T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MİTOKONDRİYAL DİNAMİK VE MİTOFAJİNİN ENDOMETRİYAL SİKLUS ve DESİDUALİZASYONDAKİ ROLÜ

Zehra SEZER

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Elif GÜZEL MEYDANLI

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Ümit Ali KAYIŞLI

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Histoloji ve Embriyoloji Programı

Aralık, 2022

Canımın içi annem, babam ve kardeşlerime ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

MİTOKONDRİYAL DİNAMİK VE MİTOFAJİNİN ENDOMETRİYAL SİKLUS ve DESİDUALİZASYONDAKİ ROLÜ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 2020-35075

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerim boyunca bana destek olup yol göstericiliği ile her daim yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana bilimselliği ve objektifliği aşılayan değerli danışman hocam Prof. Dr. E. Elif Güzel Meydanlı'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İkinci danışmanım Güney Florida Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Ümit Ali Kayışlı'ya tez projeme olan katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Değerli Hocalarım Prof. Dr. İsmail Seçkin, Prof. Dr. Meral Koyutürk, Doç. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk ve Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi ile Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na lisansüstü eğitim sürecimde, bilgi ve tecrübelerini paylaştıkları ve desteklerini her daim hissettirdikleri için teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Lisansütü eğitim sürecine beraber başladığım, ihtiyaç duyduğum her anımda yanımda olan ve beraber birçok anı paylaştığım değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Başak Işıldar, Arş. Gör. Serbay Özkan, Arş. Gör. Halil İbrahim Saygı ve Arş. Gör. Selenay Furat Rençber'e; tez sürecimde her daim yanımda olup ilgileriyle bana destek olan, deneylerimizin tüm zorluklarını ve sevinçlerini beraber paylaştığımız Uzm. Dr. Duygu Neccar ve Arş. Gör. Beyza Sağ'a; doktora sürecimde yanımda olup manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Hakan Şahin, Uzm. Dr. H. Nurdan Olcar, Dr. Kübra Çakıllı, Dr. Meryem Purelka, Aynur Abdulova, Dr. Yonca Aras ve Dr. Öğr. Gör. Belisa Kaleciye tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü eğitim sürecimde desteklerini her daim hissettiğim, tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan çok sevgili Dr.Öğr.Üy. Derya Cansız ve Dr.Öğr.Üy. Ebru Nur Ay'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, sevgi ve ilgileriyle bana güç veren ve inanan sevgili annem Azize Sezer, sevgili babam Celaleddin Sezer, değerli kardeşlerim Buşra Sezer ve Yavuz Saltuk Buğra Sezer'e çok teşekkür ederim.

Aralık 2022 Zehra Sezer

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xiii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xiv**
ÖZET ..... **xv**
ABSTRACT ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **5**
2.1. Uterus 5
2.2. Endometriyum 5
2.2.1. Menstrual siklus 6
2.2.1.1. Menstruasyon Fazı: 7
2.2.1.2. Proliferatif Faz: 7
2.2.1.3. Sekretuar Faz: 9
2.3. Desidualizasyon 10
2.4. Endokrin Kontrol 11
2.5. Mitokondri 13
2.5.1. Mitokondriyal morfoloji 13
2.5.2. Mitokondriyal Dinamik ve Mitofaji 14
2.5.2.1. Mitokondriyal Füzyon 14
2.5.2.2. Mitokondriyal Fisyon 15
2.5.2.3. Mitofaji 15
2.5.3. Mitokondriyal Dinamik ve Mitofajinin Hücredeki Rolü 16
3. YÖNTEM **18**
3.1. Gereçler 18
3.1.1. Kimyasallar 18
3.1.2. Alet ve Teçhizatlar 21
3.1.3. Cihazlar 22

3.2. Yöntemler 23
3.2.1. Endometriyum ve Desidua Doku Örneklerinin Toplanması 23
3.2.2. Endometriyum Doku Örneklerinin Histolojik İnceleme Yöntemlerine Uygun Hale Getirilmesi 24
3.2.3. Desidua Doku Örneklerinin Histolojik Yöntemlere Uygun Hale Getirilmesi 25
3.2.3.1. İlk Trimester Düşük Materyalinden Desidua Doku Örneklerinin Eldesi 25
3.2.3.2. Term Plesantadan Desidua Dokusunun Eldesi 25
3.2.4. İmmünohistokimya Analizi 27
3.2.5. Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü 30
3.2.5.1. Endometriyal Stroma Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü 30
3.2.5.2. Desidua Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü 31
3.2.5.3. İmmünositokimya ile Hücre Saflığının Değerlendirilmesi 32
3.2.6. İn Vitro Hormon Deneyi 33
3.2.7. Western Blot Analizi 34
3.2.8. Elektron Mikroskobik Analiz 36
3.2.9. İstatistiksel Analiz 38
4. BULGULAR 39
4.1. Menstrual Siklus Fazlarına ve Gebelik Dönemlerine ait Dokuların Histomorfolojik İncelenmesi 39
4.2. İmmünohistokimya bulguları 40
4.2.1. Plasentada Desidua Hücrelerin bulunduğu bölgenin tespiti 40
4.2.2. İmmünohistokimya Analizinin Skorlaması için En Uygun Yöntemin Belirlenmesi 41
4.3. In vitro Deneylere ait Bulgular 43
4.3.1. Hücre Saflığının Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular 43
4.3.2. İn vitro Hormon Deneyi 43
4.4. Mitokondriyal Füzyonun Değerlendirilmesi 44
4.4.1. MFN2 Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri 44
4.4.1.1. MFN2 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 44
4.4.1.2. MFN2 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi 46
4.4.2. OPA1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri 47
4.4.2.1. OPA1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 47
4.4.2.2. OPA1 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi 48
4.5. Mitokondriyal Fisyonun Değerlendirilmesi 49
4.5.1. Drp1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western blot analizleri 50
4.5.1.1. Drp1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 50
4.5.1.2. Drp1 Protein Ekspresyonunun Western Blot ile Analizi 51

4.5.2. Fis1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western blot analizleri 52
4.5.2.1. Fis1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 52
4.5.2.2. Fis1 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi 53
4.5.3. MFF Proteininin İmmünohistokimya ve Western blot analizleri 54
4.5.3.1. MFF Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 54
4.5.3.2. MFF Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi 55
4.6. Mitofajinin Değerlendirilmesi 56
4.6.1. Pink1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri 57
4.6.1.1. Pink1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 57
4.6.1.2. Pink1 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi 58
4.6.2. Parkin Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri 60
4.6.2.1. Parkin Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi 60
4.6.2.2. Parkin Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi 61
4.7. Elektron Mikroskobik Bulgular 62
5. TARTIŞMA 67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 76
KAYNAKLAR 77
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 91
KURUM İZNİ YAZILARI 92

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Uterusun anotomik yapısı [30]. 6

Şekil 2: Menstrual siklus boyunca steroid hormon etkisindeki endometriyumun geçirdiği biyolojik süreç [31]. 8

Şekil 3: Endometriyal stromal hücrelerin desidua hücrelerine dönüşme süreci [40]. 11

Şekil 4: Mitokondriyonun yapısı. A) Mitokondriyonu iki boyutlu (2D) elektron mikroskobik görüntüsü. B) Mitokondriyonun 3D şematik görüntüsü [48]. 13

Şekil 5: Mitokondriyal fisyon ve füzyon ile mitofaji döngüsünü gösteren şematik görüntü. Şemada, mitokondriyal fisyonda rol oynayan proteinler Drp1, Fis1 ve MFF, mitokondriyal füzyonda etkili olan proteinler MFN2 ve OPA1 ile mitofaji mekanizmasında rol oynayan proteinler Pink1 ve Parkin gösterilmiştir. 16

Şekil 6: Mitokondriyal dinamik (mt füzyon ve fisyon) ve mitofaji arasındaki denge 17

Şekil 7: Alınan doku örneklerinin histolojik inceleme yöntemleri için uygun hale getirilmesini gösteren fotoğraflar. 24

Şekil 8: İlk trimester plasenta. a) Gebeliğin ilk trimester dönemine ait desidua bazalis ve pariyetalis ile villus dokularının şematik görüntüsü. b) Alınan ilk trimester düşük materyali. c) Desidua paryetalisin stero mikroskobik görüntüsü. d, e, f) Desidua bazalis (DB) ve villus (daire içi) dokularının stero mikroskop altındaki görüntüleri. V: Villus. 25

Şekil 9: Term plasenta. a) Term plasentanın laboratuvara taşınmasında kullanılan patoloji kabı. b) Term plasentanın maternal (desidua) ve fetal kısımlarını gösteren figür. C) Term plasentanın kotiledonları içeren maternal yüzü ve kotiledonları saran fetal zar. 26

Şekil 10: Term plasentadan desidua bazalis dokusunun alınması. Sırasıyla; term plasentanın kotiledon yüzünden ince bir parça olarak alınan desidua dokusundan plasentanın villus kısmının bistüri ile uzaklaştırılması, ardından desidua dokularının PBS ile yıkanması ve histolojik yöntemlere uygun boyutlarda küçültüldükten sonra gerekli fiksatifin uygulanması. 26

Şekil 11: IHC yöntemi uygulanan dokuda mt belirtecin Fiji yazılımı ile skorlanması. a-c) IHC uygulanan dokularda Fiji ile skorlama öncesi yapılan alan seçimine örnek olarak EP grubuna ait endometriyum dokusu (a) ile FP (b) ve TP (c) desidua dokularının mikrografları yer almaktadır. Fiji yazılımında esas mikrografın (d) *'Color Deconvolution - H+DAB'* komutu sonrasında açılan kanallarından biri olan H kanalına ait mikrograf (e) analize dahil edilmemekte, DAB kanalı (f) değerlendirmeye alınmaktadır. DAB kanalına ait görüntüye

uygulanan *'eşik değeri'* komutu (g) sonrasında açılan siyah beyaz kanalda (h) ölçüm yapılmakta ve veri elde edilmektedir. 30

Şekil 12: ESH ve DH'lerin saflığının değerlendirilmesi için kullanılan ICC deney düzeneği 33

Şekil 13: Hormon deneyinin grupları 34

Şekil 14: Mitokondrinin elektron mikroskobik incelenmesinde yapılan dairesellik, sirkülarite, en-boy oranı ve Feret çapı ölçümlerinin şematik görüntüsü [11].....38

Şekil 15: H+E boyaması ile dokuların histomorfolojik incelenmesi. A; EP, B; GP, C; ES, D;OS, E; GS, F; FP, G; TP'ye ait dokular. 40

Şekil 16: Plasenta dokularında DH'lerin lokalizasyonunun tespiti için yapılan immünohistokimya analizine ait mikrograflar. A - D; gebeliğin ilk trimester dönemine (FP) ait desidua dokularında vimentin pozitif (V+) DH'lerin (A&B) ve sitokeratin7 pozitif (CK7 +) intertisyal trofoblastların (C&D) yerleşimini gösteren mikrograflar. E – H; Gebeliğin term dönemine (TP) ait desidua dokularında vimentin pozitif (V+) DH'lerin (E&F) ve sitokeratin7 pozitif (CK7 +) intertisyal trofoblastların (G&H) yerleşimini gösteren mikrograflar. A, C, E ve G; 4X. B, D, F ve G ; 40X. 40

Şekil 17: Fiji yazılımı ve HSCORE verilerinin karşılaştırılması. 42

Şekil 18: ESH ve DH'lerin karakterizasyonu. Endometriyum dokusundan izole edilen ESH'lerin (A-C) ve desidua dokusundan izole edilen DH'lerin (D-G) saflığını gösteren immün boyanmaya ait mikrograflar. A ve B; V + ve EK– ESH'leri, D-F; V +, EK – ve CK7 – DH'leri göstermektedir. C ve G; her deneyin kendine ait negatif kontrolünü gösteren mikrograflardır. 20X. H; Dokudan izole edilen hücrelerin saflığını gösteren grafiklerdir. İzole edilen hücrelerde V+ hücre miktarı ≥%95'dir. $p<0,04$. ESH; Endometriyal Stroma Hücre, DH; Desidua Hücre. 43

Şekil 19: Hormon deneyi sonunda invert faz kontrast mikroskobu ile incelenen hücrelerin morfolojik görüntüsü. 20X. 44

Şekil 20: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında MFN2 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemlerine ait plasentanın desidua dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; MFN2 protein seviyesini gösteren grafik. $^{a}p<0,003$; GP, GS ve FP ile kıyaslandığında, $^{b}p<0,03$; GS dışında tüm gruplar ile kıyaslandığında, $^{c}p<0,001$; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 45

Şekil 21: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının MFN2 ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için $*p<0,007$; FP-DH grubu için $\#p<0,007$. ns: anlamlı farklılık yok. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için $^{a}p<0,04$ TP-DH'ye göre; E2 için $^{b}p<0,005$ FP- ve TP-DH'lere göre; P4 için $^{c}p<0,04$ FP-DH'ye göre; E2+P4 için $^{d}p<0,04$ FP- ve TP-DH'lere göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. .47

Şekil 22: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında OPA1 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; OPA1 immün işaretlemesinin, yer yer yuvarlak şekilde olduğunu gösteren mikrograf. 100X. K; OPA1 protein seviyesini gösteren grafik. $^{a}p<0,001$; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 48

Şekil 23: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının OPA1 ekspresyonuna etkisi. ns: anlamlı farklılık yok. FP-DH grubu için #p<0,02. TP-DH grubu için ***p<0,03. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için $^{a}p<0,04$ ESH ve TP-DH'ye göre; E2 için $^{b}p<0,04$ ESH'ye göre; P4 için $^{c}p<0,04$ TP-DH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 49

Şekil 24: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Drp1 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; Drp1 protein seviyesini gösteren grafik. $^{a}p<0,04$; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 50

Şekil 25: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Drp1 ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,04; FP-DH grubu için #p<0,02; TP-DH grubu için ***p<0,002. ns: anlamlı farklılık yok. Aynı hormonun etkisindeki farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için $^{a}p<0,001$ ESH ve FP-DH'lere göre; P4 için $^{b}p<0,001$ ESH ve FP-DH'lere göre; E2+P4 için $^{c}p<0,002$ FP-DH'lere göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 52

Şekil 26: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Fis1 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; Fis1 protein seviyelerini gösteren grafik. $^{a}p<0,02$; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. $^{b}p<0,02$; EP, OS ve GS fazları ile kıyaslandığında. $^{c}p<0,04$; GP ve ES ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 53

Şekil 27: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Fis1 ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,008. ns: anlamlı farklılık yok.TP-DH grubu için ***p<0,002. Aynı hormonun etkisindeki farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için $^{a}p<0,4$ ESH ve FP-DH'lere göre; E2+P4 için $^{b}p<0,02$ ESH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 54

Şekil 28: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında MFF ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP),

B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. H; negatif kontrol. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; MFF protein seviyesini gösteren grafik. [a]*p*<0,01; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 55

Şekil 29: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının MFF ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,04. ns: anlamlı farklılık yok. TP-DH grubu için ***p<0,001. Aynı hormonun etkisindeki farklı hücreler kıyaslandığında: E2 için [a]p<0,001 ESH ve FP-DH'lere göre; P4 için [b]p<0,005 FP-DH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 56

Şekil 30: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Pink1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. Ok; lenfosit, DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; Pink1 protein seviyesini gösteren grafik. [a]*p*<0,01; OS, FP ve TP grupları ile kıyaslandığında. [b]*p*<0,01; EP, OS, FP ve TP grupları ile kıyaslandığında. [c]*p*<0,01; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [d]*p*<0,001; EP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında. [e]*p*<0,005; GP, ES ve OS grupları ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 58

Şekil 31: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Pink1 ekspresyonuna etkisi. ns: anlamlı farklılık yok. FP-DH grubu için #p<0,001. TP-DH grubu için ***p<0,04. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için [a]p<0,04 ESH'ye göre; P4 ve E2+P4 için [b]p<0,001 ESH ve TP-DH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 59

Şekil 32: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Parkin ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; Parkin protein seviyesini gösteren grafik. [a]*p*<0,01; EP, GP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında. [b]*p*<0,005; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [c]*p*<0,01; EP, GP ve GS grupları ile kıyaslandığında. [d]*p*<0,001; GP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında. [e]*p*<0,005; EP, ES ve OS grupları ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. ... 60

Şekil 33: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Parkin ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,02. FP-DH grubu için #p<0,03. TP-DH grubu için ***p<0,03. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için [a]p<0,003 TP-DH'ye göre; E2 için [b]p<0,001 FP- ve TP-DH'lere göre; E2+P4 için [c]p<0,001 ESH ve FP-DH'lere göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. 62

Şekil 34: Elektron mikroskobik ölçümlere ait grafikler. a) m^2 alana düşen mitokondri sayısına ait grafik. [a]p<0,001; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [b]p<0,004; EP, GP, ES grupları ile

kıyaslandığında. [c]p<0,001 ve [d]p<0,03; EP, GP, ES ve OS grupları ile kıyaslandığında. b) Mitokondrinin en ve boy oranı; mitokondriyonun maksimum boy ve genişliğinin oranını gösteren grafik. *p<0,03. c) Feret çapı; mitokondriyondaki en uzak iki nokta arasındaki uzunluğu gösteren grafik. *p<0,004; [#]p<0,007; [***]p<0,005. d) Dallanma oranına ait grafik. *p<0,006; [#]p<0,002; [***]p<0,03. e) Mitokondrinin sirküler boyutunu gösteren grafik. ns: istatistiksek anlamlılık yok. f) Mitokondrinin dairesel boyutunu gösteren grafik. *p<0,02; [***]p0<0,01; [#]p<0,007.....64

Şekil 35: Menstrual siklusun her bir fazına ait ESH'lerde ve gebelik dönemine ait DH'lerde mitokondri yapılarını gösteren mikrograflar. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait ESH'leri, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait DH'leri mikrograflar. 65

Şekil 36: Mitokondriyal (mt) fisyon (a ve b), mitofaji (c ve d) ve mt füzyonu (e-h) gösteren elektron mikroskobik görüntüler. a-b) muhtemel mt fisyon ile ayrılan mitokondrideki boğumları (ok) gösteren mikrograflar d) ESH'ye ait mikrografta kare içerisindeki alanın (c) büyütmesine ait görüntüde, sınırlandırıcı membran (SM) ile sarılan mitokondri. e) Hasarlı (*) mitokondriyon ile sağlıklı mitokondriyonun muhtemel kaynaşmasını gösteren mikrograflar. f) Kütleyi arttırmak için kaynaşan sağlıklı iki mitokondriyona ait mikrograf. g) ESH'ye ait mikrografta dikdörtgen alanın büyütmesine ait görüntüde (h) kaynaşması muhtemel iki mitokondriyon membranını gösteren mikrograf. Ok başı: mitokondriyonların kaynaşması. M: Mitokondriyon. 65

Şekil 37: Çalışmanın bulgularını özetleyen şema. Tablo, menstrual siklus ve gebelik süresince hücrelerdeki mt füzyon, fisyon ve mitofajiye ait proteinlerin ekspresyonlarındaki in vivo değişimi göstermektedir. ↑; ekspresyondaki artmayı, ↓; ekspresyondaki azalmayı ve ns; farklılık olmadığını göstermektedir. Tablonun altındaki şekilde; plasentadaki DH'lerde diğer fazlara göre baskın olan, P4 bağımlı mt fisyon ve mitofaji gösterilmektedir.....66

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Çalışmada kullanılan gruplar 23

Tablo 2: IHC'de kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları 28

Tablo 3: Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları 36

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
ESH	: Endometriyum stroma hücresi
DH	: Desidua hücre
MED	: Mezenşimal-epitelyal dönüşüm
E2	: Östrojen; 17ß-östrodiol
P4	: Progesteron
ER	: Östrojen reseptörü
mtER	: Mitokondriyal östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
ATP	:Adenozin Trifosfat
IMM	: İç mitokondriyal membran
OMM	: Dış mitokondriyal membran
ROS	: Reaktif oksijen türevlerinin
mt	: Mitokondriyal
IHC	: İmmünohistokimya
T-TBS	: Tween-20 içeren tris tampon solüsyonu
RT	: Oda ısısı
H	: Hematoksilen
ICC	: İmmünositokimya
V	: Vimentin
EK	: E-kaderin
CK7	: Sitokeratin 7
MPA	: Medroksiprogesteron-17 asetat
EP	: Menstrual siklusun erken proliferasyon fazı
GP	: Menstrual siklusun geç proliferasyon fazı
ES	: Menstrual siklusun erken sekresyon fazı
OS	: Menstrual siklusun orta sekresyon fazı
GS	: Menstrual siklusun geç sekresyon fazı
FP	: Gebeliğin ilk trimester dönemi
TP	: Gebeliğin term dönemi

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MİTOKONDRİYAL DİNAMİK VE MİTOFAJİNİN ENDOMETRİYAL SİKLUS ve DESİDUALİZASYONDAKİ ROLÜ

Zehra SEZER

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Histoloji ve Embriyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr. Emine Elif GÜZEL MEYDANLI

II. Danışman : Prof. Dr. Ümit Ali KAYIŞLI

Başarılı bir gebelik; doğru embryo gelişimi ve yeterli endometriyal farklılaşma olmak üzere iki önemli süreç gerektirir. Fakat gebeliğin gerçekleşmesi ve sürdürülmesi için ana süreçlerden biri olan desidualizasyonu düzenleyen mekanizmalar halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu çalışmada, menstrual siklus ve gebelik dönemlerinde endometriyal stroma hücrelerin (ESH'lerde) proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan mitokondriyal (mt) fisyon, füzyon ve mitofajinin mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin ve bu proteinler üzerinde etkili olan hormonların araştırılması amaçlandı. Çalışmada menstrual siklusun; erken (EP) ve geç (GP) proliferasyon, erken (ES), orta (OS) ve geç (GS) sekresyon fazlarına ait endometriyum dokularındaki ESH'lerde ve gebeliğin ilk trimester (FP) ve term (TP) dönemlerine ait insan plasenta dokusundaki desidua hücrelerinde (DH'lerde), mt dinamik ve mitofaji belirteçlerinin seviyeleri incelendi. Mt fisyon için Drp1, Fis1 ve MFF, mt füzyon için MFN2 ve OPA1, mitofaji için Pink1 ve Parkin proteinlerinin seviyeleri immünohistokimya yöntemi ile in vivo olarak araştırıldı. Buna ek olarak, EP dönemindeki endometriyumdan izole edilen ESH'lerde ve FP ile TP dokularından izole edilen DH'lerde östrojen (E2) ve/veya progesteron (P4) hormonlarının, mt belirteçler üzerindeki in vitro etkisi Western blot yöntemi ile incelendi. İn vivo bulguların değerlendirilmesi sonucunda; mt fisyonun, EP grubunda Drp1 ve MFF aracılığıyla, FP ve TP gruplarındaki DH'lerde ise Drp1 ve Fis1 aracılığıyla arttığı gözlendi. Mt fisyonun FP-DH'lerdeki artışında P4 hormonunun etkili olduğu tespit edildi. Mt füzyonun ise, GP ve FP gruplarında arttığı ve bu artışın hormona bağımlı olmadığı gözlendi. Ek olarak mitofaji değerlendirildiğinde; FP ve TP gruplarındaki DH'lerde Pink/Parkin aracılı mitofajinin arttığı ve bu artışın E2+P4'e bağlı olabileceği gösterildi. Sonuç olarak; desidualizasyon süreci ile ESH'lerin DH'lere farklılaşmasında mt füzyon, fisyon ve mitofajinin etkili olduğu, ESH'lerin FP-DH'lere farklılaşmasında mt fisyon ve mitofaji protein yolaklarının ve bu yolaklarda ise P4'ün etkili olabileceği düşünüldü. Çalışmada, sağlıklı bir desidual farklılaşmada rol oynayan mt dinamik mekanizması ve bu mekanizmada etkili olan steroid hormonu tanımlandı. Bu sayede tekrarlanan implantasyon hataları ve istenmeyen düşük gibi hatalı desidualizasyondan kaynaklanabilen hastalıkların altında yatan mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlanabilir.

Aralık 2022 , 112 sayfa.

Anahtar kelimeler: mitokondri, mitokondriyal dinamik, mitofaji, desidualizasyon, endometriyum, desidua

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

THE ROLE OF MITOCHONDRIAL DYNAMIC AND MITOPHAGY DURING ENDOMETRIAL DECIDUALIZATION

Zehra SEZER

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Histology and Embryology

Histology and Embryology

Supervisor : Prof. Dr. Emine Elif GUZEL MEYDANLI

Co-Supervisor: Prof. Dr. Umit Ali KAYISLI

A successful pregnancy requires two essential processes: correct embryo development and adequate endometrial differentiation. However, the mechanisms regulating decidualization, one of the main processes for maintaining pregnancy, are still not fully clarified. Therefore, this study aimed to determine mitochondrial (mt) fission, fusion, and mitophagy in the endometrial stroma cells (ESCs) during the menstrual cycle and pregnancy. Also, the aim of this study is to investigate the effective hormones on mt dynamic and mitophagy in ESCs. In the study, the levels of mitochondrial (mt) dynamics and mitophagy markers were examined in ESCs of endometrial tissues of early (EP) and late (GP) proliferation, early (ES), middle (OS), and late (GS) secretion phases in the menstrual cycle and in decidual cells (DCs) of placental tissue from the first trimester (FP) and term periods (TP) of pregnancy. Drp1, Fis1 and MFF proteins for mt fission, MFN2 and OPA1 proteins for mt fusion, and Pink1 and Parkin proteins for mitophagy were investigated in vivo with immunohistochemistry method. In addition, the effects of estrogen (E2) and/or progesterone (P4) hormones on mt markers in ESCs isolated from the endometrium in the EP period and DCs isolated from FP and TP tissues were investigated by the Western blot method. As a result of the evaluation of the in vivo results, mt fission was observed to increase through EP by Drp1 and MFF and through FP and TP by Drp1 and Fis1. Furthermore, the P4 hormone was effective in the increase of Mt fission in FP-DCs. Mt fusion increased in GP and FP phases, and it was shown that this increase did not happen under the influence of E2 and/or P4. In addition, when mitophagy was evaluated in cells, it was shown that Pink/Parkin-mediated mitophagy increased in DCs in FP and TP groups and this increase might be due to P4. As a result, it was determined that mt fission, fusion, and mitophagy are effective in the differentiation process from ESCs into DCs with the decidualization; P4-mediated mt fission and mitophagy protein pathways may be effective in the differentiation of EScs into FP-DCs. The mt dynamic mechanism which plays a role in the healthy targeted differentiation and also the effective steroid hormone associated with this mechanism has been determined. In this way, this study can contribute to the elucidation of the underlying mechanism of diseases that may result from defective decidualization, such as repeated implantation failure and abortion, and also contribute to the literature for further studies regarding appropriate target treatments.

December 2022, 112 pages.

Keywords: mitochondria, mitochondrial dynamic, mitophagy, decidualization, endometriyum, decidua

1. GİRİŞ

Endometriyum, uterusun bezler ve stroma ile karakterize olan mukoza dokusudur ve her ay menstrual siklus boyunca potansiyel embriyo implantasyonu için hazırlanır. Endometriyumu hazırlayan menstrual siklus 3 fazdan oluşur: östrojen (E2; 17ß-östradiol) hormonunun etkisindeki proliferatif faz, progesteron (P4) hormonunun baskın olduğu sekretuar faz ve menstruasyon fazı [1][2]. Fertilizasyon olması durumunda endometriyumun stroması, gebeliğin devamlılığı için gerekli olan değişimleri geçirerek desidua adını alır. Bu değişim sürecine de desidualizasyon adı verilir [3]. Desidualizasyon, menstrual siklusun geç sekretuar fazında başlar ve gebeliğin erken dönemlerinde (1. trimester) devam eder. Bu süreçte, endometriyal stroma hücrelerin (ESH'lerin) fenotipinde majör değişiklikler gerçekleşir; iğ şekilli fibroblast benzeri stromal hücreleri poligonal epitel benzeri sekretuar hücreler olan desidua hücrelerine (DH'lere) dönüşür. Bu dönüşüm esnasında, DH'lerin sitoplazma ve organel miktarında, sekretuar kapasitesinde, glikojen ve lipit depolanmasında ve hücre-hücre etkileşiminde artış gözlenir [4]. Hücrelerin geçirdiği bu fenotipe dayalı değişimde etkili olan moleküler mekanizmalar halen net olarak tanımlanamamıştır. Bu durum ise yetersiz desidualizasyona dayalı patolojilerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılamamasına sebep olmaktadır.

Yetersiz desidualizasyon implantasyon hatalarına, tekrarlayan düşüklere ve embriyo sağlıklı dahi olsa erken kayıplara yol açabilir. Gebeliklerin yaklaşık %30'u, yetersiz desidualizasyondan kaynaklanan implantasyon sonrası düşükler ile sonuçlanır [5,6]. Bu sebeple implantasyon hataları ve gebelik kayıplarının teşhisi ve tanısı için, ESH'lerin geçirdiği proliferasyon, farklılaşma ve diğer mekanizmaların daha kapsamlı araştırılması ve iyi anlaşılması gerekmektedir [7].

Mitokondriyon (*çoğul; mitokondri*); hücrelerin geçirdiği proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi mekanizmalarda önemli rol oynayan oldukça dinamik ve multi-fonksiyonel bir organeldir [8][9][10]. Mitokondrinin dinamikliği, hücredeki sayısının ve kütlesinin sürekli olarak değişmesine ve yenilenmesine bağlıdır. Mitokondrinin sayısı, morfolojisi, yapısı ve fonksiyonu kalite kontrol aşamaları olan mitokondriyal (mt) dinamik ve mitofaji ile kontol edilmektedir [11–14]. Mt dinamik, mitokondriyonun geçirdiği füzyon (birleşme) ve fisyon

(ayrılma) süreçleri iken mitofaji ise hasarlı veya gereksiz mitokondriyonların eliminasyonu için özelleşmiş otofajik bir süreçtir [15][16].

Mt dinamiği kontrol eden mekanizmalardan biri olan mt füzyon; mitokondrinin kaynaşması veya birleşmesine dayanan, hücrenin enerji (ATP) ihtiyacının artması ve hücredeki mt homojenitenin sağlanması için aktifleşen bir mekanizmadır [12,13,17]. Mt füzyon mekanizması sayesinde hasara uğramasına rağmen kurtarılabilir durumda olan mitokondriyonlar, sağlıklı olanlar ile kaynaşır ve hücrenin enerji kaynağının kütlesi korunur. Mitokondrinin füzyonu için membranların kaynaşması gerekmekte ve bu kaynaşmada MFN2 ve OPA1 proteinleri rol oynamaktadır [18]. Mt dinamiği kontrol eden diğer bir mekanizma olan mt fisyon ise; hücre bölünmesi (proliferasyon) esnasında yavru hücrelere eşit miktarda mitokondri dağılımında görevlidir. Ayrıca, mitokondriyonun hasarlı olan parçasının sağlıklı bir mitokondriyon ile kaynaşarak (mt füzyon) kurtarılamayacak olduğu durumlarda, mitokondriyonun hasarlı ve sağlıklı parçalarının mt fisyon ile ayrılması ve böylece hasarlı mitokondriyonun mitofaji ile elimine edilmesi sağlanır [12,13,18,19]. Mt fisyonda gerekli olan proteinler ise ana efektör protein olan Drp1 ve yardımcı, adaptör proteinlerden ikisi olan Fis1 ve MFF'dir [18] [20].

Mt füzyon ve fisyonun nörodejeneratif ve metabolik hastalıklar ile kanser patogenezinde rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterildi [21–23]. Buna ek olarak, rat ovaryumunda östrus siklusu boyunca mt dinamik proteinlerini inceleyen in vivo bir çalışmada, P4'ün baskın olduğu fazda MFN2 protein ekspresyonunun azaldığı, OPA1'in değişmediği ve Drp1 protein seviyesinin ise arttığı bildirildi [22]. Ayrıca, hiper-östrojenitenin hakim olduğu endometriozis patogenezi ile ilgili yapılan araştırmalar, endometriozis durumunda ESH'lerde mt fisyonun azaldığını ve fisyon mekanizmasının indüklenmesi sonucunda endometriyotik hücrelerin canlılığında ve migrasyonunda azalma olduğunu gösterdi [30,31]. Buna karşın, ESH'lerin proliferasyonu ve desidual farklılaşmasında mt füzyon ve fisyon proteinlerinin rolüne dair herhangi bir literatüre rastlanmadı.

Mitokondri kalite kontrolünde gerekli olan diğer bir mekanizma ise mitofajidir. Mitofaji, işlevsiz mitokondrinin seçici olarak ortadan kaldırılması ile mitokondrinin kalite kontrolüne katkıda bulunur; hasarlı ve disfonksiyonel mitokondrinin hücreden eliminasyonunu sağlar. Mitofaji aynı zamanda, hücredeki sağlıklı mitokondri sayısının ve kütlesinin azaltılmasında mt fisyon ile birlikte rol oynar. Mt fisyon ile bölünen mitokondri, mitofaji ile

hücreden elimine edilir [14,32]. Mitofaji mekanizmasında rol oynayan birkaç yolak vardır; bunlardan en etkili olanı Pink1/Parkin yolağıdır [25,33]. Pink1/Parkin aracılı mitofajinin, Alzheimer ve Parkinson gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta ve tümör gelişim mekanizmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir [34,35]. Buna ek olarak, polikistik over sendromu (PKOS) patogenezinde ve oksidatif stresin arttığı durumlarda ovaryum dokusundaki granüloza hücrelerinde Pink1 ve Parkin protein seviyelerinin arttığı bildirildi [36,37]. Zhao ve ark. (2018) ise ESH'lerin migrasyonunda ve canlılığında Parkin bağımlı mitofajinin etkili olduğunu ve mitofajinin endometriozisde önemli olabileceğini gösterdi [30]. Buna karşın, ESH'lerin proliferasyonu ve desidual farklılaşmasında mitofaji proteinlerinin rolüne dair herhangi bir literatüre rastlanmadı.

