

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA PRENATAL KAFEİN TÜKETİMİN
İMLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. FİLİZ YILMAZ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
UZMANLIK TEZİ**

İZMİR – 2019

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA PRENATAL KAFEİN TÜKETİMİN
İMLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. FİLİZ YILMAZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Işıl TEKME

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.324 sayı ile desteklenmiştir.)

“Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Filiz YILMAZ’ın ‘Sıçanlarda Prenatal Kafein Tüketimin İmplantasyon Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi’ konulu Uzmanlık Tezi 05.04.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlanmıştır.

Prof. Dr. Işıl TEKMEN

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ülker CANKURT

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Prof. Dr. Meltem KURUŞ

ÜYE

Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL DİZİNİ	v
RESİM DİZİNİ	vi
TABLO DİZİNİ	vii
GRAFİK DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜRLER	xi
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. İmplantasyon	8
2.1.1. Embriyo	8
2.1.1.1. Embriyo Gelişimi	8
2.1.1.2. Embriyonun Aktivasyonu.....	9
2.1.2. Endometriyum	11
2.1.2.1. Endometriyumun Genel Yapısı	11
2.1.2.2. Endometriyumun İmplantasyona Hazırlanması	12
2.1.3. Embriyo-Maternal Etkileşim.....	14
2.1.3.1. Apozisyon	15
2.1.3.1.1. HB-EGF (Heparin Binding Epidermal Growth Factor).....	16
2.1.3.1.2. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü).....	17
2.1.3.1.3. MUC-1 (Mucin-1).....	18
2.1.3.2. Adezyon.....	19
2.1.3.2.1. α V β 3 integrin	20

2.1.3.3.	İnvazyon	21
2.1.3.3.1.	MMP-9 (Matriks Metalloproteinaz-9)	21
2.2.	Kafein	22
2.2.1.	Kafein Metabolizması	24
2.2.2.	Kafeinin Etkileri	25
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1.	Araştırmanın Tipi	29
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	29
3.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	29
3.4.	Çalışmanın Materyali	30
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri.....	30
3.6.	Veri Toplama Araçları.....	30
3.6.1.	Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	30
3.6.2.	Araştırmada Kullanılan Yöntemler	30
3.6.2.1.	Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi	31
3.6.2.2.	Ölçme ve Fiziksel Değerlendirme	31
3.6.2.3.	Histokimyasal Değerlendirmeler	31
3.6.2.3.1.	Hematoksilen & Eozin Boya Protokolü.....	32
3.6.2.3.2.	Masson's Trichrome Boya Protokolü	33
3.6.2.4.	Morfometrik Değerlendirmeler	34
3.6.2.4.1.	İmplantasyon Alanlarının Değerlendirmesi	34
3.6.2.5.	İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler	34
3.6.2.5.1.	İmmünohistokimya Boya Protokolü	34
3.6.2.5.2.	Semikantitatif İmmünohistokimyasal Analiz.....	36
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi.....	36
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	37
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları.....	37

3.10.	Etik Kurul Onayı.....	37
4.	BULGULAR	38
4.1.	Deneklerin Menstrüel Sikluslarının ve Gebeliklerinin Belirlenmesi	38
4.2.	İmplantasyon Alan Sayılarının Değerlendirilmesi	38
4.3.	Hematoksilen & Eozin Boyama	39
4.3.1.	Kontrol Grubu	39
4.3.2.	Düşük Doz Kafein Grubu.....	42
4.3.3.	Yüksek Doz Kafein Grubu	43
4.4.	Masson Trikrom Boyaması	44
4.4.1.	Kontrol Grubu	44
4.4.2.	Düşük Doz Grubu.....	44
4.4.3.	Yüksek Doz Grubu.....	45
4.5.	İmmunohistokimyasal Bulgular	46
4.5.1.	Muc-1 (Müsin-1)	46
4.5.1.1.	Kontrol Grubu.....	46
4.5.1.2.	Düşük doz Grubu.....	46
4.5.1.3.	Yüksek doz grubu	46
4.5.2.	HB-EGF	48
4.5.2.1.	Kontrol Grubu.....	48
4.5.2.2.	Düşük doz Grubu.....	48
4.5.2.3.	Yüksek doz grubu	49
4.5.3.	İntegrin $\alpha V\beta 3$	50
4.5.3.1.	Kontrol Grubu.....	50
4.5.3.2.	Düşük doz Grubu.....	50
4.5.3.3.	Yüksek Doz Grubu	51
4.5.4.	VEGF	52
4.5.4.1.	Kontrol Grubu.....	52

4.5.4.2.	Düşük Doz Grubu.....	52
4.5.4.3.	Yüksek Doz Grubu	53
4.5.5.	MMP-9	54
4.5.5.1.	Kontrol Grubu.....	54
4.5.5.2.	Düşük Doz Grubu.....	54
4.5.5.3.	Yüksek Doz Grubu	54
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇLAR	64
7.	KAYNAKLAR.....	66
8.	EKLER	75
8.1.	EK-1 Etik Kurul Belgesi.....	75
8.2.	Özgeçmiş	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Fertilizasyon sonucu oluşan zigotun gelişim süreci.....	9
Şekil 2: <i>Blastosistin Aktivasyonu</i>	11
Şekil 3: <i>Uterin Reseptivite</i>	13
Şekil 4: <i>Embriyonun implantasyonu</i>	15
Şekil 5: <i>Blastosistin implantasyonu</i>	21
Şekil 6: <i>Kafeinin Kimyasal Yapısı</i>	22
Şekil 7: Kafeinin glioblastomada etki mekanizması	61



RESİM DİZİNİ

Resim 1: 5. Gün İmplantasyon Alan Sayıları.....	38
Resim 2: 6. Gün İmplantasyon Alan Sayıları.....	39
Resim 3: H&E boyama	41
Resim 4: Kontrol grubu H&E boyama.....	41
Resim 5: Düşük doz grubu H&E boyama.....	43
Resim 6: Yüksek doz Grubu H&E boyama	44
Resim 7: Masson trikrom boyama	45
Resim 8: Müsin-1 immünohistokimyasal boyaması	47
Resim 9: HB-EGF İmmünohistokimyasal Boyama	49
Resim 10: İntegrin $\alpha V\beta 3$ immünohistokimyasal boyama.....	51
Resim 11: VEGF immünohistokimyasal boyama	53
Resim 12: MMP-9 immünohistokimyasal boyama.....	55

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Doku takip protokolü	31
Tablo 2: Hematoksilen & Eozin boya protokolü.	32
Tablo 3: Masson Trichrome boya protokolü.	33
Tablo 4: İmmünohistokimyasal boya protokolü.	35
Tablo 5: Semikantitatif İmmünohistokimyasal Skorlama.....	36
Tablo 6: Gruplara ait semikantitatif skorlama ortalamaları.	56
Tablo 7: Gruplar arası immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması.	57
Tablo 8: İki grup arası immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması.	58



GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: İmplantasyon Alan Sayılarının İstatiksel Analizi	39
Grafik 2: Musin-1 immünoreaktivitesinin istatistiksel değeriendirmesi.....	48
Grafik 3: HB-EGF immünoreaktivitesinin istatistiksel değeriendirmesi.....	50
Grafik 4: İntegrin α V β 3 immünoreaktivitesinin istatistiksel değeriendirmesi.....	52
Grafik 5: VEGF immünoreaktivitesinin istatistiksel değeriendirmesi	54
Grafik 6: MMP-9 immünoreaktivitesinin istatistiksel değeriendirmesi.....	55



KISALTMALAR

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

HB-EGF: Heparin Bağımlı Epidermal Büyüme Faktörü

MUC-1: Musin-1

MMP-9: Matriks Metalloproteinaz-9

ECM: Ekstraselüler matriks

4-OH-E2: 4-hidroksi östradiol

ER: Östrojen Reseptörü

E2: Östradiol -17

CB-1 ve CB-2: Kanabinoid Reseptörleri

ERB1- 2: EGF Reseptörleri

P4: Progesteron

LIF: Lösemi İnhibitör Faktörü

IGF-II: İnsülin benzeri büyüme faktörü II

ERA: Endometriyal Receptivite Analizi

TGF- α : Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (Transforming Growth Factor- α)

TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β)

CSF-1: Koloni Stimule Edici Faktör-1(Colony Stimulating Factor-1)

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü- α (Tumour Necrosis Factor- α)

EPF: Erken hamilelik faktörü (Early Pregnancy Factor)

PIF: Preimplantasyon faktörü (Preimplantation Factor)

PAF: Trombosit aktivite edici faktör (Platelet Activating Factor)

PG: Prostaglandin

INF- γ : İnterferon gama

HCG: insan koryonik gonadotropin (Human Chorionic Gonadotropin)

HSPG: Heparan Sülfat Proteoglikan

OPN: Osteopontin

TIMP: Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri

cAMP: Siklik adenosin monofosfat

cGMP: Siklik guanosin monofosfatı

VIP: Vazoaktif İntestinal Peptit

TSP-1: Trombospondin-1

RGD: Arg-Gly-Asp amino asit dizisi

TEŞEKKÜRLER

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince daima yol gösterici olan, bilgi birikimini ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen ve desteğini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Işıl TEKME'ne,

Tıpta uzmanlık eğitimime katkılarını sağlayan Prof. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Bekir ERGÜR, Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Ülker CANKURT, Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN, Doç. Dr. Başak BAYKARA, Doç. Dr. Seda ÖZBAL, Doç. Dr. Serap CİLAKER MICİLİ ve biyolog Özcan ÜSTÜN'e,

ÜYTE eğitimi almamda beni destekleyen Kadın Hastalıkları ve doğum Anabilim Dalında görev yapan Prof.Dr. Murat CELİLOĞLU, Prof.Dr. Erbil DOĞAN hocalarıma ve bu eğitimi alırken benimle bilgilerini, tecrübelerini paylaşan DEÜ Tüp Bebek Merkezi'nin değerli embriyologları Dr. Öğr. Üyesi Elvan KOYUNCU, Öğretim Görevlisi Seda GÜNGÖR ve Öğretim Görevlisi Müge KOVALI SEZER'e ve tüp bebek merkezinin değerli hemşirelerine,

Tez çalışmama katkılarından dolayı sevgili arkadaşım Gökçen BİLİCİ' ye ve deneysel çalışmalarım sırasında bana eşlik eden Feyyaz ÖZEL'e,

Asistanlık sürecimin bana kazandırmış olduğu değerli arkadaşlarım; Şeyda DEMİR, Pınar AKOKAY, Betül ATIŞ, Nevin ERSOY, Selma AYDEMİR, Gözde ERKUL, Sıla SOY, Nurşin KARAMAN ve Ali Rıza KARABULUT diğer bölüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatımda da desteklerini esirgemeyen her zaman sevgi ile tüm zorlukları aşmamı sağlayan aileme ve beni her zaman desteklediğini bildiğim yanımda olan sevgili yol arkadaşım Bayram YILMAZ'a ve hayatımın neşesi olan canım kızlarım Fatma Betül ve Zeynep'ime çok teşekkür ederim.

SIÇANLARDA PRENATAL KAFEİN TÜKETİMİN İMPLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

FİLİZ YILMAZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Narlıdere, İzmir, drfilizyilmaz@gmail.com

ÖZET

Amaç: İmplantasyon gebeliğin gerçekleşmesinde en önemli aşamalardan biridir. Birçok dış faktör bu süreci olumsuz etkileyebilir. Günlük hayatımızda birçok içecek ve yiyecekte yer alan kafeinin gebelik sürecinde kısıtlı tüketimi önerilmektedir. Fakat kafein tüketiminin gebelik sürecindeki etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda sıçanlarda prenatal kafein tüketiminin doza bağımlı olarak embriyo implantasyonuna etkisi ve implantasyon aşamalarında rol oynayan moleküller ile ilişkisini araştırmayı hedefledik.

Materyal ve Metod: Çalışmada 200-220 gram arasında değişen 45 adet Wistar albino suşu kullanıldı. Gebe sıçanlar, kafeinin doza bağımlı etkilerini temsil eden kontrol, düşük doz (30mg/kg) ve yüksek doz (120mg/kg) olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı ve sıçanlarda embriyo implantasyonun gebeliğin 5. gününde gerçekleşmesi ve implantasyon aşamalarını değerlendirmek için her bir ana grup, gebeliğin 4. (pre-implantasyon), 5. (peri-implantasyon) ve 6. (post-implantasyon) günlerinde sakrifikasyon yapılmak üzere 3 alt gruba (n=5) ayrıldı, böylece 9 grup oluşturuldu. Sakrifikasyondan hemen önce verilen intravenöz Chicago Blue boyası sayesinde implantasyon alanları tespit edildi. Elde edilen dokular formaldehit ile fiksasyon sağlandıktan sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı. H&E, masson trikrom boyama ve implantasyonda önemli rol oynayan VEGF, MMP-9, $\alpha V\beta 3$ integrin, MUC-1 ve HB-EGF moleküllerin immün boyamaları gerçekleştirildi.

Bulgular: Sıçanlarda prenatal kafein tüketimi doza bağımlı olarak implantasyon alan sayısının azalmasına neden oldu. Etyolojisinde; implantasyon markerları olan integrin $\alpha V\beta 3$ ve MMP-9 moleküllerinin ekspresyonlarının azalmasının rol oynadığı gösterildi. MUC-1, HB-EGF ve VEGF ekspresyonlarında değişiklik olmadığını gösterdik.

Sonuç: Sıçanlarda prenatal kafein tüketiminin doza bağımlı olarak embriyo implantasyonunu azalttığı ve özellikle yüksek doz grubunda implantasyonda rol oynayan moleküllerin ekspresyonlarının olumsuz etkilendiğı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: kafein, implantasyon, VEGF, MMP-9, $\alpha V\beta 3$ integrin, MUC-1, HB-EGF



IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE EFFECT OF PRENATAL CAFFEINE ON EMBRYONIC IMPLANTATION IN RATS

FİLİZ YILMAZ

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology,
Narlidere, Izmir, drfilizyilmaz@gmail.com

ABSTRACT

Aim: Implantation is one of the most important stages of pregnancy. Many external factors may adversely affect this process. In our daily lives, the consumption of caffeine in many beverages and food is recommended in the pregnancy period. However, the mechanisms of caffeine consumption during pregnancy are not known exactly. In our study, we aimed to investigate the effect of prenatal caffeine consumption on the embryo implantation in rats and the relationship between the molecules involved in implantation stages.

Materials and Methods: 45 Wistar albino strains ranging from 200 to 220 grams were used in the study. Pregnant rats were divided into 3 main groups: control, low dose (30mg / kg) and high dose (120mg / kg), representing the dose-dependent effects of caffeine and embryo implantation occurs on day 5 of pregnancy in rats and to evaluate the implantation stages, each main group was divided into 3 subgroups (n=5) to be sacrificed on days 4th (pre-implantation), 5th (peri-implantation) and 6th (post-implantation) days, thus 9 groups were created. Immediately prior to sacrifice, implantation sites were detected by intravenous Chicago Blue dye. The tissues were embedded in paraffin blocks after fixation with formaldehyde. 5µm thick sections were taken from paraffin blocks. H & E, masson trichrome staining and immunostaining of VEGF, MMP-9, α V β 3 integrin, MUC-1 and HB-EGF molecules, which play an important role in implantation, was performed.

Result: Prenatal caffeine consumption in rats resulted in a dose-dependent decrease in the number of implantation sites. It has been shown that the expression of integrin α V β 3 and MMP-9 molecules, which are the markers of implantation, play a role in the etiology. We showed no change in MUC-1, HB-EGF and VEGF expressions.

Conclusion: It has been shown that prenatal caffeine consumption in rats decreases embryo implantation in a dose-dependent manner, and the expression of molecules involved in implantation, especially in the high-dose group, has been adversely affected.

Key Words: caffeine, implantation, VEGF, MMP-9, α V β 3 integrin, MUC-1, HB-EGF



1. GİRİŞ VE AMAC

Kafein; kahve, çay, kola, çikolata gibi çok sık tüketilen yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak bulunur. Düşük ve normal dozlarda (50-300 mg, yaklaşık 1-3 fincan kahveye denk gelmektedir) kafein insanda merkezi stimülasyon gerçekleştirir. Yani iyi hissetme, uyanıklık, enerji ve konsantrasyon yeteneğini artırır. Yüksek dozlarda ise (300-800 mg) anksiyete, sinirlilik ve insomnia gibi çeşitli negatif hisler oluşmasına neden olmaktadır (1,2). Günlük hayatımızın vazgeçilmezi olan bu içecek ve yiyecekler gebelik sürecinde de tüketilmektedir. Özellikle gebelikte kafein tüketim miktarı oldukça önemlidir.

Gebe kadınlar tarafından kafein tüketiminin, gebelik sürecine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar prenatal kafein tüketiminin erken spontan abortus riskini artırabileceğini belirtmiş (3,4). Bazı çalışmalarda ise gebelikte kahve tüketmenin erken doğum ve doğum ağırlığının düşmesi ile ilişkili olabileceğini ancak spontan düşük ile kafein metabolitleri arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı gösterilmiştir (5). Bir başka çalışmada günlük kafein/kahve tüketimi ile abortus riskinin doz-yanıt değerlendirmesi yapılmış, her 150 mg / gün kafein tüketimindeki artış için %19 ve her iki fincan kahve alımındaki artış için %8 abortus oranında artış olduğu gösterilmiştir (6).

İmplantasyon araştırmaları için en uygun model olarak sıçanlar kabul edilmektedir. Kafein metabolizması kemiriciler ve insanlar arasında farklılık göstermekte ve yarılanma ömrü sıçanlarda (0.7-1.2 saat) insanlara göre (2.5-4.5 saat) çok daha kısadır. Hayvan ve insan dozları karşılaştırıldığında metabolik vücut ağırlığı için düzenleme gereklidir. Bu nedenle, insanlar ve sıçanlar arasındaki doz dönüşümünü hesaplanırken, insan: sıçan 1: 6.17 vücut yüzey alanı karşılaştırmaları dikkate alınmaktadır. Örneğin; gebe kadınların ortalama kafein alımı 4.8 mg/kg /gün, sıçanlarda 30 mg/kg/gün tüketime eşittir (7,8).

İmplantasyon; gebeliğin gerçekleşmesinde şüphesiz en önemli aşamalardan biridir. Birbirinden immünolojik ve genetik olarak tamamen farklı olan blastosist ile endometriyumun aktif olarak eş zamanlı katıldığı dinamik bir süreçtir. İmplantasyon penceresi adı verilen kısa bir dönemde sonuçlanır. Bu süreçte blastosist endometriyum yüzeyine yaklaşır, sıkıca bağlanır ve endometriyuma invaze olur. Başarılı implantasyon; implante olma yeteneği kazanmış bir embriyo, reseptif bir endometriyum ve ikisi arasında başarılı bir parakrin diyalog olmak üzere üç ana faktörü gerektirir. Bu iletişime, hormonlar, sitokinler, prostaglandinler ve adezyon molekülleri dahil olmak üzere birçok faktör aracılık eder ve epitelde embriyonun invazyonuna

izin veren lokal değişikliklerle sonuçlanır (5). Bu faktörlerden bir veya birkaçının eksikliği implantasyonun gerçekleşmemesine dolayısıyla infertiliteye sebep olur.

İmplantasyon 3 aşamada gerçekleşir; 1) Apozisyon; ovulasyondan 7-8 gün sonra blastosistin zona pellusidasından ayrılarak uterusu ulaşması ve implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçerek stabil olmayan tutunmasıdır. 2) Adezyon; zonasından ayrılmış blastosistin endometrial epitel yüzeyine bağlanması, stabil tutunmasıdır. 3) İnvazyon ise; embriyonik trofoblastın endometriyuma penetre olması, bazal membranı yok ederek stromaya ilerlemesidir.

Bu dönemlerde endometriyumdan ve embriyodan eş zamanlı olarak çok sayıda mediatör salınır. Bu sinyaller uterusun reseptif olmayan aşamasından reseptif aşamaya geçişini sağlayarak, implantasyon mekanizmasının gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Örneğin; HB-EGF (Heparin Binding Epidermal Growth Factor); implantasyon penceresine yakın bölgede eksprese edilen EGF-benzeri moleküllerden birisidir. Embriyonun bağlanmasının ve farklılaşmasını kolaylaştırır ve uterus reseptivitesi boyunca eksprese edildiği gösterilmiştir. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor); anjiyogenez, embriyo implantasyonu için gerekli bir basamaktır ve reseptörleri post-ovulatuvar ve peri-implantasyon dönemi süresince belirgin olarak artmaktadır. Desidualizasyon, implantasyon ve gebelik oluşumunda önemli role sahiptir. Endometrial stromal hücrelerde, VEGF yapımı ile desidualizasyon arasında pozitif korelasyon mevcuttur. Müsinler (MUC-1); hücre yüzeyini enzimatik olarak dirençli hale getirirerek, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks adezyonlarını kısıtlar ve hücreleri immün sistemden korurlar. MUC-1 ekspresyonu uterus reseptivitesi ile zıt yönde etki gösterir. $\alpha V\beta 3$ integrin; Endometriyumun luminal epitelinde en iyi karakterize edilen hücre adhezyon molekülüdür. İmplantasyon penceresi sırasında $\alpha V\beta 3$ integrin uterusun luminal epitelinde ve glandular epitelinde eksprese edilmektedir. Bu periyod maksimum uterin reseptivite ile aynı zamana denk gelir. Bu periyod sırasında integrinlerin ekspresyonu, embriyo-maternal tanıma ve blastosistin başarılı implantasyonu için önemlidir. MMP-9 (Matriks Metalloproteinaz-9); Embriyo implantasyonunda hücre ekstraselüler matriksinin (ECM) geniş ölçüde parçalanması ve desiduanın yeniden şekillenmesi olaylarına eşlik eder. Gebe miyometrium ve plesantasında eksprese edilir. Birçok çalışma, ECM'nin bozulmasından sorumlu olan matriks metalloproteinazların (MMP) blastosist implantasyonunun düzenleyicileri olduğuna işaret etmiştir.

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda prenatal kafein tüketiminin implantasyona olumsuz etkisi olduğu sadece implantasyon alan sayıları dikkate alınarak değerlendirilmiş (9,10), fakat hangi molekül veya yolak üzerinden etkilediği açıklanmamıştır. Bu çalışmada;

kafeinin implantasyon üzerindeki etki mekanizmasını çözmeyi amaçladık. Bunun için prenatal dönemde doz bağımlı kafein tüketimi ile implantasyon aşamalarında rol oynayan moleküllerin ilişkisi immünohistokimyasal (VEGF, HB-EGF, MUC-1, α V β 3 integrin, MMP-9) olarak değerlendirdik.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmplantasyon

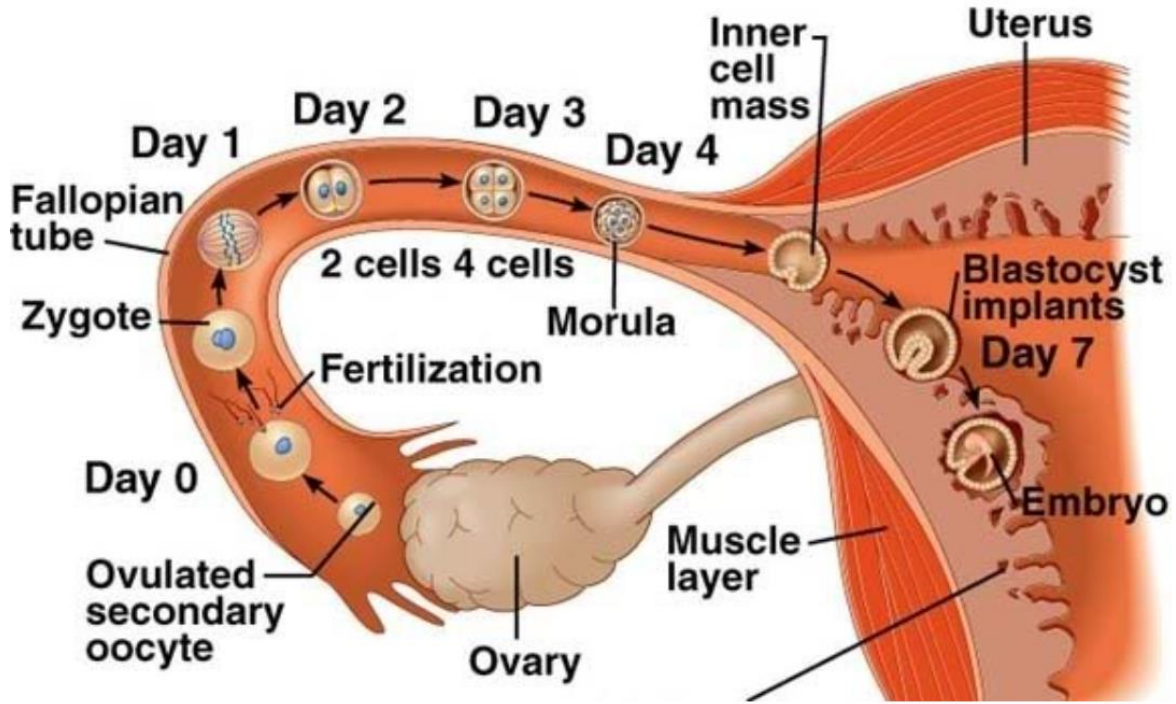
İmplantasyon süreci blastosist ile endometriyum arasında çok kısa bir pencere döneminde sonuçlanması gereken karşılıklı etkileşimi içerir. Bu süreçte blastosist endometriyum yüzeyine yaklaşır, sıkıca bağlanır ve endometriyuma invaze olur. Başarılı implantasyon için; üç önemli komponent varlığı gerekmektedir. Birincisi; moleküler olarak programlanmış hücre büyümesi ve differansiyasyonuna sahip kaliteli embriyo, ikincisi; implantasyonun sağlanması için izlenen değişkenlik potansiyeline sahip endometriyum (endometrial reseptivite) ve üçüncüsü; cross-talk diye adlandırılan embriyo ile endometriyum arasındaki bilgi alışverişidir.

