



T.C.  
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİĞİN ERKEN DÖNEMLERİNDE SIÇAN UTERUS  
DOKUSUNDA VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME  
FAKTÖRÜ'NÜN (VEGF) EKSPRESYONU**

**Büşra ŞEN YAMAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

VETERİNER HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Hakan ÖNER**

**BURDUR-2018**



T.C.  
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİĞİN ERKEN DÖNEMLERİNDE SIÇAN UTERUS  
DOKUSUNDA VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME  
FAKTÖRÜ'NÜN (VEGF) EKSPRESYONU**

**Büşra ŞEN YAMAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

VETERİNER HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Hakan ÖNER**

Bu tez çalışması Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0281-YL-16 numaralı yüksek lisans projesi ile desteklenmiştir.

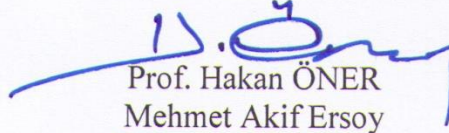
**BURDUR-2018**


## KABUL VE ONAY SAYFASI

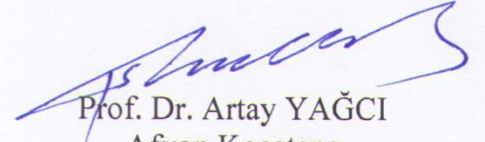
### SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

*Büşra ŞEN YAMAN* tarafından *Prof.Dr. Hakan ÖNER* yönetiminde hazırlanan "*Gebeliğin Erken Dönemlerinde Sıçan Uterus Dokusunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'nün (VEGF) Ekspresyonu*" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/01/2018

  
Prof. Hakan ÖNER  
Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi  
Başkan

  
Prof. Dr. Jale ÖNER  
Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi  
Jüri

  
Prof. Dr. Artay YAĞCI  
Afyon Kocatepe  
Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi  
Jüri

### ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 12/01/2018 Tarih ve 8 Sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU  
Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca tezin her aşamasında yol göstericiliğini esirgemeyen, edindiğı engin bilgi ve tecrübeyi benimle paylaşmaktan çekinmeyen, çok değerli hocam Prof. Dr. Hakan Öner'e sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi borç bilirim. Eğitimim boyunca Histoloji ve Embriyoloji alanında gerek ders aşamasında gerekse laboratuvar çalışmaları esnasında yardım ve görüşlerine başvurduğum değerli hocam Prof. Dr. Jale Öner'e çok teşekkür ederim. Ayrıca deney hayvanları kullanımı sırasında bana yardımcı olan Biyolog Sinem Pekşen ve Hemşire Fatma Eryavuz'a ve her zaman maddi ve manevi olarak arkamda olan değerli eşim Veteriner Hekim İsmail Yaman ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## BEYAN

*“Gebeliğin Erken Dönemlerinde Sıçan Uterus Dokusunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü’nün (VEGF) Ekspresyonu”* başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

12/01/2018

Büşra ŞEN YAMAN

ONAY

Prof. Dr. Hakan ÖNER

Danışman

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇ KAPAK SAYFASI</b>	i
<b>KABUL VE ONAY SAYFASI</b>	ii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>BEYAN</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	ix
<b>ÖZET</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Memelilerde Embriyonal Gelişim	2
2.1.1. Zigotun Yarıklanması	2
2.1.2. Morula	2
2.1.3. Blastosist	3
2.2. İmplantasyon	3
2.2.1. İmplantasyon Türleri	4
2.2.2. İmplantasyonun Oluş Mekanizmaları	5
2.3. Östrus Siklusu ve İmplantasyon Esnasında Endometriyumun Özellikleri	7
2.4. İmplantasyonda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	10
2.4.1 Hücre Adezyon Molekülleri	10
2.4.2. Sitokinler	10
2.4.3. Musinler (MUC)	10
2.4.4. Matriks Metalloproteinazlar	10
2.4.5. Prostaglandinler	11
2.4.6. Siklooksijenazlar (COX)	11

2.4.7. Büyüme Faktörleri	11
2.5. Desidualizasyon	12
2.6. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	13
2.6.1. VEGF'nin Tarihsel Gelişimi	13
2.6.2. VEGF hakkında genel bilgi	14
2.6.3. VEGF Geni-Protein yapısı	15
2.6.4. VEGF'nin biyolojik aktivitesi	15
2.6.5. VEGF isoformları	16
2.6.6. VEGF üyeleri	16
2.6.7. VEGF Reseptörleri	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	21
3.1. İmmunohistokimyasal prosedür	22
<b>4. BULGULAR</b>	25
<b>5. TARTIŞMA</b>	34
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	41
<b>7. KAYNAKLAR</b>	42
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	51



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> İmplantasyonun Aşamaları	7
<b>Şekil 2.2.</b> VEGF-A Gen Yapısı	17
<b>Şekil 2.3.</b> VEGF ve Reseptörleri	20
<b>Şekil 4.1.</b> Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400	27
<b>Şekil 4.2.</b> Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum. X400	27
<b>Şekil 4.3.</b> Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400	28
<b>Şekil 4.4.</b> Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum. X400	28
<b>Şekil 4.5.</b> Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400	29
<b>Şekil 4.6.</b> Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum. X400	29
<b>Şekil 4.7.</b> Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. PDR: Primer desidualizasyon alanı; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400	30
<b>Şekil 4.8.</b> Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400	30
<b>Şekil 4.9.</b> Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. AMZ: Antimezometriyal alan; MZ: Mezometriyal alan; PDR: Primer desidualizasyon alanı; SDR: Sekonder desidualizasyon alanı. X40	31
<b>Şekil 4.10.</b> Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. AMZ: Antimezometriyal alan; MZ: Mezometriyal alan; PDR: Primer desidualizasyon alanı; SDR: Sekonder desidualizasyon alanı. X100	31
<b>Şekil 4.11.</b> Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. MZ: Mezometriyal alan; MYM: Myometriyum; PDR: Primer desidualizasyon alanı SDR: Sekonder Desidualizasyon alanı. X100	32

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> VEGF Ligandları ve Reseptörleri	19
<b>Tablo 3.1.</b> Deney Grupları	21
<b>Tablo 3.2.</b> İmmunohistokimyasal prosedürde kullanılan malzemeler	23
<b>Tablo 3.3.</b> Sitrat Tampon Solüsyonu (500 ml için)	23
<b>Tablo 3.4.</b> Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (1000 ml için)	23
<b>Tablo 3.5.</b> PBS+ %0,2 Tween 20 Solüsyonu (500 ml için)	24
<b>Tablo 3.6.</b> PBS+ %0,1 Tween 20 Solüsyonu (500 ml için)	24
<b>Tablo 4.1.</b> Gebe sıçanların uterus dokusunda VEGF immunreaktivitesinin gebelikte günlere göre semiquantitatif analizi	33

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AMZ:</b>	Antimezometriyal Alan
<b>bFGF:</b>	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>COX:</b>	Siklooksijenazlar
<b>ECM:</b>	Ekstrasellüler Matriks
<b>EGF:</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>FGF:</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>GDF-9:</b>	Büyüme- Farklılaşma Büyüme Faktörü
<b>HB-EGF:</b>	Heparin Bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü
<b>HSPG:</b>	Heparan Sülfat Proteoglikan
<b>IGF:</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>IL-1:</b>	İnterlökin-1
<b>LE:</b>	Lümen Epiteli
<b>LIF:</b>	Lökemi İnhibitör Faktör
<b>MMP:</b>	Matriks Metalloproteinleri
<b>MUC:</b>	Musin
<b>MYM:</b>	Miyometriyum
<b>MZ:</b>	Mezometriyal Alan
<b>PBS:</b>	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyon
<b>PDGF:</b>	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>PDR:</b>	Primer Desidual Reaksiyon Alanı
<b>PGF:</b>	Plasental Büyüme Faktörü
<b>SDR:</b>	Sekonder Desidual Reaksiyon Alanı
<b>SES:</b>	Subepitelyal Stroma
<b>TE:</b>	Trofoektodermi
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Transforming Büyüme Faktörü $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$
<b>VEGF:</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

<b>VEGFR-1:</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-1
<b>VEGFR-2</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
<b>VEGFR-3</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-3
<b>VPF:</b>	Vasküler Geçirgenlik Faktörü



**T.C.**  
**MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Yüksek Lisans Tezi**  
**Gebeliğin Erken Dönemlerinde Sıçan Uterus Dokusunda Vasküler Endotelyal**  
**Büyüme Faktörü'nün(VEGF) Ekspresyonu**  
**Büşra ŞEN YAMAN**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**  
**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Hakan ÖNER**  
**BURDUR-2018**  
**ÖZET**

Anjiyogenez, implantasyon ve desidualizasyon sırasında önemli ayırt edici özelliktir. Fizyolojik koşullar altında mevcut damarlardan yeni kan damarlarının gelişme süreci olarak tanımlanan anjiyogenesis, ilk olarak reproduktif döngü ve gebelik sırasındaki canlıların uterus ve ovaryumlarında ortaya çıkar. Başka bir deyişle vasküler geçirgenlik ve anjiyogenesis, başarılı implantasyon, desidualizasyon ve plasantasyon için önemlidir. Anjiyogenesis, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler aracılığıyla karmaşık bir kontrol sistemi tarafından düzenlenir. En önemli ve en yaygın çalışılan vaskulojenik ve proanjiyogenik faktör, vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). Son çalışmalar, VEGF'nin embriyo implantasyonu ve embriyonik vaskülogenezis ile yakından ilişkili olduğunu göstermekle beraber daha çok farklı türlerde, mRNA ve reseptör düzeyindedir. Bu çalışmada, gebeliğin erken dönemlerindeki sıçan uterus dokusunda VEGF ekspresyonu araştırılmıştır. Çalışmada gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde sıçanlardan immunohistokimyasal analizler için uterus doku alanları toplanmış, VEGF immun lokalizasyonları belirlenmiş, elde edilen sonuçlar semiquantatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, erken gebelik döneminde sıçan uterus dokusunda VEGF immunekspresyonlarının güçlü olduğu ve implantasyon öncesi, implantasyon ve desidualizasyon esnasında önemli rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Erken gebelik, Uterus, VEGF, sıçan

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 0281-YL-16

**T.C.**  
**MEHMET AKİF ERSOY UNIVERSITY**  
**INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE**

**Master of Science Thesis**

**The expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in rat uterine tissue during early pregnancy**

**Büşra ŞEN YAMAN**

**The Department of Internal Medicine**

**Supervisor**

**Prof. Dr. Hakan ÖNER**

**BURDUR-2018**

**ABSTRACT**

Angiogenesis is an important distinguishing feature during implantation and decidualization. Under physiological conditions, angiogenesis, which is defined as the process of development of new blood vessel from existing vessels occurs first in the uterus and ovaries living organisms during reproductive cycle and pregnancy. In other words, vascular permeability and angiogenesis are important for successful implantation, decidualization and placentation. Angiogenesis is regulated by a complex control system via proangiogenic and antiangiogenic factors. The most important and most widely studied vasculogenic and proangiogenic factor is vascular endothelial growth factor (VEGF). Recent studies have shown that VEGF is closely associated with embryo implantation and embryonic vasculogenesis. However early studies are on the mRNA level and receptors of VEGF. In this study, VEGF expression was investigated in rat uterine tissue of early pregnancy. The uterine tissue areas were collected for immunohistochemical analysis from the rat on days 0, 1, 3, 5 and 7 of gestation in the study, VEGF immunolocalizations were determined, results obtained were evaluated semiquantatively. The study concluded that VEGF immunexpression in rat uterine tissue is strong during early pregnancy and may play important role before implantation, implantation and decidualization

**Key words:** Early pregnancy, Uterine, VEGF, Rat

This study, was supported by Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research  
Projects Unit. Project Number: 0281-YL-16

## 1. GİRİŞ

İmplantasyon gelişimsel olarak farklı olan embriyonal ve maternal dokular arasında meydana gelen kaynaşmadır (34). Başarılı bir implantasyon, blastosist ve alıcı endometriyum arasındaki karşılıklı etkileşimlerin sonucu olarak tanımlanır (11). Blastosist uterusu geldikten kısa sonra uterus mukozasına zayıf ya da güçlü bir şekilde bağlanır. Plasentayı meydana getiren bu bağlantıya implantasyon denir (59). Embriyo implantasyonu, plasentasyonu ve fetal gelişim alanı olan memeli uterusu, “endometriyum” denilen özel bir membranla sınırlıdır. Endometriyum, implantasyonun gerçekleştiği katmandır. Gebelik esnasında şekillenen embriyo implantasyonu, ovaryumdaki siklik hormonal değişiklikler ve siklik morfolojik değişiklikler, endometriyal dokunun en önemli özelliğidir. Bu morfolojik değişiklikler, endometriyal hücre çoğalması, farklılaşması, apoptozis ve doku bozulmalarıyla karakterize olan endometriyal yapı değişiklikleridir. Bu değişiklik sırasında endometriyal kan damarları devamlı olarak anjiyogenesis ve neovaskülarizasyonu kapsayan düzenli rejenarasyona maruz kalır (65). Anjiyogenesis, implantasyon ve desidualizasyon sırasında ayırt edilen önemli özelliktir. Fizyolojik koşullar altında mevcut damarlardan yeni kan damarlarının gelişme süreci olarak tanımlanan anjiyogenesis ilk olarak reproduktif döngü ve gebelik sırasındaki canlıların uterus ve ovaryumlarında ortaya çıkar (46). Anjiyogenesis, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler ile karmaşık bir kontrol sistemi tarafından düzenlenir. En önemli ve en yaygın çalışılan vaskulojenik ve proanjiyogenik faktör, vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF) (65). Son çalışmalar VEGF'nin embriyo implantasyonu ve embriyonik vaskülogenezis ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (86). VEGF ve VEGF geninin diğer üyeleri ve reseptörleri birçok makaleye konu olmuştur (27). Ancak yapılan çalışmaların çoğunluğu mRNA yada reseptör düzeyinde ve östrus siklus sürecindedir. Erken gebelik sırasında uterus dokusundaki immunekspresyonuna ilişkin çok az sayıda çalışma olmasından yola çıkılarak bu tez çalışması ile erken gebelikte sıçan uterus dokusunda VEGF ekspresyonu immunohistokimyasal teknik ile belirlenerek preimplantasyon, implantasyon ve desidualizasyon sürecindeki rolü hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Memelilerde Embriyonal Gelişim**

Olgun dişi ve erkek cinsiyet hücrelerinin biraraya gelmeleri sonucu oluşan hücreye “zigot” denir. Organizmadaki hücreler diploid kromozom sayısına sahip olup haploid kromozom sayısındaki gametlerin döllenmesi sonucu oluşur. Gametler diploid bir zigot oluşturmak üzere birleşirler (59).

#### **2.1.1. Zigotun Yarıklanması**

Döllenmiş bir yumurta hücresi 80-100 µm çapıyla en büyük memeli hücrelerinden biridir ve çekirdek büyüklüğü ile karşılaştırıldığında sitoplazma miktarı fazladır. Zigot yapısal gelişimini tamamlamak için bölünmek zorundadır (49). Her yarıklanma sonucu meydana gelen bu kardeş hücrelere “blastomer” adı verilir (52). Blastomerler, zigotun uterus tüpleri içerisindeki yolculuğu sırasında “yarıklanma” olarak bilinen bölünmelerine devam eder ve sayılarını arttırmaya (39, 40, 51). Yarıklanma, zigot oviduktta uterusu doğru ilerlerken gerçekleşir. Art arda bölünmeler birbirini takip eder ve gittikçe küçülen blastomerler oluşur (52). İlk yarıklanma sonucunda iki blastomerli embriyo meydana gelir (4). Bu bölünmede bölünme düzlemi, ovumun tepedeki animal kutbuyla aşağıdaki vejetatif kutupları arasındaki geçen vertikal düzleminden geçer (49). İkinci yarıklanma birinci yarıklanmaya dik olarak gerçekleşir. Bu bölünme sonucunda 4 blastomerli embriyo oluşur (59). Üçüncü yarıklanma ise ekvatoryal düzlemde gerçekleşir. Bölünmenin geçtiği düzleme bağlı olarak, bu bölünmeyle 4’ü animal yarım kürede, 4’ü de vejetal yarım kürede yerleşmiş olan 8 blastomer şekillenir (49). Dördüncü yarıklanma öncesi, sekiz hücreli embriyo, sınırları belirli blastomer yapısından, sınırları belirli olmayan top benzeri hücreler meydana getirmek üzere “kompaksiyon” adı verilen bir birleşme süreci geçirir (48).

