

T1418

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

+
İNSAN VE SIÇAN PLASENTASINDA
FETO-MATERNAL GLİKOZ TAŞINIM
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Emin Türkay Korgun

Doktora Tezi

T1418/1-1

Tez Danışmanları
Prof.Dr. Ramazan DEMİR
Doç.Dr. Tom HAHN (Graz-Avusturya)

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 21.01.0122.02)


“ Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2002

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.
01/11/2002

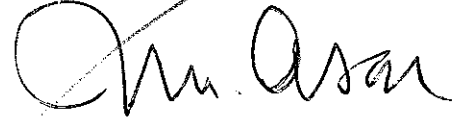
Tez Danışmanı: Prof.Dr.Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



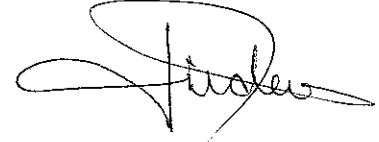
Üye : Prof.Dr.Bilal TRAK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı



Üye : Prof.Dr.Mevlüt ASAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof.Dr.Firdevs GÜRER
Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye :Doç.Dr. Alp CAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun
görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06/11/2002 tarih ve 17/123 sayılı
kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bir çok hücrede glikoz. konsantrasyon gradyeni boyunca kolaylaştırılmış diffüzyonla alınmaktadır. Bu çalışmada, memelilerde sağlıklı bir gebelik için glikoz ihtiyacını karşılamada önemli rollere sahip olan glikoz taşıyıcı proteinlerin, insan plasentasında, sıçan embriyonik hücrelerinde, fetal ve maternal dokularında üretimini ve düzenlenmesini araştırdık.

Gelişen sıçan utero-embriyonik birimde kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcı izoformlarından GLUT 1, 3 ve 4 implantasyonun başlamasından sonra embriyonik dokularda üretildiler. Bu proteinlerin, parietal endoderm, visseral endoderm, primer ektoderm, ekstraembriyonik ektoderm ve ektoplasental koni'de birlikte dağılım gösterdikleri tespit edildi.

Uterus lüminal epitelinde GLUT 1 boyanması gebeliğin 3 gününe kadar mevcut değilken, 3 günden itibaren lüminal epitel, endometriyal stromal ve desidual hücrelerde boyanmaları gözlemlendi. GLUT 1 boyanma yoğunluğu desidualizasyon süreciyle birlikte arttı. Endometriyal bezler ve miyometriyal düz kas hücreleri ne GLUT 1 ne de GLUT 3 ile postimplantasyona kadar boyanmadı. GLUT 4, gebe sıçan uterusunda bütün gelişim aşamalarında tespit edildi.

İnsan ilk trimester ve term plasentasında GLUT 3 yaygın olarak ekstravillus trofoblast ve villuslerdeki proliferatif trofoblast hücrelerinde mevcuttu. Endotel hücrelerde GLUT 3 yoğun olarak boyandı. Glikojen sentezinin primer proteini olan glikojenin, endotel hücrelerinde, trofoblast hücrelerinde ve basal desidual hücrelerde mevcuttu.

İnsan periferik kanındaki granulositler ve monositler GLUT 1, 3 ve 4 ile boyandı. Lenfositlerin küçük bir gurubu hariç bu taşıyıcı proteinler için negatifti. Gebelik esnasında hücre yüzey taşıyıcı proteinlerinde ana değişim granulositlerdeki GLUT 1 % 36 ($p < 0.05$) oranında term de azalarak düzenlenmesi ve monositlerde GLUT 3 % 37 ($p < 0.05$) oranında artış gösterirken buna paralel olarak GLUT 4, % 24 ($p < 0.05$) oranında ikinci trimester de azaldı. Hipoglisemik şartlar altında granulositlerinde euglisemik granulositlere göre GLUT 4, % 73 ($p < 0.05$) bir artış gözlenirken buna paralel olarak istatistiksel olarak anlamsızda olsa GLUT 1 de azalma ve GLUT 3 de artış oldu. Hipoglisemi, monositlerde GLUT 1 ve GLUT 4 için etkisizken, GLUT 3 proteininde % 134 ($p < 0.05$) artış gözlemlendi.

Sonuç olarak, veriler göstermektedir ki sıçan utero-embriyonik birimde, yüksek affiniteye sahip glikoz taşıyıcı proteinlerinden GLUT1, 3 ve 4 farklı ekspresyonları, preimplantasyon gelişimde kolaylaştırılmış glikoz temininde önemli rollere sahip olduklarına bir kanıt teşkil eder. Placenta ve desidua GLUT 3 ve glikojenin birlikte yerleşim göstermesi, glikojen depolayan hücrelerde metabolik ihtiyaca göre glikojen sentezi veya yıkımı ile glikoza dönüşebilirler.

GLUT 1, 3 ve 4 maternal periferik granulositlerde ve monositlerde oldukça fazla miktarda üretirler. Bu taşıyıcı izoformların gebelik esnasında farklı düzenlenmeleri, bu proteinlerin farklı görevlere sahip olduğunu göstermektedir. Hipoglisemide bu izoformlara karşı farklı cevapların alınması glikoz yokluğunda hücreleri stressten koruma mekanizmasında rolleri olabilir.

Anahtar Kelimeler: Glikoz taşınımı, GLUT, embriyo, placenta, glikojenin, lökosit

ABSTRACT

Most cells take up glucose by facilitated diffusion along a concentration gradient. In the present study, the expression of the respective carrier molecules and its regulation was investigated in rat embryonic cells as well as in fetal and maternal tissues playing a critical role for glucose supply to the mammalian conceptus.

In the developing rat utero-embryonic unit, the facilitative glucose transporter isoforms GLUT1, 3 and 4 were expressed in the embryonic tissues after the start of implantation, being co-localized in the parietal endoderm, the visceral endoderm, the primary ectoderm, the extraembryonic ectoderm as well as in the ectoplacental cone. In the uterus, a faint GLUT1 labelling emerged not until gestational day 3 in the luminal epithelium, the endometrial stroma as well as in decidual cells. GLUT1 staining intensity increased in the latter population with progressing decidualization. Endometrial glands and myometrial smooth muscle cells did neither stain for GLUT1 nor for GLUT3 until post-implantation. GLUT4 was visualized throughout the pregnant rat uterus during all developmental stages examined, as was GLUT3 with the above exceptions.

Extravillous trophoblast and proliferating villous cytotrophoblast turned out to be the major sites of GLUT3 expression in first trimester and term human placenta. Endothelial cells were also strongly labelled with the GLUT3 antiserum. The endothelium, trophoblast as well as basal decidual cells contained also glycogenin, the protein primer for glycogen synthesis.

Human peripheral blood granulocytes and monocytes stained for GLUT1, 3 and 4. Apart from a minor subpopulation, lymphocytes were negative for these carriers. Major changes in cell surface transporter expression during pregnancy were a 36% ($p < 0.05$) downregulation of granulocyte GLUT1 at term, and an increase in monocyte GLUT3 levels to 137% ($p < 0.05$), paralleled by a 24% ($p < 0.05$) decrease in GLUT4 content in second trimester. In non-pregnant women, granulocyte GLUT4 levels were increased by 73% ($p < 0.05$) under hypoglycemic conditions, which was paralleled by a marked, but non-significant reduction in GLUT1 and a rise in GLUT3. In monocytes, GLUT3 was elevated by 134% ($p < 0.05$), whereas GLUT1 and GLUT4 remained unaffected upon hypoglycemia.

In conclusion, the data point to a significant expression of the high affinity glucose transporters GLUT1, 3 and 4 in the rat utero-embryonic unit, providing supportive evidence for an important role of facilitative glucose diffusion in peri-implantation development. The co-expression of GLUT3 with glycogenin in the placenta and decidua might enable glycogen-storing cells to exchange glucose quite effectively according to prevailing metabolic demands of glycogen synthesis or degradation. GLUT1, 3 and 4 are also abundantly expressed in maternal peripheral blood granulocytes and monocytes. The particular isoforms are differentially regulated during pregnancy, suggesting an individual functional significance. The differential response of the isoforms to hypoglycemia may represent a mechanism to protect the cells from the stress of glucose deprivation.

Key Words: Glucose transport, GLUT, embryo, placenta, glikogenin, Leukocyte.

TEŐEKKUR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleŐmesinde katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluŐlara içtenlikle teşekkür eder

Sayın Prof. Dr. Ramazan DEMİR ve sayın Doç. Dr. Tom HAHN tezimin gerçekleŐmesi için her türlü desteği saĐlamıŐlardır.

Sayın Prof. Dr. Gottfried DOHR ve sayın Prof. Dr. Gernot DESOYE tezimin laboratuvarlarında yapılmasına imkan saĐlamıŐlardır.

Sayın Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tezimin gerçekleŐmesinde maddi olanakları sağlamıştır.

Sayın Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalıŐanları tezim esnasında yardımcı olmuŐlardır

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii-viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2-26
2.1. Karbonhidrat Metabolizması	2-4
2.2. Glikoz taşınımı ve glikoz taşıyıcı proteinler	4-5
2.2.1. GLUT 1: Eritrosit tip glikoz taşıyıcısı	5-6
2.2.2. GLUT-2 : Karaciğer tip glikoz taşıyıcısı	6-6
2.2.3. GLUT-3 : beyin tipi glikoz taşıyıcısı	6-7
2.2.4. GLUT-4 : İnsülin-duyarlı glikoz taşıyıcısı	7-7
2.2.5. GLUT-5: ince bağırsak glikoz taşıyıcısı	7-7
2.2.6. GLUT 6	7-8
2.2.7. GLUT 7: hepatik mikrozomal glikoz taşıyıcısı	8-8
2.2.8. GLUT 8	8-8
2.2.9. GLUT 9	8-8
2.2.10. GLUT10	8-9
2.2.11. GLUT 11	9-9
2.2.12. GLUT 12	9-9
2.3. İnsan plasenta morfolojisi ve fizyolojisi	10-12
2.4. Sıçan plasenta morfolojisi	12-15
2.5. Plasental taşıma	15-15
2.5.1. Plasental glikoz taşınımı	15-17
2.5.1.1. İnsan ve sıçan plasentasındaki glikoz taşıyıcı proteinler	17-17
2.5.1.2. İnsan plasentasındaki GLUT 1 dağılımı ve fonksiyonu	17-17
2.5.1.3. Sıçan plasentasındaki GLUT 1 dağılımı ve fonksiyonu	17-18
2.5.1.4. İnsan plasentasındaki GLUT- 3 dağılımı ve fonksiyonu	18-18
2.5.1.5. Sıçan plasentasındaki GLUT 3 dağılımı ve fonksiyonu	18-19
2.5.1.6. İnsan ve sıçan plasentasındaki GLUT 4 dağılımı	19-19
2.6. Plasental aminoasid taşınımı	19-19
2.6.1. Katyonik ve anyonik amino asid taşıyıcıları	19-20
2.6.2. Nötral amino asid taşıyıcıları	20-20
2.7. Plasental yağ asidi taşınımı	20-20
2.8. Plasental oksijen taşınımı	20-20
2.9. Plasental vitamin ve mineral taşınımı	20-21
2.10. Preimplante gelişim döneminde embriyodaki glikoz taşınımı	21-22
2.11. Gebelik esnasında plasental glikoz taşıyıcılarının fonksiyonu	23-24
2.12. Rahim İçi Büyüme Geriliğinde (IUGR) glikoz taşıyıcıları	24-24
2.13. Diabetik gebeliklerde glikoz taşıyıcıları	24-25
2.14. Plasental glikoz taşıyıcılarının düzenlenmesi	25-26

GEREÇ VE YÖNTEM	27-31
3.1. Sıçan utero-embriyonik dokunun elde edilişi	27-27
3.2. Parafin kesitler için immunohistokimya protokolü	27-28
3.3. İnsan plasenta dokusu	28-28
3.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforez ve Western-Blot	28-29
3.5. Kriyo (dondurma) kesitler için immunohistokimya protokolü	29-29
3.6. Flow sitometrik (akışkan hücre ölçer) çalışma için denek seçimi	29-30
3.7. Periferel kandan lökosit hücrelerinin ayrılması ve sitospin metodu yardımı ile immunohistokimyasal boyanmaların yapılışı	30-30
3.8. Flow sitometri (akışkan hücre ölçer)	30-31
BULGULAR	32-47
4.1. Sıçan utero-embriyonik dokulardaki immunohistokimyasal sonuçlar	33-37
4.2. İnsan plasentadaki western-blot ve immunohistokimya sonuçları	38-40
4.3. Gebelik esnasında periferel lökositlerdeki GLUT 1, GLUT 3 ve GLUT 4 proteinlerinin dağılımı	41-44
4.4. Hipoglisemik hastaların periferel lökositlerindeki flow sitometrik (akışkan hücre ölçer) ve immunohistokimya sonuçları	45-47
TARTIŞMA	48-54
SONUÇLAR	54-55
KAYNAKLAR	56-66
ÖZGEÇMİŞ	67

EKLER

- Ek 1.** Glucose transporter expression in rat embryo and uterus during decidualization, implantation, and early postimplantation.
- Ek 2.** From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta.
- Ek 3.** Physiological leukocytosis during pregnancy is associated with changes in glucose transporter expression of maternal peripheral blood granulocytes and monocytes.
- Ek 4.** Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

UDP	Uridin difosfat
SGLT	Sodyuma bağımlı glikoz taşıyıcıları
GLUT	Kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcıları (protein)
IUGR	Rahim içi büyüme geriliği
STZ	Streptozotosin
HCG	İnsan koryonik gonodotropin
PL	Plasental laktojen
FABP _{pm}	Plasma membran yağ asidi bağlanma proteini
FAT	Yağ asidi translokaz
FATP	Yağ asidi taşıyıcı proteini
FABP	Sitoplazmik yağ asidi bağlanma proteini ailesi
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
PBS	Fosfat tuz solusyonu
AEC	Amino Etil Karbozol
BSA	Sığır serum albumin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Glikoz taşıyıcı izoformunun şematize yapısı	5
Şekil 2. İnsan plasentası	11
Şekil 3. Sıçan embriyosu ve plasentası	13
Şekil 4. İnsan ve sıçan plasentasında materno-fetal dolaşım arasındaki trofoblast tabakaları	14
Şekil 5. Normal ve diabetik plasentada ki glikoz taşınımı ve metabolizmasının şematize şekli	16
Şekil 6. Blastosistlerdeki glikoz taşınım mekanizması ve bu mekanizmada rol alan glikoz taşıyıcı proteinler	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. GLUT ailesinin gen adı, kromozom lokalizasyonu ve
bulunduğu doku, hücreleri gösteren özet tablo.

9

GİRİŞ ve AMAÇ

Glikoz, memeli dokuların en önemli yakıtı olup fetüsün başlıca enerji kaynağıdır. Glikoz'un hücrel hemostaz ve metabolizmadaki önemli rolünün anlaşılmasından sonra, memeli hücrelerinde, plasma membranından glikoz taşınması, en önemli besin taşınma olaylarından biri olarak kabul edilmektedir. Memeli hücrelerinin plasma membranlarında glikoz taşınımının basit diffüzyonla gerçekleşmesini sağlayan bir sisteme sahip olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, glikoz taşınmasını hızlandıran, glikoz taşıyıcı proteinleri, glikozun hücre plasma membranından geçmesini kolaylaştırarak, glikozun hücrenin içine geçişini sağlamaktadırlar. Bu taşıyıcılar, glikoza karşı özgündürler ve enerji ihtiyacı olan herhangi bir elemana bağımlı değildirler.

Günümüze kadar üreme biyolojisiyle ilgili olarak kolaylaştırılmış glikoz taşınımıyla ilgili çalışmalar üç noktada odaklanmıştır. Birincisi plasentadaki kolaylaştırılmış glikoz taşınımı, ikincisi ise genellikle in vivo olarak embriyolardaki glikoz taşınımı ve son olarak da organogenez esnasındaki kolaylaştırılmış glikoz taşınımıyla ilgili çalışmalardır.

Gebelik başlangıcında ve daha sonraki evrelerinde embriyonun sağlıklı gelişmesinin materno-fetal ilişkideki sağlıklı düzene bağlı olduğunu biliyoruz. Preimplantasyondan terme kadar embriyo ihtiyacı olan enerji kaynaklarının belli taşıyıcılar tarafından taşınması kaçınılmazdır. Bu taşıyıcıların kimliği, dağılımı ve düzeni araştırmamızın konusunu oluşturdu. Bunun için feto-maternal glikoz taşınımında önemli roller üstlenen GLUT 1,3,4 proteinlerinin insan plasentasında, sıçan fetal ve maternal dokularında, normal, gebe ve hipoglisemik insan periferik lökositlerinde dağılımı ve düzenlenmesini içeren bir seri parametreler araştırıldı.

Bu çalışmamızın amacı, immunohistokimyasal ve moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak insan plasentasında, insan periferik kan hücrelerinde ve sıçan utero-embriyonik örneklerde sodyumdan bağımsız glikoz taşıyıcı proteinlerinden 1, 3 ve 4 in dağılımını araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Karbonhidrat Metabolizması

Organizmalar, hayati işlevlerini sürdürmek için çevrelerinden enerji gereksinimlerini temin etmek zorundadırlar. İnsanlar, hayvan ve bitki dokularının içinde yaygın bir şekilde bulunan karbonhidratlardan, günlük enerji ihtiyacının yaklaşık yarısını temin ederler. Organizmaya giren karbonhidratlar glikoza çevrilmekte ve enerji gereksinimi olmadığı durumlarda fazla glikoz, glikojen olarak depolanmaktadır.

Bitkilerde glikoz, fotosentez aracılığı ile meydana getirilir. Devamında ise ya nişasta şeklinde depolanır yada sellüloza çevrilir. Hayvanlarda, glikoz kaynağı ise karbonhidratlar ile birlikte yağ ve proteinlerdir.

Glikozdan, glikojen sentezi olayı "glikojenez", glikojenin yıkılıp tekrar glikoz haline dönüşmesi olayı ise "glikojeneoliz" olarak isimlendirilmektedir. Glikojeneoliz mekanizması kas ve karaciğerde yoğun olarak gerçekleşmektedir. Ayrıca karbonhidrat olmayan maddelerden glikoz sentezi ise "glikoneojenez" olarak adlandırılmakta ve glikoneojenez başlıca proteinlerden, yağlardan, karaciğer ve böbreklerde gerçekleşmektedir.

Diyetle alınan karbonhidratlar genelde polisakkarid, disakkarid veya çok az miktarda monosakkarid şeklindedir. Oysa karbonhidratların, bağırsaktan emilebilmeleri için, monosakkarid haline çevrilmeleri şarttır. Karbonhidratlar, tükürük ve pankreastan salgılanan α -amilaz ve ince bağırsaktaki hidrolitik enzimler aracılığıyla monosakkarid haline getirilir. Monosakkaridlerin ince bağırsaktan emilimleri için 3 yol mevcuttur.

a-Aktif taşıma ile

b-Taşıyıcı moleküllerle yürütülen kolaylaştırılmış diffüzyonla,

c-Basit diffüzyonla.

Bağırsaklardan emildikten sonra vena porta aracılığı ile sistemik dolaşıma katılan monosakkaridler (glikoz, galaktoz ve fruktoz) hücre düzeyinde sadece glikoz

üzerinden metabolize edilir. Fruktozun, glikoza dönüşümü bağırsak ve karaciğerde, galaktozun dönüşümü ise yalnızca karaciğerde gerçekleşir.

Glikoz temel olarak 3 kaynaktan elde edilmektedir

a) Yağ dokusundan:

İnsan vücudunun en büyük enerji kaynağı olarak bilinen yağ dokusundan glikoz elde edilir. 70 kg'lık bir kişi, ortalama 12 kg trigliseridi yağ dokusunda depolar ve bu miktardaki trigliserid yaklaşık 2 ay kadar bir süre için günde 2.000 k kal enerji temin eder (1). 1 gr glikojen 4 kcal enerji temin ederken, yağ dokusu g başına 9 k kal enerji temin etmektedir.

b) Proteinlerden:

Bir diğer glikoz kaynağı ise proteinlerdir. Proteinler, glikoneojenez için gerekli temel elemanların kaynağı olarak görev yapmaktadır (2). 70 kg bir insan organizması 6 kg protein içermekte ve bu da 24.000 kcal enerji potansiyeline karşılık gelmektedir. Proteinler, karaciğer ve böbreklerde "glikoneojenez" aracılığıyla glikoza dönüşür ancak temel değişim karaciğerde gerçekleşirken, renal "glikoneojenez" sadece uzun süreli açlıklarda ve asidoz oluştuğunda gerçekleşmektedir (3). İnsan vücudu, protein temin dinamizmini korumaya çalışır. Bazı durumlarda aşırı protein yıkımı, hücreyi ölüme sevk edebilir. Bu yüzden, uzun süreli açlıklarda, glikoz temini için protein yıkımından vazgeçilip, yağ ve ketonlar glikoz temini için kaynak olarak kullanılır. Bu şekilde normal glikoz temin mekanizmasının kaynağı değişir. Sürekli olarak enerji ihtiyacını serbest glikoz olarak temin eden beyin bile, uzun süreli açlıklarda keton ve başka kaynakları kullanmaya başlar. Glikozu temin eden bu temel kaynaklar, uzun süreli açlıklar esnasında, vücuttaki optimum (vasat) glisemiye sağlamaya, muhafaza etmeye çalışır (4).

c) Glikojenden:

Glikojen, glikozun depo formudur. 70 kg'lık bir insanın karaciğerinde 70gr, kaslarında ise 400gr glikojen mevcuttur. Karaciğerde depo edilen glikojen yıkımı sonucunda, beyin ve diğer nöronal dokulara glikoz temin edilir. Nöronal dokularda serbest glikoza gereksinim vardır. Kas glikojeni, glikozun lokal kaynağı olarak görev yapmaktadır. Kaslarda, glikoz-6-fosfotaz enziminin olmaması, kas glikojenini serbest glikoz haline dönüştürüp dolaşıma verememesine yol açar. Klasik olarak bilinen glikoz glikojen metabolizmasına ilaveten son yıllarda bulunan "otokatalitik" özelliğe sahip "glikojenin" proteini ile glikoz-glikojen metabolizması özetle şu şekilde ifade edilebilir. Glikojenin, otokatalitik olarak kendi Try-194 birimine, 8 glikoz birimi bağlar ve uranindifosfat (UDP) glikoz eşliğinde glikozillenir. Tam olarak glikozillenmiş olan glikojenin, proglikojenin için öncü molekülü oluşturur. Proglikojen öncüsü olan glikojenin, proglikojen sentaz, dal kırıcı

enzimler ve UDP glikoz aracılığıyla proglikojeni oluşturur. Bunu takiben de klasik glikojen sentaz ve dallandırıcı enzim aracılığı ile proglikojenden glikojen meydana gelir (5)

Açlık esnasında, glikojen fosforilaz enzimi, glikojen yıkımını başlatır ve ürün olarak glikoz-1- fosfatı oluşturur. Glikoz-1-fosfat, fosfoglukomataz aracılığıyla glikoz-6-fosfat'a dönüşür. Glikoz-6-fosfat ise glikoz-6-fosfataz aracılığıyla serbest glikoza dönüşür. Hücreye alınan glikoz, "Embden-Myerhof" glikolitik yolu aracılığıyla okside olarak enerji oluşmasını sağlar. Glikoliz tüm hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir ve 10 aşama içerir. Glikoliz sonucunda, 1 mol glikoz'dan, 2 mol ATP, 2mol NADH ve 2 mol piruvat oluşur. ATP hücresel enerji için kullanılır. Piruvat'ta anerobik glikoliz de laktata dönüşür. Laktat bir çok canlı için enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (4).

2.2 Glikoz taşınımı ve glikoz taşıyıcı proteinler

Canlıların kullandığı enerji genelde glikozun oksidasyonu sonucu kazanılır. Glikoz, basit bakterilerden ileri gelişme göstermiş (nöron gibi) memeli hücrelerinin metabolizması için çok önemli bir elemandır. Oksidatif ve oksidatif olmayan mekanizmalarla ATP üretimini sağlar. Ayrıca anabolik reaksiyonlar için, çok sayıda şeker içeren makro molekülleri içermektedir. Kan şekeri; glikoprotein, glikolipid ve nükleik asid gibi bir çok şeker içeren moleküllerin öncüsüdür. Kan şekeri metabolizması için ilk aşama glikozun plasma membranından taşınmasıdır. Glikozun plasma membranından taşınımı, glikoz taşıyıcıları adı verilen "taşıyıcı protein" ailesi tarafından gerçekleştirilir. (6,7)

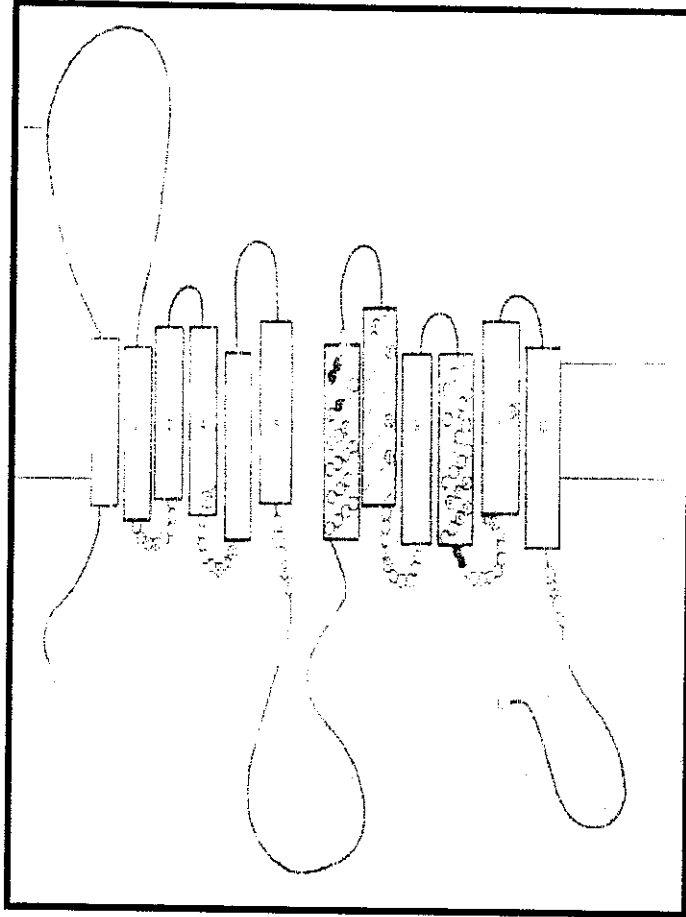
Memeli hücrelerinde iki tip glikoz taşıyıcı ailesi vardır.

1-Sodyuma bağımlı glikoz taşıyıcıları (SGLT) (aktif taşıma),

2-Kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcıları (GLUT) (kolaylaştırılmış basit taşıma) (6,7)

SGLT-1 taşıyıcı proteini, ince bağırsak hücrelerinin seroz katı tarafına yerleşmiş olup Na^+, K^+ -ATP az sistemine (sodyum pompası) bağımlı olarak çalışır ve bu sistemde glikozun, enerji harcanarak düşük yoğunluktaki barsak lümeninden yüksek yoğunluklu hücre içi ortama taşınımı gerçekleştirilir. Diğer yandan glikoz, GLUT proteinleri tarafından ATP kullanılmadan yoğunluk gradyeni boyunca taşınır. GLUT'ların en önemli görevi, kanda mevcut olan glikozun, hücre sitoplazmasına taşınmasını sağlamaktır. Bir çok memeli hücreindeki hücre içi düşük glikoz yoğunluğu, kolaylaştırılmış diffüzyonu mümkün kılar. Hücre içine alınan glikoz, heksokinaz ailesinin bir enzimi olan glikoz-6-fosfataz enzimi aracılığıyla hemen fosforile edilir. Bu işlem sonucunda kazanılan ATP hücreye gerekli enerjiyi sağlar (6,7).

Glikoz taşıyıcıları, membran proteinleri olup, glikozun membranlardan geçmesini 10 000 kez hızlandırmaktadırlar. Yaklaşık olarak 500 aminoasitten oluşmakta ve 12 adet membran segmenti şeklinde bir moleküler yapıya sahiptirler (Şekil 1) (8,9)



Şekil 1. Glikoz taşıyıcı izoformunun şematize yapısı. Plasma membranında 12 adet segmentli yapısı ile membran içi ve dışına katılan bölümleri görülmekte (9).

Glikoz taşıma sisteminde oluşan bir anormallik *diabetes mellitus*, rahim içi büyüme geriliği (IUGR), obezite gibi hastalıklara yol açabilir. Bundan dolayı, son yıllarda glikoz taşıyıcılarının anlaşılması için büyük emek sarf edilmektedir. Bu zaman esnasında belki de en önemli tespit, glikoz taşıyıcılarının çeşitli dokulara özgün olarak mevcut olmaları ile glikoz taşınmasının birbiriyle ilişkili bir aile tarafından yapılmakta olduğu ve bu glikoz taşıyıcılarının farklı genlerin ürünü olduğunun tespit edilmesidir (10).

Günümüze kadar 12 adet glikoz taşıyıcı protein (GLUT 1-12) varlığı tespit edilmiştir. Bu genetik çeşitliliğin gelişimi ve korunmasını açıkça göstermektedir. Şüphesiz ki yaşamın devamı için bu genetik çeşitlilik zorunludur. Glikoz taşıyıcı proteinleri farklı dokularda üretilmekte ve böylece her biri kan-şeker hemoztafinin düzenlenmesinde farklı roller oynamaktadırlar

2.2.1. GLUT-1

GLUT-1 yoğun bir şekilde üzerinde çalışılmış olan glikoz taşıyıcısı olup başlıca insan eritrosit membranlarında tespit edilmiştir. Eritrosit membran proteinlerinin yaklaşık % 3-5, GLUT-1 den ibarettir. 1980 yılının başında Baldwin ve arkadaşları (11) tarafından bu proteinin izole edilmesi, glikoz taşınım çalışmalarının ilerlemesini sağlamıştır. Bu saflaştırılan protein sayesinde GLUT-1 antikoruna elde edildi (12) ve 1985'te ilk kez GLUT 1 cDNA klonlanması insan hepatoma hücrelerinde yapıldı (13). İnsan GLUT 1 proteini, yaklaşık olarak % 97 oranında sıçan, fare, tavşan ve domuz GLUT 1 proteini ile homoloji göstermektedir. GLUT 1 genomik amino asit dizilimi, yaklaşık olarak 35 000 bp (baz çifti) den oluşmaktadır (13). GLUT 1, 55 kDa ağırlığında bir protein olup, dokularda oldukça yaygın olarak bulunmakta ve insülinle bağımsızdır (10,14,15). GLUT 1, en fazla beyinde, kan-beyin bariyerinde, plasental bariyerde ve retina da bol miktarda varlığı gözlenmiştir (14). Bu taşıyıcı aracılığıyla glikoz hızlıca beyine taşınmaktadır. GLUT 1 taşınımı kan-şeker hemostazini içeren diğer bazı dokularda da tespit edilmiştir (16).

2.2.2. GLUT-2

GLUT 1 in oldukça az miktarda hepatosit membranlarında tespit edilmesiyle glikoz taşıyıcı kinetiğinin hepatositlerde, eritrositlere göre farklı olduğu, farklı bir glikoz taşıyıcısı tarafından gerçekleştirildiği ileri sürüldü (17). Bu taşıyıcının varlığı birbirlerinden bağımsız olarak Thorens ve arkadaşları (18), Fukumoto ve arkadaşları (19) tarafından, karaciğer hücrelerinden GLUT-2 cDNA'si izole edilmesiyle tespit edildi. GLUT 2'nin, GLUT 1 ile büyük bir oranda homoloji gösterdiği görüldü. GLUT 2 karaciğerde, pankreas beta hücrelerinde oldukça çok miktarda mevcut iken, pankreasın alfa ve gama hücrelerinde mevcut değildir. Ayrıca, böbreğin proksimal tübüllerinde ve ince bağırsak epitelinde de mevcuttur (20,21). İnce bağırsak ve böbreklerde glikoz taşınımı iki basamak içerir. İnce bağırsağın lümeninden apikal membrana, yoğunluk gradyanına karşı SGLT ler aracılığıyla aktif glikoz taşınımı yapılır (21) ve bazolateral kenardaki yüksek miktardaki GLUT-2 aracılığıyla da basit difüzyonu gerçekleşir. GLUT 2, İnsülinle bağımsız olup düşük affiniteli bir taşıyıcıdır ve yüksek plazma-glikoz düzeyinde bile kolayca doyuma ulaşmaz. Kan glikoz yoğunluğu arttığında, beta hücrelerine çok fazla glikoz girmektedir. Beta hücreleri buna karşılık insülin sekresyonu yapmaktadır. Hepatositler ise, artan plazma glikoz seviyesine karşılık hepatik glikoz üretimini azaltırlar. Glikozun beta hücrelerinden veya hepatositlerden uzaklaştırılmasında insülinin etkisinin olmadığı ve bu hücrelerin glikoz alımı, plazma glikoz seviyesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (22,23).

2.2.3. GLUT-3

GLUT 3, 48 kDa ağırlığında bir protein olup, insan ve sıçan dokularında oldukça yoğun olarak bulunur (16). GLUT 3, glikoz için oldukça düşük bir K_m 'ye sahip olup glikoza karşı affinitesi yüksektir. Nöron gibi enerji ihtiyacı yüksek olan hücrelerin glikoz alımından sorumludur (6). GLUT 3 ilk olarak Northern-Blot analizleri sonucunda mRNA düzeyinde, erişkin iskelet kasında, yoğun olarak beyinde, beyindeki miktarının %50 oranında plasentada, az miktarda böbrek ve

karaciğerde bulunduğu rapor edildi (24,25). Fakat GLUT 3 antikorlarının elde edilmesiyle, protein düzeyinde sadece beyin ve sinir hücreleri dizilerinde sınırlı kaldığı görüldü GLUT 3 protein üretim düzeyi, genel olarak yüksek glikoz ihtiyacı olan beyin, plasenta gibi organlarda olması, bu izoformun GLUT 1 ile karşılıklı olarak birbirlerini görev olarak tamamlayabilecekleri, yardımlaşabilecekleri ileri sürülmüştür (9). Glut-3' ün de insülinden bağımsız olması, beyinde fazla yerleşimi ve glikoza en fazla affinite gösteren bir taşıyıcı olması GLUT 1 ile bir görev paralellliğini gösterir (26)

2.2.4. GLUT-4

Bu izoform sadece kas ve yağ dokusunda gözlenir. Sıçan adipoz hücreleri hücre kültürü ortamında, ortama insülinün eklenmesiyle, yaklaşık 20-30 kat daha fazla glikoz taşınımı yaptıkları tespit edildi (27, 28, 29). İnsan adipoz hücrelerinin de insüline karşı cevapları aynıdır ve yaklaşık olarak insülin eşliğinde 2-4 kat daha fazla glikoz taşınımını gerçekleştirirler (30). İnsülin, sıçan kasında 7 kat (31) glikoz taşınım aktivitesini artırırken, insan kasında sadece 2 kat (32) arttırmaktadır. İnsülin, insüline duyarlı dokularda glikoz alımı esnasında hücre içi vesiküllerde mevcut olan GLUT 4 ün artışına sebep olarak glikoz alımını sitümüle etmektedir GLUT 4 insüline bağımlı olup, esas olarak membranlarda lokalizedir. Bu yüzden kas ve yağ dokusundaki glikoz alınımında plazma insülin düzeyinin 10 kat arttığı gözlenir ve diğer yandan da paralel olarak GLUT 4 üretim miktarı artar (26,33).

2.2.5. GLUT-5

Northern-Blot analizleriyle GLUT 5 'in ince bağırsakta yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir (34) Spesifik anti-peptid antikorları da benzer sonuçları vermiş ve protein olarak incebağırsağın lüminal epitel hücrelerinin apikal uçlarında lokalize oldukları gösterilmiştir (35). İnce bağırsakta glikozun, lümen epitel hücrelerine, öncelikle Na⁺ bağımlı glikoz taşıyıcılarıyla taşınımı tespit edilmesinden sonra, Na⁺ dan bağımsız olarak kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcılarından biri olan GLUT 5 in ince bağırsaktaki varlığı kolay açıklanamadı. Ancak çalışmalar sonucunda GLUT 5 in yüksek affiniteli bir fruktoz taşıyıcısı olması ve düşük düzeyde glikoz taşıyıcı kabiliyetine sahip olmasıyla ince bağırsaktaki mevcudiyeti açıklandı (36) GLUT 5'in, ince bağırsak lüminal yüzeyindeki primer rolü, fruktoz alımı ve taşınımıdır. Northern ve immuno blot analizleri ile bu proteinin kaslarda, beyin ve yağ dokusunda da az miktarda bulunduğu gösterildi (34)

2.2.6. GLUT 6

Kayano ve arkadaşları (34) tarafından GLUT 6 cDNA si elde edilmiş, fakat bu cDNA da birden çok "stop" kodonunun varlığı ve fonksiyonel glikoz taşıyıcısı son kodonunun olmaması tartışma yarattı ve bunun bir "psödogen" olduğu anlaşıldı. Yapılan son çalışmalar sonucunda farklı bir glikoz taşıyıcı protein bulunup GLUT 6 olarak tekrar isimlendirildi İnsan GLUT 6 mRNA'sı özellikle beyin, dalak ve periferik lökositlerde mevcut olduğu bildirildi (37)

2.2.7. GLUT 7

Karaciğerde glikoz, "glikojenez" ve "glikojenoliz" mekanizmaları ile kana verilmektedir. Her iki mekanizmada da terminal aşama, çok kompleks bir enzim olan glikoz-6-fosfatazdır. Glikoz-6-fosfataz, spesifik bir fosfotaz olup, reaksiyonunun sonucu olarak glikoz üretilmekte ve bu fosfataz endoplazmik retikulum lümenini kuşatmakta böylece, karaciğerde glikoz üretimi ilk önce endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir. Waddell ve arkadaşları (38), GLUT 7 olarak isimlendirilen basit diffüzyon glikoz taşıyıcısı aracılığıyla, glikozun endoplazmik retikulum membranına geçtiğini göstermişlerdir. GLUT-2 ile aminoasid düzeyinde % 68 benzerlik olduğu gösterilen GLUT 7'in GLUT 2 den en önemli farkı, GLUT 7 in C-terminalindeki 6 aminoasidlik dizilimidir (38). Tüm bunlara rağmen son yapılan çalışmalar sonucunda GLUT 7'nin klonlama hatası olabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır (39).

2.2.8. GLUT 8

İnsan ve farelerde GLUT 8 cDNA'ları iki ayrı grup tarafından (40, 41) izole edildikten sonra mRNA'sı öncelikle bol miktarda testis'de, daha az miktarda ise, insüline duyarlı dokularda, örneğin kalp ve iskelet kasında varlıkları gösterildi (40, 41). Ayrıca GLUT 8 mRNA'sı ve proteininin preimplantasyon aşamasındaki embriyoda, beyinde piramidal nöronlarda ve dentat girusda ki granüllü nöronlarda belirlendi (42). Streptozotosin (STZ) ile deneysel olarak oluşturulan diyabetik sıçanların beyinde GLUT 8 mRNA ve protein düzeyinde bir artışın olduğu gözlemlendi (43). Bazı araştırmacılara (42) göre GLUT 8 in GLUT 4 gibi insülin tarafından düzenlendiği ileri sürülmektedir.

2.2.9. GLUT 9

İnsan GLUT 9 cDNA'sı Phay ve arkadaşları (44) tarafından 2000 yılında izole edildi ve fruktoz taşıyıcısı GLUT-5 ile yüksek oranda homoloji gösterdiği rapor edildi. GLUT 9, 46-48 kDa civarında bir protein olup, öncelikle karaciğer ve böbrekte yoğun olarak bulunmaktadır. mRNA düzeyinde yapılan çalışmalarla az miktarda ince bağırsak, plasenta, akciğer ve lökositlerde mevcut olduğu tespit edilmiştir (44). Günümüze kadar GLUT 9 un glikoz taşıma aktivitesi hakkında herhangi bir bilgi yoktur.

2.2.10. GLUT10

GLUT 10, protein düzeyinde yoğun olarak karaciğer ve pankreas'da bulunurken, GLUT 10 mRNA'sı az miktarda kalp, plasenta, iskelet kası ve böbrekte bulunmuştur. GLUT 10' un amino asid dizilimleri, GLUT 8 ile oldukça yüksek oranda homoloji göstermektedir. GLUT-10'un taşıma aktivitesi hakkında bugüne kadar bir bilgi mevcut değildir (45).

2.2.11. GLUT 11

İnsan GLUT 11 cDNA'sı, Doege ve arkadaşları (46) tarafından 2001 yılında izole edildi GLUT 11, insan fruktoz taşıyıcısı GLUT 5 ile % 41,9 oranında amino asid düzeyinde homoloji göstermektedir. GLUT 11 mRNA'sı, kalp ve iskelet kasında tespit edilmesine karşın proteini sadece insan kalbinde belirlenmiştir GLUT 11'in glikoz taşınımında, hormonal düzenlenmesi ve hücrel lokalizasyonu hakkında bilgi çok azdır (39).

2.2.12. GLUT 12

GLUT 12 cDNA' sı göğüs kanser hücrelerinde, kalp ve prostat dokularında üretimleri gösterildi (39). GLUT proteinlerinin gen kodları, lokalizasyonları tablo 1 halinde aşağıda özetlendi

Protein	Gen adı	Kromozom lokalizasyonu	Bulunduğu doku,hücre
GLUT 1	SLC2A1	1P35-31.3 (47.7 MB)	eritrosit,beyin (vasküler)
GLUT 2	SLC2A2	3q26.2-27 (186.9 MB)	karaciğer, pankreas
GLUT 3	SLC2A3	12p13.3 (8.1 MB)	beyin (nöronal)
GLUT 4	SLC2A4	17p12 (8.4)	kas, yağ, kalp
GLUT 5	SLC2A5	1p36.2 (8.3 MB)	ince bağırsak, testis, böbrek
GLUT 6	SLC2A6	9q34 (136.5 MB)	dalak, lökosit, beyin
GLUT 7	SLC2A7	1p36.2 (8.2 MB)	bilinmiyor
GLUT 8	SLC2A8	9 (129.9 MB)	testis, blastosist, beyin
GLUT 9	SLC2A9	4p 15.3-16 (10.2 MB)	karaciğer, böbrek
GLUT 10	SLC2A10	20q12-13.1(47.3 MB)	karaciğer, pankreas
GLUT 11	SLC2A11	22q11.2 (20.8 MB)	kalp, kas
GLUT 12	SLC2A12	6q23.2 (145.5 MB)	kalp, prostat

Tablo 1. GLUT ailesinin gen adı, kromozom lokalizasyonu ve bulunduğu doku, hücreleri gösteren özet tablo (39)

2.3. İnsan plasenta morfolojisi ve fizyolojisi

Plasental morfoloji, maternal-fetal ilişkiyi düzenlemek, madde ve gaz taşınımını kolaylaştırmak için en iyi şekilde özelleşmiştir. Fetüs/plasenta yapı oranı 6:1 dir. Plasenta, diğer organlarla kıyaslandığında, plasentanın tüm fonksiyonel kapasitesi ile çalışmadığı düşünülebilir. Çünkü kompleks yapısıyla üstlendiği görev sınırlı bir yaşam süresiyle orantılıdır. Bir yandan endokrin görevi üstlenirken diğer yandan fetüs için gerekli olan tüm metabolitlerin alış verişini düzenler .

İnsan plasentası, blastosisti oluşturan iki tip hücreden biri olan trofoblast hücrelerinden gelişmektedir. İnsan plasentası; fetal (koryonik plak) ve maternal kısım (bazal plak) olmak üzere iki kısımdan oluşur.

Koryonik plak; amnion epiteli, amnionik mesoderm, koryonik mesoderm, proliferen olan kök trofoblast hücreleri, Langhans fibronoidi ve Langhans fibronoidine invaze olmuş trofoblast hücreleri ve sinsisyotrofoblastlardan oluşmaktadır.

Bazal plak ise, ekstrasillöz trofoblast, endometriyal stroma, fibronoid ve maternal kan damarlarından oluşmaktadır.

Plasentanın temel görevleri belli başlıklar altında özetlenebilir.

-Fetüs'ün yaşamını devam ettirmesi ve büyümesi için maternal besinleri modifiye ederek fetüse tahsis eder.

-Fetüsdeki metabolik artık ürünlerin maternal dolaşıma taşınımını sağlar.
-Gebeliğin devamı ve embriyonun gelişimi için hormon sentezler [insan koryonik gonadotropin (hCG), plasental laktojen (PL), östrojen ve progesteron].

-Anne ile fetüs arasındaki gaz değişimini sağlar.

-Fetüs'e gerekli ısıyı sağlar.

-Fetüs'ü zararlı maddelerden korur (immünolojik bariyer yapısına sahiptir).

Bütün bu görevleri yerine getirebilmek için plasenta ihtiyacı olan enerjiyi sadece pasif taşınım ile sağlamayıp, basit kolaylaştırılmış taşıma mekanizmasını da kullanarak ihtiyacı olan enerjiyi temin eder.