2.1.1. Embriyo

2.1.1.1. Embriyo Gelişimi

Fertilizasyon sonucu oluşan zigot, ardarda mitoz bölünmeler geçirerek hücre sayısını arttırmaktadır. Bu olaya zigotun yarıklanması denir ve fertilizasyondan yaklaşık 30 saat sonra başlamaktadır. Yarıklanma sonucu oluşan her bir hücre blastomer olarak adlandırılır. 3.yarıklanmadan sonra blastomer şeklini değiştirir, birbirine sıkıca bağlı bir hücre topu oluşur. Bu paketlenme kompaksiyon olarak adlandırılır ve hücre adezyon glikoproteinlerinden olan e-kadherin türevi ovomorulinin tarafından gerçekleştirilmektedir. Kompaksiyon ile hücreler arası etkileşim artmaktadır. Blastomer sayısı 12-32 olduğunda gelişen yapıya artık morula denir. Yuvarlak şekilli morula fertilizasyondan 3 gün sonra oluşur ve uterusu gider. Morula safhasındaki zigot, uterusu ulaşmıştır. Morula uterusu ulaştıktan kısa bir süre sonra (fertilizasyondan yaklaşık 4 gün sonra) içinde blastosist boşluğu (blastosel) denilen sıvı dolu bir boşluk gözlenir. Uterustan gelen bu sıvı zona pellusidayı geçerek boşluğu doldurur. Blastosist içinde sıvı arttıkça blastomerler 2'e ayrılır; birincisi, trofoblast denilen dış hücre topluluğudur ve plesantanın embriyonik kısmını oluşturur, ikincisi; embriyoblast denilen iç hücre topluluğudur ve merkezi yerleşim gösteren bir grup blastomer embriyonun başlangıcını oluşturur. Gelişimin bu basamağındaki yapıya blastosist denmektedir. İç hücre kitlesi artık blastosist boşluğuna doğru uzanır, trofoblastlar da blastosistin duvarını oluşturur. Blastosist yaklaşık 2 gün uterin salgılar içinde yüzdükten sonra zona pellusida yavaşça dejenere olur ve kaybolur (5.gün). Zona pellusidanın dökülmesi blastosistin boyutlarının hızla büyümesine neden olur. Blastosist uterus içinde serbestçe yüzerken uterin bezlerin salgıları ile beslenir. Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra (menstrüel siklusun 20.günü) blastosist iç hücre kitlesine

yakın bölgeden (embriyonik kutup) endometrial epitele yaklaşır ve implantasyon başlar (şekil 1).



Şekil 1: Fertilizasyon sonucu oluşan zigotun gelişim süreci (11)

2.1.1.2. Embriyonun Aktivasyonu

Başarılı bir implantasyon için embriyonun yukarıda tarif edilen tüm bu olayları başarılı bir şekilde tamamlanması ve embriyonun aktivasyonu gerekmektedir. Blastosist uterusu ulaştığında inaktif, metabolik olarak uyku halinde ve uterusu bağlanma yeteneği bulunmamaktadır. Lee ve arkadaşları, dormant (uyku halinde) blastosistlerdeki trofoblastların ultrastrüktürel incelemesinde ribozomların monozom halinde, Endoplazimik Retikulum daha az girintili ve golgi cisimciği iyi gelişmemiş olduğunu gözlenmişler (12). Aktif blastosistlerdeki trofoblast stoplazmasında biriken glikojen granülleri ve daha fazla mikrovillus içeren düzensiz yüzey özellikleri gözlenmektedir (13).

Blastosist aktivasyonunda 3 sinyal yolağı rol oynar; steroid sinyalleri, kanabinoid sinyal ve Wnt sinyal yollarıdır.

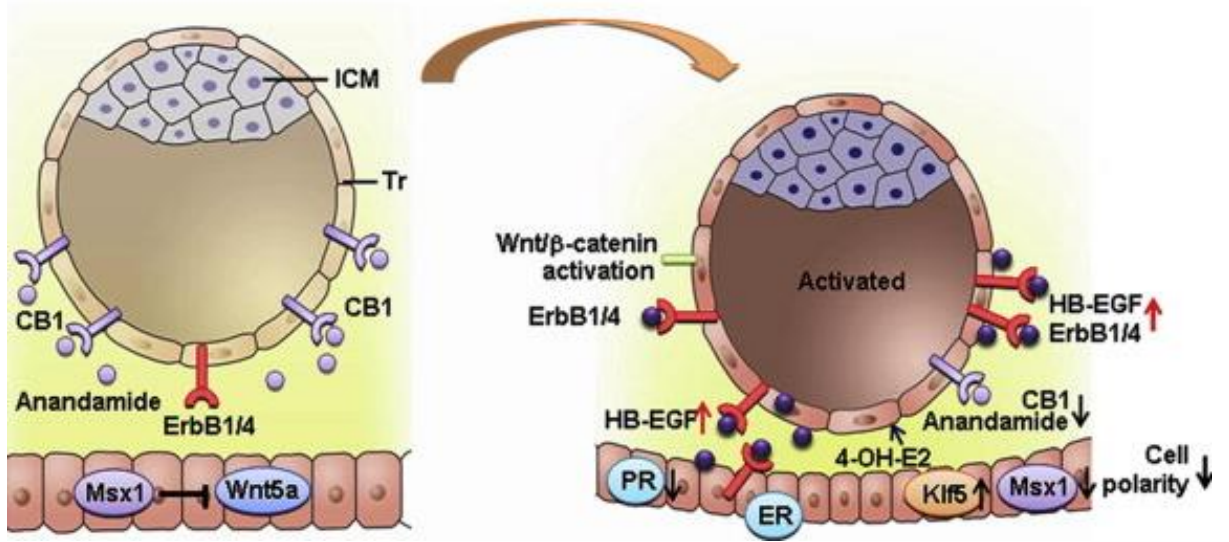
Östrojenin implantasyon için blastosist aktivasyonu tetiklediği düşünülmüştür. Endojen östrojenin bir katekol metaboliti olan 4-hidroksiestradiol (4-OH-E2), Prostaglandin sentezini stimüle ederek blastosist aktivasyonunu başlatmada etkili olduğu gösterilmiştir (14). Sonuç olarak, uterusu bulunan ER (östrojen reseptörü) ile etkileşen ovaryan östrojen, uterusu

reseptivitesi için gereklidir, oysa uterusda lokal olarak üretilen katekolestrojen (4-OH-E2) implantasyon için blastosisti aktive eder. Katekolestrojenin uyguladığı moleküler mekanizma bilinmemektedir. Fare blastosistinin aktif hale gelmesi için bir metabolit östradiol 4-OHE2 (katekolestrojen) gerekirken, uterusun implantasyon için hazırlanması için nükleer reseptörlü östradiol -17 (E2) nin etkileşimi gerekmektedir (şekil:2).

Son zamanlarda uterusda erken gebelik döneminde sentezlenen 2 endojen kanabinoid ligandı; anandamid ve 2-anachidonol gliserol belirlenmiştir. Endokanabinoid sinyalizasyonun preimplantasyon embriyo gelişimini ve embriyoların uterusu zamanında yönlendiren önemli lipit aracılı bir yol olduğu gösterilmiştir. Kanabinoid reseptörleri (CB-1 ve CB-2); embriyoda preimplantasyonda eksprese edilmektedir. Nonreseptif uterus ve dormant blastosistte CB1 ve ligandı yüksek düzeyde görülürken, uterus reseptif ve blastosist aktive iken seviyeleri düşmektedir. Başarılı gebelik için implantasyon sırasında anandamid seviyeleri düşük olması gerekmektedir (şekil:2) (15).

İmplantasyon sırasında blastosist yetkinliği için kanonik wnt sinyalizasyonu gereklidir. Wnt-3a; trofoektoderm hücrelerde beta katenin hücre içi birikimi, nükleer translokasyonunu ve prostasiklin için nükleer reseptör olan PPAR gama'nın ekspresyonunu indükler. Kanonik wnt sinyalizasyonu prostaglandin ile sinerji oluşturarak blastosiste implantasyon yeterliliği kazandırır (şekil:2) (16).

Embriyo tarafından salınan moleküller de blastosist aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hareketsiz blastosistlere kıyasla HB-EGF' nin blastosist aktivasyonu sırasında önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, aktive blastosistlerde ERB1 ve 2 reseptörlerinin ve ligand bağlama aktivitesinin artan ekspresyonu gözlenmiştir (17).



Şekil 2: Blastosistin Aktivasyonu (18)

2.1.2. Endometriyum

2.1.2.1. Endometriyumun Genel Yapısı

Uterus; endometriyum, myometriyum ve perimetriyum olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Perimetriyum; dış seröz tabakadır, mezotelyum ve ince bağ dokusundan oluşur. Myometriyum; uterus duvarının en kalın tabakasıdır ve 3 düz kas tabakasından oluşur. Stratum submukoza; longitudinal düz kaslardan, stratum vaskülar; büyük kan damarları ve sirküler ya da oblik kaslardan ve stratum supravaskülar; longitudinal kaslardan oluşur.

Endometriyum ise uterusun mukozasıdır. Endometriyum, epitel ve lamina propria (endometrial stroma) olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Epiteli; tek katlı prizmatik olup içeriğinde silyalı hücreler ve sekretuar hücreler yer alır. Lamina propria (endometriyal stroma) ise; basit tübüler bezler, bağ dokusu hücreleri ve lifleri, ekstraselüler matriks içerir.

Üreme çağında fonksiyonel olan endometriyum hücrelerinin sayıları, aktivitesi, fonksiyon ve yapısı menstrual siklus boyunca ve gebelik sırasında değişir. Temel olarak 2 tabakadan oluşur; yüzeysel olan stratum fonksiyonalis ve daha derinde bulunan stratum bazalis.

Uterin siklus esnasında endometriyum ve miometriyum siklik değişiklikler geçirir. Endometriyumdaki siklik değişiklikler yapısında bulunan glanduler, stromal ve vasküler yapılar olmak üzere her 3 komponenti de kapsar (9). Bu sırada blastosist implante olur ve gebelik başlarsa siklus durur, fonksiyonel ve bazal tabakalar büyüme ve farklılaşma dönemine girerler. Stratum bazalis; miometriyuma en yakın tabaka olup, endometriyum bezlerinin son bölümünün bulunduğu ve bağ dokusu elemanlarının çoğaldığı bağ dokusu tabakasıdır. 1/3 lük kısmı oluşturur. Bazal tabakanın kendisine ait kan damarları vardır ve menstruasyon sırasında

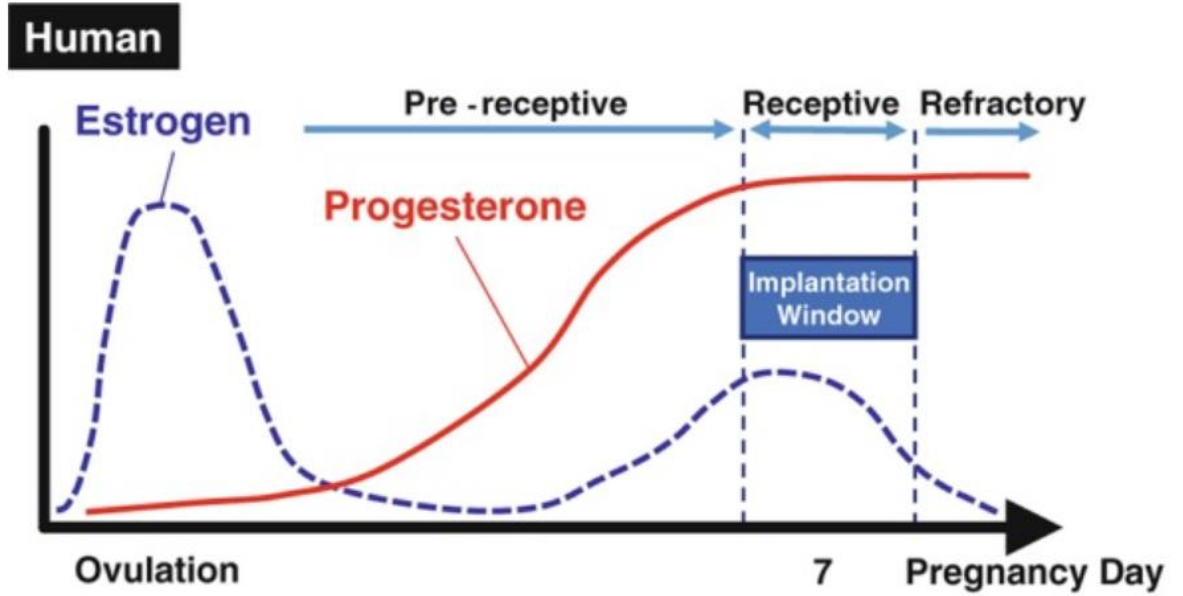
dökülmez. Siklus değişikliklerine katılmaz. Her menstrüel siklus sonunda, buradan yeni endometriyum gelişerek fonksiyonalis tabakasının rejenere olmasına kaynaklık etmektedir (5,10). Stratum fonksiyonalis (fonksiyonel tabaka); siklus değişikliklerine katılan tabaka olup, menstruasyon sırasında ve doğumdan sonra dökülür. 2/3 lük kısmını oluşturur. Fonksiyonel tabaka; spongiosum ve kompakta olmak üzere 2 ayrı tabakadan oluşmaktadır. Stratum spongiosum; stratum bazalisin üzerinde olup, geniş bezlerin ve ödemli stromanın varlığı nedeniyle sünger görünümünde bir bağ dokusudur. Endometriyum bezlerinin geniş ve kıvrımlı bölümleri bu tabakada bulunur. Stratum kompakta; uterus lümenine bakan en yüzeysel kısım olup, bezlerin ağız kısımlarını içerdiği için kompakt görünümündedir (5,19). Menstrüel siklus fazı sırasında endometriyumda meydana gelen morfolojik ve fizyolojik değişiklikler, hipotalamus, hipofiz, ovaryum ve uterusun karşılıklı etkileşimi sonucu hormonal olarak kontrol edilmektedir (10).

2.1.2.2. Endometriyumun İmplantasyona Hazırlanması

Menstrual siklus içinde, ovulasyondan yaklaşık 7-8 gün sonra endometriyumun implantasyona hazırlanması ovaryan steroidler aracılığıyla olmaktadır. Proliferatif fazın dominant hormonu östrojen iken, sekretuar faz sırasında endometriyumda belirleyici hormon progesteron 'dur. Östrojen etkisi ile proliferen olan endometriyum, progesteronun etkisi ile endometrial bez ve arterler uzayarak kıvrımlı hal alır, endometrial stroma vasküler ve ödemli olup desidualizasyon gerçekleşir. Östrojen ve progesteronun karşılıklı etkisi sonucu, implantasyon bölgesinde endometrial damar geçirgenliğinde artış izlenir (20) ve endometrial dokuda 'implantasyon penceresi' denilen değişiklikler ortaya çıkar.

Uterusun embriyoyu kabul etme yeteneği (reseptivitesi), 28 günlük menstrual siklusun 20 ve 24. günlerine denk gelen dönem (LH pikinden 5 -10 gün sonra) veya ovülasyondan 6-8 gün sonraki 4 günlük dönem şeklinde tanımlanmaktadır. Bu dönem, blastosist implantasyonu için endometriyumun en uygun gelişmiş fazıdır. Bu dönemin dışında implantasyon olanaksızdır. Uterusun kabul etme ve içine alma yeteneği, damarlı ve ödemli stromaya, salgı yapan endometriyum bezlerine, endometriyumun lümenini döşeyen epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde bulunan mikro çıkıntılara yani pinopodlara bağlıdır (20).

Ovaryan steroidlerin etkisi ile implantasyona olan uterin sensitivite değişimi 3 fazda incelenebilir: a)Prereseptif dönem, b)Reseptif dönem (İmplantasyon dönemi) c) Non-reseptif dönem (21)(Şekil 3).



Şekil 3: Uterin Reseptivite (21)

Prereseptif dönemde; ovaryan steroidleri tarafından kontrol edilen endometriyum epitelyal farklılaşma izlenir. Endometriyal stromada progesteron bağımlı “ön desidualizasyon” olarak adlandırılan morfolojik değişiklikler gözlenir. Östrojeninin küçük piki ile endometriyum, embriyo ile adezyon yeteneği kazanarak reseptif faza girer. Blastosist, endometriyum kaynaklı moleküllerle bağlanma yeteneği yani “blastosist aktivasyon”u kazanır. Luminal epitel hücrelerinin plazma membranlarındaki mikrovilluslar kaybolur ve pinopod (endometriyum reseptivite belirteci) denilen geniş membran uzantıları gelişir. Uterus- blastosist adezyonu ile blastosisti çevreleyen stromal hücreler poliploid şekle sahip desidual hücrelere farklılaşır. Uterusun reseptif fazı geçicidir ve blastosist adezyonu olmadıkça endometriyum non-reseptif faza girer. Bu nedenle, endometriyum sonuçta “implantasyon penceresi” denilen kısıtlı süre blastosist adezyonuna izin verir. Bu olay dizisi, implantasyonu başlatmak için kritik öneme sahiptir (21).

İmplantasyon öncesi luminal epitelde önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Epitel hücrelerinin apikal-bazal polaritesi belirginliğini kaybeder, özgün gap junctionlar oluşur, desmozom ve tight junctionlar azalır, hücreler yassılaşır, mikrovilluslarını kaybeder ve yerini pinopodlar alır, progesteron artışıyla musin tabaka kalkar, e-kaderin, integrin 4, 6, 1 apikal yüzeyde eksprese olur.

Bazal ve lateral plazma membranında da önemli değişiklikler izlenir; sıkı bağlantılar luminal epitelin apikalinden bazaline doğru kayar, klaudin 1, 4, 5 proteinleri lateral hücre

sınırlarının alt kısımlarında yoğunlaşır, desmozomlar azalır, terminal ağ kaybolur, bazal lamina kalınlığı artar (22).

Endometriyumun embriyoyu kabul etme yeteneği olarak tanımlanan, endometriyum reseptivitesinin morfolojik belirteci olarak pinopodlar değerlendirilmektedir. Bu süreçte epitelyal hücreler mikrovilluslarını kaybeder, onun yerine geniş ve düz membran uzantıları gelişir, implantasyon pencere dönemini lokalize eder.

Pinopodlar; endometriyum epitelinin apikal yüzeyinde bulunan kabarcık benzeri çıkıntılardır. Ekspresyonları; implantasyon penceresi döneminde kısa süreli maksimum seviyede izlenir. Pinopodlar P4 (progesteron) hormonuna bağımlıdır, menstruel siklusda progesteron seviyesinin orta luteal yükselmesi ile pinopodların ilk ortaya çıkışı arasındaki ilişki gözlenmiştir (9). Ayrıca blastosist implantasyonuna endometrial alıcılık için ekspresyonu gereken homeobox geni olan HOXA-10, pinopod gelişiminde önemli role sahiptir. Blastosist adezyonu için gereken reseptörler pinopodların üstünde olduğu gösterilmiştir (10).

İnfertilite nedeniyle kliniğe başvuran hastalarda endometriyum reseptivitenin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Reseptivitenin biyokimyasal belirteçleri olarak HB-EGF, $\alpha V\beta 3$ integrin, Lösemi inhibitör faktörü (LIF), İnsülin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II), kalsitonin, HOXA-10 transkripsiyon faktörü, L-selektin ve L-selektin ligandı kullanılmaktadır (5).

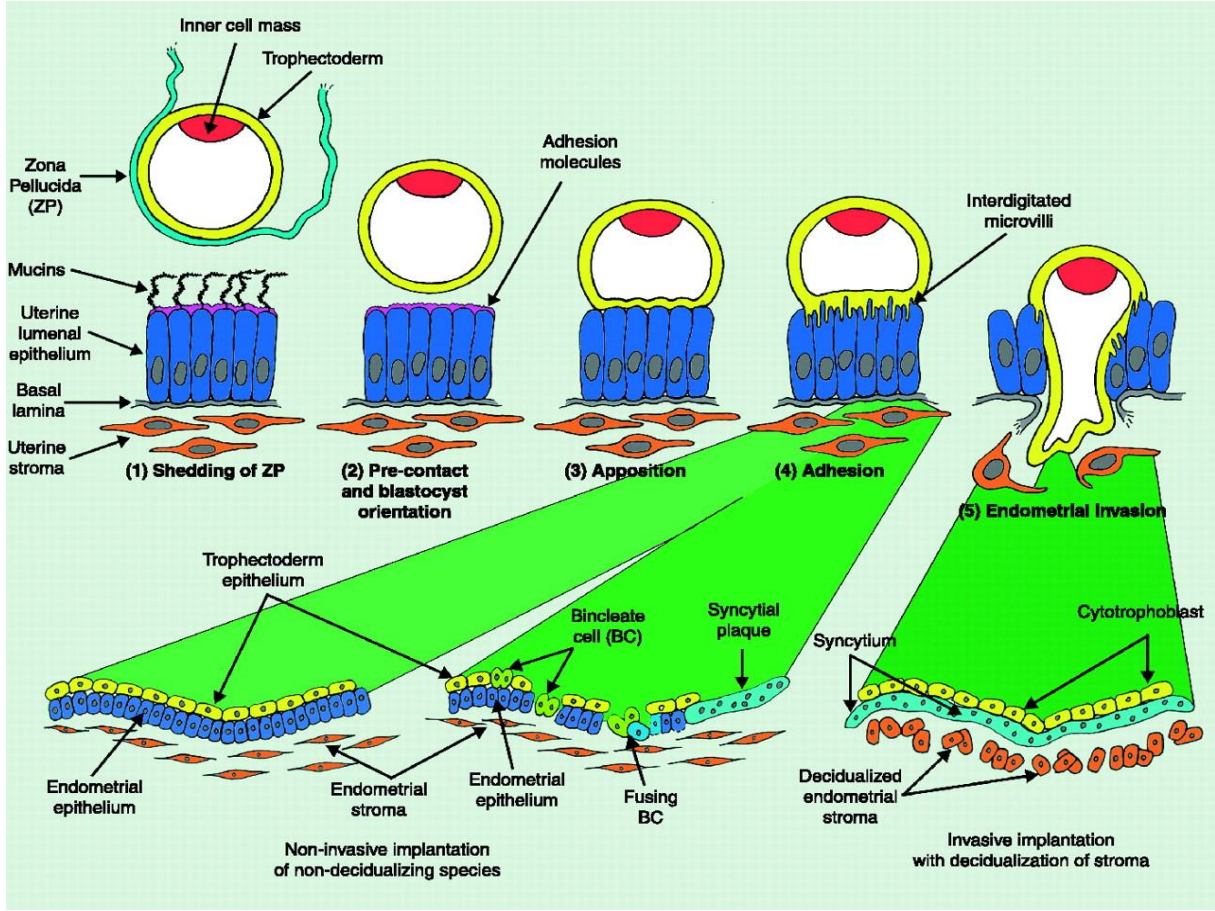
Endometrial reseptivitesinin tanımlanmasında ayrıca klasik patoloji (Noyes kriterleri), immünohistokimya (BCL-6, integrin, p27, siklin E), ERA (Endometrial Receptivity Analysis) yöntemleri de kullanılabilir.

2.1.3. Embriyo-Maternal Etkileşim

İmplantasyon; embriyo ve endometriyumun aktif olarak eş zamanlı katıldığı dinamik bir hazırlık ve karşılaşma süreci sonunda embriyonun uterus duvarına tutunup gömülme işleminin tamamlanma olayıdır (19). Temel olarak 3 evrede gerçekleşir;

- 1) Apozisyon; zona pellusidasından ayrılmış blastosistin implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçmesi, stabil olmayan tutunması
- 2) Adezyon; ovulasyondan 7-8 gün sonra zonasından ayrılmış blastosistin endometrial epitel yüzeyine bağlanması, stabil tutunması

3)İnvazyon; embriyonik trofoblastın endometriyuma penetre olması, bazal membranı yok ederek stromaya invazyonu (19).



Şekil 4: Embriyonun implantasyonu (23)

2.1.3.1. Apozisyon

Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra blastosist implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçer ve implantasyonun gerçekleşeceği bölgeye doğru yaklaşmaya başlar. Blastosist ile endometrial lümen epiteli yakın temasını devam ettirmektedir.

Apozisyon döneminde endometriyumdaki ve embriyodan eş zamanlı olarak çok sayıda mediatör salgılır. Bu sinyaller uterusun reseptif olmayan aşamadan reseptif aşamaya geçişini sağlayarak, implantasyon mekanizmasının gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır (8). Bu mediatörlerin başlıcaları endometriyumdaki salgılanan ve embriyodan salgılananlar olmak üzere iki bölümde incelenmektedir.