#### **2.1.2. Morula**

Dördüncü yarıklanma ile birlikte bir kısmı embriyo yüzeyinde, bir kısmı ise embriyonun etrafındaki komşu blastomerlerle çevrilmiş şekilde yerleşim gösteren 16-32 blastomerli bir yapı meydana gelir (63). Blastomer sayısının çoğalması ve dut benzeri görünüm kazanması ile morula dönemi başlar (37). Morulanın iç kısmında



bulunan internal blastomerler iç hücre kitlesini, dışta bulunan eksternal blastomerler ise dış hücre kitlesini yani trofoektodermi (TE) meydana getirirler (63).

### **2.1.3. Blastosist**

Morulanın uterusu girmesinden kısa bir süre sonra, morulanın merkezi blastomerleri arasında boşluklar gözlenmeye başlar (40). Bu başlangıçtaki boşluklar, ekzositoz yoluyla dış blastomerlerden salgılanan hücre içi veziküllerden ya da vakuollerden meydana gelir (45). Uterus ortamındaki sıvı zona pellusidayı geçerek bu boşlukları doldurur ve blastomerleri birbirinden ayırır. Başlangıçta küçük olan blastosöl şekillenir. Meydana gelen bu yapı "blastosist"tir. Türlerine göre farklılık göstermese de blastosist içinde bir blastosöl ile iç hücre kitlesi ve bunları dışardan çevreleyen trofoblast hücrelerinden oluşan trofoektoderm tabakalarından oluşmuştur. İç hücre kitlesi blastosist boşluğuna çıkıntı yaparken, trofoektoderm de blastosist duvarını oluşturur (40).

### **2.2. İmplantasyon**

Ovumun döllenmesi ile başlayan ve meydana gelen blastosistin endometriyuma gömülmesi ile devam eden bir dizi olayı tanımlar. Bu süreç esnasında, blastosist endometriyum yüzey epiteli ile ilişki kurarak epitele yapışır ve yavaş yavaş stromaya gömülür. Plasentanın oluşması ile implantasyon süreci tamamlanır. Farklı maternal ve embriyonel düzenleyiciler tarafından kontrol edilen embriyonel elemanların yüzey epiteline yapışması, embriyonun uterus duvarına gömülmesi ve endometriyumda desidual reaksiyonun gözlenmesi birçok memelide yaygın ortak özelliklerdir (40). Embriyo maternal organizmanın farklı alanlarına ve yüzeylerine yapışabilir. Fakat endometriyum çok seçicidir ve sadece kısa bir süre için embriyo implantasyonuna izin verir. Bu süre implantasyon penceresi olarak adlandırılır (70). İmplantasyon penceresi; implantasyon için endometriyumun embriyoyu maksimum derecede kabul ettiği dönemi gösterir. Embriyodan gelen sinyallere cevap olarak, gebelik spesifik proteinleri maternal serumundan serbest bırakılır ve uterus ortamında bir dizi morfolojik, biyokimyasal ve immunolojik değişiklikler meydana gelir. Bu sistematik ve lokal değişiklikler gebeliğin anne tarafından tanınması olarak kabul edilebilir (21). Sıçanlarda ve farelerde implantasyon penceresi gebeliğin 4 ve 5. günleri arasında, yaklaşık olarak 24 saat

süren bir periyottur. Bu faz boyunca endometriyum apozisyonu bağlanmayı ve embriyo invazyonunu kolaylaştıran, östrojen ve progesteron tarafından indüklenen morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere maruz kalır. Bu olguda rol oynayan temel molekül hakkında yeterli bilgi olmamakla birlikte büyüme faktörlerinin ekspresyonu ve lümen epitel hücrelerinin glikokaliksleri içinde değişiklikler olduğu bildirilmektedir (70).

Kemiricilerde implantasyon, zona pellusidanın blastosistten ayrılması (gebeliğin 3.5-4.5. günleri), uterusun lümen epiteli ve embriyonun trofoektodermi arasında yapışma bağlanma reaksiyonu (gebeliğin 4.5-5.5 günleri), desidualizasyon ve blastosist apozisyonu alanında apoptozis, trofoblast hücrelerinin altta yer alan bazal membrana doğru penetrasyonu (gebeliğin 6-7.günleri) ve trofoblast hücrelerinin stroma boyunca invazyonu (gebeliğin 7. günü) olaylarını kapsayan bir süreçtir (87).

### 2.2.1. İmplantasyon Türleri

İmplantasyon maternal ve fetal yarımaların bağlantı türüne göre üç farklı tipe ayrılır.

**Sentral (süperfisial) tip implantasyon:** Uterus mukozasına gömülme yoktur, embriyo uterus boşluğunda merkezdedir. Tek tırnaklılarda, ruminantlarda, karnivorlarda, domuzda ve bazı tür maymunlarda görülür.

**Ekzentrik tip implantasyon:** Embriyo büyük bir kısmı ile uterus mukozasına gömülmüş durumdadır.

**İnterstisyel tip implantasyon:** Embriyo uterus mukozasına tamamen gömülür. Bu olaya nidasyon denir. İnsan, karnivor, kemirici ve bazı tür maymunlarda görülür (59).

Ekzentrik ya da intersitisyel implantasyonda blastosist, mezometriyumun bulunduğu taraftaki endometriyum bölgesine tutunursa mezometriyal, mezometriyumun karşı tarafındaki bölgeye implante olursa antimezometriyal implantasyon tanımlaması yapılır (49). Kemiricilerde embriyo implantasyonu her zaman desidualizasyonun antimezometriyal kutbunda olur (87).

### 2.2.2. İmplantasyonun Oluş Mekanizmaları

İmplantasyon sırasında, blastosist trofoblastları ile uterus epiteli arasında, başka bir deyişle embriyo taslağı ile maternal doku arasında ileri derecede fizyolojik ve biyokimyasal etkileşmeler, yapısal farklılaşmalar meydana gelir. Karşılıklı etkileşme hücrel, hormonal ve tanımı yapılamayan diğer faktörler düzeyinde olur. Bu süreç içine giren implantasyon olayı türden türe de değişmektedir

İmplantasyon çeşitliliği birçok sebebe dayanmaktadır. Bu sebepler şu şekilde açıklanabilir.

- 1-İmplantasyon başlangıç zamanı
- 2-Uterus ve blastosistin hacmi, şekli ve yapısı
- 3-Embriyo ve anneye ait hormonal dengeler

Blastosist trofoblastı ile uterus epitelinin apikal sitoplazması arasında hücrel bir ilişkinin kurulması ile fiziksel etkileşme başlamış olur. Bu başlangıcın gerçekleşmesinde, esas faktör olarak blastosist örtülerinin yapı düzeni, biyokimyasal içerikleri, birbirleri ve çevre ile etkileşmelerinin önemi büyüktür. İmplantasyon tek aşamada gerçekleşen bir olgu değildir, belli başlı aşamaları vardır. Karşılaştırmalı ve deneysel embriyolojide implantasyon süreci şu aşamalarda incelenebilmektedir (18).

#### ***Apozisyon***

Apozisyon fazında, blastosist hareketsiz haldedir. Bu dönemde iki implantif doku temas sürecine girerler. Trofoblast ve uterus epitel hücre membranları arasında yaklaşma olur ve temas alanlarında, her iki implantif dokunun hücre apikal sitoplazmalarında bazı değişiklikler gözlenir. İki epitel yüzeyi arasında yalancı ayak benzeri sitoplazmik çıkıntılar sayesinde intersellüler boşluklar oluşur. Kemiricilerde bu tip yapılar yaygın olarak belirlenebilir. Trofoblastta fagositik aktivite, endometriyal epitelde ise mikrovillus düzleşmesi ve glikokaliks kaybı gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkar (18).

### ***Adezyon***

Blastosist örtülerinin erimesinin ardından başlar ve embriyo-maternal ilişkisi gerçekleşir. Trofoblast ile uterus epiteli arasında düğüm şeklinde sitoplazmik köprüler kurulur. İmplantif dokular arasında kenetlenmeler oluşmaya başlar. Trofoblast ve uterus epitel yüzeylerinde dejeneratif düzeyde ileri bir morfolojik değişim olmaksızın blastosist uterus yüzeyine tutunur. Belirgin bir tutunma ancak epithelio-koriyal plesantasyon gösteren memelilerde gerçekleşir (18).

### ***Penetrasyon veya İnvazyon***

Memeli türüne göre değişiklik gösterebilir. Hormonal, mekanik ve genetik faktörler ve desidual bariyer hazırlıkları trofoblasta karşı direncin yok olmasını sağlar. İmplantasyonun gerçekleşme aşamasında trofoblastın endometriyuma gömülmesi 3 tipte olur (18).

### ***Yer değiştirerek penetrasyon***

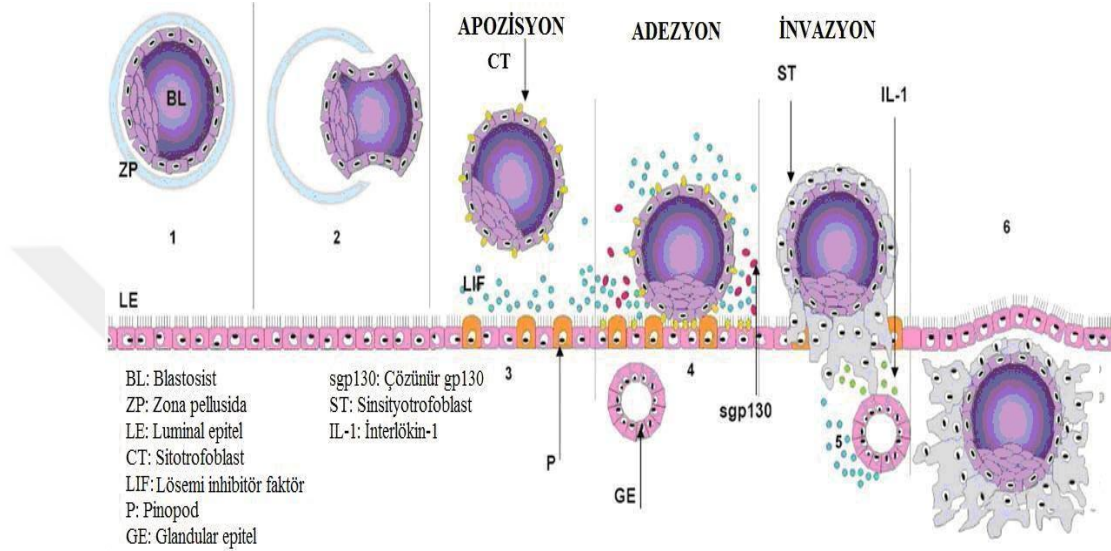
Trofoblast'ın uterus epitelini ortadan kaldırarak onun yerine geçtiği penetrasyon tipidir (67). Tipik olarak kemiricilerde gözlenir. Bu aşamadan sonra bu hücreler dejenere olur ve bazal laminadan ayrılır. Sonuçta bazal laminanın penetrasyonu desidual hücreler aracılığıyla başlatılır (18).

### ***Kaynaşarak penetrasyon***

Kaynaşarak penetrasyon, invaziv dokunun hedef noktası, sinsityum aracılığıyla uterus duvarına kaynaşmasıdır. İmplantate olan trofoblastın apikal plazma membranı, uterus epitel hücrelerinin apikal membranlarıyla temas ederek mikst bir sinsityum oluşturur. Böylece sinsityum hem maternal hem de trofoblast hücrelerden köken alır. Daha sonra sinsityum, bazal lamina ve endometriyal bağ dokusuna aktif olarak penetre olur. Buna bağlı olarak da maternal kan damarlarını yavaş yavaş eritir. Bu tip implantasyon tavşanda görülmüştür. İnsanda da gerçekleşen implantasyon tipi bu tip olabilir (18).

## Zorla Penetrasyon

Uterus epitel hücreleri ve sinsityum uzantıları bağlantılar yaparak hücreler arası aralıklara girer ve epitel hücre aralıklarından oluşan bu yarıkları doldurur. Aynı zamanda trofoblast ve uterus epiteli arasında da yeni bağlantı kompleksleri oluşur (18).



**Şekil 2.1.** İmplantasyonun aşamaları **1)** Zona pellusida ile çevrelenmiş blastosist. **2)** Zona pellusidanın ayrılması **3)** Apozisyon aşaması. Pinomodlar blastosistler için tutunma yüzeyi oluşturur. Endometriyumda LIF ekspresyonu, sitotrofoblast hücrelerinin yüzeyinde LIF reseptörleri yer alır. **4)** Adezyon evresi ve LIF reseptörlerinin miktarlarında artış izlenmektedir. **5)** Blastosist tarafından eksprese edilen IL-1, glandular epitelin LIF ekspresyonunu uyarır. **6)** İmplantasyonun tamamlanmasının ardından implantasyon penceresi kapanır (31).

### **2.3. Östrus Siklusu ve İmplantasyon Esnasında Endometriyumun Özellikleri**

İmplantasyon ve embriyonun gelişiminin gerçekleştiği uterus korpus, kornu ve serviks kısımlarından oluşur. Morfolojisi hayvan türlerine göre değişiklik gösteren uterus, kemirgenlerde gövde, iki kornu ve tek serviksten oluşan bir yapıdadır (59). İnsanlarda ise uterus armut şeklinde, kalın duvarlı, kaslı bir yapıya sahip olup, gövde ve serviksten ibarettir (59). Uterus duvarı, içten dışa doğru endometriyum, myometriyum ve perimetriyum katmanlarından meydana gelir. Endometriyum, biyokimyasal faktörlerin çoğunun üretildiği ve damarsal yapı olarak değişen derecelerde kanlanan karmaşık bir dokudur (11). Lamina epitelyalis tek katlı prizmatik epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Buradan köken alan bezler lamina

propriya ve submukozaya kadar uzanır. Lamina propriya ve submukoza gevşek bağ dokudan oluşmaktadır. Myometriyum, içte sirküler dışta longitudinal seyirli düz kas katmanıdır. Perimetriyum ise, peritonun visseral yaprağından oluşmuş ve bazal membran üzerinde oturmuş mezotel hücrelerinden ibarettir (59).

Sıçanlarda diöstrus başlangıcında uterus küçük ve inaktiftir. Kornular vaskülarizasyon açısından yetersiz ve genellikle yarık şeklinde lümene sahiptir. Zaman zaman kübik ve silindirik şekilli olan epitel hücreleri dejenerasyon göstererek düzleşir. Başlangıçta mitoz çok azdır ve bezler inaktif durumdadır. Bu fazın ilerlemesi ile beraber bezler aktifleşmeye başlar. Aynı zamanda fazın sonuna doğru endometriyum epiteline bitişik olan stromada hafif bir ödem görülebilir.

Proöstrus aşamasında, uterusun endometriyum katmanı epitel hücreleri kübik ve silindirik epitel hücrelerine dönüşmeye başlar. Endometriyumda vasküarizasyon belirgindir ve stromada proöstrusun sonuna doğru lümenin önemli bir şekilde genişlemesiyle beraber bir miktar ödem görülebilir.

Östrus aşamasında endometriyum epitelindeki değişiklikler östrusun başladığını ifade eder. Önce bezlerdeki dejenerasyon alanları ortaya çıkar. Bunu epitelin incilmesi takip eder. Buna mitotik aktivitenin kaybolması ve lökosit infiltrasyonu eşlik eder. Lümen dilatasyonu her zaman geçerli olmamakla beraber östrusun geç safhasına kadar devam edebilir. Östrusun sona ermesiyle endometriyumun mitotik aktivitesi eski halini alır.

Metöstrus aşaması sırasında uterus endometriyum epitelinde devam eden vakuolar dejenerasyon görülür. Fakat aynı zamanda mitotik aktivitede belirgin bir geri dönüş vardır. Değişken lökosit infiltrasyonu vardır (79).

Endometriyum, biyokimyasal faktörlerin büyük kısmınının üretildiği ve değişen derecelerde kanlanan karmaşık bir dokudur (11).

