



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİĞİN ERKEN DÖNEMLERİNDE SIÇAN UTERUS
DOKUSUNDA HEPARİN BAĞLAYICI EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ'NÜN (HB-EGF) EKSPRESYONU**

Sinem PEKŞEN

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 HEPARİN BAĞLAYICI EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ'NÜN (HB-EGF) EKSPRESYONU**

Sinem PEKŞEN

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 0280-YL-16 numaralı yüksek lisans projesi ile desteklenmiştir.

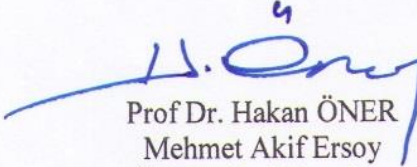
BURDUR-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

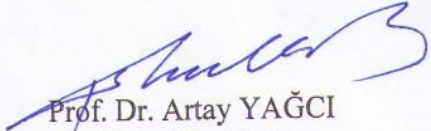
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Sinem PEKŞEN tarafından *Prof. Dr. Hakan ÖNER* yönetiminde hazırlanan "*Gebeliğin Erken Dönemlerinde Siçan Uterus Dokusunda Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü'nün (HB-EGF) Ekspresyonu*" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:12/01/2018


Prof Dr. 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 5.02.18 Tarih ve 8 Sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

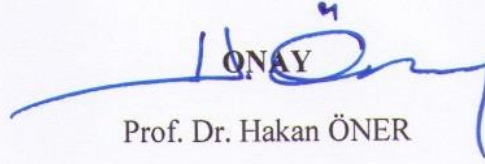
Yüksek lisans eğitimimde araştırmalarım boyunca benden yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hakan ÖNER'e, laboratuvar ve tez yazım aşaması boyunca sabırla birebir ilgilenen hocam Prof. Dr. Jale ÖNER'e, yüksek lisans eğitimim boyunca yardım ve görüşlerine başvurduğum diğeri Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, deney hayvanları kullanımı sırasında bana yardımcı olan biyolog ve veteriner hekim arkadaşlarıma ve her zaman maddi manevi olarak arkamda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

“Gebeliğin Erken Dönemlerinde Sıçan Uterus Dokusunda Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü'nün (HB-EGF) 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 olmadığı beyan ederim.

12/ 01/2018

Sinem PEKŞEN



Prof. Dr. Hakan ÖNER

Danışman

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Memelilerde Embriyonal Gelişim	3
2.1.1. Zigotun Yarıklanması	3
2.1.2. Morula	3
2.1.3. Blastosist	4
2.2. İmplantasyon	5
2.2.1. İmplantasyon Tipleri	6
2.2.2. İmplantasyonun Oluş Mekanizmaları	6
2.3. Östrus Siklusu ve İmplantasyon Sırasında Endometriyumun Özellikleri	9
2.4. İmplantasyonda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	10
2.4.1. Hücre Adezyon Molekülleri	10
2.4.2. Musinler (MUC)	12
2.4.3. Sitokinler	12
2.4.4. Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF)	12
2.4.5. Lökemi İnhibitör Faktör (LIF) Faktörü	12
2.4.6. Vasküler Endotelyal Büyüme (VEGF)	12
2.4.7. Transforming Büyüme Faktörü β (TGF- β)	12

2.4.8. Siklooksijenazlar (COX)	13
2.4.9. Prostaglandinler	13
2.4.10 Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	13
2.5. Desidualizasyon	14
2.6. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Ailesi Ve Reseptörleri	15
2.7. Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF)	19
2.7.1. HB-EGF Tanımı	19
2.7.2. HB-EGF Geni	20
2.7.3. Rekombinant HB-EGF	20
2.7.4. Transmembran HB-EGF	20
2.7.5. Mature HB-EGF (Olgun HB-EGF)	20
2.7.6. HB-EGF'nin Biyolojik Aktivitesi	21
2.7.7. Gebeliğin Erken Dönemlerinde HB-EGF'nin Rolü	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. İmmunohistokimyasal Prosedür	25
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	44
8. ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Zigotun Yarıklanması ve Blastosist Oluşumu	4
Şekil 2.2.	İmplantasyon Aşamaları	8
Şekil 2.3.	İmplante olmuş blastosist de bazı büyüme faktörlerinin ve hormonların etkisinin şematik gösterimi	13
Şekil 2.4.	EGF'nin Kimyasal Yapısı	15
Şekil 2.5.	EGF reseptörlerinin alt tiplerinin DNA yapısı	17
Şekil 2.6.	HB-EGF DNA yapısı	19
Şekil 2.7.	Gebeliğin Erken Dönemleride HB-EGF	23
Şekil 4.1.	Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.	30
Şekil 4.2.	Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; Siyah ok: Kapillar. X400.	30
Şekil 4.3.	Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; ES: Endometriyal stroma; Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.	31
Şekil 4.4.	Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; Siyah ok: Kapillar. X400.	31
Şekil 4.5.	Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.	32
Şekil 4.6.	Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum; Kırmızı ok: Bez epiteli. X400.	32
Şekil 4.7.	Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. PDR: Primer desidual reaksiyon alanı; Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.	33
Şekil 4.8.	Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.	33
Şekil 4.9.	Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. PDR: Primer desidual reaksiyon alanı; Siyah ok: Kapillar. X100.	34

Şekil 4.10. Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; PDR: Primer desidual reaksiyon alanı; SDR: Sekonder desidual reaksiyon alanı; Siyah ok: Kapillar; Kırmızı ok: Bez epiteli. X100.

34

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. EGF Ailesi	18
Tablo 3.1. Deney Grupları	24
Tablo 3.2. İmmunohistokimyasal prosedürde kullanılan malzemeler.	26
Tablo 3.3. Sitrat Tampon Solüsyonu (500ml için)	26
Tablo 3.4. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (1000ml için)	26
Tablo 3.5. PBS+ %0,2 Tween 20 solüsyonu (500ml için)	26
Tablo 3.6. PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu (500ml için)	27
Tablo 4.1. Gebe sıçanların uterus dokusunda HB-EGF immunreaktivitesinin gebelik günlerine göre semikuantitatif analizi	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

AR:	Amphiregulin
BTC:	Betacellulin
COX:	Siklooksijenazlar
ECM:	Ekstrasellüler Matriks Proteinleri
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
ErbB:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ES:	Endometriyal Stroma
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
GDF:	Büyüme-Farklılaşma Faktörü
HB-EGF:	Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
Tm HB-EGF:	Transmembran Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
Sol HB-EGF:	Olgun Çözünebilir HB-EGF
hCG:	İnsan koryonik gonadotropini
IGF:	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü
LIF:	Lökemi İnhibitör Faktör
MHC:	Major Histocompatibility Kompleks Molekülleri
MMP:	Matriks Metalloproteinleri
MUC:	Musin
MYM:	Myometriyum
NDF:	Neu Farklılaşma Faktörü
PBS:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDGF:	Trombosit kaynaklı Büyüme Faktörü

PDR:	Primer Desidual Reaksiyon Alanı
SDR:	Sekonder Desidual Reaksiyon Alanı
SES:	Subepitelyal Stroma
TGF-α,β:	Transforming Büyüme Faktörü- α, β
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Yüksek Lisans Tezi
Gebeliğin Erken Dönemlerinde Sıçan Uterus Dokusunda Heparin Bağlayıcı
Epidermal Büyüme Faktörü'nün (HB-EGF) Ekspresyonu
Sinem PEKŞEN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hakan ÖNER
BURDUR-2018
ÖZET