Endometriyumdaki salgılanan moleküller;

1) Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) ailesi;

- Heparin Bağlayıcı-Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF)
- Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (Transforming Growth Factor- α , TGF- α)
- Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β)
- İnsulin-benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor, IGF)

2) Sitokinler

- IL-1
- IL-6
- Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor, LIF)
- Koloni Stimule Edici Faktör-1 (Colony Stimulating Factor-1, CSF-1)
- Tümör Nekroz Faktörü- α (Tumour Necrosis Factor- α , TNF- α)
- Musin-1 (MUC-1)

Embriyodan salınan moleküller:

- Erken hamilelik faktörü (Early Pregnancy Factor, EPF)
- Preimplantasyon faktörü (Preimplantation Factor, PIF)
- Trombosit aktivite edici faktör (Platelet Activating Factor, PAF)
- Büyüme faktörler
- Prostaglandin (PG)
- İnterferon gama ve insan koryonik gonadotropin (interferon gama ve human chorionic gonadotropin, INF- γ ve Hcg)

2.1.3.1.1. HB-EGF (Heparin Bağımlı Epidermal Büyüme Faktörü)

İmplantasyon penceresine yakın bölgede eksprese edilen EGF-benzeri moleküllerden birisidir. Salgılanan HB-EGF endometriyum epitel hücre membranında yer alır, embriyonik EGF reseptörüne bağlanır ve embriyonun adezyonunu ve farklılaşmasını uyarır. HB-EGF'in ekspresyonu blastosiste en yakın lümen epitelinde artar ve epitelin yüzeyinde heparine bağlanır. Bu büyüme faktörü, insan endometriyumu tarafından implantasyon penceresinin başladığı sırada eksprese edilir. İnsanlarda, sıçanlarda ve farelerde; HB-EGF' in uterus reseptivitesi boyunca geçici olarak eksprese edildiği birçok çalışmayla gösterilmiştir (19).

HB-EGF geni tarafından kodlanan HB-EGF, implantasyon sırasında embriyo-uterus etkileşimlerinin erken döneminde aracı olduğu tanımlanmıştır. HB-EGF, farklı türlerin

implantasyonu sırasında hem blastosist hem de uterusda eksprese edilir ve HB-EGF gen mutant fareleri kullanılarak yapılan çalışmalar, HB-EGF'nin implantasyon başarısızlığına ve gebeliğin gerçekleşmemesine yol açtığı gösterilmiştir (24).

HB-EGF, transmembran formunun proteolitik olarak parçalanması ile soluble formu üretilir. Her iki HB-EGF formu, EGF reseptör familyasının (ErbB) ve hücre yüzeyi heparan sülfat proteoglikan (HSPG) moleküllerinin hücre yüzey proteinleri ile etkileşebilir. Hem blastosist hem de uterusda ErbB1 ve ErbB4 fosforilasyonunun güçlü bir indükleyicisidir. HB-EGF'nin ErbB1 ile etkileşimi, hücre-hücre yapışmasında ve komşu hücreler arasındaki sinyal iletilmesinde önemli rol oynamaktadır. (25).

2.1.3.1.2. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

Özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiasyonuna neden olur. VEGF; hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler vasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır (26).

Anjiogenez; embriyo implantasyonu için gerekli bir basamaktır ve reseptörleri post-ovulatuvar ve peri-implantasyon dönemi süresince belirgin olarak artmaktadır. VEGF ekspresyonu implantasyonun erken dönemi boyunca artmakta ve plasental büyüme faktörü ile birlikte gebelik gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Embriyogenez sürecinde VEGF reseptörlerinin anormal ekspresyonu meydana gelirse, bu durum embriyo kaybı ile sonuçlanır. Desidua gelişimi, implantasyon ve gebelik oluşumunda önemli role sahiptir. Endometrial stromal hücrelerde VEGF yapımı ile desidualizasyon arasında pozitif korelasyon mevcuttur (26).

VEGF mRNA ekspresyonu uterus luminal epitelde gebeliğin birinci ve ikinci günü muhtemelen yüksek ovaryan östradiol seviyelerine bağlı olarak artmaktadır. Üçüncü günde stromada VEGF seviyesi düşüktür. VEGF dördüncü ve beşinci günlerde luminal epitelde ve periepitelyal stromada görülebilmektedir. Blastosistin endometriyum ile etkileşiminden 13 gün sonra implantasyon alanındaki epitel ve periepitelyal stromada VEGF ekspresyonu şiddetli bir şekilde artmaktadır (26, 27).

VEGF, en çok anjiyogenezdeki rolleri ile bilinmektedir. VEGF ailesi beş üyeden oluşur. Bunlar; VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, plasental büyüme faktörüdür. VEGF ailesi ve bunların reseptörleri insan endometriyumunu dahil olmak üzere çeşitli dokularda vasküler büyümenin ve yeniden biçimlendirmenin temel araçlarıdır. VEGFA, endometriyal glandüler epitelyumda apikal olarak iki tirozin kinaz reseptörü olan VEGFR1 ve VEGFR2 ile bağlanır ve sinyal verir. VEGFA, endotel hücrelerinin mitojenik aktivitesini adezyon molekülü integrin $\alpha V\beta 3$ ile artırır. VEGF, endometrial bezlerde de yer alır. VEGFR1 ve 2, fare blastosistleri tarafından ifade edilir. Ayrıca, infertil kadınlarda uterus sıvısındaki orta-sekretuar fazda VEGFA, fertil kadınlarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır (28).

2.1.3.1.3. MUC-1 (Musin-1)

Uterus dahil olmak üzere farklı organlardaki salgı epitel hücreleri ve glandüler epitelyum tarafından apikal olarak ifade edilen bir entegre membran glikoproteinidir (29).

MUC-1, çeşitli üreme yolları, meme bezi, akciğer, böbrek, mide ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli organlarda eksprese edilen musin ailesine ait bir zar glikoproteinidir. Çeşitli türlerde MUC-1 uterus epitelinin yüzeyinde ortaya çıkar ve endometriyuma embriyo bağlanmasını bloke etmek için anti-adezyon bir moleküldür. İmplantasyon sırasında lüminal ve glandüler uterus epitelinde hem mRNA hem de protein seviyeleri açısından azalmış MUC-1 ekspresyonu gözlenmiş ve implantasyon sırasında MUC-1 ekspresyonunda azalmanın gerekli olduğunu kanıtlanmıştır. Uterus içine girdikten sonra, blastosist implantasyon için apozisyon, adezyon aşamalarından geçerler. Bu sırada endometriyum reseptiftir. MUC-1 ekspresyonunun progesteron tarafından up-regüle edildiği gösterilmiştir. Hem progesteron hem de östradiol seviyeleri yüksek olduğu durumlarda da reseptif endometriyumda daha fazla MUC-1 olabilir. Ayrıca, adezyon fazı sırasında blastosistlerin varlığı hem uterus epiteli MUC-1 mRNA'nın hem de protein seviyelerinin ekspresyonunu artırabilir. Bununla birlikte, insanlarda implantasyon bölgesinde lokal MUC-1 ekspresyonunun, blastosistlerin adezyon fazına ulaşması ve uterin epitele bağlanması durumunda azaldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, uterin epitel MUC-1'in ekspresyonunun hormonların ve embriyonun koordinasyonu ile düzenlendiğini göstermiştir; bu nedenle anti-adeziv molekül olan MUC-1, adezyon fazı sırasında implantasyon bölgesinden en azından lokal olarak azalması gerektiği vurgulanmıştır (30).

Antiadeziv özelliğe sahip bir glikoprotein olan MUC-1, endometriyum epitelinin hücre yüzey bağlantılı bir sekretuar ürünüdür. Müsinler hücre yüzeyini enzimatik olarak dirençli hale

getirirerek, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks adezyonlarını kısıtlar ve hücreleri, immün sistemden korurlar. MUC-1 eksprese eden hücrelerde, adezyon ve antiadezyon kuvvetleri arasında hassas bir denge vardır. Yani MUC-1 selektin ligandları taşıdığı için integrinlerin aracılık ettiği hücre adezyonunu arttırabilirken, ekspresyonunu arttırarak anti-adezyon fonksiyonunu da gösterir.

MUC-1'in endometriyumda ekspresyonu menstrüel sıklusa göre ve türden türe çeşitlilik gösterir. Yapılan fare çalışmalarına göre; MUC-1 epitel hücrelerinin özellikle apikal yüzeyindeki mikrovillus ve silyalarda çok sayıda eksprese edilir. İmplantasyon fazı boyunca yüzey epitelinde down regule edilir. Ovulasyondan sonra progesteron tarafından kontrol edilen down-regülasyonu embriyo bağlanması için gereklidir (19). MUC-1 ekspresyonu uterus reseptivitesi ile zıt yönde ilişkilidir.

MUC-1 , blastosist implantasyon adezyon fazında önemli bir rol oynayan hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu gizliyor gibi görünmektedir . Bu nedenle, nispeten düşük seviyelerde MUC-1'in implantasyon sırasında başarılı embriyo-endometrial etkileşimler için hayati olduğu varsayılmıştır (31).

2.1.3.2. Adezyon

Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra zonasından ayrılmış blastosistin endometrial epitel yüzeyine bağlanmasıyla adezyon süresi başlamış olur.

Yapışma, embriyoblastın bulunduğu kutuptaki trofoblastlar tarafından olaylanır. Bu kutba embriyonal kutup (embriyonal pole), karşı kutba ise abembriyonal kutup (abembriyonal pole) denir. Endometriyum epiteline yapışan trofoblastlar, endometriyuma değer değmez, hızla çoğalmaya başlarlar ve iki tabakaya farklanırlar (32).

Blastosistin gömülmesi (implantasyonu), birinci haftanın sonunda başlar ve ikinci haftanın sonuna kadar devam eder. Gömülme sırasında trofoblast tabakası endometriyuma değdikçe sito ve sinsityotofoblast tabakasına farklanır. Sinsityotofoblastın aktif kemirici (erosive), yiyici (ingestive), sindirici (digestive) ve yayılımcı (invasive) işlevleriyle blastosist, desidua yapısı gösteren endometriyuma gömülür. Bu işlevlerle, desidua hücrelerinden açığa çıkan lipid ve glikojen, bez ve kapillerden açığa çıkan besin maddeleri, gömülen blastosist için zengin besin kaynağı oluştururlar. (32).

Blastosist fertilizasyondan sonra 10. günde alıcı endometriyuma tamamen yuvalanır.

İmplantasyon yerinin etrafındaki bağ dokusu hücreleri, glikojen ve lipidleri depolayarak polihedral görünüm kazanırlar. Bu hücrelerin bazılarında desidual hücreler denir ve invazyon gösteren sinsityotrofoblast hücrelerin yakınında dejenere olurlar. Embriyonik beslenme için zengin kaynak oluşturan bu dejenere hücreler, sinsityotrofoblastlar tarafından alınarak kullanılırlar (33).

Adezyon aşamasında izlenen moleküler değişimler de implantasyonu destekler. Bu moleküller; sitokinler, MMP, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks komponentleri ve homeobox genleridir (34).

Hücre adezyon molekül ailesi; kadherinler, selektinler, Ig süperailisi, integrinlerdir.

2.1.3.2.1. $\alpha V\beta 3$ integrin

Kan damarlarındaki çeşitli hücrelerden (örnek; endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblast, makrofaj ve trombositler) ve mezenkimden orijin alan hücrelerin neredeyse tümünden eksprese edilen çok yaygın integrinlerden birisidir. Birçok biyolojik olaya aracılık ettiği bilinmektedir (örnek; vasküler düz kas hücrelerinin göçü, kemik matriksine osteoklastların adezyonu, anjiyogenez ve implantasyon). Ayrıca bu integrin alt üniti hücre proliferasyonu ve differansiasyonu arasındaki dengenin düzenlenmesinde anahtar sinyalleri sağlamaktadır.

$\alpha V\beta 3$ integrin, endometriyumun luminal epitelinde en iyi karakterize edilen hücre adezyon molekülüdür. İmplantasyon zamanında bu integrinin nötralizasyonu, implantasyon bölgesinde yeni damar oluşumunu önleyerek embriyo yaşamını azaltabilir ve integrin nötralize ajanların enjeksiyonundan sonra azalan implantasyon bölge sayısının sebebi olabilir.

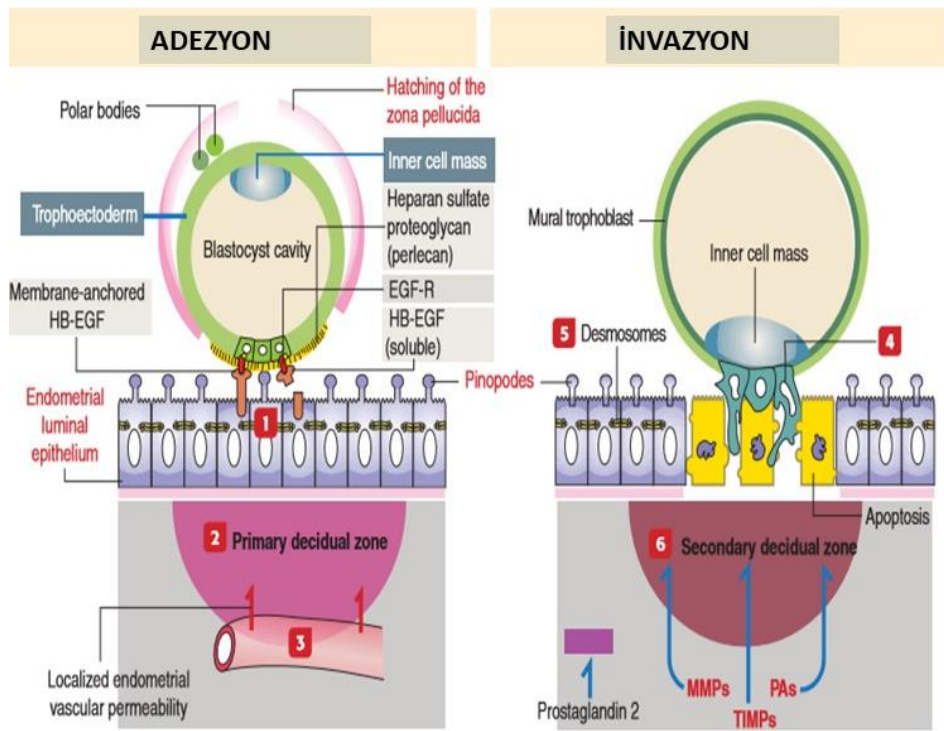
İmplantasyon penceresi sırasında $\alpha V\beta 3$ integrin uterusun luminal epitelinde ve glandular epitelinde eksprese edilmektedir. Bu periyod maksimum uterin reseptivite ile aynı zamana denk gelir. Bu periyod sırasında integrinlerin ekspresyonu, embriyo-maternal tanıma ve blastosistin başarılı implantasyonu için önemlidir (35).

$\alpha V\beta 3$ integrin için ligand olan osteopontin (OPN); insanlarda, farelerde ve tavşanlarda implantasyonda rol aldığı gösterilmiştir. İnsan endometriyumunda progesteron tarafından düzenlenir ve epitelyal hücrelerin apikal yüzeyinin altında sekretuar fazlarda bulunur. Farelerde, östrojen ile epitelde up-regüle olur. OPN, integrinin bağlandığı bir RGD alanı içerir. Böylece, trofektoderm ve maternal epitelyumdaki reseptörler arasında köprü oluşturabilen homo-oligomerler oluşturur. Bununla birlikte, OPN mutant farelerin fertil olduğu

gösterilmiştir ve $\alpha V\beta 3$ için sıçanlardaki embriyo türevli fibronektin gibi farklı ligandların olabileceği fare ve insanlarda öne sürülmüştür (36).

2.1.3.3. İnvazyon

Başarılı bir implantasyon için embriyonun adezyonundan sonra invazyon gerçekleşmelidir. Kontrollü proteolitik işlemlerle gerçekleşen, blastosistin stromaya gömülmesi sürecine invazyon denir. İlk olarak bazal membran yıkılmalı, daha sonra trofoblast stromal alana geçerek maternal kan damarlarına penetre olmalıdır. Tüm bunların gerçekleşmesi için proteinazlara (matriks metalloproteinazlar ve plazminojen aktivatörleri) ihtiyaç vardır (37).



Şekil 5: Blastosistin implantasyonu (38)

2.1.3.3.1. MMP-9 (Matriks Metalloproteinaz-9)

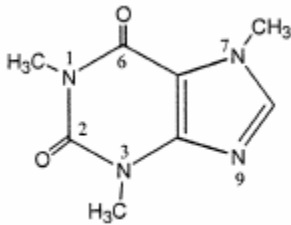
Embriyo implantasyonunda ECM'in parçalanması ve desiduanın yeniden şekillenmesi olaylarına eşlik eder. Gebe endometriyum ve plesantasında eksprese edilir. Birçok çalışma, ECM'nin bozulmasından sorumlu olan matriks metalloproteinazların (MMP) blastosist implantasyonunun düzenleyicileri olduğuna işaret etmiştir. MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9 (jelatinaz B); implantasyon sırasında ECM yeniden biçimlenmesinde ve sitotrofoblast invazivliğinin belirlenmesinde ana hız kısıtlayıcı enzimlerdir. MMP-2 ve MMP-9'un

aktiviteleri; endojen inhibitörleri olan matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (tissue inhibitors of MMP =TIMP) tarafından sıkı bir şekilde regüle edilir. MMP'lerin aktivasyonu ile TIMPler tarafından inhibisyonu arasındaki denge, embriyo implantasyonunun düzenlenmesi için önemlidir (şekil 5) (39, 40, 41).

MMP'ler hücre göçünün yanı sıra ECM bozulmasında ve yeniden yapılandırılmasında önemli bir rol oynayan çinko bağımlı proteolitik enzimler ailesidir. Anormal MMP ekspresyonu; otoimmün hastalıklar, kanser, endometriyozis ve diğer iltihaplı hastalıklar patogeneğinde rol oynar. MMP'ler üreme sisteminin normal fizyolojisi için çok önemlidir. 20 çeşit MMP'den MMP-2 ve MMP-9, insan uterus endometriyal stromasında bulunan jelatinazlardır. Hem MMP-2 hem de MMP-9, insan embriyo implantasyonunda önemli bir rol oynar ve implantasyon sırasında ECM yeniden modellemede ana hız sınırlayıcı enzimlerdir. Bununla birlikte MMP-2 ve MMP-9 hiperaktivitesi; endometriyal inflamasyonda görülenlere benzer, istenmeyen bir uterus ortamı ile ilişkilidir. Çünkü başarılı implantasyon, MMP'lerin aktivasyonu ve inhibisyonu arasında sıkı bir dengeye bağlıdır. Bir çalışmada tekrarlayan implantasyon yetersizliği olan kadınlar fertil kadınlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek intrauterin MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini bildirilmiştir. Bu gözlemler, MMP aktivitesinin, kronik endometrit gibi implantasyon için uygun olmayan bir uterus ortamını hakkında bilgi verebilen hassas bir biyo-belirteç olduğunu göstermektedir (42,43).

2.2. Kafein

Kafein (1,3,7 trimetilksantin) bir pürin alkoloit olarak birçok yiyecek ve içeceğin içeriğinde bulunur. Günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen kahve, çay, çikolata, kola ve bazı gazlı içecekler kafein ihtiva eder. Kafein uyarıcı etkileri nedeniyle yüzyıllardır kullanılan bir maddedir. Bronkodilatatör etkisi, bazı analjeziklerin içeriğinde bulunması ve yeni doğan apne tedavisine olan etkisi gibi sebeplerle tedavi amaçlı da kullanılmaktadır (1).



Şekil 6: Kafeinin Kimyasal Yapısı (1)

Yapılan araştırmalarda günümüzde insanların günde ortalama 300 mg'dan daha fazla kafein tükettiği belirtilmiştir. Bir kupa kahvede yaklaşık olarak 30-175 mg kafein bulunur. Eğer gün içerisinde, kişiden kişiye değişmekle birlikte alınan kafein miktarı hesaplanırsa hiç farkında olmadan günde 1 gramdan fazla kafein tüketildiği görülecektir. Toksik dozu erişkinlerde günlük 10 gram olarak tespit edilmiştir (44).

Bazı yiyecek ve içeceklerde ne kadar kafein var?

Filtre kahve	150 ml	60-180 mg kafein
Hazır kahve	150 ml	40-180 mg kafein
Kafeinsiz kahve	150 ml	2-8 mg kafein
Poşet cay	150 ml	24-50 mg kafein
Yeşil cay	150 ml	30-48 mg kafein
Kakao	150 ml	2-7 mg kafein
Sütlü �ikolata	28 g	1-15 mg kafein
Bitter �ikolata	28 g	5-35 mg kafein
Kola	180 ml	15-24 mg kafein
Diyet kola	180 ml	13-29 mg kafein

Kafeinin insan sağlığı üzerindeki etkileri 1900' l  yılların başlarında incelenmeye başlanmıştır. Diüretik, kas ve sinirleri uyarıcı, mide salgısını uyarıcı ve metabolik hızı artırıcı etki yaptđı, orta düzeyde alınan kafeinin (200-300mg) iştah artırıcı, uyuşukluk ve zihin yorgunluğunu giderici etkisi bildirilmiştir. Kafeinin insanda uyarıcı olduğu, tolerans ve fiziksel bağımlılık oluşturabildiği, bu olgularda kafeinin kesilmesinin kendini disfori, başağrısı, irritabilite, zihinsel konsantrasyonun azalması ve anksiyete ile belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olduğu görülmüştür (5). Aşırı tüketimi halinde (300-800 ve üstü) kişide uyku bozukluğu ve uykusuzluk hali, sinirlilik, endişe, panik atak ve kaygı hallerine sebep olduğu belirtilmektedir. Aşırı dozlarda istemsiz kasılmalar da görülebilir. Kahvenin yüksek miktarlarda tanen (kateşin analoğu) içerdiği; tanenin antioksidan, anti-mutajenik, anjiogenik, antibiyotik, anti-hiperkolesterolemik, antihipertansif ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu açıklanmaktadır (45).

Teobromin (3,7 dimetilksantin) ve ksantin, kafeinin katabolik ürünleridir. Bu  r nlerin antioksidan ve de prooksidan özellikte oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (46).

2.2.1. Kafein Metabolizması

Kafeinin oral alımından sonra, %99 'u gastrointestinal sistemden emilerek 30-120 dakika içinde plazmada en yüksek konsantrasyona ulaşır. Hidrofobik özelliğinden dolayı bütün biyolojik membranlardan kolayca geçebilme yeteneğine sahiptir. Kafeinin % 5'den daha azı metabolize olmadan idrarla atılır. Kafein plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştıktan sonra, beyinde en az bir saat konsantrasyonu değişmeden kalır (47). İnsanda normal plazma seviyesi kafein için 5-20 µM olarak belirtilmiştir (48). İnsanda 300 mg (yaklaşık 4 kupa kahve; 5mg/kg) kafein alınımından 1-2 saat sonrası plazma kafein pik seviyesi yaklaşık 7,5-9,0 µg/ml (39-46 µmol/L) dir. 5,30 mg/kg (ağır içici) kafein alınımı sonrasında plazma seviyesi yaklaşık olarak 50 µmol/L olacaktır. Normal içim 2,40 mg/kg olarak kabul edilir (49).

Hidrofobik özelliğinden dolayı kafein kan-beyin bariyeri ve plasental bariyeri de kolaylıkla geçebildiği, ağır kafein tüketen hamile bayanların yeni doğan bebeklerinde yüksek seviyelerde kafein tespit edildiği görülmüştür. İnsanlarda kafeinin yarı ömrü 2,5-6 saat arasında değişmekle birlikte, fare ve sıçanlarda bu sürenin 0,7-1,2 saat olduğu, fetus ve yeni doğan döneminde kafeinin yarı ömrünün, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması nedeniyle yaklaşık 32-149 saate uzadığı söylenmektedir (48).

İnsanda kafein, hepatik sitokrom P4501A2 (CYP1A2) enzimi ile demetilasyon sonucu paraksantine (1,7 dimetilksantin) dönüşür. Kafein metabolizmasının %72-80'i bu demetilasyon basamağı ile olur. Daha az olarak da teobromine (3,7 dimetilksantin) ve teofiline (1,3 dimetilksantin) çevrilir. Aynı enzim tarafından 1,7 dimetilksantin demetilasyonu ile önce 1-metilksantin sonra da 1-metilürik asit oluşturulur (49).

Kafein, öncelikli olarak CYP1A2 tarafından metabolize edilir, fakat N-asetiltransferaz (NAT-2) ve ksantin oksidazın da substratıdır (50). Teofilin ve paraksantin kafeinin biyolojik aktivitesi olan metabolitleridir. Teofilin, paraksantinden daha güçlü etki gösterir (2).

Sıçanlarda, kafein metabolitlerinin %40'ını trimetil türevleri oluşturur ki bu türevler insanlarda %6 civarındadır. Kafein insanlarda 25' den fazla metabolite metabolize olur ve başlıcaları paraksantin, teobromin ve teofilindir. İnsanlarda kafein metabolizması miktar olarak en fazla paraksantin (1,7 dimetilksantin) oluşumuyla karakterizedir. Bu basamak kafein metabolizmasının ilk basamağını oluşturmakla birlikte metabolizmanın %72-80'ini kapsar. Bazı kafein metabolitlerinin farmakolojik aktiviteleri vardır; örneğin, teofilin ve paraksantin, kafein içeren içeceklerde bulunur ve biyolojik aktiviteleri vardır. Kafein alınımından sonra santral sinir sisteminde teofilin ve paraksantin seviyeleri yükselir fakat teofilin, paraksantinden daha güçlü etki göstermektedir (51).

Aynı dozda gözlenen farklı sonuçlar metabolizma farklılığına dayandırılmaktadır. Bu metabolizma farklılığı; genetik polimorfizm, metabolik indüksiyon, sitokrom P-450 inhibiyonu, kilo, cinsiyet ve karaciğer hastalığı gibi nedenlerle olabilir. Kafein intestinal sistemden hızlı bir şekilde tamama yakın şekilde emilir (44).

