



CELAL BAYAR
ÜNİVERSİTESİ

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

HAFSA SULTAN HASTANESİ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

DENEYSEL FARE MODELİNDE OMEGA-3 BESİN DESTEĞİNİN
İMLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE ULTRASTRÜKTÜREL OLARAK
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Araş. Gör. Dr. Kemal SARSMAZ

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER

Manisa, 2013



T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HAFSA SULTAN HASTANESİ
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

DENEYSEL FARE MODELİNDE OMEGA-3 BESİN DESTEĞİNİN
İMLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE ULTRASTRÜKTÜREL OLARAK
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Araş. Gör. Dr. Kemal SARMAZ

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER

Manisa, 2013

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan ve tez konusunun seçimi, planlanması ve diğer tüm aşamalarında sabırla, büyük bir emek sergileyen, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER'e,

Eğitimim süresince karşılaştığımız her türlü problemde yanımızda olan ve bizi gerek tecrübe gerekse bilgisiyle aydınlatan, tüm asistanlık süresince eğitimimizi her zaman en öncelikli konumda tutan ve bu sayede bizleri en iyi şekilde yetiştiren Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanlarımız Sayın Prof. Dr. Kemal KUŞÇU ve Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU başta olmak üzere tüm hocalarıma,

Tezimin laboratuvar çalışmalarını yöneten, mikroskopi aşamasında özverili ve titiz bir şekilde mesaisini harcayan, verilerin değerlendirmeleri aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve tezin tamamlanmasında yoğun emeği geçen Sayın Doç. Dr. Bekir ERGÜR ve Dr. Serap CİLAKER MICİLİ hocalarıma,

Asistanlık hayatımın ilk gününden itibaren bana destek olan, yol gösteren, mesleki konulardaki katkılarıyla iyi bir hekim ve iyi bir cerrah olmamı sağlayan, bunun yanında meslek dışı konularda da her zaman yanımda olarak yetişmemde büyük katkıları olan tüm kıdemlilerime ve bu süreçte bir ekip olarak çalıştığımız diğer doktor arkadaşlarıma, hemşirelerimiz ve personellerimize,

Bu günlere gelmemde büyük emeği bulunan, bana her konuda yol gösteren ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim annem ve babama, biricik kardeşime ve bu süreçte büyük sabır gösteren, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bu zorlu süreçte desteğini her zaman yanımda hissettiğim, biricik moral kaynağım eşime Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR

RESİM VE TABLO LİSTESİ

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1. Endometriyum	3
2. Endometriyumun İmplantasyona Hazırlanması	4
3. İmplantasyon	6
4. Leukemia Inhibitory Factor (LIF)	9
5. Laminin	11
6. Yağlar	12
7. Omega 3 ve Diğer Çokludoymamış Yağ Asitleri	13
8. Esansiyel Yağ Asitlerinin Metabolik Etkileri	14
9. Omega Yağ Asitleri ve Gebelik	15
10. Elektron Mikroskobu ve Temel Çalışma Prensipleri	16
11. Kemirgenlerde Üreme Sistemi	17
III. GEREÇ VE YÖNTEM	20
1. Deneysel Çalışmanın Yeri ve Deneklerin Türü	20
2. Deney gruplarının oluşturulması	20
3. İmplantasyon odaklarının belirlenmesi	21
4. Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü	22
5. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	22
6. İmmunohistokimyasal Yöntem	23
7. Elektron Mikroskobik Doku Takip Prosedürü	26

8. İstatistiksel Değerlendirme	26
IV. BULGULAR	27
1. Işık Mikroskopik Bulgular	27
2. İmmunohistokimyasal Bulgular	31
3. Laminin İmmunohistokimyası	31
4. Lif İmmunohistokimyası	34
5. Ultrastrüktürel Bulgular	37
V. TARTIşMA	43
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
VII. ÖZET	53
VIII. ABSTRACT	54
IX. KAYNAKLAR	55

KISALTMALAR

LIF	Lösemi İnhibitör Faktör
hCG	Human Koryonik Gonadotropin
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPF	Erken Gebelik Faktörü
Ig	İmmun Globulin
CSF-1	Koloni Stimüle Edici faktör-1
IL-1	İnterlökin-1
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ESM	Ekstrasellüler matriks
SFA	Doymuş yağ asitleri (Saturated Fatty Acids)
MUFA	Tek bağılı doymamış yağ asitleri (Monounsaturated Fatty Acids)
PUFA	Çok bağılı doymamış yağ asitleri (Polyunsaturated Fatty Acids)
ω	Omega
EPA	Eikosapentaenoik Asit
DHA	Dokosahekzenoik Asit
AA	Araşidonik asit
DPA	Dokosapentanfoik Asit
EM	Elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TE	Trofoektoderm
LE	Lüminal Epitel
IVF	In Vitro Fertilizasyon
M-CSF	Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör
EGF	Epidermal Growth Faktör

IL-1 β	İnterlökin-1 Beta
TGF- β 1	Tarnsforming Growth Faktör Beta-1
TGF- β 2	Tarnsforming Growth Faktör Beta-2
FSH	Folikül Stimulan Hormon
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)-phthalate

RESİM VE TABLO LİSTESİ

Resim 3.1	İmplantasyonun erken ve geç dönemlerinde blastokist ve zona pellisuda	sf 7
Resim 3.1	Chigago mavisi sonrası uterus görüntüsü	sf 22
Tablo 5.1	Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü	sf 23
Tablo 6.1	Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	sf 24
Tablo 6.2	İmdirekt immunohistokimyasal Yöntem	sf 25
Resim 1.1	Kontrol grubu (HE boyanması X10)	sf 28
Resim 1.2	Kontrol grubu (HE boyanması X40)	sf 28
Resim 1.3	Düşük doz Omega-3 grubu (HE boyanması X10)	sf 29
Resim 1.4	Düşük doz Omega-3 grubu (HE boyanması X40)	sf 30
Resim 1.5	Yüksek doz Omega-3 grubu (HE boyanması X10)	sf 30
Resim 1.6	Yüksek doz Omega-3 grubu (HE boyanması X40)	sf 31
Resim 3.1	Kontrol grubu (Laminin boyanması X40)	sf 32
Resim 3.2	Düşük doz Omega-3 grubu (Laminin boyanması X40)	sf 33
Resim 3.3	Yüksek doz Omega-3 grubu (Laminin boyanması X40)	sf 33
Tablo 3.1	Laminin İmmunohistokimyasal skorlaması	sf 34

Resim 4.1	Kontrol grubu (LIF boyanması X40)	sf 35
Resim 4.2	Düşük doz Omega-3 grubu (LIF boyanması X40)	sf 35
Resim 4.3	Yüksek doz Omega-3 grubu (LIF boyanması X40)	sf 36
Tablo 4.1	LIF İmmunohistokimyasal skorlaması	sf 36
Resim 5.1	Kontrol grubuna ait normal uterus epiteli	sf 38
Resim 5.2	Düşük doz Omega-3 alan grupta uterus epiteli	sf 39
Resim 5.3	Yüksek doz Omega-3 alan grupta uterus epiteli	sf 40
Tablo 5.1	Lümen epiteli yüksekliği (Ultrastrüktürel)	sf 42
Tablo 5.2	Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme	sf 42
Tablo 5.3	Birim alan başına düşen mikrovillus sayısı	sf 42
Tablo 5.4	Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme	sf 42

I. GİRİŞ

Memelilerde türün devamlılığını sağlayan üreme; dişi üreme organında döllenme ile başlamaktadır. Döllenme olayını takiben embriyo ve eklerinin endometriyuma tutunması (implantasyon) gerçekleşir. İmplantasyon türler arasında farklılık gösteren karmaşık mekanizmalarla gerçekleşmekte ve implantasyon için endometriyum çeşitli faktörlerle düzenlenen, yapısal, hücresel ve moleküler olayların dahil olduğu bir hazırlık dönemi geçirmektedir (1). Başarılı bir implantasyon, hem uterusun ovaryum steroidlerince kontrol edilen bir dizi özgün farklılaşması, hem de blastokistin kesin bir aktivasyon evresine erişmiş olmasını gerektirir. Ayrıca blastokistler, sadece implantasyonun pencere döneminde lüminal epitel (LE) ile implantasyon etkileşimine girebilirler. İmplantasyonu takiben plasantasyon olarak isimlendirilen evrede, plasenta oluşumu ile implantasyon olayı tamamlanır ve gebelik döneminin sonuna kadar embriyoyu destekleyecek olan yapı kurulmuş olur (1).

İmplantasyon mekanizmaları, bu mekanizmalara katılan moleküller ve bu moleküllerin etkileri halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Birçok dış etkenin implantasyon ve gebelik üzerine etkisi olduğu düşünülmekte ve araştırılmaktadır. Bunlar beslenme, kullanılan ilaçlar, genetik, etnik yapı ve daha birçok faktörü kapsamaktadır.

Halk arasında "balıkyağı" olarak bilinen çoklu doymamış yağ asitlerinden olan Omega 3 ile bitkisel yağlarda bulunan Omega-6 yağ asitleri; hücre zarının temel yapı taşı olan fosfolipitlerin yapısına katılması dolayısı ile döllenme anından başlayarak fetal dönemden itibaren yaşam boyunca önemli yer tutarlar (2). Bu nedenle bu araştırmamızda diyetle alınan Omega 3'ün

implantasyon mekanizmalarında moleküler düzeyde etkisinin olup olmadığını araştırmayı planladık. Lösemi İnhibitör Faktör (LİF) ve Laminin implantasyonda artış gösterdiği bilinen belirteçler olup Omega-3 verilen ve verilmeyen deney gruplarında karşılaştırma aracı olarak kullanıldı.

II. GENEL BİLGİLER

Gebeliğin oluşmasında ilk aşama sağlıklı bir embriyonun sağlıklı bir endometriyuma implantasyonudur. İmplantasyon, hem embriyo hem endometriyumun katıldığı ve bir çok faktör tarafından etkilenen karmaşık bir olaydır. Herhangi bir faktörün eksikliği veya bozukluğu implantasyona olumsuz etki edecektir. Endometriyum menstrüel siklus boyunca bir dizi değişikliklere uğramakta eğer gebelik meydana gelirse bu değişimler oldukça karmaşık hale gelerek kendisini gebelik sürecine uyumlu hale getirmektedir (3).

1. Endometriyum

Endometriyum, bazal ve fonksiyonel tabakadan oluşan ve miyometriyumu örten dinamik bir dokudur. Uterusun mukozal kılıfı olup basit prizmatik epitel ve lamina propriadan oluşur. Buradaki hücrelerin sayıları, aktivitesi, fonksiyon ve yapısı menstrual siklus boyunca ve gebelik sırasında değişmektedir. Endometriyum, uterusun mukozal sınırıdır ve temel olarak iki tabakadan oluşur; süperfisiyal fonksiyonalis tabakası ve daha derinde bulunan bazalis tabakası (3).

Uterin siklus esnasında endometriyum ve miyometriyum siklik değişiklikler geçirir. Endometriyumdaki siklik değişiklikler yapısında bulunan glanduler, stromal ve vasküler yapılar olmak üzere her 3 komponenti de kapsar (4). Bu sırada blastokist implante olur ve gebelik başlarsa siklus durur, fonksiyonel ve bazal tabakalar büyüme ve farklılaşma dönemine girerler. Stratum (lamina) bazalis; miyometriyuma en yakın tabaka olup, endometriyum bezlerinin son bölümünün bulunduğu ve bağ dokusu elemanlarının çoğaldığı bağ dokusu tabakasıdır. Bazal tabakanın kendisine ait kan damarları vardır ve menstruasyon

sirasında dökülmez. Siklus değişikliklerine katılmaz. Her menstrüel siklus sonunda, buradan yeni endometriyum gelişerek fonksiyonalis tabakasının rejenerere olmasına kaynaklık etmektedir (3,5).

Stratum (lamina) fonksiyonalis (fonksiyonel tabaka); siklus değişikliklerine katılan tabaka olup, menstruasyon sırasında ve doğumdan sonra dökülür. Fonksiyonel tabaka spongiosum ve kompakta olmak üzere 2 ayrı tabakadan oluşmaktadır. Stratum spongiosum; stratum bazalisin üzerinde olup, geniş bezlerin ve ödemli stromanın varlığı nedeniyle sünger görünümünde bir bağ dokusudur. Endometriyum bezlerinin geniş ve kıvrımlı bölümleri bu tabakada bulunur. Stratum kompakta; uterus lümenine bakan en yüzeysel kısım olup, bezlerin ağız kısımlarını içerdği için kompakt görünümündedir (3,6).

Menstrüel siklus fazı sırasında endometriyumda meydana gelen morfolojik ve fizyolojik değişiklikler, hipotalamus, hipofiz, ovaryum ve uterusun karşılıklı etkileşimi sonucu hormonal olarak kontrol edilmektedir (5).

2. Endometriyumun İmplantasyona Hazırlanması

Overyan östrojen ve progesteron başarılı bir gebelik için gerekli olup implantasyon için uterusu uygun hale getirir. Hem epitelyal hem de stromal kısımlar östrojen ve progesteron reseptörlerini eksprese eder ve elde edilen yanıt hormonların konsantrasyonunun yanı sıra bu reseptörlerin seviyesine de bağlıdır (6). Blastokistler, endometriyal epitel ile sadece implantasyonun pencere döneminde etkileşime girebilirler. Bunu belirleyen ise, korpus luteumdan salgılanan progesteronun, endometriyumdaki etkileri ve bunları takip eden gebeliğin 4. günündeki küçük bir östrojen pikidir. Bu sebeptendir ki östrojen ve progesteron, endometriyal maturasyonun düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (7, 8, 9, 10).

Endometriyal maturasyon; yüzeysel mikrovillus ve silyalı hücrelerin kaybının yanı sıra pinopod adı verilen endometriyumun apikal yüzeyindeki hücresel çıkıntıların gelişimi ile de ilişkili olup pinopod oluşumunun progesterona oldukça bağımlı olduğu bilinmektedir (6).

Progesteron erken embriyonik gelişim, implantasyon, plasentasyon ve fetal gelişim için gerekli olan uterin fonksiyonların devamını sağlamaktadır. Desidualizasyon sırasında stromal hücreler progesterona yanıt olarak desidual hücrelere differansiye olmaktadır. (11, 12)

Desidual reaksiyon; endometriyumun implantasyona hazırlık ve ona yanıt olarak desiduaya dönüşümüdür (13). Desiduadaki bağ dokusu hücreleri glikojen ve yağ depolayarak büyür ve poligonal hücreler oluştururlar. Glikojenden zengin solgun ve büyük hücreler fibroblasttan dönüşen desidua hücreleridir. Desidualizasyonda endometriyal stromal hücrelerin büyüklüklerinde, biçimlerinde, organel dağılımlarında önemli değişiklikler olmakta, sekresyon ve sentez aktivitelerinde artışlar gözlenmektedir. Desidualizasyon sırasında Deoksiribonükleik asit (DNA), Ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezi gibi hücrenel olaylar; otokrin ve parakrin yollar aracılığıyla eş zamanlı görülmektedir (14). Desidualizasyon aynı zamanda hücre dışı matriksin yeniden şekillendirilmesi ve integrin ekspresyonunu da kapsamaktadır (11, 12). Desidual transformasyon progesteronun etkisi altındadır. Blastokistin implantasyonu da bu uyarıyı artırır (15).

İmplantasyon olmaz ise desidual transformasyon daha düşük düzeyde gerçekleşir. Fertilizasyonun gerçekleşmesi sonrasında ise blastokist uterus boşluğuna yaklaşık 5. günde ulaşır ve 6. gün (Siklusun yaklaşık 20. günü) zona kompakta'ya implante olur (16). Blastokistin trofoblast hücreleri mukozaya penetre olduktan sonra desidua hücrelerinde lizis başlar ve desidua hücreleri fagosite edilirler. Koryonun sinsityotrofoblast tabakasından salgılanan bir hormon olan human koryonik gonadotropin (hCG), korpus luteumun progesteron ve östrojen salgılamaya devam etmesini sağlar. Bu sayede sekresyon evresi devam eder ve menstruasyon olmaz (1, 6, 17).

Fertilizasyon oluşmaması durumunda hCG olmamasına bağlı olarak korpus luteum dejenere olmaya başlar ve östrojen ve progesteron olmaması dolayısı ile

sekretuar endometriyumda iskemi oluşur ve sonuç olarak menstruasyon görülür (15, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

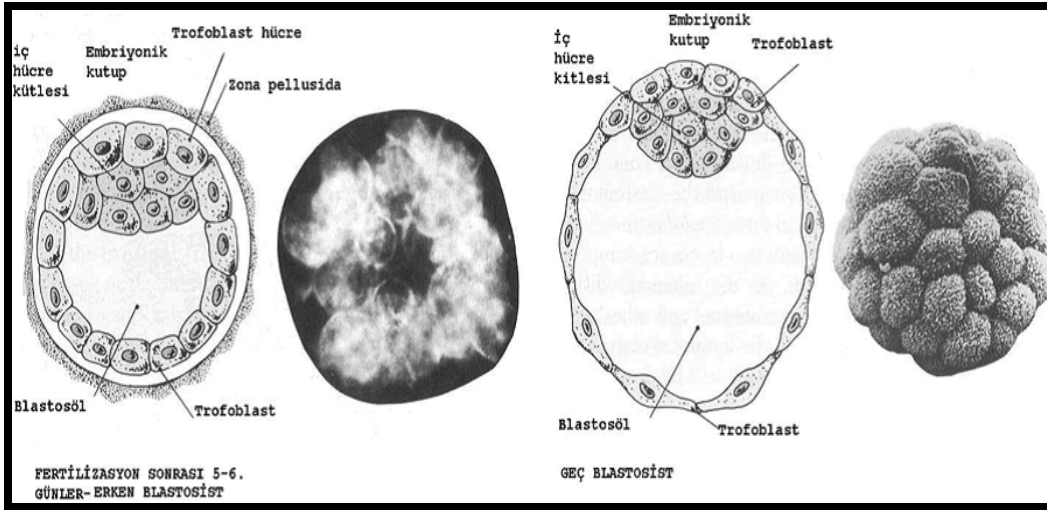
3. İmplantasyon

Başarılı bir gebelik oluşumunda kilit noktasının implantasyon olduğu düşünülmektedir. İnsanda implantasyon süreci; oosit maturasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometriyum arasındaki kompleks bir ilişki ile kontrol edilmektedir. Bu ilişki, endometriyumun maturasyonu ve oositin eş zamanlı gelişimine olanak sağlar. Çoğu moleküller (hormonlar, sitokinler, integrinler, enzimler vb.) başarılı implantasyon için blastokist ve endometriyum arasındaki diyaloga katılır. Endometriyum menstrüel siklus boyunca yeniden düzenlenir ve sadece "implantasyon penceresi" döneminde reseptiftir (24).