Mt dinamik ve mitofaji proteinlerinin hormona bağlı değişimlerini inceleyen in vitro çalışmalara bakıldığında; E2 hormonunun etkisiyle endotel, iskelet kası ve meme kanseri hücrelerinde MFN ve OPA1 ekspresyonlarının arttığı, buna karşın meme kanseri ve Schwann hücrelerinde Drp1 ekspresyonunun artarken Fis1 protein seviyesinin ise azaldığı gösterildi [19–21][24][25–27]. Buna ek olarak, E2'nin mitofajiyi indüklediği, eksikliğinde ise mitokondriyonda işlev bozukluğuna ve mitofajide azalmaya yol açtığı bildirildi [28][29]. Literatürde P4'ün mt dinamik ve mitofaji proteinleri üzerindeki etkisini inceleyen araştırmaların, E2'ye göre daha az olduğu dikkati çekmiştir. Ek olarak, mt dinamik (füzyon ve fisyon) ve mitofaji süreçlerinin ESH ve DH'lerde hormona dayalı etkilerini inceleyen herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Desidualizasyon mekanizması hücresel farklılaşmaya dayandığından, hücre içerisindeki birçok protein ve organelin dinamik değişimi ve otofajik yıkımı normal bir süreç olarak kabul edilmektedir [121,122]. Çalışmamızda; ESH'lerin geçirdiği hücresel süreçlerde rol oynayan mt füzyon, fisyon ve mitofaji mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, menstrual siklus fazlarındaki ESH'lerde ve gebelik dönemlerindeki DH'lerde mt füzyon, fisyon ve mitofajiye ait belirteçler immünohistokimya yöntemi ile in vivo incelenmiş ve ardından mt dinamiklerin hücrelerdeki değişiminde E2 ve/veya P4 hormonlarının etkisi in vitro koşullarda Western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Bu sayede, ESH'lerdeki mt dinamiklerin ve mitofajinin hormona bağımlı değişimlerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Mitokondriyonun ve geçirdiği mt süreçlerin hücre fizyolojisi, kök hücre biyolojisi ve birçok patolojinin altında yatan mekanizmaların ve potansiyel tedavilerinin araştırılması açısından

oldukça önemli olduğu düşünüldüğünde, endometriyum gibi dinamik bir dokuda mt füzyon, fisyon ve mitofaji dengesine odaklanılmasının birçok yönden gerekli olduğu düşünülmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Uterus

Dişi üreme sistemi bir çift ovaryum ve fallop tüpleri, uterus ve vajina gibi iç organlar ile dış organlardan oluşur. Bu sistem, dişi gametler olan oositleri üretir, iletir, fetilizasyon ve sonrasındaki süreç olan embriyo gelişimi için ortam sağlar [38].

Uterus, karın pelvik boşluğun orta hattında, mesanenin arkasında ve rektumun önünde bulunan, kalın duvarlı ve kaslı lümenli bir organdır. Anatomik olarak dört bölümden oluşur; fundus, korpus (gövde), isthmus ve serviks. Korpus, en büyük segmenttir ve istmus yoluyla servikse bağlanır. Serviks, uterus gövdesini vajinal lümene bağlayan kısımdır. Uterus duvarı üç katman içerir: endometriyum (en içteki), miyometriyum (orta) ve perimetriyum (en dıştaki) [39].

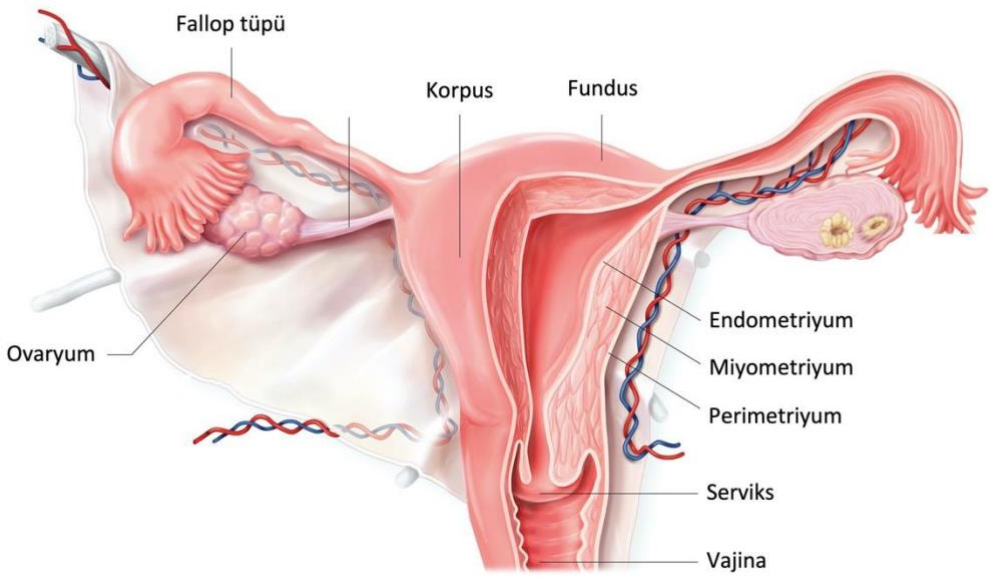
2.2. Endometriyum

Endometriyum, uterusun bezler, stroma ve vasküler bileşenler ile karakterize olan mukoza dokusudur. Endometriyum epiteli (luminal / yüzey epiteli), tek katlı silli, silindirik epitelden oluşur ve uterin boşluğu kaplar. Yüzey epitel hücreleri, altındaki bağ dokusu olan lamina propriya (stroma) içerisinde yer alan ve basit dallı tübüler yapı gösteren bezlerin hücreleri (glandular epitel) ile devam eder. Endometriyum stroması, hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten oluşan bağ dokusudur. Endometriyum stromasının ana hücre tipi fibroblasttır ve bu hücrelere endometriyum stroma hücresi (ESH) adı verilir. Endometriyum stromasında, ESH dışında uterusa ait makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (NK'ler) ve T lenfositleri gibi kalıcı immün hücreleri ve glandular epitel hücreleri, endotel hücreleri ve kök hücreleri de bulunmaktadır [2][38].

Endometriyum, hipofiz hormonlarının etkisi altında, menstrual siklus boyunca olası embriyo implantasyonu için yeniden modellenen dinamik bir dokudur ve her ay döngüsel değişiklikler gösterir. Bu değişikliklere ve fonksiyonuna bağlı olarak iki tabakaya ayrılır: Fonksiyonel tabaka, endometriyumun 2/3'lük yüzeyel kısmıdır ve her ay menstruasyon esnasında dökülüp daha sonra rejenere olur. Bazal tabaka, endometriyum dokusunun 1/3'lük

derin kısmıdır ve fonksiyonel tabakanın yeniden modellenmesi için kaynak doku olup, menstruasyon esnasında sabit kalır [2]. Menstruasyon ile endometriyumun fonksiyonel tabakasının dökülüp bazal tabakasının sabit kalmasının sebebi, bu tabakaların kanlanmasının farklı olmasıdır [40].

Endometriyumun kan damarı sistemi, menstrual siklus sırasında fonksiyonel tabakanın periyodik değişim geçirip bazal tabakanın sabit kalmasını sağlayan özel bir yapılanma gösterir. Uterusun miyometrium tabakasından kaynaklanan 6-10 adet arkuat arterler dallanarak radiyal arterleri oluşturur. Radiyal arterlerin ana kolu endometriyumun fonksiyonel tabakasına doğru devam eder ve yüksek düzeyde sarmal yapı göstererek spiral arter adını alır. Spiral arterden çıkan çok sayıda arteriyol ise genellikle anastomoz yapılanma gösterir ve fonksiyonel tabakanın bezleri ile bağ dokusu için zengin bir kapiler ağ oluşturur. Bazal tabakanın kanlanması ise arkuat arterlerden çıkan kısa düz arterler tarafından sağlanır [41].



Şekil 1: Uterusun anotomik yapısı [30]**.**

2.2.1. Menstrual siklus

Menstrual siklus, endometriyumun 28 günlük periyotta geçirdiği değişimleri kapsar ve ovaryumda görülen ovaryan siklus ile paralel gelişir (Şekil 2). Menstrual siklus, ovaryan siklus boyunca hipofiz hormonlarının etkisi altındaki ovaryumdan salınan steroid hormonları tarafından yönetilir. Streroid hormonlarına yanıt olarak endometriyumda her ay tekrarlanan doku hasarı ve onarımı gerçekleşir. Bu sayede, fertilizasyon gerçekleşirse endometriyum

embriyo implantasyonuna hazır hale gelir. Endometriyum, herhangi bir fonksiyon kaybı ve doku kalıntısı olmaksızın hızlıca doku onarımı yapması ile karakterizedir [40].

Başarılı bir gebelik; doğru embriyo gelişimi ve yeterli endometriyal farklılaşma olmak üzere iki önemli süreç gerektirir [43]. Endometriyumun farklılaşması, menstrual siklusun üç ana fazında gerçekleşir [44] (Şekil 2). Noyes ve ark.'na göre menstrual siklus faz ayrımı:

1. Menstrual Faz
2. Proliferatif Faz
    a. Erken Proliferatif Faz
    b. Geç Proliferatif Faz
3. Sekretuar Faz
    a. Erken Sekretuar Faz
    b. Orta Sekretuar Faz
    c. Geç Sekretuar Faz

2.2.1.1. Menstruasyon Fazı:

Bu fazın başlagıcı menstrual siklusun ilk günü olarak kabul edilir. Bu sebeple, menstrual siklusun 1.-4. günleri arasında gerçekleşir. Bu fazda, endometriyumun fonskiyonel tabakasında bozulma ve dökülme gözlenir [41].

2.2.1.2. Proliferatif Faz:

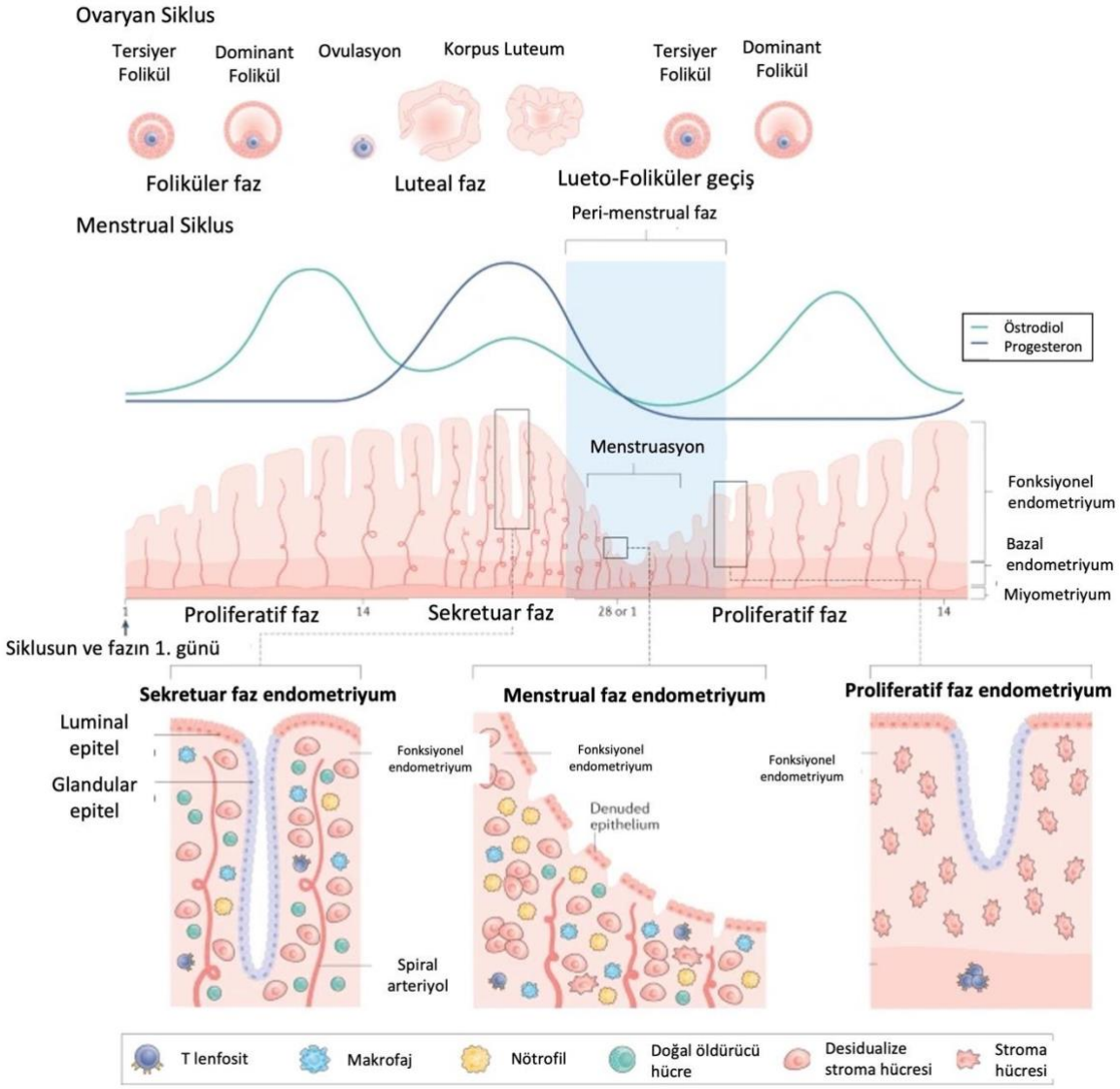
Menstrual kanama sonrasında başlayan bu faz, ana olarak östrojen hormonun etkisi altında gerçekleşir. Menstrual siklusun 5.- 14. günlerinde görülür. Proliferatif fazda ana hatları ile gerçekleşen değişimler; endometriyum yüzey epitelinin yenilenmesi, stromal hücrelerin proliferasyonu, spiral arterlerin ve bezlerin yeniden yapılanmasına dayanır. Östrojenin etkisi ile bu fazda proliferasyon hakimdir ve hem epitelde hem de stromadaki hücrelerde artan seviyede mitoz görülür. Bu proliferasyon ve tamir fazında endometriyumun kalınlığı 2-3 kat artar ve içerdiği su miktarı da artar [41][45].

Proliferatif faz, erken ve geç dönemler olarak izlenir [44]:

- Erken proliferatif faz; menstrual siklusun 5.-8. günleri arasında görülür. Menstrasyondan sonraki dönem olduğundan endometriyum oldukça incedir. Rejenere yüzey epiteli yer yer kübik görülebilir, bezler (gland) ise kısadır, düz ve dar lümenli bir yapı gösterir.

Stroma kompakttır ve mitotik aktivite gösterir, ESH'ler yıldız şeklinde veya iğ şeklindedir ve nükleusları, yetersiz sitoplazma nedeniyle nispeten büyüktür [44,46].

- Geç proliferatif faz; menstrual siklusun 8. gününden 14. gününe kadar sürer. Hücrelerde yoğun mitoz ve dokuda aktif bir büyüme izlenir. Epitel tek katlı silindirik yapıdadır. Endometriyal bez/gland epiteli histolojik doku kesitlerinde yalancı tabakalaşma gösteren uzun ve kıvrımlı tübüler bir yapı ile karakterizedir. ESH'ler çıplak nükleuslu hücreler olarak görülebilir ve stromada ödem izlenebilir [44,46].



Şekil 2: Menstrual siklus boyunca steroid hormon etkisindeki endometriyumun geçirdiği biyolojik süreç [31]**.**

2.2.1.3. Sekretuar Faz:

Sekresyon fazı, menstrual siklusun 15. – 28. günleri arasında görülür. Ovaryan siklusta ovulasyondan sonra görülen luteal faza denk gelir ve bu fazda endometriyum çoğunlukla progesteron, daha az seviyede de östrojen hormonunun etkisi altındadır. Progesteronun da etkisi ile bu fazda sekresyon artar, bezler tirbüşon şeklini alır ve endometriyum kalınlaşır. Sekretuar fazı; erken, orta ve geç sekretuar olmak üzere 3 dönemde incelenir [47][44,46]:

- Erken sekretuar faz; menstrual siklusun 15. – 17. günleri arasında izlenir. Ovulasyondan sonraki ilk 36-48 saatlik süreye denk gelen menstrual siklusun 14. ve 15. günlerinde endometriyumda gözle görülür bir farklılık izlenmez. Ancak, ovulasyon sonrası artan progesteron hormonunun etkisi ile 16. gün sonrasında sekresyonda artış görülür. Böylece erken sekretuar fazda, glandular (beze ait) epitel hücrelerinde baskın olarak subnüklear (nükleus altında) vakuoller gözlenir. Bazalde biriken glikojen salgısı sebebiyle nükleus merkezi bir yerleşim gösterir. Başlangıçta %50'den az olan salgı aktivitesi sebebiyle bez epiteli, yalancı çok katlı görünüm verebilir. 17. günde salgı aktivitesi arttıkça bez epiteli merkezi yerleşim gösteren tek sıralı nükleus ve subnüklear vakuol yapılanması gösterir. Bu fazda mitotik figürlerle halen sıkça karşılaşılmaktadır. ESH'ler, bu fazda halen, yoğun ve az sitoplazmalı, çıplak 'naked' nükleuslu ve iğ biçiminde gözlenmektedir [44,46].
- Orta sekresyon fazda (18.- 23. günler), glikojen vakuollerinin boyutunda küçülme izlenir, çünkü salgı, bez lümenine yakın olan apikal sitoplazmaya ve oradan da lümene doğru geçer. Bu fazda, bez epitelinde vakuollere apikal pozisyonda rastlanabilir. İlerleyen süreçte asidofilik salgı intralüminal izlenebilir. Bez epitel nükleusu tekrar hücrenin bazalinde yerleşim gösterir ve bezlerde tirbüşon benzeri kıvrımlı yapılanma görülmeye devam eder. Mitotik figürlere rastlanmaz. Stromada ödem geç proliferatif fazda da görülmektedir ancak bu fazın karakteristik özelliği olarak kabul edilir. ESH'lerde, artan glikojen salgısı ile iğ biçiminden yuvarlak şekilli hücrelere doğru şekil değişimi izlenir, sitoplazma miktarı artar. Menstrual siklusun 22. günü ile ödem maksimum seviyeye ulaşır ve salgı aktivitesi baskın hale gelir. Işık mikroskobik incelemede, daha önce fark edilmesi güç olan spiral arteriyoller 23. günde ilk kez görülmeye başlar ve peri-arteriyoler stroma hücrelerinde büyük bir nükleus ve fazlaca sitoplazma izlenir. Bu stroma hücrelerinde gözlenen ilk desidual reaksiyondur [44,46].
- Geç sekretuar fazda (24. 28. günler); stromanın çoğunluğunda uzun ve kıvrımlı bez yapıları izlenir. Bezlerde, intraluminal salgı gözlenir. ESH'lerde mitotik aktivite artar ve proliferasyon tekrarlar. ESH'lerde nükleus boyutunda ve glikojen salgısında artış gibi yapısal

değişimler ile izlenen predesidualizasyon, başlangıçta spiral arteriyol etrafında ve daha sonra yüzey epiteli altında kümeler halinde izlenir. 27. gün ile stromada bu predesidual hücre kümeleri birleşir ve baskın hale gelir, çıplak nükleuslu ESH'ler görülmez olur. Stromada büyük granüllü lenfosit infiltrasyonu baskın olarak izlenir [44,46].

2.3. Desidualizasyon

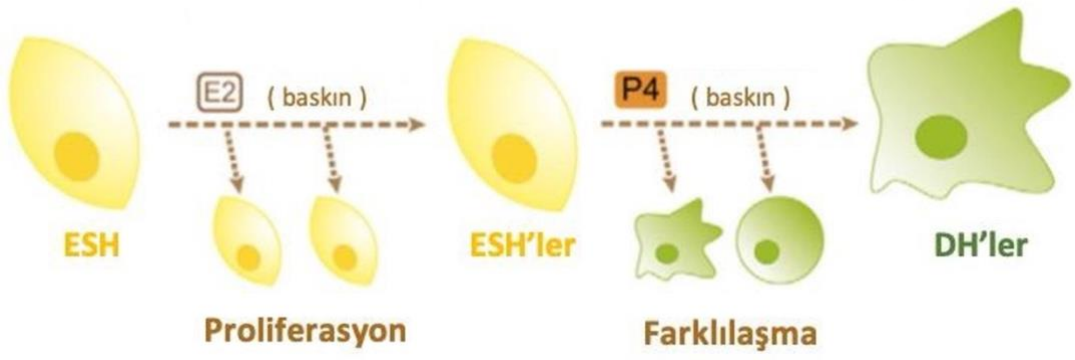
Endometriyum, her ay menstrual siklus boyunca potansiyel embriyo implantasyonuna hazırlanan dinamik bir dokudur. Fertilizasyon olması durumunda endometriyum stromasının bir kısmı, gebeliğin devamlılığı için gerekli olan değişimleri geçirerek desidua adını alır. Bu değişim sürecine de desidualizasyon adı verilir [3]. Desidualizasyon başarılı bir implantasyon için gerekli olan en önemli süreçlerden biridir. Desidua implante olan embriyonun beslenmesini sağlarken aynı zamanda maternal dokuyu, embriyonun trofoblast hücrelerinin invazyonundan korunmasını sağlar. Ek olarak, maternal-fetal ara yüzde mikroçevrenin sağlanmasında, implantasyon penceresinin kontrolünde, plasenta oluşumunda, anjiyogenezde önemli rol oynar [48,49].

Desidualizasyon mekanizması, menstrual siklusun orta sekretuar fazında başlar ve gebeliğin erken döneminde (ilk trimesterinde) devam eder. Desidualizasyon esnasında ekstrasellüler matriksin yeniden modellenmesi, lokal immün yanıtın düzenlenmesi, anjiyogenez ile vasküler re-organizasyon ve oksidatif strese karşı direnç gerçekleşir. Bu olaylarda desidua hücrelerine (DH'lere) farklılaşan ESH'lerin doğrudan veya dolaylı rolü vardır [32]. Bu süreçte, ESH fenotipinde majör değişiklikler gerçekleşir, iğ şekilli fibroblast benzeri stroma hücreleri poligonal şekilli ve epitel benzeri sekretuar hücreler olan desidua hücrelerine (DH'lere) dönüşür (Şekil 3). Hücresel farklılaşmanın bu türüne mezenşimal-epitelyal dönüşüm (MED) adı verilir. MED, desidualizasyon ve embriyo implantasyonu için gerekli bir mekanizmadır. MED esnasında DH'lerdeki sitoplazma ve organel miktarında, sekretuar kapasitede, glikojen ve lipit depolanmasında ve hücre-hücre etkileşiminde artış gözlenir [50].

Desidual farklılaşma ile ilgili yapılan araştırmalar, bu mekanizmada etkili olan yolakların aydınlatılmasını hedefler. Dokuların yeniden yapılandırılmasında ve hücresel homeostazın sürdürülmesinde proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve otofaji gibi mekanizmalar rol oynamaktadır [33–36]. Literatürde ESH'lerin proliferatif fazındaki değişimlerini inceleyen çalışmaların oldukça az olduğu, ESH'lerde oksidatif strese bağlı hücresel yaşlanma ile azalan proliferasyonun hatalı implantasyona sebep olduğu bildirildi [37]. Desidualizasyonda otofaji

mekanizmasını inceleyen Fabi ve ark (2017), MED'de ve desidualizasyonda PI3K/Akt otofaji yolağının etkili olduğunu ve Akt ekspresyonunun infertilite tedavileri için yeni bir terapötik etken olabileceğini gösterdi [38]. Buna ek olarak desidualizasyon mekanizmasında, oksidatif stresin dengeli durumda iken desidual farklılaşmayı desteklediği ancak hücrede disfonksiyonel mitokondrinin birikmesi ile artan oksidatif stres sonucunda disfonksiyonel mitokondriden serbest kalan sitokrom C'nin apoptotik yolağı aktifleştirdiği ve proliferatif-apoptotik dengenin bozulmasına yol açtığı rapor edildi [39][32].

Yetersiz desidualizasyon veya desidualizasyon esnasında meydana gelen bozulma ve anormallik; implantasyon hataları, tekrarlayan düşükler (recurrent miscarriage), preeklampsi, endometriozis, endometriyal kanser gibi birçok duruma sebep olmaktadır [49,51]. Bunun yanı sıra, gebeliklerin yaklaşık %30'unda desidualizasyon defektinden kaynaklanan, implantasyon sonrası düşükler görülmektedir [5,6]. Bu durumun, embriyo sağlıklı olsa dahi ortaya çıkabileceği görülmektedir. Mevcut yardımcı üreme teknolojilerinin kullanılması sonucunda ortaya konan düşük implantasyon (%5,26) ve gebelik başarı (%15,82) oranları, bu teknoloji ile en kaliteli embriyonun oluşturulmasının tek başına yeterli olmadığını göstermektedir [52]. Bu sebeple, implantasyon hataları ve endometriyal patolojiler için normal fizyolojik koşullarda endometriyumun geçirdiği proliferasyon, rejenerasyon ve desidualizasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılması gerekmekte ve ilgili araştırmaların artırılması önemli görülmektedir.



Şekil 3: Endometriyal stromal hücrelerin desidua hücrelerine dönüşme süreci [40]**.**

2.4. Endokrin Kontrol

Endometriyum, menstrual siklus ve gebelik sürecinde steroid hormonların endokrin kontrolü altında değişim gösterir [54]. Şekil 2'de gösterildiği üzere; menstrual siklusun proliferatif fazı; östrojenin (E2) artan seviyesinin etkisiyle, proliferasyon ve rejenerasyon ile

karakterize iken sekretuar faz ise; yüksek miktarda progesteron (P4) hormonun etkisiyle bu fazda artan sekresyon aktivitesi ve desidualizasyon mekanizması görülür. Fertilizasyon ve sonrasında embriyo implantasyonu gerçekleşmezse direk olarak düşen E2 ve P4 seviyesine bağlı olarak gelişen iskemi sonucunda menstruasyon (0-5. günler) gerçekleşir [1,55]. Endometriyumun geçirdiği bu döngüsel değişimler, ovaryum tarafından üretilen steroid hormonlar olan E2 ve P4 tarafından düzenlenir. Endometriyal epitel ve stromal hücreleri, hem östrojen ve hem de progesteron reseptörlerine sahiptir. Bu hormonların etkisi, reseptörlerinin endometriyal hücrelerdeki ekspresyonuna bağlıdır [56].

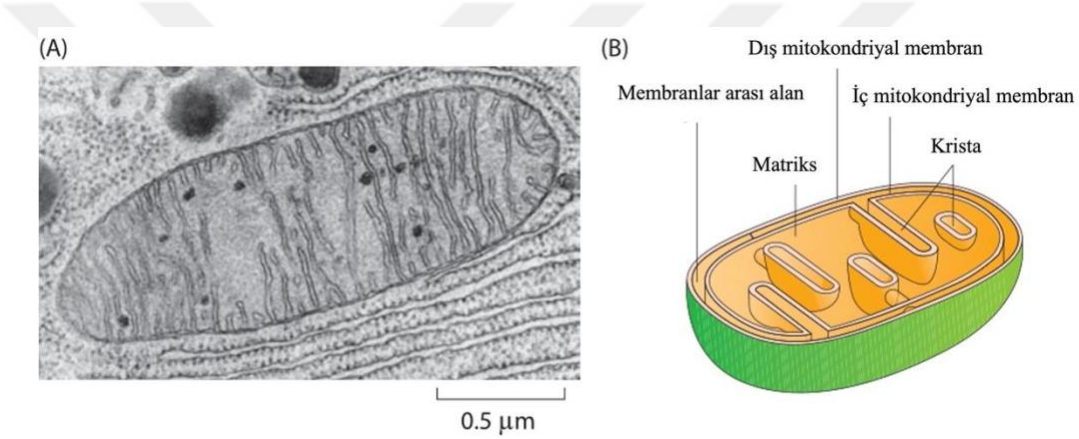
Östrojen reseptörleri (ER), ER-α, ER-ß ve G-protein-bağımlı östrojen reseptörü olan GPER (GPR30)'dir. Plazma membranı başta olmak üzere, endoplazik retikulum ve mitokondriyonda gözlenir [57–59]. Mitokondriyonda yer alan ER'lere, mitokondriyal ER (mtER) olarak özel bir adlandırma yapılır [60,61]. mtER, birçok hücre tipinde tanımlanmıştır ve E2'nin doğrudan mitokondriyon üzerindeki etkisinin açıklanmasında önemli rol oynar [61,62]. E2 eksikliği ile mitokondride hasar geliştiği ve hücre fonksiyonunda azalma olduğu görüldü [28]. Buna karşın yüksek seviyede E2'nin, endometriyal epitel hücrelerinde mitokondriyal hasarı arttırdığı bildirildi [41]. E2'nin hücrelerde mitokondri fonksiyonu ve devamlılığı üzerindeki etkisinin baskın olan reseptör tipine bağlı olduğu rapor edildi [42].

Endometriyumda, E2 ve P4 hormonları birbirine zıt etki gösterir ve P4, E2'nin proliferasyon etkisini baskılar [64]. P4'ün endometriyal hücrelerdeki etkisi, spesifik nüklear reseptör proteinleri olan progesteron reseptörleri (PR'leri) üzerinden gerçekleşir. İnsanda iki PR izoformu vardır: PR-A ve PR-B [65]. Endometriyal stromal hücrelerde PR-A ve PR-B ko-ekpresyon gösterir, fakat PR-A izoformunun daha baskın olup desidualizasyon mekanizmasında etkili olduğu gösterildi [66]. Bu nükleer PR'lerin yanı sıra mitokondri membranında da PR'nin (mPR'nin) olduğu ve P4 mitokondri üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etki gösterdiği bildirildi. P4'ün, gebelik ile artan metabolik talepleri karşılamak için hücresel enerji üretimini mPR üzerinden doğrudan etkileyebildiği ifade edildi [42]. P4'ün mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı ve mitokondri fonksiyonunu etkilediği, buna karşın yüksek dozda P4'ün mitokondri fonksiyonu üzerinde inhibe edici etki oluşturabileceği gösterildi [43,44].

Yukarıda açıklanan bilgilere dayanarak, desidualizasyon sürecinde etkili olan mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için E2 ve P4 hormonların hedefi olan mitokondriye ve ona etki eden yolakların daha ayrıntılı araştırılması gerekmektedir.

2.5. Mitokondri

Mitokondriyon (*çoğul* mitokondri), ilk olarak 1890'da hücre içindeki biyoblastlar (canlı varlıklar) olarak tanımlandı ve 1898 yılında *mitokondri* olarak adlandırıldı. Mitokondriyon terimi, hücrelerdeki tübüler ve veziküler görünümlerinin temel doğasını vurgulayan, Yunanca mitos (iplik) ve khondrion (küçük tane) kelimelerinden türetilmiştir [19,45]. Mitokondriyon, ana işlevi oksidatif metabolizma ile Adenozin Trifosfat (ATP) üretimi olan kendi genomuna sahip, çift membranlı bir organeldir [46]. Dış membran, iç membran, krista, matriks ve membranlar arası alan gibi yapılardan oluşmaktadır (Şekil 4). Mitokondri, hücreden bağımsız olarak kendi DNA, RNA (ribonükleik asit) ve protein sentezleme sistemine sahip olduğundan eski bakteriyel simbiyontlar olarak kabul edilir [47].



Şekil 4: Mitokondriyonun yapısı. A) Mitokondriyonu iki boyutlu (2D) elektron mikroskobik görüntüsü. B) Mitokondriyonun 3D şematik görüntüsü [48].

Mitokondriyon oldukça dinamik, multi-fonksiyonel bir organeldir; enerji metabolizması, aminoasit üretimi, yağ asit sentezi, apoptoz ve piroptozis gibi programlı hücre ölümü, sinyal iletimi, Ca^{+2} metabolizması ve reaktif oksijen türevlerinin (ROS'un) üretimi gibi birçok fonksiyonda görevlidir [17][9].

2.5.1. Mitokondriyal morfoloji

Mitokondriyonun morfolojisi, elektron mikroskopisinin keşfedilmesi ve hücrenin ayrıntılı olarak incelenmesiyle netlik kazanmıştır, hücrenin tipine ve fonksiyonuna göre değişim gösterdiği ortaya konulmuştur. Örneğin mitokondriyon, fibroblastlarda genellikle uzun ve daha filamentöz bir yapıda iken (1 ila 10 µm uzunluğunda, ~700 nm çapında ve oldukça

sabit), hepatositlerde daha düzgün, küre veya oval şeklinde görülür [13]. Canlı hücrelerde mitokondrinin yapısı incelendiğinde, morfolojisinin statik olmadığı görülmektedir.

1914'te Lewis ve Lewis, mitokondrinin inanılmaz derecede dinamik olduğunu, hücre içinde sürekli hareket ettiğini, kaynaştığını ve bölündüğünü bildirmesine rağmen mitokondriyonun dinamik yapısı son 20 yılda önem kazanmıştır [49]. Son 15 yılda, canlı hücre görüntüleme teknojisindeki ilerlemeler, mitokondriyonun morfolojisine ve morfolojisini kontrol eden mekanizmalara odaklanılmasını sağlamıştır. Böylece mitokondriyal morfolojideki değişimleri kontrol eden mekanizmaların araştırılması gözlenen değişikliklerin, sadece organel fonksiyonunun göstergesi olmadığını ayrıca mitokondriyonun sayısız işlevinin düzenlenmesinde gerekli olduğunu göstermiştir [13].

Yapısının ve işlevselliğinin devamlılığı mitokondrinin geçirdiği dinamik süreçlere ve sürekli olarak yenilenmesine bağlıdır [50]. Hücrenin kalite kontrol aşamalarından biri olan mitokondriyal (mt) yenilenme, mt dinamik ve mitofaji adı verilen iki önemli mekanizma tarafından gerçekleştirilir. Mt dinamik de, mt fisyon (ayrılma) ve mt füzyon (birleşme) olmak üzere iki süreçten oluşur [12]. Mitofaji ise hasarlı veya gereksiz mitokondriyonların eliminasyonu için özelleşmiş otofajik bir süreçtir [15].

2.5.2. Mitokondriyal Dinamik ve Mitofaji

2.5.2.1. Mitokondriyal Füzyon

Mt füzyon; hücrenin enerji (ATP) ihtiyacının artması ve mt homojenitenin sağlanması için aktifleşen bir mekanizmadır [12,13,17]. Bu mekanizma ile mitokondri kütlesinin artması, mitokondriye ait içeriklerin birbiri ile karışması ve hücrenin içerdiği tüm mitokondriyonların birbiri ile denk olması sağlanır. Mt füzyon mekanizması sayesinde, hasara uğramasına rağmen kurtarılabilir durumda olan mitokondriyonlar, sağlıklı olanlar ile kaynaşmakta ve hücrenin enerji kaynağının kütlesi korunmaktadır. Kısaca; ATP ihtiyacı fazla olan veya yüksek miktarda oksidatif strese maruz kalan hücrelerde mt füzyonun arttığı ve aşırı ağsı mitokondri yapısının olduğu görülmektedir [11–13,17,18].

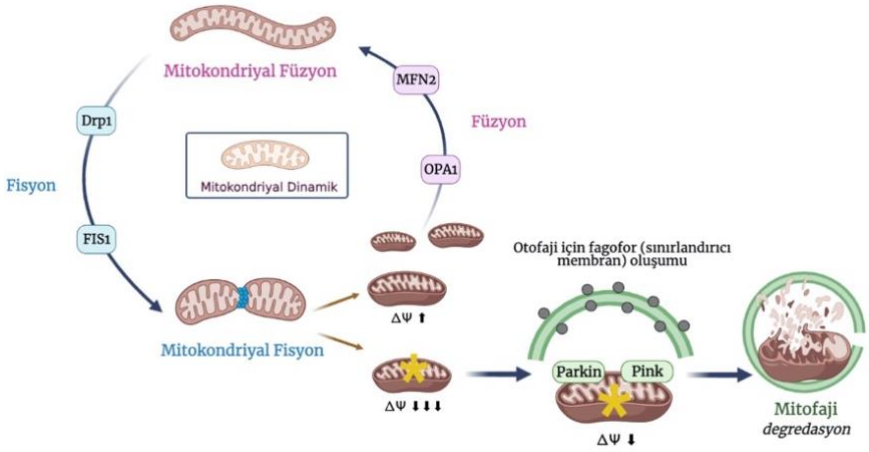
Mitokondriyonların füzyonu için ilk olarak dış membranların, daha sonra da iç membranların kaynaşması gerekmektedir. Mitokondriyonların dış membranlarının kaynaşmasında dış membranda bulunan MFN1 ve MFN2 proteinleri, iç membranların kaynaşmasında ise iç membranda bulunan OPA1 proteini rol oynar (Şekil 5) [18].