İmplantasyon esnasında blastosistin uterus lümen epiteli ile başarılı bir şekilde kaynaşması, aralarındaki karşılıklı sinyalleşme sonucu gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda bu karşılıklı sinyalleşmede büyüme faktörlerinden Epidermal Büyüme Faktörü ailesinin bir üyesi olan Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü'nün (HB-EGF) rol oynadığı bildirilmektedir. İnsan dahil diğer türlerde kültür ortamında ya da farklı teknikler ile yapılan çalışmalarda, HB-EGF'nin blastosist implantasyonunun hemen öncesinde uterusda ekspre edildiği blastosist yapışmasını, gelişimini ve büyümesini desteklediği kaydedilmiştir. Ancak erken gebelik esnasında HB-EGF'nin sıçan uterus dokusundaki immunekspresyonuna dair bilgiye rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile, gebeliğin erken dönemlerinde sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunekspresyonu araştırılmıştır. Çalışmada gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde sıçanlardan immunohistokimyasal analizler için uterus doku örnekleri toplanmış, HB-EGF immun lokalizasyonları belirlenmiş, elde edilen sonuçlar semiquantitatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda, erken gebelik döneminde sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunekspresyonlarının semiquantitatif olarak ekspre olduğu, bu nedenle de preimplantasyon, implantasyon ve desidualizasyon süreçlerinde önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: erken gebelik, sıçan, uterus, HB-EGF

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje Numarası: 0280-YL-16.

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE
Master of Science Thesis
**“Ekspression of Heparin Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF) in The
Rat Uterina Tissue During Early Pregnancy”**
Sinem PEKŞEN
The Department of Internal Medicine
Supervisor
Prof. Dr. Hakan ÖNER
BURDUR-2018
ABSTRACT

The successful fusion of the blastocyst with the uterine luminal epithelium during implantation results in a mutual signaling between them. It has been reported that the Heparin Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF), a member of the Epidermal Growth Factor family, plays a role in this reciprocal signaling. HB-EGF was expressed in uterus immediately prior to blastocyst implantation and promotes blastocyst adhesion, development and growth, in other species, including humans, in culture or through different techniques. However no information is available about immunexpression in the rat uterine tissue during early pregnancy. With this study, HB-EGF immunexpression was investigated in the rat uterus during pregnancy. Uterine tissue specimens were collected for immunohistochemical analysis from rats on days 0, 1, 3, 5 and 7 of gestation in the study, HB-EGF immunlocalization was determined and the results obtained were evaluated semiquantatively. At the end of the study, it was concluded that HB-EGF immunoexpression in the rat uterus was semiquantitatively expressed during the early pregnancy period and therefore it may play important roles in preimplantation, implantation and decidualization processes.

Key words: early pregnancy, rat, uterine, HB-EGF

This study, was supported by Mehmet Akif Ersoy University Scientific
Research Projects Unit. Project Number: 0280-YL-16.

1. GİRİŞ

Memelilerde gelişim yumurta ile spermin fertilizasyonu ile başlar, blastomerleri oluşturmak için meydana gelen mitotik hücre bölünmeleri ya da yarıklanmalarla devam eder (61). Fertilizasyon ile oluşan zigot ekvatoryal ve meridyonal yönde mitotik bölünmeler geçirir ve blastomer adı verilen hücrelerden ibarettir. Memelilerde animal kutuptan yumru şeklinde blastosöle sarkan blastomer topluluğu embriyoblast olarak isimlendirilir. Blastosölü kuşatan beslenmeyle ilgili olan tek sıralı yassı ektoderm hücreleri trofoblast olarak adlandırılır (39, 41).

Memelilerde blastosistin endometriyuma yapışması, endometriyal epitelin lümenine bakan yüzünde yapışmayı aktive ve inhibe eden faktörlerin etkisi altında gerçekleşir (71). Blastosist aşamasındaki embriyo taslağının, plasentayı oluşturmak üzere kendisini örten zarlar aracılığıyla uterus mukozasına bağlanması olayına **implantasyon** denir (39).

Blastosist trofoblastının uterus lümen epiteline başarılı kaynaşması; endometriyum ve blastosist aşamasındaki normal ve fonksiyonel embriyonun oluşturduğu maternal ve fetal dokular arası bir etkileşim ile gerçekleşir (28, 71).

Blastosist dış tabakası trofoektoderminin uterus lümen epiteli ile etkileşime girmesi ile başlayan implantasyon olayı blastosist ve lümen epiteli arasındaki sinyalleşme ile gerçekleşir. Bu sinyalizasyon, hücrelerden salınan moleküller aracılığı ile oluşabileceği gibi, zara bağlı sinyal molekülleri yoluyla da ortaya çıkabilir. Yapılan çalışmalarda, heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor; HB-EGF)'nin, blastosistin yüzey epiteline bağlanmasından önce salgılandığı, östrojen kontrolü altındaki fare endometriyum epiteli ve progesteronun kontrol ettiği stroma tarafından eksprese edildiği bildirilmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise HB-EGF'nin embriyoların blastosist aşamasına ulaşma ve yerleşme yüzdesini artırdığı, HB-EGF mRNA seviyesinin siklus boyunca sekretuar evrede arttığı, implantasyon aralığının açılmasından hemen önce ise en yüksek seviyede olup ardından düştüğü bildirilmiştir (35).

HB-EGF'nin erken gebelik döneminde özellikle preimplantasyon ve implantasyon dönemindeki mevcudiyeti ve rolüne ilişkin çalışmalar genellikle kültür ortamında, farklı türlerde ya da mRNA seviyesinde olup gebe sıçan uterusundaki immun ekspresyonuna ait çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışması ile erken gebelik dönemlerinde sıçan uterus dokusunda heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörünün (HB-EGF) etkisi immunohistokimyasal teknik ile araştırılarak gebeliğin erken dönemlerindeki etkileri hakkındaki bilgilere katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Memelilerde Embriyonal Gelişim

Canlılarda gelişim, sperm ve oositin döllenmesi sonucu başlayan ve birbirini takip eden olaylar zinciridir. Fertilizasyon sonucu meydana gelen son derece özelleşmiş ve totipotent bir hücre olan zigot, hücre bölünmesi, hücre göçü, programlı hücre ölümü, farklılaşma ve büyüme sonucu çok hücreli organizma yapısına dönüşür (68).

2.1.1. Zigotun Yarıklanması

Organizmadaki hücreler diploid kromozoma sahip olup, haploid kromozom sayısındaki gametlerin fertilizasyonu ile oluşur. Kromozom çiftleri sentromer bölgesinden uzunlamasına ayrılır ve kromatitler, zigotun her hücresi diploid kromozomu içerecek şekilde karşı kutuplara çekilirler. Kromatitlerin bu hareketi esnasında hücre yüzeyinde sitoplazmayı zamanla iki parçaya bölen derin çizgi belirir ve gerçekleşen bölünmeye **yarıklanma** adı verilir (72). Bölünme, döllenmiş yumurta hücresinin sitoplazmadan zengin olan animal kutbunda, kutup hücresine yakın bir yerde başlar ve vejetatif kutupta sonlanır (41). Bir meridyonel, bir ekvatoryal bölünmeler sonucunda birçok küçük kardeş hücre şekillenir, bunlara **blastomer** adı verilir (72).