İmplantasyon; türlerin üreme stratejisinin bir bölümü olup, oldukça yüksek düzeyde türe özgüdür. Embriyo implantasyonu çoğu türlerde üremenin en önemli basamağını temsil eden dinamik bir süreçtir (24). Erkek üreme hücresi spermatozoon ile dişi üreme hücresi oositin birleşerek zigotu oluşturması, yani yeni bir organizmanın ortaya çıkışı fertilizasyon ile başlar (22). Fertilizasyondan sonra tek hücreli zigot katlanarak çoğalır ve morulayı oluşturduktan sonra blastokiste dönüşür ki pek çok memelide blastokist daha sonra plasentaya dönüşecek olan trofoektoderm hücrelerinden ve embriyo'yu oluşturacak olan iç hücre kitlesinden oluşmaktadır (25). Zigotun üç dört bölünmesinden sonra almış olduğu "dut" görünümündeki yapıya morula denilir ve fertilizasyondan sonraki üçüncü güne denk düşer. Morula 12-16 hücreden oluşur. Morulanın embriyo dokularını oluşturacak iç hücre kitlesi embriyoblast, plasentayı oluşturacak dış hücre kitlesi trofoblast bölümleridir (22).

Gonadotropin artışından yaklaşık dört gün ve ovulasyondan üç gün sonra sekiz hücreli morula uterus kavitesine ulaşır ve 30-200 hücreli preimplantasyon embriyosu olan blastokist oluşur. İmplantasyondan önce blastokistte implantasyon ve gelişimin çeşitli düzeylerinde gerekli olan kutuplaşma meydana gelir. Öncelikle, gelişen blastokist ve oosit içerisindeki polarite embriyonik

hücrelerin differansiyasyonu için önemlidir. Bu özellik implantasyon öncesi embriyonun gelişimini destekler. Polaritenin ikinci aşaması blastokist endometriyuma yaklaştığı zaman olur ve endometriyuma belirli bir yönelim gösterir (24).



Resim 3.1: İmplantasyonun erken ve geç dönemlerinde blastokist ve zona pellusida (26).

Siklus 28 gün sürdüğünde endometriyal reseptivite 16-22. günler arasında görülür. İmplantasyon blastokistin endometriyal stromaya gömülmesi ve morulanın uterin kaviteye geçmesinden 1-3 gün sonra zona pellusidanın kaybı (hatching) ile başlar (27). Çeşitli deneysel çalışmalarda, endometriyumun implantasyon için hazırlandığı gösterilmiş ve bu dönem implantasyonun pencere dönemi olarak isimlendirilmiştir. Endometriyumda kabul edişi sağlayan gerekli elemanların ortaya çıkışı implantasyon penceresi ile düzenlenir (1, 17). Bu dönemde adezyon molekülleri, sitokinler, pinopod adı verilen büyük sitoplazmik çıkıntıların oluşumu ve diğer endometriyal proteinlerin miktarlarında değişiklikler gözlenmektedir. Pinopod adı verilen yüzey epitel mikrovillusları reseptivite döneminde ortaya çıkarak blastokist ile endometriyal epitel arasında iletişimi sağlarlar (27). İmplantasyon öncesi overlerden, implantasyondan sonra embriyo tarafından salınan ve immunosüpresif özellikleri olup hücre proliferasyonu ve

büyüme ile ilişkili olan Erken gebelik faktörü (EPF) fertilizasyondan 1-2 gün sonra maternal dolaşımında ölçülebilir (28). İmplantasyonu takiben plasentasyon olarak isimlendirilen evrede, plasenta oluşumu ile implantasyon olayı tamamlanır ve gebelik döneminin sonuna kadar embriyoyu destekleyecek olan yapı kurulmuş olur (1).

Endometriyumun proliferasyon fazından sekresyon fazına geçişi implantasyon için gerekli reseptif koşulların sağlanmasında önemlidir. Bu aşamada en önemli endokrin gereklilik progesteron varlığıdır. Midluteal fazda endometriyum 10-14 mm kalınlıkta, sekretuar aktivitesi artmış ve endometriyal hücreler glikojen ve lipid yönünden zengin durumdadır (6). Endometriyal reseptivite uterus mukozasının başarılı embriyonik implantasyonu gerçekleştirme kapasitesi olarak tanımlanabilir (29). İnsanda implantasyon blastokistin uterusu belirli bir bölgeye yerleşmesi ve endometriyum ile etkileşime girmesi ile başlar (25). Normal koşullarda adeziv olmayan apikal epitelyal yüzeylerde, implantasyon sırasında trofoektoderm ile uterus kavitesini kaplayan luminal epitel arasında etkileşim oluşması, prereseptif uterustan reseptif uterusu geçişte, epitelyal hücre organizasyonunda köklü değişiklikleri başlatır. Hücreler yassılaşıp mikrovilluslarını kaybeder, luminal epitelin apikal-bazal polaritesi arasındaki fark azalır ve apikal yüzeyle bazal yüzeylerin kompozisyonu benzer hale gelir (30). Normalde bazalde bulunan moleküller, örneğin insanda $\alpha 6$ integrin, ratlarda cadherin apikal veya laterale yer değiştirir. Reseptif dönemde, hormonlarla kontrol edilen endometriyal epitel hücrelerinde, moleküler anlamda da bazı değişiklikler oluşur ve hücre yüzey değişiklikleriyle birlikte, glikokaliksin kalınlığında azalma meydana gelir (31, 32,33). Apiko-bazal polarite kaybı olmaksızın eş zamanlı olarak epitel hücre adezyon moleküllerinde kayıp oluşur. Ancak apikal hücre-hücre etkileşimi ve endometriyum epiteli ile trofoblast arasında bir yakınlaşma meydana gelir (34,35). Embriyo ve anne arası sinyal iletişimi, hatching sonrası henüz blastokist yüzey epiteline adhere olmadan bile başlamaktadır (36,37).

İmplantasyon mekanizmaları açısından baktığımızda türler arasında pek çok fark olsa da, hepsinde belirli zamanlamalar sonucu gelişen iyi korunmuş bir otonom süreç söz konusudur (25). İmplantasyon; Apozisyon, Adezyon ve İnvazyon adlı üç dönem sonucu gelişen, embriyo ve endometriyumun aktif olarak katıldığı belirli bir hazırlık süreci sonunda embriyonun uterusu tutunup gömülmesiyle sonuçlanan aktif bir olaydır (38). İmplantasyonun başarısı; blastokistin reseptif endometriyumla doğru zamanda buluşmasına bağlıdır (24). İmplantasyon penceresi denilen dönem; embriyonun apozisyonu, adezyonu ve invazyonu için endometriyumun en uygun olduğu dönemdir (39). İnsanda implantasyon penceresi ovulasyondan yaklaşık yedi gün sonra başlar ve iki günden uzun sürmez (29). Fertilizasyon sonrası blastokistin uterusu ulaşarak uterin luminal epitele tutunmasına apozisyon denir (25). Blastokist uterus sekresyonlarında 1-3 gün kaldıktan sonra zona pellusidadan sıyrılır. Adezyon moleküllerinin önemli rol oynadığı bu aşama gebelikte belki de en önemli aşamadır (25). Bu moleküller; kaderinler, selektinler, Ig süper ailesi ve integrinler olmak üzere dört ana grupta toplanırlar. Desidualize endometriyum ve erken embriyo ekstraselüler matriks komponentlerini, özellikle de laminin ve fibronektini, eksprese ederler ki bunlar adezyon molekülleri aracılığıyla hücre adezyonunu sağlarlar (27). Uterus reseptivitesini etkileyen moleküller; integrinler, koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-1), interlökin-1 (IL-1) ve LIF'den oluşmaktadır (40). Embriyonun endometriyal bağ dokusuna penetre olmasına invazyon adı verilir ve ovulasyondan sekiz gün sonra proteolitik işlemler sonrası gelişir. İmplantasyon bölgesindeki trofoblastlar, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastları oluşturarak maternal damarları invaze ederler ve bu invazyon sonucu spiral arterlerde sinusoidal keseler oluşur (27).

4. Lösemi İnhibitör Faktör (LIF)

LIF proteini ilk olarak 1987 yılında fare myeloid lösemik M1 hücrelerinin makrofaja farklılaşmasında rol oynayan bir glikoprotein olarak tanımlanmış, ancak daha sonra çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığı saptanmıştır (40).

Embriyonik kök hücre diferansiyasyonu ve kemikten kalsiyum salınımı yanısıra implantasyondaki rolü de keşfedilmiştir (41, 42). İnterlökin-6 ailesinden bir sitokin olan LIF, reseptörü aracılığıyla sinyal iletiminde bulunur ve diferansiyasyon ve proliferasyonda rol oynar (25, 43). Farelerde gebeliğin 4. gününde uterus glandüler epitelinde bol miktarda LIF mRNA tesbit edilmiştir (44). Sağlıklı kadınların endometriyal örneklerinde LIF, LIF reseptör proteinleri ve pinopod artışı insan blastokist implantasyonunun başlangıcında, bu her iki molekül ve yapısal değişikliğin önemli olduğunu düşündürmektedir (45). Hem insanda hem farede uterus-blastokist iletişimde rol oynayan LIF insanda blastokist adezyonu yanısıra trofoblast farklılaşmasına da katkıda bulunmaktadır (46).

İmplantasyon esnasında endometriyumdan salgılanan LIF'in, menstrüel siklus ile ekspresyonu değişkenlik gösterir. LIF'in insanda menstrüel siklusun orta ve geç sekretuar fazında anlamlı derecede artış gösterdiği gösterilmiştir (47). Erken sekretuar fazda tesbit edilebilir ve geç sekretuar fazda luminal ve glanduler epitelde pik yapmak suretiyle implantasyon penceresi esnasında en yüksek salınımına ulaşır. Proliferatif dönemde ise tesbit edilemez (25). Endometriyumdaki epitelyal hücreler LIF reseptörünün gp 190 ve gp 130 komponenti için mRNA eksprese ederler ve LIF bağlanması luminal epitele sınırlıdır (40). LIF geni eksik farelerde embriyo implantasyonunun gerçekleşmediği ancak LIF enjeksiyonu sonrası desidual cevap oluştuğu tesbit edilmiştir (48, 49).

Farede bu değişiklikler implante olan blastokist ile tetiklenmektedir. LIF, fare endometriyumunda implantasyon anında üretilmekte olup, LIF'in salgılanması bu türlerde implantasyon için bir ön koşuldur. Endometriyal LIF'in, laminin reseptörleri olan 4 ve 6 integrinlerini eksprese eden sitotrofoblastın jelatinolitik aktivitesini inhibe ederek trofoblast invazyonunu kontrol ettiği tahmin edilmektedir (10, 50, 51).

5. Laminin

Laminin, bazal membranın ve ekstrasellüler matriksin yapısındaki temel glikoproteinlerdendir. Üç polipeptid zincirin (a, b ve g olarak adlandırılan) birbirleri ile sarmal bir yapı oluşturması sonucunda üç kısa ve bir uzun koldan oluşan laminin ilk olarak EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) tümöründen elde edilmiştir (52). Son yıllarda laminin'in bu üç zincirinin farklı tipleri ortaya çıkarılmış ve böylece laminin'in farklı formasyonlarının olduğu belirtilmiştir. Halen a zincirinin beş, b incirinin üç ve g zincirinin de iki tipi bulunmaktadır (53, 54). İlk bulunan laminin'e laminin-1 denmiş ve günümüze kadar da bu sayı 11'e kadar ulaşmıştır (55).

Bazal membran içinde barındırdığı özel proteinler sayesinde yapı ve çeşitliliğini sağlarken aynı zamanda hücrenin büyümesinde, farklılaşmasında, göçünde ve fonksiyonununda önemli rol oynar. Birçok proteinden oluşması yanında, temel olarak dört ana proteini vardır. Bunlar laminin, tip IV kollajen, perlekan ve nidogendir (56). Doku bütünlüğü, dokular arası kompartizasyon ve doku tamirinde görev alması yanında, özellikle embriyonik dönemde hücrenin büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve göçü gibi bazı temel hücre fonksiyonlarında da önemli rol oynaması araştırmacıların ilgisini çekmiştir. (57, 58, 59). Laminin-1 plasentasyon, embriyogenesis ve embriyonik implantasyonda önemli olduğu düşünülen bazal membran yapısındaki multifonksiyonel bir glikoproteindir (60). Gebelik devam ettiği sürece bazal membran ve altındaki subepitelyal dokudaki laminin ve tip IV kollajen aktivitesi artmaktadır (61).

İmplantasyon esnasında "integrin switch" denilen bir olay gerçekleşmektedir. Bu olayda İnterstisyel ekstravillöz sitotroblast desidua tarafından salgılanan olası hücre dışı matriks bileşenleri ile temasa geçtikçe, integrini kaybolmakta ve laminin dahil olmak üzere tip I/tip II kollajen, vitronektin gibi reseptörlerin ekspresyonu başlamaktadır (13, 62). Stromal farklılaşma veya desidualizasyon ekstrasellüler matriksteki (ESM) değişiklikler ile karakterizedir (7, 13, 63). Desidualizasyon, endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmesi,

hücre dışı matriksin yeniden şekillendirilmesi ve integrin ekspresyonunu kapsamaktadır. Gebelik söz konusu değilken, endometriyal stroma ESM'i; I, III, V ve VI kollajenleri, fibronektin ve periglandular tenaskin birikintilerini içermektedir (13). Desidualizasyon sırasında, kollajen IV, heparan sülfat proteoglikan ve laminin 2 ve 4'ü içeren bir ESM üretilir. Burada bulunan ESM bileşenleri trofoblastların adezyon ve migrasyonu için uygun olacak şekilde düzenlenmiştir. Trofoblast invazyonunda ekstrasellüler matriksin rolü olduğu kesinlik kazanmıştır (7, 63). Örneğin laminin ve tip IV kollajen epitelyal hücre tutunmasını sağlarken fibronektin hücre göçüne aracılık eder (64).

Bazal membran proteinlerinin % 70-80'ini laminin ve tip IV kollajen oluşturmakta olup farelerdeki uterin lümen epitelinin sürekli yapısı blastokist implantasyonu ile yıkılmaktadır. Bu yıkım desidual hücre farklılaşması ve trofoblast invazyonu ile ilişkilidir. Gebe farelerdeki laminin ve tip IV kollajen yoğunluğundaki azalma ilk olarak 6. günde trofoblast etrafında saptanmıştır (65). Lümen epitelindeki bazal membran azalması yanı sıra stromaya yakın desidual hücrelerdeki laminin ve tip IV kollajen artışı da saptanmıştır. Bunlar ayrıca trofoblast bazal membranını lokalize etmede de kullanılmıştır (66). Laminin ve tip IV kollajen lüminal epitel bazal membranı dışında geniş desidual hücrelerde, intermediate trofoblastlarda ve villöz stromada da saptanmıştır (67).

Bu sebeple bu çalışmada endometriyal reseptivite belirteci olan LIF ve bir embriyo belirteci olan ve endometriyumdan salgılanan laminin kullanılmıştır.

6. Yağlar

Yağlar, günlük yaşantımızda yer alan oldukça önemli olan besin öğelerindedir. Günlük enerjinin %25-30'u yağlardan sağlanmalıdır (68). Günlük yağ tüketiminin %7' den azı doymuş, %10-12'si tekli doymamış ve %10' u ise çoklu doymamış yağ asitleri içeren yağların karışımı şeklinde olmalıdır (68). Türü ne olursa olsun fazla yağ tüketimi fazla enerji demektir ve bu da şişmanlık ve kan lipidlerindeki artışla koroner kalp hastalıklarına neden olmaktadır (69).

Hayvan ve bitki organizmalarında 100'den fazla yağ asidi izole edilmiş olup özellikle bir kısım yağlar fizyolojik öneme sahip olup bazı aminoasitler ve vitaminler gibi, yaşamsal olan ve organizma tarafından sentezlenemeyen esansiyel (vücudun üretemediği ve besinler yoluyla alınması gereken) yağlar olarak adlandırılırlar (70).

Vücutta enerji kaynağı olarak kullanılmalarının yanı sıra yağda eriyen vitaminlerin emilmesi, esansiyel yağ asitleri kaynağı olması, hücre membranlarının yapısında yer alması ve eikosanoid sentezinde ön madde olarak fonksiyon göstermeleri yağların organizmadaki önemini açıklamaktadır (71).

