

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

SİRKADİYEN SAAT GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN
FARE NORMAL PLASENTA VE SİRKADİYEN RİTMİ
BOZULAN PLASENTA GELİŞİMİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Nayçe İlayda BEKTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

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

SİRKADİYEN SAAT GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN
FARE NORMAL PLASENTA VE SİRKADİYEN RİTMİ
BOZULAN PLASENTA GELİŞİMİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Nayçe İlayda BEKTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-3960 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin ilk basamağı olan yüksek lisans eğitimim sürecince her konuda beni destekleyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

Çalışma sürecimde bana her konuda yardımcı olan, yol gösteren, bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan Doç. Dr. Güler Leyla SATI hocama,

Tezime yaptığı bilimsel katkısından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Gökhan ERTOSUN'a,

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

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

Tez sürecimde tüm kahrımı çeken, gece mesailerimde beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Mehmet Onur EKİNCİ'ye,

Doğduğum günden bugüne bana saygılı, yardımsever ve güçlü olmayı öğreten, torunu olmaktan gurur duyduğum, sonsuza kadar kalbimde yaşayacak olan biricik dedeme,

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hayallerimi öngörüp sonuna kadar arkasında duran canım annem Alev ÜÇER, babam Hüseyin Cumhur BEKTAŞ, kardeşlerim Havva Aleyna BEKTAŞ ve İlay Ada BEKTAŞ'a ve ailemin diğer tüm fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nayçe İlayda BEKTAŞ

ÖZET

Amaç: Sirkadiyen ritim; günlük biyolojik ritimdir ve 7 temel gen tarafından düzenlenir: *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2*. Plasenta, anne ile fetüs arasında iletişimi sağlar ve matür plasenta sirkadiyen saat genlerini ritmik olarak ekspres eder. Gebelikte sirkadiyen ritim bozulduğunda, fetüslerde uterus içi büyüme geriliği (UIBG) gözlenir. Plasenta gelişim sürecinde sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonunun ne zaman başladığı ve sirkadiyen ritim bozulduğunda, ekspresyonlarının değişip değişmediği bilinmemektedir. Çalışmanın amacı; normal aydınlık/karanlık döngüsündeki ve aydınlık/karanlık döngüsünün bozulduğu gebe farelerin plasentalarında, UIBG oluşumunu, plasenta kompartmanlarının histomorfolojisini, sirkadiyen saat genlerinin ritmik ekspresyonu olup olmadığını değerlendirmektedir.

Yöntem: Gebelikte; kontrol ve sirkadiyen ritmi bozulan gruplar oluşturulmuştur. Sirkadiyen ritmin bozulduğu lokomotor aktivite testleriyle gösterilmiştir. Zeitgeber (ZT) zaman verici/senkronizör anlamına gelir ve 24 saati ifade eder: ZT0-ZT12 arası aydınlık, ZT12-ZT24 arası karanlıktır. Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde kontrol ve sirkadiyen ritmi bozulan annelerden ZT zaman dilimlerine göre elde edilen plasenta dokularında; hematoksilin-eozin boyaması yapılmıştır. Aynı günlerde saat genlerinin, mRNA ekspresyonları gerçek zamanlı qRT-PZR tekniği ile belirlenmiştir.

Bulgular: Tüm gebelik günlerinde ritim bozukluğu oluşturulan grupta kontrol grubuna göre plasentaların küçük olduğu, histomorfolojik defektler olduğu ve fetüslerde UIBG olduğu gözlenmiştir. Fare plasentasında sirkadiyen genlerin ritmik ekspresyonlarının gelişimin 12. gününden itibaren başladığı ve aydınlık/karanlık döngüsünün değiştirilmesiyle de 12. günden itibaren bozulmaya başladığı bulunmuştur.

Sonuç Plasental gelişim sürecinde ışık döngüsünün bozulmasıyla ortaya çıkan plasenta defektlerinin ve fetüslerde oluşan UIBG'nin sirkadiyen genlerinin ritmik ekspresyonunun bozulmasıyla ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: fare plasentası, sirkadiyen ritim bozukluğu, sirkadiyen saat genleri, uterus içi büyüme geriliği

ABSTRACT

Objective: Circadian rhythm is the daily biological rhythm and regulated by 7 genes: *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* and *Cry2*. The placenta provides the communication between the mother and the fetus and rhythmically expresses the mature placental circadian clock genes. When these genes are disturbed during pregnancy, intrauterine growth retardation (IUGR) occurs. There is no information in literature about when the expression of the circadian clock genes starts in the placenta and whether the expression of these genes changes, when the rhythm is disrupted, in the placenta during pregnancy. The purpose of this study is to evaluate the IUGR formation, histomorphology of placental compartments and the rhythmic expression of circadian clock genes in pregnant mice groups, where their light cycle is normal and disturbed experimentally.

Method: During pregnancy normal and disturbed light cycle groups were planned. Evidence of disturbance of the circadian rhythm was showed by locomotor activity tests. Zeitgeber (ZT) means time provider or synchronizer and defines a 24 hour period. H-E staining was performed and mRNA expressions were determined by qRT-PCR at 12th, 14th and 16th days of pregnancy in the placentae of both groups.

Results: When placenta of control group and group created by disrupting the circadian rhythm were compared, placentae of group created by disruption circadian rhythm was small, they showed histo-morphological defects and IUGR was present on fetuses, in all pregnancy days. It is found that the mouse placenta initiate the rhythmicity of circadian gene expressions from 12th day of embryonic development, and changing the light/dark patterns disrupts the rhythmicity starting from the 12th day of pregnancy.

Conclusion: We think that during placental development, the placental defects and the fetal IUGR occurrence might be caused by the disruption of the rhythmic expressions of the circadian genes.

Key words: mouse placenta, circadian rhythm disruption, circadian clock genes, intrauterine growth retardation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sirkadiyen Ritim	3
2.2. Memelilerde Sirkadiyen Saatin Moleküler Yapısı	4
2.3. Sirkadiyen Ritim ve Üreme Sistemi Arasındaki İlişki	6
2.4. Farelerde Fetal Gelişim	8
2.5. Fetal Sirkadiyen Ritmin Gelişimi	9
2.6. Plasenta	11
2.7. Fare Plasentası	11
2.7.1. Fare Plasentasının Gelişimi	11
2.7.2. Farelerde Olgun Plasenta Yapısı	14
2.8. Sirkadiyen Ritim ve Plasenta Arasındaki İlişki	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Grupların Oluşturulması	18
3.1.1. Kontrol Grubu	21

3.1.2. Sirkadiyen Ritmi Bozulan Grup	22
3.2. Lokomotor Aktivite Testleri	23
3.2.1. Açık Alan (Open Field) Testi	24
3.3. Doku Temini ve Hazırlanması	24
3.4. Hematoksilen-Eozin Boyaması ve Histopatolojik Değerlendirmeler.	24
3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)	25
3.5.1. Total RNA Eldesi	26
3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi	27
3.5.3. qRT-PZR Protokolü	28
3.5.4. Örneklerin Agaroze Jelde Yürütülmesi	30
3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	31
4. BULGULAR	33
4.1. Fetüs ve Plasentaların Makroskopik ve Ağırlık Değerlendirmeleri.	33
4.2. Placenta Ağırlıkları	35
4.3. Fetüs Ağırlıkları	36
4.4. Fetüs/Placenta Ağırlık Oranlarının Değerlendirilmesi	37
4.5. Fetüs Sayısının Değerlendirilmesi	38
4.6. Lokomotor Aktivite Değerlendirmeleri	39
4.7. Kontrol Grubunda ve SRB Grubunda Placenta Kompartmanlarının Değerlendirilmesi	41
4.7.1. Gelişimin 12. Gününe Ait Bulgular	41
4.7.2. Gelişimin 14. Gününe Ait Bulgular	46
4.7.3. Gelişimin 16. Gününe Ait Bulgular	51

4.8. qRT-PZR Bulguları	56
4.8.1. Gebeliğin Farklı Günlerinde Sirkadiyen Saat Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyeleri	56
4.8.2. Gebelik Günlerinde Sirkadiyen Gen mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Günlük Ritmikliği	60
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği	27
Tablo 3.2.	qRT-PZR deneylerinde kullanılan karışımın içeriği	28
Tablo 3.3.	qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri	29
Tablo 3.4.	qRT-PZR deneylerinde kullanılan primerlerin yapısı	30
Tablo 3.5.	%1,5' luk agaroz jelin hazırlanışı	31
Tablo 4.1.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde plasenta ağırlıkları	35
Tablo 4.2.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs ağırlıkları	36
Tablo 4.3.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde feyüs/plasenta ağırlık oranları	37
Tablo 4.4.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs sayıları	38
Tablo 4.5.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 12. günde plasenta alan ve boyut ölçümleri	44
Tablo 4.6.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 14. günde plasenta alan ve boyut ölçümleri	49
Tablo 4.7.	Kontrol grubu ve SRB grubunda 16. günde plasenta alan ve boyut ölçümleri	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Memeli hücresinde saat genlerinden olan Bmal1, Clock, Per, Cry, ROR ve REV-ERB'in moleküler geri bildirim döngüsü	5
Şekil 2.2.	Npas2 transkripsiyon faktörü, Clock yokluğunda Clock'ın görevini yerine getirmektedir	6
Şekil 2.3.	İnsan ve fare gebelik süreçlerinin karşılaştırılması	9
Şekil 2.4.	Fetal sirkadiyen sürecin maternal sirkadiyen sistem tarafından düzenlenmesi	10
Şekil 2.5.	Fare plasentasının embriyonik dönemden başlayarak fetal dönemdeki gelişimi	12
Şekil 2.6.	Fare plasentasının E8., E8,5., E9,5. ve E10,5. günlerdeki labrint tabakasının oluşum evreleri	12
Şekil 2.7.	Fare plasentasının labrint kompartmanındaki mononükleer. trofoblast (I) ve multinükleer sinsityotrofoblast hücrelerinin (II ve III) fetal kapillerler çevresindeki yerleşiminin şematize gösterimi	14
Şekil 2.8.	Olgun fare plasentasının 3 kompartmanı	15
Şekil 3.1.	Çalışmanın deney basamaklarını özetleyen şema.	18
Şekil 3.2.	Dişi farelerde gece boyu çiftleşme siklusu sonrası vajinal plak tespiti	19
Şekil 3.3.	Kontrol grubu ve sirkadiyen ritmi bozulan (SRB) grubun oluşturulma basamaklarını gösteren şekil	22

Şekil 4.1.	Kontrol grubu ve SRB gruplardan gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde elde edilen uteruslara ait görüntüler	33
Şekil 4.2.	Kontrol grubu ve SRB gruplardan gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde elde edilen fetüs ve plasentalara ait görüntüler	34
Şekil 4.3.	Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde; kontrol grupları ve SRB gruplara ait plasenta ağırlıkları	35
Şekil 4.4.	Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde; kontrol grupları ve SRB gruplara ait fetüs ağırlıkları	36
Şekil 4.5.	Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs/plasenta oranı	37
Şekil 4.6.	Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs sayıları	38
Şekil 4.7.	Kontrol grubu ve SRB gruplarda; gebelik öncesi ve gebeliğin 2. gününde 12, 14, 16 günlük deney gruplarına ait annelerden elde edilen lokomotor aktivite sonuçları	39
Şekil 4.8.	Kontrol grubu ve SRB gruplarda; gebeliğin 11., 13. ve 15. günlerinde elde edilen lokomotor aktivite sonuçları	40
Şekil 4.9.	Gebeliğin 12. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 4x büyütmede görüntülenmiş hematoksilin-eozin boyamaları	42
Şekil 4.10.	Gebeliğin 12. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 10x büyütmede görüntülenmiş hematoksilin-eozin boyamaları	43

- Şekil 4.11.** Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde toplam plasenta alanı, desidual tabaka boyutu, spongiyotrofoblast tabaka boyutu ve labrint tabaka boyutunun değerlendirilmesi 45
- Şekil 4.12.** Gebeliğin 14. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 4x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları 47
- Şekil 4.13.** Gebeliğin 14. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 10x ve 20x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları 48
- Şekil 4.14.** Kontrol ve SRB gruplarda 14. günde toplam plasenta alanı, desidual tabaka boyutu, spongiyotrofoblast tabaka boyutu ve labrint tabaka boyutunun değerlendirilmesi 50
- Şekil 4.15.** Gebeliğin 16. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 4x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları 52
- Şekil 4.16.** Gebeliğin 16. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 10x ve 20x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları 53
- Şekil 4.17.** Kontrol ve SRB gruplarda 16. günde toplam plasenta alanı, desidual tabaka boyutu, spongiyotrofoblast tabaka boyutu ve labrint tabaka boyutunun değerlendirilmesi 55
- Şekil 4.18.** Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde Bmal1, Clock, Npas2 ve Per1 mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi 58

- Şekil 4.19.** Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde Per2, Per3, Cry1 ve Cry2 mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi 60
- Şekil 4.20.** Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde Bmal1, Clock ve Npas2 mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi 64
- Şekil 4.21.** Kontrol ve SRB gruplarda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde Bmal1, Clock ve Npas2 genlerinin jel görüntüleri 65
- Şekil 4.22.** Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde Per1, Per2 ve Per3 mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi 68
- Şekil 4.23.** Kontrol ve SRB gruplarda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde Per1, Per2 ve Per3 genlerinin jel görüntüleri 69
- Şekil 4.24.** Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde Per1, Per2 ve Per3 mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi 71
- Şekil 4.25.** Kontrol ve SRB gruplarda gebeliğin 12., 14. ve 16. Günlerinde Cry1 ve Cry2 genlerinin jel görüntüleri 72

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMPK	: AMP bağımlı kinaz
ARNTL	: Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator-benzeri protein 1
AVP	: Arjinin vazopressin
Bmal1	: Beyin ve Kas ARNT-benzeri 1
CCG	: Saat kontrollü gen
CK1 ϵ/δ	: Kazein Kinaz ϵ/δ
Clock	: Sirkadiyen lokomotor çıktı döngüleri bozuk
Cry	: Kriptokrom
E-box	: Arttırıcı kutu
EEE	: Ekstra Embriyonik Ektoderm
EK	: Ektoplasental Kon
GnRH	: Gonadotropin-salgılatıcı hormon
Grp	: Gastrin salgılatan peptid
İHK	: İç Hücre Kitlesi
Npas2	: Nöronal PAS domain protein 2
Per	: Periyod
PKC	: Protein kinaz C
POA	: Preoptik bölge
ROR	: Retinoik asit ilişkili orphan reseptör
RRE	: ROR yanıt elementi
SR	: Sirkadiyen Ritim
SRB	: Sirkadiyen Ritim Bozukluğu
SKN	: Suprakiyazmatik Nükleus
TNP	: Tekli nükleotid polimorfizm

UİBG	: Uterus İçi Büyüme Geriliği
TE	: Trofoektoderm
VİP	: Vazoaktif intestinal peptid
ZT	: Zeitgeber Time



1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Sirkadiyen ritim, 24 saatlik periyotta vücutta ritmik olarak meydana gelen günlük biyolojik ritimdir. Sirkadiyen süreç; suprakiazmatik nükleus (SKN) tarafından düzenlenmektedir. Göze ulaşan ışık optik sinir olarak da adlandırılan retino-hipotalamik yol ile SKN'a bir bilgi olarak gelir ve SKN'da değerlendirilerek bir osilasyon süreci başlatır. Suprakiazmatik nükleusun başlattığı bu merkezi osilasyon hem beynin birçok merkezinin hem de periferal organların ışıkla düzenlenen ritmik sirkadiyen süreçten haberdar olmasını sağlar. Zeitgeber (ZT) zaman verici/senkronizör anlamına gelmektedir ve 1 günü ifade eder. Dolayısıyla; ZT0-ZT12 arası aydınlığı, ZT12-ZT24 arası da karanlığı ifade etmektedir. Memelilerde sirkadiyen ritmi düzenleyen biyolojik saat 7 gen içermektedir: Sirkadiyen lokomotor çıktı döngüleri bozuk (*Clock*), Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator-benzeri protein 1 (*ARNTL*) veya Beyin ve Kas ARNT-benzeri 1 (*Bmal1*), Periyod (*Per1*, *Per2*, *Per3*) ve Kriptokrom (*Cry1*, *Cry2*). *Clock* ve *Bmal1*, *Per* ve *Cry* birbirleriyle heterodimer oluşturarak hücre çekirdeğine gittiklerinde kendilerinin ve hedef genlerinin ekspresyonlarını düzenlerler. *Clock* geninin paraloğu olan Nöronal PAS domain protein 2 (*Npas2*) ise, *Clock* eksikliğinde görevini kompanse edebilmektedir. Sirkadiyen saat genlerinin birçok memeli türünde üreme sisteminin fonksiyonlarının düzenlenmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Güncel epidemiyolojik çalışmalar, vardiyalı çalışan kadınlarda, menstrual siklus düzensizlikleri görüldüğü ve bu kadınların gebelikleri sırasında vardiyalı çalışmaya devam etmelerinin, fetüslerinde uterus içi büyüme geriliği (UİBG) gibi problemlerle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, üreme sistemi ve sirkadiyen ritim bozukluğu arasındaki ilişki günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Plasenta gebelik boyunca; metabolik gaz değişimi, fetal atıkların uzaklaştırılması, gebelik süresince maternal fizyolojiyi değiştiren hormonların salgılanması ve maternal immün sisteme karşı bariyer görevi gibi işlevler gerçekleştiren önemli bir organdır. Farelerde gebelik süresi yaklaşık 19-20 gündür. Gebeliğin 5-6. günlerinde plasenta oluşumu başlamaktadır. Embriyonik 9. günden itibaren ilk plasental sirkülasyon başlar ve 9.-15. günler arasında plasenta gelişimi devam eder. 16. günde ise plasenta olgun halini

almaktadır. Farelerde olgun plasenta yapısı 3 kısımdan oluşur; labrint zon, spongiyotrofoblast (bağlantı) zonu ve desidua. Labrint zon fare plasentasının fetal kısmıdır. Labrint zon, trofoblast dev hücreler ve sinsisyal trofoblast hücrelerine farklılaşan kök hücrelerden oluşur. Spongiyotrofoblast zonu 3 farklı hücre tipinden oluşur; spongiyotrofoblast hücreleri, glikojenik hücreler ve dev trofoblast hücreleri. Bağlantı zonunun ana hücre bileşeni spongiyotrofoblastlardır. Fare plasentalarında spongiyotrofoblast hücreleri dev trofoblast hücrelerinin hemen altında yerleşiktir. Dev trofoblast hücreleri fare plasentasının önemli endokrin hücreleridir ve prolaktin ailesine ait hormon ve sitokinleri salgırlar. Desiduadaki hücreler ise gebelik için çeşitli hormonları, sitokinleri ve büyüme faktörlerini üretir. Literatürde sınırlı sayıdaki çalışmada, insan ve farelerin matür plasentalarında sirkadiyen saat genlerinin ritmik olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Kemirgenlerde gebelik sürecinde annenin ritmi aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek bozulduğunda, bu annelerin fetuslarında UİBG olduğu da literatürde bildirilmiştir.

Plasentanın, sirkadiyen ritmi düzenleyen saat genlerini normal gelişiminin hangi aşamasında ritmik olarak eksprese etmeye başladığı ve aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek sirkadiyen ritim bozulduğunda ise plasenta gelişim aşamalarında bu genlerin ekspresyonlarının değişip değişmediği bilinmemektedir. Tüm bunlardan yola çıkarak bu çalışmanın hipotezi; “fare plasenta gelişim sürecinde sirkadiyen saat genlerinin ritmik ekspresyonu erken dönemde başlar ve gebelikte annenin sirkadiyen ritminin bozulması farklı gelişim aşamalarındaki plasenta ve fetüsü etkiler” şeklinde kurulmuştur. Bu hipotezi test etmek için; (i) farelerde normal plasenta gelişim sürecinde (12. gün, 14. gün ve 16. gün) *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* ve *Npas2* genlerinin ekspresyonlarının ritmik olup olmadığının değerlendirilmesi ve (ii) aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek sirkadiyen ritmi bozulan annelere ait plasentaların farklı gelişim dönemlerinde (12. gün, 14. gün ve 16. gün) *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* ve *Npas2* genlerinin ekspresyonlarının gerçek zamanlı-kantitatif PZR ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyen Ritim

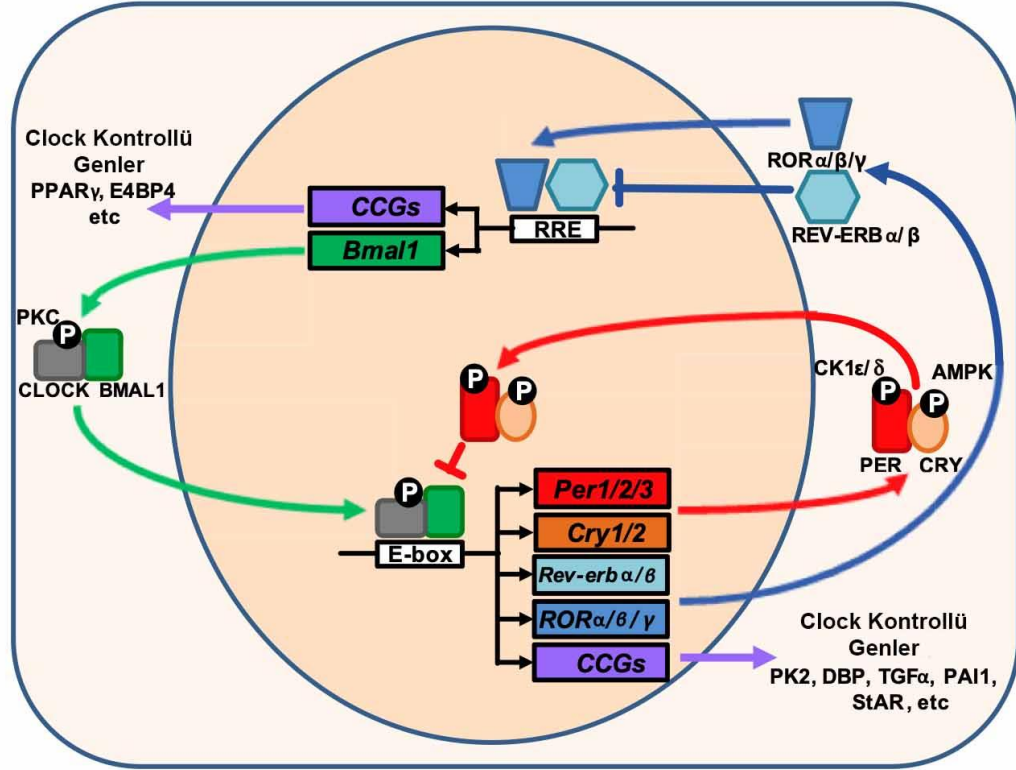
Sirkadiyen ritim; 24 saatlik periyotta vücutta ritmik olarak meydana gelen tüm fizyolojik, kimyasal ve moleküler olayları kapsayan günlük biyolojik ritimdir (Buttgereit ve ark., 2015). Sirkadiyen terimi, circa (yaklaşık) ve dies (gün) anlamına gelen iki Latince kelimenin birleşmesinden meydana gelmiş olup, yaklaşık 1 günü ifade etmek için kullanılır (Deutch, 1969). Bu içsel (intrensek) biyolojik saat, memelilerde hipotalamusta yer alan suprakiyazmatik nükleusa (SKN) yerleşmiş olan özel bir nöron topluluğu tarafından yönetilmektedir. Göze gelen ışık (fotik bilgi) optik sinir olarak da adlandırılan retino-hipotalamik yol boyunca uzanan aksonlar aracılığı ile SKN'a bir bilgi olarak gelir (Klein ve Moore, 1979). Bu fotik bilgi ilk olarak SKN'de değerlendirilerek bir osilasyon süreci başlatır. Suprakiyazmatik nükleusun başlattığı bu merkezi osilasyon hem beynin birçok merkezinin hem de periferal organların sirkadiyen süreçten haberdar olmasını sağlar. Santral sinir sisteminde nöronal ve kimyasal yollarla bu iletişim sağlanırken, periferal dokularda otonom sinir sistemi ve hormonal yollarla iletişim sağlanmaktadır (Buttgereit ve ark., 2015). Sirkadiyen süreçte SKN'un kontrolünde ritmik olarak salındığı bilinen en önemli hormon melatonindir. Işığın inhibisyonu (karanlık) ile SKN süperior servikal ganglionu uyarak pineal bezden melatonin üretimini başlatır (Klein ve Moore, 1979). Melatonin gece 02:00'de en üst seviyeye ulaşır ve bu durum hem diüurnal (gündüz aktif olan) hem de fare gibi noktürnal (gece aktif olan) canlılarda gece meydana gelmektedir (Casper ve Gladanac, 2014). Sirkadiyen düzenlenme sürecinde moleküler düzeyde; transkripsiyonel ve translasyonel olarak da hücresel bir osilasyon söz konusudur (Rosenwasser ve Turek, 2015). Hem SKN hem de periferal osilatörler, 24 saatteki farklı zaman dilimlerinde sirkadiyen ritimler sergilerler; bu nedenle aktivitelerini 24 saate kadar sürdürmek için çevresel uyaranlardan (zeitgebers; zaman verici veya senkronize edici) düzenli periyodik girdilere ihtiyaç duyarlar. Bu girişler arasında, 24 saat aydınlık-karanlık döngüsü SKN için ana zeitgeberdir (Roenneberg ve Merrow, 2016). Zeitgeber; Almanca bir kelime olup senkronizör/ zaman verici anlamına gelmektedir ve 24 saatlik 1 günü ifade eder. Kısaca ZT olarak gösterilir. Bir günde; ZT0-ZT12 arası aydınlığı, ZT12-ZT24 arası ise

karanlığı ifade etmektedir. Bu ZT zaman dilimleri türlerde farklılık göstermektedir. İnsan gibi diüurnal canlılarda ZT0-ZT12 arası aktif olan zaman iken fare gibi noktüurnal türlerde dinlenme/ rest zamanını ifade etmektedir.

2.2. Memelilerde Sirkadiyen Saatin Moleküler Yapısı

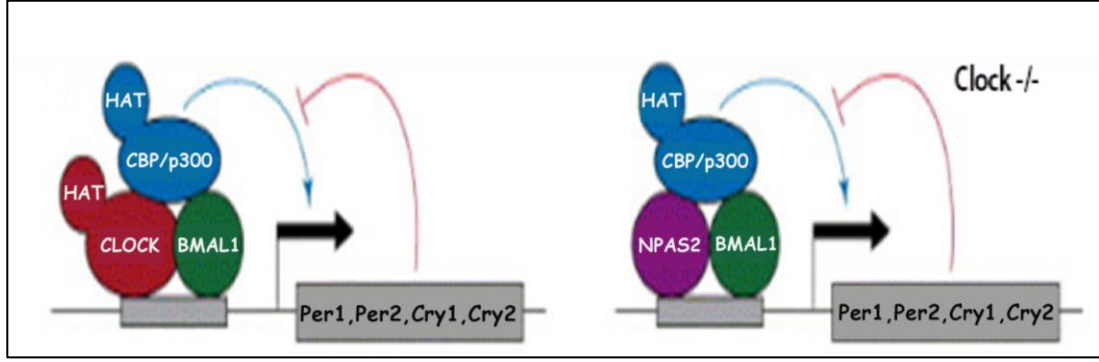
Memelilerde biyolojik saat moleküler seviyede 7 gen/protein içermektedir: Sirkadiyen lokomotor çıktı döngüleri bozuk (Clock), Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator-benzeri protein 1 (ARNTL) veya Beyin ve Kas ARNT-benzeri 1 (BMAL1) Bmal1, Periyod1, Periyod2, Periyod3 (Per1, Per2, Per3), Kriptokrom1, Kriptokrom2 (Cry1, Cry2). (Şekil 2.1). Bu moleküller hücresel saatte otoregülatör transkripsiyon-translasyon geri bildirim döngü mekanizmasına sahiptir ve pozitif-negatif yönde birbirlerinin transkripsiyonuna etki ederek transkripsiyonel bir döngü başlatırlar. *Bmal1* ve *Clock*, sitoplazmada heterodimer oluşturarak nükleusa göç ederler ve *Per* ve *Cry* genlerinin transkripsiyonunu sağlarlar. *Per* ve *Cry* proteinleri kompleks halinde hücre sitoplazmasında gece boyunca birikir, gün içinde ise hücrede degrade olur ve böylece 24 saatlik gece/gündüz döngüsünde, sirkadiyen ritimle, eş zamanlı şekilde ritmik dalgalanır. Gece boyunca sitoplazmada biriken *Per* ve *Cry*, kazein kinaz 1 ϵ/δ (CK1 ϵ/δ) ile kompleks oluşturarak nükleusa gidip kendi transkripsiyonel aktivasyonlarını da baskılamış olurlar. *Per* ve *Cry*'ın gün içinde degrade olmaları ise bu baskılanmayı ortadan kaldırır ve tekrar kendilerinin transkripsiyonel aktivasyon fazına geçmelerine neden olur (Aguilar-Arnal ve Sassone-Corsi, 2015; Buttgereit ve ark., 2015). *Clock-Bmal1* heterodimeri aynı zamanda retinoik asit ilişkili orphan reseptör (*ROR*) $\alpha/\beta/\gamma$ ile *REV-ERB* α/β genlerinin transkripsiyonunu indükler. Retinoik asit ilişkili orphan reseptör $\alpha/\beta/\gamma$, *Bmal1* ve saat kontrollü genlerin transkripsiyonunu sağlarken, *REV-ERB* α/β ise bu genlerin transkripsiyonunu inhibe etmektedir. *REV-ERB- α/β* ve *ROR- $\alpha/\beta/\gamma$* , *Bmal1* promotörü içindeki ROR Yanıt Element'lerine (RRE) bağlanmak için rekabet eder ve sırasıyla transkripsiyonu inhibe ettirir veya sürdürürler. Bu döngülerinin tamamlanması yaklaşık 24 saat sürer ve hücresel sirkadiyen ritmin oluşumunun temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla; geri bildirimin hızı ve ritmisite, bu döngüye katılan proteinlerin fosforilasyon durumu, stabilitesi ve nükleer lokalizasyonu ile kontrol edilir. Elde edilen ritmik bilgi, promotörlerinde E-kutusu veya RRE içeren saat kontrollü genlerin ritmik transkripsiyonu yoluyla genomun geri kalanına iletilir. Başta üst

regülatör SKN olmak üzere, SKN'dan bağımsız olarak periferel organlarda da sirkadiyen saat genleri ritmik bir şekilde eksprese edilmektedir (Zhang ve ark., 2014).