Uterus siklusu esnasında endometriyumda bir dizi değişimler olur. Epitel altındaki lamina propriya, desidua olarak bilinen yapısal bir dönüşümle en ileri özellikleri gösterir. Fakat bu süreçte uterus epiteli tüm özelliklerini korur. Desidua, uterus siklusunun sekresyon fazındaki ileri gelişme ve değişmelerin bir bütün olarak ifadesidir. İmplantasyon esnasında yüzey epiteli, tüm silyalı özelliğini kaybederken bir yandan küt sitoplazmik köprüler halinde gözlenen tümsekçikler aracılığıyla

blastosist arasında bir iletişim kurar. Epitel hücrelerinin ince yapı düzeyinde oluşturdukları farklılıklar, döllenme anı ile implantasyon anı arasında geçen yaklaşık 6-7 günlük sürenin değişik zaman dilimlerindeki durumuna göre farklılıklar gösterir. Gebeliğin olmadığı durumlarda uterus epitelinin yüzeyindeki mikrovillusları, sitoplazmik elemanları ve komşu hücrelerle olan ilişkisi normal konumdadır, oysa preimplantasyon aşamasında uterus epitel yüzeyinde meydana gelen sitoplazmik çıkıntılar ve köprüler gebeliğin farkını ortaya koymaktadır

Gebeliğin devam ettiği durumlarda, endometriyum bezlerinde birtakım değişimler olur ve çok farklı yapı özellikleri gösterir. Bol miktarda yoğun glikojen partikülleri ve granüllerin artması, homojen salgı ve yoğun damlacıkların lümende birikimi, blastosistin implantasyon öncesi beslenmesini sağlayan “**uterus sütü**” özelliğini gösterir

Gebeliğin ilk haftalarında endometriyumda blastosist implantasyonuna karşı immunolojik bir bariyer oluşur. Bu işlemin temelini oluşturan hücresel elemanlar, desidual hücrelerden farklı yapısal bileşimlere ve biyokimyasal içeriğe sahip granüllü hücrelerdir. Endometriyumda gözlenen bu hücrelerin kökeni hakkında farklı görüşler vardır. Genel olarak kemik iliği orjinli olabilecekleri varsayılmakla birlikte dalak veya timus orjinli olma ihtimalleri vardır. Trofoblastik invazyona karşı oluşturulan hücresel ve humoral bariyer, belli merkezlerin otokontrolü altında gerçekleşir, gerektiği zaman ve yerde trofoblastik invazyon durdurulur. Böylece tıpkı bir tümör yayılmacılığı özelliği taşıyan trofoblastın belli bir süre sonra tüm uterusu işgal etmesi engellenir (18).

Uterus veya endometriyal kabullenme, ovaryum hormonlarının etkisi altında blastosist implantasyonuna izin veren uterus koşullarını tanımlar. Bu şekilde spesifik hücresel ve moleküler olayların gelişimi kolaylaşır. İmplantasyonun gerçekleştiği alıcı dönemin sona ermesinden hemen sonra, reddedici faza geçen uterus bu aşamada blastosist implantasyonuna duyarsız olup, blastosist için toksik bir etkiye sahiptir. Sıçanda gebeliğin 5. gününde uterus, blastosist implantasyonu için alıcı dönemde iken, 6. günde reddedici faza geçer (84).

Sıçanda ve insanda kalsitoninin implantasyon penceresinin açılmasından hemen önce uterus sıvısındaki geçici artışı, endometriyal kabullenme zamanının

önceden saptanmasına yardımcı olabilir. İntegrinler ve birçok sitokin endometriyumun alıcı olmasına katkıda bulunurken, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) implantasyon penceresinin kapanmasını sağlayarak uterusu reddedici faza geçirir. Reddedici uterus sıvısında bulunan kolik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı maddeler ise blastotoksik bir etkiye sahiptir (40).

#### **2.4. İmplantasyonda rol oynayan moleküler mekanizmalar**

Gebelik sırasında uterusunda etkili olan moleküller, adezyon molekülleri, musinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve prostaglandinleri kapsar (11).

##### **2.4.1. Hücre Adezyon Molekülleri**

Hücrelerin birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse bağlanmasını sağlayan protein molekülleridir (10). Hücrenin korunması, yara iyileşmesi, doku bütünlüğünün korunması, (24) embriyogenezis, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması gibi olaylarda rol oynarlar (35). Hücre adhezyon molekül ailesi integrinler, kadherinler, selektinler ve immunoglobulinler olmak üzere dört gruba ayrılır (11).

##### **2.4.2. Sitokinler**

Bu moleküller implantasyon ve immun fonksiyon ile ilgili süreçlerle bağlantılıdır. İmplantasyon bölgesinde trofoblast farklılaşmasında rol oynarlar (11).

##### **2.4.3. Musinler (MUC)**

Anti-adheziv etkili bir gruptur. Musin ailesinden olan MUC-1, implantasyon için uygun yer ve zamanı bulana kadar embriyoyu kovan bir moleküldür (11).

##### **2.4.4. Matriks Metalloproteinazlar**

Bağ dokudaki çeşitli hücre tiplerinden salgılanan, ECM'nin fizyolojik döngüsünde yer alan homolog endopeptidazlar ailesidir (9).



#### **2.4.5. Prostaglandinler**

İmplantasyon penceresinde zamanlama aşamasında önemlidir. Blastosist implantasyonunda zamanlamada gecikme, embriyonun serviks duvarına tutunmasına, normal olmayan plasentaya ve f3tal emilime neden olabilir (11).

#### **2.4.6. Siklooksijenazlar (COX)**

Prostaglandin sentezinde hız sınırlayıcı enzimdir ve iki izoformu vardır. COX-1 ve COX-2. Sıçanda COX-2'nin seğıi inhibisyonunun reproduktif patolojiye ovulasyon, fertilizasyon, implantasyon ve desidualizasyonda aksaklıklara neden olduğu bildirilmiştir (23).

#### **2.4.7. B3y3me Fakt3rleri**

Genellikle otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalar ile etkilerini g3steren d3zenleyici molek3llerdir. Kendilerine 3zel h3cre y3zey resept3rlerine bağlanıp intrasel3ler sinyal yolaklarını ind3kleyerek 3oğunlukla h3cre b3l3nmesine neden olurlar. Memelilerin dişi genital sisteminde folik3l gelişiminin ilk aşamalarından itibaren oosit olgunlaşması, embriyo gelişiminde fertilizasyondan plasmanta oluşumuna kadar geçen s3rede b3y3me, 3oğalma ve farklılaşma olaylarını etkileyerek g3rev yaparlar. Bu fakt3rlerin en 3nemlileri EGF (Epidermal B3y3me Fakt3rleri), TGF-alfa, beta, (Transforme edici B3y3me Fakt3r3), IGF (İns3lin Benzeri B3y3me Fakt3r3), FGF (Fibroblast B3y3me Fakt3r3), PDGF (Trombosit Kaynaklı B3y3me Fakt3r3), VEGF (Vask3ler Endotelial B3y3me Fakt3r3) ve GDF-9 (B3y3me-Farklılaşma B3y3me Fakt3r3)'d3r (38). Bu b3y3me fakt3rlerinden Heparin Bağlayıcı Epidermal B3y3me Fakt3r3 (HB-EGF), blastosist gelişmesini, zona delinmesini ve trofoblast b3y3mesini uyarırken (2) 3ç farklı isoformdan oluşan Transforming B3y3me Fakt3r3  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ECM 3retimi ve yıkımında g3rev alan enzimler 3zerinde derinden etkilidir. Ek olarak TGF- $\beta$  isoformları maternal f3tal y3zeylerinde bulunur ve b3ylelikle isoformların implantasyon s3recinde 3nemli rol oynadığını g3sterir. Ayrıca k3ken olarak vask3ler geçirgenlik fakt3r3 olarak keşfedilen VEGF endotel h3creleri için mitojendir, vask3logenezis ve anjiyogenezis için 3nemli b3y3me fakt3r3d3r (46).

## 2.5. Desidualizasyon

Endometriyumun stromal hücreleri, östrojen ve progesteronun ard arda olan etkisi altında blastosist kaynaklı bir uyarıya cevap olarak iri ve epiteloid karakterli desidual hücelere farklılaşırlar. Desidualizasyon veya desidual reaksiyon olarak tanımlanan bu olay kemirici, etçil, insan ve bazı primat türlerinde belirgindir (40). Desidualizasyon terimi Latince dökülmek anlamına gelen “decidere” fiilinden köken almıştır. Desidualizasyonun gerçekleştiği stromal kompartımanda endometriyal stromal hücrelerinin desidual hücelere değişimi yanında, spiral arterlerde genişleme ve anjiyogenesis, endometriyal bezlerde sekresyon fazına geçme ve artan sitokinlerin etkisi ile monosit ve uterus doğal öldürücü hücrelerinin ortama göçü gerçekleşmektedir (32). Endometriyal stromal hücreler iğ şeklinde fibroblastik hücre fenotipine sahiptir. Değişim sürecinde ilk olarak hücrelerin çekirdekleri genişler ve sitoplazma miktarları artar. İmplantasyon yerinin etrafında bulunan bağdoku hücreleri embriyonik beslenmeye kaynak oluşturmak için glikojen ve lipitleri depolayarak polihedral bir görünüm kazanır. Ekspresyon özelliklerinden dolayı protein sentezi ve sekresyon işlevlerinin gerçekleşeceği golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum organellerinde de genişleme gözlenir (32, 52). Kemiricilerde desidualizasyonun gerçekleşebilmesi için, stromal hücrelerin steroid hormonların etkisiyle hazırlanmış olması gerekmektedir. Normal koşullar altında desidualizasyon yalnızca implantasyon bölgesinde meydana gelir (40). Farelerde desidualizasyon sürecinde meydana gelen bu değişiklikler blastosistin varlığı ile başlatılırken insanlarda desidual farklılaşma, siklus esnasında progesteronun hakim olduğu luteal fazda ortaya çıkmaktadır (34).

Kemiricilerde desidual endometriyum, bazal zon, kapsül, antimezometriyal desidua, mezometriyal desidua ve glikojenik bölge olmak üzere 5 farklı bölge gösterir. Sıçanlarda desidualizasyon uterusun antimezometriyal bölgesinde primer desidual reaksiyon şeklinde başlamaktadır (53). Bu olay implantasyon alanındaki uterus lümen epitelinin apoptozisi ile devam eder. Epitel altındaki bazal membran embriyonun uterusu gömülmesi amacıyla parçalanır. Devam eden günlerde PDR programlı hücre ölümü geçirip kaybolur ve implantasyon alanını çevreleyen sekonder desidual alan (SDR) şekillenir (2, 17). Kemirgenlerde implantasyon alanındaki stromanın desidual dokuya farklılaşması yaklaşık olarak gebeliğin 5-6.

günlerine rastlar. Ancak trofoblastların alttaki bazal membrana penetrasyonu ve trofoblastların stromaya invazyonu 7. günde gerçekleşir (87). Antimezometriyal desiduanın iç tabakası yassı, ara tabakası poligonal, myometriyuma komşu dış tabakası öncü desidual hücrelerden oluşmaktadır (53).

İnsanda desidualizasyon ilk olarak 23 ile 28 günlük döngüde yüzeysel endometriyum tabakasının terminal spiral arterlerinin çevresindeki stromal hücrelerde belirgindir (14). Daha sonra otokrin ve parakrin sinyal yolları ile tüm endometriyal kompartımana yayılır (33).

Stromal kompartımandaki desidualizasyon ilerlerken, ekstrasellüler matriksteki farklılaşma ile birlikte desidual hücrelerin sınırları daha az belirgin hale gelir (61). Gebelik şekillenmemiş endometriyal stromada ECM; tip I, III, V ve VI kollajen, fibronektin ve periglandular tenaskin birikintilerinden ibarettir. Desidualizasyon esnasında ise ECM; tip IV kollajen, heparan sülfat, proteoglikan ve laminin 2 ve 4 içerir (2).

Desidual doku, özellikle implantasyon ve erken gebelik süreçlerinde trofoblast hücreleri ve myometriyum arasında immunolojik bir bariyer oluşturarak inflamatuvar sinyallere ve oksidatif strese karşı embriyoyu korumakla görevlidir (44).

## **2.6. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)**

### **2.6.1. VEGF'nin Tarihsel Gelişimi**

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ailesinin üyesi olan VEGF ailesi (12, 80) endotel hücreye özgü temel mitojendir ve önemli vasküler geçirgenlik faktörüdür (78). Endotel hücrelerinin çoğalmasına, göçüne ve farklılaşmasına sebep olur (13). Vücutta hem fizyolojik olaylarda hem de patolojik birçok hastalığın etiolojisinde yer alır (83).

Judoh Folkman 1971 yılında antianjiyogenezisin insanda kanser tedavisi için bir strateji olabileceğini önermiştir. Bu temel hipotez, anjiyogenezisi incelemek ve kan damar büyümesini başlatan düzenleyicilerinin araştırılmasına büyük hız vermiştir (29). VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde vasküler sızıntının başlamasına sebep olduğu için vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak

adlandırılmıştır (47). 1983 yılında tümör hücrelerinin ve kapillerlerinin proteinlere geçirgenliğini arttıran bir protein olarak tanımlanmıştır (29). 1989 yılında ise bu aileden ilk özel anjiyogenik büyüme faktörü ayrıştırılmış ve buna vaskülotropin veya VEGF adı verilmiştir (12, 68, 73).

### **2.6.2. VEGF Hakkında Genel Bilgi**

VEGF ailesi organizmanın tamamına yayılmış, vasküler sistem boyunca yer alan endotel hücreleri için en özgül mitojendir. Vaskülogenez ve anjiyogenez için önemli bir faktördür (43). Endotel hücrelerinde proliferasyon yapar, hücre göçünü kolaylaştırır ve apoptozu engeller. İn vivo olarak kan damarlarındaki geçirgenliği artırır, anjiyogenezi tetikleyerek anjiyogenezisin düzenlenmesinde önemli rol oynar (75). Özellikle damar oluşumunda önemli rol oynar ve endotel hücrelerinin fonksiyonları için gerekli olduğu bildirilmiştir. Embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, myokardial iskemi ve romatoid artrit gibi hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarda rol oynar. Bu sebeplerden dolayı son yıllarda birçok araştırmaya konu olmuştur (12, 85).

Anjiyogenez, mevcut durumdaki kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişimidir. Embriyonal gelişimde, dişi genital sistemde, kıl büyümesinde, kemik gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Fakat anjiyogenezisin iyi bir şekilde düzenlenememesi diabetikretinopati, katı tümörlerin gelişimi gibi çeşitli patolojik olgulara sebep olmaktadır (12, 25). Anjiyogenezisin oluşması birbirini takip eden basamaklar şeklinde ortaya çıkmaktadır. İlk olarak anjiyogenezise neden olan bir uyarının oluşması, daha sonra bu etkenden dolayı anjiyojenik bir faktörün salınması ve ilgili faktörü ya da faktörlerin de bazal membranı parçalaması (matriks metalloproteinaz enzimi aracılığıyla) söz konusudur (19, 75).

VEGF makrofaj, mastosit, fibroblast, keratinosit, düz kas hücresi ovaryum folikülleri, korpus luteum, akciğer alveolar hücreleri, renal glomerul visseral epitel hücreleri, böbrek proksimal tubül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, leydig hücreleri, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi pek çok hücreden salgılanır (28). Fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum follüküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırır. Ovulasyondan sonra

korpus luteum, erken implantasyon döneminde de trofoblastlar tarafından salgılanır. Embriyonik gelişimin sonuna doğru azalırken, organ oluşumu döneminde salınımı oldukça artar (82). Endotel hücreleri VEGF salgılamaz ancak üzerlerinde VEGF için reseptör bulundurlar. VEGF salınımını düzenleyen faktörler hipoksi, inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri, nitrik oksit ve hormonlardır. VEGF, PGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2 arasında doğru denge kurulamaması halinde inflamatuvar anjiyogenez oluşur. Bu da psörisis, romatoid artrit, diabetik retinopati, maküler dejenerasyon, prematür retinopatisi ve tümör gelişimi gibi patolojilere yol açabilir (28).

VEGF arterler, venler ve lenfatiklerdeki endotel hücreleri için güçlü bir mitojen olmasına rağmen diğer hücre tipleri için mitojenik aktiviteden yoksundur. VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ile arasındaki güçlü sinerjistik etki ile in vitro modellerde mikrovasküler endotel hücrelerinin kollajen jellere invazyonunu sağlayarak anjiyogenezi aktive etmekte ve kapiller benzer yapıların oluşumunu uyarmaktadır (75).