Birbirini takip eden bölünmeler sonucu 2, 4, 8, 16, 32, 64 vb. çok blastomerli bir hücre kümesi ortaya çıkar (41).

2.1.2. Morula

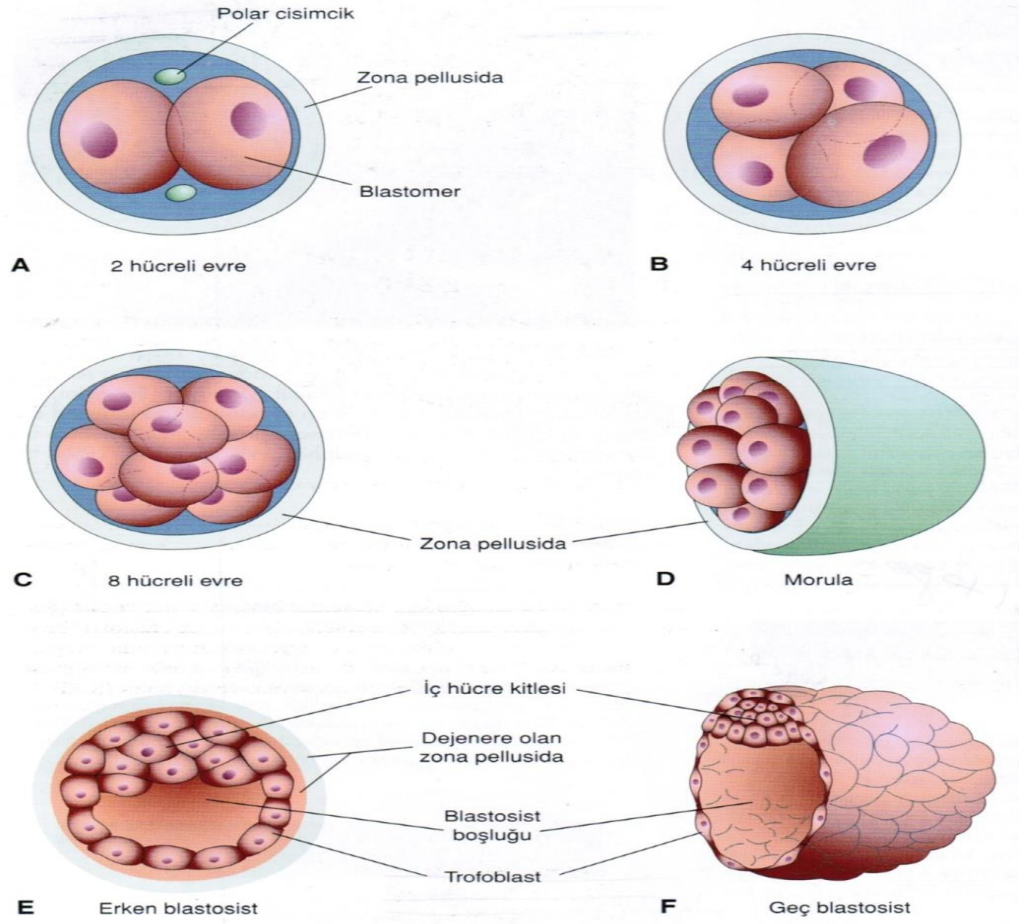
Bölünmeler bir düzen içerisinde devam ederek oldukça sıkı ilişki içerisinde olan hücreler salkım görüntüsüne sahip olurlar ve embriyonun bu dönemi **morula** evresi olarak adlandırılır (72). Farelerde bu evreye fertilizasyondan yaklaşık 60 saat sonra ulaşılır (65). Bu aşamaya kadar hücreler zona pellusida ve korona radiata ile sarılı iken morula aşamasından sonra hücrelerin etrafında sadece zona pellusida mevcuttur (72).

Evcil memeli hayvanlarda yarıklanmanın 4. gününde morula 16-64 hücre içerir. Morulanın hücreleri **kompaksiyon** adı verilen bir olay ile sıkı bir hücre kümesi halini alırlar. Bu evrede iç hücreler dış hücrelerden ayrılarak embriyonun dokularını meydana getirecek olan iç hücre kitlesi ve ilerde plasentayı oluşturacak trofoblastların geliştiği dış hücre kitlesi oluşur (72, 77). Otuz iki hücreli aşamaya ulaşıldıktan sonra embriyoyu oluşturan hücrelerin arasında blastosöl adı verilen ve giderek genişleyen içi sıvı dolu

boşluklar şekillenir ve bu aşamadan itibaren embriyo, **blastosist** olarak isimlendirilir (65).

2.1.3. Blastosist

Döllenmenin yaklaşık birinci haftasında, zigot segmentasyonu ile blastosist adı verilen embriyonik evre meydana gelir (37). Blastosistin oluşumu ile hücrelerin etrafını saran zona pellusida yapısında kaybolur (25). Kemiricilerde blastosistin etrafından zona pellusidanın ayrılması yaklaşık olarak gebeliğin 3,5-4,5. günlerine rastlar (104). Morula evresinde şekillenen iç ve dış hücre kitlesi blastosist aşamasında başkalaşımına devam ederek sırası ile **embriyoblast** ve **trofoblast** tabakalarını oluşturur (53).



Şekil 2.1. Zigotun Yarıklanması ve Blastosist Oluşumu (68).

2.2. İmplantasyon

İmplantasyon, blastosist ve endometriyum arasındaki sinyalizasyon sonucunda endometriyum lümen epiteline blastosistin bağlanmasıyla başlayan, belirgin plasenta oluşumuyla sona eren başarılı bir kaynaşmadır (49, 97). İmplantasyon esnasında, endometriyumdaki epitel hücreler daha da yassılaştır ve mikrovillus sayısı azalır, birçok türde mikrovillusların yerini pinopodlar alır, bazal membran kalınlığı önemli derecede azalır, hücre yüzeyi moleküllerinin dağılımında değişiklikler ortaya çıkar, damarlar genişler, lamina propriyanın yüksekliği hafifçe artar ve uterus bezleri glikoproteinleri salgılar. Embriyoda ise zona pellusida daha ince bir hale gelir ve sonrasında kaybolur. Böylece invaziv özellikteki trofoblast hücreleri ile endometriyum temas haline gelir (39).

Kemiricilerde implantasyon, genellikle gebeliğin 4-6. günlerinde uterusun antimezometriyal kısmında başlar (32, 69) ve zona pellusidanın blastosistten ayrılması (gebeliğin 3.5-4.5. günleri), uterusun lümen epiteli ve embriyonun trofoektodermi arasında bağlanma reaksiyonu (gebeliğin 4.5-5.5 günleri), desidualizasyon, 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 (104).

