

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Turan KARACA

**DENEYSEL HİPERTİROİDİ OLUŞTURULMUŞ GEBE
SIÇANLARIN UTERUS VE PLASENTA
DOKULARINDA OSTEONEKTİN (SPARC) VE
TGF β -1 DAĞILIMININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Rukiye KARABACAK

EDİRNE – 2015

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Turan KARACA

**DENEYSEL HİPERTİROİDİ OLUŞTURULMUŞ GEBE
SIÇANLARIN UTERUS VE PLASENTA
DOKULARINDA OSTEONEKTİN (SPARC) VE
TGF β -1 DAĞILIMININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Rukiye KARABACAK

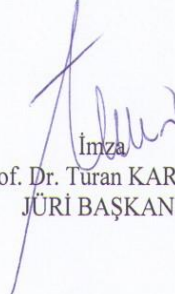
Destekleyen Kurum : TÜBAP-2015-39

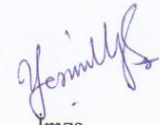
Tez No :

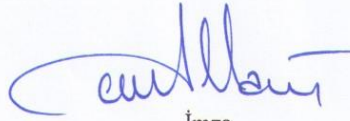
EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü
ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof.Dr. Turan KARACA danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Rukiye KARABACAK tarafından tez başlığı “**Deneysel Hipertiroidi Oluşturulmuş Gebe Sıçanların Uterus ve Plasenta Dokularında Osteonektin (SPARC) ve TGFβ-1’in Dağılımının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 08/09/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.


İmza
Prof. Dr. Turan KARACA
JÜRİ BAŞKANI


İmza
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ
ÜYE


İmza
Doç. Dr. Cevat AKTAŞ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız danışmanım Sayın Prof. Dr. Turan KARACA'ya, Sayın Anabilim Dalı hocalarım; Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'a, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a, Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR'a, Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e, çalışma arkadaşlarıma, maddi destek sağlayan TÜBAP birimi'ne, eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen kardeşim Zeynep KASABASHI'na ve aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
TİROİD BEZİ ANATOMİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ	3
TİROİD BEZİ HİSTOLOJİSİ.....	4
TİROİD BEZİ FİZYOLOJİSİ.....	5
HİPATALOMO-HİPOFİZER-TİROİD AKSI.....	7
HİPERTİROİDİ	7
HİPERTİROİDİNİN GENEL ETKİLERİ.....	9
HİPERTİROİDİ VE GEBELİK	12
UTERUS	14
UTERUS ANATOMİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ.....	14
UTERUS HİSTOLOJİSİ.....	15
UTERUS FİZYOLOJİSİ	16
PLASENTA.....	19
PLASENTA ANATOMİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ.....	20
PLASENTA HİSTOLOJİSİ.....	22

SPARC.....	25
TGF β -1.....	27
VEGF.....	28
GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
BULGULAR	37
TARTIŞMA.....	80
SONUÇLAR.....	85
ÖZET.....	87
SUMMARY.....	89
KAYNAKLAR.....	91
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	95
ÖZGEÇMİŞ	101
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat
β	: Beta
μm	: Mikrometre
AEC	: 3-amino-9-ethyl-carbazole
CO₂	: Karbondioksit
DIT	: Diiyodotirozin
dk	: Dakika
ECM	: Extracellular matrix
EGF	: Epithelial growth factor
ER	: Endoplazmik retikulum
EVT	: Extravilli trofoblast
FGF	: Fibroblast growth factor
FSH	: Follicle stimulating hormone
GH	: Growth Hormone
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H+E	: Hematoksilen & Eozin
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
hCS	: Human Chorionic Somatomotropin
hCT	: Human Chorionic Tyrotropin
hCACTH	: Human Chorionic Chorticotropin

IGF	: Insulin-Like Growth Factor
IGFBP	: IGF binding proteins
IgG	: Immunoglobulin
i.p.	: Intraperitoneal
kg	: Kilogram
LH	: Luteinizing Hormone
mcg	: Mikrogram
mg	: Miligram
MIT	: Monoiyodotirozin
mm	: Milimetre
O₂	: Oksijen
PBS	: Phosphate buffer saline
PDGF	: Platelet derived growth factor
PGF	: Placenta growth factor
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	: Revolution per minute
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPARC	: Secreted Protein Acid and Rich in Cysteine
T₃	: Triiodotironin
T₄	: Tiroksin
TBG	: Thyroid binding globulins
TBP	: Thyroid binding proteins
TGFβ-1	: Transforming growth factor β1
TNFα	: Tumor necrosis factor α
TRH	: Thyrotropin releasing hormone
TSH	: Thyroid stimulating hormone
TSH-Ab	: TSH Antibody
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VPF	: Vascular Permeability Factor
WB	: Western Blot

GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid hastalıkları konusunda araştırmalar son yirmi senedir artarak devam etmiş, tiroid bezi ve metabolizma arasında bulunan her ilişki tiroid konusunda yeni bir araştırma alanı açmıştır.

Tiroid hastalıkları kadınlarda erkeklere oranla 5 kat fazla görülür. Kadınlarda, özellikle yaşlı kadınlarda ve gebelerde tiroid teşhisinin erken konması için rutin tiroid taramaları yaygınlaşmaktadır. Tiroid hastalıklarının çoğu otoimmün hastalıklar olarak karşımıza çıkar. Kadınlarda ise endokrin otoimmün bozukluklarının daha fazla görülmesi bu artışı açıklayabilir (1).

Tiroid hormonları, vücudun bütününde farklı bölgelerde farklı görevler üstlenmektedir. Tiroid bozukluklarının farklı sistemlerde klinik olarak bulgu vermesine rağmen farklı dokular üzerinde etkileri ve bu bulguların sebepleri tam olarak bilinmemektedir. Üreme sistemi üzerinde etkileri, rahatsızlığın şiddetine göre değişmekte ve bu patolojik değişimler infertiliteye kadar gitmektedir.

Hipertiroidi, kanda tiroid hormonlarının normalden fazla bulunması olarak özetlenebilir. İnfertilite sebepleri arasında sayılmasına rağmen, hangi mekanizma üzerinden etki ettiği bilinmemektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda uterus morfolojisinde değişikliğe sebep olurken. Gebelik oranını düşürmekle beraber, özellikle ilk trimesterde abortusa kadar ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır. Tedavi edilmemesi durumunda fetusta konjenital anomalilere sebep olabilir. Hipertiroidi menstrual döngüde bozukluklara ve steroid mekanizmasında değişikliğe sebep olur. Serum strojen miktarını azalttığı gibi, uterusu östrojen direnci oluşturduğu da bilinmektedir (2).

Osteonektin (SPARC) ilk olarak kemik gelişiminde, kemik ara dokunun yeniden düzenlenmesinde rolü tespit edilen yapısal olmayan matriselüler bir proteindir. Diğer dokularda da, ara maddenin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmesine rağmen üreme sisteminde fonksiyonuna dair literatürde bilgi yer almamaktadır (3).

Gebeliğin gelişmesi için önemli olan iki proteinlerden dönüştürücü büyüme faktörü β -1 (Transforming growth factor β -1; TGF β -1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor; VEGF)'dür. Uterus endometriyum stromasının yeniden düzenlendiği, desidualizasyon süreci TGF β -1 kontrolünde gerçekleşir. Plasentanın büyümesi, fetal/maternal ilişki kan desteğinin gelişerek özelleşmesiyle mümkündür. Vaskülarizasyondan sorumlu olarak bilinen VEGF, endotel hücreleri tarafından sentezlenir ve anjiyogenezi tetikler (4).

Sunulan bu çalışma, deneysel hipertiroidi oluşturulan sıçanlarda, gebeliğin erken (5. gün) ve geç döneminde (20. gün), ekstraselüler matriks (Extracellular matrix - ECM) düzenleyicilerinden SPARC'ın, endometriyumdaki ekspresyonu ve bu proteinin ECM'nin düzenlenmesindeki rollerinin ortaya konması amacıyla planlandı. Yine SPARC'ın 20. gün plasenta dokusunda ekspresyonu ve bunun hipertiroidi ile ilişkisinin ortaya konması amaçlandı. Bunlara ek olarak, endometriyum (5. ve 20. günlerde) ve plasenta (20. gün) dokularında TGF β -1 ve VEGF ekspresyonları araştırılarak SPARC ile olan ilişkisinin aydınlatılması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

TİROİD BEZİ ANATOMİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ

Tiroid bezi boynun anterior kısmında yer almaktadır. Fiziksel olarak hekimin veya kişinin palpasyonu ile rahatlıkla farkedilebilen birkaç endokrin organdan biridir. Boyun dar bir alan olmasına rağmen tiroid bezinin etrafında önemli dokular bulunur. Trake, karotid arter, jugular ven, omurilik ve önemli sinirler arasında bez, trakenin üstünde özofagusa komşu olarak yer alır (Şekil 1). Tiroid bezi büyürse bu dokuların sıkışmasına; başta yemek yemede ve nefes almada kısıtlılık gibi komplikasyonlara sebep olabilir. Daha da büyümesi ve çene altına doğru genişlemesi guatra sebep olur (2).

Embriyonal dönemde dilin altında endodermal kökenli triglossal duktustan gelişmeye başlar. Triglossal duktus fetus boynunda aşağı doğru hareket ederken gelişmeye devam eder. Büyüdükçe bez iki loba ayrılır. Bezde bulunan parafoliküler hücreler ise nöral krestten köken alır (2). Bezin yer değiştirerek yerini bulması, lokasyonunda anatomik varyasyonlara sebep olur. Bazı durumlar, kongenital anormalliklerle sonuçlanabilir. Tiroid bezinin dil altında kalarak yerine ilerlememesi, lingual tiroidin; ilerlerken geçtiği yolda doku kalıntısı bırakması ektopik tiroid dokusunun; boyuna göç ederken oluşan epitelyal triglossal duktusun kaybolmaması ve kist oluşturması ile triglossal duktus kistlerinin oluşmasına sebep olur (5).

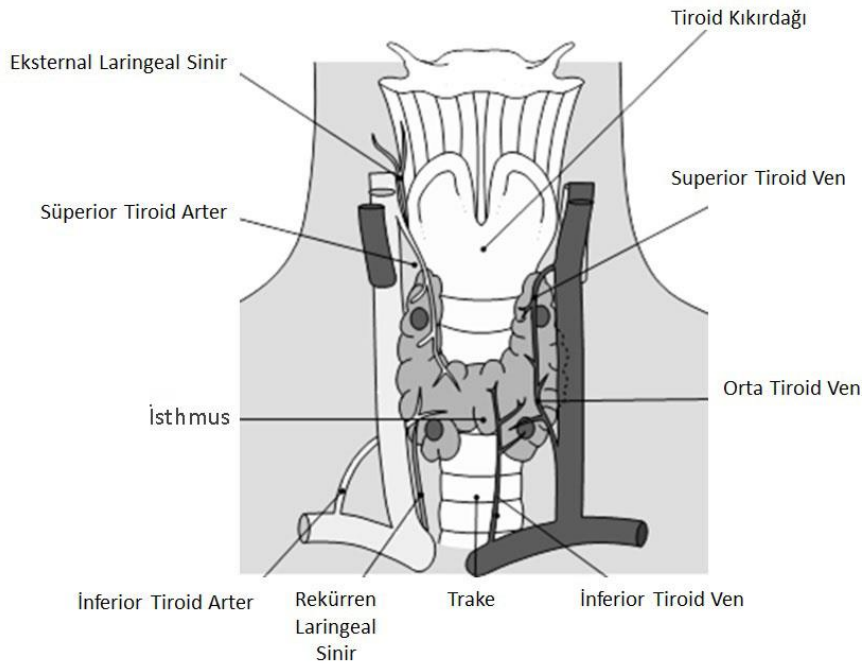
Tiroid bezinin insan ömrü boyunca üç tane hormonu (T_3 , T_4 ve kalsitonin) salgılamasından başka görevi bilinmemektedir. Önemli sinirler tarafından innerve edilir ve damar bakımından zengin bir endokrin bezdir. Damar desteği ve yoğun kan akışı aorttan gelir ve tiroid fonksiyonu için önemlidir. Ses tellerini innerve eden rekürren laringeal sinir (RLS)

tiroidin arkasında ses tellerine doğru ilerler. Tiroidi innerve eden bu sinir pakedi direk kranial sinirlerden köken alır. Bu sinir pakedinin tiroidde meydana gelen herhangi bir patolojik durumdan etkilenme derecesi yüksektir. Vücudun kalsiyum dengesini ayarlamaktan sorumlu olan paratiroid bezi ise tiroid bezinin arkasında mercimek tanesi büyüklüğünde yer alır (6).

TİROİD BEZİ HİSTOLOJİSİ

Tiroid bezi her ikisi yaklaşık 30 gr ağırlığında, 5 cm'e 2,5 cm boyutlarında iki lateral lobdan oluşur. Trake ve özofagusun her iki yanına uzanan iki lobu, trakenin anteriorundan geçen tiroid dokusu bandı olan isthmus birbirine bağlar. Anatomik görüntüsü H şeklindedir (Şekil 1). Dokuyu saran ince bağ dokusundan oluşan kapsül, parankim içine bezi lobüllere ayıracak şekilde trabeküller gönderir. Bu bağ dokusu, aynı zamanda tiroid bezinin sıkı bir şekilde özofagusa tutunmasını sağlar (2).

Tiroid bezinin fonksiyonel birimi olan tiroid folikülleri, boyutları 0,2-1 mm; duvarı tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitelle döşeli düzensiz küre şeklinde yapılardır. Bu küresel yapının içi kolloid denilen hücresel olmayan viskoz bir sıvı ile doludur. Duvarı döşeyen folikül hücrelerinin apikal yüzeyleri kolloide bakarken bazal bazal membran üzerine oturur.



Şekil 1. Tiroid bezi ve komşuluklarının şematik gösterimi

(<http://www.eu.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780723434276/9780723434276.pdf> adresinden modifiye edilmiştir.)

Tiroid bezi vücudun damarlaşması en yoğun organlardan biridir . Aorttan köken alan süperior ve inferior tiroid arterleri, beze dallanma yaparak fenestralı kapillerle folikülleri sarar. Foliküller arasındaki bağ dokuda, kör uçlu lenfatik kapiller ağ bulunur; böylece hormonlar kan yolu dışında lenfatik damarlar yoluyla da vücuda yayılır (6).

Hormon salgılayan hücreler tiroidin parankimini oluşturur ve iki tip hücreden oluşur.

Folikül Hücreleri (Esas Hücreler): T_3 ve T_4 hormonlarını sentezler. Rutin Hemotoksilen & eosin (H+E) boyamasında hafif bazofilik bazal sitoplazma; belirgin nukleolus içeren yuvarlak nukleus ile karakterizedir. Elektron incelemesinde, hücrenin hem salgı hem absorpsiyon görevi için özelleşmiş yapılar içerdiği görülür. Apikal yüzeyinde kısa mikrovilluslar, bazal bölgede granüllü endoplasmik retikulum, apikal bölgede Golgi aygıtı kaynaklı veziküller ve çok sayıda endositotik veziküller ile lizozomlar bulunur (7).

Parafoliküler Hücreler (C Hücreleri): Vücudun kalsiyum dengesi için önemli olan kalsitonin hormonunu salgılar. Folikül epiteli ile bazal laminası arasında yer alır, folikül lümeni ile temas halinde değildir. H+E boyamalarında soluk boyanır, ışık mikroskobu ile ayırt etmek zordur. Elektron incelemesinde çok sayıda 60-550 nm çaplarında veziküllere ve iyi olarak gelişmiş Golgi aygıtına sahip oldukları görülür (7).

TİROİD BEZİ FİZYOLOJİSİ

Tiroid bezinin histofizyolojisi incelendiğinde 3 temel hormonun üretiminden sorumlu olduğu görülür:

Tetraiyodotironin (Tiroksin - T_4) ve triiyodotironin (T_3): Bazal metabolizmayı ve ısı üretiminin düzenlenmesinden sorumlu hormonlardır. Büyüme ve gelişmeyi etkiler. Pituiter bezin anterior lobundan salgılanan Tiroid uyarıcı hormon (Thyroid stimulating hormone; TSH) tarafından kontrol edilir ve folikül epitel hücreleri tarafından salgılanırlar (6).

Kalsitonin (trikalsitonin): Kemik doku üzerine etki ederek kan kalsiyum dengesini düzenler. Kemik hücrelerinden osteoklastların parçalayıcı etkisini baskılayarak, kan kalsiyum seviyesini düşürür ve osteoid kalsifikasyonunu artırır. Yüksek kan Ca^{+2} seviyesi kalsitoninin üretimini artırırken, düşük serum düzeyi kalsitoninin salgılanmasını baskılar. Tiroid bezi tarafından üretilen diğer hormonların aksine kalsitonin üretimi, hipotalamus ve pitüiter bezden etkilenmemektedir (6,7).

Sahip olduğu farklı histolojik yapısı gereği tiroid bezinde hormon sentezi diğer endokrin bezlerden bazı farklılıklar gösterir. Buna bağlı olarak tiroid hormonu sentezi birkaç aşamadan geçerek gerçekleşir:

1. Tiroglobulin sentezlenmesi: Tiroglobulin öncülü folikül hücrelerinin granüllü endoplazmik retikulumlarında sentezlendikten sonra Golgi aygıtında glikozile edilerek veziküller halinde paketlenir ve lümene ekzositoz ile salgılanır (7).
2. İyodürün (I⁻) rezorbsiyonu ve okside edilmesi: İyodür, folikül hücrelerinin bazolateralinden kandan sitoplazmaya alınır. Kan plazmasında iyodür konsantrasyonu düşüktür. İyot pompası (Sodyum/iyot simporter; NIS) ile alınan iyodür, uyarılmaya bağlı olarak folikül hücrelerinde kan plazmasına kıyasla 25-350 kat daha fazla depo edilebilir. İyodür difüzyonla hücre apikaline ilerler ve folikül lümenine pendrin transmembran proteini aracılığıyla salınır. Folikül hücre zarının lümene bakan yüzünde bulunan tiroid peroksidaz ile lümeninde okside edilerek iyota (I⁺) dönüşür (6,7).
3. Tiroglobulin iyotlanması: Lümeninde bir iyotun tiroglobulinin tirozin birimlerine eklenmesiyle, monoiyodotirozin (T₁ ya da MIT); MIT'A ikinci iyotun bağlanmasıyla diiyodotirozin (T₂ ya da DIT) oluşur (7).
4. T₃ ve T₄ oluşması: Lümeninde bulunan, bir MIT ve bir DIT molekülleri oksidatif eşleme reaksiyonu ile birleştiğinde T₃; iki adet DIT oksidatif eşleme reaksiyonu ile birleştiğinde T₄ oluşur. T₃, üç iyot atomu içerirken; T₄, dört adet iyot atomu içerir. T₃ ve T₄ tiroglobuline bağlı olarak lümeninde kolloid olarak depolanır (7).
5. Tiroglobulinin lümen hücreleri tarafından absorbe edilmesi: TSH'nin uyarımı ile folikül epitel hücreleri, T₃ ve T₄'e bağlı tiroglobulinleri endositoz ile hücre içine alır. Lizozomal parçalama ile T₃ ve T₄ serbest kalır (7).
6. Tiroglobulinden serbest kalan T₃ ve T₄'ün dolaşıma katılması: Tiroglobulinden serbest kalan hormonlar, T₄:T₃ oranı 20:1 olacak şekilde lenf ve kan dolaşımına katılır. T₃, T₄'e göre beş kat daha aktiftir ve böbrek, karaciğer, kalp gibi organlarda T₄'ten dönüştürülür. T₄ sadece folikül hücreleri tarafından üretilir (6,7).

T₄ ve T₃ hormonlarının yaklaşık %99'u kan plazmasında, karaciğerden üretilen tiroid bağlayıcı proteinlere (Thyroid binding proteins-TBP) bağlı olarak taşınır (8). T₄'ün bağlı olduğu kompleksin yarılanma hızı düşüktür. Bu yüzden etkisi uzun sürer ve süreklidir. Bu özelliğiyle diğer endokrin hormonlardan ayrılır. T₃'ün yarılanma hızı daha yüksektir, daha hızlı etki eder ve etkisi daha çabuk kaybolur (1). Plazmada serbest halde bulunan T₃ aktif hormon ve T₄ ise prohormon olarak görev yapmaktadır. Her iki hormon hücre zarından taşıyıcılar vasıtasıyla geçerek hücre içi reseptörlerine bağlanır. T₄ hücre içinde T₃'e çevrilirken, T₃ transkripsiyon faktörü olarak görev yapar (8).

T₄ hormonunun birincil etkisi mitokondriler üzerinedir. Dokularda, metabolik faaliyetleri artırmasından dolayı, O₂ kullanımını artırır. Mitokondride oksidatif enzimleri artırıp, oksidasyona hız vererek metabolizmanın hızını artırır. T₄ arttığında ısı üretimi artar; bazal metabolizma hızlanır. T₄, bu etkilere paralel olarak dolaylı yoldan anabolik ve katabolik olayların da seyrini değiştirir. Protein üretimi artar, enzim sistemlerinin artmasına bağlı olarak karbonhidrat emilimi, karbonhidratın ve yağın enerji kaynağı olarak kullanımı artar. Yağların enerji kaynağı olarak kullanımı artar. Bu yüzden kanda ve karaciğer dokusunda yağ seviyesi azalır. Yağ depoları kullanılmaya başlanır (9).

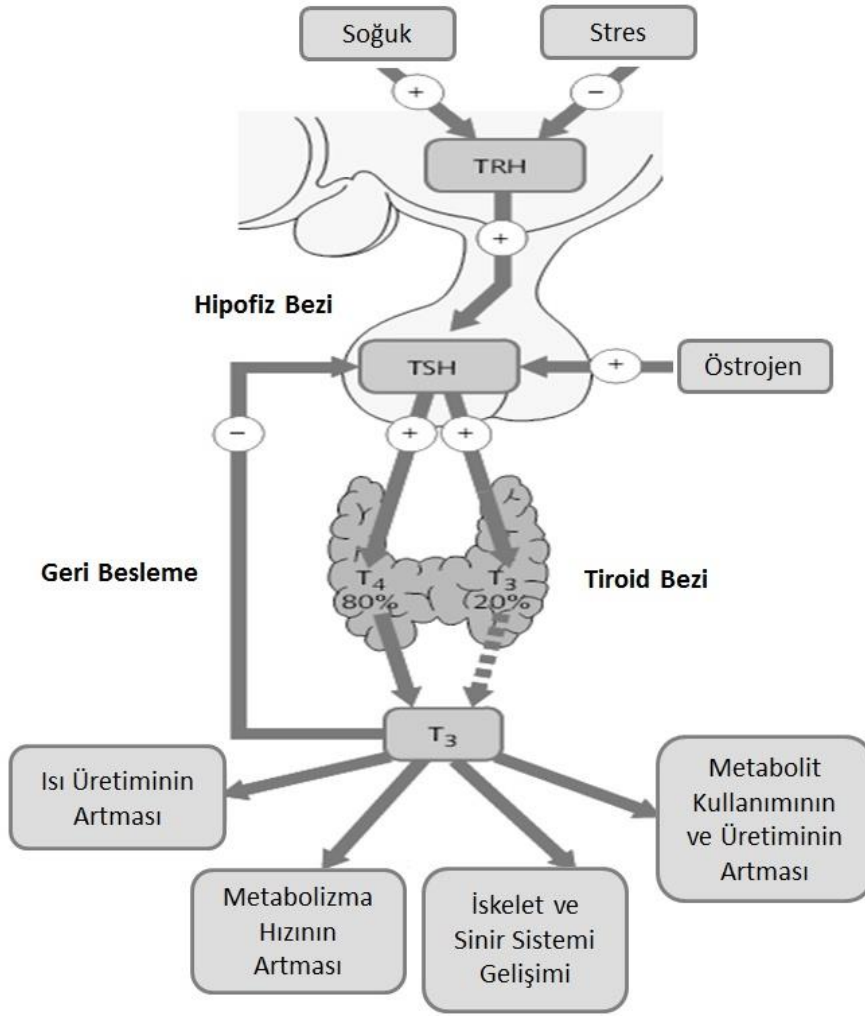
HİPOTALAMO-HİPOFİZER-TİROİD AKSI

Tiroid bezinin uyarılması hipotalamo-hipofiz aksı tarafından kontrol edilir. Dolaşımdaki düşük seviye tiroid hormonlarını algılayan hipotalamus, yanıt olarak tirotropin serbestleştirici hormon (Thyrotropin releasing hormone- TRH) üretimini artırır (Şekil 2). TRH hipofiz bezini uyararak, anteriorundan TSH salgılanmasını sağlar. TSH, folikül hücrelerinin bazal yüzeyindeki TSH reseptörlerine etki ederek tiroid bezini uyarır. Bu uyarı, folikül hücrelerine kandan iyodür transferini, tiroglobulin sentezini, trioglobulinin lümenine salınımını ve tiroglobulinin tirozin yapıtaşlarına iyot eklenmesini, tiroid hormonlarının dolaşıma salınmasını ve T₄'ün T₃'e çevrilmesini tetikler. Uzun süre TSH etkisi altında kalan tiroid bezinin hacmi ve damar miktarı, protein sentezini artırmak için artar. Tiroid bezinin çalışması sağlayan üç önemli sebep; uzun süreli soğuğa maruziyet, östrojen hormonunun hipofiz üzerindeki etkisi, adrenal bezin tiroid üzerindeki etkisidir (6).

Tiroid hormonlarının kandaki düşük seviyeleri TRH uyarımını artırdığı gibi, kandaki yüksek seviyeleri ise TSH'ı negatif etkilemektedir. Negatif geri besleme mekanizması TSH salınımını baskılayarak tiroid bezinin uyarılmasını engeller böylece hormon üretiminin azalmasını sağlar (Şekil 2).

HİPERTİROİDİ

Hipertirodi, farklı sebeplere dayansa da genel olarak kandaki tiroid hormonlarının yüksek seviyesi ile tanımlanır. Tiroid bezinin yüksek oranda tiroid hormonlarını üretmesi ve salgılaması, kan plazmasındaki hormon seviyesinin yükselmesine sebep olur. Bu durumun altında yatan sebepler geri besleme mekanizmasından, tiroid hormonlarının dolaşıma katılmasına, vücut hücrelerinde T₄'ten T₃ üretimine kadar olan herhangi bir basamaktaki bozukluktan kaynaklanabilir.



Şekil 2. Hipotalamo-Hipofizer-Tiroid Aksı

(<http://www.eu.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780723434276/9780723434276.pdf> adresinden modifiye edilmiştir.)

Hipertiroidinin oluşmasında başlıca, difüz toksik guatr (Graves Hastalığı), subakut tiroidit, toksik multinodüler guatr (Plummer Hastalığı), toksik adenom gibi tiroid bezi hastalıkları sorumludur. Hipertiroidi ile beraber adı anılan başka bir ifade ise tirotoksikoz'dur. Tirotoksikoz, kandaki yüksek oranda bulunan tiroid hormonu sirkülasyonu sonucu oluşan, organizmada klinik olarak ortaya çıkan hipermetabolik durumu ifade eder (10). Tirotoksikoz, kandaki tiroid hormonu seviyesine bağlı olarak klinik bulgu vermediği gibi hayati tehlike de taşıyabilir. Ölümcül olması durumunda (tiroid fırtınası), acil müdahale edilmezse çoklu organ yetmezliğine ve ölüme sebebiyet verebilir.

Hipertiroidi için laboratuvar testleri, plazmada yüksek T₄ ve T₃, baskılanmış TSH bulgusu verir (11). Hipertiroidi durumunda iştah artışı, diplopi, dispne, halsizlik, sıcağa toleransın azalması, tremör ve kilo kaybı gibi belirtiler gözlenebilir (12). Belirtiler genel

belirtiler olduğu için nörolojik, kardiyolojik başka hastalıklarla karıştırılabilir. Özellikle hiperadrenajik hastalarla benzer belirtiler gösterir. Yaşlı kadınlarda hipertiroidiye genellikle koroner kalp hastalığı veya enfeksiyon gibi hastalıklar eşlik etmektedir (1). Hipertirodi durumunda menstrual siklusa düzensizlik artar, amenore, oligomere gibi farklı tablolar gözlenebilir.

Tiroid kaynaklı bozulukların tedavi edilmemesi kalp rahatsızlıkları, infertilite, kas zayıflığı, osteoporoz, koma veya ölümlerle sonuçlanan komplikasyonlara sebep olabilir.

HİPERTİROİDİNİN GENEL ETKİLERİ

Hipertiroididen kaynaklanan komplikasyonlarda başlıca faktör, kanda tiroid hormonu seviyesindeki artış ve yüksek seviyenin devam ettiği süredir.

- 1. Nörolojik Etkileri:** Tiroid rahatsızlıklarında genel olarak sinir sistemi komplikasyonları kas sisteminden ayrı düşünülemez. Belirtiler, nöromusküler belirtiler olarak kendini gösterir. Tiroid hormonlarının ilk hedef dokusu iskelet kaslarıdır. Hastalığın seyrinde proksimal kas zayıflığı, kas ağrısı, kas katılığı, kramp ve yorgunlukla bulgu veren miyopati gelişir. Yapılan bir çalışmada hastaların %82'sinde proksimal kas zayıflığına rastlanmıştır. Serumda bulunan fazla miktardaki hormonlar kas histolojisini etkileyerek kasılmayı hızlandırmaktadır. Bununla beraber dinlenme süresi kısalır, glikojen kullanımı artar; fosfokreatin üretimi azalır; laktat üretimi artar. Sonuç olarak, kas proteinlerinin katabolizması hızlanarak kas yıkımını tetikler. Enerji ihtiyacı artan kas dokusu, zamanla gündelik aktivitelerde ihtiyacı karşılayamaz olur (13). Nöromusküler bulgular ve çeşitliliği yaşa göre değişiklik gösterir. Yaşlılarda miyopati, uyusukluk, yalancı demans olarak görülürken, gençlerde daha çok titreme (tremor), çarpıntı, taşikardi, terleme gibi sempato-adrenal aktivite eşliğinde ortaya çıkmaktadır. Özofagol ve bulbar kaslarda gelişen kas zayıflığı yutkunmada ve nefes alıp vermede zorlukla sonuçlanabilir. Diyafragmatik kas zayıflığı ise dispneye sebep olabilir. Moleküler düzeyde tiroid hormonları, azot dengesini negatif yönde bozar; protein yıkımını, lipid oksidasyonunu, glikoz kullanımını artırır; glikojenoliz ve mitokondrial oksidasyonu artırır (14).

Hipertiroidinin şiddetine bağlı olarak sinirsel bulgular da gözlenebilir. Anksiyete, sinirlilik, duygusal yoğunluk, kaygı, konsantrasyon problemlerinden psikoza ve depresyona kadar farklı belirtiler gelişebilir (14).

Tiroid hormonlarının nörolojik etkileri postnatal dönemde başlar. İlk trimesterde tiroid bezi aktif olmayan fetusun beyin gelişimi için maternal T₄ gereklidir. Aksonal ve dentritik büyüme, sinaptogenez, nöral göç, miyelinizasyon tiroid hormonlarının kontrolü altında

gelişir. Fetal beyin ilk trimesterde T₄-T₃ dönüşümünü gerçekleştirebilir. Gestasyonla beraber fetal tiroid üretimi ve tiroid hormonları reseptörleri artmasına rağmen maternal T₄ ve TRH büyük oranda fetal dolaşımında yer almaya devam eder(15).

2. Kardiyovasküler Etkileri: Kalp hastalıkları ve tiroid metabolizması arasındaki ilişki tek yönlü değildir. Hipertiroidi hastalarında eritropoez artar. Renin-anjiotensin-aldesteron sistemi aktiftir. Bu olaylar, kan hacminin artmasına sebep olur. Hücresel düzeyde ise hiperitoidi, serum tiroid hormonları seviyesine bağlı olarak, miyositlerde kalsiyum ve diğer iyon kanallarının ekspresyonunu kontrol ederek diastol süresini uzatır. Sonuçta, akut olarak sistolik basınç artar, diastolik basınç düşer (16). Kardiyovasküler sistemde gelişen bu hemodinamik ve hiperdinamik bozukluklar, kalbi yüksek performansda çalışmaya zorlamaktadır. Aritm ve çarpıntı hipertiroidide gözlenen belirtilerdir. Özellikle yaşlılarda atriyal fibrilasyon hiperitoidiye eşlik eder (1). Morfolojik olarak ise sol karıncıkta kalınlaşma gözlenebilir (16).

Akut ve kronik kalp hastalıklarında sebebe bağlı olarak, kanda tiroid hormonları miktarında değişiklik gözlenmiştir. Bu değişiklikler, kalp hastalıklarının dolaylı yoldan tiroid bozuklukların artmasına sebep olabileceğini gösterir (16).

3. Gastrointestinal Etkileri: T₄ hormonunun daha aktif form olan T₃'e periferdeki dönüşümünün %20'si gastrointestinal sistemde (GİS) gerçekleşir. Buna ek olarak tiroid hormonlarının GİS üzerindeki etkileri çok çalışılmamış olsa da var olduğu bilinmektedir. Tiroid hormonlarının, bağırsak içeriğinin bağırsak lümeninden kontrolsüz bir şekilde vücuda sızmasını engelleyen bağırsak ve mide epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları (tight junction) kontrol ettiği ve bağırsak mukoza hattını ülserleşmekten koruduğu bulgular arasında yer alır (17).

Hipertiroidili hastada, GİS ile ilişkili genel belirtiler karın ağrısı, kusma, aşırı kilo kaybı, yutma güçlüğü, iştah artışı, diyare olarak ortaya çıkmaktadır. Yutma güçlüğü hem hormonal değişiklik sebebiyle, hem de tiroid bezinin büyümesine bağlı olarak özofagusun baskı altında kalmasıyla gelişebilir. Bununla birlikte, hipertiroidinin kaslarda oluşturduğu miyopatinin, özofagusu ve farinksini etkileyerek yutma güçlüğüne sebep olduğu düşünülmektedir. Diyare ise hipertiroidide yaygın gözlenen bir belirtidir. Hipertiroidinin bağırsak motilitesini artırdığı bilinmektedir. Bu durumun besinlerin bağırsaktan geçiş zamanının kısaltmakta ve diyareye sebep olduğu düşünülmektedir. İntestinal mukoza salgısındaki artış, yağ emilim metabolizmasının bozulması ve adrenerjik sistemin aktif olması da diyarenin sebepleri arasında sayılmaktadır. Hiperitoidide karaciğer ve anorektal kanal

histolojisinde de bozulma olduğu saptanmıştır. Karaciğer enzimlerinin ve lezyonlarının arttığı klinik bulgular arasındadır. Hipertiroidinin uzun süre tedavi edilememesi ile hastanın siroz gelişme riski taşıdığı bildirilmektedir (17). Yapılan bir çalışmada, hipertiroidide bağırsak florasındaki yararlı ve zararlı bakteri popülasyonunun değiştiği bildirilmiştir (18). Bazı çalışmalarda ise Graves hastalarının, 5 kat daha fazla Çölyak hastalığına yakalanma riski taşıdıkları; Graves hastalığı ile ülseratif kolit arasında paralel bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (17,19).

4. Kemik Metabolizmasına Etkileri: Tiroid metabolizması hem hormonlar üzerinden, hem reseptörleri üzerinden kemik gelişimine ve mineralizasyonuna etki etmektedir. Dolaylı olarak ise, büyüme hormonu (Growth Hormone- GH), İnsülin benzeri Büyüme Faktörleri (Insulin-like Growth Factor-IGF), glukokortikoidler, östrojen ve androjenlerle iletişim halinde kemik metabolizmasına etki eder. Tiroid hormonlarının GH ve IGF'lerin salgılanmasını arttırdığı düşünülmektedir. İskelet sistemindeki birçok dokuda, tiroid hormon reseptörlerinin varlığı, farklı dokuların farklı yanıtlarla tiroid hormonlarından etkilendiğini gösterir. Buna ek olarak, hormon aktivitesinin hücre içi T_3 yoğunluğuna bağlı olduğu ve serum seviyesinden bağımsız olarak osteoblastlarda T_4 'ün T_3 'e dönüştürüldüğü bilinmektedir. Kemik oluşumu ve kemik yıkımını uyaran tiroid etki mekanizması, yaşa göre değişiklik gösterir. Tiroid, kemik oluşumunda osteoblastların çoğalması, farklılaşması ve apoptozunu kontrol ederken; osteonektin, Tip I kollajen, alkalın fosfataz, metalloprotein ve IGF gibi moleküllerin üretimini artırır. Kemik yıkımında ise osteoklast farklılaşmasını ve farklılaşma faktörleri olan İnterlökin 6 ve prostoglandin gibi molekülleri arttırdığı bildirilmiştir (20).

Hipertiroidi T_4 - T_3 dönüşümünü azaltır; buna bağlı olarak, mineralizasyon azalır ve kırılabilirlik artar. Yüksek seviye tiroid hormonlarının osteoblastik ve osteoklastik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Her iki aktivitenin artması kemik döngüsünü hızlandırarak olumsuz yönde etkiler ve kemik yapısının bozulmasına sebep olur. Bu bozulma, vücudun mineral homeostazisinde büyük değişikliklere sebep olur (13). Tiroid hormonları fazlalığında üriner sistemden normalden 3 kat daha fazla kalsiyum atıldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Na^+ seviyesine bağlı olarak, fosfat kanallarını aktive ederek Ca^{+2} renal absorpsiyonunu da artırmaktadır. Hipertiroidide hiperkalsemi gelişmesi; kemik yıkımı ile açığa çıkan kalsiyuma ve böbrek, GİS'ten kalsiyumun artan geri emilimine bağlı olarak kanda Ca^{+2} seviyesindeki artmasından kaynaklanır. Serumda artan Ca^{+2} daha sonra ECM'ye aktarılarak diğer dokuları etkiler. Benzer şekilde serum fosfat miktarı da artar. Hipertiroidi vakalarında hiperkalsemi

insidansının %8-22 arası olduğu rapor edilmektedir. Hiperkalsemi gelişiminde hipertiroidi ile birlikte anderenerjik tonunun artması da etkili olduğu düşünülmektedir (20).

Klinik olarak çocuklarda ve gençlerde, hipertiroidinin kemiğin büyüme hızını, mineralizasyonu ve ossifikasyonu artırdığı, ama son boy uzunluğunu sınırladığı tespit edilmiştir. Büyüme plaklarındaki hızlanmanın, tiroid hormonlarının fibroblast büyüme hormonu (fibroblast growth hormone- FGH), GH, IGF-1 ve Wnt sinyal yolağına etki ederek geliştiğı düşünülmektedir (13). Erişkinlerde ise kemik kütlelerinde azalma, mineralizasyonda azalma, kırılabilirliğin artması ve osteoporoz gözlenmiştir (20).

5. Üreme Sistemine Etkileri: Tiroid bezinin cinsiyet gelişimini ve erişkin dişi üreme sistemini etkilediğı bilinmektedir. Fakat fetal dönemde dişi üreme sistemi gelişimine bir etkisi olduğuna dair bir bulgu yoktur. Tiroid bozukluklarının üreme fonksiyonu, fetal gelişimi ve fertilitiyi olumsuz etkilediğı yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (21).

Dişi sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada, farklı dozlarda T₃ verilen sıçanların dozaja bağılı olarak östrus döngülerinde düzensizlik tespit edilmiştir. Uterusta östrojen direnci oluştuğı, buna bağılı olarak fonksiyonel bozuklukların geliştiğı belirtilmiştir. Yüksek dozda T₃ enjekte edilen sıçanlarda ise gebelik oluşmadığı gözlenmiştir (22). Hipertiroidi oluşturulan sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada, gelişen korpus luteumda hipertirofi, uterus endometriyumunda desidual öncül hücre sayısı ve kollajen miktarında artma, endometriyum vasküler yatağında genişleme tespit edilmiştir (23).

Hipertiroidinin steroid metabolizmasına etki ettiğı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Dişi sıçanlar üzerinde artan dozda T₃ verilerek yapılan bir araştırmada doz arttıkça adrenal bez ağırlığının ve DNA içeriğinin arttığı, tirotoksikozlu kadınlarda ise östrojen üretiminin, luteal ve foliküler fazda serum Luteinizan Hormon (LH)'un arttığı rapor edilmiştir (24). Karaciğerde üretilen cinsiyet hormonu bağlayıcı globülin (Sex hormone binding globulin; SHBG)'nin hipertiroidi durumunda arttığı görülmüştür (22,24).

Puberteden önce görülen tirotoksikozun ise menstruasyon yaşını ileri attığı bildirilmiştir. Hipertiroidinin infertilite üzerine etkisi net bilinmemekle beraber, infertilite etiyojisinde hipertiroidi de sebepler arasında sayılmakta ve otoimmün kaynaklı tiroid hastalıklarını taşıyan kadınlarda infertiliteye daha sık rastlandığı rapor edilmektedir (23).

HİPERTİROİDİ VE GEBELİK

Gebeliğin oluşması, fetusun sağlıklı gelişimi ve laktasyon dönemini kapsayan süreçte, tiroid önemli görevler üstlenir ve bozuklukları olumsuz olarak hem anneyi hem fetusu etkiler. Tiroid bozukluklarının gebelik üzerindeki etkileri, bozukluğun süresi ve şiddeti ile ilgilidir.

