



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**İMLANTASYON PENCERESİNDE
FOLİK ASİT EKSİKLİĞİNİN SIÇAN
ENDOMETRİYUM YÜZEY EPİTELİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

YASEMİN ÖZSOY

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2022



**İMLANTASYON PENCERESİNDE FOLİK ASİT EKSİKLİĞİNİN SIÇAN
ENDOMETRİYUM YÜZEY EPİTELİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Yasemin ÖZSOY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Yasemin ÖZSOY

21/02/2022

İMLANTASYON PENCERESİNDE FOLİK ASİT EKSİKLİĞİNİN SIÇAN ENDOMETRİYUM YÜZEY EPİTELİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Yasemin ÖZSOY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2022

ÖZET

Endometriyum epiteli, siklusun alıcı fazında ve progesteronunun etkisindeyken yapısal ve adeziv özellikleri açısından önemli değişikliklere uğramaktadır. Hücre adezyon moleküllerinde oluşabilecek değişiklikler, çevresel ve genetik faktörler, embriyonun gelişiminden başlayarak maternal uterin alıcılıkta sonrasında endometrial stromal hücrelerinin desidualizasyonuna varana kadar bir çok mekanizmada rol oynamaktadır. Maternal folat metabolizmasının ovaryen fonksiyonların, implantasyonun ve embriyogenez sürecinin üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Çalışmamızda implantasyon penceresinin açık olduğu geç luteal evrede (diöstrus), $\alpha 5\beta 3$ integrin ve E-Kaderin'nin folik asit eksikliğinde endometriyum yüzey ve bez epitelindeki olası sentezlenme farklılıklarını ve gene folik asit eksikliğinin endometriyumda oluşturabileceği değişimsel farklılıkların histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemler ile araştırılmasını amaçladık. Deneyde 16 adet, 8-10 haftalık Wistar Albino cinsi sıçanlardan rastgele seçilmiş 2 grup oluşturuldu. 5 hafta süresince 2 mg/kg Folik asit (FA) içeren standart Rodent yem ile beslenen sıçanlardan kontrol grubu, FA içermeyen özel Rodent yem ile beslenen sıçanlardan FA eksiklik grubu oluşturuldu. 5. haftanın bitiminde denekler kurbanı edıldı, kan örnekleri ve uterus dokuları alındı. Dokulardan alınan kesitlere hematoksilen - eozin ve $\alpha 5\beta 3$ integrin ve E-kaderin primer antikorları ile immunohistokimyasal yöntemler uygulandı. Çalışmamız sonucunda FA'in endometriyum morfolojisinin ve işlevselliğinin devamı üzerinde olumlu etkisinin olabileceği yapılan histokimya ve immünohistokimya analizleri ile görülmüş olmakla birlikte bu konuda halen daha fazla çalışmalara ve internasyonal konsensus kararlarına gereksinim duyulmaktadır.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : Folik Asit, Endometriyum, $\alpha 5\beta 3$ İntegrin, E- Kaderin

Sayfa Adedi : 80

Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

EFFECT OF FOLIC ACID DEFICIENCY ON RAT ENDOMETRIAL SURFACE EPITHELIUM IN THE IMPLANTATION WINDOW

(M. Sc. Thesis)

Yasemin ÖZSOY

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2022

ABSTRACT

The endometrial epithelium undergoes significant changes in terms of its structural and adhesive properties during the receptive phase of the cycle and under the influence of progesterone. Changes that may occur in cell adhesion molecules, environmental and genetic factors play a role in many mechanisms, starting from the development of the embryo until the decidualization of endometrial stromal cells in maternal uterine receptivity. The effects of maternal folate metabolism on ovarian functions, implantation and embryogenesis are investigated. In our study, we aimed to investigate the possible synthesis differences of $\alpha 5\beta 3$ integrin and E-cadherin in the endometrium surface and gland epithelium in folic acid deficiency in the late luteal stage when the implantation window is open, and to investigate the variational differences that may be caused by folic acid deficiency in the endometrium by histochemical and immunohistochemical methods. In the experiment, 2 randomly selected groups were formed from 16 8-10 weeks old Wistar Albino rats. Control group was formed from rats fed with standard Rodent chow containing 2 mg/kg Folic acid (FA) for 5 weeks, and FA deficiency group was formed from rats fed special Rodent chow without FA. At the end of the 5th week, the subjects were sacrificed, blood samples and uterine tissues were collected. Hematoxylin - eosin and $\alpha 5\beta 3$ integrin and E-cadherin primary antibodies and immunohistochemical methods were applied to the sections taken from the tissues. As a result of our study, it has been seen with histochemistry and immunohistochemistry analyzes that FA may have a positive effect on the continuation of the endometrial morphology and functionality, but there is still a need for more studies and international consensus decisions on this subject.

Science Code : 1033

Key Words : Folic Acid, Endometrium, $\alpha 5\beta 3$ Integrin, E- Cadherin

Page Number : 80

Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin planlanması, çalışmaların yürütülmesi ve tamamlanmasında bana destek olan, yol gösteren, bilimsel ve manevi anlamda her zaman, koşulsuzca yanımda olan saygıdeğer Danışman Hocam, Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, deneyim ve akademik olarak ilerlememde katkılarını esirgemeyen bölümümüzün değerli hocalarından Prof. DR. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU ve Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU Hocalarıma,

Tezimin çalışma aşamasında yardımcı olan Araş. Gör. Deniz İrem BULUT'a, Uzm. Dr. Esra ÖZKOÇER'e, Araş. Gör. Dr. Elif Seda ÖZDEMİR'e, Yüksek Lisans eğitimine başlamama vesile olan ve her fırsatta motivasyon ve desteğini eksik etmeyen değerli Hocam, Prof. Dr. Engin YILMAZ'a, tez çalışmam süresince iş yerinde desteğiyle yanımda olan sayın Dr. Eyyüp ÜÇTEPE ve tüm çalışma arkadaşlarıma ve bana inanan, desteği ile her an yanımda olan arkadaşım Özlem BAYTAN'a teşekkür ediyorum.

Bu günlere gelmemde en önemli paya sahip olan annem Nezaket ÖZTÜRK'e, kardeşlerim Fatih ÖZSOY ve Seda ÖZSOY 'a sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Uterus	5
2.1.1. Uterus embriyolojisi	5
2.1.2. Uterus anatomisi	7
2.1.3. Uterus histolojisi	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Deneyde Kullanılan Kit, Kimyasal Madde ve Sarf Malzemeler.....	25
3.2. Folik Asit Eksikliği Yaratılan Sıçan Modelinin Oluşturulması, Dokuların Alınması.....	26
3.3. Rutin Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması	27
3.4. Boyama Yöntemleri.....	27
3.4.1. Hematoksilen-eozin boyaması	27
3.4.2. İmmünohistokimyasal boyama	28
4. BULGULAR	31
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	31
4.1.1. Hematoksilen – eozin boyama bulguları	31

	Sayfa
4.2. İmmünohistokimyal Bulgular	40
4.2.1. E-kaderin bulguları	40
4.2.2. $\alpha 5\beta 3$ integrin bulguları	41
4.3. İstatiksel Değerlendirme	54
5. TARTIŞMA.....	57
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	77
EK-1. Etik Kurul Kararı	78
ÖZGEÇMİŞ	80

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan tüm malzemeler	25
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi.....	25
Çizelge 3.3. Kontrol grubu ve FA Eksiklik grubu Folik Asit ECLIA değerleri	26
Çizelge 3.4. Kontrol grubu ve eksiklik grubu deneklerin başlangıç, son ağırlık ve uterus ağırlık değerleri.....	27
Çizelge 4.1. İmmunohistokimya tanımlayıcı veriler.....	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Uterus, uterus tüpleri, overler.....	10
Şekil 2.2. Kaderin moleküler mekanizması	11
Şekil 2.3. İntegrin.....	16
Şekil 2.4. İmplantasyonda moleküler interaksiyon	19
Şekil 2.5. Endometriyal siklus.....	20
Şekil 2.6. Folik asidin yapısı	22
Şekil 2.7. Folat redüktaz	22

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde tek katlı prizmatik yüzey epiteli	33
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus lümeni	34
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus bezi	35
Resim 4.4. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus bezi	36
Resim 4.5. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki sıçan uterus doku kesitlerinde uterus lümeni.....	37
Resim 4.6. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki sıçan uterus doku kesitlerinde uterus lümeni.....	38
Resim 4.7. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki sıçan uterus doku kesitlerinde uterus bezi.....	39
Resim 4.8. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki sıçan uterus doku kesitlerinde perimetriyum.....	40
Resim 4.9. Kontrol grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması.....	43
Resim 4.10. Kontrol grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması	44
Resim 4.11. Kontrol grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması	45
Resim 4.12. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması	46
Resim 4.13. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması	47
Resim 4.14. Folik asit eksiklik grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması	48
Resim 4.15. Kontrol grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması yüzey epiteli ..	49

Resim	Sayfa
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması.....	50
Resim 4.17. Kontrol grubuna ait geç luteal evredeki uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması.....	51
Resim 4.18. Folik asit eksikliği geç luteal evredeki uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması.....	52
Resim 4.19. Folik asit eksikliği geç luteal evredeki uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması.....	53
Resim 4.20. Folik asit eksikliği geç luteal evredeki uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

°C	Santigrad Derece
µl	Mikrolitre
Cm	Santimetre
Gr	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
nm	Nanometre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar Açıklamalar

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
AQP	Aquaporin
CD24	Kaderin-24
CD24	Kadherin-24
CDH12	Kaderin-12
CDH12	Kadherin-12
CDH13	Kaderin-13
CDH13	Kadherin-13
CDH5	Kaderin-5
CDH5	Kadherin-5
CDH6	Kaderin-6
CDH6	Kadherin-6
Cdhr1	Kaderin- 1
Cdhr1	Cadherin 1
CRD	Karbonhidrat Tanıma Bölgeleri
ECLIA	Elektokemiluminesans İmmünassay

Kısaltmalar	Açıklamalar
E-Kadherin	Epithelial Calcium-Dependent Adhering
EMP2	Epitelyal Membran Protein 2
EMP2	Epithelial Membrane Protein 2
Esr1	Östrojen Reseptör 1
Esr1	Estrogen Receptor 1
FA	Folik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GAS3/PMP22	1,3-Beta Glukonosiltransferaz/ Periferik Miyelin Protein 22
H&E	Hematoksilen Eozin
HAV	Histidin-Valin-Alanin
Hcy	Homosistein
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IGF-1	IGF-Binding Protein
IP	İfundibulopelvik
IVF	İn-Vitro Fertilizasyon
LH	Luteinize Edici Hormon
LIF	Lösemi İnhibitör Faktör
LIF	Leukaemia-Inhibitory Factor
MIF	Müllerian İnhibe Edici Faktör
MMPs	Matrix Metalloproteinazlar
MUC1	Müsin-1
MUC1	Mucin-1
MUC16	Müsin-16
MUC16	Mucin-16
PABA	Para Amino Benzoik Asit
PABA	Para Amino Benzoic Acid
PBS	Phosphate-Buffered Saline
Pgr	Progesteron Reseptör
Pgr	Progesterone Receptor
SAM	S-Adenosilmetiyonin
SAM	S-Adenosilmetiyonine

Kısaltmalar**Açıklamalar**

TBF	Testis Belirleyici Faktör
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
THFA	Tetrahidrafolik Asit
THFA	Tetrahydrofolic Acid
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WOI	İmplantasyon Penceresi

1. GİRİŞ

Embriyonun uterus endometriyumuna implantasyonu ve implantasyonun gerçekleştiği menstrüel siklusun geç luteal evresi ile ilişkili yapılan literatürde çok sayıda çalışma vardır. Deneysel çalışmaların odağı haline gelen insanlarda menstrüel siklusun sadece 19-24. günlerini içine alan geç luteal evre, sıçan diöstrus evresiyle aynı zaman aralığında tanımlanmaktadır. İlk transmisyon elektron mikroskobu (TEM) çalışmalarından bazıları, steroid hormonlarının verilmesini izleyen bu dönemde kemirgenlerin uterus luminal yüzey epiteli hücre modifikasyonlarını göstermiştir (Kelsey, 2020). Diöstrus evresindeki sıçan endometriyumunda hormonal düzenlemelerin kontrolünde yüzey epitelinde yapısal değişiklikler oluşmaktadır. LH seviyesindeki düşüşe, FSH hormonu yükselerek eşlik etmekte ve önceki döngünün en yüksek değerine ulaşmaktadır. Bunu izleyen östrojen hormonunun düşüşü ile progesteron yüksek seviyelere çıkmaktadır. Ovaryen hormonların oluşturduğu döngüsel değişikliğin etkisiyle diöstrusdaki sıçan yüzey epiteli geniş alanlar üzerinde daha az kıvrımlı bir yapı halini almaktadır. Belirgin enine kıvrımlara sahip alanların yanında, enine kıvrımlar kadar uzun ve derin olmasa da bazı bölgelerde boyuna kıvrımlar da bulunmaktadır. Proöstrus sırasında belirgin olan uterus bezlerinin açıklığı bu dönemde boyut olarak küçülmüştür. Hücre yüksekliği, östrusa oranla azalmıştır. Hücreler küboidal ile silindirik morfolojidedir. Epitel hücre yüzeyindeki uzun mikrovillus yapıları daha kısa olanlarla bir arada bulunmaktadır. Bir bütün olarak bakıldığında, tüm epiteli kaplayan mikrovilluslar östrusdaki kadar uzun ve yoğun değildir. Diöstrusun geç döneminde hücrelere yukarıdan bakıldığında poligonal, yandan bakıldığında ise küboidal şekildedir. Yüzey epiteli, farklı mikrovillus uzunlukları ve apikal yüzeylerde oluşan değişikliklerden kaynaklı mozaik benzeri bir desen sergilemektedir. Proöstrus ve östrus sırasında görülenin aksine diöstrusda bezlerin kanalları lümene doğru çıkıntı yapmamaktadır. Bezlerin boyutları ve lümen açıklıkları krater benzeri çukurlar şekilde küçülmüştür (Spornitz, Socin ve Dravid, 1999). Pinopodlar, döngüye bağlı değişiklikler sergileyen ve varsayılan implantasyon aralığında belirgin olan orta - geç sekretuar faz endometriyumunun karakteristik yapılarıdır (Elgamal, Othman ve Ahmed, 2016). İnsanların ve sıçanların uterus endometriyumunda pinopod oluşumu ile plazma progesteron düzeyi arasında güçlü bir korelasyon bildirilmiştir (Stavreus-Evers ve diğerleri, 2001).

Endometriyumun yapısal özelliklerinin en detaylı hali ile değerlendirilmesi, özellikle de implantasyon penceresi döneminde iken implantasyon başarısızlığı paradigmasına ışık tutabilir. Karmaşık bir dizi etkileşim ve olayı içeren embriyonun uterus duvarına implantasyonu, embriyonun blastosist aşamasının ötesinde gelişmesi ve terme kadar ilerlemesi için ilk gereksinimdir. Endometriyal alıcılığın başarılı bir şekilde kurulması ve ardından endometriyumun desidua olarak farklılaşması embriyo implantasyonundaki kilit olaylardır. Ovaryen hormonlardan progesteron artışı, lutel fazın ortasındaki endometriyumda oluşan değişikliklerden sorumludur. Endometriyumun blastosistin tutunması içi alıcı hale geldiği bu sürece “*window of implantation*” (WOI) anlamına gelen implantasyon penceresi denmiştir (Kelsey, 2020; Paria, 1993). İmplantasyon penceresindeki endometriyumun ayırt edici özellikleri; endometriyal lümenin yüzey epitelinin salgı vakuelleri ile tıkanması, pinopodların oluşması ve luteal - geç luteal fazda ovaryen hormonların etkisi altında küçük tip mikrovillus yapılarının oluşması olarak sıralanabilir (Bahar, 2015; Kayıslı, 2007).

Üreme biyolojisi alanında yapılan çalışmalar, fetal-maternal etkileşim sürecinde oluşan çevresel ve genetik faktörlerin, embriyonun gelişiminde, maternal uterin alıcılıkta sonrasında endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonuna varana kadar ki bir çok mekanizmada rolü olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Xing, 2015). Endometriyal doku özelinde yine hücre adezyon moleküllerinde oluşabilecek değişiklikler, implantasyon başarısızlığına neden olabileceği gibi kanser ve endometriozis zemininde de gözlenmektedir (Kurek, 2021; Emily, 2018).

Folik asit (FA) eksikliğinin üreme üzerindeki etkisine ilişkin birçok çalışma, temel olarak fetal gelişime odaklanmıştır ve folat eksikliğinin embriyonik gelişim üzerindeki olumsuz etkileri net olarak ifade edilmiştir. Maternal tarafta ise folat metabolizmasının ovaryen fonksiyonların, implantasyonun ve embriyogenez sürecinin üzerindeki etkileri bilinmektedir. Nöral tüp defektlerinin insidansı üzerindeki köklü etkisine ek olarak, azalmış folik asit seviyeleri ile tekrarlayan spontan düşükler ve IVF/ICSI tedavisi gören infertilite hastalarında, plazma folat konsantrasyonları arasında ilişki ortaya çıkarılmıştır (Thaler, 2014). Folik asit takviyesinin nöral tüp defektlerinin oluşumunu azalttığı kanıtlanmış olmasına rağmen FA eksikliğinin doğum kusurlarını nasıl indüklediğinin mekanizması

hakkında daha az şey bilinmektedir. Folat eksikliğinin neden olduğu düşük kadın doğurganlığı, düşük embriyo sayısı ve düşük fetal canlılık dahil olmak üzere gelişimsel anormalliklerin esas olarak implantasyondan sonra ortaya çıkabileceği öne sürülmektedir (Yanlı, 2015). Folik asite benzer şekilde yetersiz D vitamini seviyesi, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve gebelik kaybı ile ilişkilendirilmiştir. D vitamininin dışı üreme dokularında sentezlendiği ve bağışıklık sistemini modüle ederek perikonsepsiyon dönemini ve üreme sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir. D vitamini sentezinin bileşenleri ovaryum, uterus endometriyumunda ve plasentada bulunmaktadır (Schröder-Heurich ve diğerleri, 2020).

Temelde maternal folik asit durumu ile fetal nöral tüp defektleri arasındaki iyi bilinen bağlantı temelinde, kadınlara perikonsepsiyonel dönemde folik asit takviyesi almaları tavsiye edilmektedir (Fekete ve diğerleri, 2010). Folat, folik aside (pteroilmonoglutamik asit) benzer vitamin aktivitesi sergileyen ilgili tüm bileşikler için genel bir terimdir. Folik asitin tamamen oksitlenmiş hali olan folat üç kısımdan oluşur: bir pteridin halkası, p-aminobenzoik asit ve bir L-glutamik asit molekülü (Shane, 2008). Doğal olarak oluşan folatlar genellikle bir poliglutamat yan zincirine sahiptir. İnsanlar pteridin halkasını sentezleyebilir ancak diğer bileşiklerle bağlayamaz. Sonuç olarak, insan sağlığı, yalnızca diyet yoluyla alınan folata değil, aynı zamanda kalın bağırsağın normal mikrobiyotası tarafından sentezlenen folatı da içeren folik asitin ekzojen kaynaklarına bağlıdır (Birn, 2006).

Folat gerektiren reaksiyonlar topluca tek karbon metabolizması olarak adlandırılır; 5,10-metilen-tetrahidrofolat bu döngülerde merkezi bir rol oynar. Bu sentetik döngüler sitozolde bulunmaktadır. Bununla birlikte, büyük mitokondriyal folat havuzları ayrıca sitozole tek karbonlu öncülleri sağlar. Tek karbonlu metabolizma, DNA ve RNA sentezinin pürin ve pirimidin öncüllerinin sentezini, serin ve glisin birbirine dönüştürülmesini ve homosisteinin (Hcy) metionine dönüştürülmesini sağlar. Metionine, S-adenosilmetiyonine (SAM) dönüştürülür. SAM; DNA, RNA, hücresel membran fosfolipidleri, nörotransmitterler, hormonlar ve miyelinin metilasyonunu içeren 100'den fazla kimyasal reaksiyonda metil donörüdür (Bailey ve Gregory, 1999).

Embriyonik gelişim süreci doğasında hücrel çöğalma ve tek karbon metabolizması oranlarındaki artışlarla ilişkili olduğundan daha önce yapılan araştırmaların ışığı altında çalışmamızda, folik asit eksikliğinin implantasyon penceresinin açık olduğu geç luteal evreye denk gelen sıçanların diöstrus evresinde, endometriyumda oluşturabileceği değişimsel farklılıkları, $\alpha 5\beta 3$ integrin ve E-Kaderin'in endometriyum yüzey ve bez epitelindeki olası sentezlenme farklılıklarını histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemler ile araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

2.1.1. Uterus embriyolojisi

Gametler, primordiyal germ hücrelerinden köken almışlardır. Primordiyal germ hücreleri 2. haftadan itibaren epiblastın içinde oluşarak, gastrülasyon ile primitif çizgiden ilerleyen yolk kesesine göç eden hücrelerdir. Primordiyal germ hücrelerinin yolk kesesinden, gelişmekte olan gonadlara doğru gerçekleşen bu yer değiştirme hareketi 4. haftadan itibaren başlar ve 5. haftada hedeflerine ulaşırlar (Sadler, 2017:14). Primordiyal germ hücreleri genetik olarak dişi gonada geldiklerinde oogoniyumlara farklılaşırlar (Sadler, 2017:25). Embriyonun genetik olarak dişi ve/veya genetik olarak erkek olması fertilizasyon esnasında belirlenmiş olmasına rağmen, gonadlar gelişimin 7. haftasına kadar erkek veya dişiye özgü fenotipik özelliklere sahip değildir. 7. hafta boyunca embriyonun cinsel fenotipik farklılaşması da başlar (Sadler, 2017:261; Dudek, 2014:169). Seksüel dimorfizmden, Y kromozomu kısa kolu (Yp11) üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici bölgedeki SRY geni sorumludur. SRY geni Testis belirleyici faktör (TBF) olarak da adlandırılır. SRY geninin ürünü olan protein cinsiyet organlarının dişi mi erkek mi fenotipik özelliklere sahip olacağını belirleyen bir transkripsiyon faktörüdür. (TBF) varlığında embriyonun cinsiyeti erkek, (TBF) yoksa kız tipinde gelişir. (TBF) ile gonad farklılaşması testis yönünde olur ve testisin Leydig hücreleri tarafından üretilen Testosteron, testisin Sertoli hücreleri tarafından üretilen Müllerian inhibe edici faktör (MIF) ile embriyo erkek fenotipi olacak şekilde farklılaşır (Sadler, 2017:261; Dudek, 2014:169).

Gonadların oluşumundan sorumlu olan gonadal çıkıntının şekillenmesinde ise çölom epiteli ve ürogenital çıkıntının altındaki mezodermin proliferasyonu rol oynar. Ürogenital çıkıntı ise intermedier mezodermin dorsal vücut duvarı boyunca uzunlamasına yükselmesiyle oluşur (Dudek, 2014:169).

Primordiyal germ hücrelerinin gonadlara olan göçünde indükleyici etkenler mevcuttur ve gonadlara ulaşmasının hemen öncesi ve ulaştıkları esnada gonadal

sırtta bulunan epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşime gömülür ve primer seks kordonlarını oluştururlar. Bu kordonlar her iki cins embriyo içinde yüzey epiteline bağlıdır. Bu evredeki gonada farklılaşmamış gonad denir ve erkek veya dişi gonad mı ayırt etmek mümkün değildir. Dişi embriyolarda primer seks kordonları düzensiz hücre gruplarına ayrılır. Bu hücre kümeleri primitif germ hücrelerini barındırır. Overin medullar bölgesinde yer alan hücre kümeleri kaybolarak vasküler bir stroma oluşturur. Dişi gonad yüzey epiteli proliferasyon olarak 7. haftada kortikal kordonlara gelişir. 3. aydaki kortikal kordonlar hücre kümelerine ayrılıp proliferasyona devam eder. Oogoniumların etrafını saran ve foliküler hücreler denilen epitel hücrelerini oluşturur. Folliküler hücrelerle sarılı oogoniumlar primordiyal folikülü oluşturur (Sadler, 2017:263).

Farklanmamış evrede hem dişi hem erkek embriyoda iki çift genital kanal vardır. Mezonefrik (*Wolffian*) ve Paramezonefrik (*Müllerian*) kanallar. Östrojen, dişi embriyoda paramezonefrik kanalların ana genital kanallara dönüşmesinde rol oynar. Genital kanalda 3 bölüm vardır. İlk iki bölümden uterus tüpleri gelişir. Son kısım olan kaudal parçalar kaynaşır uterus kanalını oluşturur. Birbirleriyle kaynaşmış paramezonefrik kanallar uterus broad ligamentini oluşturur. Uterus ve ligamentler pelvisi ikiye böler. Uterus korpusu kaynaşmış paramezonefrik kanallardan gelişir. Uterusun etrafı müköler tabaka olan miyometriyum, peritoneal örtüsü perimetriyum denilen mezenşimal tabaka ile sarılır (Sadler, 2017:266).

Uterusun gelişimsel anomalileri

Paramezonefrik (Mülleryan) kanalların füzyonunda başarısızlıktan kaynaklanabilir ve bu da uterusun armut şeklinde olmamasına neden olabilir.

Uterus didelfis, paramezonefrik kanalların tam olarak füzyonunun gerçekleşmemesinde ortaya çıkar. Uterus septus, en sık rastlanan uterus anomalisidir. Paramezonefrik kanalların orta hatta birleşimi sonrasında oluşan septumun rezorbe olmaması sonucu oluşur. Uterus bikornus, her iki paramezonefrik kanalın fundus seviyesinde füzyonunun tamamlanmamasından kaynaklanır. Uterus unikornus, bir paramezonefrik kanal gelişmediğinde veya tam

olarak gelişmediğinde ortaya çıkar. T şeklinde uterus (Dudek, 2014; Tokmak ve Sarıkaya, 2015).