### **2.6.3. VEGF Geni-Protein Yapısı**

İnsanlardaki VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yerleşmiştir (76). Kodlayıcı bölge yaklaşık olarak 14 kb'lik bir alan kaplamaktadır ve 8 exon'dan oluşmaktadır (74). VEGF ailesi alt bölümlere ayrılmaktadır. VEGF, bu alt bölümlerden PDGF ailesine aittir. Bu alt ailede yer alan monomerler yan yana bir uyumla bir arada tutulmaktadır. 2 beta tabakası, 2 kıvrımlı simetriye dik olacak bir şekilde uzanmaktadır. Tüm VEGF isoformları kovalent bağlı homodimerler şeklinde salgılanırlar (12).

### **2.6.4. VEGF'nin Biyolojik Aktivitesi,**

VEGF çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. En iyi karakterize özelliği vasküler endotel hücreleri için güçlü bir mitojen olmasıdır (55). Endotel hücrelerinin çoğalması anjiyogenez süreci içinde önemli bir olaydır. Bu çoğalma VEGF'nin hem in vivo hem de in vitro anjiyogenesize neden olduğunu gösterir. Aktif anjiyogenesizden ayrı olarak VEGF, hücre apoptozusunu önleyerek endotel hücrelerinin yaşaması için önem teşkil eder (5).

VEGF bağları, sadece proliferasyon sırasında değil aynı zamanda dinlenme halindeki endotel hücrelerinde de rol oynar. Dahası VEGF endotel hücrelerinden nitrit oksitin üretimini arttırarak vazodilatasyona sebep olur. VEGF ayrıca vasküler geçirgenlik faktörü olarak bilinir çünkü VEGF, plazma proteinlerinin mikrovasküler sızıntısına sebep olur. Bu permeabilite arttırıcı aktivite, endotel hücrelerinin büyümeleri için bir şablon olan ekstravasküler fibrin-jelin olduğu yerdeki anjiyogenezis için önem taşır (22, 42).

### 2.6.5. VEGF İsoformları

Bugüne kadar insan VEGF'sinin sırasıyla 121, 145, 165, 183, 189 ve 206 aminoasite sahip olan 6 isoformu tanımlanmıştır (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) (60). Tüm isoformları kovalent bağlı homodimerik şekilde sekrete edilir (74). VEGF üreten hücrelerin çoğu VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, ve VEGF<sub>189</sub>'u eksprese ederken, VEGF<sub>145</sub> ve VEGF<sub>206</sub> esas olarak plasental kökenli hücrelerle sınırlıdır (42).

VEGF<sub>165</sub> yaklaşık 46 kDa'lık homodimerler şeklinde salgılanır. Bu homodimerler bazik bir karaktere sahiptir ve heparine orta derecede bir yatkınlık gösterirler. Tam tersine VEGF<sub>121</sub> zayıf asidik bir proteindir ve heparini bağlamamaktadır. VEGF<sub>121</sub> kendisini üreten hücrelerden serbest bir şekilde salgılanmasına rağmen VEGF<sub>165</sub>'in yaklaşık %50-70'i hücre ve ECM ile ilişkili bir şekilde kalmaktadır. VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> ise tamamen ECM'de ve daha az ölçüde hücre yüzeyinden salgılanırlar (12, 76).

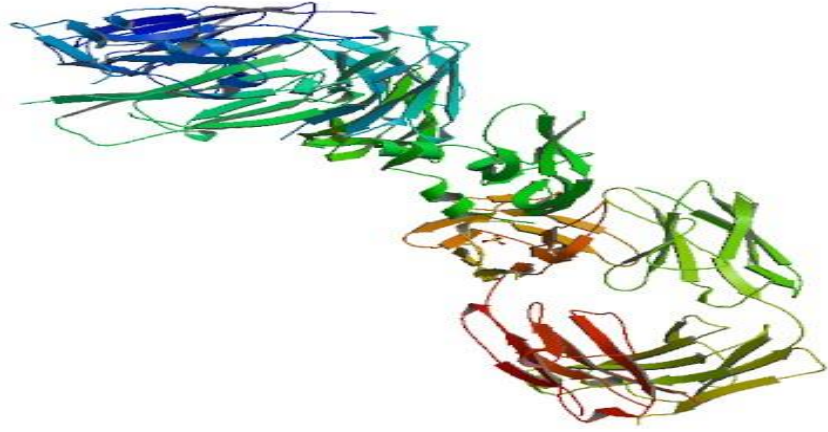
### 2.6.6. VEGF Üyeleri

VEGF ailesi VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve placentaya büyüme faktörü (Placenta Growth Factor; PGF) adı verilen 6 üyeden oluşmaktadır (82). Bu proteinler, damar gelişiminde oldukça önemli görevler üstlenirler. Damar gelişiminde fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde ve lenfanjiyogenezde önemli rolleri vardır (30). VEGF üyelerinden en fazla araştırılanı VEGF-A'dır. Koroner arter gelişimindeki rolünün dışında VEGF-B hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir. VEGF-C ve D, lenfatik sistemin gelişiminde önemlidir, ayrıca anjiyogenez ve artmış vasküler geçirgenliği tetikleyebilir (12).

## **VEGF-A**

VEGF-A'nın orjinal ismi guinea-pig derisindeki vasküler geçirgenliği oluşturma yeteneğinden dolayı vasküler geçirgenlik faktörü olarak tanımlanır (VPF). VEGF-A vasküler endotel hücreleri için önemli ölçüde spesifik mitojen olup, 34-46 kDa ağırlığında glikoproteindir. VEGF-A monomerleri iki disülfid köprüleri ile homodimer oluşturacak şekilde birbirleriyle bağlantılıdır (50). VEGF-A geni, kromozom 6p21.3' teki lokalizasyonda kodlanmıştır. Ayrıca Human-VEGF olarak bilinir (26).

VEGF-A'nın 6 adet izoformu vardır. Bunlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>146</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub>'dır (30). Bu izoformlardan VEGF<sub>121</sub> dışında hepsi heparine bağlanmaktadır. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub> ve VEGF<sub>165</sub> sınıflarda saptanabilir ancak VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> ise salgılandığı halde testlerle kolaylıkla saptanamaz (57). VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>'in aksine hücre yüzeyindeki ve ekstrasellular matriks içindeki proteoglikanlara ve heparine bağlanan izoformdur (73).



**Şekil 2.2.** VEGF-A gen yapısı (7).

VEGF-A'nın plasenta gelişimi esnasında sitotrofoblastların ve sinsisyotrofoblastların gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. En etkin olan formu VEGF<sub>165</sub>'tir (85).

### ***VEGF-B***

VEGF-B, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin farklılaşması ve etkinleşmesinde rol oynar (16, 82). Gelişen embriyonun kalbinde ve yetişkinlerin kalp ve iskelet kasında kuvvetli bir şekilde tanımlanır. VEGF-B<sub>186</sub> hücrelerden serbestçe salgılanır ve endotel hücreleri için mitojenik iken VEGF-B<sub>167</sub> heparine bağlanır. Bununla birlikte VEGF-A'nın aksine, VEGF-B hipoksi tarafından uyarılmaz (50).

### ***VEGF-C***

Lenfatik damarların oluşumunda rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak lenfanjiyogenesizi düzenler (25). VEGF-C hipoksiden değil, pro-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenir ve tavuk koriallontoik zar modelinde bir anjiyogenik yanıt oluşturabilir (50). VEGF-C aynı zamanda yara iyileşmesinde de rol oynar (25).

### ***VEGF-D***

334 amino asitten meydana gelen ve VEGF-A ile %31 oranında aynı amino asitleri kapsayan bir proteindir (1). VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer görevler üstlenir (82).

### ***VEGF-E***

VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında benzerlik gösterir. Güçlü bir mitojen ve geçirgenlik arttırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanamaz fakat VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanması sayesinde etkisini gösterir (16, 82).

### ***PGF***

VEGFR-1'e bağlanır ve endotel hücrelerinde en fazla bulunan VEGF üyesidir. VEGF-A'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını tetiklerken kendi başına zayıf bir mitojenik etkiye sahiptir (25).



**Tablo 2.1.** VEGF Ligandları ve reseptörler (8).

VEGF ligandları	Reseptörleri	Foksiyonları
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1	<u>Anjiyogenezis</u> <u>Vasküler onarım</u>
VEGF-B	VEGFR-1	Belirlenmemiştir
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	<u>Lenfanjiyogenezis</u>
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	<u>Lenfanjiyogenezis</u>
VEGF-E	VEGFR-2	<u>Anjiyogenezis</u>
PGF	VEGFR-1, neuropilin-1	<u>Anjiyogenezis</u> <u>Yangı</u>

### 2.6.7. VEGF Reseptörleri

VEGF'nin şu anda tüm anjiyogenik faktörler için önemli olduğu düşünülür. Hemen hemen anjiyogenez alanlarının her yerinde gözlenir. VEGF seviyeleri kan damar büyümesi vakalarında geçici ve bulunduğu yer açısı ile yakından ilişkilidir (42, 62). Endotel hücrelerinin VEGF'den yararlanabilmesi için onun bağlanabileceği özel reseptörleri sentezlemesi gerekir (81). Üç çeşit vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) tanımlanmıştır (12).

VEGFR-1/Flt-1 (fms-like tyrosinekinase-1)

VEGFR-2/Flk-KDR (kinase domain region-fetal liverkinase)

VEGFR-3/Flt-4 (fms-like tyrosine kinase-4)

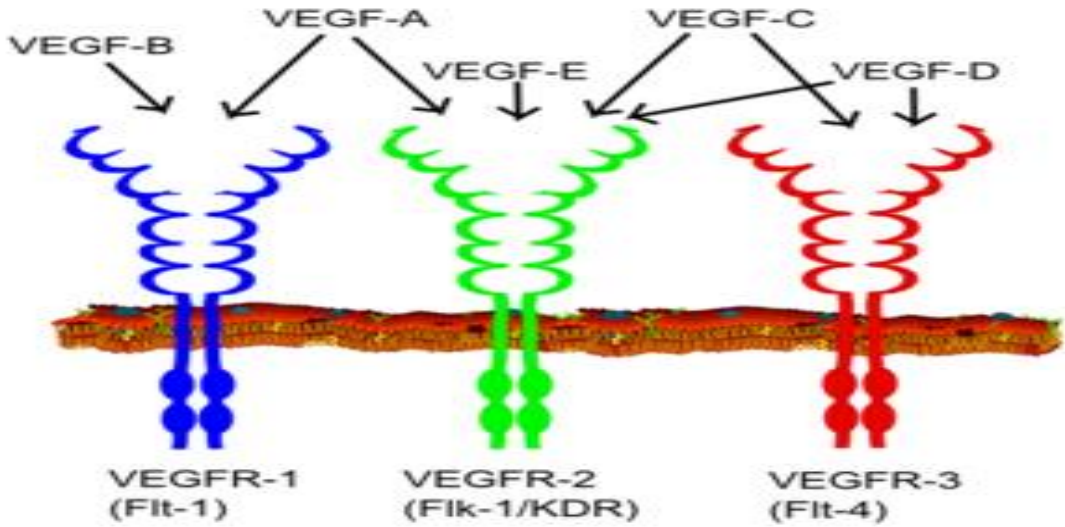
VEGF reseptör-1 (VEGFR-1, flt-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk-1, KDR) embriyogenezis sırasında sentezlenirler, (13) amino asitlerinin %44'ü ortaktır ve iki bölüm içerirler. Birinci bölüm, hücre içinde bulunan ve tirozin kinazın etkinlik

alanlarını içeren hücre içi kısım, İkinci bölüm ise, hücre dışında kalan tek sıralı kısa membran köprüleri dizisi ve ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet immunoglobülin benzeri yapıdan oluşan hücre dışı kısımdır (30, 81).

VEGF reseptörlerinden VEGFR-1 tanımlanan ilk VEGFR'dir ve VEGF' ye karşı en yüksek affiniteye sahiptir (75). VEGFR-1, VEGF-A ve PGF'e yüksek bir affinite ile bağlanır fakat iyi bir çoğalma ve kemotaktik yanıt elde edilemez (73) aynı zamanda VEGF-B'nin etkilerine aracılık etmektedir (6).

VEGFR-2, VEGF-A'nın mitojenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması ve göçünü düzenler (25). VEGFR-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E'nin etkilerine aracılık ederler (6).

VEGFR-3 ise özellikle lenfatik damarların gelişiminde önemlidir. VEGF-C ve VEGF-D'nin bağlandığı reseptördür ve lenfanjiyogeneziste rol aldığı bildirilmiştir (81).



Şekil 2.3. VEGF ve reseptörleri (6).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen, her grupta 6 adet olmak üzere toplam 30 adet (yaklaşık 180-200 gr ağırlığında, 10-12 haftalık) yetişkin dişi Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Çalışma esnasında sıçanlara, ayrı bölmelerde standart yem ile su verilerek, ortamlarının sıcaklık ve nem oranları sabit olacak şekilde, 12 saat karanlık/aydınlık ortamlarda tutuldu. Vajinal smear ile östrus evresinde oldukları belirlenen dişi sıçanlar, 1 gece erkek sıçanlar ile (2 dişi/ 1 erkek) birlikte bırakıldı. Ertesi sabah vajinal smearda sperm bulunan dişi sıçanlar gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde, gruplardaki sıçanlara rompun (5mg/kg) ketamin (60mg/kg) kombinasyonu ile sağlanan genel anestezi altında servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanarak anterior abdominal duvar açılıp uterus dokuları alındı. İmmunohistokimyasal analizler için alınan uterus dokuları trimlenerek fikzasyon için %10 Formalin solüsyonları içine konuldu. Alınan örneklerde immunohistokimyasal prosedür uygulanarak VEGF immunlokalizasyonları belirlendi. Çalışmada kullanılan sıçanlar aşağıdaki tabloda olduğu gibi deney gruplarına dahil edildi.

**Tablo 3.1.** Deney Grupları

<b>Deney Grupları</b>	
GRUP I	Gebeliğin 0. Günü
GRUP II	Gebeliğin 1. Günü
GRUP III	Gebeliğin 3. Günü
GRUP IV	Gebeliğin 5. Günü
GRUP V	Gebeliğin 7. Günü

### 3.1. İmmunohistokimyasal Prosedür

Gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde alınan uterus doku örnekleri %10 Formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra ışık mikroskopik takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5µm kalınlığındaki kesitler dehidrasyon için alkol serilerinden geçildi. Daha sonra kesitler, antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için ısıya dayanıklı kap içerisinde üzerini kaplayacak kadar sitrat tamponu (ph:6) eklenerek mikrodalga fırında (750 W) 2 kez, 5'er dakika işleme tutuldu. Daha sonra kesitler oda ısısında (20 dk) soğutuldu. Kalem ile sınırlandırılan kesitler, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) +%0,2 Tween 20 solüsyonu ve distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için, oda ısısında ve nemli ortamda, %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda (25dk) bekletildi. Tekrar PBS+%0,2 Tween 20 solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler, 1/100µ oranında dilüe edilen primer Mouse monoklonal VEGF antikorları ile +4C°de nemli ortamda bir gece bekletilerek inkübasyonu sağlandı. Negatif kontroller, primer antikorun işlemlerden çıkarılması ile elde edildi. Ertesi sabah dokular PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu ile yıkandıktan sonra Biotinle konjuge universal LSAB Kit'inde oda ısısında nemli ortamda (30dk) tutuldu. Tekrar PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında ve nemli ortamda HRP solüsyonunda (30dk) bekletildi. Uygulama sonrasında kesitler PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu ile yıkandı ve sonrasında mikroskop altında DAB kromojeni uygulandı. Daha sonra kesitler distile sudan geçirildi ve Hematoksilen (4dk) ile zıt boyama yapıldı ve alkol serilerinden geçirildikten sonra kapatıldı. Son olarak, elde edilen preparatlar Nikon E 600 ışık mikroskobu ile görüntülenerek gruplara ait doku örnekleri immunboyanma şiddeti açısından semiquantitatif olarak skorlandı.