Sıçanlarda teofilin seviyeleri yüksek olmasına rağmen plazmadaki asıl major metabolit paraksantindir (2). İnsanlar ve rodentler arasında kafein metabolizması açısından farklılıklar görülmektedir. Sıçanlarda kafein %40 oranlarında trimetil türevlerine metabolize olurken bu oran insanda %6'dan daha azdır (20). Laboratuvar hayvanlarındaki kafein uygulamalarında verilen doza göre farklı yanıtlar oluşmaktadır. Örneğin düşük doz kafein, kokain ve amfetamin gibi psikomotor uyarıcı etki gösterir. Yüksek dozda ise anksiyete oluşumu gözlenir ve fensiklidin benzeri etki oluşturur (2).

Kafein metabolizması kemiriciler ve insanlar arasında farklılık gösterdiğinden ve metilksantin'in yarılanma ömrü sıçanlarda (0.7-1.2 saat) insanlara göre (2.5-4.5 saat) çok daha kısadır. Hayvan ve insan dozları karşılaştırıldığında metabolik vücut ağırlığı için düzeltmek mantıklı görünmektedir. Bu nedenle, insanlar ve sıçanlar arasındaki doz dönüşümünü hesaplanırken, insan: sıçan 1: 6.17 vücut yüzey alanı karşılaştırmaları dikkate alınmaktadır. Örneğin; gebe kadınların ortalama kafein alımı 4.8 mg/kg/gün, sıçanlarda 30 mg/kg/gün tüketime eşittir (7, 8).

Kafeinin, en yüksek dozda subletal etkilerden kaçınmak için aralık bulma çalışmaları ile literatüre dayandırılmaktadır. Sıçanlara oral yoldan uygulanan kafein ölümcül dozu 192 mg / kg'dır (52). Literatürde bildirilen en yüksek kafein dozlar (120 ve 180 mg) gebe sıçanların fetüslerinde hipofiz ve adrenal bezler gibi endokrin sisteminin bileşenlerine etkileri araştırılmıştır. Vücut yüzey alanı bazlı doz hesaplamaları, hayvanlardan insanlara uyarlanması için en uygun yöntemdir ve vücut ağırlığına dayalı basit dönüşümlerden çok daha üstün bulunmaktadır. İnsanlarda ve sıçanlarda vücut yüzey alanına dayalı doz dönüşümünü kullanarak, çalışmada kullanılan dozlar, insanlarda yaklaşık 19.4 ve 29.1 mg/kg'a eşdeğerdir. Çoğu enerji içeceği 1 mg / mL'den fazla kafein sağlar. Bu nedenle, bir veya iki enerji içeceği kolayca yukarıdaki kafein dozlarına yol açabilir (53).

2.2.2. Kafeinin Etkileri

Kafeinin etkileri doza bağımlı olarak değişmektedir. Düşük ve normal dozlarda (50-300 mg, yaklaşık 1-3 fincan kahveye denk gelmektedir) kafein insanda merkezi stimülasyon gerçekleştirir. Yani iyi hissetme, uyanıklık, enerji ve konsantre olma yeteneğini artırır. Yüksek

dozlarda ise (300-800 mg) anksiyete, sinirlilik ve insomnia gibi çeşitli negatif hisler oluşmasına neden olmaktadır (1,2). Kafein ve teofilin gibi metilksantinler diyetle alındıktan sonra, oluşturdıkları belli başlı fizyolojik etkiler şöyle sıralanmaktadır (2) ;

Santral Sinir Sistemine Etkileri:

- Adenozin reseptörlerine antagonistik etki
(A1 reseptörlerini kompetitif olarak bloke edip adenozinin nöronları deprese etmesini engeller)
- Beyin sapındaki solunum merkezini güçlü şekilde uyarma
- Solunum merkezinin karbondioksit duyarlılığını artırma
- Psikostimulan etki, uyanıklık (zihinsel çevikliği) ve dikkati artırır, yorgunluğu azaltır.
- Yüksek dozda anksiyojenik etki.

Periferik Etkileri:

- İskelet kaslarının uyarılması sonucu lokomotor aktivitede artış
- Anti- inflamatuvar etki
- Analjezik etki
- Glukoz metabolizmasında artma
- İnsulinin lipogenetik etkisinin azaltılması (yağ hücrelerinde norepinefrin artışıyla indüklenen lipoliz sonucu doku yağ seviyelerini ve vücut yağ depolarını azaltır)
- Hücre içi cAMP düzeylerinin artırılması
- Sitozolde Ca^{+2} seviyelerinin yükseltilmesi

Kafein ve diğer metilksantinler, fosfodiesterazı inhibe ederler ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır, adenozin reseptörlerine antagonist etki gösterirler. Bütün bunlar NO üretimini artırıcı etki yaparak, hücrede siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerini yükseltir (2). cAMP'nin hücresel seviyeleri adenilat siklaz ve fosfodiesteraz aktivitelerine bağlıdır. cAMP; birçok hormonun (ACTH, katekolaminler, glukagon, tiroksin gibi) ikincil habercisidir (44). Fosfodiesterazlar, cAMP ve siklik guanozin monofosfatı (cGMP) hidrolize ederler. cAMP ve cGMP, vazodilat intestinal peptit (VIP) ve nitrik oksit hücre içi ikincil habercilerdir (54).

Metilksantinler, ürik asit, adenin, guanin, hipoksantin gibi pürinlerin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu pürin molekülleriyle ksantinlerin kimyasal benzerliği, biyokimyasal düzenleyici cAMP ile etkileşime girmeleri bakımından önem taşımaktadır (44).

Kafein molekülü yapısal olarak adenezine benzer ve adenezin reseptör antagonisti olarak fonksiyon göstermektedir. Fizyolojik mediatör olan adenezin ve adenezin agonistleri adenezin reseptörleri aracılığıyla anti anjiogenetik faktörleri (TSP-1 (trombospondin-1)) inhibe ve anjiogenetik faktörleri arttırarak anjiogenezi uyarmaktadır.

Araştırmacılar, kafeinin doza bağımlı olarak TSP-1 artışına sebep olarak angiogenezi inhibe ettiğini göstermişleridir. (55). Bir başka çalışmada kafeinin zebrafish embriyolarında vasküler gelişime etkileri araştırılmış, kafeinin nrp1a, sema3aa ve sema3c'nin aracılığı ile anjiogenezi bloke ettiğini gösterilmiştir (56).

VEGF'nin nörotrofik ve nöro-koruyucu etkileri bilinmektedir. Çalışmada günlük kahve alımının nöronal hücrelerdeki endojen VEGF ekspresyonunu artırabildiğini ve dolayısıyla insan beynindeki nöro-koruyucu etkiyi ortaya çıkarabileceğini göstermektedir. Kahve tüketimi VEGF sayesinde nörodejeneratif hastalıklar için nöroprotektif bir ajan olarak terapötik bir potansiyel gösterir (57).

Kafein ve spontan abortus riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların sonuçları çelişkili bulunmuştur. Sebebi muhtemelen çalışma tasarımı, sonuç tespit ve kafein/kahve tüketim sınıflandırması ve popülasyonlarındaki farklılıklar olmaktadır. Bazı çalışmalar hamilelik sırasında kafeinli içecek tüketiminden alınan toplam kafein tüketimine, diğer çalışmalar ise sadece kahveye odaklanmıştır. Özetle, prekonsepsiyon kafein tüketiminin genel olarak spontan abortus ile kayda değer bir şekilde ilişkili olmadığını, erken gebelik sırasında kafein tüketimi biraz daha yüksek oranda spontan abortus riski ile ilişkili olduğunu ancak doz-yanıt ilişkisine bağımlı spontan abortus riskine yönelik çok az araştırma bulunmaktadır (58).

Amerikan Üreme Tıbbı Derneği, hamilelikten önce veya hamilelik sırasında kafein tüketiminin (günde bir veya iki fincan kahve veya eşdeğeri) doğurganlık veya gebelik sonuçları üzerinde belirgin bir olumsuz etkisi olmadığını belirtmektedir (59).

ABD Gıda ve İlaç İdaresi, kafeinin çeşitli amaçlarla genel olarak kabul görmüş güvenli bir gıda maddesi olarak listelenmesine rağmen, kafein kullanımının özellikle hamile kadınlar için olumsuz etkileri olabilir. İnsanlarda, kafein plasentadan fetüse geçebilir. Maternal kafein alımının fetal gelişim üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini gösteren, ancak birbiriyle çelişen kanıtlar mevcuttur. Örneğin, daha yüksek kafein alımına sahip hamile kadınların daha yüksek spontan abortus, geç dönemde düşük ve ölü doğum riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Sıçanlarda, kafeinin kardiyovasküler malformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Kafein sıçanda kalp ve diğerk malformasyonlara neden olur. Zebra balığı üzerinde yapılan çalışmalarda, kafein tedavisi bazı nşromşskşler bozukluklara ve hareket kısıtlılığına neden olduğu gşsterilmiştir. Kafein verilen zebra balığı embriyolarında hareket bozukluğu ve nşromşskşler değişim kaydedilmiştir. Bu gşzlemler, kafeinin insan ve diğerk hayvan tşrleri üzerinde potansiyel embriyotoksik ve teratojenik etkilere sahip olduğunu gşstermiştir (56).

Kafein etkisini adenozi n reseptşrleri aracılığıyla seks steroid hormonlarının şretilmesi ve dşzenlenmesinde rol alan testis, ovaryum, adrenal bezler ve hipotalamus-hipofiz aksı gibi yapılar üzerinde gşstermektedir. Kafein alımının, seks steroid hormonları şzerine olan etkileri hakkında çeşitli insan çalışmaları olmakla beraber, sonuçlar tutarlılık gşstermemektedir (2).

Kronik kafein tşketimi hamilelik sırasında fetal gelişimi etkilemesine rağmen embriyogenezi şzerine kafeinin etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Ařırđ dozlarda kafein, gen ekspresyonunu değiştirebilir, dşşşk ağırlıkta bebek doğumuna, infertiliteye, dşşşk riskine ve uterus içinde bebeğin gelişme geriliğine neden olabilir (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız prospektif deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Proje konusunun belirlenmesi Eylül 2017’de olup, literatür taraması ve Etik Kurul onayı alınması Aralık 2017’ye kadar devam etmiştir. Daha sonra proje desteği alınması için BAP’a gönderilmiştir. Temmuz 2018’da BAP desteği alınmış ve malzemelerin gelmesi ile birlikte Kasım 2018 – Ocak 2019 tarihleri arasında deneysel çalışma yapılmıştır. Deneysel materyallerin toplanmasıyla Ocak 2019 – Şubat 2019 arasında laboratuvar çalışmaları yapılmıştır. Nisan 2019’de tez savunması yapılmıştır.

Araştırmanın deneyi, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam üç grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

1.Kontrol Grubu (n=15): Bu grup histolojik ve biyokimyasal parametrelerin bazal değerlerini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Deneklerin vaginal smear ile östrus dönemleri belirlendi. Östrustaki denekler iki dişi bir erkek sıçan olacak şekilde 12 saat boyunca aynı kafeslere konularak katıma alındı. Takip eden günde makroskopik olarak vaginal tıkaçın görülmesi ile denekler gebe kabul edildi. İmplantasyon sürecinde izlenen değişiklikleri tespit etmek için ardışık 3 farklı günde sakrifikasyon gerçekleştirildi. Deneklerden 5 tanesini 4.günde, 5 tanesi 5.günde ve 5 tanesi 6.günde eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

2.Düşük doz kafein Grubu (n=15): Deneklerin vaginal smear ile östrus dönemleri belirlendi. Östrustaki denekler iki dişi bir erkek sıçan olacak şekilde 12 saat boyunca aynı kafeslere konularak katıma alındı. Takip eden günde makroskopik olarak vaginal tıkaçın görülmesi ile denekler gebe kabul edildi. Daha sonra deneklere gebelik süresi boyunca düşük doz kafein (30mg/kg) oral gavaj ile verildi. (26). Deneklerden 5 tanesini 4.günde, 5 tanesi 5.günde ve 5 tanesini 6.günde eter anestezisi altında sakrifiye edildi.

3.Yüksek doz kafein Grubu (n=15): Deneklerin vaginal smear ile östrus dönemleri belirlendi. Östrustaki denekler iki dişi bir erkek sıçan olacak şekilde 12 saat boyunca ayrı

kafeslere konularak katıma alındı. Takip eden günde makroskopik olarak vaginal tıkaçın görülmesi ile denekler gebe kabul edildi. Daha sonra deneklere gebelik süresi boyunca yüksek doz kafein (120mg/kg) oral gavaj ile verildi (26). Deneklerden 5 tanesini 4.günde, 5 tanesi 5.günde ve 5 tanesini 6. günde eter anestezi altında sakrifiye edildi.

3.4. Çalışmanın Materyali

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden elde edilen, Wistar suşu toplam 250 - 300 gr. 45 yetişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad-libitum beslenmiştir. Herhangi bir sebeple deneyi devam ettiremeyecek olan (enfeksiyon, ilaç reaksiyonu, genel durum bozukluğu vs.) ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanan hayvanlar deney ve istatistik kapsamından çıkarılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Birinci grubumuza her hangi bir ilaç uygulanmadı ve araştırmamızda elde ettiğimiz veriler bazal değerlerimiz olmuştur. Düşük ve yüksek doz gruplarına verdiğimiz kafein bağımsız değişkenlerimiz olup bu gruplardan aldığımız implantasyon markerları ise bağımlı değişkenlerimiz olmuştur.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom ve su banyosu, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikro pipetler, kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya işlemlerine tabi tutulmuştur. Histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen & Eozin, Masson Trichrome, immünohistokimyasal değişiklikler için VEGF, MMP-9, α V β 3 integrin, MUC-1 ve HB-EGF immünohistokimya boyaması yapılmıştır.

3.6.2.1. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi

Deneklere deney başlangıcında ve katıma alındıktan sonraki gün vaginal smear uygulandı. Vaginal smear ile alınan örnekler lama yayıldı. Hazırlanan preparatlar %96'lık, %80'lik, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirilip, akarsuda 5 dakika bekletildi. Daha sonra 30 saniye eozinde bekletildi. Eozinden çıkarılan preparatlar %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirilip havada kurutulup preparatlar incelendi. Vaginal sitolojik veriler Schaberg (1992)'nin döngüsel değişimlerine bağlı olarak elde ettiği bulgular doğrultusunda değerlendirildi.

3.6.2.2. Ölçme ve Fiziksel Değerlendirme

Deneklerin implantasyon alan sayıları değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler 'SPSS for Windows, Version 15.0' istatistik programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama±standart sapma olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal-Wallis varyans analizi onu izleyen post-hoc testler (Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

3.6.2.3. Histokimyasal Değerlendirmeler

Sakrifikasyon sonrası deneklerin implantaston alanları alındı, histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat fikse edildi. Fikse edilen dokular bir gece akarsu da bekletilerek fazla fiksatif uzaklaştırıldı. Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi. Dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika dört değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra iki değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde iki değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo1).

Tablo 1: Doku takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10 Formol	24 – 48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70 – 80 – 96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 1 – 2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1 – 2	1'er saat

Bloklama	Sert parafin	
-----------------	--------------	--

3.6.2.3.1. Hematoksilen & Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki etüvde diğer ikisi oda sıcaklığında 20'şer dakikalık üç farklı ksilole tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişik azalan alkol serilerinden (absolü - %70) geçirilip, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (05- 06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile nukleusların boyanması sağlandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (05-10003L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boyası ile boyandı ve böylece hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolu alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (**Tablo 2**).

Tablo 2: Hematoksilen & Eozin boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Mayer's Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama

Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.2. Masson's Trichrome Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilolde tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile suda çalkalandıktan sonra Masson Trichrome boyama seti (5022, GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 5 damla Weigert demirli hematoksilin A solüsyonu ile 5 damla Weigert demirli hematoksilin B solüsyonu damlatılarak nükleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletildi. Yıkama işlemi yapılmadan preparatlar 5 dakika kurutulduktan sonra Pikrik asit alkolik çözeltisi C solüsyondan 10 damla damlatılarak 4 dakika bekletildi ve eritrositlerin boyanması sağlandı. Distile su ile hemen (3-4 saniye) yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 10 damla Gelincik kıvılcı fuksin çözeltisi D solüsyonu 4 dakika bekletilerek hücre sitoplazmalarının boyanması sağlandı. Sonra preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra Fosfomolibdik asit çözeltisi E solüsyonundan 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan preparatlar 5 dakika kurutuldu. Masson anilin mavisi çözeltisi F solüsyonundan 10 damla damlatıp 5 dakika bekletilerek bağ dokusunun boyanması sağlandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilol ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (**Tablo 3**).

Tablo 3: Masson Trichrome boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama

Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent A + Reagent B	10 Dakika
Boyama	Reagent C	4 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent D	4 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	10 Dakika
Boyama	Reagent F	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.4.1. İmplantasyon Alanlarının Değerlendirmesi

Her bir kesitte uterus duvarını oluşturan 3 tabaka (endometriyum, miyometriyum, perimetriyum) ayırt edildi, H&E, Masson Trikrom boyamalarla luminal epitel, glandüler epitel ve stroma, desidual reaksiyon, bazal lamina bütünlüğü semikantitatif olarak değerlendirildi.

3.6.2.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

3.6.2.5.1. İmmünohistokimya Boya Protokolü

İmmünohistokimyasal olarak VEGF, HB-EGF, MUC-1, MMP-9, α V β 3 integrin primer antikorları kullanılmıştır. Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Daha sonra dokular %10'luk Sitrat tamponunda 5 dakika mikrodalgada kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokuların etrafı Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çizildi

ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından 3 kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dakika oda ısısında H₂O₂ ile bekletilerek dokuda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik MUC-1 (1:50, Bioss USA, bs-0649R)/ VEGF (1:100, Bioss USA, bs-1313R)/ İNTEGRİN (1:100, Abcam, 85670) ile + 4 °C’ de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor (B) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile 30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solüsyonunda (İnvitrogen, LOT 1155338A) 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer’s hematoxilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: İmmünohistokimyasal boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96’lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80’lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70’lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dokuların Etrafını Çizme	Pappen	
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Antigen Retrieval	Sitrat solüsyonu (mikrodalgada)	5 Dakika
Soğutma		20 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Blocking Endogenous Peroxidase activity	H ₂ O ₂	20 Dakika

Primer Antikor	MUC-1/VEGF/İNTEGRİN/MMP-9	1 Gece (4°C’de)
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Enzim Kompleksi	Streptavidin Biotin Kompleksi	15 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Kromojen	DAB	
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Zemin Boyası	Mayer’s Hematoksilen	
Dehidratasyon	%70’lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80’lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96’lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.5.2. Semikantitatif İmmünohistokimyasal Analiz

İmplantasyon alanındaki VEGF, HB-EGF, MUC-1, MMP-9, α V β 3 integrin proteininin dağılımını belirlemek için antikor boyaması yapıldı. Gruplar arası VEGF, HB-EGF, MUC-1, MMP-9, α V β 3 integrin dağılımını belirlemek için 3 farklı günde semikantitatif değerlendirme yapıldı. Semikantitatif skora aşağıdaki gibi tanımlandı (**Tablo 5**).

Tablo 5: Semikantitatif İmmünohistokimyasal Skorlama

Skor	İmmünohistokimyasal Bulgular
3 (+++)	Kuvvetli pozitif boyanma
2 (++)	Pozitif boyama
1 (+)	Zayıf pozitif boyanma
0 (-)	Pozitif boyanma yok

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tez Konusunun Belirlenmesi ve Literatür Araştırması
Eylül 2017 –Kasım 2017



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS 23,0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Östrus siklusunda olmasına rağmen gebe kalmayan denekler deneyden çıkartılmıştır. Deneyden çıkartılan bu denekler yerine yeni denekler istenmiş, deney tekrarlanmış ve bu nedenle deney süresi uzamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 44/2017 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

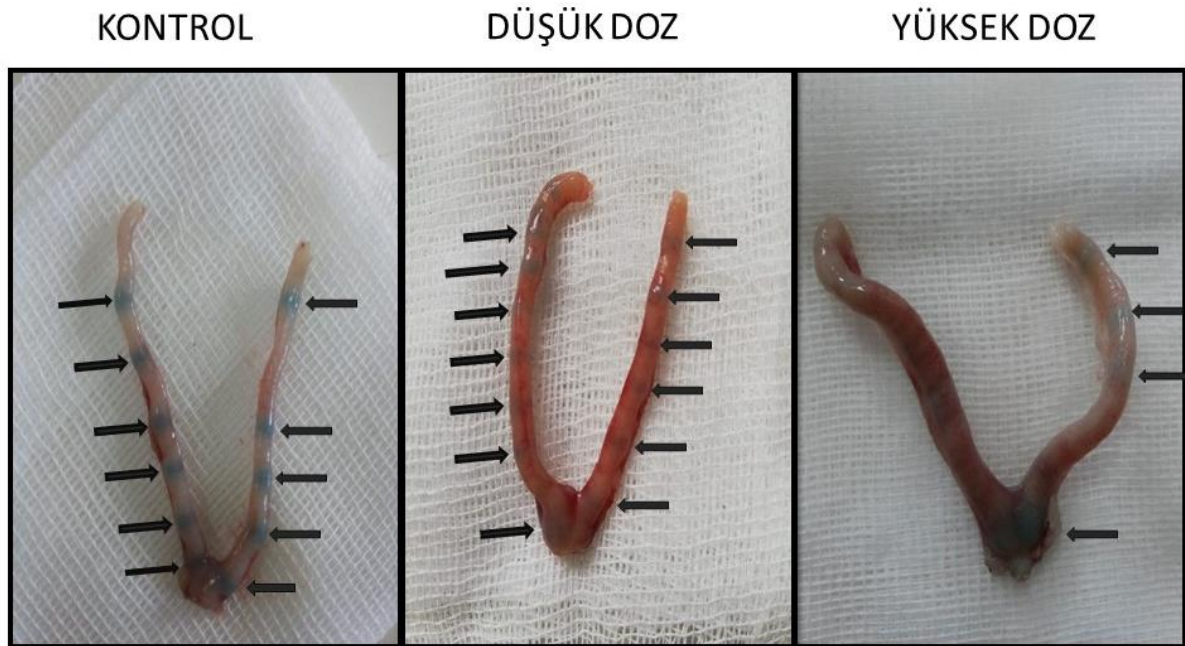
4.1. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının ve Gebeliklerinin Belirlenmesi

Deneye başlamadan önce vaginal smear ile deneklerin östrus siklusu belirlendi. Denekler, gebeliğin başarıyla gerçekleşebilmesi için östrus fazındayken katıma alındı.

Katımın ertesi günü sıçanlarda vaginal plak kontrolü yapılarak, vaginal plak gözlenen denekler gebeliğin 1. gününde kabul edildi. Gebe sıçanlar 3 ana gruba (kontrol, düşük doz ve yüksek doz kafein grubu) ayrıldı.

4.2. İmplantasyon Alan Sayılarının Değerlendirilmesi

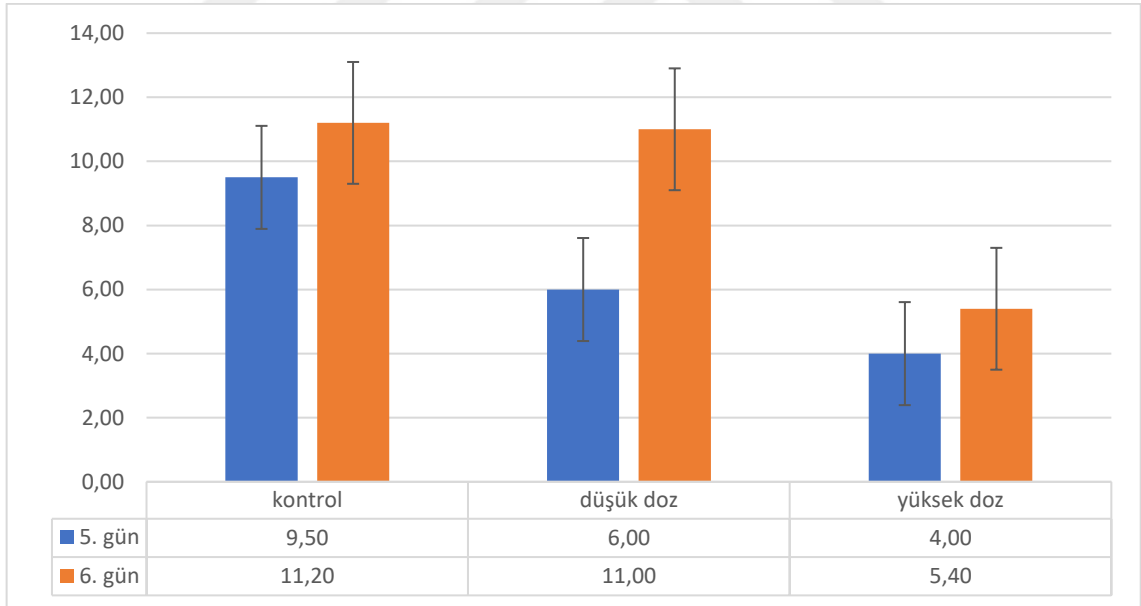
4. gün henüz implantasyon gerçekleşmediği için implantasyon alan sayıları elde edilemedi. Kontrol grubunda 5.gün implantasyon alan sayıları ortalama 9,5 iken, düşük doz kafein grubunda 6 ve yüksek doz kafein grubunda ise 4 olarak tespit edildi (resim 1). 6.günde ise kontrol grubunda implantasyon alan sayısı ortalama 11,2, düşük doz kafein grubunda 11 ve yüksek doz kafein grubunda ise 5,4 olarak tespit edildi (resim 2). İstatiksel olarak da prenatal dönemde doza bağımlı olarak kafein tüketiminin implantasyon alan sayısını azalttığı gösterildi (grafik1).