Şekil 2.1. Memeli hücresinde saat genlerinden olan Bmal1, Clock, Per, Cry, ROR ve REV-ERB'in moleküler geri bildirim döngüsü (Barnard ve Nolan, 2008; Boden ve ark., 2013'den düzenlenmiştir) (CK1 ϵ/δ , kazein kinaz ϵ/δ ; AMPK, AMP bağımlı kinaz; PKC, protein kinaz C; CCG, saat kontrollü gen; RRE, ROR yanıt elementi; E-box, enhancer/arttırıcı kutusu).

Bu 7 temel molekülün yanı sıra, *Clock* proteininin bir paraloğu olan (paralog: tek bir genomda gen ikilenmesi ile oluşmuş ve işlevleri farklılaşmış, benzer gen) Nöronal pas domain 2 (*Npas2*); *Clock*'ın yerine geçip Bmal1 ile heterodimer oluşturarak moleküler sirkadiyen saati kontrol edebilmektedir (Landgraf ve ark., 2016) (Şekil 2.2). Merkezi ve bazı periferel osilatörlerde (akciğer, karaciğer gibi) tanımlanmış olan *Npas2*- *Bmal1* heterodimer yapısının varlığı ve görevi diğer periferel organlarda henüz açıklanmamış önemli bir araştırma konusudur (Debruyne, 2008).



Şekil 2.2. Npas2 transkripsiyon faktörü, Clock yokluğunda Clock'ın görevini yerine getirmektedir (Asher ve Schibler, 2006'den düzenlenmiştir).

2.3. Sirkadiyen Ritim ve Üreme Sistemi Arasındaki İlişki

Sirkadiyen ritmin, vücuttaki çeşitli fizyolojik sistemlerin üzerinde düzenleyici etki göstermektedir. Son yıllarda, sirkadiyen ritmin bozulması, özellikle nokturnal dalgalanmanın olmaması, endotel disfonksiyona sebep olduğundan kardiyovasküler risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (Verdecchia ve ark., 1993). Bir dizi epidemiyolojik çalışma ile kararsız anjina, miyokard enfarktüsü, ani kardiyak ölümü veya inme gibi neredeyse tüm akut kardiyovasküler olayların sabahın erken saatlerinde görülmesi, sirkadiyen ritimle ilişkili olduklarını göstermektedir (Fabbian ve ark., 2017). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda; *Clock* mutant farelerde, sirkadiyen ritim bozukluğu ve vasküler disfonksiyon görülmektedir (Crnko ve ark., 2018). *Bmal1* geni silinmiş farelerde yapılan çalışmada, kan basıncının sirkadiyen ritminin ortadan kalktığı ve katekolaminlerin üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Curtis ve ark., 2007; Cheng ve ark., 2011). Sirkadiyen saatin diğer genlerinden olan *Per* geninin genetik kaybının, asetilkoline endotele bağımlı gevşeme yanıtını bozduğu gösterilmiştir (Viswambharan ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışmada, *Bmal1* ve *Per* izoformları olmayan farelerde, sirkadiyen saat disfonksiyonunun, hücre dışı matriks kompozisyonunun bozularak damarların sertleşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Anea ve ark., 2010). 2012 yılında yapılan bir çalışmada *eNOS* geni silinmiş fareler kontrol grubu fareler ile karşılaştırıldığında geç gestasyonel dönemde kardiyak çıktıların azaldığı, farelerde hipertansiyon görüldüğü ve gebeliğin 17. gününde plasenta ve fetus ağırlıklarının kontrole göre %10 daha hafif olduğu ve UİBG geliştiği bildirilmiştir (Kusinski ve ark., 2012).

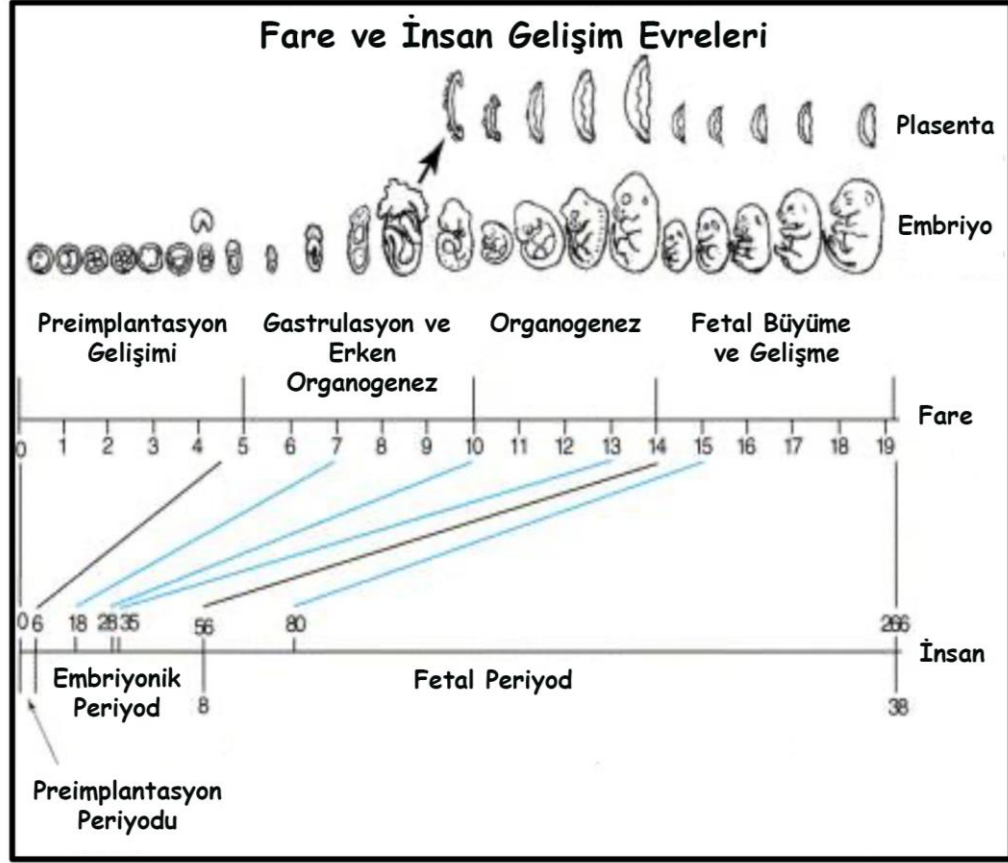
Sirkadiyen ritmin, bunlara ek olarak üreme sisteminde de rolü bulunmaktadır (Kennaway ve ark., 2012; Casper ve Gladanac, 2014). Merkezi bir biyolojik saat olan SKN, üreme sistemini düzenleyen preoptik bölge (POA), anteroventral periventriküler nükleus (AVPV) ve arkuat nükleus (ARC) gibi beyin bölgeleri ile nöronal bağlantı halindedir (Putteeraj ve ark., 2016). Bunların yanı sıra SKN'un ön hipofizdeki gonadotropin-salğılatıcı hormon (GnRH) nöronları ile iletişim halinde olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (van der Beek ve ark., 1993; Smith ve ark., 2000; Kriegsfeld ve ark., 2002). Gonadotropin-salğılatıcı hormon nöronları saat genlerini de eksprese etmektedir ve böylece bu intrensek osilatör özellikleri sayesinde pulsatil ve sirkadiyen olarak GnRH sekresyonu yapmaktadır (Putteeraj ve ark., 2016). Başta master regülatör SKN olmak üzere bazı periferel organlarda da saat genlerinin ritmik bir şekilde eksprese edildiğı bilinmektedir (Zhang ve ark., 2014). Bu genlerin birlikte ya da tek gen delesyonları ya da mutasyonları sonucunda sadece sirkadiyen ritim bozulmakla kalmamış aynı zamanda üreme sistemi, fertilitte ve gebelik süreçlerinde hatalar meydana gelmiştir (Boden ve Kennaway, 2006; Kennaway ve ark., 2012). *Bmal1* geni silinmiş dişi farelerde, düzensiz östrus siklusu geç puberte başlangıcı, proöstrusta LH artışının yetersizliğı, serum progesteron seviyelerinde düşüklüğü ve implantasyon başarısızlıkları bildirilmiştir (Ratajczak ve ark., 2009). *Clock* geni silinmiş dişi farelerde ise anormal fenotipler ve yüksek oranda fetal rezorpsiyon (kayıp/yok olmuş) meydana gelmiştir (B. H. Miller ve ark., 2004; Dolatshad ve ark., 2006). *Per* geni silinmiş dişi farelerde, düşük üreme başarısı ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında düşük vücut ağırlıklı yavruların doğumu gözlemlenmiştir (Pilorz ve Steinlechner, 2008). Tüm bu gen silme modellerinde yapılan çalışmalarda, aynı zamanda, davranışsal ritim ve lokomotor aktivite deneyleri ile farelerin sirkadiyen ritimlerinin bozulduğı ortaya konmuştur (B. H. Miller ve ark., 2004; Dolatshad ve ark., 2006; Pilorz ve Steinlechner, 2008; Ratajczak ve ark., 2009).

Sirkadiyen ritmin fonksiyon görmesinin altında moleküler saat yatmaktadır ve bu molekülün ekspresyonları ve regülasyonları üreme sistemindeki birçok dokuda tanımlanmasına rağmen, gebelik sürecinde uterus ve plasenta gibi gebeliğe ait diğer yapılarıdaki durumu hakkında literatürde yeterli bilgi mevcut değildir. Diğer yandan *CLOCK* geni ile ilişkili bir insan çalışmasında 511 infertil kadın değerlendirilmiş ve bu

kadınların bazılarında *BMAL1* ve *NPAS2* tekli nükleotid polimorfizmi (TNP) tespit edilmiştir. Tekli nükleotid polimorfizmi olan infertil kadınlar ile TNP bulunmayan infertil kadınların gebelik kayıpları karşılaştırıldığında; *BMAL1* ve *NPAS2* TNP olan kadınlarda gebelik kayıp oranları anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Kovanen ve ark., 2010). Literatürde sınırlı sayıda çalışma ile gebe farelerde gebeliğin 16. gününde uterus ve plasenta gibi ekstra embriyonik dokularda saat gen ekspresyonlarının varlığı gösterilmiştir (Ratajczak ve ark., 2010).

2.4. Farelerde Fetal Gelişim

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için fertilizasyondan sonra pre-implantif dönemde embriyo gelişimi, implantasyon, desidualizasyon ve sonrasında plasentasyonun doğru biçimde gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu olaylar erken gebelik sürecini kapsamaktadır ve bu süreci sağlıklı bir şekilde geçirebilen bir gebelik, fetal ve plasental gelişimine devam edebilmektedir (H. Wang ve Dey, 2006). Gebelik sürecindeki gelişim aşamaları insan ve farede zamanlama olarak farklılıklar gösterse de benzer olaylar serisini içermektedir. Farelerde gebelik süreci yaklaşık 20 gün iken insanlarda ise yaklaşık 270-280 gündür. Fare gebeliği gelişimsel olarak 4 aşamada değerlendirilir; pre-implantif embriyo gelişimi, gastrulasyon ve organogenez aşamaları sırasıyla 1., 2. ve 3. gestasyonel periyodu içerir ve gebeliğin 14. gününe kadar devam eder (M. S. Ko, 2001a). Dördüncü gestasyonel aşamada, 14. günden sonra doğuma kadar olan zaman olgunlaşma sürecidir ve esasen fetal büyüme için gerekli bir süreçtir (Burke ve ark., 2010). İnsanda ise; gebelik sürecinin 5'te biri faredeki ilk 3 gestasyonel periyodu içerir ve böylece embriyonik periyot 56. günde tamamlandıktan sonra geriye kalan uzun dönemde başta olgunlaşma ve büyümeyi içeren fetal periyoda geçilmiş olur (M. S. Ko, 2001a) (Şekil 2.3). Her iki türde de embriyonik periyotta plasentasyon tamamlanır ve fonksiyonel hale gelerek fetal gelişimin devamlılığını sağlamaktadır. Plasenta, memeli embriyogenezi boyunca gelişen ilk yapı olmakla birlikte, memeli embriyosunun uterus ortamında canlılığının devam ettirmesi için hayati önem taşımaktadır. Farede ilk plasental sirkülasyon gebeliğin 9-10. günlerinde başlamaktadır ve 14. günden sonra gelişimini tamamladığı için matür (olgun) plasenta olarak isimlendirilmektedir (Burke ve ark., 2010). İnsanda ise, plasental sirkülasyon yaklaşık 80. günde başlar ve gelişir (M. S. Ko, 2001a; Malassine ve ark., 2003).

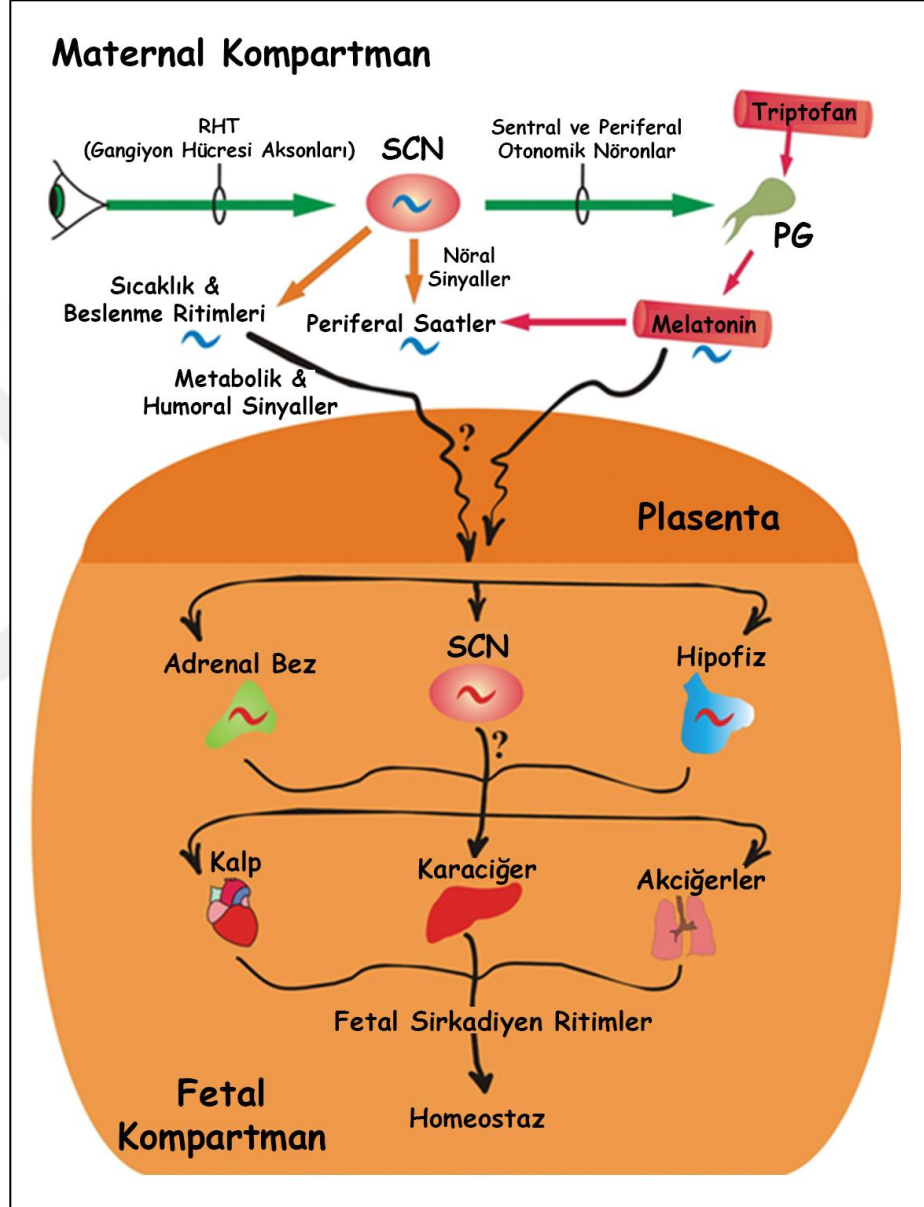


Şekil 2.3. İnsan ve fare gebelik süreçlerinin karşılaştırılması (M. S. H. Ko, 2001b'den düzenlenmiştir).

2.5. Fetal Sirkadiyen Ritmin Gelişimi

İnsanda gelişimsel süreçteki etik ve teknik kısıtlamalar nedeniyle, memeli gelişimini anlamamızda hem kısa ve hem de insana göre geniş bir periyotta inceleme olanağı nedeniyle fare modellerinin kullanılması tercih edilmektedir (M. S. Ko, 2001a). İnsan fetus gelişiminde SKN, geç gestasyonel dönemde oluşmaya başlamaktadır. Farede de benzer şekilde, embriyonik hipotalamusta SKN bölgesinin nöronal gelişimi, gebeliğin 12-15. günleri arasında oluşmaktadır (Landgraf ve ark., 2014). Sonraki günlerde SKN'ü oluşturan nöronal topluluk, vazomotor intestinal peptid (VIP), gastrin salgılatan peptid (Grp), arjinin vazopressin (AVP) gibi nöropeptitleri üreten özel hücrelere farklılaşmaktadır (Bedont ve Blackshaw, 2015). Fetal sirkadiyen sistemin kurulmasında önemli rolü olan bu nörotransmitterleri üreten hücreler bu dönemde olgunlaşmadığı için her ne kadar retinal projeksiyonlar SKN'a ulaşsa da fotik uyumluluk (ışık ile düzenlenen sirkadiyen ritim) doğumdan sonra meydana gelir (Landgraf ve ark., 2014). Bu nedenle

fetal sirkadiyen süreç, gebelik boyunca maternal sirkadiyen sistem tarafından düzenlenmektedir (Seron-Ferre ve ark., 2012; Mark ve ark., 2017) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Fetal sirkadiyen sürecin maternal sirkadiyen sistem tarafından düzenlenmesi (Reiter ve ark., 2014'den düzenlenmiştir). Maternal SKN'nin ritmik aktivitesi aydınlık/karanlık döngüsü tarafından yönetilir. Maternal kompartımanda SKN, pineal bezden (PG) sirkadiyen melatonin üretimini/salgılanmasını kontrol eder. Plasentada da melatonin üretilir, ancak bu dokuda sirkadiyen üretilip üretilmediği bilinmemektedir. Ayrıca, plasentadan türetilen melatoninin fetal olgunlaşma veya gelişim üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığı da bilinmemektedir. Fetal kompartımanda SKN'nin gelişimi ve olgunlaşması maternal sıcaklık, beslenme döngüsü ve plasentadan fetal dolaşıma kolayca geçebilen sirkadiyen melatonin ritmine bağlıdır. Fetüste, bu süreçler adrenal bezi ve hipofizi etkileyerek, periferik organlardaki ritimleri de etkilemektedir.

2.6. Plasenta

Plasenta, gebelik sürecinde anne ve fetus arasında iletimi sağlayan özelleşmiş geçici bir organdır. Maternal besin ve oksijenin fetüse aktarılması, fetüste biriken atık ürünlerin de maternal dolaşıma ulaştırılmasından sorumludur. Ayrıca, plasenta gebelik süresince maternal fizyolojiyi düzenleyen hormonlar üretir ve maternal immün sisteme karşı bariyer oluşturur (Cross ve ark., 2003). Türler arasında farklı tipte plasentalar vardır ve dişi üreme sisteminde çeşitli şekil, boyut, hücresel bileşenler ve entegrasyon düzeyi sergilerler (Latos ve Hemberger, 2016). İnsan, sıçan, fare ve birçok insan olmayan primat hemokoryal plasentaya sahiptir.

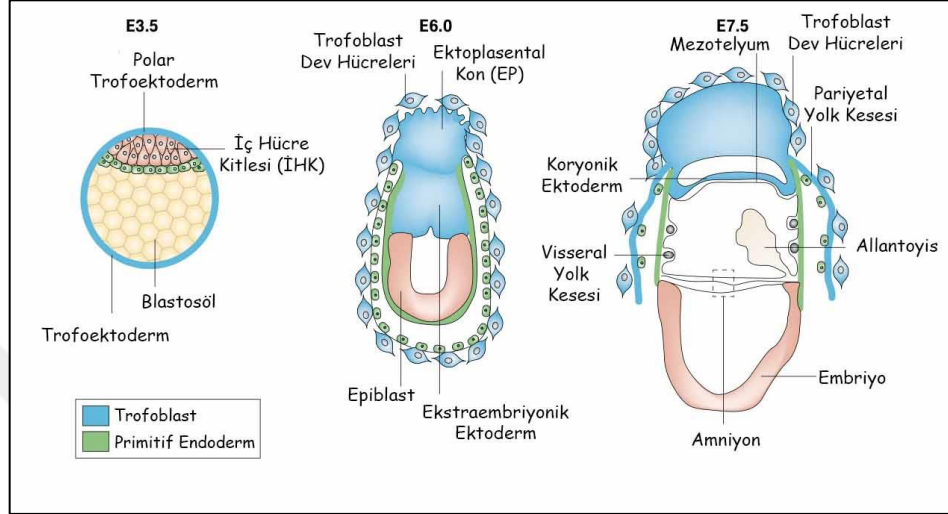
2.7. Fare Plasentası

Fareler kemirgen ailesinin üyesidir. *Mus musculus* türü fareler çift boynuzlu (bikornat) uterusu sahiptirler. Laboratuvarlarda yaygın olarak BALB/c ırkı fareler kullanılmaktadır. Gebelik süreleri yaklaşık 20-21 gündür ve yavru sayısı 6 ile 10 arasında değişmektedir. Fare plasentasının şekli diskoidal tiptedir. Maternal ve fetal vasküler sistem arasındaki tabaka sayısına göre farelerde hemotrikoryal plasenta görülmektedir.

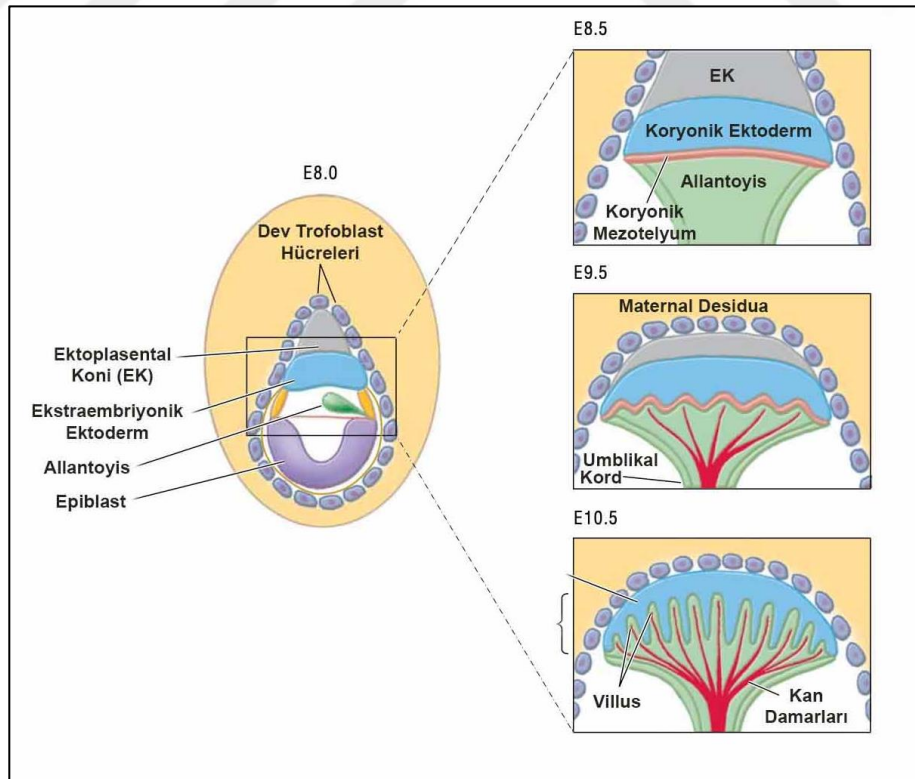
2.7.1. Fare Plasentasının Gelişimi

Fertilizasyondan sonra zigot bir dizi simetrik hücre bölünmeleri geçirir ve oluşan blastomerler, morula ve ardından blastosisti oluşturur. Blastosist, farede embriyonik 3.5 (E3.5) günde trofoektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (İHK) olarak iki tabakaya ayrılır. Blastosistin dış tabakasını TE, trofoektodermin altında sarılı tabaka ise İHK'ni oluşturmaktadır. İç hücre kitlesinin komşuluğunda bulunan trofoblastlar polar trofoektodermi, karşı kutbundaki trofoblastlar ise mural trofoektodermi oluşturmaktadır (Giritharan ve ark., 2012). İmplantasyon zamanı (E4.5), iç hücre kütlesi ile temas etmeyen mural trofoektoderm hücreleri, trofoblast dev hücreleri haline gelir (Rossant ve Cross, 2001; Watson ve Cross, 2005). Bu hücreler bölünmeyi durdurur, ancak poliploid olmak için DNA'larını (endoreduplikasyon) çoğaltmaya devam ederler (Watson ve Cross, 2005; Simmons ve ark., 2007). Polar trofoektoderm hücreleri ise prolifer olmaya devam ederek ekstra embriyonik ektoderm (EEE) ve ektoplasental koniyi (EK) oluşturur (Copp, 1978; Rossant ve Cross, 2001; Watson ve Cross, 2005) (Şekil 2.5). Ekstra embriyonik ektoderm önce koryonu ve daha sonra da plasantanın labrint tabakasını

oluşturacak şekilde trofoblast kök hücreleri halinde gelişir. Bu gelişim esnasında, labrint tabakası yapısal olarak spongiyotrofoblast adı verilen ekto plasental koni türevi bir tabaka ile desteklenir.



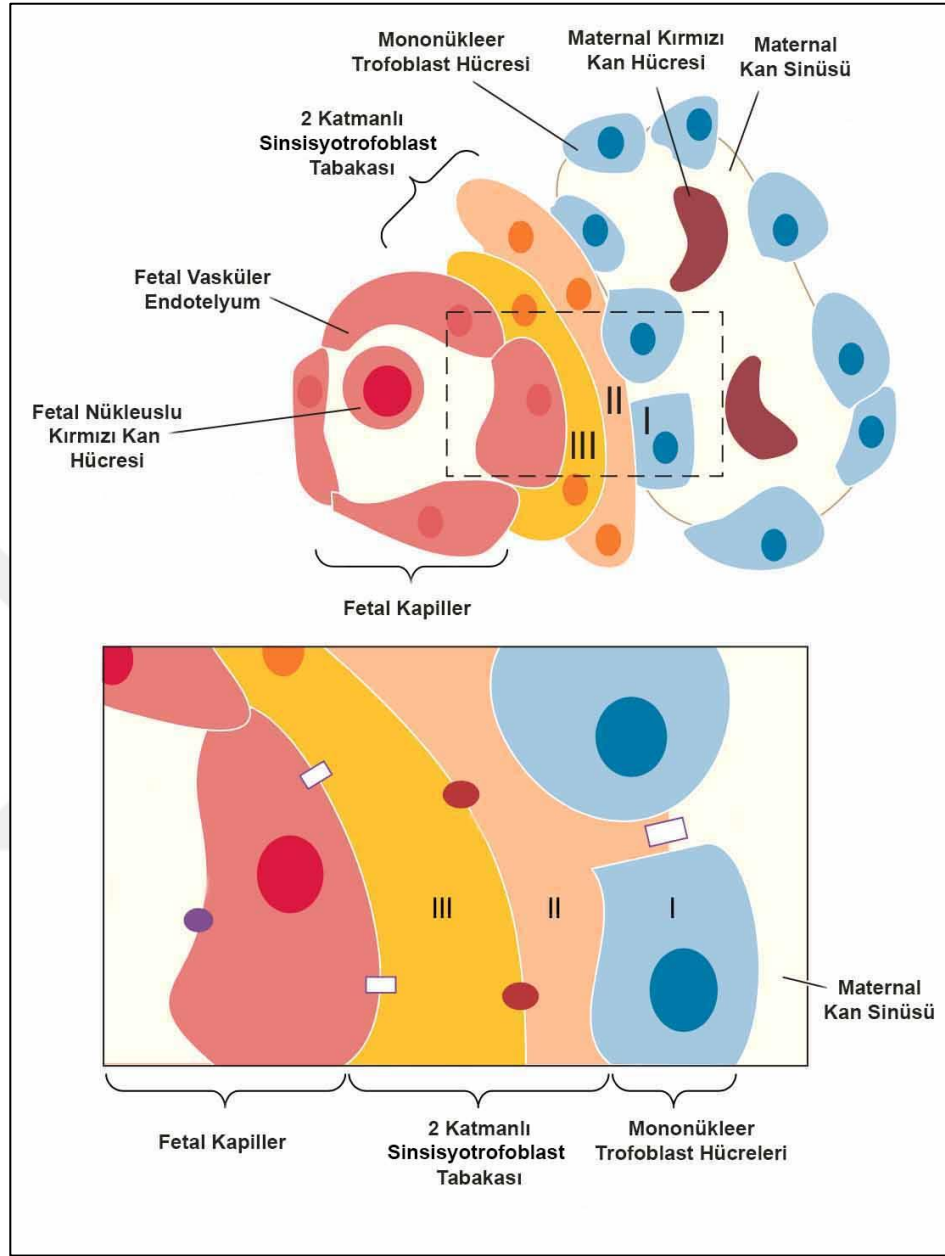
Şekil 2.5. Fare plasentasının embriyonik dönemden başlayarak fetal dönemdeki gelişimi (Rossant ve Cross, 2001'den düzenlenmiştir).



Şekil 2.6. Fare plasentasının E8., E8,5, E9,5. ve E10,5. günlerdeki labrint tabakasının oluşum evreleri (Watson ve Cross, 2005'den düzenlenmiştir).

Embriyonik 8. gün embriyonun arka ucundan uzanan ekstra embriyonik mezoderm (allantoyis) plasentanın vasküler kısmını oluşturur (Cross ve ark., 2003). Embriyonik 8.5. günde, allantoyis koryon ile temas kurar (koryoallantoik bağlanma).

Embriyonik 9. günde koryonda katlanmalar oluşmaya başlar ve allantoyisten gelişen fetoplasental kan damarlarının bulunduğu alan oluşur (Cross ve ark., 2003) (Şekil 2.6). Bir yandanda, koryonik trofoblast hücreleri; labrint tabakayı oluşturacak olan multinükleer sinsisyotrofoblast hücrelerine ve mononükleer trofoblast hücrelerine farklılaşmaya başlarlar. Trofoblast hücrelerinin füzyonu ile oluşan multinükleer sinsisyotrofoblast hücreleri, fetal kapillerlerin endotelini çevreler. Mononükleer trofoblast hücreler ise, maternal kan sinüslerini sınırlandırır (Şekil 2.7). Trofoblastlar fetal damarlar ile birlikte, labrint bölgesinde geniş ve dallanmış villus yapılarını oluştururlar. Maternal-fetal kan akımı, besin transportunu en üst düzeye çıkarmak için labrint bölgede zıt yönde akım sergilemektedir (Adamson ve ark., 2002). Labrint bölgedeki vaskülarizasyon doğru biçimde gerçekleşmezse, plasental perfüzyon bozulur, bu da fetüse doğru zayıf oksijen ve besin difüzyonu ile sonuçlanır (Pardi ve ark., 2002).