7. Omega 3 ve Diğer Çokludoymamış Yağ Asitleri

İnsan vücudu, Omega-3 ve Omega-6 hariç ihtiyaç duyduğu bütün yağ asitlerini kendisi oluşturabilir. İlk defa Evans ve Burr tarafından 1929 yılında bazı yağ asitlerinin esansiyel olduğu fikri ortaya atılmıştır. Yağsız diyetle beslenen fareler üzerinde yapılan araştırmalarda; büyümenin gecikmesi, böbrek fonksiyon bozuklukları, cilt sorunları, üreme fonksiyon bozuklukları gibi belirtiler ortaya çıkmış ve bu problemlerin özellikle linoleik asit (Omega-6) adlı yağ asidi eksikliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Araştırmalar devam ettikçe linolenik asidin (Omega 3) de vücut için esansiyel olduğu saptanmıştır. 1930'lardan beri esansiyel olduğu bilinen bu yağ asitlerinin sağlık yönünden faydaları konusundaki farkındalık 1990'lardan beri artmıştır (72, 73).

Yağ asitleri; doymuş yağ asitleri (Saturated fatty acids, SFA), tek bağlı doymamış yağ asitleri (Monounsaturated fatty acids, MUFA) ve çok bağlı doymamış yağ asitleri (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar. SFA ve MUFA insan ve hayvan vücudunda sentezlenebilmelerine karşın bazı PUFA'lar (linoleik asit, α -linolenik asit) sentezlenemezler. (72)

Aynı tür PUFA serisinin öncüsü olan dört çeşit doymamış yağ asidi vardır. Bunlar metil terminali ya da omega (ω) karbonuna en yakın çift bağ

lokalizasyonuna göre isimlendirilirler. Böylece oleik, palmitoleik, linoleik ve linolenik asitler sırasıyla $18:1\omega_9$, $16:1\omega_7$, $18:2\omega_6$, $18:3\omega_3$ karşılığı olmaktadır. Yalnızca ω_9 ve ω_7 vücutta sentez edilebilirken ω_6 bitkilerden, ω_3 ise balık ve diğer deniz canlılarından diyetle alınabilir (74). Esansiyel yağ asitleri eikosanoid (C 20) yağ asitlerinin oluşumunu başlatır ve eikosanoidlerden de prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler sentezlenirler (71, 75, 76). Ayrıca sözü edilen bu yağ asitleri, hayvansal organizmalarda ω serisi aynı olmak üzere, zincir uzama reaksiyonları ile diğer bileşiklere dönüştürülebilirler. Örneğin, linoleik asit ($18:2 \omega-6$) araşidonik asite ($20:4 \omega- 6$); linolenik asit ise ($18:3 \omega-3$) eikosapentaenoik asit (EPA, $20:5 \omega-3$) ve dokosahekzenoik asite (DHA, $22:6 \omega-3$) dönüşebilmektedir (77, 78, 79).

Alfa linolenik asit, EPA ve DHA'yı en fazla bulunduran yağ çeşidi balık yağıdır (80). Günümüzde farklı etkileri nedeni ile Omega 3 ve Omega 6 yağ asitlerinin dengeli alınmasının ne kadar önemli olduğu anlaşılmıştır. Esansiyel yağ asitleri biyolojik hücre membranlarının asıl yapısal bileşenleri olup sağlıklı hücre fonksiyonları için hem Omega-6, hem de Omega-3 yağ asitlerin dengeli bir şekilde tüketmek gerekmektedir (81).

8. Esansiyel Yağ Asitlerinin Metabolik Etkileri

Omega-3 yağ asidi, EPA' nın ön maddesidir ve EPA antitrombotik etkiye sahiptir (72). Omega-3 ve Omega-6 yağ asitleri vücutta birbirine dönüştürülemedikleri gibi metabolik ve fonksiyonel olarak da birbirlerinden farklılık göstermektedirler. Bunların vücuttaki dengesi büyüme ve gelişmede önem arz etmektedir. Bu nedenle hem Omega-3 hem de Omega-6 yağ asitlerinin dengeli bir şekilde tüketilmesi sağlık açısından oldukça önemlidir (82).

Omega-3 yağ asitleri diyetle alındığı zaman Araşidonik Asit (AA) ile yarışarak hücre zarı fosfolipitlerinin içerisine girmekte ve böylece yangı yapıcı eikosanoid sentezi için kullanılabilir olan AA miktarı azalmaktadır (83). Omega-3 ve Omega-6 eksikliğinde; trigliserid ve kolesterol seviyesinde artma (71), membran fonksiyonlarında bozulma (84), bebeklerde büyüme geriliği (71),

kan basıncında artma (85, 86), yara iyileşmesinde yavaşlama (86), saç ve kıl dökülmeleri (87) ve immun sistem fonksiyonlarında azalma (88, 86) gibi durumlar gözlenir.

Özetle halk arasında "balıkyağı" olarak bilinen Omega-3 ile bitkisel yağlarda bulunan Omega-6 yağ asitleri hücre zarının temel yapı taşı olan fosfolipitlerin yapısına katılması dolayısı ile döllenme anından başlayarak fetal dönemden itibaren yaşam boyunca önemli yer tutarlar (2). Esansiyel yağ asitleri eksikliğinde fosfolipitlerdeki Omega-3 ve Omega-6'nın yerini Omega 9 alır ki buda hücre zarı ve fonksiyonları üzerine (özellikle mitokondri ve mitokondri spesifik hücresel fonksiyonlar – oksidatif fosforilasyon) olumsuz etki gösterir (78).

9. Omega Yağ Asitleri ve Gebelik

Omega 3 ve 6 bebeğin sağlıklı gelişmesi için oldukça önemli bir besin ögesidir. Gebelikte önerilen günlük Omega-3 yağ asidi alımı ise 1.4 gr/gün'dür (89, 90).

Beynin katı kısmının % 50-60'ı lipidlerden oluşmakta olup beyin, kalp, damarlar ve gözlerin sağlıklı gelişmesinde önemli rol oynarlar (91). Gebelik diyetinde Omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin besinlerin verilmesi özellikle DHA'nın diyetinde bulunması bebeğin sinir sisteminin gelişmesinde etkindir (92). Omega-3 ve 6 dengesiyle beslenen annelerin bebeklerinde beyin, sinir sistemi ve görme yeteneklerinin sağlıklı geliştiği ve Omega yağlarının çocuğun matematiksel zekasını geliştirip, okuma, telaffuz ve yazma becerisini arttırdığı, eksikliği halinde çocuklarda davranış bozukluklarına (hiperaktivite, dikkat eksikliği, disleksi vb) yol açabildiği, bu nedenle hamile ve emzikli annelerin Omega-3 ve Omega-6 içeren gıdaları yeterince ve dengeli biçimde almaları yönünde çalışmalar vardır (71).

Gebelik sırasında veya doğum sonrası ortaya çıkabilen perinatal depresyon ile ilgili yapılmış bir metaanalizde Omega-3'ün etkileri incelenmiştir. Buna göre ağız kokusu ve gastrointestinal yan etkileri dışında olumsuz etkisi olmayan

Omega-3 kullanımının plaseboya göre depresyon skorlarını anlamlı derecede azalttığı tesbit edilmiştir (93). İntrauterin gelişme geriliği dahil pek çok plasenta ilişkili problemde plasental oksidatif stersin rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stres reaktif oksijen radikallerinin DNA hasarına yol açması, protein ve lipid denatürasyonuna neden olması sonucu meydana gelir. Antioksidanlar ile bu hasar geri döndürülebilir. Omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri oksidatif stresi sınırlayabilirler. Bununla ilgili yapılmış hayvan deneylerinde yüksek doz PUFA ile beslenen grupta oksidatif hasar belirteçleri azalmış olarak bulunmuş olup, plasental ve fetal büyümede artış tesbit edilmiştir. Anne, fetüs ve plasentanın yağ asidi içeriği de diyetle alınan miktarla orantılı bulunmuştur (94).

Tüm bu veriler ışığında gebeliğin en başında en önemli basamak olan implantasyon penceresi döneminde bir antioksidan olup membran yapısında önemli rol oynayan Omega-3 yağ asidi suplemantasyonunun implantasyon üzerine etkisini incelemeyi hedefledik.

10. Elektron Mikroskobu ve Temel Çalışma Prensipleri

Elektron mikroskobu (EM) doku parçacıklarının elektronlarla etkileşimi temeline dayanır. Işığın cam merceklerdeki sapma davranışının bir benzeri olarak, elektron demetinin elektromanyetik alanlarda sapma ilkesine dayanır (3). Vakum ortamında katodun yüksek derecede ısıtılmasıyla elde edilen elektronlar, katod ile anod arasında oluşan 60 -100 kV veya daha fazla bir potansiyel farkına sokulur. Katoddan anoda doğru ivme kazanarak hızlanan elektronlar bir elektron demeti oluşturur. Bu demet, elektromanyetik mercekler tarafından saptırılır ve bu sayede kondansatör elektron demetini nesne düzlemine odaklar ve objektif, incelenen nesnenin bir görüntüsünü oluşturur. Bu görüntü, bir çeşit yansıtıcı aracılığı ile floresan ekranına düşürülür. Bu mekanizma transmisyon elektron mikroskobunun (TEM) çalışma prensibini oluşturur (3).

Öncelikle incelenecek olan cismin yüzeyi, çok ince bir metal tabakasıyla kaplanır. Daha sonra, çok dar bir elektron demeti incelenecek olan cismin

yüzeyine nokta sıralamalı olarak gönderilir. Her bir noktadan yansıyan elektron demetleri, özel bir dedektörle tutulur ve elektrik sinyallerine dönüştürülerek ekrana gönderilir (3). İncelenen dokudan görüntü elde edebilmek için; rezolüsyon gücü ışık yerine dalga boyu çok daha küçük elektronlar kullanılarak arttırılabilir. Açık tonda ve parlak görünen yerler elektronların yansıdıkları yerler olurken elektronların emildiği yerler koyu ve karanlık görülür. EM'de, hızlandırılmış elektronlar bir ışın demeti şeklinde seyrederek dokuyu geçer ve ışık mikroskobundaki cam merceklerin yerine bir seri elektromanyetik veya elektrostatik alanlardan geçerek bir floresan ekran veya fotoğraf filmi üzerine yansır. Modern bir EM'de, büyütme 200.000-800.000 arasında değişmektedir (3).

İmplantasyonun ultrastrüktürel olarak incelenmesi ilk olarak fareler ve sıçanlar üzerinde çalışılmıştır (95, 96). Hücrelerin üzerinde yoğunlaşan gümüş granüllerinin sayısı protein sentezi ile doğru orantılı olduğundan dolayı dokuda hangi hücrelerin protein sentezlediği yada bi organın neresinde yeni hücre sentezi gerçekleştiğini elektron mikroskobisi ile anlamak oldukça mümkündür (3). Aynı zamanda endometriyal salgı hücreleri apikal sitoplazmalarında elektron yoğun salgı granülleri barındırmakta olup elektron mikroskobisi ile kolaylıkla değerlendirilebilmektedir (97). Kemirgenler üzerinde yapılan bir çok çalışmada elektron mikroskobik incelemede endometriyumun implantasyona hazırlık amacıyla bir dizi değişiklik geçirdiği; daha düz hale geldiği, mikrovillusların yerini pinopodların aldığı gösterilmiştir (98, 99).

11. Kemirgenlerde Üreme Sistemi

Fareler (*Mus musculus*) insan biyolojisine uygun kullanışlı bilgiler sağlayan ve temel biyolojik araştırmalarda kullanım alanı bularak en yaygın kullanılan omurgalı türüdür (100).

Fareler 5 haftalık olduklarında puberteye ulaşır ve siklik hale gelirler ve estrus evresi dişi farelerin çiftleşme davranışı gösterdikleri döneme karşılık gelir (100). Ortalama yaşam süreleri 1-2 yıl olan dişi farelerde; estrus döngüsü 4 (2-9) gün,

estrus süresi 14 saat olmakla beraber oldukça değişken de olabilmektedir (100). Farelerdeki reproduktif siklus estrus olarak adlandırılmakta olup bir estrus siklusunun başlangıcından bir sonraki siklusun başlangıcına kadar sürmektedir. Her bir estrus siklusu estrus, metaestrus, diestrus ve proestrus olmak üzere 4 evreden oluşur (101). Farelerde de insanlarda olduğu gibi estrus siklusları fonksiyone bir hipotalomo-hipofiz-over aksı tarafından regüle edilir. Estrus siklusu ayrıca folliküler ve luteal faz olmak üzere iki overyan faza ayrılır. Folliküler faz overyan folikül gelişiminin olduğu estrus ve proestrus evrelerinden oluşurken luteal faz corpus luteumun oluştuğu ve fonksiyon gösterdiği metaestrus ve diestrus evrelerinden oluşur. Proestrus ve estrus süresince dolaşımdaki yüksek düzey estrojene bağlı olarak uterin vasküler geçirgenliğin artması ve sıvı toplanması sonucu uterus büyüme gösterir. Uterustaki bu distansiyon estrusun geç dönemlerinde azalmaya başlarken diestrus döneminde gözlenmez (102). Estrus siklusunun evreleri en iyi şekilde vajinal smeardeki May-Günwald Giemsa boyama yöntemiyle gözlenen hücrelere göre tanımlanır (100).

Kemirgenlerde desidual endometriyum 5 farklı bölge gösterir: bazal zon, kapsül, antimezometriyal desiduama, mezometriyal desiduama ve glikojenik bölge (103). Farelerde normalde her siklusta 6-12 adet yumurta ovule olur (100). Fertilizasyon sonrasında yumurta cumulus hücrelerinden oluşan bir doku tarafından sarılır ve fertilizasyon ampullada gerçekleşir. Fare uterusu çift boynuzludur. Çiftleşme sonrası sperm hücreleri her iki uterin hornda fertilizasyon sahasına doğru göç eder ve cumulus hücrelerini penetre eder (102). Kemirici blastokistin trofoektoderm'i (TE) aktif hale gelerek bir değişim sürecinden geçer. Metabolik oranı artar, lüminal epitel (LE) ile etkileşme kapasitesini geliştirir, epitelyal-mezenşimal tranzisyonu gerçekleştirir (7, 50).

Farelerde implantasyon penceresi dönemi boyunca embriyo implantasyonu 3 aşamada incelenebilir; pre-implantasyon (4. gün), peri-implantasyon (5. gün) ve post-implantasyon (6. gün) (104). Bizde Omega-3'ün implantasyon üzerine

etkilerini immunohistokimyasal ve ultrastruktürel olarak araştırdığımız bu çalışmamızda implantasyon öncesi dönemde gerçekleşen değişiklikleri mevcut literatür bilgisi ile karşılaştırarak değerlendirdik.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 53/2011 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama için gerekli kimyasal malzemeler ve sarf malzemeleri Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2011-043 sayılı proje ile desteklenmiştir.

1. Deneysel Çalışmanın Yeri ve Deneklerin Türü

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Biriminden temin edilen, 18-22 gr ağırlığında 21 adet albino fare (musculus (C/C)) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, bu türün bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

2. Deney gruplarının oluşturulması

Farelerin düzenli menstrüel siklusa oldukları üç haftalık takip ile belirlendi.

Fareler 3 gruba ayrıldı

1.Grup: Standart gıda verilen kontrol grubu

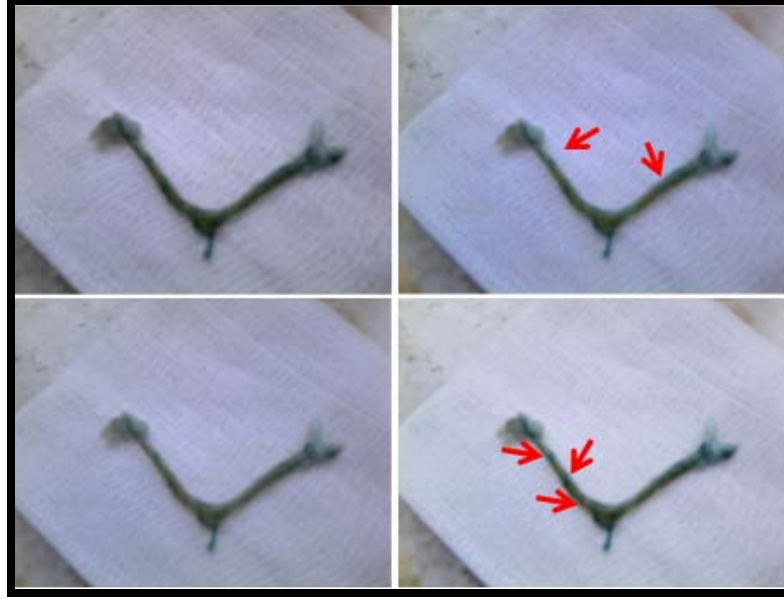
2.Grup: Düşük doz Omega-3 verilen grup (oral gavaj yöntemi ile 400 mg/kg Omega-3) (Koçak ilaç Marincap 500mg®)

3.Grup: Yüksek doz Omega-3 verilen grup (1000 mg/kg Omega-3) (Koçak ilaç Marincap 500mg®)

Bu kapsüllerin içeriğinde 500 mg Salmon Balık yağı konsantresi (Omega-3) Eikosapentaenoik asit (EPA), Dokosaheksaenoik asit (DHA), yardımcı maddeler : Nipajin (3.5 mg), nipazol (1.5 mg), vitamin E (1 mg), sığır jelatini bulunmaktadır (prospektüs bilgisi). Vajinal smear ile belirlenen birinci estrus döneminde grup II ve grup III'e Omega-3 desteği başlandı ve bir sonraki estrus döneminde üç dişiye bir erkek düşecek şekilde fareler çiftleşmeye bırakıldı. Bir gün sonra vajinal plak gebelik için kontrol edildi. Ertesi gün saat 12:00 embriyonik gün E: 0,5. gün olarak kabul edildi ve gebe olan fareler beklenen implantasyonun 3,5. gününde feda edildi. Toplam 8 günlük omega-3 desteği sonrası uterus boynuzları üzerindeki implantasyon odakları belirlenerek ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formalinde, elektron mikroskopik inceleme için %2.5'luk gluteraldehitte fikse edildi.

