

## Araştırma Makalesi

# Diyabetin, İmplantasyon Penceresi Dönemindeki Fare Endometriyumunda Laminin Ekspresyonuna Etkisi

## The Effects of Diabetes on the Laminin Expression of the Mice Endometrium During the Implantation Window

Derya YETKİN<sup>1</sup>, Banu COŞKUN YILMAZ<sup>1</sup>, Şakir Necat YILMAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mersin

### Özet

**Amaç:** Bazal membran, epitel doku ile bağ dokusu arasında bulunan, kas ve yağ hücreleri ile periferik sinir liflerini çevreleyen, yüksek derecede özelleşmiş ekstrasellüler matriksten oluşan, ince bir tabakadır. Tüm bazal membranlar, glikoproteinlerden (laminin vb.) proteoglikanlardan (heparan sülfat vb.) ve bağ dokusu liflerinden (tip IV, XV ve XVIII kollajen) oluşur. Çok fonksiyonlu bir bazal membran glikoproteinini olan laminin; hücre adezyonu, migrasyonu, differansiyasyonu, proliferasyonu gibi çeşitli biyolojik aktiviteler ile ilişkilidir. Alfa-1, beta-1 ve gama-1 zincirinden oluşan laminin-1, embriyonun gelişmesinde ve plasenta oluşumunda rol oynar. Diyabet; protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalıktır. Bu çalışmada; implantasyon döneminde fare endometriyum yapısının ve diyabetin gebe fare endometriyumunda laminin ekspresyonuna etkisinin incelenmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışmada 36 adet, 8-10 haftalık dişi Balb/C fareleri kullanıldı. Fareler kontrol (n=18) ve diyabetik (n=18) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her iki grup da kendi içinde 2., 4. ve 6. gebelik gününde ötenazi yapılmak üzere 3 alt gruba bölündü. Hayvanlarda diyabet oluşturmak için streptozotosin (200 mg/kg) uygulandı. Elde edilen uterus dokuları ışık mikroskopik immunohistokimyasal yöntemle incelendi.

**Bulgular:** Immunohistokimyasal işaretlemeye gruplar karşılaştırıldığında, 2. ve 4. günlerde fark görülmezken, diyabet grubunda laminin ekspresyonunda kontrol grubuna göre sadece 6. günde ekspresyon artışı saptandı.

**Sonuç:** Bu veriler doğrultusunda, diyabetin gebelik sürecinde laminin ekspresyonunu etkilediği, endometriyumun ve bazal membranın yapısında değişikliklere neden olduğu ve bunun da implantasyon sürecini bozabileceği görüşüne varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** bazal membran; laminin; diyabet; endometriyum

### Abstract

**Aim:** The basal membrane is a highly specialized thin layer composed of extracellular matrix that located between the mesenchymal and epithelium tissues surrounding the muscle and adipose cells plus peripheral nerve fibers. All of the basal membranes contain glicoproteins (such as laminins) proteoglycans (heparan sulfat) and connective tissue fibers (type IV, XV and XVIII collagens). Laminin, a multifunctional basal membrane glicoprotein, is associated with several biological activities such as cell adhesion, migration and differentiation. Laminin-1 is composed by alpha-1, beta-1 and gamma-1 chains and takes a role at the embryonic development and placental formation. Diabetes is a metabolic disease which affects protein, adipose and carbohydrate metabolism in the body. The aim of the current investigation is to understand the structure of endometrium tissue during the implantation window and effects of diabetes on the laminin expression at the same tissue of pregnant mice.

**Method:** At this study, 36 Balb/C mice (8-10 weeks old age) were used and separated into two main groups as control (n=18) and diabetes (n=18). Each main group was also divided into 3 subgroups as 2nd, 4th, and 6th gestational days. In order to form the diabetes model, a dose of 200 mg/kg/body weight streptozotosin was used for each mouse. Uterine tissues were processed for immunohistochemical analysis.

**Results:** Immunohistochemical labeling, showed that there was no significant difference of laminin expression in diabetes groups as compared to the controls at the 2nd and 4th gestational days. However on the 6th gestational day, there was a marked increase of laminin protein expression at the diabetes group comparing to the it's control.

**Conclusions:** Our data revealed that diabetes during pregnancy altered the expression of laminin protein as well as the structure of the basal membrane of endometrium tissue. In the light of these findings, we postulate that diabetes during pregnancy can impair the implantation process.

