MEHMET OSMAN, ATLI	**DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**	**DOKTORA TEZİ**	**DİYARBAKIR-2020**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERKEN GEBELİK DÖNEMİNDE KOYUN KORPUS LUTEUMUNDA MEMBRAN VE MEMBRAN İLE İLİŞKİLİ PROGESTERON RESEPTÖRLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

Mehmet Osman ATLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK

DİYARBAKIR-2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERKEN GEBELİK DÖNEMİNDE KOYUN KORPUS LUTEUMUNDA MEMBRAN VE MEMBRAN İLE İLİŞKİLİ PROGESTERON RESEPTÖRLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

Mehmet Osman ATLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK

DİYARBAKIR-2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mehmet Osman ATLI'nın hazırladığı "**Erken gebelik döneminde koyun korpus luteumunda membran ve membran ile ilişkili progesteron reseptörlerinin immunohistokimyasal yöntemle belirlenmesi**" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 10/07/2020

Danışman Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK _____

Jüri Üyeleri		İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr. M. Aydın KETANİ	_____
Üye	Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU	_____
Üye	Doç. Dr. M. Erdem AKBALIK	_____
Üye	Doç. Dr. İsmail Şah HAREM	_____
Üye	Doç. Dr. Deniz KORKMAZ	_____

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …./…/20.. tarih ve ……..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

…../…../……

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

13/07/2020

Mehmet Osman ATLI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Doç. Dr. M. Erdem AKBALIK'a, tavsiye ve önerileri ile her konuda bana katkı sağlayan Anabilim Dalının hocaları Prof. Dr. M. Aydın KETANİ, Prof. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN, Prof. Dr. Hakan SAĞSÖZ ve Anabilim Dalı araştırma görevlisi Uğur TOPALOĞLU'na,

Çalışmamın laboratuvar aşamalarında Araştırma laboratuvarını kullandığım Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalının değerli üyelerine,

Tezin hayvan materyalini sağlayan ve bilimsel olarak her zaman her konuda desteğini gördüğüm Doç. Dr. Mehmet KÖSE'ye,

Western Blotting görüntülemesi için laboratuvarını kullanıdığımız Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜL'e,

Bu günlere gelmemde ve eğitim hayatım boyunca çok büyük emeği olan değerli aileme, doktora süresince bilimsel ve manevi desteğini yanımda hissettiğim değerli eşim Dr. Zehra ATLI'ya ve evlatlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından VETERİNER.19.006 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ONAY ..... **i**

BEYAN ..... **ii**

TEŞEKKÜR ..... **iii**

İÇİNDEKİLER DİZİNİ ..... **iv**

RESİMLER DİZİNİ ..... **ix**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **ixi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**

1. ÖZET 1

1.1. Türkçe Özet 1

1.2. Abstract 3

2. GİRİŞ ve AMAÇ 5

3. GENEL BİLGİLER 7

3.1. Koyunlarda Östrus Siklusu 7

3.1.1. Östrus Siklusunun Evreleri 7

3.1.2. Östrus Siklusunun Hormonal Düzeni 9

3.1.2.1.Beyindeki Reprodüktif Hormonların Salınım Düzeni 11

3.1.2.2. Ovaryum Kökenli Steroid Hormon Salınım Düzeni 11

3.1.2.3. Koyunlarda Siklus İçinde Görülen Foliküler Dalgalanmalar 12

3.2. Koyunlarda Erken Gebelik 13

3.3. Corpus Luteumun Oluşumu, Devam Etmesi ve Regresyonu 17

3.3.1 Corpus Luteumun Oluşumu ve Yapısının Devam Etmesi 17

3.3.2. Corpus Luteumun Hücresel Yapıları 19

3.3.2.1. Büyük Luteal Hücreler 20

3.3.2.2. Küçük Luteal Hücreler 20

3.3.2.3.1 Büyük ve Küçük Luteal Hücrelerde Progesteron Üretimi 20
3.3.2.3. Endotel Hücreler 22
3.3.2. Corpus Luteum Yapısının Gerilemesi (Regresyonu) 23
3.3.3. Gebelikte Corpus Luteum Regresyonunun Engellenmesi 24
3.4. Progesteron Reseptörleri 25
3.4.1. Genomik Progesteron Reseptörünün Yapısı ve Fonksiyonu 25
3.4.2. Genomik Olmayan Progesteron Reseptörünün Yapısı ve Fonksiyonu 27
3.4.2.1 PGRMC1 ve PGRMC2 Yapısı ve Fonksiyonları 28
3.4.2.2 Membrane Progesteron Reseptör (mPR) Yapısı ve Fonksiyonları 29
3.4.3. Membran Progesteron Reseptörleri ile İlgili CL'da Yapılan Çalışmalar 30
4. GEREÇ VE YÖNTEM 32
4.1. Bu Tez Kapsamında Toplanan Dokuların Özeti 32
4.1.1 Koyunların Beslenmesi ve Bakımı 32
4.1.2 Koyunların Östrus Siklusunun Hormonal Senkronizasyonu ve Hormonal Östrus Sonrası Doğal Östruslarının Tespiti 32
4.1.3. Grupların Oluşturulması 33
4.1.4. Koyunların Kesilmesi ve Corpus Luteumların Elde Edilmesi 33
4.2. Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Çalışmalar 33
4.2.1. Koyun Corpus Luteum Dokularında Histolojik Kesitlerin Hazırlanması 34
4.2.2. Hematoksilen ve Eozin Boyama 35
4.2.3. İmmunfloresan Yöntemi İle Koyun CL Yapısında TLR2 Proteininin Gösterilmesi 35
4.2.4. İmmunohistokimya (İHK) Yöntemi ile PGMRC1 ve mPRα Proteinlerinin Koyun CL'undaki Lokalizasyonlarının Belirlenmesi 36
4.2.5. Western Blot Yöntemi ile PGMRC1 ve mPRα Protein Miktarlarının Koyun CL'unda Belirlenmesi 38

4.2.6. qPCR yöntemi ile PGMRC1 ve mPRα Gen Ekspresyonlarının Koyun CL'unda Belirlenmesi 39
4.2.6.1. RNA İzolasyonu 39
4.2.6.2. cDNA sentezi 40
4.2.6.3 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PZR) 40
4.3. İstatistiksel Analiz 41
5. BULGULAR 42
5.1. Koyun Corpus Luteum'unun Histomorfolojisi 42
5.2. Koyun Corpus Luteum'unda PGMRC1 ve mPRα'nın İmmunohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi 44
5.2.1. Negatif Kontrol 44
5.2.2. PGMRC1 Proteini'nin Koyun Corpus Luteum'unda Hücre İçi Lokalizasyonu 44
5.2.3. mPRα Proteini'nin Koyun Corpus Luteum'unda Hücre İçi Lokalizasyonu...47
5.3. Koyun Corpus Luteum'unda PGMRC1 ve mPRα'nın Western Blot Yöntemi ile Protein Eskpresyon Seviyesinin Belirlenmesi 50
5.3.1. Koyun Corpus Luteum'unda PGMRC1 Protein Ekspresyon Seviyesi 50
5.3.2. Koyun Corpus Luteum'unda mPRα Protein Ekspresyon Seviyesi 51
5.4. Koyun Corpus Luteum'unda PGMRC1 ve mPRα mRNA Seviyelerinin Real-Time PCR (qRT-PCR) Methodu ile Belirlenmesi 52
5.4.1. Koyun Corpus Luteum'unda PGMRC1 mRNA Ekspresyonu....52
5.4.2. Koyun Corpus Luteum'unda mPRα mRNA Ekspresyonu 52
6. TARTIŞMA 54
7. SONUÇ VE ÖNERİ 63
8. KAYNAKLAR 64
9. ÖZGEÇMİŞ 72
10. EKLER 73
EK-1. Etik Kurul Karar Belgesi 73

EK-2. Yayımlanan Makale Bilgisi 74

11. TEZ SAVUNABİLİRLİK VE ORJİNALLİK BEYAN FORMU 75

11.1. Orjinallik Raporu 76

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Siklusun 12. gününde (C12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL yapısının genel görünümü**.** 42

Resim 2. Gebeliğin 12. gününde (P12) TLR2 uygulanmış koyun CL yapısının immunfloresan boyama ile genel görünümü. A, D: hücre çekirdeğini mavi renge boyayan DAPI'nin görünümü 43

Resim 3. Gebeliğin 12. gününde (P12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL yapısının primer antikor yerine non-immun serumun konduğu negatif boyamanın genel görünümü. 44

Resim 4. Gebeliğin 12. gününde (P12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL'unda PMRC1 immunoreaktivitesi. 45

Resim 5. A:Östrus siklusunun 12. günü (C12) ile B: gebeliğin 12. gününde (P12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL'unda PMRC1 immunoreaktivitesi. C,D: Östrus siklusunun 22. gününde (C22) ovaryum üzerinde aktif progesteron üretmeyen koyun CL'unda PMRC1 immunoreaktivitesi**.** 46

Resim 6. A, B, C, D: Gebeliğin 16. gününde (P16) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL'unda mPRα immunoreaktivitesi. 48

Resim 7. A: Östrus siklusunun 16. günü (C16) ile; B: gebeliğin 16. günündeki (P16) koyun CL'unda mPRα immunoreaktivitesi. C,D: Östrus siklusunun 22. günündeki (C22) ovaryum üzerinde aktif progesteron üretmeyen koyun CL'unda mPRα immunoreaktivitesi. 49

Resim 8. A, B. Koyun CL doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) PMRC1 proteinin housekeeping proteini olan GAPDH e göre değişim miktarı. 50

Resim 9. A, B. Koyun CL doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) mPRα proteinin housekeeping proteini olan GAPDH'e göre değişim miktarı 51

Resim 10. A: Koyun CL ile PMRC1, mPRα ve housekeeping gen olan GAPDH için %2 lik agaroz jelde yerlerini gösteren jel görüntüsü, B: PMRC1 mRNA seviyesinin doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) GAPDH'e göre değişim miktarı. C: mPRα mRNA seviyesinin doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) GAPDH'e göre değişim miktarı. 53

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan antikorların listesi. 37

Tablo 2. Koyun CL'unda kulanılan PMRC1 ve mPRα Primerleri ve Referans (Housekeeping) Gen Listesi. 41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Koyunda östrus siklusunun aşamaları gösteren daire grafik. 9

Şekil 2. Koyunlarda beyin hipofiz ve gonadlar arasında hormonların çalışma sistemini gösteren reprodüktif siklusların hormonal döngüsü. 12

Şekil 3. Koyunlarda bir östrus siklus içinde görülen 3 veya 4 dalgalı foliküler gelişmeleri göstreren grafik..... 13

Şekil 4. Koyunlarda implantasyon sırasında oluşan olaylar. 16

Şekil 5. Pre-ovulatorik LH pikinden sonra ovulasyon oluşumu esnasında folikül içinde görülen olayların şemasını gösteren grafik. 19

Şekil 6. Progesteron hormonunun luteal hücrelerde üretilmesi aşamaları. 21

Şekil 7. Koyunlarda CL'u oluşturan hücrelerin dağılımı ve yapısal özelliklerini gösteren grafik. 22

Şekil 8. Doğal lüteolizis olayı esnasında endometrial kaynaklı $PGF_2\alpha$ etkisi ile (altı saat aralıklı 4 puls) corpus luteum hücrelerinde ve kanda görülen moleküler düzeydeki değişimleri gösteren grafik..... 24

Şekil 9. Progesteron hormonun hücre çekirdeği içindeki reseptörleri ile ilişkisi ve çalışma prensibini gösteren grafik..... 26

Şekil 10. Progesteron hormonun genomik ve non-genomik (membran reseptörleri) yolla hücre içinde uyarıldığı mekanizmaları gösteren grafik. 28

Şekil 11. Koyun Corpus Luteum yapısı içinde PMRC1 ve mPRα proteinlerini ekprese eden hücre tiplerini gösteren şema. 54

Şekil 12. mPRα ve PMRC1'in koyun CL yapsısı içinde gebelik (IFN-tau etkisi) veya siklus esnasındaki (progesteron etkisi) değişimlere göre ekspresyon düzeyini protein düzeyinde gösteren şema..... 58

Şekil 13. mPRα ve PMRC1'in koyun CL yapsısı içinde gebelik (IFN-tau etkisi) veya siklus esnasındaki (progesteron etkisi) değişimlere göre ekspresyon düzeyini mRNA düzeyinde gösteren şema..... 59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:	Yüzde
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
A	:	Adenin
ABC	:	Avidin Biotin Kompleksi
B-Actin	:	Beta Aktin
BSA	:	Sığır Serum Albumin
C	:	Sitozin
Ca+2	:	Serbest Kalsiyum
cDNA	:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CL	:	Corpus Luteum
DAB	:	3,3'diaminobenzidin
ddH2O	:	Arıtılmış Su
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	:	Etidyum bromür
ETOH	:	Etanol
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
G	:	Guanin
GAPDH	:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
gDNA	:	Genomik Deoksiribonükleik Asit
GnRH	:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksit
IGF	:	Insilun Benzeri Büyüme faktörü
İHK	:	İmmunohistokimya
kDa	:	Kilodalton

kg	:	Kilogram
MeOH	:	Metanol
ml	:	Mililitre
Mm	:	Milimolar
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
ng	:	Nanogram
nmol	:	Nanomol
^{o}C	:	Santigrat derece
P4	:	Progesteron
P450scc	:	Kolesterol Yan Zincir Bölünme Enzimi
PBS	:	Fosfat Tamponlu Solüsyon
PBSTw	:	Fosfat Tamponlu Solüsyonlu Tween20
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	:	Paraformaldehit
PGs	:	Prostaglandinler
pmol	:	Pikomol
RNA	:	Ribonükleikasit
RNase	:	Ribonükleaz
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
RQ1	:	RNA Nitelikli
RT-PZR	:	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyon
Sol	:	Solüsyon
TBE	:	Tris/Borate/EDTA
TBSTw	:	Tris-Buffered Saline
VEGFA	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A
α	:	Alfa
β	:	Beta

1. ÖZET

1.1. TÜRKÇE ÖZET

Erken gebelik döneminde koyun korpus luteumunda membran ve membran ile ilişkili progesteron reseptörlerinin immunohistokimyasal yöntemle belirlenmesi

Öğrencinin Adı ve Soyadı : Mehmet Osman ATLI
Danışmanı : Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK
Anabilim Dalı : Veteriner Histoloji ve Embriyoloji

Amaç: Bu çalışmada membran progesteron reseptör alfa (mPRα) ve membran ile ilişkili progesteron reseptör ailesine ait membran ile ilişkili progesteron reseptör komponenti 1 (PGRMC1) varlığının, hücresel lokalizasyonlarının ve ekspresyon seviyelerinin koyun corpus luteum (CL)'unda östrus siklusu ve erken gebelik boyunca araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaç için gebeliğin peri-implantasyon dönemindeki (12, 16, 22. günler) ve siklusun aynı günlerinde (12, 16, 22) çok doğum yapmış koyunlar rastgele gruplara ayrılmış ve ilgili günlerde CL örnekleri (her bir grup için n=4) toplanmıştır. Elde edilen koyun CL dokularında PGRMC1 ve mPRα varlığı immunohistokimya yöntemi, protein düzeyindeki ekspresyonu western bloting yöntemi, mRNA düzeyindeki ekspresyonu ise qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. Veriler, tek-yönlü-ANOVA kullanılarak analiz edildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Koyun CL yapısı içinde PGRMC1'in büyük, küçük luteal hücrelerde ve endoteliyal hücrelerde eksprese olduğu saptandı. mPRα ise sadece büyük ve küçük luteal hücrelerde tespit edildi. CL içinde PGRMC1 ekspresyonu gebeliğin 12 ve 16. günlerinde siklustaki koyunlara kıyasla önemli düzeyde arttığı belirlendi. mPRα'nın ise gebelikte değişmezken sadece fonksiyonel regresyon dönemindeki (C16) CL'da önemli düzeyde azaldığı gözlendi. Hem PGRMC1'in hem de mPRα'ın mRNA düzeyinde protein ekspresyonuna benzer bir profil sergilediği tespit edildi.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar koyunlarda mPRα ve PGRMC1'in lokalizasyonu, protein ve mRNA ekspresyon profili ilk defa ortaya konulmuştur. Luteal hücrelerde mPRα'nın ve PGRMC1'in eksprese olması ve gebelikte ve östrus siklusu içindeki önemli düzeydeki değişimler göstermesi bu reseptörlerin gebeliğin oluşması ve luteoliziste önemli rollerinin olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Progesteron membran reseptörleri, corpus luteum, koyun

1.2. Abstract

Immunohistochemical determination of membrane and membrane-associated progesterone receptors in the ovine corpus luteum during early pregnancy

Student's Surname and Name: ATLI, Mehmet Osman

Adviser of Thesis **:** Associate Professor Mehmet Erdem AKBALIK

Department **:** Veterinary Histology and Embryology

Aim: In this study, it was aimed to investigate the presence and expression profiles of membrane progesterone receptor alpha (mPRα), and membrane-associated progesterone receptor component 1 (PGRMC1) during the oestrus cycle and early pregnancy in ovine corpus luteum (CL).

Material and Method: For this purpose, multiparous ewes were selected and randomly allotted into cyclic (n = 4 for per group) or pregnant (n = 4 for per group) groups. All of the ewes were scheduled to be slaughtered for predetermined days during the estrous cycle, early pregnancy. The CLs were collected from both cyclic and pregnant ewes on days 12 (C12 and P12), 16 (C16 and P16) and 22 (C22 and P22). Western blotting and Quantitative polymerase chain reaction were used to evaluate the expression profiles of PGRMC1 and mPRα while immunohistochemistry was used to define the spatial localization of PGRMC1 and mPRα in ovine CL. Data were then analyzed by one-way ANOVA and were considered statistically significant when P values were lower than 0.05.

Results: PGRMC1 was found to be expressed in large, small luteal cells and endothelial cells in ovine CL. On the other side, mPRα was detected only in large and small luteal cells. The expression profile of PGRMC1 increased significantly in pregnant ewes CL, compared to cyclic days. While mPRα did not change during early pregnancy, it decreased significantly in CL only during the functional regression period (C16). Both protein and mRNA expression profiles of PGRMC1 and mPRα was similar.

Conclusion: This is the first study that shown expression and localization of PGRMC1 and mPRα in ovine CL during the oestrus cycle and early pregnancy. The presence of mPRα and PGRMC1 in specific CL cell types and their significant changes in expression levels at protein and mRNA levels during early pregnancy and/or oestrus cycle clearly indicate that these receptors may have an important role in the establishment of pregnancy and luteolysis.

Key Words: Progesterone membrane receptors, corpus luteum, sheep

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Koyun yetiştiriciliği ülkemizde et üretimi, süt ve süt ürünleri üretimi, yün üretimi ve deri üretimi amacıyla yapılmakta ve 2019 Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre ülkemizde yaklaşık 38 milyon baş koyun bulunmaktadır (1).

Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, östrüslarını genelde ülkemizde sonbahar aylarında göstermektedirler. Gebelik ise yaklaşık 5 ay sürmektedir (2, 3). Koyunlarda gebeliğin erken dönemi; gebeliğin maternal kabulü, embriyonun endometriyuma implantasyonu ve hemotropik beslenmeye geçişi sağlayan plasentasyonun başladığı kritik bir süreçtir (4). Koyunlarda gebeliğin oluşumu ve devamlılığında; otokrin, parakrin ve endokrin faktörlerin etkisi ile peri-implantasyon döneminde gerçekleşen hücresel proliferasyon, invazyon, differansiyasyon, adezyon, apoptosis, angiogenesis vb. olaylar çok kritik bir süreci oluşturur. Özet olarak, başarılı bir implantasyon sağlıklı bir embriyo ile reseptif bir endometriyum arasında hücresel ve moleküler olarak gerçekleşen, eş zamanlı karşılıklı konuşmaya benzeyen sinyalizasyon gen ekspresyonlarının kontrolünde gerçekleşmektedir (5, 6). Tüm bu bahsedilen olayların gerçekleştirilebilmesi için erken gebelik sırasında koyun corpus luteumundan (CL) progesteron salınımının olması ve plasentasyon dönemine (bu dönemden sonra progesteron kaynağı plansenta olur) kadar kesintisiz devam etmesi gerekmektedir (7). Steroid hormon yapısına sahip olan progesteron hormonu erken gebelikte sadece CL'dan üretilmekte olup hem östrus siklusunu hem de gebeliğin devamlılığını düzenler (8). Progesteronun hedef hücrede etkisini gösterebilmesi için nükleer progesteron reseptörlerine (PRs) bağlanması ve DNA üzerinde bulunan progesterona cevap genlerin aktivitelerini düzenlemesi gerekmektedir (9-11). Tüm bu bilinen etkiler progesteronun nükleer reseptörleri ile ilgilidir. Günümüzde ise progesteronun nükleer olmayan membran reseptörleri varlığı tespit edilmiş olup bu sinyal iletim yolağının hücre büyümesi, yeniden yapılandırma (remodeling) ve apoptozis gibi önemli hücresel aktiviteleri değiştirdiği gösterilmiştir (12-14).

Bu tez çalışması, genomik olmayan progesteron reseptörlerinin koyun corpus luteumunda davranış patternini belirleyip karakterize etmek için tasarlandı. Bu amaçla sunulan tez çalışmasının hedefleri; (1) östrus siklus günleri (aktif progesteron salındığı dönem, regresyon dönemi ve tamamen gerilediği corpus albicans dönemi) ve erken

gebelik döneminde (implantasyon öncesi, implantasyon sırası ve sonrası) progesteronun genomik olmayan etkilerini düzenleyen ve membran reseptörleri içerisinde kritik öneme sahip membran-ilişkili progesteron reseptör bileşeni 1 (PGRMC1) ve membran progesteron reseptörü alfa (mPRα)'nın koyun CL yapısı içindeki spesifik hücre lokalizasyonlarının tespit edilmesi ve (2) siklus ve erken gebelik sırasında bu reseptörlerin protein ve mRNA düzeyindeki ekspresyon profillerini karakterize etmektir. Literatür bilgi incelendiğinde, bu reseptörlerin koyun CL içindeki dağılımının saptanması ve olagelen değişikliklerin belirlenmesi şeklindeki hedefler ilk defa ortaya konulacaktır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Koyunlarda östrus siklusu

Evcil koyunlarda östrus siklusu, mevsime bağlı olarak şekillenir. Koyunlarda ovulasyonlu sikluslar (bölgesel değişimler gösterse bile) ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede, genellikle gün ışığının azalmaya başladığı sonbahar aylarında yoğunlaşmaktadır (2, 4). Bu yönü ile mevsime bağlı üreme aktivitesi olan koyunlarda üreme döngüsü; anöstrus periyodu (östrusların görülmediği dönem), anöstrustan üreme mevsimine geçiş periyodu (östruslar görülmeye başlar ama düzensizdir), ovulasyonlu siklusların görüldüğü üreme mevsimi (gebe kalmadığı müddetçe koyunlar bu dönemde düzenli aralıklarla östrus gösterir) ve östrusların tekrar kesilmeye başladığı üreme mevsiminden anöstrusa geçiş periyodu (gebe olmayan koyunlarda görülür) şeklinde 4 ana periyottan oluşur (15). Üreme mevsimi içerisinde oluşan ovulasyonlu sikluslar koyunlarda 16-17 gün sürdüğü ve bu sürenin oldukça sabit olduğu, en fazla ±1 gün değiştiği ifade edilmiştir (16). Süreler arasında uzamanın, daha çok CL ömrünün uzamasından veya ovulasyonsuz sikluslar nedeniyle oluşabileceği ifade edilmiştir (17). Benzer şekilde anöstrustan üreme mevsimine geçiş döneminde veya postpartum ilk ovulasyonu izleyen kısa östrus sikluslarının görüldüğü bilinmektedir. Sonuç olarak, koyunlarda normalden daha uzun süreli ya da kısa süreli olan sikluslar fertil (gebelik şekillenebilecek) sikluslar olarak kabul edilmezler (15).

3.1.1. Östrus siklusunun evreleri

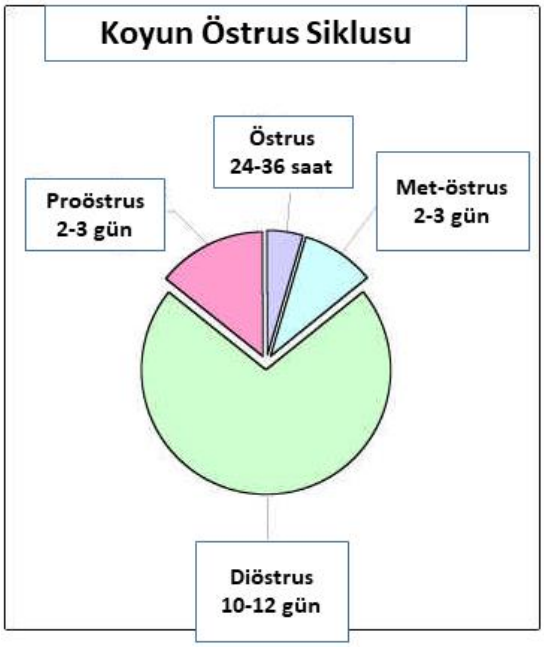
Koyunlarda yukarıda da belirtildiği gibi bir östrus siklusunun uzunluğu ortalama 17 gündür. Bu süre östrus siklusunun endokrinolojik ve fizyolojik işleyişi göz önüne alındığında 4 evreye ayrılır (Şekil 1) (15).

A) **Proöstrus evresi:** Bu evre 2-3 gün sürer. Esas olarak ovaryumlar üzerindeki CL'un regresyonu sonucu periferal progesteron düzeyinin düştüğü, hızlı ve artan bir foliküler aktivitenin olduğu ve foliküllerden artarak devam eden östrojen etkisi ile Graff folikülü/lerinin geliştiği ve ovulasyon için hazır hale geldiği evredir. Çoğunlukla klinik görünüm açısından davranış değişikliklerinin çok görülmediği, sakin geçen bir evredir.

B) **Östrus evresi:** Bu dönemde koyunlarda görülen en önemli davranış değişikliği, proöstrus'a göre artan östrojenin etkisiyle çiftleşmeyi kabul davranışıdır. Ancak yine de davranış değişiklikleri inek ve keçilerdeki kadar belirgin ve artmış değildir. Bu evre ortalama 24-36 saat sürer ve pre-ovulatör luteinleştirici hormon (LH) pikinin etkisiyle olgunlaşan Graff follikül/lerinin evrenin sonunda ovule olmasıyla tamamlanır.

C) **Metöstrus evresi:** Ovulasyonu takiben başlayan bu evre 2-3 gün sürer. Bu evrenin başlangıcıyla koyunlarda çiftleşme isteği ortadan kalkar. Progesteronun kaynağı olan CL taslağının şekillendiği ve ovulasyon sonrası ilk foliküler dalganın başladığı, buna karşılık östrojen düzeyinin hızla düştüğü ve progesteron düzeyinin düşük olduğu evredir. Bu evrede LH etkisiyle granuloza ve teka hücrelerinin luteinleşmesiyle ovule olan folikülerin yerinde corpus hemorajikum (CH, kanlı cisimcik) oluşur.