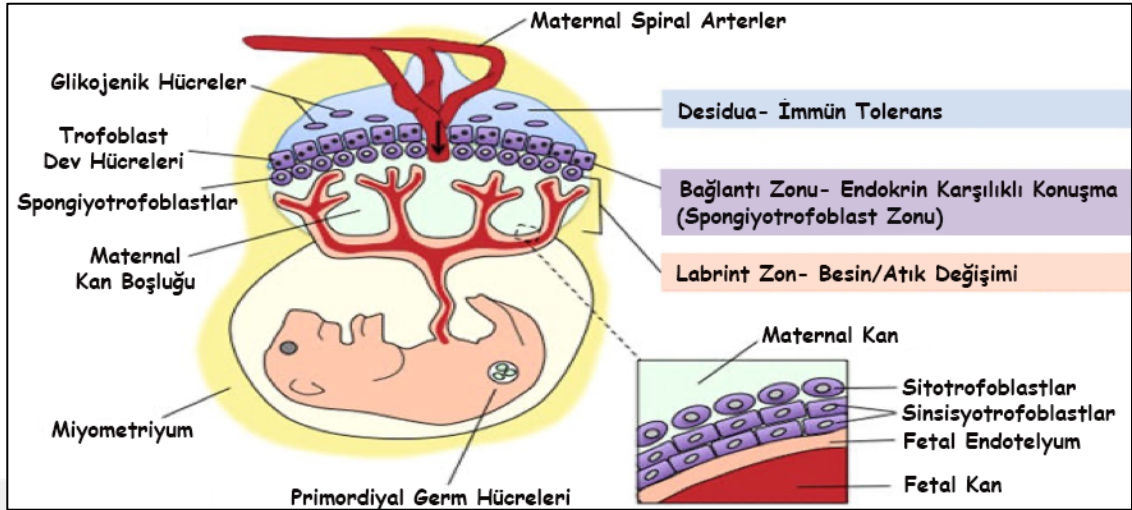


Şekil 2.7. Fare plasentasının labrint kompartmanındaki mononükleer trofoblast (I) ve multinükleer sinsisyotrofoblast hücrelerinin (II ve III) fetal kapillerler çevresindeki yerleşiminin şematize gösterimi (Watson ve Cross, 2005'den düzenlenmiştir).

2.7.2. Farelerde Matür Plasenta Yapısı

Fareler hemotrikoryal ve diskoidal tip plasentaya sahiptir ve 3 kompartmandan oluşmaktadır (Şekil 2.8). Bunlar;

1. Desidua
2. Spongiotrofoblast
3. Labrint Alan



Şekil 2.8. Olgun fare plasentasının 3 kompartmanı (Bronson ve Bale, 2016'den düzenlenmiştir).

1. Desidua: Desidua spongiotrofoblast kompartmanı ile birlikte plasentanın maternal kısmını oluşturur. Desidual hücrelerden oluşmaktadır. Desidual hücreler, uterusu ait stromal hücrelerin farklılaşmasıyla oluşur ve desidual-plasental yüzey damarlanmasının gelişiminde önemli rol oynarlar (De ve ark., 1991; Furukawa ve ark., 2014). Desidua ve spongiotrofoblast kompartmanı plasentanın maternal kısmını oluşturur. Spongiotrofoblast tabakasında bulunan glikojenik hücreler desiduyada invaze olduğundan bu tabakada da görülebilmektedir.

2. Spongiotrofoblast (Bağlantı Zonu): Bu tabaka EK'den gelişmektedir. Spongiotrofoblast hücreleri, trofoblast dev hücreleri ve glikojenik hücrelerden oluşmaktadır. Spongiotrofoblast hücreleri trofoblast dev hücrelerinin hemen altında yerleşiktir ve kompartmanın ana yapısını oluşturur. Trofoblast dev hücreleri plasentanın önemli endokrin hücrelerinden biridir ve prolaktin ailesine ait hormonlar/sitokinler sentezler ve salgılarlar (Soares ve ark., 1996; Ain ve ark., 2003; Soares ve ark., 2007). Glikojenik hücreler gebeliğin orta zamanlarında geçici olarak bu kompartmanda görülür. Bunlar küçük hücre kitleleri ve glikojen hücre adacıklarını oluştururlar. Bu hücrelerin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Spongiotrofoblast tabaka fetal kan damarları içermez sadece maternal kan damarları bulunur (Furukawa ve ark., 2011).

3. Labrint Alan: Bu kompartman ekstraembriyonik ektodermden gelişir. Labrint alan, fare plasentasının fetal kısmını oluşturmaktadır. Maternal sinüsler, fetal kan damarları ve trofoblast hücreleri bu kompartmanda yer almaktadır. Maternal kan boşlukları mononükleer trofoblast hücrelerinden (sitotrofoblast) oluşur ve mikrovillus içermez. Bu trofoblast tabakasının altında, çift tabaka halinde sinsisyotrofoblast hücre tabakası (sinsisyotrofoblast 1 ve sinsisyotrofoblast 2) vardır (Georgiades ve ark., 2002) (Şekil 2.7).

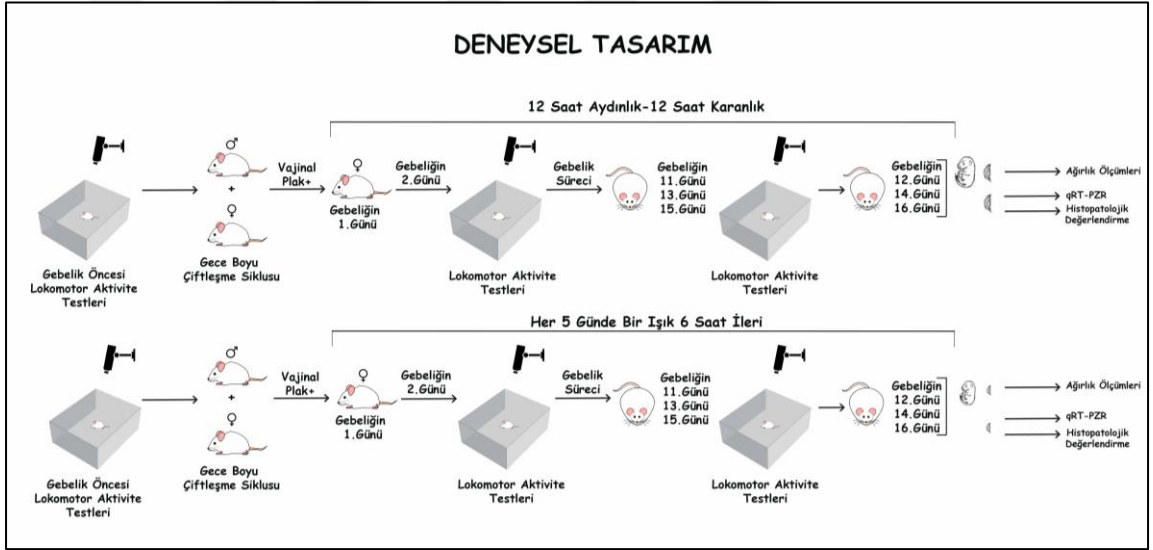
2.8. Sirkadiyen Ritim ve Plasenta Arasındaki İlişki

Olgun plasentanın sirkadiyen saat genlerini eksprese ettiği bilinmektedir (Barr, 1973). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kemirgen ve insanların olgun plasentalarında sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonları araştırılmaktadır ve literatürde annenin gebelik sürecinde sirkadiyen ritminin bozulmasının, yavrularda uterus içi büyüme geriliğine (UİBG) sebep olduğu bildirilmiştir (Mendez ve ark., 2012; S. L. Miller ve ark., 2014). Olgun plasentada mRNA düzeyinde *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* ekspresyonları sınırlı sayıdaki çalışmada gösterilmiştir (Ratajczak ve ark., 2010; Wharfe ve ark., 2011; Perez ve ark., 2015). Farelerde yapılan bir çalışmada, gebeliğin 16. gününde matür plasentada, uterus ve fetal membranlarda sirkadiyen saat genlerinden olan *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* ve *Cry2* genlerinin ekspresyonlarının varlığı gösterilmiştir (Ratajczak ve ark., 2010). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada ise, gebeliğin 20. gününde matür plasentanın kompartmanlarından spongiyotrofoblast ve labrint tabakalarında; *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* ekspresyonları değerlendirilmiş ve iki bölge arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Wharfe ve ark., 2011). Bu farklılıkların fizyolojik önemi henüz yeterince anlaşılamamasına rağmen, iki bölgenin fonksiyonel farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Wharfe ve ark., 2011). Plasentanın farklı bölgelerinde sirkadiyen saat genlerinin ritmik olarak eksprese olması, bu genlerin bulundukları plasenta bölgelerinin farklı fonksiyonları ile ilgili özgün rolleri olabileceğini düşündürmektedir. İnsan term plasentasında yapılan bir çalışmada 1 günün farklı saatlerinde elde edilmiş plasentalarda; *CLOCK*, *BMAL1*, *PER2* VE *CRY1* genlerinin ritmik ekspresyonları gösterilmiştir (Perez ve ark., 2015).

Farelerde gebeliğin 15. gününde yapılan bir başka çalışmada ise; karaciğer, kas, gonadal beyaz yağ dokusu ve plasentada sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonları değerlendirilmiştir ve bu çalışmanın sonucunda maternal karaciğer, kas, gonadal beyaz yağ dokusu ve plasentanın *Bmal1*, *Clock*, *Rev-erb α* ve *Rev-erb β*'yı ritmik olarak eksprese ettiği ortaya konmuştur (Papacleovoulou ve ark., 2017). Plasenta veya diğer dokularda, sirkadiyen saat genlerinin ritmik ekspresyonları, günün farklı saat dilimlerinde (zeitgeber zamanları), mRNA düzeyinde araştırılmaya devam etmektedir ve bu moleküllerin protein düzeyindeki ekspresyonları hakkında literatürde henüz bilgi bulunmamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2018.10.018 numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışmada; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen, daha önce hiçbir deneye girmemiş ve çiftleşmemiş, standart laboratuvar koşullarında beslenen, 22-27 gr ağırlığındaki BALB/C ırkı yetişkin (6-8 haftalık) dişi ve erkek fareler (72 dişi, 26 erkek; toplam 98 fare) kullanılmıştır. Deneylerin bitiminde fareler eter anestezisi altındayken yapılan servikal dislokasyon ile ex edilmiştir. Çalışmanın deneysel tasarımı Şekil 3.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın deneysel basamaklarını özetleyen şema.

3.1. Grupların Oluşturulması

Dişi fareler, erkek fareler ile gece siklusu boyunca çiftleştirilmeye bırakıldıktan sonra ertesi sabah vajinal plak görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Dişi farelerde gece boyu çiftleşme siklusu sonrası vajinal plak tespiti.

Vajinal plak görülen dişi fareler rastgele kontrol ve sirkadiyen ritmi bozulan gruplara dağıtılarak aşağıdaki deney grupları oluşturulmuştur:

1. Kontrol Grubu

a) Gebeliğin 12. Günü

- ZT0 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT6 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT12 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT18 Zaman Dilimi (n=3)

b) Gebeliğin 14. Günü

- ZT0 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT6 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT12 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT18 Zaman Dilimi (n=3)

c) Gebeliğin 16. Günü

- ZT0 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT6 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT12 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT18 Zaman Dilimi (n=3)

2. Sirkadiyen Ritmi Bozulan Grup

a) Gebeliğin 12. Günü

- ZT0 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT6 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT12 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT18 Zaman Dilimi (n=3)

b) Gebeliğin 14. Günü

- ZT0 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT6 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT12 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT18 Zaman Dilimi (n=3)

c) Gebeliğin 16. Günü

- ZT0 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT6 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT12 Zaman Dilimi (n=3)
- ZT18 Zaman Dilimi (n=3)

3.1.1. Kontrol grubu: Vajinal plak pozitif olan ve gebelik süresince 12 saat aydınlık-12 saat karanlık siklusuna (06:00 ışık açılışı, 18:00 ışık kapanışı) devam eden dişi farelerden; gebeliğin 12, 14 ve 16. günlerinde zeitgeber zaman dilimlerine uygun olarak 6'şar saat aralıklarla fetüs ve plasentalar elde edilmiştir. Farede ilk plasental sirkülasyon E9-10. günlerde başlamakta ve E14. günden sonra gelişimini tamamlayarak matür halini almaktadır. Bu çalışmada gebeliğin; 12. gününde immatür placent, 14. gününde organogenezin tamamlandığı ve matürasyonun başladığı placent ve 16. gününde matür plasentalar ve onlara ait fetüsler elde edilerek değerlendirilmiştir.

İlk olarak; fetüslerin ve plasentaların ağırlıkları tartılarak kayıtlar alınmıştır. Ardından placent dokularının bir bölümü histopatolojik analizler için parafin doku takibine alınmış ve bir kısmı da gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) deneyleri için -80 °C'deki buzdolabında saklanmıştır.

12.Gün (İmmatür) Placent: Gebeliğin 12. gününde “Zeitgeber Time”a göre tanımlanmış ZT0 (aydınlığın başlangıcı/06:00), ZT6 (aydınlığın ortası/12:00), ZT12 (karanlığın başlangıcı/18:00) ve ZT18 (karanlığın ortası/24:00) zaman dilimlerinde plasentalar elde edilmiştir. (Her ZT için n=3 anne (Toplam n=12); Bugüne ait toplam n=93 placent)

14.Gün (Matürasyon başlangıcı) Placent: Gebeliğin 14. gününde “Zeitgeber Time”a göre tanımlanmış ZT0 (aydınlığın başlangıcı/06:00), ZT6 (aydınlığın ortası/12:00), ZT12 (karanlığın başlangıcı/18:00) ve ZT18 (karanlığın ortası/24:00) zaman dilimlerinde plasentalar elde edilmiştir. (Her ZT için n=3 anne (Toplam n=12); Bugüne ait toplam n=99 placent)

16. Gün (Matür) Placent: Gebeliğin 12. gününde “Zeitgeber Time”a göre tanımlanmış ZT0 (aydınlığın başlangıcı/06:00), ZT6 (aydınlığın ortası/12:00), ZT12 (karanlığın başlangıcı/18:00) ve ZT18 (karanlığın ortası/24:00) zaman dilimlerinde plasentalar elde edilmiştir. (Her ZT için n=3 anne (Toplam n=12); Bugüne ait toplam n=96 placent)

14.Gün (Matürasyon başlangıcı) Plamenta: Gebeliğin 12. gününde “Zeitgeber Time”a göre tanımlanmış ZT0 (aydınlığın başlangıcı/24:00), ZT6 (aydınlığın ortası/06:00), ZT12 (karanlığın başlangıcı/12:00) ve ZT18 (karanlığın ortası/18:00) zaman dilimlerinde plasentalar elde edilmiştir. (Her ZT için n=3 anne (Toplam n=12); Bugüne ait toplam n=88 plasenta)

16.Gün (Matür) Plamenta: Gebeliğin 12. gününde “Zeitgeber Time”a göre tanımlanmış ZT0 (aydınlığın başlangıcı/06:00), ZT6 (aydınlığın ortası/12:00), ZT12 (karanlığın başlangıcı/18:00) ve ZT18 (karanlığın ortası/24:00) zaman dilimlerinde plasentalar elde edilmiştir. (Her ZT için n=3 anne (Toplam n=12); Bugüne ait toplam n=97 plasenta)

3.2. Lokomotor Aktivite Testleri

Literatürde sirkadiyen ritmin bozulması lokomotor aktivite testleri ile gösterilmektedir (Prendergast ve ark., 2015; Crossland ve ark., 2017; Sabbar ve ark., 2017; Smarr ve ark., 2017; Farsi ve ark., 2018). Çalışmamızda; lokomotor aktivite test ölçümleri kontrol ve sirkadiyen ritmi bozulan gruplar için ilk olarak; gebelik öncesinde, ikinci olarak; gebeliğin 2. gününde ve son olarak; plasentaların elde edileceği 12., 14. ve 16. günlerden 1 gün önce olmak üzere (gebeliğin 11., 13. ve 15. günlerinde) toplam 3 kez gerçekleştirilmiştir. Böylece gebeliğin başındaki ve sonundaki kayıtlardan hem gebeliğin hem de gebelik sürecinde bozulan sirkadiyen ritmin bilgileri elde edilmiştir. Lokomotor aktivite ölçümleri, testlerin standardize edilebilmesi amacıyla her grup için ZT zaman dilimlerine göre aydınlığın ortasında (ZT6) yapılmıştır (Smarr ve ark., 2017). Kontrol grubu için, birinci ve ikinci kayıtlar ışık değişimleri olmadığı için aydınlığın ortasına denk gelen saat 12:00’de (ZT6) yapılmıştır. Sirkadiyen ritmi bozulan grup için, kontrol grubundaki ZT6 zamanı dikkate alınarak standardizasyon sağlanmasına dikkat edildiğinden, ışığın kaydırıldığı ve deneyin bitiş zamanına göre birinci kayıtlar saat 18:00, ikinci kayıtlar ise saat 24:00’te alınmıştır.

3.2.1. Açık Alan (Open field) Testi

Lokomotor aktivite değerlendirmeleri için kullanılan açık alan testi, duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 40x40 cm ebatlarında kare şeklinde siyah mat tabanlı düzenekte yapılmıştır. Alan, 10 cm² büyüklüğünde birbirine eşit 16 küçük daireye bölünmüştür. Deneyin başlangıcında dişi fareler tek tek bu alanın merkezine bırakılmış ve 5 dakika boyunca hareketleri videoya kaydedilmiştir. Her farenin; bu alanda girdiği kare sayısı, kat ettiği toplam mesafe, ortalama hızı ve dış/iç kadranda geçirdiği süreler ölçülmüştür. Açık alan testi Noldus EthovisionXT system kullanılarak değerlendirilmiştir (Bazyar ve ark., 2017; Zu ve ark., 2017).

3.3. Doku Temini ve Hazırlanması

Gebeliklerinin 12, 14 ve 16. günlerindeki SRB gruptaki ve kontrol grubundaki dişi fareler eter anestezisi altında bayıldıktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek, plasenta ve fetüsleri elde edilmiştir. İlk olarak; fetüsler ve o fetüse ait plasenta hassas terazide tartılarak doku ağırlıkları kaydedilmiştir. Plasantaların bir kısmı histopatolojik değerlendirmeler için parafin doku takibi işlemine alınırken, geriye kalanlar ise kantitatif gerçek zamanlı PZR deneyleri için -80°C'ye alınarak, işlemler yapılana kadar saklanmıştır.

3.4. Hematoksilen-Eozin Boyaması ve Histopatolojik Değerlendirmeler

Tüm gruplardan elde edilen plasenta dokuları %10'luk formalin ile 24 saat fikse edildikten sonra 24 saat akan musluk suyunda yıkanmıştır. Dokular %70, %80 ve %90'lık artan etil alkol serilerinde 24 saat ve %100'lük etil alkolde ise toplam 3 saat tutularak, dokuları sudan kurtarma (dehidrasyon) işlemi gerçekleştirilmiştir. Dokular, üç farklı ksilolde 2'şer dakika bekletilerek şeffaflaştırılmıştır. 56 °C'ye ayarlı etüvde dokular, parafin serilerinden geçirilerek parafin doku blokları hazırlanmıştır. Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler lamlara alındıktan sonra, 56 °C etüve konulup dokunun lama iyice yapışması sağlanmıştır. Plasenta kesitlerinde; diskoid plasentanın tüm kompartmanlarını görecektek şekilde ve göbekte kordonundan geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır. Kesitler iki defa 10'ar dakika ara ile ksilolde bekletilerek parafinden kurtarılmıştır. Ardında, derecesi azalan etil alkol serilerinde 5'er dakika tutularak (%100, %90, %80 ve %70) yeniden

hidrate edilerek suya indirilmiştir. Hücre çekirdeklerini boyamak için lamalar 1 dakika hematoksilende bekletilmiştir ve lam üzerinde bulunan fazla boyayı akıtmak için lamalar suda yıkanmıştır. Hücre sitoplazmasını boyamak için eozin ile 10 saniye boyama yapılmıştır ve ardından fazla boya su ile uzaklaştırılarak, dereceli etil alkol serileri ve ksilolden geçirilerek Entellan ile kapatma işlemi yapılmıştır. Lamelle kapatılan kesitler 1 gece kurutulmaya bırakıldıktan sonra plasenta kesitlerinin tümü Olympus, CX43 mikroskobunda 4x, 10x ve 20x büyütmede fotoğraflanmıştır.

Elde edilen tüm plasenta kesitlerinin toplam alanlarını değerlendirmek için ImageJ programı kullanılmıştır. Plasentanın 3 kompartmanını içine alacak şekilde dıştan sınırları çizilerek ölçümler elde edilmiştir.

Toplam alanları hesaplanan plasenta kesitlerinde daha sonra desidua, spongiyotrofoblast ve labrint kompartmanlarının boyutları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her bir kompartman için standardizasyonun sağlanması amacıyla rastgele olarak 4 farklı alandan ImageJ programı ile çizgi çekilerek ölçümler alınmıştır. Dört farklı alandan alınan ölçümlerin ortalaması alınmış ve her bir plasenta için değerler elde edilmiştir.

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

Işık düzeninin bozulması sonrasında sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonlarının değişip değişmediğini kontrol etmek amacıyla, kontrol grubu ve SRB gruplardan elde edilen plasentalarda kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) yöntemi uygulanmıştır. Plasenta dokularından total RNA izolasyonu RNeasy Kiti (Qiagen, katalog numarası:74106) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapılmıştır. Total RNA, RNaz içermeyen DNaz (Qiagen, RNase-Free DNase Set, katalog numarası: 79254) ile muamele edilerek DNA kontaminasyonu engellenmiştir. Elde edilen RNA cDNA'ya çevirildikten sonra **Bmal1**, **Clock**, **Per1**, **Per2**, **Per3**, **Cry1**, **Cry2** ve **Npas2** primerlerinin özgünlüğünün kontrol edilmesi amacıyla bir PZR reaksiyonu kurularak, elde edilen ürünler jelde yürütülmüştür. *Beta-aktin* internal kontrol olarak kullanılmıştır.

3.5.1. Total RNA Eldesi:

1. Tüm gruplara ait tam plasenta dokularının (plasentanın tüm kompartmanlarını içeren) üçte birlik kısmı gerçek zamanlı kantitatif PZR analizleri için kullanılmıştır. Bir doku örneği (yaklaşık 30 mg) başına 600 µl RLT tamponu eklendikten sonra karışım pipet yardımı ile QIAshredder kolonlarına aktarılmıştır. İki dakika en yüksek devir olan 14.600 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra altta bulunan toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılmıştır. (Kullanılmadan önce RLT tamponuna beta-merkaptoetanol eklenmiştir.)
2. Lizat aynı şekilde 3 dakika boyunca en yüksek devirde santrifüj edilmiştir.
3. Lizattan 350 µL alınarak üzerine 350 µL %70'lik etanol ilave edilmiştir. Pipetlenerek hızlı bir şekilde karıştırılmıştır. QIAshredder homojenizasyonundan artan örnek - 80°C'ye kaldırılmıştır.
4. Toplam hacmi 700 µL olan örnek, RNeasy kolonlarına transfer edilmiş ve 8000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılmıştır.
5. Aynı kolonun ortasına 350 µL RW1 tamponu eklenmiş, 8000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılmıştır.
6. Her örnek için 70 µl DNase I İnkübasyon Tamponu ve 10 µl DNase I eklenip, karıştırıldıktan sonra ve çözelti RNeasy kolonlarına aktarılmıştır. Ardından, +15 ila + 25 ° C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
7. RNeasy kolonlarına 500 µl RPE tamponu ilave edilmiş ve 8.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılmıştır.
8. RNeasy çevirme kolonlarına tekrar aynı şekilde 500 µl RPE tamponu ilave edilmiş ve 8.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpünde biriken sıvı boşaltılmıştır.
9. RPE tamponunu uzaklaştırmak için kolonlar 1 dakika boyunca maksimum hızda (yaklaşık 14.600 rpm) santrifüj edilmiştir.

10. RNeasy kolonları; altında yer alan toplama tüplerinden ayrılıp, temiz, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.

11. RNA'nın elüsyonu için, RNeasy kolonlarının tam ortasından 40 µL RNaz içermeyen su eklenerek 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında, mikrosantrifüj tüpü, doğrudan RT-PZR'de kullanılabilen veya daha sonra analiz edilmek üzere -80 ° C'de saklanabilen, “elute edilmiş” RNA'yı içermektedir.

Elde edilen RNA örnekleri Epoch™ Multi-Volume spektrofotometre (BioTek) sistemi ile ölçüldükten sonra yaklaşık 600 ng RNA, cDNA'ya dönüştürülmüştür.

3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi:

Reaksiyonun hazırlanacağı yüzey “DNAoff” (Takara, Clontech, katalog numarası: TAK9036) ile temizlenmiştir. cDNA elde etmek için EvoScript Universal cDNA Master 200 reaksiyon kiti (Roche, katalog numarası: 7912455001) kullanılmıştır. Her bir reaksiyon 3 kez tekrarlanmıştır. Reaksiyon miksi, DNaz/RNaz içermeyen su ve enzim miksi oda sıcaklığında (15-25 ° C) çözülürken, RNA'ların buz üzerinde çözülmesi sağlandı.

1. Buz üzerinde ana karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği

İçerik	Miktar
Reaksiyon Karışımı	4µl
RNaz İçermeyen Su	Değişken
Enzim Karışımı	2µl
Şablon (template) RNA	Değişken
Toplam Miktar	20 µl

6. Reaksiyon ana karışımını içeren her tüpe şablon RNA eklenmiştir.

7. Kite belirtilen standart protokol doğrultusunda tüpler 42°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

8. Ters transkriptazı inaktive etmek için; tüpler 85°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.
9. Tüpler 65° C’de 15 dakika inkübe edilmiştir.
10. RNA’dan elde edilen cDNA’lar -20°C’de saklanmak üzere kaldırılmıştır.

3.5.3. qRT-PZR Protokolü

FastStart Essential DNA Green Master kiti (Roche, katalog numarası: 06402712001) kullanılmıştır. *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Npas2* ve *Beta-aktin* genleri için uygun primerler dizayn edildikten sonra genlerin transkript miktarını belirlemek amacıyla primerler için aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde reaksiyon tüpleri hazırlanmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PZR deneyi, “Thermo-QuantStudio 3” cihazında “Applied Biosystems Software” programında aşağıda verilen sıcaklık ve zaman çizelgesine uygun olarak gerçekleştirilmiştir ve software programı yardımıyla Ct (siklus eşik) değerleri belirlenmiştir. Her bir gen için reaksiyon üç defa tekrarlanarak, karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_T$ metodu ile *Beta-aktin* gen ekspresyonu ile normalize edilmiştir. Elde edilen siklus eşiği değerlerinden $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri, Windows 7 Microsoft Excel 2010 programı ile hesaplanmıştır. Elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri, Mac için GraphPad Prism 8 kullanılarak istatistiksel analizler için karşılaştırılmıştır. Amplifikasyonlar, 35 siklusta gerçekleştirilmiştir. Her bir qRT-PZR deneyi sonrasında, erime eğrisi (melting curve) analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm (erime noktası) değerleri karşılaştırılarak, agaroz jelde yürütülen PZR ürünlerinin özgüllüğü değerlendirilmiştir.

Tablo 3.2. qRT-PZR deneylerinde kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Reaksiyon başına hacim
2X SybrGreen Supermix	7 µL
Nükleaz içermeyen su	10 µL
İleri Primer	1 µL
Geri Primer	1 µL
cDNA	1 µL
Toplam Hacim	20 µL

Tablo 3.3. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri

Gen	Ayar	Başlangıç Denatürasyonu	Denatürasyon	Anneling	Extension (Uzama)
<i>Bmal1</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	59 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Clock</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Npas2</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	62 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Per1</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	59 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Per2</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Per3</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	62 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Cry1</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye
<i>Cry2</i>	Sıcaklık	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C
	Zaman	5 dakika	10 saniye	45 saniye	40 saniye

Tablo 3.4. qRT-PZR deneylerinde kullanılan primerlerin yapısı. (P_i: ileri primer ve P_G: geri primer)

Gen Adı	Primer Dizileri (5'-3') 20q	PZR Ürün Boyutu
<i>Beta-aktin</i>	P _i : GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74 bç
	P _G : ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	
<i>Bmal1</i>	P _i : TGAACCAGACAATGAGGGCT	183 bç
	P _G : TATGCCAAAATAGCCGTCGC	
<i>Clock</i>	P _i : ATGCCACAGAACAGTACCCA	189 bç
	P _G : TTGTGTGGCGAAGGTAGGAT	
<i>Npas2</i>	P _i : TTTGGCAAAGGGAAGTCGTG	175 bç
	P _G : GCTCCTGTCTCCTTTCCACT	
<i>Per1</i>	P _i : CACCACTGCCGATCTAAAGC	186 bç
	P _G : TCGAGGGGAGAATACTGGGA	
<i>Per2</i>	P _i : ACACTGGACACTAGCTGGTC	187 bç
	P _G : TCAGTAGCCGGTGGATTTGT	
<i>Per3</i>	P _i : AAAGAAGTTGCCAGCACCTG	178 bç
	P _G : GAGGAGATAAGGGGTCTGGC	
<i>Cry1</i>	P _i : TACAGCAGCCACAAACAACC	152 bç
	P _G : GAAGCTGAGTCATGATGGCG	
<i>Cry2</i>	P _i : ACCACCCCTTACCTACAAGC	212 bç
	P _G : CTGTCTCTCCTCCTTGCCAA	

3.5.4. Örneklerin Agaroz Jelde Yürütülmesi:

%1,5'lik Agaroz Jelin Hazırlanması:

- İçerisinden 50ml alınan 10X Tris-Borate-EDTA (TBE) elektroforez tamponu (Thermo, katalog numarası: B52) üzerine 450 ml distile su eklenmiş ve dilue edilmiştir.
- Kullanılacak yürütme tankına uygun miktardaki agaroz (Sigma, katalog numarası: A9539) tartılıp bir Erlen kabına konulduktan sonra üzerine 1X TBE tamponunu eklenmiştir.

Tablo 3.5. %1,5'lik agaroz jelin hazırlanışı

Malzemeler	%1,5'lik agaroz jel için
Agaroz	1,5 gr
1X TBE	100 ml
Etidyum Bromür (EtBr)	5 µl

- c. Jel hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırında kaynatılmıştır.
- d. Etidyum Bromür eklendikten sonra çalkalayarak, çözeltinin homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır.
- e. Agaroz solüsyonu tanka yavaşça döküldükten sonra, donması için en az 25 dakika beklenmiştir.