Normal gebelikte başlıca tiroid metabolizmasında ortaya çıkan değişiklikler şunlardır:

1. Tiroksin bağlayıcı globülin (TBG) miktarının artması: Artan östrojen miktarına bağlı olarak serumda tiroksinin taşınmasıyla görevli olan TBG miktarı artar ve gestasyon süresince yüksek kalır.
2. İnsan koryonik gonadotropin hormonu (human chorionic gonadotropin hormone- hCG) üretiminin artması: TSH reseptörlerine bağlanarak tiroid bezini uyarır ve tiroid yapımını artırır. Gebeliğin 8-14. haftalarında gelişen gestasyonel hipertiroidinin sebebi olduğu düşünülmektedir. hCG'nin düşmesiyle tiroid hormonları normale döner.
3. İyot ihtiyacının artması: Gebelikte birlikte renal kan akım hızının ve glomerüler filtrasyon hızının artmasıyla, idrarla aşırı iyot kaybedilmesi ve fetusa transplasental yolla iyot transferinden dolayı iyot ihtiyacı artar. İyot eksikliği giderilmediği durumda annede guatr gelişir.
4. Tiroid hormonu üretiminin %50 artması: TBG seviyesinin artması, kan plazmasında hacimsel artış gibi sebepler plazmadaki tiroid hormonu konsantrasyonunu düşürür. Diğer fizyolojik sebeplerin etkisiyle tiroid hormonu yapımı artar.
5. Gebelikte O₂ tüketimi artması: Bazal metabolizma hızı artar (25).

Tedavi edilmeyen hipertiroidi anne ve fetusta komplikasyonlara sebep olabilir. Annede görülen hipertiroidi sebeplerinden en yaygın olanı otoimmün bir hastalık olan Graves hastalığıdır. Tiroid TSH reseptörlerine karşı üretilen IgG yapısında olan antikolar (TSH-Ab), tiroid bezini sürekli uyararak tiroid hormonlarını üretmesine sebep olur (26). TSH-Ab plasentadan geçebilir ve fetal dolaşıma katılır. Hipertiroidinin gebelikteki prevalansı %0.02-0.05'tir ve hastalığın en sık görüldüğü yaşlar doğurganlığın en verimli olduğu 20-40 arasındadır (25).

Hipertiroidinin sebep olduğu maternal komplikasyonlar: abortus, plasenta dekolmanı, prematüre doğum, tiroid fırtınası, pre-eklampsi, kongestif kalp yetmezliği, hiperemesis, ve enfeksiyondur. Fetal komplikasyonlar ise ölü doğum, konjenital anomali, hipotiroidi, tirotoksikoz, guatr, intrauterin gelişme bozukluğudur. Fetal komplikasyonların en temel sebebi anneden gelen antikolar ve tiroid ilaçlarıdır (26).

Yapılan bir araştırmada artan dozda T₃ uygulamasında, uterusun östrojene direnç geliştirmesinden dolayı kasılma problemleri geliştiği ve doğumun zorlaştığı, bir batında doğan yavru sayısının azaldığı -düşük sayıda gebelik veya ölü doğumda artış- ve gestasyon süresinin uzadığı tespit edilmiştir. Yüksek doz tiroid hormonunun hipotalamusu etkilemesi ve hipertiroidi durumunda prolaktinin azalmasından dolayı koruma, besleme içgüdüünün kaybolduğu, kanibalizmin arttığı gözlenmiştir. Hamilelik süresince tiroid hormonunun meme bezleri gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. Hipertiroidinin süt üretimini azalttığı, yapılan çalışmalarla hücre düzeyindeki bulgularla ortaya konmuştur (21).

UTERUS

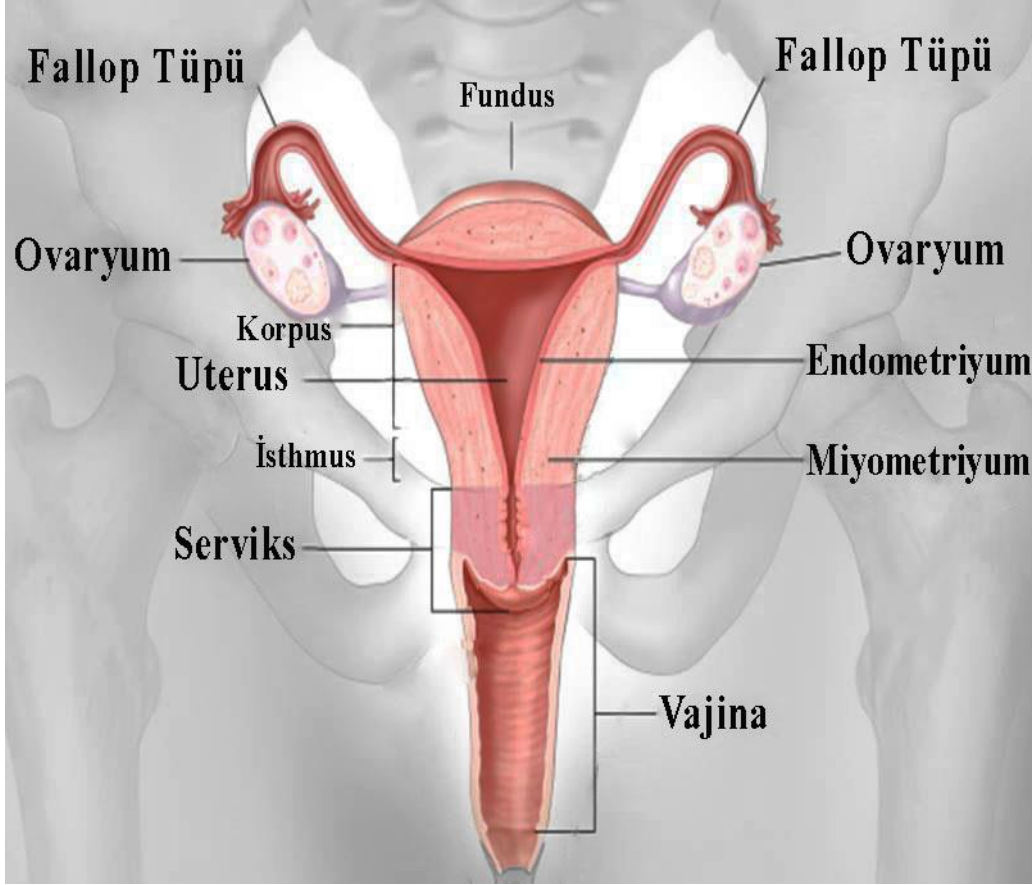
Uterus embriyonun geliştiği, doku yenilenmesi ve şekillenmesi bakımından plastisitesi en yüksek, dişi üreme sisteminde yer alan en büyük organdır. Boyutu, şekli ve ağırlığı doğum sayısına ve östrojen miktarına göre değişir. Birinci fonksiyonu implante olan embriyoyu beslemektir. Uterusta gerçekteşen önemli morfolojik değişimler ovaryumdan ve gebelik boyunca embriyodan gelen hormonal sinyal döngüsüne yanıt olarak gelişir. Gebelik boyunca uterus ağırlığı miyometriyal düz kas tabakasının hipertirofiye uğramasından ve hiperpilaziden dolayı 10 kata kadar artar . Ovaryan steroid hormonların etkisinde doğurgan bir kadının uterusu iki farklı sürece girer. Birincisi fertilizasyonun olmadığı dönemlerde döngüsel olarak ortaya çıkar ve insanlarda menstrual döngü, sıçanlarda ve farelerde ise östrus döngüsü adını alır. İkinci süreç ise gebelik gelişmesi durumunda, uterus endometriyum stroma hücrelerinin farklılaşmasıyla başlar (27). Sıçanlarda ve farelerde de bikornual yapıdaki uterusu çoklu gebeliklerin gelişimi için aynı süreç görülür.

Uterusun hiç doğum yapmamış kadınlarda ortalama yüksekliği 8 cm, kalınlığı 2.5 cm, genişliği ise 5 cm'dir (28). Normal bir uterus yaklaşık 100 gram iken gebelik sonunda 1 kg'a çıkabilir ve doğumdan 4-5 hafta sonra normal ağırlığına kavuşabilir. Doğumdan sonra involusyonda, nekroz ve apoptozis mekanizmaları işlemektedir (27).

UTERUS ANATOMİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ

Uterus fundus, korpus, isthmus, serviks olmak üzere 4 anatomik bölgeye ayrılır (Şekil 3). Fundus uterusun fallop tüplerine bağlandığı üst kısmıdır. Uterusun kaslı gövde kısmı korpus; korpus ve serviks arasında uzanan endometrial kavitenin daraldığı kısma isthmus adı verilir . Serviks yaklaşık 2-3 cm uzunluğunda uterusun vajinaya açılan boyun kısmıdır. Serviksin ortasında servikal kanal bulunur. Endometrial kavitenin serviks kanalı ile buluştuğu

bölgeye internal ostium, servikal kanalın vajinaya açıldığı bölgeye ise eksternal ostium adı verilir (29).



Şekil 3. Uterus Anatomisi

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65941/figure/CDR0000257805_158/ adresinden modifiye edilmiştir)

Uterusun endometriyum ve miyometriyum tabakaları mezodermal kökenli olup prenatal 8. ve 9. haftada mülleryan tüberkülünün birleşmesinden sonra gelişir. 20. haftaya kadar endometrium tek katlı prizmatik epitel hücreleri ile ince bir stromadan oluşur. 20. haftadan sonra epitel hücreler stromaya doğru göçerek endometriyum bezlerini oluşturur. Doğumda endometriyum epiteli alçak prizmatik veya kübik epitel hücrelerinden meydana gelmektedir ve inaktif durumdadır. Endometriyal mukoza tabakası 0.5 mm kalınlığındadır ve puberteye kadar bu durum korunur (30).

UTERUS HİSTOLOJİSİ

Uterus histolojik olarak 3 katmandan meydana gelir (Şekil 4):

Tunika seroza (perimetriyum): Seröz karakterlidir. Uterusa giren damarlar ve sinirler bulunur.

Tunika muskularis (miyometriyum): Düz kas hücrelerinden (uterus miyositleri) oluşur. Kas tabakası üç katmandan oluşur. En dışta longitudinal uzanan kasların oluşturduğu supravasküler tabaka (Stratum supravaskülare), ortada sirküler yerleşimli kas hücrelerinin oluşturduğu vasküler tabaka (Stratum vaskülare), içte longitudinal uzanan kas tabakası subvasküler tabaka (Stratum subvaskülare) bulunur (7). Uterusa giren arteria uterina miyometriyuma girdikten sonra uterusu sararak sirküler olarak stratum vaskülare tabakasında ilerler ve ön-orta hatta anastomoz oluşturur (31).

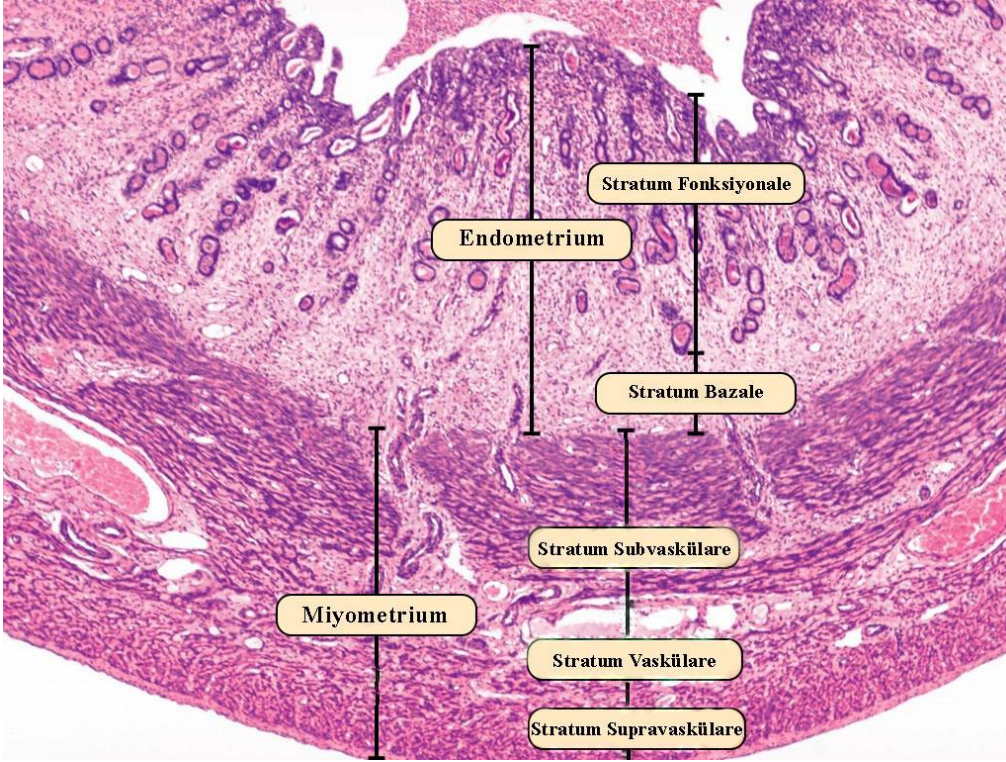
Tunika mukoza (endometriyum): Uterusun mukoza katmanıdır. Tübüler organlardan farklı olarak submukoza bulunmaz (7). Puberteden önce inaktif olan endometriyum, puberteyle birlikte doğurganlığın bittiği menopoza dönemine kadar yaklaşık 28 günde bir tekrar eden menstrual döngüye girer. Endometriyum tabakası geçirdiği morfolojik değişimlerden dolayı fizyolojik olarak iki kısımda incelenir: asıl değişimin olduğu endometriyumun apikal 2/3'lük kısmından oluşan fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonalis), endometriyumun geri kalan kısmından oluşan bazal tabaka (stratum bazalis) (Şekil 4) (7).

UTERUS FİZYOLOJİSİ

Endometriyum ve Menstrual Döngü

Hipotalamo-hipofizer hormonların regülasyonu ile üretilen steroid hormonları, ovaryum ve uterusun paralel olarak değişim geçirmesine sebep olmaktadır. Doğurganlık çağında bir kadının uterusu, her ay embriyo implantasyonuna ve gelişecek gebeliğin devamına hazırlık yapar (7). Gebelik olmaması durumunda uterus eski haline döner ve hazırlığını tekrarlar. Gebelik olması durumunda ise endometriyum, stroma hücrelerinin farklılaşmaya başlamasıyla yeni bir sürece girer. Puberteye ulaşmamış kız çocuklarında ve menopoza dönemindeki kadınlarda, endometriyum inaktiftir ve ince bir bağ dokuya sahiptir(30).

Arteria uterinadan gelen radyal arterler bazal tabakaya düz arterler, fonksiyonel tabakaya spiral arterler olmak üzere dallanmalar gönderir. Spiral arterlerin endometriyuma yakın distal kısmı menstrual döngü esnasında östrojen ve progesteronun etkisi altında her menstrual döngüde sırayla hipertrofi ve atrofiye uğrar. Fonksiyonel tabakanın, spiral arterlerin hipertrofi olmasıyla kalınlığı 6 mm'ye kadar artar. Atrofi olması durumunda ise kalınlığı normale döner (1mm) (7,31).



Şekil 4. Uterus histolojisi ve katmanları

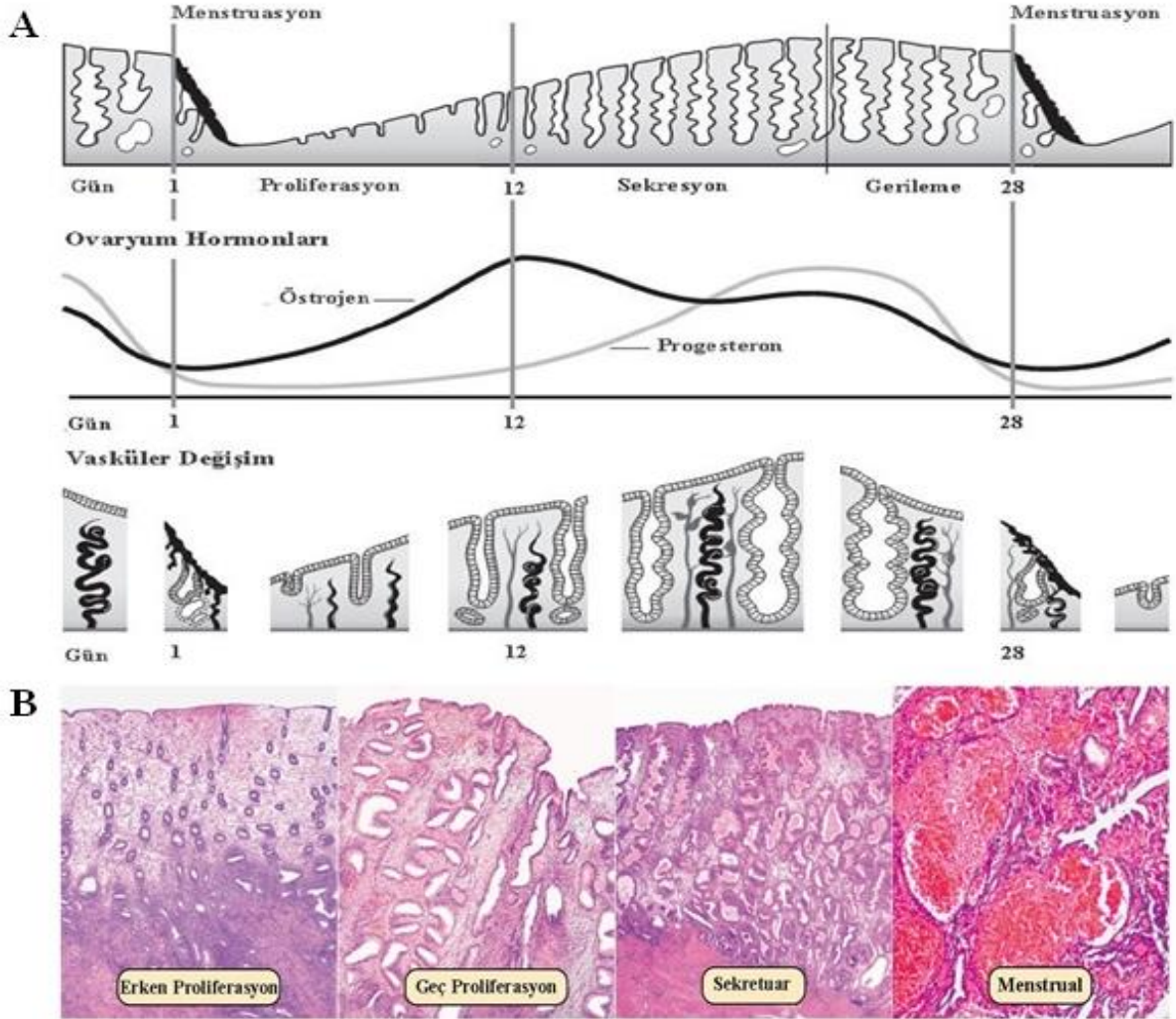
(http://medcell.med.yale.edu/systems_cell_biology/female_reproductive_system_lab.php adresinden modifiye edilmiştir.)

Menstrual döngü, proliferasyon, sekresyon ve menstruasyon olmak üzere üç fazdan oluşur (Şekil 5).

Proliferasyon fazı: Endometriyum proliferasyon fazı öncesi yaklaşık 1 mm kalınlığındadır. Fonksiyonel tabaka incedir; endometriyum bezlerinin bazal kısmını ve spiral arterlerin proksimal kısmını içeren bazal tabaka belirgindir. Ovaryumda foliküllerin gelişmesiyle artan östrojen miktarına bağlı olarak endometriyumun epitelyal hücreleri, stroma hücreleri, kan damarları artmaya başlar (31). Bezlerin bazal kısımlarından epitelyal hücreler endometriyuma göç eder, stroma hücreleri çoğalır, kollajen ve ara madde üretimi artar. Spiral arterler proksimalden distale doğru uzamaya başlar. Endometriyum kalınlığı yaklaşık 3 mm'dir. Yeni oluşan bezler dar lümenli ve epitelyal hücrelerin bazal kısımlarında bulunan glikojen granülleri ile karakterizedir. Menstruasyonun 5. gününde mitotik aktivite ayırt edilebilir ve 16-17. güne kadar devam eder (7).

Sekretuar faz: Ovulasyon sonrasında (menstruasyonun yaklaşık 14. günü) ovaryumda oluşan korpus luteumdan salgılanan progesteron, fonksiyonel tabakada daha büyük değişimlere sebep olur. Endometriyum stroması ödemli hale gelir, bezler büyür, lümenleri salgı ile dolu şekilde kese görünümünü alır (7,31). Vaskülarite artar, spiral arterler lümenine kadar uzanır ve daha kıvrımlı hale gelir. Endometriyum kalınlığı 5-6 mm'ye ulaşır ve mitotik

aktivite yavaşlamıştır. Bezler tarafından üretilen mukoid, glikojen ve besin unsurları bakımından zengindir (7).



Şekil 5. Menstrual döngü : A- Şematik gösterimi, B- Endometriyum histolojisi.

(http://medcell.med.yale.edu/systems_cell_biology/female_reproductive_system_lab.php adresinden modifiye edilmiştir.)

Menstrual faz: Ovulasyon sonrası fertilizasyon olmaması durumunda, korpus luteum 10 gün kadar progesteron salgılamaya devam eder sonra atrofi olur. Ovaryumdan progesteron ve östrojen salınımının azalması ilk olarak endometriyumun kan yatağını etkiler. Spiral arterlerin kasılmaya başlaması fonksiyonel tabakanın iskemisi olmasına neden olur. Bezler fonksiyonlarını kaybeder, stromada ödem azalır (7,31). Yüzey epiteli bozulur ve kan damarları parçalanmaya başlar. Önce yüzey epiteli ve stroma hücreleri dökülür. Açığa çıkan ven ve arterlerden kanama başlar. Fonksiyonel tabaka bazal tabakaya inene kadar dökülme devam eder. Spiral arterler kasılmaya devam ettiği için kanamanın çoğu venlerden

kaynaklanır. Bu dönem yaklaşık 5 gün sürer (7). Kanamanın durması, ovaryumda yeni bir folikül gelişmesi ile paraleldir. Proliferasyon fazı başında yüzey epiteli hızla proliferer olur (38).

Endometriyum ve Gebelik

Menstrual döngünün 22-24. günlerinde ortaya çıkan implantasyon penceresi, fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmişse endometriyumun farklılaşması ile devam eder. Blastokistin implantasyonu ile endometriyum uyarılır ve stroma hücreleri glikojen açısından zengin prostoglandin sentezleyen desidual hücrelere farklılaşmaya başlar. Bu farklılaşmaya desidualizasyon adı verilir (7). Desidua tabakası gebelik için özelleşmiş olup prolaktin, renin, IGF ve IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) gibi önemli proteinleri salgılar; glikojen ve yağ depolar; trofoblastların invazyonunu kontrol eder. İlk dönem fetal/maternal iletişimde parakrin ve otokrin rol oynar (32). Gestasyonla birlikte yer aldığı bölgeye göre yapısı farklılaşır ve bütün endometriyumu sarar. İmplantasyonun olduğu bölge yani plasenta yatağının geliştiği bölge her zaman aktif durumdadır. Bu kısma desidualis bazalis adı verilir. Uterusun plasenta yatağının geliştiği duvarının karşısında bulunan duvarda yer alan desidua tabakasına desidualis parietalis adı verilir. Embriyonun koryon zarının dışını saran kısmına desidualis kapsüllaris adı verilir. Üçüncü ayın sonunda fetusun büyümesiyle desidua parietalis ile desidua kapsüllaris kaynaşır ve aralarındaki uterin kavite kaybolur. Desidua bazalis'de ECM kollajen açısından zengindir ve embriyonun invazyonu esnasında yeniden şekillenir (33). Desidua tabakasının bir kısmı doğumda plasenta ile birlikte dökülür.

PLASENTA

Plasenta fetal/maternal alışverişte rol oynayan kompleks bir organdır. Fetal/maternal iletişimde metabolik olayların gerçekleşmesini sağlar ve endokrin organ olarak görev yapar. Fetal/maternal alışverişte plasentanın hemokoryal yapısından dolayı her iki tarafın kan destekleri birbirine karışmaz. Besin, gaz, hormonlar, elektrolitler, maternal antikolar, ilaç ve metabolitleri, artık ürünler plasenta aracılığı ile anneden fetus kan dolaşımına, fetustan anne kan dolaşımına aktarılır (34). Metabolik olarak yapım ve yıkım olaylarını düzenler. Böylece anneden gelen maddelerin fetal kan dolaşımına girmesini kontrol eder. Örnek olarak T₄'ü T₃'e çevirmesini ve fetal tiroid hormonu ihtiyacını karşılamaya yardımcı olmasını verebiliriz. Endokrin olarak, hCG, insan koryonik somatomammotropin (human Chorionic Somatomammotropin-hCS), insan koryonik tiotropin (human Chorionic Tyotropin-hCT),

insan koryonik kortikotropin (human Chorionic Chorticotropin-hCACTH), progesteron ve östrojen salgılar (35).

PLASENTA ANATOMİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ

Gebeliğin son döneminde (term) normal bir plasenta yuvarlak disk şeklinde bir organdır. Yaklaşık 22 cm çapında, merkezi kalınlığı 2.5 cm ve yaklaşık ağırlığı 500 gr'dır (36). Plasentadan plasentaya bu değerler değişiklik gösterebilir. Kan desteği üzerine gelişen bir organ olduğu için boyutunu kan hacmi etkiler. Plasenta hem maternal hem fetal dokunun bir araya gelmesiyle oluşmuştur. İki yüzü vardır (Şekil 6A).:

Fetal yüz: Koryonik tabaka fetal yüzü kaplar. Koryonik tabakanın fetusa bakan kısmında ise tek katlı epitel doku, amniyonik mezenşim ve bağ dokudan oluşan amniyon zarı bulunur (37). Umbilikal kordon koryonik tabakaya eksentirik giriş yapar. Koryonik mezenşim, koryonik umbilikal kordondan gelen koryonik damarları içerir. İki umbilikal arterden köken alan koryonik arterler fetal yüzeye dağılır ve villuslara dallanmalar gönderir. Koryonik venler villus venleri olarak dağılır ve genelde koryonik arterlere yakın ilerlerler. Koryonik venler toplanarak bir umbilikal vende birleşir (36,37).

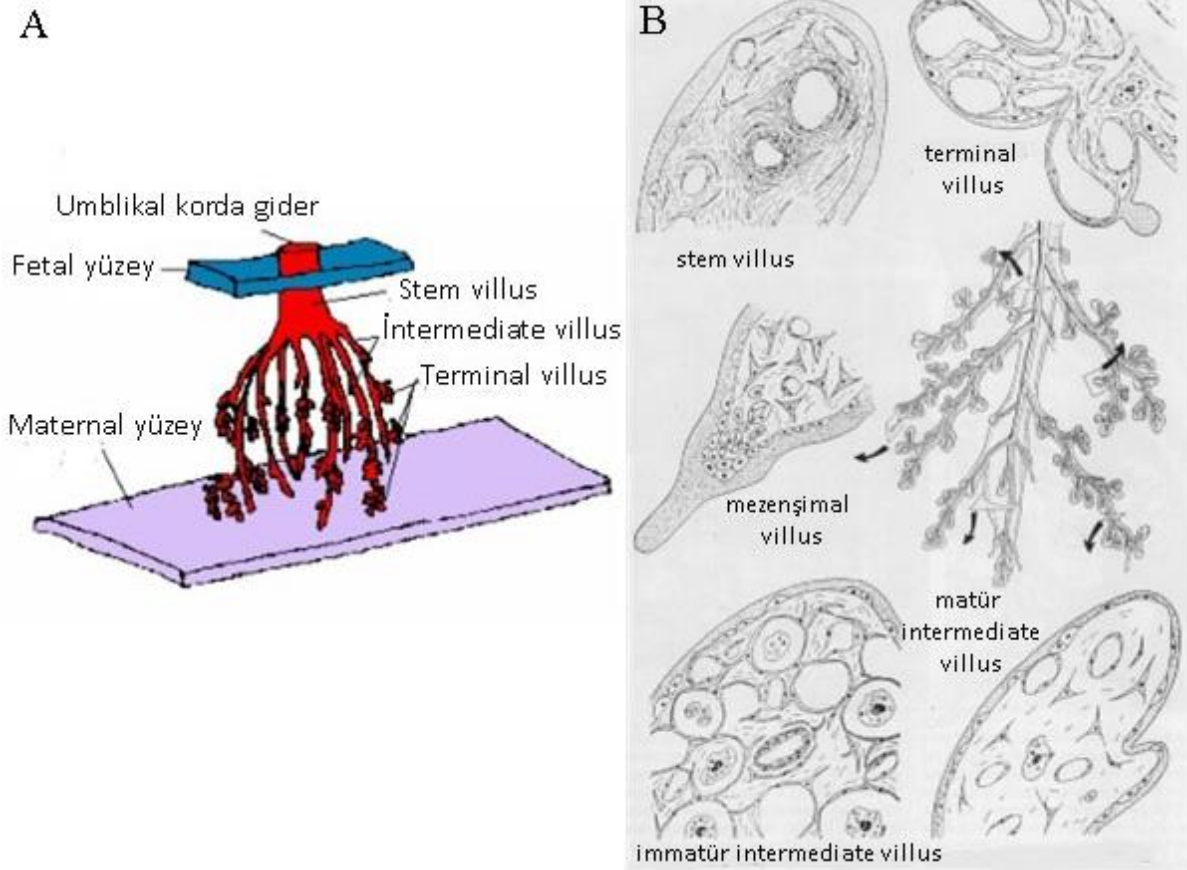
Maternal yüz: Bazal katman maternal yüzü ifade etmektedir (Şekil 6A). Bazal katman fetal ekstravillüs trofoblastlar (EVT) ve uterus desidua hücreleri, ECM, fibronoid ve kan pıhtısı içerir. Yüzey yarıklarla birbirinden ayrılan sayısı 10-40 arasında değişen yüzeyi düz kabartılar halinde görünür. Bu bölmelere lob (kotiledon) adı verilir. Loblar koryonik tabakadan intervillöz aralığa doğru büyüyen villus ağaçlarının biraraya gelmesiyle oluşmuştur. Bir villus ağacı plasenton denilen plasentanın fonksiyonel en küçük birimidir (Şekil 6A). Yarıklar lobların sınırlarını belirleyen plasental septaları ifade eder. Term plasenta 60-70 villus ağacı (fetal lob) içerir. Her maternal lob 1-4 fetal lobdan oluşur (36).

Plasenta kenarlarında ise koryonik ve bazal katmanlar birleşir koryon leveyi oluşturur. Koryon leve üç katmandan oluşur: epitel ve mezenşim dokusuyla amniyon, mezenşim ve EVT katmanıyla koryon ve desidua kapsüllaris.

Plasenta gelişiminde fetal/maternal dolaşım ilk olarak uteroplazenta dolaşım sistemi olarak gelişir. Plasenta fertilizasyonun 4. ve 5. gününde blastokistte farklılaşan trofoblast hücre tabakasından köken alır. İmplantasyondan sonra bu tabaka plasenta ve fetal zarlara, iç hücre kütlesi ise embriyoya, umbilikal kordona ve plasenta mezenşimine farklılaşacaktır.

Blastokist uterus epiteline 6-7. günde tutunur. Plasenta bu süreçte farklılaşmaya başlar. Sadece embriyoblast kutbundaki trofoblastlar (polar trofoblastlar) implantasyonu

gerçekleştirip tamamlayabilir. Polar trofoblastlar farklılaşır ve tek nükleuslu hücrelerin kaynaşması ile ilk çok nükleuslu sinsityotrofoblastlar oluşur. Sinsityotrofoblast katmanının altında bulunan tek nükleuslu trofoblastlara ise sitotrofoblast adı verilir. Sitotrofoblast kök hücre gibi görev yapar, hızla bölünür ve kaynaşarak sinsityotrofoblastları oluşturur. Bu aşamada maternal dokuyla irtibat halinde olan hücreler sadece sinsityotrofoblastlardır.



Şekil 6. Kotiledonun yapısı; A- Şematik gösterimi, B- Koryonik villus çeşitleri

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53256/> adresinden modifiye edilmiştir.)

Sinsityotrofoblast katmanı içinde sıvı dolu lakünler 8. günde oluşur ve büyüyerek trabekül adını alır. Bu aşamada üç tabaka gözlenir: embriyoya bakan erken dönem koryonik tabaka, laküner sistemin yer aldığı tabaka ve maternal endometriyum ile irtibat halinde olan primitif bazal tabaka (7).

İnvaze olan sinsityotrofoblastların hedef dokusu maternal kapiller ve venöz damarlardır. Damarların aşınması ile maternal kan hücreleri lakünlerin içine dolmaya başlar ama asıl maternal plasental dolaşım sinsityotrofoblastların arterleri aşındırmasıyla başlayacaktır. Bu aşamada lakünlerin içinde daha çok venöz kan bulunur (7).

Blastokist, 12. günde endometriyuma tamamen gömülmüştür. Blastokistin abembriyonik kutbunda oluşan lakünler küçük ve trofoblast tabakası incedir. Embriyoda gelişen ilkel çizgi (primitif streak)'den köken alan ekstraembriyonik mezodermal hücreler, sitotrofoblast hücreleriyle koryonu oluşturmak için sitotrofoblast hücrelerine doğru göç eder. Koryon sitotrofoblastları daha sonra sinsityotrofoblastlara doğru penetre olarak ekstravillus sitotrofoblastları oluşturacaktır. İnterstisyel alanda bulunan EVT tabakası endometriyum stromasına invaze olur ve spiral arterleri aşındırır (7).

Trabeküllerde ilk dallanmalar 13. günde görülmeye başlanır. Oluşan ilk primer koryonik villuslar sinsityotrofoblast tabakasının içinde sitotrofoblast tabakası ile karakterizedir . Daha sonra ekstraembriyonik mezodermal hücreler trabeküller içine doğru göç eder ve primer koryonik villusların mezenşimal kısmını oluşturarak sekonder koryonik villuslara dönüşmesini sağlar. Mezoderm içinde hematopoetik progenitör hücreler oluşmaya ve farklılaşmaya başlar (7).

İlk plasental kan hücreleri ve endotel hücreleri embriyonun vasküler sisteminden bağımsız olarak 20. günde gelişmeye başlar. Plasental damarların gelişmesiyle tersiyer koryonik villuslar gelişir (7).

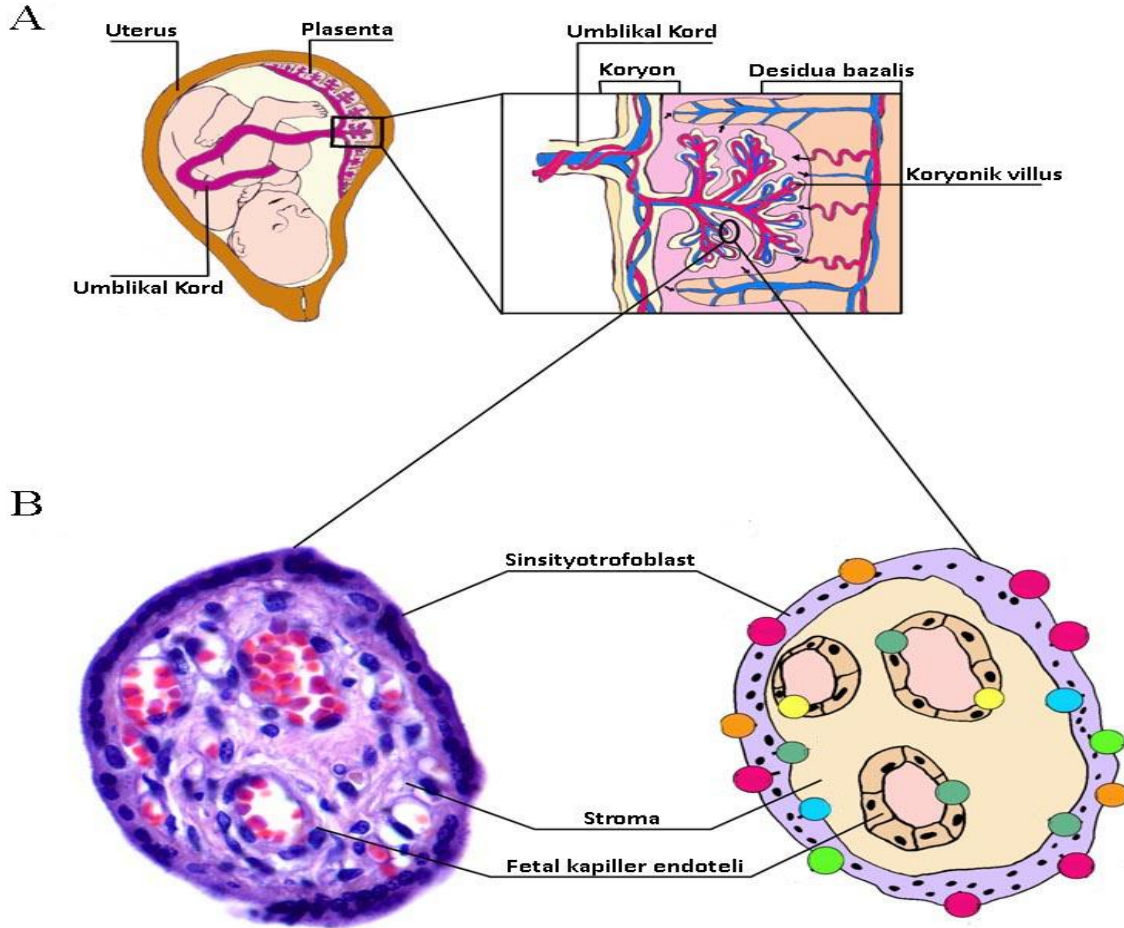
Villuslar koryonik yüzeyin tamamını 8. haftaya kadar kaplar (7). Fakat desidua kapsüllerle temas halindeki villuslar zamanla dejenere olur. Desidua bazalis üzerindeki villuslar farklılaşarak artar ve dallanmalarını derinleştirerek koryon frondozumu oluşturur. Dördüncü ve beşinci aylarda koryon frondozum plasental septumlar aracılığıyla kotiledonlara ayrılır. Desidua bazalis sıkılaşıyor bazal tabakayı oluşturur.

PLASENTA HİSTOLOJİSİ

Plasenta gelişimi birçok anjiyogenik büyüme faktörü, sitokin, hücre adhezyon molekülleri, büyüme faktörleri, ekstraselüler metalloproteinazları, hormon ve transkripsiyon faktörleri gerektirmektedir.

Plasentanın öncülü olan sitotrofoblast hücreleri, aşındırma özelliği olan mitotik olarak aktif sinsityotrofoblastlarla kaynaşan iç hücre tabakasıdır (Şekil 7B). Sinsityotrofoblast çok nükleuslu dev hücreler olarak karşımıza çıkar. Endometriyumu invaze eder, mitotik olarak inaktiftir. Çok gelişmiş Golgi aygıtlarına, Endoplazmik retikulum (ER), çok sayıda yağ granülüne ve mitokondriyona sahiptir (7).

Plasentanın fonksiyonel birimini villuslar oluşturur (Şekil 7A). Villusların stromasında bağ doku ile birlikte retiküler hücreler, mezenşimal hücreler, fibroblastlar, miyofibroblastlar, düz kas hücreleri, makrofajlar, fetal-plasental antijen sunan hücreler olarak



Şekil 7. Plasentanın yapısı; A- Plasentanın yerleşimi ve katmanları, B; Koryonik villus histolojisi
(<http://portal.faf.cuni.cz/Groups/Experimental-Pharmacology-and-Drug-Interactions/Research-Projects/Drug-transport-across-the-placenta/> adresinden modifiye edilmiştir.)

bilinen Hofbauer hücreleri bulunur. Hofbauer hücreleri fetal kaynaklı villöz makrofajlardır (7).

Villus yapıları morfolojik olarak farklılık gösterir. Term plasentada intervillöz alanda bulunan villuslar, villus yapısı, damar yapıları, histolojik özelliklerine göre 5 sınıfa ayrılır. (Şekil 6B).

Kök villuslar (Stem villus): Görevi villus dallanmalarının yapısını desteklemektir. Koryonik tabakayla irtibat halindedir. Trofoblastik dejenerasyon azdır ve az fetal kapiller damar içerir. Bu tabaka villuslarda fetal/maternal değişim az düzeydedir. Yapısal olarak yoğun fibröz stroma ve damarlar içerir. Gestasyon ilerledikçe azalır yerini fibrinoid yapıya bırakır (36).

İmmatür intermediate villuslar: İlk ve ikinci trimesterde değişimin gerçekleştiği ana bölge denebilir. Villus ağacının büyüdüğü ve dağıldığı bölgedir. Kök villusların devamı şeklindedir. Dıştaki sinsityotrofoblastlar gestasyon boyunca kalıcıdır. Gevşek veya retiküler stroma, Hofbauer hücreleri, daha belirgin damarlar ve yer yer sitotrofoblast hücrelerinden oluşur (36).

Matür intermediate villuslar: Uzun, ince ve fetal damarlar açısından zengin villuslardır. Terminal villusları oluşturur ve fetal/maternal değişim için önemlidir (36).

Terminal villuslar: Plasentanın fonksiyonel birimleridir. Elektrolit, O₂ ve CO₂, besin alışverişi yapılıdır. Terminal villuslar kök villuslarla aradaki yapılar aracılığıyla bağlıdır. Termdeki plasentada terminal villuslar küçük, daha az stroması olan ve kesintili sitotrofoblast katmanıyla tanınır. Fetal kapiller damar ile sinsityotrofoblast arasındaki mesafe ince bazal membran kadardır; böylece fetal/maternal alışveriş mesafesi ~3.7 µm'ye düşer. Plasentanın villus hacminin %40'ını, ufak çaplarından dolayı villus yüzeyinin %50'sini, villus kesit alanlarının %60'ını oluşturur (36). Bazı terminal villuslar intervillöz alanda serbest iken bazıları desidüaya tutunur ve plasentanın yapısal olarak sabit kalmasını sağlar. Placenta 15-28 kotiledondan oluşur. Her kotiledon bir kök villusun 3-5 immatür ve matür intermediat villuslara bölünmesiyle, onların da 10-12 terminal villuslara dallanmasıyla oluşur (7).

Mezenşimal villuslar: Villus proliferasyonunun ve bütün endokrin aktivitenin olduğu bölgedir (36).

