

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RAT İMPLANTASYON MODELİNDE HİYALURONİK ASİT
RESEPTÖRLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE ELEKTRON
MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Banu BOZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Manisa – 2010

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Yüksek lisansım boyunca yardımını esirgemeyen ve bu tezin ortaya çıkmasının en büyük pay sahibi değerli hocam Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN'e,

Tez hocamın olmadığı durumlarda her daim yanına koştuğum ve hiç usanmadan benimle ilgilenen anabilim dalı başkanımız sayın Prof Dr. Sevinç İNAN'a, her zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sayın Doç Dr. Seda VATANSEVER'e, bölümdeki her türlü sıkıntımı paylaşan, çözümler üreten ve bilgisayardaki tüm işlemlerimde yardımını esirgemeyen sayın Doç. Dr. İbrahim TUĞLU'ya,

Yüksek lisans eğitimine birlikte başladığımız ve asistanlık süreci boyunca yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli asistan arkadaşım Kenan ÖZÇELİK'e ve yine birlikte çalıştığım diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezimin deney hayvanları çalışmasını yürütmeme olanak sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'na,

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda elektron mikroskopik takibi ve görüntülenmesinde her türlü imkanı bana sağlayan başta Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Alper BAĞRIYANIK, Doç. Dr. Kazım TUĞYAN ve Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜL olmak üzere tüm anabilim dalı hocalarıma, yardımlarını esirgemeyen Sedef MENKÜ, Özcan BÜYÜKÜSTÜN ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji'deki asistan arkadaşlarıma,

Tezimde istatistik hesaplamalarımı yapmama yardımcı olan Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Erhan ESER ve Uzm. Dr. Beyhan CENGİZ ÖZYURT'a,

Sıkıntılı anlarımda yardıma koşan ve manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım ve sevgili meslektaşım sayın Ali Güher ENİSELER'e,

Maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim annem, babam ve kardeşime, en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Hyaluronik asit (HA)'in implantasyon, fertilizasyon, embriyonik kavite, embriyo büyümesi ve doku morfogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. HA'nın IVF uygulamalarında embriyo implantasyon oranını arttırdığı ileri sürülmektedir. HA reseptörleri (CD44, CD44s, RHAMM, Versikan) ve Hyaluronan sentetaz (HAS2) HA fonksiyonlarına aracılık etmektedir, ancak HA reseptörlerinin implantasyondaki rolleri tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, HA reseptörlerinin implantasyondaki rollerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

36 adet erişkin dişi sıçan kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere iki eşit sayıya ayrıldı. Sıçanların vaginal smear ile menstrasyon dönemleri tespit edildi. Kontrol grubunu proöstroz, östroz ve diöstroz dönemlerine ait uterus örnekleri oluşturdu. Deney grubu östroz döneminde çiftleşmeye bırakıldı, gebeliğin 4., 5. ve 6. günü Chicago Blue Dye verilerek implantasyon bölgeleri tespit edildi ve uterus örnekleri alındı. Kontrol ve deney grubuna ait doku örnekleri CD44, CD44s, RHAMM, versikan ve HAS2 poliklonal antikolarıyla immunohistokimyasal teknik kullanılarak boyandı. İmmunoreaktivite yoğunluğuna göre zayıf, orta ve kuvvetli olarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar Mann Whitney istatistik testiyle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu dönemlerdeki uterus epitel ve pinopodlar ince yapı düzeyinde, transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede, HAS2 immunoreaktivitesi, proöstroz döneminde epitelde ve subepitelde östroz ve diöstroza göre artış olduğu, deney grubunda ise desidua 5. ve 6. günlerde artış olduğu gözlemlendi. CD44 immunoreaktivitesi, proöstroz ve östroz dönemlerinde epitelde diöstroz dönemine göre artış olduğu, deney grubunda ise 5. günde artış olduğu gözlemlendi. CD44s immunoreaktivitesi, derin stromada diöstroz döneminde proöstroz ve östroza göre artmış olduğu, deney grubunda ise desidua 5. ve 6. günlerde artış olduğu gözlemlendi. RHAMM immunoreaktivitesi, proöstroz döneminde epitel, subepitel, ve derin stromada östroz ve diöstroz dönemlerine göre artış olduğu deney grubunda ise desidua 5. ve 6. günlerde artış olduğu gözlemlendi. Versikan immunoreaktivitesi, diöstrozda subepitel ve derin stromada proöstroz ve östroza göre artmış olduğu, deney grubunda ise desidua 6. günde artış olduğu gözlemlendi.

İnce kesitlerin değerlendirilmesinde, kontrol grubundan proöstroz ve östrozda epitel kalınlığının aynı olduğu, mikrovillusların varlığı gözlemlendi. Diöstroz grubunda ise mikrovillus

sayısının ve epitel kalınlığının belirgin oranda azaldığı ve hücreler arası mesafenin arttığı gözlemlendi. Deney grubunda gebeliğin 5. gününde bleb oluşumu gözlemlendi.

Deney grubunda ait doku örneklerinde 5. ve 6 gün HAS2, CD44s, RHAMM; 5 gün, CD44 ve 6. günde Versikan immunoreaktivitesinde istatistiksel anlamlı artmış olması; 5 günde elektron mikroskopik olarak epitelde pinopodların gözlenmesi ve silyaların azalmış olması, HA'nın implantasyon döneminde önemli rol oynadığının göstergeleri olarak değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: İmplantasyon, Hyaluronik asit reseptörleri, Embriyo, İmmunohistokimya, elektron mikroskop, sıçan uterusu.

SUMMARY

Hyaluronic acid (HA) was known to play a role in fertilization, implantation, embryonic cavitation, embryo growing and tissue morphogenesis. HA suggests increasing embryo implantation rate in IVF applications. HA receptors (CD44, CD44s, RHAMM and versican) [1,2, 3] and HA synthase 2 (HAS2) are mediated HA functions, but the roles of HA aren't known exactly on implantation. In this study, we aim to evaluate the role of HA on the implantation process.

Thirty-six adult female rats were divided in six groups: as control (prooestrous, estrous and diestrous) and experimental groups (after fertilization 4.day, 5. day, 6. day). Menstruation periods were detected with vaginal smear both control group (proestrous, estrous and diestrous) and experimental group. Experimental group animals were mated in the estrous period. Implantation regions of experimental group were determined with Chicago blue dye and uterine samples were obtained. Tissue samples of both groups were stained with CD44, CD44s, RHAMM, versican and HAS2 polyclonal antibodies using immunohistochemical technique. Immunoreactivity was evaluated as weak, moderate or strong and results were evaluated comparatively using Mann Whitney statistical test. In this stages, ultrastructure of pinopodes and uterine epithelial evaluate using transmission electron microscope.

In evaluation as immunohistochemical, strong HAS2 immunoreactivity of epithelial and subepithelial was observed in proestrous and diestrous on 5th, 6th days but moderate in estrous cycle. Strong CD44 immunoreactivity of endometrial epithelial cells was seen in proestrous and estrous cycle but moderate in diestrous cycle and on 5th day. Strong CD44s immunoreactivity of deep stroma was seen in diestrous and diestrous on 5th, 6th days but moderate in proestrous and estrous cycle. Strong RHAMM immunoreactivity of epithelial, subepithelial and deep stroma was seen in proestrous and diestrous on 5th, 6th days but moderate in estrous cycle. Strong Versican immunoreactivity of subepithelial and deep stroma was seen in diestrous and diestrous on 6th day but moderate in proestrous and estrous cycle.

In evaluation of thin sections, in proestrous and estrous was increased microvilli and epithelial thickness is same but decreased in the diestrous. In experimental group was observed bleb on 5th day.

In tissue samples of experimental group, increase as statistical of HAS2, CD44s, RHAMM immunoreactivity in 5th and 6th days; CD44 immunoreactivity in 5th day and Versican immunoreactivity in 6th day, pinopodes in electron microscopy was observed in 5th day and decreased of cilia, It was concluded that te HA play a important role during implantation.

Key Words: Implantation, Hyaluronic acid receptors, Embryo, immunohistochemistry, Electron microscopy, Rat uterin.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	IV
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
RESİMLER DİZİNİ	X
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Uterus	2
2.2.Menstrual Siklus	3
2.3.İmplantasyon	4
2.4.Apozisyon	5
2.4.1.Endometriyumdan Salınan Sinyaller	5
2.4.1.1.EGF Ailesi	5
2.4.1.2.TGF- β	6
2.4.1.3.IGF.....	7
2.4.1.4.Sitokinler	7
2.4.1.5.MUC1	9
2.4.2.Embriyodan Salınan Sinyaller	10
2.4.2.1.EPF	10
2.4.2.2.PIF	10
2.4.2.3.PAF	10
2.4.2.4.Büyüme Faktörleri	11
2.4.2.5.Prostoglandinler	11
2.4.2.6.IFNy ve hCG	12
2.5.Adezyon	12
2.5.1.Kaderinler	15
2.5.2.Selektinler	15
2.5.3.Ig Süperailisi	16

2.5.4.İntegrinler	16
2.5.5. Ekstraselüler Matriks Proteinleri	17
2.5.6.HA	18
2.5.6.1.Hyaluronanın İmplantasyondaki Rolü	21
2.5.6.2.HAS Ailesi ve Sentezi	26
2.5.6.3.HYAL	29
2.5.6.4.HA Reseptörleri	31
2.5.6.5. CD44	32
2.5.6.6.RHAMM	41
2.5.6.7.Versikan	45
2.6.İnvazyon	52
2.6.1.MMP	52
2.6.2.Plazminojen Aktivatörleri	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
4. BULGULAR	62
4.1.Histokimyasal Bulgular	62
4.2.İmmunohistokimyasal Bulgular	64
4.3.Elektron mikroskopik Bulgular	68
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ	86
7. RESİMLER	89
8. KAYNAKLAR	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IVF-ET	: İnvitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi
HA	: Hiyaluronik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
HB-EGF	: Heparin Bağlayıcı-Epidermal Büyüme Faktörü
TGF- α	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
IGF	: İnsulin-Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
CSF-1	: Koloni Stimüle Edici Faktör-1
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
MUC-1	: Musin-1
EPF	: Erken Hamilelik Faktörü
PIF	: Preimplantasyon Faktörü
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
GDF	: Büyüme Farklılaşma Faktörü
PG	: Prostaglandin
IFNγ	: İnterferon Gama
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
IG	: İmmunglobulin
NCAM	: Neural Cell Adhesion Molecules
ICAM1 ve ICAM2	: Intercelular Adhesion Molecule 1 ve 2
TRC	: T-Cell Receptor
LFA-3	: Lysophosphatidic Acid
VCAM1	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
PECAM-1	: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
RPTs	: Receptor Protein Tyrosine Phosphatases
GAG	: Glikozaminoglikan

HMWHA	: Yüksek Moleküler Ağırlıklı HA
LMWHA	: Düşük Molekül Ağırlıklı HA
3LL	: Lewis Akciğer Karsinoma
MIP	: Makrofaj İnflamatuvar Protein
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
NF	: Nüklear Faktör
MAP	: Mitojen Aktif Protein
TIMP-3	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3
HAS	: Hyaluronan Sentetaz
SPAM1	: Sperm Adezyon Molekülü 1
HYAL	: Hyaluronidaz
GPI	: Glikozilfosfotidil-Inositol
HBP	: Hepatosit Bağlayıcı Protein
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
SF/HGF	: Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor
BMP-7	: Kemik Morfogenetik Faktör
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
PI3K	: Fosfotidilinositolkinaz
RHAMM	: Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility
LYVE	: Lenfatik Vasküler Endotelyal Hyaluronan reseptör
CS	: Kondroitin Sülfat
DS	: Dermatan Sülfat
FOXO	: Forkhead Box Transcription Factor Class
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
TIMP-3	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1: Proöstroz, östroz siklusu döneminde uterus kesitlerinin H-E ile boyanmış preparatlar.	88
Resim 2: Gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. günlerinde H.E. ile boyanmış preparatlar.	89
Resim 3: HAS2 antikoruyla boyanmış proöstroz, östroz ve diöstroz dönemindeki uterus kesitlerinin panoromik görüntüsü.	90
Resim 4: HAS2 antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. gününün panoromik görüntüsü.	91
Resim 5: CD44 antikoruyla boyanmış proöstroz, östroz ve diöstroz dönemindeki uterus kesitlerinin panoromik görüntüsü.	92
Resim 6: CD44 antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. gününün panoromik görüntüsü.	93
Resim 7: CD44s antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda proöstroz, östroz ve diöstroz döneminin panoromik görüntüsü.	94
Resim 8: : CD44s antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. gününün panoromik görüntüsü.	95
Resim 9: RHAMM antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda (a) proöstroz (c) östroz ve (e) diöstroz döneminin panoromik görüntüsü.	96
Resim 10: RHAMM antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. gününün panoromik görüntüsü.	97
Resim 11: Versikan antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda proöstroz, östroz ve diöstroz döneminin panoromik görüntüsü.	98
Resim 12: Versikan antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. gününün panoromik görüntüsü.	99
Resim 13: : Proöstroz, östroz ve diöstroz grubu sıçan uterus örneklerinin ince kesitlerinin geçirimli elektron mikroskopik değerlendirilmesi.	100
Resim 14: Gebeliğin 4. günü, 5. günü ve 6. günü sıçan uterus örneklerinin, ince kesitlerinin geçirimli elektron mikroskopik değerlendirilmesi.	101

ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.5.1: Blastokist reseptiv endometriyuma yaklaşırken integrin ve pinopodların şematik gösterimi.	13
Şekil 2.5.2: İnsan, sıçan ve farede endometriyum lümen epitelinde pinopodların gösterimi.	14
Şekil 2.5.3: İntegrinler, büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar ve proteazları içeren trofoblast ve endometriyal hücreler arasındaki etkileşim, implante olmuş blastokistin şematik gösterimi.	17
Şekil 2.5.6.1: HA'in yapısı.	18
Şekil 2.5.6.2: HAS izoformlarının yapısı.	27
Tablo 2.5.6.1: HAS1, HAS2 ve HAS3'ün üzerinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkileri.	28
Tablo 2.5.6.2: HA'in hücre içi ve hücre dışı reseptörleri.	31
Şekil 2.5.6.3: CD44'ün yapısı.	32
Şekil 2.5.6.4: Kök bölgesindeki varyant ekzonlar tarafından kodlanan sekansların gösterildiği CD44s'in protein yapısıyla daha büyük varyant izoformu CD44v1-10'nun karşılaştırılması.	34
Şekil 2.5.6.5: CD44'ün platform fonksiyonu.	35
Şekil 2.5.6.6: CD44'ün Co-reseptör fonksiyonu.	36
Şekil 2.5.6.7: Versikan izoformunun yapısı.	50
Şekil 2.5.6.8: Versikanın diğer moleküllerle etkileşimi.	51
Tablo 4.2.1: Uterusun luminal epitelinde HA reseptörlerinin immunoreaktivite değerleri.	69
Tablo 4.2.2: Uterusun Subepitelyal bölgesinde HA reseptörlerinin immunoreaktivite değerleri.	70
Tablo 4.2.3: Uterusun Deep Stromasında HA reseptörlerinin immunoreaktivite değerleri.	71
Tablo 4.2.4: Uterusun Mature-Desidual bölgesinde HA reseptörlerinin	72

immunoreaktivite değerleri.

Tablo 4.2.5: Uterusun Pre-desidual bölgesinde HA reseptörlerinin immunoreaktivite değerleri. 73

Tablo 4.2.6: Uterusun Non-Desidual bölgesinde HA reseptörlerinin immunoreaktivite değerleri. 74

1. GİRİŞ

İmplantasyon, gebeliğin gerçekleşmesinde şüphesiz en önemli aşamadır. Başarılı bir implantasyon ve hamileliğin gerçekleşmesinde rol oynayan çok sayıda faktör bilinmektedir ancak implantasyonun mekanizmaları ve bu süreci kontrol eden moleküller tam olarak bilinmemektedir (1, 2).

İmplantasyonun gerçekleşmesini sağlayan faktörlerden bir veya birkaçının eksikliği implantasyonun gerçekleşmemesine dolayısıyla infertiliteye sebep olmaktadır. İmplantasyon mekanizmalarının tanımlanması ile infertil vakaların tedavilerinde son yıllarda büyük ilerlemeler olmuştur. Bu tedaviler özellikle embriyonun laboratuvar koşullarında elde edildiği invitro fertilizasyon uygulamalarından sonra implantasyon oranının arttırılmasını amacı ile daha da önem kazanmaktadır.

İnvitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi (IVF-ET) uygulamalarında son yıllarda kullanılan içerisinde Hiyaluronik Asit (HA) bulunan ve "Embriyo-Glue" adı verilen maddenin kullanılması ile implantasyon oranının arttığına ilişkin yayınlar bulunmaktadır (3-5). Bu çalışmalarda HA'in implantasyonun adezyon aşamasında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ancak HA'in implantasyondaki etkileri üzerinde tam bir fikir birliği bulunmamaktadır, HA'in implantasyon oranı üzerine etkisinin olmadığını bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (6).

Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan implantasyon modelinde HA reseptörlerinin histokimyasal, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece HA reseptörlerinin ve dolayısıyla HA'nin implantasyondaki rollerinin açıklanması, infertil vakaların IVF-ET uygulamalarında başarının sağlanmasına katkıda bulunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

İnsanda uterus pelvikste yerleşmiş idrar kesesi ile rektum arasında bulunan armut şeklinde lümeni olan bir organdır. Uterus lümeni düz olup, uterus tüplerine ve vajinaya açılır. Uterus tüplerinde gerçekleşen fertilizasyondan sonra blastokistin implantasyonunu sağlar. Uterus implantasyondan sonra doğuma kadar geçen sürede fetusun gelişimini, beslenmesini ve korunmasını sağlar. Uterus, korpus yada gövde ve serviks olmak üzere iki anatomik segmentten oluşmuştur; Uterus histolojik olarak 3 tabakaya ayrılır.

1. Endometriyum
2. Miyometriyum
3. Perimetriyum

Endometriyum, uterusun en iç tabakası olup implantasyona hazırlık amacı ile her ay siklik değişiklikler gösterir. İnsanda siklik değişiklikleri 28 günde tamamlanırken siklusun ortalarında (14. gün) blastokistin implantasyonu gerçekleşir. İmplantasyonun gerçekleşmesinde endometriyumdan ve embriyodan salınan çok sayıda mediyatör ile endometriyumda ortaya çıkan yapısal değişiklikler implantasyona hazırlıkta önemli rol oynar.

Miyometriyum, uterus duvarının en kalın tabakasıdır ve iç, orta, dış olmak üzere 3 kas tabakasından oluşmaktadır. İç ve dış tabakada uzunlamasına yada oblik seyirli kas lifleri bulunur. Vasküler tabaka (orta tabaka) kalındır ve sirküler seyirli kas lifleri ile çok miktarda kan damarı içerir. Normalde myometiumu oluşturan düz kas hücreleri 50 mm. uzunluğunda iken, gebelikte düz kas hücreleri hipertrofiye uğrar ve 500 mm. uzunluğa erişebilir. Gebelik sırasında fibriller ve bağ dokusu miktarı artar. Gebelik sonrası uterus genellikle orijinal ölçülerine döner.

Perimetriyum, bağ dokusu tarafından desteklenen tek sıralı mezotelyal hücrelerden oluşmaktadır. Bağ dokusu hücreleri ve kan damarından zengindir (7-9).

2.2 Menstrual siklus

Endometriyumda ve myometriyumda gözlenen siklik değişimlerinden östrojen ve progesteron hormonları sorumludur. Epitel hücrelerinin ve epitel hücrelerle ilişkili bağ dokusunun proliferasyonu ve farklılaşması bu hormonlara bağlıdır.

Menstrual siklus 4 evreden oluşmaktadır,

1. Menstrual evresi (1-5 günler arası),
2. Proliferatif evre (foliküler evre; 5-14 günler arası),
3. Sekretuar evre (progestasyonel evre; 14-27 günler arası),
4. İskemi evresi (27-28 günler arası).

1. *Menstrual Evre:* Siklusun 1-5 günleri arasındaki dönem olup, endometriyumun fonksiyonalis tabakası iskemi olur ve bu tabaka nekroze sonucu yıkılır ve atılır. Endometriyumun bazal tabakasında ise beslenme bozulmadığı için dökülme olmaz ve bu bölgeden endometriyumun yenilenmesi gerçekleşir (9).

2. *Proliferatif Evre:* Bu evre sırasında, bazal bölgedeki hücrelerde hızla proliferasyon gözlenir. Menstruel siklus sırasında dökülen epitel ve altındaki bağ dokusu hızlı yenilenir. Proliferasyonla birlikte bu dönemde ortaya çıkan yeni dokuların ihtiyaçlarını sağlamak için anjiyogenezis de aktiftir. Bu dönemde apoptotik faktörler baskılanmıştır. Siklusun bu fazı sırasında endometriyal dokunun yeterli şekilde gelişimi, sekretuar faz endometriyumunu sırasında implantasyon için dokunun maturasyonunun senkronizasyonu açısından önemlidir. Bu fazda östrojen artmıştır. Östrojen hücrelerin proliferasyonunu uyarır ve dökülen endometriyumun fonksiyonalis tabası yenilenir. (9)

3. *Sekretuar Evre:* Bu dönemde bezler gelişir, endometriyum implantasyona hazırlanır. Progesteron menstrual siklusun 2. yarısının önemli hormonudur. Ayrıca progesteron proliferasyonu da baskılar ve hücre farklılaşmasını uyarır. Progesteron Tip A (PR A) ve PR B reseptörleri aracılığıyla fonksiyon göstermektedir. Ayrıca PR A, PR B'nin baskılayıcı olarak da işlev görmektedir. PR B glandular epitel hücrelerde azalırken, stromadaki miktarında önemli değişiklik olmaz. Bundan dolayı implantasyon döneminde progesteronun etkisi stromal kompartımanda PR B aracılığı ile olmaktadır (10). Östrojenin etkisiyle gelişmiş olan

bezler, progesteronun etkisiyle glikoproteinleri salgılar. Bu glikoproteinler implantasyondan önce embriyonun en büyük beslenme kaynağı olacaktır.

Bezler fazlasıyla kıvrıntılı, spiral bir hale gelir ve epitel hücreleri nükleuslarının altında glikojen depolamaya başlar. Daha sonra, glikojen miktarında düşme olur. Glikoprotein salgı ürünleri, bezlerin lümenini genişletir. Bu fazda endometriyum, salgı ürünlerinin birikmesi ve stromadaki ödemin bir sonucu olarak maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır. Mitozlara sekretuar faz sırasında nadir olarak rastlanır. Spiral arterlerin uzaması ve kıvrılması devam eder ve endometriyumun yüzeyel kısmı içine uzanır. Progesteron miyometriyumun düz kas hücrelerinde kontraksiyonu inhibe eder, aksi takdirde embriyonun implantasyonu tehlikeye girebilir (9).

4. *İskemi Evresi:* Sekresyon evresi sonunda progesteron düşer. Endometriyumda spiral arterlerde kontraksiyon oluşur, bezler salgılayamaz endometriyum büzülür ve iskemi gerçekleşir (11)

2.3. İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonun özelleşmiş hücreleri olan trofoektoderm ile anne uterusunun özelleşmiş dokularıyla teması ile başlayan koordineli bir olaydır (1). Blastokist implantasyonunu destekleyen endometriyal farklılaşma, progesteron ve östrojen tarafından sağlanır. Endometriyumda çeşitli yapısal, hücresel ve moleküler olaylar implantasyon penceresi adı verilen bölgede ortaya çıkar ve böylece endometriyumun kabulünü sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkabilmektedir (2). İmplantasyon aşamaları Apozisyon, adezyon ve invazyon olmak üzere 3 dönem halinde incelenmektedir (12).

2.4. Apozisyon

Apozisyon durumu, endometriyumun lümen epiteli ile trofoektoderm'in yaklaşmasıyla başlar. Menstrual siklusun 14. gününden sonra blastokist implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçer ve implantasyonun gerçekleşeceği bölgeye doğru yakınlığa başlar. Blastokist ile endometriyal lümen epiteli yakın temasını devam ettirmektedir. Yakınlaşan blastokist oval şeklini almaya başlar ve daha sonra trofoektoderm endometriyal luminal epitelyuma tutunmaya geçer. Böylece adezyon süreci başlamış olur (13).

Apozisyon döneminde endometriyumdan ve embriyodan çok sayıda mediyatör salınır. Bu mediyatörlerin başlıcaları endometriyumdan salınan ve embriyodan salınanlar olmak üzere iki bölümde incelenmektedir.

2.4.1. Endometriyumdan Salınan Sinyaller

2.4.1.1. Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF)

ailesi

EGF ailesi üyeleri, ekstraselüler alanda olgun şekillerinin salınımıyla proteolitik yarıklanmaya uğrayan transmembran proteinleridir. EGF üyeleri tirozin-kinaz reseptörleri ailesi aracılığıyla sinyallenmektedir ve bu reseptör ErbB ailesi olarak bilinen 4 farklı reseptör içerir. Bunlar; EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 ve HER4/ErbB-4 'dür (14).

EGF ailesi, peptid yapısında büyüme faktörlerinden oluşmaktadır ve bunlar EGF ailesi reseptörleri için ligandlar olarak işlev görmektedir. Bunlar; EGF, TGF- α , HB-EGF, Amphiregulin (AR), Betaselülin (BTC), Epiregulin (EPR), Epigen ve 4 neuregulin'dir (15). Fare uterusunda çoğu EGF ailesi üyeleri implantasyon zamanında ekspres edilmektedir (14).

EGF

Uterusdaki EGF ekspresyonunda, türler arasında önemli farklılık bulunmamaktadır. EGF'in insanlarda normal menstrual siklusta bulunmadığı halde, gebelikte desiduada ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (14, 16).

Heparin Bağlayıcı-Epidermal Büyüme Faktörü (Heparin Binding-EGF, HB-EGF)

İmplantasyon yeterliliği gösteren blastokisten ve erken implantasyon fazında lümen epitelinden HB-EGF eksprese edilmektedir. HB-EGF implantasyon sırasında embriyo-uterus arasında 2 yönlü olarak sinyal bağı oluşturarak işlev göstermektedir (17).

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

TGF- α 'nın ekspresyonu, implantasyon periyodu boyunca memeli türlerine göre değişiklik göstermektedir. TGF- α pre-implantasyon periyodu sırasında fare uterusunda implantasyondan önce reseptiv uterusun luminal epitelinde toplanmaktadır. İnsanda ise EGF ve TGF- α desidualizasyon boyunca hücresel ve stromal proliferasyonu attırır. TGF- α implantasyonda, parakrin ve junkstakrin bir rol oynamaktadır (18).

2.4.1.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β)

TGF- β , büyüme faktörleri ailesinin üyesidir ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozisi ve doku şekillenmesi ile ilişkilidir (19). TGF- β süperailisi üyeleri endometriyumda fazla miktarda eksprese edilmektedir. Hamileliğin oluşumu, desidualizasyon, proliferasyon ve menstruasyonu içeren hücresel olayların düzenlenmesinde rolü vardır. (20).

2.4.1.3. İnsulin-Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor, IGF)

IGF sistemi IGF-I ve IGF-II, hücre membran reseptörleri ve 6 çeşit IGF bağlayıcı proteinden oluşmaktadır. İnsulin-like growth faktör bağlayıcı protein (IGFBP) reseptörleri ile IGF'in faaliyetini düzenlemektedir. IGF sistemi, endometriyal proliferasyon, farklılaşma ve embriyo-endometriyum etkileşiminde önemli rol oynamaktadır (21).

Relaksin, IGF ailesinin homolog bir üyesidir ve insan endometriyal hücreler tarafından IGFBP 'nin üretimini stimule etmektedir (22).

2.4.1.4. Sitokinler

Sitokinler, birçok fonksiyona sahip glikoprotein mediyatörleridir ve sitokinler biyolojik aksiyonlara spesifik reseptörleri ile lokal olarak aracılık etmektedir. Sitokinler implantasyon, immun fonksiyon dahil vücutta birçok fonksiyon görmektedir (23).

İnterlökin-1 (IL-1)

IL-1, trofoblastik hücreler ve desidual stromal hücreler tarafından üretilmektedir (24). IL-1 sistemi 2 agonist; interlökin-1 α (IL-1 α) ve interlökin-1 β (IL-1 β), bir antogonist; interlökin-1 reseptör antogonist (IL-1ra) ve 2 membran bağlayıcı reseptörleri interlökin 1 reseptör tip 1 ve 2 (IL-1R tI ve IL-1R tII) 'den oluşmaktadır. IL-1 sistemi ilk olarak implantasyonda ve preimplantasyon embriyo gelişiminde ortaya çıkmaktadır (25). IL-1 endometriyumda eksprese edilen blastokistin ilk sinyallerinden biridir. İn vitro olarak IL-1, prostoglandin E₂, LIF ve integrin β_3 subunit ekspresyonunun endometriyal olarak sekresyonunu arttırmaktadır (24).

İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, bir pleyiotropik sitokindir ve birçok hücrede biyolojik fonksiyonlar göstermektedir. IL-6 ve onun reseptörü (IL-6R), sinyal iletici membran proteini gp-130 ile ilişkilidir. IL-6 ekspresyonu sekretuar faz sırasında insan endometriyumunda yüksek seviyede eksprese edilmektedir. IL-6'nın güçlü

immunreaktivitesi implantasyon penceresinin oluşumu sırasında olmaktadır. IL-6 reseptörü endometriyum, trofoblast ve blastokist tarafından eksprese edilmektedir. IL-6 reseptörü ve gp130, stromaya kıyasla luminal ve glandular epitelde daha fazla lokalize olmuştur (12).

Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor, LIF)

LIF, IL-6 ailesinin bir üyesidir. LIF, yüksek glikozillenme özelliği olan 40-50 kDa moleküler ağırlığında olan glikoproteindir ve birçok biyolojik fonksiyona sahiptir. Özellikle uterus'ta yüksek seviyede eksprese olmakla birlikte çeşitli yetişkin ve embriyonik dokularda da ekspresyonu olmaktadır. LIF sinyallenmesinin tetiklenmesiyle hücre yüzeyinde LIF reseptör- β (LIF-R β), glikoprotein gp-130'u bağlamaktadır (26).

LIF, endometriyal epitelde eksprese edilmektedir ve desidual hücreler tarafından üretilmektedir. İnsanlarda LIF mRNA'sı ve proteini, implantasyonda menstrual siklusun luteal fazı sırasında endometriyal bezlerde eksprese edilmektedir (27).

Koloni Stimüle Edici Faktör-1 (Colony stimulating factor-1, CSF-1)

CSF-1, disülfid bağlarıyla bağlı glikozillenmiş bir homodimerdir. CSF-1 çeşitli hücre tiplerinde hücre farklılaşması, yaşamı ve proliferasyonunu düzenlemektedir. CSF-1 luminal ve glandular epitelde, hamilelik boyunca artış göstermektedir. CSF-1 menstrual siklus sırasında insan endometriyumunda proliferatif faza kıyasla sekretuar fazda daha yüksek seviyede eksprese edilmektedir (14).

Tümör Nekroz Faktörü- α (Tumour necrosis factor- α , TNF- α)

TNF- α , çok yönlü sitokinlerden biri olarak bilinmektedir ve çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. Üreme organlarında, preimplantasyon embriyolarında ve endometriyumda bulunmuştur. Endometriyumda fibroblastlar, immunkompetent hücreler, glandular epitelyal hücreler ve vasküler hücreler olmak üzere çeşitli hücre tipleri bulunmaktadır. Bu hücreler TNF- α eksprese etmektedir.

TNF- α , endometriyumun siklik değişikliklerinde önemli rol oynamaktadır. Proliferasyon, transformasyon ve endometriyal döküntü, östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilmektedir ve TNF- α ekspresyonunun regülasyonu bu hormonları takiben olmaktadır (28).

2.4.1.5. Musin-1 (MUC-1)

MUC1, bir transmembran glikoproteinidir ve epitelin apikal yüzeyinden eksprese edilmektedir. Transmembran MUC1'in embriyo implantasyonunda temel rol oynadığı düşünülmektedir. Rat, fare ve domuz gibi bazı memelilerde yapılan çalışmalar blastokist implantasyonu süresince uterus epitelinin apikal yüzeyi boyunca MUC1 ekspresyonunda bir azalma olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda MUC1 glikoproteini endometriyumda hem proliferatif fazda hem de sekretuar fazda eksprese edilir ve MUC1 embriyonunun tutunduğı yerde ve altındaki epitel hücrelerinde bulunmaz, fakat ekspresyonu komşu hücrelerde devam eder. Epitelde MUC1'in azalması musin molekülünün antiadhezif etkisinin azalmasından dolayı uterus epiteli ile blastokistin başarılı bir şekilde tutunmasını sağladığı düşünülmektedir.

MUC1 ekspresyonu hamileliğin bütün evrelerinde insan plasental sinsityotroblast hücrelerinde ve hamileliğin 1. ve 2. trimester'de desidial hücrelerde bulunmuştur. Yine fare plasentasında MUC1 proteini, maternal kan sinusları etrafında trofoblastın apikal yüzeyinde aşırı şekilde lokalize olduğu ve sekretuar epitelde luminal lokalizasyonuna benzer şekilde lokalize olduğu gösterilmiştir (29).

2.4.2. Embriyodan Salınan Sinyaller

2.4.2.1. Erken Hamilelik Faktörü (Early Pregnancy Factor, EPF)

EPF, chaperonin 10 (cpn 10)'nun yapısal ve fonksiyonel homologudur ve büyüme düzenleyici ve immun düzenleyici özelliği olan bir heat shock (hsp) protein molekülüdür. EPF, embriyonik yaşamın sadece bir belirteci değildir aynı zamanda embriyonik yaşamın devamı ve büyümesi için gereklidir. Embriyonun erken gelişiminde yarıklanma evreleri sırasında rol oynadığı gösterilmiştir. Gelişimin çok erken evrelerinde etkisi indirektir. İki hücreli embriyolarda anti-EPF antikolların ortama katılmasıyla gelişimin blastokist evresinin devam ettiği gösterilmiştir (30).

2.4.2.2. Preimplantasyon Faktörü (Preimplantation Factor, PIF)

PIF'ün, preimplantasyon evresindeki embriyolarda üretildiği gösterilmiştir ve uterin kavitede canlı bir embriyonun bulunmasıyla birlikte maternal serumda belirli bir miktarda olduğu bulunmuştur. 2 günlük gebe olan farenin maternal serumunda ve insan IVF siklusunun 2 günlük post-embriyo transferinde bulunmaktadır (31).

2.4.2.3. Trombosit Aktive Edici Faktör (Platelet Activating Factor, PAF)

PAF, ilk olarak antijenik stimülasyonun bir sonucu olarak bazofillerden salındığı bulunmuştur. Fare'de fertilizasyondan kısa bir süre sonra varolan geçici trombositopeni'den sorumludur.

PAF'ın çoğu hücre tipinde sentezi ve salınımı yapılmaktadır. PAF, preimplantasyon embriyosu tarafından salgılanan ilk mediyatördür ve embriyo metabolizması, hücre siklus ilerlemesi ve embriyo canlılığını stimule etmektedir (32).

2.4.2.4. Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri overde somatik hücreler tarafından, embriyonun değişik bölünme aşamalarında embriyo tarafından ve dişi üreme kanallarına ait hücreler tarafından sentezlenebilmektedirler.

Büyüme faktörleri, genellikle 6-30 kDa büyüklüğünde geniş bir düzenleyici molekül grubudur. Bunlar özgün hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak intraselüler sinyal yollarını tetikler. Otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalarla etki gösterirler. Bu mekanizmaların harekete geçmesi çoğunlukla hücre bölünmesiyle sonuçlanır.

Fare preimplantasyon embriyolarında yapılan bir çalışmada; maternal orijinli EGF'nin blastosistin tüm hücrelerinde, embriyonik EGF'nin ise sadece iç hücre kitlesi (inner cell mass- ICM) ve trofoektoderm hücrelerde olduğu saptanmıştır.

IGF sistemi, doğal foliküler gelişimin sağlanması, integrasyonu ve dominant folikülün seleksiyonunda etkilidir. bFGF ile birlikte, büyüme farklılaşma faktörü (GDF), insan oositlerinin maturasyonu ve embriyonik gelişimden sorumludur.

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan büyüme faktörlerinden biri de GDF-9'dur. GDF-9, TGF- β ailesinin bir üyesidir ve gerek farelerle gerekse insanlarla yapılan çalışmalarda, ovaryen folikulogenez için ihtiyaç duyulan önemli faktörlerdendir.

VEGF'in, follikül fonksiyonuyla ilgili olarak, sıvı (folikül sıvısı) biyokimyasında değişikliklere yol açtığı hem hücresel hem de kromozomal tabakalarda insan oositinin gelişim potansiyelini etkilediği bilinmektedir (33).

2.4.2.5. Prostoglandin (PG)

PG'ler, memeli hücrelerinde serbest araşidonik asit'den yaygın olarak üretilmektedir. Araşidonik asit membran fosfolipitlerinde bulunmaktadır. Fosfolipazların aksiyonu ile PG'ler salgılanmaktadır. Araşidonik asit PG-endoperoksid sentetaz (PTGSs)'lar tarafından PGH₂'ye dönüştürülmektedir. Memelilerde PTGS'nin 2 türevi vardır. Genelde PTGS1, yapısal olarak üretilmekte, PTGS2 ise uyarıcı olarak izole edilmektedir. PGH₂ ise spesifik sentetazlar tarafından biyolojik olarak aktif PSG'lere dönüştürülmektedir.

PG konsantrasyonları, implantasyonun başlangıcıyla ilgili olarak endometriyal vasküler permeabilitenin artış gösterdiği alanlarda artmıştır. Sıçan'larda PG E,F,I'nın konsantrasyonları implantasyon'da artmaktadır (22).