Örneklerin Agaroz Jelde Yürütülmesi:

- a. Jel tanka dikkatlice yerleştirilmiştir.
- b. Tanka jelin üzerini kapatacak kadar 1X TBE ile doldurulmuştur.
- c. İlk kuyucuğa mikropitet yardımıyla DNA kb için belirteç (Fermentas, katalog numarası: SM0333) yüklenmiştir.
- d. Her kuyucuğa 20 µl örnek yüklenmiştir.
- e. 90 V'da eksiden artıya doğru elektrofez gerçekleştirilmiştir.
- f. Ultraviyole ışık altında görüntüleme yapılmıştır (BIO-RAD, Molecular Imager® Gel DocTM XR Sistemi, katalog numarası: 170-8170)

3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler

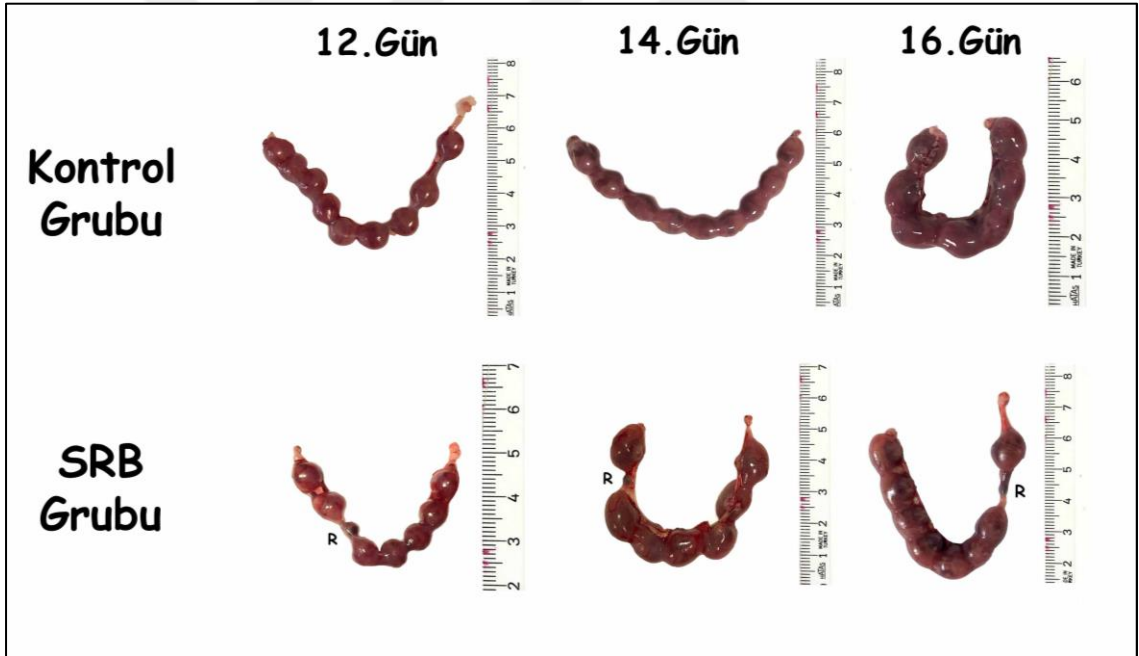
Tüm deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Histopatolojik değerlendirmeler ImageJ programı ile analiz edilmiştir. Histopatolojik değerlendirmelerden; fetüs sayıları, plasenta ağırlıkları, fetüs ağırlıkları, fetüs/plasenta ağırlık oranları, toplam alan değerlendirmeleri normalite testini geçmediğinde Mann Whitney U testi ile; desidual alan ölçümleri, spongiyotrofoblast alan ölçümleri ve labrint alan ölçümleri ise student's t testi ile değerlendirilmiştir.

Plasentada gelişimin farklı günlerinde (12., 14. ve 16. günler) her bir genin ekspresyonu için anlamlı farklılıkların olup olmadığını değerlendirmek amacıyla one way Anova testi ve ardından Holm-Sidak post hoc testi uygulanmıştır. Bu kontrol ve SRB grupları için ayrı ayrı yapılmıştır. Ardından iki bağımsız değişkenin (ışık ve ZT zaman dilimleri) bir bağımlı değişken (gen ekspresyonları) üzerindeki bireysel ve ortak etkilerinin değerlendirilmesi için two-way Anova testi ve Holm-Sidak post hoc testi uygulanmıştır. Plasentadaki sirkadiyen saat gen ekspresyonlarının zamana göre (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) ritmik olup olmadığını değerlendirmek için kontrol ve SRB grupları için ayrı ayrı One Way Anova testi ve ardından Holm-Sidak metodu uygulanmıştır. Kontrol ve SRB gruplarında ZT zaman dilimlerine göre (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) anlamlı farklılıkların olup olmadığını değerlendirmek için student's t-testi uygulanmıştır. Elde edilen tüm veriler Sigma Stat 3.5 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak belirtilmiştir ve $p < 0.05$ altında bulunan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

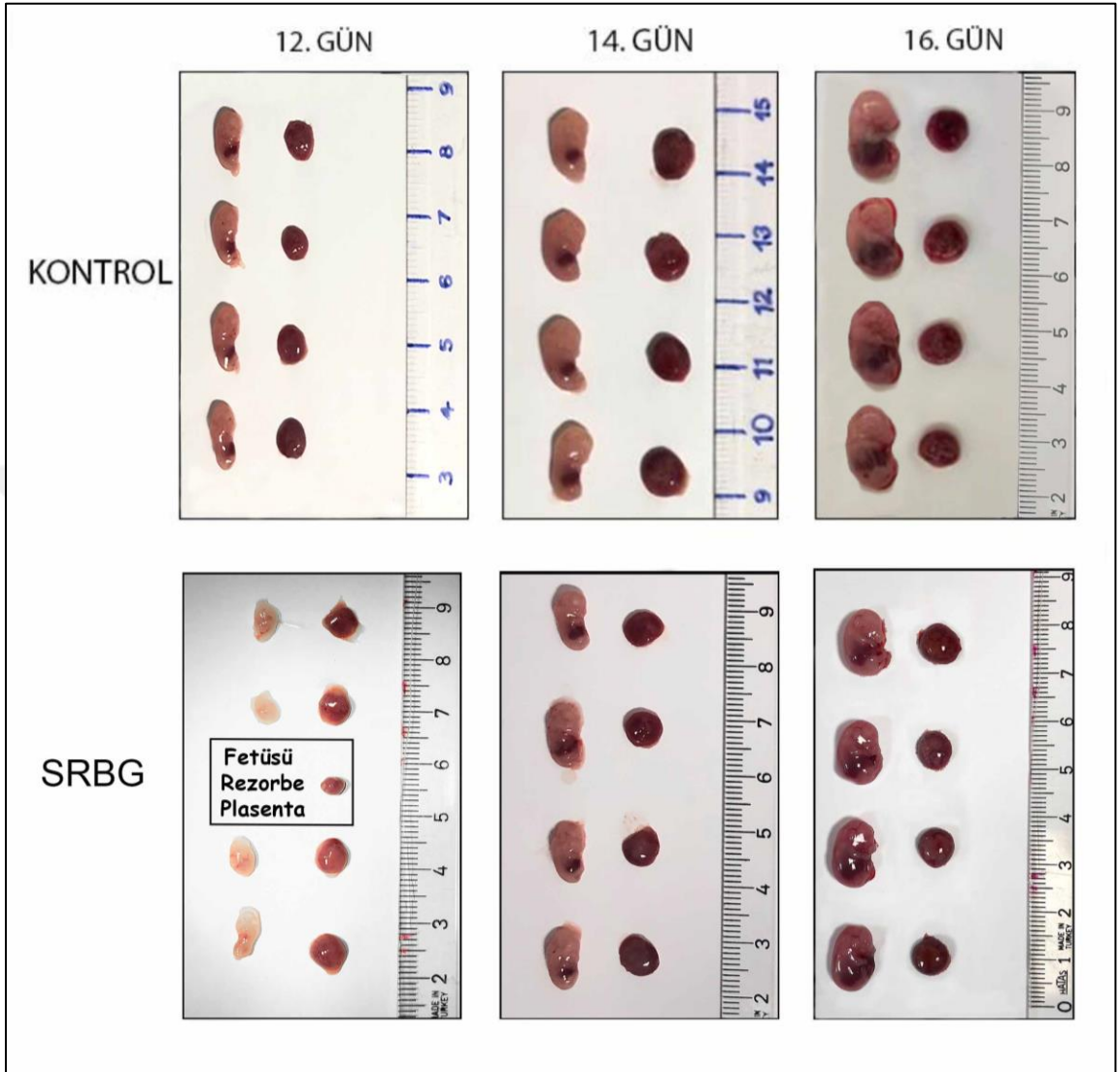
4. BULGULAR

4.1. Fetüs ve Plasentaların Makroskopik ve Ağırlık Değerlendirmeleri

Kontrol grubu ve aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek SRB gruplardan elde edilen uteruslar (Şekil 4.1) ve daha sonrasında fetüsler ve onlara ait plasentalar fotoğraflandı (Şekil 4.2). İlk olarak; gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SRB gruptaki plaseenta ve fetüslerin boyut olarak kontrol grubuna göre daha küçük olduğu makroskopik olarak belirlendi (Şekil 4.2). Önemli bir gözlem olarak, kontrol grubunda rezorbe fetüse rastlanmazken, SRB grupta ise 12. günde 11/85 (%13), 14. günde 15/88 (%17) ve 16. günde 10/97 (%10) oranında rezorbe fetüse rastlandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve SRB gruplardan gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde elde edilen uteruslara ait görüntüler (R: Rezorbe Fetüs).



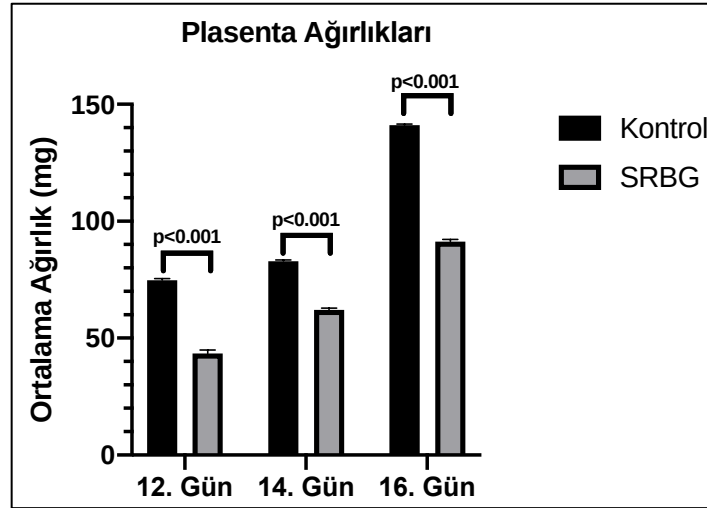
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve SRB gruplardan gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde elde edilen fetüs ve plasentalara ait görüntüler.

4.2. Plasenta Ağırlıkları

Kontrol grubu ve SRB gruplardan elde edilen plasentaların ağırlıkları ölçüldü. Aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek SRB gruplara ait plasenta ağırlıklarının, gebeliğin değerlendirilen tüm günlerinde, kontrol gruplarına kıyasla daha düşük olduğu belirlendi. Sirkadiyen ritmi bozulan gruplara ait plasentalarda gözlenen ağırlık azalışı gebeliğin 12. ($p<0.001$) 14. ($p<0.001$) ve 16. ($p<0.001$) günlerinde istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 4.1) (Şekil 4.3).

Tablo 4.1. Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde plasenta ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart sapma)

Plasenta Ağırlıkları (mg)	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
12. Gün	74.804 $\pm$ 0.607	43.454 $\pm$ 1.487	$p<0.001$
14. Gün	82.985 $\pm$ 0.427	62.071 $\pm$ 0.762	$p<0.001$
16. Gün	141.071 $\pm$ 0.465	91.346 $\pm$ 0.896	$p<0.001$



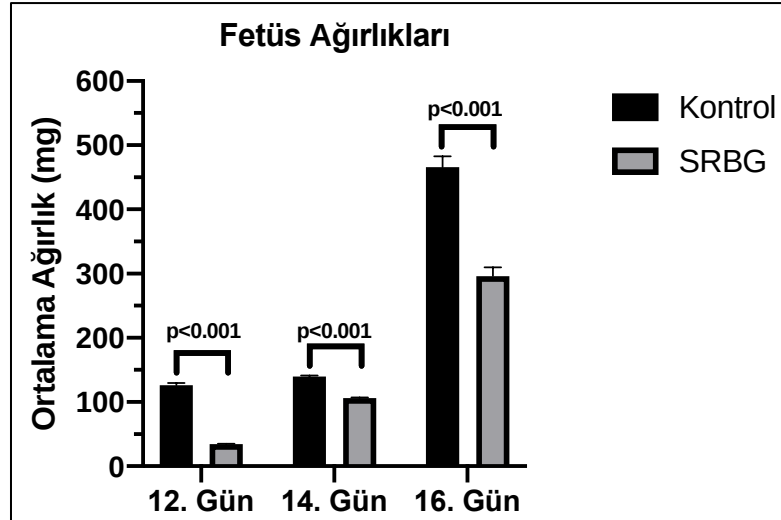
Şekil 4.3. Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde; kontrol grupları ve SRB gruplara ait plasenta ağırlıkları.

4.3. Fetüs Ağırlıkları

Kontrol grubu ve SRB gruplardan elde edilen fetüslerin ağırlıkları ölçüldü. Aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilerek SRB gruplara ait fetüs ağırlıklarının, gebeliğin değerlendirilen tüm günlerinde, kontrol gruplarına kıyasla daha düşük olduğu belirlendi. Sirkadiyen ritmi bozulan gruplara ait fetüslerde gözlenen ağırlık azalışı gebeliğin 12. ($p<0,001$), 14. ($p<0,001$) ve 16. ($p<0,001$) günlerinde istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 4.2) (Şekil 4.4).

Tablo 4.2. Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart sapma)

Fetüs Ağırlıkları (mg)	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
12. Gün	126.308 $\pm$ 3.494	34.574 $\pm$ 0.862	$p<0,001$
14. Gün	139.932 $\pm$ 1.453	106.205 $\pm$ 0.808	$p<0,001$
16. Gün	465.799 $\pm$ 16.924	296.189 $\pm$ 13.447	$p<0,001$



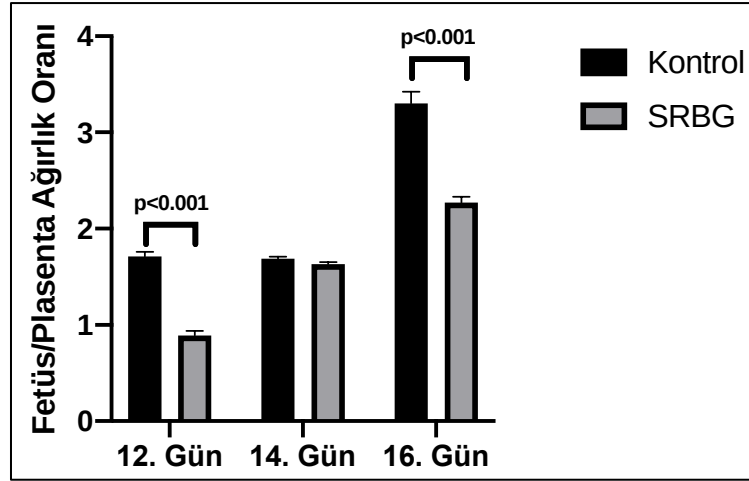
Şekil 4.4. Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde; kontrol grupları ve SRB gruplara ait fetüs ağırlıkları.

4.4. Fetüs/Plasenta Ağırlık Oranlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ve SRB gruplardan elde edilen fetüs/plasenta ağırlık oranları hesaplandı. Bu değerler 12. gün, 14. gün ve 16. gün için kontrol ve SRB gruplarda değerlendirildiğinde; kontrol grubuna oranla SRB grupta 12. ($p<0,001$) ve 16. ($p<0,001$) günde azalma görülmüştür ve azalış anlamlıdır. 14. gün için fetüs/plasenta ağırlık oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,057$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.5).

Tablo 4.3. Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs/plasenta ağırlık oranları (ortalama $\pm$ standart hata)

Fetüs/Plasenta Ağırlık Oranları	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
12. Gün	1.711 $\pm$ 0.047	0.891 $\pm$ 0.046	$p<0,001$
14. Gün	1.689 $\pm$ 0.020	1.632 $\pm$ 0.018	$p=0,057$
16. Gün	3.302 $\pm$ 0.119	2.272 $\pm$ 0.061	$p<0,001$



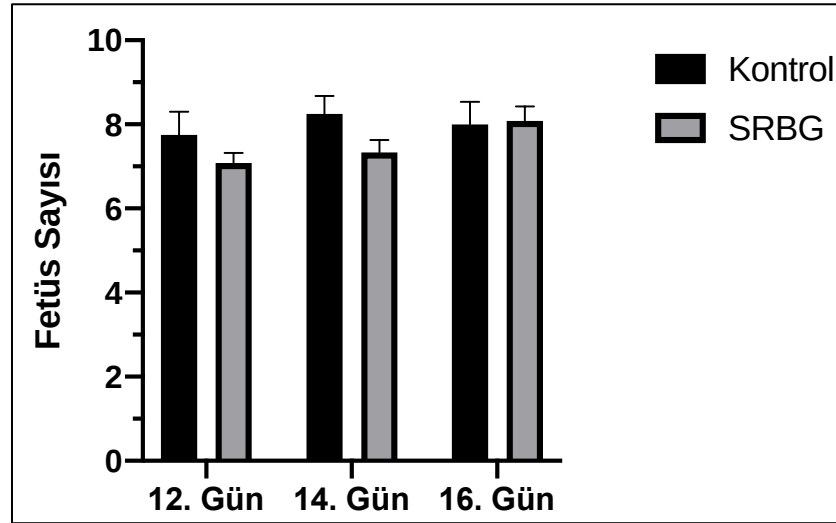
Şekil 4.5. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs/plasenta oranı.

4.5. Fetüs Sayısının Değerlendirilmesi

12. gün, 14. gün ve 16. günlerde kontrol grubu ve SRB gruplardan elde edilen fetüs sayıları değerlendirilmiştir. Tüm günlerde her iki grupta da fetüs sayıları benzer olarak bulunmuştur (12. gün $p=0.628$; 14. gün $p=0.102$; 16. gün $p=0.896$) (Tablo 4.4) (Şekil 4.6).

Tablo 4.4. Kontrol grubu ve SRB grubunda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs sayıları (ortalama $\pm$ standart sapma)

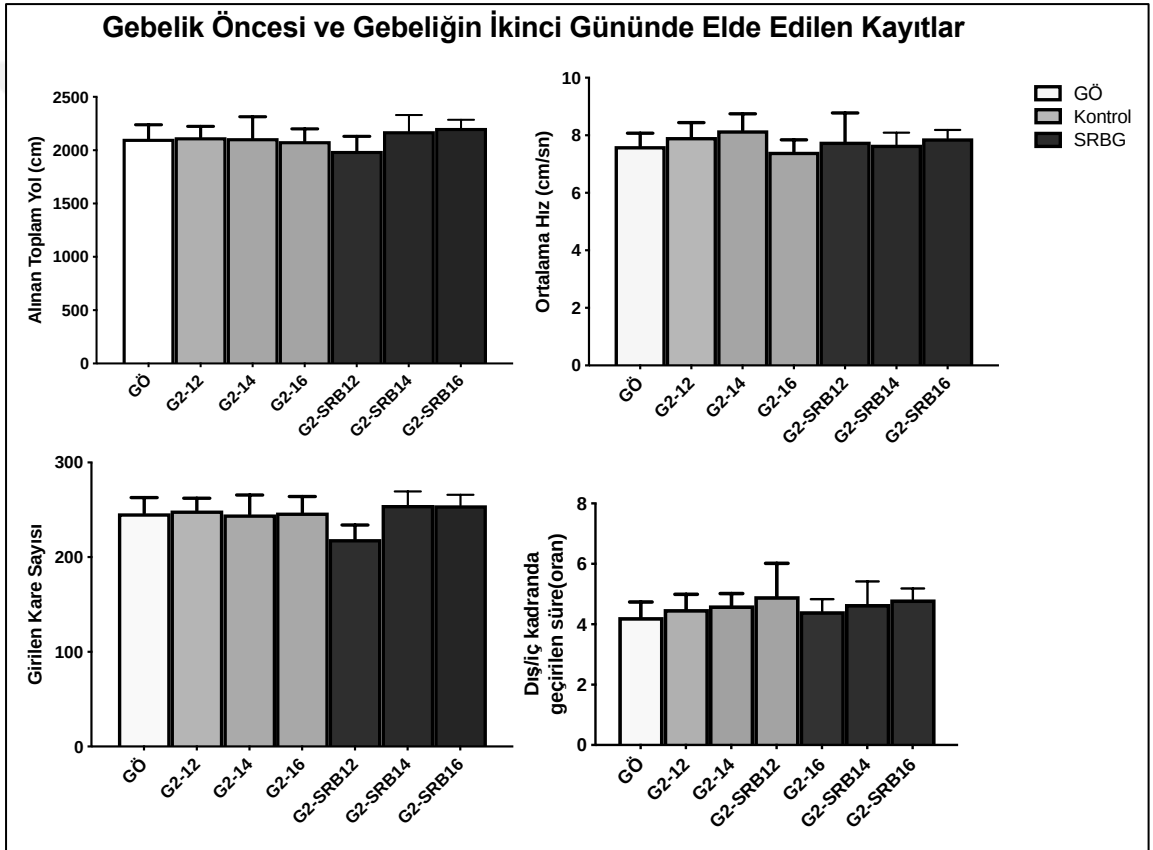
Fetüs Sayısı	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
12. Gün	7.750 $\pm$ 0.552	7.083 $\pm$ 0.229	$p=0.628$
14. Gün	8.250 $\pm$ 0.429	7.333 $\pm$ 0.284	$p=0.102$
16. Gün	8.000 $\pm$ 0.537	8.083 $\pm$ 0.336	$p=0.896$



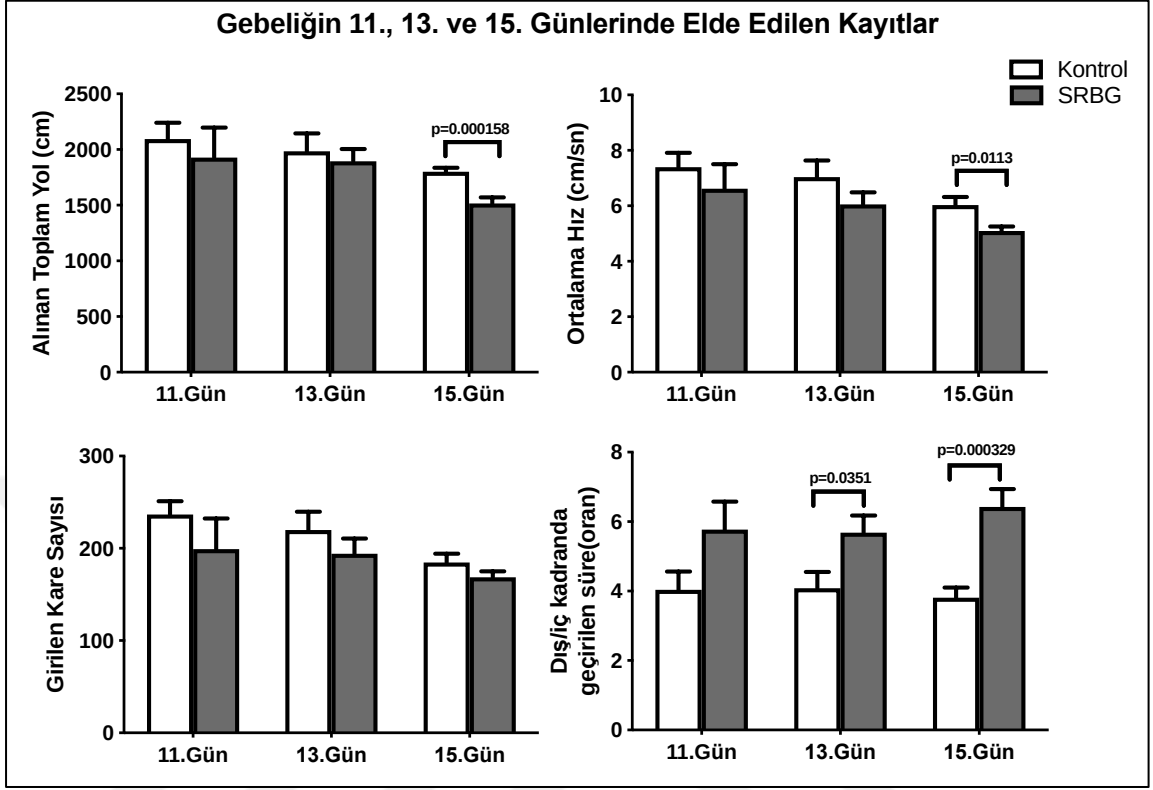
Şekil 4.6. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde fetüs sayıları.

4.6. Lokomotor Aktivite Değerlendirmeleri

Kontrol gruplarında ve SRB gruplarda; gebelik öncesi (GÖ) ve gebeliğin ikinci gününde birinci ve ikinci kayıtlar alındı (Şekil 4.7). Bu değerlendirmeler sonucunda; gebelik öncesinde ve gebeliğin 2. gününde, kontrol ve SRB gruplarında alınan toplam yol, hız, girilen kare sayısı ve iç/dış kadranda geçirilen süre oranında anlamlı bir fark gözlenmedi (Alınan toplam yol $p=0.928$; Ortalama hız $p=0.744$; Girilen kare sayısı $p=0.787$; Dış/İç kadranda geçirilen süre $p=0.979$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol grubu ve SRB gruplarda; gebelik öncesi ve gebeliğin 2. gününde 12, 14, 16 günlük deney gruplarına ait annelerden elde edilen lokomotor aktivite sonuçları (GÖ: Gebelik öncesi; G2-K12: Gebeliğin 2. Gününde Kontrol 12 günlük; G2-K14: Gebeliğin 2. Gününde Kontrol 14 günlük; G2-K16: Gebeliğin 2. Gününde Kontrol 16 günlük; G2-SRB12: Gebeliğin 2. Gününde SRB 12 günlük; G2-SRB14: Gebeliğin 2. Gününde SRB 14 günlük; G2-SRB16: Gebeliğin 2. Gününde SRB 16 günlük).



Şekil 4.8. Kontrol grubu ve SRB gruplarda; gebeliğin 11., 13. ve 15. günlerinde elde edilen lokomotor aktivite sonuçları.

Kontrol gruplarında ve SRB gruplarda, gebeliğin 12, 14, ve 16. günlerindeki lokomotor aktiviteyi değerlendiren üçüncü kayıtlar; gebeliğin 11., 13. ve 15. günlerinde alındı (Şekil 4.8). Sirkadiyen ritimi bozulan gruplarda, kontrol gruplarına oranla girilen kare sayısında azalış görüldü ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Girilen kare sayısı; 11. gün $p=0.338$; 13. gün $p=0.339$, 15. gün $p=0.173$). Alınan toplam yol ve ortalama hız değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla SRB grubunda görülen azalış 11 ve 13. günlerde istatistiksel olarak anlamlı değil iken (11. gün için; alınan toplam yol $p=0.599$, ortalama hız $p=0.467$; 13. gün için; alınan toplam yol $p=0.658$, ortalama hız $p=0.206$), bu azalış gebeliğin 15. gününde istatistiksel olarak anlamlıydı (15. gün için; alınan toplam yol $p=0.000158$, ortalama hız $p=0.0113$) (Şekil 4.8). Bir anksiyete belirtici olan dış/iç kadranda geçirilen süre oranı değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla SRB grupta görülen artış, gebeliğin 11. gününde istatistiksel olarak anlamlı değilken (11. gün için dış/iç kadranda geçirilen süre $p=0.112$), gebeliğin 13. ($p=0.0351$) ve 15. ($p=0.000329$) günlerinde istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.8).

4.7. Kontrol Grubunda ve SRB Grupta Plasenta Kompartmanlarının Değerlendirilmesi

Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde kontrol grupları ve SRB gruplardan elde edilen plasenta kesitlerine rutin hematoksilen-eozin boyaması yapıldı ve kesitler ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

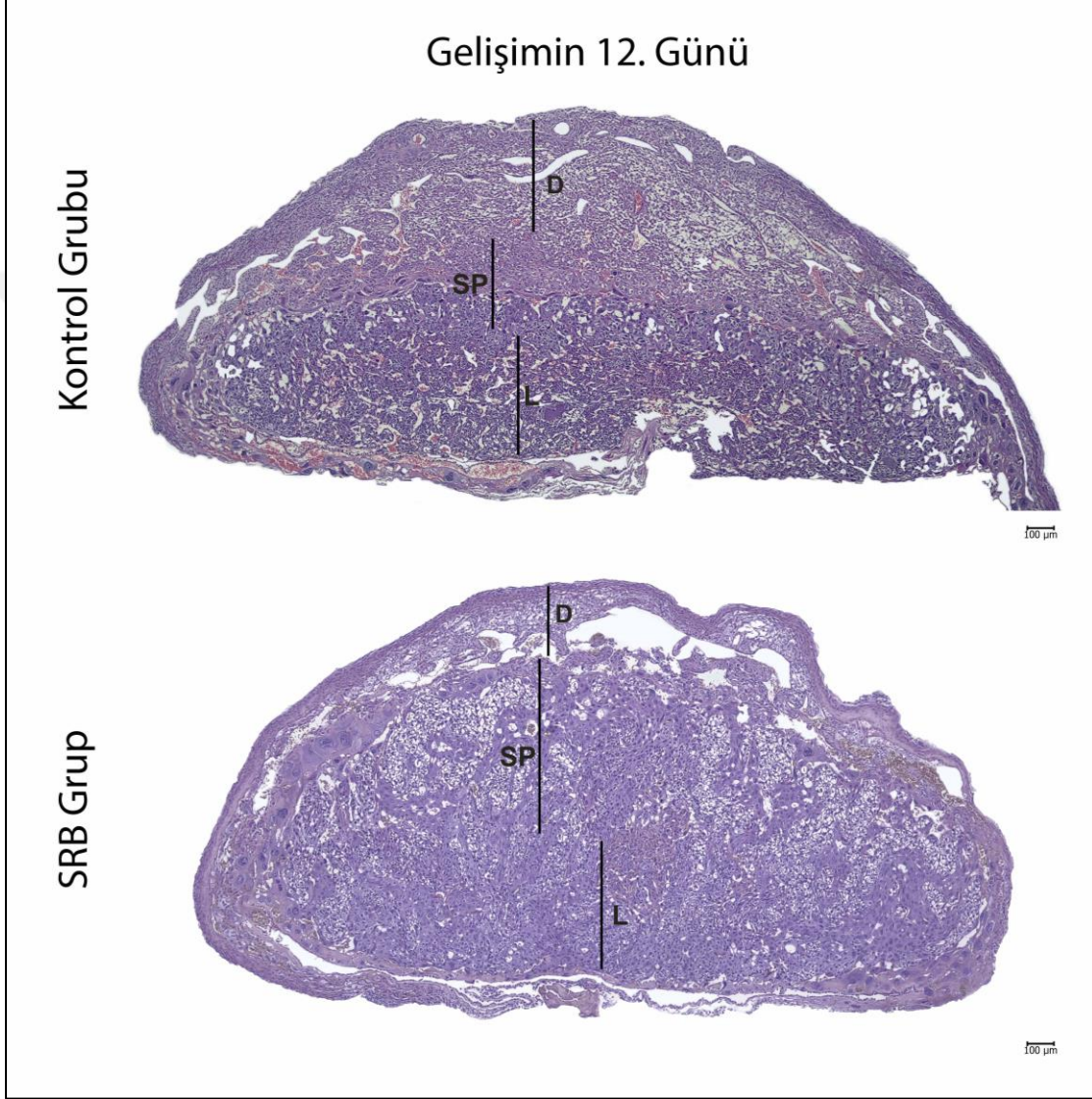
4.7.1. Gelişimin 12. Gününe Ait Bulgular

Gebeliğin 12. günündeki kontrol grubu farelerin plasentalarında; labrint, spongiyotrofoblast ve desidua tabakaları belirgin olarak ayırt edilebildi (Şekil 4.9) Desidua tabakasında desidual hücreler, maternal kan ve glikojenik hücreler gözlendi (Şekil 4.10). Plasentanın labrint tabakasının fetal kan damarları ve fetal kan hücreleri belirgin olarak izlendi (Şekil 4.9 ve dikdörtgen ile büyütülen alan). Labrint tabakanın en dışında ise Reichert membranı ve membranın üzerinde pariyetal endodermal hücreler gözlendi (Şekil 4.10). Spongiyotrofoblast tabakasında; dev trofoblast hücreleri ve spongiyotrofoblast hücreleri gözlendi (Şekil 4.10).