D) **Diöstrus evresi:** Östrus siklusunun en uzun evresidir, 10-12 gün sürer. CL'un morfolojik ve fonksiyonel açıdan iyice gelişmiş olduğu ve salgıladığı progesteronla reprodüktif sistem üzerinde etkilerinin şekillendiği evredir. Foliküler gelişme devam etmekle birlikte pre-ovulatör LH pikinin şekillenemediği dolayısıyla evrenin sonuna kadar dominant (baskın) foliküllerin regrese olduğu evredir. Evrenin sonunda endometriyumdan salınan prostaglandin F_{2alfa} ($PGF_{2\alpha}$) hormonun etkisiyle luteal regresyon şekillenir ve progesteron hormonunun reprodüktif sistem üzerindeki etkinliği sonlanır ve siklus döngüsü tamamlanmış olur.



Şekil 1: Koyunda östrüs siklusunun aşamaları gösteren daire grafik

3.1.2. Östrus siklusunun hormonal düzeni

Diğer evcil hayvanlarda olduğu gibi koyunlarda da reprodüktif siklusların işleyişi esas olarak hipotalamus, hipofiz, ovaryumlar ve uterus üzerinden salgılanan hormonlar ile yürütülür. Hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofiz bezinden salınan folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve oksitosin, antral folikülden salınan östrojen ve inhibin, CL'dan salınan progesteron ve oksitosin, endometriyumdan salgılanan $PGF_{2\alpha}$ östrus siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan temel hormonlardır. Hormonların salınım yerleri ve hedef dokuları göz önüne alındığında reprodüktif aktiviteyi düzenleyen üst merkezlerin merkezi sinir sisteminde özellikle hipotalamus, hipofiz ve epifizde lokalize olduğu görülmektedir (18).

Pineal bez olarakta bilinen epifiz bezi embriyonal dönemde beynin üçüncü ventrikülünden köken alır ve ventrikülün posterior duvarına sap benzeri bir uzantı ile bağlanmış, çokça kan perfüzyonu olan bir bezdir. Koyunlardaki mevsimsel üreme ritminin oluşumunda fonksiyonel en önemli hormon epifiz bezindeki pinealositlerce sentezlenen melatonin hormonu olduğu ifade edilmektedir. Bu fonksiyonunu, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde bulunan biyolojik saat ile oluşturduğu afferent ve efferent nöral bağlantılar ile gerçekleşir. Melatonin üretimi ve serbest

bırakılması günlük (nokturnal) ve mevsimsel model (gecenin uzunluğuna orantılı olarak değişme süresi) gösterir. Melatonin sentez ve salınımı temelde sirkadyen ritim şeklinde tanımlanan karanlığa bağlı oluşur. Işık melatonin sentez ve salınımına baskılayıcı bir faktördür. Koyunlarda fotoperiyotun melatonin sekresyon süresinde oluşturduğu değişiklik yoluyla mevsimsel üreme döngüsünü kontrol ettiği, bununla birlikte sürekli karanlıkta melatoninin sirkadyen ritmin sürekli olduğu, devamlı ışık altında pineal bez veya superior servikal gangliyon uzaklaştırıldığında sirkadyen ritmin kaybolduğu belirlenmiştir. Melatonin, triptofan aminositinden fotoperiyot ile ilişkili olarak adlandırılan aydınlık ve karanlık evre şeklinde iki aşamada sentezlenir. Karanlık evre; seratonin aşamasına ulaşan sentez basamağının karanlığın başlamasıyla karanlık bilgisinin retinal sinir reseptörlerince algılanması, superior gangliyonun postganglionik sempatik liflerinden noradrenalin salgılanması ve artan cAMP aktivitesiyle aktifleşen 5-hidroksitriptamine (Serotonin) Hidroksiindol-O-Metiltransferaz ile 5-metoksi-N-asetiltriptamin yani melatonine dönüşümüyle tamamlanır (15, 19).

Beynin hipotalamus bölgesi reprodüktif olayların düzenlenmesinde en önemli merkezlerden biridir. Kısa günlerin başlaması ve fotoperiyotta meydana gelen değişikliklerle gözün retina kısmındaki nöral hücrelerde foto-endokrin sistemin aktivasyonu gerçekleşir. Epifiz bezinden salgılanan melatoninin etkisiyle hipotalamustaki eminentia mediana'daki nörosekretorik hücrelerden GnRH salınımı uyarılır. Böylece mevsimsel üreme aktivitesi başlar yani düzenli östrus siklusları oluşmaya başlar (15, 19).

Koyunlarda üreme mevsimi içerisinde ovaryumlardaki düzenli siklik aktivitenin kontrolünde hipotalamus ve hipofiz çok önemli fonksiyonları olan üst merkezlerdir. Bu iki merkezden hipofiz, gonadotropinler olarak tanımlanan FSH ve LH'un salındığı merkezdir. Bu hormonların hem gonadotropinler olarak tanımlanması hem de adlarından da anlaşılabileceği gibi folikül ve CL gelişimi üzerine etkin oldukları ve hedef dokularının dişi üreme sistemindeki ovaryum gonadı olduğu, ayrıca bu tanımlamayla üreme mevsiminde düzenli siklik aktivitenin sürdürülmesinde önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Ovaryumlar salgıladığı ve gonadotropinler olarak adlandırılan hormonlar ile ovaryum aktivitesini düzenleyen hipotalamus-hipofiz-ovaryum hormonal yolağını oluştururlar (15, 20).

GnRH salınımının artması epifiz bezinden üretilen gonadotropik etkiye sahip melatonin hormonu ile düzenlenir. Gonadotropinlerin salınımı ve biyo-etkinliği ise eksternal ve internal kökenli birçok faktörün etkileşimleriyle şekillenmektedir. Etkileşimler, doğrudan GnRH salınımına olan etkileriyle veya indirekt olarak hipofiz bezinin GnRH'a duyarlılığının veya ovaryumların gonadotropinlere duyarlığının değişimiyle lokal kan akımı veya kan ve lenf damarları arasındaki hormonal değişimlerin etkileriyle şekillenebilmektedir. İnternal faktörler lokal olarak üretilen aminoasitler, peptidler, proteinler, ovaryumdan salgılanan steroid hormonlar, foliküllerden salgılanan aktivin, inhibin ve follistatin hormonları, nöro-transmitter maddeler, uterustan salgılanan bazı aktif maddeler şeklinde örneklendirilebilir. Eksternal faktörler ise internal faktörlerden farklı olarak hipotalamus-hipofiz-ovaryum aksisini etkilemektedirler ve beslenme, fotoperiyot, erkek feromenleri ve stress gibi dış uyarıcılardır (15, 18).

3.1.2.1. Beyindeki reprodüktif hormonların salınım düzeni:

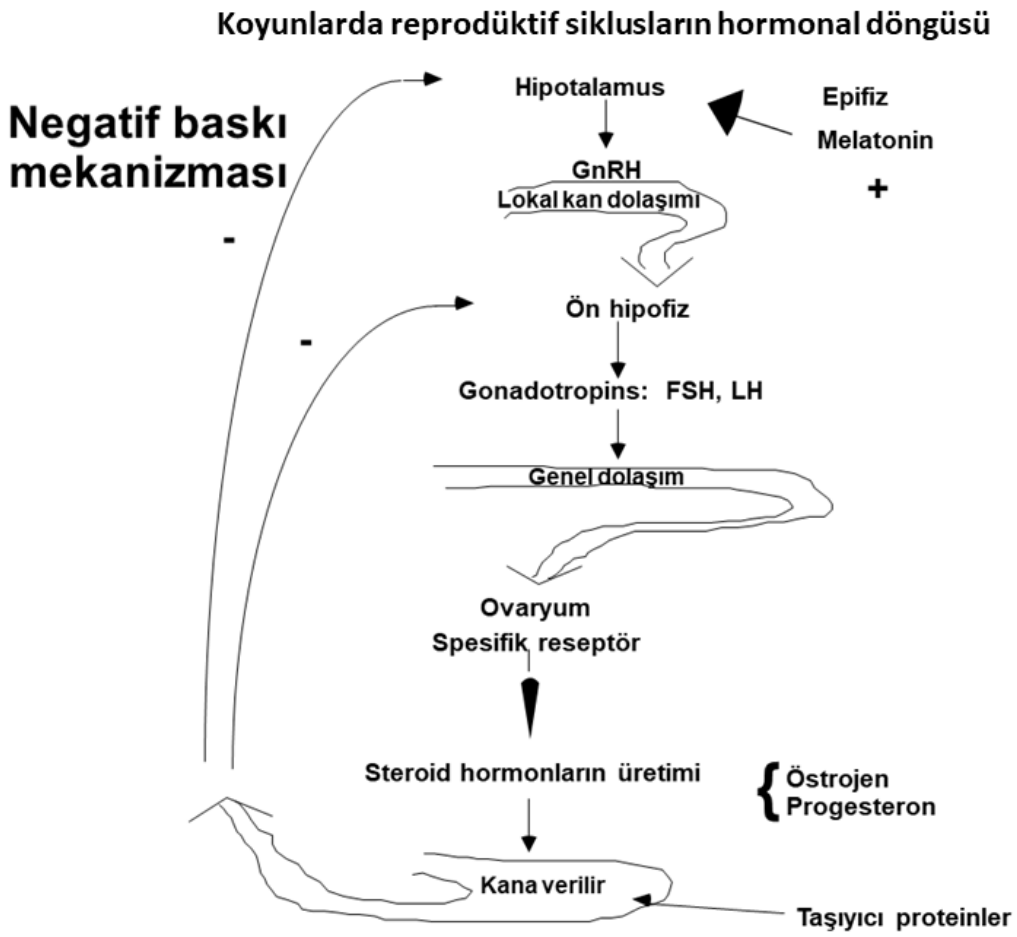
Östrus siklusu sırasında GnRH salınımı ile hipofiz ön lobunda FSH ve LH miktarı ovulasyondan 14 saat önce pik yapar. Ovulasyonu tetikleyen pre-ovulatorik GnRH pikinin oluşması için beynin progesteron etkisinden kurtulması ve ön-östrojen ile uyarılması gerekir. Bu pik, ön hipofiz hormonu olan LH'nın ve FSH'nın yüksek miktarda kana salınmasını sağlar ve bu etki ile büyümüş folikül (Graff folikül) ovule olur. LH'nun, siklus içinde GnRH bağlımlı salınımı devam eder fakat pulsları yüksek değildir. FSH etkisi ile foliküllerin ovaryumlar üzerinde gelişip büyümesi ve olgunlaşma aşamaları tamamlanır. FSH salgısı koyunlarda siklus içinde oluşan foliküler dalgalar halinde pikler şeklinde görülmeye devam eder. FSH piklerinin görülme sıklığının 3-4 güne bir olduğu, foliküler dalganın şekillenmesinden sorumlu olduğu ve progesteron ve LH etkisi ile de azaldığı bilinmektedir (15, 20).

3.1.2.2. Ovaryum kökenli steroid hormon salınım düzeni:

Östrus siklusu boyunca tıpkı FSH gibi koyunlarda östrojen de 3-4 defa pik yapar. İlki luteolizis sırasında LH piki öncesinde ya da eş zamanlı olarak görülen östrojen piki dir. Bu pik beyinde GnRH'ın yüksek salınımı için pozitif etki yaparak ovulasyonun

tetiklenmesinden sorumludur. Daha sonra görülen ve foliküler dalga olarak adlandırılıan non-ovulatorik östrojen pikleri pre-ovulatorik östrojen pikinden farksızdır (15, 20).

Progesteron hormonu ovule olan Graff folikülün yerinde oluşan CL yapısı ile birlikte kanda artmaya başlar. Ovulasyon sonrası 3-7. günlerde kanda artmaya başlayan progesteron 12. günde pik yapar. Gebelikle sonuçlanmayan sikluslarda progesteron siklusun 12. gününden sonra kanda ani bir şekilde düşer ve koyun yeni bir ovulasyonlu siklusa hazırlanır (Şekil 2) (21).

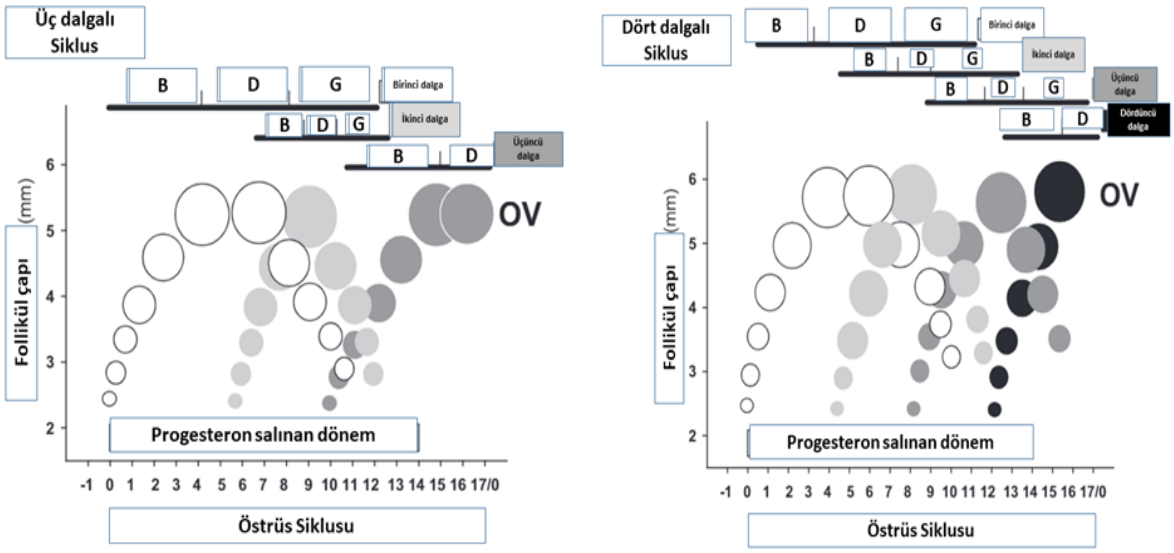


Şekil 2. Koyunlarda beyin hipofiz ve gonadlar arasında hormonların çalışma sistemini gösteren reprodüktif siklusların hormonal döngüsü

3.1.2.3. Koyunlarda siklus içinde görülen foliküler dalgalanmalar

Tüm evcil hayvanlarda pre-natal hayatta foliküller ovaryum havuzundaki primordial germ hücreleri, gelişimlerini 1. mayoz bölünmenin metafaz evresine kadar

tamamlayarak tek bir sentromer ile birbirine bağlı tetrat yapısındaki kromozomlara sahip olarak beklerler. Bir folikül primordial folikülden antral pre-ovulatorik folikül oluncaya kadar yaklaşık 200 gün geçer. Tersiyer folikül oluncaya kadar geçen bu dönemde foliküler gelişim FSH veya LH bağımsızdır. Daha sonra Graff folikül oluncaya kadar FSH ve LH bağımlı olarak büyür. Koyunlarda bir östrus siklusu içinde genellikle yukarıda ifade edildiği üzere FSH ve östrojen hormon salınımı ile uyumlu şekilde 3 veya 4 foliküler dalga görülür. Bu dalgalanmalar sırasında ovaryum üzerindeki foliküller büyümeye başlar **(B)**, gelişir ve durağan hale geçer **(D)** ve gerilemeye başlar **(G)**. Tüm bu olaylar progesteron etkisi altında meydana geldiğinden ovulasyon **(OV)** olmaz. Pre-ovulatorik safhaya ulaşan folikünün çapı yaklaşık 6 mm kadardır (Şekil 3) (15, 16, 18, 20, 21).



Şekil 3. Koyunlarda bir östrus siklus içinde görülen 3 veya 4 dalgalı foliküler gelişmeleri gösteren grafik (alınmıştır (15)

3.2. Koyunlarda erken gebelik

Koyunların da dahil olduğu memeli grubunda türlerin devamlılığı, dişi organizmada erkek gamet hücresi spermatozoon ile dişi gamet hücresi ovumun birleşmesiyle başlayan gebelik sürecinin sonunda yavrunun doğumuyla sağlanır. Ovidukt kanalında başlayan gebelik süreci, türün en küçük taslağı olan tek hücreli embriyonun doğuma kadar dış ortamda yaşayabilmesi için gerekli yetilerin kazandırıldığı bir süreçtir.

Gebelik süresi olarak tanımlanan ve genetik olarak kodlanan türe özgü bu sürecin başlangıcından sonuna kadar sağlıklı ilerleyişi ve tamamlanması başka bir ifade ile gebeliğin oluşumu ve devamlılığı yavru ve anne arasındaki kompleks ve koordineli biyokimyasal sinyalizasyon ve fiziksel etkileşimlerin işleyişine bağlıdır (22).

Koyunlarda oositin fertilizasyonu ile oviduktta başlayan ve ortalama 150 günde tamamlanan gebelik süreci; uterusta gerçekleşen, eş zamanlı başlayarak birbirini destekleyici ve geliştirici olaylar zincirleri olan maternal kabul, implantasyon ve plasentasyonu izleyen doğum ile biter (23). Ovidukt içerisinde zigot oluşumuyla başlayan sürecin devam edebilmesi için erken dönemde özellikle endometriyumda önemli düzenlemelerin yapılması gereklidir. Bu düzenlemeler, genlerinin yarısını babadan aldığı için yarı allograft olarak tanımlanan, bu nedenle maternal immün sistemin hedefi olan embriyo/fötüsün korunması ve onun gelişimiyle sürekli artan metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesine yöneliktir. Fertilizasyon sonrası embriyo, kendini oluşturan hücrelerin mitotik bölünmeleriyle hızla gelişerek 4-5. günlerde blastosist olarak uterusa ulaşır (24). İlerleyen günlerde embriyo, blastosel oluşumuyla iç hücre yığını (inner cell mass) ve trofoblastik hücreler olmak üzere iki hücre grubunun bariz bir şekilde gözlemlenebildiği ileri (expanded) blastosist aşamasına ulaşır. Bu aşamaya kadar etrafını çevreleyen kalın zona pellucida'nın etkisiyle hacmi artmadan gelişen embriyo, blastosel içerisindeki sıvı artışına bağlı artan iç basınç ve enzimatik yıkımlanmanın etkisiyle 7-8. günlerde zona pellucida'nın yırtılmasıyla serbest olur (hatching) ve doğuma kadar bağlantı oluşturacağı uterus endometriyumuyla ilk teması gerçekleşir (25). Bu aşamadan sonra memeli embriyo gelişiminin en ilginç özelliklerinden ve en önemli aşamalarından biri olan embriyonun anneyle bağlantısını oluşturmak üzere trofoblastik hücreler tarafından başlatılan düzenlemeler ve karşılıklı etkileşimlerle endometriyumun yeni formasyonu gerçekleşir. Kemirgenlerde ve insanlarda hatching aşamasının tamamlanmasını müteakip hatched blastosist endometriyuma implante olmaya başlarken ruminantlarda embriyo trofoektoderm hücrelerinin çoğalması suretiyle CL'a göre ipsilateral cornu uteri içerisinde iplik benzeri longitudinal şekilde uzayarak endometriyuma yerleşir. Embriyo, hatching sonrası hızla uzayarak gebeliğin 12. gününde 1x33 mm, 14. gününde 1x68 mm, 15. gününde 1x150-190mm ölçülerine ulaşır ve 16-20. günlerde de kollateral cornu'ya uzar (26). Koyunlarda konseptusun uzaması; östrus siklusunun

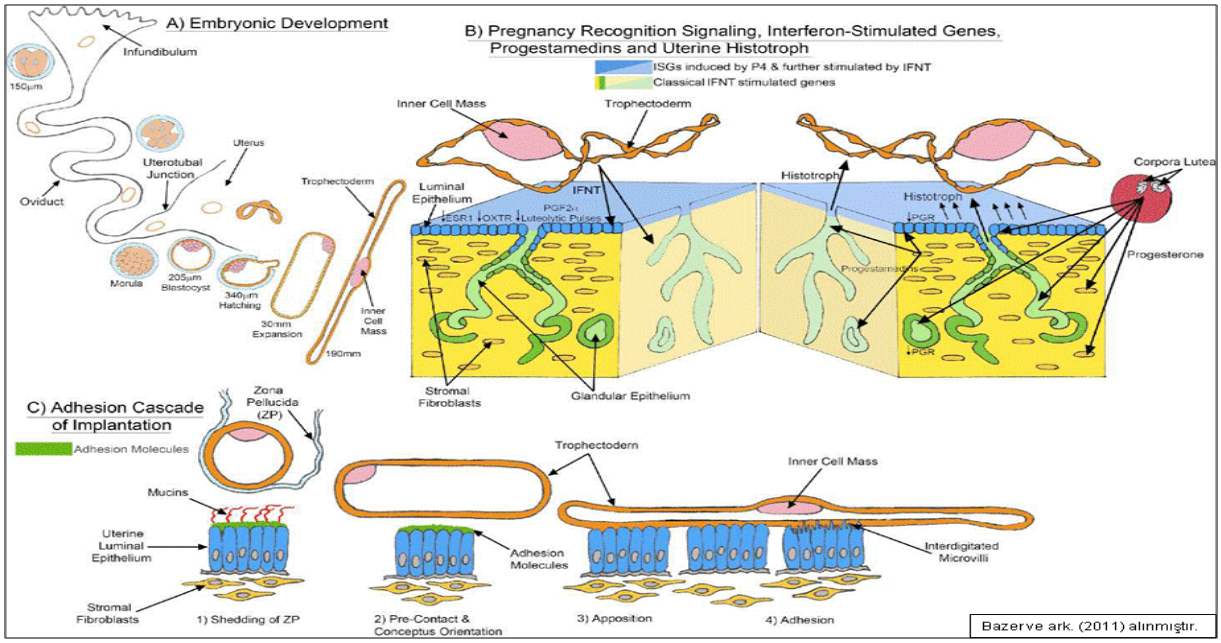
13. gününden itibaren endometriyumdan pulsatil olarak salgınlanmaya başlayarak CL'un lizisine neden olan $PGF_{2\alpha}$'nın salınımının azaltılarak yüksek kan progesteron seviyesinin sürdürülebilmesi (anti-luteolizis) için zorunludur (27). Gebeliğin maternal kabulü olarak tanımlanan bu olaylar zinciri trofoblastik hücrelerden salgılanan interferon-tau aracılığıyla başlatılır ve sürdürülür. Anti-luteolitik etkisinin yanı sıra interferon-tau'nun immun yanıtı düzenlediği ve uterus içi ve dışı çeşitli doku ve organlarda (CL, beyaz kan hücreleri vb.) hedef genlerin ekspresyonlarını değiştirdiği günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (28-30). Koyunlarda interferon-tau, beraberinde implantasyonun da gerçekleştiği 10-21. günler arasında salgılanmaktadır (31). Yavru zarlarını şekillendiren trofoblastik hücreler ve endometriyumun katmanları arasında ilk fiziksel ve fizyolojik temas ile başlayan implantasyonun başlangıcı, gebelik süresince yavrunun korunması ve beslenmesi için gerekli maternal kan akışını sağlayacak olan plasentasyonun başlangıcını da oluşturduğundan implantasyon periyodunda oluşan olayların moleküler düzeyde aydınlatılması gebelik sürecinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağından oldukça önemlidir.

İmplantasyon, kısaca embriyonun yavru zarlarını oluşturan trofoblastik hücreleri ve uterus endometriyumu arasında kurulan bağlantı şeklinde tanımlanmaktadır. Bu bağlantı endometriyumun luminal yüzeyini döşeyen epitel hücrelerinin mononükleer trofoblastik hücreler ile adezyonu ve luminal epitelde binükleer hücrelerin birleşerek sinsityum adı verilen çok çekirdekli büyük hücrelerin oluşumuyla gerçekleşmektedir. Koyunlarda 12. günde başlayan implantasyon yaklaşık 22. günde tamamlanmaktadır. İmplantasyon; başlangıçta uterusta serbestçe yüzer (free-floating) durumda olan yavrunun histotropik beslenmeden hemotropik beslenmeye geçişini sağlayan, atık metabolitlerin uzaklaştırılmasına ve solunum yollarının değişmesine izin veren plasentanın oluşumuyla sonuçlanır (23, 24, 26, 31).

Koyunların da dahil olduğu ruminantlarda implantasyon olayı; sırasıyla 1) blastosist'in zona pellucida'dan kurtulması, 2) blastosist'in endometriyum ile ilk temasıyla cornu uteriye longitudinal yerleşmesi, 3) trofoektoderm hücreleri ile luminal süferfisiyal glandular epitelin karşılaşması, 4) blastosist'in bu tabakalara adezyonu ve 5) sınırlı endometriyal invazyon şeklinde (Şekil 4) gerçekleşmektedir. Özetle gebeliğin oluşumu için implantasyon süreci içerisinde hücresel proliferasyon, invazyon,

diferansiyasyon, adezyon, apoptosis, angiogenesis vb. olayların gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu ana başlıkların moleküler düzeyde açılımı luminal epitel ve subglandular epitelde MUC1, GlyCAM-1, Galectin-15, osteopontin gibi gen ekpresyonunda değişiklikler, stromal hücrelerin fenotipik değişimi, gebeliğin maternal kabulü, konseptusun maternal immun sistem tarafından tanınması için major histocompatibility complex (MHC) class I ve Beta 2 microglobulin vb. genlerin baskılanması, uterus lumenine besin maddelerinin geçişini sağlayan ve düzenleyen, hücre büyümesi ve metabolizmasından sorumlu mammalian target of rapamycin (mTOR) hücre sinyal yolağındaki genlerin aktivasyonu gibi birçok değişikliklerin oluşumu şeklindedir (Şekil 4, (26, 27, 31).

Canlı türleri arasında implantasyon ve plasentasyon yapısında önemli farklılıklar olmakla birlikte koyunlarda endometriyal invazyonun sınırlı olması, uzayan bir süreçte gerçekleşmesi ve trofoblast ve uterus endometriyumu arasında başlangıçta gerçekleşen olayların memeli türleri arasında benzer olması, koyunlarda yapılacak çalışmalarla memelilerde gebeliğin erken dönemindeki fizyolojik, hormonal, hücresel ve moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve türler arasında karşılaştırmalı sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir (23, 24).



Şekil 4. Koyunlarda implantasyon sırasında oluşan olaylar (Alınmıştır; (27)).