Trofoblast hücreleri, implantasyon süresi sırasında blastosistin endometriyuma tutunmasından başlayarak gebeliğin sonuna kadar anneden fetüse oksijen ve besinlerin taşınmasıyla diğer işlevlerin yerine getirilmesinde görevli hücrelerdir. Bu işlevler; uterus dokusuna düzenli invazyon, çoğalma, farklılaşma ve immunoendokrin fonksiyonlardır (35). Blastosistin implante olan embriyonik kutuptaki trofoblast hücreleri bağlanma esnasında ve endometriyal epitele invazyondan sonra, süratle çoğalarak çift tabakalı bir trofoblast dizisi oluştururlar. Bunlardan iç tabakadaki tek çekirdekli hücreler sitotrofoblast olarak; sitotrofoblastların çoğalması ve kaynaşmasıyla daha ilerde maternal doku ile direkt olarak yüzleşen, çok çekirdekli, sinsisyal dış tabaka sinsisyotrofoblast olarak isimlendirilir (39). Sinsisyotrofoblastlar çok çekirdekli, hücre sınırları sitoplazmaları birbirine karıştığı için belli değildir ve koryon villus yapısının dış kısmındadır (25). Maternal lakünalar içinde insan koryonik gonadotropini (hCG) salgılamaya başlarlar. HCG gamet gelişimini uyarmakta, zigotun uterus

kavitesine ulaşımını kolaylaştırmakta ayrıca intervillöz aralığa olan kan akımını artırmaktadır (30).

Kemiricilerde invaziv trofoblastlar uterus epitelini ortadan kaldırarak onun yerini alırlar, insanlarda ise sinsityum aracılığıyla uterus duvarı ile kaynaşırlar (25).

2.2.1. İmplantasyon Tipleri

İmplantasyon maternal ve fetal yarımalarının bağlantı türüne göre 3'e ayrılır.

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

Ekzentrik tip implantasyon: Embriyo üzerini örten zarlar ile beraber büyük oranda uterus mukozasına gömülmüştür. Sincaplarda ve kunduzda görülür.

İnterstisiyel tip implantasyon: Gömülme tamamen gerçekleşir ve embriyo uterus mukozası tarafından örtülür. Bu olay nidasyon olarak isimlendirilir. İnsan, karnivor, kemirici ve bazı tür maymunlarda görülür (73).

İntersitisiyel ya da ekzentrik implantasyonda blastosist, mezometriyumun tutunma bölgesiyle aynı taraftaki endometriyuma implante olursa mezometriyal, mezometriyumun tutunma bölgesinin karşı tarafına tutunursa antimezometriyal implantasyon tanımlaması yapılır (66). Kemiricilerde embriyo implantasyonu her zaman desidualizasyonun başladığı antimezometriyal kutupta olur (104).

2.2.2. İmplantasyon Oluş Mekanizmaları

İmplantasyon sırasında, blastosit trofoblastları ile uterus epitelini arasında, diğer bir deyişle embriyo taslağıyla anne arasında ileri derecede fizyolojik ve biyokimyasal etkileşmeler, yapısal farklılaşmalar gerçekleşir. Karşılıklı etkileşme hücresel, hormonal ve tanımlanamayan diğer faktörler düzeyinde olur. Bu süreç içine giren implantasyon olayı türden türe de değişmektedir (25).

İmplantasyon çeşitliliği birçok sebebe dayanmaktadır. Bu sebepler şöyle özetlenebilir:

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 hücresele bir ilişkinin kurulmasıyla fiziksel etkileşme başlamış olur. Bu başlangıcın gerçekleşmesinde, tetik çekici faktör olarak blastosist örtülerinin yapı düzeni, biyokimyasal içerikleri, birbirleriyle ve çevre ile etkileşmelerinin önemi büyüktür. (25).

İmplantasyon, apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarını içeren ardışık üç evrede gerçekleşir.

Apozisyon

Apozisyon, gelişmekte olan embriyonun ovulasyonu takiben 4. günde uterus boşluğuna ulaşarak zona pellusidasını kaybetmesinin ardından implantasyon için uygun yeri seçtiği evredir (26).

Adezyon

Adezyon, fertilizasyon ardından yaklaşık 6. günde blastosistin embriyoblast kutbunun üzerinde yer alan trofoblastik hücrelerin adezyon molekülleri aracılığıyla endometriyumun lümen epiteline tutunduğu evredir (2).

Penetrasyon ve İnvazyon

İnvazyon; trofoblast ve epitelyal hücrelerden salınan laminin, fibronektin ve integrin gibi adezyon moleküllerinin etkileşimleri sonucu gerçekleşen adezyonun ardından, embriyonun endometriyum bazal membranını yok ederek desidual değişimin gerçekleştiği stromaya geçtiği evredir (83).

Hormonal ve mekanik etkenler, genetik faktörler, desidual bariyer hazırlıkları trofoblasta karşı direncin yok olmasını sağlar (25). Penetrasyon ve invazyon faz, memeli türüne göre çeşitlilik gösterebilir;

Yer değiştirerek penetrasyon

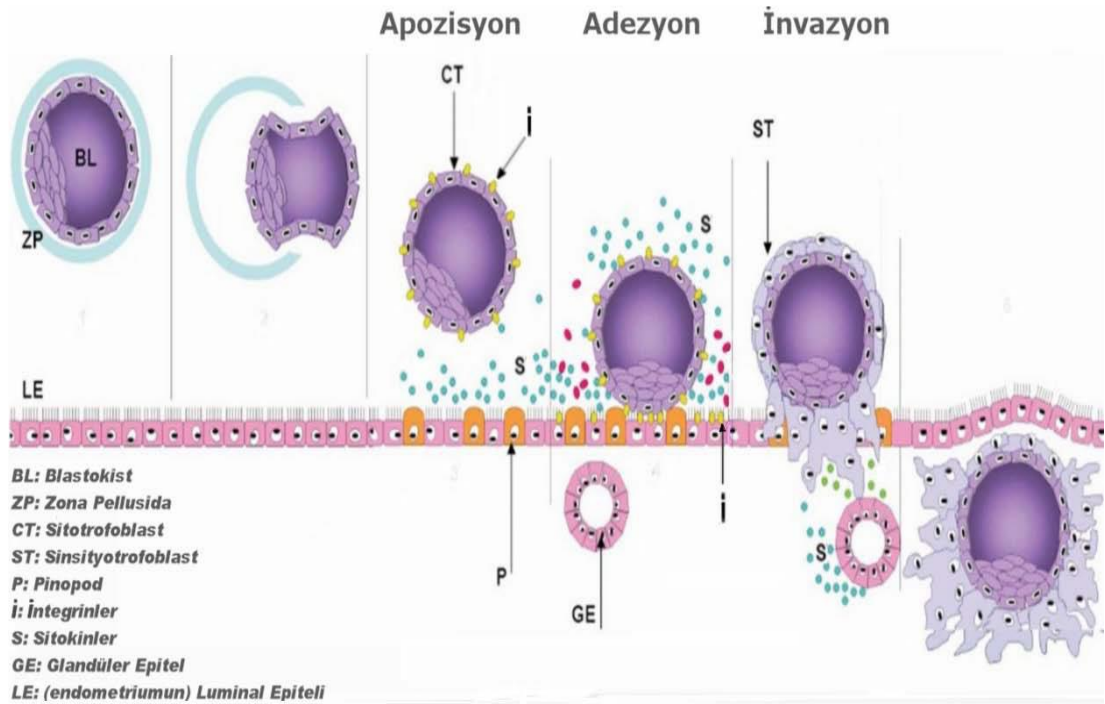
Kemiricilerde gözlenen bu durumda trofoblast hücreleri uterus epitelini ortadan kaldırarak onun yerine geçerler ve sonrasında dejenere olarak bazal laminadan ayrılırlar. Sonuçta bazal laminanın penetrasyonu, trofoblastların etkisi ile değil alttaki desidual hücreler tarafından başlatılır (25).