2.1.2. Uterus anatomisi

Uterusta hem menstrual siklus hem hamilelik süresince görülen yapısal ve işlevsel değişiklikler, nöral aktivite ve hormon seviyeleriyle yakından ilgilidir (Ross ve Pawlina, 2016:834). Uterus fertilizasyon sonrası hızlıca gelişen morulayı uterus tüplerinden alır. Embriyonik ve fetal gelişim uterus içinde gerçekleşir ve bu süreç uterusun boyut ve gelişimde dramatik bir şekilde artışa sebep olur (Ross ve Pawlina, 2016:850). Uterus anatomik olarak mesane ve rektum arasında pelviste bulunan içi boş armut şeklindedir. Doğum yapmamış bir kadında 30-40 gr ağırlığında 7,5 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde, üst tarafı da 5 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlığındadır. Uterus anatomik olarak 2 bölümden meydana gelmiştir. Korpus (gövde) ve serviks (Kierszenbaum, 2020:737). Bazı kaynaklarda uterusun 3 bölümden oluştuğu belirtilmiş olup korpus, fundus ve serviks şeklindedir (Gartner, 2019:348). En geniş kısım olan gövdeye sağ ve sol uterine tüpleri ile girilir. Korpus (gövde) uterusun en geniş parçasıdır. Korpusun anterior yüzü neredeyse düz, posterior tarafı ise konvektir, üst tarafa doğru genişleyen ve uterus tüplerine bağlanan yuvarlak bölüm ise fundus olarak adlandırılır (Ross ve Pawlina, 2016:850). Serviks, Korpusun altında bulunur ve vajinaya doğru çıkıntı yapar.

Uterus, mesane ile rektum arasındaki pelviste yer alan kalın duvarlı, kaslı bir organdır. Mesane ve uterovezikal boşluğun arkasında rektum ve rekto-uterin poşun önünde yer alır; hareketlidir, yani pozisyonu mesane ve rektumun distansiyonuna göre değişir. Doğum yapmamış erişkinde, serviks genellikle vajinanın eksenine göre öne doğru eğilir (anteversiyon) ve uterusun gövdesi servikse göre öne doğru eğilir (antefleksiyon). Kadınların %10-15'inde tüm uterus vajinaya açılı olarak geriye doğru eğilir veya geriye dönük olduğu söylenir. Arkaya doğru açı yapan uterus serviks üzerine retrofleks olarak tanımlanır (Standring, 2016:1294-1295). Round ligament, uterusu karın duvarına bağlar ve Sampson arterini içerir. Broad ligament, uterusun lateral kısmını fallop tüpü ve ovaryum ile birleştirir. Uterin arter, kardinal arterler ve üreter broad ligament içinde hareket

eder. Ovaryan ligament, ovaryumu uterusun yan yüzeyine bağlar. İfundibulopelvik (İP) ligament, ovaryumu karın duvarına bağlar. İP ligamentin içinde ovaryan arterleri ve venleri bulunur (Gaskins,2015).

Korpus uteri

Uterus gövdesi armut şeklindedir ve üstte fundustan altta servikse kadar uzanır. Uterus tüpleri uterusu her iki tarafta uterin cornua'dan girer. Kubbe benzeri yapıda olan fundus kısmı uterus tüplerinin giriş noktalarından daha üsttedir ve komşu yüzeylerde olmak üzere tüm yüzeyler periton ile kaplıdır. Fundus, ince bağırsağın kıvrımları ve bazen de sigmoid kolon ile temas halindedir (Standring, 2016:1295). Ligamentum latum uteri yaprakları arasında vesikal ve intestinal iki bölümü vardır. Korpus uteri, kalınlığı 3 cm, uzunluğu 5-6 cm, genişliği de 5 cm olan en geniş bölümdür. Uterus gövdesinin yan kenarlarına sinister ve margo uteri dekster olarak isimlendirilir. Bu yan kenarların üst uç kısımları uterin cornua'ya uyum sağlar ve hafif konveks biçimdedir. Tuba uterina'lar boynuzsu çıkıntı olan cornu uteri dekster ve sinister'e tutunur. Korpus uteri'nin içindeki boşluğa cavitas uteri adı verilir. Korpus uteri ile fundusun birleştiği yerden tuba uterina'lar uterusu bağlanır. Burası cornu uteri dekstrum ve sinistrum diye isimlendirilir (Kayhan, 2018; Arıncı ve Elhan, 2001).

Serviks

Yetişkin ve hamile olmayan kadınlarda serviks, uterusun gövdesinden daha dar ve daha silindirik ve tipik olarak 2,5 cm uzunluğundadır. Üst ucu uterus gövdesi ile internal os aracılığıyla iletişim kurar ve alt ucu eksternal os ile vajinaya açılır. Anterior ve posterior da karşılıklı duvarlarda ki kıvrımlar, kanalı kapatmak için iç içe geçer. Daha dar olan isthmus, serviksin üst üçte birini oluşturur. Gebeliğin ilk ayında etkilenmese de, ikinci ayda yavaş yavaş uterus gövdesine dahil olur ve "alt uterus segmenti"ni oluşturur (Standring, 2016:1296).

Uterusun damar ve sinirleri

Uterusun arteriyel beslenmesi uterus arterlerinden sağlanır, bunlar internal iliak arterden kaynaklanır. Uterusun venöz drenajı ise internal iliyak venler tarafından yapılır ki bunlar da İnferior vena cava'ya boşalır (Dudek, 2011:165). Uterin arterden çıkan bir ana dal, ovaryan arterin dalları ile anastomoz yaptığı ovaryen hilus bölgesine ulaşana kadar geniş ağ içinde uterusu kıvrımlı bir şekilde yükselir. Damarların kıvrımlılığı, uterus duvarındaki dallarında da tekrarlanır. Her uterin arter çok sayıda dal verir. Bunlar uterus duvarına girer, bölünür ve ön ve arka Arkuat arter grupları olarak çevresel şekilde ilerler. Ön ve arka orta hatta yaklaştıkça dallanıp daralırlar, böylece bu bölgelerde büyük damarlar kalmaz (Standring, 2016:1298).

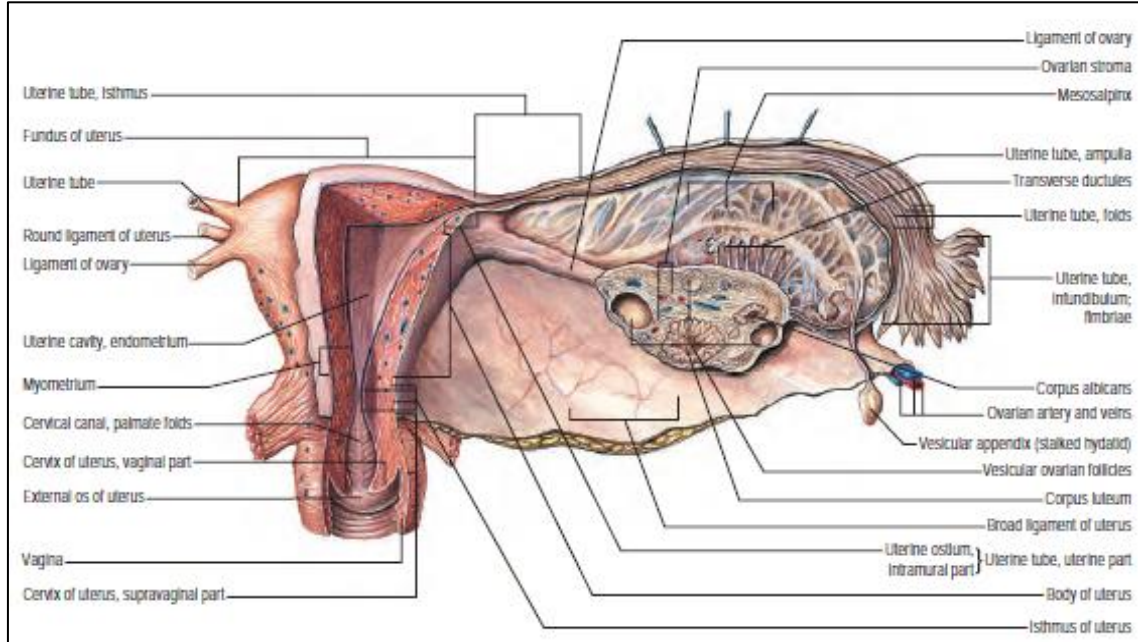
Endometriyumu Arkuat arterler besler. Bir arkuat arterin iki segmenti vardır:

1. Bazal tabakayı besleyen düz bir segment olan, *straight artery*
2. Fonksiyonel tabakayı besleyen sarmal bir segment olan, *spiral artery*.

Arterin sarmal segmenti, endometriyum kalınlığının artmasına uyum sağlayacak şekilde uzayabilir (Kierszenbaum, 2020:740). Arkuat arterler, miyometriyumun, *stratum vasculare* 'den köken alır (Gartner, 2019:348). Myometriyumdan çıkan Uterine arterden 6-10 adet Arkuat arter dallanır. Bu arkuat arterlerden radial kollar çıkar ve radial arterler olarak endometriyumun basal tabakasına girer. Radial arterler, küçük düz *straight artery* ' lere dallanır. Düz arterler *spiral artery* olarak fonksiyonel tabakaya doğru devam eder. Spiral arterler çok sayıda arteriyol verir ve bu arteriyoller endometriyum fonksiyonel tabaka içinde zengin bir kılcal ağ oluşturur. Bu kılcal ağ yatağı ince duvarlı, genişlemiş segmentler içerir. Bu boşluklar ise lakün olarak adlandırılır (Ross ve Pawlina, 2016:853).

Uterusun sinir beslenmesi ağırlıklı olarak alt hipogastrik pleksustan gelir. Bazı dallar, geniş uterus arterleriyle birlikte veya yakınında yükselir. Uterus gövdesini ve tüplerini beslerler ve alt hipogastrik pleksus ve ovaryen pleksus ile tubal sinirlere bağlanırlar.

Pleksus ve yumurtalık pleksus ile. Uterus sinirleri myometrium ve endometriumda sonlanır ve genellikle damarlara eşlik eder (Standring, 2016:1299).



Şekil 2.1. Uterus, uterus tüpleri, overler (Standring, 2016:1300)

2.1.3. Uterus histolojisi

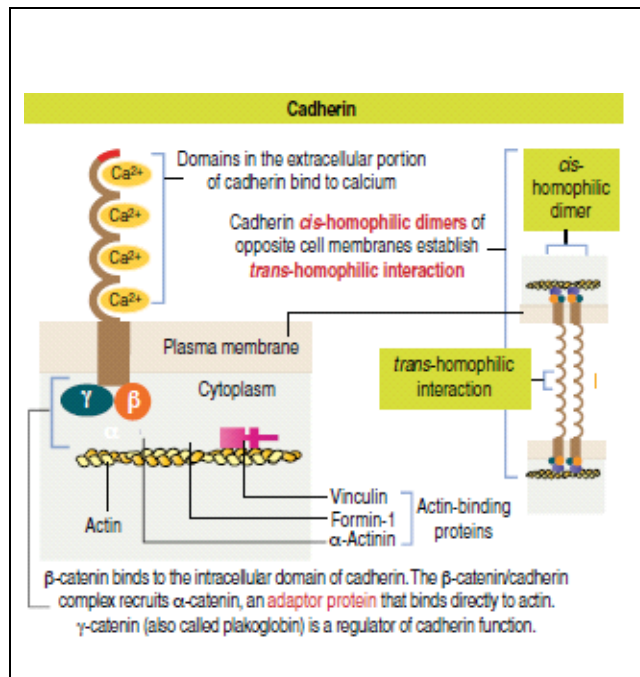
Uterus duvarı 3 tabakalıdır. Uterus lümeninden dışa doğru; endometriyum, miyometriyum, perimetriyum. Perimetriyum tabakası, seroza ya da adventisya olarak da adlandırılır. Endometriyum uterusun mukoza tabakasıdır ve epitelyal hücre hattı altındaki bezden zengin bir bağ dokusu olan stromadan ibarettir (Ross ve Pawlina, 2016:850). İşlevsel olarak 2 tabaka ayırt edilir. Menstrüasyonda dökülen yüzeyel, *fonksiyonel tabaka* ve fonksiyonel tabaka döküldükten sonra endometriyumun yeniden epitelizeasyonu için bir kaynak sağlayan bazal hücrelere ve endometriyal bezlere sahip *bazal tabaka*. Bazal tabaka yaklaşık 1mm veya daha az kalınlıkta olan endometriyumun daha derin tabakasıdır. Endometriyum hormon modülasyonlu menstrüal siklusun etkisi altından olduğundan kalınlığı 1 mm'den 7 mm'ye kadar değişebilir (Kierszenbaum, 2020:578; Gartner, 2019:348).

Endometriyum mukozası, basit kolumnar epitel ile döşelidir. Kolumnar epitel, lamina propria yada stroma denilen düzensiz tip3 kollajen demetlerinin bulunduğu, fibroblastlarca zengin zemin üzerindedir. Basit kolumnar epitel silialıdır ve salgı hücrelerine sahiptir. Kolumnar epitel hücre hattından sonra ise tüm

endometriyuma nüfus eden çok sayıda tübüler uterin bezleri sıralanmıştır (Mescher, 2016:473,474). Stroması, yıldız hücreleri (*Stella cells*) ve bol miktarda retiküler lif içeren mezenkimal bağ dokusuna benzer. Makrofajlar ve lökositler de mevcuttur. Stroma, endometriyumun basit tübüler bezlerini barındırır (Gartner, 2019:348). Epitel hücreler arasındaki ilişki ve bağlantıyı sağlayan hücre bağlantıları ve hücrelerin bir arada durmasını ve yapışmasını sağlayan hücre adezyon molekülleri vardır. Bu adezyon moleküllerinin veya hücre bağlantılarının, hücrenin apikal veya bazolateral tarafında bulunması hücrede kutuplaşmanın nedenidir. Hücre adezyon molekülleri 2 ana grupta incelenir:

- Kalsiyum bağımlı moleküller; kaderin ve selektinler
- Kalsiyum bağımsız moleküller; integrinler ve immunglobulin süper ailesi (Kierszenbaum, 2020:7).

Kaderinler



Şekil 2.2. Kaderin moleküler mekanizması (Kierszenbaum, 2020:11)

Kaderinler epitel hücrelerini bir arada tutan en önemli adezyon molekülleridir. Son çalışmalar sonucunda seksenden fazla kadherin bildirilmiştir. Desmogleinler ve Desmogleinler buna dahildir. Klasik kaderinler bulundukları dokuya göre

isimlendirilmiştir. Mesela epitel hücrelerinde bulunan epitelyal kaderin, E-Kaderin; sinir sistemindeki nöral kaderin N-kaderin ;placenta kaderini P- kaderin gibi.

E-kaderin (Epithelial calcium-dependent adhering; transmembrane linker protein) hücre yan (lateral) yüzeylerinde bulunur, epitel tabakanın sürekliliğini sağlar. E-kaderin molekülleri lateral hücre yüzeyinde bulunan cis-homofilik dimerlerle ilişki kurar. Bağlanma yüzündeki histidin-valin-alanin (HAV) dizisi yan yana olan kaderinlerin dimer oluşturmalarını kolaylaştırır. Epitelyal hücre kültürlerinde kalsiyumun çıkarılması veya E-kaderin'e karşı bloke edici bir antikorun kullanılması, hücre-hücre bağlanmasını bozar ve stabilize edici bağlantıların oluşumu engellenir. Kaderinlerin sitoplazmik alan ile bağlantısını intermediate proteinler olarak bilinen Katherin kompleksi ile yapar. Katherin kompleksi ; catenins α , β , ve actin binding proteini α -actinin, vinculin, formin-1 içerir.

Katherin kompleksinde, α -katherin aktine direk bağlanır. β ve -katherin ise kaderine bağlıdır. Katherinler, E-kaderinlerin hücreler arası alanda yapışmasını kontrol eden moleküllerdir (Kierszenbaum, 2020:7,8).

Hücreler arası bağlantı farklı hücre adezyon molekülleri arasında oluyorsa buna heterotipik bağlantı, aynı hücre adezyon molekülleri arasında oluyorsa homotipik bağlantı olur. E-kaderinler esas olarak zonula adherens bölgesinde lokalizedir. E-kaderinlerin hücreler arası etkileşimindeki kontrolü, embriyonik hücre göçünde rolü olabileceğini düşündürür. Son çalışmalar, E-Kaderinlerin sadece hücre adezyonunun molekülü olarak değil; hücre polaritesinde, farklılaşmasında, hücre göçünde, proliferasyonunda, epitel hücresinin hayatta kalmasında majör bir role sahip olduğunu göstermiştir. TEM ile incelendiğinde, zonula adherens karşılıklı hücreler arasında 15-20 nm lik bir boşluk ile karakterizedir. Hücreler arası boşluk düşük elektron yoğunluğunda olduğu açıktır fakat E-kaderinler ve Ca^{+2} iyonlarının varlığıyla zonula adherens orta derecede yoğun alan olan fuzzy plaque oluşur. Kanıtlar fuzzy plaque için boyanabildiğini ve ışık mikroskobunda görülebildiğini öne sürmektedir (Ross ve Pawlina, 2016:127,128).

Endometriyal luminal epitel, implantasyon süresince embriyonun ilk tutunduğu noktadır. Embriyonun endometriyum yüzey epiteline tutunamaması başarısız bir

implantasyon ve infertilite demektir. Alıcılığı yüksek bir endometriyal yüzey epiteli, orta sekretuar evrede (blastosistin implante olduğu ilk 2-4 günlük süre) eksprese edilen hücre adezyon molekülleri sayesinde olur. Bu noktada özellikle Kaderin-6 (CDH6) endometriyum yüzey epitelinde lokalizedir ve yine aynı epitel hücre hattında bulunan Ishikawa cells ise CDH6 'nın yıkımına etkendir. Çalışmada fertil ve infertil kadınların orta sekretuar evresindeki endometriyumun hem lüminal hem bez epitelinde CDH6'nın yerleşiminin immunoboyama yöntemiyle tespit edilmesi amaçlanmış ve karşılaştırıldığında fertil kadınlarda, CDH6 boyanma yoğunluğunda belirgin derecede artış olduğu konfirme edilmiştir. Endometriyal stromal hücrelerde ise fertil ve infertil gruplarda herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Çalışmada Ishikawa hücrelerinin CDH6 dışındaki diğer tip2 Kaderin ailesi üyelerinden CD24 ve CDH12 ekspresyonunda belirgin bir etki yaptığı (CDH13 ve CDH5 karşılaştırıldığında) görülmemiştir. Ayrıca Ishikawa hücrelerinin CDH6 nın fonksiyonel ortaklarından olan katenin ailesi üyelerinin (katenin alpha 1, katenin beta1 katenin delta 1) ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı da gözlenmiştir. İnfertil endometriyumlarda birkaç mekanizmanın CDH6 ekspresyonunun azalmasında etkisi olabilir, mikroRNA'nın aşağı yönlü düzenlenmesi gibi (Zhou, Santos ve Dimitriadis, 2020).

Estradiol ve Progesteron implantasyon sürecini başlatan ve yöneten temel hormonlardır (Kim ve Kim, 2017). E-kaderin ekspresyonu üzerinde Estradiol ve Progesteron regülasyonu incelenmiştir. Gecikmiş implantasyonun 7. gününde Estradiol ve Progesteron kombinasyonunun uygulanması, E-kaderin ekspresyon seviyelerini, tek başına Progesteron ile tedavi edilen hayvanlarda gözlenene kıyasla yaklaşık iki kat azaltmış ve Estradiolün, progesteron ile kombinasyonunun, E-kaderin ekspresyonunda antagonistik etki yaptığı belirtilmiştir (Jha ve diğerleri, 2006).

Müsin1

Müsin1 (MUC1) yüksek moleküler ağırlıklı bir transmembran proteoglikandır ve blastosistin implantasyon sürecine izin verir (Bowen, Bazer ve Burghardt, 1996). Müsinler endometriyumun önemli bileşenleridir, hücre glikokaliks tabakası hücre yüzeyinin çok ötesine uzanan, uzun ve esnek yapılara sahiptir (Francis ve

diğerleri, 2021). Uterus epiteli apikal yüzeyi gelişecek olan embriyoyu koruyabilmek için kalın bir glikokaliks ile örtülür. Müsin glikoproteinleri ,özellikle MUC1 apikal glikokaliksin ana bileşenidir. MUC1, mikrobiyal ve proteolitik saldırılara karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. Hem apikal hem bez epitelden eksprese edilir. MUC1, selektin ligandları için bir iskele vazifesi görür ve blastosist etkileşimlerini potansiyel olarak destekleyebilecek maternal-fetal arayüzde belirirler (Dharmaraj, Gendler ve Carson, 2009). Lüminal yüzey epitelinin başka bir müsin bileşeni MUC16, hücre-hücre adezyonunu inhibe eder. Pinopodların oluşumu sırasında, in vitro ortamda MUC16' nın ortamdaki uzaklaştırılması trofoblast yapışmasını kolaylaştırmıştır (Gipson ve diğerleri, 2008).

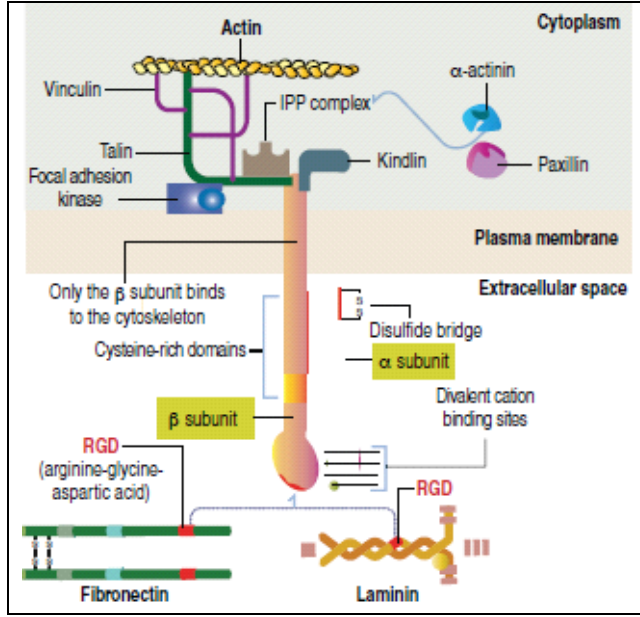
Pinopodlar

Bu yapılar ilk kez “mushroom-like” or “sea-anemonae-like” olarak perimplantasyon periyodunda tanımlanmıştır. (Nilsson, 1972; Psychoyos and Mandon, 1971). Pinopodlar genellikle uterus epitel hücrelerinin apikal plazma zarının 5-10 µm'lik hücresel çıkıntıları olarak kabul edilir. 0,2 µm ila 90 nm boyutunda olan ve silia ve mikrovilli gibi diğer epitelyal plazma membran çıkıntılarına kıyasla, pinopodlar benzersiz bir şekilde büyüktür ve implantasyon penceresi (WOI) sırasında mevcuttur (Nikas, 2000). Literatürlerin çoğu, pinopod gelişiminin uyarılmasından progesteronun sorumlu olduğunu bildirirken, östrojendeki artış ise pinopod regresyonuna neden olur. Luteal faz sırasında endometriyumun en önemli yapısal değişikliklerinden biri, pinopodlar (uterodamlar olarak da bilinir) epitel hücreleri üzerinde apikal çıkıntıların oluşmasıdır. Pinopodların fonksiyonu çok açık değildir (Develioglu ve diğerleri, 1999; Matson ve diğerleri, 2017). Luteal faz sırasında pinopod oluşumunun zamanı literatürde değişiklik gösterse de, ortalama olarak, belirgin oluşum, doğal menstrüel siklusun 20-22. günlerinde ve WOI ile aynı zamana denk gelen uyarılmış sikluslarda 1-2 gün önce meydana gelir (Develioglu ve diğerleri, 1999). Bazı araştırmacılara göre; pinopodlar, pinositoz ve uterus sıvısındaki makromoleküllerin endositozundan ve blastosistin endometriyuma yapışmasından sorumlu olduğu yönündedir. Diğerlerine göre ise endometriyum-blastosist etkileşiminde direk ilişkili olup hücre adezyon moleküllerinden integrin ve LIF gibi ekspresyonunda ve bu moleküllerin lokalizasyonunda pinopodların ilişkisini sorgulamaktadırlar (Qian ve diğerleri,

2017; Mikołajczyk, Skrzypczak ve Wirstlein, 2011). "Pinopod" terimi, uterus lümen sıvısının pinositozunu yaptığı varsayılan fonksiyonundan türetilmiştir. Embriyo implantasyonu öncesi ve sırasında lümen sıvı hacminin düzenlenmesi kritik öneme sahiptir. İmplantasyondan önce, embriyo transferini ve uygun intrauterin pozisyonu desteklemek için uterus sıvı hacmi artar (Canha-Gouveia ve diğerleri, 2021). Endositik fonksiyonu, Aquaporin'ler (AQP) denilen su kanal proteinlerinin ekspresyonunu düzenlemesi ile ilişkilidir (Tanski ve diğerleri, 2021). Trofoblastik hücrelerin endometriyal epitel hücrelerin arasına penetrasyonu süresince epitel hücreleri arasındaki dezmozomların da azalmasıyla boşa çıkan endometriyal epitel hücreleri apoptoz yoluyla pinopodlar tarafından ortamdan uzaklaştırılır (Kierszenbaum, 2020:760).

İntegrinler

İntegrinler kaderinlerden farklıdır. α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimerlerdir. Kaderinlere benzer şekilde sitoplazmik alt birim olan β alt birimi ile aktin filamentlerine bağlanır. Hücreler arası alanda bulunan β alt birimi fibronektin ve lamininin 3 peptidli bileşeni olan tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp) dizisine bağlanır. Fibronekrin ve laminin bazal membranın bileşenlerindendir. İntegrinler 2 yönlü sinyal alıcılarıdır ve hücre dışı ve hücre içi alanlarına bağlanan proteinler tarafından aktive edilebilir. İntegrinler hücre dışı matrix moleküllerine bağlandığında, bir protein kompleksi hücre iskeletine bağlanır ve birkaç sinyal yolu aktive olur. İntegrin ve extrasellüler matrix ilişkisi embriyogenez hücre göçü sırasında kritik öneme sahiptir. İntegrin veya integrin regülatörlerinde oluşan genetik mutasyonlar Glanzmann's thromboasthenia (beta 3 alt biriminde mutasyon), leukocyte adhesion deficiency (tip I beta2 alt birimi mutasyonu) sebebidir (Kierszenbaum, 2020:11).



