



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRE- VE POSTİMLANTASYON DÖNEMLERİNDE FARE  
ENDOMETRİUMUNDA RHOKİNAZ A’NIN  
İMMÜNOLOKALİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gökçen ARSLAN**

**2012**

**SİVAS**



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRE- VE POSTİMLANTASYON DÖNEMLERİNDE  
FARE ENDOMETRİUMUNDA RHOKİNAZ A’NIN  
İMMÜNOLOKALİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gökçen ARSLAN**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Emel KOPTAGEL**

**2012**

**SİVAS**

Bu alışma, Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. Emel KOPTAGEL

Üye Prof.Dr. Celal KALOğLU

Üye Yard. Doç. Dr. İlkey KOŐAR

#### ONAY

Bu tez çalışması, 02.07.2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

---

Doç. Dr. Ali Altuę BIÇAKÇI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

PRE- VE POSTİMLANTASYON DÖNEMLERİNDE FARE  
ENDOMETRİUMUNDAKİ RHOKİNAZ A'NİN İMMÜNOLOKALİZASYONU

Gökçen ARSLAN

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel KOPTAGEL

2012, 77 sayfa

Memelilerde implantasyon, birçok sinyal moleküllerinin blastosist ile reseptiv endometrium arasındaki haberleşmede rol aldığı karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Rho proteinleri, sitoiskelet ve hücre büyümesinin yanı sıra hücre hareketi, hücre-hücre adezyonu, göçü, çoğalması, apoptozu ve invazyonu gibi çok çeşitli hücresel işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynarlar. Hücresel kontrolün çoklu süreçlerindeki rolleri ile kabul edilmesi, Rho proteinlerinin tümör büyümesi - ilerlemesi, metastaz ve yakın zamanda da anjiogenezde etkili olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, fare endometriumunda implantasyon öncesi ve implantasyon döneminde Rhokinaz protein ailesinden RhoA proteininin immüno lokalizasyonunun belirlenerek olası rollerini araştırmak amaçlanmıştır.

Bu amaçla, vücut ağırlıkları 20-40 gram arasında değişen *Mus musculus* cinsi 40 adet erişkin fare kullanıldı. Normal diyetle beslenen farelere, oda ısısında, 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık periyotlar oluşturularak östrus evresine girmeleri sağlandı. Östrus siklusları vajinal smear ile belirlendi. Vajinal tıkaç oluşumuna bakılarak gebelikler tespit edildi. Metestrus, estrus, proestrus ve diestrus evrelerinin her biri için 5'er fare ile gebeliğin 5., 7., 9. ve 11. günleri için 5'er gebe fare kullanıldı. Farelere deney sonunda 200mg/kg pentotal sodyum intraperitoneal yolla uygulanarak ötenazi yapıldı. Ölüm sonrası alınan uterus dokularında ışık mikroskopik, immunohistokimyasal ve immunofloresans incelemeler için rutin takip protokolleri uygulandı. Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örnekler genel morfolojiyi göstermek amacıyla hematoksilin-eozin, spesifik molekülleri göstermek için ise immunohistokimyasal ve immunofloresans teknikler uygulandı. Işık ve floresans mikroskopik değerlendirme için alınan kesitler Olympus BX51 mikroskopta değerlendirilip, uygun alanlardan fotoğraf çekildi.

Preimplantasyon sürecinin her evresinde luminal epitel, bez epiteli ve endotelde kuvvetli RhoA ekspresyonu izlenmiştir. Postimplantasyon döneminin 5. ve 7. gününde lümen epitelinde RhoA'nın diğer alanlara göre daha kuvvetli eksprese olduğu görülmüştür. 11.günde en fazla RhoA ekspresyonu spongiöz desiduada izlenmiştir. Bu alanda görülen RhoA ekspresyonu 9.günde RhoA ekspresyonunun en fazla görüldüğü alan olan labirent desiduaaya göre daha kuvvetli olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, Rho'nun luminal epitel, bez epiteli ve desiduada kuvvetli ekspresyon göstermesi, desidua ve endometriumda koruyucu, onarıcı ve yara iyileştirici etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Rhokinaz, RhoA, implantasyon, fare

## ABSTRACT

IMMUNOLOCALISATION OF RHOKINASE A IN MOUSE ENDOMETRIUM  
DURING PRE-AND POST-IMPLANTATION PERIODS

Gökçen ARSLAN

Master of Sciences Thesis, Department of Histology-Embryology

Supervisor: Prof. Dr.Emel KOPTAGEL

2012, 77 pages

Implantation in mammals is a complex biological process that involves an crosstalking between blastocyst and receptive endometrium controlled by different signal molecules. Rho proteins are involved in the regulation of many cellular processes, including cytoskeletal organization, cell motility, cell cycle progression and growth, apoptosis, gene transcription and vesicle transport. Consequently, it is not surprising that Rho proteins are involved in different steps of tumor development and progression as well as metastasis and recently angiogenesis.

In this study, the potential roles of RhoA proteins will be investigated using their immunolocalization in the mouse endometrium during pre-and postnatal periods.

To do this, 40 *Mus musculus* mice, weighing 20-40 g were used in the present study. Animal were kept at room temperature and 14 hours light, 10 hours dark periods and were fed with normal diet in order to get them to estius cycle. Their estius cycles were determined by vaginal smear. Their pregnancies were designated by vaginal plug. Metestrus, estrus, proestrus and diestrus phase groups consisted of 5 mice for each group. Similarly 5 th, 7 th, 9 th and 11 th days of pregnancy groups consisted of 5 mice for each group. At the end of experiments, euthanasia was carried out by injection of 200 mg/kg penthatol sodium intraperitonally. Uterinal tissues were obtained and processed for light microscopical, immunohistochemical and immunoflourescence invastigations. Parafin tissue sections were used for either haemoxylene-eosin staining to show general morphology or immunohistochemical and immunoflourescence techniques to show the rhokinase A expression in uterinal tissues. Field of views were photographed using an Olympus BX51 microscope.

Findings of the present study revealed that expressions of Rho every preimplantation groups were strong at luminal and glandular epithelium and capillary endothelium. 5 th, 7 th days of pregnancy groups expressions of Rho at luminal

epithelium were stronger than seen in other sites. 11 th days of pregnancy expressions of Rho were stronger at spongius decidua than seen in labyrinth decidua at 9 th days of pregnancy group.

As a result, the showing strong expression of RhoA on the luminal and gland epithelials and the decidua suggests that RhoA may have the protective and repairing effects and the effect of the improvement of the wound on the decidua and the endometrium.

**Key words:** Rhokinase, Rho A, implantation, mouse



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince anlayışını ve desteğini benden esirgemeyen, engin hoşgörüsü ile tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini paylaşan, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Emel KOPTAGEL' e,

Bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemde emekleri olan, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. H. Eray BULUT, Sayın Prof. Dr. Celal KALOĞLU ve Sayın Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN' a,

Bulgular kısmını daha kaliteli hale getirmemde yardımını ve emeğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Osman KOPTAGEL' e,

Acı tatlı pek çok anıyı kendileriyle paylaştığım asistan arkadaşlarıma ve bölümümüz çalışanlarına,

Çalışmalarında yanımda olup, yardımını esirgemeyen Bekir YILDIZ' a ve Berna ÖZDENOĞLU' na,

Bugünlere gelinceye kadar yürüdüğüm çetin yollarda, sevgileri ve destekleri ile bana cesaret veren, bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, hayatımdaki en özel ve saygıdeğer öğretmenlerim, canım annem Zehra KÜÇÜKÇONGAR ve babam Orhan KÜÇÜKÇONGAR'a,

Varlıklarıyla hayatıma sevinç ve güzellik katan, iyi ve kötü günümde vazgeçilmezlerim olan, kardeşleri olduğum için mutluluk ve onur duyduğum, canım dostlarım Esra Deniz ÖGEDEY ve Selcen KÜÇÜKÇONGAR İNCEGÖL'e,

Yaşadığım bu zorlu süreç içerisinde sürekli özlemini hissettiğim, farklı şehirlerde de olsak manevi varlığıyla beni yüreklendiren sevgili eşim, Ömer Faruk ARSLAN' a,

Büyük bir ümitle gelmesini beklediğimiz, varlığıyla hayatımıza mutluluk ve anlam katan, ailemizin en minik ferdi, Bebeğimiz' e,

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

**Gökçen ARSLAN**

**SİVAS, 2012**

**İÇİNDEKİLER DİZİNİ**

<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>TEŞEKKÜR</b>	ix
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xii
<b>TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2. 1. Uterus Histolojisi	3
2. 2. Fertilizasyon ve Preimplantasyon Embriyo Gelişimi	5
2. 3. Preimplantasyon Dönemde Endometrial Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler	7
2. 4. İmplantasyon	8
2. 4. 1. Apozisyon	9
2. 4. 2. Adezyon	10
2. 4. 3. Penetrasyon ve İnvazyon	11
2. 5. Plasantasyon	11
2. 6. Postimplantasyon Uterin Yanıt	11
2. 7. Rho GTPazlar	12
2. 7. 1. Rhokinaz (ROCK, ROK)	15
2. 7. 2. Rho / Rhokinaz Yolağı	16
2. 7. 3. Rhokinaz Substratları	18
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	20
3. 1. Kullanılan DeneY Hayvanları ve DeneY Grupları	20
3. 2. Kullanılan Cihazlar	20
3. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3. 4. Doku Preparasyonu	21

3. 5. Işıık Mikroskopi	21
3. 6. İmmünofloresan Mikroskopi	22
<b>4. BULGULAR</b>	23
4. 1. Grup-1 Bulguları	23
4. 2. Grup-2 Bulguları	35
<b>5. TARTIŞMA</b>	47
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	51
<b>7. KAYNAKLAR</b>	52
<b>8. EKLER- YEREL ETİK KURUL KARARI</b>	62
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	63

**SİMGE ve KISALTMALAR**

GAP	GTPaz aktive edici proteinler
GDI	Guanin nükleotidi disosiyasyon inhibitörü
GEF	Spesifik guanin değişim faktörleri-Guanin nükleotidi değiştirici protein/faktör
GTP	Guanizin trifosfat
HB-EGF	Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor)
IHK	İç hücre kitlesi
MGA	Mid-preimplantasyon
MLC	Miyozin Hafif Zinciri
RHO	Rhokinaz
PH	Plekstrin homoloji bölge
ZGA	Zigotik genom aktivasyonu
ZIPK	Zipper interacting kinaz

## TABLOLAR ve ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1. 1</b>	Uterus histolojisi	3
<b>Şekil 1. 2</b>	Memeli Ras GTPaz süper-ailesini gösteren filogenetik ağaç	13
<b>Şekil 1. 3</b>	Moleküler anahtarlar olarak Rho GTP-azlar	14
<b>Şekil 1. 4</b>	Rho ailesi GTP-azları ve düzenleyicileri	14
<b>Şekil 1. 5</b>	Rho GTP-azların efektörleri	15
<b>Şekil 1. 6</b>	Rho A yolağı	18
<b>Tablo 1. 1</b>	Rhokinazın substratları, işlevleri ve hücre sel yanıtları	19
<b>Şekil 4. 1</b>	Diöstrus evresinde ışık mikroskopik bulguları (H-E)	24
<b>Tablo 4. 1</b>	Diöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	25
<b>Şekil 4. 2</b>	Diöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	26
<b>Şekil 4. 3</b>	Proöstrus evresinde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	27
<b>Tablo 4. 2</b>	Proöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	28
<b>Şekil 4. 4</b>	Proöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	29
<b>Şekil 4. 5</b>	Östrus evresinde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	30
<b>Tablo 4. 3</b>	Östrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	31
<b>Şekil 4. 6</b>	Östrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	31
<b>Şekil 4. 7</b>	Metöstrus evresinde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	32
<b>Tablo 4. 4</b>	Metöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	33
<b>Şekil 4. 8</b>	Metöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu	34
<b>Şekil 4. 9</b>	Gebeliğin 5. gününde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	35

<b>Tablo 4. 5</b>	Gebeliğin 5. gününde RhoA immunolokalizasyonu	36
<b>Şekil 4. 10</b>	Gebeliğin 5. gününde RhoA immunolokalizasyonu	37
<b>Şekil 4. 11</b>	Gebeliğin 7. gününde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	38
<b>Tablo 4. 6</b>	Gebeliğin 7. gününde RhoA immunolokalizasyonu	39
<b>Şekil 4. 12</b>	Gebeliğin 7. gününde RhoA immunolokalizasyonu	40
<b>Şekil 4. 13</b>	Gebeliğin 9. gününde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	41
<b>Tablo 4. 7</b>	Gebeliğin 9. gününde RhoA immunolokalizasyonu	42
<b>Şekil 4. 14</b>	Gebeliğin 9. gününde RhoA immunolokalizasyonu	43
<b>Şekil 4. 15</b>	Gebeliğin 11. gününde ışık mikroskopik bulgular (H-E)	44
<b>Tablo 4. 8</b>	Gebeliğin 11. gününde RhoA immunolokalizasyonu	45
<b>Şekil 4. 16</b>	Gebeliğin 11. gününde RhoA immunolokalizasyonu	46

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

GTPazların Rho alt ailesi, Ras üst ailesinin parçasıdır. Bu aile 20 protein içerir. İsimlendirilmeleri spesifik olarak tanımlandıkları yere göre olmaktadır. Rho proteinleri ile 1990'ların başında yapılan çalışmalar kültür hücrelerinin aktin sitoiskeletinde gerçekleştirilmiştir. Bir Rho proteini olan Rho A aktin stres fibrilleri olarak adlandırılırken, membran büyümesi ve lamelliopodlarda yapılan çalışmalarda diğer Rho proteini Rac 1 ve parmak benzeri filapodialarda ise Cdc42 olarak isimlendirilmişlerdir (1). Ailenin Rho, Rac ve Cdc42 adlı üyeleri, memeli hücrelerinde bulunur ve çok farklı işlevleri bulunur (2, 3). Rho proteinleri, sitoiskelet ve hücre büyümesinin yanı sıra hücre büyümesi, hareketi, hücre-hücre adezyonu, göçü, çoğalması, apoptozu ve invazyonu gibi çok çeşitli hücrel işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynarlar. Hücrel kontrolün çoklu süreçlerindeki rolleri ile kabul edilmesi, Rho proteinlerinin tümör büyümesi - ilerlemesi, metastaz ve yakın zamanda da anjiyogeneizde etkili olduğunu göstermiştir (2-5).

Rho proteinleri, anjiyogenez sürecindeki pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin etkinliğini artırır (2). Rho protein ailesinin üyeleri, endotelyal hücre morfogenezi ve kan damarlarının dallanması süreçlerinde çeşitli roller oynamaktadır. Yeni kan damarlarının oluşumunda endotelyal hücre morfogenezi, göçü, kapiller lümen oluşumu ve uygun anjiyogenik uyarıların yeni kapillerlerin dallanması için oluşumundan sorumludur (2).

Rho-GTPazlar, biyokimyasal ve yapısal olarak basit proteinlerdir. Bu proteinler GTP bağlı aktif formundan GDP bağlı inaktif formlarına hidroliz yoluyla dönüşürler. Spesifik guanin değişim faktörleri (GEFs), GDP yedeğinin katalizlenmesi ile yeni GTP oluşturarak, GTPazları tekrar aktif hale getirir. GTPazların aktif formları çeşitli hedef proteinleri tanıyabilir ve böylece aktif durumlarında anahtar rolü oynarlar (5-8).

RhoA, Ras homolog gen ailesinin küçük GTPaz protein üyesi olup stres fibrillerinin oluşumundaki aktin sitoiskeletinin düzenlenmesi ile tanınır. İnsanlarda bu gen RhoA tarafından kodlanır (9).

Memelilerde implantasyon, blastosist aşamasındaki embriyo ile reseptiv endometrium arasındaki diyalog sonucu meydana gelen en karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Bu süreçte, blastosist tarafından uterinal dokuda birçok genin

ekspresyonu indüklenir, sonrasında blastosiste komşu epitelde adhezyonu sağlayan yeni moleküller açığa çıkar, endometrial stroma hücreleri epitelooid karakterli decidua hücrelerine farklılaşırken ekstraselüler matriks bileşimi de tamamen değişir. Özellikle kemiricilerde ileri derecede invaziv özelliklere sahip blastosistin antimezometrial alana adhezyonundan sonra implantasyon bölgesinde anjiogenez, plasantasyon, matriks yıkımı, invazyon kontrolü ve apoptozu yönlendiren yeni moleküllerin katılımıyla süreç daha da karmaşık bir hal alır (10-12).

ROCK implantasyonda en iyi bilinen efektör olup, 1996'da keşfedilmiştir. Daha sonra Rho/ROCK sinyalleme yolları, çeşitli araştırma alanlarında yayınlanmış ve kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi, kanserler ve embriyonik gelişim süreçleri üzerinde odaklanmış 2000'den fazla makale ile dikkat çekmektedir (2-9, 37-41, 45-54).

Bu çalışmada, fare endometriumunda implantasyon öncesi ve implantasyon döneminde Rhokinaz protein ailesinden RhoA proteininin immunolokalizasyonu belirlenerek olası rolleri araştırılmıştır.



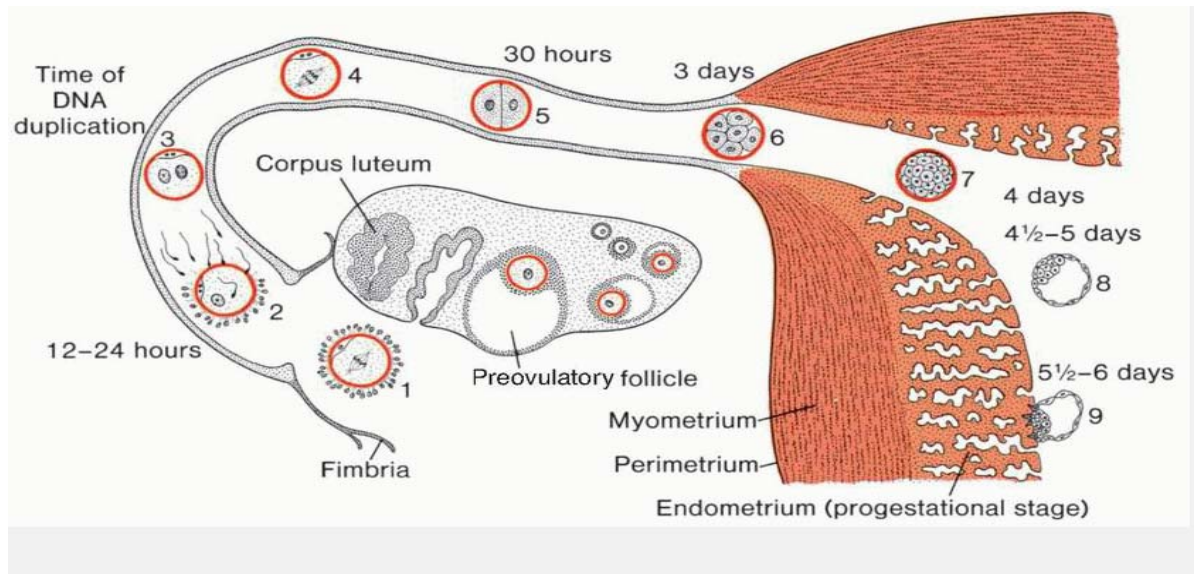
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. Uterus

Paramезonefrik (Müllerian) kanallardan köken alan uterus, tuba uterina'da oluşan zigotun yerleştiği, embriyonal ve fetal gelişimin tamamlandığı önemli bir organdır (13, 14). Uterus, pelvik kavitede rektumun önünde, bağırsakların alt tarafında, mesanenin arkasında yerleşim göstermektedir. Armut şekilli bir organ olup kasılma yeteneği kuvvetli kaslardan oluşmaktadır. Boyutları doğum yapan ve yapmayan kadınlarda farklılık göstermektedir. Doğum öncesinde 5-6 cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde ve 40-50 g ağırlığında olan uterus, ilk doğumdan sonra 6,5-7 cm uzunluğuna, 5 cm genişliğine ve 60-70 g ağırlığına ulaşır. İnsanlarda ortalama 7.5 cm uzunluğunda, 5 cm genişlikte ve 2.5 cm kalınlığında olan uterus yaklaşık 30-40 g ağırlığındadır.

Uterus, 4 ana bölümden oluşmaktadır. Bunlar;

- **Fundus:** Uterusun üstünde yer alan, incebağırsak kıvrımları ile komşuluk yapan kısım
- **Korpus:** Fundusdan istmusa kadar daralan üstteki 2/3'lik bölüm.
- **İstmus:** 1 cm uzunluğundaki korpus ve serviks arasındaki dar bölge
- **Serviks:** Silindir biçimli bir yapı olup alttaki 1/3'lük bölümdür. Korpusa göre daha fazla bağ dokusu ve elastik fibril bulunurken, daha az düz kas içermektedir. (Şekil 1. 1)



Şekil 1. 1. Uterus histolojisi (14).

Uterus, içten dışa doğru endometrium, myometrium, perimetrium tabakalarından oluşur. Uterinal siklus boyunca histolojik ve işlevsel farklılıklar gösterir.