2.5.2.2. Mitokondriyal Fisyon

Mitokondriyonun diğer bir kalite kontrol mekanizması olan mt fisyon; hücre bölünmesi (proliferasyon) esnasında yavru hücrelere eşit miktarda mitokondri dağılımında görevlidir. Ayrıca, mitokondriyonun hasarlı olan parçasının sağlıklı bir mitokondriyon ile kaynaşarak kurtarılamayacak olduğu durumlarda, mitokondriyonun hasarlı ve sağlıklı parçalarının mt fisyon ile ayrılması ve ardından hasarlı mitokondriyonun mitofaji ile elimine edilmesi sağlanır [12,13,18,19]. Genetik ve hücre biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar, mt fisyon işlemi için gerekli olan iki sınıf protein tanımlamıştır. Bu proteinlerden ilki olan Drp1, hücre sitoplazmasında bulunur ve mt fisyonun ana efektörü olarak kabul edilir [20][18]. Sitozolik lokalizasyonu göz önüne alındığında mt fisyonun gerçekleşmesi için Drp1'in, sitoplazmadan mitokondriyon yüzeyine translokasyonu gerekmektedir. Drp1'in mitokondriyona bağlanmasına bir takım spesifik adaptör proteinler yardım eder. Bunlardan ikisi, mitokondriyon dış membranında bulunan MFF ve Fis1 proteinleridir (Şekil 5) [51].

2.5.2.3. Mitofaji

Mitokondri kalite kontrolünde gerekli olan diğer bir mekanizma ise mitofajidir. Mitofaji, mitokondrinin lizozom ile parçalanmasını sağlayan otofajik bir mekanizmadır ve birçok hücre tipinde mitokondri işlevselliğinin korunması için kritik bir süreçtir. Mitofaji, işlevsiz mitokondriyi seçici olarak ortadan kaldırarak mitokondrinin kalite kontrolüne katkıda bulunur; hasarlı ve disfonksiyonel mitokondrinin hücreden eliminasyonunu sağlar. Mitofaji aynı zamanda, hücredeki sağlıklı mitokondri sayısının ve kütlesinin azaltılmasında, mt fisyon ile birlikte rol oynar. Mt fisyon ile bölünen mitokondri, mitofaji ile hücreden elimine edilir [14,52]. Mitofaji mekanizmasında rol oynayan birkaç yolak vardır; bunlardan en etkili olanı Pink1/Parkin yolağıdır. Memeli hücrelerinde Pink1 ve Parkin proteinleri, mitokondrinin otofaji yoluyla atılması için mitokondriyonu işaretlenmesini sağlamaktadır (Şekil 5) [51,53].



Şekil 5: Mitokondriyal fisyon ve füzyon ile mitofaji döngüsünü gösteren şematik görüntü. Şemada, mitokondriyal fisyonda rol oynayan proteinler Drp1, Fis1 ve MFF, mitokondriyal füzyonda etkili olan proteinler MFN2 ve OPA1 ile mitofaji mekanizmasında rol oynayan proteinler Pink1 ve Parkin gösterilmiştir.

2.5.3. Mitokondriyal Dinamik ve Mitofajinin Hücredeki Rolü

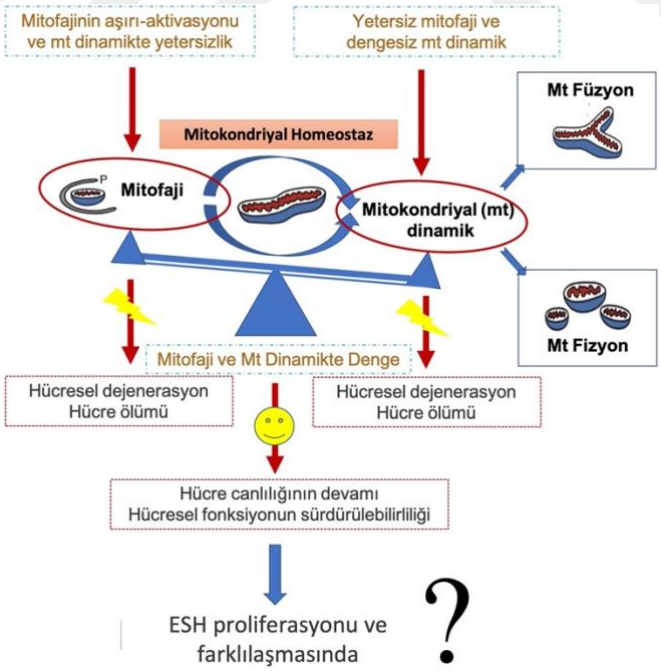
Aktif olan hücrelerde mitokondri, mitokondriyal (mt) kütlenin artması ve mt ağın oluşması için füzyona uğrar. Mt ağın kontrolü mt füzyon, fisyon ve mitofaji ile sağlanır. Mt ağda yaşlanan veya hasarlı olan kısımlar, mt fisyon ile ayrılır ve hasarlı mitokondri mitofaji ile ortadan kaldırılır. Ayrıca, daha az aktif olan veya dinlenme durumuna geçen hücrelerde, mt kütlenin azalması da mt fisyon ve mitofaji ile gerçekleşir [14].

Mitokondrinin geçirdiği füzyon, fisyon ve mitofaji süreçleri, hücrenin canlılığında ve aktivitesinde doğrudan etkilidir. Mt dinamik ve mitofaji; hem hücresel farklılaşma, proliferasyon, apoptoz, eritrosit olgunlaşması, enerji mekanizması, hücre homeostazı gibi fizyolojik olaylarda hem de patolojik süreçlerde rol oynar [14,54,55]. Mt füzyonun hücresel farklılaşmada metabolitlerin hızlı değişimi için, fisyonun ise hücre proliferasyonunda gerekli olduğu gösterildi. Hücre bölünmesinden önce mitokondri, DNA replikasyonu gibi fazla enerji isteyen mekanizmalar için hiper-fisyona uğramaktadır [56,57]. Buna ek olarak ESH'lerin elektron mikroskobik incelemesinde proliferatif ESH'lerde mitokondri sayısının arttığı ve sekretuar fazda ise mitokondriyonların büyüdüğü bildirildi [58]. Ryu ve ark (2020), in vitro olarak indüklenen desidualizasyon sonucu farklılaşan desidual-ESH'lerde mitokondri uzunluğunun ve hücresel enerji (ATP) üretiminin azaldığını gösterdi [59].

Sağlıklı hücrelerde mt dinamik ve mitofaji arasındaki denge önemlidir. Şekil 6'de özetlendiği üzere; mitofajinin artması ve mt dinamiğin yetersiz olması durumunda denge mitofaji yönünde değişir. Mt fisyon ile mitokondri sayısının, mt füzyon ile de mitokondri

kütlesinin artması, buna karşın yeterli mitofajinin olmaması durumunda denge, mt dinamik yönünde gelişir. Her iki durumda da hücresel dejerenasyon ve hücre ölümü gerçekleşir [14,50].

Mitokondriyal hasar sonucunda mitofaji ile elimine edilmeyen disfonksiyonel mitokondri sayısının mt dinamik ile arttırılması, hücrenin yapısında ve mekanizmasında önemli değişimlere sebep olmaktadır. Endometriyal kanserde mitokondriyal fisyonun, ROS üretiminin ve sonuç olarak mt disfonksiyonun arttığı gösterildi [60]. Endometriozis ile ilgili yapılan araştırmalar ise mt disfonksiyonun endometriozis ile de ilişkili olduğunu ve mt fisyon mekanizmasının indüklenmesi ile endometriyotik ESH'lerin canlılığında ve migrasyonunda azalma olduğu gösterildi [32,61] Bu bilgiler ışığında, mt dinamik ve mitofaji yolaklarındaki değişimin ve dengesizliğin, hasarlı mitokondri miktarında artışa sebep olarak proliferasyon, apoptoz, hücresel motilite, migrasyon ve metabolizma gibi süreçleri etkileyip yetersiz desidualizasyon, implantasyon hataları, tekrarlayan düşükler gibi patolojilerin mekanizmalarında rol oynadığı bilinerek, ESH'lerin proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan mt dinamik ve mitofaji yolaklarının incelenmesi ve bu yolaklarda E2 ve P4 hormonların etkisinin araştırılması amaçlandı (Şekil 5).



Şekil 6: Mitokondriyal dinamik (mt füzyon ve fisyon) ve mitofaji arasındaki denge

3. YÖNTEM

Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa (İÜC) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilen 17.05.2019 tarihli ve 41421735-302.14.02-75595 sayılı etik kurul onayı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Leibovitz-15 medyum (Pan-Biotech: P04-27500)

Dulbecco'nun modifiye edilmiş fenol red içermeyen Eagle medyumu (DMEM/F12) (ThermoFisher: 11039021)

Amfoterisin B solüsyonu (ThermoFisher: 15290026)

Penisilin+Streptomisin (Hyclone: SV30010)

Antibiotik/antimikotik (Gibco: 15240062)

Fetal bovine serum (FBS: Hyclone: HY30160.03)

Aktif kömür tozu (activated charcoal) (Sigma-Aldrich: C9157)

Deoksiribonükleaz I (Sigma-Aldrich: DN25)

Kolajenaz, Tip I (ThermoFisher: 17018029)

Tripsin/EDTA solüsyonu (ThermoFisher: 25200056)

Medroksiprogesteron-17 asetat (MPA) (Sigma-Aldrich: 46412)

ß-Östradiol (Sigma-Aldrich: E8875)

Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) (BioShop Canada)

Anti-DRP1 antikor (4E11B11) (Novus: NBP2-23489)

Anti-MFF antikor (Novus: NBP1-86799)

Anti-MNF2 antikor (Abcam: ab56889)

Anti-OPA1 antikor (Boster: PB9731)

Anti-FIS1 / TTC11 antikor (Novus: NB100-56646)

Anti-Parkin/PRKN antikor (Boster: PB9307)

Anti-PINK1 antikor (Boster: A00201)

Anti-Vimentin antikor (Boster: PB9359)

Anti-Vimentin antikor (Abcam: ab92547)

Anti-E-kaderin antikor (Abcam: ab40772)

Anti-Sitokeratin 7 (KRT7) antikor (Boster: M02416-1)

Anti-Beta (ß)-actin antikor (C4) (Santa Cruz: sc-47778)

Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG H&L antikor (Abcam: ab175471)

FITC goat anti-mouse IgG antikor (Santa Cruz: sc-2010)

FITC goat anti-rabbit IgG antikor (Santa Cruz: sc-2012)

Anti-biotin HRP-linked antikor (Cell Signaling: 7075S)

DAPI içeren kapatma medyumu (Abcam)

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack (Cell Signaling: 7727)

HRP conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Boster: BA1050)

HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Boster: BA1054)

HRP peroksidaz polyvalent kit (ScyTek: SHP125)

Ultravision polyvalent HRP Kit (ThermoFisher: TA-060-HD)

Sodyum deoksikolat (Sigma: 30970)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Fisher Scientific: BP166-500)

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Fisher Scientific: BP120-1)

2-merkaptoetanol (Fisher Scientific: BP176-100)

Proteaz ve fosfataz inhibitör (ThermoFisher:78440)

Kemiluminesans (ECL) HRP substrat kit (Advansta: K-12045)

DAB kromojen kit (ThermoFisher)

Paraformaldehit (Merck: 1.04005.1000)

Formaldehit

Etanol

Etil Alkol %96 (Alkomed: CAS 64-17-5)

Toluen (Merck: 108323)

Metanol (Sigma-Aldrich: 24229)

Hematoksilen (Invitrogen 00-8011)

Eozin (Merck: 1.15935)

Entellan (Merck 1.07961)

Trizma-Base (Sigma: T1503)

Triton X-100 (Fisher BioReagents: BP151)

Tween-20 (Sigma: P2287)

Bovine Serum Albumin (BSA, Santacruz)

Non-fat dry milk

Glisin

NaOH (Carlo Erba Reagenti: 1310-73-2)

Sodyum sitrat (Merc: 1.06448.1000)

Sitrik asit monohidrat (Merc: 100244)

Hidrojen peroksit (Merck Millipore: 1.08600)

Lityum karbonat (Merck Millipore: 105671)

Gluteraldehit (Merck Millipore: 1.04239.0250)

Osmium tetroksit (Merck Millipore: 1.00983.2511)

Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma, 45359)

Jelatin Kapsül (EMS, 70104)

Etil Alkol %96 (Alkomed: CAS 64-17-5)

Propilen oksit (Merck: 8.07027.1000)

Toluidin mavisi (Merck: 7471451)

Uranil asetat dihidrat (Merck: 4087843)

Kurşun sitrat (Sigma 15326-100G)

3.1.2. Alet ve Teçhizatlar

1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

10-200 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

100-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik mikropipet uçları

Steril serolojik pipet 10 ml (Sarstedt: 1254001)

15 ml'lik steril santrifüj tüpü (İsolab: S.078.02.002)

50 ml'lik steril santrifüj tüpü (İsolab: S.078.02.008)

2 ml'lik ependorf tüpü (İsolab: S.078.03.003)

1,5 ml'lik ependorf tüpü (İsolab: S.078.03.002)

Kültür petri dish (BD Falcon)

25 m^2'lik hücre kültür kabı (Jet Biofil: TCF-012-050)

75 m^2'lik hücre kültür kabı (Jet Biofil: TCF-012-250)

24 kuyucuklu doku kültür kabı (Biofil: TCP 011024)

40 µm'lik hücre filtresi (Corning Falcon: 352340)

70 µm'lik hücre filtresi (Corning Falcon: 352350)

100 µm'lik hücre filtresi (Corning Falcon: 352360)

Tek kullanımlık filtre 0,2 µm (Sartorius Biotech: 1653400449103)

Hemositometre (Marienfeld: 0640010)

Lam (Marienfeld)

Pozitif şarjlı lam (Thermo Scientific)

Yuvarlak lamel (Marienfeld)

Mikrotom bıçağı (Feather: 4685-S35)

%12 Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Protein jel (Biorad: 4561044)

Whatman paper

Nitrocellulose blotlama membrane (pore size 0.2 um 0.3 x 0.3 m roll)

3.1.3. Cihazlar

Sterile edilmiş sınıf II laminar havalandırmalı kabin (Esco: Class II) İnkübatör (Thermo Scientific: Heracell 150i)

Sıvı Azot Tankı (Thermo Scientific)
Santrifüj (Eppendorf: 5810 R)

Buzdolabı (Arçelik)

Vorteks (Biocote: Stuart SA8)

Dijital çalkalamalı sıcak su banyosu (Fisher Scientific)

Manyetik karıştırıcı (IKA Rct Basic)

Elektrikli pipet pompası (Ratiolab: Accupetta)

Hassas terazi (Sartorius)

Etüv (Heraeus)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Distile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)

Masaüstü otoklav (Thermo Scientific Varioklav: 25T

Mikrotom (Thermo Scientific: Microm hm430)

Ters (İnvert) mikroskop (Olympus IX71)

Işık mikroskobu (Olympus BX61)

Kamera (Olympus DP72)

Protein Elektroforezi (Mini Protean Tetra Cell) (Biorad: 1658001)

TransBlot Turbo Transfer System (Biorad: 1704150)

Güç Kaynağı (Biorad: 1645050)

Kemilüminesan Western Blot Görüntüleme Sistemi (Azure 300: AZI300)

AzureSpot analysis software (Azure: AC1061)

Geçirimli elektron mikroskobu (Jeol Jem-1011)

Ultramikrotom (Leica, EM UC7)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Endometriyum ve Desidua Doku Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan endometriyum ve term plasenta doku örnekleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine, 1. trimester plasenta doku örnekleri ise Medicana Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvurmuş vericiden, gerekli bilgilendirme yapılıp onam alındıktan sonra alındı. Bu hususta gerekli etik kurul izni; İÜC, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (Tarih: 17.05.2019, Sayı: 41421735-302.14.02-75595).

Endometriyum stroma dokuları; endometriozis, adenomiyoz veya hiperplastik endometriyal hastalığı olmayan, düzenli menstrual siklusa sahip ve önceki 3 ayda hormonal ilaç tedavisi almayan benign jinekolojik durumlar için laparoskopi veya histerektomi uygulanan sağlıklı, 25-40 yaş arası, fertil kadınlardan toplandı. Menstrual siklus için sınıflandırma; erken proliferatif (1.-6. günler), geç proliferatif (7.-14. günler), erken sekretuar (15.-18. günler), orta sekretuar (19.-23. günler), geç sekretuar (24.-28. günler) fazlarına göre yapıldı [47]. Bu çalışmada her fazdan 5 adet endometriyum stroma doku örneği alındı (Tablo 1).

Plasenta desidua dokuları; ilk trimesterde (8.-12. Haftalar) gebeliğin istemli olarak sonlandırılması ve son (term) trimesterde normal süresinde gerçekleşen sezeryan doğum (34,9 ± 5.6 hafta) operasyonlarından temin edildi [76–78]. Desidua doku örnekleri için her iki grupta 5'er doku örneği toplandı (Tablo 1). Kontaminasyon riskini düşük tutmak amacıyla sezaryen doğum yapan hasta tercih edildi.

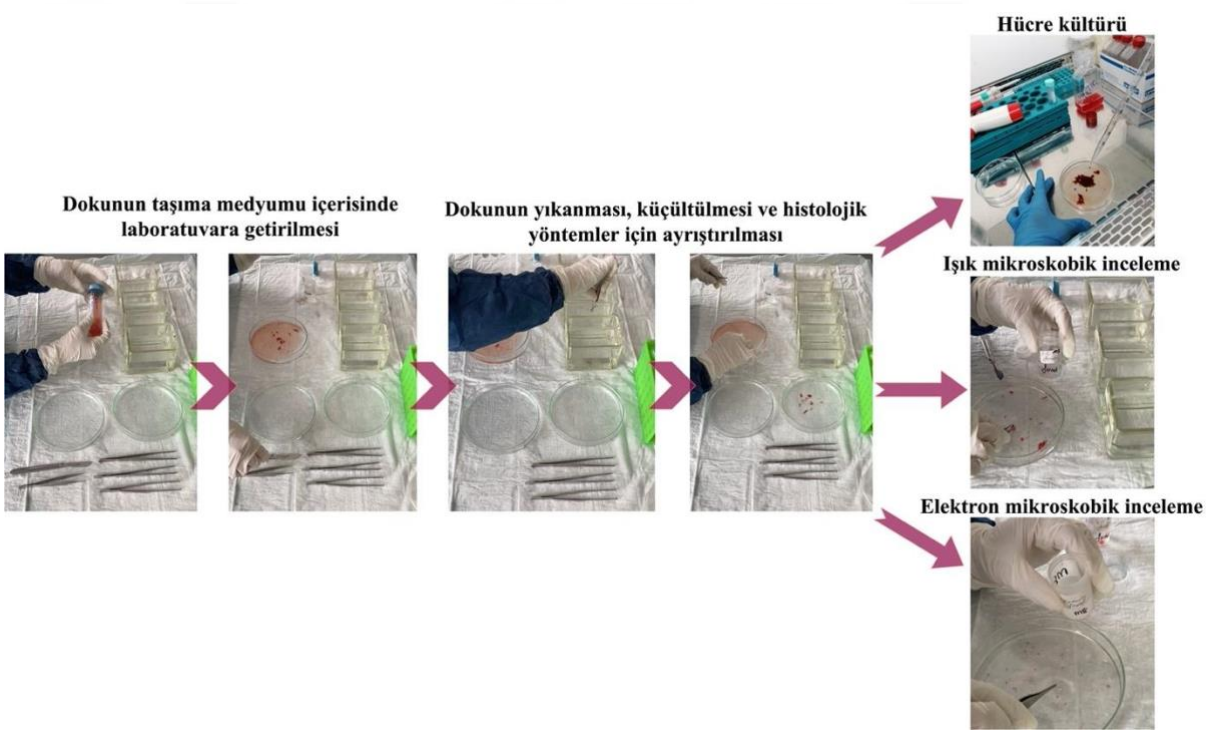
Tablo 1: Çalışmada kullanılan gruplar

Grup adı	Açıklama	Örnek Sayısı (n)
EP	Erken proliferatif faza ait endometriyum	5
GP	Geç proliferatif faza ait endometriyum	5
ES	Erken sekretuar faza ait endometriyum	5
OS	Orta sekretuar faza ait endometriyum	5
GS	Geç sekretuar faza ait endometriyum	5
FP	İlk trimester dönemine ait desidua	5
TP	Son trimester dönemine ait desidua	5

Alınan stroma doku örnekleri ve ilk trimester dönemine ait düşük / kürtaj materyali; düşük sıcaklıkta, Leibovitz's L-15 Medyum (%1 antibiyotik / antimikotik) içerisinde, term plasenta ise patolojik kap ile hızla laboratuvara getirildi.

3.2.2. Endometriyum Doku Örneklerinin Histolojik İnceleme Yöntemlerine Uygun Hale Getirilmesi

Endometriyum dokuları, steril petri kabı içerisine alınarak kan pıhtılarından arınana dek fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile steril kabin altında yıkandı, kan ve döküntü/atıklardan arındırıldı (Şekil 7). Doku parçaları hücre kültürü, ışık ve elektron mikroskobik yöntemlerde kullanılmak üzere küçültülerek üçe bölündü (Şekil 7).

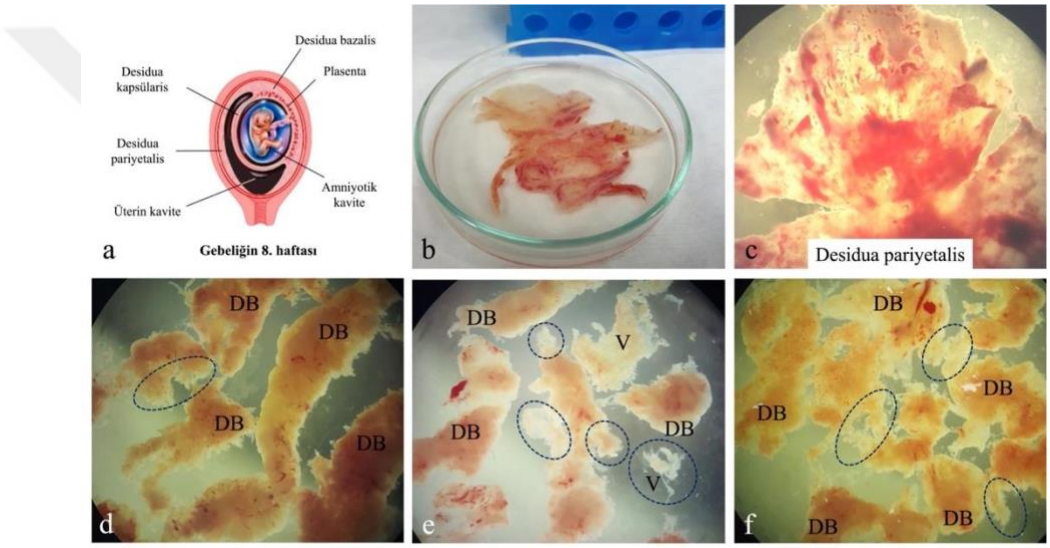


Şekil 7: Alınan doku örneklerinin histolojik inceleme yöntemleri için uygun hale getirilmesini gösteren fotoğraflar.

3.2.3. Desidua Doku Örneklerinin Histolojik Yöntemlere Uygun Hale Getirilmesi

3.2.3.1. İlk Trimester Düşük Materyalinden Desidua Doku Örneklerinin Eldesi

İlk trimester düşük materyali, steril kabın içine alınarak kan pıhtılarından arınana dek PBS ile yıkandı (Şekil 8). Petri kabına yerleştirilen dokular Stereo mikroskop ile incelendi, villus ve desidua dokuları mikroskop altında tanımlandı (Şekil 8). Villus kan damarı içermeyen, saçaklı ve beyaz doku olarak, desidua dokusu ise kan damarı içeren ve villusa göre daha koyu renkli dokular olarak tespit edildi (Şekil 8 d, e ve f). Çalışma için sadece desidua bazalis dokusu alındı, villus ve desidua pariyetalis incelemeye dahil edilmedi (Şekil 8 b, c). Çalışmamızda desidua olarak isimlendirilen dokular, desidua bazalise aittir.



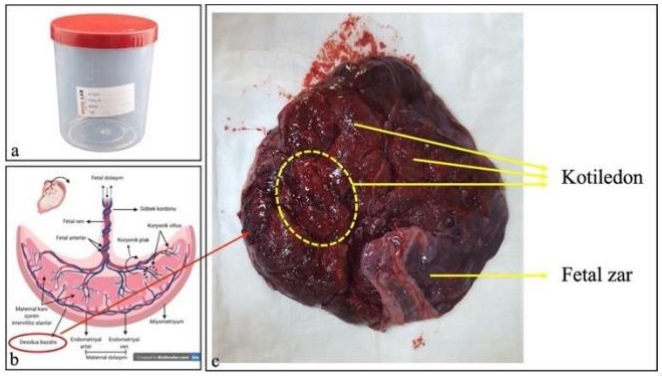
Şekil 8: İlk trimester plasenta. a) Gebeliğin ilk trimester dönemine ait desidua bazalis ve pariyetalis ile villus dokularının şematik görüntüsü. b) Alınan ilk trimester düşük materyali. c) Desidua paryetalisin stero mikroskobik görüntüsü. d, e, f) Desidua bazalis (DB) ve villus (daire içi) dokularının stero mikroskop altındaki görüntüleri. V: Villus.

Desidua dokuları hücre kültürü, ışık ve elektron mikroskobik yöntemlerde kullanılmak üzere uygun boyutlarda kesilerek ayrıştırıldı (Şekil 7).

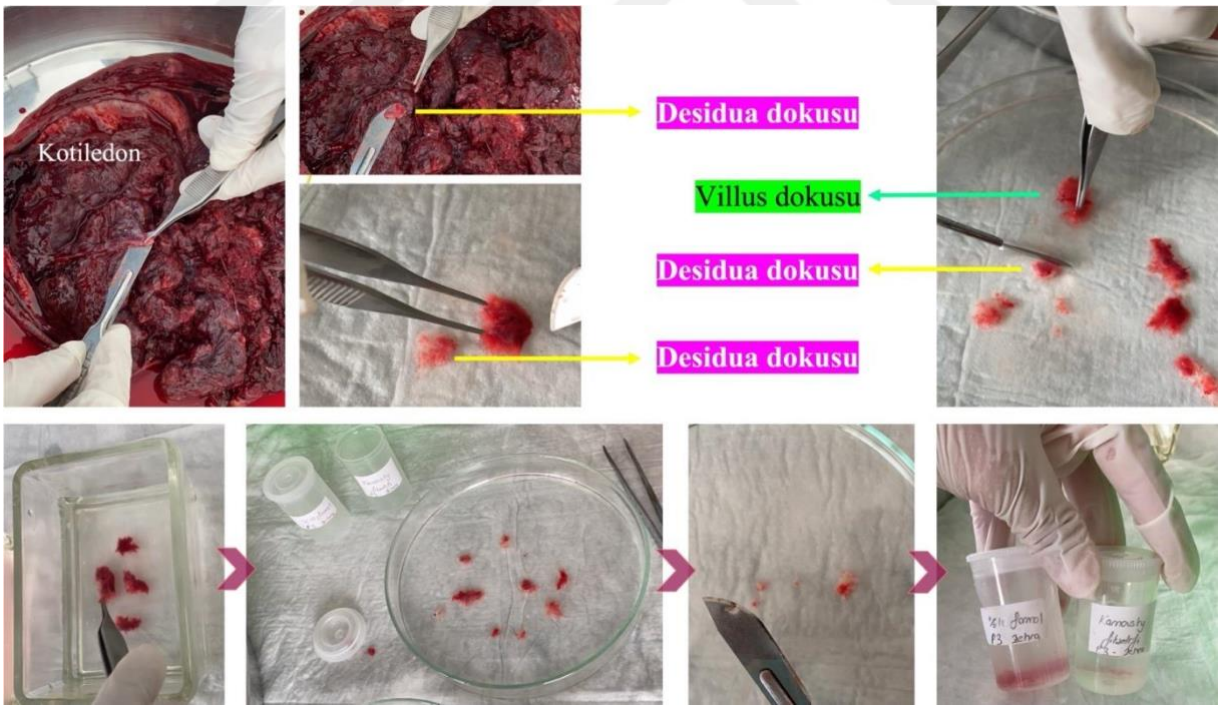
3.2.3.2. Term Plesantadan Desidua Dokusunun Eldesi

Desidua doku örneklerinin eldesi için patolojik kap (Şekil 9a) ile laboratuvara getirilen plasenta, maternal yüzü (kotiledonlar) yukarı bakacak şekilde medikal beze konuldu (Şekil 9b ve c). Plasentanın maternal ve fetal kısımları makroskobik olarak tanımlandı ve fetal zar kesilerek uzaklaştırıldı (Şekil 9c). Şekil 10'de gösterildiği üzere; kotiledon yüzeyinden ince bir

parça kesilerek elde edilen desidua dokusundan saçaklı ve koyu renkli olan villus parçaları elimine edildi, ardından PBS ile yıkanan desidua dokusu histolojik yöntemlere uygun boyutlarda küçültüldü (Şekil 10).



Şekil 9: Term plasenta. a) Term plasentanın laboratuvara taşınmasında kullanılan patoloji kabı. b) Term plasentanın maternal (desidua) ve fetal kısımlarını gösteren figür. C) Term plasentanın kotiledonları içeren maternal yüzü ve kotiledonları saran fetal zar.



Şekil 10: Term plasentadan desidua bazalis dokusunun alınması. Sırasıyla; term plasentanın kotiledon yüzünden ince bir parça olarak alınan desidua dokusundan plasentanın villus kısmının bistüri ile uzaklaştırılması, ardından desidua dokularının PBS ile yıkanması ve histolojik yöntemlere uygun boyutlarda küçültüldükten sonra gerekli fiksatifin uygulanması.

3.2.4. İmmünohistokimya Analizi

Doku örneklerinde mt dinamik ve mitofaji belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri immünohistokimya (IHC) analizi ile boyanmanın şiddeti ve yaygınlığına göre değerlendirildi (Tablo 2).

IHC analizi için dokuların parafin blok haline getirilmesinde uygulanan işlemler:

1. Dokular, fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonunda 24 sa fikse edildi.
2. Ardından yükselen alkol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) bekletilerek dehidrate edildi.
3. Toluen ile şeffaflaştırma işlemi yapıldı.
4. Saf parafine geçişi kolaylaştırmak amacıyla 1:2 oranında toluen & parafin karışımında bekletildi.
5. 56°C'deki etüvde sıvı parafin ile inkübasyonu takiben parafin bloklara gömüldü.
6. Bloklardan mikrotom ile 4 μm kalınlığında alınan kesitler IHC analizinde kullanıldı.

IHC yönteminde uygulanan işlemler [79]:

1. Doku kesitleri parafinin giderilmesi için 56^{o}C etüvde bekletildi.
2. Ardından sırasıyla %100, %96, %90, %70 alkol serisinden geçirilerek rehidrate edildi ve tris tampon solüsyonunda (TBS'te) (pH=7,6) bekletildi.
3. Doku kesitleri, mikrodalga fırın kullanılarak ısıtılan 95-98^{o}C'deki sitrat tampon solüsyonunda (pH=6,0) bekletilerek antijen iyileştirme yapıldı. Sitrat tamponunda bekletilme süresi primer antikora göre farklılık göstermektedir.
4. TBS ile yıkamanın (3x5 dk) ardından doku kesitleri endojen peroksidazı bloklamak amacıyla %3'lük H_2O_2'de bekletildi.
5. 2 x 5 dk TBS ile yıkama sonrası dokunun etrafı hidrofobik kalem (pappen) ile sınırlandıldı ve ardından doku kesitleri Tween-20 (%0,1) içeren TBS'te (T-TBS'te) 5 dk bekletildi.

6. Bloklama işlemi sonrasında doku kesitleri, yıkama yapılmadan, primer antikor ile +4ºC'de 16-18 sa (overnight) humidity chamber içinde inkübe edildi. Tablo 3'de, IHC yönteminde kullanılan primer antikorlara ve dilüsyonlarına ait bilgiler verildi.

Tablo 2: IHC'de kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları

Mt Füzyon	Mt Fisyon	Mitofaji	Stroma Hücre	Epitel Hücre	Trofoblast
MFN2 (1:500)	**Drp1** (1:100)	**Pink1** (1:500)	**Vimentin** (1:500)	**E-kaderin** (1:500)	**Sitokeratin-7** (1:500)
OPA1 (1:200)	**Fis1** (1:100)	**Parkin** (1:200)			
	MFF (1:100)				

7. Ertesi gün doku kesitlerinden primer antikor uzaklaştırıldı ve 3 x 5 dk T-TBS ile yıkama yapıldı.

8. Yıkama sonrasında kesitlere sekonder antikor uygulandı ve RT'de 20 dk bekletildi.

9. 3 x 5 dk T-TBS ile yıkamanın ardından kesitler, RT'de 20 dk streptavidin-biyotin-peroksidaz solüsyonu ile inkübe edildi.

10. Yıkanan kesitlere DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojen solüsyonu uygulandı.

11. TBS ile yıkanan doku kesitlerine Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

12. Yükselen alkol serilerinden (sırasıyla; %90 - %95 - %100 - %100) geçirilen doku kesitleri tolüende bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

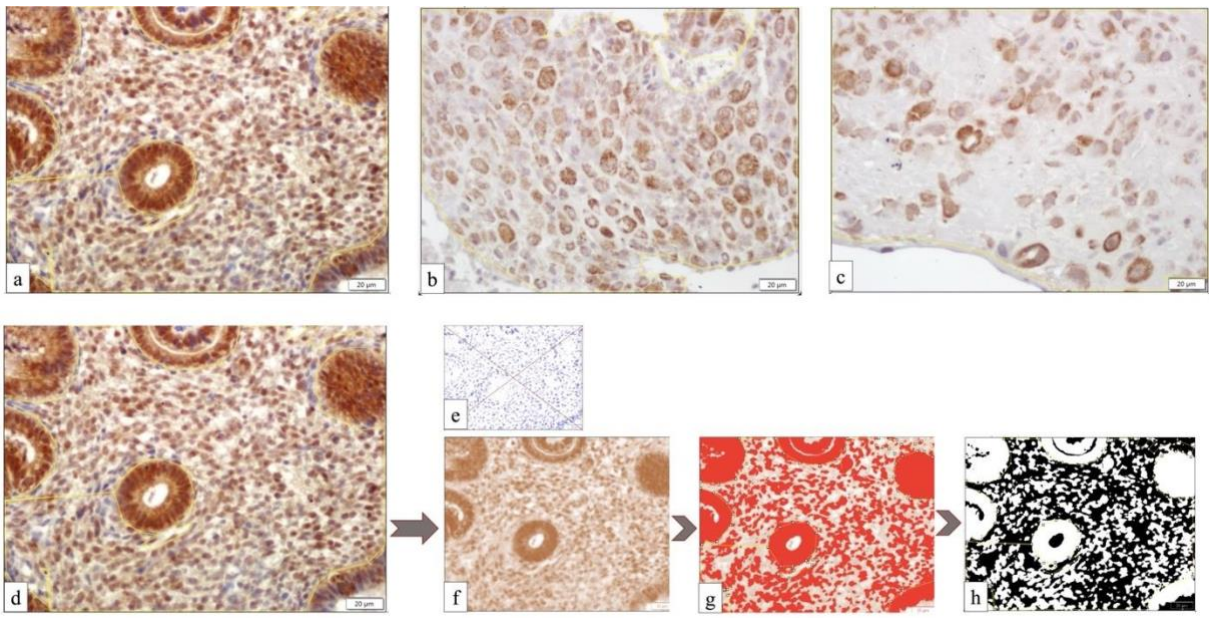
13. Olympus BX61 ışık mikroskopu ile görüntüleme yapıldı. Doku kesitlerinin, 20X ve 40X büyütmelerde fotoğrafları çekildi.

