

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA PREKONSEPSİYONEL FOLİK ASİT
TAKVİYESİNİN İMPLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ELİF SEDA ÖZDEMİR**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÇİĞDEM ELMAS**

**ANKARA
ARALIK 2021**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA PREKONSEPSİYONEL FOLİK ASİT
TAKVİYESİNİN İMPLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ELİF SEDA ÖZDEMİR**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÇİĞDEM ELMAS**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2020-46 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
ARALIK 2021**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
GRAFİKLER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR VE SEMBOLLER	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Uterus Gelişimi.....	2
2.2. Uterus Anatomisi	3
2.3. Uterus Histolojisi.....	5
2.3.1. Perimetrium	5
2.3.2. Miyometriyum	6
2.3.3. Endometriyum	7
2.3.3.1. Endometriyumun Reseptivite Kazanması	11
2.4. İmplantasyon	14
2.4.1. Apozisyon.....	15
2.4.2. Adezyon	16
2.4.3. İnvazyon.....	17
2.5. Folik Asit.....	19
2.5.1. Gebelik ve folik asit	20
2.6. Kullanılan Antikorlar	21
2.6.1. Östrojen Reseptör Alfa.....	21
2.6.2. VEGF-A (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A)	23
2.6.3. İntegrin $\alpha V\beta 3$	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deneyisel Yöntemler.....	26
3.1.1. Deney Grupları.....	26
3.1.2. Folik Asit Eksikliği Modelinin Oluşturulması	27
3.1.3. Folik Asit Takviyelerinin Verilmesi	27

3.1.4. Deneklerin Östrus Sikluslarının Belirlenmesi	28
3.1.5. Deneklerin Katıma Alınması Ve Çiftleşme Kontrolü.....	29
3.1.5. İmplantasyon Alanlarının Toplanması	30
3.2. Histokimyasal Yöntemler	32
3.2.1. Histokimyasal Analiz için Dokuların Hazırlanması	32
3.2.2. Hematoksilen Eozin Boyama.....	33
3.2.3. Masson'un Üçlü Boyaması.....	34
3.3. İmmunohistokimyasal Analizler	36
3.3.1. Semikantitatif İmmunohistokimyasal Analiz	38
3.4. Gen İfade Düzeyi Belirlenmesine Yönelik Yöntemler	39
3.4.1. Rat Uterus Dokusundan Total RNA'nın Elde Edilmesi.....	39
3.4.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (RT-PCR)	40
3.4.3. RT-PCR için Otomatik Isı Döngüsü Programı.....	41
3.4.4. Gen ifade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi	41
3.4.5. Light-Cycler (LC) Deney Programı	42
3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Deneklerin Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	44
4.2. Deneklerin Uterin Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	45
4.3. Folik Asit Düzeylerinin Değerlendirilmesi	46
4.4. Histokimyasal Boyama Analizleri	48
4.5. İmmunohistokimyasal Analizler.....	62
4.6. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	77
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ.....	89
7. KAYNAKLAR.....	91
8. ÖZET	100
9. SUMMARY	102

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimi, tecrübesi, her zaman olumlu ve destekleyici yaklaşımıyla, tez sürecimde kapısını her çaldığımda bıkmadan, usanmadan ilgilendiği ve her zaman destek olup cesaretlendirdiği, hep daha iyisini yapabileceğime inandığı için, Anabilim Dalı Başkanımız ve çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimlerini ve deneyimlerini paylaştıkları için saygı değer hocalarım, Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU, Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN'a, katkıları ve desteği için değerli hocam Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Eğitimim boyunca her zaman yol gösterici olan, bu sürece hep farklı bir bakış açısı katan Öğr. Gör. Dr. S. Esra ÖZKOÇER'e, asistanlığım boyunca dostluğunu ve desteğini hiç esirgemeyen Araş. Gör. M. Şeyma CEYHAN'a, tez çalışmamdaki katkıları ve yardımı için Araş. Gör. Deniz İrem BULUT'a, ve uzmanlık eğitimimde yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman arkamda olup, beni desteklediklerini hep hissettiren sevgili ailem; annem Ayşe BİLGİÇ'e, babam Nadir BİLGİÇ'e, ablam Aysel BAYRAM'a ve kardeşim Recep BİLGİÇ'e,

Son olarak her zorluğu birlikte aştığım sevgili eşim, yol arkadaşım Mesut ÖZDEMİR'e sevgisi ve özverisi için, yaşam enerjisiyle bana da güç verdiği ve yüzümde hep bir tebessüm olmasını sağladığı için çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

<i>Şekil 1. Dişi üreme sistemi şematik çizimi</i>	5
<i>Şekil 2. Endometriyum bazal ve fonksiyonel katmanlarıyla, arter ve venlerine ait şematik çizim</i>	8
<i>Şekil 3. Blastosist implantasyonunda moleküler mekanizmalara ait çizimler</i>	18

RESİMLER DİZİNİ

<i>Resim 1. Deneklere ait siklus evrelerinin mikroskopik görüntüleri</i>	30
<i>Resim 2. Gebelik kontrolü ve implantasyon alan tespitine yönelik makroskopik ve mikroskopik yöntemlere ait görüntüler</i>	31
<i>Resim 3. Kontrol grubu Hematoksilen Eozin boyaması.</i>	50
<i>Resim 4. Kontrol grubu Masson'un üçlü boyaması</i>	51
<i>Resim 5. Düşük doz takviye grubu H&E boyaması.</i>	53
<i>Resim 6. Düşük doz takviye grubu Masson'un üçlü boyaması</i>	54
<i>Resim 7. Yüksek doz takviye grubu H&E boyaması</i>	57
<i>Resim 8. Yüksek doz takviye grubu Masson'un üçlü boyaması</i>	58
<i>Resim 9. FA Eksiklik grubu H&E boyaması</i>	60
<i>Resim 10. FA Eksiklik grubuna ait Masson'un üçlü boyaması görüntüleri</i>	61
<i>Resim 11. Kontrol grubunda ER-α tutulumu</i>	62
<i>Resim 12. Düşük doz FA takviye grubunda ER-α tutulumu</i>	63
<i>Resim 13. Yüksek doz FA takviye grubunda ER-α tutulumu</i>	64
<i>Resim 14. FA eksiklik grubunda ER-α tutulumu</i>	65

Resim 15. Kontrol grubunda VEGF-A tutulumu.....	68
Resim 16. Düşük doz FA takviye grubunda VEGF-A tutulumu.	69
Resim 17. Yüksek doz FA takviye grubunda VEGF-A tutulumu	70
Resim 18. FA eksiklik grubunda VEGF-A tutulumu.	71
Resim 19. Kontrol grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu.	73
Resim 20. Düşük doz FA takviye grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu.....	74
Resim 21. Yüksek doz FA takviye grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu	74
Resim 22. FA eksiklik grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Pappanicolaou boyama protokolü.....	29
Tablo 2. Doku takip protokolü	32
Tablo 3. Hematoksilen- Eozin boyama protokolü.....	33
Tablo 4. Masson 'un üçlü boyamasına ait protokol.....	35
Tablo 5. İmmunohistokimyasal boyama protokolü	37
Tablo 6. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.....	40
Tablo 7. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program	41
Tablo 8. Gene özgü primer dizileri ve UPL prob numaraları	42
Tablo 9. Gruplara ait kütle ve folik asit düzeylerine ait veriler	47
Tablo 10. Tüm gruplara ait, İntegrin $\alpha V\beta 3$, VEGF-A ve ER- α boyanma yüzdelilerinin ortalamaları ve standart sapmaları.....	76

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Deneklerin başlangıç vücut ağırlıkları karşılaştırması.....	44
Grafik 2. Deneklerin uterin ağırlıklarının toplam vücut ağırlıklarına oranlarının karşılaştırmalı istatistikleri	46
Grafik 3. Deneklerin folik asit değerlerinin istatistikleri.....	47
Grafik 4. ER- α pozitif hücre yüzdelere ait ortalama $\pm$ standart sapma grafiği	66
Grafik 5. VEGF-A pozitif hücre yüzdelere ait ortalama $\pm$ standart sapma grafiği.....	72
Grafik 6. İntegrin $\alpha V\beta 3$ pozitif hücre yüzdelere ait ortalama $\pm$ standart sapma grafiği	76
Grafik 7. Rat uterus dokusunda ESR1, VEGFA, İntegrin αV ve İntegrin $\beta 3$ genlerinin mRNA ifade düzeylerindeki değişiklik	78

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

- α : Alfa
- β : Beta
- °C: Santigrat derece
- AA: Arkuat Arter
- AMH: Anti Müllerian Hormon
- AMZ: Anti-Mezometriyal Bölge
- B: Bezler
- cm: Santimetre
- cDNA: Tamamlayıcı DNA; Complementary DNA
- DNA: Deoksi Ribonükleik Asit
- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
- E: Epitel
- EGF: Epidermal Büyüme Faktörü; Epidermal Growth Factor
- ECLIA: Elektrokemiluminesans İmmunassay
- ER: Östrojen Reseptörü; Estrogen Receptor
- ET: Embriyo Transferi
- FA: Folik Asit
- FSH: Folikül Uyarıcı Hormon
- g: Gram
- H&E: Hematoksilen Eozin
- H₂O₂: Hidrojen peroksit
- HB-EGF: Heparin-bağlı Epidermal Büyüme Faktörü benzeri faktör; Heparin Binding EGF Like Growth Factor
- IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü; Insulin-like Growth Factor
- IGF-bp: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
- IL-2: İnterlökin-2 ; Interleukin-2
- IVF: İn Vitro Fertilizasyon
- Ko: Kollajen

- Lig.: Ligamentum
- Lp: Lamina propriya
- m-RNA: Mesajcı RNA
- mcg: mikrogram
- mg: miligram
- mg/ml: miligram/ mililitre
- ml: mililitre
- mm milimetre
- µl: mikrolitre
- µm: mikrometre
- MZ: Mezometriyal Bölge
- NK hücresi: Doğal Öldürücü Hücre; Natural Killer Cell
- NTD: Nöral Tüp Defekti
- P: Perimetriyum
- PBS: Fosfat Tamponlu Salin; Phosphate Buffered Saline
- PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- PCOS: Polikistik Over Sendromu; Polycystic Ovary Syndrome
- PDZ: Primer Desidual Zon
- RNA: Ribo Nükleik Asit
- TBF : Testis Belirleyici Faktör
- TM: Tunika Muskularis
- VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Fantörü ; Vascular Endothelial Growth Factor
- VEGF-A: Vasküler Endotelyal Büyüme Fantörü-A ; Vascular Endothelial Growth Factor-A
- VEGF-R: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
- ZP: Zona Pellusida

1. GİRİŞ

İmplantasyon, endometriyum ve blastosist arasında çok kısa süren bir pencere döneminde gerçekleşen karşılıklı etkileşimi içerir. Başarılı implantasyon, blastosist tarafından implantasyon yeterliliğinin kazanılması ile uterus endometriyumunun reseptif hal kazanması arasında eş zamanlı dönüşümü gerektirir (1). Bu olaylar, maternal hormonlar, özellikle ovaryan östrojen ve progesteron tarafından düzenlenir (2). Büyüme faktörleri, sitokinler, lipid mediyatörleri dahil olmak üzere lokal olarak üretilen sinyal molekülleri ile birlikte ovaryumdan salınan hormonların, implantasyon sürecini ortaya koymak için otokrin, parakrin ve jukstakrin etkileşimleri yoluyla işlev gördüğü bilinmektedir (1).

Beslenme ile günlük ihtiyacın bir kısmını karşılayabildiğimiz folat, gebelik öncesi ve gebelik sürecinde takviyesine ihtiyaç duyulan B grubu vitaminlerden biridir (3). Gebelik sürecinde ortaya çıkabilecek nöral tüp defekti, konjenital anomaliler gibi bir çok sorunu önlemede etkili olduğu ortaya konmuştur. Ancak folik asit takviyesinin implantasyon sürecindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda sıçanlarda prekonsepsiyonel folik asit eksikliğinin ve klinikte kullanılan farklı dozlardaki takviyesinin embriyo implantasyonuna etkisini implantasyon aşamalarında rol oynadığı bilinen Östrojen Reseptör-alfa (ER- α), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A (VEGF-A) ve İntegrin α V β 3 ile ilişkisi üzerinden ortaya koymak hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus Gelişimi

Genital sistemin gelişimi, bireyin genel cinsel farklanmasında önemli bir evredir. Embriyonun genetik olarak cinsiyeti aslında fertilizasyonda belirlenmiş olsa da, embriyoda morfolojik ve fenotipik olarak gelişimin 7. haftasından önce erkeğe ve dişiye ait özellikler henüz farklanmamıştır. Gelişimin farklanmamış evresi denilen bu evrede embriyonun cinsiyetinin temel göstergesi morfolojik olarak cinsiyet kromatininin (Barr cisimciği) varlığı veya yokluğudur. Barr cisimciği hücrede X kromozomlarından birinin inaktivasyonu ile oluşur (4).

Cinsiyet farklanması, çok sayıda genin rol aldığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu farklanmanın temel belirleyicisi kısa kolunda SRY genini bulunduran Y kromozomudur. SRY geni, Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge olarak bilinir. Bu genin kodladığı protein, henüz rudimenter durumda olan genital organların gelişimini belirleyen genleri aktive eder. SRY proteini olarak da bilinen bu transkripsiyon faktörüne testis belirleyici faktör (TBF) adı verilir (5).

Farklanmamış evrede hem dişide hem erkekte iki çift genital kanal bulunur. Bunlar paramezonefrik (mullerian) kanallar ve mezonefrik (wolfian) kanallardır. TBF varlığında bu kanallar erkek yönünde, yokluğunda dişi yönünde gelişir (5).

XY cinsiyet kromozomuna sahip erkek embriyoda, paramezonefrik kanallar sertoli hücresinden salınan Anti Müllerian Hormon (AMH) etkisinde büyük çoğunlukla dejenere olur. XX cinsiyet kromozomuna sahip dişi embriyoda

fetal yaşamın 7. haftasında, Y kromozomu ve dolayısıyla bu kromozomda bulunan SRY geni bulunmadığından, mezonefrik kanallar gerilerken paramezonefrik kanallar gelişimini sürdürür. Östrojen varlığı ile testosteron ve AMH olmaması paramezonefrik kanalların gelişimini uyarır (5).

Prenatal dönemde cinsiyet farklanmasında dişi embriyoda östrojenlerin varlığı oldukça önemli rol oynar. Paramezonefrik (mullerian) kanallardan östrojenlerin etkisi ile fallopian tüpler, uterus, serviks uteri ve vajenin üst kısımları gelişir. Gelişimin 8. haftasında paramezonefrik kanallar kranial parçadan kısmen birleşir. Birleşen kranial uçlar, ileride endometriyum epitelinin oluştur ve çevre mezoderm de miyometriyuma farklılar. Sonuç olarak füzyonun tamamlanması ile uterusu oluşur. Paramezonefrik kanalların birleşmeyen kranial kısımlarından tuba uterinalar, birleşen kısımların kaudalinden ise vajenin üst üçte birlik bölümü gelişir (5, 6).

İnsanda uterus başta iki boynuzlu yapıdadır. Gelişimin ilerlemesiyle son şeklini alır. Bazen bu gelişim iki boynuzlu evrede kalabilir. Ancak normalde iki boynuz arasında bulunan mezenkim çoğalır ve uterusun, erişkinde gördüğümüz armut benzeri şekli ortaya çıkar (7).

2.2. Uterus Anatomisi

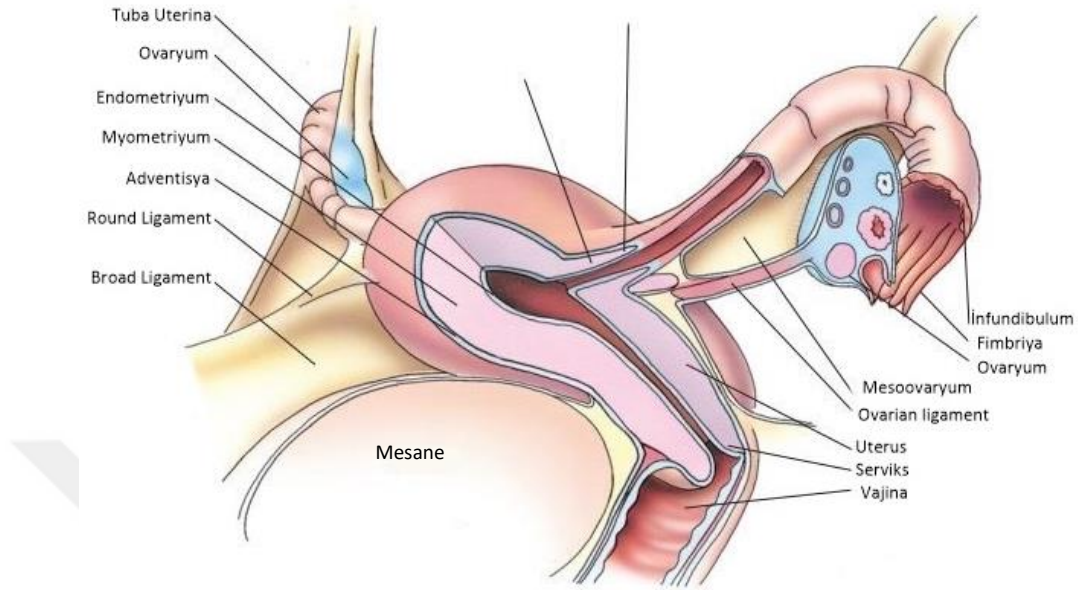
Uterus; pelvis boşluğunda rektumun önünde, mesanenin arkasında yerleşmiş, nullipar (doğum yapmamış) kadınlarda yaklaşık 30-40 gram ağırlığında, uzunluğu yaklaşık 7,5 cm, üst kısmında genişliği 5 cm olan, armut

şeklinde, içi boş bir organdır. Ligamentum latum uteri adı verilen periton yaprakları arasında, genellikle anteversiyon ve antefleksiyon pozisyonunda bulunur. Lümeni yassıdır. Yukarıda tuba uterinalar, aşağıda vajina ile devamlılık gösterir (8, 9) (Şekil 1).

Anatomik olarak gövde (korpus) ve serviks olmak üzere iki bölgeye ayrılmıştır. Gövde kısmı uterusun büyük bölümünü oluşturan üst kısımdır. Tuba uterinaların uterusu giriş yaptığı kısımlarına cornu uteri adı verilir. Ligamentum utero ovaricum ve ligamentum teres uteri adı verilen uterin ligamentler cornu uterilere tutunur. Gövdenin, serviksin hemen üstünde kalan dar bölümüne isthmus uteri denirken, tuba uterinalar ile bağlantı bölgelerinin üstünde bulunan, yuvarlak, genişleyen tepe parçası fundus olarak adlandırılır. Corpus uteri içerisinde yaklaşık 6 cm genişliğinde cavitas uteri adı verilen bir boşluk bulunur. Organın boyutuna oranla boşluğun küçük olması uterus duvarının kalın olmasından kaynaklanmaktadır (10).

Serviks silindir biçimli, isthmus ile uterus gövdesinden ayrılan kısımdır. Serviks uteri her iki ucunda açıklıkları bulunan, servikal kanal denilen bir lümene sahiptir. İnternal ostium uterin kaviteye, eksternal ostium ise vajinaya açılmaktadır (6, 8).

Uterus; broad ligament (lig. latum uteri), round ligament (lig. teres uteri), utero-ovaryan ligament, kardinal ligament (lig. transversum cervicis) ve uterosakral ligamentlerin dahil olduğu birçok ligament tarafından desteklenir. Ayrıca ürogenital diyafram, pelvik diyafram ve perineal gövde ile de aşağıdan desteklenir (11).



Şekil 1. Dişi üreme sistemi şematik çizimi (12) (Türkçeleştirilmiştir)

2.3. Uterus Histolojisi

Uterus gövdesinde duvar yapısı üç tabakadan oluşmaktadır. Bunlar lümeniden dışarıya sırasıyla; endometriyum, miyometriyum ve bunları saran perimetriyum tabakasıdır. Duvarın esas bileşeni; endometriyum adı verilen mukoza tabakası ile örtülmüş miyometriyum tabakasıdır (8).

2.3.1. Perimetriyum

Perimetriyum dış seröz tabaka veya uterusu örten visseral periton tabakasıdır. Abdominal ve pelvik periton ile devamlılık göstermektedir. Uterus anatomik olarak öne eğimli ve mesaneye doğru uzanır pozisyonda bulunduğundan, anteriorda çoğunlukla adventisya (epitelyal örtü -diğer adıyla mezotelyum- bulunmayan bağ doku) ile örtülüdür. Bu nedenle retroperitoneal olarak sınıflandırılır. Gövdenin fundusu ve posterioru mezotelyum ve altında

elastik liflerden oluşan seroza ile örtülü olduğundan bu kısım intraperitonealdır (8).

2.3.2. Miyometriyum

Uterusun en kalın, düz kas liflerinden oluşan tabakasıdır. Birbirinden net sınırlarla ayırt edilemeyen üç düz kas tabakası vardır. Bu tabakalar;

Orta kas tabakası; büyük kan damarlarından ve lenfatiklerden zengin olması nedeniyle stratum vasculare olarak da adlandırılan bu tabaka, dairesel olarak düzenlenmiş, iç içe geçen düz kas demetlerinden oluşmuştur. En kalın tabaka olan orta kas tabakası aynı zamanda arkuat arterleri de barındırır (6, 8).

İç ve dış kas tabakaları; uzun eksene paralel, boylamasına düzenlenmiş kas demetlerinden oluşmaktadır. Uterus kontraksiyonları esnasında miyometriyumun bu üç kas tabakası birlikte fonksiyonel bir sinsityum göstererek çalışır ve lümen içeriği atılır (8).

Uterus servikse doğru daralırken, düz kas dokusu azalır ve yerini fibröz bağ dokuya bırakır. Servikse gelindiğinde miyometriyum, elastik lifler ve sadece çok az sayıda düz kas hücresi barındıran sıkı düzensiz kollajenöz bağ dokusundan oluşmaktadır. Gövdede ise elastik lifler sadece miyometriyumun dış tabakasında bulunmaktadır (6, 8).

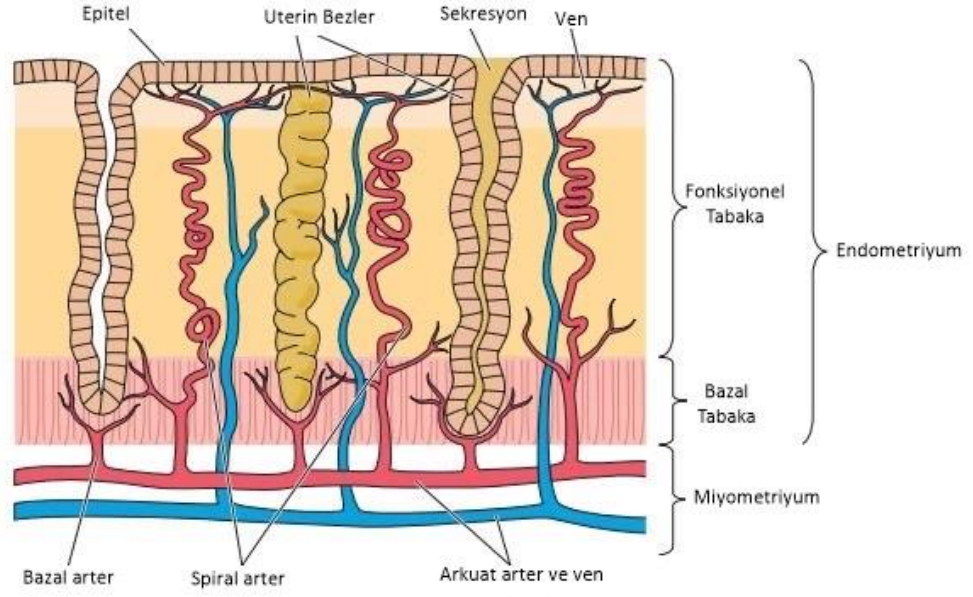
Miyometriyal düz kas hücrelerinin sayısı ve boyutları östrojen seviyelerinden etkilenir. Östrojen seviyelerinin en yüksek olduğu gebelikte uterus büyük oranda genişler. Bu genişleme gebelikte düz kaslarda hem hipertrofi hem hiperplazi ile gerçekleşir. Gebelik öncesi 50 µm boyutunda olan düz kas hücresi

bu hipertrofi ile 500 µm boyutlarına kadar ulaşır. Buna sekonder olarak diferansiye olmayan mezenkimal hücreler farklılaşmaya başlar ve mevcut kas lifleri bölünerek yeni lifleri oluşturur (8).

2.3.3. Endometriyum

Endometriyum, uterusun mukoza katmanıdır. Epitel ve lamina propriya tabakalarından oluşur. Epiteli; silyumlu hücreler ve sekretuar hücreler içeren tek katlı prizmatik epiteldir. Epitel, lamina propriyada bez yapılarıyla devamlılık gösterir. Uterus bezleri adı verilen bu yapılar bazal kısımları dallanma gösteren basit tübüler bezlerdir. Glandüler hücreler yüzey epitelindekilere benzese de silier hücreler bulunmaz. Bez yapıları arasında bağ dokusu stroma bulunur. Lamina propriya; yıldız şekilli oval nükleuslu hücreler, makrofajlar, granüler lökositler gibi bağ dokusu hücrelerinin yanı sıra retiküler lifler gibi bağ dokusu liflerini de içerir (6, 8, 12).

Endometriyum yapısal ve işlevsel olarak iki tabakadan meydana gelir. Bu tabakalar, menstrüel siklus sırasında dökülen, endometriyumun kalın üst tabakası olan fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonalis) ve siklus sırasında korunan, fonksiyonel tabakanın yenilenmesi için kaynak olarak çalışan bazal tabaka (stratum bazale) olarak adlandırılmıştır (8). Fonksiyonel tabaka östrojen ve progesteron seviyelerinden ve spiral arterlerden gelen kan miktarından etkilenir. Bazal tabaka ise hormon seviyelerinden etkilenmez ve kanlanması da spiral arterlerden değil bazal arterlerden gerçekleşir (6) (Şekil 2).



Şekil 2. Endometriyum bazal ve fonksiyonel katmanlarıyla, arter ve venlerine ait şematik çizim (12). (Türkçeleştirilmiştir)

Menstrüel siklus sırasında endometriyumda meydana gelen siklik değişimler; proliferasyon dönemi, sekretuar dönem ve menstrüel dönem olarak ayrılır. Proliferasyon dönemi, bir önceki siklusun menstrüasyon döneminin bitimiyle başlayan, menstrüasyon sırasında fonksiyonel tabakanın dökülmesi sonucu geride kalan bazal tabanın hızlı bir yenilenmeye ve çoğalmaya girdiği dönemdir. Gelişmekte olan ovaryan folliküllerden salınan östrojenlerin uyarıcı etkisi altında başlar. Endometriyum kalınlığı yaklaşık 0,5-1 mm artar. Bez yapıları bazal kısımlarındaki epitelyal hücrelerden yeniden yapılır. Stromal hücreler de proliferere olup kollajen üretimi yaparlar. Endometriyum yenilenirken spiral arterler uzar, hafifçe sarmallaşır, ancak endometriyumun üst üçte birlik kısmına kadar uzanmazlar.

Sekretuar dönem, primer olarak progesteronun etkisi altındadır. Ovulasyondan 1-2 gün sonra, overlerde korpus luteum aktivitesiyle aynı zamana denk gelecek şekilde başlar. Bezlerde hipertrofi olur, stroma tabakasında ödemle birlikte endometriyum yaklaşık 5-6 mm kalınlığa ulaşır. Bez epitelinin salgısı implantasyon gerçekleşmesi olasılığına uygun olarak mukoid özellik gösteren yapıdadır ve özellikle glikojenden zengin besleyici özelliğe sahiptir. Bez epitel hücrelerinde glikojen birikimi başta özellikle bazal kısımlarda yoğunlaşmıştır ve bezler testere dişi görünümündedir. Sekretuar evrenin sonlarına doğru glikojen birikimi apikale doğru kaymıştır ve bez lümenlerinde salgı mevcuttur. Bu dönemde mitoz proliferatif evredeki kadar aktif değildir. Büyüme, epitelyal hipertrofi, damarlanma artışı ve ödem sonucu gerçekleşir. Spiral arterler bu dönemde uzar ve daha da sarmal hale gelerek endometriyum yüzeyine kadar uzanır. Spiral arterlerin etrafındaki stroma hücreleri büyür ve desidua benzeri görünüm kazanır. Spiral arterlerin etrafında görülen mitotik aktivite de desidual reaksiyonun bir göstergesidir (6, 8).