**Tablo 3.2.** İmmunohistokimyasal Prosedürde Kullanılan Malzemeler.

Kimyasal Malzemenin Adı	Markası	Kodu
Peroxidase-Blocking Solution	Dako REAL™	S2023
Protein Block Serum-Free Ready-To-Use	Dako	X0909
VEGF (C-1) Mouse Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7269
Biotinlated Link Streptavidın-HRP	Dako	K0609
DAP+ Chromogen DAP+ Substrate	Dako	K3468

**Tablo 3.3.** Sitrat Tampon Solüsyonu (500ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
Citric asit	0,96 gr
Distile su	500ml
10N NaOH	Ph:6 olana kadar eklenir.

**Tablo 3.4.** Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (1000ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,48gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43
NACL	7,2gr
Distile su	1000ml

**Tablo 3.5.** PBS+ %0,2 Tween 20 solüsyonu (500ml için)

<b>Kimyasal Malzemenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
<b>PBS</b>	500ml
<b>Tween 20</b>	0,5ml

**Tablo 3.6.** PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu (500ml için)

<b>Kimyasal Malzemenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
<b>PBS</b>	500ml
<b>Tween 20</b>	0,25ml

## 4. BULGULAR

Yapılan çalışmada, sıçanlarda gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde alınan uterus doku kesitleri, VEGF'nin dokudaki ekspresyonlarını belirlemek için immunohistokimyasal olarak boyandı. Nikon E-600 ışık mikroskop ile incelenen boyalı doku örnekleri farklı gözlemciler tarafından incelendi ve boyanma şiddeti açısından semiquantitatif olarak skorlandı. Bu skorlanmada boyanma şiddetleri; - (boyama yok), + (zayıf), ++ (orta) ve +++ (güçlü) olarak derecelendirildi, Tablo 4.1 de özetlendi. Grupların günlerine ait boyanma örnekleri (Şekil 4.1.- 4.11.) arasında gösterildi. Gebelik günlerine ait bölge tanımlamaları Öner H ve arkadaşlarının (58) daha önce yaptıkları çalışma referans alınarak yapılmıştır.

### VEGF İmmunlokalizasyonu

**0.Gün:** Endometrium ve myometrium normal yapıda gözlemlendi. VEGF immunlokalizasyonu lümen ve bez epitel hücrelerinin stoplazmalarında, myometrium ve kapiller duvarında ve supepitelyal stromada güçlü şekilde mevcuttu. Endometriyal stromada ise az sayıda hücrede güçlü (+++) immunreaksiyon mevcuttu. Gebeliğin 5. gününe kadar desidual reaksiyon alanı oluşmamıştı (Şekil 4.1, 4.2).

**1. Gün:** Gebeliğin 1. gününde uterusun mikroskobik yapısı, VEGF immunreaksiyon alanları ve boyanma şiddeti 0. gün ile benzerlik göstermekte beraber immunreaksiyonun endometriyal stromaya doğru yapıldığı gözlemlendi (Şekil 4.3, 4.4).

**3. Gün:** Gebeliğin 3. gününde uterusun mikroskobik yapısı, VEGF immunreaksiyon alanları ve boyanma şiddeti 1. gün ile benzerlik göstermekte idi (Şekil 4.5, 4.6).

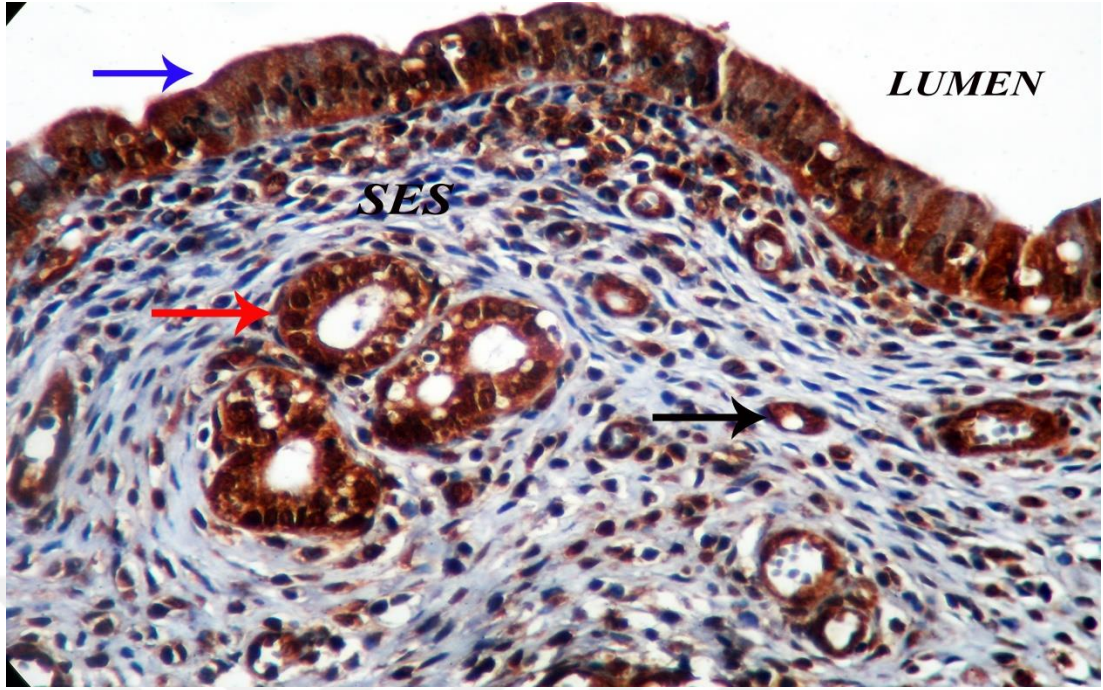
**5. Gün:** En belirgin yapısal değişiklik bezlerin küçülmüş, sayılarının oldukça azalmış, kapillerlerin miktarının ise artmış olduğu idi. İmplantasyonun ilk belirleyici işaretlerinden biri olan desidual reaksiyon alanı, primer desidual reaksiyon alanı (PDR) şeklinde antimezometrial bölgeden mezometrial alana doğru lümen epitelinin altında yayılmış, ancak lümen epitelinden stromaya doğru dar bir alanda gözlenmeye başladı. VEGF immunreaktivitesi uterus lümen ve bez epitel hücrelerde, myometriyum ve kapiller duvarında ve myometriyuma yakın endometriyal stromada

az sayıda hücrede VEGF immunekspresyonu gözlemlendi ve PDR alanında güçlü (+++) şekilde mevcuttur (Şekil 4.7, 4.8).

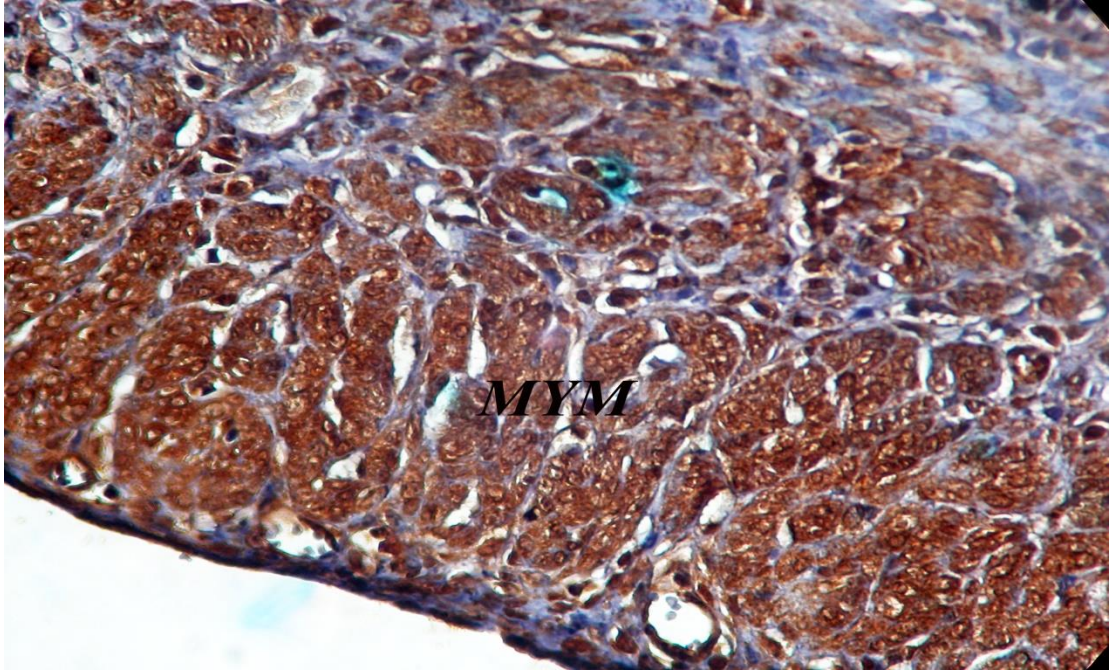
**7. Gün:** Uterus lümeni iyice küçülmüş, epiteli incelmış, lümeni çevreleyen PDR alanının dışında mezometrial alana doğru sekonder desidual reaksiyon alanı (SDR) belirginleşmişti. Bezler oldukça küçük, çok az sayıda ve miyometriyuma yakın yerleşimde idi. VEGF immunreaktivitesi, mezometrial alana doğru, hem PDR hem de SDR alanında antimezometrial alana göre daha yoğun ve güçlü (+++) gözlemlendi. Lumen ve bez epitelinde güçlü şekilde gözlenen VEGF immunreaktivitesi kapiller duvarı ve miyometriyumda hafif şiddette (+) idi (Şekil 4.9, 4.10, 4.11).



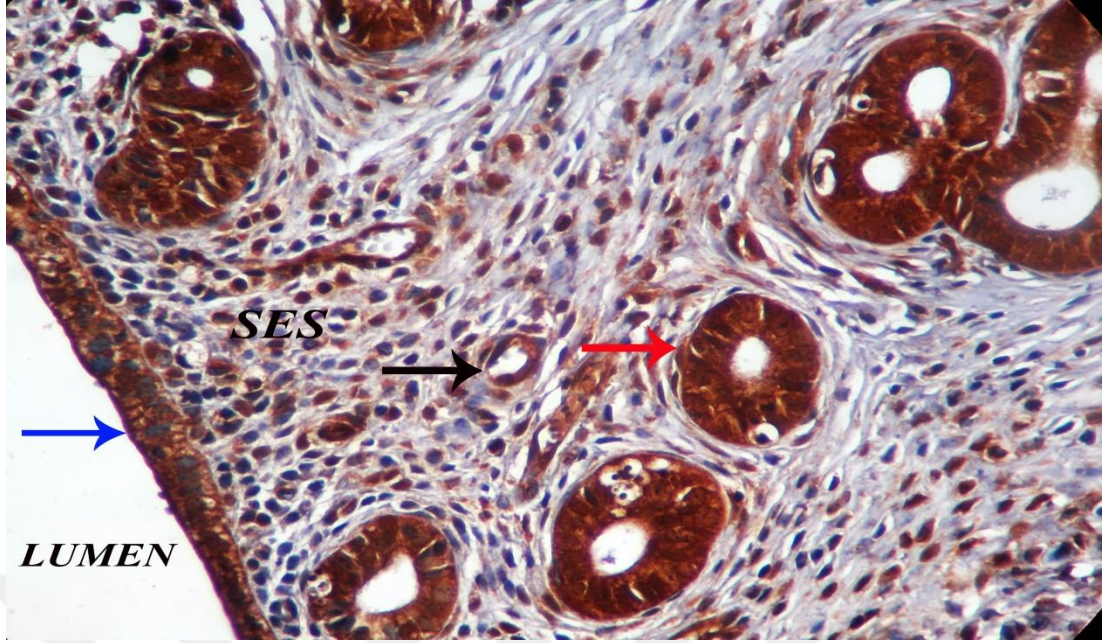




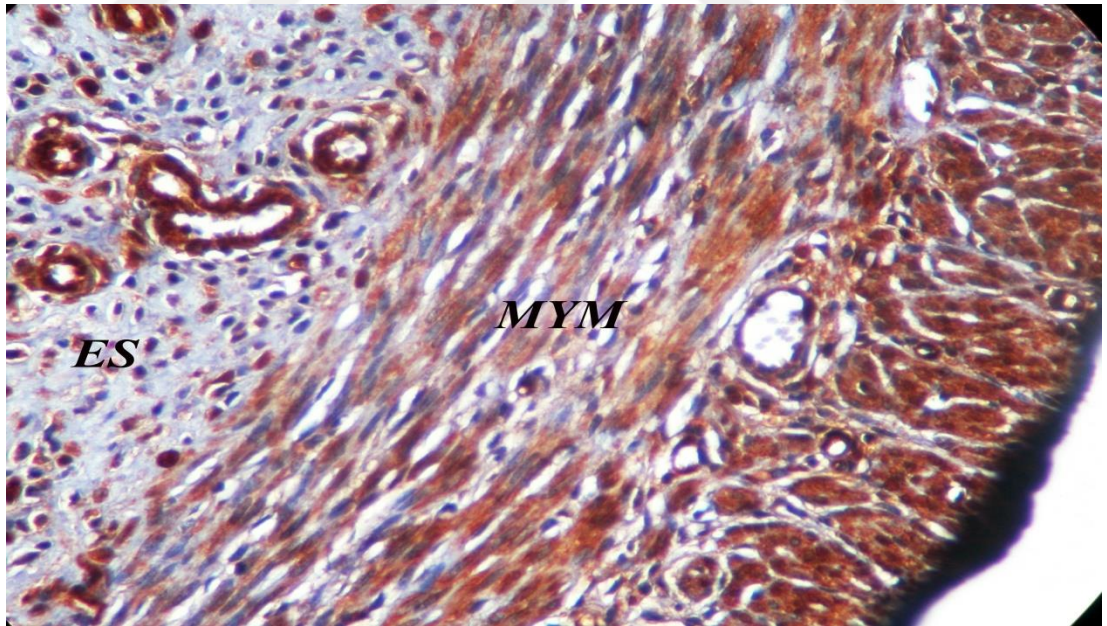
**Şekil 4.1.** Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lumen piteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400.



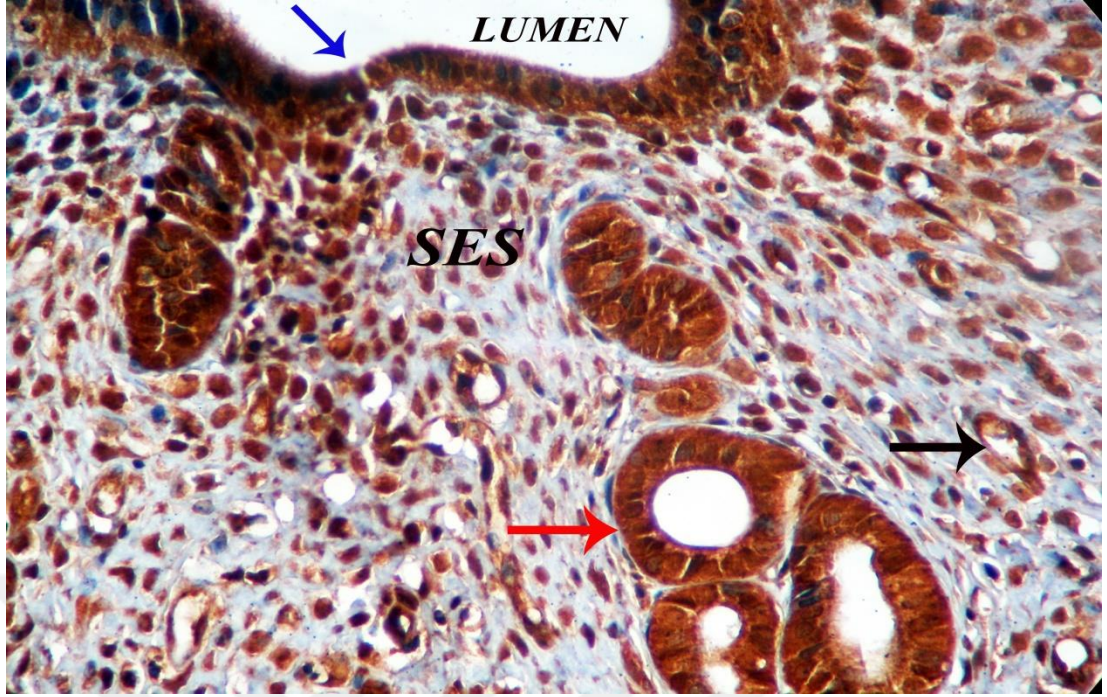
**Şekil 4.2.** Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum. X400.