2.4.2.6. İnterferon Gama ve İnsan Koryonik Gonadotropin (İnterferon Gama ve Human Chorionic Gonadotropin, IFN γ ve hCG)

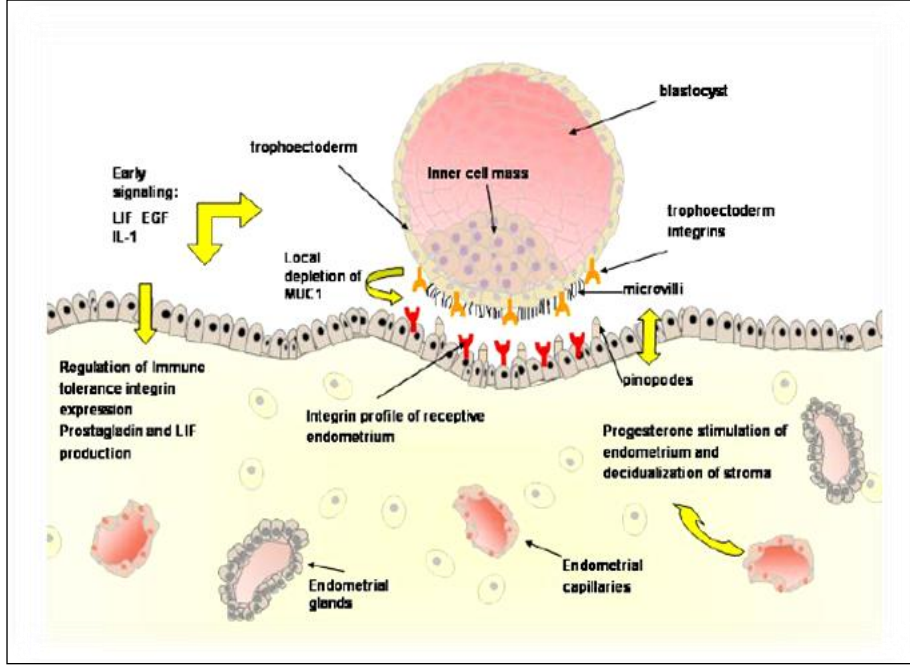
IFN γ , normal insan uterin endometriyumunda immun yanıtın oluşması, büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde rol oynamaktadır. T hücreleri ve makrofajlar uterus'ta IFN γ üretiminden sorumludur (35).

hCG, sınıtyotroblastlar tarafından sentezlenen glikoprotein yapısındaki hormondur. Stromal hücrelerde hCG, progesteron ve östrojen varlığında desidualizasyonunu devam ettirmektedir. Buda bir tür farklılaşma belirteci olan prolaktinin artış gösteren transkripsiyonu ile olmaktadır. hCG, glikodelin üretimini uyarmaktadır. Glikodelin'de temel endometriyal sekretuar proteindir. Glikodelin epitel hücre farklılaşması ve immun sistemin baskılanmasıyla ilişkilidir (36).

2.5. Adezyon

Ovulasyondan 7-8 gün sonra zonasından ayrılmış blastokistin endometriyal epitel yüzeyine bağlanmasıyla adezyon süresi başlamış olur. Adezyon süreci hamileliğin başlaması ve devamı için önemli bir süreçtir. İmplantasyon'da endometriyumun hazırlanması ovaryan steroidler aracılığıyla olmaktadır. Sekretuar faz sırasında endometriyumda belirleyici hormon progesteron iken, proliferatif fazın dominant hormonu östrojen'dir. Buna karşılık uterin duyarlılık; preresseptif, reseptif ve non-reseptif olmak üzere üç fazda programlanır. Blastokist endometriyumun morfolojik ve moleküler değişimleriyle karakterize olan reseptif fazda implantasyon olur. Östrojen ve progesteronun fizyolojik birçok rolünün taslağının çıkarılmasına rağmen bu moleküler ağ büyük oranda bilinmemektedir. Bu moleküller; sitokinler, MMP, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks komponentleri ve homeobox genleridir (37).

İmplantasyon endometriyumun invazyonu ve reseptivitesine bağlıdır. Endometriyum reseptivitesi üzerine yapılan çalışmalarda pinopod yapısının reseptivite açısından önemli olduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.5.1) (38).



Şekil 2.5.1: Blastokist reseptiv endometriyuma yaklaşırken integrin ve pinopodların şematik gösterimi (25).

Pinopodların morfolojisi

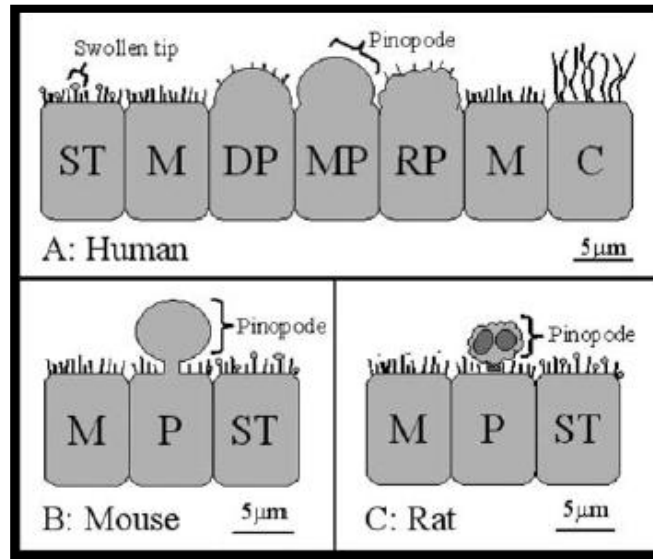
Pinopodlar hem kemirgenlerde hemde insanlarda endometriyum reseptivitesi sırasında lümen epitelinin apikal yüzeyinden oluşmaktadır. Pinopod'lar hücre yüzeyinde çıkıntılar yapar yada genişler ve yüzeyin büyük bölümünü kaplar (39).

İnsanlar ve kemirgenler arasında pinopod açısından boyut ve içerik açısından önemli morfolojik farklılıklar bulunmaktadır. Sıçan'da pinopodlar bir-iki büyük vakuol içermektedir (40), organelleri yoktur (41) ve hücrenin apikal yüzeyinde pedikül veya aktinden zengin sap genişler. İnsanlarda ise, pinopodlar hücrenin apeksi yada tüm yüzeyinden genişler, çeşitli organeller (mitokondri, golgi kompleksi, salgı vezikülü, granüllü endoplazmik retikulum ve çekirdek) içermektedir ve büyük

vakuollerden yoksundur (42). Fare pinopodlarında vakuollerin varlığı hakkında bilgi yoktur.

Sıçanla kıyaslandığında farede pinopod şekillerinde morfolojik farklılıklar bulunmaktadır. Farede endometriyum reseptivitesi sırasında balon şeklinde pinopodlar yada düz mantar şeklindeki (43), sıçanda kısmen buruşuk ve daha uzunlamasına şekillidir (44). İnsanda; gelişmekte olan, gelişmiş ve yaklaşık 24 saat boyunca her fazda gerileyen olmak üzere pinopod gelişiminin 3 farklı aşaması tespit edilmiştir (Şekil 2.5.2). Pinopodların boyutları ortalama olarak, sıçanda $\sim 3.0 \mu\text{m}$ ile $4.0 \mu\text{m}$ (44), farede $\sim 6.0 \mu\text{m}$ (43) ve insanda $6.0 \mu\text{m}$ (45) çapındadır.

Pinopodların oluşumu hem kemirgenlerde, hemde insan endometriyumunda progesteron varlığında gelişmektedir, östrojen varlığında ise hızlıca yok olduğu ileri sürülmektedir (46).



Şekil 2.5.2: İnsan, sıçan ve farede endometriyum lümen epiteli. (A) İnsan: gelişen pinopod (DP), olgunlaşan pinopod (MP), gerileyen pinopod (RP), silyalı hücre (C), mikrovilluslu hücre (M), ucu kabarık mikrovilluslu hücre (ST). (B) Fare: apikal yüzeyde saptan uzanan pinopod (P). (C) Sıçan: pinopod buruşuk ve küçük ve daha uzunlamasına şekilli (46).

Hücre adezyon molekül ailesi:

- Kaderinler
- Selektinler
- Ig süperaillesi
- İntegrinler 'dir (Şekil 2.5.3) (47).

2.5.1. Kaderinler

Kaderinler hücre adezyonu, hücre polaritesi, hücre kutuplaşması ve hücre sinyallenmesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan Ca^{2+} -bağımlı transmembran glikoproteinleridir. E-kaderin, P-kaderin, R-kaderin, B-kaderin ve N-kaderin olmak üzere farklı tipleri bulunmaktadır.

Epitelyal (E) kaderin, memeli gelişimi sırasında ekspre edilen ilk kaderin'dir. E –kaderin'nin sentezi 2 hücreli evrenin sonuna doğru ortaya çıkmaktadır ve normal olarak aktive olmaktadır. Sonraki aşamalar sırasında (yarıklanmaya kadar) E-kaderin blastomerlerin serbest yüzeylerinde dağılmış olarak bulunmaktadır fakat hücre-hücre temasının olduğu bölgelerde yoğunlaşmıştır (48).

İnsan embriyo implantasyonunda E-kaderinin rolü bilinmemektedir fakat ekspresyonuna bağlı olarak bu süreç için önemi araştırılmaktadır. E-kaderinin mRNA seviyelerinin luteal faz sırasında daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Fakat bunların menstrual siklus sırasında immunohistokimyasal çalışmalarla protein seviyeleri bulunamamıştır (12).

2.5.2. Selektinler

Selektinler CAM ailesine ait glikoproteinlerdir. 3 tipi mevcuttur; P-selektin, L-selektin ve E-selektin. Selektinler hematopoietik hücrelerde eksprese edilirken, L-selektin insan blastokistlerinde bulunmaktadır. Ayrıca L-selektin'nin ligand oligosakkaritleri; immunohistokimyasal çalışmalarda insan uterusunda luminal ve glandular epitelde yaygın bir şekilde bulunduğu gösterilmiştir. Bu ligandların ekspresyonu reseptif embriyo implantasyonu sırasında insan endometriyumunda up-regüle olmaktadır. L-selektin ligandı MECA-79, implantasyonda adezyonun

başlamasını sağlayan endometriyal epitel üzerindeki oligosakkarit ligandları ve blastokistteki L-selektin arasındaki etkileşimi sağlamaktadır (27).

2.5.3. İmmunglobulin (IG) Süperailisi

Ig-CAM süperailisi üyeleri; NCAM (Neural Cell Adhesion Molecules), CD2,CD4,CD8, ICAM1 ve ICAM2 (Intercelular Adhesion Molecule 1 ve 2), TRC (T-Cell Receptor), LFA-3 (lysophosphatidic acid), VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule-1), PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1), Receptor Protein Tyrosine Phosphatases (RPTs) ve diğerleri (49).

ICAM; ICAM-1 damar endotel hücreleri ve lökositler tarafından eksprese edilen Ig süperailisinin bir üyesidir (50).

ICAM-1'in, insan embriyolarında bulunduğu ve MUC-1'e yapıştığı bilinmektedir. İnsan MUC-1'i, karbohidrat epitoplari vasıtasıyla bir adezyon molekülüne dönüşme özelliğine sahiptir. Bunlar TE şeker bağıli molekülle ile etkileşerek embriyoları bağlayabilir ve onları apikal LE'deki CAM'lar ile temas ettirebilir. Aynı zamanda blastokistlerin, diğer CAM'lar ile etkileşmelerine de engel olabilir. MUC-1'in hücre yüzeyinden kalkması ile adezyon artmaktadır (2).

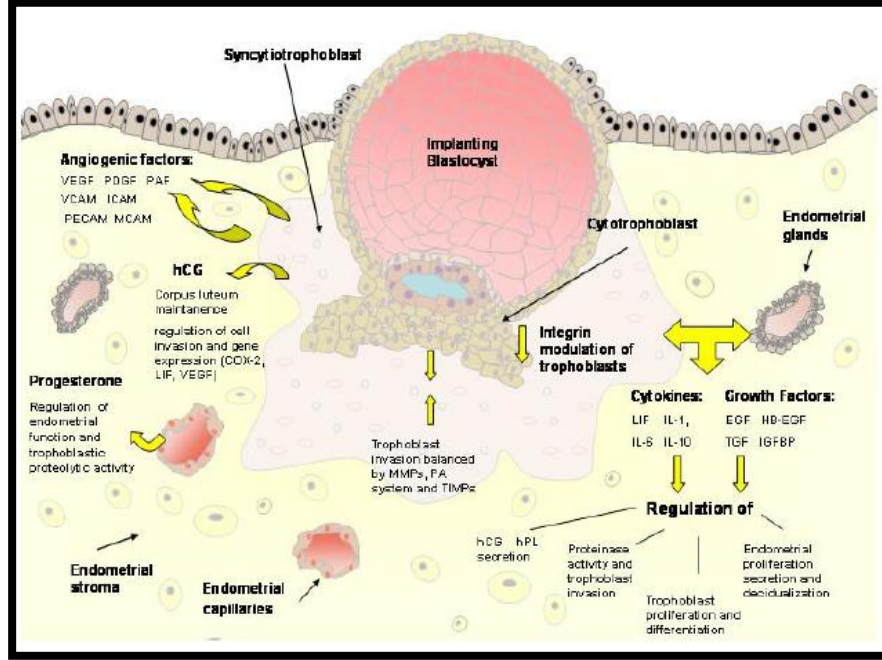
N-CAM; Bu adezyon molekülü de sinir sisteminde sentezlenir ve nöronal gelişim, rejenerasyon ve öğrenmede etkili olduğu ileri sürülmektedir.

VCAM; Damar endotel duvarında lökositlerin göçü ve adezyonunu sağlamaktadır. ICAM-1 ve VCAM-1'in her ikisi de immun yanıt ve iltihap durumlarında hayati rol oynarlar (50).

2.5.4. İntegrinler

İntegrinler transmembran glikoproteini olup, embriyonik gelişimin hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini içeren önemli fizyolojik olayların çoğuna katılır. $\alpha 5\beta 3$ integrin ve onun ligandı osteopontin, trofoblastla ilk etkileşimde endometriyum lümen epitel yüzeyinde immunohistokimya ile pozitif tespit edilmiştir.

İntegrinler en iyi çalışılan adezyon moleküllerindedir. İntegrin $\beta 3$ ekspresyonu; bir IVF programının başarısını tahmin etmek için faydalı olabilir. İntegrin $\beta 3$ ekspresyonunun artması, endometriyal reseptivite için bir işarettir (51).



Şekil 2.5.3: İntegrinler, büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar ve proteazları içeren trofoblast ve endometriyal hücreler arasındaki etkileşim, implante olmuş blastokistin şematik gösterimi (25).

2.5.5. Ekstraselüler Matris Proteinleri

Glikozaminoglikanlar (GAG)

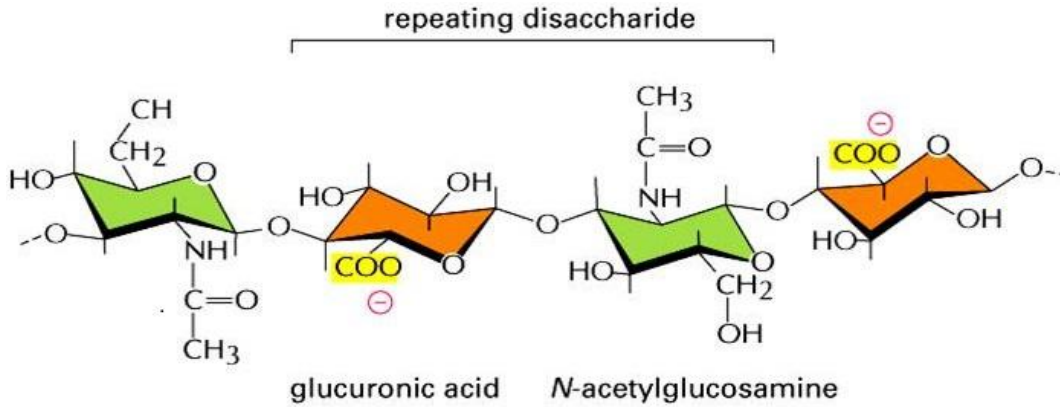
Yaygın şekilde dokularda bulunan yapısal olarak farklı proteinlerdir. Çekirdek bir protein ve buna bir veya daha fazla kovalent olarak bağlanmış sülfatlı bir disakkarit olan ve Glikozaminoglikan (GAG) denen karbohidrat zincirinden oluşmuştur. GAG'lar Hyaluronik asit, Kondroitin sülfat, Heparan sülfat, Dermatan sülfat ve Keratin sülfat olmak üzere gruplara ayrılmıştır (52).

2.5.6. Hiyaluronik asitin (HA) yapısı

GAG'ın bir üyesi olan HA, asit mukopolisakkaritler olarak bilinmektedir (53). HA, tekrarlayan N-asetil-glukozamin ve glukronik asit disakkarit ünitelerinden oluşmaktadır (54) (Şekil 2.5.6.1).

Genel olarak GAG'lar sülfat grubu içermektedir ve polisakkarit zincirleri çok kısadır. Endoplazmik retikulum ve golgide sentez edilen proteoglikanlar, burada şekillenerek diğer sakkarit türevleriyle beraber peptid çekirdeklerinden korunmaktadırlar. Sülfatlanmış GAG'ların farklı türevleri ortak bir peptid çekirdeğine bağlanmaktadır ve peptidde çeşitli varyasyonlar göstermektedir. Böylece proteoglikan yapısında diğer sakkaritler büyük çeşitlilik sağlamaktadır. Çoğu proteoglikanlar, hücreler veya uygun matriks yapılarıyla ilişkili olarak çok güçlüdür ve immobildir.

HA diğer GAG'dan farklı olup, primer yapısı peptid içermez. Golgiden daha çok plazma membranından sentezlenmektedir. Diğer GAG'lara benzer şekilde tek bir polisakkarit zincirinden oluşmasına rağmen, moleküler ağırlığı milyonlara ulaşmaktadır. Örn; normal sinovyal sıvıda ağırlığı 7×10^6 ' dır. HA'nın biyolojik rolünü anlamamızda yapısal olarak tanımlanan ilk şekli yetersiz olmasına rağmen hücre yüzeylerindeki ve diğer matriks proteinlerinde bulunan spesifik HA bağlayıcı bölgelerin miktarı bize biyolojik rolünü anlamada yol göstermektedir (53).



Şekil 2.5.6.1: HA'in yapısı. Tekrarlayan N-asetil-glukozamin ve glukronik asit disakkarit ünitelerinin şekilde gösterimi (54).

HA ve HA oligomerlerinin biyolojik aktiviteleri

HA'nın birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar; embriyolojik gelişim, immun denetim, hücrelerin migrasyonu, adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması, inflamasyon, yara iyileşmesi, angiogenez, malignant transformasyon ekstrasellüler matriksin'in vizkoelastikitesi ve su dengesi ile multi-ilaç rezistansıdır.

HA tarafından yapılan biyolojik fonksiyonlar molekül ağırlığına ve zincir uzunluğuna bağlıdır (55). HA'nın yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı formları hücre davranışında ve hareketinde zıt etkiler göstermektedir. Ekstrasellüler yüksek moleküler ağırlıklı HA (HMWHA) endotel hücre büyümesini inhibe eder ve bundan dolayı anti-anjiyogeniktir. HMWHA polimerleri fibrinojen bağlama kapasitesini arttırabilir. Bu durum pıhtı formasyonunda ortaya çıkan ilk reaksiyonlardan birisidir ve erken yara iyileşmesinde önemlidir. HMWHA polimerleri anti-inflamatör ve immunsupresiftir (56, 57). Fötal sirkulasyon ve amniyotik sıvı HMWHA'nın yüksek konsantrasyonunu içermektedir. Gelişen fetusta immunbaskılayıcıdır. HMWHA fetal yara iyileşmesinde skar oluşumunu inhibe etmektedir. Oysaki HA degradasyon ürünleri skar formasyonuna katılmaktadır (55). Ayrıca, HMWHA'nın üretimi inflamasyon bölgesinde artmaktadır ve genellikle lökosit adezyonu ve migrasyonu ile ilişkilidir (56, 57). Periferik kan monositleri; HMWHA zincirleriyle monositlerin bağlanması aracılığıyla aktive olmaktadır, ama bu etkileşim proinflamatuvar mediatörlerden daha çok büyüme faktörleri ve matriks komponentlerinin ekspresyonunu uyarmaktadır. Bu çapraz bağlı HMWHA'nın anti inflamatör rolü veya zıt inflamatör rolü olduğunu göstermektedir.

Düşük moleküler ağırlıklı HA (LMWHA) fragmentleri hücre hareketindeki belli değişiklikleri ve sinyal kaskadlarını tetikleyen farklı reseptörlerle etkileşmektedir. LMWHA anjiyogeniktir (55, 58). Ayrıca LMWHA tip1 ve 8 kollajen sentezini arttırmaktadır.

Düşük ve orta moleküler ağırlıklı HA oligosakkaritleri (2×10^4 – 4.5×10^5) inflamatör sitokin ve adezyon moleküllerinin güçlü stimulatörleridir. HA oligomerleri primer embriyonik fibroblastlarda Lewis Akciğer Karsinoma (3LL) hücrelerinde MMP-9 ve MMP-13'ün gen ekspresyonu ve hücre migrasyonunu arttırmaktadır (59).

HA fragmentleri, Makrofaj İnflamatuvar Protein (MIP)-1 α , (MIP)-1 β , crg-2, RANTES ve Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1) gibi kemokin genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. Bu fonksiyonlar inflamatuvar yanıtın başlaması ve devam etmesinde önemlidir. Ayrıca HAS2, aggrekan, MMP3, MMP13 ve iNOS ekspresyonu bovin kondrositlerinde ve insan artikular kondrositlerinde HA oligosakkaritleri tarafından stimule edilmektedir (60).

Daha kısa HA fragmentlerinin kondrositlerin, endotelial hücrelerin ve fibroblastların hücre proliferasyonunu düzenlediği rapor edilmiştir. Lacob ve Knudson (60) HA fragmentlerinin artikular kondrositler tarafından nitrik oksit sentezi ve nitrik oksit üretimini aktive ettiğini göstermişlerdir. HA fragmentlerinin stimulatör etkileri, nüklear faktör (NF)- $\kappa\beta$ aktivasyonu aracılığıyla gösterilmiştir. IL-10 ve interferon- γ fare kemik iliği kökenli makrofajlarda LMWHA uyarımlı sitokin üretimini inhibe ettiği bulunmuştur (61).

Küçük HA oligomerleri (6-20 kDA) immun sistemin antijen sunucu hücreleri olan dendritik hücrelerin güçlü aktivatörleridir. Böylece HA fragmentleri anjiyogenik, immun stimulatör ve inflamatuvar olma eğilimindedir (62). Anjiyogenik HA fragmentleri, fokal adezyon kinaz ve mitojen aktif protein (MAP) kinaz yollarının aktivasyonu ile endotelial hücre proliferasyonunu, adezyonunu ve migrasyonunu stimule etmektedir (63) Çoğu pro-inflamatör HA fragmentleri dendritik hücrelerde ve endotelial hücrelerde hem toll like receptor-4 (TLR-4) hemde TLR-2 aracılığıyla sinyallenmektedir.

Çok küçük HA oligosakkaritleri spesifik biyolojik aktivatörlere sahiptir. 6 disakkaritin oligomerleri daha büyük HA fragmentlerinin anjiyogenik etkisine yanıt olarak uyarılan endotelial hücrelerin farklılaşmasını yürütmektedir. Deri keratinositlerinde migrasyon, maturasyon ve sinyallerinin kontrolü küçük HA oligomerleriyle ilişkilidir. Elde edilen bulgu, HA oligomerinin (HA12) ezrin kodladığı Vil2 geninin up-regülasyonu 2 kat fazla uyardığını göstermiştir. HA12, miyozin 1b geninin ekspresyonunu başlatır ve miyozin 1 protein ailesine aittir. Membran füzyonu ve vezikül ayrımı dahil birçok hücresel olaya katılmaktadır (64).

Tetra ve heksasakkaritler hyaluronidaz aracılı degradasyonun predominant ürünleridir. Tetrasakkaritler, ısı-şok proteinleri (Hsps)'nin ekspresyonunu

uyarmaktadır, hipertermiye giden (uğrayan) kültürdeki hücre ölümünün baskılayıcısıdır ve anti-apoptotiktir. Bazı çalışmalarda tetrasakkaritler fosfo-inositol-3-kinaz/Akt survival yolağının baskılanmasıyla bazı tümör hücre tiplerinin anchorage-bağımsız büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (65).

Bu gözlemlerden HA katabolizmasının biyolojik aktiviteleriyle ilişkili katabolik yolak sırasında üretilen ürünler ve patolojik şartlar altında hyaluronidaz aktivitelerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Normal doku organizasyonu ve fonksiyonu için HA sentezi ve degradasyonu arasındaki denge önemlidir. HA dönüşümü diğer ekstraselüler moleküllerine kıyasla daha hızlıdır (66). HMWHA degrade edici enzimler tarafından enzimatik degradasyon veya kimyasal/mekanizmal yolaklarla ekstraselüler olarak derede olmaktadır. Enzimatik olmayan şekilde HA hidrojen peroksit, süperoksit anyon radikali gibi reaktif oksijen türü (ROS) tarafından degrade olmaktadır. (özellikle oksidatif şartlar altında). Degradasyonun bu tipi genellikle inflamasyon bölgesinde doku hasarı ve tümörögeneziste ortaya çıkmaktadır (67). İlginç olarak hyaluronidazlar endoglikozaminoglikanlardır. Oysaki ROS internal glikosidik bağlarda HA'ı degrade etmektedir (68).

2.5.6.1. Hyaluronanın İmplantasyondaki Rolü

Başarılı bir implantasyon ve hamileliğin oluşumu embriyo ve anne uterusu arasındaki moleküler etkileşimlerle karakterize olan biyolojik bir olaydır. Blastokist evresiyle embriyonun gelişimi, endometriyuma adezyonu ve stromaya invazyonu fonksiyonel plasentanın oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu plasentanın fonksiyonelliği hem maternal immunolojik tolerans hemde endometriyal modifikasyonlardan oluşan kompleks düzenlenme mekanizmalarının sonucudur. Bu olaylar türün yaşamı için önemli olmasına rağmen memeli üremesi için yetersizdir. Birçok çalışma yapılmasına rağmen gebeliğin devamını tanımlayan mekanizmalar hala bilinmemektedir. Kemirgenlerde hamilelik 19. ve 20. günlerde sonlanmaktadır. Blastokistin adezyonu ve invazyonundan oluşan implantasyon 4-5 hamilelik günleri arasında olmaktadır. Hamileliğin oluşumu sırasında endometriyum çok yüksek özel desidual dokuya dönüşmektedir. Bu işleme desidualizasyon adı verilmektedir. Bu olay sadece endometriyumdaki stromal ve desidual hücrelerin proliferasyonu değil

aynı zamanda vasküler yeni damarların oluşmasında kapsamaktadır. Sonrasında plasentasyon gerçekleşir. Placenta, anne ve fetus arasında ilişki kurar ve nutrientlerin, zararlı ürünlerin ve gazların fizyolojik değişimini sağlar. Hem farede hem insanlarda hemokorial plasentasyon vardır. Fare, sıçan ve insan plasentasyonu arasında farklılıklar olmasına rağmen sıçan hamilelik sürecini anlamamız için kullanışlı bir model oluşturmaktadır. Endometriyal yapı blastokist implantasyonu için uygun bir çevre oluşturur. Bu olay maternal ECM kompozisyonundaki değişimlerle birlikte doku yıkımı, hücresel proliferasyon ve farklılaşma fazlarını içermektedir. ECM'nin yeniden düzenlenmesi implantasyon için uygun bir ortamın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır ve bir fonksiyonel plasental birimin oluşumu ile sonuçlanan trofoblast invazyonunu modüle etmektedir (69).

Embriyo kültürü ve transferi için çeşitli medyumlar kullanılmaktadır. Embriyo kültürü ve transferinde kullanılan medyumlar yaklaşık olarak %5-10 arasında protein içeren saf, aköz, serum veya serum albumin formunda proteinlerdir fakat bu formdaki proteinler dışı üreme sisteminin viskoz sıvılarıyla benzer değildir. Transfer medyumunun viskozitesinin artırılmasında % 1'lik plasental kollajen veya polivinil alkol gibi sentetik makromoleküller önerilmektedir. Son yıllarda, kültür medyumuna hyaluronan ve rekombinant insan albumini gibi makromoleküllerin eklenmesi kriyotoleransı arttırdığı ve kriyoprezervasyondan sonra embriyo canlılığını koruduğu rapor edilmiştir. Urman ve ark (3), yaptıkları çalışmada HA'dan zengin transfer medyumunu kullanarak kriyoprezervasyon yapılan 3-5 gün transferlerinde implantasyon ve klinik hamilelik oranlarında artış olduğunu bulmuşlardır. Yaygın olarak embriyo transfer medyumları arasındaki farklılık etilendiamintetraasetik asit'in eksikliği, rekombinant insan albumin konsantrasyonunda 4 kat azalma ve HA'nın konsantrasyonunda 4 kat artış olmasıdır. Valojerdi ve ark (70), yaptıkları çalışmada HETM kullanıldığında tubal-faktör infertilitede artış olduğunu göstermişlerdir. Bunun aksine, Lautradi ve ark (71), yaptıkları çalışmada HETM'nin yararlı olmadığını göstermişlerdir. Lane ve ark (72), kriyoprezervasyon ile blastokistlerin yaşama potansiyelinin artmasını sığır serum ve rekombinant albumin içeren kültür medyumuna HA'nın eklenmesiyle göstermişlerdir. Stojkovic ve ark (73), sığır serum

albumin ve hyaluronan içeren sentetik ovidukt sıvı kültür medyumunda bovine embriyolarının, HA eklenmesiyle blastokist gelişim oranının arttığını bulmuşlardır.

HA ekstraselüler matriksin devamlı komponentidir. Özellikle hızla büyüyen, rejenerasyona ve onarıma uğrayan remodeling dokularında spesifiktir (74). HA, dışı üreme yolunda foliküler ve uterin sıvıda yüksek konsantrasyonu bulunan temel GAG'dır. HA, gebelikle ilgili birçok biyolojik olayda önemli rol oynamaktadır (75). HA'nın güçlü negatif yükü fazla miktarda su tutmaktadır. HA'nın çözücü domaini polimer hacminden 10,000 kat fazladır. Bu hidrasyon dokuların çok fazla büyümesine neden olmaktadır. Hyaluronidaz enzimleri tarafından hyaluronanın düzenlenmesi ekstraselüler matriksin hidrasyonunu azaltmaktadır. Dokuların ve hücrelerin kompaksiyonuna neden olmaktadır. Bu hücre-hücre temasını kolaylaştırmaktadır ve farklılaşmanın başlamasını sağlamaktadır.

İmplantasyon için gerekli olan doku yapının desidual lokalizasyonda trofoblastların invazyonu, ekstraselüler alanın genişlemesi ve şişmesiyle ilişkilidir. Böylece bu genişleme ve şişme interstisyum stabilizasyonu için gereklidir. Proliferatif stromal hücreler içeren endometriyum bölgeleriyle ilişkili olarak fare uterusunda HA implantasyon gününde artmaktadır. HA ekspresyonu ve hücre proliferasyonu arasında benzer bir korelasyon farklı hücre tiplerinde bulunmuştur. Böylece HA'nın endometriyumda hızlı hücre proliferasyonu sırasında önemli fonksiyonu bulunmaktadır.

ECM'de HA depozisyonunun ortaya çıkması hızlı hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. HA depozisyonunun pozitif korelasyonu proliferatif faz sırasında hücre proliferasyonu periyodu ile ortaya çıktığı gösterilmiştir. HA'nın seviyeleri ovulasyondan önce en aşağı noktaya ulaşır ve erken sekretuar faz sırasında düşük olarak kalır. Bu zamanda hücre farklılaşma başlamıştır. Embriyo tutunduğu zaman fertil sıklusta implantasyon başladığı zaman HA tekrar pik yapmak üzere artmaktadır (74).

HA embriyonik hücre proliferasyonu ve migrasyonu sırasında pik yapar ve farklılaşma için azalır. HA depozisyon seviyeleri menstruasyondan önce azalmaktadır ve doku gelişimi ortaya çıkmaktadır ama hipoksiyondan daha erken sürede olmaktadır. HA seviyeleri menstrual siklus sırasında diğer regülatör

moleküller ve çoğu sitokinlerin ekspresyonundaki değişimleriyle sonuçlanan steroidale çevrede siklik değişimler tarafından indirekt olarak düzenlenmektedir. Bunlar direkt yada indirekt olarak HA seviyelerini belirleyen HAS ve HYAL 'lerin aktivitelerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. HA depozisyonunun negatif korelasyonu menstruasyon başlangıcından önce lökositlerin inflüsuyla ortaya çıkmaktadır. HA ve onun ekspansiv suyu hücre motilitesi için çevre sağlamaktadır ve hücre iskeletiyle reseptör aracılı etkileşimler aracılığıyla hücrelerde direkt olarak motiliteyi sağlamaktadır. Bunun premenstrual periyoddaki lökositlerin migrasyonu olduğu belirli değildir. Endometriyal hücrelerde kemokinlerin salımını dahil hücre motilitesini destekleyen diğer mekanizmalar bu durumda işlev görmektedir.

HA hücresele veya fibröz bariyerlerin ayrılmasıyla invazyonu kolaylaştırır. Salamonsen ve ark (74), HA'nın kaybının azalan progesteron seviyeleriyle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlar fakat erken hamilelikte progesteronun devamıyla HA'nın devam ettiğini gösterememişlerdir. HA'nın fertil siklusta azalması sekretuar fazda HA'nın ortaya çıkışı trofoblast invazyonunun sınırlanmasına yardım etmektedir ve insanda ovulasyondan sonra 8. ve 9. günlerde ortaya çıkmaktadır. HA'dan zengin ECM implantasyon sırasında stromanın invazyonunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca insan trofoblast proliferasyonu ve differansiasyonu in-vitro olarak kollajen yada Matrigel gelişen sitotrofoblast sütunu stabilize eden fibronektin ve integrin- $\alpha\beta 1$, arasında etkileşimiyle serbest ECM için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Göç eden hücreler tarafından doku penetrasyonunun kolaylaştırılmasında HA ve onun bağlayıcı proteinleri olan Hyaledherinlerin rol oynamaktadır. Brown and Papaioannou (76), farede implantasyon sırasında proliferatif stromal hücreler etrafında HA varlığını göstermişlerdir. Ayrıca HA desidual zonda bulunmamaktadır. HA-negatif desidual hücreler embriyo implantasyonu sırasında trofoblast hücrelerinin invazyonunun sınırlanmasın neden olmaktadır. Farede desidual hücreler tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) üretirler ve bu sayede trofoblast invazyonunu sınırlamaktadırlar. Siklusun sonraki fazları sırasında insan endometriyumunda desidualize olmuş stromal hücreler fazla miktarda TIMP-1, -2 ve -3'ü üretirler. Farede desidualizasyon blastokiste yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Oysaki insanda desidualizasyon her siklusun geç-sekretuar fazı sırasında spontan

olarak ortaya çıkmaktadır. HA'yı degrade eden enzimler HYAL'lerdir. HYAL insan endometriyumunda tanımlanmıştır. Bu enzimlerin bir yada daha fazlası siklusun geç sekretuar fazı sırasında desidualizasyon bölgelerinin çevresinde sentezlenmektedir. 19-21 günde kan damarlarının çevresinde stromada HA'nın çok yoğun boyanması siklusun ilerlemesiyle kaybolmuştur. Bu kayıp desidualizasyonun başlangıç zamanı ve lokalizasyonu ile ortaya çıkmaktadır ve yaklaşık olarak siklusun 23. gününde başlamaktadır. Spiral arterlerin civarında ilk olarak lokalize olmaktadır (74).

İntrauterin kavitede HA, hücre-matriks adezyonu, hücre agregasyonu, selüler migrasyon için geçici bir matriks sağlamaktadır. HA bazı mekanizmalar aracılığıyla embriyo implantasyonunu desteklemektedir. HA içeren kültür medyumunda, kültüre edilen hayvan embriyoları fetal gelişim ve implantasyon oranını arttırmaktadır. HA insan embriyo implantasyon oranını arttırdığı ileri sürülmektedir. Bu fonksiyonlar HA için tektir. (herhangi bir yüksek viskoziteli solüsyonların implantasyonu geliştiremediği gibi) transfer kültür medyumunun viskozitesini arttırmak için eklenen insan plasental kollajen, implantasyon oranını arttıramaz. İnsan embriyoları, oositten blastokist evresine geçişi sırasında CD44 ekspresyonunu arttırmaktadır. CD44, HA reseptörü olarak bulunmaktadır. Bu reseptörler aracılığıyla embriyo, reseptif endometrial stromaya tutunur ve bu sırada endometrial stromada bol miktarda HA içerir ve HA substratları aracılığıyla göç ediyor.

HA'nın diğer önemli fonksiyonu EGF etkileşimiyle ve onun degradasyon ürünleri aracılığıyla anjiogenezisi yürütme yeteneğindedir. HA, farklı biyolojik aktivitelere sahip daha küçük polisakkaritler halinde somatik dokularda degrade olmaktadır. HA'nın 20 kDA limit fragmentleri anjiyogeniktir, immunostimulatör ve inflamatuvar sitokinlerin sentezini uyarmaktadır. HA'nın degradasyon ürünlerinin anjiyogenik aksiyonları implantasyonu geliştirmektedir ve plaseenta formasyonunda vital bir biyolojik rolü vardır.

Endometriyumda HA'nın yararlı etkisi onun fiziksel özelliğiyle ilişkilidir. Kümülus hücresi, oosit kompleksi aşırı miktarda HA tarafından çevrelenmektedir. Konsepsiyon hazırlanmasında endometriyum tarafından üretilen fazla miktarda HA tarafından çevrelenen kümulus hücre oosit (COC) kompleksi endometriyal kaviteye

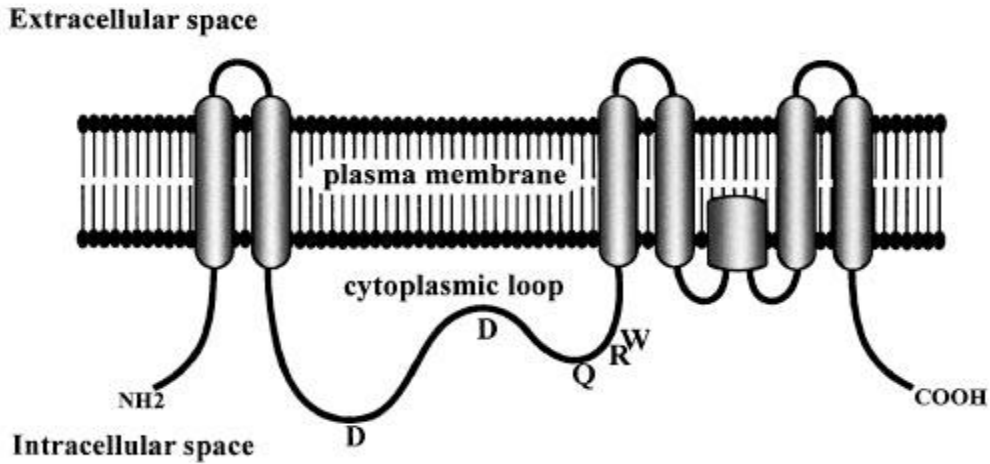
ulaştığında konsepsiyonum hazırlanmasında endometriyum tarafından üretilen epitelyum yüzeyindeki HA ile birleşmektedir. HA, büyük hacimli suyu çeken (-) yüklü grupları içermesinden dolayı hidrofilik moleküldür. HA göç eden hücreler tarafından doku penetrasyonunu kolaylaştıran endometriyal stromanın ekspansiyonunu yürüten bir hidrate jel oluşturmaktadır. İnsan endometriyumunda hidratasyon mid-sekretuar faz sırasında predominant olarak ortaya çıkmaktadır (75).