Resim 1: 5. Gün İmplantasyon Alan Sayıları



Resim 2: 6. Gün İmplantasyon Alan Sayıları



Grafik 1: İmplantasyon Alan Sayılarının İstatiksel Analizi

4.3. Hematoksilen & Eozin Boyama

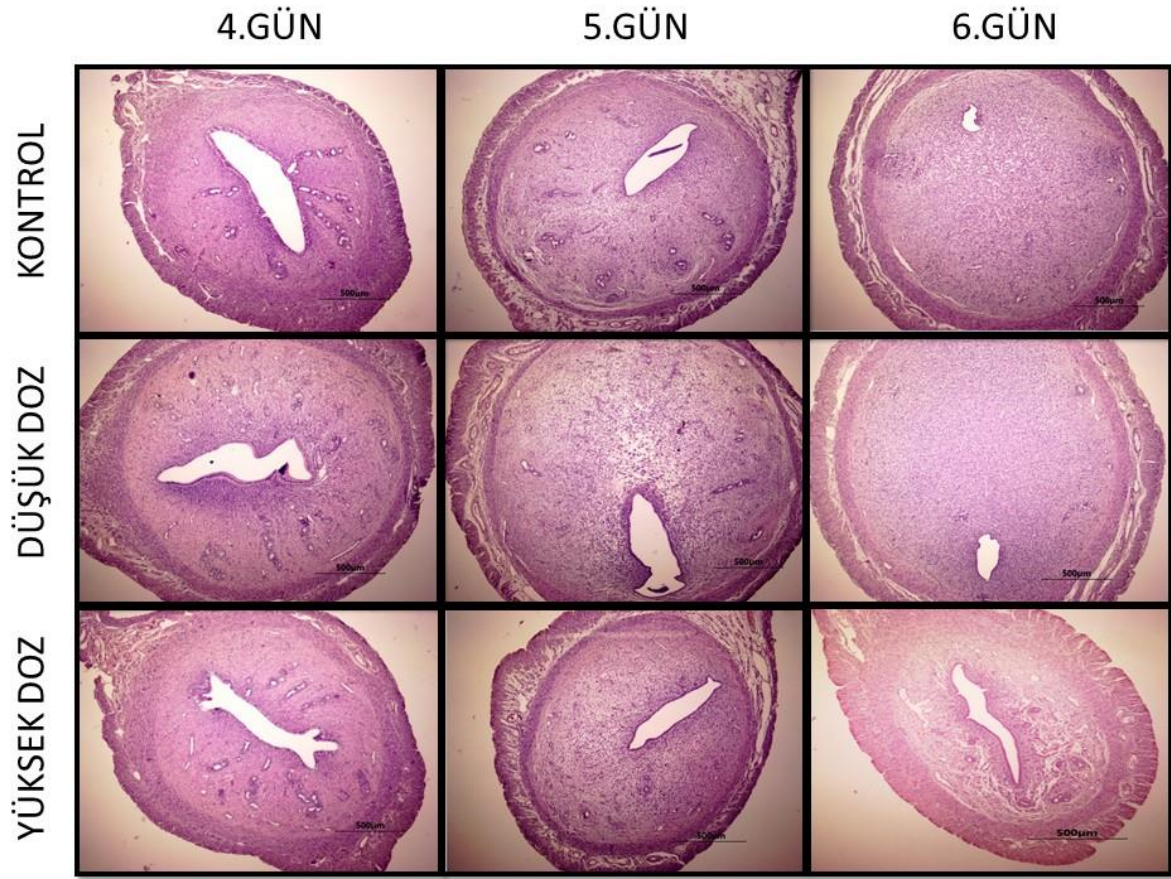
4.3.1. Kontrol Grubu

Gebeliğin 4. günü, uterusun en dıştan saran perimetrium, ortada miyometriyum ve en içte endometriyum tabakası olmak üzere 3 tabaka ayırt edilebilmekteydi. Lümen epiteli tek katlı pirizmatik epitel olarak gözlendi. Epitelin altında bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılmış uterus

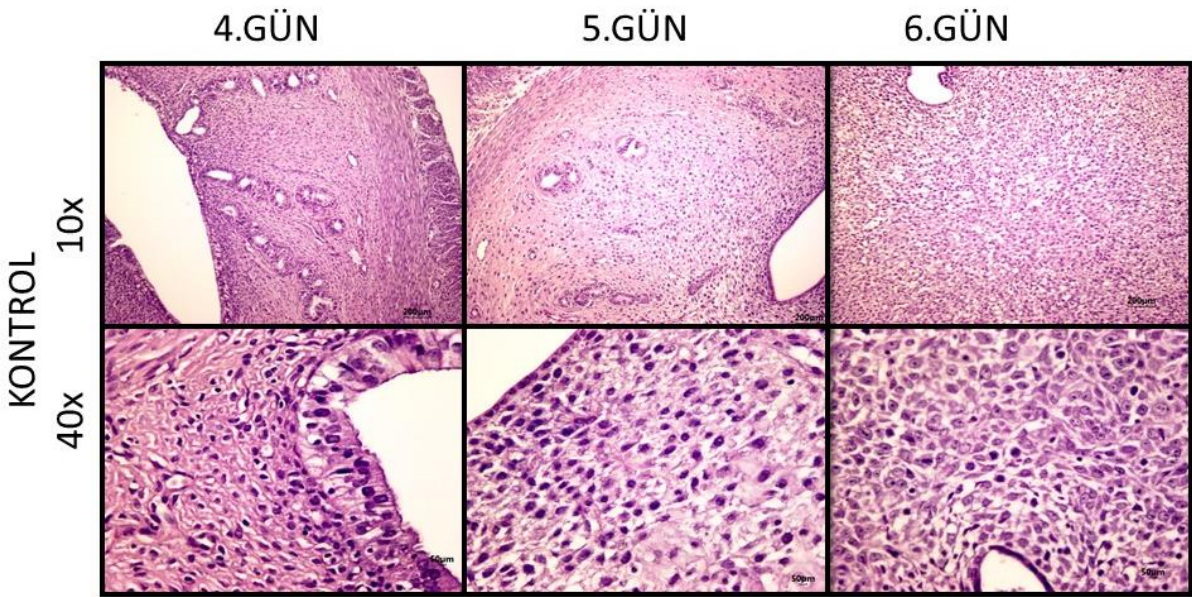
bezleri ve dağınık halde bulunan stromal hücreler gözlemlendi. Miyometriyum tabakasında düz kas hücreleri ayırt edildi. Endometriyum lümeninin geniş olduğu gözlemlendi (Resim 4).

Gebeliğin 5. Günü, uterusun yine 3 tabakası ayırt edilmekteydi. İmplantasyon günü olduğu düşünülen 5. günde primer ve sekonder desidual alanlar görülmektedir. Primer desidual alan lümen epitelinin hemen altında görülmektedir. Stromal alanda desidualize olmaya başlayan hücrelerin sayıca artışı görülmektedir. Lümeninde bir miktar daralma izlendi ve epitel yüksekliğinin azaldığı alçak prizmatik epitel hücreleri olarak değerlendirildi (Resim 4).

Gebeliğin 6. gününde sıçan uterusunun transvers kesitleri incelendiğinde, 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Uterusu en dıştan saran perimetriyum tabakasının sardığı, ortada myometriyum ve en iç tabakada endometriyum ayırt edilmekteydi. 5. günde başlayan desidualizasyonun, oldukça belirgin bir alanı kaplamasıyla arttığı gözlenmektedir. Stromal hücrelerin içlerinde glikojen ve lipid biriktirerek daha da genişledikleri tespit edildi. Myometriyum tabakasında, östrojenin artan seviyesine cevap olarak düz kas hücrelerinin boyutlarının (hipertrofi) ve sayısının artmaya (hiperplazi) başladığı izlendi. Endometriyumun önceki günlere göre oldukça kalınlaştığı izlendi. Lümen oldukça daralmış iken epitel hücrelerinde yassılaşma ve bu tabakadaki bezlerin implantasyona hazırlık amacıyla genişlediği gözlemlendi (Resim 4).



Resim 3: H&E boyama



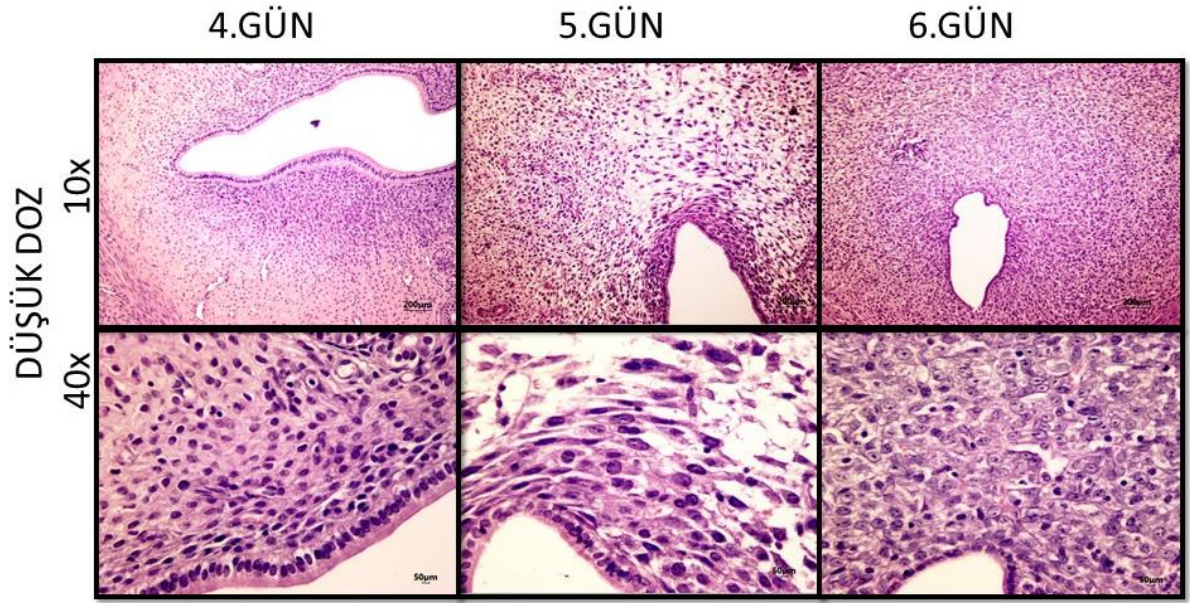
Resim 4: Kontrol grubu H&E boyama

4.3.2. Düşük Doz Kafein Grubu

Gebeliğin 4. günü kontrol grubu ile uyumlu olarak uterusu en dıştan saran perimetrium, ortada miyometriyum ve en içte endometriyum tabakası olmak üzere 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Lümen epiteli tek katlı prizmatik epitel olarak gözlendi. Epitelin altında bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılmış uterus bezleri ve dağınık halde bulunan stromal hücreler gözlendi. Miyometriyum tabakasında düz kas hücreleri ayırt edildi. (Resim 5).

Gebeliğin 5. gününde kontrol grubu ile uyumlu olarak uterusun yine 3 tabakası ayırt edilmekteydi. İmplantasyon günü olarak düşünülen 5. günde primer ve sekonder desidual alanlar izlendi. Primer desidual alan lümen epitelinin hemen altında görülmektedir. Stromal alanda desidualize olmaya başlayan hücrelerin sayıca arttığı görülmektedir (Resim 5).

Gebeliğin 6. gününde kontrol grubu ile uyumlu olarak, sıçan uterusunun transvers kesiti incelendiğinde 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Uterusu en dıştan perimetrium tabakasının sarıldığı gözlendi, ortada myometriyum ve en iç tabakada endometriyum ayırt edilmekteydi. Gebeliğin 6. Gününde; 5. günde başlayan desidualizasyonun oldukça belirgin bir alanı kaplamasıyla arttığı gözlenmektedir. Bu alanın etrafının en dıştan perimetrium ve hemen altında ise myometriyumun sarıldığı görülmektedir. Desidualizasyonun 5. günde gelişmeye başladığı bu alanda, stromal hücrelerin içlerinde glikojen ve lipid biriktirerek daha da genişledikleri tespit edilmişti. Myometriyum tabakasında, östrojenin artan seviyesine cevap olarak düz kas hücrelerinin boyutlarının (hipertrofi) ve sayısının artmaya (hiperplazi) başladığı izlendi. Endometriyumda ise, lümeni boyunca prizmatik hücrelerinin yassılaştığı ve bu tabakadaki bezlerin implantasyona hazırlık amacıyla genişlediği gözlendi (resim 5).



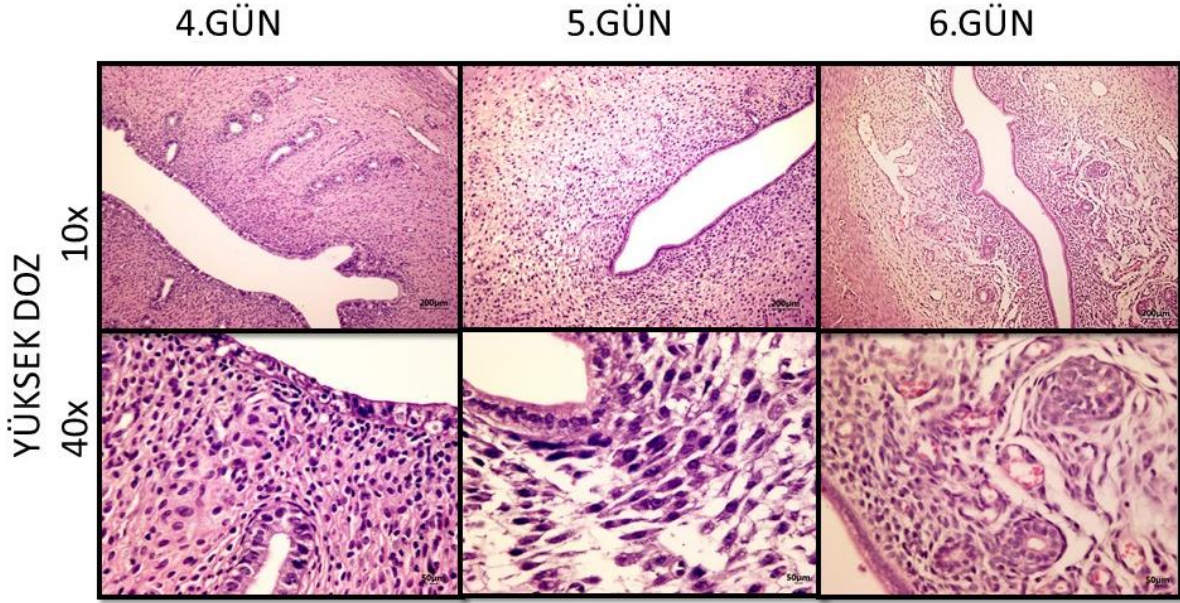
Resim 5: Düşük doz grubu H&E boyama

4.3.3. Yüksek Doz Kafein Grubu

Gebeliğin 4. gününde kontrol grubu ile uyumlu olarak uterusda; en dıştan saran perimetrium, ortada miyometriyum ve en içte endometriyum tabakası olmak üzere 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Lümen epiteli tek katlı prizmatik epitel olarak gözlemlendi. Epitelin altında bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılmış uterus bezleri ve dağınık halde bulunan stromal hücreler gözlemlendi. Miyometriyum tabakasında düz kas hücreleri ayırt edildi. (Resim 6).

Gebeliğin 5. gününde, uterusun yine 3 tabakası ayırt edilmekteydi. İmplantasyon aşaması olarak düşünülen 5. günde primer ve sekonder desidual alanlar görülmektedir. Primer desidual alan lümen epitelinin hemen altında görülmektedir. Stromal alanda desidualize olmaya başlayan hücreler, ödem, vaskülarizasyon artışı kaydedildi (Resim 6). Bazı deneklerde endometriyum stromasında hemoraji izlendi.

Gebeliğin 6. gününde sıçan uterusunun transvers kesiti incelendiğinde, 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Primer desidual alan lümen epitelinin hemen altında görülmektedir. Stromal alanda desidualize olmaya başlayan hücreler, ödem, vaskülarizasyon artışı görülmektedir (Resim 6). Bazı deneklerde endometriyum stromasında 5. güne benzer hemoraji alanları izlenmektedir. Kontrol grubunda 6.günde izlenen lümen daralmasının yüksek doz grubunda yeterli gelişmediği gözlemlendi.



Resim 6: Yüksek doz Grubu H&E boyama

4.4. Masson Trikrom Boyaması

4.4.1. Kontrol Grubu

Gebeliğin 4.gününde kollajen lif boyası olan Masson Trikrom ile boyanan uterusu incelediğimizde kollajen liflerin kan damarları arasındaki bağ dokusunda ve epitelin altındaki stromanın arasında mavi renkte boyandığı tespit edildi. Kırmızıya boyanan diğer yapılar; miyometriyum tabakasındaki düz kaslar, uterus lümen ve bez epiteli ile bağ dokusu hücreleri olarak gözlemlendi (resim 7).

Gebeliğin 5.gününde maviye boyanan kollajen liflerin; ortada desidual hücrelerin gelişmeye başlamasından dolayı kenara itilmeye başladığı tespit edildi (resim 7).

Gebeliğin 6.gününde ise stromadaki kollajen liflerinin myometriyuma komşu olacak şekilde tamamen kenara itilmiş olduğu gözlemlendi (resim 7). Embriyonun gömüldüğü desidual yatakta da hiç kollajen lifin gözlenmediği tespit edildi (resim 7).

4.4.2. Düşük Doz Grubu

Kontrol grubu ile uyumlu bulgular gözlemlendi. Gebeliğin 4.gününde kollajen lif boyası olan Masson Trikrom ile boyanan uterusu incelediğimizde kollajen liflerin kan damarları arasındaki bağ dokusunda ve epitelin altındaki stromanın arasında mavi renkte boyandığı tespit edildi. Kırmızıya boyanan diğer yapılar; miyometriyum tabakasındaki düz kaslar, uterus lümen ve bez epiteli ile bağ dokusu hücreleri olarak gözlemlendi (resim 7).

Gebeliğin 5.gününde maviye boyanan kollajen liflerin; ortada desidual hücrelerin gelişmeye başlamasından dolayı kenara itilmeye başladığı tespit edildi (resim 7).

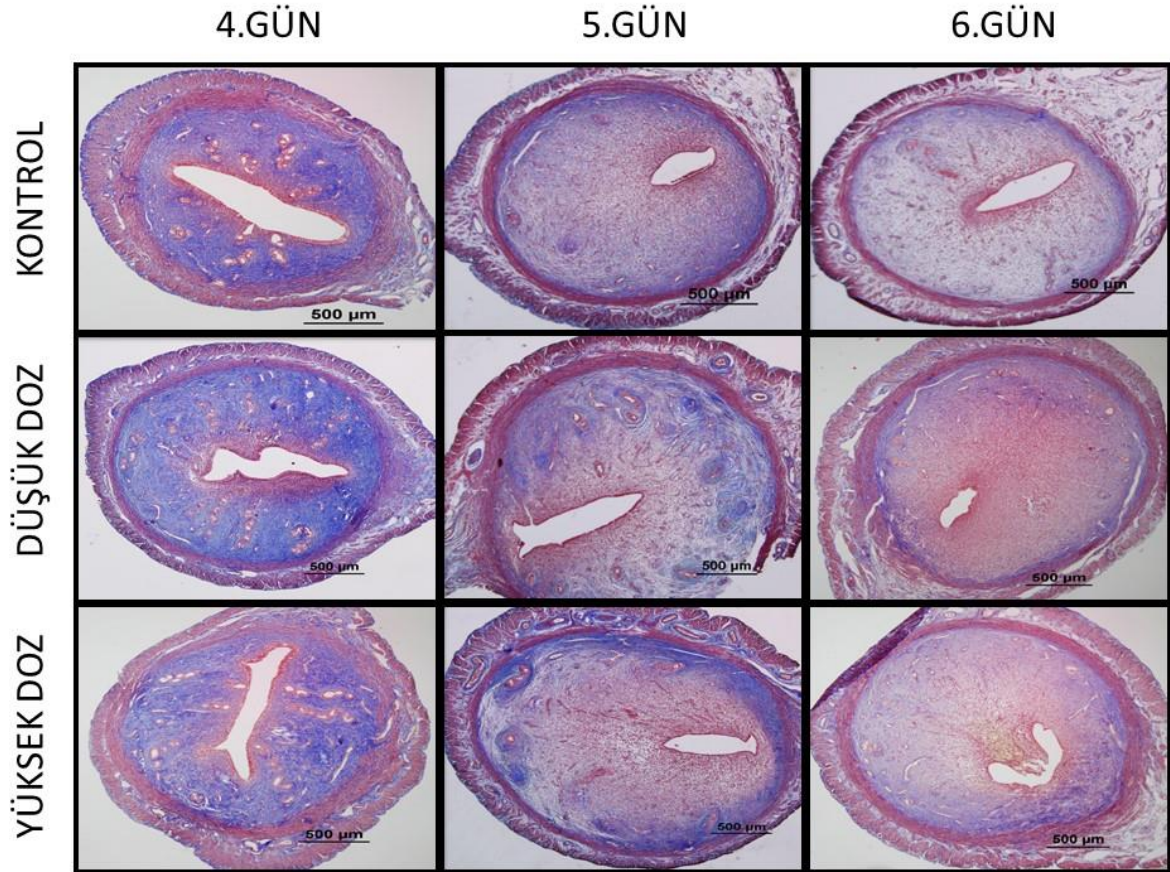
Gebeliğin 6.gününde ise stromadaki kollajen liflerinin myometriyuma komşu olacak şekilde tamamen kenara itilmiş olduğu gözlemlendi. Embriyonun gömüldüğü desidual alanda da hiç kollajen lifin gözlenmediği tespit edildi (resim 7).

4.4.3. Yüksek Doz Grubu

Gebeliğin 4.gününde kollajen lif boyası olan Masson Trikrom ile boyanan uterusu incelediğimizde kollajen liflerin kan damarları arasındaki bağ dokusunda ve epitelin altındaki stromanın arasında mavi renkte boyandığı tespit edildi. Kırmızıya boyanan diğer yapılar; miyometriyum tabakasındaki düz kaslar, uterus lümen ve bez epiteli ile bağ dokusu hücreleri olarak gözlemlendi.

Gebeliğin 5.gününde kontrol grubuna göre kollajen liflerin daha az kenara itilmeye başladığı tespit edildi (resim 7).

Gebeliğin 6. gününde kontrol grubundan farklı olarak kollajen liflerin myometriyuma kadar tamamen kenara itilmemiş olduğu ve endometriyumda daha fazla kollajen lifleri gözlemlendi. Ayrıca stromada sarı boyanmış hemoraji izlendi.



Resim 7: Masson trikrom boyama

4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda implantasyonda rol alan moleküller, immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi ve gruplar arasında günlere ve boyanma şiddetlerine göre farklı dağılımlar izlendi (tablo 1).

4.5.1. Muc-1 (Müsin-1)

4.5.1.1. Kontrol Grubu

Gebeliğin 4.gününde bariyer protein olan anti-MUC-1 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus lümeninde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken, bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 8).

Gebeliğin 5.gününde uterus lümeninde orta şiddetli (++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stroma ile bez epitelinde boyanma zayıftı (+) (resim 8).

Gebeliğin 6.gününde uterus lümeninde, stromada ve bez epitelinde zayıf (+) boyanma tespit edildi (resim 8).

4.5.1.2. Düşük doz Grubu

Gebeliğin 4.gününde bariyer protein olan anti-MUC-1 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus lümeni orta şiddetli (++) , bez epiteli ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 8).

Gebeliğin 5.gününde uterus lümeninde orta şiddetli (++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stroma ile bez epitelinde boyanma zayıftı (+) (resim 8).

Gebeliğin 6.gününde uterus lümeni, bez epiteli ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 8).

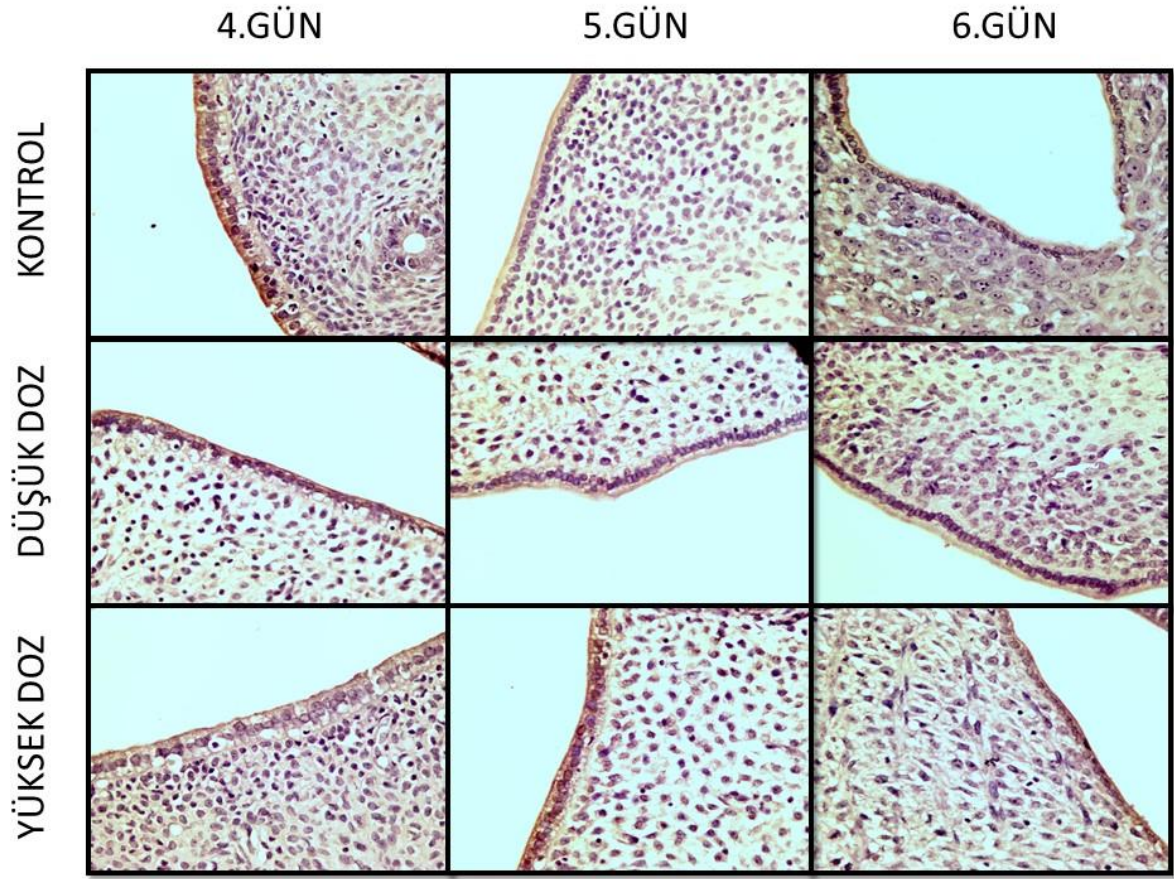
4.5.1.3. Yüksek doz grubu

Gebeliğin 4.gününde bariyer protein olan anti-MUC-1 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus lümeninde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken, bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 8).