**Endometrium;** uterusun mukozal iç yüzü olarak da adlandırılan endometrium basit prizmatik epitel ve endometrial stroma olarak da bilinen lamina propriadan oluşmaktadır. Tek katlı silyalı hücrelerden ve silyasız salgı yapan prizmatik hücrelerden oluşan endometriumun lamina propriasında miyometriuma kadar devam eden basit tübüler yapıdaki bezlerden oluşmaktadır. Başta fibroblast olmak üzere, kök hücreleri, T ve B lenfositler, mast hücreleri, desidual hücreler, endometrial granülositler, lökosit, makrofaj, retiküler lif ve yıldız şekilli hücreler bakımından zengin olup, bol miktarda temel madde içeren lamina propriada tip III kollajen lif görülmektedir. Birbirine benzeyen yüzey epiteli ile basit tübüler bez epiteli arasındaki fark bez epitelinin az sayıda silyalı hücreler içermesidir. Pubertadan menapoza kadar olan süre içinde belirli periyotlarla en büyük değişikliğe uğrayan tabakadır. İnsanda 0-28 günlük siklusta endometrial farklılık ovaryal siklus paralelinde gelişir. İnsanda ve memelilerde seksüel dönem içinde endometriumun yüzeyel fonksiyonel tabakası *menstural döngü* adı verilen bir değişimin içine girer. İnsanda bu döngünün 0-4 günü arasında endometriumun epiteli ve pars fonksiyonalis kısmı nekroza uğrar ve kanama ile birlikte uterustan atılır.

Hipotalamus-hipofiz-ovaryum aksinde salgılanan FSH'nin etkisi ile ovaryumda folliküler büyüme başlarken uterusta da östrojen etkisi ile pars basalisten endometriumun rejenerasyonu başlar. Bir gün kadar sürer. Bu dönemde kanama durmuş, pars basalisten bez ve kan kapilleri ile yeni bir endometriumu oluşturmak için uterus aktive edilmiştir. 5-14 günler arasında FSH, LH etkisi ovaryum foliküllerini ovulasyona götürme çabası gösterirken pars fonksiyonalis tabakası da östrojen artışı ile yeniden kurulur. Çoğalan epitel hücreleri yanısıra stromal hücreler, bez ve kan damarları pars fonksiyonalisine bağlı olarak endometriumu gittikçe kalınlaştırır. Sekresyon safhasında 14-28 günler arasında LH ve LTH etkisi corpus luteumu ortaya çıkarmakta, progesteron ve az miktarda östrojen salgısı da uterusun pars fonksiyonalis tabakasını implantasyon için hazırlamaktadır (13-17).

Endometrial bezler kıvrıntılı bir hal alırken, salgısını da uterus lümenine verir. Bez ve damar bakımından zengin endometrium tabakası intersellüler ara maddeyi de yoğun olarak içerir. Uterus lümeninden başlayarak stromanın sonuna

kadar varlık gösteren bezler sekresyon yapabilen prizmatik epitel hücrelerine benzeyen hücrelerle örtülüdür. Endometrial bezler steroid hormonlarının kontrolünde mukus salgırlar. Ayrıca spiral arterler de endometriumu maksimum kalınlığa ve işlev bakımından implantasyona en uygun duruma getirirler (13-17).

Fertilizasyonun olmaması halinde 25.günden sonra progesteron ve östrojen salgılanmasında düşüş olur. Bunu takiben 28.günde menstruasyon yeniden oluşur. Pars fonksiyonalisteki arterlerdeki kıvrımların artması ile kan akımı durmuştur. Daha derinlerdeki damarların genişlemesi ile iskemi durumunda bulunan arteriollerden kanama gerçekleşir. Bu kanama ile birlikte nekrotik endometrial bezler stroma ile birlikte atılır. Pars bazalis tabakası kalarak pars fonksiyonalisi yeniden oluşturur (13-17).

**Miyometrium;** içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler ve oblik yönde seyreden düz kas tabakası halinde bulunan uterus duvarının en kalın tabakasıdır. Uterus boyunca birlikte yerleşim göstermelerine rağmen düz kas hücrelerinin farklı dizilmesiyle üç tabaka ayırt edilmektedir.

**Perimetrium;** en dışta yer alan periton tabakasıdır. Uterusun mesaneye karşı uzandığı ön kısımda adventisya özelliği göstermektedir ve uterusun bu alanı retroperitoneal alan olarak adlandırılmaktadır. Gevşek bağ dokusu üzerinde yassı mezotelyal hücre tabakasından oluşan bir epitel tabakasının fundus ve korpusun posterior parçasını sarması ile bu intraperitoneal alanda seroza özelliğini göstermektedir (13-18).

Endometrium ve miyometriumda blastosist implantasyonu ve sonrasında gebelik başlamasıyla siklus durur ve bu iki tabaka büyüme ve farklılaşmaya başlar.

## 2. 2. Fertilizasyon ve Preimplantasyon Embriyo Gelişimi

Embriyonik gelişmeyi başlatan fertilizasyon, sekonder oosit ile spermin teması ile başlayan ve maternal-paternal kromozomların zigotun ilk mitoz bölünmesinin metafazında biraraya gelmesi ile son bulan karmaşık moleküler bir süreçtir. Ovum, ovulasyon sonrasında atılarak fallop tüpüne ilerler ve sonrasında da uterusu yönlendirilir. Kapasitasyonunu tamamlamış spermlerin, uterus boyunca ilerleyerek, fallop tüpünün ampulla bölgesinde ovum ile karşılaşması ile fertilizasyon gerçekleşir.

Preimplantasyon embriyo gelişimi;

- fertilizasyon ve yarıklanma,
- hücre polaritesinin (kutbunun) kurulması ve kompaksiyon (sıklaşma),
- blastosist oluşumu

olmak üzere üç temel olay ile gerçekleşir.

### **Fertilizasyon ve yarıklanma:**

Uterin tüpte bulunan ve metabolizması aktive olan 2 hücreli zigotun yarıklanma ile bir dizi hızlı mitoz bölünme geçirir. Fertilizasyondan sonra ortalama 30 saat süren yarıklanma sırasında blastomer olarak adlandırılan hücrelerin sayısında artış görülürken boyutlarında küçülme görülür.

Preimplantasyon embriyo gelişimi sürecinde, maternal RNA ve proteinlerin depolanmış olması ovumun sahip olduğu önemli bir özelliktir. Fertilizasyon ile ovumda depolanmış olan transkriptlerinin indirgenmesi indüklenir. Zigotik genom aktivasyonu olarak adlandırılan bu olay zigotta gerçekleşen transkripsiyon olup gelişimin ilerlemesi için önemli bir yere sahiptir. Blastomerin polaritesi ve kompaksiyonu (sıklaşması) sırasında gerçekleşen 2 önemli transkripsiyon olayı, ZGA (zigotik genom aktivasyonu) ve MGA (mid-preimplantasyon gen aktivasyonu) olarak tanımlanmaktadır. Zigotik genom aktivasyonu 2-4 hücreli evrede, Mid-preimplantasyon gen aktivasyonu ise 8 hücreli evrede en fazla artış göstermektedir (13-18).

### **Hücre kutbunun oluşturulması ve sıklaşma:**

Simetrik ve asimetrik yönde düzenlenim gösterebilen her blastomer 8-16 hücreli yavru üretebilmektedir. Blastomerler 8 hücreli evreyle beraber şekil değiştirmeye başlar. Kompaksiyon (kompakzasyon, kompaktizasyon, sıklaşma) olarak adlandırılan olay ile hücre yüzey adezyon glikoproteinleri aracılığıyla birbirlerine yapışırlar. Oluşan kompakt haldeki hücre topluluğu içerisinde hücreler arası iletişim artmakta ve gelecekteki iç hücre kitlesinin alt yapısını oluşturmaktadır. 12- 32 hücreli morula evresinde içteki hücrelerin (embriyoblast) iç hücre kitlesini (IHK) ve dıştaki tek katlı yassı trofoblast hücrelerinden dış hücre kütlesini oluşturarak birbirlerinden ayrıldıkları görülmektedir (13, 14).

### **Blastosist oluşumu:**

Fertilizasyondan yaklaşık 4 gün sonra morula evresindeki hücreler arasında boşluklar oluşur. Bu boşlukların içi zona pellusidayı geçen besin maddelerince zengin uterus sıvısıyla dolmaya başlar. Morulayı oluşturan hücre grubu, boşluktaki uterus sıvısı artmasına bağlı olarak dış kısımda oluşan ve gelecekte plasentayı oluşturacak olan ince hücreler (trofoblast) ve merkezde oluşan ve embriyoyu geliştirecek olan hücreler (IHK, iç hücre kitlesi, embriyoblast) olmak üzere iki farklı hücre grubu oluşturmaktadır. Sıvı dolu boşluklar birleşerek blastosist boşluğu (blastosel) olarak adlandırılan tek ve büyük bir boşluk oluştururlar. Fertilizasyondan sonraki 1. hafta içerisinde embriyoblastın bulunduğu kutuptaki trofoblast aracılığıyla endometrium epiteline blastosist yapışmakta ve bu kutup embriyonal kutup olarak adlandırılmaktadır. Embriyonal kutbun karşısındaki kutup ise abembriyonal kutup olarak isimlendirilir. NANOG, GATA6 gibi transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle embriyoblastlar, multipotent primitif endoderm ve pluripotent epiblast hücrelerini oluşturmaktadırlar (19, 20).

Fertilizasyondan sonraki yaklaşık 6. günde genellikle embriyoblastla komşu olan blastosist kısmı endometrium epiteline tutunmasıyla iç kısımda sitotrofoblastlar ve dış kısımda sinsityotrofoblastlar olmak üzere 2 farklı hücre tabakası oluşturmaktadırlar. Oldukça yayılcı olan sinsityotrofoblastlar, endometrium içerisinde ilerleyerek bağ dokusuna geçerler ve embriyoblast çevresinde kutbun oluşmasını sağlamaktadırlar. Sitotrofoblast hücrelerinin sürekli çoğalması ve sinsityotrofoblast ile hücre zarlarını kaybedecek şekilde birleşmesi sonucu sinsityum oluşmaktadır. Fertilizasyondan sonraki 7. günde ise embriyoblastın blastosele bakan iç yüzünde, hipoblast ya da embriyonik embriyonik endoderm tabakası oluşmaktadır (19-22).

## **2. 3. Preimplantasyon Dönemde Endometrial Luminal Epitel ve**

### **Değişiklikler**

İmplantasyonun anlaşılması için endometriumun proliferasyon evresinden sekretuar evresine geçişine dikkat edilmelidir. Progesteron hormonu sayesinde primer endokrin gereksinim sağlanmaktadır. Midsekretuar evrede endometrium 10-14 mm kalınlıkta olup sekretuar aktivite pik yapmıştır. Endometrial bez epiteli hücrelerinde glikojen ve lipid artarken, endometrial luminal epitel hücrelerinin apikal

yüzeyinde pinopod oluşumu görülmektedir. İmplantasyonun otokrin ve parakrin etkileri ise stromada östrojen ve progesteronun etkisiyle görülmektedir. Desidualizasyon olarak adlandırılan ve endometrial stromada meydana gelen bu süreçte, desidua stromal bağ doku; desidual hücreleri ise stromal hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Desidualizasyon sürecinde hücre, kollajen IV, heparan sülfat proteoglikan ve laminin 2 ve 4 içeren bir ekstrasellüler matriks üretir. Stromal farklılaşma veya desidualizasyon ekstrasellüler matriksteki değişiklikler ile karakterizedir. Mitotik aktiviteleri artmış, sitonükleer genişlemeleri ve bazal membran oluşumu ile tanımlanan predesidual hücreler, ilk olarak siklusun 22-23.günlerinde kan damarlarını çevreleyen alanlarda görülürler (21-23).

### **Uterin Reseptive ve İmplantasyon Penceresi**

Uterin reseptivite, blastosistlerin uterus ile karşılıklı etkileşimleri sonucunda uterusda gerçekleşen ve implantasyonun gerçekleşmesine zemin hazırlayan değişim olarak tanımlanmaktadır. Uterus reseptivitesini belirten temel faktörler; ovarian steroidler, progesteron ve östrojenler olup lokal olarak üretilen büyüme faktörleri, homebox transkripsiyon faktörler, sitokinler, lipid mediatörler, morfogenler de bu süreçte etki göstermektedir. Memelilerde implantasyon ve gebelik süreci boyunca bulunmak zorunda olan progesteron endometrial reseptiviteyi de indüklemekle görevlidir. Progesteron ve östrojenin etkileri, uterus epitelyal hücre çoğalmasının durmasıyla sonuçlanmaktadır. Pinopodlar, bu süreçte morfolojik varlıkları ile implantasyon penceresini karakterize etmektedirler. Progesteron etkisiyle oluşan ve implantasyon penceresinin oluşumu sırasında luminal epitel yüzeyinde izlenen pinopodlar, blastosistin luminal epitel ile iletişim kurmasında ve uterin boşluktaki sıvının emiliminde rol oynamaktadırlar (19-25).

### **2. 4. İmplantasyon**

İmplantasyon, embriyonun blastosist aşamasında gerçekleşen; endokrin, parakrin, otokrin, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan, çok sayıda molekülün işlev gösterdiği karmaşık bir süreçtir (18-25). İmplantasyon süreci türler arasında farklılık göstermektedir. İnsanlarda uterusun implantasyona elverişli olduğu dönem, yaklaşık olarak menstrual devrenin 19- 24. günleri arasındadır. Farelerde blastosistin aktif hale gelmesi için estradiol 4-hidroksiestradiol-17 (katekolestrogen) gerekirken, uterusun implantasyona

hazırlanması için ise nükleer reseptörlü estradiol-17'in (E<sub>2</sub>) etkileşimi gerekmektedir (25). Bu süreçte embriyo çeşitli aşamalardan geçerek en sonunda endometrial stromaya gömülmektedir. Uterus boşluğunun bir kenarına doğru yakınlaşmış eksentrik yerleşimli embriyo implantasyonu *ekzentrik noninvasiv implantasyon* olarak bilinir. Genellikle mezometriumun karşıt alanında (antimezometrial kutup) yerleşim gösterir. Bu çalışmada kullandığımız fareler bu tipte implantasyon gösterirler. İmplantasyon süreci apozisyon, adezyon ve penetrasyon-invazyon olmak üzere 3 aşamalıdır.

#### **2. 4. 1. Apozisyon (Yakınlaşma):**

Uterus yüzey epiteline embriyonik trofoektoderm hücrelerinin bağlanması eğilimi olarak tanımlanmaktadır. Blastosist kavite içinde serbest ve hareketsiz olarak bulunmaktadır (25, 26). Endometrium boşluğunda sıvı bulunmaması ve blastosistin bu süreçte büyümesi nedeniyle serbest blastosist zona pellusidadan ayrılarak luminal epitel ile fonksiyonel olmayan bir temas sağlamaktadır. Bu temas sürecinin başarılı gerçekleşmesi için blastosistin aktive olması ve uterusun ovaryum steroidlerince kontrol edilen bir dizi spesifik farklılaşma süreci geçirmesi gerekmektedir. Apozisyon sürecinde trofoektoderm hücreleri ve luminal epitel hücreleri arasındaki etkileşimi sonrasında trofoblast hücrelerin mikrovilluslarının sayısında azalma ve boyca kısalma göstermekte ve luminal epitel hücreleri ile birlikte yüzey adezyon molekülleri sentezlenmektedir. Blastosist ve luminal epitel arasındaki sinyalleşme, hücrelerden salınan eriyebilir moleküller yoluyla ortaya çıkabileceği gibi zara bağlı sinyal molekülleri yoluyla da ortaya çıkabilir. Yapılan bir çalışmada heparin bağlayan epidermal büyüme faktörünün (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor; HB-EGF) blastosistin yüzey epiteline bağlanmasından önce salgılandığı fare endometrium epitelinde gösterilmiştir. Gebeliğin 2.-3. günlerinde luminal epitelde bulunmayan HB-EGF, blastosistin luminal epitele bağlanma zamanından 6-7 saat önce luminal epitel ile blastosistin komşuluk ettiği bölgede görülmektedir. Östrojen hücre çoğalmasındaki etkilerine aracılık eden HB-EGF insan embriyolarının blastosist aşamasına ulaşma ve yerleşme yüzdesini artırması yönüyle büyük önem taşımaktadır (25, 27). Erken implantasyon mekanizmaları için Cox-2 (Siklooksijenaz 2) enzimi de önemli sinyalleşme yollarının merkezi olarak tanımlanmıştır. Cox-2 enzimine sahip olmayan dişilerin ovulasyon, döllenme ve implantasyon aşamalarında yetersizlik ve hatalar şeklinde görülen çoklu üreme başarısızlıklarına rastlanmaktadır.

Bunun için, Cox-2'den yoksun dişilere, prostasiklin eklenmesi ile desidual tepkinin verilmesi ve implantasyonun oluşması sağlanmaktadır (25, 28).

#### **2. 4. 2. Adezyon (Bağlanma):**

Yüzey epiteli ile trofoektodermin temas ederek beta integrinler aracılığı ile bağlantı kurduğu aşama olarak tanımlanmaktadır (25, 29, 30). İmplantasyon süreci ile hücre yüzeyi moleküllerinin apikolateral dağılımında değişiklikler görülmektedir. B-integrininin dağılımının, implantasyon öncesinde bazal durumdayken sekretuar evrede ise hem bazal hem de lateral olacak şekilde değişmesi implantasyon anında luminal epitelin hücrelerarası etkileşimdeki değişimini göstermektedir (25). Fare luminal epitelindeki desmozomal proteinlerin, lateral hücre yüzeyleri boyunca tekrar dağıtılması ve düzenlenmesi de değişimi göstermektedir. İmplantasyon sürecinde desmozom yoğunluğunun azalması başta olmak üzere sıkı bağlantı dağılımı değişimi ve gap junctionların ovaryum steroidlerince epitelde sıkı yerleşim göstermeleri gibi önemli değişiklikler görülmektedir. Memelilerde görülen bu implantasyon değişikliklerine ilave olarak insanlarda ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra luminal epiteldeki mikrovililer yerlerini pinopodlara bırakırlar. Bu pinopodların insan embriyolarının tutunması için özel alanlar oluşturduğuna inanılmaktadır (25, 26). Bu, E-kadherin, 6, 1 ve 4 integrin gibi bazı bazolateral hücre adezyon moleküllerinin apikal ekspresyonları ile insan embriyolarının tutunmasını desteklemektedir (25, 26). Bunun yanı sıra hücre serilerinin yapışkanlıkları Muc-1 gibi bazı anti-adeziv faktörlerin azaltılmasıyla sağlanabilmektedir. İntegrin subunitlerinin endometriumdaki varlığı blastosist implantasyonu için gerekli yapının kazanıldığını göstermektedir (25, 26, 29).

Fertilizasyondan sonraki 6. günde selektinlerin karbohidrat bağlayıcı proteinler olmaları nedeniyle uterus epitelindeki karbohidrat reseptörleri ile trofoblast hücreleri üzerindeki L- selektin molekülleri ile etkileşimleri sonucunda blastosistin uterusu ilk anda yapışmasını sağladıklarını göstermiştir (25, 26). Trofoblastlardaki integrinlerin ekstrasellüler matriks molekülleri olan laminin ve fibronektin ile etkileşimi sonucu trofoblastların endometriuma invazyonu sağlanmaktadır. Laminin ile trofoblastların bağlanmasını sağlayan integrin reseptörleri aynı zamanda uterus duvarına trofoblastın tutunmasında da rol oynamaktadır (25, 26, 29, 30). Fibronektin ile trofoblastların bağlanmasını sağlayan



integrinler, hücre göçünü uyarmalarının yanısıra trofoblast farklanmasını düzenlemekle de görevlidirler (25, 26, 29).

### **2. 4. 3. Penetrasyon ve İnvazyon:**

Yüzey epitelinin trofoektoderm tarafından invazyona uğradığı ve embriyonun uterus endometriumu içerisine gömülmeye başladığı aşama olarak tanımlanmıştır. Luminal epitel hücrelerinin apikal plazma membranları ile trofoblastların plazma membranlarının yakınlaşmasıyla luminal epitel ile trofoblastlar arasındaki başlangıç teması gerçekleşmektedir. 20 nm'lik bir uzaklıkta birbirlerine paralel olacak şekilde bulunan bu hücreler aralarındaki hücre-hücre bağlantıları ile membran altında yerleşim gösteren filamentöz ağı desteklemektedir (11, 25, 31-33).

### **2. 5. Plasentasyon**

Trofoblast hücrelerinin endometrial stromaya invazyonu ile başlayan, tersiyer villus yapısının oluşmasıyla sonlanan ve bu sırada plasenta oluşumunun gerçekleştiği aşama olarak tanımlanmaktadır. Ovulasyondan 7-13 gün sonra başlayan plasentasyon sürecinde sırasıyla primer villuslar, trofoblastlar, sekonder plasental villuslar ve vitellüs kesesi gelişim göstermektedir. Oluşan villus yapılarının dallanma göstererek endometrium ile temas kurması ve en sonunda da tersiyer villusların gelişim göstermesi ile süreç tamamlanmaktadır. Sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast olarak bulunan trofoblastlar; enzimlerin, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, plazminojen aktivatör ve inhibitör faktörlerinin etkileri sonucu kontrol sağlamak ve maternal damar duvarlarıyla birleşerek lakuna adlı boşlukları oluşturmaktadırlar (25, 32-34).

