

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

**DİYABETİN, İMPLANTASYON PENCERESİ DÖNEMİNDEKİ FARE
ENDOMETRİYUMUNDA LAMİNİN EKSPRESYONUNA VE İNCE
YAPIYA ETKİSİ**

Derya Yetkin

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Banu Coşkun YILMAZ

MERSİN – 2011

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

**DİYABETİN, İMPLANTASYON PENCERESİ DÖNEMİNDEKİ FARE
ENDOMETRİYUMUNDA LAMİNİN EKSPRESYONUNA VE İNCE
YAPIYA ETKİSİ**

Derya Yetkin

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Banu Coşkun YILMAZ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP- SBE HE
(DY) 2009-9 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:187

MERSİN – 2011

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan Diyabetin, Implantasyon Penceresi Dönemindeki Fare Endometriyumunda Laminin Ekspresyonuna ve İnce Yapıya Etkisi başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 15/06/2011



Prof. Dr. Tülin Baykal

Mersin Üniversitesi

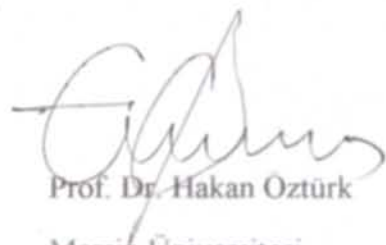
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Banu Coşkun Yılmaz

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Hakan Öztürk

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 22.06.2011. tarih ve 2011/27 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan, her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm bana sabırla yol gösteren başta tez danışmanım Prof Dr. Banu Coşkun YILMAZ'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tülin BAYKAL'a, Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a, Doç. Dr. Ebru BALLI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızda görev yapan çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde her zaman bana destek olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	ivv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İmplantasyon	3
2.2. İmplantasyon Hazırlığında Uterus Epitelinde Meydana Gelen Değişiklikler	4
2.3. İntegrinler	5
2.4. Endometriyum Reseptivitesi	6
2.5. İmplantasyon ve Embriyonik İntegrinler	7
2.6 .Maternal İntegrinlerin İmplantasyondaki Rolü.....	7
2.7. Bazal Membran	8
2.8. Bazal Membran Bileşenleri	8
2.9. Bazal Membranın Dokulara Göre Dağılımı	9
2.10. Bazal Membranın Görevleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.11. Bazal Membran Bileşeni Laminin	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.12. Lamininin Bağlanma Aktiviteleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.13. Diyabetes Mellitus Tanısı ve Sınıflaması.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı	18
3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması	18
3.3. Ovulasyonun Uyarılması	19
3.4. Uterusların Elde Edilmesi ve Fiksasyon.....	19
3.5. Işık Mikroskopik Doku Takibi ve İmmunohistokimyasal İşaretleme.....	20
3.6. Işık Mikroskopik Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz	21
3.7. Elektron Mikroskopik Doku Takibi ve İnceleme.....	22
3.8. RNA İzolasyonu ve Real Time PCR	23
3.9. Real Time PCR Reaksiyonu ve Ortamın Hazırlanması	25
3.10. Real Time PCR Reaksiyon Şartları.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4. BULGULAR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.1. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.3. Real Time PCR Bulguları.....	43
5. TARTIŞMA	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
7. KAYNAKLAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Bazal membranın başlıca bileşenleri	9
Şekil 2.2.	Lamininin alfa, beta, gama zincirleri	13
Şekil 4.1.1.	Kontrol grubu 2. güne ait 1200 büyütme oranında immunohistokimyasal görüntü	28
Şekil 4.1.2.	Kontrol grubu 4. güne ait 1200 büyütme oranında immunohistokimyasal görüntü	28
Şekil 4.1.3.	Kontrol grubu 6. güne ait 1200 büyütme oranında immunohistokimyasal görüntü	29
Şekil 4.1.4.	Deney grubu 2. güne ait 1200 büyütme oranında immunohistokimyasal görüntü	30
Şekil 4.1.5.	Deney grubu 4. güne ait 1200 büyütme oranında immunohistokimyasal görüntü	30
Şekil 4.1.6.	Deney grubu 6. güne ait 1200 büyütme oranında immunohistokimyasal görüntü	31
Şekil 4.2.1.	Kontrol grubu 2. güne ait 4,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	33
Şekil 4.2.2.	Kontrol grubu 2. güne ait 10,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	33
Şekil 4.2.3.	Kontrol grubu 4. güne ait 12,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	34
Şekil 4.2.4.	Kontrol grubu 4. güne ait 30,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	35
Şekil 4.2.5.	Kontrol grubu 6. güne ait 7,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	36
Şekil 4.2.6.	Kontrol grubu 6. güne ait 7,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	36
Şekil 4.2.7.	Kontrol grubu 6. güne ait 20,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	37
Şekil 4.2.8.	Deney grubu 2. güne ait 10,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	38
Şekil 4.2.9.	Deney grubu 2. güne ait 15,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	38
Şekil 4.2.10.	Deney grubu 2. güne ait 15,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	39
Şekil 4.2.11.	Deney grubu 4. güne ait 5,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	40
Şekil 4.2.12.	Deney grubu 4. güne ait 12,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	41
Şekil 4.2.13.	Deney grubu 6. güne ait 5,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	42
Şekil 4.2.14.	Deney grubu 6. güne ait 20,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	42
Şekil 4.2.15.	Deney grubu 6. güne ait 40,000 büyütme oranında elektron mikroskopik görüntü	43
Şekil 4.3.1.	Kantitatif Real Time PCR Analizi ile Yakima Yellow ile işaretlenen “ACTB” ve FAM ile işaretlenen “Laminin β_1 ” genlerinin ekspresyon dağılımları	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Laminin Trimerleri	12
Çizelge 3.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Günlere Bağlı Olarak Seçilen Hayvan Sayıları	18
Çizelge 4.1.1. Kontrol ve Deney Grupları Arasında Laminin Ekspresyonunun İstatistiksel Analiz Sonuçları	31
Çizelge 4.1.2. 2.,4.,6., Günlere Kontrol ve Deney Grupları Arasında Laminin Ekspresyonunun İstatistiksel Analiz Sonuçları	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BM	Bazal Membran
BSA	Sığır Serum Albumini
DM	Diyabetes Mellitus
ESM	Ekstrasellüler Matriks
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
KD	Ketanürik diyabet
LE	Luminal Epitel
LH	Luteinleştirici Hormon
LN	Lamin zincirinin N terminal globüler alanı
LEa	Laminin zincirinde EGF benzeri alanlar
PBS	Fosfatlı Tuz Tamponu
TGF-β	Değiştirici büyüme faktörü

ÖZET

Diyabetin, İmplantasyon Penceresi Dönemindeki Fare Endometriyumunda Laminin Ekspresyonuna ve İnce Yapıya Etkisi

Bazal membran, epitel doku ile bağ dokusu arasında bulunan ve kas ve yağ hücreleri ile periferik sinir liflerini çevreleyen, yüksek derecede özelleşmiş ekstrasellüler matriksten olusan, ince bir tabakadır. Tüm bazal membranlar, glikoproteinlerden (laminin, nidojen-1 vb.) proteoglikanlardan (heparan sülfat vb.) ve bağ dokusu liflerinden (tip IV, XV ve XVIII kollajen) oluşur. Çok fonksiyonlu bir bazal membran glikoproteini olan laminin; hücre adezyonu, migrasyonu, differansiyasyonu, proliferasyonu gibi çeşitli biyolojik aktiviteler ile ilişkilidir. Laminin-1, alfa-1, beta-1, gama-1 zincirinden oluşur, embriyonun gelişmesinde ve plasenta oluşumunda rol oynar. Diyabet; protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalıktır. Bu çalışmada; implantasyon döneminde fare endometriyumunun ince yapısının, ve diyabetin gebe fare endometriyumunda laminin ekspresyonuna etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada 36 adet, 8-10 haftalık dişi Balb/C fareleri kullanıldı. Fareler kontrol (n=18) ve diyabetik (n=18) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her iki grup ta kendi içinde 2., 4. ve 6. gebelik gününde ötenazi yapılmak üzere 3 alt gruba bölündü. Hayvanlarda diyabet oluşturmak için streptozotosin (200 mg/kg) uygulandı. Elde edilen uterus dokuları ışık mikroskopik immunohistokimyasal yöntemle ve elektron mikroskopik yöntemle incelendi. İmmunohistokimyasal işaretlemeye gruplar karşılaştırıldığında, 2. ve 4. günlerde fark görülmezken, diyabet grubunda laminin ekspresyonunda sadece 6. günde ekspresyon artışı saptandı. Elektron mikroskopik incelemelerde diyabetik grupta, luminal epitel hasarı, epitel hücre apikal yüzeyinde pinopodlarda bozulma, mikrovilluslarda kısalma ve kayıp, retiküler laminada artış, bazal laminada kesintiler olduğu gözlemlendi.

Bu veriler doğrultusunda, diyabetin gebelik sürecinde laminin ekspresyonunu etkilediği, endometriyumun ve bazal membranın yapısında değişikliklere neden olduğu ve bunun da implantasyon sürecini bozabileceği görüşüne varıldı.

Anahtar Sözcükler: Bazal membran, laminin, diyabet, endometriyum, elektron mikroskopi.

ABSTRACT

The Effects of Diabetes on the Laminin Expression and the Ultra/Thin Structure of the Mice Endometrium During the Implantation Window/Period

The basal membrane is a highly specialized thin layer composed of extracellular matrix that located between the mesenchymal and epithelium tissues around the muscle, pheripheral nevre. All of the basal membranes contains glicoproteins (laminins, such as Nidogen-1 (N/E-1) known as Entaktin-1), proteoglycans (heparan sulfate) and conective tissue fibers (type IV, XV ve XVIII collagens).

Laminin, a multi-functional basal membrane glicoprotein, is associated with several biological activities such as cell adhesion, migration and differentiation. Laminin-1 is composed by alpha-1, beta-1 and gamma-1 chains and takes a role at the embryonic development and placental formation. Diabetes is a metabolic disease which effects protein, adipose and carbohydrate metabolism in the body. In the current study, it is aimed to investigate the endometrium at the implantation window at the ultrastructural level and effects of diabetes on the laminin expression at the endometrium tissue of pregnant mice.

At this study, 36 Balb/C mice (8-10 weeks old age) are used. Mice are separated in two groups as control (n=18) and diabetes (n=18). Both main groups are also formed by 3 different sub-groups sacrificed at the 2th, 4th and 6th gestational days. In order to form the diabetes model, a dose of 200 mg/kg body weight streptozotosin is used for each mice. Uterine tissues obtained from light microscopic and electron microscopic methods are used for immunohistochemical analysis.

At the immunohistochemical labeling, despite there isn't any difference at the 2th and 4th gestational days, laminin expression has increased only at the 6th day of the gestation in the diabetes group comparing to control. Additionally, luminal epithelial damage, degradation of the pinopods on the apical surface of the epithelial tissue, loss and shortage of the microvilli, thickening of the reticular lamina and interruptions of the basal membrane are observed by ultrastructural examination.

Since diabetes effects the laminin expression and causes structural changes on endometrium and basal membrane during pregnancy seen as the results of this study, it is postulated that these changes might impair the implantation period.

Key words: Basal membrane, laminin, diabetes mellitus, endometrium, electron microscopy

1.GİRİŞ

İmplantasyon, genetik olarak farklı olan embriyonik ve maternal dokular arasında gelişen başarılı bir kaynaşmadır. Bu süreç oldukça karmaşık bir şekilde gerçekleşir. İmplantasyon başarısı için, embriyo ile maternal doku arasındaki iletişim korunmalıdır. İmplantasyon başlamadan önce endometriyum ve blastokist arasında sinyaller aracılığıyla etkileşim meydana gelir. Farelerde çiftleşmeden sonraki 4. günde embriyo ilk olarak uterusun luminal epitelinin antimezometriyal bölgesine tutunur. Embriyo uterin epitele tutunduktan sonra trofoblast dev hücrelerine doğru invaze olmaya başlar. Aynı zamanda stromada proliferasyon ve desidualizasyon gerçekleşir ve primer desidual zon şekillenir. Bu sırada embriyonun uterus epiteline tutunması ile epitelde apoptozis gerçekleşir (1,2).

Bazal membran; epiteli, periferik sinir liflerini, Schwann hücrelerini, yağ hücrelerini, kas hücrelerini, kan beyin bariyerini çevreleyen özel matriks bileşenlerinden oluşan ince bir tabakadır (3,4). Doku bütünlüğünü korumada, farklı gelişim süreçlerinde, filtrasyonda, farklı dokuları bölmelere ayırmada önemli rol oynar (5). Tüm bazal membranlar tip IV kollajen, nidojen, sülfatlı proteoglikanlar ve laminin içerir (3).

Ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinden laminin ve fibronektin, trofoblastik invazyonun seyirinde rol oynayan önemli elemanlardır. Laminin polipeptitlerinin; gelişimin 2, 4, 8 ve 16 hücreli kompakt ve kompakt olmayan aşamalarında gözlenmesi, embriyogenezin erken dönemlerinde hücre göçü, adezyonu ve farklılaşması gibi olaylara katıldığını ve bu molekülün hücre büyümesi ile hücre iskeletinin organizasyonunda da rol aldığını göstermektedir (2). Lamininin bu fonksiyonlarını, üzerinde bulunan belli bölgelere hücre yüzey reseptörlerinin ve diğer ESM moleküllerinin bağlanmasıyla gerçekleştirdiği sanılmaktadır (2). İmplantasyon döneminde blastokist üzerinde morfolojik olarak saptanabilen tüm membranlarda laminin bulunması bu kanıyı güçlendirmiştir (2). Laminin, hücre adezyonu, hücre göçü, hücre farklılaşması ve çoğalması gibi çeşitli biyolojik aktiviteler ile ilişkili çok işlevli bir bazal membran glikoproteinidir. Alfa, beta ve gama alt zincirlerinden oluşur. Günümüze kadar, 5 alfa, 3 beta ve 3 gama alt zinciri gösterilmiştir (5). Bu zincirlerin kombinasyonlarına bağlı olarak da 15 farklı laminin alt tipi tanımlanmıştır (6). Bu alt

tiplerden bazal laminada en çok bulunana laminin-1'dir ve alfa-1, beta-1 ve gama-1 zincirlerinden oluşur (5). Embriyonik gelişim sırasında ve plasenta oluşumunda rol oynar. İnsan embriyolarındaki laminin-1'in, tip IV kollajenaz ekspresyonunu artırdığı ve peri-implantasyon periyodunda, maternal matrikste trofoblast adezyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Laminin-1, implante fare embriyosunun erken dönemlerinde ve blastokistte bazal membranın trofoektoderminde ve iç hücre kitlesinde lokalize olmaktadır. İmplantasyon süresince laminin-1 koryonik bazal membranda ve Reichert's membranında eksprese olur. İnsan plasentasının ilk trimesterinde laminin alfa-1 zinciri trofoblastik bazal membranda eksprese olmuştur. İkinci trimester plasentada, laminin alfa-1 zinciri, çoğalan trofoblastik adalarla veya sütunlarla temas halinde olan villöz bazal membran bölgesinde selektif olarak eksprese edilir. Bundan dolayı laminin-1'in, embriyogenezis, implantasyon, plasenta oluşumu ile ilgili süreçlerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (7).

Diyabet, sık görülen sistemik bir hastalıktır. İnsülin eksikliği veya duyarsızlığı sonucu organların kronik hiperglisemiye maruz kaldığı klinik bir sendrom olarak tanımlanır. Hastalığın ileri dönemlerinde pek çok organ ve sistemin olumsuz etkilendiği ve bu etkilere bağlı komplikasyonların ortaya çıktığı bilinmektedir. Gebeliğin bu hastalığı şiddetlendirdiği, gizli kalmış diyabeti ortaya çıkarabildiği ya da sağlıklı olduğu düşünülen bireylerde oral glikoz tolerans testini bozduğu uzun zamandır bilinmektedir. Diyabet gebelik öncesi teşhis edilmiş ise pregestasyonel, ilk kez gebelik sırasında tespit edilmiş bir glikoz intoleransı ise gestasyonel diyabet adını alır. Gestasyonel diyabet gebelerin yaklaşık %4'ünde görülürken, pregestasyonel diyabetin görülme sıklığı yaklaşık 1000 gebelikte 1-3'tür (8,9).

Uterusta hücrel metabolizmada ve dokunun yapısında obezite ve diyabete bağlı değişiklikler dişi üreme sisteminin yapısını ve bütünlüğünü etkilemektedir. Çalışmalarda uterusun endometriyal epitelinde ve stroma tabakasında dokunun lipojenik metabolizmasının önemli oranda arttığı bildirilmiştir (10). Üreme bozukluğu; üreme siklusunun bozulmuş olması, over steroid hormon sentezinin bastırılması, endokrin uyarı ve endometriyal atrofinin artması ile karakterizedir. Hücre içi ve hücreler arası yağ birikiminin çok miktarda artması, endometriyal yapıyı etkiler. Diyabet ve obeziteye bağlı olarak üreme sistemi atrofiye uğramaktadır (10). Bunun yanı sıra diyabetin bazal membran üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir (10).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmplantasyon

Embriyo implantasyonu pek çok türde üremenin en önemli basamağını temsil eden dinamik bir süreçtir. Endometriyum içine blastokist implantasyonu; yaklaşma, adezyon ve invazyon aşamalarını içerir (11).

Gebeliğin 4. gününde blastokist evresindeki embriyo uterus boşluğunun içinde bulunur. Östrojen ve progesteronun karşılıklı etkisi sonucunda implantasyon bölgesinde bulunan endometriyal damar geçirgenliği artar ve endometriyum implantasyon için hazırlanır. Blastokist zona pellusidadan ayrılır ve trofoektodermin uzantıları uterus yüzey epiteli ile karşı karşıya gelir (yaklaşma aşaması). Eğer zona pellusidanın ayrılmasında bir hata olursa embriyo implante olamaz. İmplantasyonda trofoblast hücrelerinin sitoplazmik çıkıntıları, uterus epitelinin apikal yüzeyindeki pinopod adını alan yapılara bağlanır (adezyon aşaması) ve endometriyum lümenini döşeyen hücrelerin intersellüler alanına girerler (invazyon aşaması). Penetrasyon, apoptozis sonucu endometriyum epitel hücrelerini bağlayan desmozomların sayıca giderek azalmasıyla kolaylaşır (12,13).