2.5.6.2. HAS (Hyaluronan Sentetaz) Ailesi ve Sentezi

HAS farklı izozimleri kodlayan bir multigen ailesidir. Memelilerde önce HAS1 ve HAS2 daha sonra HAS3 keşfedilmiştir (77). Genler ayrı kromozomlarda lokalize olmuştur. HAS1 insanda kromozom 19q13.4, farede kromozom 17; HAS2 insanda kromozom 8q24.12, fare'de kromozom 15; ve HAS3 ise insanda kromozom 16q22.1, farede kromozom 8'de lokalize olmuştur.

Memeli HAS'ları 2 tanesi N-terminal sonunda, 5 tanesi de C-terminal sonunda olmak üzere 7 membran kapsayan bölge içermektedir (78) (Şekil 2.5.6.2).

HAS'lar plazma membranının iç yüzeyinden sentezlenirler. Herbir farklı hyaluronan sentetaz proteininin belirli biyolojik etkileri, düzenlenmesi ve aktivitelerinin kontrol edilmesi görevleri vardır (79). HAS1 ve HAS2 2000 kDA'dan daha büyük olan yüksek molekül ağırlıklı HA'yı üretirken, HAS3 200-300 kDA ağırlığında düşük moleküler ağırlıklı HA'yı üretmektedir (80). HA birçok farklı role sahiptir ve bu fonksiyonları boyutuna bağlıdır (69).



Şekil 2.5.6.2: Tüm memeli HAS izoformları 2 tanesi N-terminal sonunda, 5 tanesi de C-terminal sonunda olmak üzere 7 membran kapsayan bölge içermektedir. Glikotrasferaz aktivitesinden sorumlu aminoasit kalıntıları (D, D, Q, R ve W) HAS proteininin sitoplazmik döngüsünde gösterilmektedir. (78)

Uchiyama ve ark (80), yaptıkları çalışmada hamilelik sırasında fare uterin serviksinde, farklı olan HAS'ın 3 tipinin mRNA'larının ekspresyon şekillerini göstermişlerdir. Uterin serviksindeki HAS1 ve HAS2 mRNA'larının dokudaki seviyeleri doğumda pik yapmaktadır ve doğumdan 3 gün sonra mRNA seviyeleri tamamen azalma göstermektedir. HAS1 ve HAS2 mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerle serum HA'nın ekspresyonundaki değişiklikler benzerdir. Hamilelik sırasında servikte HAS1 ve HAS2 tarafından sentezlenen HA'dan dolayı benzerdir. Diğer yandan HAS3 mRNA'sının ekspresyonu hamileliğin 15.günde pik yapmaktadır ve doğumda hamile olmayan hayvanlarda seviyeleri azalmaktadır (80).

Hyaluronan sentezinin düzenlenmesi

HA biyosentezi farklı büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenir. İnsan fibroblast-benzeri sinovyal hücrelerde TGF- β , HAS1'i artırır ve HAS3'ün aktivasyonunu düşürür. Pasonen-Seponnen ve ark (81), epidermal rat keratinositlerinde TGF β 'nın HAS2 ve HAS3 aktivitesini azalttığını, EGF'in ise arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, insan intestinal mezenşimal hücrelerinde IL-1 β 'nin HAS2 transkripsiyon seviyesini arttırdığını ve insan sinovyal sıvı hücrelerinde total HA üretimini göstermişlerdir. HAS2 aktivitesi hem insan mikrovasküler endotel hücreleri hemde insan arter düz kas hücrelerinde PGDF tarafından uyarılır. Sığırdan korneal endotelyal hücrelerde ve tavşanlarda sinovyal fibroblastlarda HAS2 aktivitesi TGF β 1 tarafından uyarılmaktadır.

Tablo 2.5.6.1: HAS1, HAS2 ve HAS3'ün üzerinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkileri (79).

Synthetase	Effector molecule	Effect on HYA-synthesis
HAS1	TGF- β 1	→
	TGF- β	↑
	PDGF-BB	→
HAS2	TGF- β 1	↑
	TGF- β	→↓
	PDGF-BB	↑
	PDGF	↑
	EGF	↑
	INF- γ	→
	TNF- α	→
	IL-1 β	↑
HAS3	TGF- β 1	→
	TGF- β	→↓
	PDGF-BB	→
	EGF	↑

→ = no effect, ↑ = increased mRNA-levels, ↓ = decreased mRNA-levels

HAS mRNA seviyelerindeki değişiklikler, aktivasyonu gerçekleşmiş genlerin ürünleri yada etkileri salgılanan HA miktarlarının her zaman benzer olmadığını göstermiştir (79).

HA birikimi HAS ve Hyal aktiviteleri arasındaki dengenin sonucudur. R.Cordo ve ark (69), RT-PCR'la normal hamilelik ve spontan düşük modelinde desiduada HAS1, HAS2 ve HAS3 mRNA ekspresyonunu incelemişlerdir. HAS1'in HAS2'ye göre daha baskın olduğunu ancak sadece HAS2 ve HAS3'ün plasentada HAS1 mRNA ekspresyonunun olmadığı durumlarda da eksprese olduğunu bulmuşlardır. HAS izozimleri farklı enzimatik özellikler göstermektedir (69).

2.5.6.3. Hyaluronidazlar

Hyaluronidazlar, hayvanlar aleminde dağılım gösteren bir enzim grubudur. Son yıllarda hyaluronidazlar yoğun olarak çalışılmaktadır ve regülatör

fonksiyonlarından dolayı HA metabolizmasında önemli olduğu düşünülmektedir. Karl Meyer (82), HA'yı degrades eden enzimler olarak adlandırılan hyaluronidazları tanımlamıştır. Meyer biyokimyasal analiz ve üretilen son ürünlere bağlı olarak hyaluronidazları 3 grup içerisinde sınıflandırmıştır (82).

1. *Memeli Hyaluronidazları*; (testis tip) (E.C. 3.2.1.35) endo- β -N-asetilheksosaminidazlar'dır. Büyük son ürün olan HA kondroitin ve kondroitin sülfatlar gibi oligosakkaritlerde β -1-4 glikozidik bağlarla bölünmektedir ve azalan terminalde N-asetilglukozamin vardır. Bu sınıfın enzimleri memeli spermatozoasında yılanlar, sürüngenler ve hymenoptera (zar kanatlılar)'ların zehri, lizozomlarda, memeli spermatozoasında bulunan hidrolitik ve transglukozidaz aktiviteleri vardır. Örn; testiküler hyaluronidaz. (83).

2. *Hyaluronat-3-glikanhidrolazlar*; (E.C. 3.2.1.36) (asalak tip hyaluronidazlar). Hyaluronanın glukuronat bağlarını bölen endo- β -D-glukoronidazlar'dır ve GAG'lara karşı etkisizdir. Tetrasakkaritler ve heksasakkaritler glikoronik asitle üretilen son ürünlerdir. Bu sınıf, solucanlar ve sülüklerin tükrük bezlerinde bulunan enzimleri içermektedir (84).

3. *Mikrobiyal Hyaluronidazlar*; (E.C.4.2.99.1). Mikrobiyal hyaluronidazlar, β -eliminasyon sürecini kullanarak β 1-4 glikozidik bağlarda hyaluronanı parçalanmaktadır ve Δ 4-5 doymamış oligosakkaritler ortaya çıkmaktadır. Bunlar diğer hyaluronidaz gruplarından farklıdır çünkü aktivitelerinde hidrolizi kullanmamaktadır. Bu sınıftaki enzimler *Streptococcus pneumoniae* (S. PHL) ve *S. agalactiae* hyaluronidazlarını içermektedir.

Bunlara ilaveten hyaluronidazlar pH bağımlı aktivitelerine bağlı olarak 2 gruba ayrılırlar. *Asit-aktif hyaluronidazlar*, Ph 3 ve 4 arasında aktiftir. Bu grup insan karaciğer ve serum hyaluronidazlarını içermektedir. *Nötral aktif hyaluronidazlar*, pH 5-8 arasında aktiftir yılan zehri ve arı zehri hyaluronidazları pH-20 dir (82).

Memeli Hyaluronidazları (HYAL)

C-terminal domaini bütün Hyal enzimleri arasında dizi ve yapısal fonksiyonunda farklılık göstermektedir. Bütün bilinen hyaluronidazlar asidik pH'da

aktiftir. PH-20 ve Hyal2 hariç diğeri bir lizozomal lokasyonda bulunmaktadır (85). Hyaluronidazların hepsi kendine özgü belli bir optimal pH değerinde aktiftir

Memelilerde hyaluronanın enzimatik degradasyonu bir endoglikozidaz ve iki ekzoglikozidazlar olmak üzere üç ayrı enzimin koordineli aktivitesi aracılığıyla olmaktadır (Kimyasal yapısı; bir glukuronidaz, β -N-asetil-hekzosaminidazlar).

İnsanlarda 6 hyaluronidaz benzeri gen dizisi tanımlanmıştır. Bunlar; Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, PHyal1 (bir pseudogen) ve sperm adezyon molekülü 1 (SPAM1)'dir. Hyal1 ve Hyal2 insan somatik hücrelerinde eksprese edilen esas hyaluronidazlardır (86). Zıt olarak fare genomu 7 tane gen dizisi içermektedir (87). Bunlar; Hyal1, Hyal2 ve Hyal3, Hyal4, Spam1/PH-20, Hyalp1 ve Hyal-5. Hyal5 belirli bir optimal pH oranına sahiptir ve hem nötral hemde ekstraselüler iyonik pH'da aktiftir (87). Ayrıca, Hyal5 farenin dışında sıçan'larda da (BC091219) bulunmaktadır. Spam1 eksik farenin olgun spermatozoası fertildir ve hyaluronidaz aktivitesini gösterir. Buda Spam1 eksik spermatozoanın yüzeyinde aktif Hyal5 olmasından dolayıdır (68, 87).

Hyal1 insan plazmasında tanımlanan ve izole edilen ilk somatik hyaluronidazdır. Yüksek molekül ağırlıklı izoformu dolaşımda bulunmaktadır ve kültür hücrelerinde, doku ekstraktlarında ve idrarda ortaya çıkan izoformları vardır. Hyal1 bir substrat olarak herhangi bir boyuttaki HA'yı kullanabilir ve bunun sonucunda da tetrasakkaritleri/hekzasakkaritleri üretmektedir (88).

Hyal2, asit aktiftir, glikozilfosfatidil-inositol (GPI) bağıyla plazma membranına tutunur. Hyal2 soluble form şeklinde ortaya çıkar (89). Hyal2 orta boyutlu fragmentlerle (20 kDa) yüksek molekül ağırlıklı HA'yi parçalar. Hyal1 ve Hyal2 benzer yapıya sahiptir fakat farklı reaksiyon ürünleri ortaya çıkarırlar. Benzer çalışmalar göz önüne alındığında farede Hyal2 eksikliğinde embriyonik olarak ölüm gerçekleşmektedir fakat Hyal1 mutasyonunda ölüm gerçekleşmemektedir (90).

Hyal3 yaygın olarak ekspre edilmektedir fakat herhangi bir aktivitesi bulunamamıştır (86). Hyal3 kemik iliği, testis ve kondrositlerde ortaya çıkmaktadır. Fibroblastlar, kondrosit farklılaşmasına uğradığı zaman Hyal3'ün ekspresyonunu arttırmaktadır (91). Hyal2 ve Hyal3, IL-1 ve tümör nekrozis faktör- α (TGF- α) gibi inflamatuvar sitokinler tarafından up-regüle edilirken, Hyal1 edilmemektedir (92).

Memeli hyaluronidazları arasında, testis hyaluronidazları iyi çalışılmıştır ve tanımlanmıştır. Memeli spermi SPAM1 olarak ve PH-20 olarak bilinen GPI-bağlı hyaluronidaza sahiptir. PH-20 ovum zona pellusidası ve kümulus ekstraselüler matriksinde spermin penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır ve fertilizasyon için gereklidir. PH-20, 64 kDa moleküler ağırlığı olan bir polipeptid olarak sentezlenmektedir ve hem nötral hemde asidik pH'da enzim aktivitesi göstermektedir (68). PCR analiziyle PH-20 epididimiste, seminal vezikül, prostat, dışı genital yol, plasenta ve fetal dokuda bulunmuştur (93, 94).

2.5.6.4. Hyaluronan Bağlayıcı Proteinler ve Reseptörleri

Hyalodherinler, HA bağlayıcı özelliği olan heterogenezis grup proteinleridir. Bu proteinler, HA bağlayıcı bölgenin dizilişi ve onların hücre içi ve hücre dışı lokalizasyonları olmak üzere gruplandırılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2.5.6.2: HA'in hücre içi ve hücre dışı reseptörleri (68).

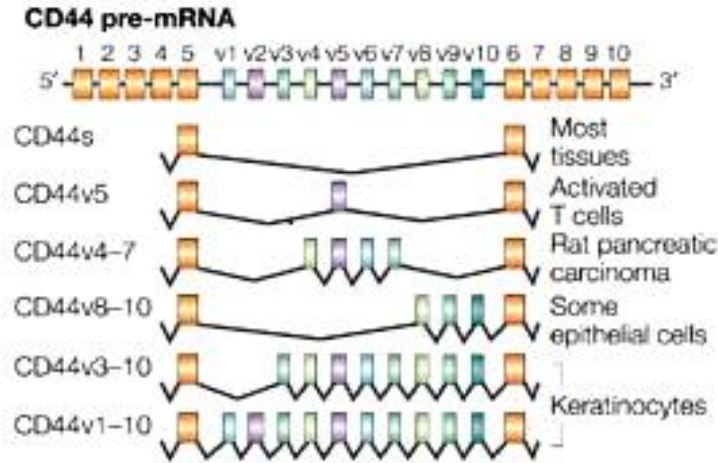
Hyaluronan reseptörleri	
Hücre içi	CD44 Ailesi, RHAMM, cdc37, p68 (gelqR), HBP (Hepatosit bağlayıcı protein), IHABP4, TSG-6, LYVE-1, LEC
Hücre dışı	Versican, aggrecan, neurocan, brevican, fibronogen, Ial (Tripsin inhibitörü)

Bilinen HA bağlayıcı reseptör ve proteinlerin çoğu bağlayıcı modül olarak adlandırılan ortak 100 aa. globüler bağlayıcı domain içermektedir. Bu bağlayıcı modül bölgesi immunglobulin domaini ve 2 yakın bağlayıcı modülden oluşmaktadır. İmmunglobulin domainleri bağlayıcı protein-proteoglikan etkileşiminde görevlidir. Oysa ki bağlayıcı molekül HA'nın bağlanmasına aracılık etmektedir (68, 95). Bu moleküler yapı agrekan, versikan, nörokan ve brevikan 'nın G1-alanlarında (domain) ortaktır.

Hyaluronan Reseptörleri-Hücre İçi Hyaledherinler

2.5.6.5. CD44

HA için temel reseptör olan CD44 transmembran glikoproteini yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmiştir. Tümör büyümesi, metastaz, inflamasyona aracılık etme, implantasyon gibi birçok fonksiyonu bu membran reseptörüyle tanımlanmıştır (96-99). CD44 reseptörü O ve N glikolizasyonları, kondroitin ve heparan sülfat bağları gibi posttranslasyonel modifikasyonlar ve ekstraselüler domaini etkileyen alternatif splayzından dolayı farklı izoformlarda bulunmaktadır. CD44 proteinleri insanda kromozom 11'de lokalize olan tek bir korunmuş gen tarafından kodlanmaktadır. CD44 pre-mRNA'sı 20 ekzon tarafından kodlanmaktadır. Bunların 10'u alternatif splayz tarafından düzenlenir (Şekil 2.5.6.3). Prensipite 10 varyant ekzonların hepsi farklı kombinasyonlarla 100 farklı izoformla sonuçlanabilir.



Şekil 2.5.6.3: CD44 pre-mRNA'sı 20 ekzon tarafından kodlanmaktadır, 10 tanesi alternatif splayz tarafından kodlanmaktadır (100).

Ekzon s9'un inklüzyonu normal olarak birçok CD44 transkriptlerinde eksiktir. Bu da CD44'ün kısa kuyruk formuyla sonuçlanır. Daha kısa standart formu CD44'ün omurgalılarda ve gelişen ve ergin organizmalarda her zaman her yerde eksprese edilmektedir. Aksine daha büyük varyant izoformları sadece epitelyal dokuda eksprese edilmektedir ve lökosit aktivasyonu, inflamasyonu ve tümör oluşumu gibi özel şartlar altında up-regüle edilir. Zıt olarak daha büyük varyant izoformları (vCD44) sadece epitelyal dokularda eksprese edilmektedir ve tümörögenesis,

lökosit aktivasyonu, inflamasyon gibi özel şartlar altında up-regüle olmaktadır (100) (Şekil 8). CD44v'nin ekspresyonunun regülasyonu ve kontrolü mitojenik sinyaller ve matur RNA içerisinde varyant eksonlarının inklüzyonunu tetikleyen Ras-Mek-Erk yolağının stimülasyonuna bağlıdır.

Hyaluronan-bağlayıcı, amino terminal domain

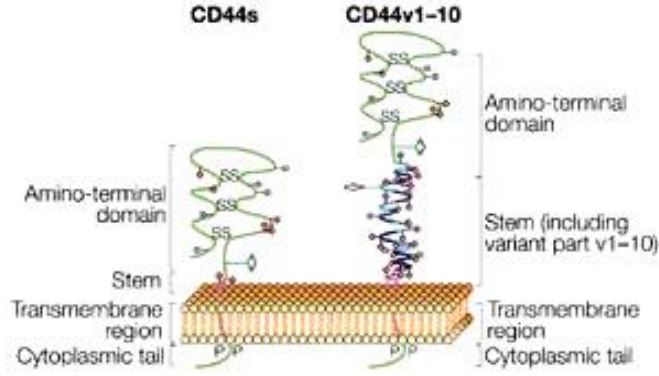
CD44'ün 2 ve 3 standart ekzonları HA bağlayıcı domain olarak bilinen amino-terminal globüler protein domaini kodlamaktadır. Bu domain, ekstraselüler matriksin bir polisakariti olan HA ile etkileşmektedir (101).

Kök yapısı

En küçük CD44 izoformunun amino-terminal globüler domaini bir kısa kök yapısı (46 aa.) ile plazma membranından ayrılmaktadır. Bu yapı bütün splayz varyant ekzonlarını içerirse 381 aa. ile bu yapı uzamaktadır. Bu kök preteolitik ayrılma bölgelerini içermektedir. CD44'ün ekstraselüler kısmı MMP'ler tarafından bölünmektedir (102, 103). Ekzon v3'ün inklüzyonu FGF (fibroblast büyüme faktörü), HGF (hepatosit büyüme faktörü) yada MIP-1 (kemokin makrofaj inflamatuvar protein-1) gibi büyüme faktörlerine bağlı heparan sülfatın bağlanması için önemli olan birtek heparan sülfat ekli bölgeyi oluşturmaktadır (Şekil 2.5.6.4) (104).

Transmembran ve sitoplazmik domain

Transmembran bölgesi ekzon s8 tarafından kodlanan 23 hidrofobik aa.'lerden oluşmaktadır. Transmembran domaini lipid tabakarıyla CD44 proteinlerinin birleşmesinden sorumludur. Ekzon s10 tarafından kodlanan karboksil terminal sitoplazması domain hücre iskeletinin organizasyonu ve sinyallenmesinde kritik fonksiyonlarıyla proteinlerinin bağlanmasını desteklemektedir (105).



Şekil 2.5.6.4: Kök bölgesindeki varyant ekzonlar tarafından kodlanan sekansların gösterildiği CD44s'in protein yapısıyla daha büyük varyant izoformu CD44v1-10'nun karşılaştırılması (100).

CD44'ün fonksiyonları ve etkileşen partnerleri

Herhangi bir hücre adezyon molekülü gibi CD44 hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerine aracılık etmektedir. CD44 ekstraselüler matriksle ve soluble ekstraselüler komponentlerle etkileşebilmektedir. CD44'ün esas ligandı HA'dir (97). ECM aracılığıyla adezyon ve migrasyonunun yanında CD44 proteinleri organ gelişimi, T hücre farklılaşması, hematopoezis, sitokin ve kemokin bağlanması dahil birçok vital fizyolojik olaylara katılmaktadır. CD44 birçok fizyolojik olayda rol oynamasına rağmen kronik inflamasyon ve tümörögenезis gibi patofizyolojik olaylarda da rol oynayabilmektedir. CD44'ün multifonksiyonelliği farklı moleküllerle onun ekstra ve intraselüler etkileşimlerinden dolayıdır (101).

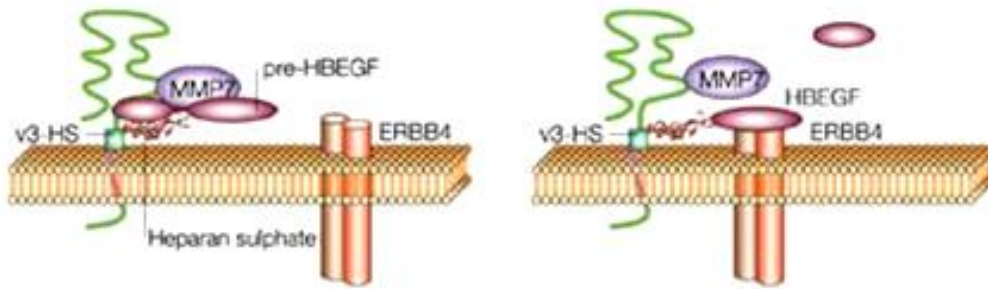
Ekstraselüler etkileşim molekülleri

Platform fonksiyonu

CD44 proteinleri büyüme faktörleri gibi soluble ekstraselüler moleküller için özelleşmiş platformlar olarak fonksiyon görebilmektedir. CD44 bağlı heparan sülfat zincirleri onları bağlama kapasitesindedir. CD44 hücre yüzeyinde MMP9'u düzenlemektedir. CD44, TGF- β 'nin aktive olması için MMP9'la biraraya gelmesini sağlayarak anjiogenezisi ve invazyonu tetiklemektedir (106). MMP7 ve onun substratı olan HBEGF'in proformu muhtemelen CD44v3 bölgesinin heparan sülfat zincirleri aracılığıyla hücre yüzeyine bağlanmaktadır (Şekil 2.5.6.5). CD44 gibi bir heparan sülfat proteoglikan ile heparan bağlayıcı büyüme faktörlerinin bağlanması

onların yüksek affiniteli reseptörlerin aktivasyonu için gereklidir. Aktive olmuş HBEGF hücre yaşamı için sinyal oluşturan ErbB reseptör trozin kinaz, ErbB4 aktivasyonunda rol oynamaktadır (107).

Sitokin, osteopontin ile CD44v6,7'nin etkileşimi fare kemik iliği hücrelerinin hücre yaşamı ve inflamasyonunu yürütmektedir (101). Varyant 3 bölgesinde heparan sülfat modifikasyonu içeren CD44 proteinleri FGF ailesinin üyelerini düzenleyebilmektedir. Bu platform fonksiyonu hücre yüzeyine entegre olan ve konsantre olan olayları sinyalleleyen fizyolojik olaylar için önemlidir (100).



Şekil 2.5.6.5: Platform fonksiyonu. MMP7 ve onun substratı olan HBEGF'in proformunun CD44v3 bölgesinin heparan sülfat zincirleri aracılığıyla hücre yüzeyine bağlanması (100).

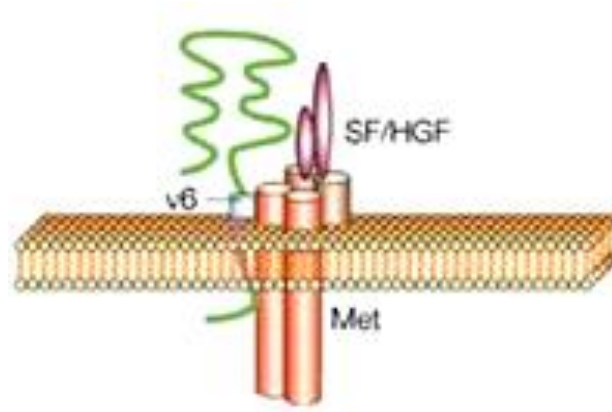
Ko-reseptör fonksiyonu

Sinyal transdüksiyonunda ortaya çıkan konsept ko-reseptörler gibi fonksiyon görebilen hücre adezyon molekülleridir ve son raporlar CD44'ün iyi bir örnek olduğunu göstermiştir. CD44'ün kendisinde kinaz aktivitesi olmamasına rağmen o reseptör-trozin kinazlarla işlev görebilmektedir ve onların kinaz aktivitesini modüle edebilmekte veya onların aktivasyonuna aracılık etmektedir. CD44v6 trozin kinaz reseptörü c-met ve onun ligandı olan SF/HGF (scatter factor/hepatocyte growth factor) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Multimerik kompleks, CD44v6/c-met/HGF formasyonu, c-met otofosforilasyonu ve sinyallenmesi için gereklidir (Şekil 2.5.6.6) (108).

CD44, ErbB reseptörlerinin trozin kinaz ailesi için ko-reseptör olarak fonksiyon görmektedir. Bazı hücre hatlarında ErbB1, ErbB2, ErbB3 ve ErbB4'de etkileşmektedir. Yukarıda tartışıldığı gibi, CD44-ErbB4 kompleksinin fonksiyonu

hücre yaşamını sağlayan MMP7 tarafından HBEGF'in yapımına yol açmaktadır (107).

Melanoma hücrelerinde laminin $\alpha 5$ ile CD44'ün birleşimi tümör migrasyonunu, invazyonu ve anjiyogenezisi inhibe etmektedir (101). Platform ve ko-reseptör fonksiyonlarının her ikisi antijenik stimulasyon ve inflamasyon sırasında immün sistemin hücrelerinde CD44'ün aksiyonundan sorumludur. Bu fonksiyonlar tümör hücrelerinin anormal proliferasyonunda gösterilmiştir.



Şekil 2.5.6.6: CD44v6 trozin kinaz reseptörü c-met ve onun ligandı olan SF/HGF (scatter factor/hepatocyte growth factor) ile ilişkisinin şekilde gösterimi. Co-reseptör fonksiyonu. CD44v6/c-met/HGF (multimerik kompleks) formasyonu, c-met otofosforilasyonu ve sinyallenmesi için gereklidir (100).

İntraselüler etkileşen moleküller

Sinyallenme moleküllerinin etkileşimi

Ekstraselüler etkileşimler yanında birçok intraselüler sinyallenme komponentleri CD44'ün sitoplazmik kuyruğu ile kompleks oluşturmaktadır. İntraselüler moleküller Rho ailesinin GTPazları ve Src ailesinin non-reseptör trozin kinazlarıdır. CD44, Src, Lyn, Lck, Fyn ve Hck ile birlikte immuno çökelti oluşturmaktadır ve CD44'ün aktivasyonu onların substratları ve kinazların trozin fosforilasyonunu stimule etmektedir (101). Ancak bu etkilerin direk mi indirek mi olduğu belirli değildir ve onların herhangi bir fonksiyonel öneme sahip olup olmadıkları açık değildir.

CD44 integrin VLA-4'le birleşmektedir. Bu etkileşim inflamasyon bölgelerinde T-hücrelerinin ekstrasvazyonu için gereklidir (97).

Smad1, CD44'ün sitoplazmik domainiyle birleşmektedir. Bu etkileşim Kemik morfolojik faktör (Bone morphogenetic protein-7, BMP-7) ile hücresel yanıtın oluşumunu sağlamaktadır ve kondrosit farklılaşması için gereklidir (101).

CD44'ün proteolitik oluşumu

Önceden anlatıldığı gibi CD44'ün ekstraselüler kök bölgesi membranda gömülü olarak bulunan bir C-terminal fragmentlerinden ayrılan MMP'ler tarafından bölünmektedir. Bu proteolizis prenesilin-1/γ sekretazlar tarafından C-terminus fragmentinin daha fazla oluşumu için gereklidir ve CD44β-like peptidin sekresyonu ve bir CD44 intraselüler domain fragmenti ile sonuçlanmaktadır. Bu CD44-ICD nükleusta transloke olmaktadır ve CD44'ün kendisini kodlayan gen olan hedef genlerin transkripsiyonunu yürütmektedir (109).

CD44'ün fonksiyonları

CD44 proteinleri, implantasyonda, immün sistemde, hematopoezis, embriyonik gelişim, tümör gelişimi gibi birçok önemli fonksiyona sahiptir (101).

CD44'ün İmplantasyondaki rolü

Normal menstrual siklus akışı sırasında endometriyum remodelige uğrar fakat regülasyonu iyi anlayamamıştır. Değişkenlerin biri embriyo implantasyonu için uygun bir çevrenin transformasyonudur ve reseptivitenin olmasıdır. Bu birkaç hormon ve stromal ECM molekülleriyle etkileşen birçok transmembran reseptörlerinin bulunmasıyla olmaktadır. Bu reseptörlerden birisi olan CD44, ECM komponenti olan HA'yı bağlamaktadır (75). HA temel reseptörü CD44'tür. CD44E epitelyumda bulunmaktadır, CD44H ise stromada bulunmaktadır. CD44H, CD44s olarak bilinmektedir ve HA için bir reseptör olarak işlev görmektedir (74).

CD44, menstrual siklusun tüm fazlarında endometriyumun stromal ve epitelyal hücreleri ve hamilelikte desidualize olmuş stromal hücrelerinde eksprese edilmektedir (74). CD44 polimorfiktir ve multifonksiyoneldir. Sadece lenfositlerde eksprese edilmez, birçok epitel türünde eksprese edilir. HA'nın birçok etkisi onun hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla olmaktadır (75).

CD44 izoformları epitelde orta-geç sekretuar fazda ortaya çıkmaktadır. Campbell ve ark (110), preimplantasyon insan trofoblastlarında CD44'ün bulunduğunu fakat implantasyonu takiben 8-11 haftalarda trofoblast yüzeyinde down-regüle olduğunu göstermişlerdir. Afify ve ark (75), CD44s'in, sekretuar faz sırasında endometriyal stromal hücrelerde eksprese edildiğini göstermişlerdir. Sekretuar faz sırasında CD44'ün aşırı ekspresyonuyla bir fertilize olmuş ovum'un implantasyonunda bu molekülün rol oynadığı ileri sürülmektedir. CD44, endometriyum ve ovum arasında adhezif temasın erken evrelerinde fonksiyon görmektedir. Bu fazda endometriyumda CD44 ekspresyonunda azalma veya kayıp infertilite veya erken düşüğe neden olmaktadır. HA aracılı morfogenezis bölgelerinde post implantasyon fare embriyolarında CD44 ekspresyonunun geçici veya aralıklı olarak regülasyonu reseptör-ligand etkileşiminde rol oynamaktadır.

CD44'ün heterojenitesi, molekülün ekstraselüler domain içinde bir bölgede çeşitli kombinasyonlarında eklenen splayz eksonları vardır (10 tane). Her yerde ekspre edilen CD44'ün standart formunun aksine varyant eksonları içeren splayz varyantları normal dokularda sınırlı eksprese olmaktadır. Örn, CD44v6 ekspresyonu bir grup epitel dokuda (yassı epitelyum hücrelerinde veya B-hücre aktivasyonu sırasında geçici olarak) bulunmuştur. Ayrıca CD44v6 bazı tümörlerin metastatik potansiyeli ve malignant transformasyonunda gösterilmiştir. CD44v6, sekretuar faz sırasında glandular epitel hücrelerde aşırı ekspre edilmiştir. CD44v6, glandular epitelyal hücrelerde eksprese edilirken CD44s çevredeki stromal hücrelerde eksprese edilir. 2 doku (epitel ve stroma) kompartmanlarında CD44s ve CD44v6 ekspresyonundaki farklılık farklı mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir. Endometriyumda büyüme ve farklılaşmasının regülasyon şekillerinin glandular epitel ve stromada farklı olduğu bilinmektedir. CD44v6 ekspresyonu menstrual siklus sırasında endometriyal glandular hücrelerin maturasyonu ve farklılaşmasıyla ilgilidir. Varyant CD44 formalarının mRNA'ları, musin bağlayıcı domainlerin karakteristiklerine sahip, hücre yüzeyinde eksprese edilen uygun glikoproteinleri oluşturmaktadır ve sekretuar fazda endometriyal glikokalikse katıldığı düşünülmektedir (75).

HA İnternalizasyonu ve Degredasyonunda CD44 Etkisi

CD44, HA'nın internalizasyonu ve intraselüler degradasyonuna katılmaktadır. Bovine kondrositleri, dönüştürülmüş fare fibroblastları (SV-3T3), insan ve hamster alveolar makrofajları CD44 bağlı bir şekilde HA bağlamaktadır. CD44'ün kendisi HA ayrıştırıcı aktive göstermez. Makrofajlar tarafından HA'nın ayrılması (cleavage) chloroquine ve NH₄CL ile bloklanabilir. CD44 bağımlı internalizasyonu takiben HA'nın degradasyonu makrofajlar ve invazif tümör hücreleri gibi mobil hücrelerin hareketliliğini kolaylaştırır (111).

Embriyonik Gelişimde CD44

Sıçan, fare, tavuk ve insan embriyonik gelişimi sırasında CD44 proteinlerinin ekspresyonu birçok çalışmada incelenmişken, CD44 gelişimsel süreçlerdeki sadece birkaç durumda tanımlanmıştır (111).

CD44 proteinleri timus ve uzuv gelişimi için gereklidir. Timus gelişimi sırasında, fetal karaciğer ve yetişkin kemik iliğinden eksprese edilen CD44v hücreleri fetal timik stromayı etkili bir şekilde yerleştirir ve olgun T hücreleri geliştirir. Fetal timik organ kültürlerinde anti-CD44v (v6, v7, v10) antikorları timosit gelişimini bloklar. CD44 varyant proteinleri timik stroma ile hematopoietik hücrelerin progenitör hücrelerin ilk etkileşimi için gereklidir. Uzuv oluşumu sırasında, CD44v3 içeren izoformlar uzuv mezenkimal hücrelerine FGF-8 sunumu için ve takip eden proliferasyonu için önemlidir. Bu CD44 splayz varyantları apikal ektodermal sırtında (AER) FGF ile ko-lokalize olmaktadır; erken uzuv gelişiminde FGF proteinleri heparan sülfat bağımlı olarak bağlanırlar. AER'nin CD44 spesifik antikorlar ile muamele edilmesi CD44 bağımlı FGF-8 sunumuna engel olarak AER'nin stimulatör kapasitesini tamamen bloklamaktadır (111).

Hematopoeziste CD44

CD44 kemik iliği hematopoietik progenitör hücrelerde eksprese olmaktadır. Bu ekspresyon hematopoietik sistemin gelişimi için önemlidir.

CD44 varyant proteinleri hematopoiezde de rol oynamaktadır. CD44s ve CD44 varyant proteinleri myelopoiezde de farklı roller oynayabilmektedir. Farklı CD44 varyant antikoları hematopoiezin farklı stimülasyonlarını tetikler. Hem CD44v4 ve v6 antikoları kemik iliği makrofajları üzerinde etkilidirler ve GM-CSF üretimini stimüle etmektedirler. Fakat v6 antikoları IL-6 üretimini stimüle ederler. Bu durum hem CD44v4'ün hemde CD44v6 antikolarlarının myelopoiezisi stimüle ettiğini ve sadece CD44v6 antikolarlarının lenfopoiezi stimüle ettiğini açıklar (112).

Hematopoieze CD44'ün diğer bir fonksiyonel katkısı, insan hematopoietik progenitör hücrelerde majör E-selektin ligandı olarak tanımlanan CD44'ün bulunmasıdır. E-selektin deride T hücrelerinin doku spesifik migrasyonunda kritik bir rol oynamaktadır ve primitif hematopoietik progenitör hücrelerin kemik iliğinde toplanmasında rol oynamaktadır (113).

İnflamasyonda CD44

Hem CD44 hemde HA inflamator hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. KMB81 (HA'nın CD44 bağlanımını engelleyen antikor) 'in yönetimi inflamator septomları azaltan IRAWB14 (HA bağlanmasını tetikleyen antikor) ile tedavide hastalığı kötüleştirir. Kültüre edilmiş endotelial hücre hatlarında ve primer endotelial kültürlerdeki hücre hatları HA ekspresyonunu arttırmaktadır ve bakteriyel lipopolisakkaritler gibi TNF- α ve IL-1 β proinflamatuvar sitokinleri tarafından indüklenebilir. CD44 ile düşük molekül ağırlıklı HA'nın etkileşimi inflamasyonda güçlü regülatör sinyal olarak etki gösterir (111).

Lenfosit Homingi ve Lökosit Ekstravazasyonunda CD44

Lenfosit homingi, kan lenfositlerinin lenfoid organlara dönüşümünü içeren bir süreçtir. Kan dolaşımındaki lökositler çeşitli dokulara ekstravazasyonunda bulunabilirler. Lökositlerin ekstravazasyonu birçok basamaktan oluşmaktadır. Lökositlerin vasküler duvar ile etkileşime başladıkları sıradaki ilk olay roling olarak bilinmektedir. Bu etkileşimi roling hücrelerin damar sistemi duvarlarına adezyonu ve takip eden ekstravazasyon izler. Birçok durumda primer adezyon olayı, selektinler ve onların karbohidrat ligandlarıyla bağımlıdır. İntegrin ailesi üyeleri sekonder

adezyon olaylarından sorumludur. Bazı durumlarda CD44 lökosit ekstravazasyonunda da rol oynamaktadır. CD44'ler ve ligandı olan HA endotelial yüzeylerdeki lökosit rolü ile ilişkilidir. CD44 spesifik antikolar KM201, KM81 yada aşırı HA ile yarışma rolü egale ederler.

Bu veriler göstermektedir ki, CD44 homing reseptörü değildir fakat bir şekilde homing içinde rolü vardır. Ayrıca CD44 lenfositlerin ekstravazasyonu ve hareketliliğinde bir rol oynamaktadır (114).