### **2. 6. Postimplantasyon Uterin Yanıt**

Endometrial stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmesi, integrin ekspresyonu ve hücre dışı matriksin tekrar şekillenmesi olarak tanımlanan desidualizasyon ekstrasellüler matriksteki değişimler ile karakterizedir. Blastosistin uyarıcı etkisi, östrojen ve progesteron varlığı ile implantasyon için önemli rol oynamaktadır (25, 26, 29).

Endometriyal stroma ekstrasellüler matriksi gebeliğin olmadığı durumlarda, I, III, V ve VI kollajenleri, fibronektin ve periglandular tenaskin içermektedir. Desidualizasyon sırasında hücre, kollajen IV, heparan sülfat proteoglikan ve laminin 2 ve 4 içeren bir ekstrasellüler matriksi üretir. Laminin ve kollajen IV, trofoblast

luminal epitel bazal membranından bazal luminal epitel hücre yüzeyine ulaşmadan önce yok olduğundan, bunların trofoblastların substratları olduğu düşünülmektedir. İnsan ve farelerdeki perisellüler matriks tabakası içine ekstrasellüler matriks tekrar yerleşim göstermektedir. Burada bulunan ekstrasellüler matriks bileşenleri trofoblastların adezyon ve göçü için uygun olanlarıdır. Luminal epitel ile adeziv etkileşim ve stroma içine invazyon sırasında blastokist aktivasyonunun en erken görülen olaylarından kolayca anlaşılabilir (25, 31, 32).

## 2. 7. Rho GTPazlar

Rho GTPazlar, küçük GTPazların (~200 aminoasit) Ras süper ailesinin alt ailesini oluştururlar (Şekil 1. 2). Rho GTPazların sayısı türlere göre çok değişmektedir. Kurtlar ve sineklerde 6; memelilerde 20 tanedir. En iyi çalışılan Rho GTPazlar, RhoA, Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) ve Cdc42'dir (cell division cycle 42).

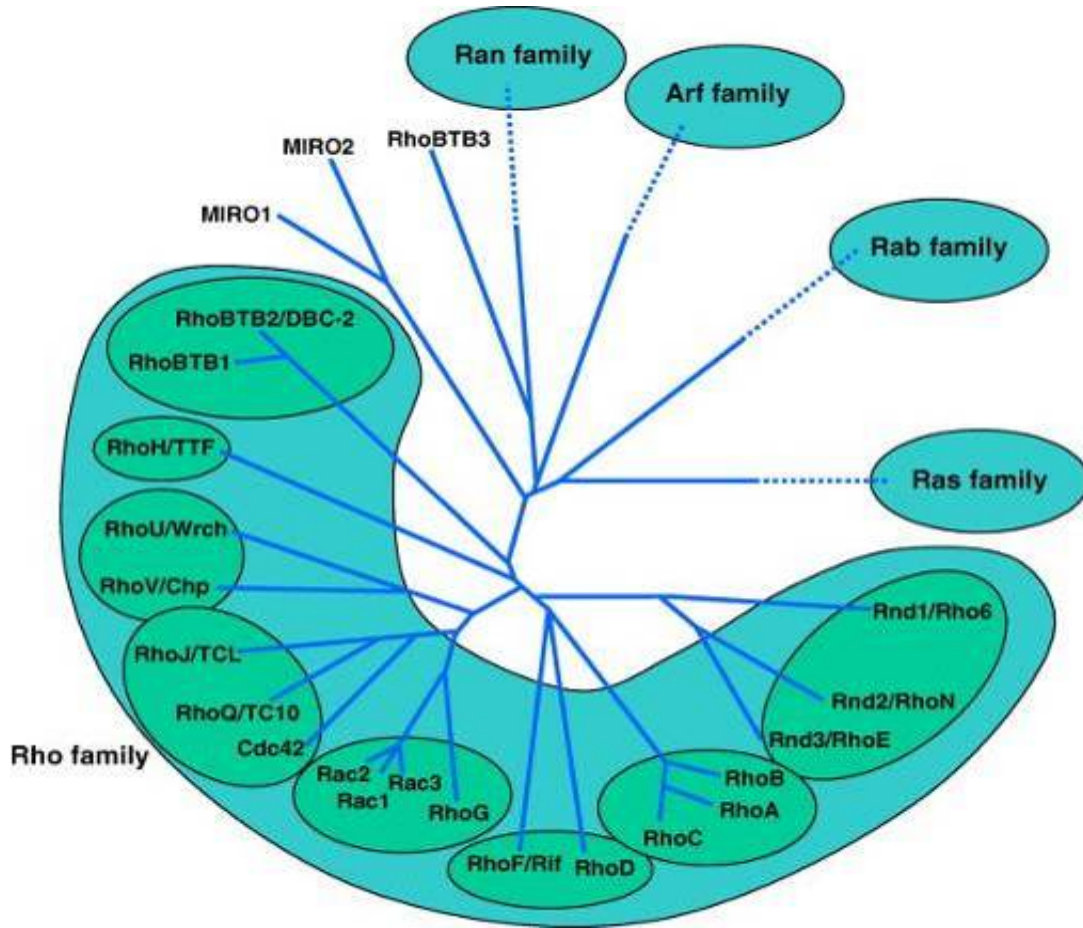
Rho GTPazlar moleküler anahtarlar olarak hareket ederler (Şekil 1. 2, 1. 3, 1. 4). İki şekilde bulunurlar:

- GDP'ye bağlı inaktif durum
- GTP'ye bağlı aktif durum

Hücrede GTP-bağlı aktif form ve GDP-bağlı inaktif form olmak üzere bu iki form halinde bulunan ve birbirine dönüşüm gösterebilen küçük G protein ailesi, lizofosfatidik asid veya sfingozin-1 fosfat gibi ajanlarla etkileşimleri sonucunda GDP-bağlı inaktif formdan GTP-bağlı aktif forma dönüşüm göstermektedirler. Rho'nun aktivasyonunu etkileyen üç protein tarafından dönüşüm gerçekleşmektedir (Şekil 1. 3, 1. 4, 1.5). Bunlar:

- **Guanin nükleotidi değiştirici protein/faktör (GEP veya GEF):** İnaktif Rho-GDP'yi aktif Rho-GTP'ye dönüşümünü sağlayarak Rho'nun aktivasyonunu sağlar.
- **Guanin nükleotidi disosiyasyon inhibitörü, GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDI):** Rho'nun GDP'den ayrılıp GTP'ye bağlanarak aktivasyonunu ve nükleotid ayrılmasını engelleyen negatif düzenleyicilerdir.

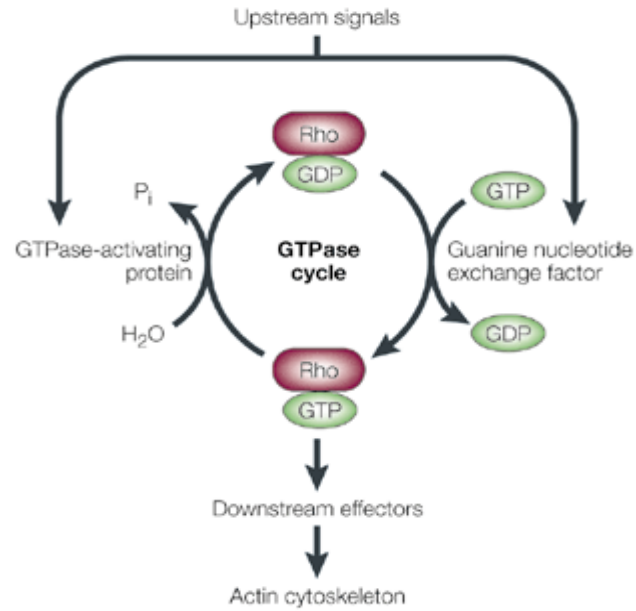
- **GTPaz aktive edici proteinler (GAP):** Aktif Rho-GTP'yi inaktif Rho-GDP'ye dönüşümünü sağlayarak Rho'nun inaktivasyonunu sağlayan negatif düzenleyicilerdir.
- **Reseptörler:** Çok sayıda G proteini ile kenetlenerek aktivasyonu sağlarlar (Şekil 1. 4) (35-50).



**Şekil 1. 2.** Memeli Ras GTP süper ailesini gösteren filogenetik ağaç. 20 Rho GTPaz aile üyesi 8 alt-aile olarak gruplandırılır. Miro proteineri ve RhoBTB3, RhoGTPazlardan ayrılarak süperaile içinde bağımsız dalları oluştururlar (51).

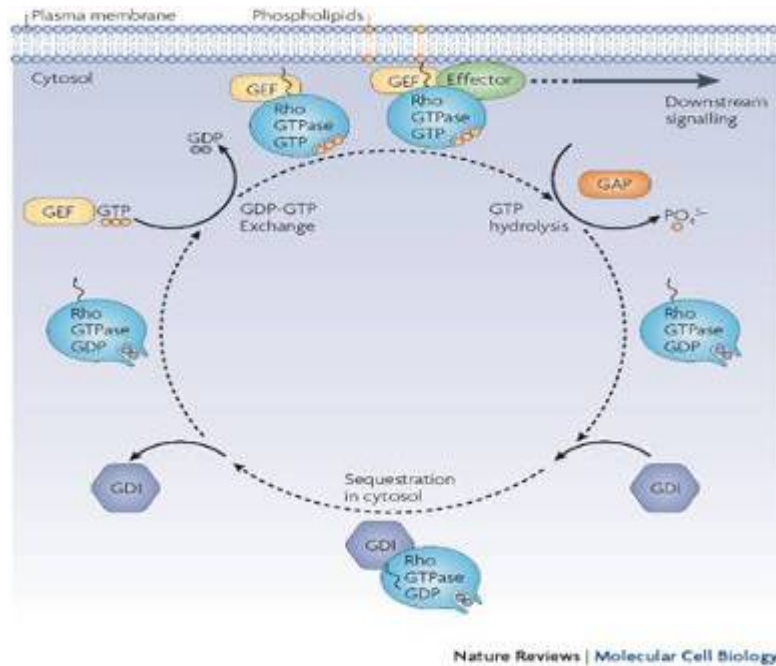
Rho GTPazlar GTP'ye bağlanıp aktifleştiklerinde farklı efektörlere bağlanabilirler ve farklı biyolojik olayları gerçekleştirebilirler. Rho GTPazlar, hücrede aktin sitoskeletonin düzenlenmesi, stress liflerinin oluşması, fibroblastların lokal adezyonu, düz kas kasılmasında  $Ca^{+2}$  duyarlılığının düzenlenmesi, hücre çoğalması, göçü, adezyonu, gen transkripsiyonu gibi farklı hücresel işlevleri

gerçekleştirirler. Rho-GTP proteinleri bu işlevlerini aktin sitoiskeletini düzenleyerek gerçekleştirirler (Şekil 1. 3, 1. 4, 1. 5,1. 6) (8, 35-50).



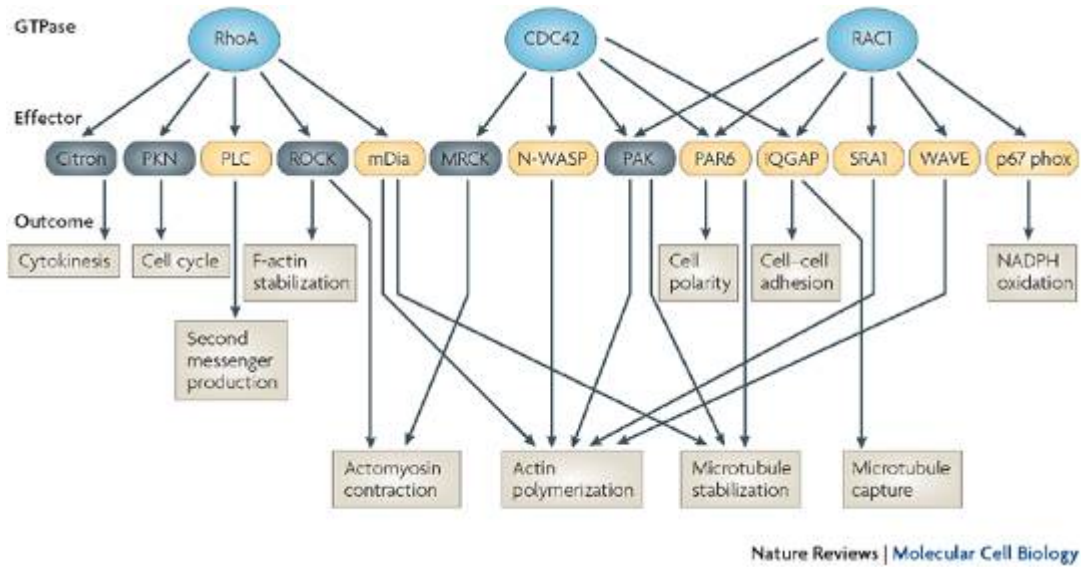
Nature Reviews | Neuroscience

Şekil 1. 3. Moleküler anahtarlar olarak Rho GTP-azlar (40).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Şekil 1. 4. Rho ailesi GTP-azları ve düzenleyicileri (39).



**Şekil 1. 5.** Rho GTP-azların efektörleri (39).

### 2. 7. 1. Rhokinaz (ROCK, ROK)

160 kDa molekül ağırlığında olan bir serin-treonin protein kinazdır. Rho'nun ilk efektörleri olarak keşfedilen rhokinazlar'ın,

- ROCK1 (ROCKI, ROCK  $\beta$ , ROK $\beta$ , Rhokinaz  $\beta$ )
- ROCK2 (ROCKII, ROCK $\alpha$ , ROK $\alpha$ , Rhokinaz  $\alpha$ )

olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Bu proteinler, buldukları kromozom, içerdikleri aminoasit sayısı ve yoğunlukla eksprese edilebildikleri yer bakımından farklılık gösterir (9). ROCK1 ve ROCK2, aminoasit dizilimi bakımından %65 benzerlik gösterir. ROCK1 proteini 1354 aminoasit, ROCK2 1388 aminoasit içerir. Rhokinaz enziminin nerdeyse her dokuda varlığı saptanmış olsa da ROCK1, akciğer, böbrek, dalak, karaciğer ve testiste; ROCK2 ise beyin ve kalpte daha fazla bulunur (3, 5, 7-9, 40, 41, 52, 59, 62, 63).

Rhokinaz 3 ana bölgeden oluşur. Bunlar;

- N-terminal bölgesinde bulunan katalitik bölge (kinaz bölge): Her iki izoformda bu bölge bakımından % 92'lik bir benzerlik bulunur.
- Orta kısımda bulunan kıvrılmış-kıvrım (coiled-coil) bölge,
- C-terminal bölgesindeki plekstrin homoloji bölge (PH): Araşidonik asit, bu bölgeye bağlanarak Rhokinaz'ın aktive olmasını sağlar.

Kıvrılmış bir yapıya sahip olan C-terminal bölgesi ile aktif haldeki Rho'nun etkileşmesiyle kinaz bölge aktif hale gelir. Ayrıca bu bölgenin üzerinde Rho'nun bağlandığı bir bölge (Rho bağlayıcı bölge, RBB) bulunmaktadır (41, 50, 62, 63).

### 2.7. 2. RhoA/Rhokinaz Yolağı

İlk olarak 1985'te bir Ras homologu *Aplysia* türündeki bir deniz salyangozunda klonlanmıştır (43, 51). Ardından Rho A, Rho B, Rho C insanda saptanmış ve bunların hücre içindeki işlevlerinin benzer olduğu ve efektör bölgelerindeki aminoasit dizilimlerinin %85 oranında benzer özellik taşıdığı gözlenmiştir. Rho ailesi insanlarda 20 üyelidir ve 8 alt ailesi vardır (38-74) (Şekil 1. 2.). Rho alt ailesi de amino asit diziliminde %84 oranında benzer olan RhoA, RhoB ve RhoC izoformlarıdır.

Rho ailesinin üyeleri:

- Rho (Rho A, Rho B, Rho C, Rho D, Rho E adlı izoformlar ve Rho G),
- Rac (Rac 1, Rac 2, Rac 3 adlı izoformlar),
- Cdc42 izoformu,
- TC10 izoformu'dur.

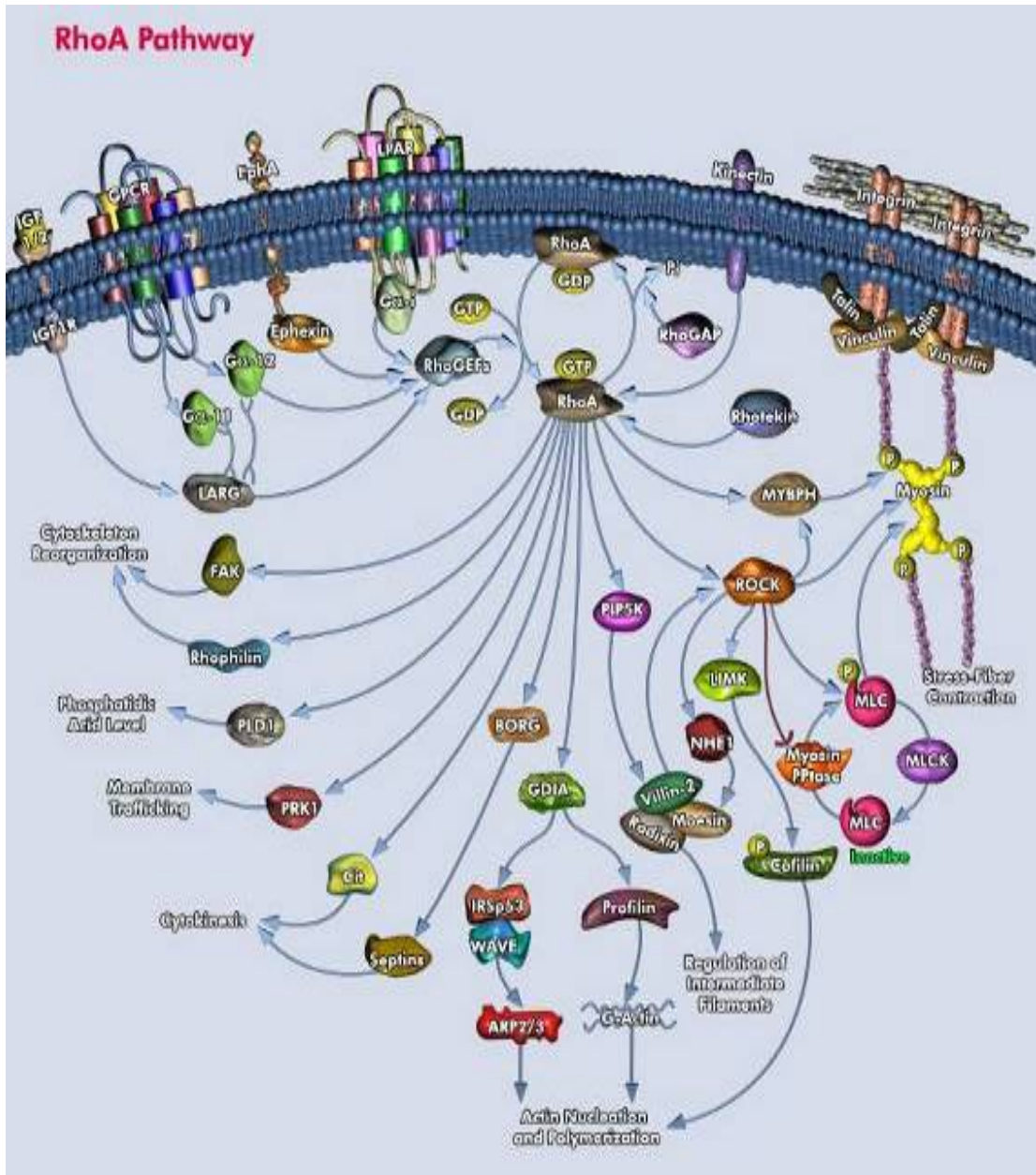
Rho ailesinde en önemli değişiklikler C terminalinde yoğunlaşmıştır (43, 48, 50, 51). RhoA ve RhoC hücre zarında yerleşiktir. RhoB ise sitoplazmadaki RhoGDI ile etkileşirlerken C-uç lipid değişikliğine sahip olduğundan endozomal zarlarda yerleşiktir ve membran reseptörlerinin endozomal hareketlerini düzenler (46-49). RhoA genellikle hücre invazyonunu engellerken, Rho C artırır (50-56). Rho protein ailesi içerisinde vücutta en fazla bulunan ve eksprese edilebilen ve en çok çalışılan RhoA'dır (38, 51, 54, 56).

Düşük molekül ağırlıklı G proteinleri sentezlendikten sonra palmitoil, farnesil ve geranilgeranil adlı lipidler ile post-translasyonel değişiklikler geçirirler. Bu

değişiklikler hücre membranına ve düzenleyicilere bağlanmaları, alt efektörlerini aktive etmeleri için gerekli olmaktadır. Geranilgeranil olmuş C-terminal ucunun membrana tutunması ile Rho'nun aktivasyonu gerçekleşir. Rho, guanin nukleotid değişiminden sonra bazı alt efektörleri aktive eder. Bunlar;

- rhokinaz (ROCK, ROK),
- protein kinaz N,
- rhophilin, rhotekin,
- citron, p140 mDia
- fosfolipaz D (miyozin fosfotazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi)' dir.