3. İmplantasyon odaklarının belirlenmesi

Deney sürelerinin sonunda eter anestezisi uygulanan hayvanlara, intravenöz olarak tuzlu suda çözülmüş 0.1ml 1% Chicago mavisi boyası verildi ve 10 dakika sonra karın ön duvarı açılarak mavi renge boyanan uterus bölgelerinden toplanan doku örnekleri alındı (105). Alınan doku örnekleri %10'luk formalinde fikse edildi.



Resim 3.1: Chigago mavisi sonrası uterus görüntüsü

4. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

%10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı.

5. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µm'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton,

Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

Tablo 5.1: Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dk
	% 80 etil alkol	20 dk
	% 95 etil alkol	20 dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dk
	Ksilol	30 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

6. İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin (00-3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen

peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan LİF (SANTA CRUZ) ve Laminin (SANTA CRUZ) antikoru ile bir saat +4°C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dk enkübe edildi. PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

Tablo 6.1: Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

Tablo 6.2: İndirekt immunohistokimyasal Yöntem

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	37°C 15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	LİF, Laminin	2 saat, 4de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

7. Elektron Mikroskopik Doku Takip Prosedürü

Karnovsky solüsyonuna (pH 7.4) konulan dokular 4°C'de bir gece tespit edildi. Ertesi gün doku takibine başlandı ve dokular 0,1 M sodiumphosphate buffer ve 0,1 M sucrose karışımında 3 kez 15 dk bekletildi. %2 sodyum fosfat solusyonunda osmium tetraoxide (pH 7.4) solüsyonu ile 90 dk post fiksasyon için muamele edildi. 0,1M sodiumphosphate buffer (pH 7.4) ile 3 kez 15 dk yıkandı. %50 oranında hazırlanmış aseton ile 2 kez 15 dk. dehidratasyonu yapıldı. Dokular %70 aseton, %0,5 uranil asetat ve %1 fosfotungustik asit karışımı ile 4°C'de kontrast amaçlı 1 gece bırakıldı. Sırasıyla % 80, 90 ve 96'lık aseton ile 2 kez 15 dk muamele edilen dokular %100'lük asetonda 2 kez 20 dk tutuldu. Propilen oksitte 2 kez 15 dk bekletilen dokular sırasıyla 30 dk 2:1, 1:1 ve 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit:epon karışımlarında bekletildi. Epon solüsyonunda 4°C'de bir gece bırakıldı. 3.gün hazırlanan yeni epon solüsyonunda 48 saat 65°C'ye polimerizasyon için bırakıldı.

Ultramikrotom ile alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopik olarak incelendi ve işaretlendi. İşaretlenen yerlerden alınan ince kesitler Carl Zeiss Libra 120 Elektron mikroskopunda incelenerek resimlendirildi.

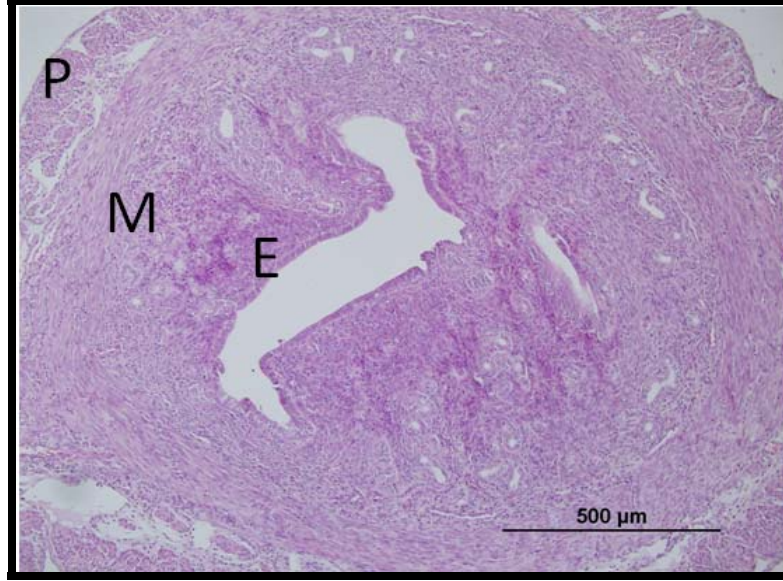
8. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı. $p < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

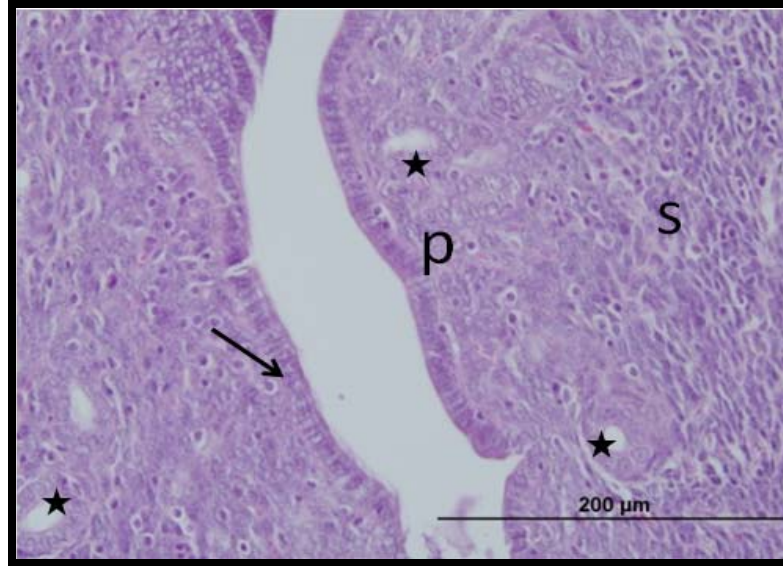
IV.BULGULAR

1. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubunda; en içte endometriyal lümen epiteli ve endometriyal bezler ile karakterize lamina propriadan oluşan endometriyum, ortada miyometriyum ve organı dıştan saran perimetriyum tabakaları olmak üzere 3 ayrı tabaka ayırt edildi. Lümen epiteli bazılarında silia içeren prizmatik epitel hücrelerinden oluşan tek katlı bir tabaka şeklindeydi. Epitelin altında bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılmış uterus bezleri ile dağınık halde bulunan stromal hücreler gözlendi. Uterus dokusunda lümen epiteline ait hücrelerin boyunun kısaldığı dikkat çekti. Miyometriyum tabakasında kas hücreleri normal yapıda gözlendi. Miyometriyum tabakasından sonra organı saran perimetriyum tabakası bulunmaktaydı. İmplantasyon belirteci olarak primer desidual alan ve sekonder desidual alanlar ayırt edildi. Primer desidual alan lümen epitelinin hemen altında gözlendi. (Resim 1.1; Resim 1.2)

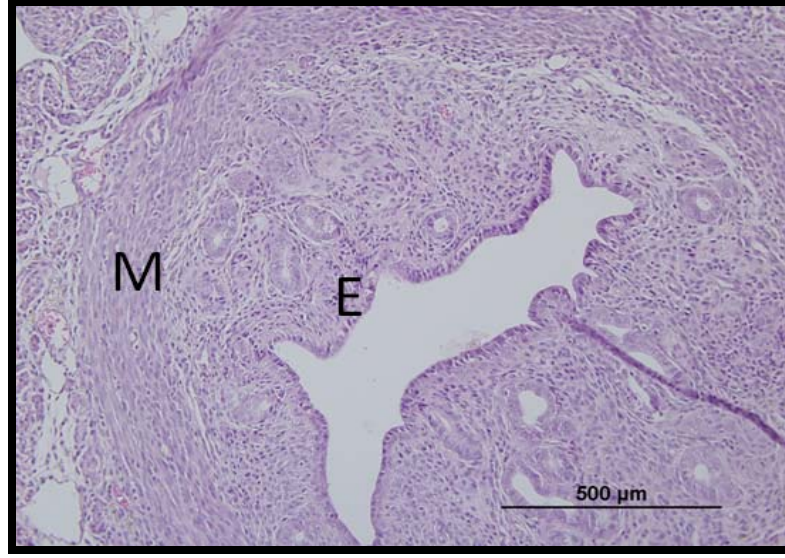


Resim 1.1: Kontrol grubu (HE boyanması X10). Gebeliğin 3.5-4. gününde uterus kesitlerinin H-E ile boyanmış preparatlarında her üç tabakada ayırt edilebilmekteydi. E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum

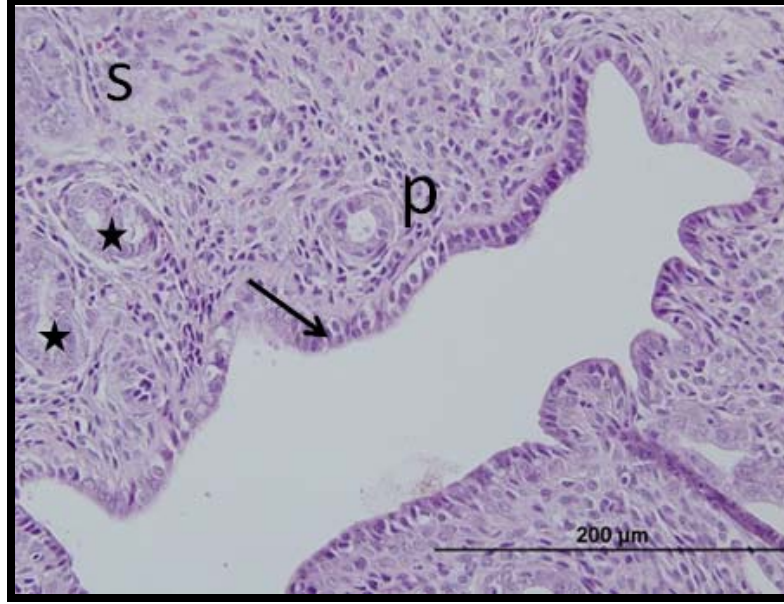


Resim 1.2: Kontrol grubu (HE boyanması X40). Primer desidual alan (P), Sekonder desidual alan (S), endometriyal luminal epitel (ok), bez epiteli (yıldız)

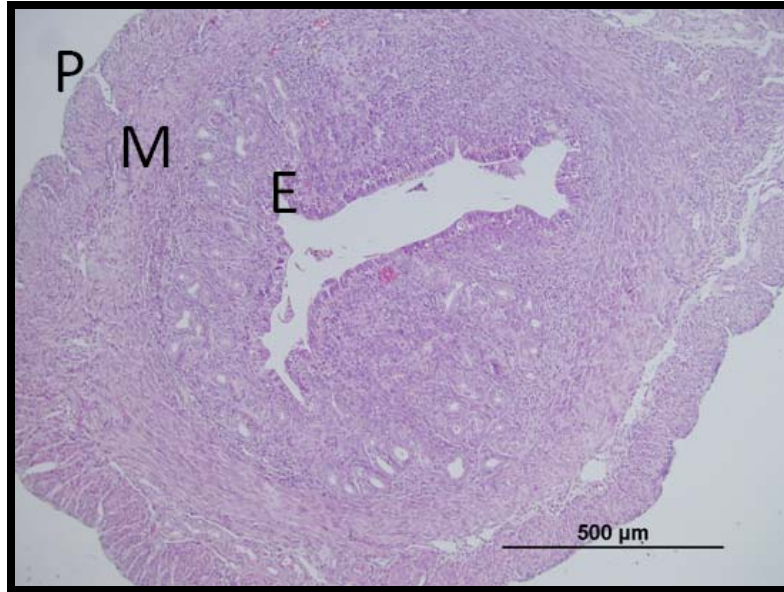
Düşük doz Omega-3, ve Yüksek doz Omega-3 gruplarında da uterusun histolojik yapısı kontrol grubuna benzer özellik göstermekteydi. (Resim 1.3; Resim 1.4; Resim 1.5; Resim 1.6)



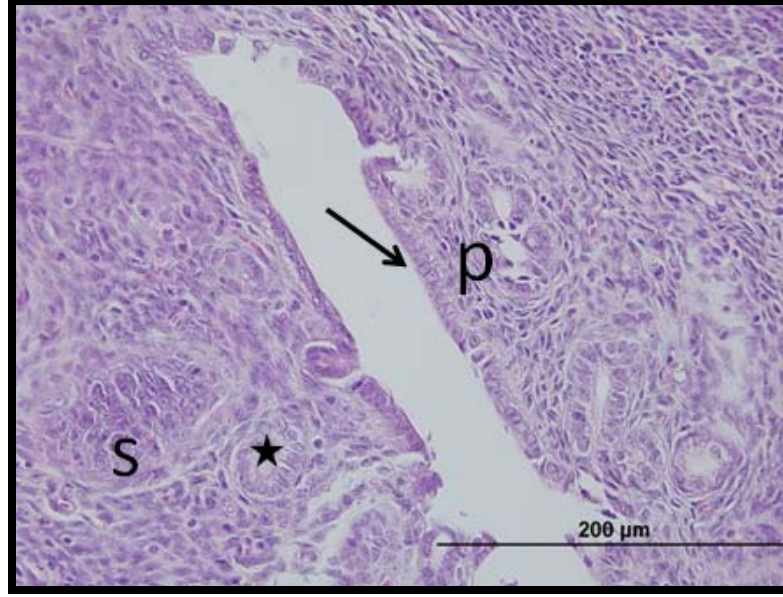
Resim 1.3: Düşük doz Omega-3 grubu (HE boyanması X10). 3.5-4. gününde uterus kesitlerinin H-E ile boyanmış preparatlarında her üç tabakada ayırt edilebilmekteydi. E: Endometriyum, M: Miyometriyum



Resim 1.4: Düşük doz Omega-3 grubu (HE boyanması X40). Primer desidual alan (P), Sekonder desidual alan (S), endometriyal luminal epitel (ok), bez epiteli (yıldız)



Resim 1.5: Yüksek doz Omega-3 grubu (HE boyanması X10). 3.5-4. gününde uterus kesitlerinin H-E ile boyanmış preparatlarında her üç tabakada ayırt edilebilmekteydi. E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum.



Resim 1.6: Yüksek doz Omega-3 grubu (HE boyanması X40) . Primer desidual alan (P), Sekonder desidual alan (S), endometriyal luminal epitel (ok), bez epiteli (yıldız)

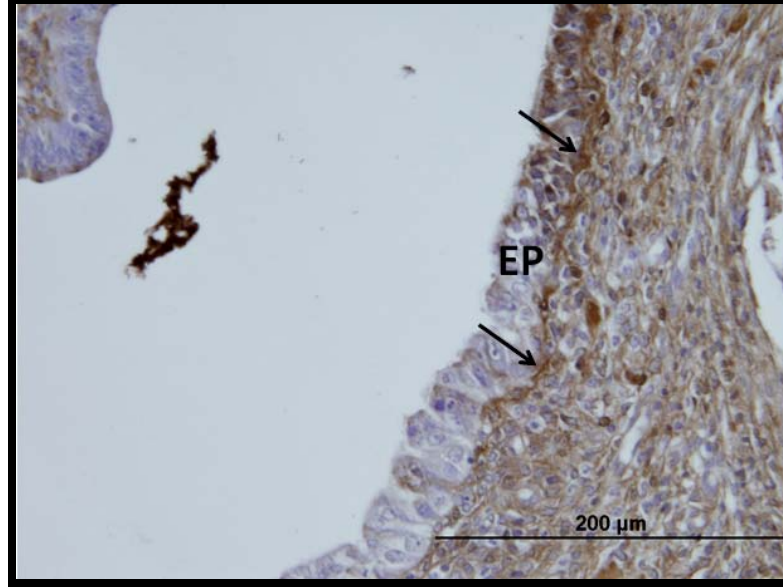
2. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal boyanmalar semi-kantitatif yöntem ile değerlendirildi. Bu yöntemle boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++,3), orta (++,2) ve zayıf (+,1), belirsiz/var-yok (-/0) olarak tanımlandı. Preparatlar ışık mikroskobu ile iki histolog tarafından değerlendirildi.