3.3. Corpus luteumun oluşumu, devam etmesi ve regresyonu

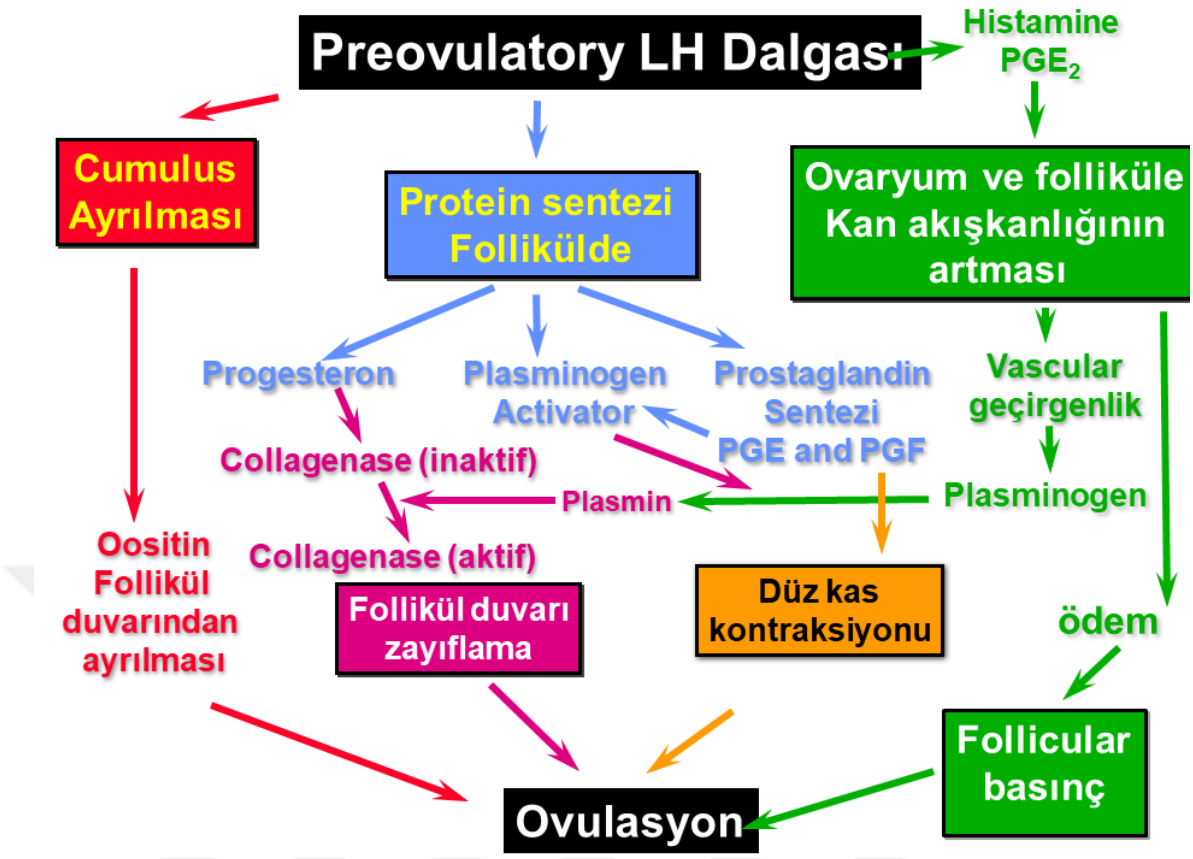
3.3.1 Corpus luteumun oluşumu ve yapısının devam etmesi

CL geçici bir endokrin bez olup, ovulasyon sonrası Graff folikülünden kalan hücrelerin re-organize olması ile oluşur. Uygun bir şekilde oluşumu, hem siklusun fizyolojik seyri hem de gebeliğin devam etmesi için kritiktir (32). Ürettiği temel hormon olan progesteron, uterus içindeki embriyonun gelişimi ve büyümesini sağlarken aynı zamanda uterus içinde allograf (yarı benzer) yapıdaki embriyonun immunolojik olarak reddedilmesini engellemek için hem genel hem de lokal savunma sistemleri düzenler (33). CL içerisinde progesteron üretiminden sorumlu transformasyona uğramış olan folikül hücreleri; 1) teka interna'dan köken alan küçük luteal hücreler ile 2) folikül içinde bulunan granuloza hücrelerinden köken alan büyük luteal hücrelerdir. Ovulasyon sonrası kan damarları ve bu hücreler ile yeniden bir re-organizasyon modeli oluşturup, önce corpus hemorrhagicum dönemi, ardından olgun CL dönemine girer. Corpus hemorrhagicum döneminde granuloza hücreleri ağırlıklarının 3 katına kadar hipertrofiye olurken (32, 34), teka hücreleri ise bölünerek sayılarında önemli artışlara neden olurlar (35). Benzer şekilde CL yapısı içinde progesteron üretmeyen ve kollektif bir damar ağı oluşumundan sorumlu endotel hücreleri, fibroblast ve parenşimal hücreler gibi diğer destek hücreleri de hızlı bir şekilde koyun CL yapısı içinde yeniden yapılanırlar. (14, 34).

Bunlarla birlikte CL yapısının oluşumunda corpus hemorrhagicum yapısı içindeki extra-cellular matrix (ECM) ve hücreler arası ilişkilerin de önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Luck and Zhao (36), tip IV kollajenin fibriler (type I) kollajene dönüştüğünü ifade etmişlerdir. Ayrıca proteazların; plazminojen-plazmin, matriks metalloproteinaz ve bunların inhibitörleri gibi ECM bileşenlerinin CL'a dönüşümünde önemli roller üstlendiği gözlemlenmiştir (37).

Graaf folikül evresinde bazal membran yapısından dolayı içerisinde kan damarı bulundurmayan ve pasif difüzyon ile beslenen yapının ovulasyon sonrası çok hızlı bir şekilde mikrodamarlaşması yine corpus hemorrhagicum döneminde gözlenir. Hatta CL yapısı içerisinde en fazla damar bulunduran ve kan akımının en fazla olduğu organ olarak bildirilmiştir (38). Damarlaşmalar üzerine etkili faktörler tam olarak

anlaşılamasa da birçok angiogenesis faktörün corpus hemorrhagicum sürecinde artış göstermesi, bu faktörlerin etkinliği üzerine fikir vericidir. Basic fibroblast growth factor (bFGF) ve vascular endothelial growth factor (VEGF) gelişen CL yapısında en önemli damarlaşma faktörleridir (39). Benzer şekilde angiopoietins 1 (ANPT-1) ve 2'nin (ANPT-2) damar stabilitesi üzerine etkili olduğu ifade edilmektedir (40). Aslında luteinizasyon ovulasyondan önce pre-ovulatorik LH piki ile başlamaktadır. LH etkisi ile granuloza hücreleri arasındaki bağlantılar (Gap junctions) kaybolur (cumulus ayrılması). Granuloza hücrelerindeki endoplazmik retikulum miktarı oldukça artar, yine mitokondri yapıları tubuler yapıdan lameller yapıya döner. Tüm bu işlemler üretilecek progesteron hormonu için hazırlıklardır (41). LH etkisi ile artık östrojen üretmeyen (aromataz enzimini kaybeder) granuloza hücreleri intra foliküler olarak progesteron üretmeye başlar (42). Progesteron üretimi içinde yine folikül içinde üretilen Insulin-like growth factor (IGF-1) ve bunların bağlayıcı proteinlerinin önemli roller üstlendiği ifade edilmiştir. Progesteronun etkisi ile folikül içinde olan olaylar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir. Histamin ve prostaglandin E (PGE) etkisi ile ovaryuma ve dolayısı ile folikül içine kan akışı artar. Damar geçirgenliğinin artması kan serumu içindeki inaktif plazminojenin folikül içine sızmasını başlatır. Folikül içinde plazminojen aktif hale gelir. Progesteron etkisi ile artan inaktif kollajenaz plazmin etkisi ile aktif kollajenaz'a dönüşür. Bu da folikül duvarının yıkımlanmasını sağlar. Artan folikül içi basınçla birlikte ovulasyon şekillenmektedir (Şekil 5, (43))



Şekil 5. Pre-ovulatorik LH pikinden sonra ovulasyon oluşumu esnasında folikül içinde görülen olayların şemasını gösteren grafik

CL yapısı tamamlandıktan sonra temel fonksiyonu erken gebeliğin devam etmesinden sorumlu olan progesteron hormonunun üretilmesidir (32).

3.3.2. Corpus luteumun hücresel yapıları

CL'un yapısında başlıca üç tip hücre tespit edilmiştir. Bunlardan iki tanesi steroidojenik hücreler (steroid hormon üreten) olan büyük ve küçük luteal hücreler, diğeri ise damar endotel hücreleridir. Bunlara ek olarak fibroblastlar, diğer damar tipi hücreleri ve immun hücreler de bulunur (44). Ruminantlarda büyük ve küçük luteal hücreler oldukça belirgin olarak birbirinden ayrılır (45). Koyunlarda küçük luteal hücrelerin boyu 15-22 µm, büyük luteal hücreler ise 30-40 µm'dir (46).

3.3.2.1. Büyük luteal hücreler

Büyük luteal hücreler olgun CL yapısının yaklaşık %40'ını oluşturur. Büyük luteal hücrelerin kaynağı granuloza hücreleridir. Büyük luteal hücrelerin pre-ovulatorik LH piki öncesi 10 μm olan granuloza boyu tam işlevsel olan büyük luteal hücre 38 μm çapa ulaşır (47). Diğer bir ifade ile hacim olarak folikul içinde 500 μm^3 yer işgal eden granuloza hücreleri CL'a dönüştüğünde 30,000 μm^3 yer kaplar ve bu artış yaklaşık 60 kattır (47, 48). Yine benzer şekilde 1 gr luteal dokunun içinde 13.8 milyon büyük hücre bulunur (47). Büyük hücreler üretilen progesteronun önemli bir kısmını üstlenir (%80) ve bu hücreler progesteron üretmek için LH uyarımına bağımlı değildirler (49).

3.3.2.2. Küçük luteal hücreler

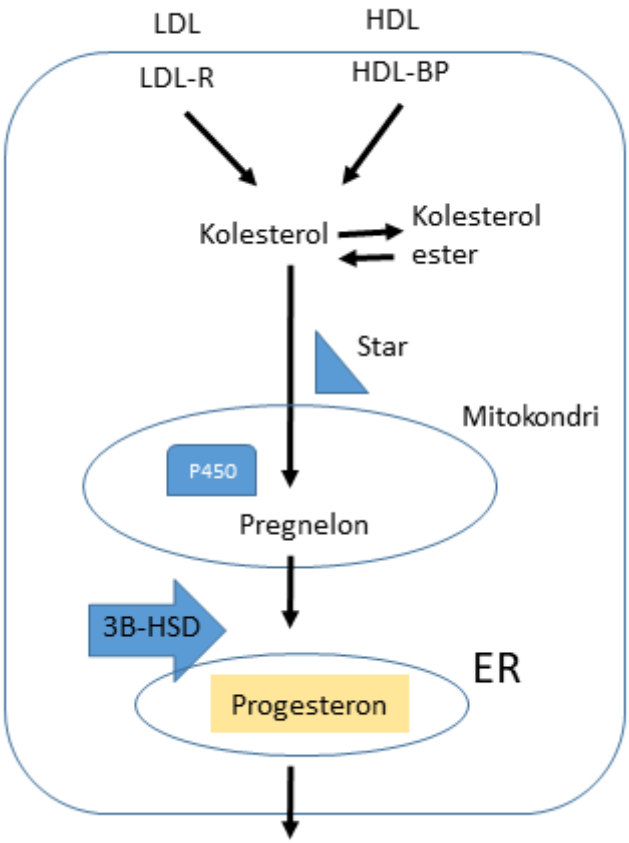
Küçük luteal hücreler folikül duvarını oluşturan teka interna hücrelerinden köken alır ve tüm CL içindeki kapladığı hacim büyük luteal hücelerin onda biridir (3,000 vs.30,000 μm3). Fakat hücre sayısı büyük luteal hücrelerin yaklaşık on katıdır. Diğer bir ifade ile 1gr CL dokusu içinde 13.8 milyon büyük luteal hücre varken 100 milyon küçük luteal hücre vardır (47). Her iki tip hücre progesteron hormon üretiminden sorumlu olsalar da morfolojik olarak birbirlerinden farklıdırlar. Örneğin büyük hücreler küre şeklinde bir çekirdek yapısına sahipken, küçük luteal hücrelerin çekirdek yapısı daha düzensizdir. Büyük hücrelerin sitoplazması içinde granüllü endoplazmik retikulum ile birçok sekretorik granül görülürken küçük hücrelerde bu yapılar gözlenmez (35, 48). Yine benzer şekilde küçük luteal hücrelerde LH reseptörü var iken büyük hücrelerde PGE ve PGF_{2alfa} reseptörleri çoğunlukla görülür (48, 50).

3.3.2.3.1 Büyük ve küçük luteal hücrelerde progesteron üretimi

Ruminantlarda progesteron üretimi cAMP üzerinden hem büyük hem de küçük luteal hücrelerde farklı mekanizmalar ile düzenlenir. Önceleri bazal cAMP bu tip hücrelerde tespit edilemeyecek seviyededir. Fakat LH pikinden sonra küçük hücrelerde cAMP seviyesi önemli şekilde artar. Forskolin, bir farmokolojik adenylate cyclase aktivatörü, hem büyük hem de küçük luteal hücrelerde cAMP'yi arttırır. Progesteron üretiminin temel yapı taşı kolesteroldür ve bu kolesterol lipoproteinlerden elde edilir. Koyunlarda

en yaygın kolesterol kaynağı yüksek yoğunluklu lipoproteindir (HDL) (51). Normal bir CL yapısında üretilen progesteronun %99'u büyük hücrelerce üretilirken %1'i küçük hücreler tarafından üretilir. Kolesterol hidrofobik bir molekül olduğundan serbet ortamdan hücre içine kolayca geçemez. Bu yüzden hücre içinde kolesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc), 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) ve steroidogenic acute regulatory protein (StAR) kolestrol'den progesteron üretmek için serbet kolestrolü mitokondri içene taşırlar (52).

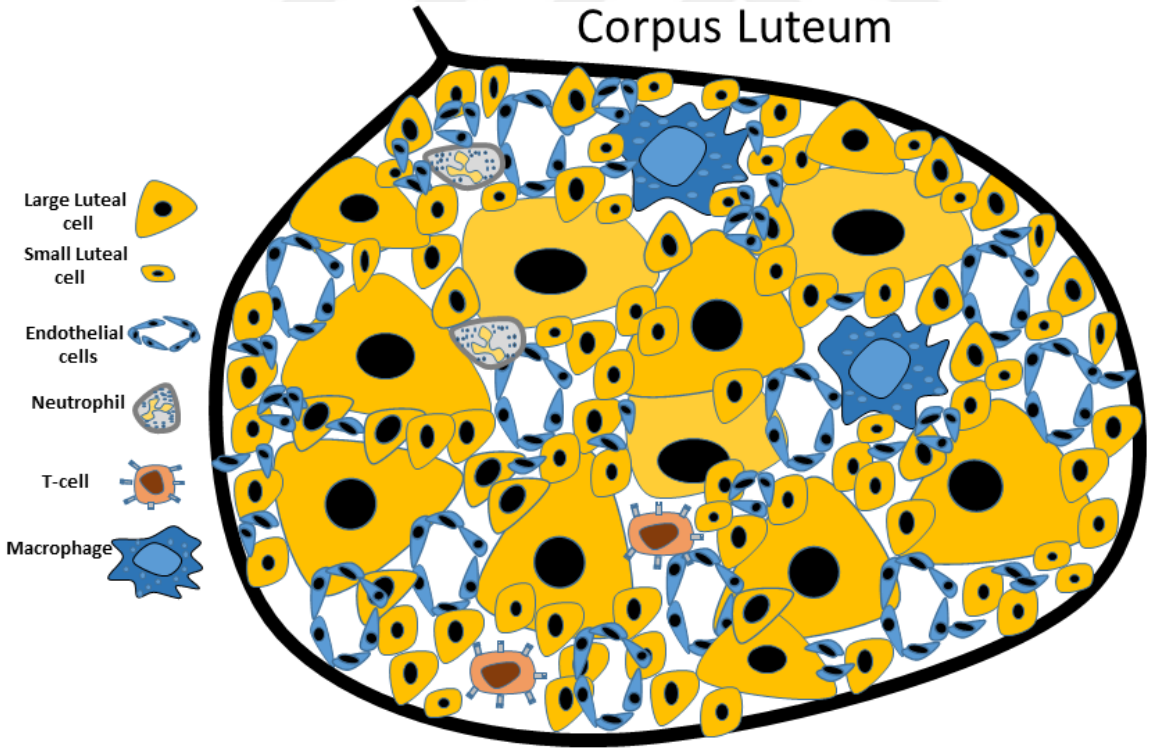
Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi serbest kolesterol hücre membranına LDL veya HDL ile bağlanır. Kolesterol mitokondri içine StAR proteini ile taşınır. Daha sonra P450ssc enzimi ile kolesterol yapısındaki karbon yapıları kesilir ve 21 karbonlu pregnelon'a dönüşür. 3β-HSD enzimi ise pregnelon'u progesterona dönüştürür. Progesteron hormonu kana verilmeye hazır haldedir (Şekil 6 (53)).



Şekil 6. Progesteron hormonunun luteal hücrelerde üretilmesi aşamaları

3.3.2.3. Endotel hücreleri

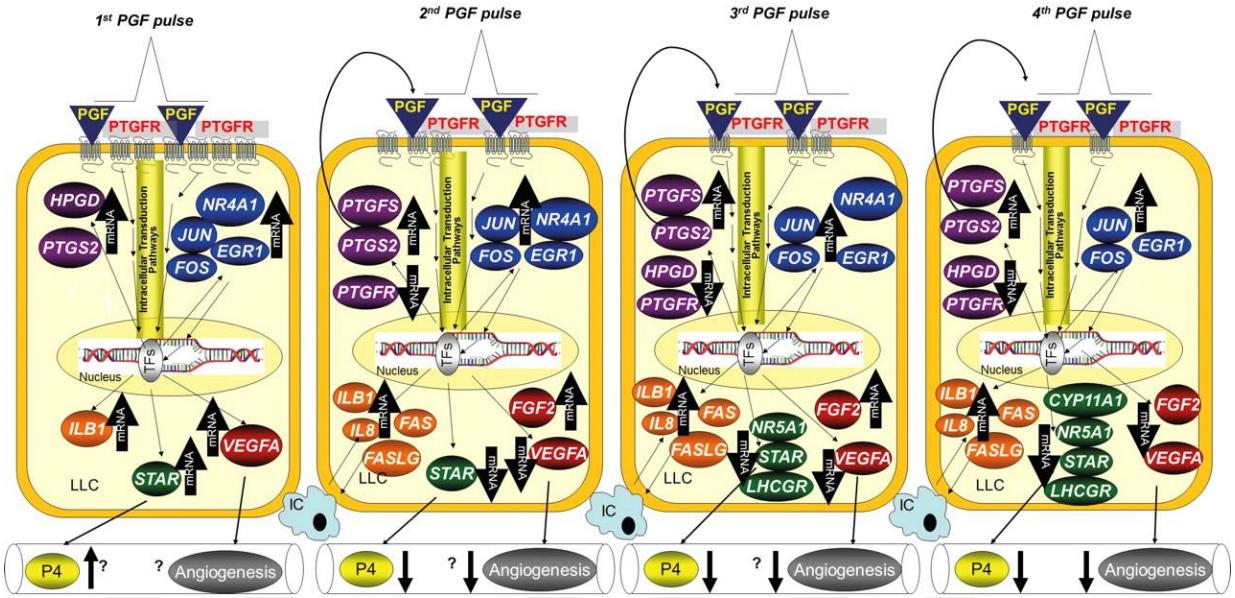
Endotel hücreler progesteron üretmeyen hücre tipi (non-stereidojenik hücreler) olup CL yapısı içinde en yaygın diğer bir hücre tipidir. Daha önceden bildiğimiz üzere folikül ortamı izole bir ortam olup granuloza hücreleri ve oosit'e asla kan damarı ulaşmaz. Ovulasyon ile birlikte bazal membran yapısı yıkımlandığından corpus yapısı içinde çok fazla kan damarı oluşmaktadır. Olgun bir CL yapsı içindeki luteal hücrelerin %60'ı doğrudan kapiller damar ağıyla bağlantı içindedir (35, 49, 54). Ayrıca CL'un vücut içinde en fazla kanlanan bir organ olduğu ortaya konmuştur. CL'daki kan akımı 30 ml/ dakika iken uterusa 0.5 ml/dakika, adrenal beze 3 ml/ dakikadır (32). Bu kadar yoğun kan akımı sadece progesteronun CL içinden çıkması için değil aynı zamanda kandan besin maddesi, hormon ve diğer faktörlerin CL'a ulaşması için gereklidir (55). Koyun CL yapısında 9-10 µm ve 19-20 µm çaplarında hücre tipleri varken bunların kesin ayrımları henüz yapılamamıştır (46). Endotel hücrelerin oluşumu için en kritik faktörün VEGF olduğu bilinmektedir (Şekil 7, (56)



Şekil7. Koyunlarda CL'u oluşturan hücrelerin dağılımı ve yapısal özelliklerini gösteren grafik (Alınmıştır (57)

3.3.2. Corpus Luteum yapısının gerilemesi (regresyonu)

Poliöstrik canlılarda birbirini takip eden östrus siklusların oluşabilmesi için CL yapısının fonksiyonunu tamamladıktan sonra gerileyip yok olması gerekir. Genelikle uterus içinde canlı bir embriyo bulunmasına bağlı olarak engellenen CL regresyonu, fizyolojik olarak koyunlarda endometriyumdan salınan pulsatil (sık sık ve yüksek miktarlarda) $PGF_{2\alpha}$ ile şekillenmektedir. Endometrial kaynaklı $PGF_{2\alpha}$'nın CL yapısına ulaşması, koyun ve ineklere özgü ovaryum arteri ile uterus venasının birbiri üzerine oluşturduğu spesifik yapı üzerinden difüzyon prensibi ile gerçekleşir (7, 58). CL'a ulaşan $PGF_{2\alpha}$'nın etkisi ile kan damarlarının daraldığı, progesteron üretimin azaldığı ve CL yapısının programlanmış hücre ölümüne gittiği (luteoliyzis) yapılan bir çok çalışmada gözlemlenmiştir. $PGF_{2\alpha}$'nın CL içinde primer etkili olduğu hücre tipi büyük luteal hücrelerdir. Çünkü $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerinin en yoğun olduğu hücreler büyük luteal hücrelerdir (59). Özellikle $PGF_{2\alpha}$'nın pulsatil sekresyonu sonucunda CL içinde erken cevap gen ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı, progesteron üretiminden sorumlu StAR protein miktarının azaldığı, CL yapısı içinde de $PGF_{2\alpha}$'nın üretilmeye başlandığı, immunolojik olarak CL yapısı içinde hücre ve immun sistemin aktive olduğu gözlenmiştir. Tüm bu yönü ile koyun ve ineklerde luteolizis olayının oldukça komplike bir mekanizmaya sahip olduğu söylenebilir (Şekil 8 (59)



Şekil 8. Doğal lüteolizis olayı esnasında endometrial kaynaklı $PGF_{2\alpha}$ etkisi ile (altı saat aralıklı 4 puls) corpus luteum hücrelerinde ve kanda görülen moleküler düzeydeki değişimleri gösteren grafik Alınmıştır (59)

3.3.3. Gebelikte corpus luteum regresyonunun engellenmesi

Koyunlarda, gebeliğin kritik günleri olarak ifade edilen 12-17. günler arasında, embriyodan salınan yüksek miktarlarda interferon-tau CL yapısının regrese olmasını engellemektedir. İnterferon-tau'nun koyun endometriyumunda pulsatil $PGF_{2\alpha}$ salınmını engellediği bilinmektedir. Bu etkiyi yine $PGF_{2\alpha}$'nın salınımını düzenleyen oksitosin ve östrojen'in uterus endometriyumundaki reseptör sayısını azaltarak gösterdiği vurgulanmıştır. Buna ilaveten; embriyonik sekresyonlardan, luteotrofik etkisi olan PGE2'nin de CL yapısından progesteron üretimini arttırdığı çalışmalarda ifade edilmektedir. Tüm bu yönleri ile embriyo ile uterus arasındaki ilişkinin sadece lokal bir etki olmadığı aynı zamanda CL'da dahil olmak üzere hipotalamus, hipofiz bezi, karaciğer ve başka birçok konunun gebelik sürecinde yeniden düzenlendiği günümüzde bilinmektedir (60).

3.4. Progesteron reseptörleri

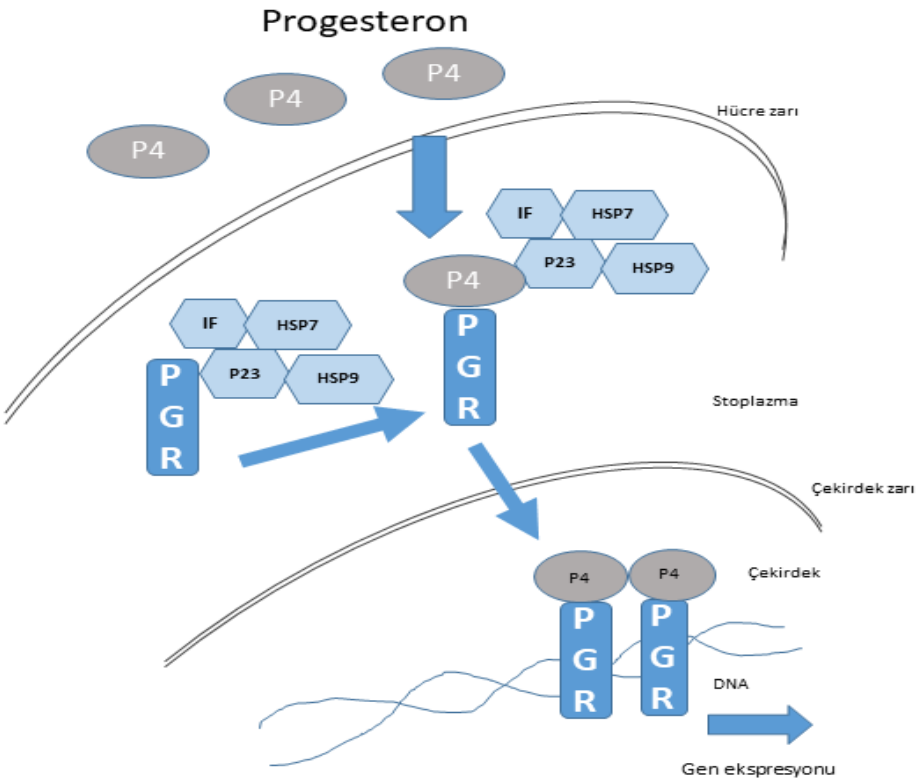
CL içinde üretilen steroid yapıdaki hormonların hedef hücrelerde etkilerini gösterebilmeleri için spesifik reseptörlerine bağlanmaları gereklidir. Progesteron hormonunun etkisini hücre çekirdeği üzerindeki reseptörler veya hücre membranı ile ilişkili reseptörler aracılığı ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. Gen aktivasyon etkileri spesifik transkripsiyon faktörlerin düzenlemesinde etkili olduğundan bu etkiler daha uzun sürede görülürken (günler içinde) non-genomik etkileri saniye veya dakikalar içinde görülür. Non-genomik etkilerin transkripsiyon veya translasyon mekanizmalarının uyarılması veya inhibe edilmesi gibi bir etkisi yoktur (8, 11, 12, 61).