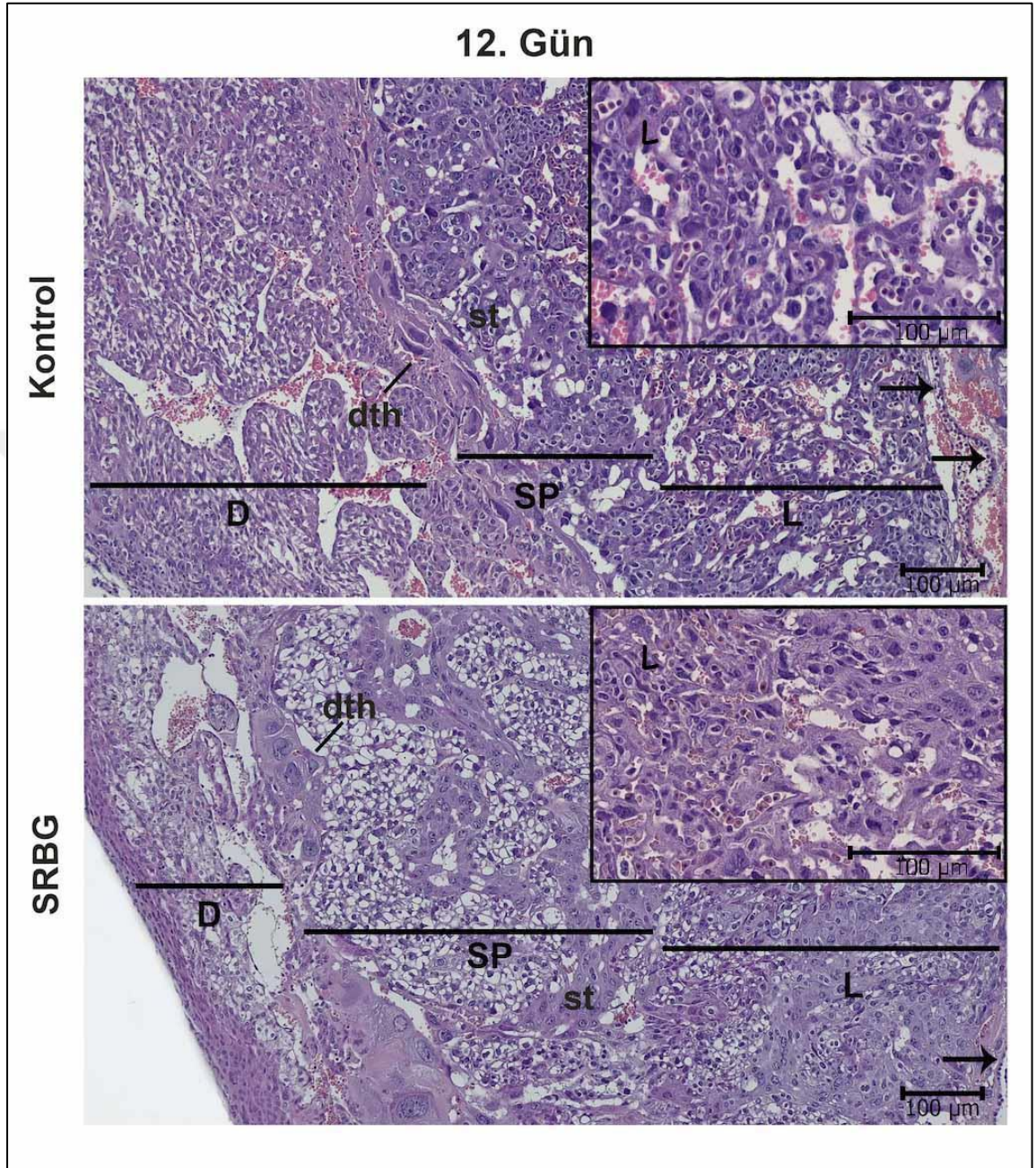
Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait plasenta kesitlerinde; kontrol grubundan farklı olarak üç temel kompartmanın birbirinden keskin sınırlarla ayrılmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Spongiyotrofoblast tabakasında bulunan spongiyotrofoblast hücrelerinin labrint tabakada da bulunmasından dolayı tabakalar iç içe geçmiş gibi görünmektedir. Diğer yandan; spongiyotrofoblast tabakasında, kontrol grubundan farklı olarak, glikojenik hücrelere rastlanmıştır. Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait plasentaların labrint tabakasında kontrol grubuna oranla fetal kan damarları ve fetal kan hücrelerinde azalış görülmüştür. Desidua tabakasında desidual hücreler ve maternal kan gözlendi (Şekil 4.10).

Kontrol grubu ve SRB grubu plasentalarda toplam alan, desidua tabakasının boyutu, labrint tabakasının boyutu ve spongiyotrofoblast tabakasının boyutu değerlendirilmiştir (Şekil 4.11). Kontrol grubu ve SRB grubu plasentaların toplam alanları karşılaştırıldığında; SRB grubunda kontrole göre azalış görülmekle birlikte bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.171$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.11). Kontrol grubu ve SRB grubu plasentaların labrint tabaka boyutları değerlendirildiğinde bir fark gözlenmemiştir ($p=0.860$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.11). Spongiyotrofoblast tabaka boyutları

değerlendirildiğinde, SRB grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken ($p<0.001$), desidua tabaka boyutunda ise SRB grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0.001$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.11).



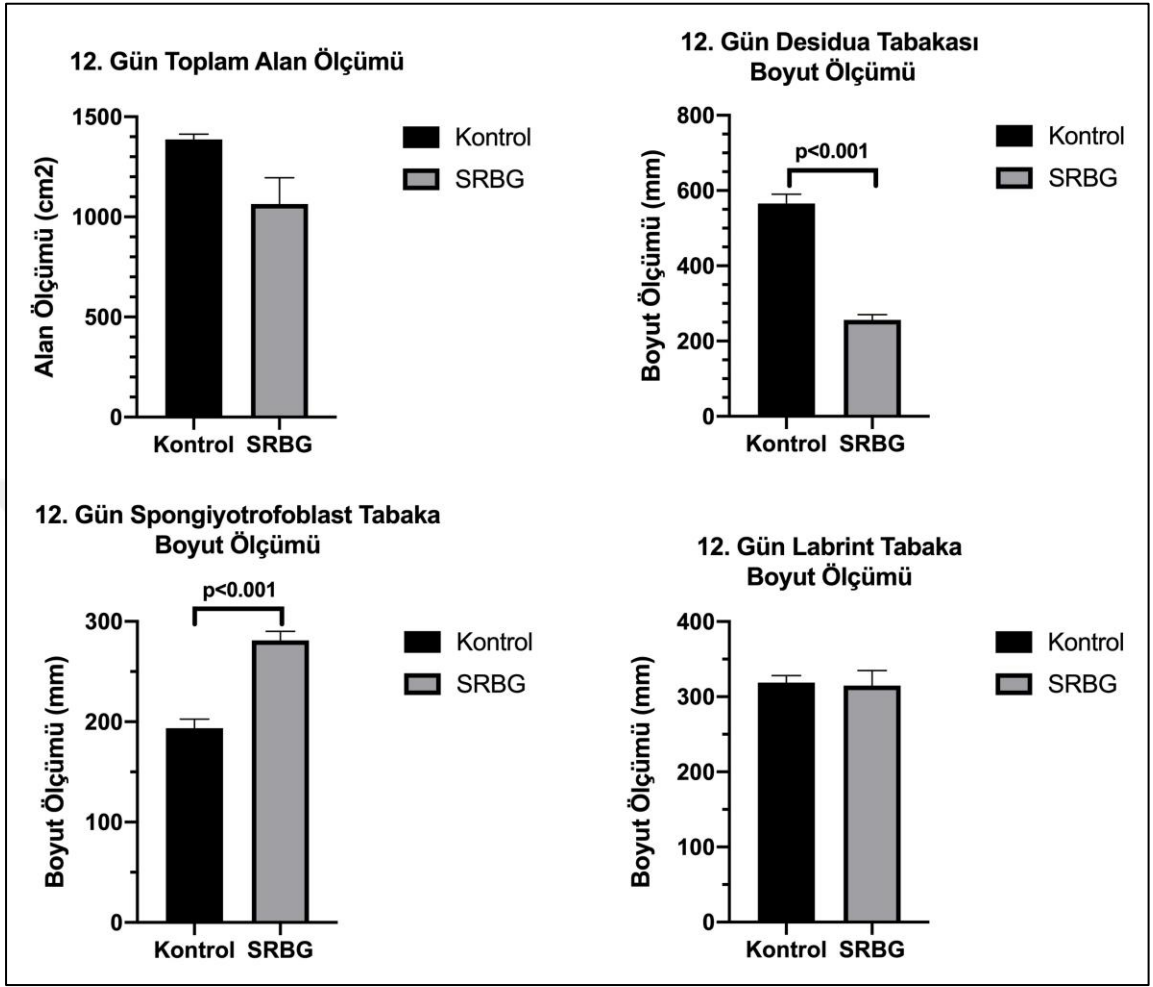
Şekil 4.9. Gebeliğin 12. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 4x büyütmede görüntülenmiş hematoksilin-eozin boyamaları (D:Desidua, Sp: Spongiyotrofoblast, L: Labrint Alan). Plasenta kesitlerinde; diskoid plasantanın tüm kompartmanlarını görecektir şekilde ve göbek kordonundan geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır.



Şekil 4.10. Gebeliğin 12. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 10x büyütmede görüntülenmiş hematoksislen-eozin boyamaları (D:Desidua, SP:Spongiyotrofoblast, L:Labrint Alan, dth:dev trofoblast hücreleri, st:spongiyotrofoblast hücreleri, Ok başları: Reichert membranı.). Plasenta kesitlerinde; diskoid plasantanın tüm kompartmanlarını görececek şekilde ve göbek kordonunun geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır.

Tablo 4.5. Kontrol grubu ve SRB grubunda 12. günde plasenta alan ve boyut ölçümleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Alan ve Boyut Ölçümleri	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
12. Gün Toplam Alan (cm²)	1387.27 $\pm$ 25.324	1164.18 $\pm$ 130.911	p=0.171
12. Gün Desidua Tabakası Boyutu (mm)	565.898 $\pm$ 24.412	256.196 $\pm$ 14.373	p<0.001
12. Gün Spongiyotrofoblast Tabakası Boyutu (mm)	193.583 $\pm$ 5.049	281.167 $\pm$ 5.042	p<0.001
12. Gün Labrint Tabakası Boyutu (mm)	318.833 $\pm$ 5.304	314.917 $\pm$ 11.094	p=0.860



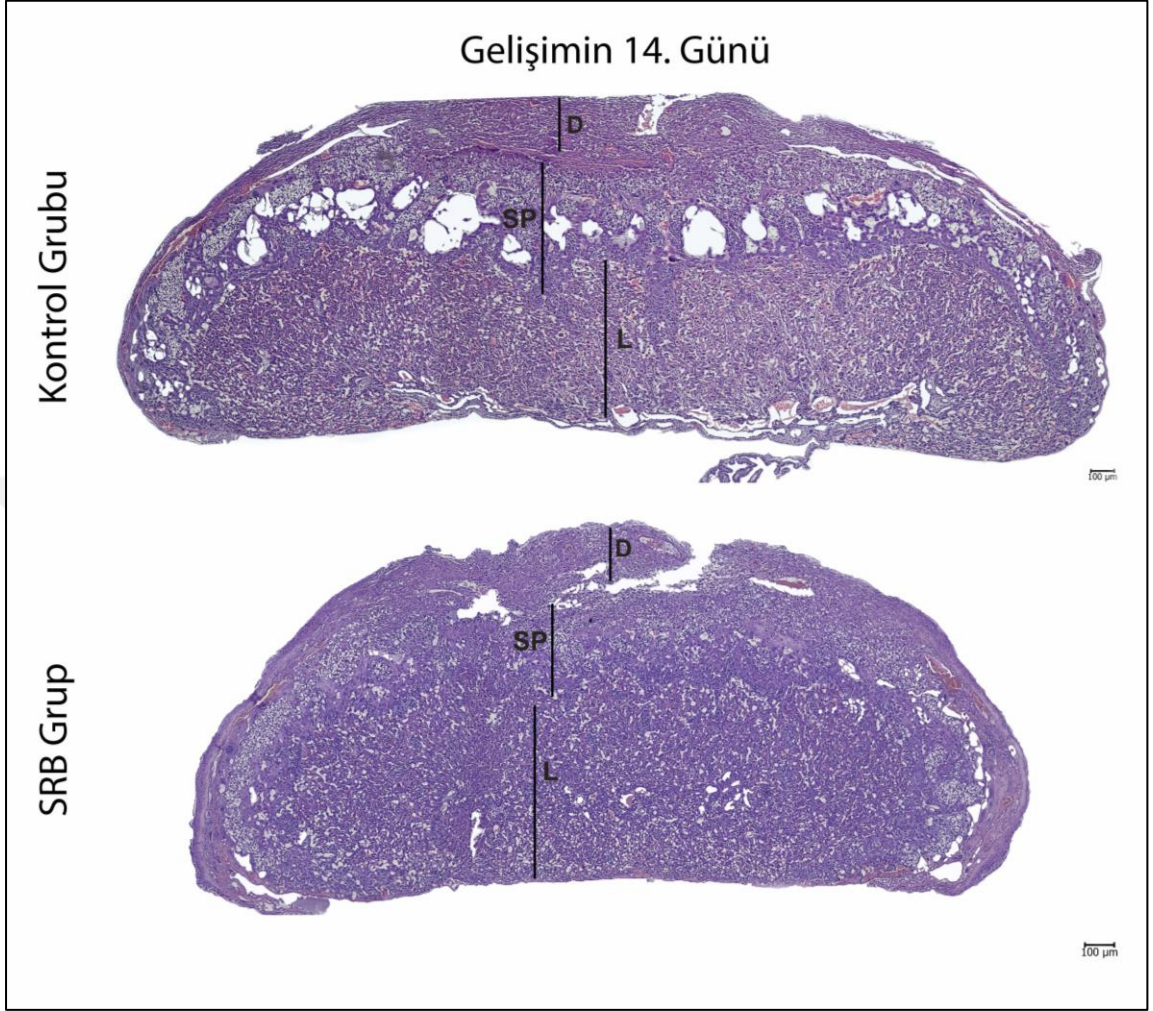
Şekil 4.11. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde toplam plasenta alanı, desidua tabaka boyutu, spongiotrofoblast tabaka boyutu ve labrint tabaka boyutunun değerlendirilmesi.

4.7.2. Gelişimin 14. Gününe Ait Bulgular

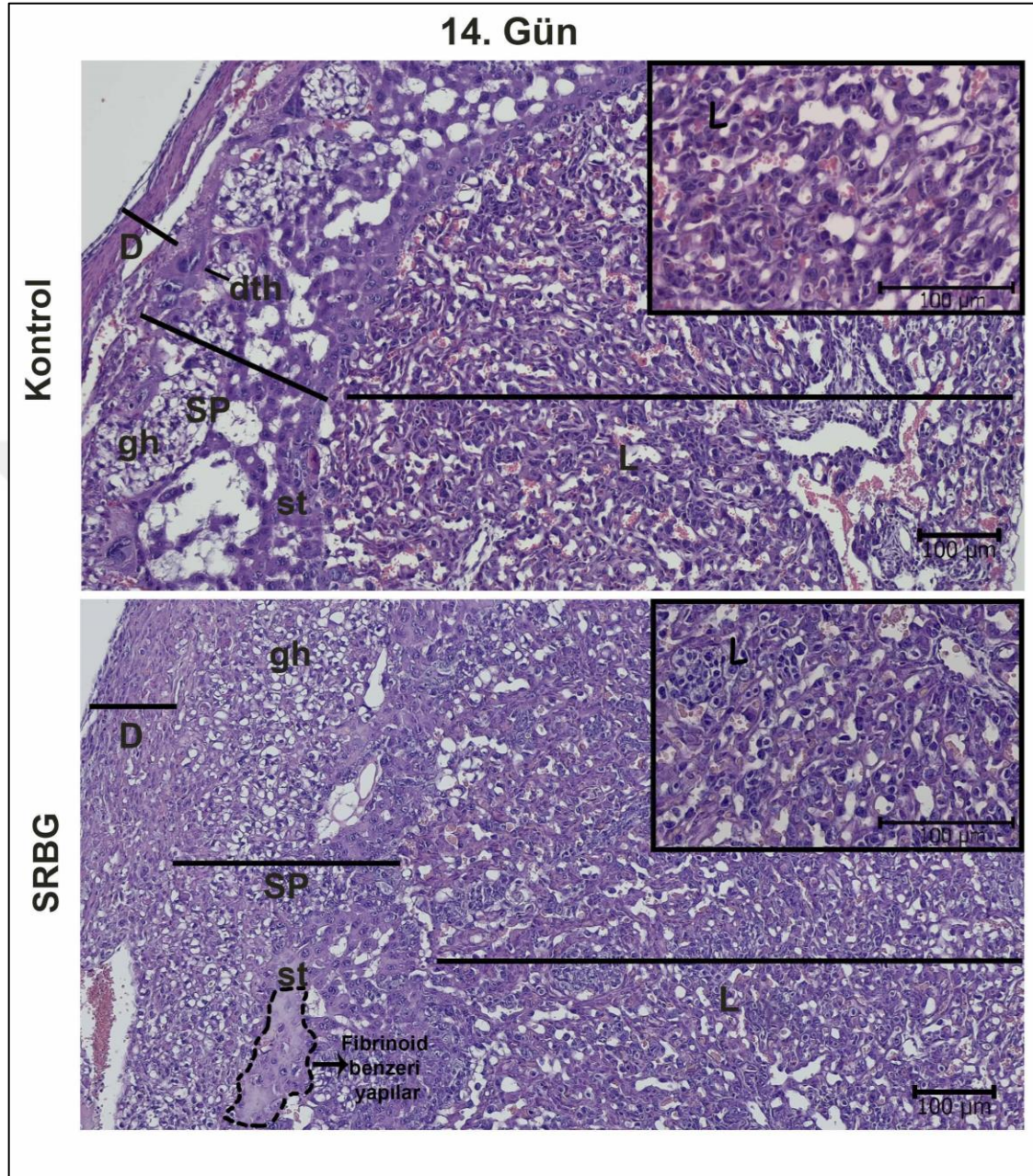
Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda, plasentanın 12. günündeki plasentaya kıyasla belirgin olarak gelişmiş olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). Bu grupta; labrint tabaka daha da gelişmiş ve bu tabakadaki fetal damarlar ile içerdikleri eritroblastlar açıkça ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.13). Spongiyotrofoblast tabakasında; dev trofoblast hücreleri, glikojenik hücreler ve spongiyotrofoblast hücreleri gözlenmiştir (Şekil 4.13). Desidua tabakasında desidual hücreler ve maternal kan gözlendi (Şekil 4.13).

Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait plasentaların kesitlerinde, plasentanın daha küçük boyutlarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12). Desidua tabakasında desidual hücreler ve maternal kan gözlendi (Şekil 4.13). Spongiyotrofoblast tabakasında; spongiyotrofoblast hücreleri ve glikojenik hücreler gözlenmiştir. Aynı zamanda bu tabakada fibrinoid benzeri yapılara rastlanmıştır. (Şekil 4.13) Labrint tabakasında ise; fetal damarlar ve fetal eritroblastlar ayırt edilebilmiştir (Şekil 4.13).

Kontrol grubu ve SRB gruba ait plasentalarda toplam alan, desidua tabakasının boyutu, labrint tabakasının boyutu ve spongiyotrofoblast tabakasının boyutu değerlendirilmiştir (Şekil 4.14). Kontrol grubu ve SRB grubu plasentaların toplam alanları değerlendirildiğinde SRB grubunda azalış görülmektedir, fakat bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.103$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.14). Kontrol grubu ve SRB grubu plasentaların labrint tabaka boyutları değerlendirildiğinde bir fark gözlenmezken ($p=0.852$), spongiyotrofoblast tabaka boyutları değerlendirildiğinde SRB grupta kontrole oranla bir azalış görülmüştür. Bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.551$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.14). Desidua tabaka boyutu değerlendirildiğinde SRB grupta kontrole oranla anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p=0.037$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.14).



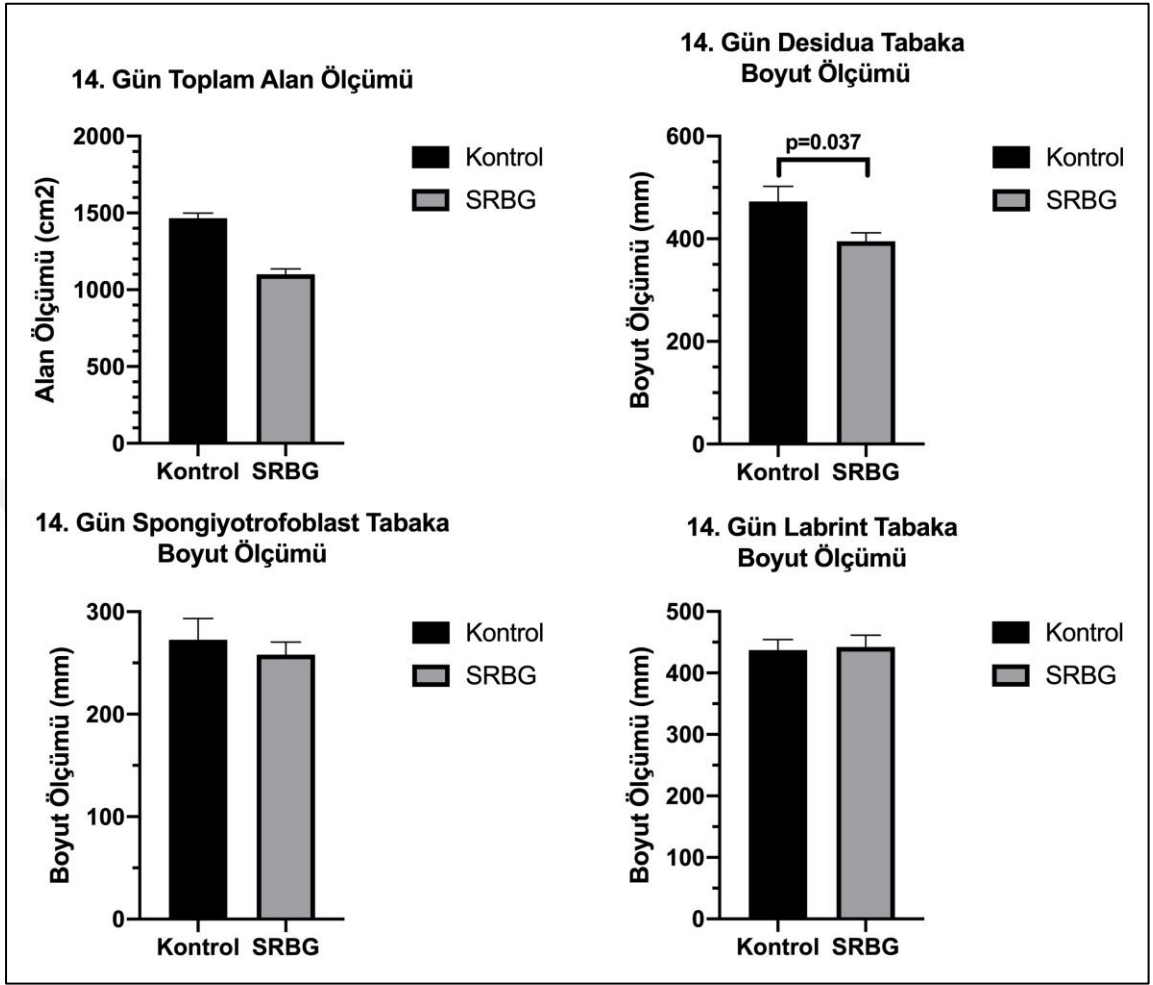
Şekil 4.12. Gebeliğin 14. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 4x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları (D:Desidua, Sp: Spongiyotrofoblast, L: Labrint Alan). Plasenta kesitlerinde; diskoid plasentanın tüm kompartmanlarını görecek şekilde ve göbek kordonunun geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır.



Şekil 4.13. Gebeliğin 14. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 10x ve 20x büyütmede görüntülenmiş hematoksilin-eozin boyamaları (D:Desidua, SP: Spongiyotrofoblast, L: Labrint Alan, st: spongiyotrofoblast hücreleri, gh: glikojenik hücreler). Plasenta kesitlerinde; diskoid plasentanın tüm kompartmanlarını görecek şekilde ve göbek kordonunun geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır.

Tablo 4.6. Kontrol grubu ve SRB grubunda 14. günde plasenta alan ve boyut ölçümleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Alan ve Boyut Ölçümleri	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
14. Gün Toplam Alan (cm²)	1466.582 $\pm$ 32.061	1100.077 $\pm$ 36.065	p=0.103
14. Gün Desidua Tabakası Boyutu (mm)	472.838 $\pm$ 29.446	395.133 $\pm$ 16.541	p=0.037
14. Gün Spongiyotrofoblast Tabakası Boyutu (mm)	272.667 $\pm$ 11.580	258.083 $\pm$ 6.958	p=0.551
14. Gün Labrint Tabakası Boyutu (mm)	437.250 $\pm$ 9.669	442.167 $\pm$ 10.876	p=0.852



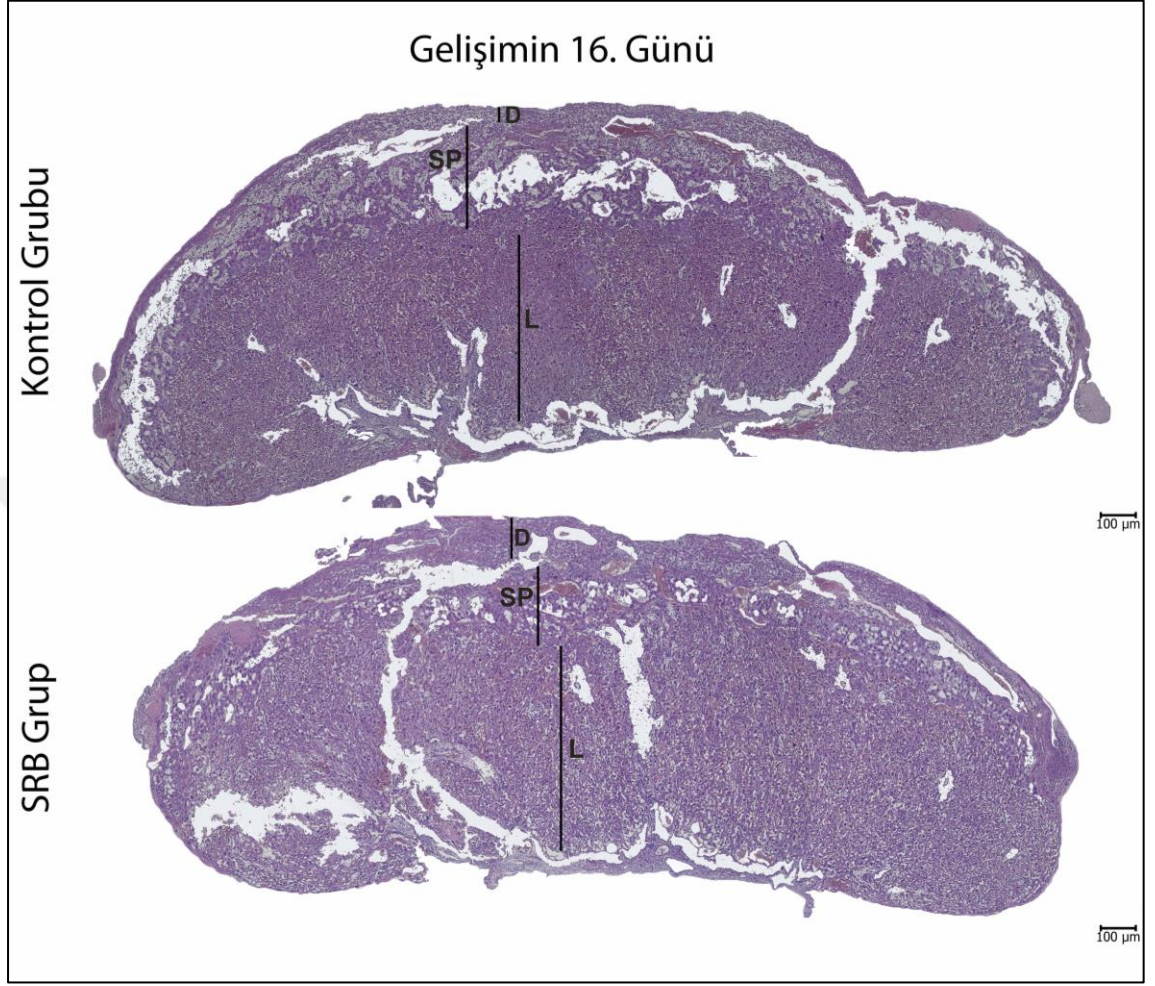
Şekil 4.14. Kontrol ve SRB gruplarda 14. günde toplam plasenta alanı, desidua tabaka boyutu, spongiyotrofoblast tabaka boyutu ve labrint tabaka boyutunun değerlendirilmesi.