Embriyo implantasyonuna hazırlanan endometriyumda fibroblast benzeri stroma hücrelerinin epitel benzeri dönüşümüyle desidua hücreleri ortaya çıkar. Bu dönüşüm için gerekli olan uyaran blastosistin implante olmaya başlamasıdır, östrojen ve progesteron da bu dönüşüme aracılık eder. Sonuç olarak büyük, glikojen ve lipitten zengin hücreler ortaya çıkar (6, 8). Sinsityotrofoblastlara yakın olan maternal kısımdaki desidua hücreleri dejenere olarak içeriğindeki glikojen ve lipitleri salgırlar. Bu özellikleriyle trofoblast invazyonunu düzenlemenin yanında embriyonun besin ihtiyacını da karşıladıkları ortaya çıkmaktadır. Bunlara

ek olarak desidua reaksiyon embriyo gelişiminde immun koruyucu rol üstlenir. Prostaglandin gibi immune sistemi baskılayıcı ajanlar sentezleyerek, doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktive olmasını önler. Desidua reaksiyonuyla birlikte endometriyal stromaya sızan lökositler de interlökin-2 (IL-2) salgılayarak maternal dokuda embriyo reddinin önlenmesine katkı sağlar. Embriyo da sinsityotrofoblast hücrelerinden doku reddinin oluşması için gerekli olan histokompatibilite kompleksi (doku uyumluluk kompleksi) sınıf II'yi ifade etmez. Bunun sonucunda da sinsityotrofoblastlar maternal CD4+ T hücrelerine antijen sunamaz (6).

Desidua hücreleri, insulin benzeri büyüme faktörleri (IGF) ile ürettikleri insulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGF-bp) aracılığıyla bağlanırlar. Bu bağlanma sonucu IGF'ler endometriyal hücrelerdeki proliferatif etkisini gösteremez. Desidua hücrelerinin gebeliğin sürdürülmesi sürecinde de rolü vardır. Korpus luteumun devamlılığını sağlayan hipofiz kaynaklı prolaktinle ilişkili desidua prolaktinini salgılar (6).

Fertilizasyon olmasa dahi korpus luteumun hormon salgısı yaklaşık 10 gün sürer. Bu süre sonunda özellikle progesteron seviyesindeki ani düşmeyle fonksiyonel tabakanın kanlanması değişiklik olur. Spiral arterlerin birkaç saat süren periyodik kasılmaları fonksiyonel tabakada hipoksi ve iskemi ile sonuçlanır. Stromal ödemin de azalması ile endometriyum büzüşür. Yaklaşık 48 saatlik bir sürenin sonunda, uzun süreli kasılmalar ve azalmış kan akımı nedeniyle arter duvarlarında rüptürler meydana gelir, kanama başlar. Spiral arterlerin rüptürüyle lamina propriya kanla dolar. Bu kanamaya nekroza gitmiş endometriyum dokusu

ve bezlerin sekresyonları da eklenir. Yaklaşık 5 gün süren bu sürece menstruasyon dönemi denir (6, 8).

Siklusun bu üç dönemi periyodik olarak gebelik oluşmadığı sürece 28 günde bir tekrarlanır. Fertilizasyon gerçekleşir ve bu süreç implantasyon ile sonuçlanır ise endometriyumun gerilemesi gebelik sonuna kalır (8).

2.3.3.1. Endometriyumun Reseptivite Kazanması

Endometriyal reseptivite; embriyoya, tutunma, invazyon ve gelişim imkanı sağlayan, yeni bir canlı oluşumu ile sonuçlanması beklenen karmaşık bir süreçtir. Endometriyum 'implantasyon penceresi' adı verilen çok kısa bir zaman dilimi içinde blastosist implantasyonu için reseptiftir. Embriyo aslında birçok dokuya kolayca implante olabilecek kapasitededir ancak endometriyumun bu dar implantasyon penceresi dışında embriyonun implantasyonunu engelleme yeteneği benzersizdir (13). Uterin reseptivite hassas bir koreografi ve dengeyle ortaya çıkan bir dizi hücresel ve moleküler olay aracılığıyla oluşturulur (14).

Midluteal fazda, östrojen ve progesteronun belirli bir düzende ortaya koydukları aktiviteleri ile normal reseptivite oluşur (15). Östrojen reseptör alfa (ER- α) ifadesindeki azalma, reseptivitenin oluşumunu belirleyici kritik bir olay olarak görülmektedir (16-18).

Endometriyal reseptivite ile birlikte blastosist trofoektodermi, endometriyum epitelyal hücrelerine bağlanıp daha sonra endometriyal stroma ve damarlara invaze olma periyoduna girer (19). Endometriyal reseptivite ya hep ya hiç prensibine uyan bir oluşum göstermez. Tamamen bozulmuş implantasyon

(inferitlite), ciddi derecede bozulmuş implantasyon (düşükler) ve preeklampside olduğu gibi hafif derecede bozulmuş implantasyon ve invazyon gibi farklı şiddetlerde ortaya çıkabilir. Reseptiviteyi bozan faktörler tam olarak aydınlatılmış olmasa da endokrin nedenler, inflamatuvar olaylar, ince endometriyum, polipler ve immunolojik nedenlerin bu olayda etkili olduğu bilinmektedir (20).

Ovulasyondan sonraki 7-8. günlerde endometriyumun implantasyon hazırlığı ovaryan steroidler aracılığıyla gerçekleşir. Proliferatif evrede baskın hormon östrojen, sekretuar evrede endometriyumda belirleyici etkiye sahip hormon progesterondur. Östrojen, endometriyum luminal epitelinde, glanduler epitelinde ve stromasında mitotik aktiviteyi hızlandırır, implantasyon hazırlığı için fonksiyonel tabakayı kalınlaştırır. Progesteron ise endometriyum bez yapıları ve arterlerde uzama ve kıvrımlanmaya sebep olurken, stromada damarlanma artışı ve ödeme sebep olarak desidualizasyonu sağlar (21). Desidual hücreler, embriyo invazyonunun düzenlenmesi, embriyo gelişiminin desteklenmesi, immun yanıtın düzenlenmesi ve anjiyogenezin desteklenmesi için sitokin ve büyüme faktörleri sağlamak gibi görevlere sahiptir. Endometriyumun reseptif hale gelmesi progesteron ve östrojenin planlı ve koordineli etkinliklerine bağlıdır (22). Progesteron ifadesi, endometriyum hücrelerinde ER- α aracılığıyla uyarılır bu nedenle östrojen; luteal evrede progesteron yanıtı için gereklidir. Bu durumun aksine progesteron, nukleer reseptörleri aracılığıyla, ER- α ifadesini inhibe etmektedir. Östrojen ve progesteronun koordineli hareket etmesiyle, implantasyon alanında endometriyal vasküler geçirgenlikte artış gözlenir (5, 23).

İmplantasyondan önce, endometriyum yüzey epitelinde anlamlı

değişiklikler gerçekleşmektedir. Epitel hücrelerinde apikal-bazal polaritede azalma olur, özgün gap-junction (oluklu bağlantı) yapıları oluşur, sıkı bağlantılar ve desmozomlar azalır, hücreler yassı hale gelir, mikrovillus yapıları kaybolarak yerini pinopodlara bırakır. Progesteron artışıyla müsin tabakası ortadan kalkar, apikal yüzeyde E-kadherin ve integrinler eksprese olur (24, 25).

Ovaryan steroidlerin etkisindeki uterusun implantasyona duyarlılığı; pre-reseptif, reseptif ve non-reseptif dönem şeklinde programlanır. Pre-reseptif dönemde endometriyum ovaryan steroidlerin kontrolündedir ve epitelyal değişimler izlenir. Stromada ise progesteron bağımlı morfolojik değişimler gözlenir, bu durum 'ön desidualizasyon' olarak adlandırılır. Küçük bir östrojen piki ile endometriyum, embriyo ile bağlanma (adhezyon) yeteneği kazanır ve böylece reseptif döneme girer. Lüminal epitel hücrelerin mikrovillusları kaybolup pinopodların gelişmesi ile endometriyumda blastosist adhezyonu sonucunda stromal hücreler polipoid şekilli stromal hücrelere farklanarak desidualizasyonu ortaya koyar. Reseptif dönem geçicidir, embriyo implantasyonu ile sonuçlanmazsa uterus non-reseptif döneme girer, "implantasyon penceresi" de böylelikle sonlanır (26).

Endometriyal reseptivite gelişiminde morfolojik belirteç pinopodların oluşumudur. Pinopodların ifadesi implantasyonun pencere döneminde kısa süreli olarak en yüksek seviyede görülmektedir. Pinopodların yüzeyinde blastosistin adezyonu için gerekli reseptörler bulunmaktadır. Pinopodlar progesterona bağımlı olarak işlev görürler, mid-luteal evrede yükselen progesteron seviyeleriyle ilk ortaya çıkışları arasında ilişki görülmüştür. Bunun yanında, endometriyal

reseptivite için gerekli homeobox geni (HOXA-10) pinopodların gelişmesinde önemli rol oynar (27).

2.4. İmplantasyon

Gebeliğin 4. gününde blastosist uterin boşluğu dolduran sıvı içinde serbest haldedir. Bu dönemde ovaryan kaynaklı östrojen ve progesteronun koordineli etkisi sonucunda, implantasyon bölgesinde vasküler geçirgenlik artışı dahil implantasyon için gerekli uterin reseptivite oluşturulur. Gebeliğin 5. gününde zona pellusidasından ayrılan blastosistin polar trofoblastları endometriyal hücrelerle karşı karşıya gelir. Blastosist zona pellusidasından ayrılamazsa embriyo implantasyonu gerçekleşemez (6).

Endometriyumun, zona pellusidasında ayrılmış embriyoyu kabul etmesi süreci 'implantasyon penceresi' olarak adlandırılır. Yaklaşık 4 gün süren bu süreç endometriyum ve blastosist arasında karşılıklı iletişimi içerir. Başarılı bir implantasyon döneminden söz edebilmek için büyüyüp gelişen bir embriyo, implantasyonu sağlamak üzere gerekli değişiklikleri geçiren ve reseptivite kazanmış endometriyumun yanı sıra blastosist ve endometriyum arasındaki bilgi alış-verişinin (cross-talk) başarılı bir şekilde sağlanması gerekir. Endometriyum ve embriyonun aktif olarak katıldığı eş zamanlı, dinamik bir karşı karşıya gelme süreci sonucunda embriyonun endometriyuma başta stabil olmayan tutunmasını, stabil bir tutunmanın sağlanması ve ardından gömülmesi olayları izler. Bu olay 3 evrede gerçekleşir (6, 8).

2.4.1. Apozisyon

Blastosistin endometriyum yüzeyine başta stabil olmayan tutunmasına apozisyon adı verilmektedir. Fertilizasyondan sonra yaklaşık 6. günde implantasyonun gerçekleşeceği yer belirlenir ve embriyo bu bölgeye yaklaşır. Bu aşamadaki implante blastosist yaklaşık 250 hücreli yapıdadır ve hücrelerin çoğunu blastosist boşluğunu çevreleyen dış çeper ve iç hücre kitlesi oluşturur (28). Apozisyon döneminde, hem endometriyumdan hem de embriyodan eş zamanlı bir çok mediator salınmaktadır. Bu medyatörler uterusu reseptif hale getirerek, implantasyonun gerçekleşmesine destek olurlar (6, 29).

Apozisyon fazı başlamadan, stromada ödem görülür. Bu stromal ödem; uterin lümen daralmasıyla, trofoektodermin mikrovillusları ile luminal epitelde pinopodların birbirine yaklaşmasını sağlar (30).

İmplantasyon, trofoblastların apikal membranlarının, endometriyum lüminal epitelinin apikal hücre membranlarına kararlı olmayan tutulmasıyla başlamaktadır. Bu durum paradoksik bir fenomen olarak değerlendirilmiştir, çünkü epitelin apikal membranları normalde non-adheziv olarak tanımlanmaktadır (28). Buna rağmen implantasyon penceresi içinde kısa bir zaman diliminde adeziv yapıdadırlar. Bu aşamadan itibaren, uterin epitel hücreleri oldukça sekretuar hale gelir. Bağlanmadan önce dahi blastosisti etkileyebilecek çeşitli medyatörler uterus lumenine sekrete edilir (31). Uterus ve embriyodan medyatörler eş zamanlı olarak salınırlar (32). Hem trofoektoderm için hem uterin epitel hücreleri için bir çok hücre adezyon molekülü ortaya konmuştur. Ancak güncel durumda bu alandaki bilgiler özellikle feto-maternal arayüzdeki immunolojik tanımayı açıklamak için

yeterli değildir (33).

2.4.2. Adezyon

Adezyon (yapışma,tutunma) blastosistin embriyoblast kutbundaki (iç hücre kitlesinin bulunduğu taraf) trofoblastlardan gerçekleştirilir. Trofoblastik hücreler adezyon molekülleri aracılığı ile endometriyum luminal epiteline tutunur. Endometriyal epitel hücrelerinin apikal kısımları heparin bağlı epidermal büyüme faktörü benzeri faktör (HB-EGF) ile kaplanmıştır. HB-EGF'nin membrana bağlı ve çözülebilir olmak üzere iki formu bulunur. Trofoblast hücrelerinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R) otofosforile olur ve heparan sülfat proteoglikan (perlekan) HB-EGF'ye sıkıca tutunur. Reseptif fazda morfolojik belirteç olarak kabul edilen pinopodlar, embriyo için bağlanma bölgeleri oluşturarak bu süreçte rol alır (6, 34) (Şekil 3). Bir karbonhidrat bağlayıcı protein olan L-selektinin de blastosistlerinin uterin epitele ilk tutunmasına aracılık eden bir sistemin parçası olarak öne sürülmüştür. Hematopoietik hücrelerde ifadesi bilinen L-selektinin trofblastlarda da ifadesine rastlanmaktadır. L-selektinin ligandı olan oligosakkaritler, endometriyum lüminal epitelinin apikal yüzündeki pinopodlarda bulunmaktadır (35).

İmplantasyon sürecinin bu evresinde uterin epitel hücresi apikal plazma membranı ve trofoblast hücresi plazma membranı aralarında 20 nm mesafe olacak şekilde paralel olarak yerleşirler. İki membran yüzeyinde de ekspresyonu artan adezyon molekülleri ile ligandları aracılığıyla fetüs ve maternal dokular arasında etkileşim meydana gelir. Bu etkileşim sürecinde adezyon moleküllerinden olan integrinler ön plana çıkmaktadır. Hem trofoblastik hücre yüzeyinde hem de

lüminal epitel hücre yüzeylerinde eksprese edilen $\alpha V\beta 3$ integrin ve bunun ligandı olan osteopontin, implantasyonun ilk hücre-hücre etkileşmesinde görev almaktadır (36). Bunlardan $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 5\beta 5$, $\alpha 6\beta 4$ gibi integrinler de adezyon aşamasında rol alan diğer moleküllerdir (1).

Epiteldeki değişimlerin yanında stroma tabakasında desidualizasyon görülür. Desidual hücreler çoğalarak primer desidual zon (PDZ) oluştururlar. Fibronektin, entaktin, laminin , kollajen tip I, III, IV ve V primer desidual zonun bileşenleridir. İmplantasyon alanında bölgesel damar geçirgenliği izlenir (6).

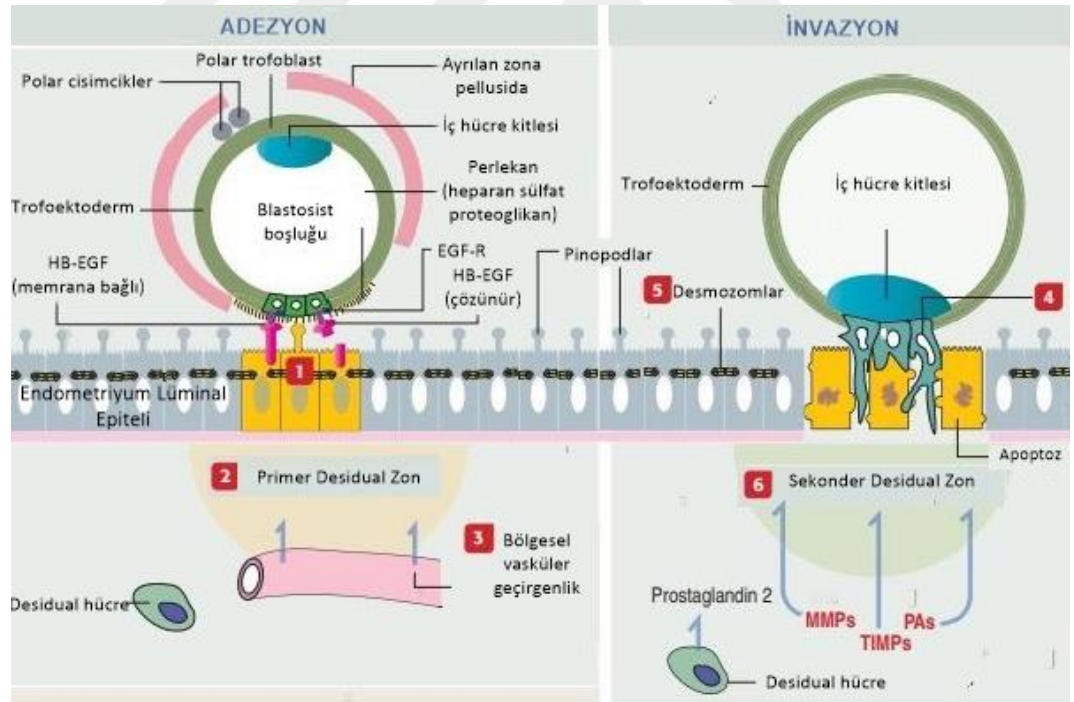
Blastosist gelişiminde temel rol oynayan E-kadherinin adezyon boyunca trofoektodermden ekspresyonu yüksek seviyelerde iken, lüminal epitel yüzeyinden diğer bağlantı elemanları eksprese olur. E-kadherinler de integrinler gibi hücre-hücre etkileşimlerinde aktif rol oynayarak adezyon sürecine dahil olurlar (37).

2.4.3. İnvazyon

Blastosistin adezyonunun ardından invazyonun gerçekleşmesi implantasyonun başarılı olması için şarttır. Embriyoda polar trofoblastlar, uterin luminal epitelin bazal membranını aşarak altındaki stromaya geçer ve uterin vasküler yapılara ulaşır (38). İnvazyon, apoptoza uğrayan endometriyal hücreleri birbirlerine bağlayan desmozomların sayısındaki azalma ile kolaylaştırılır. Primer desidual zon, metalloproteinazların da etkisiyle implante olan embrioyu da içeren sekonder desidual zona dönüşür. Blastosist, fertilizasyondan sonraki 10. günde endometriyuma gömülür (6).

İmplantasyon bölgesindeki endometriyum stroması ödemlidir ve vaskularitesi artmıştır. Büyük ve kıvrımları artmış bez yapılarından, bol glikojen ve mukus salgısı olur. Blastosist daha derinlere gömülürken, penetrasyon sırasında endometriyum yüzey epitelinde oluşan defektif alan fibrin tıkaçı yardımıyla kapatılır (5).

Blastosist gelişiminin yaklaşık 11 ve 12. Günlerine geldiğinde uterusu tamamen gömülmüştür ve endometriyum yüzey epitelindeki defekt tamamen örtülmüştür. Artık sadece uterus lümenine taşan bir kabartı şeklinde farkedilir haldedir (5).



Şekil 3. Blastosist implantasyonunda moleküler mekanizmalara ait şematik çizimler (6). (Türkçeleştirilmiştir)

2.5. Folik Asit

Folik asit; suda çözünen, insan vücudu için esansiyel olan B grubu vitaminlerden folatın (B9 vitamini) sentetik türevidir. Latinceye yaprak anlamına gelen ‘folium’ kelimesinden gelmektedir, bu da yeşil yapraklı sebzelerde bol bulunmasından ileri gelmektedir (39-41). Folat, hem bitkisel hem hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunmaktadır. Aminoasit ve nukleik asit metabolizmalarında görev alan önemli bir koenzimdir (42).

Folat besinlerle alındığında; 5-metiltetrahidrofolat, 10-formiltetrahidrofolat ve bunların poliglutamat formlarını içerir. İntestinal sistemde poliglutamatların Emilimi için folat konjugaz enzimi ile monoglutamatlara hidrolize edilmektedir ve bu reaksiyon folat Emiliminde hız kısıtlayıcı basamaktır (43, 44). Folat enterositlerin lümene bakan membranları boyunca membran pH gradiyentinin tersine yürütülen iyon değişimi mekanizmasıyla (aktif transport) taşınır. Emilim daha çok proksimalde olmak üzere tüm jejunumda olur (45, 46). Emilimden sonra, monoglutamat türevleri portal sisteme geçer. Bunlar ya karaciğerde tekrar poliglutamat türevlerine dönüştürülüp bu şekilde depolanır ya da dolaşıma salınır (43). Plazmada folat taşınması esas olarak albümine bağlanarak gerçekleşir, hücresel transportu ise çok sayıda folat transport sistemi ile gerçekleştirilir (47, 48).

Folat; doğal olarak koyu yeşil yapraklı sebzeler, kuru baklagiller, yumurta, karaciğer gibi besinlerde bulunur. Folik asit, doğal gıdalarda daha nadir bulunur ancak daha aktif ve daha fazla absorbe olan formdur (49-51).

Folat, tek karbon metabolizmasında transfer reaksiyonlarında koenzim görevi görür. Özellikle timidin, pürin sentezi ve aminoasit metabolizmasında kilit rol oynayarak, DNA sentezi ve RNA sentezinde önemli role sahiptir (49, 50). Folatın özellikle, maternal ve fetal fizyolojide DNA sentezinde metilasyon reaksiyonlarında ve hücre bölünmesinde etkinliği bilinmektedir (52).

2.5.1. Gebelik ve folik asit

Gebelik, insanların hayatları boyunca beslenmenin ve besinlerin en önemli olarak görüldüğü dönemlerden biridir (53). Bu dönem, annenin aldığı besin düzeyi ve kalitesi annenin kendi sağlığının yanında embriyo ve fetüsün sağlığı açısından da oldukça önemlidir (54). Gebelikte artan bu fetal besin ögesi ihtiyacı karşılanmalıdır (55). Gebelikte, uteroplesantal ve fetal büyüme, gelişmenin artması sonucunda folat ihtiyacı da artmaktadır (50, 56). Bu artışın sebebi olarak, gebelerde artan doku sentezi ve diğer fizyolojik değişimler bildirilmektedir (57). Artan bu folat ihtiyacının tek başına diyetle karşılanması mümkün olmadığı için gebelere folik asit takviyesi tüm dünyada önerilmektedir (52, 58). Gebelik süresince, hatta mümkünse daha öncesinde nöral tüp defektleri (NTD), anemi gibi sağlık problemlerini önlemek amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), doğurganlık çağındaki her kadına 400 mcg/gün ya da haftada bir 2800 mcg folik asit takviyesi ve folattan zengin beslenme önermektedir (3, 59). Daha önceki gebeliğinde NTD'li bebek öyküsü olan kadınlarda daha sonraki gebeliklerinde bu riski azaltmak amacıyla ilaç ya da tedavi dozu olarak bildirilen 4-5 mg/gün folik asit takviyesi önerilmektedir (60). Gebelik planlamasında, planlanan gebelik öncesi

folik asit takviyesine başlanması (400mcg/gün) ve mutlaka gebeliğin birinci trimesteri boyunca kullanmaya devam edilmesi gerekmektedir (40).

Prekonsepsiyonel folik asit takviyesinin NTD insidansını yeni ve tekrarlayan vakalarda azalttığı yıllar öncesinde gösterebilmiş olsa da, gebelikteki diğer etkileriyle ilgili veriler daha yenidir (61). Bebeğin doğum sırasındaki ağırlığı ve doğum zamanı, gelişim süreciyle ve ilerideki sağlık durumu ile ilişkilendirilmiştir (62). Serum folat düzeylerinin gebelikte düşük olması, düşük doğum ağırlığı ve erken doğum olayları ile ilişkili bulunmuştur, folatın fazla alınmasının ise bazı yayınlarda, gebelik haftasına göre iri doğum insidansını arttırabileceği öne sürülmüştür (63, 64). Ancak bu durumlar genelde gebeliğin ilk trimesterinden sonra kullanılmaya devam edilen folik asit takviyesi ile ilişkilendirilmiştir (58, 62).

Peri-konsepsiyonel kullanılan bir takviye olmasına rağmen, gebeliğin oluşumundaki etkileriyle ilgili çok fazla veri bulunmamaktadır. Folik asit eksikliği embriyogenezin ilk günlerinde implantasyon üzerine etki gösterebilir (65).

2.6. Kullanılan Antikorlar

2.6.1. Östrojen Reseptör Alfa

Östrojen, hedefindeki dokuya ulaştığında etki göstermek için hücredeki kendine özgü reseptörlerine bağlanmalıdır. Bu söz konusu etkinin oluşması için membranda ya da çekirdekte lokalize olmuş reseptörlerine bağlanır (66).

Östrojenin hedef organlardaki baskın etkisinin çekirdekteki östrojen reseptörleri (ER) aracılığıyla olduğu kabul edilmektedir (67).

Östrojenin biyolojik etkilerine homolog olmayan kromozomlar üzerinde bulunan ESR1 ve ESR2 tarafından kodlanan iki farklı ER proteini aracılık eder. Bunlar sırasıyla, ER- α ve ER- β olarak tanımlanır. ER- α 'nın baskın olarak ifade edildiği dokular; en yüksek seviyelere sahip uterus ve hipofiz gibi dokular ve bunun yanında karaciğer, hipotalamus, kemik, meme bezleri, serviks ve vajina yer alır. ER- β ise daha az dokuda ifade edilir, bunlar; ovaryum, akciğer, kardiyovasküler sistem ve prostat gibi dokulardır. ER- β özellikle ovaryumda yüksek seviyelerdedir ve sadece granüloza hücrelerinde bulunmaktadır (68, 69).

2.6.1.1. ER- α ve İmplantasyon

Normal endometriyumda, östrojen etkisinin birincil aracısı olan ER- α 'nın ifadesi, ER- β 'ninkinden anlamlı olarak yüksektir (70). ER- α 'nın endometriyal düzeyleri menstrüel sıklusa göre module edilir (71).

Çok sayıda sinyal molekülü uterin reseptivitenin oluşumunda kilit rol oynamaktadır. ESR-1 (ER- α) de bu süreçte önemli moleküler belirteçlerdendir (72). ESR-1 geninin anormal ekspresyonu, uterin reseptivitede bozulmaya ve spontan düşüklere neden olabilmektedir (73). ESR-1 geni baskılanmış farelerde, overlerin hiperstimulasyonu ve hipoplastik uterus nedeniyle infertiliteye neden olabildiği gösterilmiştir (74).

Polikistik over sendromu olan hastalarda ESR-1'in endometriyumda ifadesi azalmış ve buna zayıf endometriyal reseptivite, düşük gebelik oranları ve yüksek seviyelerde spontan düşükler eşlik etmektedir (75).

2.6.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A (VEGF-A)

VEGF, endotel hücrelerine özgü güçlü mitojenik aktiviteye sahip ayrıca endotel hücrelerini uyararak angiogenezi teşvik eden çoklu fonksiyona sahip büyüme faktörü ailesidir. VEGF hem vaskulogenez hem de yetişkinlerde anjiyogenezin oluşumu için gereklidir. Damarlanmada kritik rol oynarken bunun yanında embriyogenezis, yara iyileşmesi, miyokardiyal iskemi, tümör büyümesi ve metastazı gibi bir çok olayda da rol alır. Vasküler permeabiliteyi de uyarabildiği için 'vasküler permeabilite faktörü' de denmektedir (76).

VEGF ailesinin; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü olmak üzere beş üyesi bulunmaktadır (77). VEGF-A, her ikisi de endometriyum glandüler epitelin apikalinde yerleşmiş, iki tirozin kinaz reseptörü (VEGFR1 ve VEGFR2) aracılığıyla bağlanarak sinyal verir (78).

2.6.2.1. VEGF-A ve İmplantasyon

VEGF-A, hem endometriyal hem epitelyal hücrelerde ifade edilir (78). Endometriyal VEGF-A, adezyon molekülü $\alpha V\beta 3$ integrin aracılığıyla endotel hücrelerinin mitojenik aktivitesini arttırmaktadır (79, 80).

VEGF, farelerde gebeliğin 1. ve 2. günlerinde lümen epitelinde ifade edilirken, 3. günde stromal hücrelerde zayıf bir ifadesi gözlenmektedir. 5. günde

blastosisti çevreleyen lüminal epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde ifadesi gözlenmektedir. 6. ve 8. günler arasında desidual yataktaki hücrelerde birikim gözlenmektedir (81).

VEGF ile indüklenen anjiyogenez, embriyonun implantasyonu için gereklidir. Reseptörleri de ovulasyon sonrası ve peri-implantif dönemde belirgin şekilde artış göstermektedir (82, 83). VEGF ifadesi implantasyonun erken döneminde artmaktadır ve plasental büyüme faktörüyle beraber gebelik oluşum sürecinde önemli role sahiptir. Embriyogenez sırasında anormal ifade edilen VEGF reseptörleri sonucu embriyo kaybıyla karşılaşılmalıdır (84).