2.5.6.6. RHAMM

RHAMM (receptor for hyaluronic acid-mediated motility), HA ile bağlanmaktadır ve hyaladherinler olarak adlandırılan bir heterojen protein grubuna aittir. Hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve çekirdekte bulunan bir HA reseptörüdür ve farklı hücre tipleri tarafından eksprese edilmektedir. RHAMM, izorforma bağlı olarak hücre içi sinyal iletilmesinin ve hücre iskeletinin düzenlenmesi ve migrasyona aracılık eden HA'ya katılmaktadır. RHAMM ile HA etkileşimi birçok hücre sinyal yolağını tetiklemektedir. Bunlar; protein kinaz C, fokal adezyon kinaz (FAK), MAP kinazlar, nükleer faktör- κ B, RAS, fosfotidilinositolkinaz (PI3K), tirozin kinazlar ve hücre iskelet komponentleridir.

RHAMM hücre motilitesinde rol oynamaktadır. Bazı çalışmalarda TGF- β uyarımlı fibroblastlar, düz kas hücreleri, makrofajların ve ras-transforme olmuş fibroblastların lokomasyonunda RHAMM'ın rolü gösterilmiştir. Hücre migrasyonuna bağlı olarak RHAMM'ın, bir protein tirozin fosforilasyon yolağı aracılığıyla fokal adezyonları düzenlediği bulunmuştur. RHAMM'ın 2 büyük izoformundan;

1. *Hücre yüzey RHAMM'ı*; HA bağlı mekanizma tarafından birçok hücre tiplerinin invazyonu ve motilitesinin devamlılığında rol oynamaktadır.

2. *RHAMM'ın intraselüler varyantı (HABP)*; sentrozomda lokalize olmaktadır ve dynein ile çapraz bağlanarak birleşmesi aracılığıyla hücre kontrolü ve mitotik iğ formasyonu ve bütünlüğünü modüle etmektedir. RHAMM'ın aktin ve mikrotübül hücre iskelet elementleriyle de ilişkisi bulunduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (68).

RHAMM formları

En büyük intraselüler RHAMM proteini, 85 kDa (insanda) ve 95 kDa (murinde) kodlayan yapısal olarak eksprese edilen ve RHAMM mRNA transkripti olan RHAMM v5 olarak tanımlanmıştır (115).

v5 bir bütün uzunlukta translate olmaktadır, birçok dokuda bulunmaktadır ve mRNA transkripti eksprese etmektedir. Uzun formlu mRNA transkripti v4 kodlar. v4 transkripti hücre tabakalaştıktan sonra eksprese edilmektedir ve küçüktür. Bununla birlikte v4 proteini, v5 proteininin proteolizisi veya v5 mRNA transkripti içinde bulunan internal başlama kodonlarının kullanımı gibi birçok mekanizma tarafından üretilmektedir (115, 116).

Rhamm formlarının subselüler, selüler doku dağılımı

Subselüler dağılımı

Yapılan çalışmalarda, RHAMM'ın hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve nükleusda ortaya çıktığı rapor edilmiştir (117). Biyolojik olarak aktif v4 formu, podozomlar gibi dinamik subselüler yapılarda lokalize olmaktadır. Zıt olarak v5 perinükleolar bölgede ortaya çıkmaktadır. Scanning elektron mikroskobu genişleyen mikrovillusla lokalize olduğunu göstermiştir fakat moleküler yapısı henüz bilinmemektedir. RHAMM'ın hücre yüzey formunun ekspresyonu hücre tabakalaşmasını takiben ekspresyonunda geçiş olarak değişmektedir ve hücre-hücre temasının artışı yavaş yavaş kaybolmaktadır. HA gibi moleküllerin eklenmesiyle hücre yüzeyinde RHAMM'ın ortaya çıkışı ilerlemektedir. Hücre içi RHAMM depolanmaktadır ve hücre yüzeyinde hedefleme için hazır durumda beklemektedir (115).

Hücre yüzey RHAMM'ı hastalıkta daha fazla eksprese edilmektedir ve dinamik olarak ortaya çıkmaktadır. RHAMM'ın splayz formlarının birçoğu transforme hücrelerde veya kanser biyopsilerinde bulunmuştur (118).

Hücre doku dağılımı

RHAMM formları birçok memeli hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. Bunlar fibroblastlar, düz kas hücreleri, endotelial hücreler, makrofajlar, immatür

timositler, B hücre türevleri, kemik iliği stromal hücreleri, keratinositler, sperm, astrositler, astrositomazlar, merkezi sinir hücreleri, mikroglial hücreler, sprouting olfaktör sinir hücreleri, akciğer adenokarsinoma, malignant akciğer epitel hücrelerdir (115, 119).

RHAMM'ın fizyolojik rolleri

RHAMM'ın birçok formunun hastalıkta aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir ve v5 formu birçok yetişkin homeostatik dokuda eksprese edildiği bilinmektedir. Bundan dolayı daha kısa RHAMM formları normal dokuda hasara yanıt olarak geçici olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. Örn; bleomycin uyarımlı akciğer hasarı veya derinin eksizyonel hasarı. Sıçan deri eksizyonel yara'larda RHAMM v4 hasardan sonra hızlı bir şekilde eksprese edilmektedir fakat 24 saat sonra kaybolmaktadır. RHAMM keratinositlerde, makrofajlarda, göç eden fibroblastlarda artmıştır.

Bu gözlemlere bağlı olarak keratinositlerde transgenik ekspresyonu v4'ün bir fonksiyon baskılayıcı mutant formu MEK1 ile kompleks oluşturma veya erk1 ile bağlanması olmamaktadır. Ekr1'in aktivasyonunu azaltmaktadır ve eksizyonel yara iyileşmesi sırasında değişmektedir. Yaranın tekrar epitelizasyonu ve kontraksiyonu sınırlanmaktadır. RHAMM'ın bu etkileri (yara iyileşmesinde) pleiotropik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yine hasar gören kemirici derisine RHAMM peptidlerinin uygulanması kontraksiyonunu azalttığı için pleiotropik olduğu görülmektedir. Ama skar formasyonunda bir azalmayla sonuçlanan kollajen 3 sentezini inhibe etmektedir. Bu etkilerin bazıları, yara bölgesinde fibroblast ve makrofaj migrasyonunun azalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Yaralanma, kronik inflamasyon ve hücre transformasyonuna takiben RHAMM'ın güçlü up-regülasyonunu, bu hyaledherinlerin ekspresyonunun kontrolünde onkogenlerin veya büyüme faktörlerinin olduğunu göstermektedir (115).

Hücre modeli

RHAMM'ın aktif formları, hasarlanmaya takiben dokuda hücre aktivasyon evrelerinin regülasyonuna katılmaktadır. Dokularda hücreler genellikle

farklılaşmanın bir homeostatik durumunda devam etmektedir. Hücre dönüşümü ile düzenli aralıklarla kesilmektedir. Somatik mutasyon veya hasarlardan sonra hücreler aktive olmaktadır ve bu aktivasyon normal olarak düzenli bir şekilde kontrol edilmektedir. Örneğin, doku hasarına takiben trombositlerin lokal adheransı ve plazmaya girişi bir sitokin dalgasıyla sonuçlanmaktadır ve hücreler bu faktörlere hemen ve maximum şekilde yanıt verirler. Aktifleşmiş RHAMM ve hücre yüzey RHAMM formlarının ekspresyonu geçici hasar durumuyla karakterize olan podozomların görülmesiyle sonuçlanmaktadır. Erk1 kinazın düzenlenmiş aktivasyonu bazı MMP'ların ekspresyonunu sağlamaktadır ve büyüme faktörlerine yanıt verme kapasitesi sınırlıdır. Bu durum hücre siklusu, hücre motilitesi ve matriks remodelinginin başlamasına izin vermektedir (115).

Lenfatik vasküler endotelial hyaluronan reseptör (LYVE-1), damar endotelinde eksprese edilen HA bağlayıcı proteindir ve HA bağlayıcı domain içeren diğer bağlayıcı proteinler ve CD44'le ilişkilidir. LYVE-1, cDNA ekstraselüler alanında lokalize olan tek bir bağlayıcı modül ile 322 integral membran glikoproteinini kodlamaktadır. LYVE-1 CD44'le %43 oranda benzerlik gösterir. LYVE-1, insan, sıçan ve farenin lenfatik endoteliumunda aşırı derecede eksprese edilmektedir. Ayrıca, dalak ve akciğerin sinozoidal endoteliumunda ve aktive olmuş doku makrofajlarının farklı populasyonlarında ekspre edilmektedir. LYVE-1 damar vaskülarizasyonunda CD44-HA etkileşimlerini regüle etmektedir (68).

Layilin, HA reseptörü olarak karakterize edilmiştir ve hücre migrasyonu ve morfolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar Layilin'nin hücre adezyonuna aracılık etme kapasitesi olan fonksiyonel bir HA reseptörü olduğunu göstermiştir. Layilin diğer bilinen HA reseptörleriyle aynı homolojiye sahip değildir. Layilin bağlayıcı bir domain içermez, ortak bir HA bağlayıcı modül birçok ECM proteinleri ve hücre-yüzey reseptörlerinde bulunmuştur (68).

Ekstraselüler Hyaledherinler

Ekstraselüler hyaledherinler 'hyalektinler' olarak tanımlanan bir gen ailesinden oluşan ve agrekan, nörokan ve brevikan içeren hyaluronan bağlayıcı

proteoglikan grubudur. Bu proteoglikanlar ECM'nin komponentidir ve her proteoglikan merkezi sinir sisteminde nörokan ve brevikan, kıkırdakta agrekan, farklı yumuşak dokularda bulunan versikan ile karakteristik dağılım göstermektedir. HA bazı matriks hyaledherinlerle etkileşimiyle ECM yapısını stabilize eder. Temel kıkırdak proteoglikan molekülü olan agrekan HA ile, HA bağlayıcı domain (link module) aracılığıyla güçlü bir şekilde etkileşim göstermektedir. HA zinciriyle proteoglikanların bağlanması bağlayıcı-protein tarafından sağlanmaktadır. ECM içerisinde proteoglikanların korunması HA ile etkileşimine bağlıdır (120).

2.5.6.7. VERSİKAN

Versikan protein yapısı

Versikan HA'nın hücre dışı reseptörlerindedir. Çeşitli versikan ana proteinleri tanımlanmıştır. İnsanlarda 4 varyant formu bulunmaktadır (v0, v1, v2 ve v3). Tüm versikan splayz proteinleri immunoglobulin benzeri çemberi olan link protein benzeri bir yapı, peşpeşe dizilmiş n-terminal globüler domaini ve 2 EGF benzeri element seti (bir c-tip lektin domaini ve c-terminal globüler domainde komplement düzenleyici protein) içermektedir. Versikan splayz varyantları arasındaki farklılıklar ana proteinlerin merkez bölgelerindedir. Versikan v0 da, 2 GAG taşıyıcı segment, (GAG-a ve GAG-b) vardır, bu segmentleride 17-23 potansiyel kondroitin sülfat (CS)/dermatan sülfat (DS) bağlayıcı bölgelerde taşır. Daha küçük olan v1 ve v2 izoformları GAG-a yada GAG-b domainlerinden yoksundurlar ve 12-15 ve 5-18 potansiyel GAG bağlayıcı bölgeleri vardır. Versikan v3'de hiçbir GAG taşıyıcı molekül yoktur. Karbohidrat subsititasyonlarının sayısı, boyutu ve kompozisyonu sadece GAG zincir bağlayan bölgelerin uzunluğundan etkilenmez, hücre ve doku tipi ve lokasyon gibi g1 ve g3 domainlerinden de etkilenmektedir (121) (Şekil 2.5.6.7).

Versikanın biyosentezinin düzenlenmesi

Farklı hücre içi sinyal ileti yolları farklı hücre ve dokularda versikanın biyosentezini düzenlemektedir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet Derived

Growth Factor, PDGF) ve anjiyotensin-2 reseptör tirozin kinaz bağımlı mekanizmaları takiben düz kas hücreleri tarafından GAG zincirinin büyümesini (uzaması) ve versikanın kor-proteininin (çekirdek) ekspresyonunu stimule etmektedir (121). Rahmani ve ark (122), fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)-protein kinaz B (PKB/Akt) sinyallenmenin düz kas hücrelerinde versikan transkripsiyonun regülasyonunu sağladığı göstermişlerdir. Protein kinaz B, düz kas hücrelerinde PI3K ilişkili gen düzenlenmesinin majör bir down-stream efektörüdür ve FOXO (forkhead box transcription factor class O), cAMP yanıtı element bağlayıcı protein (CREB) nüklear faktör-kB (NF-kB) ve p53 dahil birçok transkripsiyon faktörlerini kontrol etmektedir.

Versikan geni aktif WNT proteini ile stimule edilen insan embriyonik karsinoma hücrelerinde kanonikal Wingless (Wnt) sinyallenmesinin hedef geni olarak tanımlanmıştır (123). Frizzled ve LRP5/6 ko-reseptörleri için gerekli olan Wnt ligandı β -katenin yıkım kompleksinin aktivitesini inhibe etmektedir. APC, axin ve GSK-3b dahil kompleks proteinler β -kateninin fosforillenmesini sağlayarak, proteozonlar tarafından yıkımını engellenmiş olmaktadır. Wnt- β katenin sinyallenmesi normal ve hastalık durumlarında versikan ekspresyonuna aracılık etmektedir (122).

Stromada artan versikanın daha yüksek tümör rekürans oranı ve daha da ilerlemiş hastalık durumuyla ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (124). Wnt aile üyelerinin, TGF- β süperailisine ait kemik morfogenezik proteinler ve PDGF reseptör dahil birçok geni düzenlediği gösterilmiştir (125). Wnt (122), TGF- β 1 ve PDGF (126) sinyallenmesinin versikan geninin ekspresyonunu regüle eden mediyatörler arasında olduğu gösterilmiştir. Bu kanıt SHH (sonic hedgehog) sinyallenme ve versikan ekspresyonunun tümör gelişiminde ortak bir fonksiyonunun olduğunu desteklemektedir (125).

Versikanın biyolojik rolü

Versikan tüm vücutta eksprese edilen ECM'nin ana komponentlerinden biridir. ECM'ye, gevşek ve hidrate olmuş matris yaratmak için gerekli olan

higroskopik özellikler kazandırır, bu matriks gelişim ve hastalıkta anahtar olayları desteklemek için gereklidir. Hücrelerin ve moleküllerin direkt yada indirekt etkileşimleri yoluyla, versikan hücre adezyonu ve sağkalımı, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu ve ECM assembly (toplanması) regüle eder (126). Versikan kendisine bağlanan partnerler ile n ve c terminal globüler bölgeler ve merkezi GAG bağlayan bölgesi aracılığıyla etkileşir. ECM komponentlerine *hyaluronan*, *tip 1 kollajen*, *tanaskin r*, *fibolin1 ve 2*, *fibrilin 1*, *fibronektin*, *p ve l selektin* ve *kemokinler* ile bağlanır. Versikan hücre yüzey proteinlerinden *CD44*, *integrin b1*, *egf reseptörü* ve *pselektin glikoprotein ligand 1*'ede bağlanmaktadır (127). Bu çoklu bağlanma etkileşimleri hücre ve doku davranışlarında önemli rol oynamaktadır.

Versikan kan damarlarında fazla miktarda bulunan proteoglikandır. Onun ekspresyonu birçok kardiyovasküler hastalıklarda modüle olmaktadır (126). Belirgin olarak abdominal aortik anorismis gelişim sırasında degrede olmaktadır. Belirgin olarak arteriyal SMC proliferasyonu ve migrasyonu için gerekli olan periselüler matriksi oluşturan hyaluronan ve diğer ECM komponentleri ile etkileşimi aracılığıyla ve erken lezyonlarda toplanmaktadır. Arteriyal düz kas hücreleriyle versikanın ekspresyonu, inflammatör bölgelerde salınan TGF- β , PDGF, EGF, bFGF ve interlökin 1 β gibi birçok büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir (126). Versikan'nın trombozis, inflamasyon ve lipit akümüülasyonunda rolleri olduğu bilinmektedir (125, 126).

Versikan subendotelyal tabakada onların akümüülasyonunu sağlayan LDL (düşük yoğunluklu lipoproteinler) ile bağlanabilmektedir. Köpük (foam) hücrelerinin yeterli formasyonu, makrofajlar ve arteriyal düz kas hücreleri tarafından aşırı internalizasyonu ve onların yapısal modifikasyonlarını kolaylaştırmaktadır. Kondroitin sülfat/dermatan sülfat (CS/DS) zincirlerinin uzunluğu ve sülfasyonu LDL bağlanması ve oksidasyon için önemlidir (124, 126). CS/DS'nin sülfasyon şeklinde önemli değişimleri arterosklerozisin gelişiminde gösterilmiştir (128). Azalmış sülfasyonunun ortaya çıkması sınırlı antitrombin aktivitesi ve osmotik regülasyonunun bozulması ile trombozisin lezyonları predispoze etmektedir. Versikan ECM ile inflammatör hücrelerin CD44 bağımlı etkileşimlerine stabilize eden erken arteriosklerotik lezyonlarda inflammatör hücrelerinin toplanmasını

etkilemektedir (124). G3 domaini makrofaj agregasyonunda gösterilmiştir ve PSGL-1 ile bağlandığı gösterilmiştir. Bu aktivite arterosklerozisin gelişen lezyonlarında inflamatuvar fazları sırasında lökosit akümülyasyonunun ilerletilmesinde önemlidir. Kemokinlerin yanısıra P ve L selektin gibi inflamatuvar lökositlerin yüzeyinde bulunan diğer adezyon molekülleriyle CS/DS zincirlerinde aşırı sülfatlanmış dizilimlerin etkileşimi inflamatuvar kemokinlerin varlığını etkilemektedir. İnflamatuvar hücreler için birçok bağlayıcı bölgeler sağlamaktadır (124).

Versikan ECM'nin toplanmasını etkilemektedir ve vasküler hastalıkta ECM remodelinginde önemli olan elastik lif oluşumunu kontrol etmektedir (126). Elastik lifler dokularda azalmasına rağmen versikan seviyeleri artmıştır. Versikan sentezinin inhibisyonu veya V3 izformunun aşırı ekspresyonu invivo ve invitro olarak elastik lif formasyonunu uyarmaktadır (125). Hücre yüzeyinde versikan, hyaluronan, CD44 suplomoleküler komplekslerinde glikolizlenmemiş V3 tarafından CS/DS ilişkili versikanın taşınımı veya değiştirilmesi elastik fibril toplanmasının formasyonu ve tropoelastinin aşırı ekspresyonu elastin bağlayıcı proteinin serbetleştirilmesinden sorumludur (124).

Versikanın abnormal ekspresyonu çeşitli kanser tiplerinin tümör stromasında gösterilmiştir. Bazı malign hücrelerin versikan üretmesine rağmen versikan aktifleşmiş stromal fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. Versikanın ekspresyonu kanser hücre yayılımı tümör büyümesi ve artan neoanjiyogenezis ile ilişkilidir (124). Tümör stromasında bulunan versikan onların GAG tipinde önemli post-translasyonel modifikasyonlarıyla tanımlanmıştır ve 6-sülfatlı CS yapısı tümör versikanında predominant GAG tipidir. İmmatür dokularda bulunan 6-sülfatlanmış CS yanında nöral krest hücrelerinin migratör yolları hücre adezyonu, migrasyonu akson büyümesi gibi bazı gelişimsel önemli olayları etkilemektedir (124).

Epitelyal-mezenşimal etkileşimler organ morfogenezisinin yanısıra kanser dahil birçok hastalığın oluşumu ve gelişiminde rol oynamaktadır. V1 izoformu konneksin proteinleri tarafından oluşturulan gap junction kanalları aracılığıyla hücreler arası iletişime artan NIH3T3 fibroblastlarında mezenşimal epitelyal geçişi uyarmaktadır. Gap junction'ı düzenlemesiyle versikanın kapasitesi kordineli fonksiyonlarda versikanın potansiyel bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Versikan V1

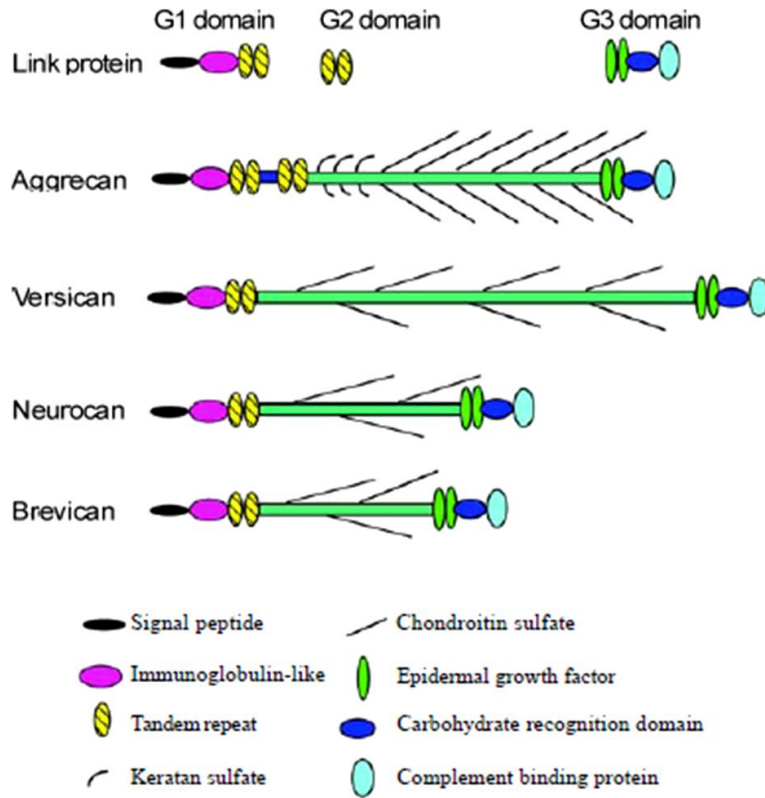
hücre proliferasyonunu stimule etmektedir, oysaki versikan V2 proliferasyonu inhibe etmektedir. Versikan V1 hücre siklus inhibitörü p27'nin kaybına bağlı olarak EGF reseptör ve ERK aktivasyon seviyelerinin artmasıyla proliferasyonu arttırmaktadır. Ayrıca V1 apoptotik rezistansın artışıyla hücre ölümünü inhibe etmektedir ama bir grup sitotoksik ajanlar ile hücrelerin duyarlılığına neden olmaktadır (125).

Soluble G3 domaini 3T3 fibroblastları ve endotelial hücreler dahil bazı hücre tiplerinin büyümesini arttırmaktadır. Bu etki EGF domaini gereklidir. EGF domainsiz G3 antiproliferatiftir. G3 domaini integrin- β 1'i bağlamaktadır. Fokal adezyon kinaz aktivasyonunu arttırmaktadır ve apoptozise karşı korumaktadır. G3 domainine benzer olarak soluble G1 domaini hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bunu da kısmen matriks ile hücrelerin adezyon direncinin azalmasıyla yapmaktadır. G3 domaini vasküler endotelial büyüme faktörü ve fibronektinin sekresyonu ve endotelial hücrelerin migrasyonunu arttırmaktadır (125). G3 domaini içeren V3 izoformu invitro olarak neoanjiyogenezis, migrasyon, aktivasyon üzerinde endotelial hücreler tarafından yeniden ekspre edilmektedir (125).

Melonama hücrelerinde V3 izoformunun retroviral aşırı ekspresyonu hücre büyümesini azalmaktadır ama hücre migrasyonu ve metastazını arttırmaktadır (129).

Merkezi ve periferik sinir sisteminde versikan glial hücreler tarafından ekspre edilmektedir ve hücre adezyonu, migrasyonu, rejenerasyonunun regülasyonunda gösterilmiştir. Diğer CS içeren proteoglikanlar arasında versikan CNS hasarını takiben up-regüle olmaktadır ve invitro olarak akson büyümesinde inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir (130). Bu yüzden bu moleküllerin artan ekspresyonu glial skarın serbest yapısına katılmaktadır.

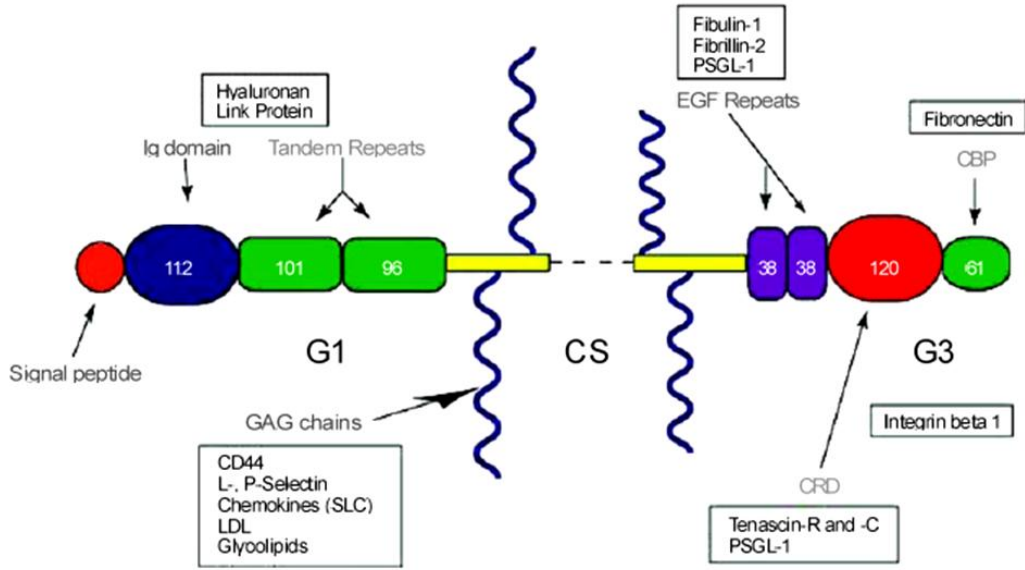
Versikan glial prekürsörlerinin migrasyonu ve nöronal farklılaşma/akson büyümesi için vital olabilir (130). Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki V1 nöronal farklılaşmayı uyarmaktadır ve akson büyümesini ilerletmektedir. Versikanın G3 domaini akson büyümesini düzenlemektedir ve hipokampal nöronlarının sinaptik transmisyonu EGF reseptörünü aktive etmektedir. Ancak, nöronal gelişimde ve rejenerasyonda versikanın katılımı incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (125).



Şekil 2.5.6.7: Versikan izoformunun yapısı. SP, sinyal peptid; Ig, immunoglobulin-like; TR, tandem repeat; EGF, epidermal büyüme faktörü; CS, kondroitin sülfat; CRD, karbohidrat tanıma bölgesi; CBP, tanımlayıcı binding protein (125).

Hyaluronanla versikan etkileşimi

Hücre yüzeyinde CD44 ile hyaluronan etkileşimi yoğun olarak çalışılmıştır (131). Hyaluronan-CD44 sinyallenmesi spesifik ara ürünlerin aktivasyonu aracılığıyla bazı yolları aktive etmektedir. Rho ve Rac1 GTPazlar aktiviteleri erbB2 trozin kinaz, aktin hücre iskeletinin yeterli düzeyde yeniden organizasyonu ile sonuçlanmaktadır (132). Hyaluronan ve CD44 etkileşiminin hücre adezyonu ve migrasyonunu etkilediği bilinmektedir (133). Versikan kültüre edilmiş fibroblastların periselüler matriksinde hyaluronan CD44 tenaskin ile kolokalize olduğu bulunmuştur. Epidermal keratinosit tümörlerinde hyaluronan, CD44, versikanın seviyeleri hastalığın agresifliğiyle koreledir (132). Versikanın ile hyaluronanın bağlanması bilinmektedir ve onun ardışık sıralarıyla ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.5.6.8).



Şekil 2.5.6.8: Versikanın diğer moleküllerle etkileşirken yapısı ve konumunun şekilde gösterimi (132).

Hyaluronan ile lektikanların birleşimi bağlayıcı proteinler ile aracılık edilmektedir. Bağlayıcı protein ve hyaluronan versikanın G1 domaini bağlanmaktadır (134). Farklı versikan yapılarının kullanılmasıyla araştırmacılar, HABR domainlerinin invitro bağlanma için yeterli ve gerekli olduğunu göstermişlerdir. Fakat bağlanma affinitesi Ig-like benzeri domaini içerdiği zaman artmaktadır. 2 HABR domainini içeren bağlayıcı protein versikanın homolog yapılarıyla etkileşmektedir. Bu etkileşme, hyaluronan ile versikan bağlanmasını etkilemez. Versikan G1 domaininin aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu arttırmaktadır ve farklı hücre tiplerinde hücre adezyonunu azaltmaktadır. Versikan hyaluronandan bağımsız olarak GAG zincirleri aracılığıyla CD44'le direk etkileşmektedir (132).

CD44 ile versikan'nın etkileşimi

Versikanın GAG zincirleri CD44 ile bağlanmaktadır (şekil 2.5.6.8) ve versikan, hyaluronan ve GAG zincirleri CD44'ün bağlayıcı modülü ile bağlanmaktadır. Versikan GAG aşırı sülfatlaşması L ve P selektin ile bağlanması

için önemlidir. GAG modifikasyonlarının CD44 bağlanması önemli olduğu görülmüştür (135).

Versikan kültüre edilmiş fibroblastların periselüler matriksinde CD44 ve tenaskin hyaluronan ile kolokalizdir (132). CD44 hem hyaluronan hemde versikanla bağlanmasıyla bu 3 molekül kompleks oluşturmaktadır. Versikan ve CD44 hyaluronidaz tedavisine takiben bağlanmaktadır. Kompleks birleşimi hyaluronanın varlığına bağlı değildir (132, 135). GAG zincirleri herhangi bir versikan kor-proteinleri katılmaksızın proteinleri bağlayabilmektedir.

2.6. İnvazyon

Başarılı bir implantasyon için embriyonun adezyonundan sonra invazyon gerçekleşmelidir. Kontrollü proteolitik işlemlerle gerçekleşen blastokistin stromaya gömülmesi sürecine invazyon denir. Bunun için gerçekleşmesi gereken ilk olay bazal membranın yıkılmasıdır. Daha sonra trofoblast stromal alana geçerek maternal kan damarlarına penetre olmaktadır. Tüm bunların gerçekleşmesi için proteinazlara (Matriks metalloproteinazlar ve plazminojen aktivatörleri) ihtiyaç vardır (136).

2.6.1. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP) yaklaşık 28 enzimden oluşan, fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan ekstrasellüler proteazlardır. Matriks metalloproteinazlar, lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Pek çok MMP embriyogenez aşamasında yaygın olarak eksprese edilir. Yetişkinlerde ise plasentada, endometriyumda, meme bezlerinin involüsyonu esnasında ve inflamasyonda hızla eksprese edilirler. Doku gelişimi ve farklılaşmasında, yeniden şekillenmede, ovulasyon, hücre göçü, angiogenez ile tam mekanizmaları bilinmese de birçok hastalığın patolojisinde MMP'ler önemli rol oynamaktadır (137).

Bu proteinler 3 grupta toplanır (138).

1. İntertisyal kollejenaz: (Örnek, MMP1 ve MMP8) İnvaziv insan sitotrofoblastları ilk aşamada birçok MMP'leri sentezler. Bu MMP'lerden bazıları gebeliğin sonraki aşamalarında invaziv olmayan hücrelerde görülür.

2. Stromelisinler: ((Örnek; MMP-2, MMP-10 ve MMP-11) Fibronektin, laminin, kollajen IV, V, VII ve proteoglikanların yıkımına neden olurlar.

3. Jelatinazlar: (Örnek; MMP-2 ve MMP-9) Kollajen IV'ü ve dejenere kollajeni sindirirler. Yapılan çalışmalara göre MMP-2 ve MMP-9 mRNA'ları ekstravillüs trofoblast hücreleri tarafından ekspre edilir ve trofoblast invazyonuna aracılık eder.

2.6.2. Plazminojen Aktivatörleri

Plazminojenin plazmine dönüşümünü sağlarlar ve urokinaz tip (uPA) olarak adlandırılırlar.

Daha önce yapılan çalışmalarda insan trofoblast hücrelerinin uPA reseptörlerini eksprese ettikleri görülmüştür (139). uPA reseptörlerinin polarize ekspresyonu, göç eden ekstravillüs trofoblast hücrelerinin yakınlarında lokalize olmuştur. Bu nedenle bu reseptörler trofoblast migrasyonuna direkt katılabilirler.

Bu enzimler ilk olarak proenzimler olarak salgılanırlar ve sekonder olarak aktive edilirler. Aktive edilmiş enzimlerin fonksiyonu metalloproteinazların doku inhibitörleri olarak isimlendirilen lokal inhibitörler tarafından kontrol edilir (136).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan deney hayvanları, histokimyasal ve immunohistokimyasal boyama için gerekli malzemeler ve sarf malzemeleri Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2008/111 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik kurulu'nun 20 Ekim 2008 tarih, 111 sayı ve 88/2008 protokol numaralı onayı ile yapıldı.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarında yetiştirilen seksüel olgunluğa erişmiş ağırlıkları 200-230 gr. arasında değişen 36 adet Wistar albino dişi sıçanlar; 25 °C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak, stres ve gürültüden izole bir şekilde deneye alındılar. Çalışma 6 grup halinde yürütüldü. Sıçanların menstrüel siklus dönemleri saat 15.00'de vajinal smear yöntemiyle belirlendi ve farklı östroz siklus dönemlerinde (Proöstroz, östroz ve diöstroz) kontrol grubu oluşturuldu.

Deney grupları sıçanların östroz durumları belirlendi. Östruzda olan dişi sıçanlar bir gece uygun şartlarda kafeste çiftleşmeye bırakıldılar. Ertesi gün vajinal plak görülenler gebe olarak kabul edilip, ayrı kafeslere alındı. Ayrı kafeslere alındıkları gün E:0 olarak kabul edildi. Embriyonik 4., 5. ve 6. günlerde sıçanlar sakrifiye edildi.

Deney Grubu

Grup 1: 4. Gün (n:6)

Grup 2: 5. Gün (n:6)

Grup 3: 6 Gün (n:6)

Kontrol Grubu

Grup 1: Proöstroz (n:6)

Grup 2: Östroz (n:6)

Grup 3: Diöstroz (n:6)

Sakrifiye edilen sıçanların implantasyon bölgeleri makroskopik olarak belirlendikten sonra ışık mikroskop düzeyinde histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmek üzere uterus doku örnekleri alındı.

Uygulamalar sonunda, alınan uterus doku örnekleri % 10 formalin ile fikse edildikten sonra, rutin ışık mikroskobu parafin doku takibi yöntemi ile takip edilerek parafine gömüldü. 5 mikrometrelilik alınacak kesitler Has2, CD44, CD44s, RHAMM ve Versican primer antikoları ile indirek immunohistokimya yöntemi ile değerlendirildi. Kontrol ve çiftleştirilen sıçanlardan elde edilen uterus dokuları karşılaştırılarak bu faktörlerin implantasyon üzerindeki hücresel etkileri değerlendirildi.

IŞIK MİKROSKOBİK GEREÇ VE YÖNTEMİ

Parafin Takibi

1.	Fiksasyon:%10 Formalin	24-48 saat
2.	Akarsuda yıkama	12-16 saat
3.	% 60 Etil Alkol	30 dk
4.	% 70 Etil Alkol	30 dk
5.	% 80 Etil Alkol	30 dk
6.	% 95 Etil Alkol	30 dk
7.	% 100 Etil Alkol I'de	1 saat
8.	% 100 Etil Alkol II'de	1 saat
9.	Ksilen-Alkol'de	30 dk
10.	Ksilen I'de	50 dk
11.	Ksilen II'de	50 dk
12.	Ksilen-Parafinde	30 dk
13.	Parafin I'de	1 saat
14.	Parafin II'de	1 saat

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek blok haline getirildi. Işık mikroskopunda incelenmek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5µm'lik seri kesitler

alındı. Preparatların ilk bölümü Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immunohistokimya boyaması yapıldı.

Histokimyasal boyama için ayrılan preparatlar 60 °C'lik etüvde 1 gece deparafinize edildi.

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

1.	Deparafinizasyon (60°C etüvde)	1 saat veya 1 gece
2.	Ksilen I	30 dk
3.	Ksilen II	30 dk
4.	%95 Alkol	2 dk
5.	%80 Alkol	2 dk
6.	%70 Alkol	2 dk
7.	%60 Alkol	2 dk
8.	Musluk suyu	5 dk
9.	Hematoksilen	3 dk
10.	Musluk suyu ile yıkama	5 dk
11.	Asit-alkol	1 sn
12.	Musluk suyu	5 dk
13.	Eozin	1 dk
14.	Musluk suyu ile yıkama	5 dk
15.	%95 Alkol	1 dk
16.	%80 Alkol	1 dk
17.	Ksilen	30-60 dk
18.	Entellan ile kapama	

İndirek İmmunohistokimya Yöntemi

Kullanılan Malzemeler:

Ksilen

Alkol

PBS (Fosfat Buffer solüsyonu)

Tripsin (Zymed, 00-3008, CA/USA)

Dakopen (Dako, S2002, Glostrup, Denmark)

% 3'lük Hidrojen Peroksidaz

Bloking solüsyonu

Primer Antikorlar;

Has2 (BA3081, Rabbit Anti-HAS2, Boster Bio-tecnology Co Ltd, Chine)

CD44 (BA0321, , Rabbit Anti-CD44(HCAM),Boster Bio-tecnology Co Ltd,Chine)

CD44s (BA3382, Rabbit Anti-CD44s, Boster Bio-tecnology Co Ltd, Chine)

RHAMM (BA3380, Rabbit Anti-RHAMM, Boster Bio-tecnology Co Ltd, Chine)

Versican (BA2593, Rabbit Anti- Versikan, Boster Bio-tecnology Co Ltd, Chine)

Sekonder Antikor Kit (Invitrogen anti-mouse, anti-rabbit, Histostain Plus Bulk Kit -85-9043, Camarillo, CA, 93012)

DAB (Diaminobenzidin kromojen, DABC-004, DABS-125, Spring Bioscience Fremont / CA)

Mayers Hematoksilen (Richord-Allan Scientific, CA/USA)

Entellan

Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

1. Ksilen 30dk
2. Ksilen 30dk
3. % 95 alkol 2dk
4. %80 alkol 2dk
5. %70 alkol 2dk
6. %60 alkol 2dk
7. Distile su 5dk

8. Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, dakopenle (Dako, S 2002, Glostrup/Denmark) çevresine daire çizildi. Bu işlem dokuların kurumasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı.

9. Tripsin (10 dk. 37 °C Etüv'de)
10. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
11. %3'lük Hidrojen Peroksidad' da 5 dakika tutuldu.
12. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
13. Bloking solüsyonu damlatıldı, 1saat bekletildi.

14. Primer Antikor damlatıldı, bir gece +4 °C'de nemli ve karanlık ortamda bekletildi. (Bizim çalışmamızda primer olarak anti-HAS2, anti-CD44, anti-CD44s, anti-RHAMM ve anti-Versikan kullanıldı.)

15. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
16. Biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı. (30dk)
17. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
18. Enzimle işaretli (peroksidad) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin)

uygulandı. (30 dk.)

19. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
20. DAB boyaması yapıldı. (3 dk.)
21. Distile su ile yıkandı.
22. Mayers hematoksilen (1-2 dk.)
23. Distile su ile yıkandı.
24. %80 etil alkol 1 dk.
25. %90 etil alkol 1 dk.
26. Ksilen 30 dk.
27. Entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan preparatlar, boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++), orta (++) ve zayıf (+), belirsiz-var yok (\pm) diye tanımlandı. Gruplardan elde edilen uterus örneklerinin primer antikorlarla elde edilen immunoreaktivite sonuçları H skor değerleri hesaplanarak Mann Whitney istatistik testiyle karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Elektron Mikroskop ile İnce Yapı Değerlendirilmesi

Elektron mikroskop takibi için elde edilen 1 mm^3 lük uterus doku örnekleri fosfat tampon solüsyonu ile hazırlanmış % 2.5 gluteraldehit solüsyonu ile tespit edildi. Birinci tespiti takiben % 1 Osmiyum tetroksit solüsyonu ile tespit edildi. Alkol serilerinden geçirildikten sonra propilen oksit uygulanan dokular araldit karışımına gömüldü. Polimerizasyon için 48 saat 60°C 'lik etüvde bırakılan araldit bloklardan Leica ultramikrotom ile yarı ince kesitler alındı. Yarı ince kesitler ışık mikroskopunda incelendi ve elektron mikroskop (EM) incelemesi için uygun alanlar belirlendi. Cam bıçak ile fazla araldit $1 \mu\text{m}$ kalınlığında kesitler alınarak uzaklaştırıldı. İstenen bölgenin etrafındaki dört kenar trimlenerek kesit yüzü oluşturuldu. Toluidin mavisi-Azür II birleşik boyası ile incelenen yarı ince kesitler ışık mikroskop ile değerlendirildi.

İnce kesit almak için Leica Ultramikrotomun kontrol paneli açıldı, kesit kalınlığı ve aralığı ayarlandı. 140 nm kalınlığında alınan seri kesitlerin havuza düşmeleri sağlandı. Havuzdaki kesitler kloroforma batırılmış fırça ile kloroform buharına tutularak düzeltildi. Kesitler, penset ile tutularak gridin mat yüzüne alındı. Kurutma kağıdının üzerinde kurutulan gridler kutularda saklandı. İnce kesitler Leica ultramikrotom ile alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ZEISS Elektron mikroskobu ile değerlendirildiler.

Elektron Mikroskop ile İnceleme için Tespit Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
%2,5'LÜK GLUTERALDEHİT SOLÜSYONU İLE TESPİT	A Solüsyonu : 3,628 gram KH ₂ PO ₄ , 400 ml distile su . B Solüsyonu : 4,744 gram Na ₂ HPO ₄ , 400 ml distile su A solüsyonundan 20 ml, B solüsyonundan 80 ml, 92 ml A+B solüsyonu, 8 ml % 25'lik gluteraldehit solüsyonu	+ 4°C, 4 SAAT
YIKAMA	Fosfat tampon solüsyonu	3-4 KEZ
%1'LİK OSMİYUM TETROKSİT İLE TESPİT	Kahverengi şişe derişik sülfirik asit içinde bekletildi, bol akarsu ile yıkılarak distile sudan geçirildi. 0,1 gr. osmiyum tetroksit ampulü 1 saat sülfirik asit içerisinde bekletilip akarsu altında yıkandı ve distile sudan geçirildi. 5 ml soğuk distile su içine atılarak kırılması sağlandı. Eşit miktarda A+B solüsyonu ile stok osmiyum tetroksit solüsyonundan alınarak %1'lik Osmiyum tetroksit solüsyonu hazırlandı.	+ 4°C, 60 -90 DAKİKA
YIKAMA	Fosfat tampon solüsyonu	3-4 KEZ

Elektron Mikroskop Takip Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEHİDRATASYON	% 50, % 60, % 70, % 80, % 90, % 96, % 100 (2 kez) etil alkol	10 DAKİKA
	% 100 etil alkol : propilen oksit 1:1 oranında	30 DAKİKA
	PROPİLEN OKSİT	30 DAKİKA
İN FİLTRASYON	ARALDİT KARIŞIMI Araldite CY 212 2,5 ml, DDSA 2,5 ml, BDMA 0,2 ml	
	PROPİLEN OKSİT : KARIŞIM 3:1	1 SAAT
	PROPİLEN OKSİT : KARIŞIM 1:1	1 SAAT
	PROPİLEN OKSİT : KARIŞIM 1:3	1 GECE
GÖMME	ARALDİT KARIŞIMINA DMP-30 EKLENDİ Grup adı yazılı kağıtlar ve dokular gömme kapsüllerine yerleştirildi. Kapsülün içindeki hava kabarcığı iğne ile çıkarıldı.	
POLİMERİZASYON		60° C'lik ETÜVDE 48 SAAT

4. BULGULAR

4.1. Histokimyasal Bulgular

Yapılan vaginal yayma sonucu parlak renkte ve mukusun nadiren izlendiği, intermedier hücrelerin predominant ve parabazal hücrelerin nadir olduğu, lökositlerin görülmediği preparatlar **Proöstroz grubu (Grup 1)** olarak tanımlandı. Bu gruba ait sıçan uterusundan transvers alınan 5 mikronluk kesitlerde, Hematoksilen-Eozin boyasıyla yapılan preparatlar incelendiğinde 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Uterusu en dıştan saran perimetriyum tabakası, ortada myometriyum tabakası ve en içte endometriyum tabakası gözlendi. Ayrıca perimetriyumun devamı olarak uterusu giren bütün damarların bir araya geldiği mezometriyal kısım ayırt edildi. Perimetriyum serozayı bağ dokusu tarafından desteklenen tek sıralı mezotelyal hücrelerin oluşturduğu gözlendi. Bu tabakanın bağ dokusu hücrelerinden ve kan damarlarından zengin olduğu görüldü. Myometriyumun ise en kalın tabaka olup, düz kas hücrelerinden oluştuğu ve kas liflerinin bağ dokusu tarafından demetler halinde ayrıldığı gözlendi. Bu özel hücreler mekik şeklinde ve uzundu. Hücrelerin tam ortasında çekirdek bulunmaktaydı. Endometriyum, uterusun lümenini kaplayarak myometriyum tabakasına sıkıca yapışmış mukoza tabakası olarak ayırt edilmekteydi. Endometriyum tabakasında çeşitli uterus bezleri, ince bir lamina propriya ve endometriyal stroma gözlendi. Yüzey epiteli basit prizmatik epitelden oluşmaktaydı ve epiteldeki bazı hücreler silyalara sahipti. Uterus bezleri yüzey epitelinin altında stroma boyunca uzanmaktaydı. Stromal hücreler ise düzensiz yerleşim göstermekteydi. Bu hücrelerin, epitelin altında retiküler liflerin oluşturduğu kafesin arasında yoğunlaşarak bazal laminayı oluşturdukları gözlendi. Ayrıca stromada net ayırt edilmemekle birlikte, lenfositler, granüler lökositler ve makrofajlar gözlendi. Endometriyumun kan damarı bakımından oldukça zengin olduğu gözlendi. Proöstroz döneminde uterusu, endometriyal boyutlarının küçük olduğu, epitel hücrelerin hacimlerindeki artışla hipertofi, uterin bezlerin proliferasyonu ve vasküler artış gözlendi (**Resim 1a, 1b**).

Yapılan vaginal yayma sonucu keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden oluşan ve gruplar oluşturan hücrelerin görüldüğü preparatlar **Östroz grubu (Grup**

2) olarak tanımlandı. Östroz döneminde epitel hücrelerde hipertrofinin, uterin bezlerinin proliferasyonun ve vasküler artışın devam ettiği gözlemlendi. Diğer tüm histolojik bulgularda proöstroz fazındaki gibi gözlemlendi (**Resim 1c, 1d**).

Yapılan vajinal yayma sonucu yaygın olarak lökositlerin izlendiği ve parabazal ve intermediyer hücrelerin gözlemlendiği preparatlar **Diöstroz grubu (Grup 3)** olarak tanımlandı. Diöstroz döneminde endometriyal bezlerde sekresyonun artmasıyla, bezlerin maximum boyutlarına ulaştığı gözlemlenmiştir. Epitel hücreleri ve uterin bezlerin kıvrıntılı olduğu dikkat çekmektedir. Tüm duvarın damarlanmasının azaldığı, kan hücrelerinin dokuya geçmiş olduğu gözlemlendi. Diğer histolojik yapılar proöstroz grupla benzer olarak bulundu (**Resim 1e, 1f**).

Gebeliğin 4. Gününde uterus

Uterusda, en dıştan saran perimetriyum, ortada miyometriyum ve en içte endometriyum tabakası olmak üzere 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Lümen epitelini tek katlı basit prizmatik epitel hücreleri olarak gözlemlendi. Epitelin altında bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılmış uterus bezleri ile dağınık halde bulunan stromal hücreler ve immun komponent hücreler gözlemlendi. Miyometriyum tabakasında düz kas hücreleri ayırt edildi. Lümen epitelinin mezometriyal kısmında ilk desidual reaksiyon ve GMG hücreler (Granulated Metrial Gland) gözlemlendi (**Resim 2a, 2b**).

Gebeliğin 5. Gününde uterus

Uterusun yine 3 tabakası ayırt edilmekteydi. Gebeliğe hazırlık aşaması olarak düşünülen 5. günde primer ve sekonder desidual alanlar görülmektedir. Primer desidual alan lümen epitelinin hemen altında görülmektedir. Stromal alanda desidualize olmaya başlayan hücreler ve immunkompetant hücrelerin sayıca arttığı görülmektedir (**Resim 2c, 2d**).

Gebeliğin 6. Gününde uterus

Gebeliğin 6. gününde sıçan uterusunun Hematoksilen-Eozin ile boyanmış transvers kesiti incelendiğinde, 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Uterusu en dıştan saran perimetriyum tabakasının sardığı, ortada miyometriyum ve en iç tabakada

endometriyum ayırt edilmekteydi. Gebeliğin 6. gününde 5. günde başlayan desidualizasyonun, oldukça belirgin bir alanı kaplamasıyla arttığı gözlenmektedir. Bu alanın etrafının en dıştan perimetriyum ve hemen altında ise myometriyumun dış tabakası olan, longitudinal kas tabakasından oluşan dış vasküler tabaka ile sarıldığı görülmektedir. Desidualizasyonun 5. günde gelişmeye başladığı bu alanda, stromal hücrelerin içlerinde glikojen ve lipid biriktirerek daha da genişledikleri tespit edilmişti.

Myometriyum tabakasında, östrojenin artan seviyesine cevap olarak düz kas hücrelerinin boyutlarının (hipertrofi) ve sayısının artmaya başladığı izlendi. Endometriyumda ise, lümeni boyunca prizmatik hücrelerinin uzandığı ve bu tabakadaki bezlerin implantasyona hazırlık amacıyla genişlediği gözlemlendi (**Resim 2e, 2f**).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmplantasyonda rol oynadığını düşündüğümüz moleküller östroz sikluslarına ve gebelik günlerine göre farklı şiddetlerde immunoreaktivite göstermişlerdir.

HAS2

Kontrol grubunda HAS2 antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış sıçan uteruslarında, uterus lümen epitelinde ve subepitelial alanda proöstroz döneminde yoğun immunoreaktivite ($298,16 \pm 14,10$, $259,00 \pm 19,94^*$) gözlenirken, östroz ($211,66 \pm 30,85$, $205,33 \pm 16,90$) ve diöstrozda ($204,66 \pm 17,86$, $127,16 \pm 46,17$) zayıf immunoreaktivite gözlemlendi. (Tablo, 4.2.1.A, 4.2.2.A) Deep stromada ise diöstrozda ($270,00 \pm 24,72$) orta derecede immunoreaktivite gözlenirken, proöstroz ($205,33 \pm 13,90$) ve östrozda ($175,16 \pm 39,63$) zayıf immunoreaktivite gözlemlendi (Tablo, 4.2.3A) (**Resim 3**).

Gebelik günlerinde HAS2 antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış sıçan uteruslarında, uterus lümen epitelinde 6. gün ($244,16 \pm 7,19$) gebe sıçanlarda yoğun immunoreaktivite gözlenirken, gebeliğin 4. ($207,50 \pm 24,56$) ve 5. ($217,33 \pm 13,07$) günlerinde zayıf immunoreaktivite gözlemlendi. (Tablo, 4.2.1.B) Subepitelial alan ve deep stromadaki stromal hücrelerde ise gebelik günlerinde immünoaktivite gözlemlendi fakat gebelik günleri kıyaslandığında

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. (Tablo, 4.2.2.B, 4.2.3.B) Mature desiduada gebeliğin 4. ($113,33 \pm 56,90$) gününde zayıf immunoreaktivite gözlenirken gebeliğin 5. ($233,16 \pm 11,60$) ve 6. ($239,67 \pm 14,06$) gününde daha yoğun immunoreaktivite gözlendi. (Tablo, 4.2.4B) Predesidua ve nondesiduada da immunoreaktivite gözlendi fakat gebelik günleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Tablo, 4.2.5.B, 4.2.6.B) **(Resim 4)**.

CD44

Kontrol grubunda CD44 antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış sıçan uteruslarında, lümen epitelinde östroz siklusunun proöstroz ($342,83 \pm 29,87$, $340,66 \pm 26,24^*$) ve östroz ($341,50 \pm 24,41^*$, $323,83 \pm 52,17^*$) dönemlerinde hem mezometriyal hemde antimezometriyal alanda yoğun immunoreaktivite gözlenirken, diöstroz döneminde ($272,00 \pm 21,58$, $269,16 \pm 27,33$) orta derecede immunoreaktivite gözlenmiştir (Tablo, 4.2.1.A) **(Resim 5)**.

Gebelik günlerinde CD44 antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış sıçan uteruslarında, uterus lümen epitelinde 4. ($205,16 \pm 7,02$) ve 6. gün ($199,33 \pm 23,47$) gebe sıçanlarda 5 güne ($273,00 \pm 30,13$) göre zayıf immunoreaktivite gözlendi (Tablo, 4.2.1.B) **(Resim 6)**.

CD44s

Kontrol grubunun proöstroz ($202,00 \pm 37,74$) ve östroz ($200,16 \pm 23,92$) dönemlerindeki uterus kesitlerinin CD44s antikoru ile indirek immunohistokimyasal tekniklerle boyanmasında deep stromada zayıf immunoreaktivite gözlenirken, diöstroz ($258,83 \pm 40,29$) döneminde daha yoğun immunoreaktivite gözlendi (Tablo, 4.2.3.A) **(Resim 7)**.

Gebelik günlerinin 4. ($213,16 \pm 20,68$) ve 5. ($214,33 \pm 25,49$) günlerindeki uterus kesitlerinin CD44s antikoru ile indirek immunohistokimyasal tekniklerle boyanmasında deep stromada zayıf immunoreaktivite gözlenirken, gebeliğin 6. ($241,33 \pm 26,91$) gününde daha yoğun immunoreaktivite gözlendi. (Tablo, 4.2.3.B) Desidual alana baktığımızda, gebeliğin 4. gününde mature desidua ($156,50 \pm 33,86$) ve predesiduada ($189,83 \pm 31,09$) zayıf immunoreaktivite gözlenirken,

gebeliğin 5. ($232,00 \pm 40,58$, $259,83 \pm 31,72$) ve 6. ($223,83 \pm 13,90$, $269,33 \pm 26,95$) günlerinde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi. (Tablo, 4.2.4.B, 4.2.5.B) Nondesiduada ise immunoreaktivite gözlemlendi fakat gebelik günleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Tablo, 4.2.6.B) **(Resim 8)**.

RHAMM

Kontrol grubunun proöstroz döneminde ($345,83 \pm 12,81$) uterus kesitlerinin RHAMM antikoru ile indirek immunohistokimyasal tekniklerle boyanmasında, epitelin antimezometriyal alanında yoğun immunoreaktivite gözlenirken, östroz ($277,00 \pm 25,96$) ve diöstroda ($253,66 \pm 20,71$) orta derecede immunoreaktivite gözlemlendi. Epitelin mezometriyal alanında ise immunoreaktivite gözlemlendi fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. (Tablo, 4.2.1.A) Subepiteliyal alan ve deep stromadaki stromal hücrelerde ise östroz ($217,50 \pm 14,48$, $217,83 \pm 11,19$) ve diöstroz ($199,16 \pm 29,25$, $212,00 \pm 12,97$) döneminde zayıf immunoreaktivite gözlenirken proöstroz ($290,50 \pm 27,26$, $267,50 \pm 36,00$) döneminde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi (Tablo, 4.2.2.A, 4.2.3.A) **(Resim 9)**.

Gebelik günlerinin 5. ($239,33 \pm 17,04$) gününde uterus kesitlerinin RHAMM antikoru ile indirek immunohistokimyasal tekniklerle boyanmasında epitelial mezometriyal alanda zayıf immunoreaktivite gözlenirken, gebeliğin 4. ($276,16 \pm 30,06$) ve 6. ($294,00 \pm 34,47$) günlerinde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi. (Tablo, 4.2.1.B) Subepiteliyal alan ve deep stromadaki stromal hücrelerde ise immunoreaktivite gözlemlendi fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. (Tablo, 4.2.2.B, 4.2.3.B) Desidual alana baktığımızda, gebeliğin 4. gününde mature desidua ($173,00 \pm 46,77$) ve predesiduada ($98,16 \pm 34,16$) zayıf immunoreaktivite gözlenirken gebeliğin 5. ($254,33 \pm 22,14$), $259,67 \pm 18,71$) ve 6. ($259,00 \pm 14,87$, $243,33 \pm 30,72$) günlerinde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi. (Tablo, 4.2.4.B, 4.2.5.B) **(Resim 10)**.

Versikan

Kontrol grubunda Versikan antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış sıçan uteruslarında, uterus lümen epitelinde

immunoreaktivite gözlemlendi fakat östrojen siklusları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Tablo, 4.2.1.A). Subepitelial alan ve deep stromadaki stromal hücrelerde ise proöstrojen (199,16 ± 23,80, 212,66 ± 16,35) ve östrojen (214,33 ± 23,70, 192,33 ± 19,66) dönemlerinde zayıf immunoreaktivite gözlemlenirken, diöstrojen (263,33 ± 27,83, 280,83 ± 28,18) döneminde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi (Tablo, 4.2.2.A, 4.2.3.A) **(Resim 11)**.

Gebelik günlerinde Versikan antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış sıçan uteruslarında, uterus lümen epitelinde gebeliğin 4. (210,16 ± 25,05) ve 6 (204,16 ± 18,01) günlerinde az immunoreaktivite gözlemlenirken, gebeliğin 5 (264,00 ± 19,07) gününde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi. (Tablo, 4.2.1.B) Subepitelial alan ve deep stromadaki stromal hücrelerde ise immunoreaktivite gözlemlendi fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. (Tablo, 4.2.2.B, 4.2.3.B) Desidual alana baktığımızda, tüm alanlarda gebeliğin 5 (199,16 ± 12,46, 216,16 ± 11,37, 198,33 ± 21,76) gününde zayıf immunoreaktivite gözlemlenirken, gebeliğin 6. (272,33 ± 53,14, 264,33 ± 40,24, 277,50 ± 17,46) gününde daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi (Tablo, 4.2.4B, 4.2.5B, 4.2.6.B) **(Resim 12)**.

4.3. Elektron mikroskopik bulgular

Proöstroz grubuna ait sıçanlardan elde edilen uterus örneklerinden alınan 120 nm'lik ince kesitlerin elektron mikroskobu altında değerlendirildiğinde, mikrovillusların sayıca fazla olduğu, pinopod oluşumunun olmadığı ve lipit damlacıkları gözlemlendi (**Resim 13a**).

Östroz grubuna ait sıçanlardan elde edilen uterus örneklerinden alınan 120 nm'lik ince kesitlerin elektron mikroskobu altında değerlendirildiğinde, mikrovillusların ve lipit damlacıklarının azaldığı, pinopod oluşumunun olmadığı gözlemlendi (**Resim 13b**).

Diöstroz grubuna ait sıçanlardan elde edilen uterus örneklerinden alınan 120 nm'lik ince kesitlerin elektron mikroskobu altında değerlendirildiğinde, mikrovillus sayısının azaldığı, çekirdeklerin yassılaştığı, hücrelerin ayrılmaya başladığı ve epitel kalınlığının belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi (**Resim 13c**).

Gebeliğin 4. gününe ait deney grubuna ait sıçanlardan elde edilen uterus örneklerinden alınan 120 nm'lik ince kesitlerin elektron mikroskobu altında değerlendirildiğinde, epitelde mikrovillusların bulunduğu, vesiküler salgı granüllerinin olduğu ve henüz pinopod oluşumunun olmadığı gözlemlendi (**Resim 14a**).

Gebeliğin 5. gününe ait deney grubuna ait sıçanlardan elde edilen uterus örneklerinden alınan 120 nm'lik ince kesitlerin elektron mikroskobu altında değerlendirildiğinde, vesiküler salgı granüllerinin artmış olduğu, mikrovillusların azalmış olduğu, epitel apikal yüzeyinde bleb oluşumu ve bazalde lipit damlacıklarının olduğu gözlemlendi. Desidual hücrelerin birbirlerinden uzaklaştığı ve ödemin olduğu gözlemlendi (**Resim 14b, Resim 15a**).

Gebeliğin 6. gününe ait deney grubuna ait sıçanlardan elde edilen uterus örneklerinden alınan 120 nm'lik ince kesitlerin elektron mikroskobu altında değerlendirildiğinde, vesiküler salgı granüllerinin varlığı, bleb oluşumunun azalmaya başladığı ve lipit damlacıkları gözlemlendi (**Resim 14c, Resim 15b**).

Tablo 4.2.1A: Uterusun luminal epitelinde HA reseptörlerinin östroz sikuslarına göre immunoreaktivite değerleri

	PROÖSTROZ		ÖSTROZ		DİÖSTROZ	
	M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	298,16 ± 14,10*	266,83 ± 13,24*	211,66 ± 30,85	203,83 ± 18,72	204,66 ± 17,86	222,00 ± 28,25
CD44	342,83 ± 29,87*	340,66 ± 26,24*	341,50 ± 24,41*	323,83 ± 52,17*	272,00 ± 21,58	269,16 ± 27,33
CD44s	322,16 ± 30,60	333,16 ± 28,54	287,33 ± 39,60	288,00 ± 39,43	278,66 ± 30,44	282,66 ± 25,43
RHAMM	284,00 ± 27,89	345,83 ± 12,81*	265,00 ± 29,29	277,00 ± 25,96	254,83 ± 16,21	253,66 ± 20,71
Versikan	299,83 ± 91,05	269,33 ± 57,16	230,66 ± 39,60	233,50 ± 37,29	242,66 ± 66,45	265,50 ± 36,68

Tablo 4.2.1.B: Uterusun luminal epitelinde HA reseptörlerinin gebelik günlerine göre immunoreaktivite değerleri

		4. GÜN		5. GÜN		6. GÜN	
		M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HA2	İMP.	207,50 ± 24,56	246,50 ± 26,40	217,33 ± 13,07	206,83 ± 33,77	244,16 ± 7,19*	262,66 ± 10,17*
	İnterİMP.	215,00 ± 14,22	218,50 ± 8,93	189,50 ± 10,48	180,66 ± 39,67	206,50 ± 10,87	209,16 ± 7,49
CD44	İMP.	205,16 ± 7,02	232,66 ± 24,26	273,00 ± 30,13*	260,66 ± 32,34*	199,33 ± 23,47	208,00 ± 30,84
	İnterİMP.	203,33 ± 12,06	233,16 ± 14,49	290,00 ± 19,43	273,66 ± 21,34	272,50 ± 24,31	217,66 ± 25,97
CD44s	İMP.	199,50 ± 15,99	200,00 ± 18,64	273,83 ± 45,98	270,16 ± 26,04	206,83 ± 23,59	240,00 ± 23,46
	İnterİMP.	203,16 ± 23,12	228,50 ± 27,03	288,33 ± 24,15	241,00 ± 18,50	283,83 ± 27,52	265,50 ± 24,38
RHAMM	İMP.	276,16 ± 30,06*	238,50 ± 20,33	239,33 ± 17,04	273,66 ± 37,08	294,00 ± 34,47*	252,33 ± 12,14
	İnterİMP.	214,00 ± 22,48	231,83 ± 44,74	265,50 ± 33,56	280,16 ± 18,64	184,83 ± 23,23	216,66 ± 17,87
Versikan	İMP.	210,16 ± 25,05	211,00 ± 32,01	264,00 ± 19,07*	244,16 ± 18,08	204,16 ± 18,01	240,33 ± 36,86
	İnterİMP.	247,50 ± 25,58	231,66 ± 29,58	210,33 ± 18,87	198,00 ± 15,96	204,33 ± 14,05	208,50 ± 41,30

*P < 0,05, M. Mezometriyal alan, AM. Antimezometriyal alan, İMP. İmplantasyon bölgesi, İnterİMP. İnterimplantasyon bölgesi

Tablo4.2.2.A: Uterusun Subepitelial bölgesinde HA reseptörlerinin östroz sikuslarına göre immunoreaktivite değerleri

	PROÖSTROZ		ÖSTROZ		DİÖSTROZ	
	M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	259,00 ± 19,94*	264,50 ± 27,51*	205,33 ± 16,90	208,00 ± 17,36	127,16 ± 46,17	135,16 ± 46,20
CD44	232,83 ± 24,87	283,00 ± 23,41	187,83 ± 36,73	228,83 ± 18,88	107,33 ± 38,87	189,50 ± 36,18
CD44s	238,66 ± 41,19	203,16 ± 15,06	189,00 ± 31,77	241,66 ± 34,79	255,16 ± 30,00	221,66 ± 21,99
RHAMM	290,50 ± 27,26*	264,83 ± 32,04	217,50 ± 14,48	281,16 ± 17,31	199,16 ± 29,25	266,16 ± 17,17
Versikan	199,16 ± 23,80	225,00 ± 43,23	214,33 ± 23,70	226,16 ± 55,77	263,33 ± 27,83*	229,83 ± 34,52

Tablo 4.2.2.B: Uterusun Subepitelial bölgesinde HA reseptörlerinin gebelik günlerine göre immunoreaktivite değerleri

		4. GÜN		5. GÜN		6. GÜN	
		M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	İMP.	207,0 ± 29,13	251,00 ± 34,11	210,16 ± 15,43	199,16 ± 17,10	250,66 ± 45,07	260,16 ± 15,35
	İnterİMP.	184,33 ± 22,89	199,16 ± 24,73	209,33 ± 11,36	150,00 ± 32,81	163,66 ± 14,03	160,83 ± 23,18
CD44	İMP.	223,50 ± 43,50	194,16 ± 40,72	168,66 ± 27,50	173,66 ± 24,28	245,66 ± 13,93	254,33 ± 32,68
	İnterİMP.	197,83 ± 34,99	265,83 ± 13,25	230,00 ± 13,38	206,00 ± 15,46	262,16 ± 45,11	206,83 ± 19,51
CD44s	İMP.	230,16 ± 35,24	284,66 ± 16,47	200,33 ± 24,77	212,83 ± 25,52	209,50 ± 29,43	223,83 ± 36,43
	İnterİMP.	219,00 ± 7,89	240,83 ± 29,17	204,00 ± 23,30	192,50 ± 20,92	284,00 ± 26,75	209,66 ± 16,41
RHAMM	İMP.	216,16 ± 5,19	209,00 ± 30,43	242,50 ± 69,25	211,83 ± 10,18	239,66 ± 70,14	224,00 ± 9,93
	İnterİMP.	221,16 ± 21,65	224,16 ± 21,68	257,33 ± 9,50	236,00 ± 9,57	237,50 ± 3,08	213,16 ± 48,17
Versikan	İMP.	203,33 ± 26,38	202,66 ± 30,44	225,83 ± 11,25	218,50 ± 25,06	210,00 ± 23,89	209,00 ± 16,56
	İnterİMP.	211,33 ± 42,91	201,83 ± 39,62	195,83 ± 23,64	187,33 ± 19,42	161,66 ± 26,15	175,00 ± 30,71

*P < 0,05, M. Mezometriyal alan, AM. Antimezometriyal alan, İMP. İmplantasyon bölgesi, İnterİMP. İnterimplantasyon bölgesi

Tablo 4.2.3.A: Uterusun Deep Stromasında HA reseptörlerinin östroz sikuslarına göre immunoreaktivite değerleri

	PROÖSTROZ		ÖSTROZ		DİÖSTROZ	
	M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	205,33 ± 13,90	204,66 ± 29,91	175,16 ± 39,63	214,00 ± 15,45	270,00 ± 24,72*	266,83 ± 35,27*
CD44	249,00 ± 50,78	262,16 ± 27,13	204,83 ± 14,42	194,16 ± 15,54	252,66 ± 43,78	264,83 ± 14,81
CD44s	202,00 ± 37,74	223,00 ± 20,77	200,16 ± 23,92	210,83 ± 26,91	258,83 ± 40,29*	276,16 ± 36,06*
RHAMM	267,50 ± 36,00*	288,16 ± 27,53*	217,83 ± 11,19	226,66 ± 9,22	212,00 ± 12,97	251,66 ± 32,76
Versikan	212,66 ± 16,35	230,83 ± 50,04	192,33 ± 19,66	195,66 ± 80,25	280,83 ± 28,18*	268,83 ± 41,78*

Tablo 4.2.3.B: Uterusun Deep Stromasında HA reseptörlerinin gebelik günlerine göre immunoreaktivite değerleri

		4. GÜN		5. GÜN		6. GÜN	
		M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	İMP.	204,00 ± 16,03	206,83 ± 22,71	217,50 ± 30,88	188,16 ± 17,30	211,50 ± 6,56	266,33 ± 14,55
	İnterİMP	276,16 ± 13,99	209,83 ± 9,55	149,66 ± 14,27	103,00 ± 4,93	173,83 ± 12,59	181,00 ± 16,13
CD44	İMP.	234,66 ± 35,71	195,50 ± 36,58	227,33 ± 36,39	241,50 ± 24,30	229,33 ± 43,55	248,50 ± 47,90
	İnterİMP.	262,50 ± 22,14	254,00 ± 21,98	232,83 ± 13,96	205,00 ± 18,48	249,16 ± 12,85	282,83 ± 21,27
CD44s	İMP.	213,16 ± 20,68	193,00 ± 31,57	214,33 ± 25,49	278,83 ± 21,78	241,33 ± 26,91*	217,33 ± 37,89
	İnterİMP.	265,83 ± 38,56	240,83 ± 28,65	218,16 ± 18,04	222,83 ± 34,44	258,66 ± 20,02	265,66 ± 20,21
RHAMM	İMP.	210,00 ± 31,17	199,00 ± 49,54	201,83 ± 38,20	220,66 ± 27,06	212,33 ± 28,65	200,50 ± 18,06
	İnterİMP.	247,66 ± 9,07	214,33 ± 11,77	256,50 ± 19,46	242,00 ± 37,43	236,66 ± 10,78	217,83 ± 23,18
Versikan	İMP.	227,16 ± 23,48	235,00 ± 15,05	238,16 ± 39,18	232,83 ± 53,30	247,33 ± 9,43	226,16 ± 31,55
	İnterİMP.	287,33 ± 21,32	287,16 ± 17,79	222,16 ± 21,86	211,66 ± 14,16	186,33 ± 52,83	194,16 ± 54,52

*P < 0,05, M. Mezometriyal alan, AM. Antimezometriyal alan, İMP. İmplantasyon bölgesi, İnterİMP. İnterimplantasyon bölgesi

Tablo 4.2.4.A: Uterusun Mature-Desidual bölgesinde HA reseptörlerinin gebelik günlerine göre immunoreaktivite değerleri

		4. GÜN		5. GÜN		6. GÜN	
		M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	İMP.	113,33 ± 56,90	144,33 ± 6,40	233,16 ± 11,60*	254,00 ± 20,10*	239,67 ± 14,06*	236,66 ± 34,59*
	İnterİMP.	273,50 ± 39,08	248,33 ± 22,55	203,50 ± 10,67	216,33 ± 18,48	219,00 ± 13,74	231,00 ± 9,93
CD44	İMP.	208,16 ± 19,49	239,33 ± 21,06	279,83 ± 26,60	277,33 ± 29,24	229,83 ± 19,10	250,00 ± 33,94
	İnterİMP.	248,16 ± 35,58	256,00 ± 31,55	249,83 ± 41,61	266,50 ± 22,79	268,66 ± 14,67	245,66 ± 16,65
CD44s	İMP.	156,50 ± 33,86	210,00 ± 23,27	232,00 ± 40,58*	261,16 ± 26,45*	223,83 ± 13,90*	255,66 ± 24,70*
	İnterİMP.	271,16 ± 21,32	246,33 ± 23,11	221,66 ± 28,23	205,00 ± 23,22	242,33 ± 26,87	240,33 ± 48,34
RHAMM	İMP.	173,00 ± 46,77	213,33 ± 14,86	254,33 ± 22,14*	229,66 ± 23,69	259,00 ± 14,87*	213,50 ± 14,61
	İnterİMP.	220,00 ± 10,02	222,66 ± 5,78	286,50 ± 29,46	241,16 ± 29,59	252,33 ± 17,42	238,33 ± 19,51
Versikan	İMP.	248,00 ± 45,13	276,33 ± 23,14	199,16 ± 12,46	220,66 ± 36,51	272,33 ± 53,14*	260,66 ± 44,42*
	İnterİMP.	296,66 ± 38,42	313,83 ± 32,65	241,16 ± 21,00	248,83 ± 18,55	258,33 ± 15,89	271,83 ± 19,68

*P < 0,05, M. Mezometriyal alan, AM. Antimezometriyal alan, İMP. İmplantasyon bölgesi, İnterİMP. İnterimplantasyon bölgesi

Tablo 4.2.5.A: Uterusun Pre-desidual bölgesinde HA reseptörlerinin gebelik günlerine göre immunoreaktivite değerleri

		4. GÜN		5. GÜN		6. GÜN	
		M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	İMP.	217,66 ± 44,58	234,66 ± 66,08	206,83 ± 15,25	216,33 ± 11,16	217,66 ± 6,53	252,33 ± 39,54
	İnterİMP.	243,66 ± 6,40	245,33 ± 18,43	233,50 ± 46,71	219,66 ± 9,91	207,00 ± 28,29	214,00 ± 8,48
CD44	İMP.	201,66 ± 17,75	222,33 ± 19,13	271,33 ± 33,08	243,16 ± 41,81	280,16 ± 20,64	256,00 ± 23,27
	İnterİMP.	275,66 ± 19,40	250,83 ± 8,44	225,00 ± 20,35	254,83 ± 38,35	252,33 ± 10,59	273,33 ± 29,11
CD44s	İMP.	189,83 ± 31,09	205,00 ± 12,29	259,83 ± 31,72*	264,16 ± 30,48*	269,33 ± 26,95*	252,00 ± 39,05*
	İnterİMP.	278,00 ± 29,57	262,83 ± 21,75	218,83 ± 12,89	221,16 ± 20,21	262,83 ± 13,64	197,66 ± 68,64
RHAMM	İMP.	98,16 ± 34,16	239,33 ± 29,76	259,67 ± 18,71*	225,00 ± 11,64	243,33 ± 30,72*	249,83 ± 13,36
	İnterİMP.	250,66 ± 15,57	237,50 ± 7,55	252,83 ± 11,72	197,00 ± 5,54	257,16 ± 11,51	235,33 ± 8,40
Versikan	İMP.	257,33 ± 42,80	269,33 ± 39,62	216,16 ± 11,37	225,66 ± 42,46	264,33 ± 40,24*	264,66 ± 45,94*
	İnterİMP.	291,50 ± 33,20	294,83 ± 25,65	273,83 ± 22,98	273,83 ± 27,73	261,66 ± 45,35	260,16 ± 27,33

*P < 0,05, M. Mezometriyal alan, AM. Antimezometriyal alan, İMP. İmplantasyon bölgesi, İnterİMP. İnterimplantasyon bölgesi

Tablo 4.2.6.A: Uterusun Non-Desidual bölgesinde HA reseptörlerinin gebelik günlerine göre immunoreaktivite değerleri

		4. GÜN		5. GÜN		6. GÜN	
		M.	AM.	M.	AM.	M.	AM.
HAS2	İMP.	196,33 ± 41,05	239,50 ± 17,04	216,50 ± 20,52	206,33 ± 12,27	256,16 ± 37,82	221,50 ± 17,63
	İnterİMP.	225,50 ± 14,11	258,66 ± 8,45	221,00 ± 14,58	198,33 ± 21,77	208,33 ± 55,46	179,83 ± 21,06
CD44	İMP.	173,00 ± 28,02	260,83 ± 19,63	281,00 ± 25,04	220,33 ± 22,93	217,00 ± 19,17	205,50 ± 23,72
	İnterİMP.	218,33 ± 31,24	244,83 ± 28,07	213,66 ± 17,37	257,33 ± 19,88	209,16 ± 18,95	200,67 ± 21,32
CD44s	İMP.	226,16 ± 40,88	271,50 ± 26,03	217,33 ± 49,57	251,66 ± 45,96	194,00 ± 24,60	223,50 ± 23,56
	İnterİMP.	242,66 ± 22,94	273,33 ± 18,74	236,33 ± 15,27	245,16 ± 35,31	263,50 ± 21,58	248,16 ± 36,22
RHAMM	İMP.	282,00 ± 13,11*	250,66 ± 24,22*	267,83 ± 13,36*	246,50 ± 12,37*	217,66 ± 10,67	221,50 ± 8,91
	İnterİMP.	247,66 ± 13,29	252,66 ± 12,78	257,33 ± 14,66	257,33 ± 12,29	260,00 ± 18,68	245,00 ± 17,04
Versikan	İMP.	229,00 ± 23,66	241,00 ± 77,79	198,33 ± 21,76	237,33 ± 27,17	277,50 ± 17,46*	283,50 ± 17,25
	İnterİMP.	281,83 ± 19,83	287,16 ± 26,96	242,16 ± 20,24	230,50 ± 20,94	255,16 ± 38,26	235,83 ± 22,15

*P < 0,05, M. Mezometriyal alan, AM. Antimezometriyal alan, İMP. İmplantasyon bölgesi, İnterİMP. İnterimplantasyon bölgesi

5.Tartışma

HA bir glikozaminoglikan olup, bağ dokusu ekstrasellüler komponentin en önemli bileşenlerinden birisidir. HA sadece yapısal bir molekül olmayıp migrasyon, proliferasyon ve differensiasyon gibi çok sayıda biyolojik olayda önemli rol oynamaktadır. HA dişi üreme sistemi organlarının (uterus ve tuba uterina) bağ dokusunda bulunur; ayrıca foliküler sıvıda, servikal mukus ve kümulus hücrelerinde de bulunmaktadır. Dişi üreme sistemi içinde bulunan HA'in fonksiyonları sadece su tutma özelliğine bağlı olarak kayganlaştırıcı ve viskozite artışı ile sınırlı olmayıp (74), başarılı bir ovulasyon, fertilizasyon ve embriyo implantasyon gerçekleşmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (140). HA invitro fertilizasyon uygulamalarında vizkositeyi artırarak, blastosistin implantasyonu kolaylaştırmak amacı ile transfer sıvıları içinde kullanılmaktadır. Transfer medyumundaki HA'in implantasyonu arttırdığını ileri süren çalışmalar olmasına rağmen (3,4,5,70,73) HA'in implantasyon üzerine etkisinin olmadığını bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (6, 71). Bu çalışmada, rat implantasyon modelinde HA'in sentezi ve reseptörleri immunohistokimyasal teknik ve ince yapı düzeyinde hücresel değişiklikler elektron mikroskopik teknik ile değerlendirilerek, HA'in implantasyon döneminde olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

HA tekrarlayan disakkarit ünitlerinden oluşmuş olup, fonksiyonları da molekül ağırlığına göre farklılıklar göstermektedir (69). HA sentezini sağlayan üç enzimden (HAS1, HAS2 ve HAS3), HAS1 ve HAS2, 2000 kDA'dan daha büyük olan yüksek molekül ağırlıklı HA'leri üretirken, HAS3 200-300 kDA ağırlığında düşük moleküler ağırlıklı HA üretmektedir (80). Bu çalışmada, HA sentezini sağlayan en önemli enzim olan HAS2 ekspresyonu incelenerek, implantasyon döneminde yüksek molekül ağırlıklı HA'in muhtemel fonksiyonları tespit edilmeye çalışılmıştır.