Blastokist implante olurken daha fazla trofoblast endometriyuma temas ederek sitotrofoblast ve sinsityotrofoblasta farklılaşır. Sitotrofoblast tabakası, mitotik olarak aktif yeni hücreler oluşturan bir tabakadır. Oluşan yeni hücreler giderek büyüyen sinsityotrofoblast kitlesine göç eder ve burada birleşerek hücre zarını kaybederler. Sinsityotrofoblast tabakası hızla genişler ve çok çekirdekli bir kitle olup hiçbir hücre sınırı gözlenemez. İlerleyen sinsityotrofoblast hücreleri endometriyumun bağ dokusuna invaze olur ve blastokist endometriyum içine gömülür. Endometriyal hücreler apoptozise uğrayarak implantasyonu kolaylaştırır (12,13). İmplantasyon çevresindeki bağ doku hücreleri glikojen ve lipid depolayarak polihedral görünüm kazanırlar ve desidual hücreler adını alırlar. İmplantasyondan sonra primer desidual zon proteazların etkisi sonucu yeniden şekillenir ve oluşan sekonder desidual zon implante olan embriyoya ev sahipliği yapar (12,14).

Adezyon ve sonrasındaki invazyon esnasında embriyo ile anne arasında görülen moleküler etkileşimler, embriyonun implante olabilmesi için hayati önem taşımaktadır. İmplantasyonun başarısı; blastokistin reseptif endometriyumla doğru zamanda buluşmasına bağlıdır. Endometriyum menstrual siklus boyunca dinamik bir yapılanma içindedir ve sadece 'implantasyon penceresi' döneminde reseptiftir. İnsanlarda, embriyo ovulasyondan 4 gün sonra uterus boşluğuna ulaşır. Endometriyum ovulasyondan 6-8 gün sonra blastokist implantasyonu için reseptif olur ve bu reseptivite 4 gün (20-24. günler) sürer (11).

2.2. İmplantasyon Hazırlığında Uterus Epitelinde Meydana Gelen Değişiklikler

İmplantasyon öncesinde luminal epitelde (LE) bir takım değişiklikler meydana gelir. İmplantasyon anında LE hücrelerinin apikal bazal polaritesi, apikal membrandaki laterobazal belirteçlerin ortaya çıkması ile belirginliğini kaybeder. Epitel hücrelerinin yüksekliği ve mikrovillus sayısı değişir, pinopod yapıları oluşur. Bazal membran kalınlığı değişir. Hücre yüzeyi moleküllerinin apikolateral dağılımında değişiklikler ortaya çıkar. Örneğin, sekretuar evresinde alfa-6 ($\alpha 6$) integrinin dağılımı, bazaldan hem bazal hem de laterale doğru değişir. Bu durum, implantasyon anında LE'nin hücrelerarası etkileşimdeki değişimine işaret eder. Desmozomal proteinler, fare LE'sindeki lateral hücre yüzeyleri boyunca tekrar dağılır ve regüle edilirler. İnsan ve fare LE'sinde implantasyon zamanı desmozom yoğunluğu azalır. Bu zaman içerisinde insan da dahil bazı türlerde lateral membrandaki sıkı bağlantı (tight junction) komplekslerinin dağılımı değişir. Buna ek olarak, özgün ara bağlantılar, implantasyonun olduğu epitelde açığa çıkar ve ovaryum steroidlerince sıkı bir şekilde kontrol edilirler (15).

2.3. İntegrinler

İntegrin ailesi hücre yüzeyinde bulunur. Alfa ve beta alt ünitelerinden oluşup hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini düzenlerler. Günümüzde 22 integrin heterodimerinde 16 alfa, 8 beta alt ünitesi bulunduğu bilinmektedir. Her alt ünite ekstrasellüler, transmembran ve sitoplazmik alanlarda bulunur. Ekstrasellüler alandaki fibronektin, vitronektin, kollajen ve laminin gibi ligandlar ekstrasellüler matriks içinde bulunurlar. Adeziv özellikleri dışında integrinler, ekstrasellüler matriksten hücre içine sinyal taşımaktadırlar. Hücre sel cevaba bağlı olarak gen transkripsiyonunda veya hücre sel morfolojide, hücre nin şekillenmesine, hücre gerilmesine, hücre göçüne, yara iyileşmesine, tümör metastazına aracılık edebilirler (16).

İmplantasyon döneminde, embriyonun endometriyuma tutunması sırasında, implantasyon başarısızlıklarında ve infertilitede integrinlerin adezyonu majör rol oynamaktadır. Alfa-v beta-3 ($\alpha\beta3$) ve $\alpha4\beta1$ integrinler implantasyon penceresi sırasında luminal epitelde birlikte eksprese olurlar. İkisinin birlikte çalışarak embriyo tutunmasına yardımcı oldukları düşünülmektedir. $\alpha\beta3$ integrinin yokluğu veya azlığı infertilite ile ilişkilidir. Birçok araştırmacı integrinin uterin reseptivite ile ilişkili olduğunu düşünülmektedir. $\alpha\beta3$ integrinin blokajı sonucu tavşanda implantasyon bölgesinde önemli bir azalma olur. $\alpha\beta3$ içermeyen farelerde implantasyon gerçekleşir, fakat yaşamını devam ettiren embriyo sayısı azalır ve plasenta hasarları oluşur. Erken hamilelik sürecinde endometriyumda çeşitli integrinlerin transkripsiyonları düzenlenmektedir. Fonksiyon blokama antikolarına karşı $\alpha5$ ve $\beta1$ integrinler in vitro olarak trofoblast çoğalmasını engellemiştir. $\alpha5\beta1$ ve $\alpha\beta3$ gibi integrinler embriyo invazyonu ve desidualizasyon ile ilişkilidir. Endometriyumda hamilelik sırasında morfolojik ve fizyolojik değişiklikler olmakta ve desidua ile plasenta gibi özelleşmiş dokular meydana gelmektedir. Bu iki doku embriyonun hayatta kalması ve başarılı hamilelik için çok önemlidir. Bu dokularda çeşitli hamilelik kusurları ile ilgili fonksiyonel anormallikler görülmektedir. Hamilelik sırasında farklı zonlar içindeki integrinlerin ve onların spesifik ligandlarının ekspresyonları açık bir şekilde bilinmemektedir. Fare endometriyumunda çiftleşmeden sonraki 6,5, 8,5 ve 13,5. günlerde implantasyon bölgesinde integrinler ($\beta3$, $\alpha6$ ve $\alpha5$ alt üniteleri) ve onların

ligandlarına (vitronektin, osteopontin, laminin ve fibronektin) bakılmıştır ve bunların implantasyonda rolü olduğu ileri sürülmüştür (16).

2.4. Endometriyum Reseptivitesi

Son otuz yıldır farelerde ve sıçanlarda embriyo implantasyonu için maternal dokuda reseptivite fazı veya penceresinin varlığı bilinmektedir. Bu türlerde reseptif faz 24 saatten daha az sürmektedir. İnsanlarda bu faz, siklusun 20. gününden 24. gününe kadar yaklaşık olarak 4 gün sürer. Ovulasyon sürecinde, ovulasyondan 36 saat önce luteinleştirici hormon (LH) pik yapar. Reseptif faz yaklaşık olarak LH+7'den LH+11'e kadar sürer. İmplantasyon başarısı farelerde yüksektir. Steroidle tetiklenmiş bir seri olay reseptif evrenin oluşmasını sağlar. Buna paralel olarak blastokist tutunmaya hazırlanır. Hamile endometriyumunun stromasının yüzeyinde integrinle ilişkili çeşitli ligandlar bulunmaktadır. Bunlar fibronektin, kollajen, laminin, entaktin, vitronektin ve trombospondindir (17). Hücre adezyon mekanizmalarının embriyonun tutunmasında ve bundan sonra da intersitisyel penetrasyonda arttığı bilinmektedir. Tutunmayla ilgili öne sürülen bir hipotez, luminal epitelin hücre yüzeyinde bir veya daha fazla adezyon molekülünün steroid hormon salınımını başlatması ve bu reseptörlerin daha sonra ligandlarıyla birlikte büyüyen embriyonun dış trofoektoderm yüzeyiyle ilişkili kurduğu görüşüdür (17).

Farelerde desidualizasyon; maternal ekstrasellüler matriksin besleyici hale gelmesidir. İlk safhada belirgin şekilde intersitisyel etkileşimler gerçekleşir. İntersitisyel penetrasyondan üç gün sonra desidualizasyon olmaktadır. İnsanlarda çok miktarda embriyo implantasyon başarısızlıkları görülmektedir (17).

2.5. İmplantasyon ve Embriyonik İntegrinler

Farede fertilizasyondan sonra gelişim sırasında $\alpha 5$, $\alpha 6B$, αV , $\beta 1$ ve $\alpha 3$ integrin alt üniteleri eksprese olmaktadır. $\alpha 3$ alt ünitesi 8 hücreli evrede eksprese olurken, $\alpha 2$, $\alpha 6A$ ve $\alpha 7$ geç blastokist evresinde eksprese olmaktadır. Fare blastokistlerinde özellikle $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha II\beta 3$ ve $\alpha V\beta 3$ integrinler bulunmaktadır. Laminin $\beta 1$ integrin ailesi için gereklidir. Farelerde implantasyon sürecinde birçok integrin inaktive edilerek çalışılmıştır. $\beta 1$ alt ünitesi olmayan embriyolarda blastokist gelişiminin normal, ancak implantasyonunun başarısız olduğu bulunmuştur. Bunun da implantasyon alanında trofoblastın epitel bariyere tutunmasında ve endometriyal stromayla ilişkisinin başlamasında meydana gelen blokajdan dolayı olduğu düşünülmüştür. Bundan dolayı trofoblastın $\beta 1$ integrin ve ekstrasellüler matriks ligandları ile ilişkili olmasının, plasenta oluşumunda önemli rolü olabileceği düşünülmektedir. İntegrin ligandları olan laminin ve fibronektin, desiduada bol miktarda bulunmaktadır. $\beta 1$ integrin bulunmayan embriyolarda iç hücre kitlesinin yapısında belirgin bir bozulma olduğu bilinmektedir (18).

2.6 Maternal İntegrinlerin İmplantasyondaki Rolü

Maternal integrinlerden αV alt ünitesi tutunmayı sağlamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda infertil kadınlarda $\beta 3$ integrin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (18). İntegrinler tutunmayı fibronektin, osteopontin, vitronektin ve diğer ekstrasellüler ligandlar içindeki Arjinin-Glisin-Aspartik Asit sekansları ile sağlarlar. Tutunma mekanizmasında rol oynayan αV integrinlerin maternal ve embriyonik yüzeyde, ligandlarla reseptörler arasında çift yönlü bir köprü görevi yapması gerekir. Köprü görevi gören bileşenlerin ya embriyonik hücrelerden ya da maternal hücrelerden türemiş olduğu düşünülmektedir. Bu ligandlardan biri olan osteopontin, dokuda sekresyon fazında apikal yüzeyde lokalize olur ve endometriyal epitelin sekresyon komponentidir. Fibronektinin insan embriyolarında zona pellusida ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Perlekan fare blastokistinde dış yüzeyde eksprese olmaktadır. Trombospondin $\alpha V\beta 3$ integrinlerin ligandıdır, desiduada, trofoektoderimde ve glandular

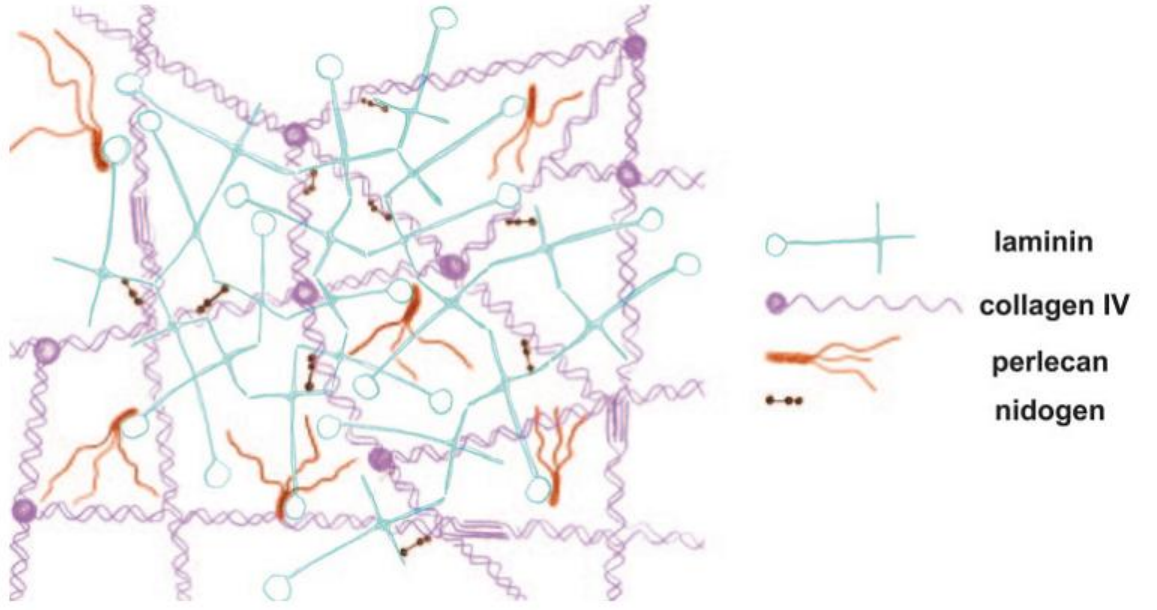
epitelde eksprese olur. Vitronektinin implantasyon sürecinde gerekli olmadığı öne sürülmektedir (17).

2.7. Bazal Membran

Bazal membran (BM), vücutta epitel ve endotel hücrelerinin bazolateral kısmında bulunur (19). Epiteli, santral sinir sisteminde kan-beyin bariyerini, yağ hücrelerini ve kas hücrelerini çevreleyen 50-100 nm kalınlığında özel matriks bileşenlerinden oluşan ince bir tabakadır (4,5,6,7,20). Bazal membranın yapısı transmisyon elektron mikroskobu ile görülmektedir. Bazal membran özelleşmiş ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerinden oluşmaktadır (19).

2.8. Bazal Membranın Bileşenleri

Bazal membran bileşenleri hücre davranışını ve sinyal yollarını düzenler. Bazal membranda 4 önemli bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenler; tip IV kollajen, laminin, nidojen/entaktin ve perlekandır (Şekil 2.1) (21). Bazal membranın yapısal bütünlüğünü laminin ve tip IV kollajen sağlamaktadır (5). Nidojen/entaktin ve perlekan, laminin ve tip IV kollajen ağı için köprü görevi görmektedir. Bunlar laminin ile tip IV kollajenin sağlamlığını artırarak bazal membranı desteklemiş olurlar. Bazal membranın bu dört bileşeni dışında farklı bileşenleri de bulunmaktadır. Bu bileşenler; agrin, fibulin, tip XV kollajen, tip XVIII kollajen, SPARC/osteonectin/BM40 ve BM90'dır. Bu özel bileşenler bazal membran dokusunun belirginliğini ve heterojenliğini korumaktadırlar. Bazal membranda en çok bulunan laminin alt tipleri ve tip IV kollajen, dokularda bazal membranın şekillenmesinden sorumludur (2,3,5).



Şekil 2.1. Bazal membranın başlıca bileşenleri. Laminin ve tip IV kollajen, heparan sülfat proteoglikanı ve nidogene bağlanır. Endotel hücre membranında başlıca laminin 8 ve 10 izoformu, tip IV kollajen [$\alpha 1(IV)_2 \alpha 2(IV)$], nidogen 1 ve 2 bulunur (21 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

2.9. Bazal Membranın Dokulara Göre Dağılımı

Bazal membran her dokuda farklı bileşenler içermektedir. Bu farklılık bazal membranın içinde bulunan bileşenlerin miktarına bağlı olarak değişir. Örneğin; böbrekte en az üç farklı tip IV kollajen görülebilir (20). Belirli organlarda dokuya özel bazal membranlarla karşılaşılır. Bundan dolayı bazal membran hücresel fonksiyona bağlı olarak değişir. Tübüllerde epitel, su ve elektrolit dengesini düzenler. Bazal membran bileşenindeki tip IV kollajen ve laminin etkileşim halindedir. Bunlar özellikle glomerüler bazal membranda farklı oranlarda bulunurlar.

Bazal membran bileşenlerinden tip IV kollajen ve lamininin dokuya özel farklı oranlarda bulunması bazal membranın fonksiyonunda farklılıklara yol açmaktadır. Laminin heterodimerinin yaklaşık 15 kombinasyonu ve 6 tane tip IV kollajen öncülleri vücutta farklı dokularda eksprese olurlar (20). Memeli böbreğinde $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ tip IV kollajen öncülleri glomerüler bazal membranda görülürken $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ ve $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ öncülleri Bowman kapsülünde görülür. Laminin izoformları dokuya özel ekspresyon gösterirler. $\alpha 1 \alpha 3, \alpha 5$ zincirleri çoğunlukla epitelin bazal membranında görülürken, $\alpha 2$ zinciri

iskelet ve kalp kasının bazal membranında ve $\alpha 4$ zinciri vasküler bazal membranda görülür (3). Bazal membrana özgü reseptörler bulunmadığında bazal membran oluşabilir, fakat yapısı parçalı veya çift katlı olabilir. Bazı durumlarda bazal membran bileşenlerindeki eksiklikler bazal membranın şekillenmesinde hata oluşturabilir. Buna örnek olarak parietal endodermin kalın ekstra embriyonik bazal membranı olan Reichert's membranının laminin reseptörü yokluğunda bozulması verilebilir. Buna rağmen primitif bazal membran kalıntıları bozulmamıştır. Buna benzer olarak distroglikansız ve β integrinsiz hayvanlarda embriyoid cisimciklerde bazal membranın şekillenmesinde hatalar gösterilmiştir (22).

2.10. Bazal Membranın Görevleri

Bazal membranın birçok biyolojik fonksiyonu bulunmaktadır. Doku organizasyonunda rol oynar, ayrıca birçok dokuda depo ve destek görevi yapmaktadır. Doku gelişimi sırasında hücre organizasyonunu düzenler. Memeli böbreğinde seçici-geçirgen bir bariyer oluşturur. $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ tip IV kollajen ağı, laminin 10/11 polimeri ve perlekan mekanik dayanıklılık sağlar. Glomerüler bazal membran kan filtrasyonu için uygun bir yapıya sahiptir. Bazal membran proteinleri hücre adezyon molekülleri için çoklu bağlanma bölgeleri içerir ve bazal membranda hücre yüzey reseptörleri için birçok ligand vardır. Hücre yüzeyindeki reseptörlerin BM proteinlerine bağlanmasıyla hücre içi sinyal başlar. BM bileşenleri hücre farklılaşmasını başlatır. Hücre proliferasyonunu ve göçünü düzenler. Bazal membran yaralanma veya neoplazi gibi patolojik durumlar sonucunda yapısını değiştirebilir (2,7,20).