14. Doku örneklerinde mt dinamik ve mitofaji belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri, boyanmanın şiddetine ve yaygınlığına göre HSCORE ve Fiji (Image J; 2020) yazılımı kullanılarak değerlendirildi (Şekil-13).

Menstrual siklusun; EP, GP, ES, OS ve GS fazlarına ait endometriyum dokuları ile FP ve TP desidua dokularına ait kesitlerde her bir mitokondriyal proteinin ekspresyon seviyesi hem HSCORE hem de Fiji yazılımı kullanılarak skorlandı [62,63]. Skorlamalarda her örnek için 40X büyütmede çekilen 5 farklı alan kullanıldı [64]. Endometriyum dokularında ESH'ler ve glandular epitel hücrelerinde, desidua dokularında ise sadece DH'lerde skorlama yapıldı. Mitokondriyal proteinlerin immün işaretlemesinin şiddeti ve yaygınlığı, semikantitatif H-skor ('Histo' Score / HSCORE) yöntemi ile ölçüldü. HSCORE yönteminde kullanılan şiddet değerleri; 0, (herhangi bir boyanma yok), 1+ (zayıf fakat kontrole göre kısmen boyanmış), 2+ (orta derecede boyanma var) ve 3+ (yoğun boyanma var) olarak belirlendi. Belirlenen şiddet değerlerinde boyanan hücrelerin yüzdesi ile boyanma şiddetlerinin çarpımlarının toplanması ile HSCORE skorlaması yapıldı [HSCORE= $\sum P_i(i + 1)$; i, boyanma şiddeti değeri; P_i, boyanan hücre yüzdesi] [62,64].

Fiji yazılımında ise açılan her bir endometriyum doku mikrografında stromayı içeren alanlar, plasenta dokusuna ait mikrografta ise Vimentin IHC'si ile tanımlanan desidua dokusunun olduğu tahmin edilen alanlar seçildi. Daha sonra, Fiji yazılımındaki *'color deconvolution'* komutu ile Hematoksilen (H) ve DAB renk kanallarına ait görüntüler açıldı. H kanalına ait görüntü analize dahil edilmediğinden kapatıldı, skorlama için DAB kanalına ait görüntü kullanıldı (Şekil 11 e ve f). Şekil-11'de gösterildiği üzere; DAB renk kanalına ait mikrografa uygulanan *'eşik değeri (threshold)*' komutu sonrasında pozitif hücreler belirlendi (Şekil 11 g ve h) ve boyanmanın şiddeti ve yoğunluğu seçilen alana oranla yüzde (%) olarak hesaplandı.

Endometriyum ve desidua dokularında IHC skorlaması için en uygun skorlama analizinin belirlenmesi amacıyla, semi-quantitative HSCORE'dan ve Fiji yazılımından elde edilen veriler karşılaştırıldı.



Şekil 11: IHC yöntemi uygulanan dokuda mt belirtecin Fiji yazılımı ile skorlanması. a-c) IHC uygulanan dokularda Fiji ile skorlama öncesi yapılan alan seçimine örnek olarak EP grubuna ait endometriyum dokusu (a) ile FP (b) ve TP (c) desidua dokularının mikrografları yer almaktadır. Fiji yazılımında esas mikrografın (d) *'Color Deconvolution - H+DAB'* komutu sonrasında açılan kanallarından biri olan H kanalına ait mikrograf (e) analize dahil edilmemekte, DAB kanalı (f) değerlendirmeye alınmaktadır. DAB kanalına ait görüntüye uygulanan *'eşik değeri'* komutu (g) sonrasında açılan siyah beyaz kanalda (h) ölçüm yapılmakta ve veri elde edilmektedir.

3.2.5. Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

3.2.5.1. Endometriyal Stroma Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

Stroma biyopsi örneklerinden hücre kültüründe kullanılmak üzere alınan doku parçaları, steril bir petri içerisine aktarıldıktan sonra bisturi yardımıyla 3 mm^3'ten küçük parçalara bölündü ve sonrasında PBS ile yıkanarak 50 ml'lik falkonda toplandı. PBS'i uzaklaştırmak adına 300 g'de 2 dakika (dk) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pelletteki doku parçaları üzerine 3 ml PBS konuldu. Ardından, üzerine sindirim enzimleri (kollajenaz I, DNAse), charocaoled/dextran stripped FBS (c-FBS), antibiyotik/antimikotik (ab/am) ve HBSS (Ca(+), Mg(+)) ile hazırlanan sindirim medyumu eklenerek 37°C'de 1 saat (sa) inkübe edildi. Daha sonra enzimatik aktiviteyi nötralize etmek için üzerine DMEM/F12 (%2 c-FBS ve %1 ab/am) medyumu ilave edildi. Bu aşamadan sonra ESH'lerin diğer hücrelerden ayrıştırılması amacıyla sindirilen materyal 40 µm'lik filtreden geçirilerek süzüldü. Falkona süzülen hücre süspansüyonu oda sıcaklığında (RT), 280 g'de 5 dk santrifüj edilerek sindirim medyumu uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası, süpernatant dikkatlice aspire edildi, pellet üzerine 1 ml

medyum eklenerek pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu, kültür medyumu (fenol redsiz DMEM/F12(1/1), %10 c-FBS, 1% ab/am) içeren T25 flasklara ekildi, 37ºC sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatörde bir gece (6-18 saat) inkübasyon sonrası medyum değiştirildi. Bu sayede kan hücreleri, doku artıkları ve epitel hücreleri gibi yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Mikroskop altında iğ biçimli stroma hücreleri gözlendi. Kültür kabına yapışan hücrelerin medyumları haftada üç defa değiştirildi ve hücrelerin çoğalmasına izin verildi. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığı zaman pasaj yapıldı ve 1. pasaj (P1) hücreleri T75 kültür flasklarına aktarıldı. P2'ye ulaşan hücrelerin ilk olarak tripan mavisi ile canlılığı ardından immünositokimya (ICC) analizi ile saflığı değerlendirildi.

3.2.5.2. Desidua Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

Alınan desidua doku örnekleri; steril bir petri içerisine konularak bisturi yardımıyla 3 mm^3'ten küçük parçalara bölündü ve sonrasında PBS ile yıkanarak 50 ml'lik falkonda toplandı. PBS'i uzaklaştırmak adına 300 g'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pelletteki doku parçaları üzerine 3 ml PBS konuldu. Ardından, üzerine desidua hücre izolasyonu için farklı gramajlarda hazırlanan sindirim enzimleri (kollajenaz I, DNAse), ab/am, c-FBS ve HBSS ile hazırlanan sindirim medyumu eklenerek 37°C'de 1 sa inkübe edildi. Daha sonra enzimatik aktiviteyi nötralize etmek için üzerine DMEMF/12 (%2 c-FBS ve %0,1 ab/am) medyumu ilave edildi. Hücre kümelerini ve doku debrislerini elimine etmek amacıyla 100 ve 70 µm'lik filtreler, DH'leri izole etmek için 40µm'lik filtre kullanıldı. Süzülen hücre süspansüyonu RT'de, 450 g'de 5 dk santrifüj edilerek sindirim medyumu uzaklaştırıldı, ardından süpernatant dikkatlice aspire edilerek pellet üzerine 1 ml medyum eklenip, pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu, kültür medyumu (fenol redsiz DMEM/F12(1/1), %10 c-FBS, 1% ab/am) içeren T25 flasklara ekilerek, 37ºC sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 6-18 saat inkübasyon sonrası medyum değiştirildi. Bu sayede, kan hücreleri, doku artıkları ve trofoblast hücreleri gibi yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Kültür kabına yapışan hücrelerin medyumları haftada üç defa değiştirildi ve hücrelerin çoğalmasına izin verildi. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığı zaman pasaj yapıldı ve P1-P3 hücreleri T75 kültür flasklarına aktarıldı. P3'e ulaşan hücreler, canlılık ve saflık analizi ile değerlendirildi.

ESH'lerin saflığı P2'de, DH'lerin saflığı ise P3'te sağlandı. Deneyde kullanılacak hücrelerin fenotipik ve genotipik ekspresyonlarındaki değişimden kaçınılması amacıyla saflığın elde edildiği minumum pasaj sayıları tercih edildi [83].

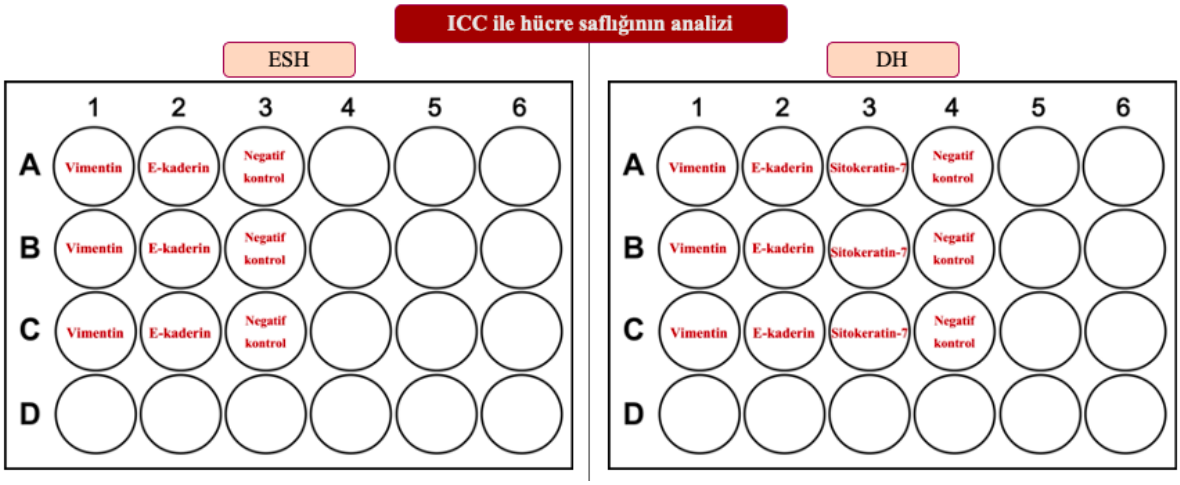
3.2.5.3. İmmünositokimya ile Hücre Saflığının Değerlendirilmesi

Hormon deneylerinden önce izole edilen hücrelerin saflığının değerlendirilmesi amacıyla immünositokimya (ICC) analizi yapıldı. ICC için 24 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilen steril coverslip üzerine 30.000 hücre/ml ekildi ve yayıldı (Şekil 12). Ekilen hücreler 3 sa inkübatörde bekletilerek hücrelerin coverslipe yapışması sağlandı. Ardından, kuyucuklara 1 ml medyum eklenerek 24 sa inkübe edildi (37^{o}C ve %5 CO_2). İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırıldı. PBS ile yıkanan hücreler, 500 µl %4'lük paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi. PBS ile yıkama sonrası hücrelerin geçirgenliğinin arttırılması amacıyla hücreler %0,2 Triton-X100/PBS solüsyonunda 15 dk bekletildi ve yıkama yapıldı. Bloklama sonrası hücreler, primer antikor ile 16-18 saat +4^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol için hazırlanan kuyucuğa PBS konuldu.

Hücre saflığının analizi için kullanılan primer antikorlar (Tablo 2):

- Vimentin: ESH ve DH belirteci
- E-kaderin: Endometriyal epitel ve amniyotik epitel hücre belirteci
- Sitokeratin-7: Trofoblast belirteci

İnkübasyon sonrası, PBS ile 3 kere 5 dk (3x5 dk) yıkamanın ardından hücreler biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda RT'de 20 dk bekletildi. Yıkamadan sonra hücreler, streptavidin peroksidaz solüsyonu ile 20 dk RT'de inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkama yapılıp hücrelere yeterli sürede DAB kromojeni uygulandı. Kromojen reaksiyonunu durdurmak amacıyla PBS ile yıkama sonrası hücrelere Mayer's hematoksilen (1:2 çeşme suyu ile dilüe) uygulanarak nükleer zıt boyama yapıldı. Yıkama sonrası coverslipe yapışan hücreler, yükselen alkol serilerinden (%90 – 96 – 100) ve toluenden geçirilip coverslipin hücre olan yüzü ters çevirilerek lam üzerine gelecek şekilde entellan ile kapatma yapıldı. Her örnekten izole edilen hücrelerin saflığının değerlendirilmesi için ICC analizi 3 kere tekrar edildi. Hücreler, Olympus BX61 ışık mikroskopu ile 40X büyütmede incelenip fotoğraflandı. Hormon deneyinde kullanılacak hücrelerin saflığı; ESH'ler için %90'dan fazla vimentin pozitif (+) ve %10'dan az e-kaderin + hücre, DH'ler için %90'dan fazla vimentin + ve %10'dan az e-kaderin ve sitokeratin + hücre oranına göre değerlendirildi [84–87].



Şekil 12: ESH ve DH'lerin saflığının değerlendirilmesi için kullanılan ICC deney düzeneği

3.2.6. İn Vitro Hormon Deneyi

Çalışmamızda; ESH ve DH'lerdeki mt füzyon, fisyon ve mitofajiye ait belirteçlerin ekspresyon seviyelerinde östrojen ve/veya progesteron hormonlarının etkisinin araştırılması hedeflendi. E2 ve P4, menstrual siklus ve gebelik sürecinde etkili olan, ESH'lerin döngüsel değişimi ile DH'lere dönüşümünde rol oynayan steroid hormonlardır [88]. Menstrual siklusun proliferatif fazı E2'nin hakimiyetinde iken siklusun sekresyon fazında ve gebelik sürecinde; E2'nin de önemli etkisine rağmen, P4'ün daha baskın olduğu bilinmektedir [88–90]. Bu doğrultuda çalışmamızda, menstrual siklusun proliferatif fazına ait ESH'lere ve gebeliğin ilk trimester ile term dönemine ait DH'lere E2 ve P4 hormonları ayrı ayrı ve birlikte (E2+P4) uygulandı [47,82,91].

Hormon deneyi için kısaca şu basamaklar izlendi [82]:

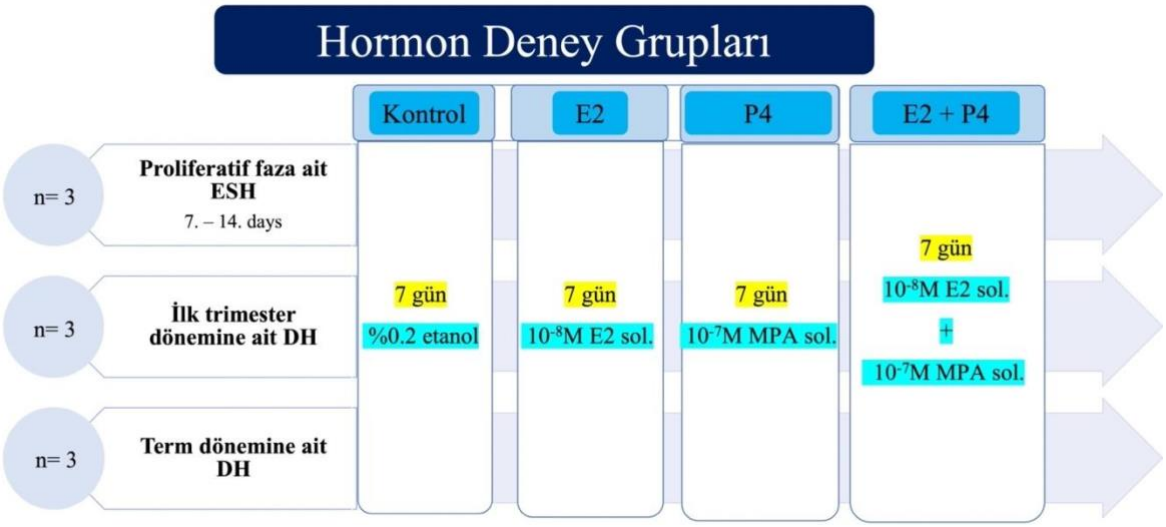
1. Saflığı doğrulanan hücreler, taze kültür medyumu (fenol redsiz DMEM/F12(1/1), %10 c-FBS, 1% ab/am) ile inkübe edildi (37°C ve %5 CO_2). İki günde bir medyumu değiştirildi.
2. Konfluense ulaşan hücrelere pasajlama işlemi yapıldı.
3. Kültür kabına, $5x10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı.
4. Hücrelere uygulanan hormonlara göre deney grupları oluşturuldu (Şekil 13) [82,92–95]:
    i. E2 grubundaki hücrelere 10^{-8} M 17ß-östradiol (E2) uygulandı
    ii. P4 grubundaki hücrelere 10^{-7} M medroksiprogesteron-17 asetat (P4) uygulandı

iii. E2 + P4 grubundaki hücrelere 10^{-8} M E2 ve 10^{-7} M P4 birlikte uygulandı

iv. Kontrol grubuna %0,2 oranında etanol uygulandı.

E2 ve P4, üretici firmanın önerisi üzerine etanol ile seyreltildi. Etanolün hücreler üzerindeki etkisinin elimine edilmesi amacıyla tüm gruplardaki hücrelere eşit oranda etanol uygulandı (%0,2) [96].

5. Hücreler, hormonlar ile 7 gün inkübe edildi ve medyum 1 kere değiştirildi (Şekil 13) [77,93,95].
6. Daha sonra hücreler PBS ile yıkandı ve deney sonlandırıldı.
7. Yıkamanın ardından PBS uzaklaştırıldı ve deney kabı hemen buzun üzerine konuldu.
8. Kuyucuklara lizis tamponu eklendi ve hücreler, kazıyıcı (scraper) ile kültür kabından kazındı.
9. Hücre ekstraktları, etiketlenen ependorf tüplere aktarıldı.
10. Tüplerdeki karışım iyice vortekslendi, Western blot analizine kadar –80°C'de saklandı.



Şekil 13: Hormon deneyinin grupları

3.2.7. Western Blot Analizi

Çalışmamızda; E2 ve / veya P4 hormonlarının etkisindeki ESH ve DH'lerde mt füzyon, fisyon ve mitofajiye ait proteinlerin ekspresyon seviyeleri Western blot analizi ile incelendi (Tablo 3).

Uygulanan işlemler [80]:

1. Hücre ekstraktları –80°C'den çıkarıldı, buza konularak erimesi beklendi.
2. Kısa süreli homojenizasyon işleminden sonra örnekler santrifüj edildi.
3. Denatürasyon işlemi için örnekler, 98°C'de 5 dk ısıtıldı. Daha sonra soğuması için buzun içine konuldu.
4. Kısa süreli vorteks ve santrifüj işlemleri yapıldı.
5. Örnekler, %12 poliakrilamid jele yüklendi.
6. Örnekler kuyucuklardan çıkıncaya kadar 100 V'da yürütüldü ve kuyucukların altına gelince voltaj 80 V'a düşürülerek yaklaşık 1,5 saat elektroforeze tabii tutuldu.
7. Elektroforez sonrası jel, plakalardan ayrıldı ve Biorad TransBlot Turbo transfer sistemi kullanılarak (25 V, 7 dk), proteinlerin jelden nitrosellüloz membrana aktarılması sağlandı.
8. Transfer sonrası, yıkanan membran bloklama solüsyonu (%5 non-fat dry milk) içerisinde 1 sa RT'de inkübe edildi.
9. Bloklama ardından, membran %5 BSA ile seyreltilen primer antikor ile bir gece (16-18 sa) +4ºC'de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Western Blot yönteminde kullanılan primer antikorlara ve dilüsyonlarına ait bilgiler Tablo 3'de verildi.
10. Ertesi gün, 5 x 10 dk T-TBS ile yıkama yapılarak zayıf bağlanan veya bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.
11. Yıkama sonrası membran, primer antikorun konakçısına uygun peroksidaz işaretli sekonder antikor ile ß-aktin antikorunu içeren solüsyon (%5 non-fat dry milk) içerisinde RT'de 1 saat bekletildi. Tablo 3'de, Western Blot yönteminde kullanılan sekonder antikorlara ve dilüsyonlarına ait bilgiler verildi.
12. T-TBS ile yıkamanın ardından membran, üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanan kemiluminesans (ECL) solüsyonunda 1 dk bekletildi. Bu aşamadan sonra, membran mümkün olduğunca ışıktan korundu.
13. Ardından membran üzerindeki fazla solüsyon dikkatlice uzaklaştırıldı. Membranın kurumamasına dikkat edildi.
14. Kemilüminesan Görüntüleme Sistemi (Azure 300: AZI300) kullanılarak membrandaki protein bantları görüntülendi.
15. Her bir kuyucuktaki mt protein ve ß-aktin bantları, ImageJ yazılımı ile dansitometrik olarak hesaplandı. Mt protein bantları, ß-aktin ile oranlanarak skorlandı.

Tablo 3: Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları

Primer antikor	Seyreltme	Sekonder antikor	Katalog numarası	Seyreltme
Drp1	1:500	HRP conjugated goat anti-mouse IgG (H+L)	BA1050	1:2000
Fis1	1:500	HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L)	BA1054	1:2000
MFN2	1:1000	HRP conjugated goat anti-mouse IgG (H+L)	BA1050	1:2000
OPA1	1:500	HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L)	BA1054	1:2000
Pink1	1:1000	HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L)	BA1054	1:2000
Parkin	1:500	HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L)	BA1054	1:2000

3.2.8. Elektron Mikroskobik Analiz

Geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri için ayrılan dokular, Karnovsky fiksatifi (%2,5 gluteraldehit + %4 Paraformaldehit) içerisinde +4 °C'de 2 gün bekletilerek tespit edildi. Sertleşen dokular, temizlenmiş jilet yardımı ile $1mm^3$'lük parçalar haline getirildi. Fosfat tamponu (pH=7,4) ile yıkama sonrası dokular, %1'lik osmiyum tetraoksit (OsO_4) içerisinde 1,5 saat bekletilerek ikinci tespit yapıldı. Fiksasyon sonrası yıkanan dokular (3x15 dk), sırasıyla 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o ve 100^o (100^o 2 kere) alkollerde 10 dk bekletilerek dehidrate edildi. Daha sonra dokular, propilen oksitte 2 x 15 dk bekletildi. Ardından sırasıyla; 1:3 ve 1:1 Araldit & Propilen karışımında 1 sa, 3:1 oranında karışımda ise bir gece (16-18 sa) +4 ^{o}'de bekletildi. Ertesi gün dokular, saf araldit içerisinde 4 sa 4 ^{o}'de inkübasyona bırakıldı. Ardından dokular, kalıplara gömüldü ve 2 gece 60°C'lik etüvde bırakılarak blokların polimerizasyonu sağlandı. Araldit bloklardan, önce Reichert UM2 mikrotomla 0,5 µ kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyanarak incelenmek istenen bölge tespit edildi. Ardından,Reichert UM3 mikrotomla 40-50 nm kalınlığında ince kesitler alındı ve bakır grid üzerine yapıştırıldı. Gridlerdeki kesitler %70 etanol ile hazırlanan doymuş uranil asetat solüsyonu ile 45 dk, ardından Reynol'un kurşun sitratı ile 15 dk boyandı [97]. Jeol-1011 model elektron mikroskobunda incelenen kesitlerin fotoğrafları Olympus Veleta TEM CCD kamera ile çekildi. EP, GP, ES, OS, GS, FP ve TP grupları için 3 farklı örnekten alınan kesitlerin her birinden 10 adet ESH / DH'de mitokondri analizleri yapıldı.

Mitokondri sayısı ve kütlesinin değerlendirilmesi için aşağıdaki ölçümler yapıldı (Şekil 14) [11]:

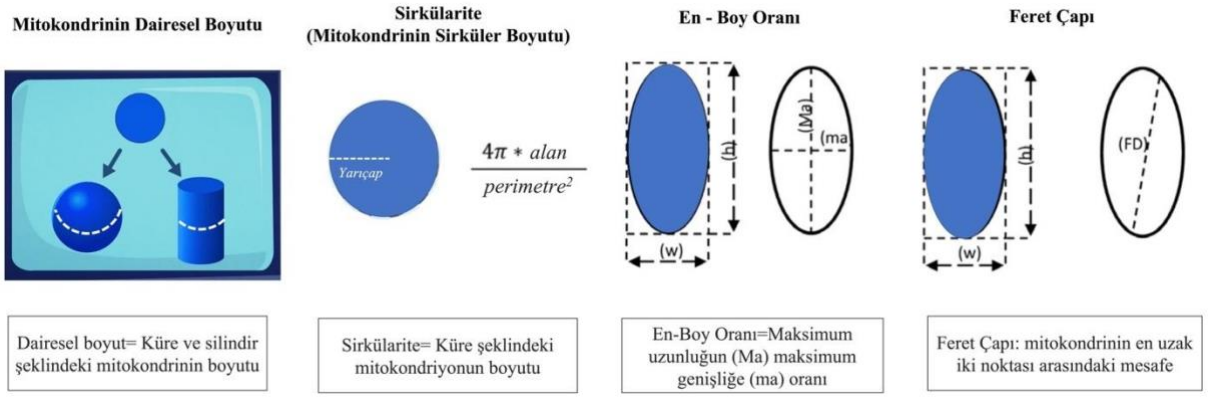
1. İlk olarak mitokondri ölçümü yapılacak hücrenin yüzey alanı (μm^2) ölçüldü.
2. Mitokondri yarı çapı (perimetre; µm) ölçüldü.
3. Mitokondrinin sirkülarite ölçümü = $4\pi \cdot$ (yüzey alanı/perimeter^2) formülü kullanılarak yapıldı. Sirkülarite ölçümü ile özellikle yuvarlak mitokondri boyutlarının, gruplar arası karşılaştırılması hedeflendi.
4. Mitokondrinin dairesel boyutu = $4 \cdot$ (yüzey alanı)/ ($\pi \cdot$ major eksen^2) formülü ile hesaplandı. Mitokondri daireselliğinin ölçümü; hem yuvarlak hem de silindirik görülen tüm mitokondrinin enine boyutlandırılması ve genişliğinin, gruplar arasında karşılaştırılması amacıyla yapıldı.

- Dairesellik ve sirkülarite hesaplanmasında, '1' değeri mükemmel küreselliği gösterir.

5. Feret çapı; bir mitokondriyonun en uzak iki noktası arasındaki mesafenin (µm) ölçümüdür.
6. En-Boy oranı; mitokondriyonun majör ekseninin (uzunluğunun), minör eksenine (genişliğine) oranı olarak hesaplandı.

- Feret çapı ve en-boy oranı ölçümleri, mitokondrinin uzunluğunun değerlendirilmesi için yapıldı.

7. Son olarak mitokondrinin dallanma oranı, mitokondrinin olası dallanma ve genişleme boyutunun hesaplanması için yapıldı. Dallanma oranı = (perimetre^2)/($4\pi \cdot$ yüzey alanı) formülü kullanılarak hesaplandı (Şekil 14).



Şekil 14: Mitokondrinin elektron mikroskobik incelenmesinde yapılan dairesellik, sirkülarite, en-boy oranı ve Feret çapı ölçümlerinin şematik görüntüsü [11]**.**

3.2.9. İstatistiksel Analiz

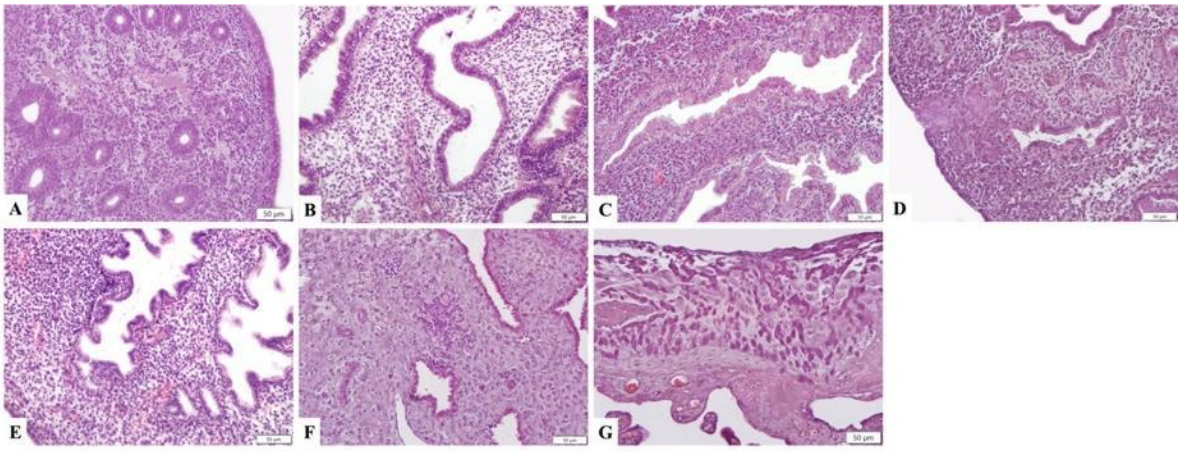
Elde edilen veriler SPSS (Version 23.0.0) istatistik programına girildi. Uygun istatistiksel testlere karar verilebilmesi için normal dağılımın varlığı ve varyansın homojenliği Kolmogorov-Smirnov testi veya Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Elde edilen veri doğrultusunda analiz parametrik ya da parametrik olmayan testler ile gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren verilerde, çoklu grup analizleri için parametrik tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler, parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ile analiz edildi. %95'lik güven aralığında çalışıldı ve elde edilen tanımsal istatistikler; ortalama değerleri ± SD (standart sapma) olarak sunuldu. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi [65].

4. BULGULAR

4.1. Menstrual Siklus Fazlarına ve Gebelik Dönemlerine ait Dokuların Histomorfolojik İncelenmesi

Toplanan biyopsi dokularının ait olduğu menstrual siklus fazının tespit edilebilmesi için doku kesitleri H+E boyandı ve histomorfolojik olarak incelendi. İnceleme sonrasında; erken proliferatif faza (EP'ye) ait doku kesitlerinde; tek katlı kübik yapıda yüzey epiteli, düz ve dar lümenli bezler görüldü (Şekil 15A). Geç proliferatif faza (GP'ye) ait doku kesitlerinde; yalancı tabakalaşma gösteren mitotik olarak aktif glandular (beze ait) epitel, çıplak nükleuslu ESH'ler ve stromada ödem gözlendi (Şekil 15B). Erken sekretuar faza (ES'ye) ait doku kesitlerinde; eozin ile boyanmayan subnüklear vakuollere sahip hücrelerin baskın olduğu bezler ve epitel hücrelerinin merkezi yerleşimli nükleusları görüldü. Daha kıvrımlı ve geniş lümenli bezler ve stromada daha az ödem gözlendi (Şekil 15C). Orta sekresyon faza (OS'ye) ait doku kesitlerinde; bazal yerleşimli glandular epitel nükleusları, asidofilik intralüminal salgı yapıları ve kıvrımlı bezler görüldü. Stromada, spiral arteriyoller ve peri-arteriyoler pre-DH'ler gözlendi (Şekil 15D). Geç sekretuar faza (GS'ye) ait doku kesitlerinde; uzun ve tirbüşon benzeri, fazlaca kıvrımlı bez yapıları görüldü. Stromada, büyük nükleusa sahip pre-DH'ler gözlendi (Şekil 15E).

İlk trimester (FP) ve term (TP) dönemlerine ait desidua dokularından alınan kesitler histomorfolojik olarak incelendi (Şekil 15 F ve G). DH'lerin doku kesitlerindeki yerleşiminin tespit edilebilmesi için immün işaretleme yapıldı.

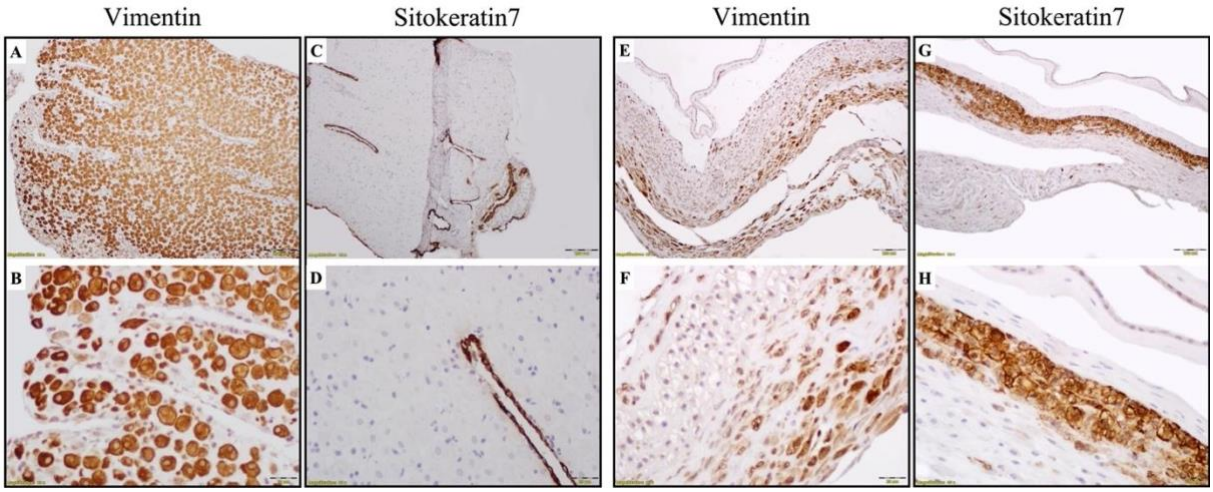


Şekil 15: H+E boyaması ile dokuların histomorfolojik incelenmesi. A; EP, B; GP, C; ES, D;OS, E; GS, F; FP, G; TP'ye ait dokular.