Kaynaşarak penetrasyon

Kaynaşarak penetrasyon, invasif dokunun hedef noktası, sinsisyum aracılığıyla uterus duvarına kaynaşmasıdır. Tutunan trofoblastın ve uterus epitel hücrelerinin apikal membranları kaynaşarak mikst bir sinsisyum oluştururlar, daha sonra sinsisyum, bazal lamina ve endometriyal bağ dokusuna aktif bir şekilde penetre olur. Sonuçta da maternal kan damarlarını aşındırır. Tavşanda ve insanda görülür (25).

Zorla Penetrasyon

Zorla penetrasyon, uterus epiteli hücreleriyle sinsisyum uzantıları bağlantılar yaparak hücrelerarası aralıklara girer ve epitel hücre aralıklarından oluşan bu yarıkları doldurur. Aynı zamanda trofoblast ve uterus epiteli arasında da yeni bağlantı kompleksleri oluşur. Bu tip implantasyon, endotelyokoriyal tip plasentasyonlarda çok derinleşmez fakat maymunlarda ve insanda gözlenen hemokoriyal plasentasyonlarda derinleşir ve implantasyon şekli insana özgü bir özellik kazanır (25).



Şekil 2.2. İmplantasyon aşamaları (47).

2.3. Östrus Siklusu ve İmplantasyon Sırasında 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 (73). İnsanlarda ise uterus armut şeklinde, kalın duvarlı, kaslı bir yapıya sahip olup, gövde ve serviksten ibarettir (67). 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 (13). 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 sisküler dışta longitudinal seyirli düz kas katmanıdır. Perimetriyum ise, peritonun visseral yaprağından oluşmuş ve bazal membran üzerinde oturmuş mezotel hücrelerinden ibarettir (73).

Sıçanlarda diöstrus başlangıcında uterus küçük ve inaktiftir. Kornular vaskülarizasyon açısından yetersiz ve genellikle yarık şeklinde lümenine sahiptir. Zaman zaman kübik ve silindirik şekilli olan epitel hücreleri dejenerasyon göstererek düzleşir. Başlangıçta mitoz çok azdır ve bezler inaktif durumdadır. Bu fazın ilerlemesiyle beraber bezler aktifleşmeye başlar. Aynı zamanda fazın sonuna doğru endometriyum epiteline bitişik olan stromada hafif bir ödem görülebilir (95).

Proöstrus aşamasında, uterusun endometriyum katmanı epitel hücreleri kübik ve silindirik epitel hücrelerine dönüşmeye başlar. Endometriyumda vaskülarizasyon belirgindir ve stromada proöstrusun sonuna doğru lümenin önemli bir şekilde genişlemesiyle beraber bir miktar ödem görülebilir (95).

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 (95).

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 (95).

Embriyo implantasyonu; fetusun uterus duvarına bağlanmasıyla sonuçlanan bir süreçtir. Embriyo, maternal organizmanın farklı bölge ve yüzeylerine bağlanırken embriyo implantasyonuna izin verdiği implantasyon penceresi adı verilen sadece kısa bir süre zarfında endometriyum içine gömülür. Fare ve sıçanlarda implantasyon penceresi, gebeliğin 4 ve 5. günleri arasındaki yaklaşık 24 saatlik bir döneme tekabül eder. Bu aşamada embriyo invazyonu ve apozisyon bağlanmayı kolaylaştıran progesteron ve östrojen tarafından uyarılan endometriyum morfolojik değişimlere uğrar (82).

Endometriyum, embriyonun invazyonuna izin veren, menstrual siklus ve gebelik süresince değişime uğrayan dört farklı hücre grubu içerir; lümen ve bez epitel hücreleri, çoğu fibroblast olan stromal hücreler, endotel hücreleri ve endometriyuma göç eden immun hücrelerdir. Epitel hücrelerde gerçekleşen morfolojik değişimler embriyonun adezyon sürecine katılırken, stromal hücreler proliferasyon evresindeki östrojen kaynaklı ilk gelişiminin ardından, geç-sekresyon evresinde, progesteronun etkisi altında desidual hücrelere farklılaşırlar (51).

2.4. İmplantasyonda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

İmplantasyon sırasında uterusu etkili olan moleküller; ekstrasellüler matriks (ECM) komponentleri, adezyon molekülleri, siklooksijenazlar, matriks metalloproteinazları (MMP), sitokinler, musinler ve büyüme faktörlerini içerir (13, 19, 82).

2.4.1. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks bağlantısını sağlayan, birbirleri ile veya ekstrasellüler sıvıdaki moleküller ile etkileşim gösteren moleküllerdir (5). Hücrelerin birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde rol oynarlar (36). Hücre adezyon molekül ailesi; integrinler, kadherinler, selektinler ve immunoglobulinlerdir (13).

İntegrinler

İntegrinler; transmembran glikoproteini olup, endometriyal, desidual ve ekstrasitotrofoblast hücrelerinde bulunan, embriyonik gelişmenin hücre-matriks ile hücre-hücre yapışmasını içeren önemli fizyolojik olayların çoğuna katılan adezyon molekülleridir (13, 35).

Kadherinler

Embriyonik dokuların oluşumu ve stabiliteleri için gerekli, hücreler arası moleküllerdir (87). Kadherinler üzerinde buldukları dokulara göre isimlendirilirler (7, 56).

E-kadherinler: Epitel hücresinde

P-kadherinler: Plasentada

V-kadherinler: Endotel hücrelerinde

N-kadherinler: Nöral dokularda ve kas hücrelerinde

H-kadherinler: Kalp kasında tanımlanırlar (3).

Selektinler

Selektinler; lökositler ve endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan transmembran glikoproteinleridir (84).

Selektinler de üzerinde buldukları dokulara göre isim alırlar (3).

L-selektinler: Lökositlerde bulunarak endotel hücresindeki ligandı ile etkileşirler (27).

E-selektinler: Endotel hücre yüzeylerinde bulunarak lökositlerin gevşek olarak endotele tutunmasını sağlarlar (84).

P-selektinler: Endotel hücreleri ve trombositler üzerinde bulunurlar (3, 46).

İmmunglobulinler

Plazma hücreleri tarafından salgılanırlar ve endometriyumun hem stroma hem de epitel hücrelerinden salındıkları için, patofizyolojisinde önemlidir (3, 4).

2.4.2. Musinler (MUC)

Musinler, adezyon sağlayan moleküllerin aksine anti-adeziv etkili bir gruptur. Musin ailesinden olan MUC1, embriyo implantasyon için doğru yer ve zamanı bulana kadar embriyoyu kovan bir moleküldür (13).

2.4.3. Sitokinler

İmplantasyon bölgesinde hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, trofoblast farklılaşması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, kemik oluşumu, hematopoez, yara iyileşmesi ve hücrel metabolizmanın değiştirilmesi gibi birçok biyolojik mekanizmada yer almaktadır (38).

2.4.4. Heparin Bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF)

HB-EGF, Epidermal büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir. HB-EGF çeşitli türlerde implantasyon sırasında önemli rol oynar (93).

2.4.5. Lökemi İnhibitör Faktör (LIF)

LIF'in sitotrofoblastlar tarafından hCG sentezini azalttığı, fibronektin sentezini artırdığı ve bu şekilde trofoblastların daha yapışkan ve invaziv olmasına sebep olduğu bildirilmiştir (29). Uterusta LIF ekspresyonu fare embriyo implantasyonu için gereklidir (22).