Östrojen VEGF 'nin salgılanmasını ve içinde VEGF bulunan hücrelerin sayısını arttırmaktadır (85).

2.6.3. İntegrin $\alpha V\beta 3$

İntegrinler, temel olarak bütün hücrelerin yüzeyinde lokalize olmuş heterodimerik yapıda glikoproteinlerdir (86). Adezyon moleküllerinin bu sınıfı hem endometriyumda, hem de embriyoda tanımlanmıştır (87-90). İntegrin $\alpha V\beta 3$ 'ün implantasyon penceresi döneminde artması bu aşamada önemli rol oynayabileceğine yönelik çalışmaları arttırmıştır (91). Yokluğu ise özellikle bazı infertilite tipleri; luteal faz defekti, endometriyozis, hidrosalfinks ve açıklanamayan infertilite ile ilişkili bulunmuştur (91-93).

2.6.3.1. İntegrin $\alpha V\beta 3$ ve İmplantasyon

İntegrin $\alpha V\beta 3$, insanda embriyo implantasyonuna denk gelen post-ovulatuvar 5-6. günlerde ortaya çıkmaktadır. Bu integrin, endometriyal reseptivitenin potansiyel bir belirteci olarak incelendiğinde ve bazı infertil kadınlarda endometriyum epitelinde anormal ifadesi gözlenmiştir (94).

Östrojen endometriyal epitelde $\alpha V\beta 3$ ekspresyonunu inhibe ediyor gibi görünmektedir (17). Polikistik Over Sendromu (PCOS) ve endometriyozisi olan kadınlarda yapılan çalışma implantasyon sırasında ER- α seviyeleri yüksek saptanmıştır ve her iki grupta da ER- α 'nın yüksek ifadesi, endometriyal reseptivitenin belirteçlerinden biri olan $\alpha V\beta 3$ integrinin ifadesindeki azalma ile ilişkilendirilmektedir (16, 95).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun G.Ü.ET-20.062 sayılı onayıyla, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme Ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, 8-10 haftalık, Wistar Albino cinsi 32 dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, rastgele 4 gruba ayrıldı, 12 saat karanlık/ 12 saat aydınlık döngüsünde 22-24 °C sıcaklıkta içme suyuna serbest erişecek şekilde barındırıldı.

3.1. Deneysel Yöntemler

3.1.1. Deney Grupları

Kontrol Grubu: Bu gruptaki sıçanlar 5 hafta boyunca 2 mg/kg Folik asit (FA) içeren standart rodent yemi ile beslendi.

Düşük Doz Folik Asit Takviye Grubu: Bu gruptaki sıçanlar 2 mg/kg FA içeren standart rodent yemi ile beslendi. Buna ek olarak rat gereksiniminin 2,5 katı olan, 5 mg/kg/gün folik asit (FA) (Sigma F7876) takviyesi 5 hafta boyunca gavaj yoluyla verildi (65).

Yüksek Doz Folik Asit Takviye Grubu: Bu gruptaki sıçanlar 2 mg/kg Folik asit içeren standart rodent yemi ile beslendi. Gebe ratlarda normal gereksinimin 20 katı olan 40 mg/kg/gün FA takviyesi (Sigma F7876) 5 hafta boyunca gavaj yoluyla verildi (65).

Folik Asit Eksiklik Grubu: Bu gruptaki hayvanlar folik asit içermeyen özel rodent yemi (Safe Diets-U8958, Fransa) ile 5 hafta beslendi. Bağırsak florasında folik asit üretimini önlemek amacıyla 1 mg/kg/gün Suksinilsulfatiazol (MP Biomedicals, cat. no:102976) gavaj yolu ile verildi (73, 96).

3.1.2.Folik Asit Eksikliği Modelinin Oluşturulması

Folik asit eksikliği modeli oluşturmak için bu gruptaki sıçanlar katıma alınmadan önce 5 hafta boyunca folik asit içermeyen standart rat yemi (Safe Diets-U8958, Fransa) ile beslendi. Bağırsak florasındaki mikroorganizmaların folik asit sentezin önlemek amacıyla günlük 1 mg/kg olacak şekilde Suksinilsulfatiazol (MP Biomedicals, cat no:102976) gavajla verildi. Folat eksikliği modelinin kontrolü için ratların serum folik asit seviyeleri deney sonunda elektrokemiluminesans immünassay (ECLIA) ile ölçüldü.

3.1.3.Folik Asit Takviyelerinin Verilmesi

Folik asit takviyesi verilen gruplarda katıma alınmadan önce düşük doz grubundaki her bir rat 5 mg/kg/gün, yüksek doz grubundaki her bir rat 40 mg/kg/gün FA alacak şekilde günlük olarak gavaj yoluyla verildi. Takviyelerin etkisini saptamak için ratların serum folik asit seviyeleri ECLIA yöntemi ile ölçüldü.

3.1.4.Deneklerin Östrus Sikluslarının Belirlenmesi

Deneklerden 4. haftanın bitiminden itibaren sikluslarının belirlenmesi amacıyla vajinal smear örnekleri toplandı. Smearler her gün sabah aynı saatte serum fizyolojik ile ıslatılıp fazlası alınan eküvyon çubuğu yardımıyla alındı. Lam üzerine yayılan hücrelerin kuruması beklenmeden üzerlerine alkol bazlı fiksatif sprey (Atom Scientific, RRSP50/B) püskürtülerek hızla fikse olması sağlandı. Tüm örneklerin toplanmasını takiben Papanicolaou boyaması için örnekler %96'lık alkole alındı. Ardından 2 dakika distile suda tutulan yaymalara Harris Hematoksilen ile 1 dakika çekirdek boyaması yapıldı, akarsu altında boyanın fazlası alınarak 15 saniye % 96'lık alkole daldırıldı. Orange G6 boyası ile 2 dakika boyunca boyandı ve tekrar %96'lık alkole alınarak bu defa 2 tekrar 15'er saniye bekletildi. EA 50 solüsyonunda 5 dakika sitoplazma boyaması sağlandıktan sonra %96 alkole 15 saniye alındı. İki tekrar 30 saniye %100 alkole alındıktan sonra entellanla kapama için 2'şer dakika 2 tekrar ksilende boyama sonlandırıldı (Tablo 1).

Boyanan preparatlar mikroskop altında incelendi. Hücreler; çekirdekli süperfisyal hücreler, çekirdeksiz kornifiye hücreler ve nötrofiller olarak sınıflandırıldı. Bulunan hücreye ve yoğunluğuna göre siklus; proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olarak evrelendirildi,. Küçük yuvarlak çekirdekli hücrelerin yoğun olarak bulunduğu, bu hücrelerin üzüm salkımı benzeri kümeler oluşturduğu evre proöstrus olarak değerlendirildi. Yoğun olarak kornifiye, çekideksiz keratinize epitel hücrelerinin varlığı ile karakterize olan evre ise östrus olarak değerlendirildi. Bu iki evrede sıklıkla nötrofil bulunmaması ya da nadiren

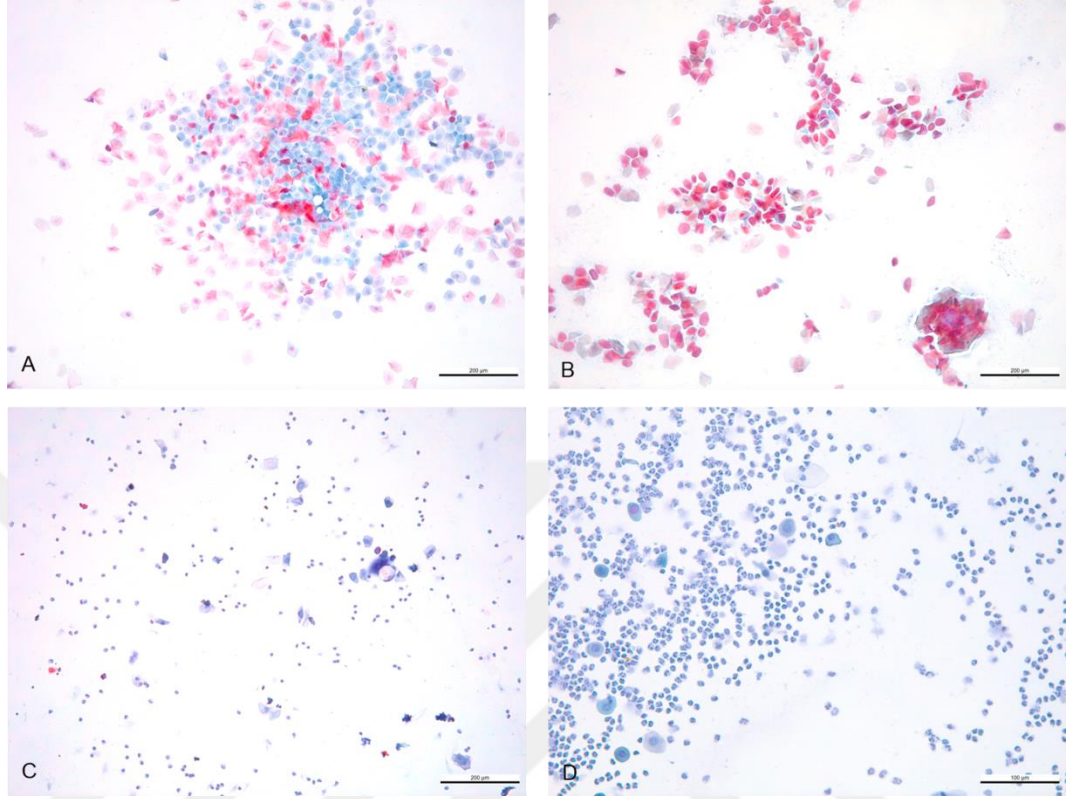
görülmesi dikkate alındı. Çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri ile nötrofillerin eşit ya da epitel hücrelerinin sayıca baskın bulunduğu evre metöstrus olarak sınıflandırıldı. Diöstrus evresinde ise nötrofillerin baskınlığı esas alındı (97). (Resim 1)

Tablo 1. Pappanicolaou boyama protokolü

PAPPANICOLAOU BOYAMASI	
Madde	Süre
%96 etanol	2 dakika
Distile su	2 dakika
Harris hematoक्सilen	1 dakika
Akar su	5 dakika
%96 etanol	15 saniye
Orange G6 solüsyonu	2 dakika
%96 etanol	15 saniye x 2 tekrar
EA 50 solüsyonu	5 dakika
%96 etanol	15 saniye
%100 etanol	30 saniye x 2 tekrar
Ksilen	2 dakika x 2 tekrar
Entellan	

3.1.5. Deneklerin Katıma Alınması Ve Çiftleşme Kontrolü

Östrusta olduğu tespit edilen dişilerin yanına erkek sıçanlar konularak 24 saat katıma alındı. Ertesi gün tekrar smear örnekleri alınarak Pappanicolaou boyaması aynı protokolle gerçekleştirildi ve bu defa smearlerde sperm bakıldı. Makroskobik olarak vajinal plak görülen denekler ve smealde spermatozoa görülen denekler gebeliğin 1. gününde kabul edildi. (Resim 2. A ve B)

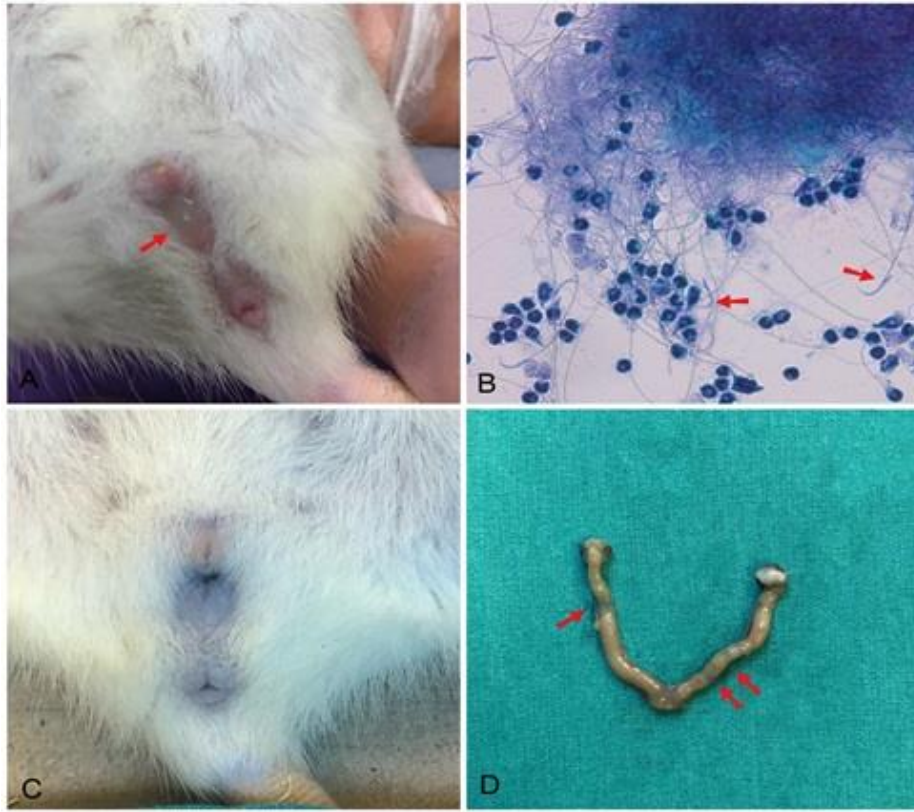


Resim 1. Deneklere ait siklus evrelerinin mikroskopik görüntüleri. A. Çekirdekli süperfisyel hücrelerin bulunduğu proöstrus evresi. B. Çekirdeğini kaybetmiş keratinize hücrelerle karakterize östrus evresi. C. Nötrofiller ve keratinize hücrelerin birlikte bulunduğu metöstrus evresi. D. Yoğun nötrofil lökositlerin görüldüğü diöstrus evresi.

3.1.5.İmplantasyon Alanlarının Toplanması

Sıçanlarda gebeliğin implantasyon günü olduğu bilinen 5. gününde, sakrifikasyondan önce folik asit ölçümü için kan alındı, ardından implantasyon alanlarının belirlenmesi amacıyla Evan's Blue boya enjeksiyonu yapıldı. Vital boyama için Evan's Blue % 0,9'luk serum fizyolojik içinde çözülerek % 1'lik boya çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,25 ml sakrifikasyondan önce kuyruk veninden enjekte edildi. Boya enjeksiyonundan sonra mukozalarda renk değişikliği gözlemlendi (Resim 2. C). Enjeksiyondan 30 dk sonra denekler sakrifiye edilerek uterus dokuları alındı. İmplantasyon alanları mavi bantlar şeklinde

Evan's Blue ile boyanmış halde gözlendi (Resim 2. D). İmplantasyon alanları disseke edilerek PCR analizi için sıvı nitrojene, histokimyasal analizler için %10'luk nötral formaline alındı. Kontrol grubunda 5 denek, düşük doz ve eksiklik gruplarında 6, yüksek doz grubunda ise 7 denek gebe kaldı.



Resim 2. Gebelik kontrolü ve implantasyon alan tespitine yönelik makroskobik ve mikroskobik yöntemlere ait görüntüler. A. Katımı takip eden günde izlenen vajinal plak B. Vajinal smearde izlenen rat spermleri. C. Evan's blue boya enjeksiyonu sonrası mukozalarda izlenen renk değişimi. D. Uterus dokusunda mavi bantlar şeklinde izlenen implantasyon alanları.

3.2. Histokimyasal Yöntemler

3.2.1. Histokimyasal Analiz için Dokuların Hazırlanması

24 saat %10'luk nötral formalinde tespit edilen dokular yıkama aşamasından sonra rutin doku takip protokolüne tabi tutuldu. Artan alkol serilerinden geçirildikten sonra sırasıyla ksilol, yarı yarıya ksilol-parafin karışımıyla hazırlanan solüsyondan geçirilerek parafin içinde infiltrasyon sağlandı (Tablo 2). Takibin ardından dokular parafin içine gömülerek parafin bloklar elde edildi.

Tablo 2. Doku takip protokolü

DOKU TAKİP PROTOKOLÜ		
Aşama	Madde	Süre
Fiksasyon	%10 nötral formalin	24 saat
Fiksatiften arındırma	Akarsu	16 saat
Dehidratasyon	%70 Etanol	1 saat
	%70 Etanol	1 saat
	%80 Etanol	1 saat
	%80 Etanol	1 gece
	%96 Etanol	1 saat
	%100 etanol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilol	40-45 dakika
	Ksilol/Parafin karışımı (%50 / %50) etüv	15 dakika
	Sıvı Parafin (etüvde)	3 saat

3.2.2. Hematoksilen Eozin Boyama

Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon için 57°C etüvde bir gece bekletildi. Ardından 3 tekrar ksilene alındıktan sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek suya alındı. 10 dakika Harris Hematoksilen'e alınan kesitlerin nükleer boyanması sağlandı, daha sonra akar suda 10 dakika yıkanarak boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Ardından asit solüsyonunda 3-4 dip yapıp tekrar 10 dakika yıkamaya alındı. Eozinde 13 dakika sitoplazma boyanmasının ardından tekrar akar suya alınıp boyanın fazlası gidene kadar yıkandı. Kapama için artan alkollerden geçirilen preparatlar ksilole alınarak 20 şer dakika iki değişim ksilolden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü

HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ		
Aşama	Madde	Süre
Deparafinizasyon	57°C Etüvde	1 gece
	1.Ksilol (etüvde)	20 dakika
	2. Ksilol	20 dakika
	3.Ksilol	20 dakika
Dehidratasyon	%100 etanol	10 dakika
	%96 etanol	10 dakika
	%80 etanol	10 dakika
	%70 etanol	10 dakika
	%50 etanol	10 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Harris Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika

	%3'lük glasiyel asetik asit	4-5 dip
	Akar su	10 dakika
Boyama	Eozin	13 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	%50 etanol	1 dakika
	%70 etanol	1 dakika
	%80 etanol	1 dakika
	%96 etanol	1 dakika
	%100 etanol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	20 dakika
	Ksilol	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.2.3. Masson'un Üçlü Boyaması

Deparafinizasyon amacıyla 57°C etüvde bir gece bekletilen kesitler, ilk ksilene de etüvde alındıktan sonra etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında 2 tekrar ksilene alındı. Azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suya alındı. Kesitlere Bio-optica masson's trichrome stain – aniline blue (Biooptica, 04-010802) kiti uygulandı. Haematoxylin Weigert's A solüsyonu ve Haematoxylin Weigert's B solüsyonu eşit miktarda karıştırılıp Weigert Hematoksilen hazırlandı. Weigert's Demirli Hematoksilen boyası ile 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı. Kesitler silkelenerek pikrik asit alkol C solüsyonunda 4 dakika bekletildikten sonra distile su ile 3-4 saniye hızlıca yıkanarak ponceau asit fuksin D solüsyonuna geçildi burada da 4 dakika boyama yapıldı. Distile su ile tekrar yıkanarak fosfomolibdik asit E solüsyonu ile 10 dakika mordantlaştırıldı. Yıkama yapılmadan kesitler silkelenerek asit solüsyonu uzaklaştırıldı ve aniline blue F

solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Distile su ile yıkanarak artan alkol serilerinden hızlıca geçirildi, %100 alkolde 1 dakika tutuldu ve ksilene alınarak entellan ile kapatıldı (Tablo 4). Sonuçta nükleuslarda siyah; sitoplazma ve kasta kırmızı; kollajenlerde mavi boyanma izlendi.

Tablo 4. Masson'un üçlü boyamasına ait protokol

MASSON'UN ÜÇLÜ BOYAMASI PROTOKOLÜ		
Aşama	Madde	Süre
Deparafinizasyon	57°C Etüvde	1 gece
	1.Ksilol (etüvde)	20 dakika
	2. Ksilol	20 dakika
	3. Ksilol	20 dakika
Dehidratasyon	%100 etanol	5 dakika
	%96 etanol	5 dakika
	%80 etanol	5 dakika
	%70 etanol	5 dakika
	%50 etanol	5 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Boyama	Weigert Hematoksilen (A + B)	10 dakika
	Pikrik asit alkol solüsyonu (C)	4 dakika
Yıkama	Distile su	3-4 saniye
	Ponceau asit fuksin solüsyonu (D)	4 dakika
Yıkama	Distile su	10 saniye
	Fosfomolibdik asit solüsyonu (E)	10 dakika
	Aniline Blue Solusyonu	5 dakika

Yıkama	Distile su	5 dakika
Dehidratasyon	Artan alkol serisi %50 etanol ,%70 etanol ,%80 etanol , %96 etanol	5'er dip
	%100 etanol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	20 dakika
	Ksilol	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.3. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal analiz için uterus kesitleri 4 µm kalınlığında poly-l-lizin kaplı lamlara alındı. Kesitler 37°C etüvde bir gece bekletildikten sonra ertesi gün 57°C de 2 saat daha deparafinize edildi. İlki etüvde olacak şekilde 3 tekrar 20'şer dakika ksilole alınarak deparafinizasyon hızlandırıldı. Ksilollerden sonra 10'ar dakika azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70, %50) geçirilerek distile suya alındı. Distile suda alkolden arındırıldıktan sonra, formaldehitin kapattığı epitoplara açılmasını sağlamak için sitrat tamponunda (Thermo Scientific, AP-9003-500, Lot: MK200219) (pH:6,0) ısı ile indüklenmiş antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Retrieval işlemi tamamlandıktan sonra kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Sitratı uzaklaştırmak için 5'er dakika 2 tekrar distile suya alınan kesitlerin Pap-pen (Patolab, Pen01) ile etrafı çizilerek yıkama işlemine PBS (Phosphate Buffer Saline) (Thermo Scientific, AP-9009-10, Lot: BBI120127) (pH:7,4) ile devam edildi. Yıkamanın ardından kesitler endojen peroksit aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük hidrojen peroksit (Thermo Scientific, TA-125-H2O2Q) ile 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası

dokular PBS (pH:7,4) ile yıkandı. Özgün olmayan bağlanmaların önüne geçmek amacıyla UltraV blok solüsyonunda (Thermo Scientific, TA-125-UB) 5 dakika bekletildi. Blok işleminden sonra yıkama yapılmadan primer antikor aşamasına geçildi. ER- α (abcam, ab3575) 4 μ g/ml dilüsyonunda, VEGF-A (Bioss, bs-1665R) 1:200 ve α V β 3 (Bioss, bs-1310R) 1:100 dilüsyonunda hazırlanarak dokularla 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün lamlar PBS ile yıkanarak, 10 dakika biotinli sekonder antikor (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile etkin bırakıldı. Tekrar PBS ile yıkanarak streptavidin peroksidaz enzimi (Thermo Scientific, TS-125-HR) uygulandı. Enzimle 10 dakika inkübasyonun ardından PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra işlemler karanlıkta gerçekleştirildi. Yıkamanın ardından hazırlanan AEC kromojeni (Thermo Scientific, TA-125-HA) ile dokular etkin bırakıldı ve reaksiyon vermesi sağlandı. Zemin boyaması hematoksilen ile yapıldıktan sonra akar suda yıkanan preparatlar su bazla kapama mediumu (Thermo Scientific, TA-125-AM) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5. *İmmunohistokimyasal boyama protokolü*

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA		
Deparafinizasyon	37°C + 57°C Etüvde	1 gece + 2 saat
	1.Ksilol (etüvde)	20 dakika
	2. Ksilol	20 dakika
	3. Ksilol	20 dakika
Dehidratasyon	%100 etanol	10 dakika
	%96 etanol	10 dakika
	%80 etanol	10 dakika

	%70 etanol	10 dakika
	%50 etanol	10 dakika
Rehidratasyon	Distile su	2x 5 dakika
Antijen retrieval	Sitrat (Mikrodalgada)	3x 5 dakika
Yıkama	Distile su	2x 5 dakika
	PBS	3x 5 dakika
Dokuları sınırlama	Pap pen	
Endojen enzim bloklama	Hidrojen peroksit blok	15 dakika
Yıkama	PBS	3x 5 dakika
	UltraV blok	5 dakika
Primer Antikor	VEGF-A, ER- α , α V β 3 integrin	1 gece , +4°C
Yıkama	PBS	3x 5 dakika
Sekonder bağlanma	Sekonder biotinli anti-polivalent	10 dakika
Yıkama	PBS	3x 5 dakika
	Streptavidin peroksidaz	10 dakika
Kromojen	AEC	3, 5 ve 6 dakika
Yıkama	PBS	1-2 dakika
Zemin boyama	Harris Hematoksilen	5 saniye
Yıkama	Distile su	5 dakika
Kapama	Aqua mount	

3.3.1. Semikantitatif İmmunohistokimyasal Analiz

İmplantasyon alanından alınan kesitlerden VEGF-A, ER- α , α V β 3 integrin proteinlerinin dağılımlarını belirlemek amacıyla antikor boyaması yapıldı. Histokimyasal boyamalar sonrasında kesitler DM 4000 Leica Germany Görüntülü

Analiz Sistemleri ve ImageJ Software kullanılarak implantasyon alanlarına ait immun boyamalarda ER- α , VEGF-A ve α V β 3 integrin yüzdeleri değerlendirildi.

3.4. Gen İfade Düzeyi Belirlenmesine Yönelik Yöntemler

3.4.1. Rat Uterus Dokusundan Total RNA'nın Elde Edilmesi

Deney sonunda uterus dokularından implantasyon alanları steril bir şekilde çıkartılarak steril petri kabın alındı. Steril serum fizyolojik ile yıkanarak, steril bistüri ile RNA izolasyonuna uygun (50mg - 100mg) büyüklüklerde küçük parçalara ayrıldı. DNaz (Deoksiribonukleaz) ve RNaz (Ribonukleaz) içermeyen 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınan doku örnekleri sıvı azot içerisinde hızlı bir şekilde donduruldu. İmplantasyon alanlarına ait doku örnekleri, analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı. Uterus doku örneklerinden RNA TriFast kullanılarak RNA eldesi gerçekleştirildi.

Ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki uterus dokusu teflon uçlu homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizasyon işlemine 1000 μ l TriFast ile devam edildi. Homojenizasyon işlemi sırasında kullanılan TriFast hacminin, örnek hacminin %10'nu geçmeyecek şekilde olmasına dikkat edildi. Oda ısısında 5 dakika bekletilen örnekler daha sonra 200 μ l kloroform eklenerek 15 saniye boyunca vortekslenerek tamamen karışması sağlandı. Oda ısısında 10 dakika daha tutuldu. Sonrasında örnekler 5 dakika, 11.000 rpm'de, +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda karışım, üç faza ayrıldı; altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), ara faz ve üstte renksiz sıvı faz. Renksiz görünen üst faz

1.5 ml'lik yeni bir steril ependorf tüpüne aktararak 500 µl izopropanol eklendi ve vortekslendikten sonra örnekler 10 dakika +4 °C'de bekletildi. On dakika 11.500 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildikten sonra, pelete dokunulmadan üstte kalan süpernatant atıldı. 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 10 dakika 12.000 rpm'de yine +4 °C'de santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant atıldı. Pelet kurumaya bırakıldıktan sonra üzerine 30-50 µl RNaz içermeyen steril distile su eklendi. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.4.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (RT-PCR)

Primer olarak Random Hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 6'da verilmiştir. cDNA sentezi için Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA üzerlerine eklendi.

Tablo 6. cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

3.4.3. RT-PCR için Otomatik Isı Döngüsü Programı

Otomatik ısı döngü cihazı, Tablo 7’de belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA’lardan cDNA sentezi elde edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR’da kullanılıncaya kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı.

Tablo 7. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

3.4.4. Gen ifade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi

ESR1 (ER- α) , VEGF-A, integrin α V ve β 3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin kantitatif değerlendirmesi Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyonlar 10 μ l toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu ve LC Probe Master karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. ESR1, VEGF-A, integrin α V ve β 3 gen ifadelenme miktarlarını normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, beta actin (ACTB) genine özgü primer ve UPL probu kullanıldı ve ACTB mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi Tablo 8’de verilmiştir. Kullanılan problar Roche Diagnostic’ten temin edilmiştir. Tüm cDNA örnekleri her bir gen için en az üçer kez çalışılmıştır.