4.7.3. Gelişimin 16. Gününe Ait Bulgular

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda; plasentanın labrint tabakasının büyümeye devam ettiği ve en geniş kompartman halini aldığı gözlemlendi (Şekil 4.15). Bu grupta; labrint tabakadaki fetal damarlar ile içerdikleri eritroblastlar açıkça ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.16). Spongiyotrofoblast tabakasında; glikojenik hücreler ve spongiyotrofoblast hücreleri görülmüştür (Şekil 4.15). Desidua tabakasında ise; desidual hücreler ve maternal kan gözlenmiştir (Şekil 4.16).

Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait plasentaların kesitlerinde, plasentanın daha küçük boyutlarda olduğu ve spongiyotrofoblast tabakasının boyutunun kontrol grubuna göre küçüldüğü görülmüştür (Şekil 4.15). Desidua tabakasında; desidual hücreler ve maternal kan gözlenmiştir (Şekil 4.16). Spongiyotrofoblast tabakasında; glikojenik hücreler ve maternal kan gözlenirken, labrint tabakasında fetal damarlar ve eritroblastlar gözlenmiştir (Şekil 4.16).

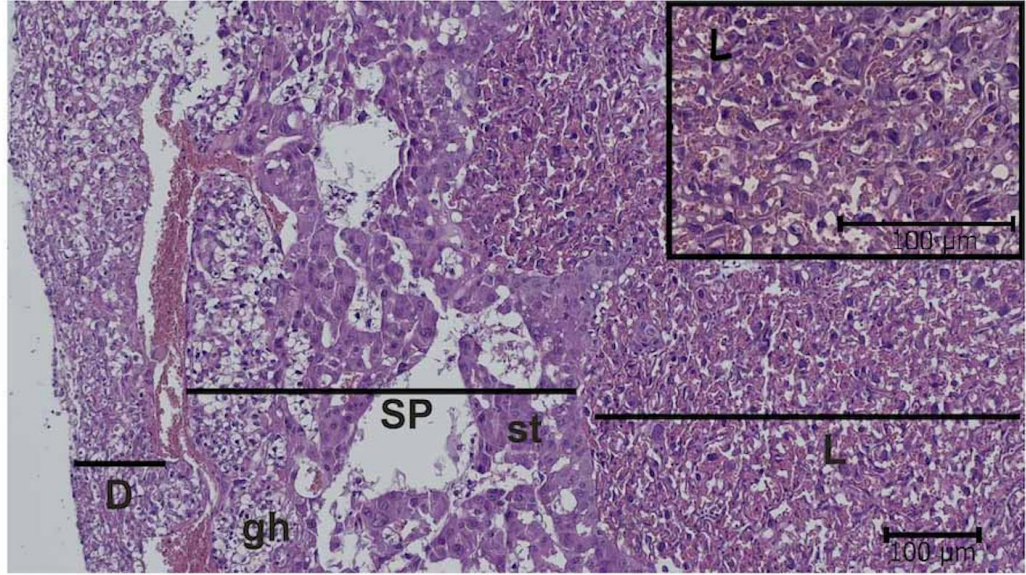
Kontrol grubu ve SRB gruba ait plasentalarda toplam alan, desidua tabakasının boyutu, labrint tabakasının boyutu ve spongiyotrofoblast tabakasının boyutu değerlendirilmiştir (Şekil 4.17). Kontrol grubu ve SRB grubu plasentaların toplam alanları değerlendirildiğinde SRB grubunda anlamlı bir azalış görülmektedir ($p<0.001$) (Tablo 4.7) (Şekil 4.17). Kontrol grubu ve SRB grubu plasentaların labrint tabaka boyutları değerlendirildiğinde bir azalış gözlenmiştir fakat bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.583$) (Tablo 4.7) (Şekil 4.17). Spongiyotrofoblast tabaka boyutları değerlendirildiğinde SRB grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür ($p<0.001$) (Tablo 4.7) (Şekil 4.17). Desidual tabaka boyutları değerlendirildiğinde ise, SRB grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0.003$) (Tablo 4.7) (Şekil 4.17).



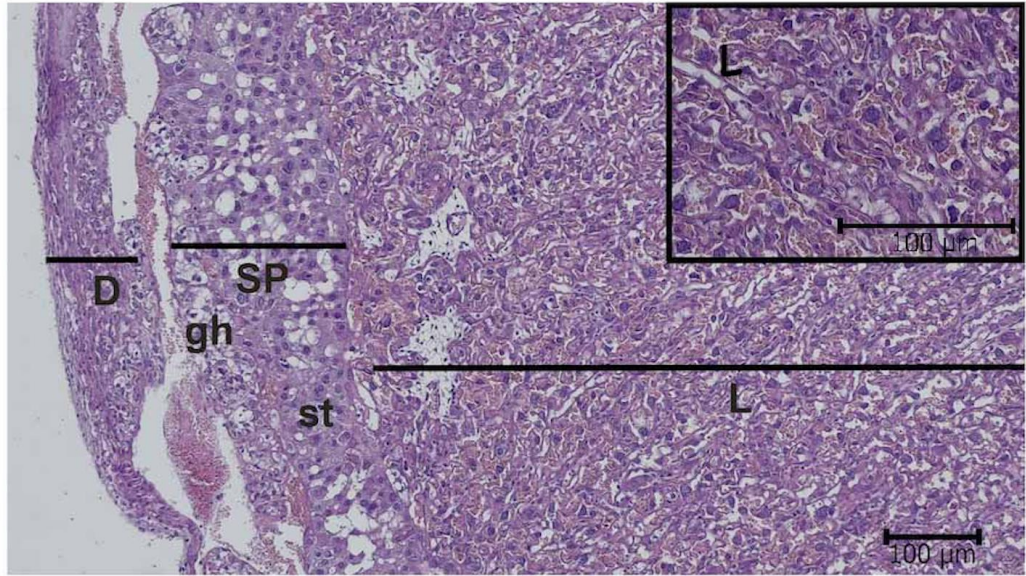
Şekil 4.15. Gebeliğin 16. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 4x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları (D:Desidua, SP: Spongiyotrofoblast, L: Labrint Alan). Plasenta kesitlerinde; diskoid plasantanın tüm kompartmanlarını görececek şekilde ve göbek kordonunun geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır.

16. Gün

Kontrol



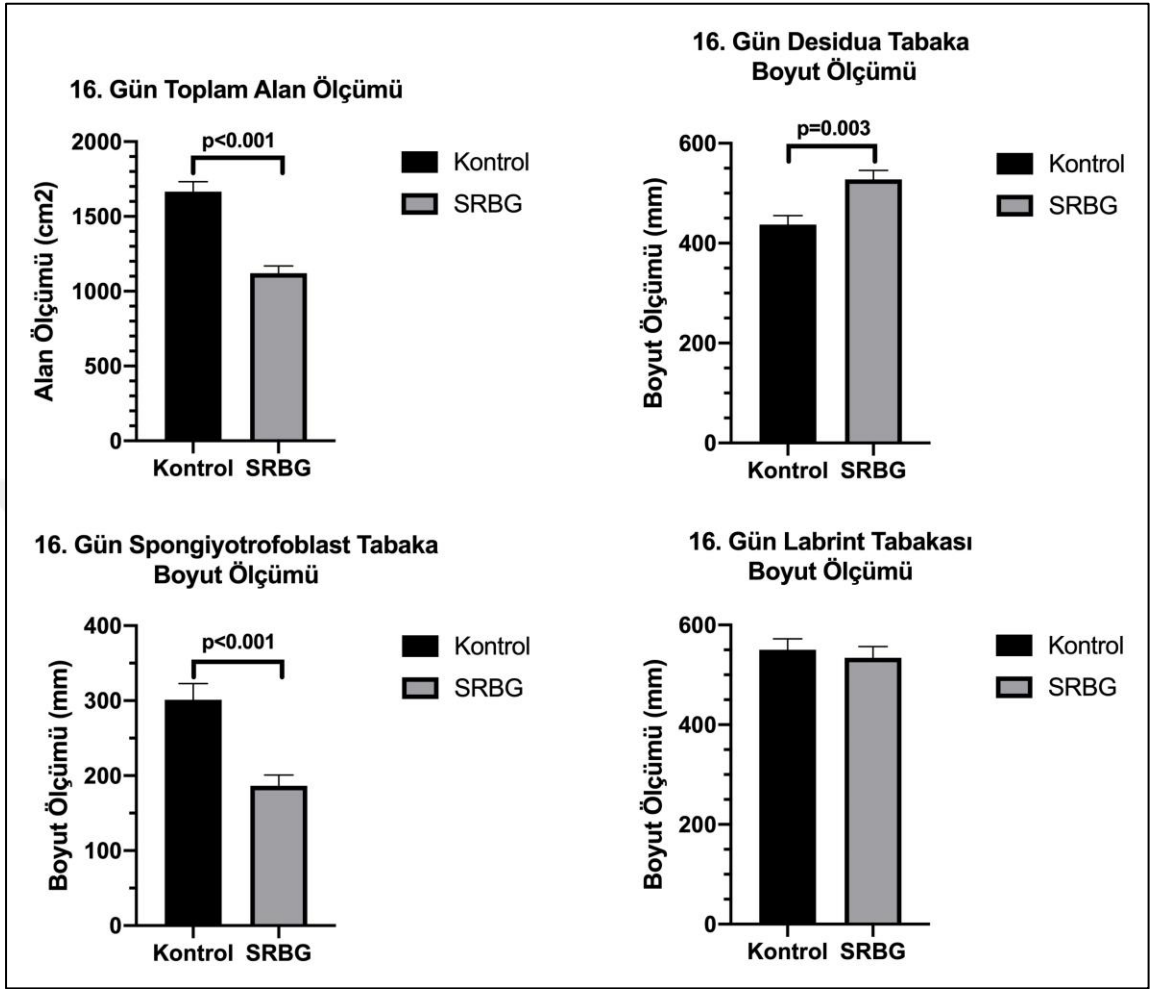
SRBG



Şekil 4.16. Gebeliğin 16. gününde kontrol grubu ve SRB gruplarından elde edilen plasenta kesitlerinin 10x ve 20x büyütmede görüntülenmiş hematoksilen-eozin boyamaları (D:Desidua, SP: Spongiyotrofoblast, L: Labrint Alan, st: Spongiyotrofoblast hücreleri, gh: Glikojenik hücreler). Plasenta kesitlerinde; diskoid plasantanın tüm kompartmanlarını görecek şekilde ve göbek kordonunudan geçen kesitler elde edilerek, tüm gruplar için standardizasyon sağlanmıştır.

Tablo 4.7. Kontrol grubu ve SRB grubunda 16. günde plasenta alan ve boyut ölçümleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Alan ve Boyut Ölçümleri	Kontrol grubu Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	SRB Grup Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM)	P değeri
16. Gün Toplam Alan (cm²)	1665.496 $\pm$ 66.849	1121.265 $\pm$ 48.139	p<0.001
16. Gün Desidua Tabakası Boyutu (mm)	437.288 $\pm$ 17.769	527.529 $\pm$ 18.239	p=0.003
16. Gün Spongiyotrofoblast Tabakası Boyutu (mm)	301.083 $\pm$ 12.250	186.500 $\pm$ 7.957	p<0.001
16. Gün Labrint Tabakası Boyutu (mm)	550.083 $\pm$ 12.518	544.972 $\pm$ 11.518	p=0.583



Şekil 4.17. Kontrol ve SRB gruplarda 16. günde toplam plasenta alanı, desidua tabaka boyutu, spongiyotrofoblast tabaka boyutu ve labrint tabaka boyutunun değerlendirilmesi.

4.8. qRT-PZR Bulguları

Gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde kontrol grupları ve SRB gruplardan elde edilen plasenta dokularında qRT-PZR metoduyla *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* ekspresyonları değerlendirildi.

4.8.1. Gebeliğin Farklı Günlerinde Sirkadiyen Saat Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Kontrol grubu ve SRB gruba ait gebeliğin 12., 14. ve 16. Günlerindeki plasentalarda *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* mRNA ekspresyonları qRT-PZR ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilen tüm genlerin ekspresyonlarının gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinden elde edilen plasentalarda var olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18) (Şekil 4.19).

Bmal1

Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Bmal1* gen ekspresyon seviyesinin artan gelişim günlerine paralel olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.18). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Bmal1* ekspresyon seviyesinin plasentanın gelişim günlerine göre arttığı gözlenmiştir ancak bu genin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre düşüktür ($p<0.001$) (Şekil 4.28). Gebeliğin 12. gününde SRB grubunda *Bmal1* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 14. gününde, SRB grubunda *Bmal1* gen ekspresyon seviyesi kontrole göre azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.171$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 16.gününde ise, SRB grubunda *Bmal1* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.303$) (Şekil 4.18).

Clock

Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Clock* gen ekspresyon seviyesinin artan gelişim günlerine paralel olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.18). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, plasenta gelişim günlerinde *Clock* ekspresyon seviyesi benzerdir ($p=0.426$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 12. gününde SRB grubunda *Clock* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuyla benzerdir ($p=0.562$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 14. gününde, SRB grubunda *Clock* gen ekspresyon

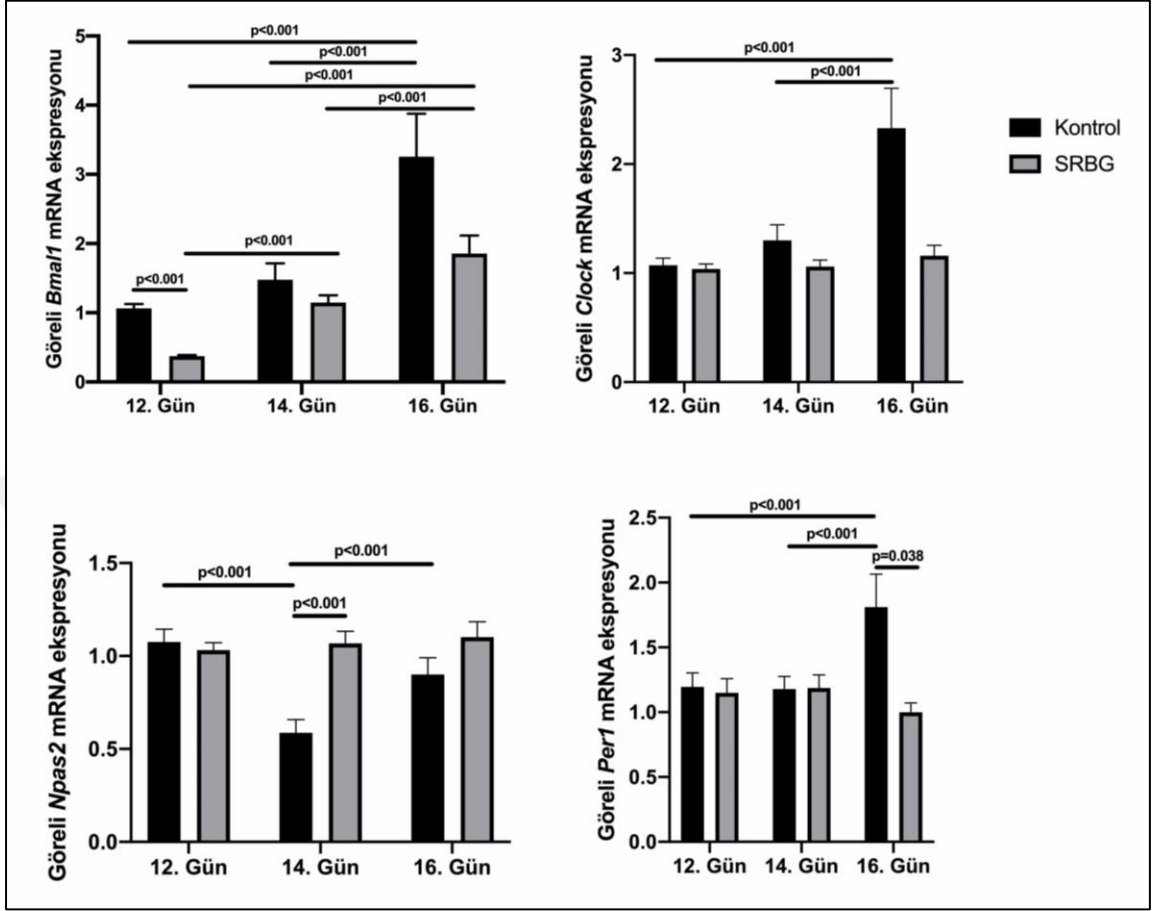
seviyesi kontrole göre azalmıştı ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.585$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 16.gününde ise, SRB grubunda *Clock* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.277$) (Şekil 4.18).

Npas2

Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Npas2* gen ekspresyon seviyesinin günlere göre değiştiği gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.18). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, plaseenta gelişim günlerinde *Npas2* ekspresyon seviyesi benzerdir ($p=0.745$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 12. gününde SRB grubunda, *Npas2* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuyla benzerdir ($p=0.585$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 14. gününde, SRB grubunda *Npas2* gen ekspresyon seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 16.gününde ise, SRB grubunda *Npas2* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.102$) (Şekil 4.18).

Per1

Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Per1* gen ekspresyon seviyesi 12. ve 14. günlerde benzer iken ($p=0.012$), 16. günde anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.18). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per1* ekspresyon seviyesi 12. ve 14. günlerde benzer iken ($p=0.338$), 16. günde azalmıştır. Bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.338$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 12. ve 14 günlerinde SRB grubunda, *Per1* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuyla benzerdir (12. gün için $p=0.624$, 14. gün için $p=0.853$) (Şekil 4.18). Gebeliğin 16. gününde, SRB grubunda *Per1* gen ekspresyon seviyesi kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p=0.038$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde *Bmal1*, *Clock*, *Npas2* ve *Per1* mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve Holm-Sidak pos hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve SRB grup verileri ZT zaman dilimlerine göre Student's t testi ile değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Per2

Kontrol grubunda plasantanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Per2* gen ekspresyon seviyesinin günlere göre değişmediği, benzer olduğu gözlenmiştir ($p=0.806$) (Şekil 4.19). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta da kontrole benzer şekilde, *Per2* ekspresyon seviyesi gelişim günlerinde benzerdir ($p=0.987$) (Şekil 4.19). Tüm gebelik günlerinde SRB grubunda *Per2* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna oranla azalmıştır. Ancak bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (12. gün için $p=0.870$, 14. gün için $p=0.942$, 16. gün için $p=0.853$) (Şekil 4.19).

Per3

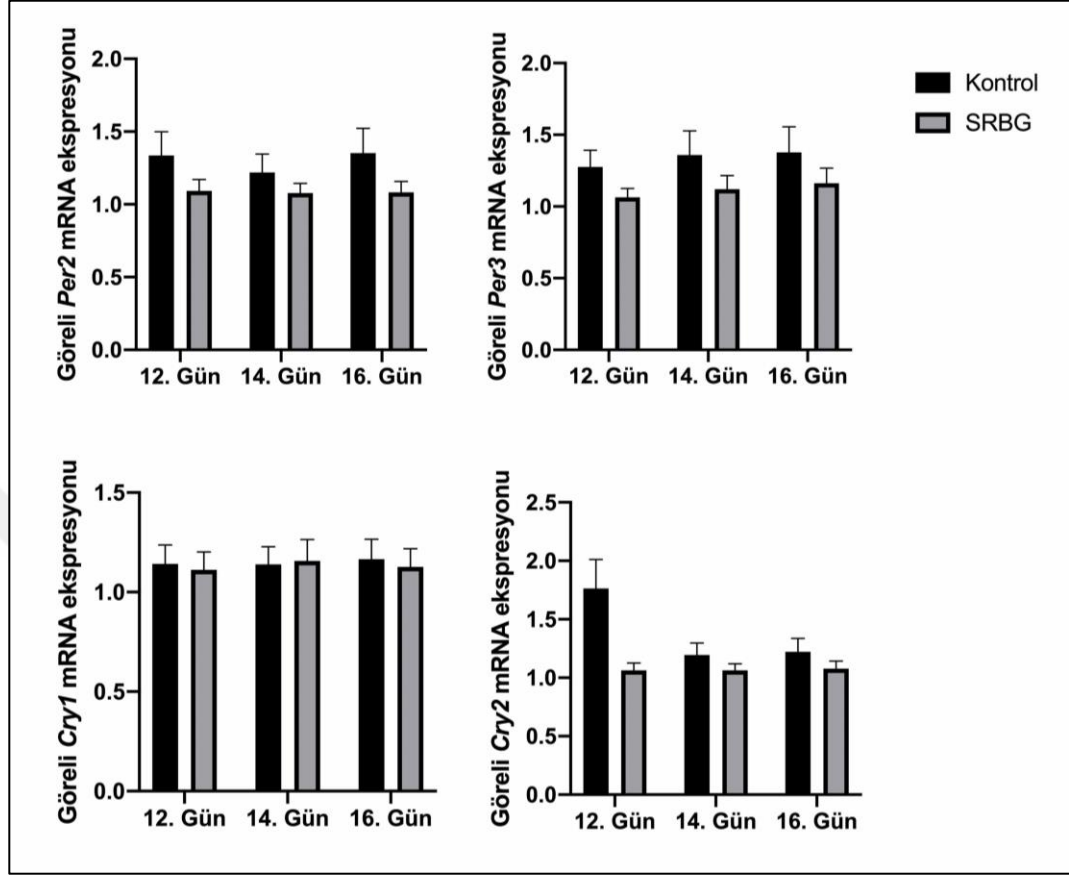
Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Per3* gen ekspresyon seviyesinin günlere göre değişmediği, benzer olduğu gözlenmiştir ($p=0.891$) (Şekil 4.19). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta da kontrole benzer şekilde, *Per3* ekspresyon seviyesi gelişim günlerinde benzerdir ($p=0.736$) (Şekil 4.19). Tüm gebelik günlerinde SRB grubunda *Per3* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (12. gün için $p=0.076$, 14. gün için $p=0.731$, 16. gün için $p=0.933$) (Şekil 4.19).

Cry1

Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Cry1* gen ekspresyon seviyesinin günlere göre benzer olduğu gözlenmiştir ($p=0.977$) (Şekil 4.19). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta da kontrole benzer şekilde, *Cry1* ekspresyon seviyesi gelişim günlerinde benzerdir ($p=0.945$) (Şekil 4.19). Tüm gebelik günlerinde SRB grubunda *Cry1* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna benzerdir (12. gün için $p=0.978$, 14. gün için $p=0.951$, 16. gün için $p=0.763$) (Şekil 4.19).

Cry2

Kontrol grubunda plasentanın farklı gelişim günlerinde (12.gün, 14.gün ve 16.gün) *Cry2* gen ekspresyon seviyesi 12.günde yüksek iken 14. ve 16. günlerde azalmıştır. Bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.051$) (Şekil 4.19). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry2* ekspresyon seviyesi gelişim günlerinde benzerdir ($p=0.978$) (Şekil 4.19). Gebeliğin 12. gününde SRB grubunda *Cry2* ekspresyon seviyesi kontrole göre azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.996$) (Şekil 4.19). Gebeliğin 14. ve 16. günlerinde ise SRB grubunda *Cry2* gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuyla benzerdir (14. gün için $p=0.359$, 16. gün için $p=0.489$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve Holm-Sidak pos hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve SRB grup verileri ZT zaman dilimlerine göre Student's t testi ile değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.8.2. Gebelik Günlerinde Sirkadiyen Gen mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Günlük Ritmikliği

Kontrol grubu ve SRB gruba ait gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerindeki plasentalardaki ZT zaman noktalarında (ZT0, ZT6, ZT12, ZT18) *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* mRNA ritmik ekspresyonları qRT-PZR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sonrası örnekler jelde yürütülerek de görüntülenmiştir.

12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Bmal1*

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Bmal1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6, ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta kontrol grubuna benzer şekilde *Bmal1* ekspresyon

seviyesi ZT6, ZT12 ve ZT18'de ZT0 zaman dilimine göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre *Bmal1* ekspresyonu ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18 zaman dilimlerinde anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

Gebeliğin 14.gününde kontrol grubunda *Bmal1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında pik yaparken, ZT12 ve ZT18 zaman noktalarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrole benzer şekilde *Bmal1* ekspresyonu ZT6 zaman noktasında pik yaparken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18 zaman noktalarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0, ZT12 ve ZT18 zaman dilimlerinde anlamlı olarak artış gösterirken, ZT6'da anlamlı olarak azalmıştır (ZT0 için $p=0.031$, ZT6 için $p<0.001$, ZT12 için $p<0.001$, ZT18 için $p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Bmal1* ekspresyon seviyesi ZT0'a göre ZT6 zaman noktasında pik yaparken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18 zaman noktalarında azalış göstermektedir ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta ise, ZT0'a göre ZT6 ve ZT12 zaman noktalarında artış gözlenirken ($p<0.001$), ZT18'de azalmıştır ($p<0.001$). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Bmal1* ekspresyon seviyesi kontrole göre ZT0 ve ZT6 zaman noktalarında ekspresyon seviyesi düşükken (ZT0 için $p=0.002$, ZT6 için $p<0.001$), ZT12 zaman noktasında anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

12. gün, 14. Gün ve 16. Gün Clock

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Clock* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Clock* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0, ZT6 ve ZT18 zaman dilimlerinde *Clock* ekspresyon seviyesi anlamlı

olarak azalırken, ZT12de anlamlı olarak artmıştır (ZT0 için $p<0.001$, ZT6 için $p<0.001$, ZT12 için $p<0.001$, ZT18 için $p=0.008$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Clock* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında pik yaparken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Clock* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT6 ve ZT18 zaman dilimlerinde *Clock* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

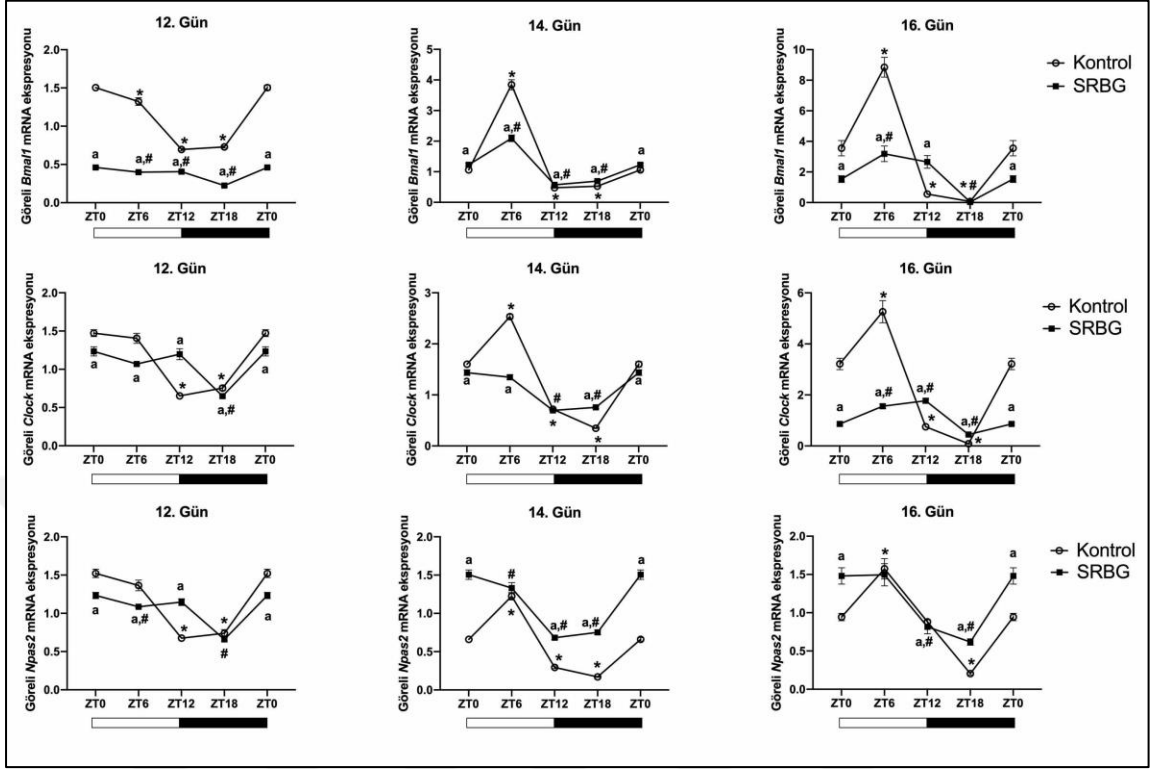
Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Clock* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında pik yaparken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Clock* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 ve ZT12’de anlamlı olarak artarken ($p<0.001$), ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Clock* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre ZT0 ve ZT6 zaman noktalarında anlamlı azalış gözlenirken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18 zaman dilimlerinde ise anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Npas2*

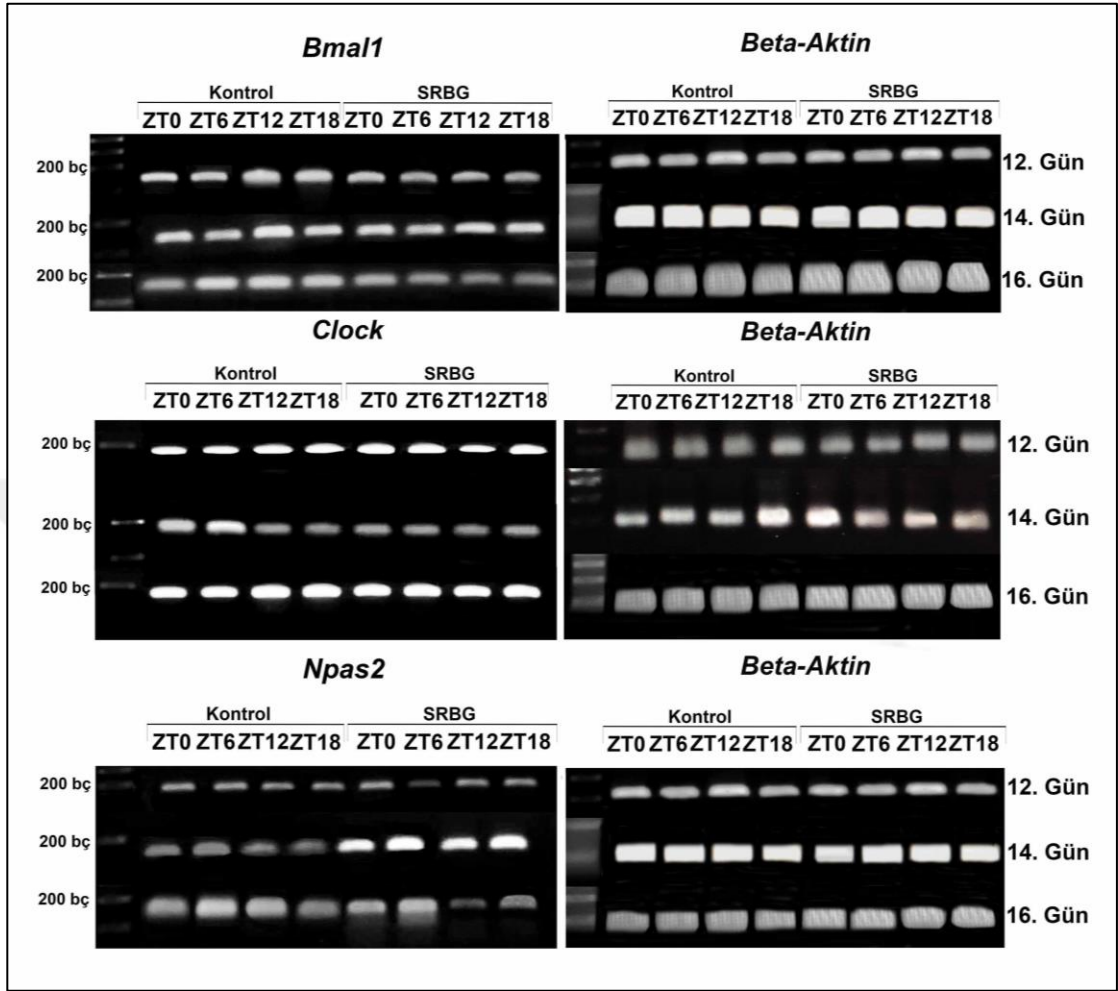
Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Npas2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Npas2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0 ve ZT6 zaman dilimlerinde *Npas2* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalırken ($p<0.001$), ZT12de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Npas2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında pik yaparken, ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Npas2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6, ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0, ZT12 ve ZT18 zaman dilimlerinde *Npas2* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Npas2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında pik yaparken ($p<0.001$), ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Npas2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.20). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0 ve ZT18 zaman noktalarında anlamlı artış gözlenirken ($p<0.001$), ZT12'de ise *Npas2* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.01$) (Şekil 4.20). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde *Bmal1*, *Clock* ve *Npas2* mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve Holm-Sidak pos hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve SRB grup verileri ZT zaman dilimlerine göre Student's t testi ile değerlendirilmiştir. *; kontrol grubu için ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı, #; SRB grubu için ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı, a; kontrol ve SRB grupları arasında ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı ifade etmektedir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.21. Kontrol ve SRB gruplarda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde *Bmal1*, *Clock*, *Npas2* ve *Beta-aktin* genlerinin jel görüntüleri (*Bmal1*=183 bç, *Clock*=189 bç, *Npas2*=175 bç, *Beta-aktin*=74 bç).