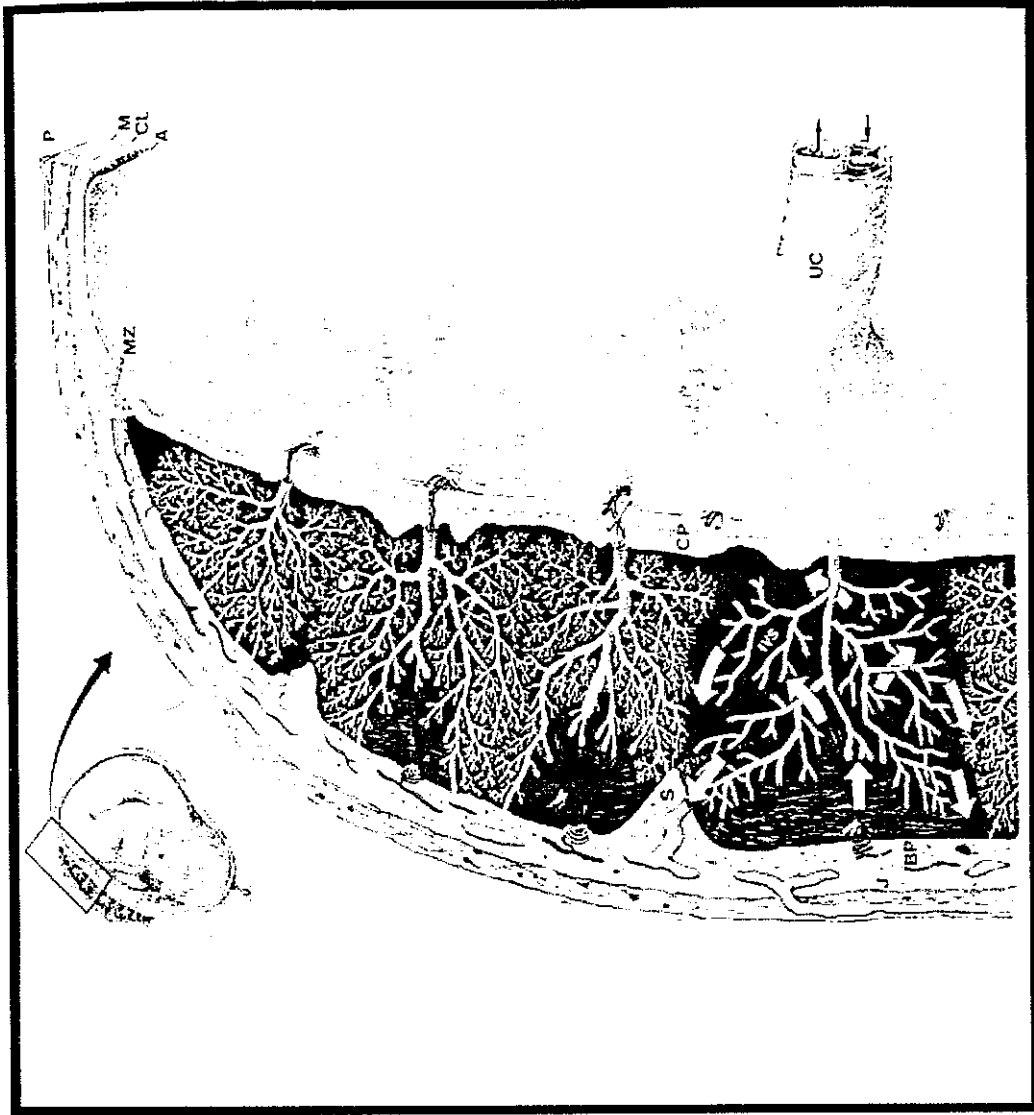
Fetal plasentanın esas yapısını oluşturan trofoblastın fonksiyonları özetle şu şekilde sıralanabilir.

1-İmplantasyon esnasında uterus duvarına invaze olurlar ve implantasyondan sonra da fetal plasentayı oluştururlar.

2-Besin ve metabolizma artıklarının taşınımında ve metabolizmasında görevlidirler.

3-Maternal immün sistemin cevabında rol oynarlar.

4-Sitokin ve hormon üretiminde görevlidirler.



Şekil.2. İnsan plasentası UC; göbek kordunu, A; amnion, CP; koriyonik plak, BP; bazal Plak, CL, koriyon Leve, S; plasental septum, M; miyometriyum, P; perimetriyum, IVS; intervillös alan, MZ; plasenta ile fetal membranlar arasındaki marjinal kısım (47)

İnsan plasentası hemokoryal tipte olup anne kanı ile direkt trofoblast ilişkidir. Sinsisyotrofoblast hücreleri çok nükleuslu olup orijinleri olan sitotrofoblast hücrelerinin füzyonu ile oluşurlar Sinsisyotrofoblastların apikal yüzeyi maternal kan ile direkt olarak temas halindedir ve bundan dolayı materno-fetal taşınımında ve bu taşınımın düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Sinsisyotrofoblast hücreleri sadece taşıma bariyerinde görev almazlar, ayrıca hormon üretiminden de sorumludurlar (47,48,49) Sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast primer hücre kültür sistemleri, insan plasental çalışmalarında yararlı olabilir (50, 51) - Buna ilaveten bir çok in vitro karyokarsinoma hücre kültür modelleri, insan plasentası için iyi bir model teşkil etmekte ve bu karyokarsinoma hücre dizilerinden (BeWo, Jeg ve Jar) BeWo hücreleri, trofoblastların taşıma mekanizmalarını anlayabilmek için oldukça kullanışlıdır (52). Bu karyokarsinoma hücrelerinin her biri sitotrofoblast

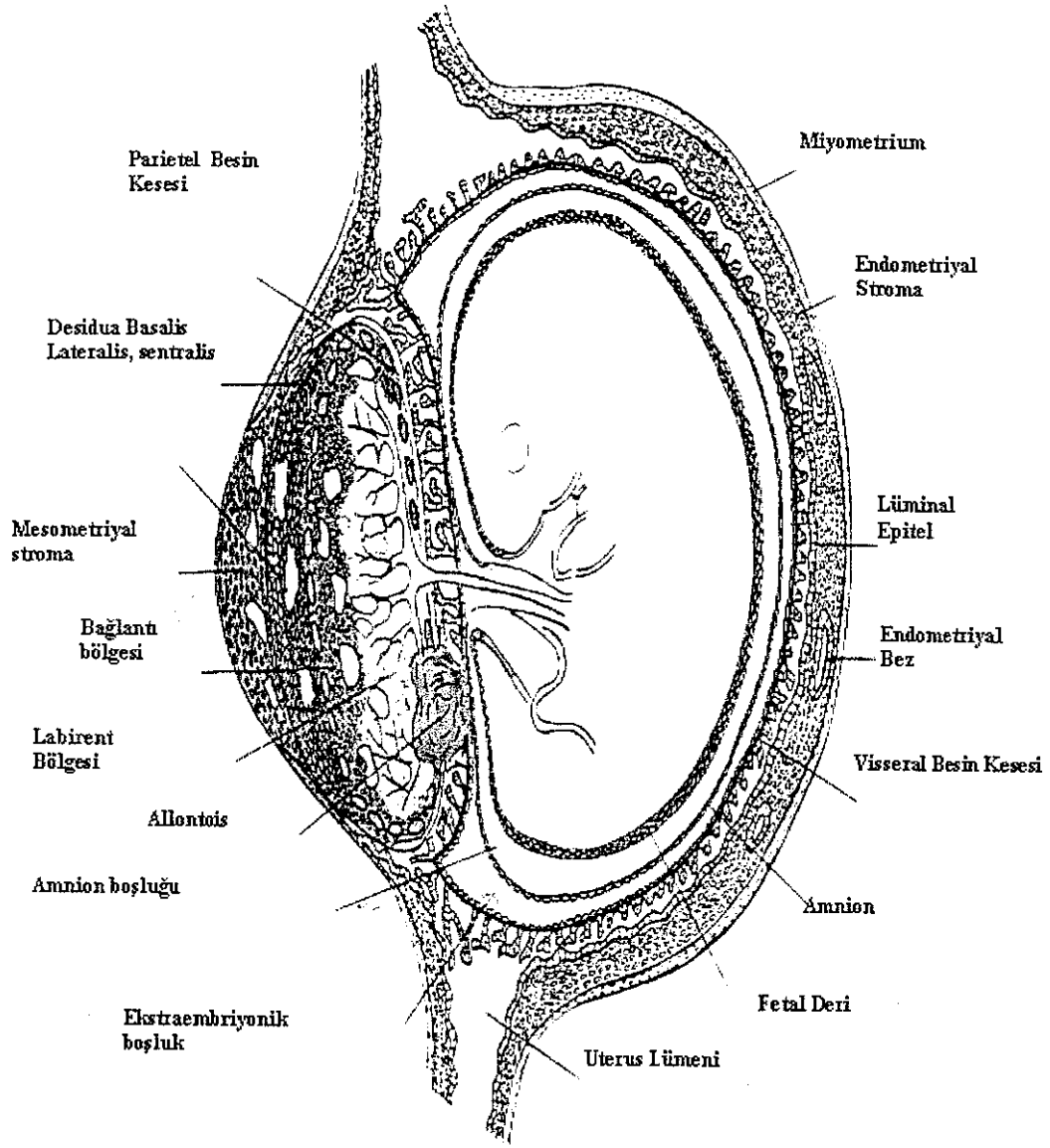
benzeri karakter gösterirler ve bir dereceye kadar sinsisyal trofoblast hücrelerine dönüşebilme özelliğine sahiptirler (52).

Plasenta, hem maternal hem de fetal etki altındadır. Anneyi gebeliğin değişik safhalarında, maternal metabolik adaptasyon şeklinde etkiler ve bu adaptasyonu fetüse yansıtır. Besin aracılığı ile gerçekleşen teratojenез fikri plasentayı anahtar bir organ yapmıştır. Çünkü plasenta maternal metabolik değişiklikleri fetüse iletir ve bu genelde fetüs için faydalıdır. Fakat bazen de bu metabolik değişimlerin iletilmesi kötü sonuçlar doğurabilir (53) Son yıllarda plasentaya olan ilginin artmasının nedenlerinden biri de, postnatal hayattaki hastalık insidansı ile fetal beslenme arasında bir ilişkinin tespit edilmiş olmasıdır (54).

2.4. Sıçan plasenta morfolojisi

Sıçanlarda plasenta, koriyo-vitellin ve koriyo-allontoik olmak üzere iki yapıdan oluşmuştur. Koriyo-vitellin plasenta, gebeliğin erken dönemlerinde gelişmektedir. Gebeliğin orta dönemlerinde koriyo-vitellin plasentadan, koriyo-allontoik plasenta gelişir. Koriyo-allontoik plasenta gebeliğin devam etmesinde ve fetüsün gelişiminin düzenlenmesinde daha etkilidir (55). Gebeliğin ilerlemesiyle birlikte koriyoallontoik plasenta morfolojisini değiştirir ve bölünerek fonksiyonel olarak junctional (bağlantı) ve labyrinth (labirent) kısımları oluşturur (55).

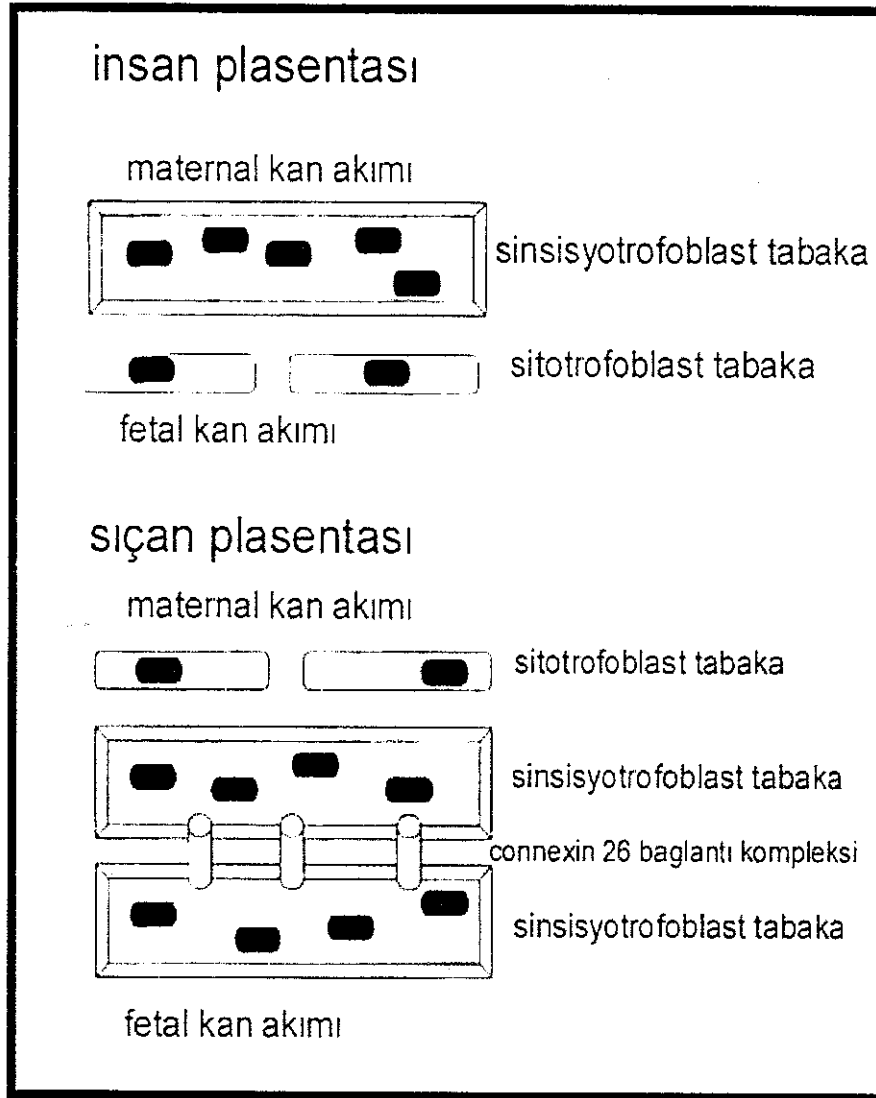
Bağlantı kısım, maternal ara yüzey şeklinde konumlanmıştır. Bu iki kısmın farklı görevleri vardır. Bağlantı kısım, endokrin ve invaziv görevleri yaparken, labirent kısım daha çok taşıma bariyeri ve anneden fetüse besin taşımını kontrolü ile ilişkilidir (55) (Şekil 3) (56)



Şekil 3 Sıçan embriyo ve plasentası (56).

Hem labirent hem de bağlantılı kısımları trofoblast hücrelerinden oluşmuştur. Labirent kısım, iki sinsisyal trofoblast hücre tabakasından (I ve II) ve tek bir sitotrofoblast hücre tabakasından oluşmuş olup hemotrikoryal plasenta yapısını oluştururlar.

İnsan plasentasının tersine sıçan plasentasında sitotrofoblastlar maternal kanla direkt temas halinde olup sitotrofoblast hücrelerinin altında ise connexin-26 proteini ile birbirlerine bağlanmış olan sinsisyal trofoblast I ve sinsisyal trofoblast II hücre tabakaları mevcuttur (Şekil 4) (57).



Şekil 4. İnsan ve siçan plasentasında materno-fetal dolaşım arasındaki trofoblast tabakaları (57)

Sinsisyal trofoblast tabakalarının altında ise fetal endotel hücreleri bulunmaktadır. Labirent kısmın sinsisyal trofoblast hücreleri besin taşınımını düzenledikleri gibi fetal artıkların plaseenta aracılığıyla maternal dolaşıma aktarımını sağlarlar (55). Siçan plasentası içinde bir çok in vitro model mevcuttur Bunlar HRP-1 ve Rcho-1 trofoblast hücre dizilerini de içeren bir çok hücre dizisidir (58). HRP-1 trofoblast hücre dizileri tamamen labirent hücre öncülerinin fenotipini taklit ederler. Oysa Rcho-1 trofoblast hücreleri ise bağlantı kısmın özelliğini sergilemekte ve bu hücreler dev hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. HRP-1 trofoblast hücreleri, kollajenlerle kaplanmış filtrelerde tek tabakalı olarak gelişebilmekte ve böylece plasentada ilaç ve besin taşınımını modelinin oluşumunda

kullanılabilmektedir. Recho-1 trofoblast hücreleri, daha çok endokrin ve invaziv görevleri içeren dev hücrelerdir (59)

Sıçan plasentasında yer alan hücreler ve görevleri:

Hücre tipi	Plasental konumu	Görevi
Dev hücre	Bağlantı kısmı, labirent kısım	Salgı, invazyon
Spongiotrofoblast	Bağlantı kısmı	Salgı
Glikojenik hücre	Bağlantı kısmı	Enerji depolama
Sinsisyal trofoblast	labirent kısım	Taşıma, bariyer oluşturma

2.5. Plasental Taşıma

Gebelikte anne-fetüs arasındaki metabolizma merkezi plasentadır. Placenta oldukça kompleks bir organ olup temel görevlerinden biri de materno-fetal taşımayı sağlamaktır. Plasentadan başlıca glikoz, amino asit, yağ asitleri, oksijen, vitamin ve minerallerin taşınımı gerçekleştirilir.

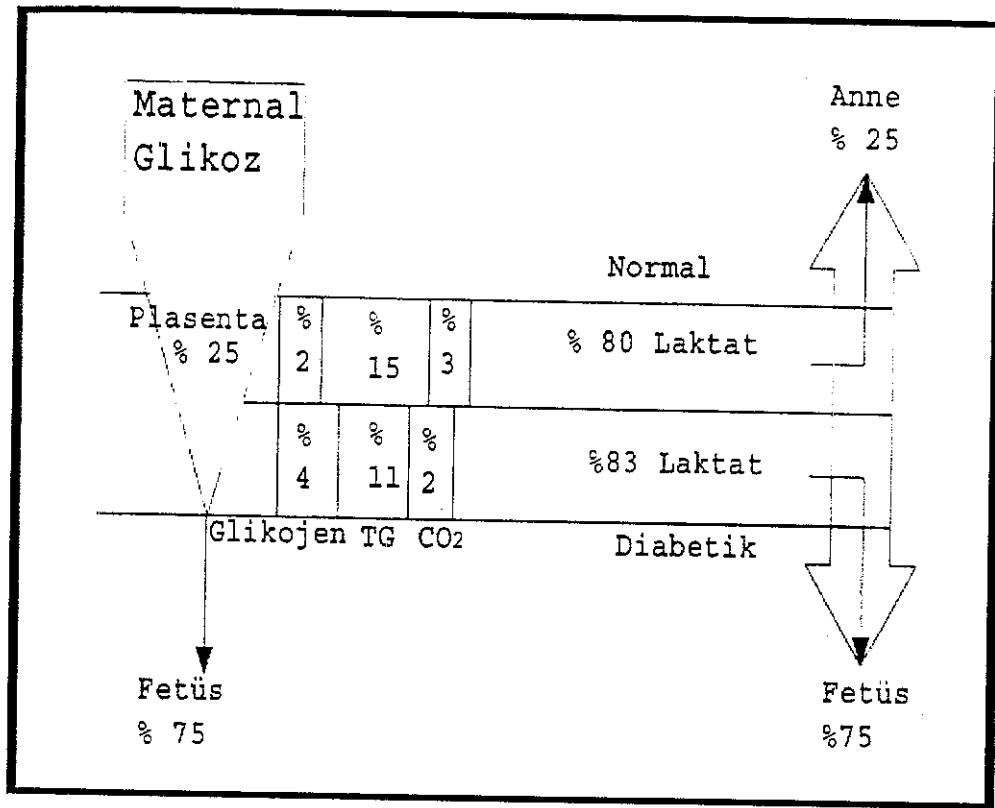
2.5.1 Plasental glikoz taşınımı

Placenta, hem kendi metabolizması hem de fetüsün ihtiyacı olan enerjiyi sağlamak için gerekli substratların geçişine izin vermektedir. Substratlar maternal dolaşımdan sağlanır. Anneden, fetüse plasental bariyerden geçiş gerçekleşmekte ve diğer yandan da fetüsten anneye de metabolik artık ürünlerin örneğin üre, bilirubin ve CO₂ gibi maddelerin taşınımı yapılmaktadır.

İnsan ve memeli plasentaları her ne kadar amino asit ve yağ asidi gibi substratları az da olsa enerji kaynağı olarak kullanabilseler de, esas olarak glikoza bağımlı dokulardır. Bu yüzden plasental glikoz alımı ve metabolizması çok önemli olup günümüze kadar tam olarak açıklanamamıştır (60)

Karbonhidrat metabolizması, özellikle glikoz, gebeliğin gelişimi esnasında fetal enerji ihtiyacının büyük bir bölümünü karşılamaktadır. İnsan fetal glikoz tüketimi fetüde ortalama dakikada 4-8 mg/kg'dir (61). İnsan fetüsü, plasentadan geçen maternal glikoza sürekli olarak bağımlıdır ve placenta, embriyoya fetal kg başına dakikada yaklaşık 6 mg glikoz transfer etmektedir (62). Fetal dolaşımdaki glikoz düzeyi yaklaşık 70mg/dL iken maternal kan glikoz düzeyi yaklaşık 100mg/dL'dir. Yoğunlukların bu şekilde olması anneden fetüse doğru basit ve kolaylaştırılmış diffüzyona izin vermektedir. Bir kaynağa göre maternal glikozun % 70, plasental taşımayla fetüse geçmekte geriye kalan % 30 maternal glikoz ise, plasental metabolizmada kullanılmaktadır. Plasental metabolizmadaki glikozun % 21 anaerobik glikolizisde, % 2 glikojen sentezinde ve % 7'side plasental pentoz

fosfat yolunda kullanılmaktadır (63). Memelilerde maternal glikozun % 75, plasentadan direkt olarak fetüse taşınımı yapılmakta, plasentada kalan % 25 glikozun ise % 80'i anaerobik glikolize uğrayarak laktata dönüşmekte, % 2 glikojen sentezinde, % 15 trigliserid sentezinde kullanılmakta ve % 3 de oksidasyon sonucunda karbondioksite dönüşmektedir. Oluşan Laktat in yine % 75 fetüse ve % 25 lik kısmı da maternal dolaşıma geri dönmektedir (Şekil 5) (64,65).



Şekil 5. Normal ve diabetik plasentada ki glikoz taşınımı ve metabolizmasının şematize şekli (TG; trigliserid, CO₂) (65)

Laktat bir çok fetal doku için mükemmel bir enerjidir Normal ve diabetik sıçanlarda glikoz ve laktat miktarı aşağıdaki tablo da gösterilmiştir (65)

	Kontrol	Diabetik
Maternal glikoz	5.5±0.5 mmol/L	19.7±0.2* mmol/L
Fetal glikoz	3.9±0.3 mmol/L	17.3±1.1* mmol/L
Maternal laktat	2.9±0.4 mmol/L	3.0±0.5 mmol/L
Fetal laktat	12.4±1.1 mmol/L	18.8±1.5* mmol/L

Tablo 2. Normal ve diabetik sıçanlarda gebeliğin 18. Günündeki plazma glikoz ve laktat miktarı. * istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı farklılık mevcut (P<0.01) (65).

Karbonhidrat taşınımıyla ilgili olarak en erken çalışmalardan biri plasental heksos taşınmasıdır. Eaton ve arkadaşları (66) perfüze edilmiş Gine domuzlarında trofoblastların aktif olarak heksos taşınımı yaptıklarını göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmalar, taşıyıcı protein aracılığı ile glikoz ve glikoz analoglarının transplasental taşınımı kolaylaştırdığını tespit etmişlerdir (67). Transplasental glikoz taşınımı, stereospesifik taşıyıcı aracılığı ile ve doyurucu mekanizmalarla gösterilmiştir (68).

2.5.1.1 İnsan ve sıçan plasentasında yer alan başlıca kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcı proteinler

Plasentada kolaylaştırılmış diffüzyon glikoz taşıyıcılarının mevcudiyeti uzun yıllardan beri bilinmesine rağmen, moleküler düzeyde bu taşıyıcı proteinlerin görevleri ve kinetikleri hakkında çok az şey biliniyordu. Bu taşıyıcı proteinlerin izoformlarına karşı özgün antikoların ve cDNA problemlerinin elde edilmesiyle glikoz taşıyıcıların, plasentadaki glikoz taşınımında ve düzenlenmesinde yeni bir dönem açılmıştır.

İlk çalışmalarda basit diffüzyonla birlikte taşıyıcı aracılığıyla gerçekleşen basamakların varlığı gösterilmiştir (69). İn vitro perfüzyon metotlarını içeren çalışmalar sonucunda ise sadece taşıyıcı aracılığıyla glikoz transferinin gerçekleşmediği bununla birlikte bu taşınımın seçici ve stereospesifik özelliklere de sahip olduğu tespit edildi (70). Gelişen tekniklerin ilerlemesiyle sinsisyotrofoblast bazal membranlarında ve mikrovillüslerin purifiye olarak elde edilmesiyle bu çalışmalar daha da ilerleyip D-glikoz taşınımının hem mikrovillüs hem de basal membranda aynı karakteristiğe sahip olduğu tespit edilmiştir (71).

Plasentada glikoz alımı birincil olarak GLUT 1 ile gerçekleşmekte ve GLUT 3 de GLUT 1 in tamamlayıcısı, yardımcı görevini üstleniyor gözükmektedir. Plasentada yer alan diğer bir glikoz taşıyıcı izoformu, son yıllardaki çalışmalar sonucu tespit edilmiş olup sentez düzeyi az da olsa GLUT 4 tür.

2.1.5.2 İnsan plasentasındaki GLUT 1 dağılımı ve fonksiyonu

GLUT 1 mRNA'sı insan plasentasında hem sitotrofoblastlarda hem de sinsisyotrofoblast hücrelerinde oldukça bol üretilir (15). GLUT 1 proteini plasental villüslerdeki sinsisyal trofoblast hücrelerinin hem apikal hem de basal plazma membranlarında farklı oranlarda mevcuttur (72,73). Bu bulgu, glikoz taşınımının normal şartlar altında anneden fetüse doğru olduğunu desteklemektedir. GLUT 1 tek yönlü taşıyıcı olmasından dolayı maternal hipoglisemi esnasında fetüsten anneye glikoz geçişini önlemekte ve böylece fetüsü korucu bir mekanizmaya sahip olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca hiperglisemik şartlar altında trofoblast hücre kültüründe GLUT1 üretiminin azalarak düzenlendiği, böylece maternal dolaşımdan glikoz taşınımının sınırlanarak ve yüksek glikoz varlığında GLUT1 azalarak düzenlendiği, sonuçta normal fetal gelişimin kontrolü için bir koruyucu mekanizma oluşturabileceği hipotezi kurulmuştur (74). Plasental fetal endotel hücrelerinde de GLUT 1 üretimi tespit edilmiş ve GLUT 1 in fetüse glikoz sağlamada direkt olarak da etkili olduğu bilinmektedir.

2.5.1.3 Sıçan plasentasındaki GLUT 1 dağılımı ve fonksiyonu

GLUT 1 sıçan koriyoallontoik plasentada hem bağlantı kısmında hemde labirent kısımda oldukça yoğun olarak bulunmaktadır (75). Bağlantı kısmının da GLUT 1 üretimi gebeliğin orta döneminde oldukça yüksek iken gebeliğin sonuna doğru azalmaktadır (76). Gebeliğin orta döneminde GLUT 1 in labirent kısmın hem maternal hem de fetal membranlarda oldukça yoğun olarak sinsisyal trofoblast tabaka I ve tabaka II 'de üretimleri tespit edildi (77). GLUT 1'in bu şekilde dağılımı nedeniyle transplasental taşınmada temel taşıyıcı olduğuna bir işarettir. Ekstrasellüler glikoz yoğunluğu, plasental GLUT 1 üretiminde zaman ve yoğunluk ihtiyacına bağlı olarak olumlu bir şekilde düzenlenmektedir (78).

2.5.1.4. İnsan plasentasındaki GLUT- 3 dağılımı ve fonksiyonu

Plasentadaki GLUT 3 mRNA düzeyi erken gebelikte oldukça yüksek olup 2.trimester esnasında ve 3 trimester de azalmaktadır (79). In situ hibridizasyon çalışmaları sonucunda sinsisyotrofoblast hücreleri için GLUT 1 in GLUT 3'e göre daha çok olduğu tespit edilmiştir (80). GLUT 3 protein düzeyinin, beyine göre plasentada çok az miktarda olduğu görülmüştür (81). GLUT 3 kinetik özelliklerine göre sinsisyotrofoblastlarda mevcut olması çelişkili olup term plasentasındaki villüslerde de tespit edilememiştir (82). GLUT 3 ekstrasellüler dokularda, öncelikle amnion epitelinde, fetal membranların sitotrofoblast hücrelerinde bulunmuştur (83). Jar koriyokarsinom hücre dizilerinde, GLUT 3 mRNA üretiminin differansiyasyona bağlı olması (84), proliferatif Jar hücrelerinin yüksek düzeyde GLUT 3 sentez etmeleri ve differansiyasyon sonrasında GLUT 3 mRNA sını ve proteinin tespit edilememesi ilginçtir (84). Bu bulgular göstermiştir ki trofoblast hücrelerinin proliferasyonu esnasında metabolik glikoz ihtiyacının karşılanmasında GLUT 3 önemli olabilir (84). İnsanda GLUT 3 proteini üretiminin sinsisyal trofoblastlarda yokluğu ve in vitro olarak proliferasyon ve differansiyasyonla ilişkili olması, GLUT 3'ün gelişen fetüse glikoz taşınımında temel kolaylaştırıcı taşıyıcı proteinlerden bir tanesi olduğunu düşündürmektedir.

2.5.1.5. Sıçan plasentasındaki GLUT 3 dağılımı ve fonksiyonu

GLUT 3, yoğun olarak sıçan koriyoallontoik plasentada labirent kısmın maternal yüzeyinde sinsisyal trofoblast membranlarının apikal kısmında üretilir (85,86). GLUT 3 üretimi gebelik boyunca artmakta (64,76), fonksiyonel olarak da fetüsü maternal hipoglisemi ve hiperglisemiden koruduğu hipotezi ileri sürülmektedir (75).

Glikoz taşınımı yoğunluk gradyeni yönünde gerçekleşmekte ve maternal hipoglisemi esnasında glikoz, fetüsten anneye doğru hareket etmektedir. Böylece fetüs normoglisemiyi sağlamaktadır. Plasentada sadece labirent kısımda maternal yüzey membranlarında mevcut olan GLUT-3 ün Km değerinin düşük olması, fetüsten anneye glikoz geçişini oldukça yavaşlatır. Normoglisemik şartlarda, GLUT-1 in Km değeri GLUT-3 den büyük olduğundan dolayı glikoz taşınımı fetüse doğrudur (75).

Streptozotosin ile oluşturulmuş diabetik sıçanlarda plasental GLUT 3 mRNA ve protein düzeyi 4-5 kat artar (85). Buna tezat olarak GLUT-1 üretimi kontrol sıçanlarla mukayese edildiğinde relatif olarak hemen hemen tamamıyla değişmediği gözlenir. GLUT 3'ün sıçan plasentasında özellikle fetüsdeki normoglisemik şartların devam etmesi için kolaylaştırılmış glikoz taşıma mekanizmasında koruyucu rolü olduğu tespit edilmiştir (85).

2.5.1.6. İnsan ve sıçan plasentasındaki GLUT 4 dağılımı ve fonksiyonu

GLUT 4 ün plasentada üretilmediği (82) veya plasental villüs stromasında az miktarda GLUT 4 mRNA ve proteini içerdiği (87) ifade edilmesine karşın amniyon fibroblastlarında ve koriyonik plağın bağ dokusunda GLUT 4 üretildiği bildirilmiştir (83).

2.6. Plasental aminoasid taşınımı

Fetüste, protein yapımında görevli olan amino asitler, oksidatif enerji kaynağı ve metabolik değişim esnasında karbon ve nitrojen kaynağı olarak ta görev yaparlar (61). Plasental amino asid taşınımı enerji bağımlı bir olay olup buna aerobik metabolizma ve "glikoliziz" inhibitörleri engel olmak isterler (61). Placenta da amino asid taşınımı, taşıyıcı aracılığıyla olduğu tespit edilmiş ve yoğunluk gradyeni anneden fetüse doğru yükselip düşmektedir (88)

Tüm aminoasitler, 1. trimester esnasında zorunlu olarak plasentadan fetüse taşınmaktadır. Çünkü, fetal karaciğer aminoasit sentezini gerçekleştirememektedir. Plasental aminoasit gradyeni hem fetal hem de maternal plazma gradyeninden yüksektir. Bundan dolayı maternal plazma ile placenta arasında aktif taşıma gerçekleşirken, placenta ile fetal plazma arasında kolaylaştırılmış taşıma gerçekleşiyor olabilir. Aktif amino asid taşınımı hücre bariyerleri arasında gerçekleşmekte ve içerdikleri özel yükler ve Na^+ ya bağımlı bir çok farklı taşıma sistemi tarafından düzenlenmektedir (89,90)

2.6.1. Katyonik ve anyonik amino asid taşıyıcıları

Katyonik amino asid taşıyıcılarının arginin ve lizin gibi temel yan zincirlere sahip olan amino asidlere affinitesi vardır. Katyonik amino asid taşıyıcılarının büyük bir kısmının plasentada fonksiyonel olduğu tespit edilmiştir (91,92)

Sıçan koriyoallontoik plasentasında hem maternal hem de fetal membran yüzeylerinde farklı iki adet Na^+ 'dan bağımsız olan katyonik amino asid taşıyıcı sistemi bulunmuştur. Bu iki Na^+ katyonik amino asid taşınım sistemi birbirinden lösine olan farklı duyarlılıkları ile ayrılırlar. Lösine duyarlı katyonik amino asid taşıyıcılarının aktivitesi, hem maternal hem fetal membran yüzeylerinde gebelik yaşının artmasıyla birlikte artar (93,94). İnsan plasentasında özgün anyonik amino asid taşıyıcıları hakkında fazla bilgimiz yoktur. Sıçan plasentasında tespit edilmiş bazı taşıyıcılar gebeliğin 14. ile 20.günlerinde sıçan koriyoallontoik plasentasında Northern, Western Blot ve immünohistokimyasal analizleriyle tespit edilmiştir (95).

Bu sonuçlar ışığında spesifik katyonik ve anyonik amino asid taşınım proteinlerinin fetüste bir regülasyon mekanizması sağladığını göstermektedir.

2.6.2. Nötral amino asid taşıyıcıları

Plasentada genel olarak nötral amino asidler için 3 çeşit nötral amino asid taşıyıcı sistemi kabul edilmektedir (96). Bazı amino asid taşıyıcılarının hem nötral hem de katyonik amino asidleri taşıyabilme kapasiteleri vardır.

2.7. Plasental yağ asidi taşınımı

Temel yağ asitleri, temel besinler olup, fetüsün gelişimine büyük katkıda bulunurlar (97). Doymamış yağ asitleri içinde en önemli olanlar n-3 ve n-6 şeklinde sınıflandırılmış olanlardır. Fetüs plasentadan geçen temel yağ asitleri için maternal dolaşıma bağımlı olup bunların transferi büyük bir miktarda direkt olarak anneden fetüse doğrudur (98). Temel yağ asitleri, fosfolipid sentezini, miyelin biyosentezini, gangliyosidaz, glikolipoliz, spingiolipidlerin sentezini içermektedirler (98). Temel yağ asidlerinden n-3 ve n-6 serileri, prostoglandinler, prostosiklinler, lökotrienler, trombositler, elikosanolikler ve lipoksinlerin sentez ve hücre-hücre sinyallerinde rol alırlar (99). Yağ asidlerinin plasentadan taşınımı, fetal beyin gelişimi (97) fetal büyüme gelişimi, kardiyovasküler ve akciğer gelişimi için oldukça önemlidir (100). Yağ asidi taşınımı bir çok anahtar protein tarafından regüle edilmektedir. Regülasyonu sağlayan proteinler şunlardır; plasma membran yağ asidi bağlanma proteini (FABPpm), yağ asidi translokaz (FAT), yağ asidi taşıyıcı proteini (FATP) ve sitoplazmik yağ asidi bağlanma protein ailesi (FABP) olup FAT, FATP ve FABPpm plazma membranında yağ asidi taşıyıcıları olarak tanımlanmışlardır. (101).

2.8. Plasental oksijen taşınımı

Trofoblastlar maternal spiral arterlere invaze olarak ve bu arterlerin bir kısmını da bloke ederek embriyoya hem gerekli oksijeni temin ederler hem de embriyoyu maternal yüksek oksijen yoğunluğundan korurlar. Fetüse oksijen transferi maternal ve fetal oksijen basıncına bağlıdır. Fetal hemoglobinin oksijene olan yüksek affinitesinden dolayı embriyo, düşük plazma oksijen basıncına sahiptir ve maternal plazma oksijen düzeyinin de yüksek olması nedeniyle oksijenin taşınımı kolaylaştırılmış diffüzyonla gerçekleşmektedir (102).

2.9. Plasental vitamin ve mineral taşınımı

Plasentada taşınımı yapılan vitaminler arasında, lipide çözünenler ile suda çözünen vitaminler arasında büyük fark vardır. Lipide çözünenlerin oldukça az miktarda taşınmakta ve bunların göbek kordonundaki yoğunluğu çok düşüktür. Suda çözünebilenlerin taşınımı ise göbek kordonu plazma yoğunlukları, maternal kan yoğunluklarından fazla olduğu için aktif taşınım ile oldukça fazla miktarda gerçekleşmektedir. Vitamin C; aktif taşınım, Na/K ATPase bağımlı, plasentada sentezlenir. Thiamin (B1), Riboflavin, Niacin, Vitamin B6 vitaminlerinin taşınımı

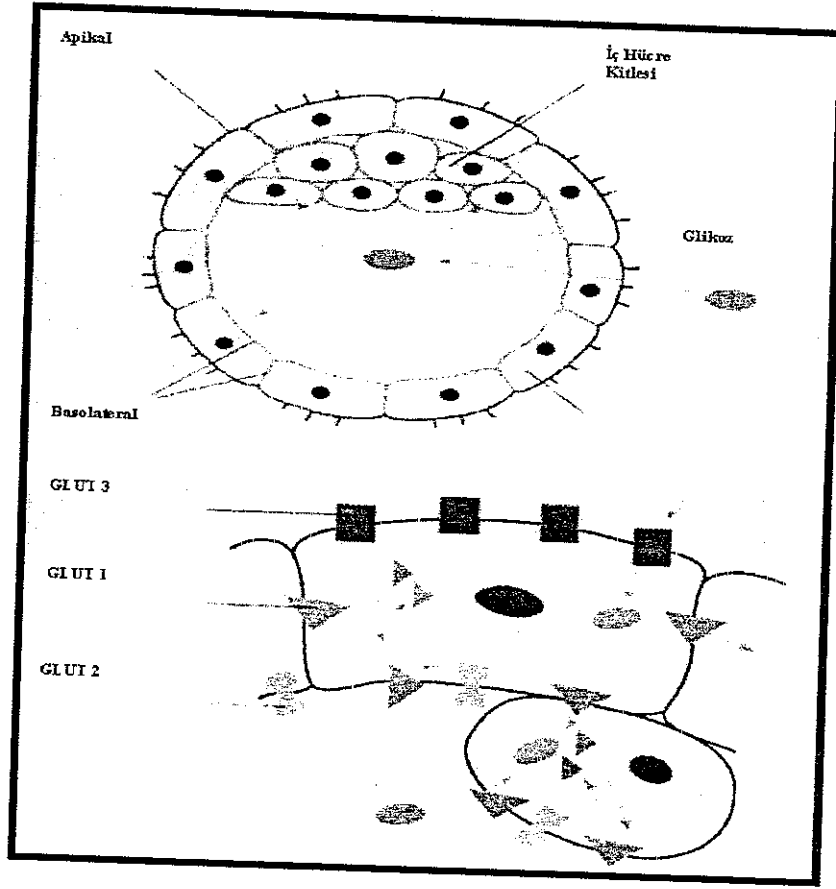
aktif taşıma ile gerçekleşmektedir. Vitamin B12 ise "transkobalamin" reseptör aracılığıyla, Vitamin A retinol bağlanma proteini ile endositoz yoluyla plasental taşınımı gerçekleşmektedir. Folik asid ve Vitamin D ise kolaylaştırılmış diffüzyon, Vitamin E, Vitamin K da pasif diffüzyonla plasental taşınımı gerçekleşmektedir (103). Kalsiyum, magnezyum ve demir aktif taşınma ile bakır ve nikel ise kolaylaştırılmış diffüzyonla plasental taşınımı yapılmaktadır (103).

2.10. Preimplante gelişim döneminde embriyodaki glikoz taşınımı

Bir çok canlı türünde embriyo, blastosist aşamasına kadar esas enerji kaynağı olan kendi glikozundan yararlanamaz. Blastosist aşamasına kadar olan evrede embriyo glikoz oksidasyonu ve glikoz taşıma sistemi için gerekli tüm imkanlara sahip olmasına rağmen enerjisini daha çok okside kaynaklardan örneğin pirüvat ve laktat'tan temin eder. Blastosist dönemine kadar embriyolarda pirüvata bağımlılık ve blastosist aşamasından itibaren metabolizmanın değişip glikozu enerji kaynağı olarak kullanmaya başlamasının mekanizması bugüne kadar tam olarak açıklanamamıştır. Blastosist aşamasından önceki dönemlerde glikoliz bloklanması, embriyoda fosfofruktokinaz aşamasının bloklanmasından kaynaklandığı ve embriyonun glikozdan faydalanamadığı ileri sürülmüştür (104). Hekzokinazlar ile glikoz alım aktivitesi arasında bir korelasyonun varlığı, blastosist öncesindeki dönemde hekzokinazların aktivitelerinin yeterli olmayışı ve bunun sonucunda fosfofruktokinaz için yeterli miktarda glikoz-6-fosfat üretilmemesi sonucunda "glikoliziz" bloklanmasına sebep olmaktadır (104). Diğer yandan, zigotta blastosist aşamasına kadar, glikoz yokluğunda, in vitro olarak embriyonun geliştiği ve bu dönemde enerji kaynağı olarak pirüvati kullandığı bir ölçüde tespit edilmiştir (105).

Tavşan blastosistinde yapılan immunogold çalışmalarında, GLUT 1, özellikle trofoektodermin basolateral membranlarında tespit edildi (106). GLUT 1 mRNA'si fare embriyolarında bütün preimplantasyon aşamalarında gösterildi. Diğer yandan 8 hücreli aşamada GLUT 2 mRNA'sı tespit edilirken GLUT 3 ve GLUT 4 tespit edilemedi (107). Tavşan embriyo çalışmalarının tersine farelerde yapılan immunoelektronmikroskopik çalışmalarda GLUT 1'in embriyoblastlarda ve trofoektodermin apikal ve basolateral membranları boyunca rastgele bir dağılım gösterdiği tespit edildi. GLUT 2 proteininin ise trofoektodermin basolateral ve blastosist boşluğuna bakan iç hücre kitlesi hücreleri membranlarında gözlenmesi (108) ilgi çekici idi. Blastosist evresinde glikozun 300 kat taşınma miktarının artmasına paralel olarak GLUT 1 üretiminin sadece 20 kat artması, GLUT 1'in trofoektodermin apikal membranlarında, maternal glikoz taşınımından sorumlu olmadığını göstermektedir (109). GLUT 2 ise GLUT 1'e göre daha yüksek bir Km değerine sahip olduğu için bu görevi yerine getiremez. GLUT 1 ancak basolateral bir taşıyıcı olarak kabul edilmektedir. Buna karşın blastosist glikoz taşınımına model olarak trofoektoderm epitelinin apikal kısmında mümkün olduğunca düşük Km değerine sahip bir taşıyıcıya ihtiyaç vardır. Aynı zamanda düşük uterin glikoz yoğunluğundan embriyoblastlara glikoz temin edebilmeli ve apikal kısımdan da embriyoblastlara glikozun taşınımını sağlayabilmelidir. Panteleon ve arkadaşları (110), GLUT 3'ü blastosistin apikal membranlarında, GLUT 1 ise trofoektodermin ve embriyoblastların basolateral membranlarında tespit etmişlerdir (Şekil 6) (111).

GLUT 3 ün oldukça düşük Km değerinin olması ayrıca glikoza karşı yüksek affinitesinin olması uterin sıvıda bulunan düşük düzeydeki glikoz yoğunluğunun taşınımı için idealdir. GLUT 1'in asimetrik bir kinetiğe sahip olduğu düşünüldüğünde embriyoblastlardan blastosit boşluğuna ve blastosit boşluğundan da embriyoblastlara doğru glikoz taşınması gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir (112) Kinetik özelliklerinin uygunluğuna göre apikalden GLUT 3 aracılığıyla alınmış olan glikoz, düşük affiniteli ve yüksek Km'ye sahip olan basolateraldeki GLUT 1 aracılığı ile blastosist boşluğuna verilebilir. Böylece blastosist boşluğunda rezerv haline gelen glikoz tekrar GLUT 1 tarafından geri alınıp embriyoblastlara taşınımı sağlanabilir (111)



Şekil 6: Blastosistlerdeki glikoz taşınım mekanizması ve bu mekanizmada rol alan glikoz taşıyıcı proteinler (111)

2.11. Gebelik esnasında plasental glikoz taşıyıcılarının fonksiyonu

Gebelik esnasında plasental glikoz taşınımıyla ilgili bilgiler birbiriyle ihtilafıdır. Plasental glikoz taşıyıcı izoformlarının lokalizasyonu ve üretimiyle ilgili mevcut bilgiler, bu taşıyıcıların çeşitli taşıma görevine sahip olduğu hipotezini desteklemektedir. Maternal-fetal glikoz taşınması, GLUT-1 aracılığıyla sinsisyotrofoblastların mikrovillüs ve basal membranlarında gerçekleşmektedir. GLUT-1, sinsisyotrofoblastların mikrovillüs membran yüzeyinde ve basal membran

yüzeyinde asimetrik olarak bulunmaktadır. Basal membran glikoz taşıyıcıları, trans-sinsisyal glikoz taşınmasını sınırlayan bir bariyer gibi görev yaparak normal kan akışının muhafaza edildiği şartlarda basal membrandaki glikoz taşıyıcıları, transplasental taşımaya sınırlayabilmektedirler (113). Böylece basal membran taşıma kapasitesi, mikrovillüs membran taşıma kapasitesinden çok daha düşük olmaktadır. Sonuçta, maternal kandaki glikoz düzeyi artarsa transplasental glikoz naklinde sınırlama olabilmektedir.