Tablo 8. Gene özgü primer dizileri ve UPL prob numaraları

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer	Prob No
ESR1	5'- TTTCTTTAAGAGAAGCATTCAAGGA -3'	5'- TTATCGATGGTGCATTGGTTT -3'	130
VEGFA	5'- TTAAACGAACGTACTTGCAGATG -3'	5'- TCTAGTTCCCGAAACCCTGA -3'	4
Integrin alpha V	5'- GCGGGAGGCAGACAATAATA -3'	5'- AGTCAAGTAAATGTGAGCTCGTC -3'	120
Integrin beta 3	5'- TGCTAAATTTGAGGAAGAACGA -3'	5'- CTTTATACAATGGGTTGTTTGCTG -3'	21
ACTB	5'-CCCGCGAGTACAACCTTCT-3'	5'CGTCATCCATGGCGAACT-3'	17

3.4.5. Light-Cycler (LC) Deney Programı

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. Kapiller tüpler 3000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra LC cihazında PCR tepkimesi gerçekleştirildi. ESR1, VEGF-A, integrin α V ve β 3, ACTB genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait ESR1, VEGF-A, integrin α V ve β 3 ve ACTB genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Cycle point (Cp) değerleri kullanılarak Pfaffl matematiksel metodu ile gruplar arasında mRNA ifade düzeylerindeki değişimler belirlendi. ACTB mRNA düzeyi ESR1, VEGF-A, integrin α V ve β 3 gen ifade düzeylerini normalize etmek amacı ile kullanıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Çalışmadaki istatistik IBM SPSS v25 kullanılarak yapılmıştır. Bütün değerler ortalama ve standart sapmalar kullanılarak ifade edilmiştir. Yapılan folik

asit düzeyi, ağırlık ölçümleri ve immunohistokimya analizlerinde değişkenler normal dağılmaması üzerine gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis H testi ile yapılmıştır. Grupların ikili karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır ve anlamlılık eşiği Bonferonni düzeltmesi ile $p<0.008$ olarak belirlenmiştir.

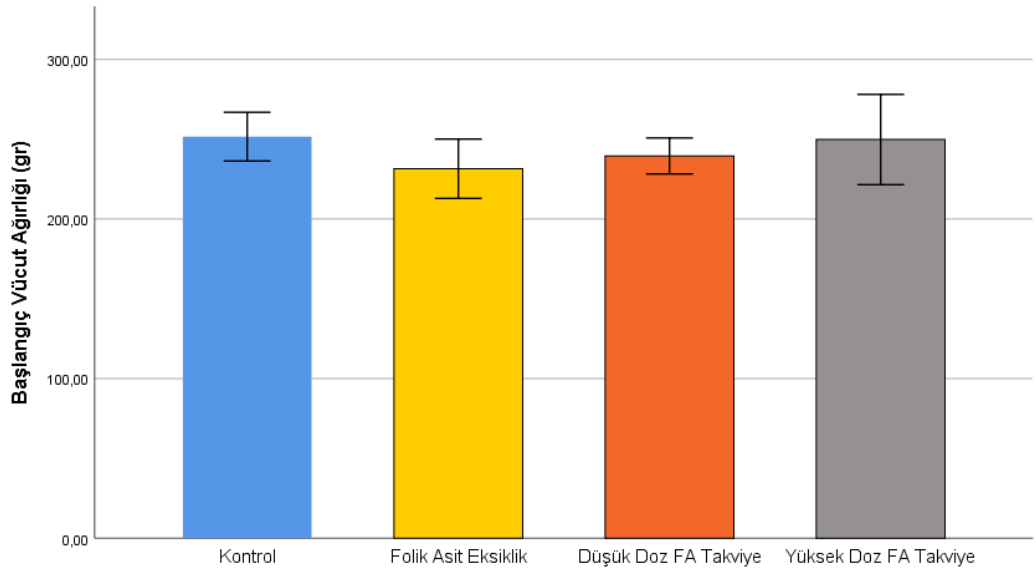
Gruplar arasında implantasyon alanını içeren uterus dokusunda folik asit eksikliği ve takviyesinde kullanılan doza bağlı olarak değişen ESR1, VEGF-A, integrin αV ve $\beta 3$ mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “Relative Expression Software Tool (REST; Qiagen, 2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı (98). 0,05’den küçük olan p değerleri ($p<0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deneklerin Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Sıçanların deney başlangıcında ve sakrifikasyon günü ağırlıkları ölçüldü. Öncelikle, gruplar arası başlangıç ağırlıkları açısından farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendime sonucunda tüm gruplara ait deney başındaki ağırlık ortalamaları sırasıyla; $251,6 \pm 15,2$; $231,5 \pm 18,;$ $239,5 \pm 11,2$; $249,8 \pm 28,25$ olarak saptandı (Şekil). Deney gruplarının başlangıçtaki ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunmadı.

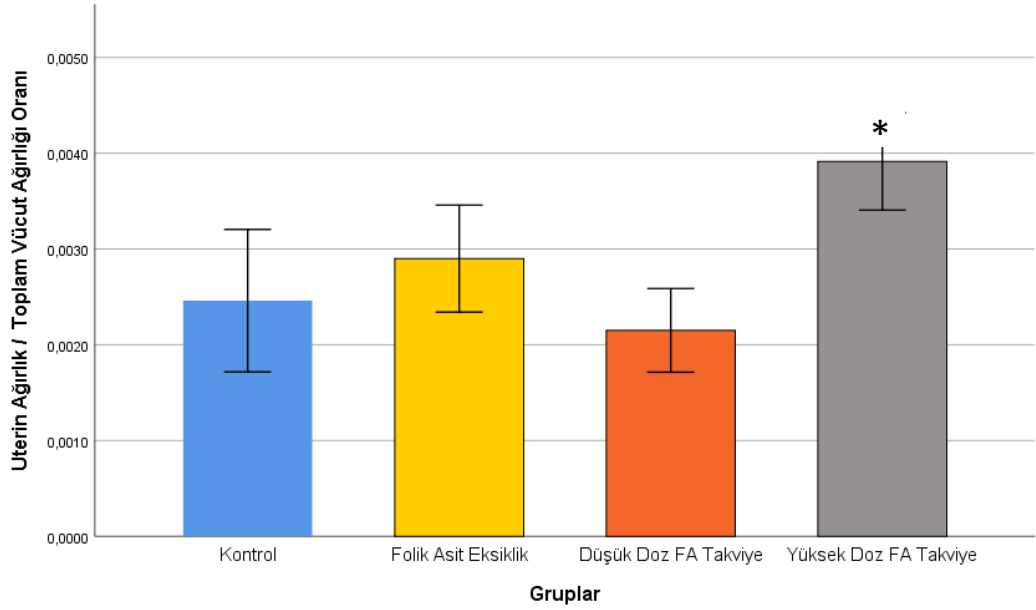
Grupların sakrifikasyon günü ölçülen ağırlıkları değerlendirildi. Sıçanların son ağırlıkları açısından fark olup olmadığının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, tüm gruplara ait son ağırlık ortalamaları sırasıyla; $254,6 \pm 27,5$; $229,3 \pm 21,9$; $247,6 \pm 8,8$; $255,5 \pm 30,0$ olarak saptandı (Tablo 9). Gruplar arası deneklerin son ağırlıkları arasında anlamlı fark izlenmedi (Grafik 1).



Grafik 1. Deneklerin başlangıç vücut ağırlıkları karşılaştırması

4.2.Deneklerin Uterin Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda bütün gruptaki sıçanların uterus dokuları tartıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede her gruba ait uterus dokusuna ait ağırlık ortalamaları sırasıyla; $0,6 \pm 0,2$; $0,6 \pm 0,1$; $0,5 \pm 0,09$; $1,0 \pm 0,1$ olarak tespit edildi. Gruplar arası uterin ağırlıklar açısından anlamlı fark saptandı. Yüksek doz FA takviyesi verilen grubun uterin ağırlıkları ortalaması diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulunurken ($p < 0,05$), diğer grupların ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark saptanmamıştır. Deneklerin uterin ağırlıklarının total vücut ağırlığından etkilenebileceği göz önünde bulundurularak her bir deneğin uterin ağırlığının toplam vücut ağırlığına oranları değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda da uterin ağırlık / toplam vücut ağırlığı oranı ortalamaları sırasıyla $0,0025 \pm 0,00074$; $0,0029 \pm ,00056$; $0,0022 \pm ,00044$; $0,0039 \pm ,00051$ olarak tespit edildi (Tablo 9). Yüksek doz FA takviyesi verilen grubun uterin ağırlık / toplam vücut ağırlığı oranları ortalaması tüm gruplara göre artmış olmasına rağmen, düşük doz takviye grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulunurken ($p = 0,003$), diğer grupların ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,008$) (Grafik 2).



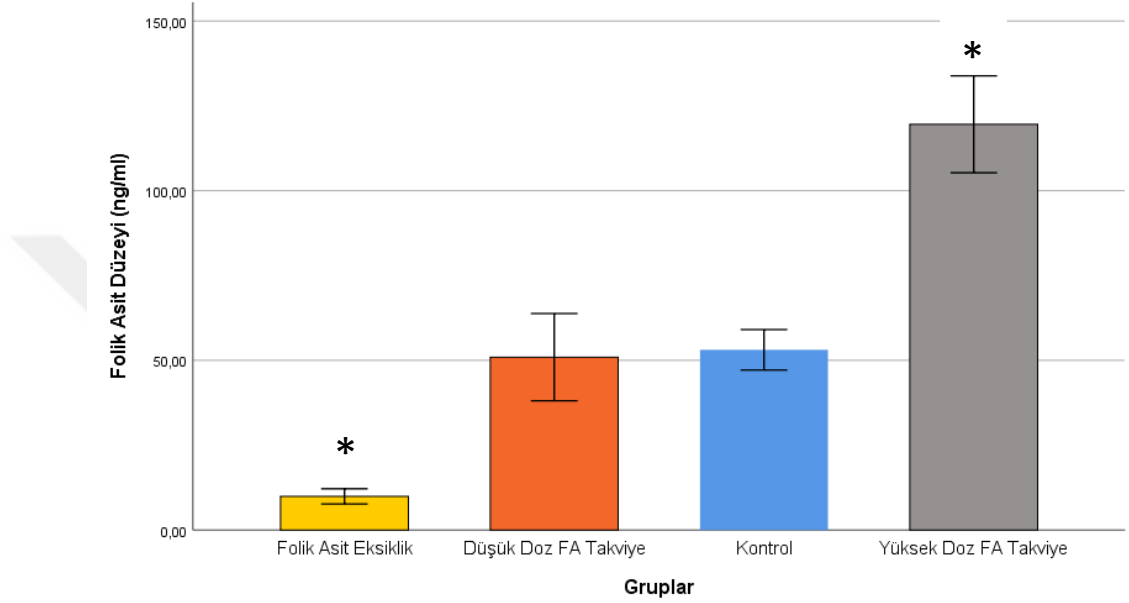
Grafik 2. Deneklerin uterin ağırlıklarının toplam vücut ağırlıklarına oranlarının karşılaştırmalı istatistikleri. *; $p = 0,003$ düşük doz takviye grubuna kıyasla

4.3.Folik Asit Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Deneklerin sakrifikasyon günü alınan kan örneklerinden yapılan Elektrokemilüminesans İmmünassay (ECLIA) analizi ile folik asit düzeyleri ölçüldü. Gruplar arası folik asit düzeyleri arasındaki farkı değerlendirmek için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda ise Scheffe testi kullanılmıştır.

Grupların folik asit seviyeleri kıyaslandığında, folik asit seviyeleri ortalamaları sırasıyla; $53,1 \pm 5,9$; $9,9 \pm 2,2$; $50,9 \pm 12,8$; $119,5 \pm 14,2$ olarak hesaplandı (Tablo 9). Gruplar birbiriyle kıyaslandığında yüksek doz (40 mg/kg/g) folik asit takviyesi verilen grubun FA düzeyi diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0,008$), folik asit eksikliği oluşturulan grupta ise diğer

gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,008$). Kontrol ve düşük doz grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Grafik 3).



Grafik 3. Deneklerin folik asit değerlerinin istatistikleri. *; $p < 0,008$ diğer gruplara kıyasla

Tablo 9. Gruplara ait kütle ve folik asit düzeylerine ait veriler

Gruplar	Başlangıç Ağırlığı (gr)	Vücut Ağırlığı (gr)	Uterin Ağırlık / Toplam vücut ağırlığı (gr/gr)	Folik Asit Düzeyi (ng/ml)
Kontrol	251,6 ± 15,2	254,6 ± 27,5	0,0025 ± 0,00074	53,1 ± 5,9
FA Eksiklik	231,5 ± 18,5	229,3 ± 21,9	0,0029 ± ,00056	9,9 ± 2,2
Düşük Doz FA Takviyesi	239,5 ± 11,2	247,6 ± 8,8	0,0022 ± ,00044	50,9 ± 12,8
Yüksek Doz FA Takviyesi	249,8 ± 28,2	255,5 ± 30,0	0,0039 ± ,00051	119,5 ± 14,2

4.4.Histokimyasal Boyama Analizleri

Kontrol grubu

Kontrol grubu H&E ve Masson'un üçlü boyaması uygulanan kesitler değerlendirildiğinde uterusun normal histolojik yapıda olduğu ve embriyo implantasyonun 5. gününe uygun histolojik bulgular sergilediği izlendi. Epitel kübikten prizmatığa değişen tek katlı epitel özelliğindedir. Epitel boyuna uygun olarak çekirdek yuvarlak ve orta yerleşimli ya da oval ve bazal yerleşimli olarak izlendi. Bazal membranın normal yapıda ve epitel altında süreklilik gösterir şekilde olduğu tespit edildi.

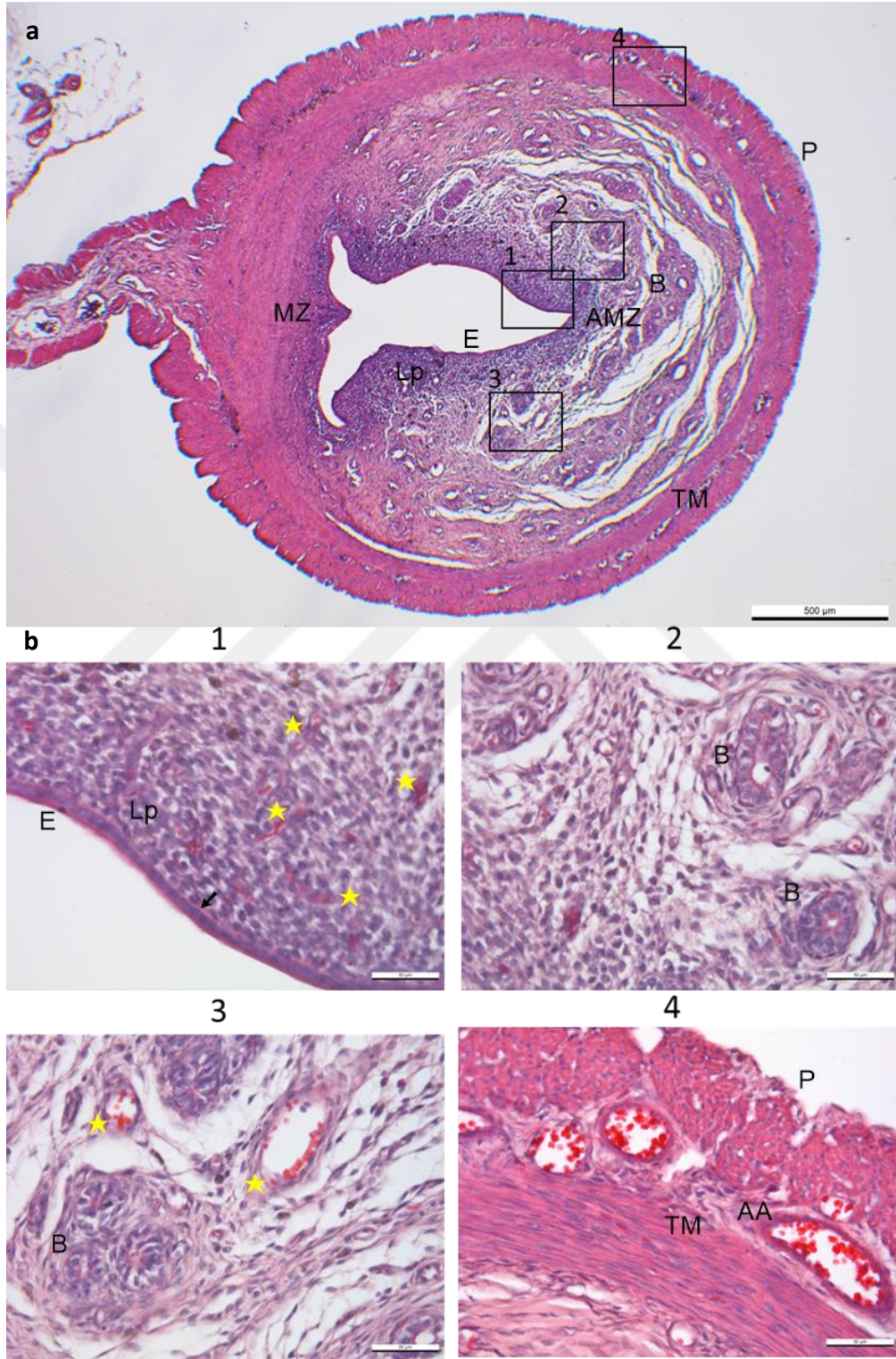
Epitelde seyrek olmakla birlikte piknotik çekirdekli yapılarıyla apoptoza giden hücreler izlenmekteydi. İmplantasyon sırasında gebeliğin 1. ve 2. günlerinden süre gelen epitel proliferasyonunun tamamlandığı izlenmekteydi ve mitotik figürlere rastlanmadı.

Lamina propriya gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Lamina propriyada neovaskülarizasyon artmış damar yapılarıyla dikkati çekmekteydi. Bezler daha çok miyometriyuma yakın yerleşimli izlenmekteydi ve bez epitel hücrelerinde seyrek de olsa piknotik çekirdekli apoptoza giden hücreler gözlendi. Yüzey epitelinde boya almayan bazı dejeneratif hücrelerin bulunduğu saptandı. Lamina proprianın fonksiyonel ve bazal endometriyum tabakalarında stromal hücrelerin de yer yer piknotik çekirdekli hücrelere de sahip olduğu gözlendi.

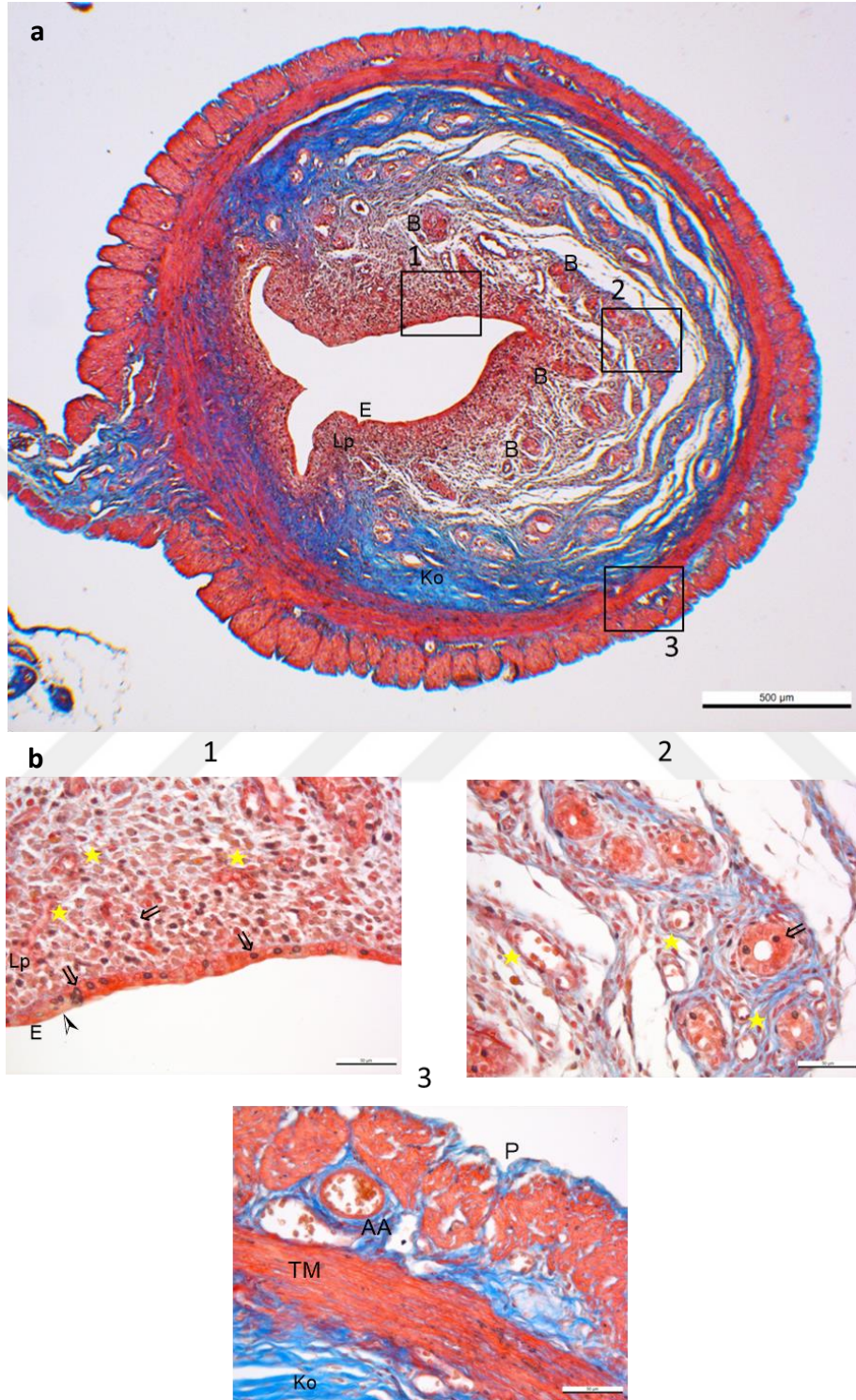
Sıçanlarda eksantrik olarak seyreden implantasyonun 5. günündeki deneklerimizde, endometriyumun antimezometriyal bölgesinde belirgin bir desidualizasyon sergilediği ve bu desidual reaksiyonun mezometriyal bölgeye doğru süreklilik gösterdiği saptandı.

Miyometriyum içte sirküler dışta longitudinal ve her ikisi arasında oblik seyreden düz kas yapılarıyla 5. gün implantasyona uygun bir şekilde artan lamina propria kalınlığı nedeniyle perimetriyuma doğru itilmiş gibi bir görünüm sergilediği ve orta tabakadaki arkuat arterlerin de oldukça belirgin olduğu izlendi. Normal yapısında izlenen perimetriyumla çevrelenmiş olduğu saptandı.

Kollajen liflerin özellikle endometriyumun bazal tabakasında oldukça yoğunlaşmış olduğu özellikle Masson'un üçlü boyamasında belirgin olarak izlendi. Kontrol grubunda ait H&E ve Masson'un üçlü boyaması örnekleri Resim 3 ve Resim 4'te verilmiştir



Resim 3. Kontrol grubu Hematoksilen Eozin boyaması. E: Epitel, (↘): Bazal Membran Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetriyum, AMZ: Antimezometriyal Bölge, MZ: Mezometriyal bölge, AA: Arkuat Arter, (*): vasküler yapılar. a (40x), b (400x)



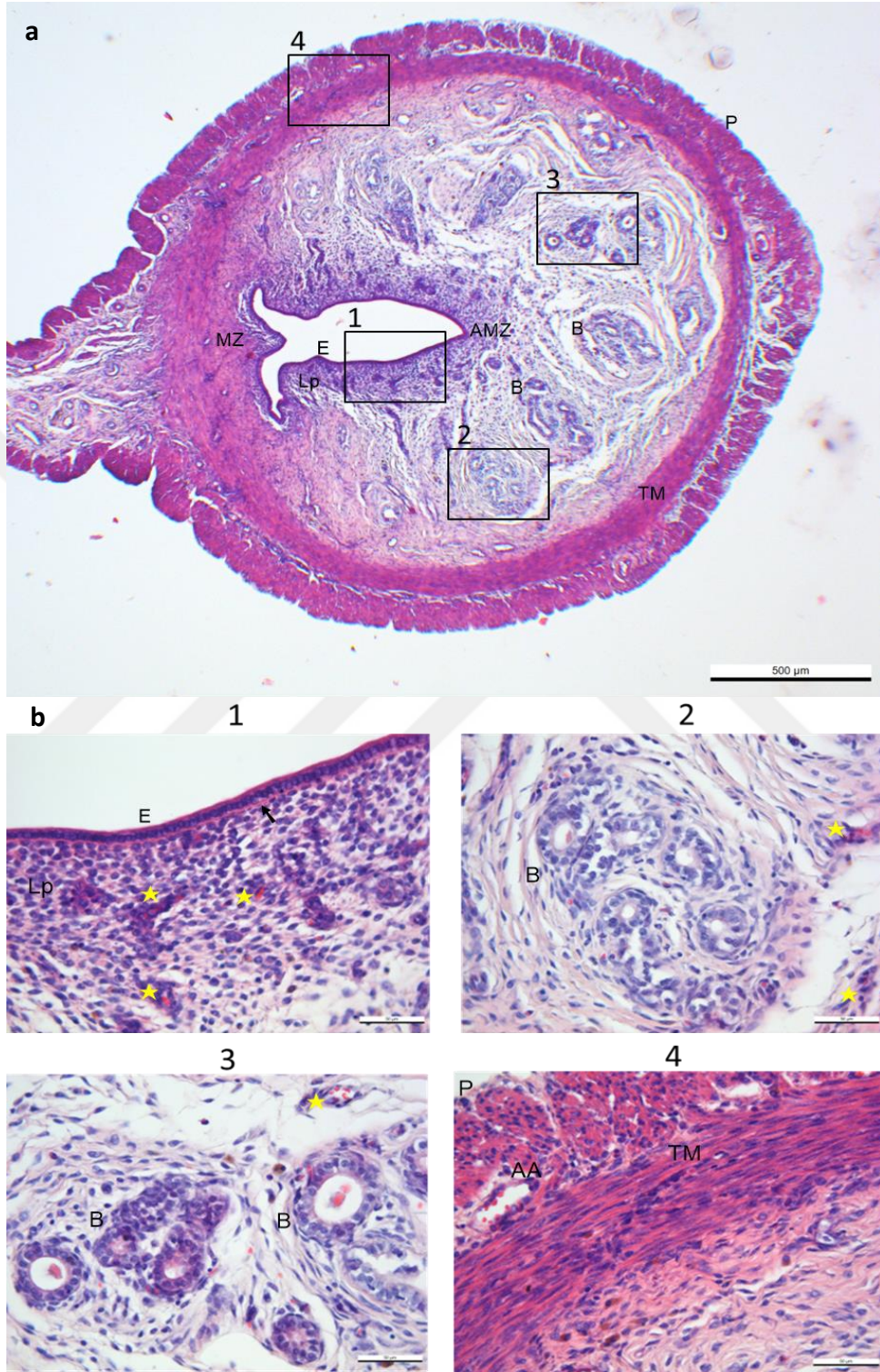
Resim 4. Kontrol grubu Masson'un üçlü boyaması. E: Epitel, Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetriyum, AA: Arkuat Arter, (*): vasküler yapılar, (⇒): Piknotik çekirdekli hücreler, (➤): dejeneratif hücre, Ko: Kollajen. a (40x), b (400x)

Düşük Doz FA Grubu

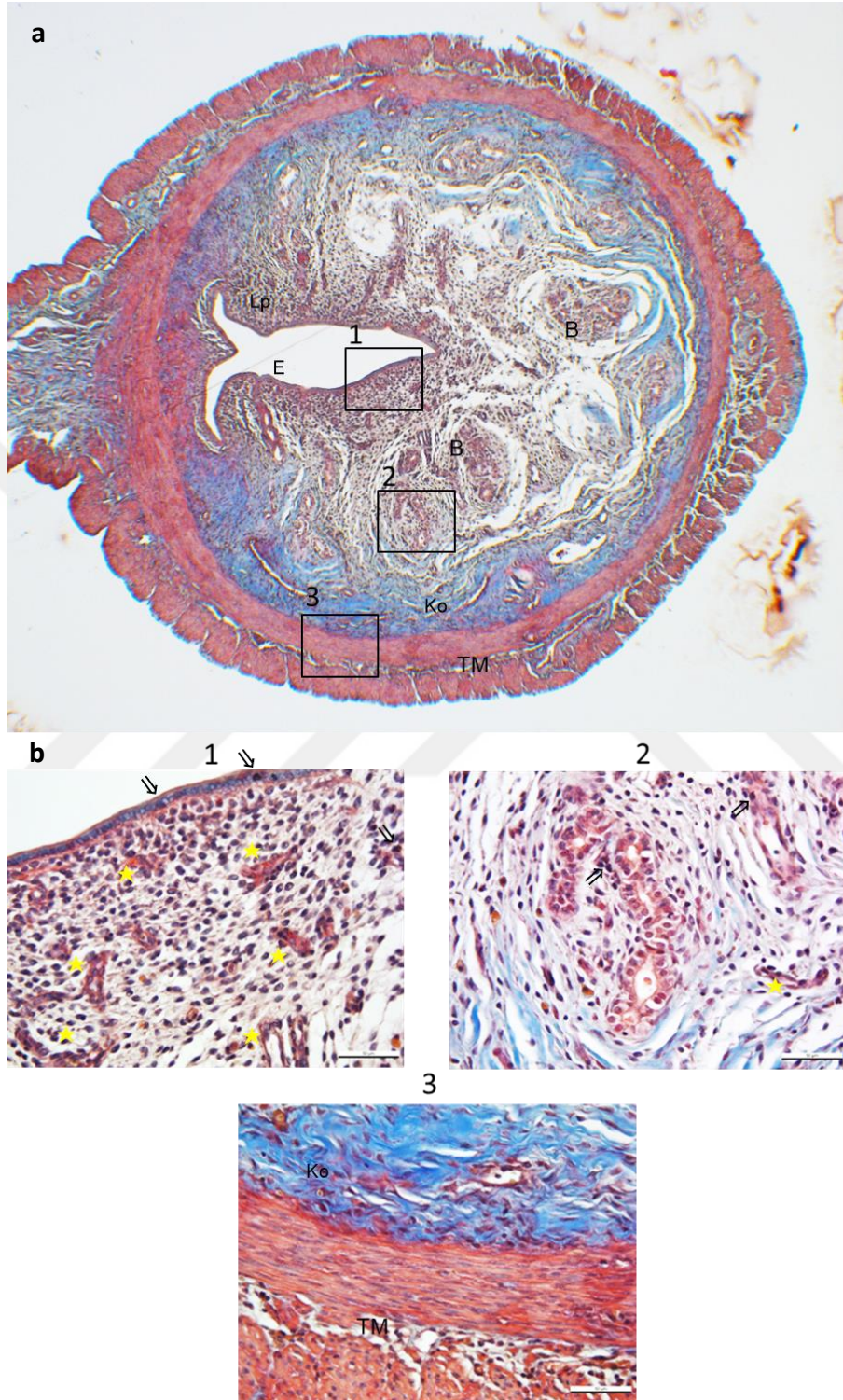
Hematoksilen & Eozin ve Masson'un üçlü boyaması uygulanan kesitler değerlendirildiğinde kontrol grubuyla eşleş bulgular olduğu izlendi. Epitel daha çok oval çekirdekleri ile belirgin tek katlı prizmatik tipte izlenirken altında bazal membranın normal yapısıyla süreklilik gösterdiği görüldü. Yine epitelde kontrol grubuyla benzer şekilde tek tük piknotik çekirdekli apoptoza giden hücreler saptandı. Piknotik çekirdekli hücrelerin seyrek olmakla birlikte stromal hücreler arasında ve bez epitel hücreleri arasında da bulunduğu görülmekteydi.