Rhokinaz, kendi kendini fosforile edebildiği gibi çok sayıdaki proteinin fosforilasyonuna neden olarak hücre içi olayları gerçekleştirir (38-74).



Şekil 1. 6. RHO A yolağı.

<https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=396>'den alınmıştır (42).

### 2. 7. 3. Rhokinazın Substratları

Rhokinazın yirmiden fazla substratı vardır. ROCK I ve ROCK II'nin katalitik bölgelerinin %92'lik benzerlikleri nedeniyle aynı substratları fosforillediği düşünülse de Rho E'ye bağlanan ve onu fosforilleyen ROCK I'in yalnızca etkinlik gösterdiği başka hedefler de bulunabilmektedir (Şekil 1. 6.) (Tablo 1. 1).



**Tablo 1. 1.** Rhokinazın substratları, işlevleri ve hücrel yanıtı (45, 58)

<b>Substratlar</b>	<b>İşlevleri</b>	<b>Hücrel Yanıtlar</b>
<b>Miyozin fosfatın miyozin bağlayıcı alt ünitesi (MYPT1)</b>	Miyozin fosfatın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında $Ca^{+2}$ duyarlaşması
<b>Miyozin Hafif Zinciri (MLC)</b>	Miyozin F-aktine bağlanmasında artış	Stres lifleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
<b>CPI-17 proteini</b>	Miyozin fosfatın inaktive edici aktivitesinin aktivasyonu	Düz kas kasılmasında $Ca^{+2}$ duyarlaşması
<b>Kalponin</b>	F-aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında $Ca^{+2}$ duyarlaşması
<b>LIM kinaz</b>	Kinaz aktivitesinde artış	Kofilinin fosforilasyonu
<b>Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)</b>	Ezrin/Radixin/Moesin aktivasyonu	Mikrovillus oluşumu
<b>Adducin</b>	F-aktine bağlanmada artış	Membranal olaylar (ruffling, hücre motilitesi)
<b><math>Na^+ / H^+</math> değiş tokuşturucusu (NHE1)</b>	Değiş tokuşturucu aktivitenin aktivasyonu	Stres lifleri oluşumu
<b>ZIP kinaz (ZIPK) (Zipper interacting kinaz)</b>	Miyozin fosfatın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında $Ca^{+2}$ duyarlaşması
<b>CRMP-2</b>	---	Büyüme konisi kollapsı
<b>İntermediyer filamentler (GFAP, vimentin)</b>	Filamentlerin dağılımı	Filamentlerin sitokinez için ayrılması
<b>PTEN (yeni tanımlanan fosfat ve tensin-homologu)</b>	Proteinlerin ve fosfoinositlerin defosforile edilmesi, antiapoptotik etkili fosfatidilinozitol (PI)-3 kinaz/ Akt yolağının negatif düzenleyicisi	Apoptoz, hücre adezyonu, göçü ve farklılaşması

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Bu çalışmada, vücut ağırlıkları 20-40 gram arasında değişen *Mus musculus* cinsi 40 adet erişkin fare kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 04.10.2010 tarih ve 218 sayılı onay belgesi alınmıştır (Ek 1).

##### Deney Grupları

**GRUP-1:** 5 gün süre ile 12 saatlik aydınlık ve karanlık periyotlar sağlanarak gebelik oluşturulmayan normal östrus siklusunun sağlandığı hayvan grubu. Östrus siklusu vaginal smear ile belirlendi. Normal östrus evresine girdiği kabul edilen hayvanlara, 5. günden sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde (diöstrus, proöstrus, östrus ve metöstrus) ve her gün için 5 hayvan olmak üzere yüksek doz anestezi madde intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulanmış ve uterus dokuları incelenmek üzere alınmıştır.

**GRUP-2:** 5 gün süre ile 12 saatlik aydınlık ve karanlık periyotlar sağlanarak, normal östrus evresinin sağlandığı ve gebelik oluşturulacak hayvan grubu. 5. günden sonra 2'şer dişi fare gebelik sağlanması için erkek farelerin kafeslerine alındı. Ertesi gün vajinal plak oluşumuna bakılarak vajinal tıkaç görülen fareler gebe kabul edilerek ayrı kafeslere alındı. Vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edildi. Gebe hayvanlara, gebeliğin 5., 7., 9. ve 11. günlerinde ve her gün için 5 hayvan olmak üzere, yüksek doz anestezi madde intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulanmış ve uterus dokuları incelenmek üzere alınmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

- Ben Mari (Leica, Germany)
- Doku Takip Cihazı (Leica, Germany)
- Embedding Oven (MKN Taab, UK)
- Floresan mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)
- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Mikro Dalga Fırın (Arçelik MD 554 İntellwave, Türkiye)

- Mikropipetler -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson, USA)
- Mikrotom (Leica, Germany)
- Masaüstü Makro Santrifuj (Mistral 1000 MSE, UK)
- Vorteks
- PH Meter (Metle Toledo MP 2200, UK)

### **3. 3. Kimyasal Maddeler**

- Crystal Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- Cyttox
- DAPI
- Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- Gel Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)
- Paraformaldehit (Sigma, USA)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- Primer Antibody Diluent (Pleasanton, USA)
- Normal goat serum (Santa Cruz, USA)
- Rabbit anti human RhoA monoclonal antibody (Santa Cruz, USA)
- Goat anti-rabbit IgG monoclonal antibody FITCH- conjugated (Santa Cruz, USA)

### **3. 4. Doku Preparasyonu**

Ötenazi sonrasında uterus dokuları %10 tamponlu formaldehit ile 30-36 saat fikse edildi. Doku takip cihazı (Leica, Germany) ile artan dereceli etanol ile dehidre edildikten sonra ksilolle şeffaflandırılıp parafin içinde bloklandı.

### **3. 5. Işık Mikroskopi**

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica marka mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitlere genel morfolojiyi göstermek

amacıyla hematoksilin-eozin boyama uygulaması yapıldı. Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskobu ile uygun alanlardan görüntüler alındı.

### 3. 6. İmmüno Floresan Mikroskopisi

Parafine gömülü doku örneklerinden alınan 4-5 µm'lik seri kesitlere aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulandı.

- Deparafinizasyon,
- Azalan derişimlerdeki etil alkol ile hidrasyon,
- Distile su
- Kesitlere antijen retrieval (10 mM sitrat tampon pH:6 içerisinde mikrodalga fırında 95 °C'de 5 dakika kaynatma) uygulandı
- PBS ile kesitler 3 defa yıkandı
- Kesitler, PBS-Triton-X 100- % 1,5 Normal goat serum ile 1x5 dakika yıkandı [Normal serum (sekonder antikorun üretildiği hayvana ait) ile nonspesifik boyanmaların engellenmesi için inkübe edildi]
- PBS-Triton-X 100-% 3 Normal goat serum ile 1x20 dakika yıkandı.
- Primer antikorla +4 °C'de 1 gece inkübe edildi
- PBS-Triton-X 100-% 1.5 Normal goat serum ile 1x5 dakika yıkama
- Sonraki aşamalar oda ısısı ve karanlık ortamda uygulandı
- Sekonder antikor ile inkübasyon, 30 dakika
- PBS-Triton-X 100-% 1.5 Normal goat serum ile 1x5 dakika yıkama
- Zıt boyama (nukleus boyası, Cyttox) 15 dakika yapıldı
- PBS ile yıkandı.
- Kapatma mediumu ile kapatma yapıldı
- Floresan mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan) ile görüntüler elde edildi.
- Negatif kontrol kesitlere primer antikor inkübasyonu yapılmayarak diğer aşamalar aynı şekilde uygulandı.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. Grup-1 bulguları

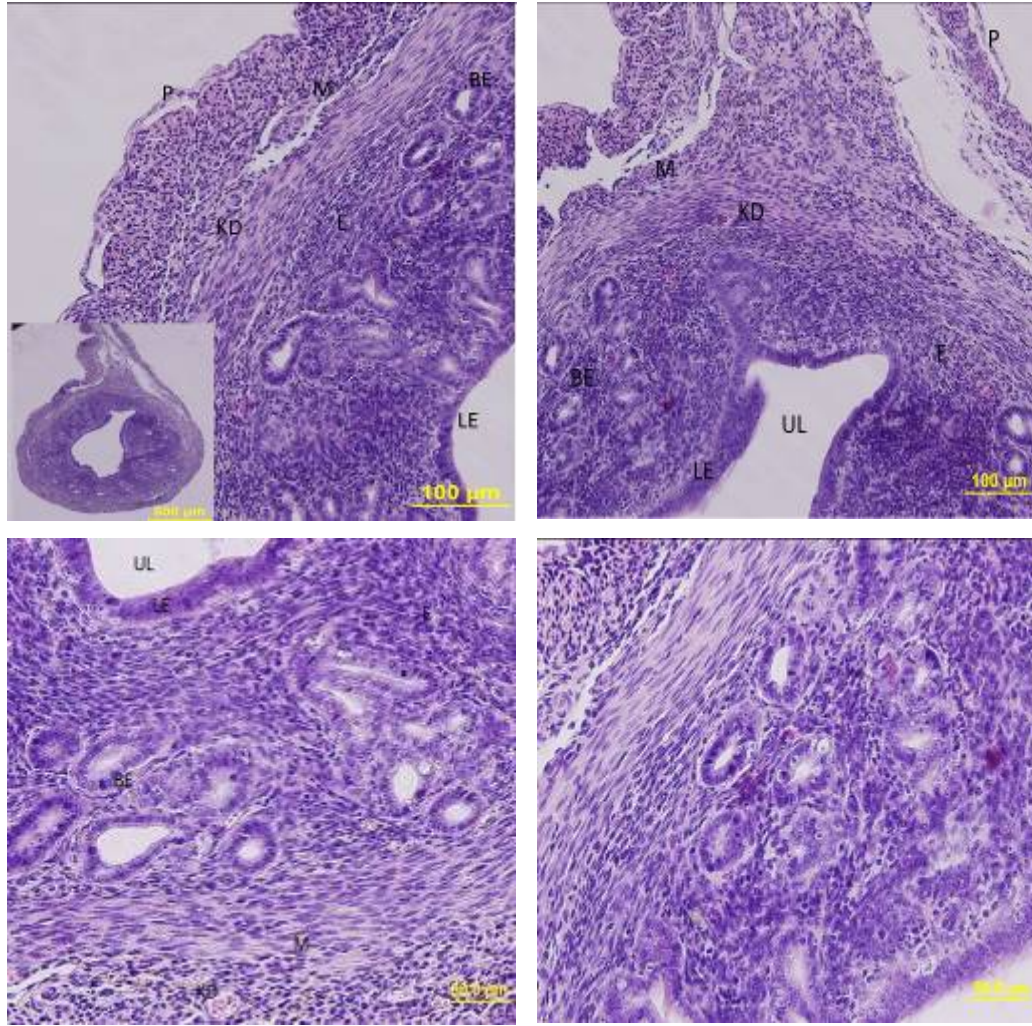
*Mus musculus* cinsi farelerden gebelik oluşturulmayan bir grup oluşturularak bu hayvanlardaki östrus siklusu evreleri değerlendirildi. Diöstrus, proöstrus, östrus ve metöstrus evreleri için ışık mikroskopik çalışmalar için hematoksil-eozin boyama ve immunofloresan mikroskopik çalışmalar için RhoA immunofloresan boyamalar yapıldı ve bulgular elde edildi.

**Diöstrus evresinde;** lümen küçük bir yarık şeklinde olup, kübik-prizmatik epitel hücreler, atrofik ve kollabe olmuş (çökmüş) endometrial bezler, sütun şeklindeki uterus mukoza hücreleri ve stromada polimorfonükleer lökositler ve ödem görüldü (Şekil 4. 1- Şekil 4. 2).

**Proöstrus evresinde;** lümen sıvıyla dolu olduğu için prizmatik epitel, hipertrofik endometrial bezler, mukoza içerisine gömülmüş lökositler, vaskülarizasyon ve ödem artışı izlendi (Şekil 4. 3- Şekil 4. 4).

**Östrus evresinde;** lümenin şişkinliği maksimum seviyede, maksimum boyutta epitel hücreleri izlendi, lökosit görülmedi (Şekil 4. 5.- Şekil 4. 6).

**Metöstrus evresinde;** sıvının azalması sonucu lümende vaskülarizasyon azalmış, kübik hücreli luminal epitelde devam eden vakuoler dejenerasyon ve lökosit infiltrasyonunda azalma izlendi. (Şekil 4. 7- Şekil 4. 8 )



**Şekil 4. 1.** Diöstrus evresinde ışık mikroskopik bulgular (H-E). BE: Bez epiteli, E: Endometrium, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, M: Miyometrium, P: Perimetrium, UL: Uterus lümeni.

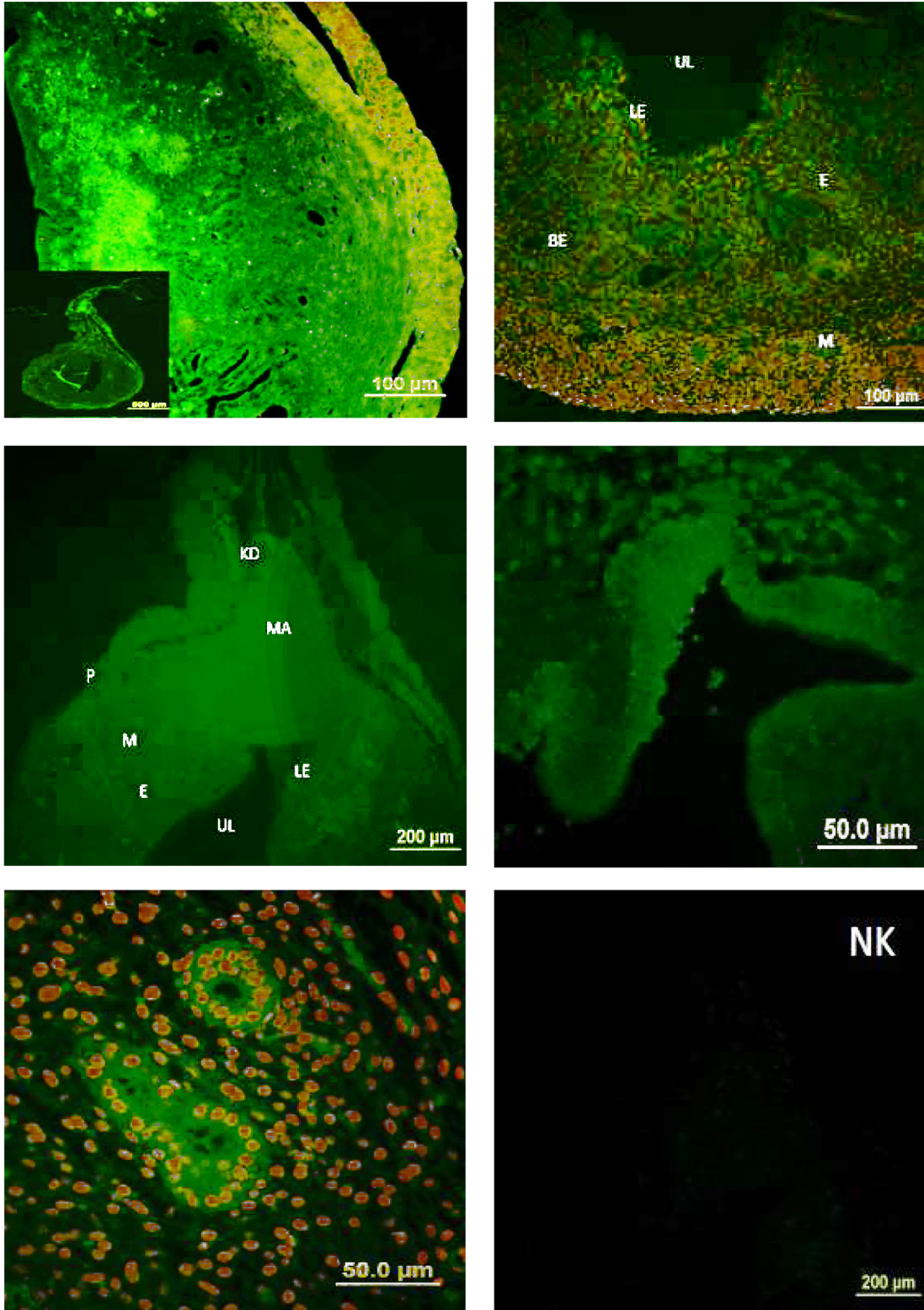
**Tablo 4. 1.** Diöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu

	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
RhoA	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+	+	+ <sup>2</sup>

BE; Bez epiteli, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, LE; Luminal epitel, M; Miyometrial düz kas tabakaları, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, SLS; Subluminal stroma, STR; Stroma,

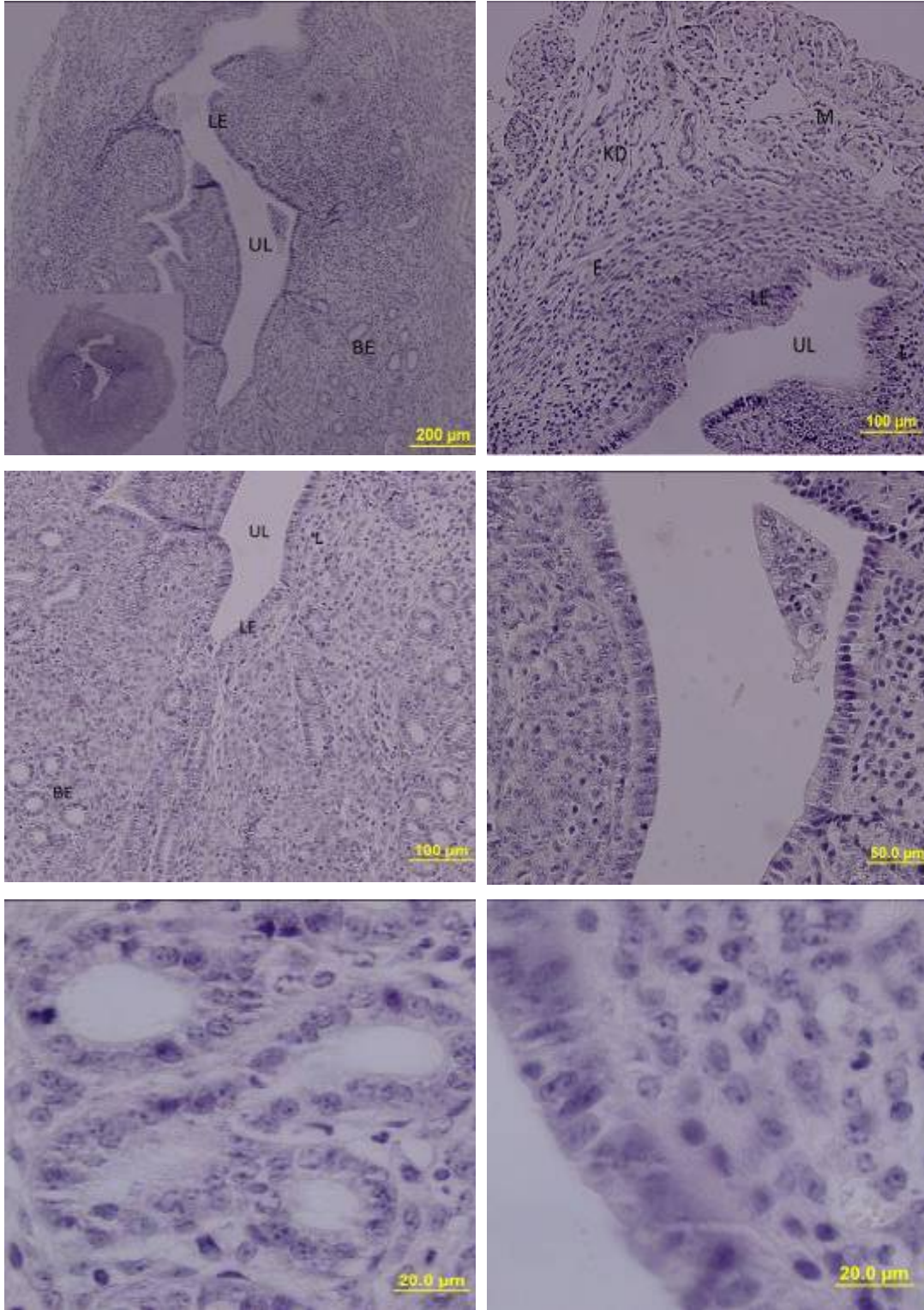
+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

Diöstrus evresinde, perimetrial-miyometrial bağ doku ve miyometrial düz kas tabakalarında kuvvetli ekspresyon görülürken; luminal epitel, bez epiteli ve endotelde orta kuvvette ekspresyon izlendi. Subluminal ve bazal stromalarda ise ekspresyonun zayıf olduğu izlendi (Tablo 4. 1) (Şekil 4. 2).



**Şekil 4. 2.** Diöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu. BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, UL: Uterus lümeni. (NK: Negatif Kontrol)





**Şekil 4. 3.** Proöstrus evresinde ışık mikroskopik bulgular (H-E). BE: Bez epiteli, E: Endometrium, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, M: Miyometriyum, P: Perimetriyum, UL: Uterus lümeni.

**Tablo 4. 2.** Proöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu

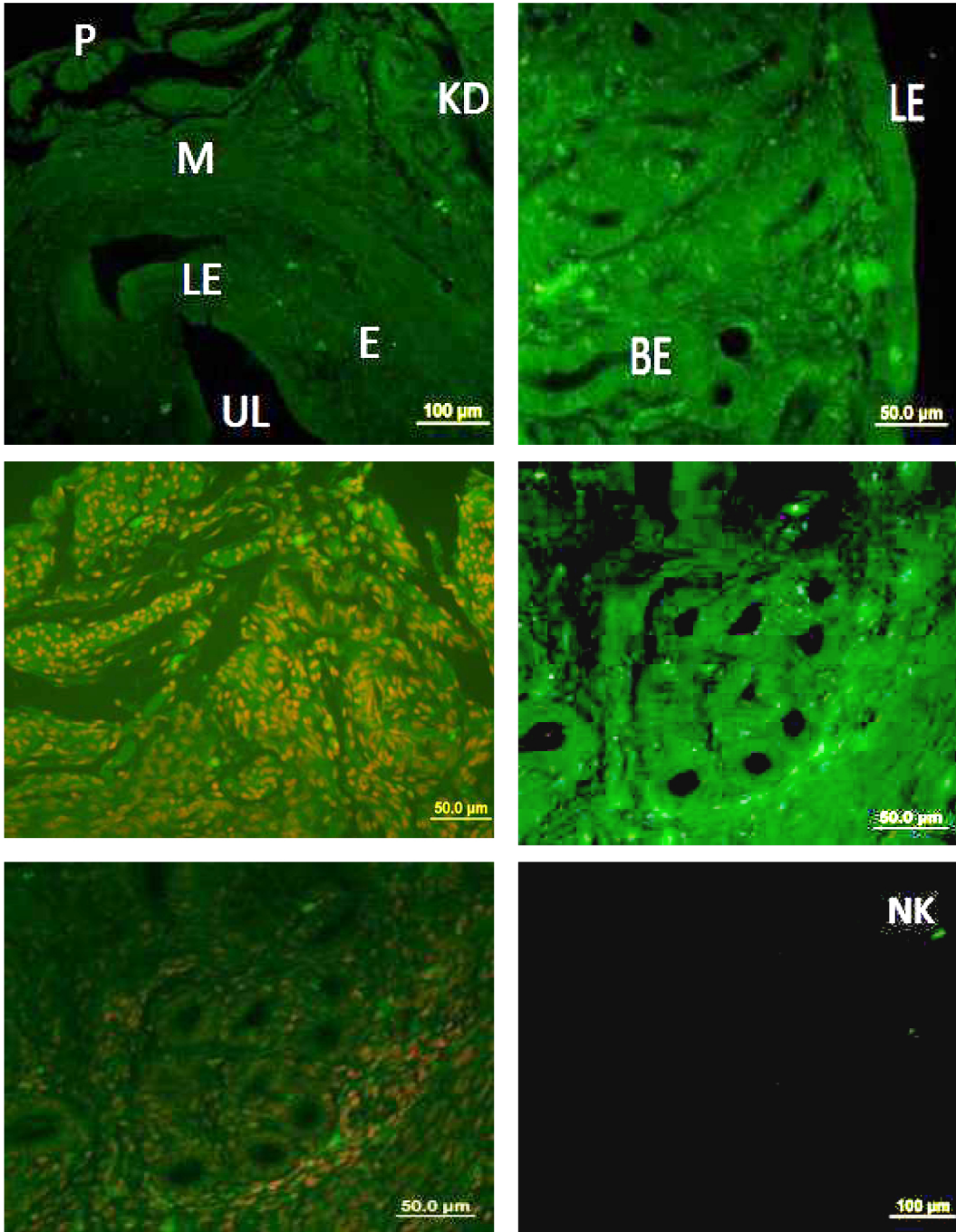
	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
RhoA	+ <sup>2</sup>	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+	+	+ <sup>2</sup>

BE; Bez epiteli, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, LE; Luminal epitel, M; Miyometrial düz kas tabakaları,

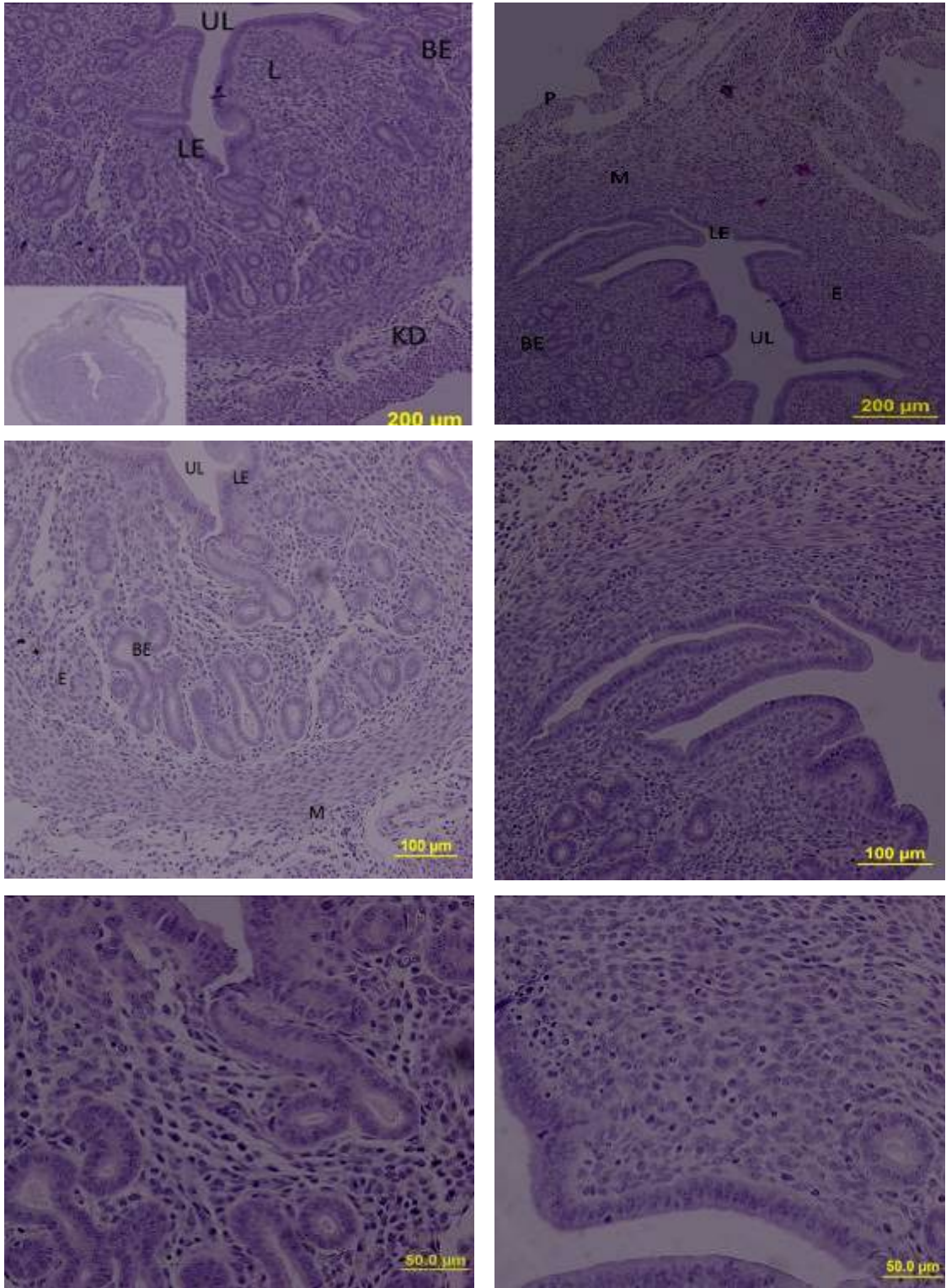
PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, SLS; Subluminal stroma, STR; Stroma,

+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

Proöstrus evresinde, diöstrus evresine göre ekspresyon değerlerinde azalma olduğu gözlemlendi. Kuvvetli ekspresyon alanları göstermeyen RhoA, perimetrial-miyometrial bağ doku, lümen epiteli, bez epiteli ve endotelde orta kuvvette ekspresyon gösterirken; miyometrial düz kas tabakaları, subluminal stroma ve bazal stromada ise zayıf ekspresyon izlendi (Tablo 4. 2) (Şekil 4. 4).



**Şekil 4. 4.** Proöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu. BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, UL: Uterus lümeni. (NK: Negatif Kontrol)



**Şekil 4. 5.** Östrus evresinde ışık mikroskopik bulguları (H-E). BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epiteli, UL: Uterus lümeni.

**Tablo 4. 3.** Östrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu

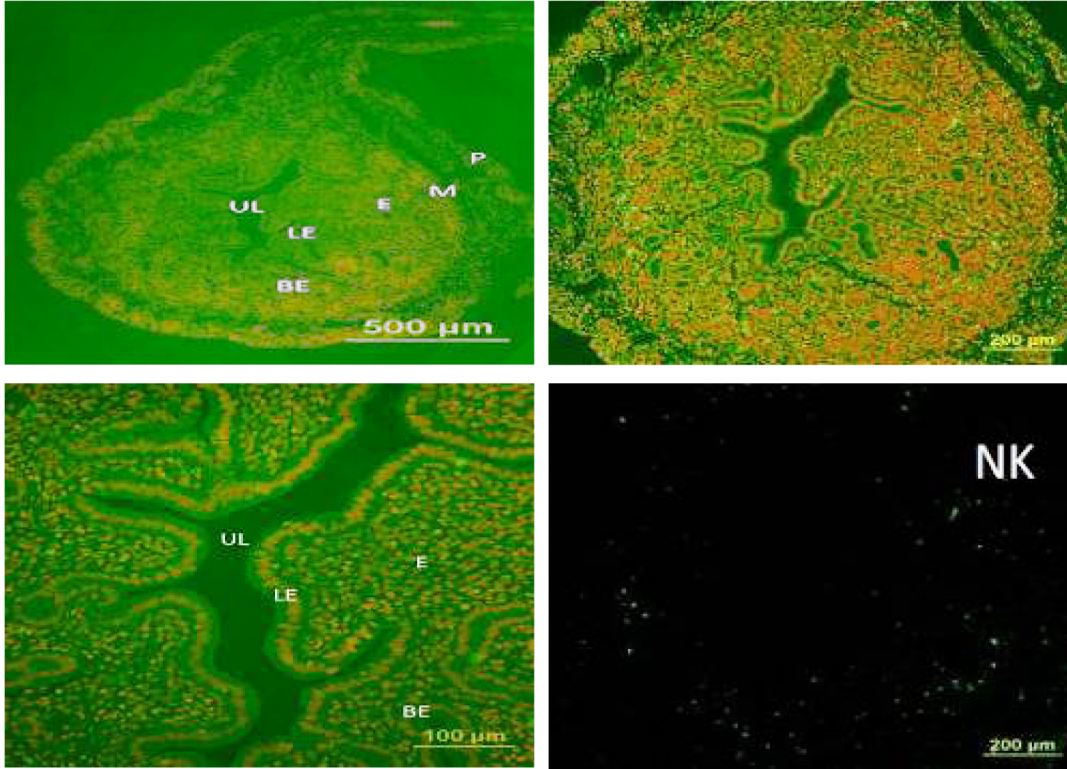
	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
RhoA	+ <sup>2</sup>	+	+ <sup>2</sup>	+	+	+	+

BE; Bez epiteli, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, LE; Luminal epitel, M; Miyometrial düz kas tabakaları,

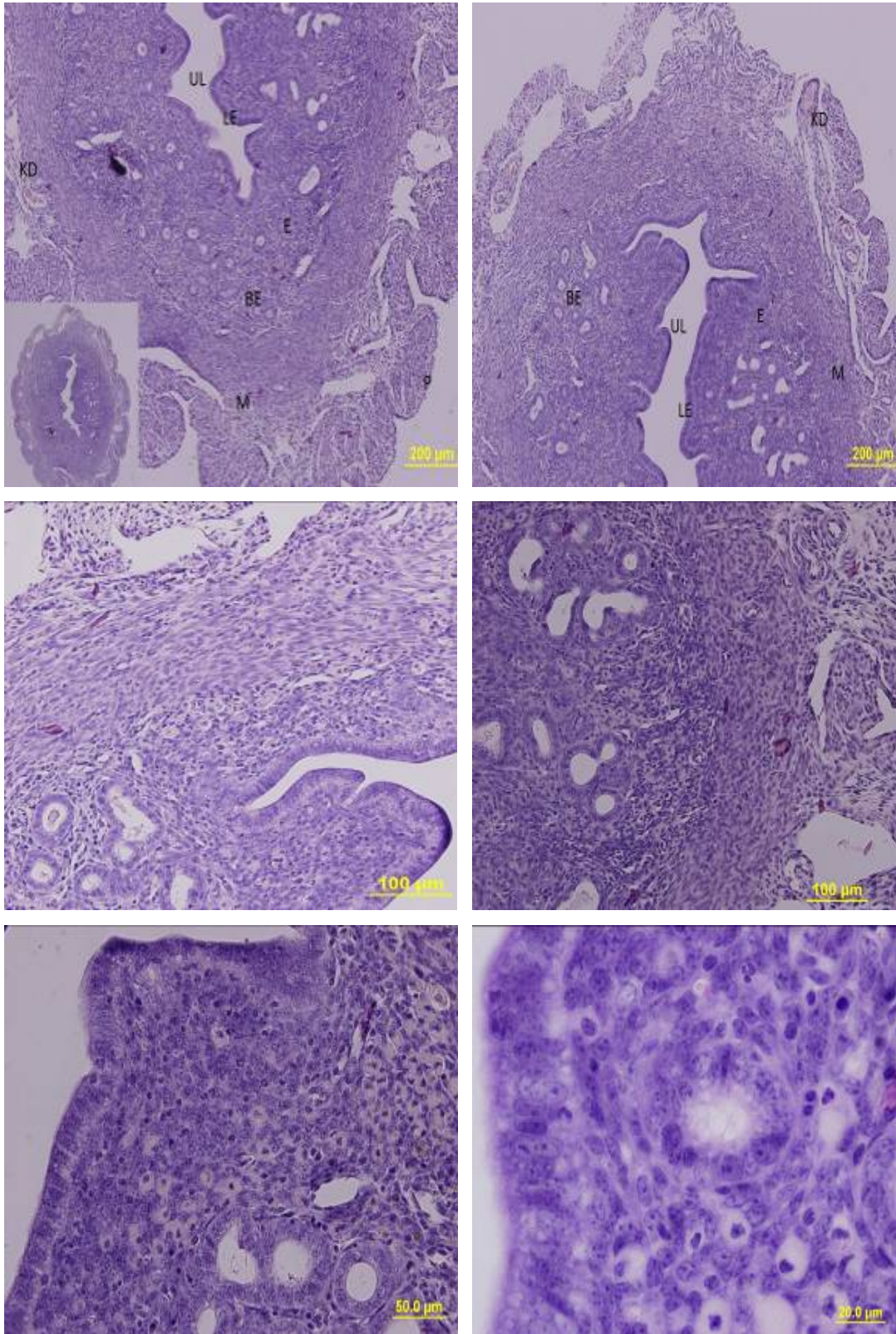
PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, SLS; Subluminal stroma, STR; Stroma,

+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

Östrus evresinde, proöstrus evresine göre eksprese alanlarda azalma belirgin halde izlendi. Perimetrial- miyometrial bağ dokuda ve lümen epitelinde orta kuvvette ekspresyon görülürken; miyometrial düz kas tabakaları, bez epiteli, subluminal ve bazal stromalarda, endotelde ise ekspresyonun zayıf olduğu izlendi (Şekil 4. 6) (Tablo 4. 3.)



**Şekil 4. 6.** Östrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu. BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, UL: Uterus lümeni. (NK: Negatif Kontrol)



**Şekil 4. 7.** Metöstrus siklusunda ışık mikroskopik bulgular (H-E). BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, UL: Uterus lümeni.

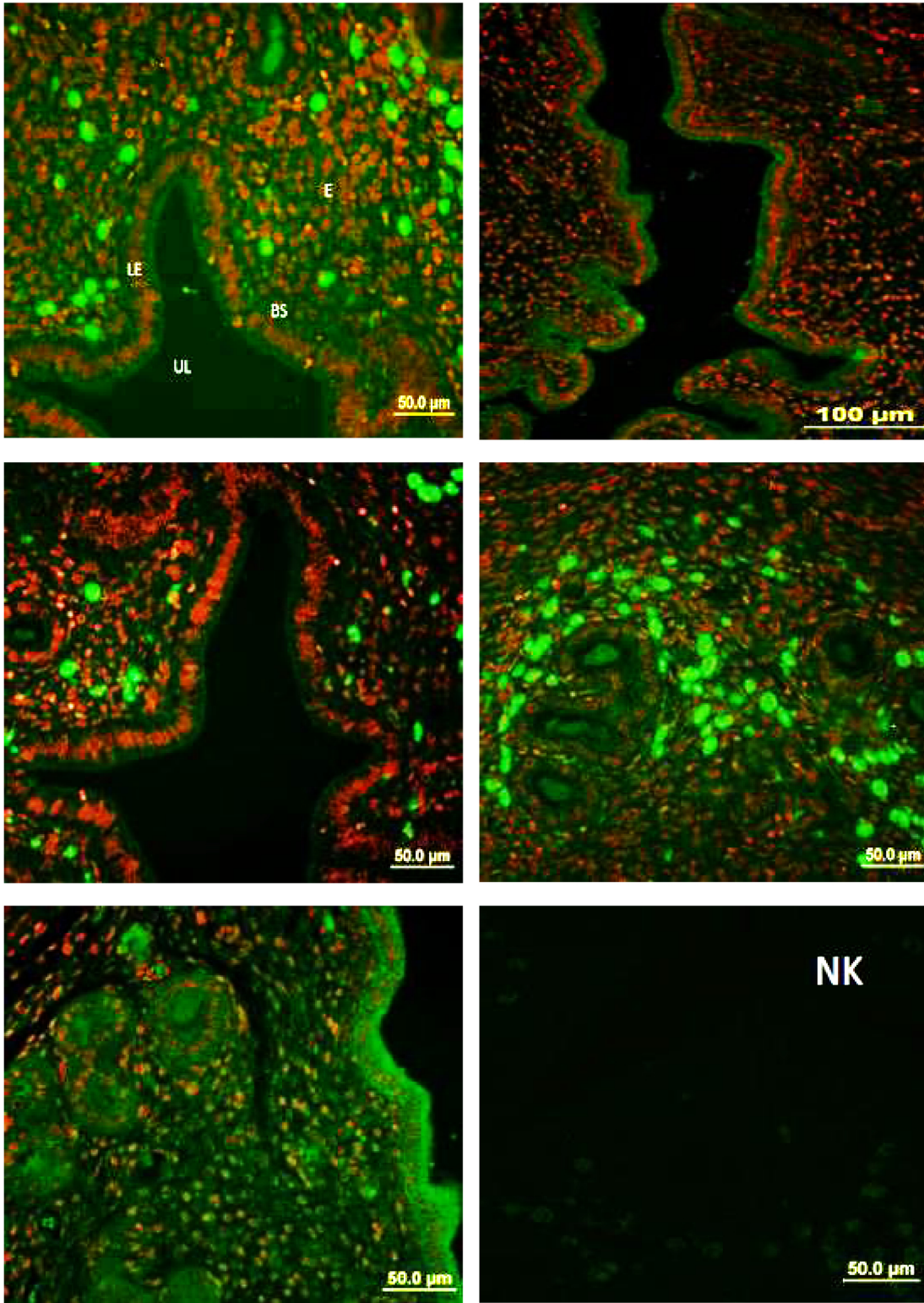
**Tablo 4. 4.** Metöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu

	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
RhoA	+ <sup>2</sup>	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+	+	+ <sup>2</sup>

BE; Bez epiteli, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, LE; Luminal epitel, M; Miyometrial düz kas tabakaları, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, SLS; Subluminal stroma, STR; Stroma,

+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

Metöstrus evresinde, östrus evresine göre RhoA'nın eksprese olduğu alanlarda artış izlendi. Perimetrial- miyometrial bağ doku, lümen epiteli, bez epiteli ve endotelde orta kuvvette ekspresyon görülürken; miyometrial düz kas tabakalarında, subluminal ve bazal stromalarda ise ekspresyonun zayıf olduğu izlendi ( Tablo 4. 4) (Şekil 4. 8).