Kontrol grubunda ait uterus örneklerinin immunohistokimyasal incelenmesinde epitel ve subepitelde proöstroz döneminde HAS2 ekspresyonun, östroz ve diöstroz grubundan anlamlı olarak farklı olduğu tespit

edildi. Proöstroz dönemindeki HAS2 ekspresyonundaki artışın, bu dönemin en belirgin özelliği olan doku yenilenmesi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda menstruel siklus gerçekleşikten sonra hem epitelde, hemde stromada yenilenmenin gerçekleştiği ve bu aşamalarda HA'nın rol oynadığı rapor edilmiştir (141, 142). Proöstroz döneminde uterus epitelinde ve subepitelinde çok sayıda hücre bölünmesi gerçekleşerek reepitelizasyon sağlanırken, aynı zamanda stromada ekstrasellüler matriks değişiklikler ortaya çıkmaktadır (142).

Subepitelyal alanda bulunan HA rolü bilinmekte iken yüzey epiteli ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bununla beraber solunum epitel hücrelerinin HAS kullanarak HA sentezlediği ve bu HA'nın ekstrasellüler alana iletiildiği gösterilmiştir (143, 144). HA ile yapılan dermis hücre kültür çalışmasında, yara oluşturulmuş epidermis, keratinositler tarafından sentezlenen HA'nın HB-EGF aracılığı ile EGFR'e bağlandığı ve epidermal iyileşme cevabını hızlandırdığı rapor edilmiştir (145).

HA'nın HAS tarafından sentezlenmesinin düzenlenmesinde çok çeşitli faktörler rol oynamaktadır. HA sentezinin sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından kontrol edildiği solunum epitelinde gösterilmiştir. Astım ve hava yolları inflamatuvar cevabında IL-1 β and TNF- α artışının HA sentezini düzenlediği ileri sürülmüştür (146-148).

Kontrol grubuna ait örneklerin her üç grubunda da stromada HAS2 ekspresyonu menstruel siklus boyunca yaygın olarak gözlemlendi ancak derin stromada diöstroz döneminde proöstroz ve östroz döneminden anlamlı olarak artmış olması dikkat çekici bulundu. HA'nın hücre proliferasyonu ve doku remodeling ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (149, 150). Bu dönemdeki artışın da stromada gerçekleşen remodeling ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Teixeira Gomes, ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada (151) HA ekspresyonunun diöstroz döneminde fazla olduğunu bildirmişlerdir. Menstruel dönemde endometriyum yapısında oldukça hızlı değişimler olmaktadır. Yeni matriks üretiminin en fazla proliferatif dönemde ve erken sekretuar dönemde olduğu gösterilmiştir (152). Bu dönemde endometriyumda ödem ortaya çıkmakta

siklusun son dönemlerinde menstruasyondan önce ise doku gerilemeye başlamaktadır (74). Bu bulgunun bu dönemde endometriyum tarafından ifade edilen ve parakrin yolla etki gösteren epidermal büyüme faktörü (EGF) bağlı olduğunu ileri sürülmüşlerdir. EGF, IGF-1 ile reaksiyona girerek endometriyumun proliferasyonunu ve differensiasyonunu sağlamaktadır (153). Diöstroz dönemindeki endometriyal EGF ve IGF-1 ekspresyonu ile aynı faktörlerin preimplantasyon periyodundaki ekspresyonları arasında büyük benzerlik bulunması bu ekspresyonun embriyonun implantasyonda rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (151).

Deney grubuna ait uterus örneklerinin incelemesinde implantasyon döneminde 5. ve 6. günlerinde mature desidua HAS2 ekspresyonunun 4.gün ekspresyonuna göre anlamlı farklı olduğu gözlemlendi. HAS2'in implantasyon döneminde ifade edilmiş olması, bu dönemde HA miktarının artmasına ve dolayısı ile HA'nın implantasyon üzerine etkisinin olabileceği düşünüldü. Memelilerde hamilelik sırasında endometriyal stromada östrojen ve progesteron ovarian hormonlarının etkisi ile endometriyal fibroblastlar fonksiyonel modifikasyonlara uğrarlar ve sonuçta desidual hücreler oluşur. Rodentlerde, endometriyumun desidualizasyonu hızla düzenlenir ve ekstraselüler matriks bileşenleri yeniden düzenlenir. Bu dönemde HA'nın su tutma özelliği nedeni ile dokularda genişlemeye neden olduğu ve daha gevşek bir biçim alarak invazyonu kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (3). Dokuda gevşeme implantasyon ve daha sonra gerçekleşecek olan invazyon için gerekli olduğu bilinmektedir. Dokulardaki gevşemeye kollajen liflerde ortaya çıkan değişikliklerde katkıda bulunmaktadır. Menstruel dönemde stromada çok miktarda kollajen lifler (I,III,V,VI) bulunurken, kollajen IV, ve laminin uterus bezlerinin ve kan damarlarının bazal membranlarında bulunmaktadır. Kollajen IV, laminin ve heparan sülfat siklusun sonlarında desidual hücrelerin etrafında organize olmaktadır. Kollajen IV proliferatif dönemde yüksek iken sekretuar dönemde progresif olarak azalması dokuda genişlemeye neden olmaktadır. Farelerde desiduanın çok ince kollajen lifler içerdiği, desidual hücrelerin bu ince lifleri fagosite ettiği ve embriyonik genişleme ile birlikte desiduanın gerilemesini

sağladığı bildirilmiştir (154). Ayrıca desidual hücreler TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) eksprese ederek, trofoblast invazyonunu sınırlandırmaktadır (74).

HA'in hücre içi temel reseptörü olan CD44, integral membran proteini ve hücre hücre adezyonu, hücre matriks adezyonu, lenfosit yerleşmesi, hücre migrasyonu ve metaztaz oluşumunda rol oynamaktadır. CD44'ün agregasyonu stimule ettiği, proliferasyonu, migrasyonu ve anjiogenezisi arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca CD44'ün sitoskelet proteinleri ile ilişki içinde olduğu ve spesifik sinyallerin düzenlenmesinde de rol oynadığı bilinmektedir (155). CD44, Hyaluronan ile hücre iskeleti arasında bağlantı kurarak HA'nin hücre içi fonksiyonlarına da aracılık etmektedir. CD44'ün bilinen iki tipi bulunmaktadır. CD44'ün epitelde bulunan bir tipi CD44E olarak isimlendirilirken, stromada bulunan tipi CD44H veya CD44s olarak bilinmektedir (74).

Bu çalışmada kontrol gruplarına ait uterus epitelde CD44 ekspresyonu, menstrual siklusun proöstroz ve östroz dönemlerinde hem mezometriyal, hem de antimezometriyal alanda diöstroz döneminden anlamlı farklı olduğu tespit edildi. CD44 ekspresyonunun epitelin fonksiyonunun değiştiği dönemde ortaya çıkması, implantasyon için hazırlanan epitelyal hücrelerin remodeling ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. CD44 ekspresyonunun menstrual siklusun farklı dönemlerinde ve gebelik endometriyumunda eksprese edildiği gösterilmiştir (74). Endometriyum epiteli oldukça dinamik epitel ve siklusa bağlı olarak reepitelizasyon gerçekleşmektedir. Proöstroz ve östroz dönemindeki CD44 ekspresyonu epitelizasyonda rol oynayabilir. Neame ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD44'ün epitelyal integritide rol oynadığını menstrual siklusda reepitelizasyon için gerekli olan motilitenin artırılıp azaltılmasında görev aldığını rapor etmişlerdir (156). Kanser hücreleri tarafından da eksprese edilen CD44 tümör hücrelerinin motilitesini artırarak metaztazların gerçekleşmesinde önemli rol oynamaktadır.

Deney grubunun 5. gününde antimezometrial tarafta CD44 ekspresyonu diöstroz dönemi ile benzer özellikler göstermesine rağmen elde edilen boyanma yoğunluğu 4. ve 6. günden anlamlı olarak yüksek bulundu.

CD44'ün 5 günde yüksek olması apozisyon ve adezyon ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. CD44, sadece HA ile değil bunun yanı sıra osteopontin (157) ile bağlanır ve αv integrinler ile köprü oluşturur. İntegrinler transmembran glikoproteinlerinden olup, embriyonik gelişimin hücre-matriks ve hücre-hücre yapışmasını gerektiren önemli fizyolojik olayların çoğuna katılır. $\alpha 5\beta 3$ integrin ve onun ligandı osteopontin, trofoblastların ilk etkileşimde endometriyum lümen epiteline bağlanmasında görev alır. Epitelyal lokalizasyon ve ekspresyonun $\alpha 5\beta 3$ 'ün, embriyonik tutunma için potansiyel bir reseptör olabileceğini düşündürmektedir. Epitelyal sinyaller subepitelyal alana geçerek implantasyona stromanın hazırlanmasında rol oynayabilir.

CD44 ekspresyonunun deney grubunda epitelde gözlenen 5. güne göre 6. günde gözlenen azalmanın, implantasyona hazırlık döneminde ortaya çıkan değişikliklerin bir belirtisi olarak değerlendirildi. İmplantasyonun en önemli aşamalarından bir olan embriyo endometriyum ilişkisinin sağlanmasında CD44 azalmasının rolü olabileceği düşünöldü. CD44'ün glikanlar ile yakın ilişki içinde olduğu bilinmektedir ve CD44 ekspresyonunun azalmasının endometriyal glikokaliks tabakasının azalması ile ilgili olabileceği ileri sürülebilir. Endometrial epitelde MUC1'in implantasyon döneminde azaldığı bilinmektedir (158, 159). Bu çalışmada CD44'ün implantasyonun gerçekleşeceği 6. günde azalmasının epitel ile MUC1 arasındaki bağlantının azalmasına neden olabilir. MUC1 üst genital sistem için koruyucu bir bariyer görevi görmekte ve endometriyumda proliferatif ve sekretuar fazlarında eksprese edilmektedir. MUC1 aynı zamanda sperm iletiminde de rolü bulunmaktadır. MUC1 uzun hidrofilik VNTR domaini proline, theronin ve serinden zengindir. MUC1'in apikal uzantıları integrin ve kadherinler için reseptör görevi görmektedir. MUC1'in hücre yüzeyinde fazla yoğunlukta olması implantasyonu engellemektedir. Embriyo implantasyonu sırasında MUC1 ekspresyonunun azalması implantasyonu kolaylaştırıcı etki yaptığı rapor edilmiştir (160). Epitelde MUC1'in azalması musin molekülünün antiadhezif etkisinin azalmasından dolayı uterus epitelyumu ile blastokistin başarılı bir şekilde tutunmasını sağladığı düşünölmektedir (29).

CD44s immunoreaktivitesi derin stromada menstrual siklusun proöstroz ve östroz döneminde az seviyede gözlemlendi, buna karşılık diöstroz döneminde anlamlı derecede artmış bulundu. Fujita ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada insan endometriyum örneklerinde CD44 ekspresyonunun sekretuar fazın orta ve son kısımlarında fazla bulunduğunu fakat proliferasyon fazında bulunmadığını rapor etmişlerdir (161). CD44 yüzey epitelinde proöstroz ve östroz döneminde artarken CD44s'in bunların aksine diöstroz döneminde artmış bulunması dikkat çekici bulundu. CD44'ün birçok farklı dokuda farklı fonksiyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Diöstroz döneminde yüzey döküleceği için bu dönemde yüzeyde azalırken, endometriyumun hazırlanması için stromada artmış olması ileri sürülebilir. CD44 ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olmasına rağmen, HA ile yapılan çalışmalarda diöstroz döneminde HA'in yüksek bulunduğu ve HA'nın implantasyonda rol oynadığı bildirilmiştir (151). Bu bulgu parakrin olaylarda EGF'in endometriyal ekspresyonunun ortaya çıkmasıyla paraleldir. Endometriyal proliferasyon ve farklılaşmada temel olan epitelyal-stromal etkileşimleri sağlayan IGF-1'le EGF etkileşmektedir (151). IGF'ler sistemi, endometriyal proliferasyon, farklılaşma ve embriyo-endometriyum etkileşiminde önemli rol oynamaktadır (21).

İmplantasyon günlerine baktığımızda 4. güne kıyasla mature desidua ve predesidua bölgesinde gebeliğin 5. ve 6. günlerinde CD44s ekspresyonu daha fazla gözlemlendi. Daha önce yapılan çalışmada uterin CD44 ekspresyonu, endometriyal stromada glandular hücrelerde, desidua lenfositlerinde ve desidual hücrelerde gözlenmiştir. Bu iki bileşen olan glandular epitelin ve desidual hücrelerin aktif plasental anjiyogenezise katıldığı bilinmektedir. Glandular epitelde CD44 ekspresyonu, hyaluronidaz aktivasyonu veya sitokin salınımı veya büyüme faktörleri aracılığıyla anjiyogenezisin regülasyonunu sağlamaktadır (162).

HA ve reseptörlerinin immunolojik reaksiyonlarda da rolü olduğu bilinmektedir. CD44'ün endotel hücrelerinin yüzeyinde varlığı ve T hücrelerinin dolaşımı migrasyonu ve adhezyonunda rol oynadığı bilinmektedir (163). CD44 T hücrelerinde ve monositlerde inaktif olarak bulunmakta ve HA ile

bağlanmaktadır. Bu hücrelerdeki CD44 reseptörleri proinflamatuvar sitokinler TNF alfa ve INF gama ile aktive olmaktadır (164).

CD44'ün inhibe edilmesi ile T immun cevabının azaltılarak böbrek doku reddinin düzeldiği rat modelinde gösterilmiştir (165). Bu çalışmada da 5. güne ait deney grubunun uterus doku örneklerinin subepitelyal bölgesinde CD44 ekspresyonunun azalması olması bu bölgedeki immun cevabın azalması ile de ilişkili olabileceğini düşündürdü. CD44'ün bağ dokusu hücreleri dışında birçok hücre yüzeyinde de bulunduğu bilinmektedir. Bu hücreler arasında T hücreleri, dendritik hücreler, monositler, makrofajlar ve endotel hücreleri gibi immunolojik fonksiyonla ilişkili hücrelerde bulunmaktadır. Bu hücrelerin CD44 ve hyaluronan ile bağlantısı ile hücrelerin dolaşımı migrasyonu ve adezyonu sağlandığı ileri sürülmektedir (165).

Bunun yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarda HA immunomodulator etkisinin olduğu HA'in lokal çevresinin inflamavutar ortam hakkında bilgi verdiği bildirilmiştir (166). Yüksek molekül ağırlıklı HA'in farklı hücre tipleri için antiinflamatuvar etki yaptığı ve adaptif cevabı uzatmaktadır. İmmunolojik olaylarda soluble bioaktif mediatörler tarafından tehlike sinyali oluşturulurken sağlam dokuda immunhemositosis HMAHA tarafından sağlanmaktadır. Yaralanan dokularda da doku integritesinin sağlanmasından sonra all-clear mesajı HA tarafından sağlanmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı HA'in T hücrelerinden Foxp3 ekspresyonunu artırarak T hücre proliferasyona neden olduğu bilinmektedir (167). HA ve CD44 etkileşimi doku integritesinde görev almaktadır. Bu fonksiyonu Treg üzerinden sağlamaktadır (168). Eksprese edilen Treg infalmasyonu durdurmaktadır.

RHAMM bir HA reseptörü olup, hücre adezyonu, hücre migrasyonu, morfogenezisi ve hücre proliferasyonu, sinyal iletimi, gen ekspresyonu RNA splicing hücre farklılaşması ve metaztazda görev almaktadır (169). Daha önce yapılan çalışmalarda embriyoda RHAMM varlığı gösterilmiştir ancak endometriyum epitelinde varlığı gösterilmemiştir. Bu çalışmada menstrel siklusun proöstroz döneminde epitelin antimezometrial bölgesinde, subepitel, ve derin stromada RHAMM ekspresyonunun kuvvetli bulundu. Östroz ve diöstroz

dönemlerinde ise proöstroz dönemine göre azalmış olduğu dikkat çekici bulundu. Menstürel doku kaybından sonra endometriyumun yenilenme safhası olan proöstroz fazında epitel ve stromada mitoz geçekleşmektedir. RHAMM'ın proöstroz dönemdeki ekspresyonu mitotik aktiviteye arttırmasına bağlı olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda RHAMM'ın G2/M fazında kuvvetli olarak eksprese edildiği ve böylece mitozu kontrol ettiği bildirilmiştir (169). RHAMM bir integral membran proteini değildir. RHAMM hücre içi sinyal mekanizmalarını harekete geçirir. RHAMM sentrozomda bulunur ve hücre içi mitotik iplikçiklerin formasyonu ve devamlılığını dynein ile çapraz bağlanarak sağlar (170). RHAMM'ın en önemli özelliklerinden birisi de mitozdan sonra ortaya çıkan hücrelerin ayrılması ve migrasyonudur. Bu nedenle uterus dokusunda yenilenme sırasında yeni oluşan hücrelerin göçünde de görev alması mümkündür. RHAMM sadece hücre içinde değil, aynı zamanda hücre yüzeyinde de bulunmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan RHAMM, CD44 gibi HA ile bağlanarak büyüme ve motilite üzerine fonksiyon göstermektedir.

Deney grubuna ait preparatların incelenmesinde RHAMM ekspresyonunun mature ve predesiduada hem 5. gün hem de 6. gün anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi. İmplantasyon döneminde RHAMM ekspresyonundaki artış implantasyonda önemli rol oynadığını düşündürdü. RHAMM bir motilite reseptörü olarak bilinmesine rağmen, hücrelerin yaşamının devamlılığında da görev almaktadır. Bu grupta RHAMM ekspresyonunun fazla olması nedeni ile implantasyon döneminde gebeliğin devamlılığını sağlamak için gerekli olan desidual değişikliklerin devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynayabileceği ileri sürülebilir. Zhang, S ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada RHAMM'ın Extracellular-Regulated Kinase (ERK) 1 üzerinde etki ederek hücre survival sağladığı bildirilmiştir (171).

Versikan büyük bir kondrodin sülfat proteoglikandır ve hyaluronan bağlayan proteoglikanlar ailesi üyesidir. Versikan, HA ile N-terminal G1 globular domain bölgesinden bağlanarak fonksiyon göstermektedir (172). Versikan tenaskin-R, kollegen I, fibronektin, elastik fiber associocited protens fibrilin ve fibulin ile de ilişkilidir (173). Fibrilin I, endometriyal stromada östroz ve diöstroz

döneminde ortaya çıkar. Versikan ayrıca kemokinler, B1 integrin, CD44, epidermal büyüme faktörü ve selektin ile de bağlanmaktadır (127). Versikan'ın bu ilişkileri birçok biyolojik olayı kolaylaştırdığı ve özellikle hücre migrasyonu üzerine etki ettiği rapor edilmiştir (172).

Doku örneklerinin immunohistokimyasal teknik ile versikan primer antikoru ile boyanmış preparatların incelenmesinde diöstroz kontrol grubu subepitel ve derin stromada yoğun boyanma gözlenirken, proöstroz ve östrozda stromada daha az boyanma gözlendi. Versikanın seviyesinin yüksek olduğu dönemde progesteronun artmış olması, versikan ekspresyonunun hormonal kontrol altında olduğunu düşündürdü. Overektomi yapılan hayvanlarda versikan ekspresyonunun endometriyum ve myometriyumda ortadan kalktığı rapor edilmiştir (172). Bununla beraber adrenal medulladan salınan östrojene bağlı superficial ekspresyon devam etmektedir (174). Östrojen seviyesi tüm menstrel siklus boyunca yüksek seyrederken progesteron seviyesi östrozda düşük diöstrozda yüksektir. Bu değişiklikler uterusun ekstrasellüler matriks komponentinde değişikliğe neden olmaktadır (175-177). Bu sonuçlar progesteronun implantasyona hazırlık dönemindeki etkisini versikan üzerinden yaptığının bir göstergesi olarak değerlendirebilir.

Daha önce yapılan çalışmalarda östroz döneminde versikanın ve HA'nın artmış olmasının endometriyal stromayı embriyonun implantasyonu için hazırladığı rapor edilmiştir (178). Versikanın doku remodeling hücre proliferasyonunda ve fibroblastların desidual hücreler farklılaşmasında rol oynadığı göz önüne alındığında östroz döneminde versikanın eksprese edilmiş olması desidual değişiklikler üzerine etki olabileceğinin bir belirtisi olarak değerlendirilmektedir (178). Desidualizasyon için konneksin ekspresyonu ve gap junction formasyonu gereklidir (179). Versikanın konneksin 43 ekspresyonunu arttırdığı ve böylece desidual hücrelere dönüşümünde rol oynadığı rapor edilmiştir (180).

Deney grubu versikan ile boyanmış preparatları incelediğinde 6. günde predesidua, ve mature desidual bölgedeki immunoreaktivitenin anlamlı olarak farklı olduğu gözlendi. Versikan immunoreaktivitesinin implantasyon döneminde

artmış olması versikanın implantasyonda rol oynadığını düşündürdü. Versikana ait desidual değişikliklerin interimplantasyon bölgelerde daha az olması versikanın implantasyon döneminde önemli rol oynadığının bir başka göstergesi olarak değerlendirildi. Uterus stroması yüzeysel ve derin iki ayrı kompartmana ayrılır (181). Bu iki yapı birbirinden farklıdır. Yüzeysel stromada yuvarlak biçimli hücreler gözlenirken derin kısımda içsi hücreler görülmektedir. Bu düzenlemeden versikan ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (182). İnvitro çalışmalarda HA ve versikan ile zengin perisellüler matriksin mitotik hücrelerde yuvarlak şekil almasına ve ayrılmasına neden olduğu gösterilmiştir (183). Versikanın hücre migrasyonunu düzenlediği ve doku formasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (178). Versikan fibroblastların kollajen I, fibronektin, vitronektin ve laminin ile bağlantılarını bozmakta ve fibroblastların lokal bağlantılarını ayırmaktadır. Versikanın implantasyon bölgesinde artmış olması bu bölgedeki ekstrasellüler matriks değişikliklerinin sorumlusu olabilir. Versikanın implantasyon döneminde oluşturduğu etkileri inceleyen San martini 2003 (178) yılında yaptığı çalışmada versikanın trofoblast invazyonunu kontrol etme de önemli rol oynadığını ileri sürmüştür.

Çalışmada bulgulardan elde edilen ince kesitlerin değerlendirilmesinde epitel yapısı, mikrovilluslar, pinopod varlığı, çekirdek ve sitoplazma değerlendirildi. Kontrol grubundan proöstroz ve östrozda epitel kalınlığının aynı olduğu, mikrovillusların varlığı gözlendi. Diöstroz grubunda ise ayırıcı tanı olarak mikrovillus sayısının ve epitel kalınlığının belirgin oranda azaldığı ve hücrelerin arası mesafenin arttığı gözlendi. Sekretuar fazda önceki fazlarda bol bulunan silyalı hücrelerin azaldığı SEM'de gösterilmiştir. İyi gelişmiş ve silyalı hücre popülasyonu ise erken folliküler fazda gözlenmektedir. Çünkü siliogenezis endojen östrojenden etkilenmektedir (184). Diöstroz grubunda gebelik gerçekleşmeyen dişilerde epiteldeki hücrelerin nekroza gideceği ve dolayısıyla hücre-hücre bağlantılarının bozulduğu sonucuna varıldı. HAS2'nin immunoreaktivitesinin de diöstroz döneminde epitelde azaldığı göz önünde bulundurulacak olursa, diöstroz döneminde epiteldeki hücrelerin ayrılmasının HA'nın adezhif etkisinin azalmasıyla ilişkili olabileceği düşünüldü.

Gebeliğin 5. gününde 4. ve 6. günlere göre mikrovillusların azaldığı ve bleb oluşumu gözlemlendi. Pinopodlar endometriyal reseptivitenin kesin işaretleyicileri olarak bulunmuştur (185). Pinopodlar lümen epitelinin apikal yüzeyinden gelişirler (39) ve sıçanlarda kısmen buruşuk ve uzunlamasına şekillidirler (44). 5. günde bleb oluşumu implantasyona etkisinin olduğunu dolayısıyla pinopodların reseptivitede görevli olduğu sonucuna varıldı.

6.Sonuçlar

Bu çalışmada sıçanlarda normal menstrual siklus evrelerinde ve implantasyon modelinde, gebeliğin 4. , 5. ve 6. gününde alınan uterus örnekleri, HAS2, CD44, CD44s, RHAMM ve Versikan primer antikoları ile immunohistokimyasal teknikle ve ince yapı düzeyindeki değişiklikler elektron mikroskopik teknik ile değerlendirilerek incelendi.

HAS2 immunoreaktivitesinin kontrol grubunda, proöstroz döneminde epitelde ve subepitelde östroz ve diöstroza göre artış olduğu gözlemlendi. Proöstroz dönemindeki HAS2 ekspresyonundaki artışın, bu dönemin en belirgin özelliği olan doku yenilenmesi ile ilişkili olabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. Derin stromada ise diöstroz döneminde proöstroz ve östroza göre artış olduğu gözlemlendi. Bu dönemdeki artışın da stromada gerçekleşen remodeling ile ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

Deney grubuna ait uterus örneklerinin incelemesinde implantasyon döneminde 5. ve 6. günlerinde mature desiduada HAS2 ekspresyonunun 4.gün ekspresyonuna göre artış olduğu gözlemlendi. HAS2'in implantasyon döneminde eksprese edilmiş olması, bu dönemde HA miktarının artmasına ve dolayısı ile HA'in implantasyon üzerine etkisinin olabileceği sonucuna varıldı.

CD44 immunoreaktivitesinin kontrol gruplarına ait uterus epitelinde, menstrual siklusun proöstroz ve östroz dönemlerinde hem mezometriyal, hem de antimezometriyal alanda diöstroz dönemine göre artış olduğu tespit edildi. CD44 ekspresyonunun epitelin fonksiyonunun değiştiği dönemde ortaya çıkması, implantasyon için hazırlanan epitelyal hücrelerin remodeling ile ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

Deney grubunun 5. gününde antimezometrial tarafta CD44 ekspresyonu diöstroz dönemi ile benzer özellikler göstermesine rağmen elde edilen boyanma yoğunluğu 4. ve 6. günden anlamlı olarak yüksek bulundu. CD44'ün 5. günde yüksek olması apozisyon ve adezyon ile ilişkili olabileceğini sonucuna varıldı. CD44 ekspresyonunun deney grubunda epitelde gözlenen 5. güne göre 6. günde gözlenen azalmanın, epitel ile MUC1 arasındaki bağlantının

azalmasına dolayısıyla implantasyona hazırlık döneminde ortaya çıkan değişikliklerin bir belirtisi olarak değerlendirildi.

CD44s immunoreaktivitesi derin stromada menstrual siklusun proöstroz ve östroz döneminde az seviyede gözlemlendi, buna karşılık diöstroz döneminde anlamlı derecede artmış bulundu. Diöstroz döneminde yüzey döküleceği için bu dönemde yüzeyde azalırken, endometriyumun hazırlanması için stromada artmış olması ileri sürülebilir.

İmplantasyon günlerine baktığımızda 4. güne kıyasla mature desidua ve predesidua bölgesinde gebeliğin 5. ve 6. günlerinde CD44s ekspresyonu daha fazla gözlemlendi. CD44s'in implantasyon döneminde artması embriyo adezyon ve invazyonunda etkisinin olduğu amacına yönelik olabilmektedir.

RHAMM immunoreaktivitesi menstrual siklusun proöstroz döneminde epitelin antimezometrial bölgesinde, subepitel, ve derin stromada östroz ve diöstroz dönemlerine göre artış olduğu gözlemlendi. RHAMM'ın proöstroz dönemdeki ekspresyonu epitel ve stromada mitotik aktiviteyi arttırmasının bir sonucu olarak değerlendirildi.

Deney grubuna ait preparatların incelenmesinde RHAMM ekspresyonunun mature ve predesiduada hem 5. gün hem de 6. günde, gebeliğin 4. güne kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi. Bu grupta RHAMM ekspresyonunun fazla olması implantasyon döneminde gebeliğin devamlılığını sağlamak için gerekli olan desidual değişikliklerin devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Versikan immunoreaktivitesi menstrual siklusun diöstroz döneminde subepitel ve derin stromada yoğun boyanma gözlenirken, proöstroz ve östrozda stromada daha az boyanma gözlemlendi. Bu sonuçlar, progesteronun implantasyona hazırlık dönemindeki etkisini versikan üzerinden yaptığının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

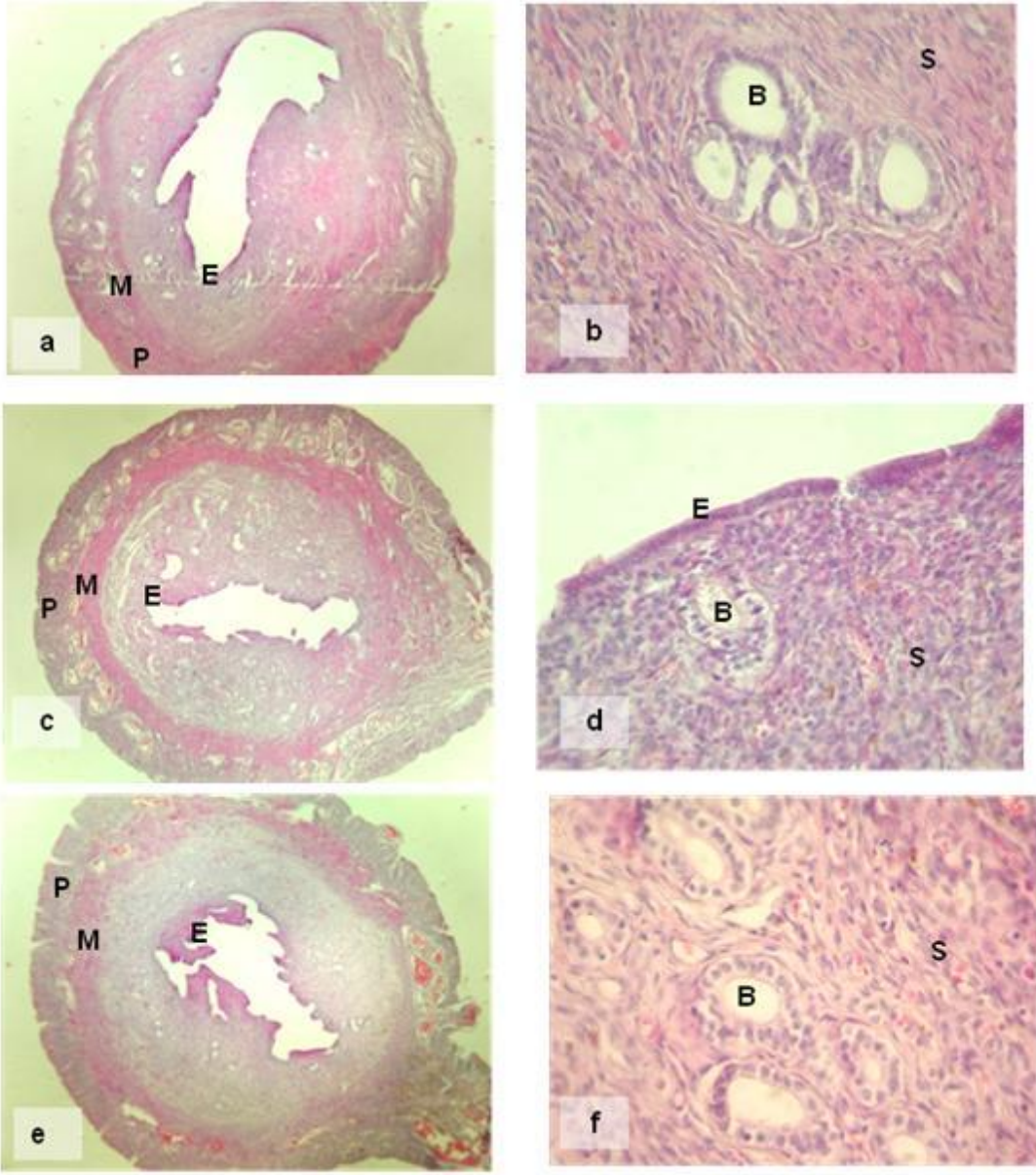
Deney grubu versikan ile boyanmış preparatları incelediğinde 6. günde predesidua, ve mature desidual bölgedeki immunoreaktivitenin anlamlı olarak farklı olduğu gözlemlendi. Versikanın implantasyon bölgesinde artmış olması bu

bölgedeki ekstrasellüler matriks değişiklerinin sorumlusu olabileceği olarak değerlendirildi.

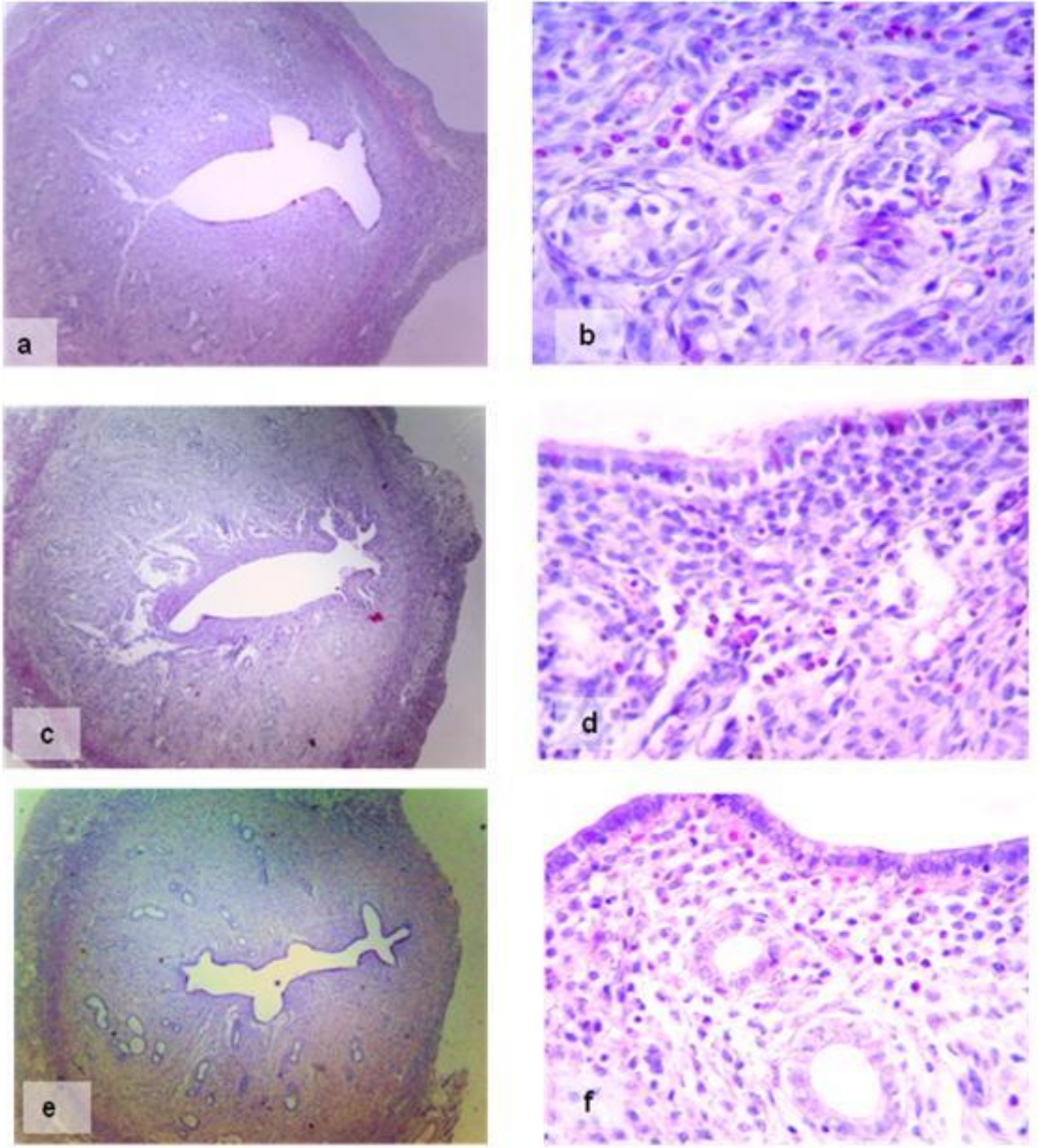
Çalışmada bulgulardan elde edilen ince kesitlerin değerlendirilmesinde epitel yapısı, mikrovilluslar, pinopod varlığı, çekirdek ve sitoplazma değerlendirildi. Kontrol grubundan proöstroz ve östrozda epitel kalınlığının aynı olduğu, mikrovillusların varlığı gözlendi. Diöstroz grubunda ise mikrovillus sayısının ve epitel kalınlığının belirgin oranda azaldığı ve hücreler arası mesafenin arttığı gözlendi. Diöstroz dönemindeki mikrovillusların sayısının azalması silogenezisin endojen östrojenden etkilenmesinin sonucu olarak azaldığı, hücrelerin ayrılmasının da gebelik gerçekteşmediği için nekroza gideceğinin işareti olarak değerlendirildi.

Gebeliğin 5. gününde bleb oluşumu gözlendi. 5. günde bleb oluşumunun gözlenmesi implantasyona etkisinin olduğunu dolayısıyla pinopodların reseptivitede görevli olduğu sonucuna varıldı.

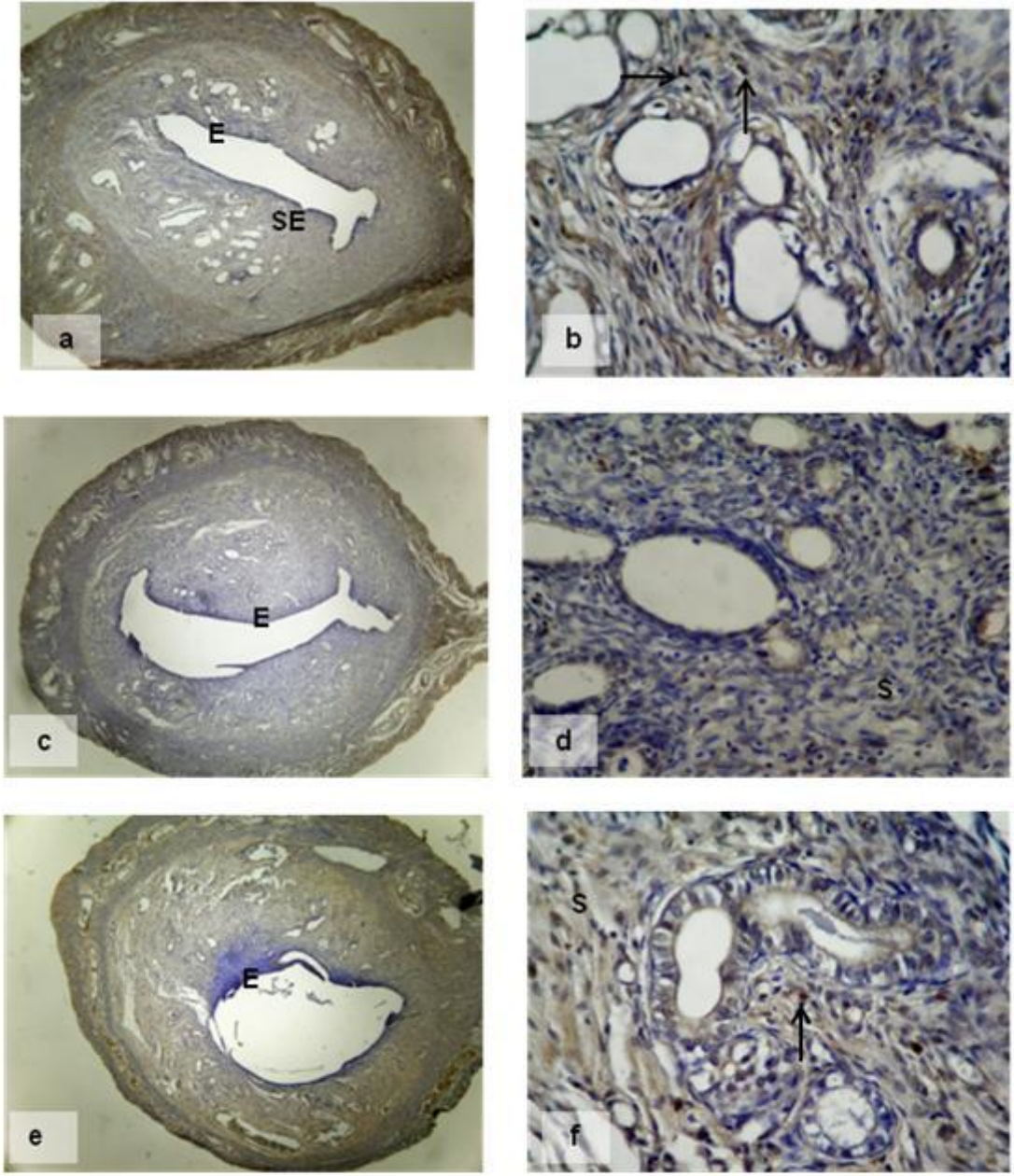
Sonuç olarak bu çalışmada, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik teknik kullanılarak implantasyon dönemindeki HA rolü araştırılmıştır. Deney grubunda ait doku örneklerinde 5. ve 6 gün HAS2, CD44s, RHAMM; 5 gün, CD44 ve 6. günde Versikan immunoreaktivitesinde istatistiksel anlamlı artmış olması; 5 günde elektron mikroskopik olarak epitelde pinopodların gözlenmesi ve silyaların azalmış olması, HA'in implantasyon döneminde önemli rol oynadığının göstergeleri olarak değerlendirildi.



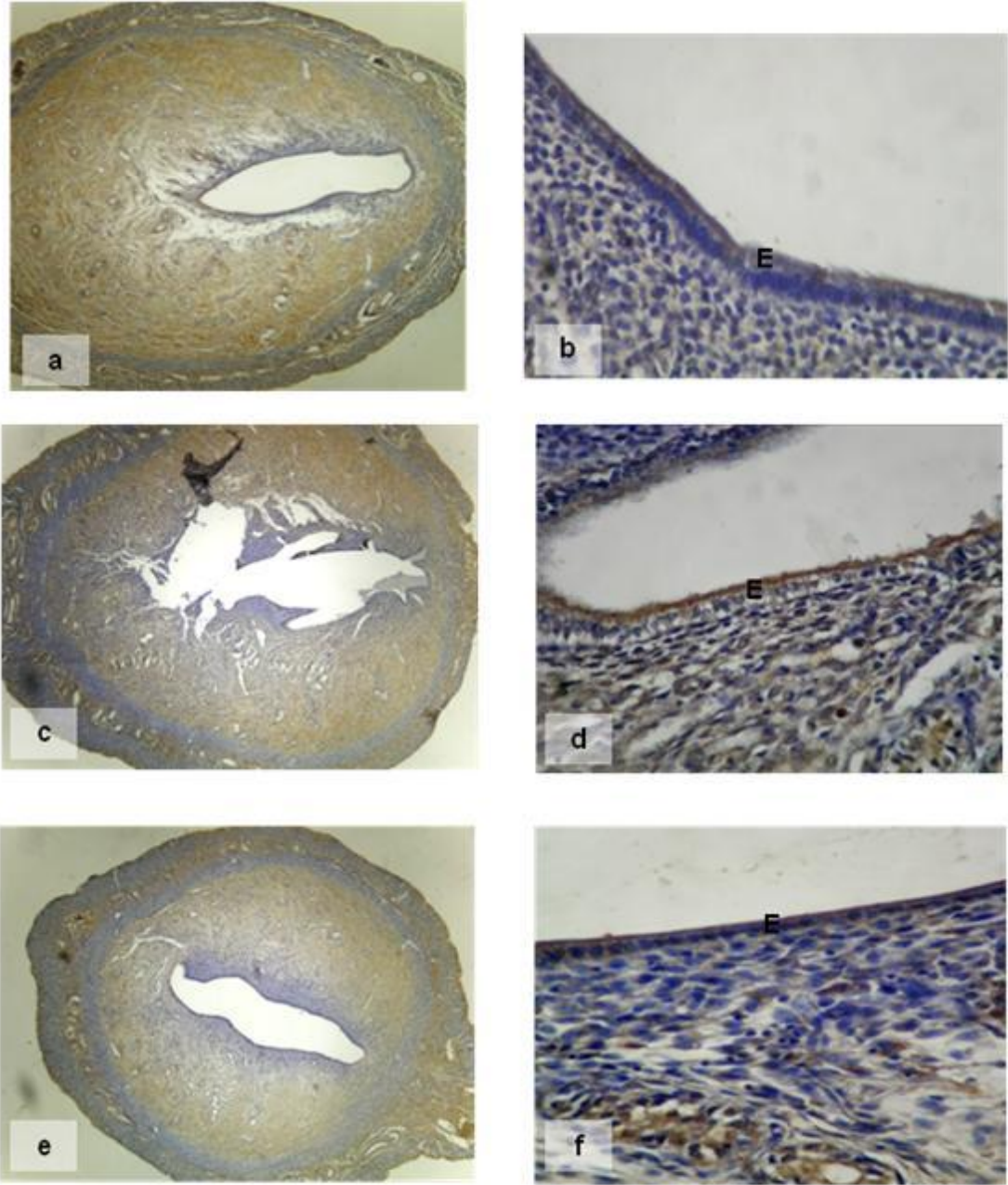
Resim 1: (a) Proöstroz, (c) östroz ve (e) diöstroz döneminde uterus kesitlerinin H-E ile boyanmış preparatlarında her üç tabakada ayırt edilebilmektedir. Perimetrium (P), Myometriyum (M) ve Endometriyum (E), x40. Lümen epitelinin hemen altında endometriyal stromal alanda stromal hücreler, uterus bez (B) yapıları ayırt edilmektedir, x400.



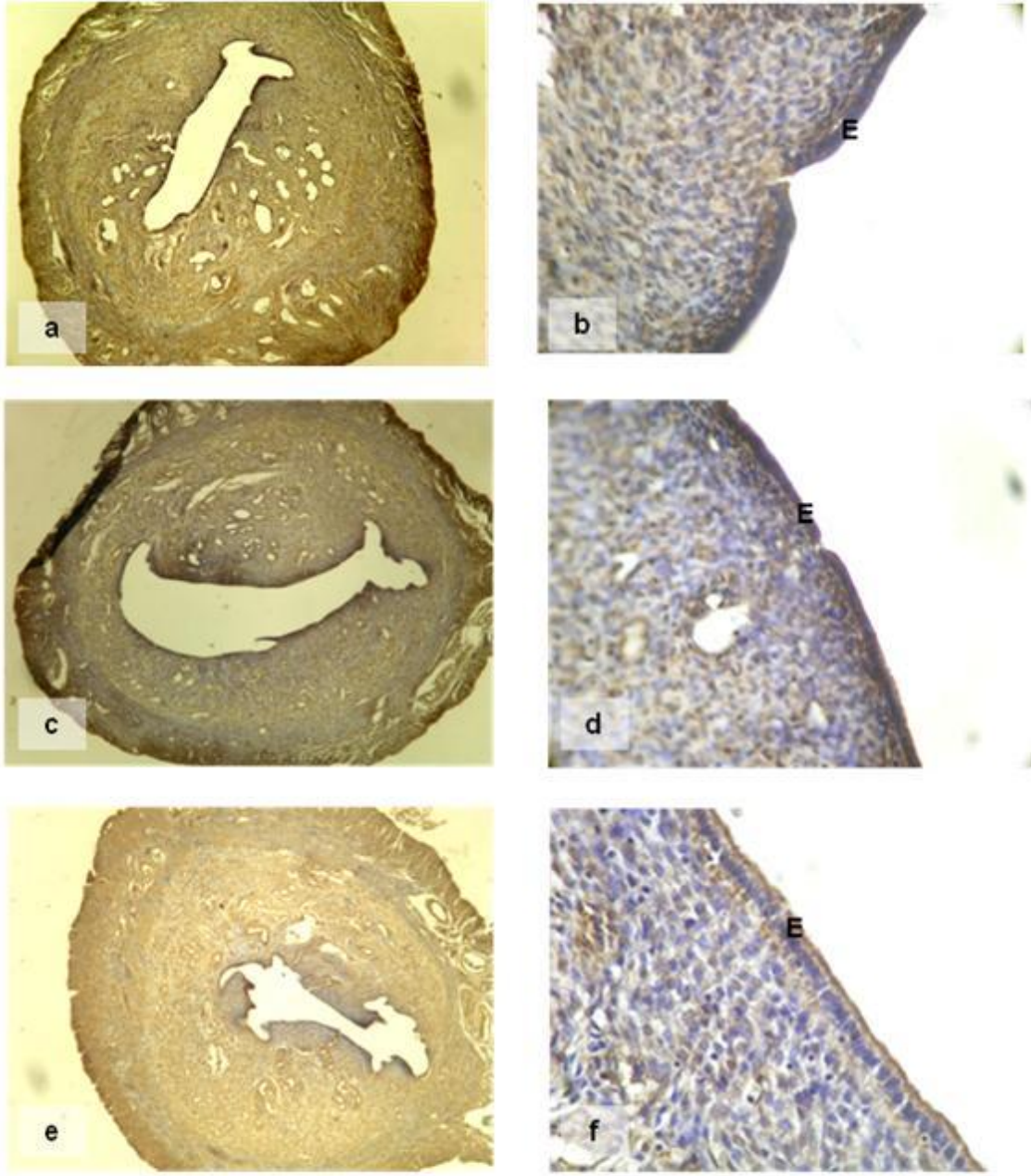
Resim 2: Gebeliğin (a) 4. günü, (c) 5. günü ve (e) 6. gününde uterusun H.E. ile boyanmış preparatlarının panoramik görüntüsü, x40. Tek katlı prizmatik epitelin altında uterus bezleri,(b) stromal hücreler görülmektedir, x400. (f) Endometriyal bezler sayıca artmıştır, x400.



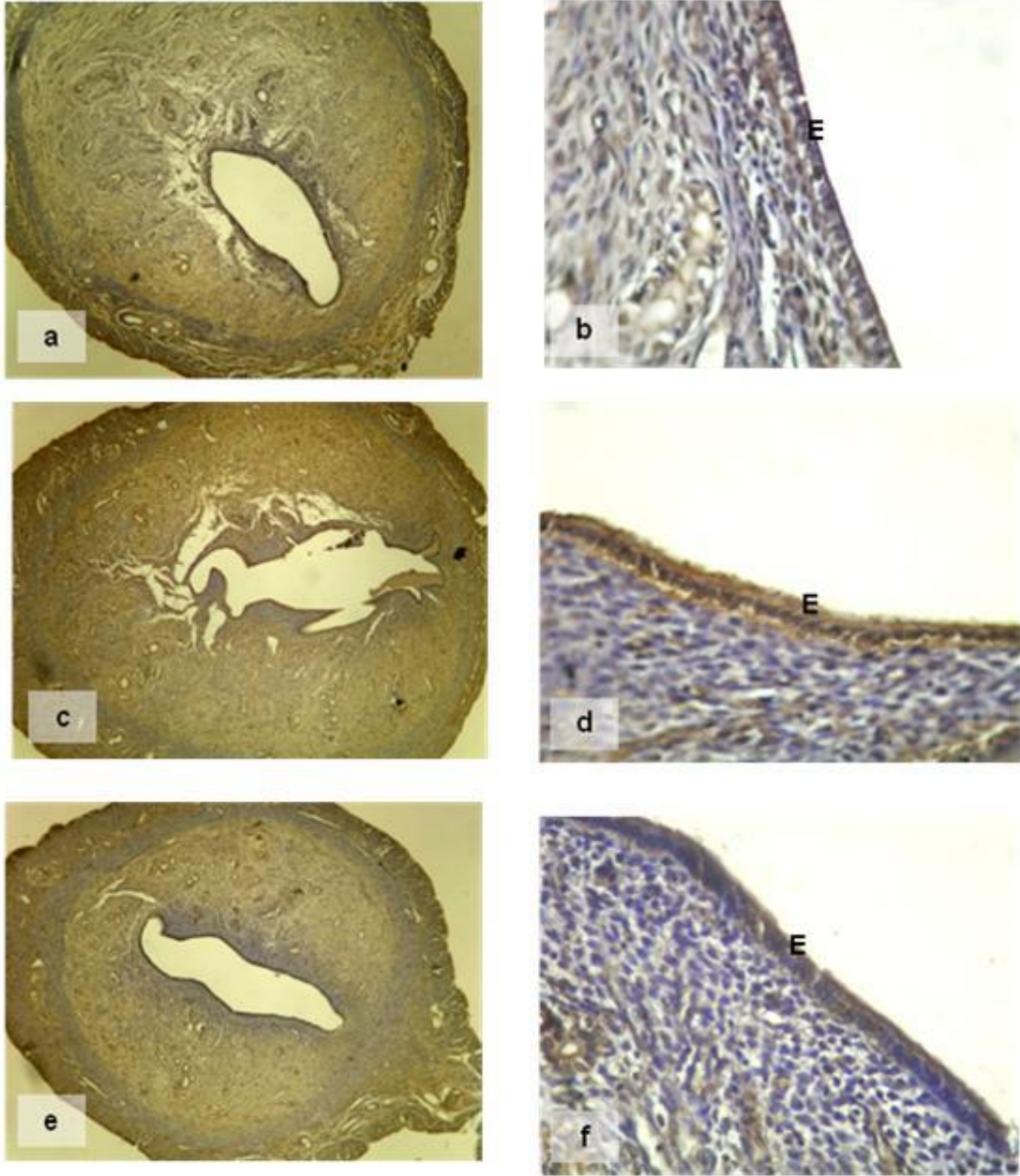
Resim 3: HAS2 antikoruyla boyanmış (a) proöstroz, (c) östroz ve (e) diöstroz dönemindeki uterus kesitlerinin panoramik görüntüsü, x40. (a) Proöstroz döneminde lümen epitelinde (E) ve subepitelyal (SE) alanda yoğun immunoreaktivite gözlenirken, (e) diöstroz döneminde zayıf immunoreaktivite görülmektedir. Östroz (d) döneminde stromada zayıf immunoreaktivite gözlenirken, diöstroz (f) döneminde orta derecede immunoreaktivite ve immukompetant hücreler (→) görülmektedir, x400.



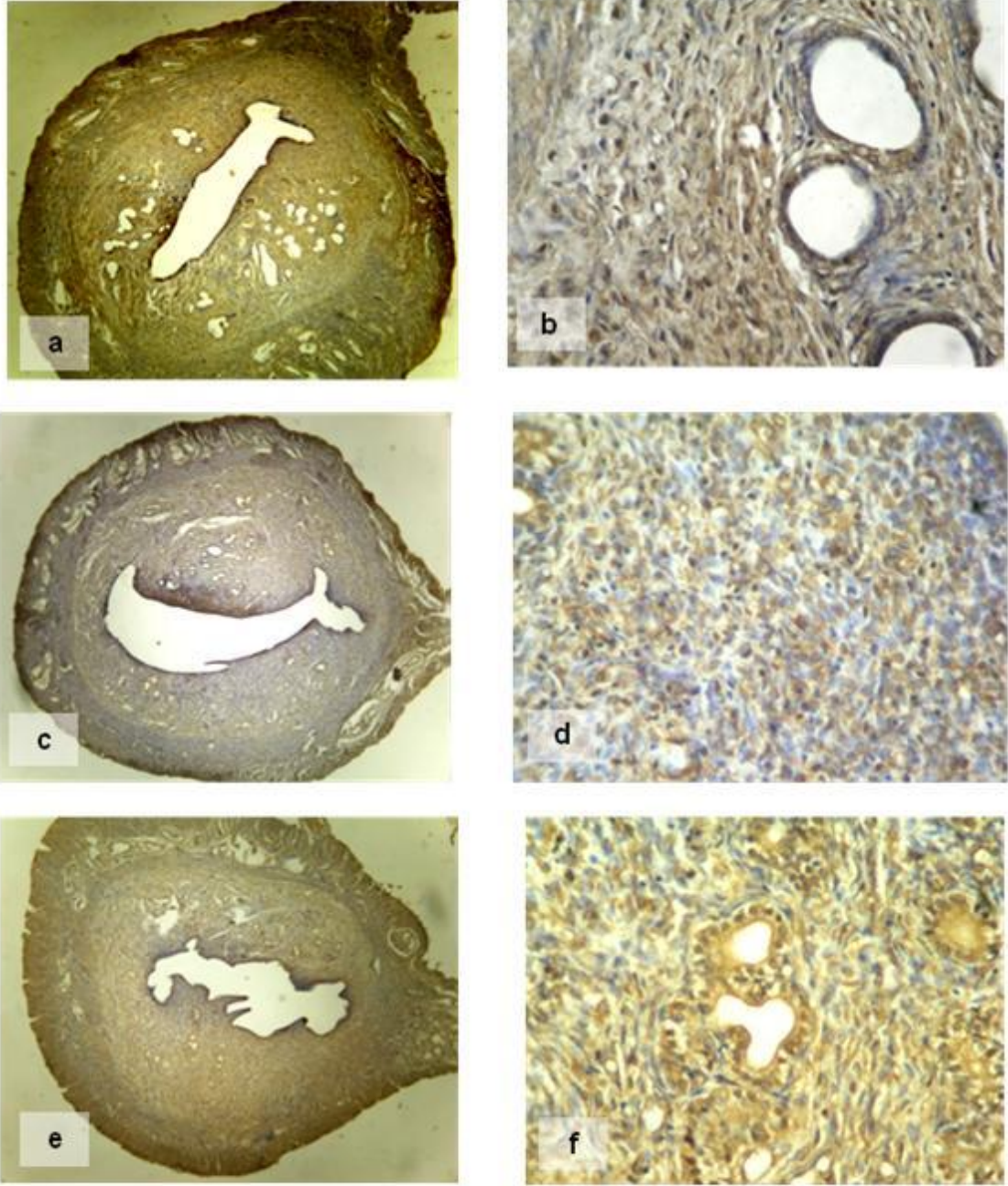
Resim 4: HAS2 antikoruyla boyanmış şıçan uterusunda gebeliğin (a) 4. günü, (c) 5 günü ve (e) 6. gününün panoromik görüntüsü, x40. Gebeliğin (b) 4. gününde ve (d) 5. gününde lümen epitelinde (E) zayıf immunoreaktivite gözlenirken, (f) 6. gününde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x400.



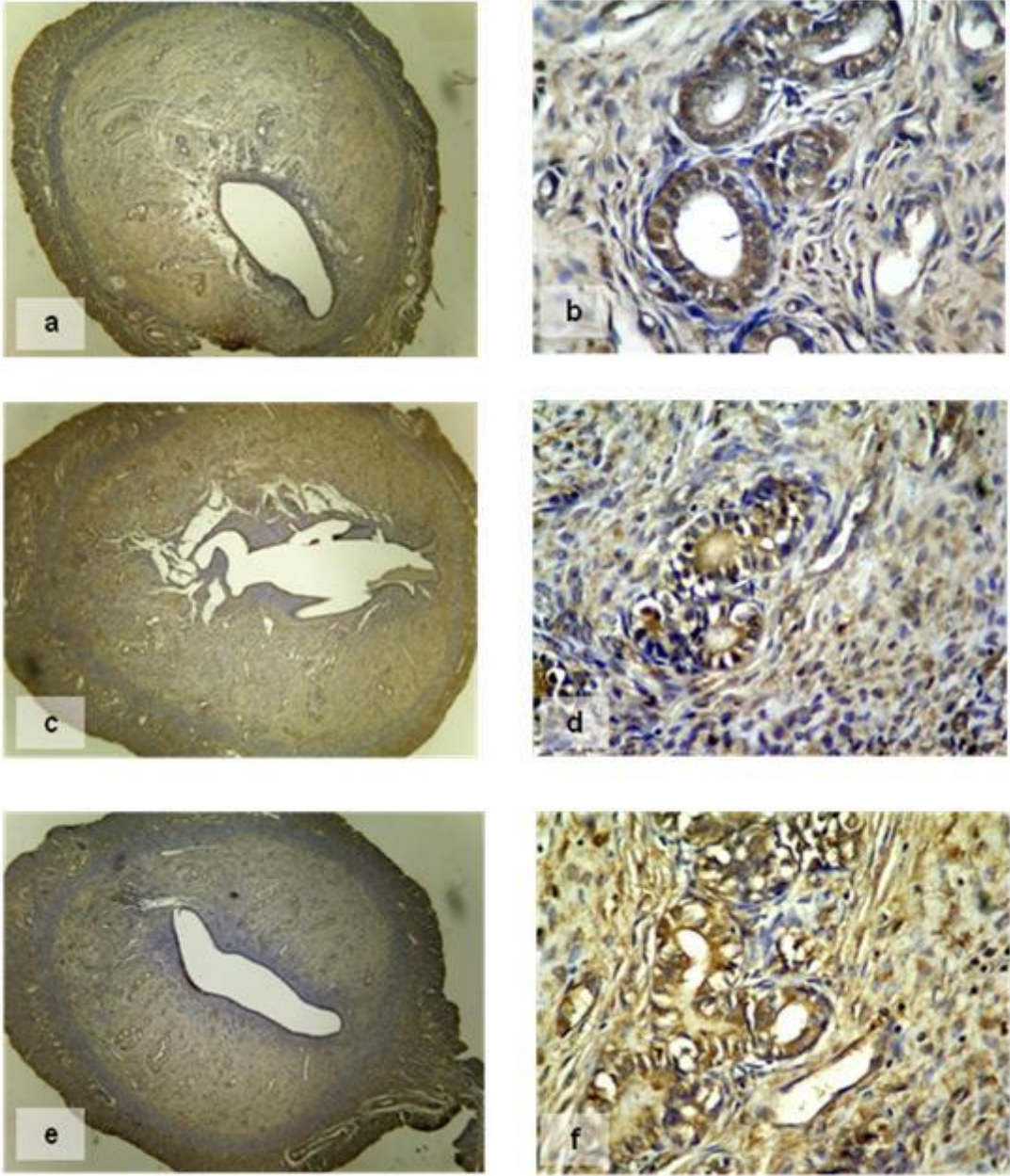
Resim 5: CD44 antikoruyla boyanmış (a) proöstroz, (c) östroz ve (e) diöstroz dönemindeki uterus kesitlerinin panoramik görüntüsü, x40. (b) Proöstroz ve (d) östroz döneminde lümen epitelinde (E) yoğun immunoreaktivite gözlenirken, (f) diöstroz döneminde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x400.



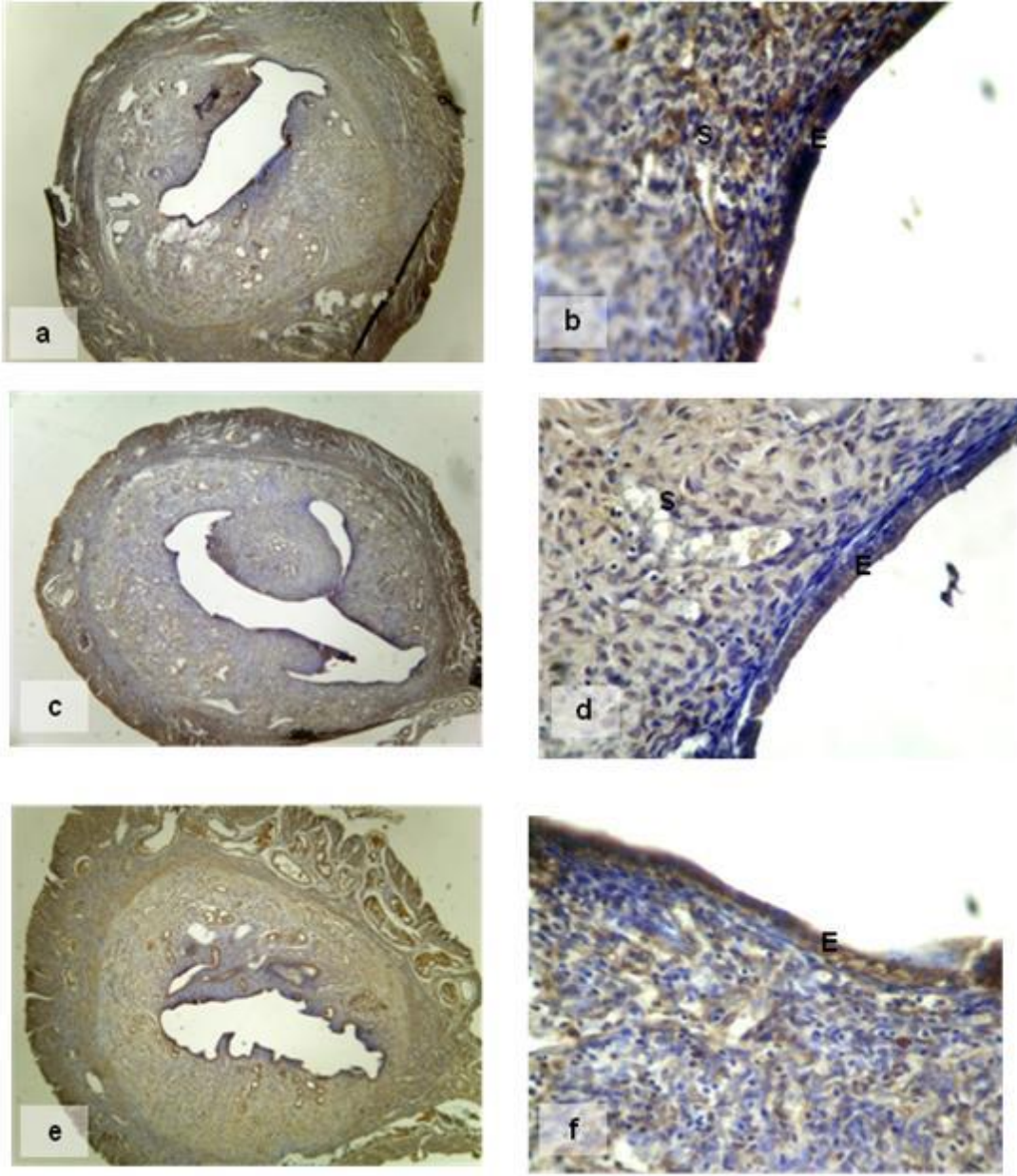
Resim 6: CD44 antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin (a) 4. günü, (c) 5. günü ve (e) 6. gününün panoramik görüntüsü, x40. Gebeliğin (b) 4. günü ve (f) 6. gününde lümen epitelinde (E) zayıf immunoreaktivite gözlenirken, (d) 5. gününde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x400.



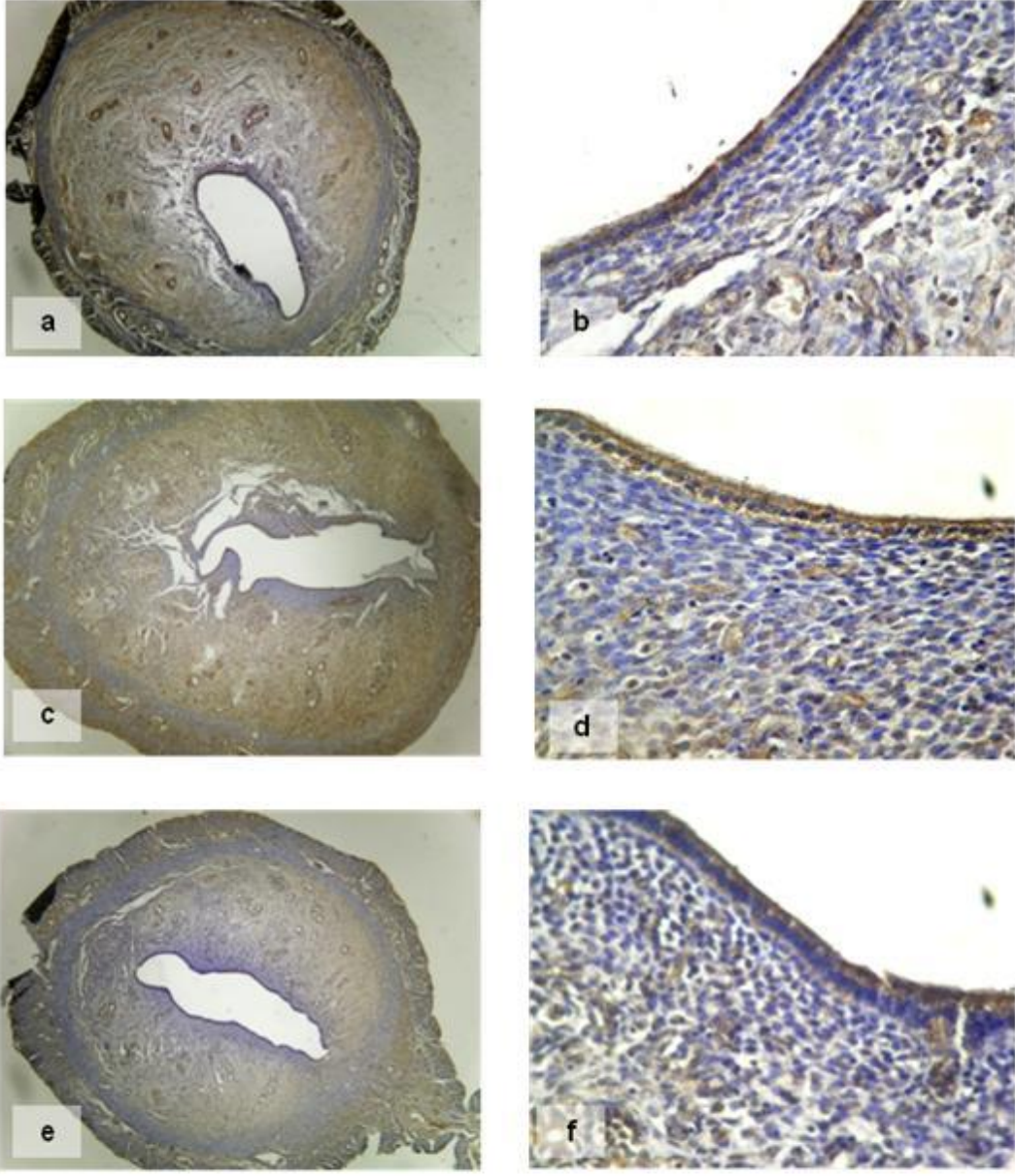
Resim 7: CD44s antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda (a) proöstroz, (c) östroz ve (e) diöstroz döneminin panoramik görüntüsü, x40. (b) Proöstroz ve (d) östroz döneminde stromada zayıf immunoreaktivite gözlenirken, (f) diöstroz döneminde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x400.



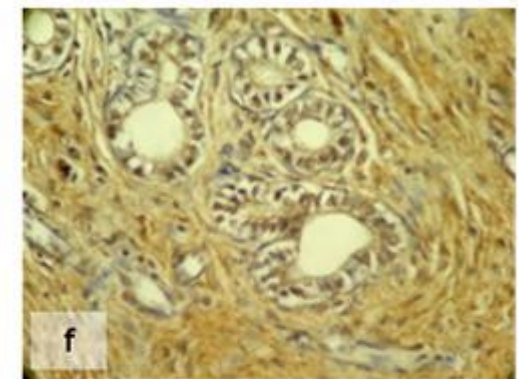
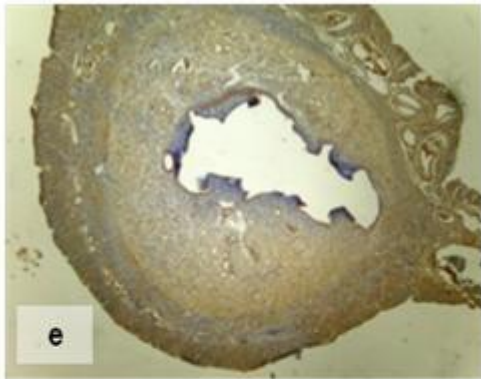
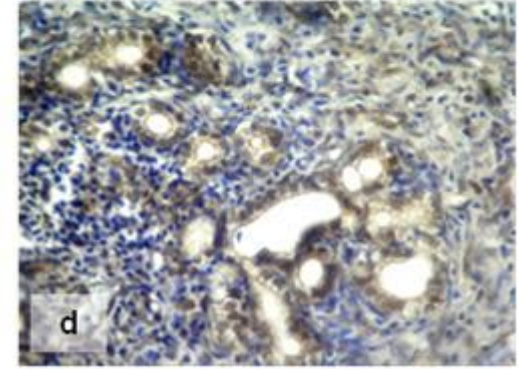
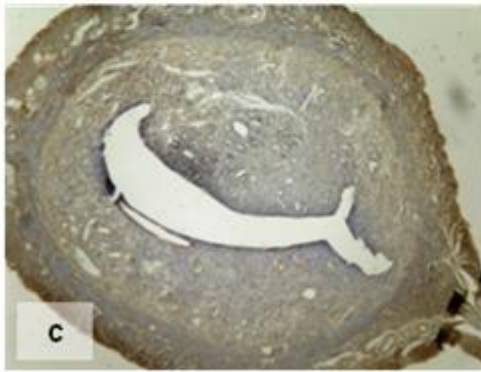
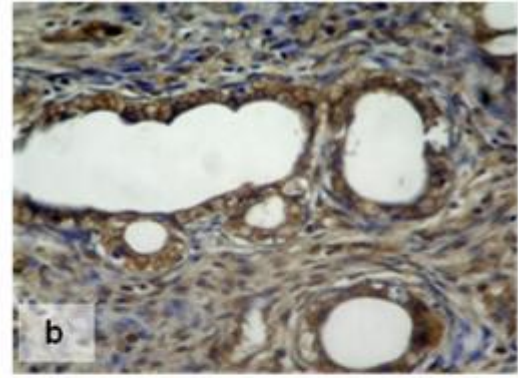
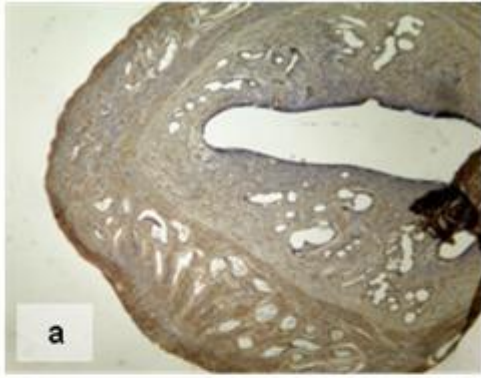
Resim 8: CD44s antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin (a) 4. günü, (c) 5. günü ve (e) 6. gününün panoromik görüntüsü, x40. Gebeliğin (b) 4. günü ve (d) 5. gününde stromada zayıf immunoreaktivite gözlenirken, (f) 6. gününde daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir, x400.