**Keywords:** basal membrane, laminin, diabetes mellitus, endometrium

\*Araştırma Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi'nde (25-28 Ekim 2011) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg, 2013;6(3):19-24

Geliş tarihi : 28.04.2014

Kabul tarihi : 06.08.2014

Yazışma adresi : Arş. Gör. Derya YETKİN, Mersin Üniversitesi, Çiftlikköy Kampüsü, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Binası, Histoloji ve Embriyoloji AD, Mersin

Tel : 0324 3610001-1187/0536 4161601

Faks : 0324 341 24 00

E-posta : deryayetkin84@gmail.com

## Giriş

İmplantasyon, genetik olarak farklı olan embriyonik ve maternal dokular arasında gelişen başarılı bir kaynaşmadır. Bu süreç oldukça karmaşık bir şekilde gerçekleşir. İmplantasyon başarısı için, embriyo ile maternal doku arasındaki iletişim korunmalıdır. İmplantasyon başlamadan önce endometriyum ve blastokist arasında sinyaller aracılığıyla etkileşim meydana gelir. Farelerde çiftleşmeden sonraki 4. günde embriyo ilk olarak uterusun luminal epitelinin antimezometriyal bölgesine tutunur. Embriyo uterin epitele tutunduktan sonra trofoblast dev hücrelerine doğru invaze olmaya başlar. Aynı zamanda stromada proliferasyon ve desidualizasyon gerçekleşir ve primer desidual zon şekillenir. Bu sırada embriyonun uterus epiteline tutunması ile epitelde apopitozis gerçekleşir (1,2). Bazal membran; epiteli, periferik sinir liflerini, Schwann hücrelerini, yağ hücrelerini, kas hücrelerini, kan beyin bariyerini çevreleyen özel matriks bileşenlerinden oluşan ince bir tabakadır (3,4). Doku bütünlüğünü korumada, farklı gelişim süreçlerinde, filtrasyonda, farklı dokuları bölmelere ayırmada önemli rol oynar (5). Tüm bazal membranlar tip IV kollajen, nidojen, sülfatlı proteoglikanlar ve laminin içerir (3). Ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinden laminin ve fibronektin, trofoblastik invazyonun seyriinde rol oynayan önemli elemanlardır. Laminin polipeptitlerinin; gelişimin 2, 4, 8 ve 16 hücreli kompakt ve kompakt olmayan aşamalarında gözlenmesi, embriyogenezin erken dönemlerinde hücre göçü, adezyonu ve farklılaşması gibi olaylara katıldığını ve bu molekülün hücre büyümesi ile hücre iskeletinin organizasyonunda da rol aldığını göstermektedir (2). Lamininin bu fonksiyonlarını, üzerinde bulunan belli bölgelere hücre yüzey reseptörlerinin ve diğer ESM moleküllerinin bağlanmasıyla gerçekleştirdiği sanılmaktadır (2). İmplantasyon döneminde blastokist üzerinde morfolojik olarak saptanabilen tüm membranlarda laminin bulunması bu kanıyı güçlendirmiştir (2). Laminin, hücre adezyonu, hücre göçü, hücre farklılaşması ve çoğalması gibi çeşitli biyolojik aktiviteler ile ilişkili çok işlevli bir bazal membran glikoproteinidir. Alfa, beta ve gama alt zincirlerinden oluşur. Günümüze kadar, 5 alfa, 3 beta ve 3 gama alt zinciri gösterilmiştir (5). Bu zincirlerin kombinasyonlarına bağlı olarak da 15 farklı laminin alt tipi tanımlanmıştır (6). Bu alt tiplerden bazal laminada en çok bulunanı laminin-1'dir ve alfa-1, beta-1 ve gama-1 zincirlerinden oluşur (5). Laminin-1, embriyonik gelişim sırasında ve plasenta oluşumunda rol oynar. İnsan embriyolarındaki laminin-1'in, tip IV kollajenaz ekspresyonunu artırdığı ve peri-implantasyon periyodunda, maternal matrikste trofoblast adezyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Laminin-1, implante fare embriyosunun erken dönemlerinde ve blastokistte bazal membranın trofoektoderminde ve iç hücre kitlesinde lokalize olmaktadır. İmplantasyon süresince

laminin-1 koryonik bazal membranda ve Reichert's membranında eksprese olur. İnsan plasentasının ilk trimesterinde laminin alfa-1 zinciri trofoblastik bazal membranda eksprese olmuştur. İkinci trimester plasentada, laminin alfa-1 zinciri, çoğalan trofoblastik adalarla veya sütunlarla temas halinde olan villöz bazal membran bölgesinde selektif olarak eksprese edilir. Bundan dolayı laminin-1'in, embriyogenezis, implantasyon ve plasenta oluşumu ile ilgili süreçlerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (7).