Placenta villus yapısı mezenşimal villus oluşumu ile başlar. 5.haftaya kadar sadece mezenşimal villuslar bulunur. Mezenşimal hücreler bu villuslara daha sonra göç ederek immature intermediat villusları oluşturur. Bu villuslar 8-22. haftalarda baskındır. Placenta kan damarları oluşmaya başlamıştır. Villuslar daha sonra farklılaşarak önce matür intermediate, sonra terminal villusları oluşturur. Trofoblastların artması ve parmak benzeri çıkıntı oluşturması, mezenşimal göçü ve lokal fetal anjiyogenezi tetikler. Villus içi fetal damar gelişimi ve fetal/placental kan akımı yaklaşık 6-8. haftalarda başlar (38).

SPARC

Secreted Protein Acid and Rich in Cystine (SPARC), aynı zamanda Osteonektin ve BM-40 olarak da bilinir. SPARC kalsiyum bağlayıcı matriselüler glikoprotein olup ilk olarak sığır kemiğinin kollajen olmayan ana bileşeni olduğu bulunmuştur (39). Sığır aort endotel hücrelerinden 43 kDa olarak izole edilmiştir. Daha sonra tümör bazal membranında yoğun olarak bulunan matriks bileşenlerinden BM-40 ile ortolog olduğu tespit edilmiştir (39,40).

Matriselüler proteinler hücre-matriks etkileşimini yöneten ekstraselüler regülatör makromolekülleri kapsar, fakat ECM yapısına katılmaz. Matriselüler moleküllerin salgılanan glikoprotein alt grubu SPARC, trombospondin 1 ve 2, tenasin C ve X, osteopontin moleküllerini içerir. Yapısal olarak farklı olsalar da fonksiyonel olarak ilişkilidirler. Hepsi hücre adhezyonunu engelleyerek hücrenin yuvarlak kalmasını ve hücre-matriks iletişiminin kısıtlanmasını sağlar. Doku yenilenmesi ve yeniden şekillenmesi, embriyonik gelişim gibi hücrenin adhezyondan kurtulmasını ve yuvarlanmasını gerektiren durumlarda bu grup proteinlerin ekspresyonuna ihtiyaç vardır. Bu yüzden, matriselüler proteinler geleneksel kollajen, fibronektin gibi adhesif ve yapısal kararlılığı sağlayan ekstraselüler matriks proteinlerinden farklıdır (40).

SPARC farede 11. Kromozom, insanda 9.kromozom üzerinde bulunan tek-kopya gen ürünüdür. Dizilim analizleri, sığır, fare ve insan SPARC dizilimlerinin yüksek oranda birbirine benzediklerini ortaya koymuştur. Omurgalı SPARC cDNA'sı 286-304 amino asitlik protein üretmektedir. 32 kDa'luk bir protein olmasına rağmen SDS-PAGE üzerinde majör olarak 43 kDa'luk bant vermektedir. Farklı moleküler ağırlıkta bantlar verdiği de tespit edilmiştir. SPARC cDNA'sının farklı uzunluktaki protein ürünlerine posttranslasyon aşamasında geçirdiği N-bağlantılı glikozilasyon basamağının sebep olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar SPARC'ın, farklı dokularda farklı glikoprotein yapıda olduğu ve her formun fonksiyonel olarak farklı olduğunu göstermiştir (40). Proteinin üç domaini bulunur:

Asidik domain: Ca^{+2} ye bağlanma afinitesi düşüktür. SPARC ailesi proteinler arasında farklılık oluşturan kısımdır. Fonksiyonel olarak hücre yayılmasını, kemotaksisi ve ECM üretimini engellediği tespit edilmiştir (40).

Sisteince zengin follistatin benzeri domain: Cu^{+2} bağlanma bölgesi içerir. Hücre proliferasyonunu engelleme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (40).

Ekstraselüler Ca^{+2} bağlanma domaini: Proteinin karboksi ucunda bulunur. Hücreye ve farklı kollajen tiplerine bağlanma özelliği göstermiştir (40).

SPARC'ın en iyi bilinen fonksiyonu, kemik dokuda Ca^{+2} 'ye bağlanarak mineralizasyona katkıda bulunması ve kemik matriksinde bulunan kollajen olmayan en yaygın protein olmasıdır (39,40). Genellikle morfogenez geçiren, mineralizasyon, anjiyogenez, tümörögenез gibi yeniden şekillenen dokularda SPARC ekspresyonunun değışkenlik gösterdiği, mikroarray analizlerle ortaya konmuştur. SPARC, hücre adhezyonunu, hücre döngüsünü ve belli büyüme faktörlerine dokunun verdiği cevabı engeller, ECM ve matriks metaloproteinazlarının üretilmesini düzenler. SPARC'ın anjiyogenez, tümörögenез, katarktogenez ve yara iyileşmesinde aktif olduğu gözlenmiştir (40).

Kalsiyum iyonuna yüksek bağlanma afinitesi olmasından dolayı, SPARC'ın fonksiyonunu ve yapısını kalsiyum iyonlarının seviyesi kontrol eder. Kalsiyumun bağlanması proteinin kararlılığını artırır. SPARC platelet kaynaklı büyüme faktörüne (Platelet derived growth factor- PDGF) bağlanır ve PDGF'in fibroblast üzerindeki reseptörlere bağlanmasını engeller. VEGF, PDGF ile homologtur ve SPARC'ın VEGF'e bağlanarak VEGF'in endotelial hücrelere bağlanmasını engellediği bulunmuştur. SPARC'ın büyüme faktörlerine bağlanması ve PDGF, VEGF gibi büyüme faktörleri üzerinden hücre proliferasyonunu engellemesi anjiyogenezde etkili olduğunu göstermektedir (40). Bir diğeri yaygın olan molekül de TGFβ'dir. TGFβ bağ dokunun şekillenmesinde ve ECM proteinlerinin ekspresyonunda önemlidir. TGFβ izoformu olan TGFβ-1'in SPARC transkripsiyonunu artırdığı, SPARC null farede ise, TGFβ-1'in azaldığı tespit edilmiştir. SPARC'ın bağlandığı bir başka protein grubu ise kollajenlerdir. SPARC null farede yapılan çalışmalarda, SPARC'ın yokluğunun ECM'de tip I kollajen miktarını azalttığı bulunmuştur. Tümör bazal membranında ekspres edilen SPARC, tip IV kollajene bağlanmaktadır (40).

Üreme sistemi ve SPARC arasındaki ilişkiye dair elimizdeki bilgiler çok az çalışma ile ortaya konmuştur. Endometriyum ve SPARC üzerinde yapılan en geniş çalışma Wever ve ark. (1988) yaptığı, gebelik döneminde ve normal menstruasyon döneminde, SPARC ekspresyonunu desidua hücreleri ve hücre bazal membranında karşılaştırdıkları çalışmadır. Çalışmada, büyük olgun desidua hücrelerinde periselüler alanda, orta büyüklükteki desidua hücrelerinde sitoplazmik alanda ekspresyonun olduğu, progenitör hücre konumunda olan küçük hücrelerde ise ekspresyonun çok az olduğu gözlenmiştir. Normal menstruasyon döneminde ise proliferatif fazda ekspresyonla karşılaşılmazken, sekretuar dönemde yoğun ekspresyon görülmüştür. Hepsinin ortak yanı laminin ve tip IV kollajen ile paralel ekspres edilmesi olarak tespit edilmiştir (41). Bir başka çalışmada ise, blastokistin implantasyon

öncesi endometriyumun reseptivitesini uyarmak için SPARC'ı baskılayıcı faktör salgıladığı bildirilmiştir (42).

TGFβ-1

Dönüştürücü büyüme faktörü, büyüme faktörleri arasında en fonksiyonel ve etkinliği en yüksek olanıdır. TGFβ süperailisi aktivin, inhibin, Mülleryan inhibitör molekülleri, kemik morfogenetik proteinleri gibi birçok regülatör molekülüne içine alan geniş bir ailedir. TGFβ-1 reseptörlerinin hemen hemen bütün hücre tiplerinde bulunması ve bir çok farklı hücrenin TGFβ-1 proteini sentezlemesi, proteinin otokrin ve parakrin yolla etki eden en yaygın regülatör proteinlerinden birisi olmasını sağlamaktadır.

In vitro yapılan çalışmalarda elde edilen farklı bulgular sonucunda, proteinin biyolojik aktivitesinin hücre tipine, kültür ortamına, ortamda var olan büyüme faktörleri gibi diğer maddelere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Büyüme, hareket, farklılaşma gibi hücreysel olayları düzenlediği, ECM şekillenmesinde ve oluşturulmasında rol oynadığı in vitro çalışmalarla ortaya konmuştur. Embriyo fibroblastları, hepatositler, T ve B lenfositleri, bronşiyol epitel hücreleri ve keratinositler ile yapılan primer ve sekonder kültür çalışmalarında, TGFβ-1'in güçlü bir proliferasyon inhibitörü olduğu saptanmıştır. Kültür ortamında TGFβ-1'in inhibitör aktivitesini, diğer büyüme faktörlerinin varlığı etkilemektedir. İnsan bronşiyol epitel hücreleri ve intestinal kript epitel hücrelerinin farklılaşmasında uyaran olarak görev yapar; fakat keratinosit ve adiposit farklılaşmasını engellediği de bulgular arasındadır (43).

TGFβ-1'in sadece proliferasyon aktivitesi değil, bütün etkilerinde ECM'nin belirleyici rolü vardır. TGFβ-1, ECM bileşenlerini fibroblast üzerinden kontrol eder. Kollajen, fibronektin, trombospondin ve tenasin üretimini uyarır. Hücre bağlantı faktörleri, matriks proteoglikan ve glikozamin için reseptör sentezini düzenler. Matriks proteinleri üzerinde proteolitik enzimlerin etkilerini inhibe eder.

In vivo olarak emriyogenez, immün regülasyon, kemik ve kırık oluşumu ve yenilenmesi, yara iyileşmesi, kardiyak fonksiyon ve karsinogenez sürecinde etkili olduğu saptanmıştır. Otoimmün hastalıklar üzerinde yapılan çalışmalarda, immün baskılayıcı özelliği olduğu bildirilmiştir. Matriks bileşenlerinin üretimini uyarması sebebiyle kemik ve kırık gelişiminde ve yenilenmesinde önemli rol oynar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, TGFβ-1'in subkutan uygulandığı bölgede anjiyogenezin ve fibroblast aktivasyonunun arttığı bildirilmiştir. PDGF, epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor- EGF), IGF ve Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor- FGF) gibi diğer büyüme faktörleri ile

etkileşim halindedir. Bu etkileşim, TGF β -1'in hücre üzerindeki etkilerini diğer büyüme faktörleri üzerinden kontrol ettiğini düşündürmektedir (43).

Üreme sistemi gelişimi ve fonksiyonu birçok hormon, sitokinler ve büyüme faktörü gerektirmektedir. TGF β -1, üreme sistemi ve embriyogenezde farklı görevleri olan en yaygın büyüme faktörüdür. Germ hücre göçünün, yetişkin üreme sisteminin yapısal ve fonksiyonel düzenlenmesine kadar birçok basamakta yer alır. TGF β -1'in uterus desidua hücreleri tarafından eksprese edildiği, implantasyonla birlikte ekspresyonun desiduaya yayıldığı tespit edilmiştir (44). Uterusta öncelikli olarak endometriyum epitel ve bez epitel dokusunda bulunmuştur. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, implantasyon sonrası desidua kapsüllerinde ekspresyonunun azaldığı, desidua bazalinde ekspresyonun yayıldığı ve özellikle laküna çevresindeki hücrelerde yoğun ekspresyon gözlenmiştir (45). Plasenta gelişiminde ise önemli rol oynayan VEGF üretiminin TGF β -1 tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (46).

VEGF

Vasküler endotel büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor- VEGF) multifonksiyonel bir proteindir. İlk olarak karsinoma hücreleri tarafından salgılanan ve tümoral kese içinde su toplanmasına yardımcı olan geçirgenlik faktörü olarak bulunmuş ve vasküler geçirgenlik faktörü (Vascular Permeability Factor-VPF) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra VEGF, endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını tetikleyen anjiyogenik faktör olarak tanımlanmıştır (47).

Organ gelişiminde VEGF-bağımlı vasküler ağ gelişiminin hızla yayılması üzerine yapılan araştırmalar VEGF'in vaskülogenezde, endotel progenitör hücrelerin farklılaşması ve organizasyonunda, varolan damarlardan yeni kapillerin gelişiminde ve anjiogenezdeki rolünü aydınlatmıştır (47,48). VEGF'in erişkin metabolizmasındaki önemli görevlerinin yanında, embriyogenez sürecinde rol oynadığı bilinmektedir. Postnatal dönemde olgun ve stabil vasküler sistem kurulana kadar VEGF'e ihtiyaç vardır. Vasküler sistem geliştikten sonra kapiller damarların VEGF'e bağımlılığı azalır. VEGF'in endotel ve nonendotel hücrelerin vasküler geçirgenliğinin korunmasını ve sürdürülmesini sağlamak nonanjiyogenik fonksiyonlarıdır (47).

Anjiyogenez, proanjiyogenik ve anti anjiyogenik faktörler ile ECM arasındaki sinyal yolları üzerinden gelişir. Endotel hücrelerinin göç edebilmesi için ECM bileşenlerinin proteolizi ve neosentezi ile ECM'nin yeniden yapılanması sağlanır. VEGF'in kollajenaz ekspresyonunu tetiklediği bilinmektedir. ECM proteolizi ile birlikte açığa çıkan faktörler

endotel proliferasyonunu tetikler (48). Anjiyogenik uyarı sonucu damara desteklik sağlayan ECM endotel hücrelerin göçüne şekilsel olarak da yardımcı olur. ECM'nin proteolize uğraması yeni damarlar için yer açar. ECM'nin aşırı proteolize uğramasıyla endotel hücreleri için iskele görevi ortadan kalkmasıyla endotel hücreleri tübül yapı yerine kistik yapı oluşturduğu gözlenmiştir. VEGF, endotel hücreler üzerinde reseptörüne bağlanarak endotelin kararlılığını sağlar (47).

Plasenta büyüme faktörü (Placental Growth Factor- PGF), FGF, TGF β -1 endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyardıkları bilinmektedir. TGF β -1, ECM depozisyonunu ve mezenşimal hücrelerin perisite farklılaşmasını tetikleyerek vasküler gelişmeyi tetikler. Perisit kapiller dışında bulunur ve endotel hücre proliferasyonunu engelleyerek yeni oluşan damarın sınırlarını belirler. Vaskülogenezde endotel hücreleri başta kollajen I ve III üretirken, son halinde kollajen IV ve V üretmektedir (47).

İmplantasyon alanı ve üreme sistemi fizyolojisinde vaskülogenez geniş yer tutar. Gebeliğin ve plasentanın gelişmesi ve menstrual siklus anjiyogeneze dayalı gelişen olaylardır. Yapılan çalışmalarda, VEGF'in baskılanması durumunda implantasyon alanında damarlaştırmanın ve sıçanlarda implantasyon alanlarında azalmanın olduğu gözlenmiştir.

Sıçanlarla yapılan çalışmalarda, endometriyumda endotel hücre proliferasyonun gebeliğin 3.gün başladığı ve 5. günde bütün endometriyuma yayıldığı tespit edilmiştir. Bu sürecin VEGF ile FGF, TGF β -1, EGF, prostoglandinler, tümör nekroz faktörü α (Tumor necrosis factor α -TNF α)'ın etkileşimi ile gerçekleştiği düşünülmektedir (48,49). Gebelik sürecine bağlı olarak desidua ve plasentada incelenen VEGF ekspresyonu term plasenta villus trofoblastlarında gözlenmezken, endometriyum bez epitelinde ve bazı desidua hücrelerinde pozitif olarak gözlenmiştir. Fakat erken dönem gebelik ve geç dönem gebelik desidua hücrelerinde VEGF ekspresyonu arasında belirgin bir fark olmadığı bulgular arasındadır (50,51). Plasentada ekspresyon farklı hücrelerde farklılık göstermektedir. Villus trofoblast ve EVT hücrelerinde karşılaşılmazken villus stromasında ve EVT dışı hücrelerde ekspresyon görülmüştür (51).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DENEKLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip Sprague Dawley türü 24 adet erişkin dişi sıçan kullanıldı. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları (22 ± 1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. İki kontrol ve iki deney olmak üzere dört grup oluşturuldu. Deney başında tüm hayvanlar numaralandırılarak ağırlık ölçümleri yapıldı.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Ek 1) 29.08.2014 tarihinde TÜHDYEK-2014/31 protokol numarası ile onay alındı.

Gruplar;

Kontrol grupları:

- I. Grup: 5.gün gebelik kontrol grubu; hiçbir müdahalede bulunulmadı (n=6).
- II. Grup: 20.gün gebelik kontrol grubu; hiçbir müdahalede bulunulmadı (n=6).

Deney grupları:

- I. Grup: 5.gün gebelik hipertiroidi grubu; 21 gün süre ile 250 mcg/kg/gün olmak üzere subkutan enjeksiyon yolu ile tiroksin (L-Tiroksin) hormonu verildi (n=6).
- II. Grup: 20.gün gebelik hipertiroidi grubu; 21 gün süre ile 250 mcg/kg/gün olmak üzere subkutan enjeksiyon yolu ile tiroksin (L-Tiroksin) hormonu verildi (n=6).

Yirmi birinci günün sonunda, tüm hayvanların kafeslerine uygun sayıda Sprague Dawley erkek sıçan bırakıldı. Vajinal smear yöntemi ile mikroskopik olarak spermatozoon tespit edilen dişi hayvanlar gebeliğin sıfırıncı gününde (0. gün) kabul edilerek gebelik takibi

başlatıldı. Kontrol grubunda; gebelik süresince hiçbir müdahale yapılmadan gebeliğin 5. ve 20. günlerinde hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildi.

Hipertiroidi grubunda; subkutan enjeksiyon yoluyla tiroksin (L-tiroksin) hormonu gün aşırı verilmeye devam edildi. Gebeliğin 5. günü ve 20. günlerinde hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildi.

Gebelik Tespitinde Vajinal Smear Yöntemi

Günün 12 saat karanlık periyodunda yanlarına uygun sayıda erkek bırakılan dişi sıçanlardan günde 1 kez olmak üzere her sabah deneklerin vulva bölgesi yüzde (%) 70 etil alkolle (Merck, Almanya) silindikten sonra, steril tahta çubukların pamukla kaplanmış uç kısımları serum fizyoloji ile nemlendirildi ve vajina içerisinden, nazıkçe sürüntü alınıp, lam üzerine yayıldı. Yayma lamaların oda sıcaklığında kuruması beklendi. %1'lik Toluidin mavisi (Sigma-USA)'nde 2 dakika boyanan smear örnekleri, distile su ile yıkanıp oda sıcaklığında kurutularak ışık mikroskobu (Olympus BX51, Japan) altında incelendi. Spermatozoon varlığı tespit edilen sıçanlar gebeliğin 0. gününde kabul edilerek, gebelik takibi başlatıldı.

BIYOKİMYASAL ANALİZ İÇİN HAZIRLANMASI

Deney sonunda anestezi (ketamin ve xylazine) sağlandıktan sonra, doku örneklerinin alımından önce kardiak kan alınarak biyokimyasal değerlendirme için Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hormon Laboratuvarı'na gönderildi. IMMULITE 2000 XPi Overview Siemens cihazında Immunoassay yöntemiyle serbest T₄ ng/ml cinsinden, TSH değerleri mIU/ml cinsinden tayin edildi.

DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

Hipertiroidi ve kontrol gruplarında gebeliklerinin 5. ve 20.günlerini tamamlayan sıçanların tartımları yapıp, intraperitoneal (i.p.) yoldan 30 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) anestezi altında sakrifikasyonları yapıldı. Beşinci gün gruplarından tiroid, uterus; 20. gün gruplarından uterus ve plasenta örnekleri alınıp, %10 luk tamponlu nötral formaldehit fiksatifinde 48 saat süre ile tespit edildi. Dokuların ışık mikroskopik incelemeleri için işlemlendirilmeleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

İŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME

İşık mikroskopik incelemeler için uterus ve plasenta dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İşık Mikroskopi Laboratuvar'ında takip edildi. Bu amaçla uterus ve plasenta dokuları, %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde 48 saat süreyle fikse edildikten sonra bir gece akarsuda yıkanarak tespit maddesinden arındırıldı. Yıkanan dokular daha sonra artan alkol serilerinde geçirilerek (%70, %90 ve %96 da birer saat, %100 de üç saat) dokulardan su uzaklaştırıldı (dehidratasyon). Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 3 kez 15'er dakika toluolde (Sigma, 32249-2.5L) bırakıldı. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde (56 °C'deki etüvde) 1 saat tutuldu. Örnekler yumuşak parafinden alınarak yarım saat sıvı sert parafinde tutularak, parafin ortama gömüldü. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirik mikrotom kullanılarak 3 µm (mikrometre) kalınlığında kesitler alındı. Uterus ve plasenta dokularındaki histolojik yapı değişikliklerini incelemek amacıyla alınan kesitler, Hematoksilen+Eosin (H+E) ile boyandı. İşık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek, bulguların fotoğrafları çekildi.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

İmmünohistokimyasal İnceleme için gerekli işlemler ve mikroskopik inceleme Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İşık Mikroskopi Laboratuvar'ında Zeiss (Primo Star 10) işık mikroskobu altında fotoğraflandı. Görüntüler Kameram (Argenit, İstanbul) analiz programı kullanılarak incelendi.

SPARC İmmünohistokimyasal Boyama

İnceleme için her gruba ait uterus ve plasenta dokularından 3 µm kalınlığında kesilen kesitler Poly-L-lisine kaplı lamlara alındı. Deparafinizasyon işleminin ardından, azalan alkol serilerinde geçirilerek kesitler suya indirildi. Kesitler, takip işlemlerinden etkilenen antijenlerin açığa çıkarak immün boyamaya uygun hale gelmesi için pH 6.0 sitrat tampon çözeltisi (Thermo Sci, AP9003-500) ile antijen retrieval işlemi için 2 kez 5'er dakika boyunca en yüksek ayarda mikrodalga fırında kaynatıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra, pH 7.2-7.4 fosfat tampon solusyonu (PBS- BioShop, PBS404.100) ile 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada hidrofobik kalemle dokuların etrafı çevrildi. Endojen hidrojen peroksidazın kullanacağımız antikörlerle reaksiyona girmesini engellemek için %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂- Merck, 1.07209.1000) içinde kesitler 10 dk oda

sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Bloklama aşamasında antikoların, dokuda antijen retrieval işlemi sırasında açığa çıkan diğer proteinlere, özgül olmayan bağlanmalarını engellemek için kesitlere Ultra V Block (Thermo Sci, TA-015-UB) damlatılarak, kesitler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Blok solüsyonu aspirasyonla dokuların üstünden temizlendikten sonra yıkanmadan nemli hazneye yerleştirilen kesitlere 1/50 oranında seyreltilmiş SPARC primer antikor (Santa Cruz- SC25574) damlatıldı ve gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Kesitler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor solüsyonu (Thermo Sci, TP-060-BN) damlatıldı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Üç kez 5'er dakika PBS'le yıkanan kesitlere streptavidin peroksidaz solüsyonu (Thermo Sci, TS-060-HR) uygulandı. Kesitler 3 kez 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra kesitlerden bir tanesi AEC kromojen solüsyonuna tabi tutuldu. Mikroskop altında boyanma için optimum süreye karar verildikten sonra bütün kesitler aynı süre AEC kromojeni ile inkübe edildi. Uterus ve plasenta dokuları için 3 dk tespit edilen optimum inkübasyon süresiydi. Kesitler distile su içine konarak AEC kromojen reaksiyonuna son verildi. Zıt boyama için kesitler 2 dakika Weigert demirli hematoksilende bekletilerek boyama işlemi tamamlandı. Oda sıcaklığında suyu çekilen kesitler aköz kapatma solüsyonu ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (Olympus BX21 ve CX31, Japan) değerlendirmeye alındı.

VEGF İmmünohistokimyasal Boyama

Uterus ve plasenta dokularından 3 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işleminin ardından, azalan alkol serilerinde geçirilerek kesitler suya indirildi. Kesitler, antijen retrieval solüsyonu, pH 6.0 sitrat tampon çözeltisinde (Thermo Sci, AP9003-500) 2 kez 5'er dakika boyunca en yüksek ayarda mikrodalga fırında kaynatıldı. Soğumaya bırakıldıktan sonra, PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada hidrofobik kalemle dokuların etrafı çevrildi. Kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (Merck, 1.07209.1000) damlatılarak, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Bloklama aşamasında kesitlere Ultra V Block (Thermo Sci, TA-015-UB) damlatılarak, kesitler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Aspirasyonla dokuların üstünden blok solüsyonu temizlendikten sonra, yıkanmadan nemli hazneye yerleştirilen kesitlere 1/300 oranında seyreltilmiş VEGF primer antikor (Abcam- ab46154) damlatıldı ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor solüsyonu (biotinylated second antibody Invitrogen UK) damlatıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üç kez 5'er dakika PBS'le yıkanan kesitlere streptavidin peroksidaz

solüsyonu (Thermo Sci, TS-060-HR) uygulandı. Kesitler 3 kez 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra kesitlerden bir tanesi AEC kromojen solüsyonuna tabi tutuldu. Mikroskop altında boyanma için optimum süreye karar verildikten sonra bütün kesitler aynı süre AEC kromojeni ile inkübe edildi. Uterus ve plasenta dokularında VEGF antikoru için 3 dk, tespit edilen optimum inkübasyon süresiydi. Kesitler distile su içine konarak AEC kromojen reaksiyonuna son verildi. Zıt boyama için dokular 2 dakika Weigert demirli hematoksilende bekletilerek boyama işlemi tamamlandı. Oda sıcaklığında suyu çekilen kesitler aköz kapatma solüsyonu ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda (Olympus BX21, Japan) değerlendirmeye alındı.

TGFβ-1 İmmünohistokimyasal Boyama

Uterus ve plasenta dokularından 3 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işleminin ardından, azalan alkol serilerinde geçirilerek kesitler suya indirildi. Kesitler, antijen retrieval solüsyonu, pH 6.0 sitrat tampon çözeltisinde (Thermo Sci, AP9003-500) 2 kez 5'er dakika boyunca en yüksek ayarda mikrodalga fırında kaynatıldı. Soğumaya bırakıldıktan sonra, PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada hidrofobik kalemle dokuların etrafı çevrildi. Kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (Merck, 1.07209.1000) damlatılarak, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Bloklama aşamasında kesitlere Ultra V Block (Thermo Sci, TA-015-UB) damlatılarak, kesitler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Aspirasyonla dokuların üstünden blok solüsyonu temizlendikten sonra, yıkanmadan nemli hazneye yerleştirilen kesitlere 1/300 oranında seyreltilmiş TGFβ-1 primer antikor (Abcam- ab25121) damlatıldı ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor solüsyonu (Thermo Sci, TP-060-BN) damlatıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üç kez 5'er dakika PBS'le yıkanan kesitlere streptavidin peroksidaz solüsyonu (Thermo Sci, TA-060-UB) uygulandı. Kesitler 3 kez 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra kesitlerden bir tanesi AEC kromojen solüsyonuna tabi tutuldu. Mikroskop altında boyanma için optimum süreye karar verildikten sonra bütün kesitler aynı süre AEC kromojeni ile inkübe edildi. Uterus ve plasenta dokularında TGFβ-1 antikoru için 3 dk, tespit edilen optimum inkübasyon süresiydi. Kesitler distile su içine konarak AEC kromojen reaksiyonuna son verildi. Zıt boyama için dokular 2 dakika Weigert demirli hematoksilende bekletilerek boyama işlemi tamamlandı. Oda sıcaklığında suyu çekilen kesitler aköz kapatma solüsyonu ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda (Olympus BX21, Japan) değerlendirmeye alındı.

WESTERN BLOT İNCELEME

Sakrifikasyon sonrasında alınan dokular serum fizyoloji ile temizlendikten sonra etiketlenerek -80°C’de saklandı. Western Blot (WB) işlemine başlamadan önce tartılarak dokulardan 100 mg alındı. Ependorf tüplere konulan dokulara şu sırayla işlem uygulandı:

Dokudan Protein İzolasyonu

1. Homojenizasyona başlamadan dokular -150°C’ye kondu.
2. 1.4 mm ve 3.2 mm çapında bilyeler tüplere kondu ve homojenizatörde en yüksek hızda 3 dk parçalandı. Parçalanmayan örnekler tekrar -150°C’de 10-15 dk bekletilerek RIPA solüsyonu eklendi ve homojenizatörde parçalama işlemi tekrar edildi. Dokuların parçalanmaması durumunda işlem birkaç kez tekrar edildi.
3. Parçalanmış dokular oda sıcaklığında karıştırıcıda 20 dk bırakıldı.
4. 3000 rpm’de 40 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası fazlara ayrılan örneklerden ortadaki berrak faz yeni tüplere aktarıldı.
6. Nanodrop (NanoQ-Optizen) ile protein konsantrasyonları ölçüldü.

Protein Örneği Hazırlama ve Yükleme

1. Her bir örnek için uygun hacimde protein, distile su, Tampon Çözeltilisi (NuPAGE LDS Sample Buffer- NP0008) ve protein indirgeme solüsyonu(NuPAGE Reducing Agent- NP0004) karıştırıldı.
2. Tüpler proteinlerin indirgenmesi için 70°C’de 10dk inkübe edildi ve hemen -20°C’ye kaldırıldı.
3. WB tanklarına uygun SDS-PAGE jeller yerleştirildi (Novex- BG04120B0X). Yürütme tamponu dökülerek, -20°C’de muhafaza edilen protein örnekleri kuyucuk başına protein miktarı 50 ug olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. Yükleme Cetveli olarak Magic Marker (Novex-LC5602) kullanıldı.
4. 40 dk 70 V’da yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Blotlama, Boyama ve Görüntüleme

1. Yürütme işlemi sonrası blotlama kiti iBlot Gel Transfer Stacks, Novex, IB301001) kullanılarak jeldeki protein örnekleri nitroselülöz membran üzerine aktarıldı.
2. Membran distile sudan geçirildikten sonra bloklama solüsyonunda (Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System, Novex, WB7106) karıştırıcı üzerinde 1 saat bırakıldı.
3. Yıkama Solüsyonunda (Western Breeze CIS, Novex, WB7106) 3 kez 5’er dk yıkandıktan sonra, distile sudan geçirildi. Bloklama solüsyonu içinde seyreltilen primer antikor (1:100

oranında anti-SPARC, Santa Cruz (SC25574) ; 1:1000 oranında anti-VEGF, Abcam (ab46154); 1:1000 oranında anti- β -Actin, Bioss) içinde gece boyunca +4°C'de karıştırıcı üzerinde bırakıldı.

4. Membranlar 3 kez 5'er dk yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra 2 kez 5'er dk distile su ile yıkandı.
5. Sekonder Antikor solüsyonunda (Western Breeze CIS, Novex, WB7106) membranlar çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat süreyle bırakıldı.
6. 3 kez 5'er dk yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra 2 kez 5'er dk distile su ile yıkandı.
7. Görüntüleme için kemilüminosans solüsyonu (Western Breeze CIS, Novex, WB7106) ile 5 dk muamale edilen membranlar, BioRad Chemi Doc MP Imaging System ile görüntülendi.

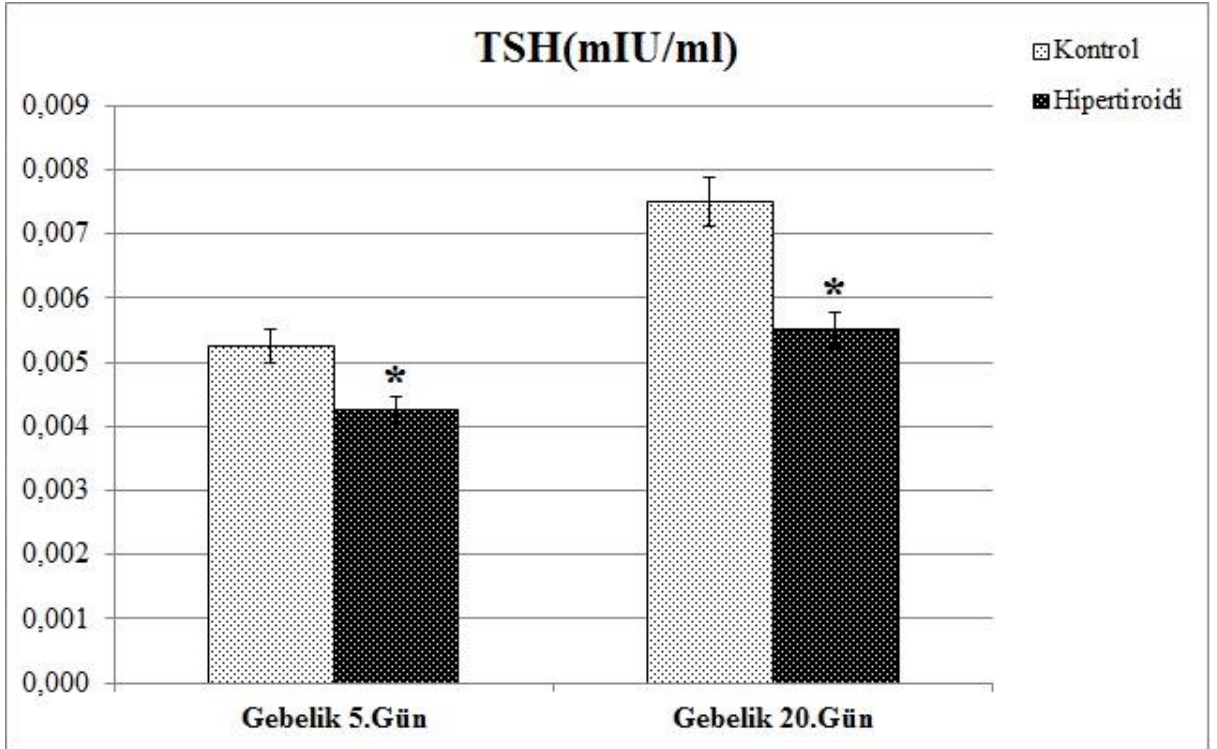
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için, SPSS 12.0 paket program kullanılarak varyans analizleri yapıldı. Gruplar arası ve içindeki farklılıklar ANOVA ile belirlendi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Tüm veriler ortalama (\pm) standart sapma (S.S) olarak ifade edildi. Uterusdaki SPARC, VEGF ve TGF β -1 immünohistokimyasal aktivitenin değerlendirilmesi, endometrium epitel hücrelerinde 100 hücrede pozitif boyanan hücreler sayılarak yapıldı. Plasentadaki SPARC, VEGF ve TGF β -1 immünoreaktivite değerlendirilmesi bazal plakta mm^2 'de pozitif hücre sayılarak, labirent tabakasında ise semikantitatif değerlendirme ile aşağıdaki skorlama kullanılarak yapıldı; 0=reaksiyon yok; 1=zayıf reaksiyon (hücre reaktivitesi %25'in altındaysa), 2=orta reaksiyon (%25-50 arasındaysa); 3=kuvvetli reaksiyon (%50-75 arasındaysa) ve 4=çok kuvvetli reaksiyon (%75'den fazlaysa).

BULGULAR

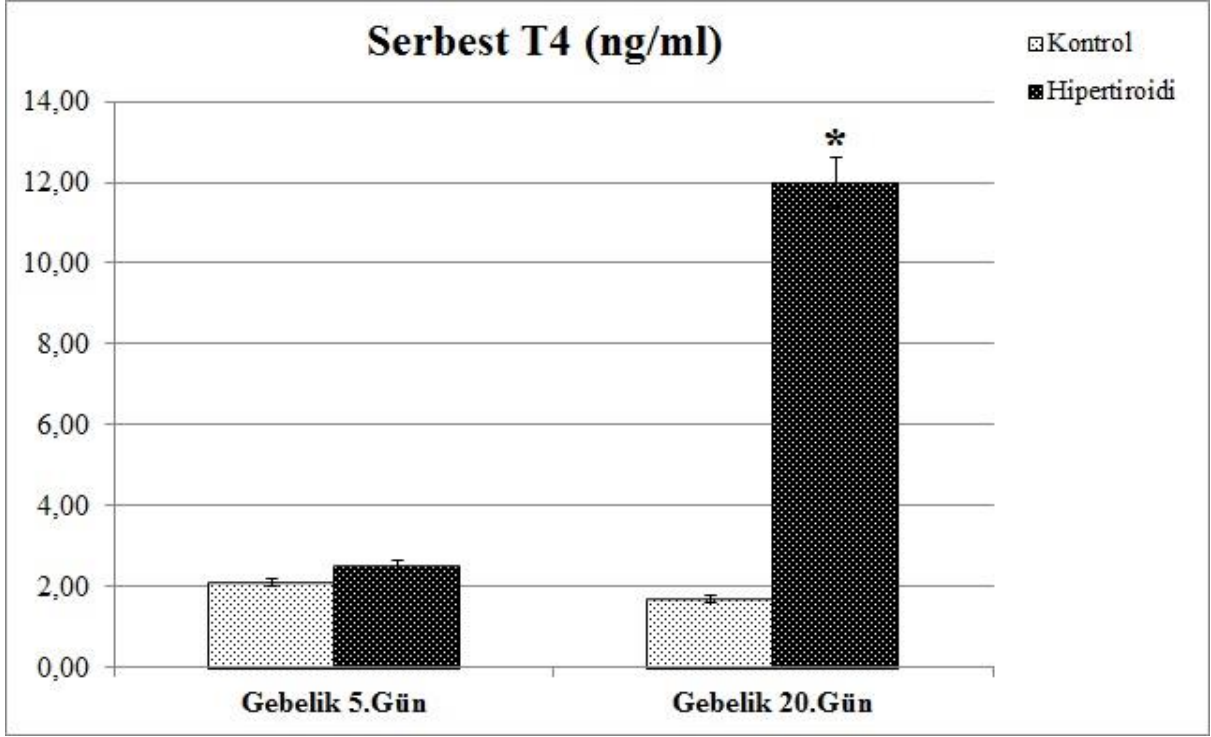
Deney Sonrası Plazma T₄ ve TSH Bulguları

Deney sonlandırıldıktan sonra toplanan kardiyak kanın biyokimyasal incelemesinde TSH değerleri hipertiroidi grubunda hem gebelik 5. gün hem de gebelik 20. günde, kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde azalma göstermiştir ($P<0.05$; Şekil 8). Serbest T₄ değerleri ise hipertiroidi gebelik 20.gün grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmıştır ($P<0.05$; Şekil 9).



* $P<0.05$; Kontrole göre anlamlı olarak düşmüştür.

Şekil 8. Hipertiroidi ve kontrol gruplarında TSH bulguları



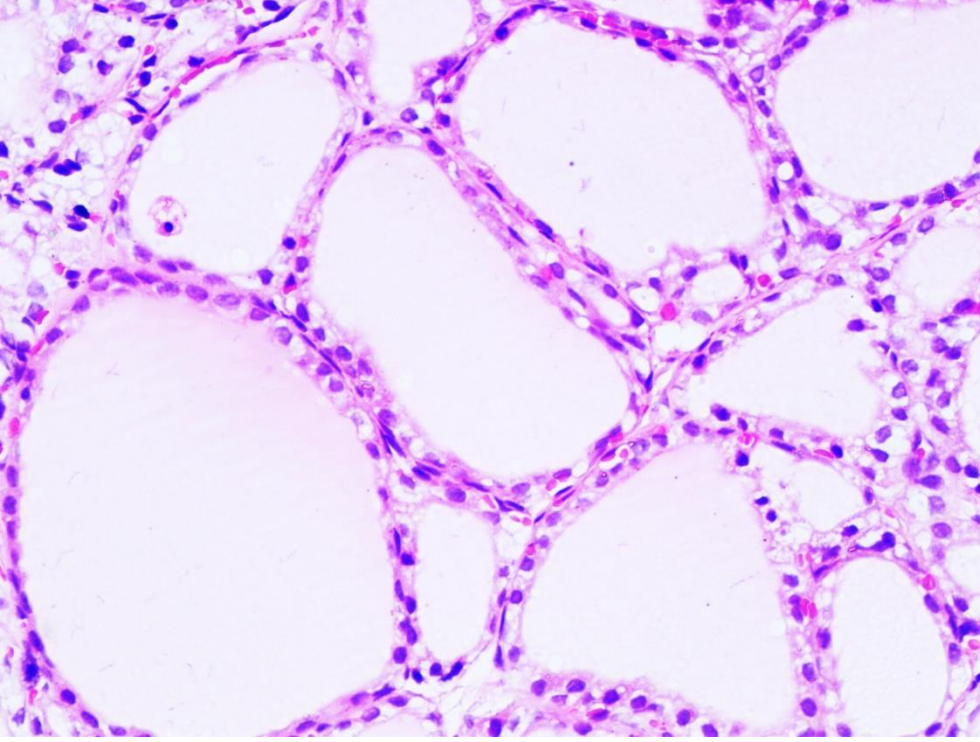
*P<0.05; Kontrole göre anlamlı olarak yükselmiştir.