3.4.1. Genomik progesteron reseptörünün yapısı ve fonksiyonu

Progesteronun hücre çekirdeği üzerine etkilerini progesteron reseptörü A (PGRA) ve B (PGRB) olarak isimlendirilen iki reseptör aracılığı ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu iki reseptör aynı gen tarafından kodlansa da farklı promoter bölgeleri fonksiyonlarının değişmesini sağlar (62). Ruminantlarda 8 ekzon bölgesi ile 15 kromozom üzerinde bulunur. Bu iki tip reseptörün üzerindeki farklı bölgelerin özellikle N-terminal üzerinde yoğunlaştığı ve bundan dolayı farklı fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. AF-1'in PGRA'nın ve AF-3 ise PGRB için DNA üzerindeki transkripsiyon faktörlerine bağlandığı bilinmektedir (62). Her iki reseptör tipininde DNA-binding domain (DBD) ortaktır. Bu DBD bölgesinin C-terminalinde bir ligand-binding domain (LBD) bölgesi bulunur. PGRB genellikle farklı tip hücrelerde aktivatör olarak rol oynar. Hücre içinde genelde iki tip PGR de aktiftir. Fakat PGRB progesteronun etkisini azattığı bilinmektedir. Bu iki tip aktif reseptörün dışında sadece meme bezinde tümör olgularında görülen transkripsiyon özelliği olmayan PGRC olduğu bildirilmiştir. Bir fonsiyonunun da PGRA veya PGRB ile heterodimer oluşturması olduğu belirtilmektedir (61, 63).

Sitoplazma içinde inaktif bulunan progesteron reseptörü nükleus içine girip transkripsyon başlatabilmesi için aktive olması gerekir. İnaktif form çeşitli şaperon proteinler ile birliktelik içindedir. Bunlar HSP 90, HSP 70, p23 ve immunophilinlerdir. Progesteron ile bağlandıklarında ATP bağımlı olarak fosforlanırlar ve bu şaperon proteinlerinden ayrılarak nükleusa doğru göç ederler. Elektrik yüklü PGR'leri A:A,

B:B şeklide homodimer veya A:B şeklinde hetero dimer oluşturabilirler. DNA bölgesi üzerinde bir hormone response elemente (HRE) bağlanıp transkripsiyon işlemini başlatırlar. Bu yönü ile genlerin bazıları uyarılırken bazı genler ise inaktive edilir. Bütün bu gen aktivasyon süreçleri hücre içinde bulunan ve tanımlanmış çok sayıda diğer koaktivatör ile etkileşim halinde düzenlenmektedir (61, 64).



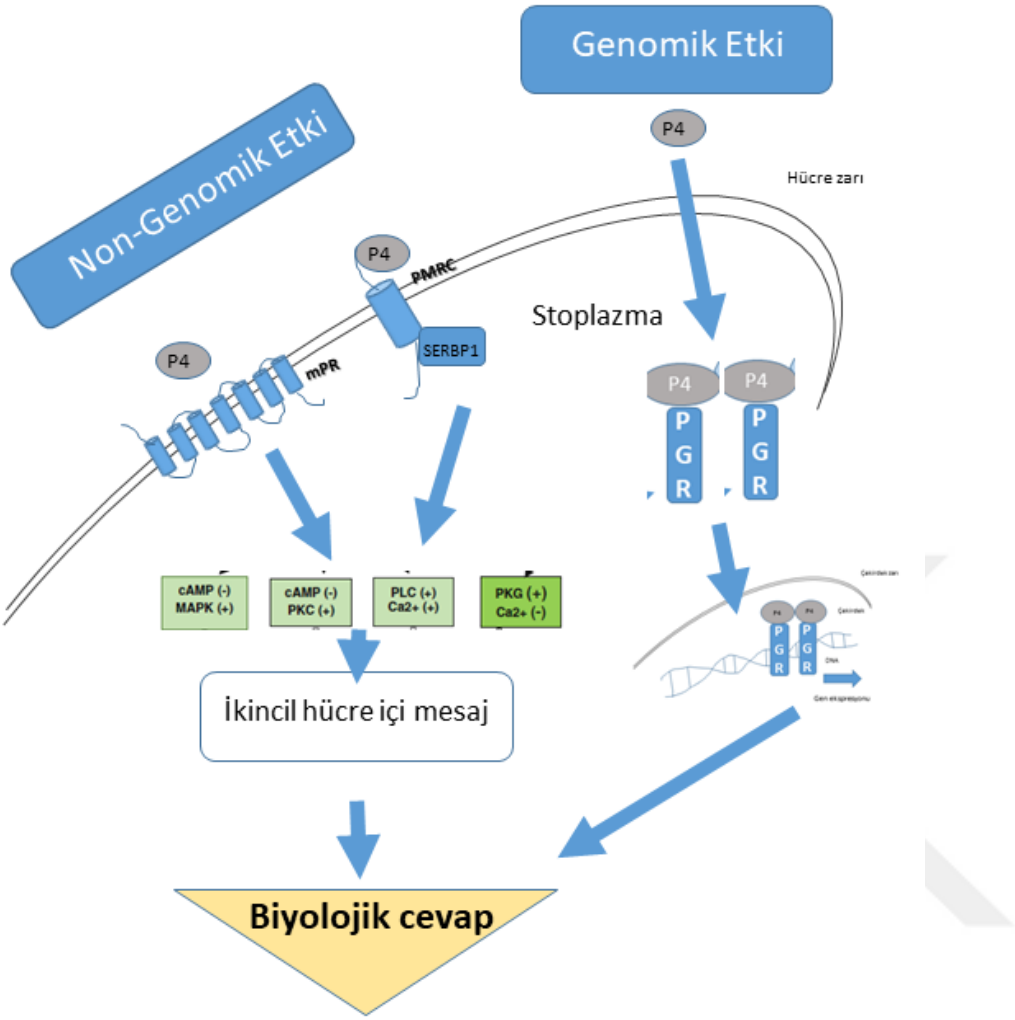
Şekil 9 . Progesteron hormonun hücre çekirdeği içindeki reseptörleri ile ilişkisi ve çalışma prensibini gösteren grafik

PGRA ile B'nin luteal hücrelerde düzenledikleri aktivite yönünden birbirinin zıttı etkilerden bahsedilebilir. Örneğin Misao, Nakanishi (65) insan CL yapısında yüksek progesteronun PGRA mRNA seviyesinde artışa neden olduğu PGRB'nin ise miktarını azalttığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde düşük progesteronun PGRA'yı azalttığı veya PGRB miktarında artışa neden olduğu ve progesteronun hedef hücredeki etkisini arttırdığı bildirilmiştir (66). Diğer bir çalışmada ise hem PGRA hem de PGRB

ovulasyondan sonraki 6. günden itibaren CL içinde azaldığı vurgulanmıştır (66). Siklus sonunda luteolizis öncesi progesteron seviyesi düştüğünde ise PGR'lerinin hem mRNA hem de protein seviyesi azalmıştır. Bu nedenle bu reseptörlerin luteolitik mekanizmada rolleri olduğu söylenebilir. Gebelikte ise tam tersi olarak PGR düzeyi artış eğilimindedir (66). PGRA ile PGRB arasındaki ekspresyon dengesinin erken gebelik döneminde PGRB yönünde bozulduğu erken gebeliğin dominant PGR'nün PGRB olduğu da ifade edilmektedir. İnsan CL yapısında yine inektekine benzer olarak PGRB'nin dominant olduğu, PGRA'nın ise siklus başında artış gösterdiği vurgulanmıştır (67). Tüm bu yönleri ile CL aktif PGR'in B formu olduğu sonucuna varılabilir.

3.4.2. Genomik olmayan progesteron reseptörünün yapısı ve fonksiyonu

Steroid yapıdaki hormonların hedef hücrelerde transkripsiyon veya translasyon aşamalarını etkilemeden direkt hücre fonksiyon ve işlevlerinde oluşturdukları değişiklikler steroid hormonların non-genomik etkileri olarak tanımlanır. Bu etki hormon reseptör ilişkisi ile bazen saniyeler bazen de dakikalar içinde olduğu ifade edilmiştir (12, 61, 68). Tüm bu non-genomik etkiler birçok reprodüktif organda tanımlanmıştır, fakat halen bu etkiler tam olarak ifade edilebilmiş değildir (69). Progesteronun hücre yüzeyinde reseptörü olmadığında veya bu reseptörlerin knockout edildiği çalışmalarda progesteronun bu etkilerinin görülmesi hücre yüzeyinde PGR dışında progesteron ile ilişkili olabilecek reseptörlerin var olabileceğini göstermiştir (12, 68-70). Progesteronun non-genomik etkileri aşağıdaki hipotezler ile açıklanmıştır: a) progesteronun hedef hücredeki oksitosin reseptörü gibi diğer reseptörler ile etkileşimde olabileceği; (b) progesteronun lipofilik yapısından dolayı hücre membranındaki sıvı akışkanlığını değiştirerek farklı reseptörlerin uyarılması veya inhibe edilmesinde etkili olabileceği; veya (c) progesteronun hücre membranında reseptörlerinin olabileceği şeklinde ifade edilmiştir (12, 68-70). Membran ile ilişkili progesteron reseptörü olarak progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 ve 2, bunların dışında membranda ise membrane progesterone receptor (mPR) alpha (mPRα), beta (mPRβ), ve gamma (mPRγ) isimli üç adet reseptör tanımlanmıştır (Şekil 9 (61).



Şekil 10. Progesteron hormonun genomik ve non-genomik (membran reseptörleri) yolla hücre içinde uyarıldığı mekanizmaları gösteren grafik

3.4.2.1 PGRMC1 ve PGRMC2 yapısı ve fonksiyonları

PGRMC1 ve PGRMC2, membran bağlı progesteron reseptör proteinleri ailesine ait proteinlerdir (68, 69). PGRMC1 ilk defa domuz düz kas hücrelerinden izole edilmiştir (71). Yaklaşık 194 amino asit uzunluğunda ve moleküler ağırlığı 25-28 kDa arasındadır (68, 69). Kısa bir hücre dışı N-terminal bölge, tek bir transmembran bölge ve sitoplazmik bölgesi vardır. Bu bölgeler üzerinde cytochrome b5 ve steroid hormona bağlanma bölgesi ihtiva eder (61, 68, 69). PGRMC1 proteini hücre membranında

bulunmasına rağmen (72) endoplazmik retikulum ve golgi aparatı üzerinde de bulunabileceği ifade edilmiştir (68). PGRMC1'in mRNA/protein düzeyindeki ekspresyonu insan, fare, sıçan ve ineklerde hem granuluza hem de luteal hücrelerde tespit edilmiştir (72-76). PGRMC1 proteininin kolesterol metabolizmasının düzenlenmesi, steroidogenesis, miyometriyum kontraksiyonu, oocyte maturasyonu, in vitro olarak ovaryum hücresi yaşamasında rolleri olduğu gösterilmiştir (77-80). Serpin mRNA- binding protein 1 (SERBP1) ile birlikte PGRMC1'in progesterona bağlandığı tahmin edilmektedir. Bu şekilde anti-apoptotik yolakları uyardığı ifade edilmiştir(79, 80). PGRMC1 ile kıyaslandığında PGRMC2 üzerine çok çalışma yoktur Yapısal olarak PGRMC1 ile yüksek homoloji gösterse de N-terminal ve transmembran bölgeleri üzerindeki farklılıklar bu iki reseptörün farklı fonksiyonları olabileceğini düşündürmektedir (81). PGRMC2 fare ve maymun endometriyumunda, miyometriyumda, oviduktta ve CL'da olduğu gözlenmiştir (80-83). Bu proteinin ovidukt fonksiyonlarını düzenlemede rolleri olduğu sanılmaktadır (61).

3.4.2.3. Membrane Progesteron Receptor (mPR) yapısı ve fonksiyonları

Diğer bir non-genomik etkinin progestin ve adipoQ receptor (PAQR) ailesine bağlı progesteron membran reseptörleri (i.e., mPRs) olduğu bilinmektedir (70, 84). Bu reseptörler ilk olarak deniz alabalık ovaryumlarında daha sonra ise diğer memelilerde tespit edilmiştir (84-88). Bu reseptörler mPRα, mPRβ ve mPRγ olmak üzere üç tipe ayrılır. Bu reseptörler aynı zamanda sırasıyla PAQR7, PAQR8 ve PAQR5 olarak da adlandırılırlar (69). Bunlar içinde en iyi bilinen mPRα reseptorü, 352 aminoasit uzunluğunda yaklaşık 40 kDa ağırlığında olduğu saplanmıştır (84). Bu protein bir adet hücre dışı N-terminal bölge, 7 geçişli transmembrane bölge ve bir sitoplazmik bölgeden oluşur, genel olarak hücre membranında veya ER üzerinde bulunurlar (69, 84). mPR izoformlarının maturasyon ve oosit transferi, uterusa embriyo implantasyonu ve, gebelik üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (85-89).

3.4.3. Membran progesteron reseptörleri ile ilgili CL'da yapılan çalışmalar

Bir kısım çalışma non-genomik olarak progesteronun CL üzerinde farklı bir takım etkileri olduğunu ifade etmiştir (13, 73, 74, 76, 79, 80, 84, 90). Bu non-genomik etkilerin anlaşılması için progesteronun genomik etkilerini engelleyen actinomycin D kullanılmıştır (61). Genomik etkiler baskılanmış olsa da progesteronun luteal hücrelerde PGE2 salınımını düzenlediği gösterilmiştir (91). Yine başka çalışmalarda hücre içi kalsiyum hareketliliğini arttırarak PGE2 salınımını tetiklediği ifade edilmiştir (92). Tüm bu luteal hücrelerdeki etkilerin CL'da varlığı daha önceden tespit edilen PGRMC1, PGRMC2, mPRα, mPRβ ve mPRγ üzerinden gerçekleştiği vurgulanmaktadır (13, 75, 76). Aynı zamanda ineklerde östrus siklusunun farklı dönemlerinde ve gebelik boyunca membran progesteron reseptörlerinin mRNA ve protein düzeyindeki varlığının değişebileceği ifade edilmiştir (13, 75, 76). Bu bulgular progesteron membran reseptörleri üzerinden de östrüs siklus ve gebelik döneminde CL üzerine çeşitli etkilerin olduğunu göstermektedir. Fakat halen progesteronun membran reseptörlerinin ilişkisi ve dönemsel farklılıkları tam olarak anlaşılamamıştır. Yüksek düzeyde PGRMC1 ve PGRMC2 mRNA'nın siklusun 6-16. günleri arasında ve gebeliğin 11-16. günlerinde görüldüğü ifade edilmiştir (76). Benzer şekilde, mPRα ve mPRβ mRNA ekspresyonlarının östrus siklusunn ikinci yarısında arttığı vurgulanmştır. mPRγ mRNA'sının da regresyon döneminde arttığı bildirilmiştir (13). PGRMC1 ve PGRMC2 proteinlerinin yoğun şekilde büyük luteal hücreler, daha sonra küçük luteal hücrelerde ve damar endotel hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir (13, 76). Fakat mPR proteinlerinin küçük hücrelerde yoğun, büyük luteal hücrelerde ise daha az yoğun olduğu saptanmıştır. (13). Tüm bu reseptörlerin CL yapısında metabolik fonksiyonları düzenlediği premature luteolizisi engellediği şeklinde yorumlanmıştır. PGRMC1'in stereogenesisteki rolü hücre kültürü çalışmada (adenocoritcal hücrelerde) de gösterilmesi ile desteklenmiştir (93). PGRMC1 cytochrome P450'ye bağlanabilir kolesterol biyosentezini düzenler. Damar üzerindeki membran P4 reseptör varlığı ise hücre farklılaşması, damar geçirgenliği üzerine progesteronun bazı fonksiyonları olabileceğine işaret etmektedir (94, 95). Tüm bunlar dikkate alındığında erken gebelikte CL yapısından progesteron üretiminin devam etmesi ve siklus döngüsü sırasında CL yapısının gelişmesi ve gerilemesi gibi kritik fonksiyonlar üzerine progesteronun non-genomik etkilerini düzenleyen progesteron

membran (mPR) ve membran ile ilişkili reseptörlerin (PGRMC) önemli roller üstlendiği söylenebilir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Sunulan bu tez çalışmasında kullanılan CL örnekleri 214O643 nolu TUBİTAK projesi kapsamında Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 02.09.20l4 tarih ve 30 numaralı etik kurul kararına dayalı olarak toplanmıştı. Bu nedenle bu tez çalışmasında canlı hayvan materyali kullanılmamıştır. Bu durum, Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı (DÜHADYEK)'ndan alınan 2018/10 no'lu rapor ile de desteklenmiştir. Bununla birlikte bu tez kapsamında kullanılan CL örneklerinin laboratuvar analizlerine kadar olan aşamaları da tez bütünlüğünün oluşturulması amacıyla aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

4.1. Bu tez kapsamında toplanan dokuların özeti

4.1.1 Koyunların Beslenmesi ve Bakımı

Proje materyali koyunlar; Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu (Konya Merinosu) ırkı koyun sürüsünden seçildi. Koyunlar 2-5 yaşlı, en az bir doğum yapmış damızlık koyunlar yarı hem açık hem de kapalı sistem ağılda oluşturulan ayrı bir bölmede tutuldu. Koyunlara ad libitum kuru yonca otu ve 300 gr/koyun/gün hesabıyla kesif yem ile ilave yemleme yapıldı.

4.1.2 Koyunların Östrus Siklusunun Hormonal Senkronizasyonu ve Hormonal Östrus Sonrası Doğal Östruslarının Tespiti:

Çalışma materyali olarak seçilen koyunlardan doğal östrus sonrası gelişen CL örneklerinin toplanmasında iş gücü ve zaman tasarrufu oluşturmak amacıyla, çalışmanın başlangıcında koyunlar östrus siklusu üreme mevsimi içerisinde olduğundan 11 gün arayla uygulanan çift doz prostaglandin ($PGF_{2\alpha}$) protokolüyle senkronize edildi. Her bir enjeksiyonda koyunlara ml'sinde 250 µg kloprostenole eşdeğer 263 µg kloprostenol sodyum içeren sentetik $PGF_{2\alpha}$ analoğu (PGS, Alke, İstanbul, Türkiye) gluteal bölgeden kas içi enjekte edildi. Bu aşamada; CL örnekleri doğal östrus (0. gün) sonrası 12, 16 ve 22. günlerde kesilecek koyunlardan elde edileceğinden östrusların kesimlerin yapılacağı bir haftada toplulaşması amacıyla çalışmaya dahil edilen koyunlar üç enjeksiyon grubuna ayrıldı ve ilk önce 22. günde, sonra 16. günde ve en son olarak 12. günde kesim olacak şekilde ilk enjeksiyon her

gruptaki koyunlara 4 gün arayla yapıldı. Böylece önce enjeksiyon yapılan bir gruptaki koyunların bir sonraki gruptaki koyunlardan daha önce östrus göstermeleri sağlandı. İkinci $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonunu izleyen 12. saatten başlayarak günde 3 kez 30 dakikalık sürelerle arama koçu kullanılarak östrus gösteren koyunlar tespit edildi ve östrus zamanı kayıt edildi (senkronize östrus).

Üreme sezonu içerisinde koyunlarda östrus siklusu ortalama 16-17 gün sürdüğünden ikinci $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu sonrası oluşan senkronize östrusu izleyen ilk doğal östrusun tespiti için, her enjeksiyon grubunda ikinci $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan 16 gün sonra arama koçlarıyla östrus tespiti yapılmaya başlandı.

4.1.3. Grupların Oluşturulması

Koyunlarda östrus siklusu içinde, ovulasyon günü veya çiftleşme günü 0. gün (gün 0) kabul edilerek; östrus siklusunun 12. günündeki aktif progesteron üreten CL (CL12), luteolizis şekillendikten sonra (koyunlarda bir siklus 17 gün olup luteolizis 13. günde şekillenir) 16. gündeki progesteron üretmeyen CL (CL16), 0. günden 22 gün sonra corpus albicans'a dönüşerek ve artık progesteron üretmeyen ve luteal hücre yapılarını kaybetmiş 22. gündeki CL kalıntısı (CL22) incelenmiştir. Gebe gruplarındaki koyunlar ise doğal östruslarında kendi ırkından koçlarla elde sıfat yöntemiyle çiftleştirildi ve yukarıdaki dönemlere karşılık gelecek şekilde 12. gündeki gebe corpus luteum (P12, implantasyon öncesi dönem), 16. gündeki gebe corpus luteum (P16, implantasyon dönemi) ve 22. gündeki gebe corpus luteum (P22 implantasyon sonrası) yapıları incelenmiştir. Çiftleştirme günü gebeliklerinin ilk günü kabul edildi.

4.1.4. Koyunların Kesilmesi ve Corpus Luteumların Elde Edilmesi

Koyunların kesim sonrası abdominal ve pelvis boşluğuna en kısa sürede ulaşıldı. Okvaryum ve uterusun asıcı bağları koparılarak cerviks uteri, uterus, ovidukt ve ovaryumların bütünü alındı ve laboratuvara getirildi. Organlar üzerinde yapılan manipülasyonların mümkün olduğunca travmatik etki oluşturmayacak şekilde olmasına özen gösterildi. Öncelikle cornu uterilerin ovidukt-ovaryum yönlü uzantıları takip edilerek ovaryumlar üzerinde korpus luteum varlığı araştırıldı ve CL ovaryum dokusundan diseke edilerek serbestleştirildi. Oluşturulan C12, P12, C16, P16, C22 ve P22 gruplarının her biri için 4 baş koyun kesildi ve CL dokuları elde edildi.

CL küçük histolojik doku örnekleri olacak şekilde parçacıklara bölündü. İmmunohistokimya (IHK) tekniği için histolojik doku örnekleri %4 PFA içine alındı. Bu örnekler 24 saat sonra sırasıyla %25, %50, %75 ve %100 oranlarındaki metanol solüsyonlarında ikişer kez yapılan 10 dakika süren yıkamalarla %100 metanol solüsyonuna alıştırıldı ve %100 metanol solüsyonunda -80 °C'de muhafaza edildi. Taze CL doku örneklerinin bir kısmı ise western blotting (WB) ve qPCR incelemesi için anında kuru buz üzerinde (-120 °C) cyrotüpler içerisinde donduruldu ve laboratuvar işlemlerinin başlatılmasına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

4.2. Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Çalışmalar:

4.2.1 Koyun corpus luteum dokularında histolojik kesitlerin hazırlanması

Histolojik kesitler için her bir grup için (C12, P12, C16, P16, C22 ve P22) n=4 olacak şekilde derin dondurucuda %100 metanol solüsyonunda saklanan CL örneklerinden mercimek tanesi büyüklüğünde parçalar alındı. Dokular metanol içinde olduklarından yıkama protokolünün tersi uygulandı. Örneklerin sırasıyla %75, %50 ve % 25'lik metanol solüsyonlarında 10'ar dakika süreyle 2'şer kez yıkamaları yapıldı. Daha sonra PBS'de 10 dakikalık 2 kez daha yıkama yapıldı. Son olarak PBS'de +4°C'de gün aşırı yıkama işlemi uygulandı. Tüm yıkamalar karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında yapıldı. Dokular slayt hazırlamak için hazır hale getirildi.

Dokular lam üzerine belirli bir planlama yapılarak yerleştirildi ve doku planlaması kayıt edildi. Üzerine Bakto Agar jel (%1) ilave edildi. Jel ile sabit hale getirilen ve jel içine gömülen doku lam üzerinden kaset içine alındı ve yıkama aşamalarına geçildi. İlk olarak; %25 ve %50'lik etanol (ETOH) solüsyonlarında 15'er dakika süreyle yıkama yapıldı. Daha sonra %75'lik ETOH solüsyonu içerisine alınarak 35 dakika süreyle yıkandı. Bu aşamadan sonra %100'lük ETOH solüsyonunda hızlı yıkama yapıldı. Hızlı yıkamayı takiben %100 ETOH solüsyonunda 30 dakika 25°C'de uzun yıkama yapıldı. Tüm yıkamalar karıştırıcı üzerinde yapıldı. Bu işlemlerden sonra tüpler +4°C'de, karıştırıcıya alınarak gün aşırı %100'lük ETOH ile örneklerin yıkaması yapıldı. Ertesi gün plastik kaset içerisinde 20 dakika 25°C'de %100 ETOH ile etüvde bekletildi.

Daha sonra %100'lük xylene dolu beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 45 dakika 25°C'de etüvde tutuldu. Kaset parafin içine atılarak bir gece 65°C'de %100 paraplastta inkubasyona alındı. Parafin her 15 dakikada bir karıştırıldı.

Parafin içerisine gömülen dokular mikrorotary mikrotom ile 5 mikron kalınlığında doku örnekleri kesildi. Kesit örnekleri pozitif yüklü slaytlara alınmadan önce doku kırışıklıklarının düzelmesi için su banyosunda 45°C'de 5 dakika bekletildi. Pozitif yüklü slaytlara alınan doku örnekleri oda ısısında kurutuldu. Daha sonra slaytlar ilgili kasetlerin içinde immunohistokimya (İHK) aşamasına kadar saklandı.

4.2.2. Hematoksilen ve Eozin Boyama

Bu amaç için, alınan parafin kesitler (5 mikron) yukarıda ifade edildiği gibi deparafinize edidi. Bu işlem için slayt'lar, 10'ar dakika sürelerle xylol içerisinde bekletildi. Deparafinize edilmiş dokular sırasıyla %100 absolut Etanol (ETOH), %95'lik alkol, %80'lik alkol ve %70'lik alkol solüsyonlarında 10'ar dakika süreyle tutuldu. Dokular Harris'in hematoksilenine (1/9 oranında sulandırılmış) alınarak 5-6 dakika boyunca tutuldu. Hematoksilenden çıkarılan dokular akan deiyonize su altında yıkandı. Daha sonra dokular eozine daldırılıp 3-4 dakika boyunca tutuldu. Dehidrasyon için slaytlar belirtilen alkol solüsyonlarından tersine geçirildi. Bu işlemden sonra slaytlar 10 dakikalık süreyle 3X Xylol'den geçirildi. Slaytların üzerine entellan ile yapıştırılıp kurumaya bırakıldı. Görüntüler ışık mikroskobunda kayıt edildi.