Diyabet, sık görülen sistemik bir hastalıktır. İnsülin eksikliği veya duyarsızlığı sonucu organların kronik hiperglisemiye maruz kaldığı klinik bir sendrom olarak tanımlanır. Hastalığın ileri dönemlerinde pek çok organ ve sistemin olumsuz etkilendiği ve bu etkilere bağlı komplikasyonların ortaya çıktığı bilinmektedir. Gebeliğin bu hastalığı şiddetlendirdiği, gizli kalmış diyabeti ortaya çıkarabildiği ya da sağlıklı olduğu düşünülen bireylerde oral glikoz tolerans testini bozduğu uzun zamandır bilinmektedir. Diyabet gebelik öncesi teşhis edilmiş ise pregestasyonel, ilk kez gebelik sırasında tespit edilmiş bir glikoz intoleransı ise gestasyonel diyabet adını alır. Gestasyonel diyabet gebelerin yaklaşık %4'ünde görülürken, pregestasyonel diyabetin görülme sıklığı yaklaşık 1000 gebelikte 1-3'tür (8,9).

Reseptif endometriyumda ESM'in şekillenmesi gerekir ve daha sonra trofoblast invazyonu, plasenta oluşumu ve hücre ölümü gibi süreçlerde ESM inceleyebilir. Bu çalışma implantasyon bölgesinde laminin ekspresyonunun hem kontrol hem de diyabetik farelerdeki dinamik dağılımının incelemesi amaçlamıştır.

## Gereç ve Yöntemler

### *Işık Mikroskopik Değerlendirme*

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilen 36 adet 8-10 haftalık dişi Balb/C fareleri kullanıldı. Denekler deney süresince, sıcaklığı  $23 \pm 1$  °C, nem oranı %45-65 ve 12 saat gece, 12 saat gündüz koşulları sağlanan laboratuvar ortamında, 35x45x25 cm boyutlarında plastik kafeslerde barındırıldı ve hazır pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi. Fareler kontrol grubu (n=18) ve deney grubu (n=18) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Kontrol ve deney grupları da kendi içlerinde 3 alt gruba ayrıldı. İlk alt grup implantasyon öncesi dönem (çiftleşme sonrası 2. gün, n=6); ikinci alt grup implantasyon günü (çiftleşme sonrası 4. gün, n=6) ve üçüncü alt grup implantasyon sonrası dönem (çiftleşme sonrası 6. gün, n=6) olarak belirlendi. Her iki grup da gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerindeki fareler Xsilazin (10 mg/kg)+Ketamin (100 mg/kg) anestezisi ile uyutuldu. Farelerin ağırlı uyaranlara yanıt vermediği anlaşıldıktan sonra hayvanların göğüs kafesleri açıldı ve transkardiak yoldan önce %0.9'luk izotonik NaCl

çözeltisi, bunu takiben ise %4'lük paraformaldehit + %0.05 gluteraldehit solüsyonu ile perfüzyon yapıldı. Yeterli perfüzyon ve fiksasyon sağlandıktan sonra, uterus iki taraflı olarak çıkartıldı. Uterus kornularının birisi immunohistokimyasal işaretlenmeye uygun fiksasyonu sağlamak için %10'luk nötral formalin çözeltisinde 48 saat bekletildi. Fiksasyondan sonra ışık mikroskopik inceleme için doku takip prosedürü uygulandı.

