



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ GEBE SIÇAN  
MODELİNDE EMBRİYO-ENDOMETRİYUM İLİŞKİSİNDE  
DİYABETE BAĞLI DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Semih TAN**

**Ağustos 2021  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ GEBE SIÇAN  
MODELİNDE EMBRİYO-ENDOMETRİYUM İLİŞKİSİNDE  
DİYABETE BAĞLI DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

**Semih TAN**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Denizli, 2021

## Yayın Beyan 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 yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metinleri ekte sunulmuştur):

Çil N, Yaka M, Ünal MS, Dodurga Y, **Tan S**, Seçme M, Karagür ER, Mete GA. Adipose derived mesenchymal stem cell treatment in experimental asherman syndrome induced rats. *Molecular Biology Reports* (2020) 47:4541–4552.

Tokgun O, Karakas DE, **Tan S**, Karagür ER, İnal B, Akca H, Durap F, Baysal A, Aydemir M. Novel ruthenium and palladium complexes as potential anticancer molecules on SCLC and NSCLC cell lines. *Chemical Papers* (2020) 74:2883–2892

Karabulut A, Simavlı SA, Abban GM, Akyer ŞP, Keskin N, **Tan S**, Şahin B. Tissue reaction to urogynecologic meshes: effect of steroid soaking in two different mesh models. *Int Urogynecol J* 27, 1583–1589 (2016).

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.

İmza :  
Öğrenci Adı Soyadı : Semih TAN

**ÖZET****DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ GEBE SIÇAN  
MODELİNDE EMBRİYO-ENDOMETRİYUM İLİŞKİSİNDE  
DİYABETE BAĞLI DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Semih TAN

Doktora Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Ağustos 2021, 103 sayfa

Diyabet, gebeliğin en sık görülen tıbbi komplikasyonudur, fetüs ve anne için önemli bir risk taşır. Konjenital malformasyonlar ve perinatal morbidite, diyabetik olmayan gebeliklerin çocuklarına kıyasla yaygın bir şekilde görülmektedir. Bu çalışma diyabetin gebeliğin erken dönemindeki etkilerinin ortaya koyulmasına, geliştirilecek yeni tanı ve tedavi yollarına ışık tutacaktır.

Çalışmamızda, diyabetin, implantasyon başarısı açısından önemli olduğu bilinen matriks metalloproteazlar (MMP) ve doku inhibitörlerine (Timp) etkisinin araştırılmasını ve diyabetik gebelik sırasında endometriyum ile embriyo arasında değişen moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulmasını amaçladık.

Çalışmamızda streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik gebe sıçan modeli oluşturuldu. Diyabetin implantasyon (gebeliğin 6,5. günü) ve post implantasyon (gebeliğin 8,5. günü) evrelerindeki etkisi, non diyabetik kontrol gruplarıyla kıyaslanarak gösterildi. İmplantasyon ve post implantasyon sırasında konseptus ile birlikte çıkarılan uterus dokularından total RNA izolasyonu yapılarak mikrodizin analizi ve ardından gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile ifade değişimi olan gen bölgeleri saptanmıştır. Daha sonra MMP'lerin ve doku inhibitörlerinin etkisi, gen düzeyindeki değişimlerine ek olarak eliza ve immünohistokimyasal analiz yöntemleri ile protein ekspresyonu düzeyinde de araştırıldı.

Diyabetin, gebeliğin 6,5. gününde MMP3, MMP9 ve MMP20 ifadelerinin artışına; 8,5. gününde ise MMP3, MMP9 ve MMP11 ifadelerinin azalmasına neden olduğu gösterildi. Tim1 ifadesinin yalnızca gebeliğin 8,5. gününde kontrole kıyasla azaldığı görüldü. Diğer Timp ifadeleri açısından gruplar arası anlamlı bir fark bulunamadı. Kegg yolak analizleri ile diyabetin cAMP, kalsiyum, BMP, p53, MAPK, PI3K-Akt, Jak-STAT, Hippo, Wnt ve TNF sinyal yolları ile ilişkili genlerin ifadesini değiştirdiği gösterildi. Ayrıca genotoloji analizleri ile de membran yapılarında, ekstraselüler matrikste, sinyal yollarında, iyon bağlanmasında, protein bağlanmasında, hücre adezyon moleküllerinin bağlanmasında ve reseptör ligand aktivitesinde değişim olduğu ortaya koyuldu.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, Gebelik, İmplantasyon, Matriks metalloproteazlar, cAMP, kalsiyum, BMP, p53, MAPK, PI3K-Akt, Jak-STAT, Hippo, Wnt, TNF

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 2019SABE004) tarafından desteklenmiştir.**

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF DIABETES-RELATED CHANGES IN EMBRYO-ENDOMETRIUM CROSSTALK ON EXPERIMENTAL DIABETES INDUCED RAT PREGNANCY MODEL**

Semih TAN

PhD Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

August 2021, 103 pages

Diabetes is the most common medical complication of pregnancy and carries a significant risk to the fetus and mother. Congenital malformations and perinatal morbidity are common in children of nondiabetic pregnancies. This study will shed light on new diagnosis and treatment methods to be developed by revealing the effects of diabetes in the early stages of pregnancy.

We aimed to investigate the effects of diabetes on matrix metalloproteases (MMP) and tissue inhibitors (Timp), which are known to be important for implantation success, and to clarify the molecular mechanisms that change between the endometrium and the embryo during diabetic pregnancy.

In this study, streptozotocin-induced diabetic pregnant rat model was established. The effect of diabetes on implantation and post-implantation stages was demonstrated by comparing non-diabetic control groups. Total RNA was isolated from the uterine tissues removed together with the conceptus during implantation and post-implantation, and gene regions with expression changes were determined by microarray analysis followed by real-time-polymerase chain reaction (GZ-PCR). Then, the effects of MMPs and tissue inhibitors were investigated at the level of protein expression by eliza and immunohistochemical analysis methods, in addition to their changes at the gene level.

Diabetes caused upregulation of MMP3, MMP9 and MMP20 on the 6.5. day of pregnancy and downregulation of MMP3, MMP9 and MMP11 on the 8.5. day of pregnancy. Tim1 expression was downregulated on the day 8.5 compared to the control. No significant difference was found between the groups in terms of other Timp expressions. Kegg pathway analyzes showed that diabetes alters the expression of genes associated with cAMP, calcium, BMP, p53, MAPK, PI3K-Akt, Jak-STAT, Hippo, Wnt and TNF signaling pathways. In addition, genontology analyzes revealed changes in membrane structures, extracellular matrix, signaling pathways, ion binding, protein binding, binding of cell adhesion molecules and receptor ligand activity.

**Keywords:** Diabetes, Pregnancy, Implantation, Matrix metalloproteases, cAMP, calcium, BMP, p53, MAPK, PI3K-Akt, Jak-STAT, Hippo, Wnt, TNF

**This study was supported by PAU Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 2019SABE004).**

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren, ihtiyaç duyduğum her anda desteğini hissettiğim tez danışman hocam Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde genetik alanındaki çalışmalarına yön vermemde ve uygulamamda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Dr. Öğr. Üy. Onur TOKGÜN'e ve Dr. Elvan TOKGÜN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın genetik analizlerinde araştırma laboratuvarı imkanlarından faydalandığım Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya teşekkür ederim.

Eğitim, öğretim ve akademik hayatım sırasında desteklerini benden esirgemeyen hocalarım, Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE, Prof. Dr. Hülya ÇETİN SORKUN, Prof. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ, Prof. Dr. Recep KUTLUBAY ve Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a tüm bilimsel katkı ve destekleri için teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olduğu gibi, tez çalışmalarımda da beni destekleyen eşim Seçil TAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında desteklerini benden hiç esirgemeyen ve beni bu günlere getiren canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Doktora tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Tezin Amacı .....	3
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1. Diyabetik Gebelik Sonrası Fetal, Neonatal ve Obstetrik Komplikasyonlar .....	4
2.2. Sıçan ve İnsan Gebelik Sürecinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi .....	5
2.2.1. Plasental organizasyon .....	7
2.2.1.1. İnsan plasental organizasyonu .....	8
2.2.1.2. Rodent plasental organizasyonu .....	9
2.2.2. Trofoblast farklılaşması .....	13
2.2.3. İntrauterin trofoblast migrasyonu .....	15
2.3. İmplantasyon Sürecinde Etkili Moleküler Mekanizmalar .....	17
2.3.1. Enerji homeostazı ve AMPK sinyal ağı .....	20
2.3.2. İmplantasyonda görev alan matriks metalloproteazlar ve doku inhibitörlerinin etkisi .....	22
2.4. Hipotezler .....	23
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>24</b>
3.1. Çalışma Grubu .....	24
3.2. Diyabet Modelinin Oluşturulması .....	24
3.3. Sıçanlarda Gebeliğin Oluşturulması .....	25
3.4. İmplant Embriyolar ile Birlikte Uterus Dokularının Alınması .....	26
3.5. Dolaşımdaki MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Tayini İçin Kan Alınması .....	27
3.6. Formaldehit Fiksasyonu ve Doku Takibi Protokolü .....	27
3.7. İmmunohistokimyasal işaretleme .....	28
3.8. Dokulardaki MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 Tayini .....	30
3.9. Dolaşımdaki MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 Tayini .....	30
3.10. Total RNA İzolasyonu .....	30
3.11. Total RNA'nın cDNA'ya Çevrimi .....	31



3.12. mRNA mikrodizin Analizi.....	32
3.12.1. Mikrodizin Sonuçlarının Analizi .....	33
3.13. GZ-PZR ile Ekspresyon Analizi.....	34
3.14. İstatistiksel Analiz.....	36
<b>4.BULGULAR .....</b>	<b>38</b>
4.1. Histolojik Değerlendirme .....	38
4.1.1 İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	40
4.2. Dokulardaki ve Dolaşımdaki MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Tayini .....	45
4.3. Mikrodizin mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları .....	48
4.4. GZ-PZR Ekspresyon Analizi Bulguları .....	59
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>73</b>
<b>7.KAYNAKLAR .....</b>	<b>75</b>
<b>8.ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>89</b>
<b>9. EKLER .....</b>	<b>90</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>91</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> Trofoblast hücrelerinde parakrin faktörler tarafından aktive edilen sinyal yolları (Modi vd 2012).....	18
Şekil 2.2 PI3K/AKT sinyal yolağı(WEB_1).....	19
<b>Şekil 2.3</b> mTORC1 ve mTORC2 yolağı (Wang vd 2012) .....	21
<b>Şekil 2.4</b> mTOR, AKT ve AMPK ilişkisi (Zeng vd 2010) .....	21
<b>Şekil 3.1</b> İmlante olan konseptuslar ile birlikte çıkarılmış uterus dokusu. A) İmlantasyon grubu (6.5 gün) B) Post implantasyon grubu (8.5. gün).....	26
<b>Şekil 4.1</b> İmlantasyon grubu embriyo kesiti. 100x büyütme, H-E Boyama.....	39
<b>Şekil 4.2</b> Post-implantasyon grubu embriyo kesiti. 100x büyütme, H-E Boyama .....	39
<b>Şekil 4.3</b> Uterus kesitleri 40x büyütme. H-E Boyama A) Non-diyabetik implantasyon B) Diyabetik implantasyon C) Non-diyabetik post-implantasyon D) Diyabetik post-implantasyon grupları .....	40
<b>Şekil 4.4</b> MMP2 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (İmlantasyon grubu fotoları 100x büyütme. Post-implantasyon grubu fotoları 40x büyütme. DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama) .....	41
<b>Şekil 4.5</b> MMP9 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (İmlantasyon grubu fotoları 40x büyütme. Post-implantasyon grubu fotoları 100x büyütme. DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama) .....	42
<b>Şekil 4.6</b> Timp1 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (100x büyütme, DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama).....	43
<b>Şekil 4.7</b> Timp2 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (100x büyütme, DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama).....	44
<b>Şekil 4.8</b> MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Serum Konsantrasyon Grafiği (N6: Non-diyabetik 6,5. gün, N8: non-diyabetik 8,5. gün, D6: Diyabetik 6,5. gün, D8: Diyabetik 8,5.gün) .....	46
<b>Şekil 4.9</b> MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Doku Konsantrasyon Grafiği (N6: Non-diyabetik 6,5. gün, N8: non-diyabetik 8,5. gün, D6: Diyabetik 6,5. gün, D8: Diyabetik 8,5.gün) .....	46
<b>Şekil 4.10</b> Pearson'un korelasyon etkinliği tablosu .....	48
<b>Şekil 4.11</b> mRNA örneklerinin normalize edilmiş değerden yapılan karşılık gelen örnek ifadesinin dağılımını gösteren yoğunluk grafiği .....	49
<b>Şekil 4.12</b> Gen ontoloji analizi biyolojik süreçler şeması .....	52
<b>Şekil 4.13</b> Gen ontoloji analizi değişen moleküler fonksiyon şeması.....	53
<b>Şekil 4.14</b> Gen ontoloji analizi değişen hücresel bileşenler şeması .....	54

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1</b> Diyabetik gebelik sonrası doğan çocuklarda sık görülen konjenital anomaliler (Mihmanlı ve Mihmanlı 2015).....	4
<b>Tablo 3.1</b> Deney grupları: Yapılan analizlere göre kullanılan sıçan ve emriyo sayıları dağılımı.....	27
<b>Tablo 3.2</b> cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları .....	32
<b>Tablo 3.3</b> GZ-PZR koşulları .....	34
<b>Tablo 3.4</b> GZ-PZR Primerleri.....	35
<b>Tablo 4.1</b> İmmunreaktivite skoru tablosu (ND: Non-diyabetik, D: Diyabetik). .....	45
<b>Tablo 4.2</b> MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2'nin doku ve serum konsantrasyon verileri istatistik sonuçları (N6: Non-diyabetik 6,5. gün, N8: non-diyabetik 8,5. gün, D6: Diyabetik 6,5. gün, D8: Diyabetik 8,5.gün, SH: Standart hata, SD: Serbestlik derecesi) .....	47
<b>Tablo 4.3</b> Mikrodizin analizinde deney gruplarında regülasyonu ortak olan genler ve kat değişimleri (D6: İmplantasyon grubu, D8: Post-implantasyon grubu) .....	50
<b>Tablo 4.4</b> İmplantasyon grubu değişen gen ifadeleri kegg yolak analizi sonuçları tablosu (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH, Functional Annotation Clustering/Kegg pathway).....	55
<b>Tablo 4.5</b> Post-implantasyon grubu değişen gen ifadeleri kegg yolak analizi sonuçları tablosu (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH, Functional Annotation Clustering/Kegg pathway).....	56
<b>Tablo 4.6</b> Mikrodizin analizinde deney gruplarında regülasyonu ortak olan genlerin ilişkili olduğu mekanizmalar.....	57
<b>Tablo 4.7</b> GZ-PZR analizi istatistik sonuçları .....	59

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

DM	Diyabetes Mellitus
MMP	Matriks metalloproteaz
Timp	Matriks metalloproteaz doku inhibitörü
STZ	Streptozotosin
ESM	Ekstraselüler matriks
EVT	Ekstravillöz trofoblast
ENT	Endovasküler trofoblast
uNK	Uterusun doğal öldürücü hücreleri
GO	Gen ontoloji
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
TKH	Trofoblast kök hücreleri
FEF	Fare embriyonik fibroblastları
D8	Diyabetik post-implantasyon grubu
D6	Diyabetik implantasyon grubu
N8	Non-diyabetik post-implantasyon grubu
N6	Non-diyabetik implantasyon grubu
KGD	Kan glukoz değeri
PMSG	Gebe kısarak serum hormonu
hCG	İnsan koriyonik gonadotropin
GZ-PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
GDM	Gestasyonel diyabet
EGF	Epidermal büyüme faktörü
cAMP	Siklik anedozin mono fostat
BMP	Kemik morgenik proteini
TP53	Tümör protein 53
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
PI3K-AKT	Fosfotidilinozitol 3 kinaz-Serin treonin kinaz
JAK-STAT	Janus kinaz/sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon
TNF	Tümör nekroz faktörü

## 1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), endojen insülinin mutlak ya da göreceli eksikliği veya periferik etkisizliği durumuna bağlı olarak karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış arteriosklerozisin görüldüğü endokrin bir hastalıktır. Diyabet insidansı, dünya çapında doğurganlık çağındaki kadınlar arasında artmaktadır. Toplumdaki yaygınlığına paralel olarak gebeliklerin %1-14'ünde gestasyonel diyabet, %0,5'inde de pregestasyonel diyabet görülmektedir. Klinik ve deneysel kanıtlar, gebeliğin başlangıcından itibaren zayıf bir şekilde kontrol edilen maternal diyabetin fetal gelişim üzerindeki etkilerinden kaynaklanan, büyüme gecikmesi, abortus, ölü doğum, makrozomi ve konjenital malformasyonlar gibi komplikasyonları içerir. Önceden var olan diyabet, hipoglisemi, gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi, erken doğum ve sezaryen doğum gibi maternal komplikasyonların yanı sıra diğer komorbiditelerin de insidansında artışa neden olur (Coustan 2000, Falls ve Milio 2002, Kalın 2008).

Maternal diyabetin yavrular üzerindeki zararlı etkilerinden sorumlu olan mekanizmaları araştıran insan çalışmaları, kısmi ve sınırlıdır. Bu sınırlamalar kısmen, insanlarda uterus içi ortamı değiştiren değişkenleri kontrol etmenin veya bunların embriyofetal gelişimin çeşitli yönleri üzerindeki etkilerini analiz etmenin mümkün olmadığı içindir. Sıçan, aşağıdaki nedenlerle konuyu ele almak için tercih edilen biyolojik modeldir: 1) diyabet, düzenlenmiş bir şekilde indüklenebilir; 2) embriyonik, anatomik ve fizyolojik özellikleri insanlarınkine benzerdir; 3) yaşam döngüleri ve gebelik dönemleri nispeten kısadır (Jawebaum ve White 2010, Seki vd 2012). Pregestasyonel diyabetin kemirgen modelleri genellikle kadınlarda diyabeti indüklemek için streptozotosin (STZ) gibi diyabetojenik ajanlar kullanılarak geliştirilir. Tek bir yüksek doz STZ enjeksiyonu ile indüklenecek diyabetin, tip 1 diyabete benzer şekilde şiddetli hiperglisemiye yol açtığı daha önce gösterilmiştir (Islas-Andrade vd 2000, Treviño-Alanís 2009). Diyabetin fare

modelleri, diyabetin etiyolojisi ve ilerlemesinin anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Bu modeller, hastalığın gelişimini, yerleşmesini ve komplikasyonlarını etkileyebilecek genetik ve çevresel faktörlerin kontrolüne izin verir. Deneysel diyabet modellerinde, gecikmiş oosit olgunlaşması, metabolik süreçlerin ve oositlerdeki epigenetik kodun bozulması, azalmış ovulasyon oranları, bozulmuş implantasyon, zayıf embriyo ve fetus gelişimi olmak üzere birden fazla dışı üreme probleminin varlığını gösteren çok sayıda kanıt vardır (Christie 1964, Eriksson vd 1980, Mulay ve Solomon 1983, Uriu-Hare vd 1985, Rodriguez vd 1998, Amri vd 1999, Eriksson vd 2000, Damasceno vd 2004, Kiss vd 2009, Marcela vd 2012, Yang vd 2012, Salazar vd 2015). Bu raporlar, gebelik öncesi diyabetin oogenez, kadın doğurganlığı ve gebelik sonucu üzerinde etkileri olduğu varsayımını desteklemektedir.

MMP'lerin ve MMP doku inhibitörlerinin (Timp) arasındaki fizyolojik dengenin bozulmasının bilinen sebeplerinden biri de diyabettir. Mevcut kanıtlar, MMP'ler ve bunların endojen inhibitörlerini, diyabetik mikrovasküler komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendiren çeşitli yollar göstermektedir (Egan vd 2020). Diyabetik nefropatide, değişen MMP ekspresyonu, proteinüri ve böbrek yetmezliğine yol açan hücre dışı matriks birikmesine ve glomerüler hipertrofiye katkıda bulunur. Diyabetik kardiyomiyopatide, MMP'ler kollajen ve elastin bakımından miyokardiyal yeniden yapılanmaya katılırlar. Diyabetik periferik arter hastalığının gelişimine, MMP'lerin aktivitesinin neden olduğu bozulmuş anjiyogenez aracılık eder. Deneysel veriler, diyabette MMP'lerin, beyin dolaşımındaki ve inmedeki rolünü desteklemektedir. Artan MMP oranı diyabetik yara iyileşmesine olumsuz etkide bulunabilir. Diyabetik mikroanjyopatinin oluşması ve ilerlemesinde, erken evre retinopatide MMP-2, MMP-9, MMP-14 ekspresyonunda artış olduğu kabul edilmektedir (Giebel vd 2005, Erman 2012). Retinal hücrelerdeki MMP-9 oluşumunun yüksek serum glukozuna yanıt olarak arttığı gösterilmiştir. Daha sonra bu durum bazal membran proteinlerinin proteolitik degradasyonunu içeren bir mekanizma ile vasküler permeabilitenin artışına yol açmaktadır. Bazal membrandaki sıkı bağlantı kompleksinin bozulması ve perisitlerin selektif apoptozu kapiller mikroanevrizmatik dilatasyonlara neden olmaktadır. Bu koşullar sonucunda bozulan mikrosirkülasyon retinadaki iskemik alanların oluşmasına neden olmaktadır. Diyabetik nefropatinin doğal seyri tip 1 diyabetik hastalarda çok daha kolay ve net bir şekilde incelenir; çünkü tip 2 diyabetiklerde renal patolojiye katkıda bulunan çok sayıda diğer faktör (hipertansiyon, ateroskleroz, obesite) sıklıkla söz konusu olabilir. Literatürdeki veriler, diyabetik hastalardaki gebelik kayıplarının MMP/Timp ekspresyonu değişimi ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir (Jacqueminet vd 2006, Erman 2012).

Diyabet durumunda bozulan insülin metabolizması ve buna bağlı değişen vücut enerji homeostazı embriyo ve endometriyum arasındaki moleküler sinyallerin bozulmasına yol açmaktadır. Bu gerekçe ile tez projesinde diyabetik gebelik modeli oluşturularak mikrodizin analizi ile değişen gen ekspresyon değişimleri saptanmıştır. Değiştiği gözlenen gen ekspresyonlarının GZ-PZR tekniği ile validasyonları yapılmıştır. Gen ekspresyonu düzeyinde değişimi gözlenen matriks metalloproteazlar ve doku inhibitörlerinin protein ekspresyonu düzeyindeki değişimleri eliza yöntemi ile saptanmış olup, dokudaki lokalizasyonları ve semi-kantitatif ekspresyon değişimleri immünohistokimyasal analiz ile gösterilmiştir.

### **1.1.Tezin Amacı**

Bu doktora tezinin amacı, embriyo implantasyonu ve gelişimi sırasında diyabete bağlı olarak değişen gen ekspresyonlarının ve diyabet hastalarında görülen gebelik kayıplarının olası etki mekanizmalarından olabileceğini düşündüğümüz MMP ve doku inhibitörlerinin seviyelerinin, implantasyon sırası ve sonrasında dönemsel olarak gösterilmesidir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Diyabetik Gebelik Sonrası Fetal, Neonatal ve Obstetrik Komplikasyonlar

İnsanlarda gebelik diyabeti terimi, oogenezi etkilemiş olabilecek bir hiperglisemi oluşmadan, gebelik sırasında ilk kez ortaya çıkan diyabeti ifade eder. Bu nedenle, gözlemlenen herhangi bir olumsuz etki, hipergliseminin gebelik etkilerini yansıtır. Bununla birlikte, diyabetik kadınlar hamile kaldıklarında, diyabetik durumları hem gebelik öncesi hem de gebelik dönemini potansiyel olarak etkileyebilir. Pregestasyonel diyabette konjenital malformasyonlar birkaç kat daha fazla görülür. Perikonsepsiyonel dönemdeki hipergliseminin derecesine göre malformasyonların oranında değişim gözlemlenmektedir (Mihmanlı ve Mihmanlı 2015). Diyabetik gebelik sonrası doğan çocuklarda sık görülen konjenital anomaliler Tablo 2.1’de yer almaktadır.

**Tablo 2.1** Diyabetik gebelik sonrası doğan çocuklarda sık görülen konjenital anomaliler (Mihmanlı ve Mihmanlı 2015)

<b>Kardiyak anomaliler</b>	Atrial septal defekt Ventriküler septal defekt Büyük damarların transpozisyonu Aort koarktasyonu Fallot tetralojisi Trunkus arteriozus Dekstrokardi Kardiomegali
<b>Santral sinir sistemi anomalileri</b>	Nöral tüp defektleri Anensefali Holopresensefali
<b>Renal anomaliler</b>	Hidronefroz Renal agenezi Üretral duplikasyon
<b>Gastrointestinal anomaliler</b>	Duodenal-anorektal atrezi Omfalosele
<b>Spinal anomaliler</b>	Kaudal regresyon sendromu Sakral agenezi



Pregestasyonel diyabete sahip gebelerde prematür doğum sık görülen önemli bir sorundur. Sıklıkla rastlanan diğer sorunlar ise respiratuar distress sendromu, fetal büyüme kısıtlılığı, hipoglisemi, hipokalsemi, hiperbilürubinemi, polisitemi, kardiyomiyopati ve makrozomi insidansındaki artıştır. Nedeni açıklanamayan fetal ölümler göreceli olarak pregestasyonel diyabetli gebelerde sık rastlanılmaktadır. Bu bebekler tipik olarak gebelik yaşına göre büyüktürler ve genellikle 35. hafta veya daha sonra olmak üzere doğumdan önce ölürlere. Neonatal morbidite ve mortalite riski de yüksektir. Ayrıca diyabetik gebelerde abortus, preeklampsi ve gestasyonel hipertansiyon, polihidroamniyoz, preterm doğum gibi obstetrik komplikasyonlarda ve sezaryen oranında artış vardır (Mihmanlı ve Mihmanlı 2015).

Diyabetik hayvan modelleri, oogenez ve utero embriyonik/fetal gelişim üzerindeki etkileri ayırt etmek için eşsiz bir fırsat sunar. Spesifik olarak, diyabetik dişilerden alınan embriyoların diyabetik olmayan alıcılara veya diyabetik olmayan dişilerden alınan embriyoların diyabetik alıcılara aktarıldığı, karşılıklı (resiprokal) embriyo transferi fare modelini kullanarak, birbirinden bağımsız olarak gebelik öncesi ve gebelik sırası etkilerini test etmek mümkündür.

## 2.2. Sıçan ve İnsan Gebelik Sürecinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

İnsan embriyosu gelişiminin ilk 3 günü yumurta ve spermin füzyonunu, germ hücre pronükleusunun migrasyonu, genetik veya epigenetik yeniden programlama ve doruğa ulaşan bir dizi bölünmeyi kapsamaktadır. Braude vd. (1988), insanlarda embriyonik genom aktivasyonu (EGA)'nın ilk olarak 4 hücreli aşamadan sonra belirgin olduğunu buldular. Daha sonra Taylor vd. (1997) babaya ait transkriptlerin 3 ila 4 hücreli aşamada ilk tespitini bildirmiştir. Daha sonra, Dobson vd. (2004), implantasyon öncesi insan embriyolarının transkriptomunu tanımladılar; gelişimin ilk 3 günü boyunca ~ 1800 mRNA'nın ekspresyonda modüle edildiğini, çoğunluğun aşağı regüle edildiğini veya yok edilmeyi hedeflediğini, 1. ve 2. günlerde küçük bir grubun yukarı regüle edildiğini ve büyük bir mRNA grubunun ekspresyonunun arttığını gösterdi. Ek olarak, ana EGA dalgasının hücre sayısından bağımsız olduğunu, 8'den az hücre ile tutuklanmış embriyolarda bile 3. günde meydana geldiğini göstermişlerdir (Dobson vd. 2004). Bu bulguların, zigotik gen aktivasyonunun (ZGA) 1 ila 2 hücreli aşamada başlatıldığı fare gibi diğer türlerde yapılanlardan farklı olduğu görülmüştür (Flach vd. 1982; Wang vd.

2004a). Transkripsiyonun ne zaman ve nasıl başlatıldığı konusunda ara sıra tartışmalar yeniden ateşlenmiş olsa da, son kanıtlar, değişikliklerin ilk tespitinden bağımsız olarak, ana EGA dalgasının insan embriyosunun gelişiminin 3. gününde meydana geldiğini göstermektedir. Bu süreç farelerde döllenmeden 26-29 saat sonra ZGA'nın ilk dalgasına karşılık gelmektedir (Vassena vd. 2011). EGA'yı takiben, embriyo daha sonra radyal simetride bir kırılmanın ilk morfolojik göstergesini işaret eden morulayı oluşturmaktadır. Sonraki hücre bölünmeleri, sıvı dolu bir blastosist boşluğu ve trofektoderm hücreleriyle çevrili bir iç hücre kütleleri içeren bir blastosistin gelişmesine yol açar. Blastosist rahim duvarına implante edilmeden hemen önce, iç hücre kitlesi, erken epiblast ve ilkel endoderm hücrelerine ayrılır. İnsanlarda gelişimin yaklaşık 7. gününde gerçekleşen implantasyon, embriyonun gelişmesi için gereklidir (Niakan vd 2012).

İlk gebelik haftasının takiben yeni oluşan blastosist destekleyici bir ortama yerleşmeye ve büyüme sürecini sürdürmeye hazırdır. 2. Hafta genellikle ikiler haftası olarak adlandırılır. Embriyoblast, ekstraembriyonik mezoderm ve trofoblastın her birinin iki ayrı katmana ayrıldığı haftadır. Blastosist, endometrium boyunca uygun bir implantasyon noktasına doğru hareket eder. Endometrium, optimum kan temini ile immünolojik olarak ayrıcalıklı bir bölgeye dönüştürülür. Zayıf bağlantılar güçlendirilir. Trofoblast ve endometrial stromanın farklılaşması endometriumun invazyonunu kolaylaştırır.  $\beta$ -hCG üretimi uyarılır. Endometriyal skar ile tam implantasyon 10. günde sağlanır. 12. günde skar çevresinde tam rejenerasyon sonuçlanır. 2. haftanın sonunda koryonik boşluk oluşur (Moore ve Persaud 2008).

İnsanlarda ve kemirgenlerde başarılı gebelik sonuçları için, trofoblastların maternal-fetal arayüzden migrasyonu, implantasyon ve plasentasyonda anahtar bir süreçtir. Fazla veya sığ trofoblastik invazyondan kaynaklanan plasentasyon başarısızlıkları, preeklampsi, intrauterin büyüme kısıtlaması, plasenta kreta, prematürite, gestasyonel trofoblastik hastalık ve hatta maternal veya fetal ölüm gibi gebelik komplikasyonlarına neden olabilir (Kaufmann vd 2003, Tantbirojn vd 2008, Smith vd 2014, Bolze vd 2015). Literatürde, bazı çalışmalar, fizyolojik koşullar altında ve preeklampsi, intrauterin büyüme kısıtlaması, gestasyonel diyabet ve maternal hipotiroidizm gibi patolojik koşullar altında, trofoblastik invazyon ve migrasyonu kontrol eden moleküler mekanizmaları değerlendirmeye çalışmıştır (Pijnenborg vd 1983, Caluwaerts vd 2005).

Plasentayı oluşturan trofoblastlar, memeli gelişimindeki ilk hücre soyudur ve embriyonik trofoektodermden kaynaklanır (Malassine vd 2003). Farklılaşmasından sonra, plasenta, trofoblastın uterus epiteline, anne damarlarının endoteline veya doğrudan anne kanına erişimine göre sırasıyla epitelokoriyal, endotelyokoriyal veya hemokoriyal olarak sınıflandırılır. Hemokoriyal plasentada, özel trofoblast

popülasyonları plasentayı terk edebilir ve doğrudan anne kanıyla temas etmek için desidua'ya doğru hareket edebilir. Bu süreç sırasında, trofoblast kök hücreleri çoğalır ve çeşitli trofoblast soylarına dönüşebilir. Bunlar arasında, interstisyel ve endovasküler trofoblastlar migrant ve invaziv özellikler sergiler ve maternal-fetal arayüzdeki diğer hücre tiplerinin davranışını tanıma, değiştirme ve uyarma kapasitesine sahiptir. Bu hücresel iletişim, maternal faktörler ve integrinler, E-kaderin, proteazlar, sitokinler, interlökinler ve büyüme faktörleri gibi trofoblastik hücrelerin kendileri tarafından salınan ve / veya ifade edilen faktörler tarafından kesin olarak kontrol edilir. Böylece, trofoblast hücrelerinin, hücre migrasyonunu teşvik etmek için, kolajen IV, laminin, vitronektin ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerini bozmasına izin verilirken, trofoblastik hücre invazyonunu kontrol eden çeşitli inhibitör proteinleri de ifade edilir. Sonuç olarak, uterin arterler büyüyen fetüse yeterli kan akışını kolaylaştıran damarlar oluşturmak için yeniden modellendiğinden, invaziv trofoblastlar vasküler endotel hücrelerinin yerini alır (Lunghi vd 2007, Rossario vd 2009).

Trofoblast invazyonunu ve migrasyonunu kontrol eden düzenleyici yollardaki değişiklikler veya yetersiz tepkiler, plasental gelişimi tehlikeye atarak anne ve fetüs sağlığının yanı sıra doğum sonrası gelişimi de olumsuz etkileyebilir (Silva ve Serakides 2016).

### **2.2.1. Plasental organizasyon**

Hemokoriyal plasental gelişim, maternal ve fetal dokular arasında yakın temas ile karakterize edilerek insanda, sıçan ve fare gibi kemirgenlerde meydana gelir. Bu süreç sırasında, trofoblast kök hücreleri, embriyonik trofoektodermden kaynaklanır ve çeşitli trofoblast soylarına farklılaşabilir. Farklılaşmış trofoblast hücrelerinin temel faaliyetlerinden biri uterus spiral arterlerini yeniden biçimlendirmektir. Vasküler yeniden şekillenme, sıkıca sarılmış uterin spiral arterleri, artık annenin kontrolü altında olmayan dilate damarlara dönüştürür. Anne damar sisteminin yeniden yapılandırılması, besinlerin fetüse en uygun şekilde verilmesi için gereklidir. Bununla birlikte, hemokoriyal plasentasyona ve özellikle insanlarda, sıçanlarda ve farelerde trofoblast yönlendirmeli vasküler yeniden modellemeye rağmen, insan ve kemirgen plasentaları arasında, yapı, plasenta gelişimi ve bazı trofoblast hücre tipleri açısından farklılıklar vardır (Pijnenborg vd 1981, Tantbirojn vd 2008, Hammer A 2011, Kent vd 2011, Soares vd 2012, Soares vd 2014).

### 2.2.1.1. İnsan plasental organizasyonu

İnsan hamileliğindeki ilk süreçlerden biri, blastosistin uterusu tutunması ile karakterize edilir. Bu süreç, implantasyonun ilk adımıdır ve yaklaşık olarak gebe kaldıktan 6 ila 7 gün sonra gerçekleşir. Bu aşamada, endometriyum zaten bir kez desidualize edilmiştir. Farelerin aksine, insan desidualizasyonu blastosist implantasyonuna bağlı değildir ve bunun yerine progesteronun etkileri nedeniyle menstural döngünün 14. gününde başlar (Zhang vd 2014). Blastosistin dış tabakası trofoektoderm tarafından oluşturulur. Fetal trofoblastlar ve maternal uterin doku arasındaki yakın temas, maternal-fetal bileşke bölgesinin oluşumuna yol açar. Birleşme bölgesi, plasentanın maternal yüzeyi olan bazal plakayı oluşturacaktır ve fetal yüzey, koryonik plaka olarak adlandırılır (Hertig 1945, Hiden vd 2007, Silva ve Serakides 2016).

Bağlantı bölgesinin oluşumundan sonra, sitotrofoblastta (en içte) ve sinsityotrofoblastta (en dışta), trofoblast proliferasyonu ve farklılaşması yoluyla implantasyon devam eder (Pijnenborg vd 1981, Malassine vd 2003). Sinsityotrofoblast, kanı ve bezlerin içeriğini, lakuna içine serbest bırakmak için desidualdaki maternal kılcak damarları ve endometriyal bezleri genişletir ve aşındırır. Sitotrofoblast, birincil, ikincil ve üçüncül villus (villöz trofoblast) oluşturmak için sırayla çoğalır. Trofoblastlar daha sonra sütunlar oluşturacak, çoğalacak ve sinsityotrofoblastın ötesine uzanarak birbirleri ile birleşerek, sitotrofoblastik kabuğu oluşturacaktır. Gebeliğin sekizinci haftasında, sitotrofoblastik kabuğun sürekliliği kaybolur ve ankraj villusunun tepesindeki trofoblastlar, plasental yatağı oluşturmak üzere bazal plaktan, desidualize endometriyumdan ve altta yatan miyometriyumdan geçecek olan ekstravillöz trofoblasta (EVT) yol açar (Hertig 1945, Hiden vd 2007, Silva ve Serakides 2016).

Plasental villusun dışında bulunan tüm trofoblastlara karşılık gelen EVT, bu hücrelerin desidua'yı (interstisyel trofoblast) ve maternal uterin spiral arterlerin duvarını (endovasküler trofoblast) mobilize etmesine ve işgal etmesine izin vermek için ekstraselüler matriks proteinlerini parçalama kapasitesi kazanır. Endovasküler trofoblastlar (ENT), spiral arterlerin lümenini invaze eder ve arter duvarına (intramural trofoblast) dahil olur. Endotelyum, kas tabakası ve bu arterlerin elastik materyali yok edilir ve yerine fibrinoid adı verilen hücre dışı bir matris ve ENT hücrelerinin kendileri yerleşir. Trofoblastik arteriyel yeniden şekillenme olarak bilinen bu süreç, uterus spiral arterlerini plasentada sürekli ve yeterli kan akışına izin veren böylece gebelik başarısını sağlayan, kolayca gerilebilir, gevşek, ince duvarlı damarlara dönüştürür (Silva ve Serakides 2016).

EVT yoğunluğu ve utero-plasental arterlerin invazyon derinliği, merkezi plasenta yatağında en belirgindir ve invazyonun hem yoğunluğu hem de derinliği plasental

sınırlara yakınlaştıkça azalır. Bu intrauterin migrasyonun kontrolü, hamileliğin 12. haftasında en yüksek trofoblastik invazyon seviyesine ulaşır ve bunu kısa bir süre sonra bir düşüş izler. Alan kontrolü, endovasküler ve interstisyel trofoblast invazyonunun derinliğini, miyometriyumun desidua ve proksimal üçte birlik kısmıyla sınırlar. Bu süreçlerin yeniden düzenlenmesi, intrauterin büyüme kısıtlaması, preeklampsi, plasenta kreta, gestasyonel trofoblastik hastalık ve kürtaj gibi çok çeşitli gebelik komplikasyonları ile sonuçlanır (Brosens vd 1967, Pijnenborg vd 1980).

Ekstravillöz trofoblasta köken olan villöz trofoblast, daha büyük çaplı fetal damarların bulunduğu yerdir ve koryonik plakadan bazal plakaya kadar uzanan bağ dokusu şaftını kaplar. Koryonik villus, bu villöz septadan kaynaklanır. Villöz septa arasındaki boşluk, intervillöz boşluk olarak adlandırılır ve uterus arterlerinden gelen anne kanıyla doldurulur. Koryonik villus, bir sitotrofoblast tabakası ve çok çekirdekli sinsityotrofoblast ile çevrili geniş bir fetal kılcak ağ içeren merkezi bir bağ dokusu ekseninden oluşur (Hamilton ve Grimes 1970, Zhou vd 1997, Kaufmann vd 2003).

Sinsityotrofoblastlar villusun dış yüzeyini oluşturur, anne kanıyla doğrudan temas eder ve sitotrofoblastlardan köken alır. Sinsityotrofoblastlar, sürekli ve kontrollü bir yenilenme ve apoptoz sürecinden geçer. Birincil işlevleri, besin emilimi, atık ürün uzaklaştırma ve hCG gibi hormonların sentezidir. Besinlerin fetüse taşınmasını ve atıkların, zararlı toksinlerin fetal dolaşımdan uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için, sinsityotrofoblastta iyon kanalları, akuaporinler, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları dahil olmak üzere çok çeşitli taşıyıcılar ifade edilir (Hamilton ve Grimes 1970, Zhou vd 1997, Kaufmann vd 2003).

Sitotrofoblastlar, sinsityotrofoblastın altında bulunur, tek çekirdekli ve küreseldir. Fetal kan, intervillöz aralıkta dolaşan ve villusları yıkayan anne kanı ile alışveriş yapar. Hamilelik ilerledikçe bağ dokusu miktarı azalırken, koryon villusundaki kan damarlarının sayısı artarak, anne ve fetüs arasındaki metabolit alışverişini kolaylaştırır. İnsanlarda plasentanın son yapısı diskoiddir ve yaklaşık olarak gebeliğin 21. gününde belirginleşir (Silva ve Serakides 2016).

### **2.2.1.2. Rodent plasental organizasyonu**

İmplantasyonu takiben, özellikle sıçanlarda ve farelerde, embriyo tamamen farklı uzamsal konumlara ve gen ekspresyon modellerine sahip çeşitli trofoblastik hücre tipleri ile kaplanır. İnsanların aksine, ekstraembriyonik ektoderm, özellikle de polar trofoektoderm, daha sonra sırasıyla plasental labirent ve birleşme bölgesine yol açacak

olan koryonik ektoderm ve ekto plasental koni olarak farklılaşır. Mossman (1937), sıçanlarda ve farelerde ekto plasental koninin insan plasentasında oluşan sitotrofoblastik kabuğa benzer olduğunu öne sürmüştür ancak kemirgenlerde, ekto plasental koni düzenli bir şekilde trofospongiumu oluşturmak üzere çoğalırken, insan sitotrofoblastik kabuğunun trofoblastları, bazal plaka, desidua ve alttaki miyometriyum boyunca düzensiz bir şekilde çoğalır (Gartner 1975, Ain vd 2006).

Fare ve sıçanların nihai plasentası diskoiddir ve sırasıyla yaklaşık olarak gebeliğin 11. ve 12. günlerinde, yani gebeliğin ortasında şekillenir. Anatomik ve fizyolojik olarak farklı 3 bölgeye sahiptir: fetal-plasental alan üzerinde daha içte bulunan plasental labirent; spongiotrofoblasttan, glikojen hücrelerinden ve blastosistin orijinal duvarından oluşan bağlantı bölgesi; trofoblastların endometriyuma girmesiyle oluşan trofoblast dev hücre tabakası (Cross 2000, Hemberger ve Cross 2001).

Trofoblast dev hücre tabakası, implantasyona, uterus invazyonuna aracılık eden ilk hücrelerdir ve fetal-plasental alan üzerinde daha dışta yer alır. Bunlar ikincil trofoblast dev hücreleri olarak bilinir ve polar trofoektodermden türetilirken, birincil trofoblast dev hücreleri nihai plasentaya katkıda bulunmaz ve mural trofoektodermden türetilir (Cross 2000). Trofoblast dev hücreleri, hücre döngüsünü terk eden, bölünmeyi durduran ve endoreduplikasyon yoluyla poliploid haline gelen, mitozsuz DNA replikasyon döngülerine giren trofoblastlardan ortaya çıkar. Plasentanın ana endokrin hücrelerinden biridir çünkü anne kanının implantasyon yerine akışını, ovaryum progesteron sentezini ve laktogenezi düzenleyen birçok sitokin ve hormon üretirler. Trofoblast dev hücrelerinin çoğu desiduya migrasyon yapar. Bununla birlikte, sıçan plasentasında maternal kanı implantasyon yerine getiren spiral arterleri işgal eden, trofoblastik dev hücrelerin bir alt tipi tanımlanmıştır. Bu kanıta dayanarak, trofoblast dev hücrelerinin, en azından sıçanlarda uterin vasküler yeniden şekillenmeye de katıldığı bilinmektedir (Adamson vd 2002, Cross vd 2002, Cross 2005).

Plasentanın orta tabakası olan birleşme bölgesi, trofoblast dev hücre tabakası ve daha dışsal olarak mezometriyal desidua ile sınırlanmıştır. Bu bölge aynı zamanda "trofospongium", "spongiotrofoblast" ve "süngerimsi bölge" olarak da adlandırılır. Dört trofoblast soyu, birleşme bölgesinde bulunan progenitor hücrelerden farklıdır: ikincil trofoblast dev hücreleri, spongiotrofoblast, glikojen hücreleri ve invazif trofoblastlar. İç hücre kitlesi ile yakın temasa yanıt olarak, bu hücrelerin tümü fibroblast büyüme faktörü 4 (FGF4) aracılı çoğalmaya maruz kalır. Spongiotrofoblastlar oval ve tek çekirdekli iken, plasentada gebeliğin 12. gününden itibaren ortaya çıkan glikojen hücreleri daha yoğun çekirdeklere sahiptir ve sitoplazmalarında glikojen granülleri bulunur. Spongiotrofoblast, korpus luteumdan progesteron salgılanmasının sürdürülmesini ve diğer işlevlerin yerine gelmesini sağlayan bir endokrin glandüler kompartman görevi görür. Spongiotrofoblast

ve ikincil olarak sinsityotrofoblast, hamilelik sırasında luteotropik ve laktojenik hormonlar üretir. Bir başka varsayılan spongiotrofoblast işlevi, çözünebilir fms benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1) ve proliferinle ilişkili protein (rPlf) gibi anti-anjiyojenik faktörlerin salgılanmasıyla maternal plasentada fetal endotel büyümesinin sınırlandırılmasıdır. Plasental gelişimde değişiklik olması durumunda, spongiotrofoblast ve glikojen hücreleri arasındaki dengede kalitatif değişiklikler meydana gelir (Adamson vd 2002, Cross vd 2002, Cross 2005, Coan vd 2006, Burdon vd 2007).

Glikojen hücreleri, spongiotrofoblastta ortaya çıkan belirsiz bir kökene sahip trofoblastlardır. Spesifik bir gen olan Tpbp (4311) 'yi eksprese eden spongiotrofoblastlardan kaynaklandıkları düşünülmektedir. Alternatif olarak, glikojen hücrelerinin, ektoplasental konide spongiotrofoblast kök hücrelerinden farklı olan bir hücre grubunun spesifik bir belirteci olan protokaderin 12'yi (PCDH12) eksprese ettiklerinde spongiyotrofoblasttan ayrılacaklarına dair kanıt vardır (Bouillot vd 2006).

Glikojen hücreleri, kanı implantasyon bölgesine taşıyan ve arteriyel kas duvarını yeniden şekillendiren uterin spiral arterleri invaze etmeleri açısından insan ekstravillöz trofoblastlarına da benzer. Bu işlem, kan akışının artmasına, oksijen ve besin maddelerinin implantasyon bölgesine taşınmasına neden olur. Sıçanlarda glikojen hücreleri maternal desiduayı invaze eder ve uterusun doğal öldürücü hücreleri (uNK'ler) ile etkileşime girerek onları uterin spiral arterlerini değiştirmeye teşvik eder. Desiduaya girdikten sonra glikojen hücreleri, hücre içi bileşenlerini, glikojeni ve hormonlarını interstisyel boşluğa salarak sitolitik bir sürece girer. Bu bileşenlerin, enerji kaynakları olarak ve gebeliğin ve / veya fetal gelişimin hormonal kontrolünde önemli olması muhtemeldir (Adamson vd 2002, Bouillot vd 2006).

Birleşme bölgesinden kaynaklanan invaziv trofoblastların, uterin vasküler yeniden şekillenmeye glikojen hücreleri ve uNK'larla birlikte katılımı, bu hücrelerin plasentadan çıkışı ve uterin stroma ve / veya miyometriyuma hareketlerinin zamansal ve mekansal olarak hareketleri iyi tanımlanmıştır. Bu hücreler, uterin spiral arterlerini çevreler, bunlara nüfuz eder ve insan ekstravillöz trofoblastınine benzer bir retrograd migrasyon sergiler. İnvaziv endovasküler trofoblastlar endotelin yerini alırken, interstisyel trofoblastlar kan damarları arasında lokalize olur. Gebeliğin 13.5 gününe kadar, sıçanlarda ve farelerde trofoblast invazyonu, endovasküler ortamla sınırlıdır ve dışta mezometriyal desidua ile çevrelenmiştir. Gebeliğin 14.5 günü sonrasında, sıçanlarda endovasküler ve interstisyel trofoblast metriyal bezde (uterine natural killer uNK) tanımlanabilir (Burton 2009, Silva ve Serakides 2016).

Bu gözlemlere dayanarak, sıçanlarda ve farelerde interstisyel ve endovasküler trofoblast invazyonu ve vasküler değişiklikler, insanlardaki süreçlere çok benzer. Bunun aksine, insan invaziv trofoblastların kan damarı duvarına dahil edilmesi, sıçanlara göre

daha fazla PAS-pozitif fibrinoid matris birikimi ile ilişkilidir. İnsanlarda intramural trofoblastların dahil edilmesi, aynı zamanda, sıçanlarda ve farelerde gözlemlendiği gibi, vasküler düz kas ve elastik liflerin ortadan kaldırılması ve ardından bir yeniden endotelizasyon süreci ile ilişkilidir. Bu türler arasındaki fark, insanlarda interstisyel invazyonun, endovasküler invazyondan önce gelmesindedir; bu durum, insanlarda interstisyel trofoblastın erken vasküler yeniden modellemede de bir rol oynamasıyla ilişkili olabilir. Aksine, sıçan ve farelerin endovasküler invazyonu, interstisyel invazyondan önce gelir. İnsanlara benzer şekilde, sıçan trofoblastları, mezometriyal üçgene uzanan desidua'yı derinden invaze eder. Farelerde, bunun tersine, interstisyel trofoblastik invazyon, miyometriyuma uzanmaz ve endovasküler invazyon, çok sınırlıdır ve mezometriyal desidua ile sınırlıdır. Ayrıca, invaziv fare trofoblastları perivasküler bir yol izler ve sıçanlarda olduğu gibi lümen içi değildir. Bu nedenle sıçan, trofoblast invazyonunu sınırlayan deneysel koşulların incelenmesi için fareye göre daha umut verici bir hayvan modelini temsil edebilir (Silva ve Serakides 2016).

Plasental diskin en büyük kısmı olan plasental labirent, allantoisin koryonik ektoderm ile etkileşimi, trofoblastlar tarafından sinsityum oluşumu ve maternal-fetal bariyerin kurulmasından kaynaklanır. Ekzosöloomik boşluk ve allantois üzerinde yer alan koryonik ektoderm, ekzosöloomik boşluk içinde epiblastın posterior primitif gövdesinden kaynaklanır. Allantois ektoplasental koniye doğru gelişir, sırasıyla farelerde ve sıçanlarda gebeliğin 8.5 ve 9.5 günlerinde koryonik ektoderm ile birleşir, bu dönem embriyo içinde kalp atışının ve dolaşımın başlamasına denk gelir. Koryoallantoik füzyonun, allantois üzerinde ifade edilen hücre adezyon molekülü VCAM1'e ve koryonik mezotelyum tarafından ifade edilen ligand  $\alpha$ 4-integrine bağlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, tüm VCAM1 veya  $\alpha$ 4-integrin eksikliği olan fareler koryoallantoik füzyonda başarısız olmaktadır, bu da farklı adezyon mekanizmalarının da dahil olduğunu göstermektedir (Gekas vd 2005, Watson ve Cross 2005).