4.2. İmmünohistokimya bulguları

4.2.1. Plasentada Desidua Hücrelerin bulunduğu bölgenin tespiti

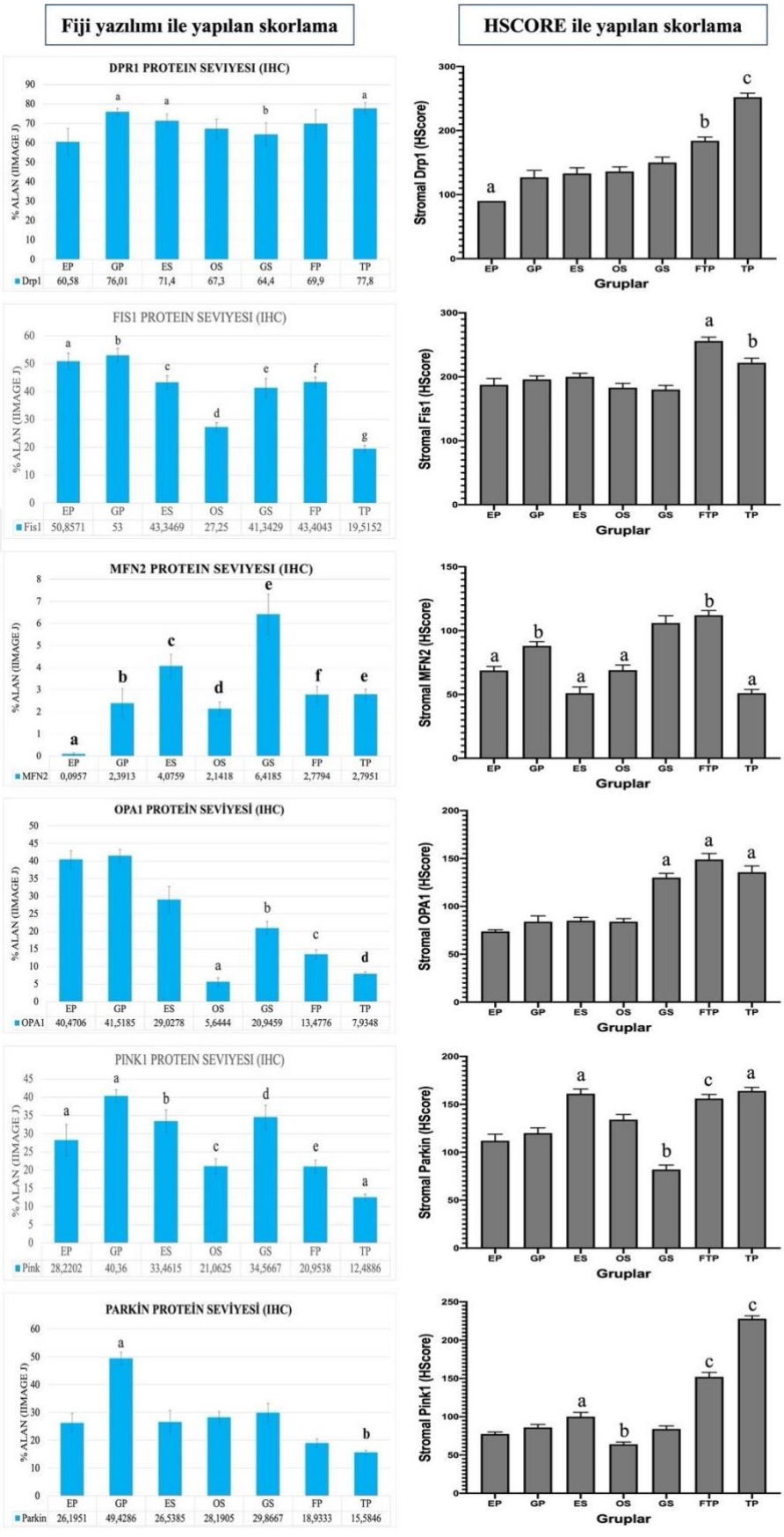
Gebeliğin FP ve TP dönemlerine ait desidua dokularında vimentin pozitif ekspresyon gösteren (V+) DH'ler ve sitokeratin7 + intertisyal trofoblastlar incelendi (Şekil 16). FP'ye ait dokuda DH'ler büyük ve yuvarlak hücreler olarak görülürken (Şekil 16 B), TP'ye ait DH'ler küçük ve yassı hücreler olarak gözlendi (Şekil 16 F).



Şekil 16: Plasenta dokularında DH'lerin lokalizasyonunun tespiti için yapılan immünohistokimya analizine ait mikrograflar. A - D; gebeliğin ilk trimester dönemine (FP) ait desidua dokularında vimentin pozitif (V+) DH'lerin (A&B) ve sitokeratin7 pozitif (CK7 +) intertisyal trofoblastların (C&D) yerleşimini gösteren mikrograflar. E – H; Gebeliğin term dönemine (TP) ait desidua dokularında vimentin pozitif (V+) DH'lerin (E&F) ve sitokeratin7 pozitif (CK7 +) intertisyal trofoblastların (G&H) yerleşimini gösteren mikrograflar. A, C, E ve G; 4X. B, D, F ve G ; 40X.

4.2.2. İmmünohistokimya Analizinin Skorlaması için En Uygun Yöntemin Belirlenmesi

İmmünohistokimya (IHC) analizi için endometriyum ve desidua dokularındaki en uygun skorlama yönteminin belirlenmesi amacıyla HSCORE ve Fiji yazılımı kullanıldı. HSCORE ve Fiji sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, sonuçların birbirinden farklı olduğu tespit edildi (Şekil 17). Dokularda ESH ve DH'lerdeki boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı ile analizlerden elde edilen veriler karşılaştırıldığında, endometriyum ve plasenta dokularında IHC yöntemi için en doğru skorlamanın HSCORE olduğu görüldü.



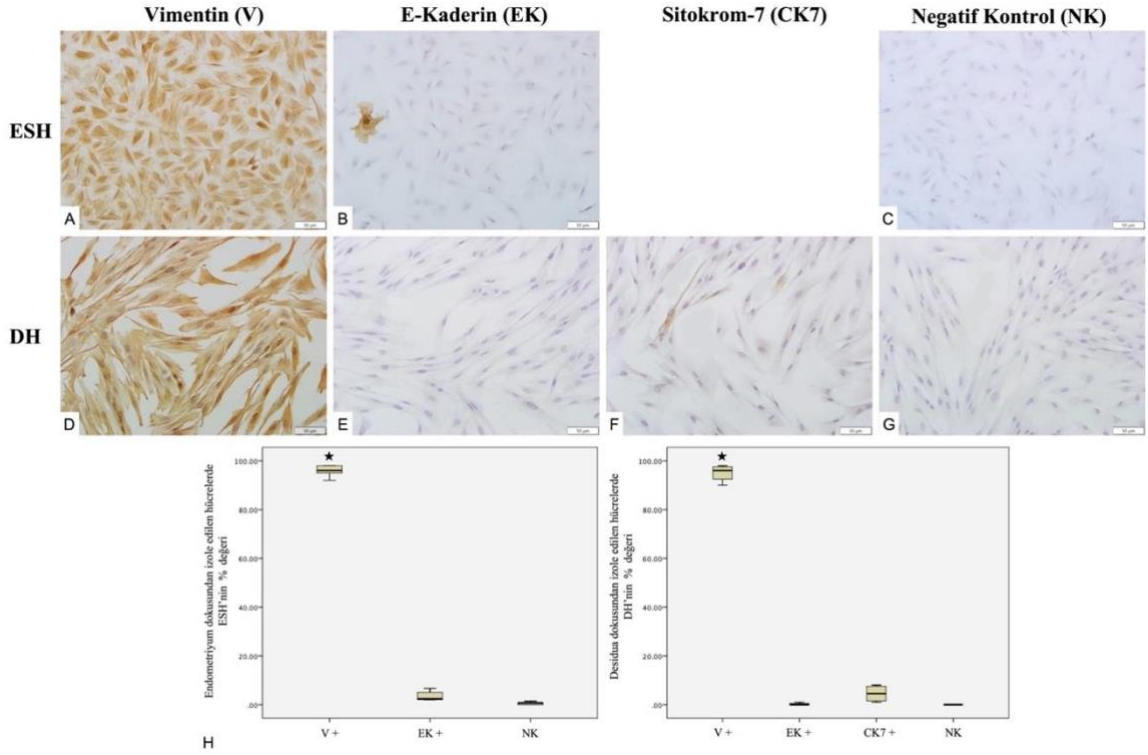
Şekil 17: Fiji yazılımı ve HSCORE verilerinin karşılaştırılması.

4.3. In vitro Deneylere ait Bulgular

4.3.1. Hücre Saflığının Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Proliferatif fazdaki insan endometriyum dokularından ESH'lerin, FP ve TP dönemlerine ait plasentanın desidua dokularından DH'lerin izolasyonu sonrasında hücrelerin saflığını değerlendirmek amacıyla immünositokimya (ICC) analizi yapıldı (Şekil 18).

İzole edilen hücrelerin saflık değerinin ESH'ler için %96, DH'ler için %95 olduğu görüldü (Şekil 18 H; p<0,04). Hücreler hormon deneyi için kullanıldı.



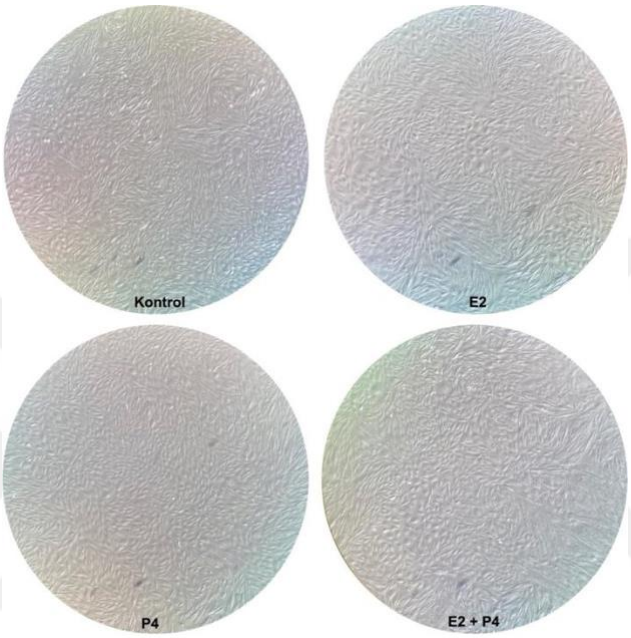
Şekil 18: ESH ve DH'lerin karakterizasyonu. Endometriyum dokusundan izole edilen ESH'lerin (A-C) ve desidua dokusundan izole edilen DH'lerin (D-G) saflığını gösteren immün boyanmaya ait mikrograflar. A ve B; V + ve EK– ESH'leri, D-F; V +, EK – ve CK7 – DH'leri göstermektedir. C ve G; her deneyin kendine ait negatif kontrolünü gösteren mikrograflardır. 20X. H; Dokudan izole edilen hücrelerin saflığını gösteren grafiklerdir. İzole edilen hücrelerde V+ hücre miktarı ≥%95'dir. p<0,04. ESH; Endometriyal Stroma Hücre, DH; Desidua Hücre.

4.3.2. İn vitro Hormon Deneyi

ESH'lerde ve FP ile TP dönemlerine ait DH'lerde mt füzyon, fisyon ve mitofaji ile ilgili proteinlerin ekspresyonlarında, östrojen (17-ß östrodiol; E2) ve progesteron (Medroksiprogesteron asetat; P4) hormonlarının etkisi araştırıldı. ESH, FP-DH ve TP-DH hücreleri, uygulanan hormon(lar)a göre 4'er gruba ayrıldı; kontrol (K), E2, P4 ve E2 + P4. E2

ve/veya P4 uygulaması sonrasında, hücrelerdeki protein seviyesinin incelenmesi için Western blot analizi yapıldı.

Deney sonlandırılmadan hemen önce, E2 ve/veya P4 uygulanan hücrelerin morfolojik özellikleri invert faz kontrast mikroskobu ile incelendi. Gruplar arasında hücrelerin morfolojisi bakımından bir farklılık gözlenmedi (Şekil 19).



Şekil 19: Hormon deneyi sonunda invert faz kontrast mikroskobu ile incelenen hücrelerin morfolojik görüntüsü. 20X.

4.4. Mitokondriyal Füzyonun Değerlendirilmesi

Menstrual siklusun EP, GP, ES, OS ve GS fazlarına ait endometriyum dokularında, gebeliğin FP ve TP ait desidua dokularında mt füzyon; MFN2 ve OPA1, proteinlerinin ekspresyon seviyeleri IHC ile in vivo değerlendirildi. E2 ve P4 hormonlarının in vitro koşullarda mt füzyon; MFN2 ve OPA1, proteinlerine etkisi Western blot analizi ile incelendi.

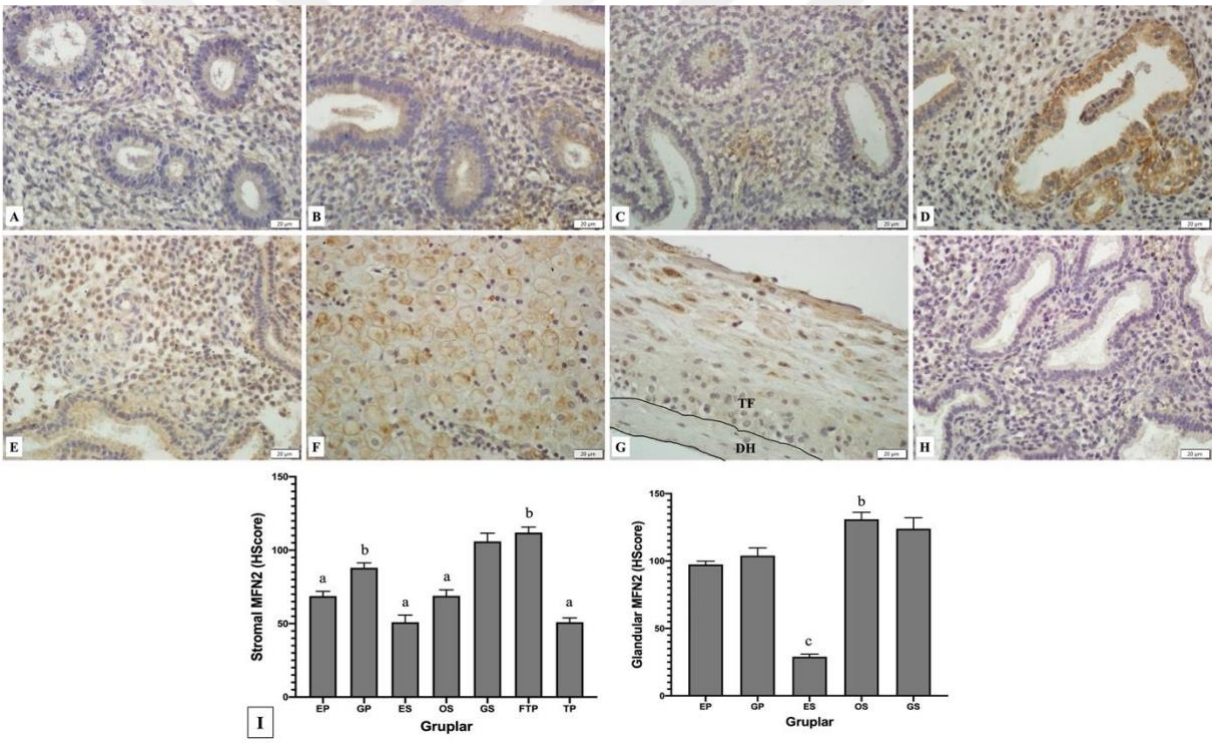
4.4.1. MFN2 Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri

4.4.1.1. MFN2 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

MFN2 ekspresyonu yalnızca hücrelerin sitoplazmasında ve oldukça düşük seviyede gözlendi (Şekil 20 A-G). GP, GS ve FP grupları ile kıyaslandığında EP, ES, OS ve TP gruplarındaki stromal MFN2 protein seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,04$;

Şekil 20 I). EP, ES, OS ve TP grupları arasında herhangi bir fark gözlenmedi (p>0,05). GP, GS ve FP gruplarında artan protein seviyesi incelendiğinde, gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Proliferatif faz içerisinde artan seviyelerde görülen MFN2 ekspresyonun, sekretuar fazın başında düştüğü ancak, sekretuar fazın ilerleyen süreçlerinde tekrar kademeli bir artış gösterdiği dikkati çekti. Sekresyon fazında artan MFN2 protein seviyesinin, GS'deki ESH'ler ile FP'deki DH'ler arasında benzer düzeyde seyrettiği görüldü (p>0,05; Şekil 20 I).

Glandular MFN2 protein seviyesi sekretuar fazın başında (ES'de) dikkat çekici bir düşüş gösterirken OS ve GS'de tekrar yükseldi (p<0,001). Bu yükselişin OS'de oldukça fazla olduğu görüldü ve OS'deki protein seviyesinin proliferatif faza ve ES'ye göre anlamlı olarak arttığı gözlendi (p<0,01; Şekil 20 I).



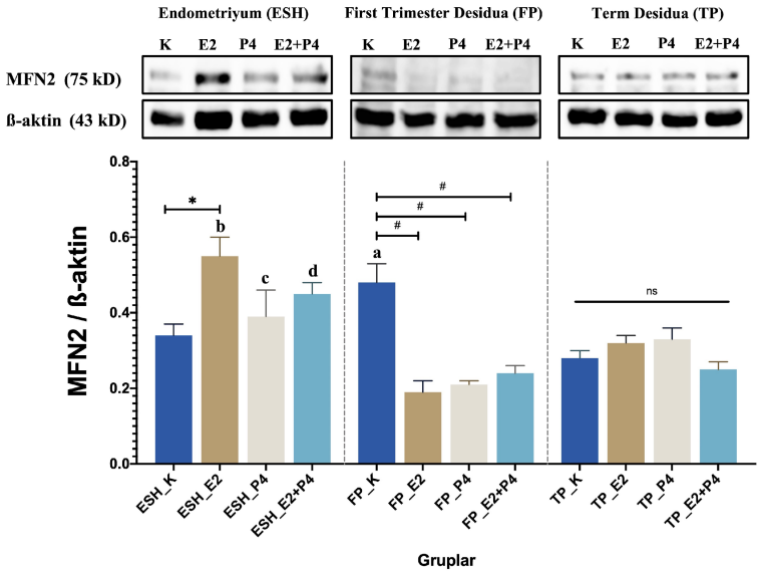
Şekil 20: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında MFN2 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemlerine ait plasentanın desidua dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. **I; MFN2 protein seviyesini gösteren grafik**. [a]*p*<0,003; GP, GS ve FP ile kıyaslandığında, [b]*p*<0,03; GS dışında tüm gruplar ile kıyaslandığında, [c]*p*<0,001; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.4.1.2. MFN2 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi

Hormon uygulaması sonrasında MFN2 protein ekspresyonu ESH'lerde ve FP -DH'lerde değişirken ($p<0,007$), TP-DH'lerin MFN2 ekspresyonunda herhangi bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 21).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının MFN2 ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi ($^{*,\ \#}p$; Şekil 21): ESH'lerde MFN2 protein ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla, E2 uygulanan grupta arttığı görüldü ($^{*}p<0,007$). ESH'lerdeki MFN2 protein seviyesinin E2, P4 ve E2+P4 grupları arasında birbirine yakın düzeyde olduğu görüldü; hormon grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). FP dönemine ait DH'ler (FP-DH'ler) incelendiğinde, kontrol grubunda yüksek seviyede MFN2 ekspresyonu olduğu ve E2 ve/veya P4 uygulanması ile bu seviyenin önemli ölçüde azaldığı tespit edildi ($^{\#}p<0,007$).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi ($^{a,b,c,d}p$; Şekil 21): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, FP-DH'lerdeki MFN2 protein ekspresyonunun TP-DH'lere göre yüksek olduğu tespit edildi ($^{a}p<0,04$). E2 etkisindeki hücreler karşılaştırıldığında; ESH'lerdeki MFN2 protein ekspresyonunun, FP- ve TP-DH'lere göre oldukça yüksek olduğu tespit edildi ($^{b}p<0,005$). ESH'lerdeki MFN2 protein seviyesi; P4 uygulanan gruplar karşılaştırıldığında FP-DH'lere göre, E2+P4 uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise hem FP hem de TP-DH'lere göre arttığı gözlendi (sırasıyla; $^{c}p<0,02$ ve $^{d}p<0,04$).



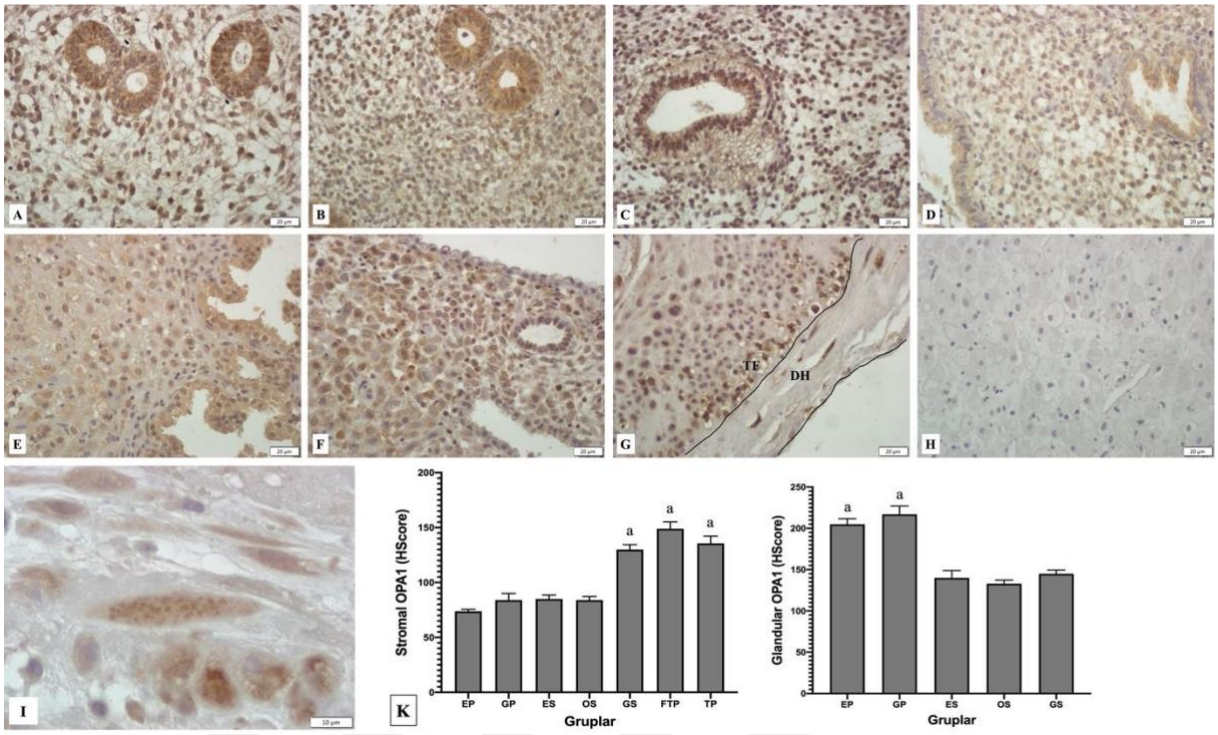
Şekil 21: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının MFN2 ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,007; FP-DH grubu için #p<0,007. ns: anlamlı farklılık yok. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için [a]p<0,04 TP-DH'ye göre; E2 için [b]p<0,005 FP- ve TP-DH'lere göre; P4 için [c]p<0,04 FP-DH'ye göre; E2+P4 için [d]p<0,04 FP- ve TP-DH'lere göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.4.2. OPA1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri

4.4.2.1. OPA1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

OPA1 protein ekspresyonu yalnızca hücrelerin sitoplazmasında görüldü (Şekil 22). 100X büyütme ile incelendiğinde OPA1 immün işaretlemesinin, yer yer yuvarlak şekilde olduğu dikkati çekti (Şekil 22 I). EP, GP, ES ve OS grupları arasında OPA1 protein seviyesi bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05). GS, FP ve TP dönemlerindeki hücrelerde, diğer gruplara kıyasla OPA1 protein seviyesinde anlamlı bir farklılık olduğu gözlendi (p<0,001; Şekil 22 K), bu grupların kendi aralarında herhangi bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Stromal hücrelerde düşük düzeyde seyreden OPA1 ekspresyonunun desidualizasyon ile arttığı ve sabit seyrettiği görüldü.

Glandular OPA1 protein seviyesine bakıldığında ise stromal bulguların tersi bir durum görülmektedir. Proliferatif fazda (EP ve GP) daha yüksek olan OPA1 ekspresyonunun, sekretuar fazın başlaması (ES) ile azaldığı ve sekretuar fazın ilerleyen süreçlerinde (OS ve GS) düşük seviyelerde seyrettiği gözlendi (p<0,001; Şekil 22 K).



Şekil 22: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında OPA1 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. I; OPA1 immün işaretlemesinin, yer yer yuvarlak şekilde olduğunu gösteren mikrograf. 100X. **K; OPA1 protein seviyesini gösteren grafik**. [a]$p<0,001$; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

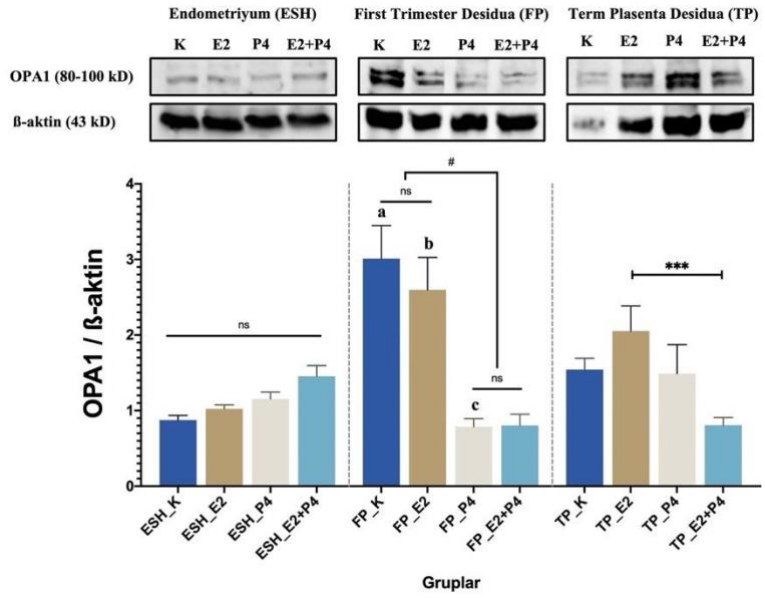
4.4.2.2. OPA1 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi

Hormon uygulaması sonrasında OPA1 protein ekspresyonu FP ve TP-DH'lerde değişirken ($p<0,02$), ESH gruplarında OPA1 ekspresyonu bakımından herhangi bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 23).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının OPA1 ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi ([#,] ***p; Şekil 23): FP-DH'de, kontrol ve E2 grupları ile kıyaslandığında, P4 ve E2+P4 uygulanan gruplardaki OPA1 protein seviyesinde önemli ölçüde azalma tespit edildi (sırasıyla; [#]$p<0,001$ ve [#]$p<0,02$). Kontrol ile E2 grupları arasında ve P4 ile E2+P4 grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Bu verilere göre FP-DH'lerde P4 hormonunun, OPA1 proteini üzerindeki ekspresyonu azaltıcı etkisi dikkati çekti. TP-DH'lerde, kontrol grubu ile hormon uygulanan gruplar arasında anlamlı

farklılık bulunmadı (p>0,05). Ayrıca, FP'lere benzer şekilde, TP-DH'lerde de E2 grubu ile kıyaslandığında, E2+P4 uygulanan gruptaki OPA1 protein seviyesinin azaldığı tespit edildi (***p<0,02).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi (^{a,b,c} *p;* Şekil 23): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, FP-DH'lerdeki OPA1 protein ekspresyonunun ESH ve TP-DH'lere göre yüksek olduğu gözlendi (^{a}p<0,001). E2 etkisindeki hücreler karşılaştırıldığında; FP-DH'ler ile TP-DH'lerdeki OPA1 protein ekspresyonunun, ESH'lere göre arttığı görüldü (^{b}p<0,04). P4 uygulanan FP-DH'lerdeki OPA1 protein ekspresyonunun TP-DH'nin P4 grubuna göre düşük olduğu görüldü (^{c}p<0,04).



Şekil 23: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının OPA1 ekspresyonuna etkisi. ns: anlamlı farklılık yok. FP-DH grubu için #p<0,02. TP-DH grubu için ***p<0,03. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için ^{a}p<0,04 ESH ve TP-DH'ye göre; E2 için ^{b}p<0,04 ESH'ye göre; P4 için ^{c}p<0,04 TP-DH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.5. Mitokondriyal Fisyonun Değerlendirilmesi

Menstrual siklusun EP, GP, ES, OS ve GS fazlarına ait endometriyum dokularında, gebeliğin FP ve TP dönemlerine ait desidua dokularında mt fisyon; Drp1, Fis1 ve MFF, proteinlerinin

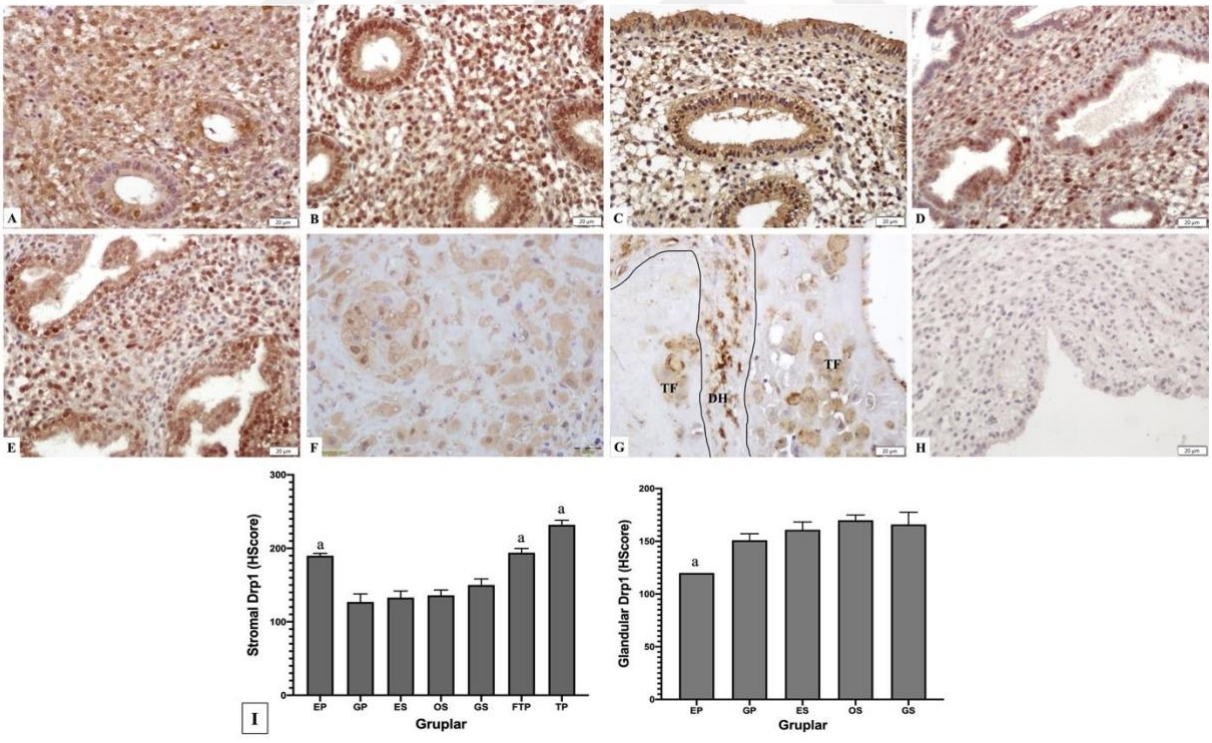
ekspresyon seviyeleri IHC ile in vivo değerlendirildi. E2 ve P4 hormonlarının in vitro koşullarda mt fisyon; Drp1, Fis1 ve MFF, proteinlerine etkisi Western blot analizi ile incelendi.

4.5.1. Drp1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western blot analizleri

4.5.1.1. Drp1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

Drp1 proteinleri hem hücrelerin sitoplazmasında hem de EP, GP, OS ve GS gruplarındaki hücrelerin nükleuslarında gözlendi (Şekil 24), ancak protein ekspresyonu sitoplazma üzerinden değerlendirildi. Menstrual siklusun GP, ES, OS ve GS fazları ile kıyaslandığında EP, FP ve TP gruplarında Drp1 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 24 A-G ve I; $p<0,04$). GP, ES, OS ve GS grupları arasında Drp1 ekspresyon seviyesi bakımından herhangi bir farklılık gözlenmedi (Şekil 24 B-E ve I; $p>0,05$).

Glandular Drp1 ekspresyonuna bakıldığında; EP grubundaki protein seviyesinin diğer gruplara kıyasla azaldığı gözlendi (Şekil 24 A-E ve I; $p<0,04$).



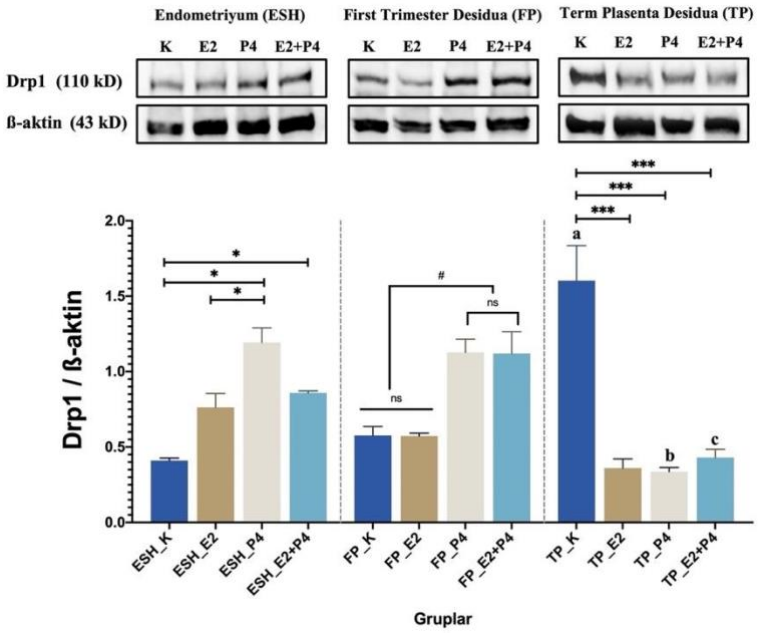
Şekil 24: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Drp1 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. **I; Drp1 protein seviyesini gösteren grafik.** $^{a}p<0,04$; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.5.1.2. Drp1 Protein Ekspresyonunun Western Blot ile Analizi

Streroid hormon uygulanması sonrasında hem ESH hem de DH'lerde Drp1 protein seviyesinin değiştiği gözlendi (Şekil 25).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Drp1 ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi (*, #, ***p; Şekil 25): ESH'lerde, kontrole kıyasla hem P4 hem de E2 + P4 uygulanan gruplarda Drp1 protein ekspresyonun arttığı görüldü (*$p<0,03$). Bunun yanı sıra P4 uygulanan gruptaki Drp1 protein seviyesi, E2 grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gösterdi (*$p<0,04$). E2 uygulanması sonrasında, ESH'lerdeki Drp1 protein seviyesinde, kontrol ile kıyaslandığında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). FP-DH'lerde, ESH'lere benzer şekilde, hem P4 hem de E2 + P4 uygulaması ile Drp1 protein ekspresyonun arttığı görüldü ($^{\#}p<0,02$). E2 grubu ile kıyaslandığında, P4 ve E2+P4 uygulanan gruplardaki protein seviyesinde anlamlı bir artış tespit edildi ($^{\#}p<0,02$). Bu verilere göre ESH ve FP-DH'lerde P4 hormonunun, Drp1 protein ekspresyonunu arttırdığı dikkati çekti. TP-DH'lerde ise bu durumun tam tersi gözlendi; kontrol grubu ile kıyaslandığında E2, P4 ve E2+P4 gruplarında Drp1 protein seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı görüldü (***$p<0,001$).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi (^{a,b,c} p; Şekil 25): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, TP-DH'lerdeki Drp1 protein ekspresyonunun ESH'lere ve FP-DH'lere göre yüksek olduğu tespit edildi ($^{a}p<0,001$). P4 uygulanan gruplara bakıldığında TP-DH'lerdeki protein seviyesinin ESH ve FP-DH'lere göre azaldığı gözlendi ($^{b}p<0,001$). Her iki hormonun birlikte (E2+P4) uygulandığı durumda, FP'ye kıyasla TP-DH'lerdeki protein ekspresyon seviyesinde azalma görüldü ($^{c}p<0,001$).