Antimezometriyal bölgede fonksiyonel endometriyumda belirgin bir desidualizasyon izlenirken bu desidualizasyonun mezometriyal bölgede devamlılık gösterdiği ancak antimezometriyal bölge kadar yoğun olmadığı saptandı. Endometriyumun her iki tabakasında da özellikle bezler çevresinde ve desidual hücreler arasında yoğun bir anjiyogenez olduğu saptandı kollajen lifler kontrol grubundaki gibi miyometriyum iç sirküler tabakasına yakın yerleşimli olduğu ve normal yapıda oldukları saptandı.

Miyometriyumun iç sirküler dış longitudinal kas yapısıyla ve orta tabakada arkuat arterleriyle normal görünümde olduğu izlendi. Kas tabakalarının en dıştan normal histolojik yapıda perimetriyumla çevrelenmiş olduğu saptandı. Düşük doz takviye grubunda ait H&E ve Masson'un üçlü boyaması örnekleri Resim 5 ve Resim 6'da verilmiştir.



Resim 5. Düşük doz takviye grubu H&E boyaması. E: Epitel, (↘): Bazal Membran Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetrium, AMZ: Antimezometriyal Bölge, MZ: Mezometriyal bölge, AA: Arkuat Arter, (*): vasküler yapılar. a (40x), b (400x).



Resim 6. Düşük doz takviye grubu Masson'un üçlü boyaması. E: Epitel, Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, (★): vasküler yapılar, (⇒):Piknotik çekirdekli hücreler, Ko: Kollajen. a (40x),b (400x)

Yüksek Doz Grubu

Yüksek doz grubunun H&E ve Masson'un üçlü boyamasıyla hazırlanan preparatları değerlendirildiğinde kontrol ve düşük doz gruplarından ayrıcalıklı olarak epitelin bazal oval yerleşimli ve çoğu piknotik çekirdekli, tek katlı prizmatik hücrelerden oluştuğu ve bu hücrelerin H&E boyamalarında oldukça belirgin asidofilik boyanmış apikal sitoplazmalarının olduğu izlendi. Epitelde sıçanların gebeliğinde 2. günde olması beklenen hücre proliferasyonunun gebeliğin 5. gününde olan deneklerimizde devam ettiği görülmekteydi. Epitelde yer yer çok katlı görünüm gösteren proliferatif hücre alanları saptandı. Epitel altında bazal membranın normal yapısıyla süreklilik gösterdiği görüldü.

Kontrol grubunda ve düşük doz grubunda endometriyum stromal hücrelerinde izlenen hücre proliferasyonu ve desidualizasyonun bizim yüksek doz kesitlerimizde 5. günde oldukça ilerlemiş olduğu ve desidualizasyonun endometriyumun her iki tabakasını da kapsayacak şekilde özellikle antimezometriyal alanda oldukça yoğun olduğu saptandı.

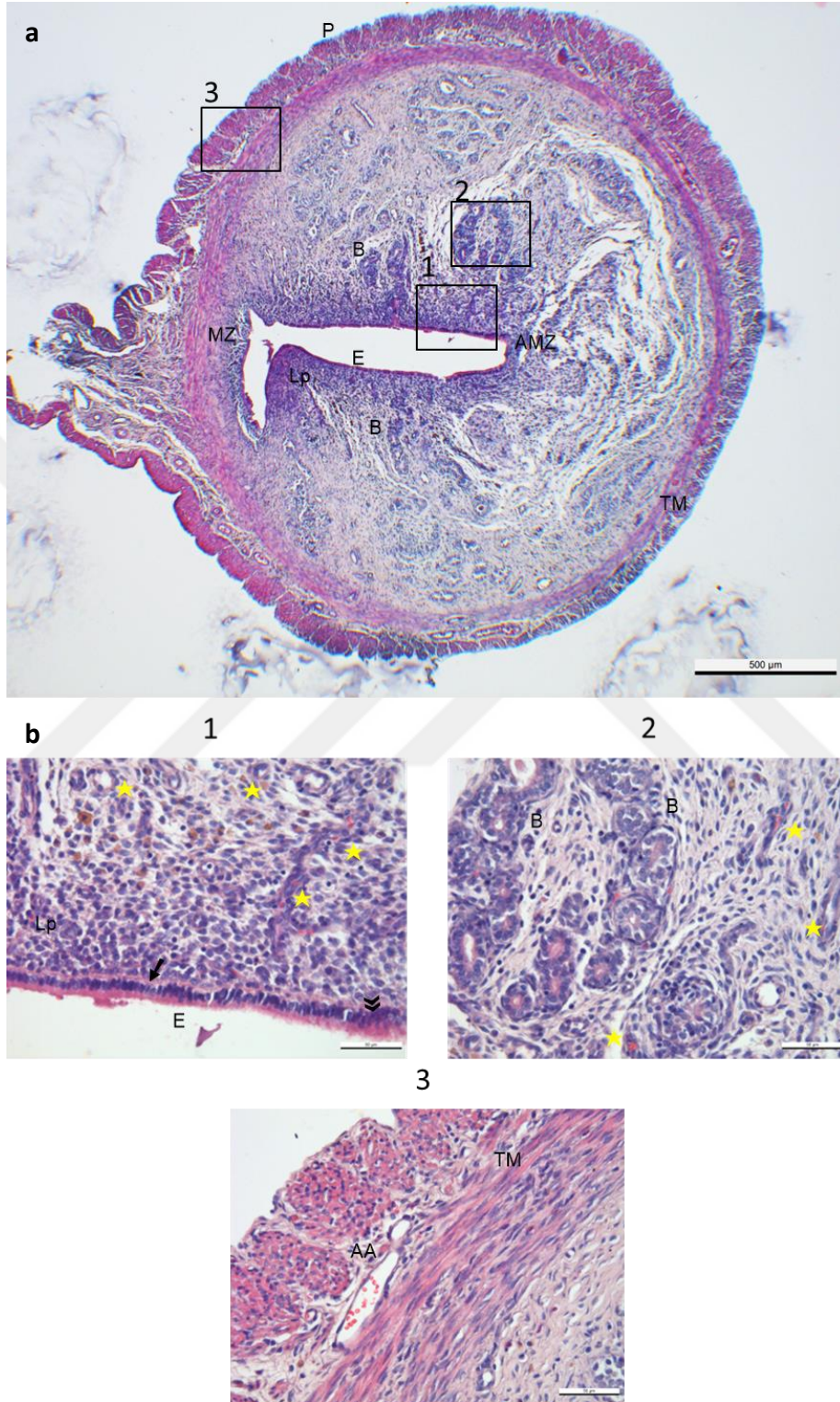
Bez yapıları kontrol ve düşük doz grupları ile karşılaştırıldığında endometriyumun fonksiyonel tabakasından başlayarak bazalisin genelinde oldukça yaygın olduğu izlendi. Yine bu iki gruba karşılaştırıldığında çok yoğun ve yaygın bir vaskülarizasyon özellikle antimezometrial alanda ve miyometriyuma kadar yaygın bir şekilde tüm endometriyumda görülmekteydi.

Diğer gruplarla eşleş olarak hem yüzey hem bez epitelinde ve stromada da tek tük piknotik çekirdekli apoptoza giden hücreler izlendi.

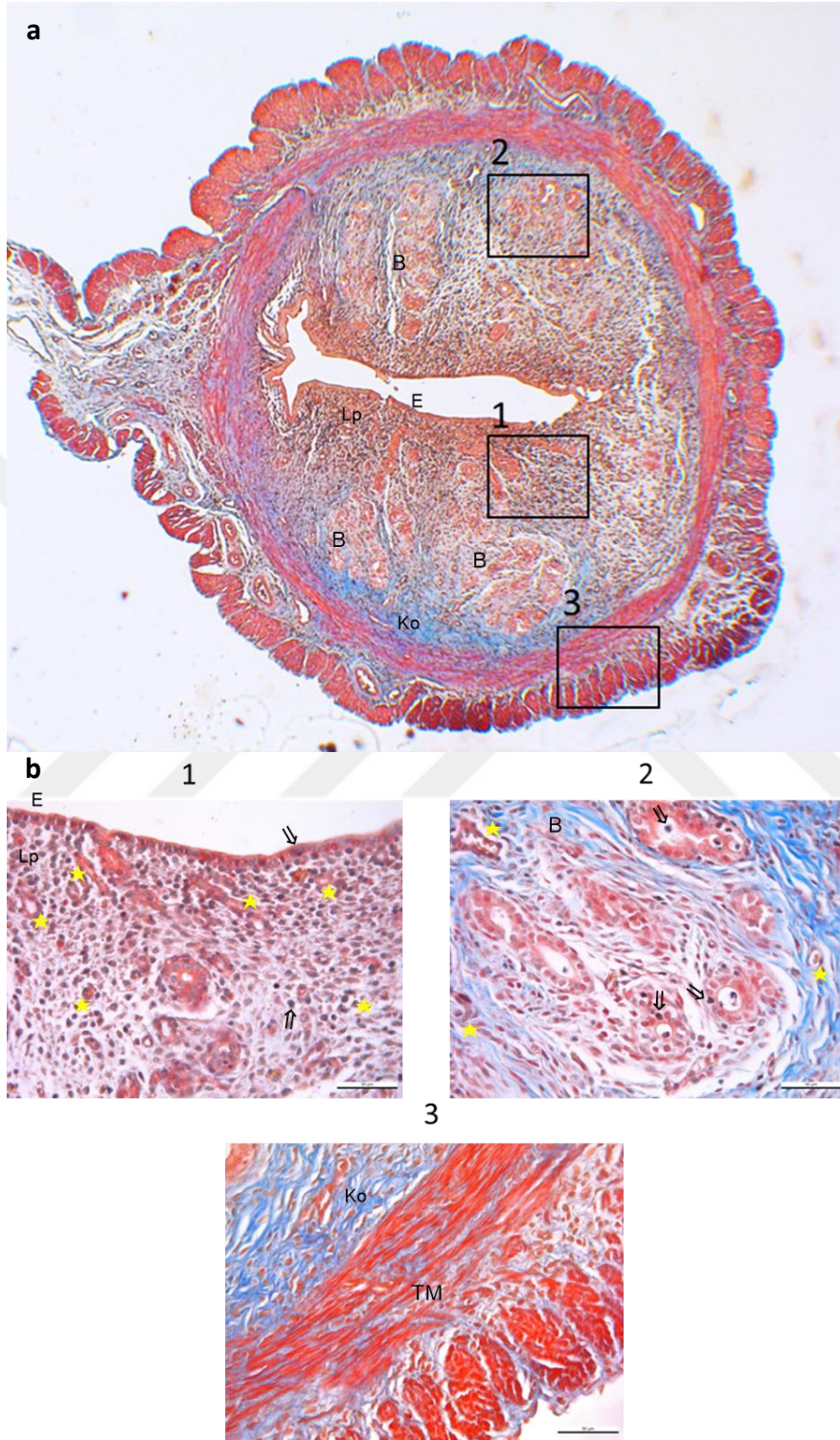
Masson'un üçlü boyamasında yüksek doz grubunda kollajen liflerin diğer gruplara oranla oldukça az olduğu ve miyometriyuma yakın bez yapıları çevresinde konsantrik yapıda halkasal şekilde yerleşmiş olduğu izlenmekteydi. Stromada piknotik çekirdekli stromal hücreler ve soluk boya alan yapılarıyla iri desidual hücreler görülmekteydi.

Miyometriyum tabakası değerlendirildiğinde iç sirküler tabakanın yoğun ve ilerlemiş desidualizasyonun belirgin artmış alan yapılarıyla izlenen lamina propriya nedeniyle daha incelmış gibi görüldüğü, buna karşın longitudinal dış yerleşimli düz kasların daha belirgin olduğu ve aralarındaki arkuat arterlerin de normal histolojik yapıda ve ortada yerleşimli olduğu izlendi. Normal yapıdaki perimetriyum longitudinal kas tabakasını çevrelemekteydi.

Yüksek doz grubunda ise kollajen liflerin oldukça azalmış olduğu desidualizasyonun endometriyumun fonksiyonals ve bazals katmanlarını da içerecek şekilde neredeyse miyometriyuma kadar yaygın bir alan kapladığı saptandı. Yüksek doz takviye grubunda ait H&E ve Masson'un üçlü boyaması örnekleri Resim 7 ve Resim 8'de verilmiştir.



Resim 7. Yüksek doz takviye grubu H&E boyaması. E: Epitel, (↘): Bazal Membran Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetrium, AMZ: Antimezometriyal Bölge, MZ: Mezometriyal bölge, AA: Arkuat Arter, («): Proliferasyon (*): vasküler yapılar. a (40x), b (400x)



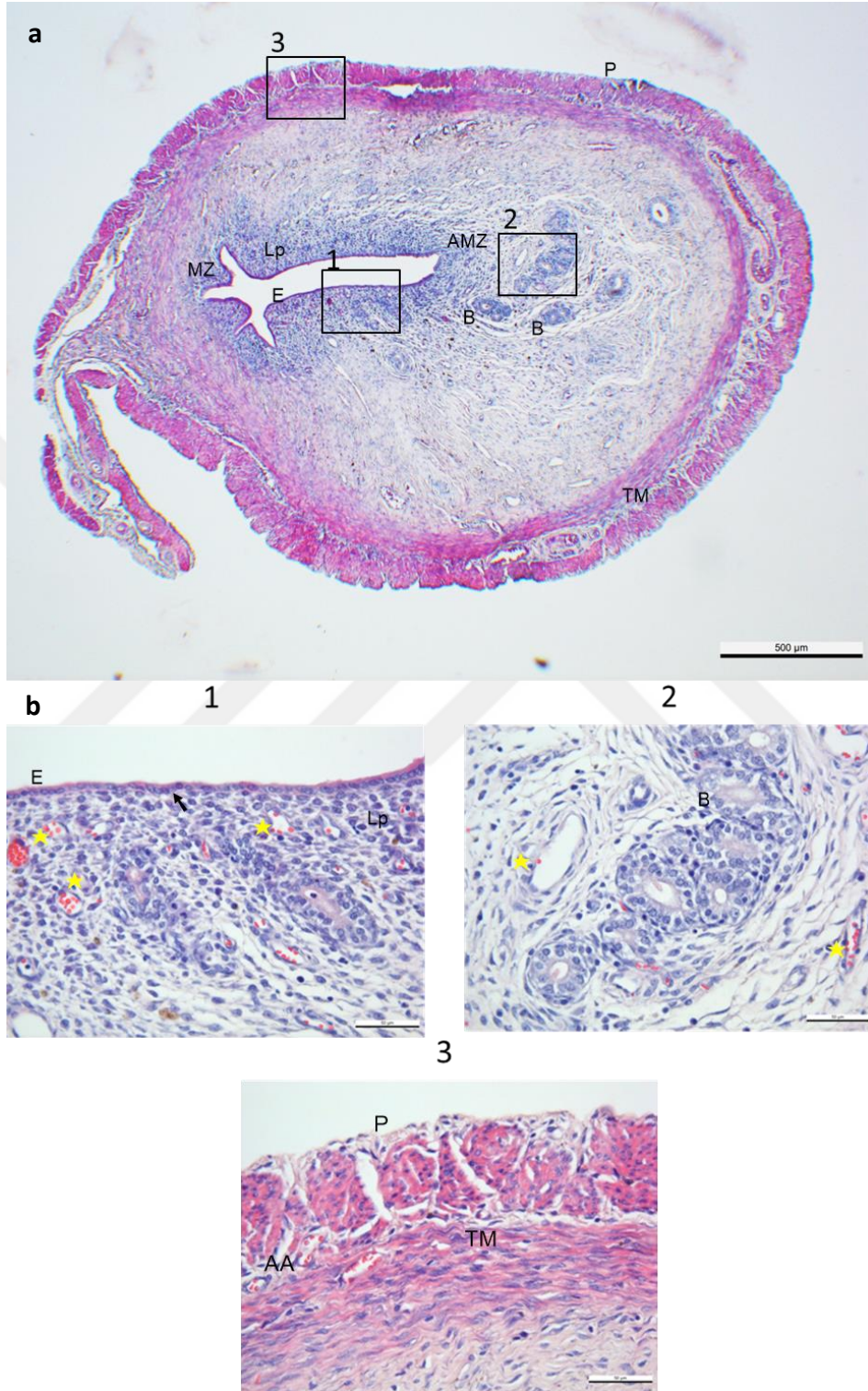
Resim 8. Yüksek doz takviye grubu Masson'un üçlü boyaması. E: Epitel, Lp: Lamina propria, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetriyum, AA: Arkuat Arter, (★): vasküler yapılar, (⇒): Piknotik çekirdekli hücreler, Ko: Kollajen. a (40x), b (400x)

Eksiklik Grubu

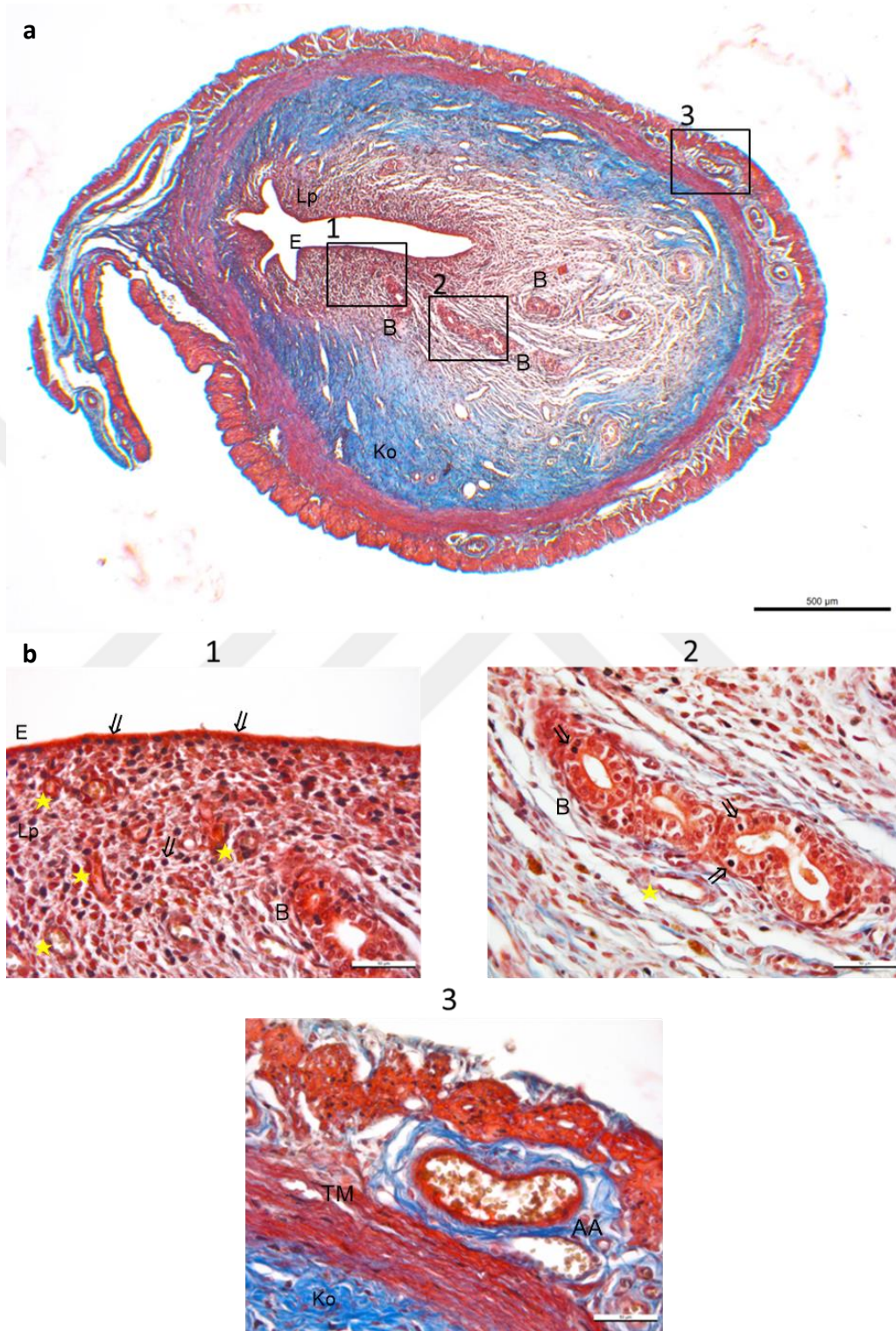
Eksiklik grubunda lüminal epitel daha çok küboidal tek katlı epitel yapısındaydı. Kontrol ve düşük doz gruplarından ayrıcalıklı olarak bu grupta en belirgin farklılık hem epitel hem bez hem de özellikle endometriyum fonksiyonel tabakasındaki stromal hücrelerde izlenen piknotik çekirdekli dejeneratif hücreler ve apoptotik hücrelerdi. Bazal membranın eksiklik grubunda yer yer kaybolduğu ve sürekliliğin bozulduğu saptandı.

Endometriyum fonksiyonel ve bazal tabakalarının, gevşek bağ doku yapısında olduğu ve tüm duvar boyunca geniş bir alana yayılmış halde bulunduğu izlendi. Vaskülarizasyonun kontrol grubuna göre azalmış olarak gözlemlendiği stromada bez yapılarında da azalma saptandı. Antimezometriyal bölgede belirgin desidualizasyon görülmekteydi ve antimezometriyal bölge gevşek bağ doku özelliğindeydi.

Kontrol grubuna göre endometriyal bölgede kollajen lifler daha fazla olarak izlendi. Miyometriyum iç sirküler ve dış longitudinal kas tabakaları arasında fibröz yapı oluşumu gözlemlendi. Bu fibröz yapının özellikle arkuat arterler çevresinde yoğunlaştığı saptandı. FA eksiklik grubuna ait H&E ve Masson'un üçlü boyaması örnekleri Resim 9 ve Resim 10'da verilmiştir.



Resim 9. FA Eksiklik grubu H&E boyaması. E: Epitel, (↘): Sürekliliği Bozulmuş Bazal Membran Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetrium, AMZ: Antimezometriyal Bölge, MZ: Mezometriyal bölge, AA: Arkuat Arter, (*): vasküler yapılar. a (40x), b (400x)

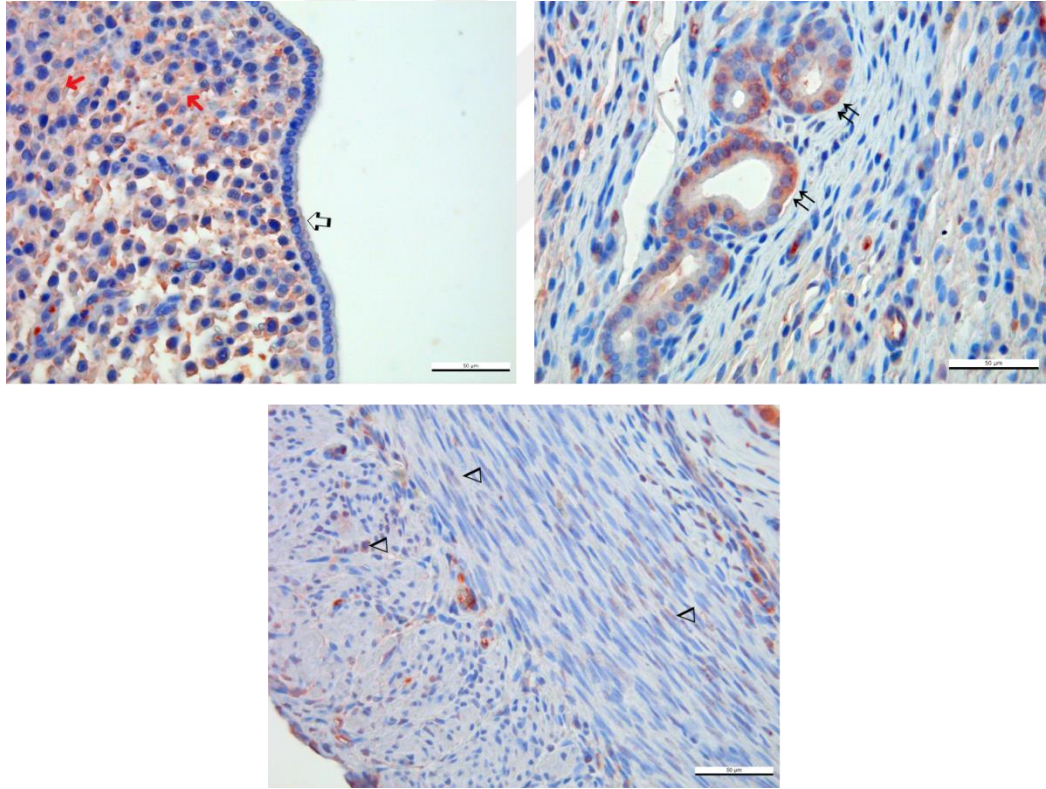


Resim 10. FA Eksiklik grubuna ait Masson'un üçlü boyaması görüntüleri. E: Epitel, Lp: Lamina propriya, B: Bez yapıları, TM: Tunika muskularis, P: Perimetriyum, AA: Arkuat Arter, (*): vasküler yapılar, (⇒): Piknotik çekirdekli hücreler, Ko: Kollajen. a (40x), b (400x)

4.5.İmmunohistokimyasal Analizler

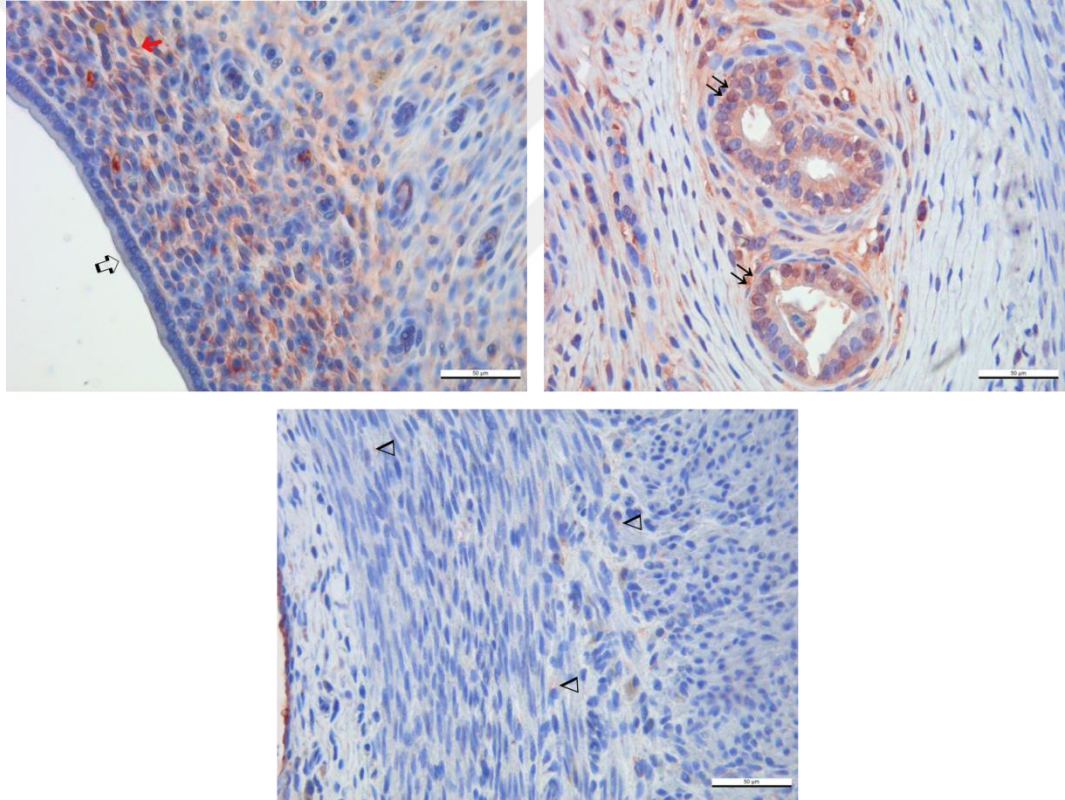
ER- α Bulguları

Kontrol grubunda östrojen reseptörünün lüminal epitel hücrelerinde zayıf (+), stromal hücrelerde ve bez epitel hücrelerinde ortadan kuvvetliye (++++), ekspresyonları izlendi. Düz kas hücrelerinde de oldukça zayıf (+) tutulum olduğu gözlemlendi (Resim 11).