Koryoallantoik füzyon sırasında, trofoblast 3 katmana: fetal endotel ile temas halinde olan 2 sinsityotrofoblast katmanına ve maternal kanla temas halindeki bir sitotrofoblast katmanına farklılaşmaya başlar. Bu tip plasental gelişim, hemo-monokoriyal olan insan plasentasından farklı olarak hemo-trikoriyal plasentasyon olarak bilinir. Sinsityotrofoblast, Gcm1 genini ifade eden trofoblast hücrelerinin füzyonu ile oluşur ve endometriyumda koryoallantoik füzyona kadar farklılaşması başlamaz. Ayrıca plasental labirent, trofoblast dev hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerden oluşur. Bununla birlikte, bu dev hücrelerin hormon üretimi için sınırlı bir kapasitesi vardır. Plasental labirent, maternal-fetal değişimin ana alanıdır, çünkü sinsityal trofoblast hücreleri, anne ve fetal kompartmanlar arasında besin ve atıkların transferine aracılık eder. Besin taşınmasını en üst düzeye çıkarmak için anne ve fetal kan labirent içinde



ters yönde akar. Bu bölge, içinden anne kanının aktığı intervillöz aralıkla çevrili, insan plasental villuslarına karşılık gelir (Silva ve Serakides 2016).

### 2.2.2. Trofoblast farklılaşması

Memeli gelişiminin erken dönemlerinde konseptus, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm olarak farklılaşır. Bu süreç sırasında, insan, sıçan ve farelerin hemokoriyal plasentasını oluşturmak için, trofoektoderimde bulunan kök hücreler, endometriyal epitelyuma sızar ve her biri belirli işlevlere sahip çeşitli hücre alt tiplerine farklılaşır. Trofoektoderm, herhangi bir fetal doku oluşumuna katkıda bulunmaz, ancak plasenta ve diğer embriyonik eklerin oluşumuna katkıda bulunur. Trofoektoderm hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması, onu plasantanın en büyük bileşeni yapar. Embriyonun dokuları, amniyon, yolk kesesi ve allantoisin ana bileşenleri, iç hücre kitlesinden türetilir (Cross 2000, Armant 2005).

Trofoektodermin farklılaşmasında rol oynayan moleküler olaylar tam olarak bilinmemektedir. Sıçanlarda ve farelerde, Eomes, Cdx2 ve Mash2 gibi kritik transkripsiyon faktörleri, çeşitli trofoblast hücre alt tiplerinin gelişimini kontrol eder. Ancak, insanlarda invaziv trofoblast farklılaşmasını hangi faktörlerin belirlediği açık değildir. Örneğin, invaziv trofoblast dev hücre farklılaşması sırasında önemli olan transkripsiyon faktörleri, farelerde tarif edilmiş olsa da bu faktörlerin insan invaziv trofoblastlarında ekspresyonu ve dağılımı mutlaka aynı rolleri göstermez. Bu, sadece insan ve kemirgen plasentasında gözlemlenen plasental morfoloji ve trofoblast hücre alt tiplerindeki farklılıklar ile değil, aynı zamanda çeşitli gebelik dönemlerinde insan invaziv trofoblastlarını incelemenin zorluğu ile de açıklanabilir (Riley vd 1998, Knofler vd 2002, Cross vd 2003, Loregger vd 2003, Imakawa vd 2004, Meinhardt vd 2005).

Sıçanlarda ve farelerde bazı transkripsiyon faktörlerinin, trofoblastların ilk farklılaşmasını teşvik etmede ve yönlendirmede kritik rollere sahip olduğu bilinmektedir. Erken evre fare embriyolarından fare trofoblast kök hücre dizilerinin oluşturulması, bu sürecin yanı sıra, trofoblast kök hücre popülasyonunun kendi kendini yenilemesini teşvik eden mekanizmaları incelemek için de yararlı olmuştur. Trofoblast kök hücreleri (TKH'ler), fibroblast büyüme faktörü 4 (FGF4) ile desteklenmiş fare embriyonik fibroblastları (FEF) ile koşullandırılmış ortam varlığında in vitro olarak türetilbilir ve korunabilir. FEF koşullu ortam ve FGF4 olmadan, trofoblast kök hücrelerinin spongiotrofoblast, sinsityotrofoblast ve dev hücreler dahil olmak üzere plasantanın çeşitli hücre tiplerine farklılaşması meydana gelir. FEF-koşullu ortam, farklılaşmamış durumun çoğalmasını ve sürdürülmesini sağlayan TGF $\beta$  ve / veya aktivin sağlar, çünkü TGF $\beta$

yolağının inhibisyonu, TKH'lerin farklılaşmasına neden olur. Bununla birlikte, insan trofoblast kök hücrelerini türetmek için FGF4 tabanlı bir strateji kullanma girişimleri başarısız olmuştur, bu da insan trofoblast kök hücrelerinin kendi kendini yenilemesi için başka faktörlerin de gerekli olduğunu göstermektedir (Erlebacher vd 2004, Red-Horse vd 2004, Tanaka 2006).

Eksprese edilecek ilk transkripsiyon faktörleri, Eomes ve Cdx-2, preimplantasyon döneminde trofoblast kök hücre farklılaşmasını etkiler ve FGF4 tedavisine yanıt olarak fare trofoblast kök hücrelerinin ifadesi artar. Tead4, Elf5, GATA3, Tcfap2c, Esrrb ve Sox2 gibi diğer transkripsiyon faktörleri de fare trofoblast kök hücrelerinin multipotent durumunun spesifikasyonu ve / veya devamlılığı için kritiktir. Çünkü bu genlerin susturulmuş olduğu fare embriyoları Eomes ve Cdx2 dahil olmak üzere trofoektoderm spesifik genleri eksprese etmez ya da azalmış ekspresyonuna sahiptir ve implantasyon öncesi aşamalarda ölmektedir (Nishioka vd 2008, Latos ve Hemberger 2014).

İmplantasyon ve implantasyon sonrası dönemler sırasında, transkripsiyon faktörlerinin Hand1, AP-2y, ETs-2, Mash2, Gcm1, Ascl2, GATA2 ve FosL1'in ardışık ifadesi, çeşitli trofoblast alt popülasyonlarının farklılaşmasına neden olur (Hughes vd 2004, Ray vd 2009, Renaud vd 2014).

Hemokoriyal plasentada, özel trofoblast popülasyonları plasentayı terk edebilir ve doğrudan anne kanıyla temas etmek için desidua'ya doğru hareket edebilir. Bu gelişimsel süreç, hipoksiye bağlı sinyal yollarına bağlıdır ve sıçanlarda invaziv trofoblast soy, esas olarak gebeliğin 8,5 ila 9,5 günü arasındaki hipoksi uyarısına bağlıdır. Sıçanlara benzer şekilde, insan sitotrofoblastik hücrelerinin in vitro olarak düşük oksijene maruz kalması, invaziv potansiyele sahip ekstravillöz trofoblast fenotipi boyunca bunların farklılaşmasını da uyarır (Adelman vd 2000, Robins vd 2007, Rosario vd 2008).

Ek olarak, HB24 ve DLX4 gibi trofoblast farklılaşma potansiyelini kontrol eden çoklu homebox genleri, birinci trimester insan plasentasından gelen invaziv trofoblastlarda tanımlanmıştır. Jia vd. (2014), Cdx2'nin MMP9 ekspresyonunu uyararak ve Timp1 ekspresyonunu azaltmak için HTR-8 / SVneo ekstravillöz trofoblast hücre invazyonunu ve migrasyonunu teşvik ettiğini gösterdi. Cdx2'den farklı olarak, Cdx1 ile transfekte edilmiş HTR-8 / SVneo ekstravillöz trofoblast hücrelerinin, MMP9 ekspresyonunu azaltarak ve Timp1 ekspresyonunu artırarak in vitro invazyonu ve migrasyonu azaltığı gösterilmiştir (Quinn vd 1997, Quinn vd 1998, Jia vd 2014).

Başka bir homebox geni, STAT3, JEG-3 insan trofoblastlarında ve ilk trimester insan trofoblastlarında tanımlanmıştır, ancak gebeliğin sonlarında trofoblastlarda tespit edilememiştir ve bu durum trofoblast invazyonunda bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Trofoblastik invazyonu engellediği bilinen plasental leptin, JEG-3 trofoblastlarında ve

insan sitotrofoblastlarında STAT3 ekspresyonunu ve aktivitesini artırır (Corvinus vd 2003, Poehlmann vd 2005).

Başka bir transkripsiyon düzenleyici faktörün, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gammanın (PPAR-g) aktivasyonu, insan sitotrofoblastlarının ve HIPEC 65 trofoblastik hücrelerin in vitro invazyonunu azaltırken, antagonistler yoluyla inhibisyonu, bu hücrelerin invazivliğini arttırarak trofoblast hareketliliğinde bu faktörün bir inhibitör rolü olduğunu düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, PPARg aktivasyonu, insan koryonik gonadotropinin (hCG) ekstravillöz trofoblast ekspresyonunu ve sekresyonunu etkiler; bu da PPAR-y'nin trofoblast invazyonu üzerindeki olumsuz etkilerinin, gebelik sırasında hCG seviyelerindeki azalmalara aracılık edebileceğini düşündürmektedir (Tarrade vd 2001, Handschuh vd 2007).

Yu vd. (2014), JEG3 insan trofoblast soyundaki Notch-1 ifadesinin trofoblast migrasyonu ve invazyonu için önemli olduğunu, öyle ki bu hücreler için, bu faktörün RNA interferansı aracılı nakavt yoluyla in vitro inhibisyonunun, MMP2, MMP9 ekspresyonunun ve NF-kB sinyalinin azalmasına, epitelyal-mezenkimal geçiş için bir işaret olan E-kaderin ekspresyonunun artmasına neden olduğunu göstermiştir. Preeklampsili plasentalarda Notch-1 ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. Notch-1'in insan trofoblastlarındaki rolüne benzer şekilde, insan trofoblast soylarında Notch-2'nin inaktivasyonu da intrauterin trofoblastik migrasyonu etkiler ve maternal uterin spiral arterlerin trofoblastik invazyonunu azaltır (Cobellis vd 2007, Haider vd 2014, Tripathy vd 2014, Yu vd 2014).

### **2.2.3. İntrauterin trofoblast migrasyonu**

Trofoblast hücreleri, desiduaı invaze eder ve maternal bağışıklık hücreleri ile iletişim, hormon ve sitokin üretimi, maternal arteriyollerin endotel hücrelerinin ikame edilmesi ve anjiyogenez gibi çeşitli işlevlere sahiptir. Bununla birlikte, bu özelliklerin düzenlenmesi, bol miktarda hücre içi ve hücre dışı sinyale bağlıdır (Silva ve Serakides 2016).

#### İnvaziv Trofoblast

Uterus dokusu ve maternal kan damarlarına trofoblast invazyonu, kemirgen ve insan gebeliği ve fetal gelişimi sırasında önemli bir süreçtir. Olağanüstü plastisiteleri nedeniyle, invaziv trofoblastlar, plasentanın maternal dokuya sabitlenmesi, hormon salgılanması, desidual anjiyogenez / lenfanjiyogenezin modüle edilmesi ve maternal uterin spiral arterlerin yeniden modellenmesi gibi çok sayıda işlevi yerine getirir. Bu son

işlev, plasentaya kan akışını artırmak ve böylece gelişmekte olan fetüse yeterli besin ve oksijen aktarımını sağlamak için kritiktir. Artan sayıda büyüme faktörü, anjiyogenik faktörler, sitokinler ve trofoblastik hücre migrasyon kinetiğini kontrol eden proteazlar, öncelikle ilk üç aylık dönem ve tam dönem insan koryonik villus eksplantları ve / veya HIPEC 65, JEG3, BeWo ve HTR8 / SVneo gibi insan trofoblast hücre hatları kullanılarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, insanlarda, sıçanlarda ve farelerde in vivo plasantasyon sırasında bu faktörlerin çoğunun önemi bilinmemektedir (Silva ve Serakides 2016).

Trofoblastik invazyonun in vitro kontrolünün çoğu, sıçanlarda ve insanlarda invaziv trofoblast fenotipini düzenleyen fosfatidilinozitol-3-kinaz / serin-treonin (PI3K / Akt) hücre içi sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından gerçekleştirilir. PI3K veya Akt'nin bozulması, invaziv fenotip ve trofoblast hücre invazyonu ile ilişkili genlerin bir ekstraselüler matriks yoluyla ekspresyonunu inhibe eder. Bu eylemlere, FosL1 proteininin aktivasyonu yoluyla aracılık ettiği düşünülmektedir (Schreiber vd 2000, Knofler vd 2010).

Bununla birlikte, PI3K / Akt sinyal aktivatörlerinin çoğu sadece trofoblast tarafından değil, aynı zamanda desidua, uNK hücreleri ve uterus makrofajları tarafından da salgılanır, bu da çeşitli hücre tipleri, araçlar ve sinyal yollarından oluşan karmaşık bir ağın, trofoblast invazyonunu düzenlediğini düşündürür (Schreiber vd 2000, Knofler vd 2010).

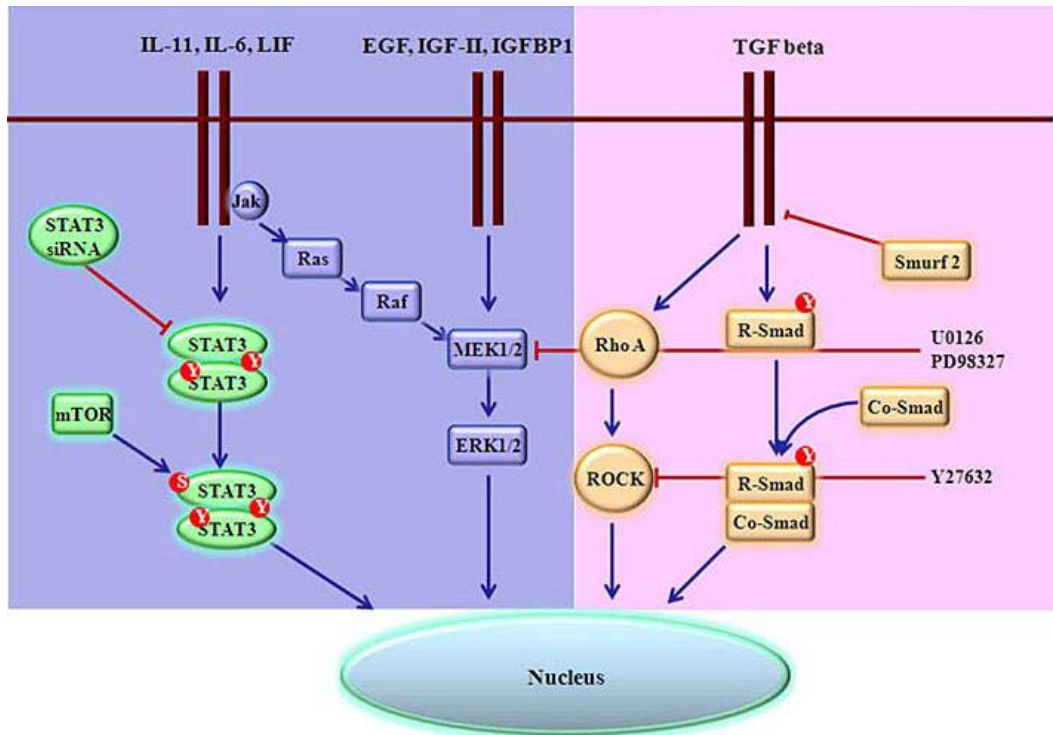
Sıçanlarda ve farelerde trofoblast invazyonunun, kısmen MMP'ler ve Timp'ler tarafından düzenlenen uterus ekstraselüler matriksinin degradasyonu ve yeniden şekillenmesini içerdiği bilinmektedir. MMP9 ve MMP14'ün invaziv hücrelerde yüksek oranda ifade edildiği bildirilmiştir ve embriyodan türetilmiş MMP9 ve uterustan türetilmiş Timp3, fare trofoblastı tarafından ESM degradasyonunun anahtar düzenleyicileri olarak görünmektedir. Bununla birlikte, sıçanların, farelerin desidua ve miyometriyumunda endovasküler, interstisyel trofoblast hücrelerinin ilerleyişini kontrol eden faktörler ve düzenleyici mekanizmalar, henüz insan trofoblast hücrelerinin kullanıldığı in vitro araştırmalarla açıklanmamıştır. Adezyon moleküllerinin farklı ifadesi, koloni uyarıcı faktör-1, epidermal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 gibi bazı faktörler, insan trofoblast hücresi invazyonunun uyarıcıları olarak dahil edilmiştir (Silva ve Serakides 2016).

### 2.3. İmplantasyon Sürecinde Etkili Moleküler Mekanizmalar

Blastosist implantasyonu, dişi üreme yolları tarafından salınan sinyaller ile bağlantılı olarak çalışan, intrinsik embriyonik programa bağlıdır. Ayrıca implantasyon sürecindeki blastosist de gebelik sürecinde endometriyal değişiklikleri düzenler. Bu moleküler diyalog sayesinde implantasyon öncesi endometriyum embriyonik sinyalleri alır ve yanıt verebilir hale gelir. İmplantasyon sürecinin başlıca faktörleri arasında büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörleri, hücre adezyon molekülleri ve ligandlar, sinyal ara ürünleri, proteazlar ve transkripsiyon faktörleri bulunur. Embriyonik sinyaller, hamileliğin erken dönemlerinde hücresel yeniden düzenlenmeyi koordine etmek için implantasyon periyodu öncesinde ve sırasında endometriyumdaki biyokimyasal değişiklikleri ortaya çıkarmada büyük bir etkiye sahiptir. Trofoblast hücrelerinde, parakrin düzenleyiciler yoluyla çeşitli sinyalleme yollarının aktivasyonu, efektör moleküllerin ekspresyonunu değiştirir. Bu karşılıklı sinyal aracılı diyalogun nihai sonucu, trofoblast invazyonunda bir artış veya azalma olup olmayacağına karar verir. Trofoblastik hücrelerde çeşitli sinyalleşme yollarının çoğunun ekspresyonu saptanmış ve bunların invazyon bağlamında işleyiş mekanizmaları birkaç derlemenin konusu olmuştur (Gökçimen ve Temel 2004, Knofler 2010, Modi vd 2012, Silva ve Serakides 2016). Literatüre bakıldığında, desidua kaynaklı parakrin düzenleyiciler tarafından aktive edilen ve trofoblast invazyon sürecini etkileyen bazı anahtar sinyal yolları göze çarpmaktadır. Bu sinyal yolları:

#### Janus kinaz (Jak)-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) sinyal yolağı

IL-6, IL-11, LIF (Lösemi inhibitör faktör), HGF (Hepatosit büyüme faktörü), GM-CSF(Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör) gibi (Şekil 2.1) bir çok sitokin ve büyüme faktörü bu yolağı aktive ederek gelişimin düzenlenmesini sağlayan gen ifadelerini oluşturmaktadır (Justine vd 2008). Ayrıca trofoblastik invazyonu inhibe ettiği bilinen leptin, insan sitotrofoblastlarında STAT3 ekspresyonunu ve aktivitesini artırır (Poehlmann vd 2005).



**Şekil 2.1** Trofoblast hücrelerinde parakrin faktörler tarafından aktive edilen sinyal yolları (Modi vd 2012).

#### Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) aracılı sinyal yolağı

Aktif ERK1 / 2'nin 12. haftaya kadar plasenta villuslarında saptanabilir olması gebeliğin ilk trimesterinde, plasental gelişimde rol oynadığını göstermektedir (Fitzgerald vd 2005). IGF-II, IGFBP-1 ve EGF trofoblast invazyonunu düzenlemek için ERK aracılı sinyal yolunu kullanır (Gleeson vd 2001, Mckinnon vd 2001). IGFBP-1, Arg-Gly-Asp (RGD) alanı aracılığıyla integrin alfa5beta1'e bağlanır ve ERK1 / 2'nin aktivasyonunu, fokal adezyon kinazın (FAK) aktivasyonu yoluyla gerçekleştirir.

#### TGF aracılı sinyal yolağı

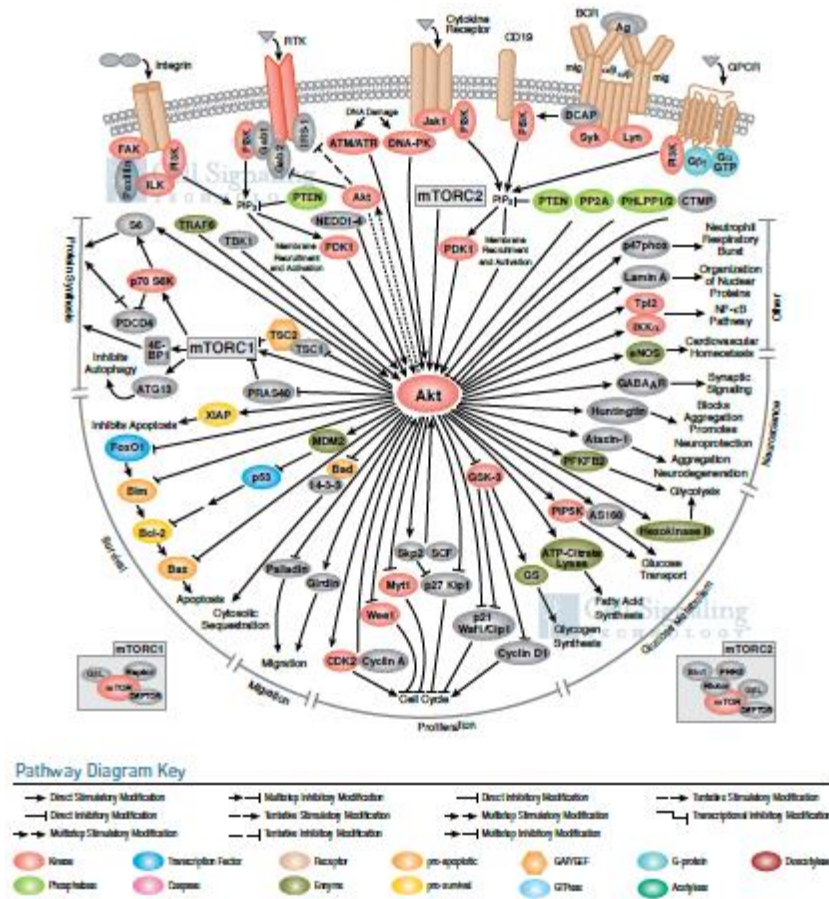
TGF, trofoblastik hücre fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisidir. TGF-beta süper ailesinin üyeleri, sinyalini aktin reseptör benzeri kinazlar (ALK) olarak da bilinen Tip I ve II Ser / Thr-reseptör tirozin kinazların çeşitli izoformlarına bağlayarak iletir. Her bir TGF-beta üyesi, tip I ve II reseptörünün spesifik kombinasyonuna bağlanır, böylece otofosforilasyona ve birkaç alt sinyalizasyon yolunun daha fazla aktivasyonuna yol açar. TGF-beta sinyali ayrıca ERK, Jun N-terminal kinaz (JNK), p38 mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (p38MAPK) ve Rho GTPazları da aktive edebilir. TGF-beta ayrıca hücrelerin migrasyonunu düzenlemek için RhoA / Rho ile ilişkili kinaz (ROCK) yolunu aktive eder. Kimyasal inhibitörü Y27632 ile ROCK'nin inhibisyonu, endometriyal hücre

tabakasındaki sinsityotrofoblast migrasyonunun TGF-beta aracılı inhibisyonunu ortadan kaldırmıştır (Fafet vd 2008).

### Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / serin treonin kinaz (AKT) yolağı

Trofoblastik invazyonun in vitro kontrolünün çoğu, sıçanlarda ve insanlarda trofoblast invaziv fenotipi düzenleyen fosfatidilinositol-3-kinaz / serin-treonin kinaz (PI3K / Akt) hücre içi sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uygulanır (Şekil 2.2). PI3K veya Akt'nin bozulması, bir ekstraselüler matriks yoluyla invaziv fenotip ve trofoblast hücre invazyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe eder (Knofler 2010).

### PI3 Kinase/Akt Signaling



Şekil 2.2 PI3K/AKT sinyal yolağı(WEB\_1)

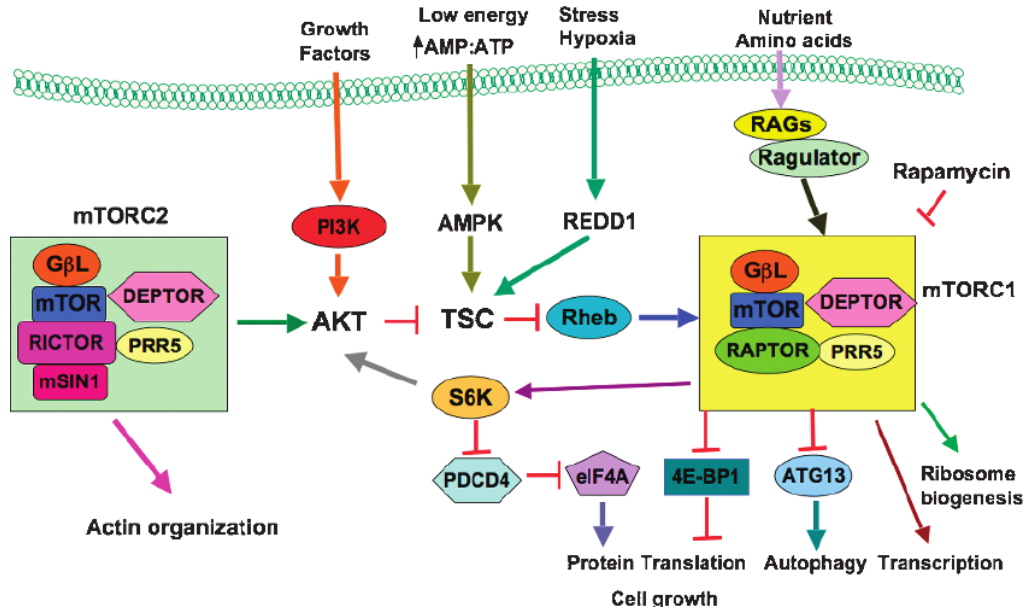
### mTORc Sinyal Yolağı

İnsülinin, erken embriyogenezde hücre fonksiyonunu ve farklılaşmasını düzenleyerek, fetal gelişim üzerinde uzun süreli pozitif etkileri olduğu iyi bir şekilde karakterize edilmiştir (Leese ve Brison 2015). İnsülin, besin kullanılabilirliğini eşleştirmek için hücre içi mTORC1 sinyalini kullanarak hücre sel tepkileri başlatır. İnsülin doğrudan insülin reseptörü ve IRS / PI3K / AKT / mTORC1 yolağı üzerinden sinyal verir (Cheng vd 2010, Leese ve Brison 2015) (Şekil 2.3). Deneysel kanıtlar, mTORC1 yolundan sinyal gönderiminin trofoblast hareketliliğinde (Martin ve Sutherland 2001, Martin vd 2003, Gonzalez vd 2012), proliferasyonda (Kim vd 2013) ve implantasyonda (Zeng vd 2013) önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Dahası mTOR geni ifadesi olmayan embriyolar 5,5. günde gelişiminin durması ile implantasyon başarısızlığıyla sonuçlanmıştır (Gangloff vd 2004).

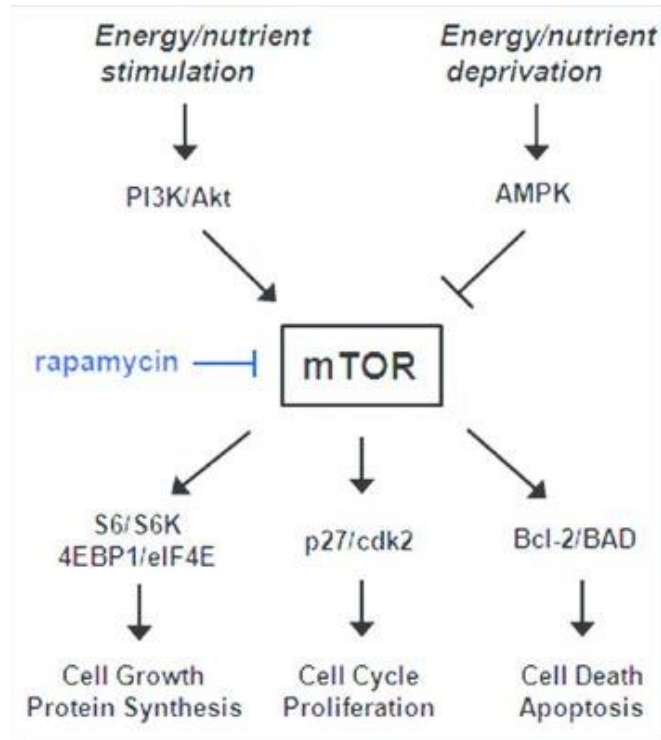
#### **2.3.1. Enerji homeostazı ve AMPK sinyal ağı**

İnsülin direnci ve diyabet modelleri, benzer şekilde, mTORC yolunu içeren insülin sinyalleşmesinin etkisini, ancak bir başka önemli metabolik sensör olan AMPK ile ilişki halinde göstermiştir (Şekil 2.4). AMPK, hücre sel enerji dengesinin korunmasından sorumlu anahtar olarak görülmektedir (Leese ve Brison 2015). AMP düzeyleri yükseldiği zaman, ATP tüketimi gözlenir ve AMPK mTORC1 inhibisyonu yoluyla protein sentezi de dahil olmak üzere, ATP-tüketen anabolik yolları kapatır ve downstream hedeflerinin fosforilasyonu yoluyla, glukoz alımı ve yağ asidi oksidasyonu gibi katabolik, ATP üreten yolları uyarır (Viollet vd 2009, Leese ve Brison 2015). Yüksek insülin veya IGF1 seviyelerine maruz kaldığında, blastosistler IGF1R ekspresyonunu azaltarak insüline dirençli hale gelir. Glukoz alımı azalır ve apoptoz artar, bunu daha sonra erken emilim ve büyüme kısıtlaması izler. AMPK aktivatörleri, trofoblast kök hücrelerini kullanarak AMP / ATP oranını arttırmakta ve bu etkiyi tersine çevirebilmektedirler (Eng vd 2007, Loudon vd 2008).





Şekil 2.3 mTORC1 ve mTORC2 yolağı (Wang vd 2012)



Şekil 2.4 mTOR, AKT ve AMPK ilişkisi (Zeng vd 2010)

İmplantasyon sürecinin başlıca faktörleri arasında çeşitli transkripsiyon faktörleri (HoxA10, HoxA11, östrojen reseptörleri, prolaktin reseptörleri), sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-6,

IL-11, IL-1 alfa ve beta, LIF, TGF), hormonlar ve büyüme faktörleri (IGFBP1, prolaktin, VEGF, glikodelin, IGF1, Cox1 ve 2), sinyal molekülleri (protein kinaz a düzenleyici ve katalitik alt ünitesi 1A, NOS, SWAP70), adezyon molekülleri (integrin alfa 1,3,4 ve a5b3, mucin 1, düz kas miyozin 2) ve proteazlar (MMP2, MMP9, MMP14, Timp1, Timp2, Timp3, Ubiquitin) görev almaktadır. Bu faktörler arasından, sinsityotrofoblast hücrelerinin invazyonunda MMP'lerin rolü oldukça önemlidir. Desidua hücrelerinin parçalanması ve trofoblast hücrelerinin ilerleyebilmesi ve sonrasında invazyonun sınırlandırılıp durması için MMP/Timp dengesi kilit rol oynamaktadır.

### **2.3.2. İmplantasyonda görev alan matriks metalloproteazlar ve doku inhibitörlerinin etkisi**

Matriks metalloproteazlar multigenik bir endopeptidaz ailesidir. Ekstraselüler matriksi parçalayan, nötral pH'da aktif olan bu proenzimler, fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanırlar. MMP'ler yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda artrit, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar (Aksun vd 2001).

Ekstravillöz trofoblastlar, ekstraselüler matriksi biyokimyasal olarak bozmak için yüksek miktarlarda MMP üreterek bu aktif invaziv potansiyele ulaşırlar. Desidua hücreleri de aynı zamanda MMP'lerin proteolitik aktivitesini antagonize etmek ve invazyonu sınırlamak için Timp'leri üretir (Lala ve Graham 1990, Librach vd 1991, Brows vd 1996). Moleküler düzeyde, desidua hücreleri MMP'lerin ekspresyonunu artırır ve trofoblast hücrelerinde Timp'leri inhibe eder. Etkileri hücre hattına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin, desidua hücreleri, ACH3P hücrelerinde MMP 2, -3 ve -9 ekspresyonunu artırıp, Timp-1, -2 ve -3 ekspresyonunu inhibe etmektedir fakat JEG-3 hücrelerinde ise Timp2'nin ekspresyonunu artırırken Timp1 ve Timp3'ü baskılamaktadır (Godbole vd 2011). İlginç bir şekilde, LIF bağımlı STAT3 aktivasyonundan etkilenen iki proteazın mRNA seviyelerinin, invaziv hücre davranışına veya implantasyonuna katkıda bulunduğu tarif edilmiştir (Menghorst vd 2012). Timp1 ekspresyonunun, LIF'e yanıt olarak azaldığı ve daha önce IL-1b dönüştürücü enzim homologu 2 (ICH-2) olarak adlandırılan, kaspaz-4'ün ekspresyonunun ise arttığı görülmüştür (Fitzgerald vd 2005, Fitzgerald vd 2008). Timp1 promotor bölgesinde STAT3 tanıma bölgesi bulundurmaktadır. İmmünoreaktif IL-1b, villöz sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlarda

bulunur (Simon vd 1994a, Simon vd 1994b, Fitzgerald vd 2008) ve en azından endometriyal stromal hücrelerde Timp1 mRNA'sının ekspresyonunu açık bir şekilde baskılar (Huang vd 1998, Menghorst vd 2012). Ayrıca Timp1, tüm MMP'leri inhibe eder, fakat tercihen, sitotrofoblast invazyonu için kritik olduğu bulunan latent ve aktif MMP9'a bağlanır (Librach vd 1991, Goldberg vd 1992, Fitzgerald vd 2008). Xiaoliang Li, Chunlian Wu vd. (2018), MMP9 promotöründeki dimetilasyonun trofoblast hücre migrasyonunun azalması ve TET2-MMP9 aracılı yolağın ekspresyonunun azalması ile preeklampsi patogeneze katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Xiaoliang vd 2018).

#### **2.4. Hipotezler**

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında doktora tez çalışmasının hipotezleri:

1. Diyabet, MMP-2, -3, -9 ve TIMP-1, -2, -3 ekspresyonunu etkileyerek invazyon sürecini bozmaktadır.
2. Diyabet gen ekspresyon seviyelerinde değişime neden olarak embriyo implantasyonu ve gelişimi hatalarına yol açmaktadır.

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1.Çalışma Grubu**

Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden alınan 9-10 haftalık 300-325 gr ağırlığında Wistar cinsi 48 adet dişi erişkin Wistar tipi sıçan kullanılmıştır. 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 0C) kontrol edilen bir odaya yerleştirilmiştir. Denekler, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (purina) beslenmiştir. Bunlardan 24 dişi diyabetik grup, diğer 24 dişi non-diyabetik (kontrol) grup olarak rasgele seçildi. Deney ve kontrol grupları kendi içlerinde eşit şekilde ve rastgele her biri 12'şer hayvandan oluşan implantasyon (6,5. gün) ve post-implantasyon (8,5. gün) grubu olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. PAUHADYEK-2019/05 numarası ile Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğumuz çalışmamızın 29.01.2019 tarih ve 2019/01 sayılı toplantısında (karar numarası: 60758568-020/8128) hayvan deneyleri etiği açısından uygun olduğuna karar verilmiştir.

#### **3.2. Diyabet Modelinin Oluşturulması**

Deney grubu olarak seçilen sıçanlarda deneysel diyabet oluşturmak için streptozosin (STZ) kullanıldı. Litaratürde deneysel diyabet oluşturmak amacıyla en sık kullanılan yöntem tek doz STZ'nin 50-60 mg/kg intraperitoneal (ip) enjeksiyonudur (Srinivasan vd 2005, Sah vd 2016). Sıçan ağırlıklarına göre ortalama değer olan 55 mg/kg STZ ip

enjeksiyonla diyabet grubu hayvanlarına uygulandı. STZ uygulamasından sonraki 3. gün sıçanların kuyruk veni kanlarından kan glukoz değeri (KGD) ölçüldü. Önceki çalışmalar göz önüne alınarak KGD'i 250 mg/dl nin üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi (Srinivasan vd 2005, Sah vd 2016). KGD 0., 3., 10., 15. ve 20. günlerde ölçüldü.

### 3.3. Sıçanlarda Gebeliğin Oluşturulması

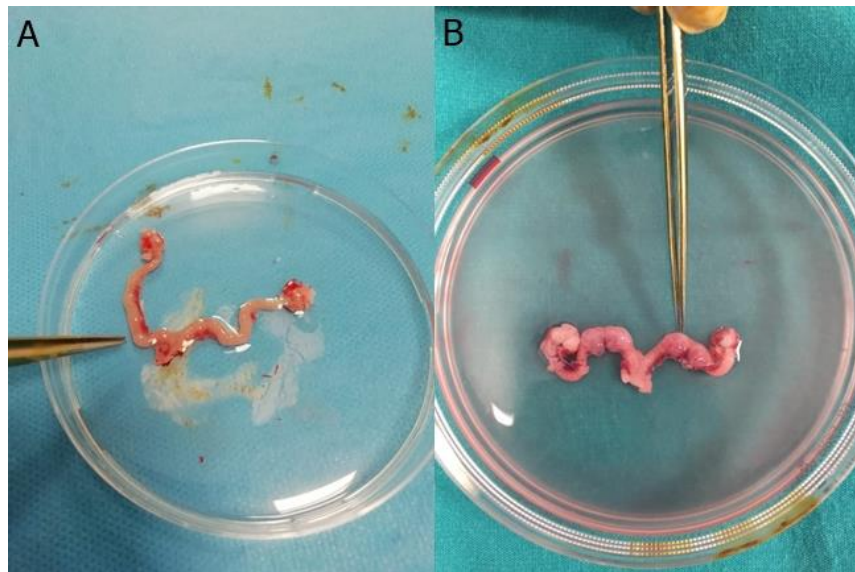
Sıçanlar, dört günde bir kızgınlık göstermektedir. Deneysel çalışmalarda kızgınlık döngüsünün (östrus siklusu) takibi ve hayvanların gruplara ayrılması zor olmaktadır. Bu nedenle dişilerin aynı anda kızgınlık döngülerine ulaşmaları için yapılan işlem (senkronizasyon) gerekir. Senkronizasyon; çeşitli hormonlar ile sağlanmaktadır. Bunun için çeşitli gonadotropinler; örneğin, Gebe Kısarak Serum Hormonu (PMSG) ve İnsan Koriyolik Gonadotropin (hCG) enjeksiyonu dişilerde hormonal bakımdan aynı anda kızgınlık göstermelerine neden olarak eşzamanlı kızgınlık döngüsünün oluşumunu sağlamaktadır (Silva ve Serakides 2016).

Tüm bireyleri eş zamanlı aynı kızgınlık döngü safhasına sokma işlemi (senkronizasyon) için PMSG ve hCG hormonları kullanıldı. PMSG ticari olarak 5 UI/0.1 ml konsantrasyonda alındı ve sıçanlara 30 UI/kg olacak şekilde karın zarı içine (intra peritoneal) saat 12:00'de verildi. PMSG enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra 15 UI/kg olacak şekilde hCG hormonu saat 12:00'de aynı yöntemle verildi. hCG enjeksiyonundan yaklaşık bir saat sonra, vajinal smear yöntemi ile östrusa girip girmedikleri kontrol edildi. Östrusa girmiş olan sıçanlar kafeslerde tekli olarak bekletilen döllenme yeteneğine sahip (fertil) erkeklerle bir gece çiftleşmeye alındı.

Çiftleşmeleri için 24 saat beklenildikten sonra, plak gösteren dişilerin plak gösterdiği saatler not edilip, vajinal smear yöntemiyle sürüntüde sperm tespiti yapıldı (Silva ve Serakides 2016). Smear testinde sperm rastlanan hayvanlar ayrı bir kafese toplanarak deneye alındı. Plak veya vaginal smearde sperm görülmeyenler deneye dahil edilmedi. Deneye dahil edilmeyen sıçanlar gerekçeleri ile deney hayvanları etik kuruluna bildirildi ve ek etik kurulu onayı alınarak yeni sıçanlar çalışmaya dahil edilip deney gruplarının sayıları 12'ye tamamlandı.

### 3.4. İmplantle Embriyolar ile Birlikte Uterus Dokularının Alınması

Vajinal plağın tespit edilmesini takiben implantasyon grupları gestasyonun 6,5. gününde ve post-implantasyon grupları 8,5. gününde total halde uterusun çıkarılması için işleme alındı. Bu işlem genel anestezi altında batının tıraşlanıp ve dezenfeksiyonunu takiben steril ortamda batın açılması, parafolmaldehit ile perfüzyon işleminin yapılması ve uterusun diseke edilmesi şeklinde uygulandı. Uterusun alınması; Oviduktun cornu uteri başlangıcı ve serviksin klemlenip, kesilerek çıkartılması yoluyla yapıldı (Şekil 3.1). Çıkarılan dokuların bir kısmı histolojik tetkikler için formaldehit fiksatifine alınırken, bir kısmı (her hayvandan eşit boyutlarda, 1 embriyo) RNA izolasyonu için taze halde trizole, bir kısmı da (her hayvandan eşit boyutlarda, 1 embriyo) protein izolasyonu için RİPA tamponuna alındı. İşlemin ardından genel anestezi altındaki sıçanlara servikal dislokasyon uygulanarak sakrifiye edildi. Deney gruplarında yer alan toplam sıçan ve elde edilen embriyo sayıları Tablo 3.1'de yer almaktadır.



**Şekil 3.1** İmplantle olan konseptuslar ile birlikte çıkarılmış uterus dokusu. A) İmplantasyon grubu (6.5 gün) B) Post implantasyon grubu (8.5. gün)

**Tablo 3.1** Deney grupları: Yapılan analizlere göre kullanılan sıçan ve embriyo sayıları dağılımı

	Non-diyabetik (Kontrol grupları)		Diyabetik (Deney grupları)	
	6,5. gün	8,5. gün	6,5. gün	8,5. gün
Sıçan sayısı	12	12	12	12
Toplam embriyo sayısı	70	87	50	75
Mikrodizin	2 sıçan / 1'er embriyo	2 sıçan / 1'er embriyo	2 sıçan / 1'er embriyo	2 sıçan / 1'er embriyo
GZ-PZR	12 sıçan / 1'er embriyo	12 sıçan / 1'er embriyo	12 sıçan / 1'er embriyo	12 sıçan / 1'er embriyo
Eliza	12 sıçan / 1'er embriyo	12 sıçan / 1'er embriyo	12 sıçan / 1'er embriyo	12 sıçan / 1'er embriyo
pIHC	12 sıçan / Toplam 67 embriyo	12 sıçan / Toplam 84 embriyo	12 sıçan / Toplam 47 embriyo	12 sıçan / Toplam 72 embriyo

### 3.5 Dolaşımdaki MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Tayini İçin Kan Alınması

Sıçanlar sakrifiye edileceği gün bütün sıçanlardan kardiyak ponksiyon yoluyla 5 ml periferik kan örneği herhangi bir antikoagülan veya diğer katkı maddelerini içermeyen düz tüplere alınıp, pıhtılaşmanın sağlanması için 30 dk bekledikten sonra 3000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında ayrıştırılmış olan serum örnekleri, her birinde 1,5 ml olacak şekilde 2 ayrı eppendorf tüpüne aktarıldı, çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

### 3.6 Formaldehit Fiksasyonu ve Doku Takibi Protokolü

- Alınan dokular 72 saat %10'luk nötral tamponlanmış formaldehitte bekletildi. Bu sürenin ardından dokular çıkarıldı ve akan su altında 30 dakika yıkandı.
- %70' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- %80' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.

- %90' lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- %96' lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- Absolu alkol 1 saat bekletildi.
- Absolu alkol 1 saat bekletildi.
- Ksilen I'de 1 saat bekletildi.
- Ksilen II'de 1 saat bekletildi.
- Parafin I'de 1 saat bekletildi.
- Parafin II'de 1 gece bekletildi.
- Dokulara parafine gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

### 3.7. İmmunohistokimyasal işaretleme

- Parafine gömülmüş dokulardan 5 mikronluk kesitler alındı.
- Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletildi.
- Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- Ksilenden çıkarılıp havada kurutularak PAP pen ile dokular işaretlendi.
- Kesitler sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
- Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- Antijen retrieval işlemi için önceden hazırlanmış sitrat tamponu ile mikrodalga fırında max sıcaklık ayarında kaynatıldıktan sonra 20 dk süre ile bekletildi.
- 10 dakika PBS'de bekletildi.
- Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, %30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1: 9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, TP-125UB, Fremont, USA) ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- MMP2(Cat: FNab 05238, Lot:20210302, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, China), MMP9(Cat: FNab 05247, Lot:20210302, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, China), Timp1(BT LAB, Cat: BT\_AP09034, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai Korain Biotech Co Ltd, Shanghai, China ) ve Timp2 (Cat: FNab 08707, Lot:20210302, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, China) monoklonal primer antikörleri 1:100 oranında dilue edildikten sonra kesitler üzerine ilave edilerek 1 gece (over-night) bekletildi.



- Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edildi. Bu işlem için ticari olarak alınan geniş spektrumlu evrensel sekonder antikör kiti (Thermo Fisher Scientific, TP-125BN, Fremont, USA) kullanıldı.
- Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş- sekonder antikörlere kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) (Thermo Fisher Scientific, TP-125HR, Fremont, USA) 10 dakika kadar muamele edildi.
- Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3-10 dakika kadar muamele edildi.
- Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merk Harris' hematoksilin) ile zıt boyama yapıldı.
- Kesitler akan suda yıkanıp ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
- Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2 şer dakika bekletildi.
- Ksilenden alınan dokuların üzeri kurumaması beklenilmeden entellan ile kapatıldı.
- Boyanma yoğunluğu ışık mikroskopunda değerlendirildi ve değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanıldı.

(3): kuvvetli boyanma, (2): orta derecede boyanma, (1): zayıf boyanma, (0): boyanma yok

İmmün boyanan her preparatın farklı alanları kör olarak üç ayrı araştırmacı tarafından değerlendirildi. Alınan kesitler ışık mikroskobu altında (40x) implantasyon bölgeleri (region of interest, ROI) Visiopharm's newCAST™ yazılımı kullanılarak seçildi. Seçilen alanlar içinden, ilk sayımın yapılacağı alan rastgele seçilerek her 3 alanda bir 400x büyütmede %50 sayım tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak, hücreler boyanma yoğunluğuna göre negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve güçlü (3) olmak üzere sayıldı. İlgili proteinlerin ekspresyonlarının semi kantitatif değerlendirmesi boyama yoğunluğunun ve pozitif hücrelerin yüzdesinin kombinasyonuna dayanarak daha önce yayınlanmış yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir (Soslow vd 2000). Pozitif boyanan hücre sayısı %0-10 (1), %11-50 (2), %51-80 (3) ve %80'den fazla ise (4) olarak skorlandı. Boyama yoğunluğu, 0 = negatif; 1 = zayıf; 2 = orta ve 3 = güçlü olmak üzere 0 ila 3 arasında derecelendirildi. Teorik olarak skor 0 ile 12 arasında değişebilir. 9-12 arası bir immunohistokimya skoru güçlü immünreaktivite, 5-8 arası orta, 1-4 arası zayıf ve 0 negatif olarak kabul edildi (Soslow vd 2000, He vd 2015).

### **3.8. Dokulardaki MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 Tayini**

Doku homejenatlarındaki MMP-2 (Lot: 201906019, Bioassay Technology Laboratory) MMP-3 (Lot:201906019, Bioassay Technology Laboratory), MMP-9 (Lot: 201906019, Bioassay Technology Laboratory), TIMP-1 (Lot: 201911013, Bioassay Technology Laboratory) ve TIMP-2 (Lot: 201911013, Bioassay Technology Laboratory) düzeylerinin tespiti ticari olarak temin edilen sıçan MMP kantitatif eliza kitleri kullanılarak, 2 tekrarlı olarak enzim bağlı immün assay (ELISA) yöntemi ile yapıldı. OD değerleri 450 nm absorbans değerinde Promega Glomax Multi-Detection System cihazı kullanılarak saptandı.

### **3.9. Dolaşımdaki MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 Tayini**

Serum örneklerindeki MMP-2 (Lot: 201906019, Bioassay Technology Laboratory) MMP-3 (Lot:201906019, Bioassay Technology Laboratory), MMP-9 (Lot: 201906019, Bioassay Technology Laboratory), TIMP-1 (Lot: 201911013, Bioassay Technology Laboratory) ve TIMP-2 (Lot: 201911013, Bioassay Technology Laboratory) düzeylerinin tespiti ticari olarak temin edilen sıçan MMP kantitatif eliza kitleri kullanılarak, 2 tekrarlı olarak enzim bağlı immün assay (ELISA) yöntemi ile yapıldı. OD değerleri 450 nm absorbans değerinde Promega Glomax Multi-Detection System cihazı kullanılarak saptandı.

### **3.10. Total RNA İzolasyonu**

Deney ve kontrol grubu sıçanlarından alınan uterus dokuları homojenize edildikten sonra direkt olarak RNA izolasyonu kiti (GeneAll Hybrid-R, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi:

- Homojenize edilen doku örnekleri üzerine 1000 µl RiboEx (Lot: REX19C27010, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) lizis reaktifi eklenerek vorteks yapıldı ve homojenize edildi.
- Homojenat oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 200 µl kloroform eklenerek iyice karıştırıldı.
- 12000xg'de 15 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak 525 µl RBI (Lot: RB119B12001, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 700 µl örnek RNeasy mini spin kolonlara (Type F) (Lot: FN018I12009, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) aktarıldı ve oda sıcaklığında 10000xg'de 30 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Örneğin kalan kısmı kolonlara aktararak santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Kolona 700 µl Buffer RBI eklenerek oda sıcaklığında 10000xg'de 30 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Kolona 500 µl Buffer SWI (Lot: SW119D09001, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) eklenerek oda sıcaklığında 10000xg'de 30 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Kolona tekrar 500 µl Buffer RNW (Lot: RNW19L03013, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) eklenerek oda sıcaklığında 10000xg'de 30 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Kolon 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı ve kolona 50 µl RNA içermeyen su (Lot: NFW19C29002, GeneAll Biotechnology Co., LTD, Seoul, Korea) eklenerek oda sıcaklığında 10000xg'de 1 dk santrifüj edilerek RNA ependorf tüpe aktarıldı. RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar bekletilmek üzere -80 °C de soğutucuya kaldırıldı.