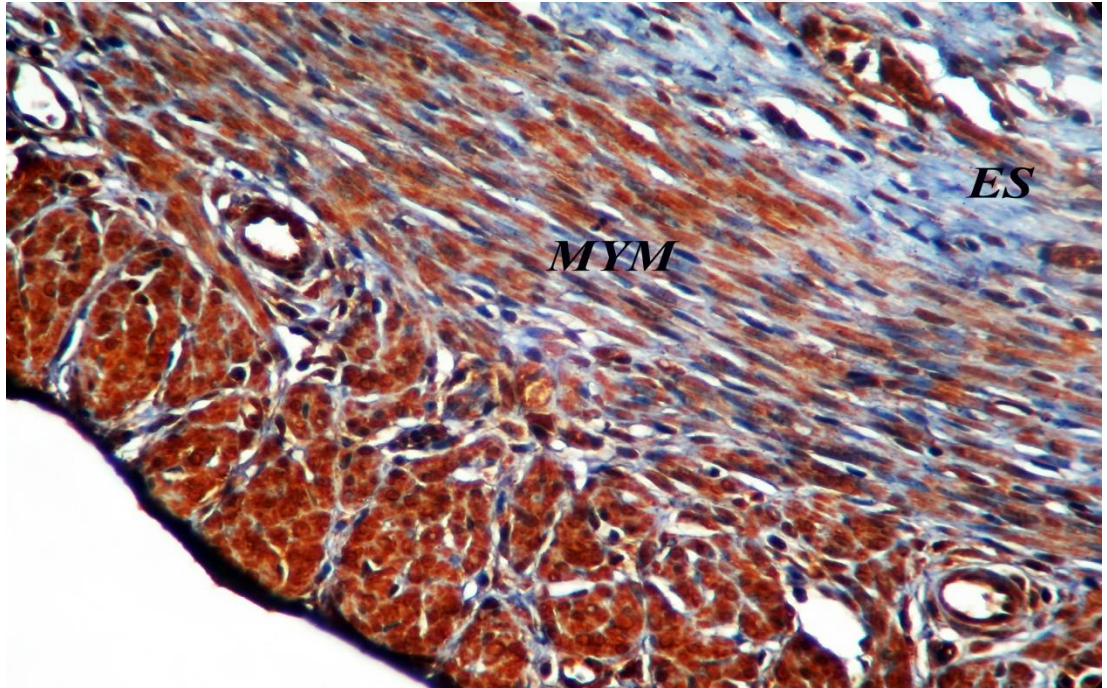
**Şekil 4.3.** Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400.



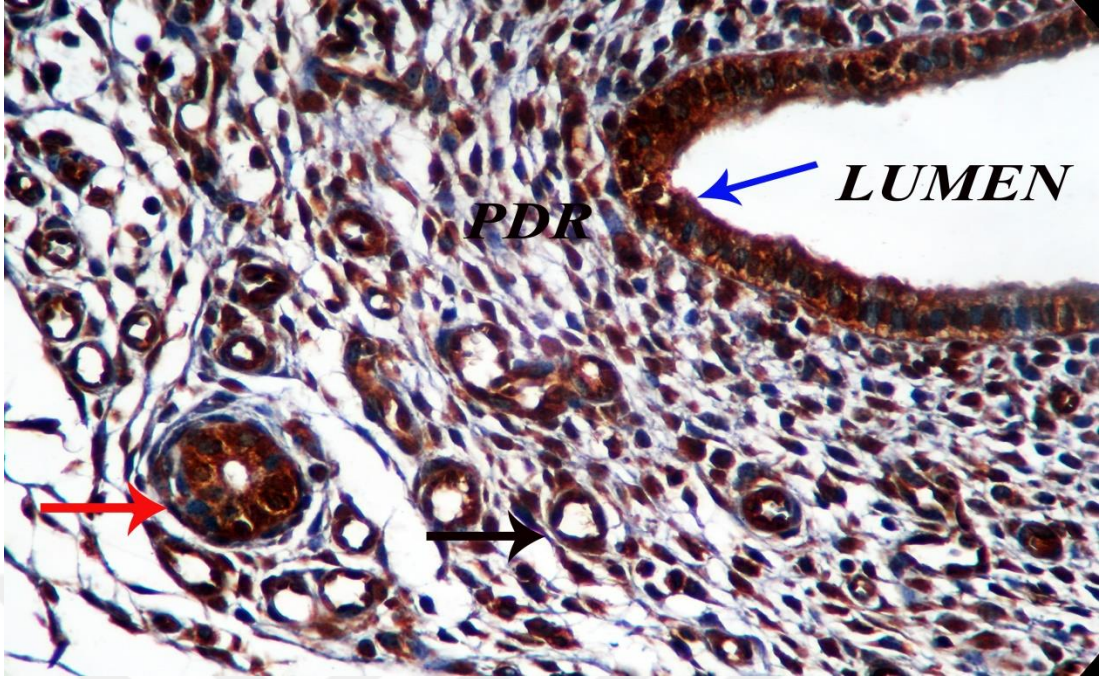
**Şekil 4.4.** Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum. X400.



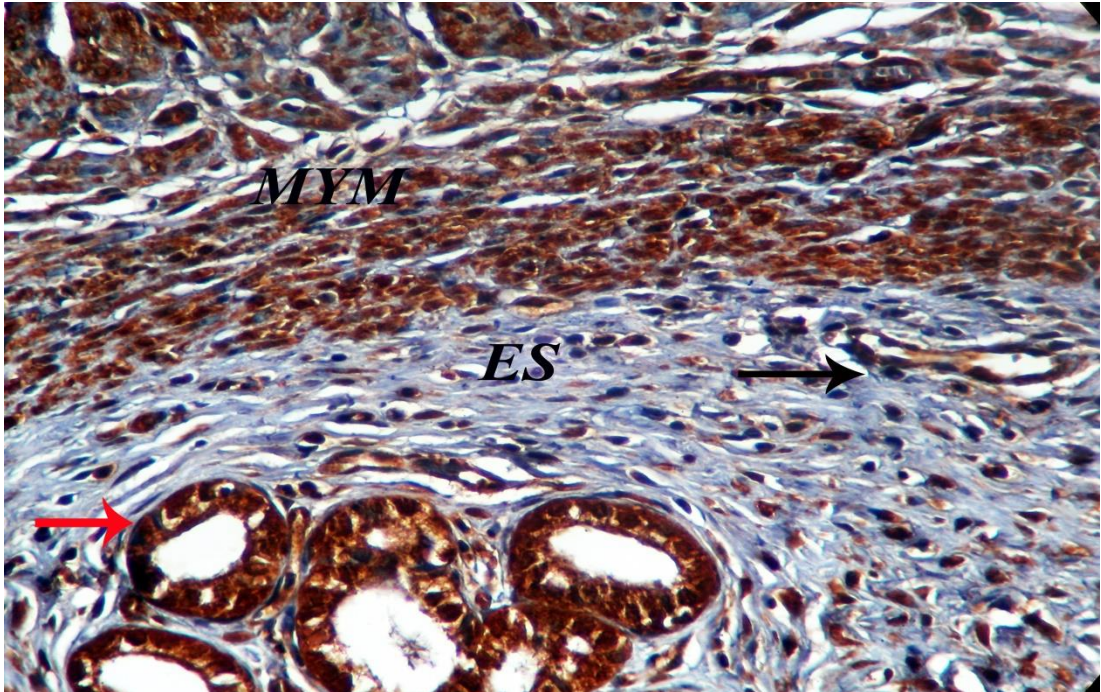
Şekil 4.5. Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400.



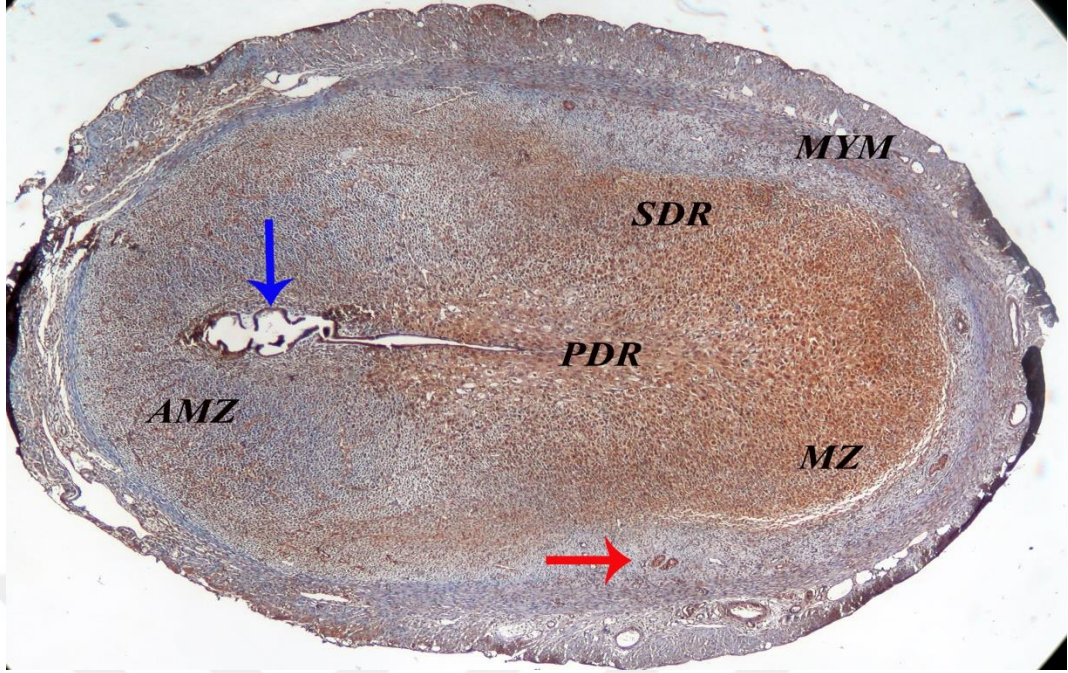
Şekil 4.6. Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum. X400.



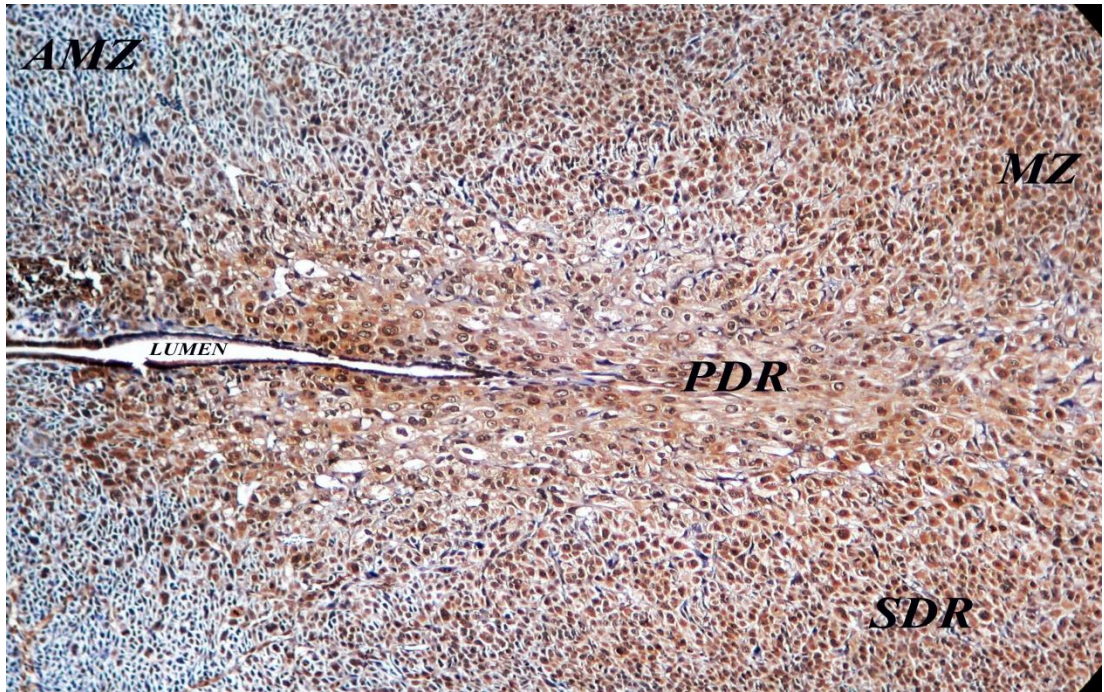
**Şekil 4.7.** Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. PDR: Primer desidualizasyon alanı; Mavi ok: Lumen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400.



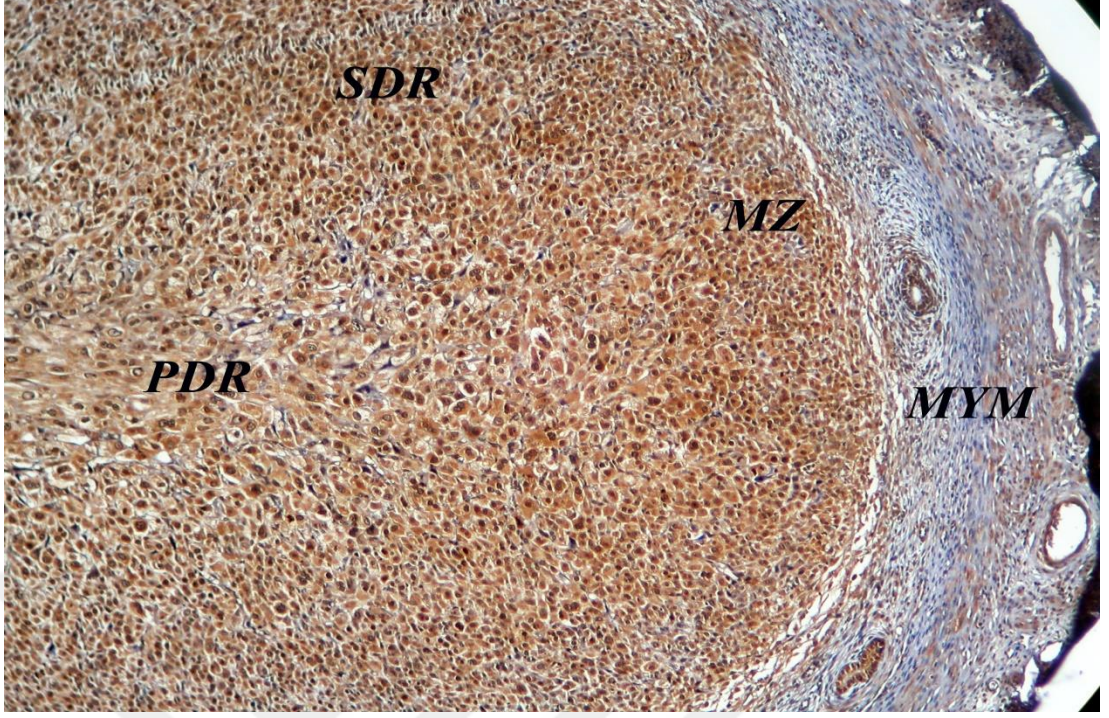
**Şekil 4.8.** Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X400.



**Şekil 4.9.** Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. AMZ: Antimezometriyal alan; MZ: Mezometriyal alan; MYM: Myometriyum; PDR: Primer desidualizasyon alanı; SDR: Sekonder desidualizasyon alanı Kırmızı ok: Bez; Mavi ok: Lumen epiteli. X40.



**Şekil 4.10.** Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. AMZ: Antimezometriyal alan; MZ: Mezometriyal alan; PDR: Primer desidualizasyon alanı; SDR: Sekonder desidualizasyon alanı. X100.



**Şekil 4.11.** Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonu. MZ: Mezometriyal alan; MYM: Myometriyum; PDR: Primer desidualizasyon alanı SDR: Sekonder Desidualizasyon alanı. X100.