Şekil 9. Hipertiroidi ve kontrol gruplarında serbest T₄ bulguları

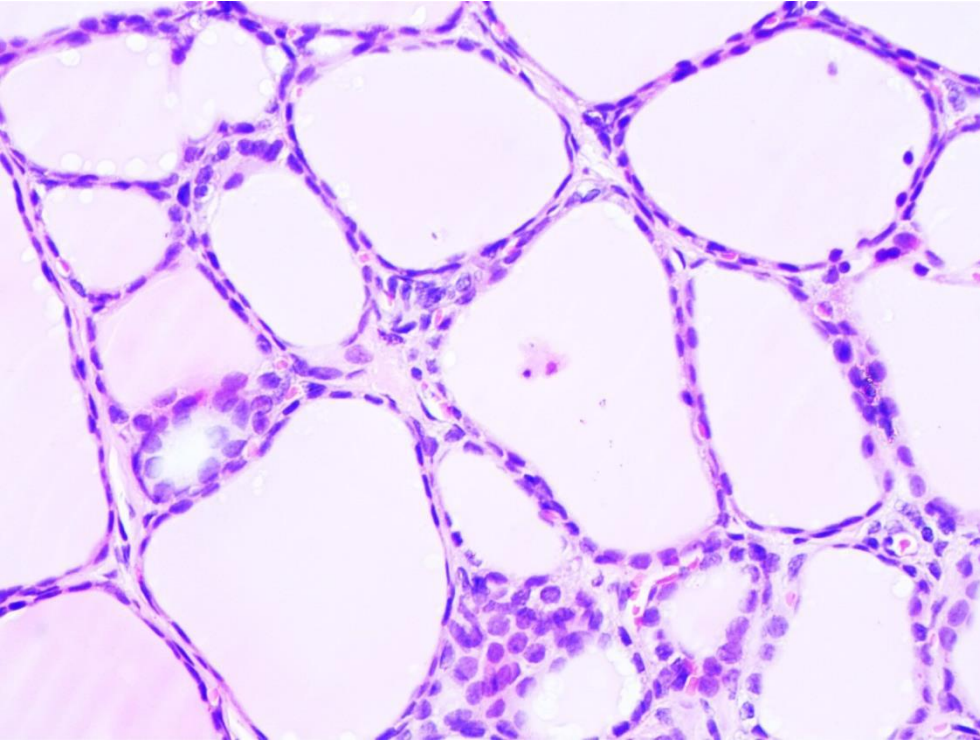
HİSTOLOJİK BULGULAR

Işık Mikroskopik Bulgular

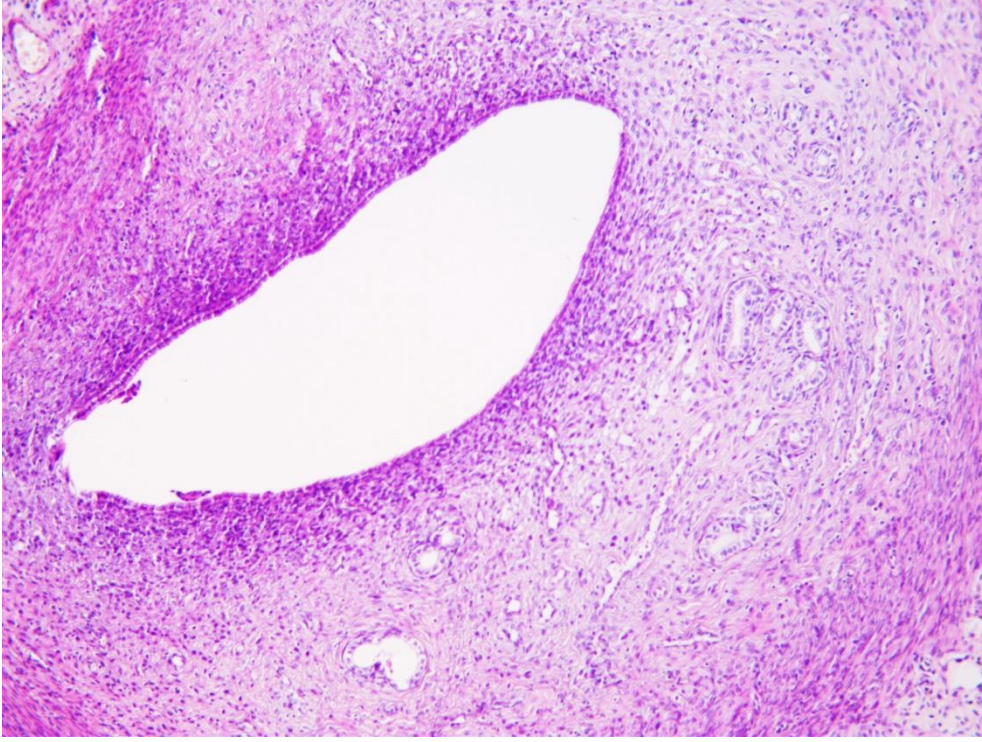
Tiroid, uterus, plasenta ve dokularının ışık mikroskopik incelemelerinde de histolojik değişimin gösterilmesi için H+E boyası yapıldı (Şekil 10-17). Tiroid dokularında kontrol grubunda sağlıklı ve normal bir tiroid doku görüntüsü izlenirken, hipertiroid grubunda doku örneklerinde kolloid ile dolu ve yassı salgı epitelleri ile sarılı folikül yapısı izlenmiştir (Şekil 10,11). Uterus dokusuna ait histopatolojik değerlendirmelerde, kontrol grubunda hem 5 hem de 20. gün normal endometriyum dokusu izlenirken, hipertiroidi grubu uteruslarında epitel dökülmeleri, aşırı nekrotik hücre kümeleri izlenmiştir.



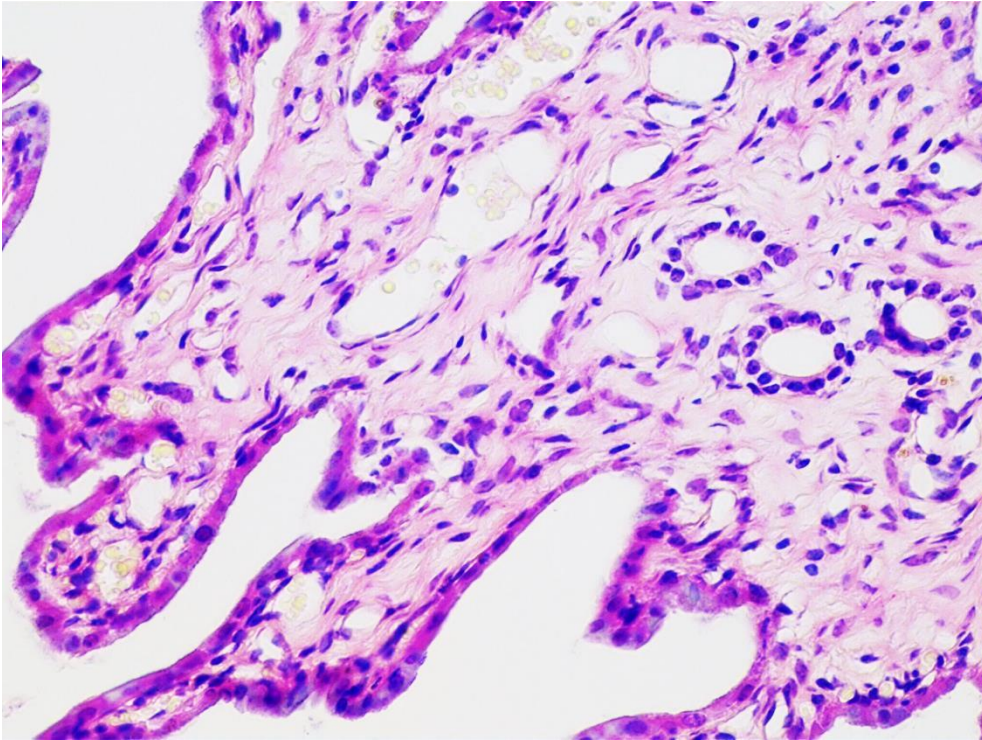
Şekil 10. Kontrol grubu gebelik 5. gün tiroid bezi H+E boyaması, X400.



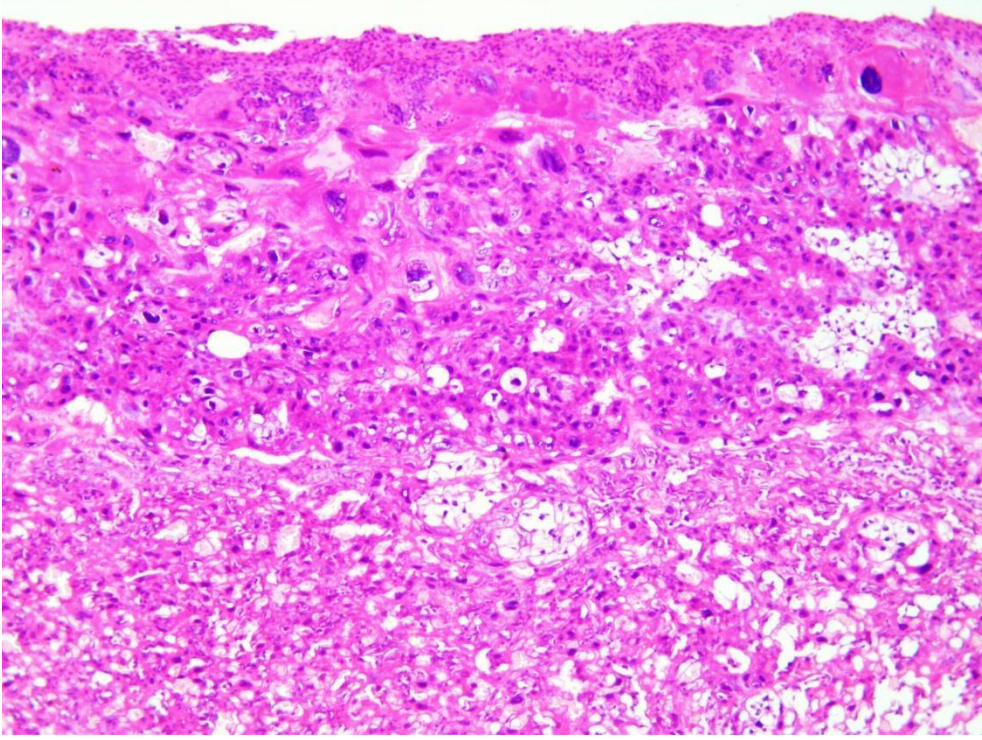
Şekil 11. Hipertiroid grubu gebelik 5. gün tiroid bezi H+E boyaması, X400.



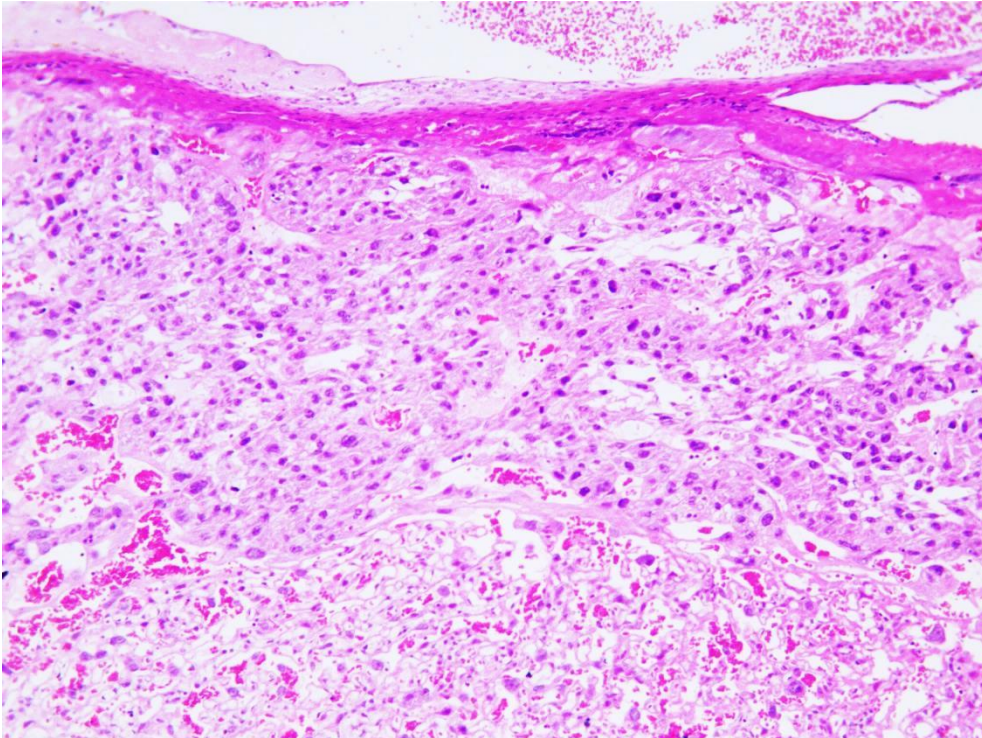
Şekil 12. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus dokusu H+E boyaması, X100.



Şekil 13. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterus dokusu H+E boyaması, X400.



Şekil 14. Kontrol grubu plasenta H+E boyaması, X100.



Şekil 15. Hipertiroid grubu plasenta H+E boyaması, X100.

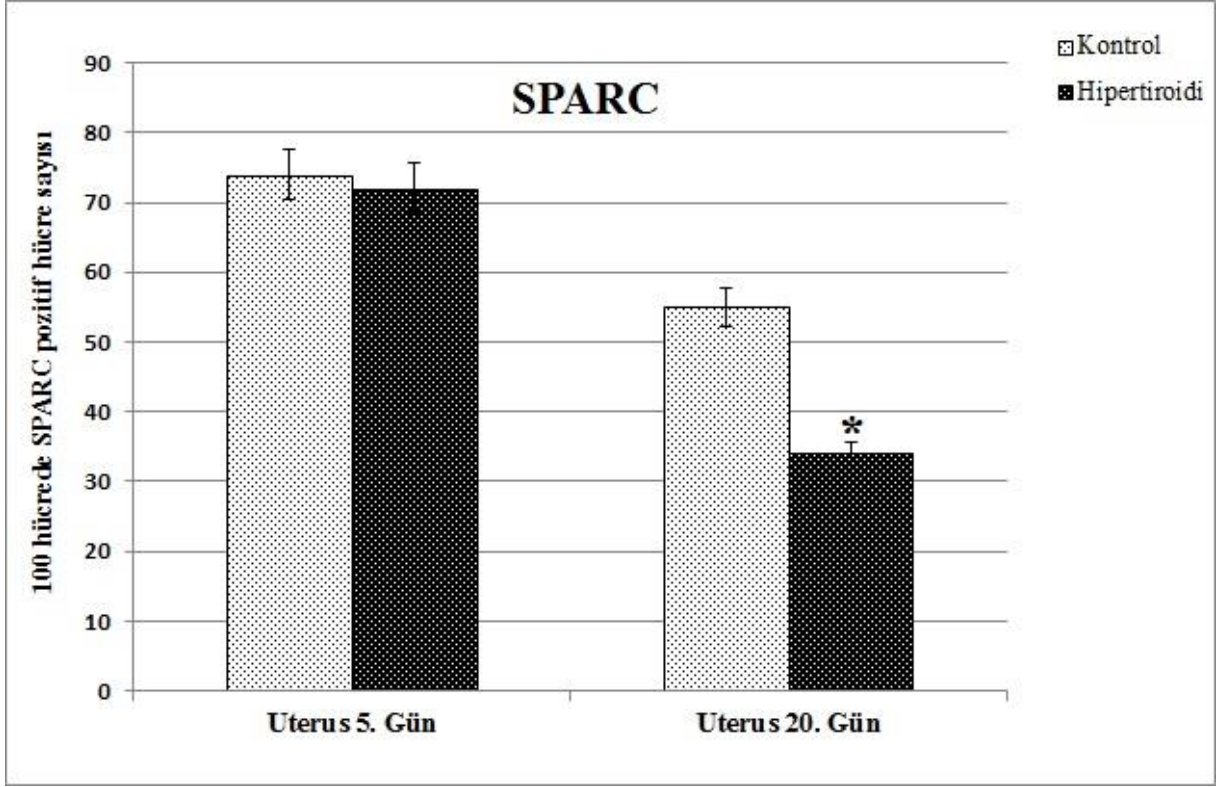
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

SPARC İmmünohistokimyasal Bulguları

Kontrol ve hipertiroidi grubu sıçanlarda, gebeliğin 5. ve 20. günlerinde alınan uterus ve plasenta dokularının immunohistokimyasal SPARC boyamasına ait sonuçların istatistiksel değerlendirmesi Şekil 16'de ve Tablo 1'de sırasıyla verilmiştir.

Uterus dokuları SPARC immünoreaktivitesi açısından incelendiğinde, özellikle endometriyum epiteli, endometriyum bezleri ve endometriyum desidua hücrelerinin sitoplazmasında immün pozitif boyama görüldü. İstatiksel analizde endometriyum epitel hücrelerindeki ve bez epitelindeki pozitif boyanma değerlendirmeye alındı. 5. gün uterus dokularında yapılan boyama sonucu, SPARC'ın hiperitiroidi grubu immünoreaktivitesinde azalma görülürken, istatistiksel olarak önem kaydetmemiştir ($P>0.05$; Şekil 19,30). Fakat 20. gün hiperitiroidi grubunda uterus endometriyum epitel dokularında gözlenen SPARC immünoreaktivitesindeki azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$; Şekil 22,32).

Plasentanın bazal plak ve labirent katmanları histolojik ve fonksiyonel olarak farklı yapı gösterdiklerinden dolayı, her iki bölge için istatistiksel değerlendirme ayrı yapıldı. Labirent alanında semikantitatif skorlama yapılırken, bazal plak kısmında mm^2 'de pozitif hücre sayımı yapıldı. Plasenta bazal plağında hiperitroid grubunda görülen SPARC boyanmasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0.05$; Şekil 25,35). Fakat labirent bölgesinde immün pozitif hücre yoğunluğundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$; Şekil 26,36).

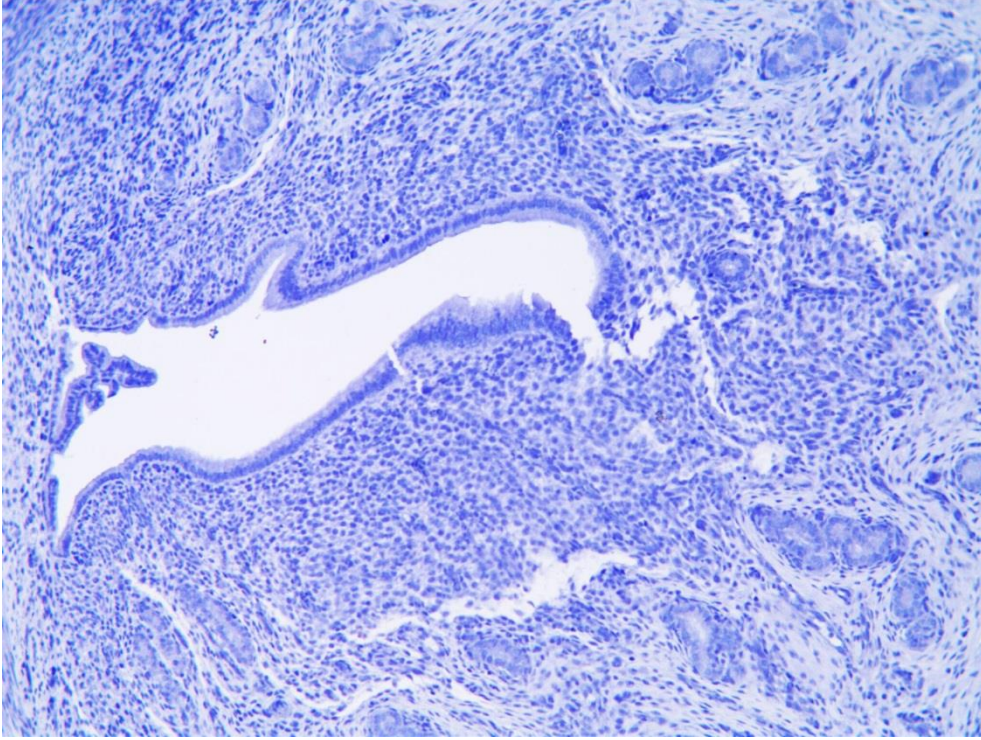


*P<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 16. Kontrol ve hipertiroidi grupları uterus dokusunda anti-SPARC pozitif hücre dağılımı

Tablo 1. Kontrol ve hipertiroidi grupları plasenta dokusunda anti-SPARC pozitif hücre dağılımı

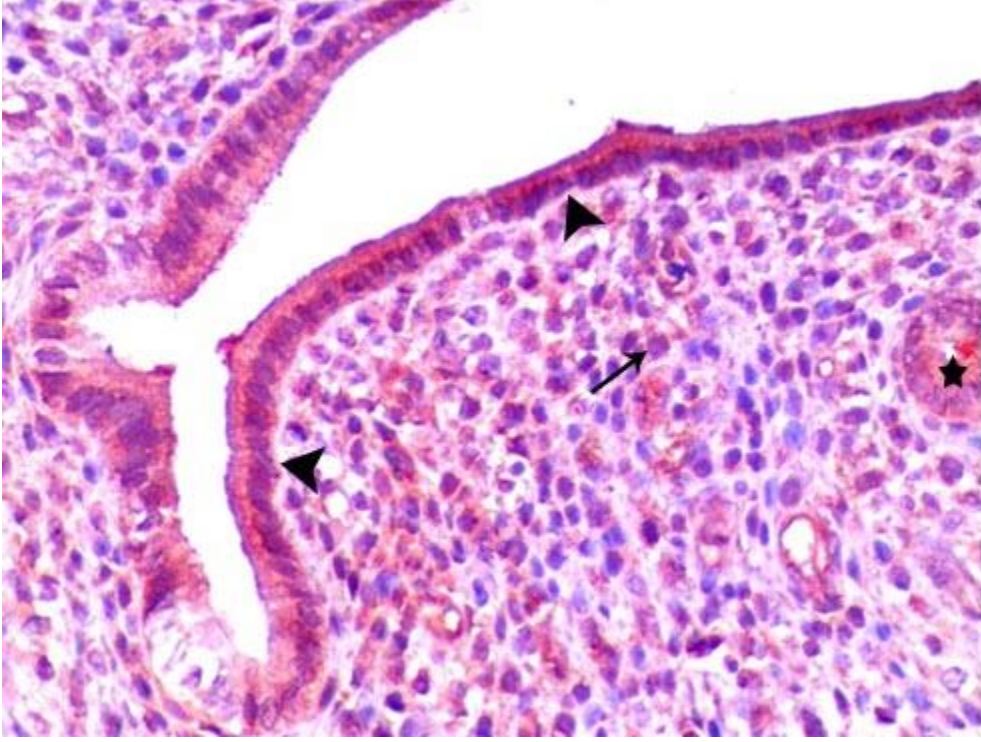
	Kontrol	Hipertiroidi	P değeri
Plasenta Bazal Plak (mm ² 'de hücre sayısı)	17.5±4.3	18±6.8	P> 0.05
Plasenta Labirent Katmanı (Semikantitatif değerlendirme)	1.64±0.2	2.47±0.4	P<0.05



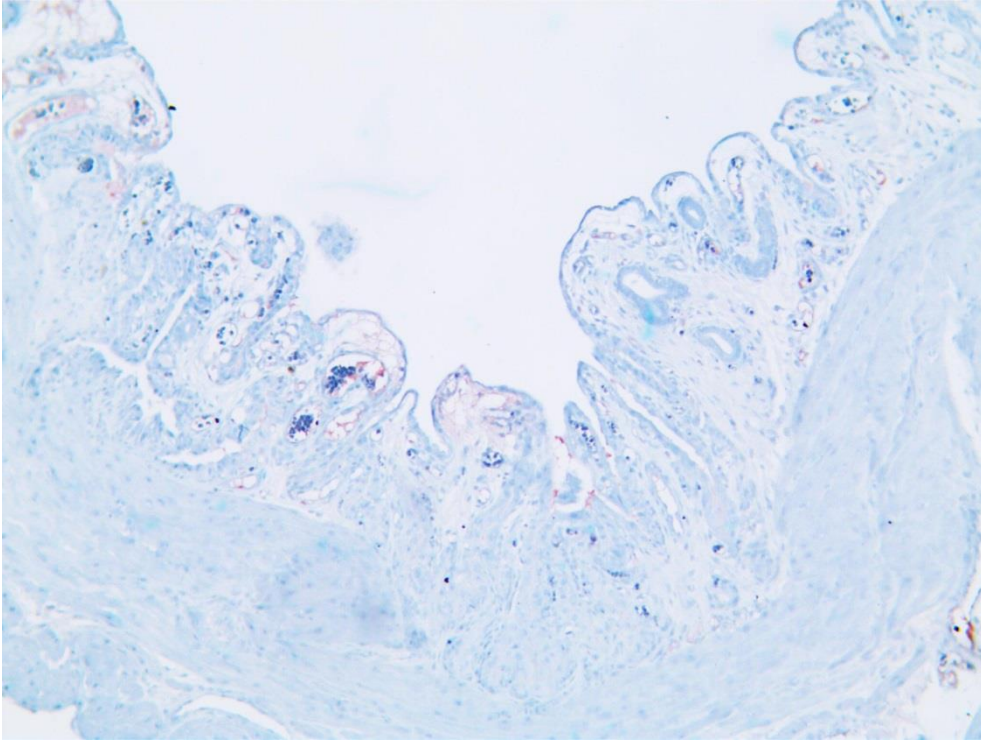
Şekil 17. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus endometriyum dokusunda anti-SPARC negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



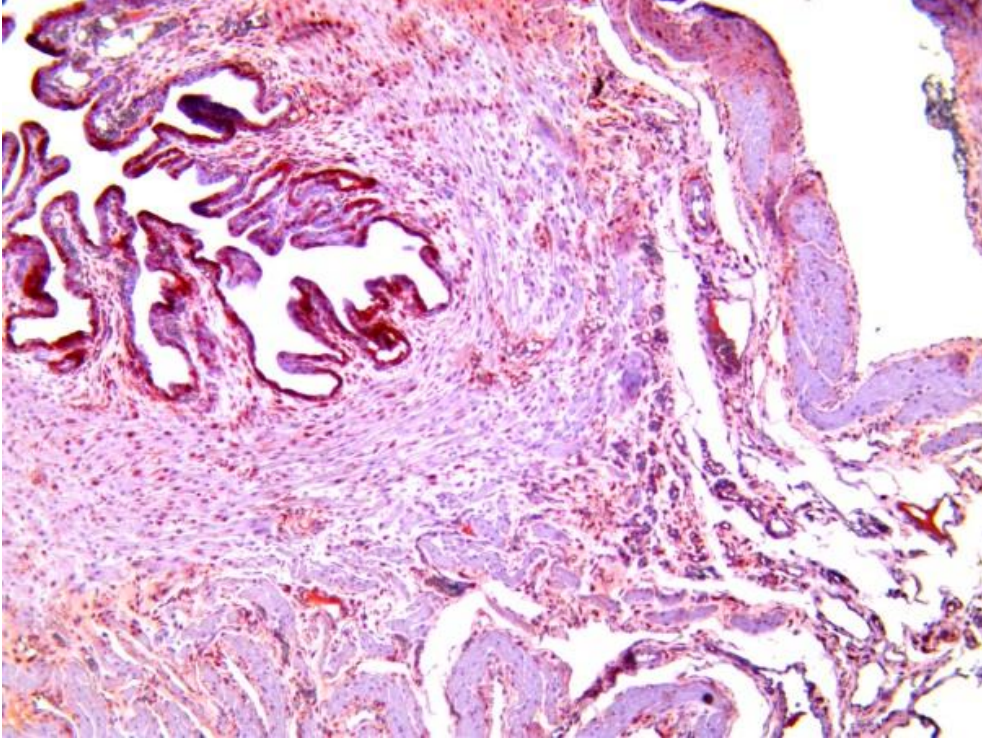
Şekil 18. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X40.



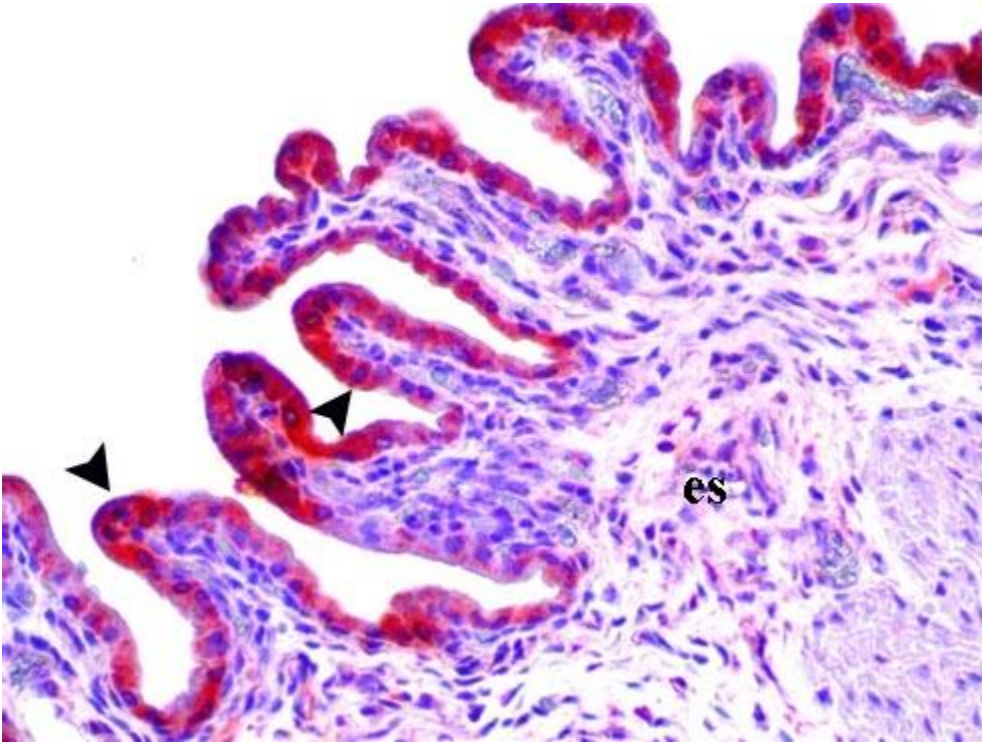
Şekil 19. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- *: endometriyum bezi, ok başı: endometriyum epiteli, ince ok: desidua hücresi), X400.



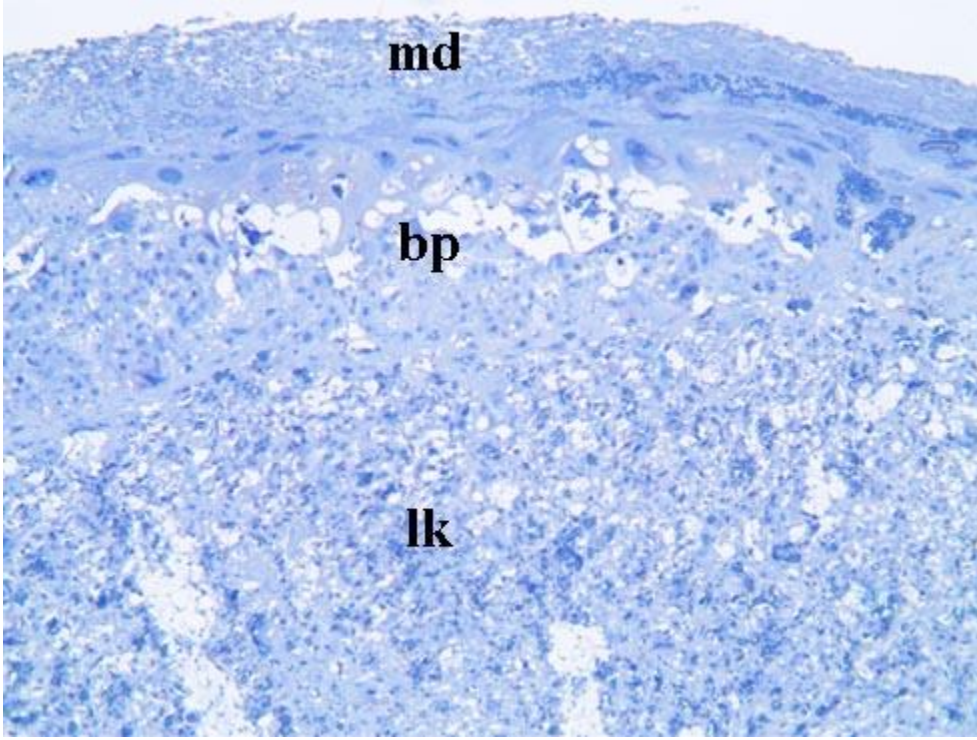
Şekil 20. Kontrol grubu gebelik 20. Gün uterus endometriyum dokusunda anti-SPARC negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



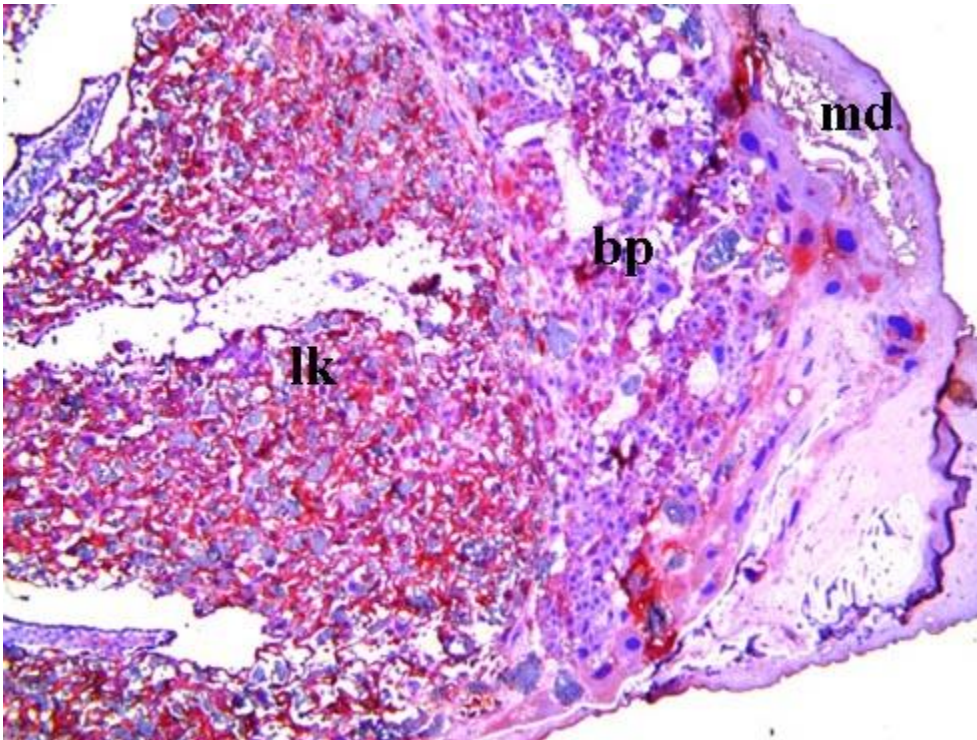
Şekil 21. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



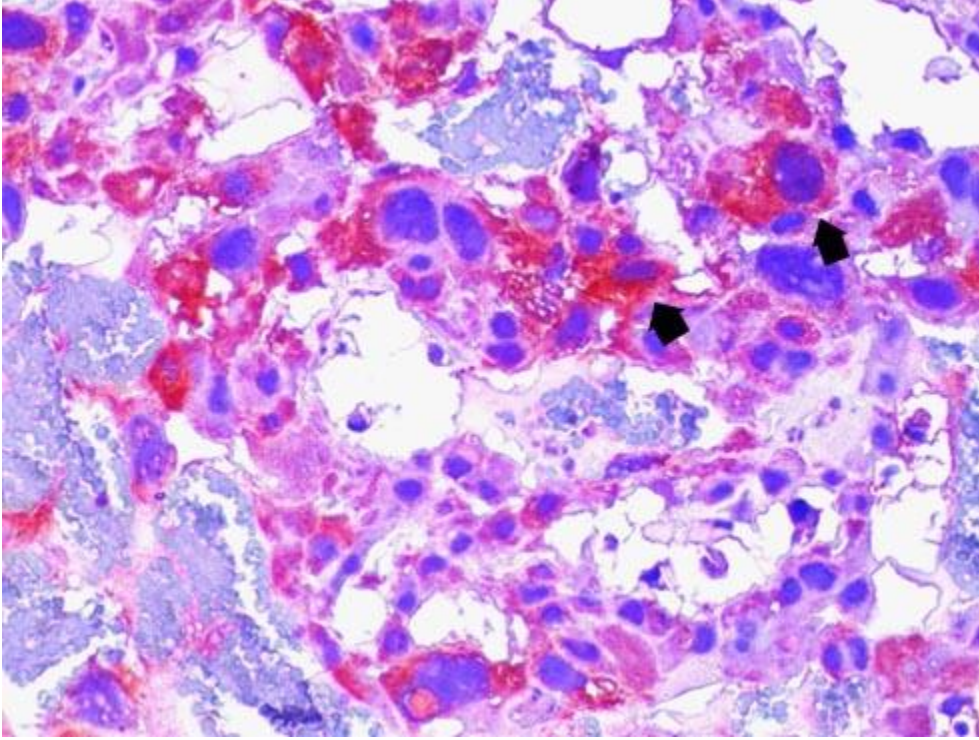
Şekil 22. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- es: endometriyum stroması, ok başı: endometriyum epiteli), X400.



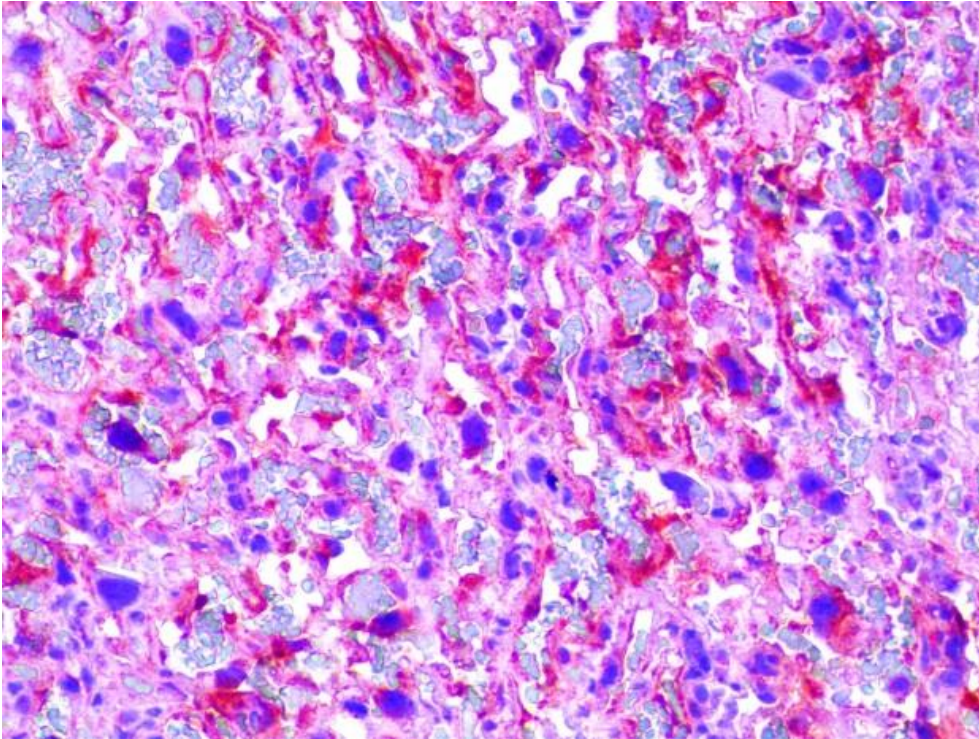
Şekil 23. Kontrol grubu gebelik 20. gün plasenta dokusunda anti-SPARC negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



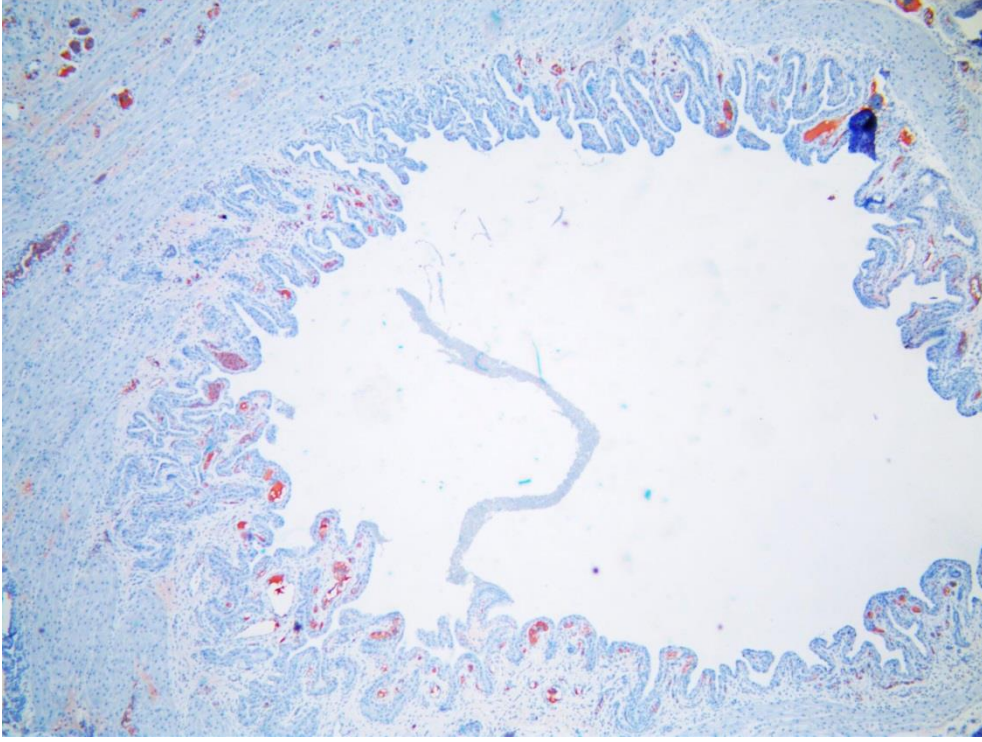
Şekil 24. Kontrol grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



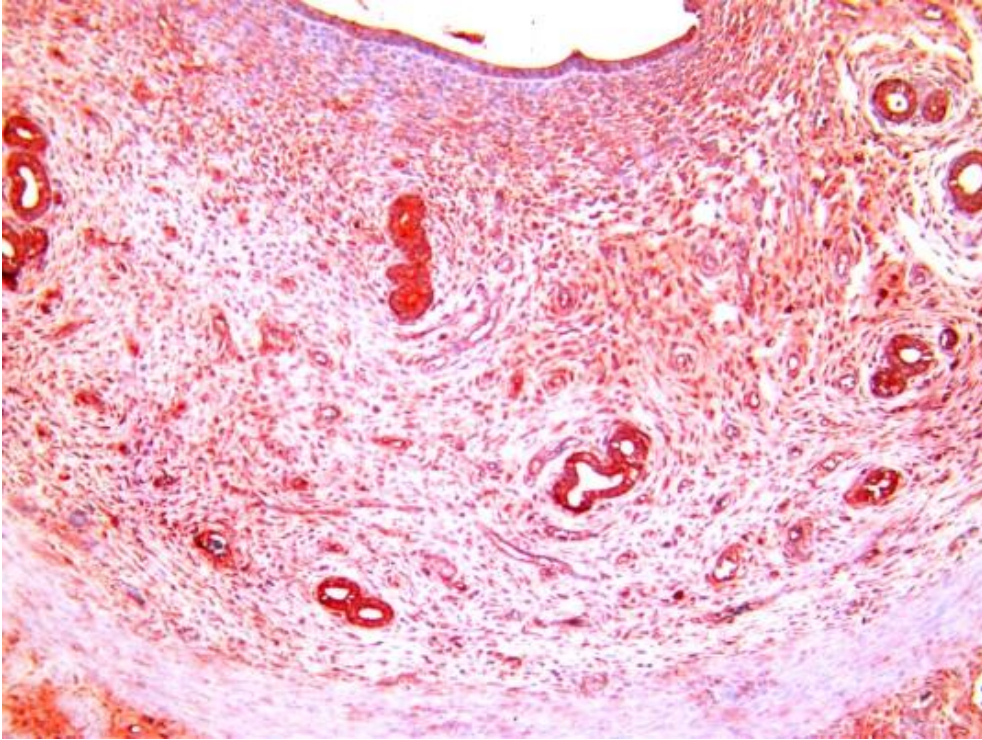
Şekil 25. Kontrol grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- kalın ok: spongiyotrofoblast hücresi), X400.