### 3.11. Total RNA'nın cDNA'ya Çevrimi

Total RNA örnekleri Hi-Capacity cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Lot: 2D0718-14, WizScript, WizBio Solutions, Gyeonggi-Go, Korea) kullanılarak cDNA'ya çevrildi (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2** cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları

Bileşen	Hacim
10x RT Solüsyonu	2 µl
20x dNTP karışımı	1 µl
Random hexamer	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
RNase İnhibitor	0,5 µl
Nükleaz içermeyen su	3,5 µl
Total hacim	10 µl

Hazırlanan 10 µl 'lik karışım üzerine 10 µl (1 µg) izolasyonu yapılan total RNA örneği eklendi. Ardından reaksiyon karışımı PZR cihazında sırasıyla 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk olacak şekilde reaksiyona tabi tutuldu. cDNA'ya dönüşen örnekler -20 °C'de saklandı.

### 3.12. mRNA mikrodizin Analizi

Deney grubu ve kontrol grubu sıçanlarından alınan uterus dokusundan izole edilen RNA örnekleri ND-1000 spektrofotometre (NanoDrop, Amerika) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika) cihazları ile saflık ve kalitesi ölçüldü ve bu örneklerden yeterli kaliteye sahip her grup için 2 'şer adet örnek rastgele olarak seçilip mikrodizin analizine tabi tutuldu. GeneChip™ Rat Gene 2.0 ST Array platformu kullanılarak direkt hibridizasyon yöntemi ile mRNA mikrodizin işlemi gerçekleştirildi. RNA örnekleri çip üzerine hibridize edilmeden önce çoğaltıldı ve biotin ile işaretlendi. Hibridizasyon sonrası Cy3- streptavidin ile işaretleme yapıldı ve çip görüntülendi. GeneChip™ Rat Gene 2.0 ST Array platformu iyi tanımlanmış genler (24000), gen adayları ve sprints varyantlarını içermektedir ve transkriptomun (27000) büyük bir kısmını saptayabilmektedir. Mikrodizin sisteminde her bir gen için 22 adet prob bulunmaktadır. Problar NCBI RefSeq Release 91 içeriğine göre tasarlanmıştır. Problar 50mer uzunluğunda olup artmış bir seçicilik ve hassaslığa sahiptir. Mikrodizin sonucu elde edilen verilen örnekler arasında kat değişimi şeklinde analiz edildi ve gruplar arasında korelasyon analizi ve küme analizleri yapıldı.

### 3.12.1. Mikrodizin Sonuçlarının Analizi

Veriler Affymetrix® Power Tools'da (APT) uygulanan sağlam çoklu ortalama (RMA) yöntemiyle özetlendi ve normalleştirildi. Sonucu gen seviyesinde RMA analizi ile aktarıldı ve farklı şekilde ifade edilen gen (differentially expressed gene, DEG) analizi gerçekleştirildi.

Ekspresyon verilerinin istatistiksel önemi, kat değişimi kullanılarak belirlendi. Bir DEG seti için, benzerliğin bir ölçüsü olarak tam bağlantı ve Öklid mesafesi kullanılarak Hiyerarşik küme analizi gerçekleştirildi.

Önemli prob listesi için Gen Zenginleştirme ve Fonksiyonel Açıklama analizi, Gene Ontology (<http://geneontology.org>) kullanılarak gerçekleştirildi.

Farklı şekilde ifade edilen genlerin tüm veri analizi ve görselleştirmesi, R 3.3.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) kullanılarak gerçekleştirildi.

Mikrodizin analizleri sonucu elde edilen veriler kullanılan platformların yazılımları sonucunda her bir örnek ve kontrolü için işlenecek ve mRNA dizin sonuçları Gen ontoloji (GO) ve KEGG Yolak analizleri ile analiz edildi.

Gen Ontoloji (GO) Analizi: Farklı ekspresyon gösteren mRNA'ların rol aldığı hücresel, biyolojik ve moleküler açıdan fonksiyonel genleri ve gen gruplarını ortaya koymak amacıyla yapıldı ve her bir analiz için kontrol ve hedef grup karşılaştırması yapılarak en belirgin farklılık gösteren hücresel süreçler belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Yolak Analizi: Ekspresyon farklılığı gösteren mRNA'ların birbirleri ile olan ilişki ağını ve hücre metabolizması hakkında bilgi vermek için de KEGG yolak analizi gerçekleştirildi. Her bir analiz için kontrol ve hedef grup karşılaştırması yapılarak yolaklarda en yoğun değme noktası farklılığı gösteren yolaklar belirlendi ve tüm analizlerin değerlendirmesinde  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### 3.13. GZ-PZR ile Ekspresyon Analizi

Mikrodizin analizi sonucunda diyabete bağlı olarak embriyo-endometriumda saptanmış olan ifadesi artan ya da azalan mRNA'ları doğrulamak amacıyla izolasyonu yapılan ve cDNA'ya dönüştürülen tüm RNA örnekleri WizPure PCR 2X master karışımı (Lot: 2D0718-09, WizBio Solutions, Gyeonggi-Go, Korea) kullanılarak Bio-Rad CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler) cihazında analiz edildi. Reaksiyon karışımı hazırlanmadan önce cDNA örnekleri 1/10 oranında nükleaz içermeyen su kullanılarak dilüe edildi ve reaksiyon karışımı 2 µl cDNA örneği, 10 µl SybrGreen 2X master mix, 1 µM ileri ve geri primerler ve 6 ddH<sub>2</sub>O ile total hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Sonuçların analizi için β-Aktin housekeeping olarak kullanıldı. Reaksiyon döngüsü aşağıda belirtildiği gibi her örnek için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi (Tablo 3.3). Seçilen primerlere ait bilgiler tablo 3.4 de yer almaktadır.

**Tablo 2.3** GZ-PZR koşulları

Segment	Döngü	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	5 dk
2	40	95°C	30 sn
		60°C	60 sn

**Tablo 3.4** GZ-PZR Primerleri

Gen No	Sembol	Gen Tanımı	Primer	Sekans (5'→3')
NM_031054	Mmp2	matrix metalloproteinase 2	F	AGCAAGTAGACGCTGCCTTT
			R	CAGCACCTTTCTTTGGGCAC
NM_133523	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	F	CAGGCATTGGCACAAAGGTG
			R	GTGGGTCACTTTCCCTGCAT
NM_031055	Mmp9	matrix metalloproteinase 9	F	CGGCAAACCCTGCGTATTTC
			R	GTTGCCCCAGTTACAGTGA
NM_012980	Mmp11	matrix metalloproteinase 11	F	ACGGTGAGAAGCCAGTCTTA
			R	TGTCCACTCGTTGGGTTCTG
NM_001106800	Mmp20	matrix metalloproteinase 20	F	GCTAACTACCGCCTCTTCCC
			R	CGAAGATCAGAGGGACAGCC
NM_053819	Timp1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	F	GCTTTCTGCAACTCGGACCT
			R	AACCGGAAACCTGTGGCATT
NM_021989	Timp2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	F	CTAATTGCAGGGAAGGCGGA
			R	GATCATAGGGCAGCGTGTGA
NM_012886	Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	F	AAATACCTTCTGGTCCCGC
			R	TAGGAGACTCTGGCGTCTGT
NM_001145828	Tlr5	toll-like receptor 5	F	AACAGGGTGCTTTGTCTCGG
			R	GACCCCAGGATTCTCAAGCC
NM_030985	Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	F	CTCTGCCACATTCCCTGAGTTA
			R	TGGGGCAGTCATCTTGATTC
NM_031764	Ddr2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	F	TGGCGGAATGAGAGTGCTAC
			R	CATTGCTGGTTTCAGAGCG
NM_053391	Hs3st1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	F	GAACCCTACTATCCGCCTGC
			R	GCGGTTGAGAGCCTTGAGT
NM_173094	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)	F	TACACCTCGTCCCTCTACGG
			R	GGTTGTATGGATTGGCCTCCTT
NM_053551	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	F	ATACTCCACTGCTCCAACGC
			R	AGAGACGGGAAATCGGCAAG
NM_053465	Fut9	fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	F	CATCCTGCCAAGCCATGTTC
			R	TCAGGACCGCATGGGATTTG
NM_057104	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	F	TTGTCCGCCCTCCGTTAATC
			R	TCTCGCCCTCGTAGATGGAA
NM_001289982	Dbp	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	F	AGGGAAACAGCAAGCCAAA
			R	CTAGAGGTCAAGCCGCCACT
NM_001106465	Ntng1	netrin G1	F	ATTTTTGGAGGGAGAGGCACC
			R	TCTTTTCCCCTTCTGGCACC
NM_022707	Pln	phospholamban	F	GTAGCCCACAAGGAGTCCC
			R	CTTCTCAACCTGTGCGTTGC
BC168181	Tnxb	tenascin XB	F	CGTGACTGAGGAGGAAGCTATG
			R	GAGGGGTTTCTTAGGAGGGG

**DİPNOT:** Tablonun devamı diğer sayfadadır.

Gen No	Sembol	Gen Tanımı	Primer	Sekans (5'→3')
XM_001054007	C7	complement component 7	F	AGAGCCTCCTCTCCAGTCAA
			R	CTTCAGTTGGACAGCCTCGT
NM_001109223	Wnt16	wingless-type MMTV integration site family, member 16	F	GTCGCTGCCTGTAAGAGTGT
			R	ACTATCCAAAGGCGACTGCC
NM_013144	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	F	CACAGCAAACAGTGCGAGAC
			R	TGAAAGGCCCTACCTCAGA
NM_001106422.1	Tnik	TRAF2 and NCK interacting kinase	F	CTGCTCGTTGACCTCACAGT
			R	CCTGGTGGTCTCTTAAATGCAA
NC_005111.4	β-actin	beta actin	F	AGCTGAGAGGGAAATCGTGC
			R	ACCAGACAGCACTGTGTTGG

### 3.14.İstatistiksel Analiz

Elizada OD değerleri alınan örneklerin arka plan düzeltilmesi boş kuyucuk OD değerinin örneklerin okunan OD değerinden çıkarılması yapılarak saptandı ve tekrarların ortalaması alındı. Konsantrasyonları bilinen standart örneklerin OD değerleri ile bilinen konsantrasyonları kullanılarak standart eğrisi grafiği P<0,05 anlamlılık düzeyinde olacak şekilde çizdirildi. Çizilen eğrinin formülü kullanılarak örneklerin ortalama OD değerlerinden konsantrasyonları hesaplandı. Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma, ortanca (en küçük - en büyük değerler) olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelendi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey yöntemi); parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Tüm incelemelerde p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

mRNA mikrodizin çalışması sonucunda gruplar arasında ekspresyonel değişim gözlenen mRNA'ların istatistiksel analizi için R istatistik dili v.3.1.2 kullanıldı. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) dataları karşılaştırmalı Ct yöntemi olan 2-ΔΔCt analiz istatistik yöntemi kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında basit Student's t testi kullanıldı. Parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların

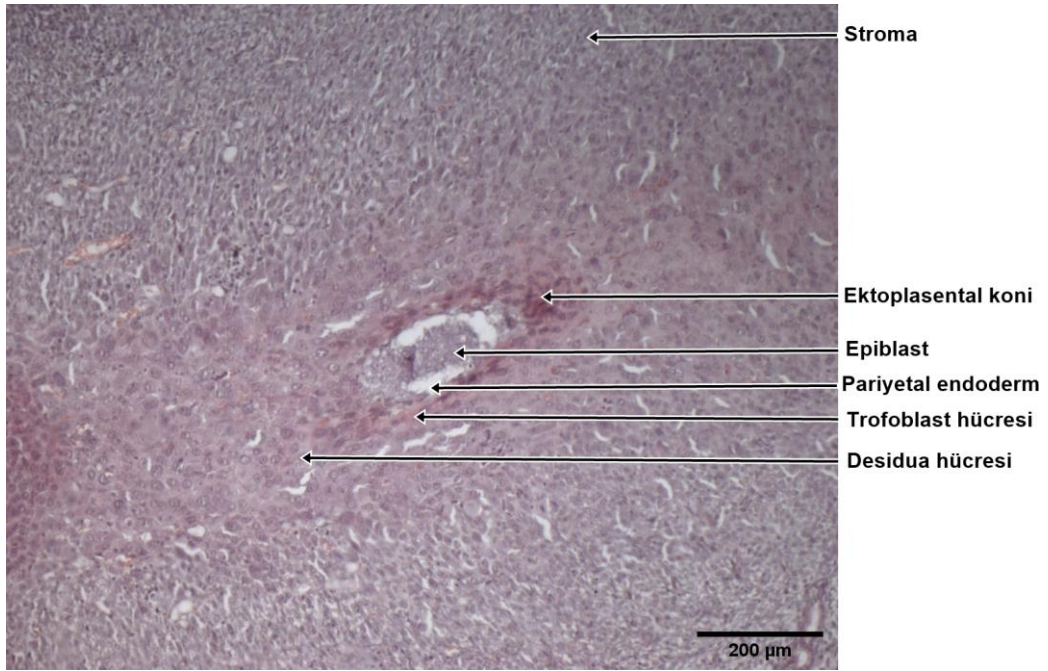


karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Data analizi Graphpad Prism versiyon 8.0.2 (GraphPad Software, Inc. La Jolla California, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi ve tüm analizlere  $P < 0,05$  anlamlılık seviyesi olarak kabul edildi.

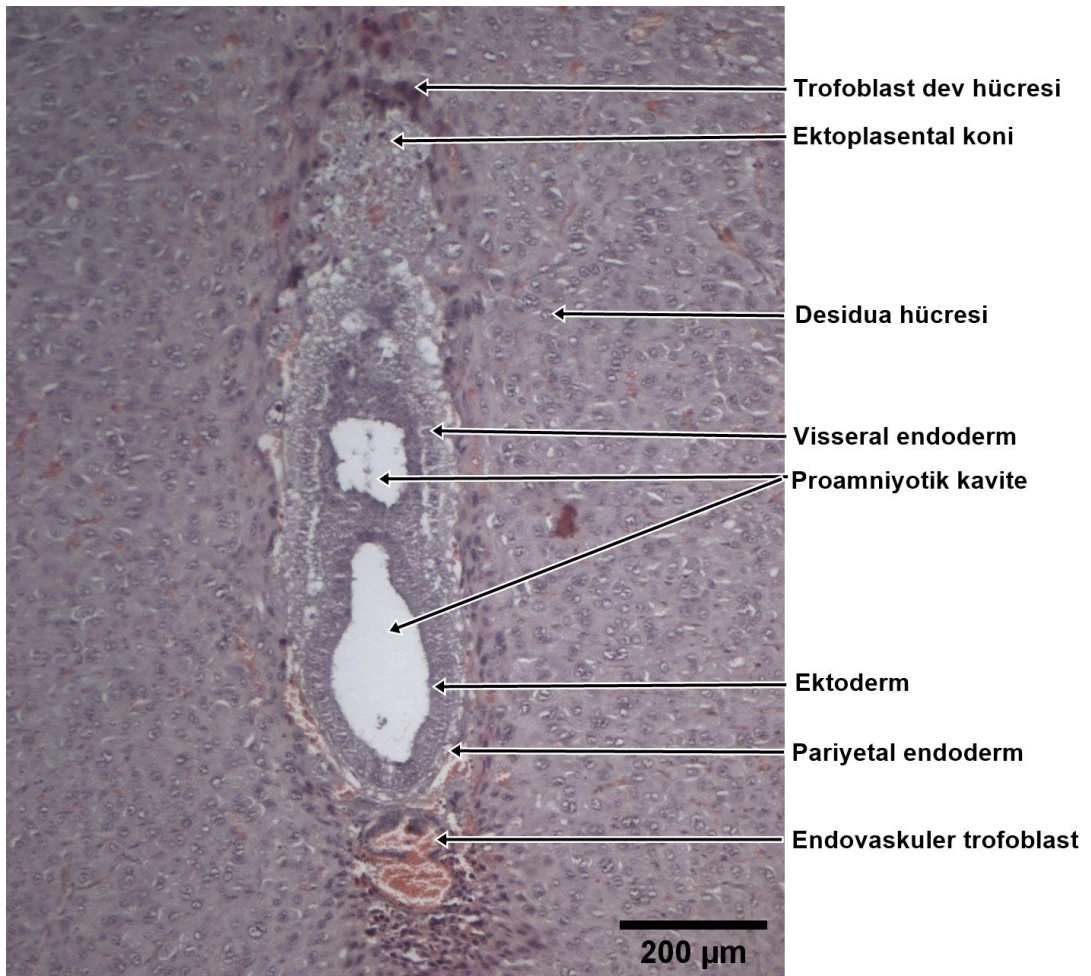
## 4.BULGULAR

### 4.1. Histolojik Değerlendirme

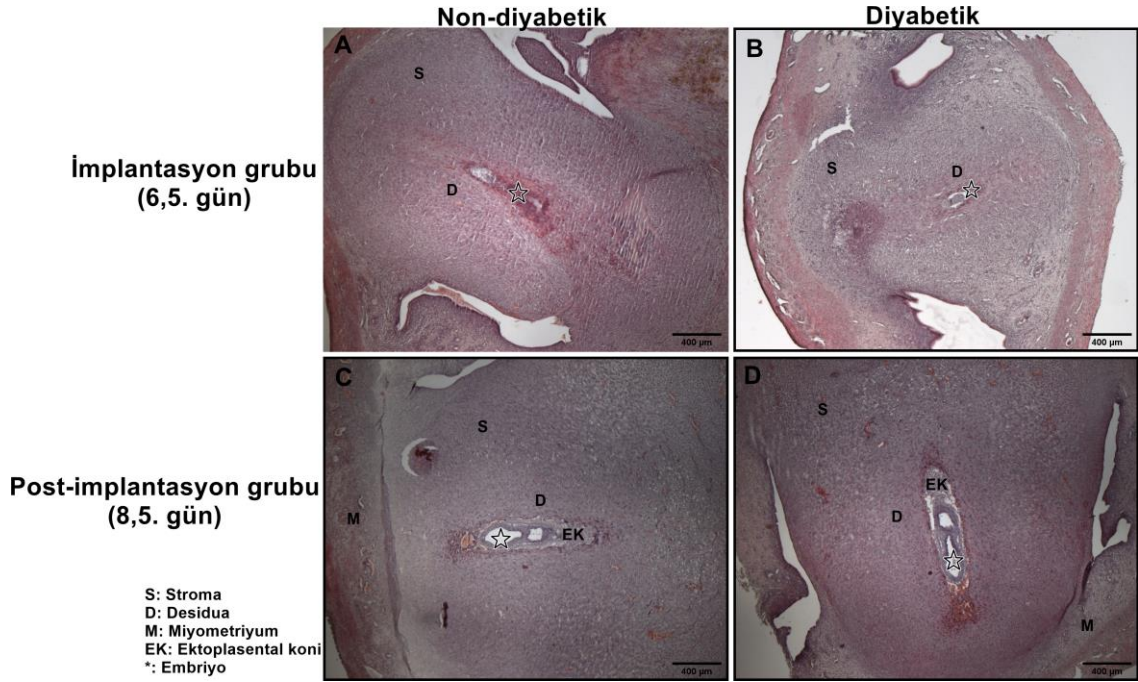
Hematoksilen- eozin boyama ile ışık mikroskobunda yapılan incelemeler ışığında 6.5 günde, implante konseptusu ve lümen boşluğunu çevreleyen stroma, büyük, yuvarlak çekirdekli, değişen sayılarda nükleoluslu ve granüler materyale sahip hacimli, hafif bazofilik sitoplazmalı desidual hücrelerden oluşuyordu (Şekil 4.1). 8,5. günde ise plasental taraftaki desidual hücrelerin sitoplazmasında çok sayıda vakuol oluşumu gözlemlendi. Büyük hücreler şeklinde izlenen desidual hücrelerdeki mitotik figürlerin 8,5. günde gebeliğin 6,5. gününe kıyasla sayıca artmış olduğu görüldü. Gebeliğin 8,5. gününde bir trofoblastik astarla çevrelenmiş olan embriyofetal doku, implantasyon tarafının karşısındaki uterus duvarına tutunup, plasenta oluşumunu tetikleyen küçük bazofilik trofoblastik hücrelerden oluşan (ektoplasental koni) ektoplasental koninin geliştiği gözlemlendi (Şekil 4.2). Bu yapıdan gelişen fagositik özelliklere sahip bir dizi dev trofoblastın 8,5. gün kontrol gruplarında daha belirgin halde olduğu görülmüştür. İmplantasyon ve post implantasyon gruplarına ait karşılaştırmalı hematoksilen-eozin boyama görüntüleri Şekil 4.3'te yer almaktadır. Diyabetik ve non diyabetik gruplar arasında membran yapılarında ve ECM de değişimlerin olduğu bilinmesine karşın, daha inflamasyonun başlamadı erken dönemlerde alınmış kesitlerde histopatolojik değişimlerin ışık mikroskobu ile tespit edilmesi mümkün olmamıştır. Bu değişimlerin gözlemlenmesi için TEM/SEM analizi gerekmektedir.



**Şekil 4.1** İmplantasyon grubu embriyo kesiti. 100x büyütme, H-E Boyama



**Şekil 4.2** Post-implantasyon grubu embriyo kesiti. 100x büyütme, H-E Boyama

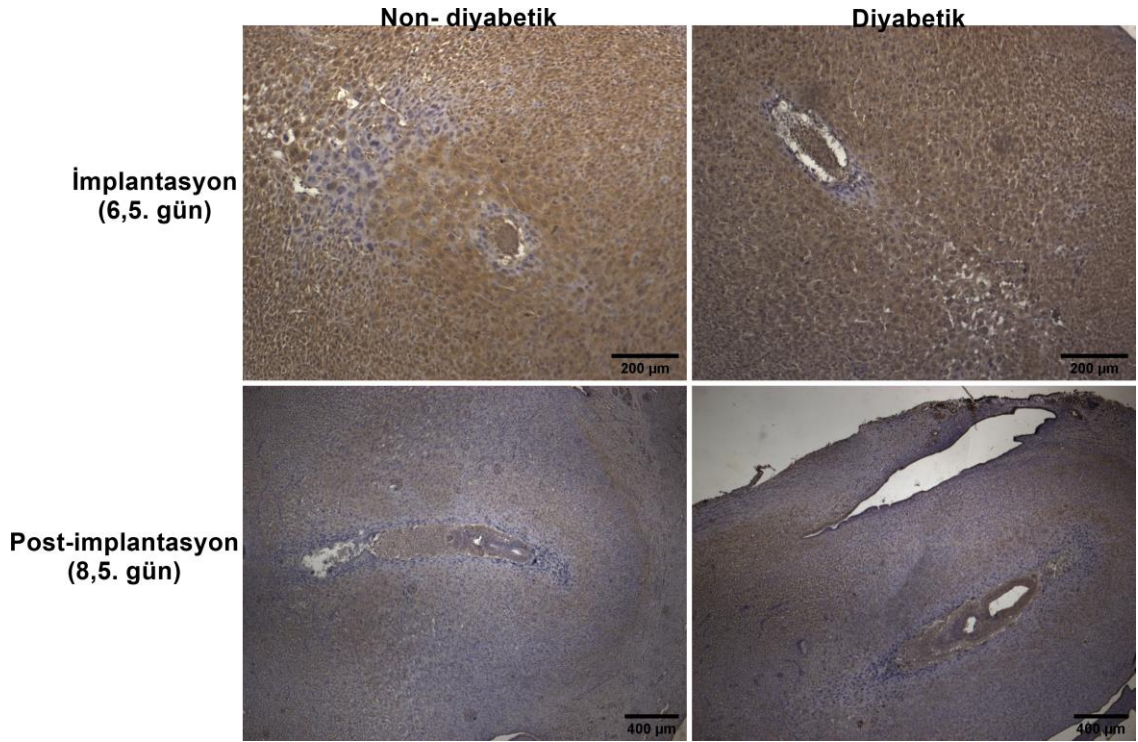


**Şekil 4.3** Uterus kesitleri 40x büyütme. H-E Boyama A) Non-diyabetik implantasyon B) Diyabetik implantasyon C) Non-diyabetik post-implantasyon D) Diyabetik post-implantasyon grupları

#### 4.1.1 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

##### MMP2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

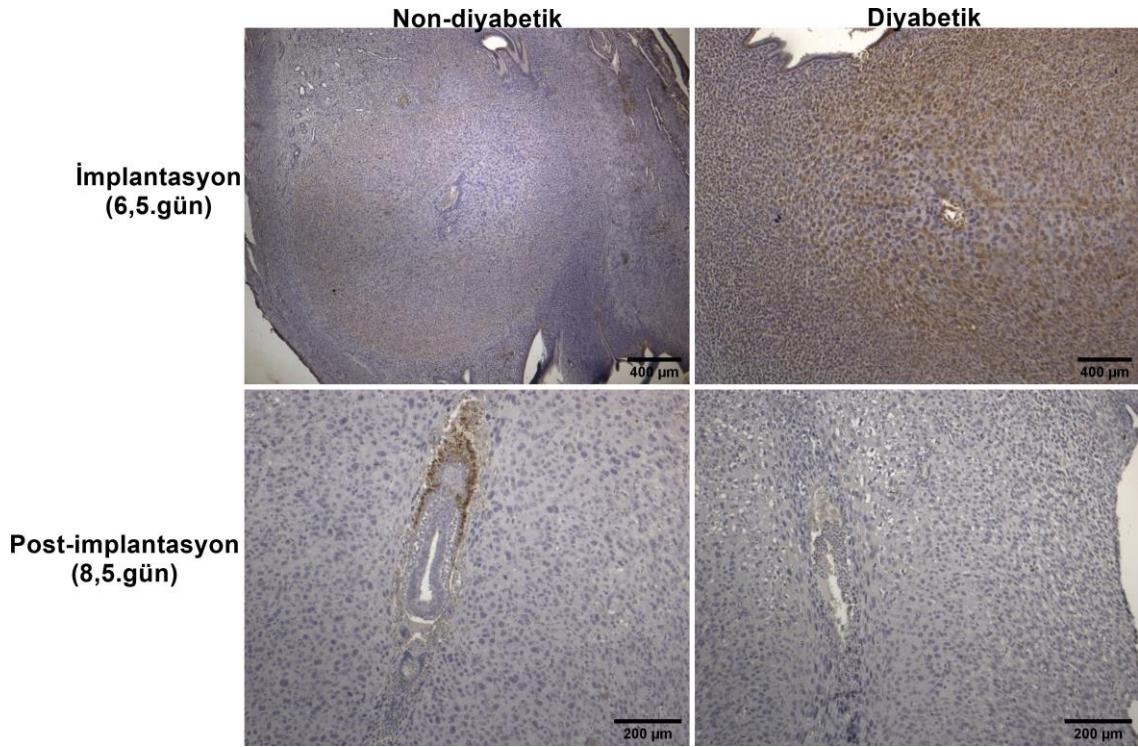
İmplantasyon ve post implantasyon grupları kendi içlerinde diyabetik olanlar ile non diyabetik olanlar arasında doku bütünlüğüne, boyanma paterni açısından bir farklılık gözlemlenmemiştir. İmplantasyon gruplarında desidua hücrelerinin tamamı kuvvetli boyanma göstermektedir. Stromal hücrelerde %40 oranında zayıf boyanma gözlemlenmiştir. Ektoplasental koni hücreleri tam kat kuvvetli boyanma göstermektedir. Trofoblast hücrelerinin ise tamamı boyanma göstermemiştir. Embriyoya ait yapılarda ise kuvvetli boyanma gözlemlenmiştir. Post implantasyon grubundan implantasyon gruplarından farklı olarak stromal hücrelerdeki ekspresyon miktarında düşüş gözlemlenmiştir. Stromal hücrelerin %20'si zayıf pozitif boyanma göstermekteyken geriye kalanı negatiftir. Post implantasyon diyabetik ve non diyabetik gruplar açısından boyanma paterni benzerlik göstermektedir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4** MMP2 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (İmplantasyon grubu fotoları 100x büyütme. Post-implantasyon grubu fotoları 40x büyütme. DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama)

#### MMP9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

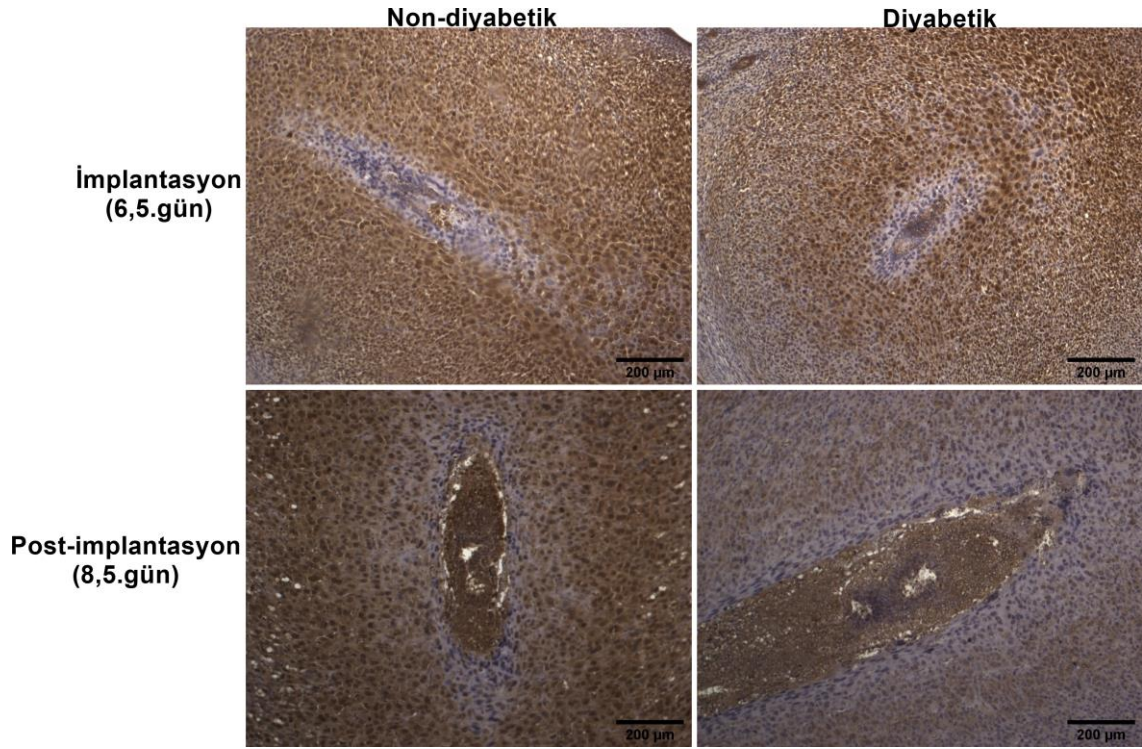
Non diyabetik implantasyon grubu stromal hücrelerinde boyanma gözlenmezken diyabetik implantasyon grubunda bu oran %50 orta şiddette pozitif boyanma şeklinde değişmiştir. Desidua hücrelerinde ise durum %10 zayıf boyanmadan %60 orta şiddette boyanma şeklinde değişmiştir. Trofoblast hücrelerinde non-diyabetik grupta %30 zayıf pozitif boyanma gözlenirken diyabetik grupta %50 orta şiddette pozitif boyanma gözlemlenmiştir. Post implantasyon gruplarında MMP9 ekspresyonunun, implantasyon gruplarına kıyasla azaldığı dikkat çekmektedir. Non-diyabetik post implantasyon grubunda MMP9 ekspresyonunun ektoplasental koni hücrelerinde %90 kuvvetli pozitif boyanması izlenmişken, diyabet grubunda %10 zayıf boyanma görülmüştür. Trofoblast hücreleri ise non-diyabetik post implantasyon grubunda %40 orta şiddette pozitifken diyabetik grupta boyanma gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5** MMP9 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (İmplantasyon grubu fotoları 40x büyütme. Post-implantasyon grubu fotoları 100x büyütme. DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama)

#### Timp1 Ekspresyonunun değerlendirilmesi

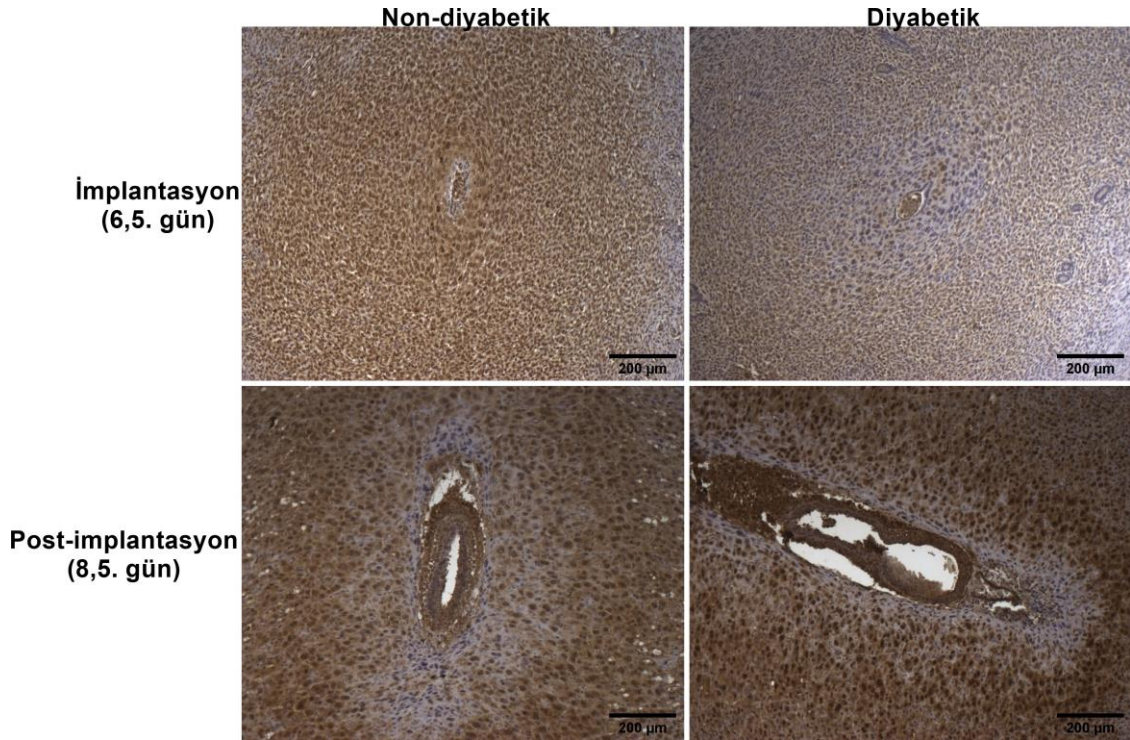
Timp1 ekspresyonunda diyabetik gruplarda desidua hücrelerinde kısmi bir azalma olduğu göze çarpmaktadır. Non diyabetik gruplarda desidua hücrelerinin tamamı kuvvetli pozitif boyanma gösterirken diyabetik gruplardan implantasyon grubunda bu oran %60 orta şiddette pozitif, post implantasyon grubunda %40 zayıf pozitif boyanma şeklinde değişmektedir. Gruplar arasında diğer hücrelerin boyanma paternleri arasında bir farklılık görülmemiştir. Tüm gruplarda trofoblast hücreleri negatif, embriyo yapıları kuvvetli pozitif boyanma göstermektedir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6** Timp1 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (100x büyütme, DAB Kromojen. Hematoksilen zit boyama)

#### Timp2 Ekspresyonunun değerlendirilmesi

Timp2 ekspresyonu açısından tüm gruplarda benzer ekspresyon paterni izlenmiştir. Desidua hücreleri %80-90 kuvvetli pozitif, trofoblast hücreleri negatif, ektoplasental koni negatif, embriyo yapıları kuvvetli pozitif boyanma göstermiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7** Timp2 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi. (100x büyütme, DAB Kromojen. Hematoksilen zıt boyama)

Yukarıda MMP2, MMP9, TİMP1 ve TİMP2'nin lokal ifade değişimleri gösterilmiştir. mRNA ekspresyonları dokudan total protein izolasyonu ile yapılan eliza analizi sonuçlarının immunohistokimya sonuçları ile korelasyonunun daha net anlaşılması açısından total doku immünreaktivite skorunun incelenmesi önemlidir. Embriyoya ait yapılarla birlikte uterusun değerlendirmesine bakıldığında lokal ifadelerinde desidua hücrelerinde ve ektoplasental koni hücrelerinde MMP2 ifadesinin artmış olduğu görülürken total ifade değişimi açısından bir fark görülmemiştir. MMP9 ifadesinin implantasyon grubunda stromada ve desidua hücrelerinde artmış olduğu, post implantasyon gruplarında ise ektoplasental koni hücrelerinde azalmış olduğu görülmektedir. Total ifade değişimi açısından da kontrole kıyasla diyabetik implantasyon grubunda artmış, diyabetik post implantasyon grubunda ise azalmış olduğu görülmektedir. TİMP1 ekspresyonu lokal olarak diyabetik grupların stromasının kısmen azaldığı, diyabetik post implantasyon grubunda ise anlamlı ölçüde azaldığı görülmektedir. Total TİMP1 ifadesinin implantasyon gruplarında benzer olduğu görülürken diyabetik post implantasyon grubunda azaldığı görülmektedir. TİMP2 lokal ifadesi açısından yalnızca diyabetik implantasyon grubunda kısmi bir azalma olduğu görülürken, total ifade değişimi açısından gruplar arasında bir fark görülmemiştir.



İmmunohistokimyasal değerlendirmeye ait immünreaktivite skorları tablo 4.1' de yer almaktadır.

**Tablo 4.1** İmmunreaktivite skoru tablosu (ND: Non-diyabetik, D: Diyabetik).

Total pIHC Skorlaması			MMP2		MMP9		Timp1		Timp2	
			ND	D	ND	D	ND	D	ND	D
Stroma	implantasyon	Skor	2	2	0	4	12	9	12	9
	Post-implan.	Skor	2	2	0	0	12	9	9	9
Desidua	implantasyon	Skor	12	12	1	6	12	12	9	9
	Post-implan.	Skor	6	9	0	0	12	6	12	12
Koni	implantasyon	Skor	9	12	0	0	12	12	0	0
	Post-implan.	Skor	12	12	12	1	12	12	0	0
Trofoblast	implantasyon	Skor	0	0	2	4	0	0	0	0
	Post-implan.	Skor	0	0	0	0	0	0	0	0
Embryo	implantasyon	Skor	12	12	12	12	12	12	12	12
	Post-implan.	Skor	12	12	0	0	12	12	12	12
Total	implantasyon	Skor	7	8	3	5	9,6	9	6,6	6
	Post-implan.	Skor	6,4	7	2,4	0	9,6	8	6,6	7

İmmünreaktivite

9-12 arası güçlü ■

5-8 arası orta, ■

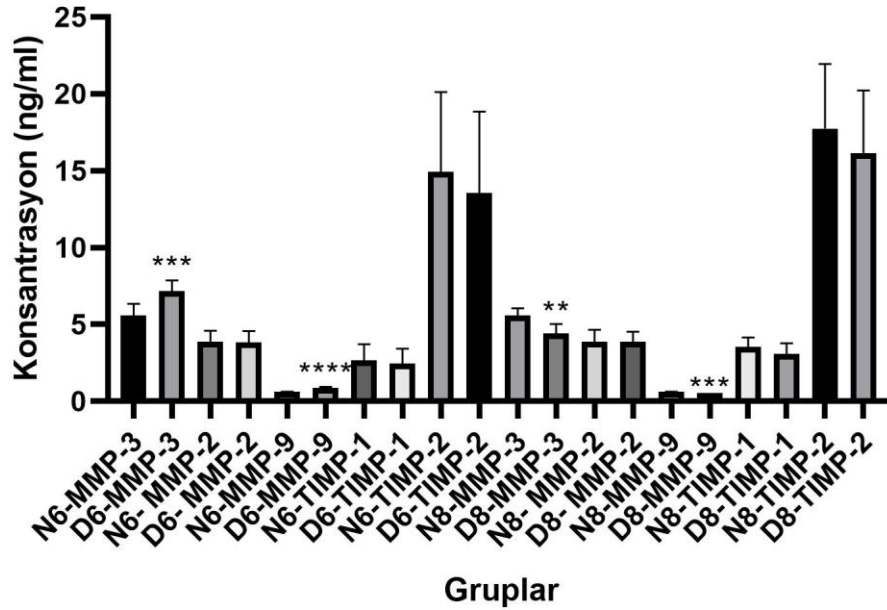
1-4 arası zayıf ■

0 negatif ■

#### 4.2. Dokulardaki ve Dolaşımdaki MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Tayini

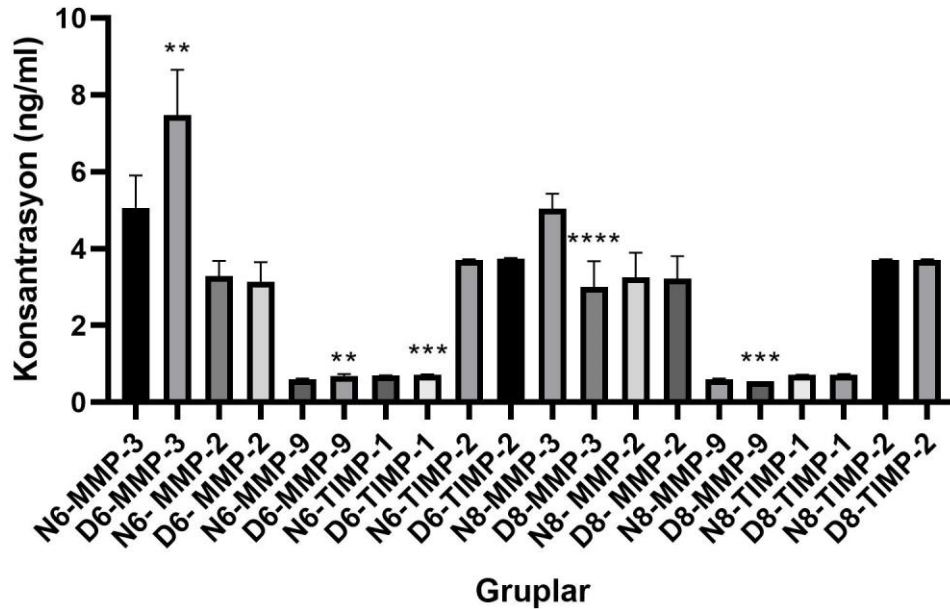
Çalışmamızda konseptus ile birlikte alınan uterus dokusu homojenatları ve kan örneklerinden Eliza yöntemiyle MMP-2, MMP-3, MMP-9, Timp1 ve Timp2 protein ekspresyonu analizi yapıldı. Elde edilen bulgulara göre çizilmiş serum (Şekil 4.6) ve doku (Şekil 4.7) konsantrasyon grafiklerine bakıldığında gruplar arasında ekspresyon farklılıkları gözlemlenmektedir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlı ölçüde ekspresyon farkı olan gruplar aşağıdaki tabloda yer almaktadır (Tablo 4.6). MMP2 ekspresyonunun non diyabetik kontrol grubuna kıyasla hem dokulardaki hem de serumdaki konsantrasyonunun değişmediği görülmektedir. MMP3 ve MMP9 ekspresyonunun benzer şekilde diyabetik implantasyon grubunda, kontrole kıyasla artmış olduğu fakat diyabetik post implantasyon grubunda ise azalmış olduğu görülmektedir. Timp1 ekspresyonu sadece dokularda implantasyon grubunda artarken diğer gruplarda anlamlı bir değişim görülmemiştir. Timp2 ekspresyonunda gruplar arası anlamlı bir değişim görülmemiştir.

### SERUM KONSANTRASYON GRAFİĞİ



**Şekil 4.8** MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Serum Konsantrasyon Grafiği (N6: Non-diyabetik 6,5. gün, N8: non-diyabetik 8,5. gün, D6: Diyabetik 6,5. gün, D8: Diyabetik 8,5.gün)

### DOKU KONSANTRASYON GRAFİĞİ



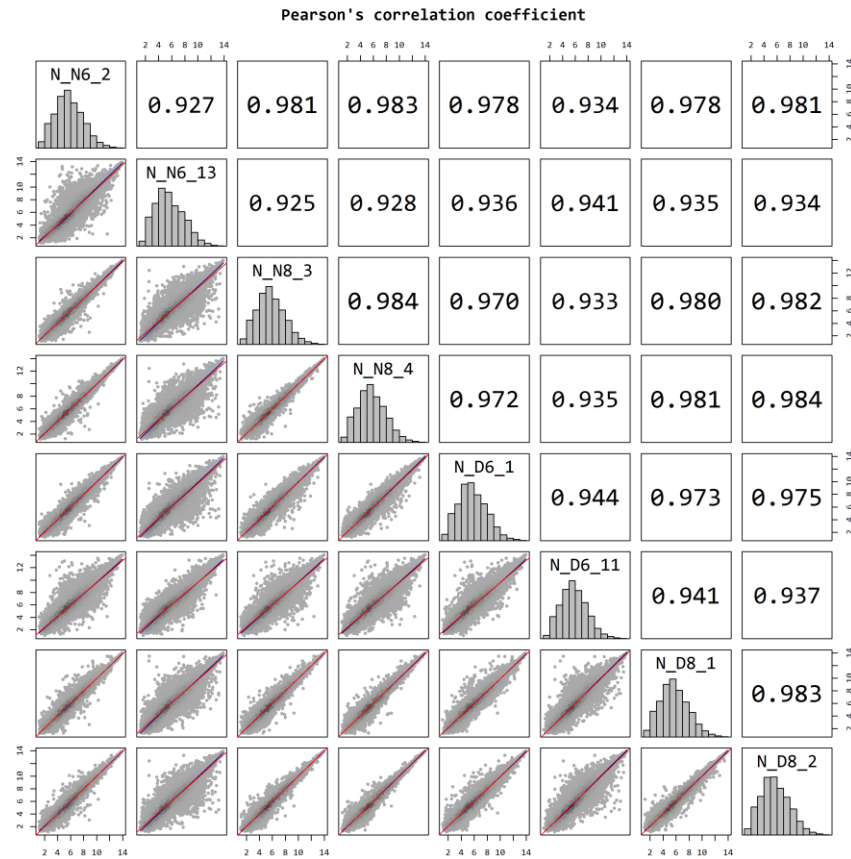
**Şekil 4.9** MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2 Doku Konsantrasyon Grafiği (N6: Non-diyabetik 6,5. gün, N8: non-diyabetik 8,5. gün, D6: Diyabetik 6,5. gün, D8: Diyabetik 8,5.gün)

**Tablo 4.2** MMP2, MMP3, MMP9, Timp1 ve Timp2'nin doku ve serum konsantrasyon verileri istatistik sonuçları (N6: Non-diyabetik 6,5. gün, N8: non-diyabetik 8,5. gün, D6: Diyabetik 6,5. gün, D8: Diyabetik 8,5.gün, SH: Standart hata, SD: Serbestlik derecesi)

	Kıyaslamalar	SH	t	SD	Güven	P Değeri
DOKU	N6-MMP-3 vs. D6-MMP-3	0,475	5,067	14,26	**	0,0016
	N6- MMP-2 vs. D6- MMP-2	0,2101	0,7137	14,96	-	0,9987
	N6-MMP-9 vs. D6-MMP-9	0,0173	5,352	11,24	**	0,0022
	N6-TIMP-1 vs. D6-TIMP-1	0,004063	6,173	15,63	***	0,0001
	N6-TIMP-2 vs. D6-TIMP-2	0,0097	3,011	16,64	-	0,0772
	N8-MMP-3 vs. D8-MMP-3	0,2679	7,592	13,2	****	<0,0001
	N8- MMP-2 vs. D8- MMP-2	0,3132	0,1081	12,43	-	>0,9999
	N8-MMP-9 vs. D8-MMP-9	0,005005	10,69	6,036	***	0,0004
	N8-TIMP-1 vs. D8-TIMP-1	0,008018	0,5833	9,087	-	0,9998
	N8-TIMP-2 vs. D8-TIMP-2	0,008539	0,08558	13,48	-	>0,9999
SERUM	N6-MMP-3 vs. D6-MMP-3	0,3186	4,948	18,99	***	0,0009
	N6- MMP-2 vs. D6- MMP-2	0,3204	0,04861	18,89	-	>0,9999
	N6-MMP-9 vs. D6-MMP-9	0,01616	17,53	14,47	****	<0,0001
	N6-TIMP-1 vs. D6-TIMP-1	0,4406	0,477	19	-	>0,9999
	N6-TIMP-2 vs. D6-TIMP-2	2,289	0,6026	18,71	-	0,9997
	N8-MMP-3 vs. D8-MMP-3	0,2642	4,387	14,78	**	0,0055
	N8- MMP-2 vs. D8- MMP-2	0,3539	0,0201	13,94	-	>0,9999
	N8-MMP-9 vs. D8-MMP-9	0,007414	7,933	7,025	***	0,0009
	N8-TIMP-1 vs. D8-TIMP-1	0,3176	1,366	14,98	-	0,8813
	N8-TIMP-2 vs. D8-TIMP-2	2,015	0,801	14,65	-	0,9967

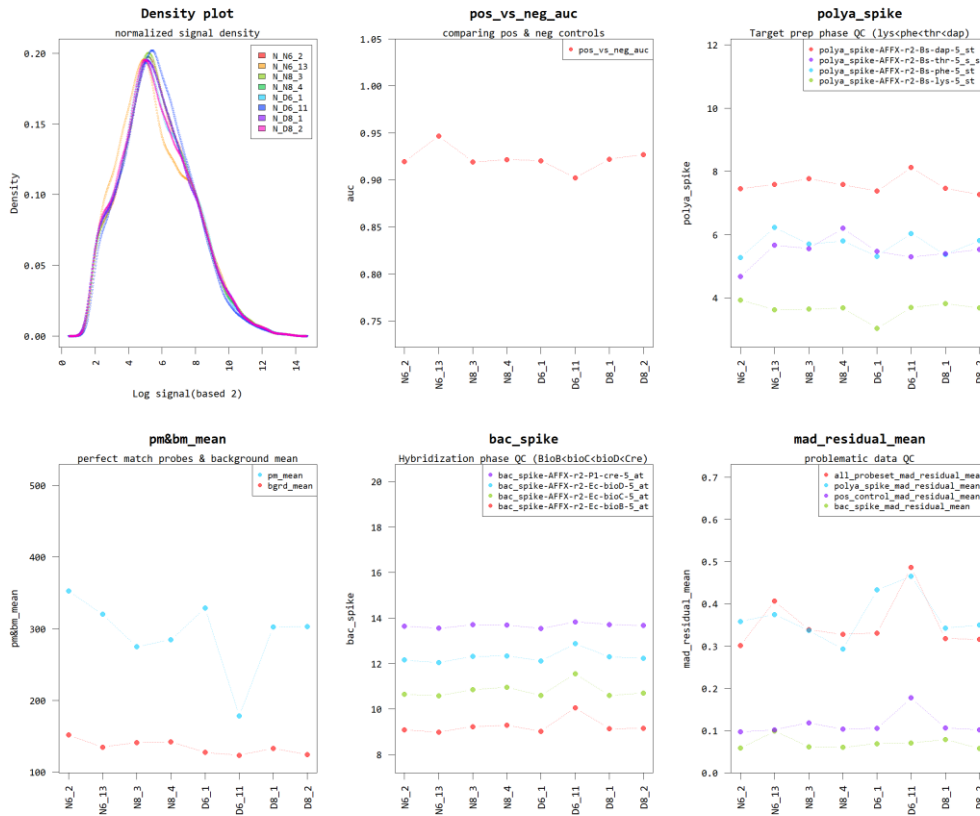
### 4.3. Mikrodizin mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları

Örnek kalitesinin kontrolü, örnekler arasındaki benzerlik, Pearson'un numunenin normalleştirilmiş değer katsayısı ile elde edildi.  $-1 \leq r \leq 1$  aralığı için, değer 1'e ne kadar yakınsa, örnekler o kadar benzerdir. Örnekler arasındaki ilişki scatter plot analizi ile aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Pearson'un korelasyon etkinliği tablosu

Aşağıdaki yoğunluk grafiği, normalize edilmiş değerden yapılan karşılık gelen örnek ifadesinin dağılımını gösterir. Kontrol sondalarının çizgi grafikleri, mikrodizin deneylerinde sorun olup olmadığını gösterir (örneğin, örnek kalitesinden kaynaklanan deneysel önyargılar veya hatalar) (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11** mRNA örneklerinin normalize edilmiş değerden yapılan karşılık gelen örnek ifadesinin dağılımını gösteren yoğunluk grafiği

Analiz edilen örneklerin ikili karşılaştırmaları sonucunda kat değişimine göre ekspresyonları artmış veya azalmış prob setlerinin sayısı belirlenmiştir. Gen ekspresyon verileri üzerinden en az 5 prob ve üzeri okuma sağlanan, ekspresyonları artmış veya azalmış gen ifadeleri seçilmiştir (28389 gen ifadesi). Seçilen bu gen ifadelerinden daha sonra kat değişimi  $\pm 1.5$  fc ve üzeri olanlar seçilmiştir (diyabetik implantasyon zamanı grubuna ait 813 artmış ve 960 azalmış gen ifadesi; diyabetik implantasyon sonrası grubuna ait 424 artmış ve 226 azalmış gen ifadesi). Hem implantasyon sırasında hem de implantasyon sonrasında ekspresyon değişimleri ortak olan gen bölgeleri belirlenmiştir. Her iki grupta da ortak artmış olan gen ifadesi sayısı 47 ve azalmış olan gen ifadesi sayısı 17'dir. Bu genlerin listesi ve kat değişimleri Tablo 4.3' de yer almaktadır.