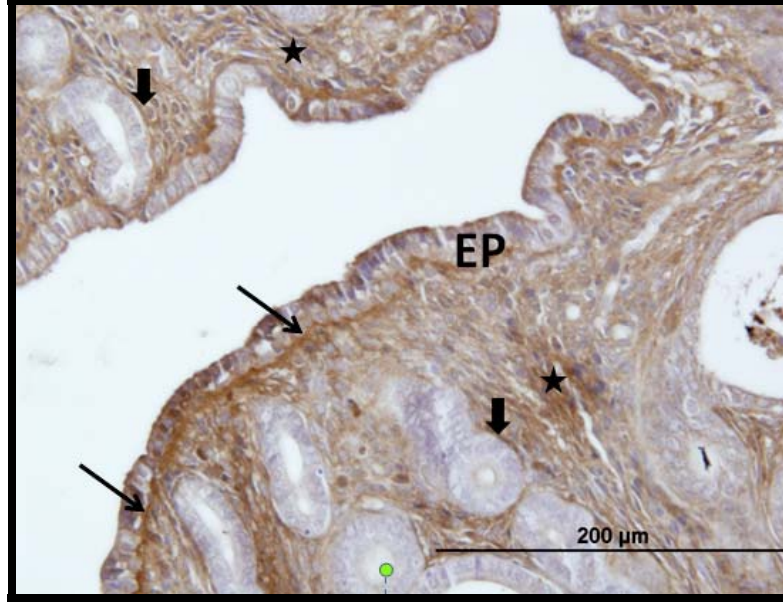
3. Laminin İmmunohistokimyası

Laminin immunoreaktivitesi, Kontrol grubu (Lümen epitel bazal membranı 1.71 ± 0.48 , Bez epitel bazal membranı 1.57 ± 0.53 , Endometriyal Stroma 1.57 ± 0.53) ve Düşük doz (Lümen epitel bazal membranı 1.57 ± 0.53 , Bez epitel bazal membranı 1.42 ± 0.53 , Endometriyal Stroma 1.85 ± 0.37) grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. Yüksek doz Omega-3 (Lümen epitel bazal membranı 2.42 ± 0.53 , Bez epitel bazal membranı 2.42 ± 0.53 , Endometriyal Stroma

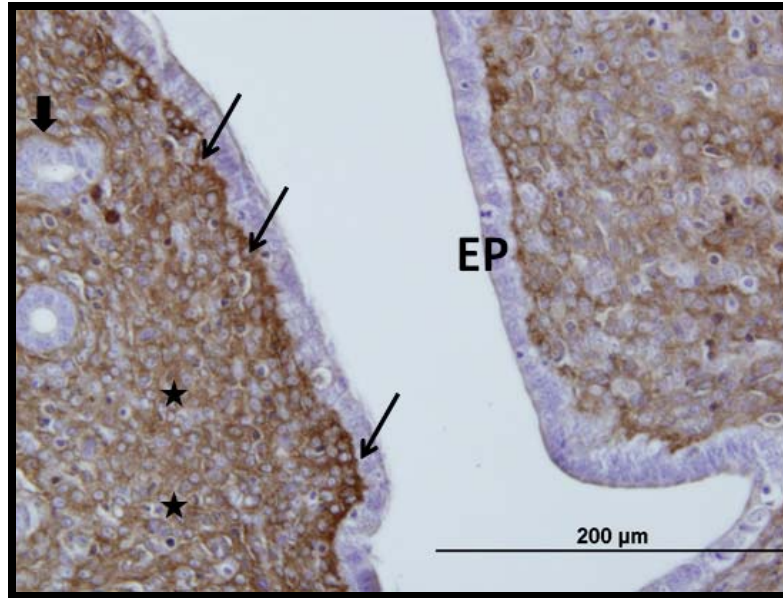
2.42±0.53) grubunda ise diğer gruplara göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0.05$).
(Resim 3.1; Resim 3.2; Resim3.3)



Resim 3.1: Kontrol grubu (Laminin boyanması X40). Endometriyum yüzey (EP) epitelinin altında yer alan bazal membranda (OK) lamininle orta şiddette işaretlenme izlendi.



Resim 3.2: Düşük doz Omega-3 grubu (Laminin boyanması X40). Endometriyum yüzey (EP) epitelinin altında yer alan bazal membranda (ince ok), bez epiteli bazal membranında ve stromal hücrelerde (yıldız) lamininle orta şiddette işaretlenme izlendi.



Resim 3.3: Yüksek doz Omega-3 grubu (Laminin boyanması X40). Endometriyum yüzey (EP) epitelinin altında yer alan bazal membranda (ince ok),

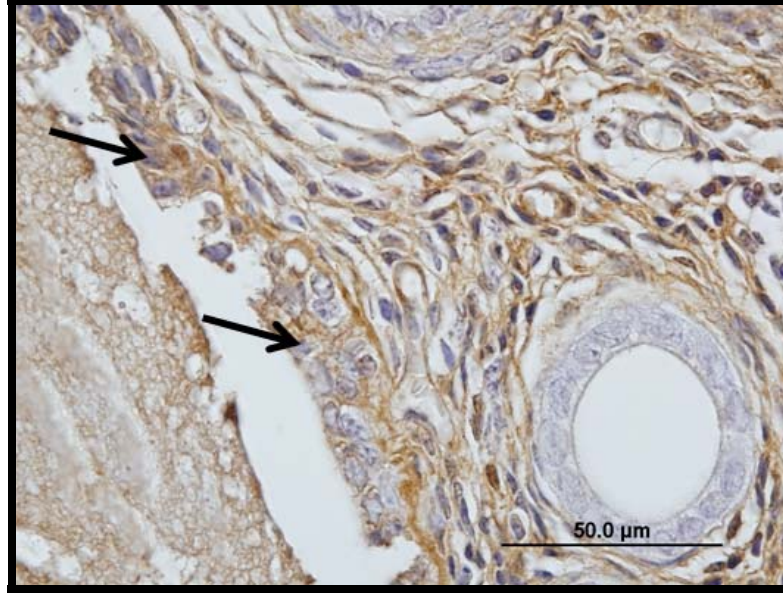
bez epiteli bazal membranında ve stromal hücrelerde (yıldız) lamininle kuvvetli işaretlenme izlendi.

Tablo 3.1: Laminin İmmunohistokimyasal skorlaması

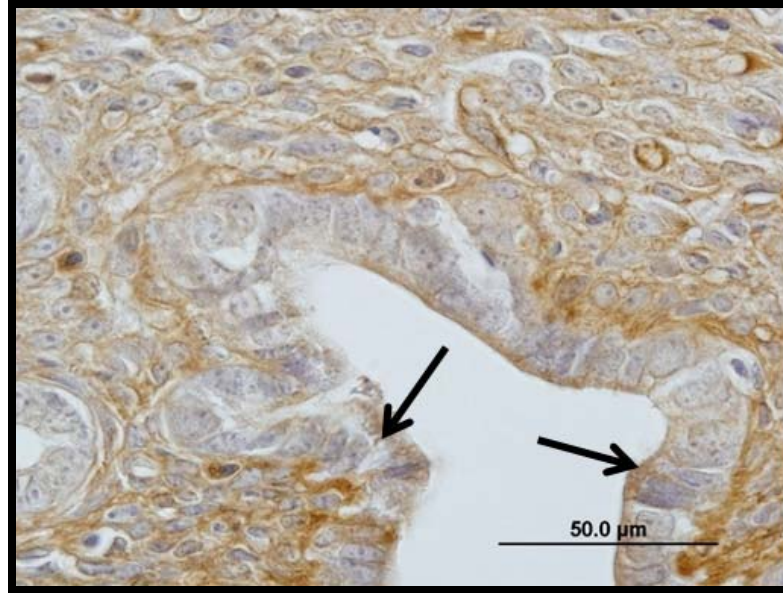
	Lümen Epiteli	Bez epiteli	stroma
Kontrol	1,71±0,48	1,57±0,53	1,57±0,53
Düşük doz	1,57±0,53	1,42±0,53	1,85±0,37
Yüksek doz	2,42±0,53	2,42±0,53	2,42±0,53
Kontrol - Düşük doz (p)	0,591	0,606	0,254
Kontrol-Yüksek doz (p)	0,030	0,018	0,018
Düşük - Yüksek doz (p)	0,018	0,010	0,044

4. Lif İmmunohistokimyası

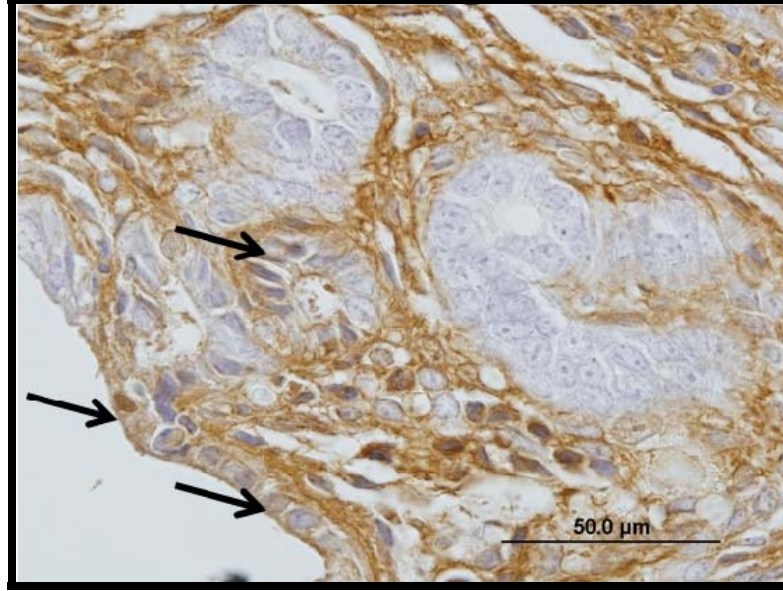
LIF immunoreaktivitesi açısından, Kontrol grubu (Lümen epiteli bazal membranı 1.00±0.57, Bez epiteli bazal membranı 0.57±0.53, Endometriyal Stroma 1.14±0.37) ve Düşük doz (Lümen epiteli bazal membranı 1.14±0.37, Bez epiteli bazal membranı 0.71±0.48, Endometriyal Stroma 1.14±0.37) grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. Yüksek doz Omega-3 (Lümen epiteli bazal membranı 2.28±0.48, Bez epiteli bazal membranı 1.71±0.48, Endometriyal Stroma 2.00±0.57) grubunda ise diğer gruplara göre anlamlı olarak artmıştı (p<0.05). (Resim 4.1; Resim 4.2; Resim 4.3)



Resim 4.1: Kontrol grubu (LIF boyanması X40). Endometriyum yüzey epitelinde (ok), bez epiteli ve endometriyal stromada stromal hücrelerde orta şiddette Lif immunoreaktivitesi gözlemlendi.



Resim 4.2: Düşük doz Omega-3 grubu (LIF boyanması X40). Endometriyum yüzey epitelinde (ok), bez epiteli ve endometriyal stromada stromal hücrelerde orta şiddette Lif immunoreaktivitesi gözlemlendi.



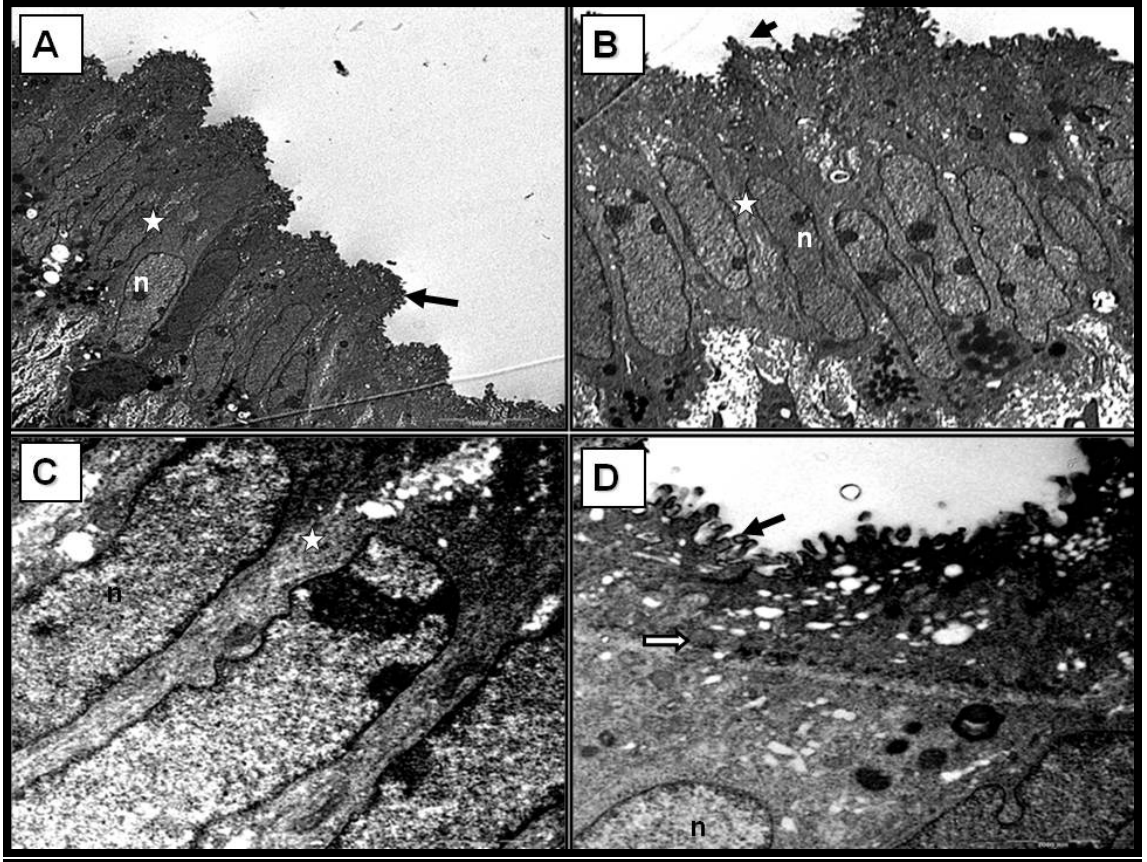
Resim 4.3: Yüksek doz Omega-3 grubu (LIF boyanması X40) Endometriyum yüzey epitelinde (ok), bez epiteli (ok)ve endometriyal stromada stromal hücrelerde artmış Lif immunoreaktivitesi gözlemlendi.

Tablo 4.1: LIF İmmunohistokimyasal skorlaması

	Lümen Epiteli	Bez epiteli	stroma
Kontrol	1,00±0,57	0,57±0,53	1,14±0,37
Düşük doz	1,14±0,37	0,71±0,48	1,14±0,37
Yüksek doz	2,28±0,48	1,71±0,48	2,00±0,57
Kontrol - Düşük doz (p)	0,593	0,591	1,000
Kontrol-Yüksek doz (p)	0,003	0,005	0,010
Düşük - Yüksek doz (p)	0,002	0,006	0,010

5. Ultrastrüktürel Bulgular

Kontrol grubunda, uterus yüzey epitel hücrelerinin prizmatik yapıda olduğu, uzun eksenlerine paralel ökromatik çekirdeklerinin bulunduğu ve organellerinin morfolojik olarak normal yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Hücrenin apikal yüzeyinde bulunan mikrovillusların ve hücreler arası bağlantıların normal olduğu saptandı. Kendi hücre ve bağ dokusu ile stromanın normal bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi. (Resim 5.1 A,B,C,D)



Resim 5.1: Kontrol grubuna ait normal uterus epiteli

A: uranil asetat-kurşun sitrat X 800.

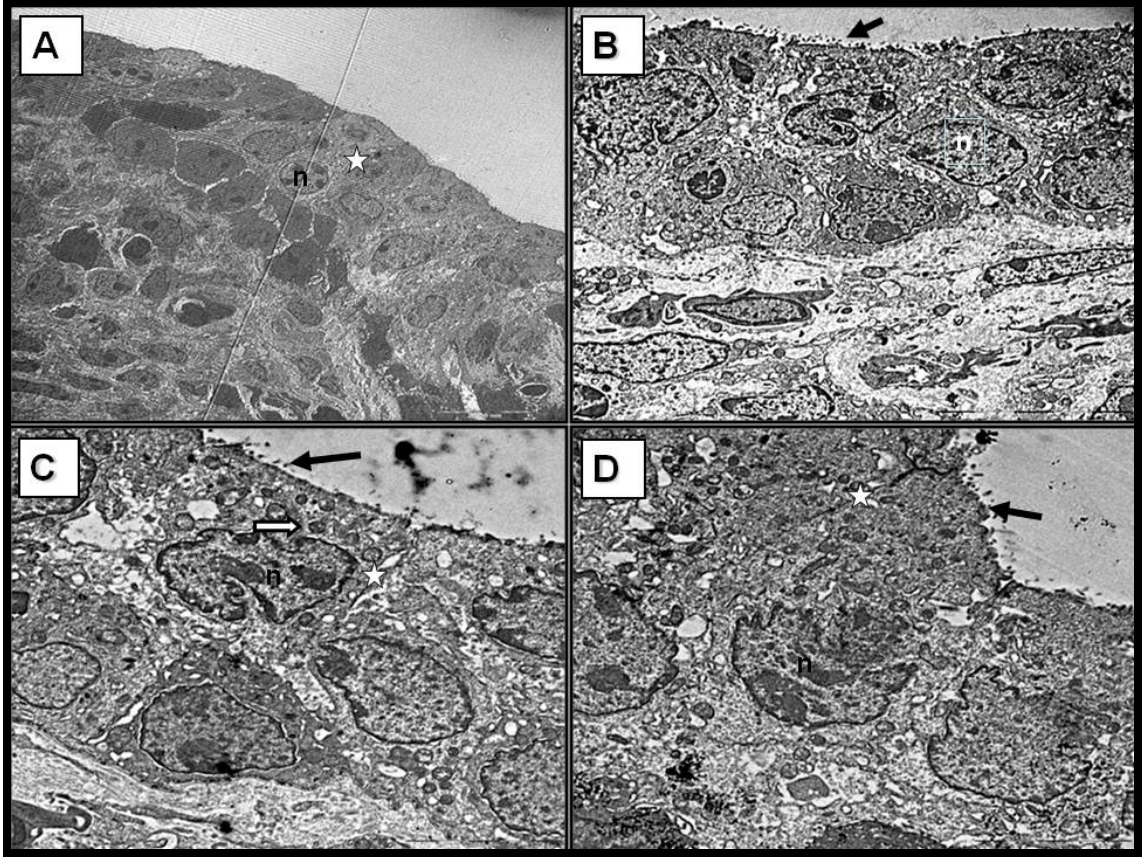
B: uranil asetat-kurşun sitrat X 1400.

C: uranil asetat-kurşun sitrat X 4000.

D: uranil asetat-kurşun sitrat X 4000.

(n: nükleus, ok: apikal farklılaşmalar, beyaz yıldız; hücreler arası bağlantılar, beyaz ok; mitokondriler)

Düşük doz omega-3 alan grupta, uterus yüzey epitelinin kontrol grubuna göre epitel yüksekliğinde azalma olduğu yapılan morfometrik ölçümler ile bulundu. Bunun dışında yüzey epitelinin apikal yüzeyinde, sitoplazmasındaki organellerde ve hücreler arası bağlantılarında dejeneratif değişikliklere rastlanılmadı. (Resim 5.2 A,B,C,D) (Tablo 5.1)



Resim 5.2: Düşük doz Omega-3 alan grupta uterus epiteli

A: uranil asetat-kurşun sitrat X 400.