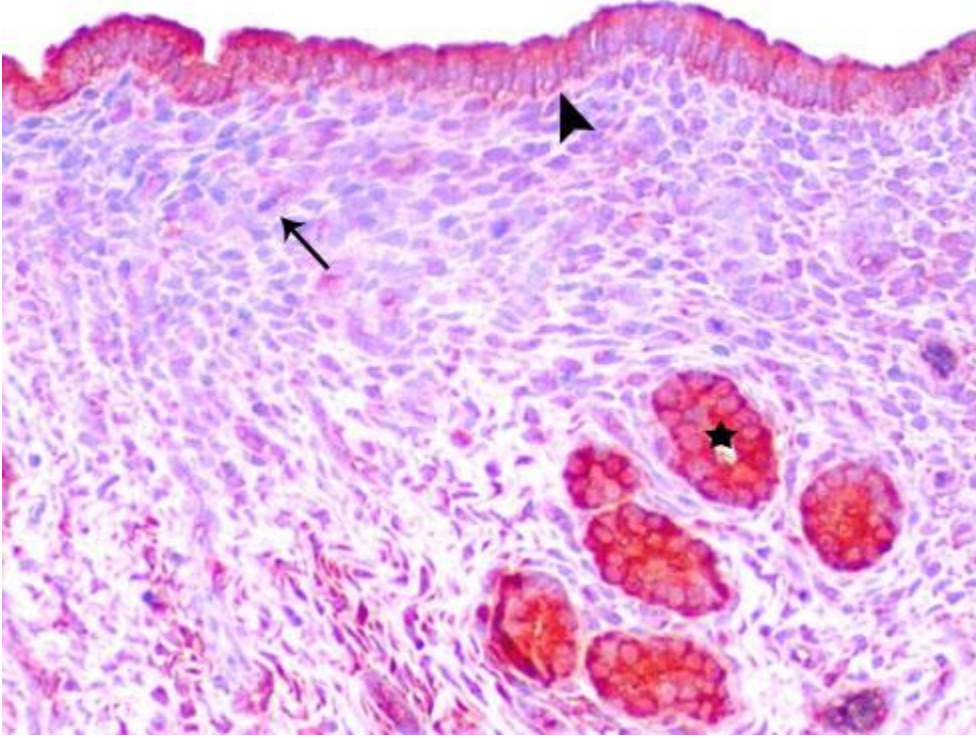
Şekil 26. Kontrol grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X400.



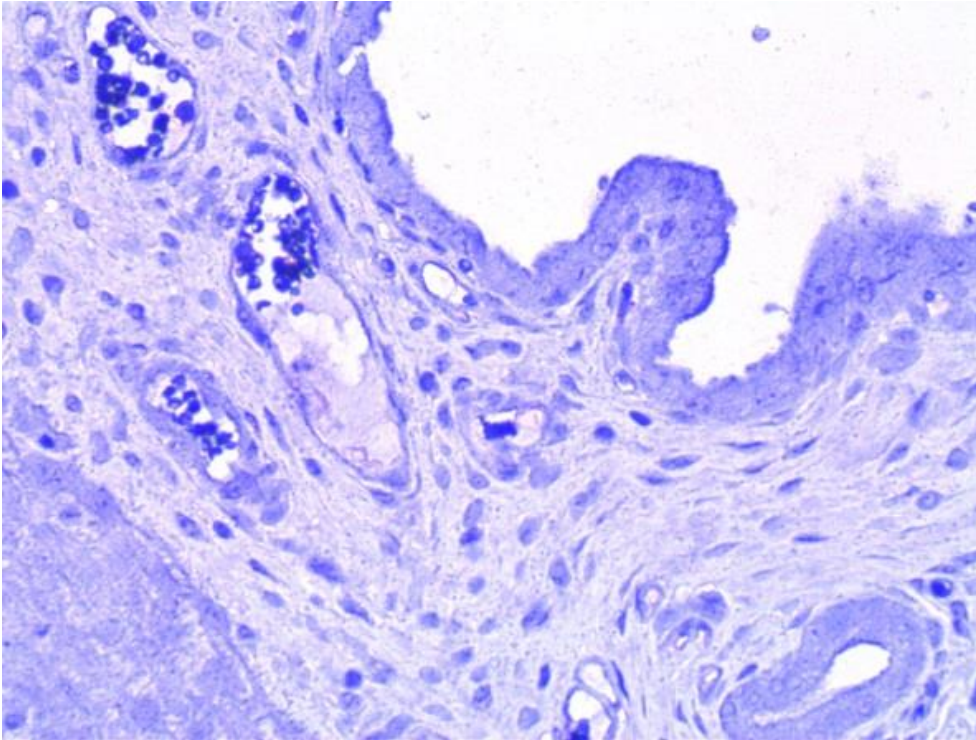
Şekil 27. Hiperitiroidi grubu 5.gün uterus endometrium dokusunda anti-SPARC negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



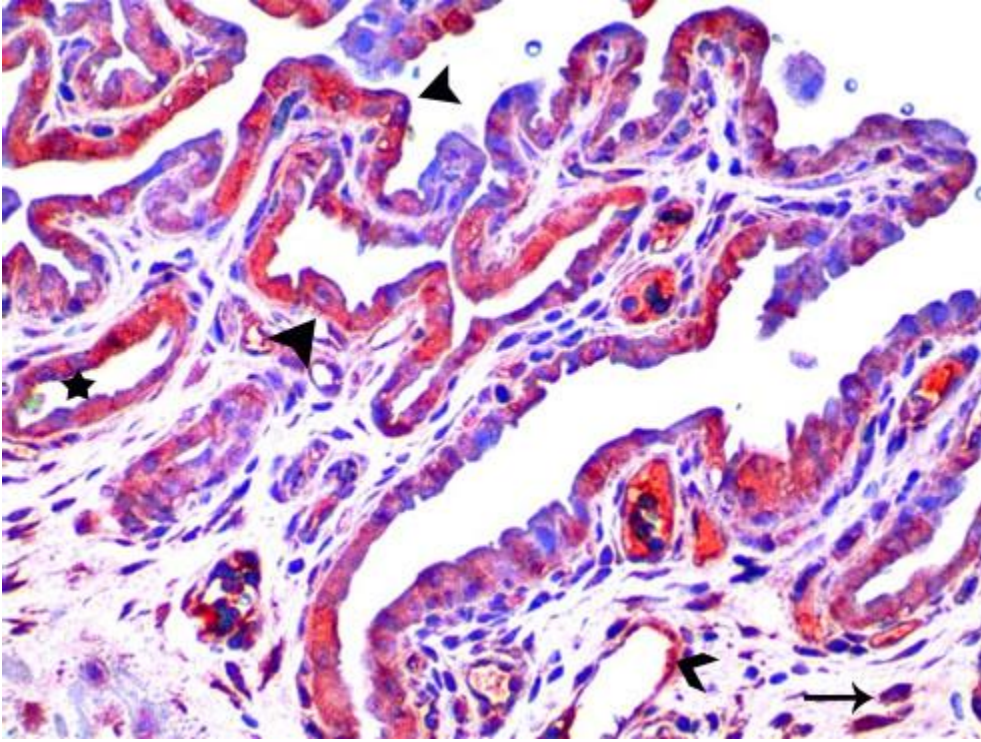
Şekil 28. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometrium epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100



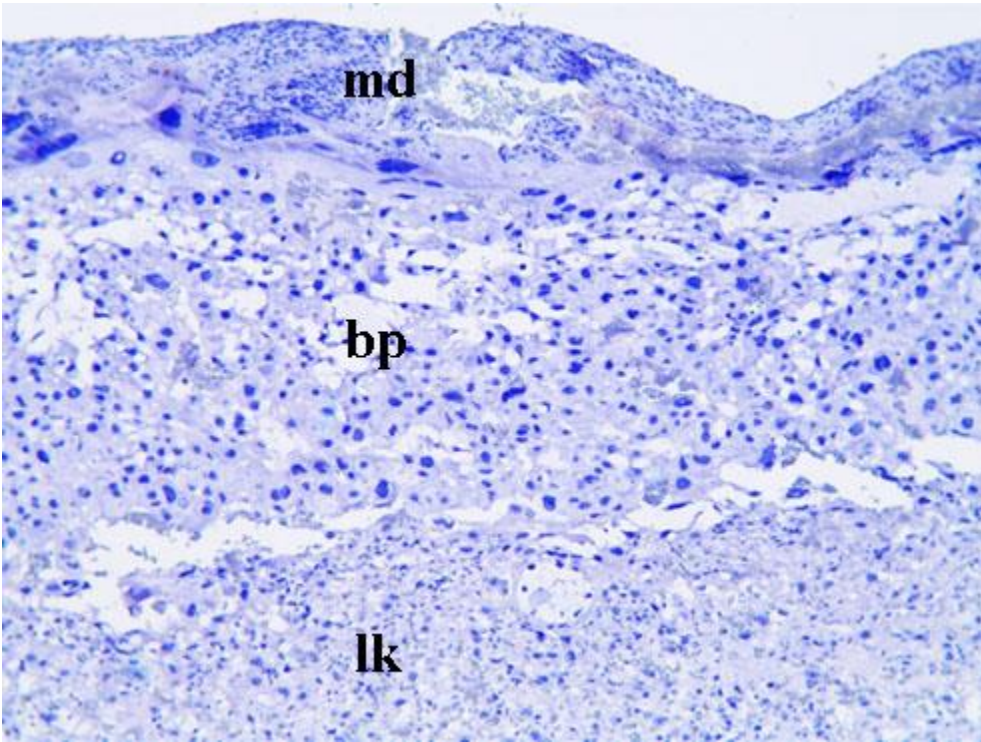
Şekil 30. Hiperitiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- *: endometriyum bezi, ok başı: endometriyum epiteli, ince ok: desidua hücresi), X400.



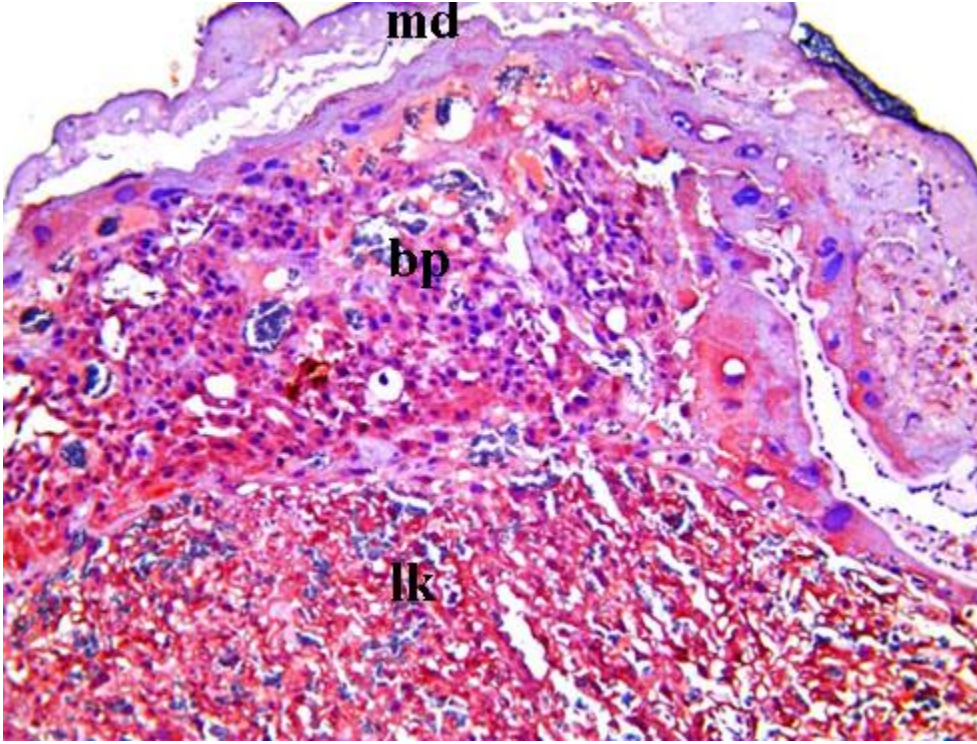
Şekil 31. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum dokusunda anti-SPARC negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) X400.



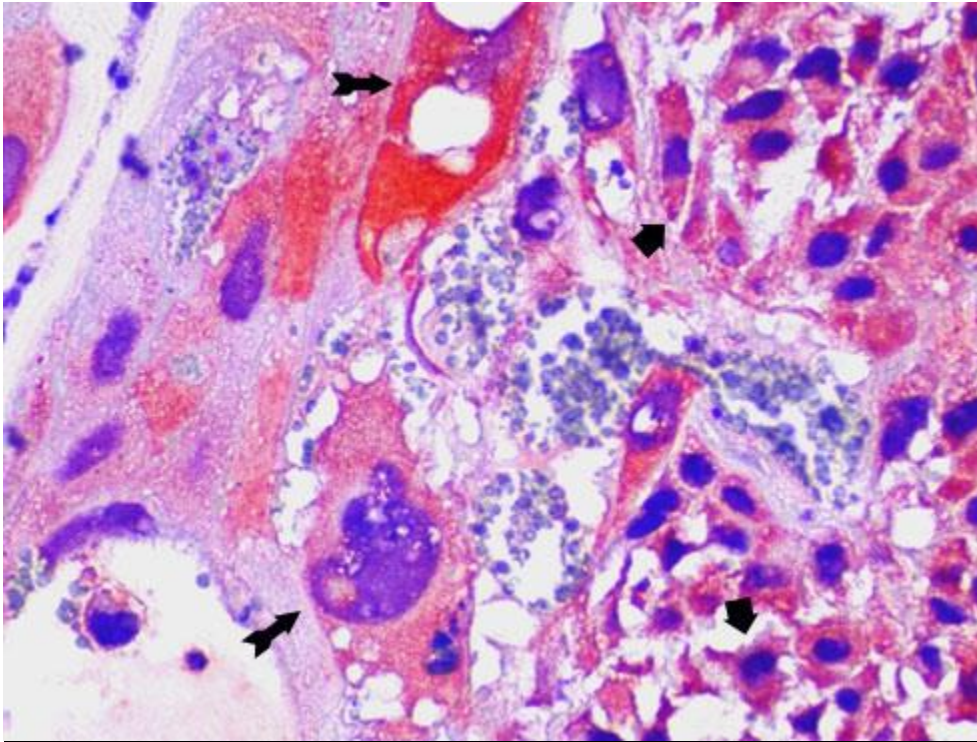
Şekil 32. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- *: endometriyum bezi, ok başı: endometriyum epiteli, yarım ok başı: endotel hücre, ince ok: desidua hücresi), X400.



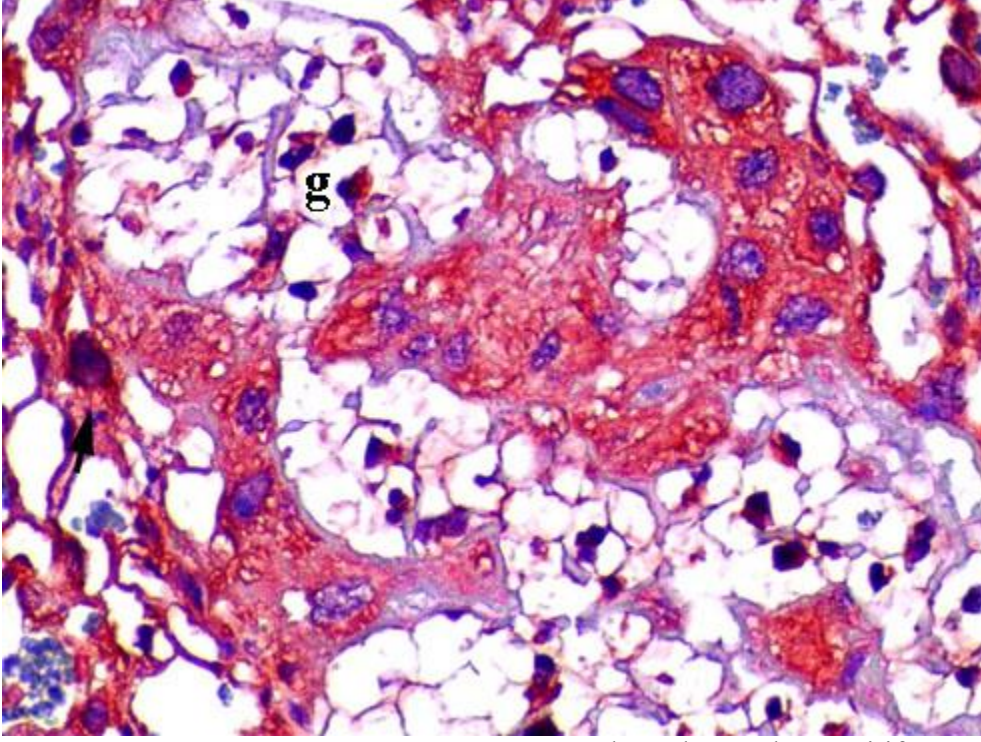
Şekil 33. Hipertiroidi grubu 20.gün plasenta dokusunda anti-SPARC negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



Şekil 34. Hipertiroidi grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



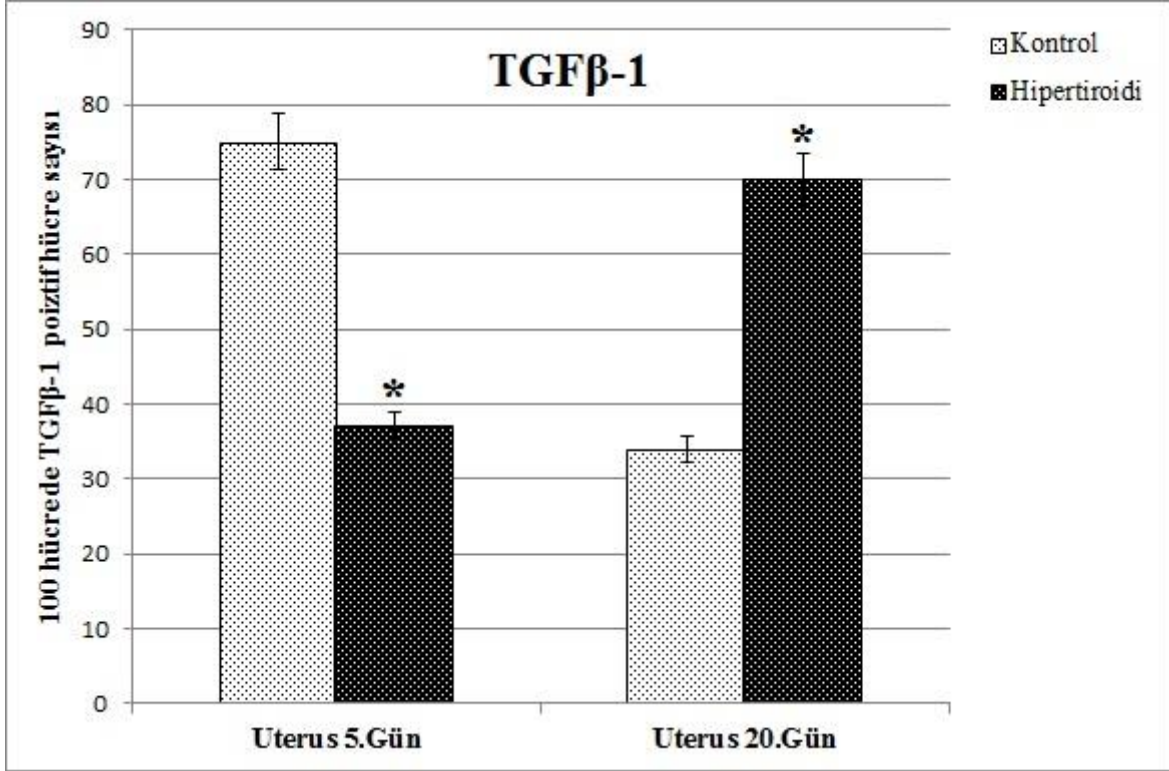
Şekil 35. Hipertiroidi grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif anti-SPARC boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- kuyruklu ok: dev hücreler, kalın ok: spongiyotrofoblast), X400.



Şekil 36. Hipertiroidi grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif anti-SPARC boyaması, (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- g: glikojen hücresi, uzun başlı ok; sitotrofoblast), X400.

TGF β -1 İmmunohistokimyasal Bulguları

Kontrol ve hipertiroidi grubu sıçanlarda, gebeliğin 5. ve 20. günlerinde alınan uterus ve plasenta dokularının immunohistokimyasal TGF β -1 boyamasına ait sonuçların istatistiksel değerlendirmesi Şekil 37’de ve Tablo 2’de sırasıyla verilmiştir.



*: P<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 37. Kontrol ve hipertiroidi grupları endometriyum dokusunda anti-TGFβ-1 pozitif hücre dağılımı

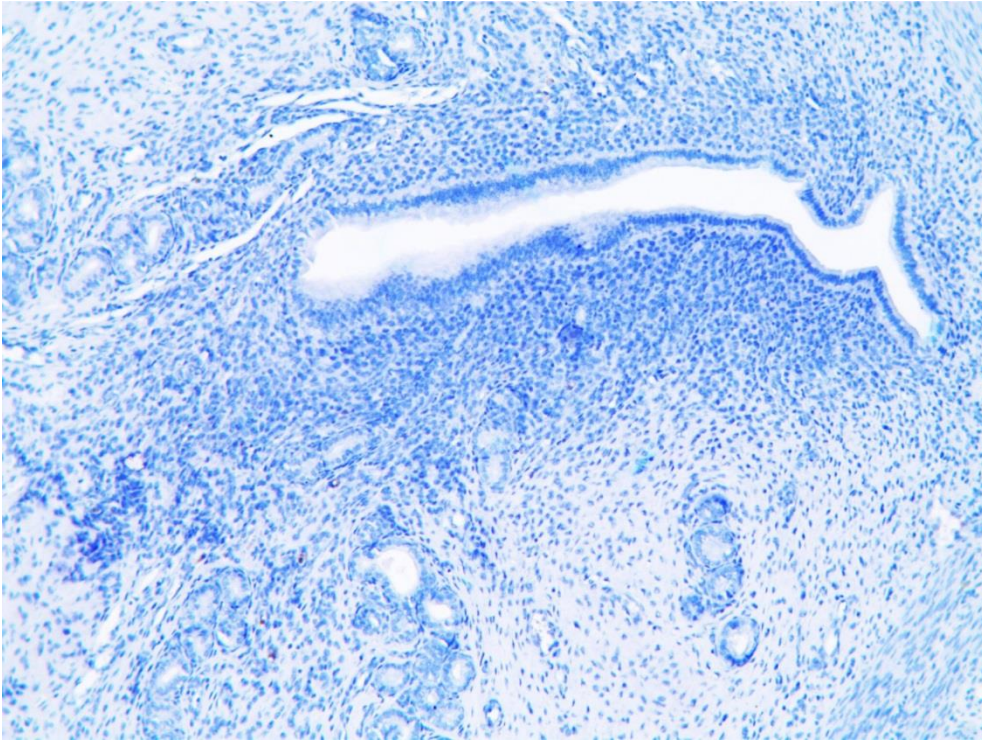
Tablo 2. Kontrol ve hipertiroidi grupları plasenta dokusunda anti-TGFβ-1 pozitif hücre dağılımı

	Kontrol	Hipertiroidi	P değeri
Plasenta Bazal Plak (mm ² 'de hücre sayısı)	16.6±6.4	23±9.7	P< 0.05
Plasenta Labirent Katmanı (Semikantitatif değerlendirme)	2±0.3	1.27±0.7	P<0.05

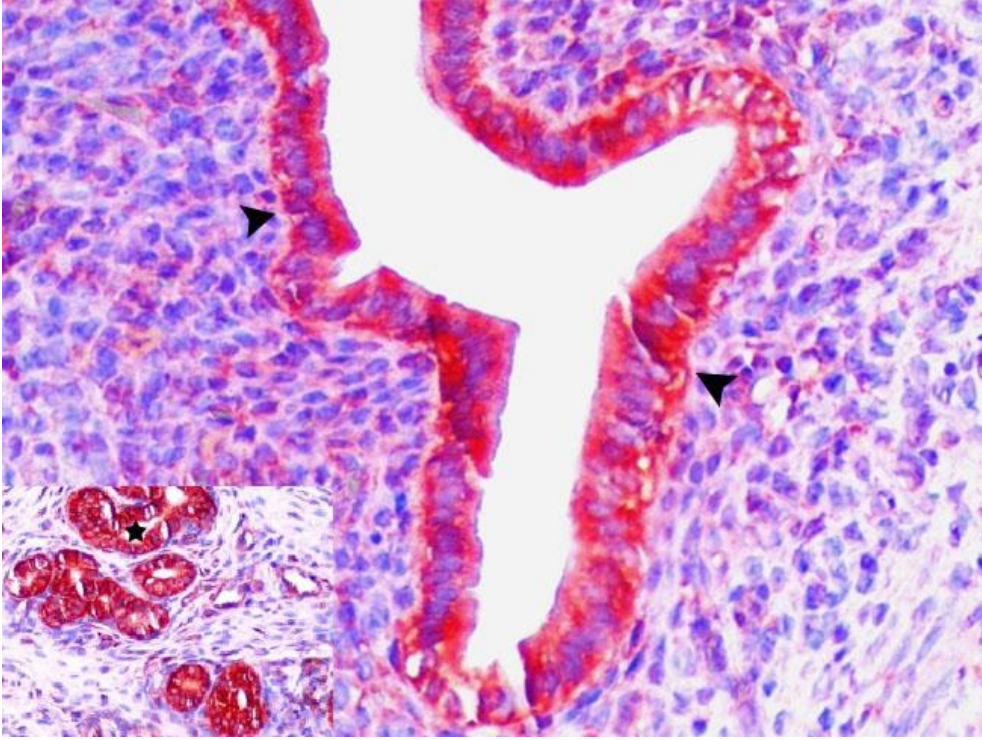
Dönüştürücü Büyüme Faktörü β-1 immunohistokimyasal incelemesi, uterus dokularında endometrium epitel ve bez epitel hücrelerindeki pozitif boyanma, plasenta dokularında ise bazal plak ve labirent katmanlarındaki pozitif boyanmalar değerlendirilerek yapıldı. Uterus dokularında TGFβ-1 immünoreaktivitesinin endometrium epiteli, endometrium bezleri ve endometrium stroma alanındaki hücresel yapıların sitoplazmasında pozitif olduğu görüldü. 5. gün uterus dokularında yapılan boyama sonucu, hipertiroidi grubunda TGFβ-1 pozitif hücre sayısında azalma görülürken (P<0.05; Şekil 39,47); 20. gün

uterus endometriyum epitel dokularında gözlenen SPARC immunoreaktivitesi hipertirodi grubunda artmıştır (P<0.05; Şekil 41,49).

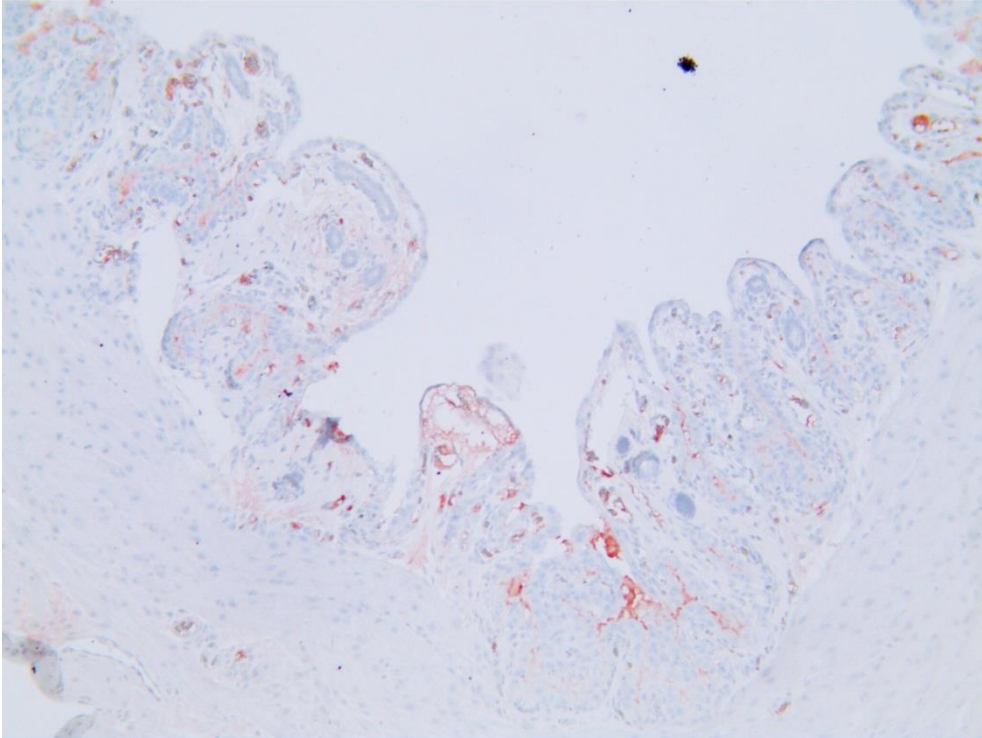
Plasenta labirent katmanında semikantitatif skorlama yapılırken, bazal plak katmanında mm²'de pozitif hücre sayımı yapıldı. Plasenta bazal plağında, hiperitroid grubunda görülen TGFβ-1 pozitif hücre sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05; Şekil 43,53). Labirent bölgesinde ise TGFβ-1 immunoreaktivitesin hiperitroidi grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gösterdi (P<0.05; Şekil 44,54).



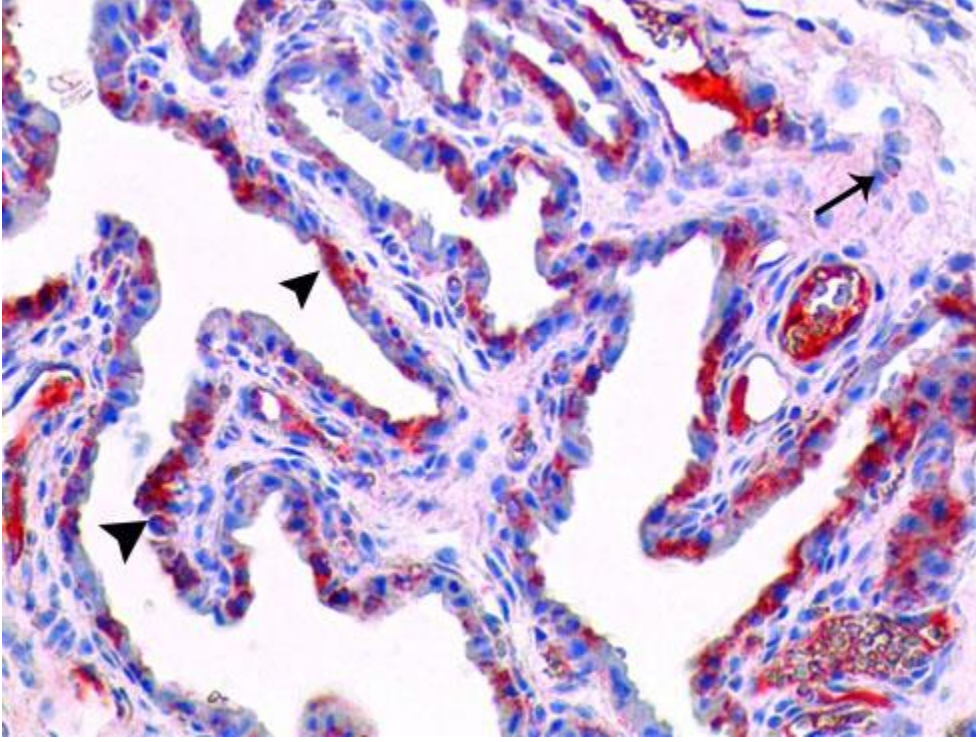
Şekil 38. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum dokusunda anti-TGFβ1 negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



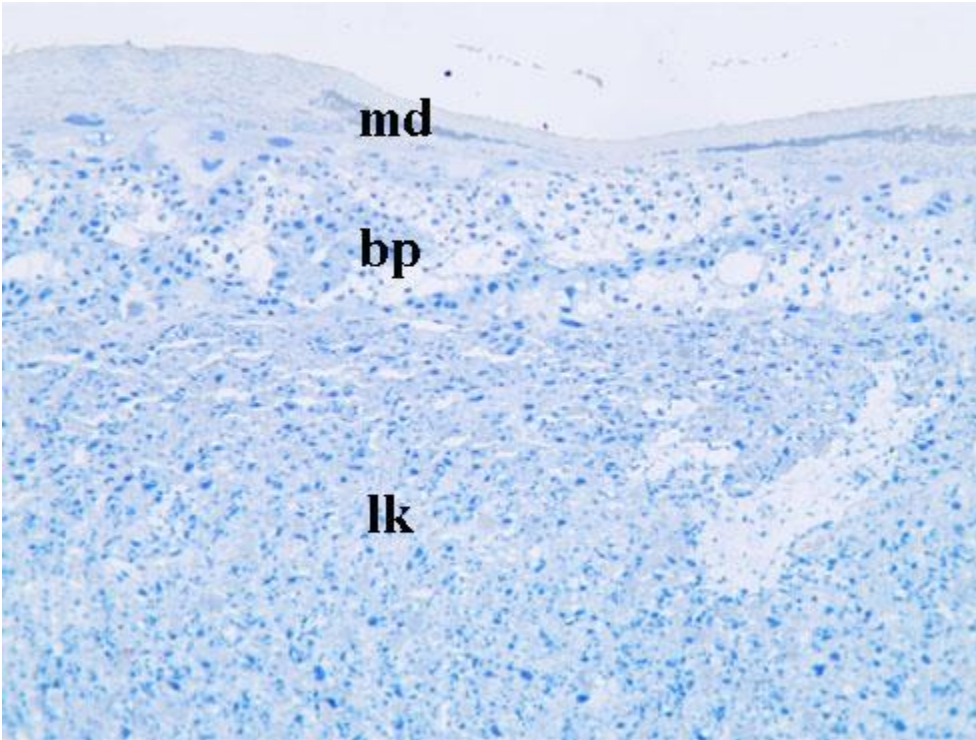
Şekil 39. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epitelinde görülen pozitif anti-TGF β -1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması-ok başı: endometriyum epiteli, *: endometriyum bezi), X400 (iç resim, X400).



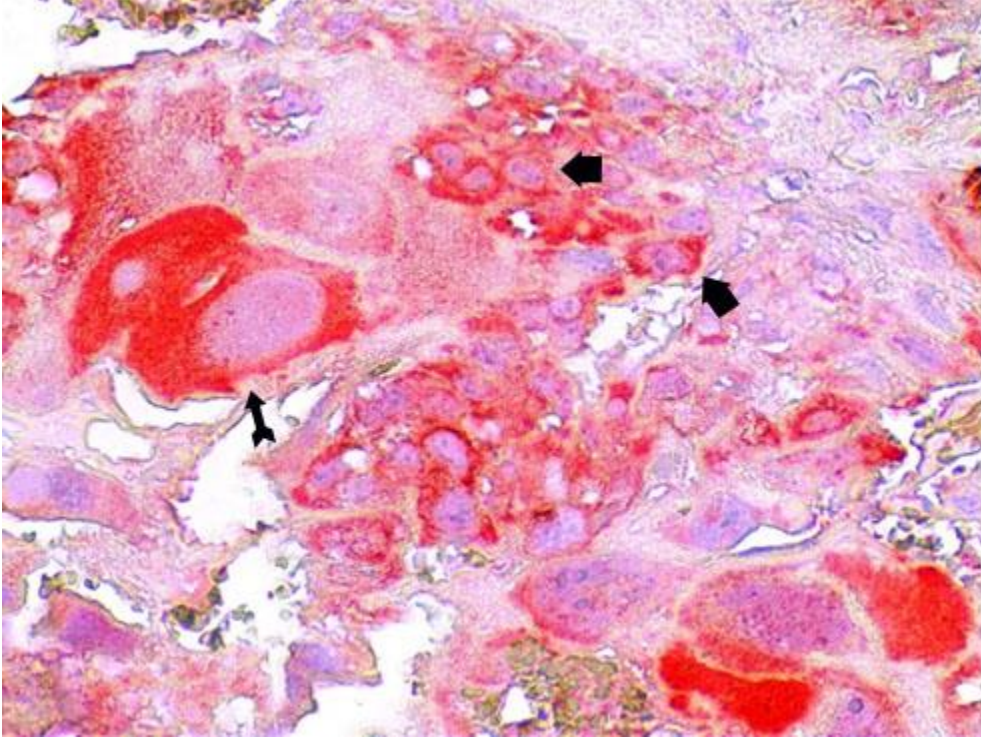
Şekil 40. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum dokusunda anti-TGF β 1negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



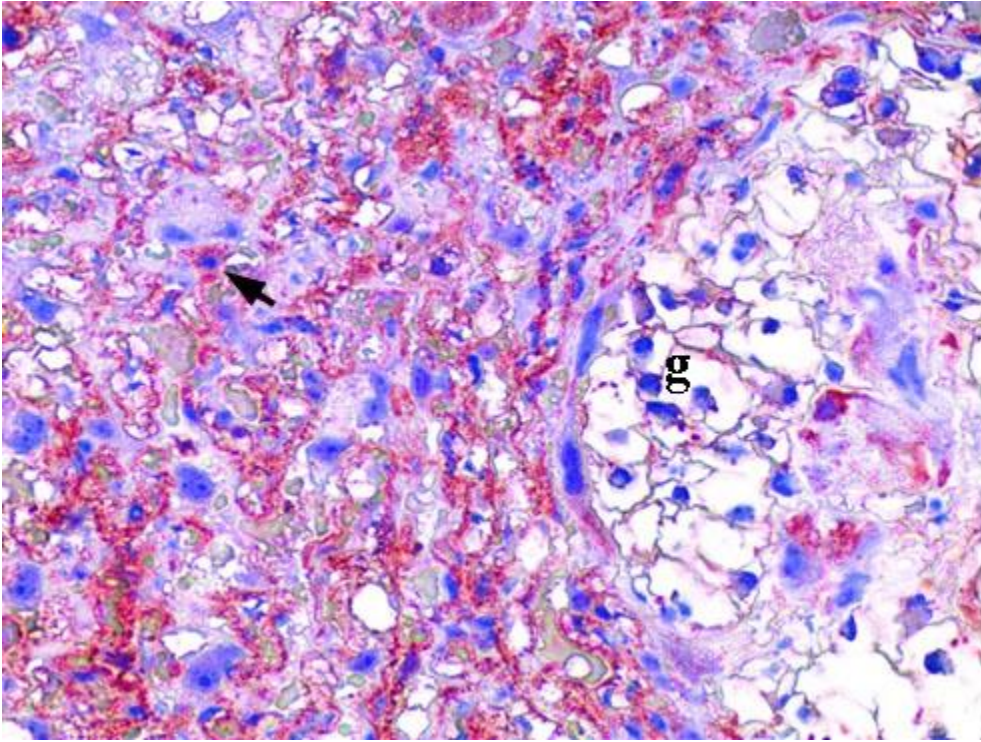
Şekil 41. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-TGF β -1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- okbaşı: endometriyum epiteli, ince ok: desidua hücresi), X400.