Şekil 2.3. İntegrin (Kierszenbaum, 2020:14)

İmmunohistokimyasal çalışmalar, implantasyon penceresi süresince lüminal epitelin apikal tarafında; $\alpha\beta3$, $\alpha4\beta1$, and $\alpha1\beta1$ alt birimli integrinlerin varlığını göstermiştir (Basak, Dhar ve Das, 2002).

İmplantasyonun başarısı için gerekli olan yeni moleküllerden EMP2 (epithelial membrane protein 2) GAS3/PMP22 ailesi üyesi olan EMP, Tetraspanin ve konneksin ile birlikte 4-TM (four-transmembrane) ailesinin alt sınıfını oluşturur. EMP2 genellikle sitoplazma ile sınırlıdır fakat implantasyon penceresi sırasında apikal yüzeydeki endometriyal epitelde bulunmak üzere yer değiştirir. EMP2, diğer integrin isoformlarından $\alpha\beta3$ integrinini endometrial epitel hücrelerinde seçici olarak ekspresyonunu modüle etmektedir. Blastosist-endometriyal etkileşimi sırasında $\alpha\beta3$ integrininin yeri vardır (Wadehra ve diğerleri, 2002; Wadehra ve diğerleri, 2005).

Selektinler

Selektinler de Kaderinler gibi Ca^{2+} -bağımlı hücre adezyon moleküllerindendir. Kaderinlerin aksine selektinler karbonhidratlara bağlanır ve C tipi lektin ailesine dahildir. Her bir C tipi selektin, 120 aminositlik karbonhidrat tanıma bölgesine (CRD) sahiptir. Kalsiyum bu aşamada CRD ile şeker molekülünün hidroksil grupları arasında bağlantıda gereklidir. C-tip Lektinler 3 sınıfta incelenir.

- 1- P- Selektin; kan damarlarında platelet ve endotel hücre aktivasyonunda bulunur,
- 2- E- Selektin; endotel hücre aktivasyonunda bulunur,
- 3- L- Selektin; lökositlerde bulunur (Kierszenbaum, 2020:737).

Desmosomlar ve sıkı bağlantı bölgeleri

Desmosomlar, lateral epitel sınırlarıyla ilişkili mekanik temas alanlarıdır. Farelerde, gebeliğin preimplantasyon döneminde, desmosomal plak proteini olan Desmoplakin uterus lüminal epitelinde azalmaktadır. Desmosomların insidansı, implantasyon sırasında azalır ,bu muhtemelen implantasyon sırasında boşlukların açılmasını ve lümen epitelinin trofoblast hücreleri tarafından penetrasyonunu kolaylaştırır (Illingworth ve diğerleri, 2000). Desmosomal plasma membran proteinlerinden olan Desmoglein ve Desmoglein'ler Kaderin süper familyası üyelerinden olup, sitoplazmik alanları klasik Kaderinlerden farklıdır. Bunlar sitoplazmik alanda hücre iskeleti yapısalı olan intermedier filamentlere bağlanır. Desmosomal Kaderinler, Klasik Kaderinlerin aksine homotipik etkileşim gösterirler. Desmosomal kaderinler, Klasik Kaderinlerin yokluğunda hücre-hücre yapışmasını başlatabilir ve sürdürebilir (Singh ve Aplin, 2009).

Uterus miyometriyum tabakası

Uterusun en kalın kas tabakasıdır, kas tabakası uterus tüpleri ve vaginaya kadar devam eder. Hem miyometrium hem de endometriyum, uterusu bir embriyonun implantasyonuna hazırlamak için her ay döngüsel değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler adet döngüsünü oluşturur. Embriyo implantasyonu olursa, döngü durur ve hamilelik sırasında her iki katman da önemli ölçüde büyüme ve farklılaşma gösterir (Ross ve Pawlina, 2016:850). Hamilelik süresince miyometriyal kontraksiyonun inhibisyonu relaksin tarafından kontrol edilir. Relaksin, ovaryum ve plasenta tarafından üretilen peptid yapıda hormondur. Doğum sırasında miyometriyal kasılma ise , nörohipofizden salgılanan bir peptit hormonu olan oksitosinin kontrolü altındadır (Kierszenbaum, 2020:737). Doğumdan sonra uterus neredeyse orijinal boyutuna döner. Bazı kas lifleri dejenere olur, ancak çoğu orijinal boyutlarına geri döner. Hamilelik sırasında miyometriyumu güçlendirmek için üretilen kollajen daha sonra onu salgılayan hücreler tarafından enzimatik

olarak parçalanır (Ross ve Pawlina, 2016:851). Uterus gövdesinde 4 kas tabakası vardır. Submukozal tabaka (en içteki) longitudinal ve bazı yerlerde oblik düz kas fibrillerinden oluşur. Uterus tüp lümeninin uterus duvarına geçtiği yerde bu kas tabakası dairesel form oluşturur. Vasküler tabaka submukozal tabakanın dışındadır kan damarlarının yanı sıra longitudinal kaslar açısından zengindir. Bu tabakayı, ağırlıklı olarak dairesel bir kas tabakası olan supravasküler tabaka izler. En dışta daha ince longitudinal kaslardan oluşan subserozal tabaka ile serozaya bitişiktir. Dıştaki iki kas tabaksının lifleri uterusun yan köşelerinde birleşir ve uterus tüplerine doğru devam eder. Bazı lifler broad ligament ve round ve ovaryan ligament içine girer diğerleri geri dönerek uterosakral ligamente girer. Korpus ve serviks arasındaki kavşakta düz kas, hem kollajen hem de elastin içeren yoğun, düzensiz bağ dokusu ile birleşir ve servikal duvarın çoğunluğunu oluşturur. Bilateral longitudinal lifler, lateral submukozal tabakada fundustan servikse uzanır. Kas lifleri yapısal olarak tipik miyometriyumdan farklıdır ve uterus duvarının kasılma aktivitelerini koordine eden hızlı ileten yollar sağlayabilirler (Standring, 2016:1299).

Uterus perimetrium tabakası (seroza)

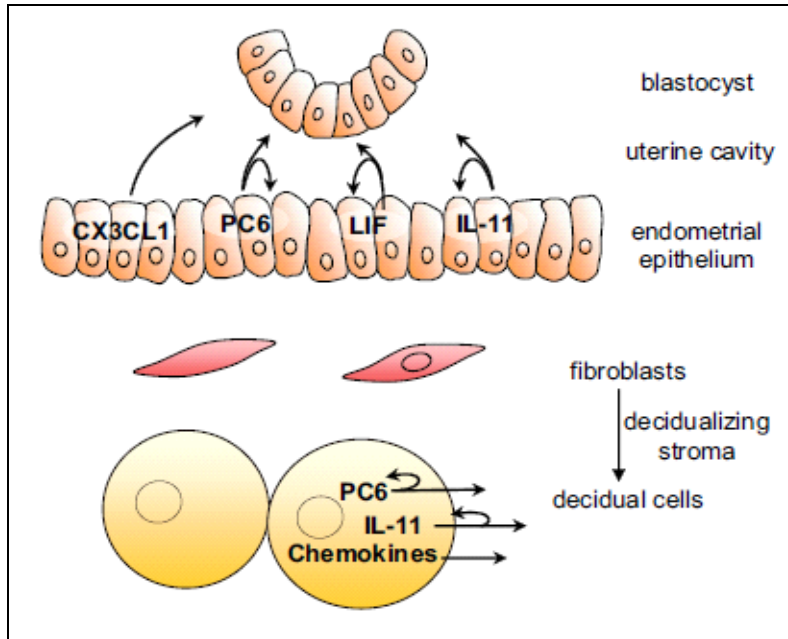
Uterus gövdesi, supravajinal serviksi kaplamak için arkaya doğru devam eden peritoneal seroza ile kaplıdır. Anterior serviks ve uterus gövdesinin lateral yüzeyleri periton ile örtülmemiştir (Standring, 2016:1301).

Uterus bezleri

Yüzey epiteli altta yatan lamina propriaya yani endometrial stromaya girerek uterus bezlerini oluşturur. Daha az siliyer hücre içeren bu basit tübüler bezler bazen endometriyumun daha derinlerine de dallanır. Endometrial stroma, mezenşime benzeyen, yüksek derecede hücrelidir, bol miktarda hücreler arası zemin maddesi içerir. Uterus tüpünde olduğu gibi, endometriyumu myometriyumdan ayıran bir submukoza yoktur (Ross ve Pawlina, 2016:853). Sitokinlerden özellikle Leukemia inhibitör faktör (LIF), İnterlökin-1,6,11,15, kemokinler, vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) gibi birçok düzenleyici faktör endometriyum epiteli ve uterus bezleri tarafından üretilir (Guzeloglu-Kayisli, Kayisli ve Taylor, 2009).

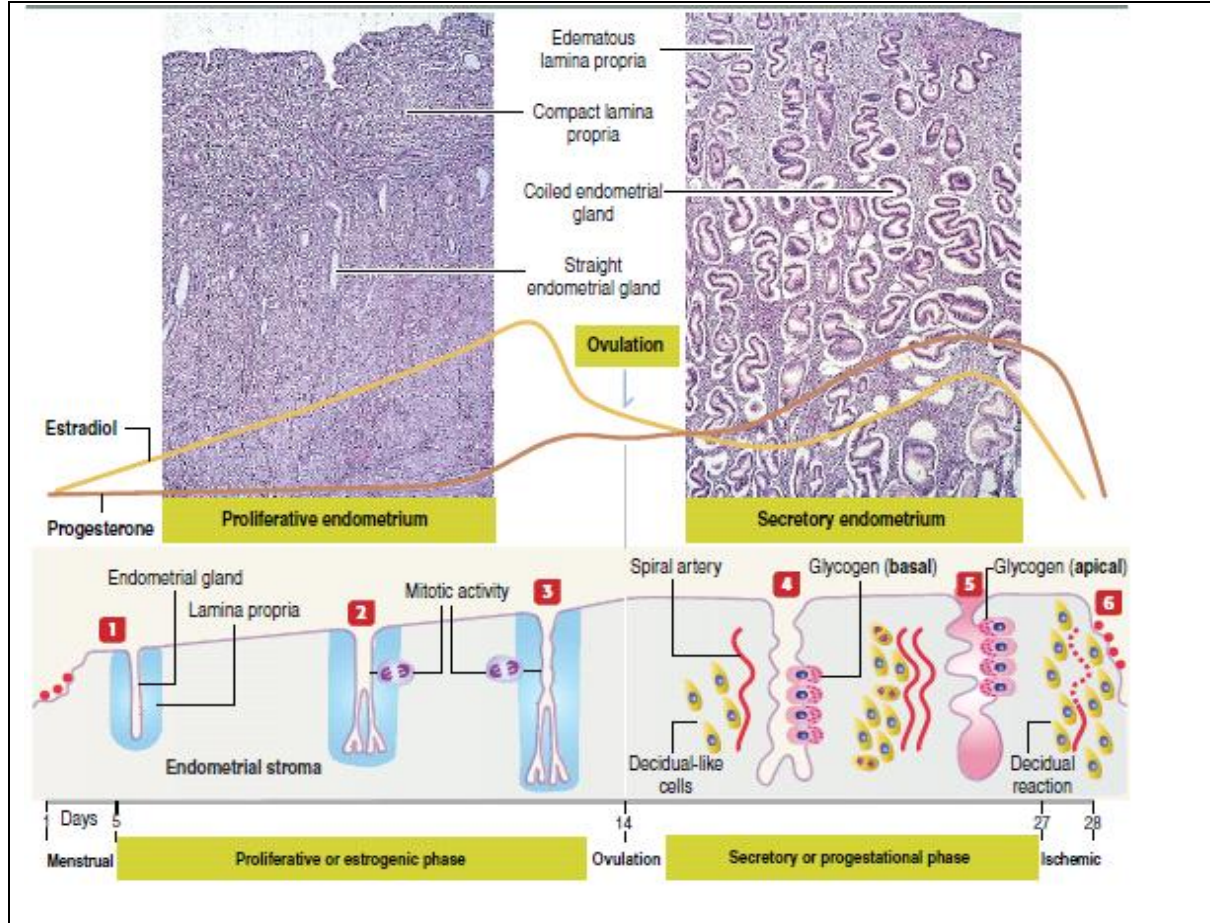
Çok sayıdaki bu düzenleyici moleküllerin, endometriyal dokuların hazırlanması da dahil olmak üzere birçok süreçte fonksiyonel roller oynadığı gösterilmiştir. Trofoblast adezyonu, invazyonu ve fetal-maternal çift yönlü trafiğin kontrolü endometriyal stromanın hazırlanması (desidualizasyon) gibi (Dimitriadis ve diğerleri, 2009).

Endometriyal bezler, embriyonun hayatta kalmasında, trofoektoderm aktivasyonunda, endometriyal invazyonda ve implante edilen embriyonun beslenmesinde rol oynayan amino asitler, glikoz ve büyüme faktörlerini içeren histiotroph denilen bir molekül kokteyli üretir ve salgılar (Cheong ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.4. İmplantasyonda moleküler interaksyon (Dimitriadis ve diğerleri, 2009:314)

Menstrüel siklusun endometriyum ve miyometriyum üzerine etkisi ve endometriyal siklus



Şekil 2.5. Endometriyal siklus (Kierszenbaum, 2020:741)

Menstrüel siklus 2 ana fazdan oluşur.

- 1- Proliferatif ya da östrojenik faz,
- 2- Sekretuar ya da progestasyonel faz.

Endometriyumu yapısal açıdan incelediğimizde ise 4 endometriyal faz gözlenir. Menstrüal, proliferatif, sekretuar, iskemik faz. Bu 4 faz boyunca meydana gelen değişiklikler endometriyal bezler ve endometriyal stroma tarafından desteklenir. Proliferatif faz, erken orta ve geç proliferatif faz içerir. Proliferatif faz süresince endometriyum kalınlığı ,ovaryen foliküllerden üretilen östrojenin uyarıcı etkisinde kalarak 0.5-1 mm artar. Endometriyal bezler hem dallanır hem de genişler. Lamina propria ve bez epitelindeki mitotik aktivite sonucunda endometriyal proliferasyon

gerçekleşir. 14 gün sonra ovulasyon olursa, endometriyumun yaklaşık 13 gün süren sekretuar evresi başlar. Bu sürede endometriyumun kalınlığı 5-7 mm olur. Epitel hücre hattı glikojenden zengin salgı içerir. Glikoproteinler ise bez lümeninde bulunur. Bu aşamada endometriyal stroma içinde desidua-benzeri hücreler gözlenir.

Endometriyal desidualizasyon

İmplantasyondan sonraki ilk önemli olay endometriyum desidualizasyonudur.

Tipik olarak 8-10 günlük bir süre içinde olan desidualizasyon sırasında, endometriyal stroma hücreleri yüksek progesteron seviyelerine maruz kalır ve farklılaşıp genişleyerek desidua hücrelerine dönüşür (Ross ve Pawlina, 2016:853; Liao ve diğerleri, 2015:856). Desidual bölgede 3 farklı alan ayırt edilebilir.

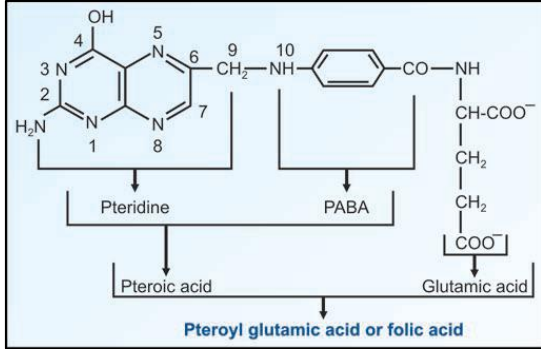
1. Desidua Basalis; implantasyon bölgesi ve miyometriyum arasındaki bölge,
2. Desidua Kapsularis; ince ara tabaka,embriyo ve uterus lümeni arasındaki bölge,
3. Desidua Paryetalis; endometriyumun embriyonik implantasyon bölgesine uzak olan bölgesi

Desidual hücreler endometriyal stromada bulunan fibroblastların genişleyip poligonal şekle gelmesi ve protein sentezi aktivitesi kazanmasıyla şekillenmiştir (Mescher, 2016:479).

Desidual hücreler, trofoblast hücre istilasını kontrol eder, gelişmekte olan embriyoya besin sağlar ve gelişimsel olarak yetersiz embriyoların anne tarafından reddedilmesini kolaylaştırmak için gelişmekte olan embriyo kalitesini yönetir. Desidual hücreler hipofizle ilişkili Desidual Prolaktini üretir. Desidual prolaktinin korpus luteum üzerinde etkisi vardır. Ayrıca desidua hücreler, Prostaglandinler ve Relaksin salgılar. Relaksin hamileliğin devamı ve başarısı için gerekli olup yine desidua hücrelerden salgılanan IGF-bağlayıcı protein IGF-1' e bağlanarak endometriyal hücrelerin çoğalmasını önler (Kierszenbaum, 2020:742).

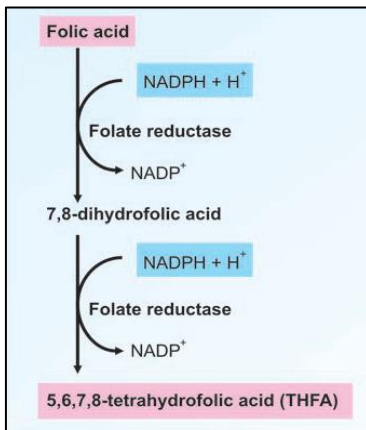
Folik asit

Suda eriyen vitaminlerden olup genel olarak fonksiyonu enzim kofaktörüdür ve tek karbonlu birimlerin taşıyıcısı ve sağlayıcısı olarak işlev görür. Eksikliği sıklıkla Megaloblastik Anemi ile ilişkilidir. Folik asitin aktif formu tetrahidrofolat. (pterol glutamat). (Rodwel ve diğerleri, 2019:1300).



Şekil 2.6. Folik asidin yapısı (Vasudevan, Sreekumari ve Vaidyanathan, 2019:400)

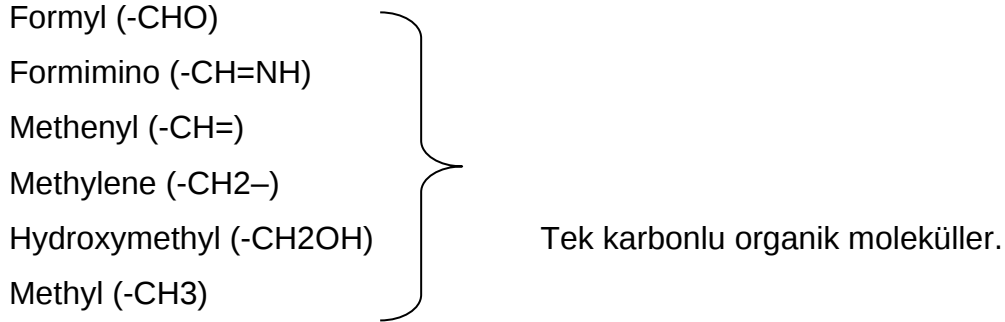
Bitkilerde bolca bulunan folik asit, 3 bileşenden oluşur. Pteridin grubu, para amino benzoik asit (PABA) ile bağlanıp Pterik asidi oluşturur. Bu bileşik glutamik aside bağlandığında folik asit oluşur. Jejunumun üst kısmında emilimi olur ve kanda beta globulinler tarafından taşınır. Dokularda depolanmaz (Vasudevan ve diğerleri, 2019:400).



Şekil 2.7. Folat redüktaz (Vasudevan ve diğerleri, 2019:401).

Folik asit koenzim olarak da iş görür. Folat redüktaz ile 7,8-dihidrofolik asite indirgenir. 5,6,7,8-tetrahidrofolik asit (THFA)'e NADPH'a bağlı folat redüktazın katalize ettiği reaksiyonla yükseltgenir. THFA tek karbonlu birimlerin

taşıyıcısıdır. Tek karbonlu bileşikler organik moleküllerdir. Bunlar; THFA in 5. veya 10. Nitrojen atomuna yada hem 5. hem 10. Nitrojen atomuna bağlanır. Mesela; Metil grubu, N5-metil THFA' in transmetilasyonu ile metiyonin sentezinde kullanılır.



Folik asit eksikliği

Gebelikten önce başlanan 400 µg/d folik asit takviyeleri, spina bifida ve diğer nöral tüp defektlerinin insidansında önemli bir azalma ile sonuçlanır. Bu nedenle, birçok ülkede unun folik asit ile zenginleştirilmesi zorunludur. Yüksek kan homosisteini, ateroskleroz, tromboz ve hipertansiyon için önemli bir risk faktörüdür. Bu durum metilentetrahidrofolat redüktaz tarafından metiltetrahidrofolat oluşturma yeteneğinin bozulmasının bir sonucudur, bu da fonksiyonel folat eksikliğine neden olur. Ayrıca düşük folat seviyelerinin kolorektal ve diğer kanserlerin gelişiminde bir faktör olan DNA'daki CpG islands metilasyonunda bozulmaya neden olduğuna dair kanıtlar vardır (Rodwel ve diğerleri, 2019:1314).

Folat eksikliği birçok patolojiyle ilişkilidir. Bununla birlikte, insan üreme ve özellikle de implantasyon üzerindeki etkisi hakkında çok daha az şey bilinmektedir. Başarılı bir embriyo implantasyonu için uterus reseptivitesinin oluşmasının çok önemli olduğu aşikardır. Bununla birlikte, uterus reseptivitesi ile ilgili genlerin metilasyonu ve ekspresyonunda folat düzeylerinden etkilenip etkilenmediği bilinmemektedir (Gao ve diğerleri, 2012). Folik asit, nükleik asitlerin biyosentezi ve metilasyonu içinde gereklidir. Metilasyon döngüsünde folat, homosisteinin metionine dönüştürülmesi için bir metil grubu sağlar ve bu daha sonra DNA'nın transmetilasyonu için metil donörü olan S-adenosilmetiyonine (SAM) dönüştürülebilir. Yetersiz beslenme veya düzensiz metabolizma nedeniyle folat

eksikliği, DNA sentezi ve onarımının bozulmasına, DNA ve diğer moleküllerin anormal genomik metilasyonuna ve homosistein birikimine neden olur. Uterus reseptivitesinde kilit rol oynayan; kaderin 1 (Cdh1), progesterone reseptör (Pgr) ve estrogen reseptör 1 (Esr1) gibi sinyal moleküller bir anlamda bu sürecin moleküler belirteçleridir. Yapılan çalışmada, normal grup ve folik asit eksikliği olan grup karşılaştırıldığında; Esr1, Cdh1, Pgr moleküllerinin ekspresyonunda pinopodların morfolofisinde değişiklik ve sayısında azalma, endometriyum üzerindeki implantaston alanı sayılarında azalma veya anlamlı bir farklılık gözlenmediği raporlanmıştır. Bununla birlikte her başarılı implantasyon hamilelikle sonuçlanmadığı için implantasyon sonrasındaki normal uterus desidualizasyonu, normal plasantasyon ve normal embriyo gelişimi sürecindeki folik asit eksikliğinin etkisi halen açıklığa kavuşmamıştır (Gao ve diğerleri, 2012).

Folat eksikliğinin çeşitli hücrelerin apoptozisini etkilediği ve desidual hücrelerin apoptozunun hem farede hem de insanda endometriyum desidualizasyonu sırasında hayati önem taşıyan bir süreç olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca, bu sürece, insanlarda olduğu kadar farelerde de endometrium stromal hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması eşlik eder, bu da iyi yeniden şekillendirilmiş uterusun yavaş yavaş büyüyen embriyoyu almasını sağlar (Liao ve diğerleri, 2015).

Avrupa'dan yapılan bir kaç çalışma, folatın infertilite tedavisinden sonra toplam ve olgun oosit sayısını ,embriyo kalitesini ve gebelik oranlarını iyileştirebileceğini göstermiştir. Ayrıca, Hollanda'da IVF tedavisinde ki 37 kadın üzerinde yapılan araştırmada, serum ve foliküler sıvı folik asit ve vitamin B12 konsantrasyonlarının embriyo kalitesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Gebelik öncesi folik asit takviyesinin foliküler sıvıdaki hem folat hem de toplam homosistein konsantrasyonlarını önemli ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir (Gaskins, 2015; Boxmeer ve diğerleri, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tezin bu bölümünde, çalışma sırasında kullanılan tüm araç, gereç ve laboratuvar sarf malzemelerinin listesi, sonrasında çalışmanın denekleri olan, sıçanlarda deney modelinin oluşturulması ve deney bitiminde yapılan işlemler anlatılmaktadır. Ayrıca bu bölümde uygulanan yöntemlerin yapılış protokolleri yazılmıştır. Deney bitiminde elde edilen sıçan uterus dokusu kesitlerinin histolojik değerlendirmeleri yapılarak elde edilen bulguların yorumu yapılmıştır.

3.1. Deneyde Kullanılan Kit, Kimyasal Madde ve Sarf Malzemeler

Çizelge 3.1. Kullanılan tüm malzemeler

Kit- sarf malzeme	Marka
Ultravision Detection System	Thermo scientific
Large Volume Anti-Polyvalent HRP (RTU)	Thermo scientific
E cadherin Polyclonal Antibody 100µl	Bioss-USA
İntegrin Polyclonal Antibody 100µl	Bioss-USA
Hydrogen Peroksit Block	Thermo scientific
UltraV Block	Thermo scientific
Streptavidin Peroxidase	Thermo scientific
PBS –Fosfat tamponlu su, Ph 7.4	Thermo scientific
Teksoll 96 % Extra pure	Tekkim
Ksilen	Tekkim
Formaldehit	Tekkim
Sitrat (10X) Ph 6.0	Thermo scientific
AEC-Chromogen	Thermo scientific
AEC Substrate Buffer	Thermo scientific
Biotinylated Goat Anti-Polyvalent	Thermo scientific

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi

Cihaz adı	Marka
Parafin Gömme (Blokla) Cihazı	Leica EG 1120
Mikrotom	Leica SM 2000
Bilgisayar destekli görüntüleme cihazı	Leica DCM 4000
Mikroskop yazılım programı	Leica Q Vin 3
Etüv	İsolab
Vortex	İsolab

3.2. Folik Asit Eksikliği Yaratılan Sıçan Modelinin Oluşturulması, Dokuların Alınması

Çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan G.Ü.ET-22.005 karar nolu etik kurul onayı alınarak yapıldı. 16 adet , 8-10 haftalık Wistar Albino cinsi sıçanlardan rastgele seçilmiş 2 grup oluşturuldu. Sıçanların kafes şartları 22-24 °C sıcaklıkta ve içme suyuna serbestçe erişecek şekilde tasarlandı.

Deney Grupları, Kontrol Grubu ve Folik Asit Eksiklik Grubu olarak ayrıldı.

- Kontrol Grubu: 5 hafta süresince 2 mg/kg Folik asit (FA) içeren standart Rodent yem ile beslenen sıçanlardan oluşturuldu.
- Folik Asit Eksiklik Grubu: 5 hafta süresince Folik asit içermeyen özel Rodent yem (Safe-Diets-U8958, Fransa) ile beslenen sıçanlardan oluşturuldu.

Sıçanlara, 1 mg/kg/gün Suksinilsulfatiazol gavaj yoluyla verildi. Böylece bağırsak florasında Folik asit üretimi önlenmiş oldu. Folik asit eksiklik modelinde, serum Folik Asit değerleri elektokemiluminesans immünassay (ECLIA) yöntemiyle ölçülerek kontrolü yapıldı. Sıçanların çiftleşme kontrolü, erkek sıçanların yanına östrusta olduğu bilinen dişi sıçanlar konularak, 24 saat katıma alınmalarıyla sağlandı. Ertesi gün alınan smear örneklerinde sperm kontrolü yapıldı. Vajinal smearlerde Papanicolaou boyama protokolü uygulandı. Smear preparatlarında spermatozoa görülen sıçanların, gebeliğin 1. Gününde oldukları kabul edilmiştir. Gebeliklerinin birinci gününde olan bu dişi sıçanların aynı zamanda implantasyon penceresinin açık olduğu insanda geç luteal evreye denk gelen diöstrus evresinde oldukları bilindiğinden, bu gebe sıçanlarda endometriyal yüzey epiteli değerlendirilmek üzere gerekli uterin alanlar tespit edilerek fiksatife alındı. Kontrol grubunda 5 denek, eksiklik grubunda 6 denek gebe kalmıştır.

Çizelge 3.3. Kontrol grubu ve FA Eksiklik grubu Folik Asit ECLIA değerleri

	Folik asit düzeyi
C1	48,2
C2	49,1
C3	51,6
C4	53,5
C5	63,1

Çizelge 3.3. (devam) Kontrol grubu ve FA Eksiklik grubu Folik Asit ECLIA değerleri

	Folik asit düzeyi
E1	11,76
E2	12,17
E3	8,96
E4	11,10
E5	9,34
E6	6,17

Çizelge 3.4. Kontrol grubu ve eksiklik grubu deneklerin başlangıç, son ağırlık ve uterus ağırlık değerleri

	Başlangıç Ağırlığı	Son Ağırlık	Uterus Ağırlığı
C1	234,5	210	0,361
C2	257	277,8	0,735
C3	266,5	273	0,994
C4	263,9	265,6	0,661
C5	236,2	247	0,469
E1	216,3	208	0,623
E2	212,3	213	0,529
E3	262,6	264,5	0,626
E4	223,3	215,4	0,796
E5	234	230	0,773
E6	240,5	245	0,587

3.3. Rutin Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması

24 saat boyunca %10 'luk nötral formalinde fiske edilen uterus doku örneklerine , yıkama aşaması ardından rutin histolojik doku takip protokolü uygulandı. Artan alkol serilerinden geçirilen dokular önce ksilen sonra ksilen-parafin karışımı solusyonuna alındı. Böylece parafin infiltrasyonu sağlanmış oldu. Rutin takip sonrasında dokular parafine gömülerek bloklar hazırlandı. Bu bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.4. Boyama Yöntemleri

3.4.1. Hematoksilen-eozin boyaması

Uterus kesitlerine 65°C etüvde 1,5-2 saat boyunca deparafinizasyon işlemi uygulandı. Sonrasında kesitler etüvden alınarak 2 kez 15'şer dakika farklı Ksilol solusyonlarında bekletildi. Ksilolden çıkan kesitler bir müddet havada ksilolün uçması için kurutulup sonrasında sırasıyla (%96-80-70-50) etil alkol serilerinde 8

dakika bekletildi. Akar musluk suyunda 10 dakika yıkanarak alkolden arındırıldı. İlk olarak Hematoksilen ile 10 dakika boyanıp akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı. Kesitlerdeki aşırı boyanmayı önlemek için asetik asit-alkol karışımına 2-3 kez batırılıp alkolle yıkandı sonrasında yine akan musluk suyunda 5 dakika yıkandı. Kesitler bu kez Eozin boyasıyla 10 dakika boyanıp akan musluk suyunda 5 dakika yıkandı. Alkol serilerinden (%96-80-70-50) hızlıca geçirilerek dehidratasyon yapıldı. Ksilolde 45 dakika bekletilip entellan ile kapatıldı.

3.4.2. İmmünohistokimyasal boyama

E-Kadherin ve $\alpha 5\beta 3$ -İntegrin proteinlerinin immünohistokimyasal antikorlar aracılığıyla tespit edilmesi hedeflenmiştir. Polilizinli lam üzerine alınan kesitlere immünohistokimyasal boyama protokolü uygulandı. Semikantitatif olarak değerlendirilmesi bilgisayar destekli Leica DM 4000 görüntüleme cihazında yapıldı. Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

Boyama aşamaları

- Kesitleri alınan dokuları parafinden kurtarmak için 63-64°C etüvde 2 saat deparafinizasyon yapıldı. Süre sonunda dokular etüvün içindeyken hemen ksilol solüsyonunun içine alındı.
- 2 kez farklı ksilol solusyonlarında 15'er dakika bekletildi.
- (%100-96-80-70) etil alkol serilerinde 7'şer dakika bekletildi.
- Alkol serilerinden çıkan kesitler 2 kez 5'er dakika distile suda yıkanır. Alkolden arındırıldı.
- Antijen retrieval için Sitrat tamponuna (Ph 6.0) alınan kesitler mikrodalga içinde kontrollü olarak en üst seviye ısıdan kademe kademe düşük seviye ısıya indirerek ve azalan tampon seviyesini tamamlayarak toplamda 15 dakika retrieval yapıldı.
- 20-25 dakika oda ısısında soğuması için bekletildi.
- Oda ısısında soğuyan kesitler distile suda 2 kez 5'er dakika bekletilerek sitratın dokudan uzaklaşması sağlandı.
- Yıkama sonrasında hidrofobik kalem PAP-pen ile dokuların etrafı çizilip yerleri belirlendi.

- Nemli ve hafif sıcak bir immünohistokimya bar ortamı oluşturulup kesitler teker teker sudan alınıp bar üstüne yerleştirildikten sonra 3 kez 3'er dakika PBS (Ph 7.4) tamponu ile yıkandı.
- PBS tampon uygulamasından sonra dokuların üzerini kapatacak şekilde birer damla hidrojen peroksit damlatıldı. İmmünobarın ortamının sıcak ve nemli olması sağlanıp üstü kapak ile kapatılarak 15 dakika bekletildi. Bu işlem dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için yapıldı.
- Hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılmasının ardından kesitler PBS (Ph 7.4) ile 3 kez 3' er dakika yıkandı.
- Bu işlemin ardından dokuların üzerini tamamen kaplayacak şekilde Large Volume Ultra V Block damlatılıp 10 dakika bekletildi.
- Ultra V Block uygulaması sonrasında çalışmada kullanılacak olan primer antikorların önerilen oranlarda dilüsyonları yapıldı.
- E-Kaderin tavşan poliklonal antikor (bs-10009R, Bioss Antibodies) için 1/200, $\alpha 5\beta 3$ -İntegrin poliklonal antikor (Bioss Antibodies) için 1/200 dilüsyon oranlarına göre primer antikorlar hazırlandı. Dilüsyon solüsyonu olarak PBS kullanıldı.
- Primer antikor solüsyonu kesitlerin üzerini kaplayacak şekilde yaklaşık 40 μ l eklendi.
- Primer antikorlar eklenmiş kesitler +4°C buzdolabında bir gece inkübe edildi.
- Ertesi gün kesitler (üzerinden 16 saat geçmeden) 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.
- Sekonder antikor olan Biotinylated Goat Anti Polyvalent damlatıldı. 10 dakika bekletildi.
- PBS (Ph 7.4) ile 3 kez 3'er dakika yıkandıktan sonra Kromojen uygulamasından önce dokuların üstünü kapatacak şekilde Streptavidin damlatıldı. 10 dakika bekletildi.
- PBS (Ph 7.4) ile 3 kez 3'er dakika yıkama yapıldı.
- E- Kaderin için AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) substratı içeren Kromojen AEC, $\alpha 5\beta 3$ -İntegrin için AEC eklenerek renk almaya başlaması mikroskop kontrolüyle gözlemlenerek reaksiyon durduruldu. Kesitler distile su içine alındı.

- Dokuların zıt boyanması için Harris'in Hematoksilen boyaması yapıldı. Tüm kesitler 10 saniye hızlıca boya solusyonunda tutuldu süre sonunda distile su içine alınıp yıkandı. Tüm kesitler akan musluk suyu altında 5 dakika yıkandı.
- Yıkama sonrasında kesitlere Aqua Mount damlatılarak kapatıldı.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Hematoksilen – eozin boyama bulguları

Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait kesitler değerlendirildiğinde, sekretuar fazın reseptif evresindeki uterus dokularının normal histolojik yapılarında oldukları izlendi (Resim 4.1). Endometriyumun yüzey epiteli, kübikten prizmatığe doğru değişen tek katlı prizmatik epitel özelliğindedir. Yüzey epitelini oluşturan hücrelerde çekirdek yapıları yuvarlak-orta yerleşimli veya oval-bazal yerleşimli olarak izlendi. Yüzey epitelinin altında bulunan bazal membran epitel altında süreklilik göstermekteydi ve normal yapıda olduğu görüldü. Ayrıca, yüzey epitelinde seyrek olmakla birlikte, apoptotik hücreler oldukları düşünülen piknotik çekirdeklere sahip hücreler ile birlikte mitotik figürler izlendi (Resim 4.2). Yüzey epitelinin altında yer alan lamina propria, normal yapısındaydı ve gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Bu bölgede spiral arterler, bezlerin epitele açılan boyun ve ağız bölgeleri, bazal tabakaya yakın bazal düz arterler, endometriyum veni, sekretuar fazın reseptif evresi ile uyumlu normal yapılarında izlendi (Resim 4.3). Spiral arterleri çevreleyen stromal hücrelerin mitotik yönden aktif oldukları görüldü. Lamina propriyada hem endometriyum bazal hem de fonksiyonelde neovaskülarizasyon, artmış damar yapılarıyla dikkati çekmekteydi. Endometriyumun bazal tabakası, sıkı bağ dokusu yapısında, düz arterlerden zengin, stromal hücrelerce çevrelenmiş salgı yapıcı ve bol glikoz ve lipid damlacıkları içeren bezlerin son kısımlarını kapsamaktaydı (Resim 4.1). Bezler daha çok miyometriyuma yakın yerleşimli izlenmekteydi ve bez epitel hücrelerinde piknotik çekirdekli apoptotik oldukları düşünülen hücreler gözlemlendi. Lamina propriyanın fonksiyonel ve bazal endometriyum tabakalarında stromal hücreler arasında da yer yer piknotik çekirdekli hücreler ve mitotik figürler izlendi. Lenfosit, plazma hücreleri ve eozinofiller endometrial stromada görüldü (Resim 4.4). Progesteron düzeyinin yüksek olması nedeniyle miyometriyumun oldukça hareketsiz olduğu bu evrede içte sirküler dışta longitudinal düz kas yapısı ile miyometriyum normal histolojik

yapısında izlendi. Miyometriyum tabakasının kas katmanları arasında ortada yerleşik arkuat arterlerin de oldukça belirgin ve normal yapılarında olduğu görüldü. Perimetriyum, tek sıra mezotel hücresi ve altında bazal membranı ile perimetriyumun visseral yaprağı olarak genel normal histolojik yapısındaydı (Resim 4.4).

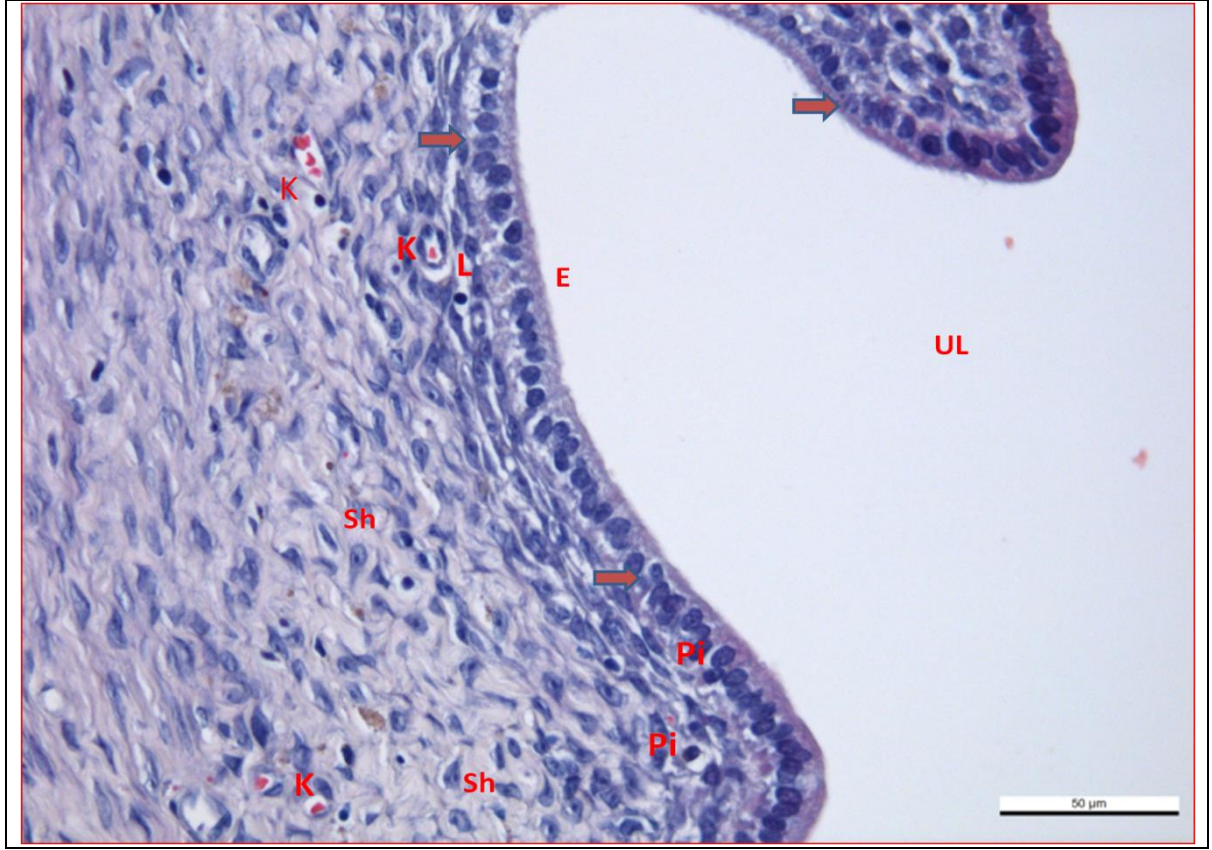
Folik asit eksikliği grubu

Folik asit eksikliği grubunda lümen epiteli daha çok küboidal tek katlı epitel yapısındaydı. Kontrol grubundan ayrıcalıklı olarak bu grupta en belirgin farklılık epitel, bez ve özellikle endometriyum fonksiyonel tabakasındaki stromal hücrelerde izlenen piknotik çekirdekli apoptoza giden hücreler oldukları düşünülen hücrelerin varlığıydı. Bazal membranın eksiklik grubunda, yer yer devamlılığının bozulduğu saptandı. Yüzey epitel hücrelerinde dejeneratif hücrelerde bol vakuolizasyon saptandı (Resim 4.6). Endometriyum fonksiyonel ve bazal tabakalarının, sıkı bağ doku yapısında olduğu ve tüm duvar boyunca geniş bir alana yayılmış durumda olduğu izlendi. Vaskülarizasyonun kontrol grubuna göre azalmış olarak gözlendiği stromada bez yapılarında da azalma saptandı (Resim 4.5). Bezlerde dejeneratif hücreler, bezlerin lümeninde epitelyal debris izlenirken, eozinofil ve lenfositlerde azalma saptandı (Resim 4.7). Ödematik venül yapısı dikkat çekiciydi. Lümen epiteli, bez epiteli ve stromada mitotik figürlere rastlanmadı (Resim 4.6).

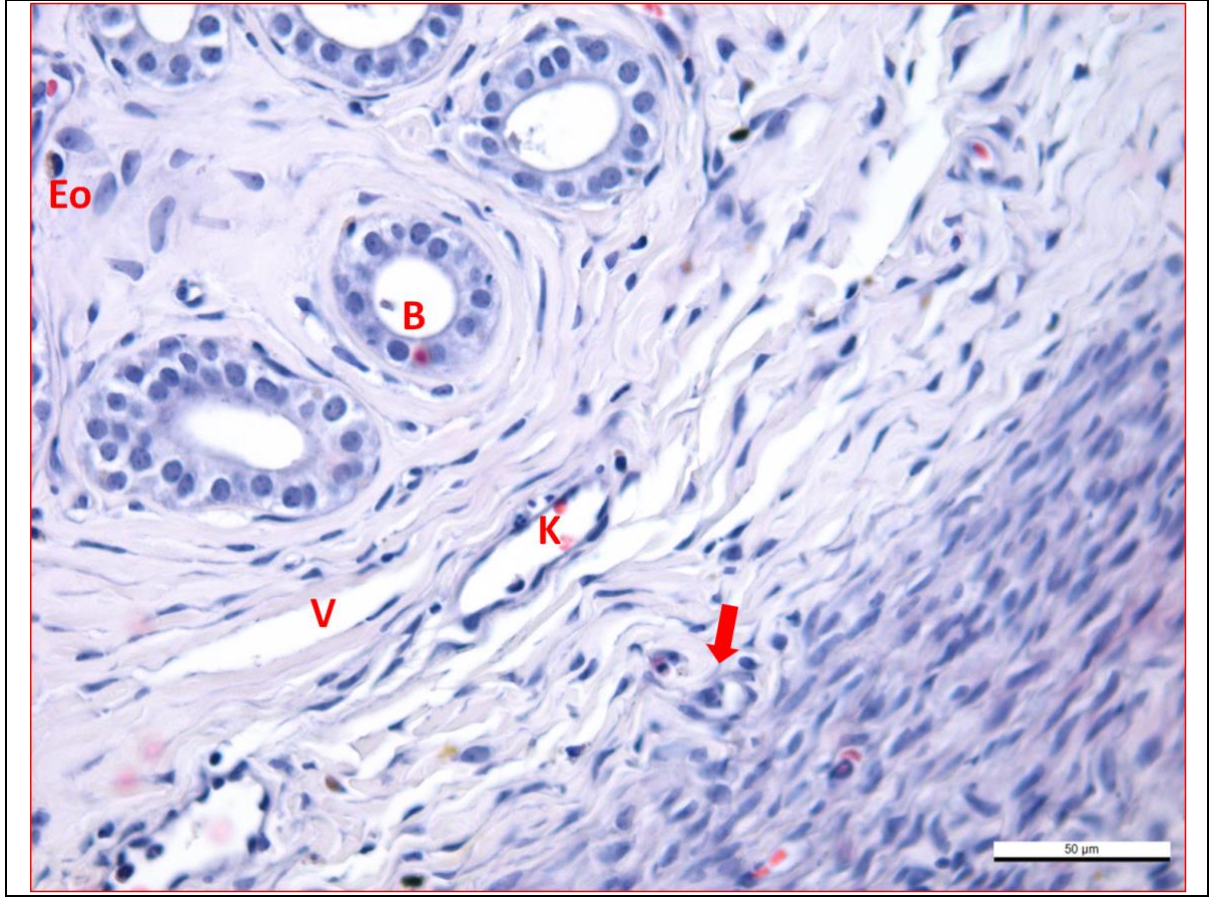
Kontrol grubuna benzer olarak, miyometriyum tabakasının kas katmanları arasında ortada yerleşik arkuat arterlerin belirgin ve normal yapılarını korudukları izlendi. Perimetriyumun tek katlı yassı epitelden oluşan mezotel katmanı ve mezotelin altında yer alan bazal membranın da kontrol grubuna benzer olarak sürekliliğini korumaya devam ettiği görüldü (Resim 4.8).



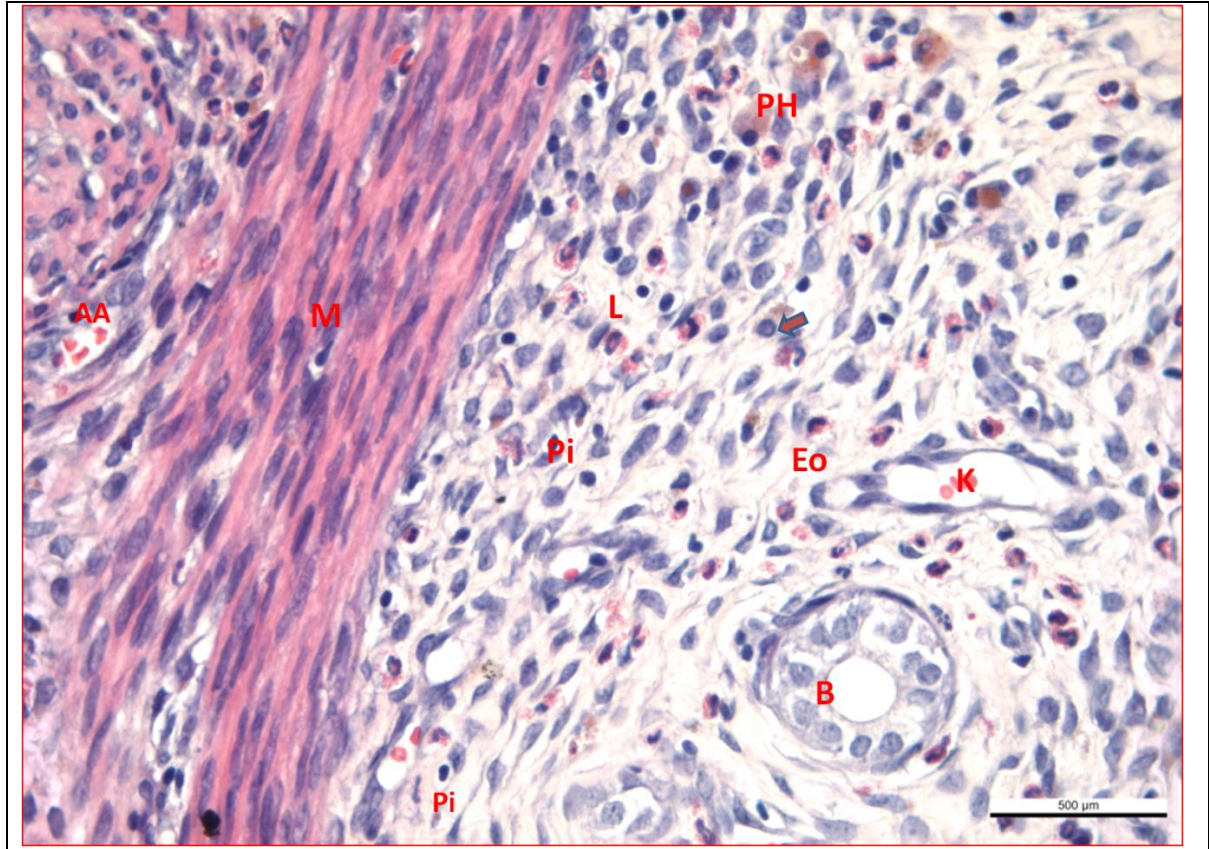
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde tek katlı prizmatik yüzey epiteli (E), uterus lümeni (UL), uterus bezleri (B), endometriyumun fonksiyonel (EnF) ve bazal tabakaları (EnB), miyometriyum (M) ve stromada bulunan kan damarları (K), Perimetriyum (P), arkuat arter (AA)ler izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; x4)



Resim 4.2. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus lümeni (UL), tek katlı prizmatik yüzey epiteli (E), yüzey epitelinde seyrek olarak yer alan piknotik çekirdekli hücreler (Pi), stromada kan damarları (K), lenfositler (L), endometriyumun stromal hücreleri (Sh) ve yüzey epitelinde mitotik figürler (→) izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; x40)



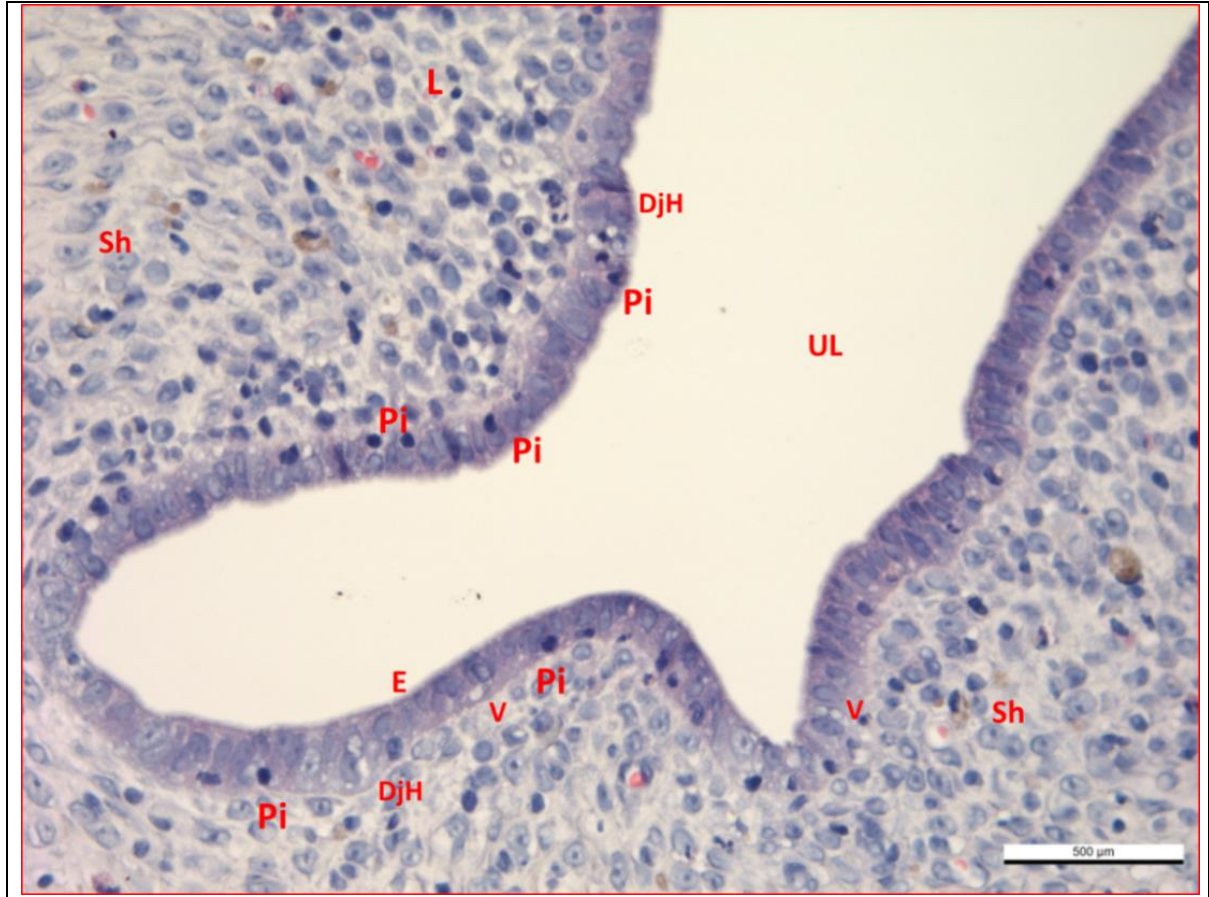
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus bezi (B), eozinofil (Eo), stromada mitotik figür (→), kan damarları (K) ve venül (V) izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; x40)



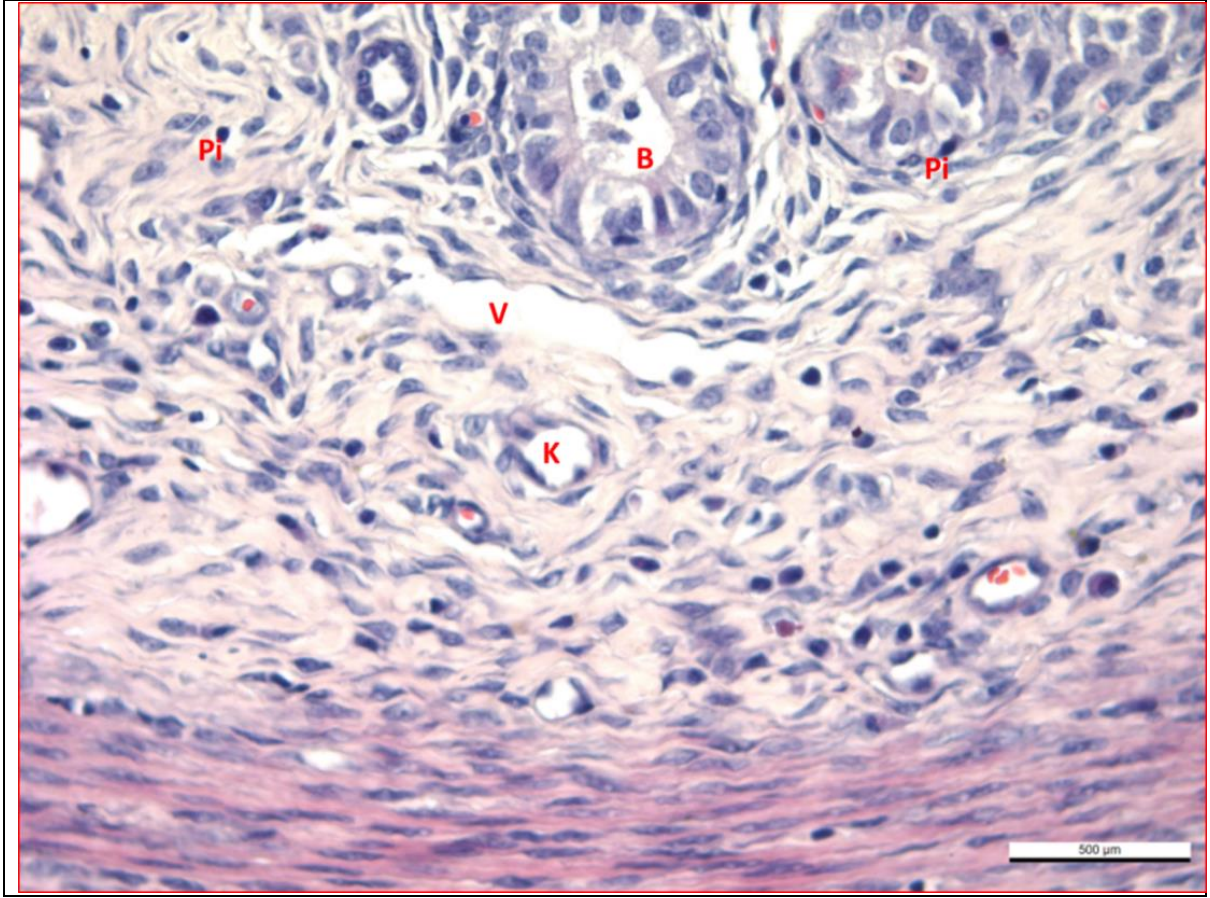
Resim 4.4. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus bezi (B), stromada yaygın bulunan eozinofiller (Eo), kan damarları (K), arkuat arter (AA), piknotik hücreler (Pi), plazma hücresi (PH), lenfosit (L) izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; x40)



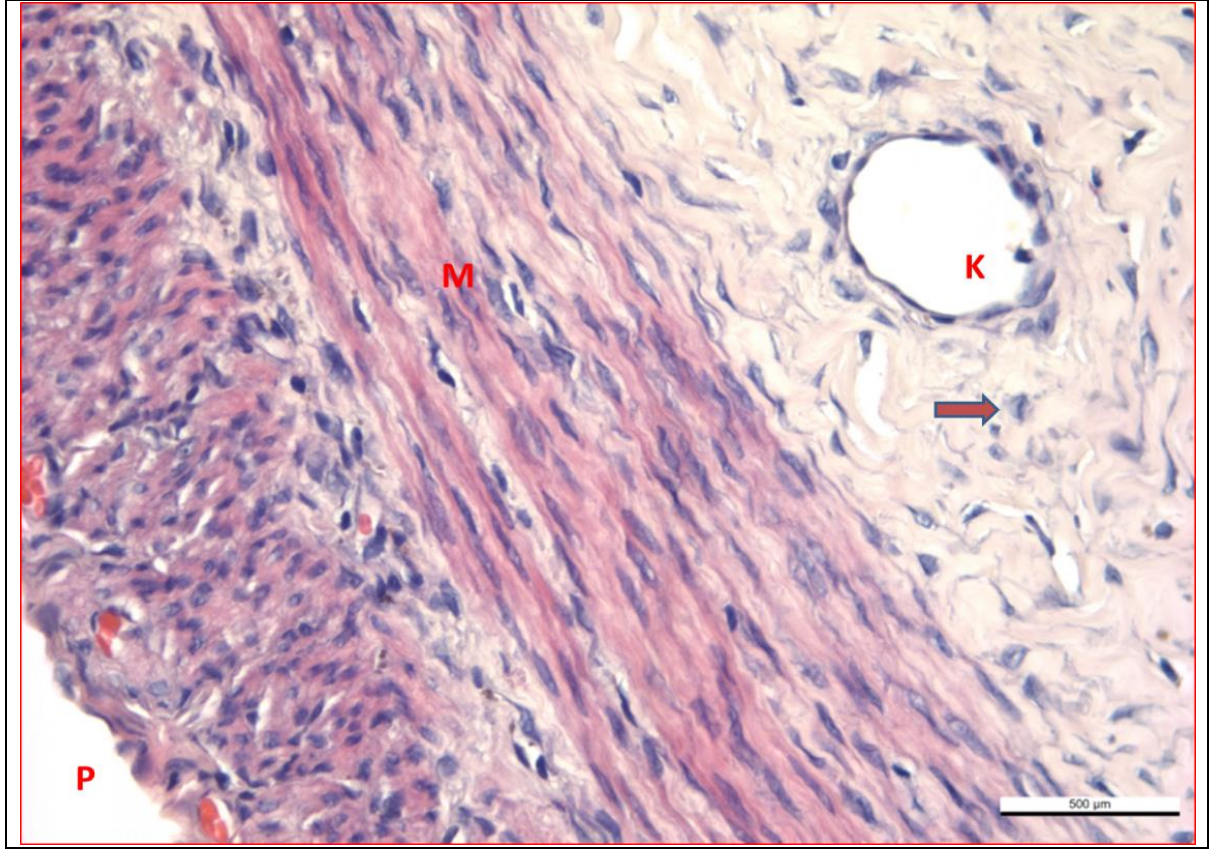
Resim 4.5. Folik asit eksiklik grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus lümeni (UL), uterus bezleri (B), endometriyumun fonksiyonel (EnF) ve bazalis tabakaları (EnB), miyometriyum (M), stromada bulunan kan damarları (K) ve perimetrium (P) izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; x4)



Resim 4.6. Folik asit eksiklik grubuna diöstrus evredeki sıçan uterus doku kesitlerinde uterus lümeni (UL), yüzey epitel hücreleri (E) ve yüzey epitelinde yer alan dejeneratif hücreler (DjH), piknotik çekirdekli hücreler (Pi), yüzey epitelinde vakuolizasyon (V) görülüyor. Stromada lenfositler (L) ve normal yapılarında olan stromal hücreler (Sh) izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; x40)



Resim 4.7. Folik asit eksiklik grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde uterus bezi (B), piknotik hücreler (Pi), stromada kan damarları (K), venül (V) gözleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; X40)



Resim 4.8. Folik asit eksiklik grubuna ait diöstrus sıçan uterus doku kesitlerinde perimetrium (P), miyometriyum (M), stromada kan damarı (K) izleniyor (Hematoksilen-Eozin boyama; X40)

4.2. İmmünohistokimyal Bulgular

4.2.1. E-kaderin bulguları

Kontrol grubu

Kontrol gruplarına ait kesitlerde, endometriyumun tek katlı prizmatik yüzey epitelini oluşturan hücrelerin apikal kısımlarında, E-kaderin immünreaktivitesinin oldukça kuvvetli membranöz tutulum sergilediği saptandı (Resim 4.9). Yüzey epitelinde ve endometriyumun fonksiyonel tabakasında bazı stromal hücrelerinde sitoplazmik E-kaderin pozitifliği dikkat çekiciydi. Hücrelere ait çekirdek yapıları E-kaderin immünreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde, immün negatif olarak izlendi. Endometriyumun fonksiyonel tabakasında ait kapillerlerin duvarını oluşturan endotel hücre katmanının sitoplazmik E-kaderin immün pozitifliği dikkat çekiciydi (Resim 4.10). Hücrelere ait çekirdek yapıları ise E-kaderin yönünden immün negatif olarak izlendi. E-kaderin'in yüzey epitelindeki tutulumu daha çok hücrelerin

apikal bölgelerinde yerleşik olmasına rağmen, endometriyuma ait bez epitelinde hem sitoplazmik hem de yaygın kuvvetli membranöz E-kaderin immünreaktivitesine rastlandı. E-kaderin'in yüzey epitelindeki tutulumu daha çok hücrelerin apikallerinde yerleşik olmasına rağmen, endometriyuma ait bez epitelinde, ortadan kuvvetliye doğru değişen derecelerde sitoplazmik E-kaderin immünreaktivitesi tespit edildi. Miyometriyumu oluşturan iç sirküler ve dış longitudinal kas katmanları E-kaderin yönünden immün negatif olarak izlendi (Resim 4.11).

Folik asit eksiklik grubu

Folik asit eksikliği oluşturulan deney gruplarında geç luteal evredeki sıçan uterus dokusuna ait kesitlerde, endometriyumun tek katlı prizmatik yüzey epitelinin oluşturan hücrelerin apikal membranlarında yer alan E-kaderin immünreaktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, zayıftan orta dereceye değişen membranöz immün tutulum belirlenmiştir (Resim 4.12). Yüzey epitelinin bazal membranının altında yerleşim gösteren stromada ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında stromal hücrelerde sitoplazmik E-kaderin immünreaktivitesinin azaldığı görüldü ve çoğunlukla zayıftan orta dereceye değişen immün tutulum izlendi (Resim 4.12). Endometriyumun fonksiyonel tabakasında yer alan bez epiteli hücrelerinde, sitoplazmik ve membranöz E-kaderin pozitif immün tutulumun, kontrol grubundan farklı olarak, zayıftan orta dereceye değiştiği gözlemlendi (Resim 4.13). Kontrol grubuna benzer şekilde, yüzey epiteli ve stromal hücrelere ait çekirdekler E-kaderin yönünden immün negatif olarak izlendi. Miyometriyumun iç sirküler ve dış longitudinal yerleşimli düz kas katmanlarına ait hücreler de kontrol grubuna benzer şekilde E-kaderin yönünden immün negatifti. (Resim 4.14).

4.2.2. $\alpha 5\beta 3$ integrin bulguları

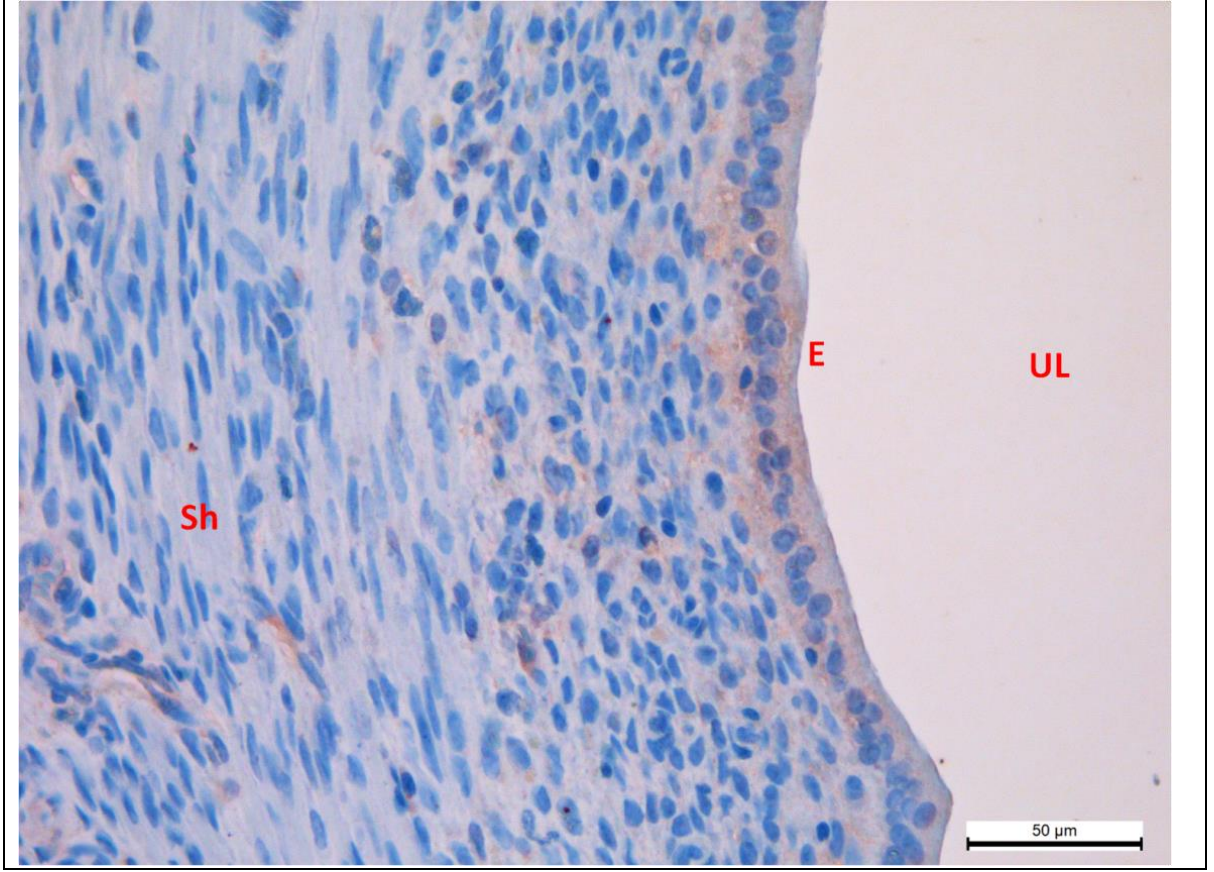
Kontrol grubu

Kontrol gruplarında diöstrus evresindeki sıçan uterus dokusuna ait kesitlerde, endometriyal tek katlı prizmatik yüzey epitelinin oluşturan hücrelerin apikal ve bazal bölgelerine yakın yerleşimli sitoplazma, zayıftan orta dereceye doğru değişen

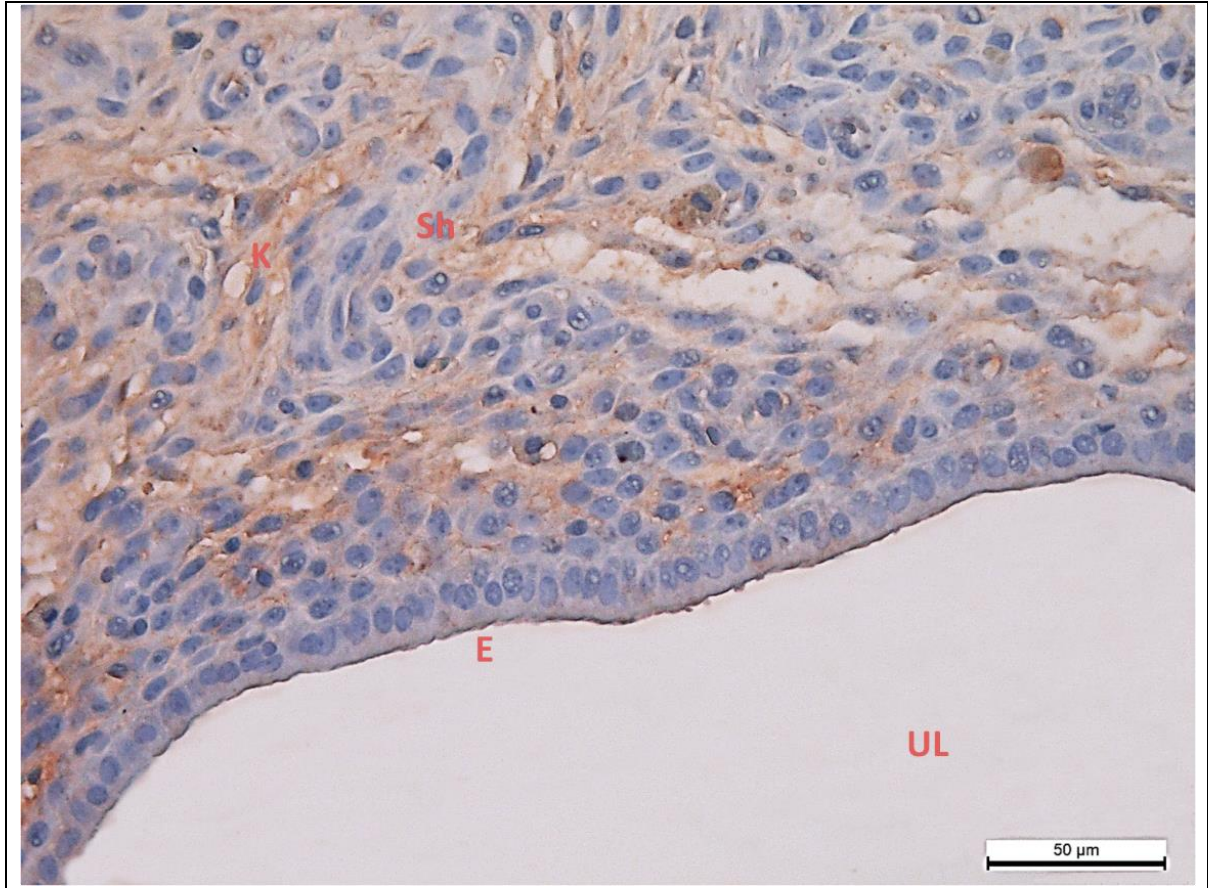
$\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesi izlendi (Resim 4.15). Endometriyumun bazal tabakasına yakın yerleşim gösteren derin bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli $\alpha 5\beta 3$ integrin immün tutulumun olması dikkat çekiciydi. Ayrıca bu derin bez epiteli hücrelerinde çekirdeklerde ve çekirdek zarı olan karyolemmada kuvvetli, karyoplazmada ise daha zayıf derecede $\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesi tespit edildi (Resim 4.16 ve Resim 4.17). Yüzey epitelinin altında yer alan stromal hücrelerde ise orta dereceli sitoplazmik $\alpha 5\beta 3$ integrin immün tutulumunun olduğu belirlendi. Endometriyumun fonksiyonel tabakasında yer alan kapillerlerin duvarını oluşturan endotel hücrelerde orta dereceli sitoplazmik $\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesi görüldü (Resim 4.16).

Folik asit eksikliği grubu

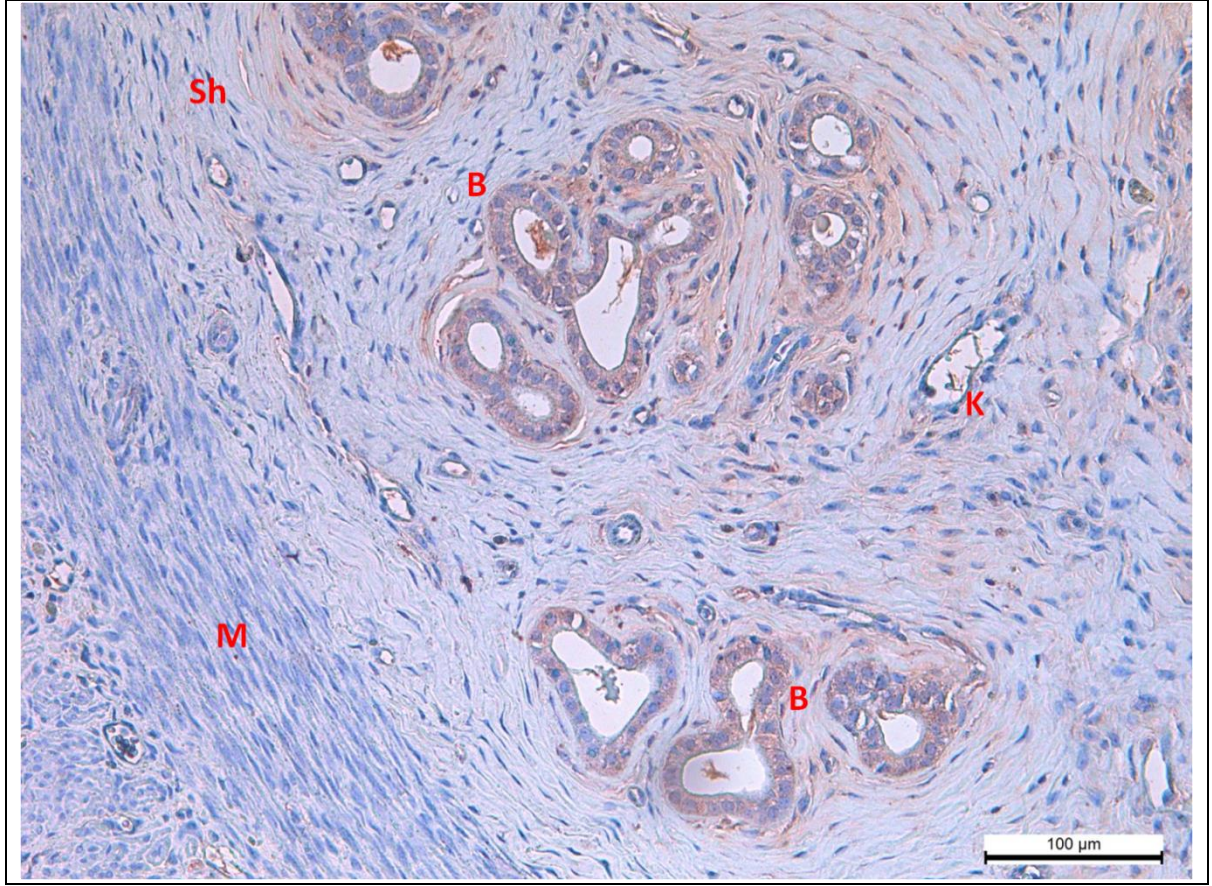
Folik asit eksikliği oluşturulan deney gruplarında diöstrus evresindeki sıçan uterus dokusuna ait kesitlerde, endometriyumun yüzey epitelini oluşturan epitel hücrelerinin apikal ve bazal membranlarına yakın yerleşim gösteren sitoplazmada, $\alpha 5\beta 3$ -integrin immünreaktivitesinin kontrol gruplarıyla kıyaslandığında belirgin olarak zayıf olması dikkat çekiciydi. Yüzey epitelinin bağ dokusu komşuluğunda stromada kontrol grubuna göre zayıf $\alpha 5\beta 3$ -integrin immünreaktivitesi gözlendi (Resim 4.18). Endometriyumun fonksiyonel tabakasına yakın olarak konumlanmış bez epiteli hücrelerinde ve kapillerlerin endotel hücrelerinde sitoplazmik $\alpha 5\beta 3$ -integrin immünreaktivitesinin kontrol grubuna oranla zayıf olduğu belirlendi. (Resim 4.19). Benzer olarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, endometriyumun bazal tabakasına yakın yerleşim gösteren derin bez epiteline ait hücrelerde ise sitoplazma, çekirdekler ve karyolemmalarında $\alpha 5\beta 3$ -integrin immün tutulumun oldukça belirgin bir şekilde zayıf olduğu ve azaldığı izlendi (Resim 4.20).



Resim 4.9. Kontrol grubuna ait diöstrus uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Tek katlı prizmatik yüzey epiteli (E), Stromal hücreler (Sh), uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X40)



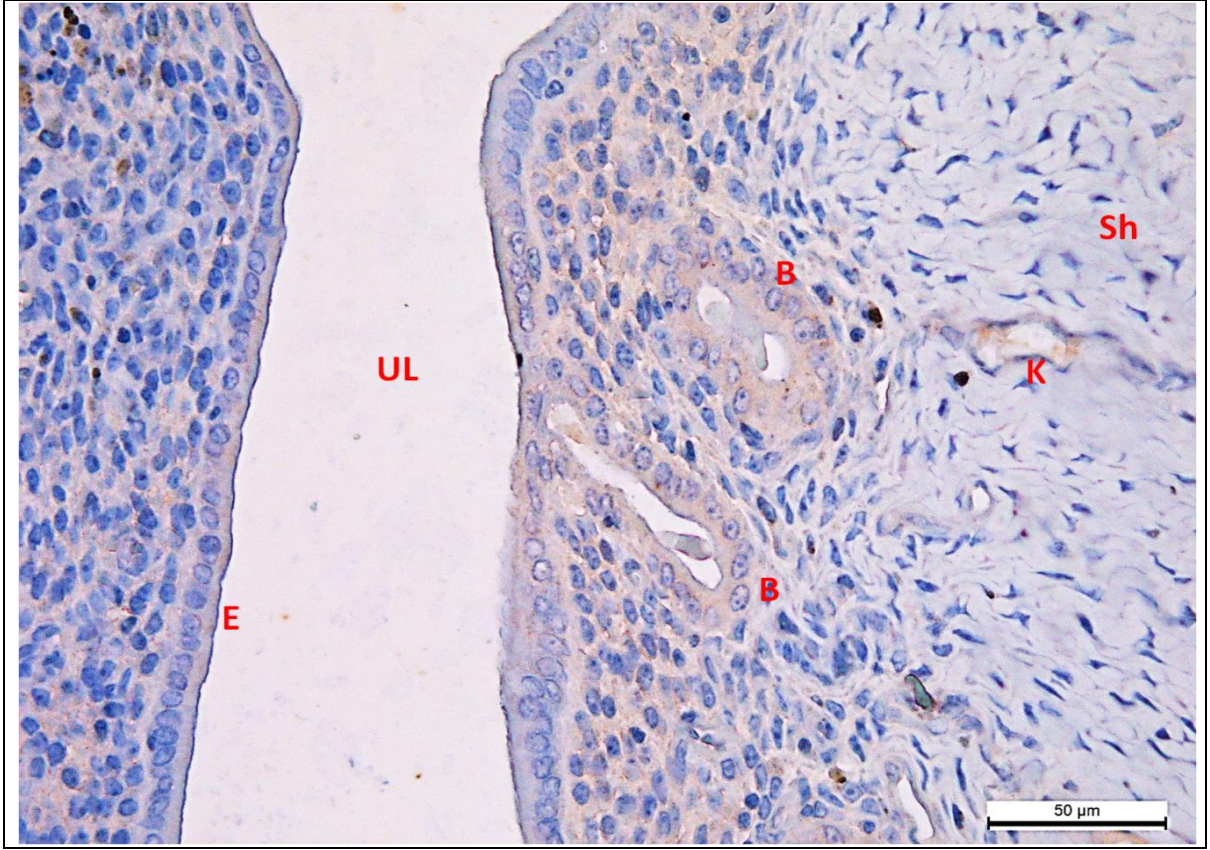
Resim 4.10. Kontrol grubuna ait diöstrus uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Yüzey epiteli (E), kan Damarı (K), Stromal hücreler (Sh), Uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , X40)



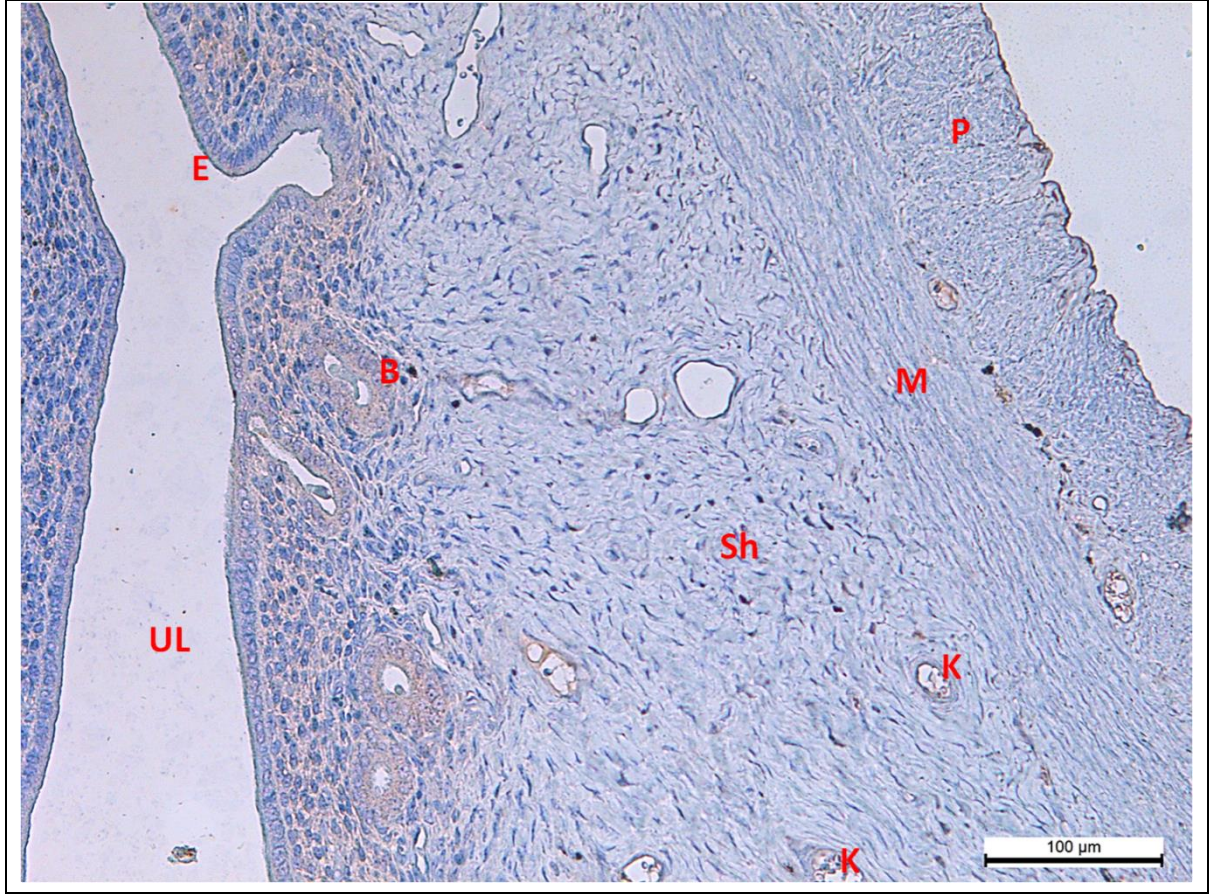
Resim 4.11. Kontrol grubuna ait geç diöstrus uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Kan damarı (K), uterus bezi epitel hücreleri (B), miyometriyum (M), Stromal hücreler (Sh). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X20)



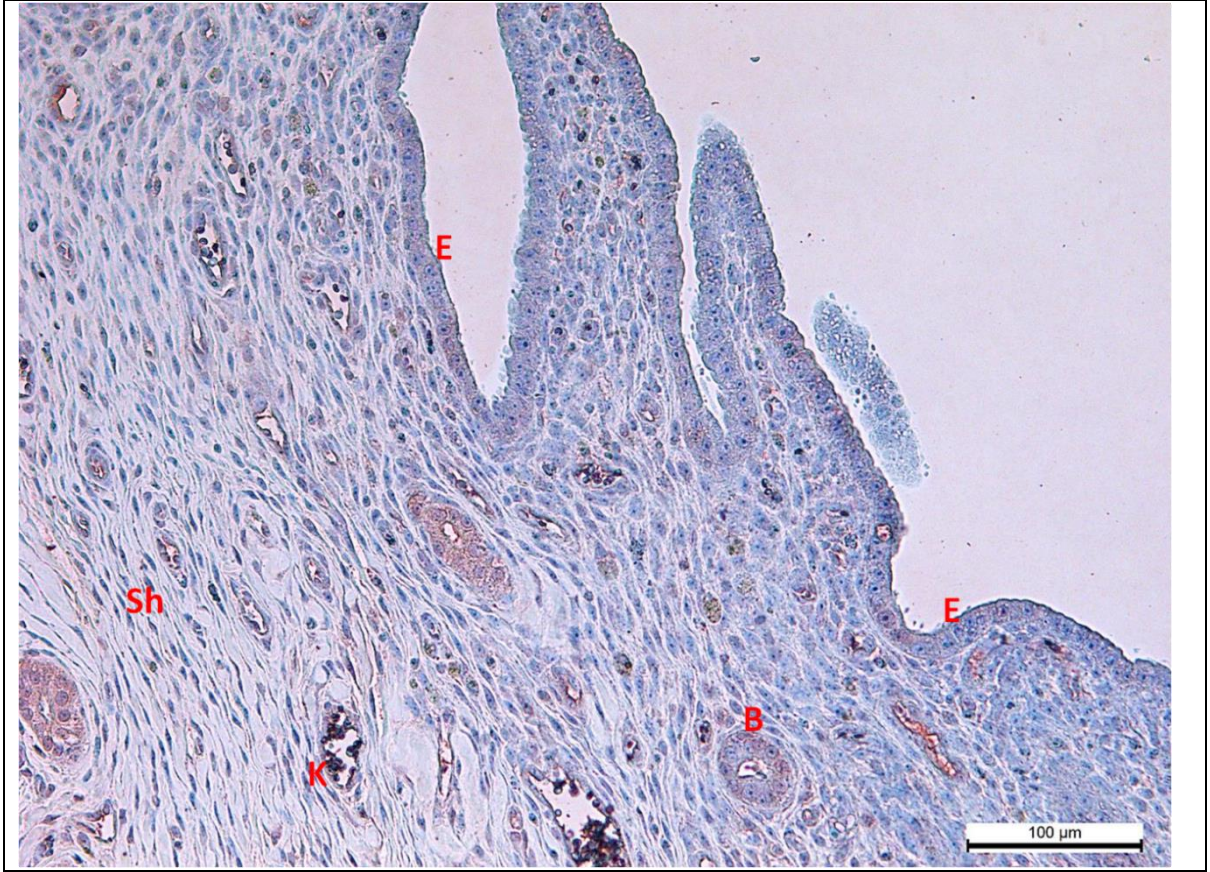
Resim 4.12. Folik asit eksiklik grubuna ait diöstrus uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Uterus yüzey epiteli (E), stromal hücrelerde zayıf reaksiyon (★), stromal hücrelerde orta dereceli reaksiyon (→), Uterus lümeni (UL), Stromal hücreler (Sh). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen ,X40)



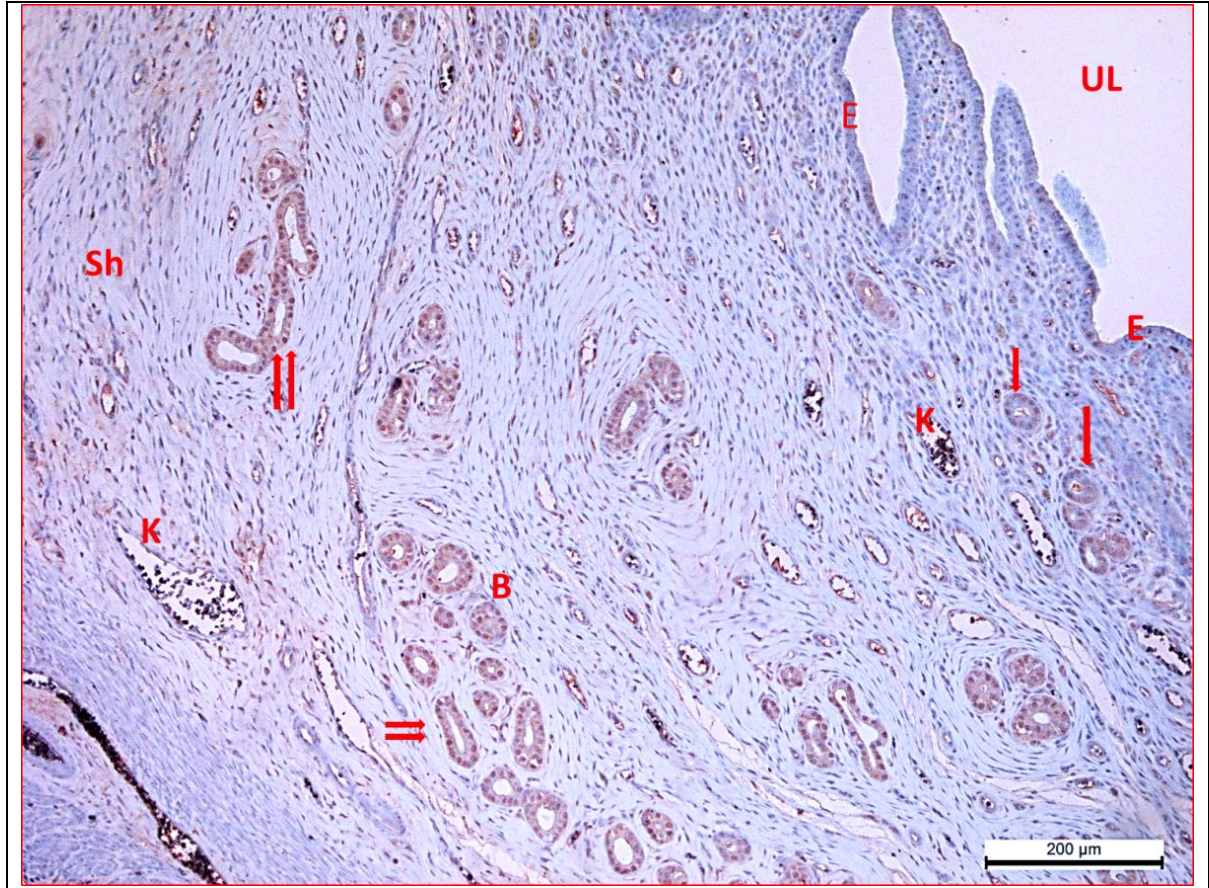
Resim 4.13. Folik asit eksiklik grubuna ait diöstrus uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Bez epiteli hücreleri (B), Kan damarı (K), stromal hücreler (Sh), uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X40)



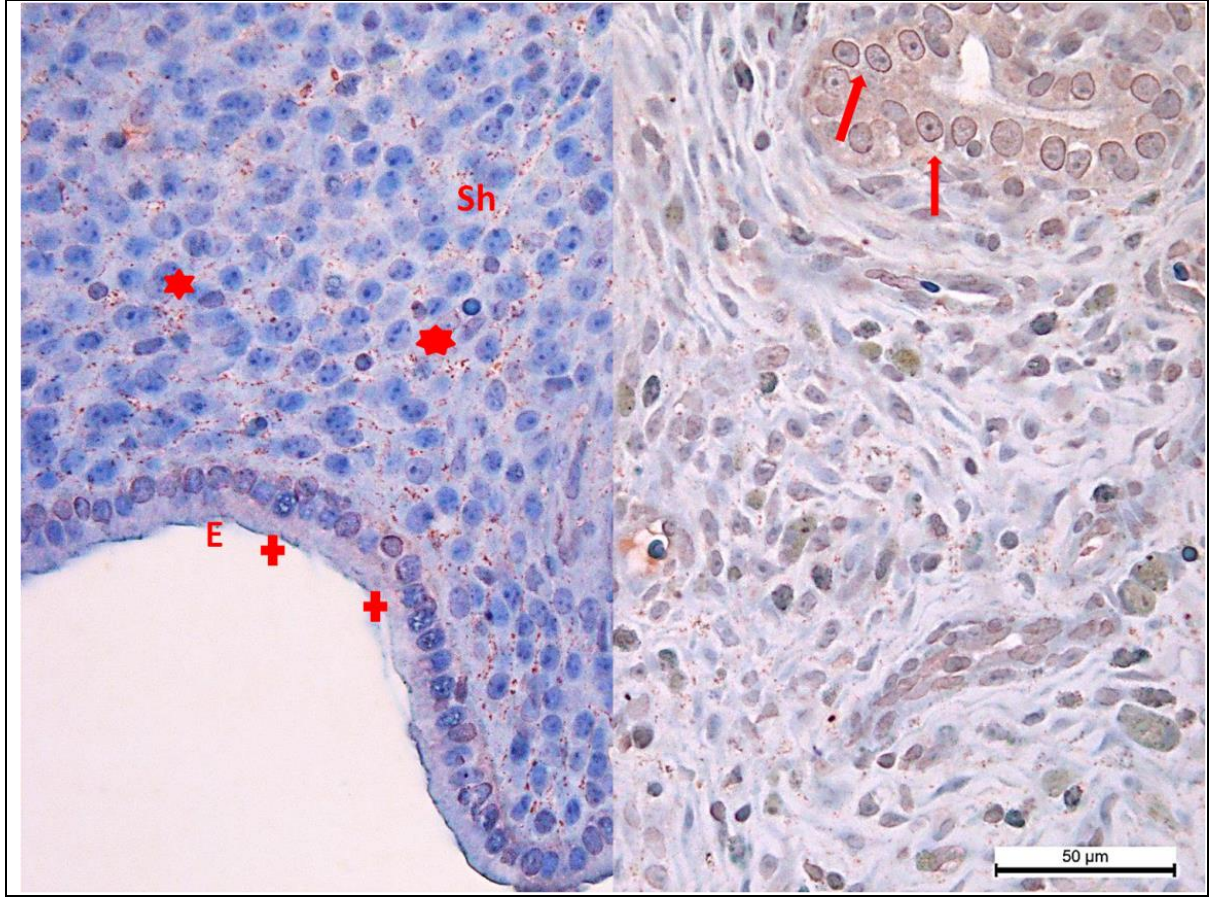
Resim 4.14. Folik asit eksiklik grubuna ait diöstrus sıçan uterus dokusunun E-kaderin primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Yüzey epiteli (E), stromal hücreler (Sh), miyometriyumun (M), Kan damarı (K), perimetriyum (P), uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X20)



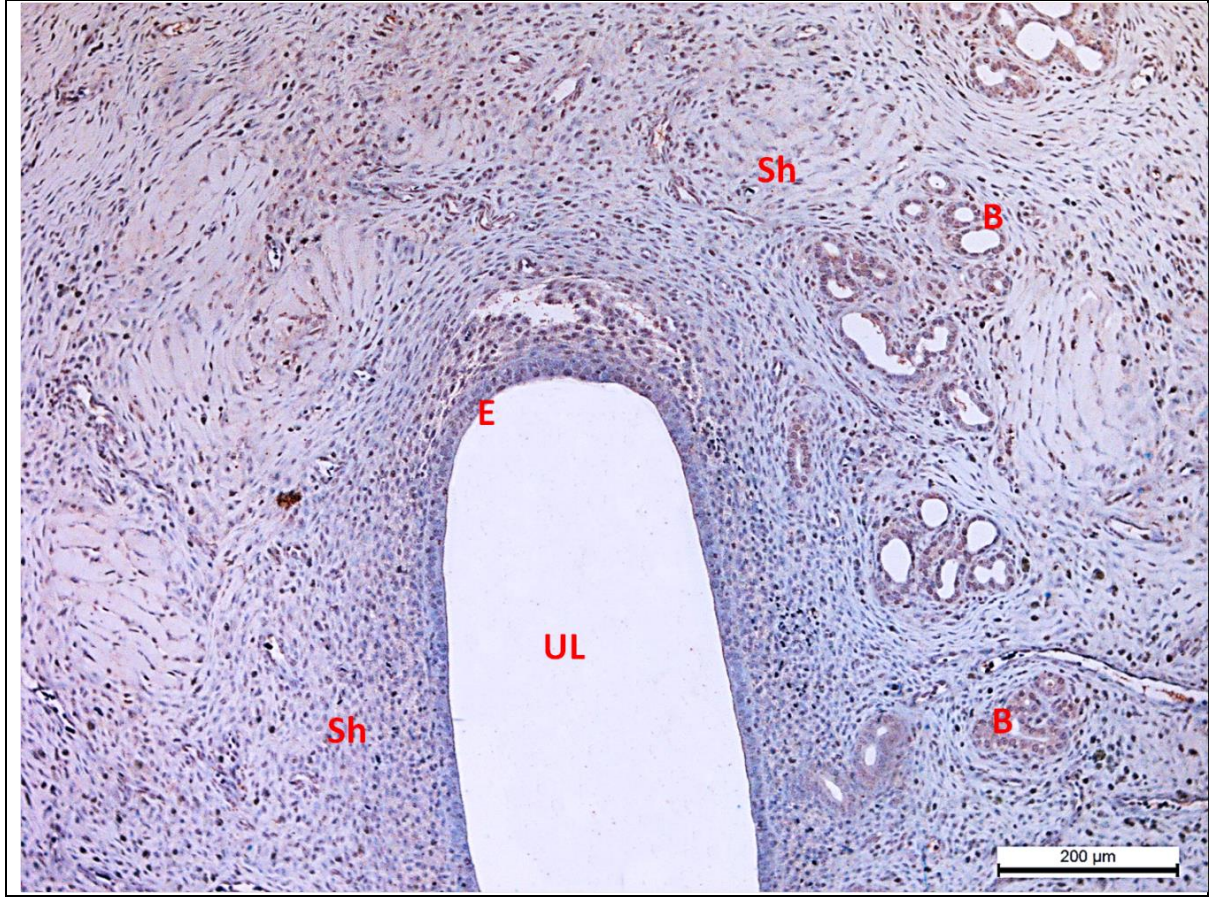
Resim 4.15. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması yüzey epiteli (E), uterus bezi (B), (kan damarı K), stromal hücreler (Sh) . (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X20)



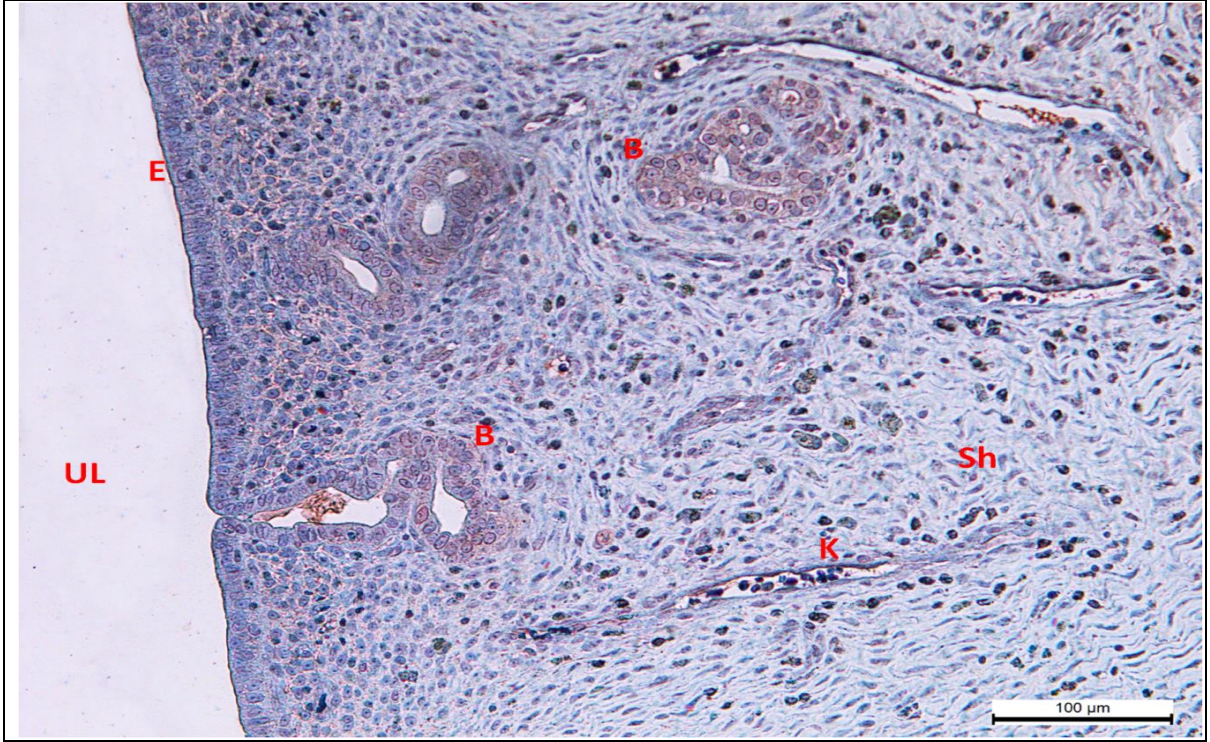
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması; Yüzey epiteli (E), uterus bezi (B), (kan damarı K). Derin uterus bezlerindeki immün boyanma ($\Rightarrow$), yüzey uterus bezlerindeki immün boyanma ($\rightarrow$) (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X10)



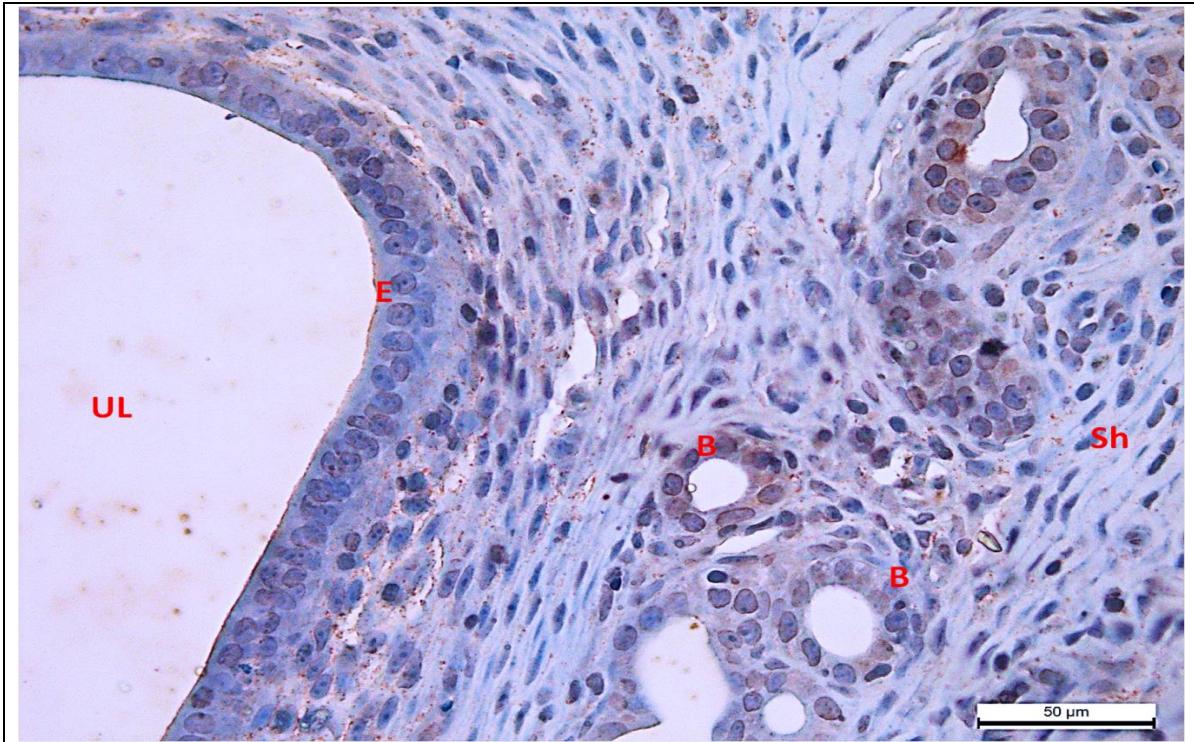
Resim 4.17. Kontrol grubuna ait diöstrus sıçan uterus dokusunun $\alpha 5 \beta 3$ primer antikoruna ile yapılan immunboyaması; Yüzey epiteli (E), stromal hücreler (Sh). $\alpha 5 \beta 3$ integrin immünreaktivitesi yüzey epiteli (E) hücrelerinde (+) orta dereceli, (→) derin bez epiteli hücrelerinde çekirdeklerde ve karyolemmada kuvvetli tutulum izleniyor. (★) Stromal hücrelerde (Sh) orta dereceli sitoplazmik $\alpha 5 \beta 3$ integrin immün tutulumu gözleniyor. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X40)



Resim 4.18. Folik asit eksikliği diöstrus sıçan uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması; yüzey epiteli (E), stromal hücreler (Sh), uterus bezi (B), uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X10)



Resim 4.19. Folik asit eksikliği diöstrus sıçan uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması; yüzey epiteli (E), stromal hücreler (Sh), uterus bezi (B), kan damarları (K), uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X10)



Resim 4.20. Folik asit eksikliği diöstrus sıçan uterus dokusunun $\alpha 5\beta 3$ primer antikoru ile yapılan immunboyaması; yüzey epiteli (E), stromal hücreler (Sh), uterus bezi (B), kan damarları (K), uterus lümeni (UL). (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X40)

4.3. İstatiksel Değerlendirme

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 16.0 analiz programı kullanılarak Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

Çizelge 4.1. İmmunohistokimya tanımlayıcı veriler

Parametre	Grup	Ortalama değer	Standart hata	Ortanca değer	Standart sapma	En düşük değer	En yüksek değer	p Değeri
Yüzey epiteli E-kaderin	Kontrol	1.2	0.374	1.0	0.837	0	2	0,662
	FA Eksiklik	1.0	0.258	1.0	0.632	0	2	
Yüzey epiteli α5β3 integrin	Kontrol	1.6	0.244	2.0	0.547	1	2	0,177
	FA Eksiklik	1.0	0.258	1.0	0.632	0	2	
Stroma E-kaderin	Kontrol	2.0	2.0	2.0	0.0	2	2	0,017
	FA Eksiklik	1.16	0.166	1.0	0.408	1	2	
Stroma α5β3 integrin	Kontrol	1.8	0.200	2.0	0.447	1	2	0,429
	FA Eksiklik	1.5	0.223	1.5	0.547	1	2	
Bez Epiteli E-kaderin	Kontrol	2.6	0.400	3.0	0.894	1	3	0,082
	FA Eksiklik	1.66	0.210	2.0	0.516	1	2	
Bez Epiteli α5β3 integrin	Kontrol	2.4	0.244	2.0	0.547	2	3	0,052
	FA Eksiklik	1.5	0.223	1.5	0.547	1	2	

Yapılan istatiksel analiz ve hesaplamalara göre, yüzey epitelinde E-kaderin immünreaktivitesi kontrol grubunda ($1.2 \pm 0,837$, Ortalama $\pm$ SS), folik asit eksikliği grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,662$). Stromada E-kaderin immünreaktivitesi kontrol grubunda ($2.0 \pm 0,00$, Ortalama $\pm$ SS), folik asit eksikliği grubuna göre yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,017$). Bez epitelinde E-kaderin immünreaktivitesi kontrol grubunda ($2.6 \pm 0,894$, Ortalama $\pm$ SS), folik asit eksikliği grubuna göre yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,082$).

Yüzey epitelinde α5β3 integrin immünreaktivitesi kontrol grubunda ($1.6 \pm 0,547$, Ortalama $\pm$ SS), folik asit eksikliği grubuna göre yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,177$). Stromada α5β3 integrin immünreaktivitesi kontrol grubunda ($1.8 \pm 0,447$, Ortalama $\pm$ SS), folik asit eksikliği grubuna göre yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır ($p=0,429$). Bez epitelinde $\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesi kontrol grubunda ($2.4 \pm 0,547$, Ortalama $\pm$ SS), folik asit eksikliği grubuna göre yüksek olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,052$).

5. TARTIŞMA

Embriyonun uterus endometriyumuna implantasyonu ve implantasyonun gerçekleştiği menstrüel siklusun geç luteal evresi ile ilişkili yapılan literatürde çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda birçok moleküler yolak, embriyonun implantasyonunun gerçekleştiği ve implantasyon penceresi olarak tanımlanan periyod ile ilişkilendirilmiştir. Blastokistin farklı insan dokularına implante olabilme yeteneğine sahip olduğu bilinse de bu fenomen normal menstrüel siklusun sadece 19-24. günleri arasında endometriyumda gerçekleşebilmektedir. İşte son derece önemli olan bu dönem “implantasyon penceresi” olarak tanımlanır ve insan endometriyumunun blastokistin tutunması için en uygun yapısal ve işlevsel değişimlerin gerçekleştiği süreyi tanımlamada kullanılır. İmplantasyon birbirini izleyen dönemlerden oluşmaktadır. Bunların sonuncusu olan adezyon evresinde invazif blastokistin lüminal epitele penetrasyonu gerçekleşir. Bu aşamada blastokist ve endometrium arasında yoğun bir etkileşim vardır, implantasyonda hücreler arası ve hücre dışı matriks etkileşimleri hücre yüzey adezyon molekülleri varlığında gerçekleşir. Bu yüzey adezyon moleküllerinden önde gelenleri; İntegrin, Kaderin, Selektin ve immünglobulinlerdir. Biz de çalışmamızda implantasyon penceresinin açık olduğu geç luteal evrede, $\alpha 5\beta 3$ integrin ve E-Kaderin’in folik asit eksikliğinde endometriyum yüzey ve bez epitelindeki olası değişimsel farklılıklarını histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemler ile araştırmayı hedefledik.

Folik asit önemli bir diyet vitaminidir ve insanlarda eksikliği çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. FA erken gebelik kayıpları ve tekrarlayan ani düşükler ile ilişkilendirilmiştir (Burren ve diğerleri, 2008). Serumda yüksek konsantrasyonlarda folat ve vitamin B-12 seviyelerinin, yardımcı üreme tekniklerinden sonra artan canlı doğum şansı ile ilişkili olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bulgular, gebelik öncesi folik asit desteğinin önemini göstermektedir (Gaskins, 2015; Boxmeer ve diğerleri, 2008).

FA alımı, fetal ve plasental gelişim açısından önemli olduğu kadar uzun sürede bireyin sağlık durumu için gereklidir. FA eksikliği, nöral tüp defekti (NTD) başta olmak üzere fetal patolojilerin oluşumunu uyarabileceğinden, birçok ülke gıdalarını FA ile güçlendirmek için kamu politikaları oluşturmuştur (Castaño ve diğerleri, 2017). Annenin beslenme durumu şüphesiz ki embriyonun gelişimini etkileyen

temel çevresel faktörlerden biridir. Folatlar başta olmak üzere B vitaminlerinin eksikliği, düşük doğum ağırlığı, erken doğumlar ve fetal malformasyonlar gibi gebelik sırasında oluşabilen bazı anomalilerle ilişkilendirilmiştir (Thaler, 2014; Badovinac ve diğerleri,2007). Nöral tüp defektleri (NTD) gebelik öncesi ve gebeliğin nöral tüpün kapanma evresine denk gelen ilk ayında gelişen, maternal folat eksikliğinin neden olduğu fetal gelişim anomalilerinden biridir (Fekete ve diğerleri, 2010).Folat, birçok metilasyon reaksiyonu için gerekli olan ve bir metil kaynağı olan S-adenosilmetiyonin'in sentezi için gereklidir. Bu özelliği ile DNA metilasyonunu da düzenler. Folat, ilişkili olduğu genetik bölgelerde hem DNA metilasyonunu hem de gen transkripsiyonunu açıkça etkilemektedir (Wasson ve diğerleri, 2006).

Munro ve diğerlerinin yaptığı araştırma, DNA metilasyon modelindeki değişikliklerin, endometriyal hücreleri işlevsel olarak değiştirebildiğini gösterir niteliktedir (Munro ve diğerleri,2010).

Ding ve diğerlerinin farelerde gerçek zamanlı PCR yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, DNA metiltransferazların (DNMT-1,-3A,-3B) uterus dokusunda gen ifadesini değerlendirmişlerdir. Çalışmada, FA eksik diyetle beslenen fareler ile kontrol grubu farelerden, gebeliğin 5. gününde alınan endometriyum dokularında DNMT'lerin gen ifadelerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, FA eksikliği oluşturulan grupta DNMT-1 ve DNMT-3A gen ifadelerinde belirgin bir artış olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca FA eksikliği olan farelerden alınan dokuların immünohistokimyasal değerlendirmesini yaptıklarında, DNMT-1 tutulumunun hem lümen hem de bez epitellerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında arttığını, buna karşın, DNMT3A'nın immün tutulumunun ise lümen epitelinde ve stromada arttığını göstermişlerdir. DNMT3B immün-boyanmasının ise bez epitelinde oldukça az bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar, DNMT'lerin uterus gen transkripsiyonu üzerindeki rollerinin, farelerde diyetle alınan FA desteğinden olumlu yönde etkilenebileceğini vurgulamışlardır (Ding ve diğerleri,2012).

Biz de çalışmamızda, FA eksikliğinin geç luteal evredeki dişi sıçanlarda, endometriyum yüzey epitelindeki olası etkilerini, $\alpha 5\beta 3$ integrin ve E-kaderin belirteçleriyle immünohistokimya yöntemiyle araştırdık.

Jha ve diğerleri yaptıkları çalışmada immünohistokimya ve Western Blot tekniklerini kullanmışlardır. Western Blot ile uterus dokusunda E-kaderin'in protein ifadesini değerlendirmişlerdir. Gebeliğin pre-implantasyon (gebeliğin 4. ve 5. günleri) ve post-implantasyon (gebeliğin 6. günü) evrelerinde olduğu bilinen sıçanlardan aldıkları uterus dokularında, E-kaderin protein ifadesinin pre-implantasyon evresinde uterusda, belirgin derecede arttığını post-implantasyonda ise azaldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, immünohistokimyasal yöntemlerle, pre-implantasyon evresindeki uterus endometriyumunun, farklılaşmış apikal yüzeyleri olan, belirgin prizmatik hücrelere sahip iyi gelişmiş bir endometriyal epitele sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin apikal yüzeylerinde, orta derecede E-kaderin tutulumunun olduğunu ancak bazal ve lateral membranlarda çok zayıf yerleşim gösterdiğini belirtirlerken, stromal hücrelerde ise güçlü immün tutulumdan söz etmişlerdir. Post-implantasyon uterus dokusunda ise endometriyum epitel hücrelerinin apikal kutbunda ve stromada immün tutulumun azaldığını tespit etmişlerdir (Jha ve diğerleri, 2006).

Çalışmamızın hem Hematoksilen-eozin hem de immünohistokimyasal değerlendirmesinde, Jha ve diğerlerinin gösterdiği şekilde kontrol grubunda sıçan uterus dokusu endometriyum yüzey epitelinin, kübikten prizmatığe doğru değişen tek katlı prizmatik epitel özelliğinde olduğunu gözlemledik. Ayrıca E-kaderin'in immünreaktivitesinin endometriyum yüzey epitelini oluşturan hücrelerin apikal kısımlarında kuvvetli membranöz tipde olduğunu tespit ettik.

Paria ve diğerleri, pre-implantasyon dönemindeki fare uterusunda epitel hücre bağlantılarıyla ilişkili iki molekül olan zonula okludens-1 (ZO-1) ve E-kaderin'i in situ hibridizasyon, Northern Blot ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirmişlerdir. Pre-implantasyon evresindeki uterus dokusunda endometriyum epitel hücrelerinin hem ZO-1 hem de E-kaderin mRNA'larını ifade ettiklerini Northern Blot yöntemiyle belirlerken aynı zamanda bu proteinlere ait mRNA'ların epitel hücrelerinde yerleşimlerini in situ hibridizasyon yöntemini

kullanarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, Zonula okludens-1 (ZO-1) ve E-kaderin'e ait mRNA'ları birlikte değerlendirdiklerinde, pre-implantasyon evresindeki sıçan uterusuna ait epitel hücrelerinde implantasyonun başlaması ve ilerlemesiyle birlikte, ZO-1 ve E-kaderin mRNA'larının primer desidual bölgenin stromal hücrelerinde ifade edildiğini ve yerleşim gösterdiğini de bu yöntemlerle saptamışlardır. Bu yöntemlerden elde ettikleri verileri destekleyecek şekilde, immünohistokimyasal yöntemleri de kullanarak E-kaderin'in endometriyumun yüzey epitelinin apikal yüzeyinde ve bazı epitel hücrelerinin ise lateral yüzeylerinde yerleşim gösterdiğini, ayrıca subepitelyal alanda ve implantasyon alanının çevresindeki stromal hücrelerde de yer aldığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda Paria ve diğerlerine benzer şekilde biz de E-kaderin tutulumunu geç luteal evredeki sıçan uterus epitelinde değerlendirmeyi amaçladık. Biz de benzer şekilde, kontrol grubuna ait uterus dokularında E-kaderin'in endometriyumun yüzey epitelini oluşturan hücrelerinin apikal membranlarında tutulum gösterdiğini izledik. Ek olarak, E-kaderin'in yüzey epiteli bazal membranının altında yer alan stromal hücrelerde de kuvvetli sitoplazmik tutulum olduğu çalışmamızda izlenirken, FA eksikliği oluşturulan deney modelimize ait uterus dokularında ise E-kaderin tutulumunun, hem yüzey epitelini oluşturan hücrelerin apikal yüzeylerinde hem de bazal membran altında yerleşim gösteren stromal hücrelerde zayıftan ortaya değişen tutulumda olduğunu, kontrol grubuna karşın tutulumun azaldığını gözlemledik.

Li ve diğerleri kalsiyum homeostazında rol oynayan bir hormon olan kalsitoninin, bir insan endometriyal adenokarsinoma hücre hattı olan Ishikawa hücrelerinde membran reseptörlerine bağlanmasından sonra gelişen hücresel olayları araştırmış ve bu hücrelerin kalsitonin ile muamelesi sonrasında kritik bir hücre adezyon molekülü olan E-kaderin'in hücre-hücre değinme bölgeleri olan epitel yan yüzlerindeki immünofloresan tutulumunun belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir. Bu bulgu doğrultusunda, kalsitonin'in implantasyon penceresi sırasında sıçan uterus dokusunda E-kaderin üzerindeki etkilerini de gerçek zamanlı PCR ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirmişlerdir. Gebe sıçanların uterus epiteli hücrelerinde, kalsitonin mRNA'sının saptanamadığı gebeliğin ilk 3 gününde, E-kaderin mRNA ifadesinin yüksek seviyelerde olduğunu,

buna karşılık gebeliğin 4-5. günlerinde ise kalsitonin ifadesinde geçici bir artışın olmasıyla birlikte E-kaderin mRNA düzeylerinin keskin bir şekilde azaldığını gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlemişlerdir. Ayrıca gebeliğin 1. gününde sıçan uterus dokusu epitel hücrelerinin hem lateral hem de apikal bölgelerinde E-kaderin'in kuvvetli immünreaktivite gösterdiğini, gebeliğin 4.gününde ise epitel hücrelerinin apikal bölgelerinde immün tutulumun çok az olduğunu buna karşın lateral bölgelerde ise negatif immünreaktivitenin izlendiğini belirlemişlerdir. Dolayısıyla bu bulgular, gerçek zamanlı PCR yöntemiyle elde ettikleri verileri destekler niteliktedir.

İmplantasyon penceresinin açık olduğu diöstrus evresinde yaptığımız çalışmamızda benzer şekilde çalışmamızın kontrol grubu kesitlerindeki E-kaderin immünohistokimya boyamasında endometriyum tek katlı prizmatik epitelinin, apikal hücre membranında kuvvetli tutulumunun görülmüş olması bu çalışmanın sonuçları ile korelasyon göstermektedir. Aynı bağlamda, FA eksiklik grubu uterus dokusu kesitlerinde, E-kaderin'in yüzey epiteli hücrelerinin apikal membranlarında immünreaktivitesi belirgin derecede azalmış, bazal membran altında yerleşim gösteren stromal hücrelerde de benzer şekilde immünreaktivitenin azaldığı çalışmamızda izlenmiştir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları ve tekrarlayan düşükler üreme biyolojisinin önemli araştırma konularındandır. Trofoblast hücrelerinin, çoğalma, göç ve kan desteği sağlama kapasiteleri gibi özellikleriyle kanser hücrelerine çarpıcı bir şekilde benzer fenotip sergilediklerini bilinmektedir. Bu iki fizyolojik sürecin birbiriyle karşılaştırılmasında birçok hücresel belirteç araştırılmıştır. Örneğin hem kanser hücreleri hem de trofoblastlar tarafından invazyon için kullanılan hücresel program, hücreden hücreye temas inhibisyonunun kaybına neden olmaktadır. Bu programla ilişkili olarak hücrelerde integrin gen ifadesindeki değişiklik ve E-kaderin'in kaybı, hücrede polarite kaybına ve hareketliliğin artmasına neden olmaktadır (Lamouille, Xu ve Derynck, 2014; Conrad ve diğerleri, 2019).

Ayrıca, Hox transkripsiyon faktörleri, kanser hücrelerinde ve benzer şekilde trofoblast hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-hücreler arası matriks adezyonunu düzenlemektedir. HOXA-10, Homeobox gen alt ailesinin bir üyesi olup iyi bilinen

bir transkripsiyonel düzenleyicidir. HOXA-10, erişkinde embriyonik gelişim ve fonksiyonel endometriyal farklılaşma sırasında uterus organogenezinde önemli bir rol oynar (Taniguchi, 2014).

Yang ve diğerleri, IVF sonrası tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan düşükleri olan kadınlar ile normal fertil kadınlardan oluşan kontrol grubunu, immünofloresan ve immünohistokimyasal yöntemlerle, HOXA-10 ve E-kaderin belirteçleri açısından değerlendirmişlerdir. Üç grupta da endometrium dokusundaki bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında E-kaderin immünreaktivitesi gösterilmiş ve bu belirtece ait tutulumun, üç grupta da benzer olduğu araştırmacılar tarafından izlenmiştir. Ancak bez epiteli hücrelerinin çekirdeklerinde E-kaderin tutulumundan söz etmemişlerdir. E-kaderin'in endometrium dokularındaki bu yerleşimi immünofloresan boyamalardan elde edilen bulgular ile de tutarlı bulunmuştur. HOXA-10 immünreaktivitesini ise her üç grupta stroma hücrelerinin çekirdeklerinde ve bez epitelinin sitoplazmasında gözlemlemişlerdir. Kontrol grubundaki deneklerle karşılaştırıldığında, tekrarlayan implantasyon ve tekrarlayan düşük gruplarında bulunan kadınlarda, bez epiteli sitoplazmalarında HOXA-10 immünreaktivitesinin önemli ölçüde daha düşük olduğunu ancak tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan düşük gruplarını HOXA-10 immünreaktivitesi açısından semi-kantitatif olarak değerlendirdikten sonra H-skor yöntemiyle birbirleriyle kıyasladıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını belirlemişlerdir. Bu bulgulara benzer şekilde, deney grupları ve kontrol grubunda, stroma hücrelerinin çekirdeklerinde HOXA-10 immünreaktivitesini kıyasladıklarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca kontrol grubuyla kıyasladıklarında her iki deney grubunda da E-kaderin immünreaktivitesinin anlamlı olarak azaldığını gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla HOXA-10 ve E-kaderin'in değişen immün tutulumlarının, üreme başarısızlığında etkin bir rol oynayabileceği sonucunu çıkarmışlardır (Yang ve diğerleri, 2017).

Yang ve diğerlerinin, tekrarlayan düşük yapan gruptaki bez epiteli hücre sitoplazmasındaki E-kaderin immünreaktivitesinin kontrol grubuna oranla belirgin derecede az olduğunu gösteren çalışmasına benzer olarak, bizim çalışmamızda da kontrol grubunda bez epiteli hücrelerinin hem sitoplazmaları hem de

membranlarında kuvvetli E-kaderin immünreaktivitesi görülmesine karşın, FA eksiklik grubunda E-kaderin immünreaktivitesinin azaldığı izlenmiştir. Yang ve diğerlerinin çalışmaları ile korele olarak, bizim çalışmamızda da E-kaderin tutulumunun hem kontrol grubunda hem de FA eksikliği oluşturulan grupta çekirdek tutulumu gözlemlenmemiştir.

Shih ve diğerleri tarafından yapılan, 30 normal ve 73 endometrial karsinoma tanısı almış iki grup arasındaki çalışmada, E-kaderin ve β -katenin tutulumları immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. E-kaderin'in normal grupta, endometrial bez hücrelerinde sitoplazmik tutulumunun, proliferatif dönemde arttığını ancak bu tutulumun endometriyumun sekretuar döneminde azaldığını göstermişlerdir. E-kaderin tutulumunun, endometriyumun hem fonksiyonel hem de bazal tabakalarında gözlemlendiğini, proliferatif ve erken sekretuar dönemlerdeki tutulumları arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermişlerdir. Stromal hücrelerin, proliferatif ve erken sekretuar dönemlerde, E-kaderin için pozitif immünreaktivite gösterdiğini, ancak pozitif immünreaktivitenin, orta ve geç sekretuar dönemlerde kaybolduğunu belirtmişlerdir. Yüzey epitel hücrelerinin menstrual döngü boyunca E-kaderin için pozitif boyanma gösterdiğini ve sekretuar dönemde boyanmada hafif bir baskınlık olduğunu tespit etmişlerdir. Endometrial karsinoma grubunda ise E-kaderin tutulumların bez epiteli hücrelerinde azaldığını göstermişlerdir. Sonuç olarak E-kaderin ve β -katenin'in normal endometriyum siklusundaki salgılanımlarının, endometrial yapıyı koruma süreci üzerine etkin olabileceğini belirtmişlerdir (Shih ve diğerleri, 2004).

Shih ve diğerleri tarafından yapılan ve E-kaderin tutulumunun proliferatif evrede immün pozitif olmasına karşın geç sekretuar evrede negatif olduğunu bildirir çalışmalarından farklı olarak biz ise çalışmamızda, geç sekretuar evrede uterus dokusu kesitlerinde yüzey ve bez epitel hücrelerinde E-kaderin tutulumunu kontrol grubumuzda immünpozitif olarak izlerken ancak bu reaksiyonun FA eksikliği grubunda oldukça azalmış olduğunu gözlemledik.

$\alpha 5 \beta 3$ integrin implantasyon penceresinin güçlü bir belirtecidir. İmplantasyon penceresi süresince bez epiteli hücrelerinde tutulum gösterir ve gebelik sırasında

endometriyal stromal hücrelerde yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (Germeyer ve diğerleri, 2014).

Trofoblastik ve malign hücreler tarafından sergilenen benzer göç ve invazyon mekanizmaları, $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 5\beta 3$ integrin reseptörlerinin artan tutulumları dahil olmak üzere, hücre adezyon moleküllerindeki fenotipik değişiklikleri içermektedir (Yoshida ve diğerleri, 2006).

Tuckerman ve diğerleri yaptıkları çalışmada, kontrol grubu olarak 29-39 yaşları arasındaki 16 fertil kadın ile 21-42 yaşları arasındaki açıklanamayan ve tekrarlanan düşük öyküsü olan 21 kadını immunohistokimyasal yöntemler ile menstrual siklusun farklı evrelerinde karşılaştırmışlardır. $\alpha 5\beta 3$ integrin'in normal fertil grupta immunohistokimyasal analizi sonucunda, proliferatif evrede, bez ve lümen epiteli hücrelerinde immünreaktivitesinin zayıf olduğunu göstermişlerdir. Sekretuar evrede ise, $\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesinin bez ve lümen epiteli hücrelerinde arttığını belirlemişlerdir. Sekretuar evrede bez ve lümen epitelinde boyanmanın iki şekilde olduğunu, ya epitel hücre hattı boyunca eşit olarak yayılmış ya da yüzey epitel hücrelerinin apikal yüzeyi boyunca küçük kümeler halinde bölgesel olarak immün-pozitif alanların olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca Stromal hücrelerde de yaygın bir immün tutulumun olduğunu tespit etmişlerdir. Orta-sekretuar evredeki stromal hücrelerin küçük ve bireysel formda ve lenfatik hücre kümeleriyle çevrili olarak immün-boyandığını göstermişlerdir. Açıklanamayan tekrarlanan düşük grubunu ile kontrol grubu immunohistokimyasal değerlendirmelerinin benzerlik sergilediğini tespit eden araştırmacılar $\alpha 5\beta 3$ integrin'in açıklanamayan tekrarlayan düşüklerin patogenezinde rol oynamadığı kanısına varmışlardır (Tuckerman ve diğerleri, 2006).

Başka bir çalışmada Elnaggar ve diğerleri, $\alpha 5\beta 3$ integrin'in endometriyal tutulumunun, açıklanamayan infertilitesi olan ve normal fertil kadınlar arasında farklılık gösterip göstermediği araştırılmıştır. $\alpha 5\beta 3$ integrin'in immünreaktivitesi, 0 -3 arasında skorlama yapılarak semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir: (-) immünreaktivite yok, (+) zayıf immünreaktivite, (++) orta dereceli immünreaktivite, (+++) kuvvetli immünreaktivite olacak şekilde skorlanmıştır. Fertil grupta yapılan immunohistokimyasal değerlendirme sonucunda hem bez epiteli hem de lümen

epitelinde $\alpha\beta3$ -integrin'in kuvvetli immünreaktivite (+++) gösterdiği, açıklanamayan infertilitesi olan grupta ise zayıf immünreaktivite (-) gözlemlendiği belirtilmiştir.

$\alpha5\beta3$ -integrin tutulumu açıklanamayan infertilite olgularında endometriyumda önemli ölçüde daha düşüktür. Bu durum $\alpha5\beta3$ integrin'in insan endometriyumunda yetersiz tutulumunun, kusurlu uterin alıcılıkla bağlantılı olabileceğini ve kadınlarda tanımlanamayan bir kısırlık nedeni olarak rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Elnaggar ve diğerleri, 2017).

Kimmins ve diğerlerinin, gebe sığır ve koyun endometriyumunda $\alpha5\beta3$ integrin ve osteopontin immünreaktivitelerinin, embriyo implantasyonu süresince etkileşimini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada lümen epiteli, stroma, miyometriyum ve düz kasta $\alpha5\beta3$ integrin tutulumunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada koyun endometriyumunda $\alpha5\beta3$ integrin tutulumunun, sığır endometriyumu $\alpha5\beta3$ tutulumuna karşın farklılıkları olduğunu gözlemlemişlerdir. Koyunlarda, lümen epitelinde veya trofoblastlarda immünreaktivitenin olmadığını belirtmişlerdir. Derin bez epiteli hücrelerinde güçlü immünreaktivite gözlemlendiğini, yüzeysel bezlerde immünreaktivitenin olmadığını buna karşın her iki cinste de aynı olacak şekilde osteopontin immün-tutulum dağılımının koyun ve sığır endometriyumu için benzer şekilde olduğunu belirtmişlerdir. Her iki tür için de lümen epitelinde, bez epitelinde ve embriyonik dokularda apikal bölgelerde osteopontin immünreaktivitesinin olduğunu bildirmişlerdir (Kimmins, Lim ve MacLaren, 2004).

Çalışmamızda Kimmins ve diğerlerinin sığır endometriyumundaki bulgularına benzer şekilde geç luteal evre sıçan uterus dokusu kontrol grubunda, derin endometriyum bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli $\alpha5\beta3$ integrin immün tutulumunun olduğu dikkati çekmiştir.

Şahin ve diğerlerinin çinkonun gebe sıçan endometriyumunda, pre-implantasyon döneminde, $\alpha5\beta5$ integrin ve vitronektin tutulumlarındaki etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, kontrol grubu ile gebeliğinin ilk 5 günü boyunca çinko uygulaması yapılan grubu karşılaştırmışlar. Çinko uygulaması yapılan grupta özellikle endometriyal bez epitel hücrelerinin bazal membranlarında $\alpha5\beta5$ integrin

tutulumların immünreaktivitesinin belirgin oranda arttığını tespit etmişlerdir. Kontrol grup ile çinko uygulanan grubun her ikisinde de endometriyum yüzey epitel hücrelerinde ve bez epiteli hücrelerinde $\alpha 5\beta 5$ integrin tutulumlarının olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca $\alpha 5\beta 5$ integrin'in çinko grubunda hücreler arası matriksde güçlü immünoreaktivitesini belirlemişlerdir. Çinko kullanımının implantasyon başarısında önemi olabileceğini belirtmişlerdir (Guzmán ve diğerleri, 2006). $\alpha 5\beta 5$ integrin, $\alpha 5\beta 3$ integrin ile benzer işleve sahiptir (Tokmak ve Sarıkaya, 2015).

Tei ve diğerlerinin, endometrial $\alpha 5\beta 3$ integrin tutulumu ile tekrarlayan IVF başarısızlıkları arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek ve Danazol tedavisinin $\alpha 5\beta 3$ integrin tutulumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 10 fertil kadın ve 57 infertil hastadan elde edilen orta-sekretuar evrede, endometriyumdaki $\alpha 5\beta 3$ integrinin semi-kantitatif olarak immünohistokimyasal değerlendirmesini yapmışlardır. Açıklanamayan infertilitesi olan 22 hastadan rastgele seçilen 9 hasta daha sonra 12 hafta boyunca oral Danazol uygulaması ile tedavi edilmiş ve Danazol tedavisinden sonraki ilk orta-sekretuar fazda yeniden muayene edilmiştir. Açıklanamayan infertilitesi olan 22 hastada endometriyal $\alpha 5\beta 3$ integrinin tutulum seviyeleri, fertil kontrol grubuna göre ve açıklanmış infertilitesi olan 35 hastaya göre daha düşük bulunmuştur. Danazol ile tedavi edilen 9 hastada ise, $\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Kontrol fertil kadınlardan elde edilen endometriyumun immünohistokimyasında, integrinin proliferatif ve erken sekretuar evre sırasında stromada güçlü bir şekilde tutulum gösterdiği, ancak lümen ve bez epitelinde oldukça zayıf tutulumunun olduğu, bunun tam tersi olarak da orta-sekretuar fazda lümen ve bez epitellerinde belirgin tutulum olduğu görülmüş, stromada ise tutulum gözlenmemiştir. Kontrol grubunda ise, menstrual siklus boyunca $\alpha 5\beta 3$ integrinin vasküler endotel boyunca sabit düzeyde bir tutulumu olduğu gösterilmiştir. Açıklanabilen infertilitesi olan hastalara ait dokular immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, bez epitelinde normal, endometriyal damarlarda kuvvetli immünreaktivite gözlenmiştir. Açıklanamayan infertil vakalarda ise bez epiteli hücrelerinde oldukça zayıf immünreaktivite gözlenmiştir. Açıklanamayan infertilitesi olan 22 hastada epitelyal $\alpha 5\beta 3$ integrin tutulumu fertil hastalardakilere oranla önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlenmiştir. Danazol tedavisinden sonra ise bezlerde immün-boyanma yoğunluğunun arttığını gözlemlemişlerdir (Tei ve diğerleri, 2003).

Çalışmamızda Tei ve diğerlerinin orta-sekretuar fazdaki bulgularına benzer şekilde, geç sekretuar evrede yaptığımız immün-boyamalarda, $\alpha 5\beta 3$ integrin tutulumların, endometriyal tek katlı prizmatik yüzey epitelini oluşturan hücrelerin apikal ve bazal bölgelerine yakın yerleşimli sitoplazmalarında, zayıftan ortaya doğru değişen yoğunlukta olduğunu gözlemledik. Tei ve diğerleri, $\alpha 5\beta 3$ integrin tutulumunun vasküler endotel boyunca sabit seviyede tespit ederken biz de çalışmamızda endometriyumun fonksiyonel tabakasında yer alan kapillerlerin duvarını çevreleyen endotel hücrelerinde orta dereceli sitoplazmik $\alpha 5\beta 3$ integrin immünreaktivitesi bulunduğunu gözlemledik. Tei ve diğerlerinden farklı olarak yüzey epitelinin altında yer alan stromal hücrelerde ise orta dereceli sitoplazmik $\alpha 5\beta 3$ integrin immün tutulumunun olduğunu tespit ettik.

Choi ve diğerlerinin Benzoik asit (BA) ile yaptığı benzer bir çalışmada, lösemi inhibitör faktöre (LIF) bağlı $\alpha 5\beta 3$ integrin ve $\beta 5$ integrin sentezinin dokuda artmasıyla endometriyal alıcılığın yükselmesine, benzoik asitin katkısı gösterilmiştir. Çeşitli bitkilerin bir bileşeni olan benzoik asit, antifungal ve antioksidan etkileri olan basit bir aromatik karboksilik asittir. Yapılan çalışmalar insan, tavşan, fare dahil implantasyon penceresi döneminde, uterus epitelinde, uterus bezlerinde ve endometriyal stromal hücrelerinde LIF sentezinin dokuda arttığını göstermiştir. Bu çalışmada benzoik asitin, LIF'e bağlı $\alpha 5\beta 3$ integrin mRNA gen ifadesindeki artışını gerçek zamanlı PCR ve Western Blot yöntemleriyle tespit etmişler. BA'in LIF'e bağlı dolaylı bir mekanizma aracılığıyla adezyon moleküllerinin dokuda sentezini arttırdığını ve bu durumun endometriyal alıcılık üzerine pozitif etkisinin olabileceği kanısına varmışlardır (Choi ve diğerleri, 2017).

Biz de endometriyal reseptivite açısından oldukça önemli bir bileşen olan FA' in implantasyon penceresinin açık olduğu ileri sekretuar dönemde $\alpha 5\beta 3$ integrin tutulumu yani dokudaki $\alpha 5\beta 3$ sentezinin ve yerleşiminin etkisine/değişkenliğine olabilecek etkisini araştırdığımız çalışmamızda, Choi ve diğerlerinin kullandıkları antioksidan BA gibi FA'in de $\alpha 5\beta 3$ immün tutulumunu pozitif yönde etkilediğini gözlemledik.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda geç luteal faz evresindeki sıçan uterus dokusunda yaptığımız histokimyasal, E-kaderin ve $\alpha\beta 3$ -integrin immün belirteçleri ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda FA eksikliğinin endometriyum yüzey, bez epiteli ve stromal hücrelerin immünoreaktivitesinde değişikliklere sebep olabileceği tespit edildi.

Sonuç olarak, endometriyal reseptivitenin günümüzde halen araştırmaya açık bir konu olduğu görülmektedir. Güncel bilgilerimiz bazı potansiyel biyoışaretleyiciler üzerinde yoğunlaşmıştır. Halen devam eden bir çok antioksidan ve benzeri biyolojik materyallerin endometriyum morfolojisinin korunması ve işlevinin sürekliliğinin olumlu yönde devamının sağlanması üzerine yoğunlaşmış olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da FA'in endometriyum morfolojisinin ve işlevselliğinin devamı üzerinde olumlu etkisinin olabileceği yapılan histokimya ve immünohistokimya analizleri ile görülmüş olmakla birlikte bu konuda halen daha fazla çalışmalara ve internasyonal konsensus kararlarına gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Arıncı, K. ve Elhan, A. (2001). *Anatomi* (3. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi, 340-345
- Badovinac, R. L., Werler, M. M., Williams, P. L., Kelsey, K. T., and Hayes, C. (2007). Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: A meta-analysis. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 79(1), 8-15.
- Bahar, L. (2015). Comparison of endometrial biopsies of fertile women and women with repeated failure at ultrasucturel level. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45, 706-713.
- Bailey, L. B., and Gregory III, J. F. (1999). Folate metabolism and requirements. *The Journal of Nutrition*, 129(4), 779-782
- Basak, S., Dhar, R., and Das, C. (2002). Steroids modulate the expression of $\alpha 4$ integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1784-1789.
- Birn, H. (2006). The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: Characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(1), 22-36.
- Bowen, J. A., Bazer, F. W., and Burghardt, R. C. (1996). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biology of Reproduction*, 55(5), 1098-1106.
- Boxmeer, J. C., Brouns, R. M., Lindemans, J., Steegers, E. A., Martini, E., Macklon, N. S., and Steegers-Theunissen, R. P. (2008). Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. *Fertility and Sterility*, 89(6), 1766-1770.
- Burren, K. A., Savery, D., Massa, V., Kok, R. M., Scott, J. M., Blom, H. J., and Greene, N. D. (2008). Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Human Molecular Genetics*, 17(23), 3675-3685.
- Canha-Gouveia, A., Prieto-Sánchez, M. T., Sánchez-Ferrer, M. L., Mollá, M., Martínez-Soto, J. C., París-Oller, E., Soriano-Úbeda, C., Landeras, J., and Coy, P. (2021). Physicochemical and functional characterization of female reproductive fluids: a report of the first two infants born following addition of their mother's fluids to the embryo culture media. *Frontiers in Physiology*, 12.
- Castaño, E., Piñuñuri, R., Hirsch Birn, S., and Ronco Macchiavello, A. M. (2017). Folate and Pregnancy, current concepts. It is required folic acid supplementation? *Revista Chilena de Pediatría*, 88(2), 199-206.
- Cheong, Y., Boomsma, C., Heijnen, C., and Macklon, N. (2013). Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1093-1099.

- Choi, H. J., Chung, T. W., Park, M. J., Kim, H. S., You, S., Lee, M. S., and Ha, K. T. (2017). Benzoic Acid Enhances Embryo Implantation through LIF-Dependent Expression of Integrin $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 5\beta 5$. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 668-677.
- Conrad, C., Benzel, J., Dorzweiler, K., Cook, L., Schlomann, U., Zarbock, A., and Bartsch, J. W. (2019). ADAM8 in invasive cancers: links to tumor progression, metastasis, and chemoresistance. *Clinical Science*, 133(1), 83-99.
- Develioglul, O. H., Hsiu, J. G., Nikas, G., Toner, J. P., Oehninger, S., and Jones Jr, H. W. (1999). Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertility and Sterility*, 71(6), 1040-1047.
- Dharmaraj, N., Gendler, S. J., and Carson, D. D. (2009). Expression of human MUC1 during early pregnancy in the human MUC1 transgenic mouse model. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1182-1188.
- Dimitriadis, E., Nie, G., Hannan, N. J., Paiva, P., and Salamonsen, L. A. (2009). Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3), 313-322.
- Ding, Y. B., He, J. L., Liu, X. Q., Chen, X. M., Long, C. L., and Wang, Y. X. (2012). Expression of DNA methyltransferases in the mouse uterus during early pregnancy and susceptibility to dietary folate deficiency. *Reproduction*, 144(1), 91.
- Dudek, R. W. (2011). *High-Yield Gross Anatomy* (4th Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 165.
- Dudek, R. W. (2014). *BRS Embryology* (6th Edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 169-190.
- Elgamal, D. A., Othman, E. E. R., and Ahmed, S. F. (2016). Ultrastructural features of eutopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4(1), 20-27.
- Elnaggar, A., Farag, A. H., Gaber, M. E., Hafeez, M. A., Ali, M. S., and Atef, A. M. (2017). AlphaVBeta3 Integrin expression within uterine endometrium in unexplained infertility: a prospective cohort study. *BMC Women's Health*, 17(1), 1-9.
- Emily, J. (2018). Adhesion in physiological, benign and malignant proliferative states of the endometrium microenvironment and the clinical big picture. *Cells*, 7(5), 43.
- Fekete, K., Berti, C., Cetin, I., Hermoso, M., Koletzko, B. V., and Decsi, T. (2010). Perinatal folate supply: relevance in health outcome parameters. *Maternal & Child Nutrition*, 6, 23-38.

- Francis, L. W., Yao, S. N., Powell, L. C., Griffiths, S., Berquand, A., Piasecki, T., Howe, W., Gazze, A. S., Farach-Carson, M. C., Constantinou, P., Carson, D., Margarit, L., Gonzalez, D., and Conlan, R. S. (2021). Highly glycosylated MUC1 mediates high affinity L-selectin binding at the human endometrial surface. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-13.
- Gao, R., Ding, Y., Liu, X., Chen, X., Wang, Y., Long, C., and He, J. (2012). Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of Esr1, Cdh1 and Pgr, and its influence on endometrial receptivity and embryo implantation. *Human Reproduction*, 27(9), 2756-2765.
- Gartner, L. P. (2019). *Cell Biology and Histology* (8th Edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 348.
- Gaskins, A. J., Chiu, Y. H., Williams, P. L., Ford, J. B., Toth, T. L., Hauser, R., and Chavarro, J. E. (2015). Association between serum folate and vitamin B-12 and outcomes of assisted reproductive Technologies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(4), 943-950.
- Germeyer, A., Savaris, R. F., Jauckus, J., and Lessey, B. (2014). Endometrial beta3 integrin profile reflects endometrial receptivity defects in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1-5.
- Gipson, I. K., Blalock, T., Tisdale, A., Spurr-Michaud, S., Allcorn, S., Stavreus-Evers, A., and Gemzell, K. (2008). MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biology of reproduction*, 78(1), 134-142.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., and Taylor, H. S. (2009). The role of growth factors and cytokines during implantation: Endocrine and paracrine interactions. *Seminars in Reproductive Medicine* 27(1), 62-79.
- Guzmán, P., Araya, J., Villaseca, M., Roa, I., Melo, A., Muñoz, S., and Roa, J. (2006). Immunohistochemical expression of the E-cadherin-catenin complex in gastric cancer. *Revista Medica de Chile*, 134(8), 1002-1009.
- Illingworth, I. M., Kiszka, I., Bagley, S., Ireland, G. W., Garrod, D. R., and Kimber, S. J. (2000). Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1764-1773.
- Jha, R. K., Titus, S., Saxena, D., Kumar, P. G., and Laloraya, M. (2006). Profiling of E-cadherin, β -catenin and Ca^{2+} in embryo–uterine interactions at implantation. *FEBS Letters*, 580(24), 5653-5660.
- Kayhan, H. Z. (2018). *Hipotiroidik Sıçanlarda Arı Sütü Takviyesinin Uterus Üzerindeki Olası Koruyucu Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 7-8
- Kayisli, Ö. (2007). Basic aspects of implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(6), 728-739.

- Kelsey, E. (2020). Pinopodes recent advancements, current perspectives, and future directions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 501, 110644.
- Kierszenbaum, A. L. (2020). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* (5th Edition). Philadelphia: Saunders Publishing, 737.
- Kim, S. M., and Kim, J. S. (2017). A review of mechanisms of implantation. *Development and Reproduction*, 21(4), 351.
- Kimmins, S., Lim, H. C., and MacLaren, L. A. (2004). Immunohistochemical localization of integrin alpha V beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1-13.
- Kurek, A. (2021). Methods for studying endometrial pathology and the potential of atomic force microscopy in the research of endometrium. *Cells* 10(2), 219.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178-196.
- Liao, X. G., Li, Y. L., Gao, R. F., Geng, Y. Q., Chen, X. M., Liu, X. Q., Ding, Y. B., Mu, X. Y., Wang, Y. X., and He, J. L. (2015). Folate deficiency decreases apoptosis of endometrium decidual cells in pregnant mice via the mitochondrial pathway. *Nutrients*, 7(3), 1916-1932.
- Matson, B. C., Pierce, S. L., Espenschied, S. T., Holle, E., Sweatt, I. H., Davis, E. S., and Caron, K. M. (2017). Adrenomedullin improves fertility and promotes pinopodes and cell junctions in the peri-implantation endometrium. *Biology of Reproduction*, 97(3), 466-477.
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap*. S. Çolakoğlu (Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 420-424, 462-470.
- Mikołajczyk, M., Skrzypczak, J., and Wirstlein, P. (2011). No correlation between pinopode formation and LIF and MMP2 expression in endometrium during implantation window. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(4), 615-621.
- Munro, S. K., Farquhar, C. M., Mitchell, M. D., and Ponnampalam, A. P. (2010). Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 16(5), 297-310.
- Nejatbakhsh, R., Kabir-Salmani, M., Dimitriadis, E., Hosseini, A., Taheripanah, R., Sadeghi, Y., Akhimoto, Y., and Iwashita, M. (2012). Subcellular localization of L-selectin ligand in the endometrium implies a novel function for pinopodes in endometrial receptivity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-9.
- Nikas, G. (2000). Endometrial receptivity: Changes in cell-surface morphology. *Seminars in Reproductive Medicine* 18(3), 229-236.
- Paria, B. C. (1993). Blastocyst's state of activity determines the window of implantation in the receptive mouse uterus. *Developmental Biology* 90(21), 10159-10162.

- Qian, Z. D., Weng, Y., Wang, C. F., Huang, L. L., and Zhu, X. M. (2017). Research on the expression of integrin $\beta 3$ and leukaemia inhibitory factor in the decidua of women with cesarean scar pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 17(1), 1-8.
- Rodwell, W. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., and Weil, P. A. (2019). *Harper'in Resimli Biyokimyası*. D. Yücel (Çev.). Ankara: Güneş Kitabevi, 1294-1314.
- Ross, M. H., and Pawlina, W. (2016). *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 850.
- Sadler, T. W. (2017). *Medikal Embriyoloji*. A. C. Başaklar (Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 14-278.
- Schröder-Heurich, B., Springer, C. J. P., and von Versen-Höynck, F. (2020). Vitamin D effects on the immune system from periconception through pregnancy. *Nutrients*, 12(5), 1432.
- Shane, B. (2008). Folate and vitamin B12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food and Nutrition Bulletin*, 29(2), 5-16.
- Shih, H. C., Shiozawa, T., Miyamoto, T., Kashima, H., Feng, Y. Z., Kurai, M., and Konishi, I. (2004). Immunohistochemical expression of E-cadherin and β -catenin in the normal and malignant human endometrium: an inverse correlation between E-cadherin and nuclear β -catenin expression. *Anticancer Research*, 24(6), 3843-3850.
- Singh, H., and Aplin, J. D. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of Anatomy*, 215(1), 3-13.
- Spornitz, U. M., Socin, C. D., and Dravid, A. A. (1999). Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 254(1), 116-126.
- Standring S. (2016). *Gray's Anatomy-The Anatomical Basis of Clinical Practice* (41st Edition). New York: Elsevier, 1294.
- Stavreus-Evers, A., Nikas, G., Sahlin, L., Eriksson, H., and Landgren, B. M. (2001). Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertility and Sterility*, 76(4), 782-791.
- Taniguchi, Y. (2014). Hox transcription factors: modulators of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion. *BioMed Research International*, 12.
- Tanski, D., Skowronska, A., Tanska, M., Lepiarczyk, E., and Skowronski, M. T. (2021). The in vitro effect of steroid hormones, arachidonic acid, and kinases inhibitors on aquaporin 1, 2, 5, and 7 gene expression in the porcine uterine luminal epithelial cells during the estrous cycle. *Cells*, 10(4), 832.

- Tei, C., Maruyama, T., Kuji, N., Miyazaki, T., Mikami, M., and Yoshimura, Y. (2003). Reduced expression of $\alpha v\beta 3$ integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20(1), 13-20.
- Thaler, C. J. (2014). Folate metabolism and human reproduction. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 74(09), 845-851.
- Tokmak, A., ve Sarıkaya, E. (2015). Mülleryan Kanal Anomalileri. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 12(2), 83-88.
- Tuckerman, E. M., Laird, S. M., Prakash, A., and Li, T. C. (2006). Expression of integrins in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, 86(3), 755-757.
- Vamberto O. A. (2015) Matrix metalloproteinases 2 and 9 and e-cadherin expression in the endometrium during the implantation window of infertile women before in vitro fertilization treatment. *Reproductive Sciences*, 22(4), 416-422
- Vasudevan, D. M., Sreekumari, S., and Vaidyanathan, K. (2019). *Textbook of Biochemistry for Medical Students*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 400-401
- Wadehra, M., Forbes, A., Pushkarna, N., Goodglick, L., Gordon, L. K., Williams, C. J., and Braun, J. (2005). Epithelial membrane protein-2 regulates surface expression of $\alpha v\beta 3$ integrin in the endometrium. *Developmental Biology*, 287(2), 336-345.
- Wadehra, M., Iyer, R., Goodglick, L., and Braun, J. (2002). The tetraspan protein epithelial membrane protein-2 interacts with $\beta 1$ integrins and regulates adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 41094-41100.
- Wasson, G. R., McGlynn, A. P., McNulty, H., O'Reilly, S. L., McKelvey-Martin, V. J., McKerr, G., and Downes, C. S. (2006). Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *The Journal of Nutrition*, 136(11), 2748-2753.
- Yang, Y., Chen, X., Saravelos, S. H., Liu, Y., Huang, J., Zhang, J., and Li, T. C. (2017). HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, 107(1), 136-143.
- Yanli, L., Gao, R., Liu, X., Chen, X., Liao, X., Geng, Y., Ding, Y., Wang, Y., and He, J. (2015). Folate deficiency could restrain decidual angiogenesis in pregnant mice. *Nutrients*, 7(8), 6425-6445.
- Yoshida, H., Broadbuss, R., Cheng, W., Xie, S., and Naora, H. (2006). Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research*, 66(2), 889-897.
- Zhou, W., Santos, L., and Dimitriadis, E. (2020). Characterization of the role for cadherin 6 in the regulation of human endometrial receptivity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 1-10.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 10.01.2022-E.258902



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-258902
Konu : Değerlendirme ve Onay

10.01.2022

Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Çiğdem ELMAS, Yasemin ÖZSOY, Elif Seda ÖZDEMİR, Deniz İrem BULUT'tan oluşan, G.Ü.ET-22.005 kod numaralı ve "*Gebe Sıçanlarda Folik Asit Eksikliğinin Endometriyum Yüzey Epiteli Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-22.005 and entitled "*Effect of Follic Acid Deficiency on Endometrial Surface Epithelium in Pregnant Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

G.Ü.ET- 20.062 kod numaralı "Sıçanlarda Prekonsepsiyonel Folik Asit Takviyesinin İmplantasyon Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi" başlıklı çalışmada kullanılan 32 adet Rat Wistar Albinonun uterus dokuları kullanılacaktır.

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSMCMP88M2

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 10.01.2022 E.256903

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 10/12/2021		TOPLANTI SAYISI : 08	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : ÖZSOY, Yasemin
Uyruğu : T. C

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	1996
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2013-devam ediyor	Acıbadem Labmed –Ankara Doku Tipleme Laboratuvarı	Bio.Analiz Sorumlusu

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