4.2.3. İmmunfloresan yöntemi ile koyun CL yapısında TLR2 proteininin gösterilmesi

Doku kesitleri (5 μm) ksilen ile deparafinize edildi. Daha sonra alkol seriler ile yıkanarak 10 mM sodium citrate (pH 6.0) içinde 20 dakika kaynatıldı. Doku TBSTw (Tris-HCl (25 mM pH 7.5), NaCl (140 mM), KCl (2.7 mM), ve% 0,1 Tween-20) içinde seri olarak yıkandı. Daha sonra non-spesifik bağlanmaların engelenmesi için 1 saat boyunca blok solüsyonu (TBSTw containing 1% Blocking Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), normal human serum ve 1% bovine serum albümin) içinde bekletildi. Dokular 1 gece boyunca 4°C 1:150 konsantrasyonda TLR2 bekletildi. Sekonder antikor olarak 1:250 mouse anti human: Fluorescein isothiocyanate kullanıldı. Auto fluoresans laboratuvarda hazırlanan 10 mM

Cu(II)SO4 ve 50 mM NH4A ile bloklandı. Çekirdek boyası olarak antifade mounting medium içinde DAPI (Vectashield, Vector Lab, USA) kullanıldı. Flüoresans görüntüler Nikon Eclipse E600 compound microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) kullanılarak alındı.

4.2.4. İmmunohistokimya (İHK) yöntemi ile PGMRC1 ve mPRα proteinlerinin koyun CL'undaki lokalizasyonlarının belirlenmesi

İHK aşaması için lamlardaki doku kırışıklıklarının düzelmesi ve doku yapışmasını arttırmak için slide örnekleri 5 dakika inkübatörde bekletildi.

Lamlar üzerinden parafini kaldırmak için (Deparafinize); karıştırıcıda her biri iki kez yapılmak üzere sırasıyla, 3'er dakika %100 Xylene, %100, %75 ve %50 ETOH ile yıkamalar yapıldı. 90 birim %100 Methanol ile 10 birim H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) karıştırılarak hazırlanan solüsyonda lamlar 10 dakika çalkalandı. Antijen retrieval işlemi için 500 ml distile suya 5 ml sitrik asit konularak hazırlanan solüsyon içine lamlar daldırıldı. Cam kabın üzeri streç filmle birkaç kat kaplandı. Mikrodalga fırında (kaynayana kadar) 20 dakika tutuldu.

Lamlar daha sonra doku harici kısım kağıt mendille silinerek dokunun etrafı hidrofobik kalemle çizildi (Sıvı dışarı dağılmasın diye etrafına bariyer oluşturur). Kalemle çizilen kısım içindeki su mikropipet ile çekildi ve üzerine (Tris-Buffered Saline-Tween) TBS-Tween damlatıldı ve 5 dakika oda ısısında çalkalandı.

Tris-Buffered Saline Tween mikropipet ile çekilerek üzerine önceden hazırlanan Roche Blocking Reagent (RGBT) solüsyonunda 25°C'de 1 saat çalkalandı. 10 ml RGBT solüsyonu 0,5 ml keçi serumu, 0,1 g BSA (Sığır serum albümin), 1 ml bloklama reaktifi, 8,5 ml TBSTw ile hazırlandı.

Çalkalama işlemi bittikten sonra üzerindeki sıvı çekildi. Tekrar TBS-Tween damlatıldı ve yine çalkalandı. Daha sonra slayt üzerindeki TBS-Tw'de çekildi. Üzerine avidin solüsyonundan damlatıldı ve 25°C'de 15 dakika çalkalandı. Tekrar TBS-Tween ile temizlendi ve biotin solüsyonundan damlatıldı ve 25°C'de 15 dakika çalkalandı. Temizleme işlemi uygulandı. 1:100 oranında primer antikor katılmış RGBT ile +4°C'de bir gece çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan antikorların listesi

Antikor adı	Üretici firma	Katalog no	Kullanım alanı
PGRMC1	Santa Cruz Biotechnology	sc-393015	IHK, WB
mPRα	ThermoFisher Scientific	PA5-61376	IHK, WB
TLR2	AbD Serotec	HCA151	IF
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778	WB
Sekonder antikor	AbD Serotec	MCA1379F	IF

İnkübasyon tamamlanınca TBS-Tween'de 25°C'de 5 dakika süreli 5 yıkama yapıldı. 3,3' diaminobenzidine (DAB) ile boyanması için 1:250 oranda RGBT içine biotin solüsyonu konuldu ve 25 °C'de 60 dakika çalkalandı. Bu basamağın sonuna doğru avidin-biotin kompleksi (ABC Kompleks) hazırlandı. Bu amaçla her bir lam için 200 ml TBSTw, 1.6 µl Reagent A, 1.6 ul Reagent B'den oluşan miks hazırlandı ve yaklaşık 30 dakika oda ısısında inkübe olması sağlandı.

TBS-Tween ile 25 °C'de her biri 5 dakika süreli 7 kez çalkalayıcı üzerinde yıkama yapılarak lam üzerindeki sekonder solüsyonun uzaklaştırılması sağlandı. Son yıkama yapılırken mikroskopta renk elde edilmesi için DAB solüsyonu hazırlandı ve lamlar üzerine damlatıldı. Daha sonra Hematoksilen boyaması yapılarak hücre çekirdekleri boyandı. Slayt'lar tekrardan düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru olacak şekilde alkol yıkamalarından geçirildi ve son olarak %100 Xylene uygulandı. Entelan kullanılarak lamel ile kapatılan slide'lar oda ısısında

kurutuldu. Görüntüleme için hazır hale gelen preparatların mikroskopta incelemeleri yapıldı ve görüntü kayıtları alındı.

4.2.5. Western Blot Yöntemi ile PGMRC1 ve mPRα protein miktarlarının koyun CL'unda Belirlenmesi

Protein izolasyonu için her bir gruptan 3 örnekleme yapılacak şekilde toplam 100 mg CL dokusu lizis solusyonu (Thermo Proteo JETTM Mammalian Cell Lysis Reagent, ABD) içinde bir homojenizatör yardımı ile homojenize edildi. Elde edilen ısı (Homojenizat) soğutmalı santrifüjde 14 000 g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım (süpernatant) ayrı bir tüpe aktarıldı ve içine proteaz inhibitör karışımı ilave edildi.

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları Bratford yöntemi ile standardize edilen spektrofometrede ölçüldü. Ölçüm sonrası her bir örnek için toplam 40 microgram/µl olacak şekilde total protein yükleme tamponu olan 2x lammeli tampon (gliserol+b-merkapto etenol+brom creasol blue) içinde (toplam 20 µl) 5 dk 95 C'de bekletildi. Daha sonra SDS-PAGE için hazır jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi, üzerine transfer solüsyonu eklendi. Bu jel üzerindeki yükleme kuyucuklarına, 1. kuyucuk protein büyüklüğünü gösterecek marker olacak şekilde (iki renkli protein boy markeri, biorad) toplam 10 kuyucuğa her bir gruptan 3'er örnek olacak şekilde yüklendi. Daha sonra yüklenen protein örnekleri üst jeli aşması için poliakril amid jelinde (SDS-PAGE) 80 V'de 30 dakika ve proteinlerin boylarına göre ayrılması için 120 V'de 1 saat yürütüldü.

Poliakril amid jelde ayrıştırılan protein bantları (nitroselluloz membrana (BioRad)) Trans-BlotR TurboTM Transfer sistemi (BioRad) kullanılarak nitroselüloz membran üzerine aktarıldı. Bu işlem transfer tamponu yardımıyla (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 4 ml %10'luk SDS 1 litre içinde) 1,0 Ave 25 volt'da 30 dk süreyle uygulandı. Nitroselüloz membran üzerine geçen proteinler transfer solüsyonundan alındı. Membran üzerine 1x TBS-T (10xTBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl, 1 ml Tween-20, 950 ml dH_2O, PH 7,6) solüsyonunda 3 kez 10'ar dakika yıkandıktan sonra %5'lik yağsız süt (5 gr yağsız süt tozu, 50 ml TBS-T) solüsyonu içinde 55 rpm ajitasyonda yaklaşık 2 saat boyunca non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için bloklandı.

Birincil antikorlar PGMRC1 ve mPRα (bunlar immunohistokimya içinde kullanılan antikorlar olup WB içinde uyumlu antikorlardır) ve housekeeping antikoru (GAPDH, son konsantrasyonu 1:1000 (1 ug/ml) ve ikincil antikorlar donkey anti-rabbit IgG 1:10000 (0,04 ug/ml) oranında blotlama solüsyonunda (%5'lik yağsız sütte) sulandırıldı. Nitroselüloz membranı 1x TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve 1 ug/ml birincil antikor solüsyonunda 50 rpm ajitasyonda gece boyunca +4 C'de inkübe edildi. Ertesi gün birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılarak membran 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandı. Blotlanan membranlar 0,1 µg/ml konsantrasyonlu ikincil antikor solüsyonu içinde 2 saat boyunca 50 rpm ajitasyonda ve oda ısısında inkübe edildi. Hedef proteinin saptanması için BioRad Clarity Western Blot Substrat kemilüminesans (Peroksidaz, Luminol ensahnsır 170-5060, ABD) solüsyonu kullanıldı. İkincil antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membranlar 3 kez 10'ar dakika 1x TBS-T solüsyonu içinde yıkandı ve substrat solüsyonu (1.8 cm^2 : 1.8 ml olacak şekilde) ile ajitasyonda oda ısısında 5 dakika boyunca muamele edildi. Membranlar tarayıcı cihaz (Licor C-DiGit® Blot Scanner, ABD) ile görüntülenerek dijital ortamda kaydedildi. Elde edilen protein bantların molekül ağırlıkları ve bant büyüklükleri analiz edildi.

4.2.6. Corpus Luteum Dokusunda PGMRC1 ve mPRα Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

4.2.6.1. RNA izoloasyonu

RNA izolasyonu amacıyla -80 °C'de muhafaza edilen CL dokularından her hayvanda eşit olacak şekilde yaklaşık 50 mg doku örneği alındı ve 800 µL solüsyon trızol (TRIzol Reagent-Invitrogen, USA) içerisinde homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizatlar başka bir mikrofüj tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl kloroform konularak tüpler vortekslendi. 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra +4 C de 12,700 g'de 15 dk santrifüj edildi.

Üstteki sulu fazdan yaklaşık 500 ml sarsmadan alınarak başka bir tüpe aktarıldı, üzerine 500 ml izoproponol eklendi ve oda ısısında 10 dk bekletildikten sonra +4 C 12,700g'de 10 dk santrifüj edildi. Dibe çöken RNA peleti üzerindeki izopropronollü süpernatant döküldü. Peletler üç kez etil alkolde (-20°C; % 70lik, % 70lik ve %95lik)

yıkandı. Her defasında +4 ^{0}C 77000 devirde 5 dk 3er kez santrifüjlendi ve sıvılar boşaltıldı. Elde edilen RNA peleti 37 ^{0}C'de kurutuldu ve nükleaz içermeyen 100 µl H_2O içerisinde 65 C'de 5 dk bekletilerek çözündürüldü. Total RNA miktarı nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000c) kullanılarak belirlendi.

Total RNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla nanodrop cihazının okuyucu bölümüne önce 2 µl dietilpirokarbonatlı (DEPC) su (ddH_2O) daha sonra da cihazın okuma yüzeyine 1µl RNA örneği steril pipet ucu ile damlatılarak ölçümler yapıldı. Örneklerin RNA miktarları ng/µl şeklinde kaydedildi. Total RNA konsantrasyonları belirlenen örnekler cDNA yapımında kullanıldı. Elde edilen örnekler diğer analizler için -80°C'de saklandı.

4.2.6.2. cDNA sentezi

Total RNA'dan tek zincirli cDNA üretilmesi için ticari kit [(RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Fermentas, ABD)] kullanıldı. Daha sonra Total RNA'dan 2µg/20µl alınarak üzerine 1 µl oligo-dT + 1 µl random hexamer ilave edildi (Random hexamer ile oligodt miks solüsyon yapılıp RNA'ya ilave edildi). Miks solüsyon örnek sayısının bir fazlası olacak şekilde hazırlandı (5x Reaksiyon tamponu 4 µl, 1 µl RiboLock RNase İnhibitör, 1 µl Reverse Aid Transcriptase, 2 µl 10 µM dNTP miks). Elde edilen miks solüsyondan 8 µl her kuyucuğa konuldu. Hafifçe karıştırıldı ve santrifüj edildi.

4.2.6.3 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PZR)

Çalışmada PGMRC1 ve mPRα gen expresyonu araştırılmıştır. Kontrol (house keeping gene) olarak glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) geni kullanılmıştır. Boya olarak çift iplikçikli DNA'ya bağlanabilen SyberGreen (Maxima™ SYBR qPCR Master Mix (2X) for Real-time PCR Fermentas Life Sciences) kullanıldı. PZR reaksiyonu cDNA ile birlikte hızlı reaksiyon tüpünde total hacim 10 µl [5 µl, Primer 0,1 µl, su 3,9 µl RNase Free, DNase Free (RNAse-free DNAse I, Promega) template 1 µl (cDNA) numune sayısının bir fazlası olacak şekilde miks solüsyon hazırlandı. Kontrol yapıldıktan sonra Real Time PZR'a dikkatlice yerleştirildi. Reaksiyon ısı profili; +95°C 10 dk ön denatürasyon, 40 siklus 95°C'de

15 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olacak şekilde ayarlandı. Melting Curve (erime eğrisi) analizi için 95°C'de 15 saniye, 60°C'ye 1 dakika ısı profili ayarlandı. Hedef genlerin yükseltgenmesi amacıyla Real-Time qPZR cihazı kullanıldı. Elde edilen eşik döngüsü (Ct) değerleri herbir gen için ayrı ayrı kayıt edildi.

Tablo 2. CL da kulanılan PGRMC1 ve mPRα Primerleri ve Referans (Housekeeping) Gen Listesi

PGMRC1	Forward	caggacccgcgtatactcat
	Reverse	gcctctggatgcatctcttc
mPRα	Forward	ccggcggtccatctatga
	Reverse	ccacccccttcactgagtctt
GAPDH	Forward	aatatcatccctgcttctactg
	Reverse	catacttggcaggtttctcca

4.3. İstatistiksel analiz

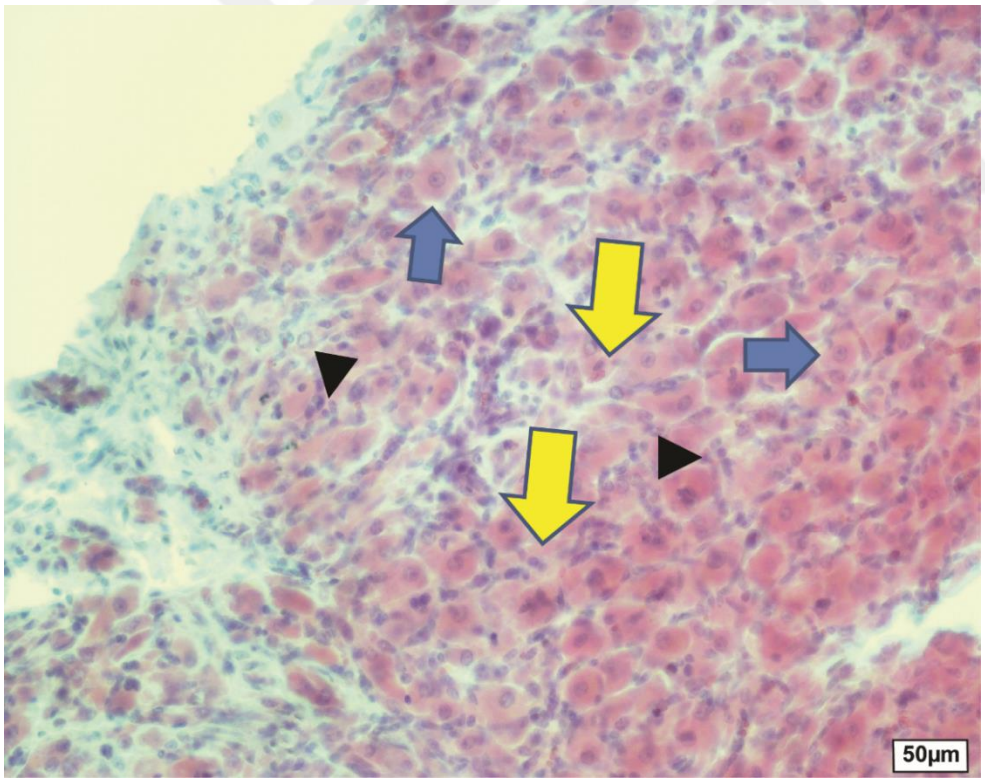
Elde edilen Ct değerlerinin normalizasyonunda Livak ve Schmittgen (2001) tarafından belirtilen $2^{-\Delta\Delta}$Ct yöntemi kullanıldı (96). Bu formüle göre; GAPDH'in Ct değerlerin ortalaması alındı. Çalışmada kullanılan hedef genlerin Ct değerleri belirlendi. 2^-ΔΔCt metoduna göre kat değişimi şeklinde elde edilen verilerin aritmetik ortalaması, standart hatası belirlendi. Elde edilen değerlerin Microsoft Excel programında grafikleri hazırlandı.

PGRMC1 ve mPRα protein ve mRNA ekspresyon değerleri gebelik ve siklus günleri içindeki farklılıkların araştırılması için ONE-WAY ANNOVA programı kullanıldı. Gruplar arası farklılıklar ise post-hoc fisher/tukey metodu ile karşılaştırdı. Sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) şeklinde sunuldu ve gruplar arasındaki farklılığın önemi $p<0,05$ olarak kabul edildi. Gruplar arası farklılıklar şekiller üzerinde farklı harfler ile gösterildi (a,b,c vb.). Verilerin analizinde SPSS istatistik programı kullanıldı.

5. BULGULAR

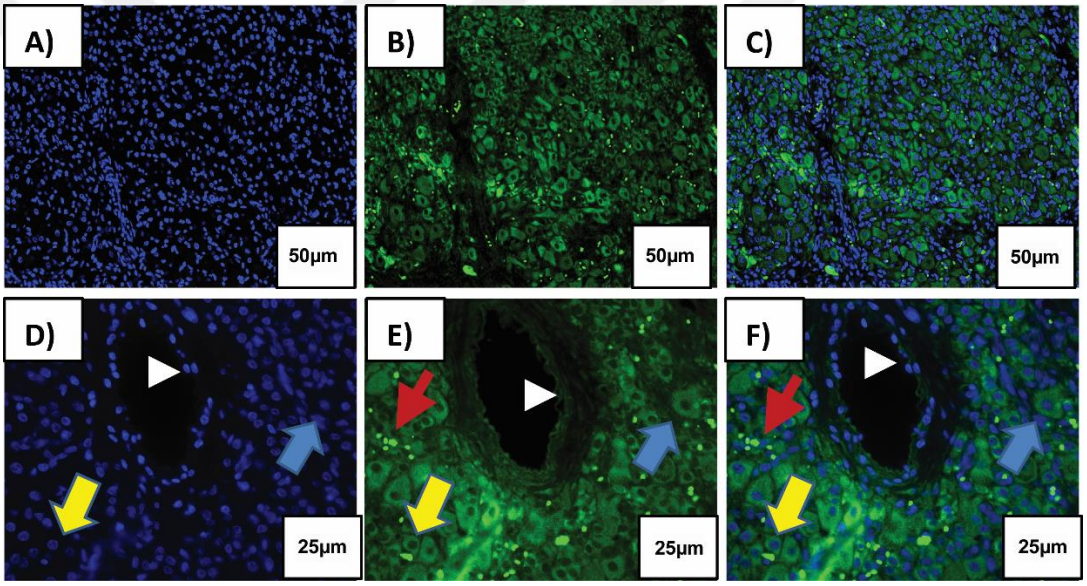
5.1. Koyun Corpus Luteum'unun histomorfolojisi

Siklustaki ve gebe koyunlardan alınan CL örnekleri, standart doku takibinin ardından hematoksilen (çekirdek boyama) ve eozin (sitoplazma) boyama yöntemi ile (H&E) boyanarak incelenmiştir. Boyamalarda, progesteron üretiminden sorumlu ovulasyondan önce folikül içinde granuloza hücrelerinden köken alan büyük luteal hücrelerin, theca interna hücrelerinden köken alan küçük luteal hücreler ile CL'a kan akışının devamlılığını sağlamak için oluşturulan damar ağları içindeki endotel hücrelerin lokalizasyonları belirlenmiştir (Resim 1). CL'un yapısı incelendiğinde hacimsel olarak en fazla yer kaplayan hücre tipinin büyük luteal hücreler olduğu gözlenmiştir. Küçük luteal hücrelerin damarlar etrafında toplandığı ve CL içinde çok fazla büyük ve küçük çapta damarların olduğu görülmektedir (Resim 1).



Resim 1. Siklusun 12. gününde (C12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL yapısının genel görünümü. Mavi ok: büyük luteal hücre, Sarı ok: küçük luteal hücre, siyah ok başı: endotel hücreleri (H&E boyaması)

Koyun CL yapısındaki hücre tiplerini tanımlamak adına ilgili antikorlarla immunfloresan yöntemi denenmiş ancak beklenen görüntü elde edilememiştir. Bu amaçla laboratuvarımızda önceki çalışmamızda kullanılan Toll-like receptor-2 (TLR2) proteini az sayıdaki örneğe uygulanmış ve en iyi demonstrasyon sonucu alınmıştır. Bunun üzerine CL yapısındaki hücre tiplerinin daha iyi anlaşılması için TLR2 proteini kullanılarak immunfloresan boyama yapılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI ile (mavi renk), sitoplazma ise yeşil renkli floresan veren spesifik TLR2 protein antikoru ile gösterilmiştir. Bu boyamada tüm CL hücrelerinin TLR2 antikorunu eksprese ettiği görülmektedir. Otofloresans özelliğe sahip eritrositlerin CL yapısı içinde çokça görülmesi, CL'un kan damarları açısından zengin olduğunu göstermektedir (Resim 2, kırmızı ok).



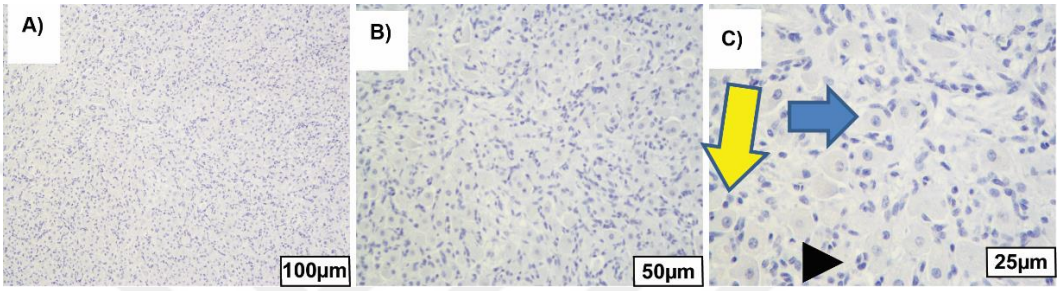
Resim 2. Gebeliğin 12. gününde (P12) TLR2 uygulanmış koyun CL yapısının immunfloresan boyama ile genel görünümü. A, D: hücre çekirdeğini mavi renge boyayan DAPI'nin görünümü, B, E: hücre sitoplazmasını yeşil renge boyayan TLR2 antikorunun CL'daki tüm hücrelerde ekspresyonu, C, E: çekirdek ile sitoplazma boyamasının birleştirilmiş görüntüsü, Mavi ok: büyük luteal hücre, Sarı ok: küçük luteal hücre, beyaz ok başı: damar endotel hücreleri, kırmızı ok: CL içindeki otofloresans veren eritrositlerin görünümü, immunfloresan (IF) boyama

,

5.2. Koyun corpus luteum'unda PGRMC1 ve mPRα'nın immunohistokimya yöntemi ile gösterilmesi

5.2.1. Negatif Kontrol

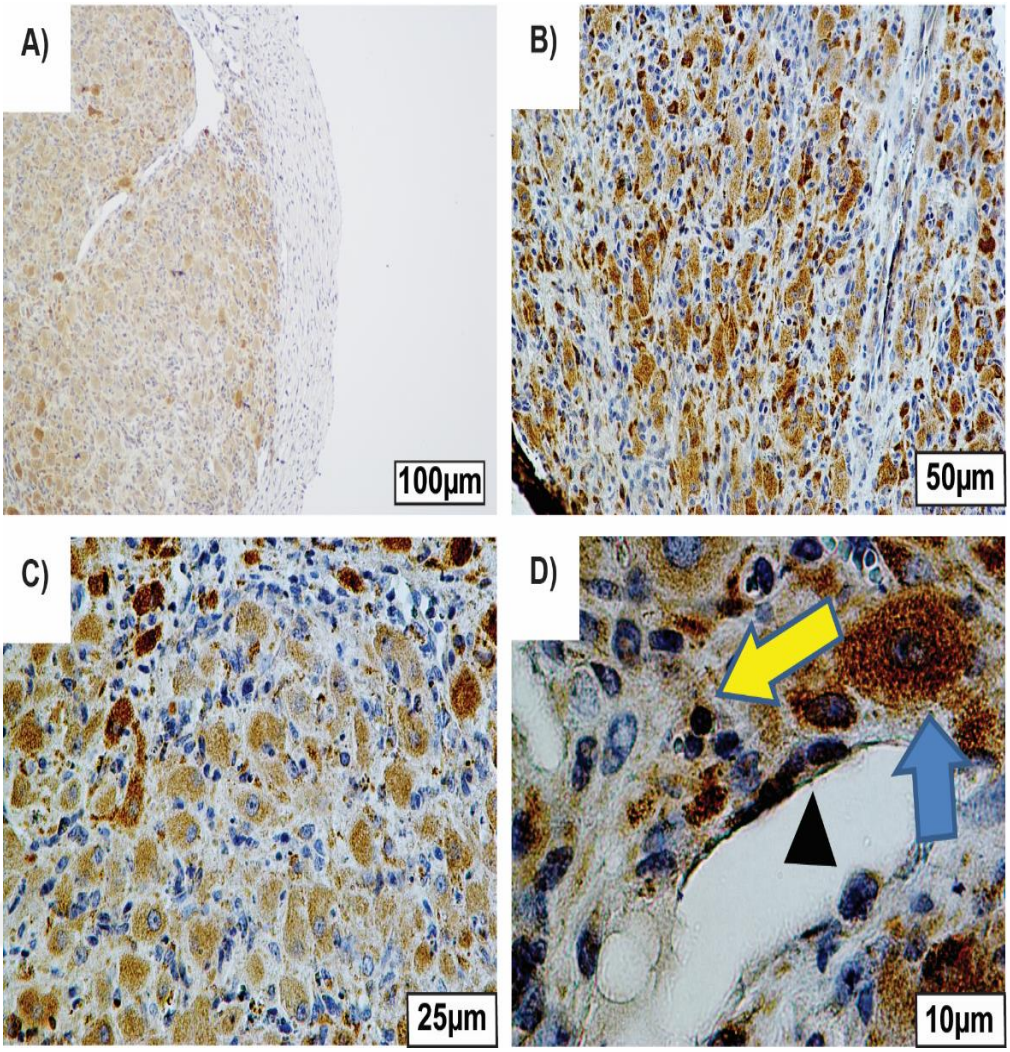
Tez çalışmasında araştırılan PGRMC1 ve mPRα için primer antikor kullanılmadan sadece sekonder antikor kullanılarak IHK yönteminin spesifitesi belirlenmiştir. Siklustaki ve gebe CL negatif kontrol örneklerinde PGRMC1 ya da mPRα için antikor spesifik boyamaya rastlanmamıştır (Resim 3).