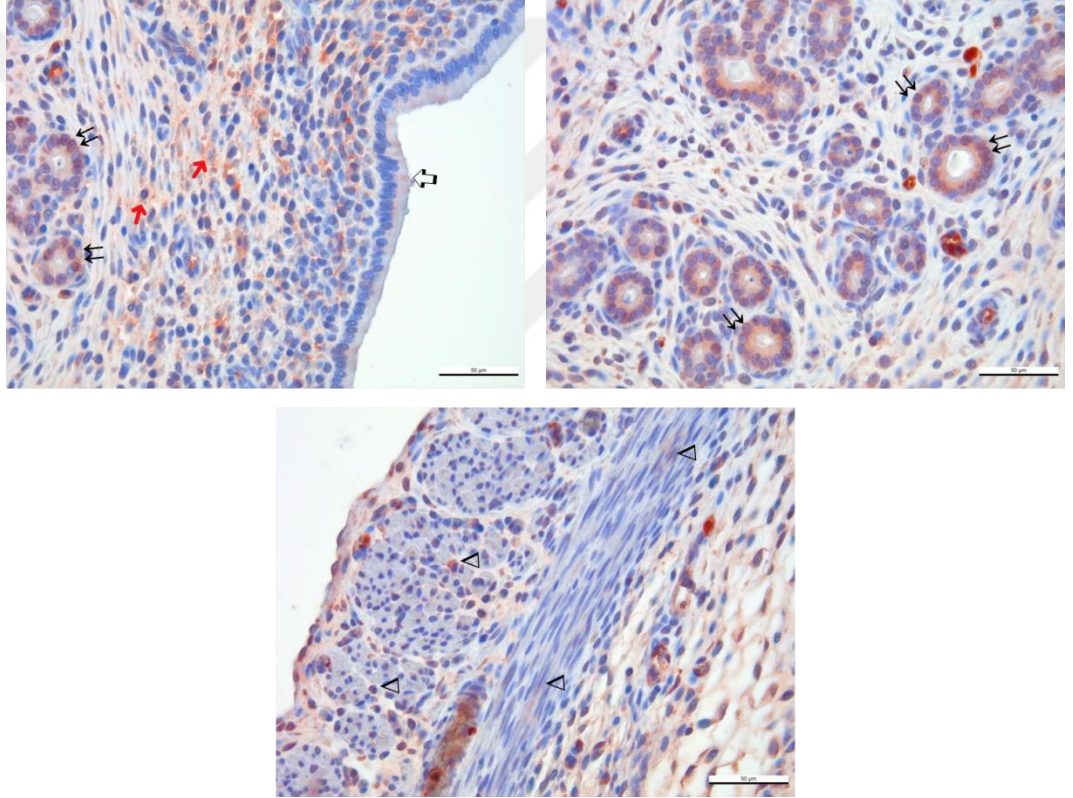
Resim 11. Kontrol grubunda ER- α tutulumu; ($\rightarrow$): Epitel hücrelerinde, ($\rightarrow$): stromal hücrelerde, ($\Rightarrow$): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen- 400x.

Düşük doz grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ER- α ifadesi açısından belirgin bir farklılık olmadığı izlendi. Lüminal epitel hücrelerinde zayıf (+), stromal hücreler ve bez epitel hücrelerinde kuvvetli (+++++) olduğu ve kontrol grubuna göre bir miktar arttığı saptandı. Düz kas hücrelerinde de yine oldukça zayıf (+) tutulum gözlemlendi (Resim 12).



Resim 12. Düşük doz FA takviye grubunda ER- α tutulumu; ($\rightarrow$): Epitel hücrelerinde, ($\rightarrow$): stromal hücrelerde, ($\Rightarrow$): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

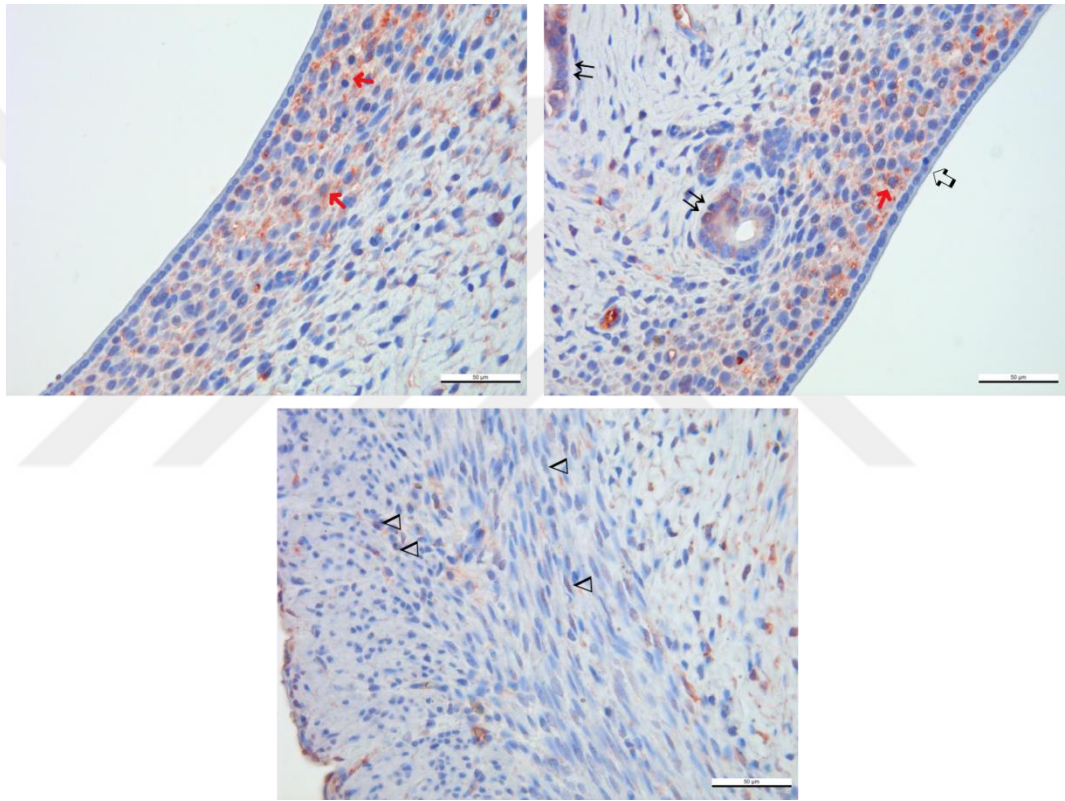
Yüksek doz grubunda ER- α ifadesi lüminal epitelde diğer gruplarda olduğu gibi zayıf (+) olarak izlendi. Stromal hücreler ve bez epitel hücrelerinde kuvvetli (+++++) bir tutulum izlenirken, düz kas hücrelerinde zayıftan ortaya (++) tutulum olduğu gözlemlendi (Resim 13).



Resim 13. Yüksek doz FA takviye grubunda ER- α tutulumu; (↔): Epitel hücrelerinde, (→): stromal hücrelerde, (⇔): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

Eksiklik grubunda ER- α ifadesine bakıldığında lüminal epitelde zayıf (+), ancak stromal hücreler ve bez epitel hücrelerinde ortadan kuvvetliye (+++++) ve

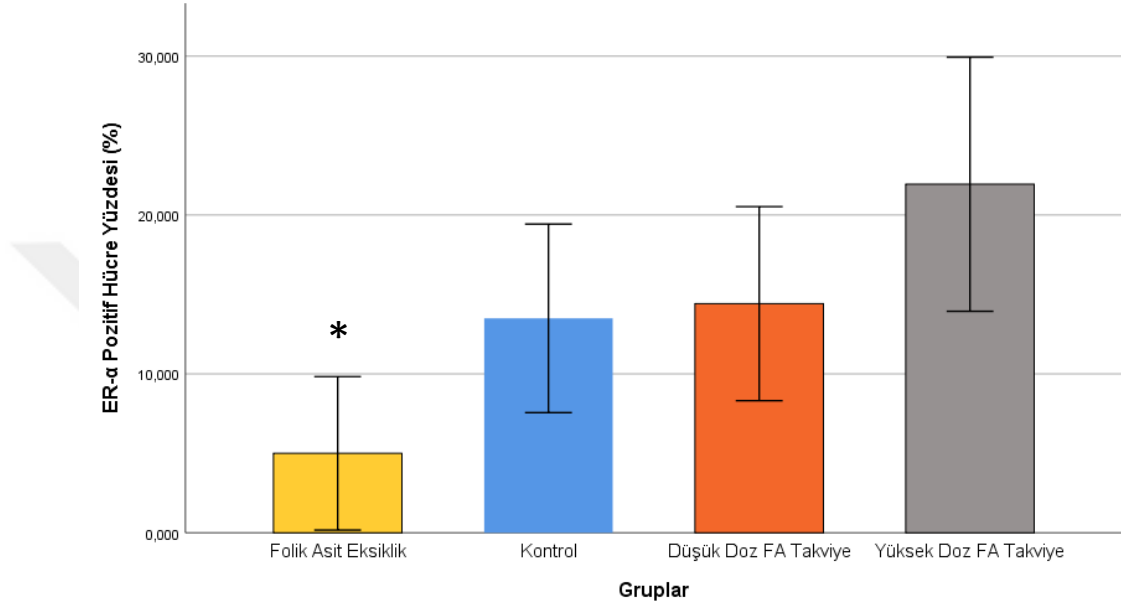
düz kas hücrelerinde de kontrol grubuna benzer zayıf (+), ancak miyometriyal kas tabakaları arasında bazı bağ doku hücrelerinde orta dereceli (+++) ifadesi izlendi (Resim 14).



Resim 14. FA eksiklik grubunda ER- α tutulumu; ($\blacktriangleleft$): Epitel hücrelerinde, ($\rightarrow$): stromal hücrelerde, ($\Rightarrow$): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

ER- α immun boyamasının implantasyon alanında dağılımına ait istatistiksel analizlerde FA eksiklik grubunun immun boyaması diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak azalmış olarak saptandı ($p<0,008$). Diğer gruplar arasında

anlamlı fark saptanmadı ($p>0,008$) (Grafik 4). ER- α İmmun boyamalarının istatistiksel analizlerine ait veriler Tablo 10'da verilmiştir.



Grafik 4. ER- α pozitif hücre yüzdelere ait ortalama $\pm$ standart sapma grafiği. *; $p<0,008$ diğer gruplara göre.

VEGF-A Bulguları

VEGF-A immün boyaması yapılan çalışmamızın tüm gruplarında majör anjiyojenik faktör olan VEGF-A' nın oldukça heterojenik bir immün boyama sergilediği izlendi.

Çalışmamızın kontrol grubunda lüminal epitel değerlendirildiğinde sadece kontrol grubunda ve belirli alanlarda oldukça spesifik ve kuvvetli yüzey membranöz immün boyanma izlenirken, kontrol grubu çoğunluğunda yüzey epitel

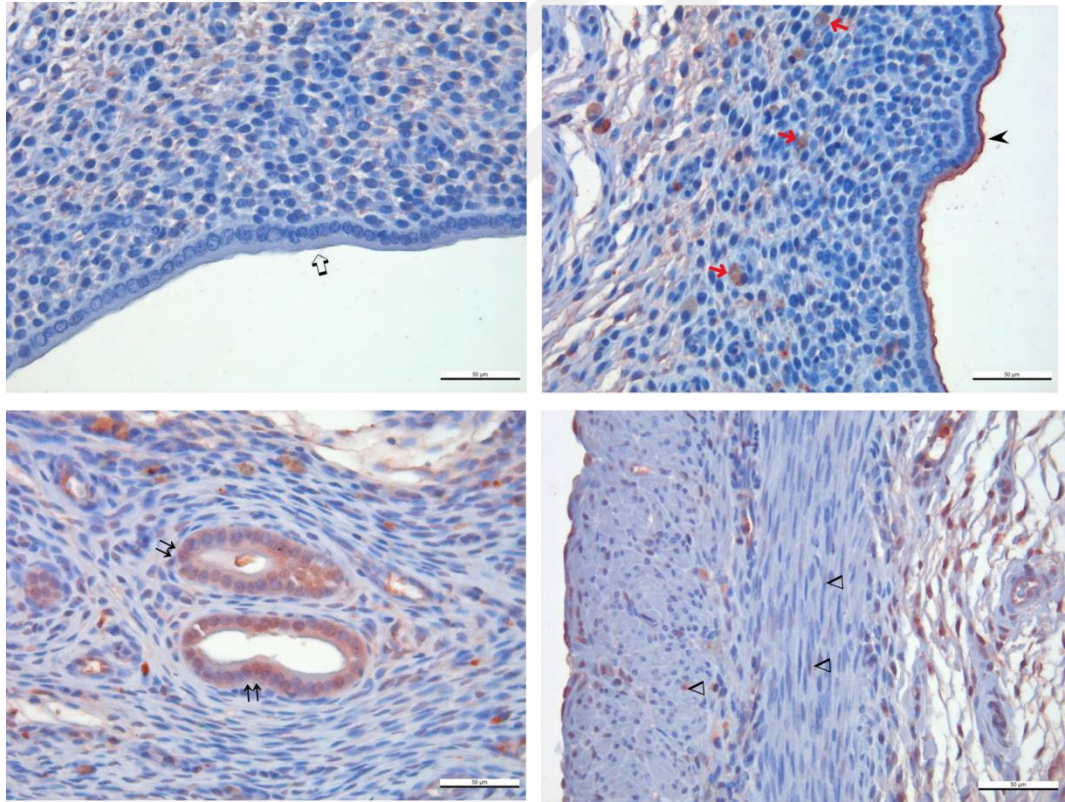
hücrelerinin VEGF-A tutulumunun oldukça zayıf (+) olduğu izlendi. Negatiften zayıfa değişen tutulum varlığı tüm gruplarda açıkça görülmekteydi.

VEGF-A tutulumu açısından en belirgin farklılığın endometriyum bez epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde olduğu izlendi. Bez epitel hücreleri değerlendirildiğinde VEGF-A'nın kontrol grubunda ve düşük doz gruplarında bez epitel hücrelerinde ortadan kuvvetliye değişen immun tutulum gösterdiği ve bu tutulumun benzer şekilde stromal hücreler ve desidual hücrelerde de ortadan kuvvetliye değişim gösterdiği izlendi.

Yüksek doz grubunda hem bez epiteli hücrelerinde hem de stromal hücrelerde VEGF-A ifadesinin belirgin şekilde arttığı ve kuvvetli immun reaksiyon sergilediği saptandı. Eksiklik grubunda ise desidual ve stromal hücreler ile bez epitel hücrelerindeki VEGF-A tutulumunun yine belirgin olduğu ancak zayıftan ortaya değişkenlik gösterdiği ve yaygınlığının azaldığı saptandı. Öte yandan miyometriyum tabakası VEGF-a immun tutulumu açısından değerlendirildiğinde tüm gruplarda düz kas ve aralardaki bağ dokudaki hücrelerinde intrasitoplazmik zayıf ancak bazı bölgelerde ortaya değişen immun boyama izlendi.

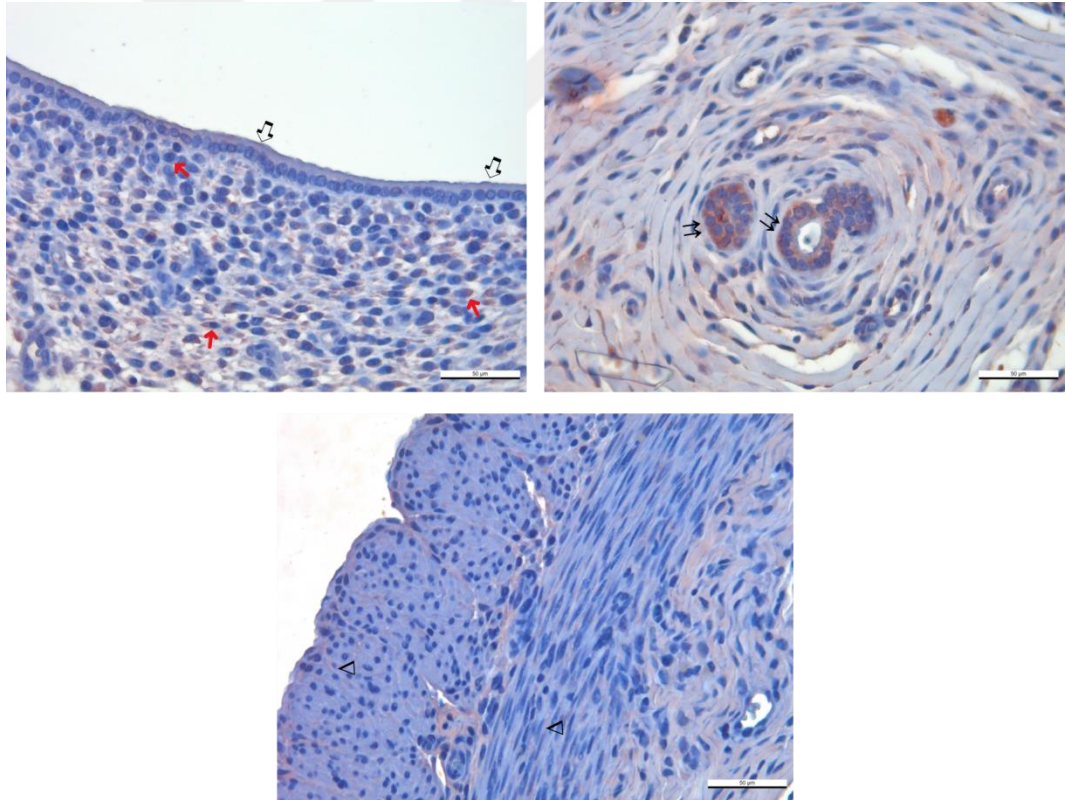
Kontrol grubu VEGF-A immun boyamasında lüminal epitel değerlendirildiğinde sadece kontrol grubunda bazı deneklerde ve belirli alanlarda oldukça spesifik ve kuvvetli yüzey membranöz immun boyanma izlenirken, lüminal epitel hücrelerinin çoğunluğunda tutulumunun oldukça zayıf (+) olduğu

izlendi. Bez epitel hücreleri değerlendirildiğinde VEGF-A'nın kontrol grubunda bez epitel hücrelerinde ortadan kuvvetliye değişen immün tutulum gösterdiği ve bu tutulumun benzer şekilde stromal hücreler ve desidual hücrelerde de ortadan kuvvetliye (++++) değişim gösterdiği saptandı. Miyometriyum tabakası değerlendirildiğinde düz kas ve aralardaki bağ dokudaki hücrelerinde intrasitoplazmik, zayıf (+) immün boyanma izlendi (Resim 15).



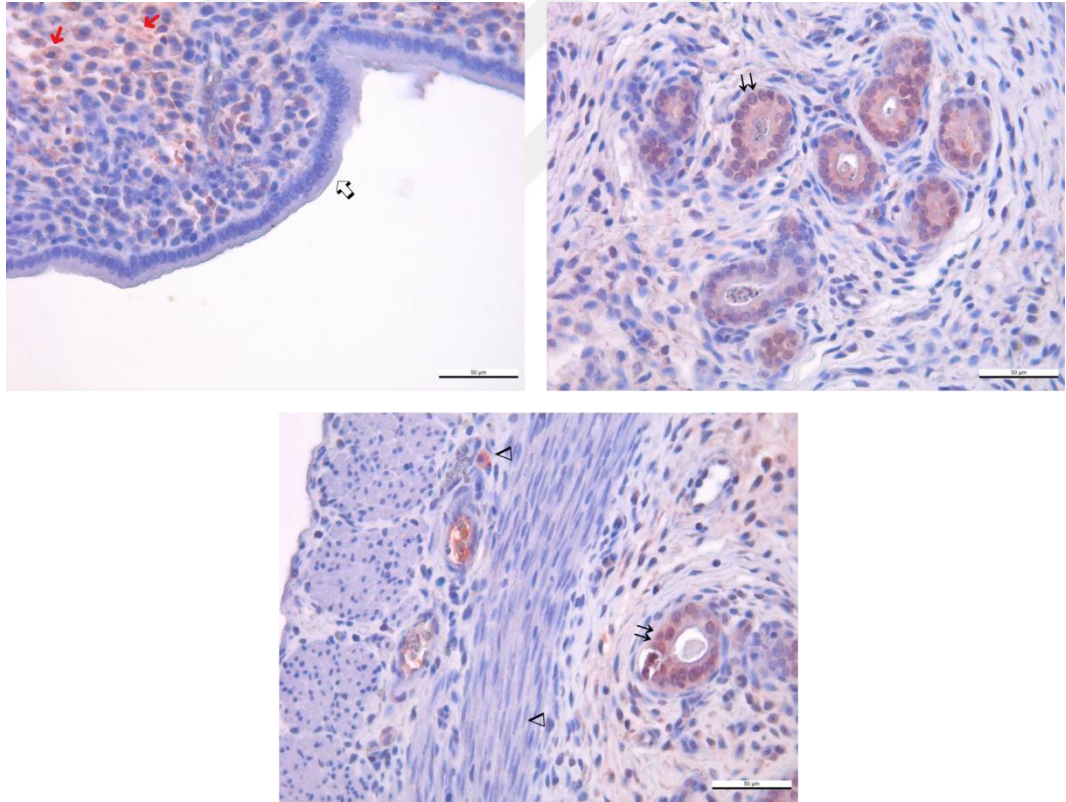
Resim 15. Kontrol grubunda VEGF-A tutulumu; (↔): Epitel hücrelerinde, (➤): spesifik olarak epitelin belirli alanlarında görülen tutulum, (➡): stromal hücrelerde, (↔): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

Düşük doz grubunda VEGF-A immun boyamasında lüminal epitel hücrelerinde tutulumun oldukça zayıf (+) olarak saptandı. Bez epitel hücreleri değerlendirildiğinde VEGF-A'nın bez epitel hücrelerinde ortadan kuvvetliye (++++), değişen immun tutulum gösterdiği ve bu tutulumun benzer şekilde stromal hücreler ve desidual hücrelerde de ortadan kuvvetliye değişim gösterdiği izlendi. Miyometriyum tabakası değerlendirildiğinde düz kas hücreleri ve aralardaki bağ doku hücrelerinde genel olarak zayıf (+) immun boyanma izlendi (Resim 16).



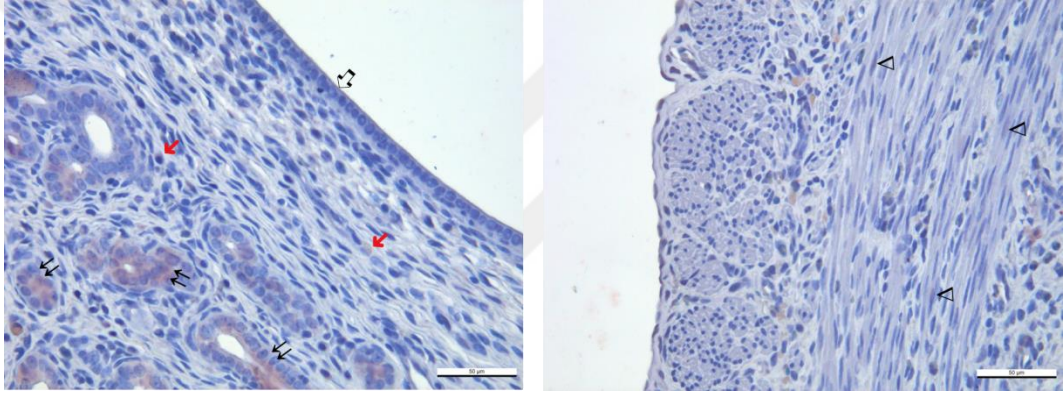
Resim 16. Düşük doz FA takviye grubunda VEGF-A tutulumu; (↔): Epitel hücrelerinde, (→): stromal hücrelerde, (⇒): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

Yüksek doz grubu VEGF-A immun boyamasında lüminal epitel hücrelerinde zayıf (+) immun reaksiyon izlenirken, hem bez epiteli hücrelerinde hem de stromal hücrelerde VEGF-A ifadesinin belirgin şekilde arttığı ve kuvvetli (+++++) immun reaksiyon sergilediği saptandı. Düz kas hücrelerinde diğer gruplara benzer şekilde zayıf(+), bazı bölgelerde zayıftan-ortaya (++) değişen reaksiyon tespit edildi (Resim 17).



Resim 17. Yüksek doz FA takviye grubunda VEGF-A tutulumu; (↔): Epitel hücrelerinde, (→): stromal hücrelerde, (⇔): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

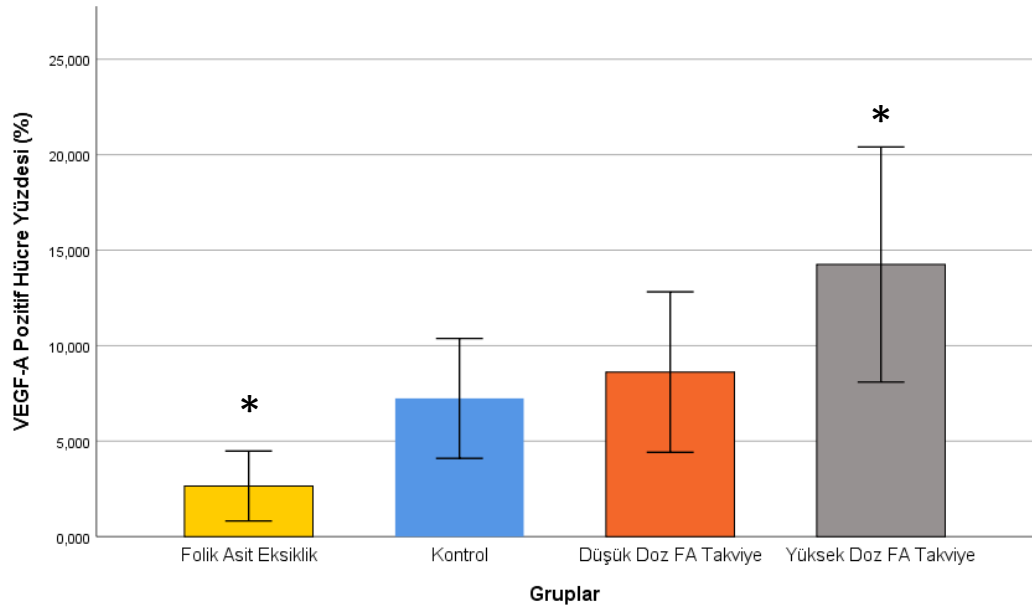
Eksiklik grubunda VEGF-A immun boyamasında lüminal epitel hücrelerinde oldukça zayıf (+) reaksiyon saptandı. Desidual ve stromal hücreler ile bez epitel hücrelerindeki VEGF-A tutulumunun yine belirgin olduğu ancak zayıftan ortaya (++) değişkenlik gösterdiği ve yaygınlığının azaldığı tespit edildi. Düz kas hücrelerinde ise zayıf (+) immun reaksiyon izlendi (Resim 18).