**Tablo 4.3** Mikrodizin analizinde deney gruplarında regülasyonu ortak olan genler ve kat değişimleri (D6: İmplantasyon grubu, D8: Post-implantasyon grubu)

Yukarı Regüle				Aşağı Regüle			
Gen	mRNA Accession	D6,5 ORT	D8,5 ORT	Gen	mRNA Accession	D6,5 ORT	D8,5 ORT
Tmc4	NM_001034104	2,38	1,52	Anpep	NM_031012	-2,18	-1,75
Olr215	NM_001000198	2,13	1,70	H19	NR_027324	-2,54	-3,15
Lipf	NM_017341	63,61	1,58	Scd1	NM_139192	-2,30	-1,67
Unc93a	XM_001061886	5,70	2,16	Krt19	NM_199498	-1,63	-1,52
Ceacam1	NM_001033860	2,17	2,19	Mcpt1	NM_017145	-2,07	-2,62
Fcgrt	NM_033351	2,18	1,51	Cdo1	NM_052809	-2,34	-1,78
Cuzd1	NM_054005	57,97	2,00	Il31ra	NM_001257278	-1,55	-2,74
Sln5	XM_001081036	1,77	1,98	S100vp	NM_176076	-1,96	-1,84
Wfdc21	NM_001003706	2,59	2,41	Vom1r82	NM_001009515	-1,97	-1,93
Retnlg	XM_006248282	2,22	1,79	Ndnf	XM_008763014	-1,56	-1,56
Muc4	XM_006221167	3,02	1,79	Vom2r51	NM_001099510	-2,04	-2,03
Tmprss11b	NM_001004020	6,37	1,54	Cd52	ENSRNOT00000020688	-2,73	-1,54
Igfbp1	NM_013144	21,08	1,99	Olr1323	NM_001000472	-1,58	-2,10
Vstm2a	XM_006221845	2,41	1,59	H2afx	NM_001109291	-1,65	-1,53
Slc7a8	NM_053442	1,90	1,99	Smad6	NM_001109002	-1,79	-1,62
Ddx60	XM_006227050	2,57	5,31	Il1rl1	NM_001127689	-2,23	-2,36
Serpnb1a	NM_001031642	2,03	1,91	Sphkap	NM_001127492	-1,82	-1,53
Cap2	NM_053874	2,30	1,57				
Rbm24	NM_001191100	1,55	1,95				
Agtr1a	NM_030985	2,14	1,77				
Prl3c1	NM_031316	6,86	1,72				
Akr1c1	NM_001033697	1,53	1,52				
Pcdhb6	NM_001014780	1,63	1,57				
Dsc2	NM_001033688	3,74	1,61				
Adrb2	NM_012492	2,01	1,60				
RGD1309651	XM_001078912	1,77	1,67				
Tnik	XM_008760893	2,10	2,33				
Gpr160	NM_001025147	1,59	1,76				
Tdo2	NM_022403	1,85	1,70				
Clca1	NM_001107449	29,29	7,09				
RT1-S3	NM_001008886	2,70	2,68				
Mmp11	NM_012980	6,58	2,14				
Slc43a3	NM_001107743	2,65	2,62				
Pamr1	NM_001107755	4,87	1,50				
Lbp	NM_017208	2,54	3,01				
Ehf	NM_001106493	1,52	1,53				
Cpxm1	NM_001106511	2,70	1,52				
Tmem140	NM_001009709	2,07	1,55				
Usp18	NM_001014058	2,52	7,58				

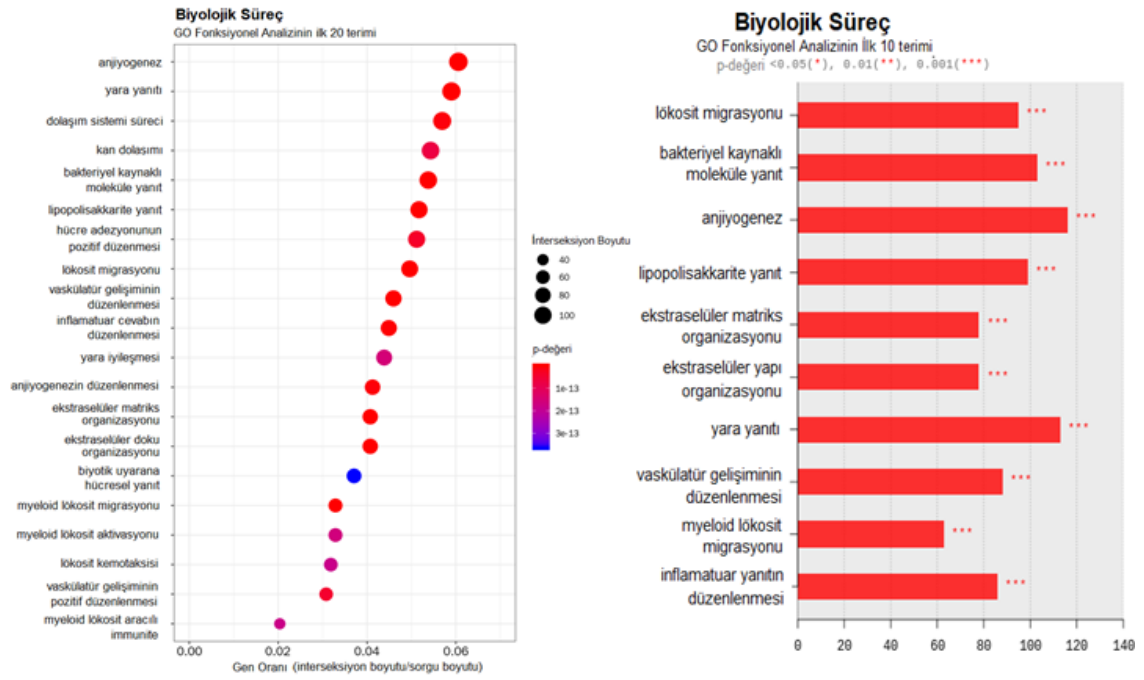
**DİPNOT:** Tablonun devamı diğer sayfadadır.

Gen	mRNA Accession	D6 ORT	D8 ORT
Dlx5	NM_012943	1,60	1,63
Herc6	XM_008762963	1,56	2,84
Il12rb2	NM_001191750	1,64	2,00
Slc26a4	NM_019214	28,34	1,75
Ly6c	NM_020103	1,88	2,31
Slc39a4	NM_001077669	1,67	1,74
Tnfrsf21	NM_001108207	1,90	1,58
Rftn2	XM_001066941	2,29	1,52

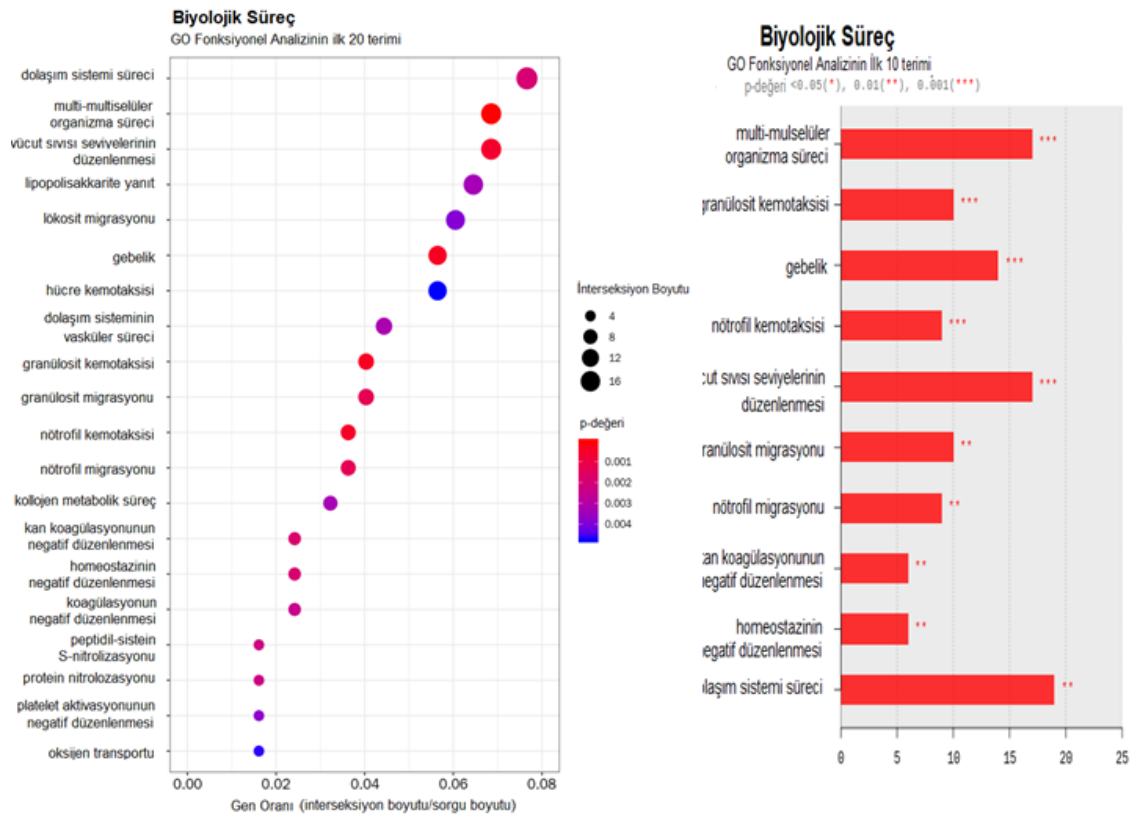
Her kategorideki en önemli 20 gen ontoloji (GO) terimini göstermek için nokta grafiği kullanılmıştır. GO terimleri, istatistiksel olarak 0,05 anlamlılık derecesindeki p-değerini karşılaması koşuluyla seçilmiştir. Ardından, p değerine göre en önemli 20 GO terimi seçildi. Son olarak, gen değişim oranları azalan sırada düzenlendi. X eksen ve y eksen sırasıyla gen değişim oranı (=etkileşim boyutu / sorgu boyutu) ve GO terimleridir. Nokta boyutu, kesişim boyutudur. Karşılaştırma sayısı altıdan azsa, her karşılaştırmadan en iyi 10 GO terimi seçildi. Aksi takdirde, her karşılaştırmadan en iyi 5 GO terimi seçildi. Ardından, bu zenginleştirilmiş GO terimlerinin tekilleştirilmiş listesi her karşılaştırma için gen değişim oranı ile çizildi. İfadesi değişen gen bölgeleri ile yapılan GO analizi sonuçları, biyolojik süreçler, moleküler fonksiyon ve hücreler bileşen başlıkları altında gruplanarak sırasıyla şekil 4.12, şekil 4.13 ve şekil 4.14'de verilmiştir.

Gen ontoloji analizine göre tip 1 diyabet, yara iyileşmesine yanıt, allograft reddi, sinyal yolağı ve gebelik ile ilişkili moleküler süreçlerin varlığı deneysel olarak oluşturmuş olduğumuz diyabetik gebelik modelini moleküler anlamda desteklemektedir. Bunlar dışında ortak görülen mekanizmalar immün sistem yanıtı, inflamasyon, vaskülojenik süreçler, hücre membran yapıları, ekstraselüler matriks bileşenleri, sinyal mekanizmaları ve reseptörlerdeki değişimlerle ilişkilidir.

## İmplantasyon grubu



## Post-implantasyon grubu



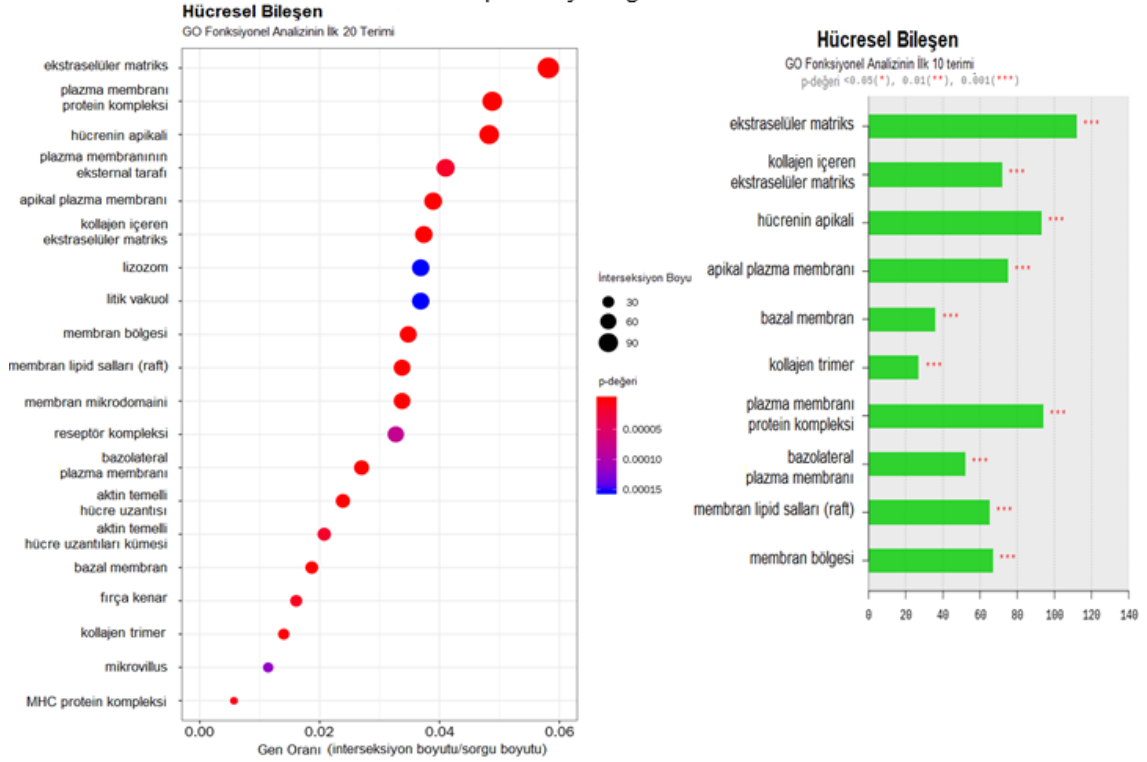
Şekil 4.12 Gen ontoloji analizi biyolojik süreçler şeması



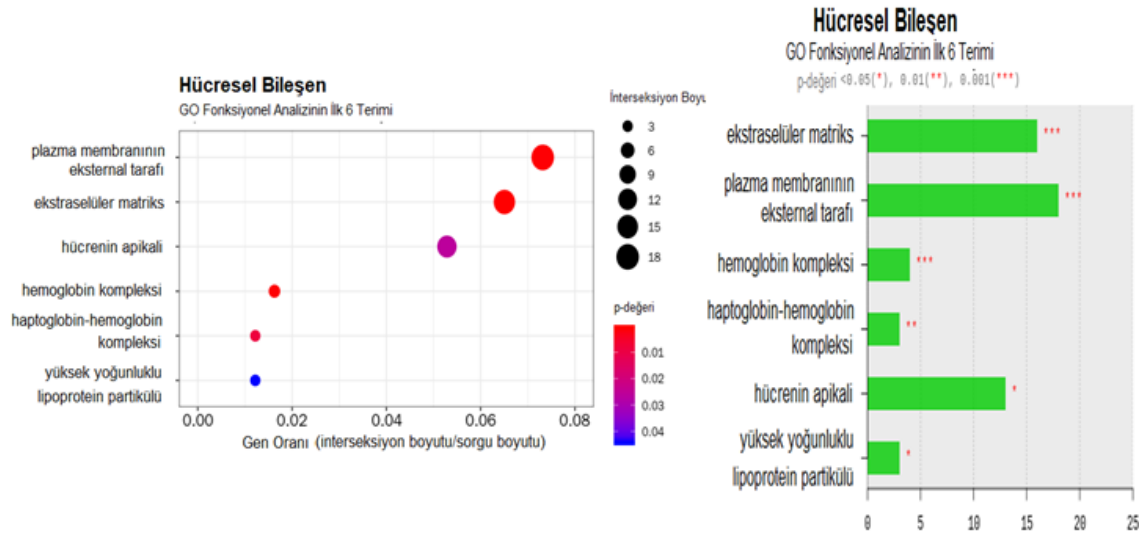


**Şekil 4.13** Gen ontoloji analizi değişen moleküler fonksiyon şeması

## İmplantasyon grubu



## Post-implantasyon grubu



Şekil 4.14 Gen ontoloji analizi değişen hüresel bileşenler şeması

### KEGG Yolak Analizi Sonuçları

Mikrodizin analizi sonuçlarına göre artan ve azalan gen ifadelerinin, kegg yolak analizi fonksiyonel açıklama kümelerinden en yüksek zenginleştirme puanına sahip ilk 3 sınıfta yer alan ilişkili oldukları yolaklar sırasıyla, implantasyon grubu için tablo 4.4'de ve post-implantasyon grubu için tablo 4.5' de yer almaktadır. Daha alt sınıflarda kümelenmiş önemli yolaklar ve ilişkili oldukları gen bölgelerine ifade değişimlerinin ilişkilendirilebilmesi için gerekli görüldüğünde tartışma kısmında ayrıca değinilmiştir.

**Tablo 4.4** İmplantasyon grubu değişen gen ifadeleri kegg yolak analizi sonuçları tablosu (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH, Functional Annotation Clustering/Kegg pathway)

Gen	% Gen	P-Değeri	Benjamini
Dna kopyalama	0,9	2,10E-07	5,90E-05
Antibiyotiklerin biyosentezi	2,4	3,50E-06	4,90E-04
Hücre döngüsü	1,6	1,70E-05	1,60E-03
Steroid biyosentezi	0,5	9,30E-05	6,50E-03
Fagozom	1,9	9,90E-04	5,40E-02
Staphylococcus aureus enfeksiyonu	0,8	1,20E-03	5,40E-02
Nükleotid eksizyon onarımı	0,7	2,90E-03	1,20E-01
Keton cisimlerinin sentezi ve bozulması	0,3	3,50E-03	1,20E-01
Viral miyokardit	1	5,70E-03	1,50E-01
P53 sinyal yolu	0,8	5,80E-03	1,50E-01
Bütanoat metabolizması	0,5	7,00E-03	1,50E-01
Hücre yapışma molekülleri (cam'ler)	1,6	7,60E-03	1,50E-01
Leishmaniasis	0,8	7,60E-03	1,50E-01
Yanlış eşleşme tamiri	0,4	7,90E-03	1,50E-01
Graft-versus-host hastalığı	0,8	8,30E-03	1,50E-01
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	1,7	1,00E-02	1,80E-01
Pirimidin metabolizması	1	1,10E-02	1,80E-01
Metabolik yollar	8,3	1,20E-02	1,80E-01
Allograft reddi	0,8	1,40E-02	2,00E-01
Otoimmün tiroid hastalığı	0,8	1,40E-02	2,00E-01
Arginin ve prolin metabolizması	0,6	1,60E-02	2,10E-01
Sitrat döngüsü (tca döngüsü)	0,5	1,60E-02	2,10E-01
Küçük hücreli akciğer kanseri	0,9	1,90E-02	2,40E-01
Iga üretimi için bağırsak bağışıklık ağı	0,6	2,30E-02	2,70E-01
Tip 1 şeker hastalığı	0,8	2,70E-02	3,10E-01
Htlv-1 enfeksiyonu	2,2	3,10E-02	3,40E-01
Glutatyon metabolizması	0,6	3,90E-02	4,10E-01
Boşluk kavşağı	0,8	4,30E-02	4,30E-01
Pürin metabolizması	1,5	4,50E-02	4,30E-01
Ecm-reseptör etkileşimi	0,8	4,60E-02	4,30E-01
Hematopoetik hücre soyu	0,8	4,80E-02	4,40E-01
Tiroid hormon sentezi	0,7	5,20E-02	4,60E-01
İltihaplı bağırsak hastalığı (İbd)	0,6	7,90E-02	6,60E-01
Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi	0,4	8,00E-02	6,60E-01
Terpenoid omurga biyosentezi	0,3	8,90E-02	7,10E-01
Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (arvc)	0,6	9,30E-02	7,30E-01

**Tablo 4.5** Post-implantasyon grubu değişen gen ifadeleri kegg yolak analizi sonuçları tablosu (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH, Functional Annotation Clustering/Kegg pathway)

Gen	% Gen	P-Değeri	Benjamini
Influenza A	3,3	7,30E-07	1,50E-04
Herpes simpleks enfeksiyonu	3,3	2,70E-05	2,70E-03
Hücre adezyon molekülleri (CAM'ler)	2,8	4,70E-05	3,20E-03
Graft-versus-host hastalığı	1,6	2,80E-04	1,40E-02
Staphylococcus aureus enfeksiyonu	1,4	3,50E-04	1,40E-02
Allogreft reddi	1,6	4,40E-04	1,50E-02
Romatizmal eklem iltihabı	1,7	7,00E-04	2,00E-02
Tip I şeker hastalığı	1,6	8,10E-04	2,00E-02
Otoimmün tiroid hastalığı	1,6	9,00E-04	2,00E-02
Hepatit C	2,1	1,10E-03	2,20E-02
Kızamık	2,1	1,60E-03	3,00E-02
Koku iletimi	9,3	2,30E-03	3,90E-02
Viral miyokardit	1,6	2,70E-03	4,30E-02
Antijen işleme ve sunumu	1,6	4,50E-03	6,60E-02
Toksoplazmoz	1,6	1,30E-02	1,70E-01
Kemokin sinyal yolu	2,1	1,40E-02	1,70E-01
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	2,2	1,40E-02	1,70E-01
Sistemik lupus eritematoz	1,6	3,00E-02	3,40E-01
Toll benzeri reseptör sinyal yolu	1,3	4,00E-02	4,30E-01
Sıtma	0,9	4,40E-02	4,50E-01
RIG-I benzeri reseptör sinyal yolu	0,9	5,90E-02	5,70E-01
İltihaplı bağırsak hastalığı (IBD)	0,9	6,20E-02	5,80E-01
TNF sinyal yolu	1,3	6,80E-02	5,80E-01
Iga üretimi için bağırsak bağışıklık ağı	0,8	6,80E-02	5,80E-01
Renin-anjiyotensin sistemi	0,6	8,70E-02	6,70E-01
Kompleman ve pıhtılaşma basamakları	0,9	8,80E-02	6,70E-01
Leishmaniasis	0,9	8,80E-02	6,70E-01

Çalışmamızda farklı ifade olmuş gen bölgeleri kıyaslanıp sınıflandırıldığında değişen bazı gen ifadelerinin her iki grupta da ortak olduğu görülmektedir. Bu gen ifadelerinin ortak işlevlerini görebilmek adına, her iki grupta da ifadesi benzer olan gen bölgelerine cluster analizi (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH, Functional Annotation Clustering) yapılmıştır. Analiz sonucunda değişen gen ifadeleri 10 sınıfta toplanmıştır. Bu sınıflardan değişen gen ifadesince en zengin olanı (enrichment skoru en yüksek olan) hücre membran yapılarında, transmembran proteinlerinde, glikoprotein yapılarında, disülfid bağlarında değişime neden olan gen bölgeleridir. Bu değişimleri ve ilgili gen bölgeleri tablo 4.6'de yer almaktadır.

**Tablo 4.6** Mikrodizin analizinde deney gruplarında regulasyonu ortak olan genlerin ilişkili olduğu mekanizmalar

		P_Değeri	Kat	Benjamini
Ek Açıklama Kümesi 1	Zenginleştirme Puanı: 3.03			
UP_KEYWORDS	sinyal	2.0E-7	2.4E0	2.4E-5
UP_KEYWORDS	disülfid bağı	3.5E-6	2.7E0	2.1E-4
UP_SEQ_FEATURE	sinyal peptidi	2.5E-4	2.3E0	4.3E-2
UP_SEQ_FEATURE	disülfid bağı	9.3E-4	2.3E0	8.1E-2
UP_SEQ_FEATURE	glikosilasyon bölgesi:N-bağlı (GlcNAc...)	2.4E-3	1.9E0	1.4E-1
UP_KEYWORDS	glikoprotein	3.5E-3	2.1E0	1.0E-1
UP_SEQ_FEATURE	topolojik etki alanı:hücre dışı	8.5E-3	2.1E0	3.7E-1
UP_SEQ_FEATURE	topolojik alan:Sitoplazmik	2.7E-2	1.8E0	9.5E-1
UP_KEYWORDS	salgı	3.5E-2	2.2E0	6.6E-1
UP_SEQ_FEATURE	transmembran bölgesi	5.1E-2	1.5E0	1.0E0
Kat				
Ek Açıklama Kümesi 2	Zenginleştirme Puanı: 1.85	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
INTERPRO	İmmüoglobulin benzeri kıvrım	1.4E-3	3.4E0	3.2E-1
SMART	FN3	3.4E-2	5.5E0	9.7E-1
INTERPRO	Fibronektin, tip III	5.7E-2	4.5E0	8.7E-1
Kat				
Ek Açıklama Kümesi 3	Zenginleştirme Puanı: 1.64	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
GOTERM_MF_DIRECT	peptid antijen bağlama	5.9E-4	2.4E1	1.2E-1
INTERPRO	MHC sınıf I benzeri antijen tanıma	2.7E-2	1.2E1	7.7E-1
INTERPRO	İmmüoglobulin benzeri alan	3.5E-2	2.8E0	8.2E-1
INTERPRO	MHC sınıfları I/II benzeri antijen tanıma proteini	3.8E-2	9.7E0	8.2E-1
INTERPRO	İmmüoglobulin/majör histo-uyumluluk kompleksi, korunmuş bölge	4.7E-2	8.6E0	8.2E-1
INTERPRO	İmmüoglobulin C1 seti	5.0E-2	8.2E0	8.2E-1
SMART	IGc1	6.2E-2	7.2E0	9.7E-1
Kat				
Ek Açıklama Kümesi 4	Zenginleştirme Puanı: 1.5	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
UP_KEYWORDS	Hücre zarı	1.3E-3	1.9E0	5.0E-2
GOTERM_CC_DIRECT	hücre zarı	1.6E-2	1.5E0	5.7E-1
UP_KEYWORDS	transmembran sarmal	5.3E-2	1.3E0	7.4E-1
UP_KEYWORDS	transmembran	5.6E-2	1.3E0	7.4E-1
GOTERM_CC_DIRECT	zarın ayrılmaz bileşeni	9.3E-2	1.3E0	8.1E-1
UP_KEYWORDS	Zar	1.7E-1	1.2E0	1.0E0
Kat				
Ek Açıklama Kümesi 5	Zenginleştirme Puanı: 0.98	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
INTERPRO	immüoglobulin	2.2E-2	1.3E1	7.7E-1
UP_KEYWORDS	immüoglobulin alanı	2.4E-2	4.5E0	5.7E-1
INTERPRO	İmmüoglobulin benzeri alan	3.5E-2	2.8E0	8.2E-1
INTERPRO	İmmüoglobulin V seti	2.3E-1	3.3E0	1.0E0
INTERPRO	immüoglobulin alt tipi	5.3E-1	1.7E0	1.0E0
SMART	IG	6.0E-1	1.5E0	1.0E0
Kat				
Ek Açıklama Kümesi 6	Zenginleştirme Puanı: 0.83	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
GOTERM_BP_DIRECT	proteoliz	5.9E-2	2.8E0	1.0E0
INTERPRO	Peptidaz S1	1.6E-1	4.1E0	1.0E0
INTERPRO	Tripsin benzeri sistein/serin peptidaz alanı	1.7E-1	4.0E0	1.0E0
SMART	Tryp_SPc	1.9E-1	3.7E0	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	serin tipi endopeptidaz aktivitesi	2.4E-1	3.2E0	1.0E0

DİPNOT: Tablonun devamı diğer sayfada yer almaktadır.

		P_Değeri	Kat Değişimi	Benjamini
Ek Açıklama Kümesi 7	Zenginleştirme Puanı: 0.65			
GOTERM_BP_DIRECT	proteoliz	5.9E-2	2.8E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	proteaz	1.2E-1	2.6E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	hidrolaz	4.4E-1	1.3E0	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	çinko iyonu bağlama	8.6E-1	8.4E-1	1.0E0
			Kat	
Ek Açıklama Kümesi 8	Zenginleştirme Puanı: 0.62	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
transkripsiyonel aktivatör aktivitesi, RNA polimeraz II çekirdek promotörü proksimal bölge sekansına özgü bağlanma		2.6E-2	4.4E0	8.7E-1
GOTERM_MF_DIRECT	bölge sekansına özgü bağlanma	2.6E-2	4.4E0	8.7E-1
GOTERM_BP_DIRECT	epitel hücre farklılaşması	4.7E-2	8.5E0	1.0E0
GOTERM_CC_DIRECT	nükleer kromatin	6.8E-2	4.2E0	8.0E-1
RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyon		1.0E-1	2.8E0	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	transkripsiyon	1.0E-1	2.8E0	1.0E0
RNA polimeraz II çekirdek promotörü proksimal bölge dizisine özgü DNA bağlanması		2.0E-1	2.6E0	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	bağlanması	2.0E-1	2.6E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	DNA bağlanması	2.0E-1	1.7E0	1.0E0
transkripsiyon faktörü aktivitesi, diziye özgü DNA bağlanması		2.4E-1	1.8E0	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	DNA bağlanması	2.4E-1	1.8E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	aktivatör	3.1E-1	2.6E0	1.0E0
RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun düzenlenmesi		3.2E-1	2.0E0	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	transkripsiyonun düzenlenmesi	3.2E-1	2.0E0	1.0E0
transkripsiyonun pozitif regülasyonu, DNA şablonlu		4.7E-1	1.6E0	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	şablonlu	4.7E-1	1.6E0	1.0E0
RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi		4.8E-1	1.3E0	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi	4.8E-1	1.3E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	transkripsiyon yönetmeliği	6.9E-1	1.1E0	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	DNA bağlanması	7.1E-1	1.0E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	Transkripsiyon	7.3E-1	1.1E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	çekirdek	8.2E-1	8.6E-1	1.0E0
			Kat	
Ek Açıklama Kümesi 9	Zenginleştirme Puanı: 0.61	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
GOTERM_BP_DIRECT	oksidasyon-redüksiyon süreci	7.0E-2	2.4E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	oksidoreduktaz	1.6E-1	2.3E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	Demir	3.4E-1	2.5E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	Metal bağlayıcı	9.8E-1	5.4E-1	1.0E0
			Kat	
Ek Açıklama Kümesi 10	Zenginleştirme Puanı: 0.4	P_Değeri	Değişimi	Benjamini
UP_KEYWORDS	alıcı	3.9E-2	1.6E0	6.6E-1
SMART	SM01381	9.9E-2	3.5E0	9.7E-1
GOTERM_MF_DIRECT	koku bağlayıcı	2.1E-1	2.5E0	1.0E0
INTERPRO	GPCR, rodopsin benzeri, 7TM	3.5E-1	1.3E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	G-proteinine bağlı reseptör	3.5E-1	1.3E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	dönüştürücü	3.9E-1	1.3E0	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	G-proteinine bağlı reseptör sinyal yolu	4.2E-1	1.2E0	1.0E0
INTERPRO	G proteinine bağlı reseptör, rodopsin benzeri	5.7E-1	1.1E0	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	G-proteinine bağlı reseptör aktivitesi	5.9E-1	1.1E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	koku alma	6.8E-1	1.0E0	1.0E0
INTERPRO	koku alma reseptörü	6.9E-1	1.0E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	duyusal transdüksiyon	7.3E-1	9.9E-1	1.0E0
koku duyusal algısında yer alan kimyasal uyarının tespiti		7.6E-1	9.5E-1	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	uyarının tespiti	7.6E-1	9.5E-1	1.0E0
GOTERM_MF_DIRECT	koku alma reseptörü aktivitesi	7.6E-1	9.4E-1	1.0E0
KEGG_PATHWAY	koku iletimi	9.0E-1	7.6E-1	1.0E0

#### 4.4. GZ-PZR Ekspresyon Analizi Bulguları

Mikrodizin analizi sonuçlarının klavuzluğunda GZ-PZR ile tüm gruplarda ekspresyonunu çalıştığımız gen ifadelerinin kat değişimleri Tablo 4.7'de yer almaktadır.

**Tablo 4.7** GZ-PZR analizi istatistik sonuçları

	Genler	Ortanca	Standart Sapma	Güvenilirlik $\alpha:0,05$	<	Ortalama <	P Değeri	P Özet		
İmplantasyon (6,5. gün)	D6-Agr1a	0,94	0,49	0,32	0,81	1,13	1,45	0,6678	-	
	D6-Ddr2	1,01	0,66	0,41	0,77	1,18	1,59	>0,9999	-	
	D6-Hmgcs2	1,24	0,63	0,41	0,98	1,39	1,80	0,1979	-	
	D6-Hs3st1	1,31	0,64	0,40	0,98	1,38	1,77	0,1138	-	
	D6-MMP2	0,62	0,84	0,52	0,46	0,98	1,49	0,4445	-	
	<b>D6-MMP3</b>	<b>1,44</b>	<b>3,39</b>	<b>2,10</b>	<b>0,75</b>	<b>2,85</b>	<b>4,95</b>	<b>0,0135</b>	<b>*</b>	
	<b>D6-MMP9</b>	<b>1,75</b>	<b>1,30</b>	<b>0,81</b>	<b>1,20</b>	<b>2,00</b>	<b>2,81</b>	<b>0,0135</b>	<b>*</b>	
	D6-MMP11	0,83	0,31	0,19	0,67	0,87	1,06	0,1979	-	
	<b>D6-MMP20</b>	<b>2,32</b>	<b>0,67</b>	<b>0,50</b>	<b>1,87</b>	<b>2,36</b>	<b>2,86</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>****</b>	
	D6-pdk4	1,27	0,60	0,37	0,81	1,18	1,55	0,4445	-	
	D6-Timp1	1,05	0,41	0,27	0,87	1,14	1,41	0,6678	-	
	D6-Timp2	1,18	0,35	0,22	0,98	1,20	1,42	0,4445	-	
	<b>D6-Fut9</b>	<b>1,26</b>	<b>0,64</b>	<b>0,42</b>	<b>1,08</b>	<b>1,50</b>	<b>1,92</b>	<b>0,0011</b>	<b>**</b>	
	D6-Ennp2	1,01	1,00	0,62	0,65	1,28	1,90	0,4445	-	
	D6-Ntng1	1,70	0,90	0,56	1,25	1,81	2,36	0,1138	-	
	D6-Pln	1,05	0,58	0,36	0,79	1,15	1,51	>0,9999	-	
	D6-Wnt16	1,97	1,78	1,10	1,09	2,19	3,30	0,4445	-	
	<b>D6-Igfbp1</b>	<b>1,27</b>	<b>0,87</b>	<b>0,54</b>	<b>0,97</b>	<b>1,51</b>	<b>2,05</b>	<b>0,0135</b>	<b>*</b>	
	D6-Tnik	1,78	1,57	0,97	1,10	2,08	3,05	0,4445	-	
	D6-TnxB	1,34	2,98	1,85	0,84	2,69	4,54	>0,9999	-	
	<b>D6-C7</b>	<b>2,32</b>	<b>1,17</b>	<b>0,72</b>	<b>1,84</b>	<b>2,57</b>	<b>3,29</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>****</b>	
	D6-Tlr5	1,15	0,89	0,55	0,71	1,27	1,82	0,1138	-	
	D6-Dbp	0,69	1,03	0,64	0,41	1,05	1,69	0,4445	-	
	D6-TIMP-3	0,91	0,74	0,46	0,69	1,15	1,60	>0,9999	-	
	Post-implantasyon (8,5.gün)	D8-Agr1a	0,84	0,65	0,43	0,65	1,07	1,50	0,7090	-
		<b>D8-Ddr2</b>	<b>0,82</b>	<b>0,72</b>	<b>0,47</b>	<b>0,48</b>	<b>0,95</b>	<b>1,43</b>	<b>0,0361</b>	<b>*</b>
D8-Hmgcs2		1,17	0,60	0,39	0,83	1,22	1,61	0,7090	-	
<b>D8-Hs3st1</b>		<b>0,79</b>	<b>0,28</b>	<b>0,18</b>	<b>0,56</b>	<b>0,75</b>	<b>0,93</b>	<b>0,0361</b>	<b>*</b>	
D8-MMP2		0,87	0,92	0,60	0,52	1,12	1,73	0,7090	-	
<b>D8-MMP3</b>		<b>0,31</b>	<b>0,70</b>	<b>0,46</b>	<b>0,26</b>	<b>0,72</b>	<b>1,18</b>	<b>0,0114</b>	<b>*</b>	
<b>D8-MMP9</b>		<b>0,36</b>	<b>0,47</b>	<b>0,31</b>	<b>0,25</b>	<b>0,55</b>	<b>0,86</b>	<b>0,0361</b>	<b>*</b>	
<b>D8-MMP11</b>		<b>0,59</b>	<b>0,37</b>	<b>0,24</b>	<b>0,42</b>	<b>0,66</b>	<b>0,90</b>	<b>0,0019</b>	<b>**</b>	
D8-MMP20		0,98	0,37	0,24	0,63	0,88	1,12	0,7090	-	
<b>D8-pdk4</b>		<b>0,82</b>	<b>0,53</b>	<b>0,35</b>	<b>0,54</b>	<b>0,88</b>	<b>1,23</b>	<b>0,0361</b>	<b>*</b>	
<b>D8-Timp1</b>		<b>0,57</b>	<b>0,24</b>	<b>0,16</b>	<b>0,45</b>	<b>0,60</b>	<b>0,76</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>****</b>	
D8-Timp2		0,84	0,25	0,18	0,68	0,85	1,03	0,3714	-	
D8-Fut9		0,91	1,09	0,71	0,59	1,30	2,01	0,7090	-	
D8-Ennp2		0,53	0,58	0,40	0,27	0,67	1,08	0,0650	-	
<b>D8-Ntng1</b>		<b>0,80</b>	<b>0,42</b>	<b>0,27</b>	<b>0,55</b>	<b>0,82</b>	<b>1,09</b>	<b>0,0361</b>	<b>*</b>	
<b>D8-Pln</b>		<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>****</b>	
D8-Wnt16		0,55	0,55	0,36	0,34	0,70	1,06	0,2235	-	
D8-Igfbp1		1,37	0,59	0,39	0,85	1,24	1,62	0,7090	-	
D8-Tnik		0,90	0,74	0,48	0,59	1,08	1,56	0,2235	-	
<b>D8-TnxB</b>		<b>0,67</b>	<b>1,01</b>	<b>0,66</b>	<b>0,25</b>	<b>0,91</b>	<b>1,57</b>	<b>0,0361</b>	<b>*</b>	
<b>D8-C7</b>	<b>0,53</b>	<b>0,35</b>	<b>0,23</b>	<b>0,32</b>	<b>0,55</b>	<b>0,78</b>	<b>0,0019</b>	<b>**</b>		
<b>D8-Tlr5</b>	<b>2,92</b>	<b>2,02</b>	<b>1,40</b>	<b>1,78</b>	<b>3,19</b>	<b>4,59</b>	<b>0,0034</b>	<b>**</b>		
D8-Dbp	0,76	0,47	0,32	0,59	0,91	1,24	0,3714	-		
D8-TIMP-3	0,85	0,26	0,19	0,71	0,91	1,10	0,6224	-		

Gen ekspresyonu bakımından MMP2 ifadesinde anlamlı bir değişim görölmezken, diyabetik gruplarda MMP3 ve -9'un implantasyon sürecinde ekspresyonu artmıştır fakat postimplantasyon sürecinde ekspresyonunda azalma söz konusudur. MMP11 ekspresyonuna bakıldığında, implantasyon grubunda kontrol grubuna yakın düzeyde izlenirken, postimplantasyon grubunda ekspresyonun azaldığı görölmektedir. MMP20'nin ise implantasyon grubunda ekspresyonu artarken post implantasyon grubunda anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Değişen MMP ifadeleri karşısında doku inhibitörlerinin rolünü anlamak için Timp1, 2 ve 3 ekspresyonuna bakılmıştır. İmplantasyon gruplarındaki Timp ekspresyonunda anlamlı bir değişim görölmemiştir. Sadece Timp1 ekspresyonunun post-implantasyon grubunda azaldığı görölmektedir. MMP ve doku inhibitörleri dışında implantasyon grubunda Fut9, Igfbp1, C7 ekspresyonunun anlamlı artışı söz konusudur. Post implantasyon grubunda ise Ddr2, Hs3st1, Pdk4, Ntng1, Pln, Tnxb, ve C7 ekspresyonunun azaldığı görölürken, Tlr5'in arttığı görölmektedir.



## 5.TARTIŞMA

Çalışmamızın ilk hipotezi, diyabetin MMP2, -3, -9 ve Timp1, -2, -3 ekspresyonunu etkileyerek invazyon sürecini bozacağı yönündedir. Yaptığımız analizlerin sonuçlarına bakıldığında, implantasyon sırasında ve sonrasında gen ifadelerindeki değişimin farklı olabildiği görülmektedir. Bir genin ifadesi diyabetik implantasyon grubunda kendi kontrolüne kıyasla artmışken postimplantasyon grubunda azalmaktadır. Konseptusun gelişimi düşünüldüğünde bu durum normal görülebilir. Çok hızlı bölünmelerin ve farklılaşmaların olduğu bu süreçte birçok gen bölgesinde ekspresyon değişiminin olacağı aşıkardır. Fakat diyabetik gruplarda bu değişimin kontrole kıyasla çok daha dramatik gerçekleştiğini görmekteyiz. Trofoblast invazyonu açısından MMP'lerin ekspresyonu önemlidir. Mikrodizin analizi ve PCR analizi sonuçlarının MMP ekspresyonu yönünden birbirleri ile korale olduğu görülmektedir. MMP3 ve 9 ekspresyonunun kontrollerine kıyasla implantasyon grubundaki artışına karşın post implantasyon gruplarındaki ekspresyon düşüşünü değerlendirebilmek için, değişen MMP ifadeleri karşısında MMP doku inhibitörleri Timp 1, 2 ve 3 ekspresyonuna bakılmıştır. İfade değişikliği sadece Timp1 gen ifadesinde kontrol grubuna (non-diyabetik post implantasyon grubu), diyabetik post implantasyon grubunda azalma şeklindedir. Timp 2 ve Timp 3 ifadelerinde ise değişim görülmemiştir. Gelişim süreçlerinde MMP ifadesinin Timp ifadesi ile bir denge halinde olması elzemdir. Bu dengenin bozulmasının tekrarlayan gebelik kayıplarında, preeklampsi vakalarında da yaşandığı görülmektedir (Chen ve Khalil 2017). Preeklamptik gebeler ile yapılan bir çalışmada çalışmamıza benzer biçimde desidual hücrelerde ve preeklamptik plasental bölümlerde komşu interstisyel trofoblastlarda önemli ölçüde daha yüksek immünohistokimyasal MMP9 seviyeleri gözlemlenmişken, MMP2 ve Timp1 ve Timp2 için immün boyama, preeklamptik ve kontrol gruplarında benzer olduğu gösterilmiştir (Lockwood vd 2008). Genel olarak bakıldığında MMP'ler ve Timp'lerin gen ifadelerindeki bu değişimlerin benzer şekilde protein ifadelerine de yansıdığı Eliza ve immünohistokimyasal analiz yöntemleriyle ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda polar trofoektoderm kaynaklı plasental koni hücreleri

ile mural trofoektodermden farklı dev trofoblast hücrelerinin ekspresyon farklılığı immünohistokimyasal analiz ile ortaya koyulmuştur. Plasental gelişim sırasında, anjiyogenez ve maternal desidua trofoblast invazyonu, hücre dışı proteolitik enzimlerin yeniden şekillenmesini ve parçalanmasını gerektirir. MMP'ler, ekstraselüler matriks bileşenlerinin degradasyonundan sorumlu anahtar moleküllerdir ve normal plasenta gelişiminde rol alırlar. Diyabetik hastalarda MMP'lerin regülasyonunda sorunların olduğu, literatürde gestasyonel diyabet (GDM), diyabetik retinopati, diyabetik nefropati ve diyabetik yara iyileşmesi gibi olgularda incelenmiştir. Pustovrh vd. MMP2 ve MMP9'un ekspresyonunun diyabetik sıçanların plasentasında arttığını ve hem labirent hem de birleşme bölgelerinde güçlü bir şekilde eksprese edildiğini bulmuşlardır (Pustovrh vd 2005). Yapılan diğer bir çalışmada ise GDM grubunda (n = 18) MMP2 ve MMP14'ün mRNA seviyelerinin normal hamile kadınlar (kontrol) grubuna (n = 16) kıyasla arttığı gösterilmiştir (Ding vd 2018). MMP14 ilk olarak membran tip 1 MMP invaziv kanser hücrelerinde eksprese edilen bir hücre yüzeyi proMMP2 aktivatörü olarak keşfedilmiş ve daha sonra MMP14 olarak anılmıştır (Itoh 2015). Peeters vd. (2015)'nin tip1 diyabeti olan hastaları kardiyovasküler komplikasyonunun olup olmamasına göre gruplandırarak yaptığı çalışmalarında, vasküler komplikasyonları olan hastalar daha yüksek yaş, BMI ve sistolik kan basıncı ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmaya göre HbA1c, LDL, trigliseridler, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP10, Timp1 ve düşük dereceli inflamasyon ve endotelial disfonksiyon belirteçleri düzeyleri, vasküler komplikasyonu olan bireylerde diğerlerine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. EVT hücrelerinin invazyonu, MMP'lerin aracılık ettiği desidual hücrelerin hücre dışı matrisinin çözünmesine ve yeniden yapılandırılmasına bağlıdır. Bu, MMP'lerin EVT hücrelerinin invazyonunu teşvik etmede önemli bir rolü olduğunu gösterir (Cohen vd 2006a). MMP'lerin bir aile üyesi olan MMP9, erken gebelik sırasında fetal nidasyon ve plasental implantasyonda yeri doldurulamaz bir rol oynar. Ayrıca, MMP9'un EVT hücreleri tarafından normal salgılanması, invazyon kabiliyetinin korunmasında önemlidir (Bischof vd 2002, Staun-Ram vd 2004). Erken gebelik sırasında MMP9 eksikliği, farklılaşma ve EVT hücrelerinin invazyon yeteneklerini bozmuş, sonuçta fetal anormalliklere, intrauterin büyüme kısıtlamasına ve hatta sıçanlarda ölü doğumlara yol açmıştır (Plaks vd 2013). MMP2 ve MMP9 benzer substrat özgüllüklerine sahip olsa da epidermal büyüme faktörü (EGF)'ne yanıt olarak ifadelerinde farklılıklar vardır. EGF'nin proMMP9 salgılanmasını uyardığını, ancak proMMP2'nin salgılanmadığı gösterilmiştir. IL-1 $\alpha$ , leptin, 12-o-tetradecanoylphorbol 13-asetat (TPA) ve TNF $\alpha$ 'nın MMP-9 ekspresyonunu arttırdığı ancak insan sitotrofoblastlarında MMP-2 aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir. Bu durum çalışmamızda ifadesi değişen gen bölgelerinden etkilenen TNF yolağının MMP9 artışında etkili olabileceğini

desteklemektedir. Ayrıca çalışmamızda yolak analizlerinde değişen gen ifadelerinden PI3K ve MAKP yollarının etkilendiği görülmektedir. Bu yollardaki değişimlerin Timp1 ifadesini etkileyebileceği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar hem PI3K hem de MAPK sinyal yollarının HTR8/SVneo hücrelerinde Timp1 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (Qiu vd 2004). Çalışmamızda mikrodizin analizlerinde laminin alt ünitelerinden; artmış laminin gamma 3, azalmış laminin alfa 5, artmış laminin beta 1, azalmış laminin alfa 1 ve artmış laminin alfa 2 (LAMA2) ifadesi görülmektedir. İnsan plasental gelişimi sırasında integrin profilindeki değişiklik, invaziv trofoblastlar tarafından sergilenen epitelyal-mezenkimal geçişte rol oynar.  $\alpha 1\beta 1$  integrini, desidua'da bol miktarda ifade edilen laminin 2 gibi farklı kolajenler ve lamininlerle bir etkileşimi teşvik eder. Wang vd. (2015) laminin reseptörü 1'in (LR1) RNA interferans aracılı susturulmasının MMP2 ve -9 ekspresyonunu azaltarak ve Timp ekspresyonunu artırarak insan trofoblast benzeri hücre (JEG3) migrasyonunu ve invazyonunu bastırdığını göstermiştir. LR1 ayrıca MMP9 ekspresyonu yoluyla hipoksiye bağlı trofoblastik migrasyona katkıda bulunur. Preeklampsili kadınların plasentaları, sitotrofoblastlarda ve sınırsız trofoblastlarda azalmış LR1 ekspresyonu sergiler. Hipoksi ayrıca, fare trofoblast kök hücrelerinde, E-kaderin ekspresyonunda bir azalma ve MMP9 ve -12 ekspresyonunda artış ve hücre dışı bir matris boyunca hareketle ilişkili bir epitelyal-mezenkimal benzeri dönüşümü in vitro olarak aktive eder. Bu yanıtlar, HIF sinyal yolunun aktivasyonuna bağlıdır (Silva ve Serakides 2016).