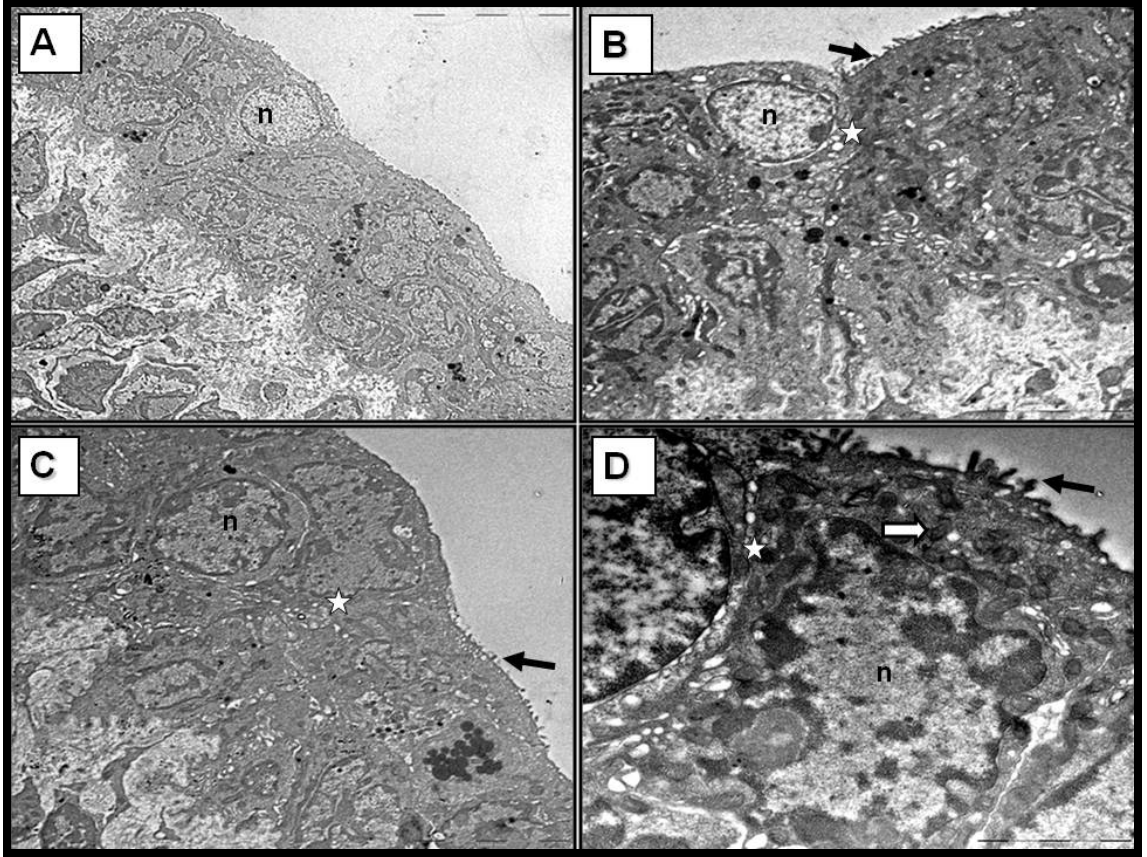
B: uranil asetat-kurşun sitrat X 1000.

C: uranil asetat-kurşun sitrat X 1600.

D: uranil asetat-kurşun sitrat X 2000

(n: nükleus, ok: apikal farklılaşmalar, beyaz yıldız; hücreler arası bağlantılar, beyaz ok; mitokondriler)

Yüksek doz omega-3 alan grupta uterus yüzey epitel yüksekliği, kontrol ve düşük doz omega-3 alan gruplara göre morfometrik ölçümler sonucunda daha da azalmış olarak gözlemlendi. Bunun dışında yüzey epitelinin apikal yüzeyinde, sitoplazmasındaki organellerde ve hücreler arası bağlantılarında dejeneratif değişikliklere rastlanılmadı. (Resim 5.3 A,B,C,D)



Resim 5.3: Yüksek doz Omega-3 alan grupta uterus epiteli

A: uranil asetat-kurşun sitrat X 800.

B: uranil asetat-kurşun sitrat X 1600.

C: uranil asetat-kurşun sitrat X 1600.

D: uranil asetat-kurşun sitrat X 4000.

(n: nükleus, ok: apikal farklılaşmalar, beyaz yıldız; hücreler arası bağlantılar, beyaz ok; mitokondriler)

3 Grup arasında epitel yüksekliğinde anlamlı farklılık anlamlılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. 3 grup arasında anlamlı farklılık anlamlılık olduğu gözlemlendi ($p=0.00$). Bu farkın hangi gruplar arasında olduğu ise Mann Whitney U testi ile değerlendirildi (Tablo 5.2).

Tablo 5.1: Lümen epiteli yüksekliği (Ultrastrüktürel)

Grup	Epitel boyu ortalaması (nm) ± Standart sapma
Kontrol	18175,94 ± 2979,3
Düşük doz Omega-3	17844,71± 719,9
Yüksek doz omega-3	7051,08± 682,3

Tablo 5.2: Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme

Gruplar	Mann Whitney U Testi (p değerleri)
Kontrol-Düşük Doz	0,599
Kontrol-Yüksek Doz	0,000
Düşük Doz-Yüksek Doz	0,000

Elektron mikrosbunda birim alan başına düşen mikrovillus sayısı ölçüldü. Düşük doz ve yüksek doz omega-3 gruplarında kontrol grubuna göre mikrovillus sayısında azalma olduğu gözlemlendi (Tablo5.3). Yüksek doz grubu diğer gruplara göre anlamlı olarak azalma gösterdi (Tablo 5.4).

Tablo 5.3: Birim alan başına düşen mikrovillus sayısı

Gruplar	mikrovillus sayısı/1000nm
Kontrol	3,80
Düşük doz Omega-3	2,67
Yüksek doz Omega-3	2,16

3 Grup arasında anlamlılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. 3 grup arasında anlamlılık olduğu gözlemlendi (p=0.001).

Tablo 5.4: Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme

Gruplar	Mann Whitney U Testi (p değerleri)
Kontrol-Düşük Doz	0,008
Kontrol-Yüksek Doz	0,004
Düşük Doz-Yüksek Doz	0,004

V. TARTIŞMA

Memeli implantasyonundaki temel olay reseptif endometriyumun gelişmesi ve desiduaya farklılaşmasıdır. Başarılı implantasyonun ön koşulu olarak, reseptif endometriyumun hazırlanması ve blastokistin implantasyonunda önemli rol oynayan moleküler etkileşimler, karmaşık bir kaskad içerir (106). Kötü olgunlaşmış bir endometriyumda implantasyonun başarılı olamayacağı iyi anlaşılmıştır (107). Yetersiz endometriyal reseptivite, implantasyon başarısızlığının yaklaşık üçte ikisinden sorumlu tutulmaktadır (108).

Embriyonik implantasyon embriyo ve maternal endometriyumu içeren bir grup süreç olup, gelişmekte olan blastokistin reseptif endometriyuma tutunduğu ve içine gömüldüğü, kadınlardaki benzersiz bir dönem olan implantasyon penceresinde gerçekleşmektedir. Kadınlarda implantasyon penceresi midluteal faza karşılık gelmekte ve yaklaşık 48 saat ile sınırlandırılmakta olup bazı endometriyal büyüme faktörleri, sitokinler ve adezyon molekülleri ile düzenlenmektedir (109, 110, 111, 112, 113). İntegrinler, IL-1, LIF, müsin, leptin, selektin-L ligandları, Hoxa genleri ve siklooksijenaz (COX) gibi bir çok moleküler belirteç bu reseptif süreci tespit etmek için önerilmiştir (114, 115, 116, 117, 118). İmplantasyon penceresi başlangıcı ayrıca endometriyal epitel hücre morfolojisindeki değişikliklerle de karakterize edilebilmektedir (33, 119). Aslında insan yaşamının ilk haftası hakkındaki bilgimiz; implantasyonun reseptif endometriyumla iletişime girecek blastokist gerektirmesi ve in vivo bir durum olması nedeniyle, bir takım gözlemsel çalışmalara dayalı ve oldukça sınırlıdır (120, 121).

İmplantasyon penceresi üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu süreç dışındaki embriyo implantasyonu ya tamamiyle engellenir ya da en iyi ihtimalle

inhibe edilmektedir (122, 123). Non-reseptif durumdan reseptif endometriyuma dönüşüm sırasında hücre yüzeyindeki moleküllerin ekspresyonundaki değişiklik önceki çalışmalarda gösterilmiş olup sağlıklı kadınların endometriyal örneklerinde LIF, LIF reseptör proteinleri ve pinopod artışı insan blastokist implantasyonunun başlangıcında, bu her iki moleküler ve yapısal değişikliğin önemli olduğunu düşündürmektedir (45, 124). İmplantasyon belirteçlerinden olan TNF- α ve LIF insan plasentasının gelişiminde oldukça önemli bir role sahip görünmektedir. LIF sadece trofoblast farklılaşmasını etkilemekle kalmayıp embriyonun adezyon şeklini de kontrol etmektedir (125, 126).

Birçok konuda olduğu gibi, embriyonun implante olabilmesi için gerekli reseptif ortamın sağlandığı desidualizasyon dönemi başlangıcı üzerinde de farklı görüşler bulunmaktadır. Abrahamson ve Zorn, stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşmasının blastokist ile lümen epiteli bazal membranı arasında ilişki kurulduktan sonra başladığını ileri sürerken (127), Welsh ve Enders tarafından, gebeliğin 6. gününde antimezometriyal bölgede lümen epiteline komşu küçük bir alana sınırlı olacak şekilde desidualizasyonun gerçekleştiğini (128), Kramer ise; sıçan endometriyumunda desidualizasyonun ilk olarak 4,5. günden itibaren tespit edilebildiğini ve 4,5-6,5. günlerde stromal dokuda yaygınlaştığını belirtmiştir (129).

Endometriyal fertilitte durumunu değerlendirmenin en az invaziv yöntemi kan örneğinde endometriyal reseptivitenin prediktif belirteçlerinin incelenmesidir. LIF implantasyon penceresi belirteçlerinden biri olup, serumdaki LIF ölçümü fertilitte durumunu yansıtmadığında ve uterin yıkama örneğindeki düşük konsantrasyonu implantasyonun başarısız olacağını öngörmektedir (125, 130, 131). Aslında endometriyal reseptivite için önerilen belirteçlerin çoğu uterusu spesifik olmaması nedeniyle bu belirteçlerin serum konsantrasyonlarının implantasyon başarısının öngörmedeki rolünü saptamak zordur. Periferik kan analizinin bir alternatifi uterin yıkama örneğinin değerlendirilmesidir. Ancak bu yöntemin de

standardize edilmemiş olması ve bakılan içeriğin konsantrasyonunun yöntem farklılıklarından etkileniyor olması gibi bazı sınırlılıkları mevcuttur (113).

Reseptif endometriyum tarafından üretilen ve servikal mukusa geçen sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin değerlendirilmesi implantasyonu incelemesindeki diğer bir non-invaziv yöntemdir. Servikal mukustaki LIF düzeyi periovulatar periyotla yüksek düzeyde ilişkili bulunmuştur (132). Başka bir çalışmada ise menstruasyon dönemi dışında servikal sekresyonda LIF saptanamamıştır (133). Bunun dışında makrofaj-koloni stimulan faktör (M-CSF), epidermal growth faktör (EGF), interlökin-1 beta (IL-1 β), transforming growth faktör beta-1 (TGF- β 1), ve TGF- β 2 serviko-vajinal sekresyonlarda saptanmış ancak EGF dışındaki belirteçlerde serum ve serviko-vajinal sekresyon arasında ya da sekretuar endometriyumdaki sitokin gen ekspresyonu ile endometriyal biyopsideki sitokin konsantrasyonu arasında korelasyon saptanamamıştır. Sadece EGF'nin sekretuar endometriyumdaki gen ekspresyonu ile serviko-vajinal sekresyonlardaki konsantrasyonu arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Bu da EGF'nin uterin reseptiviteyi öngörmede minimal invaziv belirteç olarak değerli olabileceği düşüncesini desteklemektedir (133).

Ultrasonografi da reseptif endometriyumu öngörmede kullanılan diğer bir belirteçtir. IVF uygulanan hastalarda yapılan bir çalışmada üç boyutlu ultrasonografinin değerlendirmesinde folikül stimulan hormon (FSH) uygulamasından sonra endometriyumdaki üç çizgi görünümü ve endometriyal volümde azalma gebelikle ilişkili bulunmuştur (134). Ancak yapılan bir başka çalışmada IVF sikluslarında ultrasonografi incelemesinde ne endometriyal kalınlığın ne de eko paterninin histolojik bulgularla uyumlu olmadığı ve dolayısıyla ultrasonun endometriyal reseptiviteyi öngörmede yeterli olmadığı belirtilmiştir (135). Hambartsoumian ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada siklusun 10. gününde alınan endometriyal biyopsideki LIF düzeyi ile IVF siklusu sırasındaki endometriyal gelişim arasındaki muhtemel ilişki araştırılmış ve LIF üretiminin endometriyal kalınlık ve eko paterni ile negatif

ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu bilgiye dayanarak aşırı LIF üretiminin endometriyum üzerine inhibitör etki gösterebileceği belirtilmiştir (132).

Literatürde Omega-3'ün gebelik ve fetüs üzerine etkileri konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır. Bazısı olumlu etkileri göstermişken bazısı da etkili olmadığı yönündedir. Özellikle fetal sinir sistemi gelişimi üzerinde Omega-3 etkisi çok araştırılan bir konu olmuştur. Serebellum gelişimi üzerinde olumlu etkisi olduğunu gösteren bir çalışmada nöronal gelişim, diferansiyasyon ve hatta sinaptik ağ oluşumunda Omega-3'ün yararlı olduğu gösterilmiştir (136). Diğer yandan Omega-3/Omega-6 oranı yüksek diyetlerle beslenen sıçanlarda postnatal büyüme geriliği ve hatta işitme zayıflığı görülmüştür (137). İnsanlarda yapılmış çalışmalarda gebeliğin ikinci yarısında uygulanan yağ asidi suplemantasyonunun gestasyonel diyabet veya preeklampsi riskini azaltmadığını gösteren Yeni Zelanda çalışması olmasına rağmen (138), aynı suplemantasyonun fetüs ağırlığını arttırdığı ve preterm doğumu azalttığı yönünde de bulgular vardır (139). İmplantasyon döneminde endometriyal kan damarlarındaki şekillenmeyi bozan maddelerin embriyo implantasyon oranlarını azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup (140) vasküler yatak ve kardiyovasküler sistem üzerine çok sayıda yararlı etkisi iyi bilinen Omega-3'ün özellikle bilinen vasküler patolojisi bulunan bireylerde, endometriyal perfüzyonu arttırarak gebelik oranlarını arttırabileceği de başka bir çalışma konusu oluşturabilmektedir.

Literatür taramalarımızdan elde ettiğimiz bilgiye göre; bir çok alanda yararlı etkileri gösterilmiş olan Omega-3'ün daha önceden implantasyon üzerine olası etkilerinin çalışılmamış olduğunu tespit ettik.

Endometriyal reseptivitenin ve implantasyonun başarılı olmasındaki anahtar faktör feto-maternal arayüzdeki moleküler etkileşimdir (141). Bu embriyo-endometriyal ilişki LIF gibi bazı moleküller aracılığıyla embriyonun endometriyuma tutunmasından önce başlamaktadır (142). İmplantasyon gerçekleşmeden önce endokrin, otokrin ve parakrin mesajlarla, endometriyum

ve embriyo implantasyon için hazırlanır ve uygun ortam sağlanır (8). Endometriyal reseptivite endometriyal glandlardan LIF salınımı ve lüminal epitelden LIF reseptör salınımı inhibisyonu ile düzenlenmektedir (44). LIF salınımı farelerdeki implantasyon günü olan 4. günde maksimum seviyeye çıkmakta, bu da LIF'in endometriyal reseptiviteye katkıda bulunduğunu göstermektedir (44, 143). LIF düzeyi embriyo kalitesi ile uyumlu(144) ve LIF miktarı gebelik sonucu tahmininde yüksek düzeyde ilişkili bulunmuştur (145). İmplantasyon penceresi döneminde yüksek LIF immünoreaktivitesi gösteren kadınlar yüksek gebelik şansına sahiptirler (146). Endometriozisli infertil kadınların endometriyumlarında LIF tespit edilememiştir (147). LIF yetersizliği bulunan dişi farelerin implantasyon başarısızlığına bağlı olarak infertil oldukları bulunmuştur (148, 149). Ancak 2007'de yapılan; açıklanamayan primer infertilitesi bulunan ve siklusları normal olan fertil kadınlardan alınan endometriyal biyopsilerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada her iki grup arasında LIF düzeylerinde anlamlı farklılık tespit edilememiş ve endometriozise bağlı infertilitesi bulunan kadınlarla kıyaslandığında endometriyal fenotipin farklı olabileceği ve günlük pratikte farklı tedavi yöntemlerinin gerektiği belirtilmiştir (150). Bu bilgiler bize, endometriyumdan salınan LIF'in embriyo implantasyonu için mutlak gerekli olduğunu ve LIF düzeylerinin seçilmiş olgularda yapılan IVF uygulamalarında prediktif değerinin olabileceğini düşündürmektedir. Düşük doz aspirin verilen farelerde implantasyon penceresinde endometriyal LIF immünoreaktivitesi daha güçlü bulunan bir çalışma vardır (151). Akupunkturun da sıçanlarda LIF sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (152). Bizim çalışmamızın sonuçları farelerde Omega-3 desteği verildiğinde implantasyon penceresi döneminde LIF sekresyonunun arttığını göstermektedir.