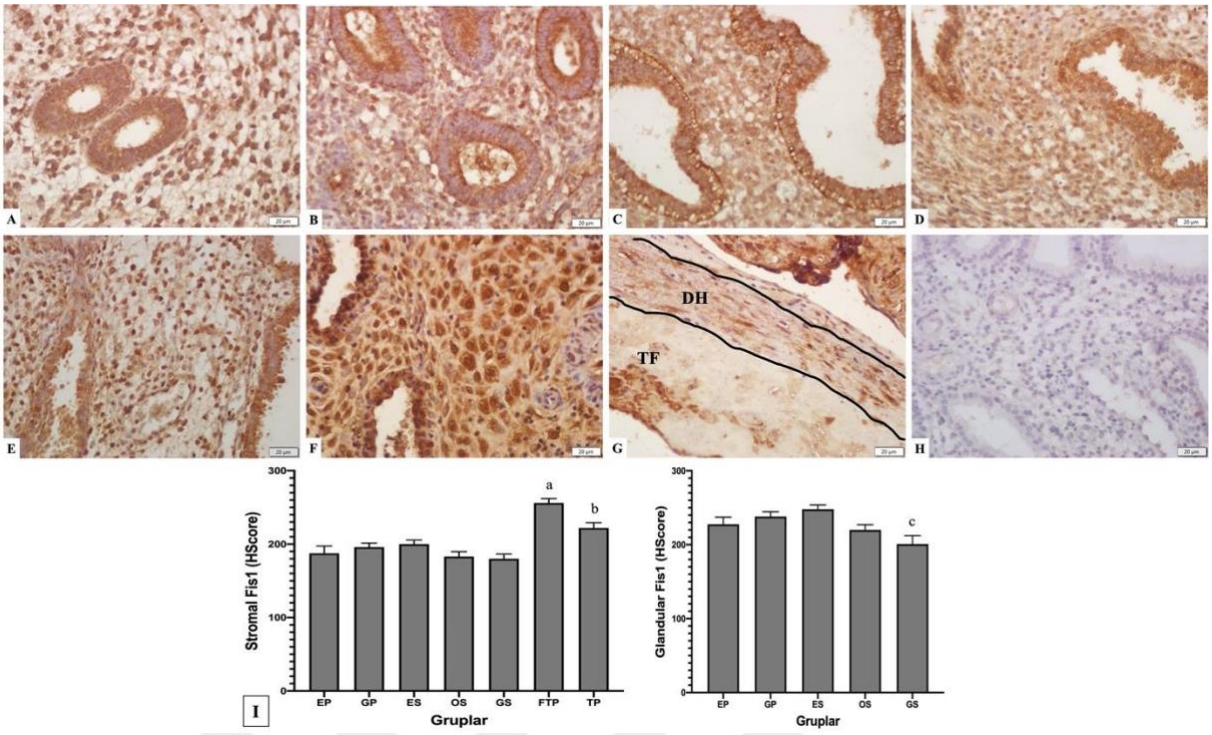
Şekil 25: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Drp1 ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,04; FP-DH grubu için #p<0,02; TP-DH grubu için ***p<0,002. ns: anlamlı farklılık yok. Aynı hormonun etkisindeki farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için [a]p<0,001 ESH ve FP-DH'lere göre; P4 için [b]p<0,001 ESH ve FP-DH'lere göre; E2+P4 için [c]p<0,002 FP-DH'lere göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.5.2. Fis1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western blot analizleri

4.5.2.1. Fis1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

Fis1 ekspresyonunun, hücre sitoplazmasında homojen olduğu gözlendi. Protein ekspresyonu, hem sitoplazmada hem de EP, OS, GS, FP ve TP gruplarındaki hücrelerin nükleuslarında görüldü (Şekil 26 A-G). Fis1 protein ekspresyonu sitoplazma üzerinden değerlendirildi (Şekil 26). Menstrual siklus fazları arasında stromal Fis1 protein seviyesi bakımından herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmedi (p>0,05). FP dönemine ait DH'lerde Fis1 protein seviyesi diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak artarken, TP dönemine ait hücrelerde yalnızca EP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlendi (p<0,02; Şekil 26 I).

Glandular Fis1 protein ekspresyonuna bakıldığında; GS fazında, GP ve ES fazlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü (p<0,04; Şekil 26).



Şekil 26: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Fis1 ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. **I; Fis1 protein seviyelerini gösteren grafik**. [a]*p*<0,02; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [b]*p*<0,02; EP, OS ve GS fazları ile kıyaslandığında. [c]*p*<0,04; GP ve ES ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

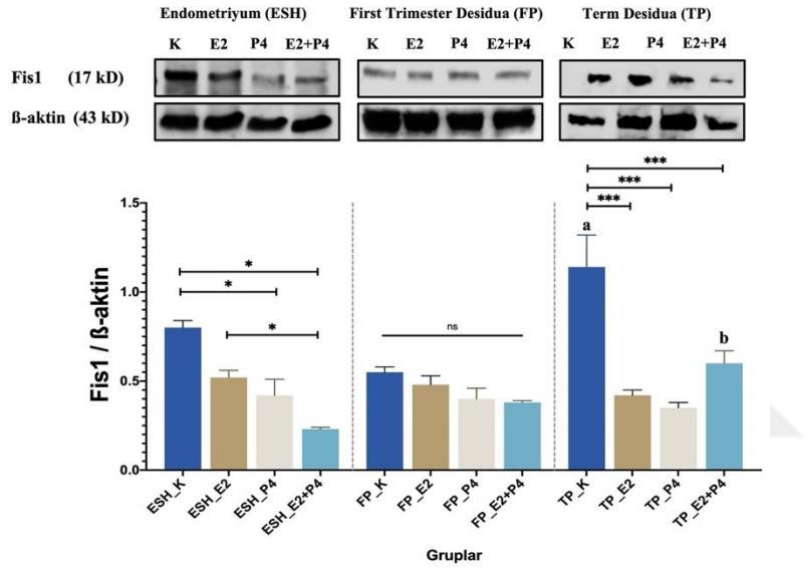
4.5.2.2. Fis1 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi

Steroid hormon uygulaması sonrasında Fis1 protein ekspresyonunun ESH'lerde ve TP-DH'lerde değişiklik gösterdiği görülürken (p<0,04), FP-DH'lerde herhangi bir farklılık gözlenmedi (p>0,05) (Şekil 27).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Fis1 ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi (*, ***p;* Şekil 27): ESH'lerde, kontrole kıyasla hem P4 hem de E2 + P4 uygulanan gruplardaki Fis1 protein ekspresyonunda azalma olduğu; E2 ile kıyaslandığında, E2+P4 uygulanan gruptaki hücrelerde Fis1 protein seviyesinin azaldığı gözlendi (sırasıyla; *p<0,008, *p<0,04). TP-DH'ler incelendiğinde, kontrol grubunda yüksek

seviyede Fis1 protein ekspresyonu olduğu ve E2 ve/veya P4 uygulanması ile bu seviyenin azaldığı tespit edildi (***p<0,002).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi ([a,b]*p;* Şekil 27): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, TP-DH'lerdeki Fis1 protein ekspresyonunun ESH ve FP-DH'lere göre oldukça yüksek olduğu tespit edildi ([a]p<0,04). E2+P4 uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, ESH'lerdeki Fis1 protein seviyesinin TP-DH'lere göre daha az olduğu görüldü ([b]p<0,02).



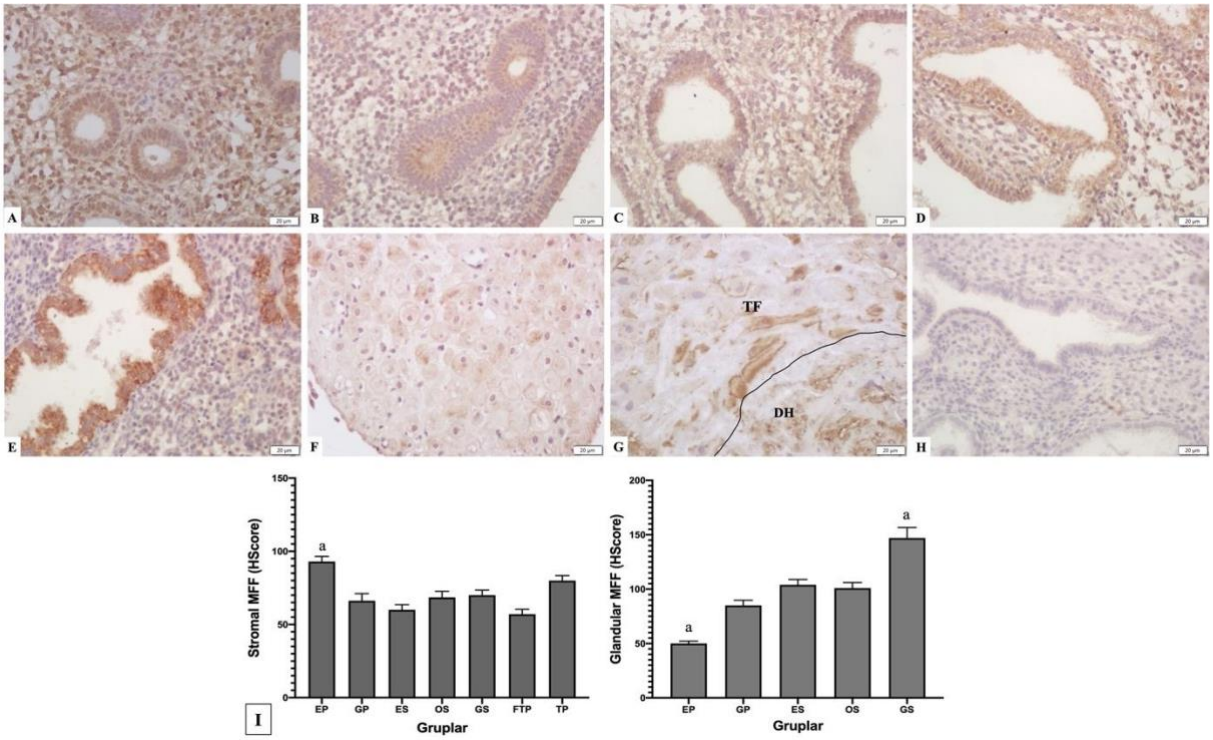
Şekil 27: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Fis1 ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,008. ns: anlamlı farklılık yok.TP-DH grubu için ***p<0,002. Aynı hormonun etkisindeki farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için [a]p<0,4 ESH ve FP-DH'lere göre; E2+P4 için [b]p<0,02 ESH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.5.3. MFF Proteininin İmmünohistokimya ve Western blot analizleri

4.5.3.1. MFF Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

MFF ekspresyonu yalnızca hücrelerin sitoplazmasında gözlendi (Şekil 28 A-G). Endometriyum ve desidua dokularında MFF proteininin genel olarak düşük ekspresyon sergilediği görüldü (Şekil 28 A-G). Stromal MFF seviyesinin gruplar arasında karşılaştırılması yapıldığında; EP fazındaki ESH'lerde, diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış olduğu gözlendi (p<0,01; Şekil 28 I). Buna ek olarak; glandular MFF seviyeleri karşılaştırıldığında, MFF protein

seviyesinin GP fazında en az, GS fazında ise en fazla seviyede olduğu bulundu (p<0,004; Şekil 28 I).



Şekil 28: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında MFF ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. H; negatif kontrol. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. **I; MFF protein seviyesini gösteren grafik**. [a]*p*<0,01; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

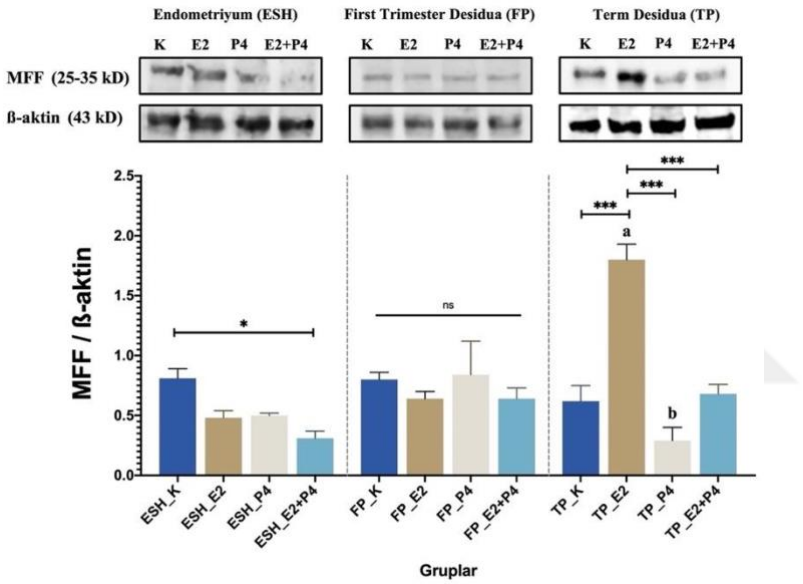
4.5.3.2. MFF Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi

Streroid hormon uygulaması sonrasında MFF protein ekspresyonu ESH'lerde ve TP dönemine ait DH'lerde değişirken, FP dönemine ait DH'lerin MFF ekspresyonunda herhangi bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla; p<0,04, p>0,05; Şekil 29).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının MFF ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi (*, ***p;* Şekil 29): ESH'lerde kontrole kıyasla, E2 + P4 uygulanan gruptaki MFF protein seviyesinde azalma olduğu görülürken, hormon gruplarının kendi arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla; *p<0,04, p>0,05). TP-DH'lere uygulanan hormonların etkisi incelendiğinde, diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında, E2

uygulaması sonrasında MFF protein seviyesinin önemli ölçüde arttığı tespit edildi (***p<0,001).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi ([a,b] *p;* Şekil 29): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, MFF protein ekspresyonu bakımından hücreler arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi (p>0,05). E2 etkisindeki hücreler karşılaştırıldığında; TP-DH'lerdeki MFF protein ekspresyonunun, ESH ve FP-DH'lere göre oldukça yüksek olduğu tespit edildi ([a]p<0,001). P4 uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise, TP-DH'lerdeki MFF protein seviyesinin FP-DH'lere göre azaldığı gözlendi ([b]p<0,005).



Şekil 29: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının MFF ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,04. ns: anlamlı farklılık yok. TP-DH grubu için ***p<0,001. Aynı hormonun etkisindeki farklı hücreler kıyaslandığında: E2 için [a]p<0,001 ESH ve FP-DH'lere göre; P4 için [b]p<0,005 FP-DH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.6. Mitofajinin Değerlendirilmesi

Menstrual siklusun EP, GP, ES, OS ve GS fazlarına ait endometriyum dokularında ve gebeliğin FP ve TP dönemlerine ait desidua dokularında mitofaji; Pink1 ve Parkin, proteinlerinin ekspresyon seviyeleri IHC ile in vivo değerlendirildi. E2 ve/veya P4 hormonlarının in vitro koşullarda mitofaji; Pink1 ve Parkin, proteinlerine olan etkisi Western blot analizi ile incelendi.

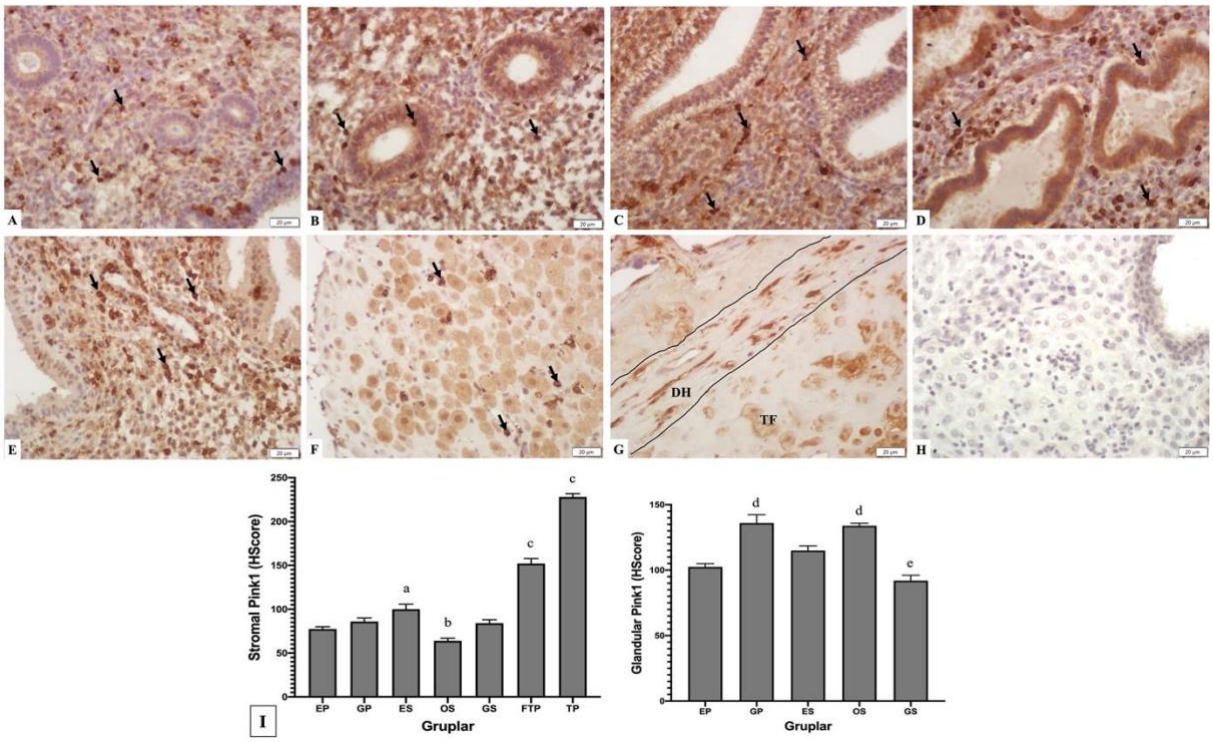
4.6.1. Pink1 Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri

4.6.1.1. Pink1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

Pink1 protein ekspresyonu hücrelerin sitoplazmasında ve yer yer nükleuslarında görüldü (Şekil 30 A-G). Endometriyum ve FP desidua dokularında küçük, yuvarlak nükleuslara sahip hücreler gözlendi (Şekil 30 A-F). Endometriyum dokusunda stroma hücrelerinin yanı sıra lenfositlerin de bulunduğu ve özellikle T lenfositlerinin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin implantasyon öncesinde ve gebeliğin erken dönemlerinde arttığı bildirilmiştir [99][100]. Farklı dokulardaki T lenfositlerinde Pink1 ekspresyonunun varlığı daha önce gösterilmiştir [101][102]. Bu bilgiler ışığında, lenfosit olduğu tahmin edilen ve yoğun olarak Pink1 immün boyanması gösteren hücreler skorlamaya dahil edilmedi ve analizden dışlandı (Şekil 30 A-F).

Stromal Pink1 protein seviyesi, proliferatif fazda benzer seviyelerde iken ES'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi, bu artışın EP'ye göre anlamlı iken GP grubu ile kıyaslandığında anlamlı olmadığı görüldü (sırasıyla; $p<0,01$, $p>0,05$; Şekil 30 I). OS'de stromal Pink1 seviyesinde dikkat çekici bir azalma olduğu gözlendi ($p<0,04$; Şekil 30 I). FP ve TP gruplarındaki stromal Pink1 seviyesinde artış olduğu görüldü. GS, FP ve TP gruplarındaki protein seviyesi, OS grubuna kıyasla arttı ($p<0,04$; Şekil 30 I). FP ve TP'deki Pink1 protein seviyesinde diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0,001$; Şekil 30 I). Gebelik döneminde artan Pink1 ekspresyonu, TP döneminde en yüksek seviyede gözlendi (Şekil 30 G).

Glandular Pink1 protein seviyesi, menstrual siklusta düzensiz bir ekspresyon paterni gösterdi. EP'de düşük seviyede olan Pink1 ekspresyonunun, GP'de anlamlı düzeyde arttığı ve ES'de tekrar azaldığı bulundu ($p<0,01$; Şekil 30 I). ES'de azalan Pink1 protein ekspresyonunun, OS'de tekrar yükseldiği ve sekresyon fazının sonunda (GS'de) ise en düşük seviyede olduğu görüldü ($p<0,02$; Şekil 30 I).



Şekil 30: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Pink1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. Ok; lenfosit, DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. **I; Pink1 protein seviyesini gösteren grafik**. [a]*p*<0,01; OS, FP ve TP grupları ile kıyaslandığında. [b]*p*<0,01; EP, OS, FP ve TP grupları ile kıyaslandığında. [c]*p*<0,01; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [d]*p*<0,001; EP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında. [e]*p*<0,005; GP, ES ve OS grupları ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

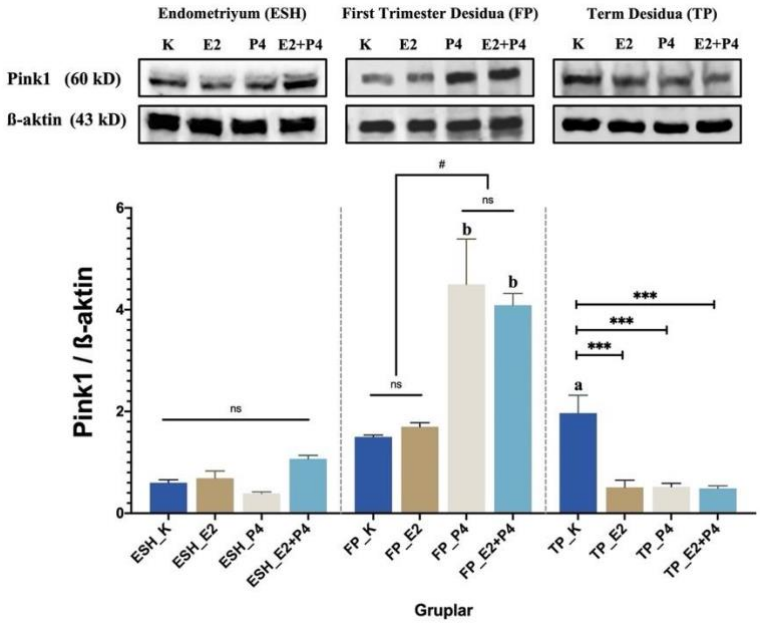
4.6.1.2. Pink1 Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi

Hormon uygulaması sonrasında Pink1 protein ekspresyonunun FP ve TP-DH'lerde değiştiği, ESH'lerde hormona bağımlı bir değişim olmadığı görüldü (sırasıyla; p<0,04, p>0,05; Şekil 31).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Pink1 ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi ([#], ***p;* Şekil 31): FP-DH'lerde, kontrol ve E2 grupları ile kıyaslandığında P4 ve E2+P4 uygulanan gruplardaki Pink1 protein seviyelerinin arttığı gözlendi ([#]p<0,001). Kontrol ile E2 grupları arasında ve P4 ile E2+P4 grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (p>0,05). Bu verilere göre FP-DH'lerde P4 hormonunun, Pink1 proteini

üzerindeki ekspresyonu arttırıcı etkisi dikkati çekti. TP-DH'lerde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hormon uygulanan gruplarda Pink1 protein seviyelerinin istatistiksel olarak azaldığı gözlendi (***p<0,04). Hormon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p>0,05).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi (^{a,b,c} *p;* Şekil 31): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, TP-DH'lerdeki Pink1 protein ekspresyonunun ESH'lere göre yüksek olduğu gözlendi (^{a}p<0,04). E2 grupları kendi içinde kıyaslandığında, Pink1 protein ekspresyonu bakımından hücreler arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi (p>0,05). P4 ve E2+P4 etkisindeki hücreler ayrı ayrı karşılaştırıldığında; FP-DH'lerdeki Pink1 protein ekspresyonunun, hem ESH'lere hem de TP-DH'lere göre oldukça yüksek olduğu görüldü (^{b}p<0,001).



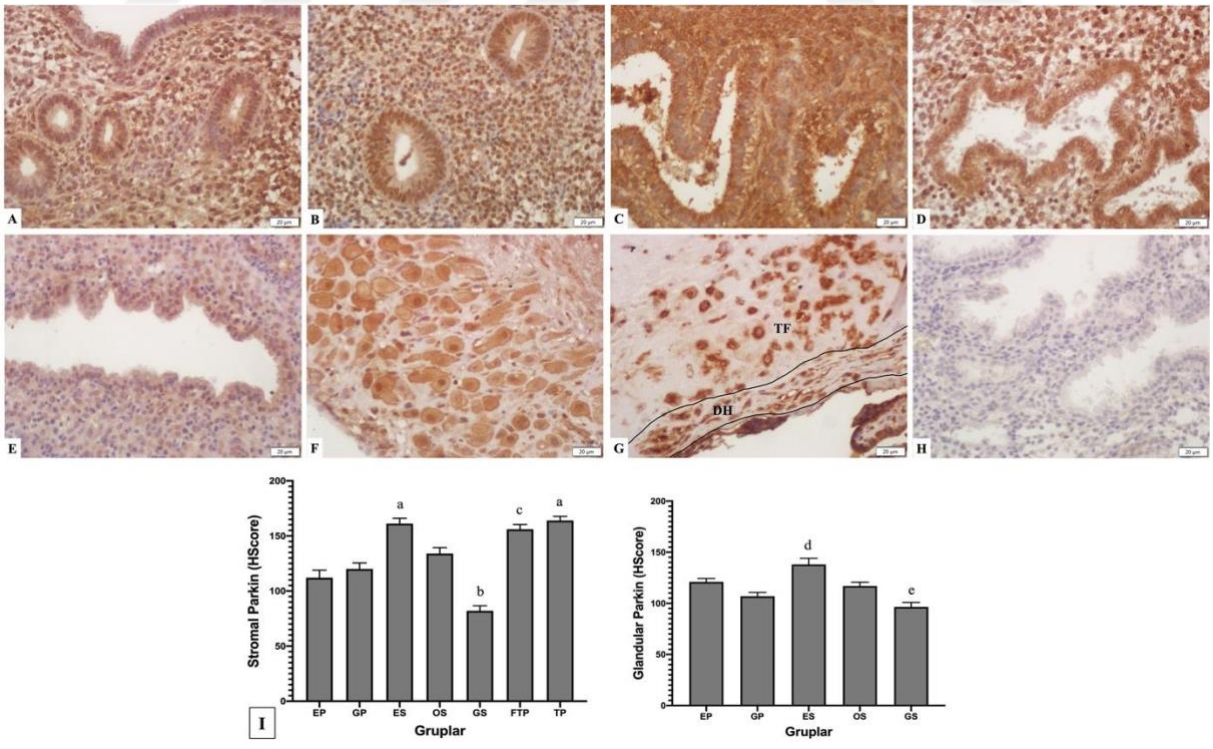
Şekil 31: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Pink1 ekspresyonuna etkisi. ns: anlamlı farklılık yok. FP-DH grubu için #p<0,001. TP-DH grubu için ***p<0,04. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için ^{a}p<0,04 ESH'ye göre; P4 ve E2+P4 için ^{b}p<0,001 ESH ve TP-DH'ye göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.6.2. Parkin Proteininin İmmünohistokimya ve Western Blot Analizleri

4.6.2.1. Parkin Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

Parkin protein ekspresyonu hücrelerin hem sitoplazmasında hem de nükleuslarında görüldü (Şekil 32 A-G). Stromal Parkin protein seviyesi proliferatif fazlarda benzer düzeyde izlendi, EP ve GP grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). ES fazındaki Parkin protein seviyesi EP, GP, OS ve GS fazlarına göre anlamlı olarak arttı ($p<0,001$; Şekil 32 I). Sekresyon fazının başında görülen bu yüksek düzeyde Parkin ekspresyonu, fazın ilerleyen dönemlerinde kademeli olarak azalma gösterdi ($p<0,01$; Şekil 32 I). Stromal Parkin seviyesi; FP grubunda, EP, GP ve GS fazlarına göre anlamlı bir artış gösterirken, TP grubunda EP, GP, OS ve GS fazlarına göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,005$; Şekil 32 I). GS'de azalan ve en düşük seviyede izlenen Parkin ekspresyon seviyesinin, gebelik döneminde arttığı ve TP-DH'lerde en yüksek seviyede gözlendiği görüldü (Şekil 32 E, G, I).

Glandular Parkin protein seviyesinin, EP ve GP fazlarında benzer düzeylerde iken ES fazında GP, OS ve GS gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0,02$; Şekil 32 I). ES'de artan glandular Parkin protein seviyesinin, OS ve GS fazlarında kademeli olarak azaldığı ve GS'de siklusun en düşük seviyesinde izlendiği görüldü ($p<0,03$; Şekil 32 I).



Şekil 32: Menstrual siklusun her bir fazına ait endometriyum dokularında ve gebelik dönemine ait desidua dokularında Parkin ekspresyonunun IHC ile incelenmesi. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS)

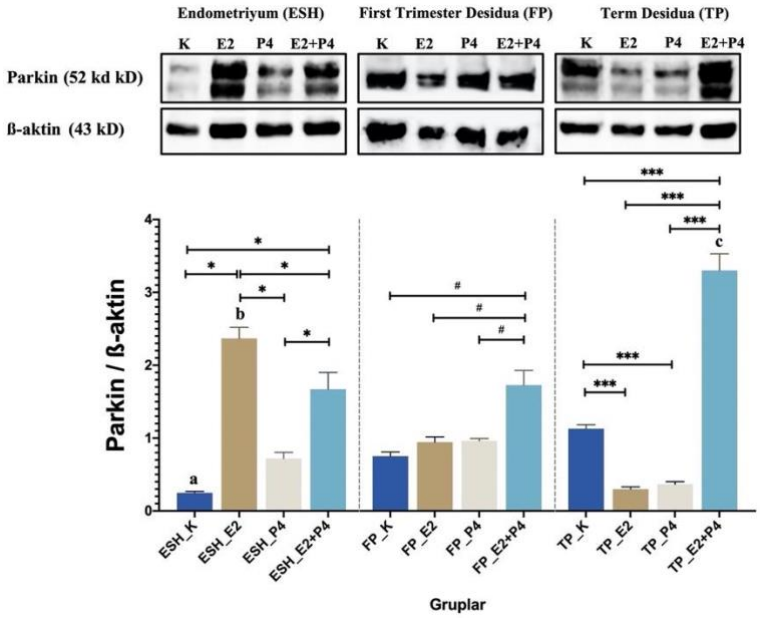
dönemlerine ait endometriyum dokularını, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait plasentanın maternal dokusunu gösteren mikrograflar. G'de desiduanın olduğu alan vurgulanmıştır. H; negatif kontrol. 40X. DH; desidua hücresi, TF; trofoblast. **I; Parkin protein seviyesini gösteren grafik**. [a]*p*<0,01; EP, GP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında. [b]*p*<0,005; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [c]*p*<0,01; EP, GP ve GS grupları ile kıyaslandığında. [d]*p*<0,001; GP, OS ve GS grupları ile kıyaslandığında. [e]*p*<0,005; EP, ES ve OS grupları ile kıyaslandığında. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.6.2.2. Parkin Protein Ekspresyonunun Western Blot Analizi

Hormon uygulaması sonrasında hem ESH hem de DH'lerde Parkin protein seviyesinin değiştiği gözlendi (Şekil 33).

Hormonların hücredeki etkisini incelemek için aynı hücreye uygulanan E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Parkin ekspresyonu bakımından kıyaslaması yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık, semboller ile gösterildi (*, #, ***p;* Şekil 33): ESH'lerdeki Parkin protein ekspresyonunun, E2 uygulanan gruplarda, kontrol ve P4 gruplarına kıyasla arttığı gözlendi (*p<0,001). E2 grubu ile kıyaslandığında Parkin protein seviyesinin hem P4 hem de E2+P4 gruplarında azaldığı tespit edildi (*p<0,02). FP-DH'ler incelendiğinde, E2+P4 grubunda, kontrol grubuna kıyasla Parkin ekspresyon seviyesinin arttığı belirlendi ([#]p<0,002). Bunun yanı sıra, FP-TP'lerde E2 ve P4 grupları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında, her iki hormonun birlikte verildiği grupta Parkin ekspresyon seviyesinin arttığı görüldü ([#]p<0,03). TP-DH'lerde Parkin protein seviyesinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, E2 ve P4 uygulanan gruplarda azaldığı, E2+P4 uygulanan grupta ise önemli ölçüde arttığı tespit edildi (sırasıyla; ***p<0,01, ***p<0,03, ***p<0,001). Ayrıca, FP'lere benzer şekilde TP-DH'lerde de, E2 ve P4 grupları ile kıyaslandığında, E2+P4 grubundaki Parkin protein seviyesinin arttığı gözlendi (***p<0,001).

Aynı hormonun farklı hücrelerdeki etkisini incelenmek için hücreler arasında karşılaştırma yapıldı ve gruplar arasındaki farklılık harfler ile gösterildi ([a,b,c] *p;* Şekil 33): Kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, ESH'lerdeki Parkin protein ekspresyonunun TP-DH''lere göre yüksek olduğu gözlendi ([a]p<0,003). E2 uygulanan gruplara bakıldığında, ESH'lerdeki Parkin protein ekspresyonunun, hem FP-DH'lere hem de TP-DH'lere göre oldukça yüksek olduğu görüldü ([b]p<0,001). P4 grupları kendi içinde kıyaslandığında, Parkin protein ekspresyonu bakımından hücreler arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi (p>0,05). E2+P4 etkisindeki hücreler ayrı ayrı karşılaştırıldığında, TP-DH'lerdeki Parkin protein ekspresyonunun, ESH'lere ve FP-DH'lere göre oldukça yüksek olduğu görüldü ([c]p<0,001).



Şekil 33: ESH ve DH'lerde E2, P4 ve E2+P4 hormonlarının Parkin ekspresyonuna etkisi. ESH grubu için *p<0,02. FP-DH grubu için #p<0,03. TP-DH grubu için ***p<0,03. Aynı hormonun etkisinde farklı hücreler kıyaslandığında: Kontrol için [a]p<0,003 TP-DH'ye göre; E2 için [b]p<0,001 FP- ve TP-DH'lere göre; E2+P4 için [c]p<0,001 ESH ve FP-DH'lere göre. Gruplardaki değerler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi.

4.7. Elektron Mikroskobik Bulgular

Menstrual siklusun EP, GP, ES, OS ve GS fazlarına ait ESH'lerdeki ve gebeliğin FP ve TP dönemlerine ait DH'lerdeki mitokondri yapısı elektron mikroskobik olarak in vivo incelendi.