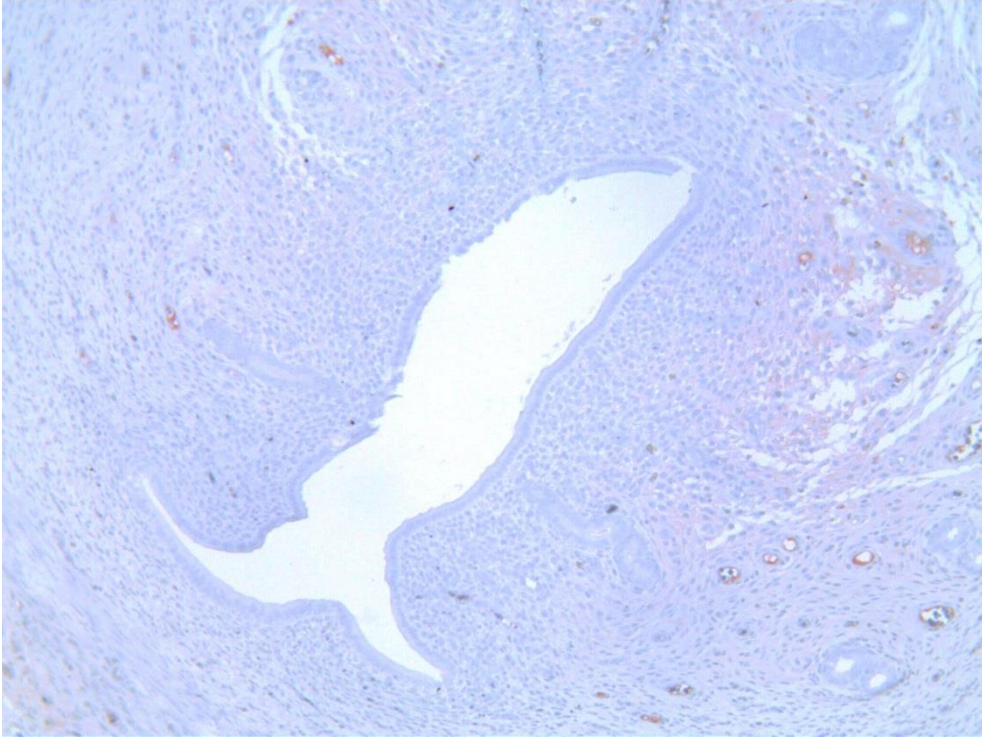
Şekil 42. Kontrol grubu gebelik 20.gün plasenta dokusunda anti-TGF β -1 negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



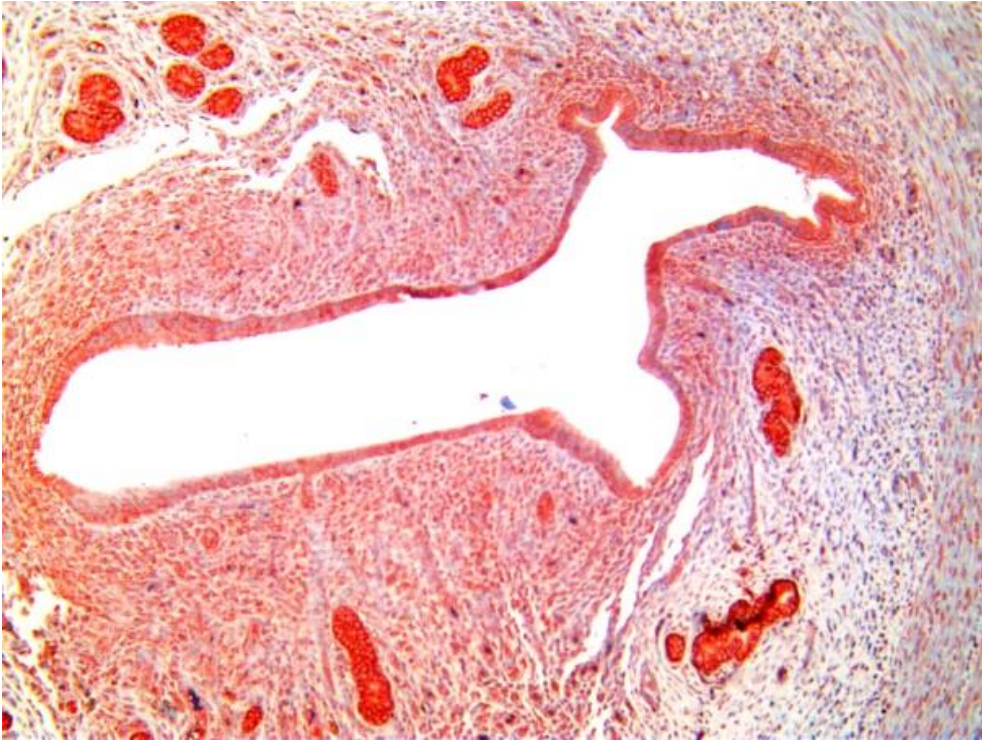
Şekil 43. Kontrol grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif anti-TGF β -1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- kalın ok: spongiyotrofoblast hücreleri, kuyruklu ok: dev hücre), X400.



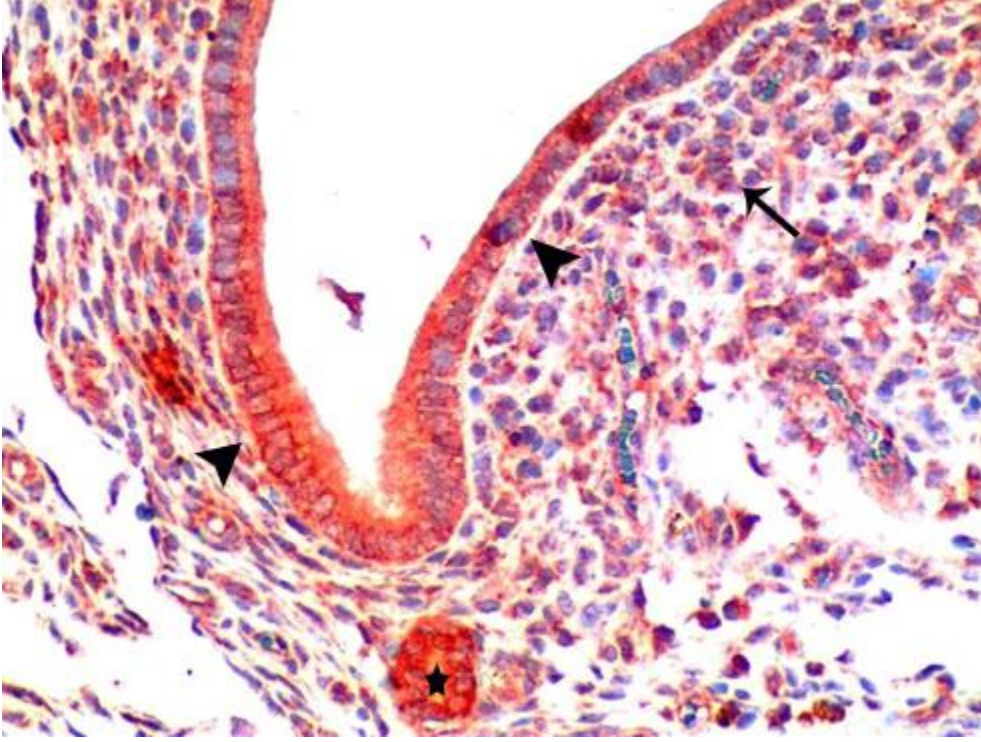
Şekil 44. Kontrol grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif anti-TGF β -1 boyaması, (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- uzun başlı ok: sitotrofoblast, g: glikojen hücre), X400.



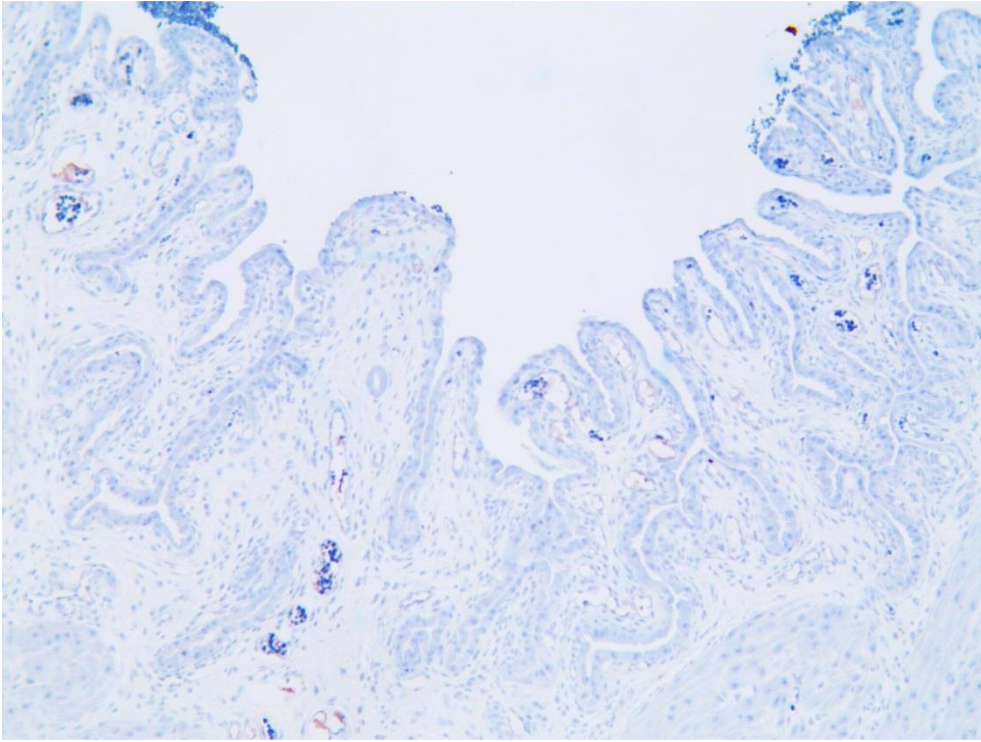
Şekil 45. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum dokusunda anti- TGFβ-1 negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



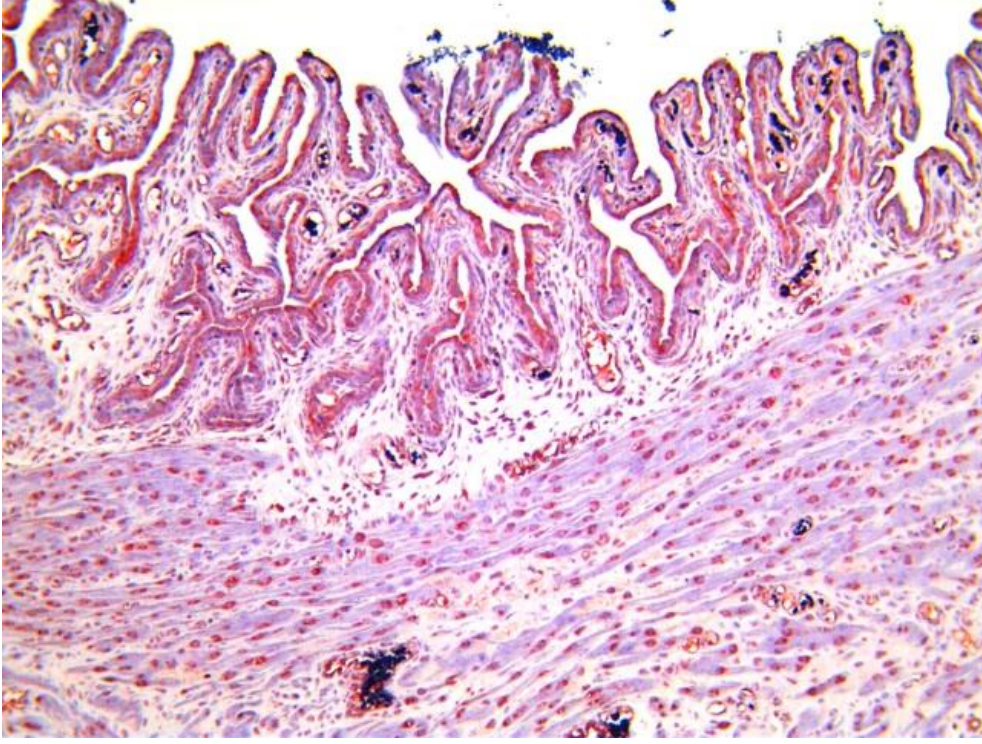
Şekil 46. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen anti-TGFβ-1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100



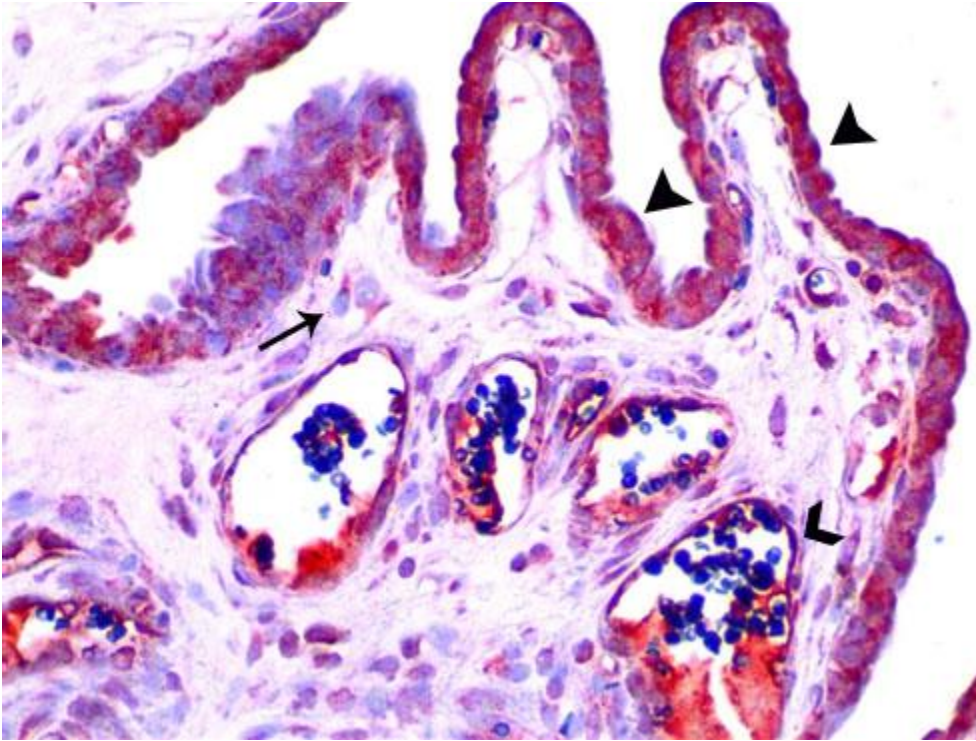
Şekil 47. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen anti-TGF β -1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli, *: endometriyum bezi, ince ok: desidua hücresi), X400.



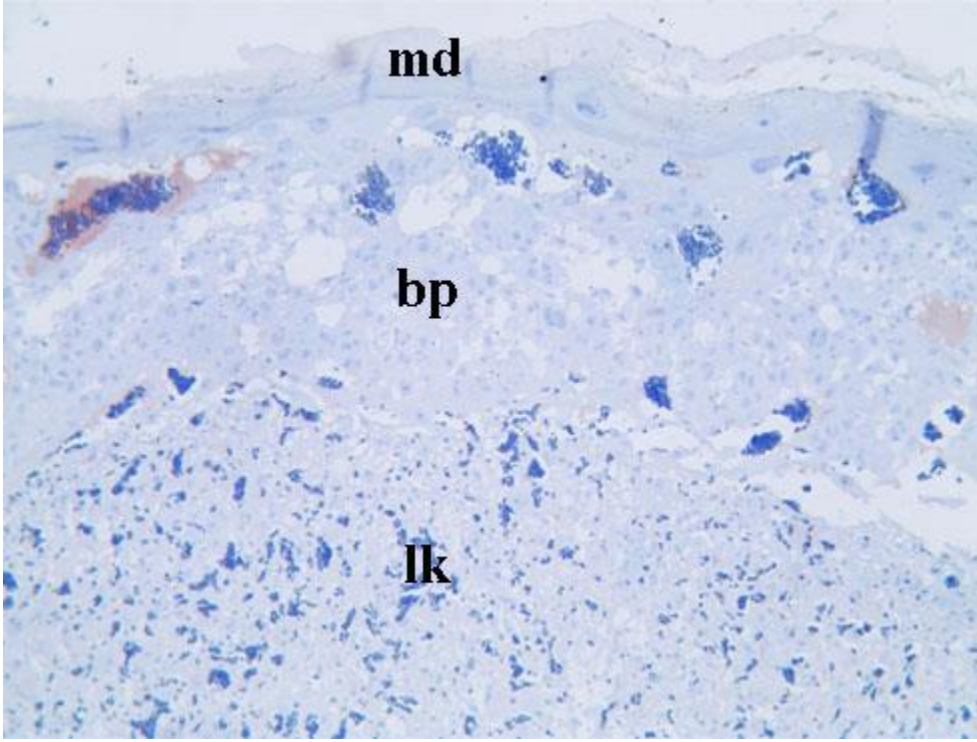
Şekil 48. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum dokusunda anti-TGF β -1 negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



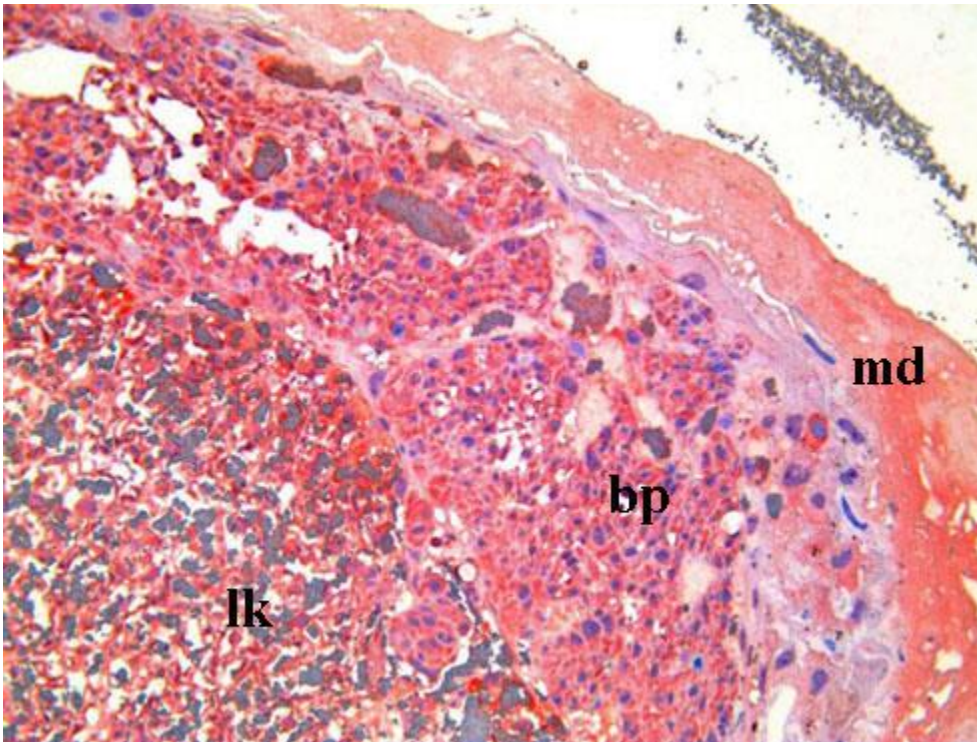
Şekil 49. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-TGFβ-1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



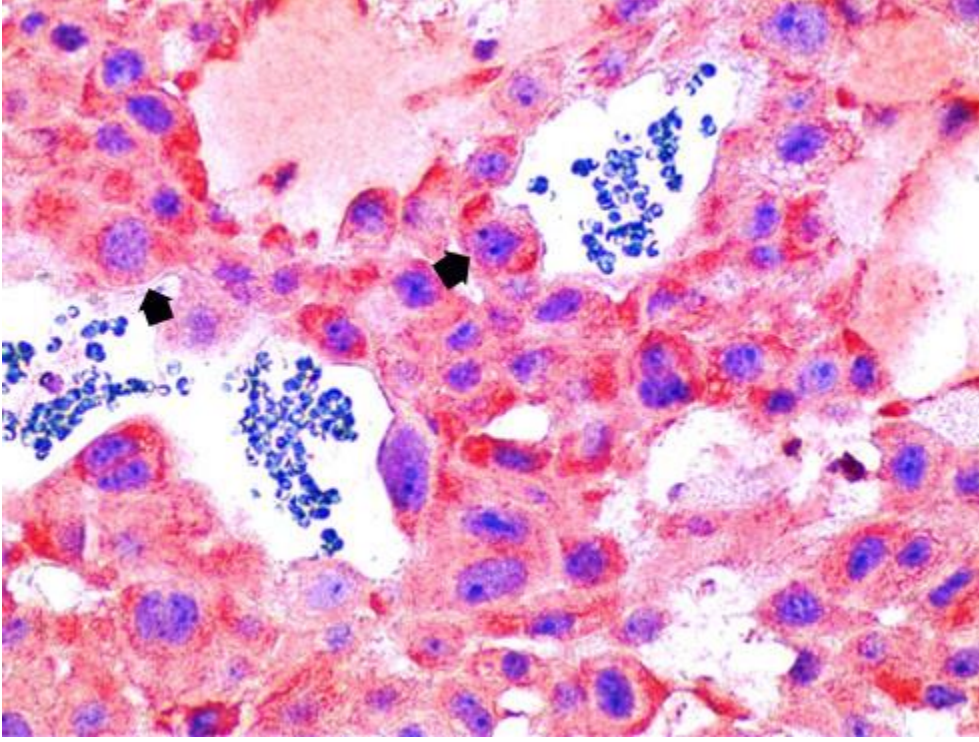
Şekil 50. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-TGFβ-1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum bez epiteli, uzun ok: desidua hücresi, yarım ok başı: endotel hücresi), X400.



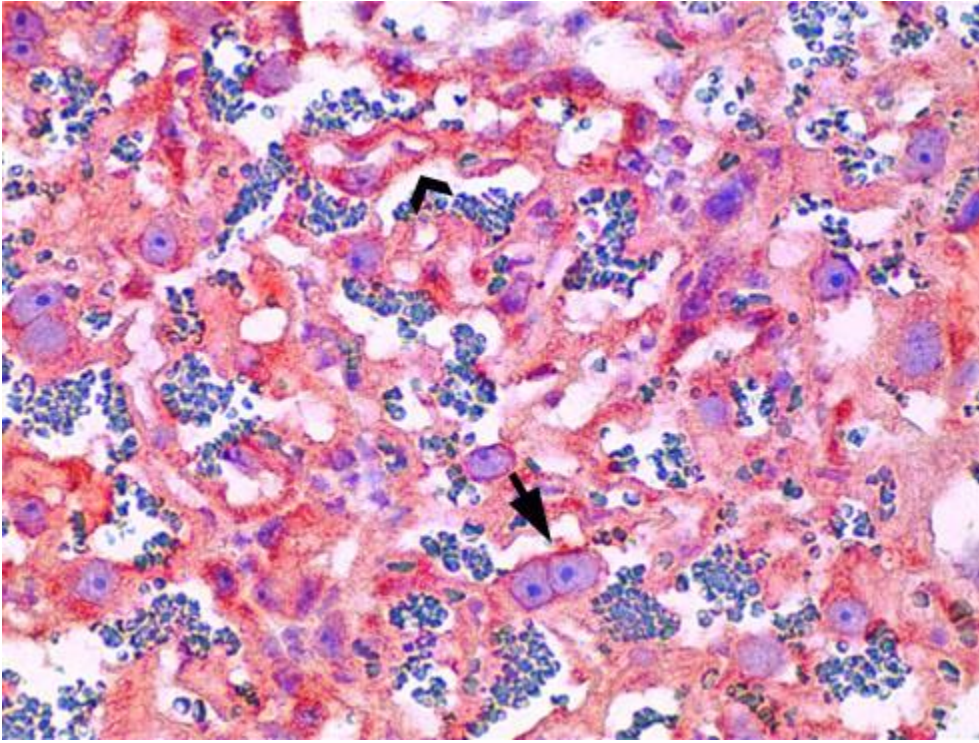
Şekil 51. Hipertiroidi grubu 20. gün plasenta dokusunda anti-TGFβ-1 negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



Şekil 52. Hipertiroidi grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif anti-TGFβ-1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



Şekil 53. Hipertiroidi grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif anti-TGFβ-1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- kalın ok: spongiyotrofoblast), X400.



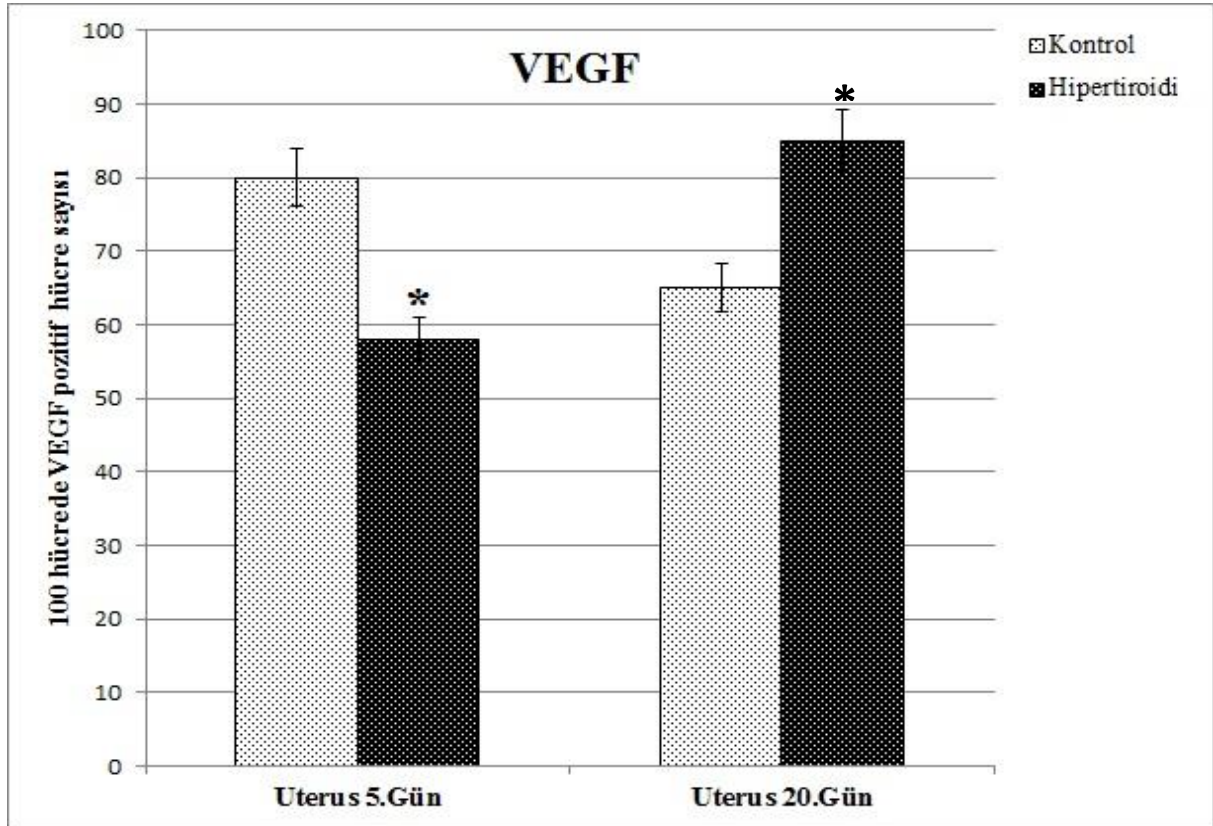
Şekil 54. Hipertiroidi grubu plasenta labirent katmanında görülen pozitif anti-TGFβ-1 boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- yarım ok başı: endotel hücresi, uzun başlı ok: sitotrofoblast), X400.

VEGF İmmunohistokimyasal Bulguları

Kontrol ve hipertiroidi grubu sıçanlarda, gebeliğin 5. ve 20. günlerinde alınan uterus ve plasenta dokularının immunohistokimyasal VEGF boyamasına ait sonuçların istatistiksel değerlendirmesi Şekil 55’de ve Tablo 3’de sırasıyla verilmiştir.

VEGF immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol ve hipertiroid grupları uterus ve plasenta dokularından elde edilen görüntüler Şekil 56-75’de özetlenmiştir. Uterus endometriyum epitel hücrelerinde, endometriyum bezleri ve endometrium stroma alanındaki hücresel yapıların sitoplazmasında pozitif boyanma görülürken, istatistiksel değerlendirmeler için endometriyum epitelinde ve bez epitelindeki pozitif hücre sayısı alındı.

Plasenta için yapılan immünohistokimyasal uygulamada plasentanın bazal plak ve labirent bölgelerinde görülen immun reaktivite bazal plak kısmında pozitif hücre sayımı ile labirent kısmında görülen immun reaktivite semikantitatif skorlama ile değerlendirildi.



*P<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 55. Kontrol ve hipertiroidi grupları uterus dokusunda anti-VEGF pozitif hücre dağılımı

Tablo 3. Kontrol ve hipertiroid gruplarına ait plasenta dokusunda anti-VEGF pozitif hücre dağılımı

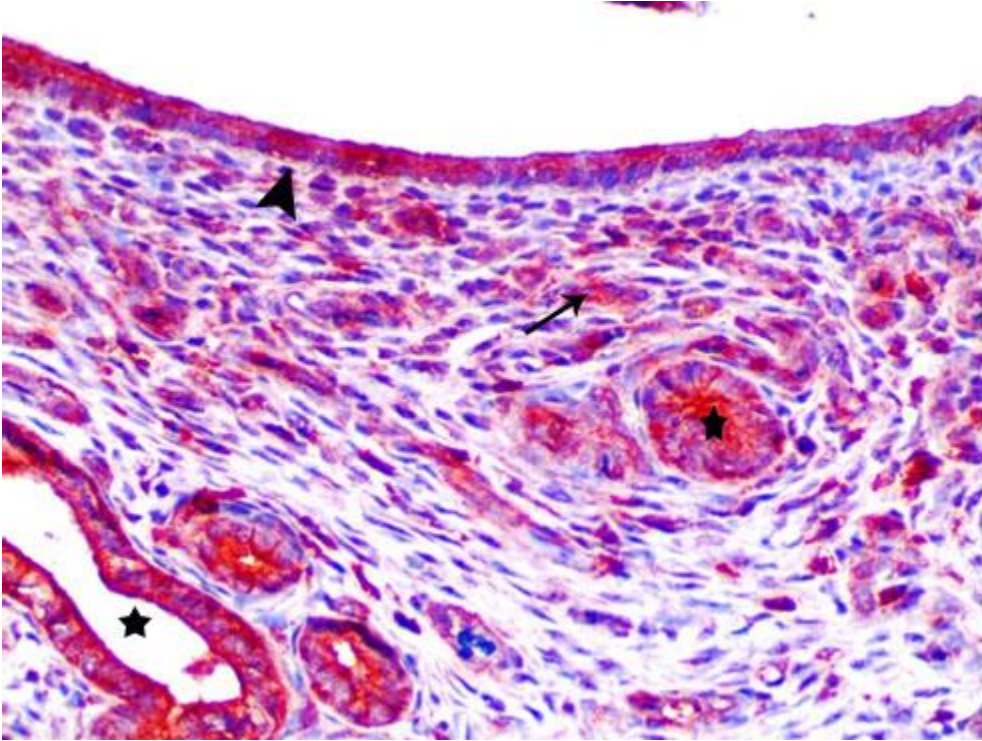
	Kontrol	Hipertiroidi	P değeri
Plasenta Bazal Plak (mm ² 'de hücre sayısı)	16.8±7.2	33.7±6.2	P< 0.05
Plasenta Labirent Katmanı (Semikantitatif değerlendirme)	2.17±0.2	2.95±0.9	P<0.05



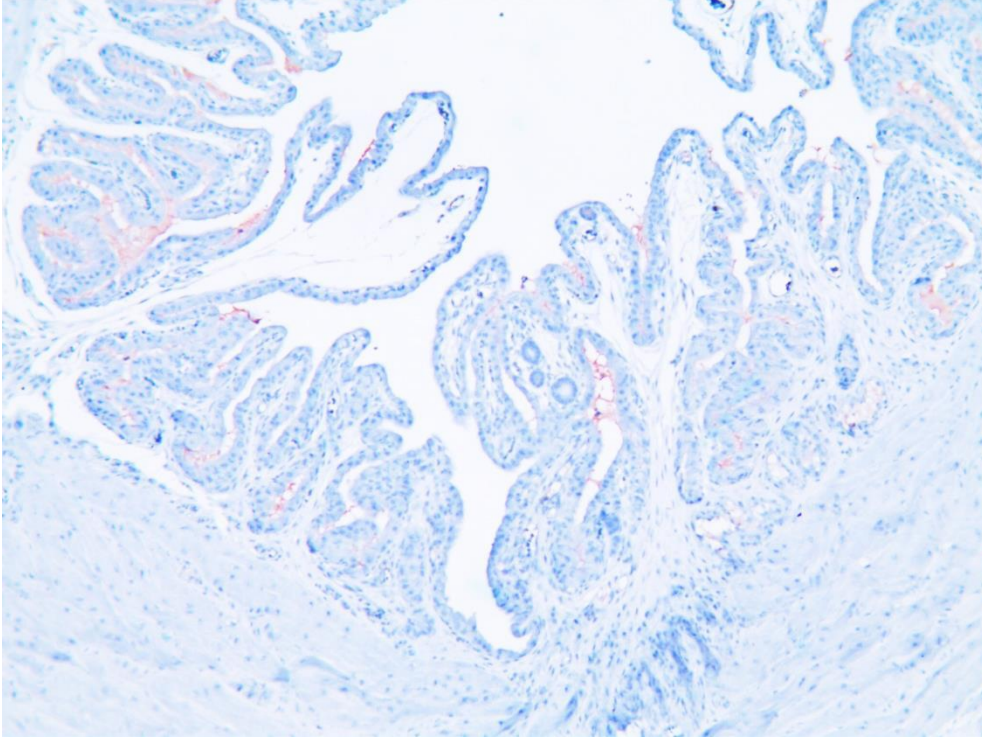
Şekil 56. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum dokusunda anti-VEGF negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli, *: endometriyum bezi), X100.



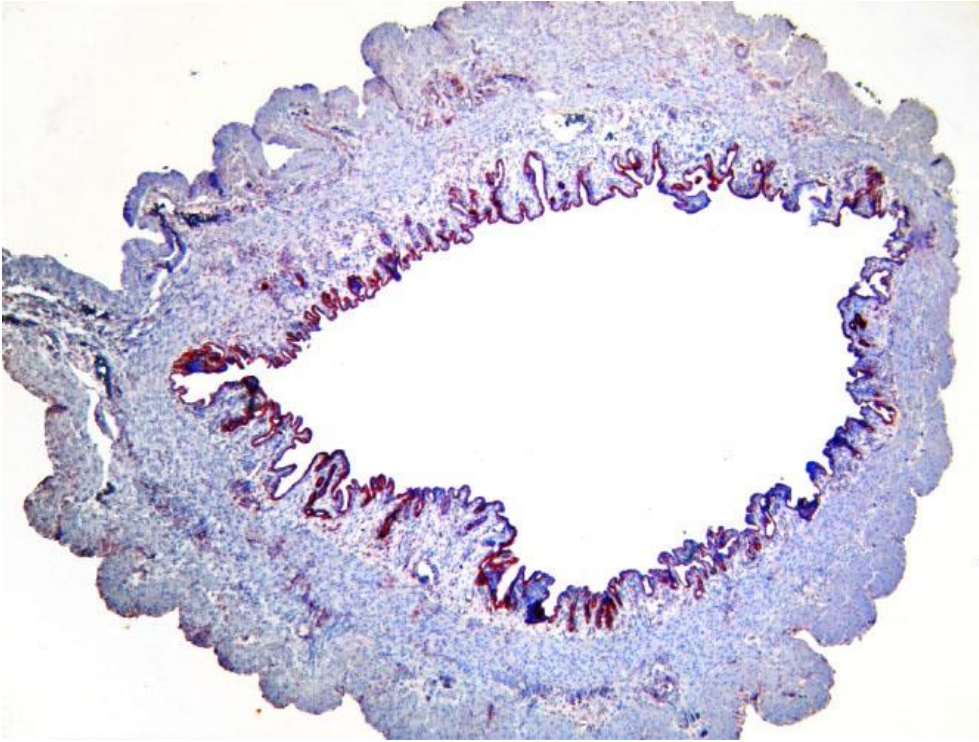
Şekil 57. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



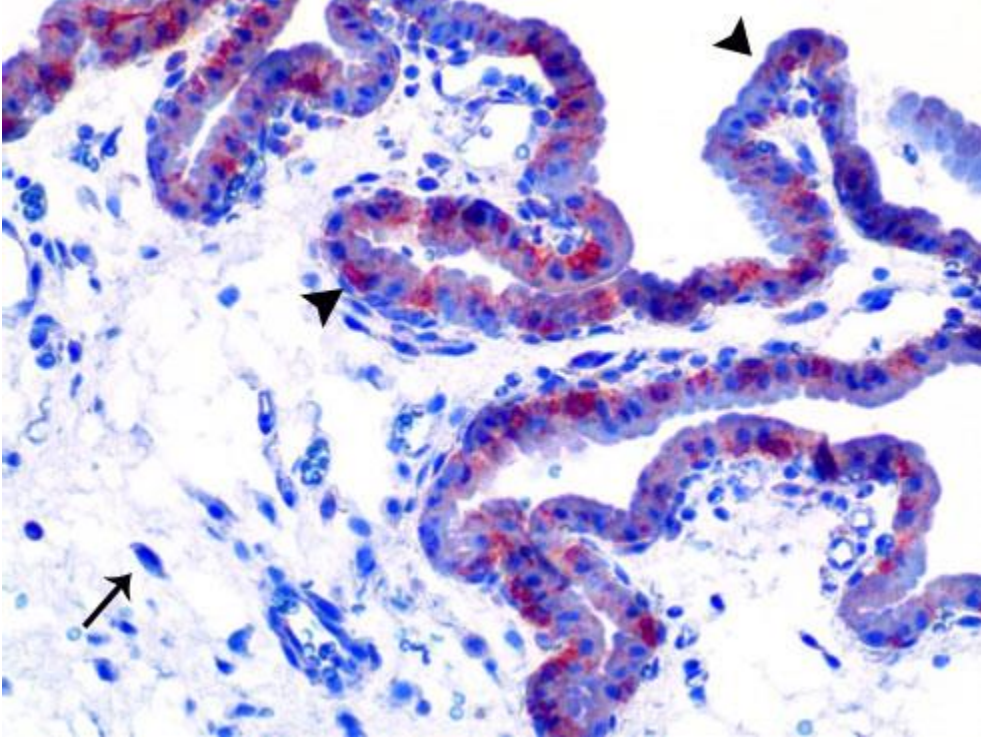
Şekil 58. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli, yıldız: endometriyum bezi, ince ok: desidua hücresi), X400.



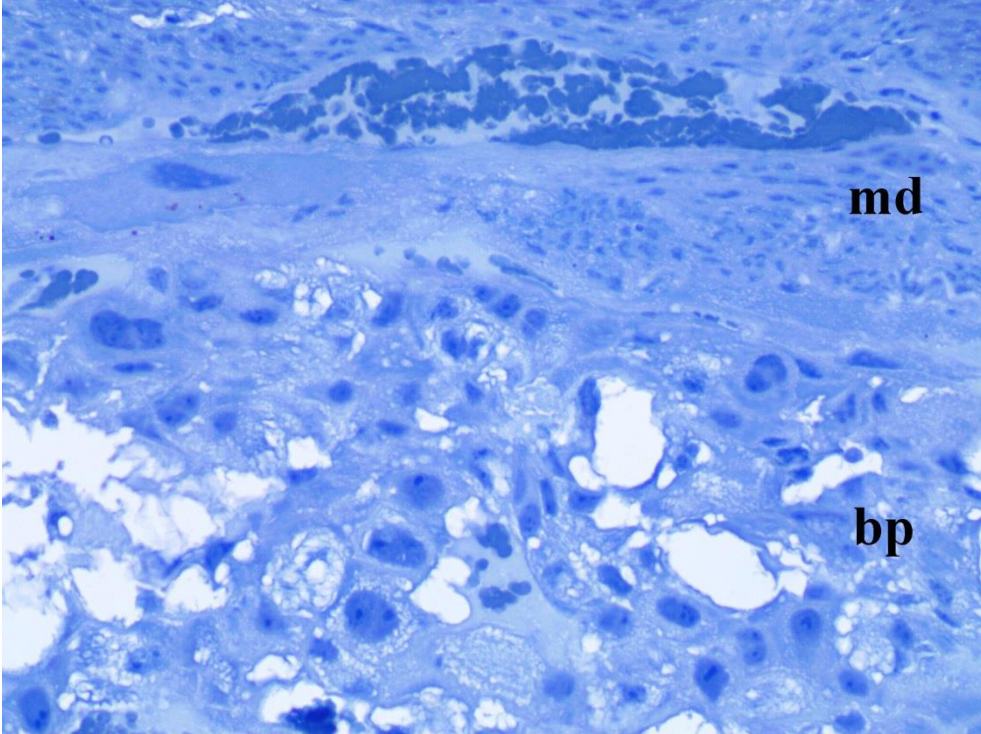
Şekil 59. Kontrol grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum dokusunda anti-VEGF negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



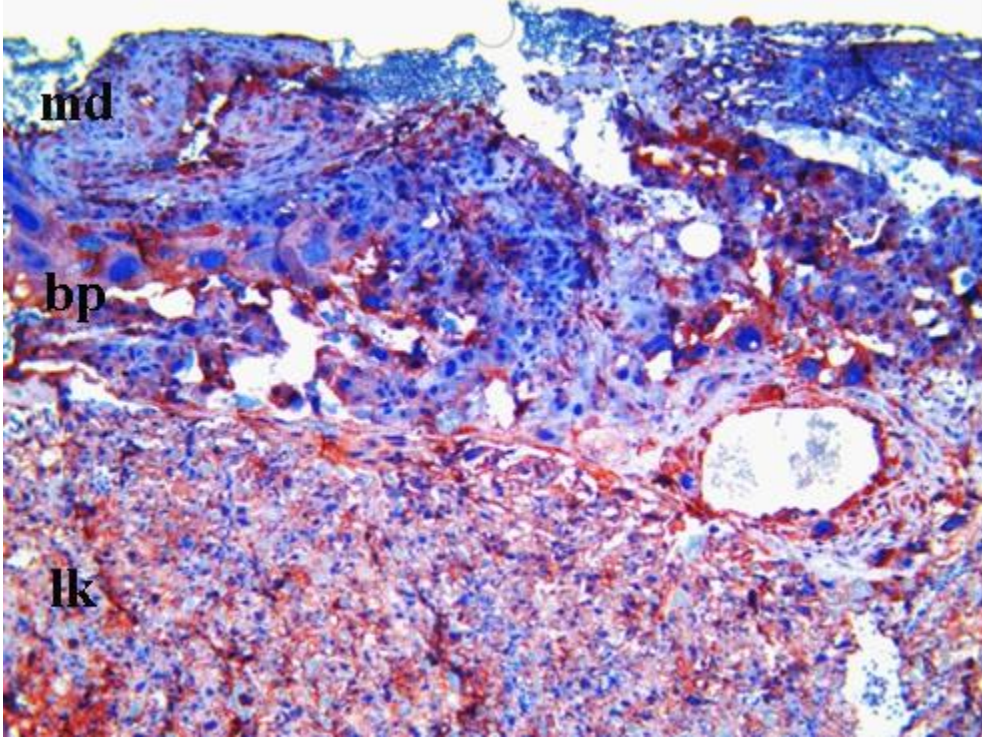
Şekil 60. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X40.