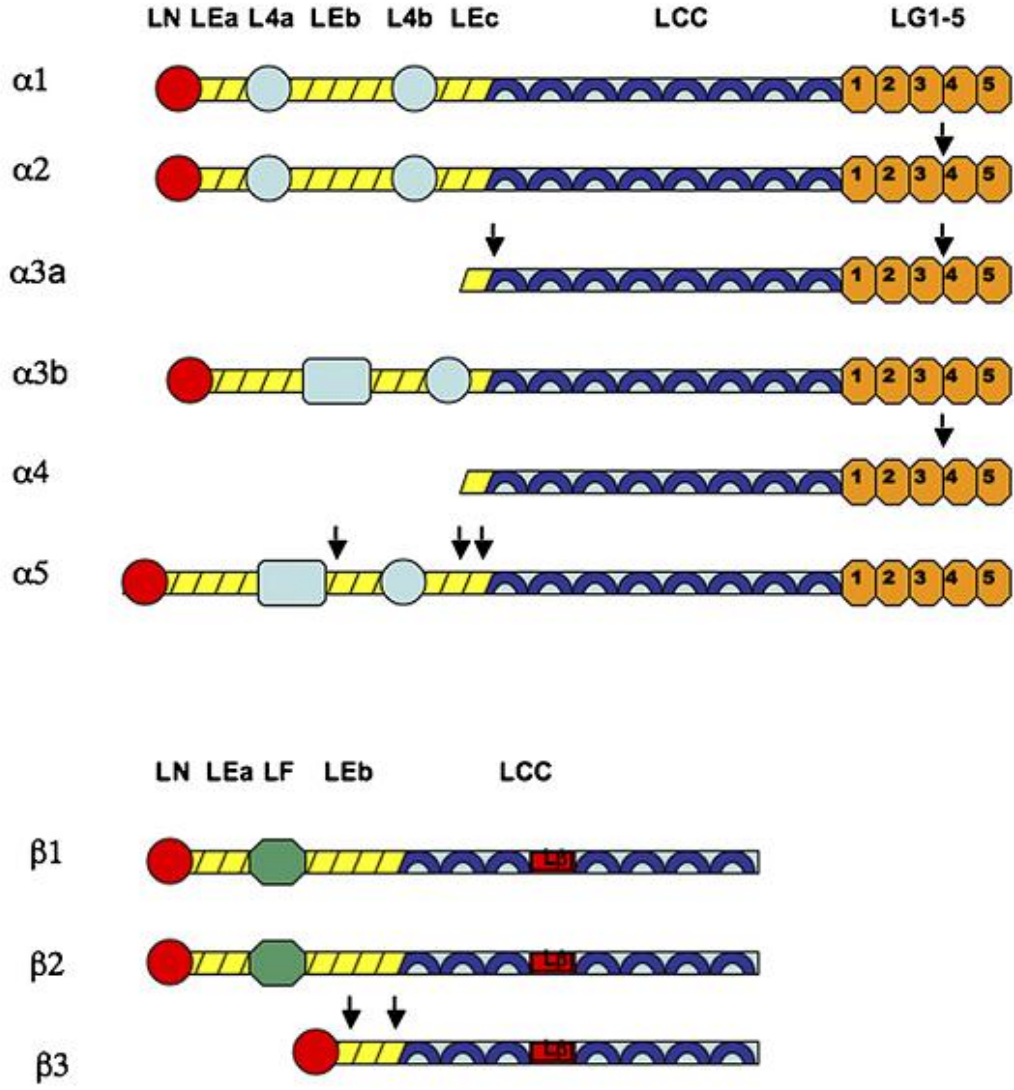
2.11. Bazal Membran Bileşeni Laminin

Laminin glikoprotein heterodimeridir ve tek polipeptid zincirinden oluşur. Bu zincir uzun kol boyunca birbirine sarılmış şekilde bulunur ve 3 tane kısa alana sahiptir. Farklı laminin genlerinde her zincir için bir kod vardır. Alandaki yapılar aynı homolojiyi paylaşır.

Şu ana kadar memelilerde 5 alfa, 4 beta, 3 gama laminin tanımlanmıştır. Bu alt üniteler 15 laminin heterodimerini oluşturmak için bir araya gelir. Laminin alt sınıfları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 2.1). Bu alt tiplerden bazal laminada en çok bulunanı laminin 1'dir ve alfa-1, beta-1 ve gama-1 zincirlerinden oluşur (23). Farelerde gelişim sırasında 4,5. günde ilk olarak eksprese olmaktadır (3). Embriyonik gelişim sırasında ve plasenta oluşumunda rol oynar. İnsan embriyolarındaki laminin 1'in, tip IV kollajenaz ekspresyonunu artırdığı ve peri-implantasyon periyodunda, maternal matrikste trofoblast adezyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (17). Laminin 1, implante fare embriyosunun erken dönemlerinde ve blastokistte bazal membranın trofoektoderminde ve iç hücre kitlesinde lokalize olmaktadır. İmplantasyon sürecince laminin-1 koryonik bazal membranda ve Reichert's membranında eksprese olur. İnsan plasentasının ilk trimesterinde laminin alfa-1 zinciri trofoblastik bazal membranda eksprese olurken ikinci trimesterde plasentanın trofoblastik adaları veya sütunlarıyla temas halinde olan villöz bazal membranda eksprese olur. Bundan dolayı laminin 1 embriyogenezis, implantasyon, plasenta oluşumu ile ilgili süreçlerde önemli rol oynayabilir (17).

Çizelge 2.1. Laminin trimerleri (24 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

Laminin alt sınıfları	
Laminin-1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
Laminin-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminin-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminin-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminin-5	$\alpha 3A\beta 3\gamma 2$
Laminin-5B	$\alpha 3B\beta 3\gamma 2$
Laminin-6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
Laminin-7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
Laminin-8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin-9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin-10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin-11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$
Laminin-12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
Laminin-14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
Laminin-15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$



Şekil 2.2. Lamininin alfa, beta, gama zincirleri. Kısa alanlarda çubuk şeklinde EGF-benzeri alanlar (LEa, LEb, LEc) ve yuvarlak alanlar (LN, L4a, L4b, L4, LF) vardır. Uzun alanın her birini alfa heliks sarmaktadır (LCC). Beta zincirinde L β alanı bulunmaktadır. Alfa zincirinde tekrarlayan 5 tane LG bölgesi bulunmaktadır (LG1-5) (25 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

Alfa alt ünitesi 3A ve 3B olmak üzere ikiye ayrılır. Alfa3A kısa kola sahip değilken, alfa3B kısa kola sahiptir. Laminin 1'den 4'e kadar N-terminal globüler alanın (LN) 3 kısa kolu vardır, çubuk şeklindeki alanlarda laminin-EGF benzeri (LEa) tekrarlardan oluşur. İç globüler (L4, IV) alanla aynı yerdedir ve çubuk şeklindeki uzun alan G alanı ile sınırlanmıştır (5,22,25). Alfa2 laminin (2 ve 4) lamininin α zincirindeki LG-3'bölgesi proteaz furinler tarafından ayrılır (24). Bu ayrılma kovalent olmayan

bağlantılar tarafından gerçekleşir, bundan dolayı terminal segmentte ayrılma olmaz. Laminin 5, alfa2 ve beta3 zincirlerini içeren tek laminin alt tipidir, çubuk şeklindeki laminin epitelde çok miktarda bulunmaktadır. Laminin 5'in tepesinde zincir yoktur. Birçok proteazlar; kemik morfogenetik protein-1, matriks metalloproteinaz-2, membran tip metalloproteinaz-1 ve plasmin gibi gama2 alanının N terminal kısmından ve terminal 2LG modülünden ayrılır. Bu proteazlar nidojeni, fibulini, heparin bağlayan aktiviteyi ve keratinositin göç etkisini uzaklaştırır, ayrıca lamininin ESM'e katılmasını etkiler. Laminin 6'dan 9'a kadar birkaç LE tekrarları hariç alfa alt ünitesinin kısa kolları eksiktir. Laminin 10-11'in her birinde alfa5 alt ünitesi LN alanı ile birlikte bulunur ve farklı sayıdaki LEa,b,c tekrarları kısa bölgedeki globüler alanlar arasında yer alır (Şekil 2.2) (7).

2.12. Lamininin Bağlanma Aktiviteleri

Lamininler, ekstrasellüler matriks etkileşimine (polimerizasyon, nidojenlere ve diğer ESM moleküllerine bağlanma) ve hücre yüzey etkileşimlerine (glikolipid, proteoglikan ve glikoprotein, reseptör aktivitelerinin birkaçı ile) katılırlar. Genellikle, çoğu hücreyel olmayan ekstrasellüler matriks bağlanması tüm üç alt ünitenin kolları ile sınırlandırılır. Oysa tüm reseptör aracılı etkileşimler alfa alt ünitesinin N-terminal ve C-terminal alanlarıyla olur. Laminin 1-4 ve laminin 10-11'de lamininin Ca bağımlı 3 LN bölgesinde polimerizasyon gerçekleşir ve bunun sonucunda bazal membran şekillenir (5,25). Laminin 6'dan 9'a kadar alfa alt ünitesinin kısa kolu yoktur. Bundan dolayı laminin 6-9 sadece 2 LN alanına sahiptir. Laminin 6-9 alt zincirleri kısa kollarından dolayı çok az polimerizasyon aktivitesine sahiptirler. Nidojen laminin 6 ve 7'ye, tip VII kollajen ise laminin 5'e bağlanır. Laminin 5, laminin 6 ve 7'ye kovalent olarak bağlanır ve bu bileşenler ESM'de gömülü halde bulunur. Laminin 8 ve 9, bazal membran içerisinde sabitlenmek için hücre yüzeyi ve nidojene bağlanabilir (5). Alfa alt ünitesinin kısa kolunun diğer moleküller ve reseptörlerle etkileşime girdiği bulunmuştur. Laminin alfa1 ve alfa2 alt ünitesinin LN zincirine bağlanan alfa1-beta1 ve alfa2-beta2 integrinler

ve laminin 5'in IVa bölgesine bağlanan alfaV-beta3 integrinler buna örnek olarak verilebilir (5,25).

2.13. Diyabetes Mellitus Tanısı ve Sınıflaması

Diyabetes mellitus (DM), insülin eksikliği veya insülinin etkisiz kalması sonucu oluşur. DM, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozulmasıyla birlikte hiperglisemi ile seyreden kronik metabolik bir sendromdur (26,27). Diyabetes mellitus, çeşitli mikro ve makrovasküler hastalıklara neden olarak vücudun tüm sistemlerini etkiler (28). Hastalığın patogenezi klinik tiplere göre farklılık göstermektedir. Tip I DM'da pankreasın β hücrelerinde genetik ve immünolojik faktörler sonucu gelişen harabiyet vardır. Tip II DM'da insüline karşı periferik direnç, insülin sekresyonunda azalma ve aşırı hepatik glikoz üretimi mevcuttur. İnsülin direncinin nedeni periferdeki insülin fonksiyonunun azalması ve hepatik glikoz üretiminin artmasıdır. Tüm bu olaylarda primer neden kesin olarak bilinmemekle birlikte hastalığın çevresel ve genetik etkiler sonucu geliştiği düşünülmektedir (9,29).

Günümüzde uzlaşmanın en fazla sağlandığı diyabetes mellitus sınıflaması Amerikan Diyabet Derneği tarafından 2000 yılında kabul görmüştür (9).

Diyabetes Mellitusun Sınıflandırılması

1) TİP 1 Diyabetes Mellitus

- a. Otoimmün
- b. İdiyopatik

2) TİP 2 Diyabetes Mellitus

- a. Periferik insülin direnci
- b. İnsülin salınım yetersizliği

3) Diğer özel tipler

- a. Beta hücre fonksiyonu ile ilgili genetik bozukluklar
- b. İnsülin etkisi ile ilgili genetik bozukluklar
- c. Ekzokrin pankreas hastalıkları
- d. Endokrinopatiler

- e. İlaçlar
- f. Enfeksiyonlar
- g. İmmün kökenli DM
- h. Gestasyonel DM

Tip 1 DM, çocukluk yaş grubunda pankreasın beta hücrelerinin otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle haraplanması sonucu gelişen insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Dünyada genel prevalans 5 yaşında 1/1430, 16 yaşında ise 1/360 civarındadır. Ülkemizdeki prevalansı yaklaşık 1/2000'dir. Etiyolojisinde genetik ve çevresel birçok etken rol oynamaktadır. Poliüri, polidipsi ve kilo kaybı ile kendini gösteren tip 1 DM, insülin, egzersiz ve beslenmenin planlanması ile tedavi edilmektedir. Birçok farklı insülin rejiminin yanısıra immünoterapi gibi yeni tedavi yöntemleri üzerinde de çalışılmaktadır (30).

Tip 2 DM en yaygın görülen metabolizma hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerde toplumun %5-10'u tip 2 DM'dur. Tüm dünyada tanı konulan diyabet vakalarının %90-95'ini tip 2 diyabet, %5-10'unu tip 1 diyabet ve %2-3'ünü ise diğer diyabet formları oluşturmaktadır. Diyabetin topluma yükü artmaktadır. Toplumların çoğunda körlük ve son dönem böbrek yetersizliğinin en önemli nedeni diyabettir. Diyabetli olmayan yaşlılarına kıyasla, tip 2 diyabetlilerde kardiyovasküler risk 2-4 kat daha fazladır (31).

Gestasyonel DM, gebelikte başlayan glikoz toleransı bozukluğunun herhangi bir derecesi olarak tanımlanır. Diyabet, gebelik öncesinde teşhis edilmiş ise pregestasyonel DM, ilk kez gebelik sırasında tespit edilmiş bir glikoz intoleransı ise gestasyonel DM adını alır (32). Gestasyonel DM, 9 hamileliğin 2'sinde görülür ve maternal ve perinatal komplikasyonlar ile ilişkilidir. Gestasyonel DM'de perinatal ölüm riskinde değişiklik olmazken gigantizm (irilik) riski artmaktadır. Diğer perinatal riskler ise; omuz distosisi, kemik çatlaması, beyin felci ve hipoglisemi gibi doğum hasarlarıdır (33). Gestasyonel diyabetli kadınların büyük çoğunluğunda glikoz intoleransı doğum sonrasında normale dönmektedir. Ancak, ileri dönemlerde bozulmuş glikoz intoleransı ya da DM ortaya çıkma riski oldukça fazladır (30,33). İnsanlarda tip 1 diyabet veya insülin bağımlı diyabetin, düşük ve konjenital anomalilerin riskini artırmak gibi nedenlerle gebeliği negatif şekilde etkilediği bulunmuştur. Ayrıca maternal diyabetin, tip 1 diyabet oluşturulan kemiricilerde implantasyon öncesinde embriyo gelişimini olumsuz etkilediği de gösterilmiştir (30,33). Genetik olarak ketonürik diyabet (KD) olan çin

hamsterlarında yapılan çalışmalarda uterus morfolojisindeki değişiklikler çalışılmış ve diyabet olmayan hamsterlarla karşılaştırıldıklarında KD'li hamsterların uterus yüzeylerinde mikrovillus bulunmadığı ve sekresyon aktivitesi olmadığı saptanmıştır. Bu epiteli döşeyen bazal laminasının kalınlığında kontrol grubuna göre 2-5 kat artış görülmüştür. KD'li hamsterların uterusunda bozulma ve hücreler arası matrikste artış saptanmıştır. Çin hamsterlarında KD safhası ile ilişkili olarak uterin epitel ve stromada bozulma olduğu ve bunun üreme bozukluğu ile muhtemel bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (34). Diyabet ve obezitenin zararlı etkileri, uterusun hücrel metabolizmasını ve yapısını bozarak dişi üreme sistemi yapısını ve fonksiyonunu tehlikeye atar (10,35). Hem insan hem de deney modellerinde yapılan çalışmalarda, uterusun endometriyal epitel ve stromal hücre katmanını indükleyen hücrel lipotoksitenin dokuda belirgin lipojenik metabolizma artışına neden olduğu bulunmuştur (10). Bunun sonucunda üreme yetersizliğinin; üreme asiklusu, ovaryan folikül gelişiminin baskılanması, ovaryan steroid hormon sentezinin baskılanması, endokrin aktivite ile uyarılmış hücrel metabolizma ve artan endometriyal atrofi ile karakterize olduğu düşünülmektedir. Diyabetten etkilenen endometriyal yapı çok miktarda artan hücre içi ve hücreler arası lipid birikimleri ile karakterizedir. Bunlar; interstisyel perivasküler sızıntı ve daha sonra da çok miktarda trigliserid emilimi ve serbest yağ asidi konsantrasyonunun artması sonucu oluşur. Obezite ve diyabete bağlı olarak üreme bölgesinin maturasyonunun tehlikeye girmesi sonucu, fetus ile plasenta gelişimi baskılanır ve üreme bölgesinde atrofi meydana gelir (35). Yüksek miktardaki plazma glikozu renal hücrelerde ve endotel hücrelerinde ESM moleküllerinin gen ekspresyonunu değiştirir. Bununla ilişkili olarak yapılan çalışmalarda da diyabetik sıçanların böbreğinde ESM bileşenlerinin ekspresyonları belirlenmiş ve kollajen sentezinde artış, heparan sülfattan zengin proteoglikanların sentezinde azalma ve laminin mRNA protein ekspresyonunda artma olduğu görülmüştür. Diyabetik bireylerin farklı dokularında ESM bileşenlerinin ekspresyonları değişmektedir, bu değişimin diyabetin patolojisine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Plasentanın yapısında ve fonksiyonunda ESM moleküllerinin potansiyel rolü vardır ve bazı çalışmalarda diyabetik hayvanların plasentasında ESM proteininin yapısı ve dağılımı açığa çıkarılmıştır. Forsberg diyabetik sıçanlarda plasentada tip IV kollajen, laminin ve fibronektindeki değişiklikleri göstermiştir (36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilen, 36 adet 8-10 haftalık dişi Balb/C fareleri kullanıldı. Fareler kontrol grubu (n=18) ve deney grubu (n=18) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Farelerde, çiftleşmeden sonraki 4. günün implantasyon penceresi dönemi olarak kabul edilmesi nedeniyle (37), kontrol ve deney grupları da kendi içlerinde 3 alt gruba ayrıldı. İlk alt grup implantasyon öncesi dönem (çiftleşme sonrası 2. gün, n=6); ikinci alt grup implantasyon günü (çiftleşme sonrası 4. gün, n=6) ve üçüncü alt grup implantasyon sonrası dönem (çiftleşme sonrası 6. gün, n=6) olarak belirlendi.

Oluşturulan gruplar ve her grupta yer alan hayvan sayısı Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kontrol ve deney gruplarında günlere bağlı olarak seçilen hayvan sayıları.