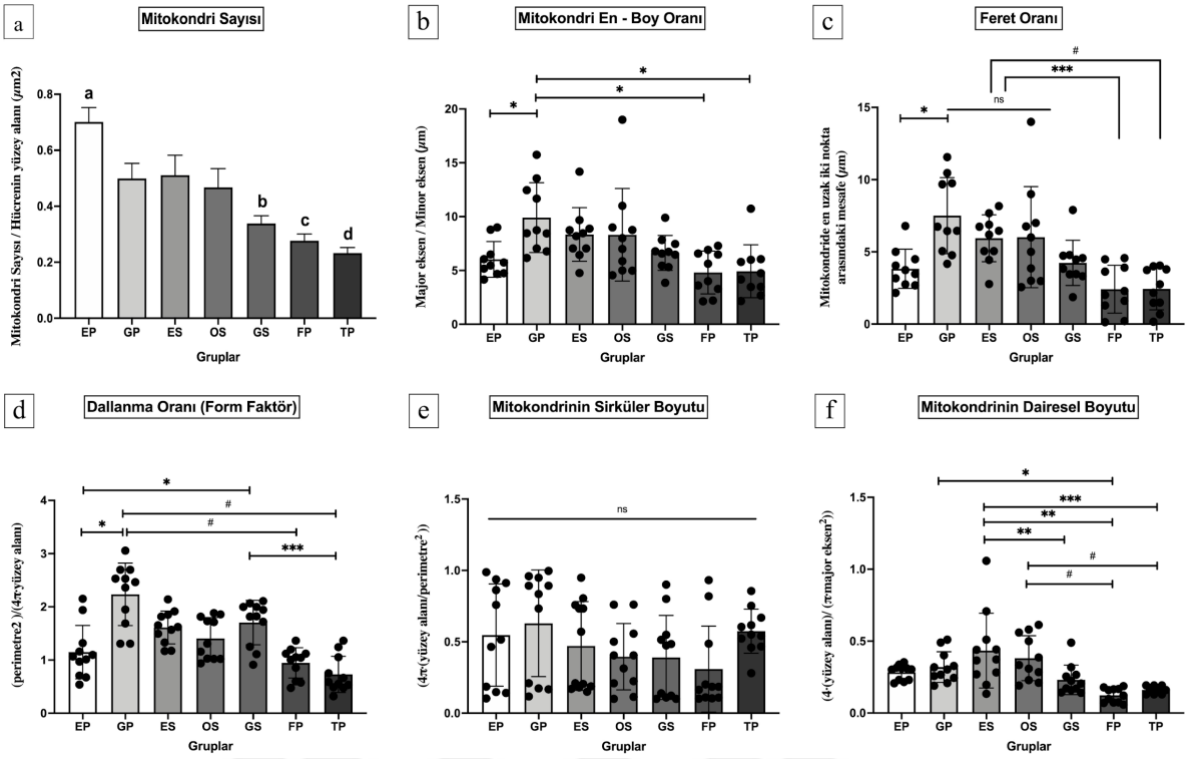
Hücrelerdeki mitokondri sayısı değerlendirildiğinde, EP-ESH'lerdeki mitokondri sayısının diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında yüksek olduğu görüldü (p<0,001; Şekil 34 a). GP, ES ve OS gruplarındaki mitokondri sayısının; EP'ye göre azaldığı, buna karşın GS, FP ve TP gruplarına göre arttığı gözlendi (sırasıyla; p<0,001 ve p<0,04) (Şekil 34a, 35a). GP, ES ve OS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05; Şekil 34a). TP-DH'lerde mitokondri sayısının tüm gruplardaki ESH'lere göre azaldığı, ancak FP grubundaki DH'lere göre değişmediği görüldü (sırasıyla; p<0,03 ve p>0,05; Şekil 34 a).

Mitokondri boyutundaki (uzunluk, genişlik ve çap) değişimler, mitokondri en-boy oranı ve Feret çapı üzerinden değerlendirildiğinde; GP grubundaki mitokondri uzunluğunun EP, FP ve TP grubuna kıyasla arttığı görüldü (p<0,04) (Şekil 34 b ve c, Şekil 35). GP, ES ve OS grupları arasında mitokondri uzunluğu bakımından herhangi bir anlamlı farklılık bulunmadı

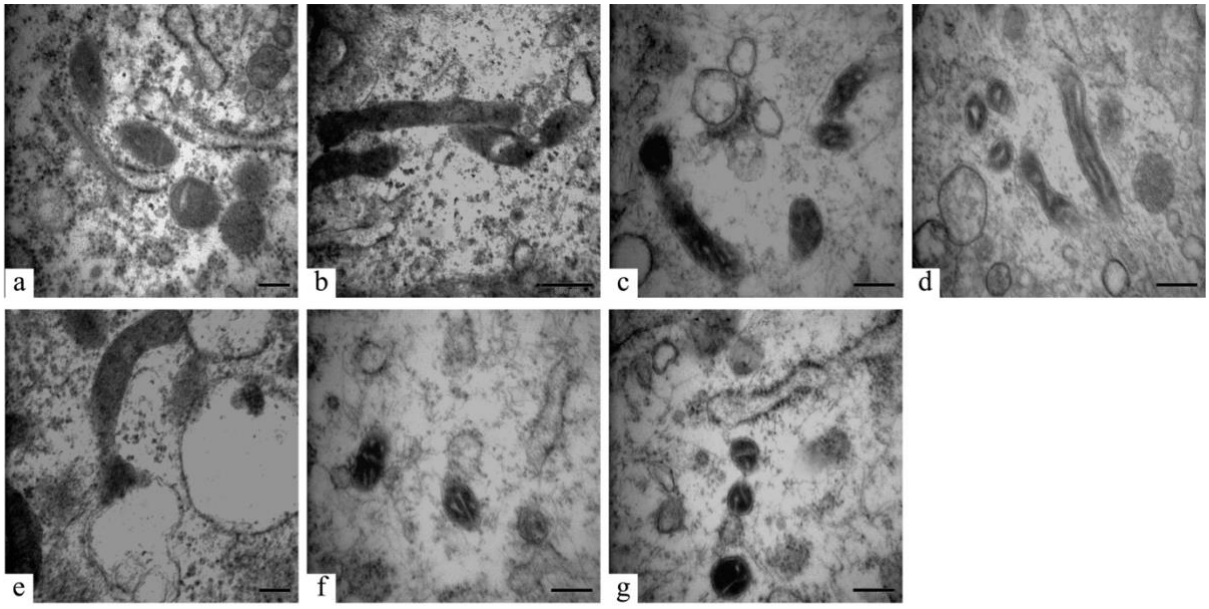
($p>0,05$). Feret çapı ve dallanma oranı incelendiğinde, EP, FP ve TP gruplarındaki mitokondri kütlesinde, GP grubuna kıyasla azalma olduğu görüldü ($p<0,02$) (Şekil 34 c ve d, Şekil 35).

Mitokondrinin sirküler ve dairesel boyutu değerlendirildiğinde; mitokondriyonların sirkülaritesinde gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 34 e). Mitokondrinin dairesel boyutuna göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; ES ve OS grupları ile kıyaslandığında, FP ve TP gruplarındaki mitokondri daireselliğinin azaldığı gözlendi ($p<0,02$) (Şekil 34 f).

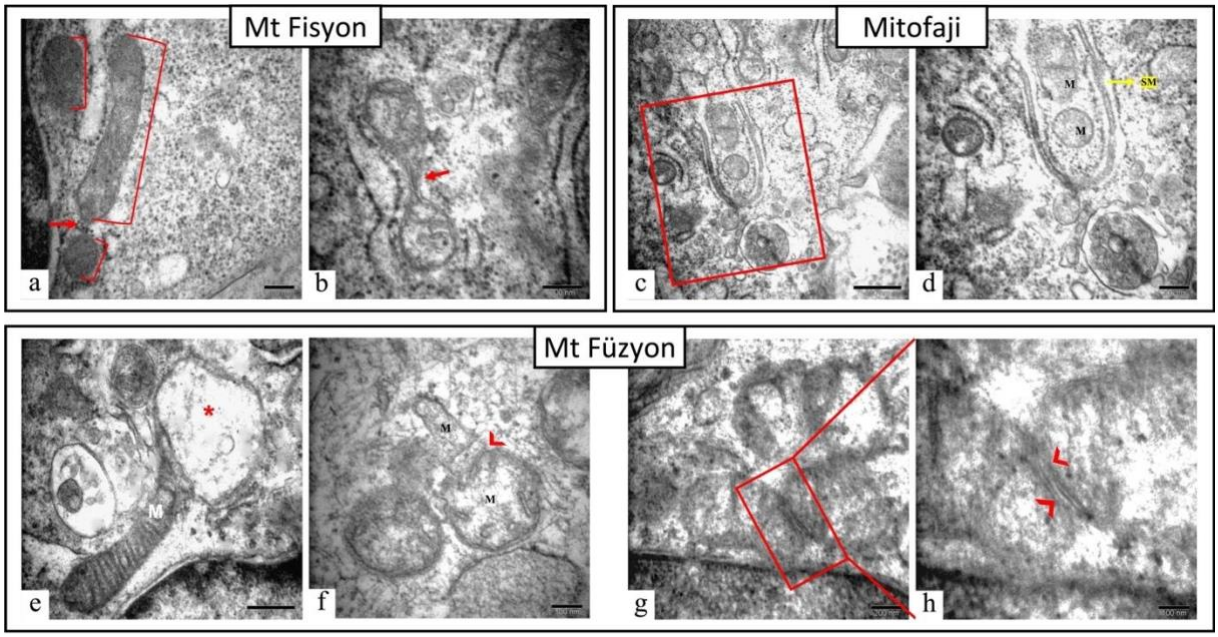
Histomorfolojik değerlendirmede; ESH ve DH'lerde hem elektron yoğun hem de soluk matrikse sahip dairesel ve silindir şeklinde mitokondri görüldü (Şekil 35 ve 36). Buna ek olarak, hücrelerde muhtemel mt füzyon, fisyon ve mitofaji geçiren mitokondri yapıları gözlendi (Şekil 36). Mt fisyon, mitokondriyonda boğum ve yakınında granüllü endoplasmik retikulumun görülmesi, mitofaji ise mitokondri etrafında çift katlı sınırlandırıcı membranın görülmesi ile incelendi (Şekil 36 a-d). Elektron mikroskobunda mt füzyonun tanımlanmasının zor olduğu görüldü. Şekil-36'da görüldüğü üzere iki mitokondriyon arasında, kaynaşmaya benzer görüntüler izlendi ve mitokondriyonlarda daralma ve boğum olmadığından mt füzyon tespiti yapıldı (Şekil 36 e-h).



Şekil 34: Elektron mikroskobik ölçümlere ait grafikler. a) m^2 alana düşen mitokondri sayısına ait grafik. [a]p<0,001; diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında. [b]p<0,004; EP, GP, ES grupları ile kıyaslandığında. [c]p<0,001 ve [d]p<0,03; EP, GP, ES ve OS grupları ile kıyaslandığında. b) Mitokondrinin en ve boy oranı; mitokondriyonun maksimum boy ve genişliğinin oranını gösteren grafik. *p<0,03. c) Feret çapı; mitokondriyondaki en uzak iki nokta arasındaki uzunluğu gösteren grafik. *p<0,004; [#]p<0,007; [***]p<0,005. d) Dallanma oranına ait grafik. *p<0,006; [#]p<0,002; [***]p<0,03. e) Mitokondrinin sirküler boyutunu gösteren grafik. ns: istatistiksek anlamlılık yok. f) Mitokondrinin dairesel boyutunu gösteren grafik. *p<0,02; [***]p0<0,01; [#]p<0,007.



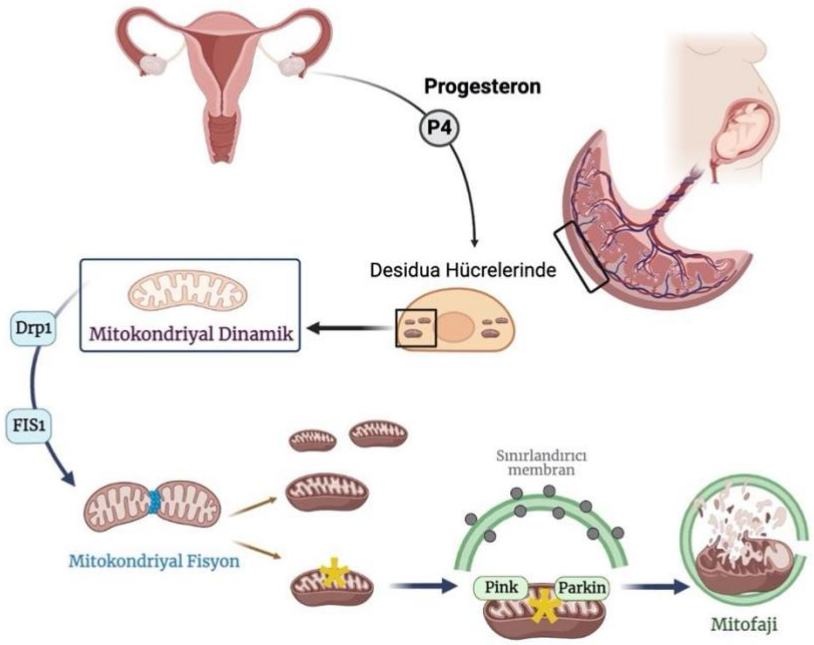
Şekil 35: Menstrual siklusun her bir fazına ait ESH'lerde ve gebelik dönemine ait DH'lerde mitokondri yapılarını gösteren mikrograflar. A; erken proliferatif (EP), B; geç proliferatif (GP), C; erken sekretuar (ES), D; orta sekretuar (OS) ve E; geç sekretuar (GS) dönemlerine ait ESH'leri, F; ilk trimester (FP) ve G; term (TP) dönemine ait DH'leri mikrograflar.



Şekil 36: Mitokondriyal (mt) fisyon (a ve b), mitofaji (c ve d) ve mt füzyonu (e-h) gösteren elektron mikroskobik görüntüler. a-b) muhtemel mt fisyon ile ayrılan mitokondrideki boğumları (ok) gösteren mikrograflar d) ESH'ye ait mikrografta kare içerisindeki alanın (c) büyütmesine ait görüntüde, sınırlandırıcı membran (SM) ile sarılan mitokondri. e) Hasarlı (*) mitokondriyon ile sağlıklı mitokondriyonun muhtemel kaynaşmasını gösteren mikrograflar. f) Kütleyi arttırmak için kaynaşan sağlıklı iki mitokondriyona ait mikrograf. g) ESH'ye ait mikrografta dikdörtgen alanın büyütmesine ait görüntüde (h) kaynaşması muhtemel iki mitokondriyon membranını gösteren mikrograf. Ok başı: mitokondriyonların kaynaşması. M: Mitokondriyon.

Proliferasyon → Desidualizasyon

		ESH				ESH Pre-DH	DH	
		EP	GP	ES	OS	GS	FP	TP
Mt Fisyon	*Drp1*	↑	ns	ns	ns	ns	↑	↑
	Fis1	ns	ns	ns	ns	ns	↑	↑
	MFF	↑	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mt Füzyon	*MFN2*	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↓
	OPA1	ns	ns	ns	ns	↑	↑	↑
Mitofaji	*Pink1*	ns	ns	ns	↓	ns	↑	↑
	Parkin	ns	ns	↑	↑	↓	↑	↑



Şekil 37: Çalışmanın bulgularını özetleyen şema. Tablo, menstrual siklus ve gebelik süresince hücrelerdeki mt füzyon, fisyon ve mitofajiye ait proteinlerin ekspresyonlarındaki in vivo değişimi göstermektedir. ↑; ekspresyondaki artmayı, ↓; ekspresyondaki azalmayı ve ns; farklılık olmadığını göstermektedir. Tablonun altındaki şekilde; plasentadaki DH'lerde diğer fazlara göre baskın olan, P4 bağımlı mt fisyon ve mitofaji gösterilmektedir.

5. TARTIŞMA

Başarılı bir gebelik; doğru embriyo gelişimi ve yeterli endometriyal farklılaşma süreçlerini gerektirir [103][43]. Endometriyum, her menstrual siklus boyunca potansiyel embriyo implantasyonu için hazırlanır ve implantasyon gerçekleşirse gebeliğin devamında desidua adını alır. Endometriyumdaki stroma hücrelerinin (ESH'lerin), desidua hücrelerine (DH'lere) farklılaşması sürecine desidualizasyon adı verilir. Desidualizasyon mekanizması, menstrual siklusun orta sekretuar fazında başlar ve gebeliğin erken dönemlerinde (ilk trimesterde) devam eder. Bu süreçte, ESH'lerin fenotipinde majör değişiklikler görülür; iğ şekilli fibroblast benzeri ESH'ler, poligonal yapıda ve epitel benzeri sekretuar hücreler olan DH'lere dönüşür [50]. Bu dönüşüm mekanizmaları sağlıklı bir gebeliğin gerçekleşmesi ve sürdürülmesinde gerekli olmasına rağmen desidualizasyonu düzenleyen mekanizmalar halen tam olarak bilinememektedir [48].

Yetersiz desidualizasyon veya desidualizasyon esnasında meydana gelen bozulma ve anomaliler implantasyon hataları, tekrarlayan düşükler, preeklamsi, endometriozis ve endometriyal kanser gibi birçok duruma sebep olmaktadır [Cha vd. (2012), Zhang vd. (2013)]. Gebeliklerin yaklaşık %30'unda desidualizasyon defektinden kaynaklanan, implantasyon sonrası düşükler yaşanmaktadır [5,6]; bu durum, embriyo sağlıklı olsa dahi ortaya çıkabilmektedir. Mevcut yardımcı üreme teknolojilerinin kullanılması sonucunda ortaya konan düşük implantasyon (%5,26) ve gebelik başarı (%15,82) oranları, bu teknoloji ile en kaliteli embriyonun oluşturulmasının tek başına yeterli olmadığını, başarılı bir gebelik için implantasyonun gerçekleşeceği dokuda doğru desidualizasyonun da gerekli olduğunu göstermektedir [52]. Bu sebeple, implantasyon hataları ve endometriyal patolojiler için normal fizyolojik koşullarda endometriyumun geçirdiği proliferasyon, rejenerasyon ve desidualizasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılması gerekmekte ve ilgili araştırmaların artırılması önemli görülmektedir. Bu çalışmada, menstrual siklus ve desidualizasyon boyunca mitokondriyal (mt) füzyon, mt fisyon ve mitofajinin varlığının belirlenmesi, ESH'lerin proliferasyonu ve desidua hücrelerine (DH'lere) farklılaşmasında mt füzyon, mt fisyon ve mitofajinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, mitokondriyal belirteçlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi için insan biyopsi doku örnekleri kullanılmıştır. Bilimsel araştırmalarda insan dokusunun kullanılması, insan vücudunun anlaşılmasında, ortaya çıkan hastalıkların tanısında ve bu hastalıkların altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasında oldukça önemlidir; ek olarak hem günümüzde uygulanan tedavilerin etkinliğinin hem de ilerde geliştirilecek olan tedavi protokollerinin temelinin ortaya konulmasında da gereklidir. Buna rağmen, yapılan çalışmalarda genellikle deney hayvanlarının kullanıldığı görülmektedir. Deney hayvanına ait hücre soyları ve doku örnekleri deneysel araştırmalar için faydalıdır, ancak deney hayvanına ait hastalıkların ve moleküler özelliklerin genel olarak insandan farklı olması, bu araştırmalardan elde edilen verilerin insan için yanıltıcı olmasına sebebiyet vermektedir. Biyolojik ve fizyolojik araştırmalardaki ilgili doku modellerinde insan örneklerinin kullanılması, bu modellerin klinik uygulamalara uyarlanmasından önce yapılan hayvan deneylerinin ilk birkaç basamağının ortadan kaldırılmasını sağlayarak tedavi gelişimini hızlandırmaya yardımcı olabilmektedir [104,105]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda mitokondriyal proteinlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi için kadınlardan alınan biyopsi dokularının kullanılması hem insan biyolojisinin fizyolojik sürecine moleküler olarak açıklık getirilmesi bakımından hem de ilerleyen basamaklarda ilgili hastalık modellerindeki moleküler eksikliğin belirlenmesi açısından önemli görülmektedir.

Mitokondriyon oldukça dinamik bir organeldir, morfolojisi ve hücredeki sayısı, hücrenin metabolizması ile ilişkilidir. Mitokondriyonun dinamikliği hücredeki sayısının ve kütlesinin sürekli olarak değişmesine ve yenilenmesine bağlıdır. Mitokondriyonun sayısı, morfolojisi, yapısı ve fonksiyonu kalite kontrol aşamaları olan mt füzyon, fisyon ve mitofaji ile kontol edilmektedir [11–14]. Mt füzyon; hücrenin enerji (ATP) ihtiyacının artması ve mt homojenitenin sağlanması için aktifleşen bir mekanizmadır [12,13,17]. Bu mekanizma ile mitokondri kütlesinin artması, mitokondriye ait içeriklerin birbiri ile karışması ve hücrenin içerdiği tüm mitokondriyonların birbiri ile denk olması sağlanır. Mt füzyon mekanizması sayesinde, hasara uğramasına rağmen kurtarılabilir durumda olan mitokondriyonlar, sağlıklı olanlar ile kaynaşmakta ve hücrenin enerji kaynağının kütlesi korunmaktadır. Kısaca; ATP ihtiyacı fazla olan veya yüksek miktarda oksidatif strese maruz kalan hücrelerde mt füzyonun arttığı ve aşırı ağsı mitokondri yapısının olduğu görülmektedir [11–13,17,18]. Desidualizasyon ile hücrelerde ATP ihtiyacının ve oksidatif stresin arttığı bilinmektedir [106][107]. Bu bilgiler

ışığında, desidualizayson sürecinde ESH'lerde mt füzyonun araştırılması için MFN2 ve OPA1 proteinlerinin seviyeleri incelenmiştir.

Mitokondriyonların füzyonu için ilk olarak dış membranların, daha sonra da iç membranların kaynaşması gerekmektedir. Mitokondriyonların dış membranlarının kaynaşmasında dış membranda bulunan MFN2 proteini, iç membranların kaynaşmasında ise iç membranda bulunan OPA1 proteini rol oynar [18]. Çalışmamızda, menstrual siklusun; erken proliferasyon (EP), geç proliferasyon (GP), erken sekresyon (ES), orta sekresyon (OS) ve geç sekresyon (GS) fazlarına ait ESH'lerde ve gebeliğin ilk trimester (FP) ve term (TP) dönemlerine ait DH'lerde, mt füzyon değişimleri MFN2 ve OPA1 protein seviyelerinin araştırılması ile değerlendirilmiştir. Dokulardaki IHC analizleri sonucunda; GP, GS ve FP grubundaki ESH'lerde MFN2 protein seviyesinin EP, ES ve TP gruplarına kıyasla arttığı görülürken GS, FP ve TP grubundaki ESH'lerde OPA1 protein ekspresyonun EP, GP, ES ve OS gruplarına kıyasla arttığı gözlenmiştir. Bu doğrultuda, desidualizasyonun başlayıp devam ettiği ve sekresyonun aktif olduğu GS ve FP gruplarındaki hücrelerde, MFN2 ve OPA1 proteinleri üzerinden mt füzyonun arttığı izlenmiştir. Desidualizasyon sürecindeki hücrelerde ATP ihtiyacının arttığı ve mitokondri kütlesindeki artışın bu ihtiyacı karşılayacağı bilindiğinden [106][107], GS ve FP gruplarında gözlenen mt füzyon seviyesindeki yükselmenin desidualizasyon mekanizması ile ilişkili olduğu söylenebilir. Cormio ve ark. (2017) östrojen bağımlı tip I endometriyal karsinoma dokularında, MFN2 protein seviyesinin, normal endometriyum dokusuna göre azaldığını göstermiştir [32]. Basha ve ark. (2022) obezite koşullarında E2 ve P4 hormonlarının azalması ile ovaryumda MFN2 protein seviyesinin azaldığını, E2 ve P4 seviyelerini arttırıcı bir ajanın uygulanması ile MFN2 protein seviyesinin arttığını bildirmiştir [108]. Literatürde P4'ün hücredeki mt füzyon proteinleri üzerindeki etkisini inceleyen araştırma sayısı, E2'ye göre daha azdır. Park ve ark (2022) rat ovaryumunda östrus siklusu boyunca mt dinamik proteinlerini incelemiş ve P4'ün baskın olduğu fazda MFN2 protein ekspresyonunun azaldığını, OPA1'in ise değişmediğini göstermiştir [22]. Bu bilgiler ışığında; bu çalışmada ESH'lerin desidualizasyonunda rol oynayan E2 ve P4 hormonlarının mt füzyon üzerine olan etkisi in vitro analizler ile incelenmiştir.

Mt füzyonun, steroid hormonlarından etkilendiği bilinmektedir [21,109]. Daha önce yapılan çalışmalar, E2 hormonu etkisinde iken endotel, iskelet kası ve meme kanseri hücrelerinde MFN ve OPA1 proteinlerinin ekspresyonunun arttığını göstermiştir [19–21]. Bu tez çalışmasında ise ESH'lerde, E2'nin etkisi ile MFN2 protein ekspresyon seviyesinin kontrole

kıyasla arttığı, buna karşılık P4 ve E2+P4 verilen gruplarda ise herhangi bir farklılığın olmadığı görülmüştür. FP-DH'lerde ise hormon uygulanan gruplardaki MFN2 protein seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülürken, hormon uygulaması sonucunda TP-DH'lerdeki MFN2 protein ekspresyonunda herhangi bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. OPA1 protein seviyesine bakıldığında; ESH'lerde hormona bağımlı herhangi bir farklılık gözlenmezken, FP-DH ve TP-DH'lere P4 uygulanan gruplarda OPA1 protein ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. E2'nin etkisinde iken ESH'lerde mt füzyonun arttığı ancak FP-DH'lerde azaldığı tespit edilmiştir. ESH'lerde E2'ye bağlı olarak mt füzyonun artması daha önce endotel, iskelet kası ve meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmaları ve in vivo bulgularımızı desteklemektedir [19–21]. Buna karşılık, FP-DH'lerde in vivo koşullarda mt füzyon artarken, in vitro analizlerde E2'nin etkisi ile azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda, mt füzyonun FP-DH'lerdeki in vivo artışında, E2'nin etkili olmadığı söylenebilir. E2'nin etkisinde mt füzyonun ESH ve FP-DH'lerde gösterdiği bu farklılık, ESH'lerin DH'lere farklılaşması sürecinde E2'nin mt füzyonu üzerinde etkili olmadığını düşündürmektedir. İn vitro analizlerde P4'ün, ESH ve TP-DH'lerde mt füzyon üzerine herhangi bir etki oluşturmadığı görülürken, FP-DH'lerde hem MFN2 hem de OPA1 proteinleri üzerinden mt füzyonu azalttığı tespit edilmiştir. IHC analizde (in vivo olarak) mt füzyonun GS ve FP'de arttığı ancak in vitro analizlerde P4'ün etkisinde iken FP-DH'lerde azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, mt füzyonun FP-DH'lerdeki in vivo artışında, P4'ün etkili olmadığı söylenebilir. Sonuç olarak; ESH'lerin desidualizasyonunda rol oynayan E2 ve P4 hormonlarının MFN2/OPA1 aracılı mt füzyon üzerinde doğrudan bir etkisi olmadığı söylenebilir.

Mitokondriyonun diğer bir kalite kontrol mekanizması olan mt fisyon; hücre bölünmesi (proliferasyon) esnasında yavru hücrelere eşit miktarda mitokondri dağılımında görevlidir. Ayrıca, mitokondriyonun hasarlı olan parçasının sağlıklı bir mitokondriyon ile kaynaşarak kurtarılamayacak olduğu durumlarda, mitokondriyonun hasarlı ve sağlıklı parçalarının mt fisyon ile ayrılması ve ardından hasarlı mitokondriyonun mitofaji ile elimine edilmesi sağlanır [12,13,18,23]. Genetik ve hücre biyolojisi ile ilgili yapılan araştırmalar, mt fisyon işlemi için gerekli olan iki sınıf protein tanımlamıştır. Bu proteinlerden ilki olan Drp1, hücre sitoplazmasında bulunur ve mt fisyonun ana efektörü olarak kabul edilir [24][18]. Sitozolik lokalizasyonu göz önüne alındığında mt fisyonun gerçekleşmesi için Drp1'in, sitoplazmadan mitokondriyon yüzeyine translokasyonu gerekmektedir. Drp1'in translokasyonuna bir takım spesifik adaptör proteinler aracılık eder. Bunlardan ikisi, mitokondriyon dış membranında

bulunan Fis1 ve MFF proteinleridir [25]. Çalışmamızda mt fisyonun değerlendirilmesi için Drp1, Fis1 ve MFF proteinleri IHC yöntemi ile incelenmiştir.

Bu çalışmada mt fisyonun fizyolojik koşullarda değerlendirilmesi için, menstrual siklus fazları ve gebelik dönemlerindeki ESH ve DH'lerde Drp1, Fis1 ve MFF proteinleri IHC yöntemi kullanılarak in vivo koşullarda incelenmiştir. İn vivo değerlendirmelerde; Drp1 protein ekspresyonunun EP-ESH'ler ile FP ve TP-DH'lerde en yüksek seviyelerde seyrettiği gözlenmiştir. Fis1 protein seviyesinin ise, Drp1 gibi, FP ve TP-DH'lerde en yüksek seviyede olduğu, ancak menstrual siklus fazlarındaki seviyelerde farklılık olmadığı görülmüştür. Diğer bir mt fisyon proteini olan MFF ekspresyonu in vivo incelendiğinde, EP-ESH'lerde artış olduğu ancak diğer gruplar arasında herhangi bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, mt fisyonun DH'lerde Drp1 ve Fis1 proteinleri üzerinden, EP-ESH'lerde ise Drp1 ve MFF proteinleri üzerinden arttığı tespit edilmiştir. İn vivo bulgular ile in vitro bulgular kıyaslandığında; E2'nin etkisindeki EP fazında Drp1 aracılı mt fisyonda artış görülmesine rağmen in vitro olarak E2 uygulanan ESH'lerde Drp1 ekspresyonunda değişim gözlenmemesi, EP'de artan mt fisyonun E2'den etkilenmediğini düşündürmüştür. Drp1 aracılı mt fisyonun kardiyovasküler, nörodejeneratif, renal ve kornea ile ilgili hastalıkların patogenezinde rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [26–29]. Bunlara ek olarak, hiper-östrojenitenin hakim olduğu endometriozis patogenezinde Drp1 protein seviyesinin azaldığı in vivo olarak gösterilmiştir [30]. Diğer taraftan, E2'nin meme kanseri hücrelerinde Drp1 aracılı mt fisyonu arttırdığı bildirilmiştir [110]. Çalışmamızda ise in vitro olarak hücrelere E2 uygulandığında Drp1 seviyesinin etkilenmemiş olması, endometriozisin altında yatan mekanizmanın E2'nin etkisi dışında bir başka etken üzerinden mitokondrial fisyonu inhibe ettiği düşündürmektedir, bu sebeple ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Drp1 protein ekspresyonunda görülen in vivo değişimlerde P4'ün etkileri in vitro olarak değerlendirildiğinde; hem ESH hem de FP-DH'lere P4 ve E2+P4 uygulandığında, kontrol grubuna kıyasla, Drp1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu doğrultuda, in vivo ve in vitro bulgular birlikte değerlendirildiğinde; FP grubundaki DH'lerde görülen Drp1 seviyesindeki artışın P4 ile doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızdaki in vivo bulgulara paralel olarak, Park ve ark.'nın (2022) rat ovaryumunda östrus siklusu boyunca mt dinamik proteinlerini incelediği bir araştırmada, P4'ün baskın olduğu fazda Drp1 protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [22]. Bu çalışma, deney hayvanın ovaryumunda yapılmasına rağmen bu çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Bu bilgiler ışığında; P4

hormonuna bağımlı gerçekleşen ESH'lerin DH'lere farklılaşmasında ve desidualizasyon mekanizmasında P4 bağımlı Drp1 aracılı mt fisyonun etkili olabileceği düşünülmüştür. İleriki çalışmalarda Drp1'in inhibe edilmesi ile mt fisyonun desidualizasyon mekanizmasındaki etkisinin araştırılması, hatalı (defektif) desidualizasyondan kaynaklanan hastalıkların altında yatan mekanizmalara ışık tutabilir.

İn vitro bulgularda, mt fisyon için Drp1'e yardımcı olan Fis1 ve MFF proteinleri üzerinde steroid hormonların etkisi değerlendirilmiştir. Literatürde Fis1 protein ekspresyonu üzerinde E2'nin etkilerine dair bilgilerin kısıtlı ve çelişkili olduğu görülmektedir. Sastre-Serra ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, E2 uygulanan meme kanseri hücrelerinde Fis1 mRNA seviyesinin, kontrol grubuna göre azaldığı ancak protein seviyesinde, kontrol grubuna kıyasla, herhangi bir farklılık olmadığı bildirilmiştir [19]. Buna ek olarak Schwann hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmada ise, hücrelere E2 uygulanmasının Fis1 protein seviyesini azalttığı ifade edilmiştir [111]. Bu tez çalışmasında ise, ESH ve FP-DH'lerde E2 uygulaması sonucunda Fis1 protein seviyesinin kontrol ile kıyaslandığında herhangi bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu durumda ya E2'nin Fis1 ekspresyonunu etkilemediği ya da E2'nin uygulandığı süreden dolayı Fis1 protein ekpsresyonuna etki etmediği söylenebilir. İnsan glioblastoma hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada; hücrelere 1, 3, 6 ve 24 saat sürelerde uygulanan E2 hormonunun 3. ve 6. saatlerde Fis1 protein ekspresyonunu arttırdığı, ancak 24. saatte kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık oluşturmadığı bildirilmiştir [112]. Bu bilgiye dayanarak, E2'nin hem Fis1 hem de Drp1 protein ekspresyonlarında in vitro koşullarda herhangi bir etki oluşturmamasının sebebi olarak, uygulama süresinin etkili olabileceği düşünülmektedir. P4'ün etkisine bakıldığında; ESH ve TP-DH'lerde P4 uygulanması ile Fis1 protein seviyesinin azaldığı; FP-DH'lerde ise hormonların Fis1 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Son olarak, MFF protein seviyesinde hormonların in vitro etkisine bakıldığında, E2 ve/veya uygulanması ile MFF protein seviyesinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Literatürde MFF'nin E2 ve P4 hormonları ile bağlantısını gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Mt füzyon ve fisyon birlikte değerlendirildiğinde; çalışmamızda, desidualizasyon ile hem mt füzyonun hem de mt fisyonun arttığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, mt füzyonda hormona bağımlı, doğrudan bir değişim gözlenmese de, Drp1 aracılı mt fisyonda P4'ün etkili olduğu ortaya konulmuştur. Meme kanser hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada, E2'nin Drp1 ve Fis1 proteinleri üzerine olan etkisinin tutarsız olduğu ancak, mt füzyon belirteçleri olan

MFN2 ve OPA1'in mRNA seviyesini arttırdığı bildirilmiştir [113]. Bu tez çalışmasında ise Drp1 ve Fis1'in hormon uygulandığında tutarsızlık sergilediği (Drp1'in arttığında, Fis1'in değişmemesi) ancak, her ikisinin de in vivo koşullarda desidualizasyon ile arttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak; MFN2 ve OPA1'in in vitro olarak hormona bağlı olmadığı ancak in vivo'da desidualizasyon ile arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; DH'lerde mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasının sürekli olarak aktif olduğu ve hücrenin desidual farklılaşması için mitokondrinin fisyon ve füzyon arasında sürekli bir değişim geçirmesi gerektiği düşünülmüştür. Bu değişimlerin, Drp1 dışında, doğrudan hormona bağlı olmadığı söylenebilir.