Özetle çalışmamız ilk hipotezinde önermiş olduğumuz MMP/Timp dengesindeki bozulmanın diyabetle doğrudan ve/veya dolaylı yollardan ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızın diğer bir hipotezi değişen gen ifadeleri nedeniyle ortaya çıkabilecek olumsuzluklar üzerinedir. Mikrodizin analizi sonuçlarına göre değişen gen ifadelerinin ilişkili olduğu çok sayıda yolak, biyolojik fonksiyon, moleküler işlev ve hücre yapısına ait mekanizmanın olduğu ortaya konmuştur. Genontoloji analizi sonuçlarına göre biyolojik işlevler ile ilgili değişimlerin büyük oranı sistem gelişimi, multiselüler organizma gelişimi, hücre popülasyonu proliferasyonu ve dış uyarana yanıt ile ilişkilidir. Hücresel bileşenlerdeki en büyük ortak değişimin ekstraselüler matris ilişkili olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra membran yapıları ve transmembran proteinlerinde değişim olduğu görülmektedir. Moleküler fonksiyonlardaki değişimlere bakıldığında ise iyon bağlanması, protein bağlanması, hücre adezyon moleküllerinin bağlanması ve reseptör ligand aktivitesindeki değişim tüm gruplarda ortak olarak görülen değişimlerin başında gelmektedir. Kegg yolak analizinde de en fazla değişimin membran yapıları, ekstraselüler matris ve uyaranlara karşı yanıt mekanizmaları ile ilgili olduğu görülmektedir. Öncelikle, oluşturduğumuz çalışma modelinin teyidi açısından diyabet ve insülin mekanizmaları ile ilgili gen ifadelerinde değişimin olduğu görülmüştür. Bu

bağlamda kegg yolak analizine göre Cd80, RT1 sınıf I, lokus CE2 (RT1-CE2), RT1 sınıf I, lokus T24, gen 4 (RT1-T24-4), RT1 sınıf II, lokus Ba(RT1-Ba), RT1 sınıf II, lokus Bb (RT1-Bb), RT1 sınıf II, lokus Dma (RT1-DMa), RT1 sınıf II, lokus DMb (RT1-DMb), RT1 sınıf II, lokus Db1 (RT1-Db1), RT1 sınıf Ib, lokus O1 (RT1- O1), RT1 class Ib, locus S3 (RT1-S3), interleukin 1 beta (Il1b) ve perforin 1(Prf1) ile ilgili gen ifadelerindedir. Bunun dışında SHC adaptör protein 2 (Shc2), asetil-CoA karboksilaz alfa(Acaca), fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz, katalitik alt birim beta (Pik3cb), fosforilaz, glikojen; beyin(Pygb) protein tirozin fosfataz, non-reseptör tip 1 (Ptpn1), sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktör 1 (Srebf1) ve sitokin sinyalleşmesini baskılayıcı 3 (Socs3) gen ifadeleri de insülin sinyal yolağında etkili ifadesi değişen gen bölgeleridir. Bu yolaklarla ilgili değişimler diyabet modelimizin doğruluğunu gen ifadesi bağlamında da teyit etmektedir. Çalışmamızda ayrıca cAMP sinyal yolağı, kalsiyum sinyal yolağı, BMP sinyal yolağı, p53 sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, PI3K-Akt sinyal yolağı, Jak-STAT sinyal yolağı, Hippo sinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı ve TNF sinyal yolağı ile ilişkini gen ifadelerinde de değişim olduğu görülmüştür.

cAMP sinyal yolağına ilişkin değişen gen ifadeleri 5-hidroksitriptamin reseptörü 1F(Htr1f), ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> taşıma alt birimi alfa 2 (Atp1a2), ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> taşıma alt birimi beta 1 (Atp1b1), FBJ osteosarkom onkogeni(Fos), T hücre lenfoma invazyonu ve metastaz 1 (Tiam1 ), adrenoseptör beta 2(Adrb2), cAMP'ye yanıt veren element bağlayıcı protein 3 benzeri 1 (Creb3l1), cAMP'ye yanıt veren element bağlayıcı protein 3 benzeri 2(Creb3l2), kolinerjik reseptör, muskarinik 2 (Chrm2), gama-aminobütirik asit tip B reseptör alt birim 1 (Gabbr1), glutamat iyonotropik reseptör AMPA tipi alt birim 4 (Gria4), fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz, katalitik alt birim beta (Pik3cb), fosfolamban (Pln) prostaglandin E reseptör 3 (Ptger3), ras- ilgili C3 botulinum toksin substratı 2 (rho ailesi, küçük GTP bağlayıcı protein Rac2) (Rac2) ve tiroid uyarıcı hormon reseptörü (Tshr)'dür. Hücre içi siklik AMP'nin yükselmesi, kalsiyum kanalları, potasyum kanalları ve miyozin hafif zincir kinaz dahil olmak üzere çoklu hücre içi hedefler üzerindeki etkiler yoluyla miyometriyal gevşemeyi destekler. cAMP düzenleyici yolların (sentez ve hidroliz) tam olarak anlaşılması, erken doğumu geciktirmek veya engellemek için daha iyi tokolitiklerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (Yuan ve Bernal 2007). Ahn vd. (2016) desidualizasyon süreci için CREB3L1'in gerekli olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, ERK1 / 2'nin fosforilasyonunun da CREB3L1 ile susturulmuş insan embriyonik kök hücrelerinde (iEKH) önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır. Endometriozisli hastalardan alınan iEKH'lerinin bozulmuş desidualizasyon gösterdiği ve P4-PR sinyalleme ekseninin düzensizliğinin infertilite ve endometriozis dahil olmak üzere çeşitli endometriyal hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir.

Kalsiyum sinyal yolağında ifadesi değişen gen bölgeleri 5-hidroksitriptamin reseptörü 2A (Htr2a), 5-hidroksitriptamin reseptörü 2B (Htr2b), adrenoseptör alfa 1A(Adra1a), adrenoseptör beta 2 (Adrb2), anjiyotensin II reseptörü, tip 1a (Agtr1a), bradikinin reseptörü B2 (Bdkrb2) kolinerjik reseptör , muskarinik 2(Chrm2), erb-b2 reseptörü tirozin kinaz 3 (Erb3), erb-b2 reseptörü tirozin kinaz 4 (Erb4), gastrin salan peptit reseptörü(Grpr), inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü, tip 1( Itpr1), nitrik oksit sentaz 2 (Nos2), fosfolamban (Pln) fosfolipaz C, gama 1 (Plcg1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa (Pdgfra), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü beta (Pdgrb), prostaglandin E reseptörü 3 (Ptger3) ), purinerjik reseptör P2X 1 (P2rx1), purinerjik reseptör P2X 2 (P2rx2), ryanodin reseptör 3 (Ryr3) tirotropin salgılatıcı hormon reseptörü (Trhr) ve troponin C2, hızlı iskelet tipi (Tnnc2)' dir. Hamilelik sırasında insan plasentası anneden fetüse yaklaşık 30 g kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) transfer eder (Baczyk vd 2011). Bu transfer esas olarak üçüncü trimesterde 140 mg/kg oranında yapılır. Ca<sup>2+</sup> fetüsün iskeletinin mineralizasyonu ve birçok hücrel fonksiyon için hayati önem taşıdığından fetüsün yeterli büyümesine ve gelişmesine izin verir. Fetal dolaşıma girdikten sonra, Ca<sup>2+</sup> özellikle fetüs tarafından kemik mineralizasyonu için, ayrıca hormon salgılanması, enzimatik fonksiyonlar, hücre sinyalizasyonu, kas kasılması ve diğer birçok metabolik süreç için kullanılır (Lafond vd 2001). Ayrıca Ca<sup>2+</sup>, sitotrofoblastlar tarafından da eksprese edilir. Sinsityotrofoblastların CaR'nin lokal ifadesi, anne ve fetüs arasındaki transepitelyal taşımanın kontrolünde maternal Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunun bir rolü olduğunu düşündürür. Plasentanın ekstravillöz bölgesinde, ankraj villuslarında trofoblast kolonları oluşturan hücrelerde, maternal kan damarlarının yakınında ve geçiş sitotrofoblastlarında CaR tespit edilmiştir. Uterus invazyonu ve plasental bağışıklık ayrıcalığının korunması sürecinde ekstravillöz sitotrofoblastların önemi göz önüne alındığında, CaR, maternal hücre dışı Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunun plasentasyonu destekleyebileceği veya sürdürebileceği olası bir hedefi temsil eder (Bradbury vd 2002). Large vd (2014), erken gebelik sırasında endometriyal fonksiyon için kritik olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (Egfr) ekspresyonu olmayan farelerde, proliferasyonun, hücre sağ kalımı, farklılaşma ve hedef gen ekspresyonu dahil desidualizasyondaki kusurlar nedeniyle blastosist implantasyonundan kısa bir süre sonra gebeliğin sonlandığını ortaya koymuşlardır.

BMP sinyal yolağında SMAD aile üyesi 6 (Smad6), kemik morfogenetik protein 6 (Bmp6), kemik morfogenetik protein reseptörü tip 1B (Bmpr1b), distalsiz homeobox 5 (Dlx5), follistatin (Fst), büyüme farklılaşma faktörü 6 (Gdf6), DNA bağlama inhibitörü 1, HLH protein (Id1), msh homeobox 2 (Msx2), teratokarsinom kaynaklı büyüme faktörü 1 (Tdgf1) ve transmembran protein 100 (Tmem100) ifadesi değişmiş olan gen bölgeleridir. Kemik Morfogenetik Proteinleri (BMP'ler), proteinlerin Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β

(TGF- $\beta$ ) süper ailesine ait olan bir sinyal molekülleri grubudur. Başlangıçta kemik oluşumunu indüklemeye yetenekleri keşfedilen BMP'lerin artık tüm organ sistemlerinde çok önemli roller oynadığı bilinmektedir. BMP'ler embriyogenez ve gelişimde ve ayrıca yetişkin doku homeostazının korunmasında önemlidir (Wang vd 2014). BMP'ler, kanonik, Smad'e bağlı yol veya çeşitli kanonik olmayan yollar aracılığıyla sinyal verir. Kanonik yolda, BMP'ler, tip I veya tip II serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanarak ve bir heterotetramerik kompleks oluşturarak sinyal iletim kaskadı başlatır. Yapısal olarak aktif tip II reseptör daha sonra tip I reseptörü transfosforile eder ve tip I reseptör R-Smads'ı (Smad1/5/8) fosforile eder. Fosforillenmiş Smad1/5/8, ko-Smad (Smad4) ile birleşir ve kompleks, gen ekspresyonunu düzenlemek için koaktivatörler veya koruyucularla birleştiği nükleusa yer değiştirir. Retinal apoptoz, gelişim sırasında yalnızca ventral retinada eksprese edilen BMPR-1B'nin kaybıyla da ilişkilidir (Liu vd 2003). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, *in vitro* fertilizasyon uygulanan kontrol hastalarından elde edilen granüloza hücrelerine kıyasla polikistik over sendromu hastalarından izole edilen granüloza hücrelerinde BMP-6 mRNA seviyesinin arttığını göstermiştir (Khalaf vd 2013).

p53 sinyal yolağı ile ilişkili ifadesi değişen gen bölgeleri; kontrol noktası kinaz 1 (Chek1), siklin B1 (Ccnb1), siklin B2 (Ccnb2), siklin E1 (Ccne1), siklin E2 (Ccne2), sikline bağımlı kinaz 2 (Cdk2), sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1A (Cdkn1a), sitokrom c somatik (Cyts), büyüme durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir, alfa (Gadd45a), büyüme durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir, gama (Gadd45g), ribonükleotid redüktaz düzenleyici alt birim M2 (Rrm2), serpin ailesi B üye 5 (Serpib5) ve sestrin 1 (Sesn1)'dir. Somatik hücrelerde genomik stabilitenin korunmasında ve tümör oluşumunun önlenmesinde temel işlevleri yerine getirdiği bilinen p53 proteini, insan üremesinde de önemli bir rol oynar. p53, dişi germinatif hücrelerin ve embriyoların teratojenik ajanlara karşı korunmasında rol oynar ve embriyo implantasyonunun önemli bir aracısı olan lösemi inhibitör faktör (LIF) proteininin ekspresyonunu indükler (Hu vd 2007, Hu 2009). Ayrıca TP53 Arg/Arg (rs1042522) ve MDM2 TT (rs2279744) genotiplerinin kombinasyonu, tekrarlayan gebelik kayıpları için bir risk faktörü olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Fraga vd 2014).

MAPK sinyal yolağında değişen gen ifadeleri; FBJ osteosarkom onkogeni(Fos), fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (Fgfr3), büyüme durması ve DNA hasarı ile indüklenebilir, alfa (Gadd45a), büyüme durması ve DNA hasarı ile indüklenebilir, gama (Gadd45g), interlökin 1 beta (Il1b), interlökin 1 reseptör tip 1 (Il1r1), mitojenle aktive olan protein kinaz 13 (Mapk13), mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz 3 (Map2k3), mitojenle aktive olan protein kinazla aktive olan protein kinaz 3 (Mapkapk3), trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü alfa (Pdgfra), trombosit kaynaklı büyüme faktörü

reseptörü beta (Pdgfrb) ve ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substratı 2 (rho ailesi, küçük GTP bağlayıcı protein Rac2) (Rac2)'dir. Çok sayıda rapor, MMP9 ekspresyonunun, hücrelerin hayatta kalma, çoğalma ve invazyon yeteneklerinin düzenlenmesinde yer alan MAPK, PI3K/AKT ve Notch sinyal yolları tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Bazı sonuçlar, siklosporin A (CsA)'nın, MAPK sinyal yolunu aktive ederek erken gebelik sırasında MMP9 ve MMP2 ekspresyonunun artmasının yanı sıra EVT hücrelerinin invazyonunu desteklediğini gösterdi (Zhou vd 2007). Önceki çalışmalar, MAPK sinyal yolunun EVT hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, invazyon, farklılaşma ve apoptozunda yer aldığını bildirmiştir. Çoğu durumda, migrasyon ve invazyon yetenekleri, MAPK sinyal yolunun aktivasyonu ile daha da geliştirildi (Fitzgerald vd 2005). Örneğin, EGF, PI3K ve MAPK sinyal yollarının eş zamanlı aktivasyonu yoluyla EVT hücrelerinden MMP9 ve TIMP1 salgılanmasını teşvik edebilir (Qiu vd 2004). Ayrıca EVT hücrelerinin MMP9 ekspresyonundaki artışın, 12 saat boyunca "Semen Cuscutae'den elde edilen toplam flavonoidler (TFSC)" ile tedavi edildiğinde MAPK sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla düzenlenebileceğini göstermiştir. Ayrıca, toplam protein ekspresyonu değişmeden ERK, p38 ve AKT'nin fosforilasyonu da artmıştır. Fosforilasyonun en çok 12 saat gibi daha sonraki bir zaman noktasında olduğu gösterildi (Gao vd 2018). TNF- $\alpha$  ve LAMA4 ayrıca EVT hücrelerinde MMP9 ekspresyonunu indükleyebilir ve MAPK sinyal yolu yoluyla invazyon yeteneğini teşvik edebilir (Cohen vd 2006b).

PI3K-Akt sinyal yolağında cAMP'ye duyarlı element bağlayıcı protein 3 benzeri 1 (Creb3l1), cAMP'ye duyarlı element bağlayıcı protein 3 benzeri 2 (Creb3l2), kolinerjik reseptör, muskarinik 2 (Chrm2), kolajen tip I alfa 1 zinciri (Col1a1), kolajen tip I alfa 2 zinciri (Col1a2), kolajen tip VI alfa 5 zincir (Col6a5), kolajen tip XXIV alfa 1 zincir (Col24a1), kolajen, tip VI, alfa 4 (Col6a4), koloni uyarıcı faktör 3 reseptörü (Csf3r), koloni uyarıcı faktör 3 (Csf3), siklin E1 (Ccne1), siklin E2 (Ccne2), sikline bağımlı kinaz 2 (Cdk2), sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1A (Cdkn1a), fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (Fgfr3), hepatosit büyüme faktörü (Hgf) integrin alfa 2 (Itga2) integrin alt birimi alpha 3 (Itga3), integrin alt birimi alpha 8 (Itga8), integrin alt birimi beta 3 (Itgb3), laminin alt birimi alpha 2 (Lama2), laminin alt birimi alpha 3 (Lama3), laminin alt birimi alpha 5 (Lama5), lizofosfatidik asit reseptörü 4 (Lpar4), fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz, katalitik alt birim beta (Pik3cb), plasental büyüme faktörü (Pgf), platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa (Pdgfra), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü beta (Pdgfrb), Myb proto-onkogen proteini (C-myb) ve vitronektin (Vtn) benzeri salgılanan fosfoprotein 1 (Spp1) ifadesinin değiştiği görülmektedir. PI3K/Akt sinyal yolu, çoğalma, büyüme, hayatta kalma, apoptoz, tümör büyümesi ve anjiyogenez gibi çeşitli kritik hücre fonksiyonları düzenler. PI3K/Akt sinyal yolu, implantasyon öncesi aşamada da çok önemlidir. Yapılan çalışma farelerde 'implantasyon penceresi' sırasında PI3K/Akt sinyal

yolunun önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Liu vd 2014). Gebeliğe bağlı kardiyak hipertrofi gelişimi sırasında ERK1/2 aktivasyonu ile PI3K/Akt/GSK3b yolu arasında karşılıklı etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir (Chung vd 2012). Ayrıca fosfatidilinositol-3-kinaz/Akt/memeli rapamisin hedefi (PI3K/Akt/mTOR) yolunun azalan ekspresyonunun, preeklampsi gelişimi ile güçlü bir korelasyona sahip olduğu da bildirilmiştir (Yuan vd 2017). Preeklampsi plasentalarında LN- $\alpha$ 5 ekspresyon seviyelerinin, normal gebeliklerinkinden önemli ölçüde düşük olduğu, LN- $\alpha$ 5 ekspresyonundaki eksikliğin trofoblast proliferasyonu ve invazyonunun azalmasına, ancak hücre apoptozunun artmasına neden olduğunu ve bu arada PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun da LN- $\alpha$ 5'nin susturulması tarafından bozulduğu ortaya konmuştur (Zhang vd 2018). Ayrıca LNa5 gen mutasyonu, nöral tüp kapanması, parmak ayrılması, plasantasyon, böbrek oluşumu, pulmoner lob ayrılması, saç morfogenez ve bağırsak düz kas farklılaşmasında kusurlara yol açtığı bilinmektedir (Miner ve Li 2000, Nguyen vd 2002, Olcato-Bellemin vd 2003). Ekspresyonu azalan LNa5, preeklampsi plasentalarında gözlenir ve PI3K/AKT/mTOR yolları yoluyla HUVEC'lerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezisini inhibe eder (Zhang vd 2020).

Jak-STAT sinyal yolağında ifadesi değişen gen bölgeleri; siliyer nörotrofik faktör reseptörü (Cntrf), koloni uyarıcı faktör 2 reseptörü beta ortak altbirimi (Csf2rb), koloni uyarıcı faktör 3 reseptörü (Csf3r), koloni uyarıcı faktör 3 (Csf3), interferon, epsilon(Ikne), interlökin 10 (Il10), interlökin 11 reseptör alt birimi alfa 1 (Il11ra1), interlökin 12 reseptör alt birimi beta 2 (Il12rb2), interlökin 24 (Il24), lösemi inhibitör faktör reseptör alfa (Lifr), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz, katalitik alt birim beta (Pik3cb), sitokin sinyalizasyon baskılayıcısı 3 (Socs3) ve interlökin 6 reseptörü (IL6r)'dür. STAT protein aktivasyonu, hamileliğin erken evrelerinde yer alan yaygın bir olgudur. JAK bağlayıcı reseptörleri uyaran spesifik biyoaktif peptitlerin etkisinin bir sonucudur. Bu reseptörler için ligandlar çok yönlü olarak hareket edebilir ve gebelik düzenlemesine katılan çok sayıda dokuyu etkileyebilir. Bu ligandlar arasında sınıf I veya II sitokin reseptörlerini kullanan sitokinler, IFN'ler ve hormonlar bulunur. Bu memelilerde en yüksek LIF ekspresyonu seviyesi, hamileliğin dördüncü gününde, embriyonun uterus epiteline yapışmasının gerçekleştiği zamanda gözlenir. LIF hem JAK/STAT hem de MAPK sinyal yollarını uyarabilse de STAT proteinleri muhtemelen uterus epiteli alıcılığının oluşturulmasından sorumludur (Maj ve Chelmonska-Soyta 2007). Beta hücre genişlemesi, prolaktin reseptörü (PRLR) aracılığıyla sinyal göndererek yönlendirilir. Laktojenik hormonlar prolaktin ve plasental laktojen tarafından PRLR yoluyla sinyal verilmesi, JAK-STAT sinyalleşme kaskadını uyarır. Spesifik olarak, Janus Kinaz 2 (JAK2) yapısal olarak PRLR ile ilişkilidir ve JAK2 kinaz aktive edildiğinde Sinyal Dönüştürücüyü ve Transkripsiyon 5 Aktivatörünü (STAT5) alır ve fosforile eder. STAT5, hücre döngüsü



ve hayatta kalma ile ilgili genler dahil olmak üzere çekirdekdeki birkaç hedef genin ekspresyonunu düzenler. Kemirgen modellerinde ilk keşifler yapılmış olmasına rağmen, insan prolaktininin beta hücre sağkalımını da arttırdığı gösterilmiştir (Mortlock vd 2021).

Hippo sinyal yolağı ile ilişkili ajuba LIM proteini (Ajuba), kemik morfogenetik proteini 6 (Bmp6), kemik morfogenetik protein reseptörü tip 1B (Bmpr1b), büyüme farklılaşma faktörü 6 (Gdf6), DNA bağlama inhibitörü 1, HLH proteini (Id1), kanatsız tip MMTV entegrasyonu bölgesi ailesi üyesi 2 (Wnt2), kanatsız tip MMTV entegrasyon bölgesi ailesi, üye 16 (Wnt16) ve kanatsız tip MMTV entegrasyon bölgesi ailesi 7A (Wnt7a) gen ifadesi değişimi görülmüştür. TEAD4 içeren Hippo aracı kompleksine odaklanılan iki çalışmada: Saha vd (2020) erken postimplantasyon fare plasentadaki işlevini birinci trimester insan plasentasıyla karşılaştırır ve eksikliğini tekrarlayan gebelik kaybı (RPL) ile ilişkilendirirken Meinhardt vd (2020) transkripsiyonel kofaktör YES ile ilişkili protein 1'in (YAP1) trofoblast kök yapısını düzenlediği mekanizmaya odaklanmıştır. Hippo sinyal yolağının organ boyutunu, doku rejenerasyonunu, hücre kaderi kararını, kök hücre kaynağını ve farklılaşmayı kontrol ettiği bilinmektedir (Varelas 2014). Fare preimplante embriyosunda, morulanın iç ve dış hücreleri arasındaki Hippo yolunun farklı aktivasyonu, blastosistin iç hücre kütlesi ve dış TE tabakası arasında ayırım yapılmasına yol açan ilk soy spesifikasyonunu belirler (Nishioka vd 2008). Dış katmandaki kapalı durum, TEAD4 ile kompleks halinde TE'ye özgü genlerin ekspresyonunu yönlendiren ve bu soyu belirleyen YAP1 kofaktör proteininin nükleer translokasyonuna izin verir (Nishioka vd 2009). Bu mekanizmanın insan trofoblast soy spesifikasyonunda korunduğuna dair bazı kanıtlar vardır (Home vd 2012, Soncin ve Parast 2020). Ajuba LIM proteinleri (Ajuba, LIMD1, WTIP), epiteli yeniden şekillendirmek için hücre adeziv olaylarını nükleer yanıtlarla iletme potansiyeli sergileyen sitozolik adaptör proteinlerdir (Marie vd 2003, Langer vd 2008). Memeli ve *Drosophila* hücrelerinde, Ajuba LIM proteinleri/dJub, YAP/Yki'nin fosforilasyonunu engellemek için LATS/Wts ve WW45/Sav ile etkileşime girerek Hippo sinyal yolunun negatif düzenleyicileri olarak görev aldıkları gösterilmiştir (Das Thakur vd 2010). Endometrial fibrozis, epitelyal/fibroblast-miyofibroblast geçişi ile karakterize olan intrauterin adezyonun (IUA) gelişiminde anahtar bir patolojik olay olarak kabul edilmektedir. Myofibroblastlar, fibröz skarlaşmanın patogenezinde çok önemli roller oynar ve myofibroblast farklılaşması çoklu sinyal yolları tarafından tetiklenebilir. Hippo sinyali, endometriumdaki spesifik bir spatiotemporal ekspresyon sergileyen epitelyal / fibroblast-miyofibroblast geçişi ve alfa-düz kas aktininin kritik bir düzenleyicisidir. Hippo sinyali, fibröz hastalıklarda kritik bir rol oynar, Wnt ve TGF- $\beta$  sinyalleme ile çapraz etkileşimlere katılır (Zhu vd 2017).

Wnt sinyal yolağı ile ilgili ise kalsiklin bağlayıcı protein (Cacybp), matriks metallopeptidaz 7 (Mmp7), ras ile ilgili C3 botulinum toksin substratı 2 (rho ailesi, küçük GTP bağlayıcı protein Rac2) (Rac2), kıvrık ilişkili protein 1 (Sfrp1), salgılanmış kıvrılmış ile ilgili protein 5 (Sfrp5), kanatsız tip MMTV entegrasyon bölgesi ailesi üyesi 2 (Wnt2), kanatsız tip MMTV entegrasyon bölgesi ailesi üyesi 16 (Wnt16) ve kanatsız tip MMTV entegrasyon bölgesi ailesi üyesi 7A (Wnt7a) gen ifadelerinde değişim söz konusudur. Wnt'lerin reseptörlerine bağlanmasıyla üç yolun aktive edildiği bilinmektedir: (1) kanonik Wnt/b-katenin kaskadı; (2) kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolu; ve (3) kanonik olmayan Wnt/Ca<sup>2+</sup> yolu. PCP yolunda, Wnt'nin bağlanması, Dvl ve Dvl ile ilişkili morfogenez 1 aktivatöründen (Daam1) oluşan bir kompleksin oluşumunu tetikler. Bu kompleks sırayla Rho'yu ve ardından Rho ile ilişkili kinazı (Rock) ve miyozini aktive eder. GTPaz'ın uyarılması ve Rac'in aktivasyonu da gerçekleşir, ancak Daam1'den bağımsızdır; Rac daha sonra c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunu indükler (Marlow vd 2002). Kanonik olmayan sinyalleme ikinci dalı, fosfolipaz C'nin (PLC) heterotrimerik G-proteinleri aracılığıyla ilk aktivasyonunu içerir ve bu da inositol 1,4,5-trifosfatın (IP3) salınımı ve aktivitesi yoluyla sitoplazmik Ca<sup>2+</sup> seviyelerini artırır. Artan Ca<sup>2+</sup> seviyeleri, birkaç Ca<sup>2+</sup> yanıt veren kinazı aktive eder. Bunlardan üçünün Wnt/Ca<sup>2+</sup> sinyali ile aktive edildiği iyi bilinmektedir: kalmodulin bağımlı kinaz II (CaMKII), protein kinaz C (PKC) ve kalsinörin. Wnt/Ca<sup>2+</sup> sinyali hücre adezyonu, hücre iskeleti yeniden düzenlemeleri ve diğer gelişim süreçleri ile ilişkilidir (Kohn ve Moon 2005). Preimplantasyon dönemi embriyoda ifade edilen çeşitli Wnt sinyal bileşenlerinin, ağırlıklı olarak Ca<sup>2+</sup> bağımlı sinyalleşme ve/veya MAPK aktivasyonunu içeren kanonik olmayan yollar aracılığıyla işlev görmesi muhtemeldir. Bu yolların preimplantasyon gelişimi için gerekli olduğu bilinmektedir (Wang vd 2004b, Nayeem vd 2016). Wnt'lerin implantasyon düzenleyicilerinin kilit bir ailesi olduğunu ilk kez doğrulayan çalışma, TCF/Lef-LacZ raportör faresini kullanmıştır. Bu çalışma, uterustaki kanonik Wnt sinyalinin, implantasyondan hemen önce embriyo implantasyonunun olası bölgesinde indüklendiğini göstermiştir. Bu geçici, ancak zamanında aktivasyon, bir blastosist ve preimplantasyon östrojen sekresyonunun varlığını gerektirir. Aktif blastosist tarafından eksprese edilen bir Wnt ligandı olan Wnt7a proteininin intrauterin verilmesi, uterus Wnt/b-katenin sinyalini indükleyebilirken, sFRP2'nin Wnt7a ile birlikte uygulanması sinyal yolunu inhibe eder ve implantasyonu bozar (Mohamed vd 2004, Mohamed vd 2005). SFRP1/SFRP3'ün Wnt yolağının negatif düzenleyicileri olduğu, plasental gelişimde aktif rol oynadığı ve gebelik patolojisinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (Tepekoy vd 2015, Zmijanac vd 2018).

TNF sinyal yolağı ile ilgili değişen gen ifadeleri CXC motifli kemokin ligandı 10 (Cxcl10), CXC motifli kemokin ligandı 2 (Cxcl2), C-X3-C motifli kemokin ligandı 1

(Cx3cl1), kemokin (CC motifi) ligandı 12 (Ccl12), interferon gama indüklenebilir protein 47 (Ifi47), lösemi inhibitör faktör (Lif), karışık soy kinaz alanı benzeri (Mik1) ve selektin E (Sele)'dir. Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inflamasyonun merkezi bir düzenleyicisidir. TNF- $\alpha$  ayrıca implantasyon, plasentasyon ve gebelik sonucu ile ilgili inflamatuvar mekanizmalarla da ilişkilendirilmiştir. TNF- $\alpha$ , bağışıklık hücreleri tarafından salgılanır ve TNFR1 ve TNFR2 hücre reseptörlerine bağlanarak çalışır. TNF- $\alpha$  ayrıca, JAK/STAT yolağıyla da ilişkilidir. Th1 sitokinleri, özellikle TNF- $\alpha$ , Th17 ve Th2, özellikle IL-10 arasındaki doğru denge, iyi obstetrik sonuçlar elde etmek için esastır. TNF- $\alpha$  hedefli tedavi, tekrarlayan gebelik kaybı, erken ve şiddetli preeklampsi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı sendromu gibi aşırı TNF- $\alpha$  üretimine bağlı obstetrik komplikasyonları olan ve tümü "idiyopatik" veya aPL pozitifliği ile ilişkili olan kadınların tedavisinde rasyonel olabilir (Alijotas- Reig vd 2017). Geç gebelik sırasında insülin direnci, yağ kütlelerinden bağımsız olarak dolaşımdaki TNF- $\alpha$ 'daki değişikliklerle önemli ölçüde ilişkilidir. Artmış TNF- $\alpha$ 'nın birincil kaynağı plasenta gibi görünmektedir. TNF- $\alpha$ , insülin sinyalini ve insülin tarafından düzenlenen glukoz alımını inhibe eder, dolayısıyla gebeliğin insülin direncine bu sitokin aracılığıyla aracılık edebileceğini düşündürmektedir (Kirwan vd 2002). MMP-9 düzenlemesinin p38 MAP kinaz aracılı kontrolünde yer alan transkripsiyon faktörü NF-kappaB'yi aktive ederek 5637 hücre hattında TNF-alfa MMP-9 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Le vd 2008). Herpes simpleks keratit modelinde TNF- $\alpha$  seviyesinin MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiğine dair in vivo ve TNF- $\alpha$ 'nın MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini insan kornea epitel hücrelerinde FAK/ERK sinyalleşmesinin aktivasyonu yoluyla uyardığına dair in vitro kanıtlar literatürde mevcuttur (Yang YN vd 2012).

Bu çalışmada, sıçanlarda diyabete bağlı gebelik başarısızlıklarının genetik ve biyolojik temelini anlamak için bütünleştirici bir genomik analiz gerçekleştirdik. Çalışmamızda, ilk önce STZ ile diyabeti indüklediğimiz sıçanlardan hamile olduğu doğrulanan ve sağlıklı gebe sıçan verileri kullanarak implantasyon ve post implantasyon dönemlerindeki embriyo ile endometriyum arasındaki total gen ifadesi değişimine odaklanıldı. İlginç bir şekilde, bu genomik bölgeler, embriyo implantasyonu, bağışıklık modülasyonu, kalsiyum sinyali, vaskülarizasyon ve organogenezde çeşitli biyolojik rollere sahip aday genleri barındırır. Ayrıca, zenginleştirme analizi, hücre-hücre bağlanması, hücresel proliferasyon, membran bütünlüğü, bağışıklık, kalsiyum sinyali, steroid metabolizması ve gebelik kaybıyla ilişkili genlerle önemli olan on adet en ilgili süreci ortaya çıkardı. Ek olarak, zenginleştirme analizi Ca<sup>2+</sup>, insülin, Wnt, Hippo, MAPK, PI3K-Akt, TNF, p53, BMP, JAK-STAT ve cAMP sinyal yolları dahil olmak üzere bir dizi önemli gen sinyal yolunu ortaya çıkardı. Bu sinyal yollarının gebeliğin sürdürülmesinde, plasental gelişimde ve fetal büyümede çeşitli rolleri vardır. Genel

olarak, bu kapsamlı çalışma, diyabetik gebeliğin sürdürülmesinden sorumlu genetik varyantları, bireysel genleri ve karmaşık biyolojik ve fizyolojik yolları çözerek gebelik kaybının genetik mimarisinin daha iyi ve daha derin bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

## 6. SONUÇ

Diyabetin gebelik komplikasyonlarına neden olabilecek embriyo ve endometriyum arasında değişen moleküler etkileşimleri araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda ortaya koyduğumuz sonuçlar göstermektedir ki;

- 1) Diyabet, gebeliğin 6,5. gününde MMP3, MMP9 ve MMP20 ifadelerinin artışına; 8,5. gününde ise MMP3, MMP9 ve MMP11 ifadelerinin ise azalmasına neden olmaktadır.
- 2) Tim1 ifadesinin yalnızca gebeliğin 8,5. gününde kontrole göre azaldığı gösterilmiştir. Diğer Timp ifadeleri açısından gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır. Değişen MMP ekspresyonuna karşı Timp ekspresyonunda beklenen değişimin olmaması değişen MMP ekspresyonuna karşı gerekli yanıtın gerçekleşmediğini ve bu nedenle MMP/Timp dengesinde bozulmaya yol açtığını göstermektedir.
- 3) İmplantasyon sürecini etkileyen temel moleküler mekanizmalardan cAMP sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, PI3K-Akt sinyal yolağı ve Jak-STAT sinyal yolağı ile ilişkili çeşitli gen ifadelerinin değişimi ortaya koyulmuştur.
- 4) Gebeliğin sürdürülmesi, embriyonik hücre farklılaşması ve organ gelişimi dahil olmak üzere birçok metabolik süreçle ilgili moleküler yollardan, kalsiyum, BMP, p53, Hippo, Wnt ve TNF sinyal yolları diyabetten etkilenen mekanizmalar arasındadır.
- 5) Diyabetik gebelik implantasyon sürecinde ve sonrasında farklı genlerin ekspresyon değişimine neden olduğu gibi aynı genlerin farklı ekspresyon paternleri sergilenmesine de neden olmaktadır. İmplantasyon sırası ve sonrasında ortak değişen gen ifadesi sayısı birbirinden farklılık gösteren gen ifadesine oranla oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu durum diyabetin bu gen

ifadelerine doğrudan etkisinden ziyade, değişimine neden olduğu fizyolojik mekanizmalar ile dolaylı yoldan etkilediği kanaatini uyandırmaktadır.

Sonuç olarak diyabetin gebelik sürecinde değişen gen ifadeleri ve bu genlerin ilişkili olduğu biyolojik, hücresel, moleküler işlevler ve yollar ortaya koyulmuştur. Fakat diyabetin bu gen ifadelerini hangi mekanizmalar aracılığıyla değiştirdiğine yönelik ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Çalışmamız diyabetik gebelik komplikasyonlarına neden olan mekanizmaların araştırılması hususunda klavuz niteliğindedir.

## 7.KAYNAKLAR

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 2002; 250: 358-73.

Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev* 2000; 14: 3191-203.

Ahn JI, Yoo JY, Kim TH, Kim YI, Ferguson SD, Fazleabas AT, Young SL, Lessey BA, Ahn JY, Lim JM, Jeong JW. cAMP-Response Element-Binding 3-Like Protein 1 (CREB3L1) is Required for Decidualization and its Expression is Decreased in Women with Endometriosis. *Curr Mol Med* 2016; 16(3): 276-87.

Ain R, Konno T, Canham LN, Soares MJ. Phenotypic analysis of the rat placenta. *Methods Mol Med* 2006; 121: 295-313.

Aksun SA, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin J Med Sci* 2001; 21: 332-342

Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llurba E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017; 53(1): 40-53.

Amri K, Freund N, Vilar J, Merlet-B´enichou C, Leli`evre-P´egorier M, Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes* 1999; 48(11): 2240–2245.

Armant DR. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol* 2005; 280: 260-80.

Baczyk D, Kingdom JCP, Uhlén P. Calcium signaling in placenta. *Cell Calcium* 2011; 49(5): 350-6.

Bischof P, Meisser A, Campana A. Control of MMP-9 expression at the maternal–fetal interface. *J Reprod Immunol* 2002; 55(1): 3-10.

Bolcato-Bellemin AL, Lefebvre O, Arnold C, Sorokin L, Miner JH, Kedingler M, Simon-Assmann P. Laminin  $\alpha 5$  chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol* 2003; 260(2): 376-90.

Bolze PA, Attia J, Massardier J, Seckl MJ, Massuger L, van Trommel N, Niemann I, Hajri T, Schott AM, Golfier F, EOTTD group. Formalised consensus of the European Organisation for Treatment of Trophoblastic Diseases on management of gestational trophoblastic diseases. *Eur J Cancer* 2015; 51(13): 1725-31.

Bouillot S, Rampon C, Tillet E, Huber P. Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta* 2006; 27: 882-8.

Bradbury RA, Cropley J, Kifor O, Lovicu FJ, de lough RU, Kable E, Brown EM, Seely EW, Peat BB, Conigrave AD. Localization of the Extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing Receptor in the Human Placenta. *Placenta*. 2002; 23(2): 192-200.

Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 1967; 93: 569-79.

Burdon C, Mann C, Cindrova-Davies T, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the murine placenta. *Placenta* 2007; 28: 724-33.

Burrows TD, King A, Loke YW: Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 307–321.

Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat* 2009; 215(1): 27-35.

Caluwaerts S, Vercruyse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 2005; 26: 574-84.

Chakraborty D, Rumi MA, Konno T, Soares MJ. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 16295-300.

Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017; 148: 87-165.

Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(10): 589–98.

Christie GA. Developmental stages in somite and postsomite rat embryos, based on external appearance and including some features of the macroscopic development of the oral cavity. *J Morphol* 1964; 114: 263-283.

Chung E, Yeung F, Leinwand LA. Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *J Appl Physiol (1985)* 2012; 112(9): 1564-75.

Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* 2006; 235: 3280-94.

Cobellis L, Mastrogiacomo A, Federico E, Schettino MT, De Falco M, Manente L, Coppola G, Torella M, Colacurci N, De Luca A. Distribution of Notch protein members in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Cell Tissue Res* 2007; 330: 527-34.

Cohen M, Meisser A, Bischof P. Metalloproteinases and Human Placental Invasiveness. *Placenta* 2006a; 27(8): 783-93.

Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway in TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Rep* 2006b; 12(4): 225-32.

Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 316-21.

Coustan DR. Making the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Clin Obstet Gynecol* 2000; 43: 99-105.



Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H, Kingdom JC. Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta* 2003; 24: 123-30.

Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 207-12.

Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 105-13.

Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice—a review. *Placenta* 2005; 26(Suppl A): 3-9.

Damasceno DC, Volpato GT, Calderon IMP, Aguilar R, Rudge MVC. Effect of Bauhinia forficata extract in diabetic pregnant rats: Maternal repercussions. *Phytomedicine* 2004; 11(2-3): 196–201.

Das Thakur M, Feng Y, Jagannathan R, Seppa MJ, Skeath JB, Longmore GD. Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Current biology* 2010; 20(7): 657-62.

Ding R, Liu X-M, Xiang Y-Q, Zhang Y, Zhang J-Y, Guo F, Liu ZW ve Fan JX. Altered Matrix Metalloproteinases Expression in Placenta from Patients with Gestational Diabetes Mellitus. *Chin Med J (Engl)* 2018; 131(10): 1255-8.

Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C, Reijo Pera RA. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13, 1461–1470

Egan AM, Dow ML, Vella A. A Review of the Pathophysiology and Management of Diabetes in Pregnancy. *Mayo Clin Proc* 2020; 95(12): 2734-2746.

Eng GS, Sheridan RA, Wyman A, Chi MM, Bibee KP, Jungheim ES, Moley KH. AMP kinase activation increases glucose uptake, decreases apoptosis, and improves pregnancy outcome in embryos exposed to high IGF-I concentrations. *Diabetes* 2007; 56(9): 2228–34.

Eriksson UJ, Andersson A, Efendic S, Elde R, Hellerstrom C. Diabetes in pregnancy: effects on the fetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentration and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 94(3): 354-364.

Eriksson UJ, Borg LA, Cederberg J, Nordstrand H, Simán, C M, Wentzel C, Wentzel P. *Ups J Med Sci* 2000; 105(2): 53–84.

Erlebacher A, Price KA, Glimcher LH. Maintenance of mouse trophoblast stem cell proliferation by TGF-beta/ activin. *Dev Biol* 2004; 275: 158-69.

Erman HÇ (Uzmanlık Tezi). Tip 2 Diabet Hastalarında Dolaşımdaki Matriks Metalloproteinazları (Mmp-2, Mmp-9), Doku Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri (TIMP-1, TIMP-2), Reaktif Karbonil Bileşikleri Ve İleri Glikasyon Son Ürünlerinin Düzeyleri. *T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi* Biyokimya Anabilim Dalı Danışman: Doç. Dr. Remisa Gelişgen. İstanbul, 2012.

Fafet P, Rebouissou C, Maudelonde T, Vignais ML. Opposite effects of transforming growth factor-beta activation and rho-associated kinase inhibition on human trophoblast migration in a reconstituted placental endometrial coculture system. **Endocrinology** 2008; 149: 4475-4485.

Falls J ve Milio L. Endocrine Disease in Pregnancy. In: Brandon J.B, Amy E H eds. **The Johns Hopkins Manuel of Gynecology and Obstetrics** 2th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2002; 162-82.

Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. Signal transduction in trophoblast invasion. **Chem Immunol Allergy** 2005; 88: 181–199.

Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E and Markert UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Hum Reprod Update** 2008; 14(4): 335-344.

Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RA, Bolton VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. **EMBO J.** 1982; 1, 681–686

Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, Vianna FS, Gonçalves RO, Paskulin DD, Costa OL, Ashton-Prolla P, Sanseverino MT, Schuler-Faccini L. p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. **Mol Biol Rep** 2014; 41(3): 1871-7.

Gangloff YG, Mueller M, Dann SG, Svoboda P, Sticker M, Spetz JF, Um SH, Brown EJ, Cereghini S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. **Mol Cell Biol.** 2004; 24(21): 9508–16

Gao F, Zhou C, Qiu W, Wu H, Li J, Peng J, Qiu M, Liang C, Gao Ji Luo S. Total flavonoids from Semen Cuscutae target MMP9 and promote invasion of EVT cells via Notch/AKT/MAPK signaling pathways. **Sci Rep** 2018; 8(1): 17342.

Gardner RL. Analysis of determination and differentiation in the early mammalian embryo using intra- and interspecific chimeras. **Symp Soc Dev Biol** 1975: 207-36.

Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. **Dev Cell** 2005; 8: 365-75.

Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. **Lab Invest** 2005; 85: 597-607.

Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK. Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86: 2484-2493.

Godbole G, Suman P, Gupta SK, Modi D: Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. **Fertil Steril** 2011; 95: 1278–1283.

Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. **J Biol Chem** 1992; 267: 4583–4591.

Gonzalez IM, Martin PM, Burdsal C, Sloan JL, Mager S, Harris T, Sutherland AE. Leucine and arginine regulate trophoblast motility through mTOR-dependent and independent pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 2012; 361(2): 286–300.

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

Haider S, Meinhardt G, Velicky P, Otti GR, Whitley G, Fiala C, Pollheimer J, Knofler M. Notch signaling plays a critical role in motility and differentiation of human first-trimester cytotrophoblasts. *Endocrinology* 2014; 155: 263-74.

Hamilton WJ, Grimes DH. Growth relationship between the foetus and the placenta. *Proc R Soc Med* 1970; 63: 496-8.

Hammer A. Immunological regulation of trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 2011; 90: 21-8.

Handsuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator- activated receptor-gamma. *Endocrinology* 2007; 148: 5011-9.

He Y, Wang W, Xu L, Li L, Liu J, Feng M, Bu H. Immunohistochemical Expression and Prognostic Significance of CD97 and its Ligand DAF in Human Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2015; 34(5): 473-9.

Hemberger M, Cross JC. Genes governing placental development. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 162-8.

Hertig AT. On the development of the amnion and exocoelomic membrane in the previllous human ovum. *Yale J Biol Med* 1945; 18: 107-15.

Hiden U, Bilban M, Knofler M, Desoye G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8: 31-9.

Home P, Saha B, Ray S, Dutta D, Gunewardena S, Yoo B, Pal A, Vivian JL, Larson M, Petroff M, Gallagher PG, Schulz VP, White KL, Golos TG, Behr B, Paul S. Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(19): 7362-7367.

Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007; 450(7170): 721-4.

Hu W. The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb perspect biol* 2009; 1(6): a001073.

Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1721–1729.

Hughes M, Dobric N, Scott IC, Su L, Starovic M, St- Pierre B, Egan SE, Kingdom JC, Cross JC. The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. **Dev Biol** 2004; 271: 26-37.

Imakawa K, Chang KT, Christenson RK. Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. **J Reprod Dev** 2004; 50: 155-69.

Islas-Andrade S, Monsalve MCR, De La Peña JE, Polanco AC, Palomino MA, Velasco AF. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. **Acta Histochem Cytochem** 2000; 33(3): 201– 208.

Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. **Matrix Biology** 2015; 44-46: 207-23.

Jacqueminet S, Ben Abdesselam O, Chapman MJ, Nicolay N, Foglietti MJ, Grimaldi A, Beaudeau JL. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in type 1 diabetic patients with and without retinopathy **Clin Chim Acta** 2006; 367: 103-107.

Jawerbaum A ve White V. Animal models in diabetes and pregnancy. **Endocr Rev** 2010; 31( 5): 680–701.

Jia RZ, Ding GC, Gu CM, Huang T, Rui C, Wang YX, Lu Q. CDX2 enhances HTR-8/SVneo trophoblast cell invasion by altering the expression of matrix metalloproteinases. **Cell Physiol Biochem** 2014; 34: 628-36.

Justine S. Fitzgerald, Tobias G. Poehlmann, Ekkehard Schleussner, Udo R. Markert. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Hum Reprod Update** 2008; 14(4): 335–344.

Kalın A (Uzmanlık Tezi). Gebelik ve Diyabet Olgularımızın İrdelenmesi. **T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**. Danışman: Prof. Dr. Vildan OCAK. İstanbul, 2008.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biol Reprod** 2003; 69: 1-7.

Kent LN, Rumi MA, Kubota K, Lee DS, Soares MJ. FOSL1 is integral to establishing the maternal-fetal interface. **Mol Cell Biol** 2011; 31: 4801-13.

Khalaf M, Morera J, Bourret A, Reznik Y, Denoual C, Herlicoviez M, Mittre H, Benhaim A. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. **Eur J Endocrinol** 2013; 168(3): 437-44.

Kim J, Song G, Wu G, Gao H, Johnson GA, Bazer FW. Arginine, leucine, and glutamine stimulate proliferation of porcine trophoblast cells through the MTOR-RPS6K-RPS6-EIF4EBP1 signal transduction pathway. **Biol Reprod** 2013; 88(5): 113.

Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier J-C, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF- $\alpha$  Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy. **Diabetes** 2002; 51(7): 2207-13.

Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, Damasceno DC. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1(1): 21.

Knofler M, Meinhardt G, Bauer S, Loregger T, Vasicek R, Bloor DJ, Kimber SJ, Husslein P. Human Hand1 basic helix-loop-helix (bHLH) protein: extra-embryonic expression pattern, interaction partners and identification of its transcriptional repressor domains. *Biochem J* 2002; 361(Pt 3): 641-651.

Knofler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 269-80.

Kohn AD and Moon RT. Wnt and calcium signaling: betacatenin- independent pathways. *Cell Calcium* 2005; 38(3-4): 439-446.

Lafond J, Goyer-O'Reilly I, Laramée M, Simoneau L. Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta. *Endocrine*. 2001;14(3): 285-94.

Lala PK, Graham CH, Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 369–379.

Langer EM, Feng Y, Zhaoyuan H, Rauscher FJ 3rd, Kroll KL, Longmore GD. Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in *Xenopus*. *Dev Cell* 2008; 14: 424–436.

Large MJ, Wetendorf M, Lanz RB, Hartig SM, Creighton CJ, Mancini MA, Kovanci, E, Lee KF, Threadgill DW, Lydon JP, Jeong JW, DeMayo FJ. The epidermal growth factor receptor critically regulates endometrial function during early pregnancy. *PLoS genet* 2014; 10(6): e1004451.

Latos PA, Hemberger M. Review: the transcriptional and signalling networks of mouse trophoblast stem cells. *Placenta* 2014; 35: 81-5.

Lee SJ, Park SS, Lee US, Kim WJ, Moon SK. Signaling pathway for TNF-alpha-induced MMP-9 expression: mediation through p38 MAP kinase, and inhibition by anti-cancer molecule magnolol in human urinary bladder cancer 5637 cells. *Int immunopharmacol* 2008; 8(13-14): 1821-6.

Leese HJ and Brison DR. Advances in Experimental Medicine and Biology. *Springer* New York Heidelberg Dordrecht London 2015. p1-34(224).

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ: 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113: 437–449.

Liu J, Wilson S, Reh T. BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. *Dev Biol* 2003; 256(1): 34-48.

Liu L, Wang Y, Yu Q. The PI3K/Akt signaling pathway exerts effects on the implantation of mouse embryos by regulating the expression of RhoA. *Int J Mol Med* 2014; 33(5): 1089-96.

Lockwood CJ, Oner C, Uz YH, Kayisli UA, Huang SJ, Buchwalder LF, Murk W, Funai EF, Schatz F. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua

and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol Reprod* 2008; 78(6): 1064-72.

Loregger T, Pollheimer J, Knofler M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast—a review. *Placenta* 2003; 24 (Suppl A): 104-10.

Louden E, Chi MM, Moley KH. Crosstalk between the AMP-activated kinase and insulin signaling pathways rescues murine blastocyst cells from insulin resistance. *Reproduction* 2008;136(3): 335–44.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 6.

Maj T, Chelmonska-Soyta A. Pleiotropy and redundancy of STAT proteins in early pregnancy. *Reprod Domest Anim* 2007; 42(4): 343-53.

Malassine A, Frenzo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 531-9.