Resim 18. FA eksiklik grubunda VEGF-A tutulumu; (↗): Epitel hücrelerinde, (→): stromal hücrelerde, (↘): bezlerde, (Δ): miyometriyumda tutulum, AEC & Hematoksilen - 400x.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, VEGF-A immun boyamasına ait dağılım yüzdeleri kıyaslandığında, yüksek doz FA takviyesi verilen grupta VEGF-A immun boyaması tüm gruplara göre artmış olmasına karşın, kontrol ve eksiklik gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edilirken, düşük doz takviye grubuyla anlamlı fark saptanmamıştır. Eksiklik grubunda ise tüm gruplara göre anlamlı olarak azalmış immun reaktivite tespit edilmiştir ($p<0,008$)

(Grafik 5). VEGF-A immün boyamalarının istatistiksel analizlerine ait veriler Tablo 10'da verilmiştir.



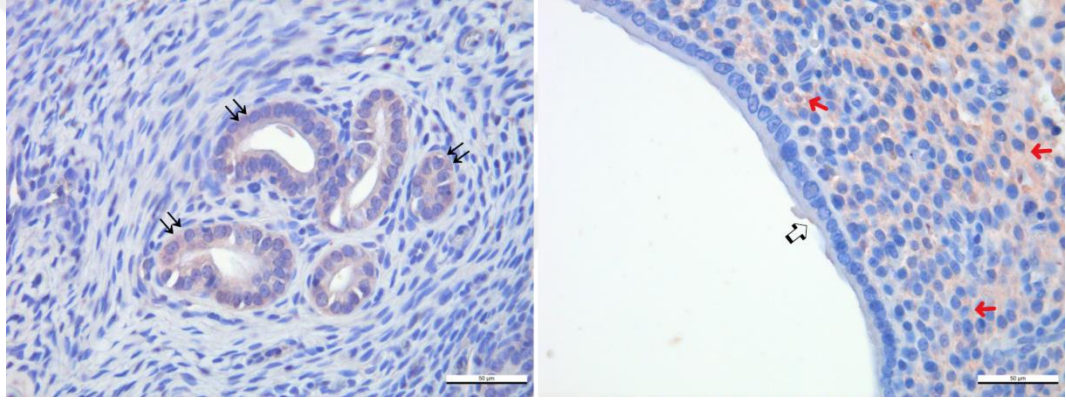
Grafik 5. VEGF-A pozitif hücre yüzdelere ait ortalama $\pm$ standart sapma grafiği.
*, $p<0,008$ kontrol grubuna göre.

İntegrin $\alpha V\beta 3$

Embriyonik implantasyonun reseptörüdür. Lüminal ve bez epitel hücrelerince implantasyon sırasında eksprese olan bu ajan, embriyonun uterus bez epiteline bağlanması için son derece gereklidir. Ekspresyon luteal fazın ortalarında artar ki bu olası implantasyon zamanıdır. $\alpha V\beta 3$ integrinin azalması durumunda ya da ekspresyonunda başarısızlık olması durumunda desidual

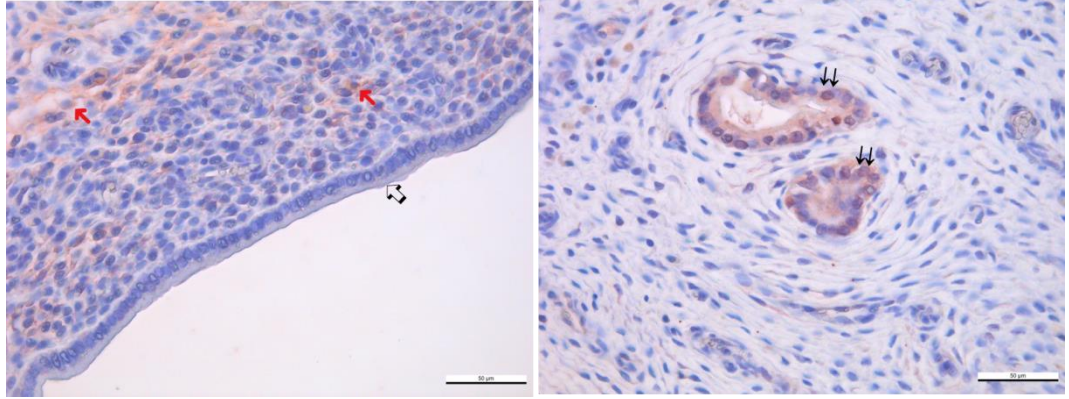
anjiyogenezin de azaldığı bildirilmiştir. Bu yolaktaki aksama implantasyonun devamı ve doğru orantılı olarak da desidual anjiyogenezin başarısızlığına sebep olur.

Çalışmamızda kontrol grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin değerlendirildiğinde, ekspresyon yeri olan lüminal epitelde zayıftan ortaya (++) ve bez epitel hücrelerinde orta dereceli (+++) eksprese olduğu izlenmiştir (Resim 19).



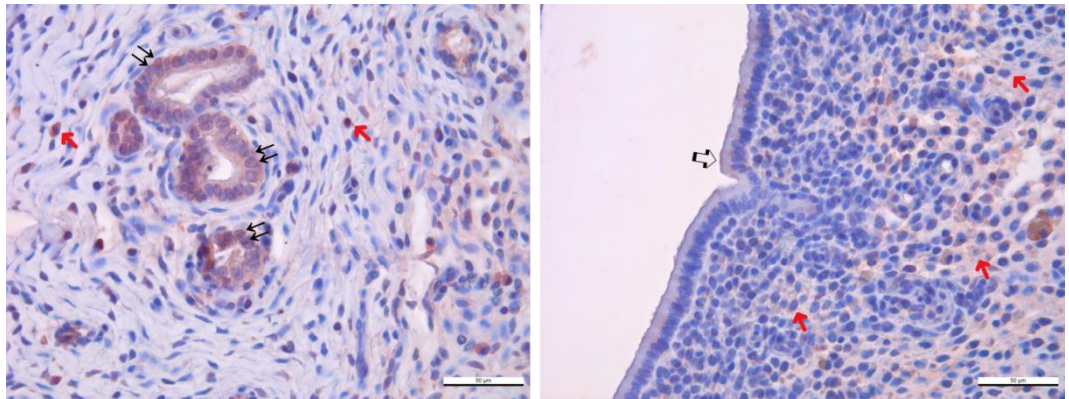
Resim 19. Kontrol grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu; ($\blacktriangleright$): Epitel hücrelerinde, ($\rightarrow$): stromal hücrelerde, ($\Rightarrow$): bezlerde tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

Düşük doz grubunda da $\alpha V\beta 3$ integrin değerlendirildiğinde lüminal epitelde zayıftan ortaya (++) ve bez epitel hücrelerinde $\alpha V\beta 3$ integrinin bazı bölgelerde orta dereceli (+++) bazı bölgelerde ortadan kuvvetliye (+++++) değişen immün tutulum sergilediği izlendi (Resim 20).



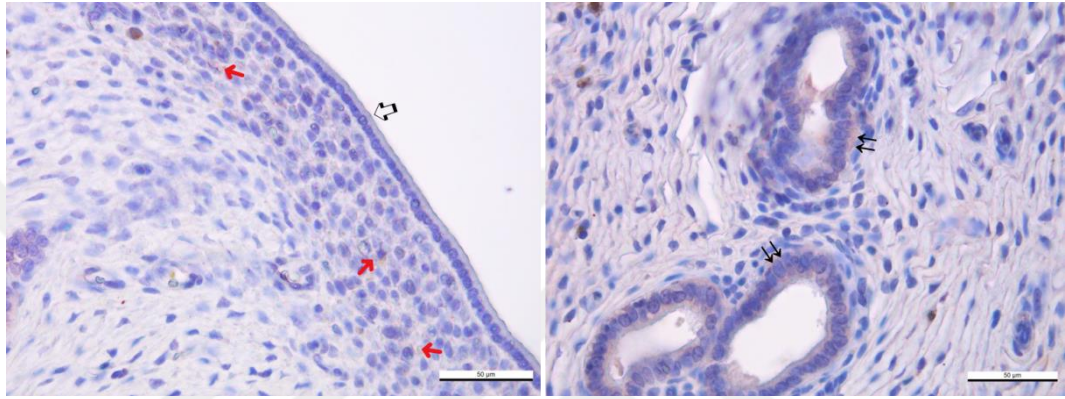
Resim 20. Düşük doz FA takviye grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu; (↺): Epitel hücrelerinde, (→): stromal hücrelerde, (⇨): bezlerde tutulum, AEC & Hematoksilen - 400x.

Yüksek doz grubu $\alpha V\beta 3$ integrin immün boyamaları incelendiğinde, lüminal ve bez epitel hücrelerinde kontrol ve düşük doz gruplarına göre belirgin şekilde kuvvetli (+++++) tutulum sergilediği saptandı (Resim 21).



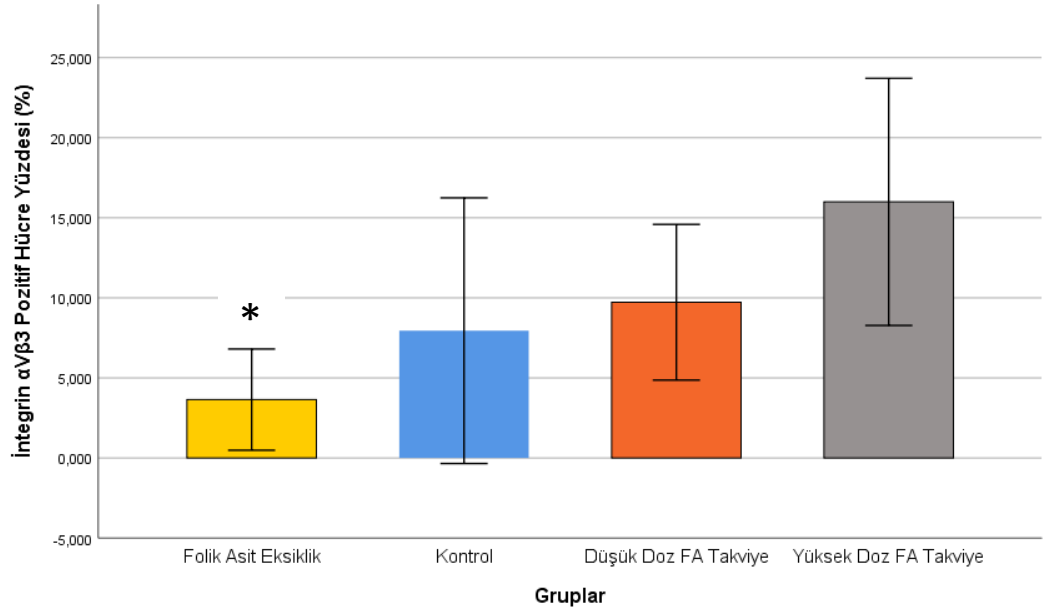
Resim 21. Yüksek doz FA takviye grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu; (↺): Epitel hücrelerinde, (→): stromal hücrelerde, (⇨): bezlerde tutulum, AEC & Hematoksilen - 400x.

Eksiklik grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin immün boyamaları incelendiğinde, luminal epitel ve bez epitel hücrelerinde $\alpha V\beta 3$ integrin immün reaksiyonunun zayıf (+) olduğu izlendi (Resim 22).



Resim 22. FA eksiklik grubunda $\alpha V\beta 3$ integrin tutulumu; ($\rightarrow$): Epitel hücrelerinde, ($\rightarrow$): stromal hücrelerde, ($\Rightarrow$): bezlerde tutulum, AEC & Hematoksilen -400x.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, $\alpha V\beta 3$ integrinin implantasyon alanlarındaki dağılımı karşılaştırıldığında yüksek doz ve düşük doz FA gruplarının $\alpha V\beta 3$ integrin dağılımı FA eksiklik grubuna göre anlamlı olarak artmış olarak tespit edilmiştir. Takviye dozlar ve kontrol grupları arasında FA dozuyla uygun şekilde immün reaktivitede artış izlenmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,008$) (Grafik 6). $\alpha V\beta 3$ integrin immün boyamalarının istatistiksel analizlerine ait veriler Tablo 10'da verilmiştir.



Grafik 6. *İntegrin αVβ3 pozitif hücre yüzdelere ait ortalama ± standart sapma grafiği.*
 *; $p < 0,008$ düşük doz ve yüksek doz FA takviye gruplarına göre

Tablo 10. *Tüm gruplara ait, İntegrin αVβ3, VEGF-A ve ER-α boyanma yüzdelерinin ortalamaları ve standart sapmaları*

Gruplar	İntegrin αVβ3	VEGF-a	ER-α
Kontrol	7,95 ± 8,29	7,23 ± 3,13	13,49 ± 5,93
Folik Asit Eksiklik	3,64 ± 3,16	2,64 ± 1,83	4,99 ± 3,09
Düşük Doz FA Takviye	9,72 ± 4,86	8,61 ± 4,20	14,41 ± 6,10
Yüksek Doz FA Takviye	15,99 ± 7,71	14,24 ± 6,15	21,93 ± 7,99

4.6. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

ESR1 (ER- α), VEGFA, Integrin α V ve Integrin β 3 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cyclers 480 cihazı kullanıldı. Rat uterus dokularından elde edilen ESR1, VEGFA, Integrin α V, Integrin β 3 ve bu genlerin ifadelenmesini normalize etmek için ACTB genlerine özgül primerler ve UPL problemleri kullanılarak çalışıldı.

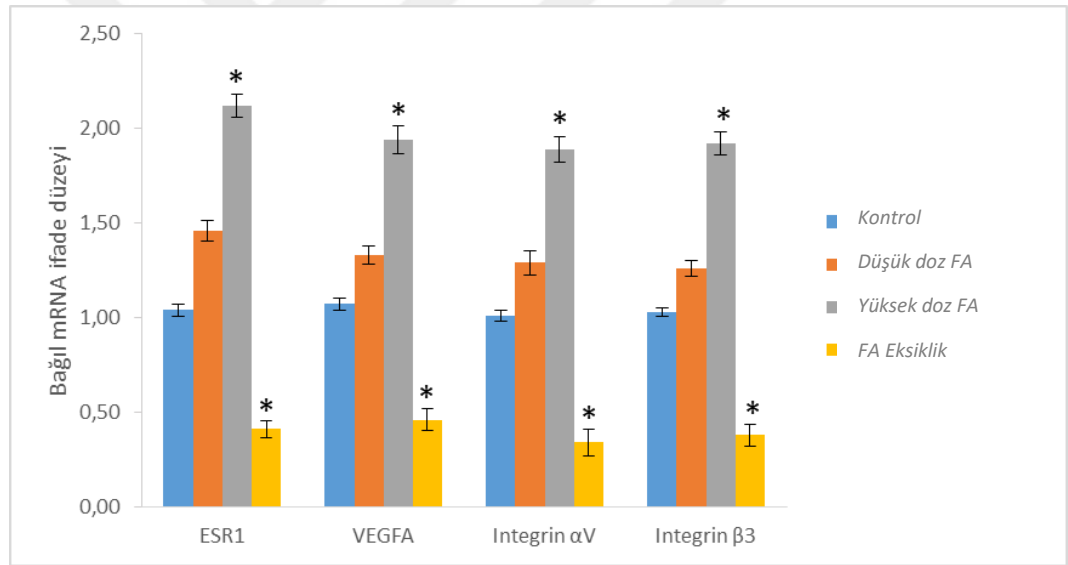
Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

Real Time PCR yönteminde ilgili hedef genin ortamdaki derişimi primerlerin ilgili gen dizileri ile bağlanması ile doğru orantılıdır. Hedef gene ait mRNA ortamda ne kadar çok bulunursa eşleşmeyle doğru orantılı seyreden amplifikasyonlar ışımanın o kadar erken gerçekleşmesine neden olur. Bu bilgiler ışığında, ESR1, VEGFA, Integrin α V ve Integrin β 3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı. İfade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi Qiagen-REST-2009 (Relative Expression Software Tool, Pfaffl reff) programı ile birlikte Qiagen-RT 2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 programı kullanılarak eş zamanlı olarak gerçekleştirildi.

Rat uterus dokularında düşük doz folik asit uygulanan grupta ESR1, VEGFA, Integrin α V ve Integrin β 3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla az da olsa bir artış gözlenmesine rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Rat uterus dokularında yüksek doz folik asit uygulanan grupta ESR1, VEGFA, Integrin α V ve Integrin β 3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$).

Bunun yanı sıra, rat uterus dokularında folik asit eksikliği olan grupta ESR1, VEGFA, Integrin α V ve Integrin β 3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Tüm gruplara ait mRNA ifade düzeyleri Tablo 11’de gösterilmiştir.



Grafik 7. Rat uterus dokusunda ESR1, VEGFA, Integrin α V ve Integrin β 3 genlerinin mRNA ifade düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyi ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$ Kontrol grubuna kıyasla.

5. TARTIŞMA

İmplantasyon, embriyo ile uterus arasında karşılıklı etkileşimi içeren karmaşık bir süreçtir. Blastosistin gelişimiyle senkronize şekilde endometriumun da gelişip hazırlanması, başarılı bir implantasyon ve dolayısıyla sağlıklı bir gebelik için olmazsa olmazdır. İmplantasyon, implantasyon penceresi denilen kısa bir süreçte gerçekleşir ve bu süreçte embriyo ile endometrium karşılıklı etkileşim içindedir (99).

Gebeliğin klinik olarak saptanmasından önceki peri-implantasyon döneminde meydana gelen erken gebelik kaybı, insanlarda yaygın olarak görülür (100). Bir menstrüel siklusta meydana gelebilecek başarılı gebelik şansı yaklaşık %30 ile sınırlıdır (101). Tüm gebeliklerin de sadece %50-60'ı 20. haftanın ötesine geçer (102). Bu gebelik kayıpları içinde, implantasyon başarısızlığı, yaklaşık %75'e ulaşan başlıca nedendir (103). İn-vitro fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF-ET) teknolojisinde, infertilitenin altında yatan sebeplerin birçoğunun üstesinden gelinmiştir. Buna rağmen, gebelik başarı oranları, esas olarak implantasyon başarısızlığı nedeniyle nispeten düşük kalmaktadır (102, 104).

Folik asit dünyada kullanımı oldukça yaygın, Dünya Sağlık Örgütü tarafından özellikle kadınlarda kullanımı sıklıkla vurgulanmış vitaminlerdendir. Folik asit eksikliği olan toplumlarda anemi, kardiyovasküler hastalıklar, şizofreni, majör depresyon gibi hastalıkların riskinde artış bildirilmiş, hatta bazı karsinomlarla ilişkili olduğu ve karsinom riskini de artırabileceğine dair çalışmalar ortaya konmuştur (42). Gebelikte folik asit eksiliğini ise özellikle nöral

tüp defektleri ve konjenital anomalilerle ilişkilendiren bir çok çalışma mevcuttur (105-107).

Folik asit takviyesinin gebeliğin erken evrelerinde ekşini araştıran bir çalışmada, gebeliğin 5. gününde yüksek doz folik asit (40 mg/kg/gün) takviyesi verilen grupta vücut ağırlığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Ancak eksiklik oluşturulan grupta kontrol ve yüksek doz folik asit takviyesi verilen gruplara göre anlamlı farklılık izlenmemiştir (65).

5 hafta boyunca eksiklik ve standart diyetlerle beslenen gruplarda standart diyetle beslenen deneklere farklı dozlarda folik asit takviyesi yaptığımız çalışmamızda tüm gruplardaki deneklerin başlangıçtaki vucüt ağırlıkları ve deney sonundaki vücut ağırlıkları değerlendirildi. Başlangıç ağırlıklarında anlamlı fark olmayan deneklerde, folik asit takviyesi verilen gruplarda kilo artışı olmasına rağmen gruplar arası anlamlı fark izlenmedi.

VEGF, embriyo implantasyonu ve vaskülogenezisle yakın ilişki içindedir (108). Ovaryum ve uterusu anjiyogenezis sürecine katılır. Gebelikte de endotel proliferasyonu ve vasküler permeabilitede artışla ilişkilidir. VEGF ve reseptörleri insanlarda, farelerde, sıçanlarda ve başka memelilerde implantasyon ve uterin siklus sırasında saptanmıştır (109).

Yi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, peri-implantif dönemdeki hamsterlarda VEGF ekspresyonu farklı günlerde değerlendirilmiştir. 3. günde sadece lüminal epitelde zayıf VEGF ekspresyonu saptanmış, 4. günde stromal hücrelerde de ekspresyo görülmüştür. 5. Günde ise desidual hücrelerde ve

vasküler endotelde hem VEGF hem de VEGF reseptörü için immünreaktivite ortaya konmuştur (110).

Chakraborty ve arkadaşlarının çalışmasında, VEGF ifadesi fare uterusunda implantasyon periyodu boyunca incelenmiştir. Buna göre 1. Ve 2. günlerde uterin lüminal epitelde VEGF-mRNA ifadesi izlenmiştir. 3. günde stromal hücrelerde zayıf ifadesi görülürken, 4. günde lüminal epitel ve stromada ifadesi saptanmıştır. 5. Ve 7. Günlerde ise mRNA varlığı ortaya konmuştur. 5. günde lüminal epitel ve stromada VEGF-mRNA birikimi gözlenmiştir. 6.-8. günlerde hem mezometriyal hem de antimezometriyal alanda saptanmıştır. Sonuçlar VEGF'nin, implantasyonda meydana gelen artmış vasküler permeabilite ve anjiyogenez sürecinde etkili olduğunu ve desidualizasyon sürecinde de yer aldığını ortaya koymaktadır (81).

Zhang ve arkadaşları VEGF'nin implantasyon sürecindeki ekspresyonunu farelerde yaptıkları çalışmada immunfloresans yöntemiyle araştırmışlardır. Gebeliğin 4. gününde uterus içinde VEGF antikoru enjekte edilerek 8. günde implantasyonu değerlendirmişlerdir. Sonuçta tutunan embriyo sayısında ve tutunmanın olduğu hücre yüzdesinde anlamlı azalma saptamışlardır. Bu bulgular ışığında implantasyon için VEGF'nin önemli sitokinlerden biri olduğu gösterilmiştir (108).

VEGF ve reseptörleri üzerine yaptıkları çalışmada, Sugino ve arkadaşları endometriyum dokusunu immunohistokimyasal yöntemle incelemişlerdir. VEGF immun boyamasının, midsekretuar evrede bez epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde en yüksek seviyede olduğunu, premenstruel evrede azaldığını

göstermişlerdir. Östrojen ve progesteron verilen deneklerde desidualizasyon sürecinde stromal hücrelerde kuvvetli boyanma izlenmiştir. Bu veriler implantasyon sürecinde, vasküler permeabilite artışı ve ilerleyen dönemde desidual vaskülerağ gelişiminde VEGF ve VEGF reseptörlerinin etkili olabileceğini düşündürmüştür (111).

VEGF-A, fare endometriyumunda erken gebelikte vasküler yeniden modellenme sürecinde etkili ajanlardan biridir. Walter ve arkadaşları farelerde yaptıkları çalışmada, erken gebelikte uterusu VEGF-A izoformlarının ve reseptörlerinin ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. VEGF-A seviyesinde gebeliğin 4. gününe kadar ciddi bir artış izlenmezken, 5. günde arttığı saptanmıştır. Bu ekspresyon artışının endometriyal endotelde hücre proliferasyonu ile eş zamanlı olarak ortaya çıktığı izlenmiştir. Bu artışın endometriyumda anjiyogenez için gerekli olduğu ve VEGF-A'nın implantasyon sürecinde ortaya çıkan vasküler yeniden modellenmeye aracılık ettiği öne sürülmüştür (112).

Kim ve arkadaşlarının, faredeki implantasyonu araştırdığı çalışma, VEGF'nin desidual anjiyogenezin anahtar düzenleyicisi olduğunu, özellikle VEGF'nin erken gebelikte anjiyogenezin hem miktarını hem de uzaysal dağılımını etkilediğini göstermiştir (113).

Folat eksikliği oluşturulan gebe farelerde 6.-8. günlerde desidual anjiyogenezin değerlendirildiği Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, VEGF-A ve VEGFR2 protein ve mRNA düzeyleri incelenmiş, folat eksikliği olan grupta vasküler anormallikler ve desidual anjiyogenezde sınırlılık saptanmıştır. Bunun yanında bu grupta VEGF-A ve VEGFR2 düzeylerinde azalma ve östrojenin

anormal ekspresyonu belirlenmiştir. Sonuç olarak folat eksikliğinin desidual anjiyogenezi bozabileceği, bunun vaskülotoksik etkiler ve hormonal dengesizlikler ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (114).

Bizim çalışmamızda da gebeğilin 5. gününde olan sıçanlardan alınan implantasyon alanlarında uygulanan VEGF-A immun boyaması ve gen ifade düzeylerine ait analizlerde, yüksek doz FA (40 mg/kg/g) takviyesi alan grupta VEGF-A ifadesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Folik asit eksikliği oluşturulan grupta ise hem immunohistokimyasal analizlerde hem de RT-PCR analizlerinde anlamlı olarak VEGF-A düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Düşük doz FA (5mg/kg/g) takviyesi verilen grupta ise RT-PCR analizinde ve immunohistokimyasal analizde kontrol grubuna göre VEGF-A seviyelerinde artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Hewitt ve arkadaşları yaptıkları östrojen reseptörü knockout (α ERKO) farelerde desidualizasyonu değerlendirdikleri çalışmada, uterusu transfer edilen embriyoların α ERKO farelerde implante olmadığını, ancak kontrol grubunda implante olduğunu göstermişler ve bu bilgilere dayanarak ER- α 'nın implantasyon için gerekli olduğu sonucuna varmışlardır (115)

Folat eksikliği olan sıçan yavrularında Pourie ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, folat eksikliğinin serebellumdaki etkileri incelendiğinde, folat eksikliği olan dişilerin yavrularında purkinje hücrelerinde ciddi bir farkla ER- α protein ekspresyonunu önemli oranda düşük bulmuşlardır. Bu etkinin folatın metilasyon üzerindeki etkisi nedeniyle, eksiklik grubunda ER- α 'nın metillenmesinde azalma yoluyla gerçekleştiği düşünülmüştür (116).

Belliard ve arkadaşları yaptıkları çalışmada endometriozis hastalarında östrojen ve progesteron reseptörlerinin apoptozis ve proliferasyonla ilişkisini araştırmışlardır. İmmunohistokimyasal olarak yapılan değerlendirmede östrojen ve progesteron reseptörleri ile hücrel proliferasyon, fertil kadınların normal endometriyumundan alınan örneklerle karşılaştırmıştır. Sonuçta apoptozis ile östrojen ve progesteron reseptörleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (117).

Tabebordbar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, diyabetik sıçanlarda ESR-1 gen ekspresyonu ve promotör DNA metilasyonuna folik asit etkisini değerlendirmişlerdir. Folik asit takviyesinin diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre ESR-1 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını öne sürmüşlerdir (118).

Ancak Gao ve arkadaşlarının yaptığı daha önceki bir çalışmada, folat eksikliği oluşturulup gebe kalan farelerde, gebeliğin 5. gününde alınan implantasyon alanlarına ait örneklerde eksiklik grubunda ESR-1 mRNA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (73).

Li ve arkadaşları gebeliğin erken evrelerindeki farelerde yaptıkları çalışmada, ER- α ekspresyonunun desidual dokuda arttığını göstermişler ve bunun daha önce Gao ve arkadaşlarının çalışmasında gebe farelerde ER- α promotörünün folat eksikliğinde daha az metillendiğinin gösterilmesinden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Östradiol ile aktive olan ER- α kompleksi ise folat eksikliği olan gebe farelerde ciddi olarak azaldığını ve kompleksin işlevinin zayıfladığını tespit

etmişlerdir. Bu nedenle folat eksikliğinin progesteron ve östrojen ile bunların ilgili reseptörleri arasındaki dengeyi bozabileceğini öne sürmüşlerdir (114).

Yuan ve arkadaşları folat eksikliğinin erkeklerde üreme fonksiyonuna etkisini araştırdıkları çalışmada, insan sperminde ESR-1 gen ifade düzeylerine bakılmış, farelerde oluşturulan eksiklik modelinde testis doku örnekleri RT-qPCR western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmada düşük seminal plazma folat konsantrasyonuna sahip grupta ESR-1 mRNA seviyeleri yüksek seminal plazma folat konsantrasyonuna sahip grupta anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Fare testis dokusunda yapılan RT-qPCR ve western blot analizlerinde folat eksikliği olan farelerde ESR-1 mRNA seviyeleri ve ESR-1 protein ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştı (119).

Çalışmamızda sıçalarda gebeliğin 5. gününde implantasyon alanında ER- α ifadesine folik asitin etkisi incelenmiştir. İmmunohistokimyasal olarak ER- α ifadesi, RT-PCR analizlerinde de ER- α 'yı kodladığı bilinen ESR-1 analiz edilmiştir. ESR-1'in, RT-PCR'da yüksek doz FA (40mg/kg/g) takviyesi grubunda kontrole göre anlamlı olarak arttığı, eksiklik grubunda ise anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. Düşük doz FA (5mg/kg/g) takviye grubunda ise kontrole göre bir fark izlenmemiştir. ER- α ifadesi immunohistokimyasal olarak incelendiğinde ise eksiklik grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak azalma olduğu tespit edilmiştir.