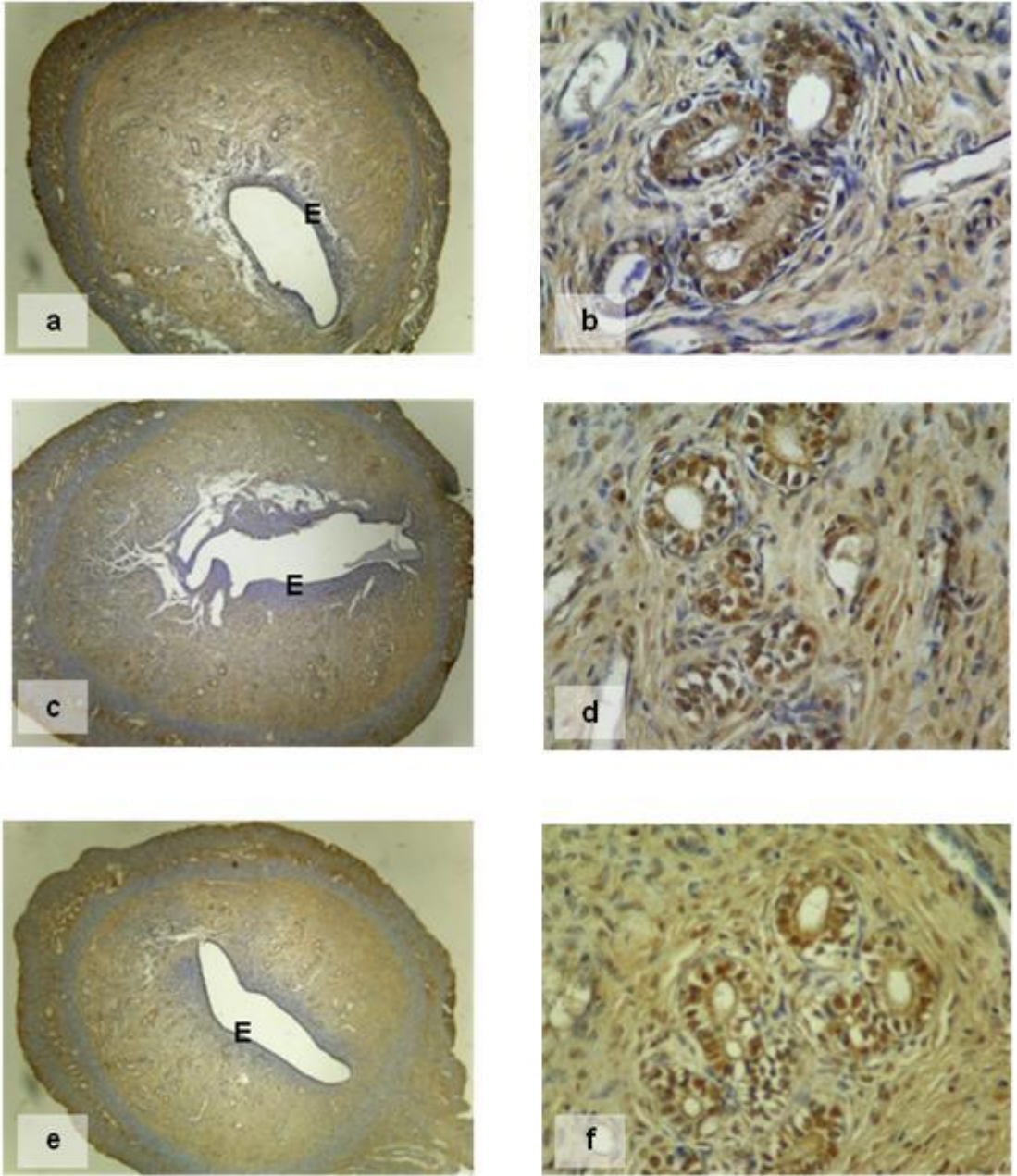
Resim 9: RHAMM antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda (a) proöstroz (c) östroz ve (e) diöstroz döneminin panoramik görüntüsü, x40. (b) Proöstroz döneminde lümen epitelinin (E) antimezometriyal alanında yoğun stromasında (S) zayıf immunoreaktivite, (d) östroz döneminde hem lümen epitelinde hem de stromada zayıf immunoreaktivite, (f) diöstroz döneminde ise lümen epitelinde orta derecede stromada zayıf immunoreaktivite görülmektedir, x400.



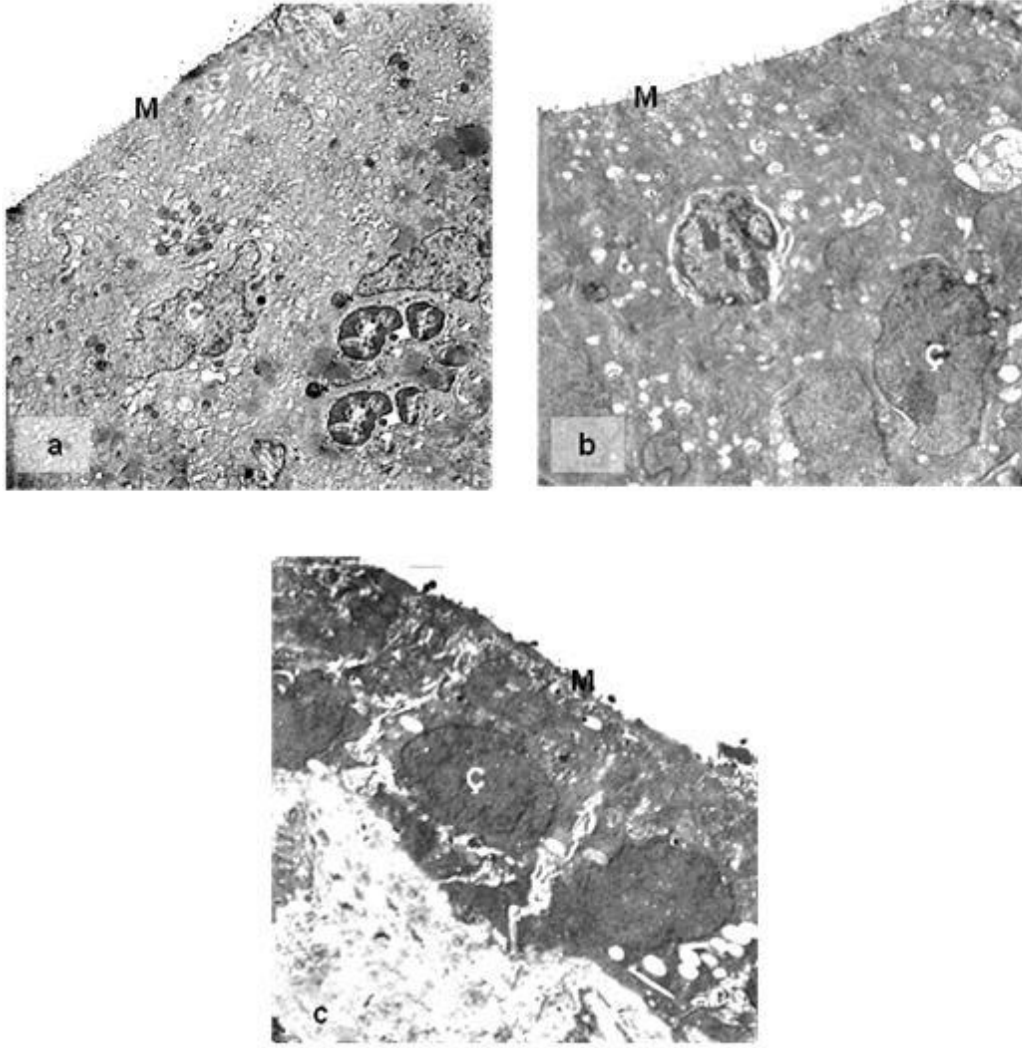
Resim 10: RHAMM antikoruyula boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin (a) 4. günü, (c) 5. günü ve (e) 6. gününün panoramik görüntüsü, x40. Gebeliğin (b) 4. günü ve (f) 6. gününde lümen epitelinde (d) 5. gününe göre daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir, x400.



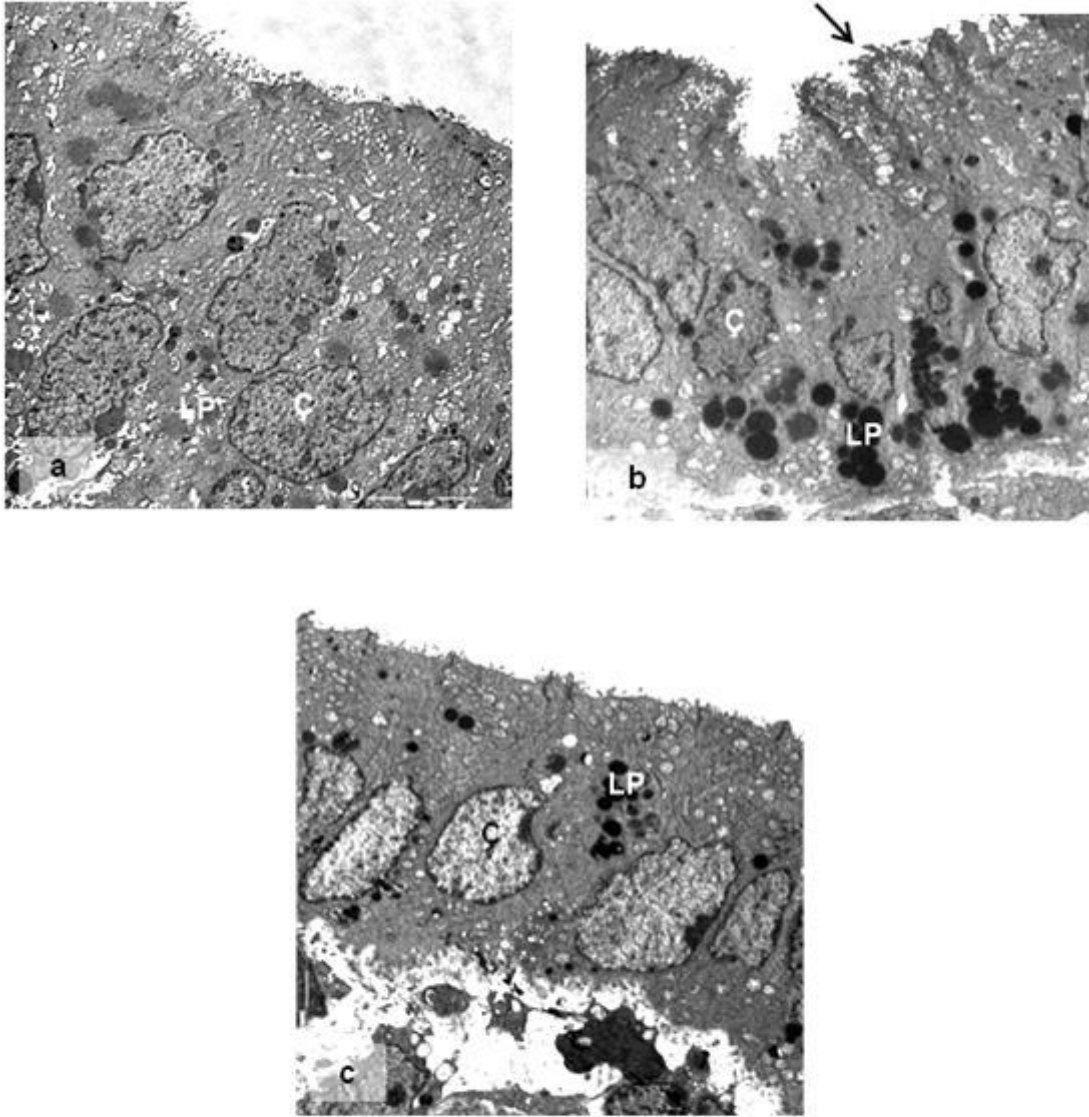
Resim 11: Versikan antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda (a) proöstroz, (c) östroz ve (e) diöstroz döneminin panoramik görüntüsü, x40. (b) Proöstroz ve (d) östroz döneminde stromada zayıf immunoreaktivite gözlenirken, (f) diöstroz döneminde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x400.



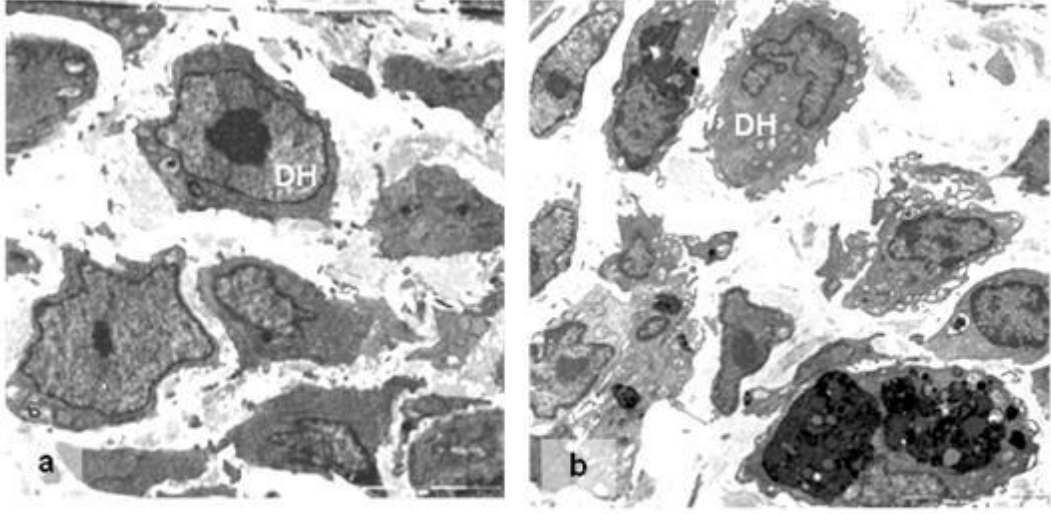
Resim 12: Versikan antikoruyla boyanmış sıçan uterusunda gebeliğin (a) 4. günü, (c) 5. günü ve (e) 6. gününün panoramik görüntüsü. Gebeliğin (a) 4. günü ve (e) 6. gününde lümen epitelinde (E) zayıf immunoreaktivite gözlenirken (c) 5. gününde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x40. Desidual alanda gebeliğin (b) 4. günü ve (d) 5. gününde zayıf immunoreaktivite gözlenirken, (f) 6. gününde orta derecede immunoreaktivite görülmektedir, x400.



Resim 13: (a) Proöstroz , (b) östroz ve (c) diöstroz grubu sıçan uterus örneklerinin ince kesitlerinin geçirimli elektron mikroskobik değerlendirilmesi. Kontrol grubundan proöstroz ve östrozda epitel kalınlığının aynı olduğu , mikrovillusların (M) varlığı gözlemlendi. Diöstroz grubunda ise mikrovillus sayısının ve epitel kalınlığının belirgin oranda azaldığı ve hücreler arası mesafenin arttığı gözlemlendi, x1250.(Ç: Çekirdek)



Resim 14: Gebeliğin (a) 4. günü, (b) 5. günü ve (c) 6. günü sıçan uterus örneklerinin, ince kesitlerinin geçirimli elektron mikroskobik değerlendirilmesi. Gebeliğin 5 gününde bleb (→) oluşumu gözlemlendi, x1250. (LP: Lipit damlacıkları, Ç: Çekirdek)



Resim 15: Gebeliğin (a) 5. günü ve (b) 6. günü sıçan uterus örneklerinde desidual hücrelerin (DH) elektron mikroskopik değerlendirilmesi, x1250.

8. KAYNAKLAR

1. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo Implantation. *Developmental Biology*, 2000; 223: 217-237.
2. Gökçimen A, Temel S. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004; 11: 25-33.
3. Urman B, Yakin K, Ata B, Işıklar A, Balaban B. Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 2008; 90(3): 604-612.
4. Schoolcraft W, Lane M, Stevens J, Gardner DK. Increased hyaluronan concentration in the embryo transfer medium results in a significant increase in human embryo implantation rate. *Fertil Steril*, 2002; 78 (1): 5.
5. Hazlett WD, Meyer LR, Nasta TE, et al. Impact of EmbryoGlue as the embryo transfer medium. *Fertil Steril*, 2007; [Epub ahead of print].
6. Loutradi KE, Tarlatzi TB, Kolibianakis EM, Tarlatzis BC. Does hyaluronan improve embryo implantation?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2008, 20: 305–307.
7. Kierszenbaum AL(Ed): *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual döngü (siklus) (Çev Ed.R Demir)*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 577-580.
8. Gürsoy E, Koptagel E, Ergin K. *Hücre-Dokuları-Genel Embriyoloji, Dişi üreme sistemi*, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, 2009; 196-201.
9. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO(Ed): *Temel Histoloji, Dişi üreme sistemi (Çev Ed. Y Aytekin)*, Barış Kitabevi, İstanbul, 1998; 433-435.
10. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff MV. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reproduction Update*, 2006; 12: 617-630.

11. Karaöz E. Özel Histoloji, Genital sistem histolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta, 2002; 228.
12. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 2006; 12: 731-746.
13. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, 2004; 128: 657-668.
14. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction*, 2004; 128: 679-695.
15. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GAA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: Their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2006; 186: 38-53.
16. Sakakibara H, Taga M, Saji M. Gene expression of epidermal growth factor in human endometrium during decidualization. *J. Clin. Endoc. Metab*, 1994; 79: 223-226.
17. Lim HJ, Dey SK. HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Experimental Cell Research*, 2009; 315: 619-626.
18. Slater M, Murphy CR. Transforming growth factors α and β -1 are co-expressed in the uterine epithelium during early pregnancy. *Cell Tissue Research*, 2000; 300: 315-320.
19. Drummond A, Findlay J. Focus on TGF- β signalling. *Society for Reproduction and Fertility*, 2006; 132: 177-178.
20. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Society for Reproduction and Fertility*, 2006; 132: 217-232.
21. Rutanen EM. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the endometrium. Effect of intrauterine levonorgestrel delivery. *Human Reproduction*, 2000; 15: 173-181.

22. Ghosh D, Sengupta J. Endocrine and paracrine correlates of endometrial receptivity to blastocyst implantation in the human. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2004; 48: 6–30.
23. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update*, 2005; 11: 613-630.
24. Ram ES, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005; 3: 56.
25. Kriissel JS, Hirchenhain J, Schanz A, Hess AP, Huang HY, Simon C, Polan ML. Interleukin-1 and Implantation. *Immunology of Pregnancy*, 2006; 294-302.
26. Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction*, 2005; 130: 131-145.
27. Salmani MK, Hosseini A, Valojerdi MR. Endometrial Receptivity to Implantation in Humans: Biochemical and Molecular Aspects. *Yakhteh Medical Journal*, 2008; 10: 1-24.
28. Wolff MV, Linke IC, Heid D, Krusche CA, Hellwig KB, Karl C, Beier HM. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Molecular Human Reproduction*, 1999; 5: 146-152.
29. Paszkiewicz GA, Sredzinska K. Expression of MUC1 mucin in full-term pregnancy human placenta. *Advances in Medical Sciences*, 2008; 53: 54-58.
30. Platsis SA, Corcoran CM, Kaye PL, Cavanagh AC, Morton H. Early Pregnancy Factor is Required at Two Important Stages of Embryonic Development in the Mouse. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2000; 43: 223-233.
31. Rosario GX, Modi DN, Sachdeva G, Manjramkar DD, Puri CP. Morphological events in the primate endometrium in the presence of a

- preimplantation embryo, detected by the serum preimplantation factor bioassay. *Human Reproduction*, 2005; 20: 61-71.
32. Neill CO. The role of paf in embryo physiology. *Human Reproduction Update*, 2005; 11: 215-228.
33. Bulgurcuoğlu S, Özsait B, Attar E. Büyüme Faktörlerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi üzerindeki Etkisi. *Artemis*, 2003; 4: 18-26.
34. Kennedy TG, Carolina GM, Phang SM. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Society for Reproduction and Fertility*, 2007; 134: 635-643.
35. Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Guyre PM, Wira CR, Fanger MW. IFN- γ is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of Immunology*, 1998; 160: 5145-5153.
36. Kodaman PH, Taylor HS. Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin N Am*, 2004; 31: 745– 766.
37. Bahar L, Baykal T. Endometriyal reseptivitenin implantasyondaki rolü. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008; 1: 1-6.
38. Bayçu C, ÖZATİK O, Gürer F, İnalöz SS, Gürer D. Endometriyum Reseptivitesi Tuba Epitelinin Oosit ve Embriyo ile Otokrin ve Parakrin İlişisine mi Bağlıdır?. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 2009; 10: 133-139.
39. Develioglu OH, Nikas G, Hsiu JG, Toner JP, Jones HW JR. Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. *Fertil Steril*, 2000; 74: 767– 770.
40. Lopata A, Bentin-Ley U, Enders A. 'Pinopodes' and implantation. *Rev Endocr Metab Disord*, 2002; 3: 77–86.
41. Nilsson O. Structural differentiation of luminal membrane in rat uterus during normal and experimental implantations. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 1966; 125: 152–159.

42. Bentin-Ley U, Horn T, Sjogren A, Sorensen S, Falck Larsen J, Hamberger L. Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions in vitro. *J Reprod Fertil*, 2000; 120: 337–350.
43. Quinn CE, Detmar J, Casper RF. Pinopodes are present in *Lif* null and *Hoxa10* null mice. *Fertil Steril*, 2007; 88: 1021–1028.
44. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat*, 1973; 138: 277–299.
45. Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med* 2000;18:229–235.
46. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, 2009; 15: 229–236.
47. Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. Cytokines and Chemokines during Human Embryo Implantation: Roles in Implantation and Early Placentation. Thieme Medical Publishers, 2007; 25: 437-444.
48. Alikani M. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. *Human Reproduction*, 2005; 20: 3369–3375.
49. Blundell R. Epithelial cells interaction-Review paper. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*, 2006; 2: 299-306.
50. Ergüler G, Demir N, Demir R. Adezyon Moleküllerinin Yapısal Özellikleri ve Fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2002; 22: 313-327.
51. Bahar L, Baykal T. Endometriyal reseptivitenin implantasyondaki rolü. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008; 1: 1-6.
52. Terekeci MH, Şahan B, Top C. Hücre Adezyon Molekülleri. *Nobel Medicus*, 2008; 4: 4-10.
53. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan its nature, distribution, function and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997; 242: 27-33.
54. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages

- from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology*, 2008; 18: 288–295.
55. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 2004; 4: 528–539.
56. Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation. *Trends in Immunology*, 2005; 26: 637–643.
57. Milner CM, Higman VA, Day AJ. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator?. *Biochemical Society Transactions*, 2006; 34: 446–450.
58. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 1985; 228: 1324–1326.
59. Fieber C, Baumann P, Vallon R, Termeer C, Simon JC, Hofmann M, Angel P, Herrlich P, Sleeman JP. Hyaluronan-oligosaccharides-induced transcription of metalloproteases. *Journal of Cell Science*, 2003; 117: 359–367.
60. Lacob S, Knudson CB. Hyaluronan fragments activate nitric oxide synthase and the production of nitric oxide by articular chondrocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2006; 38: 123–133.
61. Horton MR, Shapiro S, Bao C, Lowenstein CJ, Noble PW. Induction and regulation of macrophage metalloprotease by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *Journal of Immunology*, 1999; 162: 4171–4176.
62. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 2002; 195: 99–111.
63. Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, Sugahara KN, Miyauchi T, Sako Y, Yanagida T, Miyasaka M. Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279: 4541–4550.
64. Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, Heldin P. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in

- a CD44 and CXCL1/GRO1-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280: 24195–24204.
65. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 38013–38020.
66. Tammi MI, Tammi R. Hyaluronan in the Epidermis. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>, 2006.
67. Uchiyama H, Dobashi Y, Ohkouchi K, Nagasawa K. Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 1990; 265: 7753–7759.
68. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*, 2007; 80: 1921–1943.
69. Russo RC, Garcia MG, Barrientos G, Orsal AS, Viola M, Moschansky P, Ringel F, Passi A, Alaniz L, Hajos S, Blois SM. Murine Abortion is Associated with Enhanced Hyaluronan Expression and Abnormal Localization at the Fetomaternal Interface. *Placenta*, 2009; 30: 88–95.
70. Valojerdi MR, Karimian L, Yazdi PE, Gilani MA, Madani T, Baghestani AR. Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective, randomized clinical trial study. *J Assist Reprod Genet*, 2006; 23: 207–212.
71. Loutradi KE, Prassas I, Bili E, Sanopoulou T, Bontis I, Tarlatzis BC. Evaluation of a transfer medium containing high concentration of hyaluronan in human in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2007; 87: 48–52.
72. Lane M, Maybach JM, Hooper K, Hasler JF, Gardner DK. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol Reprod Dev* 2003;64: 70–78.
73. Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, et al. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium

- on development and survival rates of fresh and frozenthawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 2002;124: 141–153.
74. Salamonsen LA, Shuster S, Stern R. Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle. *Cell Tissue Research*, 2001; 306: 335–340.
75. Afify AM, Craig s, Paulino AFG. Temporal Variation in the Distribution of Hyaluronic Acid, CD44s, and CD44v6 in the Human Endometrium Across the Menstrual Cycle. *Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology*, 2006; 14: 328-333.
76. Brown JJ, Papaioannou VE. Distribution of hyaluronan in the mouse endometrium during the periimplantation period of pregnancy. *Differentiation*, 1992; 52: 61–68.
77. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan Synthases. *The Journal Of Biological Chemistry*, 1997; 272: 13997–14000.
78. Itano N, Kimata K. Mammalian Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life*, 2002; 54: 195–199.
79. Hellström M. Hyaluronan and the Receptor CD44 in the Heart and Vessels. *Umea University Medical Dissertations*, 2007.
80. Uchiyama T, Sakuta T, Kanayama T. Regulation of hyaluronan synthases in mouse uterine cervix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005; 327: 927–932.
81. Pasonen-Seppanen, S., et al., *EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation*. *J Invest Dermatol*, 2003. 120(6): p. 1038-44.
82. Meyer K. Hyaluronidases. In: Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes*. Academic pres. New York, 1971; 307–320.
83. Cramer JA, Bailey LC, Bailey CA, Miller RT. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994; 1200: 315–321.

84. Hotez PJ, Narasimhan S, Haggerty J, Milstone L, Bhopale V, Schad GA, Richards FF. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larva and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. *Infection and Immunity*, 1992; 60: 1018–1023.
85. Vigdorovich V, Strong RK, Miller AD. Expression and characterization of a soluble, active form of the Jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2. *Journal of Virology*, 2005; 79: 79–86.
86. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology*, 2001; 20: 499–508.
87. Reitinger S, Laschober GT, Fehrer C, Greiderer B, Lepperdinger G. Mouse testicular hyaluronidase-like proteins, SPAM1 and Hyal5 but not Hyal1 degrade hyaluronan. *Biochemical Journal*, 2007; 401: 79–85.
88. Afify AM, Stern M, Guntenhoener M, Stern R. Purification and characterization of human serum hyaluronidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993; 305: 434–441.
89. Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. HYAL2—less active, but more versatile?. *Matrix Biology*, 2001; 20: 509–514.
90. Duh FM, Dirks C, Lerman MI, Miller AD. Amino acid residues that are important for Hyal2 function as a receptor for Jaagsiekte sheep retrovirus. *Retrovirology*, 2005; 2: 59–69.
91. Nicoll SB, Barak O, Csoka AB, Bhatnagar RS, Stern R. Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002; 292: 819–825.
92. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998; 252: 824–829.
93. Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 2003; 69: 446–454.

94. Oettl M, Hoehstetter J, Asen I, Bernhardt G, Buschauer A. Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003; 18: 267–277.
95. Spicer AP, Joo A, Bowling Jr, RA. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core proteins genes: the missing links. *Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278: 21083–21091.
96. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 1991; 65: 13-24.
97. Nandi A, Estess P, Siegelman M. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity*, 2004; 20: 455-465.
98. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Günthert U. CD44 variant isoforms in non- Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood*, 1995; 85: 2885-2899.
99. Wittig BM, Stallmach A, Zeitz M, Günthert U. Functional involvement of CD44 variant 7 in gut immune response. *Pathobiology*, 2002; 70: 184-189.
100. Mackay CR, Terpe H-J, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol*, 1994; 124: 71-82.
101. Iza AM. Regulation of Fas Mediated Apoptosis by CD44. *Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel*, 2005.
102. Nakamura H, Suenaga N, Taniwaki K, Matsuki H, Yonezawa K, Fujii M. Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, 2004; 64: 876-882.

103. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*, 2001; 153: 893-904.
104. Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, Stamenkovic I, Plowman G, Aruffo A. CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol*, 1995; 128: 687-698.
105. Perschl A, Lesley J, English N, Hyman R, Trowbridge I. Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts. *J. Cell. Sci*, 1995; 108: 1033-1041.
106. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, 2000; 14: 163-176.
107. Yu WH, Woessner JF, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev*, 2002; 16: 307-323.
108. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev*, 2002; 16: 3074-3086.
109. Lammich S, Okochi M, Takeda M, Kaether C, Capell A, Zimmer AK, Edbauer D, Walter J, Steiner H, Haass C. Presenilin dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *J Biol Chem*, 2002; 277: 44754-44759.
110. Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M (1995) CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod* 10:425–430.
111. Chen L. CD44 Function as a growth factor co-receptor. Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, 2003.

112. Khaldoyanidi S, Karakhanova S, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. CD44 variant-specific antibodies trigger hemopoiesis by selective release of cytokines from bone marrow macrophages. *Blood*, 2002; 99: 3955-3961.
113. Dimitroff CJ, Lee JY, Raffii S, Fuhlbrigge RC, Sackstein R. CD44 is a major E-Selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*, 2001; 153: 1277-1286.
114. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med*, 1996; 183: 1119-1130.
115. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html>
116. Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, Lange LA, Wang C, Curpen GD, Savani RC, and Turley EA. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell*, 1995; 82: 19-26.
117. Entwistle J, Hall CL, Turley EA. HA receptors: Regulators of signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem*; 1996; 61: 569-577.
118. Crainie M, Belch AR, Mant MJ, and Pilarski LM. Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: Identification of three distinct RHAMM variants. *Blood*, 1999; 93: 1684-1696.
119. Nagy JI, Price ML, Staines WA, Lynn BD, Granholm AC. The hyaluronan receptor RHAMM in noradrenergic fibers contributes to axon growth capacity of locus coeruleus neurons in an intraocular transplant model. *Neuroscience*, 1998; 86: 241-255.
120. Seyfried NT, Day AJ, Almond A. Experimental evidence for all-ornone co-operative interactions between the G1-domain of versican and multivalent hyaluronan oligosaccharides. *Matrix Biology*, 2006; 25: 14–19.

121. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol*, 2002; 14: 617–623.
122. Rahmani M, Read JT, Carthy JM, McDonald PC, Wong BW, Esfandiarei M, Si X, Luo H, Rennie PS, McManus BM. Regulation of the versican promoter by the beta-catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*, 2005; 280: 13019–13028.
123. Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev. Biol*, 2002; 2: 8. doi: 10.1186/1471-213X-2-8.
124. Theocharis AD, Tsolakis I, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. *Adv. Pharmacol*, 2006; 53: 281–295.
125. Theocharis AD. Versican in Health and Disease. *Connective Tissue Research*, 2008; 49: 230–234.
126. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ. Res.*, 2004; 94: 1158–1167.
127. Wu YJ, Lapierre D, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res*, 2005; 15: 483–494.
128. Theocharis AD, Theocharis DA, DeLuca G, Hjerpe A, Karamanos NK. Compositional and structural alterations of chondroitin and dermatan sulfates during the progression of atherosclerosis and aneurysmal dilatation of the human abdominal aorta. *Biochimie*, 2002; 84: 667–674.
129. Miguel-Serra L, Serra M, Hernandez D, Domenzain C, Docampo MJ, Rabanal RM, de Torres I, Wight TN, Fabra A, Bassols A. V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Lab. Invest*, 2006; 86: 889–901.
130. Cattaruzza, S, Perris R. Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading. *Matrix Biol*, 2005; 24: 400–417.

131. Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol*, 1992; 116: 1055-1062.
132. Wu YJ, Pierre DPL, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Research*, 2005; 15: 483-494.
133. Koochekpour S, Pilkington GJ, Merzak A. Hyaluronic acid/ CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells *in vitro*. *Int J Cancer*, 1995; 63: 450-454.
134. Matsumoto K, Shionyu M, Go M, *et al*. Distinct interaction of versican/PG-M with hyaluronan and link protein. *J Biol Chem*, 2003; 278: 41205-41212.
135. Kawashima H, Atarashi K, Hirose M, *et al*. Oversulfated chondroitin/ dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J Biol Chem*, 2002; 277: 12921-12930.
136. Hiller SG. Paracrine control of follicular estrogen synthesis. *Reprod Endoc*. 1991; 9: 332-340.
137. Soyduñç HO, Çamlıca H, Duranyıldız D, Sağlam EK, Taş F, Yasasever V, Dalay N. Matriks Metalloproteinazlar ve Akciğer Kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 2006; 21: 53-56.
138. Seyfeli S, Üstünel İ, Değer N, Demir R. Ekstrasellüler Matriks ve Bazı Kardiovasküler Hastalıklarla İlişkisi. *Turkiye Klinikleri J Cardiology*, 2001; 14: 359-369.
139. Zini JM, Murray SC, Graham CH. Characterization of urokinase receptor expression by human placental trophoblast. *Blood*, 1992; 79: 2917-2929.
140. Gardner DK, Rodriegez-Martinez H, Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum Reprod*, 1999; 14: 2575–2580.
141. Salomonsen, F. 1968: The moult migration. – *Wildfowl*, 19: 5-24.

142. Wynn RM, Jollie WP. The human endometrium. Cyclic and gestational changes. *Biology of the uterus*, 1989; 289–331.
143. Monzon ME, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM. Identification of glycosaminoglycans in human airway secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006; 34: 135–141.
144. Basbaum CB, Finkbeiner WE. Airway secretion: a cell-specific analysis. *Horm Metab Res*, 1988; 20: 661–667.
145. Tammi RH, Tammi MI. Hyaluronan Accumulation in Wounded Epidermis: A Mediator of Keratinocyte Activation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009; 129: 1858–1860.
146. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 1992; 146: 109–115.
147. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002; 166: 849–854.
148. Monzón ME, Manzanares D, Schmid N, Matsuda SMC, Forteza RM. Hyaluronidase Expression and Activity Is Regulated by Pro-Inflammatory Cytokines in Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008; 39: 289–295.
149. Mian N. Analysis of cell-growth-phase-related variations in hyaluronate synthase activity of isolated plasma-membrane fractions of cultured human skin fibroblasts. *Biochem J*, 1986; 15: 237: 333–342.
150. Toole BP. Proteoglycans and Hyaluronan in Morphogenesis and Differentiation. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, 199; 305-342.
151. Gomes RCT, Verna C, Nader HB, Sim RDS, Dreyfuss JL, Martins RM, M.D., Baracat EC, Sim MDJ, Soares JM. Concentration and

- distribution of hyaluronic acid in mouse uterus throughout the estrous cycle. *Fertility and Sterility*, 2008; 92: 785-792.
152. More IAR, Armstrong EM, Carty M, McSeveney D. Cyclical changes in the ultrastructure of the normal human endometrial stromal cell. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, 81: 337–347.
 153. Hana V, Murphy LJ. Interdependence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I expression in the mouse uterus. *Endocrinology*, 1994; 135: 107–112.
 154. [Abrahamsohn PA](#), [Zorn TM](#). Implantation and decidualization in rodents. 1993; Sep 1; 266: 603-628.
 155. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001; 277: 4589-4592.
 156. Neame SJ, Isacke CM. The Cytoplasmic Tail of CD44 Is Required for Basolateral Localization in Epithelial MDCK Cells but Does Not Mediate Association with the Detergent-insoluble Cytoskeleton of Fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 1993; 121: 1299-1310.
 157. Weber, G. Episodic learner modeling. *Cognitive Science*, 1996; 20: 195–236.
 158. Braga VM, Gendler SJ. Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *Journal of Cell Science*; 1993: 105: 397-405.
 159. Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, DD Carson. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, 1995; 136: 3639-3647.
 160. Aplin JD. The cell biology of human implantation. *Placenta*, 1996; 17: 269–276.
 161. Fujita N, Yajima A, Nakamura M. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum Pathol*, 1995; 26: 862–865.

162. Goshen R, Ariel I, Shuster S, Hochberg A, Vlodavsky I, Groo N, Rafael ZB, Robert Stern. Hyaluronan, CD44 and its variant exons in human trophoblast invasion and placental angiogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 1996; 9: 685-691.
163. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J*, 2006; 20: 9–22.
164. Pure E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol. Med*, 2007; 7: 213–221.
165. Anushree CS, Daniel RG. Activation of the innate immune system by the endogenous ligand hyaluronan. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 2008; 13: 20-25.
166. Knoflach A. Immunomodulatory Functions of Low-Molecular Weight Hyaluronate in an Acute Rat Renal Allograft Rejection Model. *J Am Soc Nephrol*, 1999; 10: 1059-1066.
167. **Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT.** Cutting Edge: High Molecular Weight Hyaluronan Promotes the Suppressive Effects of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells. ***The Journal of Immunology***, 2007; 179: 744 -747.
168. Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA. Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*, 2007; 179: 744–747.
169. Choudhary M, Zhang X, Stojković P, Hyslop L, Anyfantis G¹, Herbert M, Murdoch AP, Stojković M, Lako M. Putative Role of Hyaluronan and Its Related Genes, *HAS2* and *RHAMM*, in Human Early Preimplantation Embryogenesis and Embryonic Stem Cell Characterization. *Stem Cells*, 2007; 25: 3045-3057.
170. [Mohapatra S](#), [Yang X](#), [Wright JA](#), [Turley EA](#), [Greenberg AH](#). Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996; 183: 1663-1668.

171. Zhang S. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J. Biol. Chem*, 1998; 273: 11342–11348.
172. Salgado RM, Capelo LP, Favaro RR, Glazier JD, Aplin JD, Zorn TMT. Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009; 7: 60.
173. Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP, Sakai LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem*, 2002; 277: 4565-4572.
174. Tibetts TA, Mendoza-Meneses M, O'Malley BW, Conneely OM. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 1998; 59: 1143-1152.
175. Takata K, Teramaya H. Hormonal effect on glycosaminoglycans and glycoproteins in uteri of ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta*, 1977; 500: 333-343.
176. Wu WX, Zhang Q, Unno N, Derks JB, Nathanielsz PW. Characterization of decorin RNAm in pregnant intrauterine tissues of the ewe and regulation by steroids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000; 278: C199-C206.
177. Gaide Chevronnay HP, Cornet PB, Delvaux D, Lemoine P, Courtoy PJ, Henriot P, Marbaix E. Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium. *Endocrinology*, 2008; 149: 1015-1025.
178. Martin SS, Suazo MS, Zorn TMT. Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003; 36: 1067-1071.

179. Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology*, 1993; 266: 603-628.
180. Sheng W, Dong H, Lee DY, Lu WY, Yang BB. Versican modulates gap junction intercellular communication. *J Cell Physiol*, 2007; 211: 213-219.
181. Salgado RM, Favaro RR, San Martin S, Zorn TM. The estrous cycle modulates small leucine-rich proteoglycans expression in mouse uterine tissues. *Anat Rec*, 2009; 292:138-153.
182. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*, 2002; 14: 617-623.
183. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 1004-1013.
184. Ferenczy A, Richart RM, Agate FJ, Purkerson ML, Dempsey EW. Scanning electron microscopy of the human endometrial surface epithelium. *Fertil. Steril*, 1972; 23: 515-521.
185. Nikas G, Makrigiannakis A. Pinopodes as markers of endometrial receptivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 2003; 997: 120-123.