Marcela SG, Cristina RMM, Angel PGM, Manuel AM, Sofia DC, Patricia D, Bladimir RR, Concepción SG. Chronological and morphological study of heart development in the rat,” *Anat Rec (Hoboken)* 2012; 295(8): 1267-1290.

Marie H, Pratt SJ, Betson M, Epple H, Kittler JT, Meek L, Moss SJ, Troyanovsky S, Attwell D, Longmore GD, Braga VM. The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin. *J Biol Chem* 2003; 278(2): 1220–1228.

Marlow F, Topczewski J, Sepich D, and Solnica-Krezel L. Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* 2002; 12(11): 876-884.

Martin PM, Sutherland AE, Van Winkle LJ. Amino acid transport regulates blastocyst implantation. *Biol Reprod* 2003; 69(4): 1101–8.

Martin PM, Sutherland AE. Exogenous amino acids regulate trophectoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Dev Biol* 2001; 240(1): 182–93.

McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3665-3674.

Meinhardt G, Husslein P, Knofler M. Tissue-specific and ubiquitous basic helix-loop-helix transcription factors in human placental trophoblasts. *Placenta* 2005; 26: 527-39.

Meinhardt G, Haider S, Kunihs V, Saleh L, Pollheimer J, Fiala C, Hetey S, Feher Z, Szilagy A, Than NG, Knöfler M. Pivotal role of the transcriptional co-activator YAP in trophoblast stemness of the developing human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; 117: 13562–13570.

Menkhorst EM, Lane N, Winship AL, Li P, Yap J, Meehan K, Rainczuk A, Stephens A, Dimitriadis E: Decidual-secreted factors alter invasive trophoblast membrane and secreted proteins implying a role for decidual cell regulation of placentation. **PLoS One** 2012; 7: e31418.

Mihmanlı V, Mihmanlı M. Diabetes Mellitus ve Gebelik. **Okmeydanı Tıp Dergisi** 2015; 31: 17-22.

Miner JH and Li C. Defective Glomerulogenesis in the Absence of Laminin  $\alpha 5$  Demonstrates a Developmental Role for the Kidney Glomerular Basement Membrane. **Dev Biol** 2000; 217(2): 278-89.

Modi DN, Godbole G, Suman P, Gupta SK. Endometrial biology during trophoblast invasion. **Front Biosci** (Schol Ed). 2012; 4: 1151-71.

Mohamed OA, Dufort D and Clarke HJ. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo–maternal signaling at implantation. **Biol Reprod** 2004; 71(2): 417-424.

Mohamed OA, Jonnaert M, Labelle-Dumais C, Kuroda K, Clarke HJ and Dufort D. Uterine Wnt/b-catenin signaling is required for implantation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 2005; 102(24): 8579-8584.

Moore KL and Persaud TVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, **Saunders Elsevier**.2008.

Mortlock RD, Georgia SK, Finley SD. Dynamic Regulation of JAK-STAT Signaling Through the Prolactin Receptor Predicted by Computational Modeling. **Cell Mol Bioeng** 2021; 14(1): 15-30.

Mossman HW. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Contrib Embryol** 1937; 26: 133-247.

Mulay S ve Solomon S. Influence of streptozotocin-induced diabetes in pregnant rats on plasma corticosterone and progesterone levels and on cytoplasmic glucocorticoid receptors in fetal tissues. **Endocrinol** 1983; 96(2): 335-345.

Nayeem SB, Arfuso F, Dharmarajan A, Keelan JA. Role of Wnt signalling in early pregnancy. **Reprod Fertil Dev** 2016; 28(5): 525-44.

Nguyen NM, Miner JH, Pierce RA, Senior RM. Laminin  $\alpha 5$  Is Required for Lobar Septation and Visceral Pleural Basement Membrane Formation in the Developing Mouse Lung. **Dev Biol.** 2002; 246(2): 231-44.

Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. **Development.** 2012 Mar;139(5):829-41.

Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. **Dev Cell** 2009; 16(3): 398–410.

Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, Nakao K, Sasaki H. Tead4 is required for specification of trophoblast in pre-implantation mouse embryos. **Mech Dev** 2008; 125: 270-83.

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332, 459–461

Peeters SA, Engelen L, Buijs J, Chaturvedi N, Fuller JH, Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Fuller JH, Schalkwijk CG, Stehouwer CD and EURODIAB Prospective Complications Study Group. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. **Cardiovasc Diabetol** 2015; 14(1): 31.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. **Placenta** 1983; 4: 397-413.

Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. **Placenta** 1980; 1: 3-19.

Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. **Placenta** 1981; 2: 71-91.

Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, Flannery M, Sund M, Kanasaki K, Ni W, Kalluri R, Werb Z. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Proc Natl Acad Sci USA** 2013; 110(27): 11109-11114.

Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. **Placenta** 2005; 26(Suppl A): 37-41.

Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, López-Costa JJ, González E. Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation. **Placenta**. 2005; 26(4): 339-48.

Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. **Reproduction** 2004; 128(3): 355-63.

Quinn LM, Latham SE, Kalionis B. A distal-less class homeobox gene, DLX4, is a candidate for regulating epithelial- mesenchymal cell interactions in the human placenta. **Placenta** 1998; 19: 87-93.

Quinn LM, Latham SE, Kalionis B. Homeobox gene HB24, a regulator of haematopoiesis, is a candidate for regulating differentiation of the extra-embryonic trophoblast cell lineage. **Reprod Fertil Dev** 1997; 9: 617-23.

Ray S, Dutta D, Rumi MA, Kent LN, Soares MJ, Paul S. Context-dependent function of regulatory elements and a switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate Gata2 transcription during trophoblast differentiation. **J Biol Chem** 2009; 284: 4978-88.



Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **J Clin Invest** 2004; 114: 744-54.

Renaud SJ, Kubota K, Rumi MA, Soares MJ. The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion. **J Biol Chem** 2014; 289: 5025-39.

Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. **Nat Genet** 1998; 18: 271-5.

Robins JC, Heizer A, Hardiman A, Hubert M, Handwerger S. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. **Placenta** 2007; 28: 1141-6.

Rodriguez RR, Renaud A, Celener D, Pérez RL, Susemihl MC. Offspring of streptozotocin diabetic rats: size changes in Langerhans islets with time after birth. **Diabetes Res Clin Pract** 1998; 41(2): 95-100.

Rosario GX, Ain R, Konno T, Soares MJ. Intrauterine fate of invasive trophoblast cells. **Placenta** 2009; 30: 457-63.

Rosario GX, Konno T, Soares MJ. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. **Dev Biol** 2008; 314: 362-75.

Sah SP, Singh B, Choudhary S, Kumar A. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacol Rep** 2016; 68(6): 1165-1177.

Saha B, Ganguly A, Home P, Bhattacharya B, Ray S, Ghosh A, Rumi M, Marsh C, French V.A., Gunewardena S, Paul S. TEAD4 ensures postimplantation development by promoting trophoblast self-renewal: An implication in early human pregnancy loss. **Proc Natl Acad Sci USA** 2020; 117: 17864–17875.

Salazar GM, Reyes ME, Revilla MMC, Villavicencio GL, Reyes LA, Sánchez-Gómez C. Importance of maternal diabetes on the chronological deregulation of the intrauterine development: an experimental study in rat. **J Diabetes Res** 2015; 2015: 354265.

Schreiber M, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C, Wagner EF. Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. **Development** 2000; 127: 4937-48.

Seki Y, Williams L, Vuguin PM, and Charron MJ. “Minireview: epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models,” **Endocrinology** 2012; 153(3):1031–1038.

Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. **Cell Adh Migr** 2016; 10(1-2): 88-110.

Simon C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. **J Clin Endocrinol Metab** 1994a; 78: 847–854.

Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. **Endocrinology** 1994b; 134: 521–528.

Smith JM, Currie S, Cannon T, Armbruster D, Perri J. Are national policies and programs for prevention and management of postpartum hemorrhage and preeclampsia

adequate? A key informant survey in 37 countries. **Glob Health Sci Pract** 2014; 2: 275-84.

Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T, Renaud SJ. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. **Placenta** 2012; 33: 233-43.

Soares MJ, Chakraborty D, Kubota K, Renaud SJ, Rumi MA. Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling during the establishment of pregnancy. **Int J Dev Biol** 2014; 58 :247-59.

Soncini F, Parast MM. Role of Hippo signaling pathway in early placental development. **Proc Natl Acad Sci USA** 2020; 117(34): 20354-6.

Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. **Cancer** 2000; 89(12): 2637-2645.

Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacol Res** 2005; 52: 313–20.

Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. **Reprod Biol Endocrinol** 2004; 2(1): 59.

Tanaka S. Derivation and culture of mouse trophoblast stem cells in vitro. **Methods Mol Biol** 2006; 329: 35-44.

Tantbirojn P, Crum CP, Parast MM. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. **Placenta** 2008; 29: 639-45.

Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette- Egly C, Evain-Brion D, Fournier T. PPARgamma/ RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86: 5017-24.

Taylor DM, Ray PF, Ao A, Winston RM, Handyside AH. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three-to-four-cell stage. **Mol. Reprod. Dev.** 1997; 48, 442–448

Tepekoy F, Akkoyunlu G, Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. **J Assist Reprod Genet.** 2015; 32(3): 337-46.

Treviño-Alanís M, Ventura-Juárez J, Hernández-Piñero J, Nevárez-Garza A, Quintanar-Stephano A, González-Piña A. Delayed lung maturation of foetus of diabetic mother rats develop with a diminish, but without changes in the proportion of type I and II pneumocytes, and decreased expression of protein D-associated surfactant factor. **Anat Histol Embryol** 2009; 38(3): 169-76.

Tripathi V, Popescu NC, Zimonjic DB. DLC1 induces expression of E-cadherin in prostate cancer cells through Rho pathway and suppresses invasion. **Oncogene** 2014; 33: 724-33.

Uriu-Hare JY, Stern JS, Reaven GM, Keen CL. The effect of maternal diabetes on trace element status and fetal development in the rat. **Diabetes** 1985; 34(10): 1031–1040.

Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. **Development** 2014; 141: 1614–1626.

Vassena R, Boué S, González-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Belmonte J. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. **Development** 2011; 138, 3699–3709

Viollet B, Athesa Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, ve Bertrand, LAMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. **Front Biosci (Landmark Ed)** 2009; 14: 19–44.

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. **Genes Dis** 2014; 1(1): 87-105.

Wang TS, Gao F, Qi QR, Qin FN, Zuo RJ, Li ZL, Liu JL, Yang ZM. Dysregulated LIF-STAT3 pathway is responsible for impaired embryo implantation in a Streptozotocin-induced diabetic mouse model. **Biol Open** 2015; 4(7): 893-902.

Wang Q, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, Zernicka-Goetz M. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. **Dev. Cell** 2004a; 6, 133–144

Wang Y, Wang F, Sun T, Trostinskaia A, Wygle D, Puscheck E and Rappolee DA. Entire mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway is present in preimplantation mouse embryos. **Dev Dyn** 2004b; 231(1): 72-87.

Wang Z, Zhong J, Inuzuka H, Gao D, Shaik S, Sarkar FH, Wei W. An evolving role for DEPTOR in tumor development and progression. **Neoplasia** 2012; 14(5): 368-75.

Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology (Bethesda)** 2005; 20: 180-93.

WEB\_1. cellsignal internet sitesi. <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-pi3k-akt-signaling-resources/pi3k-akt-signaling-interactive-pathway/pathways-akt-signaling> (son güncelleme tarihi: 20.03.2020, alındığı tarih: 10.07.2021)

Xiaoliang Li, Chunlian Wu, Ying Shen, Ke Wang, Li Tang, Mi Zhou, Ming Yang, Tianying Pan, Xinghui Liu, Wenming Xu. Ten-eleven translocation 2 demethylates the MMP9 promoter, and its down-regulation in preeclampsia impairs trophoblast migration and invasion. **J Biol Chem.** 2018; 293(26): 10059-10070.

Yang W, Carmichael SL, Tinker SC, Shaw GM. Association between weight gain during pregnancy and neural tube defects and gastroschisis in offspring. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol** 2012; 94(12): 1019-1025.

Yang YN, Wang F, Zhou W, Wu ZQ, Xing YQ. TNF- $\alpha$  stimulates MMP-2 and MMP-9 activities in human corneal epithelial cells via the activation of FAK/ERK signaling. **Ophthalmic res** 2012; 48(4): 165-70.

Yu Y, Wang L, Tang W, Zhang D, Shang T. RNA interference- mediated knockdown of Notch-1 inhibits migration and invasion, down-regulates matrix metalloproteinases and suppresses NF-kappaB signaling pathway in trophoblast cells. **Acta Histochem** 2014; 116: 911-9.

Yuan W, Bernal AL. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. **BMC pregnancy and childbirth** 2007; 7(Suppl 1): 10.

Yuan Y, Shan N, Tan B, Deng Q, Liu Y, Wang H, Luo X, He C, Luo X, Zhang H, Baker PN, Olson DM, Qi Het. SRC-3 Plays a Critical Role in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Regulating the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Preeclampsia. **Reprod Sci** 2017; 25(5): 748-58.

Zeng LH, McDaniel S, Rensing NR, Wong M. Regulation of cell death and epileptogenesis by the mammalian target of rapamycin (mTOR): a double-edged sword? **Cell Cycle** 2010; 9(12): 2281-5.

Zeng X, Mao X, Huang Z, Wang F, Wu G, Qiao S. Arginine enhances embryo implantation in rats through PI3K/PKB/mTOR/NO signaling pathway during early pregnancy. **Reproduction** 2013; 145: 1–7.

Zhang P, Tang M, Zhong T, Lin Y, Zong T, Zhong C, Zhang B, Ren M, Kuang H. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. **PLoS One** 2014; 9: e97647.

Zhang X, Li Q, Jiang W, Xiong X, Li H, Zhao J, Qi H. LAMA5 promotes human umbilical vein endothelial cells migration, proliferation, and angiogenesis and is decreased in preeclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med** 2020; 33(7): 1114-24.

Zhang XM, Xiong X, Tong C, Li Q, Huang S, Li QS, Liu YM, Li HY, Baker P, Shan N, Qi HB. Down-Regulation of Laminin (LN)-  $\alpha$ 5 is Associated with Preeclampsia and Impairs Trophoblast Cell Viability and Invasiveness Through PI3K Signaling Pathway. Cellular physiology and biochemistry. **Cell Physiol Biochem** 2018; 51(5): 2030-40.

Zhou WH, Du MR, Dong L, Zhu XY, Yang JY, He YY, Li DJ. Cyclosporin A increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Hum Reprod** 2007; 22(10): 2743-50.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? **J Clin Invest** 1997; 99: 2139-51.

Zhu HY, Ge TX, Pan YB, Zhang SY. Advanced Role of Hippo Signaling in Endometrial Fibrosis: Implications for Intrauterine Adhesion. **Chin Med J (Engl)** 2017; 130(22): 2732-7.

Zmijanac Partl J, Karin V, Skrtic A, Nikuseva-Martic T, Serman A, Mlinarec J, Curkovic-Perica M, Vranic S, Serman L. Negative regulators of Wnt signaling pathway SFRP1 and SFRP3 expression in preterm and term pathologic placentas. **J Matern Fetal Neonatal Med** 2018; 31(22): 2971-2979.

## 9. EKLER

EK-1 : Çil N, Yaka M, Ünal Ms, Dodurga Y, Tan S, Seçme M, Karagür Er, Mete Ga. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell Treatment İn Experimental Asherman Syndrome İnduced Rats. *Molecular Biology Reports* (2020) 47:4541–4552.

EK-2 : Tokgun O, Karakas DE, **Tan S**, Karagür ER, İnal B, Akca H, Durap F, Baysal A, Aydemir M. Novel ruthenium and palladium complexes as potential anticancer molecules on SCLC and NSCLC cell lines. *Chemical Papers* (2020) 74:2883–2892.

EK-3 : Karabulut A, Simavlı SA, Abban GM, Akyer ŞP, Keskin N, **Tan S**, Şahin B. Tissue reaction to urogynecologic meshes: effect of steroid soaking in two different mesh models. *Int Urogynecol J* 27, 1583–1589 (2016).

**EKLER**

**EK-1**

Çil N, Yaka M, Ünal Ms, Dodurga Y, **Tan S**, Seçme M, Karagür Er, Mete Ga. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell Treatment İn Experimental Asherman Syndrome İnduced Rats. ***Molecular Biology Reports*** (2020) 47:4541–4552.



# Adipose derived mesenchymal stem cell treatment in experimental asherman syndrome induced rats

Nazlı Çil<sup>1</sup> · Mutlu Yaka<sup>1</sup> · Murat Serkant Ünal<sup>1</sup> · Yavuz Dodurga<sup>2</sup> · Semih Tan<sup>1</sup> · Mücahit Seçme<sup>2</sup> · Ege Rıza Karagür<sup>3</sup> · Gülçin Abban Mete<sup>1</sup>

Received: 27 February 2020 / Accepted: 6 May 2020 / Published online: 22 May 2020  
© Springer Nature B.V. 2020

## Abstract

Asherman syndrome (AS) occurs due to fibrosis or uterine adhesions as a result of damage to the basal layer of the endometrium. The aim of this study is investigating the effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ADMSC) application on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF-1), miRNA-98, miRNA199a in endometrial tissue in rats with AS. Study groups were designed as, control (C), Asherman syndrome (AS), AS + oral estrogen (ASO), AS + ADMSC (ASSC), AS + oral estrogen + ADMSC (ASSCO) with 7 samples in each group. Characterization and differentiation experiments were performed in ADMSC obtained. Two weeks after the development of the AS, ADMSC therapy was applied. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) labeling was performed to show the presence of ADMSC in the tissues. Rats were sacrificed after 8 weeks and bilateral uterine horn resection was performed. Tissues were fixed in formaldehyde. After routine tissue follow-up, sections were taken and evaluated with hematoxylin eosin staining. VEGF1 and IGF1 expressions were evaluated by immunohistochemical staining and western blot analysis. Expression changes of miR-98 and miR-199a were detected by RT-PCR. Our results showed that stem cells and estrogen giving together reduced inflammation and fibrosis in the endometrium. Immunohistochemistry and western blot results suggested that this effect was achieved especially through IGF-1. In our study, decreased miR-98 and miR-199a expressions were determined in Asherman syndrome. Furthermore, no changes of miRNA expressions were observed in treatment groups.

**Keywords** Asherman syndrome · Mesenchymal stem cells · VEGF · IGF-1 · miR-98 · miR-199a

## Abbreviations

AS	Asherman syndrome
ADMSC	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell
VEGF	Vascular endothelial growth factor
IGF-1	Insulin-like growth factor
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
BM-MSC	Bone marrow-mesenchymal stem cell
miRNA	MicroRNA

PBS	Phosphate-buffered saline
HG-DMEM	High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovine serum
KÖGEM	Kocaeli University stem cell and gene therapy research and application centre
HCl	Hydrochloric acid
HRP-SA	Horse radish peroxidase conjugate streptavidin
H SCORE	Histological Score
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HRT	Hormone replacement therapy
hAEC	Human amniotic epithelial cell

✉ Nazlı Çil  
ncil@pau.edu.tr

<sup>1</sup> Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Pamukkale University, Pamukkale, Denizli, Turkey

<sup>2</sup> Department of Medical Biology, School of Medicine, Pamukkale University, Pamukkale, Denizli, Turkey

<sup>3</sup> Department of Medical Genetics, School of Medicine, Pamukkale University, Pamukkale, Denizli, Turkey

## Introduction

Asherman syndrome (AS) occurs due to fibrosis or uterine adhesions as a result of damage to the basal layer of the endometrium. This disease is often associated with



hypomenorrhea or amenorrhea, infertility or recurrent pregnancy losses. AS has recently been shown to significantly increase the risk of premature rupture of membranes, placental detachment, malpresentation [1]. Several studies have shown that various stem cell sources provide endometrial regeneration in AS [2]. Bone marrow-mesenchymal stem cells (BM-MSCs) have been shown to differentiate progenitor cells which form the basis for endometrial stromal fibroblasts [3]. Adipose tissue is one of the most remarkable stem cell sources due to its high availability, abundance of mesenchymal progenitor cells, and minimal invasiveness for autologous cell therapy. ADSCs secrete high levels of regeneration-associated cytokines and growth factors [4]. Insulin-Like Growth Factor (IGF-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is required for cyclic regeneration of the endometrium. IGF-1 plays a critical role in uterine repair. VEGF is a mitogen growth factor for the proliferation of smooth muscle cells and vascular endothelial cells. They play an important role in wound healing and tissue regeneration [3].

MicroRNAs (miRNAs) are functional RNA molecules that are transcribed from the intron or exon regions on the genome but are not translated into proteins [5–7]. These non-coding RNA molecules bind to target mRNAs that are complementary to their nucleotide sequences and perform the regulation of post-transcriptional gene expression by translational suppression or mRNA degradation. miRNAs play important roles in homeostatic processes such as cell proliferation, cell differentiation and cell death using this pathway [6]. In a study, miRNA and mRNA expressions have been shown comparatively during embryo implantation in rat uterus [8]. miR-98 expression level was found low in the follicular and luteal phase of endometrium and peri-postmenopausal period, but the level was increased while tumor development and implantation in rat uterus [9]. miRNA 98, miRNA 199a has been shown to regulate various periods of pregnancy in rat uterus [10–11].

The aim of this study was to evaluate the improvement of endometrial tissue by immunohistochemistry and western blot methods after ADMSC therapy on rats with AS. It was also to show whether there was any difference between groups in terms of miRNA expression in AS.

## Materials and methods

### Animals and experimental protocol

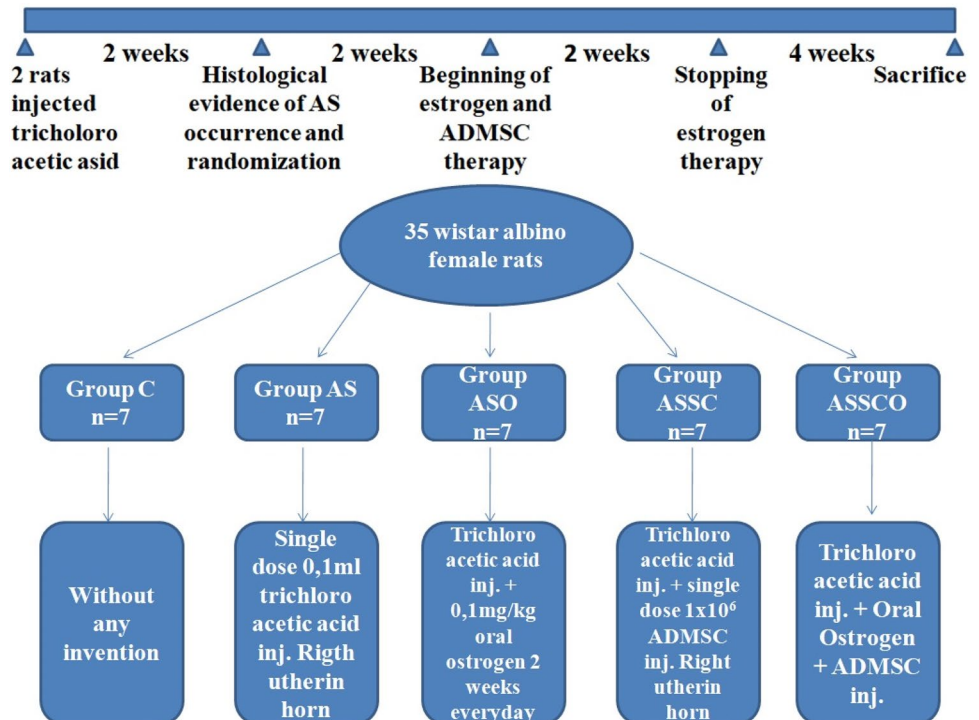
Wistar albino, 40 healthy, 200–250 g, female rats were used in our study. Rats were kept at 12-h light–dark cycle at 22 °C and fed ad libitum. Ethics committee approval was obtained from the ethics committee of Animal Experiments Ethics Committee of Pamukkale University (Denizli, Turkey) with

the number PAU EK-2015/17. Before starting the study, 0.1 ml trichloroacetic acid was injected into the right uterine horn of 2 rats and the left uterine horn left as control. AS was histopathologically demonstrated after 2 weeks. After experimental model of AS has proven, experimental groups were formed (Fig. 1).

Control group (C) (n = 7), AS group (0.1 ml trichloroacetic acid (6L015040; 20%, Biochemica) right uterine horn, single dose) (AS) (n = 7), AS + oral estrogen group (daily 0.1 mg/kg, 2 weeks (ASO) (n = 7), AS + ADMSC ( $1 \times 10^6$  adipose tissue-induced mesenchymal stem cell, single dose, local) group (ASSC) (n = 7), AS + oral estrogen + ADMSC group (ASSCO) (n = 7) (Fig. 1). Before application to the experimental groups, MSC from rat adipose tissue were characterized and differentiation experiments were performed. Stem cell therapy was administered 2 weeks after the AS was established. BrdU [5-bromo-2-deoxyuridine] detection kit (B5002; Sigma Aldrich, USA) was used to show the presence of MSCs in the tissues. After 8 weeks, rats were sacrificed and bilateral uterine horn resection was performed. Tissues were fixed in neutral buffered formaldehyde. After tissues routinely fixed in 10% neutral-buffered formalin, hematoxylin–eosin staining was performed. VEGF, IGF-1 expression was evaluated by immunohistochemical staining. VEGF, IGF-1 expression level was analyzed by Western Blot method. After miRNA isolation from rat endometrium, miRNA expression change was determined by real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

### Mesenchymal stem cell isolation from adipose tissue

In this study, MSC was isolated from rat adipose tissue material. In order to obtain mesenchymal stem cells from adipose tissue, preliminary preparations were made. Perirenal adipose tissue of one male rat was taken from the retroperitoneal region with laparotomy incision. Adipose tissue was transferred to the laboratory in Phosphate-buffered saline (PBS, Modified, Lot: AE28871274, USA) at room temperature. Whole cell culture studies were performed with sterile materials and under a laminar flow cabinet. The tissues taken to the laboratory were quickly divided into small pieces. After washing with PBS, it was incubated with 0.1% collagenase enzyme in a shaking water bath for 1 h. The high Glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium (Sigma, RNBH4184 HG-DMEM, Germany), 10% Fetal bovine serum (FBS, Capricorn, CP19-2648, South America), and 1% Penicillin streptomycin were then left in the incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Cell proliferation was monitored. When the cells reached 70% confluence, they were passaged to the subculture. Cells reaching the third passage and reaching 70% confluency rate were removed with 0.25% trypsin and

**Fig. 1** Diagram of rats during the experiment

cell count was performed. And then flow cytometry analysis and differentiation experiments were started.

### Flow cytometry

Some of the cells in the third passage were sent to the Kocaeli University Stem Cell and Gene Therapy Research and Application Centre (KÖGEM) for mesenchymal stem cell characterization. Flow cytometry analysis confirmed the characterization of the cells using FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) and CD29, CD90, CD45, CD54, CD71, CD106 mesenchymal stem cell surface markers. For the validation of these analysis results mesenchymal stem cell differentiation experiments were performed. All these steps were observed using invert microscope (CKX41, Olympus, Japan). The proliferating cells were counted in Thoma cell counting chamber after staining with trypan blue.

### Differentiation experiments

#### Adipogenic differentiation and oil red O staining

Third-passage culture-expanded cells at 70% confluence were induced in the following adipogenic mediums for 15 days. The adipogenic medium (45 ml basal medium, 5 ml adipocyte supplement, 25 µl penicillin–streptomycin) was prepared and changed every 3 days. Adipogenesis were determined by post induction oil red O staining. Cells

were washed twice with PBS and fixed with 10% formalin for 10 min. After fixation, cells were stained with aliquots of filtered oil red O solution (stock solution: 3 mg/ml in isopropanol; working solution: 60% oil red O stock solution and 40% distilled water) for 1 h. After staining, cells were washed with water to remove unbound dyes. Hematoxylin–Eosin was added to each box for 1 min and then washed with distilled water. Cells visualized by phase contrast microscope and photographed.

#### Osteogenic differentiation and Alizerin Red S staining

After removing the cells in the third passage and counting the cells, there were  $3.5 \times 10^6$  viable cells in 1 ml of cell suspension. After inserting medium (1,813,285; Gibco, USA) into a culture dish and adding 20 µl of cell suspension, the culture dish was placed in the incubator. The medium was changed every 2–3 days (twice a week). At the end of the 21st day, after removing the medium, 4% formaldehyde was added to the cells and left for 30 min. After fixation, stained with Alizerin Red S (E1816; ChemCruz, SantaCruz, USA) for 2–3 min. Cells visualized by phase contrast microscope and photographed.

#### Chondrogenic differentiation and alcian blue staining

Cells in the third passage were removed and counted. Five droplets which had five microliters of the cell suspension prepared at a concentration of  $1.6 \times 10^7$  live cells/ml were

placed in the center of 12 well-plate wells and incubated at 37 °C for 2 h. Then, the chondrogenic differentiation medium (1,813,309; Gibco, USA) added on it and placed in the incubator. The medium was changed every 2–3 days (twice a week). At the end of the 14th day, after removing the medium, 4% formaldehyde was added to the cells and left for 30 min. After fixation, the cells were incubated in 1% Alcian blue (SLBR0633V; SigmaAldrich, India) solution dissolved in 0.1 N HCl for 30 min. Alcian Blue was removed and cells washed with 0.1 N HCl then cells were visualized by Phase contrast microscope.

### Histological evaluation

The excised uterine horn was fixed for 72 h in neutral buffer formaldehyde. The tissues were washed for 1 h under running water. Dehydrated with 50, 60, 70, 80, 90 and 100% concentrated ethanol. After waiting for 2 h in xylene for clearing tissue sections, tissues were left in liquid paraffin for 2 h. At the end of 2 h, tissues were embedded to paraffine blocks.

### Hematoxylin eosin staining protocol

The specimens were transversely and longitudinally sectioned. Sections were cut at 5 µm using a Leica RM-2125 rotary microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and mounted on lysine-coated glass slides (23,573; Marienfeld Laboratory Glassware, Histobond, Marienfeld, Germany). Sections were deparaffinized in xylene, rehydrated through graded ethanols and stained with hematoxylin and eosin (Merck Germany).

### 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) staining of adipose tissue derived mesenchymal stem cells

To label MSCs in vitro, 10 µl of BrdU solution (1 mM BrdU in 1×Dulbecco's PBS, BD Pharmingen) was carefully added for each ml of tissue culture medium. The cell culture density was  $2 \times 10^6$  cells/ml. The treated cells were incubated for 2 h before their administration.  $2 \times 10^6$  MSCs were injected into right uterine horn followed by three consecutive intraperitoneal injections with 5-day intervals. To show the presence of BrdU (+) cells in the uterine tissues; formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were prepared as 5 µm thick slides and deparaffinized twice in xylene for 5 min each. The slides were transferred to 100% and 95% alcohol and two changes for 3 min were performed each time. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min. The slides were rinsed 3 times for 5 min each time in PBS. Then the sections were immunohistochemically stained with BrdU detection Kit (BD-Pharmingen) to show the presence of BrdU (+) cells. To determine

the percentage of BrdU (+) cells, they were counted in the x–y plane at ×40 magnification.

### Immunohistochemical staining

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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 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: VEGF (F1312; SantaCruz Biotechnology) diluted 1:100, IGF (A0512; SantaCruz Biotechnology) diluted 1:100. 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 horse radish 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.

Separate histological score (H SCORE) was obtained for VEGF, IGF and BrdU positive staining in uterine epithelium, gland and stroma cells.  $H\ SCORE = \sum Pi(I + 1)$ . Here, I denotes the dyeing intensity (0 = no expression, 1 = light, 2 = medium, and 3 = dense) and Pi is the percentage of cells stained for each density.

### Western blot analysis

After uterus tissue cell protein extracts were collected in RIPA buffer (0.15 molar NaCl, 10% SDS, 0.05 molar Tris–HCl pH: 7.65, 1% NP-40 and 0.5% deoxycholate), centrifuged at 12,000×g, 4 °C for 3 min to remove unwanted cell debris. After centrifugation, the supernatant was collected and the protein concentration determined by the Bradford assay. Equal amounts of proteins (100 µg total protein/lane) were separated. Protein loading dye (100 mM Tris–HCL (pH 6.8), 12% betamercaptoethanol, 2% SDS, 1% bromophenol blue, 20% glycerol) and protein samples were added to these in 1: 1 ratio and boiled at 100° C for 3.5 min. Immediately after boiling, samples were loaded in 2–4% gradient or 10% SDS gel (PIERCE) and electrophoresed for 45 min at 80 V with running buffer (0.1 M Tris, 0.1 M HEPES, 3 mM SDS,

pH 8). After electrophoresis, the proteins were transferred to the immunoblot membrane (Thermo) overnight at 75 mA at a temperature of 4 °C in transfer buffer. After this, the membrane was blocked for 2 h at room temperature in a 5% dry milk powder containing TBST (34 mM NaCl, 25 mM Tris–HCl pH:7.6, 0.1% Tween 20) solution. After blocking (5% non-fat milk), the membrane was first incubated with each primary antibody (VEGF 1:10,000; IGF 1:1000; and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] 1:20,000) (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA) at 4 °C overnight and then with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:7500) for 1 h at room temperature. Western blots were developed using the ECL method, and the images were scanned and analysed with Image Studio Lite version 4.0 software, and values of bands were normalized against GAPDH.

### RNA extraction, miRNA cDNA synthesis and real-time qRT-PCR

Total RNA from the tissues were isolated with Tri-Reagent (Ambion) according to the manufacturer's instructions and quantitated with a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific). Real-Time RT-PCR was performed with Step One RT-PCR instrument using miRNA specific primers to analyze the miRNA98, miRNA199a expressions. U6 was used as housekeeping miRNA in the study for normalization of target expression data. cDNA synthesis was performed by using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit according to kit procedure (Taqman® MicroRNA Assay). Relative quantification of miRNA98, miRNA199a was analyzed by RT-PCR using TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG miRNAqPCR profiling kits.

### Statistical analysis

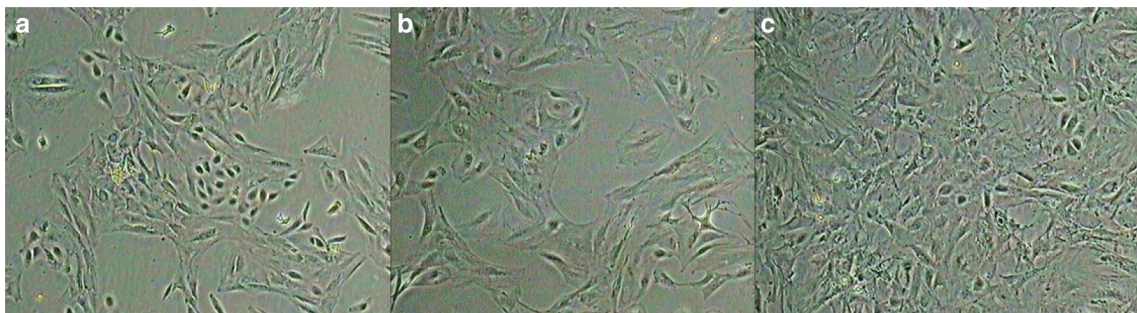
Data were analyzed by using  $\Delta\Delta CT$  method and quantified by computer program. VolcanoPlot analyzes were used in the web-based “RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data

Analysis” program. The aim of the method is based on the comparison of two expression results with  $\pm 3SD$ . Thus, in cases where miRNA expression was compared, expression values of miRNAs in the groups were relatively determined. Comparison of groups was statistically evaluated by Student's t-test analysis in RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis program. Statistical analysis of histological results was made by SPSS for Windows 21 package program. The difference between the groups was analyzed with Kruskal–Wallis.  $P < 0.05$  was accepted as statistically significant. Tukey post hoc tests were performed for H-score results to describe any differences between the groups.

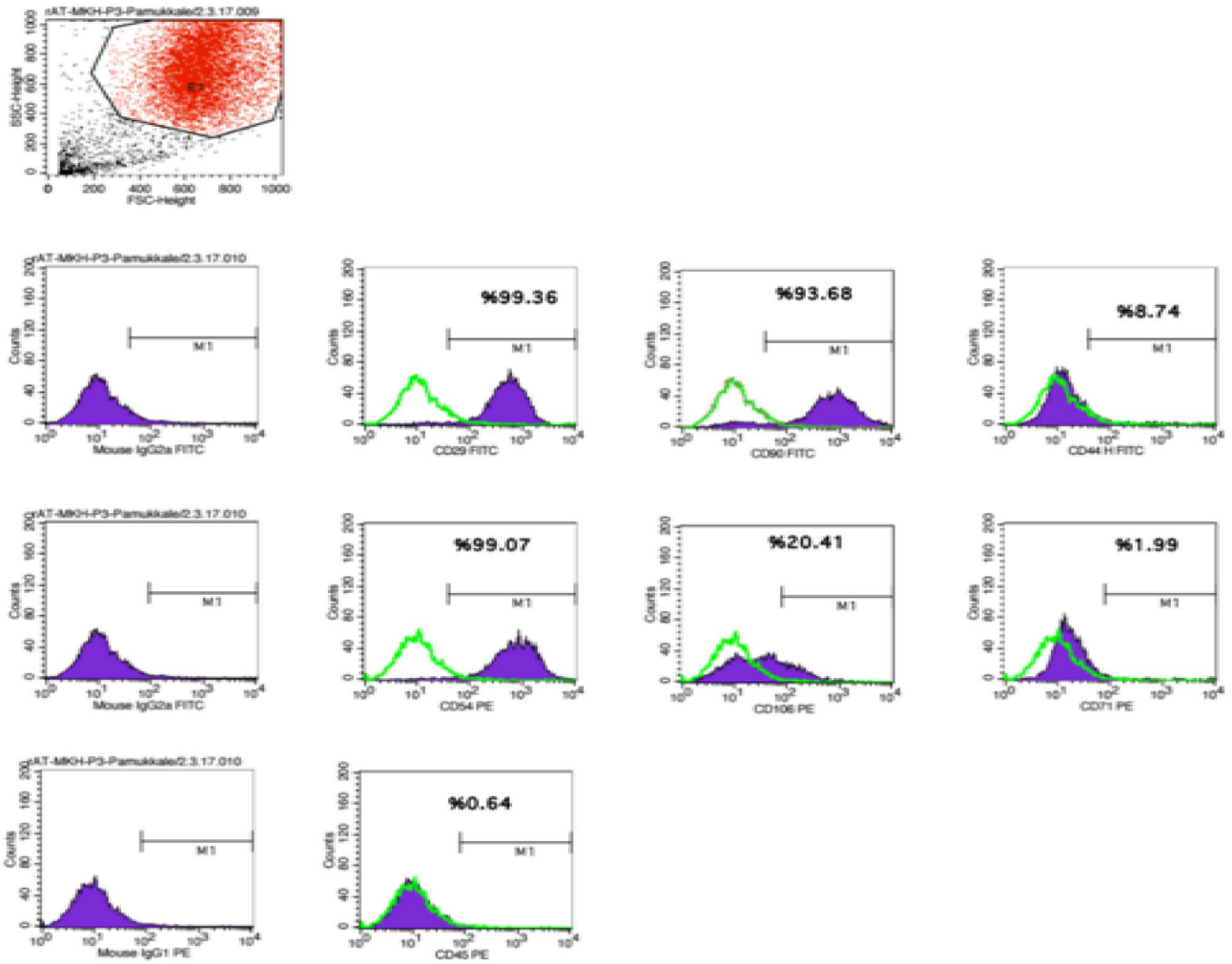
## Results

### Obtaining mesenchymal stem cells and differentiation experiments

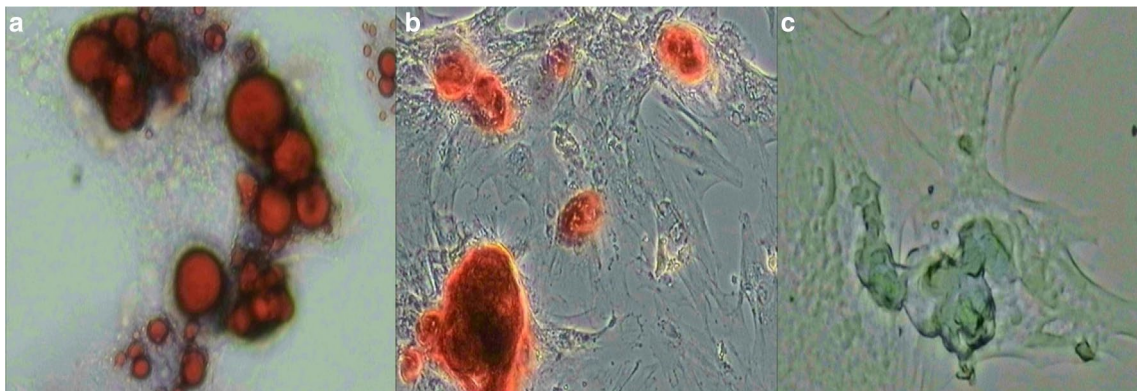
In order to obtain stem cells from the adipose tissue by enzymatic method, the cultivated cells were monitored day by day under inverted microscope. In the first days, a stem cell was seen in 4–5 areas at  $\times 4$  magnification. In the following days, the number of adherent cells increased, and they started to connect with each other (Fig. 2). According to the results obtained from flow cytometry analysis, CD29, CD90, CD54 surface markers were high titers and CD45, CD71 surface markers were found to be very low. These results phenotypically showed that mesenchymal stem cells derived from adipose tissue were obtained successfully (Fig. 3). Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of stem cells were shown. Cultured cells were differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes by oil red, alizarin red, alcian blue dyes respectively. (Fig. 4). Differentiation of cultured cells to the adipocytes, osteoblasts and chondrocytes was shown by oil red, alizarin red, alcian blue dyes respectively.



**Fig. 2** Primary cell culture images of mesenchymal stem cells obtained from rat adipose tissue. **a** Third day of ADMSC, **b** second week of ADMSC, **c** third passage of ADMSC,  $\times 20$ , inverted microscope



**Fig. 3** Flow cytometry results of our mesenchymal stem cells: CD29, CD90, CD54 were 99.36%, 93.68%, 99.07% positive, CD45 and CD71 were 0.64% and 1.99% positive, respectively



**Fig. 4** Differentiation of mesenchymal stem cells into adipogenic (a), osteogenic (b) and chondrogenic tissue (c).  $\times 20$ , inverted microscope

### H–E staining results

It was observed that the endometrium which has lost surface epithelial integrity and areas where epithelial tissue disappeared in the group AS. Collagen fibers formed bundles beside the picnotic nucleated stromal cells in the endometrium was also monitored (Fig. 5).

In the ASO group, capillary dilatation was observed, the epithelium had generally maintained its integrity, but the presence of picnotic nucleated cells in the stroma and epithelial tissue was remarkable. Leukocyte infiltration in the endometrium was significantly reduced, but capillary dilatation was observed. Fibrosis observed in the AS group decreased in this group.

The surface and gland epithelium were normal in the ASSC group. Unlike the picnotic nuclei cells observed in epithelial tissue in the ASO group, their numbers were observed to be very low in this group. Likewise, leukocyte infiltration in the endometrium was found to be decreased compared to the AS group but higher than the ASO and ASSCO groups. On the other hand, significantly decreased fibrosis was found in this group compared to both the AS and the ASO groups. Vascular proliferation was mostly detected

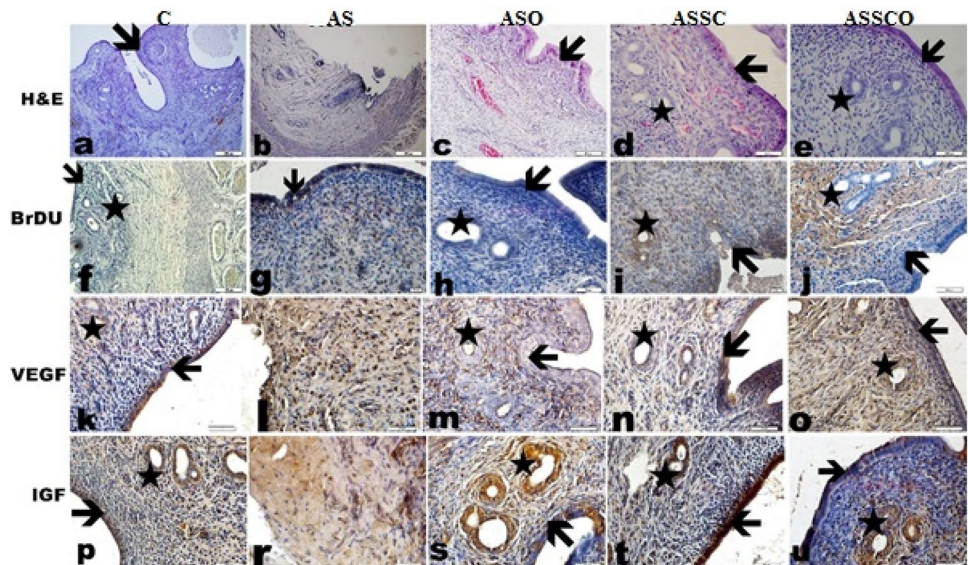
in this group. Surface and gland epithelium were normal in the ASSCO group. Inflammation and fibrosis were at least in this group. Vascular proliferation was observed more than the ASO group but less than the ASSC group. Leukocyte infiltration and capillary dilatation in the endometrium was very low in this group (Fig. 5).

### Immunohistochemistry and Western Blot Results of VEGF, IGF expression in the groups

VEGF expression was positive in the surface epithelium and endometrial glands in the control, ASSCO and ASSC groups. In the ASO group, negative expression was observed in the cytoplasm and nuclei of surface and gland epithelial cells, while only positive staining in the apical membrane was noted (Fig. 5) VEGF level was evaluated with H-score as semiquantitatively in all groups (Tables 1, 2).

IGF reaction was evaluated in epithelium, glands and stroma. IGF was intensive in all groups except AS group. However, some positive and some negative areas were monitored along the epithelium in the ASO group. IGF levels were evaluated semiquantitatively with H-score in all groups (Tables 1, 2).

**Fig. 5** Histological section (H&E) of endometrium (a–e) immunohistochemical staining of BrdU in C, AS, ASO, ASSC, ASSCO (f–j). The immunohistochemical staining of VEGF in C, AS, ASO, ASSC, ASSCO (k–o). The immunohistochemical staining of IGF in C, AS, ASO, ASSC, ASSCO (p–u). Surface epithelium of endometrium (arrows), gland epithelium of endometrium (asterix) H&E, immunoperoxidase-hematoxylin

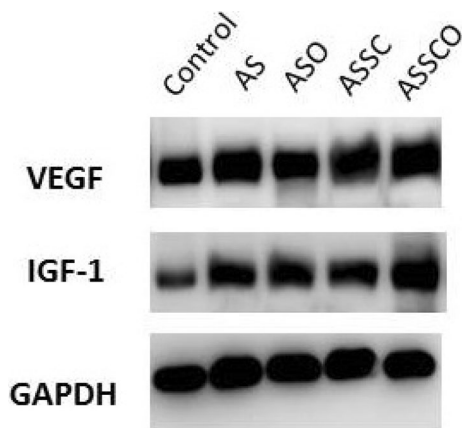
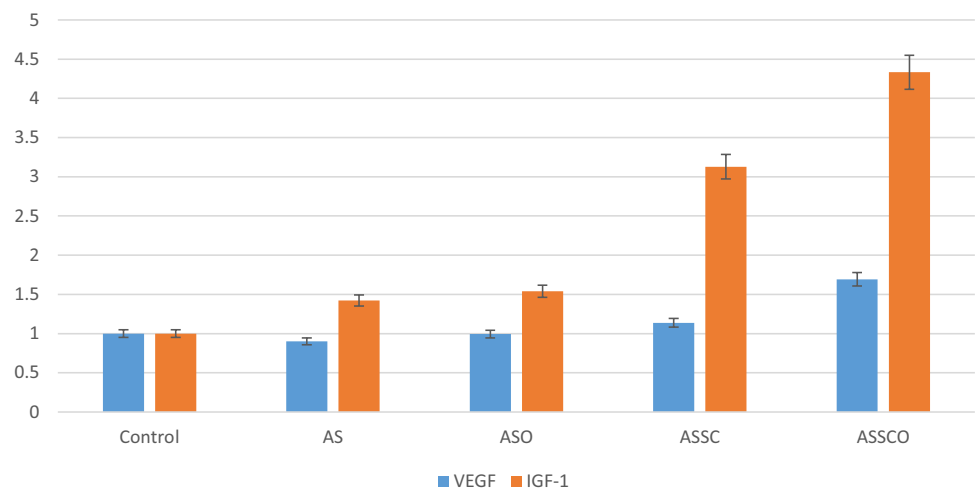


**Table 1** The H score was calculated by immunohistochemical staining of VEGF, IGF and BrdU (P < 0.05)

	VEGF Mean ± SD P values	IGF Mean ± SD P values	BrdU Mean ± SD P values
Surface epithelium	171.95 (± 76.34) P=0.000	162.33 (± 112.10) P=0.000	10.00 (± 0.00) P=1
Cloth epithelium	189.66 (± 45.38) P=0.000	225.83 (± 87.71) P=0.000	10.00 (± 0.00) P=1
Stroma	214.400 (± 54.038) P=0.002	136.83 (± 70.23) P=0.000	18.00 (± 16.89) P=0.000

**Table 2** Quantitative analysis of fibrosis, inflammation, and vascular proliferation ( $P < 0.05$ ) is considered statistically significant

	P values		
	Fibrosis	Inflammation	Vascular proliferation
C-AS	0.002	0.003	0.002
C-ASO	0.002	0.019	0.002
C-ASSC	0.056	0.02	0.001
C-ASSCO	0.065	0.180	0.002
AS-ASO	0.042	0.003	0.019
AS-ASSC	0.06	0.007	0.001
AS-ASSCO	0.07	0.003	0.02
ASO-ASSC	0.019	0.56	0.002
ASO-ASSCO	0.03	0.57	0.03
ASSC-ASSCO	0.03	0.57	0.05

**Fig. 6** Western blot results of VEGF and IGF expression in uterine tissue**Fig. 7** Graphical representation of western blot results of VEGF and IGF expression in uterine tissue ( $P < 0.05$ )

VEGF expressions results were significantly higher in ASSC and ASSCO groups according to in Western blot analysis. Significant increase in IGF expression was observed in ASSC and ASSCO groups compared to other groups ( $P < 0.05$ ) (Figs. 6, 7).

### BrdU staining results

Mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue were labeled with BrdU chemical. As a result of immunostaining, positive staining was found in the surface and gland epithelium in ASSC group. Increased proliferation was determined in stromal cells of ASSCO group. These results showed us, stem cells reached to target tissue. (Figs. 5, 8).