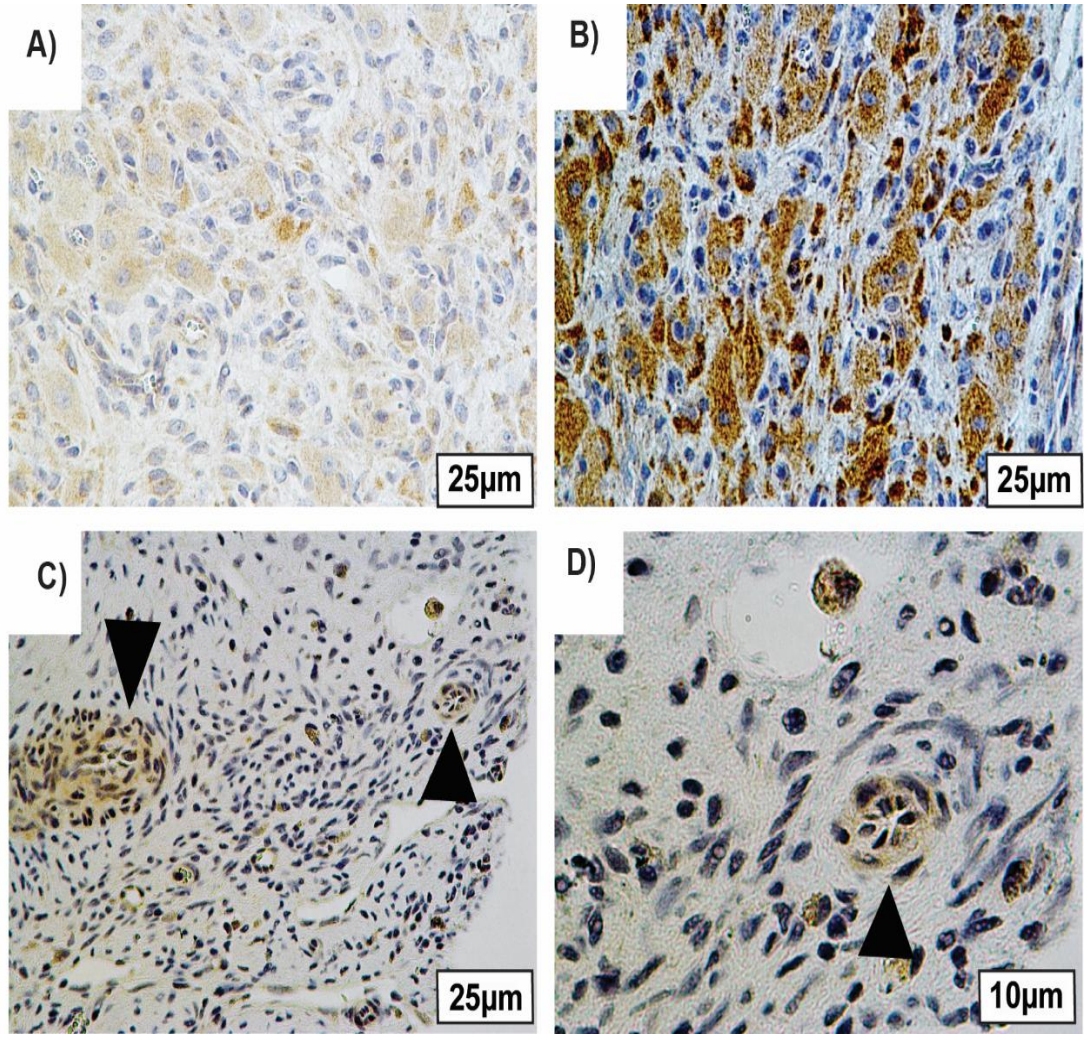
Resim 3. Gebeliğin 12. gününde (P12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL yapısının primer antikor yerine non-immun serumun konduğu negatif boyamanın genel görünümü. Mavi ok: büyük luteal hücre, Sarı ok: küçük luteal hücre, siyah ok başı: endotel hücreleri

5.2.2. PGRMC1 proteini'nin koyun corpus luteum'unda hücre içi lokalizasyonu

Siklustaki ve gebe koyunlardan toplanan (her bir grup için n=4) CL örneklerinde PGRMC1 proteininin hücresel lokalizasyonu incelenmiştir. PGRMC1 proteininin CL hücrelerindeki lokalizasyonu Resim 4 ve Resim 5 gösterilmiştir. Buna göre PGRMC1 proteininin, hem büyük ve küçük luteal hücre hem de damar endotel hücrelerinde lokalize olduğu görülmüştür. Dönemler arasındaki farklılık göz önünde bulundurulduğunda; C12 grubundan ziyade P12 grubunda, yine benzer şekilde C16 grubundan ziyade P16 grubunda belirgin bir PGRMC1 immunoreaktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Resim 5A, B). Regrese olan ve artık aktif progesteron üretmeyen 22. gün gruplarında ise PGRMC1 proteininin sadece damar endotel hücreleri tarafından eksprese edildiği saptanmıştır (Resim 5C, D).



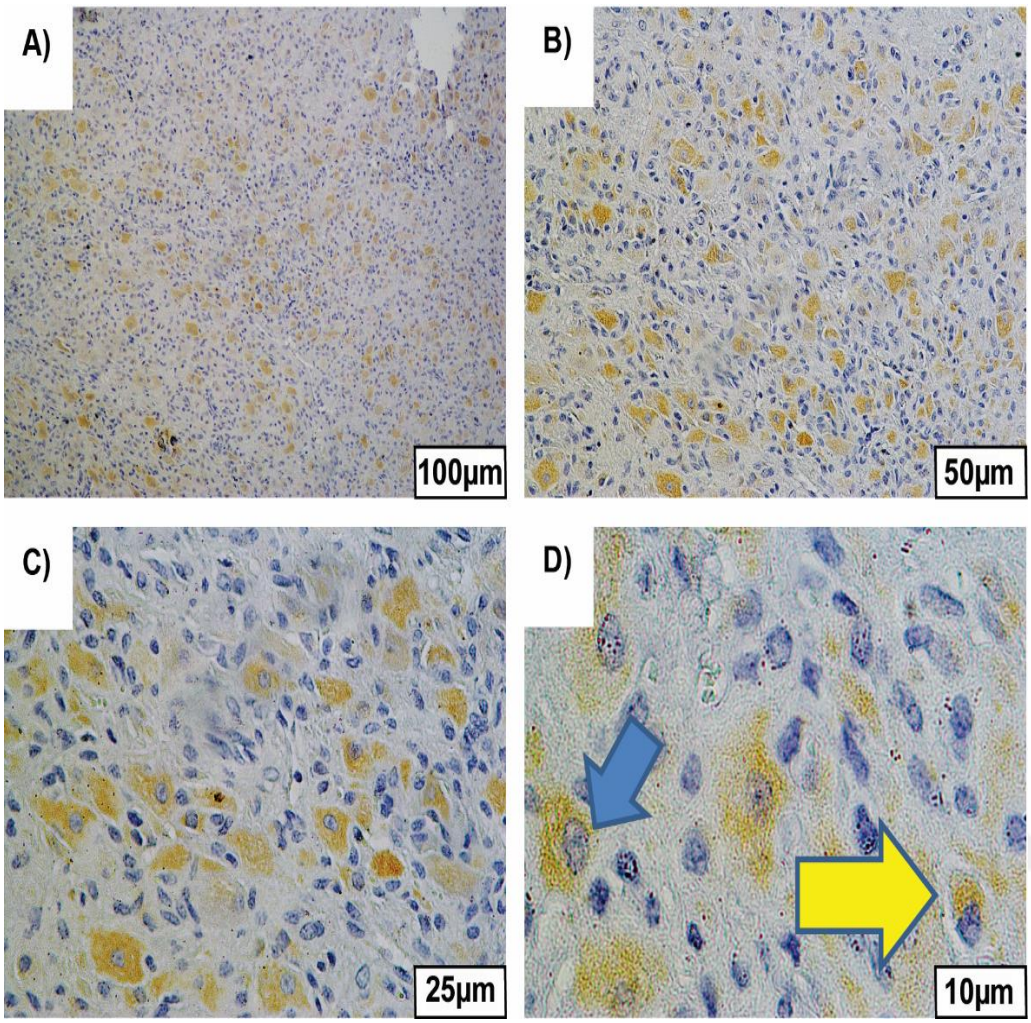
Resim 4. A, B, C, D: Gebeliğin 12. gününde (P12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL'unda PGRMC1 immunoreaktivitesi. Mavi ok: büyük luteal hücre, Sarı ok: küçük luteal hücre, siyah ok başı: endotel hücre



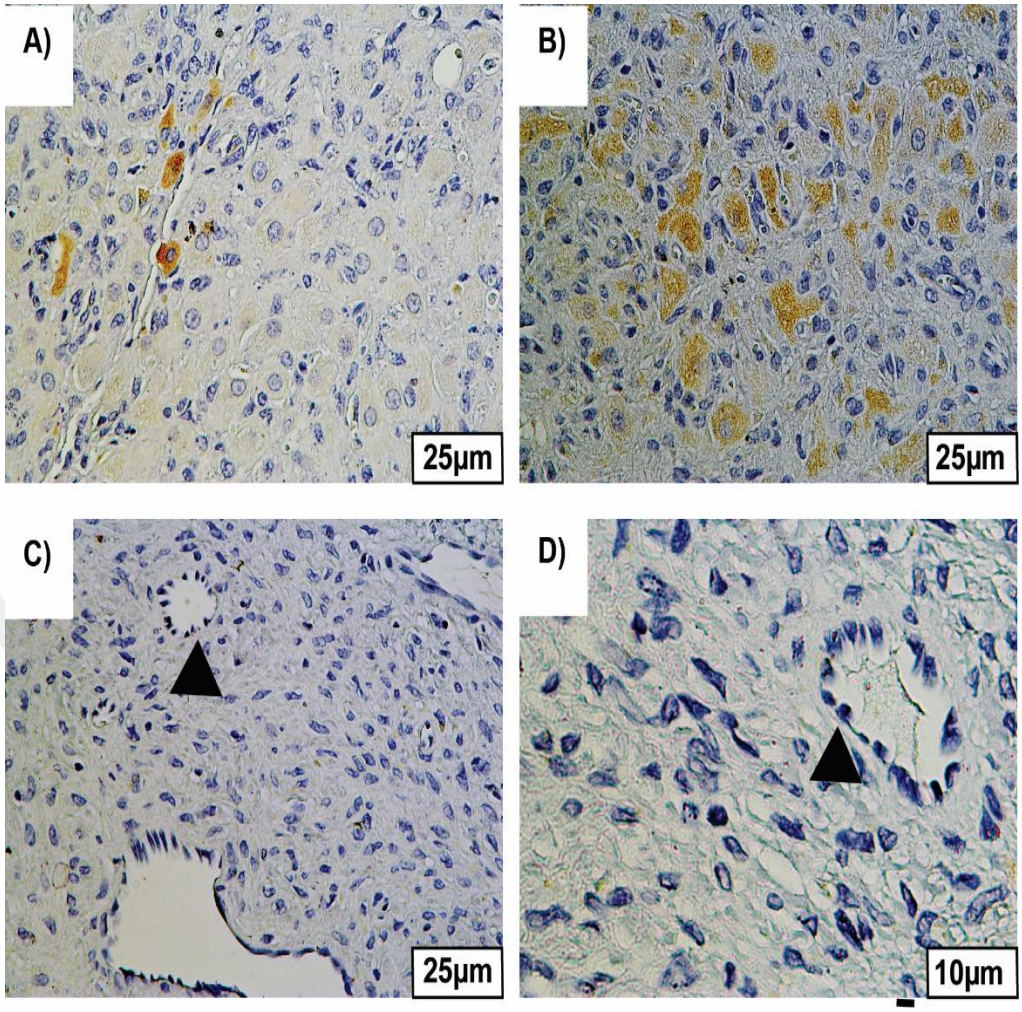
Resim 5. A: Östrus siklusunun 12. günü (C12) ile **B:** gebeliğin 12. gününde (P12) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL'unda PGRMC1 immunoreaktivitesi. **C,D:** Östrus siklusunun 22. gününde (C22) ovaryum üzerinde aktif progesteron üretmeyen koyun CL'unda PGRMC1 immunoreaktivitesi. Siyah ok başı: endotel hücre

5.2.3. mPRα proteini'nin koyun corpus luteum'unda hücre içi lokalizasyonu

Siklustaki ve gebe koyunlardan toplanan (her bir grup için n=4) CL örneklerinde mPRα proteininin hücresel lokalizasyonu incelenmiştir. mPRα proteininin CL hücrelerindeki lokalizasyonu Resim 6 ve Resim 7 gösterilmiştir. Buna göre mPRα proteininin hem büyük luteal hem de küçük luteal hücrelerinde lokalize olduğu görülmüştür (Resim 6 D). Dönemler arasındaki farklılık göz önünde bulundurulduğunda; C16 grubundan ziyade P16 grubunda belirgin bir mPRα immunoreaktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Resim 7A, B). Regrese olan ve artık aktif progesteron üretmeyen 22. gün gruplarında ise mPRα immunoreaktivitesine rastlanmamıştır (Resim 7C, D).



Resim 6. A, B, C, D: Gebeliğin 16. gününde (P16) ovaryum üzerinde aktif progesteron üreten koyun CL'unda mPRα immunoreaktivitesi. Mavi ok: büyük luteal hücre, Sarı ok: küçük luteal hücre

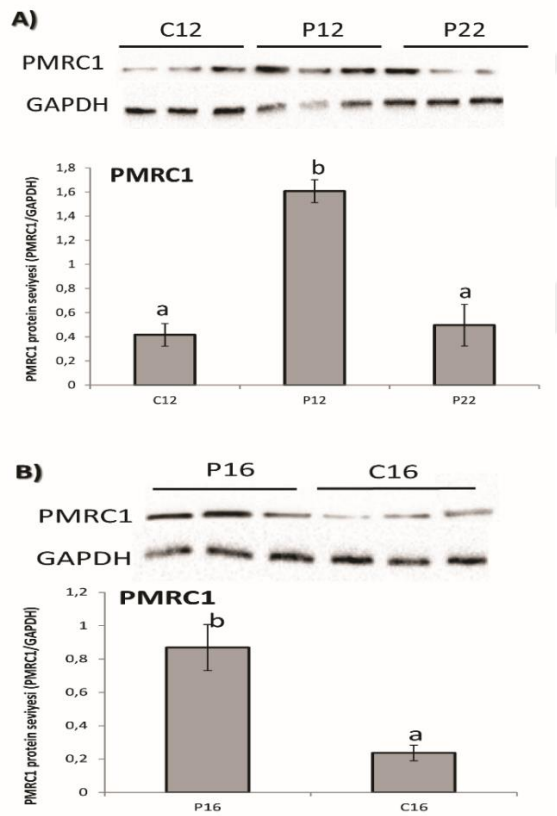


Resim 7. A: Östrus siklusunun 16. günü (C16) ile; B: gebeliğin 16. günündeki (P16) koyun CL'unda mPRα immunoreaktivitesi. C,D: Östrus siklusunun 22. günündeki (C22) ovaryum üzerinde aktif progesteron üretmeyen koyun CL'unda mPRα immunoreaktivitesi. Siyah ok başı: endotel hücre

5.3. Koyun corpus luteum'unda PGRMC1 ve mPRα'nın Western Blot yöntemi ile protein eskpresyon seviyesinin belirlenmesi

5.3.1. Koyun corpus luteum'unda PGRMC1 protein ekspresyon seviyesi

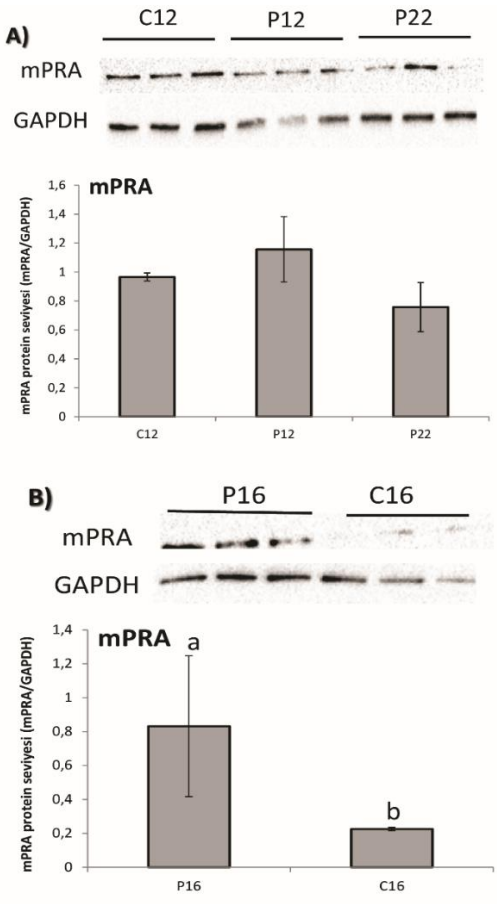
Siklustaki ve gebe koyunlardan toplanan (her bir grup için n=3) CL örneklerinde PGRMC1 protein ekspresyonu Western Blot yöntemi ile incelenmiştir. PGRMC1 proteininin (25 kA moleküler ağırlığı) CL'daki ekspresyon miktarı Resim 8A, B'de gösterilmiştir. Buna göre PGRMC1 protein ekspresyonunun C12 ile kıyaslandığında P12 grubunda önemli ölçüde arttığı yine benzer şekilde P16 ile kıyaslandığında C16 grubunda önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Resim 8A, B).



Resim 8A, B. Koyun CL doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) PGRMC1 proteinin housekeeping proteini olan GAPDH e göre değişim miktarı. Barlar üzerindeki farklı harfler (a, b) istatistiksel olarak gruplar arasındaki farkı ifade etmektedir. ($p<0,05$).

5.3.2. Koyun corpus luteum'unda mPRα protein ekspresyon seviyesi

Siklustaki ve gebe koyunlardan toplanan (her bir grup için n=3) CL örneklerinde mPRα protein ekspresyonu Western Blot yöntemi ile incelenmiştir. mPRα proteinin (25 kA moleküler ağırlığı) CL'daki ekspresyon miktarı Resim 9A, B'de gösterilmiştir. Buna göre mPRα protein ekspresyonunun sadece P16 ile kıyaslandığında C16'da önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Resim 9A, B).



Resim 9A, B. Koyun CL doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) mPRα proteinin housekeeping proteini olan GAPDH'e göre değişim miktarı. Barlar üzerindeki farklı harfler (a, b) istatistiksel olarak gruplar arasındaki farkı ifade etmektedir. ($p<0,05$).

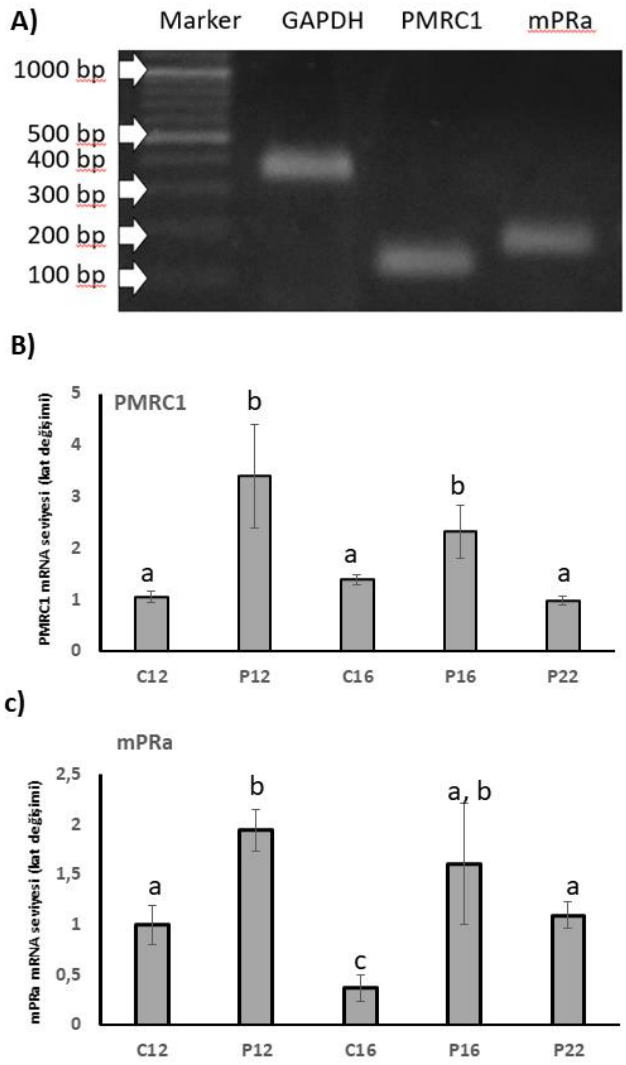
5.4. Koyun corpus luteum'unda PGRMC1 ve mPRa mRNA seviyelerinin Real-Time PCR (qRT-PCR) Methodu ile belirlenmesi

5.4.1 Koyun corpus luteum'unda PGRMC1 mRNA ekspresyonu

Siklustaki ve gebe koyunlardan toplanan (her bir grup için n=4) CL örneklerinde PGRMC1 mRNA ekspresyonu real-time PCR yöntemi ile incelenmiştir. PGRMC1 mRNA'sı kullanılarak elde edilen 120 bp PCR ürününün %2 lik agaroz jel resminde doğru yerde olduğu görüntülenmiştir (resim 10A). PGRMC1 mRNA'sının CL'daki ekspresyon miktarı Resim 10B gösterilmiştir. Buna göre PGRMC1 mRNA ekspresyonu diğer gruplar ile kıyaslandığında P12 ve P16 gruplarında artış gösterdiği tespit edilmiştir (Resim 10B).

5.4.2. Koyun corpus luteum'unda mPRα mRNA ekspresyonu

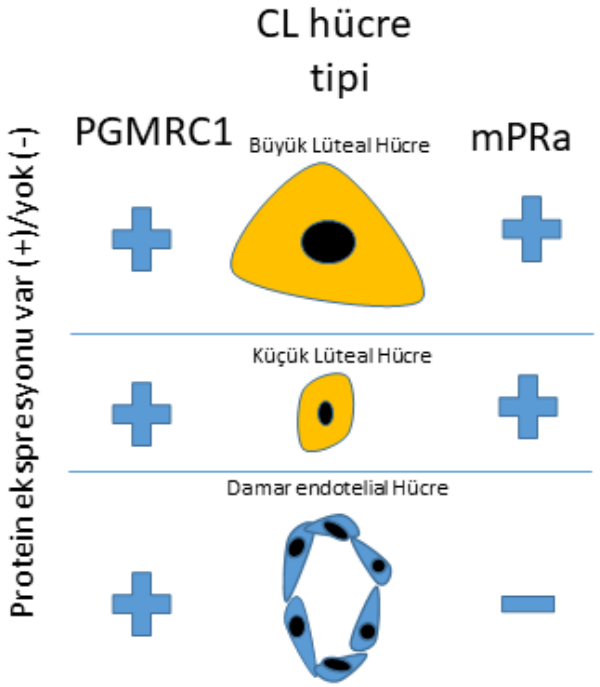
Siklustaki ve gebe koyunlardan toplanan (her bir grup için n=4) CL örneklerinde mPRα mRNA ekspresyonu real-time PCR yöntemi ile incelenmiştir. mPRα mRNA'sı kullanılarak elde edilen 159 bp PCR ürünü %2 lik agaroz jel resminde doğru yerde görüntülenmiştir (Resim 10A). mPRα mRNA'sının CL'daki ekspresyon miktarı Resim 10C gösterilmiştir. Buna göre mPRα mRNA ekspresyonunun sadece gebeliğin 12. gününde (P12) arttığı, siklusun 16. gününde (C16) ise diğer gruplar ile kıyaslandığında azaldığı tespit edilmiştir (Resim 10C).



Resim 10. A: Koyun CL ile PGRMC1, mPRα ve housekeeping gen olan GAPDH için %2 lik agaroz jelde yerlerini gösteren jel görüntüsü, B: PGRMC1 mRNA seviyesinin doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) GAPDH'e göre değişim miktarı. C: mPRα mRNA seviyesinin doku gruplarında (C12, P12, C16, P16, P22) GAPDH'e göre değişim miktarı. Barlar üzerindeki farklı harfler (a, b) istatistiksel olarak gruplar arasındaki farkı ifade etmektedir ($p<0,05$).

6. TARTIŞMA

Çalışmada; östrus siklusu ve erken gebelik boyunca, koyun CL yapısı içinde progesteron hormonunun non-genomik etkilerini düzenleyen, membran progesteron ailesine bağlı mPRα ve membranla ilişkili progesteron membran reseptör ailesine bağlı PGRMC1'in, immunohistokimya yöntemi ile CL içindeki hücresel lokalizasyonu, western blotting yöntemi ile CL'daki protein ekspresyon seviyesi ve qPCR yöntemi ile CL içindeki mRNA düzeyindeki ekspresyon profili incelenmiştir. Elde edilen bulgular aşağıdaki tablo ve şekillerde özetlenmiş ve kullanılan materyal, teknikler ve elde edilen bulgular sırası ile aşağıdaki gibi tartışılmıştır.



Şekil 11. Koyun Corpus Luteum yapısı içinde PGRMC1 ve mPRα proteinlerini ekprese eden hücre tiplerini gösteren şema. Var (+) yok (-)

Koyun CL yapısında en fazla damar endotel hücre, küçük luteal ve büyük luteal hücrelerin bulunduğu bilinmektedir (45, 47, 48). Sunulan çalışmada ışık mikroskobik ve TLR2 proteininin IF yöntemi kullanılarak boyanması sonucu CL'daki tüm hücre tipleri (damar endotel hücreleri, büyük ve küçük luteal hücreler) ve hücre

topluluklarının dağılımı görüntülenmiştir. Sunulan bu çalışmaya benzer olarak Atli ve ark. (57, 97) inek ve koyun CL yapısındaki tüm hücre tipleri tarafından TLR2 protein ve mRNA'sının eksprese edildiğini bildirmektedirler. Bu yönü ile sunulan tez çalışmasının büyük luteal, küçük luteal ve endotel hücre topluluklarının koyun CL içindeki lokalizasyon ve dağılımının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı söylenebilir.