2.4.6. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF ailesi endotel hücresinin çoğalmasına, göçüne ve farklılaşmasına sebep olan, vasküler sistem boyunca dizilmiş, endotel hücreleri için bilinen en özgül mitojendir (55, 88).

2.4.7. Transforming Büyüme Faktörü β (TGF- β)

Tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında önemli rol oynayan TGF- β ailesi, hücre çoğalması, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücrel süreçleri düzenleme yeteneğine sahip olan çok sayıda büyüme faktörü içerir (64, 81).

2.4.8. Siklooksijenazlar (COX)

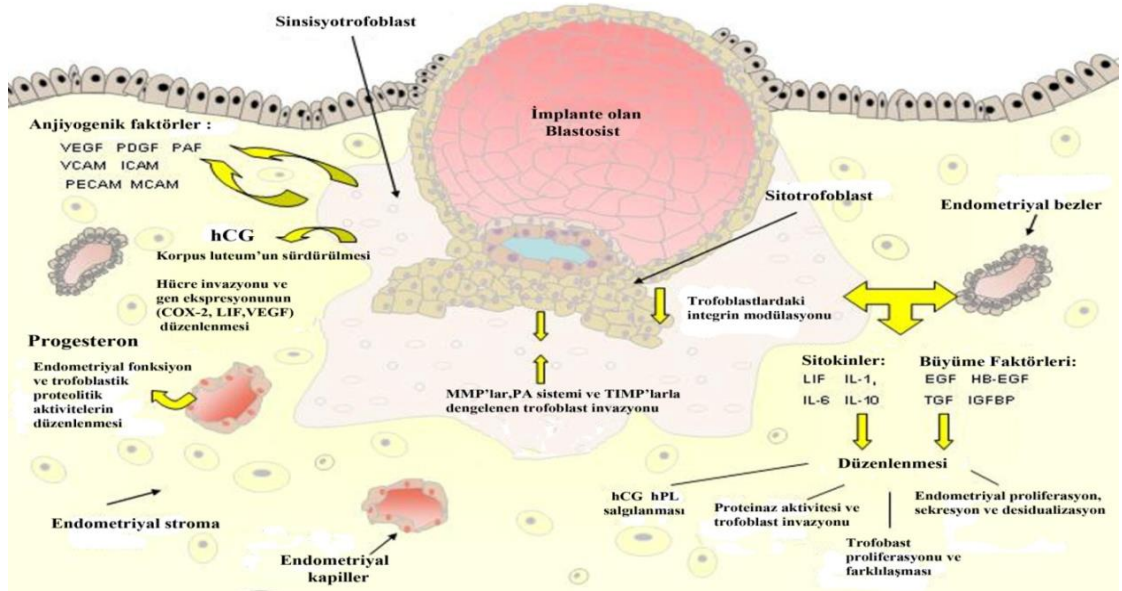
COX enziminin 3 izoformormu tanımlanmıştır: COX-1, COX-2 ve son yıllarda COX-3 (15). COX-1 ve COX-2 prostoglandin sentezinde hız sınırlayıcı enzimlerdir (29). COX-2 memeli embriyo implantasyonu sürecinde rol oynar. İmplantasyonun başarısı üzerine doğrudan etkiye sahiptir (45).

2.4.9. Prostaglandinler

İmplantasyon penceresinde zamanlama aşamasında önemlidir. Blastosist implantasyonunda zamanlamada gecikme, embriyonun serviks duvarına tutunmasına, anormal plasentasyona ve fetal emilime neden olabilir (13).

2.4.10. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

MMP'ler ovulasyon, embriyo implantasyonu, embriyogenezis, laktasyon, uterus ve meme dokusu fonksiyonları, yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, gibi fizyolojik olayların yanı sıra tümör hücrelerinin invazyonu, metastaz ve artrit gibi patolojik süreçlerde de görev alırlar (6).



Şekil 2.3. İmplant olmuş blastosist de bazı büyüme faktörlerinin ve hormonların etkisinin şematik gösterimi (80).

2.5. Desidualizasyon

Desidualizasyon; başarılı bir gebeliğin kurulumu için endometriyum stromasının ön koşuludur (78). İmplantasyon sonrası endometriyum desidua adını alır (33). Blastosistin, uterus lümen epiteli bazal membranıyla temasından sonra ilk olarak implantasyon bölgesindeki stromal hücrelerde desidualizasyon başlar, ardından tüm endometriyuma yayılır. Desidual reaksiyon, erken gebelik dönemlerinde ovaryum tarafından salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında blastosist ve uterus arasındaki sinyalizasyon sonucunda meydana gelir. Gebeliğin şekillenmesi ile ilk olarak uterus lümen ve bez epitel hücreleri çoğalmaya başlar, sonra epitel hücre çoğalması durur, stromal hücre çoğalması başlar (69). Desidualizasyonun şekilleneceği yerdeki bağ doku hücreleri embriyonik beslenmeye kaynak oluşturmak üzere glikojen ve lipidleri depolayarak desidual hücelere dönüşürler (68).

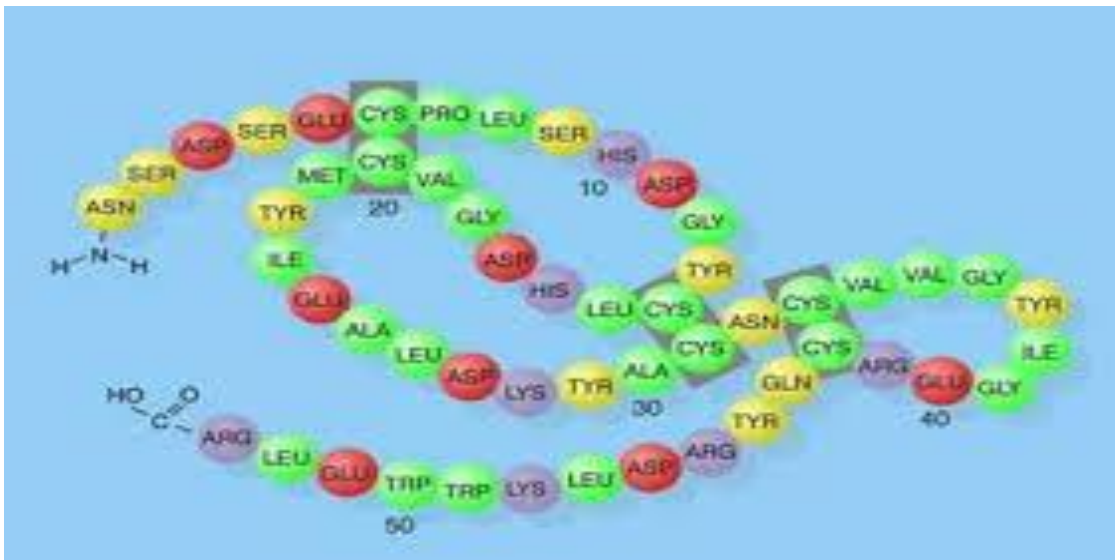
Kemiricilerde desidualize olan endometriyum; bazal zon, kapsül, antimezometriyal desidua, mezometriyal desidua ve glikojenik bölge olmak üzere 5 farklı bölgeden oluşur. Sıçanlarda implantasyon ve desidualizasyon olayları, uterusun antimezometriyal bölgesinde özellikle primer desidual alanda (PDR) gerçekleşmektedir. Bu alandaki stromal hücreler çoğalır ve sonrasında yapışma yerindeki uterus lümen epiteli apoptozise uğrar alttaki bazal membran embriyonun uterusu gömülmesi için parçalanır, ilerleyen günlerde PDR alanı apoptozis geçirir ve implantasyon alanını çevreleyen SDR alanı şekillenir (23). Desidualizasyon diğer türlerin aksine insanlarda, menstrual siklusun geç salgılama fazında başlar. Progesteron ve düzenleyici ajanların, siklik AMP (cAMP) seviyelerini arttırması ile uyarılır (16, 17). Desidualizasyon, trofoblast invazyonunu ve plasenta oluşumununun metalloproteinaz, sitokinler, yüzey integrinleri, MHC kompleks molekülleri (major histocompatibility complex molecules) gibi düzenleyici faktörlerin ekspresyonundaki değişiklik ile düzenlediği düşünülmektedir. Trofoblastlar, desidual stromal hücrelerin gen ekspresyonunu düzenleyen parakrin sinyaller salıverirler (42).