KONTROL GRUBU			DENEY GRUBU		
2. GÜN	4. GÜN	6. GÜN	2. GÜN	4. GÜN	6. GÜN
6 FARE	6 FARE	6 FARE	6 FARE	6 FARE	6 FARE

3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması

Deney grubundaki farelere, konsantrasyonu 200 mg/kg olacak şekilde 4 gün boyunca streptozotosin (Sigma Chemical Co.) sodyum sitrat tampon (pH:4,4)

solüsyonunda çözündürülerek periton içi yolla enjekte edildi. Enjeksiyondan 4 gün sonra kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi. Kontrol grubundaki streptozotosin verilmeyen farelerin tümünün kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl'den daha düşüktü.

3.3. Ovulasyonun Uyarılması

Ovulasyonun uyarılması amacıyla, hem kontrol hem de deney grubundaki hayvanlara (deney grubuna streptozotosin enjeksiyonundan 2 hafta sonra), denek başına 5 IU olacak şekilde gebe kısrak serum gonadotropini (Folligon, İntervet®) periton içi yoldan enjekte edildi. Gebe kısrak serumu verildikten 48 saat sonra da insan 5 IU koryonik gonodotropin hormonu (hCG) periton içi yolla enjekte edildi. Bu enjeksiyonun yapıldığı gün fareler bir kafeste 3 dişi ve 1 erkek fare olacak şekilde çiftleşmeye konuldu. Vajinal plağın görüldüğü sabah hamileliğin birinci günü olarak kabul edildi.

3.4. Uterusların Elde Edilmesi ve Fiksasyon

Her iki grupta gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerindeki fareler Xsilazin (10 mg/kg) + Ketamin (100 mg/kg) anestezisi ile uyutuldu. Farelerin ağırlı uyaranlara yanıt vermediği anlaşıldıktan sonra hayvanların göğüs kafesleri açıldı ve transkardiak yoldan önce %0,9'luk izotonik NaCl çözeltisi, bunu takiben ise %4'lük paraformaldehit + %0,05 glutraldehit solüsyonu ile perfüzyon yapıldı. Yeterli perfüzyon ve fiksasyon sağlandıktan sonra, uterus iki taraflı olarak çıkartıldı. Uterus kornularının birisi immunohistokimyasal işaretlenmeye uygun fiksasyonu sağlamak için %10'luk nötral formalin çözeltisinde 48 saat bekletildi. Diğer uterus kornununun bir kısmı RNA izolasyonu için ependorfa, kalan kısmı ise elektron mikroskopik incelemeye uygun fiksasyonu sağlamak için %2,5'lik glutraldehit çözeltisine alındı. Fiksasyondan sonra ışık ve elektron mikroskopik inceleme için ayrı ayrı doku takip prosedürü uygulandı.

3.5. Işık Mikroskopik Doku Takibi ve İmmunohistokimyasal İşaretleme

1. Işık mikroskobu için dokular fikse edildikten sonra akarsuda yıkandı.
2. Artan derecelerde alkollerden geçirildi (%70, 80, 90, 96).
3. Ksilol ile şeffaflandırma işlemi yapıldı.
4. Ksilol + sıvı parafin karışımında bekletildi.
5. Dokular sıvı parafine gömüldü.
6. Mikrotomla adeziv lamlara 5µm kalınlığında kesitler alındı.
7. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısında 3X10 dakika ksilolden geçirildi.
8. Rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı.
9. Fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için tripsin (pH:7,6) içinde 37°C'de (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika muamele edildi.
10. Bu işlemden sonra taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3X5 dakika yıkandı.
11. Endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için distile suda %12,5'luk olarak hazırlanmış hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 10 dakika inkübe edildi.
12. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
13. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için Novocastra™ Protein Block ile 8 dakika inkübe edildi.
14. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmadan PBS içinde %0,5'lik sığır serum albumin (BSA) ile sulandırılmış anti-laminin primer antikor (Abcam ab11575) 1/25 dilüsyonda damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
15. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
16. Biotin ile bağlanmış polivalan sekonder antikor (Scytek®) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.
17. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
18. Streptavidin peroksidaz enzim solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi.

19. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
20. Peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkube edildi.
21. Distile suda 5 dakika yıkandı.
22. Hematoksilen ile 5-10 saniye zıt boyama yapıldı.
23. Akarsuda berraklaşana kadar yıkandı.
24. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildi.
25. Ksilolden 3x5 dakika geçirildi.
26. Entellan ile kapatıldı.

Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0,5 PBS-BSA damlatıldı. Daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi.

Dokular, ışık mikroskobu (Olympus®BX50 Olympus GmbH, Almanya) ile incelendi, aynı mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Nikon®Coolpix5000, Nikon Corp. Tokyo, Japonya) ile fotoğrafları çekildi.

3.6. Işık Mikroskopik Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz

Işık mikroskopik düzeyde, kontrol ve deney gruplarında endometriyal epitelin bazal membranında, laminin ile işaretlenme düzeyi değerlendirildi. Değerlendirme aşağıdaki şekilde yapıldı:

Hiç işaretlenme yok: 0

Yer yer işaretlenme var: +

Orta düzeyde işaretlenme var: ++

Kuvvetli işaretlenme var: +++

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde kategorik veriler frekans ve yüzde cinsinden, sürekli veriler ise verinin dağılım şekline göre ortalama \pm standart sapma ya da ortanca değer (yüzdeler) cinsinden özetlenmiştir. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin gruplarda karşılaştırılmasında *Mann Whitney U* testi

uygulandığından kontrol ve deney grubu arasında laminin düzeyleri bakımından istatistiksel olarak fark olup olmadığına karar verebilmek için *Mann Whitney U* testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7 Elektron Mikroskopik Doku Takibi ve İnceleme

Elektron mikroskopik inceleme için alınan dokular öncelikle 1mm³'lük parçalara bölündü ve yaklaşık 4–6 saat %2,5'lik gluteraldehit solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular fosfat tampon solüsyonuna alındı. Daha sonra aşağıdaki sıraya göre doku takibi yapıldı

1. %1'lik osmium tetraoksit solüsyonunda + 4° C'de 1 saat
2. Fosfat tamponda 2X10 dakika
3. % 50'lik etil alkolde + 4 °C'de 15 dakika
4. % 70'lik etil alkolde + 4 °C'de 15 dakika
5. % 85'lik etil alkolde + 4 °C'de 15 dakika
6. % 96'lık etil alkolde + 4 °C'de 15 dakika
7. % 100'lük etil alkolde + 4 °C'de 15 dakika
8. % 100'lük etil alkolde + 4 °C'de 15 dakika
9. %100'lük etil alkolde oda sıcaklığında 15 dakika
10. Propilen oksitte oda sıcaklığında 15 dakika
11. Propilen oksitte oda sıcaklığında 15 dakika
12. Propilen oksit + rezin oda sıcaklığında 30 dakika
13. Propilen oksit + rezin oda sıcaklığında 30 dakika
14. Epoksi rezinde oda sıcaklığında 1 gece

Bu işlemlerden sonra dokular rezine (EMBed-812 Embedding Kit Katalog No:13940) gömülerek 60 °C'lik etüvde 24 saat süreyle polimerize edildi. Bu bloklardan ultramikrotom (Leica Ultracut UCT125, Leica Avusturya-Viyana) ile 70 nm kalınlığında kesitler, 300 gözenekli bakır gridlere alındı ve uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile kontrastlandı. Kontrastlama işlemi; aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Kesitler uranil asetatda 5 dakika bekletildi.
2. Distile su ile yıkandı.

3. Kurşun sitratta 5 dakika bekletildi.
4. Distile suda yıkandı.
5. Kurutma kâğıdı ile kurutuldu.

İncelemek için boyanan kesitler transmisyon elektron mikroskobu (Jeol JEM1011, Tokyo, Japonya) ile incelendi. Mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Germany) ile incelenen kesitlerin fotoğrafları çekildi.

3.8. RNA İzolasyonu ve Real Time-PCR

Uterus dokularından RNA izolasyonu manuel olarak Asit Guanidinyum-Fenol-Kloroform Yöntemi (AGPC) ile yapıldı (38).

Kullanılan solüsyonlar aşağıdaki gibidir:

Sodyum Sitrata (0,75 M): 15,78 g sodyum sitrat tartıldı ve DEPC-H₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

N-Lauroyl Sarkozil (%10): 1 gr sarkozil tartıldı ve DEPC-H₂O ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

DEPC-H₂O: 1000 ml iyonize su içerisine 2 damla DEPC eklendi. 1 gece oda ısısında bekletildi. Ertesi gün, pastör fırınında 60 °C'de 2 saat şişenin kapağı hafifçe gevşetilip bekletilerek hazırlandı.

Guanidinyum İsoyosiyanat (GSCN) Solüsyonu: 25 mg GSCN (4 M), 5 ml sodyum sitrat (0,75 M), 2,5 ml sarkozil (%10) tartıldı ve DEPC-H₂O ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Denatürasyon Solüsyonu: 9,9 ml GSCN çözeltisi içerisine 0,1 ml 2-merkaptetanol (14 M) eklenerek hazırlandı.

İşlemler aşağıdaki gibi yapıldı:

- 1) RNA izolasyonu için ayrılan steril ependorftaki dokular steril PBS ile yıkandı
- 2) Üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklenip birkaç saniye vortekslendikten sonra 15 dk -20 °C'de bekletildi.
- 3) 500 µl fenol-kloroform-isoamilalkol (25:24:1) eklendi.

- 4) 15 dk -20 °C'de bekletildi. 4 dk 10.000 rpm'de santrifüjlendi.
- 5) Üst faz alınıp yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
- 6) Üzerine 500 µl kloroform-isoamilalkol (24:1) eklendi.
- 7) 2 dk 10.000 rpm'de santrifüjlendi.
- 8) Üst faz yeni bir 1,5 ml'lik tüpe alınıp üzerine 1 ml %96'lık etanol eklendi.
- 9) En az 1 gece beklemek üzere -20 °C'ye bırakıldı.
- 10) 15 dk 12.500 rpm'de santrifüjlendi.
- 11) Tüpteki etanol atılıp, 500 µl %70'lik etanol eklendi.
- 12) Birkaç saniye vortekslendi.
- 13) 5 dk 12.500 rpm'de santrifüjlendi.
- 14) Süpernatant atılıp, tüpün ağzı açık olarak en az 10 dk bekletildi.
- 15) Pellet üzerine 50 µl DEPC-H₂O eklendi.
- 16) 70 °C'de 1 saat bırakıldı.
- 17) Elde edilen total RNA, 200 ünite *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptaz* enzimi kullanılarak cDNA'ya reverse transkribe edildi.
- 18) Bunun için elde edilen RNA örnekleri ile (1 µl) RT-PCR yapıldı.
- 19) PCR ortamı; 5 µl 5X RT-PCR buffer, 10 µl 2 mM dNTP karışımı, 1µl poli-T primeri, 0,1 µl reverse transkriptaz enzimi, 0,5 µl RNase inhibitörü ve 12 µl distile su ile hazırlandı.
- 20) RT-PCR koşulları; 37 °C'de 1 saat ve 95 °C'de 5 dakika olarak uygulandı.
- 21) Elde edilen cDNA'lar ekspresyon analizi yapılana kadar +4 °C'de saklandı.
- 22) Elde edilen cDNA örneklerinden; laminin β₁ ve kontrol geni olarak da beta aktin'in gen ekspresyonları Real Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems) cihazı ile belirlendi.
- 23) Laminin β₁ ekspresyon tayini için TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, 186424853_1) kiti, kontrol geni olarak *Mus musculus actin*, beta geni kullanıldı.
- 24) *Mus musculus actin*, beta geni ekspresyon belirlemesi için, Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak "NM_007393.3, *Mus musculus actin*, beta(ACTB), mRNA", nükleotid dizisinden oluşturulan aşağıda belirtilen primer ve prob dizileri kullanıldı. Primer ve proplar, "Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland" tarafından sentezlendi.

ACTB-Mm-F,5'-GGCTCCTAGCACCATGAAG-3'

ACTB-Mm-R,5'-ACCGATCCACACAGAGTACT-3'

ACTB-Pr,5'-Yakima Yellow-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-BHQ-1-3'

ACTB genine özgü prob "Yakima Yellow" işaretlidir. Değerlendirme sürecinde "VIC" olarak değerlendirilmesinin sebebi "Yakima Yellow" ile "VIC" in benzer dalga boylarında ışımaya yapmasıdır. Yakima Yellow maksimum emisyon değeri 549 nm dir (39,40).

3.9. Real-Time PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı

Real-Time reaksiyon ortamı, toplam 25µl olacak şekilde hazırlandı.

- 12,5 µl, 2x TaqMan Gene Expression Master Mix
- Laminin β₁ için, 1,2 µl Assay Mix (Applied Biosystems, 186424853_1), ACTB için ACTB-Mm-F ve ACTB-Mm-R primerlerinden 900 nmol olacak şekilde primerler, ACTB-Pr probundan 200 nmol olacak şekilde probalar kullanıldı.
- 2,5µl cDNA örneği
- 8.8 µl Distile Su

3.10. Real-Time PCR Reaksiyon Şartları

50 °C'de 2 dakika ön inkübasyon	(1 döngü)
95 °C'de 10 dakika aktivasyon	(1 döngü)
95 °C'de 15 saniye denatürasyon	(40 döngü)
60 °C'de dakika bağlanma/uzama	(40 döngü)

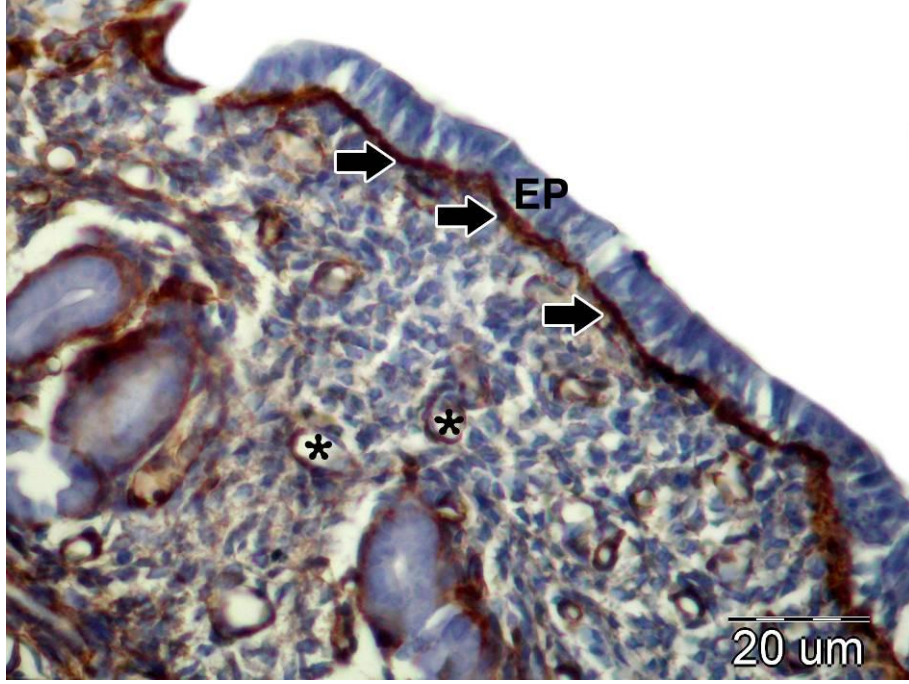
Real-time PCR işlemi ve kantitasyon “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) cihazı” ve “7500 Software; SDS 2.0.3 software for 7500 Real Time PCR Product” programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

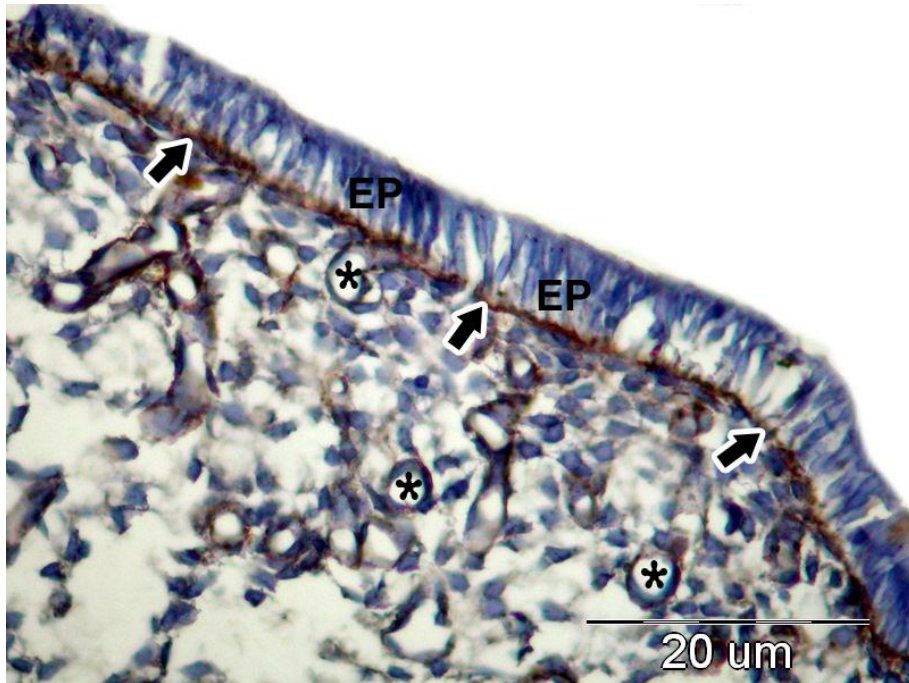
4.1. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve deneysel diyabet oluşturulmuş gebe farelerden alınan uterus dokularında laminin ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi.