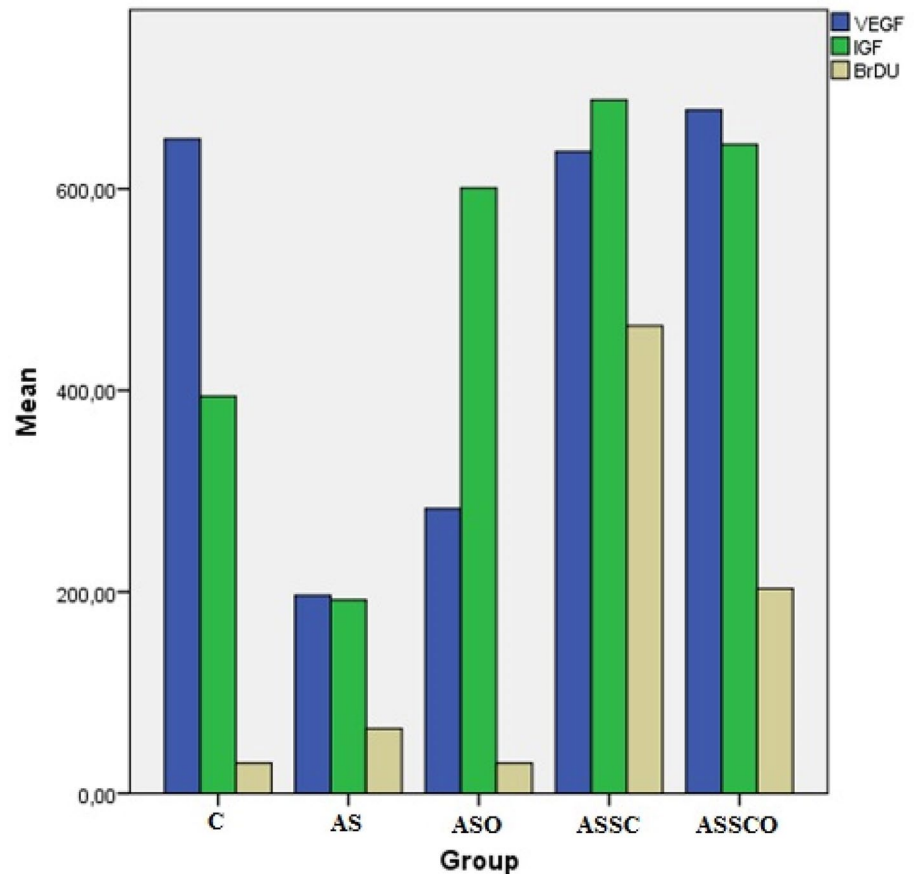
### miR-98 and miR-199a expression results

miR-98 expression was significantly decreased in the AS group compared to the C group ( $P < 0.05$ ). miRNA-98 expression decreased significantly when ASSCO group was compared to the C group, ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in miRNA-98 expression between the other groups.

When the C and AS groups were compared, miRNA-199a expression was significantly decreased in the AS group. There was no significant difference in miRNA-199a expression between the other groups. The results were shown in Table 3.

### Discussion

The aim of this study was to investigate the efficacy of stem cell transplantation, estrogen therapy and combined application of estrogen therapy and stem cells in experimentally

**Fig. 8** H-score analysis of VEGF, IGF and BrdU according to groups**Table 3** miRNA-98, miRNA-199a expression results in uterus tissues of the groups compared to control group

Position	Symbol	Up-down regulation (comparing to control group)							
		AS		ASSC		ASO		ASSCO	
		Fold regulation	P value	Fold regulation	P value	Fold regulation	P value	Fold regulation	P value
1	U6	1		1		1		1	
2	<i>miRNA-98</i>	- 6.3847	0.041448	- 13.8819	0.17549	- 5.717	0.17741	- 4.8766	0.041994
3	<i>miRNA-199a</i>	- 6.9888	0.0100796	- 7.4307	0.195273	- 12.5862	0.193229	- 13.6546	0.122867

induced female rats. Our results showed that estrogen treatment with stem cells is very effective in AS-induced rats. Epithelial integrity was maintained, and leukocyte infiltration and fibrosis were significantly reduced, and vascular proliferation was also significantly increased in this combined group. Although inflammation and fibrosis decreased in single groups of estrogen and stem cells compared to the AS group, they are slightly higher than the combined group. Only vascular proliferation is highest in the stem cell group. Significantly higher expression results of VEGF and IGF, which is important in tissue regeneration and proliferation, in the treatment groups have supported this proliferative situation.

Gao et al. have given bone marrow-derived mesenchymal stem cells systematically from the tail vein of AS created rats. Reproliferation was observed of hematoxylin-stained endometrium in the treatment group and decreased fibrosis in endometrium was determined as a result of masson trichrome staining was reported in their study [12]. Liu designed electrocoagulation-induced animal model of AS. He reported that Mesenchymal stem cell-secretome-loaded, crosslinked Hyaluronic Acid Hydrogel was developed as a therapeutic that restores injured endometrial morphology and fertility in a rat [13] Insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) are critical for uterine repair processes [14]. IGF-I increases connective tissue regeneration and



epithelialization when applied together with other growth factors [15].

It is thought that proliferative and differentiating effects of IGFs on uterine cells support the growth and regression of uterine tissue in regenerative processes and during the reproductive cycle of women after menstruation [15–16]. VEGF is a potent mitogen for the proliferation of multiple cell types, including vascular endothelial cells and smooth muscle cells. It plays an important role in wound healing and tissue regeneration [17–19]. VEGF is critical for angiogenesis and re-epithelization of the endometrium [3]. It was thought that BM-MSCs applied on the collagen skeleton promoted the regeneration of the uterus and facilitated access to food, oxygen and hormones by inducing vascularity through secretion of bFGF and VEGF [19]. In a study, it is showed that transplanted bone marrow mesenchymal stem cells were localized to the regenerative endometrium and provided growth factors such as VEGF, FGF, IGF-1 and TGF $\beta$ -1.

It has been concluded that while angiogenesis is provided for the regeneration of the new uterine cavity, it induces migration and proliferation of stromal cells, epithelial cells and muscle cells [3]. Chen et al. found that hormone replacement therapy (HRT) combined with hysteroscopic adhesiolysis significantly increased endometrial VEGF expression and micro vascular density in IUA patients. In addition, the researchers have reported those with a better curative effect have higher VEGF expression and more intensive microvessels than those with poor response to treatment [20]. Li et al. reported that human amniotic epithelial cells (hAECs) increased VEGF expression and Micro Vascular Density in the AS model and they defined that this is angiogenesis effect of stem cells that can facilitate healing in endometrial injuries [21].

In our study, VEGF showed a positive reaction in the stroma and epithelial cells in both groups in which adipose tissue originated mesenchymal stem cell treatment was applied. In the ASO group, negative expression was observed in epithelial cells while stromal cells showed positive reaction. IGF expression was positive in epithelial, stromal cells in ASO, AS and ASSC groups. Intense reaction was observed in epithelial cells, whereas staining in stromal cells was poor in these groups. In contrast, both VEGF and IGF expression in stromal cells were higher in the AS group. Although it is observed that tissue has not yet recovered in the AS group, the positive VEGF expression may be interpreted as a self-healing process in this group.

Several studies have shown that miRNA98 belonging to the Let-7 family has decreased expression in high-grade ovarian cancer, lung cancer, melanomas and other solid tumors [22–25]. In a study, it was determined that miRNA-98 expression in rat uterus at 5th and 6th gestational days was lower than 3rd, 4th and 7th and 8th days. miRNA-98 was found mainly

in the glandular and luminal epithelium and stroma/desidua. miRNA-98 expression decreased after blastocyst activation induced by estrogen therapy for implantation. The effects of estrogen and progesterone on miRNA-98 expression under physiological conditions are still unclear. It is also reported that, the application of 17 $\beta$  estrogen or estrogen + progesterone in the rat uterus that underwent non-pregnant ovariectomy significantly reduced miRNA-98 expression. miRNA-98 overexpression inhibits cell proliferation and causes cell apoptosis in endometrial stromal cells [26]. In another study, Panda et al. have evaluated miRNA-98 and miRNA-181a expressions in endometrial biopsy materials from 52 patients. They have showed that overexpression of miRNA-98 and miRNA-181a was correlated with the transformation of the endometrium from normal to cancer tissue. They have also demonstrated that estrogen treatment increased miRNA-98 expression moderately [27]. Ning et al. have reported that miRNA-98 overexpression was shown to be a good prognostic factor in patients with acute myeloid leukemia treated with chemotherapy [28]. In our study, miRNA-98 expression significantly decreased in AS group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Decreased expression in miRNA-98 in estrogen and stem cell treated groups is parallel to other studies. miRNA-199a was first characterized in 2003 and has been associated with many different diseases. It is known that miRNA-199a synthesis is reduced in various cancerous tissues and it contributes to many malignant processes including tumor invasion, metastasis and angiogenesis [29, 30]. Dai et al. reported that miRNA-199a is an antiangiogenic factor and suppresses VEGF secretion [31]. In another study, miRNA 199a was found to be a proangiogenic factor in melanoma [32]. As a result, miRNA 199a affects the mechanisms of angiogenesis differently in different cell types under different conditions. For example, miRNA-199a inhibition promotes wound angiogenesis by regulating the Ets-1/MMP-1 pathway [33] while overexpression of miRNA-199a has been shown to inhibit tumor-induced angiogenesis by reducing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression [30]. In addition, studies show that miR-199a inhibits ESC invasiveness and has a strong anti-angiogenic effect [28]. Injawilert et al. have showed that the presence of miRNA-199a expression in the uterine epithelial cells during the early period of pregnancy [34]. Studies in ovariectomized rats have shown that estrogen reduces miRNA-199a and miRNA 214 and induces COX-2 [35]. Low levels of miRNA-199a and high VEGF expressions in our treatment groups are consistent with the literature.

## Conclusion

In conclusion, our results show that the use of stem cells with estrogen have a curative effect, proliferative effect on epithelial tissues, decreases inflammation and fibrosis and increases vascular proliferation in disrupted endometrial

tissue after Asherman syndrome. According to immunohistochemistry and western blot results, it is determined that the possible effect of estrogen application is realized especially through IGF and both IGF and VEGF were found to be effective in stem cell application. In our study, it was determined that the secretion of miRNA-98 and miRNA-199a in uterine tissue decreased in AS. Decreased in miRNA expression determination in the treatment group demonstrated that these treatments did not affect the miRNA expressions. Preliminary information about miRNA-98 and miRNA-199a is presented in our study. More detailed molecular studies will contribute to our data and increase our knowledge on this subject.

**Acknowledgements** This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project Numbers 2016BSP001.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to disclose.

**Ethical approval** Ethics committee approval was obtained from the ethics committee of Animal Experiments Ethics Committee of Pamukkale University (Denizli, Turkey) with the number PAU EK-2015/17. Ethical approval all applicable, national, international and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

### References

- Alawadhi F, Du H, Cakmak H, Taylor HS (2014) Bone marrow-derived stem cell (BMDSC) transplantation improves fertility in a murine model of Asherman's syndrome. *PLoS ONE* 9(5):e96662
- Gan L, Duan H, Xu Q, Tang YQ et al (2017) Human amniotic mesenchymal stromal cell transplantation improves endometrial regeneration in rodent models of intrauterine adhesions. *Cytotherapy* 19(5):603–616
- Ding L, Li X, Sun H, Su J et al (2014) Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials* 35(18):4888–4900
- Choi JS, Ryu HA, Cheon SH, Kim SW (2019) Human adipose derived stem cells exhibit enhanced liver regeneration in acute liver injury by controlled releasing hepatocyte growth factor. *Cell Physiol Biochem* 52(4):935–950
- Şahin B, Karagün B, Şaşmaz Aİ, Kılınc Y (2014) Mikro RNA and Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 12(1):45–56
- Saydam F, Değirmenci İ, Veysi H (2011) MikroRNA'lar ve kanser Güneş Dicle Tıp Dergisi. *Dicle Med J* 38(1):113–120
- Bodur E, Demirpençe E (2010) Kodlanmayan RNA'lar ve Gen Susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi* 41:82–89
- Chen K, Chen X, He J, Ding Y et al (2015) Mouse endometrium temporal and spatial expression mRNA and MicroRNA associated with embryo implantation. *Reprod Sci* 22(11):1399–1408
- Xia HF, Jin X-H, Cao Z-F, Shi T, Ma X (2014) MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl. *FEBS Lett* 588:574–583
- Xia HF, Cao J-L, Jin X-H, Ma X (2013) MiR199a is implicated in embryo implantation by regulating Grb10 in rat. *Reproduction* 147:91–99
- Xia HF, Jin X-H, Cao Z-F, Hu Y, Ma X (2014) MicroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat. *FEBS J* 281:1872–1891
- Gao L, Huang Z, Lin H, Tian Y, Li P, Lin S (2018) Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) restore functional endometrium in the rat model for severe Asherman syndrome. *Reprod Sci* 26:436–444
- Liu F, Hu S, Yang H, Li Z et al (2019) Hyaluronic acid hydrogel integrated with mesenchymal stem cell-secretome to treat endometrial injury in a rat model of Asherman's syndrome. *Adv Healthc Mater* 8(14):e1900411
- Suh DY, Hunt TK, Spencer EM (1992) Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. *Endocrinology* 131(5):2399–2403
- Giudice LA, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR (1993) Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 76(5):1115–1122
- Rutanen EM (1998) Insulin-like growth factors in endometrial function. *Gynecol Endocrinol* 12(6):399–406
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626):671–674
- Wei P, Chen XL, Song XX, Han CS, Liu YX (2004) VEGF, bFGF, and their receptors in the endometrium of rhesus monkey during menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 68(4):456–462
- Fan X, Krieg S, Kuo CJ, Wiegand SJ, Rabinovitch M, Druzin ML, Brenner RM, Giudice LC, Nayak NR (2008) VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium. *FASEB J* 22(10):3571–3580
- Chen L, Qu J, Xiang C (2019) The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Therapy* 10:1
- Li B, Zhang Q, Sun J, Lai D (2019) Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model. *Stem Cell Res Therapy* 10(1):257
- Wendler A, Keller D, Albrecht C, Peluso JJ et al (2011) Involvement of let-7/miR-98 microRNAs in the regulation of progesterone receptor membrane component 1 expression in ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 25(1):273–279
- Xiang Q, Tang H, Yu J, Yin J et al (2013) MicroRNA-98 sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells by up-regulation of HMG2. *Pharmazie* 68(4):274–281
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M et al (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9:189–198
- Li F, Li XJ, Qiao L, Shi F et al (2014) miR-98 suppresses melanoma metastasis through a negative feedback loop with its target gene IL-6. *Exp Mol Med* 46(10):116–125
- Xia HF, Jin XH, Cao ZF, Shi T, Ma X (2013) MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl febslet. *FEBS Lett* 588(4):574–583
- Panda H, Chuang TD, Luo X, Chegini N (2012) Endometrial miR-181a and miR-98 expression is altered during transition from normal into cancerous state and target PGR, PGRMC1, CYP19A1, DDX3X, and TIMP3. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7):E1316–E1326
- Ning H, Zhiheng C, Yifan P et al (2019) High expression of MiR-98 is a good prognostic factor in acute myeloid leukemia patients treated with chemotherapy alone. *J Cancer* 10(1):178–218

29. Shen Q, Cicinnati VR, Zhange X, Lacob S et al (2010) Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. *Mol Cancer* 9:227
30. He J, Jing Y, Li W, Qian X et al (2013) Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PLoS ONE* 8:e56647
31. Dai L, Lou W, Zhu J, Zhou X, Di W (2015) MiR-199a inhibits the angiogenic potential of endometrial stromal cells under hypoxia by targeting HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 8(5):4735–4744
32. Pencheva N, Tran H, Buss C, Huh D et al (2012) Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell* 151:1068–1082
33. Chan YC, Roy S, Huang Y, Khanna S, Sen CK (2012) The microRNA miR-199a-5p down-regulation switches on wound angiogenesis by derepressing the v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1-matrix metalloproteinase-1 pathway. *J Biol Chem* 287:41032–41043
34. Inyawilert W, Fu TY, Lin CT, Tang PC (2014) MicroRNA-199a mediates mucin 1 expression in mouse uterus during implantation. *Reprod Fertil Dev* 26(5):653–656
35. Williams KC, Renthall NE, Gerard RD, Mendelson CR (2013) The microRNA (miR)-199a/214 cluster mediates opposing effects of progesterone and estrogen on uterine contractility during pregnancy and labor. *Mol Endocrinol* 27(1):188

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**EK-2**

Tokgun O, Karakas DE, **Tan S**, Karagür ER, İnal B, Akca H, Durap F, Baysal A, Aydemir M. Novel ruthenium and palladium complexes as potential anticancer molecules on SCLC and NSCLC cell lines. *Chemical Papers* (2020) 74:2883–2892.



# Novel ruthenium and palladium complexes as potential anticancer molecules on SCLC and NSCLC cell lines

Onur Tokgun<sup>1</sup> · Duygu Elma Karakas<sup>2</sup> · Semih Tan<sup>3</sup> · Ege Rıza Karagür<sup>1</sup> · Behcet İnal<sup>4</sup> · Hakan Akca<sup>1</sup> · Feyyaz Durap<sup>5</sup> · Akın Baysal<sup>5</sup> · Murat Aydemir<sup>5</sup>

Received: 1 October 2019 / Accepted: 5 March 2020 / Published online: 10 March 2020  
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2020

## Abstract

Lung cancer is one of the major causes of cancer-related deaths in the world. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer, and small-cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive subtype of lung cancer. Proper therapies for SCLC have not yet been developed. However, new molecules have been designed and big innovation in treating SCLC has been achieved. Platinum-based antitumor drugs like cisplatin and carboplatin have several disadvantages including side effects, cisplatin-resistant tumors and limited solubility in aqueous media. Thus, two novel chiral aminoalcohol-based bis(phosphinite) ligands containing ( $\eta^6$ -p-cymene)-Ru(II)-phosphinite and bis(phosphinite)-Pd(II) complexes were synthesized and evaluated for anticancer activity. In this study, the results showed that complex **1** has the strongest cytotoxic effects on SCLC and NSCLC cell lines. On the other hand, cisplatin, ruthenium and palladium complexes are capable to induce apoptosis. Especially, complexes **1** and **2** can induce apoptosis for both SCLC and NSCLC. When compared to the qRT-PCR and TUNEL results, we obtained a significant correlation between apoptotic index and p21, Bax gene expressions. This work revealed the potential of the synthesized complexes as anticancer agents with cytotoxic and pro-apoptotic activity as leading compounds for further anticancer researches.

**Keywords** SCLC · NSCLC · Phosphinite · Palladium · Ruthenium · p21 · Bax

## Introduction

Transition metal complexes may play a variety of important roles in many biological processes (Patel et al. 2013) such as cell division and gene expression, as well as carcinogenesis (Heydari et al. 2017). Among the synthesized compounds, organometallic- and inorganic-based compounds are very useful molecules. Organophosphorus compounds, especially phosphines (Gümgüm et al. 2007; Durap et al. 2008), aminophosphines (Gümgüm et al. 2006; Biricik et al. 2007a), phosphinites (Karakas et al. 2018; Al-Bayati et al. 2018), etc., are excellent versatile organometallic ligands that are easily prepared and form a variety of complexes with various transition metals including platinum (Durap et al. 2008), ruthenium (Karakas et al. 2018; Ok et al. 2014), palladium (Deepthi et al. 2012; Karakas et al. 2016), gold (Lazarevic et al. 2017) and copper (Biricik et al. 2007b) metal centers. In the literature, most studies showed that organometallic and inorganic compounds have potential anticancer effects (Mjos and Orvig 2014; Demkowicz et al. 2016; Wani et al.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11696-020-01129-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Onur Tokgun  
otokgun@pau.edu.tr

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Pamukkale University, 20160 Denizli, Turkey

<sup>2</sup> Science and Technology Application and Research Center, Siirt University, 56100 Siirt, Turkey

<sup>3</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, 20160 Denizli, Turkey

<sup>4</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Agriculture Faculty, Siirt University, 56100 Siirt, Turkey

<sup>5</sup> Department of Chemistry, Science Faculty, Dicle University, 21280 Diyarbakir, Turkey

2016) Their anticancer activity is currently a hot topic of cancer research.

In the last decades, ruthenium(II) complexes bearing chelating phosphine and phosphinite ligands have been received much attention due to their application in the field of homogeneous catalysis (Lindner et al. 2003; Arauj et al. 2005; Baysal et al. 2017). These compounds have also been successfully tested as anticancer, antibacterial and antioxidant agents. Biological properties of Ru ion similar to Fe mimicking in binding to a variety of serum proteins such as transferrin and albumin (Deshpande and Kumbhar 2005; Richert and Budzisz 2010). Ruthenium complexes generally show low systemic toxicity and antitumor activity. Chemical properties of Ru complexes under physiological conditions are dependent on the two oxidation states (+2 and +3) (Lazarevic et al. 2017). Therefore, organometallic Ru complexes have been considered to be an alternative to platinum and the organometallic half-sandwich ruthenium(II) complexes in type of  $[(\eta^6\text{-arene})\text{RuL}]$  (arene: *p*-cymene, benzene, etc.) have been extensively studied in recent years (Debreczeni et al. 2006; Liu et al. 2006; Pettinari et al. 2014; Ellahioui et al. 2019).

Pd(II) and Pt(II) complexes share similar properties like structural and thermodynamic analogy (Ruiz et al. 2008a; Rocha et al. 2010). In recent years, newly synthesized palladium complexes have been a very popular field of research due to their similarity to traditional platinum-based anticancer molecules (Moghadama et al. 2016). There is a huge tendency to study the antitumor activity of Pd(II) complexes on many cancer cell lines (Miklášová et al. 2012; Ruiz et al. 2008b). In addition, palladium has higher lability than platinum analogs. Bidentate ligands like amino acids that are present in biological systems have been utilized to synthesize palladium anticancer complexes (Anzellotti et al. 2006). In order to obtain effective Pd(II) complexes, stabilization of the N–Pd interaction with the amine carrier ligand is necessary to decrease the excessive reactivity. Usage of sterically hindered amines increases the lipophilicity of the complexes, thus making easier for complexes to enter the cells (Fanelli et al. 2016). Especially, phosphine-based palladium(II) complexes have been studied for their valuable bioactivities (Priyarega et al. 2011; Shabbir et al. 2017). The cytotoxicity of the palladium(II) complexes was comparable to that of platinum-based drugs; it is mediated by apoptosis. According to the literature, Pd(II) complexes can be potential candidates for anticancer therapy (Fanelli et al. 2016).

Lung cancer is one of the major causes of cancer-related deaths in the world. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer and represents about approximately 80–85% of lung cancers (James et al. 2018). Small-cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive subtype of lung cancer, and the overall survival at 5 years is

approximately 5–10% (Fiorentino et al. 2016). Reducing power, radical scavenging, DNA binding, antibacterial activity and DNA cleavage activity of ionic liquid-based Ru(II)-phosphinite complexes were reported (Meriç et al. 2019). However, to the best of our knowledge, there are no study on the use of chiral aminoalcohol-based bis(phosphinite) ligands and their transition metal complexes in anticancer activity. Herein, for the first time, synthesis and potential anticancer properties of chiral aminoalcohol-based bis(phosphinite) ligands containing  $(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{-Ru(II)}$ -phosphinite and bis(phosphinite)—Pd(II) complexes were explored.

## Experimental

### Materials

Bis(phosphinite) ligands 1 and 2 (Karakas et al. 2016), bis(phosphinite) palladium(II) complexes (Karakas et al. 2016) and bis(phosphinite) ruthenium(II) complexes (Karakas et al. 2018) were prepared according to procedures in our previous works. Synthesis of bis(phosphinite) palladium(II) complexes (**1** and **2**) and bis(phosphinite) ruthenium(II) complexes (**3** and **4**) were carried out under dry argon atmosphere using Schlenk line technique. All solvents were dried and distilled under argon prior to use.  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  NMR (162.0 MHz),  $^1\text{H}$  (400.1 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (100.6 MHz) spectra were evaluated by a Bruker AV400 spectrometer, with tetramethylsilane (TMS) as an internal reference for  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^1\text{H}$  NMR or 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  as an external reference for  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  NMR.

### Synthesis of bis(phosphinite) ligands 1 and 2

(2R)-1-[benzyl({[6-({benzyl[(2R)-2-hydroxypropyl]amino)methyl]pyridin-2-yl]methyl}) amino]propan-2-ol and (2R)-1-[benzyl({[3-({benzyl[(2R)-2-hydroxypropyl]amino)methyl]phenyl]methyl})amino]propan-2-ol (1.5 mmol) were dissolved in dry toluene (20 mL) under an argon atmosphere. Then, trimethylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) (3 mmol) and monochlorophosphine ( $\text{ClPPh}_2$ ) (3 mmol) were added dropwise into this mixture and stirred at room temperature for 1 h. The white precipitate (triethylammonium chloride) was filtered under argon, and the remaining part was dried in vacuo to produce a white viscous oily compound.

### Ligand 1

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 106.86 (s, O-P-(C6H5)2);  $^1\text{H}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.26 (d, 2H,  $J = 6.20$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$ ); 2.56 (br, 2H,  $-\text{CHCH}_2$  (a)); 2.80 (br, 2H,  $-\text{CHCH}_2$

(b)); 3.63–3.75 (m, 4H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2$ ); 4.11–4.15 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 7.20–7.54 (m, 33H, aromatic protons of ligand);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 20.85 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 59.45 ( $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2\text{Py}$ ); 75.34 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 60.86 ( $-\text{CHCH}_2$ ); 120.96, 126.88, 128.19, 128.21, 128.45, 128.97, 129.07, 130.00, 130.25, 130.52, 130.69 (aromatic carbons); 136.50, 142.61, 158.94 (*i*-carbons).

### Ligand 2

$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 108.05 (s,  $\text{O-P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ );  $^1\text{H}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.24–1.30 (m, 6H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 2.54–2.58 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_2$  (a)); 2.72–2.76 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_2$  (b)); 3.57–3.63 (m, 4H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2$ ); 4.20 (br, 2H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 7.23–7.50 (m, 34H, aromatic protons of ligand);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 139.24, 139.42, 142.65 (*i*-carbons of phenyl); 126.80, 127.57, 128.14, 128.20, 128.32, 128.43, 128.95, 129.42, 130.06, 130.25, 130.34, 130.58 (aromatic carbons of phenyl); 75.53 (d,  $J=23.1$  Hz,  $-\text{CHCH}_3$ ); 60.50 ( $-\text{CHCH}_2$ ); 59.08 ( $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2$ ); 20.92 ( $-\text{CHCH}_3$ ).

### Synthesis of dichlorobis(phosphinite)Pd(II) complexes (1 and 2)

Bisphosphinite (1.5 mmol) and  $\text{Pd}(\text{cod})\text{Cl}_2$  (1.5 mmol) were dissolved in 30 mL of dichloromethane under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solution was concentrated to ca. 2 ml and adding 15 ml petroleum ether caused precipitation of the dark yellow solid. The supernatant was removed and the solid was washed with hexane/diethyl ether (1:1) and then dried by vacuum to obtain bis(phosphinite) palladium(II) complexes (**complexes 1–2**) as a final product.

#### Complex 1

$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 108.22 (s,  $\text{O-P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 1.28 (m, 6H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 2.50 (broad, 4H,  $-\text{CHCH}_2$ ); 3.11–3.82 (m, 8H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2$ ); 4.10 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 7.22–7.54 (m, 33H, aromatic protons);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 19.84 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 59.52 ( $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2\text{Py}$ ); 74.93 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 60.35 ( $-\text{CHCH}_2$ ); 120.62, 126.75, 127.40, 127.46, 127.75, 128.43, 128.96, 131.78, 131.99, 132.45, 132.85, 133.40 (aromatic carbons); 136.23, 140.60, 159.78 (*i*-carbons).

#### Complex 2

$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 103.76 (s,  $\text{O-P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 7.20–7.58 (m, 34H, aromatic

protons), 3.87 (broad, 2H,  $-\text{CHCH}_3$ ), 3.21–3.29 (m, 8H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2$ ), 2.37–2.42 (m, 4H,  $-\text{CHCH}_2$ ), 0.84–0.90 (m, 6H,  $-\text{CHCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 138.02, 138.25 (*i*-carbons), 127.24, 127.86, 128.37, 128.60, 128.73, 130.98, 131.69, 131.86, 132.07, 132.42, 132.72, 133.12 (aromatic carbons), 74.84 ( $-\text{CHCH}_3$ ), 59.51 ( $-\text{CHCH}_2$ ), 57.96 ( $\text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{NCH}_2$ ), 19.47 ( $-\text{CHCH}_3$ ).

### Synthesis of ( $\eta^6$ -*p*-cymene)-Ru(II)-phosphinite complexes (3 and 4)

Bisphosphinite (1.5 mmol) and  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  (1.5 mmol) were dissolved in 30 mL of dichloromethane under argon atmosphere and stirred for 1 h at room temperature. Final product concentrated to ca. 2 ml under reduced pressure. Addition of 15 ml petroleum ether caused precipitation of a tile-red solid. The supernatant was removed and the solid was washed with hexane/diethyl ether (1:1) and then dried in vacuum to obtain ruthenium(II) complexes (**complexes 3–4**) as a final product.

#### Complex 3

$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 110.32 (s,  $\text{O-P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.05–1.13 (m, 18H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  *p*-cymene +  $-\text{CHCH}_3$ ); 1.83 (s, 6H,  $-\text{CH}_3$  *p*-cymene); 2.33–2.40 (m, 2H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph}$ (b)); 2.56–2.72 (m, 4H,  $-\text{NCH}_2\text{Ph}$ (a) +  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  *p*-cymene); 3.27 (d, 2H,  $J=13.7$  Hz,  $-\text{NCH}_2$  (b)); 3.40 (d, 2H,  $J=14.5$  Hz,  $-\text{CHCH}_2$  (b)); 3.56 (d, 2H,  $J=13.72$  Hz,  $-\text{NCH}_2$  (a)); 3.62 (d, 2H,  $J=14.5$  Hz,  $-\text{CHCH}_2$  (a)); 4.63 (br, 2H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 5.15 (br, 6H, aromatic protons of *p*-cymene); 5.25 (br, 2H, aromatic protons of *p*-cymene); 7.25–7.901 (m, 33H, aromatic protons);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 17.43 ( $-\text{CH}_3$  of *p*-cymene); 20.46 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 21.77, 21.95 ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  of *p*-cymene); 29.97 ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  of *p*-cymene); 59.22–59.63 ( $-\text{NCH}_2 + \text{NCH}_2\text{Ph}$ ); 60.75 ( $-\text{CHCH}_2$ ); 74.36 ( $-\text{CHCH}_2$ ); 87.41, 88.14, 89.56, 90.60 (aromatic carbons of *p*-cymene); 97.45, 111.23 (*i*-carbons of *p*-cymene); 121.00, 126.76, 127.65, 127.77, 128.06, 128.98, 130.83, 132.84, 132.95, 133.11, (aromatic carbons); 137.630, 138.12, 139.40, 158.98 (*i*-carbons);  $m/z$ : 1415.25 [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]  $\text{C}_{71}\text{H}_{81}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}_2\text{Ru}_2\text{Cl}_4$  (MA: 1414.23).

#### Complex 4

$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 110.24 (s,  $\text{O-P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.98–1.05 (m, 18H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  of *p*-cymene +  $-\text{CHCH}_3$ ); 1.77 (s, 6H,  $-\text{CH}_3$  of *p*-cymene); 2.32 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz,  $-\text{CHCH}_2$  (b)); 2.44 (d, 2H,  $J=8.7$  Hz,  $-\text{CHCH}_2$  (a)); 2.56 (br, 2H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  of *p*-cymene); 3.14 (d, 4H,  $J=13.4$  Hz,  $-\text{NCH}_2\text{Ph}$ ); 3.50 (d, 4H,

$J=13.5$  Hz,  $-\text{NCH}_2$ ); 5.08–5.30 (m, 8H, aromatic protons of *p*-cymene); 4.55 (br, 2H,  $-\text{CHCH}_3$ ); 7.06–7.85 (m, 34H, aromatic protons);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 17.41 ( $-\text{CH}_3$  of *p*-cymene); 20.49 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 21.97, 21.70 ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  of *p*-cymene); 30.08 ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  of *p*-cymene); 59.24–59.00 ( $-\text{NCH}_2 + \text{NCH}_2\text{Ph} + -\text{CHCH}_2$ ); 74.40 ( $-\text{CHCH}_3$ ); 87.22, 88.15, 89.59, 91.00 (aromatic carbons of *p*-cymene); 97.32, 110.91 (*i*-carbons of *p*-cymene); 126.68, 127.39, 127.66, 127.79, 128.03, 128.85, 129.31, 130.78, 130.86, 132.94, (aromatic carbons); 137.35, 137.89, 139.43, 139.62 (*i*-carbons);  $m/z$ : 1413.20  $[\text{M}-\text{H}^+]$   $\text{C}_{72}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}_2\text{Ru}_2\text{Cl}_4$  (MA: 1413.36).

### Cell culture and cell proliferation assay

NSCLC and SCLC cell lines were obtained from Dr. Jun YOKOTA (IGTP, Barcelona). NSCLC cell line H1975, HCC78 and SCLC cell line H209, N417 were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin–streptomycin in a humidified of 5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C. Cell proliferation was determined by using a CellTiter-Glo kit (Promega, USA) which is a homogenous method to determine the number of viable cells. Cells were counted with an automated cell counter, seeded in 96 well plates  $3 \times 10^3$  cell/well. Different concentrations (1, 10, 30, 50, 75, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of ruthenium and palladium complexes were added per well. On the other hand, to compare the effect of synthesized complexes to the cisplatin we treated cells with different concentrations (0.1, 0.5, 1, 10, 30, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of cisplatin (CAS 15663-27-1). Afterward, cells were cultured in 96 well plates for 48 h.  $\text{IC}_{50}$  values were calculated by regression analysis.

### Apoptosis assay

To evaluate the potential apoptotic effects of the synthesized molecules on H1975, HCC78, H209 and N417 cells, cell lines were treated with cisplatin, ruthenium and palladium complexes and survival rates were evaluated based on their  $\text{IC}_{50}$  values. Cell lines were incubated in a humidified of 5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C at 24 h. At the end of the incubation period, in situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, USA) was used to detect apoptotic cells in situ by the indirect TUNEL method. The results of TUNEL assay were analyzed by using fluorescence microscopy.

### Real-time polymerase chain reaction

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was applied to determine apoptosis and proliferation-dependent mRNA expression changes in ruthenium and palladium complexes treated for 48 h. At

the end of the incubation, treated and untreated cell lines were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and then, total RNA from the cell lines was isolated as described previously (Tokgun et al. 2015). Quantitative real-time qRT-PCR analysis performed by using SYBR green (Qiagen, Germany) reagent and Corbett Rotorgene (Qiagen, Germany) instrument according to the manufacturer's protocol. The relative mRNA expression levels were calculated using the comparative Ct method. Expression levels of Bax and p21 were evaluated. The transcript level of the  $\beta$ -actin gene was used as the endogenous reference. The results were assessed with delta delta CT formulas ( $2^{-\Delta\text{CT}}$ ).

### Statistical analysis

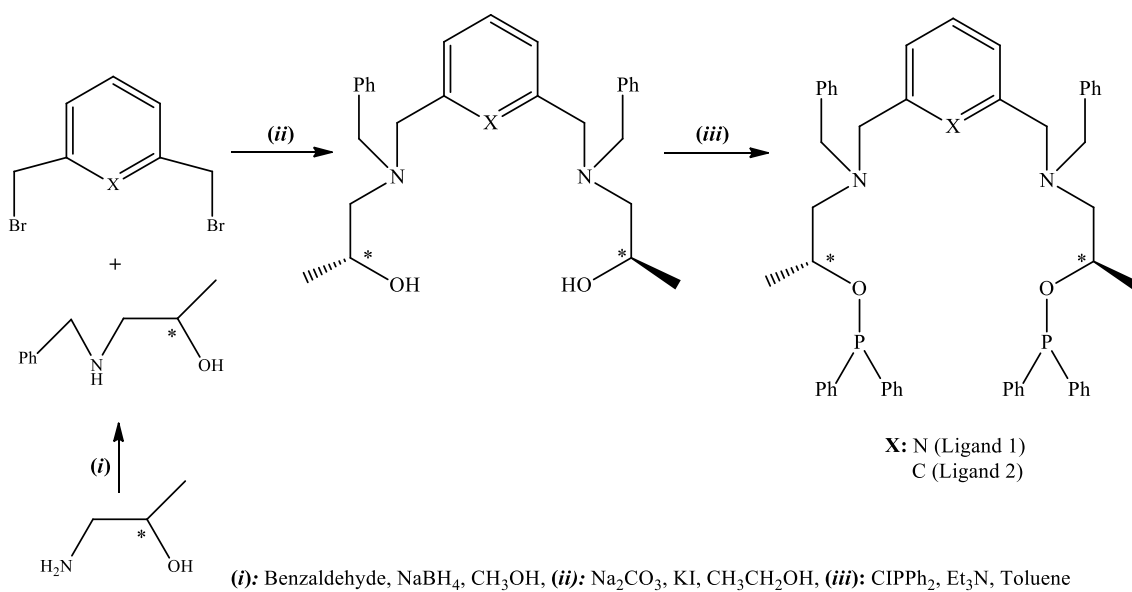
All experiments were repeated independently to confirm the results by performing in three replicates. The Student's *t* test is used to calculate a *p* value based on the difference in the mean values between two groups of data and  $p \leq 0.05$  considered to be statistically significant.

## Results and discussion

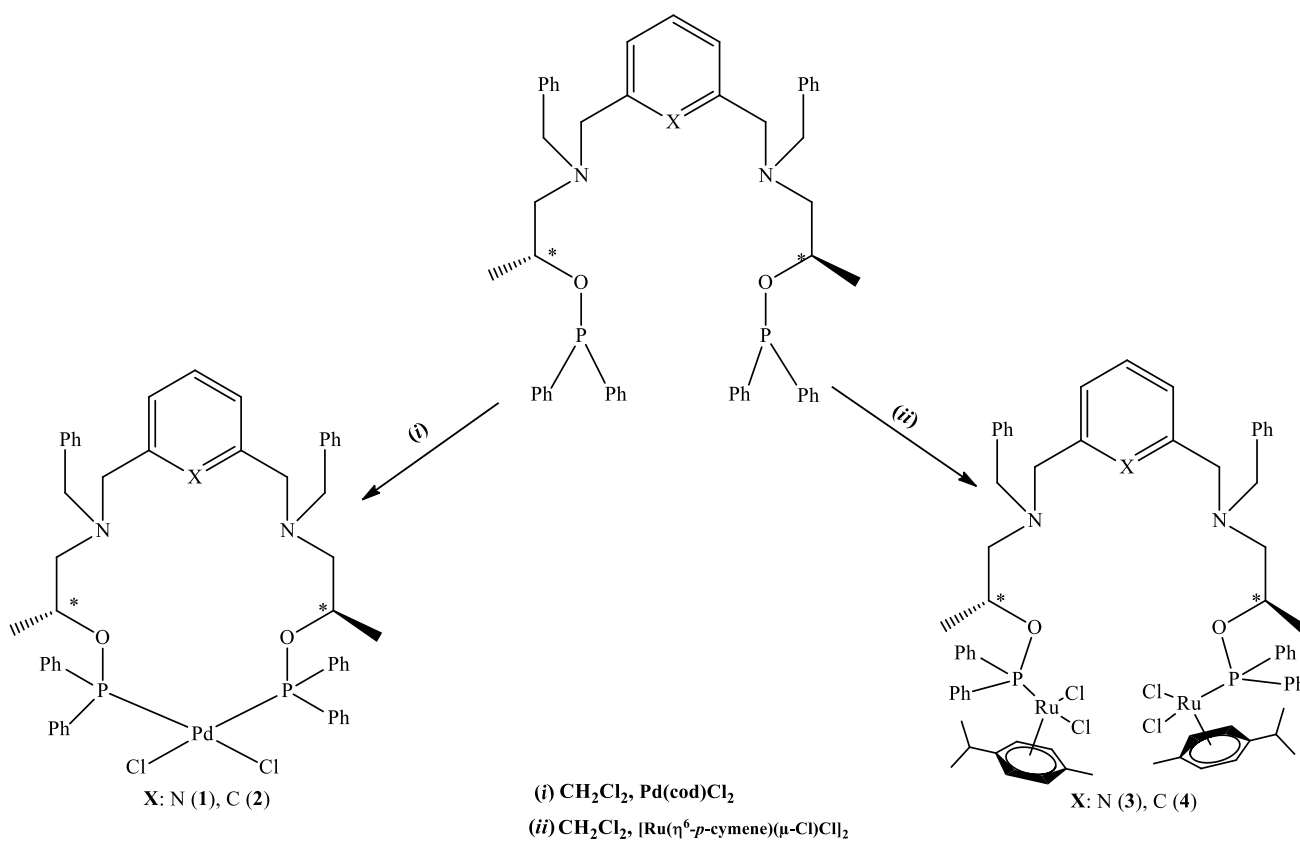
### Synthesis of bis(phosphinite) ligands and their complexes

Coordination chemistry studies of the P-donor ligands have become center of attention through their unique applications in bioinorganic chemistry (Dong et al. 2007; Appelt et al. 2017). Recently, the preparation of ionic liquid-based Ru(II)-phosphinite (James et al. 2018) and phosphine containing heterobimetallic ruthenium(II) complexes and their applications were reported (Appelt et al. 2017). Attracting features of this type of compound prompted us to focus on chiral aminoalcohol-based bis(phosphinite) ligands (Fig. 1). In the present study, two bis(phosphinite) palladium(II) complexes (**1–2**) and half-sandwich ( $\eta^6$ -*p*-cymene)-Ru(II)-phosphinite complexes (**3–4**) were prepared using the different synthetic strategies as shown in Fig. 2. These bis(phosphinite) ligands and their Ru(II) and Pd(II) complexes were originally synthesized by our research group (Karakas et al. 2016, 2018). Pd(cod)Cl<sub>2</sub> was used in the preparation of bis(phosphinite) palladium(II) complexes (**1–2**) through the replacement of cod (1,5-cyclooctadiene) by the phosphinites (Fig. 2). Complexes **1–2** were isolated in good yields as bright yellow solids. Air stable red compounds (**3–4**) occur in high yields by the reaction of  $[\text{Ru}(\textit{p}\text{-cymene})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  with one equivalent of bis(phosphinite) ligands in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at room

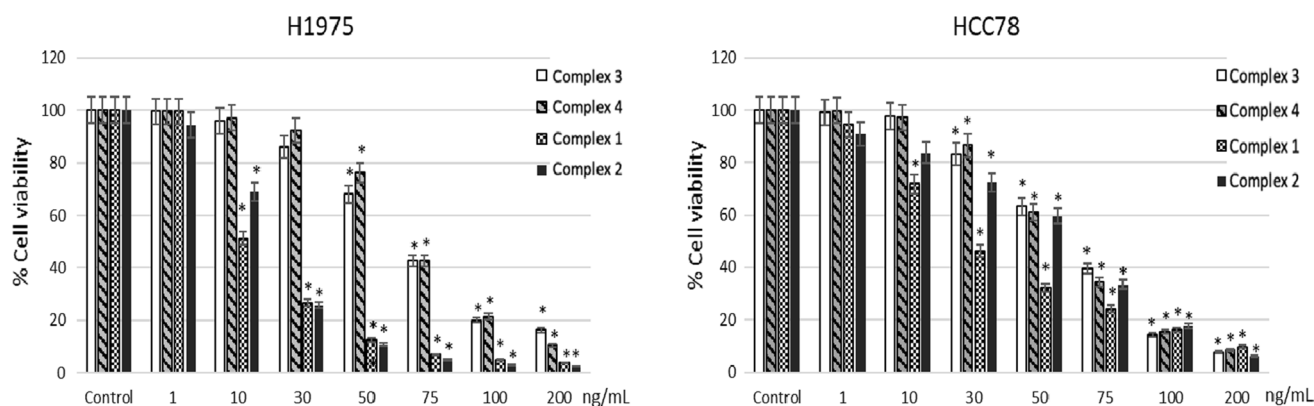




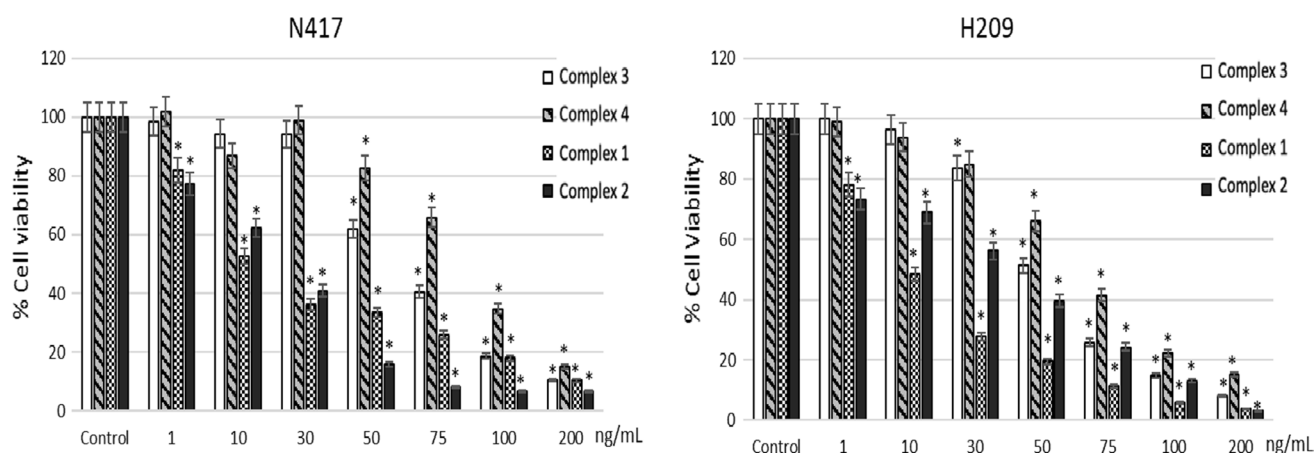
**Fig. 1** Synthesis of bis(phosphinite) ligand 1 and 2



**Fig. 2** Synthesis of bis(phosphinite)Pd(II) complexes (1, 2) and (η<sup>6</sup>-p-cymene)-Ru(II)-phosphinite complexes (3–4)



**Fig. 3** Cytotoxic effects of the complexes on NSCLC cells. Cell death was determined by the luminometric method. The Student's *t* test ( $*p < 0.001$ ) was used to evaluate the significance of cytotoxic effects of the complexes



**Fig. 4** Cytotoxic effects of the complexes on SCLC cells. Cell death was determined by the luminometric method. The Student's *t* test ( $*p < 0.001$ ) was used to evaluate the significance of cytotoxic effects of the complexes

temperature (Fig. 2). Both complexes have high melting points and are highly soluble in MeCN, MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , DMF and DMSO, but exhibit very poor solubility in water. The bis(phosphinite)-Ru(II) and Pd(II) complexes are stable for a month in ambient air and moisture. The complexes were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

### The cytotoxic effect of the bis(phosphinite)Pd(II) (1–2) and ( $\eta^6$ -p-cymene)-Ru(II)-phosphinite complexes (3–4) on lung cancer cells

Luminometric CellTiter-Glo analysis was performed to determine the specific cytotoxic activity of each complex. NSCLC and SCLC cells were incubated with different concentrations (1, 10, 30, 50, 75, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) of ruthenium and palladium complexes for 48 h (Figs. 3 and 4, respectively).

**Table 1**  $\text{IC}_{50}$  values for each molecule for each cell line

	NSCLC		SCLC	
	H1975	HCC78	N417	H209
Complex 1	$10.43 \pm 0.85$	$19.85 \pm 1.54$	$8.17 \pm 1.43$	$6.52 \pm 1.24$
Complex 2	$15.17 \pm 0.75$	$48.48 \pm 4.96$	$12.15 \pm 3.53$	$22.21 \pm 6.94$
Complex 3	$55.38 \pm 4.12$	$52.38 \pm 3.92$	$53.65 \pm 3.02$	$44.97 \pm 2.52$
Complex 4	$66.67 \pm 3.84$	$50.85 \pm 2.98$	$136 \pm 8.8$	$51.6 \pm 3.74$

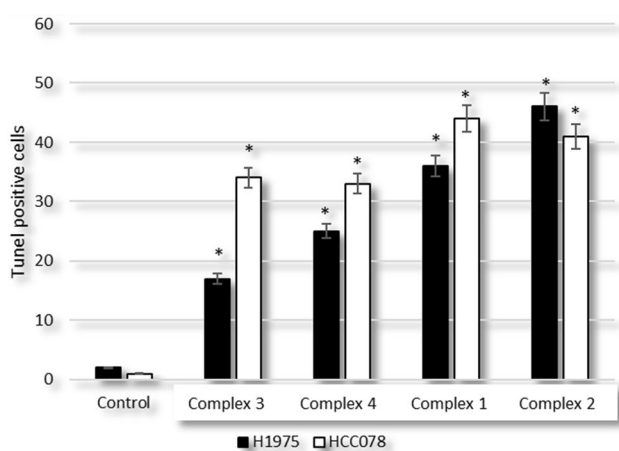
Afterward, the half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) has been calculated by using regression analysis. We obtained that complex 1 has the strongest cytotoxic effects on both SCLC and NSCLC cell lines, while complex 4 has the lowest cytotoxic effects on both cell lines.

**Table 2** IC<sub>50</sub> values for cisplatin for each cell line

	NSCLC		SCLC	
	H1975	HCC78	H1975	HCC78
Cisplatin	16.72 ± 0.98	1.87 ± 0.24	14.23 ± 1.01	0.89 ± 0.05

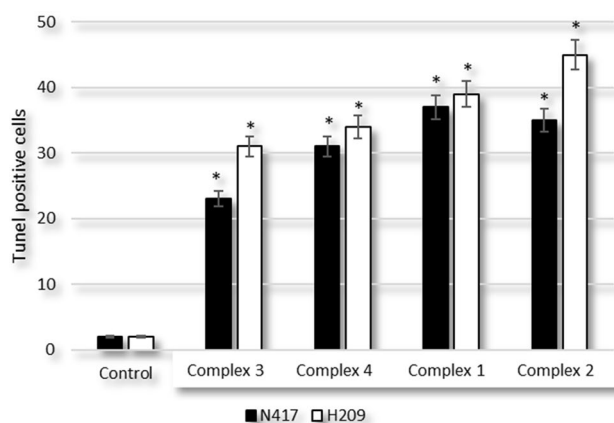
When the results of cytotoxic effects of the ruthenium and palladium complexes were compared, it was observed that palladium has more cytotoxic activity than ruthenium (Table 1).