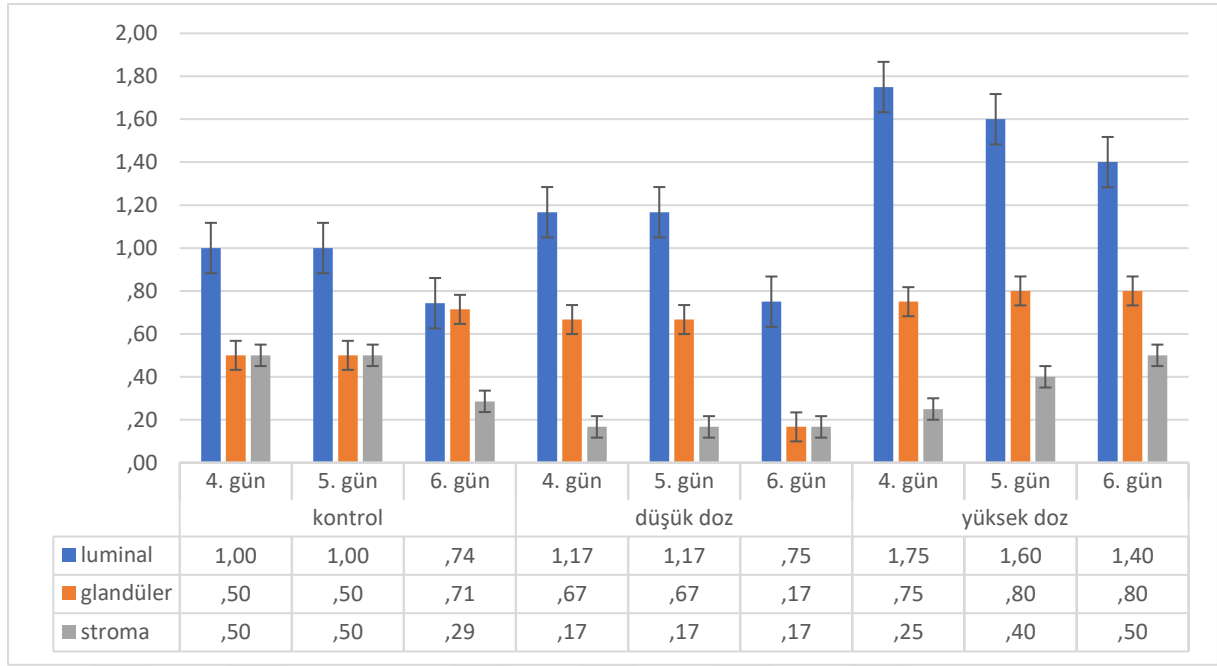
Gebeliğin 5.gününde uterus lümeninde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken, bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 8).

Gebeliğin 6.gününde uterus lümeninde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken, bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 8)

Müsin boyamasında kontrol grubu ile düşük doz ve yüksek doz arasında istatistiksel olarak anlamlı bulgu saptanamamıştır (Grafik 2).



Resim 8: Müsin-1 immünohistokimyasal boyaması



Grafik 2: Musin-1 immünoaktivitesinin istatistiksel değerlendirilmesi

4.5.2. HB-EGF

4.5.2.1. Kontrol Grubu

Gebeliğin 4.gününde HB-EGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus lümeninde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 9).

Gebeliğin 5.gününde maksimum ekspresyonun 5.günde olduğu gözlemlendi. Uterus lümeninde şiddetli (+++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stroma ile bez epitelinde boyanma orta şiddetli (++) boyanma tespit edildi (resim 9).

Gebeliğin 6.gününde uterus lümeninde orta şiddetli (++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stroma ile bez epitelinde boyanma orta şiddetli (++) boyanma tespit edildi (resim 9).

4.5.2.2. Düşük doz Grubu

Gebeliğin 4.gününde HB-EGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus lümeninde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 9).

Gebeliğin 5.gününde uterus lümeninde şiddetli (+++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stroma ile bez epitelinde boyanma orta şiddetli (++) boyanma tespit edildi (resim 9).

Gebeliğin 6.gününde uterus lümeninde şiddetli (+++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stroma ile bez epitelinde boyanma orta şiddetli (++) boyanma tespit edildi (resim 9).

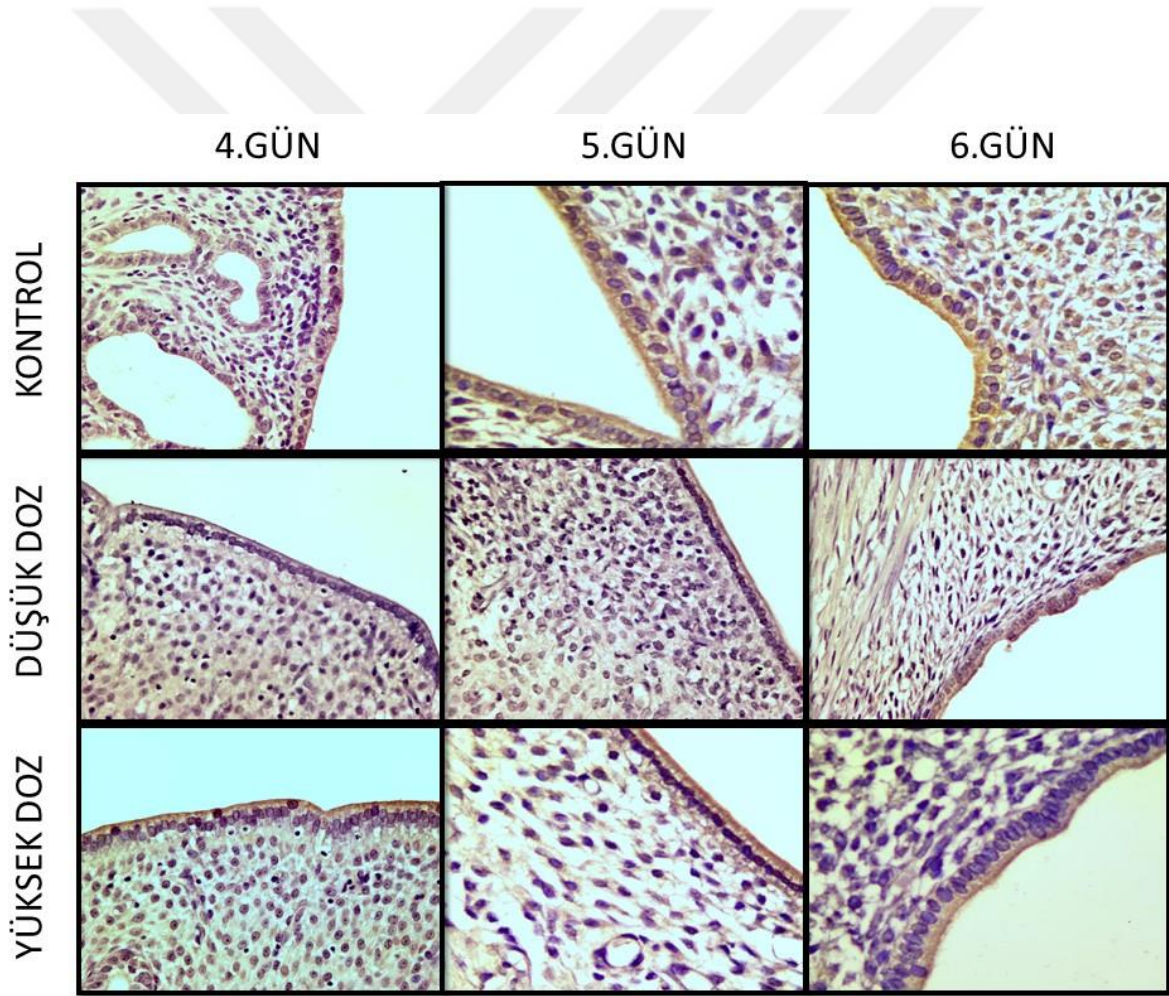
4.5.2.3. Yüksek doz grubu

Gebeliğin 4.gününde HB-EGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus lümeninde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 9).

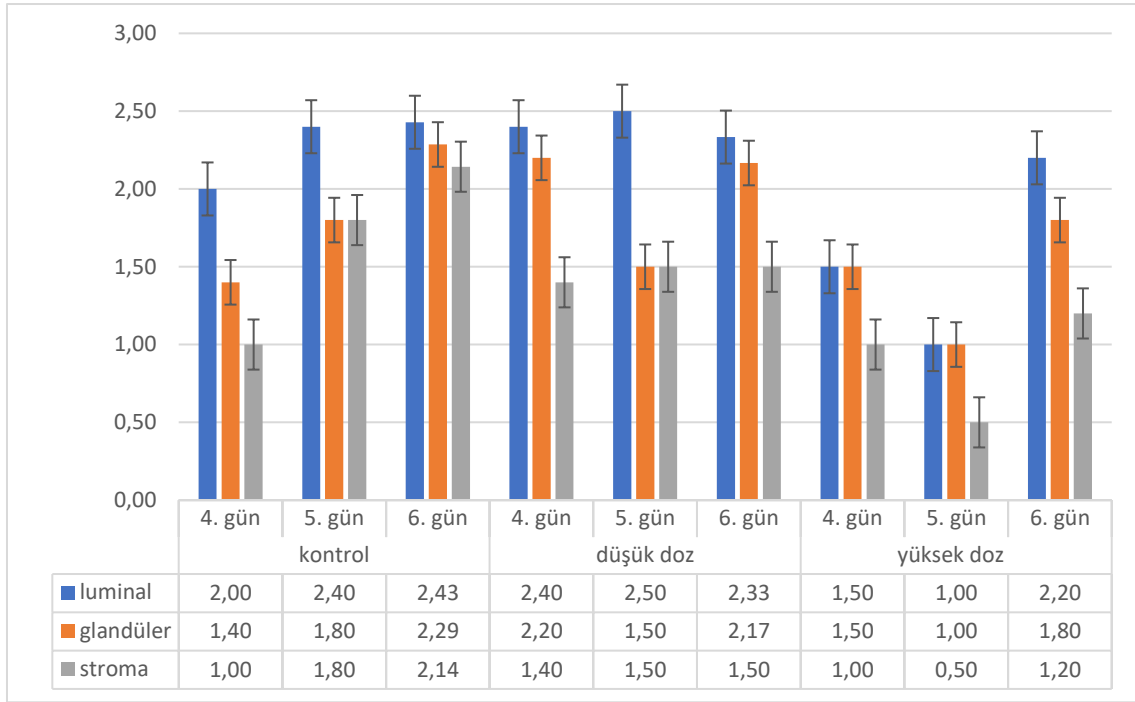
Gebeliğin 5.gününde uterus lümeni, stroma ile bez epitelinde zayıf (+) boyanma tespit edildi (resim 9).

Gebeliğin 6.gününde uterus lümeni ve bez epitelinde orta şiddetli (++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stromada zayıf (+) boyanma tespit edildi (resim 9).

Gruplar arasında HB-EGF ekspresyonu ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır (grafik 3).



Resim 9: HB-EGF İmmünohistokimyasal Boyama



Grafik 3: HB-EGF immünoaktivitesinin istatistiksel değerlendirmesi

4.5.3. *İntegrin $\alpha V\beta 3$*

4.5.3.1. *Kontrol Grubu*

Gebeliğin 4.gününde integrin primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus luminal epitelinde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 10).

Gebeliğin 5.gününde uterus luminal epitelinde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 10).

Gebeliğin 6.gününde uterus luminal epitel, bez epiteli ve stromada şiddetli (+++) boyanma tespit edildi.

4.5.3.2. *Düşük doz Grubu*

Gebeliğin 4.gününde integrin primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus luminal epitelinde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 10).

Gebeliğin 5.gününde uterus luminal epitelinde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada orta şiddetli (++) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 10).

Gebeliğin 6.gününde uterus luminal epitel, bez epitelinde şiddetli (+++) boyanma ve stromada zayıf (+) boyanma tespit edildi (resim10).

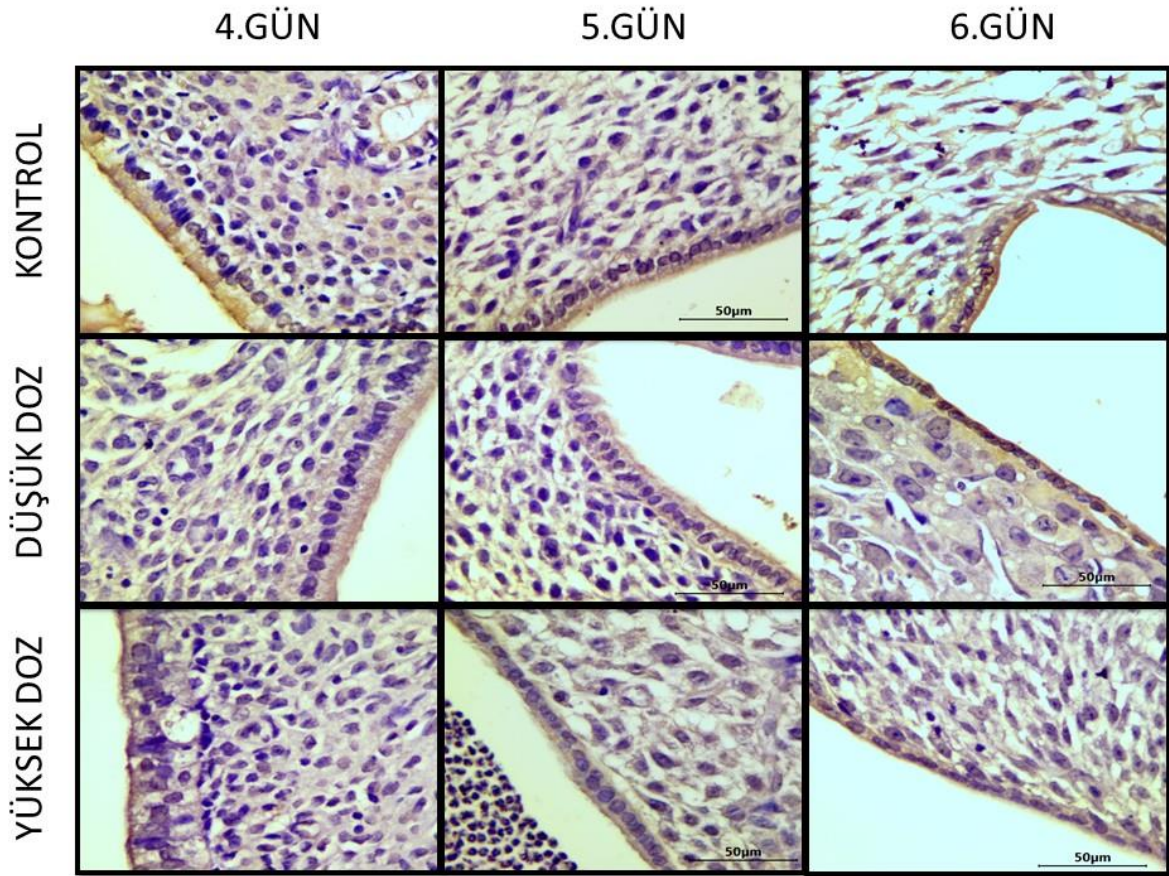
4.5.3.3. Yüksek Doz Grubu

Gebeliğin 4.gününde integrin primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus luminal epitelinde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 10).

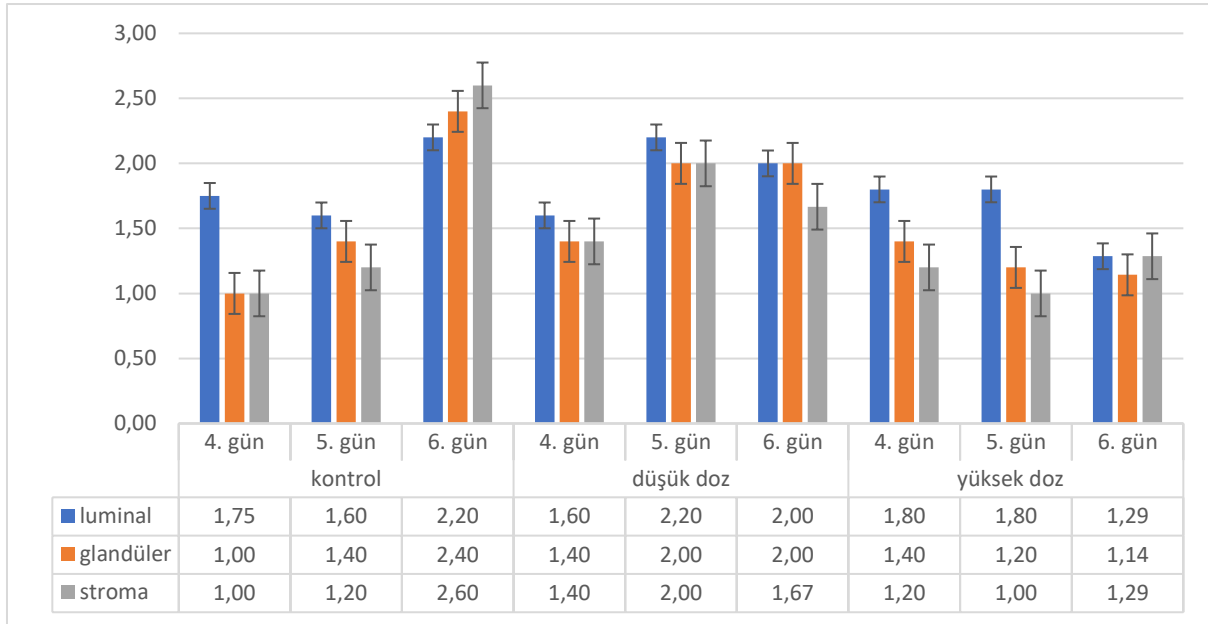
Gebeliğin 5.gününde uterus luminal epitelinde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 10).

Gebeliğin 6.gününde uterus luminal epitel, bez epiteli ve stromada zayıf (+) boyanma tespit edildi (resim 10).

İstatistiksel olarak yüksek doz grubunda özellikle 6. günde integrin ekspresyonunda anlamlı azalma olmuştur (p 0,005) (grafik 4).



Resim 10: İntegrin $\alpha V\beta 3$ immunohistokimyasal boyama



Grafik 4: İntegrin $\alpha V\beta 3$ immünoreaktivitesinin istatistiksel değerlendirilmesi

4.5.4. VEGF

4.5.4.1. Kontrol Grubu

Gebeliğin 4.gününde VEGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus luminal epitel ve bez epitelinde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

Gebeliğin 5.gününde uterus luminal epitelinde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada orta şiddetli (++) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

Gebeliğin 6.gününde uterus luminal epitel, bez epiteli ve stromada orta şiddetli (++) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

4.5.4.2. Düşük Doz Grubu

Gebeliğin 4.gününde VEGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus luminal epitel orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

Gebeliğin 5.gününde uterus luminal epiteli ve bez epitelinde orta şiddetli (++) ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

Gebeliğin 6.gününde uterus luminal epitelde ve bez epitelinde orta şiddetli (++) boyanma gözlenirken stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

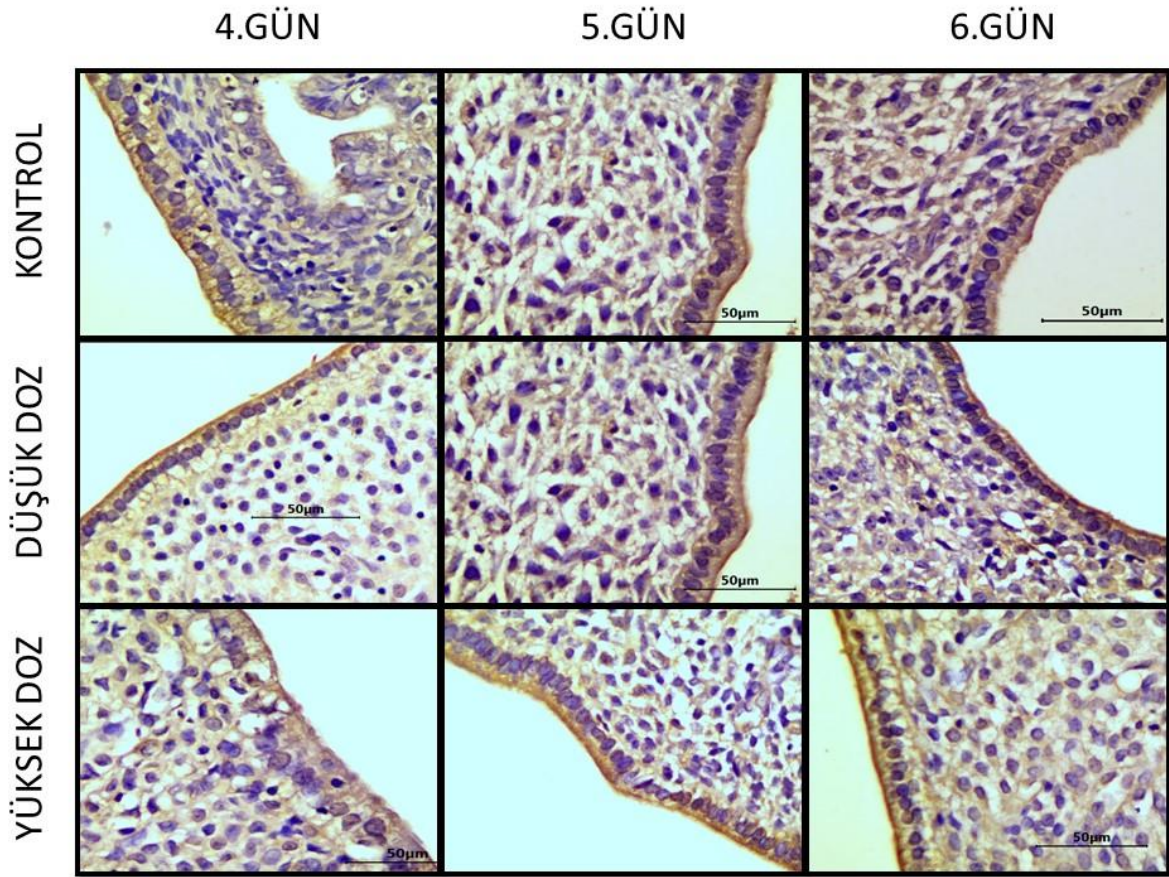
4.5.4.3. Yüksek Doz Grubu

Gebeliğin 4.gününde VEGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde, uterus luminal epitel şiddetli (+++) boyanma gözlenirken bez epitelinde orta şiddetli (++) ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 11).

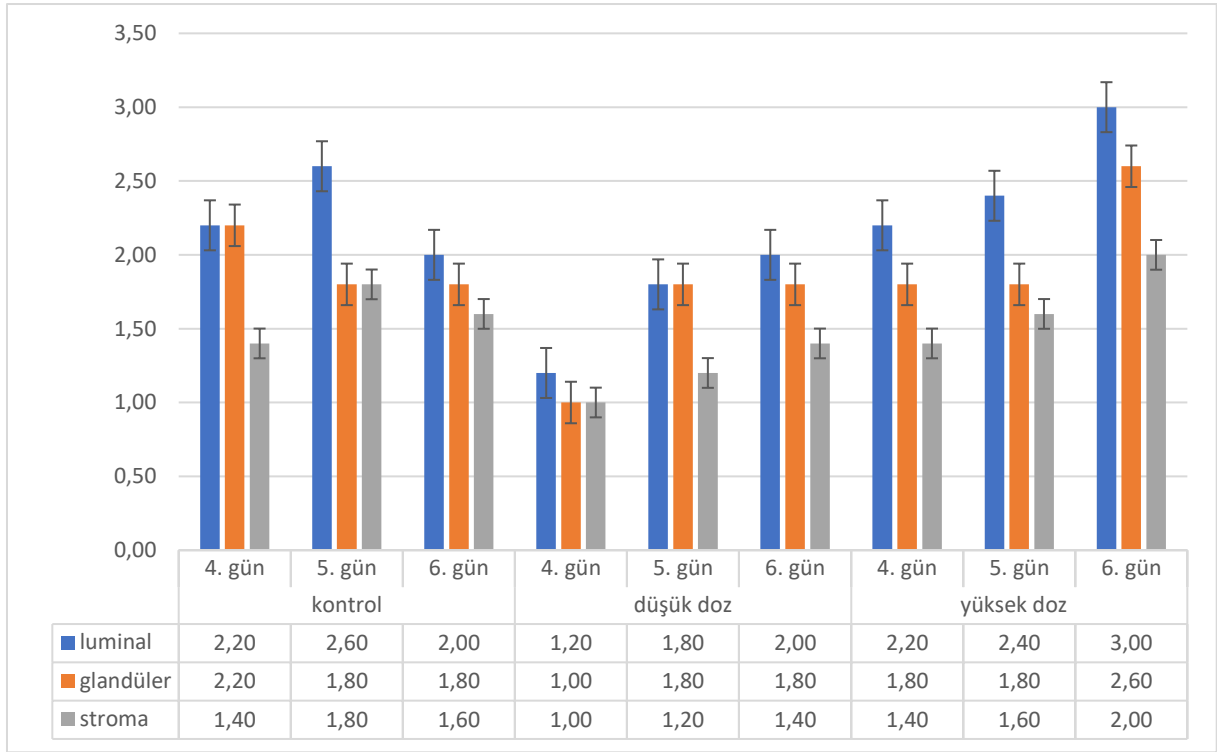
Gebeliğin 5.gününde uterus luminal epitel şiddetli (+++) boyanma gözlenirken bez epitelinde ve stromada orta şiddetli (++) immünoreaksiyon tespit edildi (resim 11).