Padilla-Banks ve arkadaşları, eksojen östrojenlerin uterin etkilerini farelerde ve sıçanlarda değerlendirdikleri çalışmalarında 3 gün eksojen östrojen verilmesinden sonra hem farelerde hem de sıçanlarda uterus ağırlığı/ vücut ağırlığı oranında birbirlerine benzer şekilde doz-yanıt artışı ortaya koymuşlardır (120).

Çalışmamızda yüksek doz folik asit (40 mg/kg/gün) takviyesi verilen grupta, diğer gruplara kıyasla ER- α seviyelerinde artış ile birlikte uterin ağırlık / vücut ağırlığı oranı diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek olarak saptandı. Bu veriler uterin ağırlıktaki bu artışın yüksek doz grubunda ER- α artışıyla ilişkili olabileceğini düşündürdü.

Endometriyum, adezyonda rol oynayan moleküllerden olan integrinler bakımından zengindir. İntegrinlerin, fertilizasyon ve embriyo implantasyonu gibi gebeliğin erken olaylarında yer alan faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (121). Artık integrin $\alpha V\beta 3$ implantasyon için fonksiyonel bir belirteç olarak kabul görmüştür. İntegrin $\alpha V\beta 3$ 'ün yetersiz salınımı sonucu implantasyon başarısızlıkları ve düşükler karşımıza çıkmaktadır (122).

He ve arkadaşlarının, IVF tedavisi için başvuran hastalarda yaptıkları çalışmada, endometriyal biyopsi örnekleri alınmıştır. Bu örneklerde $\alpha V\beta 3$ integrine ait immunohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. İntegrin $\alpha V\beta 3$ 'ün ifadesinin özellikle bez epitel hücrelerinde membran üzerinde olduğunu ve reaksiyonun dağınık ve zayıf pozitiflik gösterdiğini saptamışlardır (123).

Sıçanlarda implantasyonda $\alpha V\beta 3$ 'ün rolünü araştıran bir çalışmada, endometriyumun reseptif olmayan, pre-reseptif ve reseptif dönemlerinde $\alpha V\beta 3$

integrin ifadesi immunohistokimya, immunositokimya ve akış sitometrisi yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Yapılan incelemelerde koitus sonrası 4. ve 5. günlerde endometriyal epitel hücrelerinde hücrelerinde αV ve $\beta 3$ alt birimlerine ait immunreaksiyon saptanmıştır. Bu reaksiyon 5. günde 4. günden ve gebe olmayan kontrollerden daha fazla olarak tespit edilmiştir. İntegrin $\alpha V\beta 3$ fonksiyonunu engelleyen ajan kullanımında ise implantasyonda azalma tespit edilmiştir. Bu veriler sonucunda $\alpha V\beta 3$ integrinin endometriyal reseptivitenin bir belirteci olduğu ve embriyo implantasyon sürecinde gerekli olduğu ortaya konmuştur (124).

İllera ve arkadaşları, gebe tavşanlarda yaptıkları çalışmada, gebeliğin 6. gününde uterus boynuzuna $\alpha V\beta 3$ integrine özgü bir antikor uygulanmışlardır. Gebeliğin 10. gününde uterin dokuda yapılan incelemede antikor uygulanan uterin boynuzlarda implantasyon sayılarında önemli bir azalma tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da $\alpha V\beta 3$ integrinin erken embriyo-maternal etkileşimde rol oynadığı ortaya konmuştur (80).

İntegrin $\alpha V\beta 3$ ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşim, kapiller damarlardan filizlenen endotelyal hücreler ve anjiyogenezis için oldukça önemlidir. Bunun yanında integrin aracılı sinyallerin, hücre proliferasyonunu ve motilitesini desteklemek amacıyla büyüme faktörü reseptörleri ile birlikte çalıştığı bilinmektedir. İntegrin $\alpha V\beta 3$ 'ün anjiyojenik etkilerini anlamak için VEGFR-2 ile ilişkisini araştıran çalışmada, VEGF-A tarafından indüklenen VEGFR-2 fosforilasyonu ve mitojenitesi; $\alpha V\beta 3$ ligandı ve vitronektin ile kaplanmış hücrelerde, $\alpha 5\beta 1$ ligandı, fibronektin ve $\alpha 2\beta 1$ ligandıyla kaplananlara göre artmış

olarak tespit edilmiştir. Bu verileri $\alpha V\beta 3$ integrinin yeni oluşan damalar için önemli koruyucu etkisinin yanında önemli bir anjiyojenik indükleyici VEGF-A ile tetiklenen VEGFR-2'nin aktivasyonuna da katıldığını göstermektedir (79).

Çalışmamızda sıçalarda gebeliğin 5. gününde implantasyon alanında $\alpha V\beta 3$ integrin ifadesine folik asitin etkisi incelenmiştir. RT-PCR analizlerinde de αV ve $\beta 3$ integrin alt birimleri ayrı olarak incelenmiş yüksek doz FA (40mg/kg/g) takviyesi grubunda anlamlı olarak arttığı, eksiklik grubunda ise anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. Düşük doz FA (5mg/kg/g) takviye grubunda ise kontrole göre anlamlı bir fark ortaya konmamıştır. İmmunohistokimyasal analizlerde ise $\alpha V\beta 3$ integrin tek boyamada incelenmiş, eksiklik grubunda yüksek doz FA (40mg/kg/g) takviyesi grubuna ve düşük doz FA (5mg/kg/g) takviye grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

6. SONUÇ

Desidual hücrelerde VEGF-A ekspresyonu ER- α tarafından düzenlenmektedir. Ancak bu mekanizma günümüzde hala açıklanamamıştır. Bu nedenle erken gebelik döneminde ER- α ile VEGF-A arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yaptığımız bu çalışmada; bu etkileşimin desidual anjiyogenezis üzerindeki etkisini göstermeyi planladık. Bunun yanında bu ilişkinin folik asit eksikliği ya da takviyesinden etkilenip etkilenmediğini de ortaya koymak amacıyla bu çalışmada yaptığımız immün boyamalarda özellikle lüminal ve bez epitel hücrelerinde implantasyon sırasında ekprese olan α V β 3 integrinin VEGF-A ekspresyonu uyarak implantasyon bölgesinde güçlü bir anjiyogeneze sebep olduğunu gördük. Damarlarda bu yeniden modelleme VEGF-A ekspresyonunda artışla birlikte çalışmamızda belirlenmiştir. Lüminal epitel hücreleri bazı miyometriyal hücreler ve stromal hücrelerin erken gebelik faktörü olan östrojen reseptörü salınımını uyarmaları ile desidual hücrelerin de yine aynı yolakla VEGF-A ekspresyonunu uyardığı gösterilen birçok bilimsel çalışma bulgusuyla eşleşerek biz de çalışmamızda ER- α ekspresyonu ile VEGF-A ekspresyonu arasında benzerlik saptadık. Sonuç olarak bu 3 moleküler düzenleyicinin gruplar arasındaki birbirine benzer ekspresyon gösterdiğini salgılandıkları hücrelerce implantasyonun ilişkili dönemi ile bağlantılı olarak ekspresyonlarının birbirleriyle uyumlu olduğu saptanmıştır.

Folik asit eksikliğinin ise bu üç moleküler düzenleyicinin ekspresyonlarını önemli ölçüde azaltması folik asit takviyesinin implantasyon başarısında önemli bir etkisi olabileceğini düşündürmüştür. Yapılacak ileri moleküler ara yolak çalışmaları konuya ışık tutacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Dey S, Lim H, Das SK, Reese J, Paria B, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews*. 2004;25(3):341-73.
2. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent progress in hormone research*. 2002;57:339-56.
3. Organization WH. Guideline: Intermittent iron and folic acid supplementation in menstruating women: World Health Organization; 2011.
4. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology E-Book: With STUDENT CONSULT Online Access: Elsevier Health Sciences; 2018.
5. Sadler TW. Langman's medical embryology. 13th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
6. Kierszenbaum AL TL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi : Patolojiye Giriş. 4th ed. R. D, editor. Ankara: Palme Yayıncılık; 2021.
7. Kayalı H. ŞG, Taşyürek M. . İnsan Embriyolojisi: Alfa Basım Yayım Dağıtım; 1992.
8. Ross MH PW. Histoloji : konu anlatımı ve atlas. B. B, editor. Ankara: Palme Yayıncılık; 2017.
9. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Before We are Born E-Book: Essentials of Embryology and Birth Defects with STUDENT CONSULT Online Access: Elsevier Health Sciences; 2015.
10. H. O. Ozan Anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.
11. Ameer MA, Fagan SE, Sosa-Stanley JN, Peterson DC. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Uterus. *StatPearls* [Internet]. 2020.
12. Gartner L. Color Atlas and Text of Histology: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
13. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(23):1796-9.
14. Gao F, Ma X, Rusie A, Hemingway J, Ostmann AB, Chung D, et al. Epigenetic changes through DNA methylation contribute to uterine stromal cell decidualization. *Endocrinology*. 2012;153(12):6078-90.
15. Talbi S, Hamilton A, Vo K, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. 2006;147(3):1097-121.
16. Dorostghoal M, Hamid-o-allah Ghaffari FM, Keikhah N. Overexpression of endometrial estrogen receptor-alpha in the window of implantation in women with unexplained infertility. *International journal of fertility & sterility*. 2018;12(1):37.
17. Lessey BA, Palomino WA, Apparao K, Young SL, Lininger RA. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2006;4(1):1-10.

18. Lee D-K, Kurihara I, Jeong J-W, Lydon JP, DeMayo FJ, Tsai M-J, et al. Suppression of ER α activity by COUP-TFII is essential for successful implantation and decidualization. *Molecular endocrinology*. 2010;24(5):930-40.
19. Lessey BA, Young SL. Structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*: Elsevier; 2019. p. 206-47. e13.
20. Lessey BA, Young SL. What exactly is endometrial receptivity? *Fertility and sterility*. 2019;111(4):611-7.
21. Yilmaz F, Tekmen I. İmplantasyon Sürecinde Embriyo, Endometriyum Farklanması ve Moleküler Yolaklar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2019;39(2):212-20.
22. Hantak AM, Bagchi IC, Bagchi MK. Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation. *The International journal of developmental biology*. 2014;58:139.
23. Makieva S, Giacomini E, Ottolina J, Sanchez AM, Papaleo E, Viganò P. Inside the endometrial cell signaling subway: mind the gap (s). *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9):2477.
24. Tu Z, Wang Q, Cui T, Wang J, Ran H, Bao H, et al. Uterine RAC1 via Pak1-ERM signaling directs normal luminal epithelial integrity conducive to on-time embryo implantation in mice. *Cell Death & Differentiation*. 2016;23(1):169-81.
25. Davidson LM, Coward K. Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2016;108(1):19-32.
26. Egashira M, Hirota Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reproductive medicine and biology*. 2013;12(4):127-32.
27. Mokhtar HM, Giribabu N, Muniandy S, Salleh N. Testosterone decreases the expression of endometrial pinopode and L-selectin ligand (MECA-79) in adult female rats during uterine receptivity period. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(5):1967.
28. Benirschke K, Kaufmann, P., Baergen, R.N. . Pathology of the human placenta. In: Fifth Edition ed. ed. New York, NY Springer; 2006.
29. Wu Y-m, Luo H-w, Kou H, Wen Y-x, Shen L, Pei L-g, et al. Prenatal caffeine exposure induced a lower level of fetal blood leptin mainly via placental mechanism. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;289(1):109-16.
30. Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology*. 1993;266(6):603-28.
31. Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biology of reproduction*. 2010;82(2):235-45.
32. Fierro-González JC, White MD, Silva JC, Plachta N. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nature Cell Biology*. 2013;15(12):1424-33.

33. PrabhuDas M, Bonney E, Caron K, Dey S, Erlebacher A, Fazleabas A, et al. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature immunology*. 2015;16(4):328-34.
34. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human reproduction update*. 2006;12(6):731-46.
35. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*. 2003;299(5605):405-8.
36. Dominguez F, Yáñez-Mó M, Sanchez-Madrid F, Simon C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *The FASEB journal*. 2005;19(9):1056-60.
37. Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, Yoshinaga K. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Developmental biology*. 1999;208(2):488-501.
38. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Reviews of reproduction*. 1997;2:84-93.
39. Talaulikar VS, Arulkumaran S. Folic acid in obstetric practice: a review. *Obstetrical & gynecological survey*. 2011;66(4):240-7.
40. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products NaA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Folate. *EFSA Journal*. 2014;12(11):1-59.
41. Banjari I, Matoković V, Škoro V. The question is whether intake of folic acid from diet alone during pregnancy is sufficient. *Medicinski pregled*. 2014;67(9-10):313-21.
42. Eskes TK. From anemia to spina bifida—the story of folic acid: A tribute to Professor Richard Smithells. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2000;90(2):119-23.
43. Avşar A, Serdar K, Başak K. Türkiye’de Folik Asit Perikonsepsiyonel Olarak Kullanılmalı Mıdır? *Ankara Medical Journal*. 2012;12(4):188-94.
44. Imbard A, Benoist J-F, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(9):4352-89.
45. Luccock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism*. 2000;71(1-2):121-38.
46. Younis IR, Stamatakis MK, Callery PS, Meyer-Stout PJ. Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. *International journal of pharmaceuticals*. 2009;367(1-2):97-102.
47. Krishnaswamy K, Nair KM. Importance of folate in human nutrition. *British Journal of Nutrition*. 2001;85(S2):S115-S24.
48. Butterworth C, Baugh C, Krumdieck C. A study of folate absorption and metabolism in man utilizing carbon-14—labeled polyglutamates synthesized by the solid phase method. *The Journal of clinical investigation*. 1969;48(6):1131-42.

49. Wagner C. Biochemical role of folate in cellar metabolism In: Folate in Health and Disease (LB Bailey ed) Marcel Dekker New York NY. 1995.
50. Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. The American journal of clinical nutrition. 2006;83(5):993-1016.
51. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. The American journal of clinical nutrition. 2007;85(1):285S-8S.
52. Yan J, Liu Y, Cao L, Zheng Y, Li W, Huang G. Association between duration of folic acid supplementation during pregnancy and risk of postpartum depression. Nutrients. 2017;9(11):1206.
53. Köksal G, Gökmen, H. Çocuk Hastalıklarında Beslenme Tedavisi (3. bs.). Ankara: Hatiboğlu Yayınları; 2013. s. 95 p.
54. UZDİL Z, ÖZENOĞLU A. GEBELİKTE ÇEŞİTLİ BESİN ÖĞELERİ TÜKETİMİNİN BEBEK SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi. 2015;4(2):117-21.
55. Salcedo-Bellido I, Martínez-Galiano JM, Olmedo-Requena R, Mozas-Moreno J, Bueno-Cavanillas A, Jimenez-Moleon JJ, et al. Association between vitamin intake during pregnancy and risk of small for gestational age. Nutrients. 2017;9(12):1277.
56. McPartlin J, Weir D, Halligan A, Darling M, Scott J. Accelerated folate breakdown in pregnancy. The Lancet. 1993;341(8838):148-9.
57. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu Y-h. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. Reviews in Obstetrics and Gynecology. 2011;4(2):52.
58. Wang H, De Steur H, Chen G, Zhang X, Pei L, Gellynck X, et al. Effectiveness of folic acid fortified flour for prevention of neural tube defects in a high risk region. Nutrients. 2016;8(3):152.
59. Organization WH. Guideline: Daily iron and folic acid supplementation in pregnant women: World Health Organization; 2012.
60. Czeizel AE, Dudás I, Vereczkey A, Bánhidy F. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. Nutrients. 2013;5(11):4760-75.
61. Dayı T, Pekcan G. GEBELERDE FOLİK ASİT DESTEĞİ VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR. Food and Health. 2019;5(2):128-38.
62. Fekete K, Berti C, Trovato M, Lohner S, Dullemeijer C, Souverein OW, et al. Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: a systematic review and meta-analysis on birth weight, placental weight and length of gestation. Nutrition journal. 2012;11(1):1-8.
63. Xie K, Fu Z, Li H, Gu X, Cai Z, Xu P, et al. High folate intake contributes to the risk of large for gestational age birth and obesity in male offspring. Journal of cellular physiology. 2018;233(12):9383-9.
64. Bakanlığı TS. Türkiye Beslenme Rehberi (TÜBER). Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara. 2015;20:2019.
65. Chandracharya PL, Alva R, Hosapatna M, Konuri A, Kumar A. Role of folic acid supplementation and/or its absence during pregnancy on implantation of embryos—An experimental study of Wistar rats. Journal of the Anatomical Society of India. 2018;67(1):80-5.

66. Maric C, Forsblom C, Thorn L, Wadén J, Groop P-H, Group FS. Association between testosterone, estradiol and sex hormone binding globulin levels in men with type 1 diabetes with nephropathy. *Steroids*. 2010;75(11):772-8.
67. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835.
68. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2015;29(4):557-68.
69. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J-Ak, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*. 1997;138(11):4613-21.
70. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(12):4258-65.
71. Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, Sasano H, Okamura K. Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertility and sterility*. 2001;75(6):1198-205.
72. Liu Z-J, Maekawa M, Horii T, Morita M. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ER α gene in tumor cell lines. *Life sciences*. 2003;73(15):1963-72.
73. Gao R, Ding Y, Liu X, Chen X, Wang Y, Long C, et al. Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of Esr1, Cdh1 and Pgr, and its influence on endometrial receptivity and embryo implantation. *Human reproduction*. 2012;27(9):2756-65.
74. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(23):11162-6.
75. Wang A, Ji L, Shang W, Li M, Chen L, White RE, et al. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecological Endocrinology*. 2011;27(4):251-5.
76. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25.
77. Hornung D, Lebovic DI, Shifren JL, Vigne J-L, Taylor RN. Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertility and sterility*. 1998;69(5):909-15.
78. Möller B, Rasmussen C, Lindblom B, Olovsson M. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular human reproduction*. 2001;7(1):65-72.

79. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *The EMBO journal*. 1999;18(4):882-92.
80. Illera MJ, Lorenzo P, Gui Y-t, Beyler SA, Apparao K, Lessey BA. A role for $\alpha v \beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. *Biology of reproduction*. 2003;68(3):766-71.
81. Chakraborty I, Das S, Dey S. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *Journal of Endocrinology*. 1995;147(2):339-52.
82. Licht P, Russu V, Lehmeyer S, Wissentheit T, Siebzehnriibl E, Wildt L. Cycle dependency of intrauterine vascular endothelial growth factor levels is correlated with decidualization and corpus luteum function. *Fertility and sterility*. 2003;80(5):1228-33.
83. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, Stavreus-Evers A, Tzonou A, Landgren B-M. Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles. *Fertility and sterility*. 2004;81(5):1322-7.
84. Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376(6535):66-70.
85. Abbas MM, Evans JJ, Sykes PH, Benny PS. Modulation of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in normal human endometrial stromal cells. *Fertility and sterility*. 2004;82:1048-53.
86. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal*. 1990;4(11):2868-80.
87. Lessey B, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda S, Buck C. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(1):188-95.
88. Aplin JD, Spanswick C, Behzad F, Kimber SJ, Vićovac L. Molecular aspects of implantation: Integrins $\beta 5$, $\beta 3$ and αv are apically distributed in endometrial epithelium. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1996;2(7):527-34.
89. Campbell S, Swann H, Seif M, Kimber S, Aplin J. Integrins and adhesion molecules: Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reproduction*. 1995;10(6):1571-8.
90. Sutherland A, Calarco P, Damsky C. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*. 1993;119(4):1175-86.
91. Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the $\alpha v \beta 3$ Integrin Adversely Affects Implantation in the Mouse¹. *Biology of Reproduction*. 2000;62(5):1285-90.
92. Meyer W, Castelbaum A, Somkuti S, Sagoskin A, Doyle M, Harris J, et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1997;12(7):1393-8.

93. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertility and sterility*. 1995;63(3):535-42.
94. Somkuti SG, Yuan L, Fritz MA, Lessey BA. Epidermal growth factor and sex steroids dynamically regulate a marker of endometrial receptivity in Ishikawa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(7):2192-7.
95. Gregory CW, Wilson EM, Apparao K, Lininger RA, Meyer WR, Kowalik A, et al. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(6):2960-6.
96. Ungvari Z, Sarkadi-Nagy E, Bagi Z, Szollár L, Koller A. Simultaneously increased TxA2 activity in isolated arterioles and platelets of rats with hyperhomocysteinemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(5):1203-8.
97. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic pathology*. 2015;43(6):776-93.
98. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*. 2002;30(9):e36-e.
99. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(3):185-99.
100. Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(4):995-1003.
101. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 1996;65(3):503-9.
102. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(19):1400-8.
103. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 1988;319(4):189-94.
104. Miller PB, Parnell BA, Bushnell G, Tallman N, Forstein DA, Higdon III HL, et al. Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Human Reproduction*. 2012;27(3):881-8.
105. McLone DG. The etiology of neural tube defects: the role of folic acid. *Child's Nervous System*. 2003;19(7-8):537-9.
106. Pacheco SS, Braga C, Souza AId, Figueiroa JN. Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects. *Revista de Saúde Pública*. 2009;43:565-71.
107. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews T, Erickson JD, Wong L-YC. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama*. 2001;285(23):2981-6.

108. Zhang J, Wang L, Cai L, Cao Y, Duan E. The expression and function of VEGF at embryo implantation “window” in the mouse. *Chinese Science Bulletin*. 2001;46(5):409-11.
109. Schäfer-Somi S, Sabitzer S, Klein D, Reinbacher E, Kanca H, Beceriklisoy H, et al. Vascular endothelial (VEGF) and epithelial growth factor (EGF) as well as platelet-activating factor (PAF) and receptors are expressed in the early pregnant canine uterus. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013;48(1):20-6.
110. Yi X, Jiang H, Lee K, Tang P, Chow P. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell and tissue research*. 1999;296(2):339-49.
111. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*. 2002;123(3):379-87.
112. Walter LM, Rogers PA, Girling JE. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms in the mouse uterus during early pregnancy. *Reproductive biomedicine online*. 2010;21(6):803-11.
113. Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(9):1415-30.
114. Li Y, Gao R, Liu X, Chen X, Liao X, Geng Y, et al. Folate deficiency could restrain decidual angiogenesis in pregnant mice. *Nutrients*. 2015;7(8):6425-45.
115. Curtis Hewitt S, Goulding EH, Eddy EM, Korach KS. Studies Using the Estrogen Receptor α Knockout Uterus Demonstrate That Implantation but Not Decidualization-Associated Signaling Is Estrogen Dependent. *Biology of Reproduction*. 2002;67(4):1268-77.
116. Pourié G, Martin N, Bossenmeyer-Pourié C, Akchiche N, Guéant-Rodriguez RM, Geoffroy A, et al. Folate-and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *The FASEB Journal*. 2015;29(9):3713-25.
117. Belliard A, Noel A, Foidart J. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril*. 2004;8:80-5.
118. Tabebordbar M, Moradi Sarabi M, Vakili S, Zare R, Zal F. Effect of folic acid and vitamin E on promoter DNA methylation and expression of TGF- β 1, ESR-1 and CDH-1 in the uterus of STZ-induced diabetic rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2020:1-7.
119. Yuan H-F, Zhao K, Zang Y, Liu C-Y, Hu Z-Y, Wei J-J, et al. Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of Esr1, Cav1, and Elavl1, and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(15):24130.

120. Padilla-Banks E, Jefferson WN, Newbold RR. The immature mouse is a suitable model for detection of estrogenicity in the uterotrophic bioassay. *Environmental health perspectives*. 2001;109(8):821-6.
121. Bowen JA, Hunt JS. The role of integrins in reproduction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine: Minireviews*. 2000;223(4):331-43.
122. Tei C, Maruyama T, Kuji N, Miyazaki T, Mikami M, Yoshimura Y. Reduced expression of $\alpha v \beta 3$ integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2003;20(1):13-20.
123. He Z, Ma Y, Li L, Liu J, Yang H, Chen C, et al. Osteopontin and Integrin $\alpha v \beta 3$ Expression during the Implantation Window in IVF Patients with Elevated Serum Progesterone and Oestradiol Level. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2016;76(06):709-17.
124. Srinivasan KR, Blesson CS, Fatima I, Kitchlu S, Jain SK, Mehrotra PK, et al. Expression of $\alpha v \beta 3$ integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. *General and comparative endocrinology*. 2009;160(2):124-33.

8. ÖZET

Sıçanlarda Prekonsepsiyonel Folik Asit Takviyesinin İmplantasyon Üzerine Etkilerinin İmmunohistokimsal Yöntemlerle Değerlendirilmesi

İmplantasyon, gebelik oluşumunda önemli aşamalardan biridir. Yardımcı üreme tekniklerindeki gelişimlerle birlikte infertilite sebepleri içinde implantasyon başarısızlıkları ön plana çıkmaya başlamıştır. İmplantasyon uterus endometriumu ile embriyo arasında karşılıklı etkileşimi içeren kısa bir süreçte gerçekleşir. Bu süreçte embriyo ve endometriumun implantasyona hazır olması gerekmektedir. İmplantasyon sürecine endometriumda ve embriyoda ifade edilen birçok molekül aracılık eder. Folik asit (FA), gebelik oluşmadan takviye olarak kullanılması önerilen, eksikliğinde konjenital anomalilere sebep olabilen bir vitamindir. Gebelikte farklı dozlarda kullanım önerileri bulunmaktadır. Bu çalışmada folik asitin embriyo implantasyonu ile ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflendi.

Çalışmamızda 6-8 haftalık 32 adet wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol, eksiklik modeli oluşturulan, düşük doz (5mg/kg) FA takviyesi verilen, yüksek doz (40mg/kg) FA takviyesi verilen olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 5 haftalık takviye ve eksiklik model oluşumunun ardından erkek sıçanlarla çiftleştirilen dişiler, çiftleşmeyi takiben 5. günde implantasyon değerlendirilmesi için kurban edildi ve implantasyon alanları toplandı. Alınan dokular histolojik olarak ve gen ifade düzeyinde değerlendirildi.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A), Östrojen Reseptörü-alfa (ER- α), İntegrin α V β 3 açısından değendirilen gruplarda, eksiklik grubunda tüm belirteçlerde anlamlı azalma izlenirken, düşük doz ve yüksek doz gruplarında tüm belirteçler açısından immunohistokimya ve RT-PCR ile artış tespit edildi.

Çalışmamız sonucunda gebelik öncesi folik asitin takviye edilmesinin bilinen diğer neonatal etkilerinin yanında gebeliğin oluşum ve sürdürülmesi aşamasında da olumlu etkilerinin olduğu, eksikliğinde implantasyon aşamasında bozukluklara yol açabileceği ortaya konmuştur. İleride yapılacak ara yolak çalışmalarıyla embriyo implantasyonundaki etkileri daha açık şekilde ortaya konabilir.

Anahtar kelimeler: Folik asit, implantasyon, VEGF-A, ER- α , integrin α V β 3

9. SUMMARY

Immunohistochemical Analysis of the Effect of Preconceptional Folic Acid Supplementation on Embryonic Implantation in Rats

Implantation is one of the important stages in pregnancy formation. With the improvements in assisted reproductive techniques, implantation failures have started to come to the fore among the causes of infertility. Implantation takes place in a short period of interaction between the uterine endometrium and the embryo. In this process, the embryo and endometrium must be ready for implantation. The implantation process is mediated by many molecules expressed in the endometrium and embryo. Folic acid (FA) is a vitamin recommended to be used as a supplement before pregnancy occurs, and its deficiency can cause congenital anomalies. There are recommendations for use in different doses during pregnancy. In this study, it was aimed to evaluate the relationship of folic acid with embryo implantation.

In our study, 32 female wistar albino rats, 6-8 weeks old, were used. The rats were divided into 4 groups as control, deficiency model was created, low dose (5mg/kg) FA supplement was given, and high dose (40mg/kg) FA supplement was given. After 5 weeks of supplementation and deficiency pattern formation, females mated with male rats were sacrificed and implantation sites were collected for implantation evaluation on day 5 following mating. Tissues taken were comparatively evaluated histologically and at the level of gene expression.

In the groups evaluated for vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Estrogen Receptor-alpha (ER- α), integrin α V β 3, all markers were significantly decreased in the deficiency group, while in the low-dose and high-dose groups, an increase was observed in all markers with IHC and RT-PCR.

As a result of our study, it has been revealed that supplementation of folic acid before pregnancy has positive effects in the formation and maintenance of pregnancy as well as other known neonatal effects, and its deficiency may lead to disorders in the implantation stage. The effects on implantation can be revealed more clearly with future pathway studies.

Keywords: Folic acid, implantation, VEGF-A, ER- α , integrin α V β 3