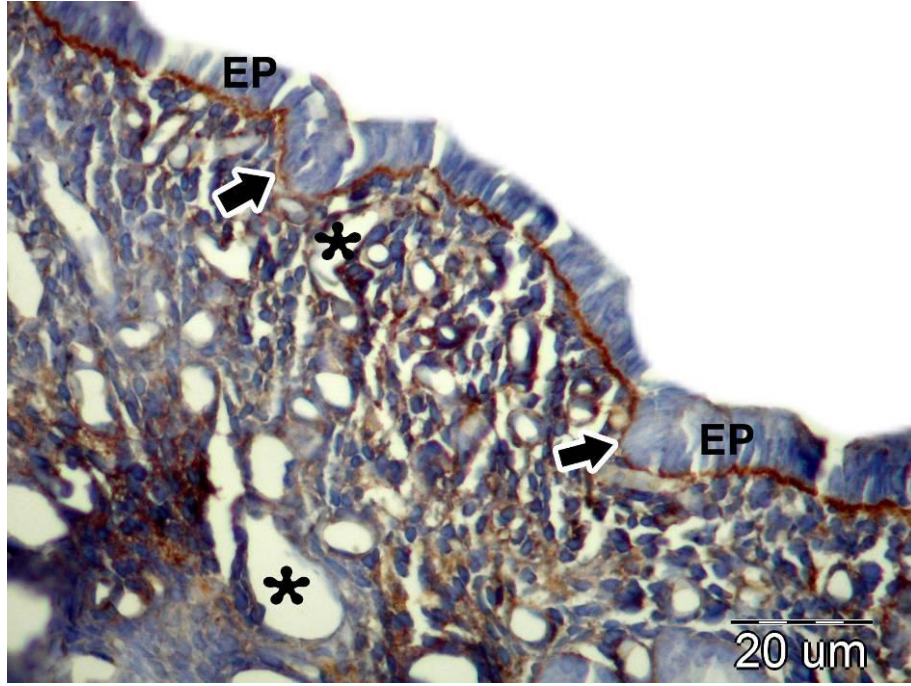
Kontrol Grubu: Kontrol grubundaki farelerde, gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde endometriyum yüzey ve bez epitelinin altında yer alan bazal membranda lamininle kuvvetli işaretlenme izlendi (Şekil 4.1.1, 4.1.2 ve 4.1.3). Günler arasında laminin ekspresyonunda fark görülmedi. Fakat implantasyon döneminden sonra desidua hücrelerinde laminin ekspresyonu görüldü.



Şekil 4.1.1. Kontrol grubu. 2. günde yüzey epitel hücreleri (EP), laminin antikoruna ile işaretlenmiş bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).

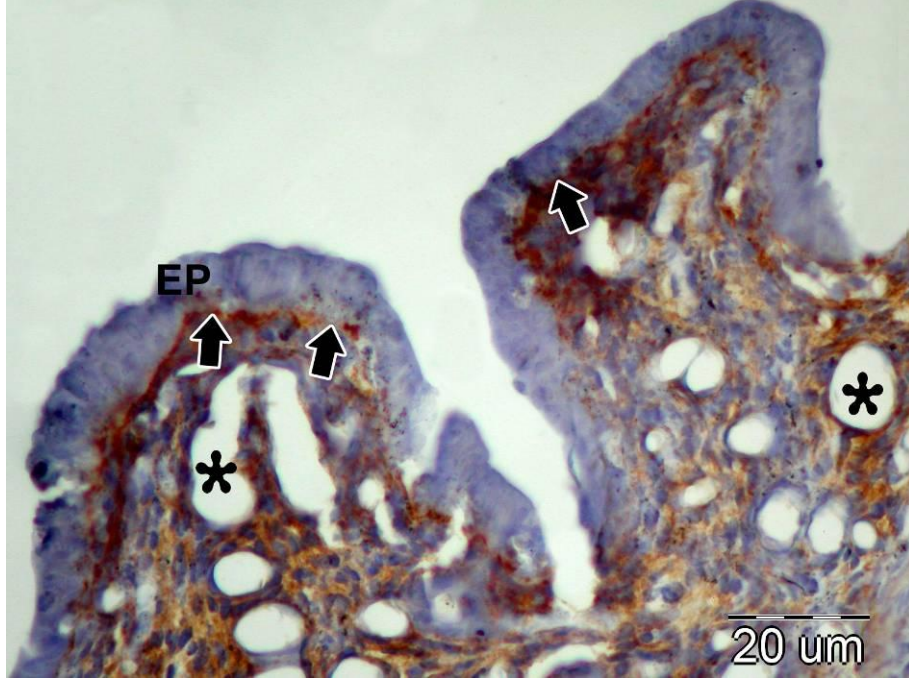


Şekil.4.1.2. Kontrol grubu. 4. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).

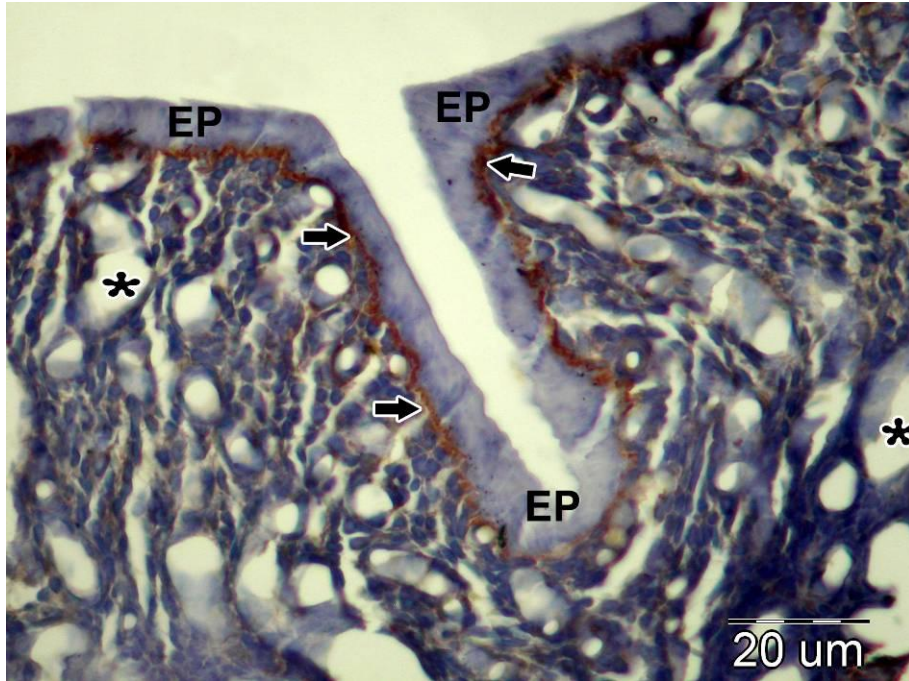


Şekil 4.1.3. Kontrol grubu. 6. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).

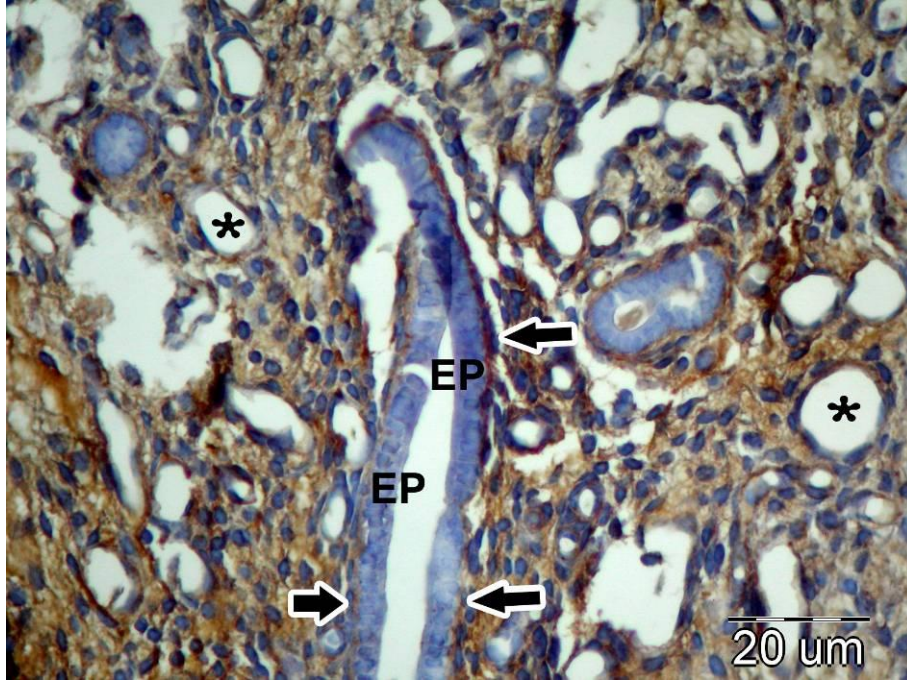
Deney Grubu: Diyabet oluşturulan deney grubunda gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde fare uteruslarından alınan örneklerde endometriyum yüzey ve bez epitelinin altında yer alan bazal membranda lamininde işaretlenme gözlemlendi. Bu işaretlenme kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı ($p=0,021$) (Çizelge 4.1.1). İkinci, dördüncü ve altıncı günlerdeki işaretlenme yoğunluğu kontrol grubu ile kıyaslandığında; 2. ve 4. günde epitelin bazal membranında laminin ekspresyonu açısından bir fark görülmedi ($p=0,201$) ($p=0,214$). Fakat gebeliğin 6. gününde kontrol grubuna göre laminin ekspresyonunda artış olduğu görüldü ($p=0,023$) ve bazal membranda yer yer kesintiler olduğu saptandı (Şekil 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6) (Çizelge 4.1.2).



Şekil 4.1.4. Deney grubu. 2. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).



Şekil 4.1.5. Deney grubu. 4. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).



Şekil 4.1.6. Deney grubu. 6. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).

Çizelge 4.1.1. Kontrol ve deney grupları arasında laminin ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları.

Kontrol		Deney	
Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
1,58	0,84	2,21	0,85

Çizelge. 4.1.2. 2.,4.,6., günlerde kontrol ve deney grupları arasında laminin ekspresyonunun istatistiksel analizinin sonuçları.

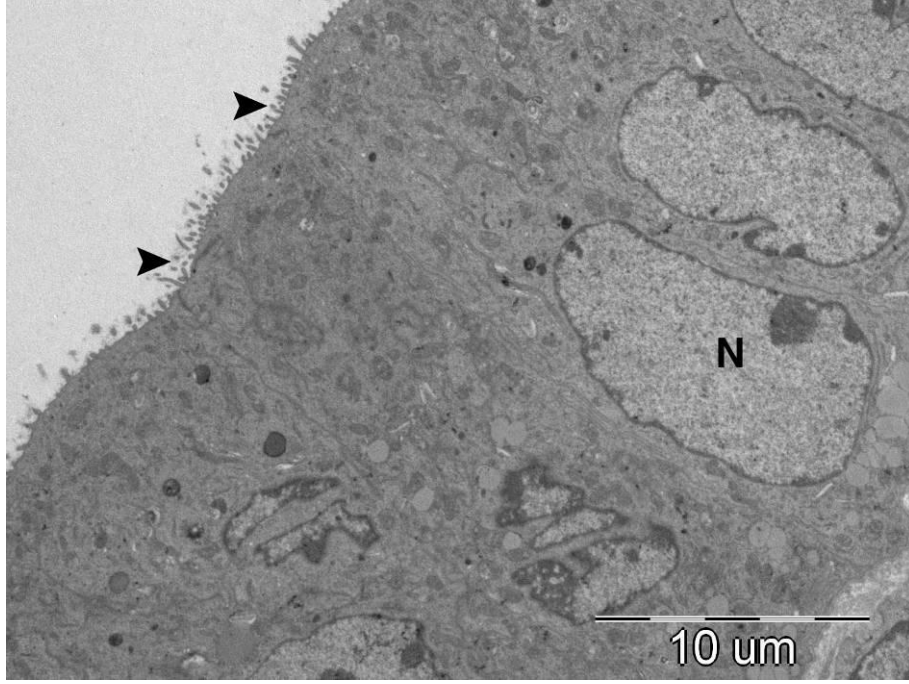
GRUP GÜN	Kontrol		Deney	
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
2. gün	2,166	0,983	1,500	0,547
4.gün	2,571	0,534	2,00	0,894
6.gün	2,166	1,169	2,871	1,975

İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ 'dir. Laminin düzeyleri bakımından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,021$). Laminin düzeyleri bakımından ikinci günde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,201$). Laminin düzeyleri bakımından dördüncü günde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,214$). Laminin düzeyleri bakımından altıncı günde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,023$).

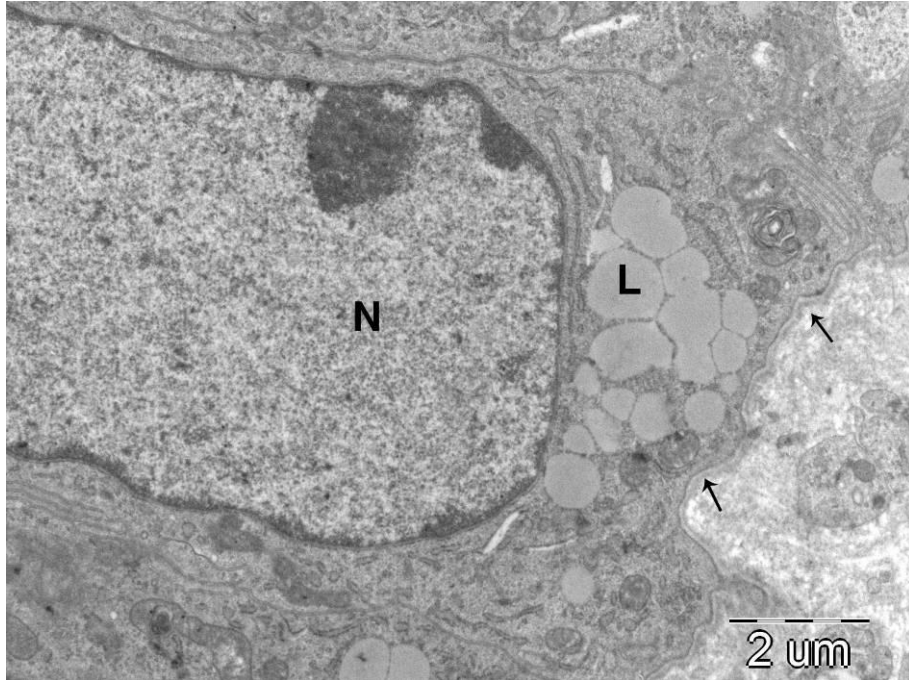
4.2 Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol Grubu: İnce yapı düzeyinde normal uterus histolojik yapısı görüldü. Endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum tabakaları ayırt edildi. Endometriyumda yüzey ve bez epitel, bazal membran ve altındaki stroma incelendi. Bu yapıların doğal görünümde olduğu tesbit edildi.

Kontrol grubu 2. günde endometriyum yüzey epitelinde çok sayıda ve normal morfolojik görünümüne sahip mikrovillus izlendi (Şekil 4.2.1). Endometriyum epitel hücrelerinin apikal kısmında geniş tabanlı hücre protrüzyonları olarak tanımlanan pinopod yapıları gözlemlenmedi. Luminal epitel hücrelerinin bazal kısmında az miktarda lipid damlacıkları görüldü. Bazal ve retiküler lamina kalınlığı normaldi ve bazal membran devamlı olarak izlendi. Epitel tabakasında dejenere hücre görülmedi. Komşu epitel hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri gözlemlendi (Şekil 4.2.2).

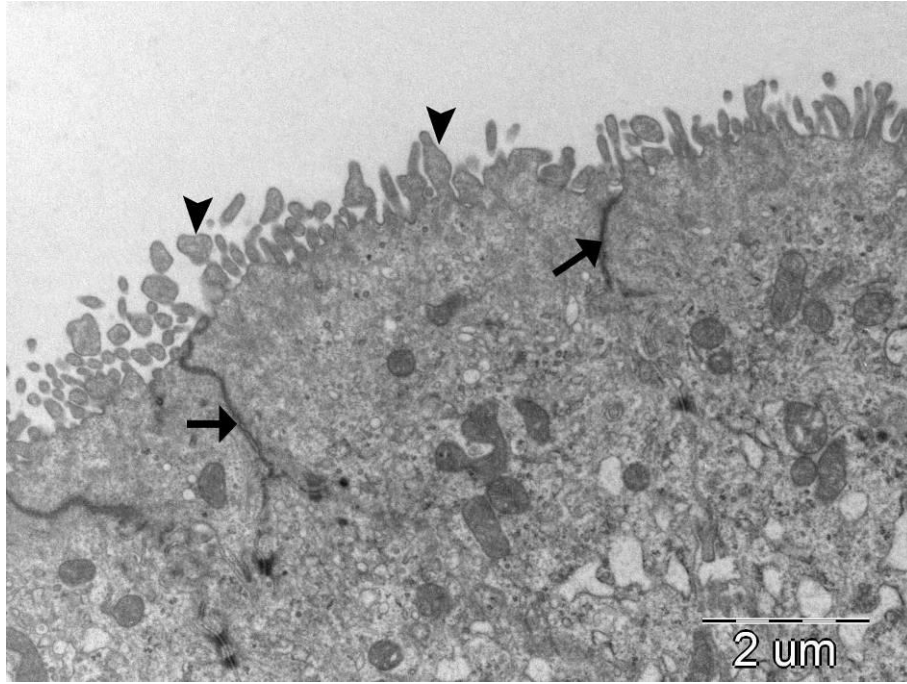


Şekil 4.2.1. Kontrol grubu. 2. gün endometriyum luminal epitelindeki mikrovilluslar (ok başı), epitel hücresi nukleusu (N) (X4,000).

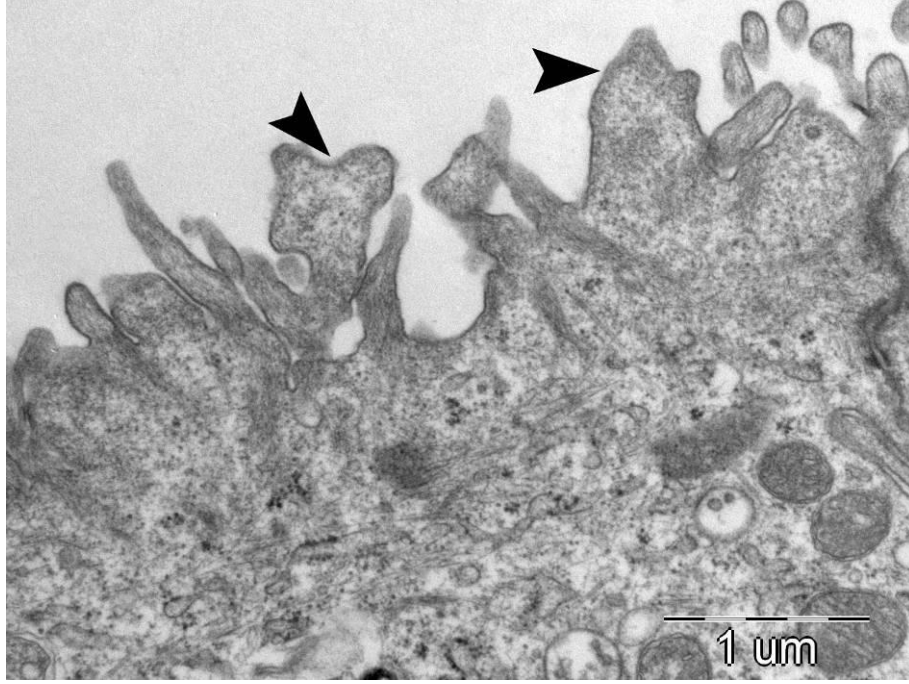


Şekil 4.2.2. Kontrol grubunda gebeliğin 2. gününde epitel nukleusu (N), epitelin bazal kısmında lipid damlacıkları (L), epitelin bazal laminası (oklar) (X10,000).