Uterus bazal membranı; lüminal epitel ve stromal hücreler arasındaki karşılıklı makromoleküllerin difüzyonunu kontrol etmektedir. Bu yüzden bazal membran kalınlığı difüzyon oranını belirlemektedir. Ek olarak ekstrasellüler matrix proteinlerinin; hücrelerin çoğalma, farklılaşma, göç ve tutunma gibi

fonksiyonları üzerine de etkileri bulunmaktadır (153, 154). Ekstrasellüler matrix elemanı olan laminin embriyo gelişiminin erken dönemlerinde görülmezken sonraki dönemlerde bazal membranda artmaya başlar (155). Üstelik laminin polipeptidlerinin morula döneminde gözlenmesi, embriyogenezin erken dönemlerinde hücre göçü, tutunması ve farklılaşması gibi olaylara katıldığını ve hücre büyümesi ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol aldığını düşündüren çalışmalar da mevcuttur (155). Ancak laminin'in bu fonksiyonlarını nasıl gerçekleştirdiği henüz tam olarak anlaşılmış değildir. Laminin bu fonksiyonlarını, üzerinde bulunan belli bölgelere hücre yüzey reseptörlerinin ve diğer ESM moleküllerinin bağlanmasıyla gerçekleştirdiği sanılmaktadır. Zira implantasyon döneminde blastokist üzerinde morfolojik olarak saptanabilen tüm membranlarda laminin bulunması bu kanıyı güçlendirmiştir (153, 155). Biz de benzer olarak yapmış olduğumuz çalışmamızda yüksek doz Omega-3 verilen farelerde preimplantasyon döneminde lümen epiteli bazal membranı, bez epiteli bazal membranı, endometriyal stromada anlamlı olarak artmış laminin immunoreaktivitesi saptadık.

Diğer bir ESM proteini olan fibronektin ve ESM proteinlerinin hücre membranındaki reseptörleri olarak görev yapan integrinler de implantasyon sürecinin değişik aşamalarında görev yapmaktadır. Öte yandan pre-implantasyondan peri-implantasyon dönemine geçişte implantasyon bölgesinde blastokist invazyonu sırasında bazal membrandaki laminin immunoreaktivitesindeki azalmaya bağlı lüminal epitelde bozulma olduğu sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada gebeliğin 5. gününden itibaren net olarak tespit edilmiştir (156).

Desidualizasyon süresince ESM'nin yeniden modellenmesi sırasında bir taraftan adezyon moleküllerinde dinamik ve geçici bir ekspresyon gözlenirken bir taraftan da değişik hücresel modifikasyonlar gözlenmektedir (36, 157). İmplantasyonun başlangıç dönemlerinde ESM proteinlerinde görülen bu ani ve

kısa süreli değişikliklerin nedeni henüz net olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak, bu dönemde hücrelerde hızlı transformasyonların olduğu da bir gerçektir.

Kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda reseptif dönemde endometriyumda önemli yapısal değişikliklerin olduğu ve sekretuar hücrelerdeki apikal membranlarda bulunan mikrovillusların azaldığı ve bunların birleşerek pinositoz da görevli büyük apikal çıkıntılar olan pinopodları oluşturduğu gözlenmiştir (158, 159).

Bu çalışmamızda yüksek dozda Omega-3 verilen farelerde implantasyon öncesi dönemde embriyonun implante olabilmesi için endometriyumun daha uygun hale geldiğini; LIF ve laminin oranlarının arttığını, epitel yüksekliğinin azaldığını ve mikrovillusların azaldığını tespit ettik. Düşük doz Omega-3 verilen grupta kontrol grubuna göre epitel yüksekliği açısından anlamlı farklılık yokken, mikrovillus miktarında anlamlı azalma olduğu görüldü. Benzer olarak kontrollü overyan stimülasyon uygulanan farelere estradiol desteği verilmesi sonucunda LIF düzeylerinde ve pinopod miktarında artış olduğu saptanmış ve estradiol desteğinin endometriyal reseptiviteyi arttırabileceği ileri sürülmüştür (160). İmplantasyonun başarılı olabilmesi için mutlak gerekli olarak görülen pinopodların oluşumu bazı faktörler tarafından engellenebilmekte. Öneğin antiprogestin olan mifepriston uygulandığı bir çalışmada pinopod oluşumunun geciktiği gösterilmiştir (161).

Bununla birlikte günlük hayatta maruz kalınan Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) gibi bazı meddelerin de implantasyonu olumsuz yönde etkileyen değişikliklere neden olduğunu bilmek gerekmektedir. DEHP ile yapılan çalışmalarda farelerde anormal estrus siklusuna neden olan endokrin düzensizlikler yaptığı, östrojen ve progesteron reseptörlerinde ve E cadherin düzeylerinde değişikliklere neden olduğu, pinopodlarda azalmaya neden olarak endometriyal reseptiviteyi azalttığı, kan damarlarında yeniden düzenlenmeyi baskılayarak emriyo implantasyon oranlarını azalttığı ayrıca uzun dönem yüksek dozda maruz kalınması durumunda düşük gebelik oranlarıyla yüksek oranda

erken dönem gebelik kaybına, düzensiz östrojen ve progesteron seviyeleriyle birlikte ovulasyonu engelleyebildiği gösterilmiştir (140).

Blankenship ve Given fare uterin lüminal epiteli bazal membranında gebeliğin 5-7. günleri arasında laminin ve tip IV kollajen azalması olduğunu saptamışlar ve bu azalmanın bazal membrana yakın yerleşimli olan stromal desidual hücrelerle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (161). Stromal ve desidual hücrelerinde bazal membran matrixini değiştirebildiği söylenebilir (163, 164). Bazal membrandaki incelmeye stromal hücrelerin fonksiyonlarından da kaynaklanıyor olabilir, çünkü gebeliğin olmadığı siklularda da trofoblastlardan bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir (165). Hayvan deneylerinden anlaşıldığı üzere bazal membrandaki azalma azalmış matrix üretiminden ziyade enzimatik yıkıma bağlı görülmektedir (165). Sarani ve arkadaşlarının insan lüminal endometriyumu üzerinde yapmış olduğu bir çalışmaya göre bazal membran kalınlığı implantasyon için en uygun zaman olan LH piki sonrası 6. günde en düşük düzeye ulaşmaktadır ve bu değişiklik implantasyon penceresinin morfolojik kanıtı olarak değerlendirilmiştir. Lüminal epiteldeki incelmeye endometriyumun blastokist invazyonu için uygun implantasyon alanı oluşturmasını yansıtır olabileceği önerisinde bulunulmuştur (166). Benzer olarak mevcut çalışmamızda da düşük ve yüksek doz Omega-3 verilen farelerin implantasyon öncesi dönemde endometriyum epitel yüksekliğinde azalma olduğu ultrastrüktürel olarak tespit edilmiş olup implantasyon başarısını arttıran bir faktör olarak değerlendirilmiştir.

VI.SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde birçok çalışma implantasyon dönemindeki endometriyumun moleküler ve morfolojik değişikliklerini anlamaya adanmış ancak halen daha mevcut değişikliklerin nasıl gerçekleştiği, tetikleyici mekanizmalar ve bu değişikliklerin nasıl başladığı açıklık kazanmamıştır. Üstelik birçok çalışmada da çelişkili sonuçlar mevcuttur. İmplantasyon için gerekli mekanizmaların başlamasını tetikleyen faktörler tam olarak bilinmediği gibi bu değişiklikleri arttıracak etmenlerinde üzerinde pek durulmayan bir diğer konu olduğu görülmektedir.

Günümüz obstetri kliniğinde bir çok klinisyen tarafından besin desteği olarak önerilen Omega-3'ün literatür taramamıza göre daha önceden implantasyon üzerine etkileri araştırılmamıştır. Bu sebeple bu çalışmamızda Omega-3 verilen farelerde implantasyon penceresi döneminde endometriyumdaki değişiklikleri implantasyon döneminde artış gösterdiği bilinen laminin ve LIF'i kullanarak immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel yöntemlerle göstermeyi amaçladık.

Bu çalışmada elde etmiş olduğumuz verilere göre çiftleşme öncesi Omega-3 verilen farelerin endometriyumlarında implantasyon öncesi dönemde bazal membranlarında laminin ve LIF düzeyinin arttığı, elektron mikroskopik incelemede ise implantasyonu kolaylaştıran faktörler olarak görülen epitel yüksekliğinde ve mikrovillus yoğunluğunda azalma olduğu belirlenmiştir.

İmplantasyonun başarılı olabilmesi reseptif endometriyum ve sağlıklı embriyo arasındaki etkileşime bağlı olup endometriyumun implantasyon penceresi dönemindeki değişikliklerin görülmesi tek başına sağlıklı bir gebelik elde

edilmesi açısından yeterli olmayabilir. Başarılı implantasyon mekanizmaları halen net olarak anlaşılabilmif değildir ve bu sürecin net olarak ortaya konulabilmesi için çok yönlü değerlendirmelerin yapıldığı prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın implantasyon öncesi, implantasyon sırasında ve implantasyon sonrası olmak üzere gebeliğin değişik günlerinde yapılan incelemelerle desteklenmesi gerekmele beraber mevcut sonuçlarla Omega-3'n endometriyumda implantasyonu olumlu yönde etkileyen etkileri gösterilmiştir.

VII. ÖZET

İmplantasyonda rol alan bir çok mekanizma bilinmekle birlikte bunları neyin ve nasıl tetiklendiği henüz netlik kazanmamıştır. İmplantasyon başarısızlığının üçte ikisi endometriyal reseptivite kusurundan kaynaklanmakta ve bu nedenle endometriyal reseptivite üzerine olumlu etki gösterebilecek etmenlerin incelenmesi önem arz etmektedir. Hem hücre zarı yapısına katılması, hemde bir antioksidan özellik taşıması nedeniyle gebelik ve sonrası dönemde oldukça önemli yararları bulunan Omega-3 günümüz obstetri pratiğinde bir çok klinisyen tarafından da tercih edilmektedir. Mevcut literatür bilgimize göre Omega-3 besin desteğinin implantasyon üzerine etkilerinin incelenmemiş olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda 7'şerli gruplar halinde toplam 21 fare kullanıldı. Standart laboratuvar şartlarında tutulan farelerden kontrol grubunda olanlara standart gıda, düşük doz grubuna gıdaya ek olarak 400mg/kg Omega-3, yüksek doz grubuna ise gıdaya ek olarak 1000mg/kg Omega-3 oral gavaj ile verildi. Farelerin düzenli sıklısta oldukları üç haftalık takip ile belirlendikten sonra birinci estrus döneminde Omega-3 desteği başlandı ve bir sonraki estrus döneminde üç dişiye bir erkek düşecek şekilde fareler çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi gün vajinal plak gebelik açısından kontrol edildi ve gebe olduğu saptanan fareler beklenen implantasyonun 3. gününde sakrifiye edildi. Toplam 8 günlük Omega-3 desteği alan farelerin implantasyon sonuçlarında yüksek doz verilen grupta laminin ve LIF immunoreaktivitesi kontrol ve düşük doz gruplarına göre anlamlı olarak artmış, elektron mikroskopik değerlendirmede de benzer şekilde yüksek doz grubunda epitel yüksekliğindeki azalma ve mikrovillus kaybı diğer iki gruba göre anlamlı oranda farklı bulunmuştur.

Bu bulgular literatür bilgisiyle de uyumlu olup Omega-3 besin desteğinin endometriyal reseptivite ve implantasyon üzerine olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

VIII. ABSTRACT

**IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE
EFFECT OF OMEGA-3 ON EMBRYONIC IMPLANTATION IN AN
EXPERIMENTAL MOUSE MODEL**

Many mechanisms are defined that play a role during implantation, however how the process is triggered remains a mystery. Defects in endometrial receptivity are responsible for two-thirds of implantation failure, thus the investigation of positive factors on endometrial receptivity is important. Many obstetricians encourage use of Omega-3 during pregnancy due to its antioxidant effect and being a part of cell membrane structure. According to our knowledge, there is no study published on the effect of Omega-3 nutritional support on implantation.

A total of 21 mice equally divided into three groups was used for the experiment. All were kept under standard laboratory conditions. The control group was fed with standard food, the low dose group was fed with Standard food and was given 400 mg/kg of Omega-3 and the high dose group was fed with standard food and was given 1000 mg/kg Omega-3 by oral gavage. After determining the regular cycles of the mice by three-week follow-up, Omega-3 nutrition support was started during the first estrus cycle. The mice were allowed to mate in the next cycle with one male to three females. The day after mating, vaginal plates were checked for pregnancy and mice were sacrificed on the third day of the expected implantation.

Results showed that laminin and LIF immunoreactivity were increased significantly in the high dose group when compared to the control and low-dose groups. Similarly electron microscopic evaluation showed a decrease in epithelial height and microvilli loss in the high dose groups.

IX. KAYNAKLAR

- 1.Gökçimen A, Temel S. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg 2004; 11(4):25-33.
- 2.Thomas TR, Smith BK, Danahue OM, Altena TS, Marily J, Krake and Sun GY. Effect of omega 3 fatty acid supplementation and exercise on LDL and HDL subfractions. Metabolism 2004; 53,6, 749-754.
- 3.Aytekin Y, Solakoğlu S. Dişi üreme sistemi; Temel Histoloji (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2006: 449-468.
- 4.Lecce G, Meduri G, Ancelin M, Bergeron C, Perrot-Appianat M. Presence of Estrogen Receptor s in the Human Endometrium through the Cycle: Expression in Glandular, Stromal, and Vascular Cells J Clin Endocrinol Metab. 86(3):1379-1386.
- 5.Halvorson LM. Reproductive Endocrinology. In: Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Gynecology, 1st ed. McGraw-Hill Companies,2008:681-684.
- 6.Halvorson LM. Reproductive Endocrinology. In: Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Gynecology, 1st ed. McGraw-Hill Companies,2008:730-732.
- 7.Susan JK. Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation. Sem Re- prod Med 2000;18(3):237-43.
- 8.Attar E. Spermatogenezis, Fertilizasyon, Erken embriyo gelişimi ve İmplantasyon. Umur Çolgar. Reprodktif Endok- rinoloji ve İnfertilite, 1. baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006:34-45.
- 9.Paria BC, Lim H, Wang XN, Liehr J, Das SK, Dey SK. Coordination of different effects of primary estrogen and catecho- lestrogen on two

- distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* 1998;139(12):5235-46.
- 10.Sunder S, Lenton E. *Endocrinology of the Peri- Implantation Period. Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(5):789-800.
 - 11.Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100:2963–2968.
 - 12.Özcan T. Diyabetin, implantasyon penceresi dönemindeki sıçan endometriyumunda $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonuna ve ince yapıya etkisi [TezJ. Mersin; Merin Üniversitesi,2010. 3s.
 - 13.Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S. The Role of Integrins in Human Embryo Implantation. *Fetal Diagn Ther* 2001;16:364-371.
 - 14.Korgun ET, Cayli S, Asar M, Demir R. Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. *J Mol Hist* 2007; 38:253–260.
 - 15.Dilsiz ÖY. Deneysel sıçan endometriyozis modelinde implantasyon kusurunun histolojik olarak değerlendirilmesi [TezJ. İzmir; Ege Üniversitesi, 2008.76-267-331s.
 - 16.Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*, 2003, Lippincott Williams And Wilkins, London: Cev. Ed: Başaklar AC, s43, 2005.
 - 17.Paria BC, Huet-Hudson Ym, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the 'window' of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10159-10162.
 - 18.Gartner LP, Hiatt, JL. *Color Textbook of Histology*, W.B. Saunders Company, 461-487, 2001.
 - 19.Gursoy E, Ergin K. *Dişi ureme sistemi Atlası, Nobel Tıp Kitabevleri*, 2007
 - 20.Kierszenbaum AL., *Histology and Cell Biology*, Mosby, 2002.

21. Moore K, Persaud T. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology'. W.B. Saunders Company, 3rd Edition, 18-62, 2003.
22. Başaklar AC, çev ed; Gelişimin birinci haftası: ovulasyondan implantasyona. Sadler TW. Langman's Medikal Embrioloji (içinde). Ankara: Palme yayıncılık 2005:38.
23. Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology, Sydney: Churchill Livingstone 2000.
24. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. Human Reproduction 2007; 1-13.
25. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. Society for Reproduction and Fertility 2004; 679-691.
26. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. Blastosist Oluşumu. Moore KL, Persaud TVN, ed; İnsan Embriyolojisi (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 40-42, 130-135.
27. Speroff L., Glass RH., Kase NG. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, Lippincott Williams&Wilkins 1999: 1097-1149.
28. Noonan FP, Halliday WJ, Morton H & Clunie GJA. Early pregnancy factor is immunosuppressive. Nature 1979;278: 649 – 651.
29. Cavagna M., Mantese JC. Biomarkers of Endometrial Receptivity-A Review, Placenta 2003, 24: 39-47.
30. Kimber SJ, Spanswick C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. Cell&Developmental Biology 2000; 11: 77-92.
31. Elder K, Dale B. Preimplantation Genetic Diagnosis. In Vitro Fertilization, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2000:1-33.
32. Bahar L, Kahraman S, Baykal T. Comparatively Evaluation of Infertile (RIF) and Fertile Women Endometrial Biopsies at the Ultrastructural Level by TEM. In: Dubuisson JB, Gomel V. Reproductive Medicine and Surgery from the Proceedings of the 15th World Congress on In Vitro Fertiliza-

- tion and 4th World Congress on In Vitro Maturation, 1st edn. Geneva, Monduzzi International Proceedings, 2009:171-3.
33. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod* 1999;14(2):99-106.
 34. Tinel H, Denker HW, Thie M. Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation. *Mol Hum Reprod* 2000;6(12):1119–30.
 35. Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Albers A, Denker HW. Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol* 1995;66(2):180–91.
 36. Albers A, Thie M, Hohn HP, Denker HW. Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cell during the menstrual cycle. *Acta Anat* 1995; 153:12-19.
 37. Hyland RA, Shaw TJ, Png FY, Murphy CR. Pancadherin concentrates apically in uterine epithelial cell during uterine closure in rat. *Acta Histochem* 1998;100: 75-81.
 38. Denker HW. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a biological paradox. *Trophoblastic Research* 1990; 4:3-29.
 39. Özyürek ŞE. Yardımcı Üreme Teknoloji Siklüslerinde Luteal Faz Steroid ve hCG Seviyelerinin Paternleri, Tedavi Sonuçları ile İlişkileri, Uzmanlık Tezi 2001.
 40. Steck T, Giess R, Suetterlin MW, Bolland M, Wiest S, Poehls UG, Dietl J. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Europ J Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology* 2004;112: 69-73.