Sunulan bu tez çalışmasında; IHK yöntemi ile mPRα ve PGRMC1 proteinlerinin koyun CL içindeki spesifik hücre lokalizasyonları siklus ve erken gebelik dönemleri içinde incelenmiştir (Şekil 10). IHK yöntemine ilave olarak, mPRα ve PGRMC1 protein ekspresyonlarının östrus siklusu ve/veya erken gebelik dönemi içerisindeki karşılaştırması amacıyla western blotting (WB) yöntemi kullanılmıştır. Doku içerisinde protein ekspresyon farklılıklarının gösterilmesi için en iyi yöntemlerden biri olarak WB yöntemi kabul edilmektedir (98). Bunun yanı sıra araştırılan mPRα ve PGRMC1'in mRNA düzeyindeki ekspresyon profili qPCR yöntemi ile de incelenmiştir. Özellikle henüz protein düzeyine yansımayan bazı değişimlerin mRNA düzeyinde tespit edilmesi hedeflenmiştir. Hücre içinde gen düzeyindeki değişimler özellikle anlık değişimlerin anlaşılması açısından önemli olup, mRNA düzeyinde artan ekspresyonların genelde protein düzeyine de yansıyabileceği bilinmektedir (99). Bu yönü ile birbirini destekleyen bu yöntemler (IHK, WB, ve qPCR) ile koyun CL yapısı içerisinde mPRα ve PGRMC1'in östrus siklusu ve erken gebelik dönemindeki ekspresyon biçiminin çok daha iyi anlaşılacağı söylenebilir. Sunulan bu tez çalışmasına benzer olarak inek ve sıçan CL yapısı içinde mPRα ve PGRMC1 ekspresyonunu aynı yöntemlerle araştırmışlardır (13, 74, 76).

Koyunlarda östrus siklusu içinde 1) 12. Gün; kan progesteron seviyesinin yüksek olduğu aktif bir CL yapısının olduğu gün, 2) 16. Gün; endometriyal kaynaklı $PGF2_{alfa}$ etkisi ile CL yapısının progesteron üretme fonksiyonunu kaybettiği ve fonksiyonel regresyonun tamamlandığı gün, 3) 22. Gün; CL yapısının tamamen yok olduğu geride sadece skar dokusunun kaldığı (corpus albicans) gün incelenmiştir (15). Böylelikle araştırılan non-genomik etkiye sahip PGRMC1 ve mPRα'nın östrus siklusu içinde, hem progesteron etkisi altındaki hem de progesteron etkisi altında olmayan

dönemlerdeki ekspresyon profili ve lokalizasyonu gösterilmiştir. Bu yönü ile sunulan tez çalışmasında PGRMC1 ve mPRα'nın östrüs siklusu içindeki rolleri progesteron varlığı veya yokluğunda çok daha iyi bir şekilde anlaşıldığı söylenebilir. Sunulan bu tez çalışmasına benzer şekilde Kowalik ve ark. (13, 76) inek CL yapısı içinde östrus siklsunun farklı dönemlerinde (yüksek progesteron, düşük progesteron) içerisinde non-genomik PR varlığını araştırarak progesteronun bu proteinler üzerine etkilerini araştırmışlardır.

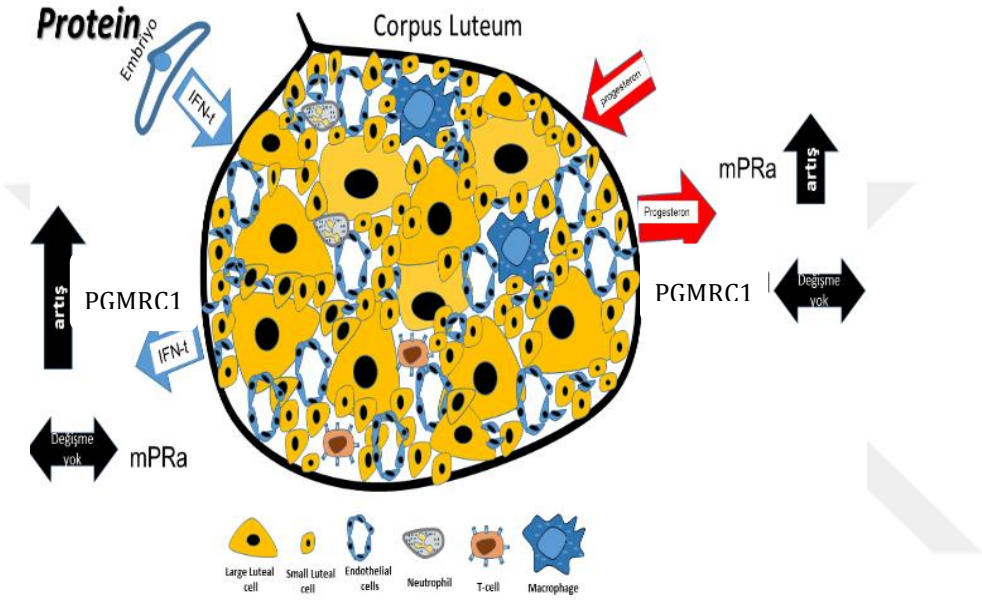
Çalışmamız için seçilen gebelik günleri östrus siklusu için karşılaştırmalı günler olup, erken gebeliğin önemli süreçlerini kapsayan günlerdir. Örneğin 1) gebeliğin 12. günü; embriyonun uterus içinde olmasına rağmen trofoblast hücrelerin henüz endometriyuma bağlanmadığı dönem (pre-implantasyon dönemi), 2) gebeliğin 16. günü; embriyonik trofoblast hücreleri ile uterus endometriyumu arasında invazyonun (bağlanmanın) şekillendiği dönem olan (implantasyon dönemi) 3) gebeliğin 22. günü; koyunlar için embriyo ile uterus arasında bağlanma/yapışmanın tamamlandığı (post-implantasyon) dönemi kapsar. Tüm bu gebelik günleri kanda yüksek progesteron bulunan ve aktif bir CL yapısının bulunduğu günlerdir (5, 23, 24, 26). Bu yönü ile sunulan tez çalışması gebelik ile ilgili tüm bu kritik aşamaların görüldüğü peri-implantasyon dönemidir. Bu dönemde gebeliğin anne tarafından tanınması için interferon-tau isimli bir lokal mediyatör embriyo tarafından üretilmektedir (31). Sunulan bu tez çalışması anılan bu kritik günleri içerdiğinden erken gebelikte embriyodan salınan interferon-tau'nında CL'da eksprese olan PGRMC1 ve mPRα üzerine olan etkilerin daha iyi anlaşıdığı söylenebilir (Şekil 11). Sunulan bu tez çalışmasına benzer olarak PGRMC1 ve 2 ile mPRα, mPRγ ve betanın erken gebelikte başta CL, endometriyum, oviduktta ineklerde tespit edildiği ifade edilmiştir (100-103) . Bunun dışında sıçanların erken gebe CL yapısında hem mPRα'nın hem de PGRMC1'in ekprese olduğu gösterilmiştir (74). Bu yönü ile araştırılan PGRMC1 ve mPRα'nın koyun CL yapısı içinde erken gebelik sırasında önemli roller üslendiği söylenebilir.

Daha önce sıçanlarda ve ineklerin CL yapısı içerisinde non-genomik PR ailesine ait reseptörlerin (PGRMC1 ve 2 ile mPRα, mPRβ, ve mPRγ) hem östrus siklusu hem de

gebelik sırasındaki ekspresyon profilleri detaylı bir şekilde araştırılmıştır (74, 76, 101, 103). Ayrıca koyun CL yapısı içerisinde sadece mPRα'nın östrus siklusu içinde yüksek seviyede eksprese olduğu luteolizis sırasında ise azaldığı gösterilmiştir (86, 88). Bu çalışma dışında koyun CL yapısı içinde hem östrus siklusu hem de erken gebelik döneminde literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönü ile sunulan bu tez çalışması en önemli non-genomik progesteron reseptörlerinden mPRα ve PGRMC1'in östrus siklusu ve gebeliğin kritik günlerinde ekspresyon profillerini hem protein hem de mRNA düzeyinde ayrıca CL'da içerisinde hücresel lokalizasyonlarını tanımlayan ilk çalışma olması yönüyle önemlidir.

Progesteron östrus siklusunun diöstrüs dönemi boyunca veya gebelik süresince üretilerek kana verilir ve hedef doku ve hücrelere kan yoluya ulaşır (14). Progesteron hormonu gebeliğin oluşması ve devam etmesinde ovulasyon oluşması, implantasyon, desidua hücrelerine dönüşüm, doğumun başlaması ve laktasyon sürecinde meme bezlerinin gelişimi ve süt sekresyonu için kiritk bir öneme sahiptir (104). Progesteron etkileri progesteron hormonun hücre çekirdeğindeki genomik reseptörleri (PRA ve B) ile hücre zarı üzerinde bulunan non-genomik PGRMC1 ve 2 ile mPRα, mPRβ ve mPRgama reseptörleri aracılığı ile yönetilmektedir (11, 61). Başta endometriyum olmak üzere (embriyonun yaşaması için gerekli salgılar), meme bezlerinde ve diğer birçok doku ve organda PR varlığı gösterilmiştir (105). Fakat CL'da üretilen progesteron'un sadece endokrin etkileri olmayıp, progesteron üreten hücreler üzerine de otokrin etkilerinin olduğu gösterilmiştir (106). Örneğin progesteron'un luteal hücreler üzerine anti-apoptotik etkilerin olduğu bilinmektedir (80). Yine *in vitro* olarak sentetik progesteron analoğu olan progestin R5020, luteal hücrelerden çok daha fazla progesteron üretimine neden olmaktadır. Ayrıca luteolizis sırasında artan ve progesteronun katabolizmasından sorumlu enzim 20-hydroxysteroid dehydrogenase'ın (20-HSD) progesteron tarafından luteal hücelerde inhibe edildiği saptanmıştır (72). Tüm bu etkiler CL içinde PR reseptörleri ile oluşabilir. Fakat farklı türlerde yapılan çalışmalar genomik PR'lerin aktif CL içerisinde varlığının oldukça zayıf veya hiç olmadığını göstermiştir (107). Bu yönü ile CL üzerine progesteronun yukarıda sayılan etkilerini non-genomik reseptörler yoluyla gösterdiği birçok çalışma ile tanımlanmıştır (74, 80, 103, 104, 106, 108). İneklerde ekpsreyon seviyesi CH

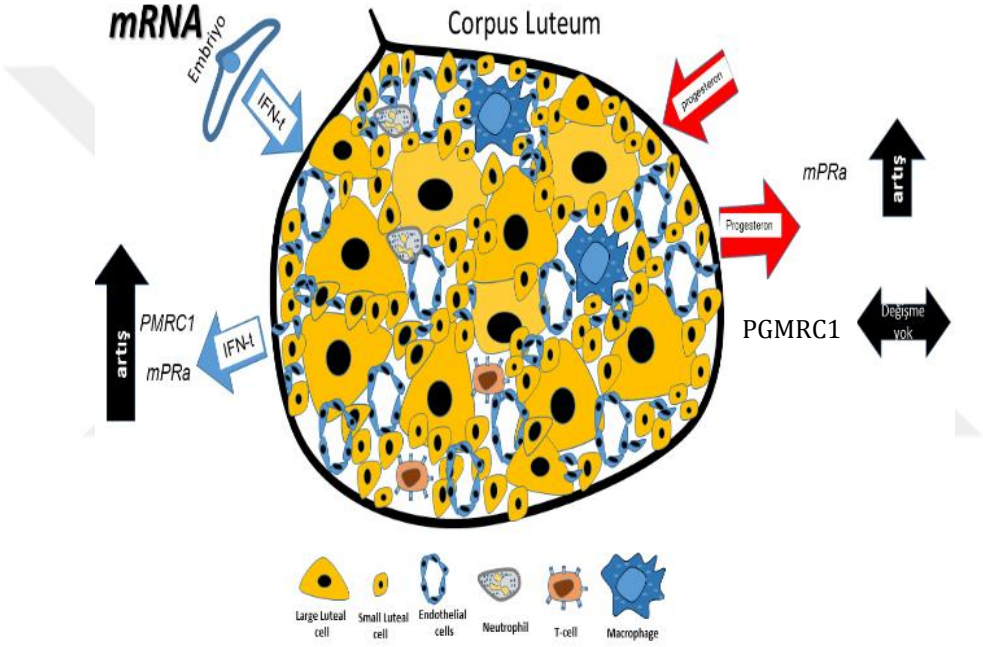
döneminde yüksek olan genomik PR'lerinin CL yapısı içinde ekspresyonlarının azalması yine bu durumu ile uyumludur (75). Bu yönü ile sunulan tez çalışmasında luteal ve endotelial hücrelerde yüksek ekspresyon profili tespit edilen PGRMC1 ve mPRα'nın CL'da progesteron salgılanmasının devam etmesi üzerine etkisi olduğu söylenebilir. Fonkisyonel luteolizisin görüldüğü C16'da her iki nongenomik progesteron reseptörünün (PGRMC1 ve mPRα'nın) azalması da bu durumu desteklemektedir.



Şekil 12. mPRα ve PGRMC1'in koyun CL yapısı içinde gebelik (IFN-tau etkisi) veya siklus esnasındaki (progesteron etkisi) değişimlere göre protein ekspresyon düzeyini gösteren şema

Özellikle progesteron hormonunun hızlı etkileri non genomik progesteron reseptörleri aracılığı ile düzenlenir (12, 73, 74, 90, 108, 109). Progesteronun bu etkilerinden en bilinenleri arasında; akrozom reaksiyonu, oosit maturasyonu, t-hücrelerde immun regülasyon, trombosit kümelenmesi, granuloza hücrelerinde anti-apoptosis, luteal hücrelerde steroidogenesis, beyin hücrelerinde nöroprotektif etki sayılabilir (80, 109-112). Bu tez çalışmasında CL hücrelerinde eksprese olan PGRMC1 ve mPRα'nın varlığı ve luteolizis sırasında ve sonrasında azalması ile (C16 ve C22 de) progesteron hormonunun CL üzerine anti-apoptotik etkisi olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Progesteron membran reseptörleri aktivitelerini direkt veya indirekt olarak uyardıkları sitoplazma içindeki protein kinazlar aracılığı ile (cAMP, Ca+2, PLC, MAP kinaz, ve PKC) göstermektedir. mPR'leri hücre zarında 7 membran geçişli bir motif sergilerken, PGRMC ailesi tek geçişli bir transmembran proteinidir (61, 70). Sunulan bu tez çalışmasında, çalışmalar ile uyumlu şekilde daha önceden CL içinde önemli roller üstlenenher iki tip non-genomik progesteron reseptörünün (mPRα ve PGRMC1) varlığı tespit edilmişitir.



Şekil 13. mPRα ve PGRMC1'in koyun CL yapısı içinde gebelik (IFN-tau etkisi) veya siklus esnasındaki (progesteron etkisi) değişimlere göre ekspresyon düzeyini mRNA düzeyinde gösteren şema

PGRMC1 ovulasyon öncesi folikülü oluşturan granuloza hücreleri içinde tespit edilmiştir (113, 114). Özellikle PGRMC1'nin gonadotropinler ile ekspresyon profili düzenlendiği ifade edilmektedir (12). Örneğin eCG uygulamasının granuloza hücrelerinde PGRMC1 ekpresyonunu önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir (12). Benzer şeklide erken gebelik sırasında siklustaki ekspresyon profili ile kıyaslandığında

embriyonik interferon-tau'nun salındığı dönemde PGRMC1 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Bu yönü ile eCG gibi embriyonik interferon-tau'nun da CL'da PGRMC1 ekspresyonunu arttırıcı etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) yaklaşık 25 ile 28 kDa arasında kısa bir transmembran protein olup sitoplazma içinde serpin mRNA binding protein 1 (SERBP1) isimli başka bir protein ile ilişkilidir (61). Özellikle CL hücrelerini progesteron etkisi ile apotozisten koruduğu ifade edilmiştir (68, 72, 74, 79, 90) Sunulan bu tez çalışmasında progesteron salgısının düştüğü C16 ile kıyaslandığında C12 de gözlenen yüksek düzeyde PGRMC1 ekspresyonu bu durumu desteklemektedir. Benzer şekilde inek CL yapısı içinde PGRMC1 'in luteal aktif progesteron üretildiği dönemde regresyon ile kıyaslandığında PGRMC1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptanmıştır (103). Sıçan CL yapısı içinde yine sunulan bu tez çalışması ile uyumlu progesteron yüksek olduğu zamanlarda PGRMC1 ekspresyonunun yüksek seyrettiği ifade edilmektedir (74). Tüm bu verilere bakıldığında PGRMC1'in CL yapsı içinde progesteron etkisi ile ekspresyon profilinin düzenlendiği söylenebilir. Protein ekspresyon profili ile uyumlu olarak erken gebelikte ve aktif progesteron üretilen dönemlerde PGRMC1 mRNA seviyesinin CL yapısında yüksek olması ineklerdeki bulgular ile uyumludur. Bu durum yine mRNA daki artışın protein seviyesine de yansıdığı şeklinde yorumlanabilir. İnek CL yapısı içinde PGRMC1'in hem luteal hücrelerde (büyük ve küçük) hem de endotel hücrelerde eksprese olduğu ifade edilmektedir (103). Bu data ile uyumlu bir şekilde sunulan bu tez çalışmasında da hem luteal hem de endotel koyun CL hücrelerinde IHK yöntemi ile PGRMC1'in eksprese edildiği saptanmıştır. Elde edilen bu veriler ışığında, yukarıda PGRMC1'in CL yapısı içinde gösterdiği bu fonksiyonların (anti-apoptotik, kolesterol metabolizması vb) tüm CL yapısını oluşturan hücrelerde meydana geldiği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca daha önceki çalışmalarda inek CL ve endometriyumundaki damar hücrelerinde PGRMC1 ekspresyonunun saptanması (13, 76, 100, 101) özellikle progesteron etkisi ile uterus ve CL'a olan kan akımı üzerine bu reseptörlerin etkileri olabileceği şeklinde düşünülebilir.

Gebelikteki PGRMC1 ekspresyonunun östrus siklusu ile kıyaslandığında çok daha yüksek olduğu, hem inek hem de sıçan CL çalışmalarında ifade edilmektedir (74, 76). CL yapısı yanında endometriyum, myometrium gibi uterus içi dokularda da PGRMC1'in gebelikte arttığı ifade edilmektedir (103). Bu yönü ile sunulan bu tez çalışmasında yukarıdaki çalışmalar ile uyumlu bir şekilde PGRMC1 ekspresyonu erken gebelik döneminde önemli ölçüde artmıştır. Özellikle artan PGRMC1 ekspresyonunun gebeliğin oluşması devam etmesi, myometrial kontrasiyonların azaltılması gibi gebelik üzerine kritik rollerinin olduğu ifade edilmektedir (103). Sunulan çalışmada bu bilgilere ek olarak özellikle kanda yüksek miktarda embriyonik INF-tau bulunduğu dönemlerde PGRMC1 ekspresyonunun olması erken gebelikte PGRMC1'in embriyonik salgılar ile de düzenlendiğine işaret etmektedir.

Non-genomik etkileri düzenleyen diğer progetesteron membran reseptörü ailesine ait en önemli proteinin mPRα olduğu bilinmektedir (108). Özelikle ovaryum ve CL içinde ekspresyonu tespit edilen ilk non-genomik progeteron reseptörü mPRα'dır (86, 88). Bu yönü ile sunulan bu tez çalışmasında mPRα'nın östrus siklusu ve erken gebelikte CL yapısı içinde karakterize edilmiştir. CL içersinde mPRα'nın östrus siklusu'u içinde inek corpus luteum yapısı içinde sadece CL yapısının gerilediği regresyon döneminde (progesteron etkisinin ortadan kaldığı) azaldığı ifade edilmiştir (101). Gebelik sürecinde ise mPRα ekspresyonunun östrus siklusu günlerinden farklı olmadığı ifade edilmektedir (101). Bu çalışma ile benzer olarak sunulan tez çalışmasında mPRα ekpresyonu C16'da önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Gebelikte ise önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Erken gebelikte mRNA düzeyinde artış olmasına rağmen bu artış protein seviyesine yansımamıştır. Bu durum mRNA ekspresyonunun her zaman aktif protein ekspresyonu profiline yansımayacağı görüşü ile açıklanabilir (115). Sunulan bu tez çalışmasında mPRα'nın sadece luteal hücrelerde eksprese olduğu saptanmıştır. Fakat Kovalik ve ark. (101) inek CL yapısı içinde hem luteal hem de endotel hücrelerde mPRα ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Sıçan CL yapısı içinde ise mPRα'nın sunulan bu tez çalışması ile benzer olarak luteal hücrelerde eksprese olduğu ifade edilmektedir (74). Sunulan bu çalışma ile inek CL'daki endotel hücrelerde mPRα yönündeki ekspresyon farklılıklarının kullanılan antikorun spesifitesi veya hayvan farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sunulan bu tez projesinde mPRα ve PGRMC1 (en önemli iki non-genomik progesteron reseptörü) östrus döngüsü ve erken gebelikte araştırılmıştır. Fakat gerek bütçe yetersizliği ve gerekse hayvan materyalindeki çeşitli kısıtlamalardan dolayı projenin tespit edilen bazı eksik yönleri maddeler halinde özetlenmiştir. 1) Bu non-genomik progesteron reseptör ailelerine ait diğer progesteron reseptörleri PGRMC2, mPRβ, ve mPRγ ekspresyon profilleri halen bilenmemektir. 2) PGF_{2alfa} uygulaması sonrası luteolizis sırasındaki bu reseptörlerin ekspresyon profillerinin ortaya konması özellikle fonksiyonel luteolizis sırasında bu reseptörlerin rollerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. 3) Diğer yandan günümüzde temin edilebilen reseptörlerin bloklanma çalışmaları ile bu reseptörlerin CL yapısı içindeki rollerin çok daha iyi anlaşılabileceği söylenebilir.

7. SONUÇ VE ÖNERİ

Östrus siklusu ve erken gebelik boyunca CL yapısı içinde non-genomik mPRα ve PGRMC1'in lokalizasyonu, protein ve mRNA ekspresyon profili ilk defa koyunlarda ortaya konmuştur. mPRα'nın sadece sterogenik hücrelerde eksprese olmasına rağmen PGRMC1'in hem sterojenik hem de sterojenik olmayan endotel hücrelerde eksprese olması CL yapısı içindeki hücreler üzerine her iki reseptöründe fonksiyonel rolleri olduğuna işaret etmektedir. Elde edilen veriler incelendiğinde mPRα ve PGRMC1'in progesteron etkisi altında olmayan C16 ve C22'de lokalizasyon ve ekspresyonlarının önemli ölçüde azalması bu iki reseptöründe CL yapısının yaşaması için rolleri olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Erken gebelikteki ekspresyon profiline bakıldığında C12 (progesteron etkisi altında) P12 ve P16'da daha yüksek miktarda eksprese olan PGRMC1'in gebeliğe bağlı faktörler ile de (interferon-tau gibi) düzenlendiği söylenebilir.

Sonuç olarak hem östrus siklusu hem de gebelik içinde araştırılan mPRα ve PGRMC1'in artan ve/veya azalan şeklinde bir profil sergilemesi her iki reseptörün de progesteronun CL içindeki fonksiyonlarının düzenlemesinde roller üstlendiği sonucuna varılabilir. Bu konudaki eksikliklerin anlaşılabilmesi için tüm gebelik ve östrus siklusu içinde fonksiyonel luteolizisin görüldüğü dönemlerde bu reseptörlerin araştırılacağı daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Anonim. https://www.esk.gov.tr/tr/13886/TUIK-Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2019. 2019.

2. Arıtürk E, Akçapınar H, Aydoğan M. Karayaka koyun ırkının saf yetiştirme ve melezleme ile ıslahı. Doğa Bilim Dergisi. 1985;9:21-6.

3. Koyuncu M, Duru S. Karacabey Merinosu koyunlarda gebelik süresine bazı çevre faktörlerinin etkisi. Uludağ Üniv Zir Fak Derg. 2003;17(2):137-43.

4. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Şirvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Medipress, Malatya-Türkiye. 2012:469-506.

5. Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. Journal of animal science. 2013;91(4):1627-38.

6. Dorniak P, Welsh TH, Jr., Bazer FW, Spencer TE. Cortisol and interferon tau regulation of endometrial function and conceptus development in female sheep. Endocrinology. 2013;154(2):931-41.

7. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. Physiological reviews. 1999;79(2):263-323.

8. Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Krause E, et al. Progesterone, estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic cat, Iberian lynx (Lynx pardinus) and Eurasian lynx (Lynx lynx). Theriogenology. 2016;86(9):2107-18.

9. Maybin JA, Duncan WC. The human corpus luteum: which cells have progesterone receptors? Reproduction. 2004;128(4):423-31.

10. Tamane R, Pilmane M, Jemeljanovs A, Dabuzinskiene A. Expression of progesterone receptors in bovine corpus luteum during pregnancy. Medicina (Kaunas). 2004;40(5):459-66.

11. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue-selective actions of progesterone receptors. Ernst Schering Res Found Workshop. 2005(52):19-37.

12. Peluso JJ. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. Biology of reproduction. 2006;75(1):2-8.

13. Kowalik MK, Dobrzyn K, Rekawiecki R, Kotwica J. Expression of membrane progestin receptors (mPRs) α, β and γ in the bovine uterus during the oestrous cycle and pregnancy. Theriogenology. 2019;140:171-9.

14. Meidan R. The life cycle of the corpus luteum: Springer; 2016.

15. Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL. Reproductive cycles in sheep. Animal reproduction science. 2011;124(3-4):259-68.

16. Rosa H, Bryant M. Seasonality of reproduction in sheep. Small Ruminant Res. 2003;48(3):155-71.

17. Hunter M. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. J Reprod Fertil. 1991;43:91-9.

18. Rawlings NC, Bartelewski PM. Clinical reproductive physiology of ewes. Current therapy in large animal theriogenology: Elsevier; 2007. p. 642-9.

19. Goodman R. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. The physiology of reproduction. 1994:659-710.

20. Rawlings N, Cook S. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. Animal reproduction science. 1993;30(4):289-99.

21. Bartlewski P, Beard A, Cook S, Chandolia R, Honaramooz A, Rawlings N. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. Reproduction. 1999;115(1):111-24.

22. Parr R. Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep. Reproduction, Fertility and Development. 1992;4(3):297-300.

23. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Reprod Biol Endocrin. 2004;2(1):49.

24. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. Biology of reproduction. 2004;71(1):2-10.

25. Nagaoka K, Yamaguchi H, Aida H, Yoshioka K, Takahashi M, Christenson R, et al. Implantation in ruminants: changes in pre-implantation, maternal recognition of pregnancy, control of attachment and invasion. Asian Austral J Anim. 2000;13(6):845-55.