Gebeliğin şekillenmediği endometriyal stromada ECM; tip I, III, V ve VI kollajen, fibronektin ve periglandular tenaskin birikintileri içerirken, desidualizasyonun şekillenmesi ile beraber proteoglikan, heparan sülfat, tip IV kollajen ve laminin 2 ve 4 içeren bir ECM üretilir (3).

Otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalarla etki gösteren büyüme faktörleri, kendilerine özel yüzey reseptörlerine bağlanıp intraselüler sinyal yollarını tetiklemek suretiyle çoğunlukla hücre bölünmesiyle sonuçlanan fonksiyonlar gerçekleştirirler (18). Bu faktörler memelilerin dişi genital sisteminde follikülogenezisin ilk aşamalarından başlayarak oosit maturasyonu, fertilizasyon, preimplantasyon, implantasyon, menstruasyon ve plasantasyon aşamalarında, büyüme, çoğalma ve farklılaşma olaylarını doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyerek görev yaparlar (79). Bunların en önemlileri TGF-alfa, beta, (Transforme edici Büyüme Faktörü), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), IGF (İnsülin benzeri Büyüme Faktörü), PDGF (Trombosit kaynaklı Büyüme Faktörü), VEGF (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü) ve GDF-9 (Büyüme-Farklılaşma Faktörü)'dür (40).

2.6. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Ailesi Ve Reseptörleri

İlk kez Stanley Cohen tarafından, 1962 yılında, erkek fare submandibuler tükürük bezlerinden izole edilen EGF, bazı üreme organlarında mitojenik aktivite gösterebilen 53 aminoasitlik bir polipeptittir (52, 96). EGF, yara dokusunun oluşumunda yer alan fibroblastların, keratinositlerin ve vasküler endotel hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını uyarır (10).

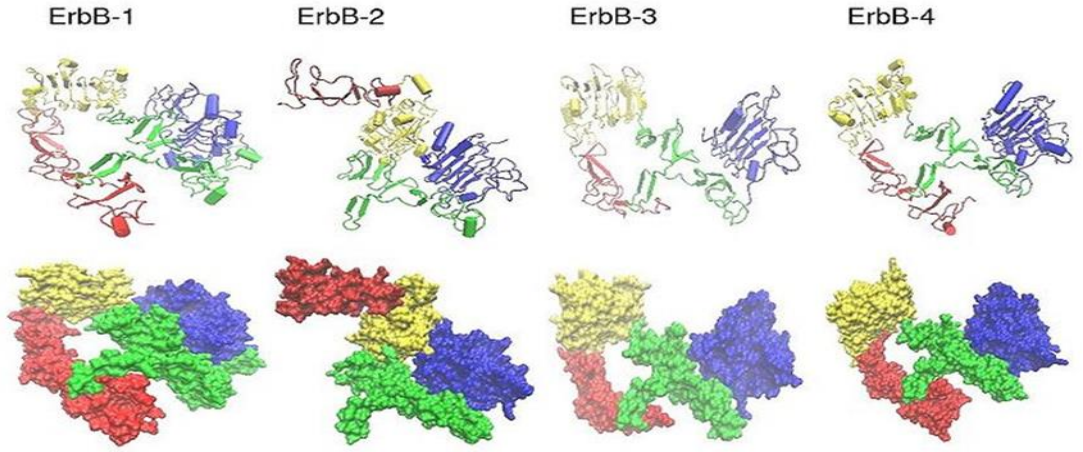


Şekil 2.4. EGF'nin Kimyasal Yapısı (10).

EGF, büyük bir affinite ile hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır ve reseptörün hücre içindeki protein-tirozin kinaz aktivitesini uyararak sinyal ileti sürecini başlatır. Hücre içinde kalsiyum seviyeleri, glikoliz ve protein sentezi artar, DNA sentezine ve hücre büyümesine neden olan EGRF geni gibi genlerin ortaya çıkmasını artırır (10).

Epidermal büyüme faktörü ailesi epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktörü (TGF-a), heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), amphiregulin (AR), betacellulin (BTC), epiregulin ve neu farklılaşma faktörü (NDF)'i içermektedir (Tablo 1). Bu ligantlar EGF-benzeri alan olarak bilinen altısı sistein artıklarını içeren yaklaşık 40-45 aminoasitlik ortak bir aminoasit motifine sahiptir. EGF ve TGF-a içerisinde gösterildiği gibi altı sistein artıkları HB-EGF'nin mitogenic aktivitesi için gerekli olan üçlü disülfid bağlarını oluşturur. EGF ailesi üyesinin ortak özelliği, transmembran öncü moleküller olarak sentezlenmeleri ve sonrasında hücre yüzeyinden çözülebilir, olgun büyüme faktörlerinin salınımı için proteolitik olarak işleme tabi tutulur (63, 75). Epidermal büyüme faktör reseptörü, ErbB hücre reseptör ailesindedir. EGF reseptörleri, ErbB veya tirozin kinaz'lar olarak da bilinir. ErbB protein ailesi, yapısal olarak ilişkili dört transmembran reseptörden oluşur. Bunlar: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (Her2/ neu), ErbB3 (HER3), ve erbB4 (HER4) (50, 58).

EGF ailesi ligantları reseptörlerin bağlanması ve aktifleşmesiyle spesiflik gösterir. EGF, TGF-a ve AR HER1'i bağlar, NGR-1 ve NGR-2 HER3 ve HER4'ü bağlar ancak sadece HER4 aktifleşir. HB-EGF ve Betacellulin HER1 ve HER4'ün her ikisini de bağlar ve aktifleştirir. HER2 için şimdiye kadar tanımlanmış bir ligand yoktur (75).



Şekil 2.5. EGF reseptörlerinin alt tiplerinin DNA yapısı (8).

Epidermal büyüme faktörü ailesi ve epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin uterusu embriyo implantasyonu için önemli olduğu kabul edilir. Örneğin; preimplantasyon süresinde gebeliğin 1-8. günlerinde östradiol ve progesteronun uyarması sonucu fare uterusunda ErbB2 geni sentezlenmektedir (59).