41. Abe E, Tanaka H, Ishimi Y. Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone reabsorption. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1986;83:5958-5962.
42. Gearing DP, Gough M, King JA. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 1987;6:3995-4002.
43. Auernhammer CJ, Chesnokova V, Melmed S. Leukaemia inhibitory factor modulates interleukin-1 beta-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 1998;139:2201-2208.
44. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukaemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88:11408-11412.
45. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren BM. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 1):808-14.
46. Nachtigall M, Kliman HJ., Feinberg RF., Olive DL., Engin O., Arıcı A. The effect of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) on Trophoblast Differentiation: A Potential Role in Human Implantation, *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81: 801-806.
47. Arıcı A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clinical Endocrinology Metabolism* 1995;80:1908-1915.
48. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359:76-79.
49. Mohamet L, Heath JK and Kimber SJ. Determining the LIF-sensitive period for implantation using a LIF-receptor antagonist. *Reproduction* 2009;138:827-836.

50. Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F. Embryo- Maternal Interactions at the Implantation Site: A Delicate Equilibrium. *Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 83 (1): 85-100.
51. Bischof P, Campana A. Effect of Leukemia Inhibitory Factor on Human Cytotrophoblast Differentiation along the Invasive Pathway. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 1995; 2 (2): 198.
52. Timpl R, Rodhe H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM and Martin GR. Laminin- A glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979; 254:9933-37.
53. Engel J. Laminins and other strange proteins. *Biochem* 1992;31:10643-651.
54. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, Timpl R, Tryggvason K, Yamada Y and Yurchenco PD. A new nomenclature for laminins. *Matrix Biol* 1994;14:209-11.
55. Aumailley M, Symth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 1998;193:1-21.
56. Sana Hashmi BS, M. Peter Marinkovich MD. Molecular organization of the basement membrane zone. *Clinics in Dermatology* Volume 29, Issue 4, July–August 2011;398–411
57. Hay ED. Interaction of embryonic cell surface and cytoskeleton with extracellular matrix. *Am J Anat* 1982;5:1-12.
58. Ekblom P. Extracellular matrix in animal development. *Experientia*. 1995; 51:851-2.
59. Clark EA and Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways:
 - a. the road taken. *Science* 1995; 268:233-9.
60. Inagaki J, Sugiura-Ogasawara M, Nomizu M, Nakatsuka M, Ikuta K, Suzuki N, et al. An association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with endometriosis in infertile patients. *Hum Reprod* 2003;18:544 –9.

61. MacIntyre DM, Lim HC, Ryan K, Kimmins S, Small JA, MacLaren LA. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biol Reprod* 2002;66:1430–6.
62. Damsky CH, Librach C, Lim KH. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994;120:3657-3666.
63. Guillomot M. Changes in Extracellular Matrix Components and Cytokeratins in the Endometrium During Goat Implantation. *Plasenta* 1999;20(4):339-345.
64. Sadler TW. Embryology: Old and New Frontiers and an Introduction to Molecular Regulation and Signaling In: Sadler TW ed. *Langman's Medical Embryology*, 11th ed. Lippincott Williams&Wilkins 2009: 9.
65. Thomas T, Dziadek M. Expression of laminin and nidogen genes during the postimplantation development of the mouse placenta. *Biol Reprod* 1993;49:1251–9.
66. Enders AC. Morphological manifestations of maturation of the blastocyst. *Prog Clin Biol Res* 1989;294:211–23.
67. Fernandez PL, Merino MJ, Nogales FF, Charonis AS, Stetler-Stevenson W, Liotta L. Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kilodalton type IV collagenase in the implantation placental site. An integrated view. *Lab Invest.* 1992;66(5): 572-9.
68. Kocabas A. Farklı Sosyoekonomik Düzeyde Yasayan Yetiskin Bireylerin Diyet Örüntüleri ve Diyet Kalite indekslerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Çalışma. [TezJ. Ankara; Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyet Programı, Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 2003.
69. Baysal A ve ark. Diyet El Kitabı. H.Ü. Yayınları. Ankara: Hatiboglu Yayınevi, 1999.
70. Aksoy M. Beslenme Biyokimyası. Hatipoglu Yayınevi, Ankara, 2000.

71. Mayes PA. Lipidlerin fizyolojik önemi. Menteş G, ed; Harper'ın Biyokimyası Bölüm 16 (içinde). 1993.
72. Akçay YD. Beslenme. Ulukaya E, çev.ed; Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007:360-361.
73. Holman RT. The Slow Discovery of the Importance of ν 3 Essential Fatty Acids in Human Health The Journal of Nutrition, 1998;128 (2 Suppl): 427S-433S.
74. Rudman D. Nutritional Requirements. In: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 11 th ed. Vol. 1. New York, St Louis, San Francisco, Auckland, Bogota, Hamburg, Johannesburg, London, Madrid, Mexico, Milan, Montreal, New Delhi, Panama, Paris, Sao Paulo, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto. McGraw-Hill, 1987:383-390.
75. Burtis CA, Ashwood ER. Clinical Chemistry. USA: WB. Saunders Company, 1994.
76. Nizamlıoğlu M. Lipidler "Biyokimya" İkinci Baskı. Konya: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi Ünitesi, 2000:216-264.
77. Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacol. Ther. 1999;83 (3), 217-244.
78. Başpınar N, Kurtoğlu F. Vitaminler Ders Kitabı. Isparta: S.Ü. Veteriner Fak. Yayınevi Ünitesi, 2003.
79. Türker RK, Melli M, Kayaalp SO. Eikozanoidler (Araşidonik Asit Metabolitleri) ve Diğer Otakoidler. Kayaalp SO, ed; Tıbbi Farmakoloji 10. Baskı (içinde). Ankara: Feryal Matbaacılık San. Ve Tic. Ltd.Şti., 2002:1439-1463.
80. Kitessa SM, Peake D, Bencini R, Williams AJ. Fish oil metabolism in ruminants III. transfer of n-3 polyunsaturated fatty acids (pufa) from tuna oil into sheep's milk. Anim. Feed Sci. and Techn. 2003; 108:1-14.

81. Simopoulos AP. Omega -3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr* 1991;54:438–463.
82. Ayerza R. Omega-3 fatty acid enriched eggs: advantage of chia over other raw materials. *Omega-3 fatty Acids, Evolution and Human Health Symposium*. 2002; 23-24 September. Washington.
83. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: Potential application in surgical and trauma patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36 (4), 433- 446.
84. Pepe, S. Risk factors for cardiovascular disease. *Ageing Heart and Vessels*. Melbourne, Australia. 2004:3-5.
85. Baumgard LC, Sangster JK, Bauman DE. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 2001;131:1764-1769.
86. Naguib Y. Conjugated linoleic acid. *Vitamin Retailer Magazine, Inc., A-2* Brier Hill Court, East Brunswick, NJ 08816 2002.
87. Holub J. Clinical nutrition: 4. Omega -3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ.* 2002; March 5; 166(5): 608-615.
88. Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression, *Poultry Science* 1993; 72: 1301-1305.
89. National Research Council. Lipids. In: *Food Recommended Dietary Allowances*. 10 th ed, National Academy Press Washington, D.C., 2001:44-51.
90. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Türkiye'ye Özgü Beslenme Rehberi. Ankara: 2004.
91. Helland IB, Smith L, Sacrem K, Saugstad OD, Drewan CA. Maternal supplementation with very long chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 2003;111(1): 39-44.

- 92.Köksal G, Gökmen H. Çocuk Hastalıklarında Beslenme Tedavisi. Ankara: Hatiboglu Yayınları, 2000.
- 93.Borja-Hart NL, Marino J. Role of omega-3 Fatty acids for prevention or treatment of perinatal depression. *Pharmacotherapy*. 2010;30(2):210-6.
- 94.Jones ML, Mark PJ, Mori TA, Keelan JA, Waddell BJ. Maternal dietary Omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biol Reprod*. 2013;88(2):37.
- 95.Reinius, S. Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat*. 1967;11: 257-66.
- 96.Enders, A. C. & Schlafke, S. J. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am. J. Anat*. 1967;120: 185-226.
- 97.Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, et al. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech* 2006; Jun 69(6):396-407.
- 98.Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine a. receptivity: pinopods—or uterodomes? *Hum. Reprod*. 2000;15: 2451–2454.
- 99.Lopata A, Bentin-Ley U, Enders A. "Pinopodes" and implantation. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2002;3: 77– 86.
- 100.Von Zupthen LFM, Baumans V, Beynen AC. the basic principles of laboratory animal science, 2003
- 101.Allen E. The estrous cycle in the mouse. *Am. J. Anat*.1992;30: 297–371.
- 102.Cengiz F. Hormonal Sistem ve Üreme Fizyolojisi. *Temel Veteriner Fizyoloji (içinde) Anadolu Üniversitesi* 2011:124-128
- 103.Oshea JD, Kleinfeld RG, Morrow AH. Ultrastructure of Decidualization in the Pseudopregnant Rat. *Am. J. Anat*. 1983;166: 271-298.
- 104.Liu G, Zhang X, Lin HY, Wang HM, Li QL, Ni J, Zhu C. Effect of E-cadherin on mouse embryo implantation and expression of matrix

metalloproteinase-2 and -9, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;343:832-838.

105. Soares MJ and Hunt JS. Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols. In: Deb K, Reese J, Paria BC, eds. *Methodologies to Study Implantation in Mice, Methods in Molecular Medicine*, vol 121 Humana Press Inc Totowa, NJ.
106. Rashid NA, Lalitkumar S, Lalitkumar PG, Gemzell-Danielsson K. Endometrial Receptivity and Human Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol* 2011;66(1):23–30.
107. Valbuena D, Jasper M, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1999;14 (Suppl 2):107–11.
108. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002;17(1):213-8.
109. Aghajanova L, Simon C, Horcajadas JA. Functional genomics of human implantation: are favorite molecules of endometrial receptivity still in favor? *Rev Exp Obstet Gynecol* 2008;3:487e501.
110. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002;296:2185e8.
111. Giudice LC. Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J Reprod Med* 1999;44:165–71.
112. Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999;14 Suppl 2:3– 16.
113. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004;9:692–715.

114. Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4883–8.
115. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003;299:405–8.
116. Horcajadas JA, Riesewijk A, Dominguez F, Cervero A, Pellicer A, Simon C. Determinants of endometrial receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:166–75.
117. Edwards RG. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod Biomed Online* 2006;13:887–904.
118. Giudice LC. Application of functional genomics to primate endometrium: insights into biological processes. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4 (Suppl 1):S4.
119. Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999;14:787–92.
120. Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, et al. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153: 211–217.
121. Formigli L, Formigli G, Roccio C. Donation of fertilized uterine ova to infertile women. *Fertil Steril* 1987;47:162–165.
122. Giudice LC. Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4:299–312.
123. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril* 1991;55:114–8.

- 124.Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:107e17.
- 125.Stewart CL. The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:157– 65.
- 126.Marwood M, Visser K, Salamonsen LA, Dimitriadis E. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation. *Endocrinology* 2009;150:2915e23.
- 127.Abrahamson PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in Rodents *J. Exp. Zool.* 1993;266: 603-628.
- 128.Welsh AO, Enders AC. Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. *Am. J. Anat.*1983;167: 463-477.
- 129.Kramer B. Changes in vascular permeability and desiduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins. *Anat. Rec.* 1997;242: 20-24.
- 130.Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001;76:1091–6.
- 131.Mikolajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P. The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol* 2003;3:259–70.
- 132.Hambartsoumian E. Leukemia inhibitory factor (LIF) in cervical mucus of infertile women. Relationship with endometrial LIF secretion. *Fertil Steril* 1997;O-035.
- 133.Gargiulo AR, Fichorova RN, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1226–34.
- 134.Jarvela IY, Sladkevicius P, Kelly S, Ojha K, Campbell S, Nargund G. Evaluation of endometrial receptivity during in-vitro fertilization using

three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;26:765–9.

135. Sterzik K, Grab D, Schneider V, Strehler EJ, Gagsteiger F, Rosenbusch BE. Lack of correlation between ultrasonography and histologic staging of the endometrium in in vitro fertilization (IVF) patients. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:165–70.
136. Uauy R, Dangour AD. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr. Rev.* 2006;64 (5 Pt 2): S24–33.
137. Church MW, Jen KL, Jackson DA, Adams BR, Hotra JW. Abnormal neurological responses in young adult offspring caused by excess omega-3 fatty acid (fish oil) consumption by the mother during pregnancy and lactation. *Neurotoxicol. Teratol.* 2009;31: 26–33.
138. Zhou SJ, Yelland L, McPhee AJ, Quinlivan J, Gibson RA, Makrides M. Fish-oil supplementation in pregnancy does not reduce the risk of gestational diabetes or preeclampsia. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(6):1378-84.
139. Carlson SE, Colombo J, Gajewski BJ, Gustafson KM, Mundy D, Yeast J, Georgieff MK, Markley LA, Kerling EH, Shaddy DJ. DHA supplementation and pregnancy outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(4):808-15.
140. Rui Li , Chao Yu , Rufe Gao, Xueqing Liu, Jing Lu, Letian Zhao, Xuemei Chen, Yubin Ding, Yingxiong Wang, Junlin He. Effects of DEHP on endometrial receptivity and embryo implantation in pregnant mice. *Journal of Hazardous Materials* 241-242 (2012) 231-240.
141. Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007;15:728-39.
142. Aghajanova L. Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22:213-9.
143. Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at

the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8680-5.

144. Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones EE. Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod* 1997;12:1233-9.
145. Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J. The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:65-74.
146. Serafini P, Rocha AM, Osório CT, da Silva I, Motta EL, Baracat EC. Endometrial leukemia inhibitory factor as a predictor of pregnancy after in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;102:23e7.
147. Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2006;21:3054-8.
148. Fouladi-Nashta AA, Jones CJ, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, et al. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev Biol* 2005;281:1-21.
149. Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 2005;130:131-45.
150. Dimitriadis E, Sharkey AM, Tan YL, Salamonsen LA, Sherwin JRA. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, IL 11 AND leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007;5:44.
151. Zhao M, Chang C, Liu Z, Chen LM, Chen Q. Treatment with low-dose aspirin increased the level LIF and integrin β 3 expression in mice during the implantation window *Placenta* 2010;31:1101-1105.
152. Giudice 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. *Journal of Reproductive Immunology* 1998; 39 (1-2): 133-148.
153. Albert E. The extracellular matrix in development. In: Nikolas Z ed *Organization of the early vertebrate embryo*. Plenum Press, New York, 1995:149-167.
154. Mulholland J, Aplin JD, Ayad S, Hong L, Glasser SR. Loss of collagen type VI from rat endometrial stroma during decidualization. *Biol. Reprod.* 1992;46: 1136-43.
155. Zagris N, Stavridis V. The expression of the genes for laminin in the early embryo. In: Zagris N, ed. *Organization of the early vertebrate embryo*. Plenum Press New York, 1995:169-183.
156. Kayışlı ÜA, Asar M, Demir R. Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matriksin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri İntegrin $\beta 4$ ve $\alpha 5$ 'in Dağılımları ve Muhtemel Roller. *Turk J Biol* 2000;24: 379–395
157. Fazleabas AT, Bell SC, Fleming S, Sun J, Lessey BA. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during menstrual cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 1997;56: 348-56.
158. Potts M, Psychoyos A. Évolution de l'ultrastructure des relations ovoendométriales sous l'influence de l'oestrogène, chez la Ratte en retard expérimental de nidation. *C R Acad Sci Paris* 1967;264:370–373
159. Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med.* 2000;18(3):229-35.
160. Zhang CL, Xie JK, Zhang SD, Qiao YH. Effect of estradiol supplementation during the luteal phase on mouse endometrial expression of leukaemia inhibitory factor and pinopodes in controlled ovarian stimulation cycles. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2008;43(12):937-41.

161. Murphy CR, Rogers PAW, Hosie MJ, Leeton J, Beaton L. Tight junctions of human uterine epithelial cells change during the menstrual cycle: a morphometric study. *Acta Anat* 1992;144:36–38.
162. Blankenship TN, Given RL . Loss of laminin and type IV collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse. *Anat. Rec.* 1995; 243,27-36.
163. Kisalus L, Herr JC and Little CD. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and collagen synthesis in first trimester human decidua. *Anat. Rec.* 1987;218:402-415.
164. Blankenship TN, Given RL and Parkening TA. Blastocyst implantation in Chinese hamster. *Anat. Rec.* 1990;187:137-157.
165. Wewer UM, Damjanov A, Weiss J, et al. Mouse endometrial stromal cells produce basement membrane components. *Differentiation.* 1986;32:49-58.
166. Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, Cooke ID. Morphological evidence for the "implantation window" in human luminal endometrium. *Human Reproduction* 1999;14: 3106,1999.