**Tablo 4.1.** Gebe sıçanların uterus dokusunda VEGF immunreaktivitesinin gebelik günlerine göre semiquantatif analizi

Gebelik Günleri	Lumen Epiteli	Bez Epiteli	SES	ES	MYM	PDR	SDR	Kapiller
0.Gün	+++	+++	+++	+++	+++	Yok	Yok	+++
1.Gün	+++	+++	+++	+++	+++	Yok	Yok	+++
3.Gün	+++	+++	+++	+++	+++	Yok	Yok	+++
5.Gün	+++	+++	PDR	++	+++	+++	Yok	+++
7.Gün	+++	+++	PDR	SDR	+	+++	+++	+

## 5. TARTIŞMA

Anjiyogenezis yeni kan damarlarının oluşumu ile sonuçlanan ekstrasellüler matriks ve endotel hücre çoğalmasını, yeniden modellendirmeyi içeren karmaşık bir süreçtir (56). Anjiyogenezis pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeye dayanan karmaşık bir sistemle regüle edilir. En önemli pro-anjiyogenik faktör vasküler endotelial büyüme faktörüdür (64). VEGF anjiyogeneziste önemli rol oynayan, endotel hücresine özgü mitojendir. Geçmiş raporlar, VEGF'nin embriyo implantasyonu ve embriyonik vaskülogenezis ile yakından bağlı olduğunu göstermiştir (86). Seksüel siklus boyunca VEGF, ovaryum ve uterus dokusunda anjiyogenezise dahil olur. Gebelik sırasında ise VEGF, endotel hücre çoğalmasını ve vasküler geçirgenliği artırır. Farelerde VEGF- alleli kaybı embriyonik ölümlerin yanısıra vaskülarizasyonun defekti gibi embriyonik anomalilere sebep olur. Ayrıca VEGF ve reseptörleri kadınların, sıçanların, farelerin, tavşanların ve koyunların uterus implantasyonu ve uterus siklusunda tespit edilmiştir (66). Örneğin Yi ve arkadaşları embriyonik peri-implantasyon sırasındaki hamsterlarda VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonunu (çiftleşme sonrası 3, 4, 5, 6 ve 7. günleri) in situ hibridizasyon, immunohistokimya ve PCR ile araştırmıştır. Bu araştırmaya göre çiftleşmeden 3 gün sonra in situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal boyama tekniği ile sadece uterus epitelinde zayıf VEGF ekspresyonu ortaya koyulmuştur. 4. günde subepitelial stroma ve embriyoda, VEGF ve VEGF reseptörlerinden biri olan Flt-1 için immunreaktivite gösterilmiştir. 5. günde desidual hücreler ve vasküler endotel hücrelerinde hem VEGF hem de reseptörleri için immunreaktivite tespit edilmiştir. Araştırmacılar sadece birkaç embriyonik hücrenin VEGF mRNA'yı eksprese ettiğini ancak desidual hücrelerde güçlü sinyaller kaydettiğini gözlemlemiştir. 7.günde ise embriyonik ektoderm, amniyon ve koryonda da daha güçlü VEGF sinyalleri tespit edilmiştir. Tüm bu bulgulara dayanarak araştırmacılar, VEGF ve reseptörlerinin desidual dokularda ekspre olması için embriyonun implante olması gerektiğini, dolayısıyla VEGF ve reseptörlerinin erken embriyonik gelişim ve endometriyum desidualizasyonunda rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (83).

Chakraborty ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, VEGF ekspresyonunu peri-implantasyon periyodu ( 1-8 günler) boyunca fare uterusunda, Northern ve in situ



hibridizasyon tekniğini kullanarak incelemiştir. İn situ hibridizasyon deneylerinin sonuçlarına göre 1. ve 2. günlerde lümen epitelinde VEGF-mRNA birikimi gösterilmiştir. 3. günde stromal hücrelerde zayıf, 4 günde lümen epitel hücreleri ve subepitelyal stromadaki hücrelerde VEGF-mRNA birikimi gözlemlenmiştir. Devamında 5. ve 7. günlerde de bu mRNA'nın varlığı tam anlamıyla kesinleştirilmiştir. İlk bağlanma reaksiyonundan sonraki 5. günde blastosisti çevreleyen lümen epiteli ve stromal hücrelerde VEGF-mRNA birikimi sergilenmiştir. 6 ve 8. günlerdeki birikimin, desidual tabakadaki hücrelerde hem mezometrial hem de antimezometrial alanda olduğu görülmüştür. Embriyonun ise 8. günde VEGF-mRNA'yı trofoblast dev hücrelerinde biriktirdiği gözlemlenmiştir. Çıkan sonuçlar VEGF'nin, implantasyon sırasında uterusu meydana gelen artmış vasküler geçirgenlik ve/veya anjiyogenesize katıldığını, dahası trofoblast ayırımında ve istilada, ayrıca desidualizasyon ve plasentasyonda yer aldığını düşündürmektedir (15).

Zhang ve arkadaşları VEGF'nin fare embriyosunda "implantasyon penceresindeki" ekspresyonunu ve fonksiyonunu immunfloresans tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmacılar, gebeliğin 4. günündeki fare uterus kornusu içerisine VEGF antikoru enjekte edip 8. günde implante olmuş embriyo miktarını ve epitel hücre blastosistin yapışma yüzdesini kontrol grubu ile karşılaştırmışlar ve VEGF enjeksiyonunun, implante olan embriyo miktarını ve blastosistin uterus epitel hücrelerine yapışma yüzdesini kontrol grubuna göre önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Bu bulgular VEGF'nin fare embriyo implantasyonu için gerekli sitokinlerden biri olduğunu göstermiştir. Buna bağımlı olarak maternal-fetal etkileşimini düzenlemek ve blastosist implantasyonunu kolaylaştırmak için arabulucu olarak görev yapabileceği düşünülmüştür (86).

Karuri ve arkadaşları sıçan uterusunun erken proöstrus, proöstrus, östrus ve diöstrus aşamalarındaki VEGF ekspresyonunu, in situ hibridizasyon, immunohistokimya ve Western Blot analiz teknikleri ile incelemişlerdir. İn situ hibridizasyon tekniği ile VEGF-mRNA ekspresyonunun, proöstrus sırasında uterus lümen epiteli ile sınırlı olduğu, ancak östrus süresince stromal bölmeye kayırıldığı gösterilmiştir. Immunohistokimyasal boyama tekniği ile immunreaktif VEGF

proteini esas olarak lümen epitelinde ve kısmende östrus siklusunun değişik evrelerindeki bez epitelinde tespit edilmiştir. Stroma ve myometriyumda hiçbir boyanma tespit edilmemiştir. Lümen epitelindeki boyanmanın erken proöstrus ve proöstrus sırasında daha hafif, östrus siklusunun daha sonraki bölümlerinde ise azaldığı gözlemlenmiştir. Diöstrus sırasında uterus endometriyumunun herhangi bir bölümünde VEGF proteininin boyanması saptanmamıştır. Western Blot analizine göre ise uterustaki VEGF proteininin, erken proöstrus ve proöstrus sırasında saptandığı ve östrus evresi sırasında maksimum seviyeye yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, VEGF-mRNA'sının östrus siklusu sırasında sıçan endometriyumunun farklı kompartımanlarında ekspre edilebileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca proöstrus ve östrus ile ilişkili olaylar VEGF için mRNA sentezini başlatabileceği düşünülmüştür (41).

VEGF'ler spesifik olarak VEGF reseptör-1, 2, 3 gibi alıcılarla etkin hale gelir (71). VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'yi aktive ederek anjiyogenesizi ve vasküler geçirgenliği düzenler. VEGF-C / VEGF-D ve bunların reseptörü olan VEGFR-3 çoğunlukla lenfanjiyogenesizi düzenler (69). Gen hedefleme çalışmaları her 3 VEGFR geninin embriyonik vaskülarizasyonun normal gelişimi için esansiyel olduğunu göstermiştir. Ancak bu üç reseptörün endotel hücre çoğalması ve farklılaşmasındaki rolleri birbirinden farklı gibi düşünülmektedir. VEGFR-1 ve VEGFR-1 açısından eksik olan fareler embriyo halinde iken 8.5 -9.5. günler arasında ölmüştür. Embriyonik alanlarda endotel hücreler gelişmiş ancak bu hücreler normal vasküler yapıda gelişim göstermemiştir. VEGFR-3 açısından eksik olan fareler embriyo halinde iken 9.5. günde ölmüştür. Bu farelerde vaskülogenezis ve anjiyogenesiz gerçekleşmiş fakat kalp yetmezliği şekillenmiştir (12).

VEGF, ovaryum, uterus ve embriyoda aktiftir ve bu yapıların herhangi birinde VEGF fonksiyonunun inaktivasyonu normal gebelik gelişimini engelleyebilir. Buna bağlı olarak, Douglas ve arkadaşları desidual anjiyogenesizin, VEGF reseptörleri aracılığıyla hareket eden VEGF tarafından düzenlendiğini ve farelerde erken gebelik sırasında rol oynayan VEGFR-2'nin önemini immunohistokimya ve immunfloresans tekniği ile araştırmıştır. Bu çalışmaya göre, VEGFR-2, 3,75. gebelik haftasında spesifik antikörlerle bloke edildiğinde desidual

anjyogenez ve hücre çoğalması önemli ölçüde azalmıştır. Gebeliğin 6.günü 6,5. saatte VEGFR-2'ye karşı antikörlerin uygulanmasının embriyo gelişimi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Dolayısıyla farelerde implantasyon öncesi dönemde anjyogenezin esas olarak, VEGF ve VEGFR-2 ile düzenlendiği gözlemlenmiştir. Dahası bu süre zarfında anjyogenezisteki bozuklukların, VEGF'nin VEGFR-2'ye bağlanmasından sonra başlatılan sinyal yollarının işlev bozukluğuyla ilgili olduğu düşünülmüştür (20).

Ovariectomize edildikten sonra östrojen ve progesteron verilmek suretiyle maymunlarda yapılan bir araştırmada, suni menstrual siklus oluşturdukları endometriyumda VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2 mRNA ekspresyonunu değerlendirmek üzere in situ hibridizasyon tekniğini kullanmışlardır. Proliferatif endotel hücreleri, KI-67 antijenini ve willebrand faktörünü saptayan çift immunohistokimya prosedürü ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler VEGF ekspresyonunun erken proliferatif fazda lümen epitelinde, orta proliferatif fazda stromada, geç sekretor fazda bezlerde arttığını göstermiştir. Menstruasyonu başlatmak için progesteronun çekilmesinden (adet öncesi) bir ve iki gün sonra VEGF mRNA seviyesinin, endometriyal bölgedeki bezler ve stromada arttığı görülmüştür. Bu VEGF'nin menstrual siklusta rol oynayabileceği yönündeki öneriyi desteklemiştir. Postmenstrual onarım evresi sırasında iyileşen yüzey epitelinin hemen altındaki küçük damarlarda VEGFR-1 ve VEGFR-2 sinyallerinin güçlü artışı ile birlikte, VEGF mRNA ekspresyonunda çarpıcı bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre endometriyum iyileşmesi ve rejenerasyon ile ilişkili erken anjyogenik süreçlerde VEGF'nin etkili olduğu düşünülmüştür (54).

Sugino ve arkadaşları VEGF ve reseptörleri (fms benzeri tirozin kinaz (flt-1) ve kinaz ekleme alanı içeren bölge (KDR)) için gebeliğin erken dönemlerinde abort yapan kadınların, östrojen ve progesteron verilen hastaların, normal menstrual siklusta olup myom varlığından dolayı hysteroktomi yapılan hastaların endometriyumunu immunohistokimya tekniği kullanarak araştırmışlardır. Orta salgılama evresinde VEGF immun boyamasının hem bez epiteli hemde stromal hücrelerde en yüksek yoğunlukta olduğu, boyama yoğunluğunun premenstrual evrede azaldığı, östrojen ve progesteron alan hastalarda desidualizasyon ile birlikte

stromal hücrelerde ve erken gebeliğin desidual hücrelerinde güçlü olduğu gözlemlenmiştir. Tüm bu sonuçlara göre VEGF ve reseptörlerinin implantasyonda, vasküler permeabilite artışında gebeliğin devamında ise desiduada vasküler ağ oluşumunda önemli rol oynayabileceği öngörülmüştür (72).

Akbalık ve arkadaşları VEGF ve reseptörleri ile vasküler endotelial büyüme inhibitörünün (VEGI) fizyolojik rollerini daha iyi anlamak için, immunohistokimya tekniğini kullanarak anöstrus sıçan uterusunda bu faktörlerin hücresel lokalizasyonunu araştırmıştır. Anöstrus süresince sıçan uterusunda lümen ve bez epitel hücreleri, stroma ve düz kas hücreleri ile damarların endotel ve düz kas hücrelerinin VEGF ve reseptörleri ile pozitif immunreaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak VEGF ve reseptörleri ile VEGI'nin olası bir genital siklus hazırlığında fonksiyonel bir role sahip olabileceği belirlenmiştir (3).

Sıçan uterusunun doğum sonrası involusyon periyodunda büyüme faktörlerinin, anjiyojenik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir. Bununla ilgili olarak Sağsöz ve arkadaşları postpartum involusyon periyodu sırasında, sıçan uterusunda, VEGF reseptörleri ve ligandlarının ekspresyonunu, immunohistokimyasal yöntem ile araştırmıştır. VEGF immunreaktivitesinin postpartum'un 1, 3 ve 5. günlerinde lümen epitel hücrelerinin apikal zarında kuvvetli olduğu ve bu hücrelerin sitoplazmik boyama yoğunluğunun, glandular epitel ve stroma hücrelere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir ve devamında postpartum 10-15 günlerinde de benzer olduğu fakat postpartum ilerledikçe azaldığı öne sürülmüştür. Buna bağlı postpartum sırasında stromal hücrelerdeki ve kan damarlarındaki VEGF ve reseptörlerinin varlığı, farenin uterusunda stromal tamir ve anjiyogenesizin düzenlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmüştür (64).

VEGF geni hem insanlarda hemde farelerde birkaç VEGF izoformu üretir. VEGF<sub>121</sub> ve VEGF<sub>165</sub> insandaki en baskın izoformken VEGF<sub>120</sub> ve VEGF<sub>164</sub> farelerde baskındır (46). Örneğin Halder ve arkadaşları VEGF<sub>164</sub>'ün fare uterusunda baskın izoform olup olmadığını, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği ile araştırmıştır. VEGF<sub>164</sub> mRNA birikiminin primer olarak gebeliğin 1. ve 2. günlerinde epitel hücrelerinde meydana geldiği, 3. ve 4. günlerde epitel

hücrelere ilaveten subepitelyal stromada da mRNA birikimi yaptığı gözlemlenmiştir. VEGF<sub>164</sub> mRNA birikimi 5. günde ilk bağlanma tepkimesinden sonra blastosisti çevreleyen lümen epiteli ve stromal hücrelerde, 6. ve 8. günlerde ise hem mezometriyal hemde anti mezometriyal alandaki desidual hücrelerde gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre VEGF<sub>164</sub>'ün implantasyon ve desidualizasyon sırasında uterusu vasküler değişikliklere ve anjiyogenesize aracılık ettiği kanıtlanmıştır (36).

VEGF-A farelerde erken gebelik sırasında endometriyal vaskülariteyi yeniden modellendirmeye aracılık eder. Örneğin farelerin bir model olarak kullanıldığı çalışmada erken gebelik sırasında fare uterusundaki VEGF-A izoformları ve reseptörlerinin ekspresyonu Western blot analizi ve immunohistokimya teknikleri ile ölçülmüştür. VEGF<sub>120</sub> ve VEGF<sub>164</sub> izomerleri için en düşük mRNA ekspresyonu gebeliğin 2. gününde gözlenirken, VEGF<sub>120</sub>'nin gebeliğin 2. ve 3. günlerinde önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir. VEGF-A ve VEGF<sub>164</sub> mRNA seviyelerinde gebeliğin 4. gününe kadar önemli bir artış gözlenmezken, 5 günde yükseldiği görülmüştür. Seçilen izoform ekspresyonunun endometriyal endotel hücre çoğalmasıyla eş zamanlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışın implantasyona hazırlık sağlamak üzere artan endometriyal anjiyogenesiz için gerekli olduğu ve VEGF-A'nın implante olan blastosist etrafında meydana gelen vasküler yenilenmeyi düzenlediği öne sürülmüştür (77).

Son yıllardaki çalışmalar incelendiğinde, yapılan çalışmaların çoğunluğunun VEGF reseptörleri ve mRNA düzeyinde genellikle östrus siklusu boyunca olduğu gözlenmiştir. VEGF ekspresyonunun gebe sıçan dokularındaki immunlokalizasyonuna ilişkin çok az çalışma mevcuttur. Bu alandaki çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla yapmış olduğumuz çalışmamızda, gebeliğin erken dönemlerinde (0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde) sıçan uterus dokusunda VEGF immunreaksiyonunu araştırdık ve gebeliğin ilk üç gününde immunreaksiyonun uterus lümen ve bez epitellerinde, özellikle sitoplazmada, subepitelyal ve az miktarda endometriyal stromada, kapiller duvarında ve myometriyumda lokalize olduğunu ve 5. günde ilk bağlanma reaksiyonunun başlamasıyla beraber immunreaksiyonun anti mezometriyal alandan mezometriyal alana doğru primer desidual reaksiyon alanına

yayıldığını gözlemledik. Primer desdual reaksiyon alanındaki VEGF reaksiyonu gebeliğin 7. gününden itibaren mezometriyal alana doğru sekonder desdual reaksiyon alanında da belirginleşmişti.