12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Per1*

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Per1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6'da azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak artmış ve ZT12'de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18'de anlamlı olarak artmıştır ve kontrol grubunsa benzer şekilde ZT12 pik noktasıdır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT6 zaman diliminde anlamlı olarak artarken ($p<0.001$), ZT0 ve ZT18 zaman dilimlerinde *Per1* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır (ZT0 için $p=0.006$, ZT18 için $p<0.001$) (Şekil 4.22). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Per1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre *Per1* ekspresyon seviyesi benzerdir. Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Per1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 zaman noktasında pik yaparken ($p<0.001$), ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da anlamlı azalış gösterirken ($p<0.001$), ZT12’de anlamlı olarak artmıştır ($p=0.003$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per1* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre ZT6 zaman noktasında anlamlı artış gözlenirken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de ise anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Per2*

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmış ve ZT12’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per2* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre ZT6 zaman diliminde anlamlı olarak azalırken ($p<0.001$), ZT18 zaman noktasında anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ve ZT12’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi

bozulan grupta, kontrol grubuna göre *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 ve ZT6 zaman noktalarında artmış (ZT0 için $p=0.002$, ZT6 için $p=0.032$), ZT12’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ve ZT12’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per2* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre ZT6 zaman noktasında anlamlı artış gözlenirken ($p<0.001$), ZT12’de ise anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

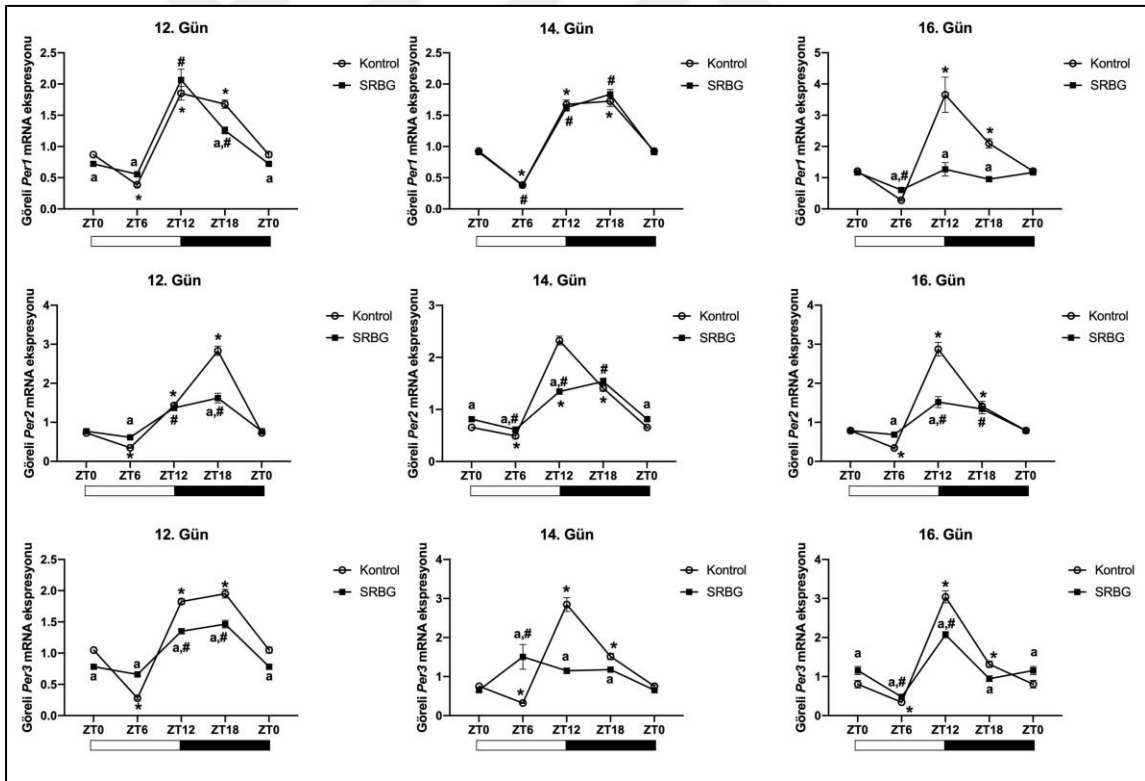
12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Per3*

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Per3* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per3* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per3* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre ZT6 zaman diliminde anlamlı olarak artarken ($p<0.001$), ZT0, ZT12 ve ZT18 zaman dilimlerinde anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

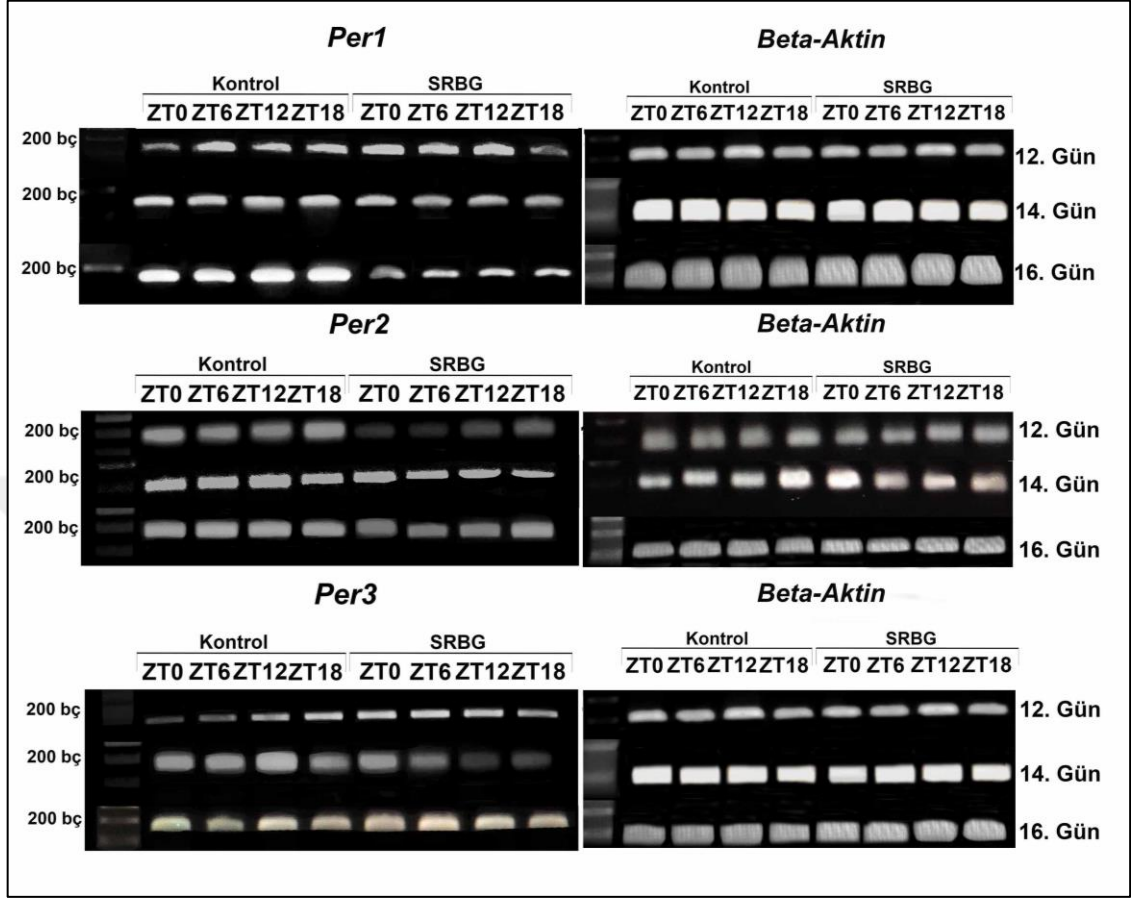
Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Per3* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ve ZT12’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per3* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da artmıştır ($p=0.010$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre *Per3* ekspresyon seviyesi ZT6 zaman noktasında artmış ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak

azalmıştır (ZT12 için $p<0.001$, ZT18 için $p=0.003$). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Per3* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ve ZT12’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Per3* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalmış ve ZT12’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.22). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0 ve ZT6 zaman noktasında anlamlı artış gözlenirken (ZT0 için $p<0.001$, ZT6 için $p=0.005$), ZT12 ve ZT18’de ise *Per3* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır (ZT12 için $p<0.001$, ZT18 için $p=0.003$). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde *Per1*, *Per2* ve *Per3* mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve Holm-Sidak pos hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve SRB grup verileri ZT zaman dilimlerine göre Student's t testi ile değerlendirilmiştir. *; kontrol grubu için ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı, #; SRB grubu için ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı, a; kontrol ve SRB grupları arasında ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı ifade etmektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.23. Kontrol ve SRB gruplarda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde *Per1*, *Per2*, *Per3* ve *Beta-aktin* genlerinin jel görüntüleri (*Per1*=186 bç, *Per2*=187 bç ve *Per3*=178 bç, *Beta-aktin*=74 bç).

12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Cry1*

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6'da azalırken ($p<0.001$), ZT12'de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 ve ZT18'de anlamlı olarak artmıştır (ZT6 için $p=0.004$, ZT18 için $p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT6 zaman diliminde anlamlı olarak artarken ($p=0.003$), ZT0 ve ZT12 zaman dilimlerinde *Cry1* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.25).

Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalmış ve ZT18’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 ve ZT18 zaman noktalarında artmış ($p=0.003$), ZT12’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.25).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry1* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6’da azalmış ve ZT18’de pik yapmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT6 zaman noktasında anlamlı artış gözlenirken ($p=0.047$), ZT12’de ise *Cry1* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.25).

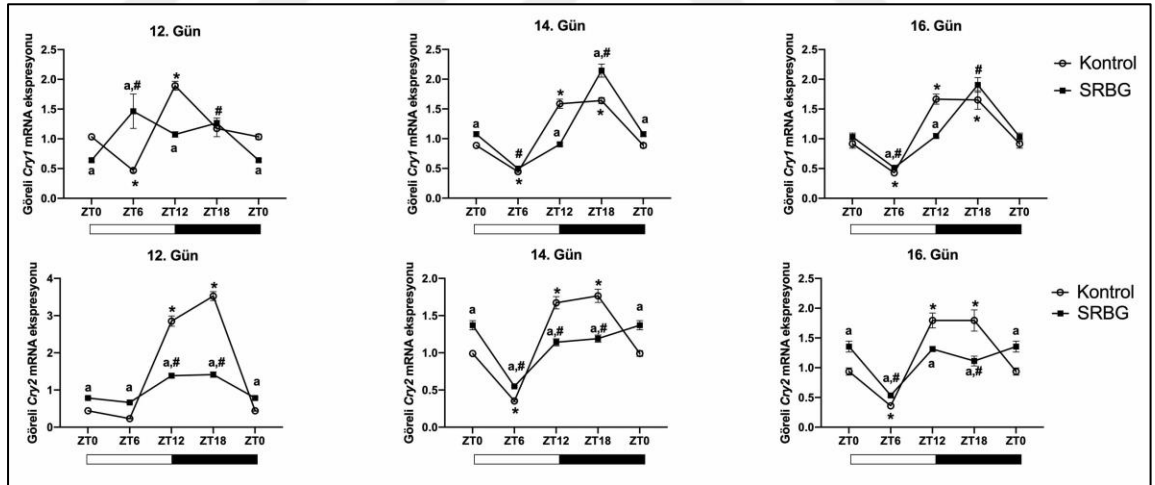
12. gün, 14. Gün ve 16. Gün *Cry2*

Gebeliğin 12. gününde kontrol grubunda *Cry2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry2* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre ZT0 ve ZT6 zaman dilimlerinde anlamlı olarak artarken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18 zaman dilimlerinde anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.25).

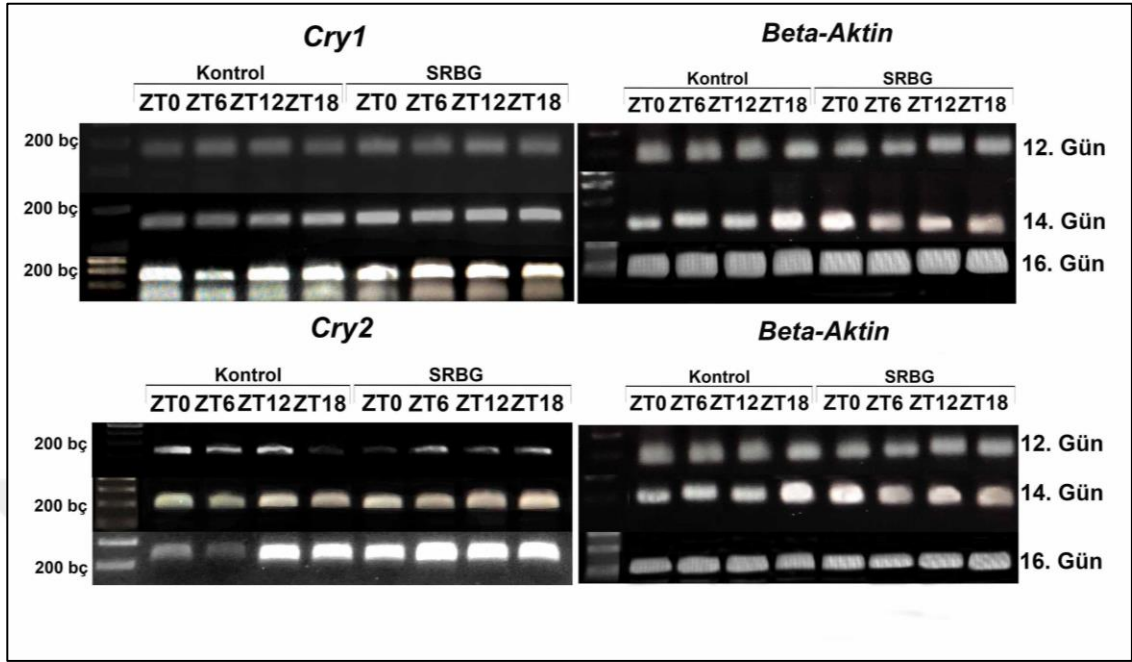
Gebeliğin 14. gününde kontrol grubunda *Cry2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6, ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre *Cry2*

ekspresyon seviyesi ZT0 ve ZT6 zaman noktalarında artmış ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.25).

Gebeliğin 16. gününde kontrol grubunda *Cry2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 zaman noktasında azalırken ($p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, *Cry2* ekspresyon seviyesi ZT0 zaman dilimine göre ZT6 ve ZT18’de anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.24). Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrol grubuna göre ZT0 ve ZT6 zaman noktalarında anlamlı artış gözlenirken (ZT0 için $p=0.002$, ZT6 için $p<0.001$), ZT12 ve ZT18’de ise *Cry2* ekspresyon seviyesi anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.003$) (Şekil 4.24). Aynı örneklerin jelde yürütülmesi ile elde edilen bant bulguları, qRT-PZR sonuçları ile uyumludur (Şekil 4.25).



Şekil 4.24. Kontrol ve SRB gruplarda 12., 14. ve 16. günlerde *Cry1* ve *Cry2* mRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesi. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve Holm-Sidak pos hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve SRB grup verileri ZT zaman dilimlerine göre Student's t testi ile değerlendirilmiştir. *; kontrol grubu için ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı, #; SRB grubu için ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı, a; kontrol ve SRB grupları arasında ZT zaman dilimlerine göre anlamlılığı ifade etmektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.25. Kontrol ve SRB gruplarda gebeliğin 12., 14. ve 16. Günlerinde *Cry1*, *Cry2* ve *Beta-aktin* genlerinin jel görüntüleri (*Cry1*=152 bç, *Cry2*=212 bç, *Beta-aktin*=74 bç).

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, sirkadiyen saat genleri olan; *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* 'nin normal fare plasenta gelişim sürecindeki (12, 14 ve 16. günler) ışık döngüsüne bağlı olan 24 saatlik ritmik ekspresyonları ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca, gebelikleri boyunca ışık döngüsü değiştirilerek sirkadiyen ritmi bozulan annelerden gelişim sürecinde (12, 14 ve 16. günler) elde edilen plasentalarda, bu genlerin 24 saatlik ritmik ekspresyonlarının bozulduğu ortaya konmuştur. Gen ekspresyonlarındaki bu düzensizliklerin, gebelikte sirkadiyen ritmi bozulan annelerin fetüslerinde gelişen uterus içi büyüme geriliğiyle (UİBG) ilişkisi olduğu, fetüs, plasenta ağırlıkları ve plasenta kompartmanlarının (desidua, spongiotrofoblast ve labrint tabakalar) morfolojisi değerlendirilerek gösterilmiştir.

Sirkadiyen ritim, 24 saatlik periyotta, aydınlık ve karanlık döngüsüne bağlı olarak, vücutta ritmik şekilde meydana gelen günlük biyolojik ritimdir ve vücutta pek çok hormonal, metabolik ve fizyolojik süreci düzenler. Memelilerde sirkadiyen ritmi düzenleyen 7 temel gen (*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2*) bulunmaktadır ve literatürdeki çalışmalarda, bu genlerin birçok memeli türünde üreme sisteminin fonksiyonlarını düzenlediği bildirilmiştir (Kennaway ve ark., 2012; Casper ve Gladanac, 2014) Bu genlerin birlikte ya da tek gen delesyonları ya da mutasyonları sonucunda sadece sirkadiyen ritim bozulmakla kalmamış aynı zamanda üreme sistemi, fertilité ve gebelik süreçlerinde hatalar meydana gelmiştir (Boden ve Kennaway, 2006; Kennaway ve ark., 2012). *Bmal1* geni silinmiş dişi farelerde, düzensiz östrus siklusu geç puberte başlangıcı, proöstrusta LH artışının yetersizliği, serum progesteron seviyelerinde düşüklüğü ve implantasyon başarısızlıkları bildirilmiştir (Ratajczak ve ark., 2009). *Clock* geni silinmiş dişi farelerde ise anormal fenotipler ve yüksek oranda fetal rezorpsiyon (kayıp/yok olmuş) meydana gelmiştir (B. H. Miller ve ark., 2004; Dolatshad ve ark., 2006). *Per* geni silinmiş dişi farelerde, düşük üreme başarısı ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında düşük vücut ağırlıklı yavruların doğumu gözlemlenmiştir (Pilorz ve Steinlechner, 2008). Tüm bu gen silme modellerinde yapılan çalışmalarda, aynı zamanda, davranışsal ritim ve lokomotor aktivite deneyleri ile farelerin sirkadiyen ritimlerinin bozulduğu da ortaya konmuştur (B. H. Miller ve ark., 2004; Dolatshad ve

ark., 2006; Pilorz ve Steinlechner, 2008; Ratajczak ve ark., 2009). Diğ er yandan *Clock* geni ile ilişkili bir insan çalışmasında 511 infertil kadın değ erlendirilmiş ve bu kadınların bazılarında *Bmal1* ve *Npas2* tekli nükleotid polimorfizmi (SNP) tespit edilmiştir. Tekli nükleotid polimorfizmi olan infertil kadınlar ile SNP bulunmayan infertil kadınların gebelik kayıpları karşılaştırıldığında; *Bmal1* ya da *Npas2* SNP olan kadınlarda gebelik kayıp oranları anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Kovanen ve ark., 2010). Literatürde sınırlı sayıdaki çalışmada, insanlarda term plasenta ve farelerin matür plasentalarında, sirkadiyen saat genlerinin ritmik olarak eksprese edildiğ i gösterilmiştir (Barr, 1973; Ratajczak ve ark., 2010; Wharfe ve ark., 2011; Perez ve ark., 2015). Kemirgenlerde gebelik sürecinde annenin ritmi aydınlık/karanlık döngüsü değ iş tirilerek bozulduğ unda, bu annelerin fetuslarında UİBG olduğ u da literatürde bildirilmiştir (Mendez ve ark., 2012; S. L. Miller ve ark., 2014). Sirkadiyen ritmin fonksiyon görmesinin altında moleküler saat genleri ve onların düzenledikleri süreçler yatmaktadır. Bu genlerin ekspresyonları ve regülasyonları üreme sistemindeki birçok dokuda tanımlanmasına rağmen, erken gebelik sürecinde uterus ve plasenta gibi gebelikle ilişkili dokulardaki durumu hakkında literatürde yeterli bilgi mevcut değ ildir. Tüm bu sebeplerle, sirkadiyen ritim bozukluğu ve üreme sistemi arasındaki ilişki günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Plasentanın, sirkadiyen ritmi düzenleyen moleküler saat genlerini normal gelişiminin hangi aşamasında ritmik olarak eksprese etmeye başladığ ı ve aydınlık/karanlık döngüsü değ iş tirilerek sirkadiyen ritim bozulduğ unda ise plasenta gelişim aşamalarında bu genlerin ekspresyonlarının değ iş ip değ iş mediğ i literatürde bilinmemektedir. Bu çalışma ile bu sorular aydınlatılmış tır.

Çalışmamızda normal 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ışık döngüsü değ iş tirilerek (vajinal plak görüldüğ ü gün gebe farelerin normal aydınlık-karanlık döngüsü her 5 günde bir ışık 6 saat ileri alınarak) sirkadiyen ritmin bozulması (SRB) sağ lanmıştır ve bu annelerin fetuslarında UİBG oluşmuştur. Elde ettiğ imiz verilerde, gebeliğ in 12., 14. ve 16. günlerinde SRB grubu plasenta ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğ u tespit edilmiştir. Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait fetus ağırlıklarında, plasenta ağırlıklarına benzer şekilde gebeliğ in 12., 14. ve 16. günlerinde kontrole göre azalma tespit edilmiştir ve bu azalış gebeliğ in incelenen tüm günlerinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Literatürde gebeliğ in 18. gününde ışık

düzeninin değiştirilmesi ile fetüs ağırlıklarının düştüğü ve IUGR modeli olduğu gösterilmiştir (Mendez ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda, literatürde bilinen bu bilgi bir basamak daha ileriye taşınarak, plasenta gelişiminin immatür (12. gün), matürasyonun başlangıcı (14. gün) ve matür (16. gün) evrelerinden başlayarak UİBG olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca; gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde SRB grubunda, fetüs/plasenta ağırlık oranlarının kontrole göre azaldığı da görülmüştür ve bu azalış gebeliğin 12. ve 16. günleri için istatistiksel olarak anlamlıdır. Böylece, ışık düzenin bozulmasının plasenta gelişim erken evrelerinden itibaren UİBG'nin oluşmasında rolü olduğu bu çalışmada ilk kez ortaya konmuştur.

Çalışmamızda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde SRB grubundan elde edilen fetüs sayıları kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Bu sonuç sirkadiyen ritmin bozulmasının fetüs sayısını etkilenmediğini ancak erken gebelik döneminde de sorun/defektlere yol açtığını göstermektedir. Bu bulgu çalışmamızda ilk kez ortaya konmuştur ve böylece SRB ve üreme ilişkisinin peri-implantasyon sürecinde detaylı olarak değerlendirilmesi önemli bir araştırma konusu olarak yerini almıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz açık alan testi sonuçlarına göre, gebelik günlerine bağlı olarak hem kontrol hem de SRB gruplarında lokomotor aktivite verilerinden “alınan toplam yol, ortalama hız ve girilen kare sayısında” bir azalma olduğu görülmüştür. Bu azalış özellikle gebeliğin 16. günü için istatistiksel olarak anlamlıdır. Anksiyetenin bir göstergesi olan dış/iç kadranda geçirilen süre değerlerinde ise; gebeliğin 14. gününden itibaren kontrole göre SRB grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Gebelik sürecinde vücut ağırlık artışından dolayı güne bağlı olarak lokomotor aktive her iki grupta da azalmakla birlikte, buna ek olarak ışık düzeninin değiştirilmesi de lokomotor aktivite bozukluğunda önemli bir faktördür. Böylece, bu farelerde sirkadiyen ritmin bozulduğu kanıtlanmıştır. Literatürde lokomotor aktivite testlerinin sirkadiyen ritmin bozulduğunu kanıtlamak için kullanılmaktadır (Prendergast ve ark., 2015; Crossland ve ark., 2017; Sabbar ve ark., 2017; Smarr ve ark., 2017; Farsi ve ark., 2018) ve bulgularımız bu çalışmalarla uyumludur.

Plasenta morfolojisini incelediğimiz çalışmalarda; gebeliğin 12. gününde; SRB gruba ait plasenta kesitlerinde kontrol grubundan farklı olarak gelişmekte olan plasenta tabakaların sınırlarının ayırt edilemediği tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre SRB grupta desidua tabaka boyutunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. Spongiyotrofoblast tabaka boyutunda ise SRB bozulan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Spongiyotrofoblast tabakası fare plasentasının endokrin kompartmanıdır ve bu bölgede bir sorun olduğunda fetüs etkilenir ve UİBG fenotipi ortaya çıkar (Woods ve ark., 2018). Spongiyotrofoblast tabakasının büyümesi ya da küçülmesi büyük prolaktin benzeri hormon ailesinin bozulmuş üretimi ile ilişkilidir (Horseman ve ark., 1997). Prolaktin ailesine ait hormonların anormal ekspresyonunda, plasentanın bu kompartmanında defektlere neden olmaktadır (Simmons ve ark., 2008). Fetal büyüme, her durumda, gelişen spongiyotrofoblast tabakanın boyutundan etkilenir (Woods ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda da; ışık döngüsünün bozulmasının spongiyotrofoblast tabakasının boyutunu doğrudan etkilediği ilk kez gösterilmiştir. Spongiyotrofoblast tabakasında bulunan glikojenik hücreler maternal kan sinüsleriyle ilişkilidir ve embriyonik 12-12.5 günde desiduaaya göç ederler (Woods ve ark., 2018). Çalışmamızda literatüre uygun şekilde kontrol grubunda 12. günde glikojenik hücreleri desidua tabakasında gözlemlenirken, SRB grubunda bu hücrelerin göç etmediği ve spongiyotrofoblast tabakasında kaldığı gözlemlenmiştir. Glikojenik hücrelerin glikojen içeriği ve yerleri nedeniyle, plasenta ve/veya embriyoya ek beslenme sağlayabilen bir enerji deposu olarak hizmet ettiği bilindiğinden, çalışmamızda SRB grubunda bu hücrelerin desiduaaya göç etmemesi sebebiyle, plasental gelişimin erken günlerinde yeterince beslenemeyen fetüslerde UİBG oluşmaya başladığı düşünülmektedir. Bunu irdeleyen ileri çalışmalar, laboratuvarımızda devam etmektedir. Kontrol grubuna göre SRB grupta labrint tabaka boyutunda bir değişiklik gözlenmemiştir ancak fetal kan damarları ve fetal kan hücrelerinde azalış gözlenmiştir. Bu bulguları desteklemek için, endotel ve kan hücrelerini belirleyen immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmalıdır.

Plasenta morfolojisini incelediğimiz çalışmalarda; gebeliğin 14. gününde; SRB gruba ait plasenta kesitlerinin kontrollere göre belirgin olarak küçük olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre SRB grupta desidua tabaka boyutunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. Gebeliğin 12. gününe benzer şekilde kontrol grubunda spongiyotrofoblast ve desidua tabakasında glikojenik hücreler incelenirken, SRB grupta glikojenik hücrelerin desiduya göç etmediği ve esasen spongiyotrofoblast tabakasında yer aldıkları ve bu tabakadaki sayılarının oldukça az olduğu gözlemlenmiştir. Glikojenik hücre sayısının azalması ile yetersiz glikojen birikimi oluşur (Woods ve ark., 2018). Glikojen seviyesinin azalması sonucunda ise fetüse ek besin sağlanamaz ve buna bağlı olarak fetal büyümenin geri kalması meydana gelir (Woods ve ark., 2018). Gebelik sürecinde annelerin günlük ışık düzeninin bozulmasının buna sebep olduğu çalışmamızda ilk kez gösterilmiştir. Bu durumu irdeleyen ileri çalışmalar, laboratuvarımızda devam etmektedir. SRB grupta, kontrol grubuna göre labrint tabaka boyutunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu tabakada yer alan fetal kan damarları ve fetal kan hücrelerinde azalış gözlenmiştir. Bu bulguları desteklemek için, endotel ve kan hücrelerini belirleyen immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmalıdır.