Mitokondri kalite kontrolünde gerekli olan diğer bir mekanizma ise mitofajidir. Mitofaji, mitokondrinin lizozom ile parçalanmasını sağlayan otofajik bir mekanizmadır ve mitokondri işlevselliğinin korunması sağlar. İşlevsiz mitokondriyi seçici olarak ortadan kaldırarak mitokondrinin kalite kontrolüne katkıda bulunan mitofaji, hasarlı ve disfonksiyonel mitokondrinin hücreden eliminasyonu için gereklidir. Mitofaji aynı zamanda, hücredeki sağlıklı mitokondri sayısının ve kütlesinin azaltılmasında, mt fisyon ile birlikte rol oynar. Mt fisyon ile bölünen mitokondri, mitofaji ile hücreden elimine edilir [14,32].

Mitofaji mekanizmasında rol oynayan birkaç yolak vardır; bunlardan en etkili olanı Pink1/Parkin yolağıdır. Memeli hücrelerinde Pink1 ve Parkin proteinleri, otofaji yoluyla atılması için mitokondrinin işaretlenmesini sağlamaktadır [25,33]. Pink1/Parkin aracılı mitofajinin, Alzheimer ve Parkinson gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta ve tümör gelişim mekanizmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir [34,35]. Buna ek olarak, polikistik over sendromu (PKOS) patogenezinde ve oksidatif stresin arttığı durumlarda ovaryum dokusundaki granüloza hücrelerinde Pink1 ve Parkin protein seviyelerinin arttığı bildirilmiştir [36,37]. Zhao ve ark. ise ESH'lerin migrasyonunda ve canlılığında Parkin bağımlı mitofajinin etkili olduğunu göstermiş, endometriozis patogenezinde Parkin proteininin önemli olduğunu bildirmiştir [30]. Çalışmamızda mitofajinin, ESH'lerin DH'lere farklılaşmasındaki rolünü incelemek amacıyla menstrual siklus fazlarına ait endometriyum ve gebelik süreçlerindeki desidua dokularında Pink1 ve Parkin protein seviyeleri in vivo koşullarda IHC ile değerlendirilmiştir.

İn vivo değerlendirmede, Pink ve Parkin ekspresyon seviyelerinin FP ve TP gruplarındaki DH'lerde yüksek olduğu gözlenmiştir. İn vivo koşullarda gözlenen bu değişimlerde hormon(ların) etkisi incelenmiştir. İn vitro koşullarda ESH'lerdeki Pink1 protein seviyesinde hormona bağımlı bir değişim gözlenmezken, FP-DH'lerde E2+P4 uygulanması ile

Pink1 ekspresyon seviyesinin arttığı, buna karşın TP-DH'lerde azaldığı görülmüştür. Parkin protein seviyesinde hormonların etkisine bakıldığında ise; hem ESH hem de DH'lerde E2+P4 uygulandığında Parkin protein seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular in vivo analizler ile karşılaştırıldığında; FP grundaki DH'lerde Pink1/Parkin aracılı mitofajide gözlenen in vivo artışın, E2 ve P4 hormonlarının birlikte oluşturduğu etkiye bağlı olabileceği düşünülmektedir. Li ve ark.'nın (2022) yaptıkları çalışmada, desidualizasyon ile endometriyal hücrelerdeki Atg9A aracılı mitofajinin arttığının gösterilmesi bulgularımızı desteklemektedir [116]. Desidualizasyon ile artan mitofajinin, mt füzyon ve fisyon arasındaki dengenin sağlanması için veya mitokondri kaynaklı oksidatif stresi azaltıcı bir durum olarak ortaya çıktığı düşünülebilir. Daha önce yapılan çalışmalar; hatalı desidualizasyonun, trofoblastlarda artan oksidatif stres ve mt disfonksiyonun ve azalan mitofajinin preeklampsi patogenezi ile ilişkili olduğunu göstermiştir [117–119]. Buna ek olarak, mt disfonksiyondaki artışın hatalı desidualizasyona yol açtığı bildirilmiştir [120]. Bu literatür bilgileri ve çalışmamızdan elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, preeklampsi patogenezinde görülen hatalı desidualizasyonun mitofaji yolağındaki proteinlerin eksikliğinden ve mitofajinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Desidualizasyon mekanizması hücresel farklılaşmaya dayandığından, hücre içerisindeki birçok protein ve organelin dinamik değişimi ve otofajik yıkımı normal bir süreç olarak kabul edilmektedir [121,122]. Bu tez çalışmasında, ESH ve DH'lerde mitokondrinin geçirdiği füzyon, fisyon ve mitofaji mekanizmaları birlikte değerlendirildiğinde; genel olarak, DH'lerde ESH'lere göre mitokondrinin kalite kontrolünde önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da, desidualizasyon ile Atg9A aracılı mitofajinin arttığı ve mitokondri uzunluğunda azalma olduğu gösterilmiştir; bu sayede desidual farklılaşma ile hücredeki mitokondride belirli değişimlerin olduğu öngörülebilmektedir [107,116]. Çalışmamızda, desidualizasyon ile hücredeki mitokondriyonun sürekli bir füzyon, fisyon ve mitofajiye uğradığı ve gebelik sürecindeki DH'lerde mitokondrinin oldukça dinamik olduğu söylenebilir.

ESH ve DH'lerde mt füzyon, fisyon ve mitofajinin mitokondri morfolojisine olan etkisinin incelenmesi için elektron mikroskobik bulgular değerlendirilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, desidualizasyonun in vitro indüklenmesi sonucunda farklılaşan desidual-ESH'lerdeki mitokondri uzunluğunun ve çapının, proliferatif fazdaki ESH'lere göre azaldığı bildirilmiştir [107]. Bu tez çalışmasında ise ultrastrüktürel olarak mitokondri uzunluğu ve

dallanma oranı değerlendirildiğinde, DH'lerde, mitokondri uzunluğu ve dallanma oranının GP-ESH'lere göre önemli seviyede azaldığı gösterilmiştir. Bunun sebebi, GP-ESH'lerde sadece mt füzyonun artmasına rağmen, DH'lerde hem mt füzyon hem de mt fisyon ve mitofajinin artması olarak söylenebilir. Mitokondri sayısı değerlendirildiğinde ise, EP grubundaki ESH'lerde diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ve desidualizasyon ile birlikte azaldığı gösterilmiştir. EP grubunda ultrastrüktürel olarak görülen mitokondri sayısındaki artışın sebebi olarak, in vivo olarak belirlenen Drp1/MFF aracılı mt fisyonun artmasına ek olarak mt füzyonun ve mitofajinin diğer gruplara göre daha az olması düşünülebilir. Diğer yandan, EP ile karşılaştırıldığında, DH'lerde mitokondri sayısının az olmasının sebebi mt fisyona ek olarak mt füsyon ve mitofajinin de artan seviyelerde görülmesi olabilir. Özetle, IHC bulgularında DH'lerde mt füzyon, fisyon ve mitofajinin arttığı görülmesine rağmen, ultrastrüktürel bulgularda DH'lerdeki mitokondri sayısının, uzunluğunun ve dallanma oranının azaldığı gözlenmiştir. Bunun nedeni; in vivo bulgularımızda gözlenen, DH'lerdeki mt fisyon ve mitofaji proteinlerinin, mt füzyon proteinlerine oranla daha yoğun ekspresyon göstermesi ve bu hücrelerde mt fisyon ile mitofajinin daha baskın olması olabilir. Sonuç olarak; DH'lerdeki mitokondri oldukça dinamiktir; mt füzyon, fisyon ve mitofaji arasındaki değişimde denge, mt fisyon ve mitofaji yönünde daha baskın olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez projesinde, ESH'nin geçirdiği proliferasyon ve desidualizasyon süreçlerinde mt dinamik ve mitofajinin fizyolojik rolü araştırılmıştır. Çalışmamızda sağlıklı bir desidual farklılaşma için gerekli olabilecek mt mekanizma ve bu mekanizmaya doğrudan veya dolaylı olarak etki edebilecek steroid hormonu belirlenmiştir. Buna karşın, belirlenen bu etkenlerin eksikliği veya yokluğunda desidualizasyonda görülebilecek olası değişimlerin incelenmemiş olması çalışmamızın bir eksikliği olarak kabul edilebilir. Mt füzyon, fisyon ve mitofajinin desidualizasyon ile ilişkisinin ve P4'ün Drp1 aracılı mt fisyon üzerinden desidualizasyona etkisinin netleştirilmesi için ileri çalışmalar planlanmaktadır. Bu sayede tekrarlanan implantasyon hataları ve istenmeyen düşük gibi hatalı desidualizasyondan kaynaklanabilen hastalıkların altında yatan mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlanabilir. Çalışmamızın bir sonraki basamağında; desidualizasyonda P4 hormonuna bağımlı etki gösteren Drp1 proteinine odaklanılması ve E2 ile P4 hormon reseptörlerinin yokluğunda mt dinamikteki değişimlerin araştırılması planlanmaktadır. Tez projemizde belirlenen proteinler ile araştırmamızın bir sonraki basamağında gebelik ile ilgili patolojilerde değişen mt genler ve yolaklar belirlenecek, desidualizasyon defektinden kaynaklanan hastalıkların altında yatan mekanizmalar ve potansiyel terapötik hedefler için yeni bakış açılarının kazanılması sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: Of mice and men. Semin Reprod Med 2010. doi:10.1055/s-0029-1242989.

[2] Carrascosa JP, Horcajadas JA, Moreno-Moya JM. The molecular signature of the endometrial receptivity: research and clinical application. Reprod -Omics Revolut Its Impact Hum Reprod Med 2018:279–301. doi:10.1016/B978-0-12-812571-7.00016-2.

[3] McLennan CE, Rydell AH. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. Obstet Gynecol 1965;26:605–21.

[4] Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. Hum Reprod Update 2019;25:114–33. doi:10.1093/humupd/dmy035.

[5] Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, et al. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometriyum disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. PLoS One 2010;5:e10287. doi:10.1371/journal.pone.0010287.

[6] Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. Mol Hum Reprod 2010;16:886–95. doi:10.1093/molehr/gaq079.

[7] Camden AJ, Szwarc MM, Chadchan SB, DeMayo FJ, O'malley BW, Lydon JP, et al. Growth regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB1) is a novel progesterone-responsive gene required for human endometrial stromal decidualization. MHR Basic Sci Reprod Med 2017;23:646–53.

[8] Jin G, Xu C, Zhang X, Long J, Rezaeian AH, Liu C, et al. Atad3a suppresses Pink1-dependent mitophagy to maintain homeostasis of hematopoietic progenitor cells. Nat Immunol 2018;19:29–40. doi:10.1038/s41590-017-0002-1.

[9] Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH, et al. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of

mitochondria during apoptosis. Nat Cell Biol 2007;9:1057–65. doi:10.1038/ncb1630.

[10] Wallace DC, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. Mitochondrion 2010;10:12–31. doi:10.1016/j.mito.2009.09.006.

[11] Abbade J, Klemetti MM, Farrell A, Ermini L, Gillmore T, Sallais J, et al. Increased placental mitochondrial fusion in gestational diabetes mellitus: an adaptive mechanism to optimize feto-placental metabolic homeostasis? BMJ Open Diabetes Res Care 2020;8:e000923. doi:10.1136/BMJDRC-2019-000923.

[12] Scott I, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion. Essays Biochem 2010;47:85–98. doi:10.1042/BSE0470085.

[13] Youle RJ, Van Der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science 2012;337:1062–5. doi:10.1126/SCIENCE.1219855.

[14] Pickles S, Vigie P, Youle RJ. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. Curr Biol 2018;28:R170–85. doi:10.1016/j.cub.2018.01.004.

[15] Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Rejuvenation Res 2005;8:3–5. doi:10.1089/rej.2005.8.3.

[16] Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. Physiol Rev 2009;89:799–845. doi:10.1152/physrev.00030.2008.

[17] Picard M, Wallace DC, Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. Mitochondrion 2016;30:105–16. doi:10.1016/J.MITO.2016.07.003.

[18] Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. Int J Mol Sci 2018;19:1–19. doi:10.3390/ijms19020564.

[19] Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J. The over-expression of ERbeta modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line. Int J Biochem Cell Biol 2013;45:1509–15. doi:10.1016/J.BIOCEL.2013.04.007.

[20] Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti

M, et al. Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. J Endocrinol 2014;221:391–403. doi:10.1530/JOE-14-0008.

[21] Lynch S, Boyett JE, Smith MR, Giordano-Mooga S. Sex hormone regulation of proteins modulating mitochondrial metabolism, dynamics and inter-organellar cross talk in cardiovascular disease. Front Cell Dev Biol 2021;8:610516. doi:10.3389/FCELL.2020.610516.

[22] Park J-E, Lee SG, Yoo YH, Kim J-M. Drp1 Expression and phosphorylation in steroidogenic corpus luteum during the estrous cycle in rat ovaries. Dev Reprod 2022;26:71–7. doi:10.12717/DR.2022.26.2.71.

[23] Hatch AL, Gurel PS, Higgs HN. Novel roles for actin in mitochondrial fission. J Cell Sci 2014;127:4549–60. doi:10.1242/JCS.153791.

[24] Duarte A, Poderoso C, Cooke M, Soria G, Cornejo Maciel F, Gottifredi V, et al. Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. PLoS One 2012;7. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0045829.

[25] Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. Trends Endocrinol Metab 2016;27:105–17. doi:10.1016/j.tem.2015.12.001.

[26] Jin J yu, Wei X xiang, Zhi X ling, Wang X hong, Meng D. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease. Acta Pharmacol Sin 2021;42:655–64. doi:10.1038/S41401-020-00518-Y.

[27] Bertholet AM, Delerue T, Millet AM, Moulis MF, David C, Daloyau M, et al. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. Neurobiol Dis 2016;90:3–19. doi:10.1016/J.NBD.2015.10.011.

[28] Wang Y, Lu M, Xiong L, Fan J, Zhou Y, Li H, et al. Drp1-mediated mitochondrial fission promotes renal fibroblast activation and fibrogenesis. Cell Death Dis 2020;11. doi:10.1038/S41419-019-2218-5.

[29] Zhang K, Guo MY, Li QG, Wang XH, Wan YY, Yang ZJ, et al. Drp1-dependent mitochondrial fission mediates corneal injury induced by alkali burn. Free Radic Biol Med 2021;176:149–61. doi:10.1016/J.freeradbıomed.2021.09.019.

[30] Zhao Q, Ye M, Yang W, Wang M, Li M, Gu C, et al. Effect of Mst1 on endometriosis apoptosis and migration: role of Drp1-related mitochondrial fission and Parkin-required mitophagy. Cell Physiol Biochem 2018;45:1172–90. doi:10.1159/000487450.

[31] Wang H, Zhao X, Ni C, Dai Y, Guo Y. Zearalenone regulates endometrial stromal cell apoptosis and migration via the promotion of mitochondrial fission by activation of the JNK/Drp1 pathway. Mol Med Rep 2018;17:7797–806. doi:10.3892/mmr.2018.8823.

[32] Cormio A, Musicco C, Gasparre G, Cormio G, Pesce V, Sardanelli AM, et al. Increase in proteins involved in mitochondrial fission, mitophagy, proteolysis and antioxidant response in type I endometrial cancer as an adaptive response to respiratory complex I deficiency. Biochem Biophys Res Commun 2017;491:85–90. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.047.

[33] Eiyama A, Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. Curr Opin Cell Biol 2015;33:95–101. doi:10.1016/J.CEB.2015.01.002.

[34] Poole LP, Macleod KF. Mitophagy in tumorigenesis and metastasis. Cell Mol Life Sci 2021;78:3817–51. doi:10.1007/S00018-021-03774-1.

[35] Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. Pink1/Parkin signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. Acta Neuropathol Commun 2020;8:189. doi:10.1186/S40478-020-01062-W.

[36] Jiang Y, Shen M, Chen Y, Wei Y, Tao J, Liu H. Melatonin represses mitophagy to protect mouse granulosa cells from oxidative damage. Biomolecules 2021;11. doi:10.3390/BIOM11070968.

[37] Yi S, Zheng B, Zhu Y, Cai Y, Sun H, Zhou J. Melatonin ameliorates excessive Pink1/Parkin-mediated mitophagy by enhancing SIRT1 expression in granulosa cells of PCOS. Am J Physiol Endocrinol Metab 2020;319:E91–101. doi:10.1152/AJPENDO.00006.2020.

[38] Roy A, Matzuk MM. Reproductive tract function and dysfunction in women. Nat Rev Endocrinol 2011 79 2011;7:517–25. doi:10.1038/nrendo.2011.79.

[39] Gasner A, A AP. Physiology, Uterus. StatPearls, StatPearls Publishing; 2022.

[40] Jain V, Chodankar RR, Maybin JA, Critchley HOD. Uterine bleeding: how understanding endometrial physiology underpins menstrual health. Nat Rev Endocrinol 2022 185 2022;18:290–308. doi:10.1038/s41574-021-00629-4.

[41] Ross M, Pawlina W. Histology: A text and atlas. 7th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins.; 2016.

[42] The uterus | Anatomy of the uterus 2020. https://anatomy-medicine.com/endocrine-system/101-the-uterus.html (accessed November 21, 2022).

[43] Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Von Wolff M. The human endometriyum as a fertility-determining factor. Hum Reprod Update 2006;12:617–30.

[44] Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. Am J Obstet Gynecol 1975;122:262–3. doi:10.1016/S0002-9378(16)33500-1.

[45] Gartner L. Textbook of Histology. Philadelphia: Elsevier.; 2017.

[46] Dubowy RL, Feinberg RF, Keefe DL, Doncel GF, Williams SC, McSweet JC, et al. Improved endometrial assessment using cyclin E and p27. Fertil Steril 2003;80:146–56. doi:10.1016/S0015-0282(03)00573-9.

[47] Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A. In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. Biol Reprod 2004;71:714–21.

[48] Fabi F, Grenier K, Parent S, Adam P, Tardif L, Leblanc V, et al. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. PLoS One 2017;12:e0177387. doi:10.1371/journal.pone.0177387.

[49] Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. Nat Med 2012;18:1754–67. doi:10.1038/nm.3012.

[50] Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. Hum Reprod Updat 2018;25:114–33. doi:10.1093/humupd/dmy035.

[51] Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, et al. Physiological and molecular

determinants of embryo implantation. Mol Asp Med 2013;34:939–80. doi:10.1016/j.mam.2012.12.011.

[52] Lai Q, Zhang H, Zhu G, Li Y, Jin L, He L, et al. Comparison of the GnRH agonist and antagonist protocol on the same patients in assisted reproduction during controlled ovarian stimulation cycles. Int J Clin Exp Pathol 2013;6:1903–10.

[53] Zhu H, Hou CC, Luo LF, Hu YJ, Yang WX. Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions. Gene 2014;551:1–14. doi:10.1016/j.gene.2014.08.047.

[54] Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometriyum during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:4144–7. doi:10.1210/jcem.81.11.8923873.

[55] Christian M, W-F Lam E, SC Wilson M, J Brosens J. FOXO transcription factors and their role in disorders of the female reproductive tract. Curr Drug Targets 2011;12:1291–302.

[56] Slayden OD, Nayak NR, Burton KA, Chwalisz K, Cameron ST, Critchley HO, et al. Progesterone antagonists increase androgen receptor expression in the rhesus macaque and human endometriyum. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2668–79. doi:10.1210/jcem.86.6.7606.

[57] Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature 1977;265:69.

[58] Critchley HO, Saunders PT. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometriyum. Reprod Sci 2009;16:191–9. doi:10.1177/1933719108331121.

[59] Kolkova Z, Noskova V, Ehinger A, Hansson S, Casslen B. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER, GPR 30) in normal human endometriyum and early pregnancy decidua. Mol Hum Reprod 2010;16:743–51. doi:10.1093/molehr/gaq043.

[60] Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD. Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. J Cell Biochem 2004;93:358–73.

doi:10.1002/jcb.20178.

[61] Ronda AC, Boland RL. Intracellular distribution and ınvolvement of GPR30 in the actions of E2 on C2C12 cells. J Cell Biochem 2016;117:793–805. doi:10.1002/jcb.25369.

[62] Liao XG, Li YL, Gao RF, Geng YQ, Chen XM, Liu XQ, et al. Folate deficiency decreases apoptosis of endometriyum decidual cells in pregnant mice via the mitochondrial pathway. Nutrients 2015;7:1916–32. doi:10.3390/nu7031916.

[63] Fan DX, Yang XH, Li YN, Guo L. 17beta-estradiol on the expression of g-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) mitophagy, and the PI3K/Akt signaling pathway in ATDC5 chondrocytes in vitro. Med Sci Monit 2018;24:1936–47.

[64] Shimizu T, Krebs S, Bauersachs S, Blum H, Wolf E, Miyamoto A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometriyum. Physiol Genomics 2010;42A:290–300. doi:10.1152/physiolgenomics.00107.2010.

[65] Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. EMBO J 1990;9:1603–14.

[66] Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometriyum during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:2963–71. doi:10.1210/jcem.84.8.5928.

[67] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. Nat Rev Genet 2006;7:185–99. doi:10.1038/nrg1808.

[68] Lonard DM, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. Nat Rev Endocrinol 2012;8:598–604. doi:10.1038/nrendo.2012.100.

[69] Benda C. Ueber die spermatogenese der vertebraten und höherer evertebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. Arch Für Physiol 1898:393–8.

[70] Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, et al. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. Nucleic Acids Res 1998;26:865–878.

[71] Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. BMC Biol 2015;13:1–11. doi:10.1186/S12915-015-0201-X/FIGURES/9.

[72] Fawcett DW. The cell, its organelles and inclusions. An Atlas Fine Struct. Second ed, W. B. Saunders Co.; 2013.

[73] Lewis MR, Lewis WH. Mitochondria in tissue culture. Science (80-) 1914;39:330–3. doi:10.1126/SCIENCE.39.1000.330/ASSET/45DBD878-143E-4DAF-9C77-84A29FBB99DA/ASSETS/SCIENCE.39.1000.330.FP.PNG.

[74] Seo AY, Joseph A-M, Dutta D, Hwang JCY, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. J Cell Sci 2010;123:2533–42.

[75] Vangrieken P, Al-Nasiry S, Bast A, Leermakers PA, Tulen CBM, Schiffers PMH, et al. Placental mitochondrial abnormalities in preeclampsia. Reprod Sci 2021;28:2186–99. doi:10.1007/S43032-021-00464-Y.

[76] Huang JY, Yu PH, Li YC, Kuo PL. NLRP7 contributes to in vitro decidualization of endometrial stromal cells. Reprod Biol Endocrinol 2017;15:1–10. doi:10.1186/s12958-017-0286-x.

[77] Lockwood CJ, Kayisli UA, Stocco C, Murk W, Vatandaslar E, Buchwalder LF, et al. Abruption-induced preterm delivery is associated with thrombin-mediated functional progesterone withdrawal in decidual cells. Am J Pathol 2012;181:2138–48.

[78] Schatz F, Kayisli UA, Vatandaslar E, Ocak N, Guller S, Abrahams VM, et al. Toll-like receptor 4 expression in decidual cells and interstitial trophoblasts across human pregnancy. Am J Reprod Immunol 2012;68:146–53. doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01148.x.

[79] Sezer Z, Ekiz Yilmaz T, Gungor ZB, Kalay F, Guzel E. Effects of vitamin E on nicotine-induced lipid peroxidation in rat granulosa cells: Folliculogenesis. Reprod Biol 2020;20.

doi:10.1016/j.repbio.2019.12.004.

[80] Guzel E, Basar M, Ocak N, Arici A, Kayisli UA. Bidirectional ınteraction between unfolded-protein-response key protein HSPA5 and estrogen signaling in human endometriyum. Biol Reprod 2011;85:121–7. doi:10.1095/biolreprod.110.089532.

[81] Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative determination of protein expression using ımmunohistochemistry staining and analysis: An integrated protocol. BIO-PROTOCOL 2019;9:e3465. doi:0.21769/BioProtoc.3465.

[82] Yen CF, Kim SH, Liao SK, Atabekoglu C, Uckac S, Arici A, et al. Increased expression of integrin-linked kinase during decidualization regulates the morphological transformation of endometrial stromal cells. Fertil Steril 2017;107:803–12. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.11.025.

[83] Luddi A, Pavone V, Semplici B, Governini L, Criscuoli M, Paccagnini E, et al. Organoids of human endometriyum : a powerful ın vitro model for the endometriyum-embryo cross-talk at the ımplantation site. Cell 2020;9:1–16. doi:0.3390/cells9051121.

[84] Saleh L, Otti GR, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. Reprod Biol Endocrinol 2011. doi:10.1186/1477-7827-9-155.

[85] Farine T, Parsons M, Lye S, Shynlova O. Isolation of primary human decidual cells from the fetal membranes of term placentae. J Vis Exp 2018;2018:1–8. doi:10.3791/57443.

[86] Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, et al. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. Am J Pathol 2008;172:1571–9. doi:10.2353/ajpath.2008.070629.

[87] Jividen K, Movassagh MJ, Jazaeri A, Li H. Two methods for establishing primary human endometrial stromal cells from hysterectomy specimens. J Vis Exp 2014. doi:10.3791/51513.

[88] Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. Anim Reprod Sci 2011;124:229–36. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2010.08.030.

[89] Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. Endocrinology 1999;140:4809–20. doi:10.1210/ENDO.140.10.7070.

[90] Ferenczy A, Bertrand G, Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometriyum during the normal menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol 1979;133:859–67. doi:10.1016/0002-9378(79)90302-8.

[91] Kimmins S, Lim HC, Parent J, Fortier MA, MacLaren LA. The effects of estrogen and progesterone on prostaglandins and integrin beta 3 (β3) subunit expression in primary cultures of bovine endometrial cells. Domest Anim Endocrinol 2003;25:141–54. doi:10.1016/S0739-7240(03)00015-8.

[92] Yen CF, Kim SH, Liao SK, Atabekoglu C, Uckac S, Arici A, et al. Increased expression of integrin-linked kinase during decidualization regulates the morphological transformation of endometrial stromal cells. Fertil Steril 2017;107:803–12. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.11.025.

[93] Lockwood CJ, Kayisli UA, Stocco C, Murk W, Vatandaslar E, Buchwalder LF, et al. Abruption-induced preterm delivery is associated with thrombin-mediated functional progesterone withdrawal in decidual cells. Am J Pathol 2012;181:2138–48. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.036.

[94] Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Semerci N, Basar M, Buchwalder LF, Buhimschi CS, et al. Mechanisms of chorioamnionitis-associated preterm birth: Interleukin-1β inhibits progesterone receptor expression in decidual cells. J Pathol 2015;237:423–34. doi:10.1002/path.4589.

[95] Funghi L, Damiani F, Yen CF, Lee CL, Lombardi A, Schatz F, et al. Expression and regulation of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in first trimester human decidua cells: Implication in preeclampsia. Mol Cell Endocrinol 2016;437:163–70. doi:10.1016/j.mce.2016.08.023.

[96] Surrey ES, Halme J. Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro. Fertil Steril 1992;58:273–8. doi:10.1016/s0015-0282(16)55199-1.

[97] Sezer Z, Ekiz Yilmaz T, Gungor ZB, Kalay F, Guzel E. Effects of vitamin E on nicotine-induced lipid peroxidation in rat granulosa cells: Folliculogenesis. Reprod Biol 2020;20:63–74. doi:10.1016/J.REPBIO.2019.12.004.

[98] Yen CF, Liao SK, Huang SJ, Tabak S, Arcuri F, Lee CL, et al. Decreased Endometrial Expression of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Disrupts the STAT3 Signaling in Adenomyosis during the Implantation Window. Reprod Sci 2017. doi:10.1177/1933719116681515.

[99] Marron K, Harrity C. Endometrial lymphocyte concentrations in adverse reproductive outcome populations. J Assist Reprod Genet 2019;36:837–46. doi:10.1007/s10815-019-01427-8.

[100] Feyaerts D, Benner M, Van Cranenbroek B, Van Der Heijden OWH, Joosten I, Van Der Molen RG. Human uterine lymphocytes acquire a more experienced and tolerogenic phenotype during pregnancy. Sci Rep 2017;7:1–10. doi:10.1038/s41598-017-03191-0.

[101] Ellis GI, Zhi L, Akundi2 R, Büeler2 H, Marti1 F. Mitochondrial and cytosolic roles of PINK1 shape induced regulatory T cell development and function. Physiol Behav 2018;43:3355–3360. doi:10.1002/eji.201343571.

[102] Bradshaw A V., Campbell P, Schapira AHV, Morris HR, Taanman JW. The PINK1-Parkin mitophagy signalling pathway is not functional in peripheral blood mononuclear cells. PLoS One 2021;16:1–18. doi:10.1371/journal.pone.0259903.

[103] An X, Liu X, Zhang L, Liu J, Zhao X, Chen K, et al. MiR-449a regulates caprine endometrial stromal cell apoptosis and endometrial receptivity. Sci Rep 2017;7:12248. doi:10.1038/s41598-017-12451-y.

[104] Bledsoe MJ, Grizzle WE. Use of human specimens in research: the evolving United States regulatory, policy, and scientific landscape. Diagn Histopathol (Oxf) 2013;19:322–30. doi:10.1016/J.MPDHP.2013.06.015.

[105] Al Diffalha S, Sexton KC, Watson PH, Grizzle WE. The importance of human tissue bioresources in advancing biomedical research. Biopreserv Biobank 2019;17:209–12. doi:10.1089/BIO.2019.0039.

[106] Al-Sabbagh M, Fusi L, Higham J, Lee Y, Lei K, Hanyaloglu AC, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediate decidualization of human endometrial stromal cells in response to cyclic AMP signaling. Endocrinology 2011;152:730–40. doi:10.1210/EN.2010-0899.

[107] Ryu MJ, Seo BJ, Choi YJ, Han MJ, Choi Y, Chung MK, et al. Mitochondrial and metabolic dynamics of endometrial stromal cells during the endometrial cycle. Https://HomeLiebertpubCom/Scd 2020;29:1407–15. doi:10.1089/SCD.2020.0130.

[108] Basha EH, Eltokhy AKB, Eltantawy AF, Heabah NAE, Elshwaikh SL, El-Harty YM. Linking mitochondrial dynamics and fertility: promoting fertility by phoenixin through modulation of ovarian expression of GnRH receptor and mitochondrial dynamics proteins DRP-1 and Mfn-2. Pflugers Arch 2022;474:1107–19. doi:10.1007/S00424-022-02739-Y.

[109] Beikoghli Kalkhoran S, Kararigas G. Oestrogenic regulation of mitochondrial dynamics. Int J Mol Sci 2022;23:1118. doi:10.3390/IJMS23031118.

[110] Oo PS, Yamaguchi Y, Sawaguchi A, Kyaw MTH, Choijookhuu N, Ali MN, et al. Estrogen regulates mitochondrial morphology through phosphorylation of dynamin-related protein 1 in MCF7 human breast cancer cells. Acta Histochem Cytochem 2018;51:21–31. doi:10.1267/AHC.17034.

[111] Namjoo Z, Moradi F, Aryanpour R, Piryaei A, Joghataei MT, Abbasi Y, et al. Combined effects of rat Schwann cells and 17β-estradiol in a spinal cord injury model. Metab Brain Dis 2018;33:1229–42. doi:10.1007/S11011-018-0220-8.

[112] Castracani CC, Longhitano L, Distefano A, Anfuso D, Kalampoka S, La Spina E, et al. Role of 17 β-Estradiol on cell proliferation and mitochondrial fitness in glioblastoma cells. J Oncol 2020;2020:9. doi:10.1155/2020/2314693.

[113] Saleh L, Otti GR, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. Reprod Biol Endocrinol 2011;9:155. doi:10.1186/1477-7827-9-155.

[114] Hou Y, Zhao W, Yu H, Zhang F, Zhang HT, Zhou Y. Biochanin A alleviates cognitive impairment and hippocampal mitochondrial damage in ovariectomized APP/PS1 mice. Phytomedicine 2022;100. doi:10.1016/J.PHYMED.2022.154056.

[115] Feng Y, Madungwe NB, da Cruz Junho CV, Bopassa JC. Activation of G protein-coupled oestrogen receptor 1 at the onset of reperfusion protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial dysfunction and mitophagy. Br J Pharmacol 2017;174:4329–44. doi:10.1111/BPH.14033.

[116] Li J, Zhang S, Zhang Y, Dai Y, Zhang Y, Yang A, et al. Atg9A-mediated mitophagy is required for decidual differentiation of endometrial stromal cells. Reprod Biol 2022;22:100707. doi:10.1016/j.repbio.2022.100707.

[117] Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. Proc Natl Acad Sci U S A 2017;114:E8468–77. doi:10.1073/PNAS.1706546114.

[118] Marín R, Chiarello DI, Abad C, Rojas D, Toledo F, Sobrevia L. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in early-onset and late-onset preeclampsia. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2020;1866. doi:10.1016/J.BBADIS.2020.165961.

[119] Zhou X, Zhao X, Zhou W, Qi H, Zhang H, Han T li, et al. Impaired placental mitophagy and oxidative stress are associated with dysregulated BNIP3 in preeclampsia. Sci Rep 2021;11. doi:10.1038/S41598-021-99837-1.

[120] Ma X, Gao F, Rusie A, Hemingway J, Ostmann AB, Sroga JM, et al. Decidual cell polyploidization necessitates mitochondrial activity. PLoS One 2011;6. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0026774.

[121] Citrinovitz ACM, Strowitzki T, Germeyer A. Decreased autophagy ımpairs decidualization of human endometrial stromal cells: A role for ATG proteins in endometrial physiology. Int J Mol Sci 2019, Vol 20, Page 3066 2019;20:3066. doi:10.3390/IJMS20123066.

[122] Oestreich AK, Chadchan SB, Popli P, Medvedeva A, Rowen MN, Stephens CS, et al.

The autophagy gene Atg16L1 is necessary for endometrial decidualization. Endocrinology 2020;161. doi:10.1210/ENDOCR/BQZ039.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİTOKONDRİYAL BİYOGENEZ VE MİTOFAJİNİN ENDOMETRİYAL SİKLUS ve DESİDUALİZASYONDAKİ ROLÜ

ORİJİNALLİK RAPORU

%5	%4	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
2	9lib.net İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
4	YILDIZ, Ali, GÜR, Mustafa, YILMAZ, Remzi, DEMİRBAĞ, Recep, ÇELİK, Hakim, ASLAN, Mehmet and KOÇYİĞİT, Abdurrahim. "Lymphocyte DNA damage and total antioxidant status in patients with white-coat hypertension and sustained hypertension", Türk Kardiyoloji Derneği, 2008. Yayın	<%1
5	avesis.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.ibu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Zehra SEZER
(İmza)