#### *Işık Mikroskopik Doku Takibi ve İmmunohistokimyasal İşaretleme*

Işık mikroskobu için dokular fikse edildikten sonra akarsuda yıkandı. Daha sonra artan derecelerde alkollerden geçirildi (%70, 80, 90, 96) ve ardından ksilol ile şeffaflandırma işlemi yapıldı. Ksilol+sıvı parafin karışımında bekletildikten sonra dokular parafine gömüldü. Elde edilen bloklardan mikrotomla adeziv lamlara 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60°C etüde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısında 3x10 dakika ksilolde bekletildi. Rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alınan kesitler fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için tripsin (pH:7,6) içinde 37°C'de (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika muamele edildi. Bu işlemten sonra taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3x5 dakika yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için distile suda %12.5' luk olarak hazırlanmış hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 10 dakika inkübe edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkandı ve nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için Novocastra TM Protein Block ile 8 dakika inkübe edildi. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmadan PBS içinde %0.5'lik sığır serum albumin (BSA) ile sulandırılmış anti-laminin primer antikor (Abcam ab11575) 1/25 dilüsyonda damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde oda ısısında 1 saat inkübe edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Biotin ile bağlanmış polivalan sekonder antikor (Scytek®) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Streptavidin peroksidaz enzim solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkübe edildi. Distile suda 5 dakika yıkandı. Hematoksilen ile 5-10 saniye zıt boyama yapıldı. Akarsuda berraklaşana kadar yıkandı. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolden 3x5 dakika geçirildi. Entellan ile kapatıldı. Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0.5 PBS-BSA damlatıldı. Daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi. Dokular, ışık mikroskobu (Olympus®BX50 Olympus GmbH, Almanya) ile incelendi, aynı mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Nikon®CoolpiX5000, Nikon Corp. Tokyo, Japonya) ile fotoğrafları çekildi. Işık mikroskopik düzeyde, kontrol ve deney gruplarında

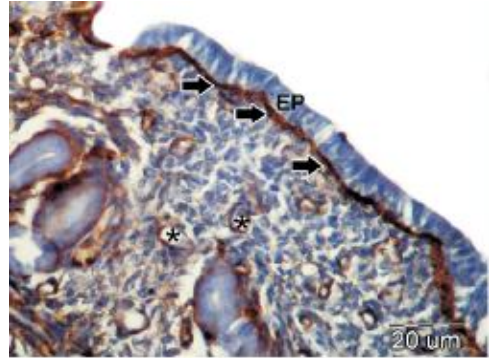
endometriyal epitelin bazal membranında, laminin ile işaretlenme düzeyi değerlendirildi. Değerlendirme aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Hiç işaretlenme yok: 0
- Yer yer işaretlenme var: +
- Orta düzeyde işaretlenme var: ++
- Kuvvetli işaretlenme var: +++

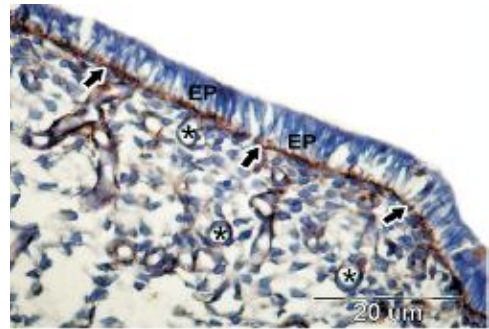
Kontrol ve deney grubu laminin düzeylerini incelemek amacıyla Mann Whitney U testi kullanıldı ve p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama±standart sapma (medyan [%25-%75.yüzdellikler]) olarak verildi.

## **Bulgular**

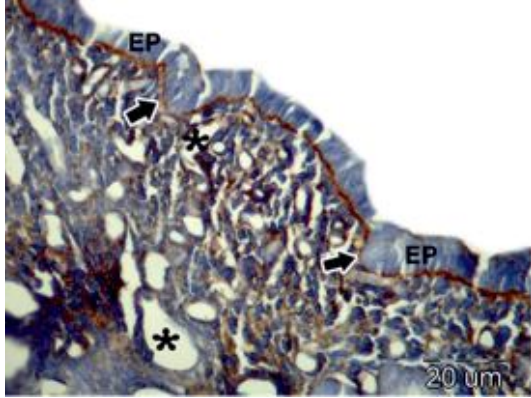
Kontrol ve deneysel diyabet oluşturulmuş gebe farelerden alınan uterus dokularında laminin ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi. Kontrol grubundaki farelerde, gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde endometriyum yüzey ve bez epitelinin altında yer alan bazal membranda lamininle kuvvetli işaretlenme izlendi (Şekil 1, 2 ve 3). Günler arasında laminin ekspresyonunda fark görülmedi. Fakat implantasyon döneminden sonra desidua hücrelerinde laminin ekspresyonu görüldü.