Kontrol grubunda 4. günde, endometriyal luminal epitelde mikrovillus sayısında 2. güne göre artış gözlemlendi. Ayrıca çok sayıda pinopod vardı (Şekil 4.2.3, 4.2.4). Luminal epitelin bazal kısmında lipid artışı vardı. Retiküler laminada bazı bölgelerde hafif kalınlaşma görüldü.

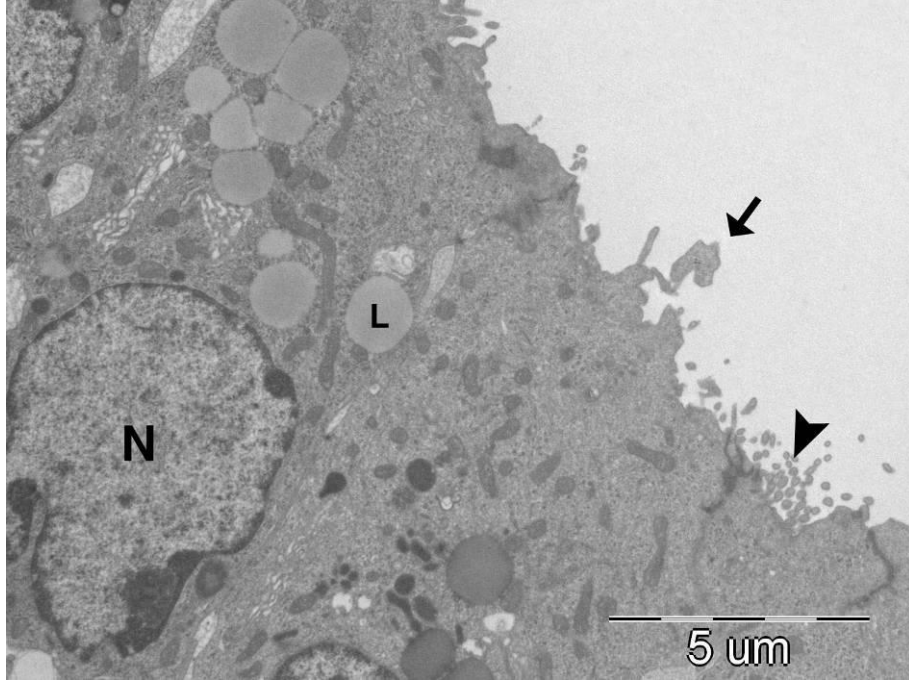


Şekil 4.2.3. Kontrol grubunda gebeliğin 4. gününde endometriyal epitel hücrelerindeki pinopod yapıları (ok başı), sıkı bağlantı kompleksleri (ok) (X12,000).

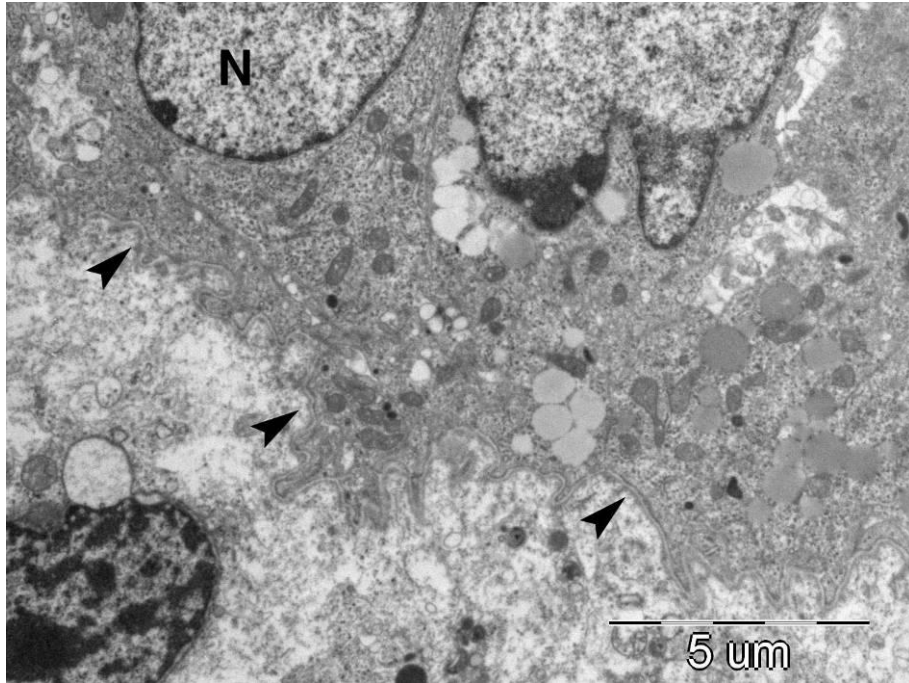


Şekil 4.2.4. Kontrol grubunda gebeliğin 4. gününde endometriyal epitel hücrelerindeki pinopod yapıları (ok başı) (X30,000).

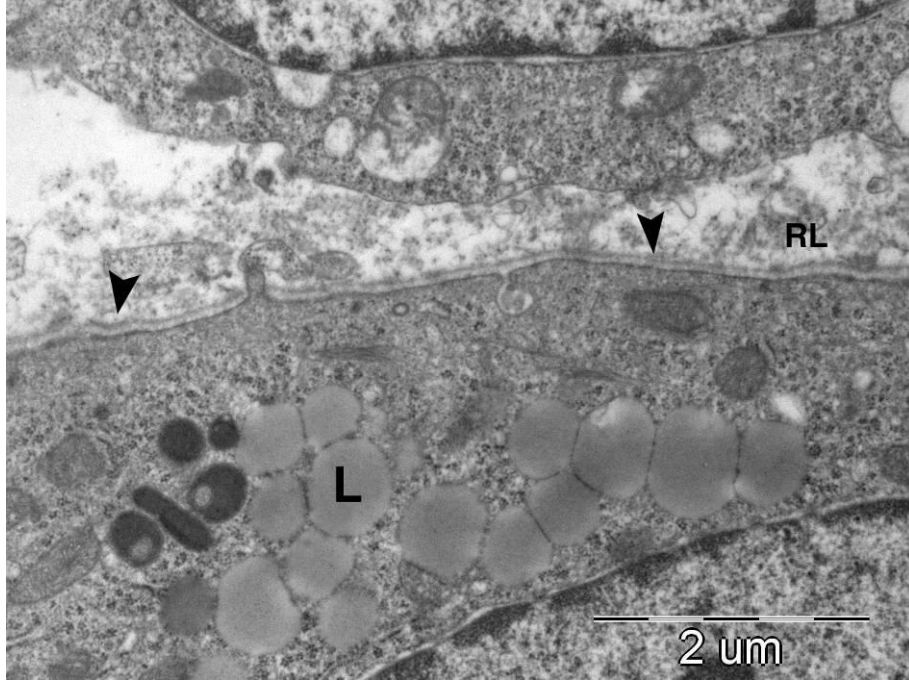
Kontrol grubunda 6. günde 4. güne göre az olmakla beraber mikrovillus yapıları ve pinopodlar görüldü (Şekil 4.2.5). Endometriyal luminal epitel hücrelerinin bazal kısmında az miktarda lipid damlacıkları görüldü. Bazı epitel hücreleri dejenere olmuştu. Bazal lamina kesintisiz olarak izlendi (Şekil 4.2.6, 4.2.7).



Şekil 4.2.5. Kontrol grubunda gebeliğin 6. gününde luminal epiteldeki mikrovillus (ok başı) ve pinopod (ok) yapısı. Epitel hücre nükleusu (N) (X7,000).

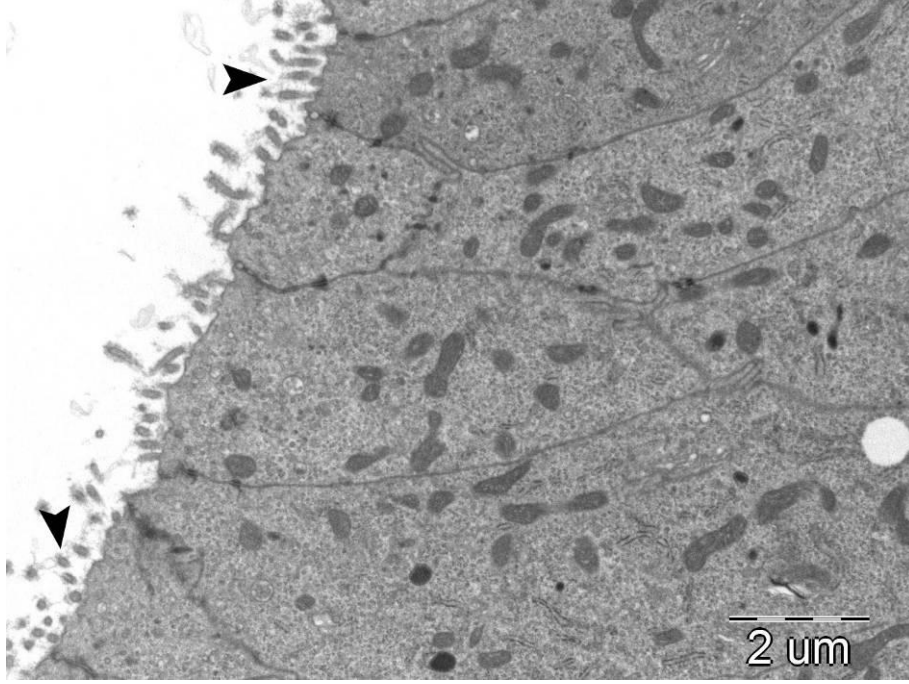


Şekil 4.2.6. Kontrol grubunda gebeliğin 6. gününde luminal epitelin nükleusu (N), epitelin altını döşeyen bazal lamina (ok başları) (X7,000).

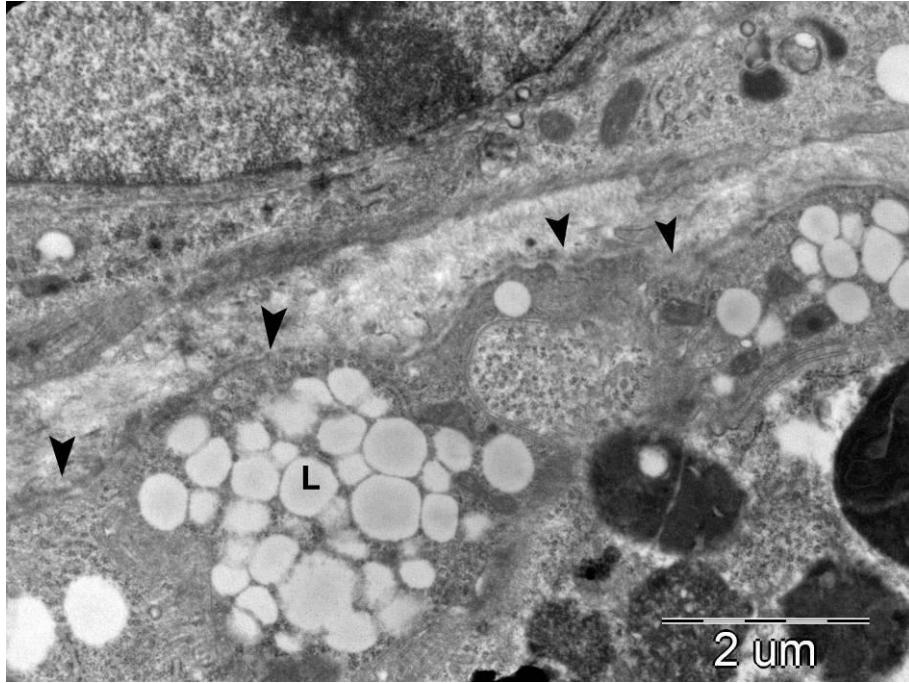


Şekil 4.2.7. Kontrol grubunda gebeliğin 6. gününde luminal epitelin nükleusunun bazal kısmında bulunan lipid damlacıkları (L), epitelin altını döşeyen lamina densa (ok başları) ve retiküler lamina (RL) (X20,000).

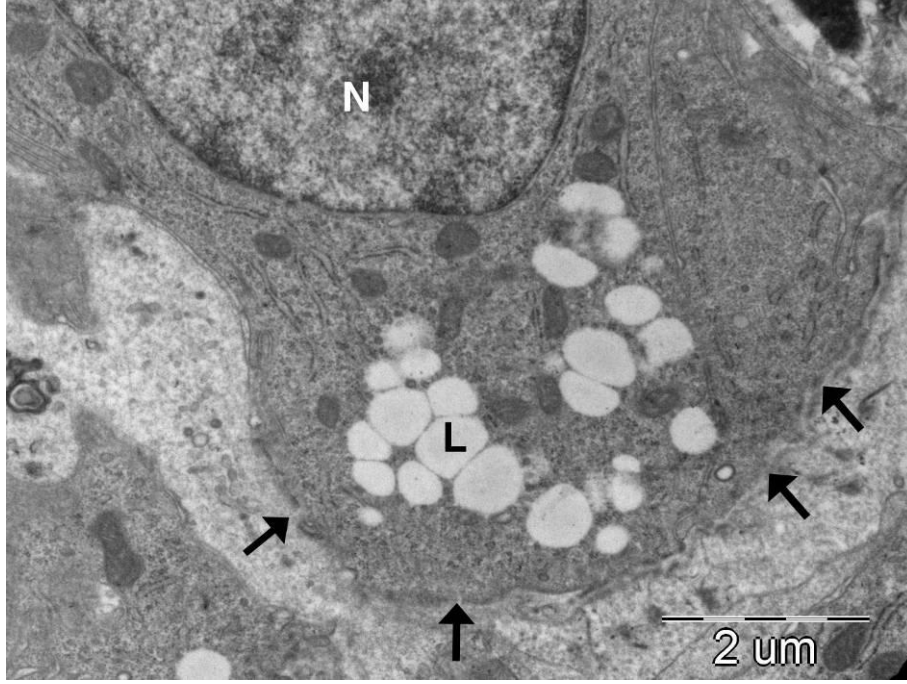
Deney Grubu: Diyabet oluşturulan deney grubunun 2. gününe ait uterus dokularının elektron mikroskopik incelemesinde, luminal epitel hücrelerinde bölgesel olarak mikrovillus kaybı görüldü (Şekil 4.2.8). Lipid birikimi epitelin hem bazal hem de apikal kısmında mevcuttu (Şekil 4.2.9). Bazal laminada kesintiler izlendi ve retiküler laminada kalınlaşma olduğu saptandı (Şekil 4.2.10).



Şekil 4.2.8. Deney grubunda gebeliğin 2. gününde luminal epitelin apikal yüzeyindeki mikrovilluslar (ok başları) (X10,000).

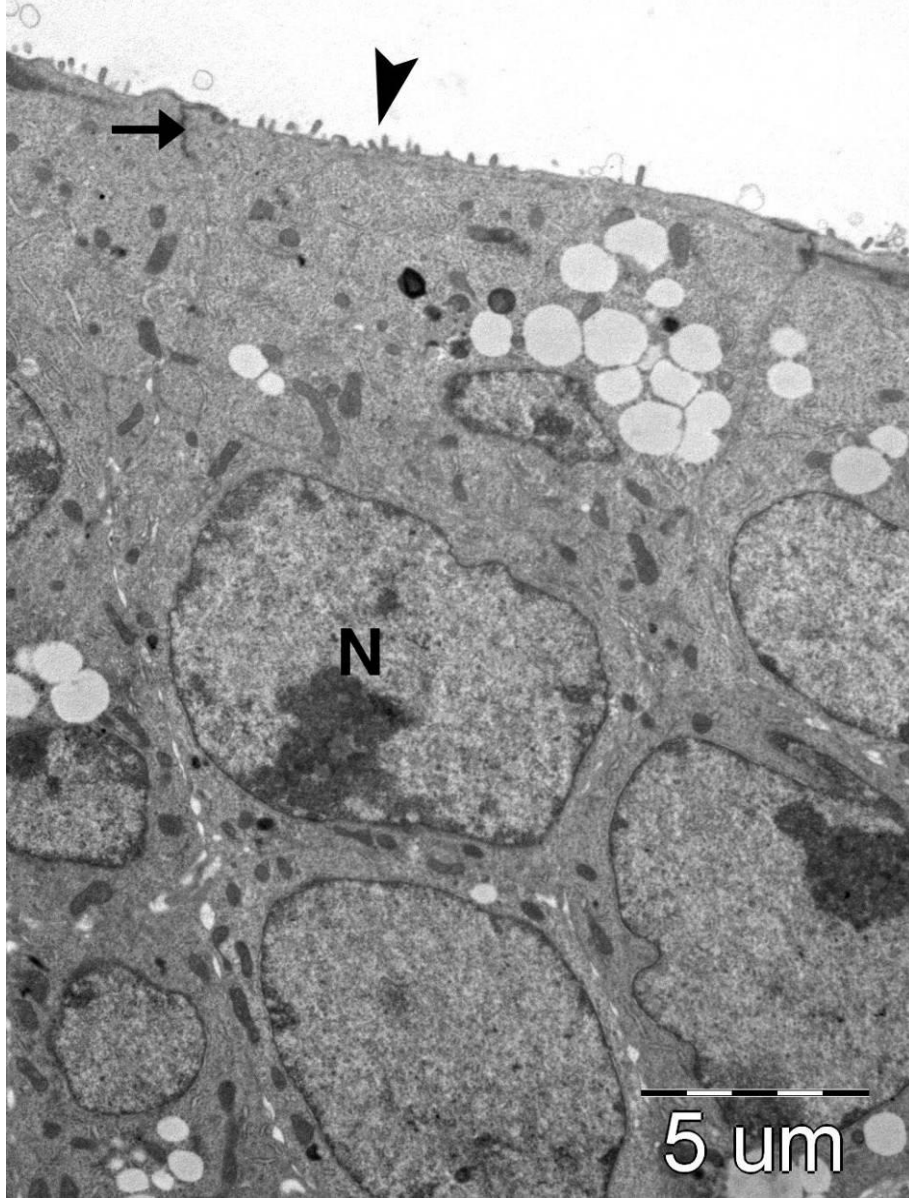


Şekil 4.2.9. Deney grubunda gebeliğin 2. gününde epitel-hücrelerinin bazal kısmında bulunan lipid damlacıkları (L), lamina densada kesintiler (ok başı) (X15,000).