Gebeliğin 6.gününde uterus luminal epiteli ve bez epitelinde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken stromada orta şiddetli (++) immünoreaksiyon tespit edildi (resim 11).

İstatistiksel olarak VEGF ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olmamıştır (grafik 5).



Resim 11: VEGF immunohistokimyasal boyama



Grafik 5: VEGF immünoreaktivitesinin istatistiksel değerlendirmesi

4.5.5. MMP-9

MMP-9 invazyon markeri olduğu için gebeliğin 4. ve 5. gününde ekspresyonu izlenmemiştir.

4.5.5.1. Kontrol Grubu

Gebeliğin 6.gününde MMP-9 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde; uterus luminal epitelde, bez epitelinde ve stromada şiddetli boyanma (+++) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 12).

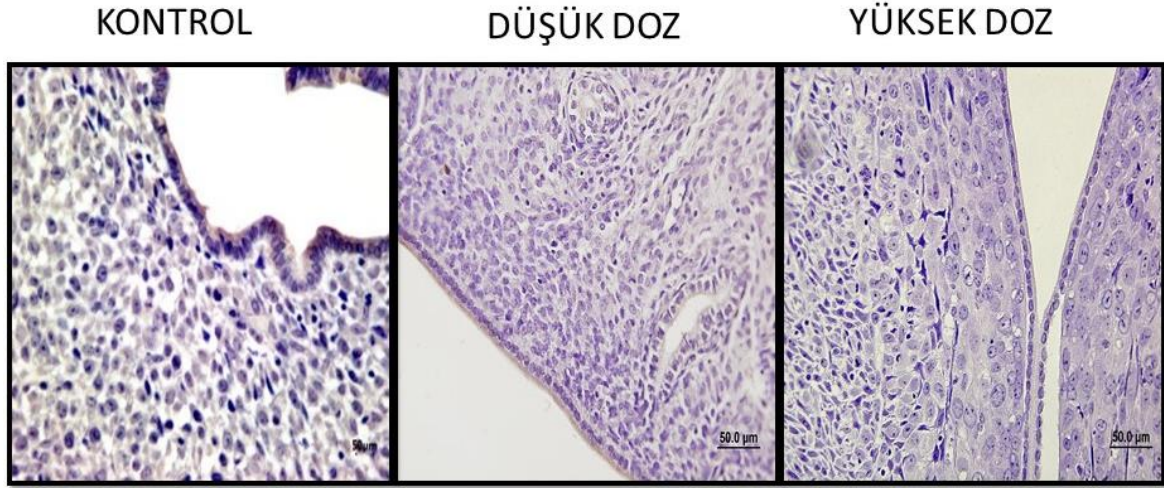
4.5.5.2. Düşük Doz Grubu

Gebeliğin 6.gününde MMP-9 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde; uterus luminal epitelde, bez epitelinde ve stromada orta şiddetli boyanma (++) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 12).

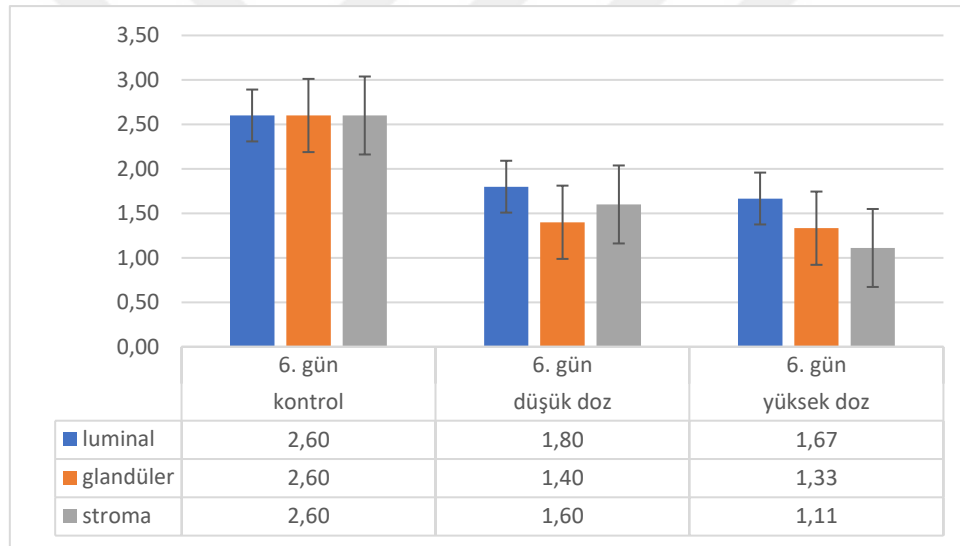
4.5.5.3. Yüksek Doz Grubu

Gebeliğin 6.gününde MMP-9 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış sıçan uterusu incelendiğinde; uterus luminal epitelde, bez epitelinde ve stromada zayıf boyanma (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (resim 12).

Yüksek doz grubunda MMP-9 ekspresyonu azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (grafik 6).



Resim 12: MMP-9 immünohistokimyasal boyama



Grafik 6: MMP-9 immünoaktivitesinin istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 6: Gruplara ait semikantitatif skrlama ortalamaları.

ORTALAMALAR										
		KONTROL			DÜŞÜK DOZ			YÜKSEK DOZ		
		4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN
VEGF	LUMİNAL	2,20±0,44	2,60±0,89	2,00±0,70	1,20±0,44	1,80±0,83	2,00±1,00	2,20±0,83	2,40±0,54	3,00±0,00
	GLANDÜLER	2,20±0,44	1,80±0,44	1,80±0,83	1,00±0,00	1,80±0,83	1,80±0,44	1,80±0,44	1,80±0,83	2,60±0,54
	STROMA	1,40±0,54	1,80±0,44	1,60±0,89	1,00±0,00	1,20±0,44	1,40±0,54	1,40±0,54	1,60±0,54	2,00±0,00
HB-EGF	LUMİNAL	2,00±1,00	2,40±0,89	2,42±0,53	2,40±0,89	2,50±0,83	2,33±0,83	1,50±0,70	1,00±0,00	2,20±0,83
	GLANDÜLER	1,40±0,54	1,80±0,44	2,28±0,48	2,20±0,83	1,50±0,83	2,16±0,93	1,50±0,70	1,00±0,00	1,80±0,83
	STROMA	1,00±0,00	1,80±0,44	2,14±0,37	1,40±0,89	1,50±0,83	1,50±0,83	1,00±1,41	0,50±0,70	1,20±0,83
İNTEGRİN	LUMİNAL	1,75±0,50	1,60±0,54	2,20±0,44	1,60±0,54	2,20±0,44	2,00±0,00	1,80±0,83	1,80±0,83	1,28±0,48
	GLANDÜLER	1,00±0,00	1,40±0,54	2,40±0,54	1,40±0,54	2,00±0,00	2,00±0,00	1,40±0,54	1,20±0,44	1,14±0,37
	STROMA	1,00±0,00	1,20±0,44	2,60±0,54	1,40±0,54	2,00±0,00	1,66±0,51	1,20±0,44	1,00±0,54	1,28±0,48
MÜSİN	LUMİNAL	1,00±0,50	1,00±0,63	0,74±0,37	1,16±0,40	1,16±0,40	0,75±0,40	1,75±0,54	1,60±0,54	1,40±0,51
	GLANDÜLER	0,50±0,54	0,50±0,54	0,71±0,48	0,66±0,51	0,66±0,51	0,16±0,40	0,75±0,44	0,80±0,44	0,80±0,42
	STROMA	0,50±0,54	0,50±0,54	0,28±0,48	0,16±0,40	0,16±0,40	0,16±0,40	0,25±0,54	0,40±0,54	0,50±0,52
MMP-9	LUMİNAL	-	-	2,60±0,54	-	-	1,80±1,09	-	-	1,66±0,70
	GLANDÜLER	-	-	2,60±0,54	-	-	1,40±0,54	-	-	1,33±0,70
	STROMA	-	-	2,60±0,54	-	-	1,60±0,89	-	-	1,11±0,33

Tablo 7: Gruplar arası immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRMA				
		4.GÜN	5. GÜN	6.GÜN
VEGF	LUMİNAL	0,042*	0,235	0,061
	GLANDÜLER	0,005*	0,991	0,112
	STROMA	0,280	0,174	0,212
HB-EGF	LUMİNAL	0,460	0,142	0,906
	GLANDÜLER	0,245	0,231	0,562
	STROMA	0,559	0,133	0,063
İNTEGRİN	LUMİNAL	0,901	0,308	0,007*
	GLANDÜLER	0,353	0,039*	0,002*
	STROMA	0,373	0,004*	0,011*
MMP-9	LUMİNAL	-	-	0,310
	GLANDÜLER	-	-	0,032*
	STROMA	-	-	0,095
MÜSİN	LUMİNAL	0,131	0,598	0,426
	GLANDÜLER	0,552	0,575	0,039*
	STROMA	0,699	0,241	0,383

Tablo 8: İki grup arası immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması.

İKİ GRUP ARASI KARŞILAŞTIRMA										
		4. GÜN			5. GÜN			6. GÜN		
		KONTROL-DÜŞÜK	KONTROL-YÜKSEK	DÜŞÜK-YÜKSEK	KONTROL-DÜŞÜK	KONTROL-YÜKSEK	DÜŞÜK-YÜKSEK	KONTROL-DÜŞÜK	KONTROL-YÜKSEK	DÜŞÜK-YÜKSEK
VEGF	LUMİNAL	0,032*	1,000	0,095	0,222	0,548	0,310	1,000	0,032*	0,151
	GLANDÜLER	0,008*	0,421	0,032*	1,000	1,000	1,000	1,000	0,151	0,095
	STROMA	0,310	1,000	0,310	0,151	0,690	0,310	0,841	0,310	0,151
HB-EGF	LUMİNAL	0,548	0,571	0,381	0,931	0,190	0,143	0,945	0,755	0,792
	GLANDÜLER	0,151	0,857	0,381	0,662	0,190	0,429	0,945	0,343	0,537
	STROMA	0,310	1,000	0,857	0,662	0,095	0,286	0,234	0,073	0,537
İNTEGRİN	LUMİNAL	0,730	1,000	0,841	0,222	0,841	0,421	0,662	0,030*	0,035*
	GLANDÜLER	0,413	0,413	1,000	0,151	0,690	0,032*	0,329	0,005*	0,008*
	STROMA	0,413	0,730	0,690	0,032*	0,690	0,008*	0,052*	0,010*	0,295
MÜSİN	LUMİNAL	0,114	0,730	0,177	0,699	0,945	0,417	0,945	0,417	0,492
	GLANDÜLER	0,610	0,905	0,429	0,699	0,101	0,813	0,101	0,813	0,042*
	STROMA	0,914	0,730	0,537	0,394	0,731	0,475	0,731	0,475	0,313
MMP-9	LUMİNAL	-	-	-	-	-	-	0,310	0,042*	1,000
	GLANDÜLER	-	-	-	-	-	-	0,032*	0,012*	0,699
	STROMA	-	-	-	-	-	-	0,095	0,002*	0,364

5. TARTIŞMA

İmplantasyon gebeliğin gerçekleşmesinde en önemli aşamalardan biridir. Birçok dış faktör bu süreci olumsuz etkileyebilir. Günlük hayatımızda birçok içecek ve yiyecekte yer alan kafeinin gebelik sürecinde kısıtlı tüketimi önerilmektedir. Fakat kafein tüketiminin gebelik sürecindeki etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda prenatal kafein tüketiminin implantasyona olumsuz etkisi olduğu sadece implantasyon alan sayıları dikkate alınarak değerlendirilmiş (9,10), fakat hangi molekül veya yolak üzerinden etkilediği açıklanmamıştır. Çalışmamızda; kafeinin implantasyon üzerindeki etki mekanizmasını çözmeyi hedefleyerek sıçanlarda prenatal dönemde doz bağımlı kafein tüketimi ile implantasyon aşamalarında rol oynayan moleküllerin ilişkisi immünohistokimyasal (VEGF, HB-EGF, MUC-1, α V β 3 integrin, MMP-9) olarak değerlendirildi. Yadegari ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada sıçanlara gebeliğin 1.günü ile 5.günleri arasında 150mg/kg/gün kafein intraperitoneal yolla uygulamışlar, gebeliğinin 7.günde sakrifikasyon gerçekleştirilerek prenatal yüksek doz kafein tüketiminin, implantasyon alan sayısını azalttığını göstermişler (9). Biz ise çalışmamızda düşük (30mg/kg, oral gavaj) ve yüksek dozları (120mg/kg, oral gavaj) karşılaştırdık, bu olumsuz etkiye yol açan moleküler mekanizmada α V β 3 integrin ve MMP-9 moleküllerinin azalmasının rol oynadığını gösterdik.

Jingjing Qian ve ark. (2018) farelerde prenatal düşük (5mg/kg, oral/intraperitoneal) ve yüksek dozda (30mg/kg, oral/intraperitoneal) kafein tüketiminin embriyo gelişimi ve uterin reseptivitesini olumsuz etkilediğini ve implantasyonda rol oynayan COX-2, Musin-1, LİF, Ltf, Areg ekspresyonlarında değişiklik olduğunu gözlemlemişler (61). Biz ise çalışmamızda sıçanlarda düşük doz grubunda(30mg/kg, oral gavaj) implantasyonun etkilenmediğini, yüksek doz grubunda(120mg/kg, oral gavaj) implantasyonda azalma olduğunu gözlemledik. Ayrıca çalışmamızda gruplar arasında Musin-1 ekspresyonunda değişiklik kaydedilmedi.

Literatürde kafeinin veriliş yolu ile farklı çalışmalar bulunmaktadır. İçme suyuna ilave, oral gavaj veya intraperitoneal uygulamalarda benzer farmokinetik etki olduğu gözlemlenmiştir (62). Bu yüzden biz de çalışmamızda güvenilir uygulama yöntemi olarak oral gavaj uygulamayı tercih ettik. Ayrıca sıçan ve insandaki kafeinin benzer metabolik yolu nedeniyle (63) sonuçlarımız kafeinin insan üreme sağlığı üzerindeki etkisini anlamada yardımcı olabilir.

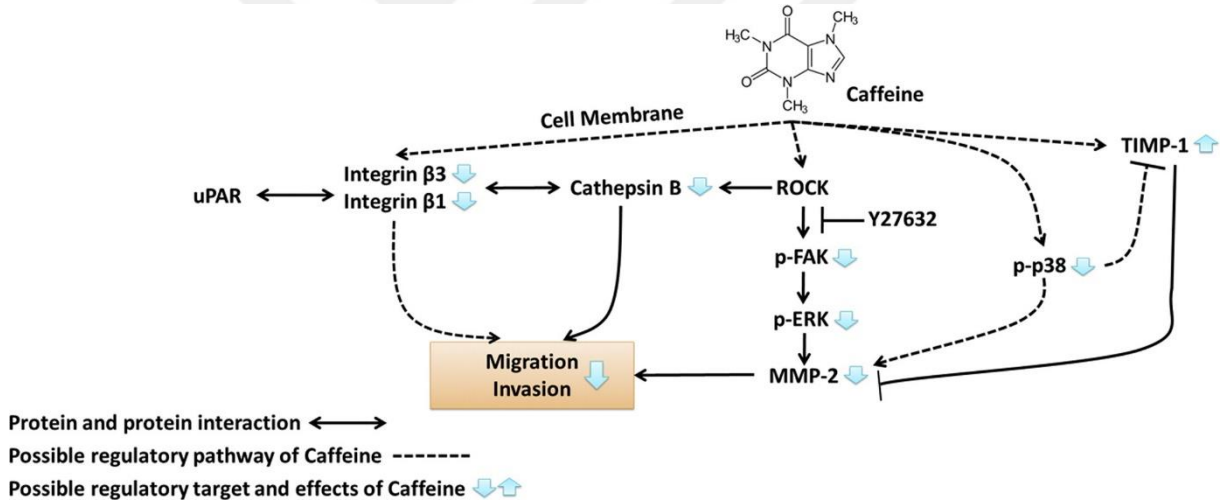
Çalışmalarda dikkat çekici bir bulgu olarak, kafeine verilen cevaplardaki bireysel değişkenlik gözlenmiştir. Fizyolojik koşullar altında, adenosin reseptörü antagonisti olarak

kafein, etkilerini ağırlıklı olarak iki adenosin reseptörü alt tipi olan A1 reseptörü ve A2a reseptörü blokajı yoluyla gösterir (64) ve hepatik mikrozomlarda sitokrom-450 oksidaz enzim sistemi (CYP1A2) tarafından metabolize edilir. Adenozin reseptörleri ve CYP1A2'nin genetik polimorfizmleri, bireyler arasında farklı kafein duyarlılıklarının nedeni olabilir (65,66), örneğin, A2a reseptörünün spesifik genetik polimorfizmi, insanlarda kafeine karşı çeşitli anksiyete / uyku yanıtlarına katkıda bulunur (67-69). Gebelikte düzenli olarak ve kabul edilen miktarlarda kafein tüketen kadınların bir kısmında yüksek CYP1A2 aktivitesi izlendiği ve bunun sonucu olarak spontan düşüklerin artması ve intrauterin büyüme kısıtlamaları olduğu doğrulanmıştır (70,71). Ayrıca, spesifik CYP1A2 genotipleri olan kadınlar arasında maternal kafein alımı ile azalan fetal doğum boyutu veya tekrarlayan gebelik kaybı arasında anlamlı korelasyonlar bildirilmiştir (72, 73]. Bu sonuçlar, kafein metabolizma genlerinin genetik polimorfizmlerinin, maruziyetinin etkilerini belirlediğini, kafeine maruz kaldıktan sonraki gebelik sonuçlarının sadece doza bağlı olmadığını, aynı zamanda belirli bir bireyin metabolizma hızıyla da ilişkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda benzer şekilde yüksek doz grubunda farklı bulgular kaydettik. Örneğin, bir denekte gebeliğin 2.gününde vaginal kanama, bir başka denekte uterus lümeninde çok sayıda lökosit, eritrosit izlendi, bir başka denekte ise stromada hemoraji şeklinde bulgular kaydedildi.

Özel kollajen lif boyası olan masson trikrom ile yaptığımız boyamada immunohistokimya bulguları ile benzer bulgular gözlenmiştir. 4.günde henüz implantasyonun gerçekleşmediği, uterusda kollajen liflerin epitel altındaki stromada ve mezometriyal kısımda dağılmış olarak boyandığı tespit edilmiştir. Gebeliğin 5.gününde ise kollajen liflerin uterusun myometriyal tabakasına doğru yer değiştirmeye başladıkları gözlenmiştir. Bu kollajen liflerin yer değiştirmesinin desidual yatağın iyice genişlemesi, hücrelerin proliferasyonu ile gelişmenin rahat gerçekleştirebilmesi amacına yönelik olabileceği söylenebilir. Gebeliğin 6.gününde ise kollajen liflerin artık tamamen myometrial tabakanın üstüne doğru itildikleri ve bir kısmının mezometriyal tarafta lokalize oldukları gözlenmiştir. Embriyonun gömülmüş olduğu desidual yatakta kollajen liflerin gözden kaybolmuş olması, desidualizasyon sürecinde embriyonun invazyonu gerçekleştirebilmesi ve trofoblast ile desidual hücreler arasında ki adezyonu kolaylaştırabilmesi amacıyla olduğunu kanıtlamıştır (6). Yüksek doz grubunda kollajen liflerin myometriyuma doğru göç etmesinde yetersizlik olduğu gözlemlendi ve bu bulgu yüksek doz kafeinin desidualizasyonu olumsuz etkilediğini gösterdi. Bu bilgiyi teyit etmek amaçlı desidualizasyon markeri olan molekülün ekspresyonunun değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

İmplantasyon sürecinde uterin epitelyal ve stromal hücrelerden salınan çok sayıda sinyal molekülü ve steroid hormonları ile birlikte endometriyum reseptivite kazanır. Çalışmamızda bu moleküllerden VEGF, HB-EGF, MUC-1, $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin, MMP-9 kafein ile ilişkisini inceledik.

Literatürde kafeinin $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin ve MMP-9 ile ilişkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Cheng ve ark. kafeinin glioblastomda invazyona etkisini yani anti-kanser etkisini araştırmışlar. Kafein verilen deney hayvanlarında matriks metaloproteinaz-1 doku inhibitörü (TIMP-1) 'in mRNA'sı ve protein ekspresyonunun arttığı ve matriks metaloproteinaz-2 (MMP-2)'nin azaldığı kaydedilmiştir. Ki67, p-p38, fosforile edilmiş hücre dışı düzenlenmiş protein kinazları (p-ERK) ve membranöz integrin $\beta 1$ ve $\beta 3$ miktarı kafein ile azalmıştır. Ayrıca kafein hayvan modelinde tümör boyutunu, katepsin B ve Ki67 ekspresyonunu azaltmış. Kafein, glioma hücrelerinin ROCK-katepsin B / FAK / ERK sinyal yoluyla invazyonu azaltarak glioma tedavisinde anti-kanser potansiyelini desteklemiştir. Kafeinin etki mekanizmasını görseldeki yolak ile açıklamışlardır (74).



Şekil 7: Kafeinin glioblastomada etki mekanizması (74)

MMP ve integrin arasındaki ilişki farklı çalışmalarda da incelenmiştir. Örneğin, Raffetto JD ve ark. yaptıkları çalışmada varis patogenezinde MMP ve integrin ilişkisini incelenmişler. MMP'lerin variköz venlerdeki rolü büyük ölçüde ECM proteinlerinin bozulması şeklinde yorumlansa da, MMP'lerin VSM hücre fonksiyonu üzerindeki etkileri, özellikle variköz ven oluşumunun erken evrelerinde etkileri belirsizdir. Arg-Gly-Asp (RGD) amino asit dizisini içeren peptitler, integrin reseptörleri ile etkileşime giren önemli ligandlardır. Bu gözlemler, MMP'lerin ECM proteinleri üzerindeki proteolitik aktivitesinin, VSM zarı integrinlerini ve kanal aktivitesini etkileyen, RGD peptitlerinin oluşumunu artırabileceği hipotezini araştırmışlar

ve Varis patogenezinde rol alan MMP-2 ile RGD ve integrin arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir (75).

D'Onofrio PM ve ark. gözde optik sinir hasar sonrası artan MMP nedeniyle retinal ganglion hücreleri için esansiyel olan olan integrinin azaldığı kaydedilmiştir. Gözde MMP ile integrin ekspresyonu arasında negatif feedback olduğu kaydedilmiş. Aksotomi ile FAK yolağı sayesinde MMP inhibisyonu ve RGD - integrin artışı gösterilmiştir (76).

İmplantasyon döneminde endometriyum reseptivitesi açısından birbirini etkileyen, tetikleyen veya baskılayan pek çok faktör rol oynamaktadır. Bu açıdan bakıldığında; çalışmalarda farklı protokoller, farklı çalışma grupları ve farklı zamanlar kullanılmakta ve doğal olarak bunların sonuçları da -implantasyon pencere dönemi oldukça kısa olduğu için- çalışmada kullanılan reseptivite belirteçleri açısından farklı sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir.

Embriyoyu endometriyum epitelinde ilk karşılayan yapı, anti-adezyon moleküllerinin oluşturduğu bariyer olduğu bilinmektedir. Anti-adezyon molekülleri implantasyon sırasında oluşturdukları doğal bariyeri yıkarak, epitelyal adezyon moleküllerinin bağlanmayı gerçekleştirmelerini kolaylaştırması gerekmektedir (77). Musinler içinde en çok dikkat çeken MUC-1'dir. MUC-1 hücrelerde adezyon ve anti-adezyon kuvvetleri arasındaki hassas dengeyi oluşturur. Yapılan çalışmalarda farelerde MUC-1 epitel hücrelerinde kuvvetlice eksprese edilirken, implantasyon fazı boyunca yüzey epitelinde down-regüle edilir. Bu bulgulara dayanılarak MUC-1 in ekspresyonundaki bu azalma blastosist tarafından üretilen sinyallerin vasıtasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (78).

Çalışmamızda tüm gruplarda özellikle 4.gün endometriyum lümen epitelinde yoğun bir MUC-1 immünoreaksiyonu gözlenmiştir (resim 8). MUC-1 in kuvvetli salınımının, implantasyondan önce epiteli koruyan bir bariyer oluşturduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. 6.günde ise epiteldeki ekspresyonunun azaldığının gözlenmesi implantasyonun kolaylaştırılmasına yönelik olabilir. Seren ve ark. yaptıkları çalışmada MUC-1'in 6.günde azalıp 7.günde lümen epitelinde kaybolması ile adezyon moleküllerinin ortaya çıktığı bilgisini teyit etmişlerdir. İmplantasyon sırasında MUC-1 ortadan kalktığı zaman, trofoblast ve endometriyum epitelindeki adezyon molekülleri birbirine bağlanma aşamasına girmektedirler.

