

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

**DİYABETİN, İMPLANTASYON PENCERESİ DÖNEMİNDEKİ
SIÇAN ENDOMETRİYUMUNDA $\alpha V\beta 3$ İNTEGRİN
EKSPRESYONUNA VE İNCE YAPIYA ETKİSİ**

Tuba ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ

MERSİN – 2010

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

**DİYABETİN, İMPLANTASYON PENCERESİ DÖNEMİNDEKİ
SIÇAN ENDOMETRİYUMUNDA α V β 3 İNTEGRİN
EKSPRESYONUNA VE İNCE YAPIYA ETKİSİ**

Tuba ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ

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

Tez No: 172

MERSİN – 2010

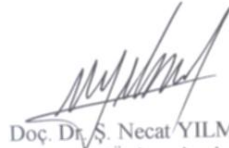
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Diyabetin, Implantasyon Penceresi Dönemindeki Sıçan Endometriyumunda $\alpha\text{V}\beta 3$ İntegrin Ekspresyonuna ve İnce Yapıya Etkisi ” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/08/2010



Prof. Dr. Tülin BAYKAL
Mersin Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 11/08/2010 tarih ve 2010/231 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülkü CÖMBEKOĞLU



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 Doç. Dr. Ő. Necat YILMAZ'a, Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tülin BAYKAL'a, Prof Dr. Banu Coşkun YILMAZ'a, Doç. Dr. Ebru Ballı'ya ve Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŐ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen laboratuardaki çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Endometriyum	3
2.2. Kemirgenlerde Uterus Yapısı.....	4
2.3. İmplantasyon	4
2.4. Adezyon Molekülleri.....	6
2.5. İntegrinler	7
2.5.1. $\alpha V\beta 3$ İntegrin	9
2.6. İntegrinler ve İmplantasyon	10
2.7. İntegrinler ve Üreme Başarısızlığı	12
2.8. Diabetes Mellitus.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi	15
3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması	16
3.3. Uterusların Elde Edilmesi, Fiksasyon	16
3.4. İmmünohistokimyasal İşaretleme	16

3.5. Elektron Mikroskopik İnceleme.....	18
4. BULGULAR.....	20
4.1. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	20
4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	30
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	50
7. KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	İntegrin α ve β alt ünitelerinin yapısı	7
Şekil 2.2	İntegrin ailesinin şematik resmi	9
Şekil 3.1	Sıçan vajinal sürüntüsündeki spermlerin fotoğrafı	15
Şekil 4.1.1	Negatif Kontrol, 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	20
Şekil 4.1.2	Kontrol grubu 3. güne ait 300 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	21
Şekil 4.1.3	Kontrol grubu 3. güne ait 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	22
Şekil 4.1.4	Kontrol grubu 5. güne ait 300 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	23
Şekil 4.1.5	Kontrol grubu 5. güne ait 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	23
Şekil 4.1.6	Kontrol grubu 7. güne ait 300 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	24
Şekil 4.1.7	Kontrol grubu 7. güne ait 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	25
Şekil 4.1.8	Deney grubu 3. güne ait 300 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	26
Şekil 4.1.9	Deney grubu 3. güne ait 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	26
Şekil 4.1.10	Deney grubu 5. güne ait 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	27
Şekil 4.1.11	Deney grubu 5. güne ait 1200 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	28
Şekil 4.1.12	Deney grubu 7. güne ait 300 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	29
Şekil 4.1.13	Deney grubu 7. güne ait 600 büyütme oranındaki immunohistokimyasal görüntü	29
Şekil 4.2.1	Kontrol grubu 3. güne ait 4,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	30
Şekil 4.2.2	Kontrol grubu 3. güne ait 15,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	31
Şekil 4.2.3	Kontrol grubu 3. güne ait 15,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	31
Şekil 4.2.4	Kontrol grubu 3. güne ait 7,500 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	32
Şekil 4.2.5	Kontrol grubu 5. güne ait 10,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	33
Şekil 4.2.6	Kontrol grubu 5. güne ait 14,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	33
Şekil 4.2.7	Kontrol grubu 5. güne ait 15,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	34
Şekil 4.2.8	Kontrol grubu 5. güne ait 3,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	34
Şekil 4.2.9	Kontrol grubu 7. güne ait 4,000 büyütme oranındaki elektron mikroskopik görüntü	35

Şekil 4.2.10	Kontrol grubu 7. güne ait 15,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	36
Şekil 4.2.11	Kontrol grubu 7. güne ait 12,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	36
Şekil 4.2.12	Kontrol grubu 7. güne ait 5,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	37
Şekil 4.2.13	Deney grubu 3. güne ait 12,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	38
Şekil 4.2.14	Deney grubu 3. güne ait 6,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	38
Şekil 4.2.15	Deney grubu 3. güne ait 4,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	39
Şekil 4.2.16	Deney grubu 3. güne ait 4,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	39
Şekil 4.2.17	Deney grubu 5. güne ait 5,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	40
Şekil 4.2.18	Deney grubu 5. güne ait 10,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	41
Şekil 4.2.19	Deney grubu 5. güne ait 25,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	41
Şekil 4.2.20	Deney grubu 5. güne ait 3,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	42
Şekil 4.2.21	Deney grubu 7. güne ait 15,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	43
Şekil 4.2.22	Deney grubu 7. güne ait 15,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	43
Şekil 4.2.23	Deney grubu 7. güne ait 4,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	44
Şekil 4.2.24	Deney grubu 7. güne ait 4,000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Menstrual siklus sırasında endometriyumda integrin alt ünitelerinin dağılımı 12

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik Asit
DM	Diabetes Mellitus
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
E₂	17 β -estradiol
PBS	Fosfatlı Tuz Tamponu
HB-EGF	Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
HOXA 10	Homeobox gen
LIF	Lösemi İnhibitör Faktör
OPN	Osteopontin
BSA	Sığır Serum Albumini
TGF-β	Değiştirici/Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β

ÖZET

Diyabetin, İmplantasyon Penceresi Dönemindeki Sıçan Endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ İntegrin Ekspresyonuna ve İnce Yapıya Etkisi

İnsanda implantasyon süreci; oosit maturasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometriyum arasındaki kompleks bir ilişki ile kontrol edilmektedir. Endometriyum menstrual siklus boyunca yeniden düzenlenir ve sadece 'implantasyon penceresi' döneminde reseptiftir.

İntegrinler; memelilerde tüm vücutta yaygın olarak bulunan adezyon moleküllerinin bir sınıfıdır. Birçok fizyolojik olayda ve erken gelişimsel olaylarda önemli rol oynarlar. $\alpha V\beta 3$ integrin endometriyumun luminal epitelinde en iyi karakterize edilen hücre adezyon molekülüdür.

Diabetes mellitus, insülinin yetersiz salınması ve/veya yetersiz etkisi sonucu ortaya çıkan ve hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Bu çalışmada diyabetin gebe sıçan endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonuna etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada 42 adet, 8 haftalık dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol (n=21) ve diyabetik (n=21) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu gruplardan da 3, 5 ve 7. gebelik gününde ötenazi yapılmak üzere toplam 6 alt grup oluşturuldu. Hayvanlarda diyabet yapmak için streptozotosin (50 mg/kg) uygulandı. Elde edilen uterus dokuları elektron mikroskopik ve immunohistokimyasal işaretleme için takip edilerek incelendi.

İmmunohistokimyasal işaretlemede diyabet grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunda artış gözlemlendi. Elektron mikroskopik incelemelerde diyabetik grupta, luminal epitel hasarı, epitel hücre apikal yüzeyinde pinopodlarda bozulma, stromal kapiller damarlarda endotel hipertrofisi ve buna bağlı lümen daralması olduğu gözlemlendi.

Bu veriler doğrultusunda implantasyonda önemli bir rolü olan $\alpha V\beta 3$ integrinin, diyabette ekspresyonunun arttığı, diyabette artmış implantasyon başarısızlığının da bu artışa bağlı olabileceği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: İmplantasyon, $\alpha V\beta 3$ integrin, diyabet, endometriyum, elektron mikroskopi.

ABSTRACT

The Effect of Diabetes on α V β 3 Integrin Expression and Ultrastructure of Rat Endometrium at the Time of Implantation Window

Implantation in humans is controlled by a complex interaction between embryo and endometrium, which begins at the early stages of oocyte maturation. The endometrium is remodelled throughout the menstrual cycle, and exhibits only a short period of receptivity, known as the 'implantation window'.

Integrins are a class of cell adhesion molecules that expressed on almost all cells in body. Integrins participate in many physiological processes and early developmental events. α V β 3 integrin is an adhesion molecules that have been well characterized in endometrial luminal epithelium.

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia and insufficiency of secretion or action of endogenous insulin. The main purpose of this study was to observe the effects of diabetes to α V β 3 integrin expression on the endometrium of diabetic pregnancy rats.

Eight weeks old, forty-two female Wistar abino rats were used for this study. Animals were separated as diabetes (n=21) and control (n=21) groups. Each group were subdivided for euthanasia in thirth, fifth and seventh pregnancy days. In the diabetes group, 50 mg/kg streptozotocin were administered intraperitoneally to each rats. Obtained tissues were processed for the ultrastructural examination and immunohistochemical staining.

In comparison to the control group, there was an increased immunohistochemical labeling for α V β 3 integrin in the diabetes groups. Ultrastructural examination of the diabetes group tissues showed luminal epithelium damage, at the apical surface of epithelium, cell pinopod degeneration, narrowing in capillary vessels due to endothelial hypertrophy.

According to this study; α V β 3 integrin expression, which has an important role in implantation, increased in diabetes and this increase might be related to the implantation failure.

Key Words: Implantation, α V β 3 integrin, Diabetes mellitus, Endometrium, Electron microscopy

1. GİRİŞ

Memelilerde üreme, dişi üreme organında döllenme ve üreme bölgesi içerisinde geçen erken embriyonik gelişme ile başlamaktadır. Bunu embriyo ve eklerinin uterus duvarındaki tutunması (implantasyonu) izlemektedir. İmplantasyon, blastokist dış tabakası trofoektoderminin uterusun luminal epiteli ile etkileşime girdiği genel bir birliktelik safhasını gerektirmektedir. Çeşitli deneysel çalışmalarda, endometriyumun implantasyon için hazırlandığı gösterilmiş ve bu dönem implantasyonun pencere dönemi olarak isimlendirilmiştir. Endometriyumda çeşitli yapısal, hücresel ve moleküler olaylar implantasyon penceresi ile kontrol edilir ve böylece endometriyal kabul edişi sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkabilir. Bunlar adezyon molekülleri, sitokinler, pinopod adı verilen büyük sitoplazmik çıkıntılarının oluşumu ve diğer endometriyal proteinlerin miktarlarında değişikliklerdir. İmplantasyonu takiben plasantasyon olarak isimlendirilen evrede, plasenta oluşumu ile implantasyon olayı tamamlanır ve gebelik döneminin sonuna kadar embriyoyu destekleyecek olan yapı kurulmuş olur (1).

İntegrinler; memelilerde tüm vücutta yaygın olarak bulunan adezyon molekülleridir. Bunlar, hücre-hücre dışı matris (bazal lamina) bileşenleri arasındaki adezyonda olduğu kadar hücre-hücre adezyonunda da yer alırlar (2). Memelilerde α ve β zincirler olmak üzere iki alt birimden oluşan integrinlerin birbirinden farklı 18 α ve 8 β zinciri tanımlanmış olup eşleştirildiğinde farklı fonksiyonları olan 24 farklı integrin heterodimeri oluşturabilirler. Bu iki alt birim birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlıdır (3,4).

Endometriyum adezyon molekülleri olan integrinlerden zengin bir bölgedir. İntegrinlerin endometriyal, desidual ve ekstravillöz sitotroblastik hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir (5). Mid-luteal fazdaki implantasyon penceresi döneminde integrin ekspresyonunun arttığı ve bu artışın implantasyon penceresi için bir belirteç (marker) olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir (6). $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha V\beta 3$ integrin alt

tipleri menstrual siklusun 20-24. günlerinde insan endometriyumunda birlikte eksprese edilir ve $\alpha V\beta 3$ integrin ve ligandı osteopontin, trofoblastın ilk temas ettiği endometriyal luminal epitel yüzeyinde de saptanmıştır (7). Anormal $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunun; açıklanamayan infertilite, hidrosalpinks, endometriosis, luteal faz eksikliği ve son zamanlarda polikistik over sendromu ile birlikte görüldüğü öne sürülmüştür (8).

Diyabet (Diabetes Mellitus (DM)), insülin eksikliği ve/veya dokuların insüline duyarsızlığı sonucu organların uzun süre hiperglisemiye maruz kaldığı bir grup metabolik hastalıktır. Diyabetteki hiperglisemi başta göz, böbrekler, sinirler, kalp ve damarlar olmak üzere birçok organda zamanla hasara ve fonksiyon bozukluklarına yol açar (9). Diyabet Tip I (insüline bağımlı) ve Tip II (insüline bağımlı olmayan) olmak üzere iki gruba ayrılır. Tip I diyabet, otoimmün olarak pankreas beta hücrelerinin harabiyeti ile seyrederek (10). Tip II diyabet ise insülin aktivitesine karşı direnç ve beta hücre fonksiyonunda bozulma ile karakterizedir (11).

Diyabetin dişi üreme sistemi üzerindeki etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma mevcuttur. Obez olmayan diyabetik farelerde uterus ağırlığının azaldığı, luminal ve glandular epitel içinde lipid biriktiği, endometriyum ve myometriyumun atrofiye uğradığı ve kas hücre tabakası sayısının azaldığı gösterilmiştir (12). Yine diyabetik Chinese hamsterinin endometriyal bazal membranında kalınlaşma ve luminal epitelinde boy kısılması, sitoplazmik vakuolizasyonla karakterize çeşitli düzensiz hücrelerin bulunduğu ve amiloid benzeri hücreler arası temel madde ile kollajen fibril ayrılması gözlenmiştir (13). Diyabetin implantasyona etkisi üzerine çok sayıda çalışmaya rastlanmamakla birlikte yapılan bir çalışmada diyabetik ratlarda implantasyon bölgesinde östrojen reseptör düzeylerine bakılarak normal ovulatuvar siklus sonrası %20 düşük implantasyon hızı gözlemlenmiştir (14).

Sunulan çalışmada, diyabetik gebe sıçan endometriyumlarının ince yapısının ve implantasyon penceresi dönemindeki $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunun incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometriyum

Endometriyum, bazal ve fonksiyonel tabakadan oluşan ve myometriyumu örten dinamik bir dokudur. Fonksiyonel tabakadaki hücreler menstruasyon sırasında bazal tabakadan ayrılır. Bazal tabaka myometriyuma bağlıdır ve endometriyal rejenerasyonda temel görev alır. Endometriyum; luminal ve glandular hücrelerin döşediği epitel, stromal fibroblastik hücreleri içeren stroma, bağışıklık hücreleri ve kan damarlarından oluşur. Bu hücrelerin sayıları, aktivitesi, fonksiyon ve yapısı menstrual siklus boyunca ve gebelik sırasında değişmektedir.

Östrojen ve progesteron, endometriyal maturasyonun anahtar ayarlayıcılarıdır, bu süreçteki rolleri karmaşıktır. Ovaryan östrojen ve progesteron implantasyon için uterusu uygun hale getirir ve başarılı gebelik için gereklidir. Hem epitel hem de stromal kısımlar östrojen ve progesteron reseptörlerini eksprese eder ve yanıt hormonların konsantrasyonunun yanı sıra bu reseptörlerin seviyesine de bağlıdır. Progesteron erken embriyonik gelişim, implantasyon, plasentasyon ve fetal gelişim için gerekli olan uterin fonksiyonların devamını sağlamaktadır. Desidualizasyon sırasında stromal hücreler progesterona yanıt olarak desidual hücrelere differansiye olmaktadır. Desidualizasyon aynı zamanda hücre dışı matriksin yeniden şekillendirilmesi ve integrin ekspresyonunu kapsamaktadır (15,16).

Endometriyal luminal epitel doku homeostozisini sürdürmenin yanı sıra, mikrobiyal enfeksiyonun önünde bir engel olarak da görev yapmaktadır. Uterin epitel hücrelerinin yüzeyinde glikokaliks olarak adlandırılan apikal glikoproteinler vardır (17).

2.2. Kemirgenlerde Uterus Yapısı

Kemirgenlerde desidual endometriyum 5 farklı bölge içermektedir: 1- Bazal bölge, 2- Kapsül, 3- Antimezometriyal desiduama, 4- Mezometriyal desiduama ve 5- Glikojenik bölge. Sığıçanda gebeliğın erken dönemlerinde görülen desidualizasyon ve implantasyon olayları, uterusun antimezometriyal bölgesinde özellikle primer desidual alanda gerçekleşmektedir. Antimezometriyal desiduanın iç tabakası embriyoyu saran ileri derecede yassı hücrelerden, ara tabakası poligonal hücrelerden, miyometriyuma komşu dış tabakası ise predesidual hücrelerden oluşmaktadır (18,19).

2.3. İmplantasyon

Embriyo implantasyonu çoğtu türlerde üremenin en önemli basamağını temsil eden dinamik bir süreçtir. İmplantasyon süreci 3 aşamada sınıflandırılabilir: yaklaşma, adezyon ve invazyon. İmplantasyondan önce blastokist polarite gösterir. Polarite embriyonik implantasyon ve gelişimin çeşitli düzeylerinde gereklidir. Öncelikle, gelişen blastokist ve oosit içerisindeki polarite embriyonik hücrelerin differansiyasyonu için önemlidir. Bu özellik implantasyon öncesi embriyonun gelişimini destekler. Polaritenin ikinci aşaması blastokist endometriyuma yaklaştığı zaman olur ve endometriyuma belirli bir yönelim gösterir. İnsanlarda blastokistin iç hücre kitlesi endometriyuma yönelim göstermektedir. Blastokist yönlenir yönlenmez (yaklaşma), zona pellusidasını kaybeder. Trofoblast hücreleri reseptif endometriyal epitele bağlanır (adezyon). En sonunda blastokist stromaya invaze olur. Adezyon ve sonrasındaki invazyon esnasında embriyo ile anne arasında görülen moleküler etkileşimler embriyonun implante olabilmesi için hayati önem taşımaktadır (20).

İmplantasyonun başarısı; blastokistin reseptif endometriyumla doğru zamanda buluşmasına bağlıdır. Endometriyum menstrual siklus boyunca yeniden düzenlenir ve sadece 'implantasyon penceresi' döneminde reseptiftir. İnsanlarda, menstrual siklus sırasında embriyo ovulasyondan 4 gün sonra uterin kaviteye ulaşır. Endometriyum blastokist implantasyonuna ovulasyondan 6-8 gün sonra reseptif olur ve bu reseptivite 4 gün (20-24. günler) sürer (20).

İnsanda implantasyon süreci; oosit maturasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometriyum arasındaki kompleks bir ilişki ile kontrol edilmektedir. Bu ilişki, endometriyumun maturasyonu ve oositin eş zamanlı gelişimine olanak sağlar. Çoğu moleküller (hormonlar, sitokinler, integrinler, enzimler vb.) başarılı implantasyon için blastokist ve endometriyum arasındaki diyaloga katılır. Donasyon programlarındaki tecrübelerle göre; optimal koşullarda maksimum implantasyon başarıları siklus başına %40 olup, bu oran yaş ile azalmaktadır (20).