Plasenta morfolojisini incelediğimiz çalışmalarda; gebeliğin 16. gününde SRB gruba ait plasenta kesitlerinin kontrol göre küçük olduğu ve desidua tabaka boyutunun arttığı gözlenmiştir. Diğer yandan, spongiyotrofoblast tabaka boyutunda, SRB bozulan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. Sirkadiyen ritmi bozulan grupta glikojenik hücrelerin maternal kan damarlarının çevresine göç ettiği gözlenmiştir. SRB bozulan grupta 16. güne ait normal plasenta tabakalarına kısmen benzer bir morfoloji izlense de plasental kompartmanlardaki morfolojik ve hücresel düzensizlik hala dikkat çekicidir. Bu durumu irdeleyen ileri çalışmalar, laboratuvarımızda devam etmektedir. Kontrol grubuna göre SRB grupta labrint tabaka boyutunda 14. Güne benzer şekilde değişiklik gözlenmemiş olsa da, fetal kan damarları ve fetal kan hücrelerinde azalış gözlenmiştir.

Gebeliğin 12, 14 ve 16. günlerinde spongiyotroblast tabakasında hücrel anomaliler ve kusurlar gözlenmiştir. Örneğin fibrinoid benzeri yapılar SRB grupta izlenmektedir. Literatürde spongiyotrofoblast tabakasında gözlenen kusurların UİBG fenotipi sergilediği ve fare modellerinde fetal büyümeyi bozduğu bilinmektedir (Salas ve ark., 2004; Tunster ve ark., 2012). Bu bağlamda çalışmamız literatür ile uyumludur ve ışık düzensizliğinin de buna sebep olabileceğini ilk kez ortaya koymuştur. Spongiyotrofoblast tabaka kusurları, lokal olarak plasentada endokrin ortamın değişmesine neden olur ve hem fetüs hem de anne üzerinde sistemik etkilere neden olmaktadır (Fowden ve Moore, 2012). Diğer yandan, plasenta tabakalarında gözlenen anomalilerin detaylı araştırması için, genel ve özel trofoblast hücre belirteçleri ve endotel hücre belirteçleriyle bu hücrelerin lokalizasyon ve sayılarını ve glikojenik hücre sayılarını değerlendirdiğimiz çalışmalar yürürlükte olan 2019 yılı destekli TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında devam etmektedir.

Sirkadiyen saat genlerinin plasenta gelişiminin farklı evrelerinde total ekspresyonlarını değerlendirdiğimiz çalışmalarımızda; kontrol grubunda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde *Bmal1*, *Clock*, *Npas2* ve *Per1* genlerinde gebelik günlerine bağlı olarak total ekspresyon seviyesi değişimleri gözlenirken, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* genlerinin total ekspresyon seviyeleri benzerdir. Sirkadiyen ritmi bozulan grupta *Bmal1* mRNA total ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla tüm gebelik günlerinde (12, 14, 16) anlamlı olarak düşüktür fakat bu gelişim günlerinde kendi içinde anlamlı bir artış göstermiştir. Sirkadiyen ritmi bozulan grupta *Per1* total ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla 16. gebelik gününe anlamlı olarak düşüktür. Diğer yandan; SRB grupta *Clock*, *Npas2*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* genlerinin total ekspresyonları kontrol grubu ile benzerdir. Total gen ekspresyonu, sirkadiyen ritmi tam olarak yansıtmasa da, plasenta gelişim günlerinde bu genlerin hem kontrol hem de SRB gruplarında ekspresyon düzeylerinin ilk kez ortaya konması, bu genlerin plasenta gelişiminde önemli rolleri olabileceğine ışık tutarak, literatüre önemli bir temel katkı sağlamıştır.

Sirkadiyen saat genlerinin günlük zaman noktalarına (ZT0, ZT6, ZT12 ve ZT18) göre ritmik ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmalarımızda; kontrol plasentalarda gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde tüm moleküler saat genlerinin ekspresyonlarının ritmik olduğu, karanlık ve aydınlıkta artıp/azaldığı gözlenmiştir. Literatürde erken gebelik döneminde sirkadiyen saat genlerinin plasentadaki ritmik ekspresyonları ile ilgili bilgi mevcut değildir. Bu çalışma, sirkadiyen saat genleri olan; *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2*'nin plasenta gelişiminin erken dönemlerinden başlayarak plasentada ekspre edildiğini ve bu ekspresyonlarının ritmik olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Diğer yandan, sirkadiyen ritmi bozulan grupta ışık düzeninin kaydırılması ile bu genlerin hem zaman dilimlerine göre ekspresyon seviyelerinin değiştiği hem de ritmik ekspresyonlarının 12. günden itibaren bozulmaya başladığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, moleküler saat genlerindeki bu düzensizlikler, fetüslarda UİBG oluşmasının temelinde yatan önemli mekanizmalardan biri olabilir. Kronoterapi (ışık düzenlemesi) ve melatonin tedavisi yaklaşımıyla bu süreçleri değerlendirdiğimiz ileri çalışmalar yürürlükte olan TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında devam etmektedir.

Sirkadiyen ritimdeki anormallikler, uyku ve duygu durum bozuklukları, diyabet, obezite ve kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Literatürde, *Bmal1* geni silinmiş farelerin makrofajlarında ROS birikiminin arttığı ve hipoksik yanıt proteini HIF-1a'nın birikmesini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Early ve ark., 2018). Aynı zamanda *Bmal1*'in NF- κ B sinyal yolu aracılığı ile MMP9 ekspresyonunun artmasına neden olarak tümör metastazını etkilediği bilinmektedir (J. Wang ve ark., 2019) Başka bir çalışmada, *Bmal1*'in karaciğer ve yağ dokularındaki aritmik ekspresyonun, insülin direncinin oluşmasında rolü olduğu ve buna bağlı olarak polikistik over sendromunun patogenezeine katkısı olduğu gösterilmiştir (Zhai ve ark., 2020). *Bmal1*'in döngüsel ana düzenleyici hedef genleri; *ROR α* ve *REV-ERB α* 'dır. *ROR α* 'nın glikoz metabolizmasında, *REV-ERB α* 'nın ise lipit metabolizmasında önemli bir rol oynadığını literatürde gösterilmiştir (Solt ve ark., 2011). *Bmal1* geni sirkadiyen saat mekanizmasının kilit bir genidir. Biz de çalışmamızda ışık düzeninin kaydırılması ile özellikle *Bmal1* geninin total ekspresyonun değiştiğini, gözlemledik.

Bu bulgularımız, plasenta gelişim sürecinde ışık döngüsünün bozulmasıyla ortaya çıkan morfolojik defektlerin ve akabinde fetüslerde oluşan UİBG'nin *Bmal1* geni ile temel olarak düzenlenebileceğini düşündürmüştür. Bu mekanizmasının aydınlatılması için ileri çalışmalara gerek vardır.

Melatonin sirkadiyen sistemin bilinen en önemli hormonudur ve üreme sistemi ve özellikle gebelik sürecine etki ettiği bilinmektedir. Gebelikte pre-eklampsia gelişen ve fetüslerinde UİBG gözlenen kadınlarda melatonin düzeylerinin değiştiği belirtilmiştir (Reiter ve ark., 2014). Koyunlarda yapılan bir çalışmada; gebelik sırasında kronik hipoksi sebebiyle oluşan UİBG'nde, yavrularda kan-beyin bariyerinde (KBB) yapısal anormallikler görüldüğü bildirilmiş ve maternal melatonin uygulanmasıyla melatoninin nöroprotektif ve antioksidan etkileri ile vasküler homeostaz ve stabilitenin sağlanması için gerekli olan perivasküler hücreleri koruyarak KBB'nin bozulmasını önlediği gösterilmiştir (Castillo-Melendez ve ark., 2017). Koyunlarda yapılan bir başka çalışmada, maternal melatonin uygulamasının UİBG ile doğmuş kuzuların beyinlerinde oksidatif stres, miyelinleşme kusurlarını ve aksonopatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir. Yine koyunlarda yapılan bir çalışmada; melatonin tedavisinin UİBG görülen fetuslarda fetal hipoksemiye azalttığı, kalp fonksiyonunu ve koroner kan akımını iyileştirdiği ve UİBG tarafından indüklenen kardiyo-koroner defisiti düzelttiği gösterilmiştir (Tare ve ark., 2014). Farelerde yapılan bir çalışmada, melatoninin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen intra-uterin fetal ölüm (İUFD) ve UİBG üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmış ve melatoninin LPS ile indüklenen oksidatif stres sebebiyle oluşan İUFD ve UİBG'ni önlediği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2006). Literatürde gebelik sürecinde UİBG'nin önlenmesi için melatonin uygulamasına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Uterus içi büyüme geriliğinde melatonin uygulanmasının koruyucu etkisini bildiren güncel çalışmalara rağmen, sirkadiyen ritim bozukluğunda oluşan UİBG'nde melatonin uygulamasının fetal ve plasental gelişime etkisinin mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır. Bu bağlamda; kronoterapi (ışık düzenlemesi) ve melatonin tedavisi yaklaşımıyla bu süreçleri değerlendirdiğimiz çalışmalar yürürlükte olan TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında devam etmektedir.

Sonuç olarak; bu yüksek lisans tezi farelerde plasenta gelişimi ve 24 saatlik sirkadiyen ritim arasındaki ilişkiyi tanımlayan, annelerinin ışık döngülerinin bozulduğu fetüslerde UİBG'ne oluşmasında sirkadiyen ritmin rolüne dolaylı olarak atıfta bulunan ilk çalışmadır. Klinikte gözlenen; özellikle vardiyalı çalışan ve günlük yaşamında uyku düzensizlikleri olan gebe kadınların bebeklerinde, bu düzensizliklerinden kaynaklanan sirkadiyen ritim bozukluğu nedeniyle oluşan düşük doğum ağırlığının sebeplerinin anlaşılmasına yönelik literatüre temel bilgi düzeyinde dolaylı ve önemli bir katkı sağlamıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerindeki kontrol ve SRB grubu fare plasentalarında sirkadiyen saat genleri *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* ve *Cry2* genlerinin ekspresyonları qRT-PZR tekniğiyle belirlenmiş ve aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait plasentaların ağırlıkları kontrol grubuna göre daha düşüktür.
2. Sirkadiyen ritmi bozulan gruba ait fetüslerin ağırlıkları kontrol grubuna göre daha düşüktür. Uterus içi büyüme geriliği oluşmuştur.
3. Sirkadiyen ritmi bozulan gruptan elde edilen fetüs sayıları kontrol grubuyla benzerdir.
4. Gebelik sürecinde vücut ağırlık artışından dolayı güne bağlı olarak lokomotor aktive her iki grupta da azalmakla birlikte, buna ek olarak ışık düzeninin değiştirilmesi de lokomotor aktivite bozukluğunda önemli bir faktördür. Böylece, bu farelerde sirkadiyen ritmin bozulduğu kanıtlanmıştır.
5. Sirkadiyen ritmi bozulan grupta, kontrole göre gebeliğin 12., 14. ve 16. günlerinde plasenta tabakalarının boyutları ve hücrel düzenlemeleri değişmektedir.
6. Fare plasentasındaki sirkadiyen gen ekspresyonlarının ritmikliğini embriyonik gelişimin 12. gününden itibaren kazanmaktadır.
7. Fare plasantasının ritmisitesi ışık düzeninin değiştirilmesiyle birlikte 12. günden itibaren, henüz immatür halde iken, bozulmaya başlar.
8. Vardiyalı çalışan ve uyku düzensizliği olan gebe kadınların bebeklerinde saat düzensizliklerinden kaynaklanan ritim bozukluğu nedeniyle gözlenen düşük doğum ağırlığının sebeplerinin anlaşılmasına yönelik literatüre dolaylı katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Adamson, S. L., Lu, Y., Whiteley, K. J., Holmyard, D., Hemberger, M., Pfarrer, C., & Cross, J. C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2002; 250 (2): 358-373.
- Aguilar-Arnal, L., & Sassone-Corsi, P. Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112 (22): 6863-6870.
- Ain, R., Canham, L. N., & Soares, M. J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: Novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol.* 2003; 260 (1): 176-190.
- Anea, C. B., Ali, M. I., Osmond, J. M., Sullivan, J. C., Stepp, D. W., Merloiu, A. M., & Rudic, R. D. Matrix metalloproteinase 2 and 9 dysfunction underlie vascular stiffness in circadian clock mutant mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30 (12): 2535-2543.
- Asher, G., & Schibler, U. A clock-less clock. *Trends Cell Biol.* 2006; 16 (11): 547-549.
- Barnard, A. R., & Nolan, P. M. When clocks go bad: Neurobehavioural consequences of disrupted circadian timing. *PLoS Genet.* 2008; 4 (5): e1000040.
- Barr, M., Jr. Prenatal growth of wistar rats: Circadian periodicity of fetal growth late in gestation. *Teratology.* 1973; 7 (3): 283-287.
- Bazyar, S., Inscoc, C. R., Benefield, T., Zhang, L., Lu, J., Zhou, O., & Lee, Y. Z. Neurocognitive sparing of desktop microbeam irradiation. *Radiat Oncol.* 2017; 12 (1): 127.
- Bedont, J. L., & Blackshaw, S. Constructing the suprachiasmatic nucleus: A watchmaker's perspective on the central clockworks. *Front Syst Neurosci.* 2015; 9: 74.
- Boden, M. J., & Kennaway, D. J. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction.* 2006; 132 (3): 379-392.
- Boden, M. J., Varcoe, T. J., & Kennaway, D. J. Circadian regulation of reproduction: From gamete to offspring. *Prog Biophys Mol Biol.* 2013; 113 (3): 387-397.
- Bronson, S. L., & Bale, T. L. The placenta as a mediator of stress effects on neurodevelopmental reprogramming. *Neuropsychopharmacology.* 2016; 41 (1): 207-218.
- Burke, S. D., Barrette, V. F., Bianco, J., Thorne, J. G., Yamada, A. T., Pang, S. C., Croy B. A. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. *Hypertension.* 2010; 55 (3): 729-737.

Buttgereit, F., Smolen, J. S., Coogan, A. N., & Cajochen, C. Clocking in: Chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015; 11 (6): 349-356.

Casper, R. F., & Gladanac, B. Introduction: Circadian rhythm and its disruption: Impact on reproductive function. *Fertil Steril.* 2014; 102 (2): 319-320.

Castillo-Melendez, M., Yawno, T., Sutherland, A., Jenkin, G., Wallace, E. M., & Miller, S. L. Effects of antenatal melatonin treatment on the cerebral vasculature in an ovine model of fetal growth restriction. *Dev Neurosci.* 2017; 39 (1-4): 323-337.

Chen, Y. H., Xu, D. X., Wang, J. P., Wang, H., Wei, L. Z., Sun, M. F., & Wei, W. Melatonin protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and growth retardation in mice. *J Pineal Res.* 2006; 40 (1): 40-47.

Cheng, B., Anea, C. B., Yao, L., Chen, F., Patel, V., Merloiu, A., Rudic, R. D. Tissue-intrinsic dysfunction of circadian clock confers transplant arteriosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (41): 17147-17152.

Copp, A. J. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. I. A study of cellular proliferation. *J Embryol Exp Morphol.* 1978; 48: 109-125.

Crnko, S., Cour, M., Van Laake, L. W., & Lecour, S. Vasculature on the clock: Circadian rhythm and vascular dysfunction. *Vascul Pharmacol.* 2018; 108: 1-7.

Cross, J. C., Simmons, D. G., & Watson, E. D. Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 995: 84-93.

Crossland, R. F., Balasa, A., Ramakrishnan, R., Mahadevan, S. K., Fiorotto, M. L., & Van den Veyver, I. B. Chronic maternal low-protein diet in mice affects anxiety, night-time energy expenditure and sleep patterns, but not circadian rhythm in male offspring. *PLoS One.* 2017; 12 (1): e0170127.

Curtis, A. M., Cheng, Y., Kapoor, S., Reilly, D., Price, T. S., & Fitzgerald, G. A. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (9): 3450-3455.

De, M., Choudhuri, R., & Wood, G. W. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leukoc Biol.* 1991; 50 (3): 252-262.

Debruyne, J. Oscillating perceptions: The ups and downs of the clock protein in the mouse circadian system. *J Genet.* 2008; 87 (5): 437-446.

Deutch, M. Circadian: "Circa dies". *N Engl J Med.* 1969; 280 (12): 673.

- Dolatshad, H., Campbell, E. A., O'Hara, L., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Johnson, M. H. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum Reprod.* 2006; 21 (1): 68-79.
- Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslon, Z., Carroll, R. G., Curtis, A. M. Circadian clock protein *bmal1* regulates *il-1beta* in macrophages via *nrf2*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115 (36): E8460-E8468.
- Fabbian, F., Bhatia, S., De Giorgi, A., Maietti, E., Bhatia, S., Shanbhag, A., & Deshmukh, A. Circadian periodicity of ischemic heart disease: A systematic review of the literature. *Heart Fail Clin.* 2017; 13 (4): 673-680.
- Farsi, H., Harti, D., Achaaban, M. R., Piro, M., Ouassat, M., Challet, E., El Allali, K. Validation of locomotion scoring as a new and inexpensive technique to record circadian locomotor activity in large mammals. *Heliyon.* 2018; 4 (12): e00980.
- Fowden, A. L., & Moore, T. Maternal-fetal resource allocation: Co-operation and conflict. *Placenta.* 2012; 33 Suppl 2: e11-15.
- Furukawa, S., Hayashi, S., Usuda, K., Abe, M., Hagio, S., & Ogawa, I. Toxicological pathology in the rat placenta. *J Toxicol Pathol.* 2011; 24 (2): 95-111.
- Furukawa, S., Kuroda, Y., & Sugiyama, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol.* 2014; 27 (1): 11-18.
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C., & Burton, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta.* 2002; 23 (1): 3-19.
- Giritharan, G., Delle Piane, L., Donjacour, A., Esteban, F. J., Horcajadas, J. A., Maltepe, E., & Rinaudo, P. In vitro culture of mouse embryos reduces differential gene expression between inner cell mass and trophectoderm. *Reprod Sci.* 2012; 19 (3): 243-252.
- Horseman, N. D., Zhao, W., Montecino-Rodriguez, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S. J., Dorshkind, K. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 1997; 16 (23): 6926-6935.
- Kennaway, D. J., Boden, M. J., & Varcoe, T. J. Circadian rhythms and fertility. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 349 (1): 56-61.
- Klein, D. C., & Moore, R. Y. Pineal n-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyltransferase: Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1979; 174 (2): 245-262.
- Ko, M. S. Embryogenomics: Developmental biology meets genomics. *Trends Biotechnol.* 2001a; 19 (12): 511-518.
- Ko, M. S. H. Embryogenomics: Developmental biology meets genomics. *Trends Biotechnol.* 2001b; 19 (12): 511-518.

Kovanen, L., Saarikoski, S. T., Aromaa, A., Lonnqvist, J., & Partonen, T. Arntl (bmal1) and npas2 gene variants contribute to fertility and seasonality. *PLoS One*. 2010; 5 (4): e10007.

Kriegsfeld, L. J., Silver, R., Gore, A. C., & Crews, D. Vasoactive intestinal polypeptide contacts on gonadotropin-releasing hormone neurones increase following puberty in female rats. *J Neuroendocrinol*. 2002; 14 (9): 685-690.

Kusinski, L. C., Stanley, J. L., Dilworth, M. R., Hirt, C. J., Andersson, I. J., Renshall, L. J., Glazier, J. D. Enos knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 303 (1): R86-93.

Landgraf, D., Koch, C. E., & Oster, H. Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Front Neuroanat*. 2014; 8: 143.

Landgraf, D., Wang, L. L., Diemer, T., & Welsh, D. K. Npas2 compensates for loss of clock in peripheral circadian oscillators. *PLoS Genet*. 2016; 12 (2): e1005882.

Latos, P. A., & Hemberger, M. From the stem of the placental tree: Trophoblast stem cells and their progeny. *Development*. 2016; 143 (20): 3650-3660.

Malassine, A., Frendo, J. L., & Evain-Brion, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update*. 2003; 9 (6): 531-539.

Mark, P. J., Crew, R. C., Wharfe, M. D., & Waddell, B. J. Rhythmic three-part harmony: The complex interaction of maternal, placental and fetal circadian systems. *J Biol Rhythms*. 2017; 32 (6): 534-549.

Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Galdames, H. A., Spichiger, C., Richter, H. G., Torres-Farfan, C. Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One*. 2012; 7 (8): e42713.

Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H., & Takahashi, J. S. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*. 2004; 14 (15): 1367-1373.

Miller, S. L., Yawno, T., Alers, N. O., Castillo-Melendez, M., Supramaniam, V. G., VanZyl, N., Wallace, E. M. Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction. *J Pineal Res*. 2014; 56 (3): 283-294.

Papacleovoulou, G., Nikolova, V., Oduwole, O., Chambers, J., Vazquez-Lopez, M., Jansen, E., Williamson, C. Gestational disruptions in metabolic rhythmicity of the liver, muscle, and placenta affect fetal size. *FASEB J*. 2017; 31 (4): 1698-1708.

Pardi, G., Marconi, A. M., & Cetin, I. Placental-fetal interrelationship in iugr fetuses--a review. *Placenta*. 2002; 23 Suppl A: S136-141.

Perez, S., Murias, L., Fernandez-Plaza, C., Diaz, I., Gonzalez, C., Otero, J., & Diaz, E. Evidence for clock genes circadian rhythms in human full-term placenta. *Syst Biol Reprod Med*. 2015; 61 (6): 360-366.

Pilorz, V., & Steinlechner, S. Low reproductive success in *per1* and *per2* mutant mouse females due to accelerated ageing? *Reproduction*. 2008; 135 (4): 559-568.

Prendergast, B. J., Cable, E. J., Stevenson, T. J., Onishi, K. G., Zucker, I., & Kay, L. M. Circadian disruption alters the effects of lipopolysaccharide treatment on circadian and ultradian locomotor activity and body temperature rhythms of female siberian hamsters. *J Biol Rhythms*. 2015; 30 (6): 543-556.

Putteeraj, M., Soga, T., Ubuka, T., & Parhar, I. S. A "timed" kiss is essential for reproduction: Lessons from mammalian studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016; 7: 121.

Ratajczak, C. K., Boehle, K. L., & Muglia, L. J. Impaired steroidogenesis and implantation failure in *bmal1*^{-/-} mice. *Endocrinology*. 2009; 150 (4): 1879-1885.

Ratajczak, C. K., Herzog, E. D., & Muglia, L. J. Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *Reprod Fertil Dev*. 2010; 22 (5): 743-750.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Korkmaz, A., & Rosales-Corral, S. A. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*. 2014; 20 (2): 293-307.

Roenneberg, T., & Merrow, M. The circadian clock and human health. *Curr Biol*. 2016; 26 (10): R432-443.

Rosenwasser, A. M., & Turek, F. W. Neurobiology of circadian rhythm regulation. *Sleep Med Clin*. 2015; 10 (4): 403-412.

Rossant, J., & Cross, J. C. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*. 2001; 2 (7): 538-548.

Sabbar, M., Dkhissi-Benyahya, O., Benazzouz, A., & Lakhdar-Ghazal, N. Circadian clock protein content and daily rhythm of locomotor activity are altered after chronic exposure to lead in rat. *Front Behav Neurosci*. 2017; 11: 178.

Salas, M., John, R., Saxena, A., Barton, S., Frank, D., Fitzpatrick, G., Tycko, B. Placental growth retardation due to loss of imprinting of *phlda2*. *Mech Dev*. 2004; 121 (10): 1199-1210.

Seron-Ferre, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, F. J., Reynolds, H. E., Torres-Farfan, C. Circadian rhythms in the fetus. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 349 (1): 68-75.

Simmons, D. G., Fortier, A. L., & Cross, J. C. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2007; 304 (2): 567-578.

Simmons, D. G., Rawn, S., Davies, A., Hughes, M., & Cross, J. C. Spatial and temporal expression of the 23 murine prolactin/placental lactogen-related genes is not associated with their position in the locus. *BMC Genomics.* 2008; 9: 352.

Smarr, B. L., Grant, A. D., Perez, L., Zucker, I., & Kriegsfeld, L. J. Maternal and early-life circadian disruption have long-lasting negative consequences on offspring development and adult behavior in mice. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 3326.

Smith, M. J., Jiennes, L., & Wise, P. M. Localization of the vip2 receptor protein on gnRH neurons in the female rat. *Endocrinology.* 2000; 141 (11): 4317-4320.

Soares, M. J., Chapman, B. M., Rasmussen, C. A., Dai, G., Kamei, T., & Orwig, K. E. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta.* 1996; 17 (5-6): 277-289.

Soares, M. J., Konno, T., & Alam, S. M. The prolactin family: Effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18 (3): 114-121.

Solt, L. A., Kojetin, D. J., & Burris, T. P. The rev-erbs and rors: Molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. *Future Med Chem.* 2011; 3 (5): 623-638.

Summa, K. C., Vitaterna, M. H., & Turek, F. W. Environmental perturbation of the circadian clock disrupts pregnancy in the mouse. *PLoS One.* 2012; 7 (5): e37668.

Tare, M., Parkington, H. C., Wallace, E. M., Sutherland, A. E., Lim, R., Yawno, T., Miller, S. L. Maternal melatonin administration mitigates coronary stiffness and endothelial dysfunction, and improves heart resilience to insult in growth restricted lambs. *J Physiol.* 2014; 592 (12): 2695-2709.

Tunster, S. J., Van de Pette, M., & John, R. M. Impact of genetic background on placental glycogen storage in mice. *Placenta.* 2012; 33 (2): 124-127.

van der Beek, E. M., Wiegant, V. M., van der Donk, H. A., van den Hurk, R., & Buijs, R. M. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol.* 1993; 5 (2): 137-144.

Verdecchia, P., Schillaci, G., Gatteschi, C., Zampi, I., Battistelli, M., Bartoccini, C., & Porcellati, C. Blunted nocturnal fall in blood pressure in hypertensive women with future cardiovascular morbid events. *Circulation.* 1993; 88 (3): 986-992.

Viswambharan, H., Carvas, J. M., Antic, V., Marecic, A., Jud, C., Zaugg, C. E., Yang, Z. Mutation of the circadian clock gene *per2* alters vascular endothelial function. *Circulation*. 2007; 115 (16): 2188-2195.

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

Wang, J., Li, S., Li, X., Li, B., Li, Y., Xia, K., Wu, H. Circadian protein *bmal1* promotes breast cancer cell invasion and metastasis by up-regulating matrix metalloproteinase9 expression. *Cancer Cell Int*. 2019; 19: 182.

Watson, E. D., & Cross, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)*. 2005; 20: 180-193.

Wharfe, M. D., Mark, P. J., & Waddell, B. J. Circadian variation in placental and hepatic clock genes in rat pregnancy. *Endocrinology*. 2011; 152 (9): 3552-3560.

Woods, L., Perez-Garcia, V., & Hemberger, M. Regulation of placental development and its impact on fetal growth-new insights from mouse models. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 570.

Zhai, J., Li, S., Hu, M., Di, F., Liu, J., & Du, Y. Decreased brain and muscle *arnt*-like protein 1 expression mediated the contribution of hyperandrogenism to insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020; 18 (1): 32.

Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111 (45): 16219-16224.

Zu, X., Zhang, M., Li, W., Xie, H., Lin, Z., Yang, N., Zhang, W. Antidepressant-like effect of bacopaside i in mice exposed to chronic unpredictable mild stress by modulating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and activating *bdnf* signaling pathway. *Neurochem Res*. 2017; 42 (11): 3233-3244

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nayçe İlayda	Uyruğu	T.C.
Soyadı	BEKTAŞ	Tel no	05312152221
Doğum tarihi	28.06.1992	e-posta	nayce.ilyayda@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Konyaaltı Lisesi	2010
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2020
Doktora	-	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	73

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıllar)	Görevi
Peri-Implantif Dönem Fare Endometriyumunda Foxo1, Foxo3 ve Foxo4 Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonlarının ve Rollerinin Araştırılması	TÜBİTAK-1001 Proje No: 215S868	2017-2018	Bursiyer/ Araştırmacı
Sirkadiyen Ritmi Bozulan Gebe Farelerde Oluşan Uterus İçi Büyüme Geriliğinin Mekanizmasının Araştırılması	TÜBİTAK-1001 Proje No: 119S121	2019-Devam Ediyor	Bursiyer/ Araştırmacı
Sirkadiyen Saat Genlerinin Ekspresyonunun Fare Normal Plasenta ve Sirkadiyen Ritmi Bozulan Plasenta Gelişiminde Değerlendirilmesi	BAP TYL-2018-3960	2018-2020	Araştırmacı

Burslar-Ödüller:

1. Sözlü Sunu 3.lük Ödülü, Üreme Tıbbı Derneği, 2013. Celik-Ozenci C, Kuscı N, Bektas N, Ordueri E, Sahin P, Tasatargil A. Doksorubisin Uygulanan PARP-1 Geni Silinmiş Farelerde FOXO Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonları Spermatogenez Sürecinde Değişiklik Gösterir. IV. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi, 26-29 Eylül 2013, Antalya
2. TÜBİTAK Bursiyeri, 2019-Devam ediyor. Sirkadiyen Ritmi Bozulan Gebe Farelerde Oluşan Uterus İçi Büyüme Geriliğinin Mekanizmasının Araştırılması

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar:

1. Adiguzel D, Sahin P, Kuscı N, Ozkavukcu S, **Bektas NI**, Celik-Ozenci C. Spatiotemporal expression and regulation of FoxO1 in mouse uterus during peri-implantation period. **PLoS ONE**, 2019, 14(5): e0216814. DOI: 10.1111/fcp.12041

Ulusal Bildiriler:

1. Celik-Ozenci C, Kuscı N, **Bektas N**, Ordueri E, Sahin P, Tasatargil A, Doksorubisin Uygulanan PARP-1 Geni Silinmiş Farelerde FOXO Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonları Spermatogenez Sürecinde Değişiklik Gösterir. **IV. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi, 26-29 Eylül 2013, Antalya, Türkiye**
2. **Bektas N.I.**, Adigüzel D, Akcay G, Derin N, Kuscı N, Celik-Ozenci C. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu Oluşturulan Farelerde Görülen Uterus İçi Büyüme Geriliği Sirkadiyen Saat Proteinlerinin Azalan Ekspresyonları ve Bozulan Endotel Disfonksiyonu ile İlişkili Olabilir. **14. Ulusal Histoloji & Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye**
3. Adigüzel D, Sahin P, **Bektas N.I.**, Tosun G, Kuscı N, Celik-Ozenci C. FoxO3 Transkripsiyon Faktörü Farede İmplantasyon ve Desidualizasyonda Rol Alıyor Olabilir. **14. Ulusal Histoloji & Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye**