

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

**EMBRİYONUN ENDOMETRİUMA İMPLANTASYONUNDA
MİKRORNA200-C'NİN ROLÜ**

**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Ayşe AKGÜN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin METE

Denizli, 2020

Doktora Tezleri İçin Yayın Beyanı Sayfası

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayınların listesi aşığıdadır (Tam metinleri ekte sunulmuştur):

Ek 1. Sağlam M., Köseoğlu S., Aral C.A., Savran L., Pekbağrıyanık T., **etinkaya A.** Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. ***Odontology***. 2017 Apr;105(2):184-190.

Ek 2. il N., Oğuz E.O., Mete E., **etinkaya A.**, Mete G.A. Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries. ***Biotech Histochem***. 2017;92(1):15-28. doi: 10.1080/10520295.2016.1243728. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28098485.

Ek 3. Köseoğlu S., Pekbağrıyanık T., Küçükyılmaz E., Sağlam M., Enhos S., **Akgün A.** Biological response of commercially available different tricalcium silicate-based cements and pozzolan cement. ***Microsc Res Tech***. 2017 Sep;80(9):994-999.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : AYŞE AKGÜN

İmza :



ÖZET

EMBRİYONUN ENDOMETRİUMA İMPLANTASYONUNDA MİKRORNA200-C'NİN ROLÜ

Ayşe AKGÜN
Doktora Tezi, Histoloji Embriyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin METE

Kasım 2020, 152 Sayfa

İmplantasyon, reseptif uterus ile blastosist arasındaki etkileşimi içeren oldukça kompleks bir süreçtir. Kusurlu implantasyon; infertilite, spontan düşük, preeklamsi gibi olumsuz gebeliklere neden olabilmektedir.

Çalışma kapsamında 30 adet dişi sıçan kullanılmış, altışarlı beş gruba ayrılan bu sıçanlardan, dört grupta gebelik oluşturulmuştur. Gebeliğin 4. gününde, gebelik oluşturulan grup2 ve grup3 sıçanların, sağ uterus boynuzlarına miRNA200-c mimiği, sol uterus boynuzlarına fizyolojik salin uygulanmıştır. Gebeliklerinin 8. gününde grup2 ve 13. gününde grup3 sıçanlara servikal dislokasyon yapılarak uterus dokuları alınmış ve embriyoları sayılmıştır. Grup4 ve grup5 gebe sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Gebeliklerinin 8. gününde grup4'ün ve 13. gününde grup5'in uterus dokuları, servikal dislokasyon yapılarak alınmış ve embriyoları sayılmıştır. Gebelik oluşturulmayan grup1 sıçanların uterus dokuları, östrus siklusunda servikal dislokasyon yapılarak alınmıştır. Gruplar arasındaki farklılığı belirlemek için embriyo sayıları istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Dokular, ışık mikroskop takip yöntemi uygulandıktan sonra parafin bloklardan kesitler alınmıştır. Kesitlere $\alpha 5\beta 3$ integrin, VEGF, LIF, CD105, Oct3/4, SSEA-1, NANOG, IL-6, IL-18 ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal işlem uygulanmıştır. MiRNA-200c uygulanan gruplardaki embriyo sayılarında, istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir. Yapılan immunohistokimyasal analizlerde; CD105'in stromal hücrelerdeki ekspresyonunun miRNA-200c mimiği uygulanan gruplarda azaldığı, $\alpha 5\beta 3$ 'ün gruplar arasında farklı olmadığı, IL-6'nın mimik uygulanan grupta bez epitelinde ve stromal hücrelerde ekspresyon görülmediği, IL-18'in mimikli gruplarda azaldığı, LIF'in erken gebelikte azaldığı ve gebeliğin 13. gününde tekrar arttığı görülmüş, mimik uygulanan gruplarda gebeliğin 8. gününde yüksek seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir. NANOG ekspresyonunun mimik uygulanan gruplarda stromal hücrelerde arttığı, mimik uygulanmayan erken gebelikte azaldığı ve plasentada arttığı, Oct3/4'ün mimik uygulanan Grup2 ve grup3'te lümen epitelinde ekspresyonun, negatif olduğu görülmüştür. SSEA'nın mimik uygulanan gruplarda arttığı, VEGF'nin mimik uygulanan gruplarda stromal hücrelerde iyice azaldığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, miRNA-200c'nin, implantasyon olayında implante olan embriyo sayılarının üzerinde etkili olduğunu ve implantasyon sürecini etkilediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Uterus, Endometriyum, İmplantasyon, miRNA-200c, İnfertilite

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018SABE014).

ABSTRACT

THE ROLE OF MICRORNA200-C IN IMPLANTATION OF EMBRYO TO ENDOMETRIUM

Ayşe AKGÜN

PhD Thesis, Histology Embryology Department

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Gülçin METE

November 2020, 152 Page

Implantation is a highly complex process involving the interaction between the receptive uterus and blastocyst. Defective implantation can cause adverse pregnancies such as infertility, spontaneous abortion, and preeclampsia.

Thirty female rats were used in this study. The rats were divided into five groups of six and pregnancy was established in four of these groups. miRNA200-c mimic was applied to the right uterine horns and physiological saline was applied to the left uterine horns of the group2 and group3 rats on the 4th day of pregnancy. Uterine tissues were taken by cervical dislocation on the 8th day of the pregnancy in the group2 rats and 13th day of the pregnancy in the group3 rats, and the embryos were counted. No application was applied to the group4 and group5 pregnant rats. Uterine tissues were removed by cervical dislocation on the 8th day of the pregnancy in group4 rats and 13th day of the pregnancy in group5 rats, and the embryos were counted. In non-pregnant rats, uterine tissues were removed by cervical dislocation during estrous cycle. Embryo numbers were statistically analyzed to determine the difference between groups. Sections were taken from the paraffin blocks after the light microscope method was applied to the tissues. An immunohistochemical procedure was applied to the sections to determine the expressions of $\alpha 5\beta 3$ integrin, VEGF, LIF, CD105, Oct3/4, SSEA-1, NANOG, IL-6, IL-18. A statistically significant decrease was observed in the number of embryos in the miRNA-200c groups. In the immunohistochemical analyzes, it was reported that; the expression of CD105 in stromal cells decreased in miRNA-200c mimic groups, $\alpha 5\beta 3$ was not different between groups, IL-6 was not expressed in gland epithelium and stromal cells in the mimic group, IL-18 decreased in mimic groups, LIF decreased in early pregnancy and increased again on the 13th day of pregnancy, and a high level of expression was observed on the 8th day of pregnancy in the mimic groups. It was observed that; NANOG expression increased in stromal cells in mimic groups although it decreased in early pregnancy and increased in placenta in the mimic-free group, and Oct3/4 had negative expression in the lumen epithelium in group2 and group3 in which mimic was applied. It was observed that; SSEA increased in mimic groups, VEGF decreased in stromal cells in mimic groups. These results show that; miRNA-200c has an effect on the number of implanted embryos during the implantation event, and it affects the implantation process.

Keywords: Uterus, Endometrium, Implantation, miRNA-200c, Infertility.

This study was supported by the PAU Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 2018SABE014).

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim aşamasında tecrübelerinden yararlandığım ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında katkıları bulunan, karşılaştığım zorlukları bilgi ve deneyimiyle aşmamda yardımcı olan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr Gülçin METE'ye teşekkür ederim.

Doktora eğitimim aşamasında her zaman yakın desteğini hissettiğim başta Prof. Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ olmak üzere tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımız sırasında yardımını esirgemeyen Öğr. Gör. Barbaros ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca güler yüzleri ile beni her daim motive eden, her koşulda yanımda olan aileme, hayatıma değer katan, desteği ve sevgisiyle ruhumu aydınlatan eşime, yüzündeki küçük bir tebessümle, tüm yorgunluklarımı alıveren, çalışmalarım esnasında beni sabırla ve sevgiyle bekleyen biricik kızıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜRLER	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Uterusun Embriyolojisi	4
2.2. Uterus Anatomisi	5
2.3. Uterus Histolojisi.....	6
2.3.1. Perimetrium	7
2.3.2. Miyometriyum	7
2.3.3. Endometriyum	8
2.4. Sıçanlarda Östrus Siklusu Evreleri ve Özellikleri	13
2.4.1. Proöstrus	13
2.4.2. Östrus.....	13
2.4.3 Metaöstrus	14
2.4.4. Diöstrus	14
2.5. İmplantasyon	14
2.5.1. İmplantasyon öncesi embriyodaki gelişmeler	15
2.5.2 Endometriyumun implantasyona hazırlanması	16
2.5.3. İmplantasyonun ilerleyen döneminde meydana gelen değişiklikler.....	16
2.6. MikroRNA	19
2.7. İntegrinler	21
2.7.1 İntegrin $\alpha\beta 3$	22
2.8. Sitokinler.....	24

2.8.1. LIF	26
2.8.2. İnterlökin 6	29
2.8.3. İnterlökin 18	30
2.8.4. VEGF.....	31
2.9. Kök Hücre.....	32
2.10. Hipotez.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları	35
3.2. Deneysel Uygulama.....	35
3.2.1. Deneyin Gruplarının Oluşturulması.....	35
3.2.2. Embriyoların Sayılması.....	37
3.3. Doku Takibi	37
3.4. Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü.....	37
3.5. İmmünohistokimya Protokolü.....	38
3.6. İstatistiksel Analiz	39
4.BULGULAR	41
4.1. Uterusa İmlante Embriyolar	41
4.2. Embriyo Sayılarının İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması	43
4.3. Hematoksilen ve Eosin Boyama Sonuçları.....	51
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	55
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇLAR.....	94
7. KAYNAKLAR	96
8. ÖZGEÇMİŞ	106
9. EKLER.....	107

Ek 1. Sağlam M., Köseoğlu S., Aral C.A., Savran L., Pekbağrıyanık T., **Çetinkaya A.** Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. *Odontology*. 2017 Apr;105(2):184-190.

Ek 2. Çil N., Oğuz E.O., Mete E., **Çetinkaya A.**, Mete G.A. Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries. *Biotech Histochem*. 2017;92(1):15-28. doi: 10.1080/10520295.2016.1243728. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28098485.

Ek 3. Köseoğlu S., Pekbağrıyanık T., Küçükyılmaz E., Sağlam M., Enhos S., **Akgün A.** Biological response of commercially available different tricalcium silicate-based cements and pozzolan cement. *Microsc Res Tech.* 2017 Sep;80(9):994-999.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Dişi üreme sisteminin iç organları ve bölümleri.....	7
Şekil 2.2 Uterusun histolojik yapısı.....	8
Şekil 2.3 İnsan endometriyumunda luminal epitelde, fonksiyonelis ve bazalisin histolojik olarak görünümü	10
Şekil 2.4 Utersun menstrual döngü boyunca değişimi	12
Şekil 2.5 Sıçanlarda görülen menstrual döngü evrelerine ait smear sitolojik görüntüleri.....	14
Şekil 2.6 İmplantasyon da endometriyum embriyo integrin ilişkisi.....	24
Şekil 2.7 Embriyo implantasyonunda LIF'in bilinen rollerinin özeti.....	27
Şekil 3.1 Sıçan uterus boynuzuna miRNA 200c uygulanması.....	36
Şekil 4.1 Sağ uterus boynuzuna miRNA-200c mimiği, sol uterus boynuzuna fizyolojik salin uygulanmış bir sıçanın, 8 günlük embriyolarının görünümü.....	41
Şekil 4.2 Gebe grubunda yer alan bir sıçanın, gebeliğinin 8. gününde görüntülenen embriyoları.....	42
Şekil 4.3 Sağ uterus boynuzuna miRNA-200c mimiği, sol uterus boynuzuna fizyolojik salin uygulanmış bir sıçanın, 13 günlük embriyolarının görünümü.....	42
Şekil 4.4 Gebe grubunda yer alan bir sıçanın gebeliğinin 13. gününde görüntülenen embriyoları.....	43
Şekil 4.5 Deneysel tasarım	44
Şekil 4.6 Grup 1: Östrus siklusundan alınan uterus dokusu.....	51
Şekil 4.7 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük endometriyum dokusu.....	52
Şekil 4.8 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusu.....	53
Şekil 4.9 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük endometriyum dokusu	53
Şekil 4.10 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük embryonun plasentasından alınmış kesit	54
Şekil 4.11 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük embriyonun plasentasından alınmış kesit	54

Şekil 4.12	Grup 1: Östrus evresindeki uterusu $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	55
Şekil 4.13	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	56
Şekil 4.14	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	56
Şekil 4.15	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	57
Şekil 4.16	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı	57
Şekil 4.17	Grup 1: Östrus evresindeki uterusu LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	58
Şekil 4.18	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	59
Şekil 4.19	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	59
Şekil 4.20	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı	60
Şekil 4.21	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	60
Şekil 4.22	Grup 1: Östrus evresindeki uterusu IL-6 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	61
Şekil 4.23	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda IL-6 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	61
Şekil 4.24	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda IL-6 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	62
Şekil 4.25	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda IL-6 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	62
Şekil 4.26	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda IL-6 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	63
Şekil 4.27	Grup 1: Östrus evresindeki uterusu IL-18 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	63
Şekil 4.28	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda IL-18 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	64
Şekil 4.29	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda IL-18 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı	64

Şekil 4.30	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda IL-18 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	65
Şekil 4.31	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda IL-18 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılım.	65
Şekil 4.32	Grup 1: Östrus evresindeki uterusda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılım.....	66
Şekil 4.33	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	67
Şekil 4.34	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	67
Şekil 4.35	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	68
Şekil 4.36	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	69
Şekil 4.37	Grup 1: Östrus evresindeki uterusda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılım.....	69
Şekil 4.38	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	70
Şekil 4.39	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	70
Şekil 4.40	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	71
Şekil 4.41	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	71
Şekil 4.42	Grup 1: Östrus evresindeki uterusda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	72
Şekil 4.43	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	73
Şekil 4.44	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	73
Şekil 4.45	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı...	74
Şekil 4.46	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı....	74
Şekil 4.47	Grup 1: Östrus evresindeki uterusda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	75

Şekil 4.48	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.	75
Şekil 4.49	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	76
Şekil 4.50	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı....	76
Şekil 4.51	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterus dokusunda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	77
Şekil 4.52	Grup 1: Östrus evresindeki uterusda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	78
Şekil 4.53	Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	78
Şekil 4.54	Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	79
Şekil 4.55	Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	80
Şekil 4.56	Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı.....	80

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 2.1	İntegrinlerin endometriyum hücrelerinde dağılımı ve hücre dışı matris ligand tercihleri.....	23
Tablo 2.2	İmplantasyona katılan bazı sitokinlerin bulunduğu lokalizasyon ve zamanlaması.....	25
Tablo 4-1	Gruplara göre embriyo sayıları.....	44
Tablo 4-2	Deney Planı.....	45
Tablo 4-3	Embriyo sayılarının 8.gün sağ uterus boynuzlarının gebe ve mimikli grubu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları..	46
Tablo 4-4	Embriyo sayılarının 13.gün sağ uterus boynuzlarının gebe ve mimikli grubu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları..	47
Tablo 4-5	Embriyo sayılarının 8.gün sol uterus boynuzlarının gebe ve fizyolojik salin uygulanan grup değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	47
Tablo 4-6	Embriyo sayılarının 13.gün sol uterus boynuzlarının gebe ve fizyolojik salin uygulanan grup değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	48
Tablo 4-7	Embriyo sayılarının grup2 sağ ve sol uterus boynuzları değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	48
Tablo 4-8	Embriyo sayılarının grup4 sağ ve sol uterus boynuzu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	49
Tablo 4-9	Embriyo sayılarının grup3 sağ ve sol uterus boynuzları değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları	49
Tablo 4-10	Embriyo sayılarının grup5 sağ ve sol uterus boynuzu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	49
Tablo 4-11	Embriyo sayılarının grup2 ve grup3 sağ uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	50
Tablo 4-12	Embriyo sayılarının grup4 ve grup5 sağ uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	50

Tablo 4-13	Embriyo sayılarının grup2 ve grup 3 sol uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	50
Tablo 4-14	Embriyo sayılarının gebe grubunun sol uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EGF.....	Epidermal Büyüme Faktörü
FSH.....	Folikül Stimule Eden Hormon
Gp130.....	Glikoprotein 130
HB-EGF.....	Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
HOX.....	Homeoboks Genleri
IL.....	İnterlökin
LH.....	Luteinizan Hormon
LIF.....	Lösemi İnhibitör Faktör
miRNA.....	MikroRNA
NANOG.....	Nanog Homeobox
OCT3/4.....	Oktamer Bağlayıcı Protein 4
RGD.....	Arjinin-glisin-aspartik asid
SOX2.....	Cinsiyet Belirleyici Bölge Y-Kutusu 2
TGF.....	Dönüştürücü Büyüme Faktör
TNF.....	Tümör Nekroz Faktörleri
UB.....	Uterus Bozynuzu
VEGF.....	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VSEL.....	Çok Küçük Embriyonik Kök Hücre
ZEB.....	Çinko parmak E-box-binding homeobox
$\alpha\beta 3$	AlfaVBeta3

1. GİRİŞ

İmplantasyon, blastosistin endometriyuma yerleşmesi, yapışması, penetrasyonu ve trofoblast istilasını içeren kompleks bir süreçtir (Van mourik vd 2009). İmplantasyon sırasında endometriyum ve özellikle apikal yüzeyi, endometrial reseptivite olarak adlandırılan birçok morfolojik, moleküler ve biyokimyasal değişikliklere uğramaktadır. Steroid hormonları, adezyon molekülleri, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve reseptörler; başarılı bir implantasyonda etkilidir (Inyawilert vd 2014). Başarılı implantasyon için; alıcı bir endometriyum, blastosist aşamasında normal ve fonksiyonel bir embriyo, maternal ve embriyonik dokular arasında senkronize bir diyalog gerekmektedir (Guzeloglu-Kayisli 2009).

Endometriyumun alıcı bir fenotip oluşturamaması, önemli bir infertilite nedenidir. Bozulmuş uterus reseptivitesi, yardımcı üreme tekniklerinde gebeliğin başarısız olmasının ardındaki ana nedenlerden biri olarak görülmektedir. Açıklanamayan infertilite, endometrial alıcılık ve implantasyon süreci ile ilgili hedef moleküllerin mekanizmaları, araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Altmäe vd 2010).

Normalden farklı olarak eksprese edilen mikroRNA'lar (miRNA) ve hedef mRNA'lar, dokuların fizyolojik durumlarında değişikliklere yol açabilmekte ve patolojik süreçleri başlatabilmektedir (Yang vd 2019). miRNA'ların ekspresyonu ve hedef genlerinin düzenleyici fonksiyonu, hücre ve dokuya özgü şekilde meydana gelmektedir. Uterusta infertilite için miRNA-200 ailesi üyelerinden en spesifik belirteç, miRNA-200c olarak tespit edilmiştir. Endometriyum, miRNA-200c hedef genleri tarafından düzenlenen kapsamlı hücresel ve moleküler değişikliklere uğramaktadır. miRNA-200c yüksekliği, implantasyonu olumsuz etkilemekte ve bir üst adım olan desidualizasyon basamağına geçilememektedir (Panda vd 2012, Zheng vd 2017).

İntegrinler, tüm hücrelerde bulunan adezyon molekülleridir. İntegrinler, hücre-hücre adezyonunun yanı sıra hücre-hücre dışı matriksin bileşenleri arasındaki adezyona da katılmaktadırlar. İntegrinler, implantasyonun ilk aşaması olan sekresyon evresinde meydana gelen endometrial fenotip değişikliklerde önemli rol oynarlar (Merviel vd 2001). İntegrinler orta sekresyon evresinde, endometriyumda önemli ölçüde artmaktadır. İntegrinler, implantasyon penceresinin çerçevesi için potansiyel işaretler olarak işlev görmektedirler. İntegrinlerden alfaVbeta3 ($\alpha V\beta 3$), integrin embriyonik bağlanma için reseptör olarak rol oynamaktadır (Elnaggar vd 2017).

Endometriyum ve embriyo arasındaki immünolojik etkileşim, gebeliğin oluşması ve devamlılığında büyük öneme sahiptir. Endometriyumda mevcut bağışıklık sistemi, IL-18' in de içinde olduğu lokal olarak üretilen çeşitli sitokinlerle modüle edilir. IL-18, özellikle stromal hücrelerde bulunmaktadır (Yoshino ve ark. 2001). Uterus luminal ve glandüler epitel hücreleri; desidual fibroblastlar ve endotel hücreleri, LIF (Lösemi inhibitör faktör), interlökin (IL) 1, IL-6, IL-12, Tümör Nekroz Faktörleri (TNF) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF) dahil olmak üzere birçok sitokin güçlü kaynaklarıdır (Jasper vd 2007). Normal ekspresyon dışındaki sitokin ifadeleri; implantasyonda mutlak veya kısmi bir başarısızlığa veya anormal plasenta oluşumuna yol açmaktadır (Guzeloglu-Kayisli 2009). LIF, implantasyon için varlığı gerekli bir sitokindir (Hoozemans vd 2004). İnsan endometriyumunda ve fallop tüpünde LIF ekspresyonu, sekresyon evresinde en yüksek seviyeye ulaşır (Carson vd 2000, Tawfeek vd 2012). LIF ifadesi olmayan dişilerde, implantasyon gerçekleşmez (Kimber 2005, White vd 2007).

IL-6, blastosistin endometriyuma yapışması ve invazyonu sırasında, anne embriyo etkileşimi ile ilgili proenflamatuar sitokinlerdir (Biba vd 2015). İmplantasyon penceresi döneminde endometriyum luminal epiteli, desidual fibroblastlar ve endotel hücrelerinde, IL-6 ekspresyonu görülür (Jasper vd 2007).

Vücutta döngüsel olarak anjiyogenezin görüldüğü tek organ; uterusur (Hoozemans vd 2004). VEGF (vasküler endotelial faktör), implantasyon penceresinde vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezin moleküler mekanizmalarında başrollerde görev almaktadır (Chakraborty vd 1995, Das vd 1997). VEGF ifadesi olmayan fareler, gebe kalabilmelerine rağmen, canlı yavru doğumu gerçekleştirememektedirler (Hoozemans vd 2004).

Embriyonik gelişim sırasında vaskülogenez ve anjiyogenez için endoglin diğer ismiyle CD105 gereklidir. CD105; uterus lümen ve bezlerin epitel hücrelerinde, trofoblastta, endotel ve stromal hücrelerinde, implantasyon penceresi döneminde eksprese edilen bir TGF- β reseptörüdür (Chadcan vd 2016).

Epitel progenitör hücre ve mezenkimal kök hücreler, menstruasyon ve doğumdan sonra endometriyumun fonksiyonel tabakasının rejenerasyonundan sorumlu bulunmaktadır. Endometrial kök hücreler için spesifik yüzey belirteçleri yoktur. Temel olarak köklülükle ilgili genler olan üç transkripsiyon faktörü, cinsiyet belirleyici bölge Y-kutusu 2 (SOX2), Nanog homeobox (NANOG) ve oktamer bağlayıcı protein 4 (Oct4) ekspresyonları; hücrelerin çoğalmasını ve kendini yenilemesini sağlamada önemli bir rol oynamaktadır (Xiao vd 2017). Bir hücre yüzeyi glikanı olan SSEA-1; preimplantasyon fare embriyoları, teratokarsinom kök hücreleri ve fare embriyonik kök hücrelerinde eksprese edilmektedir. SSEA-1, insan endometriyumunda epitel hücrelerde eksprese olmaktadır (Tempest vd 2018).

1.1. Amaç

Çalışma; miRNA-200c'nin, infertil bayanlarda kan, serum ve uterus dokusunda yüksek miktarlarda ifade edilme özelliği temel alınarak planlanmıştır. Çalışma, miRNA-200c ile endometriyuma implantasyonda etkili olan faktörler arasındaki ilişkilerin belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu kapsamda endometriyuma implantasyonda etkili olan $\alpha 5\beta 3$ integrin, LIF, IL-6, IL-18, VEGF, CD105, Oct3/4, SSEA-1, NANOG moleküllerinin ekspresyonu ile miRNA-200c arasındaki ilişki ve implante olan embriyo sayısında farklılık olup olmadığı araştırılmaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Uterusun Embriyolojisi

Dişi üreme sistemi organları; gonadlar, üreme kanalları ve dış genital bölgeler olarak üç ana gruba ayrılır. Dişi üreme sistemi; mezoderm, primordial germ hücreleri, koelomik epitel ve mezenkim kökenlidir (Moncada ve Rodríguez 2019). Genital sistem, fetal yaşamın beşinci ve altıncı haftasına kadar farklılaşmamıştır (Gossman 2019). Dişi ve erkek embriyolarda paramezonefrik (Müllerian) kanal ve mezonefrik (Wolffian) kanal bulunmaktadır. Dişilerde, anti-Müllerian hormonu ve SRY geninin bulunmaması, Wolff kanalları gerilemesine ve Müllerian kanalların dişiliğe doğru farklılaşmasına neden olur. Paramezonefrik kanallardan; serviks, fallop tüpleri ve uterus gelişir (Moncada ve Rodríguez 2019).

Paramezonefrik kanal, ürogenital kabarıklığın yüzeyinde yer alan sölom epitelinin uzunlamasına bir girinti oluşturması sonucunda meydana gelmektedir. Kanal, kranial uçtan sölom boşluğu içine huni şeklinde bir yapıyla açılmaktadır. Paramezonefrik kanallar, genital kanalları oluştururlar.

Başlangıçta paramezonefrik kanalda üç kısım gözlemlenmektedir. Bu kısımlardan;

- 1- Kranial vertikal bölüm- Sölom boşluğuna açılmakta,
- 2- Horizontal bölüm- Mezonefrik kanalları çaprazlamakta,
- 3- Kaudal vertikal bölüm-Karşı taraftan eşiyile birleşmektedir.

Tuba uterinalar, paramezonefrik kanalların ilk iki bölümünden gelişirler (Sözen 2008). Kaynaşmış kranial uç, uterus haline gelecek olan yapının sol ve sağ kısımlarına kaynak oluşturur. Bu yapı, endometriyum ve miyometriyumu oluşturacak mezodermi içerir. Müllerian kanallarının kaynaşmamış kranial uçları, fallop tüplerine dönüşür (Moncada ve Rodríguez 2019). 8. hafta boyunca iki taraflı Müllerian kanalları, birbirine kaynaşır. Geçici olarak bir orta hat epitelyal septum, iki bitişik Müllerian kanalının lumenini ayırır. Bu orta hat septumu, 9. haftada büyük ölçüde kaybolur ve farklılaşmamış basit yapılı Müllerian epitelyumu ile kaplı, orta hat uterovajinal kanalı oluşur (Cunha vd 2018).

Pelvis duvarından birleşmiş paramezonefrik kanalların lateraline kadar uzanan katlantı, ligamentum latum uteri olarak isimlendirilir. Ovaryumlar; ligamentin arka yüzünde bulunurken, uterus tüpleri; üst sınırında yer alır. Uterus ve uterusun sınırlayıcı ligamentleri pelvisi; uterovezikal ve uterorektal boşluklar olmak üzere ikiye böler. Uterovajinal kısımdan; uterusun endometriyum epiteli ile endometriyum bezleri, fundus ve korpus gelişir. Miyometriyum ve endometriyum stroması, komşu splanknik mezodermden farklıdır (Sözen 2008).

2.2. Uterus Anatomisi

Uterus; menstruasyon, gebelik ve doğum gibi çeşitli işlevlerden sorumlu, dinamik, kaslı bir organdır (Ovalle ve Nahirney 2009, Chaudhry ve Chaudhry 2020). Pelvis boşluğunda, rektum ile mesane arasında, vajinanın üst kısmında yer alır (Balasubramanya ve Valle 2020). Uterus boyutu dōnemsel olarak değişkenlik göstermektedir. Genişliği 3-6 cm, kalınlığı ise 2-3 cm arasındadır, uzunluğu doğurmamış bayanlar da 7 cm, doğurmuş bayanlar da ise 9 cm kadardır (Arifoğlu 2019, Eroschenko 2016).

Uterus; üç temel anatomik segmente ayrılır:

1. Fundus uteri (Fundus)
2. Korpus uteri (Gövde)
3. Serviks uteri (Boyun)

Tuba uterinaların, uterusu bağlandıkları kısmın üzerinde kalan, geniş üst bölüme; fundus uteri denir. Korpus uteri, fundus hizasının altında kalan ve aşağıda servikse

kadar uzanan uterusun ana gövdesidir. Serviks uteri, uterusun en alt kısmıdır. Vajinaya açılır, vajina ön duvarında sonlanır (Atasü ve Şahmay 2001, Gossman 2019).

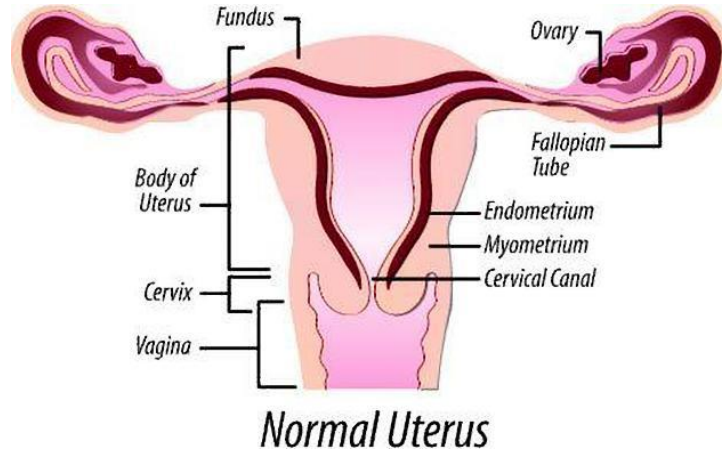
Korpus uterinin mesaneye doğru olan yüzü; Facies anterior, sigmoid kolona doğru olan yüzü ise; Facies posterior olarak isimlendirilir. Uterusun içinde bulunan boşluk, Cavitas uteri olarak isimlendirilir. Ön ve arka duvarlar birbiriyle temas halinde oldukları için, sagittal kesitte yarık şeklinde görülür (Cumhur 2001). Uterusu arteria iliaca'nın dalı; arteria uterina ve pars abdominalis aortae' nin dalı; arteria ovarica besler. Bu damarlar, uterusun duvarında kıvrıntılı yapıdadır ve birbirleriyle anastomozlar yaparlar. Uterusu, anastomoz kavisinden ayrılan dalları besler (Arıncı ve Elhan 2006). Uterusun venleri, kalın yapıdadır ve arterlerle birlikte uzanırlar. Plexus venosus uterus denilen ven ağını oluştururlar. Ağdan çıkan venler ise vena uterinae denilen venlerle, vena iliaca interna'ya açılırlar (Arıncı ve Elhan 2006). Uterus'un sinirleri, plexus pelvici ve plexus uterovaginalis'ten gelir. Parasempatik sinir lifleri, vasodilatasyon ve inhibisyon oluştururken, sempatik sinir lifleri ise uterus kasları üzerinde; vasokonstrüksiyon ve kontraksiyon oluşturur (Cumhur 2001).

2.3. Uterus Histolojisi

Uterus, döllenmiş ovumu tutan, besleyen, içi lümenli bir organdır (Arifoğlu 2019). Endokrin sistem kontrolünde her menstrual döngüde mukozal değişikliklere uğrar (Kierzszenbaum 2006).

Uterus, histolojik olarak 3 tabakadan oluşur.

1. Perimetriyum veya Tunika seroza
2. Miyometriyum veya Tunika muskularis
3. Endometriyum veya Tunika mukozadan oluşmaktadır (WEB-1, Gossman vd 2019).



Şekil 2.1 Dişi üreme sisteminin iç organları ve bölümleri (WEB-2)

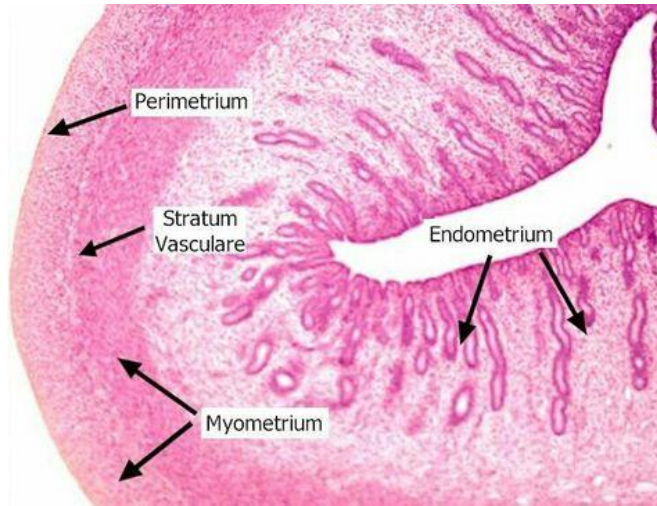
2.3.1. Perimetrium

Perimetrium, ince bağ dokusu tabakasından meydana gelir ve uterusun en dış kısmında bulunur. Uterusun posterior yüzeyi ve anterior yüzeyin üst bölümü, seroza (bağ dokusu ve mezotelyum) ile kaplıdır. Anterior yüzeyin kalan kısmı, bağ dokusu adventisya ile kaplıdır (Ovalle ve Nahirney 2009, Atasü ve Şahmay 2001).

2.3.2. Miyometriyum

Uterusun orta kısmında bulunan ve düz kas demetlerinden oluşmuş miyometriyum, uterusun en kalın tabakasıdır (Kierzszenbaum 2006, Junqueira ve Carneiro 2009). Miyometriyum, birbirlerinden tam olarak ayırt edilemeyen 3 tabaka şeklinde düzenlenmiştir. Dıştaki ve içteki tabakada yer alan kas lifleri, uterusun uzun eksenine paralel yerleşmiş olup, longitudinal uzanmaktadır.

Miyometriyumun orta tabakası kalın olup, sirküler yerleşmiş liflerden ve daha büyük kan damarlarından oluşur. Bu nedenle, bu tabakaya Stratum vasculare denir. Arkuat arterlerden, endometriyumu besleyen 2 grup damar çıkar. Bazal bölümde düz arterler bulunurken, fonksiyonel bölümde yer alan kıvrımlı spiral arterler yüzeye doğru uzanır (Eroschenko 2016).



Şekil 2.2 Uterusun histolojik yapısı (WEB-3)

Miyometriyum tabakası, hormonal değişikliklerden etkilenir. Hamilelikte, kas fibrillerinde hiperplazi (sayıca artış) ve hipertrofi (hücre boyutlarının artması) görülür (Köse 2011). Gebelik döneminde 10 kat kadar büyürler ve bu dönemde uterus hacmi, yaklaşık olarak 24 kat artış gösterir (Çakar ve Atilla 2006). Gebelik sonrasında düz kas hücrelerinin bir kısmında bozulmalar görülürken, bazılarında ise boyutların azaldığı gözlemlenir. Gebelik öncesi boyutlarına yakın ölçülere iner (Junqueira ve Carneiro 2009).

Hipofizden salgılanan oksitosin hormonu; miyometriyumdaki kasların kasılmasını artırırken, plasentadan ve korpus luteumdan salgılanan progesteron hormonu; uterustaki kasların kasılmasını engeller. Östrojen hormonu ise miyometriyum tabakasının normal hacminde kalmasını ve fonksiyonlarını sürdürmesini sağlar. Östrojen yokluğu, atrofiye neden olur (Köse 2011).

2.3.3. Endometriyum

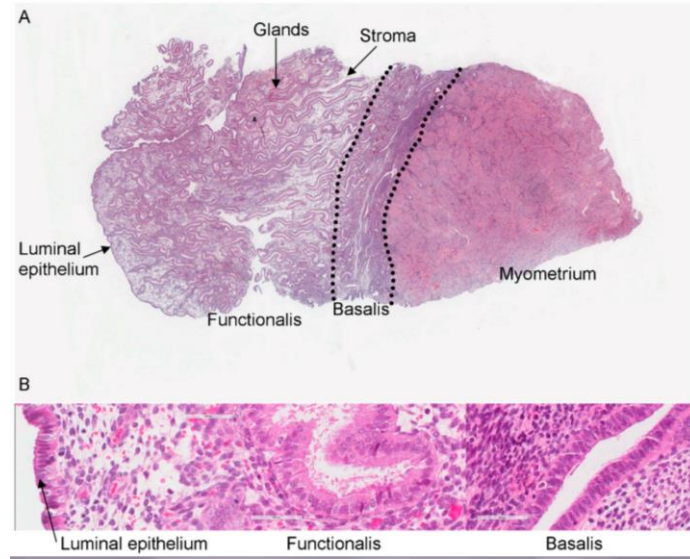
Uterusun lümene bakan en iç mukozal tabakasıdır. Endometriyum epitelinde, tek katlı silyumlu prizmatik epitel ve salgı hücreleri bulunur. Alt kısmında, lamina propria diye adlandırılan gevşek bağ dokusu bulunur. Endometrial stroma olarak da adlandırılan lamina propria tabakası; hücre açısından zengin, sıkı ve düzensiz bir bağ dokusudur. Lamina propria tabakası, gebelik sırasında görülen desidua hücrelerini oluşturacak yıldız biçimli hücreleri, lökositleri, makrofajları, retiküler ve kollajen fibrilleri içerir (Çakar ve Atilla 2006). Yüzey epiteli, uterus bezlerini oluşturmak için alttaki

lamina propria tabakasına doğru invajine olarak basit tübüler bezleri oluştururlar. Bezlerde, az sayıda silyumlu hücreler bulunur. Bezler, endometriyumun iç kısmına doğru dallanmalar yaparlar (Ross ve Pawlina 2014).

Endometriyum, yapısal ve fonksiyonel olarak 2 tabakadan meydana gelir.

1) Stratum fonksiyonale ya da fonksiyonel tabaka: Menstrual döngü sırasında, proliferere olup, sonrasında dejenere olan tabakadır (Ross ve Pawlina 2014). Endometriyumun 2/3'l k yüzeyel kısmını oluşturur. Menstruasyon sürecinde dökülür. Fonksiyonel tabaka, süngerimsi kat ve kompakt kat olarak da ikiye ayrılır. Süngerimsi kat, bazal tabakaya yakın olan ve bezlerin gövde kısımlarının bulunduğu 2/3'l k kısımdır. Kompakt kat ise yüzey epitelinin altında, bezlerin ağız bölgelerinin bulunduğu bölge olarak adlandırılır ( akar ve Atilla 2006). Fonksiyonel tabakada bulunan bezler, dört tip epitel hücreden oluşur. Bunlar; proliferatif hücreler, salgı oluşturan hücreler, silyalı hücreler ve bazal hücrelerdir. Proliferatif hücrelerin sitoplazmaları bazofiliktir, çekirdek kromatinleri yoğundur. Proliferasyon döneminde, hücre sayısı artar ve bez epiteli; yalancı çok katlı epitel Şeklinde görülür. Salgı hücreleri, müsinöz olmayan salgı üretir. Salgı hücreleri, tuba uterina hücrelerine benzer hücreler, vakuols z, vakuollü hücre olarak     farklı yapıdadır. Silyalı hücreler, proliferasyon döneminde daha belirgindir. Genç silyalı hücreler, piramit Şeklinde ve bazal laminaya yakındır. Sitoplazmaları açık renkte olup Őeffaftır. Bazal hücreler de yoğun kromatin içeren belirsiz bir çekirdekçik görülür. Çekirdekte ise yoğun kromatin gözlemlenmektedir (Sözen 2008).

2) Stratum bazale, fonksiyonalis tabakasının altında, endometriyumun 1/3'l k taban kısmını oluşturur. Menstruasyon sonrasında, fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabakadır (Ross ve Pawlina 2014, Köse 2011). Stratum bazaliste dökülme görülmez (Sözen 2008). Stratum fonksiyonale tabakası; kandaki progesteron ve östrojen düzeyindeki değişikliklerden ve endometriyumdaki spiral arterlerin kanlanmasından etkilenirken, stratum bazale tabakası; hormonal değişikliklerden etkilenmez (Kierszenbaum 2006).



Şekil 2.3 İnsan endometriyumunda luminal epitelde, fonksiyonelis ve bazalis'in histolojik olarak görünümü (WEB-4).

Endometriyumda çok özel bir damar sistemi vardır. Endometriyumu besleyen kan damarları, periyodik olarak stratum fonksiyonale tabakasının dökülmesinde önemli göreve sahiptir (Junqueira ve Carneiro 2009). Uterin arter, miyometriyumda anastomoz yapan 6-10 arkuat arter şeklinde dallara ayrılır (Ross ve Pawlina 2014). Miyometriyumun orta tabakasında dairesel olarak yerleşmiş bulunan arkuat arterler, endometriyumun beslenmesi için 2 grup damar sistemine ayrılırlar. Düz arterler, bazal bölümü beslemekle görevlidir (Junqueira ve Carneiro 2009). Spiral arterler, yukarı doğru uzanır ve fonksiyonelis tabakasına kan taşır. Spiral arterler, stratum fonksiyonelis tabakasının üst bölümlerinde incelerek, arteriol ve kapilleri oluşturur (Ross ve Pawlina 2014). Kapiller, damar ağı yüzey epitelinin altında yer alır. Arterioller, kapiller damar ağını beslemekle görevlidir (Sözen 2008). Menstrual siklus sırasında spiral arterlerin ve düz arterlerin proksimal parçaları, herhangi bir değişime uğramaz (Ross ve Pawlina 2014, Junqueira ve Carneiro 2009).

Yeni doğanda endometriyum, proliferasyon evresindeki yapıdadır ve bu yapıda iki hafta içinde gerileme meydana gelir. Ergenlik döneminden önce endometriyum, tek katlı alçak boylu kübik epitel ile döşelidir ve zayıf bir stroma ile desteklenir. Tübüler bez sayısı çok azdır ve aktif değildir. Menstrual döngünün görüldüğü dönemde endometriyum, tek katlı prizmatik epitel ve lamina propria'dan oluşur. Menopozda endometriyum, tek katlı alçak boylu kübik epitel ile döşeli ve ince görünümlüdür. Bezler genişleme gösterir, stroma sıkılaşır (Sözen 2008).

Menstrual döngü evrelerine göre fonksiyonel tabakanın mikroskobik özellikleri değişiklik gösterir. Menstrual döngü, yaklaşık 28 gün sürer ve 3 evreden meydana gelir.

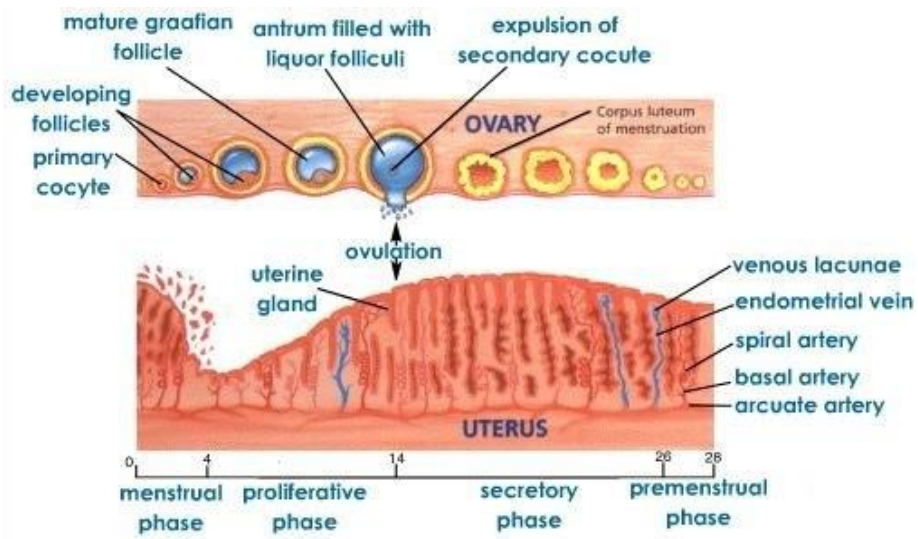
1. Proliferasyon (Çoğalma, foliküler) evresi
2. Sekresyon (Luteal, progestasyonel) evresi
3. Menstrual evre (Eroschenko 2016).

Proliferasyon (Foliküler veya Östrojenik) evresi, menstruasyon döneminde dökülen epitelin yenilediği evredir. Bu evre, yaklaşık 9 gün sürer (Ross ve Pawlina 2014, Eroschenko 2016). Proliferasyon evresi, büyüyen ovaryum foliküllerine bağlı olarak artan östrojen seviyelerinin etkisi altında olup, endometriyumun rejenerasyonunu sağlayabilmek için epitel, stroma ve vasküler endotelin çoğalmasını sağlar (Kim ve Kim 2017). Ovaryumda foliküller olgunlaşır ve östrojen sentezlemeye başlar. Proliferasyon evresinin başlangıcında bezler düz, kısa ve dar yapıdadır. Lamina propria, kompakt halde görülür (Kierszenbaum 2006). Evre ilerledikçe bezler hızla yukarı doğru büyür ve kıvrımlı bir yapı halini alır. Bez yapılarında ve stromada, mitotik hücreler görülür (Berne vd 2008). Lamina propriada hafif ödem görülür. Son evrede mitoz artmıştır. Stromal hücreler kollajen ara madde salgırlar ve proliferer olurlar. Endometriyum yeniden oluşurken spiral arterler uzar. Endometriyumun üçte birlik kısmına uzanmazlar (Ross ve Pawlina 2014).

Menstrual siklusun 14. günü ovulasyon ile başlayan sekresyon evresi, siklusun 28. gününe kadar devam eder (Köse 2011). Salgılama döneminin başlarında, östrojenin etkisi ile salgılanan Luteinizan hormon (LH) en yüksek seviyeye ulaşır. Ovulasyonun gerçekleşmesini ve korpus luteumun gelişmesini sağlar. Korpus luteumdan salgılanan progesteronun etkisi ile stratum fonksiyonalede değişiklikler meydana gelir. Damarlanmanın artması ve stromadaki ödeme bağlı olarak endometriyum kalınlaşır. Bez yapıları gelişmeye başlar. Stroma içinde bezler daha fazla kıvrılır, dallanır ve lümenleri genişler (Ovalle ve Nahirney 2009, Kierszenbaum 2006). Bezlerden salınan mukozal salgı maddesi artar. Glikojenden zengin, mukoid bir madde ile dolar. Artan salgı maddesi, embriyonun yaşamasını ve endometriyuma yapışmasını kolaylaştıran glikoproteinleri, glikojenleri ve glikolipitleri içerir (Berne vd 2008). Spiral arterler uzar ve kıvrılarak, endometriyum yüzeyine kadar uzanırlar (Ross ve Pawlina 2014, Kierszenbaum 2006).

Endometriyum yumuşak, kalın ve bol damarlı bir yapı halini alır. Arterio spiralislerin sayısı artar (Kierszenbaum 2006). Artan östrojen seviyesi ile servikal mukus, spermelerin uterusu geçişini kolaylaştıracak şekilde inceler, yapışkanlığı azalır

(Berne vd 2008). Stroma hücreleri de genişleyerek, glikojenden zengin desidua hücrelerine dönüşmeye hazırlanır (Ross ve Pawlina 2014, Kierzszenbaum 2006). Desidua hücrelerine dönüşmeyi uyaran etken, blastosistin uterusu implantasyonudur. Döllenme gerçekleşmişse, depolama ve aktif salgılama devam eder. Stromal hücreler, desidua hücrelerine dönüşür. Desidualizasyon; endometrial stromal fibroblastın embriyo implantasyonu ve gebelik oluşumu için kritik olan farklı desidual hücelere, morfolojik ve biyokimyasal dönüşümüdür (Estella, vd 2012). Döllenme olmazsa korpus luteum'un işlevi azalır, progesteron ve östrojen salgısında düşüş ve nekroz başlar (Ross ve Pawlina 2014, Kierzszenbaum 2006).



Şekil 2.4 Utersun menstrual döngü boyunca değişimi (WEB-5)

Menstruasyon (kanama) evresi, progesteron salgısının durması ile lökositlerin akışı, spiral damar vazokonstriksiyonu ve VEGF ekspresyonu ile gerçekleşir. Bu evrede endometriyum kalınlığı azalır ve bezler kısalır. Kanamadan 2 gün önce, spiral arterler aralıklı olarak kasılır ve endometriyum kanlanması azalır. Daha sonra kalıcı olarak kasılırlar ve fonksiyonals katmanına kan akımı engellenir. Oluşan iskemi, damar duvarlarını ve fonksiyonals tabakasının bir kısmını nekroza uğratar. Kasılmalar sonucu kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Progesterondan bağımsız ve geri dönüşümsüz hale gelir ve lökositler, hücresel zarların parçalanması ve hücre dışı matriksin çözünmesi için matris metalloproteazları salgılar. Kan, uterin sıvı, stromal ve epitel hücreleri vajinal akıntıyı oluşturur (Mihm vd 2011, Ross ve Pawlina 2014).

2.4. Sıçanlarda Östrus Siklusu Evreleri ve Özellikleri

Puberta ile başlayan sıçanların menstrual döngüsü, 14 günde bir gerçekleşir ve ortalama 4–5 gün sürer. Bu kısa süre, prelinik çalışmalar için sıçan kullanımının önemini arttırmaktadır (Marcondes vd. 2002). Sıçanlar, cinsel olgunluğa 50-60 günlük iken ulaşırlar. Östrus aşamalarını belirlemek için vajinal smear yöntemi kullanılarak vajinal sitolojiye bakılabilir. Bu yöntem, araştırmacıların hayvanın östrus dönemini belirlemeleri için hızlı ve pratik bir yöntemdir (Westwood 2008, Saruhan ve Dereli 2016). Vajinal smear yöntemi, vajinal duvardan sürüntü alınarak ya da vajinal yıkama ile gerçekleştirilir. Alınan örnekler, preparatlar üzerinde şekil 2.5'te görüldüğü gibi mikroskop altında incelenmesi, hücre tiplerinin (epiteliyal veya kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak değerlendirilmesi ile evreler belirlenir (Bozoğlu 2013).

Sıçanlarda östrus siklusu; proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus olmak üzere dört evreden oluşmaktadır.

2.4.1. Proöstrus

Östradiol ve LH, en yüksek düzeye ulaşır. Folikül stimüle eden hormonda (FSH) az bir artış görülür. Yaklaşık 12 saat sürer. Endometriyum yüzey epitelinde, proliferasyon görülür. Tek katlı prizmatik epitel hücreleri uzayarak, yüksek prizmatik hücrelere dönüşür (Ekizceli 2015). Proöstrus evresinin başlangıcında vagina sitolojisinde superfisial ve parabazal hücreler az sayıdadır ve baskın hücre tipi intermediyer hücredir. Smear değerlendirmesinde lökosit çok az görülür ya da hiç görülmez, nükleuslu epitel çok fazladır ve kornifiye hücre nadir olarak görülmektedir (Karakuş 2012).

2.4.2. Östrus

Çiftleşmenin olduğu dönemdir. Yaklaşık 12-14 saat sürer. LH'in en yüksek seviyeye ulaşmasıyla ovulasyon gerçekleşir. Uterus epitelinde proliferasyon artık gerçekleşmez. Epitelde, yalancı çok katlı epitel izlenebilir (Ekizceli vd 2015). FSH, en yüksek değerine ulaşır. Östradiol düzeyi azalır ve en alt düzeye iner. Progesteron düzeyi artar. Ovülasyon gerçekleşir. Çiftleşme olmuş ise vajinal plak görülür. Vajinada kornifiye hücrelerde artış olur, epitel 7–11 hücre katı şeklinde görülür. Evrenin başlangıcında parabazal ve bazal hücreler az sayıdadır, ortalara doğru hücreler

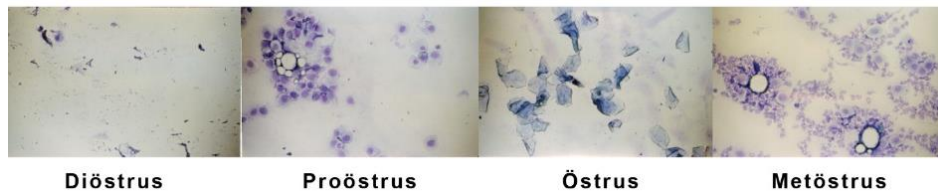
kaybolur. Smearde lökosit, kornifiye hücreler ve büyük bazofilik epitel hücreleri görülür (Karakuş 2012, Westwood 2008).

2.4.3. Metaöstrus

Bu evrede dişi, çiftleşmek için erkeği kabul etmez. Yaklaşık 21 saat boyunca sürer (Ekizceli vd 2015). Estradiol seviyesinde artış olur. Progesteron, yüksek seviyede kalır. Metaöstrus'ta vajinada yüzeysel hücrelerde azalma görülür, epitel 5–9 hücre; katı şeklinde gözlenir. Bazal ve parabazal hücrelerde ve lökositlerde artış olur. Uterusta endometrial epitel hücrelerinin dejenerasyonu devam eder. Mitotik aktivite yeniden başlar. Smearde lökosit bol miktarda görülür, nükleuslu epitel yoktur, kornifiye hücre çok azdır, bazofilik hücreler vardır (Web- 6, Westwood 2008).

2.4.4. Diöstrus

Siklusun bu evresinde, epitel dokuda rejenerasyon başlar ve yaklaşık 57 saat sürer. Kanda LH ve FSH düzeyleri düşüktür. Vajina epiteli, 10 hücre katı şeklinde görülür. Uterusta, alçak boylu kolumnar epitel gözlenir. Başlangıçta mitotik hücreler görülür. Az sayıda da olsa, dejenere hücre de bulunmaktadır. Diöstrusun sonunda ödem gözlenir. Smearde az miktarda mukozal yapı, bazofilik hücreler, kornifiye hücreler, nükleuslu epitel hücreleri ve lökositler bulunur (Karakuş 2012, Westwood 2008).



Şekil 2.5 Sıçanlarda görülen menstrual döngü evrelerine ait smear sitolojik görüntüleri (WEB-6).

2.5. İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonun uterus endometriyum epitel yüzeyine yapışıp, plasentayı oluşturmak için maternal yapıya girdiği süreç olarak tanımlanır (Kim ve Kim 2017). İmplantasyon elde etmek için, uterusun yapısal ve fonksiyonel yeniden şekillenmeye tabi tutulması gerekir. Bu şekillenmeye aracılık eden ana hormonlar,

östrojen ve progesterondur (Das vd 1997, Marquardt vd 2019). Başarılı bir implantasyon için uygun bir blastosistin, alıcı bir endometriyuma uygun şekilde zamanlanmış gelişimi gereklidir. Endometriyum, "implantasyon penceresi" döneminde sadece kısa bir süreliğine blastosisti kabul eder (Kim ve Kim 2017). İmplantasyon penceresi, LH dalgalanmasından 6-10 gün sonra, 28 günlük normal bir adet döngüsünün 20-24. günleriyle sınırlıdır (Van Mourik vd 2009). Embriyo ve endometriyum arasında özel bir diyalog vardır. Önce oositin gelişimini ve endometriyumun olgunlaşmasını sağlayan bu diyalog, ardından blastosist tarafından embriyo oryantasyonunu, apozisyonu, yapışmasını ve endometrial istilasını sağlar (Diedrich vd 2007). Endometriyum, embriyo için bu dönemin dışında reseptif özellik göstermemektedir (Sharma ve Kumar 2012). Hücre-hücre yapışması, blastosist implantasyonu sırasında gerçekleşen önemli bir olgudur (Abban vd 2005). İmplantasyonun, matriks maddelerinin, adezyon moleküllerinin ve matriks maddeleri için yüzey alıcılarının sentezi ile senkronize bir şekilde gerçekleşmesi gereklidir (Sharma ve Kumar 2012).

2.5.1. İmplantasyon öncesi embriyodaki gelişmeler

Fertilize olmuş ovum, uterin kavitede mukozal dokuya gömülebilmek için tuba uterinadan uterin kaviteye geçerken birtakım değişikliklere uğrar. Zigotta yarıklanma meydana gelir ve mitotik bölünmeler ile hücre sayısı artar. Mitotik bölünmeler sonucunda, blastomer olarak adlandırılan hücreler oluşur ve 16 blastomerli zigot, marula denen hücre kütleli halini alır (Bozdoğan 2004). Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra zona pellusida ile çevrili marula, uterin kaviteye geçer. Yaklaşık 24 saat kadar uterusu serbest bir şekilde yüzer. Hücre bölünmeleri ve gelişim devam eder (Ross ve Pawlina 2014). Uterus boşluğundaki sıvı, zona pellusida içine girip hücreler arasında boşluklar oluşturur. Oluşan boşluklar büyür ve birleşmeye başlar. Blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur, embriyo ise blastosist adını alır. Blastosist'de kutuplaşma meydana gelir ve oluşan iç hücre kitlesi embriyoblast, dış hücre kitlesi trofoblast olarak adlandırılır (Vardı 2011). Trofoblast hücreleri, plasentanın embriyonik kısmını oluşturur. Embriyoblast, blastosist boşluğuna doğru ilerler ve trofoblastlar, blastosistin duvarını meydana getirirler (Moore ve Persaud 2002). Trofoblastlar tarafından tripsin benzeri enzimler sentezlenir ve uterus sıvılarının etkisiyle zona pellusida erir. Embriyo, fertilizasyondan 6-8 gün sonra endometriyuma implante olur (Vardı 2011).

2.5.2 Endometriyumun implantasyona hazırlanması

İmplantasyon için endometriyumda çeşitli değişiklikler meydana gelir. Yapısal, hücrel ve moleküler olaylar, eş zamanlı ve senkronize bir şekilde gerçekleşmelidir. Endometriyumda görülen başlıca değişiklikler; adezyon molekülleri, büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, immunglobulinlerin ekspresyonu, homeoboks genleri (Özellikle HOXA10ve HOXA11), pinopodların oluşumudur. Tüm bu değişiklikler, östrojen ve progesteron tarafından düzenlenmektedir (Kim ve Kim 2017, Galliano ve Pellicer 2014). Bu tür seks steroid hormonları, endometriyumun çoğalması ve alıcılığı için gerekli olan endometrial gen ekspresyonlarını da düzenler (Galliano ve Pellicer 2014).

Ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra luminal epitel hücrelerinde yer alan düzenli mikroviluslar yerini pinopodlara bırakır (Rarani vd 2018). Lüminal epitelde bulunan apikal hücre zarı üzerindeki hücre zarı çıkıntıları olan pinopodlar, elektron mikroskobu ile görselleştirilebilirler (Nikas ve Aghajanova 2002). Görünümleri, döngüye bağlıdır ve progesteron kontrolü altındadır. Pinopodların görüldüğü spesifik zamansal ve mekansal ifade, implantasyon penceresiyle aynıdır (Rarani vd 2018). Düzenli menstural sıklusa sahip kadınlarda yapılan çalışmada, yumurtlama sonrası 6. günde endometrial biyopsilerin %78'inde pinopodların olduğu bildirilmiştir. Pinopodların işlevi tamamen açık değildir. Pinopodlar, implantasyon penceresi döneminde buldukları için implantasyon belirteci olarak değerlendirilirler. Yokluklarının implantasyon başarısızlığı ile ilişkili olması nedeniyle, pinopodların klinik açıdan değerlendirilmeleri uygun olabilir (Hoozemans vd 2004).

Bazal membranda kalınlık azalır. Hücre yüzeyi moleküllerinin, lateral dağılımında değişiklikler meydana gelir. Desmozomal proteinlerin yoğunluğu azalır. Lateral membrandaki sıkı bağlantı dağılımı değişir. Ovaryum steroidleri tarafından düzenlenen özgün gap junctionlar, implantasyonun olduğu epitelde açığa çıkarlar (Gökçimen 2004, Aplin ve Ruane 2017). Endometrial hazırlık evresi, gebeliğin erken evreleri ve normal embriyo oluşumuna miRNA'lar da dahil olmuşlardır ancak miRNA'ların hamilelik açısından rolleri belirsizdir (Galliano ve Pellicer 2014).

2.5.3. İmplantasyonun ilerleyen döneminde meydana gelen değişiklikler

Blastosist, gebelikten yaklaşık 6-7 gün sonra uterusu yapışır ve plasenta oluşumu başlar. Embriyo, endometrial epitele çoğunlukla embriyonik kutup bölgesinden

tutunur. Hızla bölünmeye başlayan trofoblast hücreleri, sitotroblast ve sinsityotroblast olarak iki farklı tabakaya ayrılır. Sitotroblastlar, iç kısımda hücresel trofoblastları oluştururlar. Sinsityotroblastlar, dış kısımda bulunur ve hücre sınırı görülemeyen çok çekirdekli bir kitle şeklindedir. Sinsityotroblast tabakası (sintroblast); endometrial epitele doğru uzantılar oluşturur, bağ dokusu içinde ilerler, maternal dokuları parçalayan bazı enzimler salgılar ve parçalanmış maternal dokulardan beslenir. İç hücre kitlesinin iç kısmında, hipoblast olarak adlandırılan kübik hücre tabakası oluşur. Yüksek prizmatik hücrelerden oluşan kalın kısmına ise epiblast denir (Moore ve Persaud 2002).

Sinsityotroblastlar, uterus kapillerlerinin ve bezlerin bulunduğu endometrial stromayı invaze ederler ve endometriyumun içine gömülürler. Sinsityotroblast hücreleri, invazyonu sağlayan proteolitik enzimler salgılar. İmplantasyon bölgesinin etrafındaki stromal hücreler; glikojen ve lipit ile dolu, polihedral görünümüne desidual hücrelere dönüşür. Desidual hücreler, embriyonik beslenmeye kaynak oluştururlar. İmplantasyon gerçekleşirken, iç hücre kitlesinin içinde küçük amniyotik kavite oluşmaya başlar. Epiblasttan ayrılıp kaviteyi çevreleyen hücreler (amniyoblast), amniyonu oluşturur. Hipoblast hücreleri ise ekzosöloomik kavitenin çatısını oluşturmak için çoğalırlar ve ekzosöloomik membran ile kaviteyi oluştururlar. Ekzosöloomik kavite vitellüs kesesini meydana getirir (Moore ve Persaud 2002).

Gebe kaldıktan yaklaşık sekiz gün sonra, sinsityotroblast laküna adı verilen düzensiz boşluklar görülür. Bu lakünalar, uterus sekresyonlarından kaynaklanan sıvılarla doldurulur ve aralıklı boşlukları oluşturmak için birleşir. Kalan sinsityotroblastlar ise, plasental villöz ağacının temelini oluştururlar. Bu nedenle, plasentanın üç temel alanı; embriyoya bakan erken koryonik plaka, aralıklı alanın ve villöz ağacın gelişiminde yer alan laküner sistem ve maternal desiduaya bakan ilkel bazal plaka olarak tespit edilebilir. Desidua yoluyla litik aktivitesi sayesinde, sinsityotroblast anne kılcal damarlarına ulaşır ve erozyona uğrar. Lakünada az sayıda anne kan hücresinin ortaya çıkmasına izin veren bu durum, plasentadaki ilkel maternal dolaşımın habercisidir. Gebe kaldıktan yaklaşık 12-13 gün sonra, sitotroblast hücreleri sinsityotroblast içine nüfuz ederek, aralıklı çıkıntı yapan primer trofoblast villusunu oluşturur (Avagliano vd 2016).

Sitotroblast hücrelerinin sinsityotroblast içine nüfuz etmesiyle primer villus gelişir. Ekstra embriyonik mezoblast, birincil villus içine nüfuz ederek mezenkimal çekirdeği oluşturur. Primer villusu içinde yer alan embriyonik mezoblast ve mezankimal

çekirdeğin bir arada bulunduğu bu yapı, sekonder villus olarak adlandırılır. Sekonder villusun, mezoblast hücreleri arasında, hematopoetik hücrelerin gelişmesiyle oluşan yapıya tersiyer villus adı verilir. Bu villuslardan bazıları, 15. günden sonra, sinsityotroblastı istila eden, maternal dokulara ulaşan ve sitotroblastik ankraj kolonlarını oluşturan, bir sitotroblastik hücre havuzu içerir. Bunu takiben bazı sitotroblastik hücreler, villusdan ayrılır ve invaziv fenotipli özel bir hücre türü olan ekstravillöz trofoblasta farklılaşır. Daha sonra bu hücreler, maternal desidua'ya girer, maternal spiral arterlere ulaşır, damar duvarını aşındırır ve spiral arterleri sürekli akışlı, düşük dirençli tüplere dönüştürür. Bu adımla fetal dolaşım başlar (Avagliano vd 2016).

Olgun plasentanın organizasyonu, genellikle üç ayrı katmanla tanımlanır. Apikal tarafta (en dış konum) implantasyon bölgesi; ikincil trofoblast dev hücrelerinin bir tabakası ile maternal desidua'dan ayrılır. Hormon üreten bu dev hücreler, adlarını büyük yapıdaki hücrelerden alırlar. Birbirini izleyen endoreduplikasyon turları yoluyla, 500'den fazla DNA içeriği kopyası biriktirebilen poliploid çekirdek oluşur. Bu hücreler proliferatif değildir, daha çok diploid trofoblast öncülerinden kaynaklanır. Bu diploid hücreler, gelişim sırasında çok dinamik olan bir ara tabaka olan spongiotroblast tabakası ile sınırlıdır (Lefebvre 2012).

Spongiotroblast katmanı; iki ana trofoblast popülasyonu olan spongiotroblast hücreleri ve glikojen hücrelerinden oluşur. Her iki hücre tipinin gelişimi ve işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte glikojen hücrelerinde glikojen biriktiği bilinmektedir. Bağlantı bölgesinin ana işlevlerinden biri, endokrin bölme işlevidir. Korpus luteumdan, progesteron salgılanmasını sürdürmek için, bağlantı bölgesi ve ikincil dev hücrelerin spongiotroblastları, gebelik sırasında prolaktin benzeri hormonlar, laktojenler ve sitokinler üretir (Coan vd 2006).

Embriyonun yakınında yer alan, maternal ve fetal dolaşım arasındaki ana besin ve gaz alışverişinin sağlandığı bölge, labirent tabakasıdır. Epiblasttan türetilmiş olan ekstraembriyonik mezodermal endotel hücreleri ile kaplı yoğun bir fetal kılcak damar ağı, bu tabakanın büyük kısmını kaplar. Çok çekirdekli sinsityotroblast tabakası ve maternal sinüzoidlerde bulunan mononükleer trofoblast dev hücre tipinden oluşan labirent trofoblast hücreleri; fetal endotelyumu, maternal kandan (trichorial plasenta) ayırır. Bu hücre tiplerinin tümü koryonik ektodermden türetilmiştir (Lefebvre 2012).

Olgun bir plasentanın maternal kısmı, plasenta septumları olarak adlandırılan ve desidua bazalisten gelişen 30-35 loba ayrılır. Septumlar, koryonik plağa doğru

uzanır. Her lob, birden fazla kotiledondan oluşur. Kotiledonlar, ana kök villus ve onun dallarından meydana gelmektedir. Göbek kordonu, kıvrıntılı bir yapıya sahiptir ve koryon plağına bağlanır. Oksijenden fakir 2 umblikal arter ve oksijenden zengin kan taşıyan umblikal ven içerir.

Plasenta, maternal ve fetal kısımlardan meydana gelir. Anneye ait plasental kısım, desidüadan oluşur. Desidua 3 kısımdan meydana gelir.

1. Desidua bazalis, plasentanın maternal kısmını oluşturur. Desidua bazalis ile karşılıklı koryonik villuslar gelişme gösterir ve koryon frondozumu oluştururlar.
2. Desidua kapularis, embriyoyu ve koryon kesesini kaplayan yüzeysel tabakadır.
3. Desidua pariyetalis, embriyonun bulunmadığı uterus boşluğunda yer alan tabakadır (Kierzszenbaum 2006).

Villuslar, koryonik yüzeyin tüm kısımlarını kaplarlar. Büyüme devam eder ve desidua kapsülarisin üzerinde bulunan villuslar, dejenere olurlar ve koryon leave' i (düz koryon) oluştururlar. Desidua bazalis ile karşılıklı olan villusların sayıları ve boyutları artar ve yüksek düzeyde dallanır. Plasentanın fetal komponenti olan koryon frondozum ya da villöz koryonu meydana getirirler. Villusların plasentadan çıktıkları tabakaya, koryonik plak denir (Ross ve Pawlina 2014). Koryonik plaktan köken alan her bir villus, mezenkimal bağ doku özü (villus stroması) ile fetal kan damarları arterioller ve kapillerler içerir. Mezenkimal bağ doku da 2 ana hücre tipi bulunmaktadır.

1. Hofbauer hücreleri olarak adlandırılan fagositik hücreler,
2. Ekstraselüler matriks elemanlarının ve çeşitli tip kollajenlerin sentezini yapan ve fibroblastlara farklılaşabilen mezenkimal hücreler.

Mezenkimal özü, iki hücre tipi çevreler. Bunlar; maternal kan ile temasta olan sinsityotrofoblast hücreleri ve bazal lamina ile desteklenen, sinsityotrofoblastların altında bulunan sitotrofoblast hücreleridir (Kierzszenbaum 2006).

2.6. MikroRNA

MikroRNA'lar, gen ekspresyonunu düzenleyen ve özellikle üreme biyolojisinde önemli bir role sahip olan evrimsel olarak korunan, 18-25 nükleotit uzunluğunda protein kodlamayan RNA molekülleridir (Shen vd 2013). Yapılan çalışmalarda, insanda yaklaşık 1800'ün üzerinde miRNA olduğu ve insanların genlerinin yaklaşık %30-60'ının bu miRNA'lar tarafından transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede

düzenlendiği düşünülmektedir (Selçuk ve Türkölmez 2016, Çelik vd 2013). miRNA'ların; hücre döngüsü, hücre farklılaşması, embriyo gelişimi (Zheng vd 2017), kadın ve erkek üreme sisteminin fizyolojik süreçleri gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerde temel rol aldıkları tespit edilmiştir (Selçuk ve Türkölmez 2016, Shen vd 2013).

Keşfedilen miRNA'ların karışıklığa neden olmaması amacıyla bir isimlendirme sistemi geliştirilmiştir. Örneğin hsa-miRNA-200 ifadesinde yer alan hsa; Homo sapiens, miRNA; mikroRNA ve 200 (sayısal ifade) de; miRNA türünün keşfedilme sırasını ifade etmektedir. Benzer yapıya sahip olan miRNA'lar (miRNA sisters), sayısal ifadeyi takip eden bir küçük harf ile ayırt edilirler. Örneğin; miRNA-200b ve miRNA-200c, sekans içinde çok benzerdir (Carlberg ve Molnar 2014).

MikroRNA'ları kodlayan, yüksek seviyede korunmuş ve kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliği bulunan gen bölgeleri vardır. Normal ve patolojik dokular arasında farklı seviyede ifade edilen miRNA'ların tespitinin, infertilite için ışık tutabileceği düşünülmektedir (Karagün vd 2014). miRNA aktivitesindeki değişiklikler, implantasyon ve menstrual döngü üzerinde olumsuz etki oluşturma potansiyeline sahiptirler (Hull ve Nisenblat 2013). miRNA ekspresyon profilleri; infertilite, endometriozis ve preeklampsi dahil olmak üzere çeşitli patolojik jinekolojik koşullarda tanımlanmıştır (Zheng vd 2017). Endometrial disfonksiyonda, iatrojenik miRNA manipülasyonunun endometrial bozuklukları düzeltmesi de mümkündür. Bununla birlikte, endometrial miRNA fonksiyonu ve miRNA'nın güvenli manipülasyonu hakkında, klinik kullanıma geçmeden önce daha fazla bilgi gereklidir (Hull ve Nisenblat 2013).

Spesifik miRNA'lar; blastosist aktivasyonunu, embriyo implantasyonunu ve embriyo gelişimini düzenleyen insan embriyonik hücrelerinde, yüksek oranda eksprese edilirler. Anne için, menstrual döngü, uterus alıcılığı, stromal desidualizasyon ve benzeri ilişkili embriyo implantasyonları sırasında farklı miRNA'lar eksprese edilmekte ve salgılanmaktadır (Zheng vd 2017).

Menstrual siklusun, geç proliferasyon ve orta sekresyon evresinde olan bayanlardan izole edilen endometrial epitel hücreleri kullanılarak elde edilen 12 adet miRNA (miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30d, miR-31, miR-193a-3p, miR-203, miR-204, miR-200c, miR-210, miR-582-5p, ve miR-345) ekspresyonuna bakıldığında, sekresyon evresinde, geç proliferatif evreye göre ekspresyonların azaldığı görülmektedir (Nothnick 2016).

MikroRNA'lar; hücre proliferasyonunu, hücre göçünü ve / veya istilasını düzenlerler ve miRNA-200 ailesinin üyeleri, bu düzenleyici yollarda önemli rol oynarlar (Nothnick 2016). MiRNA-200 ailesi üyeleri; miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429 olarak tanımlanmışlardır (Zheng vd 2017). Hem insan, hem fare dokularında Çinko parmak E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) and ZEB2 ifadesi ile ters orantılı ekspresyonları vardır. Yapılan çalışmalar, reseptif uterusu miRNA-200 ailesi üyelerinin ekspresyonlarının düşük olduğunu göstermektedir (Nothnick 2016). Reseptif uterus oluşumu, infertilite ve düşüklerde miRNA-200 ailesi üyelerinin ekspresyonları hakkında çok az bilgi mevcuttur (Zheng vd 2017). Fare endometrial stromal hücrelerinde, miRNA-200 ailesi üyelerinin ekspresyonu, implantasyon sırasında aşağı regüle edilir (Liu vd 2016, Zheng vd 2017) ve insan desidualizasyon modelinde in vitro olarak ekspresyonları azalır (Zheng vd 2017).

Sağlıklı birey kontrol grubu, infertil, erken gebelik ve düşük yapmış olan kadınlarda yapılan çalışmalarda, kan serumlarında ve uterus dokusunda miRNA-200 ailesi üyeleri arasında en duyarlı ve spesifik belirtecin miRNA-200c olduğu bildirilmiştir (Zheng vd 2017). RL95-2 ve Ishikawa endometrial hücrelerinin, In vitro olarak tarama elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerinde, belirgin morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Daha yüksek miRNA-200c seviyesine sahip hücrelerin, uterus alıcılığının bir belirteci olan hücre yüzeyinde, daha az pinopod yapısına sahip oldukları görülmüştür (Zheng vd 2017).

2.7. İntegrinler

İntegrinler, tüm hücrelerde hücre yüzeyinde bulunurlar. Hücre-hücre ve hücre matriks etkileşiminde görev alırlar (Lessey vd 1992). İntegrinler, transmembran glikoprotein ailesi üyesidir. Kovalent olmayan etkileşim ile bir arada duran alfa ve beta alt birimleri vardır. Her alt birim; hücre dışı bir alan, bir zar ötesi bölge ve hücre içi bir alan içerir (Singh ve Aplin 2009). Yapılan çalışmalarda integrinlere ait 18 alfa ve 8 beta alt birimi tanımlanmıştır. İntegrin α ve β alt ünitelerinin özel kombinasyonu, ligand spesifitesi belirlenir (Hynes 2002).

İntegrinler; embriyolojik gelişim, implantasyon, yara iyileşmesi, hemostazis, trombozis, savunma mekanizmaları gibi fizyolojik olaylarda görev alırlar. Çeşitli hücre dışı matriks ligandları için reseptör görevi gören integrinler, bağlanma ve sinyal iletimi

yoluyla hücresel fonksiyonun modülatörleri olarak işlev görürler (Carson vd 2000, Şensoy ve Öznurlu 2009). İntegrinler; hücre-dışı matriks glikoproteinlerinde, bazı kompleman proteinlerinde ve bazı hücre yüzeylerinde bulunan arjinin-glisin-aspartik asid (RGD) aminoasit dizilerine sahip molekülere bağlanır (Carson vd 2000, Guç 2004).

Endometrial $\beta 3$ integrin ekspresyonu, implantasyon sırasında yükselen ve implantasyon için yararlı bir belirteç olarak gösterilen bir hücre adezyon reseptörü olarak tanımlanmıştır (Dorostghoal vd 2017). Bazı integrin tipleri, menstrual döngüde dönemlere bağlı şekilde ifade edilirler. Örneğin $\alpha\beta 3$ (menstrual döngünün 19. Gününden, adet gününe kadar) $\alpha 4\beta 1$ (menstrual döngünün 14.gününden, 24.gününe kadar) ve $\alpha 1\beta 1$ (menstrual döngünün 28. gününde). İntegrinler, uterus reseptivite dönemini saptamak için, immünohistokimyasal belirteçler olarak kullanılmaktadırlar (Illera vd 2000).

2.7.1. İntegrin $\alpha\beta 3$

Hem insanlarda hem de diğer memeli türlerinde $\alpha\beta 3$ integrin, implantasyon sırasında, endometriyuma hücre yüzeyi yapışmasında önemli görevler üstlenir (Illera vd 2003). İntegrin $\alpha\beta 3$, mezenkimden köken alan hücrelerde ve kan damarındaki çeşitli hücre tiplerinde (örn., endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar, makrofaj ve trombositler) eksprese edilen en yaygın integrinlerden biridir (Kokubo 2007).

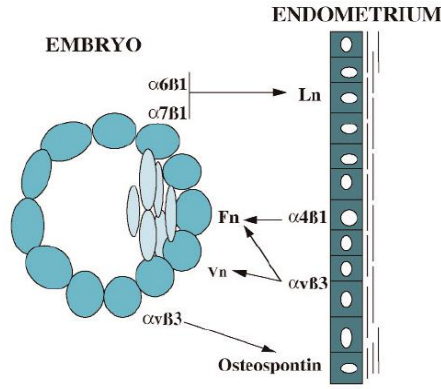
Endometriyumda, ilk olarak $\alpha\beta 3$ integrin hücre dışı fonksiyonel ligandı osteopontin (OPN) tanımlanmıştır. Diğer integrin ligandları, tablo 2.1. de belirtildiği gibi endometriyumda bulunan; hücre dışı matriks-kollajen-laminin, fibronektin ve vitronektin molekülüdür (Hoozemans vd 2004). $\alpha\beta 3$ integrin, birçok farklı liganda bağlandığı için en karışık integrindir. Etkileşimlerini RGD motifi ile gerçekleştirirler. $\alpha\beta 3$ integrin; vasküler düz kas hücrelerinin göçü, osteoklastların kemik matriksine yapışması ve anjiogenezis gibi birçok biyolojik olayda aracılık etmektedir (Kokubo 2007). Plasenta ve desiduadağı integrinlerin ekspresyonu; integrinlerin, implantasyonun sonraki aşamalarına katılımını arttırmaktadır (Illera vd 2000).

Tablo 2.1 İntegrinlerin endometriyum hücrelerinde dağılımı ve hücre dışı matris ligand tercihleri (Lessey vd 1996).

	Ligand	Hücre Tipi			Döngüye Özgü Değişiklikler		
		Bezler	Lumen	Stroma	Bezler	Lumen	Stroma
$\alpha 1\beta 1$	Col/LM	-/+b	-	-/+b	+	-	+
$\alpha 2\beta 1$	Col/LM	+	--	-	-	+	-
$\alpha 3\beta 1$	Col/LM/FN	+	++	-/+b	-	-	+
$\alpha 4\beta 1$	FN	++	-	-	+	-	-
$\alpha 5\beta 1$	FN	-	-	++	-	-	-/+
$\alpha 6\beta 4$	LM	++	++	-/+b	-	-	+
$\alpha 8\beta 1$?	-	-	-	-	-	-
$\alpha 9\beta 1$	Ten	-/+b	++	-	+	-	-
$\alpha v\beta 3$	VN/OP/FN/FB/vWF	-/+b	-/+b	-/+b	+	+	+
$\alpha v\beta 5$	VN	-	-	+	-	-	+
$\alpha v\beta 6$	FN	-	+	-	-	+	-

col: collejen, VN: vitronektin, OP:osteopontin, LM:Laminin, FN Fibrinojen, vWF: Willebradn faktör, Ten: Tenascin, b: Menstrual siklusa bağlı olarak Negatif yada pozitif.

Menstrual siklusa bağlı $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha 4\beta 1$ integrinler, implantasyon penceresi sırasında luminal epitelde birlikte eksprese olurlar. $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha 4\beta 1$ in birlikte çalışarak embriyo tutunmasına yardımcı oldukları düşünülmektedir (Sachin ve Reddy 2007). $\alpha v\beta 3$ integrin, sekresyon evresinin ortasında, endometrial epitelyalde eksprese edilir, implantasyon penceresinin etrafını çevreler ve desidual integrinler oluşması ile bir üst düzenlemeye geçer. İntegrin V dimeri hem uterus epitelinde hem trofoblastta bulunur. İntegrin V dimeri, RGD serilerine bağlanır ve uterus epitelini trofoblasta bağlamak için hücre-hücre etkileşimlerini meydana getirir (Hoozemans vd 2004). Trofoblastta bulunan subunit V, endometriyumdaki osteopontini tanır, trofoblastta eksprese olan fibronektin ve vitronektin ise endometriyumdaki subunit V ile etkileşime girer (Hoozemans vd 2004). Döngü etkileşimleri, embriyonun tutunmasını mümkün kılar: Şekil 2.1.6 da görüldüğü gibi trofoblastik $\alpha v\beta 3$, endometrial OPN'i tanır ve endometrial $\alpha v\beta 3$ trofoblast tarafından eksprese edilen vitronektin ve fibronektin ile etkileşir (Merviel vd 2001).



Şekil 2.6 İmplantasyonda endometriyum embriyo integrin ilişkisi (WEB-7)

İmplantasyon sırasında integrinlerin ekspresyonu, maternal-embriyo tanıma ve başarılı blastosist implantasyonu için çok önemlidir. Endometriyumda $\alpha\beta3$ integrinin azlığı veya yokluğu, infertilite ile ilişkilendirilebilir. İmplantasyon penceresinde $\alpha\beta3$ integrin, uterusun bez epitelinde ve luminal epitelinde eksprese edilmektedir. $\alpha\beta3$ integrin ekspresyonunun, implantasyon penceresiyle ilişkilendirilmesi; endometriozis, hidrosalpinks ve açıklanamayan infertilite dahil olmak üzere belirli infertilite tipleri ile integrin yokluğunun ilişkilendirilmesi sebebiyle araştırmacıların ilgisini uyandırmıştır (Illera vd 2000, Sachin ve Reddy 2007).

2.8. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasındaki iletişime aracılık eden küçük çok fonksiyonlu glikoproteinlerdir (WEB-8). Sitokinler; hücre büyümesi, enflamasyon, yaralanma, iyileşme ve sistemik yanıtı da içinde bulunduran enflamatuvar olayları ve bağışıklık sistemini düzenlerler (Akdoğan ve Yöntem 2018). Sitokin genel bir isimdir. Diğer alt isimler; varsayılan işlevleri, salgı hücresi veya eylem hedefleri temel alınarak tanımlanırlar. Örneğin; lenfositler tarafından üretilen sitokinlere, lenfokinler denir. İnterlökinler, bir lökosit tarafından yapılır ve diğer lökositler üzerine etki eder. Kemokinler, kemotaktik aktiviteleri olan sitokinlerdir (WEB-8).

Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

1. Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü (EGF) vb.),
2. Lenfokinler (IL-1, IL 2, IL3, IL 6, IL-18 vb.),
3. Koloni stimüle eden faktörler (LIF),

4. Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α ; TGF- β),
5. Tümör nekroz faktörleri (TNF- α ; TNF- β),
6. Interferonlar (IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ) (Güneş 1999).

Sitokinler, spesifik hücre yüzeyi reseptörlerinin aracılık ettiği biyolojik etkilere sahip olan ve embriyo-maternal etkileşimler sırasında işlevleri düzenleyen sinyallerdir (Biba vd 2015). Endometriyum, sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin önemli bir üretim bölgesidir. Sitokinlerin hücrel orijini değişir, ancak birçoğu uterus desidualize stromal hücrelerde, glandüler ve lüminal epitelinde baskındır (Salamonsen 2000).

Çeşitli sitokin dizileri, başarılı bir embriyo implantasyonu ve erken plasenta gelişimini kolaylaştıran bağışıklık adaptasyonu ve endometrial doku yeniden şekillendirme olaylarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Jasper vd 2007). Sitokin ekspresyon seviyelerindeki ve sitokin sinyallerindeki dengesizlikler, implantasyon başarısızlığına veya anormal yerleşime yol açabilirler. Bugüne kadar incelenen sitokin ve büyüme faktörlerinden; IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IL-10, interferon-gama, LIF, IL-11 ve TGF- β , EGF, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve insülin büyüme faktörünün, embriyo implantasyon süreci için çok önemli olduğu belirtilmiştir (Biba vd. 2015). Endometrial sitokinler, konseptusun fetal bağışıklık reddinden korunması, desidualizasyon ve yeterli plasental gelişim için gerekli doku yeniden şekillendirme işlemlerini kolaylaştırmak ve gerekli lökosit popülasyonlarındaki değişiklikleri düzenlemek için karmaşık ağlarda hareket eder.

Uterus luminal ve glandüler epitel hücreleri, desidual fibroblastlar ve endotel hücreleri; LIF, GM-CSF, IL-1, IL-1, IL-6, IL-12, TNF ve TGF dahil olmak üzere birçok ek sitokinin güçlü kaynaklarıdır (Jasper vd 2007). TGF- β immünsüpresiftir ve aynı zamanda in vitro kültürlenmiş insan endometrial hücrelerinde, LIF / IL-6 yolağı üzerinde etkilidir (Chaouat vd 2007).

Tablo 2.2 İmplantasyona katılan bazı sitokinlerin bulunduğu lokalizasyonlar ve zamanlamaları (Van Mourik vd 2009).

Sitokin	İnfamatuar etki	Bulunma zamanı	Endometriyum	Blastosist	Fertiliteye etkisi
LIF	+	18-28 gün	+	+	+
IL 1	+	Sekresyon Evresi	+		+
IL 6	+	Desidualizasyon	+	+	bilinmiyor
IL 11	+	Sekresyon Evresi	+	+	Farelerde yok
IL 18	-	Desidualizasyon	+		bilinmiyor

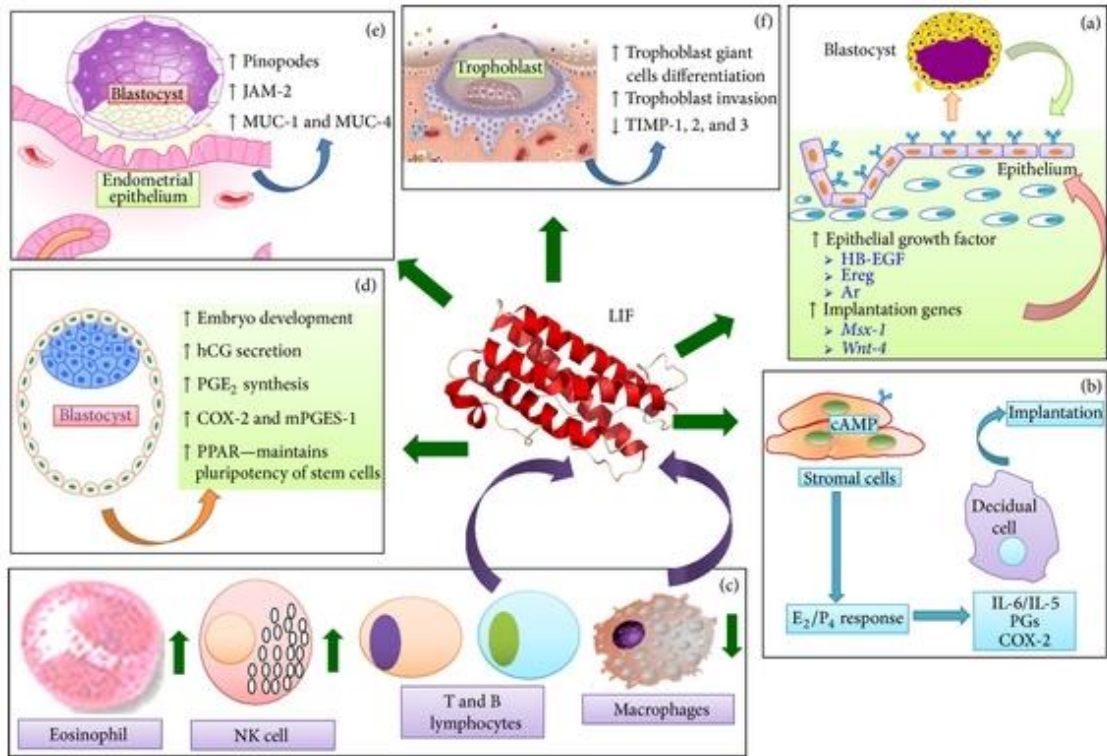
Sitokinler, dendritik hücrelerin ve makrofajların fenotipi ve işlevi üzerindeki etkileri yoluyla, bağışıklık yanıt sonuçlarını düzenlerler. Sitokinler, implantasyon başarısı için gerekli olan vasküler ve doku onarım değişikliklerine aracılık etmek için endotelial hücreleri, epitelyal hücreleri ve stromal hücreleri hedef alırlar. Endometriyumda düzenleyici sitokinlerin ekspresyonlarının değiştirilmesinin, açıklanamayan tekrarlayan düşüklerin nedeni olma ihtimali, bu konuda çok fazla çalışma yapılmasına neden olmuştur (Jasper vd 2007).

2.8.1. LIF

LIF, pleiotropik (bir genin, birden fazla fenotipik etkiye sahip olması) olarak üretilen, indüklenebilen, çok fonksiyonlu glikoprotein yapısında, IL-6 ailesi üyesi bir sitokindir (Hoozemans vd 2004, White vd 2007). LIF, farklı hücre tiplerinde proliferasyon ve farklılaşmanın modülasyon faktörüdür (Hoozemans vd 2004).

LIF yapısal olarak; IL-6, oncostatin-M, siliyer nörotrofik faktör ve IL-11 dahil olmak üzere, ilgili sitokin ailesi ile ortak bir hücre içi sinyal yolağına sahiptir (Van Mourik vd 2009, Tawfeek vd 2012). LIF-R kompleksi, iki alt birim içerir: LIF'e özgü alt birim; LIFR-beta ve glikoprotein 130 (gp130) alt birimidir (Tawfeek vd 2012, Salleh ve Giribabu 2014). LIF'in LIF-R ve gp130'a bağlanması, sinyal iletim yollarını aktive eder. LIF'in Hücre yüzeyinde, LIF reseptörüne bağlanması ile LIF reseptörü-beta (LIF-R β) glikoprotein gp-130'u (IL-6 ailesi sitokinleri için ortak sinyal reseptörü) bağlayarak bir reseptör kompleksini oluşturur (White vd 2007). Uterustaki LIF sinyali, JAK/STAT yolunda gerçekleşir (Kimber 2005). Sinyal transdüksiyonu, Janus ailesinin üyelerinin aktivasyonunu ve STAT ailesinin transkripsiyon faktörleri üyelerinin fosforilasyonunu içerir (Tawfeek vd 2012).

LIF, embriyonun preimplantasyon gelişiminde, sonraki implantasyon aşamasında ve erken gebelikte önemli rol oynamaktadır (Hoozemans vd 2004). LIF; implantasyon için uterus düzenlenmesi, blastosist büyümesi ve gelişmesi, embriyo endometrial etkileşimi, embriyo implantasyonu, desidualizasyon, implante embriyolara karşı uterin inflamatuvar yanıtı ve trofoblast istilası süreçlerine aracılık etmektedir (Salleh ve Giribabu 2014). LIF ekspresyonu, insan endometriyumunda ve falop tüpünde (Carson vd 2000, Tawfeek vd 2012) menstrual döngüye bağlı olarak, siklusun 21 – 24. günleri arasında implantasyon penceresi döneminde eksprese edilir (Hoozemans vd 2004).



Şekil 2.7 Embriyo implantasyonunda LIF'in bilinen rollerinin özeti (Salleh ve Giribabu 2014).

LIF: lösemi inhibitör faktörü, **HB-EGF:** heparin bağlayıcı-epidermal büyüme faktörü, **Ereg:** epiregulin, **Ar:** amphiregulin, **E2:** östrojen, **P4:** progesteron, **IL:** interlökinler, **PG'ler:** prostaglandinler, **COX:** siklo-oksijenaz, **NK:** doğal katil, **PPAR:** peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör, **PGE2:** prostaglandinler E2, **hCG:** insan koryonik gonadotropin, **MUC:** müsin, **JAM:** jonksiyonel adezyon molekülleri

Embriyo implantasyonunda LIF'in bilinen rolleri, şekil.2.7.de özetlenmiştir. Şekil 2.7.'de harflerle ifade edilen her bir alanı tek tek açıklamak gerekirse;

- LIF, reseptif endometriyumdaki EGF ve implantasyon genlerinin ekspresyonunu artırır.
- LIF, sitokin ve prostaglandin üretimini artırarak, stromal desidualizasyonu uyarır.
- LIF, implantasyon sırasında enflamatuar yanıtta katılan spesifik lökosit topluluğunun tutulmasında rol oynar.
- Endometriyum ve blastosist tarafından üretilen LIF, embriyonun büyümesini ve gelişmesini düzenler.
- LIF ayrıca pinopodlar ve adezyon molekülleri yoluyla, embriyo endometrial etkileşiminin artırılmasında rol oynar.
- LIF, trofoblast hücrelerinin farklılaşmasını uyarır ve uterus stromalarını istila etmek için trofoblast kapasitesini artırır (Salleh ve Giribabu 2014)

Endometriyumda LIF ekspresyonu, proliferatif evre sırasında düşük kalır, ovulasyondan sonra yükselir (Tawfeek vd 2012). Maksimum ekspresyon,

implantasyon penceresi döneminde endometriyumda, luminal epitel ve endometrial bezlerde eksprese edilir (Kimber 2005, White vd 2007). Farelerde hamileliğin 1. gününde (1. gün vajinal tıkaçın gözlem günü), farelerin endometrial bezlerinde önemli bir LIF seviyesi eksprese edilir. Bu ekspresyon, gestasyonun 3. gününde azalır. İkinci bir LIF ekspresyonu artışı, implantasyon günü olan gebeliğin 4. gününde uterus bezlerinde meydana gelir. İmplantasyonu takiben 5. günde, LIF ekspresyonu azalır ve gebeliğin geri kalanında düşük bir seviyede bulunur (Carson vd 2000).

LIF mRNA'sının ekspresyonu, gebeliğin 1. gününde luminal epitelde ve daha sonra gebeliğin 4. gününde glandüler epitelde en yüksek eksprese edilir (Fouladi-Nashta vd 2005). LIF proteini, sekresyon evresinde endometrial bezlerde maksimumdur ve uterus sıvısı, orta ila geç sekresyon evresinde maksimum düzeylerde LIF proteini içerir (White vd 2007). İmplantasyonun 5. gününden itibaren stroma'nın desidualizasyonunda da tespit edilir (Fouladi-Nashta vd 2005). Hem LIF-R β hem de gp-130 proteini, gebeliğin 3-5 günlerinde luminal epitelde bulunur. Luminal epiteldeki gp-130 ekspresyonu, progesteron ile birlikte östrojen tarafından uyarılır (Kimber 2005). Ayrıca Fare, tavşan ve insan blastosistleri preimplantasyon embriyo gelişim hızını artırmaya yardımcı olan LIF mRNA' sını ve LIFR ve gp130'u eksprese ederler (Salleh ve Giribabu 2014).

LIF, desidualizasyonda önemli bir rol oynar. STAT3 fosforilasyonu yoluyla, insan endometrial stromal hücrelerinde östrojen ve progesteronun etkisi ile desidualizasyonu artırır. LIF, İn vitro desidualize endometrial stromal hücrelerinden IL-6 ve IL-15 salgılanmasını yukarı regüle eder (Salleh ve Giribabu 2014). Maternal LIF sinyali, fare blastosist implantasyonu için gereklidir. Gen hedefleme deneyleri, LIF eksikliği olan dişi farelerin infertil olduğunu göstermiştir (White vd 2007). LIF-null farelerde yapılan çalışmalarda, fonksiyonel LIF geni bulunmayan homozigot dişiler normaldir ve ovulasyon gerçekleşir (Tabibzadeh vd 1995, Carson vd 2000), blastosistler uterus luminal epiteline bağlanır, ancak implantasyon gerçekleşmez (White vd 2007). Epitelyal apoptoz, stromal desidualizasyon ve blastosist istilası gözlenmez (Cheng vd 2017).

Lif-/- dişilerinden alınan blastosistlerin, yaban tip farelere aktarılması ile Lif-/- dişilerinin embriyoları, normal implantasyon sürecinde ilerler ve gelişim gösterirler (Fouladi-Nashta vd 2005). Hamile Lif-/- farelerinin falop tüpüne, gebeliklerinin 4. veya 5. günlerinde tek bir rekombinant LIF enjeksiyonu, blastosist implantasyonuna neden olur. Bu durum, hamilelik sırasında LIF'in sadece implantasyonu başlatmak için gerekli

olduğunu göstermektedir (Cheng vd 2017, White vd 2007). LIF eksikliği olan infertil kadınlarda, gebeliğin eksojen LIF infüzyonu veya enjeksiyonu ile meydana geldiği bildirilmiştir (Fouladi-Nashta vd 2005).

2.8.2. İnterlökin 6

İnterlökinler, hücre yüzeylerindeki yüksek afiniteli reseptörlere bağlanarak, hücreler ve dokulardaki birçok reaksiyona katılan, büyük protein gruplarından oluşmaktadır (Justiz Vaillant ve Qurie 2020).

IL-6, farklı tipte immün, immün olmayan hücreler ve tümör hücreleri tarafından üretilen bir pleiotropik sitokindir (Sakurai vd 2012). IL-6, çeşitli patolojik durumlarda rol oynamasının yanında, doku homeostazına katkıda bulunan fizyolojik fonksiyonlarda da görevlidir (Von Wolff vd 2002). IL-1 β ve IL-6, blastosist yapışması ve endometriyuma invazyon sırasında, anne embriyo etkileşimi ile ilgili proenflamatuar sitokinlerdir (Biba vd 2015). IL-6, spesifik bir IL-6 reseptörü ve gp130'dan oluşan bir reseptör kompleksine bağlanarak etkinlik gösterir. IL-6, menstrual kanama ile ilişkili bir sitokin olan TNF- α ile sıkı bir şekilde düzenlenir (Von Wolff vd 2002). Steroid hormonlar, özellikle östrojen, IL-6 ekspresyonunu indüklemektedir (Salamonsen vd 2000).

Fare uterusunda epitel hücreleri, stromal fibroblastlar, desidual fibroblastlar, endotel hücreleri (Jasper vd 2007) ve makrofajlar tarafından, özellikle preimplantasyon döneminde sentezlenen IL-6; IL-6 reseptörleri, lökositler, endotel hücreleri, endometriyum ve trofoblast üzerinde bulunmaktadır (Salamonsen vd 2000, Van Mourik vd 2009). IL-6, lüminal epitel tarafından döngüsel bir şekilde üretilir; implantasyon ve menstrüasyon sırasında en yüksek seviyeye ulaşır (Van Mourik vd 2009).

Proliferatif evrede düşük seviyelerde ve sekresyon evresinde ise luminal epitelde ve endometrial bezlerde artan konsantrasyonlarda eksprese edilmektedir (von Wolff vd 2002, Salamonsen vd 2000). Geç sekresyon evresinde, IL-6 seviyeleri tekrar düşer (ancak bu düşüş, proliferatif evredeki kadar düşük seviyelere inmez). IL-6 ekspresyonu, IL-1 dahil olmak üzere birçok faktörün kontrolü altındadır (Salamonsen vd 2000).

Sekresyon evresinde IL-6'nın yukarı regülasyonu, IL-6'nın implantasyon sürecine dahil olduğuna dair varsayımlara yol açmıştır. Erken dönem düşüklerden muzdarip hastalarda, orta sekresyon evresinde baskılanmış endometrial IL-6

ekspresyonunu gösteren bulgulara rastlanmıştır (von Wolff vd 2002). IL-6 eksikliği olan farelerde, implantasyon bölgesinde %48'lik daralma (Salamonsen vd 2000, Chaouat vd 2007), doğurganlık ve implantasyon oranlarında ise azalma görülmektedir (Biba vd 2015). Tekrarlayan düşükleri olan kadınların, sekresyon evresi endometriyumunda IL-6 ve IL-1 mRNA'larının ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Chaouat vd 2007).

Son araştırmalar, düşük IL-6 mRNA üretiminin; doku yeniden modellenmesi, desidualizasyon ve plasenta/trofoblast gelişimindeki fonksiyonların azalması sonucu tekrarlayan düşüklerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda, serum seviyeleri yüksek IL-6 tespit edilmiştir. Bu durum IL-6 fazlalığının ve eksikliğinin başarısız implantasyon sonuçlarına yol açabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır (Van Mourik vd 2009).

2.8.3. İnterlökin 18

İnterlökin-18, bağışıklık hücreleri ve bağışıklık sisteminde görev almayan diğer hücreler tarafından üretilmektedir (Tokmadzić vd 2002). Hücrede aktif olmayan bir öncü olarak üretilen IL-18, kaspazların etkisiyle aktif IL-18'e aktive edilmektedir (Van Mourik vd 2009).

Olgun IL-18 proteini, *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonu gibi durumlarda bazı insan epitel hücreleri tarafından da salgılanabilir. Klamidyal enfeksiyonu, IL-1 dönüştürücü enzim aktivasyonu yoluyla, olgun IL-18'in salınmasına neden olmaktadır (Lu vd 2000). Hamilelik sırasında eksprese edilen IL-18 hakkında çok az veri bulunmaktadır. Maternal periferik kandaki IL-18 yüksekliği, normal gebeliğin yanı sıra bazı karmaşık gebeliklerde de görülebilmektedir (Tokmadzić vd 2002). İnsan adet döngüsü boyunca ve desidualizasyon sırasında, IL-18 sisteminin tüm bileşenlerinin üretimi büyük ölçüde artar. IL-18R, endometriyumun stromal hücreleri üzerinde eksprese edilir (Van Mourik vd 2009). IL-18'ler, farelerde ve insanlarda, EBI3 (IL 27 alt birim) veya IL-18 BP (IL-18 bağlayıcı protein) tarafından düzenlenirler (Chaouat vd 2007). IL-18'lerin over steroidlerinin etkisi altında, endometriyumda orta sekresyon evresinde sekresyonlarının azaldığı fakat istatistiksel olarak diğer fazlar ile aralarında fark olmadığı bildirilmiştir (Lé dée vd 2006).

IL-18, anjiyopietin 2 salgılamak için uNK (doğal katil) hücrelerini aktive eder. IL-18 yolunun aktivasyonunun gerekli olduğu ve implantasyon penceresi sırasında fonksiyonel spiral arterlerin fizyolojik olarak dengesinin bozulmasına yol açtığı

düşünülmektedir (Lé dée vd 2006). Steroidler, IL-18 ekspresyonunun kontrolü için önemli kabul edilirler. Son araştırmalar, östrojenin; IL-18 ve IL-18BP üretimini engellediğini göstermektedir. IL-18, IL-18R yoluyla proenflamatuar sinyallemeyi arttırmak için IL-1 üretimini de indüklemektedir. IL-18 fazlalığı veya IL-18 eksikliği, implantasyon sonucunu olumsuz etkilemektedir (Van Mourik vd 2009).

2.8.4. VEGF

Vasküler endotel büyüme faktörü, endotel hücreleri için güçlü bir mitojen ve güçlü bir anjiyogenez indükleyicisidir (Chakraborty 1995). Kromozom 6 (6p12) üzerinde bulunan VEGF, homodimerik bir glikoproteindir (Hoozemans vd 2004, Zhang vd 2001). Vasküler büyümenin ve vasküler yeniden yapılanmanın ana modülatörü olan VEGF, endometriyumdaki vasküler geçirgenliği arttırmaktadır. Uterus, travma veya malignite gibi patolojik durumlar olmaksızın vücutta dögüsel olarak anjiyogenezin görüldüğü tek organdır (Hoozemans vd 2004, Zhang vd 2001).

Altı alt tip [VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFE ve plasental büyüme faktörü (PlGF)] ve üç reseptör alt tipi (VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3) tespit edilmiştir. Bunlar beş protein ek varyantına sahip olan VEGF-A endometriyumda baskındırlar (Hoozemans vd 2004, Sharkey vd 2000). VEGF, iki tirozin kinaz ailesi reseptörü c-fms benzeri tirozin kinaz ve fetal karaciğer kinaz-1 yolları ile endotel hücre bölünmesini, proliferasyonunu, hücre göçünü, hücre geçirgenliğini ve hücrelerin dokulara istilasını düzenler (Chakraborty 1995, Das vd 1997). Preimplantasyon döneminde blastosistin senkronize gelişimi ve uterusun alıcı duruma farklılaşması, implantasyon süreci için kritik öneme sahiptir. İmplantasyon penceresinde; vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezde birçok moleküler mekanizmalar bulunmaktadır (Chakraborty vd 1995).

VEGF ekspresyonu, endometriyumda sekresyon evresinin implantasyon penceresi döneminde maksimumdur. VEGF-R2 ekspresyonu; geç proliferatif evrede maksimum seviyeye ulaşırken, VEGF-R1; orta sekresyon evresinde artış göstermektedir (Hoozemans vd 2004). Blastosist apozisyon bölgesinde artan, uterin vasküler geçirgenlik, kemirgenlerde implantasyon işleminin başladığının dikkat çeken ilk işaretidir. Bu yüksek lokalize vasküler geçirgenlik, lüminal epitel ve trofoektoderm arasındaki ilk bağlanma reaksiyonuyla aynı anda meydana gelmektedir ve implantasyon işlemi için en erken ön koşullardan biri olarak kabul edilmektedir. Artan vasküler geçirgenlik ve bağlanma reaksiyonları farelerde ilk olarak gebeliğin 4.

gününün sonlarına doğru gerçekleşmektedir. Stromal yapının ekstrasellüler matriksi yeniden biçimlendirilirken, bu prosedüre anjiyogenez eşlik eder (Chakraborty 1995).

VEGF ve VEGF reseptörlerinin mRNA'sının fare embriyosunun trofoblastlarındaki varlığı, VEGF'nin trofoblastların farklılaşması ve istilasında önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (Zhang vd 2001). VEGF ve karşılık gelen reseptörlerinin, blastosistlerin bağlandığı yerde uterus vasküler geçirgenliğinin artırılmasında ve sonrasında gerçekleşen endometriyumun desidualizasyonunda çok önemli rol oynadığını göstermiştir (Das vd 1997). Hem VEGF hem de fonksiyonel reseptörü, özellikle invaziv birinci trimester ekstravillöz sitotrofoblast ile trofoblast tarafından eksprese edilmektedir. Bu durum VEGF'nin, trofoblastın otokrin bir şekilde proliferasyon, göç/istila ve metabolik aktivitesini düzenlemeye katıldığını gösterir (Hoozemans vd 2004). Embriyonun endometriyuma implantasyonu ve ardından endometriyum içine gömülmesi, endometriyumda anjiyogenez olmadan mümkün değildir. Anjiyogenez olmadan plasenta oluşumu da gerçekleşmez. Bu durum önemli bir anjiyogenez faktörü olan VEGF'in implantasyon sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. VEGF nakavt fareler, gebe kalabilmelerine rağmen, canlı yavru doğumu gerçekleştiremezler (Hoozemans vd 2004).

Gonadotropin stimülasyonunun farelerde VEGF konsantrasyonlarını ve implantasyon oranlarını düşürüyor olması ve insanlarda rekombinant FSH tedavisinin serum VEGF konsantrasyonlarını azaltıyor olması, klinisyenler için önemli olan bir gözlemdir. İmplantasyondaki anjiyogenez sürecini daha fazla aydınlatmak ve VEGF'nin anjiyogenez için bir belirteç olarak tanı olanaklarını daha da geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Hoozemans vd 2004).

2.9. Kök Hücre

Endometriyum, memelilerin üreme dönemlerinde dramatik büyüme, bozulma ve rejenerasyon geçirmektedir. Kök hücreler üreme dönemindeki değişikliklere dahil edilmişlerdir. Ancak kökenleri, doğaları, anatomik lokalizasyonları ve karakterizasyonları tam olarak aydınlatılamamıştır (Gunjal vd 2015). Kök hücreler, insan vücudunun farklılaşmamış hücreleridir (Zakrzewski, 2019). Bir organizmanın herhangi bir hücrelerine farklılaşabilen, çoğalabilen kök hücreler, kendini yenileme

yeteneğine sahiptirler (Girlovanu vd 2015). Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunmaktadır (Biehl ve Russell 2009).

Kök hücrelerin üç ortak özelliği vardır;

- a) Kendini Yenileme (Self-Renewal):** Erken embriyonik dönemde, yüksek düzeyde hücre kendini yeniler. Bölünebilme kabiliyetleri, bir sonraki jenerasyona aktarılabilir. Farklılaşmanın ilerleyen dönemlerinde kendini yenileme kabiliyetleri azalır.
- b) Özelleşmemiş Hücreler:** Herhangi bir doku hücresine ait karakteristik özelliklere sahip değildir.
- c) Farklılaşabilme (Plastisite):** Kök hücreler farklılaşarak kas, kan, kalp, sinir ve kıkırdak gibi çok fazla özelleşmiş hücreyi oluşturabilirler.

İnsan endometriyumunda epitel progenitör hücre ve mezenkimal kök hücre popülasyonu tanımlanmıştır (Xiao vd 2017). Yetişkinlerde bulunan mezenkimal kök hücreler; stromal kökenli olup, organizmadaki hemen hemen her dokudan izole edilebilirler (Chagastelles ve Nardi 2011). Salgıladıkları sitokinler ve kemokinler; immün sistemin regülasyonunda, hücrelerin çeşitli bölgelere yöneliminde ve hücrelerin farklılaşmasında önemli işlevlere sahiptir (Avcılar vd 2018). Mezenkimal kök hücreler, spesifik hücre yüzey belirteçleri olarak CD105, CD73 ve CD90' ı sergilerler (Girlovanu vd 2015).

CD105, TGF- β için yardımcı bir reseptör görevi gören tip 1 transmembran glikoproteindir. CD105, vaskülojenez ve anjiyogenez mekanizmalarında görev alır. Embriyo implantasyonu için uterus alıcılığındaki işlevsel rolü hala belirsizdir. İmplantasyon penceresinde uterus, lümen ve bezlerin epitel hücrelerinde çoğalan endotel hücrelerinde, plasentanın sinstiotroblastında ve stromal hücrelerde eksprese edilir. İmplantasyon boyunca endometriyumda gözlemlenen CD105 ekspresyonunun, implantasyon aşaması sırasında arttığı gözlemlenmiştir. Lümen ve bezlerin epitel hücrelerinde baskın olan CD105 ekspresyonu, stromal hücrelerde daha hafif bir ekspresyon göstermektedir (Chadchan vd 2016).

Kök hücrelerin, menstruasyon ve doğumdan sonra endometriyumun fonksiyonel tabakasının, rejenerasyonundan sorumlu oldukları düşünülmektedir. Endometrial doku örneklemelerinde, endometrial hastalıklarda, mezenkimal kök/progenitör hücreler üzerinde yapılan çok fazla araştırmaya rastlanmamıştır. İlgili çalışmalar temel olarak kök hücreler ve ilgili genlere odaklanmaktadır. Endometrial hastalıklarda üç transkripsiyon faktörü; cinsiyet belirleyici bölge Y-kutusu 2 (SOX2), Nanog homeobox

(NANOG) ve oktamer bağlayıcı protein 4 (OCT3/4), düzenleyici ağı iş birliği içinde sürdürür ve kök hücrelerin pluripotensitesini ve kendi kendini yenilemesini sağlamada önemli bir rol oynar (Xiao vd 2017). Bu üç transkripsiyon faktörünün; östrojen döngüsünün tüm fazlarında, endometriyum bezleri, endometrial stroma, endometriyumun bazal ve fonksiyonel katmanlarının perivasküler bölgelerinde ve miyometriyumda sıklıkla görüldükleri bildirilmiştir (Choobineh vd 2016).

SSEA-1; hücre yüzeyi glikanı, Lewis X karbonhidrat olarak tanımlanan bir antijenik epitoptur ve preimplantasyon fare embriyoları, teratokarsinom kök hücreleri ve fare embriyonik kök hücrelerinde eksprese edilir. İnsan endometriyumunda SSEA-1'e karşı immüno reaktivitesi epitel ve sadece bazı lökositlere özgüdür (Tempest vd 2018). Sağlıklı ve hasta bireylerde, mevcut endometrial biyoloji bilginizi genişletmek için kök/progenitör hücre aktivitesi ve bazalis epitelyumu iyi tanımlamak gerekir. Fonksiyonel endometrial bezler, menstrüasyondan sonra bazalis bezlerinden yenilenirler. SSEA-1, ağırlıklı olarak epitelyal kök/progenitör hücrelerin öngörülen yeri olan bazal bez epitel hücrelerinde eksprese edilir. SSEA-1 ekspresyonu; premenopozal endometriyumda adet döngüsünün erken proliferatif aşamasında yüzeysel bezlerde az olup, bazal kısımdaki bez epitelinde yoğundur. Sekresyon döneminde fonksiyonel bezlerde, SSEA-1 ekspresyonu düşük iken, bazalis bölgesinde SSEA-1 immünoreaktivitesi mevcuttur. Ekspresyon paterninin, bazalisten fonksiyonalse değişmesi, SSEA-1'in hücre hiyerarşisiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. SSEA-1'in endometriyumdaki işlevi, tam olarak bilinmemekle beraber bu işlev; hücre yapışması, yer değiştirmesi ve farklılaşma kapasitesi ile ilişkili olabilir. SSEA-1'in bazalis epitelinde gerçekleşen belirgin ekspresyonu göz önüne alındığında, hücrelerin endometrial spesifik epitelyal kök/progenitör hücre nişinin bir bileşeni oldukları düşünülebilir (Valentijn vd 2013).

2.10. Hipotez

Çalışmanın hipotezi;

İmplantasyonda önemli bir molekül olan miRNA-200c'nin, embriyo implantasyonunu olumsuz bir şekilde etkilediği, miRNA-200c'nin hem histolojik bozukluklara hem de embriyo sayılarında azalmaya neden olacağıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulundan 17.01.2018 tarihinde PAUHADYEK 2018/01 numarasıyla onay alındı. Çalışma için gerekli hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Çalışmamızda Wistar Albino türü, sağlıklı 30 adet dişi sıçan kullanıldı. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış ve sıçanlar, ışıklandırması (12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık), havalandırılması (%60-70 nem) ve oda ısısı (20-24 °C) kontrol edilen bir odaya yerleştirildi. Ortalama ağırlıkları 150-160 gr. ağırlığındaki 8 haftalık sıçanlar rastgele seçilerek gruplar oluşturuldu.

3.2. Deneysel Uygulama

3.2.1. Deneğin gruplarının oluşturulması

Çalışma kapsamında 30 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların 6 tanesi Grup 1 olarak belirlendi. Grup 1 östrus evresindeki sıçanlardan oluşmaktaydı. Östrus evresi vajinal smear yöntemi ile alınan vajinal sıvı içerisindeki hücresel morfolojilere bakılarak tespit edildi. Menstrual döngünün östrus evresinde uterus dokuları servikal dislokasyon yapılarak alındı. Yirmidört tanesinde gebelik oluşturuldu. 4 dişi sıçan ve 1 erkek sıçan, kafeste 1 gece beraber tutuldu. 1 gün sonra smear alındı ve sperm görüldüğünde, gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Gebelik oluşturulan sıçanların 12 tanesi ayrıldı. Gebeliğinin 4. günü (n=12) sağ uterus boynuzuna anestezi altında 500 µl fizyolojik salin içinde 5 µl miRNA-200c mimiği (Dharmacon-lot-180814) ve sol uterus boynuzuna 500 µl fizyolojik salin enjekte edildi (Zhang vd 2001, Zheng vd 2017). Bunlardan 6 tanesinin uterusları gebeliğin 8. gününde alındı ve bu denekler Grup 2 olarak adlandırıldı

(Charkraborty vd 1995, Cai vd 2000), geri kalan 6 tanesininde uterusları gebeliğin 13. gününde alındı ve grup 3 olarak adlandırıldı. Gebe grubu sıçanların on iki tanesine herhangi bir uygulama yapılmadı. Uterus dokuları, altı tanesinin gebeliğin 8. gününde (Grup 4), altı tanesininde 13. gününde (Grup 5) servikal dislokasyon yapılarak alındı ve embriyoları sayıldı. Alınan uterus dokuları tespit için %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Dokular 72 saat tespit edildikten sonra rutin ışık mikroskopi takibine tabi tutuldu. Parafin bloklar oluşturuldu ve Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 μ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere, α 5 β 3 integrin, LIF, IL-6, IL-18, VEGF, CD105, Oct3/4, SSEA-1, NANOG ekspresyonlarını belirlemek amacıyla immunohistokimyasal boyama işlemi uygulandı. Olympus BX51 marka ışık mikroskobu ile Olympus DP72 dijital kamera kullanılarak kesitler resimlendi.

Deney grupları aşağıda özetlenmiştir.

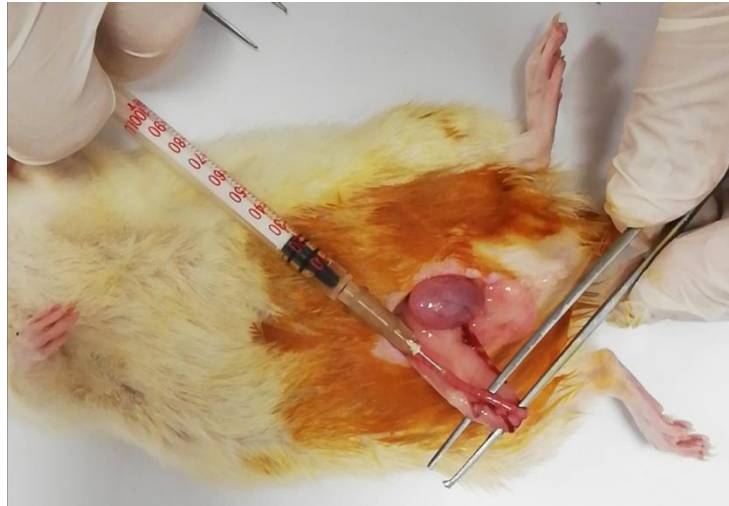
Grup 1: Östrus evresinde alınanlar

Grup 2: Gebelik oluşturulan ve gebeliğin dördüncü gününde miRNA-200c uygulanan ve uterus dokuları gebeliğin 8. gününde alınanlar

Grup 3: Gebelik oluşturulan ve gebeliğin dördüncü gününde miRNA-200c uygulanan ve uterus dokuları gebeliğin 13. gününde alınanlar

Grup 4: Gebelik oluşturulan ve uterus dokuları gebeliğin 8. gününde alınanlar

Grup 5: Gebelik oluşturulan ve uterus dokuları gebeliğin 13. gününde alınanlar



Şekil 3.1. Sıçan uterus boynuzuna miRNA-200c uygulanması

3.2.2. Embriyoların sayılması

MikroRNA-200c uygulamasının embriyo implantasyonuna etkisini görebilmek için deney sürecini bitirip dekapite edilen sıçanların uterus dokuları çıkartıldı. Sağ ve sol boynuzda bulunan embriyolar sayıldı ve not edildi (Liu vd 2016).

3.3. Doku Takibi Prosedürü

1. Alınan dokular 3 gün formaldehitte bekletildi.
2. Akarsuda 30 dakika yıkandı.
3. %50 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
4. %70 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
5. %80 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
6. %90 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
7. %100 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
8. Ksilen I de 1 saat bekletildi.
9. Ksilen II de 1 saat bekletildi.
10. Parafin I de 1 saat bekletildi.
11. Parafin IIde 1 saat bekletildi.
12. Dokulara parafine gömme ve etiketleme işlemi yapıldı.

3.4. Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü

Doku takip yöntemi tamamlandıktan sonra mikrotom cihazıyla 5 µ' luk kesitler alındı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir:

1. Etüvde 60 °C'de 2 saat bekletildi.
2. Ksilende yarım saat bekletildi.
3. Ksilende yarım saat bekletildi.
4. %100'lik etil alkolde 3 dk. bekletildi.
5. %90'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.
6. %80'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.
7. %70'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.
8. %70'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.
9. %50'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.

10. Hematoksilen 4 dk
11. Asit alkol
12. Çeşme suyu ile yıkama
13. Amonyak
14. Çeşme suyu ile yıkama
15. Eozin 10 sn
16. Çeşme suyu ile yıkama
17. %50'lik etil alkolde 3 dk. bekletildi.
18. %70'lik etil alkolde 3 dk. bekletildi.
19. %80'lik etil alkolde 3 dk. bekletildi.
20. %90'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.
21. %100'lık etil alkolde 3 dk. bekletildi.
22. Ksilende yarım saat bekletildi.
23. Ksilende yarım saat bekletildi.
24. Entellan ile kapatma.

3.5. İmmünohistokimya Protokolü:

Reaktifler için Life Technologies, USA Lot:1954379A Histostain-Plus kit kit kullanılmıştır.

1. Doku takip yöntemi tamamlandıktan sonra mikrotom cihazıyla 5 μ ' luk kesitler alındı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir:
2. Etüvde 60 °C'de 2 saat bekletildi.
3. Deparafinizasyon işlemi için 1 saat Ksilende bekletildi.
4. Ksilenden çıkarılıp havada kurutuldu.
5. Kesitler sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
6. Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
7. Antijen retrieval işlemi için sodyum sitrat buffer ile (10 nM sodyum sitrat, 0.05 ml Tween 20, pH 6,0) mikrodalga içerisinde 5 dk kaynatıldı.
8. Dokular 10 dakika fosfat buffer salin (PBS)'da bırakıldı.
9. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, %30' luk H₂O₂: Metanol (1: 9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
10. Dokular 5 dakika 3 kez tekrarlı PBS'de bırakıldı. Pappen ile doku sınırlandırıldı.
11. İmmun bloklama: sekonder kitin içindeki A solüsyonu immün blok solüsyonudur.

- Sınırlandırılmış doku üzerine damlatılır ve 10 dk inkübe edildi.
12. Dokular üzerine uygun 1/ 150 oranda dilüe edilmiş primer antikolar ilave edilerek 1 gece bekletildi.
 13. Kullanılan Antikolar: LIF Bios Lot: 9G23N13, CD15 FUT4/SSEA-1 Bios Lot: 7G19M10, CD105 Bios Lot: 8G22M18, $\alpha\beta 3$ Bios Lot: 7G11M19, VEGF Bios Lot: 9G16 M21, IL 6 Bios Lot: 6G24M21, NANOG Bios Lot: 8G15M12, Oct3/4 Santa cruz Lot: F2719, IL 18 Protein Tech 10663-1-AP
 14. Sekonder antikor ile inkübasyon: sekonder kitteki B solüsyonu sekonder antikordur. Pappen ile sınırlandırılmış doku üzerine damlatılıp 10 dk inkübe edildi.
 15. Dokular 5 dakika 3 kez tekrarlı distile su da bırakıldı.
 16. Enzim ile inkübasyon: sekonder kit içindeki C solüsyonu sekonder antikora bağlanan enzim içerir. Dokular üzerine damlatıldı ve 10 dk inkübe edildi.
 17. Dokular 5 dakika 3 kez tekrarlı PBS'de bırakıldı.
 18. Kromojen boyaması için dokuların üzerine DAP kromojen damlatıldı ve 25 dk inkübe edildi.
 19. Dokular 5 dakika 3 kez tekrarlı distile su da bırakıldı.
 20. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merk Harris' hematoksilin) ile zıt boyama yapıldı.
 21. Kesitler akar suda yıkandı ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
 22. Dokular ksilen I ve ksilen II'de 2 şer dakika bekletildi.
 23. Dokuların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Uterusa implante olmuş (uterus boynuzuna miRNA 200c mimiği, fizyolojik salin uygulanmış ve herhangi bir uygulama yapılmamış) gebeliğin 8. ve 13. günlerinde elde edilen farklı gruplara ait embriyo sayıları arasındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığına dair karşılaştırmaların yapılabilmesi için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel işlemler, IBM-SPSS-Statistic Version 21 programı ile gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada elde edilen veriler analiz edilerek, deney ve kontrol gruplarına ait istatistiki değerleri gösteren tablolar oluşturulmuş, gruplar arası farklılıklar 0,05 anlamlılık düzeyinde, elde edilen p değerleri doğrultusunda test edilmişlerdir. Buna göre, $p > 0,05$ ise, gruplar arası farklılığın önemli olmadığı kabul edilmiş, $p \leq 0,05$

ise gruplar arası farklılığın önemli olduğu kabul edilmiştir. Bulgular arasında farklılığın mevcut olduğu durumlarda, gruplar arası farklılığın yönünün tespit edilmesinde, sıra ortalaması değerine bakılmış, fark sıra ortalaması değeri büyük olan grubun lehine yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Uterusa İmlante Embriyolar



Şekil 4.1 Sağ uterus boynuzuna miRNA-200c mimiği, sol uterus boynuzuna fizyolojik salin uygulanmış bir siçanın, 8 günlük embriyolarının görünümü. Sağ uterus boynuzunda 4, sol uterus boynuzunda 9 embriyo gözlemlenmektedir.



Şekil 4.2 Gebe grubunda yer alan bir sıçanın, gebeliğinin 8. gününde görüntülenen embriyoları. Sağ uterus boynuzunda 3, sol uterus boynuzunda 5 adet embriyo gözlemlenmektedir.



Şekil 4.3 Sağ uterus boynuzuna miRNA-200c mimiği, sol uterus boynuzuna fizyolojik salin uygulanmış bir sıçanın, 13 günlük embriyolarının görünümü. Sağ uterus boynuzunda 3, sol uterus boynuzunda 9 embriyo gözlemlenmektedir.



Şekil 4.4 Gebe grubunda yer alan bir sıçanın gebeliğinin 13. gününde görüntülenen embriyoları. Sağ uterus boynuzunda 5, sol uterus boynuzunda 5 embriyo görülmektedir.

4.2. Embriyo Sayılarının İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Gebeliklerinin 8. ve 13. günlerinde sonlandırılan sıçanların uterus dokusuna implante olmuş embriyo sayıları tablo 4.1’de verilmiştir. Mimik uygulanmış gruplar gebeliğin 4. günü miRNA mimiği uygulanan (Grup2 ve 3), gebe grubu herhangi bir uygulama yapılmayan gruplar (Grup 4 ve 5).

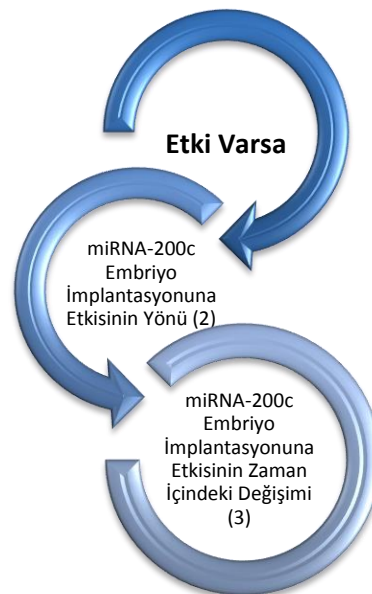
Tablo 4-1 Gruplara göre embriyo sayıları

Gruplara Göre Embriyo Sayıları							
Grup2 8. gün		Grup4 8. gün		Grup3 13. gün		Grup5 13. gün	
Sağ UB	Sol UB.	Sağ UB.	Sol UB.	Sağ UB.	Sol UB.	Sağ UB.	Sol UB.
MiRNA 200c mimiği (A)	Fizyolojik Salin (B)	- (C)	- (D)	miRNA 200c mimiği (E)	Fizyolojik Salin (F)	- (G)	- (H)
2	6	4	5	3	9	5	6
4	9	5	3	0	6	6	4
0	5	4	4	3	7	4	5
3	5	4	6	0	2	5	3
2	6	3	5	5	9	3	3
2	6	4	6	3	5	5	5

UB: Uterus boynuzu

Deneysel çalışmada (1) miRNA-200c'nin embriyo implantasyonuna etkisinin varlığı, (2) Etkinin varlığının tespiti halinde, etkinin yönü (artış/azalış) ve (3) etkinin zaman içindeki değişimi araştırılacaktır.

miRNA-200c'nin Embriyo İmplantasyonuna Etkisinin Varlığı Araştırılacak (1)

**Şekil 4. 5.** Deneysel tasarım

Tablo 4 -2 Deney planı

SÜREÇ	İNCELENECEK	İŞLEM	
1.Aşama	miRNA-200c mimiğinin gebe grubuna kıyasla embriyo sayılarına etkisinin tespit edilmesi	Mimik uygulanan gruplarının sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında, gebe grubuna kıyasla fark olup olmadığının, iki farklı grupta (8.ve 13.gün) ölçülmesi	AC-EG
2.Aşama	Fizyolojik Salin'in gebe grubuna kıyasla embriyo sayılarına etkisinin tespit edilmesi	Mimik uygulanan gruplarının sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında, gebe grubuna kıyasla fark olup olmadığının, iki farklı grupta (8.ve 13.gün) ölçülmesi	BD-FH
3.Aşama	Sıçanların sağ ve sol uterus boynuzlarına tutunan embriyo sayıları arasında kendiliğinden mevcut doğal bir farkın var olup olmadığının tespit edilmesi	4 farklı sıçan grubunun (8.gün mimikli/8.gün gebe/13.gün mimikli/13.gün gebe) kendi içinde uterus boynuzlarının sağ ve solundaki embriyo sayıları arasındaki farkın ölçülmesi	AB-EF-CD-GH
4.Aşama	Güne göre fizyolojik salin/miRNA-200c, gebe grubu embriyo sayıları arasındaki farkın var olup olmadığının tespit edilmesi	Mimik uygulanan ve gebe gruplarının her birinin gebeliğin 8.ve 13. gününe göre kendi içinde aynı yönlü uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasındaki farkın ölçülmesi	AE-BF-CG-DH

Tüm bu araştırmalar, deneyin farklı aşamalarında gerçekleştirilen farklı uygulamalar sonucunda ortaya çıkan embriyo sayılarının karşılaştırılmasına dayalıdır. Deneyin farklı aşamaları ve bu aşamalarda gerçekleştirilen sayım işlemleri, tablo. 4.2 'de yer almaktadır.

Embriyo sayımlarına dair sonuçlar ve karşılaştırmalar, gerçekleşen süreç içinde, bahsi geçen aşamaların detaylı olarak tanımlanmasıyla aktarılacaktır. Tanımlar esnasında, işlem takibatını kolaylaştırabilmek adına Tablo.4.1 de görülen sekiz farklı harf kodundan yararlanılmıştır (A-B-C-D-E-F-G-H).

1.Aşama:

Grup2'de yer alan gebe 6 sıçanın, sağ uterus boynuzuna, miRNA-200c, sol uterus boynuzuna ise sıçanların embriyolarına zarar vermediği bilinen, fizyolojik salin enjekte edilmiştir. Grup4 gebe sıçanlar üzerinde hiçbir işlem yapılmamış olan sağlıklı 6 sıçandan oluşmaktadır.

Deneyin 1.aşamasında miRNA-200c'nin embriyo sayılarına etkisi, gebe grubu aracılığıyla ölçülecektir. Bu doğrultuda, Grup2 sağ uterus boynuzuna miRNA-200c enjekte edilen sıçanların embriyo sayıları ile gebe grubu sağ uterus boynuzundaki embriyo sayıları arasındaki fark, iki farklı grupta (8.gün ve 13.gün) gözlemlenmiş (A-C) (E-G) ve aradaki farkın istatistiki açıdan önemli olup olmadığına yönelik işlemler gerçekleştirilmiştir.

Grup2'de yer alan 8 günlük gebe sıçanların mimiklenmiş sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları ve gebe grubu sıçanların sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunduğu gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Tablo 4.3.'de 8.gün Grup2'de yer alan gebe sıçanların mimiklenmiş sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarının ($m= 4,08$), 8.gün Grup4 gebe grubunda yer alan gebe sıçanların sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarından daha küçük olduğu görülmektedir ($m=8,92$, $u= 3,5$).

Tablo 4-3 Embriyo sayılarının 8.gün sağ uterus boynuzlarının gebe ve mimikli grubu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

A C	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
8. Gün Grup2 Sağ Uterus Boynuzu	6	24,5	4,08	3,5	-2,431	0,015
8. Gün Grup 4 Sağ Uterus Boynuzu	6	53,5	8,92			

Grup3'de yer alan 13 günlük gebe sıçanların mimiklenmiş sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları ve Grup5 gebe grubu sıçanların sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde anlamlı bir fark bulunduğu gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Tablo 4.4.'de, Grup3'de yer alan gebe sıçanların mimiklenmiş sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarının ($m = 4,33$), Grup5' de yer alan gebe sıçanların sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarından küçük olduğu görülmektedir ($m = 8,67$, $u = 5,0$).

Tablo 4-4 Embriyo sayılarının 13.gün sağ uterus boynuzlarının gebe ve mimikli grubu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

E G	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
13. Gün Grup3 Sağ Uterus Boynuzu	6	26,0	4,33	5,0	-2,163	0,041
13. Gün Grup 5 Sağ Uterus Boynuzu	6	52,0	8,67			

2.Aşama:

2.aşamada, Grup2 sıçanların sol uterus boynuzuna verilen fizyolojik salinin embriyo sayılarına etkisi, Grup4 aracılığıyla ölçülecektir. Bu amaçla, Grup2'de yer alan ve sol uterus boynuzuna fizyolojik salin enjekte edilen sıçanların embriyo sayıları ile Grup4 sol uterus boynuzunda yer alan embriyo sayıları arasındaki fark, iki farklı grupta (8.gün ve 13.gün) gözlemlenmiş ve (B-D) (F-H) aradaki farkın istatistiki açıdan önemli olup olmadığına yönelik işlemler gerçekleştirilmiştir.

Grup2 sol uterus boynuzuna fizyolojik salin enjekte edilen sıçanların embriyo sayıları ile Grup4 uterus boynuzundaki embriyo sayıları arasında ilişki gözlemlenmiştir (B-D) ve embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$) (Tablo.4.5).

Tablo 4-5 Embriyo sayılarının 8.gün sol uterus boynuzlarının gebe ve fizyolojik salin uygulanan grup değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

B D	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
8. Gün Grup2 Sol Uterus Boynuzu	6	48	8,00	9	-1,523	0,180
8. Gün Grup4 Sol Uterus Boynuzu	6	30	5,00			

Aynı işlem 13.gün için tekrarlanmıştır (F-H). Tablo.4.6 incelendiğinde, Grup3 sol uterus boynuzuna fizyolojik salin enjekte edilen sıçanların embriyo sayıları ile Grup5 sol

uterus boynuzundaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$).

Tablo 4-6 Embriyo sayılarının 13.gün sol uterus boynuzlarının gebe ve fizyolojik salin uygulanan grup değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

F H	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
13. Gün Grup3 Sol Uterus Boynuzu	6	48,5	8,08	8,5	-1,540	0,132
13. Gün Grup5 Sol Uterus Boynuzu	6	29,5	4,92			

3.Aşama: Deneyin bu aşamasında, embriyo sayıları arasındaki olası farkın, sıçanlara enjekte edilen mimikten değilde, sıçanların sağ ve sol uterus boynuzlarına dağılan embriyo sayılarının tüm sıçanlarda doğal olarak bir yöne ağırlıklı gerçekleşmesinden kaynaklanmış olabileceği ihtimali tespit edilmeye çalışılacaktır. Bu amaçla, 4 farklı sıçan grubunun (Grup2, Grup 3, Grup 4, Grup 5) kendi içinde uterus boynuzlarının sağ ve solundaki embriyo sayıları arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olup olmadığına yönelik işlemler gerçekleştirilmiştir (A-B) (C-D) (E-F) (G-H).

Grup2 gebe sıçanların mimiklenmiş sağ ve fizyolojik salin verilmiş sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunduğu gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Tablo 4.7.'de 8 günlük gebe sıçanların mimiklenmiş sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarının ($m = 3,5$), fizyolojik salin verilmiş sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarından daha küçük olduğu görülmektedir ($m = 9,5$, $u = ,00$).

Tablo 4-7 Embriyo sayılarının Grup2 sağ ve sol uterus boynuzları değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

A-B	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
Grup2 Sağ Uterus Boynuzu	6	21	3,50	,00	-2,929	0,002
Grup2 Sol Uterus Boynuzu	6	57	9,50			

Gebe grubunda yer alan ve üzerinde hiçbir işlem yapılmamış 8 günlük gebe sıçanların sağ ve sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$) (Tablo.4.8.) (C-D).

Tablo 4-8 Embriyo sayılarının grup4 sağ ve sol uterus boynuzu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

C D	N	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
Grup4 Sağ Uterus Boynuzu	6	30,5	5,08	9,5	-1,428	0,180
Grup4 Sol Uterus Boynuzu	6	47,5	7,92			

Tablo.4.9. ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde Grup3'de yer alan 13 günlük gebe sıçanların mimiklenmiş sağ ve fizyolojik salin verilmiş sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunduğu gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$). Tablo 4.9.'de 13 günlük gebe sıçanların mimiklenmiş sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarının ($m=4,25$), fizyolojik salin verilmiş sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarından daha küçük olduğu görülmektedir ($m= 8,75$ $u= 4,5$) (E-F).

Tablo 4-9 Embriyo sayılarının grup3 sağ ve sol uterus boynuzları değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

E F	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
Grup 3 Sağ Uterus Boynuzu	6	25	4,25	4,5	-2,189	0,026
Grup 3 Sol Uterus Boynuzu	6	52,50	8,75			

Gebe grubu 13 günlük gebe sıçanların sağ ve sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$) (Tablo.4.10.) (G-H).

Tablo 4-10 Embriyo sayılarının grup5 sağ ve sol uterus boynuzu değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

G H	N	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
Grup 5 Sağ Uterus Boynuzu	6	42	7,00	15	-0,504	0,699
Grup 5 Sol Uterus Boynuzu	6	36	6,00			

4.Aşama:

Deneyin 4.aşamasında, mi-RNA200c'nin embriyo implantasyonuna olası etkisinin, zaman içindeki değişimini tespit edebilmek için, mimikli ve gebe gruplarının her birinin gebeliğin 8.ve 13. gününe göre kendi içinde aynı yönlü uterus

boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında anlamlı bir fark bulunup bulunmadığı ölçümlenmiştir (A-E, C-G, B-F, D-H).

Öncelikle, sağ uterus boynuzuna miRNA-200c enjekte edilen sıçanların, sağ uterus boynuzlarında 8.günde yer alan embriyo sayıları ile 13.günde yer alan embriyo sayıları arasındaki ilişki incelenmiş ve Tablo.4.11.'da görüldüğü gibi 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$). (A-E).

Tablo 4-11 Embriyo sayılarının grup2 ve grup3 sağ uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

A-E	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
8. Gün Grup2 Sağ Uterus Boynuzu	6	36,5	6,08	15,5	-,414	0,699
13. Gün Grup3 Sağ Uterus Boynuzu	6	41,5	6,92			

Gebe grubunda yer alan ve üzerinde hiçbir işlem yapılmayan sıçanların gebeliklerinin 8. ve 13.günde sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasındaki ilişki incelenmiştir (C-G). Tablo.4.12.de görüldüğü üzere, gebe grubunda yer alan ve üzerinde hiçbir işlem yapılmayan sıçanların sağ uterus boynuzlarında 8.günde yer alan embriyo sayıları ile 13.günde yer alan embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$).

Tablo 4-12 Embriyo sayılarının grup 4 ve grup 5 sağ uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

C-G	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
8. Gün Grup4 Sağ Uterus Boynuzu	6	36,5	6,08	15,5	-,414	0,699
13. Gün Grup5 Sağ Uterus Boynuzu	6	41,5	6,92			

Tablo.4.13. ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde 8 günlük gebe sıçanların fizyolojik salin verilmiş sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları ile 13 günlük gebe sıçanların fizyolojik salin verilmiş sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p > 0,05$). (B-F).

Tablo 4-13 Embriyo sayılarının grup2 ve grup 3 sol uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

B-F	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
8. Gün Grup2 Sol Uterus Boynuzu	6	36,5	6,08	15,5	-,414	0,699
13. Gün Grup3 Sol Uterus Boynuzu	6	41,5	6,92			

Gebe grubunda yer alan ve hiçbir işlem yapılmamış 8 günlük gebe sıçanların sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları ile gebe grubu 13 günlük gebe sıçanların sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayıları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde bir fark bulunmadığı Tablo.4.14.'de görülmektedir ($p>0,05$). (D-H).

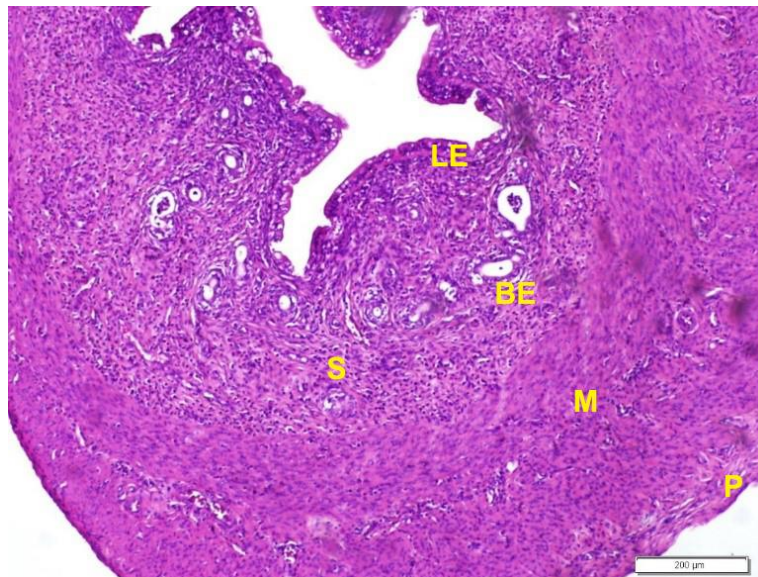
Tablo 4-14 Embriyo sayılarının gebe grubunun sol uterus boynuzunun 8. ve 13.gün değişkenine göre Mann Whitney-U testi sonuçları

D-H	n	Sıra Toplamı	Sıra Ortalaması	U	Z	P
8. Gün Grup4 Sol Uterus Boynuzu	6	43,5	7,25	13,5	-,746	0,485
13. Gün Grup5 Sol Uterus Boynuzu	6	34,5	5,75			

4.3. Hematoksilen Eosin Boyama Sonuçları

Grup 1

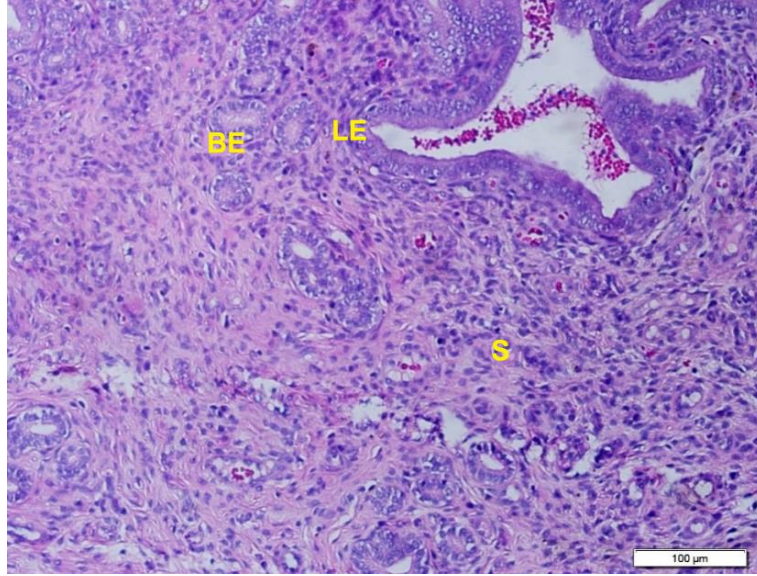
Endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum katmanları belirgindi. Endometriyumda lümen epiteli prizmatik epitel olup lümeni çevrelemekte olduğu görüldü. Hem lümen epiteli hem de bez epiteli hücrelerinde vakuolleşme ve dejenerasyon izlendi. Stromada dejeneratif görünümlü hücrelerle birlikte nötrofillerde izlendi.



Şekil 4. 6 Grup 1: Östrus siklusunda alınan uterus dokusu. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stroma;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). H&E. Bar__200µm.

Grup 2

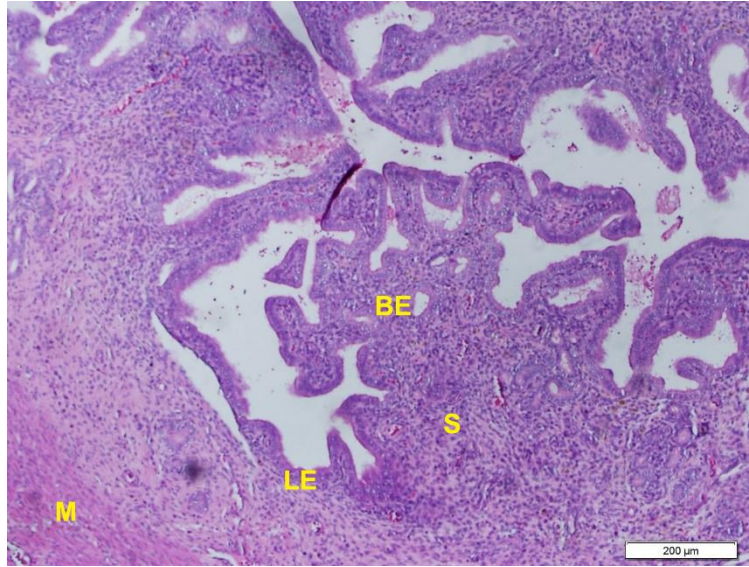
Östrus siklusu uterusuna benzer özellikler görüldü. Bununla birlikte lümeni çevreleyen prizmatik epitel hücreleri ile birlikte bulunan kısa boylu hücreler dikkati çaktı. Grup 1'e benzer şekilde lümen ve bez epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve dejenerasyon izlendi.



Şekil 4.7 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük endometriyum dokusu. Lümen epitel;(LE), Bez epiteli;(BE), Stroma;(S). H&E. Bar__100µm.

Grup3

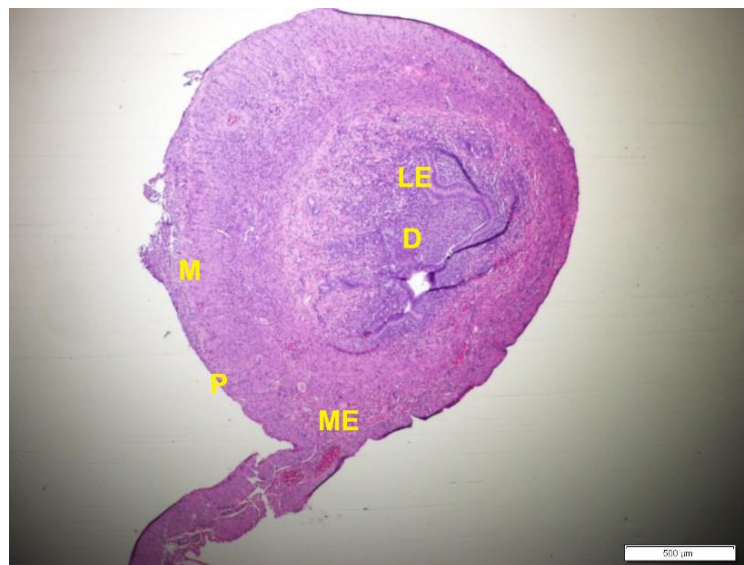
Endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum katmanları belirgindi. Lümenin genişlediği ve grintili hal aldığı izlendi. Lümen ve bez epitelinde dejeneratif görünümlerin kaybolduğu belirlendi.



Şekil 4. 8 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusu. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stroma;(S), Miyometriyum tabakası;(M). H&E. Bar__200µm.

Grup 4

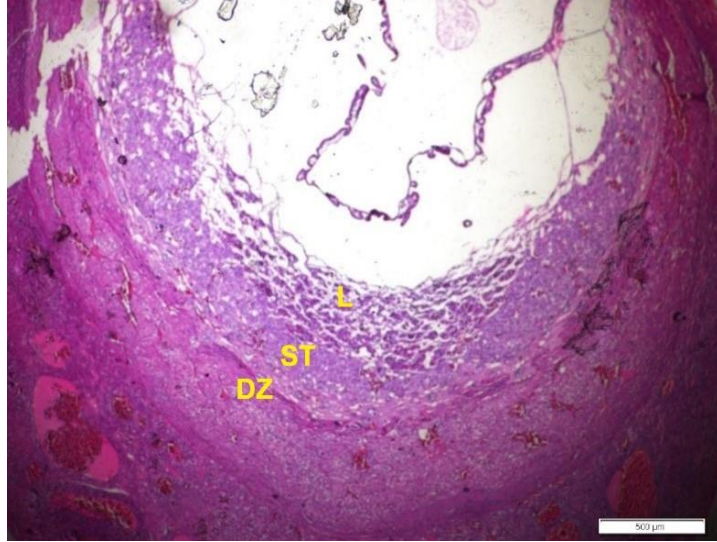
Uterustan elde edilen kesitlerde lümen epitel, uterus bezleri ve desidua hücreleri gözlemlendi. Lümen epitelinin mezotelyum bölgesinde içleri glikojen ve lipidle dolan desidua hücreleri dikkati çekti. Blastosistin uterusu gömülmeye başladığı yerde lümen epitel hücrelerinin arasında oval ve büyük çekirdekleri ile embriyoblastlar belirlendi ve yassı hücreleri ile trofoblastlar ayırt edildi.



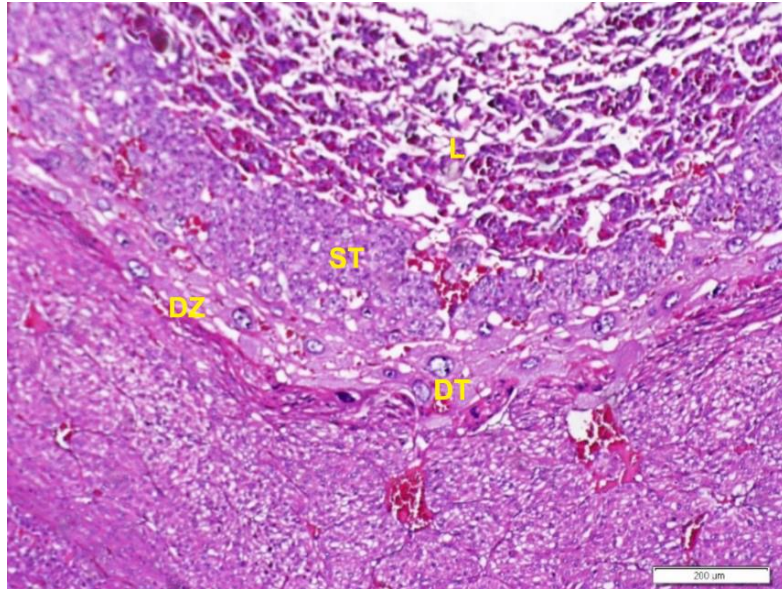
Şekil 4. 9 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük endometriyum dokusu. Lümen epitel;(LE), Desidua;(D), Mezotelyum;(ME), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). H&E; . Bar_500µm.

Grup 5

Bağlantı zonu ve plasental labirent bölümü ayırt edildi. Labirent bölümünün maternal yüzüne bakan bölümünde spongiyotrofoblast ve dev trofoblast hücreleri belirgindi. Labirent bölümünde yer alan koryonik villuslarda fetal kapillerler stromal hücreler, trofoblast hücreler ve plasental makrofajlar (Haufler hücreleri) gözlemlendi.



Şekil 4.10 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük embriyonun plasentasından alınmış kesit. Desidua bağlantı zonu;(DZ), Spongiyotrofoblast;(ST), Labirent zone;(L). H&E. Bar __500µm.



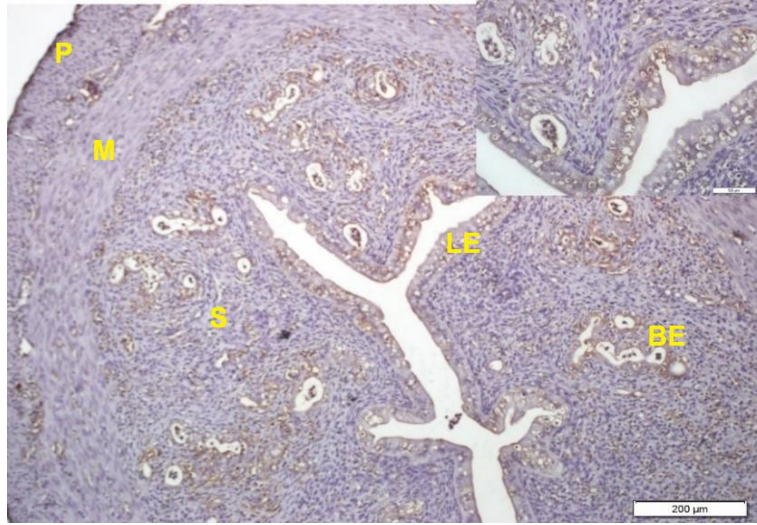
Şekil 4.11 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük embriyonun plasentasından alınmış kesit. Desidua bağlantı zonu;(DZ), Spongiyotrofoblast;(ST), Dev trofoblastlar;(DT), Labirent zone;(L). H&E. Bar __200µm.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

1. $\alpha 5\beta 3$

Grup 1

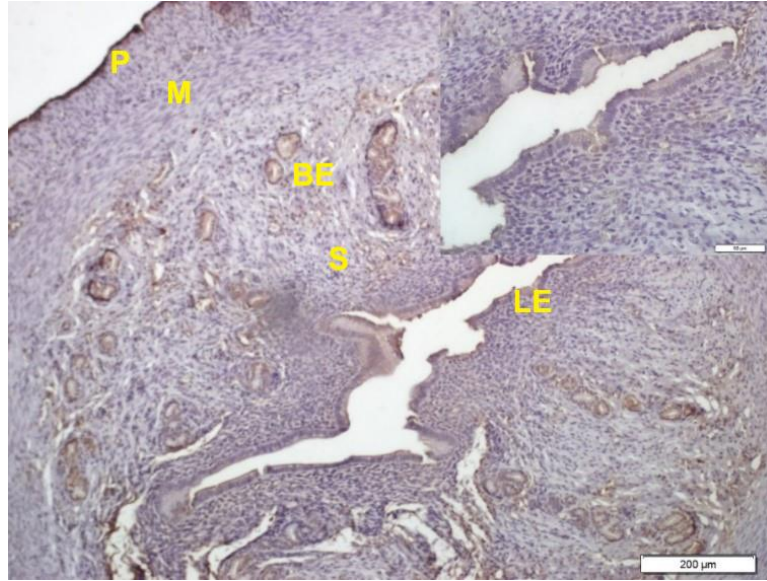
Lümen epiteli ve bez epitelinde orta derecede $\alpha 5\beta 3$ reaksiyonu izlenirken, stromal hücrelerde ve miyometriyum da boyanma gözlenmedi.



Şekil 4. 12 Grup 1: Östrus evresindeki uterusu $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetrium (P). İmmunoperoksidaz & hematoksilen. Bar: — 200 μ m.

Grup 2

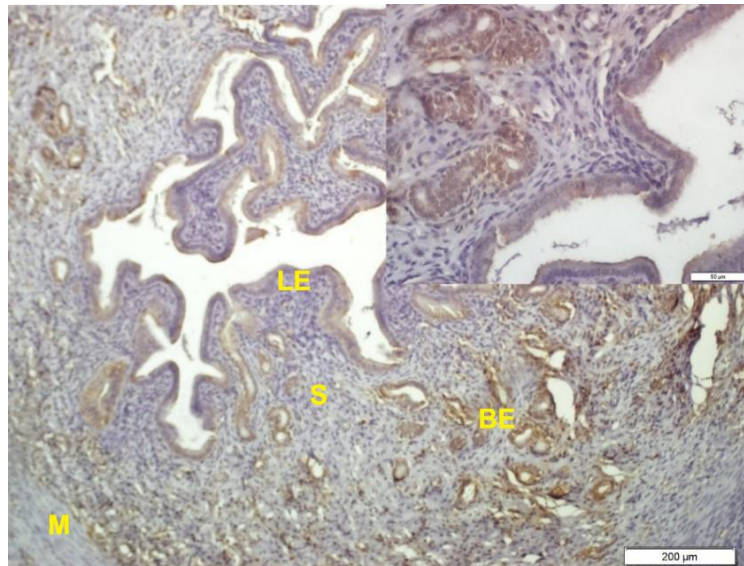
Lümen epiteli apikal membranlarında ve apikal sitoplazmalarında zayıf reaksiyon izlenirken, bezlerde kuvvetli sitoplazmik boyanma izlendi. Stromal hücrelerde reaksiyon negatif görüldü.



Şekil 4. 13 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: — 200 μ m

Grup 3

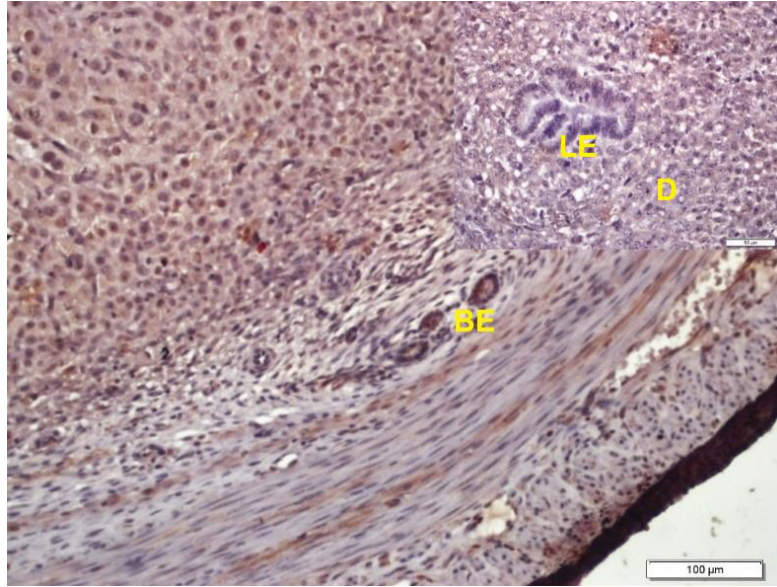
Lümen epitel hücrelerinin apikal membranında ve sitoplazmalarında zayıf, bezlerde ise kuvvetli boyanma gözlemlendi. Lümene yakın stromal hücrelerde ekspresyon negatif olarak görüldü.



Şekil 4.14 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: — 200 μ m

Grup 4

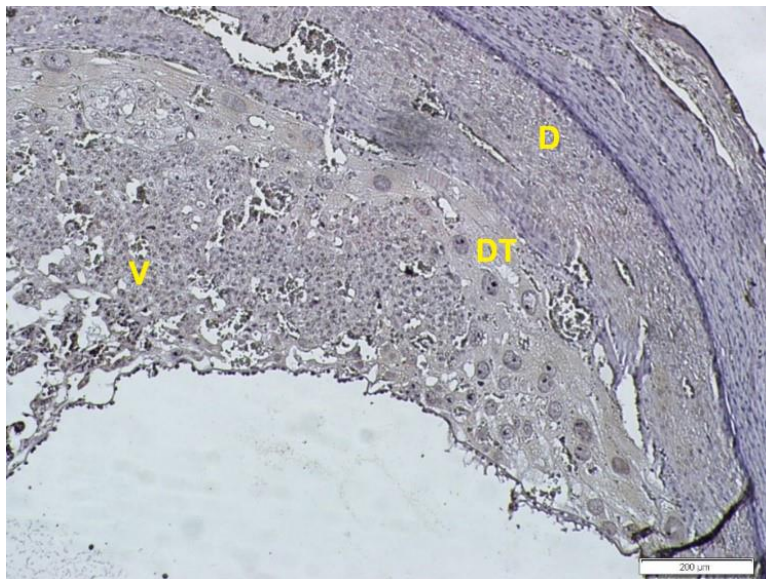
Lümen epiteli ve desidual hücrelerde ekspresyon negatif izlenirken, uterus bezlerinde ekspresyon pozitif olarak izlendi.



Şekil 4.15 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Desidua hücreleri;(D), Bez epiteli;(BE), İmmunoperoksidaz & hematoksilen. Bar: — 50 μm

Grup 5

Trofoblast hücreleri kan damarları ve dev trofoblast hücreleri negatif olarak görüldü.



Şekil 4.16 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda $\alpha 5\beta 3$ ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua tabaka;(D). Dev trofoblast hücreler;(DT), Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz & hematoksilen Bar: — 200 μm .

2. LIF

Grup1

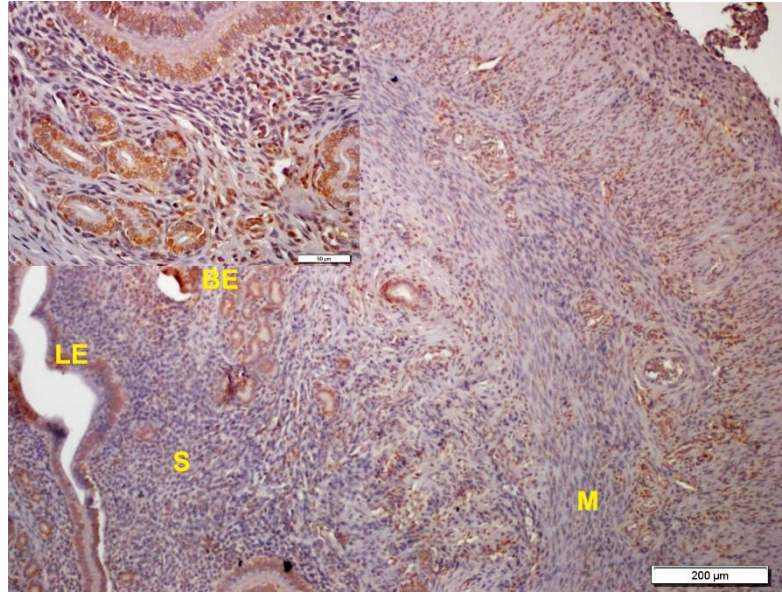
Lümen epitelinin apikal membranında ve çekirdeklerde kuvvetli boyanma izlenirken sitoplazmada boyanmanın negatif olduğu görüldü. Bezlerde yoğun sitoplazmik ve nükleer boyanma izlenirken stromal hücrelerde de çekirdek boyanması dikkat çekiciydi.



Şekil 4.17 Grup 1: Östrus evresindeki uterusda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitelini;(LE), Bez epitelini;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum ;(M), Perimetriyum (P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —500 µm.

Grup2

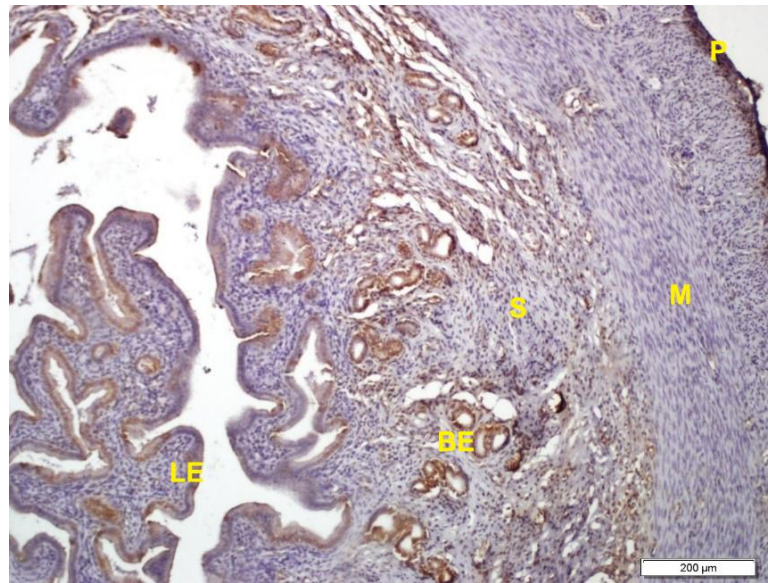
Lümen, bez epitelini ve stromal hücrelerde kuvvetli boyanma dikkati çekti. Boyanma sitoplazmik ve nükleer olarak gözlemlendi.



Şekil 4. 18 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda LIF Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 200 µm

Grup 3

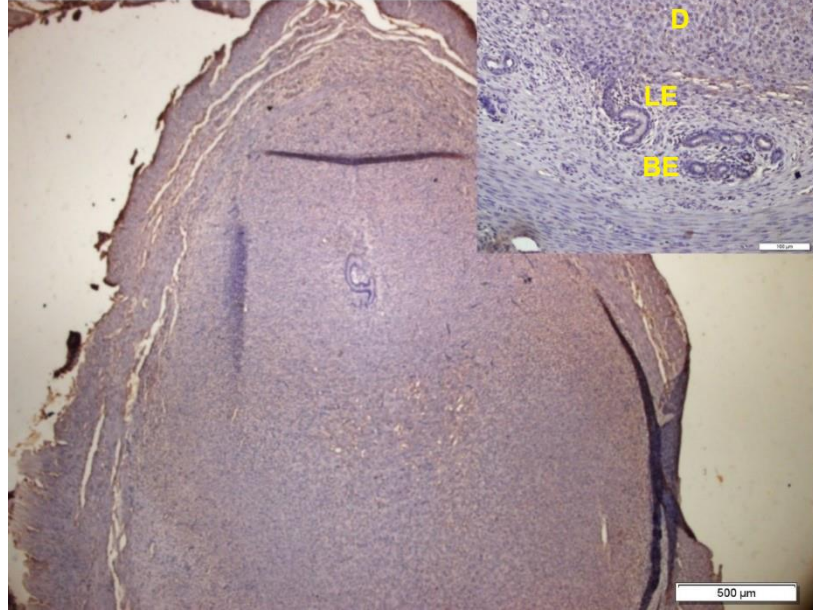
Lümen epitelinde yer yer kuvvetli yer yer zayıf boyanma izlenirken bezlerde boyanma kuvvetli olarak gözlemlendi. Endometriyum stromal hücrelerinde özellikle de bazal yerleşimli stromal hücrelerde kuvvetli reaksiyon görülürken, miyometriyum tabakası negatif olarak görüldü.



Şekil 4.19 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda LIF Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 200 µm.

Grup 4

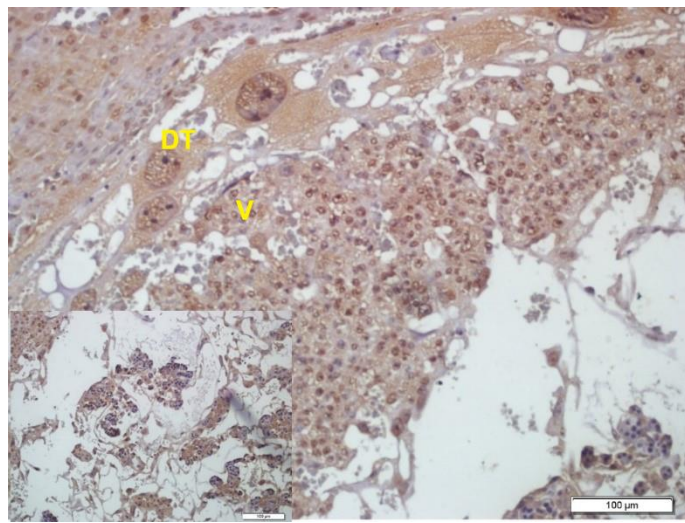
Lümen epiteli ve bez epitelinde negatif boyanma gözlemlendi. Endometrial desidual hücrelerde pozitif hücreler gözlemlendi.



Şekil 4.20 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua;(D), Bez epiteli;(BE), Lümen epiteli;(LE), İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 50 µm

Grup 5

Dev trofoblast hücrelerde kuvvetli pozitif reaksiyon izlenirken, villuslardaki fetal kapillerlerin negatif olduğu dikkati çekti.

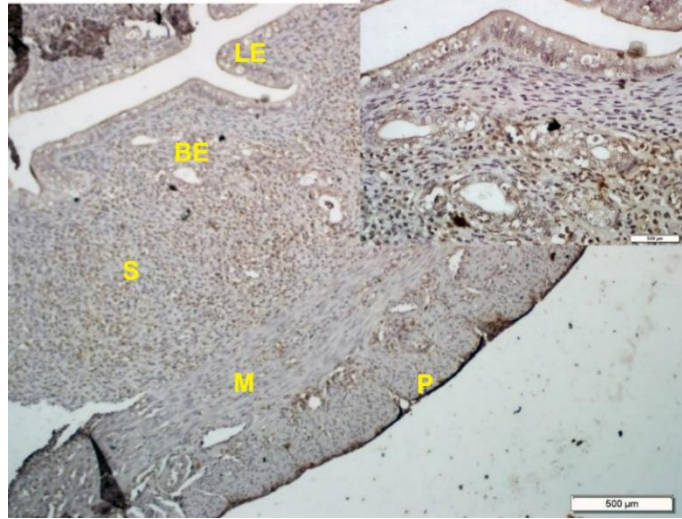


Şekil 4.21 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda LIF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Dev trofoblast hücreler (DT). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 100 µm.

3. IL 6

Grup 1

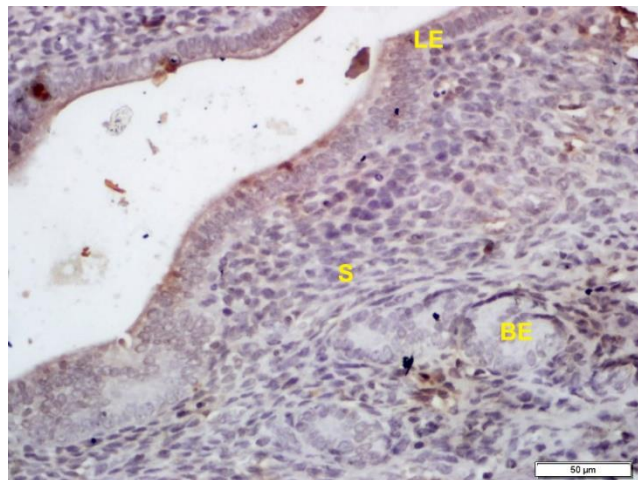
Lümen epitelinde ve bez epitelinde zayıf derece boyanma izlendi. Stromal hücrelerde ekspresyon pozitif olarak izlendi. Özellikle endometriyum bazal bölgesinde kuvvetli IL 6 eksprese eden stromal hücrelerin yoğun olduğu dikkati çekti. Miyometriyum tabakasının ise negatif boyanma gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.22 Grup 1: Östrus evresindeki uterusu IL-6 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —200 µm.

Grup 2

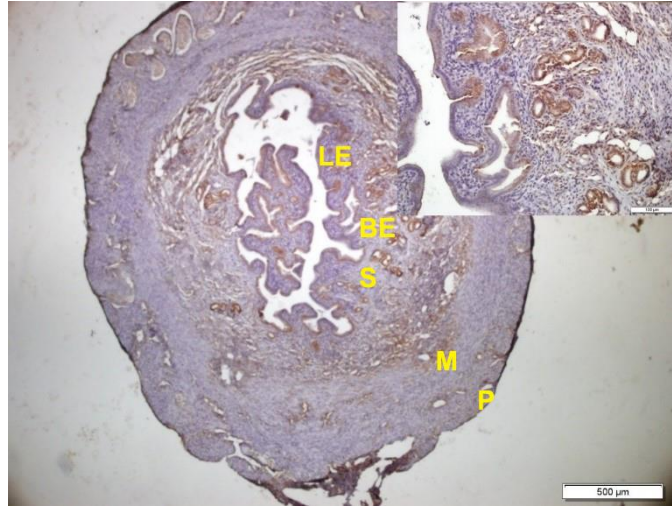
Lümen epitelinde pozitif ekspresyon izlendi. Lümen epitel apikal membranı, sitoplazmaya nazaran daha kuvvetli olduğu görüldü. Bezlerde ve stromal hücrelerde ekspresyon negatif olarak izlendi.



Şekil 4. 23 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda IL-6 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 50 µm

Grup 3

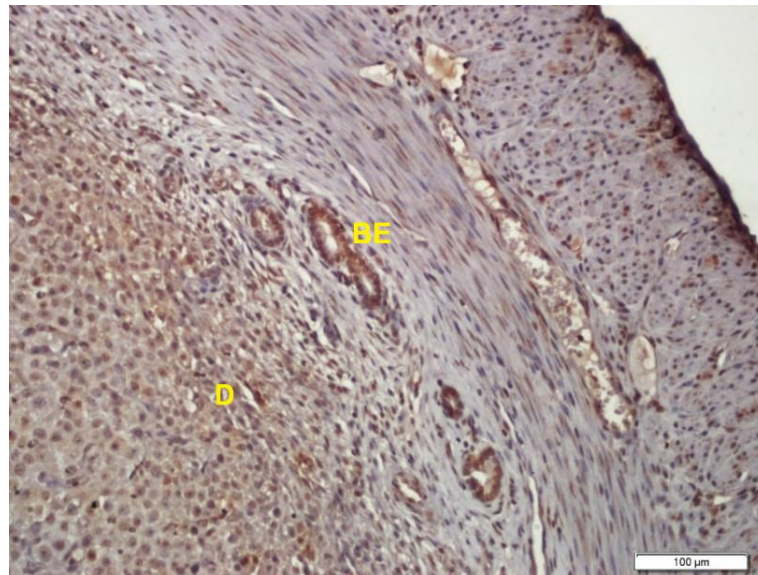
Lümen epitelinin apikal membran ve sitoplazmasında zayıf derecede boyanma izlendi. Bezlerdeki kuvvetli boyanma görüldü. Stromal hücreler, miyometriyum ve perimetriyum tabakası negatif olarak tespit edildi.



Şekil 4.24 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda IL-6 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz&hematoksilen Bar: — 500 µm

Grup 4

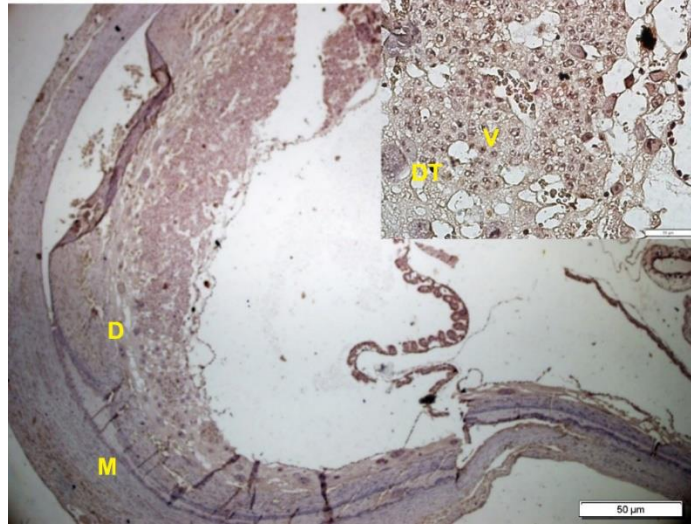
Endometrial bezlerde ve desidual hücrelerde kuvvetli nükleer boyanma izlendi.



Şekil 4.25 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda IL-6 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Bez epitel;(BE), Desidua hücreleri;(D). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 100 µm

Grup 5

Trofoblast hücreleri, dev trofoblast hücreleri ve intervillöz kapillerler kuvvetli pozitif ekspresyon gösterirken, miyometriyum tabakası negatif ekspresyon gösterdi.

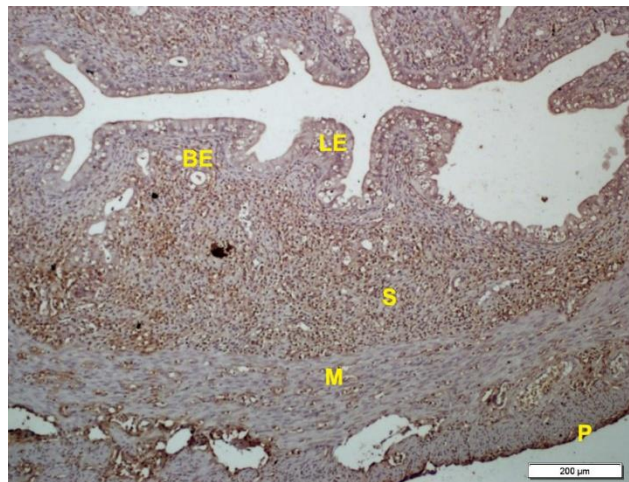


Şekil 4. 26 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda IL-6 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua tabaka(D). Dev trofoblast hücreleri;(DT), Miyometriyum;(M), Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 50 µm

4. IL-18

Grup 1

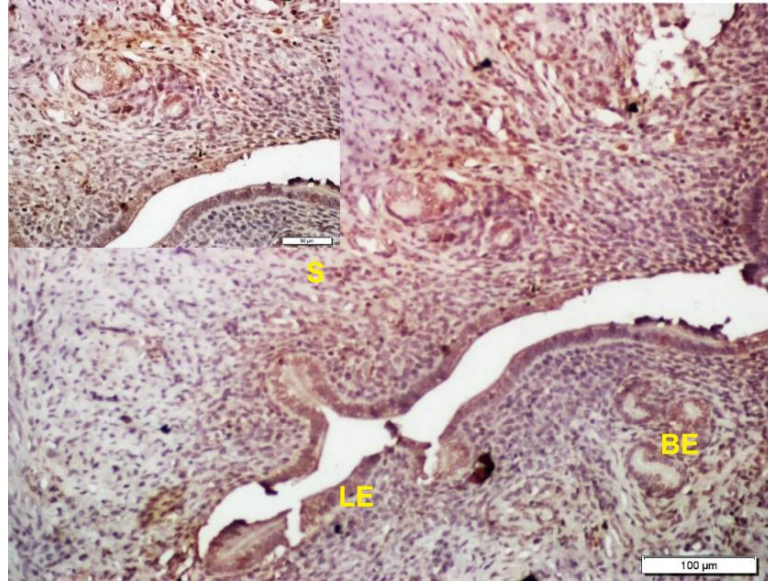
Epitel hücrelerinin apikal membranı orta derece boyanma gösterirken sitoplazma ve çekirdekte boyanma izlenmedi. Stromal hücrelerde ve miyometriyum tabakasında ekspresyon kuvvetli pozitif olarak görüldü.



Şekil 4.27 Grup 1: Östrus evresindeki uterusuta IL-18 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitelii;(LE), Bez epitelii;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum (P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —200 µm.

Grup 2

Lümen epitelinde ve bezlerde pozitif boyanma izlendi. Stromal hücrelerde özellikle lümeneye yakın bölgelerde zayıf reaksiyon gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.28 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda IL-18 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz & hematoksilen Bar: — 200 µm

Grup 3

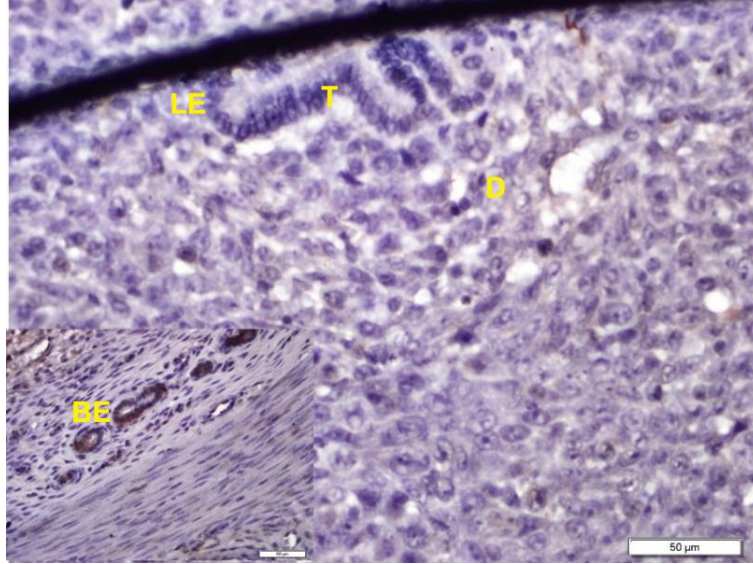
Lümen epiteli, bez epiteli ve stromal hücreler zayıf reaksiyon gösterirken, miyometriyum tabakasında negatif reaksiyon gösterdi.



Şekil 4. 29 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda IL-18 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum(P). İmmunoperoksidaz & hematoksilen Bar: — 200 µm

Grup 4

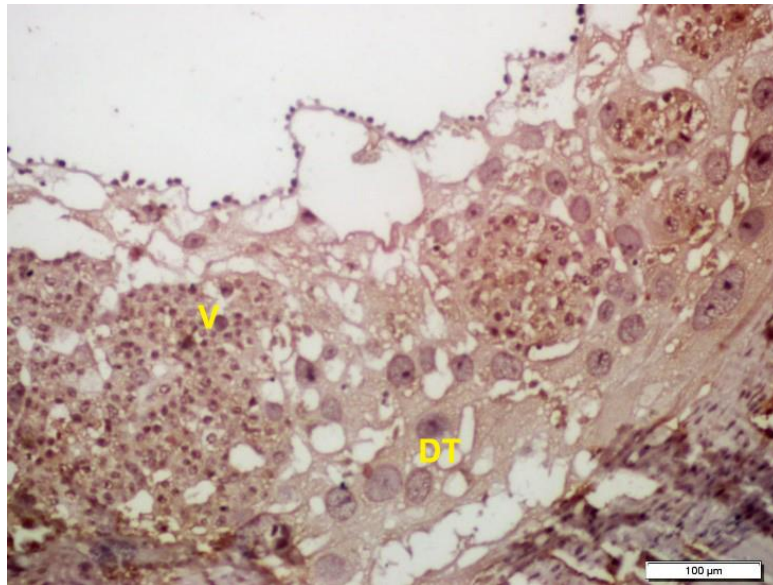
Lümen epitel hücreleri ve endometrial desidual hücreler negatif olarak izlenirken, uterus bezlerinde zayıf sitoplazmik ekspresyon dikkat çekiciydi.



Şekil 4.30 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda IL-18 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen Epiteli;(LE), Trofoblast; (T), Bez epiteli;(BE), Desidua hücreleri;(D), İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 50 µm

Grup 5

Trofoblast hücreleri pozitif ekspresyon gösterirken, dev trofoblast hücreleri negatif ekspresyon gösterdi.

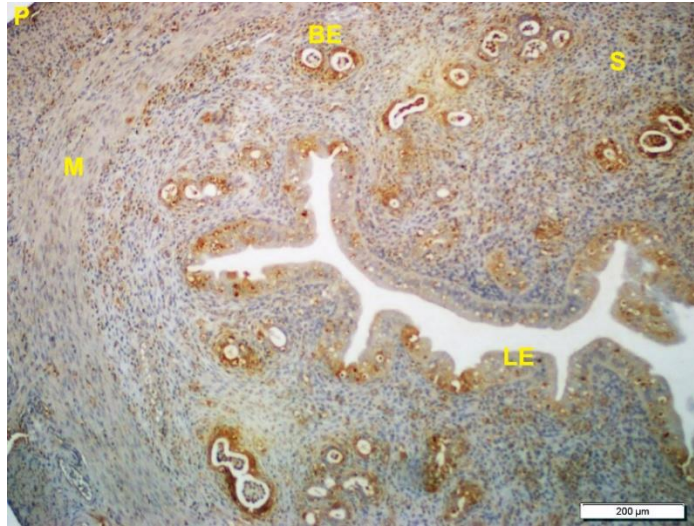


Şekil 4.31 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda IL-18 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Dev trofoblast hücreleri;(DT). Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 100 µm.

5. VEGF

Grup1

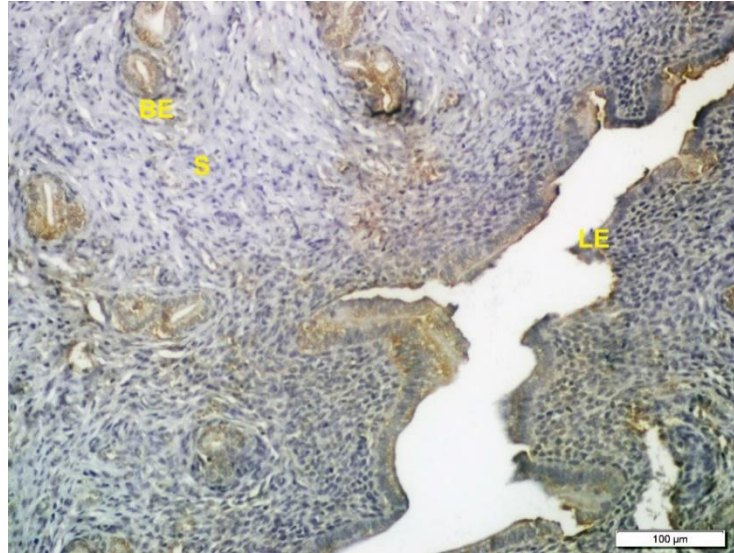
Lümen ve bez epitelinde kuvvetli pozitif boyanma izlendi. Boyanma hem nükleer hem sitoplazmik olarak görüldü. Stromal hücrelerde kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren hücreler tüm endometriyumda dağılmış şekildeydi. Miyometriyum tabakasında yoğun nükleer boyanma gösteren hücreler izlendi.



Şekil 4.32 Grup 1: Östrus evresindeki uterusu VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —200 µm

Grup2

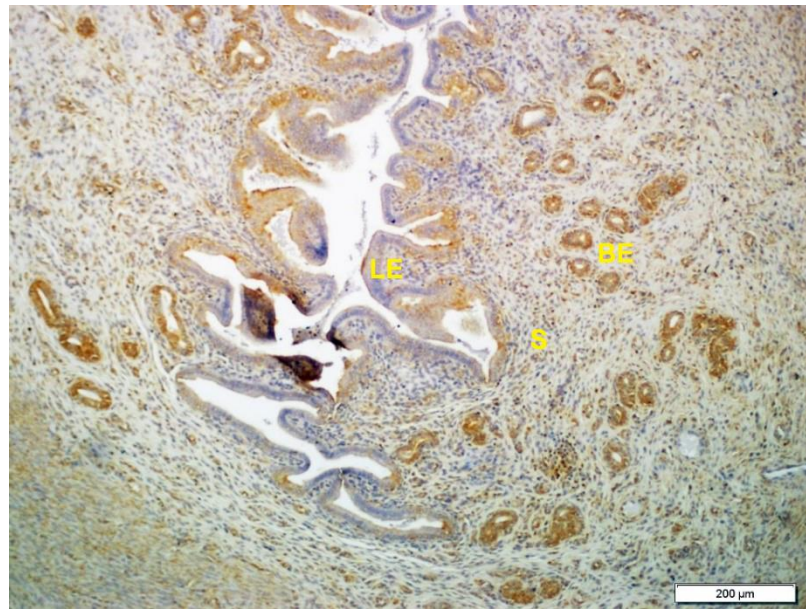
Lümen epitelinin apikal membranında orta derecede reaksiyon gösterirken hücrelerin çekirdeklerinde negatif, sitoplazmalarında zayıf boyanma görüldü. Endometriyumdaki tüm bezlerde boyanma orta derecede ve zayıf olarak izlendi. Stromal hücrelerde reaksiyon negatif olarak görüldü.



Şekil 4.33 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz & hematoksilen Bar: — 100 µm

Grup 3

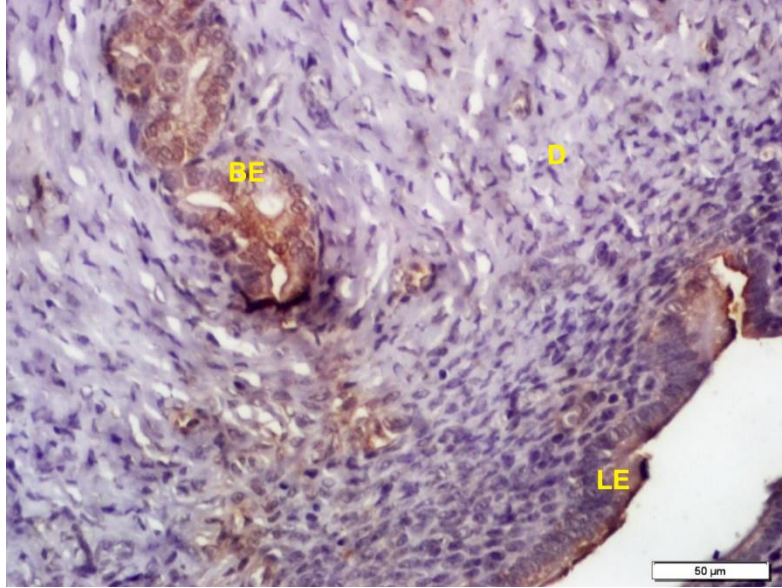
Lümen epitelinde yer yer kuvvetli sitoplazmik ve nükleer boyanma izlendi. Bezlerde boyanma yoğun sitoplazmik ve nükleer olarak görüldü. Stromal hücrelerde kuvvetli pozitif boyanma görüldü.



Şekil 4.34 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz & hematoksilen. Bar: — 200 µm.

Grup 4

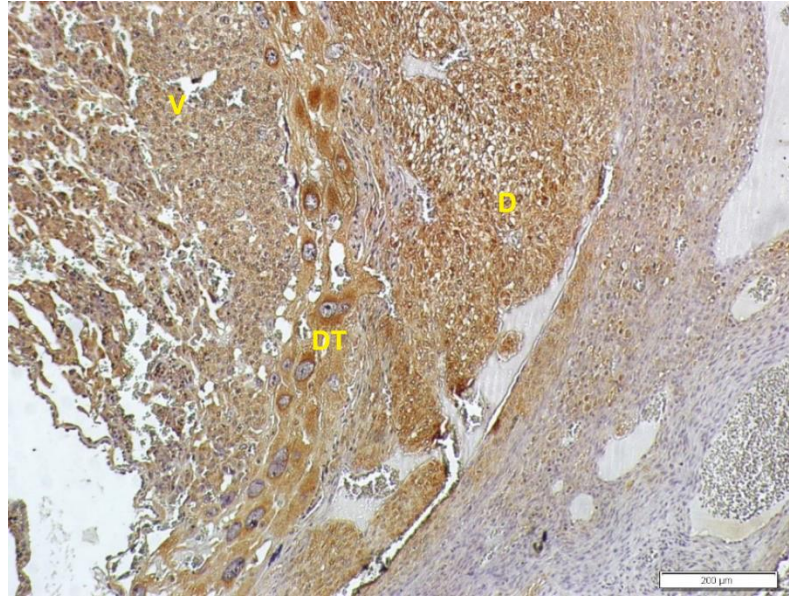
Lümen ve bez epitelinde boyanma kuvveti pozitif olarak görüldü. Desidual hücrelerde ise ekspresyon negatif olarak izlendi.



Şekil 4.35 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda VEGF Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümin epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Desidua hücreleri;(D). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: — 50 µm

Grup 5

Trofoblast hücrelerinde sitoplazmik ekspresyon kuvvetli pozitif olarak görüldü. Dev trofoblast hücreleri negatif boyanırken, hücrelerin çevrelerinin çok yoğun boyanması dikkat çekici olarak görüldü.

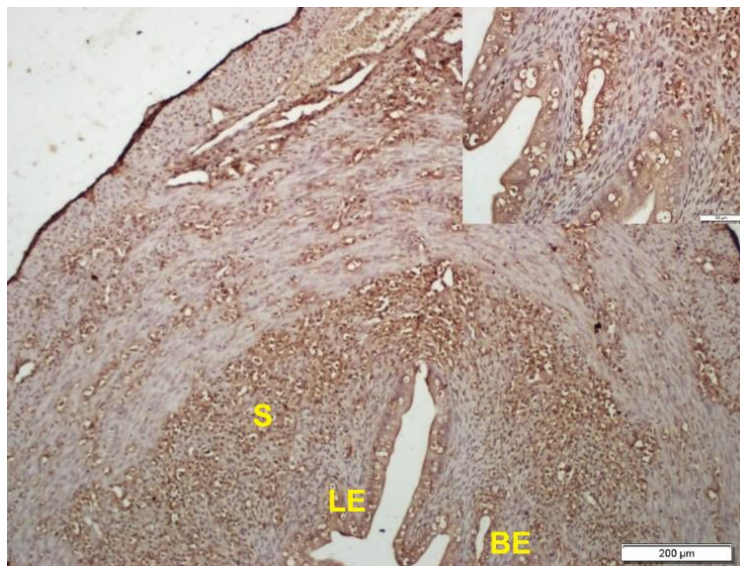


Şekil 4.36 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua tabaka;(D). Dev trofoblast hücreler;(DT). Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz & hematoksilen Bar: — 200 μm

6. CD 105

Grup 1 (Östrus Evresi)

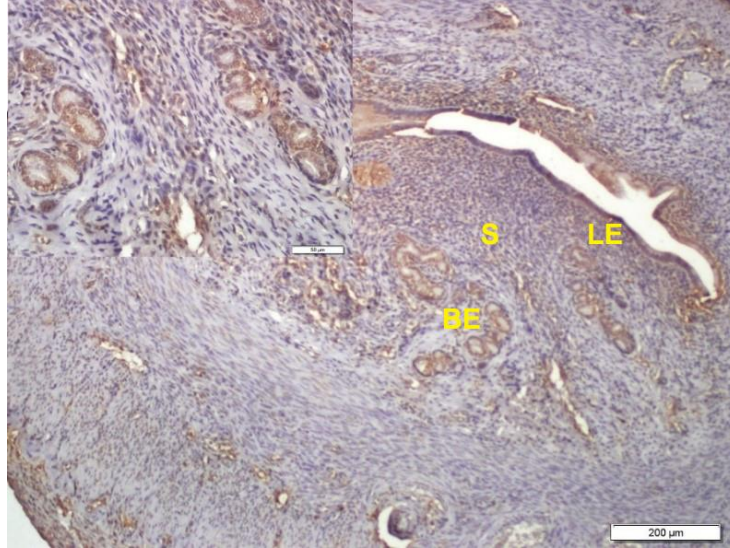
Lümen ve bez epitelinde pozitif reaksiyon izlendi. Stromal hücrelerin pozitif boyanma gösterdiği, özellikle pozitif boyanan hücrelerin bazal tabakada yoğunlaştığı dikkati çekti.



Şekil 4. 37 Grup 1: Östrus evresindeki uterusda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz & hematoksilen Bar: — 200μm.

Grup 2

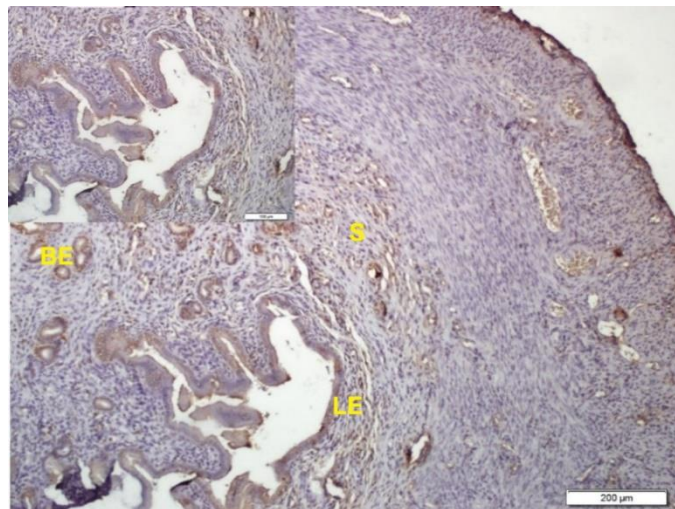
Lümen epitelinin zayıf reaksiyon gösterdiği, reaksiyonun apikal membranında orta dereceye çıktığı gözlemlendi. Bezlerde sitoplazmada ve nükleer bölge de kuvvetli boyanma dikkat çekiciydi. Fonksiyonel tabakadaki stromal hücrelerde de pozitif sitoplazmik boyanma gözlemlendi.



Şekil 4. 38 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel; (LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz&hematoksilen. Bar: —200 µm.

Grup 3

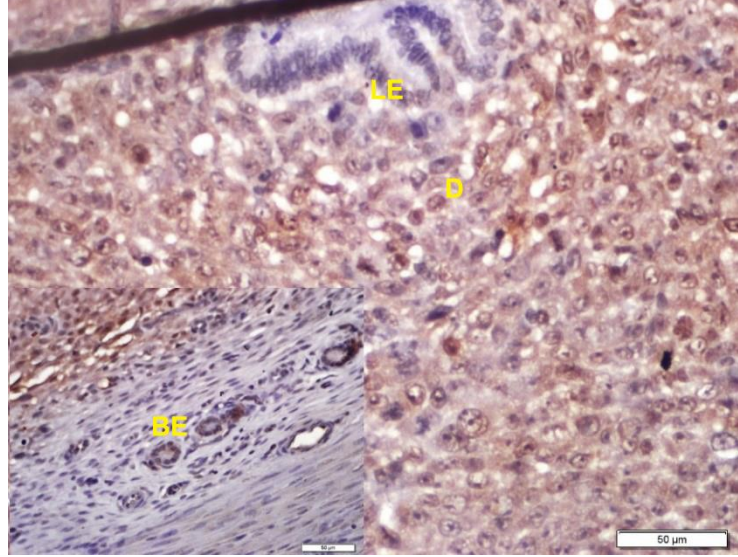
Lümen epitel hücreleri sitoplazması zayıf pozitif, çekirdekler ise negatif ekspresyon gösterdi. Stromal hücrelerde de pozitif reaksiyon gösteren hücreler tespit edildi.



Şekil 4.39 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz&hematoksilen. Bar: — 200 µm

Grup 4

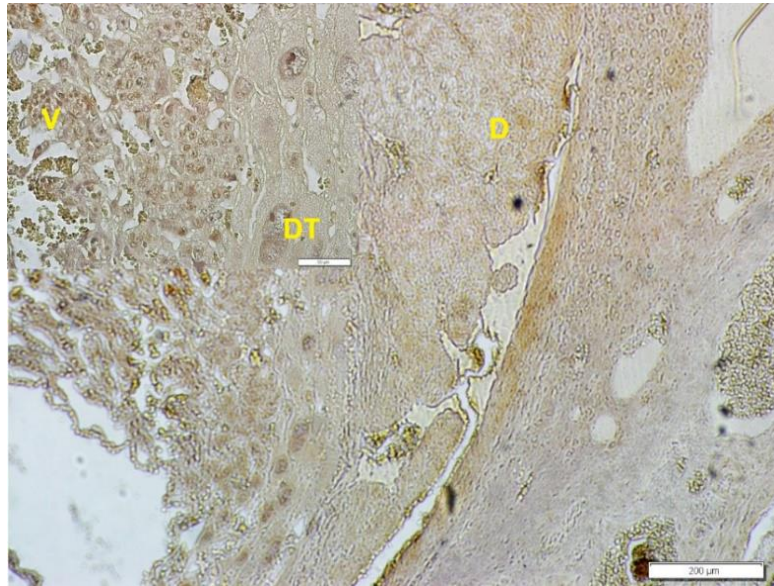
Lümen epiteli hücreleri negatif reaksiyon gösterirken, desidua hücrelerinde kuvvetli boyanmanın olduğu dikkati çekti. Bezlerde ise çok zayıf boyanma olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 40 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Desidua hücreleri;(D), İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: — 50 µm

Grup 5

Trofoblast hücrelerinde, dev trofoblast hücrelerde, fetal kapillerlerde ve desidua hücrelerinde boyanma yoğun pozitif olarak gözlemlendi.

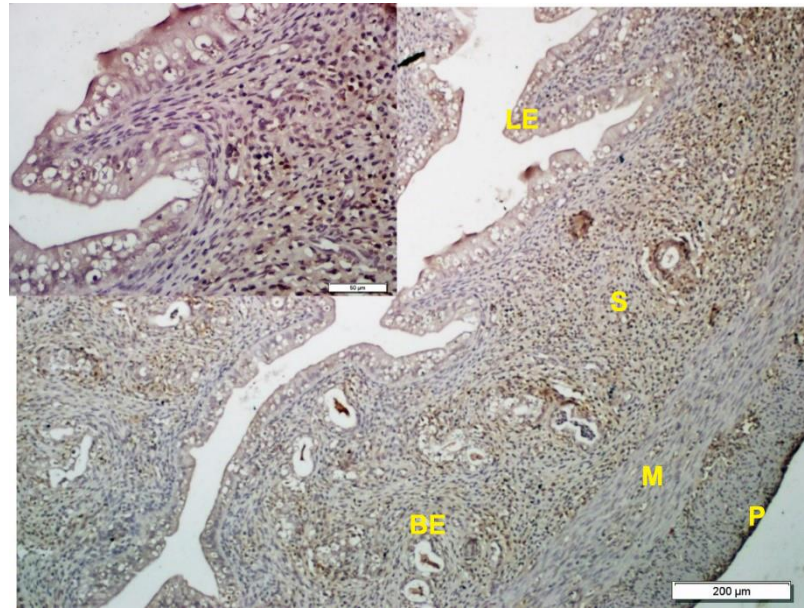


Şekil 4.41 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda CD105 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua tabaka;(D), Dev trofoblast hücreler;(DT), Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: — 200 µm

7. NANOG

Grup1

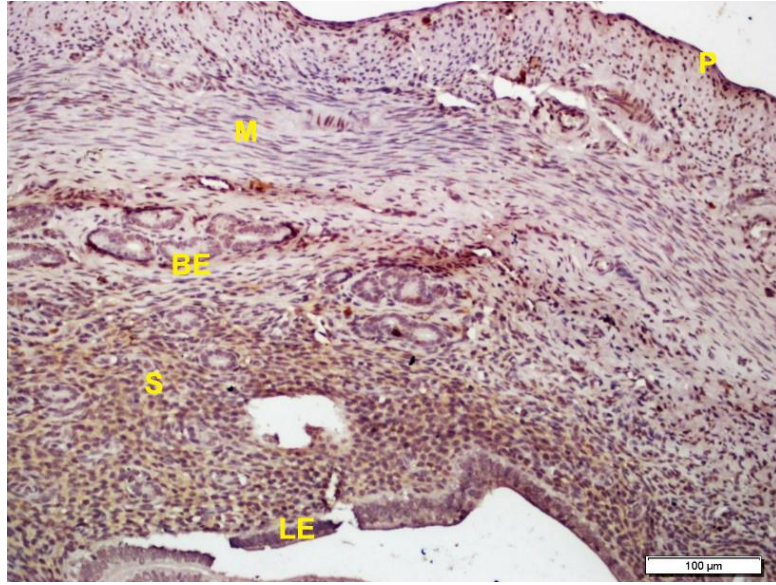
Lümen ve bez epitelinin apikal bölgesinde zayıf boyanma izlenirken sitoplazma ve çekirdekte boyanma gözlenmedi. Epitel tabakanın altındaki stromal hücrelerde boyanma negatifken bazal kısımda pozitif boyanan stromal hücrelerin varlığı dikkat çekiciydi. Miyometriyum ve perimetriyum tabakalarında negatif ekspresyon görüldü. Bununla birlikte kan damarlarında pozitif boyanma belirgindi.



Şekil 4.42 Grup 1: Östrus evresindeki uterusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitelii;(LE), Bez epitelii;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —200 µm

Grup 2

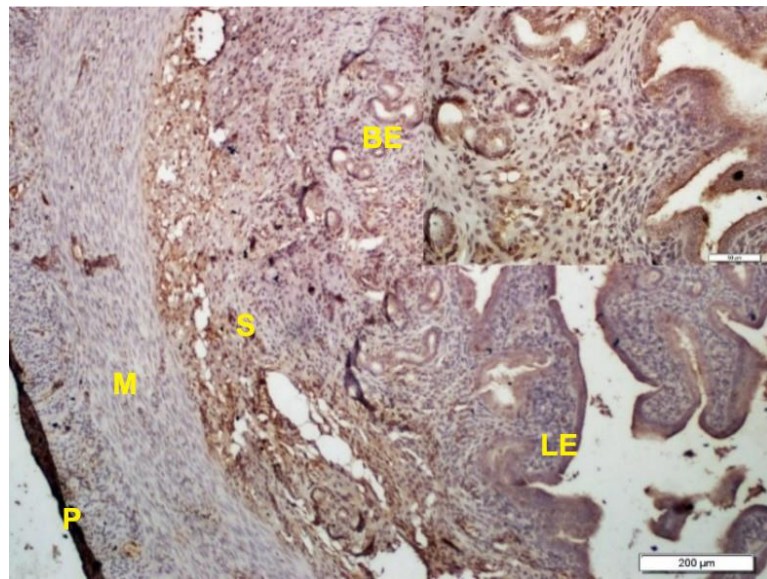
Lümen epitelinin apikal membranında zayıf pozitif boyanma izlenirken sitoplazma ve çekirdekte negatif ekspresyon görüldü. Bez epitelinde ekspresyon negatif olarak belirlendi. Genel olarak stromal hücrelerde zayıf sitoplazmik boyanma görüldü. Fonksiyonel tabaka stromal hücrelerde boyanma orta derecede, bazal tabakaya yakın bezler de boyanma çok zayıf olarak belirlendi. Miyometriyumda ve perimetriyum tabakasında çok az hücre de zayıf boyanma izlendi.



Şekil 4.43 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 100 µm.

Grup3

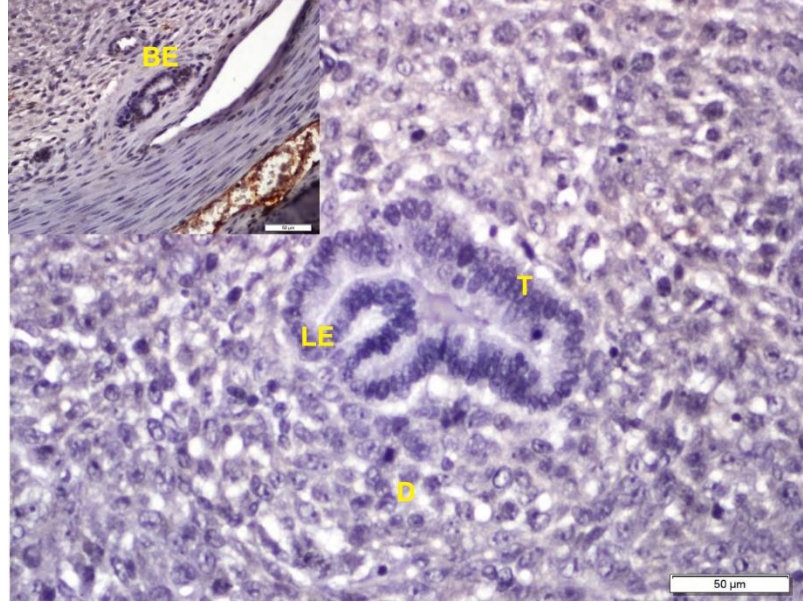
Lümen epitelinin apikal membranı daha kuvvetli olmakla birlikte kuvvetli pozitif reaksiyon izlendi. Bezlerde boyanma orta derecede sitoplazmik ve nükleer olarak görüldü. Stromal hücrelerde kuvvetli nükleer boyanma izlendi. Özellikle bazalis tabakasında pozitif boyanan hücrelerin yoğun olduğu dikkati çekti. Miyometriyum tabakasında az da olsa çekirdek boyanması saptandı.



Şekil 4.44 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 200 µm

Grup 4

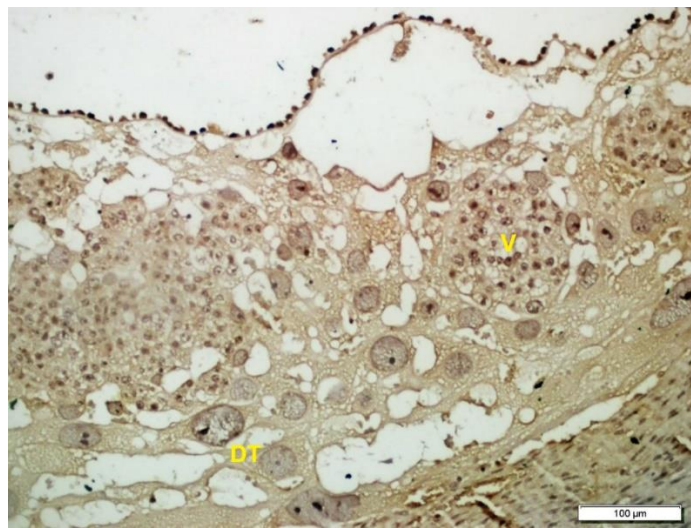
Lümen epiteli ve desidula hücrelerde ekspresyon negatif olarak izlendi. Uterus bezleri zayıf pozitif reaksiyon gösterirken damarların kuvvetli pozitif boyanması dikkat çekiciydi. Miyometriyum tabakasında çok zayıf ekspresyon gözlemlendi.



Şekil 4.45 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Trofoblast;(T), Bez epiteli;(BE), Lümen epiteli;(LE), Desidua hücreleri;(D). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 50 µm

Grup 5

Trofoblast hücrelerinde kuvvetli pozitif reaksiyon izlenirken dev trofoblast hücreleri negatif olarak izlendi.



Şekil 4.46 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterus dokusunda NANOG ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Dev trofoblast hücreleri;(DT). Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 100 µm

8. Oct3/4

Grup1

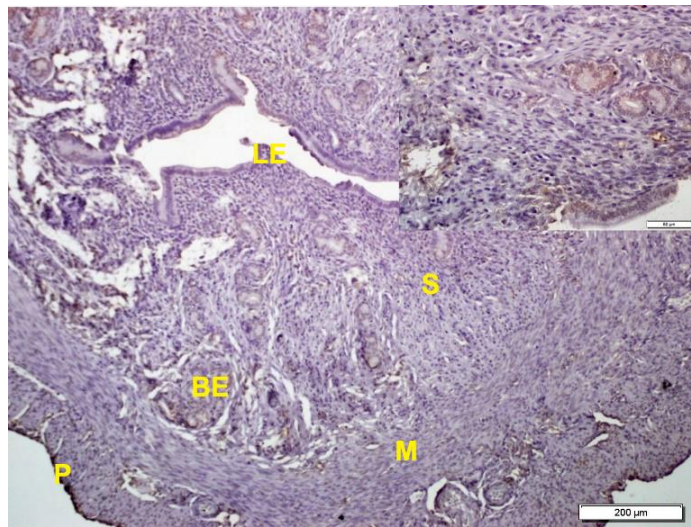
Lümen epiteli, bez epiteli ve stromal hücreler pozitif reaksiyon gösterdi.



Şekil 4.47 Grup 1: Östrus evresindeki uterusda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum (P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —200 µm.

Grup 2

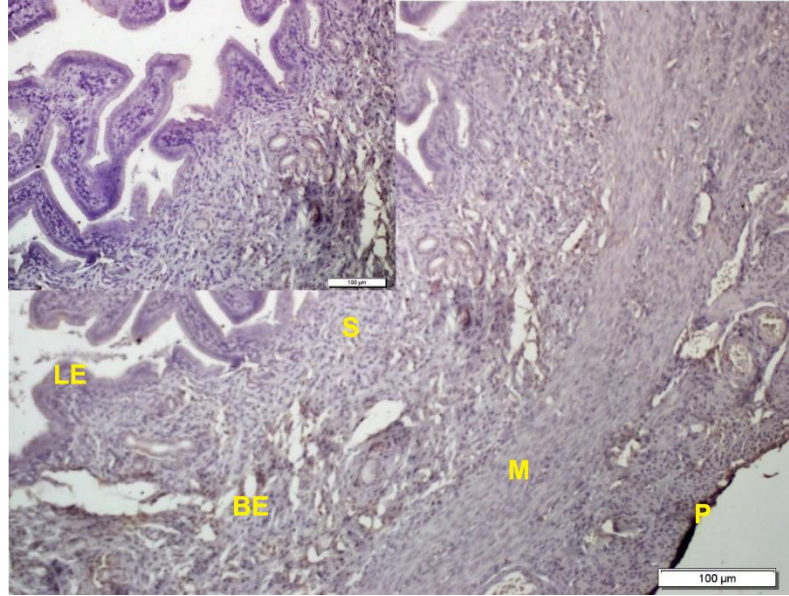
Lümen epitelinde, stromal hücrelerde, miyometriyum ve perimetriyum tabakasında boyanma negatif gözlemlendi. Bezlerde orta derecede sitoplazmik ve nükleer boyanma dikkat çekici olduğu görüldü.



Şekil 4.48 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda Oct3/4 Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 200 µm.

Grup 3

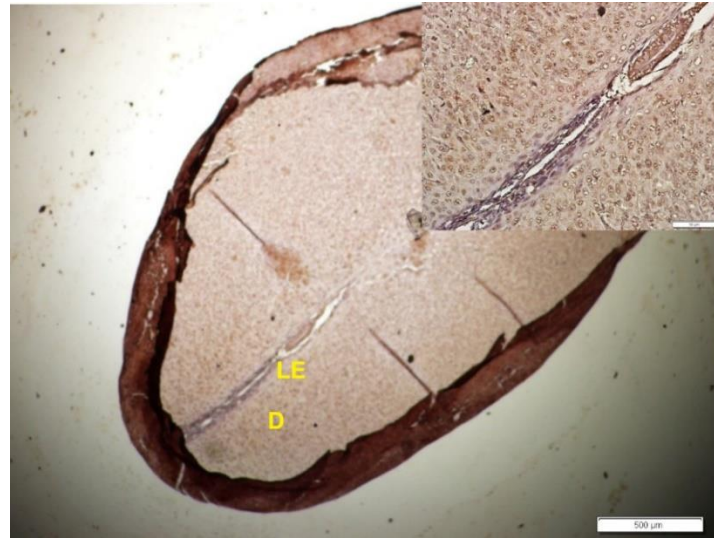
Lümen epiteli negatif ekspresyon gösterirken bezlerde zayıf ekspresyon dikkat çekti. Stromal hücreler, miyometriyum ve perimetriyum tabakalarında Oct3/4 için negatif ekspresyon görüldü.



Şekil 4.49 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 100 µm.

Grup 4

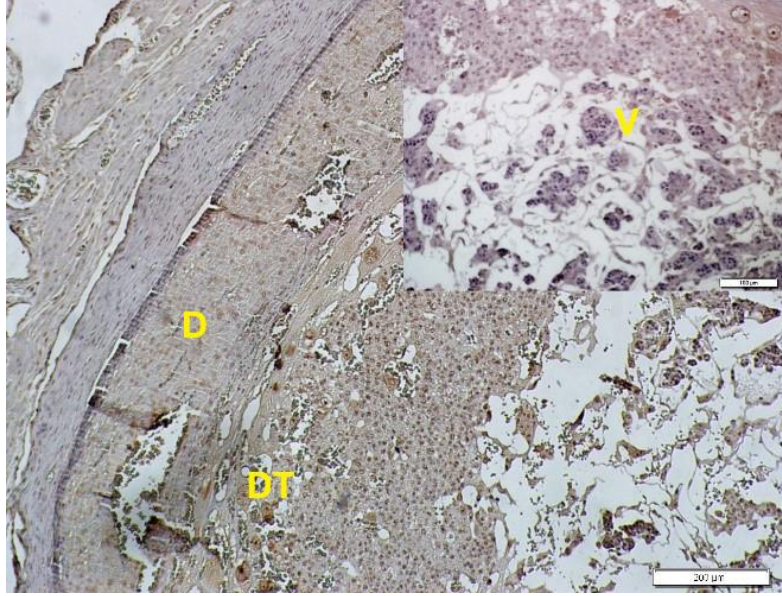
Lümen epitelinde, trofoblast hücrelerde, desidual hücrelerde pozitif ekspresyon görüldü.



Şekil 4. 50 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda. Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Desidua hücreleri;(D), İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: —, 500 µm

Grup 5

Trofoblastlarda ve dev trofoblastlarda pozitif ekspresyon görüldü. Koryonik villuslarda sinsityotrofoblastlar negatifken, Hofbauer hücreleri pozitif olarak izlendi.

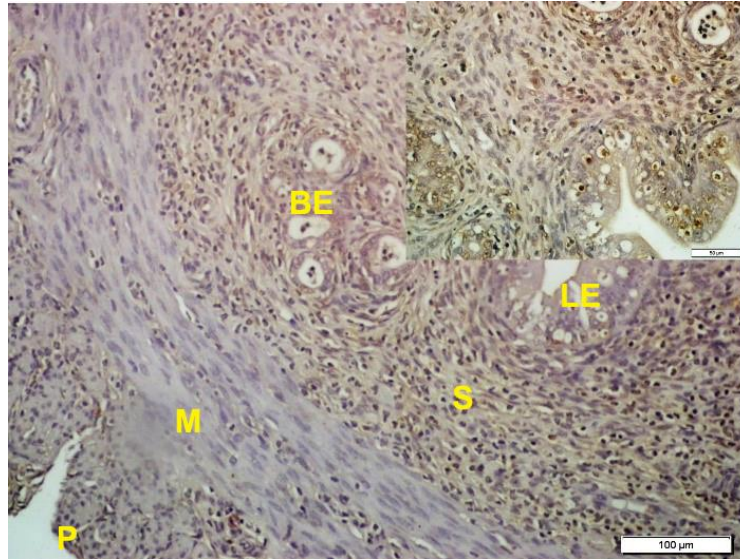


Şekil 4.51 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterus dokusunda Oct3/4 ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua tabaka;(D), Dev trofoblast hücreler;(DT), Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 200 µm.

9. SSEA

Grup 1

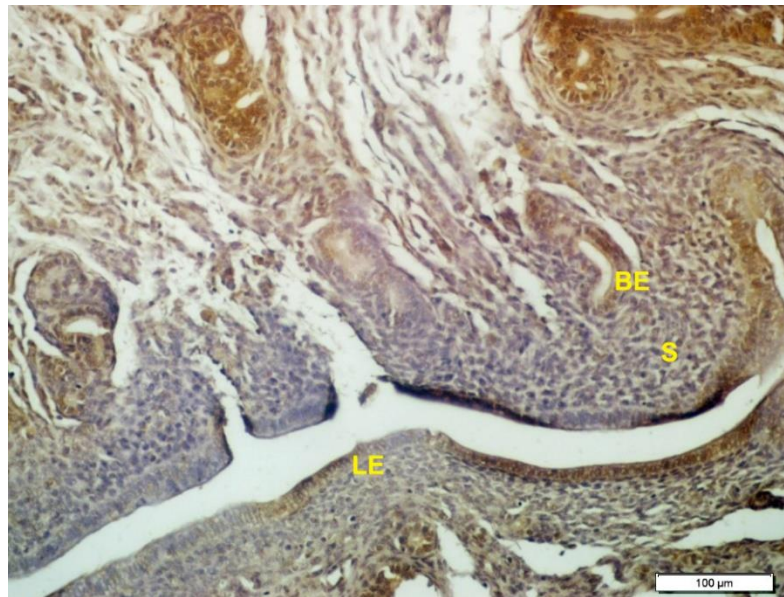
Lümen epiteli hücrelerin de kuvvetli nükleer boyanma gösteren hücreler belirlendi. Bez epiteli hücrelerinde orta ve zayıf derecede nükleer boyanma görüldü. Stromal hücrelerde hem fonksiyonel hem bazal bölgelerdeki hücreler zayıf pozitif boyanma izlendi. Miyometriyum tabakasında boyanma negatif olarak görüldü.



Şekil 4. 52 Grup 1: Östrus evresindeki uterusda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S), Miyometriyum;(M), Perimetriyum;(P). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —100µm.

Grup2

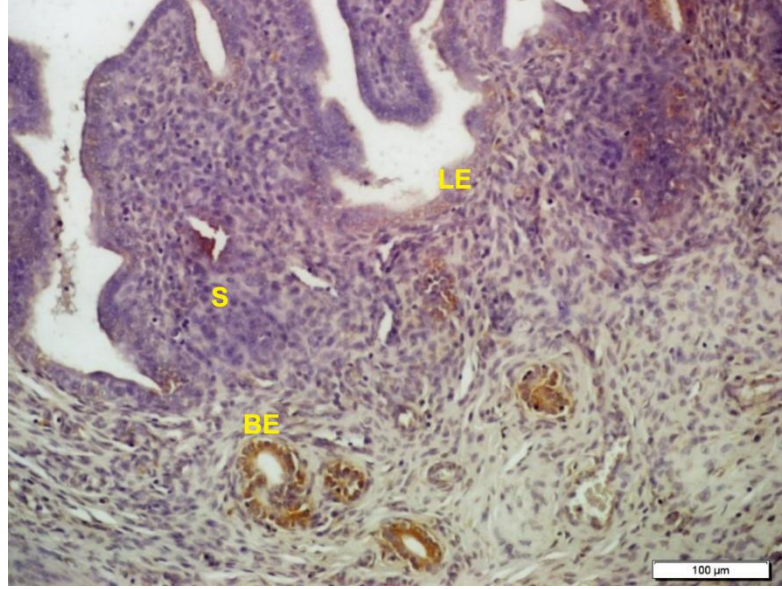
Lümen epitelinde negatiften orta dereceye kadar değişen derecelerde boyanma gösteren hücreler görüldü. Bezler de kuvvet pozitif boyanma dikkat çekiciydi. Stromal hücreler hem fonksiyonel hem bazal tabaka da zayıf pozitif boyanma görüldü. Miyometriyum da zayıf pozitif boyanma gösteren hücreler olmakla birlikte genel olarak negatif boyanma görüldü.



Şekil 4. 53 Grup 2: Mimik uygulanan 8 günlük uterus dokusunda SSEA Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Bez epiteli;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: —100 µm

Grup 3

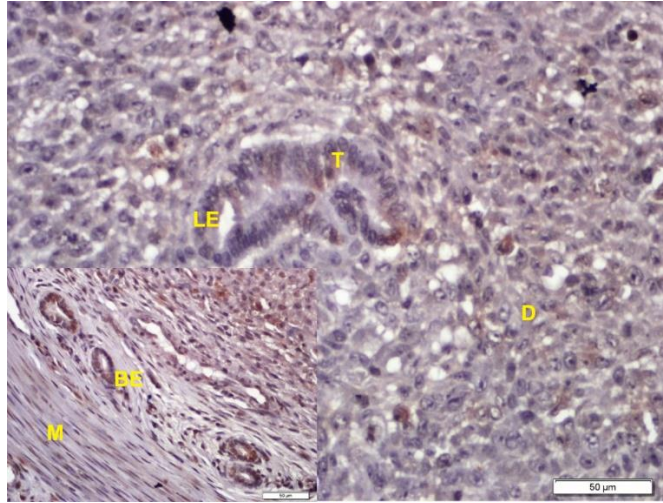
Lümen epitelinde çok zayıf ekspresyon izlenirken, bez epitel hücrelerinin kuvvetli boyanması dikkat çekiciydi. Stromal hücrelerde boyanma negatif olarak görüldü.



Şekil 4.54 Grup 3: Mimik uygulanan 13 günlük uterus dokusunda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epitel;(LE), Bez epitel;(BE), Stromal hücreler;(S). İmmunoperoksidaz & hematoxilen Bar: — 100 µm

Grup 4

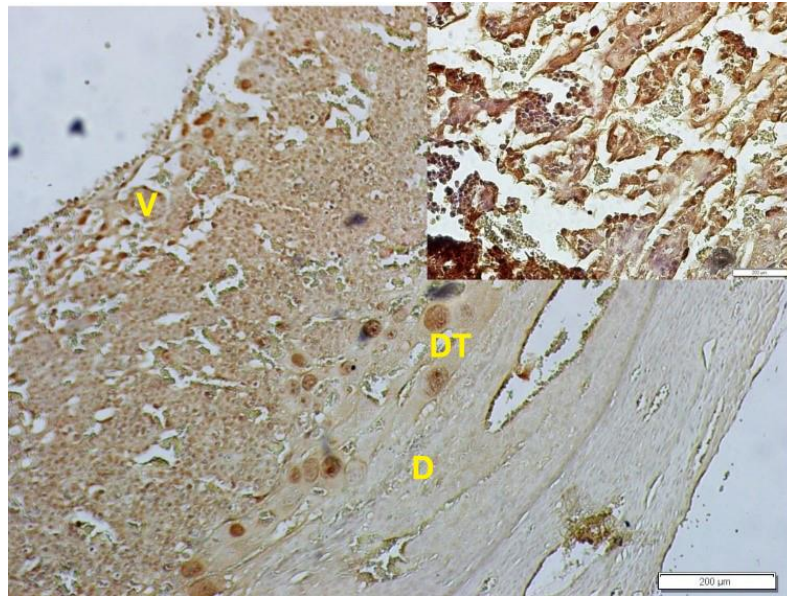
Hem desidual hücrelerde hem de endometrial bezlerde kuvvetli pozitif ekspresyon izlendi. Lümen epitelinde sayısı az olmakla birlikte pozitif ekspresyon gösteren hücreler görüldü. Miyometriyum tabasında hem nükleer hem de sitoplazmik kuvvetli ekspresyon görüldü.



Şekil 4.55 Grup 4: Mimik uygulanmayan 8 günlük gebe uterus dokusunda SSEA ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Lümen epiteli;(LE), Miyometriyum;(M), Trofoblast;(T), Bez epiteli;(BE), Desidua hücreleri;(D). İmmunoperoksidaz &hematoksilen. Bar: — 50 µm

Grup 5

Trofoblast hücrelerde, dev trofoblast hücrelerde, ekstravillöz trofoblast hücrelerde kuvvetli pozitif boyanma görüldü.



Şekil 4.56 Grup 5: Mimik uygulanmayan 13 günlük gebe uterusunda SSEA Ekspresyonunun yerleşimi ve dağılımı. Desidua tabaka(D), Dev trofoblast hücreler;(DT), Villöz yapılar;(V). İmmunoperoksidaz &hematoksilen Bar: — 200 µm

5. TARTIŞMA

Genel olarak, miRNA-200 ailesi üyelerinin ekspresyonu, endometriyum reseptivitesinde düşüktür. Fare endometrial stroma hücrelerinde miRNA-200a, miRNA-200b ve miRNA-200c ekspresyonları, implantasyon sırasında azalır (Liu ve ark 2016). Estella ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada, insan endometrial stromal hücrelerinin desidualizasyonu boyunca miRNA ekspresyonunun profillerine bakmış ve miRNA ailesinin üç üyesinin (miRNA-181, miRNA-183 ve miRNA-200'ün) desidualizasyon sırasında aşağı regüle olduklarını bildirmişlerdir (Estella vd 2012). Zheng ve ark. (2017) ise sağlıklı kontrol, infertil, erken gebelik ve düşük yapmış olan kadın grupları üzerinde yapmış oldukları çalışmada, serumdaki miRNA-200 ailesi üyelerinden (miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-141 ve miRNA-429) miRNA-200c'nin infertilite için en duyarlı ve spesifik belirteç olduğunu öne sürmüşlerdir (Zheng vd 2017).

Endometrial gelişim ve stromal hücre desidualizasyonu, östrojen ve progesteron tarafından düzenlenmektedir. Fare endometrial stromal hücrelerinde miRNA-200 ekspresyonu; en fazla östrus evresinde artış gösterirken, metaöstrus ve diöstrus sırasında kademeli bir azalma göstermektedir. miRNA-200 knockdown farelerde desidualizasyon, olumsuz etkilenir ve desidual farklılaşmaya eşlik eden mezenkimal epitelyal geçiş benzeri değişikliklerin oluşmadığı görülür (Jimenez vd 2016).

Endometrial proliferasyonun çok fazla olduğu implantasyon öncesi proliferasyon evresinde, miRNA-200c ekspresyonu yüksektir. İmplantasyon döneminde ise hem miRNA-200c ekspresyonunun ve hem de endometrial proliferasyonun azaldığı düşünülmektedir. Zheng ve ark. (2017) yapmış oldukları çalışmada, miRNA-200c ekspresyonunun yaban tip farelerin gebeliklerinin 4. Gününde, uterus endometriyumlarında azalmış olduğunu bildirmişlerdir. miRNA-200c mimiği enjeksiyonu

yapılan farelerde miRNA-200c ekspresyonunun arttığı ve enjeksiyonun, embriyo sayılarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Zheng vd 2017). Liu ve ark (2016) yapmış oldukları çalışmada, uterus boynuzlarına yapılan miRNA-200a enjeksiyonunun, apoptozisi etkileyerek implantasyon hızını kısmen azalttığını ve implante olan embriyo sayısında azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir (Liu vd 2016).

Çalışmamız da benzer şekilde, miRNA-200c mimiği uygulanan sıçanların sağ uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarının, mimik uygulanmayan sol uterus boynuzlarındaki embriyo sayılarına göre istatistiki açıdan anlamlı olarak ($p < 0,05$) azaldığını gösterdi. Bazı deneklerin, mimik uygulanan uterus boynuzlarında implante olan hiçbir embriyoya rastlanmadı. Çalışmamız, miRNA-200c'nin embriyo implantasyonunu olumsuz bir şekilde etkilediğini gösterdi.

Blastosistin uterusu implantasyonu, memeli üremesinde çok önemli bir adımdır. Bu implantasyon, blastosist ile alıcı uterus arasında karşılıklı bir etkileşim içermektedir. Steroid hormonları, adezyon molekülleri, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve reseptörlerin, başarılı implantasyonu etkilediği bilinmektedir (Inyawilert vd 2014). İntegrinler; İmplantasyon sırasında hem maternal hem de embriyonik yüzeylerde bulunmaktadır (Illera vd 2003).

İntegrinler, üreme döngüsü ve erken gebelik boyunca uterus içinde dinamik bir şekilde düzenlenirler. Endometrial epitel hücrelerde, özellikle $\alpha 1\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6$ ve $\beta 4$ integrinlerin zamansal ve uzamsal ifadelerinin tanımlanmasının, endometrial alıcılıkta embriyo implantasyonu için anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (Reddy vd 2003). Preeklampsi, vasküler problemlerin neden olduğu intrauterin gelişme geriliği ve kusurlu luteal fazlar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar, integrin paternlerindeki anomaliler ile açıklanabilmektedir (Merviel vd 2001).

Marwood ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada, insanlarda endometriyum lümen epitelinde ve bez epitelinde integrin $\alpha 1$, $-\alpha v$, $-\beta 1$, ve $-\beta 2$ alt birimleri ve dimer $-\alpha v\beta 5$ $-\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ 'ün yer aldığını bildirmişler ve $\alpha v\beta 3$ düzeylerinin orta seviyede eksprese edildiğini gözlemlemişlerdir (Marwood vd 2009). Gebeliğin başında, integrin ekspresyonundaki değişiklik, trofoblasttaki integrinler (embryo/endometriyum iletişimini sağlayan integrinler $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 7\beta 1$) ve embriyonun desidua ($\alpha 6\beta 4 \rightarrow \alpha 5\beta 1 \rightarrow \alpha 1\beta 1 \rightarrow \alpha 4\beta 1$ çoğalma durumundan endovasküler sisteme geçiş) istilası ile senkronize edilir. Alfa dimer, aynı anda uterus epitelinde ve trofoblastta bulunur (Merviel vd 2001).

Illera ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada, gebe tavşan uterus boynuzuna $\alpha\beta3$ integrinini bloke edici antikor uygulamışlar ve enjeksiyonu takiben 10. günde embriyo sayılarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. İmplantasyon dışı bölgelerde, hamile olmayan erişkin ve olgunlaşmamış endometriyumda ve implantasyon bölgesinde $\beta3$ alt birimi için RT-PCR analizleri yapılmış ve implantasyon bölgesinde yüksek mRNA seviyeleri tespit edilmiştir. İn situ hibridizasyonda, $\beta3$ integrin mRNA'sının uterus miyometriyumunda ve trofoblastta ekspresyonu gösterilmiştir (Illera vd 2003).

He ve ark. (2016) yapmış oldukları çalışmada, integrin $\alpha\beta3$ 'ün, bez epitel hücrelerinin membranında eksprese edildiğini ve boyanmanın dağınık ve zayıf pozitif olduğunu bildirmişlerdir. $\alpha\beta3$ mRNA ekspresyonunun, implantasyon penceresi sırasında yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (He vd 2016). İntegrin $\alpha\beta3$ 'ün tüm menstrual döngü sırasında, stromal hücrelerinde ekspresyonu çok azdır veya hiç yoktur (DuQuesnay vd 2009).

Çalışmamızda, östrus dönemi uterusdaki $\alpha\beta3$ ekspresyonunun, miRNA uygulanan grup2 ve grup3 uterusundaki ekspresyon seviyelerinde fark olmadığı görüldü. Bununla birlikte, mimik uygulanmayan grup4 ve grup5'te ekspresyonun giderek azaldığı, özellikle grup5 te ekspresyonun tamamen negatif olduğu tespit edildi. Çalışmamızın sonuç kısmında, miRNA-200c uygulamasının $\alpha\beta3$ ekspresyonuna etkisinin olmadığı gözlemlendi.

LIF, insan endometrial hücrelerinde eksprese edilen hayati bir sitokindir ve implantasyon sürecinde rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde, LIF'in anormal ekspresyonunun, anormal embriyo implantasyonu ile ilişkili olduğunu doğrulayan farklı çalışmalara rastlanmıştır.

LIF, blastosistlerin implantasyona ilerlemesinde hayati bir rol oynamaktadır. LIF mekanizmasında, LIF-LIFR-gp130 kompleksi önemli görev almaktadır. Bu kompleks, hücre içi alanda JAK/ STAT3 moleküler yolağını izlemektedir. LIF, ayrıca STAT3'ün fosforilasyonunu indükleyerek, ekstrasvillöz trofoblast istilasını düzenler. Bazı hayvan çalışmalarında JAK-STAT yolunun çeşitli modeller kullanılarak bozulması, blastosist implantasyonunun başarısızlığına neden olmuştur (Shan vd 2019). İnsanlarda LIF, endometriyum, desidua ve koryon tarafından salgılanır. LIF eksikliği olan farelerin

uterusunun, desidual bir tepkiye giremediği ve bu nedenle de LIF'in stromal desidualizasyon için vazgeçilmez olduğu düşünülmektedir (Hambartsoumian 1997).

Gebelik sırasında, sitokin fonksiyonu için nispeten stabil miktarlarda LIF'in gerekli olması hayati öneme sahiptir. LIF eksikliği, implantasyonu olumsuz yönde etkiler. LIF'in aşırı ekspresyonu, endometrial büyümeyi inhibe edebilir (Hambartsoumian 1997).

Tawfeek ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada, hem doğurgan hem de infertil kadınların endometriyumunda implantasyon penceresi sırasında, LIF mRNA ekspresyonunun varlığına bakmışlar ve infertil kadınların endometriyumunda LIF mRNA ekspresyonunun, fertil gruba kıyasla önemli ölçüde azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir (Tawfeek vd 2012).

Cai ve ark. (2000), LIF antikorunu gebeliğin 3.gününde uterus boynuzu içine enjekte etmişler ve gebeliğin 8. gününde LIF antikoru uygulanan uterin boynuzlarına implante olan embriyo sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığını bildirmişlerdir (Cai vd 2000). Bhatt ve ark. (1991), LIF ekspresyonunun endometrial bezlerde gebeliğin dördüncü gününde, maksimum ifade edildiğini bildirmişlerdir (Bhatt vd 1991).

Charnock-Jones ve ark. (1994), sağlıklı bayanlardan alınan endometrial biyopsi örneklerinde LIF mRNA miktarının, proliferatif fazda düşük olduğunu veya saptanamadığını, orta ila geç sekresyon evresinde ise ekspresyonun yaklaşık altı kat artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek ekspresyonun ise geç sekresyon evresinde görüldüğünü ifade etmişlerdir. Çalışmada, LIF ekspresyonunun orta ve geç sekresyon evresinde glandüler epitelde lokalize olduğu belirtilmiş, stromada, bezlerdekine kıyasla zayıf ve değişkenlik gösteren bir miktar LIF immünoreaktivitesi tespit edilmiştir. Altı farklı hastadan alınan örnekler, döngünün her fazı için analiz edilmiş, orta ve geç sekresyon evresinde, glandüler epitelde net ve tekrarlanabilir boyanma gösterirken, stromada hafif lekelenme olduğu ve bu boyanmanın zayıf olduğu ve hücre dışı matriks ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, miyometriyum tabakasında hem büyük kan damarlarının hem de düz kas hücrelerinin çoğunun güçlü bir şekilde boyanma gösterdiğini bildirmişlerdir. In vitro fertilizasyon laboratuvarından blastosist temin edilerek yapılan araştırmada, implantasyon sırasında maternal endometriyumun LIF ürettiği, blastosistin LIF reseptör

mRNA'sını eksprese ettiği ve bu nedenle bu sinyale yanıt verebileceğın öne sürülmüştür (Charnock-Jones vd 1994).

Çalışmada Charnock-Jones ve arkadaşlarının bulgularına benzer şekilde, LIF ekspresyonunun, grup1 östrus dönemi endometriyumunda özellikle reaksiyonun bez epitelinde kuvvetli olduğu saptanmıştır. Lümen epitelinin genellikle negatif olduğu buna karşın yer yer pozitif reaksiyon gösteren bölgelerin de bulunduğu görülmüştür.

Chen ve ark. (2000) yapmış oldukları çalışmada, LIF eksikliği olan dişi ve embrioların, LIF'in intra peritoneal enjeksiyonu ile normal embriyonel gelişme ve implantasyon gösterdikleri belirtilmiştir. Geçici LIF ekspresyonu, gebeliğın 4. gününde sadece uterusu embriyo implantasyonu ve desidualizasyonuna izin veren bir alıcılık durumuna neden olmaktadır. LIF eksikliği olan farelerde ve yaban tip farelerde implantasyonun başlangıcına kadar, uterus hücre proliferasyonundaki değişiklikler, hormon seviyeleri, blastosist lokalizasyonu ve laktoferrin ve Muc-1 ekspresyonunda fark olmadığı gösterilmiştir. LIF eksikliği olan farelerde, uterusu embrioların varlığına veya yapay uyarılara (Parafin oil) karşı desidualizasyon gerçekleşmez (Chen vd 2000).

Maternal LIF'in, trofoblast büyümesine, konseptus fonksiyonuna ve ankrajına dahil olduğu bildirilmiştir. LIF mRNA ekspresyonunun, desidual stromal hücreler ve glandüler epitelde sınırlı olduğu bildirilmiştir (Hambartsoumian 1997). LIF'in miyometriyumda eksprese edildiği bildirilmiştir. LIF'in, diğer sitokinler tarafından arttırılan bir etki olan in vitro miyoblast çoğalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Austin ve ark 1992).

Çalışmamız kapsamında miyometriyum tabakasından elde edilen sonuçlar, Austin ve arkadaşlarının çalışmalarından elde edilen sonuçlardan farklıdır. Miyometriyum tabakası; grup 1, grup 3 ve grup 4'te de negatif eksprese olurken, grup 2 ve grup 5'te pozitif ekspresyon göstermektedir. Çalışma bulguları, miRNA200-c'nin miyometriyum tabakasındaki rolü hakkında net bilgi vermemektedir.

Plasentadaki LIF'e özgü reseptörlerin seviyesi, normal hamilelikte değişmemektedir (Kojima vd 1995). LIF, hamileliğin erken döneminde desidual doku tarafından aktif olarak salgılanmaktadır ve hamileliğin kurulmasında önemli bir role sahiptir. (Hambartsoumian 1997).

Çalışmamızda yer alan grup2 ve grup3'te LIF ekspresyonunun arttığı, buna karşılık özellikle grup4'te ekspresyonunun negatif olduğu görülmüştür. Gebeliğin ileri dönemlerinde trofoblast hücrelerinde, ekspresyonun pozitif olduğu ancak serbest villuslarda sinsityotrofoblast hücrelerinin negatif ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Bulgular, miRNA-200c uygulamasının lümen ve bez epitelinde LIF ekspresyonu üzerinde etkili olmadığını düşündürmektedir.

İnterlökin-6 (IL-6), bağışıklık ve enflamatuar yanıtlarda, hücrel proliferasyon ve farklılaşma üzerinde çoklu biyolojik etkileri olan bir sitokindir (Nishino vd 1990). IL-6 immünreaktivitesi, menstrual döngü boyunca hem endometrial epitel hücrelerinde hem de stromal hücrelerde gözlemlenmektedir (Tabibzadeh 1991). Endometrial dokuda yetersiz IL-6 ve IL-1 mRNA ekspresyonu, bozuk bir maternal bağışıklık yanıtına yol açabilir, desidual dokunun yeniden şekillenmesini sağlayıp, anjiyogenezi etkileyebilir veya düzensiz trofoblast farklılaşması ve tekrarlayan düşüklere neden olabilir (Jasper vd 2007).

Yapılan çalışmalarda IL-6 mRNA'sının orta ve geç sekresyon evresindeki endometriyumda, geç proliferatif evre endometriyumuna göre daha fazla eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Vandermolen ve Gu 1996, Chimote vd 2010). IL-6 proteini ve mRNA'sı, orta sekresyon evresindeki endometriyumda ağırlıklı olarak bez ve lüminal epitel hücrelerinde lokalizasyon göstermektedir (Tabibzadeh ve Sun 1992, Champion vd 2012).

Çalışmamızda yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı olarak, Grup1'de hem lümen hem de bez epitelinde zayıf IL-6 ekspresyonu izlenmiş buna karşın ekspresyonun stromal hücrelerde kuvvetli olduğu görülmüştür. miRNA-200c mimiği uygulanan grup2'de bezlerde ekspresyonun negatif olduğu gözlenirken, grup3'te kuvvetli pozitif ekspresyon gözlenmiştir. Fakat bu olası ekspresyon farklılığının nedeni açıklanamamıştır.

Azalmış IL-6 ve IL-1 mRNA'sı, nedensiz tekrarlayan düşüklere ilişkilidir. Jasper ve ark (2007) yapmış oldukları çalışmada, tekrarlayan düşük yaşayan bir grup hastada IL-6 ve IL-1'in endometrial ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (Jasper vd 2007). IL-6'nın trofoblast üzerindeki fonksiyonel etkileri, IL-6 üretiminin yapıldığı bölgeler ve trofoblastta IL-6 ile indüklenen sinyal mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Champion vd 2012).

Nishino ve ark (1990) yapmış oldukları çalışmada, plasentada trofoblast hücrelerinin IL-6 ürettiklerini ve IL-6-R'nin trofoblast tabakasında bulunduğunu ancak mezankimal ve endotel hücreleri gibi diğer hücrelerde boyama görülmediğini bildirmişlerdir. IL-6'nın insanlarda trofoblast büyümesine ve plasental gelişimine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda epitelyal, endotelial ve lenfoid hücreler içermeyen endometrial stromal hücrelerin kültür ortamına IL-6 salgıladıkları bildirilmiştir (Nishino vd 1990).

İltihapla ilişkili bazı sitokinler (IL-1a, IL-1f TNF α ve IFN γ), IL-6 salgılamak için stromal hücreleri indükler. Bununla birlikte IL-1alfa, endometrial stromal hücrelerde IL-6 üretiminin güçlü indükleyicisidir. İnsan trofoblast hücrelerinde hem IL-6 hem de IL-6 reseptörü bulunmaktadır. IL-6, trofoblast kültürlerinde insan koryonik gonadotropin (hCG) üretimini indükler. Trofoblastlardan hCG salınımını, otokrin mekanizma ile düzenlediği düşünülmektedir. IL-6'nın insan endometrial stromal hücreleri tarafından üretimi, fizyolojik östrojen seviyesi ile yukarı regüle edilir (Tabibzadeh 1991).

Champion ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmada 8-10, 12-14 ve 16-20 haftalık gebelik yaşlarında sonlandırdıkları embriyoların, plasenta ve desidua dokularını makroskopik olarak ayırmışlar ve CD10 + stromal hücreleri, sitotrofoblast ve extravillöz trofoblast hücrelerini isole edip, kültüre etmişlerdir. IL-6'nın plasenta yatağı boyunca tüm gebelik yaşlarında yaygın olduğu ve lökositler, stromal hücreler ve extravillöz trofoblast hücrelerinde immün reaktivite gösterdiği bildirilmiştir. IL-6 reseptörleri, gp130 ve IL-6R α tüm gebelik yaşları gruplarının plasenta yatağında extravillöz trofoblast hücrelerinde tespit edilmiştir. Plasental yatak içindeki spiral arterlerde IL-6R α ve gp130 görülmüştür. Ayrıca IL-6, incelenen tüm gebelik yaşlarında plasentanın hücre kolonlarındaki sinsiyo trofoblast, villöz sitotrofoblast ve extravillöz trofoblast hücrelerinde immün reaktivite göstermiştir. IL-6 immün boyama, extravillöz trofoblast hücre kolonlarının distal kısımlarında en belirgin olduğu bildirilmiştir.

IL-6 nötralize edici antikor ilavesinin extravillöz trofoblast hücresi istilası üzerinde etkisinin bulunmadığı, extravillöz trofoblast hücrelerinden salgılanan endojen IL-6'nın invazivliklerinde bir rol oynamadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, erken gebelikte uteroplazental dokularda yüksek seviyelerde IL-6 ekspresyonu görülmüş, desidual stromal hücreler, sitotrofoblast ve extravillöz trofoblast hücreleri IL-6 üretiminin, gebelik yaşı ile birlikte arttığı gözlemlenmiştir (Champion vd 2012).

Çalışmamız içinde grup5'te; spongiotrofoblastlarda, desidua ve dev trofoblast hücrelerinde negatif ekspresyon görülürken, ekstrasvillöz trofoblastlarda ve erken gebelik döneminde (grup 4) desidua hücrelerinde pozitif ekspresyon izlendi. Elde edilen çalışma bulguları, miRNA-200c'nin IL-6 ekspresyonuna çok fazla etkisinin olmadığını düşündürdü.

Endometriyum ve embriyo arasındaki immünolojik etkileşim, gebeliğin kurulması ve sürdürülmesinde merkezi bir öneme sahiptir. Endometriyumda çalışan bağışıklık sistemi, TNF, IL -1 IL-6 IL-8, IL-15 ve IL-18 gibi lokal olarak üretilen çeşitli sitokinlerle modüle edilir (Yoshino vd 2001).

Endometriyumun mukozal bağışıklık sistemi, cinsel yolla bulaşan bakteri veya virüsler dahil olmak üzere patojenik organizmalara karşı önemli bir ilk savunma hattıdır (Yoshino vd 2001). IL 18, hem doğuştan gelen bağışıklığı ve hem de Th1 ve Th2 kaynaklı bağışıklık tepkilerini artırır (Weissenbacher vd 2014). Yoshino ve ark (2001), herhangi bir hormonal tedavi almamış sağlıklı bayanlardan histeroskopi ile endometrial biyopsi almış, endometrial dokudan stromal hücreler ve endometrial epitel hücreler elde etmiş, bu hücelere RT PCR analizi yapmış ve IL-18, IL-18R ve IL-18BP mRNA'larının menstrual döngü boyunca önemli bir dalgalanma olmadan yapısal olarak eksprese edildiklerini göstermişlerdir (Yoshino ve ark 2001). Epitel hücrelerdeki IL-18 ekspresyonunun, stromal hücrelerdeki IL-18 ekspresyonundan daha fazla olduğu bildirilmiştir. IL-18 üretimi, desiduaizasyon sırasında büyük ölçüde artar. IL-18R, endometriyumun stromal hücrelerinde ifade (eksprese) edilir (Van Mourik vd 2009).

Çalışmamızda, östrus dönemi (grup1) endometriyumunda stromal hücrelerde kuvvetli pozitif reaksiyonlar izlenmiştir. Epitel hücrelerindeki apikal membranda pozitif reaksiyon görülmüştür. Mimik uygulanan grup2 ve grup3 epitel dokularda, pozitif reaksiyon izlenmiştir. Stromal hücrelerde ekspresyonun zayıfladığı dikkat çekmiştir. Grup1'den farklı olarak miRNA200-c'nin epitel ve bezlerinde ekspresyonun artması, stromal hücrelerde azaltması dikkat çekicidir.

Östrojen ve progesteron, fare uterusunda IL-18 mRNA ekspresyonunu inhibe eder ve Fas-Fas ligand apoptozunu artırır. Bu durumun, anjiyogenez üzerinde inhibe edici etkisi olduğu düşünülmektedir. İnfertilite tedavisi sırasında embriyo transferi sonrası implantasyonu başarısız olan hastalarda, fertil hastalara kıyasla IL-18 ekspresyonunda geniş değişiklikler gözlemlenmiştir (Lédée vd 2006). IL-18 fetal veya diğer antijenlerin etkisi altındaki makrofajlar, stromal hücrelerde ve desidua dokudaki

hücrelerden üretilebilirler. IL-18 reseptörünün trofoblast hücreleri üzerindeki ekspresyonu ilginçtir. Trofoblastın maternal doku hücrelerine yayılması veya büyümesi, maternal taraftan üretilen IL-18 tarafından etkilenebilir ve kontrol edilebilir. İmmünohistolojik olarak bakıldığında, IL-18 reseptörünün villöz damarlarda, trofoblast tabakası, interstisyel hücreler ve fetal kan hücreleri (esas olarak çekirdeklenmiş eritrositler ve monositler) üzerinde güçlü bir şekilde boyandığı gösterilmiştir (Tokmadzic vd 2002).

IL-18, insan villöz trofoblast hücrelerinde erken dönemde görünmese de ilerleyen dönemlerde dev ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinde ve nadiren aktif makrofajlarda görülür. Periimplantasyon bölgesindeki IL-18, uterin doğal öldürücü hücrelerini, erken hamilelik sırasında vasküler yeniden şekillenmede önemli bir rol oynayan IFN üretmek için uyarabilir. IL-18'in, implantasyon yerinin vaskülarizasyonu için gerekli olabildiği düşünülmektedir (Weissenbacher vd 2014).

Çalışmamız içindeki grup5'te trofoblast hücrelerinde pozitif ekspresyon izlenmesine karşın dev trofoblast hücrelerde ekspresyon izlenmemiştir. Bununla birlikte, erken gebelik döneminde ekspresyonun negatif olduğu belirlenmiştir.

VEGF; yetişkin dokularında, embriyogenez ve anjiyogenez sırasında vaskülogenezin önemli bir düzenleyicisidir (Halder vd 2000). VEGF, vasküler geçirgenliği uyarabildiği için, vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinir (Chakraborty vd 1995). Endometriyum, erken gebelikte hızlı ve dinamik değişikliklere uğrayan heterojen hücre tiplerinden oluşur. Epitelde eksprese olan VEGF-A, damarların yeniden şekillenmesinde özel bir işlev göstermektedir (Halder vd 2000).

VEGF, başarılı embriyo implantasyonu için önemli bir sitokindir. Bağlanma reaksiyonunun başlamasıyla birlikte kemirgenlerde blastosist bölgelerinde uterusun vasküler geçirgenliği artar. Bunu, stromal desidualizasyon ve anjiyogenez takip eder (Chakraborty vd 1995).

Walter ve arkadaşları, gebeliğin 1- 5. günlerinde uterus boynuzlarını çıkarttıkları fare VEGF A izoformlarının mRNA ekspresyonlarına bakmışlardır. Ekspresyonun gebeliğin 2. gününde en düşük düzeyde, gebeliğin 5. gününde ise en yüksek düzeyde olduğunu gözlemlemişlerdir. VEGFR ekspresyonunun, implantasyonun 3. gününden sonra arttığı bildirilmiştir. Yapılan immunohistokimyasal boyamada, en yüksek immun reaktivite endotelial hücrelerde gözlenmiştir. Bununla birlikte, endometriyum ve

miyometriyumda gebelik günlerinde (1.-5. günler) ekspresyonda anlamlı bir fark olmadığı, perisitler ve vasküler düz kas hücrelerinde ve subepitelyal stromal fibroblastlarda boyanmaların olduğu gözlenmiştir. Miyometriyumun, gözlem yapılan günler içinde genellikle az boyanma gösterdiği bildirilmiştir. VEGFR-2, glandüler epitel hücrelerinde ve daha az oranda lüminal epitelde immünreaktivite göstermiştir. Epitelial boyamalarda çekirdekte sitoplazmaya göre daha fazla boyanma olduğu bildirilmiştir. Hamilelik günleri arasında glandüler veya luminal epitel hücreleri için anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (Walter vd 2010).

Zhang ve ark (2001), gebeliğin 4. gününde uterin boynuzuna 1.9 µg/3µl. VEGF antikorunu enjekte ettikleri farelerde, implante olan embriyoların sayılarında azalma gözlemlenmiştir. VEGF antikor dozajlarının, embriyo implantasyonunu tamamen inhibe etmediği görülmüştür. Bu durum, VEGF'nin düzenleyici yolaktaki tek anahtar faktör olmadığını göstermiştir. Gebeliğin 4. gününde toplanan fare blastosistleri in vitro ortamda uterus epitelyal hücreleri ile kültüre edilmiş ve tek tabaka epitel hücre mediumuna farklı dozlar da VEGF antikorunu ilave edilmiştir. Blastosistlerin, artan doza bağlı olarak tek tabakalı playtlere yapışma oranının istatistiksel olarak azaldığı bildirilmiştir (Zhang vd 2001).

Yapılan çalışmalar, fare blastosisti üzerinde lokalize VEGF ekspresyonunun, embriyo implantasyonu sırasında trofoblastların invazyonunu ve göçünü düzenleme kapasitesine sahip olabileceğini göstermektedir (Zhang vd 2001, Chakraborty vd 1995). Halder ve ark (2000), gebeliğin 3. ve 4. günlerinde hibridizasyon yöntemi ile VEGF-A ve izoformlarının epitel hücrelerinde ve subepitelyal stromada mRNA ekspresyonunu gözlemlenmiştir. İmplantasyonu takiben 5. günde VEGFA mRNA birikiminin ağırlıklı olarak implantasyon bölgesinde blastosisti çevreleyen luminal epitelde ve desidualize edici stromada olduğu bildirilmiştir. 6-8. günlerde implantasyonun ilerlemesi ile VEGF A izoformu mRNA, desidual hücrelerde görülmüştür. Bu mRNA'nın 8.günde trofoblast dev hücrelerinde ve bazı embriyonik dokularda da mevcut olduğu bildirilmiştir (Halder vd 2000).

VEGF, endotelial hücreler için bir mitojendir ve anjiyogenezin bir indükleyicisidir. VEGF mRNA'sının gebeliğin 1.ve 2.günlerinde endometriyumdaki lüminal epitelyumda, gebeliğin 3.gününde az da olsa stromal hücrelerde, 4. günde luminal epitel hücrelerinde, subepitelyal hücrelerde ve stromal bölgede ekspresyon edildiği bildirilmiştir. VEGF mRNA ekspresyonu, ilk bağlanma reaksiyonundan sonraki 5. günde lüminal epitel ve blastosisti hemen çevreleyen stromal hücrelerde meydana

gelmiştir. Mezometrial ve antimesometrial kutuplardaki desidual bölgelerde yer alan hücreler ve özellikle 8. günde VEGF trofoblast dev hücreleri, mRNA'yı eksprese etmişlerdir (Charkraborty vd 1995).

Çalışmamızda özellikle grup 5'te VEGF'nin çok yoğun eksprese olduğu saptanmıştır. Grup1-grup 2 ve grup 3'te özellikle lümen ve bez epitelinde VEGF ekspresyonunun kuvvetli izlenmesi, miRNA200c'nin VEGF ekspresyonunu etkilemediğini göstermiştir.

Embriyonik gelişim sırasında damar oluşumu ve anjiyogenez için CD105 gereklidir. CD105, ağırlıklı olarak çoğalan endotel hücrelerinde eksprese edilir. Menstrual döngü sırasında endometrial endotel hücrelerinde, mezenkimal kök hücrelerde ve plasentada CD105 bulunmaktadır (Chadchan vd 2016).

Chadchan ve ark (2016), reseptif aşamada 4. gün farelerde luminal epitel hücrelerinde ve bez epitel hücrelerinde CD105 ekspresyonunun; yüksek seviyelerde olduğunu, stromal hücrelerde ve miyometriyal hücrelerde CD105 ekspresyonunun; daha düşük düzeylerde olduğunu belirtmişlerdir (Chadchan vd 2016).

Çalışmamızda da grup1'de lümen epitelinde, bez epitelinde ve stromal hücrelerde pozitif reaksiyon izlenmiştir. Mimik uygulanan Grup2 ve Grup3 lümen epitelinde zayıf reaksiyon izlenmiş, bez epiteli sitoplazmasında ve nükleer bölgede kuvvetli boyanma görülmüştür.

Trofoblast hücreleri tarafından maternal vasküler sistemin başarılı bir şekilde istila edilmesi, normal bir plasentanın oluşması için bir ön koşuldur. TGF-beta, trofoblast yayılmasının düzenlenmesinde rol oynar. CD105, beta1 ve beta3 izoformlarını bağlayan ve gebelik boyunca sinsitiyotrofoblastta yüksek seviyelerde eksprese edilen TGFbeta reseptör kompleksinin bir bileşenidir. CD105, istilacı yol boyunca farklılaşan ekstravillöz trofoblastlar üzerinde geçici olarak yukarı regüle edilir. CD105, ağırlıklı olarak proliferen olan endotelial hücrelerde, plasentanın sinsitiyotrofoblastında ve stromal hücrelerde yüksek seviyelerde, ekstravillöz trofoblastlarda geçici olarak eksprese edilir (Caniggia vd 1997, Chadchan vd 2016)

Chadchan ve ark (2016) implantasyon penceresi boyunca embriyo implantasyonu için CD105 proteini ve mRNA ekspresyonu araştırdıkları çalışmalarında alıcı aşamasında ve blastosist varlığında CD105 ekspresyonunun yukarı regüle

edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, lüminal epiteli ve bez epitelinde baskın olduğu ve stromal hücrelerde daha hafif ekspresyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Embriyo yapışmasından sonra, birincil ve ikincil desidual bölgelerin kurulduğu stromal hücrelerde desidualizasyon süreci başlar. CD105 ekspresyonunun gebeliğin 6. gününde implantasyon bölgelerinde birincil desidual bölgede, 7. günden itibaren ikincil desidual bölgenin stromal hücrelerinde ve özellikle implantasyon bölgesinde yaygın olduğu bildirilmiştir. İmplantasyon bölgesini baskılayan ve daha sonra geri kazanılmasını sağlayan bir CD105 siRNA'sı kullanılarak yapılan çalışmada, blastosist sayılarında azalma olduğu bildirilmiştir. CD105 siRNA'sının, endometrial CD105'i etkilemekle kalmadığı, embriyonik CD105 ekspresyonu üzerinde de etkili olduğu belirtilmiştir. CD105'in embriyo büyümesindeki rolü üzerine yapılan inceleme; tek tabaka endometrial epitel hücrelerinin, CD105 engellenmiş kültürlerde embriyo bağlanmasını ve yapışma reaksiyonunu engellediğini göstermiştir. Tek katman epitel hücre kültürü, embriyo bağlanma reaksiyonunda gerçekleşen trofoblast yapışma ve bağlanmasında endometrial eksprese edilen CD105'in rolü olduğunu göstermektedir (Chadchan vd 2016).

Çalışmamızda yer alan grup4'te, desidual hücrelerde görülen kuvvetli boyanma dikkat çekiciydi. Bez epitellerinde çok zayıf boyanma olduğu gözlemlendi. Grup5'te trofoblast hücrelerinde, dev trofoblast hücrelerde, fetal kapillerlerde ve desidual hücrelerde ise boyanma, yoğun pozitif.

Endometrial hücrelerde hedef genlerinin transkripsiyonunu birlikte düzenleyen üç köklük markeri Oct-4, NANOG ve SOX-2'nin fonksiyonel rolünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Shariati vd 2019).

Bentz ve ark (2010), Oct3/4 ekspresyonunun menstrual döngüye bağlı olmaksızın, bez epitellerinde ve stromada eksprese edildiğini bildirmişlerdir (Bentz vd 2010). Matthai ve ark (2006), herhangi bir nedenle histereskopi yapılmış bayanların endometriyumunda Oct-4 ekspresyonlarını incelemişler ve ekspresyonları genellikle endometriyumun stromasında gözlemlenmiştir (Matthai vd 2006). Choobineh ve ark (2016), 12 dişi fare (6 ila 8 hafta arasında) ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, vajinal smearda gözlenen hücre tiplerine göre proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus evrelerini tespit etmişlerdir. Uterus dokusunda farklı menstrual döngüde Oct-4, SOX2, NANOG ve KLF4'un (Kruppel-benzeri faktör 4, çinko parmak transkripsiyon faktörü) ekspresyonlarına bakan araştırmacılar, östrojen döngüsünün tüm fazlarında; endometriyum bezleri, endometrial stroma ve endometriyumun bazal ve fonksiyonel

katmanlarının perivasküler bölgelerinde ve miyometriyumda sıklıkla pozitif hücreler gördüklerini ifade etmişlerdir (Choobineh vd 2016).

Çalışmamızda mimik uygulanan Grup2 ve Grup3' te Oct3/4'ün lümen epitelinde ekspresyonu negatif olarak gözlenmiştir. Bez epitelinde Grup2 de ekspresyon orta derecede iken Grup3'te zayıf pozitif olarak görülmüştür. NANOG'un grup1'de stromal hücrelerde reaksiyon gösterirken, mimik uygulanan grup3'te bezlerde ve epitelde pozitif reaksiyon göstermesi ilginç bulunmuştur. Mimik uygulanmayan Grup4'te kan damarları dışında ekspresyonun negatif olmasına karşın grup5 te trofoblast hücrelerinde izlenen pozitif ekspresyon dikkat çekici bulunmuştur. miRNA200-c uygulamasından sonra NANOG ekspresyonunun arttırması oldukça ilginç olarak değerlendirilmiştir.

Valentijn ve ark (2013) yaptıkları çalışmada, histereskopi ile alınan endometriyum dokusunda SSEA-1'in bazalisin epitel hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Premenopozal endometriyumda, adet döngüsünün erken proliferatif fazda SSEA-1 ekspresyonunun bazal bezlerde yoğunlaştıkları ve hem proliferatif fazda hemde sekresyon fazında yüzeysel bezlerde ekspresyonun azaldığını bildirmişlerdir. SSEA-1 immünoreaktivitesi, endometriyumda yüzeysel bez epitelinde %1'den daha az iken bazaliste %60'ın üzerinde bir oranda ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (Valentijn vd 2013).

Çalışmamızda, SSEA-1'in grup1 lümen epitelinde kuvvetli çekirdek boyanması, bez epitelinde ise orta derecede çekirdek boyanması gözlenmiştir. Mimik uygulanan gruplarda lümen epitelinde boyanma izlenmezken, bez epitellerinin kuvvetli boyanması oldukça dikkat çekicidir. Grup4'te bez epitelinde ekspresyon izlenmiştir. Grup5'te trofoblast hücrelerinde, dev trofoblast ve ekstravillöz trofoblast hücrelerinde kuvvetli boyanma dikkat çekicidir. Östrus grubuyla karşılaştırıldığında bez epitellerinde SSEA-1 ekspresyonunun artması miRNA uygulamasının bezlerde ekspresyonu arttırdığını düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, uterus boynuzuna fizyolojik salin uygulanan sıçanların embriyo sayıları ile herhangi bir uygulama yapılmayan sıçanların embriyo sayıları arasında herhangi bir anlamlı fark bulunmadığı istatistiksel analizler ile gösterilmiştir. Uterus boynuzlarına miRNA-200c uygulanan sıçanların, uygulamanın yapıldığı taraftaki embriyo sayıları ile uterus boynuzlarına salin uygulanan ve herhangi bir uygulama yapılmayan sıçanların embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. Bu noktadan hareketle miRNA-200c'nin, embriyo sayısını anlamlı bir şekilde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır.

İmmunohistokimyasal analizle yapılan boyanmada, gruplar arasında CD105, Alfa5beta3, IL-6, IL-18, LIF, NANOG, Oct3/4, SSEA ve VEGF ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma neticesinde, aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Alfa5Beta3 ekspresyonunun gruplar arasında fark göstermediği,
- LIF ekspresyonunun östrus grubunda lümen ve bez epitelinde yoğun ekspresyon gösterdiği, mimik uygulanan gruplarda gebeliği takip eden grup2'de ekspresyonun yoğun olduğu, ancak grup3'te ekspresyonun azalması beklenirken yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği, erken gebelikte azalmış ve gebeliğin 13. gününde tekrar artmış olduğu,
- IL-6 ekspresyonunun grup2'de bez epiteli ve stromal hücrelerde negatif izlendiği görülmüştür. İmplantasyon dönemi olan 4. günde uygulanan miRNA-200c uygulamasının, IL-6 ekspresyonunu baskıladığı,
- IL-18 ekspresyonunun, miRNA-200c uygulanan mimikli gruplarda azaldığı,
- VEGF ekspresyonunun, miRNA-200c uygulanan grupların stromal hücrelerinde azaldığı, mimik uygulanmayan grup 4'te azalmanın olduğu ancak plasentada arttığı

- CD105 ekspresyonu karşılaştırıldığında, gruplar arasında lümen ve bez epitelinde fark bulunmazken, stromal hücrelerdeki ekspresyonun miRNA200c uygulanan gruplarda azaldığı,
- NANOG ekspresyonunun miRNA-200c mimiği uygulanan gruplarda stromal hücrelerde arttığı, mimik uygulanmayan erken gebelikte azaldığı ve plasentada arttığı,
- Oct3/4 ekspresyonu; grup1de lümen epiteli, bez epiteli ve stromal hücrelerde pozitif boyanma gösterirken, mimik uygulanan Grup2 ve Grup3' te lümen epitelinde negatif ekspresyon göstermiştir. Bez epitelinde ekspresyonun, Grup2'de orta derecede iken Grup3 te zayıf pozitif olarak görüldüğü,
- SSEA1 ekspresyonunun, miRNA-200c uygulanan gruplarda bezlerde arttığı, mimiksiz gruplardan gebeliğin 13. gününde elde edilen plasentada ekspresyonun arttığı bulunmuştur.

Araştırmalarımızın sonuçları, miRNA-200 ailesi üyelerinden en spesifik belirteç olan miRNA-200c'nin, uterusu infertiliteyi sağlayan moleküler mekanizmalar arasında olduğunu göstermiştir. miRNA-200c'nin, gelecek çalışmalarda klinik infertilite tanısında kullanılabilme ihtimali düşünüldüğünde, elde ettiğimiz veriler özgün olup, literatüre önemli katkı sağlayacak ve bu alanda yapılacak ileri çalışmalara zemin oluşturacaktır.

7. KAYNAKLAR

Abban G, Erdogan D, Ozogul C, Take G, Yildirim NB. Immunohistochemical localization of beta1 and beta4 integrins in mouse endometrium during implantation and early pregnancy. *Acta Physiol Hung* 2005;92(2):153–162.

Akdoğan M, Yöntem M. Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi* 2018; 3(1):36-45.

Altmae S, Martinez-Conejero JA, Salumets A, Simon C, Horcajadas JA, Stavreus-Evers A. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Molecular Human Reproduction* 2010;16(3):178–187.

Aplin JD, Ruane PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 2017;130(1):15–22.

Arıncı K, Elhan A. Anatomi, *Güneş Kitap Evi*, Ankara, 2006;1:340-345

Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi, *İstanbul Tıp Kitapevi*, İstanbul, 2019;2: S. 417-418.

Atasü T, Şahmay S. Jinekoloji (Kadın Hastalıkları), *Nobel Tıp Kitapevi*, İstanbul, 2001, s.11-34.

Austin L, Bower J, Kurek J, Vakakis N. Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *J Neurol Sci* 1992 Oct;112(1-2):185-91.

Avagliano L, Massa V, Bulfamante G P. Histology of Human Placenta. *SMGroup İtalya* 2016, s. 2-7.

Avcılar H. , Saraymen B., Ozturan O. O. , Köker M. Y. Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Asthma Allergy Immunol* 2018;16:1-10

Balasubramanya R, Valle C. Uterine Imaging. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* 2020 Jan.

Bentz EK, Kenning M, Schneeberger C, Kolbus A, Huber JC, Hefler LA, Tempfer CB. OCT-4 expression in follicular and luteal phase endometrium: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:38.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Physiology (5 th ed). Çeviri: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. Fizyoloji, **Güneş Tıp Kitabevleri**, Ankara 2008; s. 958 - 960.

Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. **Proc Natl Acad Sci** 1991;88(24):11408–11412.

Biba M, Keramitsoglou T, Goukos D, Varla-Leftherioti M, Pantos K, Koumantakis G, Makrigiannakis A, Loannis E. Interleukin (IL)-1 Beta and IL-6 Levels in Human Embryo Culture Supernatants and their Role in Implantation Following IVF: A Prospective, Non-randomized Study. **Journal of Immunobiology** 2015;1:105.

Biehl JK, Russell B. Introduction to stem cell therapy. **J Cardiovasc Nurs** 2009;24(2):98-105.

Bozdoğan Ö. Fizyoloji, **Palme yayıncılık**, Ankara, 2004, s. 468-469.

Bozoğlu H. Deneysel Hipertiroidi Oluşturulmuş Sıçanlarda Östrus Siklusunun Değişik Evrelerinde Dişi Genital Organlarda (Ovaryum Ve Uterus) Östrojen Ve Progesteron Reseptör Dağılımının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, **Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi**, Edirne, 2013, s. 24

Cai LQ, Cao YJ, Duan EK. Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse. **Cytokine** 2000;12(11):1676–1682.

Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JW, Lye SJ, Letarte M. Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. **Endocrinology** 1997 Nov;138(11):4977-88.

Carlberg C, Molnar F. Mechanism of gene regulation. **Dordrecht: Springer** 2014:201

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. **Dev Biol** 2000;223(2):217–237.

Chadchan SB, Kumar V, Maurya VK, Soni UK, Jha RK. Endoglin (CD105) coordinates the process of endometrial receptivity for embryo implantation. **Mol Cell Endocrinol** 2016;425:69– 83.

Chagastelles P.C, Nardi N.B. Biology of stem cells: an overview. **Kidney Int Suppl** 2011;1(3): 63–67.

Chakraborty I , Das S K . Dey S K. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. **Journal of Endocrinology** 1995;147(2):339-352.

Champion H, Innes BA, Robson SC, Lash GE, Bulmer JN. Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. **Mol Hum Reprod** 2012;18(8):391–400.

Chaouat G. Dubanchet S. Ledée N Cytokines: Important for implantation? **J Assist Reprod Genet** 2007; 24:491–505

Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. **J Reprod Fertil** 1994;101(2):421–426.

Chaudhry SR, Chaudhry K. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Uterus Round Ligament. **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing** 2020 Jan–. PMID: 29763145.

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. **Endocrinology** 2000;141(12):4365–4372.

Cheng J, Rosario G, Cohen TV, Hu J, Stewart CL. Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure. **Endocrinology** 2017;158(6):1916–1928.

Chimote N, Chimote M, Mehta B, Nath N. Cytokines and growth factors in implantation. **Reprod Stem Cell Biotechnol** 2010;1(2): 219-243.

Choobineh K, Zavareh S, Salehnia M, Ghorbanian MT, Paylakhi SH. Expression of pluripotent stem cell markers in mouse uterine tissue during estrous cycle. **Vet Res Forum** 2016;7(3):181– 188.

Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. **Dev Dyn** 2006;235(12):3280-3294.

Cumhur M. Temel Anatomi, **ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık Aş**, Ankara. 2001:S. 283

Cunha GR, Robboy SJ, Kurita T, Isaacson D, Shen J, Cao M, Baskin LS. Development of the human female reproductive tract. **Differentiation** 2018;103:46–65.

Çakar A. N., Atilla P. 'Üreme Organları, Kadın Genital Sistemleri Histolojisi', Jinekoloji, Üreme Endokrinolojisi&İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji içinde s. 45 Edt: Beksaç MS, Ayhan A, Demir N, HassaH, Kösebay D, Tıraş MB, Tuncer ZS, Yaralı H, Yüce F. **Medical Network** Ankara, 2006;1

Çelik D A, Koşar P A, Özçeli N. MikroRNAlar ve kanser ile ilişkisi. **Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Derg.** 2013;20(3)/121-127

Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri implantation rabbit uterus. **Biol Reprod** 1997;56(6):1390–1399.

Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. **Hum Reprod Update** 2007;13(4):365–377.

Dorostghoal M, Ghaffari HO, Shahbazian N, Mirani M. Endometrial expression of $\beta 3$ integrin, calcitonin and plexin-B1 in the window of implantation in women with unexplained infertility. **Int J Reprod Biomed** 2017;15(1):33–40.

DuQuesnay R, Wright C, Aziz AA, Stamp GW, Trew GH, Margara RA, White JO. Infertile women with isolated polycystic ovaries are deficient in endometrial expression of osteopontin but not alphavbeta3 integrin during the implantation window. **Fertil Steril** 2009;91(2):489–499.

Ekizceli G, İnan S, Öktem G, Onur E, Özbilgin K. Sıçanlarda Östrus Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusların Histolojik Değerlendirmesi. **Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi** 2015; 41(2): 65-72.

Elnaggar A, Farag AH, Gaber ME, Hafeez MA, Ali MS, Atef AM. AlphaVBeta3 Integrin expression within uterine endometrium in unexplained infertility: a prospective cohort study. **BMC Womens Health** 2017;17:90.

Eroschenko, V. P. Difiore Histoloji Atlası, Ceviri Editoru: Demir R. **Palme yayıncılık** 2016; 505-532.

Estella C, Herrer I, Moreno-Moya JM, Quiñonero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C. miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization *in vitro*. **Plos One** 2012; 7: 41080.

Fouladi-Nashta AA, Jones CJ, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, Kimber SJ. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. **Dev Biol** 2005;281(1):1–21.

Galliano D, Pellicer A. MicroRNA and implantation. **Fertil Steril** 2014;101(6):1531–1544.

Girlovanu M, Susman S, Soritau O, Rus-Ciuca D, Melincovici C, Constantin AM, Miha CM. Stem cells - biological update and cell therapy progress. **Clujul Med** 2015; 88(3): 265–271.

Gossman W, Fagan SE, Sosa-Stanley JN, Peterson DC. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Uterus. **StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;** 2019.

Gökçimen A, Temel S. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg**, 2004; 11(4):25-33.

Guc, D. Adezyon molekülleri. **ANKEM Derg.** 2004 18 (Ek-2): 158-163.

Güneş H. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkileri. **Turkish Journal of Biology** 1999;23: 283-292.

Gunjal P, Bhartiya D, Metkari S, Manjramkar D, Patel H. Very small embryonic-like stem cells are the elusive mouse endometrial stem cells--a pilot study. **J Ovarian Res** 2015;8:9.

Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. **Semin Reprod Med** 2009;27(1):62–79.

Halder JB, Zhao X, Soker S, Paria BC, Klagsbrun M, Das SK, Dey SK. Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. **Genesis** 2000;26(3):213–224.

Hambartsoumian E. Human endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) secretion and its relationship to sonographic endometrial appearance. **Am J Reprod Immunol** 1997;37:320-5.

He, Z., Ma, Y., Li, L., Liu, J., Yang, H., Chen, C., Lin, N., Bai, Y., Ma, R., Li, R., Wu, Z., & Qiao, J. Osteopontin and Integrin $\alpha\beta 3$ Expression during the Implantation Window in IVF Patients with Elevated Serum Progesterone and Oestradiol Level. **Geburtshilfe Frauenheilkd** 2016;76(6):e1.

Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG. **Reprod Biomed Online** 2004;9(6):692–715.

Hull ML, Nisenblat V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. **Reprod Biomed Online** 2013;27(5):515–529.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** 2002;110(6):673–687.

Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin adversely affects implantation in the mouse. **Biol Reprod** 2000;62(5):1285–1290.

Illera MJ, Lorenzo PL, Gui YT, Beyler SA, Apparao KB, Lessey BA. A role for $\alpha v \beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. **Biol Reprod** 2003;68(3):766–771.

Inyawilert W, Fu TY, Lin CT, Tang PC. MicroRNA-199a mediates mucin 1 expression in mouse uterus during implantation. **Reprod Fertil Dev** 2014 Jun;26(5):653-64.

Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Reduced expression of IL-6 and IL-1 α mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. **J Reprod Immunol** 2007;73(1):74–84.

Jimenez PT, Mainigi MA, Word RA, Kraus WL, Mendelson CR . miR-200 regulates endometrial development during early pregnancy. **Mol Endocrinol** 2016; **30**: 977–987.

Junqueira L C, Carneiro J. Temel Histoloji, Çeviri Editorleri: Seyhun Solakoğlu, Yener Aytakin, **Nobel Tıp Kitapevleri**, İstanbul, 2009; s. 444-449.

Justiz Vaillant AA, Qurie A. Interleukin. **StatPearls [Internet]** 2020 Aug 30

Karagün BŞ, Bülen, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınç Y. Mikro RNA ve Kanser. **Türk Klinik Biyokimya Derg** 2014; 12(1): 45-56.

Karakuş S. Fluoksetinin sıçanların menstrual siklusu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi **İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji Ve Genetik**, 2012, s.9-12

Kierzszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviri Editoru: Demir R. **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2006 s. 575 582

Kim SM, Kim JS. A Review of Mechanisms of Implantation. **Dev Reprod** 2017;21(4):351–359.

Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. **Reproduction** 2005;130(2):131–145.

Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblast. **Hum Reprod** 1995;10:1907-11.

Kokubo T, Uchida H, Choi ET. Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. **J. Vasc Surg** 2007;45 Suppl A(6S):A33–A38.

Köse E. 'Kadın Genital Organları' Yardımcı Üreme Teknikleri-Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar içinde s. 5-11. Edt; Çelik Ö. **Palme Yayinevi**, Ankara, 2011.

Lé dée N, Dubanchet S, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G. Downregulation of human endometrial IL-18 by exogenous ovarian steroids. **Am J Reprod Immunol** 2006;56(2):119–123.

Lefebvre, L. The placental imprintome and imprinted gene function in the trophoblast glycogen cell lineage. **Reproductive BioMedicine Online** 2012;25(1):44–57.

Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. **J Clin Invest** 1992;90(1):188–195.

Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. **Am J Reprod Immunol**. 1996 Mar;35(3):195-204.

Liu W, Niu Z, Li Q, Pang RT, Chiu PC, Yeung WS. MicroRNA and Embryo Implantation. **J Reprod Immunol** 2016;75(3):263–271.

Lu H, Shen C, Brunham RC. Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. **J Immunol** 2000;165:1463–1469.

Marcondes F. K, Bianchi F. J, Tanno A. Determination Of The Estrous Cycle Phases Of Rats: Some Helpful Considerations. **Braz J Biol** 2002; 62(4A):609–614.

Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis?. **Int J Mol Sci** 2019;20(15):3822.

Marwood M, Visser K, Salamonsen LA, Dimitriadis E. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation. **Endocrinology** 2009;150(6):2915–2923.

Matthai C, Horvat R, Noe M, Nagele F, Radjabi A, van Trotsenburg M, Huber J, Kolbus A. *Oct-4 expression in human endometrium*, **Molecular Human Reproduction** 2006; 12(1):7–10.

Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S. The role of integrins in human embryo implantation. **Fetal Diagn Ther** 2001;16(6):364–371.

Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. **Anim Reprod Sci** 2011;124(3-4):229–236.

Moncada-Madrado M, Rodríguez Valero C. Embryology, Uterus.. **In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing** 2020 Jan-[Updated 2019 Sep 20]

Moore KM, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi, 6. İngilizce Baskıdan Çeviri, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. 1.Türkçe Baskı, **Nobel Tıp Kitabevi**, İstanbul, Türkiye; 2002; 35-51

Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? **Reprod Biomed Online** 2002;4 Suppl 3:18-23.

Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, et al. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;71(2):436–441.

Nothnick WB. Non-coding RNAs in Uterine Development, Function and Disease. **Adv Exp Med Biol** 2016;886:171–189.

Ovalle, W. K., Nahirney, P. C. Netter Temel Histoloji, Çeviri Editorleri: Sevda Muftuoğlu, Figen Kaymaz, Pergin Atilla, **Güneş Tıp Kitapevleri**, Ankara, 2009, s. 412-416.

Panda H, Pelakh L, Chuang TD, Luo X, Bukulmez O, Chegini N. Endometrial miR-200c is altered during transformation into cancerous states and targets the expression of ZEBs, VEGFA, FLT1, IKK β , KLF9, and FBLN5. **Reprod Sci** 2012 Aug;19(8):786-96.

Rarani FZ, Borhani F, Rashidi B. Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and microRNAs. **J Cell Physiol** 2018;233(12):9145–9158.

Reddy KV, Mangale SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. **Tissue Cell** 2003;35(4):260–273.

Ross H. M. Pawlina W. Editör Baykal B. Histoloji. **Palme Yayıncılık**, Ankara 2014, s. 830-860.

Sachin S. M and Reddy K. V. R., Expression pattern of integrins and their ligands in Mouse fetomaternal tissues during pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development** 2007, 19, 452– 460.

Sakurai T, Takai R, Bürgin H, Ishihara K, Sakamoto Y, Amano J, Higuchi Y, Chiba S, Singer T, Kawamura A, Suzuki M, Müller L. The effects of interleukin-6 signal blockade on fertility, embryofetal development, and immunization in vivo. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol** 2012;95(4):304–317.

Salamonsen LA, Dimitriadis E, Robb L. Cytokines in implantation. **Semin Reprod Med** 2000;18(3):299–310.

Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. **Scientific World Journal** 2014;2014:201514.

Saruhan B G, Dereli S. Deney Hayvanlarının Beslenme, Barınma ve Üremesi. **Dicle Üniv Vet Fak Derg** 2016; :1(3):16-21.

Selçuk Ö B. Türkölmez S. Mikro RNA'ların erkek infertilitesindeki rolü. **Androloji Bülteni** 2016; 18(66): 192-196. xx

Shan L, Zhou Y, Peng S, Wang X, Shan Z, Teng W. Implantation failure in rats with subclinical hypothyroidism is associated with LIF/STAT3 signaling. **Endocr Connect** 2019;8(6):718–727.

Shariati F, Favaedi R, Ramazanali F, Ghoraieian P, Afsharian P, Aflatoonian B, Aflatoonian R, Shahhoseini M. Increased expression of stemness genes *REX-1*, *OCT-4*, *NANOG*, and *SOX-2* in women with ovarian endometriosis versus normal endometrium: A case-control study. **Int J Reprod Biomed (Yazd)** 2019;16(12):ijrm.v16i12.3684.

Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK, Charnock-Jones DS. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(1):402–409.

Sharma A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. **J Hum Reprod Sci** 2012 Jan;5(1):2-6

Shen LJ, He JL, Yang DH, Ding YB, Chen XM, Geng YQ, Liu SJ, Liu XQ, Wang YX. Mmu-microRNA-200a overexpression leads to implantation defect by targeting phosphatase and tensin homolog in mouse uterus. **Reprod Sci** 2013;20(12):1518–1528.

Singh H. and Aplin J. D. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of anatomy*. **J. Anat** 2009; 215:3–13.

Sozen, E. O. Menstruel dongude sıcan uterus epiteline sıkı ve oluklu bağlantı proteinlerinin dağılımlarının immunohisto kimyasal olarak belirlenmesi, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2008, s. 71

Şensoy E. Öznurlu Y. Hücre Adezyon Molekülleri. **Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.** 2009; 4(1): 57-68.

Tabibzadeh S. Human Endometrium: An Active Site of Cytokine Production and Action. **Endocrine Reviews** 1991;12(3):272–290,

Tabibzadeh S, Sun XZ. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Hum Reprod** 1992;7(9):1214–1221

Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. **Hum Reprod** 1995;10(10):2793–2799.

Tawfeek MA, Eid MA, Hasan AM, Mostafa M, El-Serogy HA. Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility. **BMC Womens Health** 2012;12:10. .

Tempest N, Maclean A, Hapangama DK. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. **Int J Mol Sci** 2018;19(10):3240.

Tokmadžić VS, Tsuji Y, Bogović T, Laskarin G, Cupurdija K, Strbo N, Koyama K, Okamura H, Podack ER, Rukavina D. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. **Am J Reprod Immunol** 2002;48(4):191–200.

Valentijn AJ, Paliak K, Al-Lamee H, Tempest N, Drury J, Von Zglinicki T, Saretzki G, Murray P, Gargett CE, Hapangama DK. SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis. **Hum Reprod** 2013;28(10):2695–2708.

van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **J Leukoc Biol** 2009;85(1):4–19.

Vandermolen DT, Gu Y. Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production, and stimulation thereof by IL-1 beta. **Fertil Steril** 1996;66(5):741–747.

Vardı N. 'Fertilizasyon' Yardımcı Üreme Teknikleri-Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar içinde s.71-83. Edt; Çelik Ö. **Palme Yayınevi**, Ankara, 2011

von Wolff M, Thaler CJ, Zepf C, Becker V, Beier HM, Strowitzki T. Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle. **Gynecol Endocrinol** 2002;16(2):121–129.

Walter LM, Rogers PA, Girling JE. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms in the mouse uterus during early pregnancy. **Reprod Biomed Online** 2010 Dec;21(6):803-11.

WEB1. https://www.researchgate.net/publication/322180345_Uterus-Endometrium

WEB 2. <https://radiopaedia.org/articles/uterus>

WEB 3. <https://instruction.cvhs.okstate.edu/Histology/fr/HiFRp14.htm>

WEB 4. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/3240/htm>

WEB 5. <http://www.jinekoloji.ws/adet-dongusu.asp>

Web-6. <http://www.jcam.com.tr/files/KATD-585.pdf>

WEB7. https://www.researchgate.net/figure/Trophectoderm-Endometrium-integrin_-interactionsduring-implantation-Ln-laminin-Vn_fig1_41000564

WEB 8. <https://www.sinobiological.com/cytokine-reriew-receptor-source-targets-main-functiondisease-association-a-1310.html>

Weissenbacher E.R. Mylonas W.I Ledge W. J. Immunology in Reproductive Medicine. Immunology of the Female Genital Tract. **Springer** 2014. S.180

Westwood F.R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology** 2008; 36: 375-384.

White CA, Zhang JG, Salamonsen LA, Baca M, Fairlie WD, Metcalf D, Nicola NA, Robb L, Dimitriadis E. Blocking LIF action in the uterus by using a PEGylated antagonist prevents implantation: a nonhormonal contraceptive strategy. **Proc Natl Acad Sci** 2007;104(49):19357–19362.

Xiao L, Song Y, Huang W, Yang S, Fu J, Feng X, Zhou M. Expression of SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute uterine injury and intrauterine adhesions. **Reprod Biol Endocrinol** 2017;15(1):14.

Yang P, Wu Z, Ma C, Pan N, Wang Y, Yan L. Endometrial miR-543 Is Downregulated During the Implantation Window in Women With Endometriosis-Related Infertility. **Reprod Sci** 2019;26(7):900–908.

Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Yano T, Fujii T, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Tomita K, Taketani Y. Evidence for the expression of interleukin (IL) - 18, IL-18 receptor and IL18 binding protein in the human endometrium. **Mol Hum Reprod** 2001; 7:649–654.

Zhang J, Wang L, Cai, L. Cao Y, Duan E. The expression and function of VEGF at embryo implantation “window” in the mouse. **Chin.Sci.Bull** 2001;46:409–411.

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Res Ther** 2019;10,68.


Zheng, Q., Zhang, D., Yang, Y. U., Cui, X., Sun, J., Liang, C., Qin, H., Yang, X., Liu, S., and Yan, Q. MicroRNA-200c impairs uterine receptivity formation by targeting FUT4 and α 1,3-fucosylation. **Cell Death Differ** 2017;24(12):2161–2172.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Akgün 1985 yılında Aydın Nazilli' de doğdu. Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü 2003 yılında kazanmış ve bu bölümden 2007 yılında mezun olmuştur. Yüksek Lisansı Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD da eğitimine başlamış ve 'Radlarda Daaidzeinin Testis Histolojisi Üzerine Etkisi' isimli yüksek lisans bitirme tezini savunarak mezun olmaya hak kazanmıştır. Doktora eğitimine 2014 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD başlamıştır. Evli ve bir kız çocuğu annesidir.

9.EKLER

Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis

Mehmet Sağlam¹ · Serhat Köseoğlu¹ · Cüneyt Asım Aral² · Levent Savran¹  · Tuğba Pekbağrıyanık¹ · Ayşe Çetinkaya³

Received: 29 November 2015 / Accepted: 20 June 2016
© The Society of The Nippon Dental University 2016

Abstract The purpose of this clinical study is to comparatively investigate the interleukin-33 (IL-33) levels in gingival crevicular fluid (GCF), saliva and plasma of patients with periodontal disease as well as periodontally healthy subjects and the association between these levels and clinical parameters. GCF, saliva and plasma samples were collected from systemically healthy, non-smoker chronic periodontitis patients (CP group, $n = 20$), gingivitis patients (G group, $n = 20$) and periodontally healthy control groups (H group, $n = 20$). Full-mouth clinical periodontal parameters were also recorded. IL-33 levels were determined by ELISA. The total amount of GCF IL-33 was greater in the G and CP groups compared to the H group ($p < 0.05$). The GCF IL-33 concentration was significantly lower in the CP group than in the H and G groups ($p < 0.001$). Salivary or plasma IL-33 levels were similar in the study groups. The total amount of GCF IL-33 was positively correlated with the GI, PI and BOP (%) ($p < 0.05$). Considering the present findings, the increase in total amounts of GCF IL-33 may have a role in the pathogenesis of periodontal disease.

Keywords Interleukin-33 · Periodontal diseases · Gingival crevicular fluid · Plasma · Saliva

Introduction

Periodontal diseases are infectious/inflammatory diseases initiated by complex interactions between microbial dental plaque and host inflammatory-immune response and this disease affects the supporting tissues of teeth, which leads to their progressive destruction and tooth loss [1–4]. Mediators produced by hosts such as proteinases, cytokines and prostaglandins contribute to tissue destruction [5]. The interleukin-1 (IL-1) family of cytokines (IL-1 α , IL-1 β and IL-1Ra) has various immunoregulatory properties in the infection and inflammation processes [6]. One of the recently defined member of the IL-1 family is IL-33 [7]. This cytokine is expressed in many tissues including activated macrophages, fibroblasts, epithelial cells, keratinocytes, smooth muscles and endothelial and dendritic cells [8]. Interleukin-33 is the ligand of the ST2 receptor, a member of the Toll-like receptor/IL-1R superfamily [9]. Various cell types such as T-helper type 2 (Th2) cells, mast cells, basophils, eosinophils and innate lymphoid cells are activated by IL-33 [7, 10]. IL-33 is now known as a dual function cytokine acting both as an anti-inflammatory intracellular and as a proinflammatory extracellular cytokine [10]. IL-33 enhances the expression of IL-4, IL-5 and IL-13 by Th2 cells and also stimulates the production of proinflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6 and IL-1 β [11]. Saidi et al. reported that IL-33 expression was not constitutive, but was mainly inducible by TNF- α and IL-1 β in bone marrow stromal cells and CD14+ mononuclear cells from peripheral blood [12]. It has been suggested that IL-33 has a role in several diseases such as cardiovascular diseases, asthma, atopic dermatitis, inflammatory bowel disease (IBD), rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) [13, 14]. It has been indicated that IL-33 presumably has

✉ Levent Savran
savranlevent@gmail.com

¹ Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Izmir Katip Celebi University, Aydınlık Evler Mah., Cemil Meriç Bulv., 6780 Sok. No: 48, 35640 Çiğli-Izmir, Turkey

² Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Sifa University, Izmir, Turkey

³ Research Center, Faculty of Dentistry, Izmir Katip Celebi University, Izmir, Turkey

three roles in relation to periodontal disease: as an alarmin, a chemoattractant and a systemic cytokine [9]. IL-33 is released by damaged cells (mainly fibroblasts and epithelial cells), because of necrosis and acts as an alarmin. IL-33 also induces mast cell degranulation and the production of proinflammatory cells (i.e., macrophages, eosinophils and basophils) [9]. After IL-33 is recognized by mast cells, these cells are activated and express histamines, leukotrienes, prostanoids, proteases, cytokines and chemokines attracting neutrophils to the infection site [9, 10]. Thus, it has been suggested that the release of inflammatory mediators and IL-33 induce osteoclast activation by increasing RANKL production and diminishing OPG production [9]. Mun et al. demonstrated that IL-33 was equivalently effective in inducing osteoclast differentiation from human CD14⁺ monocytes as RANKL and independently of RANKL/RANK [15]. According to this finding, IL-33 may play a role in alveolar bone destruction in periodontitis.

In our previous study, we evaluated the IL-33 expression in rat periodontium immunohistochemically. Significantly increased IL-33 levels were observed in periodontitis group compared to the healthy group. Additionally, a positive correlation between IL-33 and RANKL expressions was also demonstrated [16]. However, Buduneli et al. concluded that IL-33 was not a diagnostic marker in separating chronic periodontitis from periodontally healthy condition in humans, although they found the gingival crevicular fluid (GCF) IL-33 concentrations were significantly lower in the periodontitis group than in controls [17]. In another study, GCF levels of IL-33 were evaluated in generalized aggressive periodontitis (GAP), chronic periodontitis, gingivitis and periodontally healthy subjects and it was demonstrated that IL-33 total amounts of the study groups were similar [18]. In a recent study, Papathanasiou et al. failed to detect IL-33 in GCF samples from healthy, gingivitis and periodontitis sites [19].

The studies investigating the relationship between IL-33 and periodontal disease were inadequate in the literature. This present study comparatively investigates the levels of IL-33 in chronic periodontitis (CP), gingivitis and periodontally healthy individuals and tests whether this cytokine is correlated with clinical parameters.

Materials and methods

Study population

The present study consisted of 60 subjects (33 females and 27 males; age range 19–64 years): 20 periodontally healthy, 20 with gingivitis and 20 with chronic periodontitis. All participants were recruited from the Department of

Periodontology, Faculty of Dentistry, Izmir Katip Celebi University, Izmir, Turkey. Approval for the study was taken from the Izmir Katip Celebi University Ethics Commission for human subjects and conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki (2014/166). The study protocol was explained to all participants and written informed consent was taken from all before clinical periodontal examination and biofluid sampling. Individuals with medical disorders such as diabetes mellitus, immunologic disorders, pregnant or nursing females, smokers and those who had antibiotic/anti-inflammatory drugs or periodontal therapy in the previous 6 months were excluded from the study. All participants had ≥ 20 teeth present. The participants were divided into three groups according to periodontal health: H group—healthy periodontium, BOP at $< 20\%$ of the sites and no sites with probing depth (PD) > 3 mm and clinical attachment level (CAL) > 2 mm or alveolar bone loss ($N = 20$, 12 males, 8 females, mean age: 33.38); G group—gingivitis, BOP at $\geq 20\%$ of the sites and no sites with PD and CAL > 3 mm or bone loss ($N = 20$, 6 males, 14 females, mean age: 32.35); CP group—chronic periodontitis, ≥ 4 teeth in each jaw with PD of ≥ 5 mm, CAL of ≥ 4 mm, BOP at $> 80\%$ of the proximal sites and radiographic evidence of interproximal bone loss ($N = 20$, 9 males, 11 females, mean age: 42.88).

Clinical measurements

The clinical evaluation of the patients was determined by PD, plaque index (PI) [20], gingival index (GI) [21] and BOP (%). Four sites for each tooth (mesial, distal, buccal and lingual/palatal) for PI, GI and BOP (%) measurements, six sites for each tooth (mesiobuccal, mid-buccal, distobuccal, mesiolingual/palatal, mid-lingual/palatal and distolingual/palatal) for PD and CAL measurements were examined. All clinical measurements were recorded by the same calibrated examiner.

GCF sampling

At least 24 h after the clinical measurement visit, GCF, saliva and plasma samples were collected in the morning after an overnight fast. Filter paper strips (Periopaper, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA) were used for GCF sampling. GCF sampling sites were determined considering the clinical measurements at the first visit. GCF sample collection was done before instructions for oral hygiene and full-mouth scaling. The isolation of sampling area was performed with sterile cotton rolls to protect samples from saliva contamination. All supragingival plaque was removed by a sterile curet and the sample site was dried by air spray. The paper strips were carefully inserted into the

gingival sulcus until feeling a mild resistance and left in place for 30 s. Blood-contaminated paper strips were discarded. A calibrated device (Periotron 8000, Oraflow) was used for GCF volume measurements. The two paper strips taken from two non-adjacent sites of each participant were placed in a plastic sample tube and pooled before storing at -80°C . An actual volume (microliters) by reference to the standard curve was determined converting the electronic readings.

Saliva sampling

A saliva volume of 1–1.5 mL was taken simply by expectorating into plastic tubes on the day GCF samples were taken. Samples were vortexed for 3 min, followed by centrifuging at $10,000\times g$ for 10 min to separate cellular and food debris and minimize the turbidity of saliva, which can negatively affect the accuracy of analysis. Saliva supernatants were stored at -80°C until additional measurement of salivary IL-33 levels was performed using ELISA.

Plasma sampling

Plasma samplings were performed on the same day after GCF and saliva samples were taken. A standard venipuncture method was used for obtaining venous blood (5 mL) from the antecubital vein, and the plasma separation from blood was performed by centrifugation at $1500\times g$ for 10 min. Then, samples were stored at -80°C until subsequent ELISA analyses.

ELISA analysis of IL-33 in biofluids

The IL-33 (eBioscience, Vienna, Austria) levels in GCF, saliva and plasma were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions. The detection range was 7.8–500 pg/mL, with a sensitivity of 0.2 pg/mL for the IL-33 ELISA assay. A wavelength of 450 nm was used for spectrometric measurement. The GCF IL-33 concentrations (pg/ μL) were calculated by multiplying the IL-33 absorbance values by 0.65 mL (dilution volume) and dividing by the GCF volume (μL). The absorbance values of IL-33 (pg/mL) in GCF were multiplied by diluent volume (0.65 mL) and then divided by 2 (two stripes) for determining the total amount of IL-33 gathered in 30 s (pg/30 s).

Statistical analyses

The statistical analysis was carried out using commercially available software (SPSS v.20.0, IBM, Chicago, IL, USA). The normality of the data was verified using the Shapiro–

Wilk normality test. While clinical parameters were normally distributed, GCF volume and biochemical parameters were not normally distributed. Therefore, ANOVA test followed by Tukey's test for pairwise comparisons were used for clinical parameters. For GCF volume and biochemical parameters, the differences between groups were tested by the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's nonparametric comparison for which the Kruskal–Wallis test is significant. Spearman rank correlation test was used for associations among mean levels of the IL-33 and clinical parameters. A $p < 0.05$ value was considered to be statistically significant for all analyses.

Results

Clinical analyses

Table 1 presents the mean whole-mouth clinical parameters and individuals' age in the study groups. Subjects in the CP group were significantly older than subjects in both H and G groups ($p = 0.001$). The CP group presented greater mean PD, CAL, GI, PI and BOP (%) in comparison to the other groups ($p < 0.001$). All clinical parameters were also significantly greater in the G group compared with the H group ($p < 0.001$).

GCF, saliva and plasma IL-33 levels

IL-33 levels in biofluids and GCF volume are presented in Table 2. Significantly higher GCF volumes were found in the CP group than in the other groups ($p < 0.001$). There was also significant difference between the H group and the G group in terms of GCF volume ($p = 0.001$). The total amount of IL-33 in GCF was greater in the G group and CP group compared to the H group ($p < 0.05$). The total IL-33 levels were similar in the G group and CP group ($p > 0.05$). The GCF IL-33 concentration was significantly lower in the CP group than in the H and G groups ($p < 0.001$, $p = 0.003$ respectively). IL-33 concentration in the G group was also lower compared to the H group ($p < 0.05$). Salivary or plasma IL-33 levels were similar in the study groups ($p > 0.05$).

Correlations

The total amount of GCF IL-33 positively correlated with the GI, PI and BOP (%) ($p < 0.05$), but GCF IL-33 concentration negatively correlated with all clinical parameters and GCF volume ($p < 0.05$). There was no correlation between salivary IL-33 levels and clinical parameters ($p > 0.05$) and also between plasma IL-33 levels and clinical parameters ($p > 0.05$) (Table 3).

Table 1 Ages and whole-mouth clinical periodontal measurements in the study groups

Clinical parameters	H group Mean (SD)	G group Mean (SD)	CP group Mean (SD)	<i>p</i> value
Age (years)	30.62 (7.65) ^a	33.38 (7.77) ^a	43.625 (13.54) ^b	0.001
# of teeth	27.12 (1.20) ^a	27.11(1.02) ^a	25.75 (1.43) ^b	0.003
PD (mm)	1.34 (0.36) ^a	1.71 (0.27) ^b	3.05 (0.46) ^c	<0.001
CAL (mm)	0 ^a	2.16 (0.54) ^b	4.03 (0.21) ^c	<0.001
GI	0.37 (0.28) ^a	1.08 (0.36) ^b	1.71 (0.42) ^c	<0.001
PI	0.58 (0.35) ^a	1.19 (0.25) ^b	1.64 (0.39) ^c	<0.001
BOP (%)	8.70 (4.89) ^a	43.07 (14.52) ^b	60.74 (21.86) ^c	<0.001

Different letters mean statistically significant differences among the groups

Table 2 GCF, saliva and plasma levels of IL-33 in the study groups

Biologic parameters	H group Median (IQR)	G group Median (IQR)	CP group Median (IQR)	<i>p</i> value
GCF volume	0.24 (0.30) ^a	0.71 (0.57) ^b	1.3 (0.59) ^c	<0.001
IL-33				
GCF total amount (pg/30 s)	13.83 (0.75) ^a	14.40 (1.55) ^b	15.63 (2.79) ^b	0.035
GCF concentration (pg/μl)	55.90 (75.98) ^a	23.27 (29.90) ^b	12.02 (4.10) ^c	<0.001
Saliva (pg/mL)	18.79 (1.84)	19.52 (2.92)	19.86 (2.51)	0.803
Plasma (pg/mL)	16.89 (1.07)	16.61 (0.70)	17.18 (1.30)	0.159

Different letters mean statistically significant differences among groups. *p* value = Kruskal–Wallis test difference between groups. IQR = interquartile range

Table 3 Correlation coefficients for IL-33 levels in biofluids and clinical parameters

	PD (mm)	GI	PI	BOP (%)	GCF volume (μl)	IL-33 (pg/30 s)	IL-33 (pg/μL)	Saliva IL-33 (pg/μL)	Plasma IL-33 (pg/μL)
PD (mm)	1	0.801**	0.768**	0.777**	0.654**	0.226	−0.656**	0.185	0.233
GI		1	0.834**	0.823**	0.615**	0.362**	−0.594**	0.134	0.137
PI			1	0.648**	0.604**	0.355*	−0.576**	0.184	0.087
BOP (%)				1	0.695**	0.351*	−0.684**	0.124	0.177
GCF volume (μl)					1	0.258	−0.994**	0.032	0.229
IL-33 (pg/30 s)						1	−0.185	0.039	0.107
IL-33 (pg/μL)							1	−0.03	−0.23
Saliva IL-33 (pg/mL)								1	0.262
Plasma IL-33 (pg/mL)									1

* Correlation significance at the *p* < 0.05 level by Spearman rank correlation test

** Correlation significance at the *p* < 0.01 level by Spearman rank correlation test

Discussion

This present cross-sectional study comparatively investigates GCF, saliva and plasma levels of IL-33 between patients with gingivitis or CP and individuals with clinically healthy periodontium. In this study, we observed that total amounts of GCF IL-33 were significantly higher in periodontal disease compared to healthy periodontal condition. The GCF level of IL-33 was also positively correlated with clinical measurements such as GI, PI and BOP.

In the light of these findings, we can assume that IL-33 can be an important biomarker in CP.

In the literature, various studies investigating the relationship between IL-33 and periodontal disease were reported. In an in vitro study, it was reported that stimulation of human monocytes with *E. coli* and *P. gingivalis* LPS up-regulated IL-33 at both the mRNA and protein levels [22]. Beklen et al. indicated that IL-33 levels were significantly increased in TNF- α stimulated human gingival fibroblasts compared with unstimulated human gingival

fibroblasts in cell culture lysates, but were undetectable in fibroblast culture supernatants after stimulation by TNF- α . Therefore, he suggested that IL-33 might be an important regulator of TNF- α -induced functions by fibroblasts in cases of periodontitis [23]. In our previous animal study, IL-33 expressions were evaluated immunohistochemically in rat periodontitis model. Significantly higher IL-33 expressions were observed in the periodontitis group compared to periodontally healthy control group. We also observed a positive correlation between IL-33, RANKL and the number of mast and inflammatory cells [16].

There are a few studies in the literature on clinical human trials investigating the IL-33 levels in periodontal health and disease. Buduneli et al. reported that the total amounts of IL-33 in GCF samples and salivary and plasma IL-33 concentrations were similar in the CP patients and periodontally healthy individuals. They explained this situation with episodic progression of periodontal disease and suggested that it might be considered that the rather quiescent form of periodontal tissue destruction in CP patients might have caused the lack of significant difference between CP patients and periodontally healthy individuals in terms of IL-33 levels in biological fluids. It was also observed that the GCF IL-33 concentrations were significantly lower in CP patients than in periodontally healthy individuals. They indicated that the significantly lower GCF sample volume in periodontally healthy individuals easily explained the significantly higher GCF IL-33 concentration in the healthy individuals than in the CP patients [17]. They suggested that analyzing other members of the IL-1 family along with IL-33 may particularly provide better understanding of the possible role of this cytokine in periodontal diseases. Kursunlu et al. demonstrated that the total amounts of IL-33 were similar in the GAP, CP, gingivitis and periodontally healthy subjects. They also observed that GCF IL-33 concentration of the GAP, CP and gingivitis subjects was lower compared to the periodontally healthy subjects. Thus, they concluded that IL-33 does not contribute to the pathogenesis of periodontal disease, unlike other members of the IL-1 cytokine family [18]. In this present study, the total amounts of GCF IL-33 were higher in the CP group and G group compared to the H group in contrast to previous studies [17, 18]. We paid attention to sampling sites being GI = 2 and positive in BOP in gingivitis and CP patients, according to the clinical records at the first visit. Therefore, we tried to prevent taking GCF samples from quiescent sites, considering the findings of the study by Buduneli et al. [17]. While Buduneli et al. reported no significant correlations between GCF, salivary or plasma IL-33 levels and any of the clinical periodontal measurements in their study, we observed that total amount of GCF IL-33 positively

correlated with GI, PI and BOP (%). This finding suggested that IL-33 levels increased in the presence of inflammation. In this study, GCF IL-33 concentrations were significantly lower in the CP group than in the H and G groups. This finding was in agreement with the study of Buduneli et al. [17]. However, the concentrations were directly affected by the GCF sample volume [24], and we proved this situation by demonstrating that GCF IL-33 concentration negatively correlated with the GCF volume. The significantly lower GCF sample volume in the H group easily explains the significantly greater GCF IL-33 concentration in the H group than in the CP group.

The plasma levels of IL-33 were found in this study to be 16.89, 16.61 and 17.18 pg/mL in the H, G and CP groups, respectively. Buduneli et al. [17] found 2.3 ng/mL in the CP group and 1.9 ng/mL in the H group. This much difference with their findings can be the reason for the different ELISA kits used in the study. However, inter-group relations are consistent with our study, showing no significant difference between the study groups. Saliva concentrations of IL-33 in the same study were similar between groups (1.1 and 1.2 ng/mL in the CP and H groups, respectively). Our findings of saliva concentration are 18.79, 19.52 and 19.86 pg/mL in the H, G and CP groups, respectively. The salivary and plasma IL-33 levels were similar in all study groups as in the previous study [17]. In fact, the salivary IL-33 levels were higher in the G and CP groups compared to the H group, but the difference between the study groups failed to reach the level of significance. This result could have been significant with larger sample size and may explain the relation between periodontal disease and IL-33 levels.

In a recent study by Papathanasiou et al., the detection of IL-33 levels was not achieved in GCF samples using a multiplex bead immunoassay. They indicated that the lowest levels of detection reported by the commercial kit used in their study was 4.9 pg/mL for IL-33. They conclude that IL-33 may not be associated with periodontal diseases and suggested that this condition would be clarified by evaluating the gene expression of IL-33 from gingival tissue biopsies [19]. In our present study, we could detect IL-33 in biological fluids of all study groups as in the previous studies using ELISA [17, 18]. The lowest detection limit of the ELISA kit in our study was 0.2 pg/mL. It was indicated that multiplex bead immunoassay was an extremely reproducible and reliable analysis method, but cytokine concentration was dependent on the assay system preferred [25]. Furthermore, the presence of autoantibodies producing non specific bindings can inhibit the detection of cytokines in biological samples using multiplex assays [25]. Another limitation in some multiplex bead immunoassays is the interpretation and reporting of analyte values at extremely low concentrations, and it was pointed

out that there were some sensitivity issues in the very low range of concentrations, especially for several cytokines [26, 27].

In another study, it was reported that salivary IL-33 concentrations were statistically higher in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) than the healthy control group [28]. They suggested that increased IL-33 salivary concentration did not seem to be related with the clinical periodontal data. In their study, no statistically significant differences were found in the clinical periodontal parameters in the OSAS and non-OSAS groups. However in our study, patients were divided to groups according to their clinical parameters and, while there was no correlation between salivary IL-33 concentration and clinical parameters, there was a significant correlation between the clinical parameters and the total amounts of GCF IL-33.

In a recently published study, Malcolm et al. demonstrated that IL-33 expression was higher in periodontal tissues of *Porphyromonas gingivalis*-infected mice as compared to sham-infected controls. They also reported that the expression of IL-33 and ST2 was elevated in gingival tissues of chronic periodontitis patients as compared to healthy tissues and concluded that IL-33 has a role in exacerbating bone loss in a RANKL-dependent manner in the presence of bacterial infection [29]. These results were in agreement with our present and previous animal study [16].

It has been proved that IL-33 is associated with the pathogenesis of various diseases including cardiovascular disease, asthma, IBD, fibroproliferative disease and autoimmune diseases such as RA, SLE, Behçet's disease, Wegener's granulomatosis and progressive systemic sclerosis [13, 30]. In this present study, we observed that the total amounts of GCF IL-33 were higher in periodontal disease compared to the periodontal healthy condition. This finding supported the results of our animal study reporting increased IL-33 levels in the periodontium of rats with periodontitis compared to healthy controls immunohistochemically.

Considering the present findings, the increase in the total amounts of GCF IL-33 may have a role in the pathogenesis of periodontal disease. Additional studies with larger sample size, different methods (evaluating gene expression of IL-33 in gingival tissue samples) or intervention studies are required to better clarify the role of this cytokine in periodontal disease pathogenesis.

Acknowledgments No external funding, apart from the support of the authors, was available for this study. The authors thank the Assistant Professor Bülent Özkan (Department of Biostatistics and Medical Informatics, İzmir Katip Çelebi University, Faculty of Medicine) for providing statistical advice in this research.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Smalley JW. Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):320–8.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology.* 2000;1997(14):9–11.
- Ebersole JL. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontology* 2000. 2003;31(1):135–66.
- Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000. 2015;69(1):7–17.
- Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1592–600.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology.* 2000;1997(14):112–43.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23(5):479–90.
- Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev.* 2008;226(1):172–90.
- da Luz FA, Oliveira AP, Borges D, Brigido PC, Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediat Inflamm.* 2014;2014:342410.
- Lunderius-Andersson C, Enoksson M, Nilsson G. Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33. *Front Immunol.* 2012;3:82.
- Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38(Suppl 11):60–84.
- Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine.* 2011;53(3):347–54.
- Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm.* 2011;8(1):22.
- Zhao Q, Chen G. Role of IL-33 and its receptor in T cell-mediated autoimmune diseases. *BioMed Res Int.* 2014;2014:587376.
- Mun SH, Ko NY, Kim HS, Kim JW, Kim do K, Kim AR, et al. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2010;67(22):3883–92.
- Koseoglu S, Hatipoglu M, Saglam M, Enhos S, Esen HH. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontol Res.* 2015;50(4):525–34.
- Buduneli N, Ozcaka O, Nalbantsoy A. Interleukin-33 levels in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma do not differentiate chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2012;83(3):362–8.
- Kursunlu SF, Ozturk VO, Han B, Atmaca H, Emingil G. Gingival crevicular fluid interleukin-36beta (-1F8), interleukin-36gamma (-1F9) and interleukin-33 (-1F11) levels in different periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 2014;60(1):77–83.
- Papathanasiou E, Teles F, Griffin T, Arguello E, Finkelman M, Hanley J, et al. Gingival crevicular fluid levels of interferon-

- gamma, but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2014;49(1):55–61.
20. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand.* 1964;22:121–35.
 21. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967;38(6):610–6.
 22. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010;130(2):172–80.
 23. Beklen A, Tsaous Memet G. Interleukin-1 superfamily member, interleukin-33, in periodontal diseases. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm.* 2014;89(3):209–14.
 24. Lamster IB, Oshrain RL, Gordon JM. Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *J Clin Periodontol.* 1986;13(8):799–804.
 25. Tighe P, Negm O, Todd I, Fairclough L. Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits. *Methods.* 2013;61(1):23–9.
 26. Liu MY, Xydakis AM, Hoogeveen RC, Jones PH, Smith EO, Nelson KW, et al. Multiplexed analysis of biomarkers related to obesity and the metabolic syndrome in human plasma, using the Luminex-100 system. *Clin Chem.* 2005;51(7):1102–9.
 27. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2008;63(8):879–84.
 28. Nizam N, Basoglu OK, Tasbakan MS, Nalbantsoy A, Buduneli N. Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease. *J Periodontol.* 2014;85(7):e251–8.
 29. Malcolm J, Awang RA, Oliver-Bell J, Butcher JP, Campbell L, Adrados Planell A, et al. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J Dent Res.* 2015;94(7):968–75.
 30. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci.* 2011;26(9):1132–9.



Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries

N Çil, EO Oğuz, E Mete, A Çetinkaya & GA Mete

To cite this article: N Çil, EO Oğuz, E Mete, A Çetinkaya & GA Mete (2017): Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries, Biotechnic & Histochemistry, DOI: [10.1080/10520295.2016.1243728](https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1243728)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10520295.2016.1243728>



Published online: 18 Jan 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries

N Çil¹, EO Oğuz¹, E Mete², A Çetinkaya¹, GA Mete¹

Departments of ¹Histology and Embryology and ²Microbiology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

Accepted September 28, 2016

Abstract

The use of stem or progenitor cells from bone marrow, or peripheral or umbilical cord blood is becoming more common for treatment of diabetic foot problems. These cells promote neovascularization by angiogenic factors and they promote epithelium formation by stimulating cell replication and migration under certain pathological conditions. We investigated the role of CD34 + stem cells from human umbilical cord blood in wound healing using a rat model. Rats were randomly divided into a control group and two groups with diabetes induced by a single dose of 55 mg/kg intraperitoneal streptozocin. Scarred areas 5 mm in diameter were created on the feet of all rats. The diabetic rats constituted the diabetes control group and a diabetes + stem cell group with local injection into the wound site of 0.5×10^6 CD34 + stem cells from human umbilical cord blood. The newly formed skin in the foot wounds following CD34 + stem cell treatment showed significantly improvement by immunohistochemistry and TUNEL staining, and were closer to the wound healing of the control group than the untreated diabetic animals. The increase in FGF expression that accompanied the local injection of CD34 + stem cells indicates that FGF stimulation helped prevent apoptosis. Our findings suggest a promising new treatment approach to diabetic wound healing.

Key words: CD34, diabetic foot, wound healing, apoptosis VEGF, PDGF, FGF, IL-1, Caspase 3, TGF- α , TNF- β

Umbilical cord blood (UCB) transports nutrients and oxygen from the mother to the fetus throughout pregnancy, while also removing fetal waste. UCB contains not only blood cells, such as erythrocytes, leucocytes and thrombocytes, but also greater numbers of stem cells than are found in adult blood. The stem/progenitor cells (SPCs) in UCB exhibit longer telomeres and greater replication capacity than SPCs in bone marrow and peripheral blood. Thymic conditioning

of UCB SPCs is incomplete; therefore, they are more compatible with recipients and possess greater advantages for therapeutic use compared to other stem cells (Beksaç 2009).

Diabetes mellitus is a hyperglycemic disorder that causes impairment of carbohydrate, protein and fat metabolism. Foot injuries in diabetic individuals often require hospitalization and are a significant cause of increased mortality and morbidity in this patient group (Kahn et al. 2005).

Wound healing is a complex process that is especially complicated in patients with diabetes mellitus. There generally are three phases of wound healing: (a) inflammation, (b) fibroblastic proliferation and (c) maturation (remodeling) (Sayek and Özmen 2009). The inflammatory phase of wound healing begins with damage to the tissue and ends within 24–48 h. Acute inflammation is the initial phase of wound

Correspondence: Emin Oğuzhan Oğuz, Department of Histology & Embryology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey. Phone: +90-530-2033716, fax: +90-258-2961765, e-mail: oguzemin@yahoo.com Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/ibih

© 2017 The Biological Stain Commission
Biotechnic & Histochemistry 2017, **Early Online**: 1–14.

healing and it is characterized by migration of immune cells, which provide protection against mechanical, bacterial and chemical effects. Blood vessels are important during the inflammatory phase; regional bleeding commences initially, then coagulation begins (Sayek and Özmen 2009)

After an injury occurs, neutrophils, lymphocytes and macrophages migrate to the wound site. The roles of macrophages at the wound site include fibroblastic proliferation and differentiation, angiogenesis and release of mitogenic substances that stimulate collagen synthesis. The growth factors released by active macrophages include transforming growth factor (TGF)- β , platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin (IL)-1, platelet-activating factor (PAF), transforming growth factor (TGF)- β , tumor necrosis factor (TNF), fibroblast growth factor (FGF) and epidermal growth factor (EGF) (Sayek and Özmen 2009).

We investigated the potential ameliorative effects of CD34 + stem cells for diabetic rats with foot injuries. We used immunohistochemical methods to investigate TGF- β , PDGF, VEGF, FGF, IL-1 and TNF- α expression at the wound site. We also investigated the effects of CD34 + stem cells on apoptosis using the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method and an immunohistochemical method for caspase-3.

Material and methods

Animals

Our experimental animal procedures were approved by the Pamukkale University Experimental Animal Research Ethical Board. We acquired 18 healthy male, 20-week-old, 200–250 g Wistar albino rats from the Experimental Animal Laboratory of the Faculty of Medicine of Eskişehir Osmangazi University. The rats were divided randomly into three groups. Group 1 was the control group (C) ($n = 6$), group 2 was the diabetic control group (D) ($n = 4$; two rats developed diabetes but anesthesia dosage was too high; therefore, they died), group 3 was the diabetic group with active stem cell administration (D + SCs; $n = 6$). All rats were housed under laboratory conditions at room temperature ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), $60 \pm 5\%$ humidity and a 12 h light/12 h dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*.

A full thickness circular wound of 5 mm in diameter was created on the front right legs of all rats using a sterile biopsy punch

Each rat was weighed at the start of the experimental period (day 0). The blood glucose level (BGL) of each rat also was measured in tail vein blood on

day 0, using a BGL Optium Xceed glucometer and Abbott Optium FreeStyle and blood glucose sticks (Abbott Diabetes Care Ltd., Oxon, UK).

Diabetes induction

The six rats of group D and the six rats of group D + SCs were injected intraperitoneally (i.p.) with a single 55 mg/kg dose of streptozotocin (STZ) (Sigma, St. Louis, MO) freshly dissolved in distilled water. Development of diabetes in the experimental groups was confirmed 72 h after STZ treatment by measuring glucose levels in tail vein blood samples. Rats with blood glucose levels ≥ 250 mg/dl were considered diabetic (Gürpınar et al. 2010); four of the six rats in the D group and all six rats in the D + SCs group met this criterion.

CD34 + cells from UCB

Twenty milliliters of human UCB was obtained from volunteers in the Obstetrics Clinic of Denizli State Hospital, Denizli, Turkey, who provided written informed consent. The blood was placed on ice and transferred immediately to the laboratory in the Department of Histology and Embryology of the Faculty of Medicine at Pamukkale University (Denizli, Turkey).

We used the Easysep method with an EasySep magnet (18000; Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) and an EasySep Human CD34 Positive Selection kit (12B43208; Stemcell Technologies) to obtain the CD34 + stem cells from the UCB. The cord blood was treated with ficoll, centrifuged at $1913 \times g$ for 25 min, then the buffy coat was pipetted to another tube. The desired cells were separated using the Easysep human CD34 positive selection kit. The D + SCs group was treated by injection of CD34 + stem cells derived from UCB into the wound bed. No dressings were applied to the wounds during the experiment.

Histology

On day 14 of the experiment, i.e., 10 days after inflicting the foot injury, the weight and BGL of each rat were measured again. The rats were anesthetized with 30 mg/kg ketamine 1 = 1 HCl and 6 mg/kg xylazine HCl injected i.p., then sacrificed by decapitation. Tissue samples were taken from the wound sites and fixed in 10% formaldehyde overnight (070312510; Tekkim Kimya San.Tic. Ltd., Bursa, Turkey). The tissues were rinsed with tap water, then dehydrated through ascending ethanols for 1 h in each

concentration. The tissue was cleared in two xylene baths for 1 h each, then embedded in paraffin for 1 h. Sections were cut at 5 μ m using a Leica RM-2125 rotary microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and mounted on lysine-coated glass slides (23573; Marienfeld Laboratory Glassware Histobond, Marienfeld, Germany). Sections were deparaffinized in xylene, rehydrated through graded ethanols and stained with hematoxylin and eosin (H & E) (Demir 2001) The sections were examined using TUNEL and immunostaining for TGF- β 1, PDGF, VEGF, FGF1, IL-1, TNF- α and caspase-3 using a Histostatin-Plus Kit (1018708A; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Immunohistochemistry

After deparaffinization, sections were rehydrated through a descending ethanol series for 2 min in each bath. After rinsing the sections with tap water, the sections were placed in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 1:9 30% H₂O₂:methanol. Slides were washed with PBS three times, then serum blocking solution (Reagent A) was added to the sections for incubation for 10 min at room temperature. After 10 min, Reagent A was removed and primer antibody was added drop-wise to wet slides. Sections were incubated overnight with relevant primary antibodies: TGF- β (F2512; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:100, PDGF (E1311; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100, VEGF (F1312; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100, FGF1 (A0512; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100, IL-1 (F2212; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100, TNF- α (F2211; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100, and caspase-3 (1992267; Millipore, Darmstadt, Germany) diluted 1:10. All primary antibodies were diluted with PBS. Sections were washed three times with PBS for 2 min each, then treated with Broad Spectrum Second Antibody (Reagent B) for 20 min. The sections were washed three times with PBS for 2 min each, then treated with horseradish peroxidase conjugate streptavidin (HRP-SA) (Reagent C) for 10 min. After washing with PBS three times for 2 min each, the sections were treated with DAB-Plus Substrate Kit (1018723A; Invitrogen) for 3–10 min. The sections then were counterstained with Harris hematoxylin (Merck). The sections were washed with tap water and dehydrated through 70, 80, 90 and 100% ethanol for 2 min each. Sections then were coverslipped with Entellan.

We examined immunohistochemical staining in epidermis, connective tissue, sebaceous glands and

sweat glands. Immunohistochemical staining intensity was scored as: (/) no structure to examine, (-) no staining, (+/-) very weak staining, (+) weak staining, (++) medium staining, (+++) strong staining.

TUNEL staining

ApopTag Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection kits (1951838; Millipore Corp., Billerica, MA) were used for the TUNEL assays according to the manufacturer's protocol. Briefly, sections were deparaffinized in xylene, rehydrated and incubated with 20 μ m/ml proteinase K for 10 min, then rinsed in distilled water. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide. The sections were incubated in Equilibration Buffer for 5 min, then TdT enzyme was applied and the sections incubated at 37° C for 1 h. Sections were placed in pre-warmed working strength stop/wash buffer at room temperature for 10 min, then incubated with anti-streptavidin-peroxidase for 45 min. Each step was separated by washing in PBS. Immunostaining was visualized by DAB staining with Harris hematoxylin counterstaining.

TUNEL positive (apoptotic) cells were counted from 10 randomly chosen fields at 400 x and expressed as apoptotic index using the formula: (number of apoptotic cells/total number of counted cells) x 100.

Statistical analysis

All data were analyzed using the SPSS 17.0 package. For comparisons of the rat weights and BGLs, we used the Kruskal-Wallis test and we used the Mann-Whitney U tests to determine the significance of differences among the groups. Values for $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Diabetes findings

The initial and final weights of the rats during the experimental period (days 0–14) are given in Table 1. We found no significant differences in the initial weights among groups C, D and D + SCs. By day 14, however, the body weights for both groups D and D + SCs, were decreased significantly compared to group C ($p < 0.05$). We found no significant difference in body weights between groups D and D + SCs. Groups D + SCs and D exhibited weight loss compared to their weights at the beginning of the experiment ($p < 0.05$).

Table 1. Mean body weights and blood glucose levels

Treatment group (n)	Body weight (g)		Blood glucose (mg/dl)		
	Day 0	Day 14 ^b	Day 0	Day 3 ^a	Day 14 ^b
Control (6)	255.7 ± 30.7	289.0 ± 35.0	90.8 ± 35.6	101.5 ± 14.0	84.0 ± 10.0
Diabetes control (4)	239.0 ± 35.1	238.0 ± 6.3 ^{c,d}	99.7 ± 17.6	265.7 ± 22.1	319.2 ± 90.0
Diabetes + SCs (6)	239.3 ± 26.8	230.0 ± 24.0 ^{c,d}	83.3 ± 7.6	357.3 ± 61.6	373.3 ± 59.0

Data are means ± SE.

^aThree days after diabetes induction in the diabetes and diabetes + SCs groups, and the day of foot wounding of all rats. ^bTen days after foot wounding and day of sacrifice. ^cSignificantly different from control group ($p < 0.05$). ^dSignificantly reduced from day 0 ($p < 0.05$).

We found that on day 0, the BGLs were similar among groups C, D and D + SCs. On days 3 and 14, we found significant increases in BGLs in both groups D and D + SCs compared to group C ($p < 0.05$), although we found no significant differences in the number of BGLs between groups D and D + SCs (Table 1).

H & E staining

In group C, the epidermis was stratified squamous. The keratin layer of the epidermis exhibited intense H & E staining, while the connective tissue fibers, sebaceous glands, and sweat glands in the dermis also were well stained (Fig. 1A). In group D, the epidermis was stratified, but the thickness was decreased and the spaces around the connective tissue fibers were increased compared to group C. The sebaceous and sweat glands in the dermis appeared normal (Fig. 1B). The appearance of the epidermis of group D + SCs approached that of group C. The connective tissue fibers, and sebaceous and sweat glands in the dermis all appeared normal (Fig. 1C).

FGF1

We found weak staining for FGF1 in the group C epidermis, fibroblast cell nuclei, connective tissue fibers and sebaceous glands (Table 2, Fig. 2A). In group D, the epidermis, sebaceous cells and fibroblast nuclei showed no staining for FGF1; only weak FGF1 staining appeared in the connective tissue fibers (Table 2, Fig. 2B). In group D + SCs, we found intense FGF1 staining in the apical region of the epidermis. We also observed FGF1 staining in the fibroblasts and sebaceous cell nuclei ($p < 0.05$) (Table 2, Fig. 2C). FGF1 staining in epidermis, connective tissue, sebaceous tissue and sweat gland was significantly greater in group D + SCs than in group D ($p < 0.05$). The number of FGF1 stained cells in epidermis was greater in group C than for group D ($p < 0.05$). The number

of FGF cells in the epidermis, connective tissue, sebaceous tissue and sweat glands was greater in group D + SCs than in group C ($p < 0.05$).

IL-1

We observed intense IL-1 staining in the epidermis and sebaceous glands and weaker staining in the dermal connective tissue cells and fibers in group C. The IL-1 staining was both cytoplasmic and nuclear in the stained cells (Table 2, Fig. 3A). In group D, the cytoplasm and nuclei in epidermis cells, and connective tissue fibers and nuclei were stained intensely. Intense staining also was observed in the cytoplasm and in nuclei of sebaceous cells (Table 2, Fig. 3B). IL-1 staining in group D + SCs was comparable to that in group C; however, there were unstained areas in both the epidermis and the sebaceous glands, (Table 2, Fig. 3C). We found more IL-1 positive cells ($p < 0.05$) in group D + SCs than in groups C and D. IL-1 positivity was significantly greater in group D + SCs than in group D ($p < 0.05$). The number of connective tissue stained cells was significantly greater in group D than in group C ($p < 0.05$). IL-1 positivity was significantly greater in group D + SCs than in group C ($p < 0.05$).

TGF-β

We found a strong TGF-β reaction in the epidermis and sebaceous glands in group C; the connective tissue fibers in the dermis exhibited medium to weak staining and the sweat glands showed medium TGF-β staining (Table 2, Fig. 4A). We observed strong TGF-β staining in the epidermis and sebaceous glands, and weak to medium staining of fibroblast cells and connective tissue fibers, and in the sweat glands in group D (Table 2, Fig. 4B). Although epidermis, connective tissue fibers and sebaceous glands were stained in group D + SCs,

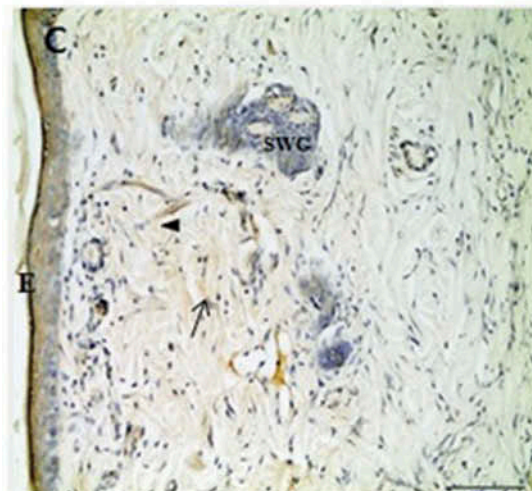
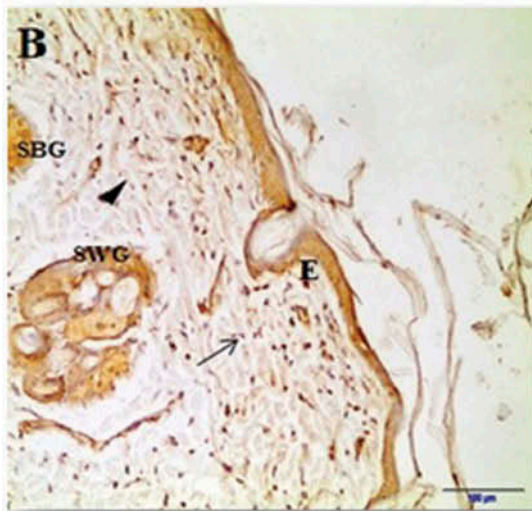
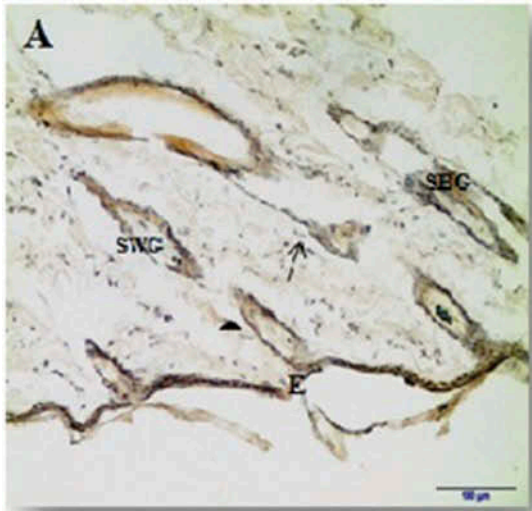


Fig. 1. H & E staining. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland.

some sweat glands and connective tissue cells were stained while others were not (Table 2, Fig. 4C). Epidermis, connective tissue and sebaceous tissue TGF- β staining was stronger in group D + SCs than in group D ($p < 0.05$). In sweat glands, TGF- β staining was stronger in group D than in group D + SCs ($p < 0.05$). There were more positive cells in the connective tissue in group D than in group C, while there were more positive cells in sebaceous tissue and sweat glands in group C than in group D ($p < 0.05$). There were more positive cells in connective tissue and sebaceous tissue in group D + SCs than in group C, while there were more positive cells in sweat glands in group C than in group D + SCs ($p < 0.05$)

TNF- α

Group C exhibited medium TNF- α staining in the epidermis, connective tissue fibers and cells, sebaceous glands and sweat glands. The staining was cytoplasmic; no nuclear staining was found (Table 2, Fig. 5A). In group D, the epidermis, sebaceous glands and sweat glands exhibited TNF- α staining in the sebaceous and sweat glands that was cytoplasmic; no nuclear staining was found. TNF- α nuclear staining was found in the epidermal cells, while no staining was observed in connective tissue fibers and cells. (Table 2, Fig. 5B). In group D + SCs, the upper layers of the epidermis exhibited TNF- α staining, while deeper layers were unstained. We observed strongly positive TNF- α staining in the sebaceous and sweat glands, but weak TNF- α staining in the connective tissue fibers and cells (Table 2, Fig. 5C). TNF- α staining was greater in epidermis, connective tissue and sebaceous tissue in group D than in group D + SCs ($p < 0.05$). TNF- α positivity was greater in connective tissue in group D, while it was greater in sebaceous tissue and sweat glands in group C ($p < 0.05$). TNF- α positivity was greater in epidermis, connective tissue and sweat glands in group C than in group D + SCs ($p < 0.05$).

PDGF

In group C, the epidermal layer exhibited strongly positive PDGF staining, while the connective tissue fibers exhibited weak staining. The sebaceous and sweat glands showed medium PDGF staining without nuclear staining (Table 2, Fig. 6A). In group D, the basal epidermal layers were not stained, while the more superficial layers were stained strongly. Some of the sebaceous and sweat gland cells exhibited medium PDGF staining, while others exhibited weak staining. The

Table 2. Localization and expression of the markers in the skin of samples from the experimental groups

Analysis	Experimental group	Epidermis	Connective tissue fibers	Connective tissue cells	Sebaceous glands	Sweat glands
Caspase-3	Control	++*	+	++	+**	+
	Diabetes control	+++	+++	+++	+++	+++
	Diabetes + SCs	++*	+	+	+**	+
FGF	Control	+,+/-	-	-	+,+/-	+,+/-
	Diabetes control	-	-	-	-	-
	Diabetes + SCs	++	+	+++	+++	+
IL-1	Control	+++	+ / +++	+	+++	+++
	Diabetes control	+++	+++	+++	+++	+++
	Diabetes + SCs	+++	+++	+++	+++	+++
TGF- β	Control	+++	- / ++	- / ++	+++	++
	Diabetes control	+++	+ / ++	+ / ++	+++	++
	Diabetes + SCs	+++	+++	+++	+++	+++
TNF- α	Control	+++	++	++	++	++
	Diabetes control	+++	- / +	- / +	+++	+++
	Diabetes + SCs	+++	+	+	+++	+++
PDGF	Control	+++	+	++	++	++
	Diabetes control	- / +++	- / +	- / +	+++	++ , +
	Diabetes + SCs	+++	+++	+++	+++	+++
VEGF	Control	+++	+++	+++	+++	+++
	Diabetes control	+++	+++	+++	+++	+++
	Diabetes + SCs	+++	+++	+++	+++	+++

*Stratum basale layer was unstained. **Staining was cytoplasmic only.

connective tissue fibers and cells exhibited weak PDGF staining (Table 2, Fig. 6B). In group D + SCs, the epidermis, connective tissue fibers and cells, and sebaceous and sweat glands exhibited strong PDGF staining in both the cytoplasm and nuclei (Table 2, Fig. 6C). We found significantly more PDGF positive cells in group D + SCs in connective tissue and sweat glands than in group D ($p < 0.05$). We found more PDGF positive cells in group C in connective tissue, sebaceous tissue and sweat glands than in group D ($p < 0.05$). We found significantly more PDGF positive cells in sebaceous tissue in group C than in group D + SCs and in sweat glands in group D + SCs than in group C ($p < 0.05$).

VEGF

The epidermis, and sebaceous and sweat glands exhibited strong VEGF staining in group C (Table 2, Fig. 7A). In group D, the epidermis, dermal connective tissue cells, and sebaceous and sweat glands exhibited strong VEGF staining, but the connective tissue fibers were stained weakly. VEGF staining was cytoplasmic (Table 2, Fig. 7B). In group D + SCs, the epidermis, dermis, connective tissue cells and fibers, and

sebaceous and sweat glands all exhibited strong cytoplasmic and nuclear VEGF staining (Table 2, Fig. 7C). VEGF staining was significantly different in epidermis, connective tissue and sweat glands among C, D and D + SCs groups ($p < 0.05$). We found significantly more VEGF positive cells in epidermis, connective tissue and sweat glands in group D + SCs than in group D ($p < 0.05$). The number of VEGF positive cells was significantly greater in group C than group D in epidermis ($p < 0.05$). In connective tissue, the number of VEGF positive cells was greater in group D than group C. VEGF positivity was stronger in epidermis, connective tissue and sweat glands in group D + SCs than in group C ($p < 0.05$).

Caspase-3

The epidermis was stratified in two to three layers and caspase-3 staining was medium, with weak nuclear staining in group C. Staining of sebaceous tissue also was medium with weak staining of the connective tissue fibers (Table 2, Fig. 8A). All layers of the epidermis were caspase-3 positive and staining was diffuse. The cytoplasm and nuclei of the epidermis in group D were intensely caspase-3 positive. Connective tissue cells exhibited

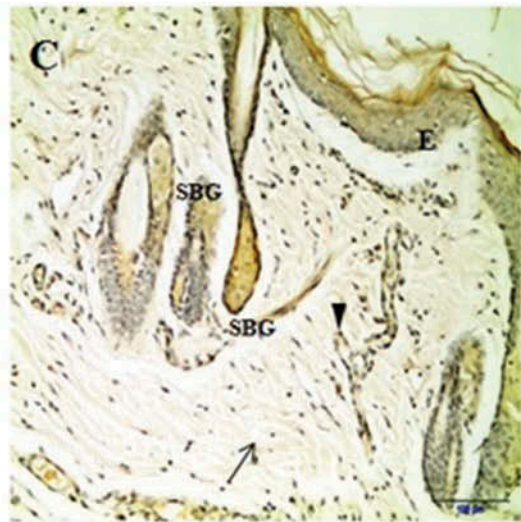
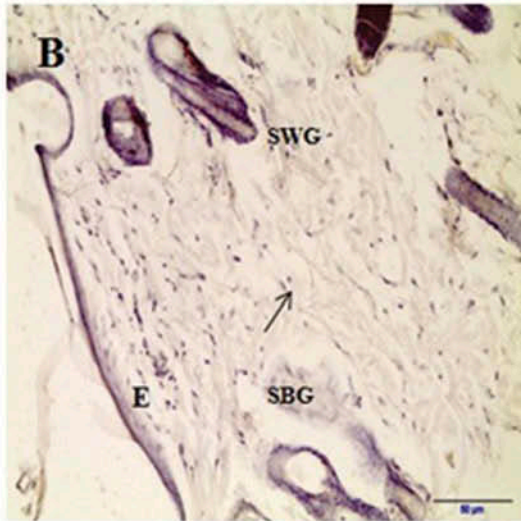
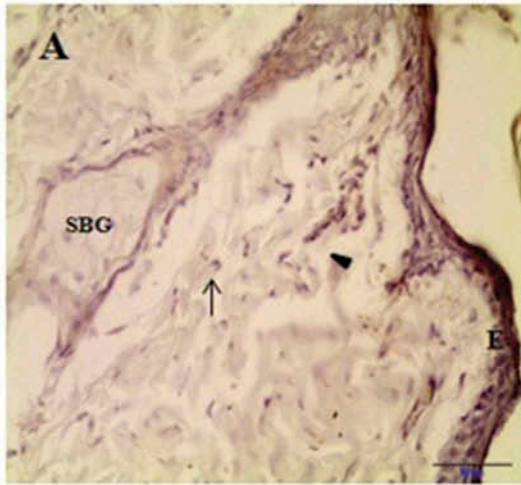


Fig. 2. FGF expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

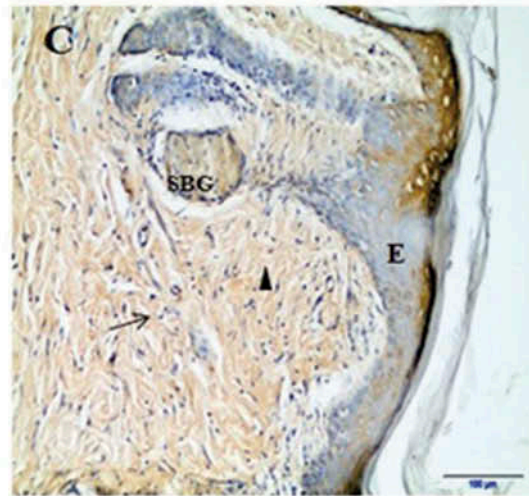
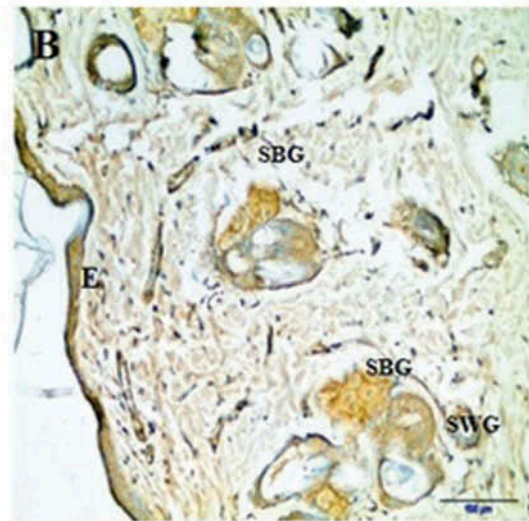
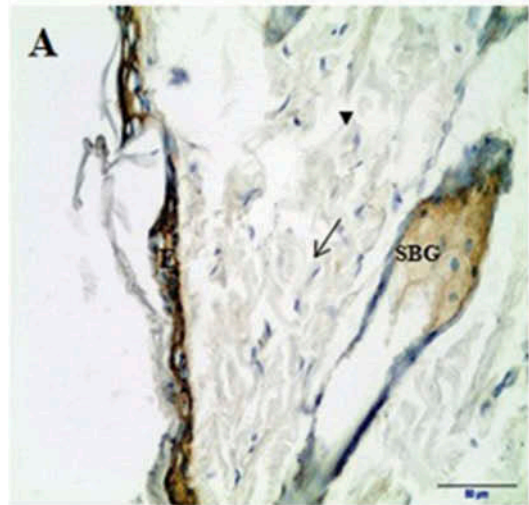


Fig. 3. IL-1 expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

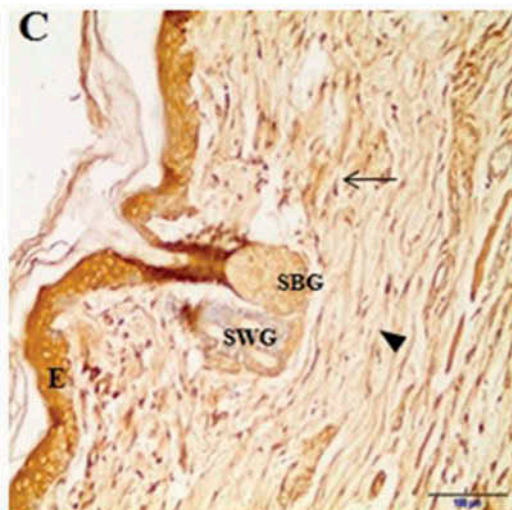
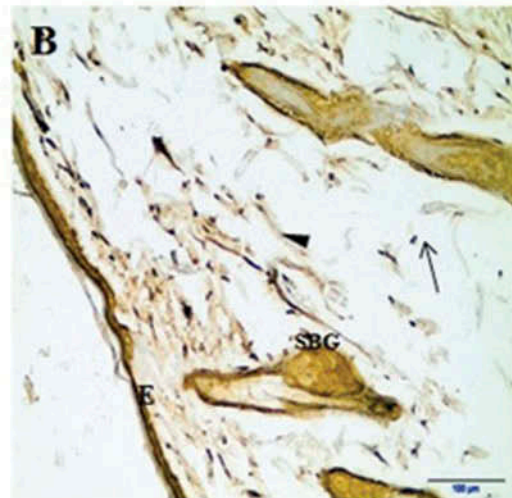
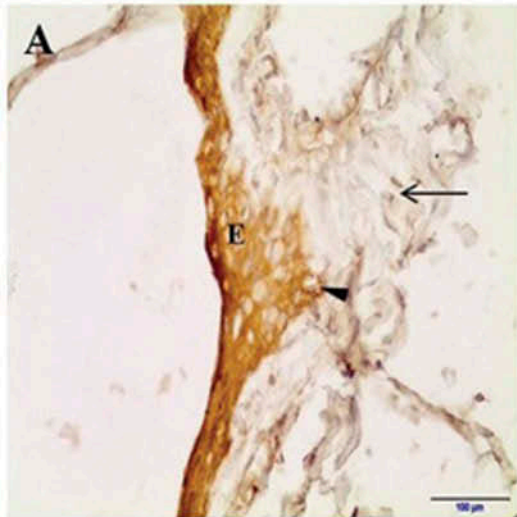


Fig. 4. TGF- β 1 expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

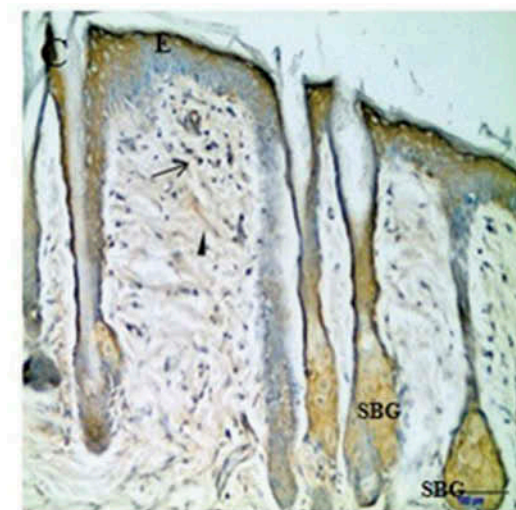
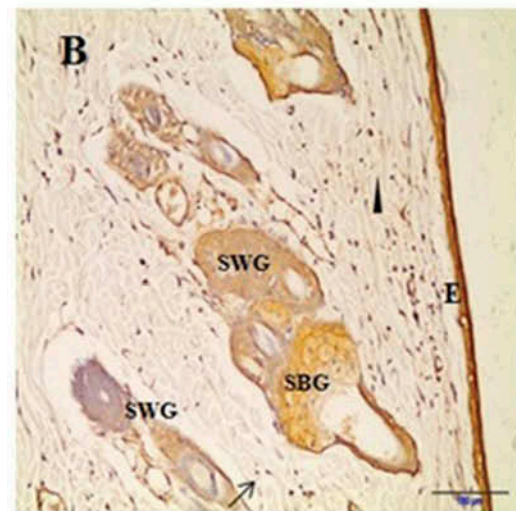
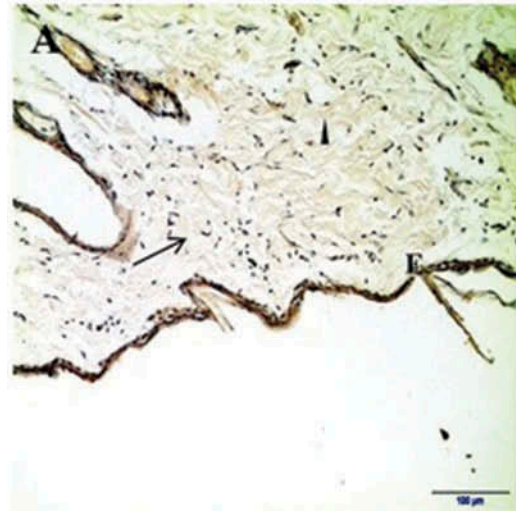


Fig. 5. TNF- α expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

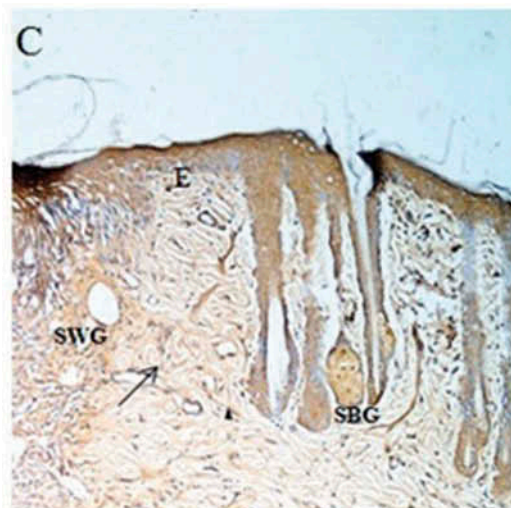
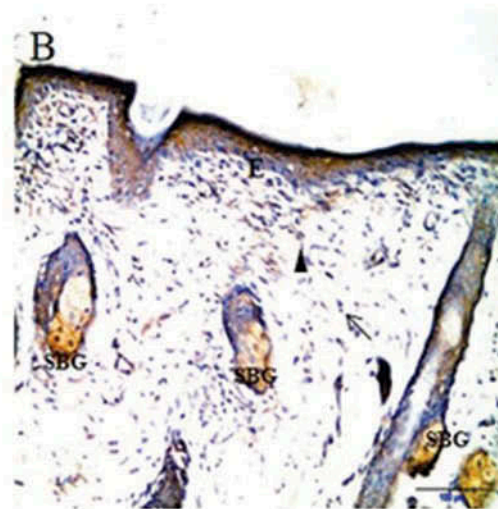
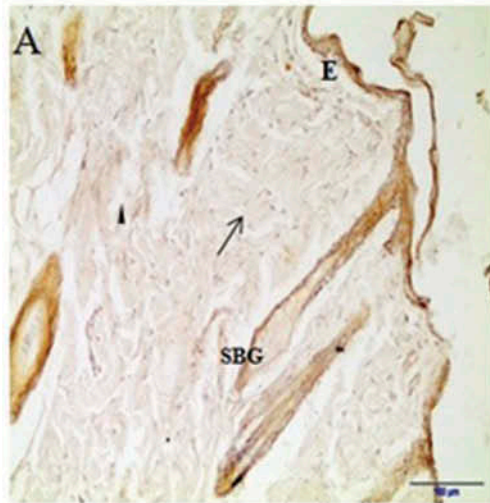


Fig. 6. PDGF expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

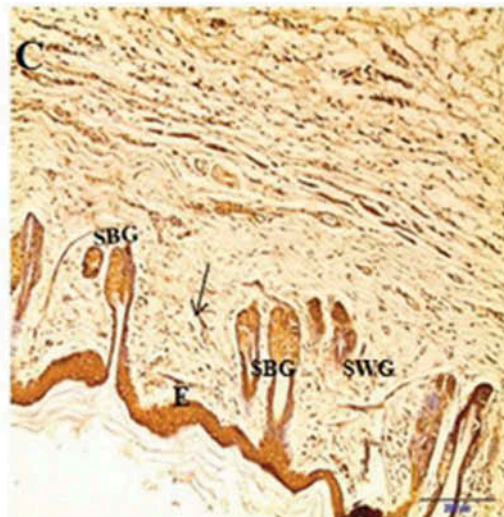
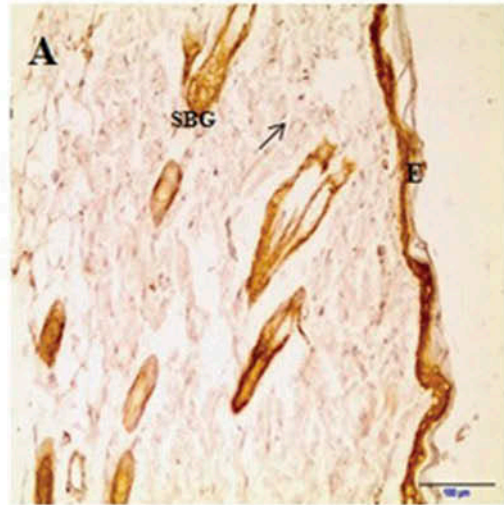


Fig. 7. VEGF expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

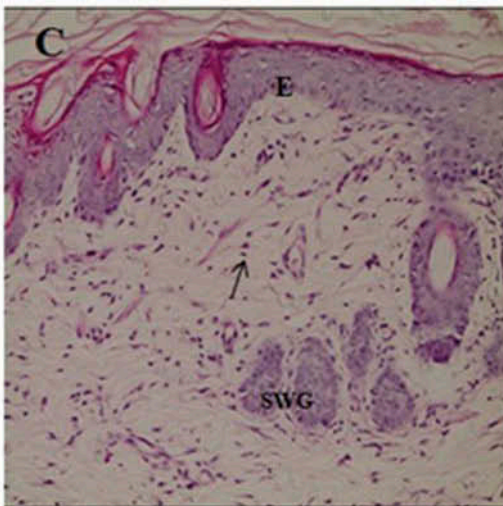
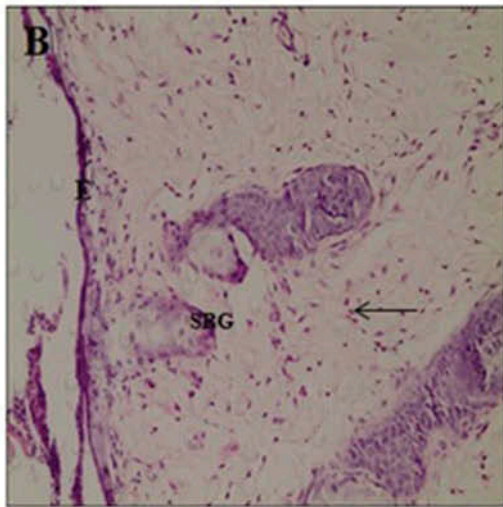
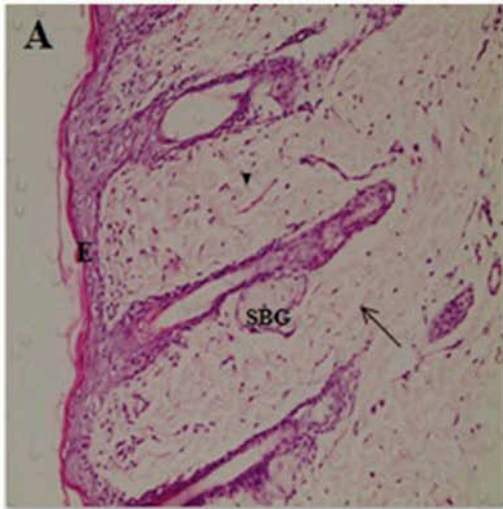


Fig. 8. Caspase-3 expression. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. E, epidermis; arrow, connective tissue cells; arrowhead, connective tissue fibers; SBG, sebaceous gland; SWG, sweat gland. Immunoperoxidase with hematoxylin counterstaining.

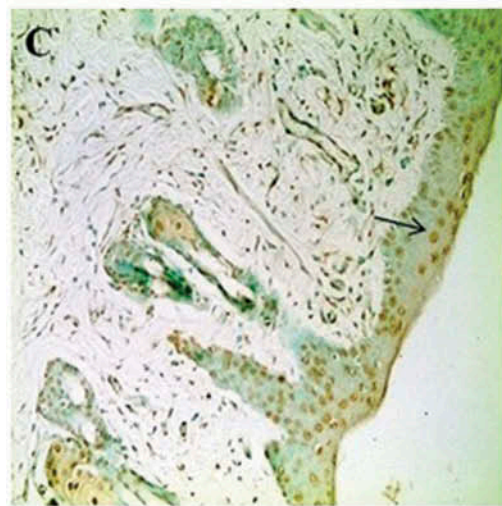
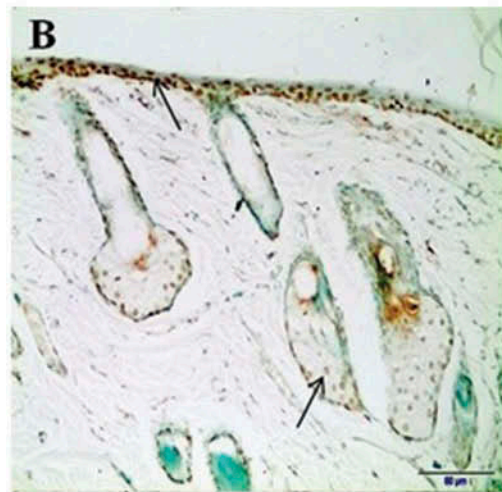
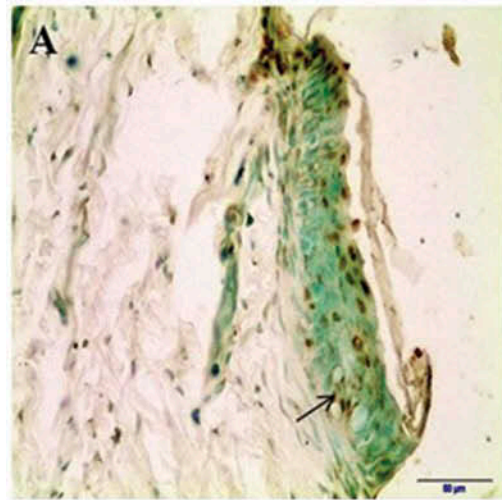


Fig. 9. TUNEL-positive cells. A) Group C. B) Group D. C) Group D + SCs. Arrows, connective tissue.

weak staining and the nuclei were unstained. Sebaceous cells and their nuclei exhibited moderate staining (Table 2, Fig. 8B). The epidermis was stratified in group D + SCs and caspase-3 staining was medium with weak nuclear staining; however, the caspase-3 staining intensity was greater toward the apical end of these cells. Caspase-3 staining was weak in the connective tissue fibers and the fibroblast nuclei were mostly unstained. The sebaceous cells were stained intensely for caspase-3, although their nuclear staining was weak (Table 2, Fig. 8C).

The number of stained epidermal and connective tissue cells and sebaceous cells was significantly greater in groups D and D + SCs than in groups C and D + SCs ($p < 0.05$). The number of caspase-3 stained connective tissue cells in group D + SCs was significantly greater than for group C ($p < 0.05$). Group D exhibited significantly more caspase-3 stained cells than groups C and D + SCs ($p < 0.05$).

TUNEL assay

We found TUNEL-positive cells in the epidermis, dermis, and sebaceous tissue and sweat glands in groups C and D + SCs (Fig. 9A). In group D, the epidermal layer was strongly TUNEL-positive and many more cells were TUNEL-stained than for groups C and D + SCs. The fibers in the dermis exhibited medium TUNEL positivity, while the cells in the dermis were strongly positive. We found intense TUNEL positivity in the sebaceous and sweat gland cells (Fig. 9B). TUNEL positive cells were stained more intensely in epidermis, dermis, sweat and sebaceous tissue in groups C and D + SCs; however, TUNEL-positive cells were stained more intensely in group D than in groups C and D + SCs ($p < 0.05$).

The apoptotic indices were for group C, $55.6 \pm 3.6\%$; group D, $92.3 \pm 0.9\%$; and group D + SCs, $67.3 \pm 4.1\%$. Group D exhibited significantly more apoptotic cells than groups C and D + SCs ($p < 0.05$).

Discussion

An important complication of diabetes mellitus is slow healing of foot injuries, which eventually can lead to amputation and life-threatening sepsis (Pradhan et al. 2009). Factors in diabetes mellitus that delay wound healing include cellular dysfunction and altered growth factors. The following all play important roles in healing injuries: epidermal growth factor (EGF), TGF- β , FGF1, VEGF,

granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), PDGF, connective tissue growth factor (CTGF), interleukins (IL), TNF- α , insulin-like growth factor (IGF), and nerve growth factor (NGF). Disruption of these factors disrupts wound healing in diabetes (Chotinantakul 2013). Decreased neuropeptide levels due to diabetic neuropathy also can affect healing of injuries. Neuropeptides affect chemotaxis and the production of growth factors (Pradhan et al. 2009). Leung (2007) reported that in patients with diabetic ulcers, the aggregation of leucocytes in the injury site was hindered, which disrupted normal healing. Metabolic disorders including oxidative stress, hyperglycemic pseudohypoxia, non-enzymatic glycation and activation of the coagulation cascade also can cause endothelial dysfunction.

In diabetes mellitus, factors that delay wound healing include cellular dysfunction, changes in growth factors, changes in signals that decrease keratinocyte and fibroblast migration and proliferation, decreased production of extracellular matrix, decreased angiogenesis and susceptibility of injured tissue to bacteria and infection (Bao et al. 2009). Diabetic rats exhibited decreased granulation tissue originating from re-epithelization and unsuccessful cell apoptosis, which caused decreased wound healing (Smith and Liu 2002). To counter these complications, treatment requires enhancement of the multi-step wound healing process (Chotinantakul 2013). It has been suggested that stem cells can accelerate injury healing (Elsharawy 2012). There are two possibilities whereby stem cells may accelerate the wound closure process. First, stem cells release growth factors, cytokines and mediators in a paracrine manner to stimulate the generation of neighboring cells. Second, stem cells differentiate into regenerative cells or cooperate with neighboring cells to stimulate wound healing (Chotinantakul et al. 2013).

UCB serum contains larger amounts of growth factors and more stem cells than human blood serum (Ang et al. 2011). We injected UCB CD34 + stem cells into injured rats and assessed the expression of angiogenesis growth factors, TGF- β , PDGF, VEGF and FGF1, and cytokines, IL-1 and TNF- α , during wound healing. We found no reports in the literature concerning the effects of stem cells on apoptosis during wound healing. Therefore, we investigated the effects of UCB stem cells on apoptosis using the TUNEL method and immunohistochemical staining of caspase-3.

STZ damages pancreatic β cells and causes diabetes (Motyl and McCabe 2009). Kim et al. (2010)

reported that endothelial progenitor cells (EPC) obtained from human cord blood stimulated keratinocyte and fibroblast proliferation. EPC express PDGF, keratinocyte growth factor and angiogenic growth factors in damaged tissue, which stimulate angiogenesis. As a result, wound closure in diabetic mice was significantly accelerated.

Oxidative stress induced by high levels of blood glucose causes DNA damage and can initiate apoptosis by p53-related mechanisms. High blood glucose levels activate calpain, a calcium-dependent protease. Calpain can initiate apoptosis by caspase-dependent and -independent mechanisms (Allen et al. 2005).

Hematopoietic stem cells (HSCs) are progenitors of myeloid, lymphoid cells and multipotent cells. Although HSCs are scarce, they can produce all blood cells (Can 2014). Some cytokines and growth factors that are produced by hematopoietic stem cells, including IGF-1, TGF- β 1, TNF- α and IL-1, stimulate wound repair (Majka et al. 2001). Human peripheral blood CD34 + cells facilitate neovascularization and improve wound healing in diabetic rats (Sivan-Loukianova et al. 2003). In earlier studies, HSCs obtained from human peripheral blood and CD31-vWF immunohistochemistry were used. We investigated the use of HSCs obtained from human cord blood for accelerating healing of injury using TUNEL staining and TGF- β , PDGF, VEGF, FGF1, IL-1, TNF- α and caspase-3 immunohistochemical staining.

Human UCB cells embedded in fibrin gel and CD34 + cells derived from endothelium facilitated wound healing in our diabetic rats by decreasing inflammatory reactions and increasing wound revascularization (Pedroso et al. 2011). UCB CD34 + cells have been used to treat foot wounds in diabetic rats. The use of CD34 + stem cells ameliorated the injuries in most cases. By light and electron microscopy, the new skin tissue appeared normal (Elsharawy et al. 2012). We found that in the group D + SCs, the appearance of the dermis and epidermis were similar to group C, which is consistent with earlier reports.

Chotinantakul et al. (2013) demonstrated enlarged CD34 + cells and human UCB CD34 + cells in a site of injury, which suggests that these cells work cooperatively with local stem cells, macrophages, endothelial cells, fibroblasts and inflammatory cells.

Some cytokines and growth factors produced by HSCs, e.g., IGF-1, TGF- β 1, TNF- α , and IL-1, participate in wound repair; therefore, HSCs may be useful for cell-based treatment of injuries. Human UCB CD34 + cells also can differentiate

into endothelial cells (Chotinantakul 2013). Increased VEGF levels indicates development of blood vessels and microvascular activity, as well as increased vascular permeability (Wang et al. 2011). VEGF is secreted by platelets, macrophages, fibroblasts and keratinocytes. VEGF is up-regulated during the early phase of wound healing, increases the production of collagen and epithelium, and stimulates angiogenesis. VEGF is present in normal, nondiabetic tissue; however, STZ induced diabetic mice exhibit decreased synthesis of growth factors including VEGF (Bao et al. 2009).

Wang et al. (2011) reported that VEGF expression was increased significantly in biopsies of chronic diabetic wounds treated with extracorporeal shock wave and hyperbaric oxygen therapy. We found VEGF in epidermis and dermis in both groups C and D + SCs. The number of VEGF stained cells was greater in the groups C and D + SCs than in group D. Bao et al. (2009) reported that VEGF was increased during the early phases of diabetes, which is consistent with our findings.

The TUNEL assay detects apoptotic cells. The rate of apoptosis increases in necrotic tissue associated with chronic injury (Wang et al. (2001). Darby et al. (1997) reported that the TUNEL assay demonstrated a higher apoptosis rate in obese diabetics on days 7 and 14 compared to non-obese diabetic mice. The proliferation rate of diabetic granulation was low, so wound healing was delayed. Acute repair is delayed and the apoptosis rate is high in diabetics (Darby et al. 1997). We found that TUNEL stained cells were numerous and caspase-3 immunostaining was more intense in D group compared to groups C and D + SCs, which is consistent with the earlier report.

FGF1 increases fibroblast proliferation by increasing the expression of TGF- β and PCNA. TGF- β regulates cell growth and apoptosis, and causes synthesis of extracellular matrix. The expression of TGF- β is consistent with microvascular regeneration. TGF- β stimulates secretion of collagen proteins and integrin from fibroblasts, and increases epithelial cell migration (Xie et al. 2011), which promotes wound healing. The impaired function of macrophages in diabetic foot injuries decreases the secretion of cytokines, such as TNF and IL-1 β , which normally facilitate wound healing (Xie et al. 2011).

Dysfunctional phagocytic activity in diabetic patients has been demonstrated. In diabetic mice, macrophages isolated from a wound were incapable of removing debris, which would extend the inflammatory phase of wound healing (Rafehi et al. 2011).

Cytokines and growth factors, such as PDGF, IL-8, IL-10 and TGF- β 1, participate in stimulating epithelial cells; these factors are decreased in diabetic foot injuries. TGF- β 1 is a chemo-attractant for fibroblasts, keratinocytes and inflammatory cells, and it stimulates angiogenesis and production of extracellular matrix. TGF- β 1 is decreased in diabetic skin and foot ulcers. Topical application of TGF- β 1 accelerated wound healing in diabetic foot ulcers in rats (Rafehi et al. 2011). Also, TGF β 1 and various cytokines involved in the promotion of angiogenesis are down-regulated in diabetic foot ulcers, including PDGF, IGF-1, EGF, IL-8 (Rafehi et al. 2011).

Jude et al. (2002) reported that TGF- β 3 expression was significantly increased in the epidermis of a diabetic foot ulcer compared to normal skin; a II layers of the epidermis and dermis showed strong TGF β 3 immunoreactivity in diabetic foot injury.

Jude et al. (2002) reported that western blotting showed that TGF- β 3 staining increased more in diabetic foot injury than in normal groups. We found TGF- β , PDGF, TNF- α and IL-1 expression in the epidermis, connective tissue fibers and cells, and sweat and sebaceous glands in the dermis of group D. The number of TNF- α positive cells was greater in group D than in group D + SCs, which suggests that SCs inhibit TNF- α .

Xie et al. (2011) showed that the application of acidic FGF1 to an ulcer site increased the number of fibroblasts and capillaries significantly in diabetic rats. FGF1, TGF- β and PCNA increased the expression of proliferation proteins. Therefore, FGF1 promotes healing of diabetic foot injuries, because it has been shown that α FGF stimulates the proliferation of wound repair cells (Xie et al. 2011).

In an injury in the early phase of healing, FGF 1 secreted from endothelial cells and macrophages stimulated the proliferation of keratinocytes and fibroblasts; the stimulation was facilitated by various cytokines, proteases, and collagenases (Xie et al. 2011). Mellin et al. (1995) used western blotting to show that inflammatory cytokine expression was significantly greater in FGF1 treated animals than in diabetic animals. Mellin et al. (1995) and Xie et al. (2011) reported that FGF1 enhanced healing of diabetic ulcers. Fibroblasts are crucial for repair of injury; they synthesize and secrete extracellular matrix proteins that produce wound contraction and granulation tissue. Xie et al. (2011) reported that FGF1 treated diabetic animals exhibited increased capillaries and fibroblast-derived collagen protein compared to diabetic animals.

Our study had some limitations. A larger foot injury might have permitted stereology of the injury. Also, to apply the our findings to humans, we must define further both chronic conditions, i.e., ischemia, infection, edema and the severity of the injury, i.e., depth, extent and location of diabetic foot injury to which UCB stem cell treatment might be applied. We also used immunohistochemical staining to demonstrate TGF- β , PDGF, VEGF, FGF1, IL-1, TNF- α and caspase-3 activities. Had we investigated these expressions using RT-PCR or western blotting, we might have obtained more precise results. The expressions of VEGF, PDGF and TGF β were higher in group D + SCs, which suggests that these factors are important for wound healing. TUNEL-positive cells were more numerous and caspase-3 immunostaining was significantly more intense in group D, which suggests that apoptosis is increased in diabetes. The expression of TNF- α was significantly greater in group D than in group D + SCs. We believe that FGF1 stimulation can prevent apoptosis by inhibiting TNF- α , which is important for wound healing. We believe also that application of UCB stem cells increases FGF expression.

Acknowledgments

Pamukkale University, Scientific Research Department provided the grant for our study. Grant no. 2012TPF022. The authors thank Dr. Chris Berrie for editorial discussions.

Declaration of interest The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

References

- Allen D, Yaqoob MM, Harwood SM (2005) Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J. Nutr. Biochem.* 16: 705–713.
- Ang LP, Do TP, Thein ZM, Reza HM, Tan XW, Yap C, Tan DT, Beuerman RW (2011) Ex vivo expansion of conjunctival and limbal epithelial cells using cord blood serum-supplemented culture medium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52: 6138–6147.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in

physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85: 221–228.

Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich P, Brem H (2009) The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res.* 153: 347–358.

Beksaç M (2009) Kök Hücre Kaynağı Olarak Kordon Kanı, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamaları. *Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara, Türkiye.* 20: 30–38.

Can A (2014) *Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımı.* MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, Türkiye. 1st ed. pp. 338–339.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3(4).

Chotinantakul K, Dechsukhum C, Dejjuj D, Leeanansaksiri W (2013) Enhancement of wound closure in diabetic mice by ex vivo expanded cord blood CD34 + cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18: 263–283.

Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG (1997) Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 191–200.

Demir R (2001) *Histolojik Boyama Teknikleri. Palme Yayıncılık*, 1st ed., Ankara, Turkey. pp. 51–61

Elsharawy MA, Naim M, Greish S (2012) Human CD34 + stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. *Interac. Cardiovasc. Thor. Surg.* 14: 288–293.

Gürpınar T, Ekerbiçer N, Uysal N, Barut T, Tarakçı F, Tuğlu M (2010) The histologic evaluation of atorvastatin and melatonin treatment on oxidative stress and apoptosis of diabetic rat pancreas. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi* 16: 547–552.

Higley HR, Ksander GA, Gerhardt CO, Falanga V (1995) Extravasation of macromolecules and possible trapping of transforming growth factor-beta in venous ulceration. *Br. J. Dermatol.* 132: 79–85.

Jiang XY, De-Bin Lu, Chen B (2012) Progress in stem cell therapy for the diabetic foot. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 97: 43–50.

Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW (2002) Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet. Med.* 19: 440–447.

Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ (2005) *Joslin's Diabetes Mellitus.* 14th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, MD. pp. 146–147.

Kim JY, Song SH, Kim KL, Ko JJ, Im JE, Yie SW, Ahn YK, Kim DK, Suh W (2010) Human cord blood-derived endothelial progenitor cells and their conditioned media

exhibit therapeutic equivalence for diabetic wound healing. *Cell Transplant.* 19: 1635–1644.

Leung PC (2007) Diabetic foot ulcers—a comprehensive review. *Surgeon* 5: 219–231.

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ (2001) Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34 + cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97: 3075–3085.

Mellin TH, Casheen DE, Ronan JJ, Murphy BS, DiSalvo J, Thomas KA (1995) Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice. *J. Invest. Dermatol.* 104: 850–855.

Motyl K, McCabe LR (2009) Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol. Proc. Online* 11: 296–315.

Pedroso DC, Tellechea A, Moura L, Fidalgo-Carvalho I, Duarte J, Carvalho E, Ferreira L (2011) Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One* 6: e16114.

Pradhan L., Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A (2009) Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Exp. Rev. Mol. Med.* 11: 1–24.

Rafehi H, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. *Int. Wound J.* 8: 12–21.

Sayek İ, Özmen MM (2009) *Temel Cerrahi El Kitabı, Güneş Tıp Kitabevleri*, Ankara, Turkey. pp. 230–234.

Schmid P, Cox D, McMaster G, Morrison C, Stahelin H, Luscher N, Seiler W (1993) TGF-beta s and TGF-beta type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J. Pathol.* 17: 191–197.

Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC (2003) CD34 + blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J. Vasc. Res.* 40: 368–377.


Smith PG, Liu M (2002) Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 307: 281–291.

Wang CJ, Ko JY, Kuo YR, Yang YJ (2011) Molecular changes in diabetic foot ulcers. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 94: 105–110.

Xie L, Zhang M, Dong B, Guan M, Lu M, Huang Z, Gao H, Li X (2011) Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 93: 396–403.

RESEARCH ARTICLE

Biological response of commercially available different tricalcium silicate-based cements and pozzolan cement

Serhat Köseoğlu¹  | Tuğba Pekbağrıyanık¹ | Ebru Kucukyılmaz² | Mehmet Sağlam¹ | Sukru Enhos¹ | Ayşe Akgün³

¹Faculty of Dentistry, Department of Periodontology, İzmir Katip Celebi University, İzmir, Turkey

²Faculty of Dentistry, Department of Pedodontics, İzmir Katip Celebi University, İzmir, Turkey

³Research Center of Faculty of Dentistry, Katip Celebi University, Turkey

Correspondence

Serhat Köseoğlu, Faculty of Dentistry, Department of Periodontology, İzmir Katip Celebi University, İzmir, 35640, Turkey.
Email: serhatkoseoglu@gmail.com

Funding information

Scientific Research Project in Katip Celebi University, İzmir, Turkey, Grant/Award Number: 2013-1-TCSP-24.

Review Editor: Prof. George Perry

Abstract

This study evaluated four root repair materials for cytotoxicity and cell attachment in vitro. Cell viability was determined at 24 hr, 3 days and 7 days by using a 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay with material extracts. Cell adhesion was examined with a scanning electron microscope on the surface of materials at 24 and 48 hr. Angelus MTA displayed the lowest cell viabilities at all-day incubations. Endocem had high biocompatibility on the first day. After culturing for 3 days and 7 days, the cell viabilities of Biodentine, Endocem and MM-MTA had similar results, and their cell viability was significantly higher than that of Angelus. No definite relation was found between the incubation time and the relative cell viability in any group. In scanning electron micrographs, the cells were attached to the material surface for all materials, although the cells in the Biodentine group were attached better than the other groups on the second day. Cell viability and cell attachment was lower in the Angelus group. Endocem, Biodentine and MM-MTA were similar in biocompatibility and cytotoxicity.

KEYWORDS

biocompatibility, cell adhesion, cytotoxicity, MTA cements, root repair material

1 | INTRODUCTION

The choice of repair material is critical to successful root perforation repair or apical root-end surgery. Ideal root-repair materials should have antimicrobial affect (Gartner & Dorn, 1992), biocompatibility, effective sealing ability, moisture and solubility resistant, short setting time, adequate radiopacity, ease of handling (Lee et al., 2012; Torabinejad & Pitt Ford, 1996). Biocompatibility is a crucial factor of prognosis.

Until today several materials have been used for root perforation; amalgam, glass ionomer cements, zinc oxide-eugenol and composites. However none of these materials has ideal properties and has not been required for long-term repair process (Aqrabawi, 2000; Fernandez-Yanez Sanchez, Leco-Berrocal, & Martinez-Gonzalez, 2008). For example, amalgam has possible mercury pollution and poor esthetics. Also, composite materials shrink during polymerization and release toxic monomers (Zhou et al., 2013).

MTA stands out from the other root repair materials with its clinically successful long-term results; therefore, the application area of

MTA has increased steadily. Nowadays, MTA is one of the most widely used materials for root and furcation perforation, external and internal resorption, pulpotomy, apical sealing and dentine restoration due to its biocompatibility, antimicrobial activity, great sealing property and regenerative capacity (Chang et al., 2015; Lee et al., 2012; Zhou et al., 2013). Despite its popularity, the first MTA product, Proroot MTA, has some drawbacks, such as difficult handling, a prolonged setting time and potential discoloration of teeth or soft tissues (Chang et al., 2015; Mori, Teixeira, de Oliveira, Jacomini, & da Silva, 2014). These drawbacks have led to new product development.

In 2001, Angelus MTA (Angelus, Londrina, Brazil) was developed as an alternative to ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA). The chemical difference between them is that Angelus has calcium dihydrate as one of its components, which reduced its setting time and increased its workability (Damas, Wheeler, Bringas, & Hoehn, 2011; Gomes-Filho et al., 2009). Besides advantages, Angelus may lead to tooth discoloration in coronal area which creates esthetic problems (Keskin, Demiryurek, & Ozyurek, 2015).

TABLE 1 Composition of the tested materials

Angelus	Powder: tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalciumaluminat, calcium oxide, bismuth oxide, calcium carbonate Liquid: distilled water
Biodentine	Powder: tricalcium silicate, calcium carbonate, calcium oxide, zirconium oxide Liquid: distilled water, calcium chloride, modified polcarboxylate (Plasticising agent)
Endocem	Powder: amorphous or glassy silica, calcium hydroxide, aluminum oxide, magnesium oxide, calcium carbonate and bismuth trioxide Liquid: distilled water
MM-MTA	Powder: tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminat, bismuth oxide, calcium sulfate dihydrate, magnesium oxide, and calcium carbonate Liquid: distilled water

Biodentine (BD) (Septodont, Saint Maur de Fosses; France) has been developed as a novel tricalcium silicate-based cement. The indication of BD are similar to the other MTAs, but it has also been used as a dentine substitute. BD can induce odontoblastic differentiation (Setbon, Devaux, Iserentant, Leloup, & Leprince, 2014; Zanini, Sautier, Bernal, & Simon, 2012). The setting time of BD is reduced by adding calcium chloride (Watson, Atmeh, Sajini, Cook, & Festy, 2014) and as the difference between BD and the other cements, BD does not contain bismuth oxide for radiopacity, rather it contains zirconium oxide (Tanalp, Karapınar-Kazandağ, Dölekoğlu, & Kayahan, 2013). Another tricalcium silicate-based cement having an improved setting and handling characteristics is MicroMega MTA (MM-MTA; MicroMega Besancon, France). MM-MTA is injectable after trituration of its capsule, and, contains calcium carbonate, which purportedly reduces the setting time (Khalil, Naaman, & Camilleri, 2015; Khalil, Sarkis, & Naaman, 2013). A MTA-derived pozzolan cement, Endocem, (Maruchi, Wonjui-si, Korea) which contains fine silica particle to accelerate setting (Park et al., 2014), has been introduced. This pozzolan-based cement material is a siliceous or siliceous and aluminous material that has none or little cementitious value in itself but it reacts chemically in the presence of water with calcium hydroxide to form compounds possessing cementitious properties, which is known as the pozzolanic reaction. (Askarinejad, Pourkhorshidi, & Parhizkar, 2012) Endocem is lead to less discoloration and has short setting time compared with traditional MTA (Jang et al., 2013; Kim, Yang, Kim, & Ko, 2014).

Cytotoxic compounds from root repair materials may influence the viability of periradicular cells, cause cell death and adversely affect the clinical outcome of the treatment (Zhou et al., 2013). Biocompatibility is important for materials in contact with vital tissues. The purpose of this *in vitro* study was to compare the cytotoxicity of Angelus, BD, MM-MTA and Endocem. The null hypothesis was that all tested cements show similar results for all of the experiments.

2 | MATERIALS AND METHODS

Four root repair materials were tested: MicroMega MTA (MM-MTA), Angelus, Endocem and Biodentine (BD). Cell viability was measured by 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), and cell morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM). Table 1 lists the composition of the tested materials.

2.1 | Cell culture

L-929 mouse fibroblasts (ATCC CCLI, NCTC clone 929, mouse L cells) were used to evaluate the cytotoxic effect and cell adhesion of the tested materials. The L-929 cells were grown in T-75 flasks, and cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Biological Industries, Beit-Hamek, Israel) supplemented with 1% antibiotics (10.000 units/ml penicillin, 10mg/ml streptomisin, Biological Industries) and 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries Kibbutz Beit-Haemek, Israel).

2.2 | Test material preparation

Under aseptic conditions, MM-MTA, Angelus, Biodentine and Endocem were mixed with distilled water following the manufacturer's instructions. Seven cylindrical cement disks of each test material were moided (7 mm diameter and 2 mm thick) to the manufacturers' recommendations under aseptic conditions, then incubated at 37°C, 5%CO₂ and 100% humidity for 24 hr. Next; the samples were sterilized with ethylene oxide gas.

2.3 | XTT assay

Discs of each material were placed in individual 15 ml culture tubes containing 5 ml of DMEM and incubated for 24 hr at 37°C. After 1 day of incubation, extracts of the test materials were harvested and diluted.

Separately, the L-929 cells, at the logarithmic growth phase, were removed by trypsin-EDTA (0.25%) and incubated for 3–5 min. The cells were counted, 1×10^4 cells were seeded in six 96-well culture plates, and incubated for 24 hr to provide attachment of the cells onto the surface of the plates. After 24 hr, the culture media was exchanged for the cement's extracts. For the control group, only the growth medium was changed. The extracts were exposed for 24 hr, 3 days and 7 days for each pair of 96-well culture plates. Cell viability was determine using an XTT assay (Biological Industries, Biological Industries, Beit Haemek, Israel), according to the manufacturers' introductions; 0.1 ml of the activation solution was added to 5 ml of the XTT reagent. Fifty microliters of the reaction solution were added to each well, and then the plate was incubated for 2 hr at 37°C. The absorbance of the samples against a background control as a blank was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 450–500 nm.

2.4 | Scanning electron microscopic examination

The cell adhesion on the surface of the four materials, was examined by a scanning electron microscope. The discs of BD, MM-MTA, Angelus and Endocem were prepared under the same conditions as the XTT assay. Six discs of each test material were fabricated and placed into 24-well plates (1 disc per well). The specimens were immersed in DMEM for 48 hr. After 48 hr, the L-929 cells were seeded onto four discs of each material and incubated for 24 and 48 hr. Two specimens of each material were identified as the control group and were immersed only in DMEM.

After 24 and 48 hr of incubation, the discs were rinsed with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 hr. After fixation, the samples were washed with PBS and dehydrated with sequential concentration of ethanol (ie, in 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, and 90% ethanol for ten minutes, and three times in 100% ethanol for ten minutes each time). The dehydrated samples were dried in an incubator at 37 °C for 24 hr and then mounted on aluminum stubs using carbon tape adhesive. The specimens were sputter-coated with gold-palladium (15 nm thick) (EMI-TECH K550X Sputter Coater, Emitech Ltd., Ashford, UK) for electrical conductivity. Specimens were examined using a scanning electron microscope (SEM, Quanta-FEG 250, FEI Company, OR, USA) at an accelerating voltage of 8–10 kV. Statistical analysis was performed using the SPSS software program (SPSS 20.0, IBM, Chicago, IL, USA). To verify the normality of the data, Shapiro Wilk's normality test was used. The differences between the groups were determined by using an one- way ANOVA analysis of the variance, followed by Tukey tests. A *p* value of < .05 was considered to be statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | XTT assay

The absorbance values of cell viability test of the calcium silicate-based materials is summarized in Figure 1. Angelus displayed the lowest cell

viabilities at all-day incubations. The cell viability of Endocem was significantly higher than that of Angelus ($p < .05$) after 1 day; however, no other significant differences were observed among Angelus, BD and MM-MTA ($p > .05$).

After culturing for 3 days and 7 days, cell viability was similar among BD, Endocem and MM-MTA ($p > .05$); their cell viability was significantly higher than that of Angelus ($p < .05$). No definite relation between the incubation time and the relative cell viability in all the groups ($p > .05$).

3.2 | Scanning electron microscopic findings

The cell attachment to the surface of the test materials and cellular morphology are shown in Figure 2. All test material showed the typical structure of calcium silicate-hydrate gel on the surface of the crystals. The L-929 fibroblast cells seeded on Angelus, Endocem, BD and MM-MTA surfaces showed similar characteristics; the cells attached to the material surface displayed the typical elongated fibroblast morphology. Also, thin cytoplasmic extensions were observed and projected from cell to adjacent cells or to the surrounding surface. After 48 hr, increased numbers of attached cells were seen in contact with the test material. More cell attachment was observed on the BD surface over 24 hr than on the other materials.

4 | DISCUSSION

The negative characteristics of amalgam, composites or other similar materials have long been recognized in root repair, but MTA-type materials have superceded these because of MTA's well-known non-cytotoxic properties (Aqrabawi, 2000; Zhou et al., 2013). Unfortunately, the original MTA products have had some drawbacks; consequently, newer formulations of MTA are being developed to overcome these disadvantages. This study demonstrated that newer MTAs have

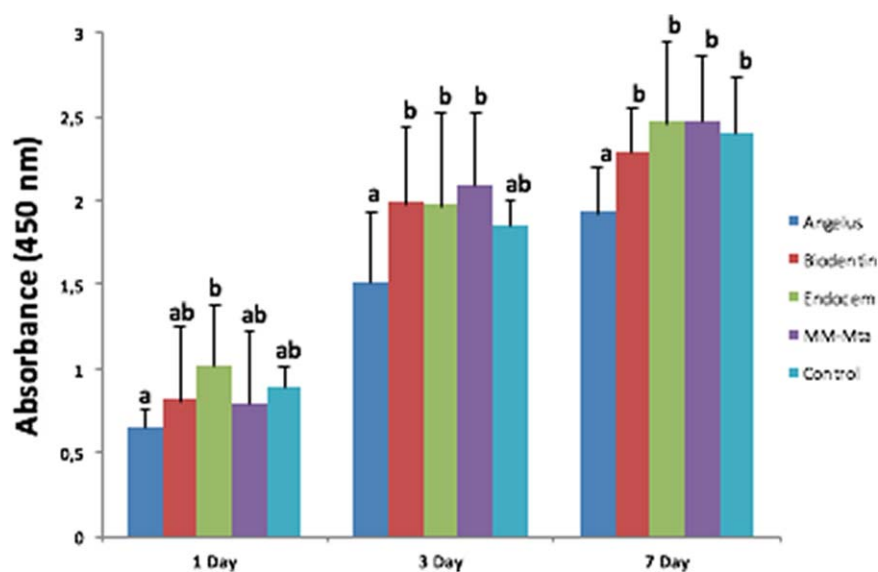


FIGURE 1 XTT absorbance values of groups (Different letters indicate statistical difference with the other group at the same experimental time) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

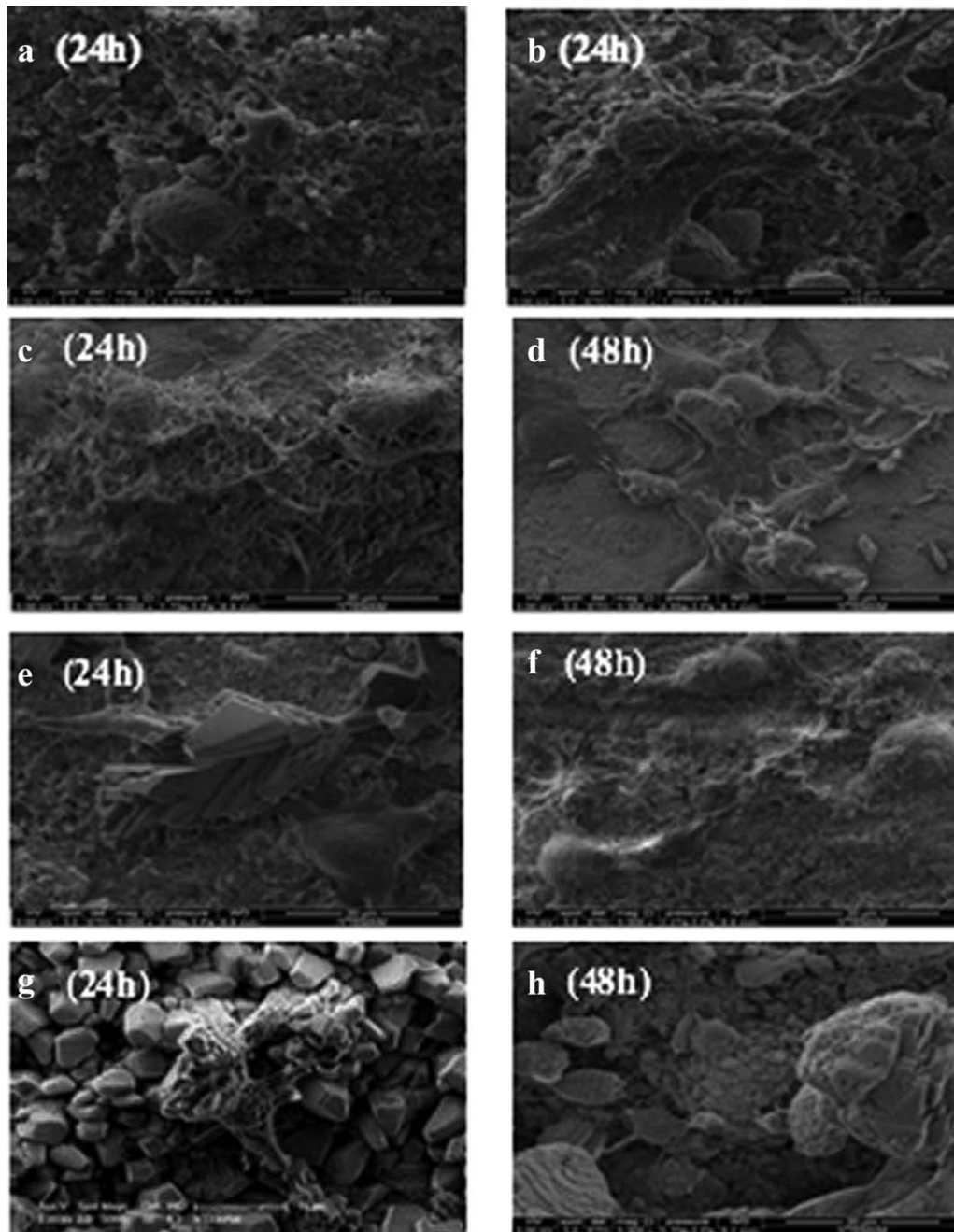


FIGURE 2 Scanning electron micrographs of cells attached on the surface of Angelus (A-B) Biodentine (C-D), Endocem (E-F), MM-MTA (G-H) after 24 hr (A,C,E and G) and 48 hr (B,D,F and H) incubation

more favorable result on cell viability than Angelus. Thus, we experimentally rejected our null hypothesis.

This study evaluated cell viability and cell morphology in cultured mouse fibroblast cells (L-929) in contact with four root repair materials. L-929 cell line is one of the mostly used established continuous cell line for investigating cytotoxicity because of rapid and easy growth. (Schweikl & Schmalz, 1996) Root repair materials are in direct contact with fibroblast-rich tissues such as periodontal ligaments and connective tissues; hence a fibroblast cell line was used to assess the cytotoxicity. Gingival fibroblast also could be used for evaluation but it was not preferred because standardized cell line has the advantage of

reproducibility of results and also has been recommended by ISO to detect biological responses to materials (Mozayeni, Milani, Marvasti, & Asgary, 2012; Schweikl & Schmalz, 1996). When comparing the four root repair materials for relative cell viability, the results of the assay show that for 1, 3, and 7 days of culturing, MM-MTA and BD had similar biocompatibility. This result can be compared with previous results published by Margunato et al. (Margunato, Tasli, Aydin, Karapinar Kazandag, & Sahin, 2015) which found that cell viability of MM-MTA and BD for 1, 3, 7, and 14 days were equal.

On the first day results of XTT, only Endocem had significantly higher cell survival than Angelus. In addition, BD and MM-MTA were

not found statistically different from either Endocem or Angelus. The first possible explanation of this result is that, Endocem has no any chemical accelerator (Choi et al., 2013; Setbon et al., 2014). The constituents of dental materials play a critical role in assessing their interactions with living cells, as well as with the microenvironment. Also, the small particle size of Endocem increases the surface contact of the particles while mixing with sterilized water, resulting in fast setting. Endocem is a faster setting (4 min) (Choi et al., 2013) cement might be more resistant to washout when compared with the other tricalcium silicate based cements. Choi et al. (Choi et al., 2013), evaluated Endocem washout and found that the degree of washout for MTA was significantly higher than that for Endocem. The rapid setting of Endocem enhances its washout resistance, and it may decrease its release of ions. Another difference between Endocem and the other cements' ingredient is the amount of calcium carbonate. While all materials in this study have different amounts of calcium carbonate, Endocem contains about 40% (major component) calcium carbonate as the highest material (Camilleri, 2014). This excess calcium carbonate indicates that the material is pozzolanic. Calcium carbonate was demonstrated to play an active role in the hydration reaction by acting as nucleation sites, thereby accelerating the setting kinetics. This element is commonly used as filler in polymer science, and is known to increase mechanical properties (Zulfli, Bakar, & Chow, 2014). The presence of calcium carbonate may enhanced mechanical strength, decreased the solubility and it may cause less ion release into the medium. Calcium carbonate also reduces the duration of the induction period. As a consequence of a short induction period, the initial setting time of the material is expected to be less. But this property was not considered to contribute to biocompatibility because already set cements were used in this study.

At 3 and 7 days, the incubation results showed that the cell viabilities of MM-MTA, BD and Endocem were similar, and Angelus was less biocompatible than the other three cements. This result might be explained with the particle size and distribution of the MTA powder. About Angelus, the median particle sizes are below 10 μm , but contains many particles more coarser than 40 μm , up to 100 μm . Komabayashi et al. reported that Angelus particles had relatively wide size distribution and were less homogeneous than ProRoot MTA (Komabayashi & Spångberg, 2008). In another study Song et al. (Song, Mante, Romanow, & Kim, 2006) reported in a chemical composition comparison study that ProRoot MTA appeared to have more homogeneous chemical composition than Portland cement and gray MTA Angelus. The potential influence of particle size and shape might increase in surface area and hence the potential increase in the reactivity of the dicalcium and tricalcium silicate particles to form and calcium silicate hydrate phases and calcium hydroxide. There is speculation about the potential influence of particle size on porosity reduction, ettringite formation, and reduction in liquid to powder ratio. It is also necessary to maintain the biologic qualities of MTA in regards to particle size and shape characterization. Also, the observed lower cell viability in Angelus might be explained as being due to the high calcium hydroxide in Angelus. The release of hydroxyl ion and high alkalinity may decrease cell

viability in *in vitro* conditions. Also, some researchers found that a large amount of heavy metals such as arsenic, aluminum and bismuth in samples of Angelus (De-Deus et al., 2009; Setbon et al., 2014).

Scanning electron microscope images obtains valuable information for determining on cell morphology and the material-cell interactions (Nuñez, Bosomworth, Field, Whitworth, & Valentine, 2014). Cells had a normal morphology and were growing in contact with the four materials. In SEM examinations, cell contact with BD showed increased cell attachment after 24 hr, compared to the other materials. This effect could be explained by the difference of radiopacifiers between BD and the other cements. For Angelus, Endocem and MM-MTA, the radiopacifier is bismuth oxide, whereas for BD, it is zirconium oxide (Jang et al., 2014; Nuñez et al., 2014; Setbon et al., 2014). Zirconium oxide had a noncytotoxic effect on human differentiated cells and mouse fibroblast cells (Dion et al., 1994).

A limitation of the present study is the use of set cements, not freshly mixed, unset material for cytotoxicity assessment. *In vivo*, freshly mixed cements are used and are probably more toxic to vital tissues than set ones. Song et al. (Song, Yoon, Kim, & Kim, 2014) reported that cells which in direct contact with the fresh mixed Endocem showed round shape with low density since the plating, which means the cytotoxicity. This could be explained by heat of the cement surface and a high pH that were produced at the initial mixing. Further investigations are recommended to evaluate the relationship between freshly mixed tricalcium silicate-based materials and their cytotoxicity.

Overall, this study is the first one in literature to report the cell viability and cell attachment of Endocem, MM-MTA, BD and Angelus at the same time. The findings of this study suggest that new repair materials that have been developed by adding different components or changing the compound's sizes, have more favorable results than Angelus.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant 2013-1-TCSP-24 from the Scientific Research Project in Katip Celebi University, Izmir, Turkey.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

- Aqrabawi, J. (2000). Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. *British Dental Journal*, 188(5), 266–268.
- Askarinejad, A., Pourkhorshidi, A. R., & Parhizkar, T. (2012). Evaluation the pozzolanic reactivity of sonochemically fabricated nano natural pozzolan. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(1), 119–124.
- Camilleri, J. (2014). *Mineral trioxide aggregate in dentistry*. Springer.
- Chang, S. W., Bae, W. J., Yi, J. K., Lee, S., Lee, D. W., Kum, K. Y., & Kim, E. C. (2015). Odontoblastic differentiation, inflammatory response, and angiogenic potential of 4 calcium silicate-based cements: Micro-mega MTA, ProRoot MTA, RetroMTA, and experimental calcium silicate cement. *Journal of Endodontics*, 41(9), 1524–1529.

- Choi, Y., Park, S.-J., Lee, S.-H., Hwang, Y.-C., Yu, M.-K., & Min, K.-S. (2013). Biological effects and washout resistance of a newly developed fast-setting pozzolan cement. *Journal of Endodontics*, 39(4), 467–472.
- Damas, B. A., Wheeler, M. A., Bringas, J. S., & Hoen, M. M. (2011). Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bio-ceramic root repair materials. *Journal of Endodontics*, 37(3), 372–375.
- De-Deus, G., de Souza, M. C. B., Fidel, R. A. S., Fidel, S. R., de Campos, R. C., & Luna, A. S. (2009). Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 35(6), 887–890.
- Dion, I., Bordenave, L., Lefebvre, F., Bareille, R., Baquey, C., Monties, J.-R., & Havlik, P. (1994). Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(1), 18–24.
- Fernandez-Yanez Sanchez, A., Leco-Berrocal, M. I., & Martinez-Gonzalez, J. M. (2008). Metaanalysis of filler materials in periapical surgery. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 13(3), E180–E185.
- Gartner, A. H., & Dorn, S. O. (1992). Advances in endodontic surgery. *Dental Clinics of North America*, 36(2), 357–378.
- Gomes-Filho, J. E., Rodrigues, G., Watanabe, S., Bernabé, P. F. E., Lodi, C. S., Gomes, A. C., ... Moraes, J. C. S. (2009). Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1377–1380.
- Jang, J.-H., Kang, M., Ahn, S., Kim, S., Kim, W., Kim, Y., & Kim, E. (2013). Tooth discoloration after the use of new pozzolan cement (Endocem) and mineral trioxide aggregate and the effects of internal bleaching. *Journal of Endodontics*, 39(12), 1598–1602.
- Jang, Y.-E., Lee, B.-N., Koh, J.-T., Park, Y.-J., Joo, N.-E., Chang, H.-S., ... Hwang, Y.-C. (2014). Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 39(2), 89–94.
- Keskin, C., Demiryurek, E. O., & Ozyurek, T. (2015). Color stabilities of calcium silicate-based materials in contact with different irrigation solutions. *Journal of Endodontics*, 41(3), 409–411.
- Khalil, I., Naaman, A., & Camilleri, J. (2015). Investigation of a novel mechanically mixed mineral trioxide aggregate (MM-MTA®). *International Endodontic Journal*, 48(8), 757–767.
- Khalil, I. T., Sarkis, T., & Naaman, A. (2013). MM-MTA for direct pulp capping: A histologic comparison with ProRoot MTA in rat molars. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 14(6), 1019–1023.
- Kim, M., Yang, W., Kim, H., & Ko, H. (2014). Comparison of the biological properties of ProRoot MTA, OrthoMTA, and Endocem MTA cements. *Journal of Endodontics*, 40(10), 1649–1653.
- Komabayashi, T., & Spångberg, L. S. (2008). Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *Journal of Endodontics*, 34(1), 94–98.
- Lee, B. N., Son, H. J., Noh, H. J., Koh, J. T., Chang, H. S., Hwang, I. N., ... Oh, W. M. (2012). Cytotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. *Journal of Endodontics*, 38(12), 1627–1630.
- Margunato, S., Tasli, P. N., Aydin, S., Karapinar Kazandag, M., & Sahin, F. (2015). In vitro evaluation of ProRoot MTA, biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization. *Journal of Endodontics*, 41(10), 1646–1652.
- Mori, G. G., Teixeira, L. M., de Oliveira, D. L., Jacomini, L. M., & da Silva, S. R. (2014). Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *Journal of Endodontics*, 40(9), 1485–1488.
- Mozayani, M. A., Milani, A. S., Marvasti, L. A., & Asgary, S. (2012). Cytotoxicity of calcium enriched mixture cement compared with mineral trioxide aggregate and intermediate restorative material. *Australian Endodontic Journal*, 38(2), 70–75.
- Nuñez, C. M. C., Bosomworth, H. J., Field, C., Whitworth, J. M., & Valentine, R. A. (2014). Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *Journal of Endodontics*, 40(3), 406–411.
- Park, S. J., Heo, S. M., Hong, S. O., Hwang, Y. C., Lee, K. W., & Min, K. S. (2014). Odontogenic effect of a fast-setting pozzolan-based pulp capping material. *Journal of Endodontics*, 40(8), 1124–1131.
- Schweikl, H., & Schmalz, G. (1996). Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *European Journal of Oral Sciences*, 104(3), 292–299.
- Setbon, H., Devaux, J., Iserentant, A., Leloup, G., & Leprince, J. (2014). Influence of composition on setting kinetics of new injectable and/or fast setting tricalcium silicate cements. *Dental Materials*, 30(12), 1291–1303.
- Song, J.-S., Mante, F. K., Romanow, W. J., & Kim, S. (2006). Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 102(6), 809–815.
- Song, M., Yoon, T. S., Kim, S. Y., & Kim, E. (2014). Cytotoxicity of newly developed pozzolan cement and other root-end filling materials on human periodontal ligament cell. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 39(1), 39–44.
- Tanalp, J., Karapinar-Kazandag, M., Dölekoğlu, S., & Kayahan, M. B. (2013). Comparison of the radiopacities of different root-end filling and repair materials. *The Scientific World Journal*, 2013;23:594950.
- Torabinejad, M., & Pitt Ford, T. R. (1996). Root end filling materials: a review. *Endodontics & Dental Traumatology*, 12(4), 161–178.
- Watson, T. F., Atmeh, A. R., Sajini, S., Cook, R. J., & Festy, F. (2014). Present and future of glass-ionomers and calcium-silicate cements as bioactive materials in dentistry: biophotonics-based interfacial analyses in health and disease. *Dental Materials*, 30(1), 50–61.
- Zanini, M., Sautier, J. M., Berdal, A., & Simon, S. (2012). Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *Journal of Endodontics*, 38(9), 1220–1226.
- Zhou, H. M., Shen, Y., Wang, Z. J., Li, L., Zheng, Y. F., Hakkinen, L., & Haapasalo, M. (2013). In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *Journal of Endodontics*, 39(4), 478–483.
- Zulfli, N. M., Bakar, A. A., & Chow, W. (2014). Mechanical and thermal properties improvement of nano calcium carbonate-filled epoxy/glass fiber composite laminates. *High Performance Polymers*, 26(2), 223–229.

How to cite this article: Köseoğlu S, Pekbağrıyanık T, Kucukyilmaz E, Sağlam M, Enhos Ş, Akgün A. Biological response of commercially available different tricalcium silicate-based cements and pozzolan cement. *Microsc Res Tech*. 2017; 00:1–7. <https://doi.org/10.1002/jemt.22891>