İmplantasyon süreci henüz insanlarda doğrudan in vivo olarak incelenememiştir. Fakat özellikle kemirgenler, koyun ve primat gibi hayvanlardan, implantasyon öncesinde ve implantasyon sırasında kadınlarda meydana gelen hormonal ve morfolojik değişiklikler hakkında ipuçları sağlanmaktadır. Endometriyal gelişimin hayvanlarda gözlemlenen 3 döneminin (nötr dönem, reseptif dönem, refrakter dönem) insanlarda da olduğuna inanılmaktadır (21).

Başarılı bir implantasyon, hem uterusun ovaryum steroidlerince kontrol edilen bir dizi özgün farklılaşması, hem de blastokistin kesin bir aktivasyon evresine erişmiş olmasını gerektirir. Kemirici blastokistin trofoektodermi aktif hale gelerek bir değişim sürecinden geçer. Metabolik oranı artar, luminal epitel ile etkileşme kapasitesini geliştirir. Trofoektoderm ve luminal epitelin adeziv etkileşim ve blastokistin stroma içine penetrasyonu için gerekli olan moleküler olayların aynı anda ortaya çıkması gerekmektedir. Blastokistler, sadece implantasyonun pencere döneminde luminal epitel ile implantasyon etkileşimine girebilirler (22).

İmplantasyon öncesinde endometriyumun luminal epitelinde bir takım değişiklikler meydana gelir. Hücreler artık daha yassılaşıyor ve mikrovillus sayısı azalır. Birçok türde mikrovillusların yerini pinopod adı verilen büyük sitoplazmik çıkıntılar alır. İnsanlarda luminal epitel hücrelerindeki düzenli mikrovilluslar ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra yerlerini pinopodlar'a bırakırlar. Tekrarlayan biyopsileri içeren çalışmalar, bu pinopodların kadınlarda 48 saatten daha az bir ömre sahip olduklarını ortaya koymuştur. Pinopodlar menstrual siklusun 20-22. günleri arası değişmekte ve her bireyin kendine özgü olmaktadır. Bu durum, insanın beklenen implantasyon penceresi ile uyum göstermektedir (23). Kemirgenlerde pinopodların fonksiyonu uterin lümeninden sıvının pinositotik alınımıdır. Yine bu türlerde pinopod içerisindeki vakuollerin pinositotik fonksiyona katıldığı düşünülmektedir. Fakat insanlarda ise pinositoz

gözlenmemektedir. Lösemi İnhibitör Faktör (LIF), Homeobox gen (HOXA10), α V β 3 integrin, Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF) ve glutaredoksin gibi çeşitli moleküler belirteçler pinopodların varlığıyla ilişkilidir (24). Hücre yüzeyi moleküllerinin apikolateral dağılımında değişiklikler ortaya çıkar. Desmozomal proteinler, fare luminal epitelindeki lateral hücre yüzeyleri boyunca tekrar dağılır ve düzenlenirler. İnsan ve fare luminal epitelinde implantasyon zamanında desmozom yoğunluğu azalır (25). Bu zaman içerisinde insan da dahil bazı türlerde lateral membrandaki sıkı bağlantı dağılımı ve kompleksitesi de değişir. Buna ek olarak, geçit bağlantıları (gap junctionlar), implantasyonun olduğu epitelde açığa çıkar ve ovaryum steroidlerince sıkı bir şekilde düzenlenirler (26).

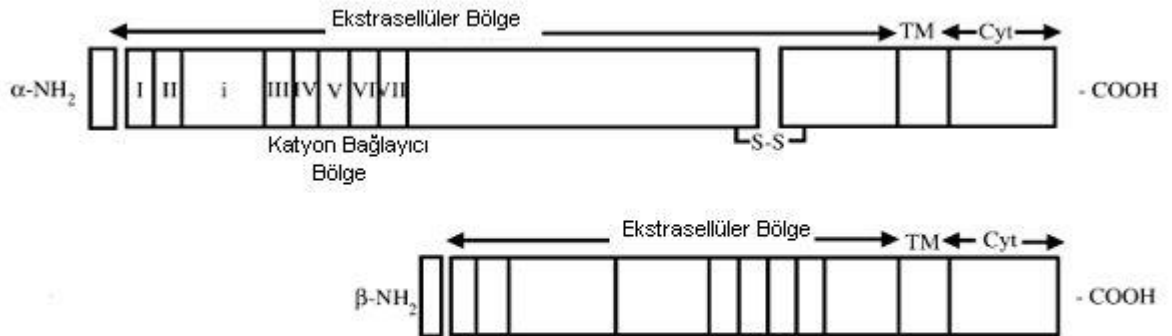
2.4. Adezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri; hücre yüzeyinde yapısal olarak var olan, bazı uyarılarla hücre yüzeyinde beliren, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde rol alan moleküllerdir. Hücre korunmasında, yara iyileşmesinde, doku bütünlüğünün sağlanmasında görev alırlar. Hücrelerin çoğalması ve göçü gibi önemli hareketlerin başlatılması, endotel ve epitel hücrelerinin seçici bir bariyer oluşturması, hücrelerin birbirlerine ve matrikse bağlanması adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Ayrıca bu moleküller, hücre içi ya da hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesinde de etkin roller üstlenmektedirler. Tüm bunlara ek olarak, hücre iskeleti aracılığıyla hücre hareketinin organizasyonunda önemli görevleri vardır. Hücre adezyon molekülleri ve onların ligandları; gelişim, farklılaşma, göç, tümör oluşumu ve metastazı gibi olayların gelişmesinde organizmadaki çeşitli kontrol fonksiyonlarına sahiptirler. Adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks (ECM) arasındaki ilişkilerin; hücre aktivasyonu, proliferasyonu, tümör oluşumu ve apoptozda önemli olduğu gösterilmiştir. Hücre adezyon molekülleri yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önünde tutularak altı grup altında toplanabilir. Bunlar; reseptör protein tirozin fosfatazlar, immüoglobulin süper ailesi, kaderinler, integrinler, selektinler ve hyaluronat reseptörleridir (27).

2.5. İntegrinler

İntegrinler; insanda tüm hücrelerde bulunan hücre adezyon moleküllerinin bir sınıfıdır. Embriyolojik gelişim, hemostazis, trombozis, yara iyileşmesi, immün ve immün olmayan savunma mekanizmaları gibi birçok fizyolojik olayda hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonuna katılırlar. Fertilizasyon, implantasyon ve ilk blastula oluşumunu içeren erken gelişimsel olaylarda önemli rol oynarlar. Bu gereksinim embriyolojik gelişim, yetişkin dokunun oluşumu ve devamı süresince olmaktadır. Adezyondaki rollerine ek olarak integrinler, hücre membranında çift yönlü sinyal yapabilme yeteneğindedir (28). İntegrinler, kovalent olmayan bağlarla birbirine bağlanmış olan α ve β alt ünitelerinden oluşmaktadır. 18 alfa ve 8 beta zinciri tanımlanmış olup eşleştirildiğinde farklı fonksiyonları olan 24 farklı integrin heterodimeri oluşturabilirler. Her heterodimer için ligand spesifitesi, α ve β alt ünitelerinin özel kombinasyonuyla belirlenir (29, 30).

İntegrinler; büyük N-terminal ekstrasellüler alan (β alt ünitesi için yaklaşık 700 aminoasit, α alt üniteleri için 1000 aminoasit), transmembran alan ve kısa C-terminal sitoplazmik alandan oluşan katyon bağlı heterodimerik (α ve β zinciri) transmembran adeziv reseptör ailesidir (Şekil 2.1).



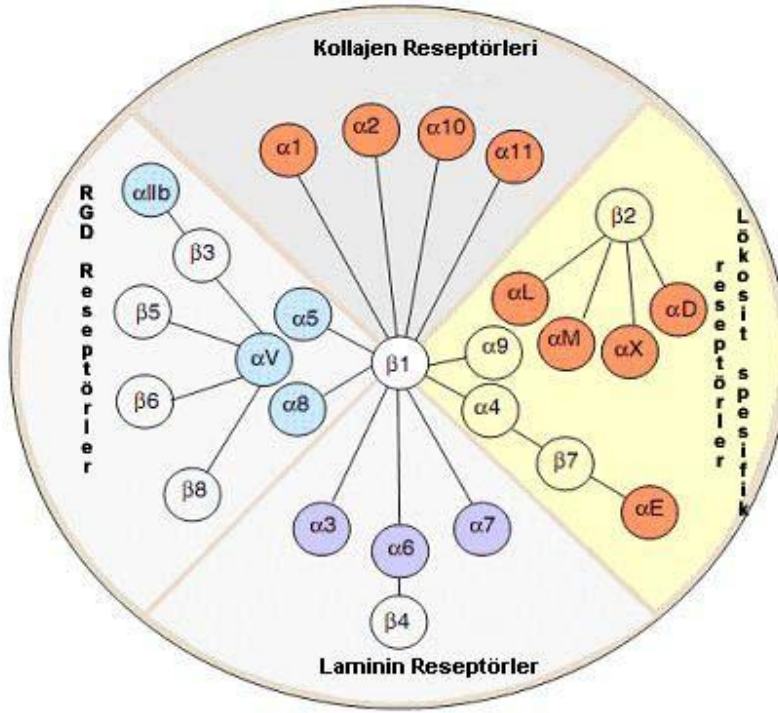
Şekil 2.1. İntegrin α ve β alt ünitelerinin yapısı. -NH₂ = amino uç, Cyt = sitoplazmik alan, TM = transmembran alan, S-S= disülfid zincir, -COOH = karboksil uç (31 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

İntegrin reseptörlerinin birçoğu ECM bileşenlerinde gözlenen tripeptid, arjinin-glisin-aspartik asid (RGD) dizisini tanır. ECM ve integrinler arasındaki bu etkileşim hücre iskeletinde sinyal dönüşümü için önemli değişiklikleri indükler. Çoğu hücreler integrinleri eksprese eder ve çoğu integrinler yaygın hücre çeşidinde eksprese edilir (31).

İntegrinlerin major fonksiyonu hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks bağlanmasına aracılık etmektir. İntegrinler β alt ünitenin sitoplazmik alanı aracılığıyla hücre iskeleti ile çok yakından bağlantılı olur ve α -aktinin, paksilin, talin, tenasin ve vinkülin gibi çeşitli hücre iskeleti proteinlerine bağlanabilir. İntegrinlerin ekstrasellüler bağlanması adezyon, proliferasyon, yaşamı sürdürme ya da apoptozis, şekil, polarite, motilite (hareket yeteneği), gen ekspresyonu ve diferansiyasyon gibi hücre davranışlarını ayarlayan çeşitli sinyal geçiş olaylarının büyük kısmını başlatır (31).

Memelilerde bazı integrinler belirli hücre tipi ya da doku ile sınırlıdır: α IIb β 3 plateletlerde, α 6 β 4 keratinositlerde, α E β 7 mukozal dokularda mast hücreleri, dendritik hücreler ve T hücrelerinde, α 4 β 7 hafıza T hücrelerinin alt kümesinde ve β 2 integrinler lökositlerde bulunur (32).

Ligand spesifitelerine göre memeli integrinleri laminin bağlayıcı integrinler (α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α 7 β 1 ve α 6 β 4), kollajen bağlayıcı integrinler (α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 10 β 1 ve α 11 β 1), lökosit integrinler (α L β 2, α M β 2, α X β 2 ve α D β 2) ve arjinin-glisin-aspartik asid (RGD) tanıyıcı integrinler (α 5 β 1, α V β 1, α V β 3, α V β 5, α V β 6, α V β 8 ve α IIb β 3) olarak gruplara ayrılabilir (Şekil 2.2) (33).



Şekil 2.2. İntegrin ailesinin gösterimi. Omurgalılarda, integrin ailesi 24 heterodimer içerir (33 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

2.5.1. $\alpha V\beta 3$ İntegrin

$\alpha V\beta 3$ integrin kan damarlarındaki çeşitli hücrelerden, (örnek; endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblast, makrofaj ve plateletler) mezankimden orijin alan hücrelerin neredeyse tümünden eksprese edilen çok yaygın integrinlerden birisidir (34). Birçok biyolojik olaya aracılık ettiği bilinmektedir (örnek; vasküler düz kas hücrelerinin göçü, kemik matrisine osteoklastların adezyonu, anjiyogenez ve implantasyon). Ayrıca bu integrin alt üniti hücre proliferasyonu ve differansiyasyonu arasındaki dengenin düzenlenmesinde anahtar sinyalleri sağlamaktadır.

$\alpha V\beta 3$ integrin aracılı hücre matris etkileşimlerinin osteoblast fonksiyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. Artan ekspresyonu çeşitli invaziv malign tümörler ve tümör endotelinde gözlenir. $\alpha V\beta 3$ integrin osteoporozun patogenezinde de önemli rol oynamaktadır (35, 36).

$\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha IIb\beta 3$ heterodimerlerini içeren integrin ailesinin çoğu üyesi ligandlarındaki RGD dizisini tanır (37). $\alpha V\beta 3$ integrin, RGD

etkileşimi ile vitronektin, fibronektin, fibrinojen, osteopontin, trombospondin ve von Willebrand faktör (faktör VIII) gibi çok farklı ligandlara bağlanabilir (38, 39).

$\alpha V\beta 3$ integrin endometriyumun luminal epitelinde en iyi karakterize edilen hücre adezyon molekülüdür. Fare ve tavşan modellerinde $\alpha V\beta 3$ integrinin blokajı implantasyonu bozar, fakat αV siz fareler fertildir (40, 41). Cheres ve ark. (42), $\alpha V\beta 3$ integrinin anjiyogenez için önemli olduğunu göstermiştir. İmplantasyon zamanında bu integrinin nötralizasyonu, implantasyon bölgesinde yeni damar oluşumunu önleyerek embriyo yaşamını yaşamını azaltabilir ve integrin nötralize ajanların enjeksiyonundan sonra azalan implantasyon bölge sayısının sebebi olabilir.

İnsan endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu, hem epidermal büyüme faktörü (EGF), HB-EGF gibi pozitif, hem de 17β -estradiol (E_2) gibi negatif faktörlerle düzenlenir. Proliferatif fazda, yüksek östrojen seviyelerinin integrin ekspresyonunu östrojenin alfa reseptörü üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca luteal fazda progesteron artışı, östrojen alfa reseptörlerinin sayısını azaltır ve bu durum belirgin integrin artışı ile sonuçlanır. Progesteron, epitelyal $\beta 3$ integrin ekspresyonunu indüklemek için parakrin faktörlerin (örnek; EGF ve HB-EGF) artırılmasında olumlu rol oynar. HOXA 10, $\beta 3$ alt ünitesinin ekspresyonunun düzenlenmesini sağlar. HOXA 10 ile muamele edilen kültüre endometriyal epitel hücrelerde $\beta 3$ integrin ekspresyonu fazlasıyla artmıştır (43).

2.6. İntegrinler ve İmplantasyon

İntegrinler üreme siklusu ve erken gebelik boyunca uterus içerisinde uzamsal ve geçici olarak düzenlenir. Uterin integrin reseptörlerine dair bilgilerin çoğu kemirgen deneyleri ve klinik çalışmalardan elde edilir. İnsanlarda $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αV , $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$ ve $\beta 6$ integrin alt birimleri uterusun lumial epitelinde tanımlanmıştır. $\beta 5$ ve $\beta 6$ hariç bu integrinlerin tümünün ayrıca $\alpha 1$ ve $\alpha 4$ integrin alt ünitelerinin de glandular epitelde eksprese edildiği gösterilmiştir (Çizelge 2.1). Böylece, uterin luminal yüzeyde mevcut olan heterodimerler $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ ve $\alpha V\beta 6$ integrinleri içerir. Proliferatif endometriyumda bulunmayan $\alpha 4\beta 1$ integrin, ovulasyon sonrası (14. gün) sadece glandular epitel hücrelerinde görünür ve maksimum uterin reseptivite periyodu sona erdiği zaman siklusun 24. gününde kaybolur. $\alpha 1\beta 1$ integrin ise siklusun

14 ve 28. günler arası epitelyal hücrelerinden eksprese edilmektedir. $\alpha V\beta 1$ integrin, implantasyon penceresi açık olduğu zaman 19/20. gün sonrası glandular epitel hücrelerinden eksprese edilir. İmplantasyon penceresi sırasında $\alpha V\beta 3$ integrin uterusun luminal epitelinde ve glandular epitelinde eksprese edilmektedir. Bu periyot maksimum uterin reseptivite ile aynı zamana denk gelir. Bu periyot sırasında dört integrinin birlikte ekspresyonu, embriyo-maternal tanıma ve blastokistin başarılı implantasyonu için önemlidir. $\alpha 4\beta 1$ integrinin kaybı bu pencerenin kapanmasını haber verir. Uterin epitelin penetrasyonundan sonra blastokist uterin stromaya invaze olur.

İmplantasyon sırasında insan trofoblast hücreleri tarafından integrin ekspresyonu hakkında çok az bilgi mevcuttur. Kemirgen implantasyonu da invaziv olduğundan bazı görüşler kemirgen trofoektoderminin incelenmesinden elde edilir. Adezyonun ilk aşaması sırasında, kemirgen trofoektodermi $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha V\beta 3$ integrinleri eksprese eder. Fakat konseptus uterin epitelin ötesine invaze olmaya başladığında trofoektoderm $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 7\beta 1$ integrin ekspresyonuna yer değiştirir. Laminin ve kollajene bağlanan bu integrinler, epitelin invazyonunu destekler ve stromaya göçü kolaylaştırır. Embriyo-endometriyal etkileşimler için 3 senaryo vardır: (i) trofoektodermden eksprese edilen integrinler uterin epiteldeki ligandlara bağlanır, (ii) uterin epitelin apikal yüzeyinden eksprese edilen integrinler trofoektodermdeki ligandlara bağlanır, (iii) integrinler hem hücrelerden eksprese edilir ve hücreler arası alanda bulunan ekstrasellüler matriks bileşenlerine bağlanır. İnsan fibronektini ($\alpha 4\beta 1$ için ligand) ve vitronektin ($\alpha V\beta 3$ için ligand) trofoblastlardan eksprese edilir. Endometriyal $\alpha 4\beta 1$ trofoblastik dokunun tanınmasına katılır. $\alpha V\beta 3$ integrin; vitronektin, fibrinojen, osteopontin (OPN), fibronektin, trombospondin ve endometriyal hücrelerden eksprese edilen von Willebrand faktör dahil geniş ECM komponentlerine bağlanma yeteneğinde olan çok yönlü bir integrindir (31).

Çizelge 2.1. Menstrual siklus sırasında endometriyumda integrin altünitelerinin dağılımı (31 nolu makaleden modifiye edilerek kullanılmıştır).

Siklus fazı	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	αV	$\beta 1$	$\beta 4$	$\beta 3$
Proliferatif faz (8/9. gün)										
Epitel hücreleri	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Stromal hücreler	-	±	±	-	-	+	-	+	+	-
Ovulatuvar faz (14/15. gün)										
Epitel hücreleri	±	±	±	+	-	+	-	+	+	-
Stromal hücreler	±	±	±	+	-	+	-	+	+	-
Mid-luteal faz (19/20. gün)										
Epitel hücreleri	+	+	+	++	-	++	+++	+	+	+++
Stromal hücreler	±	+	+	++	-	++	+++	+	+	+++
Menstrula faz (26/27. gün)										
Epitel hücreleri	-	-	±	±	-	+	-	±	±	-
Stromal hücreler	-	-	±	-	-	+	-	±	±	-

2.7. İntegrinler ve Üreme Başarısızlığı

Üreme başarısızlığı teriminin, tekrarlayan gebelik kaybı, hormonal dengesizlik, açıklanamayan infertilite, IVF (In Vitro Fertilizasyon) başarısızlığı, endometriosis, polikistik overler, pre-mature ovaryan başarısızlık ve anormal endometriyal fonksiyon dahil çeşitli tanıları kapsayan geniş bir anlamı vardır.

İntegrinlerin pek çoğunun embriyo-endometriyal etkileşimler ve implantasyona katıldığı açıktır. Sorulardan biri “üreme başarısızlığı olan kadınların endometriyumunda integrin

ekspresyonunun profili nedir?” olarak özetlenebilir. Polikistik Over Sendromlu hastalarda $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu endometriyumda ya gecikmiştir ya da bulunmamaktadır. Endometriyozis ve uterin reseptivite arasındaki etiyolojik ilişki çoğunlukla bilinmez. Anormal $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu endometriyozis ile ilişkilidir ve uterin reseptivitede siklus verimi azalan bazı kadınlarda tanımlanabilir. Meyer ve ark.(31), endometriyal reseptiviteyi olumsuz etkileyen inflamatuvar hidrosalpinski göstermiştir. Bu çalışmada $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu, hidrosalpinski kadınların mid-luteal faz endometriyumunda az olarak saptanmıştır (31).

2.8. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), kronik hiperglisemi ile seyreden, insülin sekresyonu azlığı veya insülinin etkisinde azlık ve bazen de her ikisinin bozukluğundan kaynaklanan ve karakteristik olarak hiperglisemi ile seyreden metabolik bir hastalıktır. Klinik olarak ortaya çıkışı, klasik olarak poliüri, polifaji, polidipsi ve zayıflama gibi semptomlarıdır. Kronik bir metabolizma hastalığı olan diyabetes mellitusta akut metabolik komplikasyonların yanı sıra, kronik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar, hastalığa bağlı morbidite ve erken mortalitenin en önemli nedenidir (44).

Diabetes Mellitus, insanlarda en sık rastlanan metabolik hastalıktır, değişik popülasyonlarda yaklaşık %2-8 arasında bildirilmektedir ve bu oran her geçen yıl daha da artmaktadır. Gebelik öncesi teşhis edilmiş ise pregestasyonel, ilk kez gebelikte teşhis edilmişse gestasyonel diyabetes mellitus adını alır. Toplumdaki yaygınlığına paralel olarak değişik popülasyonlarda gebeliklerin %1-14'ü gestasyonel diyabet, %0,5'i de pregestasyonel diyabet ile komplike olmaktadır (45).

Diyabetin yaygın olarak iki tipi vardır. Tip I diyabet pankreasın β (beta) hücrelerinde insülin hormonunun yapım eksikliğine bağlı ortaya çıkan otoimmün bir hastalıktır. Tip II diyabet ise insülin duyarlılığında azalma ve insülin direncine bağlı olarak gelişir (46).

Diyabet gebelikte oldukça sık görülen bir komplikasyondur. Diyabetle komplike olmuş gebelikler normal gebe durumuna göre birtakım maternal ve fetal riskler

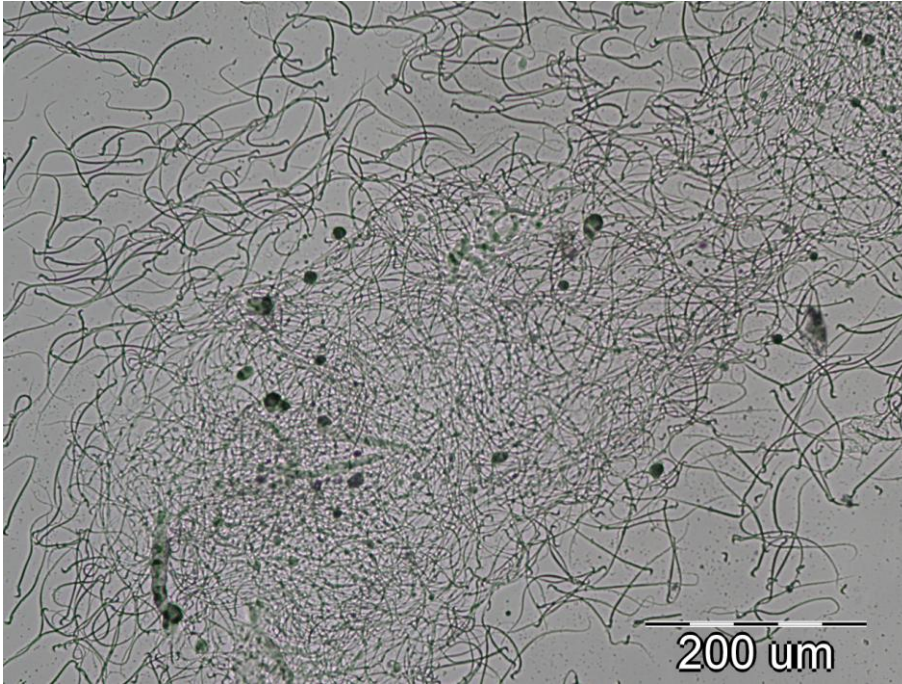
içermektedir. Yeterli glisemik kontrol sağlanamadığı zaman bebekte konjenital malformasyonlardan uterus içerisinde ölüme, annede hipoglisemiden diyabetik ketosidoza, retinopati ve nefropatide artışa neden olmaktadır (47).

Yaş ile birlikte ilerleyen hiperglisemik durumun şiddetlenmesi özellikle endometriyal epitel tabaka içerisinde sitolojik değişikliklerin artmasıyla birlikte olmaktadır. Db/db mutasyonun ekspresyonundan sonra uterusun epitel hücresel bütünlüğünde azalma olduğu, epitel bazal membran katlantılarının arttığı, bazal membranın kalınlaştığı, sitoplamik organellerin hacminin azaldığı ve belirgin bazal kutup lipid birikiminin olduğu gösterilmiştir (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmamız Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ve Uygulama Merkezi'nden elde edilen 42 adet, 8 haftalık dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar diyabet ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her iki gruptaki hayvanlarda gebeliğin 3, 5 ve 7. günlerinde ötenazi yapılmak üzere 3'er alt gruba (n=7) ayrıldı. Bu günlerin seçilmesindeki amaç; gebeliğin erken döneminde, implantasyonun pencere dönemini, bu dönemin öncesini ve sonrasını inceleyebilmektir. Sıçanların gebelik süresi yaklaşık olarak 21-23 gündür ve implantasyon gebeliğin yaklaşık 5-6. gününde olmaktadır (49,50).



Şekil 3.1. Sıçan vajinal sürüntüsündeki spermler (X300).

3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması

Deney grubundaki sıçanlara tek doz olarak 50 mg/kg streptozotosin (Sigma Chemical Co.) sodyum sitrat tampon (pH:4,4) solüsyonda çözüldürülerek periton içi yolla enjekte edildi. Enjeksiyondan 3 gün sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kan glikozu düzeyi glukometre (Accu-Chek®) ile değerlendirilerek diyabetes mellitusun oluşumu kontrol edildi. Kan glikoz düzeyi 130-200 mg/dl arasında olan sıçanlar orta diyabetik olarak kabul edildi. Diyabetik sıçanlar 2 haftalık diyabet periyodundan sonra çiftleşmeye konuldu. Aynı sürelerde kontrol grubundaki sıçanlarda çiftleştirildi. Sıçanların çiftleşebilmeleri için bir erkek, üç dişi olmak üzere aynı kafese konuldu. Ertesi sabah vajinal sürüntü ile dişi sıçanların gebe kalıp kalmadıkları kontrol edildi ve spermin saptandığı gün 1. gebelik günü sayıldı. Diyabetik ve kontrol grubundaki sıçanlara gebeliğin 3., 5. ve 7. günde ötenazi yapıldı.

3.3. Uterusların Elde Edilmesi, Fiksasyon

Sıçanlar intraperitoneal Ksilazin+Ketamin anestezisi ile uyutulduktan sonra göğüs kafesleri açılarak sol ventrikülden, önce %0,9'luk izotonik NaCl ile takiben sodyum fosfat tampon içinde (pH:7,2) hazırlanan %4'lük paraformaldehit+%0,5'lik glutraldehit ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Perfüzyon fiksasyonunun tamamlanmasını takiben uteruslar çıkarıldı. Bir kısmı immunohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehite, bir kısmı da elektron mikroskobik inceleme için %2,5'lük glutraldehite konuldu. Dokular tespit olduktan sonra ışık mikroskobik inceleme için parafin ve elektron mikroskobik inceleme için resin bloklara gömüldü.

3.4. İmmünohistokimyasal İşaretleme

Mikrotomla adheziv lamlara 7µm kalınlığında alınan kesitlere uygulanan işlemler aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısında 3X10 dakika ksilolden geçirildi.

2. Rehidratasyon işlemleri için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı.
3. Fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için tripsin (pH:7,6) içinde 37°C (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika muamele edildi.
4. Bu işlemden sonra taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3X5 dakika yıkandı.
5. Distile suda %12,5'lük hazırlanmış hidrojen peroksit (H₂O₂) ile endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için 10 dakika inkübe edildi.
6. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
7. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için Novocastra™ Protein Block ile 8 dakika inkübe edildi.
8. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan PBS içinde %0.5'lik sığır serum albumin (BSA) ile sulandırılmış primer antikor damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde oda ısısında 1 gece inkübe edildi.
9. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
10. Biotin ile bağlanmış polivalent sekonder antikor (Scytek®) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.
11. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
12. Streptavidin peroksidaz enzim reagenti ile 10 dakika inkübe edildi.
13. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
14. Peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkübe edildi.
15. Distile suda 5 dakika yıkandı.

16. Hematoksilen ile 5-10 saniye zıt boyama yapıldı.
17. Akar suda berraklaşana kadar yıkandı.
18. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildi.
19. Ksilolden 3x5 dakika geçirildi.
20. Entellan ile kapatıldı.

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

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

3.5. Elektron Mikroskopik İnceleme

Elektron mikroskopik inceleme için alınan uterus 1 mm³'lük parçalara bölündü ve 4-6 saat %2,5'lük gluteraldehit solüsyonunda bekletildi. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu ile yıkandıktan sonra elektron mikroskopik incelemeler için doku takip işlemi Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) cihazı kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı ve rezin içine gömüldü.

1. %1' lik osmium tetraoksit 1saat
2. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dk
3. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dk
4. Etil alkol (%50) 15 dk
5. Etil alkol (%60) 15 dk
6. Etil alkol (%70) 15 dk
7. Etil alkol (%80) 15 dk
8. Etil alkol (%90) 15 dk

9. Etil alkol (%100) 15 dk
10. Etil alkol (%100) 15 dk
11. Etil alkol (%100) 15 dk
12. Etil alkol (%100) 15 dk
13. Propilen oksit 15 dk
14. Propilen oksit 15 dk
15. Propilen oksit+rezin (2+1)
16. Propilen oksit+rezin (1+1)
17. Propilen oksit+rezin (1+2)
18. Saf rezin 12 saat
19. Resin içine gömme işlemi
20. Etüvde (60°C) polimerizasyon 24 saat

İlk 11 basamak +4°C'de daha sonrakiler oda ısısında gerçekleştirildi.

EMBed-812 Embedding Kit içine gömülen dokulardan Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) ile 70 nm kalınlığında kesitler 300 gözenekli bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandıktan sonra Jeol Jem-1011 transmisyon elektron mikroskopuna (Jeol Ltd. Tokyo-JAPONYA) eklenmiş Megaview III dijital kamera (Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflanarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve deneysel diyabet oluşturulmuş gebe sıçanlardan alınan uterus dokularında $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Şekil 4.1.1).



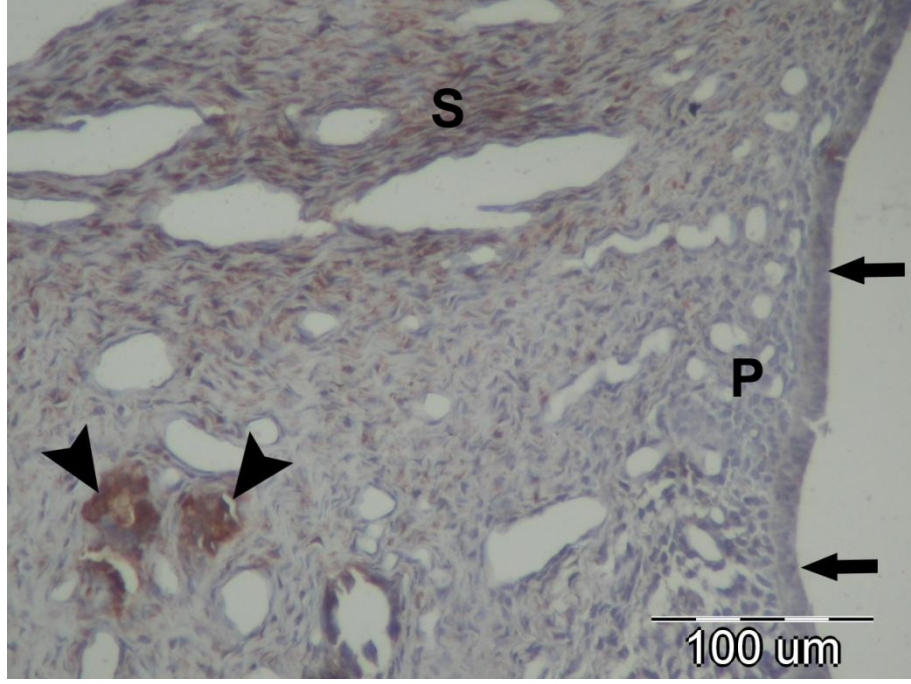
Şekil 4.1.1. Negatif kontrol. Primer desidual alan (P), Sekonder desidual alan (S), endometriyal luminal epitel (ok), bez epiteli (ok başı), desidual kan damarları (yıldız) (X600).

Kontrol grubu: $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu açısından gebe sıçan endometriyumunun luminal epitel, glandular epitel ve stromasında önemli farklar vardı.

Kontrol 3. günde antimezometriyal bölgenin luminal epitelinde az sayıda hücrede zayıf işaretlenme gözlenirken, mezometriyal bölge epitelinde işaretlenme görülmedi. Sekonder desidual alanda özellikle de kan damarları çevresindeki ekstrasellüler matrikste ve stromal hücrelerde belirgin olarak işaretlenme gözlenirken, primer desidual alanda bu yapılarda zayıf işaretlenme bulunmaktaydı. Bu gruptaki en belirgin işaretlenme bez epiteli hücrelerinde saptandı (Şekil 4.1.2, 4.1.3).

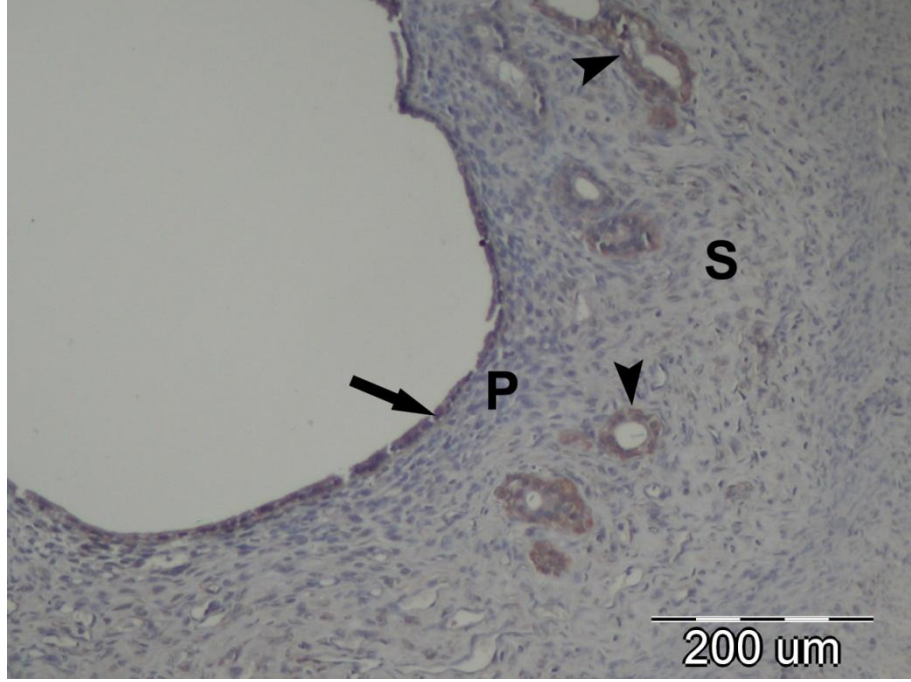


Şekil 4.1.2. Kontrol grubu 3. günde $\alpha V\beta 3$ integrin antikoru ile zayıf işaretlenmiş luminal epitel hücreleri (ok), primer desidual alandaki (P) ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, sekonder desidual alanda (S) belirgin işaretlenmiş ekstrasellüler matriks, stromal hücreler ve bez epitel hücreleri (ok başı) (X300).

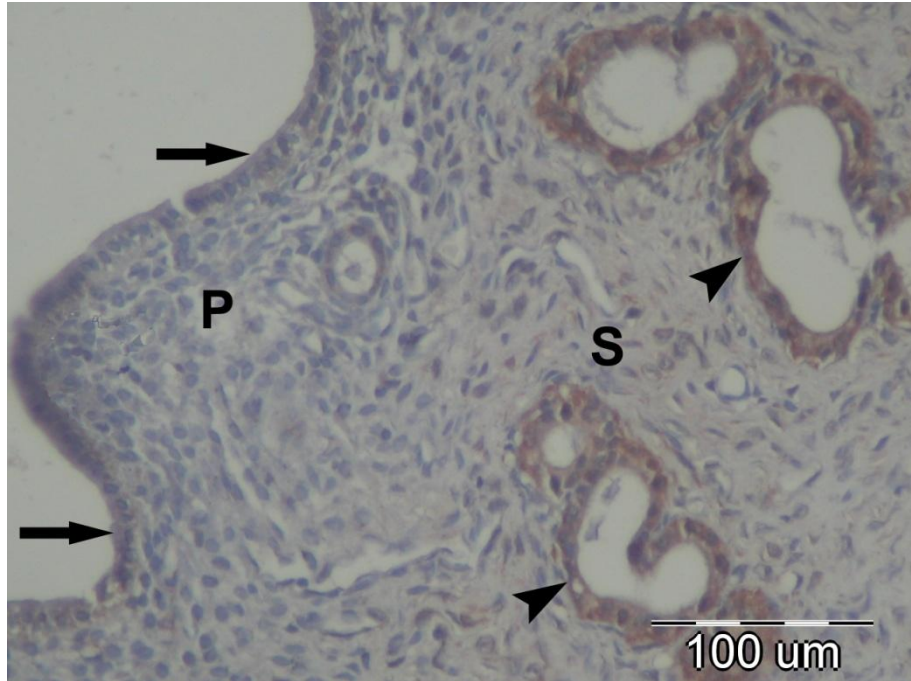


Şekil 4.1.3. Kontrol grubu 3. günde zayıf işaretlenmiş luminal epitel hücreleri (ok), primer desidual alandaki (P) ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, sekonder desidual alanda (S) belirgin işaretlenmiş ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, belirgin işaretlenmiş bez epitel hücreleri (ok başı) (X600).

Kontrol 5. günde antimezometriyal bölgenin endometriyal luminal epitelinde kısmen işaretlenmenin varlığı belirlendi. Kontrol 3. güne göre epiteldeki işaretlenme daha yoğundu. Yine sekonder desidual alanın ekstrasellüler matriksinde ve stromal hücrelerinde belirgin işaretlenme bulunmaktayken, primer desidual alandaki hücreler ve ekstrasellüler matriks zayıf işaretlenmişti. Bez epiteli hücreleri, bu grupta da en şiddetli pozitif boyanan hücrelerdi, ancak bu boyanma 3. gündeki bez epiteli hücrelerine göre daha azdı (Şekil 4.1.4, 4.1.5).



Şekil 4.1.4. Kontrol grubu 5. günde kontrol 3. güne göre daha yoğun işaretlenmiş luminal epitel hücreleri (ok), primer desidual alandaki (P) zayıf işaretlenmiş ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, sekonder desidual alanda (S) belirgin işaretlenmiş ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler ve pozitif boyanan bez epitel hücreleri (ok başı) (X300).

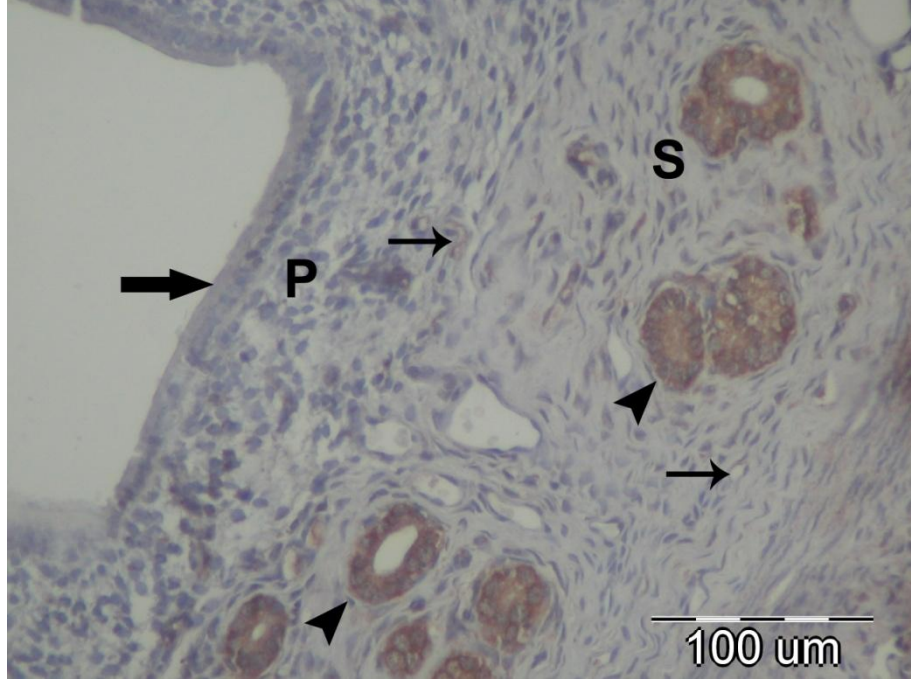


Şekil 4.1.5. Kontrol grubu 5. günde kontrol 3. güne göre daha yoğun işaretlenmiş luminal epitel hücreleri (ok), primer desidual alandaki zayıf işaretlenmiş ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler (P), sekonder desidual alanda (S) belirgin işaretlenmiş ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, pozitif boyanan bez epitel hücreleri (ok başı) (X600).

Kontrol 7. günde hem antimezometriyal hem de mezometriyal bölgenin luminal epitelindeki işaretlenme hemen hemen kaybolmuştu. Primer desidual alandaki stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste zayıf işaretlenme gözlenirken, sekonder desidual alandaki stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste daha belirgin işaretlenme saptandı. Bu grubun en belirgin ekspresyonu da yine bez epitelinde gözlemlendi. Ayrıca bu grupta endometriyumun desiduasında ve perimetriyumunda bulunan damarların endotel hücrelerinde $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu oldukça zayıftı (Şekil 4.1.6, 4.1.7).

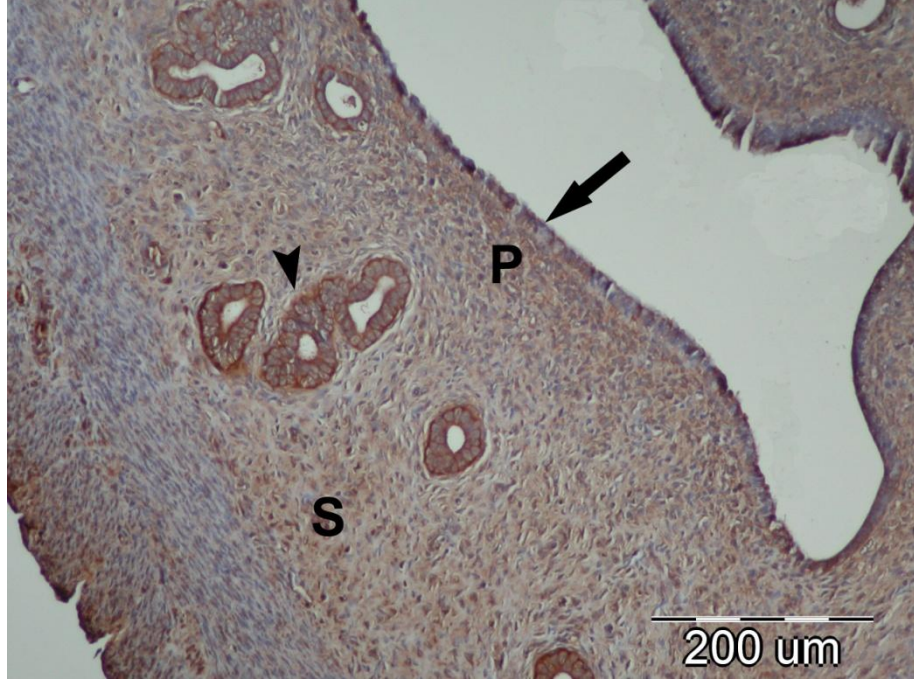


Şekil 4.1.6. Kontrol grubu 7. günde çok zayıf işaretlenmiş luminal epitel hücreleri (ok), primer desidual alan (P), sekonder desidual alan (S) pozitif boyanan bez epitel hücreleri (ok başı) (X300).

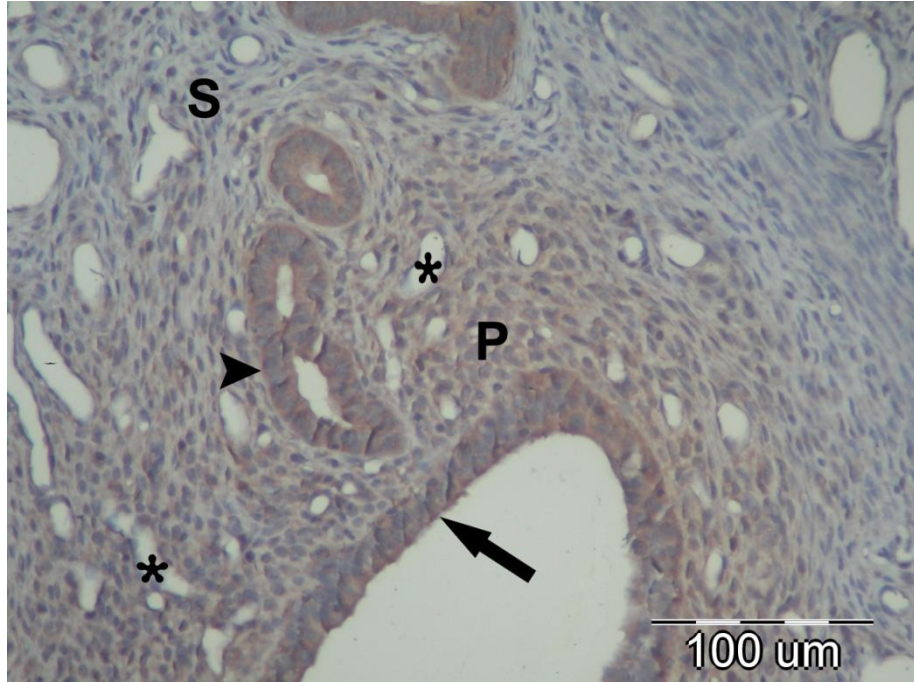


Şekil 4.1.7. Kontrol grubu 7. günde zayıf işaretlenmiş luminal epitel hücreleri (ok), primer desidual alandaki (P) ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, sekonder desidual alanda (S) belirgin işaretlenmiş ekstrasellüler matriks ve stromal hücreler, damarların endotel hücrelerinde zayıf işaretlenme (ince ok), belirgin işaretlenmiş bez epitel hücreleri (ok başı) (X600).

Diyabet grubu: Diyabetik sıçanlarda gebeliğin 3. gününde $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu epitelin tüm bölgelerinde görüldü. Bu grupta hem primer desidual bölgede hem de sekonder desidual bölgedeki ekstrasellüler matriks ve stromal hücrelerde işaretlenme bulunmakla birlikte, primer desidual alandaki matriks ve hücreler sekonder desidual bölgedekilere göre daha kuvvetli işaretlenmişlerdi. Bu grubun bez epitel hücreleri de, kontrol gruplarındakilere benzer şekilde oldukça belirgin olarak işaretlenmişti. Desidual ve perimetriyal damarların endotel hücrelerinde de işaretlenme gözlemlendi (Şekil 4.1.8, 4.1.9).

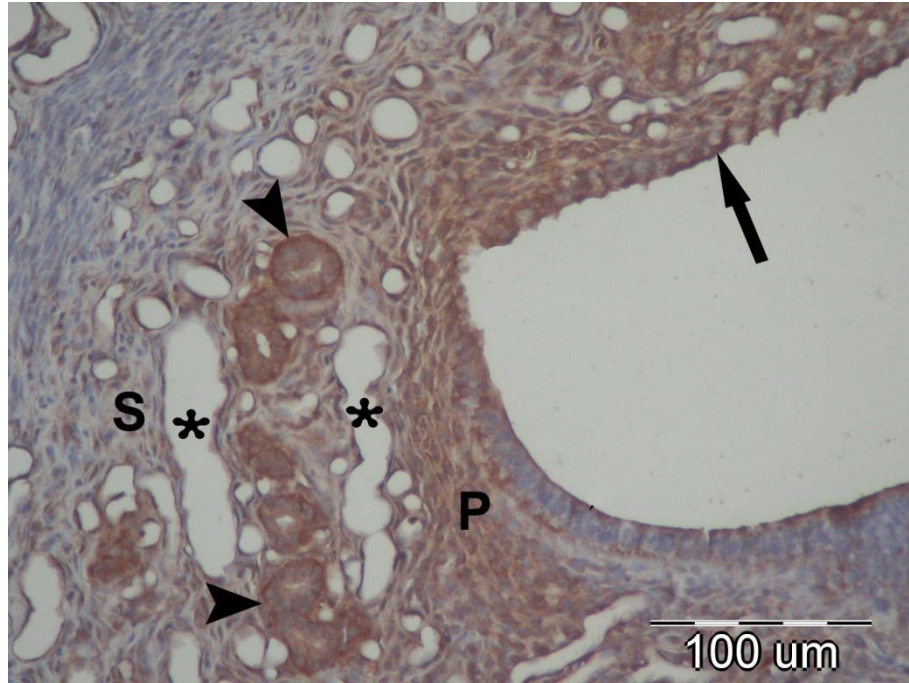


Şekil 4.1.8. Diyabet 3. günde luminal epitel hücrelerinin tüm bölgelerindeki işaretlenme (ok), primer desidual alan (P), sekonder desidual alan (S), belirgin işaretlenmiş bez epitel hücreleri (ok başı) (X300).

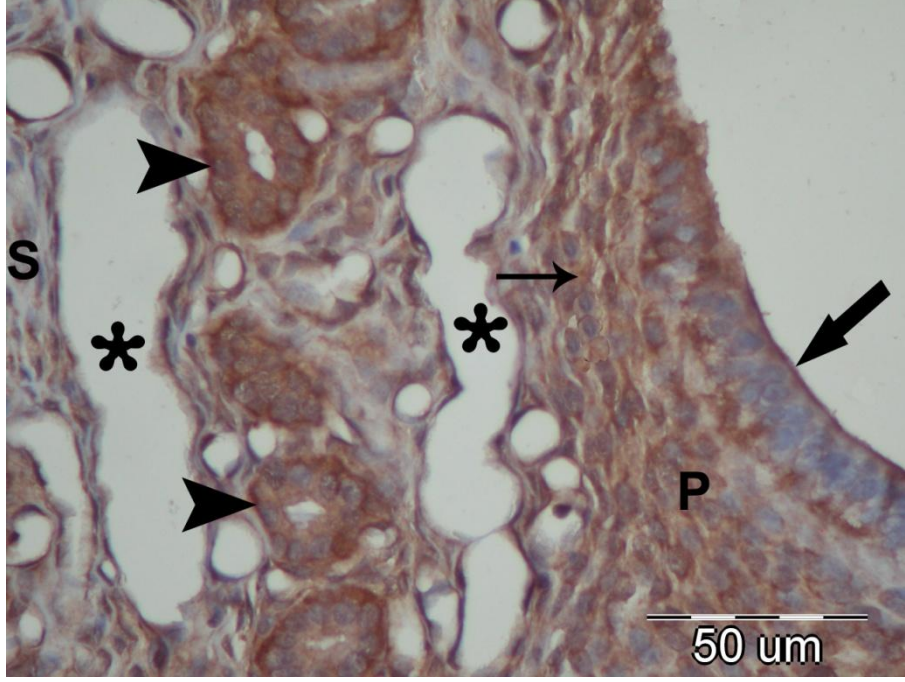


Şekil 4.1.9. Diyabet 3. günde luminal epitel hücrelerinin tüm bölgelerindeki işaretlenme (ok), kan damarlarının endotel hücrelerinde işaretlenme (yıldız), kuvvetli işaretlenmiş bez epitel hücreleri (ok başı) (X600).

Diyabet 5. günde tüm bölgelerdeki luminal epitel hücrelerinin bir kısmında işaretlenme görülürken diğer kısmında işaretlenme gözlenmedi. Endometriyal bez epitelinde ekspresyon yine kuvvetliydi. Primer desidual alandaki stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste belirgin işaretlenme vardı. Sekonder desidual alanda ise, stromal hücrelerin ve ekstrasellüler matriksin daha az işaretlendiği belirlendi. Desidual ve perimetriyal damarların endotel hücrelerinde de belirgin işaretlenme gözlendi (Şekil 4.1.10, 4.1.11).

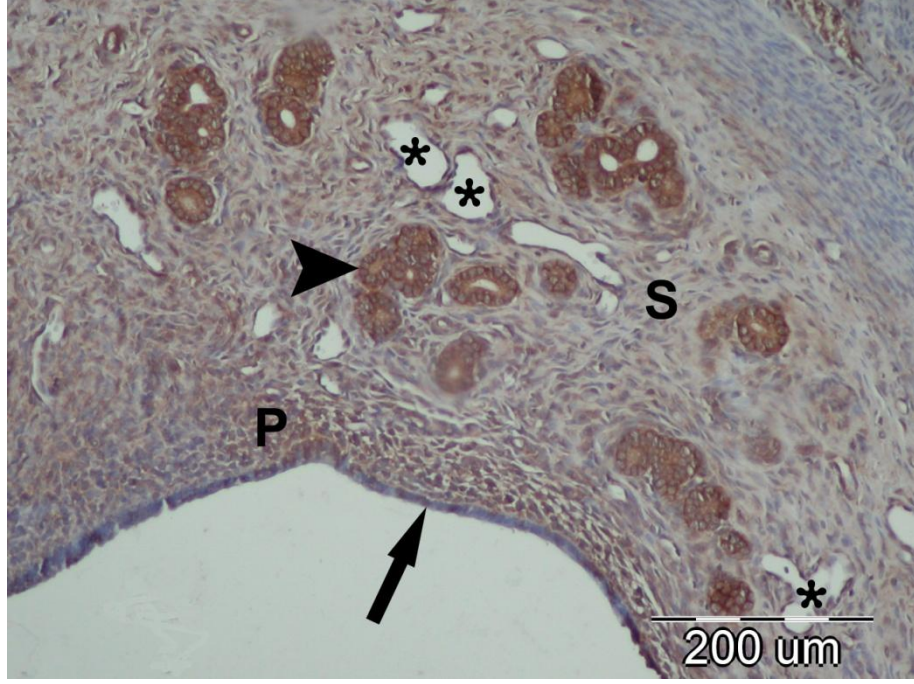


Şekil 4.1.10. Diyabet 5. günde işaretlenen epitel hücreleri (ok), Primer desidual alan (P), sekonder desidual alan (S), damarların endotel hücrelerinde belirgin işaretlenme (yıldız) (X600).



Şekil 4.1.11. Diyabet 5. günde işaretlenen epitel hücreleri (ok), primer desidual alanda (P) stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste (ince ok) belirgin işaretlenme, sekonder desidual alanda (S) zayıf işaretlenmiş stromal hücreler ve ekstrasellüler matriks, damarların endotel hücrelerinde belirgin işaretlenme (yıldız) (X1200).

Diyabet 7. günde tüm luminal epitelde ekspresyon azalmıştı. Epitelde az sayıda hücrede işaretlenme izlendi. Hem primer hem de sekonder desidual alandaki stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste ekspresyon gözlenmekle birlikte primer desidual alandaki stromal hücreler ve ekstrasellüler matriks daha kuvvetli işaretlenmişti. Bazı epitel hücreleri yine kuvvetli pozitif olarak gözlemlendi. Desidual ve perimetriyal damarların endotel hücrelerinde de belirgin işaretlenme vardı (Şekil 4.1.12, 4.1.13).



Şekil 4.1.12. Diyabetik 7. günde luminal epitel hücrelerinde zayıf işaretlenme (ok), primer desidual alan (P), sekonder desidual alan (S), bez epitel hücrelerinde kuvvetli pozitif işaretlenme (ok başı), damarların endotel hücrelerinde belirgin işaretlenme (yıldız) (X300).



Şekil 4.1.13. Diyabetik 7. günde luminal epitel hücrelerinde zayıf işaretlenme (ok), primer desidual alandaki (P) stromal hücreler ve ekstrasellüler matrikste sekonder desidual alana göre daha yoğun işaretlenme, sekonder desidual alan (S), bez epitel hücrelerinde kuvvetli pozitif işaretlenme (ok başı), damarların endotel hücrelerinde belirgin işaretlenme (yıldız) (X600).

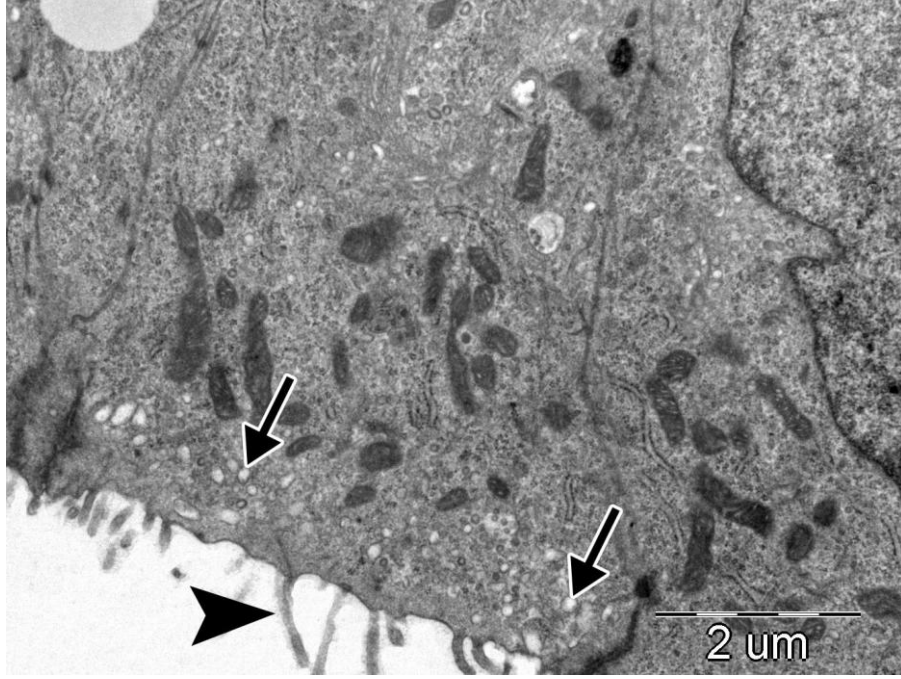
4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol Grubu

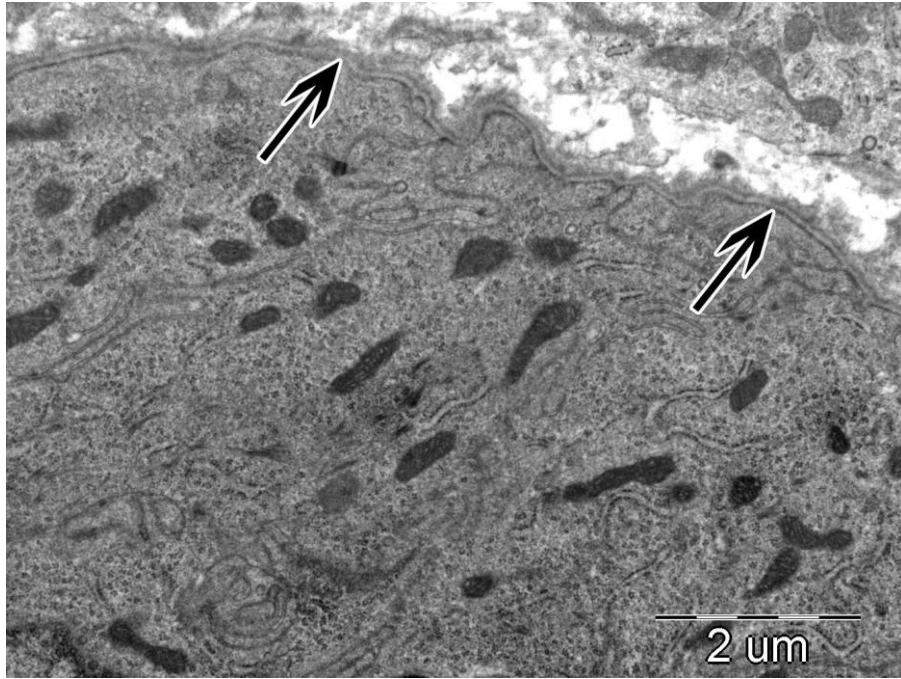
Kontrol 3. günde endometriyal luminal epitelin mikrovillusları uzun ve düzgündü (Şekil 4.2.1, 4.2.2). Luminal epitel hücrelerinde lipid damlacıkları gözlemlendi (Şekil 4.2.1). Apikal veziküller azdı (Şekil 4.2.2). Bazal lamina hafif kıvrıntılıydı (Şekil 4.2.3). Stromadaki kapiller damarlar normaldi (Şekil 4.2.4)



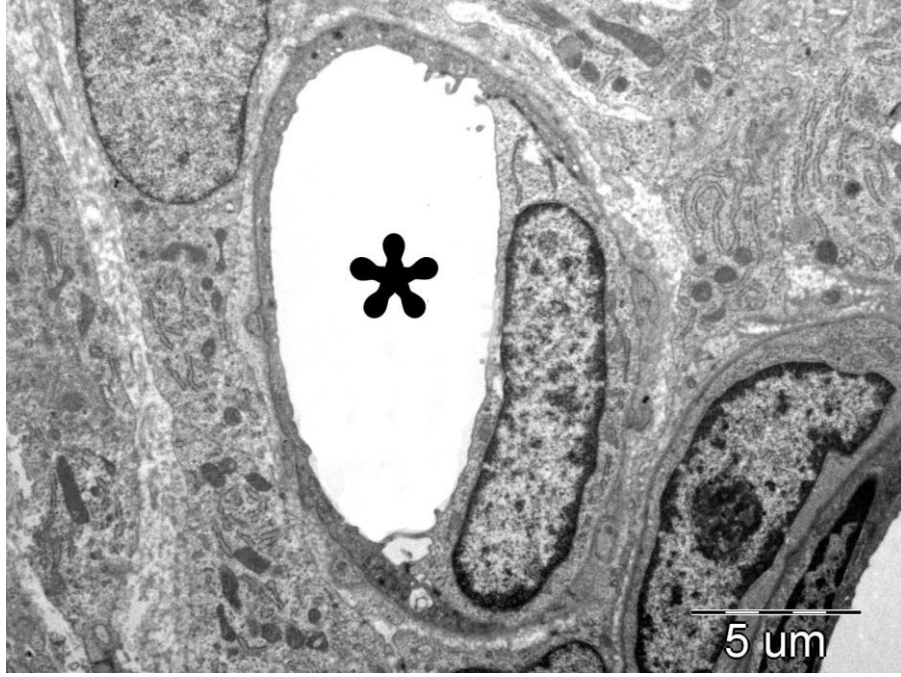
Şekil 4.2.1. Kontrol grubu 3. günde luminal epitel hücreleri ve lipid damlası (ok) (X4,000).



Şekil 4.2.2. Kontrol 3. günde luminal epitel hücrelerinin apikalindeki mikrovilluslar (ok başı) ve apikal veziküller (ok) (X15,000).

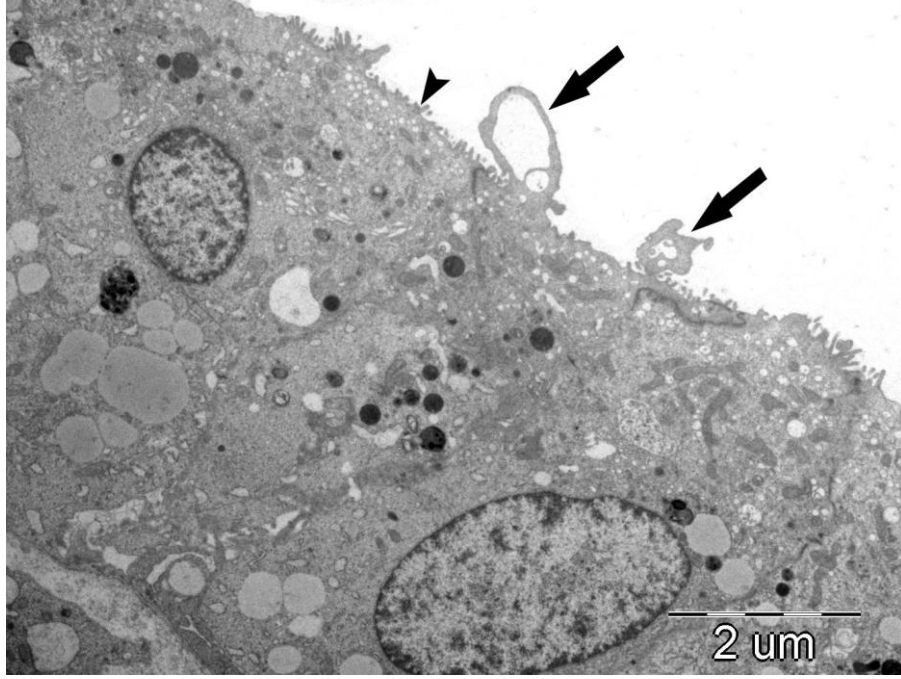


Şekil 4.2.3. Kontrol grubu 3. günde luminal epitel hücrelerinin hafif kıvrıntılı bazal laminası (ok) (X15,000).

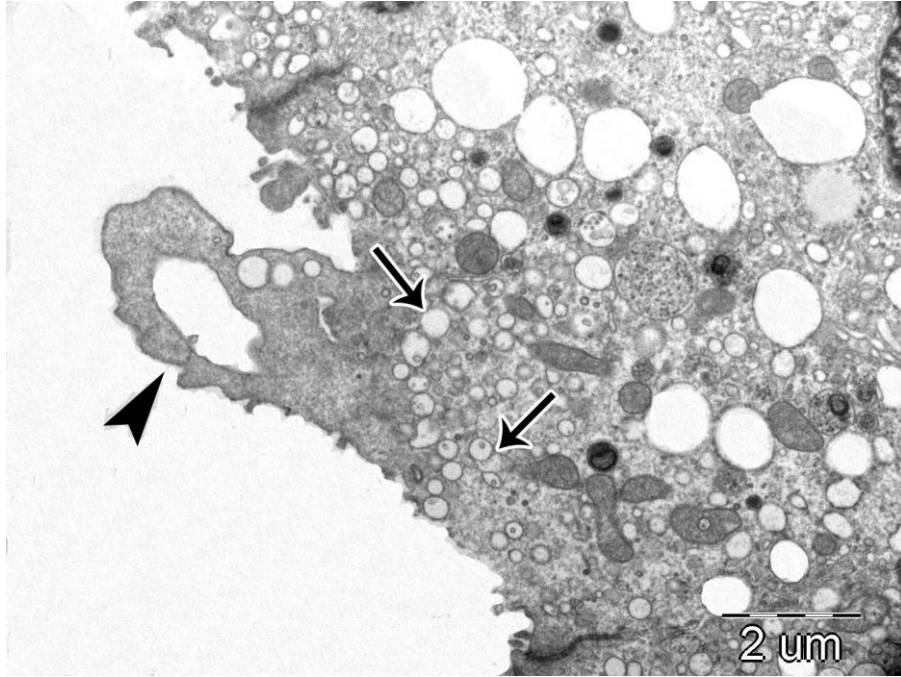


Şekil 4.2.4. Kontrol grubu 3. günde stromadaki normal görünümlü kapiller damar (yıldız) (X7,500).

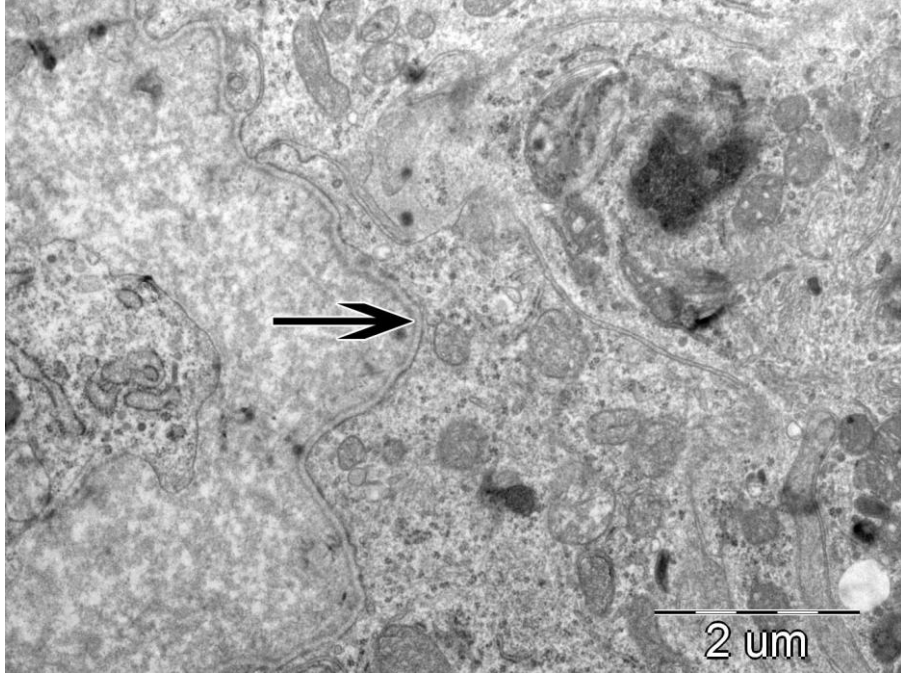
Kontrol 5. günde luminal epitel hücreleri 3. güne göre daha kısa ve az sayıda mikrovilluslara sahipti. Hücrelerin boyları daha kısalmıştı ve mikrovillusların yerini düzensiz apikal sitoplazmik uzantılar olan pinopodlar almaktaydı (Şekil 4.2.5). Pinopodların bazılarının bir ya da iki büyük vakuol içerdiği ancak organel içermediği tespit edildi. Pinopodların boyları mikrovilluslardan uzundu. Apikal veziküller çok sayıda ve büyüklükleri çeşitliydi (Şekil 4.2.6). Epitelin bazal laminası düzgün olarak değerlendirildi (Şekil.4.2.7). Stromadaki kapiller damarlar normaldi (Şekil 4.2.8).



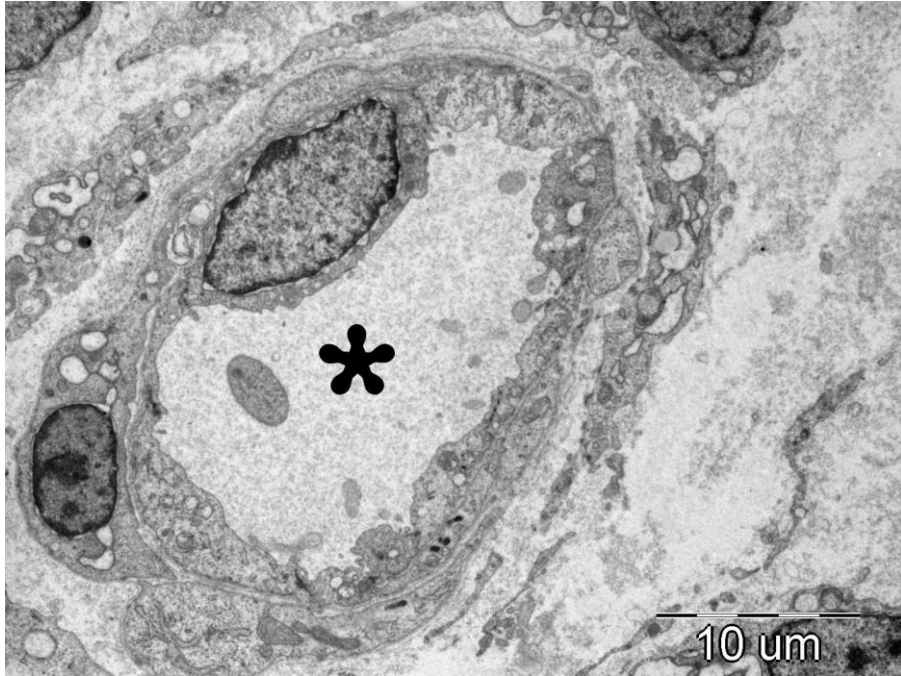
Şekil 4.2.5. Kontrol grubu 5. günde vakuol içeren pinopodlar (ok), mikrovilluslar (ok başı) (X10,000).



Şekil 4.2.6.Kontrol grubu 5. günde pinopod (ok başı), çok sayıda apikal veziküller (ok) (14,000).

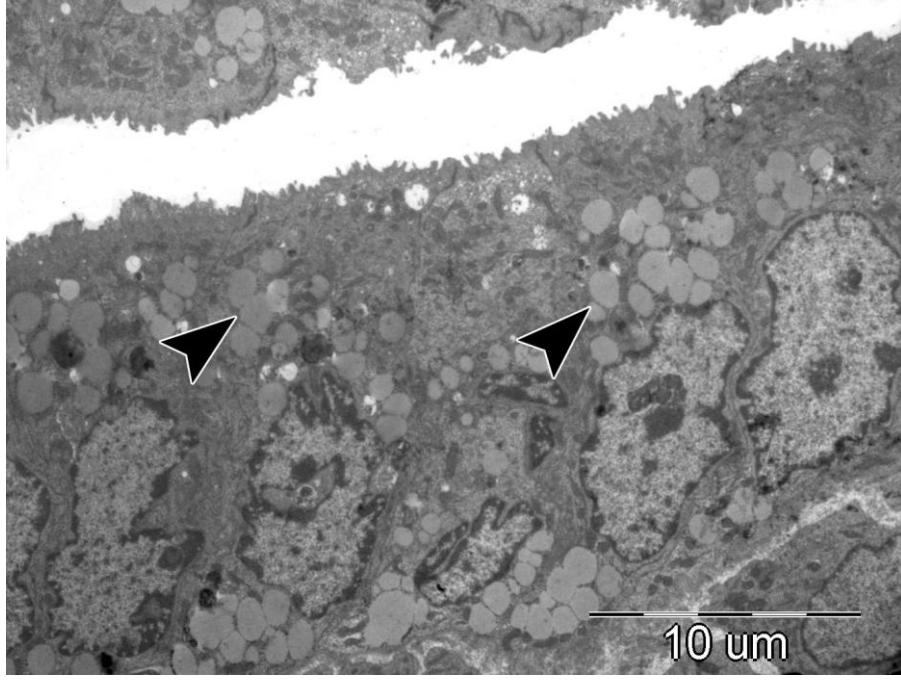


Şekil 4.2.7. Kontrol grubu 5. günde luminal epitel hücrelerinin bazal laminası (X15,000).

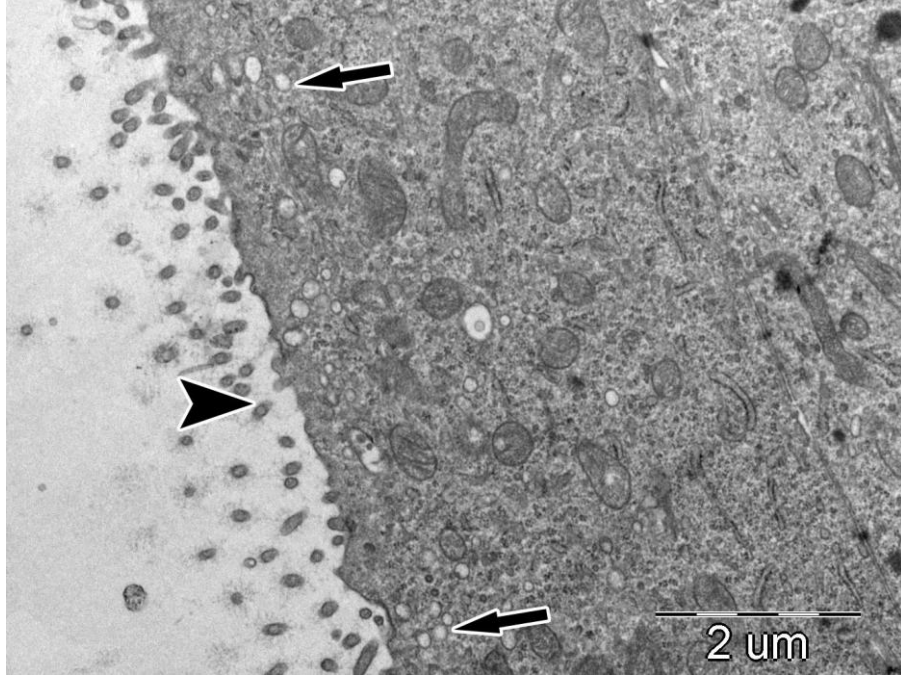


Şekil 4.2.8. Kontrol grubu 5. günde stromadaki normal görünümlü kapiller damar (yıldız) (X3,000).