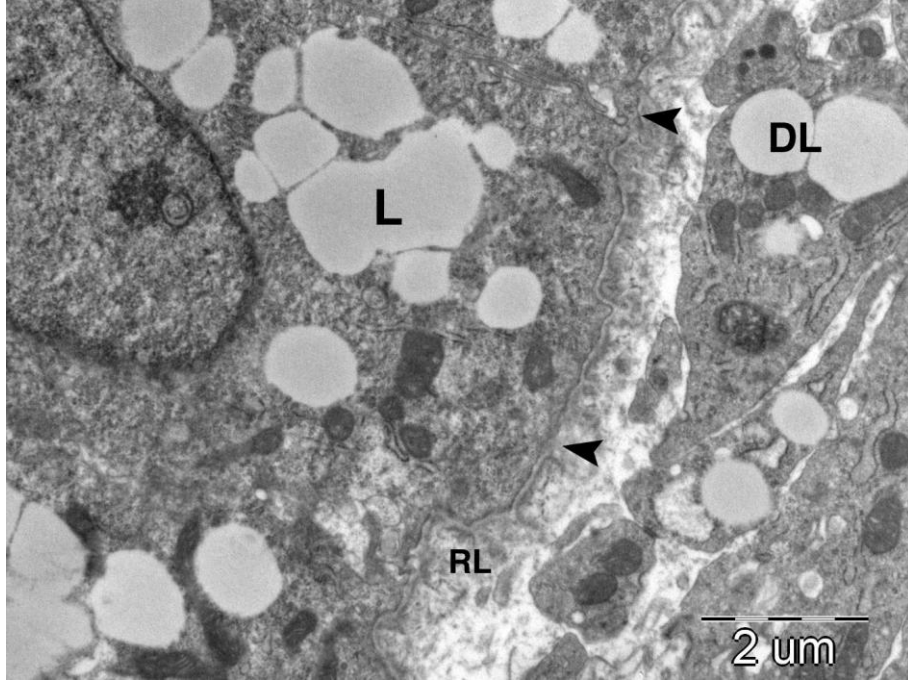


Şekil 4.2.10. Deney grubunda gebeliğin 2. gününde epitel hücresinin bazal kısmında bulunan lipid damlacıkları (L), lamina densada kesintiler (ok başı) (X15,000).

Dördüncü günde mikrovilluslarda kontrol grubuna göre azalma, küntleşme ve yer yer tümüyle kayıp olduğu görüldü (Şekil 4.2.11). Pinopod yapıları izlenmedi (Şekil 4.2.11). Bazal lamina içerisinde lamina densada yer yer silinme ve retiküler laminada kalınlaşma görüldü (Şekil 4.2.12). Bu kalınlaşmanın kontrol grubuna göre daha fazla olduğu saptandı. Komşu epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde yer alan bağlantı komplekslerinin boyunda genel olarak kısalma belirlendi. Epitel hücrelerinin yanı sıra, stromada yer alan desidua hücrelerinde aşırı lipid birikimi dikkati çekti (Şekil 4.2.12).

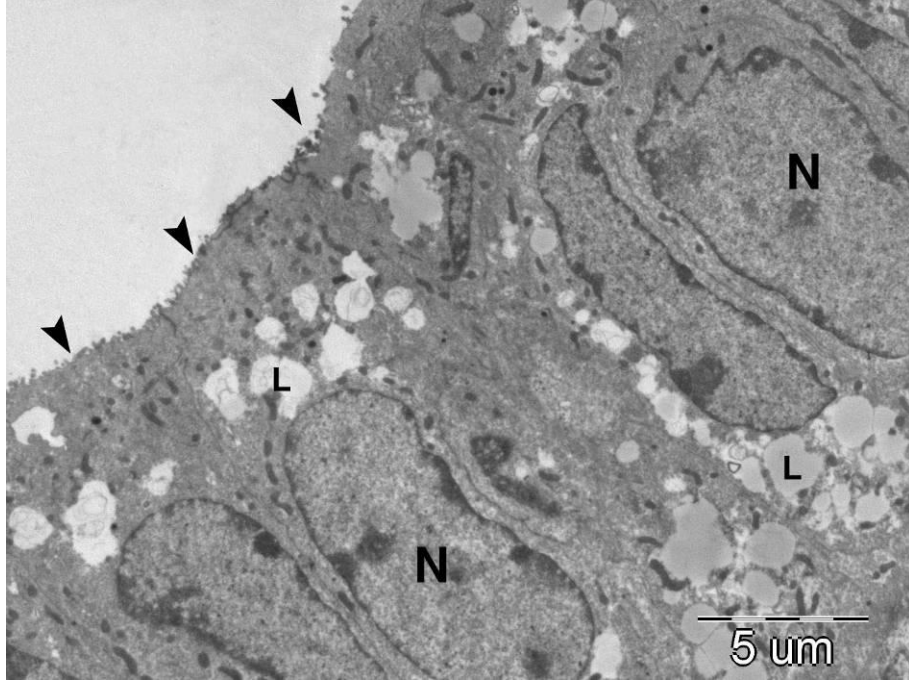


Şekil 4.2.11. Deney grubunda gebeliğin 4. gününde endometriyal epitelin apikal yüzeyinde az sayıda mikrovillularda kontrol grubuna göre azalma (ok başları), epitel hücre nükleusu (N), sıkı bağlantı kompleksleri (ok) (X5,000).

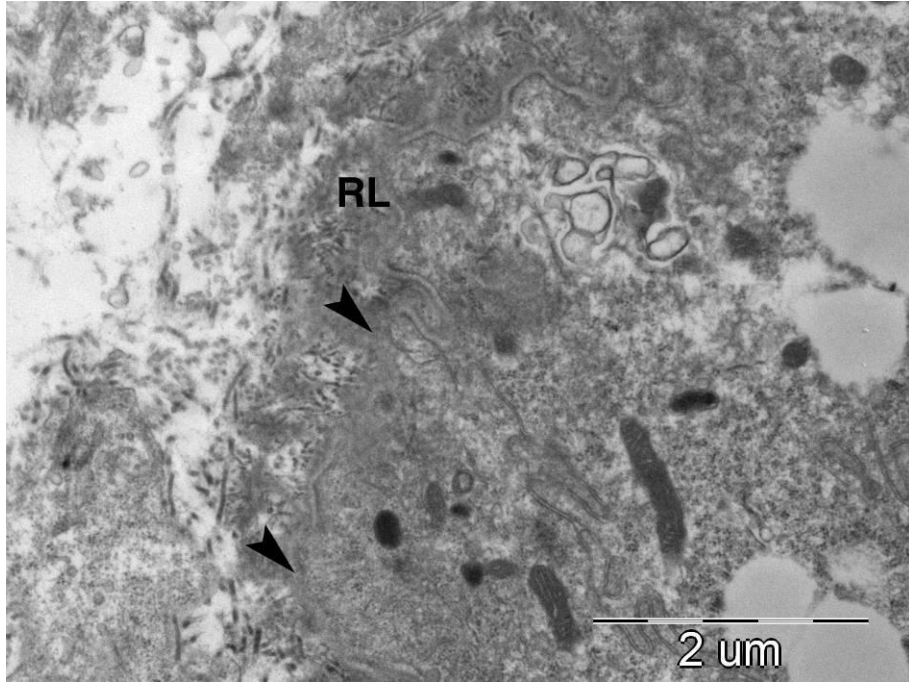


Şekil 4.2.12. Deney grubunda gebeliğin 4. gününde endometriyal epitelin bazal yüzeyinde lipid damlacıkları (L), desidual hücrelerdeki lipid damlacıkları (DL), retiküler laminada kalınlaşma (RL), lamina densada kesintiler (ok başları) (X12,000).

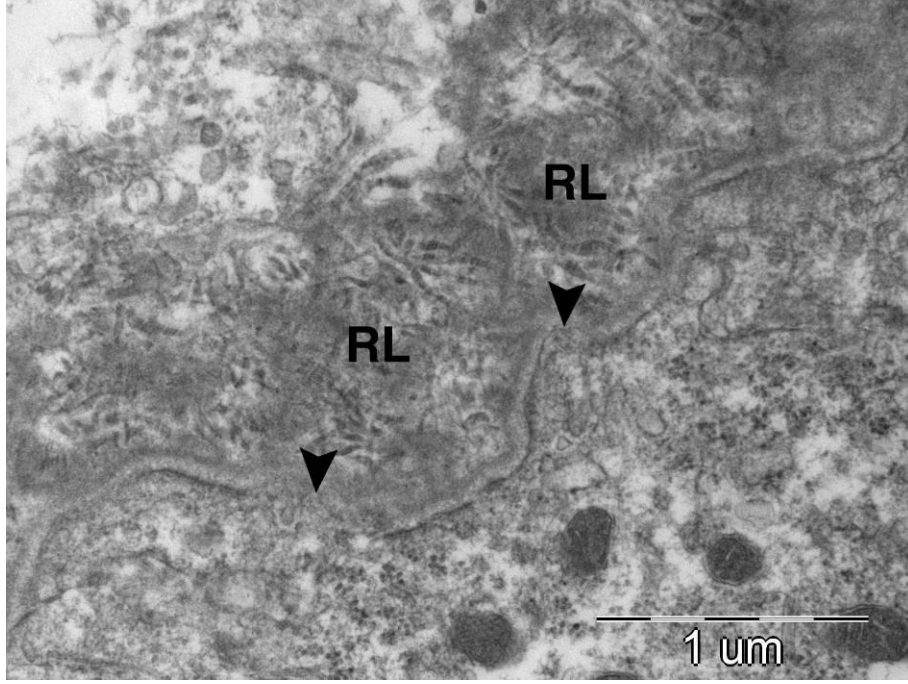
Altıncı günde luminal epitel hücrelerinin apikal ve bazal kısmında aşırı miktarda lipid birikimi vardı. Yer yer mikrovillus sayısında azalma ve küntleşme görüldü (Şekil 4.2.13). Bazal laminadaki kalınlaşmanın oldukça belirgin ve yaygın olduğu saptandı. Ayrıca bazal laminada kesintiler görüldü (Şekil 4.2.14, 4.2.15).



Şekil 4.2.13. Deney grubunda gebeliğin 6. gününde endometriyal epitelin apikal yüzeyindeki mikrovilluslar (ok başları), epitelin apikal ve bazal yüzeyinde lipid damlacıkları (L), epitel nukleusu (N), (X5,000).



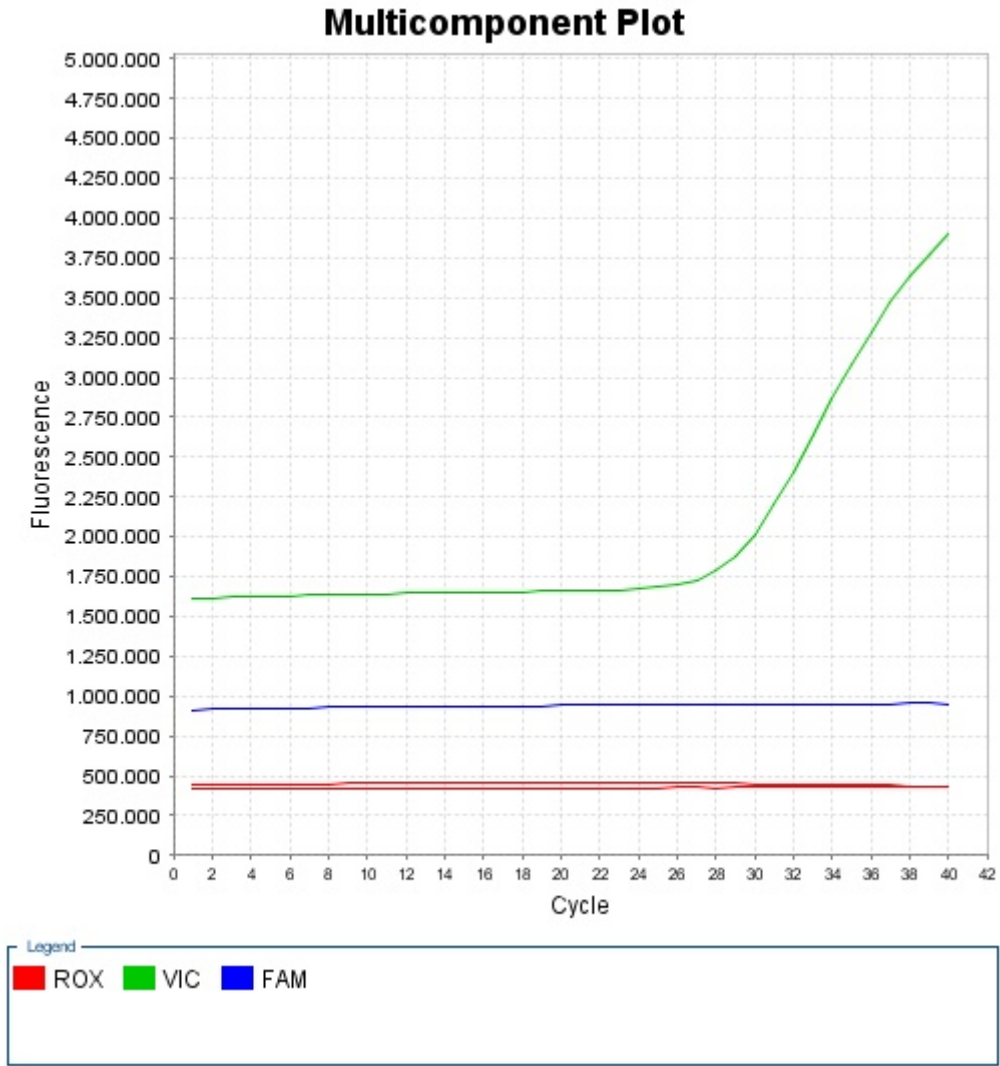
Şekil 4.2.14. Deney grubunda gebeliğin 6. gününde retiküler laminada kalınlaşma (RL),-lamina densada kesintiler (ok başları) (X20,000).



Şekil 4.2.15. Deney grubunda gebeliğin 6. gününde retiküler laminada kalınlaşma (RL), lamina densada kesintiler (ok başları) (X40,000).

4.3 Real Time PCR Bulguları

ACTB geninde (grafikte yeşil renkle görülen Yakima Yellow (VIC) ile işaretli) bir amplifikasyon gözlenirken, Laminin β_1 geninde (grafikte mavi renkli görülen FAM ile işaretli) amplifikasyon gözlenmedi. (Şekil 4.3.1). Bu durum ilgili dokudan elde edilen cDNA'da ACTB genine ait ekspresyonun varlığını, buna karşılık Laminin β_1 genine ait ekspresyonun olmadığını gösterdi. Laminin β_1 geninde ekspresyon olmadığı için ACTB ile arasında oransal veya miktarsal bir değerlendirme ve karşılaştırma da yapılamadı.



Şekil 4.3.1. Kantitatif Real-Time PCR analizi ile Yakima Yellow ile işaretlenen "ACTB" ve FAM ile işaretlenen "Laminin β_1 " genlerinin ekspresyon dağılımları. (ROX: İnternal Pasif Referans boya).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada diyabetik farelerde gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde uterus dokusu immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle incelendi. Uterusta bazal membran glikoproteini olan laminin ekspresyonunun ışık mikroskopik düzeyde değerlendirilmesi amacıyla immünohistokimyasal boyama yapıldı. Endometriyumun morfolojik değerlendirmesi ise ince yapı düzeyinde gerçekleştirildi.

Blastokist tutunmasından sonra endometriyum, endometriyal sinyallere (sitokinler, steroid hormonları, büyüme faktörleri gibi) cevap olarak değişikliklere uğrar. Kemirgenlerde stromal cevap (desidualizasyon); iç şeklindeki desidual hücrelerin epitelooid şeklindeki desidual hücrelere dönüşmesini, blastokistin etrafındaki implantasyon bölgesinin formasyonunu ve ESM bileşenlerinin yeniden şekillenmesini içerir (1,41).

ESM, fibröz proteinler, proteoglikanlar ve fibronektin, laminin, nidojen, tenasin ve trombospondin gibi glikoproteinleri içerir. Bu ESM proteinleri farklı alt ünitelerden oluşur ve ekstrasellüler alanda hücre yüzey reseptörleri ile ilişkilidirler. Birçok ESM proteini hücre yüzeyinden eksprese edilen integrinlerle ilişki içerisindedir. Bu adezyon moleküllerinin en önde gelenleri, fibronektin (α 3-5, β 1), laminin (α 1-3 β 1, α 6 β 1) ve kollajendir (α 1-3, β 1). Bu dinamik yapısından dolayı ESM bileşenleri, sadece yetişkin dokuda değil, embriyogenez sırasında hücre differansiyasyonu, göçü ve büyümesinde de önemli rol oynarlar. Ancak laminin ve fibronektinin benzer biyolojik özelliklerinden dolayı, hücre davranışında farklı fonksiyonları da vardır. Fibronektin embriyogenez sırasında hücre adezyonunu ve göçünü sağlarken, laminin epitel histogenezinin erken döneminde önemli rol oynayabilir ve hücre fonksiyonunu değiştirebilir. ESM moleküllerinin endometriyal stromadaki dağılımları ve farelerdeki hamilelik başarısındaki rolleri hala tam olarak açıklanamamaktadır. Başarılı bir gebelik için, blastokist implante olurken trofoblast hücreleri endometriyal stroma boyunca invaze olmalıdır ve maternal ESM bileşenleri ile etkileşim içinde bulunmalıdır (36). Öte yandan ESM proteinlerinden laminin ve fibronektin, diyabet ve preeklampsi gibi patolojik durumlarda embriyo ve maternal alandaki yüzeyde ekspresyonu değiştirerek embriyo kayıplarına sebep olabilir (36).

Endometriyumda implantasyonun gerçekleşeceği bölgede ESM'in şekillenmesi gerekir. Daha sonra trofoblast invazyonu, plasenta oluşumu ve hücre ölümü gibi

süreçlerde ESM bileşenlerinin ekspresyonları incelenerek rolleri hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabilir. Bu çalışmada normal farelerde implantasyon bölgesinde laminin ekspresyonunun dinamik dağılımını ve diyabetin bu dağılıma etkisini incelemek amaçlanmıştır. Daha önce sıçanlarda yapılan bir çalışmada, gebeliğin 4., 5., 6., 7. ve 8. günlerinde bazal membranda, desidua hücrelerinde ve bez epitellerinde laminin ekspresyonu bulunmuştur (2). Bir başka çalışmada, habeş maymunlarında implantasyon döneminde ESM proteinlerinin ekspresyonlarına bakılmış ve endometriyumda BM boyunca laminin ekspresyonu görülmüş, ayrıca implantasyon alanında laminin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (42). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, her iki drupta luminal epitel ve bez epitelinin bazal membranı ile desidua hücrelerinde laminin ekspresyonu görülmüştür. Buna bağlı olarak da lamininin implantasyon sürecinde rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Günlere bağlı olarak laminin ekspresyonunda farklılık gözlenmemiştir. Literatürde, farelerde implantasyon penceresi döneminde (2., 4. ve 6. günlerde) yüzey epitelinin bazal membranında laminin ekspresyonunu inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın; farelerde implantasyon sürecinde, gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde laminin ekspresyonunun değerlendirildiği ilk çalışma olduğu düşünülmektedir.