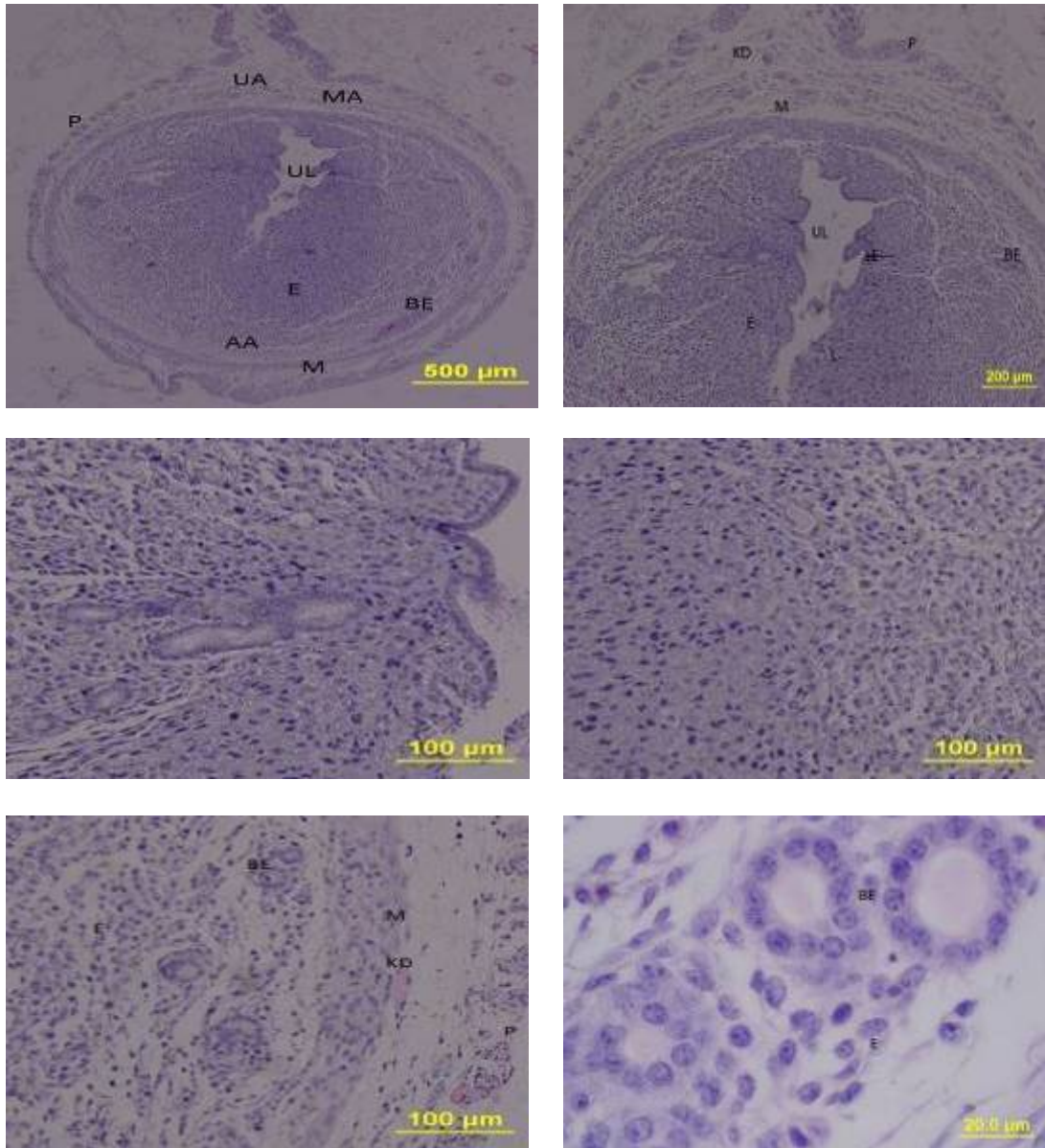
**Şekil 4. 8.** Metöstrus evresinde RhoA immunolokalizasyonu. BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, UL: Uterus lümeni. (NK: Negatif Kontrol)



## 4. 2. Grup-2 bulguları

### Gebeliğin 5. günü

Kübik- prizmatik şekilli hücreleri ile uterus lümen epiteli, bazal membran ve subluminal stromada yer alan lökositler görüldü. Vaskülarizasyonun fazla olmadığı 5.günde endometrial bez epitelinde vakuolizasyon ve dejenerasyon görülmedi (Şekil 4. 9).



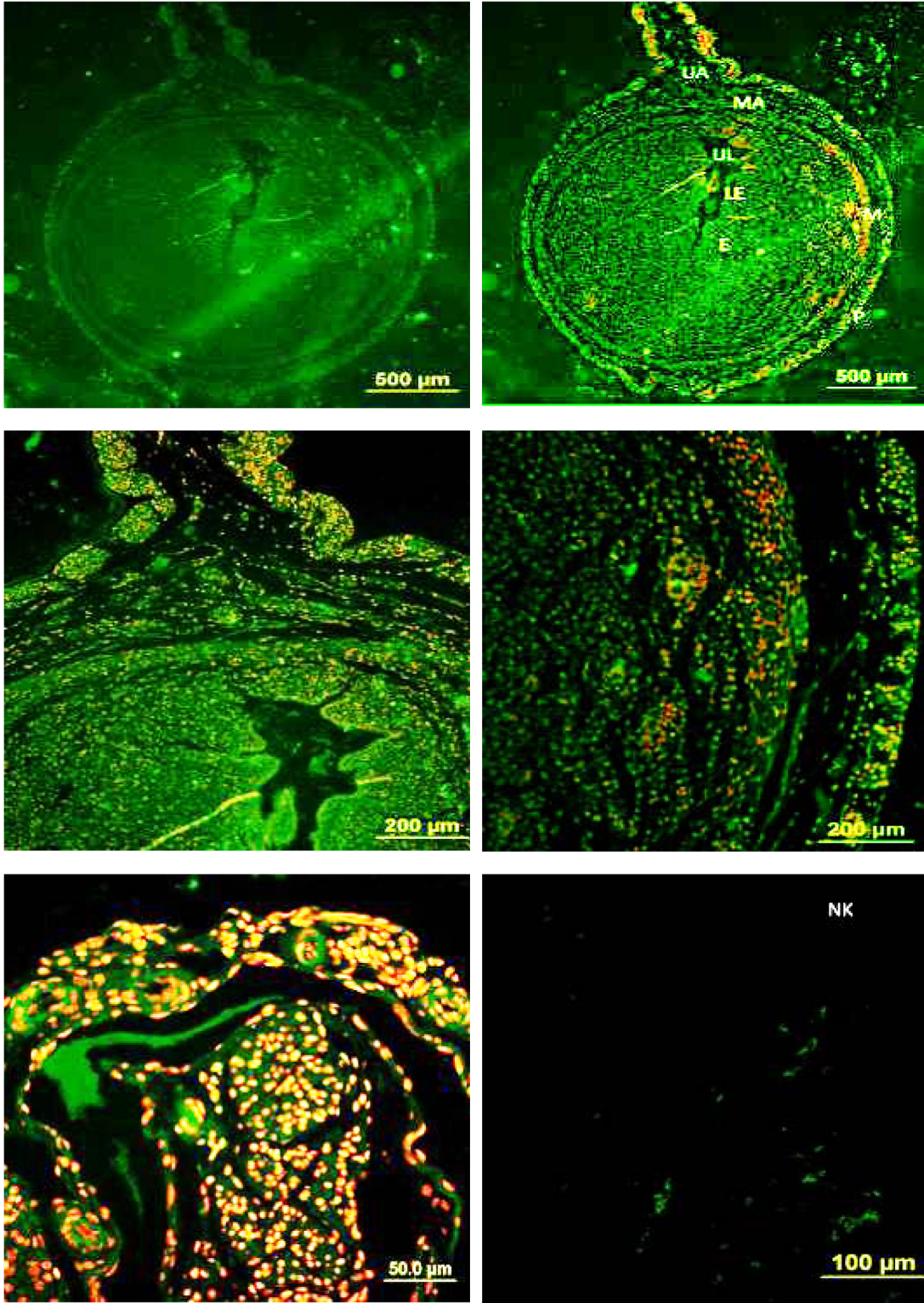
**Şekil 4. 9.** Gebeliğin 5. gününde ışık mikroskopik bulguları (H-E). AA: Antimezometrial alan, BE: Bez epiteli, E: Endometrium, KD: Kan damarı, L: Lökosit, LE: Luminal epitel, M: Miyometrium, MA: Mezometrial alan, P: Perimetrium, UA: Uterin arter, UL: Uterus lümeni.

**Tablo 4. 5.** Gebeliğin 5. gününde RhoA immunolokalizasyonu

5.GÜN	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
RhoA	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+	+	+

PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları, LE; Luminal epitel, BE; Bez epiteli, STR; Stroma, SLS; Subluminal stroma, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, +<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

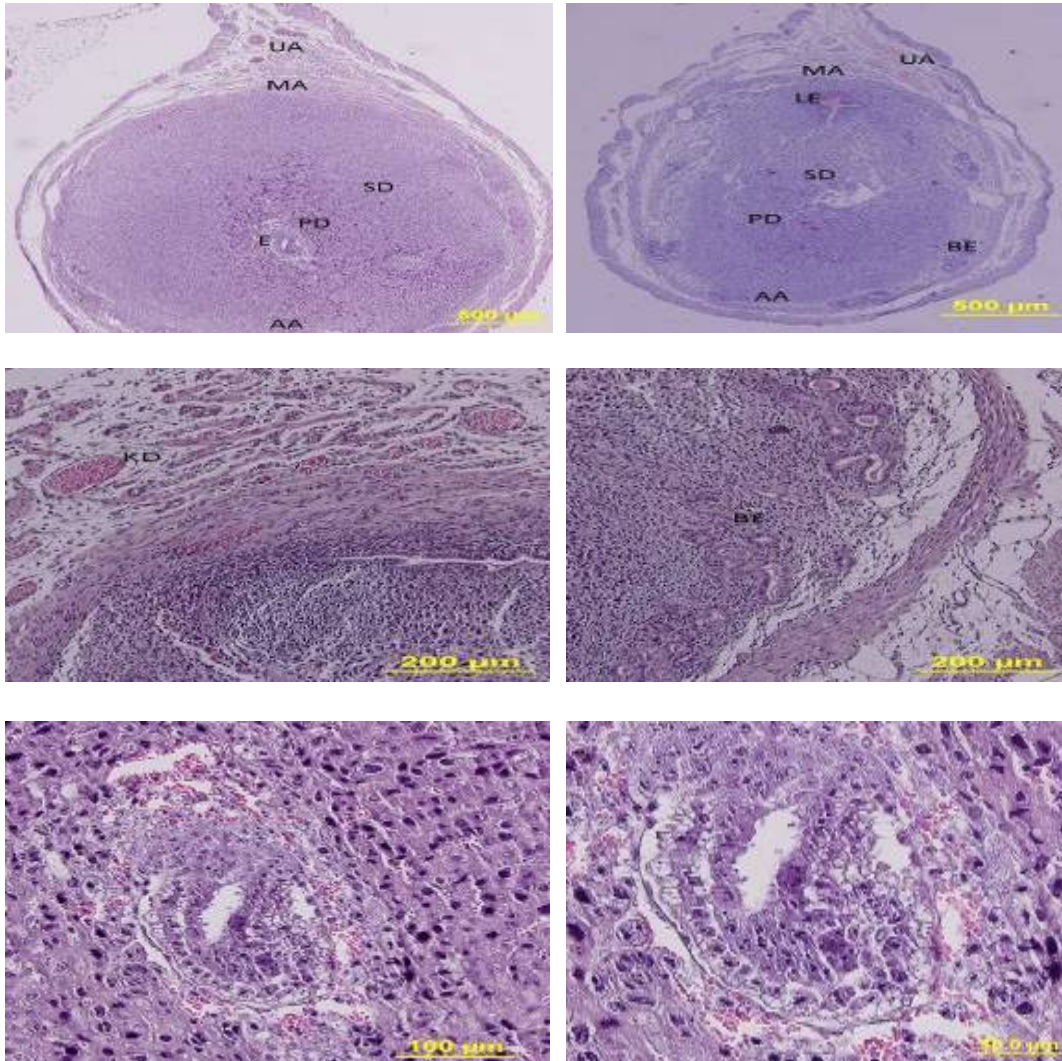
Luminal epitel, bez epiteli ve miyometrial düz kas tabakalarında orta kuvvette RhoA ekspresyonları izlendi. Subluminal stroma, bazal stroma, endometrium ve perimetriumda zayıf ekspresyonlar şeklinde görüldü (Tablo 4. 5) ( Şekil 4. 10).



**Şekil 4. 10.** Gebeliğin 5. gününde RhoA immunolokalizasyonu. AA: Antimezometrial alan, BE: Bez epiteli, E: Endometrium, KD: Kan damarı, L: Lökosit, M: Miyometrium, MA: Mezometrial alan, P: Perimetrium, UA: Uterin arter, UL: Uterus lümeni. (NK: Negatif Kontrol)

### Gebeliğin 7. Günü

Embriyonun poligonal şekilli büyük hücrelerden oluşan primer desidua tabakası ile çevrelenmiş olduğu görüldü. Vaskularizasyon primer desiduada görülmezken, sekonder desiduada yoğun boşluklarla birlikte görüldü. Uterin arter varlığıyla mezometrial alan ve bu alanın zıt yönünde yer alan antimezometrial alanlar oldukça belirgin olarak izlendi. Luminal epitelin, mezometrial alan ile antimezometrial alan arasında bulunan kübik- prizmatik hücrelerden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4. 11).



**Şekil 4. 11.** Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskopik bulgular (H-E). AA: Antimezometrial alan, BE: Bez epiteli, E: Embriyo, KD: Kan damarı, LE: Luminal Epitel, MA: Mezometrial alan, PD: Primer desidua, SD: Sekonder desidua, UA: Uterin arter.

**Tablo 4. 6.** Gebeliğin 7. Gününde RhoA immunolokalizasyonu

7.GÜN	ENDOMETRİUM			M	PMB	DESİDUA			
	BE	LE	STR			EB	BZ	PDZ	SDZ
RhoA	+	+ <sup>2</sup>	+	+	+	+ <sup>2</sup>	+	+	+

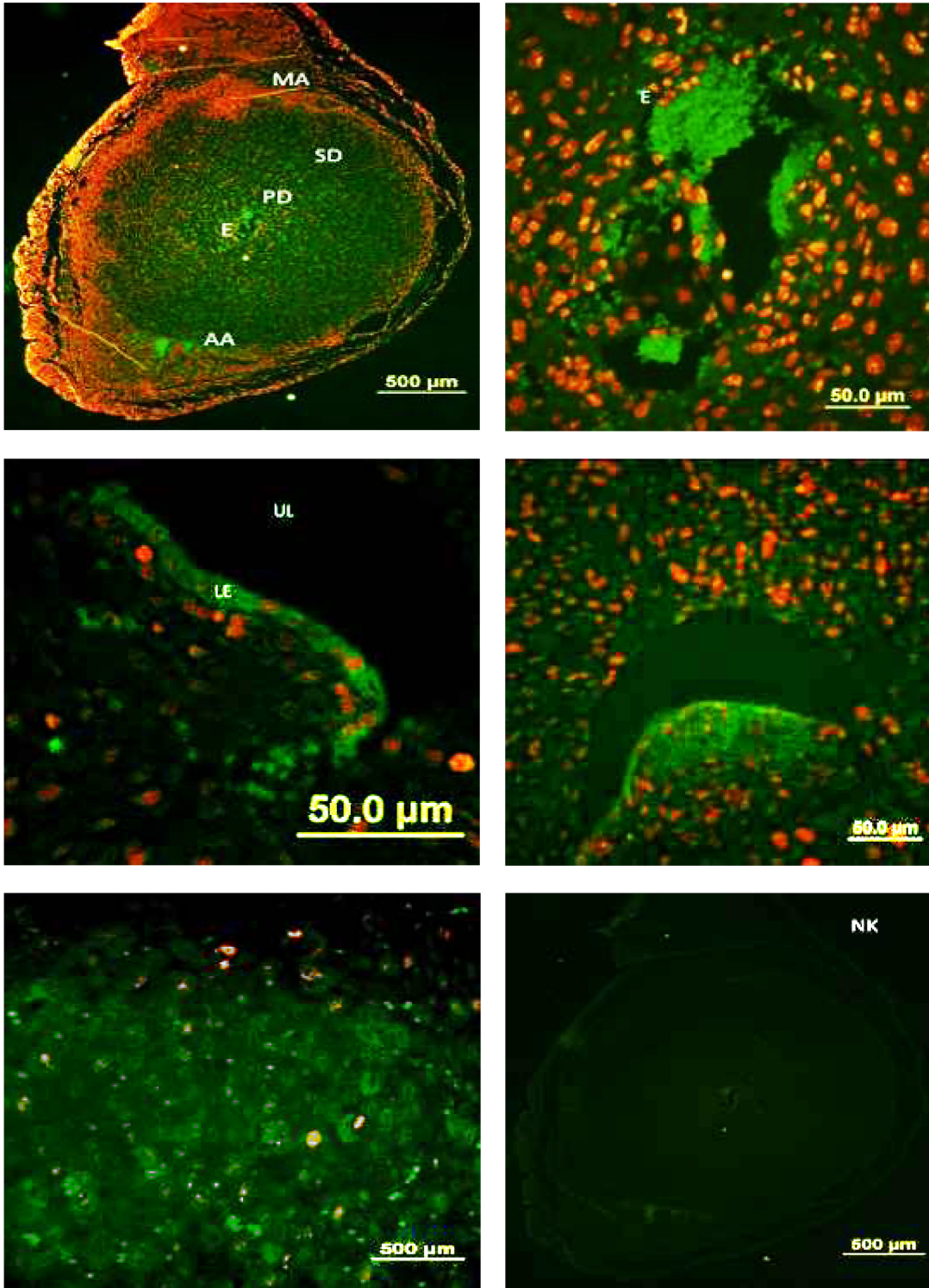
BE: Bez epiteli, BZ: Bazal zon, EB: Embriyo bölgesi, LE: Luminal epitel,

M: Miyometrium, PDZ: Primer desidual zon, PMB: Perimetrial-miyometrial bağ doku,

SDZ: Sekonder desidual zon, STR:Stroma

+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

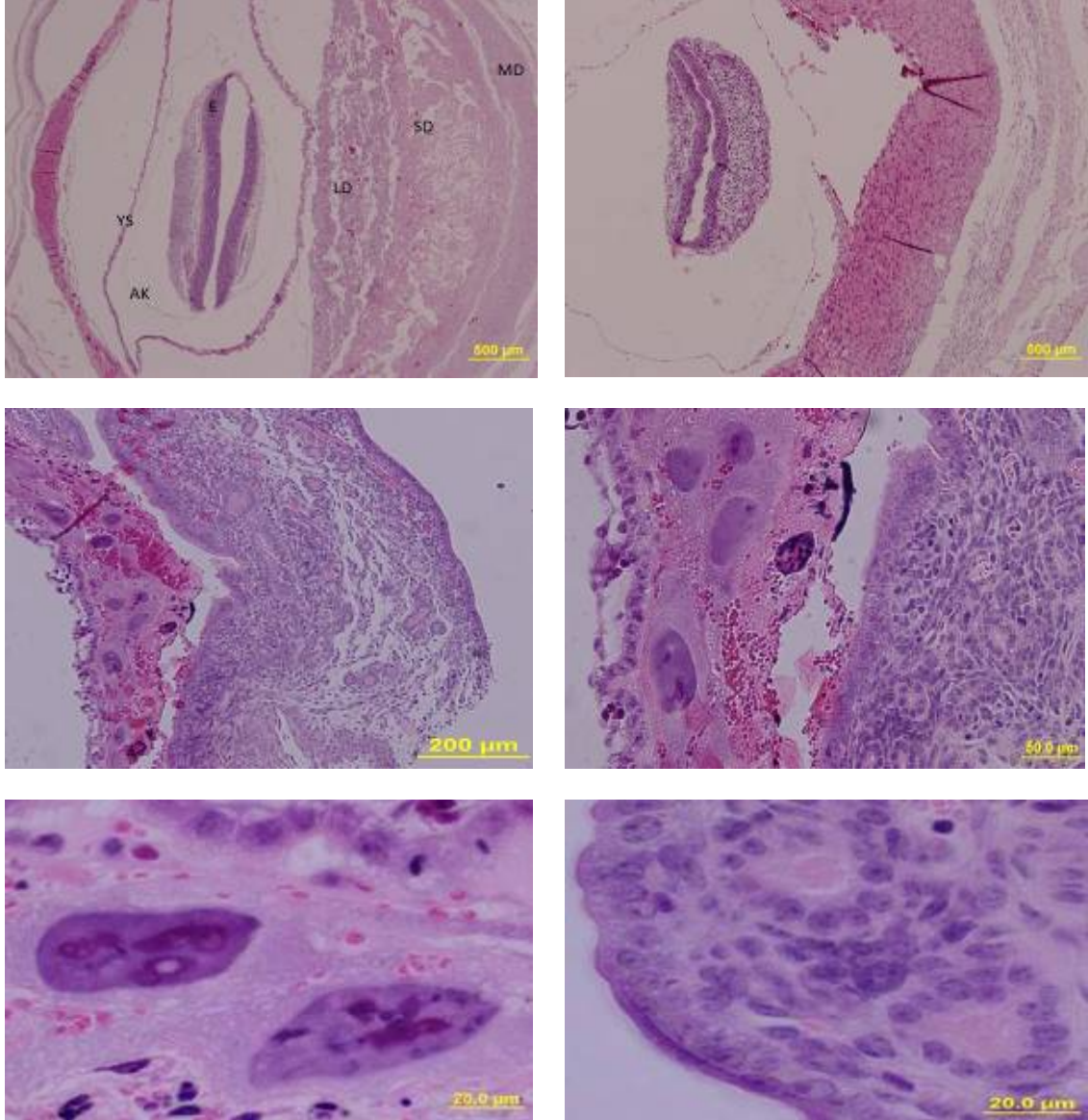
Embriyo bölgesi ve luminal epitelde orta kuvvette ekspresyon gösteren RhoA'nın, bez epiteli, stroma, miyometrium, perimetrial- miyometrial bağ doku ve desidua alanlarında zayıf ekspresyon gösterdiği izlendi (Tablo 4. 6) (Şekil 4. 12).