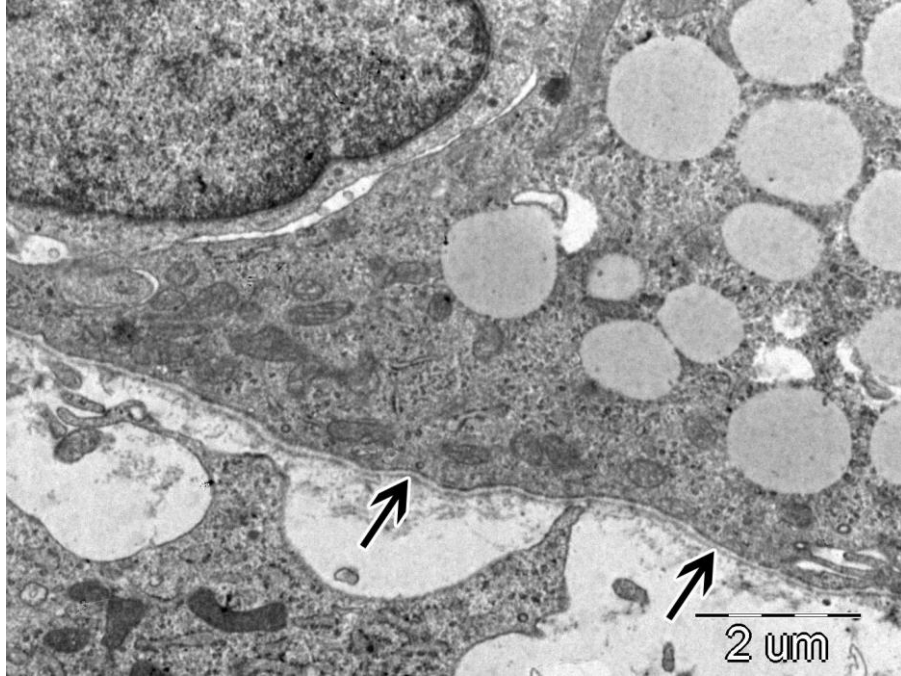
Kontrol 7. günde luminal epitel mikrovillus sayı ve uzunluğunun arttığı tespit edildi (Şekil 4.2.10). Pinopod yapıları kaybolmuştu (Şekil 4.2.9, 4.2.10). Apikal sitoplazmalarındaki apikal veziküller azalmıştı (Şekil 4.2.10). Bazal lamina düzgün görünümdeydi (Şekil 4.2.11). Stromadaki kapiller damarlar normaldi (Şekil 4.2.12).



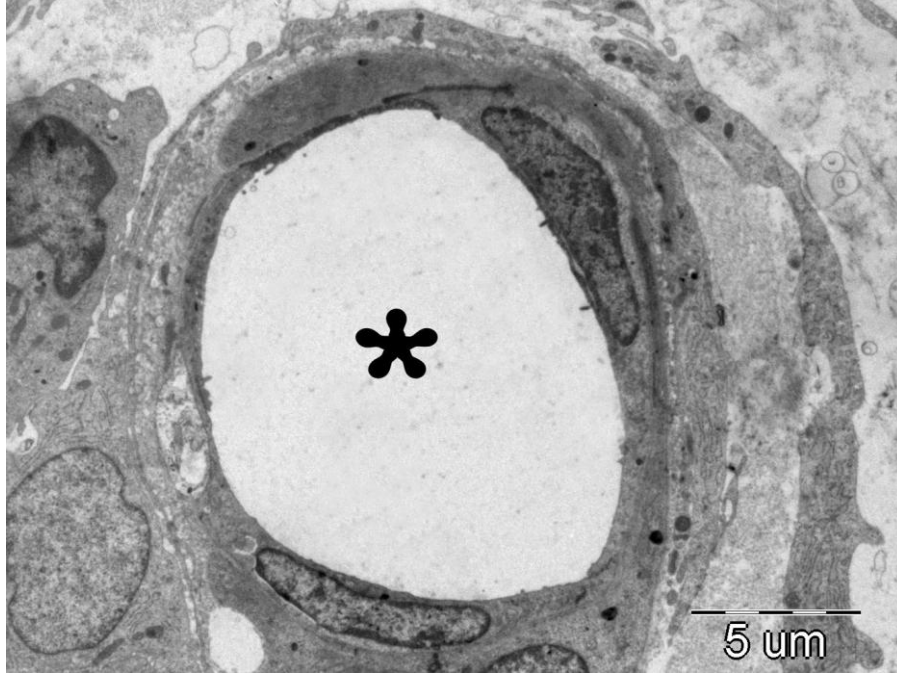
Şekil 4.2.9. Kontrol grubu 7. günde luminal epitel hücreleri ve lipid damlaları (ok) (X4,000).



Şekil 4.2.10. Kontrol grubu 7. günde luminal epitel hücrelerinin apikalindeki uzun mikrovilluslar (ok başı) ve apikal veziküller (ok) (X15,000).



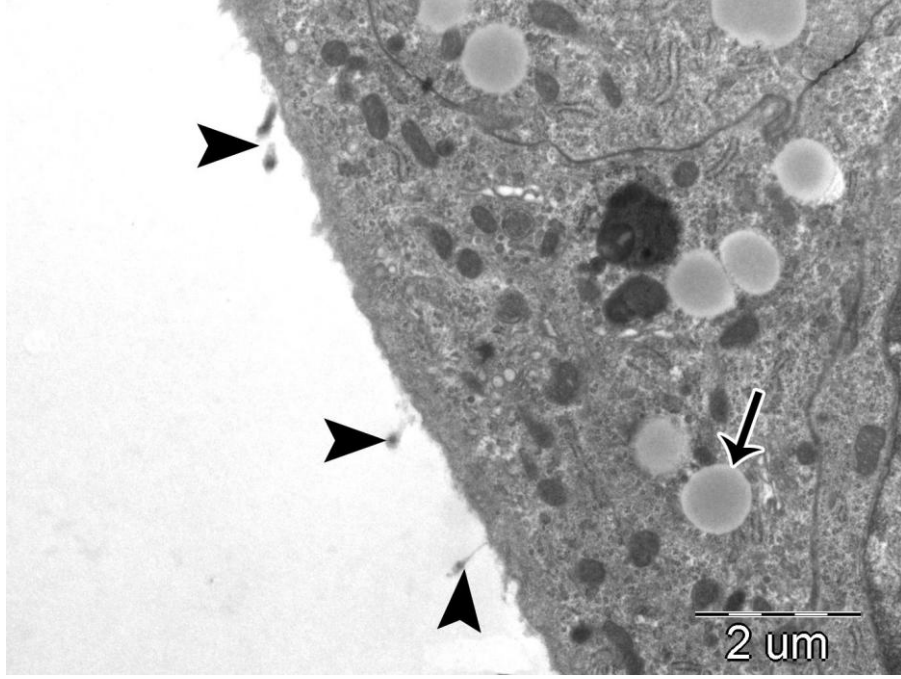
Şekil 4.2.11. Kontrol grubu 7. günde luminal epitel hücrelerinin düzgün görümlü bazal laminası (ok). (X12,000).



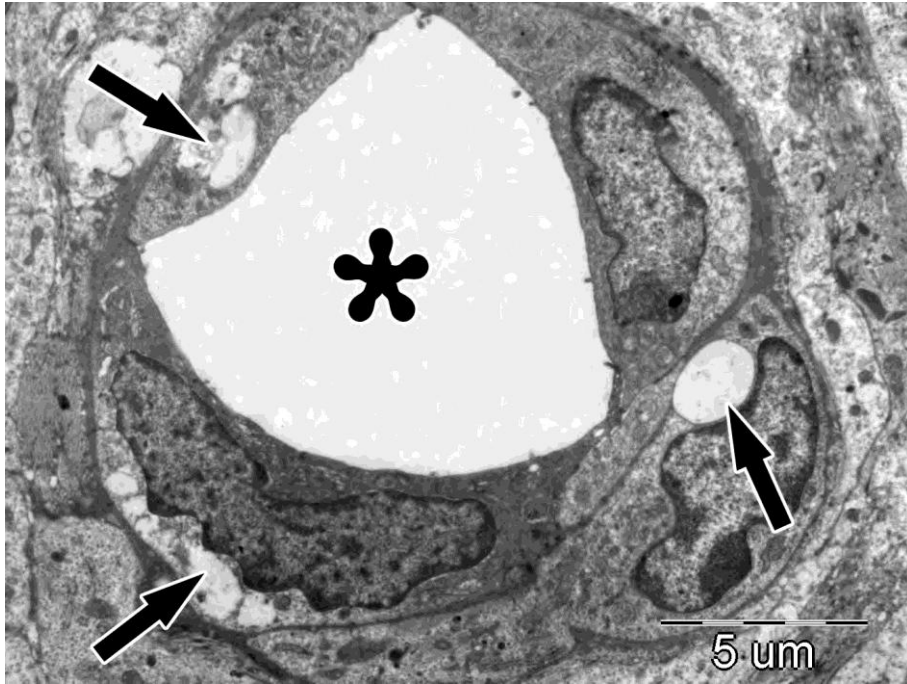
Şekil 4.2.12. Kontrol grubu 7. günde stromadaki normal görünümlü kapiller damar (yıldız) (X5,000).

Diyabetik Grup

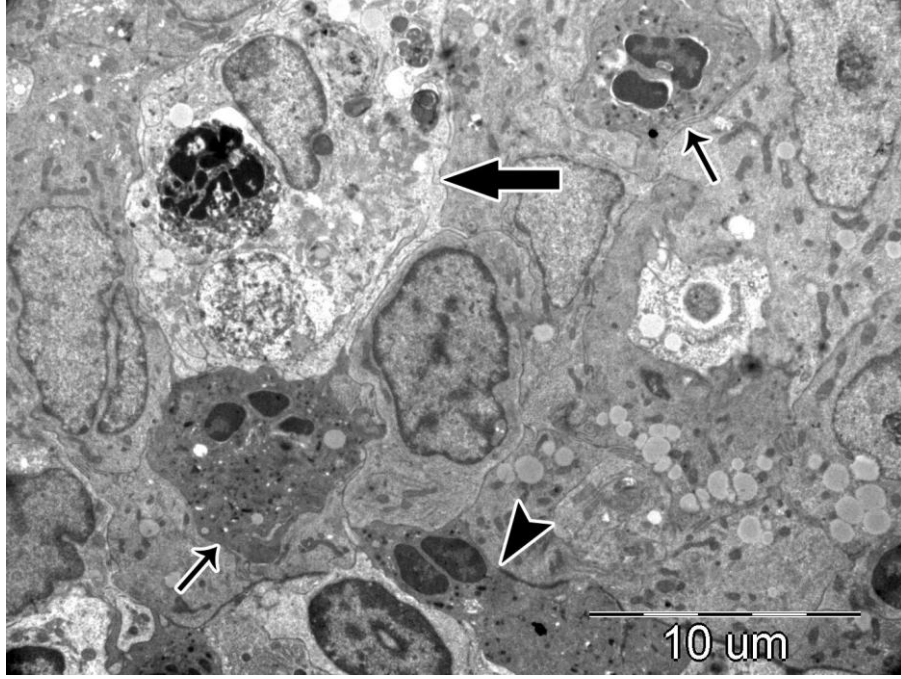
Diyabetik grupta gebeliğin 3. gününde, kontrol 3. günle karşılaştırıldığında endometriyal luminal epitel mikrovillus sayı ve uzunluğunda azalma görüldü (Şekil 4.2.13). Stromadaki kapiller damarların endotel hücrelerinde hipertrofiye bağlı daralma ve vakuolizasyon bulunmaktaydı (Şekil 4.2.14). Endometriyal luminal epitel içerisinde heterojen içerikli lizozomal granüllere sahip çok sayıda makrofajlar ve nötrofiller gözlemlendi. Makrofajların içerisinde çok sayıda apoptotik hücre artıkları bulunmaktaydı (Şekil 4.2.15, 4.2.16).



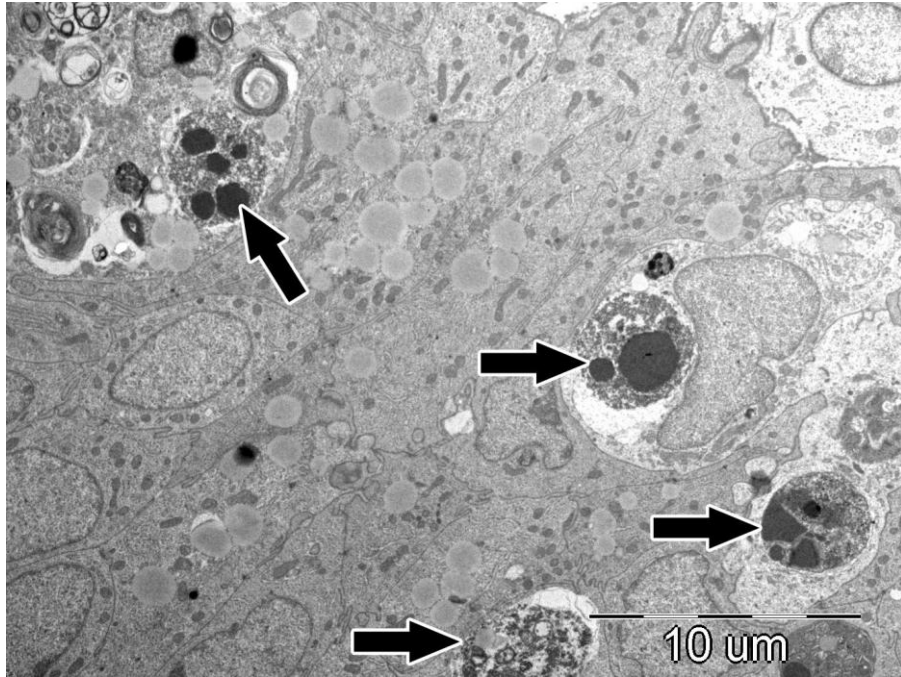
Şekil 4.2.13. Diyabet 3. günde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında luminal epitel hücrelerinin apikalindeki mikrovillusların sayı ve uzunluğunda azalma (ok başı), lipid damlası (ok) (X12,000).



Şekil 4.2.14. Diyabet 3. günde stromadaki kapillar damarlarda (yıldız) endotel hücrelerinde hipertrofiye bağlı daralma ve vakuolizasyon (ok) (X6,000).



Şekil 4.2.15. Diyabet 3. günde luminal epitel içerisindeki fagositik hücre (kalın ok), nötrofiller (ince ok), stromdan luminal epitel içerisine girmekte olan nötrofil (ok başı) (X4,000).

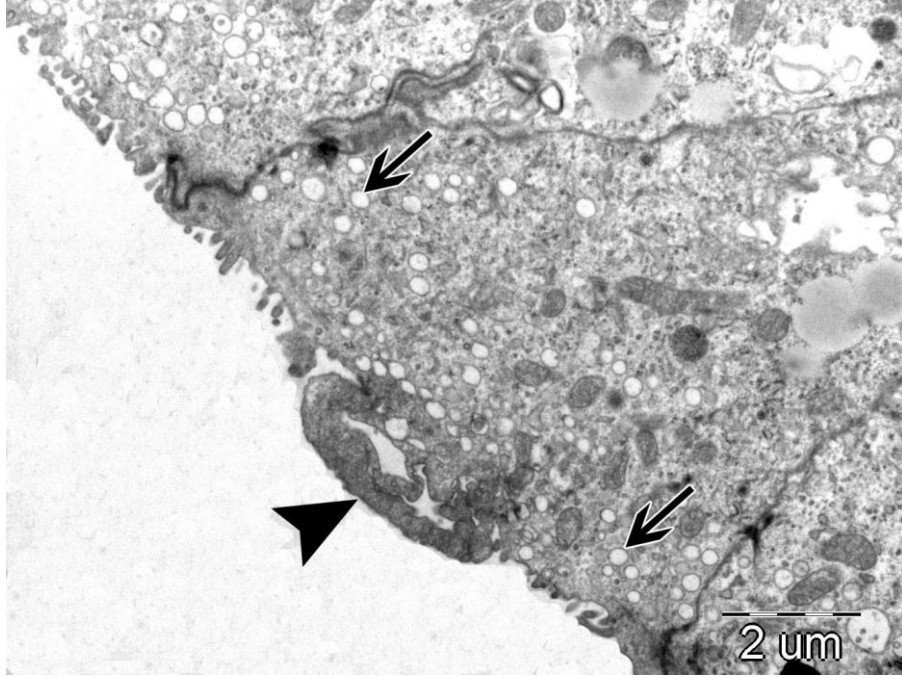


Şekil 4.2.16. Diyabet 3. günde luminal epitel içerisindeki fagositik hücreler (ok) (X4,000).

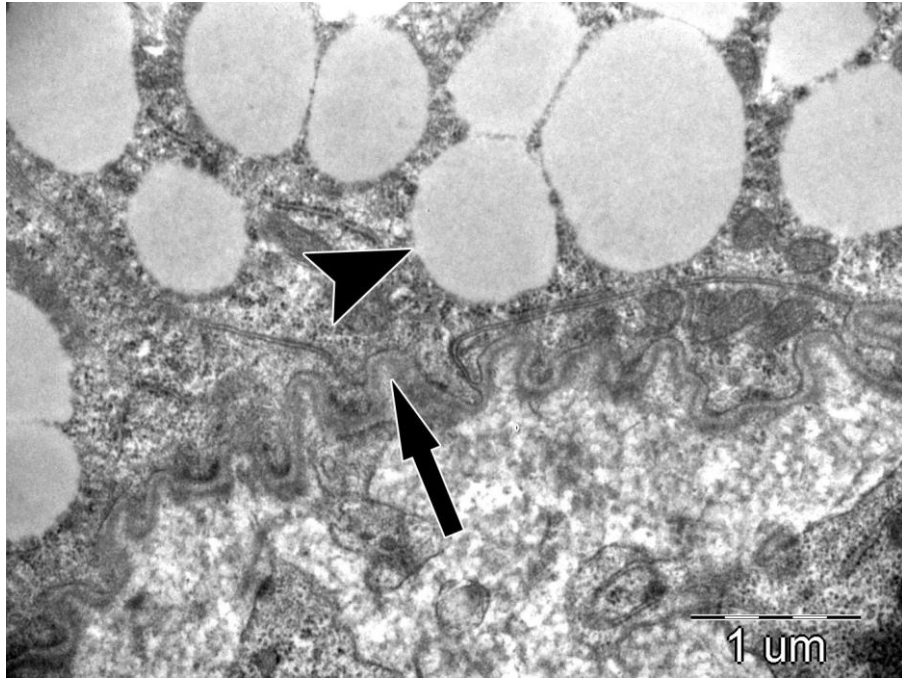
Diyabet 5. günde apikal yüzeyde kontrol 5. güne göre mikrovillus sayı ve uzunluğunda azalma tespit edildi (Şekil 4.2.17) Endometriyal luminal epitelde pinopodların bulunduğu ancak yapılarının bozuk olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.18). Apikal veziküller diyabetik 3. güne göre daha fazlaydı (Şekil 4.2.17, 4.2.18). Bazal laminada kıvrılmalar ve lipid damlaları bulunmaktaydı (Şekil 4.2.19). Kapiller damarlarda endotel hipertrofisi ve dejenerasyona bağlı olarak daralma gözlemlendi (Şekil 4.2.20).



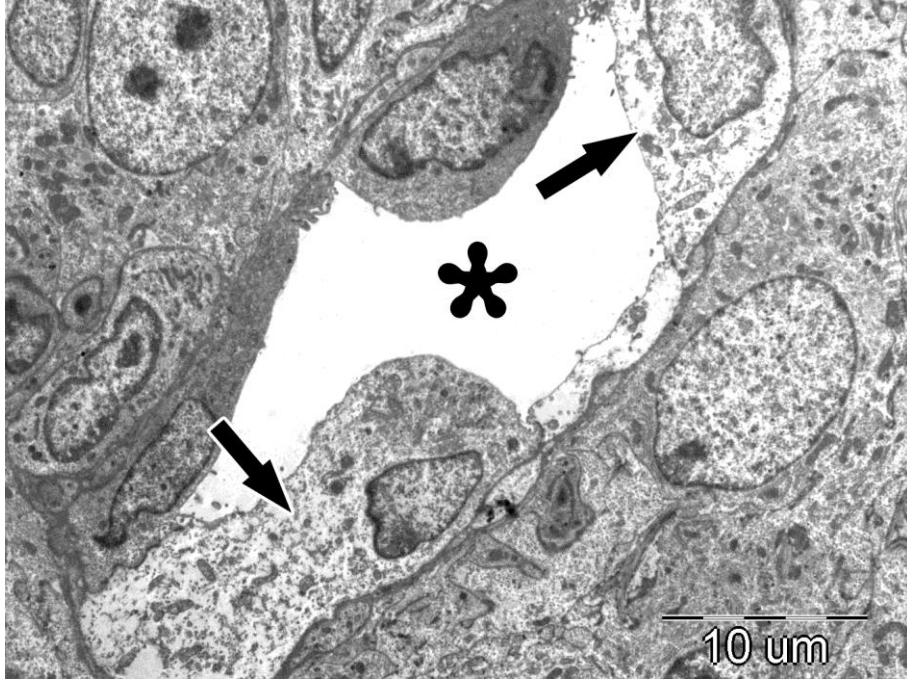
Şekil 4.2.17. Diyabet 5. günde kontrol grubuna göre mikrovillus sayı ve uzunluğunda azalma (kalın ok), apikal veziküller (ince ok) (X5,000).



Şekil 4.2.18. Diyabetik 5. günde yapısı bozulmuş pinopod (ok başı), apikal veziküller (ok) (X10,000).

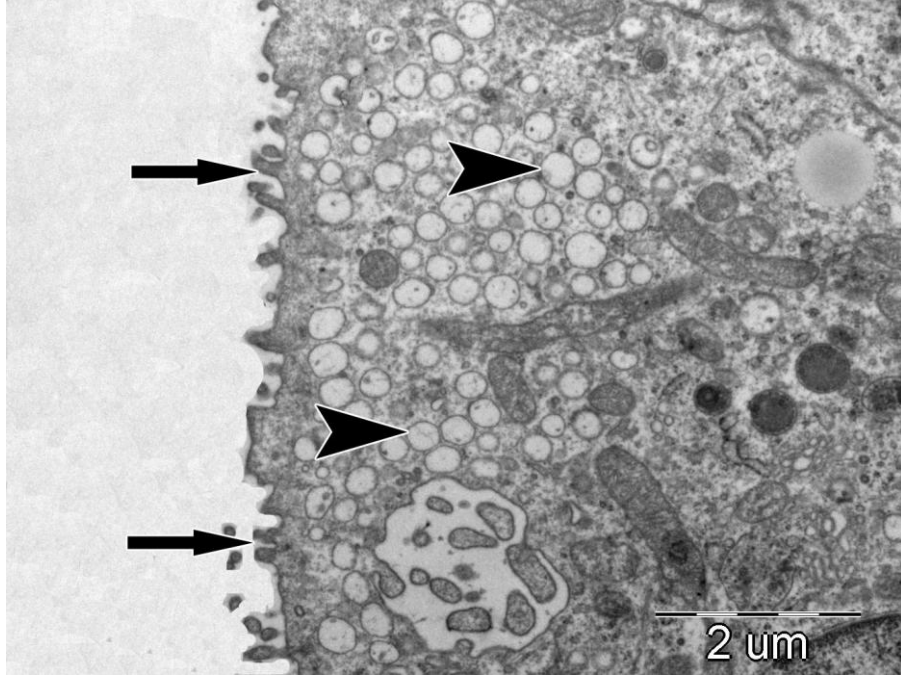


Şekil 4.2.19. Diyabet 5. günde luminal epitel hücrelerinin kıvrımlı bazal laminası (ok), luminal epitel içerisindeki lipid damlaları (ok başı) (X25,000).

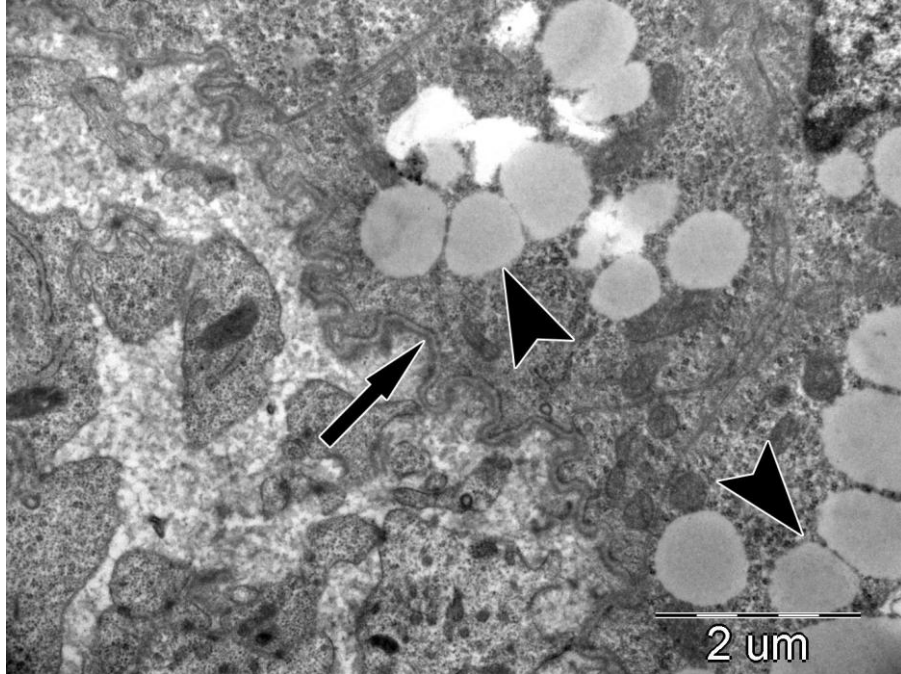


Şekil 4.2.20. Diyabetik 5. günde stromadaki kapiller damarlarda (yıldız) endotel hücrelerinde hipertrofi ve dejenerasyona bağlı olarak lümen daralma (ok) (X3,000).

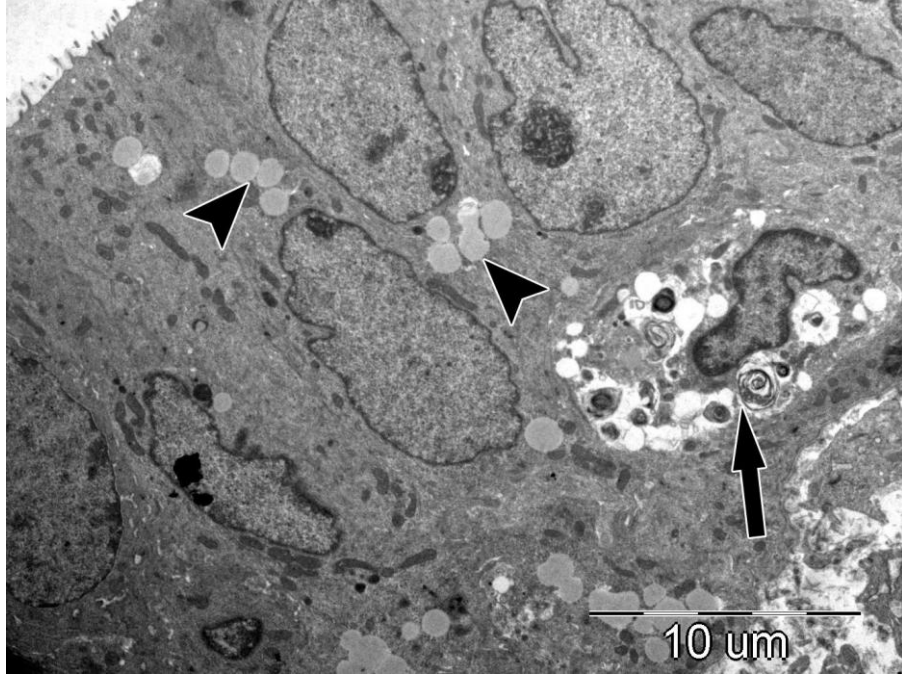
Diyabet 7. günde endometriyal luminal epitelin mikrovilluslarının kontrol 7. güne kıyasla sayı ve uzunluğunda azalma ve şekillerinde bozulma tespit edildi (Şekil 4.2.21). Apikal veziküller diğer diyabetik gruplara göre artmıştı (Şekil 4.2.21). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bazal lamina daha kıvrıntılıydı ve lipid damlacıkları da bulunmaktaydı (Şekil 4.2.22). Luminal epitel içerisinde fagositik hücreler gözlemlendi (Şekil 4.2.23). Kapiller damarlarda endotel hipertrofisine bağlı olarak lümen daralma, düzensizleşme ve vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 4.2.24).



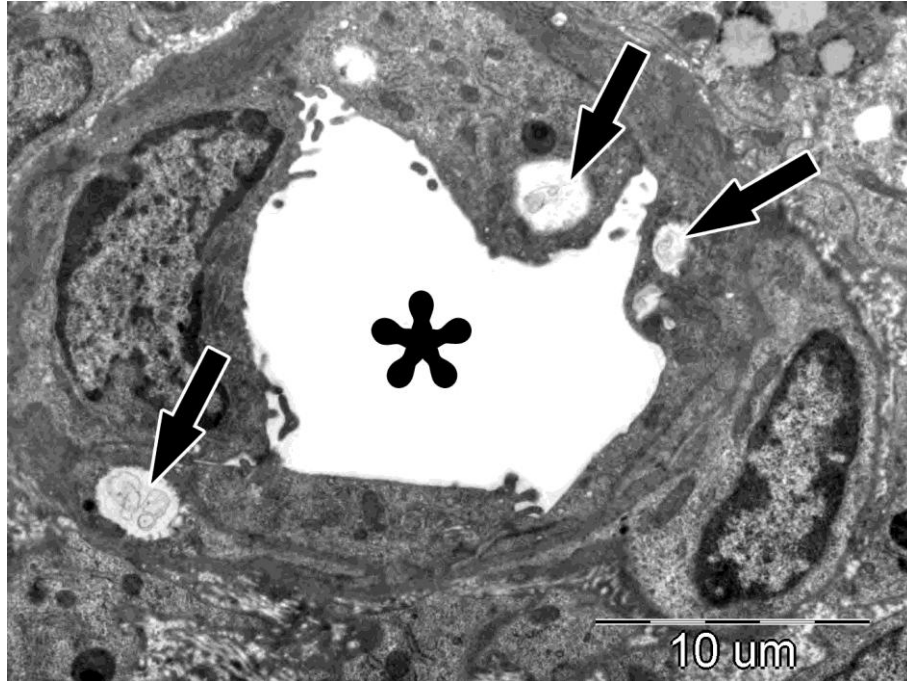
Şekil 4.2.21. Diyabetik 7. günde kontrol 7. güne göre mikrovillus sayı ve uzunluğunda azalma (ok), diğer diyabetik gruplara göre pek çok apikal veziküller (ok başı) (X15,000)



Şekil 4.2.22. Diyabetik 7. günde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında luminal epitel hücrelerinin daha kıvrıntılı bazal laminası (ok), lipid damlaları (ok başı) (X15,000).



Şekil 4.2.23. Diyabetik 7. günde luminal epitel içerisindeki heterojen içerikli lizozomal granüllere sahip fagositik hücreler (ok), lipid damlaları (ok başı) (X4,000).



Şekil 4.2.24. Diyabetik 7. günde stromadaki kapiller damarlarda (yıldız) endotel hücrelerinde hipertrofiye bağlı olarak lümende daralma, düzensizleşme ve vakuolizasyon (ok) (X4,000).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda gebeliğin 3, 5 ve 7. günlerinde $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunun immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle incelendi. Morfolojik değerlendirme için transmisyon elektron mikroskopla inceleme yapılırken, uterusu adezyon molekülünün bir sınıfı olan integrin ekspresyonunun değerlendirilmesi için $\alpha V\beta 3$ integrin antikoruna ile immün boyama yapıldı.

Endometriyum adezyon molekülleri olan integrinlerden zengin bir bölgedir. İntegrinlerin, fertilizasyon, implantasyon ve ilk blastula oluşumunu içeren erken gelişimsel olaylarda önemli rol oynadığı bilinmektedir (5). Bu gereksinim embriyolojik gelişim, yetişkin dokunun oluşumu ve devamı süresince olmaktadır. İntegrinler implantasyon sırasında endometriyal ve embriyonik yüzeyde karakterize edilmekte; insan, fare, sıçan, tavşan ve koyun gibi çeşitli türlerde uterus reseptivite belirteci olarak kabul edilmektedir (51). Sunulan çalışmada da $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunun kontrol grubunda gebeliğin 3. gününde var olduğu ancak en yüksek ekspresyon düzeyine gebeliğin 5. gününde ulaştığı, 7. günde ise ekspresyonun neredeyse tamamen kaybolduğunu gözlemledik.

Gebelik, embriyo implantasyonu, plasentasyon ve embriyo gelişimini kapsayan komplike bir süreçtir. Bu süreçte, reseptif endometriyal epitele trofoblastın adezyon ve invazyonu çok önemli olaylardan biridir ve hücre proliferasyonu, differansiyasyonu, adezyon, göç, ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması ve maternal kan damarlarının yeniden düzenlenmesini içermektedir. Kontrol mekanizmasındaki herhangi bir başarısızlık yetersiz implantasyona neden olmaktadır (52). Çalışmamızda elde ettiğimiz temel bulgulardan birisi diyabetik grupta stromal kapiller damarların yapısal bozulmaya uğramasıydı. Bu bozulmanın, uterus kan akımını azaltarak iskemiye yol açabileceği ve implantasyonu engelleyebileceği düşünüldü.

Orta ve ağır diyabetik nefropatide epitel hücrelerinde lokalize olan integrin alt ünitelerinin (αV , $\beta 3$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$) ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Bu artışın diyabette Değiştirici/Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) artışına bağlı olarak

ortaya çıkmış olabileceği de aynı çalışmada öne sürülmüştür (53). Çünkü başka bir çalışmada TGF- β 'nin normal glomerülde $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 5\beta 1$ integrin sentezini stimüle ettiği gözlenmiştir (54). Ayrıca TGF- β diabetes mellitusun deneysel modellerinde artmaktadır (55). İn vitro çalışmalar yüksek glikoz konsantrasyonlarında kültüre hücrelerde integrin ekspresyonunun değiştiğini göstermiştir. Endotel hücre integrinleri yüksek glikoz konsantrasyonlarında artmaktadır ve diyabetik anjiyopatide hücre fonksiyon bozukluğu için bir potansiyel olduğu öne sürülmüştür (56).

Literatürdeki bu çalışmalar sunulan çalışmamızdaki verileri desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da immunohistokimyasal olarak $\alpha V\beta 3$ integrin ile yapılan immun işaretlemeye diyabet grubundaki sıçanların endometriyumunda kontrol grubuna göre işaretlemenin arttığı görülmüştür. Bu durumun önceki çalışmalarda gösterildiği gibi diyabetin TGF- β sentezini artırması, artan TGF- β 'nin da $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunu artırmaya bağlı olabileceği düşünülmüştür.

İntegrinler ile ekstrasellüler matriks sentezindeki artışın, hücre proliferasyonunun azalmasına yol açabileceği bildirilmiştir (55). Çalışmamızda diyabetik gruplarda $\alpha V\beta 3$ ekspresyonunun artmış olmasının, implantasyon sonrası embriyodaki hücre proliferasyonunu azaltabileceği ve böylece infertiliteye katkısının olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Kontrol grubunda primer desidual alandaki stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste zayıf işaretlenme gözlenirken, sekonder desidual bölgede stromal hücrelerde ve ekstrasellüler matrikste daha belirgin işaretlenme gözlemledik. Diyabetik grupta ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem primer desidual bölgede hem de sekonder desidual bölgedeki ekstrasellüler matriks ve stromal hücrelerde işaretlenme bulunmakla birlikte primer desidual alandaki matriks ve stromal hücreler sekonder desidual bölgedekilere göre daha kuvvetli işaretlenmişti. Literatürde diyabetik gebe endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ integrin dağılımı ile ilgili bizim bulgularımızı da açıklayacak yeterli bilgiye ulaşamadık. Bu farklılıkların açıklanabilmesi daha ileri çalışmalar ile mümkün olabilecektir.

Pinopodlar, hem kemirgenlerde hem de insanlarda implantasyonun pencere döneminde uterusun luminal epitelinin apikal yüzeyinde ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda sıçanlardan farklı olarak, pinopodlar mitokondri, golgi kompleksi, sekretuar veziküller, düz endoplazmik retikulum ve büyük vakuoller içermektedir. Bazı çalışmalar insanlarda

pinopodların 48 saatten kısa bir ömre sahip olduklarını ortaya koymuştur. Sıçanlarda ise pinopodların ömrü biraz tartışmalıdır. Gebeliğin 4. gününde artmakta, embriyo implantasyonu gününde yani 5. günde pik yapmakta 6. günde ise neredeyse gözden kaybolmaktadır (24). Çalışmamızın elektron mikroskopik incelemesinde, gebelik dönemine göre kontrol ve diyabet grubunda luminal epitel hücrelerinin apikal membranının genel düzenlenmesinin değiştiği gözlemlendi. Kontrol 3. günde mikrovilluslar uzun ve düzenliken, kontrol 5. günde ise mikrovillusların kısaldığı ve bazı epitel hücrelerinin düzensiz çıkıntılara sahip olduğu tespit edildi. Mikrovilluslardan daha uzun pinopodların bulunduğu, pinopodların bir ya da iki büyük vakuol içerdiği ve organel içermediği de belirlendi. Diyabet grubunda ise mikrovillusların ve pinopodların gebelik dönemine göre görülme sırası kontrol grubuyla benzer olmasına rağmen, sayı ve uzunluklarının kontrol gruplarına göre azaldığı görüldü. Diyabet grubunda pinopod yapısının bozulmuş olduğu izlendi. Steroid hormonların etkisi altında endometriyal faktörler implantasyonu regüle etmektedir. Endometriyal pinopod gelişimi; mid-luteal LIF, progesteron ve $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunda artma ile birliktedir (24). Yapılan bir çalışmada gebeliğin erken döneminde diyabetik sıçanların plazmasında düşük östrodiol/progesteron oranı saptanmıştır. Araştırmacılar, bu sonuçlara göre; kontrol grubu sıçanlarla karşılaştırıldığında diyabetik gruptaki %20 düşük implantasyon oranının aksayan hormonal çevrenin bir sonucu olabileceğini öne sürmüşlerdir (14). Diyabetin neden olduğu lipid metabolizma bozukluğu steroid hormon sentezi yapımında azalmaya yol açabilir. Bizim bulgularımızda da pinopodların yapısının bozulmasının nedeninin steroid hormonlarının oranındaki dengesizlik ve etkisi altındaki faktörlerdeki bir değişim sonucu olabileceğini düşündürdü.

Yapılan çalışmalarda diyabetin epitel bazal laminaları üzerinde hastalığın ağırlığına bağlı olarak değişikliklere yol açabileceği, bazal membranda ayrılmalar, kalınlaşmalar ve kıvrılmalar oluşabileceği gösterilmiştir (48, 56). Çalışmamızda, diyabetik gruptaki bazal laminaların normal kalınlıkta görülmelerine rağmen, kontrol gruplarına göre daha kıvrıntılı olduğu saptandı. Bu durumun stromadaki kan damarlarının daralmasına bağlı gelişen iskemiye karşı kompensatuar bir yanıt, yani beslenme yüzeyini artırma amaçlı bir değişiklik olabileceği değerlendirildi.

Diyabetli hastalarda endotel fonksiyonunda anormallikler olduğu bilinmektedir. Normal bir endotel, oldukça seçici geçirgen bir bariyer, nontrombojenik bir yüzey olup,

pek çok vazoaktif maddenin sentezinden sorumlu metabolik olarak aktif bir yapıdır. Kan damarlarının işlevleri açısından yaşamsal öneme sahiptir. Hiperglisemi, diyabetin en önemli sorunlarından birisi olan damar hasarı oluşumunu hızlandırarak ateroskleroz gelişimine yol açar (57). Çalışmamızda diyabetik grupların stromal kapiller damar endotel hücrelerindeki hipertrofiye bağlı olarak daralma ve endotel hücrelerinde vakuolizasyon ve dejenerasyon gözlemlendi.

Çalışmamızda diyabetik grupların endometriyumunda desidual ve perimetriyal damarların endotel hücrelerinde belirgin işaretleme gözlemledik. Bunun da diyabetik gruplardaki kan damarlarında meydana gelen hasara bağlı olarak artan anjiyogenez gereksinimini karşılamak amaçlı bir telafi mekanizması olabileceği düşünüldü.

Diyabet ve kontrol grubunun her ikisinde luminal epitel hücrelerinin apikalinde veziküller görüldü. Literatürde de sıçanlarda 3. günden 7. güne kadar apikal veziküllerin bulunduğu ve gebeliğin 5. gününde maksimum sayıda olduğu gösterilmiştir. Erken gebelikte ilk tutunma sırasında endositotik aktivitenin apikal veziküllerin oluşumu ile birlikte artış gösterdiği aynı çalışmada bildirilmiştir. Bu veziküllerin olasılıkla golgi kompleksinde oluştuğu ve uterin lümenine bilinmeyen bir salgı üretimini iletmek için sekretuar vezikül olarak fonksiyon gördüğü ya da endositotik aktiviteyle apikal plazma membranını yeniliyor olabileceği de öne sürülmüştür (58). Bizim çalışmamızda bu veziküllerin sayısı kontrol 5. günde, kontrol 3. ve 7. güne göre daha fazlaydı. Diyabetik 5. günde ise apikal veziküller, diyabet 3. gününe göre artmıştı fakat kontrol 5. güne göre daha azdı. Diyabetik 7. günde ise apikal veziküllerin sayısı diğer diyabetik gruplara göre en fazlaydı. Bu durum diyabetin epitelyal hücre işlevini bozması nedeniyle vezikül yapımının gecikmesiyle açıklanabilir.

Diyabetin endometriyal luminal epitel hücrelerinde apoptoza yol açtığı ve bu yoldan endometriyal atrofiye neden olduğu gösterilmiştir (59, 60). Bizim çalışmamızda da, diyabetik grupların luminal epitelinde içleri apoptotik hücre artıklarıyla dolu makrofajlar ve yine fagositik karakterli hücreler olan nötrofiller görüldü. Bu durumun diyabet komplikasyonu olarak epitel iskemisi nedeniyle ortaya çıkabileceği öngörüldü.

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 (61). Çalışmamızda stromal kapiller damar endotel

hücrelerinde hipertrofi ve dejenerasyon gözlemledik. Bu dejenerasyonun kaynağının, diyabete bağlı olarak artan serbest oksijen radikalleri olabileceği değerlendirildi.

İmplantasyon hücresel, hormonal ve moleküler birçok faktörün rol oynadığı kompleks ve hala tam aydınlatılmamış bir süreçtir. Bilgi arttıkça; implantasyon oranlarındaki azlık, tekrarlayan gebelik kaybı ve yardımcı üreme teknikleri başarısızlıkları gibi konular daha iyi irdelenebilecektir. Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde diyabetin embriyonun endometriyuma tutunmasını sağlayacak adezyon moleküllerinin ekspresyonlarında ve endometriyal kanlanmada bozulmaya neden olarak implantasyon başarısızlığına yol açabileceği düşünüldü. Ayrıca, iskemiye bağlı olarak gelişen epitel apoptozisi ve atrofisi, serbest radikallerin artışı, hormonal dengesizlik gibi sebeplerin de bu tabloyu ağırlaştırabileceği sonucuna ulaşıldı.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Diyabet gruplarının endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonu, kontrol grubuna göre artmış olarak değerlendirildi. Bu durum, diyabetin TGF- β üzerinden $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunu artırmasına bağlı olabilir. Artmış integrin ekspresyonu da implantasyon sonrası embriyodaki hücre proliferasyonunu azaltabileceğinden bu durumun infertiliteye olumsuz etkilediğini düşündük.
2. Diyabet grubu endometriyal epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki mikrovillusların, kontrol grubuna göre sayılarının ve uzunluklarının azaldığı, pinopodların da diyabet grubunda sayıca azaldığı ve yapılarının bozulduğu tespit edildi. Kanımızca bu sonuçlar da implantasyon başarısını olumsuz yönde etkilemektedir.
3. Kontrol grubuna göre diyabetik grupta primer desidual alan ve sekonder desidual alandaki stromal hücreler ve ekstrasellüler matrikste $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunun arttığı belirlendi. Bu farklılığın nedenlerinin aydınlatılabilmesi için ek çalışmalara gereksinim vardır.
4. Diyabetin neden olduğu lipid metabolizma bozukluğu steroid hormon sentezi yapımında azalmaya yol açabilir. Bu azalmanın da diyabetik 5. günde pinopodlarda gözlemlediğimiz sayısal ve yapısal değişikliklere neden olması mümkündür.
5. Diyabet gruplarının epitel bazal membranlarının kontrol grubuna göre daha kıvrıntılı bir şekil aldığı belirlendi. Bu kıvrıntılar, bozulmuş epitel beslenmesini artırabilmek için beslenme yüzeyini genişletme çabası olarak değerlendirildi.
6. Diyabetik grupların endometriyumunda desidual ve perimetriyal damarların endotel hücrelerinde belirgin işaretleme gözlemlendi. Bunun da diyabetik damar

hasarı nedeniyle artmış anjiyogenezin integrin ihtiyacını karşılamak amaçlı olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünüldü.

7. Endometriyal epitel hücrelerinde görülen apikal veziküller kontrol grubunda 5. günde maksimum sayıya ulaşırken, diyabet grubunda 7. günde en fazla sayıya ulaştığı gözlemlendi. Düşüncemize göre bu durum diyabetin epitel hücrelerinde meydana getirdiği hasardan kaynaklanan yapım gecikmesine bağlıdır.
8. Diyabetik grupların luminal epitelinde içleri apoptotik hücre artıklarıyla dolu makrofajlar ve yine fagositik karakterli hücreler olan nötrofiller görüldü. Bu durumu diyabet komplikasyonu olarak epitel iskemisi ve harabiyeti ile açıklayabiliriz.
9. Diyabete bağlı olarak artan serbest oksijen radikallerinin endotel hücrelerine zarar verdiği bilinmektedir. Biz de çalışmamızda diyabetik grupların stromal kapiller damarlarında endotel hücrelerindeki hipertrofiye bağlı olarak daralma ve endotel hücrelerinde vakuolizasyon ve dejenerasyon gözlemledik. Artmış serbest oksijen radikallerinin endotel hasarına ve endometriyal iskemiyeye yol açabileceğini düşündük.
10. Literatürde diyabetin endometriyumda adezyon molekülünün bir sınıfı olan $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonuna etkilerini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır. Sunduğumuz bu çalışma bu konuda sınırlı bir ön değerlendirme olarak kabul edilebilir, ancak implantasyonda önemli rol oynayan bu integrin alt biriminin moleküler mekanizmasının bozulmasıyla ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Gökçimen A, Temel S.** İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*, **2004**; 11(4):25-33.
2. **Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S.** The Role of Integrins in Human Embryo Implantation. *Fetal Diagn Ther*, **2001**; 16:364-371.
3. **Luo BH, Carman, CV. and Springer TA.** Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol*, **2007**; 25:619–647.
4. **Berrier AL and Yamada KM.** Cell–Matrix Adhesion. *J. Cell. Physiol*, **2007**; 213:565–573.
5. **Bowen JA, Hunt JS.** The Role of Integrins in Reproduction. *P.S.E.B.M*, **2000**; 223:331-343.
6. **Achache H, Revel A.** Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction*, **2006**; 12(6):731–746.
7. **Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR and Lessey.** Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86:4991–5000.
8. **Makker A, Singh MM.** Endometrial Receptivity: Clinical Assessment in Relation to Fertility, Infertility, and Antifertility. *Medicinal Research Reviews*, **2006**; 26(6):699-746.
9. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; *Diabetes Care*, **2005**; 28(1):37-42.
10. **Haas LB.** Pathophysiology of diabetes mellitus. *Nurse Pract Forum*, **1998**; 9(2): 42-45.
11. **Lutz TA, Rand JS.** A review of new developments in type 2 diabetes in human beings and cats. *Br Vet J*, **1993**; 149(6):527-36.
12. **Tatewaki R, Otani H, Tanaka O, Kitada J.** A morphological study on the reproductive organs as a possible cause of developmental abnormalities in diabetic NOD mice. *Histol Histopathol*, **1989**; 4 (3):343-358.

13. **Garris DR, Williams S, Smith-West C, West L.** Diabetes-associated endometrial disruption in the Chinese hamster: structural changes in relation to progressive hyperglycemia. *Gynecol Obstet Invest*, **1984**; 17(6): 293-300.
14. **Hertogh RD, Vanderheyden I, Glorieux B, Ekkat E.** Oestrogen and progesterone receptors in endometrium and myometrium at the time of blastocyst implantation in pregnant diabetic rats. *Diabetologia*, **1989**; 32:568-572.
15. **Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK.** Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**; 100:2963–2968.
16. **Lessey BA.** Two pathways of progesterone action in the human endometrium: Implications for implantation and contraception. *Steroids*, **2003**; 68:809–815.
17. **Carson DD, DeSouza MM, Regisford EGC.** Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. *BioEssays*, **1998**; 20:577–583.
18. **Korgun ET, Cayli S, Asar M, Demir R.** Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. *J Mol Hist* **2007**; 38:253–260.
19. **Abrahamsohn PA and Zorn TMT.** Implantation and Decidualization in Rodents. *The Journal of Experimental of Zoology*; **1993**; 266:603-628 .
20. **Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G.** The role of the endometrium and embryo in human Implantation. *Human Reproduction*, **2007**; 1–13.
21. **Lee KY and DeMayo FJ.** Animal models of implantation. *Reproduction*, **2004**; 128 679–695.
22. **Susan JK, Ph. D.** Molecular Interactions at the Maternal-Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation. *Sem Reproductive Med*, **2000**; 18(3):237-253.
23. **Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T.** Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod*, **1999**; 14:515-520.
24. **Quinn CE and Casper RF.** Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, **2008**; 1–7.
25. **Amanda M. Preston, Laura A. Lindsay, and Christopher R. Murphy.** Desmosomes in Uterine Epithelial Cells Decrease at the Time of Implantation: An Ultrastructural and Morphometric Study. *Journal of Morphology*, **2006**; 267:103–108.

26. **Christopher R. Murphy.** Junctional barrier complexes undergo major alterations during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells. *Hum Reprod*, **2000**; Vol 15, 182-188.
27. **Ergüler G, Demir N, Demir R.** Structural properties and functions of adhesion molecules. *T Klin J Med Sci*, **2002**; 22:313-327.
28. **Christopher M. Meighan, Jean E. Schwarzbauer.** Temporal and spatial regulation of integrins during development. *Curr Opin Cell Biol*, **2008**; 20(5):520–524.
29. **Hynes RO.** Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines. *Cell*, **2002**; 110:673–687.
30. **Stupack DG.** Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death and Differentiation*, **2005**; 12:1021–1030.
31. **Reddy KVR, Mangale SS.** Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue & Cell*, **2003**; 35:260–273.
32. **Takada Y, Ye X, Simon S.** The integrins. *Genome Biology*, **2007**; 8:215.
33. **Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D.** Integrins. *Cell Tissue Res*, **2010**; 339:269–280.
34. **Kokubo T, Uchida H, Choi ET, Louis S.** Integrin $\alpha V\beta 3$ as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. *J Vasc Surg*, **2007**; 45:33A-38A.
35. **Switala-Jelen K, Dabrowska K, Abrowska A, Opolski A, Lipinska L, Nowaczyk M, Gorski A.** The Biological Functions of $\beta 3$ Integrins. *Folia Biologica (Praha)*, **2004**; 50:143-152.
36. **Takagi J.** Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochemical Society Transactions*, **2004**; Vol 32, part 3.
37. **Micheal A. Horton.** The $\alpha V\beta 3$ Integrin “ Vitronectin Receptor”. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **1997**; 29(5):721-725
38. **Mourik MSM, Macklon NS, and Heijnen CJ.** Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J. Leukoc. Biol*, **2009**; 85: 4–19.
39. **John D. Aplin.** Adhesion molecules in implantation. *Journals of Reproduction and Fertility*, **1997**; 2:84–93.
40. **Illera MJ, Emily Cullinan, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA.** Blockade of $\alpha V\beta 3$ the Integrin Adversely Affects Implantation in the Mouse. *Biology of Reproduction*, **2000**; 62:1285–1290.
41. **Illera MJ, Lorenzo PL, Gui YT, Beyler SA, Apparao KBC, Lessey BA.** A role for $\alpha V\beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod*, **2003**; 68:766–771.

42. **Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA.** Requirement of vascular integrin $\alpha V/\beta 3$ for angiogenesis. *Science*, **1994**; 264:569–571.
43. **Kabir-Salmani M, Hosseini A, Valojerdi MR.** Endometrial Receptivity to Implantation in Humans Biochemical and Molecular Aspects. *Yakhteh Medical Journal*, **2008**; 10(1):1-24.
44. **Watkins PJ, Drury PL, Howell SL:** Diabetes and its management 5 th ed. *Blackwell Co*, **1996**; P:3.
45. **İsmail D, Özlem Ö.** Diabetes Mellitus ve Gebelik. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. 1. baskı. Güneş Kitabevi, **2006**; Sayfa: 435-450
46. **Vardı N, Uçar M, Iraz M, Öztürk Feral.** Morphological Changes Of Rat Endocrine Pancreas İn Experimental Diabetes. *T Klin J Med Sci*, **2003**; 23:27-32.
47. **Kuhl C.** Glucose metabolism during and after pregnancy in normal and gestational diabetic woman. *Acta Endocrinol*, **1995**; 79,709.
48. **David R. Garris and Bryan L. Garris.** Diabetes-Induced, Progressive Endometrial Involution Characterization of Periluminal Epithelial Lipoatrophy. *Diabetes*, **2003**; 52:51–58.
49. **Paria B.C, Huet-Hudson YM, Dey SK.** Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Developmental Biology*. **1993**; 90:10159-10162.
50. **Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH.** Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction*, **2007**; 134:635–643.
51. **Srinivasan KR, Blesson CS, Fatima I, Kitchlu S, Jain SK, Mehrotra PK, Dwivedi A.** Expression of $\alpha V\beta 3$ integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. *General and Comparative Endocrinology*, **2009**; 160:124-133.
52. **Qin L, Wang YL, Bai SX, Ji SH, Qiu W, Tang S, Piao YS.** Temporal and Spatial Expression of Integrins and Their Extracellular Matrix Ligands at the Maternal-Fetal Interface in the Rhesus Monkey During Pregnancy. *Biology of Reproduction*, **2003**; 69:563–571.
53. **Jin DK, Fish AJ, Wayner EA, Mauer M, Setty S, Tsilibary E, Kim Y.** Distribution of Integrin Subunits in Human Diabetic Kidneys. *Am. Soc. Nephrol*, **1996**; 7:2636-2645.
54. **Kagaml S. Border WA, Ruoslahti E, Noble NA.** Coordinated expression of $\beta 1$ Integrins and transforming growth factor- β induced matrix proteins in glomerulanephritis. *Lab Invest*, **1993**; 69:68-76.
55. **Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA.** Diabetic kidney disease. Is linked to elevated expression of transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci*, **1993**; 90:1814-1818.

56. **Roth T, Podesta F, Stepp MA, Boeri D, Lorenzi M.** Integrin overexpression induced by high glucose and by human diabetes: Potential pathway to cell dysfunction in diabetic microangiopathy. *Communicated by Rachmiel Levine*, **1993**; 90:9640-9644.
57. **Gaal Z, Ruzicska E, Valenta B, Somogyi A.** The role of adhesion molecules in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Orv Hetil*, **2000**; 141(46):2483-2486.
58. **Parr M.** Apical Vesicles in the Rat Uterine Epithelium During Early Pregnancy: A Morphometric Study. *Biology of Reproduction*, **1982**; 26:915-924.
59. **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):1186-1477
60. **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.
61. **Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB.** Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol*, **2003**; 17:24-38.

ÖZGEÇMİŞ

31.05.1984'de Bucak'ta doğdu. İlk, ortaokul ve lise eğitimini Isparta'da tamamladı. 2003-2007 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini aldı. 2007 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve halen eğitimine devam etmektedir.