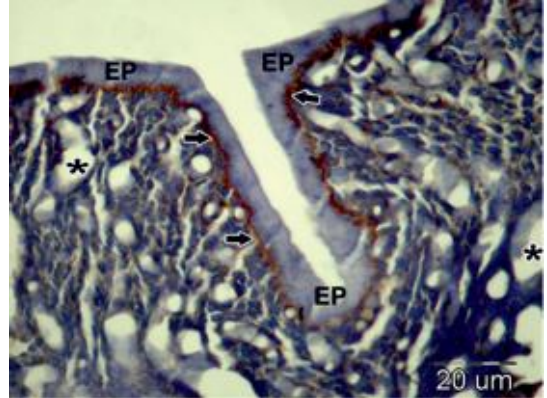
**Şekil 1.** Kontrol grubu. 2. günde yüzey epitel hücreleri (EP), laminin antikoruna ile işaretlenmiş bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).



**Şekil 2.** Kontrol grubu. 4. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).



**Şekil 3.** Kontrol grubu. 6. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).



**Şekil 5.** Deney grubu. 4. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).

Diyabet oluşturulan deney grubunda gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde fare uteruslarından alınan örneklerde endometriyum yüzey ve bez epitelinin altında yer alan bazal membranda laminininde işaretlenme gözlemlendi. Bu işaretlenme kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı ( $p=0.021$ ) (Tablo 1).

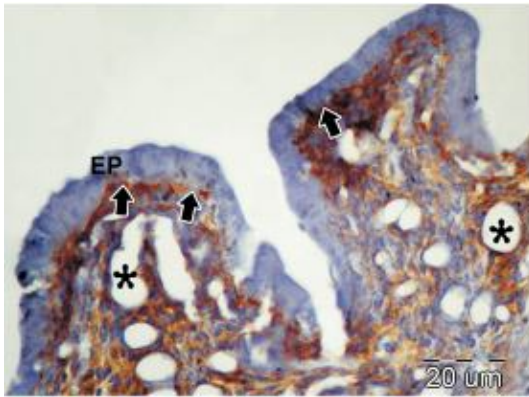
**Tablo 1.** Kontrol ve deney grupları arasında laminin ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları. Ortalama±standart sapma (medyan [%25-%75.değer])

Kontrol	Deney	p
1.580±0.840 (3[2-3])	2.210±0.850 (2[1-2]) <sup>a</sup>	0.021

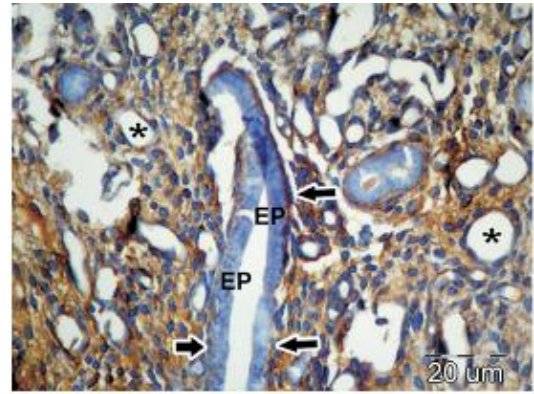
İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p<0.05$ 'dir.

a:deney grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır.

İkinci, 4. ve 6. günlerdeki işaretlenme yoğunluğu kontrol grubu ile kıyaslandığında; 2. ve 4. günde epitelin bazal membranda laminin ekspresyonu açısından bir fark görülmedi ( $p=0.201$ ) ( $p=0.214$ ). Fakat gebeliğin 6. gününde kontrol grubuna göre laminin ekspresyonunda artış olduğu görüldü ( $p=0.023$ ) ve bazal membranda yer yer kesintiler olduğu saptandı (Şekil 4, 5, 6) (Tablo 2).



**Şekil 4.** Deney grubu. 2. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).



**Şekil 6.** Deney grubu. 6. günde yüzey epitel hücreleri (EP), bazal membran (ok), kan damarları (yıldız) (X1200).

**Tablo 2.** 2.,4.,6., günlerde kontrol ve deney grupları arasında laminin ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları. Ortalama±standart sapma (medyan [%25-%75.değer])

Grup Gün	Kontrol	Deney	P
	2. gün	2.166±0.983 (2.5[1-3])	
4.gün	2.571±0.534 (3[2-3])	2.000±0.894 (2[1-3])	0.214
6.gün	2.166±1.169 (2.5[1.5-3])	2.871±1.975 (2[1-2]) <sup>a</sup>	0.023

Laminin düzeyleri bakımından dördüncü günde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

a: deney grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır.