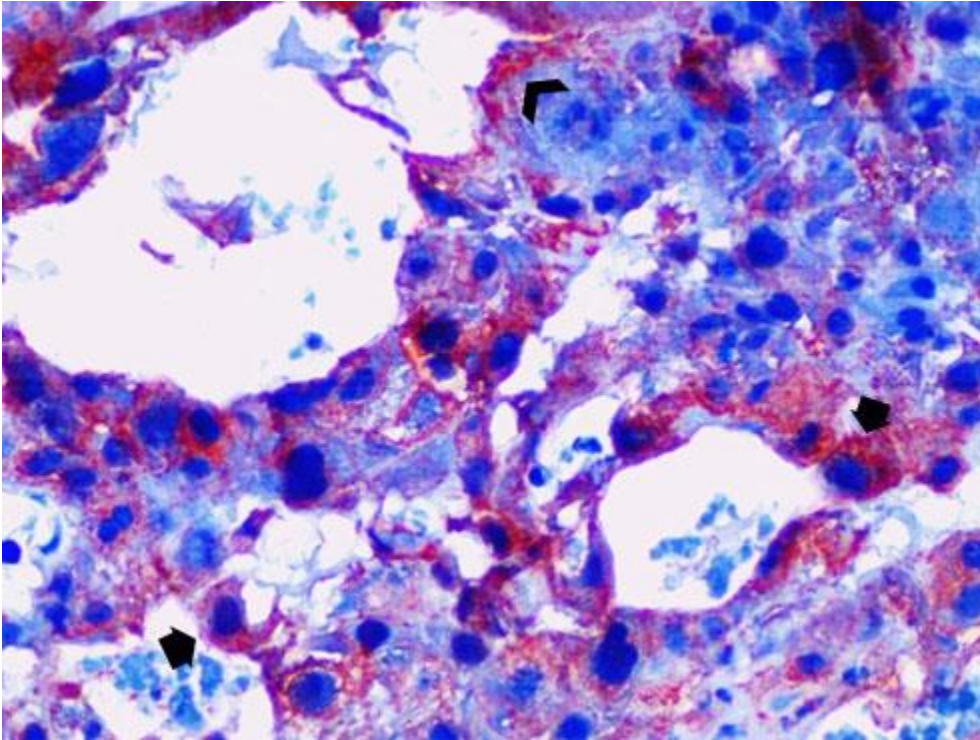
Şekil 61. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epitelinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli, ince ok: desidua hücresi), X400.



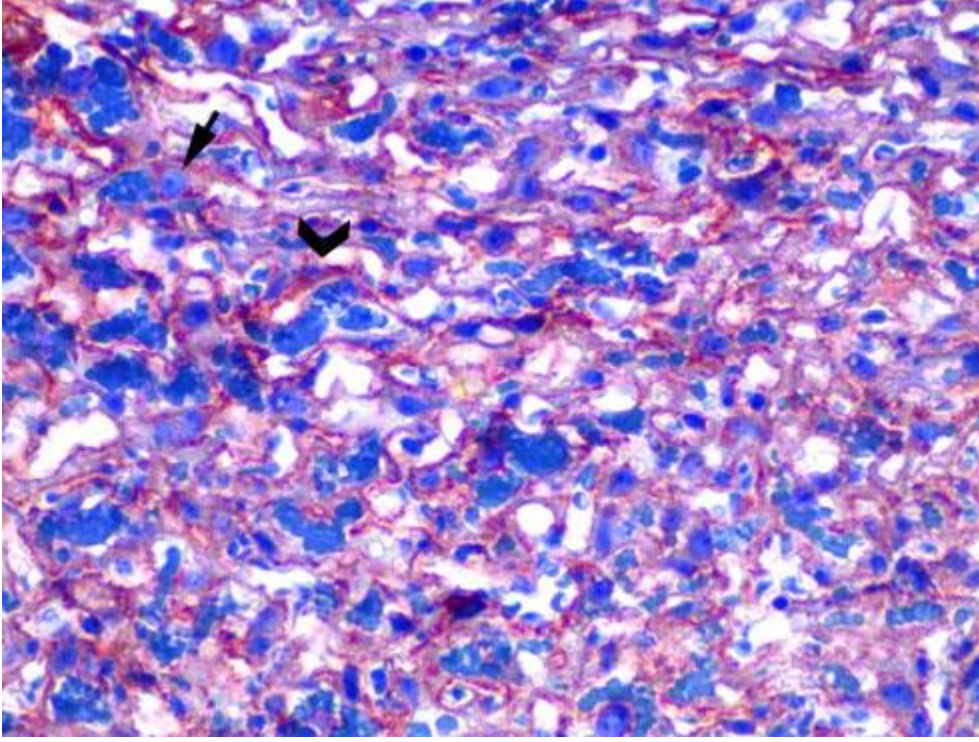
Şekil 62. Kontrol grubu 20. gün plasenta dokusunda anti-VEGF negatif boyanma, (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, kuyruklu ok: dev hücre, kalın ok: spongiyotrofoblast), X400.



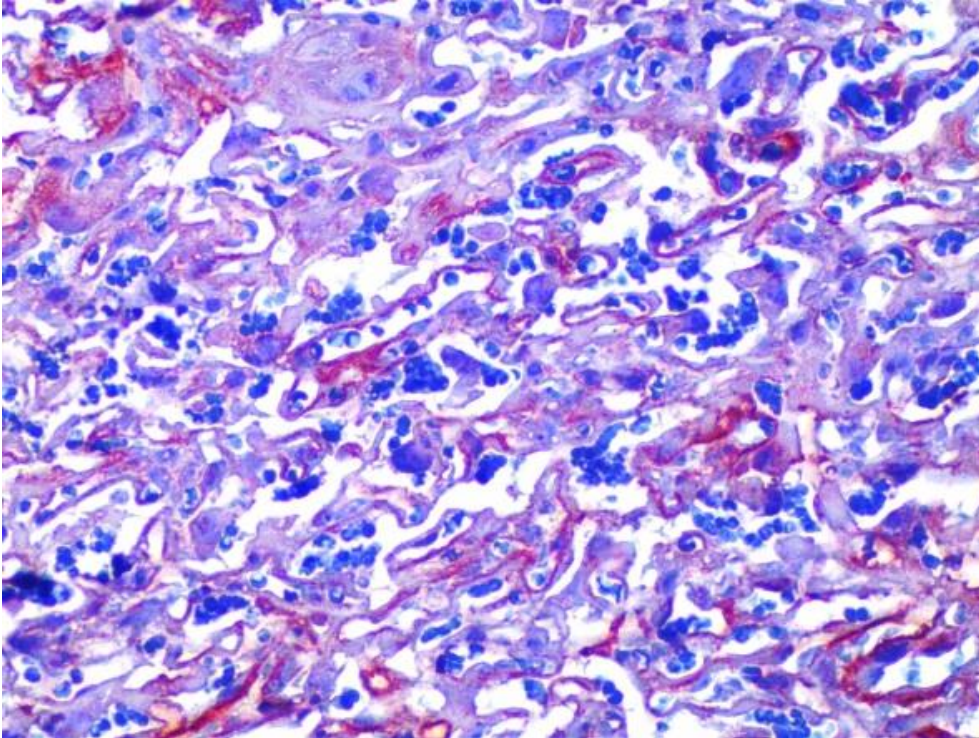
Şekil 63. Kontrol grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



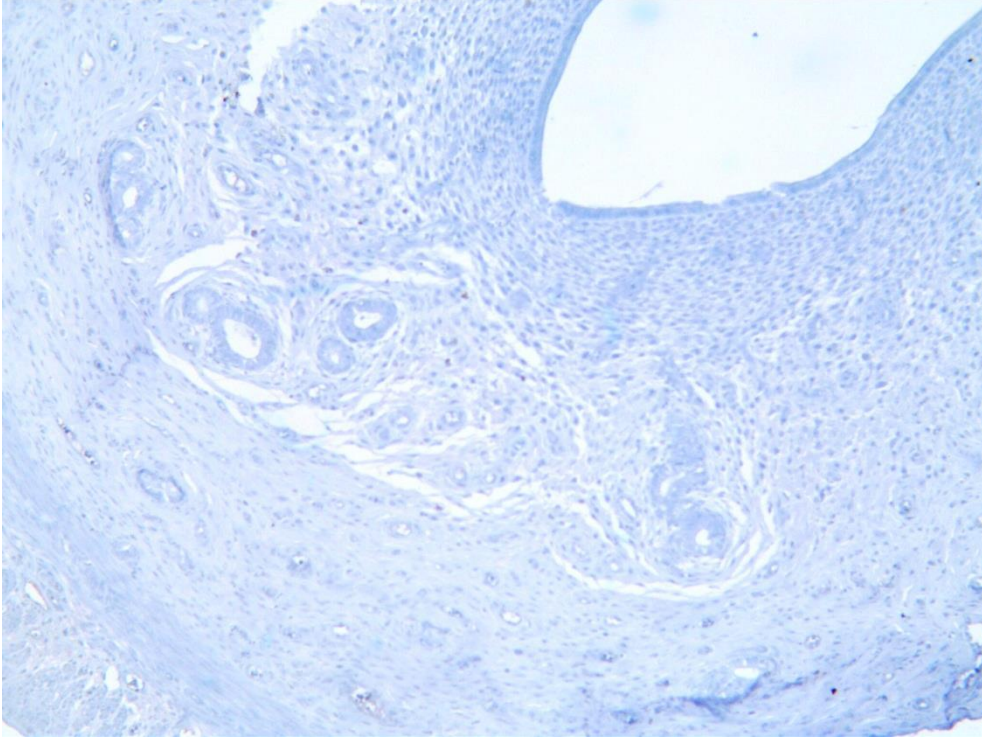
Şekil 64. Kontrol grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- kalın ok: spongiyotrofoblast, yarım ok başı: endotel hücresi), X400.



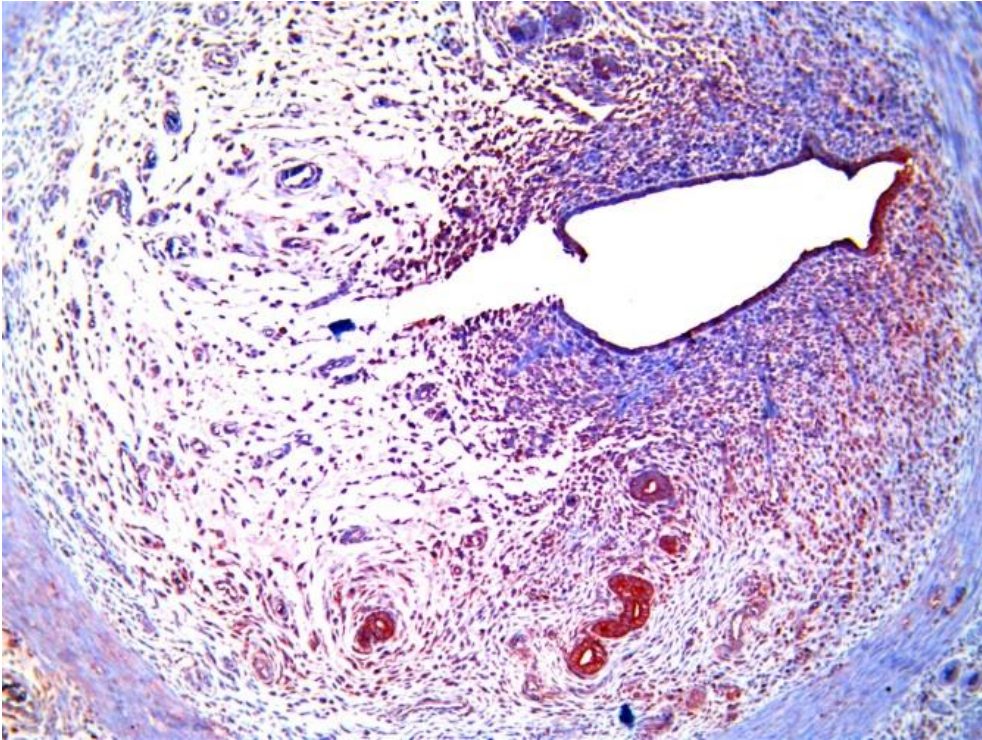
Şekil 65. Kontrol grubu plasenta labirent katmanında görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- uzun başlı ok: sitotrofoblast, yarım ok başı: endotel hücresi), X400.



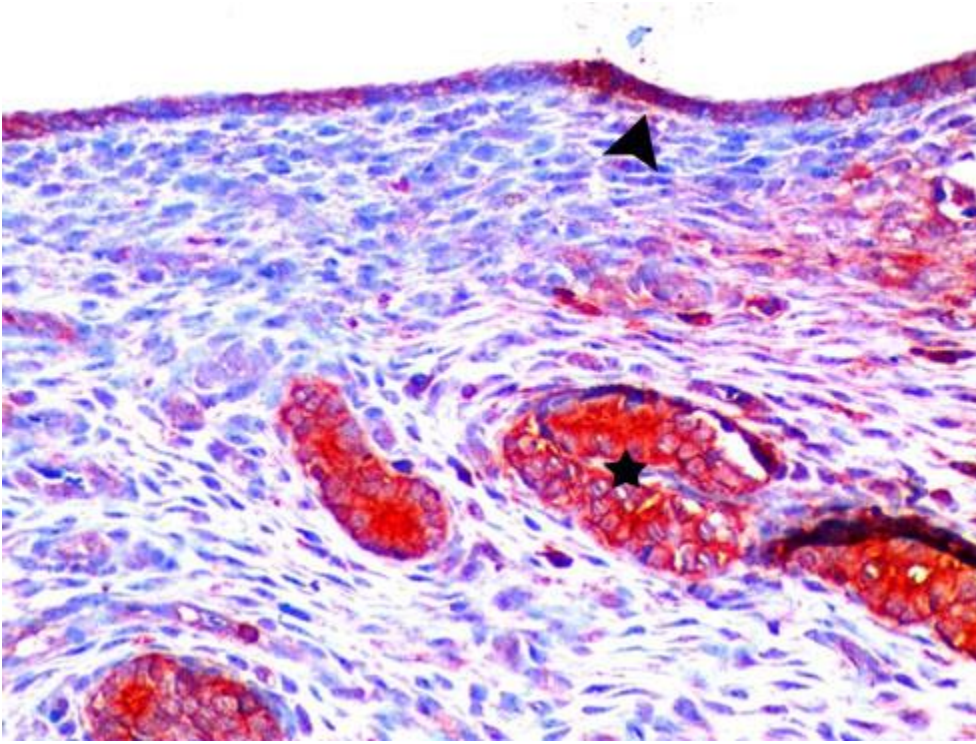
Şekil 66. Kontrol grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X400.



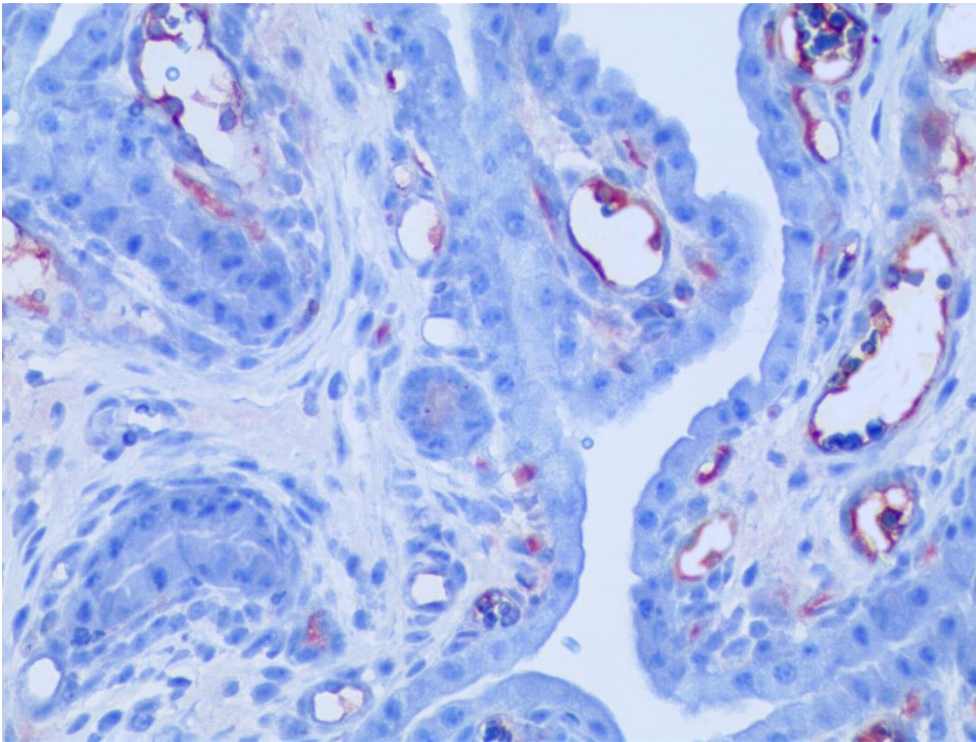
Şekil 67. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum dokusunda anti-VEGF negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



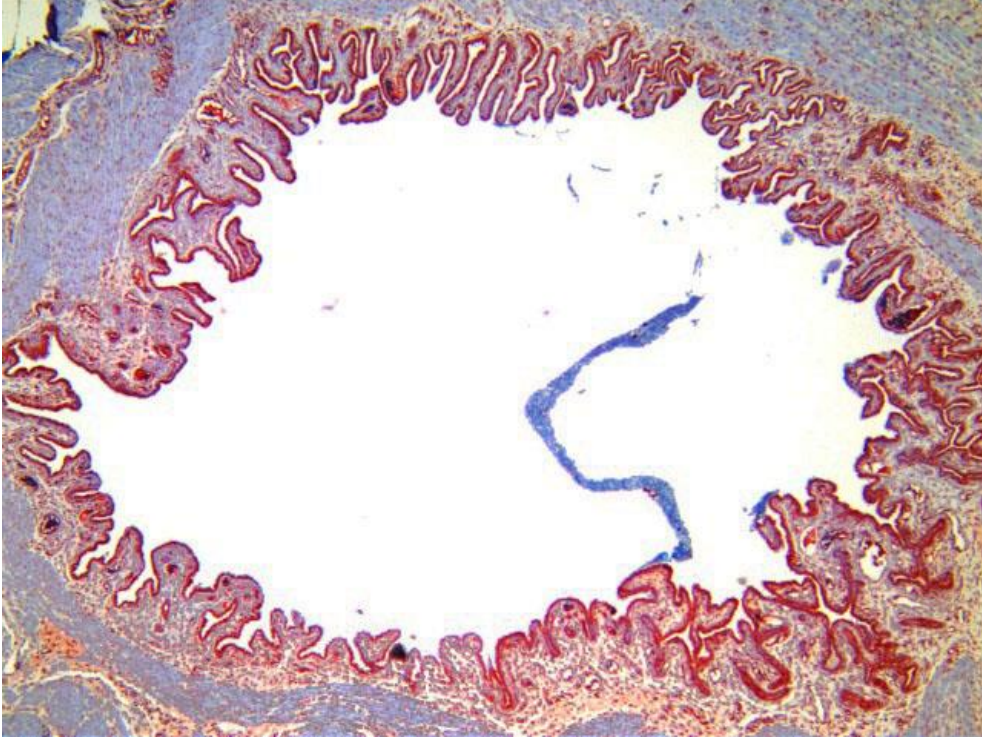
Şekil 68. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



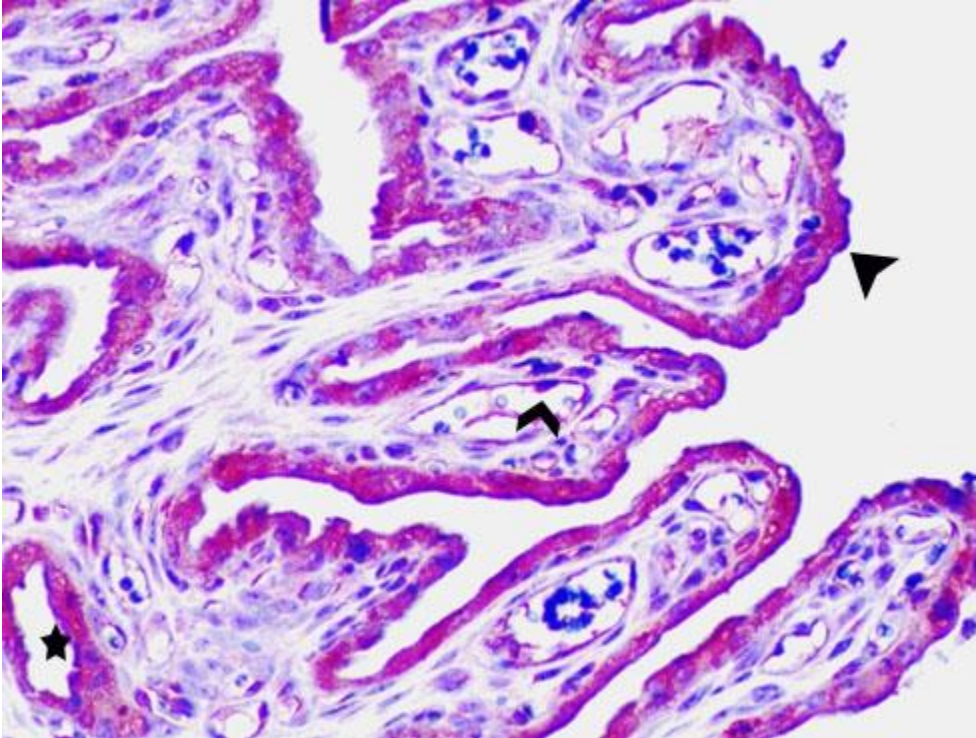
Şekil 69. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli, yıldız: endometriyum bezi), X400.



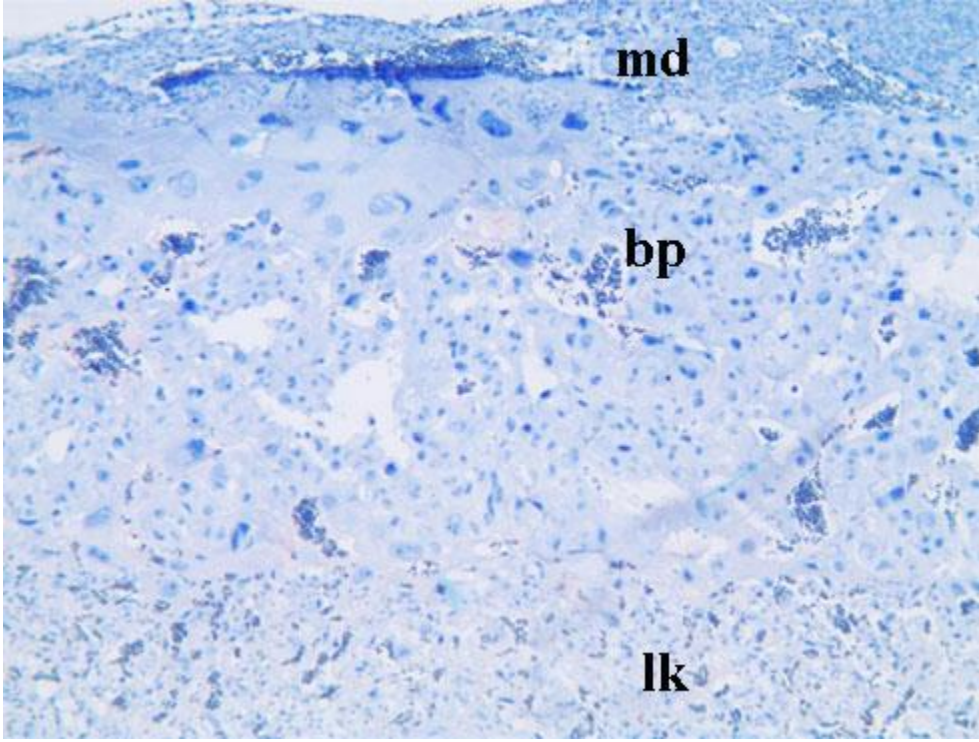
Şekil 70. Hipertiroidi grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum dokusunda anti-VEGF negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli; yıldız: endometriyum bezi), X400.



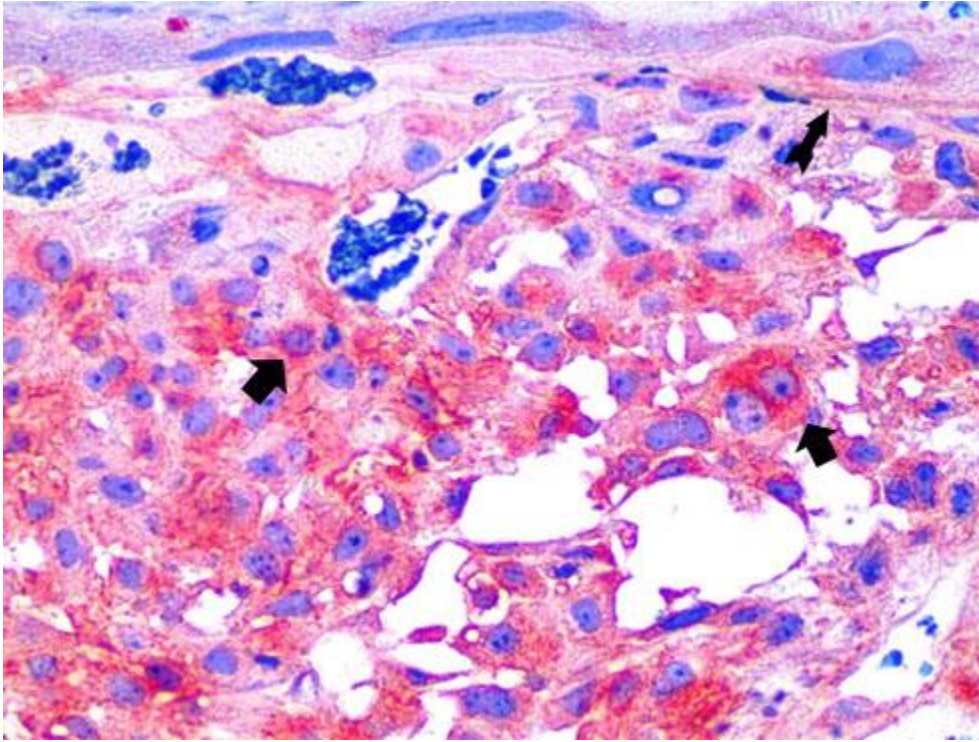
Şekil 71. Hipertiroidi grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması), X100.



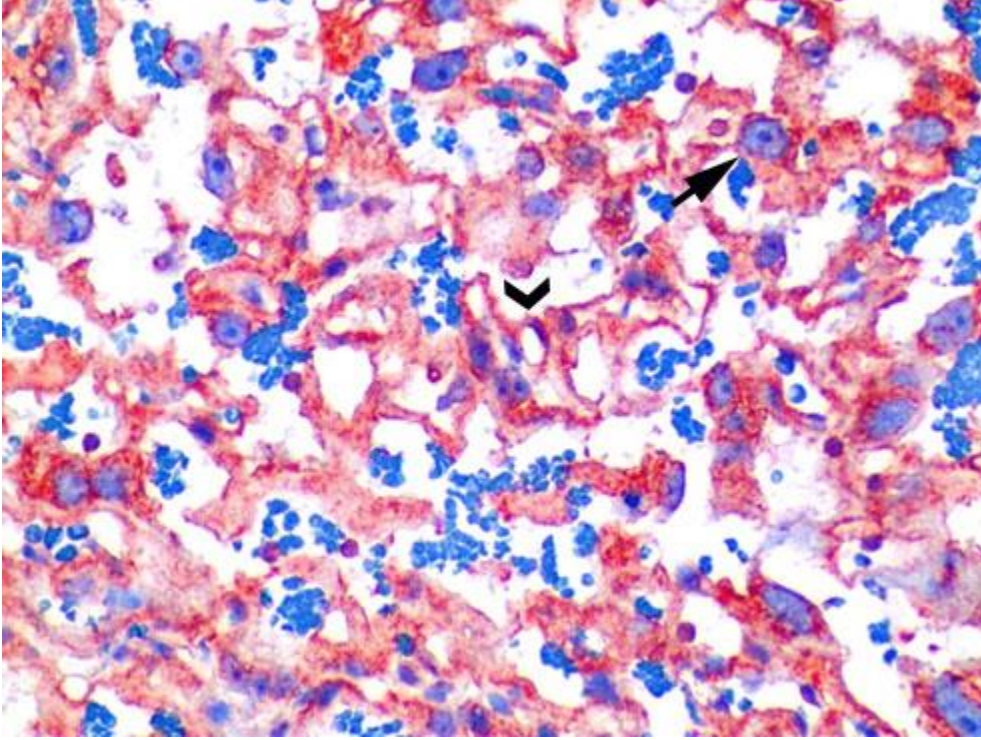
Şekil 72. Hipertiroidi grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezinde görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- ok başı: endometriyum epiteli, yıldız: endometriyum epiteli bezi, yarım ok başı: endotel hücre), X400.



Şekil 73. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün plasenta dokusunda anti-VEGF negatif boyanma (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- md: maternal desidua, bp: bazal plak, lk: labirent katmanı), X100.



Şekil 74. Hipertiroidi grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif anti-VEGF boyaması,(immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- kalın ok: spongiyotrofoblast, kuyruklu ok: dev hücre), X400.



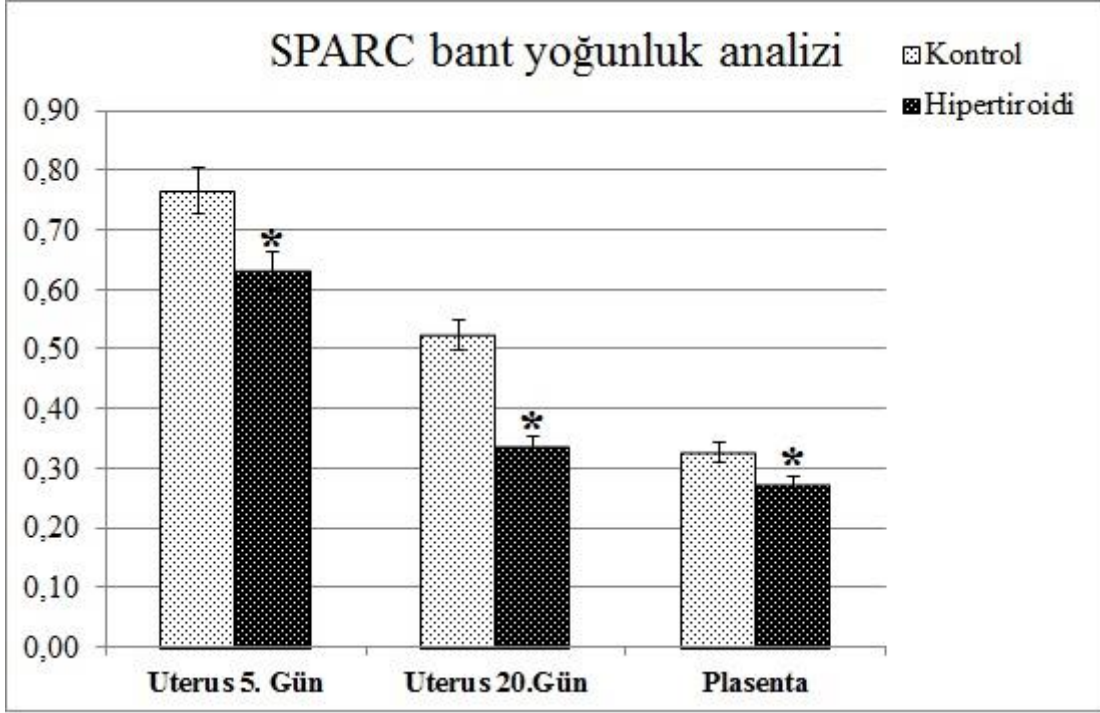
Şekil 75. Hipertiroidi grubu plasenta labirent plağında görülen pozitif anti-VEGF boyaması (immün peroksidaz, Hematoksilen zıt boyaması- uzun ok başı: sitotrofoblast, yarım ok başı: endotel hücresi), X400.

WESTERN BLOT BULGULARI

Bölgesel ekspresyonları immunohistokimyasal olarak incelenen SPARC ve VEGF proteinlerinin, Western Blot protein analizi yöntemi ile uterus ve plasenta dokularındaki genel protein ekspresyon düzeyleri incelendi.

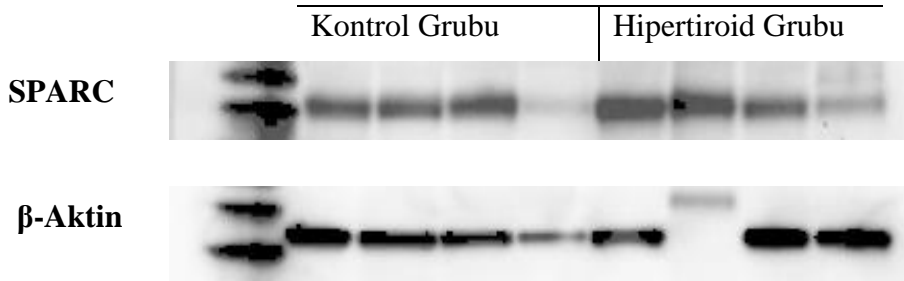
SPARC Western Blot Bulguları

5. gün ve 20. gün gebelik gruplarından alınan uterus ve 20. gün gebelik grubundan alınan plasenta dokularının SPARC ekspresyonunun Western blot bulguları Şekil 76'de grafik olarak verilmiştir. Yapılan analizlerde, SPARC ekspresyonu hem uterus hem de plasenta dokularında, hipertiroid gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalma göstermiştir ($P < 0.05$; Şekil 76-79)

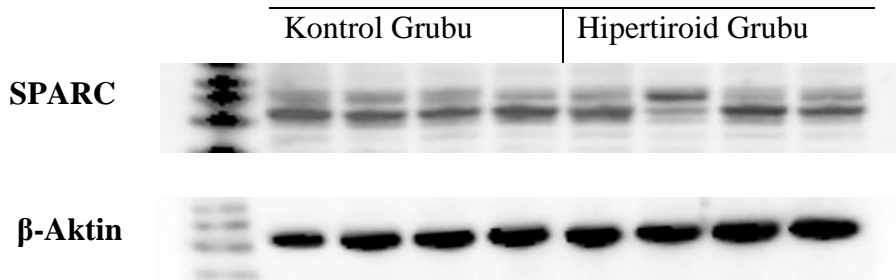


*: $P < 0.05$; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermiştir.

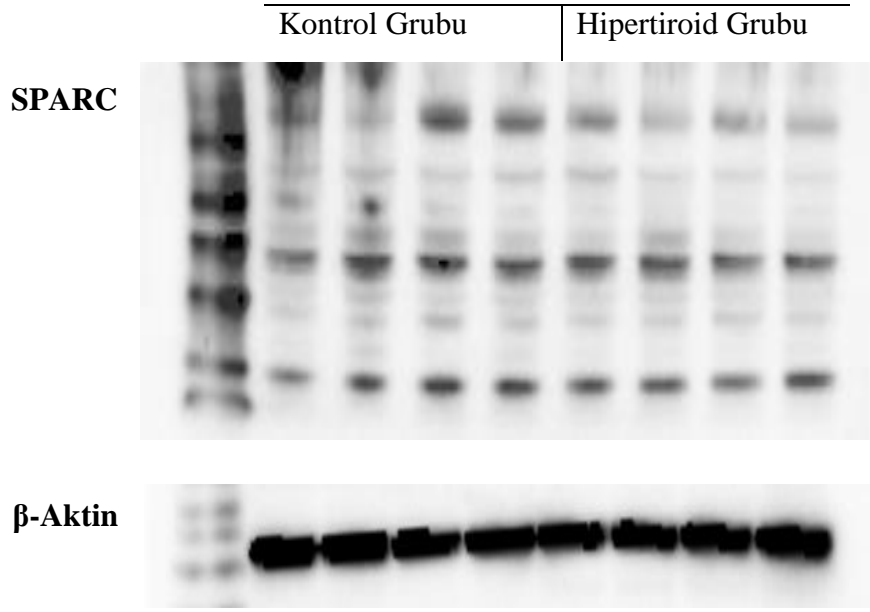
Şekil 76. Kontrol ve hipertiroidi grupları uterus ve plasenta dokusunda SPARC protein ekspresyon düzeyi



Şekil 77. Kontrol ve hipertiroidi grupları 5. gün uterus dokularında SPARC protein ekspresyonu



Şekil 78. Kontrol ve hipertiroidi grupları 20. gün uterus dokularında SPARC protein ekspresyonu

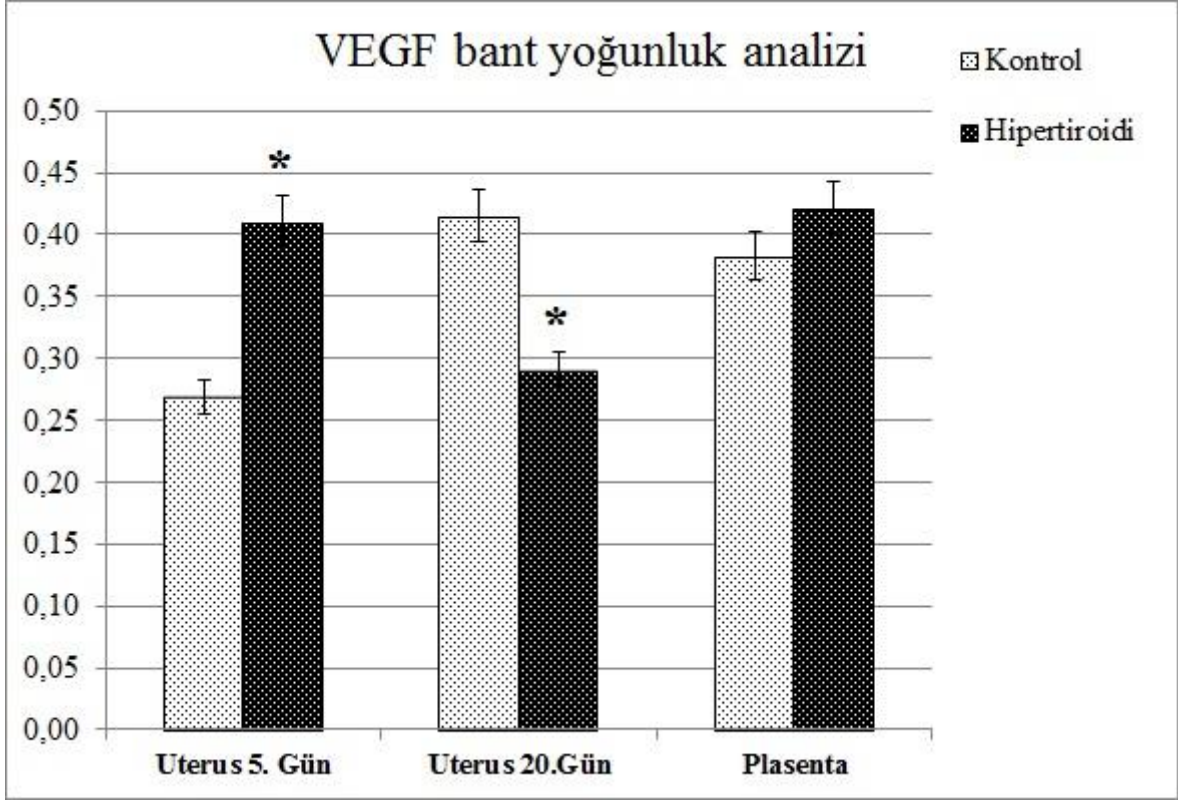


Şekil 79. Kontrol ve hipertriodi grupları plasenta dokularında SPARC protein ekspresyonu

VEGF Western Blot Bulguları

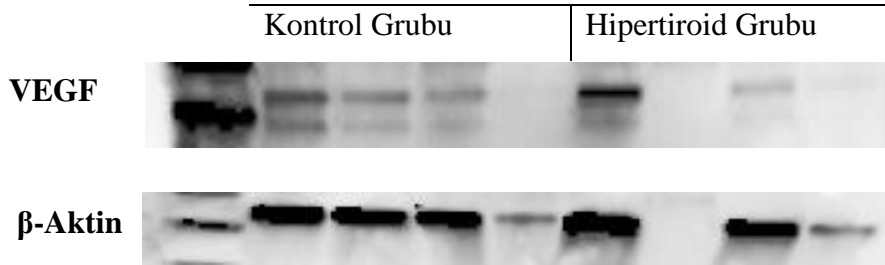
5. gün ve 20. gün gebelik gruplarından alınan uterus ve 20. gün gebelik grubundan alınan plasenta dokularının VEGF ekspresyonunun western blot bulgularına ait bant yoğunluk analizleri Şekil 80’de grafik olarak verilmiştir.