HB-EGF, implantasyon sırasında embriyo-uterin etkileşiminin erken dönemde eksprese olan önemli bir molekül olarak tanımlanmaktadır. HB-EGF, farklı türlerin implantasyonu sırasında hem blastosiste hem de uterusda eksprese edilir ve genomik HB-EGF mutant fareleri

kullanan alışmalar, HB-EGF'nin maternal eksikliğini implantasyonun gecikmesi ve riskli gebeliklere yol açtığını göstermiştir (79).

Jia Yuan ve ark. Yalancı gebelik oluşturulan farelerde HB-EGF ile muamele edilmiş blastosist boyutundaki bilyeleri transfer ederek, HB-EGF'nin embriyo ve endometriyal bezler arasındaki iletişim için bir tetikleyici olduğunu göstermişler (80).

Hyuk ve ark. gebe sıçanlarda gebeliğin ilk gününden 20. gününe kadar hergün 3'er adet sıçan olacak şekilde sakrifikasyon gerçekleştirmişler ve implantasyonda rol oynayan moleküllerin mRNA düzeylerinin incelemişlerdir. HB-EGF, gebeliğin 4.gününde (GD4) anlamlı yükseliş gösterdiği, ancak ve hamileliğin ortasında (GD12) en yüksek ekspresyon gösterdiğini bulmuşlar. alışmalarında gebeliğin 4.gününü implantasyon günü olarak kabul etmişlerdir (81).

Aa ve ark. gebe sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda implantasyon gününü gebeliğin 5.günü olarak kabul etmişler ve HB-EGF ekspresyonunu en yüksek 5.günde izlemişlerdir. Bizde alışmamızda uyumlu olarak HB-EGF ekspresyonunu en yüksek 5.günde kaydettik.

İmplantasyon sırasında uterus damar geçirgenliği ve anjiyogeneze VEGF çok önemlidir. Çalışmamızda kontrol ve düşük doz grubunda özellikle luminal epitelde 5. günde en yoğun VEGF immünreaktivitesi gözlenirken, yüksek doz grubunda en yoğun ekspresyon 6.günde gözlendi. Ve ayrıca yüksek doz grubunda VEGF ekspresyonu diğer gruplara göre daha yoğun boyanma kaydedildi. Bu sonucu kafeinin genel olarak anjiogenezi arttırıcı etkisine bağladık. Bir başka çalışmada ise kafein doza bağımlı olarak anjiogenezi azalttığı vurgulanmıştır. Bu etkide thrombospondin-1 (TSP-1) rol oynadığı gösterilmiş(82).

6. SONUÇLAR

Sıçanlarda prenatal kafein tüketiminin doza bağımlı olarak implantasyon sürecine etki mekanizmasını araştırmak amacıyla immünohistokimyasal tekniklerle yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar şöyle özetlenebilir:

Çalışmamızda düşük kafein grubundaki bulgular kontrol grubu ile uyumlu olup herhangi bir patolojik durum kaydedilmemiştir. Yüksek doz grubunda ise implantasyon alan sayısında anlamlı derece azalma gözlemlendi. Bu olumsuz etkiye yol açan moleküler mekanizmada $\alpha V\beta 3$ integrin ve MMP-9 moleküllerinin azalmasının rol oynadığını gösterdik.

Endometriyum reseptivitesini saptamak için kullanılan pek çok belirteç vardır ancak bunların hiçbirisi kendi başına reseptiviteyi tam olarak saptayacak nitelikte ya da saptamaya yeterli değildir. Endometriyumun reseptif olduğu dönem oldukça kısadır ve pek çok faktör reseptiviteye olumlu ya da olumsuz katkıda bulunmaktadır.

İmplantasyon başarısızlığına ve endometriyum reseptivitesinde yetersizliğe neden olan sorun ya da hastalık patogenezi ortaya koymak için daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Araştırmalarda Q-PCR, Western Blot gibi daha spesifik olarak verilerin elde edildiği yöntemler de kullanılmalı, çok daha fazla belirteç incelenmeli, bunların birbirini nasıl tetiklediğini ya da baskıladığını ortaya çıkarabilecek moleküler mekanizmalar üzerine daha fazla ağırlık verilmelidir.

Kafeinle ilgili ulaştığımız immünohistokimyasal bulgular, kadınlarda prenatal kafein tüketiminin kısıtlamasının önemini vurgulamıştır. Gelecekte tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları ve endometriyal reseptivite bozuklukları yaşayan ve benzer yollar üzerinden etki eden kimyasalların tüketiminin sorgulanması gerektiğini ve yeni tedavi protokollerinin oluşturulmasında eksik moleküllerin yerine konulması gerektiğine dikkat çeken ön çalışma niteliğinde umut verici bir çalışma olduğunu düşünüyoruz.

Literatürde prenatal dönemde tüketilen kafeinin endometriyumda seçtiğimiz implantasyon markerlerinin ekspresyonuna etkilerini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır. Sunduğumuz bu çalışma bu konuda sınırlı bir ön değerlendirme olarak kabul edilebilir, ancak implantasyonda önemli rol oynayan diğer markerların da moleküler mekanizmasının bozulmasıyla ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

Sonuç olarak, verilerimiz hamileliğin erken dönemindeki kafein tketimeinin endometriyum reseptivitesini bozduğu ve embriyo implantasyonunu olumsuz etkilediğini göstermiştir. Çalışmamızda kafeinin tüketim sresinin, gebe kalmayı planlayan kadınlar için kafein alımının kısıtlanmasıının özellikle pre-implantasyon döneminde önemli olduğu sonucuna vardık.



7. KAYNAKLAR

- 1.Ofluoğlu F.,Ratlarda Beyin L-arginin Metabolizması Üzerine Kafeinin Etkileri, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi,2007
- 2.Karaismailoğlu S. Perinatal Kafein Uygulamasının Yavru Sıçanların Beyin Dokusundaki Seks Steroid Hormonları Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2014.
- 3.Collins TF, Galce JJ, Black TN, Ruggles DI. A study of the teratogenic potential of caffeine ingested in drinking-water. Food Chem Toxicol. 1983 Dec;21(6):763-77
- 4.Cnattingius S, Signorello LB, Anneren G, Clausson B, Ekblom A, Ljunger E, ve ark. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion.N Engl J Med. 2000; 343 (25): 1839-1845.
- 5.Klebanoff MA, Levine RJ, Derimonyalı R, Clemens JD, Wilkins DG. Maternal serum paraxanthine, a caffeine metabolite, and the risk of spontaneous abortion N Engl J Med. 1999; 341 (22): 1639-1644.
- 6.Li J, Zhao H, Song JM, Zhang J, Tang YL, Xin CM A meta-analysis of risk of pregnancy loss and caffeine and coffee consumption during pregnancy, Int J Gynaecol Obstet. 2015 Aug;130(2):116-22. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.03.033. Epub 2015 May 14.
- 7.Fredholm BB, Bättig K, Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use, Pharmacol Rev. 1999 Mar;51(1):83-133.
- 8.Wu YM, Luo HW, Kou H, Wen YX, Prenatal caffeine exposure induced a lower level of fetal blood leptin mainly via placental mechanism, Toxicol Appl Pharmacol. 2015 Nov 15;289(1):109-16
- 9.Yadegari M., Khazaei M., Prenatal Caffeine Exposure Impairs Pregnancy in Rats, Int J Fertil Steril. 2016 Jan-Mar; 9(4): 558–562.
- 10.Pollard I, Murray JF Effects of Preconceptual Caffeine Exposure on Pregnancy and Progeny Viability, J Matern Fetal Med. 1999 Sep-Oct;8(5):220-4
11. Pregnancy Begins at Conception/Fertilization, Not Implantation, OPINION KELSEY HAZZARD DEC 5, 2011 | 11:29AM WASHINGTON, DC

12. Hyejin Shin, Soyoung Bang, Jiyeon Kim, Jin Hyun Jun, Haengseok Song, and Hyunjung Jade Lim The formation of multivesicular bodies in activated blastocysts is influenced by autophagy and FGF signaling in mice, *Sci Rep.* 2017; 7: 41986.
13. Zheng Fu Bingyan Wang Shumin Wang Weiwei Wu Qiang Wang Yongjie Chen Shuangbo Kong Jinhua Lu Integral Proteomic Analysis of Blastocysts Reveals Key Molecular Machinery Governing Embryonic Diapause and Reactivation for Implantation in Mice, *Biology of Reproduction*, Volume 90, Issue 3, 1 March 2014, 52, 1-11,
14. Kyosuke Saito Etsuko Furukawa Mitsuru Kobayashi Emiko Fukui Midori Yoshizawa Hiromichi Matsumoto Degradation of estrogen receptor α in activated blastocysts is associated with implantation in the delayed implantation mouse model, *MHR: Basic science of reproductive medicine*, Volume 20, Issue 5, 1 May 2014, Pages 384–391
15. Correa F¹, Wolfson ML¹, Valchi P¹, Aisemberg J¹, Franchi AM, Endocannabinoid system and pregnancy. . *Reproduction*. 2016 Dec;152(6):R191-R200.
16. Qian Zhang and Junhao Yan Update of Wnt signaling in implantation and decidualization, *Reprod Med Biol.* 2016 Apr; 15(2): 95–105.
17. Jessmon P, Leach RE, Armant DR. Diverse functions of HBEGF during pregnancy. *Mol Reprod Dev.* 2009;76(12):1116–1127.
18. Shuang Zhang a,b,1 , Haiyan Lin a,1 , Shuangbo Kong a,b,1 , Shumin Wang a , Hongmei Wang a , Haibin Wang a,† , D. Randall Armant c,d,† Physiological and molecular determinants of embryo implantation, *Mol Aspects Med.* 2013 Oct;34(5):939-80. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.011. Epub 2013 Jan 2.
19. Giray S. implantasyonda Adezyon Moleküllerin Rolü, Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 2003
20. Abraham Kierszenbaum Laura Tres, *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, 4th Edition, 26th January 2015
21. Egashira M^{1,2}, Hirota Y^{1,3}. Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reprod Med Biol.* 2013 Jun 1;12(4):127-132. doi: 10.1007/s12522-013-0153-1. eCollection 2013 Oct.

22. Poon CE, Madawala RJ, Dowland SN, Murphy CR ,Nectin-3 Is Increased in the Cell Junctions of the Uterine Epithelium at Implantation, *Reprod Sci*. 2016 Nov;23(11):1580-1592. Epub 2016 May 23.
23. Bazer FW¹, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation, *Reproduction*. 2009 Aug;138(2):195-209. doi: 10.1530/REP-09-0158. Epub 2009 Jun 5.
24. Zhao LH¹, Cui XZ, Yuan HJ, Liang B, Zheng LL, Liu YX, Luo MJ, Tan JH. Restraint stress inhibits mouse implantation: temporal window and the involvement of HB-EGF, estrogen and progesterone, . *PLoS One*. 2013 Nov 14;8(11):e80472. doi: 10.1371/journal.pone.0080472. eCollection 2013.
25. Wang X¹, Wang H, Matsumoto H, Roy SK, Das SK, Paria BC. Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster, *Development*. 2002 Sep;129(17):4125-34.
26. Çakmak, B. Rahimiçi araçların kontraseptif etkinliğinde implantasyon faktörlerinin rolü ve piroksikam beta-siklodekstrinin rahimiçi araçların kontraseptif etkinliği üzerine olan etkisinin embriyo sayısı ve immünohistokimyasal yöntemlerle rat modelinde araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2007
27. Chakraborty I, Das SK. Dey SK. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *J Endocrinol*. 1995;147:339–352.
28. Binder NK¹, Evans J², Gardner DK³, Salamonsen LA⁴, Hannan NJ Endometrial signals improve embryo outcome: functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice, *Hum Reprod*. 2014 Oct 10;29(10):2278-86. doi: 10.1093/humrep/deu211. Epub 2014 Aug 14.
29. Inyawilert W¹, Fu TY¹, Lin CT¹, Tang PC¹. MicroRNA-199a mediates mucin 1 expression in mouse uterus during implantation, *Reprod Fertil Dev*. 2014 Jun;26(5):653-64. doi: 10.1071/RD12097.

30. Inyawilert W , Fu TY, Lin CT, Tang PC, Let-7-mediated suppression of mucin 1 expression in the mouse uterus during embryo implantation, J Reprod Dev. 2015;61(2):138-44. doi: 10.1262/jrd.2014-106. Epub 2015 Jan 26.
31. Bastu E¹, Mutlu MF², Yasa C³, Dural O³, Nehir Aytan A³, Celik C⁴, Buyru F³, Yeh J⁵ Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure, Fertil Steril. 2015 Apr;103(4):1059-1064.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.025. Epub 2015 Mar 4.
32. Şeftalioğlu A., Genel İnsan Embriyolojisi, 1996 30. Moore Keith L., The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 8th Edition, 2008
33. Moore Keith L., The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 8th Edition, 2008
34. Bahar L, Baykal T. Endometrial Reseptivitenin İmplantasyondaki Rolü. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2008; 1: 1-6.
35. Özcan T. Diyabetin, İmplantasyon Penceresi Dönemindeki Sıçan Endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ İntegrin Ekspresyonuna ve İnce Yapıya Etkisi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 2010
36. Kang YJ¹, Forbes K, Carver J, Aplin JD. The role of the osteopontin-integrin $\alpha v\beta 3$ interaction at implantation: functional analysis using three different in vitro models. Hum Reprod. 2014 Apr;29(4):739-49. doi: 10.1093/humrep/det433. Epub 2014 Jan 17.
37. Boz B., Rat İmplantasyon Modelinde Hiyaluronik Asit Reseptörlerinin İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik Yöntemlerle İncelenmesi, Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 2010
38. T.W. Sadler, Langman's Medical Embryology, 13th Ed. 2014
39. Vamberto O. A. Maia-Filho, Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and E-Cadherin Expression in the Endometrium During the Implantation Window of Infertile Women Before In Vitro Fertilization Treatment, Reprod Sci. 2015 Apr; 22(4): 416–422
40. Liu G, Zhang X, Effects of E-cadherin on Mouse Embryo İmplantation and Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 343, Issue 3, 12 May 2006, Pages 832-838

41. GuoyiLiu ,XuanZhang ,HaiyanLin ,HongmeiWang ,QingleiLi ,JiangNi ,ChengZhu ,Effects of E-cadherin on mouse embryo implantation and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9, Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 343, Issue 3, 12 May 2006, Pages 832-838
42. Yoshii N¹, Hamatani T, Inagaki N, Hosaka T, Inoue O, Yamada M, Machiya R, Yoshimura Y, Odawara Y. Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity, Reprod Biol Endocrinol. 2013 May 11;11:37. doi: 10.1186/1477-7827-11-37.
43. Maia-Filho VO¹, Rocha AM², Ferreira FP³, Bonetti TC⁴, Serafini P⁵, Motta EL⁶, Matrix metalloproteinases 2 and 9 and e-cadherin expression in the endometrium during the implantation window of infertile women before in vitro fertilization treatment, Reprod Sci. 2015 Apr;22(4):416-22. doi: 10.1177/1933719114529373. Epub 2014 Apr 3.
44. Sakarya AH, Kafeinin ratlarda vasküler anastomoz açıklığı üzerine etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı uzmanlık tezi. Ankara, 2016
45. Sakamoto W., Nishihira J., Fujie K., Iizuka T., Handa H., Ozaki M., Yukawa S.: Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. Bone, 28, No. 3, 332–336 (2001).
46. Azam S., Hadi N., Khan NU., Hadi SM.: Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. Med Sci Monit, 9(9), 335-330 (2003).
47. Tanda G., Goldberg SR.: Alteration of the Behavioral Effects of Nicotine by Chronic Caffeine Exposure. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 66, No. 1, 47–64 (2000).
48. Lorist MM., Tops M.: Caffeine, fatigue, and cognition. Brain and Cognition, 53, 82–94 (2003)
49. Lee C.: Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. Clinica Chimica Acta, 295, 141–154 (2000).
50. Benowitz NL., Peng M., Jacob P.: Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 74, No:5, 468-474 (2003).

51. Fredholm BB., Battig K., Holmen J., Nehling A., Zwartau EE.: Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reviews*, 51, No. 1, 84-125 (1999).
52. Olchowik G¹, Chadaj-Polberg E, Tomaszewski M, Polberg M, Tomaszewska M, The influence of caffeine on the biomechanical properties of bone tissue during pregnancy in a population of rats, *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(3):504-11.
53. Minji Park, Yuri Choi, Hyeonhae Choi, Ju-Yearn Yim, and Jaesook Roh * High Doses of Caffeine during the Peripubertal Period in the Rat Impair the Growth and Function of the Testis *Int J Endocrinol.* 2015; 2015: 368475.
54. Sordelli MS, Beltrame JS, Cella M, Interaction between lysophosphatidic acid, prostaglandins and the endocannabinoid system during the window of implantation in the rat uterus, *PLoS One.* 2012;7(9):e46059
55. Li H¹, Jin SY, Son HJ, Seo JH, Jeong GB., Caffeine-induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis *Anat Cell Biol.* 2013 Mar;46(1):57-67. doi: 10.5115/acb.2013.46.1.57. Epub 2013 Mar 25.
56. Yeh CH¹, Liao YF, Chang CY, Tsai JN, Wang YH, Cheng CC, Wen CC, Chen YH, Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos, *Drug Chem Toxicol.* 2012 Oct;35(4):361-5. doi: 10.3109/01480545.2011.627864. Epub 2012 Feb 8.
57. Kakio S¹, Funakoshi-Tago M¹, Kobata K², Tamura H¹. Coffee induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells *Nutr Neurosci.* 2017 Jul;20(6):336-342. doi: 10.1080/1028415X.2015.1133106. Epub 2016 Jan 20.
58. Hahn KA¹, Wise LA², Rothman KJ³, Mikkelsen EM⁴, Brogly SB⁵, Sørensen HT⁶, Riis AH⁴, Hatch EE Caffeine and caffeinated beverage consumption and risk of spontaneous abortion, *Hum Reprod.* 2015 May;30(5):1246-55. doi: 10.1093/humrep/dev063. Epub 2015 Mar 18.
59. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive Endocrinology and Infertility Optimizing natural fertility. *Fertil Steril.* 2008;90(5 Suppl):S1-6. [PubMed]].
60. Yılmaz Demirtaş C., Kafeinin Rat Karaciğerinde Oksidan-Antioksidan Mekanizmalara Etkisi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2009

61. Qian J^{1,2}, Zhang Y^{1,3,2}, Qu Y^{1,2}, Zhang L^{1,2}, Shi J³, Zhang X³, Liu S³, Kim BH³, Hwang SJ³, Zhou T³, Chen Q³, Ward SM³, Duan E¹, Zhang Y¹. Caffeine consumption during early pregnancy impairs oviductal embryo transport, embryonic development and uterine receptivity in mice, *Biol Reprod*. 2018 Dec 1;99(6):1266-1275. doi: 10.1093/biolre/ioy155.
62. Wang Y, Lau CE. Caffeine has similar pharmacokinetics and behavioral effects via the i.p. and p.o. routes of administration. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 60:271–278. 57.
63. Arnaud MJ. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini S (ed.), *Caffeine, Coffee and Health*. New York: Raven Press; 1993:43–95.
64. Ribeiro JA, Sebastiao AM. Caffeine and Adenosine. *J Alzheimers Dis* 2010; 20:S3–S15.
65. Gunes A, Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2008; 9:625–637. 64.
66. Yang A, Palmer AA, de Wit H. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 211:245– 257.
67. Alsene K, Deckert J, Sand P, de Wit H. Association between A2a receptor gene polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28:1694–1702. 66.
68. Retey JV, Adam M, Khatami R, Luhmann UF, Jung HH, Berger W, Landolt HP. A genetic variation in the adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81:692–698. 67.
69. Rogers PJ, Hohoff C, Heatherley SV, Mullings EL, Maxfield PJ, Evershed RP, Deckert J, Nutt DJ. Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35:1973–1983. 68.
70. Signorello LB, Nordmark A, Granath F, Blot WJ, McLaughlin JK, Anneren G, Lundgren S, Ekblom A, Rane A, Cnattingius S. Caffeine metabolism and the risk of spontaneous abortion of normal karyotype fetuses. *Obstet Gynecol* 2001; 98:1059–1066. 69.
71. Grosso LM, Triche EW, Belanger K, Benowitz NL, Holford TR, Bracken MB. Caffeine metabolites in umbilical cord blood, cytochrome P-450 1A2 activity, and intrauterine growth restriction. *Am J Epidemiol* 2006; 163:1035–1041

- 72.Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Kato EH, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2005; 11:357–360.
- 73.Sasaki S, Limpar M, Sata F, Kobayashi S, Kishi R. Interaction between maternal caffeine intake during pregnancy and CYP1A2 C164A polymorphism affects infant birth size in the Hokkaido study. *Pediatr Res* 2017; 82:19–28.
- 74.Cheng YC¹, Ding YM², Hueng DY³, Chen JY², Chen Y⁴ , Caffeine suppresses the progression of human glioblastoma via cathepsin B and MAPK signaling pathway, *J Nutr Biochem*. 2016 Jul;33:63-72. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.03.004. Epub 2016 Mar 29.
- 75.Raffetto JD¹, Barros YV, Wells AK, Khalil RA.MMP-2 induced vein relaxation via inhibition of [Ca²⁺]_i-dependent mechanisms of venous smooth muscle contraction. Role of RGD peptides. *J Surg Res*. 2010 Apr;159(2):755-64. doi: 10.1016/j.jss.2008.09.022. Epub 2008 Oct 24.
- 76.D'Onofrio PM^{1,2}, Shabanzadeh AP^{1,3}, Choi BK^{1,2}, Bähr M⁴, Koeberle PD^{1,2}. MMP Inhibition Preserves Integrin Ligation and FAK Activation to Induce Survival and Regeneration in RGCs Following Optic Nerve Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Feb 1;60(2):634-649. doi: 10.1167/iovs.18-25257.
- 77.Inyawilert W, Fu TY, Lin CT, Tang PC, Let-7-mediated Suppression of Mucin1 Expression in the Mouse Uterus During Embryo Implantation, *J Reprod Dev*. 2015;61(2):138-44. doi: 10.1262/jrd.2014-106. Epub 2015 Jan 26.
- 78.Bastu E, Mutlu MF, Yasa C, Dural O, Nehir Aytan A, Celik C, Buyru F, Yeh J.Role of Mucin1 and Glycodelin in recurrent implantation failure.*FertilSteril*. 2015 Apr;103(4):1059-1064.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.025. Epub 2015 Mar 4.
- 79.Zhao LH, Cui XZ, Yuan HJ, Liang B, Zheng LL, Liu YX, Luo MJ, Tan JHRestraint stress inhibits mouse implantation: temporal window and the involvement of HB-EGF, estrogen and progesterone, *PLoS One*. 2013 Nov 14;8(11):e80472. doi: 10.1371/journal.pone.0080472. eCollection 2013.

80.Jia Yuan, Wenbo Deng, Jeeyeon Cha, Xiaofei Sun, Jean-Paul Borg & Sudhansu. K. Dey, Tridimensional visualization reveals direct communication between the embryo and glands critical for implantation, Nature Communications volume 9, Article number: 603 (2018).

81.Byun HS, Lee GS, Lee BM, Hyun SH, Choi KC, Jeung EB Implantation-related expression of epidermal growth factor family molecules and their regulation by progesterone in the pregnant rat. Reprod Sci. 2008 Sep;15(7):678-89. doi: 10.1177/1933719108317581. Epub 2008 Jun 30.

82. Li H, Jin SY, Son HJ, Seo JH, Jeong GB. Caffeine induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis, Anat Cell Biol. 2013 Mar;46(1):57-67. doi: 10.5115/acb.2013.46.1.57. Epub 2013 Mar 25.



8. EKLER

8.1. EK-1 Etik Kurul Belgesi

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

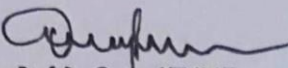
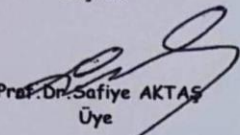
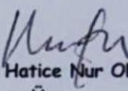
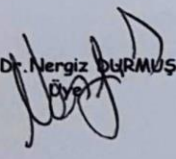
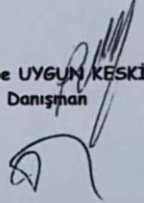
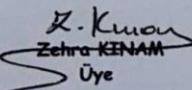
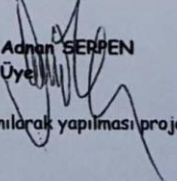
Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/19/2017
Toplantı Tarihi : 31 Ekim 2017

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Sayın, Prof.Dr. Işıl TEKMEK
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

44/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sıçanlarda Prenetal Kafein Tüketimin İmplantasyon Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi" isimli; Filiz Yılmaz'ın araştırmacı olduğu, 45 adet (22 adet katım için erkek) dişi Wistar Albino sıçanın verilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEK Başkan Vekili
 Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Üye	 Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN Üye
Prof.Dr.Gülğün OKTAY Üye (Topl.Katılmadı)	Prof.Dr.Günay KIRKIM Üye (Topl.Katılmadı)
Prof.Dr.Türkan ERTAY Üye (Topl.Katılmadı)	Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU Danışman
 Prof.Dr.Nergiz BURMUŞ Üye	 Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN Üye
Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye (Topl.Katılmadı)	Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ Üye(Topl.Katılmadı)
 Zehra KENAN Üye	 Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.