## Tartışma

Bu çalışmada diyabetik farelerde gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde uterus dokusu immunohistokimyasal yöntemle incelendi. Uterusta bazal membran glikoproteini olan laminin ekspresyonunun ışık mikroskopik düzeyde değerlendirilmesi amacıyla immünohistokimyasal boyama yapıldı.

ESM, fibröz proteinler, proteoglikanlar ve fibronektin, laminin, nidojen, tenasin ve trombospondin gibi glikoproteinleri içerir. Birçok ESM proteini hücre yüzeyinden eksprese edilen integrinlerle ilişki içerisinde ve  $\beta 3$  integrin, implantasyonda rol oynayan önemli belirteçlerden biridir (10). İntegrinlerle ilişkili bu adezyon moleküllerinin en önde gelenleri, fibronektin ( $\alpha 3-5$ ,  $\beta 1$ ), laminin ( $\alpha 1-3$   $\beta 1$ ,  $\alpha 6$   $\beta 1$ ) ve kollajendir ( $\alpha 1-3$ ,  $\beta 1$ ). Bu dinamik yapısından dolayı ESM bileşenleri, sadece yetişkin dokuda değil, embriyogenez sırasında hücre differansiasyonu, göçü ve büyümesinde de önemli rol oynarlar. Ancak laminin ve fibronektinin benzer biyolojik özelliklerinden dolayı, hücre davranışında farklı fonksiyonları da vardır. Fibronektin embriyogenez sırasında hücre adezyonunu ve göçünü sağlarken, laminin epitel histogenezinin erken döneminde önemli rol oynayabilir ve hücre fonksiyonunu değiştirebilir. ESM moleküllerinin endometriyal stromadaki dağılımları ve farelerdeki hamilelik başarısındaki rolleri hala tam olarak açıklanamamaktadır. Başarılı bir gebelik için, blastokist implante olurken trofoblast hücreleri endometriyal stroma boyunca invaze olmalıdır ve maternal ESM bileşenleri ile etkileşim içinde bulunmalıdır (11). ESM bileşenleriyle ilişkili olan  $\beta 3$  integrin ekspresyonları endometriyal reseptivite başarısızlığı olan hastalarda değişmektedir (10). Öte yandan ESM proteinlerinden laminin ve fibronektin, diyabet ve preeklampsi gibi patolojik durumlarda embriyo ve maternal alandaki yüzeyde ekspresyonu değiştirerek embriyo kayıplarına sebep olabilir (11). Endometriyumda implantasyonun gerçekleşeceği bölgede ESM'in şekillenmesi gerekir. Daha sonra trofoblast invazyonu, plasenta oluşumu ve hücre ölümü gibi süreçlerde ESM bileşenlerinin ekspresyonları incelenerek rolleri hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabilir. Bu çalışmada normal farelerde implantasyon bölgesinde laminin ekspresyonunun dinamik dağılımını ve diyabetin bu dağılıma etkisini incelemek amaçlanmıştır. Daha önce sıçanlarda yapılan bir çalışmada, gebeliğin 4., 5., 6., 7. ve 8. günlerinde bazal membranda, desidua hücrelerinde ve bez epitellerinde laminin ekspresyonu bulunmuştur (2). Bir başka çalışmada, habes maymunlarında implantasyon döneminde ESM proteinlerinin ekspresyonlarına bakılmış ve endometriyumda bazal