**Şekil 4. 12.** Gebeliğin 7. gününde RhoA immunolokalizasyonu. AA: Antimezometrial alan, BE: Bez epiteli, E: Embriyo, KD: Kan damarı, LE: Luminal Epitel, MA: Mezometrial alan, PD: Primer desidua, SD: Sekonder desidua. (NK: Negatif Kontrol)

### Gebeliğin 9. günü

Desidua tabakaları ve embriyo bölgesi hücresel morfolojilerine bakıldığında net izlendi ve bu dönemde dev trofoblast hücrelerinin varlığı oldukça belirgindi. Desidua içerisinde bez ve damar yoğunluğunun artış izlendi. Bununla birlikte amnion ve vitellus kesesinin varlığı izlendi (Şekil 4. 13).



**Şekil 4. 13.** Gebeliğin 9. gününde ışık mikroskopik bulgular (H-E). AK: Amnion kesesi, BE: Bez epiteli, E: Embriyo, LD (LP): Labirent desidua (plasenta), MD (MP): Maternal desidua (plasenta), , SD (SP): Spongiyoz desidua (plasenta), YS (VK): Vitellüs kesesi.

**Tablo 4. 7.** Gebeliğin 9. gününde RhoA immunolokalizasyonu

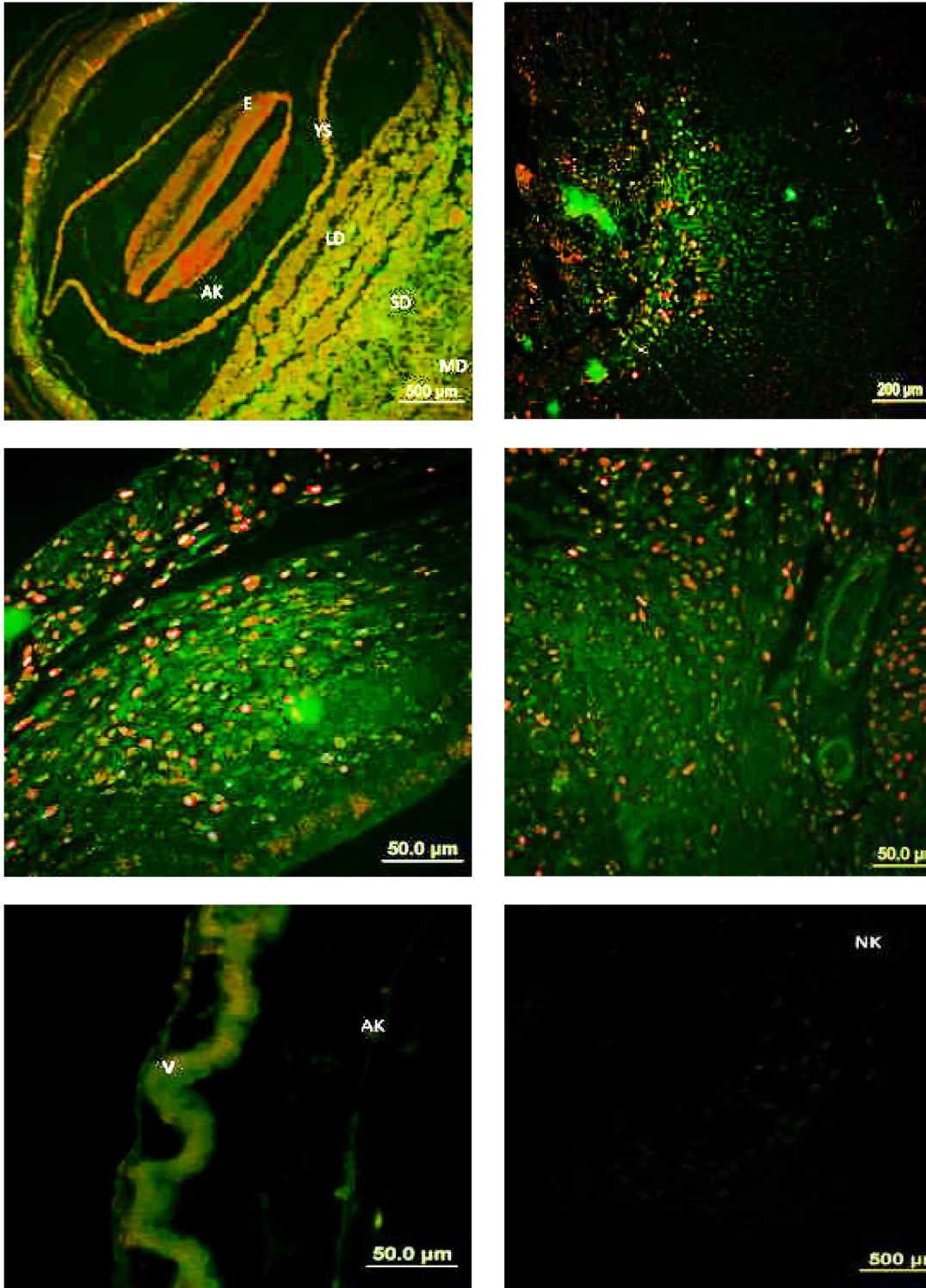
9.GÜN	DESİDUA						PMB	M
	EB	LD	SD	MD	DK	EBS		
RhoA	+	+ <sup>2</sup>	+	+	+	-	+	+

EB; Embriyo bölgesi, LD; Labirent desidua, SD; Spongiyoz desidua, MD; Maternal desidua, DK; Desidual kapsül, EBS; Endometrial bazal stroma, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları

+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

Labirent desiduada orta kuvvette eksprese olan RhoA'nın, endometrial bazal stromada ekspresyon göstermediği ve kalan diğer tüm alanlarda zayıf ekspresyon gösterdiği izlendi (Tablo 4. 7) (Şekil 4. 14).

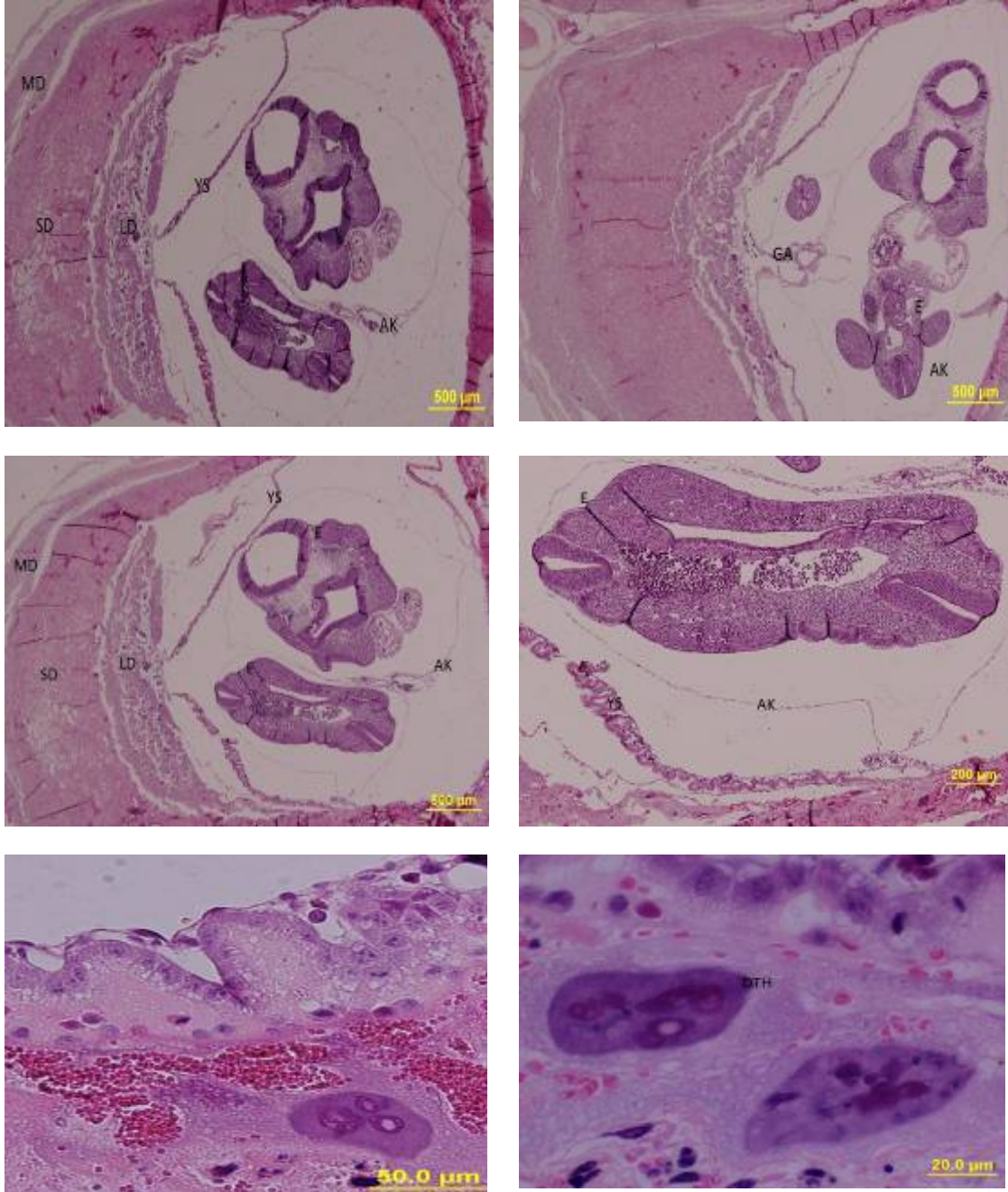




**Şekil 4. 14.** Gebeliğin 9. gününde RhoA immunolokalizasyonu. AK: Amnion kesesi, BE: Bez epiteli, E: Embriyo, LD (LP): Labirent desidua (plasenta), MD (MP): Maternal desidua (plasenta), , SD (SP): Spongiyoz desidua (plasenta), YS (VK): Vitellüs kesesi. (NK: Negatif Kontrol)

### Gebeliğin 11. günü

Göbek atardamarı (arteria umbilicalis), vitellus kesesi, amnion, labirent desidua ve dev trofoblast hücreleri oldukça belirgin izlendi (Şekil 4. 15).



**Şekil 4. 15.** Gebeliğin 11. gününde RhoA immunolokalizasyonu. AK: Amnion kesesi, DTH: Dev trofoblast hücreleri, E: Embriyo, GA: Göbek atardamarı, LD (LP): Labirent desidua (plasenta), MD (MP): Maternal desidua (plasenta), SD (SP): Spongiyoz desidua (plasenta), YS (VK): Vitellüs kesesi.

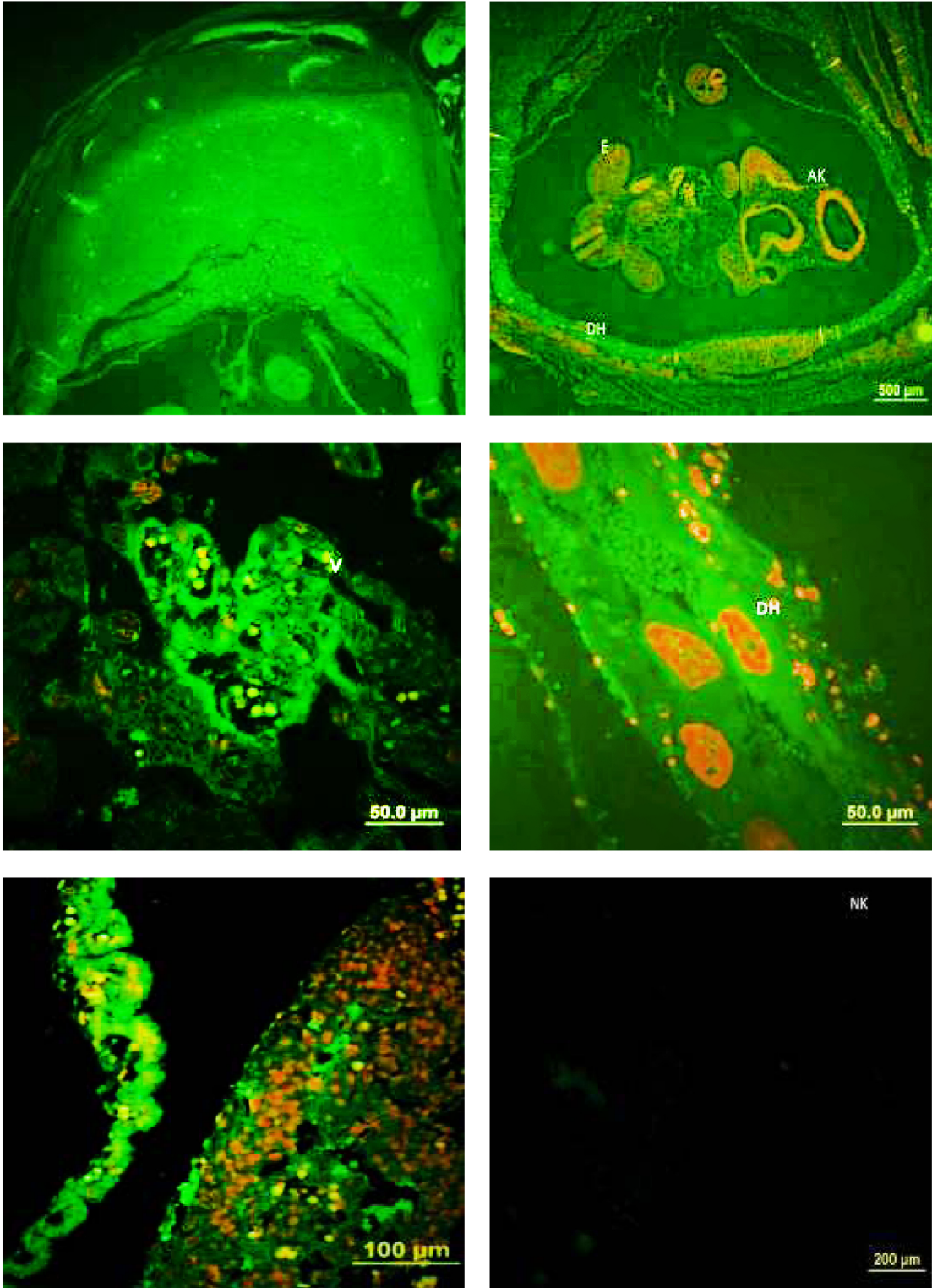
**Tablo 4. 8.** Gebeliğin 11. gününde RhoA immunolokalizasyonu

11.GÜN	DESİDUA						PMB	M
	EB	LD	SD	MD	DK	EBS		
RhoA	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	+	+	+	+

EB; Embriyo bölgesi, LD; Labirent desidua, SD; Spongiyoz desidua, MD; Maternal desidua, DK; Desidual kapsül, EBS; Endometrial bazal stroma, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları

+<sup>3</sup>; Kuvvetli ekspresyon, +<sup>2</sup>; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok

Spongiyoz desiduada kuvvetli, labirent ve maternal desiduada orta kuvvette ekspresyon gösterirken RhoA'nın geri kalan alanlarda zayıf ekspresyon gösterdiği izlendi(Tablo 4. 8) (Şekil 4. 16).



**Şekil 4. 16.** Gebeliğin 11. gününde RhoA immunolokalizasyonu. AK: Amnion kesesi, DTH: Dev trofoblast hücreleri, E: Embriyo, GA: Göbek atardamarı, LD (LP): Labirent desidua (plasenta), MD (MP): Maternal desidua (plasenta), SD (SP): Spongiyoz desidua (plasenta), YS (VK): Vitellüs kesesi. (NK: Negatif Kontrol)

## 5. TARTIŞMA

Embriyonun uterin kompartmanına implantasyonu, embriyonun endometrial epitele tutunmasını ve embriyonun endometrial stroma içinde invazyonunu içeren çok basamaklı bir süreçtir. Embriyonun endometriuma implantasyonu gebeliğin oluşması için gereken kritik çok basamaklı süreçtir. İmplantasyon başarısızlığı infertilitenin en büyük nedenidir ve yardımla üreme tekniklerinin başarısının önünde önemli bir engel oluşturur. Embriyo-uterus diyalogu büyüme faktörleri, sitokinler, transkripsiyon faktörleri, lipid medyatörleri içerir. Bu yapılar hep birlikte embriyonun uterus epiteline tutunmasını ardından da embriyonun endometrial stromaya invazyonunu sağlarlar. Endometrium, menstrual döngü boyunca yoğun remodellenme ve tamir olaylarını geçiren çok dinamik bir organdır. Ovaryal hormonlara, sitokinlere, büyüme faktörlerine yanıt olarak gerçekleşen tekrar modellenme, genel doku tamir mekanizmalarıyla birçok ortak özellik gösterir. Bu süreç göçsel fenotip, sitoiskeletin tekrar kurulması ve hücre-matriks-bağımlı sinyalleme ile karakterizedir. Endometriumda bulunan propteolitik enzimler, büyüme faktörleri ve kemokinlerin menstruasyonu takiben doku yenilenmesinde ve tamirinde önemli olduklarına inanılmaktadır (51).

Memelilerde implantasyon, blastosist aşamasındaki embriyo ile reseptiv endometrium arasındaki diyalog sonucu meydana gelen en karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Bu süreçte, blastosist tarafından uterinal dokuda birçok genin ekspresyonu indüklenir, sonrasında blastosiste komşu epitelde adezyonu sağlayan yeni moleküller açığa çıkar, endometrial stroma hücreleri epitelooid özellikteki desidua hücrelerine farklılaşırken ekstraselüler matriks bileşimi de tamamen değişir. Özellikle kemiricilerde ileri derecede invaziv özelliklere sahip blastosistin antimezometrial alana adezyonundan sonra implantasyon bölgesinde anjiogenez, plasantasyon, matriks yıkımı, invazyon kontrolü ve apoptozu yönlendiren yeni moleküllerin katılımıyla süreç daha da karmaşık bir hal alır (10-12, 33).

RhoA, RAC1 ve CDC42 hücre göçü ve sitoiskeletin tekrar düzenlenimi gibi hücre işlevlerini kontrol eden Rho GTPaz ailesinin üyeleridir (39). Grewal ve arkadaşları endometrial stromal hücre kompartmanlarındaki Rho GTPaz aktivitesinin fare embriyosunun stromaya invazyonunun ilerlemesini düzenlemede çok önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (8). Aynı araştırmacılar Rho GTPazlar ve bunların downstream sinyal yollarının endometrial stromanın, stromal hücre göçünü

düzenleyerek remodelenmesini değiştirdiğini de ileri sürmüşlerdir (8). Bu olay kısmen Rho GTPazların fokal adezyon dinamikleri üzerine etkileri ile gerçekleştirilebilir.

İnsan endometriumu proliferasyon ve sekresyon evrelerinde önemli değişiklikler gösterir. Bu süreç çok iyi mekanizmalarla kontrol edilir, endometriumu bu fazlardan geçirip dokuyu implantasyona hazırlar (27, 33). RhoA proteini erken proliferatif ve midsekretuar evrede glandular epitelyumda önemli ölçüde azken desiduadaki stromal hücrelerde önemli miktarda RhoA gösterilmiştir (39, 52). Rat-2 fibroblastlarda RhoA'nın sitoplazmanın her tarafında floküler tarzda floresan boyandığı; hücre zarında da az miktarda bulunduğu gösterilmiştir (46).

Rho/Rhokinaz yolağı, damar düz kas kasılmasını sağlamakla birlikte fasudil adlı rhokinaz inhibitörü inflamatuvar aterosklerotik lezyonların gelişmesini önlemektedir. Spontan hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada bu hayvanlarda agonistle indüklenen Rho-aracılı  $Ca^{+2}$  duyarlılığın arttığı saptanmıştır (58, 63). Kalp nakli sonrası gelişen vaskülopatinin önlenmesinde fasudil tedavisinin uzun süreli kullanımının rol oynadığı bildirilmiştir (61, 62). Diğer bir çalışmada ise ROCK-2 enziminin sıçan superior mezenterik arterinde eksprese edildiği ve damar yatağı perfüzyon basıncının kontrolüne katkı sağladığı gösterilmiştir (63, 71). Rhokinaz inhibitörlerinden Y-27632'in aritmilere karşı miyokardi koruduğu ve hidroksifasudil'in köpek efor anjinasındaki myokardiyal iskemiye önlediği saptanmıştır. Rho/Rhokinaz yolağının hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, aritmi, diyabetik komplikasyonlar ve hipertrofik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir terapötik hedefdir. Gelecekte bu yolağı inhibe eden ilaçların tedavide yer alması yüksek bir olasılık olarak görünmektedir (59-78).