Diğer yandan plasental dokularda GLUT 1 proteininin mikrovillüs ve basal membranlardaki yoğunluğu gebeliğin 16-22, 27-30 ve 31-36 haftalarında ölçülmüş ve sonuçta gebelik haftaları arasında GLUT 1 için mikrovillüs membranlarında bir fark gözlenmemiştir (73). Ayrıca, in situ hibridizasyon çalışmalarında gebeliğin 16-22 haftaları ile term arasında GLUT-1 mRNA'sı bakımından bir fark görülmemekle birlikte basal membran fraksiyonlarında 16-22 ve 27-30 hafta periyodlarında ortalama iki kat taşıyıcı sentezi ve aktivitesi gözlenmiştir (80). Bu artış belki de term'e doğru plasental glikoz taşınımının artışından sorumlu olabilir Sakata ve arkadaşları (79) plasental GLUT 1 mRNA'sı için gebeliğin 7-10 ve 18-20 ve 38-40 haftaları arasında her iki grup ile term arasında mikrovillüs ve basal membran parçacıklarında % 50 artış olduğunu tespit etmişlerdir. Görüldüğü gibi çalışma sonuçları ihtilafıdır.

Diğer taraftan cevabı aranan başka bir soru ise, maternal ve fetal plazma yoğunlukları ile taşıma arasındaki bir ilişkinin olup olmadığıdır. Sinsisyotrofoblast, intrasellüler alana serbest glikoz geçmesini sağlayarak fonksiyonel olarak maternal ve fetal plazma yoğunluklarındaki değişikliğin normale dönmesi için bir bariyer gibi görev yapmaktadır. Bu şekilde maternal-fetal dolaşımdaki glikozun normal düzeyde kalmasını sağlar Sinsisyotrofoblast tarafından fazla miktarda alınan glikoz, heksokinazlar tarafından fosforile edilerek glikoz-6-fosfat tarafından da defosforile edilmektedir (114). Fakat bu mekanizma aşamalarının transplasental taşımaya etkisi bilinmemektedir.

Glikoz taşıyıcılarının mikrovillüslerdeki yüksek yoğunluğunun bir başka sonucu da intrasinsisyal glikoz yoğunluğunu, maternal plazma düzeyinde muhafaza etmektir. Böylece sinsisyotrofoblast ve fetal plazma arasındaki metabolik kayıplara rağmen en üst düzeyde gradiyent oluşturulur. Basal membran GLUT-1 üretimi veya aktivitesi transplasental glikoz taşınmasına, özellikle de gebelik gelişiminde ve diabetik gebeliklerde oldukça etkilidir. Sinsisyal glikoz taşıyıcı rolüne ilaveten GLUT 1'in endotelial GLUT 3'le birlikte anneden fetüse trans-sinsisyal glikoz taşınımında rol oynayabileceği hipotezi mevcuttur (87). GLUT 1'in endotelial hücrelerdeki sentezi ve rolünü Hahn ve arkadaşları (115) göstermiştir. Diğer taraftan plasental kapiller endotel tabakalarının geçirgenliği düşünüldüğünde, glikoz gibi küçük ağırlıklı moleküller için ne GLUT 3 nede GLUT 1'in bir rolünün olması ihtimal dahilinde değildir (116).

2.12. Rahim İçi Büyüme Geriliğinde (IUGR) glikoz taşıyıcıları

Fetal büyüme ve gelişim için glikoz çok önemli olmasına rağmen patolojik şartlar altında glikoz taşıyıcılarının faaliyeti ve sentezi hakkında çok az bilgi vardır. Term ve gebeliğin önceki haftalarında GLUT 1 için mikrovillüs ve basal membran örneklerinde IUGR olan fetüslerde bir farklılık görülmemiştir (73). IUGR'deki fetal plazma glikoz yoğunluğu anormalliği belki İnsülin benzeri büyüme faktör I (IGF-I) gibi faktörlerin, GLUT 1 üretimini değiştirmesi ile açıklanabilir. IUGR şartları altında plasental glikoz taşıyıcıları etkisiz olarak görülmektedir. Fakat yeterli sayıda ve homojen olarak IUGR örnekleri incelenmediğinden, GLUT 1 senteziyle ilgili olarak plasental glikoz taşıyıcılarının görevi hakkında yorum yapmak eksik kalabilir.

2.13. Diabetik gebeliklerde glikoz taşıyıcıları

Glikoz fetal oksidatif metabolizma için en önemli maddedir. İnsan fetüsü plasentadan geçen glikoza bağımlıdır (62). Çünkü embriyonun kendisinin glikoz üretimi çok düşüktür. Plasenta maternal dolaşımdan glikozu almakta ve bunun 3/4 ünün fetal dolaşıma taşınımı gerçekleştirmekte geri kalan 1/4 ünü de kendi metabolizması için kullanılmaktadır. Glikozun sadece maternal yönden fetal yöne taşınması gerçekleşmemekte aynı zamanda maternal hipoglisemik şartlarda fetal dolaşımdan maternal dolaşıma da geri taşınımı gerçekleşmektedir (117). Kolaylaştırılmış taşıma sistemi maternal glikozun plasentadan kolayca fetal dolaşıma geçmesini sağlar. Fakat bu durum diabetik gebeliklerde fetus için büyük bir risk yaratır. Çünkü, maternal hiperglisemi, fetal hiperglisemiye sebep olmaktadır. Fetal hiperglisemi sonucunda fetal insülin sekresyonu artmakta ve fetal büyümede anormallikler oluşmakta, makrosomi gelişmekte ve bir seri komplikasyonlar sonucunda gebelik son bulmaktadır. Bu yüzden transplasental glikoz taşınımı diabetojenik anomali gelişiminde oldukça önemli bir role sahiptir.

Plasental glikoz metabolizması diyabetlilerde açıkça maternal veya fetal hormonlar tarafından kontrol edilip edilmediği tartışmalıdır (118). Plasenta insülin için geçirgen değildir fakat oldukça fazla insülin reseptörüne sahiptir. Plasentadaki insülin etkisi daha tam olarak açıklanamamıştır. Gebelikteki, tip II diabet ve gebelik diabetinin plasental metabolizmaya etkisi hakkında hala çok az şey bilinmektedir. Plasental metabolik ve endokrin fonksiyonlar genel olarak hayvan deneylerinde STZ ile yapılan çalışmalarla açıklanmaya çalışılmıştır (119).

Maternal-fetal glikoz transferinde GLUT 1 değişikliğinin etkisini saptamak doğumdan önce fetal plazmaya ulaşmanın güçlüğünden dolayı oldukça zordur. GLUT 3 ve GLUT 4 mRNA ve protein düzeyinde insülin bağımlı diabetlilerde etkisizdir (87, 120). Bu sonuçlar plasental glikoz taşınımının diabetik gebeliklerdeki makrozomik büyümeyle ilgili olduğunu gösterebilir. Gerek diaznoz öncesinde olsun, gerek kontrollü bir periyod esnasında, maternal hiperglisemi, fetal hiperglisemiye sebep olmaktadır. Fetüs'de bunun akabinde IGF-I gibi faktör üretiminde artış gerçekleşir ve bu faktörler sinsisyotrofoblast bazal membranlarındaki glikoz taşınımında artış sağlar. Transplasental glikoz taşıma fetal büyüme faktörlerin sekresyonu ve sitümlasyonu ile sürekli ilişki halindedir. Sinsisyotrofoblastların bazal membranındaki glikoz taşıyıcılarının üretimindeki artış, fetal büyüme

faktörlerini arttırmaktadır. Böylece maternal öglisemi esnasında, normal düzeyde olması gerekirken, glikoz taşınım düzeyi artmakta ve büyüme faktörlerinin sekresyonu sağlanmaktadır. Bundan dolayı da fetal büyüme de düzensizliğe yol açmaktadır. IGF-I potansiyel düzenleyici faktör olarak kabul edilirken, insülin reseptörü sinsisyumun bazal membranında mevcut olmadığından, insülin düzenleyici bir faktör olarak kabul edilmemektedir (121).

2.14. Plasental glikoz taşıyıcılarının düzenlenmesi

Materno-fetal glikoz hemostazinin düzenlenmesi oldukça kompleks olup plasental glikoz taşıyıcılarının rolü bir dereceye kadar açıklanabilmiştir. GLUT1, gelişim boyunca oldukça yoğun olarak üretilen ve sinsisyal trofoblast hücrelerinde mevcut olan temel bir glikoz taşıyıcısıdır. Bununla beraber, özellikle, sıçan plasentasında GLUT-3 ile asimetric bir dağılım göstermektedir. Plasentada GLUT 1 ve GLUT 3 temel glikoz taşıyıcısıdır ve GLUT 4 ise plasental taşınımında sadece yardımcı glikoz taşıyıcı proteindir.

Glikoz taşıyıcılarının bir çok hücrede ve dokuda çeşitli faktörler tarafından düzenlendiği ileri sürülmüştür. Bu faktörler; glikoz, glikolitik substratlar (122), insülin ve IGF'lerdir (123) Plasental hücrelerde bu faktörlerle ilgili sonuçlar birbirine tezdır. Diğer taraftan bir çok araştırmacı, plasental glikoz taşıyıcılarına cevaben, ekstrasellüler glikoz yoğunluğunun değişip değişmediğini araştırmışlardır. Hiperglisemi etkili trofoblast hücre kültürü deneylerinde ekstrasellüler glikoz yoğunluğu 20 mM'dan büyük eşit olduğu şartlarda, GLUT-1 mRNA'sının azalmış olup, protein üretimi ve aktiviteside düşme görülmüştür (74, 124, 125). Ayrıca, ekstrasellüler glikoz yoğunluğunun 20 mM'dan küçük eşit olduğu koşullarda ise, bazı araştırmacılara göre GLUT 1 mRNA ve proteininin azaldığı (126) bazılarına göre ise etkili bir değişim aktivitesinin olmadığı ileri sürülmektedir (74). Ekstrasellüler glikoz yoğunluğunun 1-12 mM arasında iken GLUT 1 protein üretiminin etkili olmadığı tespit edilmiştir (124). GLUT 1 üretim miktarı, ekstrasellüler glikoz yoğunluk miktarı ile normalde paralellik göstermektedir. Diabetik plasentalarda sinsisyotrofoblastların basal membranında GLUT 1'in arttığı tespit edilmiş ve bundan dolayı GLUT 1'in hiperglisemiye diğer faktörler gibi etkili olduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar hangi şartlar altında GLUT 1 sentezinin değiştiği yada bunun için tetik çekici ajanın glikoz yada hangi proteinler olduğu konusu aydınlatılamamıştır.

Ekstrasellüler glikozun etkisi konusundaki farklı sonuçların en önemli nedenlerinden biri deney modelleridir. Primer trofoblast hücre kültürü yapılan trofoblast hücrelerin orijini için farklılıklar gözlemlendiği, hücre kültür şartları ve hiperglisemik inkübasyon süresi ve hiperglisemik inkübasyon öncesi zaman açısından farklılıklar görüldüğü ileri sürülmüştür (74, 124, 125, 126). GLUT 1 izoformu için 1-12 mM ekstrasellüler glikoz yoğunluğunda koryokarsinoma hücrelerinin cevabı primer trofoblastlarıkiyle aynıdır (127). Ne Jar nede JEG-3 hücrelerinde ekstrasellüler glikoz yoğunluk miktarı GLUT 1 üretim düzeyine etkili olmadığı görülmüştür (124, 128). Diğer yandan plasentaldaki glikoz taşınımı veya taşıyıcılarının düzenlenmesiyle ilgili olarak glikoz haricindeki faktörler hakkında bilgi oldukça azdır. ED27 ilk trimester trofoblast hücre dizisinde insülin, IGF-I ve

IGF-II etkisi araştırılmış ve bunların 60 dakikalık bir inkübasyon zamanından sonra cytochalasin- β ile inhibe olabilen 2-deoxyglucose alınımını arttığı tespit edilmiştir (129) Daha sonraki deneylerde, insülinin glikoz taşınım aktivitesini artırdığına yönelik olup insülinin, GLUT 1 mRNA sentezi ile de ilişkili olduğu tespit edilmiştir. İnsülinin maksimal etkisi 24 saatlik inkübasyon sonunda ortaya çıkmakta ve GLUT 1 sentezi artmaktadır (126)

İnsülin, sinsisyotrofoblastlardaki mikrovillüslerde GLUT 1' i azaltırken basal membrandaki GLUT 1 proteinini artırmaktadır (124). İnsülinin, bu etkisini sadece IGF-I tip reseptörüyle ve İnsülin reseptörüyle ile değil ayrıca ilk trimester ve term'de plasental hücrelerdeki farklı reseptörler üzerinden gerçekleşen etkisiyle de etkili olabileceği düşünülmektedir (121, 129, 130)

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Sıçan utero-embriyonik dokunun elde edilişi

Araştırmada daha önce deneye girmemiş ve çiftleşmemiş *Rattus norvegicus* türü ortalama 90 günlük, 64 dişi ve 32 erkek sıçan kullanıldı. Normal yem ve musluk suyu ile beslenen sıçanlar iki dişiye bir erkek olacak şekilde kafeste bir gece bırakıldıktan sonraki sabah sıçanlara vajinal simir yapıldı. Mikroskopta bakılan simir preparasyonları ile spermiyum taşıyan sıçanlar belirlendi ve bu hayvanların gebeliğin sıfırncı gününde olduğu kabul edildi

Bu çalışma, gebeliğin 1-8 günler arasında yapılması planlandığından, her gebelik günü için 8 sıçandan oluşan bir grup olmak üzere 8 ayrı grup oluşturuldu. Gebeliğe bağlı olarak implantasyon alanındaki damarların permeabilitelerindeki artış, organizmaya damardan verilen bazı boyaların bu bölgelerde birikmesine yol açtığı bilinmektedir. Sıçan uterusunda implantasyon alanlarını saptamak için, eter anestezisi altındaki deneklere, arka sağ ekstremitte femoral veninden, NaCl'de çözülmüş 1ml %1'lik evans mavisi verildi 10 dakika sonra, karın ön duvarı açılan hayvanın uterus boynuzlarında evans mavisi ile boyanan bölgeler desidual reaksiyon alanları, diğer bölgeler ise desidualize olmayan bölgeler olarak belirlendi. Uterusun desidual alanlarından doku örnekleri alınıp 1000 ml distile suda %40'lik 100ml formalin, 5ml glasiyal asetik asid, 40 gr pikrik asid, 2,5 gr bakır asetat içeren Holland fiksatifinde 4-12 saat tespit edildi. Daha sonra 24 saat musluk suyunda yıkanan dokular sıra ile %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinde 24'er saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Ksilol içinde 3 defa 5'er dakika bekletilerek şeffaflandırıldı. 58 dereceye ayarlı parafin fırınında dokular 3 defa 30 dakikalık parafin banyosunda tutulduktan sonra etüv dışında temiz erimiş parafinle bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5-7 mikron kalınlığındaki kesitlere immunohistokimyasal teknik uygulandı.

3.2 Parafin kesitler için immunohistokimya protokolü

SuperFrost Plus lamlara (Novoglas, Berne İsviçre) alınan parafin kesitler, bir gece 40 °C de etüvde bekletildikten sonra 3 defa 10'er dakika ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 5'er dakika (%100, %96, %90, %80, %70) bekletildi. Distile suda 3 defa 5'er dakika çalkalandı. Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için mikrodalga fırına alındı.

200 ml Sitrat tamponu (pH:6, 1000ml distile suda 2,1 gr sitrik asid ve 15ml NaOH) içine alınan lamlar mikrodalga fırında 750 Watt'da 2 defa 5'er dakika tutuldu Mikrodalga fırın işleminden sonra sitrik asit solüsyonu içinde 20 dakika bekletildi ve dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizilip fosfat tuzu tamponuna alındı Takiben PBS (PBS, pH:7.2-7.4) ile 3 defa 5'er dakika muamele edildi Bir sonraki basamakta ise dokulardaki hidrojen peroksidad aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler 20 dakika % 3 hidrojen peroksit ile muamele edildi Kesitler 4 ayrı şale kabında bulunan PBS işleminden geçirildikten sonra oda sıcaklığında nemli ortamda kesitler oda sıcaklığında 20 dakika non-immün keçi serumuyla bloklanıp yıkama yapılmadan sadece serumlar dökülüp dokular 60 dakika GLUT-1 (CGLFHPLGADSQV), GLUT-3 (NSMQPVKEPGNA), GLUT-4 (CTELEYLGPEND) ve GLUT-5 için (ELKELPPVITSEQ) (hepsi Chemicon, Temecula, CA) C- terminal sequenslerine karşı olarak üretilmiş tavşan poliklonal antikolarıyla inkübe edildi Primer antikolar 1:1000 (GLUT1), 1:500 (GLUT3), 1:100 (GLUT4) ve 1:500 (GLUT5) olacak şekilde antikor dilüsyon solüsyonuyla (Dako, Carpinteria, CA) dilüe edildi Bir sonraki basamakta 4 defa 5'er dakika PBS işleminden geçirildi Kesitler daha sonra 40'ar dakika biyotinli sekonder antikolarla (Universal LSAB Dako) ve streptavidin-peroksidad (Universal LSAB Dako) kompleksi ile boyandı Dokular PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olarak Amino Etil Karbozol (AEC) ile dokularda kırmızı bir renk oluşuncaya kadar ortalama 3-5 dakika muamele edildi Daha sonra Mayer hameleum (Merck Darstadt Almanya) ile zıt boyama yapıp, distile suda çalkalanıp 3 dakika akar musluk suyunda yıkandı Kaiser gliserol jelatin (Merck) kapatma solüsyonu ile kapatıldı Kontrol kesitleri için primer antikolarla karşı hazırlanmış olan oligopeptidler (10 mikrogram/ml, Pichem, Graz Avusturya) ile gece boyu aynı miktardaki primer antikorla inkübe edilip dokularda primer antikor yerine bu oligopeptidler kullanıldı İmmunohistokimyasal olarak boyanmış bu preparatlar Axiophot mikroskopu (Zeiss, Oberkochen, Almanya) altında değişik büyütmelede fotoğraflandı

3.3. İnsan plasenta dokusu

Gebeliğin 12 haftasında, klinik olarak normal olan 5 adet gebe kadınların kürtaj materyali ile 39 hafta da doğum yapmış ve fetüs ağırlığı 2850-3460 (ortalama 3180) gr, plasenta ağırlıkları 421-605 (Ortalama 543) gr olan kadınların 5 adet term plasentaları kullanıldı İlk trimester plasentalar disseksiyon mikroskopu altında koriyonik plak ve desidial plak olarak belirlendi ve sıvı nitrojene alındı

3.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforez ve Western-Blot

İnsan plasental villüs dokuları homojenize edilip bir kısmı (100 mikrolitre) proteaz inhibitör kokteyli (Boehringer, Mannheim, Almanya) ile inkübe edilerek protein yoğunluk miktarları Lowry metoduna göre (Lowry et al 1951 136) tespit edildi Geri kalan kısmı laemli sample buffer (Sigma, Taufkirchen, Almanya) ile inkübe edildi Numuneler 100 000g de 1 saat 4 C de santrifüj yapılarak süpernatant kısımları alınıp -20 C alındı Elektroforez yapmadan önce 3 dakika 100 C de numuneler su içindeki kapta ısıtma işlemene tabi tutuldu % 8-18 lik hazır gradiyent jeline (ExcelGel; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Almanya) numuneler pipet yardımıyla her kutucuğa 10 mikrolitre olacak şekilde protein miktarları eşit

olarak konulup, SDS hazır katot ve anotları (ExcelGel; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Almanya) jelin üzerine karşılıklı olacak şekilde yerleştirildi. Numuneler 150 dakika 600V/50mA/30W da yatay elektroforezde yürütüldü.

Bu esnada nitrosellüloz membran (Amersham Pharmacia Biotech), üstte ve altta 4 er adet filtre kağıdı olacak şekilde 0.2 mol/l glisin, 25 mmol/tris ve % 20 metanol içeren semi-dry elektroblotting solusyonunda işleme tabi tutuldu. Yürütülmüş jel nitrosellüloz membranın üzerine alınarak jelde bulunan proteinler 45 dakika 30V/100mA/6 W'ta nitrosellüloz membrana transfer edildi. Transferin başarılı olduğu Ponceau S (Sigma) solusyonu ile test edildi. Membran 12 saat süre ile 4 C de pH sı 7.2-7.4 olan 0.14 mol/l Tris tuz solusyonu (TBS) ile hazırlanan % 5 lik yağsız kuru süt tozu (Biorad, Hercules, CA, USA) ile bloklandı. Bloklama solusyonuna ayrıca % 0.1 Tween-20 (Sigma) ilave edildi. Membran, 1:500 oranında bloklama solusyonu ile dilüe edilmiş glikojenin antikor ve 1:3000 oranında bloklama solusyonu ile dilüe edilmiş GLUT-3 antikor (Chemicon, Temecula, CA,USA) ile oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bloklama solusyonu ile 3 defa 5 dakika yıkama yapıldı. Membran, glikojenin antikor için 1:1000 oranında bloklama solusyonu ile dilüe edilmiş tavşan anti-keçi IgG horseradish peroksidaz (HRP) konjuge (Biorad) sekonder antikorla ve GLUT-3 için ise 1:5000 dilüsyon oranındaki aynı sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS ile 3 defa 5 dakika yıkama yapıldı. Membran SuperSignal Chemiluminisans'la (CL)-HRP substrat sistemi (Pierce, Rockford, IL, USA) ile 5 dakika inkübasyon yapıldı ve sonrasında membranlar hiperfilm'e (Amersham Pharmacia Biotech) fotoğraf odasında aktarıldı. Film developer ve fiksatiften geçirilerek musluk suyu ile yıkanıp kurutuldu. Kontrol membranlarında primer antikor yerine sadece antikor dilüsyon solusyonu kullanılarak inkübasyon yapıldı.

3.5. Kriyo (dondurma) kesitler için immunohistokimya protokolü

İlk trimester ve term plasentasından 5 mikrometre kalınlığında kryokesitler alındı ve asetonla 5 dakika fikse edildi. 20 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Bu esnada PAP pen ile lamaların etrafı çevrelendi. TBS ile 5 dakika yıkandıktan sonra % 10 insan AB serumu ve %1 sığır serum albumin (BSA) ve geri kalanı ise Ultravision Bloklama solusyonu (Ultravision) hazırlanan bloklama solusyonu ile 5 dakika bloklandı. Numuneler 30 dakika oda sıcaklığında glikojenin ve GLUT-3 antikorlarıyla sırasıyla 1:100 ve 1:500 oranında bloklama solusyonuyla dilüe edilmiş antikorlarla inkübe edildi. Kesitler TBS-Tween-20 karışımıyla 3 defa 5 dakika yıkandı. GLUT 3 için sekonder antikor olarak polivalent (domuz anti-tavşan, fare, keçi) olan ve streptavidin ile konjuge edilmiş (LSAB+ Kit, Dako) ve glikojenin için ise dilüsyon oranı 1:500 olan tavşan anti-koyun IgG HRP konjuge (Dako) sekonder antikor ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. TBS-Tween 20 karışımıyla 3 kere 5 dakika yıkandıktan sonra 3-5 dakika 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) ile immün işaretlenmeler görünür hale getirildi. Kesitler TBS-Tween 20 karışımıyla 3 kere 5 dakika yıkandı ve Mayer Hemaleum (Merck) ile zıt boyanma yapılarak Kaiser gliserol jelatin (Merck) ile kapatıldı.

3.6. Flow sitometrik (akışkan hücre ölçer) çalışma için denek seçimi

12 adet gebe olmayan, 9 adet ilk trimester, 7 adet ikinci trimester ve 7 adet termdeki gebe kadınlardan 4ml periferik kan EDTA'lı tüplere alındı. Çalışmadaki tüm kadınlar vücut ağırlık indeksine göre normaldiler. Kendilerinde ve ebeveynlerinde diabet hastalığı yoktu. Gebe kadınlara sürekli olarak oral glikoz tolerans testi yapıldı ve gebelik diabeti gelişmediği tespit edildi.

Hipoglisemik hastalardaki çalışmamız için de açlık kan şekeri düzeyi ortalama olarak 6 hipoglisemik hastada 39.4 ± 7.9 mg/dl tespit edilirken, 6 tane öglisemik insanın açlık kan şekeri düzeyi ortalama olarak 106.3 ± 17.5 mg/dl tespit edildi. Bu insanların periferik total kanları alındı.

3.7. Periferik kandan lökosit hücrelerinin ayrılması ve sitospin metodu yardımı ile immunohistokimyasal boyanmaların yapılması

4 ml total kan 1:1 oranında PBS ile dilüe edildi. Bu karışımın içine 4,8 ml Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) solüsyonu ilave edilip 30 dakika 2200 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Elimizdeki kan numune örneklerinde kan hücreleri arasında gradiyent olduğu gözlemlendi. Otomatik pipet aracılığı ile mononükleer hücreler alındı. Mononükleer hücreler sitospin aleti ve ateçmanları vasıtasıyla 800 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek lamplara alındı. Lamplar bir gece oda ısısında kurutulup ertesi gün PBS ile yıkayıp, 20 dakika non-immün keçi serumuyla bloklayıp yıkama yapılmadan sadece serumlar dökülüp dokular 60 dakika GLUT-1 için (CGLFHPLGADSQV), GLUT-3 (NSMQPVKEPGNA) ve GLUT-4 (CTELEYLGPEND) (hepsi Chemicon, Temecula, CA) C- terminal sequenslerine karşı olarak üretilmiş tavşan poliklonal antikorlarıyla inkübe edildi. Primer antikorlar 1:1000 (GLUT1), 1:500 (GLUT3) ve 1:100 (GLUT4) olacak şekilde antikor dilüsyon solüsyonuyla (Dako, Carpinteria, CA) dilüe edildi. Bir sonraki basamakta 4 defa 5'er dakika PBS işleminden geçirildi. Kesitler daha sonra 40'er dakika biyotinli sekonder antikorlarla (Universal LSAB Dako) ve streptavidin-peroksidaz (Universal LSAB Dako) kompleksi ile boyandı. Dokular PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olarak Amino Etil Karbozol ile hücrelerde kırmızı bir renk oluşuncaya kadar ortalama 3-5 dakika muamele edildi. Daha sonra distile suda çalkalanıp 3 dakika akar musluk suyunda yıkandı. Mayer hameleum ile zıt boyama yapıldı. Kaiser jelatin (Merck) kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Kontrol boyanmaları için primer antikorlar yerine non-immün tavşan serumu (Dako) kullanıldı. İmmunohistokimyasal olarak boyanmış bu preparatlar Axiophat mikroskopu altında değişik büyütmelemlerde fotoğraflandı.

3.8. Flow sitometri (akışkan hücre ölçer)

Gece boyu aç kalan insanlardan ertesi günü açlık venöz kanı EDTA lı tüplere alındı. Her bir numune kanından 100 µl total kan alınıp 1:60 oranında dilüe edilmiş GLUT1, 3 ve 4 (Chemicon) poliklonal antikorlarıyla 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Numuneler iki kere 4 ml PBS-% 0.1 Sodyum Azid (PBS-Na₃) solüsyonuyla yıkanarak 1200 rpm de 4 C 'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant

kısmı atıldı. Sekonder antikor olarak 1:20 dilüe fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilmiş anti-tavşan immunoglobulin F(ab')₂ (Dako) ile 4 C 'de 20 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Hücreler tekrar iki kez 4 ml PBS-% 0.1 Sodyum Azid (PBS-NaN₃) ile yıkanarak ve 1200 rpm de 4 C 'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Yıkamadan sonra flow sitometri için eritrosit lizis solusyonu ile karanlık ortamda 10 dakika inkübe edilerek eritrositler lizis edildi. Hücreler tekrar iki kez 4 ml PBS-% 0.1 Sodyum Azid (PBS-NaN₃) ile yıkanarak ve 1200 rpm de 4 C 'de 5 santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Her bir numuneye 200 µl PBS ilave edilerek sulandırıldı. Daha sonra numuneler FACS "Calibur Flow Cytometer" (Becton Dickinson, San Jose, CA) aleti ile argon lazer (dalga boyu 488nm) de CellQuest programı uygulanarak granülositler, monositler ve lenfositler için "forward scatter/ side scatter" diagramına göre ölçümler yapıldı.

BULGULAR

Araştırmanın sonuçları, farklı parametreleri içeren dört ayrı makale halinde yayınlanarak bilim dünyasına sunuldu. Bu araştırma makaleleri sırasıyla şu isimler altında yayımlandı.

Makale 1- Glucose transporter expression in rat embryo and uterus during decidualization, implantation, and early postimplantation
Korgun ET, Demir R, Hammer A, Dohr G, Desoye G, Skofitsch G, Hahn T. *Biology of Reproduction* 65 (5): 1364-1370, 2001

Makale 2- From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta
Hahn D, Blaschitz A, Korgun ET, Lang I, Desoye G, Skofitsch G, Dohr G. *Molecular Human Reproduction* 7 (12): 1173-1178, 2001

Makale 3- Physiological leukocytosis during pregnancy is associated with changes in glucose transporter expression of maternal peripheral blood granulocytes and monocytes
Korgun ET, Demir R, Sedlmayr P, Desoye G, Arıkan G, Puerstner P, Haeusler M, Dohr G, Skofitsch G, Hahn T. *American Journal Of Reproductive Immunology* 48 (2): 110-116, 2002.

Makale 4- Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes
Korgun ET, Demir R, Sedlmayr P, Desoye G, Arıkan GM, Puerstner P, Haeusler M, Dohr G, Skofitsch G, Hahn T. *Blood Cells Molecules And Diseases* 28 (2): 152-159, 2002.

Sıçan utero-embriyonik dokulardaki immunohistokimyasal sonuçlar
("Glucose transporter expression in rat embryo and uterus during decidualization, implantation, and early postimplantation", adlı makelenin özet sonuçları)

Sıçan uterusu ve embriyosunda, yaptığımız tüm günlerdeki immunohistokimyasal boyamalarda GLUT-5 antikoruna negatifliği

Gebeliğin 1-8 günleri arasında uterus ve embriyonik dokulardaki GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4 ile yaptığımız immunohistokimyasal boyanmaların sonuçları, tablo halinde ve semikantitatif olarak özetlendi (Tablo 3)

Gebelik günleri	Uterus Epiteli	Endometriyal Stroma	Endometriyal Gland	Myometrial düz kas hücreleri	Primer Desidual Bölge	Sekonder Desidual Bölge	Glikojenik Bölge	Kapsül	Primer Ektoderm	Parietal Endoderm	Viskeral Endoderm	Ekstraembryonik Ektoderm	Ektoplental Kon	GLUT İzoformları
1	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++										GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
2	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++										GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
3	+ +++	+ ++	+++ ++	+++ ++	+ +++									GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
4	++ +++	++ ++	+++ ++	+++ ++	++ +++									GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
5	+ ++	++ ++	+++ ++	+++ ++	+ +++				++ +++					GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
6	+ +	+ +	+++ ++	+++ ++	+ +	+ +			++ +++	+ ++	+ +++	++ +++	++ +++	GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
7		+ +	+++ ++	+++ ++	+ +	+++ +++	++ +++	++ +++	+++ +++	++ ++	++ ++	+++ +++	+++ +++	GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
8		+ +	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ +++	++ +++	++ +++	++ +++	++ ++	++ ++	++ ++	+++ ++	GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4

Tablo 3. Siçanlarda gebeliğin 1-8 günleri arasındaki glikoz taşıyıcı proteinlerden GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4 immunohistokimyasal olarak dağılım tablosu (+, boyanma yoğunluğu az, ++, boyanma yoğunluğu normal, +++, boyanma yoğunluğu çok, -, boyanma yok)

Genel bulgular gebelik gün sırasına göre şu şekilde ifade edilebilir:

Gebeliğin birinci günü

GLUT-3, endometriyal stromal hücrelerde ve uterus epitelinde yerleşikti (Şekil 7A) GLUT-4 ise, uterus epiteli, endometriyal stromal hücreler, endometriyal bez ve miyometrial düz kas hücrelerinde immunopozitif reaksiyon gösterdi (Şekil 7B) GLUT-4 proteini, gebeliğin tüm günlerinde uterinal bezlerde, endometriyal stromal hücrelerde ve miyometrial düz kas hücrelerindeki varlığını aynı şekilde devam ettirdi. GLUT-3, uterus epitelinde plasma membranında, bazo-lateral bölgelere göre apikal ve basal kısımda daha yoğun olarak boyandı. GLUT-1 gebeliğin birinci gününde uterus dokusunda immunolojik olarak bir reaksiyon göstermedi

Gebeliğin ikinci günü

Uterusdaki immünoreaksiyonlar GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4 için gebeliğin birinci günüyle aynı idi.

Gebeliğin üçüncü günü

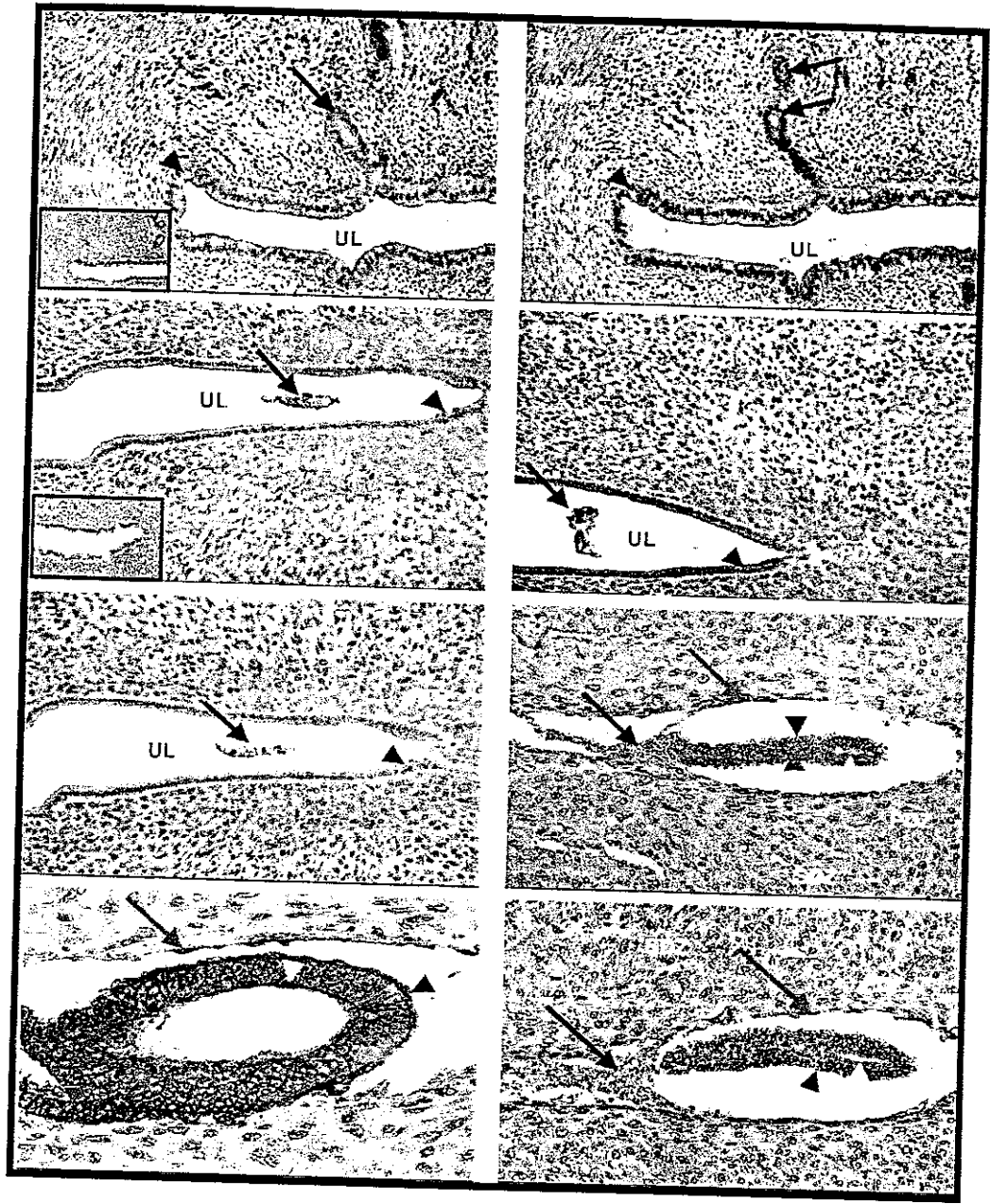
GLUT-1, uterus lüminal epitelinde, endometriyal stromada, desidualizasyon başlangıcı olan primer desidual alanın hücrelerinde zayıf bir reaksiyon gösterdi. Endometriyal bez ve miyometriyal düz kas hücreleri GLUT-1 ve GLUT-3 için immunolojik olarak bir reaksiyon göstermedi. Her iki glikoz taşıyıcı protein için postimplantasyon dönemine kadar negativitelerini devam ettirdi (Şekil 1). GLUT-3'ün uterinal apikal bölgesindeki hücrelerdeki üretimi gebeliğin birinci ve ikinci gününe oranla arttı. Endometriyal stromal hücreler ve primer desidual hücrelerde boyanmalar mevcuttu.

Gebeliğin dördüncü günü

GLUT-1'in gebeliğin 3 günündeki reaksiyon gösterdiği hücre populasyonlarındaki boyanmalarına göre daha belirgindi. GLUT-3 ve GLUT-4 uterusda daha önceki günlerde yerleştiği hücrelerdeki varlığına devam etti. Her iki glikoz taşıyıcı proteini özellikle primer desidual alan hücrelerinde yoğundu.

Gebeliğin beşinci günü

Gebeliğin bu gününde, sıçan blastosistinin implantasyon aşamasında olduğu gözlemlendi. Blastosist GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4 için immün pozitivite gösterdi (Şekil 7C, D, E). Blastosisteki immünopozitivite her üç glikoz taşıyıcı protein için gebeliğin 8.gününe kadar devam etti (Tablo 3) Bu glikoz taşıyıcı proteinlerin uterusdaki dağılımları antimesometriyal bölgedeki boyanmalar hariç, aşağı yukarı gebeliğin dördüncü günündeki dağılımları gibiydi. Sadece uterus epiteli çok zayıf boyanmıştı (Şekil 7C ve 7E).



Şekil 7. Sıçan utero-embriyonik birimde gebeliğin 1 günü (G G) (A,B), gebeliğin 5 günü (C,D,E) ve gebeliğin 6 günü (F,G,H). A) GLUT 3. ok başı uterus epiteli, ok endometriyal gland B) GLUT 4. ok başı uterus epiteli, ok endometriyal gland C) GLUT 1. ok başı uterus epiteli, ok embriyo. D) GLUT 3. ok başı uterus epiteli, ok embriyo. E) GLUT4. ok başı uterus epiteli, ok embriyo F) GLUT1. siyah ok, ekto-plasental kon, kırmızı ok, parietal endoderm, siyah ok başı visceral endoderm, kırmızı ok başı ekto-embriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm G) GLUT3 kırmızı ok parietal endoderm, siyah ok başı visceral endoderm, kırmızı ok başı ekto-embriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm H) GLUT4. siyah ok, ekto-plasental kon, kırmızı ok, parietal endoderm, siyah ok başı visceral endoderm, kırmızı ok başı ekto-embriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm PDZ, primer desidual zone, SDZ, sekonder desidual zone, UL, uterus lümeni A ve C deki küçük şekiller kontrol kesitleri A,B,C,D,E için büyütme X 150, F,H için büyütme 300, G için büyütme 600 ve A ve C deki kontrol kesitleri için büyütme X 50

Gebeliğin altıncı günü

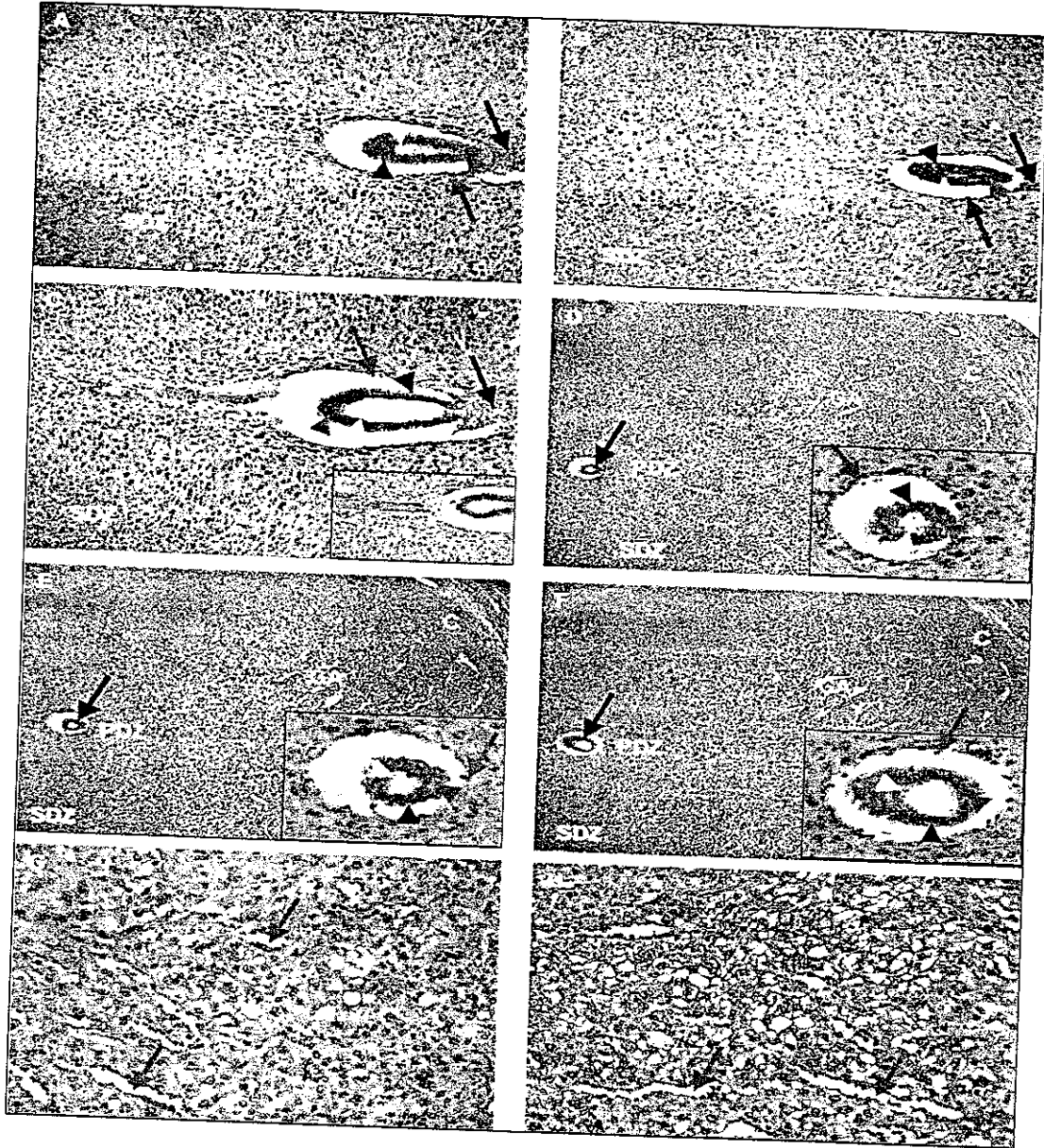
Parietal endoderm, visseral endoderm, primer ektoderm, ekstraembriyonik ektoderm hücreleri ve ektoplasental koni GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4 için immünoreaktif pozitifler (Şekil 7F, G, H). Gelişmekte olan sekonder desidual bölgedeki desidual hücrelerde az miktarda GLUT-1 (Şekil 7F), GLUT3 ve GLUT4 boyanması mevcuttu. Gebeliğin 6.gününde uterusda, gebeliğin 5. gününden farklı bir boyanma gözlenmedi. Sadece özellikle GLUT 3 için embriyoda oldukça yoğun boyanma gözlendi.

Gebeliğin yedinci günü

Embriyonik dokulardaki boyanmalar GLUT-1 için gebeliğin altıncı gününe oranla daha yoğundu. Birden bire uterus'un sekonder desidual alanında boyanma yoğunluğu arttı (Şekil 8A). Buna karşılık primer desidual alanda boyanmalar azaldı. Gebeliğin bu gününde uterusda glikojenik bölge ve kapsül oluşumu belirgin olarak gözlendi. GLUT-3 ve GLUT-4 için gebeliğin altıncı günü ile yedinci günü arasında embriyonik dokularda bir fark yoktu (Şekil 8B, C). Genel olarak uterus da kapsül, glikojenik bölge ve sekonder desidual bölge yoğun olarak glikoz taşıyıcı proteinleri ekspere etmekteydi.

Gebeliğin sekizinci günü

Sekonder desidual ve glikojenik bölgeler hariç GLUT-1 için uterusda herhangi bir bölgede immünoreaktivite yoktu (Şekil 8D, G). GLUT-3 ve GLUT-4 için gebeliğin 7. günüyle aynı uterinal boyanmalar vardı. Fakat boyanma yoğunluğu oldukça azalmıştı (Şekil 8E, F). Glikojenik bölge de GLUT-3 boyanmaları oldukça yoğundu (Şekil 8H). GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4 proteinlerinin embriyonik boyanmaları gebeliğin 7. gününe benzemekteydi (Şekil 8D, E, F).

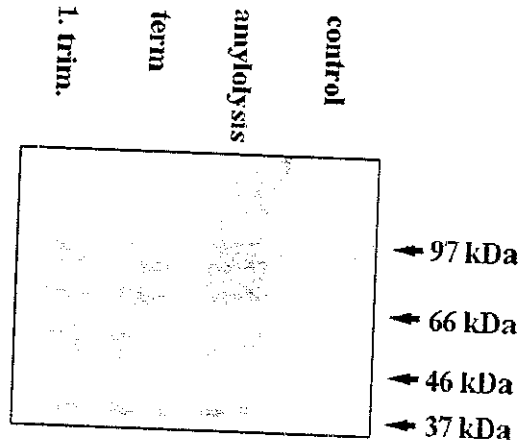


Şekil 8. Sıçan utero-embriyonik birimde gebeliğin 7 gününde (A,B,C) ve gebeliğin 8 gününde (D,E,F,G,H) A) GLUT1 Siyah ok, ekto-plasental kon, kırmızı ok, parietal endoderm, siyah ok başı visseral endoderm, kırmızı ok başı, ekstraembriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm. B) GLUT1 Kırmızı ok, parietal endoderm, siyah ok başı visseral endoderm, kırmızı ok başı, ekstraembriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm. C) GLUT4 Siyah ok, ekto-plasental kon, ekstraembriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm D) GLUT1 ok, embriyo. Çerçeve içindeki fotoğraf kırmızı ok, , parietal endoderm, siyah ok başı visceral endoderm, kırmızı ok başı, ekstraembriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm. E) GLUT3 ok, embriyo Çerçeve içindeki fotoğraf kırmızı ok, , parietal endoderm, siyah ok başı visseral endoderm, kırmızı ok başı, ekstraembriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm F) GLUT4 ok, embriyo. Çerçeve içindeki fotoğraf kırmızı ok, , parietal endoderm, siyah ok başı visseral endoderm, kırmızı ok başı, ekstraembriyonik ektoderm, sarı ok başı primer ektoderm. G) GLUT1 glikojenik bölgede. Ok ucu kan damarları. C, Kapsül, GA, glikojenik bölge, PDZ, primer desidual zone, SDZ, sekonder desidual zone, Kontrol çerçeve içinde C. A,B,C için büyütme X 150, D,E,F için büyütme X 75, G,H için büyütme X 100, çerçeve için C de büyütme için X 100, çerçeve için D,E,F büyütme için X 200

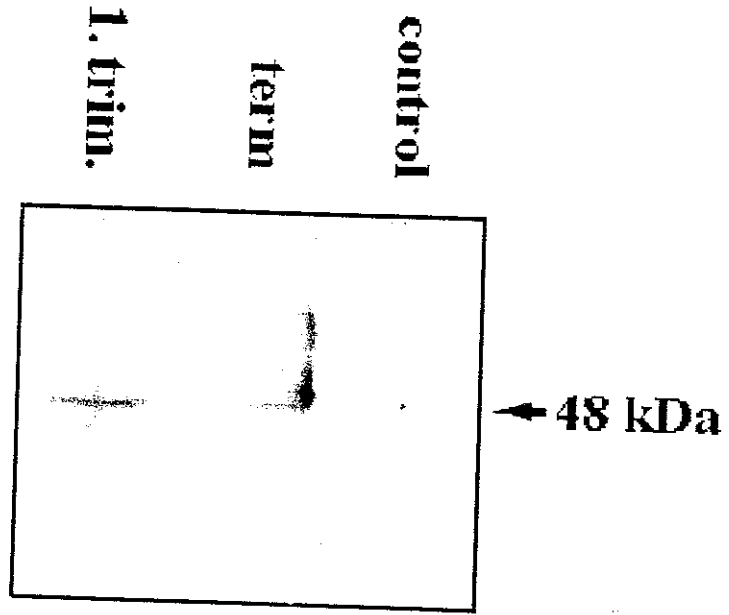
İnsan plasentasındaki western-blot ve immunohistokimya sonuçları

("From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta", adlı makalenin özet sonuçları).

Glikojenin proteini immunoblot metoduyla 37 kDa ağırlığında bir bant şeklinde term ve ilk trimester plasentalarında tespit edildi (Şekil 9). 37 kDa band, glikozillenmemiş glikojenine karşılık gelmektedir. Elde edilen bandların optikal yoğunluğu hesaplandı ve istatistiksel olarak termde ilk trimestere göre glikojenin proteini daha fazla miktarda (0.77 ± 0.21 (term), 0.22 ± 0.07 (ilk trimester) $p < 0.05$) olduğunu tespit edildi. Numuneler alfa amilaz, izoamilaz ve amiloglikozidaz ile inkübe edilerek glikozillenmiş glikojenin proteini tespit edilmeye çalışıldı. Fakat bu enzimlerle inkübe edilmiş numunelerdeki bandlarda herhangi bir farklılık görülmedi (Şekil 9). GLUT 3 proteini, 48 kDa ağırlığında bir band olarak ilk trimester plasental dokuda term plasentasına göre daha fazladır (Şekil 10) (0.87 ± 0.40 , 0.05 ± 0.02 ; $p < 0.05$) Kontrollerde ne glikojenin nede GLUT 3 proteini için bir bant görülmedi (Şekil 10)

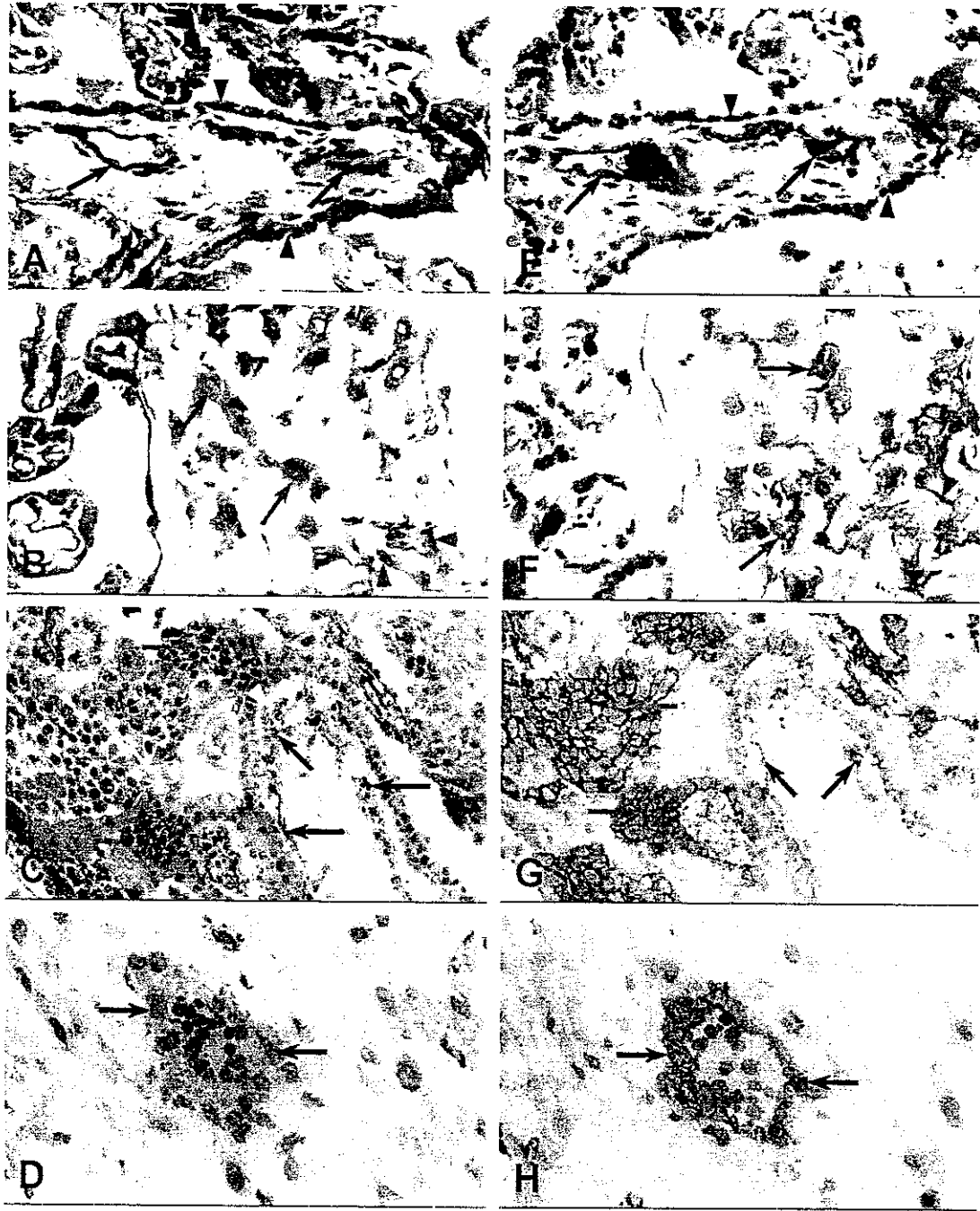


Şekil 9. İnsan ilk trimester ve term plasentasında glikojenin western blot sonuçları



Şekil 10. İnsan ilk trimester ve term plasentasında GLUT-3 western blot sonuçları.

İmmunohistokimyasal olarak glikojenin proteini, term plasentasında fetal damarların endotel hücrelerinde yoğun bir şekilde gözlemlendi (Şekil 11A) Sinsisyotrofoblast, ekstrasvillöz trofoblast ve basal desidual hücreler pozitif immünoreaktivite gösterdiler (Şekil 11A, B). İlk trimesterdeki glikojenin boyanmaları term plasentalarındakine benzemektedir. Çoğalan mesenşimal hücrelerde zayıf bir şekilde boyanmalar gözlemlendi (Şekil 11C, D). Fakat, genel olarak ilk trimesterde term plasentaya göre glikojenin boyanma yoğunluğu daha azdır. GLUT 3 proteini, term ve ilk trimester fetal damarlarda mevcuttur (Şekil 11E, F, G, H). Desidual hücreler GLUT 3 için pozitifdir (Şekil 11F). Yaklaşık olarak ekstrasvillöz trofoblastların %50 si yoğun olarak GLUT 3 ile boyanırken bu hücre popülasyonunun diğer yarısı negatifdir (Şekil 11F). İlk trimesterde GLUT 3 üretimi hücre klonlarındaki ekstrasvillöz trofoblastlarda ve villöz sitotrofoblastlarda pozitifdir (Şekil 11G). Sinsisyotrofoblastlarda ise GLUT 3 negatifdir (Şekil 11E, F, G, H). Kontrol kesitleri için normal tavşan serumu ile inkübe edilen kesitlerinde sonuç negatifdir (Şekil 11D ve E deki küçük fotoğraflar).



Şekil 11. İmmunohistokimyasal olarak glikogenin (A-D) ve GLUT3 proteinin (E-H) insan term (A,B,E,F) ve ilk trimester (C,D,G,H) plasentasındaki boyanmaları Siyah ok, fetal damar endoteli, kırmızı ok immün pozitif ekstravillöz trofoblast, siyah ok immün negatif ekstravillöz trofoblast, siyah ok başı sinsisyotrofoblast, kırmızı ok başı desidua bazalisin desidua hücreleri, sarı ok başı proliferen olan mezenkimal hücreler, mavi ok başı proliferen olan villöz trofoblast hücreleri A,B,E,F için büyütme X150, C,G için büyütme X200, D,H için büyütme X400.

Gebelik esnasında periferik lökositlerdeki GLUT 1, GLUT 3 ve GLUT 4 proteinlerinin dağılımı.

("Physiological leukocytosis during pregnancy is associated with changes in glucose transporter expression of maternal peripheral blood granulocytes and monocytes", adlı makalenin özet sonuçları).

Bu çalışma esnasında hücre akışkan kinetiği ile yapılan deneyler sonucunda glikoz taşıyıcı proteinler ve kontrol olarak kullanılan serum sonucunda elde edilen değerlere Mann-Whitney U testi yapılarak tablo halinde verilmiştir (Tablo 4). Glikoz taşıyıcı proteinler için elde edilen değerler serum için elde edilen değerler bölünerek hesaplanmıştır. Pozitiflik sınırı olarak 1,5 kabul edilmiştir.

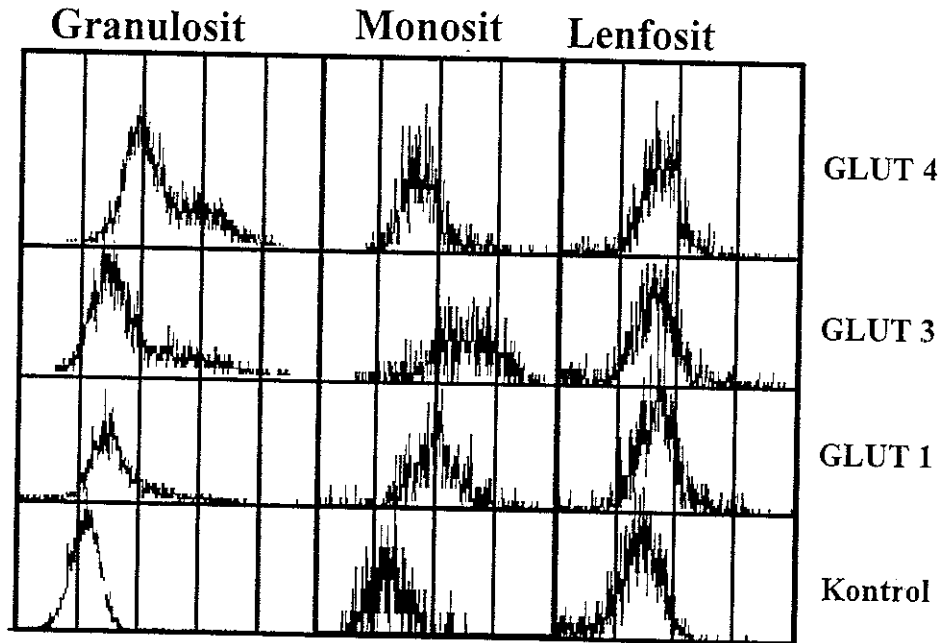
		Gebe değil	1 trimester	2. trimester	term
Granülosit	GLUT1	3.1±0.5	2.8±0.5	2.4±0.5	2.0±0.2*
	GLUT3	4.6±0.5	3.5±0.4	3.2±0.3	3.3±0.7
	GLUT4	4.7±0.5	3.3±0.3	3.1±0.3	3.3±0.4
Monosit	GLUT1	2.9±0.3	2.7±0.3	3.2±0.6	3.0±0.4
	GLUT3	3.8±0.6	3.5±0.6*	5.2±0.3*	4.1±0.8
	GLUT4	1.6±0.2	1.5±0.2	1.2±0.1*	1.7±0.4*

Tablo 4 Normal ve gebe kadın granulosit ve monositlerindeki flow sitometrik olarak hesaplanan GLUT izoformlarının ekspresyonun gösteren tablo GLUT izoformları için bulunan miktar non-immün tavşan serumuyla bulunan sayıya bölünüp elde edilen sayı 1,5 ise sınır seviyede pozitifite, 2 den büyük ise açık bir şekilde pozitif. * p<0.05

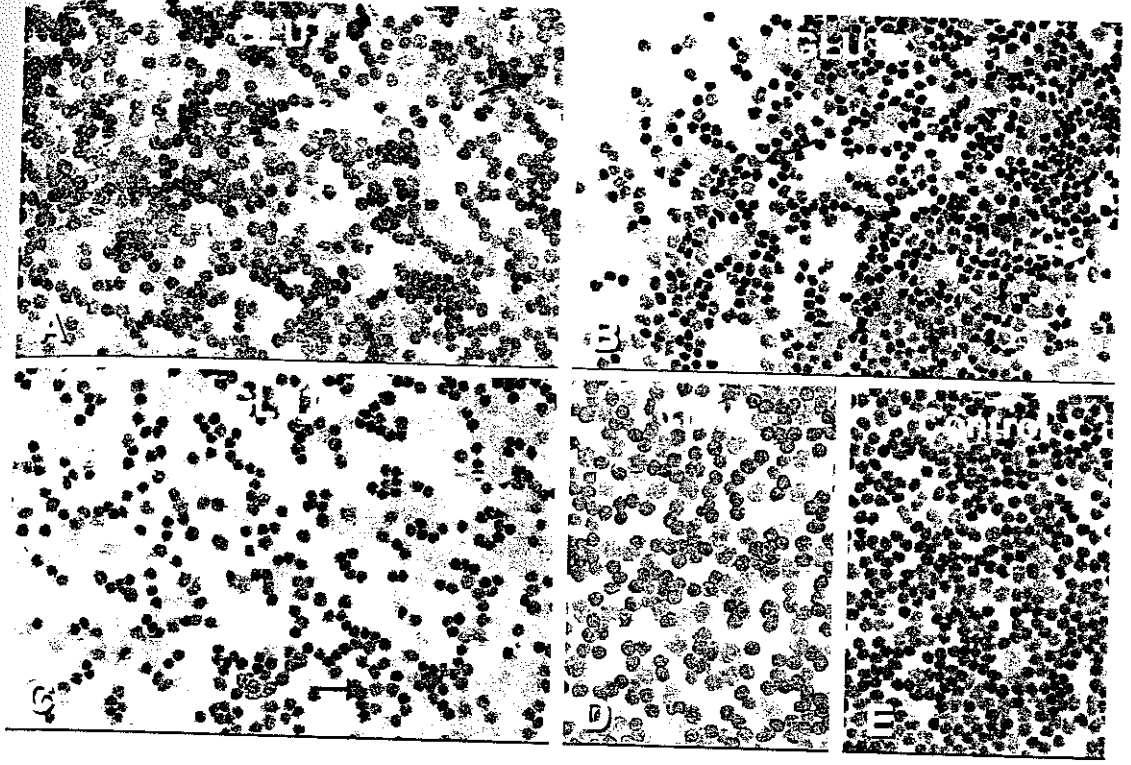
Gebe olmayan kadınların sitospin preparatlarında granulositlerin bu glikoz taşıyıcıları için monositlere göre daha yoğun boyandığı gözlemlendi. Akışkan hücre ölçer sonuçları da (Şekil 12) sitospin gözlemlerini desteklemekteydi (Şekil 13).

Bu çalışmadaki temel bulgular şunlardır; GLUT-4, % 186 ($p < 0.05$) oranında monositlere oranla granüositlerde daha fazla üretildikleri tespit edildi. GLUT-3 diğer glikoz taşıyıcı izoformlarına göre granüositler ve monositler için temel glikoz taşıyıcı izoformuydu. Granüositler için GLUT-4 ve GLUT-3 miktarı yaklaşık olarak eşitti. Granüositlerdeki GLUT-1 miktarı gebelik esnasında trimesterler boyunca derece derece azalıp termde gebe olmayan kadın granüositlerine göre % 36 oranında ($p < 0.05$) azalmıştır (Şekil 14). Granüositlerde GLUT 3 ve GLUT 4 de gebelik boyunca gebe olmayan kadın granüositlerine göre % 24 oranında azalmıştır. Fakat bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Monositlerde GLUT 1 gebelik esnasındaki değişimi istatistiksel olarak gebe olmayan kadınların monositleriyle karşılaştırıldığında etkili değildi. Monositlerde GLUT 3 protein üretimi ikinci trimesterde normal kadın monositlerine göre % 37 ($p < 0.05$) oranında artış göstermiştir (Şekil 15). Termde ise 2 trimestere göre bir azalış göstermiştir. Monositlerde GLUT 4 üretimi gebeliğin başlamasıyla birlikte bir düşüş gösterip 2. trimesterde normal kadın monositlerine göre % 76 oranında ($p < 0.05$) (Şekil 16) azalarak glikoz taşıyıcı sistemin düzenlenmesini sağlayabilir ve termde tekrar artış göstermiştir. Kontrol için kullanılan normal tavşan serumu ile yapılan boyamalarda sonuçlar negatifti.

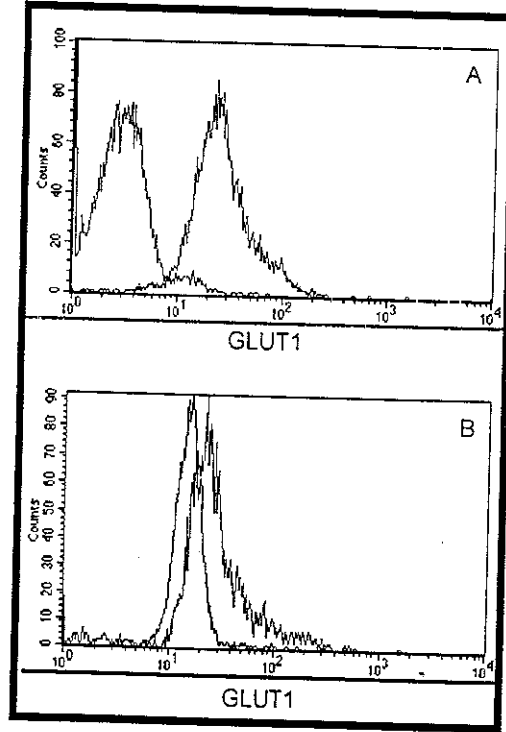
Verilere göre gebelikle birlikte lökositlerdeki glikoz taşıyıcı proteinlerin üretimlerinde bir değişim gözlenmekte ve bunun muhtemel olarak fizyolojik lökositozise bağlı olarak artan ve azalan lökositlerle ilişkili olacağı düşünülmektedir.



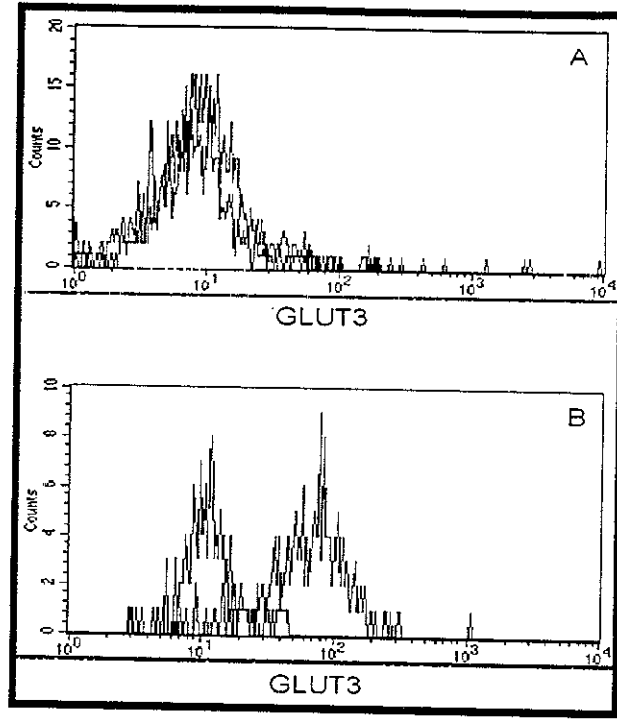
Şekil 12. Gebe olmayan kadın beyaz kan hücrelerinde GLUT1,3 ve 4 için floresans sinyallerinin flow sitometri ile tespiti. Hipoglisemik hastaların periferik lökositlerindeki flow sitometrik (akışkan hücre ölçer) ve immünohistokimya sonuçları



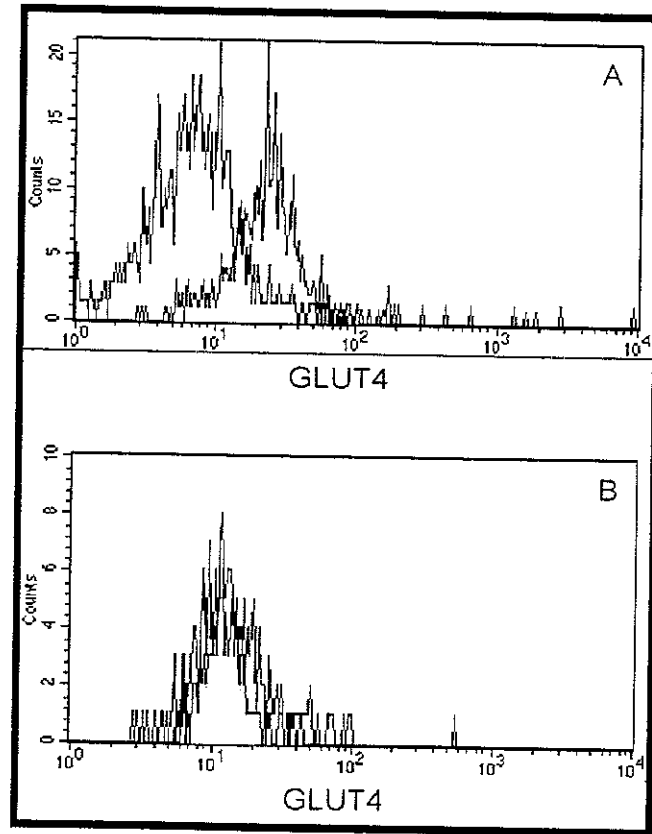
Şekil 13. İmmunohistokimyasal olarak gebe olmayan kadın beyaz kan hücrelerinde GLUT1 (A), GLUT3 (B), GLUT4 (C) ve CD45 (D) boyanmaları. Kontrol kesitlerinde (E) primer antikor yerine tavşan non-immün serum kullanıldı. Bütün fotoğraflar için büyütme X 200.



Şekil 14. Granulositlerde gebe olmayan (A) ve term deki GLUT 1 düzeyini gösteren flow sitometriyle tespit edilmiş histogram



Şekil 15. Monositlerde gebe olmayan (A) ve ikinci trimesterdeki GLUT 3 düzeyini gösteren flow sitometriyle tespit edilmiş histogram.



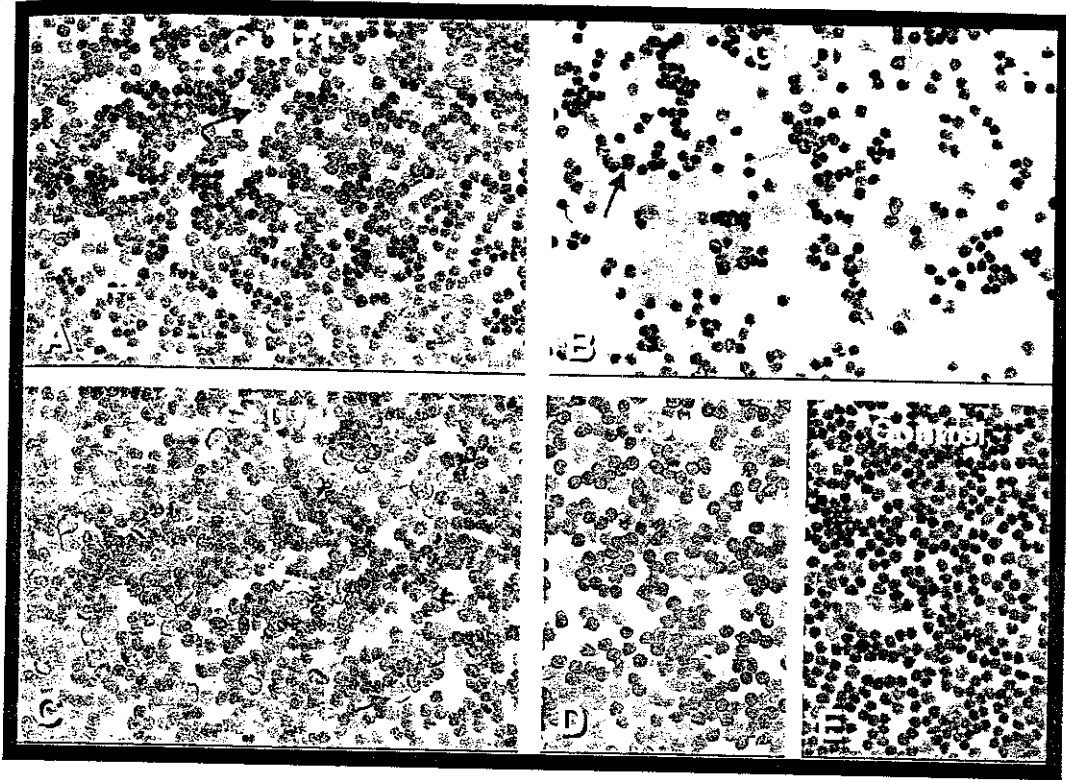
Şekil 16. Monositlerde gebe olmayan (A) ve ikinci trimesterdeki GLUT 4 düzeyini gösteren flow sitometriyle tespit edilmiş histogram.

("Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes", adlı makalenin özet sonuçları)

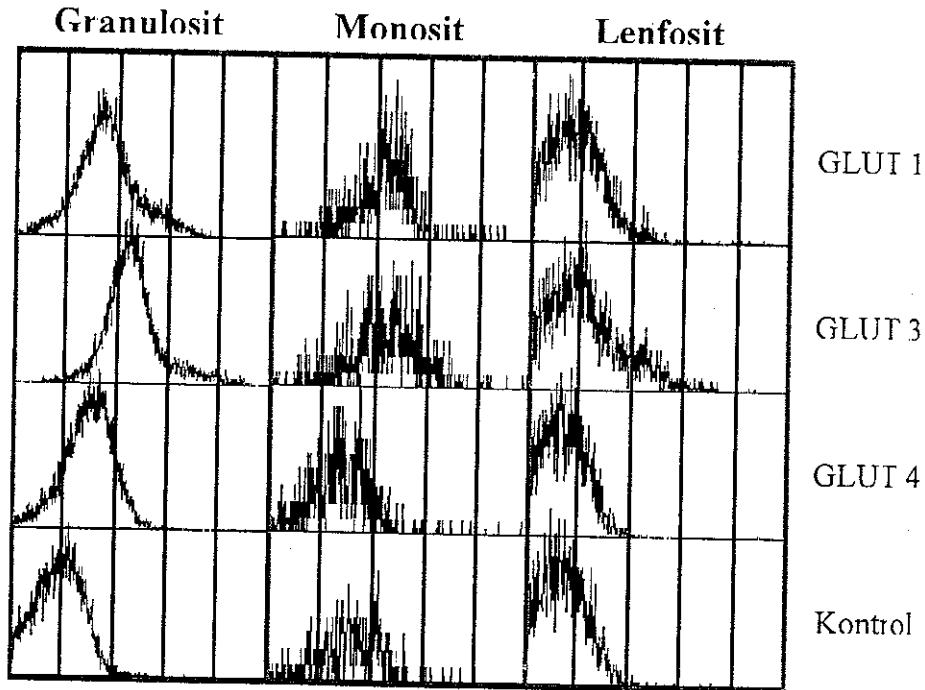
Lökositlerde yapılan çalışmanın flow sitometrik sonuçları tablo 3 de gösterilmiştir. Genel olarak flow sitometrik çalışmalar sonucunda granülositler ve monositlerin GLUT 1, 3 ve 4 için immünreaktif olarak pozitif oldukları tespit edildi (Şekil 17). Küçük bir kısmı hariç lenfositler immunohistokimyasal olarak negatifler (Şekil 18). Sitospin preparatlarında öglisemik insanlardan elde edilen granülositler, monositlere göre daha fazla boyandılar. Bu bulguyu flow sitometri sonuçları da desteklemektedir (Tablo 5) GLUT 4 proteini ise aynı yoğunlukta granülositlerde mevcuttu. Flow sitometrik olarak öglisemik ve hipoglisemik GLUT 1, GLUT 3 ve GLUT 4 üretimleri karşılaştırıldığında, hipoglisemik şartlardaki granülositlerde GLUT 4 proteini % 73 oranında ($p < 0,05$) daha fazladır (Şekil 19). GLUT 3 proteinin ise monositlerde % 134 oranında arttığı ($p < 0,05$) tespit edildi (Şekil 20). Granülositlerdeki GLUT 4 artışı GLUT 1 deki % 20 azalışına eşlik etmekte ve GLUT 3 de de artış gözlenmekte idi. Fakat, hem GLUT 1 te ki azalış hem de GLUT 3 teki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Monositlerde ise GLUT 1 ve GLUT 3 de artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı. Sitospin preparatlarında CD45 ile yaptığımız pozitif kontrol boyanmaları pozitif (Şekil 17D). Normal tavşan serumuyla yapılan kontrol boyanmalarında hiç bir boyanma yoktu (Şekil 17E).

		GLUT 1	GLUT 3	GLUT 4
Granulosit	Öglisemi	3.5 ± 2.4	3.9 ± 2.1	3.4 ± 1.1
	Hipoglisemi	2.8 ± 0.5	5.2 ± 1.7	5.9 ± 1.6*
Monosit	Öglisemi	2.9 ± 1.5	2.3 ± 0.7	1.6 ± 1.0
	Hipoglisemi	3.2 ± 1.0	5.4 ± 2.3 *	1.7 ± 0.2

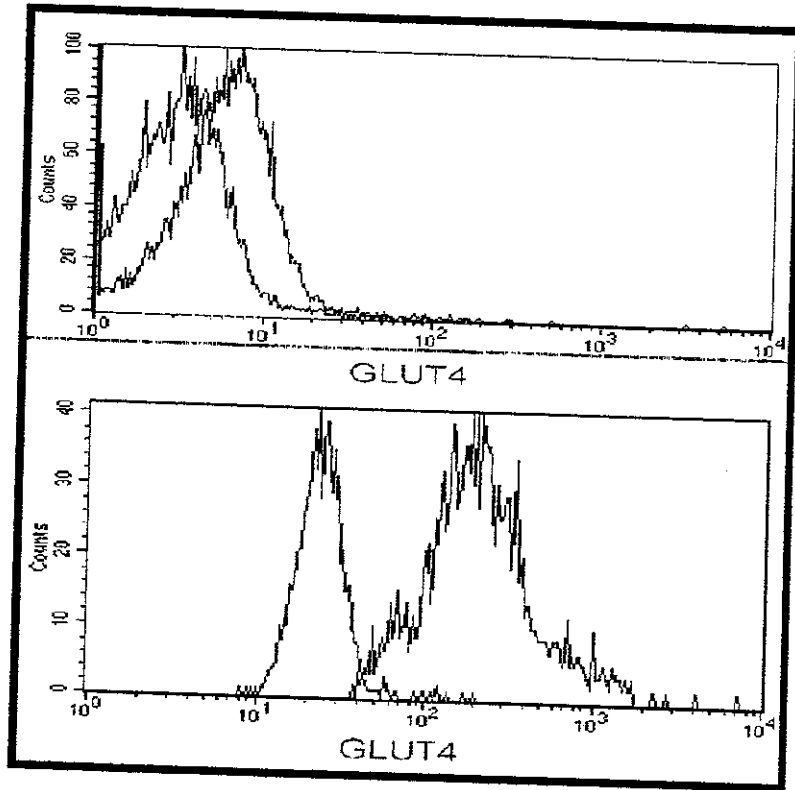
Tablo 5. Hipoglisemik ve Euglisemik granulosit ve monositlerdeki flow sitometrik olarak hesaplanan GLUT izoformlarının ekspresyonun gösteren tablo. GLUT izoformları için bulunan miktar non-immün tavşan serumuyla bulunan sayıya bölünüp elde edilen sayı 1,5 ise sınır seviyede pozitivite, 2 den büyük ise açık bir şekilde pozitif * $p < 0.05$



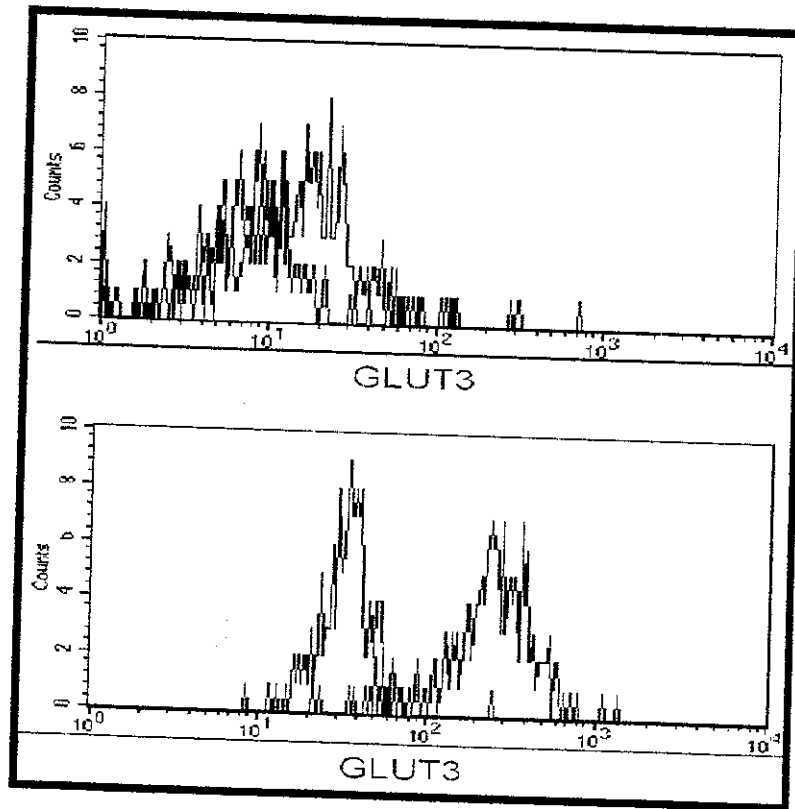
Şekil 17. İmmunohistokimyasal olarak hipoglisemik ve öglisemik beyaz kan hücrelerinde GLUT1 (A), GLUT3 (B), GLUT4 (C) ve CD45 (D) boyanmaları Kontrol kesitlerinde (E) primer antikor yerine tavşan non-immün serum kullanıldı Bütün fotoğraflar için büyüme X 200



Şekil 18. Hipoglisemik ve öglisemik beyaz kan hücrelerinde GLUT 1, 3 ve 4 için fluorosans sinyallerinin flow sitometri ile tespiti Hipoglisemik hastaların periferik lökositlerindeki flow sitometrik (akışkan hücre ölçer) ve immünohistokimya sonuçları.



Şekil 19. Öglisemik insan Granulositlerindeki GLUT 4 dağılımını gösteren histogram.



Şekil 20 Öglisemik insan Monositlerindeki GLUT 3 dağılımını gösteren histogram.

TARTIŞMA

Intrauterin hayatın her evresinde anneden embriyonik elemanlara yeterli miktarda glikoz transferi, uterusdaki embriyonun gelişiminin korunması ve yaşamını devam ettirmesi için önemlidir. Çünkü embriyo, oksidatif metabolizma için gerekli maddelerin çok azını üretmektedir. Diğer taraftan, implantasyon öncesinde uterus stromal hücrelerin, implantasyonun başarılı olması için gerçekleştirdikleri yeniden modellenme (desidualizasyon) için de enerji gereklidir.

GLUT 1 glikoz taşınımında plasental trofoblast gibi kan-doku bariyerindeki epitel hücrelerinde mevcut olan başlıca glikoz taşıyıcı izoformudur (74,131). Gen düzeyinde de sıçan embriyosunda GLUT 1 üretiminin gösterilmesi (76) implantasyon sonrasında gelişimin ilerleyen günlerinde de GLUT 1, temel glikoz taşıyıcı izoformu olarak görülmektedir (132). Çalışmamızın sonuçlarında, sıçan implantasyon periyodlarında GLUT 1 tüm embriyonik hücrelerde mevcut olduğunu tespit ettik. Bu sonuç daha önce fare morulasında GLUT 1 üretiminin varlığıyla ilgili yapılan çalışmalara bir kanıt teşkil edebilir (133). Bu verilerimiz de, GLUT 1'in genel olarak, embriyo için, temel glikoz taşıyıcı izoformu olduğunu desteklemektedir; ayrıca embriyonun glikoz taşıyıcılar aracılığı ile ATP üretimini gerçekleştirdiğini ve gerekli hücresele glikoz ihtiyacını bu şekilde temin edildiğine dair bir kanıt teşkil edebilir. Sıçan uterusunda hemen hemen bütün desidual hücreler GLUT 1 proteinini içermekteydi. Bu bulgu daha önce uterusda GLUT 1 mRNA sini tespit edilmesiyle (76) de uygunluk göstermektedir.

İmplantasyon sonrasında sıçan embriyolarında, organogenez esnasında oldukça fazla miktarda GLUT 3 üretiminin tespit edilmesi, aynı şekilde yoğun olarak GLUT 3 'ün desidual hücrelerde de varlığı (134) yeni tartışmaları beraberinde getirdi. Bu sonuç in situ hibridizasyon tekniği ile GLUT 3 mRNA'sının desidual hücrelerdeki üretimiyle ilgili bulguyla tersti (76). Bu çalışmada GLUT 3 proteini embriyonik hücre popülasyonlarında oldukça yoğun olarak tespit edildi. Bu bulgu sıçanlarda GLUT 3 mRNA'sının varlığı ile uyumluydu (76). Bu farklı veriler sıçan uterusunda GLUT 3 regülasyonunun post transkripsiyonunun farklı olabileceğini düşündürdü. Gebe olmayan sıçan uterusunda GLUT 3 tespit edilemediğine göre (128,135), GLUT izoformunun üretimindeki farklılık gebelik ile ilişkili olabilir.

GLUT 4 üretimi genel olarak insüline duyarlı dokularla sınırlıdır. Welche ve Gorski (135) tarafından GLUT mRNA ve proteinin normal sıçan uterusunda gösterilmesi, gebeliğin 1-8 günleri arasındaki uterusdaki GLUT 4 bulgularımız ile uyumludur. Özellikle endometriyal bezlerde ve miyometriyal kasta sürekli bir üretim mevcuttu. Uterus epitel hücrelerinde GLUT 1, GLUT 3 ve GLUT4 ile kolokalizasyon gösterirken ışık mikroskopi düzeyinde GLUT 4 molekülü GLUT 1 ve GLUT 3 den farklı olarak intrasellüler bir boyanma gösterdiler. GLUT 1 ve GLUT 3 moleküllerinin sentezi epitel hücrelerinin plasma membranında sınırlı kalırken GLUT 4 molekülü tüm epitel hücrelerde homojen bir dağılım gösterdi. GLUT 4 ün bu hücrelerde homojenizasyon göstermesi belki bu molekölün hücre içinde

depolanarak glikoz depolanması ile ilgili olabileceği şeklinde açıklanabilir. Diğer GLUT izoformları için rezerve depoları tespit edilememekle birlikte GLUT 1 in plasma membranında mevcut olması bu proteinin subsellüler olarak glikoz taşınımında yer aldığını göstermektedir (136). Gebe sıçan uterusunun tersine, embriyoda az olmakla birlikte GLUT 4 immunoreaktivitesinin pozitif olduğu embriyo kökenli dokularda açık ve net olarak gözlenmesi genel olarak embriyonik hücre popülasyonunda GLUT 4 sentezinin varlığı hakkındaki daha önceki çalışmalarla uygunluk göstermedi. Çünkü ilk olarak sunulan bu çalışmanın sonuçlarında implantasyon esnasında sıçan embriyosunda GLUT 4 pozitif olarak tespit edildi. Bu haliyle bulgularımız orijinaldir. Şimdiye kadar sadece sıçan beyninde en erken gebeliğin 14 gününde (137) ve sıçan plasentasında gebeliğin 14 ve 21. günleri arasında (138) GLUT 4 mRNA'ları tespit edilmiştir. GLUT 4 mRNA'si sığır blastosistinde tespit edilmesine karşın (139) daha önceki bir çok çalışmada GLUT 4 mRNA'si (76, 132, 134) ve proteini (140) sıçanlarda gebeliğin 9 ve 14 günleri arasında tespit edilemedi. GLUT 4 tarafından boyanan embriyonik dokular aynı zamanda insülin reseptör tarafından da boyanmaktadır. Bu bulgular preimplantasyon sıçan embriyolarındaki insülin reseptör mRNA üretimi ile uyumludur (141). İlaveten, embriyonik ve uterin insülin reseptör üretimi memelilerde farklı olarak sentez oldukları gösterilmiştir (142, 143, 144). Araştırmamızın bir bölümünü oluşturan gebeliğin 1-8 günleri arasında sıçan uterusunda embriyonun implante olabilmesi için yeniden modellenme (desidualizasyon) gerçekleşmektedir. Endometriyal stromal hücrelerdeki bu değişim için hücre metabolik olarak enerjiye ihtiyaç duymaktadır ve bu enerji büyük oranda glikoz tarafından karşılanmaktadır. Böylece uterustaki glikoz taşıyıcı proteinlerin varlığı akla uygundur. Uterustaki hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için sadece insülin görevli değildir. Aynı zamanda insülin tarafından düzenlenen ve glikozun hücreye alınmasını kolaylaştıran GLUT 4'de rol oynamaktadır. Ayrıca, gebeliğin geç dönemlerinde, GLUT 4 ideal olarak gebelik uterusu için glikoz ihtiyacını karşılayabilir. Çünkü gebeliğin devamında plazma insülin düzeyinin artmasına cevaben GLUT 4 aktivitesi de artmaktadır (145). Embriyonik hücrelerde 8 hücreli morula safhasına kadar insülin reseptörü görülmemektedir (146) ve buna paralel olarak glikoz metabolizması da aynı şekildedir. Embriyoda mitojenitenin artması ile birlikte insülin ortaya çıkmakta ve buna paralel olarak da glikoz taşınımı başlamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda hiperglisemik şartlar altında GLUT'ların geri düzenlenmesi aracılığıyla embriyonik gelişimde gecikme, duraklama ve apoptoz görülmesi (74, 147, 148) erken gebelik esnasında insülin tarafından GLUT regülasyonunun yapıldığı çalışmaların sonucunda üreme performansının hiperglisemik şartlarda normale dönmesi için insüline ihtiyaç olduğu belirlenmiştir (149, 150, 151). Bu şartlar altında GLUT 1, 3 ve 4 ün bir çok embriyonik hücredeki üretimine hormonların etkisiz olduğunu ileri süren görüşler (132, 157) oldukça şaşılacak bulgulardır. GLUT 8, 2000 yılında tespit edilen yeni glikoz izoformu olup fare blastosistinde yaygın olarak bulunduğu ve GLUT 4 gibi aynı şekilde insülin tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir (42). Bu yüzden GLUT 8, embriyoda GLUT 4 aksiyonuna göre daha önemli bir aday olabilir. Çünkü GLUT 8 in Km değeri GLUT 3 ün Km değerine yakın olup diğer GLUT'lardan farklıdır.

İnsan plasentasında glikojen metabolizması hala günümüze kadar çözülememiş bir paradokstur. Diabet esnasında karaciğer, yağ ve iskelet kasında glikojen azalması gözlenirken plasentada glikojen artmaktadır. Çünkü glikojen sentezi insüline bağımlıdır. Böyle olmasına rağmen plasentada glikojen sentezi ve fosforilasyonuna in vivo ve in vitro şartlarda insülinin etkili olmadığı yönünde görüşler vardır (153). Plasentadaki bu paradoks sonucunda diyabetik plasentalarda anormallikler gözlenmekte ve embriyo aşırı glikojen ve glikozdan dolayı insülin üretmektedir. Bunun sonucunda da embriyoda "makrozomiya" olarak isimlendirilen büyüme anormalliği görülmektedir.

Yıllar önce normal ve diyabetik plasentalarla yapılan elektron mikroskopik çalışmalarda glikojen'in öncelikle fetal endotelde ve az olarak da trofoblast ta varlığı gösterilmiştir (154). Fakat günümüze kadar plasentadaki glikojen metabolizması normal ve diyabetik şartlar altında açıklanamamıştır. Bunun en büyük sebebi glikojen metabolizmasıyla ilişkili olan basamaklar için gerekli antikor ve cDNA ların elde edilememesi ve ayrıca diyabet gebeliğinin insülin tedavisi olmadan devam edememesidir.

Plasenta gebeliğin geç dönemlerine kadar yeterli miktarda glikozu üretme yeteneğine sahip değildir. Plasental glikojen biosentezinin ilk adımı maternal veya fetal dolaşımdaki glikoz alımıyla sınırlıdır. Bu mekanizma yoğunluk gradyeni boyunca kolaylaştırılmış diffüzyonla gerçekleşmektedir. Kolaylaştırılmış diffüzyon integral membran glikoproteinleri olan ve GLUT 1-12 olarak isimlendirilmiş proteinleri içerir. Çalışmamızda bu taşıyıcı proteinlerden GLUT 3 ü seçmemizin nedeni, fetal endotel hücrelerinde en yoğun olarak bulunan glikoz taşıyıcı izoformu olmasından kaynaklanmaktadır. Bu da son derece doğaldır. Çünkü, GLUT 3 glikoza yüksek affinitesinden dolayı enerji ihtiyacı fazla olan dokularda ve hücrelerde bulunmaktadır. Glikojen sentezi orijini bilinmeyen bir karbonhidrat primeri ile başlamakta ve glikojen sentezinin diğer basamakları için UDP glikoz, glikojen sentaz ve dallanmış yıkım enzimleri gerekmektedir. Daha önce kabul edilen metabolizma aşamaları yeni bulunan glikoziltransferaz glikojenin (EC 2.4.1.186, karbonhidrat değil, protein) (155) ve glikojen öncüsü olan proglükojen (156) in bulunmasıyla değişmiştir. Bir çok dokuda ve hücrede glikojen metabolizmasında glikojenin anahtar role sahip olduğu tespit edilmiştir (157, 158, 159).

Çalışmamızda immunohistokimya ve Western Blot metotları ile insan ilk trimester ve term plasentasında glikojen sentezi için primer protein olan glikojenin ile yine aynı şekilde hücresel glikojen metabolizmasının bir potansiyel regülatörü olabilecek olan GLUT 3 üretimini inceledik.

İlk kez plasentada glikojen sentezi için gerekli olan glikojenin proteinin zamansal ve uzaysal dağılımı gösterildi. Term plasentasında glikojenin yoğun olarak fetal damarların endotel hücrelerinde tespit edilmesi, bu bulgunun daha önceki çalışmalarda insan plasental endotelyumundaki glikojen bulgusuyla uyumlu olduğunu gösterir (154). Diğer glikojenin pozitif hücre popülasyonları ise villüs ve ekstrasvillös trofoblast hücreleri ile desidual hücrelerdir. İlk trimester plasentalarındaki glikojenin dağılımı term plasentalarındaki dağılımı andırıyor olmasına rağmen immunoreaktivite yoğunluğu daha azdı. Karaciğerde olduğu gibi

(158), Western Blot analizlerinde hem serbest hem de glikozillenmiş glikojenin plasental villöz dokularında 37 Kda ağırlığında bandlar gösterdiler. Amyolitik glikojen yıkımı glikojenin immunoreaktivitesi için etkisizdi. Bu serbest ya da depolanmış glikojenin olduğunu gösterir. Term trofoblastlarıyla yapılan fluorometrik çalışmada insülinin plasental glikojen içeriğine etkisi olmadığı (152) gösterildi. Fakat günümüze kadar endotel hücrelerinde glikojen sentezine insülinin veya glikozun etkisi araştırılmış değildir.

GLUT 3 ektravillöz trofoblast ve villös sitotrofoblastlarda üretilmesi, endotel hücrelerin GLUT 3 için yoğun olarak immunopozitif olması, GLUT 3 ün endotel hücrelerindeki lokalizasyonu hakkındaki daha önceki çalışmalarda da göstermiştir. Çalışmamızda glikojenin proteinin ilk trimesterde terme göre anlamlı olarak az miktarda olması gebeliğin erken döneminde plaseenta aracılığıyla embriyoya glikoz taşınımının daha fazla yapıldığını düşündürdü. Çünkü, embriyo plasentaya göre glikoz ihtiyacı bakımından önceliğe sahip olup bu dönemde plaseenta, glikozu glikojen olarak depolamak yerine direkt olarak embriyoya taşınımı tercih ediliyor olabilir. Bu hipotezimizi gözlediğimiz GLUT 3 sonuçları da desteklemektedir. Çünkü GLUT 3 glikojenin proteinin tersine ilk trimesterde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde miktar olarak daha çoktu. Bu bulgu bu dönemde embriyoya glikoz taşınımının terme göre daha fazla olduğunu göstermektedir ki bu da son derece akla uygundur. Embriyo gelişimin son dönemlerinde az da olsa ihtiyacı olan glikozu kendisi üretebilmektedir.

Fertilizasyondan sonra maternal lökositlerin aktivasyonu açıklanmamış bir fenomendir (160). Lökositler implantasyondan doğuma kadar gebeliğin devam etmesinde fetüsü infeksiyonlara (161) karşı koruyarak çok önemli bir role sahiptir. Böylece gebelik esnasında lökositlerin sayı ve fonksiyonlarındaki artış "fizyolojik lökositoz" olarak isimlendirilmektedir.

Gebe uterusunda genetik olarak maternal ve fetal dokuların farklı olmalarına rağmen spesifik immünitinin baskılanmasıyla implantasyonun gerçekleştiği bilinmektedir (162). Diğer yandan bir çok çalışma sonucunda gebelik esnasında spesifik olmayan (non-spesifite) immünitinin arttığı tespit edilmiştir. Hem spesifik hem de non-spesifik immünite de temel olan hücreler sitümüle olan lökositlerdir. Beyaz kan hücrelerinin aktivasyonunu onların metabolik-enerji ihtiyacı etkilemekte (163) ve gerekli olan enerji sadece glikoliz ile karşılanabilmektedir (164). Glikoz ya ekstrasellüler ortamdan alınarak sağlanmakta ya da intrasellüler glikojen katabolizmasıyla temin edilmektedir. Glikojen sentezinin, glikojenin ve glikojen sentez enzimlerinin aktivitesinden ziyade glikoz taşınımıyla sınırlandırıldığına dair kanıtlar vardır (165,166,167). Gözlemler sonucunda anlaşılmıştır ki lökositlerin fonksiyonlarını yapabilmeleri için yeterli miktarda glikoz sağlanmalıdır. "Hiperlipidemi"de, "diabetes mellitus" ve "arteroskleroz" infeksiyonlarında ve bazı kanser çeşitlerinde immün hücrelerin glikoz alımı bozulmaktadır (168). Daha önce yapılan kinetik deneyler sonucunda lökositlerin basit kolaylaştırılmış glikoz taşıma sistemine sahip oldukları gösterilmiştir (169). Fakat bu taşıyıcı proteinlerin beyaz kan hücrelerindeki üretimi veya düzenlenmesi ile ilgili detaylı bir çalışma olmadığı için bu konular hala muallaktır. Lökositlerdeki nadir olmakla birlikte glikoz taşıyıcı protein senteziyle ilgili deneyler genellikle blotting çalışmalarını

çermektedir. Bu blotting çalışmalarında da farklı lökosit subpopulasyonları kullanılmış olup genelde kültüre edilmiş lökositlere öncelik tanınmıştır. şüphesiz bu in vitro çalışmalar in vivo çalışmaların yerini tutmaz. Hücre kültürü çalışmalarında esas olarak lökosit gen işlevinin kontrol şartları altındaki etkileri gösterilmiştir (170,171). Bu yüzden ilk kez immunohistokimyasal ve flowsitometrik metodlarla normal ve gebe kadınların gebelik trimesterleri boyunca glikoz taşınımında rol alan GLUT 1, 3 ve 4 proteinlerinin etkilerinin sonuçları, bu araştırmanın bir bölümünde sunuldu. Diğer taraftan hipoglisemik insanların lökositlerinde, glikoz eksikliğinin, glikoz taşıyıcı proteinlerin üretimine etkisini araştırılması ve hipoglisemide glikoz taşıyıcı proteinlerinin kantitatif olarak değiştiğini flow sitometri ile tespit edilmesi konuya yeni boyut kazandırmıştır.

Gebelik süreci boyunca glikoz taşıyıcı proteinlerde artma ve azalmalar saptanması dikkat çekicidir. GLUT 1'in granulositlerde termde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalması, gebe ve normal kadınların monositlerinde GLUT 1 üretiminde bir farklılık olmaması, Granulositlerde normale göre 3. trimesterde GLUT 1 azalması tespit edilebilen temel değişikliklerdi. GLUT 3 ve GLUT 4 de granulositlerde anlamlı bir değişiklik görülmedi. GLUT 1 in term deki granulositlerdeki azalışı, termdeki granulosit sayısının paradoksu ile ilişkili olabileceğini ileri süren görüşleri (172) destekler nitelikte olup diğer taraftan term'e doğru azalan glikoz yoğunluğuyla uyumludur (173). GLUT 1' in granulositlerdeki fonksiyonlarının açıklanabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Granulositler ve monositler sayısal olarak gebelik esnasında artarlarken (174,175), bu hücrelerin aktivasyonu için glikoz seviyesinin arttığı ve bu şekilde gerekli ATP nin kazanıldığı bildirilmiş olup (163), GLUT 3'ün ikinci trimesterde monositlerde birinci trimestere göre anlamlı bir artış gösterip termde tekrar azalması konunun karmaşıklığını göstermektedir. İkinci trimesterde monositlerde GLUT 3 artışı, terme doğru daha önce yapılan ve monositlerin sayısal olarak ikinci trimesterde artıp termde azaldığıyla uygunluk göstermektedir (174).

Sunulan bu çalışmanın sonuçlarına göre monositlerde, GLUT 4 gebeliğin ilerlemesiyle birlikte bir azalma gösterirken 2. trimester ile 3. trimester arasında anlamlı bir artış gösterdi. Oysa GLUT 3'ün, GLUT 4 ün azalış gösterdiği 2. trimesterde anlamlı bir artış göstermesi ilginçtir. GLUT 3'ün glikoza karşı yüksek affinitesi düşünüldüğünde GLUT 4 deki bu azalışı GLUT 3 tarafından kompanse edebilir. Monositlerdeki GLUT 4 değişimi ne 2 trimesterdeki insülin reseptör bağlanmasıyla (176) ne de plasma insülin seviyesiyle (177) ayrıca ne de insülin direnciyle (178) uyumlu değildi. Bu şunu göstermektedir; monositlerdeki GLUT 4 üretimi insülininden başka hormonların veya başka endokrin faktörlerin kontrolü altında regüle edilmektedir.

HücreSEL HEKZOS TAşIYICILARINI İÇEREN BİR ÇOK DOKUDA, GLIKOZ YOKLUĞUNDA GENEL olarak hücreSEL HEKZOS TAşINIMININ arttığı yoğun olarak görülmesine rağmen (14, 122) kan hücreleri için glikoz taşıma sisteminin düzenlenmesi açık değildir. Hatta temel olarak glikoz taşıyıcı proteinlerin lökositlerdeki üretimi hakkında bilgiler çok az olmakla birlikte bu sonuçlarda birbiriyle tezatlık içermektedir. Çalışmamızda hipoglisemik insanların açlık plazma glikoz yoğunluğu ortalama 39 mg/dl olarak bulundu. Bu değer, yemek sonrası fizyolojik olarak azalan glikoz ile ilişkili olmamalı

ya da devamında hiperinsülinemi olmaması beklenmelidir. İnsülinün yemekten yarım saat sonra pik yapması (179) ve sonrasında 2 saat esnasında bazal duruma geldiği biliniyor (180) Bu şartlar altında insülin ve büyüme hormon kan düzeyi ya en alt ya da ona yakın yoğunluğuk düzeyindedir (179). Bu yüzden açlık kan şeker düzeyi genel beslenme için iyi bir indikatör olmalıdır. Bu çalışmaların sonuçları göstermiştir ki glikoz yokluğunda periferal kandaki granulosit ve monositlerdeki glikoz taşıyıcılarının üretimi glikoz yokluğuna uygun olarak değişmektedir. GLUT 1, total hücrel membran proteinlerinin % 3,5 uğunu içermektedir (181) ve özellikle glikoz alımının gerçekleştiği eritrosit ve kan doku bariyerlerinin epitel hücrelerinde üretilmesi (74, 136) bunu doğrulamaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, insan lökositlerinde GLUT 1 in monositlerde ve granüositlerde yoğun bir şekilde üretildikleri ortaya konulmuştur. Bu sonuç daha önceki immunoblot çalışmalarıyla uygunluk göstermektedir (182). Ayrıca, GLUT 1, monositlerden köken alan makrofajlarda üretilmektedir (183,184) Sonuçlarımız GLUT 1 in genel olarak temel glikoz taşıyıcı olduğu şeklindeki hipotezle uyum sağlamaktadır. GLUT 3, yüksek glikoz ihtiyacı olan hücrelerde mevcut olması (128), bulgularımızla da GLUT 3 granüositlerde ve monositlerde oldukça yoğun olarak bulunması çalışmanın orijinal bir yönünü yansıtıyor. Granüositlerde, glikoz taşıyıcı proteinlerin üretimi ile ilgili günümüze kadar herhangi bir bilginin olmaması bulgularımızın orijinalliğini güçlü kılmaktadır. Bu çalışmanın monositlerdeki GLUT 3 sonuçlarımız daha önce yapılan Northern-Western Blot (185) çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

Konuya metabolik öncelikler açısından baktığımızda, in vivo olarak monositlerin ve granüositlerin GLUT 3 ihtiva etmesi onlara bir avantaj sağlamaktadır. Monositler ve granulositler yüksek metabolik aktiviteye sahiptirler. Onların sürekli olarak yüksek miktarda enerji ihtiyaçlarını sağlayamadıkları göz önünde tutulursa, özellikle trans endotelyal diapedes ve infiltrasyondan sonra, hipoglisemik koşullarda lökositlerin inflamasyon ve infiltrasyon gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip olacakları durumlarda sürekli olarak kendilerine glikoz sağlamaları gerekir (186). Bu durumlarda monosit ve granüositlerin GLUT 3 içermesi kendilerine bir avantaj sağlayabilir.

Daha önceki bir çalışmada GLUT 4 monositlerde western blot analiziyle gösterilememesine karşın (122) biz, GLUT 4'ün monositlerde ve granüositlerde var olduklarını tespit ettik. Hipoglisemik şartlar altında GLUT 4 ile GLUT 1 kıyaslandığında aralarında bir korelasyon yoktur. GLUT 1'in asimetric taşınımı göz önüne alındığında GLUT 1 in glikozu dışarıya verme kabiliyeti içeri alma kabileyitinden 4 kat daha fazladır (187). Bundan dolayı GLUT 4'de granüositlerdeki hücre içine glikoz alışındaki artış belki GLUT 1 deki azalıştan kaynaklanıyor olabilir. İnsüline duyarlı dokularda GLUT 4 aktivasyonu ve lokalizasyonu hücre yüzeyinde veya sitoplazmik membran parçacıklarında insülin sinyaliyle indüklenmektedir (87). Fakat GLUT 4 üretimi insüline duyarlı dokularla sınırlı değildir (188). Bu yüzden insülin haricinde hormonlar tarafından hipoglisemide GLUT 4 artışının speküle edilmesi kuvvetli bir ihtimaldir. Eğer endokrin faktörler bunu başaramıyorsa, gerçi bizim çalışmamızda da buna bir kanıt bulunamadı, fakat alternatif bir aday olarak mUbc9 enzimi gösterildi (189) Sentrin ile konjuge enzim olan mUbc9 enziminin granüositlerde glikoz taşıyıcı proteinlerin sentezine etkili olması bu enzimin bizim sonuçlarımıza paralel bir şekilde GLUT 4' ün hücrel

olarak artmasını ve GLUT 1 in azalarak glikoz mekanizmasını düzenlediğini gösterir (179).

Çalışmamızda lenfositlerin büyük bir kısmı için tüm glikoz taşıyıcı izoformlarının negatif olduğunun tespit edilmesi son derece ilginçtir Aynı şekilde daha önceki çalışmalarda GLUT 1 (190), GLUT 3 ve GLUT 4 için de (182, 190) negatif sonuçlar bulunmuştur. GLUT 3 ile ilgili lenfosit çalışmaları genel olarak blot çalışmaları olup (185,190) lenfositlerin tam olarak saf bir şekilde izole edildiği şüphelidir.

SONUÇLAR

Glikoz taşıyıcıları hakkında varılan sonuçları maddeler halinde özetlemek gerekirse;

- 1- GLUT 1, 3 ve 4 'ün embriyonal ve maternal dokularda, özellikle implantasyon evresinde kolaylaştırılmış basit glikoz taşımında görev aldıkları,
- 2- İnsan plasental bariyerde " glikojenin" proteini aracılığıyla immatür glikojenden, glikojen işlenerek kullanılır hale getirildiği, GLUT 3 ile glikojenin proteinin birlikte bu mekanizmayı işlettikleri,
- 3- Gebelik esnasında glikoz taşıyan proteinlerin miktarında, fizyolojik lökositoza uygun olarak azalmanın olduğu, azalan taşıyıcının görevinin bir başkası tarafından kompanse edilebileceği ve her izoform taşıyıcısının farklı roller üstlenebileceğini,
- 4- GLUT 1, 3 ve 4 proteinlerinin, granulositlerde ve monositlerde yoğun olarak üretildikleri, taşıyıcı proteinlerin hipoglisemiye farklı cevap verebildiği ve glikoz yokluğunda hücrelerin glikoz eksikliklerinden kaynaklanabilecek stres gibi faktörlerden korunmak için bir mekanizma geliştirebilecekleri sonucuna varılabilir.

KAYNAKLAR

- 1- DeFronzo, R.A and Ferrannini, E.R Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding In Pots, J.T , Rubenstein,A.H , Cahill, G F , Martini L. (eds) , Saunders Press, Philadelphia 1995, pp 1389-1410.
- 2- Gerich, J.E and Campbell, P.J (1988) Overview of counterregulation and its abnormalities in diabetes mellitus and other conditions *Diabetes Metab. Rev.* 4, 93-111.
- 3- Owen, O.E., Felig, P , Morgan, A.P. et al (1969) Liver and kidney metabolism during prolonged starvation *J. Clin Invest* 48, 574-83.
- 4- Tirone, A T and Brunicardi C. (2001) Overview of glucose regulation *World J Surg* 25, 461-467
- 5- Alonso,M D., Lomako,J., Lomako,W.M. et al. (1995) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9, 1126-37.
- 6- Mueckler, M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219, 713-25
- 7- Mueckler, M.M (1992) The molecular biology of mammalian glucose transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1, 12-20.
- 8- Devaskar, S.U and Mueckler, M.M. (1992) The mammalian glucose transporters *Pediatr Res.* 31, 1-13
- 9- Gould, G.W. and Holman, G.D. (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression *Biochem J.* 295, 329-41.
- 10- Bell, G L., Kayano, I., Buse. et al. (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters *Diabetes Care.* 13,198-208.
- 11- Baldwin, S A., Baldwin, J.M and Lienhard, G.E. (1982) Monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Characterization of an improved preparation. *Biochemistry.* 21, 3836-42 .
- 12- Baldwin, S.A., Gorga, J.C. and Lienhard, G.E. (1981) The monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Transport activity upon reconstitution. *J Biol Chem* 256. 3685-3689
- 13- Mueckler, M , Caruso, C., Baldwin, S.A. et al. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter *Science,* 229, 941-5.
- 14- Kahn, B.B. and Flier, J.S. (1990) Regulation of glucose-transporter gene expression in vitro and in vivo. *Diabetes Care* 13, 548-64.
- 15- Takata, K. and Hirano, H (1997) Mechanism of glucose transfer cross the human and rat placental barrier: A review, *Microsc Res. Tech.* 38, 145-152
- 16- Flier, J.S., Mueckler, M., McCall, A.L. et al. (1987) Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissues of rat and man. *J. Clin. Invest.* 79, 657-61.
- 17- Axelrod, J.D and Pilch, P.F (1983) Unique cytochalasin B binding characteristics of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry.* 22, 2222-7
- 18- Thorens,B , Sarkar, H K , Kaback, H R. et al. (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55, 281-290.

- 19- Fukumoto, H, Seino, S, Imura, H et al. (1988) Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5434-8
- 20- Thorens, B, Cheng, Z.Q., Brown, D. et al (1990) Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am. J. Physiol.* 259, C279-85,
- 21- Orci, L., Thorens, B, Ravazzola, M. et al (1989) Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science.* 245, 295-7.
- 22- Matschinsky, F.M (1996) A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 45, 223-41.
- 23- Williams, T.F., Exton, J.H., Park, C.R. et al (1968) Stereospecific transport of glucose in the perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 215, 1200-9.
- 24- Gould, G.W., Brant, A.M., Kahn, B.B. et al. (1992) Expression of the brain-type glucose transporter is restricted to brain and neuronal cells in mice. *Diabetologia.* 35, 304-9.
- 25- Shepherd, P.R., Gould, G.W., Colville, C.A. et al. (1992) Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 149-54.
- 26- Birnbaum, M.J. (1992) The insulin-sensitive glucose transporter. *Int. Rev. Cytol.* 137, 239-97
- 27- Taylor, L.P. and Holman, G.D. (1981) Symmetrical kinetic parameters for 3-O-methyl-D-glucose transport in adipocytes in the presence and in the absence of insulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 642, 325-35
- 28- May, J.M. and Mikulecky, D.C. (1982) The simple model of adipocyte hexose transport. Kinetic features, effect of insulin, and network thermodynamic computer simulations. *J. Biol. Chem.* 257, 11601-8.
- 29- Holman, G.D., Kozka, I.J., Clark, A.E. et al. (1990) Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 265, 18172-9.
- 30- Pedersen, O. and Gliemann, J. (1981) Hexose transport in human adipocytes: factors influencing the response to insulin and kinetics of methylglucose and glucose transport. *Diabetologia.* 20:630-5.
- 31- Ploug, I., Galbo, H., Vinten, J. et al. (1987) Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am. J. Physiol.* 253, E12-20.
- 32- Dohm, G.L., Tapscott, E.B., Pories, W.J. et al. (1988) An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 82:486-94.
- 33- Stephens, J.M. and Pilch, P.F. (1995) The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT 4, the major insulin responsive glucose transporter. *Endocr. Rev.* 16, 529-46
- 34- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H. et al. (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.* 265, 13276-82.

- 35- Davidson, N O , Hausman, A M , Ifkovits, C.A. et al. (1992) Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am. J. Physiol.* 262, C795-800.
- 36- Burant, C F , Takeda, J , Laroche, B E et al. (1992) Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J. Biol. Chem.* 267,14523-6.
- 37- Doege, H , Bocianski, A., Joost, H.G. et al. (2000) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.* 350, 771-6
- 38- Waddell, I D, Zomerschoe, A.G., Voice, M.W et al. (1992) Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem. J.* 286,173-7.
- 39- Joost, H.G. and Thorens, B. (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol.* 18, 247-56.
- 40- Doege, H, Schurmann, A., Bahrenberg, G. et al. (2000) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol. Chem.* 275, 16275-80.
- 41- Ibberson, M, Uldry, M and Thorens, B. et al. (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol. Chem.* 275, 4607-12.
- 42- Carayannopoulos, M.O, Chi, M.M., Cui, Y. et al. (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 97, 7313-8.
- 43- Reagan, L.P, Gorovits, N., Hoskin, E.K. et al. (2001) Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 98, 2820-5
- 44- Phay, J.E., Hussain, H.B. and Moley, J.F. (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66, 217-20.
- 45- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R. and Chen, Y I. (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72, 113-7.
- 46- Doege, H, Bocianski, A, Scheepers, A. et al. (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* 359, 443-9.
- 47- Benirschke K, Kaufmann P. (1995) *Pathology of the human placenta*. Springer Verlag pp 1-13
- 48- Page, K R. (1993) *The physiology of the human placenta*. University College London Press pp. 3-34.
- 49- Demir R. (1995) *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*. Palme yayıncılık pp. 179-209.
- 50- Bloxam, D L , Bax, B E. and Bax, C.M. (1997) Culture of syncytiotrophoblast for the study of human placental transfer. Part II: Production, culture and use of syncytiotrophoblast. *Placenta*, 18, 99-108.

- 51- Bloxam, D.L., Bax, C.M. and Bax BE. (1997) Culture of syncytiotrophoblast for the study of human placental transfer Part I: Isolation and purification of cytotrophoblast. *Placenta*, 18, 93-8.
- 52- Liu, F, Soares, M.J and Audus, K.L (1997) Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo *Am J Physiol* 273, C1596-604.
- 53- Freinkel, N. (1980) Banting lecture 1980. of pregnancy and progeny *Diabetes*, 29,1023-35
- 54- Barker, D.J., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M et al (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life *Lancet*, 341, 938-41
- 55- Soares, M., Chapman, B.M., Rasmussen, C.A. et al. (1996) Differentiation of trophoblast endocrine cells *Placenta*, 17, 277-89.
- 56- Risek B and Gilula NB. (1991) Spatiotemporal expression of three gap junction gene products involved in fetomaternal communication during rat pregnancy *Development*, 113, 165-81
- 57- Knipp, G.I., Audus, K.L. and Soares, M.J. (1999) Nutrient transport across the placenta. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38, 41-58
- 58- Hunt, J.S., Deb, S., Faria, I.N. et al, (1989) Isolation of phenotypically distinct trophoblast cell lines from normal rat chorioallantoicplacentas. *Placenta*, 10,161-77.
- 59- Shi, F, Soares, M.J., Avery, M. et al, (1997) Permeability and metabolic properties of a trophoblast cell line (HRP-1) derived from normal rat placenta *Exp. Cell Res.* 234,147-55.
- 60- Illsley, N.P. (2000) Glucose transporters in the human placenta *Placenta*, 21, 14-22.
- 61- Aldoretta, P.W. and Hay, W.W. (1995) Metabolic substrates for fetal energy metabolism and growth *Clin.Perinatol.* 22, 15-37.
- 62- Kalhan, S.C., D'Angelo, L.J., Savin, S.M. et al. (1979) Glucose production in pregnant women at term gestation *J. Clin. Invest* 63, 388-394.
- 63- Page KR. (1993) *The physiology of the human placenta* pp 60-71 University College London Press
- 64- Desoye, G. and Shafir, E. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. In *Molec. Aspect Med*, vol 15 (ed.) Baum H, UK: Elsevier Science pp.505-682
- 65- Mouzon, S.H. and Shafir, E. (2001) Carbohydrate and fat metabolism and related hormonal regulation in normal and diabetic placenta *Placenta*, 22, 619-27.
- 66- Eaton, B.M., Leichtweiss, H.P., Short, A.H. et al, (1978) Transport of hexoses across the trophoblast in the dually perfused isolated placenta of the guinea-pig *Proc. Physiol. Soc.* 1, 60-1.
- 67- Hay, W.W., Sparks, J.W., Wilkening, R.B. et al, (1984) Fetal glucose uptake and utilization as functions of maternal glucose *Am. J. Physiol.* 246, E237-E242
- 68- Schneider, H., Challier, J.C. and Dancis, J. (1981) Transfer and metabolism of glucose and lactate in human placenta studied by a perfusion system in vitro, *Placenta*, 2, 129-38.
- 69- Holmberg, N.G., Kaplan, B., Karvonen, M.J. et al, (1970) Permeability of the human placenta to glucose, fructose, and xylose. *Acta. Phys. Scand* 36, 291-99.
- 70- Rice, P.A., Rourke, J.E. and Nesbitt, R.E.L. (1976) in vitro perfusion studies of human placenta. IV. Some characteristics of the glucose transport system in the human placenta *Gynecol. Invest* 7, 213-21.

- 71- Johnson, L.W. and Smith, C.H. (1985) Glucose transport across the basal plasma membrane of human placental syncytiotrophoblast. *Biochim Biophys Acta.*, 815, 44-50
- 72- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M. et al. (1992) Localization of erythrocyte/HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in human placental villi. *Cell Tissue Res* 267, 407-12
- 73- Jansson, I., Wennergren, M., and Illsley, N.P. (1993) Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and intrauterine growth retardation. *J.Clin Endocrinol. Metab* 77, 1554-62
- 74- Hahn, T., Barth, S., Weiss, U. et al. (1998) Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development? *FASEB J* 12, 1221-31.
- 75- Shin, B.C., Fujikara, K., Suzuki, T. et al. (1997) Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: A possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology*, 138, 3997-4004.
- 76- Zhou, J. and Bondy, C.A. (1993) Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J Clin Invest* 91, 845-52
- 77- Shin, B.C., Suzuki, T., Matsuzaki, T. et al. (1996) Immunolocalization of GLUT1 and connexin 26 in the rat placenta. *Cell Tissue Res* 285 83-89.
- 78- Das, U.G., Sadiq, H.F., Soares, M.J. et al. (1998) Time-dependent physiological regulation of rodent and bovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. *Am J. Physiol.* 274, 339-47.
- 79- Sakata, M., Kurachi, H., Imai, T. et al. (1995) Increase in human placental glucose transporter-1 during pregnancy. *Eur. J. Endocr.* 132, 206-12
- 80- Jansson, I., Cowley, E.A., and Illsley, N.P. (1995) Cellular localization of glucose transporter messenger RNA in human placenta. *Reprod. Fertil Dev* 7, 1425-30.
- 81- Haber, R.S., Weinstein, S.P., O'Boyle, E. et al. (1993) Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology*, 132, 2538-43.
- 82- Barros, L.F., Yudilevich, D.L., Jarvis, S.M., et al. (1995) Quantitation and immunolocalization of glucose transporters in the human placenta. *Placenta*, 16, 623-33
- 83- Wolf, H.J., and Desoye, G. (1993) Immunohistochemical localization of glucose transporters and insulin receptors in human fetal membranes at term. *Histochemistry*, 100, 379-85.
- 84- Clarson, L.H., Glazier, J.D., Sides, M.K., et al. (1997) Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (JAr) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta*, 18, 333-9
- 85- Boileau, P., Mrejen, C., Girard, J. et al. (1995) Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. *J.Clin Invest* 36, 309-17
- 86- Haugel-de, M.S., Challier, J.C., Kacemi, M. et al. (1997) The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 82, 2689-94.
- 87- Xing, A.Y., Challier, J.C., Lepercq, J., et al. (1998) Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 4097-101

- 88- Eaton, B.M and Yudilevich, D.L (1981) Uptake and assymetric efflux of amino acids at maternal and fetal sides of the placenta, *Am. J. Physiol.* 241, C106-12
- 89- Enders, R.H., Judd, R.M., Donohue, T.M. et al. (1976) Placental amino acid uptake III Transport systems for neutral amino acids, *Am. J. Physiol.* 230, 706-10
- 90- Christensen, H.N (1992) Amino acids nutrition across the placenta, *Nutr. Rev.* 50,13-5.
- 91- Moe, A.J (1995) Placental amino acid transport, *Am.J.Physiol.* 268, C1321-31
- 92- Eleno, N., Deves, R., and Boyd, C.A., (1994) Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *J. Physiol* 749, 291-300.
- 93- Fei, Y.J., Prasad, P.D., Leibach, F.H. et al. (1995) The amino acid transport system y+L induced in *Xenopus laevis* oocytes by human choriocarcinoma cell (JAR) mRNA is functionally related to the heavy chain of the 4F2 cell surface antigen. *Biochemistry* 34, 8744-51
- 94- Malandro, M.S., Beveridge, M.J., Kilberg, M.S. et al. (1994) Ontogeny of cationic amino acid transport systems in rat placenta *Am. J. Physiol.* 267 C804-11
- 95- Matthews, J.C., Beveridge, M.J., Malandro, M.S. et al. (1998) Activity and protein localization of multiple glutamate transporters in gestation day 14 vs day 20 rat placenta, *Am. J. Physiol.* 274, C603-14.
- 96- Harding, J.E. (1993) Placental physiol, in Gluckman PD, Heymann MA (Eds.), *Perinatal and Pediatric Pathophysiology: A Clinical Perspective*, Edward Arnol, London pp 136-40
- 97- Crawford, M.A., Doyle, W., Leaf, A. et al. (1993) Nutrition and neurodevelopmental disorders *Nutr. Health* 9, 91-7
- 98- Kuhn, D.C. and Crawford, M. (1986) Placenta fatty acid transport and prostaglandin synthesis, *Prog Lipid res.* 25, 345-53
- 99- Jumpsen, J. and Clandinin, M.I. (1995) *Brain Development: Relation ship To Diatary Lipid and Lipid Metabolism*, AOCS Press, Champaign, IL,
- 100- Hornstra, G., Houwelingen, A.C.V., Foreman-van, D.M. (1995) Essential fatty acids in pregnancy and early human development, *Eur. J. Obstet Gynecol.* 61, 57-62.
- 101- Campbell, F.M., Bush, P.G., Veerkamp, J.H. et al (1998) Detection and localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta *Placenta*, 19 409-15
- 102- Kenneth, R. (1993) *The physiology of the human placenta*. University College London Press pp 52-57.
- 103- Kenneth, R. (1993) *The physiology of the human placenta*. University College London Press. pp 111-119
- 104- Barbehenn, E.K., Law, M.M., Brown, J.G., et al (1974) The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc Natl. Acad. Sci U S A.* 71, 1056-60.
- 105- Martin, K.L. and Leese, H.J. (1995) Role of glucose in mouse preimplantation embryo development *Mol Reprod Dev.* 40, 436-43.
- 106- Robinson, P., Smith, P., Benos, D. (1990). Hexose transport in preimplantation rabbit blastocysts *J. Repr. Fertil.* 89, 1-11
- 107- Hogan, A., Heyner, S., Charron, M.J. et al. (1991) Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development.* 113, 363-72

- 108- Aghayan, M , Rao, L.V., Smith, R.M. et al. (1992) Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development*. 115, 305-12.
- 109- Morita, Y., Tsutsumi, O , Hosoya, I et al. (1992) Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts *Biochem. Biophys Res. Commun* 188, 8-15.
- 110- Pantaleon, M., Harvey, M B , Pascoe, W.S et al. (1997) GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 94, 3795-800.
- 111- Pantaleon, M. and Kaye, P.L. (1998) Glucose transporters in preimplantation development *Rev. Reprod* 3, 77-81.
- 112- Thorans, B. (1996) Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes *Am. J. Physiol.* 270, G541-53
- 113- Gaither, K., Quraishi, A.N., Illsley, N.P (1999) Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 695-701
- 114- Magnani, M., Stocchi, V., Canestrari, F., (1985) Human erythrocyte hexokinase deficiency: a new variant with abnormal kinetic properties. *Br. J. Haematol.* 61, 41-50
- 115- Hahn, T., Hartmann, M , Blaschitz, A. et al (1995) Localisation of the high affinity facilitative glucose transporter protein GLUT 1 in the placenta of human, marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) and rat at different developmental stages. *Cell Tissue Res* 280,49-57.
- 116- Leach, L. and Firth, J.A. (1995) Advances in understanding permeability in fetal capillaries of the human placenta: a review of organization of the endothelial paracellular clefts and their junctional complexes. *Reprod. Fertil. Dev.* 7,1451-6.
- 117- Reiber, W , Malek, A., Aegerter, E. et al (1991) Bidirectional human placental glucose transfer in vitro prefers maternofetal direction. *Placenta*, 12, 430A.
- 118- Illsley, N:P. (2000) Placental glucose transport in diabetic pregnancy *Clin. Obstet. Gynecol.* 43, 116-26
- 119- Shafir, E. (1996) Animal models of diabetes in pregnancy. *Diabetes Rev*, 4, 114-28.
- 120- Kainulainen, H, Jarvinen, T, Heinonen, P.K. (1997) Placental glucose transporters in fetal intrauterine growth retardation and macrosomia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 44, 89-92.
- 121- Desoye, G, Hartmann, M , Blaschitz, A et al (1994) Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern. *Histochem.* 101, 277-85.
- 122- Klip, A , Tsakiridis, T., Marette, A. et al. (1994) Regulation of expression of glucose transporters by glucose : a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB. J.* 8, 43-53
- 123- Maher, F. and Harrison, L.C. (1990) Stabilization of glucose transporter mRNA by insulin/IGF-1 and glucose deprivation *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 210-215.
- 124- Illsley, N.P , Sellers, M.C , and Wright, R.L. Glycaemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. (1998) *Placenta*, 19, 517-24.

- 125- Haugel-de M S, Leturque, A., Alsat, E et al. (1994) Developmental expression of GLUT1 glucose transporter and c-fos genes in human placental cells. *Placenta*, 15, 35-46
- 126- Gordon, M.C., Zimmerman, P.D., Landon, M B et al. (1995) Insulin and glucose modulate glucose transporter messenger ribonucleic acid expression and glucose uptake in trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *Am. J Obstet Gynecol* 173, 1089-97.
- 127- Clarson, L.H., Glazier, J.D., Sides, M K et al (1997) Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (Jar) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta*, 18, 333-40
- 128- Hahn, T., Barth, S, Hofman, W, et al. (1998) Hyperglycemia regulates the glucose-transport system of clonal choriocarcinoma cells in vitro A potential molecular mechanism contributing to adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int. J Cancer* 78, 353-360.
- 129- Kniss, D.A., Zimmerman, P.D., Su, H.C. et al (1993) Expression of functional insulin-like growth factor-I receptors by human amnion cells. *Am. J Obstet Gynecol.* 169,632-40.
- 130- Zhou, J and Bondy, C (1992) Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology*, 131,1230-40
- 131- Hahn, T., Barth, S., Graf, R et al. (1999) Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 1445-52
- 132- Maeda, Y, Akazawa, S., Akazawa, M, et al. (1993); Glucose transporter gene expression in rat conceptus during early organogenesis and exposure to insulin-induced hypoglycemic serum. *Acta Diabetol* 30, 73-78.
- 133- Sasaki, R., Nakayama, I and Kato, I. (1999). Microelectrophoretic analysis of changes in protein expression patterns in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 60, 1410-18.
- 134- Takao, Y., Akazawa, S, Matsumoto, K., et al (1993) Glucose transporter gene expression in rat conceptus during high glucose culture. *Diabetologia*, 36, 696-706
- 135- Welch, R D and Gorski, J. (1999) Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus. *Endocrinology*, 140, 3602-8
- 136- Hahn T, Hahn D, Blaschitz A, et al. (2000) Hyperglycaemia-induced subcellular redistribution of GLUT1 glucose transporters in cultured human term placental trophoblast cells. *Diabetologia*, 43,173-80.
- 137- Royer, C, Lachuer, J, Crouzoulon, G et al (2000) Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res* 856,119-28.
- 138- Hauguel-de M S, Boileau, P., Caüzac, M., et al (1995) Expression of genes involved in placental glucose transport and phosphorylation. *Placenta*; 16:Abstract 25
- 139- Navarrete, S. A, Augustin, R, Lazzari, G, et al. (2000) The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem. Biophys. Res Commun* 271, 753-60
- 140- Trocino, R.A., Akazawa, S, Takino, H et al (1994) Cellular-tissue localization and regulation of the GLUT-1 protein in both the embryo and the visceral yolk sac from normal and experimental diabetic rats during the early postimplantation period. *Endocrinology*, 134, 869-78

- 141- Zhang, X, Kidder, G.M., Watson, A.J., et al. (1994) Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction *J. Reprod Fertil* 100, 375-80
- 142- Heyner, S., Smith, R.M., Schultz, G.A. (1989) Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *Bioessays*, 11, 171-6.
- 143- Nagamani, M and Stuart, C.A. (1992) Specific binding sites for insulin in the human myometrium and leiomyomas of the uterus. *Fertil Steril* 58, 120-123
- 144- Kaye, P.L. and Harvey, M.B. (1995) The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res* 6, 1-24
- 145- Leturque, A., Hauguel, S., Ferre, P., et al. (1987) Glucose metabolism in pregnancy *Biol Neonate* 51, 64-9
- 146- Schultz, G.A., Hogan, A. and Watson, A.J. (1992) Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos *Reprod. Fertil. Dev.* 4, 361-71.
- 147- Moley, K.H., Chi, M.M., Manchester, J.K. et al. (1996) Alterations of intraembryonic metabolites in preimplantation mouse embryos exposed to elevated concentrations of glucose: a metabolic explanation for the developmental retardation seen in preimplantation embryos from diabetic animals *Biol Reprod* 54, 1209-16.
- 148- Moley, K.H. (1999) Diabetes and preimplantation events of embryogenesis. *Semin Reprod. Endocrinol.* 17, 137-51.
- 149- Moley, K.H., Chi, M.M., Knudson, C.M., et al. (1998) Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 4, 1421-4.
- 150- Diamond, M.P., Moley, K.H., Pellicer, A. et al. (1989) Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *J. Reprod Fertil.* 86, 1-10.
- 151- Moley, K.H., Vaughn, W.K., DeCherney, A.H., et al. (1991) Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. *J. Reprod. Fertil.* 93, 325-32.
- 152- Guillet-Deniau, I., Leturque, A. and Girard, J. (1994) Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat foetuses. *J. Cell Sci.* 107, 487-96.
- 153- Shafir, E. and Barash, V. (1991) Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy. *Isr. J. Med. Sci.* 27, 449-61.
- 154- Jones, C.J. and Desoye, G. (1993) Glycogen distribution in the capillaries of the placental villus in normal, overt and gestational diabetic pregnancy. *Placenta*, 14, 505-17.
- 155- Whelan, W.J. (1986) The initiation of glycogen synthesis. *Bioessays* 5, 136-40.
- 156- Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J. (1991) Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett.* 279, 223-8.
- 157- Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J., et al. (1993) Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J* 7, 1386-93.
- 158- Ercan, N., Gannon, M.C. and Nuttall, F.Q. (1994) Incorporation of glycogenin into a hepatic proteoglycogen after oral glucose administration. *J. Biol. Chem.* 269, 22328-33.

- 159- Mu, J and Roach, P.J. (1998) Characterization of human glycogenin-2, a self-glucosylating initiator of liver glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.* 273, 34850-6.
- 160- Branch, D.W: (1992) Physiologic adaptations in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 28,120-22.
- 161- Rukavina, D., Gill, T J: (1997) Immunobiology and immunopathology of early pregnancy *Early Pregnancy* 3, 141-45.
- 162- Hunt, J S., Hutter, H: (1996) Current theories on protection of the fetal semiallograft *In HLA and the maternal-fetal relationship*, Hunt JS (ed) New York, Chapman and Hall, pp 27-50.
- 163- Toh, H., Miyata, T., Torisu, M. (1993) Characterization of neutrophil activation by repeated injection of endotoxin in rabbits. Role of neutrophils in the generalized Shwartzman reaction *J Leukoc. Biol.* 53, 256-63.
- 164- Jemelin, M., Frei, J. (1970) Leukocyte energy metabolism. 3 Anaerobic and aerobic ATP production and related enzymes. *Enzymol Biol Clin (Basel)* 11, 298-323
- 165- Hansen, B. F., Derave, W., Jensen, P., et al. (2000) No limiting role for glycogenin in determining maximal attainable glycogen levels in rat skeletal muscle. *Am J. Physiol. Endocrinol Metab* 278, E398-E404.
- 166- Ren, J. M., Marshall, B. A., Gulve, E. A., et al. (1993) Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 268, 16113-15
- 167- Mueckler, M., Holman, G (1995) Homeostasis without a GLUT *Nature* 377, 100-1.
- 168- Moriguchi, S , Kato, M., Sakai, K., et al (1998) Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). *Am. J. Clin. Nutr* 67, 1124-9.
- 169- Peters, J. H., Hausen, P. (1971) Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 2 Stimulation of "facilitated diffusion" of 3-O-methyl-glucose *Eur J Biochem.* 19, 509-13.
- 170- Lijnen, P , Saavedra, A., Petrov, V (1997) In vitro proliferative response of human peripheral blood mononuclear cells to concanavalin A. *Clin. Chim. Acta* 264, 91-101
- 171- Blaehr, H , Ladefoged, J (1988) Mitogen-induced lymphocyte transformation in four different serum-free media *J. Immunol. Methods.* 111, 125-29
- 172- Matsubara K, Ochi H, Kitagawa H, et al. (1999) Concentrations of serum granulocyte-colony-stimulating factor in normal pregnancy and preeclampsia *Hypertens. Pregnancy* 18, 95-106
- 173- Pedersen J: (1977) The pregnant diabetic and her newborn. Copenhagen, Munksgaard,
- 174- Valdimarsson, H , Mulholland, C., Fridriksdottir, V., (1983) A longitudinal study of leucocyte blood counts and lymphocyte responses in pregnancy: a marked early increase of monocyte-lymphocyte ratio. *Clin. Exp Immunol.* 53, 437-43
- 175- Griffin, J.F. and Beck, I: (1983) A longitudinal study of leucocyte numbers and mitogenesis during the last ten weeks of human pregnancy *J Reprod. Immunol.* 5, 239-47
- 176- Andersen, O and Kuhl, C: (1986) Insulin receptor binding to monocytes and erythrocytes during normal human pregnancy. *Eur. J. Clin Invest* 16, 226-32

- 177- Desoye, G., Schweditsch, M.O., Pfeiffer, K.P. et al. (1987) Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab.* 64, 704-12.
- 178- Nelson, D.M., Ortman-Nabi, J., Curran, E.M.: (1990) Human placental insulin binding in normal and well-controlled diabetic patients. *Gynecol Obstet Invest* 29:1-5.
- 179- Zierler, K. (1999) Whole body glucose metabolism. *Am J Physiol.* 276, E409-E426.
- 180- Rabinowitz, D., Zierler, K. L. (1963) A metabolic regulating device based on the actions of the human growth hormone and of insulin, singly and together, on the human forearm. *Nature*, 199, 913-915
- 181- Zoccoli, M. A., Baldwin, S. A., Lienhard, G. E. (1978) The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J. Biol. Chem.* 253, 6923-30.
- 182- Daneman, D., Zinman, B., Elliott, M. E., et al. (1992) Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes*, 41, 227-34
- 183- Gamelli, R. L., Liu, H., He, L. K., et al (1996) Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. *J. Leukoc. Biol.* 59, 639-47.
- 184- Everett, K. D., Barghouthi, S., Speert, D. P. (1996) In vitro culture of murine peritoneal and alveolar macrophages modulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* and glucose transport. *J. Leukoc. Biol.* 59, 539-544
- 185- Estrada, D. E., Elliott, E., Zinman, B., et al (1994) Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals. *Metabolism*, 43, 591-598
- 186- Hunt, T. K. (1980) *Wound healing and wound infection*, Appleton-Crofts, New York 291.
- 187- St-Denis, J. F. and Cushman, S. W. (1998) Role of SNARE's in the GLUT4 translocation response to insulin in adipose cells and muscle. *J. Basic Clin. Physiol Pharmacol.* 9, 153-65.
- 188- Burant, C. F., Sivitz, W. I., Fukumoto, H., et al (1991) Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* 47, 349-87
- 189- Chakrabarti, R., Jung, C. Y., Lee, I. P. et al (1994) Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J Immunol* 152, 2660-68.
- 190- Younes, M., Lechago, L. V., Somoano, J. R. et al (1997) Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res.* 17, 2747-50.

ÖZGEÇMİŞ

25 03 1967 tarihinde Ankara' da doğdu 1978 yılında İlköğrenimini Çankırı-Eldivan Merkez İlkokulunda, Orta öğrenimini 1984 yılında Ankara Atatürk Lisesinde, Lisans eğitimini 1992 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler bölümünde, Yüksek Lisans eğitimini 1997 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında tamamladı 1998 ve 2001 yıllarında Avusturya hükümetinin Türkiye'ye mahsus araştırma ve Kuzey-Güney Dialog burslarıyla Karl Franzens Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında çalıştı Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine devam etmektedir

Glucose Transporter Expression in Rat Embryo and Uterus During Decidualization, Implantation, and Early Postimplantation¹

Tom Türkay Korgun,^{3,4} Ramazan Demir,⁴ Astrid Hammer,³ Gottfried Dohr,³ Gernot Desoye,⁵ Richard Skofitsch,⁶ and Tom Hahn^{2,3}

¹Institute of Histology and Embryology,³ University of Graz, A-8010 Graz, Austria

²Institute of Histology and Embryology,⁴ Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

⁵Department of Obstetrics and Gynecology,⁵ University of Graz, A-8036 Graz, Austria

⁶Institute of Zoology,⁶ University of Graz, A-8010 Graz, Austria

ABSTRACT

Efficient transfer of glucose from the mother to the embryonic compartment is crucial to sustain the survival and normal development of the embryo in utero, because the embryo's production of this primary substrate for oxidative metabolism is minimal. In the present study, the temporal sequence of expression of the sodium-independent facilitative glucose transporter proteins GLUTs 1, 3, 4, and 5 was investigated in the developing uteroembryonic unit between conception and Gestational Day 10 using immunohistochemistry. The GLUTs 1, 3, and 4 were expressed in the embryonic tissues after the start of implantation, being colocalized in the parietal endoderm, visceral endoderm, primary ectoderm, extraembryonic ectoderm, and the placental cone. In the uterus, a faint GLUT1 labeling emerged, but not until Gestational Day 3, in the luminal epithelium, endometrial stroma, and decidual cells. The intensity of GLUT1 staining increased in the latter population with progressing decidualization. Endometrial glands and myometrial smooth muscle cells stained neither for GLUT1 nor for GLUT3 after postimplantation. During all developmental stages examined, GLUT4 was visualized throughout the pregnant rat uterus, whereas GLUT3 (with the above-mentioned exceptions) The density of GLUT5 was generally less than the sensitivity of the immunohistochemical detection method in all tissues investigated. In conclusion, the data point to a significant expression of the high-affinity glucose transporters GLUTs 1, 3, and 4 in the rat uteroembryonic unit, providing supportive evidence for an important role of facilitative glucose diffusion during peri-implantation development.

Key words: early development, implantation, placental transport, glucose transporters

INTRODUCTION

Early mammalian embryos are not able to utilize glucose as an energy source until compactation. The situation changes radically with the beginning of blastocyst formation, when the embryonic fuel metabolism switches its preferred substrate from the more oxidized pyruvate to glucose, an alternation that is signaled by glucose transport

proteins [1]. From this stage onward, adequate transfer of glucose from the mother to the embryonic compartment is decisive to the survival and normal development of the embryo in utero [2]. In general, glucose transport can be brought about by a sodium-coupled mechanism or by facilitated diffusion along a concentration gradient. The latter process is mediated by carrier proteins rendering substrate entry approximately 10 000-fold faster than that calculated for diffusion across the lipid membrane layer. The transport facilitators are approximately 500 amino acids in length and belong to a growing superfamily of integral membrane glycoproteins with 12 membrane-spanning domains. The genes of these glucose transporters have been designated as GLUT1 through GLUT9, in the order in which they were identified. Very recently, GLUT8 and GLUT9 have both been described [3, 4], but their similarity with the "classical" GLUT isoforms is not higher than that with bacterial inositol, arabinose, or xylose transporters [5]. Therefore, they constitute a separate branch within the family of hexose transporters. The clone termed GLUT7 has turned out to be an artifact and does not, as suggested previously, encode a liver endoplasmic reticulum transporter. Additionally, GLUT6 encodes a pseudogene that is not translated into protein, and GLUT2 has, alternatively to its glucose transport function, also been considered to serve as a glucose sensor and/or a fructose transporter. It is somewhat unusual, in that it operates with a significantly lower affinity for glucose than any of the other isoforms and can, therefore, not function efficiently in the low-glucose environment prevailing in the uterus. In contrast, the remaining isoforms (GLUTs 1, 3, 4, and 5) represent high-affinity transport facilitators. Because of their low Michaelis constant (K_m), these transporters function at rates close to maximal velocity. Thus, their level of cell surface expression greatly influences the rate of glucose uptake into the cells.

Because considerable agreement now exists that the significance of sodium-dependent transport in supplying pre-implantation embryos with glucose is not worth mentioning (for review, see [1]), it seems reasonable to assume that facilitative glucose transporters might play a pivotal role in meeting the energy requirements of the embryo during the critical period between blastocyst formation and implantation. For obvious ethical reasons, no information is generally available regarding glucose transporter expression in the human uterus or developing (i.e., nonpolyploid) embryo during the first weeks of pregnancy. However, in the commonly used animal models, the spatiotemporal distribution pattern of GLUT proteins also has not been investigated in the uteroembryonic unit from conception until postimplantation. To close this gap, we have performed experiments to study, in parallel, expression of the high-affinity sugar

Supported by grants from the Austrian Science Foundation FWF (P13721-01) and the Jubilaeumsfonds of the Oesterreichische Nationalbank (1311).

Correspondence: Tom Hahn, Institute of Histology and Embryology, University of Graz, Harrachgasse 21, A-8010 Graz, Austria
Tel: +43 316 380 9625; e-mail: tom.hahn@kfunigraz.ac.at

Received: 13 February 2001.

Accepted: 19 March 2001

Revised: 13 June 2001

© 2001 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.
0006-3363 http://www.biolreprod.org

Gestational Day	Uterine Epithelium	Endometrial Stroma	Endometrial Glands	Myometrial Smooth Muscle	Primary Decidual Zone	Secondary Decidual Zone	Glycogenic Area	Capsule	Primary Ectoderm	Parietal Endoderm	Visceral Endoderm	Extraembryonic Ectoderm	Ectoplacental Cone	GLUT Isoform
1	+++	+++	+++	+										GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
2	+++	+++	+++	+										GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
3	+++	+++	+++	+++	+++									GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
4	+++	+++	+++	+++	+++									GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
5	+++	+++	+++	+++	+++				++					GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
6	+++	+++	+++	+++	+++	+			+++	+	+	++	++	GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4
8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	GLUT 1 GLUT 3 GLUT 4

FIG. 1 Distribution of glucose transporters GLUT1 (yellow), GLUT3 (blue), and GLUT4 (pink) in the developing rat uteroembryonic unit between GD 1 and GD 8. Empty cells in the table indicate that the concerned tissue is either not yet differentiated or has not been investigated at the respective GD. +, Weak staining; ++, moderate staining; +++, strong staining.

transporters GLUTs 1, 3, 4, and 5 during decidualization, implantation, and early postimplantation (Gestational Days [GDs] 1-8) in the rat conceptus and uterus.

MATERIALS AND METHODS

Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections of the developing rat uteroembryonic unit between conception and GD 8. Briefly, 1 ml of 1% (v/v) Evans blue in 0.9% (v/v) NaCl was injected into the posterior right femoral vein of 32 impregnated white Wistar rats under deep ether anesthesia to identify the implantation areas within the uterus. Ten minutes after the injection, the anterior abdominal wall was opened, and tissue samples were taken from parts of the uterus containing the dye. These samples were fixed in Holland fixative for 4 h, embedded, and then serial sections (6 μm) were collected on SuperFrost Plus slides (Novoglas, Berne, Switzerland). After rehydration, samples were transferred to 0.01 M citrate buffer (pH 6) and subsequently heated twice in a microwave oven for 5 min each time at 750 W for antigen retrieval. After cooling for 20 min at room temperature, the sections were washed with PBS. To remove endogenous peroxidase activity, sections were kept in 3% H₂O₂ for 20 min and afterward washed with PBS. Sections were incubated for 60 min at room temperature in a moist chamber with rabbit antisera against the C-terminal sequences of GLUT1 (CGLFHPLGADSQV), GLUT3 (NSMQPVKEPGNA), GLUT4 (CTEYLYLGPEND), and GLUT5 (ELK-ELPPVTSEQ) (all from Chemicon, Temecula, CA). Antisera were diluted 1:1000 (v/v) (GLUT1), 1:500 (GLUT3), 1:100 (GLUT4), and 1:500 (GLUT5) with Antibody Diluent (Dako Carpinteria, CA). Labeling was visualized using the Universal LSAB kit (Dako) according to the manufacturer's instructions. The sections were counterstained with Mayer hemalum (Merck, Darmstadt, Germany) and mounted with Kaiser glycerol gelatin (Merck). For controls, sections were incubated with antisera preadsorbed with corresponding oligopeptides (10 μg/ml; Pichem, Graz, Austria) based on the sequences used for the immunization of the antibody-generating rabbits. Pictures were taken with an Axiophot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Investigations were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research of the National Academy of Science, Bethesda, MD; 1996).

RESULTS

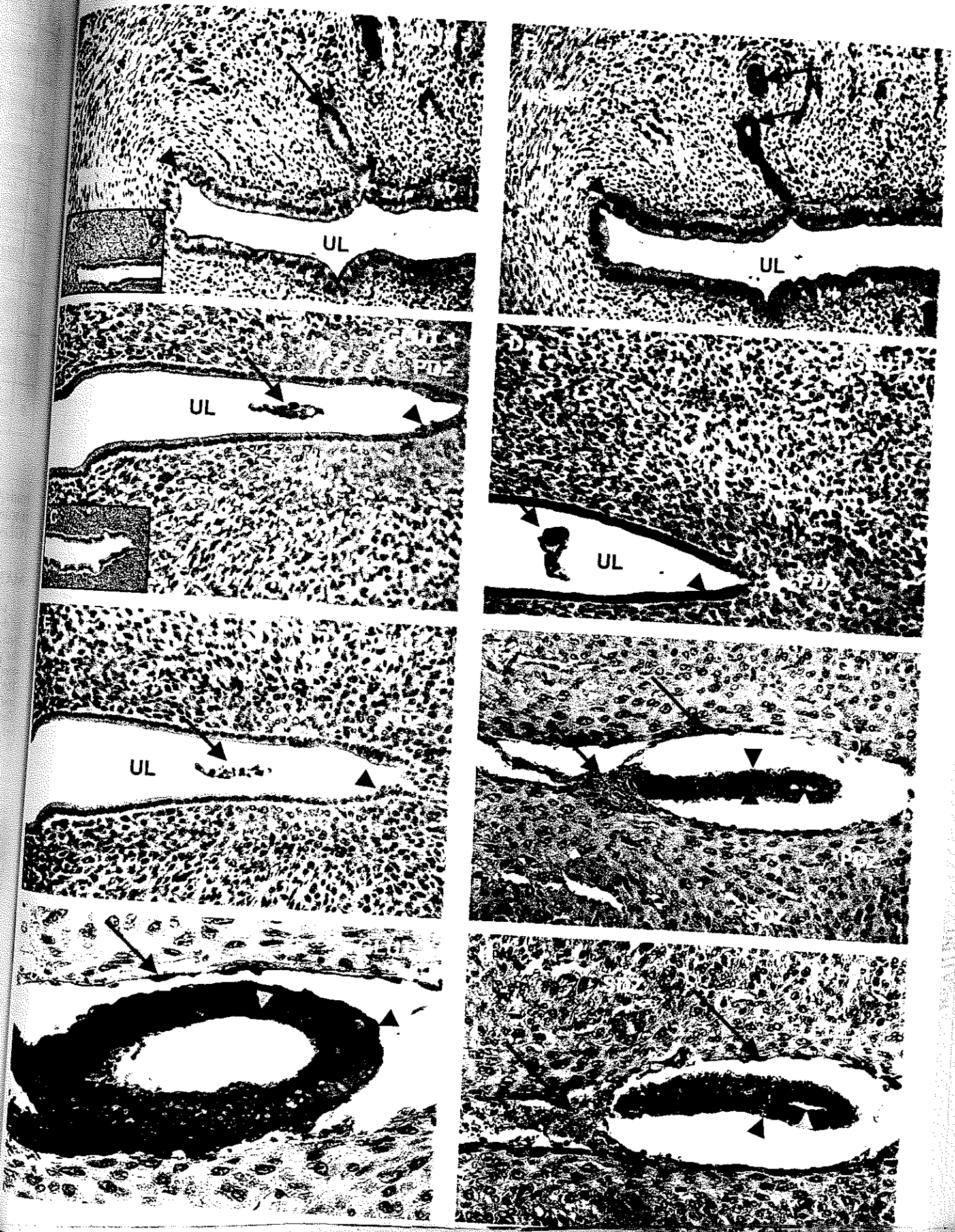
The density of GLUT5 in rat uterus and developing embryo was generally less than the sensitivity of the immunohistochemical detection method between GD 1 and GD 8. The distribution of the GLUTs 1, 3, and 4 in the rat uteroembryonic unit is detailed in Figure 1. Major findings are presented below.

Gestational Day 1

At the first day of gestation, GLUT3 was localized in distinct populations of endometrial stromal cells and in the uterine epithelium (Fig. 2A). The GLUT4 antiserum immunoreacted with the uterine epithelium, endometrial stromal cells, epithelium of the endometrial glands, and myometrial smooth muscle cells (Fig. 2B). The significant GLUT4 labeling in uterine glands as well as in endometrial stroma and myometrial smooth muscle cells was observed throughout the whole gestational period investigated, with no (or negligible) decrease in intensity (Fig. 1). In contrast to the homogeneously distributed GLUT4 signal within the cells of the luminal uterine epithelial layer (Fig. 2B), GLUT3 staining was limited to plasma membranes, being more pronounced in the apical membranes of the uterine epithelium than in the basolateral areas (Fig. 2A). However, GLUT1 could not be detected in the uterus of the newly impregnated rats.

Gestational Day 2

The localization of GLUTs 1, 3, and 4 was similar to that observed at GD 1.



Gestational Day 3

A faint GLUT1 reaction emerged in the luminal uterine epithelium, endometrial stroma, and primary endometrial decidual cells with progressing decidualization at GD 3. Endometrial glands and myometrial smooth muscle cells neither stained for GLUT1 nor for GLUT3, and the respective cells remained negative for both transporters until postimplantation (Fig. 1). In contrast, GLUT3 staining was even increased in the apical region of uterine epithelial cells compared with GDs 1 and 2. Endometrial stromal cells and primary endometrial decidual cells also reacted with the GLUT3 antiserum, but the latter stained more intensely.

Gestational Day 4

The GLUT1 staining became more apparent in the cell populations where it was first recognized the day before. The GLUT4 immunoreactivity was visualized throughout the uterus, as was GLUT3 immunoreactivity (with the above-mentioned exceptions). Both transport facilitators were most abundant in the primary decidual cells.

Gestational Day 5

Implantation starts at this developmental stage, and the blastocyst that became visible in these sections was immunopositive for GLUTs 1, 3, and 4 (Fig. 2, C-E). This reaction pattern remained constant until GD 8, with only slight changes in intensity (Fig. 1). The glucose transporter expression of the uterus roughly resembled that observed on GD 4, apart from a drastically reduced GLUT1 and GLUT4 staining in the epithelium, which was found exclusively in the antimesometrial region (Fig. 2, C and E).

Gestational Day 6

Parietal endodermal, visceral endodermal, primary ectodermal, extraembryonic ectodermal cells, and the ectoplacental cone immunoreacted with antisera to GLUTs 1, 3, and 4 (Fig. 2, F-H). The newly emerging secondary decidual cells were weakly or moderately labeled for

GLUT1 (Fig. 2F), GLUT3, and GLUT4; otherwise, no considerable changes were observed in uterine glucose transporter distribution compared to that found at GD 5.

Gestational Day 7

Embryonic tissues stained more intensively for GLUT1 at GD 7 than at GD 6. Simultaneously, a striking increase of this isoform was observed in the secondary decidual zone of the uterus (Fig. 3A). No significant changes were observed in embryonic GLUT3 and GLUT4 expression between GD 6 and GD 7 (Fig. 3, B and C). Generally, together with the capsule and the glycogenic area, the secondary decidual zone represented the major site of GLUT expression in the uterus.

Gestational Day 8

Except for the primary decidual region, where GLUT1 was no longer detectable and GLUT3 and GLUT4 staining was markedly reduced (Fig. 3, D-F), the antisera labeled the same uterine structures as they did at GD 7. Conspicuous GLUT3 expression was visualized in the glycogenic area (Fig. 3H) accompanied by immunoreactivity for GLUT1 (Fig. 3G) and GLUT4 (Fig. 3F). Trophoblast, inner cell mass, and the ectoplacental cone expressed GLUTs 1, 3, and 4 (see insets in Fig. 3, D-F).

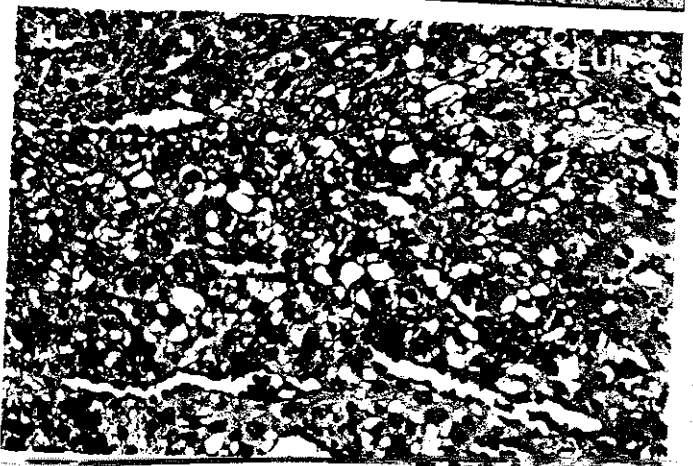
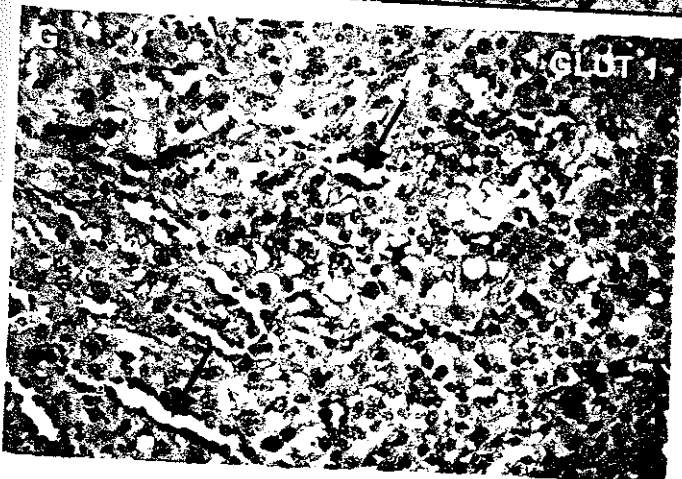
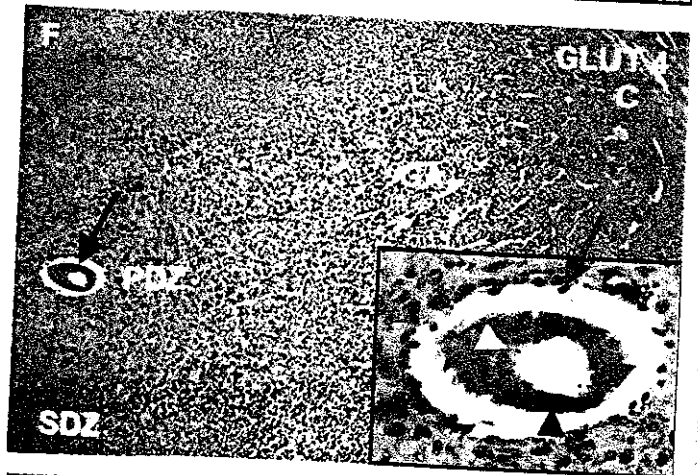
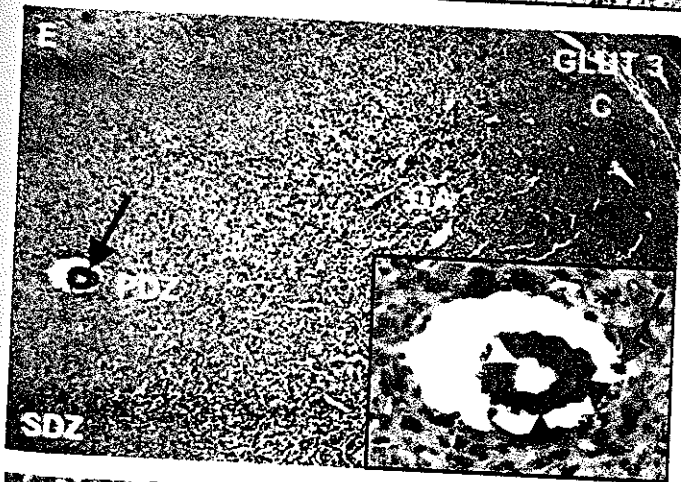
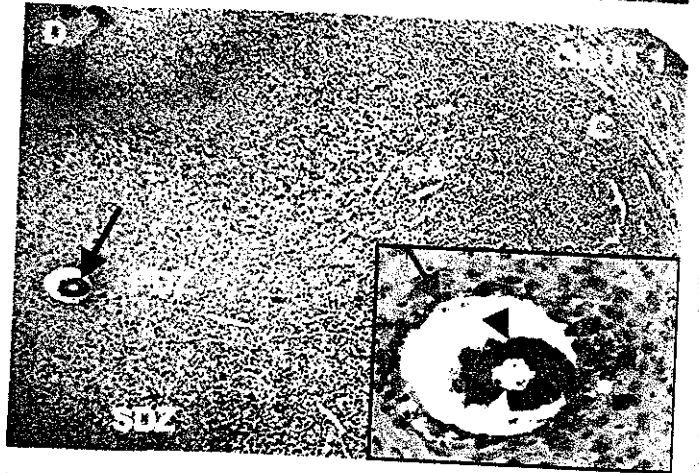
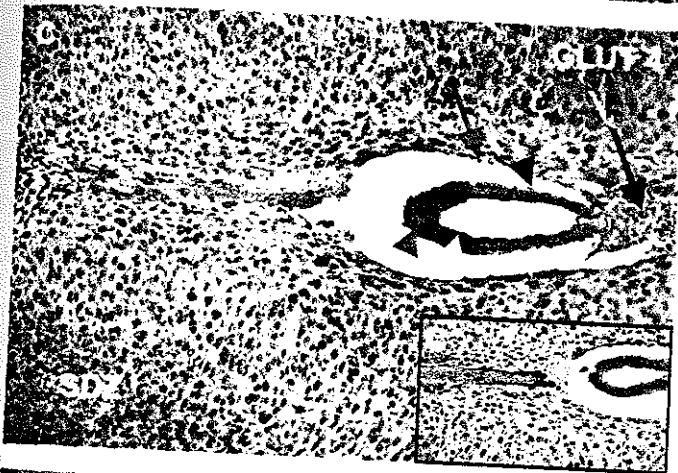
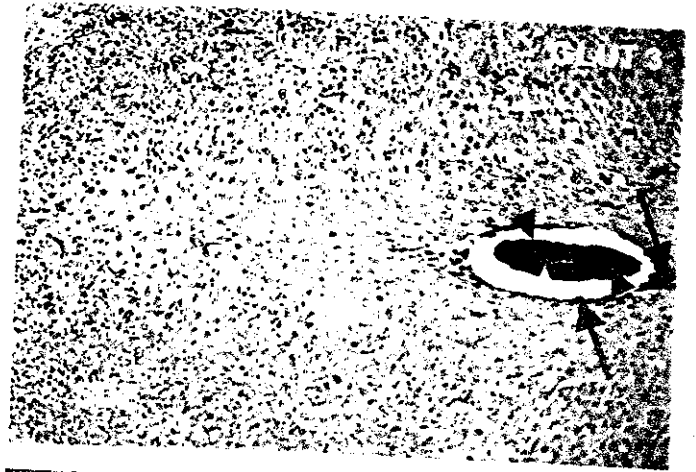
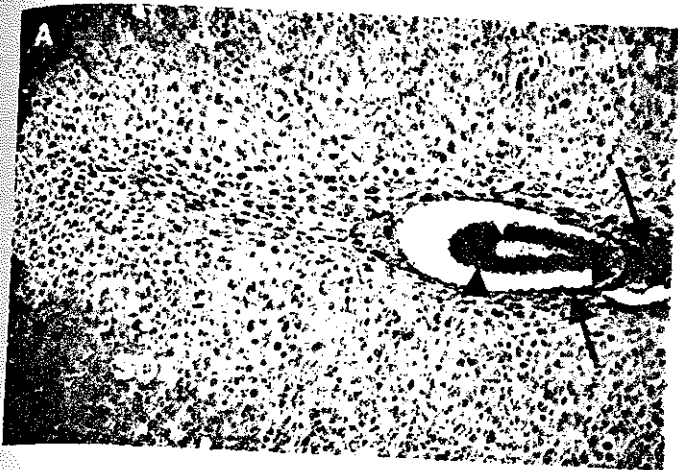
DISCUSSION

In the present study, data concerning the expression of facilitative glucose transporter proteins are provided, to our knowledge for the first time, from conception until an early postimplantation stage of the rat.

The heterogeneously glycosylated GLUT1 isoform was originally considered to represent the specific transport machinery for glucose in epithelial cells of blood-tissue barriers, such as the placental trophoblast [6, 7]. The data presented here for the rat implantation period demonstrated GLUT1 to be expressed in all embryonic cell populations examined, which is in good agreement with the preceding GLUT1 expression in mouse morulae [8] as well as an intense labeling of the respective transcript throughout in the early postimplantation rat embryo [9]. During subsequent developmental stages of the rat conceptus, GLUT1 was even reported to represent the predominant glucose transporter isoform [10]. Collectively, these results support the concept of a more ubiquitous occurrence of GLUT1, which might play a kind of "housekeeping" role [11], thus covering the cellular glucose requirement for ATP production and biosynthesis of sugar-containing macromolecules, at least during embryonic development. In the uterus, decidual cells above all were found to contain appreciable amounts of GLUT1 protein, also coinciding with the earlier significant GLUT1 mRNA levels detected in this tissue [9].

The transporter isoform characteristic for cells with high-glucose requirements, such as neurons or tumor cells [12], is GLUT3, because it has a particularly high affinity for glucose. In this study, GLUT3 protein was most abundant in embryonic cell populations, in accordance with noticeable mRNA staining demonstrated previously for rats at GD 8 [9]. Rat embryos were also shown to express significant amounts of GLUT3 during organogenesis [13]. Within the rat uterus, the highest GLUT3 levels were found in decidual cells, which is in contrast to the relatively little GLUT3 mRNA detected there by *in situ* hybridization [9]. These divergent data may reflect a significant posttranscrip-

FIG. 2. Transverse sections of the developing rat uteroembryonic unit from GD 1 (A and B), GD 5 (C-E), and GD 6 (F-H). For every developmental stage and GLUT isoform, control sections were incubated with antisera preadsorbed with corresponding oligopeptides; examples are shown as insets in A and C. A) GLUT3 at GD 1. Arrowheads indicate uterine luminal epithelium; the arrow points to an immunonegative endometrial gland. B) GLUT4 at GD 1. Arrowheads indicate uterine luminal epithelium; the arrow points to an immunopositive endometrial gland. C) GLUT1 at GD 5. Arrowheads indicate uterine luminal epithelium. The embryo (arrow) is located antimesometrially in the uterus lumen. D) GLUT3 at GD 5. Arrowheads indicate uterine luminal epithelium; the arrow points to the embryo. E) GLUT4 at GD 5. Arrowheads indicate uterine luminal epithelium; the arrow points to the embryo. F) GLUT1 at GD 6. The black arrow points to ectoplacental cone, the red arrow to parietal endoderm, the black arrowhead to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. G) GLUT3 at GD 6. The red arrow indicates parietal endoderm. The black arrowhead points to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. H) GLUT4 at GD 6. The black arrow points to ectoplacental cone, the red arrow to parietal endoderm, the black arrowhead to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. ESC, Endometrial stromal cells; MSMC, myometrial smooth muscle cells; PDZ, primary decidual zone; SDZ, secondary decidual zone; UL, uterus lumen. Magnification: 150 for A-E, 300 for F and H, 600 for G, and 50 for the insets in A and C.



ional GLUT3 regulation, such as a reduced turnover rate of the transporter protein, and/or a stabilization of the GLUT3 mRNA. In the nonpregnant rat uterus, GLUT3 has not been detectable at all [12, 14], which suggests that uterine expression of this isoform is only induced in the wake of specific differentiation programs associated with gestation.

Expression of GLUT4 is considered to be limited to insulin-responsive tissues. Welch and Gorski [14] have demonstrated GLUT4 mRNA and protein in the nonpregnant rat uterus, and the immunohistochemical data presented here clearly identified GLUT4 as a glucose carrier protein expressed in this organ between GD 1 and GD 8. Endometrial glands and myometrial smooth muscle cells even contained GLUT4 exclusively. In uterine epithelial cells coexpressing GLUT4 with GLUT1 and/or GLUT3, a difference in the intracellular staining pattern of these molecules became apparent at the light microscopic level. The GLUT4 signal was homogeneously distributed throughout the cells, whereas the GLUT1 and GLUT3 signals were more restricted to the plasma membranes (Fig. 2, A and B). The homogeneous GLUT4 staining might be ascribed to intracellular reserve pools of this molecule. Reserve pools could not be detected for the other isoforms examined, although a growing body of evidence suggests that the level of functional plasma membrane GLUT1 transporters is also determined via subcellular trafficking of the protein [15]. In contrast to the pregnant rat uterus, GLUT4 reactivity in embryo-derived tissues and in the embryo proper was rather moderately, but clearly, detectable. In general, GLUT4 expression in embryonic cell populations is a controversial issue. Because we are the first, to our knowledge, to investigate rat embryos around implantation in this context, our positive results for GLUT4 are unique so far. Until now, only the transcripts were identified in the developing rat brain as early as GD 14 [16] and in the rat placenta between GD 14 and GD 21 [17]. Indeed, recent reports concerning other species support our findings. The

GLUT4 mRNA was visualized in bovine blastocysts [18], and both transcript and protein were found in murine neuroepithelium as early as GD 9 [19]. However, several earlier attempts failed to detect GLUT4 mRNA [9, 10, 13] and protein [20] in the rat conceptus between GD 9 and GD 14, and a number of older investigations concerning mice provided evidence against GLUT4 expression during peri-implantation development [21–24].

Interestingly, the tissues staining for GLUT4 in this study are also richly endowed with the insulin receptor (unpublished results). This finding coincides with the presence of insulin receptor mRNA in preimplantation rat embryos [25]. In addition, embryonic and uterine insulin receptor expression has also been demonstrated in various mammalian species different from rat [26–30]. During the period of time investigated here, the uterus undergoes extensive remodeling to prepare for the invasion of the embryo. These changes impose acute metabolic demands on the cells, which can largely be met by utilization of glucose. Thus, having the uterine GLUT staining pattern in mind, it is conceivable that insulin not only promotes cellular proliferation and differentiation events in the uterus but also stimulates uterine glucose uptake mediated by the insulin-sensitive GLUT4. In addition, later during gestation, GLUT4 would be ideally suited for covering the increasing glucose requirements of the gravid uterus, because its activity could increase in response to the elevated plasma insulin levels that can be observed with continuing pregnancy [31]. The appearance of insulin receptors on embryonic cells is delayed until the compacted eight-cell stage [23] and parallels the switch of the conceptus to a glucose-based metabolism. Accordingly, one may expect that insulin, apart from acting mitotically, exerts its effect on glucose transport in the embryo as well. Increasing evidence suggests that diabetes-like conditions retard embryonic development via down-regulation of GLUTs and the triggering of apoptosis [6, 32, 33], but the most important outcome of the rare studies dealing with GLUT regulation by insulin during early pregnancy is that these deleterious effects of hyperglycemia on reproductive performance can be prevented by treatment with insulin [2, 34, 35]. In this context, reports showing that the overall expression levels of GLUTs 1, 3, and 4 remain unaffected by the hormone in various rat embryonic cells [10, 36] seem rather perplexing. However, the supposed discrepancy no longer appears as such when insulin is considered to bring about the translocation of GLUT4 from intracellular vesicles to the cell membrane. This mechanism, which could compensate for impaired GLUT expression, is well known from other insulin-dependent tissues (for review, see [37]) and has also been demonstrated in rat embryonic myoblasts [36]. The activity of the previously unidentified GLUT8 glucose carrier, which was among other sites detected in the mouse blastocyst, is regulated similarly by insulin [3]. Therefore, GLUT8 seems to be a candidate for supplementing, or even overriding, the action of GLUT4 in the embryo, because its K_m is closer to that of GLUT3 than to those of the other transporters.

In summary, the results demonstrate the paramount importance of high-affinity glucose transport facilitators for rat peri-implantation embryos, and they suggest a different functional significance for the individual isoforms in the developing uteroembryonic unit.

ACKNOWLEDGMENT

Our sincere thanks go to Rudolf Schmied for excellent technical assistance.

FIG. 3 Transverse sections of the rat uteroembryonic unit from GD 7 (A–C) and GD 8 (D–H). For every developmental stage and GLUT isoform, control sections were incubated with antisera preadsorbed with corresponding oligopeptides; an example is shown as an inset in C. A) GLUT1 at GD 7. The black arrow points to ectoplacental cone, the red arrow to parietal endoderm, the black arrowhead to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. B) GLUT3 at GD 7. The red arrow indicates parietal endoderm. The black arrowhead points to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. C) GLUT4 at GD 7. The black arrow points to ectoplacental cone, the red arrow to parietal endoderm, the black arrowhead to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. D) GLUT1 at GD 8. The arrow points to the embryo. Inset: The red arrow indicates parietal endoderm, and the black arrowhead points to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. E) GLUT3 at GD 8. The arrow points to the embryo. Inset: The red arrow indicates parietal endoderm, and the black arrowhead points to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. F) GLUT4 at GD 8. The arrow points to the embryo. Inset: The red arrow indicates parietal endoderm, and the black arrowhead points to visceral endoderm, the red arrowhead to extraembryonic ectoderm, and the yellow arrowhead to primary ectoderm. G) GLUT1 at GD 8 in the glycogenic area. Arrows point to blood vessels. H) GLUT3 at GD 8 in the glycogenic area. Arrows point to blood vessels. C, Capsule; GA, glycogenic area; PDZ, primary decidua; SDZ, secondary decidua. Magnification: $\times 150$ for A–C, $\times 75$ for D–F, $\times 600$ for G and H, $\times 100$ for the inset in C, and $\times 200$ for the insets in D–F.

REFERENCES

- Pantaleon M, Kaye PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod* 1998; 3:77-81.
- Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM. Hyperglycemia induces apoptosis in preimplantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 1998; 4:1421-1424.
- Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:7313-7318.
- Phay JE, Hussain HB, Moley JF. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 2000; 66:217-220.
- Doerge H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 2000; 275:16275-16280.
- Hahn T, Barth S, Weiss U, Mosgoeller W, Desoye G. Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development. *FASEB J* 1998; 12:1221-1231.
- Hahn T, Barth S, Graf R, Engelmann M, Beslagic D, Reul JM, Holsboer F, Dohr G, Desoye G. Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1445-1452.
- Sasaki R, Nakayama T, Kato T. Microelectrophoretic analysis of changes in protein expression patterns in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1999; 60:1410-1418.
- Zhou J, Bondy CA. Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J Clin Invest* 1993; 91:845-852.
- Maeda Y, Akazawa S, Akazawa M, Takao Y, Trocino RA, Takino H, Kawasaki E, Yokota A, Okuno S, Nagataki S. Glucose transporter gene expression in rat conceptus during early organogenesis and exposure to insulin-induced hypoglycemic serum. *Acta Diabetol* 1993; 30:73-78.
- Mueckler M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes* 1990; 39:6-11.
- Hahn T, Barth S, Hofmann W, Reich O, Lang I, Desoye G. Hyperglycemia regulates the glucose transport system of clonal choriocarcinoma cells in vitro. A potential molecular mechanism contributing to the adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int J Cancer* 1998; 83:353-360.
- Takao Y, Akazawa S, Matsumoto K, Takino H, Akazawa M, Trocino RA, Maeda Y, Okuno S, Kawasaki E, Uotani S. Glucose transporter gene expression in rat conceptus during high glucose culture. *Diabetologia* 1993; 36:696-706.
- Welch RD, Gorski J. Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus. *Endocrinology* 1999; 140:3602-3608.
- Hahn T, Hahn D, Blaschitz A, Korgun ET, Desoye G, Dohr G. Hyperglycemia-induced subcellular redistribution of GLUT1 glucose transporters in cultured human term placental trophoblast cells. *Diabetologia* 2000; 43:173-180.
- Reyer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J, Peyronnet J, Mamet J, Guignot J, Dalmaz Y. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and steroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res* 2000; 86:119-128.
- Dauguel-de Mouzon S, Boileau P, Caüzac M, Girard J. Expression of genes involved in placental glucose transport and phosphorylation. *Placenta* 1995; 16:A25.
- de Vearrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B. The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271:753-760.
19. Vannucci SJ, Rutherford I, Wilkie MB, Simpson IA, Lauder JM. Prenatal expression of the GLUT4 glucose transporter in the mouse. *Dev Neurosci* 2000; 22:274-282.
20. Trocino RA, Akazawa S, Takino H, Takao Y, Matsumoto K, Maeda Y, Okuno S, Nagataki S. Cellular-tissue localization and regulation of the GLUT-1 protein in both the embryo and the visceral yolk sac from normal and experimental diabetic rats during the early postimplantation period. *Endocrinology* 1994; 134:869-878.
21. Hogan A, Heyner S, Charron MJ, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Thorens B, Schultz GA. Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development* 1991; 113:363-372.
22. Aghayan M, Rao LV, Smith RM, Jarett L, Charron MJ, Thorens B, Heyner S. Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development* 1992; 115:305-312.
23. Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 1992; 4:361-371.
24. Smith DE, Gridley T. Differential screening of a PCR-generated mouse embryo cDNA library: glucose transporters are differentially expressed in early postimplantation mouse embryos. *Development* 1992; 116:555-561.
25. Zhang X, Kidder GM, Watson AJ, Schultz GA, Armstrong DT. Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Reprod Fertil* 1994; 100:375-380.
26. Heyner S, Smith RM, Schultz GA. Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *Bioessays* 1989; 11:171-176.
27. Nagamani M, Stuart CA. Specific binding sites for insulin in the human myometrium and leiomyomas of the uterus. *Fertil Steril* 1992; 58:120-123.
28. Glatstein IZ, Choi YM, Osathanondh R, Yeh J. Human fetal uterine cells: culture, characterization, and analysis of growth factor receptor gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:126-133.
29. Kaye PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6:1-24.
30. Puscheck EE, Pergament E, Patel Y, Dreschler J, Rappolee DA. Insulin receptor substrate-1 is expressed at high levels in all cells of the peri-implantation mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1998; 49:386-393.
31. Leturque A, Hauguel S, Ferre P, Girard J. Glucose metabolism in pregnancy. *Biol Neonate* 1987; 51:64-59.
32. Moley KH, Chi MM, Manchester JK, McDougal DB, Lowry OH. Alterations of intraembryonic metabolites in preimplantation mouse embryos exposed to elevated concentrations of glucose: a metabolic explanation for the developmental retardation seen in preimplantation embryos from diabetic animals. *Biol Reprod* 1996; 54:1209-1216.
33. Moley KH. Diabetes and preimplantation events of embryogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17:137-151.
34. Diamond MP, Moley KH, Pellicer A, Vaughn WK, DeCherney AH. Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *J Reprod Fertil* 1989; 86:1-10.
35. Moley KH, Vaughn WK, DeCherney AH, Diamond MP. Effect of diabetes mellitus on mouse preimplantation embryo development. *J Reprod Fertil* 1991; 93:325-332.
36. Guillet-Deniau I, Leturque A, Girard J. Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat fetuses. *J Cell Sci* 1994; 107:487-496.
37. Rea S, James DE. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 1997; 46:1667-1677.

From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta

Tom Hahn^{1,5}, A. Blaschitz¹, E.T. Korgun^{1,2}, I. Lang¹, G. Desoye³, G. Skofitsch⁴ and G. Dohr¹

¹Institute of Histology and Embryology, University of Graz, Harrachgasse 21, A-8010 Graz, Austria, ²Institute of Histology and Embryology, Akdeniz University, 07070 Kampus Antalya, Turkey, ³Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Graz, Inbrennruherplatz 14, A-8036 Graz and ⁴Institute of Zoology, University of Graz, Universitätsplatz 3, A-8010 Graz, Austria

To whom correspondence should be addressed E-mail: tom.hahn@kfunigraz.ac.at

The present study investigated the expression of glycogenin, the protein primer for glycogen synthesis, and the high affinity glucose transporter isoform GLUT3 as a further potential regulator of cellular glycogen metabolism, in first trimester and term human placenta using immunohistochemistry and Western blotting. At term, glycogenin was most abundant in the endothelium of fetal vessels. Trophoblast as well as basal decidual cells were moderately stained. The glycogenin distribution pattern in first trimester placentae resembled that at term, but reactivity was generally less intense. Extravillous trophoblast and villous cytotrophoblast were the major sites of GLUT3 expression. Endothelial cells were also strongly labelled with the GLUT3 antiserum. Western blotting identified both free and glucosylated glycogenin, as well as a 48 kDa band reacting with GLUT3 antiserum in placental villous tissue. Glycogenin immunoreactivity remained unaffected by amyolytic glycogen digestion, although preceding electron microscopical examination demonstrated the presence of glycogen. These data may indicate that placental glycogenin can be recycled from the immature glycogen or that it is located on the surface of the glycogen molecule. In conclusion, the co-expression of glycogenin with GLUT3 might enable glycogen-storing cells to exchange glucose quite effectively according to prevailing metabolic demands of glycogen synthesis or degradation.

Key words: glucose transport/GLUT/glycogen/glycogenin/placenta

Introduction

As the placenta is not capable of producing appreciable amounts of glucose until late in gestation, the first limiting step in placental glycogen biogenesis is the uptake of glucose by cells fronting to the maternal or fetal circulation. This process is brought about by facilitated diffusion along a concentration gradient and involves certain members of a growing superfamily of integral membrane glycoproteins, named GLUT1-9.

The subsequent steps in the glycogenetic cascade were considered to be classical, well explored pathways until the last decade. Starting with a carbohydrate primer of unknown origin, all that was needed for glycogen synthesis were UDPglucose, glycogen synthase and a branching enzyme. This simplistic concept is now to be changed considerably by taking into account two recently identified molecular species additionally involved in glycogenesis: the glucosyltransferase glycogenin (EC 2.4.1.186; not a carbohydrate) as the original primer (Whelan, 1986) and the stable glycogen-precursor proglycogen (Lomako *et al.*, 1991). Based on these findings, the following sequence of glycogen metabolism is now becoming clear; glycogenin transfers glucose from UDPglucose to the

hydroxyl of its Tyr-194 and then adds further residues to form protein-bound maltosaccharides. This fully glucosylated glycogenin serves as the primer for the synthesis of proglycogen by a putative proglycogen synthase (distinct from the well recognized glycogen synthase) and branching enzyme with UDPglucose as substrate. Subsequently, the classical glycogen synthase and branching enzyme take proglycogen to glycogen. Proglycogen also functions as an intermediate in glycogen degradation. When it is caused to break down to glycogenin, the enzyme regains its autocatalytic activity and is ready to prime glycogen biogenesis as soon as glucose is taken up by the cell.

Evidence has been provided from various cells and tissues (Lomako *et al.*, 1993; Ercan *et al.*, 1994; Mu and Roach, 1998), suggesting that glycogenin may represent the key control point of glycogen metabolism, even having the potential to override what was previously considered to be the rate limiting enzyme, glycogen synthase (Alonso *et al.*, 1995). On the other hand, glycogenin itself, being downstream of glucose carriers in the synthetic pathway, is dependent on effective glucose uptake to provide substrate for autoglucosylation (Mueckler and Holman, 1995). Therefore, in a first step to

to gain deeper insight in placental glycogen metabolism, the present study investigated the expression of glycogenin and the high affinity GLUT3 glucose transporter in first trimester and term human placenta

Materials and methods

Patients and tissues

Graavidas participating in the study were non-obese and consumed customary diets without any systematic attempt to restrict calories. The subjects had no family history of diabetes and were endocrinologically normal according to serum concentrations of LH, FSH, prolactin, oestradiol and progesterone. The pregnant women routinely underwent an oral glucose tolerance test showing that none of them had gestational diabetes.

First trimester placental tissue ($n = 5$) was obtained from clinically normal pregnancies which were interrupted for psychosocial reasons by vacuum suction and curettage at gestational week 12. Term placentae ($n = 5$) were investigated after uncomplicated pregnancies and vaginal deliveries in gestational week 39. Term placental weights ranged from 421–605 g (mean 543) with babies weighing 2850–3460 g (mean 3180). Villous tissue was identified and isolated from chorionic plate and decidua under the dissection microscope.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Villous tissue from human placenta was homogenized and cellular proteins were solubilized in Laemmli sample buffer (Sigma, Taufkirchen, Germany) supplemented with Complete protease inhibitor cocktail (Boehringer, Mannheim, Germany). Insoluble material was removed by centrifugation at 100 000 g for 1 h at 4°C. Samples were either used immediately or stored for up to 10 days at -70°C. Prior to electrophoresis, samples were boiled for 3 min at 100°C.

Equal amounts of protein, determined according to Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951) were subjected to sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis on 8–18% gradient gels (ExcelGel; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) using ExcelGel strips (ExcelGel; Amersham Pharmacia Biotech). Samples were run for 150 min at a constant 600 V/50 mA/30 W. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech) by semi-dry electroblotting in a buffer containing 0.2 mol/l glycine, 25 mmol/l Tris and 20% methanol for 45 min at 30 V/100 mA/6 W. Successful transfer was confirmed by Ponceau S (Sigma) staining of the blots.

The membranes were blocked for 12 h with 5% non-fat dry milk (BioRad, Hercules, CA, USA) and 0.1% Tween-20 (Sigma) in 0.14 mol/l Tris-buffered saline (TBS) pH 7.2–7.4 at 4°C. The same solution was used for subsequent washings and as diluent for the antibodies. The blotting membranes were incubated for 1 h at room temperature with antisera against glycogenin (Lomako *et al.*, 1988) (dilution 1:500) or GLUT3 (Chemicon, Temecula, CA, USA; dilution 1:3000). After washing the membranes were further incubated with rabbit anti-goat IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate (BioRad) diluted 1:1000 for detection of glycogenin antibodies or goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (BioRad) diluted 1:5000 for detection of GLUT3 antibodies, both for 1 h at room temperature. After three washings in TBS, pH 7.2–7.4, the immunolabelling was visualized using the chemiluminescence based SuperSignal Chemiluminescence (CL)-HRP Substrate System (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the instructions of the manufacturer. Membranes were exposed to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) which was subsequently analysed using an Eagle Eye II gel documentation unit (Stratagene, Cambridge, UK).

Control blots were incubated with antibody diluent only instead of the primary antiserum.

Immunohistochemistry

Cryostat sections (5 μ m) of placental tissue were fixed in acetone and treated for 5 min with blocking solution containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 10% human serum. Specimens were immunolabelled for 30 min at room temperature using polyclonal antisera against glycogenin (Lomako *et al.*, 1988; Smythe *et al.*, 1989) or GLUT3 glucose transporter (Chemicon), each diluted 1:500 in antibody diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA). After three washings in TBS-Tween 20, sections were incubated with either biotinylated polyvalent (rabbit, mouse, goat) swine secondary antibody followed by streptavidin-HRP (LSAB+ Kit, Dako) or rabbit-anti-sheep IgG conjugated with HRP (Dako; dilution 1:500). The sections were washed again in TBS-Tween 20, and immunolabelling was visualized by a 5 min exposure to 3-amino-9-ethylcarbazole.

In control sections the primary antiserum was replaced by antibody diluent (Dako) only or normal rabbit serum respectively. The sections were counterstained with Mayer's haemalum (Merck, Darmstadt, Germany). Specimens were mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck).

Enzymatic glycogen digestion

Glycogen in homogenate samples or tissue sections was digested by incubation for 1 h at 37°C in a reaction mixture containing 8 μ g/ml human salivary α -amylase (Sigma), 10 μ g/ml isoamylase from *Pseudomonas amyloferamos* (Sigma), 50 μ g/ml amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (Sigma), 8 mmol/l CaCl₂ and 50 mmol/l sodium acetate buffer, pH 5.0.

Cell culture

Mononucleated trophoblast was isolated from term human placenta as described in detail elsewhere (Schmon *et al.*, 1991). Briefly, villous material was digested with a 0.125% trypsin solution (Gibco Life Technologies Ltd, Paisley, UK). The released cells were loaded on top of a Percoll (Amersham Pharmacia Biotech) gradient ranging from 10–70%. After centrifugation the band containing trophoblasts was removed (Blaschitz *et al.*, 2000). Following extensive washings, the trophoblasts were highly purified using immunomagnetic particles (Dynabeads M-280; Dynal, Hamburg, Germany) which had been conjugated with the monoclonal antibody W6/32 (Serotec, Kidlington, UK) against human leukocyte antigen (HLA) class-I antigens. In the human placenta this antibody reacts only with stromal cells, macrophages, the endothelium and with the extravillous trophoblast. It does not identify villous trophoblast, which is devoid of HLA class-I antigens (Shorter *et al.*, 1993).

Cells were plated at a density of 500 cells/mm² into Transwell-COL culture chamber inserts (Costar, Cambridge, MA, USA) or 35 mm polystyrene culture dishes (Falcon Becton Dickinson, Meylan Cedex, France) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 15% defined fetal bovine serum (HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), 100 μ g/ml streptomycin (Gibco), 100 IU/ml penicillin (Gibco) and 100 μ g/ml amphotericin B (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/air. Trophoblast cells were allowed to recover their microvillous surface for 24 h after the trypsinization, before further analysis.

Cell characterization

Viability of the trophoblast cells was assessed after 24 h in culture by 0.05% Trypan Blue (JRH Biosciences, Crawley Down, UK) dye exclusion during a 2 min incubation, and by measuring the concentrations of β -human chorionic gonadotrophin (HCG) (OPUS

... immun assay; Behring Diagnostics Inc., Westwood, MA.
... secreted into the culture media.

Electron microscopy

... processing, the trophoblast cells remained adherent to the
... well-COL membrane on which they were grown in culture
... washing with phosphate-buffered saline (PBS), the cells were
... with 2.5% glutaraldehyde (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland)
... for 30 min at room temperature and then washed in ultrapure
... After three washings in ultrapure water the samples were
... with 2% osmium tetroxide in cacodylate buffer at room
... temperature for 20 min. The cells were washed with cacodylate buffer
... (10 min) and subsequently with distilled water for 10 min. Samples
... dehydrated in 70% ethanol that was replaced three times after
... 15 min. Afterwards they were contrasted with 0.5% uranyl
... in 1% phosphotungsten acid and 70% ethanol for 30 min
... further dehydrated in 80, 90 and twice in 100% ethanol for
... min each time. The samples were embedded in resin (TAAB
... Equipment Ltd, Aldermaston, UK) after pre-infiltration
... a terpeneol/resin mixture (1:1 and 1:3 respectively, for each 15
... Ultra-thin (50 nm) sections were examined with a Zeiss 902
... electron microscope at an accelerating voltage of 50 kV. Photographs
... taken on Kodak electron microscope film SO 163 at 2 s
... exposure time.

Preparation and quantification of glycogen

... the cells cultured in polystyrene dishes had been counted and
... washed twice with distilled water, the cells were immediately scraped
... in 3 ml ice-cold water and sonicated under extensive and careful
... (4°C) for 10 s at a 40 W energy setting. The sonicate
... (homogenate) was adjusted to 30% KOH by the addition of KOH
... . Glycogen was extracted by digesting the preparations at
... °C for 30 min in 30% KOH (Krisman, 1962). Samples were
... on ice for 5 min, after which 5 µl saturated Na₂SO₄ (Van
... el, 1965) were added and thoroughly mixed. After the addition
... 9 ml 95% ethanol and mixing again, the solution was heated to
... , cooled and centrifuged at 2500 g for 15 min at 4°C. The
... supernatant was aspirated, and the precipitate was washed once more
... -10 ml ethanol. The supernatant was again aspirated, and the
... remaining fluid was evaporated by placing the tubes in boiling water
... a few minutes until the precipitate was dry. The precipitate was
... dissolved in 400 µl water and glycogen was estimated fluoro-
... metrically (Nahorski and Rogers, 1972) using a Shimadzu RF-
... spectrofluorophotometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The
... method is based on the enzymatic conversion of glycogen to 6-
... phosphogluconate with amylo-α-1,4-α-1,6-glucosidase, hexokinase
... and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The increase in NADPH is
... measured fluorometrically (excitation 350 nm/emission 460 nm) and
... is proportional to the amount of glucose released after digestion of
... glycogen in the sample. Liver glycogen (Sigma) was used as standard.
... Intracellular glucose levels were measured by replacing amylo-α-1,4-
... -glucosidase with 0.2 mol/l acetate buffer (pH 4.8). Glycogen
... content was calculated as the difference between total cellular glucose
... after glycogen degradation and basal glucose levels and expressed as
... µg cellular protein. Protein content of the cells was measured
... according to Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951).

1. trim.
term
amylolysis
control

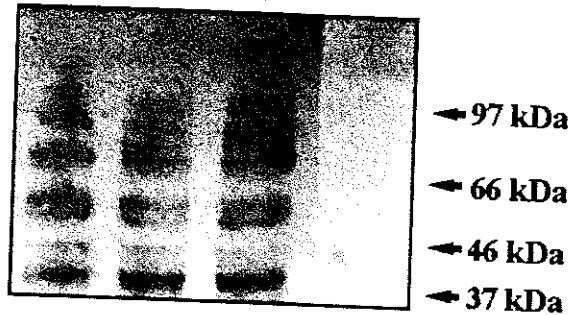


Figure 1. Representative Western blot of glycogenin (at 37 kDa) also showing glucosylated species at higher molecular weights in homogenates of first trimester and term placental villous tissue and in a homogenate of term villous tissue after enzymatic glycogen degradation (amylolysis)

1. trim.
term
control

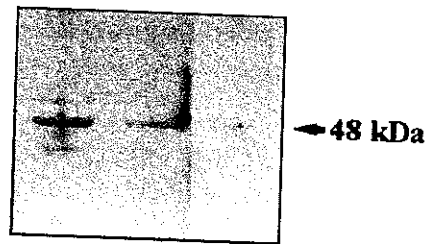


Figure 2. Representative Western blot of GLUT3 glucose transporter in homogenates of first trimester and term placental villous tissue

Results

Glycogenin immunoblotting identified a major band at 37 kDa. In addition, a series of faint bands was visualized ranging up to sizes >200 kDa (Figure 1). The 37 kDa band, representing the non-glucosylated glycogenin, was more pronounced in homogenates of term than in homogenates of first trimester placental villi (integrated optical density: 0.77 ± 0.21 versus 0.22 ± 0.07 arbitrary units; $P < 0.05$). The staining pattern remained virtually unchanged after pre-treatment of the samples with α-amylase, isoamylase and amyloglucosidase (Figure 1). Analysis of GLUT3 expression in villous tissue extracts by Western blotting revealed a discrete band at 48 kDa, reacting more intensively in first trimester compared with term placental villi (Figure 2; integrated optical density: 0.87 ± 0.40 versus 0.05 ± 0.02 arbitrary units; $P < 0.05$). Replacement of the antisera with antibody diluent resulted in the absence of detectable bands (Figures 1 and 2).

Immunohistochemically, glycogenin was most abundant in the endothelium of fetal vessels in term placentae (Figure 3A). Syncytiotrophoblast, extravillous trophoblast and basal decidual cells were moderately stained (Figure 3A and B). Proliferating mesenchymal cells were also faintly labelled. The

...
... are presented as mean ± SD. Data were analysed using the
...-Whitney U-test. A level of $P \leq 0.05$ was chosen to identify
... significant differences.

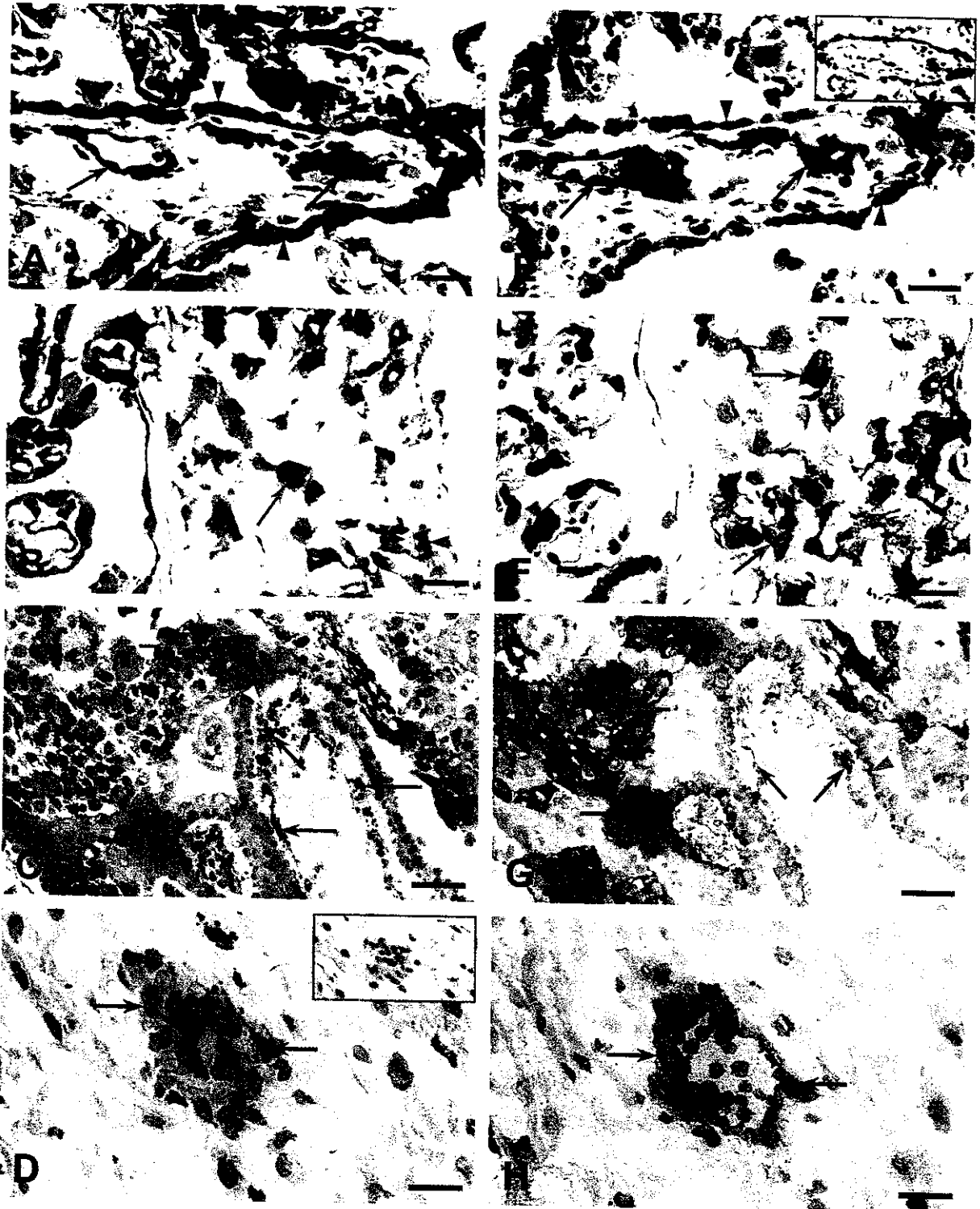


Figure 3. Immunohistochemical identification (brown staining) of glycogenin (A–D) and GLUT3 glucose transporter (E–H) in human term (A, B, E, F) and first trimester (C, D, G, H) placentae. Black arrow, endothelium of fetal vessel; red arrow, immunopositive extravillous trophoblast; yellow arrow immunonegative extravillous trophoblast; black arrowhead, syncytiotrophoblast; red arrowhead, basal decidual cell; yellow arrowhead, proliferating mesenchymal cell; blue arrowhead, villous cytotrophoblast. Magnifications: (A, B, E, F) bar = 40 μ m; (C, G) bar = 60 μ m; (D, H) bar = 25 μ m.

glycogenin distribution in first trimester placentae resembled that at term, but reactivity was generally less intense (Figure 3C and D)

The GLUT3 antiserum labelled fetal endothelial cells in term and first trimester placentae independent of arterial or

venous nature of the vessels (Figure 3E–H). About 50% of the extravillous trophoblast cells within the basal decidua were strongly stained, whereas the other half of the population remained negative for GLUT3 (Figure 3F). Decidual cells themselves also immunoreacted with the GLUT3 antiserum



Figure 4. Electron micrograph of a portion of term placental trophoblast with microvillous plasma membrane showing several glycogen aggregates (arrowheads) separated by bundles of actin-like filaments. Magnification: bar = 0.4 μ m

Measuring the glycogen content of isolated trophoblast cells on the basis of enzymatically released glucose residues resulted in values of $87.35 \pm 16.37 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein

At the electron microscopic level, glycogen was visualized in trophoblast cells as small individual granules and prominent aggregates. The latter resembled α -particles and were often associated with large arrays of actin-like filaments (Figure 4)

Discussion

The present study for the first time provides data on the spatio-temporal expression of glycogenin, the rediscovered protein primer for glycogen synthesis (Whelan, 1986) in the human placenta. Highest levels of the enzyme were found in endothelial cells, which is in good agreement with significant amounts of glycogen detected in human placental endothelium (Jones and Desoye, 1993). Other glycogenin-positive populations were villous and extravillous trophoblast, and decidual cells. The latter are connective tissue stromal cells in the endometrial stratum functionalis, which start accumulating glycogen in the secretory phase.

Western blotting identified the 332 amino acid glycogenin in extracts of placental villous tissue at 37 kDa, suggesting that there is a reservoir of free glycogenin present in this organ, as also seems to be the case in liver (Ercan *et al.*, 1994), but not in muscle (Smythe and Cohen, 1991; Alonso *et al.*, 1995). Fluoro-enzymatical estimation revealed that term placental villous trophoblast cells contained moderate amounts of glycogen, which was shown to be aggregated to macromolecular α -particles at the electron microscopic level. The lack of effect of amylase treatment on immunochemical glycogenin detection levels is consistent with the idea that glycogenin could be located in the outermost regions of glycogen instead of in the centre, thus enabling its recognition by specific antibodies also in the macromolecular polysaccharide. Alternatively, it is also conceivable that glycogenin molecules may become separated from the nascent glycogen chains, resulting in a more or less constant cellular pool of immunochemical-detectable glycogenin under basal conditions.

Several studies have failed to demonstrate insulin effects on placental glycogen content (Shafrir and Barash, 1991), and the hypothesis has been advanced that the synthesis of placental glycogen is driven by substrate availability (Desoye and Shafrir, 1994). Since we (Hahn *et al.*, 1998a, 2000) and others (Hillsley *et al.*, 1998) have shown that the expression of the ubiquitous GLUT1 glucose transporter in the placenta is impaired under hyperglycaemic conditions, which hardly tallies with increased placental glycogen levels in diabetes (Desoye and Shafrir, 1996), we reinvestigated the expression of another potential glucose scavenger (GLUT3) in the placenta using a refined avidin-biotin technique. In line with earlier reports (Hauguel de Mouzon *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 1999), GLUT3 was abundantly expressed in fetal vascular endothelium, not restricted to arterial vessels only as was suggested (Head *et al.*, 1999). In placental trophoblast, GLUT3 expression has been highly controversial. Despite the detection of mRNA (Clarson *et al.*, 1997; Esterman *et al.*, 1997) and protein (Allen and Smith, 1992; Jansson *et al.*, 1993) by Northern and Western blotting respectively, numerous studies

Figure 3F) Other sites of GLUT3 expression were the extravillous trophoblast in cell columns and cell islands in both developmental stages of the placenta investigated, as well as villous cytotrophoblast cells (Figure 3G). In contrast, the syncytiotrophoblast was generally not labelled by the antiserum (Figure 3E-G). None of the immunoreactions described above were observed when the antisera were replaced by antibody diluent or normal rabbit serum respectively (for examples see insets in Figure 3D and E).

Similar to that observed in Western blotting experiments, pre-treatment of the sections with glycogen-degrading enzymes failed to materially enhance the signal for glycogenin (not shown). This result was the opposite of that expected, since one would argue that the glycogenin domain recognized by the antibodies is masked within a macromolecular glycogen particle and becomes accessible only after degradation of the polysaccharide chains covering it. Therefore, it was additionally investigated whether there was glycogen present at all, using isolated and cultured term placental villous trophoblast cells.

Viability of these cells was >90% by Trypan Blue exclusion. They appeared as populations tending to form aggregates in culture but did not fuse to multinucleated syncytia after 24 h. Electron microscopic examination of trophoblast cells demonstrated a pale cytoplasm and pleomorphic nuclei with diffuse chromatin pattern. Common cytological features included sparse stacks of rough endoplasmic reticulum, perinuclear Golgi apparatus, few mitochondria and a microvillous membrane on the apical surface (Figure 4). Cells possessed bundles of cytoplasmic actin-like filaments. The accumulated level of β -HCG, the major endocrine product of placental trophoblast, was $1.2 \pm 26 \text{ mIU}/10^6$ cells after 24 h in culture.

been unsuccessful in immunohistochemically visualizing GLUT3 in term placental villous trophoblast (Jansson et al., 1993; Barros et al., 1995; Hauguel de Mouzon et al., 1997; Kainulainen et al., 1997; Hahn et al., 1999). In contrast, Ogura et al. demonstrated the carrier in this cell population using tissue sections of first trimester placental villi (Ogura et al., 2000). GLUT3 is expressed in cytotrophoblast cells and syncytiotrophoblast in choriocarcinoma tissue, as well as trophoblast-derived JAR and JEG-3 choriocarcinoma cell lines, which are frequently used as models for dividing trophoblast cells, have also been shown to react with antisera against GLUT3 (Clarson et al., 1997; Hahn et al., 1998b). In the present study, we have unambiguously identified this transporter isoform in placental extravillous cytotrophoblast and villous cytotrophoblast sub-populations, whereas it was not detectable in the differentiated, mitotically active villous syncytiotrophoblast. Taken all together, the above supposed inconsistencies in data no longer appear as such when trophoblast GLUT3 expression is considered to be confined to rapidly proliferating, poorly differentiated cells as first suggested (Clarson et al., 1997). GLUT3 is not detected in term placental villous trophoblast by blotting experiments might have been due to cross-contaminating trophoblast sub-populations (Blaschitz et al., 2000). In conclusion, the most important outcome of this study is the co-expression of glycogenin with the high affinity glucose transporter GLUT3 in endothelium, basal decidua and invading extravillous trophoblast. GLUT3 may enable these cells to take the substrate for glycogen biogenesis effectively even under conditions of GLUT1 down-regulation.

acknowledgements

Sincere thanks go to Sir Philip Cohen (University of Dundee, UK), Joseph Lomako (University of Miami, FL, USA) and Juan A Curtino (University of Cordoba, Argentina) for providing glycogenin antisera, as well as to Iris Greiner and Rudolf Schmied for excellent technical assistance. The study was supported by grants P13721-MED (FWF Austria) and 7361 (Austrian National Bank).

References

- Clarson, S.R. and Smith, C.J. (1992) Glucose transport in the human placenta: GLUT1 and GLUT3 glucose transporter protein localization in syncytiotrophoblast microvillous and basal membranes. *J. Soc. Gyn. Invest.* **21**, 345A.
- Clarson, S.R., Lomako, J., Lomako, W.M. et al. (1995) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**, 1126-1137.
- Clarson, S.R., Yudilevich, D.L., Jarvis, S.M. et al. (1995) Quantitation and immunolocalization of glucose transporters in the human placenta. *Placenta* **16**, 623-633.
- Blaschitz, A., Weiss, U., Dohr, G. et al. (2000) Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta*, **21**, 733-741.
- Jansson, I., H. Glacier, J.D., Sides, M.K. et al. (1997) Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (JAR) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta*, **18**, 333-340.
- Hauguel-de-Mouzon, S. and Shafir, E. (1994) Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Mol. Asp. Med.* **15**, 505-682.
- Hauguel-de-Mouzon, S. and Shafir, E. (1996) The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes Reviews* **4**, 70-89.
- Hahn, N., Gannon, M.C. and Nuttall, F.Q. (1994) Incorporation of glycogenin into a hepatic proteoglycan after oral glucose administration. *J. Biol. Chem.* **269**, 22328-22333.
- Esterman, A., Greco, M.A., Mitani, Y. et al. (1997) The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism. *Placenta* **18**, 129-136.
- Hahn, T., Barth, S., Weiss, U. et al. (1998a) Sustained hyperglycemia *in vitro* downregulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast. A mechanism to protect fetal development? *FASEB J.* **12**, 1221-1231.
- Hahn, T., Barth, S., Hofmann, W. et al. (1998b) Hyperglycemia regulates the glucose transport system of clonal choriocarcinoma cells *in vitro*. A potential molecular mechanism contributing to the adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int. J. Cancer*, **78**, 353-360.
- Hahn, T., Barth, S., Graf, R. et al. (1999) Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1445-1452.
- Hahn, T., Hahn, D., Blaschitz, A. et al. (2000) Hyperglycaemia-induced subcellular redistribution of GLUT1 glucose transporters in cultured human term placental trophoblast cells. *Diabetologia* **43**, 173-180.
- Hauguel-de-Mouzon, S., Challier, J.C., Kacemi, A. et al. (1997) The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 2689-2694.
- Head, J.R., Fujikawa, H., Casey, M.L. (1999) Preferential expression of glucose transporter-3 in the cotyledonary vessels of the placental vasculature. *J. Soc. Gyn. Invest.* **6**, 153A.
- Illsley, N.P., Sellers, M.C. and Wright, R.I. (1998) Glycemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. *Placenta*, **19**, 517-524.
- Jansson, I., Wennergren, M. and Illsley, N.P. (1993) Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1554-1562.
- Jones, C. and Desoye, G. (1993) Glycogen distribution in the capillaries of the placental villus in normal, overt and gestational diabetic pregnancy. *Placenta*, **14**, 505-517.
- Kainulainen, H., Jaervinen, I. and Heinonen, P.K. (1997) Placental glucose transporters in fetal intrauterine growth retardation and macrosomia. *Gynecol. Obstet. Invest.* **44**, 89-92.
- Krisman, C.R. (1962) A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.* **4**, 17-23.
- Lomako, J., Lomako, W.M. and Whelan, W.J. (1988) A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* **2**, 3097-3103.
- Lomako, J., Lomako, W.M. and Whelan, W.J. (1991) Proglycogen: a low molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett.* **279**, 223-228.
- Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J. et al. (1993) Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J.* **7**, 1386-1393.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mueckler, M. and Holman, G. (1995) Homeostasis without a GLUT. *Nature*, **377**, 100-101.
- Mu, J. and Roach, P.J. (1998) Characterization of human glycogenin-2, a self-glucosylating initiator of liver glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.* **273**, 34850-34856.
- Nahorski, S.R. and Rogers, K.J. (1972) An enzymatic fluorometric micro method for determination of glycogen. *Anal. Biochem.* **49**, 492-497.
- Ogura, K., Sakata, M., Okamoto, Y. et al. (2000) 8-bromo-cyclic AMP stimulates glucose transporter-1 expression in a human choriocarcinoma cell line. *J. Endocrinol.* **164**, 171-178.
- Schmon, B., Hartmann, M., Jones, C. et al. (1991) Insulin and glucose do not affect the glycogen content in isolated and cultured cells of human term placentas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 888-893.
- Shafir, E. and Barash, V. (1991) Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy. *Isr. J. Med. Sci.* **27**, 449-461.
- Shorter, S.C., Starkey, P.M., Ferry, B.L. et al. (1993) Antigenic heterogeneity of human cytotrophoblast and evidence for the transient expression of MHC class I antigens distinct from HLA-G. *Placenta*, **14**, 571-582.
- Smythe, C. and Cohen, P. (1991) The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* **200**, 625-631.
- Smythe, C., Villar-Palasi, C. and Cohen, P. (1989) Structural and functional studies on rabbit liver glycogenin. *Eur. J. Biochem.* **183**, 205-209.
- Van Handel, E. (1965) Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* **11**, 256-265.
- Whelan, W.J. (1986) The initiation of glycogen synthesis. *Bioessays* **5**, 136-140.

Received on May 8, 2001; accepted on September 11, 2001

Physiological Leukocytosis during Pregnancy is Associated with Changes in Glucose Transporter Expression of Maternal Peripheral Blood Granulocytes and Monocytes*

EMIN T KORGUN, RAMAZAN DEMIR, PETER SEDLMAYR, GERNOT DESOYE, GUERKAN ARIKAN, PETER PUERSTNER, MARTIN HAEUSLER, GOTTFRIED DOHR, GERHARD SKOFITSCH, AND TOM HAHN

Korgun ET, Demir R, Sedlmayr P, Desoye G, Arikan G, Puerstner P, Haeusler M, Dohr G, Skofitsch G, Hahn T. Physiological leukocytosis during pregnancy is associated with changes in glucose transporter expression of maternal peripheral blood granulocytes and monocytes. AJRI 2002. 48 110-116 © Blackwell Munksgaard 2002

PROBLEM: The scarce data on glucose transporter expression of leukocytes are contradictory and nothing is known about changes accompanying physiological leukocytosis during pregnancy, which imposes acute metabolic demands on the cells.
METHOD OF STUDY: Cytospin preparations of intravascular leukocytes were searched immunocytochemically for the high affinity glucose transporters GLUT1, 3 and 4. Pregnancy-associated quantitative changes in transporter expression were assessed by flow cytometry.

RESULTS: Granulocytes and monocytes stained for GLUT1, 3 and 4. Major changes in cell surface transporter expression during pregnancy were a 36% ($P < 0.05$) down-regulation of granulocyte GLUT1 at term, and an increase in monocyte GLUT3 levels to 137% ($P < 0.05$), paralleled by a 24% ($P < 0.05$) decrease in GLUT4 content in second trimester. Apart from a minor subpopulation, lymphocytes were negative for these carriers.

CONCLUSION: GLUT1, 3 and 4 are abundantly expressed in granulocytes and monocytes. The particular isoforms are differentially regulated during pregnancy, suggesting an individual functional significance.

Key words:
Glucose transport, GLUT,
leukocyte, neutrophilia

EMIN T. KORGUN
PETER SEDLMAYR
GOTTFRIED DOHR
TOM HAHN
Institute of Histology and
Embryology, University of Graz,
Austria

EMIN T. KORGUN
RAMAZAN DEMIR
Institute of Histology and
Embryology, Akdeniz University,
Antalya, Turkey

GERNOT DESOYE
GUERKAN ARIKAN
PETER PUERSTNER
MARTIN HAEUSLER
Department of Obstetrics and
Gynecology, University of Graz,
Graz, Austria

GERHARD SKOFITSCH
Institute of Zoology, University of
Graz, Graz, Austria

Address reprint requests to Tom
Hahn, Institute of Histology and
Embryology, University of Graz,
Harrachgasse 21, A-8010 Graz,
Austria.

*This work is a part of the thesis of Emin T Korgun, submitted at the Akdeniz University Antalya, Turkey.

E-mail:
tom.hahn@kfunigraz.ac.at

Submitted July 24, 2001;
revised October 8, 2001;
accepted October 11, 2001

INTRODUCTION

The activation of maternal leukocytes after fertilization is a well documented phenomenon¹ and is considered to play an integral role in the control and maintenance of a normal pregnancy from implantation to parturition, by protecting the developing fetus against ascending infections.² This so-called physiological leukocytosis imposes acute energy-metabolic demands on the cells involved that are almost exclusively met by glycolysis.³ Glucose, its primary substrate, can either be supplied by uptake from the extracellular space or by consumption of endogenous glycogen stores. Even in the latter case, adequate glucose transfer is of critical importance for nourishing leukocyte functions, because it must precede the cellular accumulation of glycogen. There is increasing evidence showing the rate of glycogen synthesis to be determined by glucose transport efficiency rather than by the activity of glycogen synthase.⁴ Also glycogenin, the recently rediscovered protein primer for glycogen synthesis, is located downstream of glucose transporters in the synthetic pathway and thus depends on glucose uptake providing substrate for autoglucosylation.⁵

In general, glucose transfer can be brought about by facilitated diffusion along a concentration gradient or by a not yet understood sodium-coupled mechanism being largely restricted to intestinal and proximal renal tubular epithelial cells. The former process is mediated by carrier proteins rendering substrate entry about 10,000 times faster than calculated for diffusion across the lipid membrane layer. The transport facilitators are about 500 amino acids in length and belong to a growing superfamily of integral membrane glycoproteins with 12 membrane-spanning domains. The genes of these glucose transporters have been designated GLUT1–GLUT9 in the order in which they were identified. The isoforms GLUT1, 3 and 4 represent high affinity transport facilitators. Because of their low Michaelis constant (K_M), these transporters function at rates close to maximal velocity. Thus their level of cell surface expression greatly influences the rate of glucose uptake into the cells.

In the present study we examined the immunocytochemical distribution of GLUT1, 3 and 4 in human peripheral blood granulocytes, monocytes and lym-

phocytes using a refined avidin–biotin technique. Then we searched for quantitative changes in cell surface transporter expression associated with the rise in leukocyte count during pregnancy by flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study was approved by the University of Graz Ethical Committee. Twelve non-pregnant women and nine first trimester, seven second trimester and seven third trimester gravidas participated in the study after having given informed consent. They were non-obese (body mass index < 25 kg/m²) and consumed customary diets without any systematic attempt to restrict calories. The subjects had no family history of diabetes and were endocrinologically normal according to serum concentrations of LH, FSH, prolactin, estradiol and progesterone. The pregnant women routinely underwent an oral glucose tolerance test, showing that none of them had gestational diabetes. None of the women had taken oral contraceptives or any other medication at least 3 months before they were entered into the study.

Cytopreparation, Cyto centrifugation and Immunocytochemistry

Whole blood was diluted 1:1 (v/v) with 3 g/L sodium citrate in phosphate buffered saline (PBS) and loaded onto a Ficoll–Hypaque density gradient (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). After centrifugation for 30 min at 1000 g at room temperature, mononuclear cells were collected and placed into a disposable cytofunnel sample chamber (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) containing 100 μ L PBS. The cells were spun at 50 g for 5 min at room temperature. The slides were dried for 2 hr at room temperature and washed with PBS. After a 20-min exposure to blocking solution, specimen were incubated for 60 min at room temperature in a moist chamber with rabbit antisera against the C-terminal sequences of GLUT1 (CGLFHPLGADSQV), GLUT3 (NSMQPVKEP-GNA) and GLUT4 (CTELEYLGPEND) (all from Chemicon, Temecula, CA, USA). These antisera were diluted 1:1000 (GLUT1), 1:500 (GLUT3) and 1:100 (GLUT4) with Antibody Diluent (Dako, Carpinteria,

CA, USA) Staining with monoclonal CD45 antibodies (Dako) in 1:200 dilution was used to identify leukocytes in the preparations. Labeling was visualized using the Universal LSAB kit (Dako) according to the instructions of the manufacturer. Specimens were counterstained with Mayer's hemalum (Merck, Darmstadt, Germany) and mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck). For controls, cells were incubated with non-immune rabbit serum (Dako) instead of the primary antibodies. Pictures were taken with an Axiophot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Flow Cytometry

Two microliters of the above described polyclonal antisera against the glucose transporters GLUT1, 3 and 4 (Chemicon) were incubated in 1:60 dilution for 20 min at room temperature with 100 μ L each of whole EDTA-anticoagulated venous blood taken in the morning after an overnight fast. Non-immune rabbit serum (Dako) was used as control. Cells were washed twice in 4 mL PBS containing 0.1% sodium azide (PBS-NaN₃) and subsequently incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated swine antirabbit immunoglobulin F(ab')₂ (Dako; final dilution 1:20) at 4°C in the dark for 20 min. Cells were then washed twice in 4 mL PBS-NaN₃. After washing, red cells were lysed by addition of Erythrocyte Lysing Reagent for Flow Cytometry (Dako) to each tube. The tubes were immediately vortexed and incubated at room temperature for 10 min in the dark. Again, the cells were washed twice with 4 mL PBS-NaN₃ and centrifuged at 300 g for 5 min at 4°C and finally resuspended in 200 μ L PBS. Samples were analyzed using a FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with an argon laser (wavelength 488 nm) using the CellQuest program. Gates were set on granulocytes, monocytes and lymphocytes in the forward scatter/side scatter diagram.

Statistics

Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U*-test. A level of $P < 0.05$ was chosen to identify significant differences.

RESULTS

Granulocytes and monocytes immunoreacted with antisera against the glucose transporter isoforms GLUT1, 3 and 4 in cytospin preparations (Fig 1) and flow cytometry (Fig. 2). In contrast, apart from a minor, not yet precisely defined subpopulation, lymphocytes remained negative for these carriers using immunochemical detection methods (Figs 1 and 2). In cytospin preparations from non-pregnant women,

granulocytes stained more intensely for the transporter molecules investigated than monocytes. This observation was further confirmed by flow cytometry (see Table I) showing particularly GLUT4 to be higher expressed in granulocytes than in monocytes (+186%, $P < 0.05$). Comparing the abundance of individual transporter isoforms based on labeling intensity, GLUT3 appeared to represent the predominant carrier expressed on granulocytes and monocytes with GLUT4 reaching similar levels in granulocytes.

None of the immunoreactions described above was observed when the antisera were replaced by normal rabbit serum (for example see Fig 1E).

An increase in leukocyte count was observed throughout pregnancy, reaching peak level in second trimester ($14.5 \pm 1.8 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ versus $6.9 \pm 1.7 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ in non-pregnant subjects).

Pregnancy-associated quantitative changes in leukocyte glucose transporter expression as assessed by flow cytometry are detailed in Table I. Major findings were the following: in granulocytes, GLUT1 content gradually decreased with progressing pregnancy being reduced by 36% at term ($P < 0.05$; Fig. 3). GLUT3 and GLUT4 labeling was also decreased during pregnancy by at least 24%, but without reaching statistical significance at any stage examined. In monocytes, GLUT1 remained unaffected during pregnancy, whereas GLUT3 was increased by 37% ($P < 0.05$) in second trimester when compared with non-pregnant values (Fig 4), followed by a decrease towards normal at term. Monocyte GLUT4 levels tended to decrease at the beginning of pregnancy with a nadir in second trimester (76% of non-pregnant signal; $P < 0.05$;

TABLE I Pregnancy-Associated Quantitative Changes in Glucose Transporter Expression as Assessed by Flow Cytometry

	Non-pregnant	First trimester	Second trimester	Term
Granulocyte				
GLUT1	3.1 ± 0.5	2.8 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2*
GLUT3	4.6 ± 0.5	3.5 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.7
GLUT4	4.7 ± 0.5	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.3 ± 0.4
Monocyte				
GLUT1	2.9 ± 0.3	2.7 ± 0.3	3.2 ± 0.6	3.0 ± 0.4
GLUT3	3.8 ± 0.6	3.5 ± 0.6*	5.2 ± 0.3*	4.1 ± 0.8
GLUT4	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1*	1.7 ± 0.4*

Values are given as mean ± S.E.M. of the ratios of median fluorescence intensity following binding of the specific antiserum divided by median fluorescence intensity of non-immune serum. A ratio of >2 was considered as positive >1.5 as borderline. * $P < 0.05$ versus non-pregnant values.

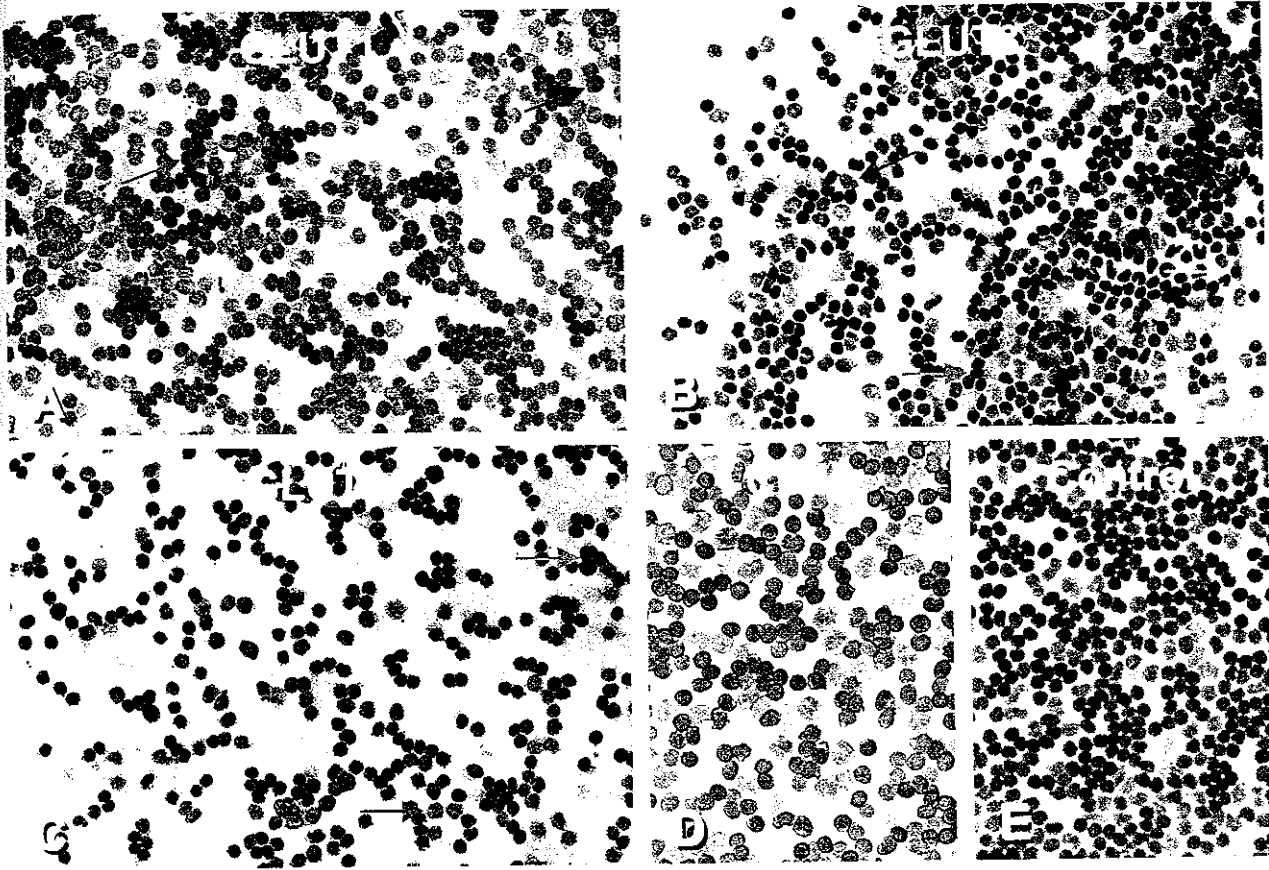


Fig 1 Immunocytochemical detection of GLUT1 (A) GLUT3 (B) GLUT4 (C) and CD45 (D) in peripheral white blood cells of non-pregnant women. Control sample, incubated with non-immune serum instead of the primary antibodies (E). Granulocyte (green arrow) monocyte (red arrow) lymphocyte (white arrow). Magnification of all pictures 200x.

Fig 5) and recovered above baseline at term pregnancy

expression during activation of human peripheral blood granulocytes and monocytes under physiological conditions using state of the art methods

DISCUSSION

There is now considerable agreement that suppression of specific immunity is a key mechanism preventing rejection of the fetal semiallograft, despite the intimate juxtaposition of genetically disparate maternal and fetal tissues in the pregnant uterus⁶ On the other hand, numerous studies have shown an increase in non-specific host defense during pregnancy, which was proposed to be a compensatory mechanism for diminished specific immunosensitivity⁷ The rare approaches focusing so far on the inter-relationship between stimulation of non-specific immunocompetent cells and their glucose transport capacity have used cultured leukocytes or related immortalized cell lines, often without having clearly defined the leukocyte subpopulations and glucose transporter isoforms involved. The present study is the first comprehensive analysis of specific high affinity facilitative glucose transporter

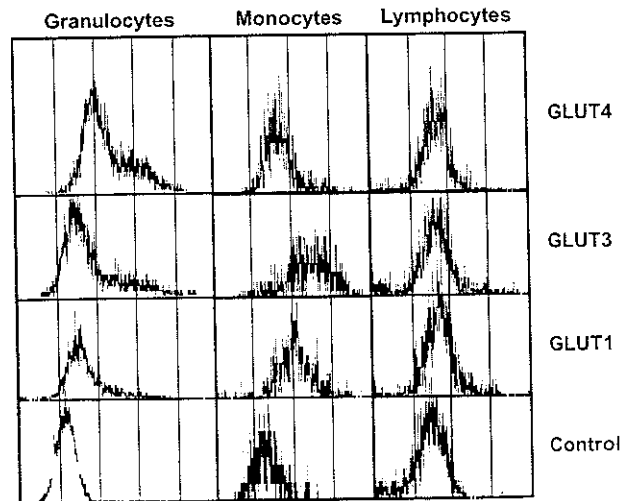


Fig 2 Fluorescence signals for GLUT1, 3 and 4 in peripheral white blood cells of non-pregnant women as detected by flow cytometry

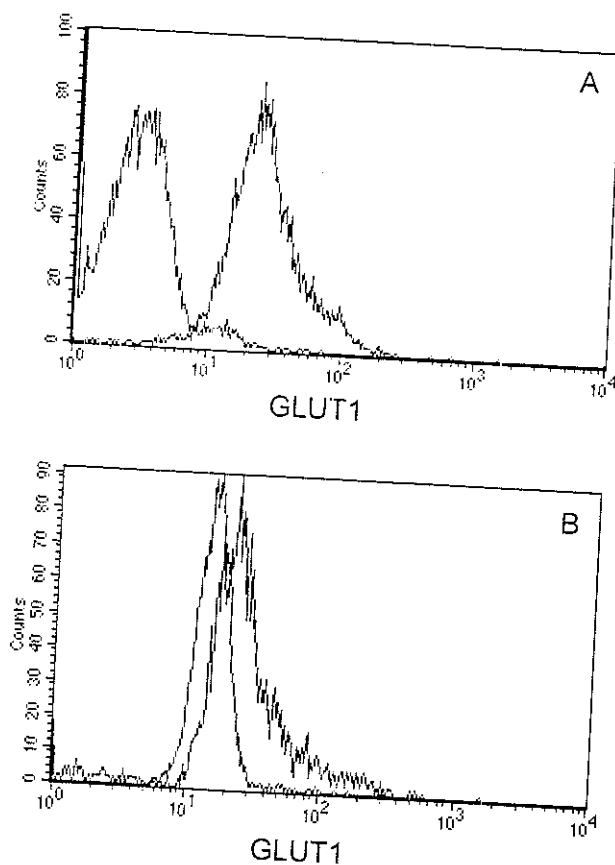


Fig. 3. Representative histograms showing the level of GLUT1 in granulocytes of a non-pregnant woman (A) and at term pregnancy (B) as detected by flow cytometry

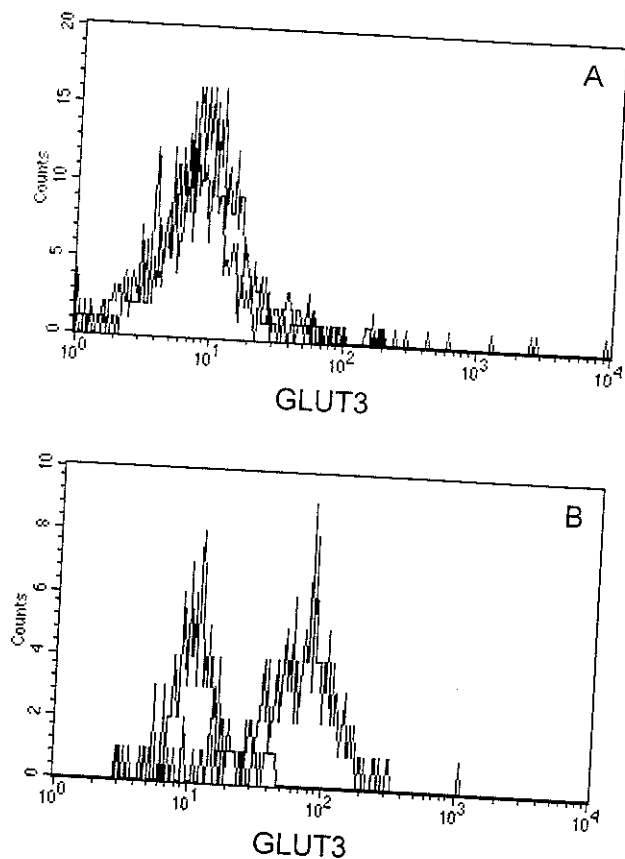


Fig. 4. Representative histograms showing the level of GLUT3 in monocytes of a non-pregnant woman (A) and in second trimester (B) as detected by flow cytometry

The GLUT1 transporter is regarded as the constitutive isoform within the facilitated diffusion glucose carrier family, thus covering the basal cellular glucose requirements for ATP production and biosynthesis of sugar-containing macromolecules. It is not only expressed in epithelial cells of blood-tissue barriers, such as the placental trophoblast,^{8,9} but was demonstrated in almost all tissues examined so far. Apart from a noticeable decrease in granulocytes at term, there were no major changes of GLUT1 expression associated with pregnancy measured in leukocytes. This significant decline of GLUT1 immunoreactivity was the only clear-cut effect of pregnancy on the high affinity glucose transporters detected in circulating granulocytes at all. This finding seems rather paradoxical in view of elevated granulocyte counts¹⁰ and deteriorating plasma glucose concentrations towards term pregnancy.¹¹ Further studies are needed addressing a potential regulation of granulocyte GLUT1 by its own substrate to clarify this problem.

GLUT3 is the transporter isoform characteristic for cells with high glucose demands such as neurons or

tumor cells,¹² because of its high substrate affinity. Granulocytes and monocytes are increased in number during pregnancy,^{13,14} suggesting that these cells are activated and thus require increasing levels of glucose for ATP production,¹⁵ which especially applies to cells depending almost exclusively on glycolysis. In this context, it is intriguing that the fluctuation of monocyte GLUT3 expression levels during pregnancy demonstrated here fits exactly with a marked increase in monocyte numbers until the second trimester, followed by a gradual decrease towards term.¹³

GLUT4 is mainly expressed in insulin-responsive tissues. The hormone was shown to stimulate cellular glucose uptake by inducing the translocation of intracellular vesicles containing the carrier to the cell membrane.¹⁶ The physiological significance of the demonstrated down-regulation of GLUT4 in monocytes may be rather limited, because it was paralleled by a remarkable augmentation of GLUT3 expression in second trimester. As GLUT3 has a much higher glucose affinity than GLUT4, it will easily compensate

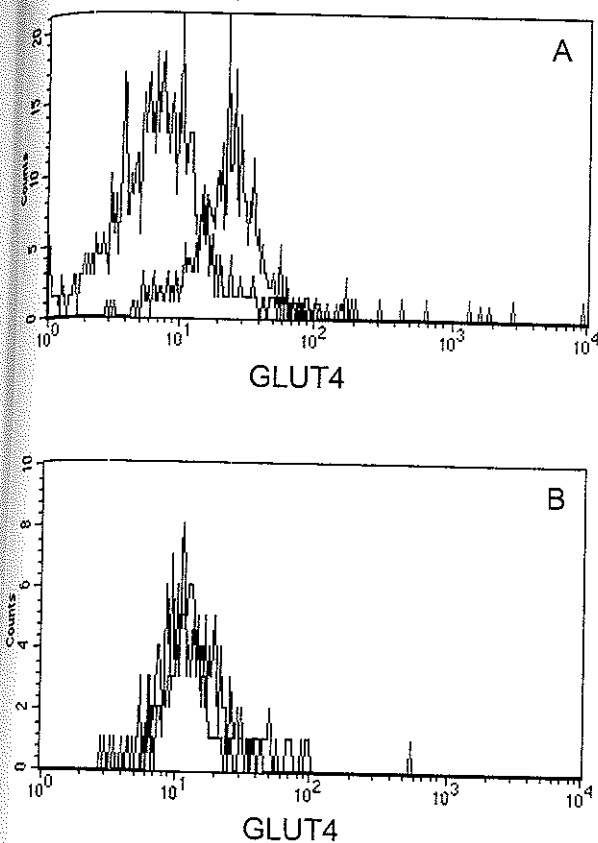


Fig 5 Representative histograms showing the level of GLUT4 in monocytes of a non-pregnant woman (A) and in second trimester (B) as detected by flow cytometry

for the loss of cell surface GLUT4. The observed changes in monocyte GLUT4 labeling correlate neither with monocyte peak insulin receptor binding in second trimester,¹⁷ nor with elevated plasma insulin levels¹⁸ or with progressive insulin resistance¹⁹ found with continuing pregnancy, suggesting that monocyte GLUT4 expression is under the control of hormones or factors different from insulin, if at all regulated by endocrine factors

In conclusion, the data demonstrate the paramount importance of high affinity facilitative glucose transporters as fuel scavengers for peripheral blood granulocytes and monocytes, and suggest a different functional significance of the individual isoforms during pregnancy. The moderate or even lacking augmentation of cell surface glucose transporter levels under conditions of physiological leukocytosis point to the presence of additional mechanisms serving to meet the increased metabolic needs of activated leukocytes, i.e. changes in the intrinsic activity of transporter molecules or utilization of glucose released from intracellular glycogen.

Acknowledgments

Our sincere thanks go to Rudolf Schmied for excellent technical assistance. The study was supported by grant P13721-MED (FWF Vienna)

REFERENCES

- 1 Branch DW: Physiologic adaptations in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:120-122
- 2 Rukavina D, Gill TJ: Immunobiology and immunopathology of early pregnancy. *Early Pregnancy* 1997; 3:141-145
- 3 Jemelin M, Frei J: Leukocyte energy metabolism. 3 Anaerobic and aerobic ATP production and related enzymes. *Enzymol Biol Clin (Basel)* 1970; 11:298-323
- 4 Ren JM, Marshall BA, Gulve EA, Gao J, Johnson DW, Holloszy JO, Mueckler M: Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1993; 268:16113-16115.
- 5 Mueckler M, Holman G: Homeostasis without a GLUT. *Nature* 1995; 377:100-101
- 6 Hunt JS, Hutter H: Current theories on protection of the fetal semiallograft. In *HLA and the Maternal-Fetal Relationship*. JS Hunt (ed) New York: Chapman & Hall, 1996. pp 27-50
- 7 Shibuya T, Izuchi K, Kuroiwa A, Harada H, Kumamoto A, Shirakawa K: Study on nonspecific immunity in pregnant women. II Effect of hormones on chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26:76-81
- 8 Hahn T, Barth S, Weiss U, Mosgoeller W, Desoye G: Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development. *FASEB J* 1998; 12:1221-1231
- 9 Illsley NP: Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 2000; 21:14-22.
- 10 Matsubara K, Ochi H, Kitagawa H, Yamanaka K, Kusanagi Y, Ito M: Concentrations of serum granulocyte-colony-stimulating factor in normal pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1999; 18:95-106
- 11 Pedersen J: *The Pregnant Diabetic and Her Newborn*. Copenhagen: Munksgaard, 1977.
- 12 Hahn T, Barth S, Hofmann W, Reich O, Lang I, Desoye G: Hyperglycemia regulates the glucose transport system of clonal choriocarcinoma cells *in vitro*. A potential molecular mechanism contributing to the adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int J Cancer* 1998; 78:353-360
- 13 Valdimarsson H, Mulholland C, Fridriksdottir V, Coleman DV: A longitudinal study of leucocyte blood counts and lymphocyte responses in pregnancy: a marked early increase of monocyte-lymphocyte ratio. *Clin Exp Immunol* 1983; 53:437-443
- 14 Griffin JF, Beck I: A longitudinal study of leucocyte numbers and mitogenesis during the last ten weeks of human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1983; 5:239-247
- 15 Toh H, Miyata T, Torisu M: Characterization of neutrophil activation by repeated injection of endotoxin in

- rabbits. Role of neutrophils in the generalized Shwartzman reaction *J Leukoc Biol* 1993; 53:256-263
- Rea S, James DE: Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles *Diabetes* 1997; 46:1667-1677
- Andersen O, Kuhl C: Insulin receptor binding to monocytes and erythrocytes during normal human pregnancy *Eur J Clin Invest* 1986; 16:226-232
- 18 Desoye G, Schweditsch MO, Pfeiffer KP, Zechner R, Kostner GM: Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:704-712
- 19 Nelson DM, Ortman-Nabi J, Curran EM: Human placental insulin binding in normal and well-controlled diabetic patients *Gynecol Obstet Invest* 1990; 29:1-5

Sustained Hypoglycemia Affects Glucose Transporter Expression of Human Blood Leukocytes

Submitted 10/28/01; revised 01/17/02
(Communicated by B. Babior, M.D. 02/20/02)

E. T. Korgun,^{1,2} R. Demir,² P. Sedlmayr,¹ G. Desoye,³ G. M. Arikan,³ P. Puerstner,³ M. Haeusler,³ G. Dohr,¹ G. Skofitsch,⁴ and T. Hahn¹

ABSTRACT: The scarce data available on leukocyte glucose transporter expression are contradictory and nothing is known about its regulation by glycemic state. Therefore, cytospin preparations of blood leukocytes were searched immunocytochemically for the high-affinity glucose transporters GLUT1, 3, and 4. Hypoglycemia-associated quantitative changes in transporter expression were assessed by flow cytometry. Granulocytes and monocytes stained for GLUT1, 3, and 4. Granulocyte GLUT4 levels were increased by 73% ($P < 0.05$) under hypoglycemic conditions, which was paralleled by a reduction in GLUT1 and a rise in GLUT3. In monocytes, GLUT3 was elevated by 134% ($P < 0.05$), whereas GLUT1 and GLUT4 remained unaffected upon hypoglycemia. Apart from a minor subpopulation, lymphocytes were negative for these carriers. In conclusion, GLUT1, 3, and 4 are abundantly expressed in granulocytes and monocytes. The differential response of individual isoforms to hypoglycemia may represent a mechanism to protect the cells from the stress of glucose deprivation. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: GLUT; granulocyte; leukocytosis; lymphocyte; monocyte; starvation

INTRODUCTION

Innumerable studies have focused so far on various cellular mechanisms of specific and non-specific immunity, both involving stimulated leukocytes as key mediators. The activation of white blood cells imposes acute energy-metabolic demands on them (1), that are almost exclusively met by glycolysis (2). Glucose, its primary substrate, can either be supplied by uptake from the extracellular space or by catabolism of intracellular glycogen. Also in the latter case, sufficient cellular glucose transfer must have provided substrate for the preceding accumulation of glycogen. There is even evidence showing the rate of glycogen synthesis to be limited by glucose transport efficiency rather than by the activity of the prim-

ing enzyme glycogenin (3) or glycogen synthase (4, 5). The critical importance of adequate glucose supply for nourishing leukocyte functions is further underlined by the observation that decreased cellular immunity in subjects suffering from hyperlipidemia, diabetes mellitus, atherosclerosis, infections or some types of cancer is associated with impaired glucose uptake into immune cells (6).

Glucose is transferred across the plasma membrane of most cells by sodium-independent facilitated diffusion along a concentration gradient involving transport proteins. These glucose transport facilitators are about 500 amino acids in length and belong to a growing superfamily of integral membrane glycoproteins with 12 trans-

Correspondence and reprint requests to: Tom Hahn, Institute of Histology and Embryology, University of Graz, Harrachgasse 21, A-8010 Graz, Austria. Fax: +43 316 380 9625. E-mail: tom.hahn@kfunigraz.ac.at
This work is a part of the Ph.D. Thesis of E. T. Korgun, submitted at the Akdeniz University, Antalya, Turkey.
Institute of Histology and Embryology, University of Graz, A-8010 Graz, Austria
Institute of Histology and Embryology, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey
Department of Obstetrics and Gynecology, University of Graz, A-8036 Graz, Austria
Institute of Zoology, University of Graz, A-8010 Graz, Austria



membrane helices. The membrane-spanning regions presumably form a channel through which glucose can move in one or more association-dissociation steps. The genes of these carriers have been designated GLUT1–GLUT9 in the order in which they were identified. GLUT8 and GLUT9 have both been described very recently (7, 8). Their similarity with the “classical” GLUT isoforms is not higher than that with bacterial inositol, arabinose, or xylose transporters (9). Therefore, they constitute a separate branch within the family of hexose transporters. The clone termed GLUT7 turned out to be an artifact and does not, as suggested previously, encode a liver endoplasmic reticulum transporter. GLUT6 encodes a pseudogene, which is not translated into protein. GLUT5 and GLUT2 turned out to act as fructose transporters, that operate with a significantly lower affinity for hexoses than any of the other carriers and can, therefore, not function efficiently as glucose scavengers. In contrast, the remaining isoforms GLUT1, 3, and 4, represent high affinity transport facilitators. Because of their low Michaelis constant (K_M), these transporters function at rates close to maximal velocity. Thus their level of cell surface expression greatly influences the rate of glucose uptake into the cells.

Although kinetic experiments have indicated leukocytes to possess a facilitative diffusion glucose transport system already three decades ago (10), a detailed study investigating the expression of the respective transporter molecules and its regulation in white blood cells is still pending. The scarce data on leukocyte GLUT expression available to date are exclusively based on blotting experiments using samples in which cross-contamination of the different leukocyte subpopulations was not unequivocally excluded and/or they are derived from cultured white blood cells, although cell culture has been shown to profoundly affect leukocyte gene expression even under control conditions (11, 12). Therefore, in a first step we examined the immunocytochemical distribution of GLUT1, 3, and 4 in human blood granulocytes, monocytes and lymphocytes using a refined avidin-biotin technique. Since challenged white blood cells often have to face a hypoglyce-

mic milieu, e.g., following endotoxicosis, septic shock (13), or once they have left the bloodstream (14), we subsequently investigated the effect of glucose deprivation *in vivo* on leukocyte cell surface glucose transporter levels by flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study was approved by the University of Graz Ethical Committee. Twelve nonpregnant and nonobese (body mass index $<25 \text{ kg m}^{-2}$) women participated in the study after having given informed consent. The subjects underwent an oral glucose tolerance test, showing that none of them had diabetes. In addition, they had no family history of diabetes. None of the women had taken oral contraceptives or any other medication at least 3 months before they were entered into the study. Data from patients with a suboptimal nutritional status as indicated by fasting plasma glucose levels of $39.4 \pm 7.9 \text{ mg/dl}$ (mean \pm SD; $n = 6$) were compared with those of an euglycemic control group ($106.3 \pm 17.5 \text{ mg/dl}$ fasting plasma glucose; mean \pm SD; $n = 6$).

Cytopreparation, Cyto centrifugation, and Immunocytochemistry

Whole blood was diluted 1:1 (v/v) with 3 g/L sodium citrate in phosphate-buffered saline (PBS) and loaded onto a Ficoll–Hypaque density gradient (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). After centrifugation for 30 min at 1000g at room temperature, mononuclear cells were collected and placed into a disposable cytofunnel sample chamber (Shandon, Pittsburgh, PA) containing 100 μl PBS. The cells were spun at 50g, for 5 min at room temperature. The slides were dried for 2 h at room temperature and washed with PBS. After a 20-min exposure to blocking solution, specimen were incubated for 60 min at room temperature in a moist chamber with rabbit antisera against the C-terminal sequences of GLUT1 (CGLFHPLGADSQV), GLUT3 (NSMQPVKEPGNA), and GLUT4 (CTELEYLGPEND) (all from Chemi-

con, Temecula, CA). Antisera were diluted 1:1000 (GLUT1), 1:500 (GLUT3), and 1:100 (GLUT4) with Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, CA). Staining with monoclonal CD45 antibodies (Dako) in 1:200 dilution was used to identify leukocytes in the preparations. Labeling was visualized using the Universal LSAB kit (Dako) according to the instructions of the manufacturer. Specimen were counterstained with Mayer's hemalum (Merck, Darmstadt, Germany) and mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck). For controls, cells were incubated with nonimmune rabbit serum (Dako) instead of the primary antibodies. Pictures were taken with an Axiophot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany)

Flow Cytometry

Two microliters of the above-described polyclonal antisera against the glucose transporters GLUT1, 3, and 4 (Chemicon) was incubated in 1:60 dilution for 20 min at room temperature with 100 μ l each of whole EDTA-anticoagulated venous blood taken in the morning after an overnight fast. Nonimmune rabbit serum (Dako) was used as control. Cells were washed twice in 4 ml PBS containing 0.1% sodium azide (PBS-NaN₃) and subsequently incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin F(ab')₂ (Dako; final dilution 1:20) at 4°C in the dark for 20 min. Cells were then washed twice in 4 ml PBS-NaN₃. After washing, red cells were lysed by addition of Erythrocyte Lysing Reagent for Flow Cytometry (Dako) to each tube. The tubes were immediately vortexed and incubated at room temperature for 10 min in the dark. Again, the cells were washed twice with 4 ml PBS-NaN₃ and centrifuged at 300g for 5 min at 4°C and finally resuspended in 200 μ l PBS. Samples were analyzed using a FACS Calibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser (wavelength 488 nm) using the CellQuest program. Gates were set on granulocytes, monocytes and lymphocytes in the forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) diagram.

Statistics

Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test. A level of $P < 0.05$ was chosen to identify significant differences.

RESULTS

Granulocytes and monocytes immunoreacted with antisera against the glucose transporter isoforms GLUT1, 3, and 4 in cytospin preparations (Fig. 1) and flow cytometry (Fig. 2). In contrast, apart from a minor, not yet precisely defined subpopulation, lymphocytes remained negative for these carriers using immunochemical detection methods (Figs. 1 and 2). In cytospin preparations from euglycemic subjects, granulocytes stained more intensely for the transporter molecules investigated than monocytes. This observation was further confirmed by flow cytometry (see Table 1)

Based on labeling intensity, GLUT3 appeared to represent the predominant isoform expressed on granulocytes and monocytes with GLUT4 reaching similar levels in granulocytes.

None of the immunoreactions described above was observed when the antisera were replaced by normal rabbit serum (for example, see Fig. 1E).

Comparing leukocyte cell surface GLUT expression in eu- and hypoglycemic individuals (Table 1), flow cytometry revealed significant augmentations in GLUT4 content for granulocytes (+73%; $P < 0.05$; Fig. 3) and in GLUT3 levels for monocytes (+134%; $P < 0.05$; Fig. 4) upon hypoglycemia. In granulocytes, the increase in GLUT4 was accompanied by a 20% loss in GLUT1 and a rise in GLUT3 content by one-third. However, both effects did not reach statistical significance. In monocytes, GLUT1 and GLUT4 remained virtually unaffected by reduced plasma glucose.

DISCUSSION

Although it is a common observation that glucose deprivation increases cellular hexose transporter content in various tissues (15, 16), evidence for regulation of the glucose transport

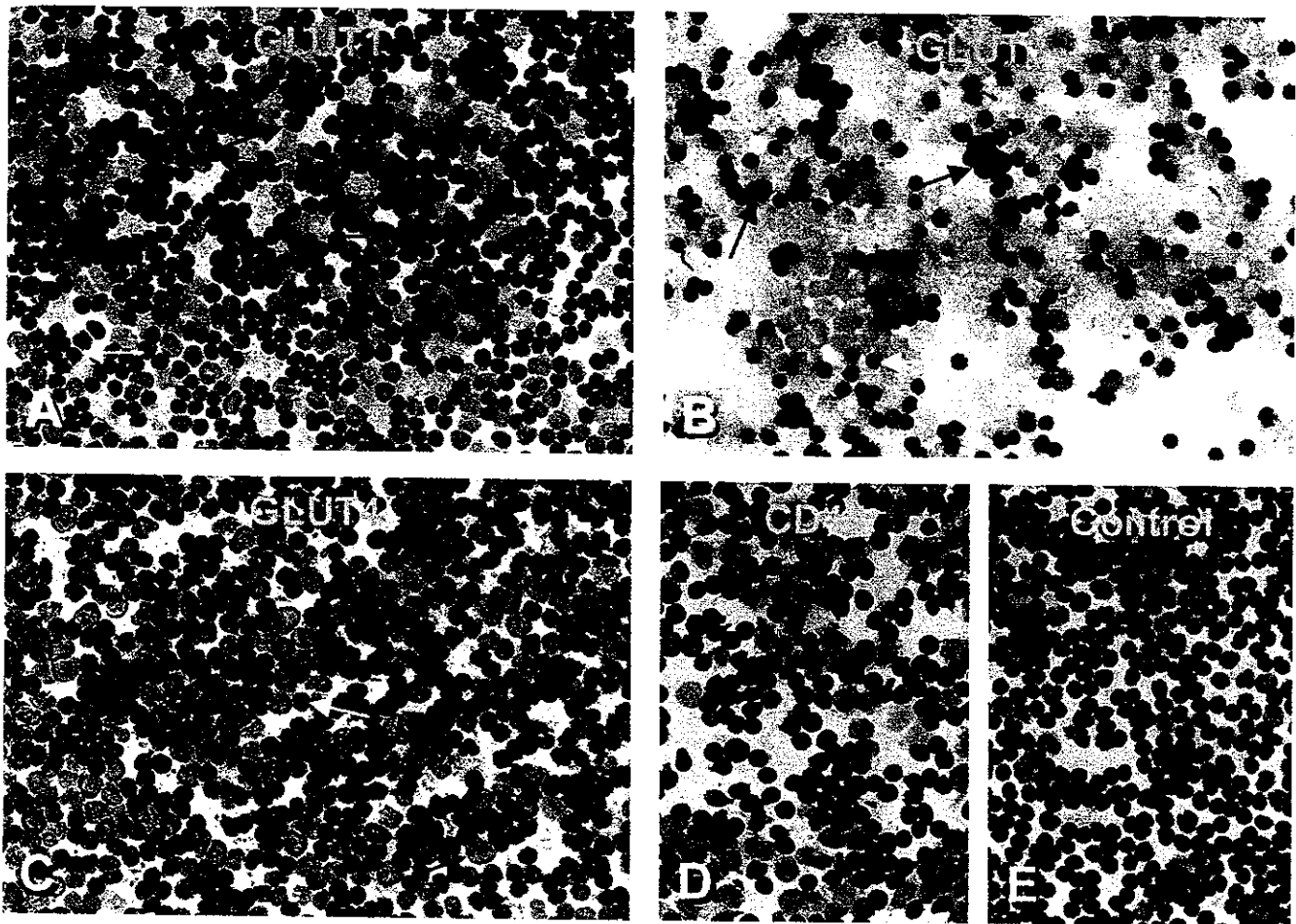


FIG. 1. Immunocytochemical detection of GLUT1 (A), GLUT3 (B), GLUT4 (C), and CD45 (D) in peripheral white blood cells of euglycemic subjects. Control sample, incubated with nonimmune serum instead of the primary antibodies (E). Granulocyte (green arrow), monocyte (red arrow), and lymphocyte (white arrow). Magnification of all pictures, 200X.

system by substrate availability is generally lacking for blood cells. Even in the basal state, data on leukocyte glucose transporter expression are rare

and conflicting so far. The present study is the first comprehensive analysis of specific high affinity facilitative glucose transporter distribution in hu-

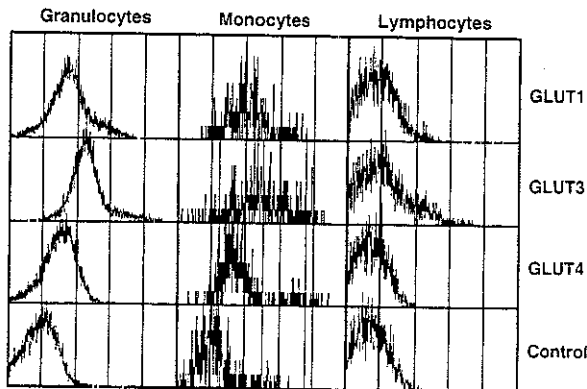


FIG. 2. Fluorescence signals for GLUT 1, 3, and 4 in peripheral white blood cells of euglycemic subjects as detected by flow cytometry.

TABLE 1

Hypoglycemia-Induced Quantitative Changes in GLUT Expression as Assessed by Flow Cytometry

	GLUT1	GLUT3	GLUT4
Granulocyte			
Euglycemia	3.5 ± 2.4	3.9 ± 2.1	3.4 ± 1.1
Hypoglycemia	2.8 ± 0.5	5.2 ± 1.7	5.9 ± 1.6*
Monocyte			
Euglycemia	2.9 ± 1.5	2.3 ± 0.7	1.6 ± 1.0
Hypoglycemia	3.2 ± 1.0	5.4 ± 2.3*	1.7 ± 0.2

Note: Values given as means ± SEM of the ratios of median fluorescence intensity following binding of the specific antiserum divided by median fluorescence intensity of nonimmune serum; a ratio of >2 was considered positive. >1.5 borderline

* P < 0.05 by Mann-Whitney U test vs euglycemic values

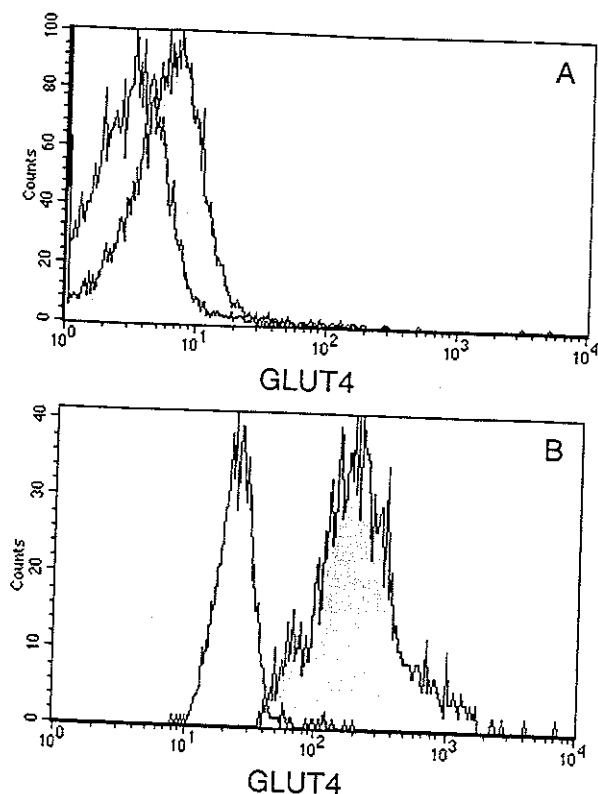


FIG. 3. Representative histograms showing the level of GLUT4 in granulocytes of an euglycemic (A) and a hypoglycemic subject (B) as detected by flow cytometry.

man peripheral white blood cells *in vivo*, and in addition it compares expression levels in euglycemic and glucose deprived subjects. The latter suffered from severe hypoglycemia as indicated by a mean fasting plasma glucose concentration of 39 mg/dl. These depressed values can not simply be ascribed to a physiological postprandial glucose decline following prandial hyperinsulinemia. The insulin peak occurs half an hour after a meal (17) and after a total duration of about 2 h, the postprandial period evolves into the basal state (18). Under these conditions insulin and growth hormone blood levels are at or near their lowest concentration of the 24-h interval (17) and there is only a slow further decline of blood glucose concentration by less than 1% per hour (19). Therefore, fasting blood glucose is a good indicator of general nutritional status. The present results demonstrated glucose deprivation to be accompanied by substantial changes in the membrane expression of particular granulocyte and monocyte glucose carriers.

The GLUT1 transporter isoform may represent up to 3.5% of total cellular membrane proteins (20) and was originally considered to represent the specific uptake machinery for glucose in erythrocytes and in epithelial cells of blood-tissue barriers, such as the placental trophoblast (21, 22). The data provided here for human leukocytes demonstrated GLUT1 to be abundantly expressed in granulocytes and monocytes, the latter being in good agreement with immunoblotting results reported earlier (23). Also the monocyte derived macrophages express GLUT1 (24, 25). Collectively, these results support the concept of a more ubiquitous occurrence of GLUT1, which might play a kind of "housekeeping" role (26), thus covering the basal cellular glucose requirements for ATP production and biosynthesis of sugar-containing macromolecules.

GLUT3 is the transporter isoform characteristic for cells with high glucose requirements such as neurons or tumor cells (27), because its high sub-

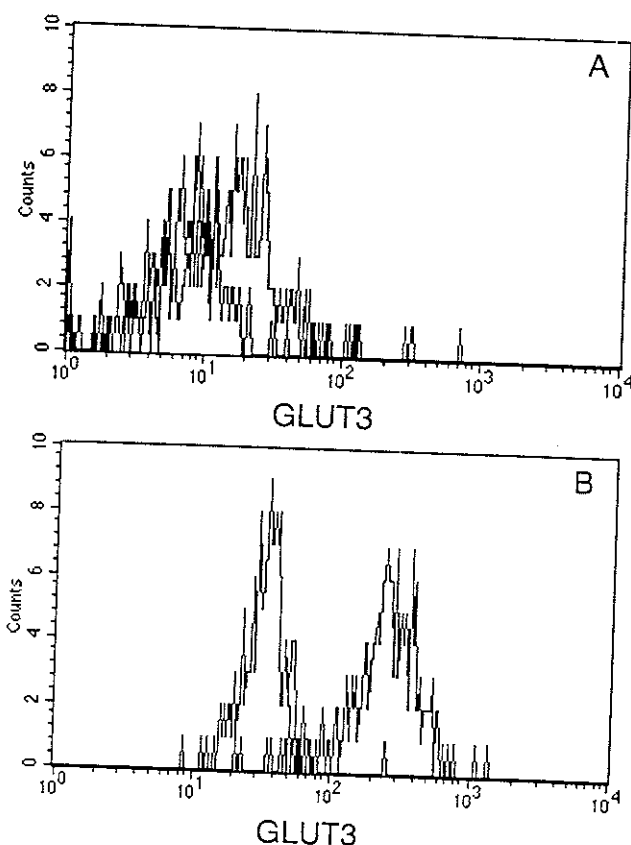


FIG. 4. Representative histograms showing the level of GLUT3 in monocytes of an euglycemic (A) and a hypoglycemic subject (B) as detected by flow cytometry.

strate affinity. In this study, granulocytes and monocytes were found to be richly endowed with GLUT3. Previous information about glucose transporter expression of granulocytes is generally not available, but our monocyte data are in accordance with the presence of GLUT3 transcript and protein as demonstrated earlier by Northern and Western blotting (28) in these cells. From a teleological point of view, a high GLUT3 content might confer a selective advantage on granulocytes and monocytes *in vivo*, since, despite having a high metabolic activity, they cannot count on a constant high glucose supply, particularly after transendothelial diapedesis and infiltration of the cells into abscesses or inflammatory exudates, where the milieu is hypoglycemic as a rule (14). Competing for a limited substrate availability would be more successful, if cells could rely on the high-affinity GLUT3 glucose transport system. The K_M value of GLUT3 is so low that it may become saturated already at subphysiological plasma glucose concentrations. Therefore, GLUT3 mediated changes in transmembrane glucose uptake could only be brought about by translocation of intracellular reserve-carriers, an acceleration of the de-novo transporter synthesis, or a reduced turnover rate of existing carriers in response to hypoglycemia. Based on our experimental data we cannot decide which mechanism has been effective here, but it resulted in a considerable elevation of granulocyte and monocyte cell surface GLUT3 content upon hypoglycemia.

In contrast to a previous study (23), that failed to demonstrate GLUT4 in monocytes by Western blotting, here using sensitive detection methods, GLUT4 was found on both monocytes and granulocytes. Augmented granulocyte GLUT4 levels accompanying hypoglycemia in this study provide the first evidence for any human cell population that in addition to GLUT1 also GLUT4 may be involved in the glucose deprivation response (see 16). The absence of correlation between the granulocyte content of GLUT4 and GLUT1 in the hypoglycemic state no longer appears as an inconsistency, when taking into account that GLUT1 exhibits an asymmetric pattern of transport *in situ*, with a 4-fold higher K_M for efflux compared to influx (29). Due to this extraordinary feature, the impact of the demon-

strated upregulation of GLUT4 on intracellular granulocyte glucose accumulation may even have been potentiated by the decline in GLUT1.

In insulin-sensitive tissues GLUT4 activation and translocation from a cytoplasmic membrane fraction to the cell surface is related to the insulin-induced signaling (30). However, the expression of this isoform is not limited to insulin-sensitive tissues (31). Also granulocytes are generally regarded as non-insulin-responsive and correspondingly, all attempts to detect the insulin receptor on these cells have failed so far. It is therefore tempting to speculate that the increased GLUT4 expression observed upon hypoglycemia is under the control of hormones different from insulin, if at all achieved by endocrine factors, although our experimental data do not provide direct evidence for this. An alternative candidate for mediating the demonstrated effects on granulocyte glucose transporter expression is the sentrin-conjugating enzyme mUbc9 which was recently shown to increase cellular GLUT4 abundance while down-regulating GLUT1 (32), exactly as it was found in the present study.

Interestingly, the great majority of lymphocytes did not react with any of the GLUT antisera employed in this study, in line with previous negative results for GLUT1 (33), GLUT3 (34) and GLUT4 (23, 33). Data demonstrating lymphocyte GLUT3 (28, 33) are exclusively based on blotting experiments, in which the purity of the lymphocyte preparations was not conclusive.

The fact that under hypoglycemic conditions the adaptive response of monocytes and granulocytes involved different GLUT isoforms suggests that distinct mechanisms are operative in these cell populations that affect only individual GLUT isoforms. GLUT4 upregulation with no change in GLUT3 and the other way around as it was observed in granulocytes and monocytes, respectively, is not without precedent (for examples, see 32, 35) and has been attributed to the effect of the above mentioned mUbc9 on GLUT4 in the former case and an increased GLUT3 half-life following prolonged cellular energy demand in the latter. Such specific regulatory machineries may enable the leukocyte subsets to maintain a tight relationship between glucose transport and metabolism

despite individual metabolic differences downstream of glucose uptake, e.g., in the kinetics of hexokinase and/or glucose 6-phosphatase.

In conclusion, the abundance of high affinity facilitative glucose transporters in resting blood granulocytes and monocytes is compatible with a proposed pivotal role of these carriers as fuel scavengers for the various leukocyte functions in innate and adaptive immunity, wound healing, tumor surveillance and tissue remodeling. The changes in glucose transporter expression detected under hypoglycemic conditions may represent an autoregulatory mechanism to ensure adequate cellular glucose supply, thus protecting leukocytes from detrimental effects of low glucose levels.

ACKNOWLEDGMENTS

Our sincere thanks go to Rudolf Schmied for excellent technical assistance. This study was supported by Grant P13721-MED (FWF Vienna)

REFERENCES

1. Toh, H., Miyata, I., and Torisu, M. (1993) Characterization of neutrophil activation by repeated injection of endotoxin in rabbits. Role of neutrophils in the generalized Shwartzman reaction. *J Leukocyte Biol* **53**, 256-263
2. Jemelin, M., and Frei, J. (1970) Leukocyte energy metabolism. 3 Anaerobic and aerobic ATP production and related enzymes. *Enzymol. Biol. Clin. (Basel)* **11**, 298-323
3. Hansen, B. F., Derave, W., Jensen, P., and Richter, E. A. (2000) No limiting role for glycogenin in determining maximal attainable glycogen levels in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E398-E404
4. Ren, J. M., Marshall, B. A., Gulve, E. A., Gao, J., Johnson, D. W., Holloszy, J. O., and Mueckler, M. (1993) Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem* **268**, 16113-16115
5. Mueckler, M., and Holman, G. (1995) Homeostasis without a GLUT. *Nature* **377**, 100-101.
6. Moriguchi, S., Kato, M., Sakai, K., Yamamoto, S., and Shimizu, E. (1998) Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). *Am J Clin Nutr.* **67**, 1124-1129
7. Carayannopoulos, M. O., Chi, M. M., Cui, Y., Pingerhaus, J. M., McKnight, R. A., Mueckler, M., Devaskar, S. U., and Moley, K. H. (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7313-7318
8. Phay, J. E., Hussain, H., and Moley, J. F. (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* **66**, 217-220.
9. Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., and Joost, H. G. (2000) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* **275**, 16275-16280.
10. Peters, J. H., and Hausen, P. (1971) Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 2 Stimulation of "facilitated diffusion" of 3-O-methylglucose. *Eur J Biochem* **19**, 509-513
11. Lijnen, P., Saavedra, A., and Petrov, V. (1997) *In vitro* proliferative response of human peripheral blood mononuclear cells to concanavalin A. *Clin. Chim. Acta* **264**, 91-101.
12. Blaehr, H., and Ladefoged, J. (1988) Mitogen-induced lymphocyte transformation in four different serum-free media. *J. Immunol. Methods* **111**, 125-129
13. Hinshaw, L. B., Beller, B. K., Archer, L. T., and Benjamin, B. (1976) Hypoglycemic response of blood to live *Escherichia coli* organisms and endotoxin. *J Surg Res* **21**, 141-150
14. Hunt, T. K. (1980) Wound Healing and Wound Infection, Appleton-Crofts, New York.
15. Kahn, B. B., and Flier, J. S. (1990) Regulation of glucose-transporter gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Diabetes Care* **13**, 548-564.
16. Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A., and Ortiz, P. A. (1994) Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies *in vivo* and in cell cultures. *FASEB J.* **8**, 43-53.
17. Zierler, K. (1999) Whole body glucose metabolism. *Am. J. Physiol* **276**, E409-E426
18. Rabinowitz, D., and Zierler, K. L. (1963) A metabolic regulating device based on the actions of the human growth hormone and of insulin, singly and together, on the human forearm. *Nature* **199**, 913-915
19. Hother-Nielsen, O., and Beck-Nielsen, H. (1990) On the determination of basal glucose production rate in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus using primed-continuous 3-3H-glucose infusion. *Diabetologia* **33**, 603-610.
20. Zoccoli, M. A., Baldwin, S. A., and Lienhard, G. E. (1978) The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J. Biol. Chem* **253**, 6923-6230
21. Hahn, T., Barth, S., Weiss, U., Mosgoeller, W., and

- Desoye, G (1998) Sustained hyperglycemia *in vitro* downregulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast. A mechanism to protect fetal development? *FASEB J* **12**, 1221-1231
- 22 Hahn, I., Hahn, D., Blaschitz, A., Korgun, E. I., Desoye, G., and Dohr, G (2000) Hyperglycaemia-induced subcellular redistribution of GLUT1 glucose transporters in cultured human term placental trophoblast cells. *Diabetologia* **43**, 173-180
- 23 Daneman, D., Zinman, B., Elliott, M. E., Bilan, P. J., and Klip, A. (1992) Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* **41**, 227-234
- 24 Gamelli, R. L., Liu, H., He, L. K., and Hofmann, C. A. (1996) Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. *J. Leukocyte Biol.* **59**, 639-647
- 25 Everett, K. D., Barghouthi, S., and Speert, D. P. (1996) *In vitro* culture of murine peritoneal and alveolar macrophages modulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* and glucose transport. *J. Leukocyte Biol.* **59**, 539-544
- 26 Mueckler, M. (1990) Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes* **39**, 6-11.
- 27 Hahn, I., Barth, S., Hofmann, W., Reich, O., Lang, I., and Desoye, G. (1998) Hyperglycemia regulates the glucose transport system of clonal choriocarcinoma cells *in vitro*. A potential molecular mechanism contributing to the adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int. J. Cancer* **78**, 353-360
- 28 Estrada, D. E., Elliott, E., Zinman, B., Poon, I., Liu, Z., Klip, A., and Daneman, D. (1994) Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: Studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals. *Metabolism* **43**, 591-598.
- 29 Burant, C. F., Sivitz, W. I., Fukumoto, H., Kayano, I., Nagamatsu, S., Seino, S., Pessin, J. E., and Bell, G. I. (1991) Mammalian glucose transporters: Structure and molecular regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* **47**, 349-387
- 30 St-Denis, J. F., and Cushman, S. W. (1998) Role of SNARE's in the GLUT4 translocation response to insulin in adipose cells. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **9**, 153-165
- 31 Xing, A. Y., Challier, J. C., Lepercq, J., Cauzac, M., Charron, M. J., Girard, J., Hauguel-de, and Mouzon, S. (1998) Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 4097-4101.
- 32 Giorgino, F., de-Robertis, O., Laviola, L., Montrone, C., Perrini, S., McCowen, K. C., and Smith, R. J. (2000) The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1125-1130.
- 33 Chakrabarti, R., Jung, C. Y., Lee, I. P., Liu, H., and Mookerjee, B. K. (1994) Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J. Immunol.* **152**, 2660-2668
- 34 Younes, M., Lechago, L. V., Somoano, J. R., Mosharaf, M., and Lechago, J. (1997) Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res.* **17**, 2747-2750
- 35 Khayat, Z. A., McCall, A. L., and Klip, A. (1998) Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased protein half-life. *Biochem. J.* **333**, 713-718.