On the other hand, the cytotoxicity results clearly indicate that complexes 1–3 are more cytotoxic than complexes 2–4 in dose-dependent manner. The cytotoxic activity of each complex are also compared with cisplatin via treating cells with different concentrations of cisplatin. Depending on the CellTiter-Glo results, we calculated IC<sub>50</sub> values for cisplatin and we obtained that cisplatin is an effective molecule, especially against to complexes 1 and 2 in H209 and HCC78 cell lines (Table 2). These results revealed that complexes 1 and 2 are more effective proliferation inhibitors for fast growing cells such as H1975 and N417. This study has shown for the first time that ruthenium and palladium complexes could induce apoptosis in both human small- and non-small-cell lung carcinoma cell lines. Among the anticancer agents containing metals, ruthenium and palladium complexes have become the most promising therapeutic molecules. Recent studies in the literature showed that ruthenium polypyridyl and ruthenium(II) salicylate complexes could inhibit cancer cell proliferation (Chen et al. 2019; Jiang et al. 2019). Ru(III) (d<sup>5</sup>, paramagnetic) and Ru(II) (d<sup>6</sup>, diamagnetic)

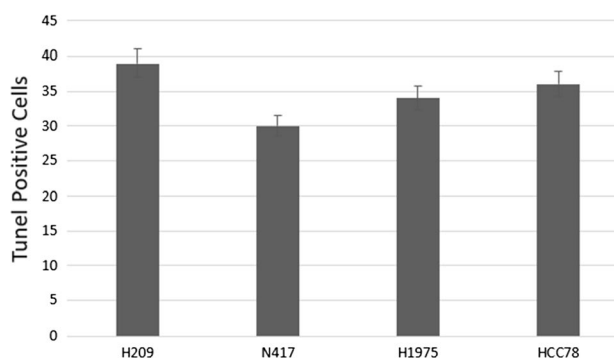


**Fig. 5** Complexes induce apoptosis in NSCLC cell lines. Apoptotic cells were analyzed by terminal transferase dUTP Kit (Millipore) system. The Student's *t* test (\**p* < 0.001) was used to evaluate the significance of the TUNEL results

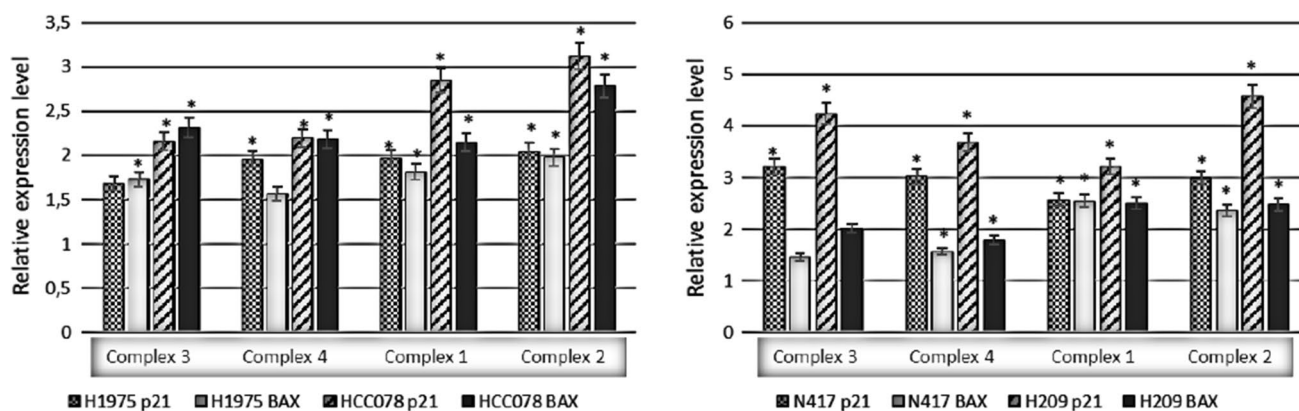
oxidation states are available for ruthenium species in physiological solution. These two oxidation states are of important for their biological activity. In both oxidation states, Ru has good affinity for sulfur and nitrogen ligands and coordinated with octahedral geometry. Most of the Ru compounds have a low level of toxicity, and some of the Ru complexes have the capacity to be selective elimination of cancer cells. Therefore, ruthenium has been considered to be a strong alternative to platinum complexes (Deshpande and Kumbhar 2005). On the other hand, in the literature, there are some reports which mentioned that palladium complexes are intercalated with DNA, thereby exerting a significant effect on in vitro antitumor activity (Farhangian et al. 2017). In the literature, recent studies show that ruthenium complexes are more cytotoxic than palladium ones (Onar et al. 2019). However, we thought that in our study these differences come from the differences of the side groups of molecules that designed in our study.



**Fig. 6** Complexes induce apoptosis in SCLC cell lines. Apoptotic cells were analyzed by terminal transferase dUTP Kit (Millipore) system. The Student's *t* test (\**p* < 0.001) was used to evaluate the significance of the TUNEL results



**Fig. 7** Cisplatin induce apoptosis in lung cancer cell lines. Apoptotic cells were analyzed by terminal transferase dUTP Kit (Millipore) system. The Student's *t* test (\**p* < 0.001) was used to evaluate the significance of the TUNEL results



**Fig. 8** Complexes induce p21 and bax mRNA expressions. The Student's *t* test ( $*p < 0.001$ ) was used to evaluate the significance of the qRT-PCR results

### Bis(phosphinite)Pd(II) (1–2) and ( $\eta^6$ -p-cymene)-Ru(II)-phosphinite complexes (3–4) induce apoptosis on lung cancer cell lines

To obtain the cell death mechanism after treatment with ruthenium and palladium complexes and to determine apoptotic cell index, we performed the indirect TUNEL method. DNA fragmentation of apoptotic cells has been detected by using the TUNEL assay. The TUNEL assay has been the most widely used for identifying apoptotic cells in situ. Our results indicate that cisplatin, ruthenium and palladium complexes are able to induce apoptosis in each cell line. Especially, complexes **1** and **2** can induce apoptosis for both SCLC and NSCLC (Figs. 5, 6 and 7, respectively).

When the effects of Pd and Ru side groups were compared, we obtained that Pd has stronger effect on induction of apoptosis.

In a similar manner, the TUNEL assay and qRT-PCR results clearly showed that there is a significant correlation between apoptotic cell index and p21, Bax gene expressions (Fig. 7). In the literature, some researchers mentioned that the type of cell death in response to Pd(II) complexes was shown to be through apoptotic pathways which is similar to our results (Kacar et al. 2014; Antunovic et al. 2015).

The TUNEL assay results showed that complex **2** strongly induces apoptosis in the lung cancer cells compared to the other complexes (Fig. 8).

## Conclusions

In conclusion, the results show that the complexes are more efficient in their action on both NSCLC and SCLC cell lines. We synthesized four complexes and showed their potential cytotoxic effects. Importantly, they also successfully inhibited the cellular viability and induce apoptosis

at lower concentrations. Previous works have shown that ruthenium complexes are more cytotoxic than palladium complexes in general. However, it should be remembered that this effect can change depending on the additional side groups. These findings obviously demonstrate that four complexes are very promising antitumor agents and support further investigations concerning its molecular targets in lung cancers.

## References

- Al-Bayati YWA, Karakaş DE, Meriç N, Aydemir M, Durap F, Baysal A (2018) Ferrocene based chiral binuclear  $\eta^6$ -benzene-Ru(II)-phosphinite complexes: synthesis, characterization and catalytic activity in asymmetric reduction of ketones. *Appl Organomet Chem* 32:3919. <https://doi.org/10.1002/aoc.3919>
- Antunovic M, Kriznik B, Ulukaya E, Yilmaz VT, Mihalic KC, Madunic J, Marijanovic I (2015) Cytotoxic activity of novel palladium-based compounds on leukemia cell lines. *Anticancer Drugs* 26(2):180–186. <https://doi.org/10.1097/CAD.000000000000174>
- Anzellotti AI, Sabat M, Farrell N (2006) Platination of nucleobases to enhance noncovalent recognition in protein–DNA/RNA complexes. *Inorg Chem* 45:1638–1645. <https://doi.org/10.1021/ic049086d>
- Appelt P, da Silva JP, Fuganti O, Aquino L, Sandrino B, Wohnrath K, Santos VA, Cunha MAA, Veiga A, Murakami FS, Back DF, de Araujo MP (2017) New heterobimetallic ruthenium (II) complexes [Ru(N-S)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub>: synthesis, molecular structure, electrochemistry, DFT, antioxidant and antibacterial potential. *J Organomet Chem* 846:326–334. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.07.005>
- Araujo MP, Figueiredo AT, Bogado AL, Poelhsitz GV, Ellena J, Castellano EE, Donnici CL, Comasseto JV, Batista AA (2005) Ruthenium phosphine/diimine complexes: syntheses, characterization, reactivity with carbon monoxide, and catalytic hydrogenation of ketones. *Organometals* 24(25):6159–6168. <https://doi.org/10.1021/om050182b>
- Baysal A, Karakaş DE, Meriç N, Ak B, Aydemir M, Durap F (2017) Chiral phosphinites as efficient ligands for enantioselective Ru(II), Rh(I) and Ir(III)-catalyzed transfer hydrogenation reactions.

- Transit Met Chem 42:365–372. <https://doi.org/10.1007/s11243-017-0140-1>
- Biricik N, Durap F, Gümgüm B, Fei Z, Scopelliti R (2007a) Synthesis and reactivity of N, N-bis(diphenylphosphino) dimethylaniline compounds. *Transit Metal Chem* 32(7):877–883. <https://doi.org/10.1007/s11243-007-0231-5>
- Biricik N, Durap F, Kayan C, Gümgüm B (2007b) New bis(diphenylphosphino)aniline derivatives: synthesis and spectroscopic characterization. *Heteroat Chem* 18:613–616
- Chen JC, Zhang Y, Jie XM, She J, Dongye GZ, Zhong Y, Deng YY, Wang J, Guo BY, Chen LM (2019) Ruthenium(II) salicylate complexes inducing ROS-mediated apoptosis by targeting thioredoxin reductase. *J Inorg Biochem* 193:112–123. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.011>
- Debrezzeni JE, Bullock AN, Atilla GE, Williams DS, Bregman H, Knapp S, Meggers E (2006) Ruthenium half-sandwich complexes bound to protein kinase Pim-1. *Chem Int Ed* 45:1580–1585. <https://doi.org/10.1002/anie.200503468>
- Deepthi SB, Trivedi R, Sujitha P, Kumar CG, Sridhar B, Bhargava UK (2012) Synthesis, characterization and cytotoxic activity of palladium (II) carbohydrate complexes. *J Chem Sci* 124:1405–1413. <https://doi.org/10.1007/s12039-012-0340-3>
- Demkowicz S, Rachon J, Dasko M, Kozak W (2016) Selected organophosphorus compounds with biological activity. Applications in medicine. *RSC Adv* 6:7101–7112. <https://doi.org/10.1039/C5RA25446A>
- Deshpande MS, Kumbhar AS (2005) Mixed-ligand complexes of ruthenium(II) incorporating a diazo ligand: synthesis, characterization and DNA binding. *J Chem Sci* 117:153–159. <https://doi.org/10.1007/BF03356110>
- Dong W, Wang M, Liu T, Liu X, Jin K, Sun L (2007) Preparation, structures and electrochemical property of phosphine substituted diiron azadithiolates relevant to the active site of Fe-only hydrogenases. *J Inorg Biochem* 101(3):506–513. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.11.013>
- Durap F, Biricik N, Gümgüm B, Özkur S, Ang WH, Fei Z, Scopelliti R (2008) Synthesis and characterizations of N, N-bis(diphenylphosphino)ethylaniline derivatives and X-ray crystal structure of palladium (II), platinum (II) complexes. *Polyhedron* 27:196–202. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2007.09.011>
- Ellahioui Y, Patra M, Mari C, Kaabi R, Karges J, Gasser G, Gómez-Ruiz S (2019) Mesoporous silica nanoparticles functionalised with a photoactive ruthenium (II) complex: exploring the formulation of a metal-based photodynamic therapy photosensitizer. *Dalton Trans* 48(18):5940–5951. <https://doi.org/10.1039/C8DT02392A>
- Fanelli M, Formica M, Fusi V, Giorgi L, Micheloni M, Paoli P (2016) New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coord Chem Rev* 310:41–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.004>
- Farhangian H, Moghadama ME, Divsalar A, Rahimzadeh A (2017) Anticancer activity of novel amino acid derivative of palladium complex with phendione ligand against of human colon cancer cell line. *J Biol Inorg Chem* 22(7):1055–1064. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1483-y>
- Fiorentino FP, Tokgün E, Solé-Sánchez S, Giampaolo S, Tokgün O, Jauset T, Kohno T, Perucho M, Soucek L, Yokota J (2016) Growth suppression by MYC inhibition in small cell lung cancer cells with TP53 and RB1 inactivation. *Oncotarget* 7(21):31014–31028. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8826>
- Gümgüm B, Akba O, Durap E, Yıldırım TL, Ülkü D, Özkur S (2006) Synthesis characterization, crystal and molecular structure of diphenylphosphino ethylenediamines. *Polyhedron* 25:3133–3137. <https://doi.org/10.3390/molecules20045771>
- Gümgüm B, Biricik N, Durap E, Özdemir İ, Gürbüz N, Ang W, Pj Dyson (2007) Application of N, N-bis(diphenylphosphino) aniline palladium(II) complexes as pre-catalysts in Heck coupling reactions. *Appl Organomet Chem* 21:711–715. <https://doi.org/10.1002/aoc.1253>
- Heydari M, Moghadam ME, Tarlani A, Farhangian H (2017) DNA as a target for anticancer phen-imidazole Pd(II) complexes. *Appl Biochem Biotechnol* 182:110. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2314-2>
- James N, Shanthi V, Ramanathan K (2018) Drug design for ALK-positive NSCLC: an integrated pharmacophore-based 3D QSAR and virtual screening strategy. *Appl Biochem Biotechnol* 185:289. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2650-x>
- Jiang GB, Zhang WY, He M, Gu YY, Bai L, Wang YJ, Yi QY, Du F (2019) Design and synthesis of new ruthenium polypyridyl complexes with potent antitumor activity in vitro. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 5(220):117132. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.05.037>
- Kacar O, Adiguzel Z, Yilmaz VT, Cetin Y, Cevatemre B, Arda N, Baykal AT, Ulukaya E, Acilan C (2014) Evaluation of the molecular mechanisms of a palladium(II) saccharinate complex with terpyridine as an anticancer agent. *Anticancer Drugs* 25(1):17–29. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328364c6ad>
- Karakaş DE, Durap F, Aydemir M, Baysal A (2016) Synthesis, characterization and first application of chiral C2-symmetric bis(phosphinite)-Pd(II) complexes as catalysts in asymmetric intermolecular Heck reactions. *Appl Organometal Chem* 30:193–198. <https://doi.org/10.1002/aoc.3416>
- Karakaş DE, Aydemir M, Durap F, Baysal A (2018) Chiral C2-symmetric η<sup>6</sup>-p-cymene-Ru(II)-phosphinite complexes: synthesis and catalytic activity in asymmetric reduction of aromatic, methyl alkyl and alkyl/aryl ketones. *Inorg Chim Acta* 471:430–439. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.11.044>
- Lazarevic T, Rilak A, Bugarcic ZD (2017) Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem* 142:8–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>
- Lindner E, Mayor HA, Warad I, Eichele K (2003) Supported organometallic complexes: part XXXV. Synthesis, characterization, and catalytic application of a new family of diamine(diphosphine) ruthenium(II) complexes. *Organomet Chem* 665:176–185. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(02\)02112-5](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(02)02112-5)
- Liu HK, Berners-Price SJ, Wang FY, Parkinson JA, Xu JJ, Bella J, Sadler PJ (2006) Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex. *Chem Int Ed* 45:8153–8156. <https://doi.org/10.1002/anie.200602873>
- Meriç N, Kayan C, Rafikova K, Zazybin A, Okumuş V, Aydemir M, Durap F (2019) Synthesis of ionic liquid-based Ru(II)-phosphinite complexes and evaluation of their antioxidant, antibacterial, DNA-binding, and DNA cleavage activities. *Chem Pap* 73:1199–1208. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-00670-0>
- Miklášová N, Fischer-Fodor E, Lönnecke P, Tomuleasa CI, Virag P, Schrepler MP, Mikláš R, Dumitrescu LS, Hey-Hawkins E (2012) Antiproliferative effect of novel platinum(II) and palladium(II) complexes on hepatic tumor stem cells in vitro. *Eur J Med Chem* 49:41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.12.001>
- Mjos KD, Orvig C (2014) Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev* 114(8):4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>
- Moghadama ME, Saidifar M, Divsalar A, Torshizid HM, Sabourye AA, Farhangiana H, Ghadamgahif M (2016) Rich spectroscopic and molecular dynamic studies on the interaction of cytotoxic Pt(II) and Pd(II) complexes of glycine derivatives with calf thymus DNA. *J Biomol Struct Dyn* 34:206–222. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1015056>
- Ok F, Aydemir M, Baysal A, Durap F (2014) Novel half-sandwich η<sup>5</sup>-Cp\*–rhodium(III) and η<sup>5</sup>-Cp\*–ruthenium(II) complexes bearing bis(phosphino)amine ligands and their use in the transfer

- hydrogenation of aromatic ketones. *Appl Organometal Chem* 28:38–43. <https://doi.org/10.1002/aoc.3068>
- Onar G, Gürses C, Karataş MO, Balcıoğlu S, Akbay N, Özdemir N, Ateş B, Alici B (2019) Palladium(II) and ruthenium(II) complexes of benzotriazole functionalized N-heterocyclic carbenes: cytotoxicity, antimicrobial, and DNA interaction studies. *J Organomet Chem* 886:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.02.013>
- Patel MN, Patel CR, Joshi HN (2013) Metal-based biologically active compounds: synthesis, characterization, DNA interaction, antibacterial, cytotoxic and SOD mimic activities. *Appl Biochem Biotechnol* 169(4):1329–1345. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0086-x>
- Pettinari R, Marchetti F, Condello F, Pettinari C, Lupidi G, Scopelliti R, Mukhopadhyay S, Riedel T, Dyson PJ (2014) Ruthenium(II)–Arene RAPTA type complexes containing curcumin and bisdemethoxycurcumin display potent and selective anticancer activity. *Organometallics* 33:3709–3715. <https://doi.org/10.1021/om500317b>
- Priyarega S, Kalaivani P, Prabhakaran R, Hashimoto T, Endo A, Natarajan K (2011) Nickel(II) complexes containing thiosemicarbazone and triphenylphosphine: synthesis, spectroscopy, crystallography and catalytic activity. *J Mol Struct* 1002:58–62. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.06.046>
- Richert M, Budzisz E (2010) Ruthenium complexes in cancer therapy. *Wiad Chem* 64:357
- Rocha F, Barra C, Netto AG, Mauro AE, Carlos I, Frem RCG, Ananias S, Quilles M, Stevanato A, Rocha M (2010) 3,5-Dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole and its Pd(II) complexes: synthesis, spectral studies and antitumor activity. *Eur J Med Chem* 45:1698–1702. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.073>
- Ruiz J, Lorenzo J, Vicente C, López G, Monge M, Avilés FX, Bautista D, Moreno V, Laguna A (2008a) New palladium(II) and platinum(II) complexes with 9-aminoacridine: structures, luminescence, theoretical calculations, and antitumor activity. *Inorg Chem* 47:6990–7001. <https://doi.org/10.1021/ic800589m>
- Ruiz J, Villa MD, Cutillas N, López G, de Haro C, Bautista D, Moreno V, Valencia L (2008b) Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with 4,7-dihydro-5-methyl-7-oxo[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine. Antitumor activity of the platinum compounds. *Inorg Chem* 47:4490. <https://doi.org/10.1021/ic701873b>
- Shabbir M, Akhter Z, Ashraf AR, Ismail H, Anum H, Mirza B (2017) Nickel(II) and palladium(II) triphenylphosphine complexes incorporating tridentate Schiff base ligands: synthesis, characterization and biocidal activities. *J Mol Struct* 1149:720–726. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.050>
- Tokgun O, Demiray A, Bulent K, Akca H (2015) Silica nanoparticles can induce apoptosis via dead receptor and caspase 8 pathway on A549 cells. *Adv Food Sci* 2:65–70
- Wani WA, Prashar S, Shreaz S, Gómez-Ruiz S (2016) Nanostructured materials functionalized with metal complexes: in search of alternatives for administering anticancer metallodrugs. *Coord Chem Rev* 312:67–98. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.01.001>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**EK-3**

Karabulut A, Simavlı SA, Abban GM, Akyer ŞP, Keskin N, **Tan S**, Şahin B. Tissue reaction to urogynecologic meshes: effect of steroid soaking in two different mesh models. *Int Urogynecol J* 27, 1583–1589 (2016).

# Tissue reaction to urogynecologic meshes: effect of steroid soaking in two different mesh models

Aysun Karabulut<sup>1</sup> · Serap Aynur Simavlı<sup>1</sup> · Gülçin Mete Abban<sup>2</sup> · Şahika Pınar Akyer<sup>3</sup> · Nazan Keskin<sup>2</sup> · Semih Tan<sup>2</sup> · Barbaros Şahin<sup>4</sup>

Received: 23 December 2015 / Accepted: 14 March 2016 / Published online: 2 April 2016  
© The International Urogynecological Association 2016

## Abstract

**Introduction and Hypothesis** Steroid soaking may decrease mesh-triggered inflammatory reaction in tissue. We aimed to investigate the tissue reaction to a steroid-soaked mesh material and an unsoaked mesh material in the rat model.

**Methods** Neutral and steroid-soaked type I macroporous polypropylene (PP) monofilament and polyvinylidene fluoride (PVF) mesh materials were implanted on the rectus abdominis muscle of 20 mature Wistar albino rats. Animals were divided into four groups: PP mesh with steroid (PP-S), PP mesh without steroid, PVF mesh with steroid (PVF-S), and PVF mesh without steroid. The rats were killed after 12 weeks, and histologic, immunohistochemical and electron microscopic examinations were performed. For immunohistochemical analysis, polyclonal rabbit anti-mouse CD3, rabbit anti-mouse CD68, rabbit anti-mouse CD15, and rabbit anti-mouse CD34 antibodies were used for the detection of lymphocytes, macrophages, polymorphonuclear leukocyte foreign body giant cells, and fibromyocyte stem cells, respectively. Samples were stained with hematoxylin and eosin for the histologic evaluation of inflammation and with Masson's trichrome stain

for the evaluation of collagen deposition. Pore size and mesh ultrastructure were evaluated by electron microscopy.

**Results** Expression of CD3 was lower in the PVF, PVF-S and PP-S groups, and expression of CD34 was higher in the PVF-S and PP-S groups than in the PP groups ( $p < 0.05$ ). Collagen deposition was lower in the PVF, PVF-S and PP-S groups ( $p < 0.05$ ). Histologically, the intensity of inflammation was lower in the PVF-S and PP-S groups than in the PP mesh group ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences among the groups in terms of pore size and mesh ultrastructure on electron microscopic examination ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions** PVF mesh induces less inflammation than PP mesh, and in both mesh types steroid soaking further decreases inflammation without changing the pore size.

**Keywords** Urogynecology · Mesh · Inflammation · Tissue reaction · Polypropylene · Polyvinylidene fluoride

## Introduction

Mesh implants have been widely used in urogynecology practice for the surgical treatment of urinary incontinence and pelvic organ prolapse [1]. However, in 2008 the American Food and Drug Administration (FDA) reported adverse effects related to the use of mesh in pelvic organ prolapse surgery [2]. This report drew attention to high complication rates in addition to better success rates compared with native tissue repair, and made surgeons more skeptical about the use of mesh. The FDA [3] revised the warning related to urogynecologic meshes in 2011, and most of them were withdrawn from the market [4]. Therefore, new innovations in mesh technology which cause less tissue reaction and good anatomical and functional compatibility are required to increase safety and efficacy. Today, polypropylene (PP) monofilament macropore type I

✉ Aysun Karabulut  
aysunkarabulut@yahoo.com

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Pamukkale University Medical School, 20070 Denizli, Turkey

<sup>2</sup> Department of Histology-Embryology, Pamukkale University Medical School, Denizli, Turkey

<sup>3</sup> Department of Anatomy, Pamukkale University Medical School, Denizli, Turkey

<sup>4</sup> Animal Experiment Laboratory, Pamukkale University Medical School, Denizli, Turkey



meshes are preferred in urogynecologic surgery [5, 6]. Despite high tolerability, type I meshes also cause some degree of tissue reaction [5, 6]. On the other hand, polyvinylidene fluoride (PVF) meshes are relatively new in the market, and have comparable safety and efficacy [7].

A mesh material initiates a foreign body reaction after implantation triggered by an initial acute phase reaction [8, 9]. Migration of fibroblasts in response to chemotactic substances results in the production of glycosaminoglycans and collagen [9]. The cascade of events leads to the formation of a collagen capsule covering the mesh fibers, shielding the host from the foreign material [8]. However, the inflammatory response created by the surgical mesh in humans may be highly variable, and has been shown to be affected by many factors such as age, smoking, diabetes, and body mass index [10]. An exaggerated inflammatory process following mesh implantation may lead to increased production of reactive oxygen species by neutrophils which degrade the transplanted mesh and have been shown to cause microfractures on the mesh surface [10, 11], and finally results in changes in structural integrity and physical properties such as significant embrittlement of the mesh material that directly contributes to postoperative complications [11–13]. Therefore, advances are necessary in the area of mesh–tissue compatibility so that meshes can continue to be used with better success rates.

The use of systemic steroid has been shown to reduce tissue reactions in the animal models [14]. Studies have been performed to investigate the effects of soaking the mesh in antibiotic solution or coating it with collagen on the tissue reaction, but no previous study has investigated the effects of soaking the mesh in steroid solution [15–17]. We hypothesized that soaking the mesh in steroid solution may reduce the intensity of the inflammatory reaction, and we aimed to investigate the structural and immunohistochemical tissue reactions to a steroid-soaked mesh and an unsoaked mesh in the rat model.

## Materials and methods

The study protocol was approved by the Institutional Review Board and Animal Use Committee, and complied with

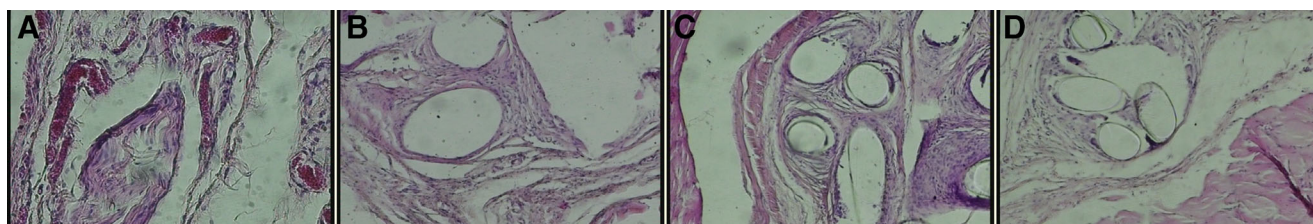
guidelines for the care and use of laboratory animals for research (Committee meeting number 2014/11, date 10 December 2014; study number PAUHDEK-2014/032).

Type I macroporous PP monofilament mesh (I-STOP®; CL Medical inc., Winchester, MA), and polyvinylidene fluoride (PVF) mesh (DynaMesh®; FEG Textiltechnik mbH, Aachen, Germany) were used in this experimental study. PP and PVF meshes were implanted in 20 mature Wistar albino rats with an average weight of 250 g. Ten rats received mesh that had been soaked in steroid solution, and the other ten rats received unsoaked mesh. The rats underwent surgery with a midline incision under sterile conditions after injection of ketamine hydrochloride (90 mg/kg, Ketalar®; Pfizer, Espoo, Finland) and xylazine (10 mg/kg, Keproxylazine 20®; Biopharm, Istanbul, Turkey), and the incisions were closed with 3.0 polyglactin sutures. In the ten rats receiving the unsoaked mesh, two 1 × 1-cm pieces of PP mesh were fixed in direct contact over the rectus abdominis muscle 1 cm apart on the right side, and two 1 × 1-cm pieces of PVF mesh were placed 1 cm apart on the left side in the same way. In the other ten rats, the same procedure was performed after soaking the mesh pieces in 40 mg methyl prednisolone dissolved in distilled water (Prednol-L®, 40-mg ampoule; Mustafa Nevzat Pharmaceuticals, İstanbul, Turkey) for 1 h. Thus the following four groups were formed: PP with steroid (PP-S), PP without steroid (PP), PVF with steroid (PVF-S), and PVF without steroid (PVF).

As mesh-related chronic inflammatory reaction settles in 4 weeks and mesh complications are usually seen in the first 2–3 months [8, 9, 14], we sacrificed the rats after 12 weeks. Implants were removed en-bloc with the underlying muscle tissue. One specimen from each region was used to investigate the inflammatory process, and the other for electron microscopy.

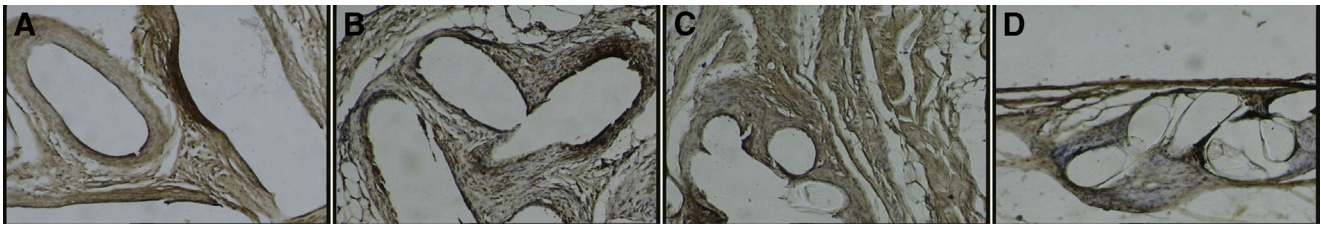
## Histochemical and immunohistochemical analysis

Samples for histologic examination were fixed in 10 % buffered formalin and processed accordingly for histologic assessment. Slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Fig. 1) and Masson's trichrome (Fig. 2) and examined by



**Fig. 1** Representative H&E-stained histologic cross sections ( $\times 100$ ) of tissue from the four mesh treatment groups: **a** polypropylene mesh without steroid soaking; **b** polypropylene mesh with steroid soaking; **c**

polyvinylidene fluoride mesh without steroid soaking; **d** polyvinylidene fluoride mesh with steroid soaking



**Fig. 2** Photomicrographs of Masson's trichrome-stained sections ( $\times 100$ ) of tissue from the four mesh treatment groups: **a** polypropylene mesh without steroid; **b** polypropylene mesh with steroid; **c** polyvinylidene fluoride mesh without steroid; **d** polyvinylidene fluoride mesh with steroid

light microscopy (Olympus BX51 phase contrast microscopy 200) blindly by the examiners (G.M.A., S.T.).

Masson's trichrome staining was used to evaluate the intensity of collagen deposition (Fig. 2). Granuloma formation, necrosis, inflammation, and the presence of necrosis were evaluated on H&E-stained slides (Fig. 1). Specimens were specifically analyzed for the inflammatory reaction, fibrosis and muscle infiltration, and scored using a previously reported grading scale [14]: 1; sparse, affecting less than 25 % of the area, 2; mild, affecting 25–50 % of the area, 3; moderate, affecting 50–75 % of the area, and 4; dense or marked lesion, affecting 75 % or more of the area. Ten areas were screened under  $\times 100$  magnification and the mean was taken as the score.

The antibodies used included polyclonal rabbit anti-mouse CD3 (MyBioSource, San Diego, CA) for lymphocytes, rabbit anti-mouse CD68 polyclonal antibody (MyBioSource) for macrophages, rabbit anti-mouse CD15 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) for polymorphonuclear (PMN) leukocytes and foreign body giant cells, and rabbit anti-mouse CD34 polyclonal antibody for fibromyocytes and stem cells (Fig. 3). The morphology of the inflammatory reaction was evaluated by quantitative cell analysis. The intensity of inflammation was defined as the percentage of cells positive

for each inflammatory marker in H&E-stained slides in ten fields of a  $10 \times 10$  grid (100  $0.1\text{-mm}^2$  fields).

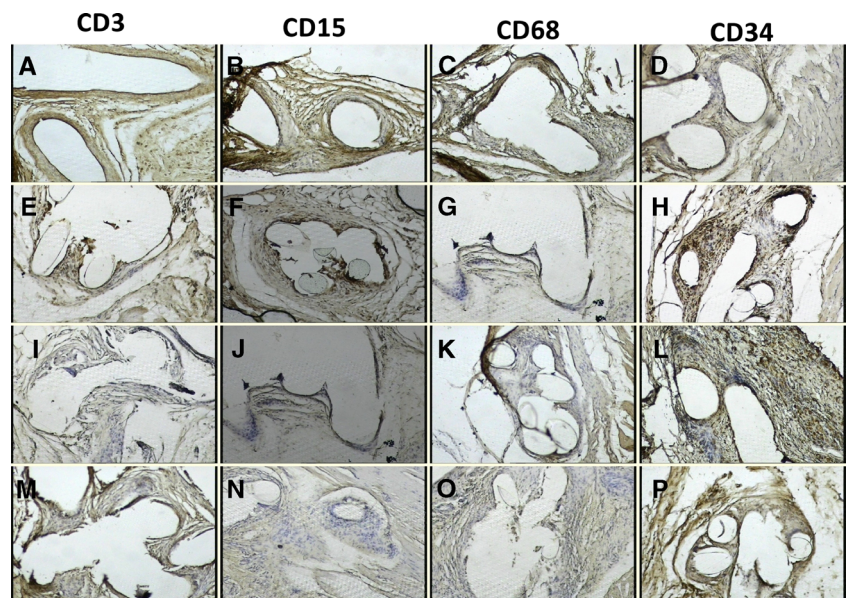
### Electron microscopic analysis

The electron microscopic analyses were performed by a single observer (N.K.) using a field emission electron microscope (FESEM; Carl Zeiss, Supra 40 VP). The samples were initially fixed in glutaraldehyde solution. After washing in sodium phosphate-buffered solution, the samples were dehydrated through a series of increasing concentrations of acetone, then critical point dried, mounted on stubs and sputter-coated with gold/palladium. The pore sizes of the meshes were measured using the FESEM (Fig. 4).

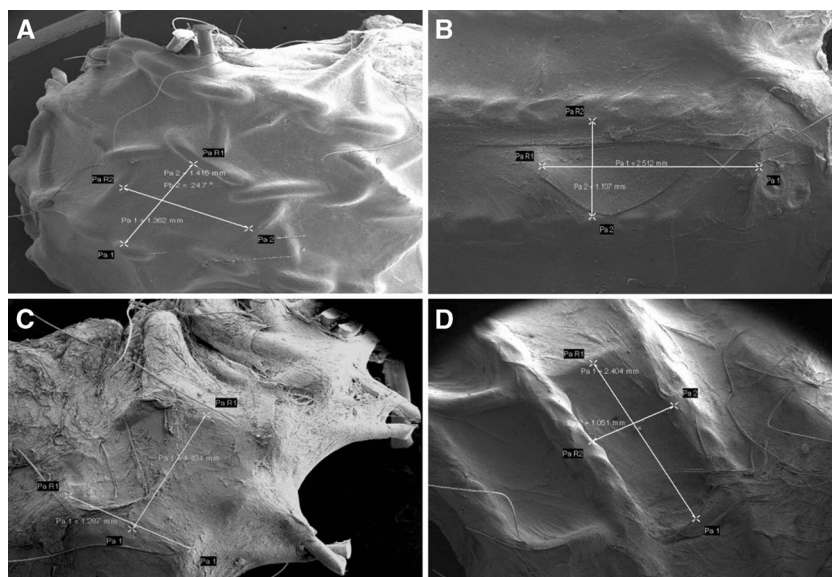
### Statistical analysis

The SPSS 11 package (SPSS, Chicago, IL) was used for the analysis. Parametric variables are expressed as means  $\pm$  standard deviation and nonparametric variables as medians and quartiles. The four mesh treatment groups were compared in terms of the degree of inflammatory tissue response using the Kruskal-Wallis test with Scheffé correction for multiple

**Fig. 3** Immunostained sections (immunoperoxidase-hematoxylin,  $\times 100$ ) focused on the area adjacent to mesh fibers and the area between mesh fibers: **a, e, i, m** lymphocyte marker CD3; **b, f, j, n** polymorphonuclear cell marker CD15; **c, g, k, o** macrophage marker CD68; **d, h, l, p** fibromyocyte and stem cell marker CD34



**Fig. 4** Scanning electron micrographs showing the appearance of the pores and their measurement in specimens from the four mesh treatment groups: **a** polypropylene mesh without steroid ( $\times 51$ ); **b** polyvinylidene fluoride mesh without steroid ( $\times 54$ ); **c** polypropylene mesh with steroid ( $\times 58$ ); **d** polyvinylidene fluoride mesh with steroid ( $\times 49$ )



comparisons. An independent sample *t* test was used for comparison of pore sizes between steroid-soaked and unsoaked meshes for each type of mesh. Statistical significance was assumed at *p* values  $< 0.05$ .

## Results

All 20 study animals survived for the whole 12-week post-implantation study period without any complications. No differences were seen macroscopically between steroid-soaked and unsoaked meshes. Microscopically measured markers of the inflammatory process in the different

groups are summarized in Table 1. An extensive inflammatory reaction, collagen deposition, necrosis, and positivity for CD3, CD15 and CD68 were considered as indicators of reduced biocompatibility. Statistically significant differences were found for CD3, CD34, CD15 and CD68 biomarkers between groups ( $p < 0.05$ ; Table 1). Lower levels of CD3 were seen in the PVF, PVF-S and PP-S groups, and higher levels of CD34 were seen in the PVF-S and PP-S groups compared with the PP group ( $p < 0.05$ ; Table 1). Levels of CD15 which was used for the detection of PMN leukocytes and foreign body giant cells were significantly lower in the PVF-S group than in the PP group ( $p < 0.05$ ). Levels of CD68 were significantly lower in the

**Table 1** Distribution of histopathologic findings and immunohistochemical markers between groups

	Mesh group				<i>p</i> value
	PVF		PP		
	Unsoaked	Steroid-soaked	Unsoaked	Steroid-soaked	
CD3	20.10 $\pm$ 9.36 (7–35)	14.40 $\pm$ 6.42 (8–25)	35.50 $\pm$ 7.72 (25–53)	19.60 $\pm$ 9.31 (8–35)	$< 0.0001$
CD34	27.50 $\pm$ 19.58 (5–61)	52.10 $\pm$ 23.50 (5–77)	6.80 $\pm$ 2.74 (4–12)	40.30 $\pm$ 26.53 (6–74)	0.001
CD15	15.30 $\pm$ 7.83 (5–31)	12.10 $\pm$ 7.40 (3–25)	23.50 $\pm$ 6.19 (14–31)	15.10 $\pm$ 7.69 (6–27)	0.013
CD68	34.70 $\pm$ 10.96 (22–57)	22.20 $\pm$ 10.27 (13–45)	35.70 $\pm$ 11.63 (17–54)	25.70 $\pm$ 10.91 (10–40)	0.028
Inflammation	2.5 (1.75–4)	1.5 (1–2)	3 (2.75–4)	2 (1–2.25)	0.007
Foreign body reaction	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–0.25)	0 (0–0)	0.038
Collagen	3 (2–3.25)	1 (1–1.25)	3 (2.3.25)	2 (1–2)	$< 0.0001$
Muscle invasion	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.392
Necrosis	0 (0–1.25)	0 (0–0)	1 (1–1)	0 (0–0)	0.062

The expression levels of the inflammatory markers CD3, CD34, CD15 and CD68 (measured in terms of the percentage of positive cells, as described in the text) are presented as means  $\pm$  SD (range). The scores for the other parameters (scored using a grading scale according to the area affected, as described in the text) are expressed as medians (25th and 75th weighted percentiles)

PVF Polyvinylidene fluoride, PP Polypropylene

PVF-S and PP-S groups at first, but the differences were not significant after Scheffé correction ( $p > 0.05$ ; Table 2).

Collagen deposition was significantly lower in the PVF-S group than in the PVF and PP groups, and lower in the PP-S group than in the PP group ( $p < 0.05$ ). The histologic analysis showed less inflammation in the PVF-S and PP-S groups than in the PP group ( $p < 0.05$ ; Table 2). There were no significant differences in muscle invasion and necrosis, pore size and mesh ultrastructure among the groups ( $p > 0.05$ ).

## Discussion

PVF meshes were found to induce less tissue reaction than PP meshes, and steroid soaking of the meshes decreased the inflammatory reaction. These observations are important because the main concern in the use of mesh is to minimize the inflammatory reaction while achieving high success rates. To the best of our knowledge, of studies investigating mesh biocompatibility this was one of the long-term studies with regard to postimplantation period related to mesh biocompatibility. After implantation of the mesh material, the foreign body reaction starts in 7 days and lasts for 21 days, and this is defined as the acute phase [18]. During this period, macrophages and PMN leukocytes migrate first into the environment, followed by lymphocyte infiltration [19, 20]. With time, the acute inflammatory process is replaced by the chronic reaction which promotes healing, and leads to the formation of low-intensity granulomatous inflammation [14].

The lymphocyte and macrophage markers CD3 and CD68, respectively, showed low levels of positivity. Together with PMN leukocytes, these two cell types are predominant in the acute phase of inflammation, and decline thereafter. Despite the significant differences initially detected in CD68 levels,

the differences were no longer significant after Scheffé correction. This can be explained by the negligible effect of steroid on macrophages. However, as the rats were killed at the end of postimplantation week 12, the inflammation phase had progressed from acute to chronic so that the numbers of macrophages had decreased and the markers of chronic inflammation had increased. This may explain the lack of significance. Since we did not have a treatment group to investigate the inflammatory events during the first week after mesh implantation, we cannot draw a conclusion about the involvement of macrophages in the acute inflammatory response, despite promising indications. In accordance with our hypothesis, Zheng et al. found that the acute reaction reached a peak at 7–14 days and was negligible by 90 days [21]. Therefore, the reason for the lack of statistical significance may be explained by the natural flow of the inflammatory process [21]. On the other hand, increased numbers of foreign body giant cells formed by coalition of macrophages, which play a role in cleaning up cellular debris and foreign bodies, is a sign of an increased inflammatory reaction [22]. Low levels of CD15, which stains PMN leukocytes and foreign body giant cells, were detected in steroid-soaked meshes, and this can be interpreted as reduced tissue reaction to the mesh in this group.

Myofibroblasts, which are considered to play a pivotal role in tissue repair and remodeling, were first observed in experimental wound healing by electron microscopy. They are located in granulation tissue and exhibit bundles of microfilaments [23–25]. After any event causing tissue damage, fibroblasts in the connective tissue are converted to myofibroblasts which are responsible for remodeling and mesh integration [22]. Myofibroblasts and stem cells trigger angiogenesis and provide neovascularization [25, 26]. They help tissue integration by increasing the infiltration of multipotential cells and the integration of cells with the skeleton formed by the mesh structure [27, 28]. In accordance with this theory, we found

**Table 2** Post hoc analysis of  $p$  values

	Group comparisons					
	PVF–PVF-S	PVF–PP	PVF–PP-S	PVF-S–PP	PVF-S–PP-S	PP–PP-S
CD3	0.509	0.003*	0.999	<0.001*	0.585	0.002*
CD34	0.079	0.177	0.580	<0.001*	0.643	0.008*
CD15	0.811	0.118	1	0.014*	0.839	0.105
CD68	0.108	0.998	0.352	0.072	0.916	0.262
Inflammation	0.158	0.830	0.235	0.023*	0.997	0.039*
Foreign body reaction	0.084	0.619	0.084	0.619	1	0.619
Collagen	0.003*	0.952	0.052	0.001*	0.717	0.014*

PVF Polyvinylidene fluoride unsoaked, PVF-S Polyvinylidene fluoride steroid-soaked, PP Polypropylene unsoaked, PP-S Polypropylene steroid-soaked

\* $p < 0.05$ , with Scheffé correction

increased levels of CD34, which stains myofibroblasts and stem cells, in steroid-soaked meshes, and this may be interpreted as better tissue compatibility in this group.

Fibroblasts also play an important role in the inflammatory reaction by secreting collagen in response to macrophage stimulation. This collagen accumulates in the extracellular matrix and pore spaces, and covers the mesh fibers [28, 29]. Despite differences in inflammatory response between steroid-soaked and unsoaked meshes, we did not detect any significant ultrastructural changes between the mesh groups by electron microscopy. Thus, we suggest that steroid-soaked mesh is also well-preserved and covered by a collagen layer in the same manner and unsoaked mesh without any change in pore size.

It has been shown that systemic steroid therapy reduces collagen deposition and the inflammatory reaction [14]. Similarly, in this study, we found decreased collagen deposition in steroid-soaked mesh. However, since we did not include a systemic steroid group, we could not compare steroid-soaked mesh with systemic steroid treatment. Indeed, it is not possible to use systemic steroids for long periods due to side effects.

In this study, we used a rat model to show tissue–mesh integration since it has been shown to be a suitable model for this application [14, 16]. Furthermore, the use of this model allowed two different mesh types to be compared in the same animal. We implanted PVF and PP meshes into same rat allowing objective comparisons. The PVF mesh was associated with a less-intense inflammatory reaction than the PP mesh, although the difference was not statistically significant for all parameters, and soaking in steroid solution before implantation further decreased the inflammatory reaction.

Our study had some limitations. First, we could not be sure about the amount of steroid attached to the mesh surface, but to optimize the process we soaked the meshes in solutions with the same steroid concentration for the same time. Second, the two types of mesh used may have different affinities for steroid. We therefore compared pore sizes only between steroid-soaked and unsoaked mesh of the same mesh type. Despite these limitations, our study is very valuable since it provides information from a direct comparison of two popular mesh types performed under standardized conditions.

In conclusion, PVF mesh is associated with a lower degree of inflammatory reaction in tissue, and in both PVF and PP meshes steroid-soaking further reduces the intensity of the inflammatory reaction without changing the pore size, leading to better tissue integration. Despite being an experimental animal study, our findings are strong enough to suggest a practical method to mitigate mesh-induced tissue reaction. Our preliminary observations may also have implications for mesh manufacturers who could consider investigating the feasibility of producing steroid-soaked meshes.

## Compliance with ethical standards

**Conflicts of interest** None.

## References

1. Ulmsten U, Petros P (1995) Intravaginal slingplasty (IVS): an ambulatory surgical procedure for treatment of female urinary incontinence. *Scand J Urol Nephrol* 29(1):75–82
2. Food and Drug Administration. FDA public health notification: serious complications associated with transvaginal placement of surgical mesh in repair of pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. Silver Spring (MD): FDA; 2008. Available at: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm061976.htm> Accessed 28 March 2016
3. Food and Drug Administration. FDA safety communication: UPDATE on serious complications associated with transvaginal placement of surgical mesh for pelvic organ prolapse. Silver Spring (MD): FDA; 2011. Available at: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm262435.htm>. Accessed 28 March 2016
4. Committee on Gynecologic Practice (2011) Committee Opinion no. 513: vaginal placement of synthetic mesh for pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 118:1459–1464
5. Finamore PS, Echols KT, Hunter K, Goldstein HB, Holzberg AS, Vakili B (2010) Risk factors for mesh erosion 3 months following vaginal reconstructive surgery using commercial kits vs. fashioned mesh-augmented vaginal repairs. *Int Urogynecol J* 21:285–291
6. Jakus SM, Shapiro A, Hall CD (2008) Biologic and synthetic graft use in pelvic surgery: a review. *Obstet Gynecol Surv* 63(4):253–266
7. Gerullis H, Klosterhalfen B, Borós M, Lammers B, Eimer C, Georgas E, Otto T (2013) IDEAL in meshes for prolapse, urinary incontinence, and hernia repair. *Surg Innov* 20(5):502–508
8. Krause HG, Galloway SJ, Khoo SK, Lourie R, Goh JT (2006) Biocompatible properties of surgical mesh using an animal model. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46(1):42–45
9. Yildirim A, Basok EK, Gulpinar T, Gurbuz C, Zemheri E, Tokuc R (2005) Tissue reactions of 5 sling materials and tissue material detachment strength of 4 synthetic mesh materials in a rabbit model. *J Urol* 174(5):2037–2040
10. Kurtz J, Rael B, Lerma J, Wright C, Khraishi T, Auyang ED (2015) Effects of reactive oxygen species on the physical properties of polypropylene surgical mesh at various concentrations: a model for inflammatory reaction as a cause for mesh embrittlement and failure. *Surg Endosc*. doi:10.1007/s00464-015-4646-3
11. Sternshuss G, Ostergard D, Patel H (2012) Post-implantation alteration of polypropylene in the human. *J Urol* 188(1):27–32
12. Costello CR, Bachman SL, Ramshaw BJ, Grant SA (2007) Materials characterization of explanted polypropylene hernia meshes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83(1):44–49
13. Costello CR, Bachman SL, Grant SA, Cleveland DS, Loy TS, Ramshaw BJ (2007) Characterization of heavyweight and lightweight polypropylene prosthetic mesh explants from a single patient. *Surg Innov* 14(3):168–176
14. Karabulut A, Akyer SP, Abban Mete G, Sahin B (2014) Effects of menopause, diabetes mellitus and steroid use on type I mesh-induced tissue reaction in a rat model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 179:27–31
15. Sadava EE, Krpata DM, Gao Y, Novitsky YW, Rosen MJ (2013) Does presoaking synthetic mesh in antibiotic solution reduce mesh infections? An experimental study. *J Gastrointest Surg* 17(3):562–568

16. Dias FG, Prudente A, Siniscalchi RT, de Vidal BC, Riccetto CL (2015) Can highly purified collagen coating modulate polypropylene mesh immune-inflammatory and fibroblastic reactions? Immunohistochemical analysis in a rat model. *Int Urogynecol J* 26(4):569–576
17. Barski D, Gerullis H, Georgas E, Bär A, Lammers B, Ramon A, Ysebaert D, Klosterhalfen B, Boros M, Otto T (2014) Coating of mesh grafts for prolapse and urinary incontinence repair with autologous plasma: exploration stage of a surgical innovation. *Biomed Res Int* 2014:296498
18. Gerullis H, Georgas E, Borós M, Klosterhalfen B, Eimer C, Arndt C, Otto S, Barski D, Ysebaert D, Ramon A, Otto T (2014) Inflammatory reaction as determinant of foreign body reaction is an early and susceptible event after mesh implantation. *Biomed Res Int* 2014:510807
19. Dabrowiecki S, Svanes K, Lekven J, Gronk K (1991) Tissue reaction to polypropylene mesh: a study of oedema, blood flow, and inflammation in the abdominal wall. *Eur Surg Res* 23(3-4):240–313
20. Klinge U, Dietz U, Fet N, Klosterhalfen B (2014) Characterisation of the cellular infiltrate in the foreign body granuloma of textile meshes with its impact on collagen deposition. *Hernia* 18(4):571–578
21. Zheng F, Lin Y, Verbeken E, Claerhout F, Fastrez M, De Ridder D, Deprest J (2004) Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model. *Am J Obstet Gynecol* 191(6):1961–1970
22. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20(2):86–100
23. Jiang YL, Dai AG, Li QF, Hu RC (2006) Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38(1):29–36
24. Yi B, Chen L, Zeng J, Cui J, Wang G, Qian G, Belguise K, Wang X, Lu K (2015) Ezrin regulating the cytoskeleton remodeling is required for hypoxia-induced myofibroblast proliferation and migration. *Front Cardiovasc Med* 3(2):10. doi:10.3389/fcvm.2015.00010, eCollection 2015
25. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 6(7):301–311
26. Vong S, Kalluri R (2011) The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer* 2(12):1139–1145
27. Tredget EE (2007) The basis of fibrosis and wound healing disorders following thermal injury. *J Trauma* 62(6 Suppl):S69
28. Shafiq M, Jung Y, Kim SH (2015) Stem cell recruitment, angiogenesis, and tissue regeneration in substance P-conjugated poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) nonwoven meshes. *J Biomed Mater Res A* 103(8):2673–2688
29. Earle DB, Mark LA (2008) Prosthetic material in inguinal hernia repair: how do I choose? *Surg Clin North Am* 88(1):179–201