Rhokinaz'ın kobay ileumunda, agonistle indüklenen artmış myozin fosforilasyon düzeylerine düz kas kasılmasına aracılık ettiği görülmüştür (63-73). Başka bir çalışmada ise rhokinaz enziminin gastrik fundus düz kasında agonist, nöronal ve depolarizasyonla oluşturulan kasılmaların tümüne katıldığı ve kolinerjik sinirlerden nörotransmitter, asetilkolin salınmasında etkili olduğu saptanmıştır. Hava yolu düz kas tonusunun düzenlenmesinde Rho-aracılı sinyalin  $Ca^{+2}$  duyarlaşması yoluyla işlev görmektedir. Rhokinaz yolağının hava yolu duyarlılık artışı durumlarında hayvan modellerinde etken olduğunu göstermiştir (63, 77). Bununla birlikte rhokinaz inhibitörü olan Y-27632 inhalasyonu, asetilkolin ve ovalbumin ile

indüklenen solunum yolunda rezistans artışını engellemiştir. Ayrıca pulmoner hipertansiyonda etkili olan rhokinaz inhibitörlerinin selektif vazodilatasyonda da etkili olduğu görülmüştür (59-66). Rhokinazın, serebral damar yatağında vasküler direnç ve kan akımının kontrolüne etkisi de saptanmıştır (59-66). Rhokinaz aktivitesinin deneysel köpek subaraknoid kanama modelinde arttığını gösteren bir çalışmada Y-27632'nin arteriyel düz kas hiperkontraksiyonunu önlediği de saptanmıştır (59-66, 79).

İyicil prostat hiperplazisinin günümüzdeki tedavisi prostat hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmek veya tonusunu azaltmaktır. Prostatik düz kas hücrelerinde Rho-kinaz inhibitörlerinin antiproliferatif ve gevşetici etkisinin olduğu gösterilerek iyicil prostat hiperplazisi tedavisinde Rho-kinaz inhibitörlerinin kullanılabilmesi öne sürülmüştür (78, 79).

Aköz ve vitroz humordan kaynaklanan büyüme faktör ve hormonlar lens epitelium hücrelerinin büyüme ve gelişmesini düzenler. Büyüme faktörleri lens hücrelerinde aktin hücre iskelet yapısı üzerinde etkilidir. Büyüme faktörlerinin Rho-GTPaz aktivitesini uyardığı gösterilmiştir. Rho/Rho-kinaz yolağının, büyüme faktörlerinin oluşturduğu hücre iskeleti reorganizasyonunda önemli downstream efektör olduğu ortaya konmuştur (80)

Meme kanserinde ROCK1 ve ROCK2 genlerinin etkilerinin araştırıldığı ve ROCK 1 geninin etkisinin çalışıldığı bir çalışmada, ROCK 2 geni Thr431Asn polimorfizminin etkili olabileceği görülmüştür (81).

İnsan gebe myometriyumunda, ROCK 1 ve ROCK 2 izoformlarının arttığı gösterilmiştir. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oksitosinle oluşan kontraktıl aktiviteyi doza bağımlı olarak azalttığı ortaya konmuştur. Rho-kinaz inhibitörlerinin erken doğum tehditinde yeni tokolitik ajan olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (69).

Ark ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, normal ve preeklampitik insan plasentalarında ROCK 2 ekspresyonları incelenmiş. Çalışma sonucunda ROCK 2 enziminin preeklampitik plasentalarda arttığı ve aktif ROCK 2 enziminin ölçülebilir düzeyde olduğu gösterilmiştir (82). Çalışmamızda da gebeliğin 9. gününde labirent desiduaada yoğun eksprese olan Rho 11. günde artış göstererek hem labirent desidua hem de maternal desidua bulunması, RhoA'nın preeklampisi ve bununla birlikte apoptozda etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Rhokinaz inhibitörlerinden Y-27632'nin gebelik sürecinde erken doğuma neden olduğu öne sürülen bir

araştırmaya bakılarak, inhibitörü ile antagonist halde çalışan ve bulunan RhoA'nın erken doğumu engelleyebileceği öne sürülebilir(69).

RhoGTPazların epitelyal tübül formasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada epitel hücrelerinin hücresel bağlantı yerlerinin ve fonksiyonlarının kontrolünün Rho/Rhokinaz yolağı kontrolü ile gerçekleştiği vurgulanmıştır(60). Çalışmamızda preimplantasyon dönemi boyunca RhoA'nın bez epiteli, luminal epitel ve endotelde yoğun ekspresyon göstermesi, RhoA'nın epitelyal tübül oluşumunda önemli roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Preimplantasyon süresi boyunca endotelde yoğun halde eksprese olan RhoA'nın, integrinlerle işbirliği ile çalışarak anjiogenez başta olmak üzere anti-anjiogenez ve tümör oluşumunda belirleyici rol oynadığını düşünmek olasıdır.

İnsan endometriyumunda ve desiduasında RhoA'nın sürekli bulunduğunu kanıtlanmıştır (8). Farelerle yaptığımız çalışma sonucunda da preimplantasyon döneminde lümen epiteli ve bez epitelinin RhoA ile kuvvetli eksprese olduğu, gebeliğin 5. ve 7. günlerinde de lümen epitelinde, 9. günde labirent desiduada ve 11.günde de spongiyoz desiduada daha kuvvetli olmak üzere desiduanın bütününde ve embriyoda RhoA'nın eksprese olduğu görülmüştür.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

### Sonuçlar;

- ✓ RhoA'nın, pre ve postimplantasyon sürecinde fare endometriumunda ekspresyon gösterdiği, dolayısıyla
- ✓ Başarılı bir implantasyonun gerçekleştirilebilmesinde etkin rol oynadığı,
- ✓ RhoA sinyal yolağının tek başına ve/veya başka sinyal yollarıyla birlikte önemli roller üstlendiği,
- ✓ RhoA'nın hücre çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi olaylardaki etkileri bilinerek desidualizasyon basamağından başlayarak embriyo gelişimi de dahil pek çok olayda önemli oldukları,

sonuçlarına ulaşılmıştır.

### Öneriler;

- ✓ RhoA'nın ve Rho ailesi üyelerinin üreme biyolojisinde, infertilite ve düşükle sonuçlanan gebeliklerin tedavisinde önemli rolleri olduğu düşünülerek bu alanlarda daha fazla araştırma yapılmalıdır.
- ✓ Kanser tanı ve tedavisinde Rho ailesi ve RhoA'nın etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılıp tedavi uygulamalarına yönelik çalışmalara ağırlık verilmelidir.
- ✓ Hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, aritmi, diyabetik komplikasyonlar ve hipertrofik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için Rho/Rhokinaz yolağının etkisi daha iyi anlaşılabilir ve gelecekte tedavi hizmetlerinde kullanılmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Gündogdu MS, Liu H, Metzdorf D, Hildebrand D, Aigner M, Aktories K, Heeg1 K, Kubatzky KF. (2010). The haematopoietic GTPase RhoH modulates IL3 signalling through regulation of STAT activity and IL3 receptor expression, *Molecular Cancer*, 9:225. <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/225>
2. Merajver DS, Usmani SZ. (2005). Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(4), 291-298.
3. Fessler MB, Arndt PG, Just I, Nick JA, Malcolm KC, Worthen GS. (2007). A dual role for RhoA in suppression and induction of cytokines in the human neutrophil, *Blood*, Feb 1;109(3):1248-56.
4. Loirand G, Guilluy C, Pacaud P (2006). Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system, *Trends Cardiovasc Med.*, Aug;16(6):199-204.
5. Ridley AJ. (2004). Rho proteins and cancer, *Breast Cancer Research and Treatment*, 84: 13–19.
6. Sato J, Iiri T. (2006). Rho and Rho-kinase, *Nippon Rinsho.*, Jul;64 Suppl 5:197-202.
7. Manser E. (2005). Rho famil GTPases. *Proteins and cell regulation*, Chapter: The Rho GTPase critical regulators in cell biology. Volume 3, 1-18.
8. Grewal S, Carver J, Ridley AJ, Mardon HJ. (2010). Human endometrial stromal cell Rho GTPases have opposing roles in regulating focal adhesion turnover and embryo invasion *in vitro*, *Biol Reprod*, 83(1): 75–82.

9. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase, *Science*, Aug 6;285(5429):895-8.
10. Kaloğlu C. Gürsoy E. (1997). İmplantasyon, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 19 (3):233-241.
11. Kaloğlu C, Onarlıoğlu B. (2000). Sıçan implantasyonunda decidüalizasyon ve ekstrasellüler matriks değişiklikleri, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
12. Kaloğlu C, Gürsoy E, Onarlıoğlu B. (2003). Early maternal changes contributing to the formation of the chorioallantoic and yolk sac placentas in rat: a morphological study, *Anat Histol Embryol*, 32, 200–206.
13. Moore KL, Persaud TVN. (2007). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, With The Collaboration of Mark G. Torchia. 8th ed., Saunders- Elsevier; Elsevier Science Health Science, Saint Louis, Page Count: 522.
14. Sadler TW. (2008). *Langman's Medical Embryology*, 10 th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown, Page Count: 371.
15. Kierszenbaum AL. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*. Çeviri Editörü Ramazan Demir, Sayfa:585- 606, Palme Yayıncılık.
16. Junqueira LC, Carneiro J. (2003). *Temel Histoloji* (Çeviri Editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S) Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN: 975-420-467-5.
17. Ovalle WK, Nahirney PC. (2009). *Netter Temel Histoloji*, Güneş Tıp Kitabevleri.
18. Dilsiz Ö. (2008). Deneysel sıçan endometriyozis modelinde implantasyon kusurunun histolojik olarak değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Ege

Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 361 s.

19. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development, *Dev. Cell*, Jan;6(1):117 – 31.
20. Wang H, Dey SK. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models, *Nature Reviews Genetics*, 7: 185-199.
21. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. (2000). Embryo implantation, *Dev Biol.*, 15;223(2):217-37.
22. Theiler K. (1989). *The House Mouse Atlas of Embryonic Development*, Springer-Verlag New York Inc., 178.
23. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. (2004). Molecular cues to implantation, *Endocrine Reviews*, 25 (3): 341 -373.
24. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface, *J Clin Invest.*, 114(6):744-54.
25. Gökçimen A, Temel S. (2004). İmplantasyon ve moleküler etkileşimler, *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 11 (4):25 -33.
26. van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ. (2009). Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment, *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 85, 4 - 1.
27. Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, Dey SK. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site

- of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation, *Development*, 120(5):1071 - 83.
28. Dey SK. (2002). Role of Cox 2 in implantation, British Endocrine Societies Joint Meeting, Endocrine Abstracts 3 S9.
  29. Wang J, Armant DR. (2002). Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation, *Cells Tissues Organs*, 172(3):190 - 201.
  30. Damsky HC, Librach C, Lim KH, Filzgerald LM, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion, *Development*, 1994;120, 3657 - 3666.
  31. Tabibzadeh S, Babaknia A. (1995). The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion, *Mol. Hum. Reprod.*, 1 (4): 179-202. doi: 10.1093/molehr/1.4.179.
  32. Parr EL, Parr MB. (1989). Epithelial cell death during rodent embryo implantation. In Yoshinaga, K. (ed.), *Blastocyst Implantation*, Sero Symposia, USA, Adams Publishing Group, Boston, MA, pp. 105–115.
  33. Staun-Ram E, Shalev E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process, *Reprod Biol Endocrinol.*, Oct., 20; 3:56.
  34. Dunk C, Petkovic L, Baczyk D, Rossant J, Winterhager E, Lye S. (2003). A novel *in vitro* model of trophoblast-mediated decidual blood vessel remodelling, *Lab Invest.*, 83(12):1821-8.
  35. Abrahamson PA, Zorn TMT. (1993). Implantation and decidualization in rodents, *J Exp Zool.*, 266: 603-628.

36. Guillomot M, Flechon JE, Leroy F. (1993). Blastocyst development and implantation, *Reproduction in Mammals and Man*, Edited by M.C. Levsseur, RHF Hunter, Ellipses, Paris, 386 - 410.
37. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der JC. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 10:842 - 857, doi:10.1038/nrc2960.
38. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. (2007). Evolution of the Rho Family of Ras-like GTPases in Eukaryotes, *Mol Biol Evol.*, 24(1):203–216. doi:10.1093/molbev/msl145.
39. Iden S, Collard JG. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 846 -859, doi:10.1038/nrm2521.
40. Luo L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis, *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 173 - 180 doi:10.1038/35044547.
41. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton, *Mol. Cell. Biol.*, 16 (10): 5313–27.
42. <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=396>  
(01.07.2012 tarihli gün)
43. Maduale P, Axel R. (1985). A novel *ras*-related gene family, *Cell*, 41:31–40.
44. Nakamura Y, Kaneto H, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Node K, Hori M, Yamasaki Y. (2006). Marked increase of insulin gene transcription by suppression of the Rho/Rho-kinase pathway, *Biochem Biophys Res Commun*,10;350(1):68-73.

45. Blumenstein L, Ahmadian MR. (2004). Models of the cooperative mechanism for Rho effector recognition. Implications for RhoA-mediated effector activation, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(51):53419-53426.
46. Ehrenreiter K, Daniela P, Velamoor V, Sobczak I, Small V, Takeda J. (2005). Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration, *The journal of Cell Biology*, 168(6):955-964.
47. Chrissobolis S, Budzyn K, Marley PD, Sobey, CG. (2004). Evidence that estrogen suppresses Rho-kinase function in the cerebral circulation *in vivo*, *Stroke*, 35:2200-2205.
48. Chen X, Tan I, Han C, Hall C, Lim L. (2002). Characterization of RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  implication of the pleckstrin homology domain in ROK $\alpha$  function using region-specific antibodies, *The Journal of Biological Chemistry*, 277(15):12680-12688.
49. Mueller BK, Mack H, Teusch N. (2005). Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 387-398 doi:10.1038/nrd1719.
50. Adamson P, Paterson HF, Hall A. (1992). Intracellular localization of the P21 rho proteins, *J Cell Biol.*, 119:617–627.
51. Vega FM, Ridley AJ. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology, *FEBS Lett.*, 582:2093-2101.
52. Wheeler AP, Ridley AJ. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility, *Exp. Cell Res.*, 301:43-49.
53. Haesman SJ, Ridley AJ. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vitro* studies, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9:690-701.

54. Simpson KJ, Dugan AS, Mercurio AM. (2004). Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma, *Cancer Res.*, 64:8694-8701
55. Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oettgen P, Mercurio AM. (2006). Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma, *Oncogene*, 25:6959–6967. doi:10.1038/sj.onc.1209682
56. Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ. (2011). RhoA and Rho C have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets, *J. Cell Biol.*, Vol. 193 No. 4 655–665.
57. Brûle F, Berndta S, Simona N, Coulona C, Goaranta J, Munauta C, Noëla A, Frankennea F, Foidart JM. (2005). Immunology of gametes and embryo implantation, *Chem Immunol Allergy*, Basel, Karger, vol 88, pp 163–180.
58. Loirand G, Guérin P, Pacaud P, (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology, *American Heart Association*, doi: 10.1161/01.RES.0000201960.04223.3c
59. Olson MF. (2008). Applications for ROCK kinase inhibition, *Current Opinion in Cell Biology*, 20: 242-248.
60. Eisen R, Walid S, Ratcliffe DR, Ojakian GK. (2005). Regulation of epithelial tubule formation by Rho family GTPases, *Am J Physiol Cell Physiol*, 290: 1297-1309, 2006. doi: 10.1152/ajpcell.002870.
61. Mohri M, Shimokawa H, Hirakawa Y, Masumoto A, Takeshita A. (2003). Rho- kinase inhibition with intracoronary fasudil prevents myocardial ischemia in patients with coronary microvascular spasm, *J Am Coll Cardiol*, 41:15-9.



62. Noma K, Oyama N, Liao JK. (2006). Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system, *Am J Physiol Cell Physiol*, 290:661 – 668, 2006. doi: 10.1152/ajpcell.00459.
63. Shimokawa H, Takeshita A. (2005). Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1767-1775. doi:10.1161/01.ATV.0000176193.83629.c8.
64. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. (2002). Suppression of coronary artery spasm by the rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina, *American Heart Association*, 105;1545-1547. doi:10.1161/hc1002.105938.
65. Lee DL, Webb RC, Jin L. (2004). Hypertension. Hypertension and rhoA/rho-kinase signalling in the vasculature, *American Heart Association*, doi:10.1161/01.hyp.0000148303.98066.ab.
66. Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I, Oka M. (2004). Rho/Rho kinase signalling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats, *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4):L665-72.
67. Amerongen GPN, Delft S, Vermeer MA., Collard JG, Hinsbergh VWM. (2000). Activation of rhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of rhokinase and protein tyrosine kinases, *American Heart Association*, 87;335-340.
68. Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura KK. (1998). Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of myosin phosphorylation by rho-associated kinase and myosin phosphatase, *The Journal of Cell Biology*, 141(2), April, 20, 1998 409-418.

69. Tahara M, Morishige K, Sawada K, Yoshihide I, Kawagishi R, Tasaka K, Murata Y. (2002). RhoA/rho-kinase cascade is involved in oxytocin- induced rat uterin contraction, *Endocrinology*, 143(3) 920-929.
70. Dong JM, Leung T, Manser E, Lim L. (1998). cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated rhoA small GTPase and the rho kinase ROK $\alpha$ , *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 22554-22562.
71. Chiatelty K, Webb RC. (2002). Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signalling, *Hypertension*, 39 (2):438-442.
72. Begum N, Sandu OA, Duddy N. (2002). Negative regulation of rho signalling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signalling pathways, *Diabetes*, Vol. 51, July no. 7, 2256-2263.
73. Seasholtz TM, Brown JH. (2004). Molecular interventions, Rho signalling in vascular disease, *Mol Interv*, 4(6): 348-358.
74. Shi J, Wei L. (2007). Rho kinase in the regulation of cell death and survival, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 55, 61-75. doi:10.1007/s00005-007-0009-7.
75. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chilahara K, Nakafuku M. Ito M, Nakano T, Okawa Katsuya, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as putative target for the small GTP binding protein Rho, *The EMBO Journal* vol. 15 no.9 pp.2208-2216.
76. Jin L, Ying Z, Webb RC. (2004). Activation of rho/rho kinase signalling pathway by reactive oxygen species in rat aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287:H1495-H1500.
77. Somlyo AP, Somlyo AV. (2003). Ca<sup>+2</sup> sensivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin

phosphatase, Amerikan Pysiological Society, 83:1325-1358, 101152/physrev.00023.2003

78. Adam R. (2003). Rho-kinase inhibitors: potential therapeutics for benign prostate hyperplasia, J Urol. Dec;170(6 Pt 1):2523-4.
79. Rees RW, Foxwell NA, Ralph DJ, Kell PD, Moncada S, Celtek S. Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, inhibits proliferation and adrenergic contraction of prostatic smooth muscle cells. J Urol. 2003 Dec;170(6 Pt 1):2517-22.
80. Maddala RL, Reddy VN, Rao PV. (2001). Lovastatin-induced cytoskeletal reorganization in lens epithelial cells: role of Rho GTPases. Invest Ophthalmol Vis Sci., Oct;42(11):2610-5.
81. Kalender ME, Demiryürek Ş, Öztuzcu S, Kızılyer A, Demiryürek AT, Balakan O, Camcı C. (2011). ROCK1 geni Lys222Glu ve Arg1262Gln polimorfizmleri ile meme kanseri arasındaki ilişkinin araştırılması, Gaziantep Tıp Dergisi, 17(2):77-8.
82. Ark M, Yılmaz N, Yazıcı G, Kubat H, Aktaş S. (2005). Rho associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas, Placenta, 26, 81-84.

## 8. EKLER- YEREL ETİK KURUL

Ek-1

T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/ 73  
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

07.10.2010

Sayın  
Prof.Dr.Emel KOPTAGEL  
Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07.10.2010 tarihinde Prof.Dr.Ömer POYRAZ başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararı almıştır.

Prof.Dr.Emel KOPTAGEL'in yürütücülüğünü yapmış olduğu 04.10.2010 tarih ve 218 sayılı "Pre ve postimplantasyon dönemlerinde fare endometriumundaki RhoA'nın immünolokalizasyonu" isimli Yüksek Lisans Tezi Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Prof.Dr.Eray BULUT Üye Katılmadı	Doç.Dr.Mustafa GÜRELİK Üye Katılmadı	Doç.Dr.Sinan GÜRSOY Üye Katılmadı
Doç.Dr.Yavuz SİLİĞ Üye	Yrd.Doç.Dr.Erşin TUNCER Üye	Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM Üye
Doç.Dr.İhsan HUBBEZOĞLU Üye	Yrd.Doç.Dr.Bülent SARAC Üye	Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN Üye - Başkanvekili
Ecz.İkram SARAC Sivil Üye Katılmadı	Emrah KÖREKE Sivil Üye	
	Prof.Dr.Ömer POYRAZ Başkan	

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Gökçen ARSLAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 08/08/1981
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	gokcenk.arslan@gmail.com

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Lisesi, 1998
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2005
Yüksek Lisans	Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Alan Öğretmenliği, 2006
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı, 2012

### İş Tecrübesi

2006- 2008	Sivas Koleji Özel Bilgi Lisesi, Biyoloji öğretmeni
Cumhuriyet Üniversitesi	Yüksek Lisans Öğrencisi, 2009

### Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler

Bu çalışma (T-456), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.