Çalışmamızın sonunda, tüm bu bulguların ışığında geçmiş raporlarda da belirtildiği gibi, vaskülojenesis sürecinde önemli rol oynayan VEGF'nin gebeliğin erken dönemlerinde sıçan uterus dokusunda vasküler değişiklik ve anjiyogenesis sürecinde etkili olarak, preimplantasyon, implantasyon ve desidualizasyon sürecinde rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile gebeliğin erken dönemlerinde sıçan uterus dokusunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'nün (VEGF) ekspresyonu immunohistokimyasal teknik ile araştırılarak erken gebelikteki etkileri hakkında yeni bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde alınan uterus doku örneklerinde VEGF immun boyaması yapılmıştır.

Quantitatif sonuçlar elde etmek üzere sonraki çalışmalarımızda Western Blot ile destekleyebileceğimiz bulgularımız; VEGF'nin erken gebelik esnasında uterus dokusundaki immun ekspresyonunu, bu büyüme faktörünün preimplantasyon, implantasyon ve desidualizasyon sürecinde meydana gelen vasküler değişiklikler ve anjiyogeneziste etkili olabileceğini göstermektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Achen MG, Stacker SA** (1998): The VEGF family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int Exp Path.*, **79**, 255-265
2. **Akalın D** (2016): Gebeliğin erken dönemlerinde sıçan uterus dokusunda heparin'in matriks metalloproteinaz-2,-9 (MMP-2 ve MMP-9) ekspresyonu üzerine etkisi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi., 9-13
3. **Akbalık ME, Saruhan BG, Topaloğlu U, Ketani MA, Kılınc M, Sağsöz H** (2016): Anöstrus süresince sıçan uterusunda vasküler endotel büyüme faktörü ve reseptörleri ile vasküler endotel büyüme inhibitörünün dağılımı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, **2(6)**, 83-90
4. **Alarcon VB** (2010): Cell Polarity Regulator PARD6B Is Essential For Trophectoderm Formation in the Preimplantation Mouse Embryo., *Bio of reprod.*, **83**, 347-358
5. **Alon T, Hemo I, Itin A, Peer J, Stone J, Keshet E** ( 1995): Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.*, **1**, 1024-1028
6. **Anonim**: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:VEGF\\_receptors.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:VEGF_receptors.png) 25.09.2016
7. **Anonim**:<http://www.creativebiomart.net/pdf/VEGFA-47M,VEGFA.pdf> 26.02.2016
8. **Anonim**:<https://www.biooncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/vegf/vegf-tumor-angiogenesis.html> 25.09.2016
9. **Arıcan M, Çalım KD** (2004): Köpek artritlerinin oluşumunda enzimlerinin rolü ve sağaltımına yeni bir bakış II: Matriks Metalloproteinazları, Etki Mekanizmaları, Metalloproteinaz inhibitörleri. *Vet Bil Derg.*, **20 (1)**, 77-83.
10. **Atabekoğlu CS, Engin Y,Üstün Y, Aytaç R** (2002): Üreme fizyolojisi ve adhezyon molekülleri. *Ankara Üni Tıp Fak Mecm.*, **55**, 85-92
11. **Bahar L, Baykal T** (2008): Endometriyal Reseptivitenin İmplantasyondaki Rolü. *Mersin Üniv Sağ Bil Derg.*, **1(2)**, 1-6



12. **Bayhan A** (2013): Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü'nün Yara İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi., 27-48
13. **Bikfalvi A** (2004): Recent Development in the Inhibition of Angiogenesis: Examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharm.*, **68**, 1017-21
14. **Brosens J, Gellersen B** (2006): Death or survival-progesterone-dependent cell fate decision in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol.*, **36**, 389-398.
15. **Chakraborty I, Das SK, Dey SK** (1995): Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the Mouse uterus around the time of implantation. *J of Endocrinol.*, **147**, 339-352
16. **Clauss M** (2000): Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost.*, **26**, 561-569
17. **D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD** (2007): Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Bio Reprod.*, **77** (3), 433-41
18. **Demir R** (1995): *İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi*, Palme Yayınevi, Ankara, s:78-118.
19. **Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S** (2002): The molecular of angiogenesis. *Intern Rev Immunol.*, **21**, 33-49
20. **Douglas NC, Tang H, Gomez R, Pytowski B, Hicklin DJ, Sauer CM, Kitajewski J, Sauer MV, Zimmermann RC** (2009): Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Endocrinol.*, **150**(8), 3845-3854
21. **Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F** (1999): Embryo-Maternal Interactions at the Implantation Site: A Delicate Equilibrium. *Europ J of Obst & Gyn and Reprod Bio.*, **83**(1), 85-100.
22. **Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM** (1999): Vascular permeability factor/ Vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **237**, 97-132

23. **Elter K, Oral E** (2000): İmplantasyon fizyolojisi ve implantasyonu etkileyen faktörler. *Obst ve Jinekolojî Sürekli Eğit Derg.*, **4**, 48-63
24. **Ergüler G, Demir N, Demir R** (2002): Adezyon moleküllerinin yapısal özellikleri ve fonksiyonları. *T Klin Tıp Bilimleri.*, **22**, 313-327
25. **Erol N** (2007): Vasküler endotelial Büyüme Faktörü ve Anti-VEGF Ajanlar. *Eskişehir Osmangazi Üni Göz Hast.*, **15**, 35-40
26. **Feng D, Nagy J, Hipp J, Dvorak H, Dvorak A** (1996): Vesiculo-Vacuolar Organeller and The Regulation of Venule Permeability to Macromolecules by Vascular Permeability Factor, Histamin and Serotonin. *J Exp Med.*, **183**, 1981-1986
27. **Ferrara N** (2001): Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Regulation of Physiological Angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **280**, 1358-1366.
28. **Ferrara N** (2004): Vascular Endothelial Growth Factor As A Target For Anticancer Therapy. *The Onco.*, **9(1)**, 2-10
29. **Ferrara N** (2009): Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **29**, 789-791
30. **Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J** (2003): The biology of VEGF and its Receptors. *Nat Med.*, **9**, 669-676
31. **Fitzgerald JS, Poehlman TG, Schleussner E, Market UR** (2008): Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update.*, **14**, 335-344
32. **Gellersen B, Brosens J** (2006): Cyclic Amp and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Mol Endocrinol.*, **36**, 389-398.
33. **Gellersen B, Reinmann K, Samalcos A, Aupers S, Bamberger AM** (2010): Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod.*, **25**, 862-873
34. **Gökçimen A, Temel S** (2004): İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *SDÜ Tıp Fak Derg.*, **11(4)**, 25-33
35. **Güç D** (2004): Adezyon molekülleri. *ANKEM Derg.*, **18 (Ek 2)**, 158-163

36. **Halder JB, Zhao X, Soker S** (2000): Differential expression of VEGF isoforms and VEGF (164) – specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF (164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis J Genet Dev.*, **26**, 213-224
37. **Harem İŞ** (2013): Trofoblastların Yapısal Özellikleri. *Harran Üni Vet Fak Derg.*, **2(1)**, 48-53
38. **Harem İŞ, Karadağ Sarı E, Koçak Harem M, Sözmen M** (2013): Bildircin (Coturnix Coturnix Japonica) Oviduktunda Fibroblast Büyüme Faktörü-2 ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Ekspresyonu. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, **2(1)**, 6-11
39. **Johnson M, Everitt B** (1988): *Essential Reproduction*. Blackwell Sci Pub., s: 171-285
40. **Kaloğlu C** (2000): Sıçan İmplantasyonunda Decidualizasyon ve Ekstrasellüler Matriks Değişiklikleri: Histokimyasal, İmmünohistokimyasal ve Ultrastrüktüel Bir Çalışma. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi., 12-26
41. **Karuri AR, Kumar AM, Mukhopadhyay D** (1998): Differential expression and selective localisation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. *Socie of Endocrinol.*, **159**, 489-499
42. **Lam PM** (2004): The role of Vascular Endothelial Growth Factor as a Regulator of Secretion in the Human Oviduct. The Chinese university of Hong Kong Doctora thesis., 28-33
43. **Lecouter J, Lin R, Ferrara N** ( 2004): EG-VEGF: a novel mediator of endocrine-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Ann N Y Acad Sci.*, **1014**, 50-57
44. **Makrigiannakis A** (2007): Mechanisms of implantasyon. *Reprod Biomed Online.* **14**, 102-109
45. **Marikawa Y, Alarcon VB** (2012): Creation of trophectoderm, the first epithelium, in Mouse preimplantation development. *Mouse Develop Springer Berlin Heidelberg.*, **55**, 165-184

46. **Matsumoto H, Sato E** (2006): Uterine angiogenesis during implantation and decidualization in mice. *Reprod Med and Bio.*, **5**, 81-86
47. **Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marme D, Birnbaum D** (1996): Assignment of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PGF) Genes to Human Chromosome 6p12 and 14q24-q31 Regions Respectively. *Genomics.*, **32**, 168-169 1983
48. **McConnell JM, Johnson MH** (2004): Lineage allocation and cell polarity during Mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.*, **15**, 583-597
49. **McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT** (2006): *Veterinary Embryology (Veteriner Embriyoloji)*. Çeviren: Çelik İ, Öznurlu Y, Medipres Yayıncılık, Malatya, 20-86
50. **McLaren J** (2000): Vascular endothelial growth factor and endometrial angiogenesis. *Hum Reprod Update.*, **6**, 45-55
51. **Moore KL, Persaud TVN** (1993): *The Urogenital System. The Developing Human*, WB Saunders Company., 265-303
52. **Moore KL, Persaud TVN** (2009): *Before We Are Born (Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri)*. Çeviren: Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F, 7. Baskı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, s:23-26
53. **Mutluay D, Öner J, Öner H** (2015): Examination in the Light Microscopical bir Level of the Changes Occurring in the Rat Uterus Tissue during Preimplantation. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, **3(2)**, 43-53
54. **Nayak NR, Brenner RM** (2002): Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *The J of Clinic Endocrinol&Metabolism.*, **87(4)**, 1845-1855
55. **Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M** (1994): Vascular Endothelial growth factor, platelet- derived growth factor and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol.*, **145**, 1023-1029
56. **Ochoa AL, Mitchner NA, Paynter CD, Morris RE, Ben-Jonathan N**(2000): Vascular endothelial growth factor in the rat pituitary: differential distribution and regulation by estrogen. *J of Endocrinol.*, **165**, 483-492
57. **Ortega N, Faqih FE, Plouet J** (1998): Control of VEGF Angiogenic Activity By The Extracellular Matrix. *Biol Cell.*, **90**, 381-390

58. **Öner H, Öner J, Demir R** (2006): Expression of nidoges in rat uterus and embryo during decidualization and implantation. *J of Morph.*, **267**, 822-830
59. **Özfiliz N, Erdost H, Zık B** (2010): *Veteriner Embriyoloji*. Editör: Özer A, 4. Baskı, Nobel Basım Evi, Ankara, s:27-117
60. **Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G** (1997): VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem.*, **272**, 7151-7158).
61. **Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H** (1995): Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insülin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod.*, **52**, 609-615.
62. **Robinson CJ, Stringer SE** (2001): The splice variants of vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Their Receptors. *J Cell Sci.*, **114**, 853-865
63. **Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM** (1990): A POU- domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature.*, **345**, 686-692
64. **Sağsöz H, Liman N, Alan E** (2015): Ekspression of Vascular Endothelial growth factor receptors and their ligands in the rat uterus during the postpartium involution period. *Bio & Histochem.*, **90(5)**, 361-374
65. **Sağsöz H, Liman N, Küçükaslan İ, Saruhan BG** (2013): Immunolocalization of Vascular Endothelial Growth Factor, İts Receptors (flt 1/fms, flk1/KDR, flt4) and Vascular Endothelial Growth İnhibitor İn the Bitch Uterus During the Sexual Cycle. *Anim Reprod Sci.*, **140**, 241-254
66. **Schafer-Somi S, Sabitzer S, Klein D, Reinbacher E, Kanca H, Beceriklisoy HB, Aksoy OA, Küçükaslan I, Macun HC, Aslan S** (2013): Vascular endothelial (VEGF) and epithelial growth factor (EGF) as well as platelet-activating Factor (PAF) and receptors are expressed in the early pregnant canine uterus. *Reprod Dom Anim.*, **48**, 20-26
67. **Schlafke S, Weish AO, Enders AC** (1985): Penetration of the Basal Lamina of the Uterina Luminal Epithelium During İmplantation in the Rat. *The Anat Record.*, **212**, 47-56

68. **Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML** (1995): Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1 Deficient Mice. *Nature.*, **376**, 62-66
69. **Shibuya M** (2011): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis. *Genes&Cancer.*, **2(12)**, 1097-1105
70. **Sposito DR, Santos Jr AR** (2011): Histochemical Study of Early Embryo Implantation in Rats. *Int J Morphol.*, **29(1)**, 187-192
71. **Stuttfeld E, Hofer KB** (2009): Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life.*, **61(9)**, 915-922
72. **Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H** (2002): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction.*, **123**, 379-387
73. **Thomas KA** (1996) : Vascular Endothelial Growth Factor, A Potent and Selective Angiogenic Agent. *J Biol Chem.*, **271**, 603-606
74. **Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA** (1991): The Human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.*, **266**, 11947-11954
75. **Turgut B, Güler M, Demir T, Türkçüoğlu P, Çeliker Ü** (2007): Oküler Anjiyogenezde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün Rolü. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol.*, **16**, 38-46
76. **Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G** (1996): Assignment of the vascular endothelial growth Factor gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation.*, **93**, 1493-1495
77. **Walter LM, Rogers PAW, Girling JE** (2010): Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms in the Mouse uterus during early pregnancy. *Reprod Bio Onl.*, **21**, 803-811
78. **Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ, Zimonjic DB** (1996): Localization of The Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene, At Chromosome 6p12. *Hum Genel.*, **97**, 794-797

79. **Westwood FR** (2008): The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Tox Path.*, **36**, 375- 384
80. **Yancopoulos GD, David S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J** (2000): Vascular- Specific Growth Factors and Blood Vessel Formation. *Nature.*, **407**, 242-248
81. **Yazır Y** (2007): Vasküler Endotelyal büyüme faktörü (VEGF): reseptörleri ve Fonksiyonları. *Cumhuriyet Üni Tıp Fak Derg.*, **29(3)**, 128-136
82. **Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalçık H** (2004): Endotel hücreleri İçin Önemli Bir Protein ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *Cumhuriyet Üni Tıp Fak Derg.*, **26(4)**, 181-184
83. **Yi XJ, Jiang HY, Lee KKH, Tang PL, Chow PH** (1999): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster. *Cell Tissue Res.*, **296**, 339-349
84. **Yoshinaga K** (1988): Uterine receptivityfor blastocyst implantation. *Annal NY Acad Sci.*, **541**, 424-431
85. **Zachary I** (1998): Molecules in Focus Vascular Endothelial Growth Factor. *Int J Biochem Cell Biol.*, **30**, 1169-1174
86. **Zhang J, Wang Li, Cai L, Cao Y, Duan E** (2001): The Expression and Function of VEGF at Embriyo İmplantation “Windiw” in the Mouse. *Chinese Sci Bulletin.*, **46**, 409-411
87. **Zhao YG, Xiao AZ, Cao XM, Zhu C** (2002): Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy. *Mol Reprod Develop.*, **62**, 149-158.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı:** Büşra ŞEN YAMAN

**Doğum Yeri ve Yılı:** Burdur-Merkez / 26.02.1990

**Medeni Hali:** Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Uyruğu:** T.C.

**Telefon No:** 0554 941 85 22

**Elektronik Posta:** vetbusrasen@hotmail.com

**İletişim Adresi:** Şirinevler Mahallesi 39024.Sokak No:11  
Daire:1 Merkez - BURDUR

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):**

**Lisans:** Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi 2014