membran boyunca laminin ekspresyonu görülmüş, ayrıca implantasyon alanında laminin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (12). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, her iki grupta luminal epitel ve bez epitelinin bazal membran ile desidua hücrelerinde laminin ekspresyonu görülmüştür. Buna bağlı olarak da lamininin implantasyon sürecinde rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Günlere bağlı olarak laminin ekspresyonunda farklılık gözlenmemiştir. Literatürde, farelerde implantasyon penceresi döneminde (2., 4. ve 6. günlerde) yüzey epitelinin bazal membranında laminin ekspresyonunu inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın; farelerde implantasyon sürecinde, gebeliğin 2., 4. ve 6. günlerinde laminin ekspresyonunun değerlendirildiği ilk çalışma olduğu düşünülmektedir. Diyabet oluşturulmuş hamile sıçanlarda, plasentada ESM bileşenlerinin ekspresyonlarına bakılmış ve diyabete bağlı olarak ekspresyonlarının değiştiği görülmüştür (11). Tip 2 diyabet oluşturulan yeni doğan sıçanlarda böbrek glomerülünde tip IV kollajen ve değiştirici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ekspresyonuna bakılmış ve diyabete bağlı olarak artış görülmüştür. Diyabete bağlı olarak artan TGF- $\beta$ 'nın ESM bileşenlerinin ekspresyonunu değiştirdiği sonucuna varılmıştır (13). Diyabetik nefropatide epitel hücrelerinde lokalize olan integrin alt ünitelerinin ( $\alpha V$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ) ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Aynı çalışmada bu artışın diyabete TGF- $\beta$  artışına bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği de öne sürülmüştür (14,16). Daha önce implantasyon dönemindeki farelerde laminin ekspresyonu çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda immunohistokimyasal olarak laminin ile yapılan immün işaretlemeye, diyabet grubundaki fare endometriyumunda kontrol grubuna göre işaretlemenin arttığı görülmüştür. Bu sonuç literatürdeki verileri desteklemektedir. Bu durum, önceki çalışmalarda gösterildiği gibi, diyabetin TGF- $\beta$  sentezini artırdığı, artan TGF- $\beta$ 'nin da  $\beta 1$  integrin ekspresyonunun artmasına sebep olduğu bilinmektedir (15). Çalışmamızda diyabetik gruplarda sadece 6. günde gözlenen laminin ekspresyonundaki artışın, integrin ekspresyonunun artışına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür. Bunun sonucunda lamininin implantasyon sonrasında embriyodaki hücre proliferasyonunu azaltabileceği ve böylece infertiliteye katkısının olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. İmplantasyon döneminde diyabetik fare uterus epitelinde laminin ekspresyonu ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde; farelerde implantasyon döneminde laminin ekspresyonunun implantasyonda görev alabileceği sonucuna varıldı. Diyabetin embriyonun endometriyuma tutunmasını sağlayan glikoprotein ekspresyonlarında artışa neden olduğu saptandı. Buna bağlı olarak diyabetin implantasyon başarısızlığına yol açabileceği sonucuna varıldı.

## Kaynaklar

1. D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD. Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biology of Reprod* 2007;77(3):433-41.
2. Kayışlı ÜA, Demir R. Distributions and possible roles of laminin, fibronectin and their receptor subunits integrin and in remodelling of extracellular matrix during decidualization in rats. *Turkish Journal of Biol* 2000;24(3):79-95.
3. Lebleu VS, Brian M, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* 2007;232(9):1121-9.
4. Alpy F, Jivkov I, Sorokin L, Klein A, Arnold C, Huss Y, Kedinger M, Simon-Assmann P, Lefebvre O. Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha 1 gene. *Genesis* 2005;43(2):59-70.
5. Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE. Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 2004;131(10):2247-56.
6. Öner H, Öner J. Bir bazal membran glikoproteini: nidogen. *J Med Sci* 2005;25(5):688-92.
7. Wiradjaja F, DiTommaso T, Smyth I. Basement membranes in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2010;90(1):8-31.
8. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005;28(1):37-42.
9. Karayalçın C. Unilateral diyabetik ayak ülseri gelişiminde polinöropatinin etkisi. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilimdalı, Adana, 2007.
10. Germeyer A, Savaris RF, Jauckus J, Lessey B. Endometrial beta3 Integrin profile reflects endometrial receptivity defects in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12(1):53.
11. Giachini FRC, Carriel V, Capelo LP, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB, Zorn TM, San Martin S. Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. *J Anat* 2008;212(1):31-41.
12. Fazleabas ST, Stephen CB, Steven F, Jinghai S, Bruce AL. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1997;56(2):348-56.
13. Tunçdemir M, Dağıstanlı FK, Öztürk M. Yeni doğan streptozotosin diyabetik nefropatide İsradipinin TGF-β1 ve tip IV kollajen ekspresyonları üzerine etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2007;38:152-8.
14. Jin DK, Fish AJ, Wayner EA, Mauer M, Setty S, Tsilibary E, Kim Y. Distribution of integrin subunits in human diabetic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(12):2636-45.
15. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. Coordinated expression of β1 integrins and transforming growth factor-β induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest* 1993;69(1):68-76.
16. Kreidberg JA, Symos JM. Integrins in kidney development, function and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(2):233-42.