Diyabet oluşturulmuş hamile sıçanlarda, plasentada ESM bileşenlerinin ekspresyonlarına bakılmış ve diyabete bağlı olarak ekspresyonlarının değiştiği görülmüştür (36). Tip 2 diyabet oluşturulan yeni doğan sıçanlarda böbrek glomerülünde tip IV kollajen ve değiştirici büyüme faktörü- β (TGF- β) ekspresyonuna bakılmış ve diyabete bağlı olarak artış görülmüştür. Diyabete bağlı olarak artan TGF- β 'nin ESM bileşenlerinin ekspresyonunu değiştirdiği sonucuna varılmıştır (43). Diyabetik nefropatide epitel hücrelerinde lokalize olan integrin alt ünitelerinin (α V, β 3, α V β 3, α V β 5) ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Aynı çalışmada bu artışın diyabette TGF- β artışına bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği de öne sürülmüştür (44,45,46). Daha önce implantasyon dönemindeki farelerde laminin ekspresyonu çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda immunohistokimyasal olarak laminin ile yapılan immun işaretlemeye, diyabet grubundaki fare endometriyumunda kontrol grubuna göre işaretlemenin arttığı görülmüştür. Bu sonuç literatürdeki verileri desteklemektedir. Bu durum, önceki çalışmalarda gösterildiği gibi, diyabetin TGF- β sentezini artırdığı, artan TGF- β 'nin da β 1 integrin ekspresyonunun artmasına sebep olduğu bilinmektedir (45). Çalışmamızda

diyabetik gruplarda sadece 6. günde gözlenen laminin ekspresyonundaki artışın, integrin ekspresyonunun artışına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür. Bunun sonucunda lamininin implantasyon sonrasında embriyodaki hücre proliferasyonunu azaltabileceği ve böylece infertiliteye katkısının olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. İmplantasyon döneminde diyabetik fare uterus epitelinde laminin ekspresyonu ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

Pinopodlar, hem kemirgenlerde hem de insanlarda implantasyonun pencere döneminde, uterusun luminal epitelinin apikal yüzeyinde ortaya çıkmaktadır. Bazı çalışmalar insanlarda pinopodların 48 saatten kısa bir ömre sahip olduklarını ortaya koymuştur (47). Sıçanlarda ise pinopodların ömrü biraz tartışmalıdır. Gebeliğin 4. gününde artmakta, embriyo implantasyonu gününde yani 5. günde pik yapmakta, 6. günde ise neredeyse gözden kaybolmaktadır (47).

Yukarıda belirtildiği gibi diyabet ve obezite, uterusun hücrel metabolizmasını bozarak dişi üreme sisteminin yapısını ve bütünlüğünü tehlikeye atar. İnsanlarda ve deney modellerinde yapılan çalışmalarda diyabet, uterusun endometriyal epiteli ve stromasını indükleyerek hücrel lipotoksisiteye sebep olur. Bu da dokuda belirgin bir şekilde lipojenik metabolizma artışı ile sonuçlanır. Bunun sonucunda üreme yetersizliği; üreme asiklusı, ovaryan folikül gelişiminin baskılanması, ovaryan steroid hormon sentezinin baskılanması, endokrin ile uyarılmış hücrel metabolizma ve artan endometriyal atrofi oluşur. Diyabetten etkilenen endometriyal yapı, çok miktarda hücre içi ve hücreler arası lipid birikimleri ile karakterizedir (10). Daha önce yapılan bir çalışmada fare endometriyumunda diyabetin etkisine transmisyon elektron mikroskobu ile bakılmış ve kontrol grubunda endometriyal epitel hücrelerinin bazal kısmında lipid birikimi görülürken, diyabete bağlı olarak epitel hücrelerinin bazal kısmı ile apikal yüzeylerinde lipid birikimleri birikimleri görülmüştür. (10,35). Bizim bulgularımız da bu çalışmalarla uyumludur. Lipid artışının diyabet komplikasyonu olarak epitel iskemisi nedeniyle ortaya çıkabileceği düşünülmüştür. Başka bir çalışmada diyabete bağlı olarak mikrovilluslarda kayıp olduğu bildirilmiştir (34). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, elektron mikroskobik düzeyde, kontrol ve diyabet grubunda luminal epitel ve bazal membran yapılarının değiştiği gözlemlendi. Kontrol grubunda gebeliğin 2. gününde pinopod görülmedi, mikrovilluslar uzun ve düzenliydi. Dördüncü günde, mikrovillusların arttığı ve çok sayıda pinopodun olduğu izlendi. Altıncı günde

mikrovillusların azaldığı, yer yer yok olduğu, pinopodların da çok azaldığı dikkati çekti. Diyabet grubunda ise mikrovilluslarda azalma ve küntleşme saptandı. Ayrıca pinopod yapılarının oluşmadığı belirlendi. Bu sonuçlar daha önceki çalışmaları destekler niteliktedir (34,35). Diyabetik hayvanlarda implantasyon günlerinde mikrovillusların azalmasının ve pinopod yokluğunun, implantasyonu olumsuz yönde etkileyebileceği akla gelmektedir.

Koyunlarda embriyo invazyonu sırasında komşu epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların artarak implantasyon için trofoektodermin tutunmasını ve yapışmasını sağladığı düşünülmektedir (48). Sıkı bağlantıları olmayan hayvanlarda yapılan çalışmalarda embriyo proliferasyonunun azaldığı görülmüştür (49). Başka bir çalışmada implantasyon döneminde sıkı bağlantıların implantasyon bölgesinde artarak embriyoyu maternal immunoglobülinlerden koruduğu görülmüştür (50). Bizim çalışmamızda gebeliğin 4. gününde kontrol grubunda komşu epitel hücreleri arasında sıkı bağlantıların arttığı, diyabet grubunda ise azaldığı izlenmiştir. Kontrol grubundaki sıkı bağlantıların artışı daha önceki çalışmaları destekler niteliktedir (48,49). Fakat diyabete bağlı olarak uterus epitelinde sıkı bağlantılarda azalma ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Diyabetin etkisine bağlı olarak sıkı bağlantılardaki azalmanın, implantasyon başarısızlıklarına sebep olabileceği ve embriyo kayıpları ile sonuçlanabileceği düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada KD oluşturulan çin hamsterların uterusunda bazal membran kalınlığının da diyabete bağlı olarak 2-5 kat arttığı bildirilmiştir (34). Çalışmamızda bazal lamina kalınlıklarının diyabete bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Bu sonuç da, daha önce yapılan çalışmayı destekler niteliktedir. Diyabete bağlı olarak bazal membran kalınlaşmasının implantasyon başarısızlıklarına sebep olabileceği kanısına varılmıştır. Diyabetin endometriyal luminal epitel hücrelerinde apoptoza yol açtığı ve bu yoldan endometriyal atrofiye neden olduğu gösterilmiştir (35,51). Diyabetli hastalarda ve diyabet oluşturulmuş hayvanlarda yapılan çalışmalarda, oksidatif stres ve bunun sonucunda serbest oksijen radikallerinin yapımında artış tespit edilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin pek çok yolak aracılığıyla doku hasarına yol açabildiği bilinmektedir (52).

Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde; farelerde implantasyon döneminde laminin ekspresyonunun implantasyonda görev alabileceği sonucuna varıldı. Diyabetin embriyonun endometriyuma tutunmasını sağlayan glikoprotein ekspresyonlarında artışa neden olduğu saptandı. Buna bağlı olarak diyabetin implantasyon başarısızlığına yol açabileceği sonucuna varıldı. İskemiye bağlı olarak gelişen epitel apoptozisi ve atrofi, serbest radikallerin artışı gibi sebeplerin de implantasyon başarısızlığına sebep olabileceği düşünüldü. Ayrıca, diyabetin uterus epiteli ve altındaki bazal membranda ince yapı düzeyinde bozulmalara neden olduğu ve bunların da implantasyon başarısını olumsuz yönde etkileyebileceği görüşü benimsendi.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Kontrol ve diyabet grubunda, implantasyon döneminde laminin ekspresyonu uterus epitelinin bazal membranı boyunca izlenmiştir. Fakat gebeliğin erken dönemlerinde laminin ekspresyonunda anlamlı farklılıklar görülmemiştir.
2. Diyabet gruplarında 6. günde endometriyumunda laminin ekspresyonu, kontrol grubuna göre artmış olarak değerlendirildi. Bu durumun, diyabetin TGF- β üzerinden integrin ekspresyonunu arttırmasına bağlı olduğu düşünüldü ve bunun da laminin ekspresyonunu değiştirdiği sonucuna varıldı. İmplantasyondan sonra artan laminin ekspresyonunun, embriyoda hücre proliferasyonunu azaltarak infertiliteye sebep olabileceği düşünüldü.
3. Diyabet grubu endometriyal epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki mikrovillusların, kontrol grubuna göre sayılarının ve uzunluklarının azaldığı, pinopodların da diyabet grubunda hemen hemen hiç bulunmadığı tespit edildi. Bu sonuçlara bağlı olarak implantasyon başarısında azalma olduğu düşünüldü.
4. Diyabet grubunda epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların azaldığı ve kısaldığı görüldü. Embriyo, maternal immunoglobülinlerden korunamadığı için diyabete bağlı olarak embriyo kayıpları olabileceği düşüncesi benimsendi.
5. Bazal membran kalınlığının diyabete bağlı olarak artması sonucu, embriyo uterus epiteline tutunamayabilir. Bu da implantasyon başarısızlıkları ile sonuçlanabilir.
6. Diyabetin neden olduğu lipid metabolizma bozukluğu steroid hormon sentezinde azalmaya yol açabilir.
7. Uterus dokuları için yapılan Real Time PCR analizinde laminin β_1 genine ait ekspresyonun olmadığı görüldü. Real Time PCR analizi için lamininin diğer alt ünitelerinin de çalışılması daha kapsamlı sonuçlar verebilir.
8. Literatürde diyabetin endometriyumda ekstrasellüler matriks bileşeni olan laminin ekspresyonuna etkilerini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır.

Sunduđumuz bu çalışma bu konuda sınırlı bir ön değerlendirme olarak kabul edilebilir, ancak implantasyonda önemli rol oynadığı düşünülen ekstrasellüler matriks bileşenlerinin mekanizmasının bozulmasıyla ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD.** Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biology of Reproduction*, **2007**; 77:433–441.
2. **Kayışlı ÜA, Demir R.** Distributions and possible roles of laminin, fibronectin and their receptor subunits integrin and in remodelling of extracellular matrix during decidualization in rats. *Turkish Journal of Biolog*, **2000**; 24:379-395.
3. **Lebleu VS, Brian M, Kalluri R.** Structure and function of basement membranes. *Experimental Biology and Medicine*, **2007**; 232:1121–1129.
4. **Alpy F, Jivkov I, Sorokin L, Klein A, Arnold C, Huss Y, Kedingler M, Simon-Assmann P, Lefebvre O.** Generation of a conditionally null allele of the laminin 1 gene. *Wiley Liss Inc*, **2005**; 43(2):59–70.
5. **Miner JH, Cong Li, Mudd JL, Go G, Sutherland AE.** Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *The Company of Biologists*, **2004**;131:2247-2256.
6. **Öner H, Öner J.** Basement membran glycoprotein: nidojen Review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, **2005**;25:688-692.
7. **Wiradjaja F, Ditommaso T, Smyth T.** Basement membranes in development and disease. *Wiley Liss In*, **2010**;90:8-31.
8. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; *Diabetes Care*, **2005**; 28(1):37-42.
9. **Karayalçın C.** Unilateral diyabetik ayak ülseri gelişiminde polinöropatinin etkisi. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilimdalı, Adana, 2007.

10. **Garris DR.** Ultrastructural analysis of progressive endometrial hypercytolipidemia induced by obese (ob/ob) and diabetes (db/db) genotype mutations: structural basis of female reproductive tract involution. *Tissue and Cell*, **2004**;36(1):19–28.
11. **Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G.** The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human Reproduction*, **2007**;13(4):1–13.
12. **Ross HM, Pawlina W.** *Histology A Text and Atlas*. 6nd Ed., Philadelphia: MPS Limited, A Macmillan Company, **2011**.
13. **Kierszenbaum AL, Ed.** *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2006**:589-592.
14. **Moore KL, Persaud TVN. Ed. Dalçık H, Yıldırım M.** *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 8. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2009**:36-48.
15. **Gökçimen A, Temel S.** İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2004**;11(4):25-33.
16. **Sachin SM, Reddy KVR.** Expression pattern of integrins and their ligands in mouse fetomaternal tissues during pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, **2007**;19:452–460.
17. **Inagaki J, Sugiura-Ogasawara M, Nomizu M, Nakatsuka M, Ikuta K, Suzuki N, Kaihara K, Kobayashi K, Yasuda T, Shoenfeld Y, Matsuura KA.** An association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with endometriosis in infertile patients. *Human Reproduction*, **2003**;18:544-549.
18. **Aplin JD.** Adhesion molecules in implantation. *Reviews of Reproduction*, **1997**;2:84–93.
19. **Lebleu VS, Macdonald B, Kalluri. R.** Structure and function of basement membranes. *Experimental Biology and Medicine*, **2007**;232:1121–1129.
20. **Suzuki N, Yokoyama F.** Functional sites in the laminin alpha chains. *Connective Tissue Research*, **2005**;46:142–152.
21. **Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM.** Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological Reviews*, **2005**;85(3):979–1000.

22. **Colognato H, Yurchenco PD.** The laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics*, **2000**;218:213–234.
23. **Inagaki J, Kondo A, Lopez LR, Shoenfeld Y, Matsuura E.** Pregnancy loss and endometriosis: pathogenic role of anti-laminin-1 autoantibodies. *The New York Academy of Sciences*, **2005**;1051:174-184.
24. **Miner JH, Yurchenco PD.** Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, **2004**;20:255–284.
25. **Tzu J, Marinkovch Mp.** Bridging structure with function structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Cell Biology*, **2008**;40:199-214.
26. **Peksen Y.** Diabetes mellitus epidemiyolojisi. Gülman B, Ed. *Diyabetik Ayak*. 2. Baskı, Samsun: Ofset, **2000**;11–26.
27. **Delibaş N, Kılınc İ.** The effect of insulin and gliclazide treatment on hippocampal oxidant-antioxidant system in streptosotisine diyabetic rats. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2003**;1:33-39.
28. **Amaral SJ, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J.** Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Current Diyabetes Reviews*, **2008**;4(1):46-54.
29. American Diabetes Association. Diagnosis and Clasification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **2004**;27:5–14.
30. **Satman İ.** Diabetes mellitus tanı ve izleminde yeni kriterler ve belirlenme gerekçeleri. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*, **2007**;3(3):1-15.
31. **Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS.** Moleculer mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *The New England Journal of Medicine*, **2001**; 345:971–977.
32. **Crowther JE, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS.** Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *The New England Journal of Medicine*, **2005**; 352 (24):2477-2486.

33. **Alvin C. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Lango D.** *Diabetes mellitus*. 15nd Ed., New York: McGraw-Hill Company, **2000**;114-2125.
34. **Garris DR, Smith C.** Diabetes-associated endometrial disruption in the ketonuric, diabetic Chinese hamster. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, **1983**;16(2):86-96.
35. **Garris DR.** Diabetes (db/db) mutation-induced endometrial epithelial lipoapoptosis: Ultrastructural and cytochemical analysis of reproductive tract atrophy. *Reproductive Biology and Endocrinology*,**2005**;3.15.
36. **Giachini FRC, Carriel V, Capelo LP, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB, Zorn TM, San Martin S.** Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. *Journal of Anatomy*, **2008**;212:31–41.
37. **Wen-ge M, Haengseok S, Sanjoy KD, Bibhash C. Paria, Sudhansu KD.** Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *PNAS*, **2003**;100(5):2963–2968.
38. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **1987**;162(1):156-159.
39. **Kuchta T, Krascenicsová K, Bánréti G.** Optimization of fluorescence measurement in duplex real-time PCR with TaqMan probes labeled with VIC and quenched by TAMRA. *Biotechniques*. **2007**;42(2):147-149.
40. <https://secure.eurogentec.com/product/research-yakima-yellow.html?country=bel>, Erişim Tarihi: 13.05.2011.
41. **Xiaohong W, Hiromichi M, Xuemei Z, Sanjoy K, Bibhash CP.** Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *Journal of Cell Science*, **2004**;53-62.
42. **Fazleabas ST, Stephen CB, Steven F, Jinghai S, Bruce AL.** Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon. *Biology of Reproduction*, **1997**;56:348-356.
43. **Tunçdemir M, Dağistanlı FK, Öztürk M.** Yeni doğan streptozotosin diyabetik nefropatide isradipin'in TGF-β1 ve tip IV kollajen ekspresyonları üzerine etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **2007**;38:152-158.

44. **Jin DK, Fish AJ, Wayner EA, Mauer M, Setty S, Tsilibary E, Kim Y.** Distribution of integrin subunits in human diabetic kidneys. *American Society of Nephrology*, **1996**;7:2636-2645
45. **Kagaml S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA.** Coordinated expression of $\beta 1$ integrins and transforming growth factor- β induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Laboratory Investigation*, **1993**;69:68-76.
46. **Kreidberg JA, Symos JM.** Integrins in kidney development, function and disease. *The American Physiological Society*. **2000**;279:233-242.
47. **Quinn CE, Casper RF.** Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, **2008**;1-7
48. **Satterfield MC, Dunlap KA, Hayashi K, Burghardt RC, Spencer TE, Bazer FW.** Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by pregnancy and progesterone. *Endocrinology*, **2007**;148(8):3922-3931.
49. **Jianliang X, Kausalya PY, Dominic CY, Phua SMA.** Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and Cellular Biology*, **2008**, 28(5):1669-1678.
50. **Bibhash CP, Xuemei Z, Sanjoy KD, Sudhansu KD, Koji Y.** Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Developmental Biology*, **1999**;208:488-501.
51. **Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y.** Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *The Anatomical Record*, **1997**;248:76-83.
52. **Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB.** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol*, **2003**;17:24-38.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Mersin’de doğdum. İlkokulu İleri İlkokulunda, ortaokulu Bahçelievler Ortaokulunda okudum. Lise eğitimimi Ticaret ve Sanayi Odası Anadolu Lisesinde tamamladım.

2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2008 yılı Ocak ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. 2010 yılı aralık ayında aynı anabilim dalına araştırma görevlisi olarak atandım. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime ve görevime devam etmekteyim.