26. Bazer FW, Kim J, Song G, Ka H, Tekwe CD, Wu G. Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development. Annals of the New York Academy of Sciences. 2012;1271(1):88.

27. Bazer FW, Wu G, Johnson GA, Kim J, Song G. Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. Biology of reproduction. 2011;85(6):1094-107.

28. Kiyma Z, Kose M, Atli MO, Ozel C, Hitit M, Sen G, et al. Investigation of interferon-tau stimulated genes (ISGs) simultaneously in the endometrium, corpus luteum (CL) and peripheral blood leukocytes (PBLs) in the preluteolytic stage of early pregnancy in ewes. Small Ruminant Res. 2016;140:1-6.

29. Kose M, Kaya MS, Aydilek N, Kucukaslan I, Bayril T, Bademkiran S, et al. Expression profile of interferon tau-stimulated genes in ovine peripheral blood leukocytes during embryonic death. Theriogenology. 2016;85(6):1161-6.

30. Kiyma Z, Kose M, Kaya MS, Atli MO. Early and efficient pregnancy diagnosis in ewes: expression profile of ISG15 mRNA in peripheral blood leucocytes compared to transrectal ultrasonography. Indian J Anim Sci. 2017;87(1):49-52.

31. Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. American Journal of Reproductive Immunology. 1997;37(6):412-20.

32. Wiltbank M, Salih S, Atli M, Luo W, Bormann C, Ottobre J, et al. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. Animal reproduction/Colegio Brasileiro de Reproducao Animal. 2012;9(3):242.

33. Mann G, Payne J, Lamming G. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F2α secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. Domestic animal endocrinology. 2001;21(2):127-41.

34. Alila H, Hansel W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. Biology of reproduction. 1984;31(5):1015-25.

35. Farin C, Moeller C, Sawyer H, Gamboni F, Niswender G. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. Biology of reproduction. 1986;35(5):1299-308.

36. Luck M, Zhao Y. Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. Reproduction. 1993;99(2):647-52.

37. Curry Jr TE, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. Endocrine reviews. 2003;24(4):428-65.

38. Christenson LK, Stouffer RL. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. Endocrinology. 1996;137(1):367-74.

39. Schams D, Amselgruber W, Einspanier R, Sinowatz F, Gospodarowicz D. Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. Endocrine. 1994.

40. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 2000;407(6801):242-8.

41. Smith M, McIntush E, Smith G. Mechanisms associated with corpus luteum development. Journal of animal science. 1994;72(7):1857-72.

42. Voss A, Fortune J. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. Endocrinology. 1993;132(5):2239-45.

43. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions. Inc Pullman, WA. 2003:144.

44. Pate JL, Keyes PL. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? REPRODUCTION-CAMBRIDGE-. 2001;122(5):665-76.

45. Rodgers R, O'shea J, Bruce N. Morphometric analysis of the cellular composition of the ovine corpus luteum. Journal of anatomy. 1984;138(Pt 4):757.

46. Brannian JD, Stouffer RL, Shiigi SM, Hoyer PB. Isolation of ovine luteal cell subpopulations by flow cytometry. Biology of reproduction. 1993;48(3):495-502.

47. O'shea J, Rodgers R, D'occhio M. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. Reproduction. 1989;85(2):483-7.

48. Wiltbank MC. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. Journal of animal science. 1994;72(7):1873-83.

49. Niswender G, Juengel J, McGuire W, Belfiore C, Wiltbank M. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. Biology of reproduction. 1994;50(2):239-47.

50. Fitz T, Mayan M, Sawyer H, Niswender G. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. Biology of reproduction. 1982;27(3):703-11.

51. Grummer R, Carroll D. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. Journal of animal science. 1988;66(12):3160-73.

52. Wiltbank M, Belfiore C, Niswender G. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. Molecular and cellular endocrinology. 1993;97(1-2):1-7.

53. Kuru M, Kükürt A, Oral H, Öğün M. Clinical use of progesterone and its relation to oxidative stress in ruminants. Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases. 2018:303-27.

54. Dharmarajan A, Bruce N, Meyer G. Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. American journal of anatomy. 1985;172(1):87-99.

55. Miyamoto A, Shirasuna K, Shimizu T, Bollwein H, Schams D. Regulation of corpus luteum development and maintenance: specific roles of angiogenesis and action of prostaglandin F2alpha. 2010.

56. Fraser HM, Duncan WC. SRB Reproduction, Fertility and Development Award Lecture 2008. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. Reproduction, Fertility and Development. 2009;21(3):377-92.

57. Atli MO, Kose M, Hitit M, Kaya MS, Bozkaya F. Expression patterns of Toll-like receptors in the ovine corpus luteum during the early pregnancy and prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis. Theriogenology. 2018;111:25-33.

58. Wiltbank J, Casida L. Alteration of ovarian activity by hysterectomy. Journal of animal science. 1956;15(1):134-40.

59. Atli MO, Bender RW, Mehta V, Bastos MR, Luo W, Vezina CM, et al. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. Biology of reproduction. 2012;86(4):130.

60. Wiltbank MC, Mezera MA, Toledo MZ, Drum JN, Baez GM, García-Guerra A, et al. Physiological mechanisms involved in maintaining the corpus luteum during the first two months of pregnancy. Animal Reproduction (AR). 2018;15(Supplement 1):805-21.

61. Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. Steroid Hormone Receptors in the Corpus Luteum. The Life Cycle of the Corpus Luteum: Springer; 2017. p. 79-97.

62. Misrahi M, Venencie P-Y, Saugier-Veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. Structure of the human progesterone receptor gene. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. 1993;1216(2):289-92.

63. Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(52):32889-900.

64. Cheung J, Smith DF. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. Molecular Endocrinology. 2000;14(7):939-46.

65. Misao R, Nakanishi Y, Iwagaki S, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of progesterone receptor isoforms in corpora lutea of human subjects: correlation with serum oestrogen and progesterone concentrations. Molecular human reproduction. 1998;4(11):1045-52.

66. Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. Cloning and expression of progesterone receptor isoforms A and B in bovine corpus luteum. Reproduction, Fertility and Development. 2015;27(7):1029-37.

67. Auletta F, Kelm L, Schofield M. Responsiveness of the corpus luteum of the rhesus monkey (Macaca mulatta) to gonadotrophin in vitro during spontaneous and prostaglandin F2α-induced luteolysis. Reproduction. 1995;103(1):107-13.

68. Lösel RM, Besong D, Peluso JJ, Wehling M. Progesterone receptor membrane component 1—many tasks for a versatile protein. Steroids. 2008;73(9-10):929-34.

69. Gellersen B, Fernandes M, Brosens J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. Human reproduction update. 2009;15(1):119-38.

70. Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, Schwertfeger KL, Lange CA. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. Steroids. 2011;76(1-2):11-7.

71. Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. Biochem Bioph Res Co. 1996;229(1):86-9.

72. Peluso JJ, Liu X, Gawkowska A, Johnston-MacAnanny E. Progesterone activates a progesterone receptor membrane component 1-dependent mechanism that promotes human granulosa/luteal cell survival but not progesterone secretion. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2009;94(7):2644-9.

73. Sasson R, Rimon E, Dantes A, Cohen T, Shinder V, Land-Bracha A, et al. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases. MHR: Basic science of reproductive medicine. 2004;10(5):299-311.

74. Cai Z, Stocco C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. Endocrinology. 2005;146(12):5522-32.

75. Luciano A, Corbani D, Lodde V, Tessaro I, Franciosi F, Peluso J, et al. Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. European journal of histochemistry: EJH. 2011;55(3).

76. Kowalik MK, Rekawiecki R, Kotwica J. Expression and localization of progesterone receptor membrane component 1 and 2 and serpine mRNA binding protein 1 in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. Theriogenology. 2014;82(8):1086-93.

77. Rohe HJ, Ahmed IS, Twist KE, Craven RJ. PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. Pharmacology & therapeutics. 2009;121(1):14-9.

78. Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, Ceciliani F, Peluso JJ. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. Reproduction. 2010;140(5):663.

79. Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. Endocrinology. 2008;149(2):534-43.

80. Peluso JJ, Liu X, Gawkowska A, Lodde V, Wu CA. Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression. Molecular and cellular endocrinology. 2010;320(1-2):153-61.

81. Wendler A, Wehling M. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. Steroids. 2013;78(6):555-8.

82. Keator CS, Mah K, Slayden OD. Alterations in progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) in the endometrium of macaques afflicted with advanced endometriosis. MHR: Basic science of reproductive medicine. 2012;18(6):308-19.

83. Saint-Dizier M, Sandra O, Ployart S, Chebrout M, Constant F. Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. Reprod Biol Endocrin. 2012;10(1):76.

84. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(5):2237-42.

85. Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, et al. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. Molecular Endocrinology. 2006;20(7):1519-34.

86. Ashley R, Clay C, Farmerie T, Niswender G, Nett T. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. Endocrinology. 2006;147(9):4151-9.

87. Fernandes M, Pierron V, Michalovich D, Astle S, Thornton S, Peltoketo H, et al. Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. Journal of Endocrinology. 2005;187(1):89-102.

88. Ashley RL, Arreguin-Arevalo JA, Nett TM. Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle. Reprod Biol Endocrin. 2009;7(1):42.

89. Qiu H, Lu S, Ji K, Song X, Lu Y, Zhang M, et al. Membrane progestin receptor beta (mPR-β): A protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus–oocyte complexes. Steroids. 2008;73(14):1416-23.

90. Engmann L, Losel R, Wehling M, Peluso JJ. Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2006;91(12):4962-8.

91. Bogacki M, Silvia W, Rekawiecki R, Kotwica J. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2α from bovine endometrial tissue. Biology of reproduction. 2002;67(1):184-8.

92. Mlynarczuk J, Sasiadek J, Kotwica J. Non-genomic action of progesterone in cultured bovine luteal and endometrial epithelial cells. Bull Vet Inst Pulawy. 2005;49(2):193-8.

93. Min L, Takemori H, Nonaka Y, Katoh Y, Doi J, Horike N, et al. Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis. Molecular and cellular endocrinology. 2004;215(1-2):143-8.

94. Albrecht C, Huck V, Wehling M, Wendler A. In vitro inhibition of SKOV-3 cell migration as a distinctive feature of progesterone receptor membrane component type 2 versus type 1. Steroids. 2012;77(14):1543-50.

95. Hughes AL, Powell DW, Bard M, Eckstein J, Barbuch R, Link AJ, et al. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. Cell metabolism. 2007;5(2):143-9.

96. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001;25(4):402-8.

97. Atli MO, Kose M, Kaya MS, Aydilek N, Guzeloglu A, Wiltbank MC. Toll-like receptor 2 and 4 expression in the bovine corpus luteum during the different stages of the estrous cycle. Animal Reproduction. 2017;14:1270-7.

98. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. Expert review of proteomics. 2014;11(5):549-60.

99. Tevfik Dorak M. Real-time PCR. Tailor & Francis Group. 2006;1:1-143.

100. Kowalik MK, Martyniak M, Rekawiecki R, Kotwica J. Expression and immunolocalization of membrane progesterone receptors in the bovine oviduct. Domestic animal endocrinology. 2016;55:83-96.

101. Kowalik MK, Rekawiecki R, Kotwica J. Expression of membrane progestin receptors (mPRs) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and first trimester of pregnancy. Domestic animal endocrinology. 2018;63:69-76.

102. Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. The expression of progesterone receptor coregulators mRNA and protein in corpus luteum and endometrium of cows during the estrous cycle. Animal reproduction science. 2017;183:102-9.

103. Kowalik MK, Slonina D, Rekawiecki R, Kotwica J. Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. Reproductive biology. 2013;13(1):15-23.

104. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Demayo F, Lydon JP, O Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. Recent progress in hormone research. 2002;57:339-56.

105. Atkins DT, Kraemer D, Harms P, Fleeger J. Progesterone-receptor complex in the nuclear fraction of the bovine endometrium. Biology of reproduction. 1980;23(2):317-23.

106. Rueda BR, Hendry IR, Hendry III WJ, Stormshak F, Slayden O, Davis JS. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. Biology of reproduction. 2000;62(2):269-76.

107. Park-Sarge O, Parmer T, Gu Y, Gibori G. Does the rat corpus luteum express the progesterone receptor gene? Endocrinology. 1995;136(4):1537-43.

108. Thomas P. Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. Front Neuroendocrinol. 2008;29(2):292-312.

109. Ndiaye K, Poole DH, Walusimbi S, Cannon MJ, Toyokawa K, Maalouf SW, et al. Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. Journal of reproductive immunology. 2012;95(1-2):15-26.

110. Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi E. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. Steroids. 2004;69(8-9):553-9.

111. Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S, Pfaff DW. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(23):12816-21.

112. Thomas P, Zhu Y, Pace M. Progestin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. Steroids. 2002;67(6):511-7.

113. McRae R, Johnston H, Mihm M, O'shaughnessy P. Changes in mouse granulosa cell gene expression during early luteinization. Endocrinology. 2005;146(1):309-17.

114. Jiang H, Whitworth KM, Bivens NJ, Ries JE, Woods RJ, Forrester LJ, et al. Large-scale generation and analysis of expressed sequence tags from porcine ovary. Biology of reproduction. 2004;71(6):1991-2002.

115. Battle A, Khan Z, Wang SH, Mitrano A, Ford MJ, Pritchard JK, et al. Impact of regulatory variation from RNA to protein. Science. 2015;347(6222):664-7.

9. ÖZGEÇMİŞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Adı	M. Osman	**Soyadı**	ATLI
Doğum Yeri	URFA	**Doğum Tarihi**	1979
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	**Tel**	8660
E-posta	moatli@dicle.edu.tr		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora 2	D. Ü. Sağlık Bil. Enst. Vet. Histoloji ve Embriyoloji AB	
Doktora	Selcuk Üniversitesi Sağlık Bil. Enst. Doğum ve Jinekoloji AB	2009
Y. Lisans	H. Ü. Sağlık Bil. Enst. Doğum ve Jinekoloji AB	2005
Lisans	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2001
Lise	Davut Zeki Akpınar Lisesi	1995

İŞ DENEYİMİ

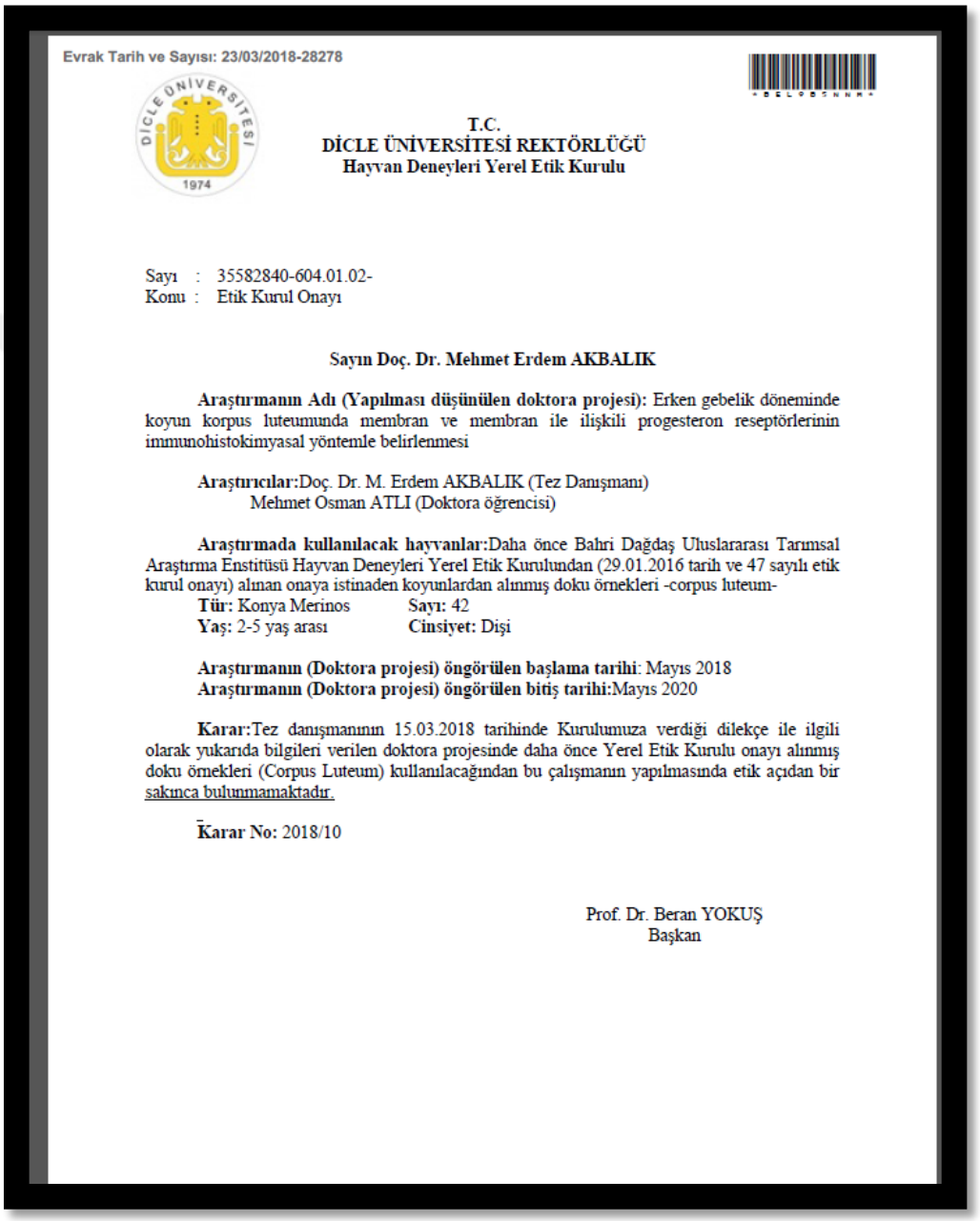
Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
Doç Dr	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2013- Halen
Doktora Sonrası Araştırmacı	University of Wisconsin, Dept of Dairy Science	2010- 2011
Yard. Doç.Dr	Dicle Üniversitesi Veterine Fakültesi	2009- 2013
Ziyaretçi Araştırmacı	University of Florida, Collage of Vet Med	2006-2007
TUBİTAK Doktora Eğitim Burslusu	Selcuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2006-2009

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
85								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,95	X	X
(Diğer) Puanı			

10. EKLER

EK-1. Etik Kurul Karar Belgesi



Evrak Tarih ve Sayısı: 23/03/2018-28278

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 35582840-604.01.02-
Konu : Etik Kurul Onayı

Sayın Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK

Araştırmanın Adı (Yapılması düşünülen doktora projesi): Erken gebelik döneminde koyun korpus luteumunda membran ve membran ile ilişkili progesteron reseptörlerinin immunohistokimyasal yöntemle belirlenmesi

Araştırıcılar: Doç. Dr. M. Erdem AKBALIK (Tez Danışmanı)
Mehmet Osman ATLI (Doktora öğrencisi)

Araştırmada kullanılacak hayvanlar: Daha önce Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (29.01.2016 tarih ve 47 sayılı etik kurul onayı) alınan onaya istinaden koyunlardan alınmış doku örnekleri -corpus luteum-
Tür: Konya Merinos **Sayı:** 42
Yaş: 2-5 yaş arası **Cinsiyet:** Dişi

Araştırmanın (Doktora projesi) öngörülen başlama tarihi: Mayıs 2018
Araştırmanın (Doktora projesi) öngörülen bitiş tarihi: Mayıs 2020

Karar: Tez danışmanının 15.03.2018 tarihinde Kurulumuza verdiği dilekçe ile ilgili olarak yukarıda bilgileri verilen doktora projesinde daha önce Yerel Etik Kurulu onayı alınmış doku örnekleri (Corpus Luteum) kullanılacağından bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Karar No: 2018/10

Prof. Dr. Beran YOKUŞ
Başkan

EK-2. Yayımlanan Makale Bilgisi

Son 5 yılda yayınlanan makalesinden seçilmiş bir yayının kapak sayfası bilgisi



Theriogenology 111 (2018) 25–33

Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Expression patterns of Toll-like receptors in the ovine corpus luteum during the early pregnancy and prostaglandin F2α-induced luteolysis

Mehmet O. Atli [a, *], Mehmet Kose [a], Mustafa Hitit [b], M. Salih Kaya [c], Faruk Bozkaya [d]

[a] Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey
[b] Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Kastamonu University, Kastamonu, Turkey
[c] Department of Physiology, Faculty of Medicine, Yildirim Beyazit University, Ankara, Turkey
[d] Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, SanliUrfa, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 September 2017
Received in revised form
9 January 2018
Accepted 10 January 2018
Available online 11 January 2018

Keywords:
Toll-like receptors
Corpus luteum
Ovine

ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate the expression profiles of Toll-like receptors (TLRs) in the ovine corpus luteum (CL) during early pregnancy and prostaglandin F2α (PGF2α)-induced luteolysis. For this purpose, multiparous Anatolian Merino ewes were selected and randomly allotted into cyclic (including those in the induced luteolysis group, n = 20) and pregnant (n = 12) groups. All of the ewes were scheduled to be slaughtered for predetermined days/hour during the estrous cycle, early pregnancy, and PGF2α induced luteolysis. The CLs were collected from both cyclic and pregnant ewes on days 12 (C12 and P12; n = 8) and 16 (C16 and P16; n = 8) and pregnant ewes on day 22 (P22; n = 4). For the induced luteolysis model, ewes were injected with PGF2α on day 12 of the estrous cycle and CLs were collected at 1 h (PG1h; n = 4), 4 h (PG4h; n = 4), and 16 h (PG16h, n = 4) after injection. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to evaluate the expression profiles of *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR8*, and *TLR10*, while free-floating in situ hybridization and immunohistochemistry were used to define the spatial localization of TLR2, TLR4, and TLR7 in the CL. Data were then analyzed by one-way ANOVA and were considered statistically significant when P values were lower than 0.05. Expression of *TLR2* was upregulated in both early and late stages of luteolysis ($P < .05$). An upregulation of *TLR4* was detected at PG16h, while *TLR6* was decreased at PG4h ($P < .05$). Expression of *TLR7* and *TLR8* was significantly increased during early pregnancy, at both PG16h and regressed groups (C16, $P < .05$). In contrast, *TLR10* was downregulated during PGF2α-induced luteolysis and on P16 ($P < .05$). TLR4 and TLR7 proteins were particularly localized in endothelial cells on C12/PG0h, but prominent signals corresponding to TLR4 and TLR7 were detected in luteal cells at PG16h. The results suggest an involvement of TLRs in the luteolytic mechanism in ovine CL, as indicated by differential expression levels of TLRs during PGF2α-induced luteolysis. Moreover, the present study indicates that early pregnancy-mediated changes in TLR expression in the CL may contribute to the establishment and maintenance of ovine pregnancy.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In many species, including ruminants, progesterone released from the corpus luteum (CL) during early pregnancy regulates vital functions in the uterus, such as endometrial nutrient secretion and immune modulation of the endometrium for the developing embryo [1,2]. If pregnancy occurs, the CL is protected from luteolytic prostaglandin F2α (PGF2α) pulses by embryonic interferon-τ (IFN-τ) [3,4]. If an animal is mated, but pregnancy does not occur, the CL needs to regress to allow for a new fertile estrous cycle. The regression of the CL in ruminants is initiated by the rhythmic release of PGF2α in high concentrations from the non-pregnant uterus [5,6]. The CL is composed of multiple cell types, including steroidogenic cells (large and small luteal cells) and non-steroidogenic cells (endothelial cells, pericytes, fibrocytes, and immune cells) [7,8]. Due to the heterogeneous structure of the CL, understanding the communication among the various cells during luteolysis is still an ongoing field of research. For example, immune cells in the CL were previously thought to play a phagocytic role following luteolysis [9], the immune cell population and

* Corresponding author. Department of OBGYN, Faculty of Veterinary Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey.
E-mail addresses: moatli@hotmail.com, moatli@dicle.edu.tr (M.O. Atli).

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.010
0093-691X/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

11.TEZ SAVUNABİLİRLİK VE ORJİNALLİK BEYAN FORMU

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ SAVUNABİLİRLİK VE ORJİNALLİK BEYAN FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Mehmet Osman ATLI
ÖĞRENCİ NO	14870001
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2019-2020
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI/BİLİM DALI	Veteriner Histoloji ve Embriyoloji
PROGRAM	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora
TEZ BAŞLIĞI	Erken Gebelik Döneminde Koyun Korpus Luteumunda Membran ve Membran ile İlişkili Progesteron Reseptörlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemle Belirlenmesi
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	63
BENZERLİK ORANI	% 7
RAPORLAMA TARİHİ	13/07/2020

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 13/07/2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir. Uygulanan filtrelemeler:

- ☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
- ☒ Kaynakça hariç
- ☐ Alıntılar hariç/dâhil
- ☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Mehmet Osman ATLI
13/07/2020

Yukarıda bilgileri verilen tezi bilimsel, şekilsel ve etik kurallar çerçevesinde inceledim. Tezin Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği ve Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olduğunu onaylarım. Jüri karşısında savunabilir olduğunu bilgilerinize arz ederim.

Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK
TEZ DANIŞMANI
13/07/2020

11.1. Orjinallik Raporu



Doküman Görüntüleyici

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme konu: 13-Tem-2020 15:31 +03

NUMARA: 1356972283

Kelime Sayısı: 13991

Gönderildi: 1

ERKEN GEBELİK DÖNEMİNDE KOYUN KORPUS LUTEUMUN...
Mehmet Osman Atlı tarafından

Benzerlik Endeksi %7

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources: %4
Yayınlar: %2
Öğrenci Ödevleri: %5

alıntıları çıkar | bibliyografyayı çıkar | küçük eşleşmeleri çıkar | mod: raporu hızlı görüntüle (klasik) | Change mode | yazdır | yenile | İndir

1% match (24-Haz-2020 tarihli internet)
http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080

1% match (08-Haz-2019 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Dicle University on 2019-06-08

1% match (yayınlar)
Mehmet O. Atli, Mehmet Kose, Mustafa Hitit, M. Salih Kaya, Faruk Bozkaya. "Expression patterns of Toll-like receptors in the ovine corpus luteum during the early pregnancy and prostaglandin F2α-induced luteolysis", Theriogenology, 2018

<1% match (yayınlar)
Mehmet Salih Kaya, Mehmet Kose, Aydin Guzeloglu, Zekeriya Kıyma, Mehmet Osman Atli. "Early pregnancy-related changes in toll-like receptors expression in ovine trophoblasts and peripheral blood leukocytes", Theriogenology, 2017

<1% match (09-May-2019 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Izmir Katip Ãelebi Ãniversitesi on 2019-05-09

<1% match (04-May-2020 tarihli internet)
https://complete.bioone.org/journals/biology-of-reproduction/volume-86/issue-4/biolreprod.111.094870/Patterns-of-Gene-Expression-in-the-Bovine-Corpus-Luteum-Following/10.1095/biolreprod.111.094870.full

<1% match (11-Şub-2020 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Dicle University on 2020-02-11