Uterus 5. gün dokularında hipertriodi grubunda VEGF ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$; Şekil 81). 20.gün uterus dokularında VEGF ekspresyonu hipertriodi grubunda azalma göstermiştir ($P<0.05$; Şekil 82). Hipertiroidi plasenta dokusundaki VEGF protein miktarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$; Şekil 83).

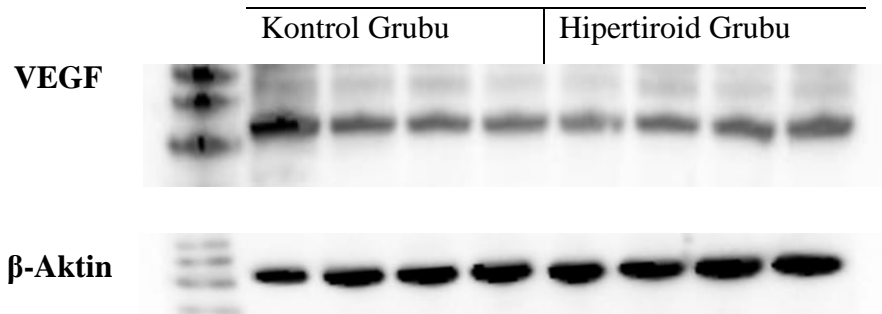


*: $P < 0.05$; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermiştir.

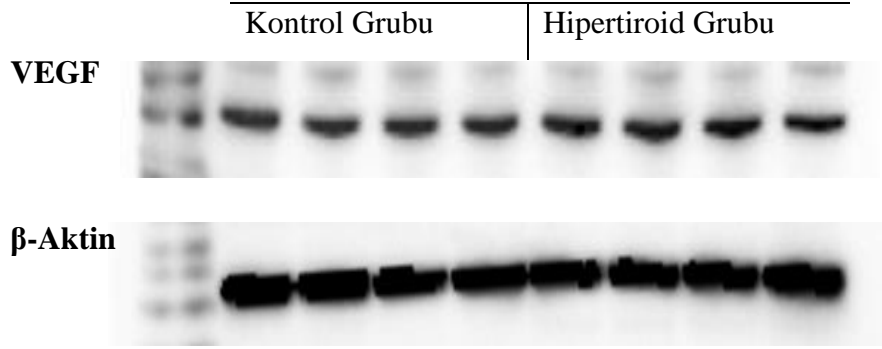
Şekil 80. Kontrol ve hipertriodi grupları uterus ve plasenta dokusunda VEGF protein ekspresyon düzeyi



Şekil 81. Kontrol ve hipertriodi gruplarında 5. gün uterus dokularında VEGF protein ekspresyonu



Şekil 82. Kontrol ve hipertrioidi gruplarında 20.gün uterus dokularında VEGF protein ekspresyonu



Şekil 83. Kontrol ve hipertiroidi gruplarında plasenta dokularında VEGF protein ekspresyonu.

TARTIŞMA

Vücutta metabolik olayların gerçekleşmesi ve sağlıklı devam etmesi için tiroid hormonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Herhangi bir sebeple tiroid hormonlarının serumda normalden daha az olması veya daha fazla olması metabolik olayları olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple patolojik bulgular, birçok organda gözlenebilir. Yapılan çalışmalarda, tiroid hormonlarının serum seviyelerine bağlı olarak farklı dokuları farklı şekilde etkilediği ortaya konmuştur. Tiroid hormonları komplikasyonları serum TSH, T₄ ve T₃ seviyeleri ile bulgu verir (11).

Tiroid bezinin kontrol Hipotalamo-hipofizer aksı tarafından geri besleme mekanizması ile kontrol edilir. Hipotalamustan salgılanan TRH hipofizi uyararak TSH salınımını artırır. Kanda artan TSH konsantrasyonu, tiroidi uyararak tiroid hormonlarının üretilmesini ve kanda seviyelerinin artmasına sebep olur. Artış yeterli seviyeye ulaştığında hipofizin TSH üretimini azaltması ve tiroid bezinin uyarılmasını durdurması için hipofiz uyarılır ve TSH salınımı azalır. Böylece tiroid hormonu, kendi seviyesinin negatif geri besleme mekanizması ile kontrol eder (6).

Hipertiroidi serumda yüksek seviyede T₃ ve T₄, düşük seviyede TSH ile karakterizedir. Serumda tiroid hormonlarının yüksek seviyede olmasının birçok nedeni olabilir. Klinik olarak en yaygın sebebi, otoimmün bir hastalık olan Graves hastalığında, vücudun fazla oranda IgG yapıda TSH antikoru üretmesidir. Bu antikolar, geri besleme mekanizmasından etkilenmeden tiroid bezi üzerindeki TSH reseptörlerine bağlanıp tiroidin sürekli uyarılmasını sağlar (26).

Graves hastalığından sonra hipertiroidinin en yaygın sebepleri toksik multinodüler guatr (Plummer Hastalığı) ve toksik adenom hastalıklarıdır. Her iki hastalıkta tiroid dokusunda gelişen nodüller, TSH uyarımına ihtiyaç duymadan sürekli tiroid hormonu üretirler.

Deneysel hipertiroidi farklı yöntemlerle oluşturulmaktadır. Günümüzde gelişen moleküler biyolojik tekniklere bağlı olarak tiroid hastalıklarına ait ayrı ayrı deneysel modeller oluşturulabilmektedir. Bu teknikler arasında en yaygın, olanı rekombinant DNA kullanımı ile modeli oluşturulmak istenen hastalığa bağlı olarak, tiroid bezinin sürekli çalışmasını sağlayacak transgenik hayvanlar üretmektir. Belirli dozajlarda LT_4 ve LT_3 uygulamalı deneysel hipertiroid modeli, hastalıklarının sebeplerinden bağımsız olarak hepsinin ortak komplikasyonu olan serum tiroid hormonu seviyesini artırarak oluşturulmaktadır. Deneyin şartlarına bağlı olarak LT_4 veya LT_3 yada ikisi birden uygulanır (26). T_3 tiroid hormonunun aktif hali olup yarılanma ömrü ve etki süresi kısadır. Tiroidden salgılanır, periferde ise T_4 'ten T_3 'e çevrilerek üretilir. LT_4 , prohormon olarak görev yapar, sadece tiroidden salgılanır. Yarılanma hızı uzundur bu sebeple LT_4 varlığında tiroid etkisi kontrollü ama süreklidir. Bu çalışmada, serum fizyolojik içinde 250 mcg/kg konsantrasyonunda LT_4 subkutan enjeksiyon yolu ile uygulandı. Bu oranın, hem çalışmamızda hem diğer çalışmalarda metabolizmada hipertiroid komplikasyonları oluşturmaya yeterli bir oran olduğu ortaya konmuştur. Hipertiroid çalışmalarında uygulanan tiroid hormonu dozajı, komplikasyonların karakterini, şiddetini ve süresini etkileyen faktörlerdir.

LT_4 uyarımlı deneysel hipertiroid modelinde, insan hipertiroid durumuna benzer olarak serum T_3 ve T_4 oranında artış, TSH seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Gruplardan alınan tiroid bezi histolojik kesitlerinin rutin ışık mikroskobu incelemesi, hipertiroid komplikasyonlarının organ morfolojisi seviyesinde ortaya çıktığını göstermektedir.

Hipertiroidinin üreme sistemi fizyolojisi ve morfolojisini etkilediği yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu etkilerin hangi mekanizmalar üzerinden olduğu ve fizyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Buna bağlı olarak, hipertiroidi hastası annenin gebeliği süresince gelişen komplikasyonlar ve mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Gebeliğin oluşumundan, devamına ve doğuma kadar olan süreçte tiroid hormonlarının farklı görevleri olduğu bilinmektedir.

Hipertiroidi yüksek miktarda tiroid hormonu seviyesinden dolayı metabolizmayı hızlandırır ve lipid oksidasyonu, protein yıkımı, glikoz kullanımını artırır. Kas sisteminde kasılma artar, eritropoez artar, GIS'te besin emilim mekanizması bozulur (17). Karaciğerde

enzim miktarı ve karaciğer lezyonları artar. Kemik dokusunda ise GH, IGF'in salınımı artar (9). Kemik metabolizması hem ossifikasyonun hem kemik yıkımın artışıyla bozulur. Hiperkalsemi gelişir (20). Üreme sisteminde ise menstruasyonda düzensizlik, uterusu östrojen direnci, östrojen miktarında artış görülür. Gebelik sürecinde prolaktinin azaldığı, dozaja bağlı olarak bir batındaki doğum sayısının düştüğü, implantasyon oranının düştüğü tespit edilmiştir (26).

Çalışmamızda, hipertiroidin gebelik üzerindeki etkilerini anlamak üzere 5. gün ve 20. gün gebelik grupları oluşturulmuştur. Uterus ve plasenta dokularının immunohistokimyasal analizinde uterusu; endometrium epitel ve endometrium bez epiteli hücreleri, plasentada; bazal plak ve labirent katmanı incelenmiştir. Bulgular uterusu 100 hücredeki pozitif hücre sayısı; plasentada bazal plakta mm²'de pozitif hücre sayısı, labirent katmanında ise mm²'de semikantitatif değerlendirme ile edilmiştir. Proteinlerin dokuda protein düzeyindeki ekspresyonu ise WB aracılığıyla tayin edilmiştir.

İlk kemik dokuda ve tümör bazal membranında tespit edilen glikoprotein yapıdaki SPARC molekülü, dokuların yenilenmesi sırasında ECM'nin düzenlenmesini sağlar (39). Hücrenin adhezyonunu engelleyerek ve yuvarlanmasını sağlayarak, hücrenin ECM ve diğer hücreler ile irtibatını en aza indirger. Böylece hücrenin proliferasyonunu engellemiş olur. Kalsiyum bağlayıcı bir proteindir, kalsiyumun varlığı kararlılığını artırır. Büyüme faktörleri ve kollajenlerle bağlandığı bilinmektedir.

Uterus dokuları SPARC pozitif hücreler açısından incelendiğinde bir çalışmada, Wever ve ark. (1988) endometrium bez epitel hücrelerinde ve bazal membranında immunohistokimyasal olarak tespit edememiş ise de; in situ hibridizasyonla bez epitel dokuda SPARC ekspresyonu olduğu bilgisini vermişlerdir (41). Çalışmamızda ise, bütün gruplarda endometrium epitel ve bez epitel hücreleri sitoplazmasında belirgin pozitif boyanma görülmüş, epitel bazal membranında belirgin bir boyanmayla karşılaşılmanmıştır. İstatistiksel analiz sonucu 5. gün gebeliklerde kontrol grubu ve hipertiroid grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Uterus dokusu protein düzeyi ekspresyonunda ise 5. gün hipertiroid grubunda SPARC ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (P<0.05).

Yirminci gün uterus endometrium epitel ve bez epitel hücrelerinde, immunohistokimyasal incelemede SPARC ekspresyonu hipertiroid grubunda anlamlı bir azalma göstermiştir. Uterus dokusu protein düzeyi WB ile analiz edildiğinde benzer şekilde hipertiroid grubunda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Plasenta bazal katmanda SPARC ekspresyonu immünohistokimyasal bulguları her iki grup arasında anlamlı bir farklılığın olmadığını göstermektedir. Bazal katmanda plasentanın maternal kısmı olan desidua tabakasında ekspresyona rastlanmamıştır. Desidua katmanının hemen altında bulunan dev hücrelerde belirgin pozitif boyanma gözleendiği gibi, belirgin negatif boyanmalar da gözlenmiştir. Yoğun boyanmanın olduğu tabaka sitotrofoblast tabakasıdır. Sitoplazmik olarak boyanan sitotrofoblast tabakasında endotel hücrelerinde de boyanma görülmüştür.

Labirent katmanında, SPARC'ın immünohistokimyasal incelemesinde, hipertiroidi grubu anlamlı bir artış göstermiştir. Labirent katmanında SPARC ekspresyonu hem sitoplazmik hem ECM'de görülmüştür.

Uterusun gebelik öncesi özelleşerek desidua tabakasını oluşturması implantasyonun başarılı olması için önemlidir. Endometrium stroma tabakasının farklılaşarak desiduya dönüşmesi TGFβ-1 kontrolünde gerçekleşir. ECM proteinlerinin sentezini ve bağ dokunun şekillenmesini kontrol eder. Fibroblastlar üzerine yapılan bir araştırmada, TGFβ-1'in SPARC ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. Bununla paralel olarak, fare mezengiyal hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ise SPARC'ın TGFβ-1'i artırdığı tespit edilmiştir (40).

Çalışmamızda TGFβ-1 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelenmiş gebelik 5. gün uterus endometrium epitel ve bez epitel hücrelerinde ekspresyon hipertiroid grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. 20. gün uterus dokusu endometrium epitel ve bez epitelinde hipertiroid grubu, anlamlı bir artış göstermiştir.

Plasenta dokusunda ise bazal plakta immünohistokimyasal incelemede TGFβ-1 pozitif hücre sayısı hipertiroid grubunda kontrole göre artış göstermiştir. Labirent katmanında ise semikantitatif değerlendirme hipertiroid grubunda azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Plasenta gelişimi ve uterus fizyolojisinde önemli rolü olan VEGF anjiyogenik faktör olarak bilinir. Endotel hücreleri tarafından salgılanır. ECM'yi kontrol ederek vaskülogenez ve anjiyogenezi tetikler. ECM'de kollajenaz aktivitesini tetikleyerek endotel proliferasyonunu uyarır. Antianjiyogenik olarak endotel geçirgenliğini kontrol eder ve hücrelerin korumasından sorumludur. Clark ve ark. (1998) ilk trimester ve son trimesterde elde edilen insan desidua ve plasenta dokularında yaptıkları VEGF immünohistokimya analizi term plasenta villuslarındaki trofoblast hücrelerinin boyanma göstermediğini, villus stromasında pozitif boyanma görüldüğünü tespit etmişlerdir. Endometrium epiteli, endometrium bez epitelinde ve bazı desidua hücrelerinde her iki trimesterde pozitif boyanma görülmüş fakat her iki grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir (51).

Çalışmamızda kontrol grubuna göre hipertiroid grubunda 5. gün uterus endometrium epitel ve bez epitel hücrelerinde, immünohistokimyasal anti-VEGF pozitif hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Protein düzeyi ekspresyonda ise hipertiroid grubunda artma gözlenmiştir. Endometriyum epitel ve bez epitel hücrelerinde immünohistokimyasal bulgular anlamlı farklılık göstermezken dokuda protein düzeyi ekspresyon hipertiorid grubunda azalma göstermiştir.

Plasenta dokusu VEGF immünohistokimyasal incelemesinde hipertiroid grubunda anlamlı olarak daha fazla pozitif boyanma tespit edilmiştir. Labirent katmanında ise benzer şekilde hipertiroidi grubunda anlamlı bir artış vardır. Western blot analizinde ise VEGF ekspresyonu hipertiroidide artmış olsa da anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada deneysel hipertiroid modelinde gebeliğin farklı dönemlerinde bazı faktörlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

250 mcg/kg dozda uygulanan L-tiroksin uyarımlı sıçan hipertiroid modelinde; gebeliklerinin 5. ve 20. Günde sakrifiye edilen hayvanlardan alınan uterus ve plasenta dokularında immünohistokimyasal ve protein ekspresyonu değerlendirmeleri yapıldı. SPARC ve VEGF proteinlerinin uterus endometrium epitel ve bez epitel hücrelerinde ekspresyonu immünohistokimyasal ve Western blot yöntemiyle; SPARC , VEGF ve TGF β -1 proteinleri immünohistokimyasal olarak incelendi.

1. 250 mcg/kg L-tiroksinin uygulamasıyla oluşturulan deneysel hipertiroidin organ düzeyinde morfolojik değişimlere sebep olduğu gözlemlendi.
2. Yapılan mikroskopik incelemede hipertiroid grubunda tiroid bezinde hasar olduğu gözlemlendi.
3. Gebelik plasenta ve uterus dokularında SPARC ekspresyonunun olduğu gözlemlendi.
4. SPARC ekspresyonunun erken dönem gebelikte aktif rol oynamadığı gözlemlendi ($p>0.05$).
5. SPARC ekspresyonunun geç dönem gebelikte hipertiroidi ile uterus endometriyumunda artış gösterdiği, plasenta labirent tabakasında ise azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$).

6. SPARC ekspresyonunun kontrol grubunda uterus dokusunda endometrium ve bez epiteli ile bazı stroma hücrelerinde ekspres edildiği tespit edildi.
7. Hipertiroidide, endometriyum epitel ve bez epiteli dokusunda VEGF ve TGF β -1 ekspresyonları 5. günde azalma gösterirken, 20. gün gebelikte artış göstermiştir. (p<0.05).

ÖZET

Hipertiroid tiroid hormonları serum seviyesinin yükselmesiyle tanımlanır. Üreme sistemi de dahil olmak üzere birçok dokuda çeşitli komplikasyonlara sebep olmaktadır. Üreme sistemiyle ilgili implantasyon başarısızlığı, abortus, plasenta dekolmanı, pre-eklempsiye gibi hipertroidin etkileri değişmektedir. Çalışmamızda yer alan SPARC protein ekstraselüler matrkisin ve hücre-matriks iletişimini şekillendiren matriselüler bir proteindir. Hipertiroididen etkilendiği bilinen vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) direk bağlandığı ve Dönüştürücü büyüme faktörü β -1 (TGF β -1) ile etkileşim halinde SPARC'ın fonksiyonel olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda farklı dönem gebelikte hipertroidinin sebep olduğu komplikasyonların hücresel düzeyde sebeplerinin aydınlatılmasına katkıda bulunmayı hedefledik. 24 adet dişi Sprague Dawley sıçan 6 üyeli halinde 4 gruba ayrıldı (kontrol 5. grup, kontrol 20. grup, hipertroid 5. grup, hipertroid 20. grup). Hipertiroid grubuna 21 gün boyunca L-tiroksin subkutan olarak uygulandı ve uygun erkek sıçanlarla bir araya bırakılarak gebelik gelişmesi sağlandı. Vajinal smear ile gebelik tayini yapılan hayvanlar gebeliğin 5. ve 20. günlerinde sakrifiye edilerek plasenta ve uterus dokuları alındı. Uterus endometrium ve bez epitel hücrelerinde 100 hücrede pozitif hücre sayısı elde edilerek, plasenta bazal plak tabakasında mm^2 'de pozitif hücre sayısı sayılarak, labirent katmanında ise mm^2 'de semikantitatif değerlendirme ile SPARC, VEGF and TGF β -1 immünoreaktivitesi analiz edildi. Protein seviyesinde SPARC ve VEGF ekspresyonunu anlamak için 5. gün ve 20. gün uterus dokuları ve plasenta dokusu Western Blot ile incelendi. Semikantitatif değerlendirme şu şekilde skorlandı; 0=reaksiyon yok; 1=zayıf reaksiyon, hücre reaktivitesi 25%'in altındaysa, 2=orta

reaksiyon, %25-50 arasındaysa; 3=kuvvetli reaksiyon, 50-75 arasındaysa ve 4=çok kuvvetli reaksiyon %75'den fazlaysa.

Bulgu olarak, 5. gün hipertiroid endometrium ve bez epitel hücrelerinde, kontrol grubuna göre SPARC ekspresyonunun anlamlı değişme göstermediği; VEGF ve TGFβ-1 'in ise azaldığı gözlenmiştir. 20. gün endometrium ve bez epitellerinde ise, hipertiroid grubunda SPARC ekspresyonunun azaldığı, VEGF ve TGFβ-1 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Plasenta bazal tabakada ise SPARC iki grup arasında değişiklik göstermezken, VEGF ve TGFβ-1 kontrol grubuna göre hipertiroid grubunda artma göstermiştir. Labirent katmanında ise SPARC ve VEGF semikantitatif analizle kontrol grubuna göre daha yüksek skor alırken, TGFβ-1 daha düşük skor vermiştir. Western Blot bulgularında ise 5. gün, 20. gün uterus dokularında ve plasenta dokusunda SPARC azalma gösterirken, VEGF ekspresyonu 5. gün uterus dokusunda ve plasenta dokusunda artmış, 20. gün uterus dokusunda azalma göstermiştir.

Sonuç olarak hipertiroid ile birlikte uterus ve plasenta SPARC, VEGF ve TGFβ-1 ekspresyonları değişmektedir. Hipertiroid VEGF and TGFβ-1 ekspresyonlarını erken dönem gebelikte azalmasına sebep olurken SPARC'ta anlamlı bir değişikliğe sebep olmaması erken dönem desidualizasyon sürecinde SPARC'la aynı işlevde olan diğer matriselüler proteinlerin varlığını düşündürmektedir. Geç dönem gebelikte ise SPARC'ın büyüme faktörleri ile etkileşimi halinde olduğu düşünülmektedir. SPARC'ın diğer büyüme faktörleri ile etkileşiminin mekanizmasını anlamak için daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu iletişimi ortaya çıkarmak hipertiroidden kaynaklanan gebelik komplikasyonlarının tedavisinde yeni bir kapı aralayabilir.

Anahtar Kelimeler: Hipertiroid, uterus, plasenta, SPARC, TGFβ-1, VEGF.

**THE IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF OSTEONECTIN
(SPARC) AND TGF β -1 DISTRIBUTION IN THE PLACENTA AND
UTERIN TISSUES OF PREGNANT RATS WITH
EXPERIMENTALLY INDUCED HYPERTHYROID
SUMMARY**

Hyperthyroidism is defined with high blood levels of thyroid hormones. As for reproductive system, hyperthyroidism causes various complications such as miscarriage and pre-eclampsia. In addition, SPARC is a matricellular protein to regulate the organization of extracellular matrices and cell-matrix interactions. It binds directly to Vascular endothelial growth factor (VEGF) and also interacts with Transforming Growth Factor β -1(TGF β -1) which the expression levels also change in hyperthyroidism, in addition to various growth factors .

In our study, we aim to contribute to the underlying mechanism of the complications because of hyperthyroid during pregnancy in different stages. Twenty four female rats are divided into four groups (control 5thday, control 20thday, hyperthyroid 5thday and hyperthyroid 20thday; n=6 for each). L-thyroxine are administered to animals for 21 days to establish hyperthyroid and then mate with male rats to develop pregnancy. With vaginal smear analysis, the pregnancy are identified. In the 5thday and 20thday of pregnancy, the animals are sacrificed; the immunoreactivity of SPARC, TGF β -1 and VEGF protein expression are analysed in placenta and uterine tissues. The protein expression level of SPARC and VEGF are detected by Western Blot in placenta and uterine tissue. 20thday placenta sections are analysed by counting the number of positive cells per mm² whereas 5th and 20thday uterine

sections are graded with semiquantitative scoring system as described. The intensity of staining with antibodies are subjectively scored; 0=nonreactivity; 1=weak, individualized cell reactivity in $\leq 25\%$ of magnified area; 2=mild to moderate reactivity in $\leq 50\%$ of magnified area; 3=strong reactivity in $\leq 75\%$ of islets; and 4=very strong reactivity in $>75\%$ of magnified area.

As a result, we observed that in hyperthyroid endometrium epithelial and glandular epithelial cells, the expression of SPARC does not change in comparison to control group whereas that of VEGF and TGF β -1 decrease in 5th day. In 20th day uterine endometrium and glandular epithelial cells, the expression of SPARC decreases whereas that of VEGF and TGF β -1 increase. In placenta basal plate of hyperthyroid groups, expression of SPARC has no change, however immunoreactivity of VEGF and TGF β -1 increases comparing to control groups. In the placenta labyrinth zone, SPARC and VEGF show higher score; TGF β -1 shows lower score in comparison to control group with semiquantitative analysis. As for Western Analysis, in placenta and uterine tissues of hyperthyroid groups, SPARC band intensity decreased when they were compared to control groups. VEGF expression in 5th day uterine and placenta in hyperthyroid group increased whereas it decreased in hyperthyroid 20th day uterine.

In conclusion, SPARC, VEGF and TGF β -1 are underlying proteins of the complications of hyperthyroid in uterine and placenta tissues during pregnancy. Hyperthyroid affect VEGF and TGF β -1 expression in uterine during pregnancy in the same profile when it accounts for only endometrium. The results show that SPARC has not active role in the early pregnancy. It could be the activity of other matricellular proteins which share the similar function with SPARC. However in 20th day uterine, hyperthyroid changes SPARC expression. In the early pregnancy, it shows that SPARC does not have correlation with VEGF and TGF β -1. Understanding the interaction between SPARC and growth factors, further studies are required. Understanding the interactions between them and the downstream and upstream mechanisms contributes the treatments to prevent fertility dysfunctions because of hyperthyroidism.

Keywords: Hyperthyroid, uterine, placenta, SPARC, TGF β -1, VEGF.

KAYNAKLAR

1. Türker T. Tiroid Hastalıkları ve Metabolik Sendrom (Tez). İstanbul: Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
2. Krassas GE, Poppe K, Glinoeer D. Thyroid function and human reproductive health. *Endor Rev* 2010; 31(5):702–55.
3. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Bio* 2012;44(3):480–488.
4. Conti E, Zezza E, Ralli D, Caserta MB, Msumucei M, Moscarini A et al. Growth factors in preeclampsia: A vascular disease model. A failed vasodilation and angiogenic challenge from pregnancy onwards?. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24(5): 411-25.
5. Bora F, Şekercan Ö, Yücel Z, Ceylan S, Batmaz T, Atalay Erdoğan B. Çift Duktus traktlı Tiroglossal kist fistülü: Olgu sunumu. *İstanbul Tıp Derg* 2011;12(3):141-4.
6. The thyroid gland. [sample chapter online] <http://www.eu.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780723434276/9780723434276.pdf>
7. Ross MG, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (çeviri: B.Baykal) İstanbul: Palme Yayıncılık; 2014.
8. Rasmussen UF, Rasmussen AK. Thyroid hormone transport and actions. *Pediatr Adolesc Med*. 2007;11:80–103
9. Malik R, Hudgson H. The relationship between the thyroid gland and the liver. *Q J Med* 2002; 95:559–69.
10. Devereaux D, Tewelde SZ. Hyperthyroidism and thyrotoxicosis. *Emerg Med Clin N Am* 2014;32:277–92.
11. McKeown NJ, Tews MC, Gossain VV, Shah SM. Hyprethyroidism. *Emerg Med Clin N Am* 2005;23:669–685.

12. Gündoğdu SA. Hipertiroidi. Tiroid Hastalıklar Sempozyumu s.37-42, İstanbul, 1999.
13. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Duncan Bassett JH. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol* 2012;213(3):209-21.
14. Kung AWC. Neuromuscular complications of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67(5):645-50.
15. Girling JC. Thyroid disorders in pregnancy. *Current Obstetrics & Gynaecology* 2006;16:47-53
16. Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:31-50.
17. Daher R, Yazbeck T, Jaoude JB, Abboud B. Consequences of dysthyroidism on the digestive tract and viscera. *World J Gastroenterol* 2009;15(23):2834-8.
18. Zhou L, Li X, Ahmed A, Wu D, Lü L, Qiu J et al. gut microbe analysis between hyperthyroid and healthy individuals. *Curr Microbiol* 2014; 69:675-80.
19. Ch'ng CL, Biswas M, Benton A, Jones MK, Kingham JGC. Prospective screening for coeliac disease in patients with Graves' hyperthyroidism using anti-gliadin and tissue transglutaminase antibodies. *Clin Endocrinol* 2005;62:303-6.
20. Cardoso LF, Maciel LMZ, Paula FJA. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(5):452-63.
21. Lu MH, Anderson RR. Triiodothyronine induced hyperthyroidism and reproduction in female rats. *Endocr Res* 1996;22(3):237-60.
22. Mansourian AR. Female reproduction physiology adversely manipulated by thyroid disorders: A review of literature. *Pak J Biol Sci* 2013;16(3):112-20.
23. Crowther CA, Middleton P. Interventions for hyperthyroidism pre-pregnancy and during pregnancy (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2013;11:CD008633.
24. Tahboub R, Arafah BM. Sex steroids and the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23(6):769-80.
25. Tazegül A, Şimşek B. Gebelikte tiroid hastalıkları. *Selçuk Tıp Derg* 2010;26(2):63-7.
26. Dadan J, Zbucki RL, Sawick B, Bialuk I, Zawadzka A, Winnicka MM et al. Preliminary immunohistochemical investigations of thyroid C cells in an experimental model of hyperthyroidism. *Folia Morphol* 2003;62(4):319-21.
27. Socol ER. Clinical anatomy of the uterus, fallopian tubes, and ovaries. *Glob libr women's med* [online dergi]. 2011.
http://www.glowm.com/section_view/heading/Clinical%20Anatomy%20of%20the%20Uterus,%20Fallopian%20Tubes,%20and%20Ovaries/item/1
28. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY (çeviri: Y. Ceylan, G.Yıldırım, A.Gedikbaşı, H.Aslan, A.Gül) Williams obstetrik. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2010.

29. Ellis H. Anatomy of uterus. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 2011;12(3):99 – 101.
30. Healey A. Embryology of the female reproductive tract. In: Mann GS, Blair CJ, Garden AS (Editörler). *Imaging of Gynecologic disorders in infants and children* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012. sf. 21-30.
31. Cicinelli E, Einer-Jensen N, Galantino P, Alfonso R, Nicoletti R. The vascular cast of the human uterus from anatomy to physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034: 19–26.
32. Guidice LC, Mark SP, Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual–trophoblast interface. *J Reprod Immunol* 1998;39(1-2):133-48.
33. Ferin M, Jewelewicz R, Warren M. *The menstrual cycle*. New York: Oxford University Press;1993.
34. Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* 2005;27(2):141–69.
35. Lacroix MC, Guibourdenche J, Frenzo JL, Pidoux G, Brion DE. Placental growth hormones. *Endocrine* 2002;19(1);73–9.
36. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol* 2008;61:1296–1302.
37. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King R. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004;114:397—407.
38. Wang Y, Zhao S. *Vascular biology of the placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. (online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53256/>)
39. Motamed K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Bio*. 1999;31(12):1363-6.
40. Yan Q, Sage HE. SPARC, a Matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999;47(12):1495-506.
41. Wever UM, Albrechtsen R, Fisher LW, Young MF, Termine JD. Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissues characterized by de novo formation of basement membrane. *Am J Pathol* 1988; 132(2):345-55.
42. Cuman C, Menkhorst EM, Rombauts LJ, Holden S, Webster D, Blandzic M et al. Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative. *Hum Reprod*. 2013;28(5):1161-71.
43. Gombotz WR, Pankey SC, Bouchard LS, Phan DH, MacKenzie AP. Stability, Characterization, Formulation, and Delivery System Development for Transforming Growth Factor-Beta 1. Pearlman R, Wang JY (Editörler). *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs*’da. New York: Plenum Press;1996. sf.219-245.
44. Shull MM, Doetschmann T. Transforming growth Factor- β 1 in reproduction and development. *Mol Reprod Dev* 1994;39(2):239-46.

45. Tamada H, McMasterj MT, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK. Cell type-specific expression of transforming growth factor- β 1 in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol Endocrinol* 1990;4(7):965-72.
46. Qian D, Lin HY, Wang HM, Zhang X, Liu DL, Li QL et al. Involvement of ERK1/2 pathway in TGF- β 1-Induced VEGF secretion in normal human cytotrophoblast cells. *Mol Reprod Dev* 2004;68(2):198-204.
47. Breen E. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007;102(6):1358-67.
48. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) — part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol* 2011;62(5):444-55.
49. Rabbani M(LM), Rogers PAW. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 2001;122(1):85-90.
50. Srivastava RK, Gu Y, Zilberstein M, Gibori G. Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J Mol Endocrinol* 1998;21(3):355-62.
51. Clark DE, Smith, SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998;159(3):459-67.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	SAYFA NO
Şekil 1. Tiroid bezi ve komşuluklarının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2. Hipotalamo-Hipofizer-Tiroid Aksı	8
Şekil 3. Uterus Anatomisi.....	15
Şekil 4. Uterus histolojisi ve katmanları.....	17
Şekil 5. Menstrual döngü : A- Şematik gösterimi, B- Endometrium histolojisi.	18
Şekil 6. Kotiledonun yapısı; A- Şematik gösterimi, B- Koryonik villus çeşitler.....	21
Şekil 7. Plasentanın yapısı; A- Plasentanın yerleşimi ve katmanları, B-Koryonik villus histolojisi	23
Şekil 8. Deney ve Kontrol Gruplarında TSH Bulguları	37
Şekil 9. Deney ve Kontrol Gruplarında Serbest T4 Bulguları	38
Şekil 10. Kontrol grubu gebelik 5. gün tiroid bezi H+E boyaması, X400.....	39
Şekil 11. Hipertiroid grubu gebelik 5. gün tiroid bezi H+E boyaması, X400.....	39
Şekil 12. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus dokusu H+E boyaması, X100.....	40
Şekil 13. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterus dokusu H+E boyaması, X400.....	40
Şekil 14. Kontrol grubu plasenta dokusu H+E boyaması, X100.....	41
Şekil 15. Hipertiroid grubu plasenta dokusu H+E boyaması, X100.....	41
Şekil16. Kontrol ve hipertiroidi grupları uterus dokusunda SPARC pozitif hücre dağılımı.....	43

Şekil 17. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus endometriyum epiteli ve bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	44
Şekil 18. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X40	44
Şekil 19. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	45
Şekil 20. Kontrol grubu gebelik 20. Gün uterus endometriyum epiteli ve bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	45
Şekil 21. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X100.....	46
Şekil 22. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	46
Şekil 23. Kontrol grubu gebelik 20. gün plasenta dokusunda görülen negatif boyanma, X100.....	47
Şekil 24. Kontrol grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif SPARC boyaması, X100.....	47
Şekil 25. Kontrol grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	48
Şekil 26. Kontrol grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	48
Şekil 27. Hiperitiroidi grubu 5.gün uterus endometrium epiteli ve bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	49
Şekil 28. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometrium epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X100.....	49
Şekil 30. Hiperitiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	50
Şekil 31. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X400.....	50
Şekil 32. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	51
Şekil 33. Hiperitiroidi grubu 20.gün plasenta katmanlarında görülen negatif boyanma, X100.....	51

Şekil 34. Hipertiroidi grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif SPARC boyaması, X100.....	52
Şekil 35. Hipertiroidi grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	52
Şekil 36. Hipertiroidi grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif SPARC boyaması, X400.....	53
Şekil 37. Kontrol ve hipertiroidi grupları uterus ve plasenta dokusunda TGFβ-1 pozitif hücre dağılımı	54
Şekil 38. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	55
Şekil 39. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif TGFβ-1 boyaması, X400.....	56
Şekil 40. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	56
Şekil 41. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif TGFβ-1 boyaması, X400.....	57
Şekil 42. Kontrol grubu gebelik 20.gün plasenta katmanlarında görülen negatif boyanma, X100.....	57
Şekil 43. Kontrol grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif TGFβ-1 boyaması, X400.....	58
Şekil 44. Kontrol grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif TGFβ-1 boyaması, X400.....	58
Şekil 45. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	59
Şekil 46. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen TGFβ-1 boyaması, X100.....	59
Şekil 47. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen TGFβ-1 boyaması, X400.....	60
Şekil 48. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	60
Şekil 49. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen TGFβ-1 boyaması, X100.....	61
Şekil 50. Hipertiroidi grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve	

endometrium bezlerinde görülen TGF β -1 boyaması, X400.....	61
Şekil 51. Hipertiroidi grubu 20. gün plasenta katmanlarında görülen negatif boyanma, X100.....	62
Şekil 52. Hipertiroidi grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif TGF β -1 boyaması, X100.....	62
Şekil 53. Hipertiroidi grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif TGF β -1 boyaması, X400.....	63
Şekil 54. Hipertiroidi grubu plasenta labirent katmanında görülen pozitif TGF β -1 boyaması, X400.....	63
Şekil 55. Kontrol ve hipertiroidi grupları uterus dokusunda VEGF pozitif hücre dağılımı	64
Şekil 56. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	65
Şekil 57. Kontrol grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometriyum bezlerinde görülen pozitif VEGF boyaması, X100.....	66
Şekil 58. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	66
Şekil 59. Kontrol grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	67
Şekil 60. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif VEGF boyaması, X40.....	67
Şekil 61. Kontrol grubu gebelik 20.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	68
Şekil 62. Kontrol grubu 20. gün plasenta katmanlarında görülen negatif boyanma, X400.....	68
Şekil 63. Kontrol grubu plasenta katmanlarında görülen pozitif VEGF boyaması, X100.....	69
Şekil 64. Kontrol grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	69
Şekil 65. Kontrol grubu plasenta labirent katmanında görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	70
Şekil 66. Kontrol grubu plasenta labirent alanında görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	70
Şekil 67. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	71
Şekil 68. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve	

endometrium bezlerinde görülen pozitif VEGF boyaması, X100.....	71
Şekil 69. Hipertiroidi grubu gebelik 5.gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen VEGF boyaması, X400.....	72
Şekil 70. Hipertiroidi grubu gebelik 20. Gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen negatif boyanma, X100.....	72
Şekil 71. Hipertiroidi grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezlerinde görülen pozitif VEGF boyaması, X100.....	73
Şekil 72. Hipertiroidi grubu gebelik 20. gün uterusu endometriyum epiteli ve endometrium bezinde görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	73
Şekil 73. Kontrol grubu gebelik 20.gün plasenta katmanlarında görülen negatif boyanma, X100.....	74
Şekil 74. Hipertiroidi grubu plasenta bazal plağında görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	74
Şekil 75. Hipertiroidi grubu plasenta labirent plağında görülen pozitif VEGF boyaması, X400.....	75
Şekil 76. Kontrol ve hipertrioidi grupları uterus ve plasenta dokusunda SPARC protein ekspresyon düzeyi.....	76
Şekil 77. Kontrol ve hipertrioidi grupları 5. gün uterus dokularında SPARC protein ekspresyonu.....	76
Şekil 78. Kontrol ve hipertrioidi grupları 20. gün uterus dokularında SPARC protein ekspresyonu.....	76
Şekil 79. Kontrol ve hipertrioidi grupları plasenta dokularında SPARC protein ekspresyonu.....	77
Şekil 80. Kontrol ve hipertrioidi grupları uterus ve plasenta dokusunda VEGF protein ekspresyon düzeyi.....	78
Şekil 81. Kontrol ve hipertrioidi gruplarında 5. gün uterus dokularında VEGF protein ekspresyonu.....	78
Şekil 82. Kontrol ve hipertiroidi gruplarında 20.gün uterus dokularında VEGF protein ekspresyonu.....	78
Şekil 83. Kontrol ve hipertiroidi gruplarında plasenta dokularında VEGF protein ekspresyonu.....	79

Tablolar

Tablo 1. Kontrol ve deney grupları plasenta dokusunda SPARC pozitif hücre dağılımı.....	43
Tablo 2. Kontrol ve deney grupları dokusunda TGF β -1 pozitif hücre dağılımı.....	54
Tablo 3. Kontrol ve deney grupları dokusunda VEGF pozitif hücre dağılımı.....	65

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Rukiye KARABACAK

Doğum Yeri ve Yılı: Riyad/ 27.05.1984

Eğitim:

- Lisans; Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2002-2008)
- Yüksek Lisans; Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ABD (2010 – terk)
- Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Histoloji ve Embriyoloji ABD (2013-2015)

Mesleki Tecrübe:

- İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD’de Araştırma Görevlisi (2013-2014/ 2012-2 ÖYP naklen atama)
- Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD’de Araştırma Görevlisi (2014-halen / ÖYP 35.madde kapsamında görevlendirme)

EKLER

EK - 1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/08

Karar Tarihi: 29.08.2014

KARAR NO: 2014.08.05

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Turan KARACA'nın yaptığı, Ar. Gör. Rukiye KARABACAK'ın Yüksek Lisans Tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/31 protokol nolu "Deneysel hipertiroidi oluşturulmuş gebe sıçanların uterus ve plasenta dokularında osteonektin (SPARC) ve TGFβ-1'in dağılımının immünohistokimyasal olarak incelenmesi" başlıklı çalışmanın değişiklik önerisi görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergelerinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	izinli
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	izinli
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	izinli

EK – 2

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: Rukiye KARABACAK										
Numarası:1138310103										
Anabilim Dalı: Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) ABD										
Programı: <input checked="" type="radio"/> Yüksek Lisans <input type="radio"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: Deneysel Hipertiroidi Oluşturulmuş Gebe Sıçanların Uterus ve Plasenta Dokularında Osteonektin (SPARC) ve TGFβ-1'in Dağılımının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi										
Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne										
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezinin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 84 sayfalık kısmına ilişkin 10/09/2015 Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>Turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezinin benzerlik oranı % 2 olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler:</u></p> <table><tr><td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td><td>6-Kaynaklar hariç</td></tr><tr><td>2-Teşekkür hariç</td><td>7-Şekiller Listesi hariç</td></tr><tr><td>3-İçindekiler hariç</td><td>8-Özgeçmiş hariç</td></tr><tr><td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td><td>9-Ekler hariç</td></tr><tr><td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td><td></td></tr></table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim</p> <p style="text-align: right;">10/09/2015 Öğrencinin Adı Soyadı, İmza Rukiye KARABACAK</p>	1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç									
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç									
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç									
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç									
5-Gereç ve Yöntemler Hariç										
Ek:Orijinallik Raporu (1 Sayfa)										
UYGUNDUR 10/09/2015										
Prof. Dr. Turan KARACA Hist. Emb. A.D. Başkanı										
Danışman Adı Soyadı, İmza										