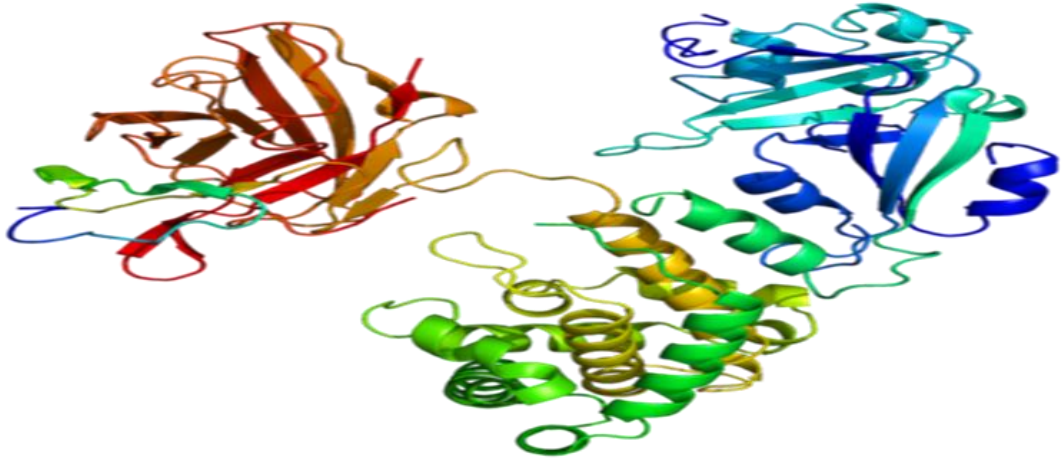
Tablo 2.1. EGF Ailesi (75).

EGF Ligant	EGF-Receptor Subtype
Epidermal growth factor (EGF)	HER1
Transforming growth factor-a (TGF-a)	HER1
Vaccinia growth factor (VGF)	HER1
Amphiregulin (AR)	HER1
Heparin bulding epidermal growth factor (HB-EGF)	HER1
Betacellulin (BTC)	HER1
Epiregulin	HER1
Neuregulin-1 (NGR-1)	HER3,HER4
Neu differentiation factor (NDF)	
Heregulin (HRG)	
Glial growth factor (GGF)	
Acetylcholine receptor including activity (ARIA)	
Neuregulin-2 (NGR-2)	

2.7. Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF)

2.7.1. HB-EGF Tanımı

Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir üyesidir (20). HB-EGF gen ekspresyonu ağırlıklı olarak akciğer, kalp, beyin ve iskelet kaslarındaki çeşitli dokularda tespit edilmektedir (1). HB-EGF ilk olarak, düz kas hücreleri için mitojen olan immobilize heparin için güçlü bir affiniteli büyüme faktörü olarak, insan makrofajının uygun kültür ortamlarında tanımlanmış fakat endotel hücrelerinde tanımlanamamıştır. Daha sonra HB-EGF heparin affinite kromatografisi ve ters fazlı sıvı kromatografisi kullanılarak makrofaj benzeri insan U-937 hücrelerinin kültür ortamlarından saflaştırılmış ve U-937 hücre cDNAsından klonlanmıştır (14, 43). HB-EGF DNA analizi putatif sinyal peptidi, propeptid, olgun HB-EGF, transmembran ve sitoplazmik alanları içeren 208 aminoasitin primer translasyon ürünü olarak tahmin edilen açık okuma iskeletine sahiptir (75, 99).



Şekil 2.6. HB-EGF DNA yapısı (9).

Transmembran öncü maddesinin (tm-HB-EGF) önemli bir miktarı hücre yüzeyinde tam olarak kalmasına rağmen ekstraselüler alan metalloproteinazların etkisi sonucu HB-EGF'nin çözünebilir formunu (sol-HB-EGF) açığa çıkarabilir. Hem tm-HB-EGF hem de sol-HB-EGF biyolojik olarak aktiftirler (34).

2.7.2. HB-EGF Geni

HB-EGF gen lokusu insanlarda 5 kromozoma farelerde ise 18 kromozoma eşlenmiştir. HB-EGF tamamlayıcı DNA (cDNA) sıçan uterus stromal hücrelerinde progesteron tarafından indüklenerek cDNA kütüphanesinin transkripsiyonu çıkartılarak tanımlanmıştır (101). Bir HB-EGF cDNA'nın en uzun formu yaklaşık olarak 2.4 kb uzunluğunda klonlanmıştır. İnsan ve fare HB-EGF genleri yaklaşık 1.4 kb kapsamakla birlikte 6 ekson ve 5 introndan oluşarak EGF ailesinin diğer ligandlarının gen yapısı ile uyumludur (48, 75).

EGF reseptör aktivasyonu blastosist implantasyonunun ve devamında plasentasyon esnasında trofoblastik hücre davranışını etkiler. HB-EGF gen transfeksiyon deneyleri blastosistin lümen epiteline yapışmasına aracılık eden faktörlerden birisi olan membrana bağlı HB-EGF'nin blastosist üzerinde mevcut olan heparan sülfat proteoglikanlarına ve/veya EGF reseptörlerine bağlanabildiğini işaret etmektedir (54).

2.7.3. Rekombinant HB-EGF

İnsan da HB-EGF proteini E. Coli'den rekombinant olarak üretilmiştir, 208-artık HB-EGF birincil translasyon ürününün 73 ile 149 arasındaki aminoasitleri takip eden bir çeviriyi başlatan metionin tortusundan oluşur (24).

2.7.4. Transmembran HB-EGF

EGF ailesinin birçoğu transmembran proteinlerine bağlı olarak sentezlenir. HB-EGF cDNA analizi, HB-EGF'nin bir transmembran öncüsü olarak sentezlendiğini ortaya koyar. HB-EGF'in transmembran formu, HB-EGF'nin sitoplazmik alanının C-terminali 16 amino asitlerine karşı yönlendirilmiş bir antikör kullanarak hücreler üzerinde tespit edilmiştir (60, 75). HB-EGF transmembran formu çözünmez olmasına rağmen biyolojik olarak aktiftir (76). HB-EGF'nin transmembran formu jukstakrin aktivitesine sahiptir (75).

2.7.5. Mature HB-EGF (Olgun HB-EGF)

HB-EGF'nin diğer bir formu olan olgun HB-EGF (solHB-EGF) toplamda 86 aminoasit içermektedir (44). Olgun çözünür HB-EGF, proteolitik bölünme yoluyla membrana tutturulmuş öncü moleküllerden salınır (34). Çözünebilir olan olgun HB-

EGF; makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri üzerinde mitojenik ve kemotaktik, endotel hücrelerinde kemotaktik, astrositler ve normal epitel hücreleri üzerinde ise büyüme aktivitesine sahiptir (90).

2.7.6. HB-EGF'nin Biyolojik Aktivitesi

HB-EGF hücre çoğalması ve yer değiştirmesi için güçlü bir uyarıcıdır. Doğal HB-EGF, U-937 hücre kültürlerinden ve rekombinant HB-EGF, E.Coli ve Bakulovirüs ile enfekte olmuş böcek hücrelerinden saflaştırılmıştır (21).

Doğal ve rekombinant proteinler eşit biyoaktivitededirler. HB-EGF özellikle fibroblastlar, düz kas hücreleri ve epitel hücrelerini hedef alan geniş bir spekturuma sahiptir. Hücre kültüründe HB-EGF; fare 3t3 fibroblastları, sığır aortik düz kas hücreleri, sıçan hepatositleri, primer tavşan böbrek tubul hücreleri, tavşan böbreği epitel hücreleri, meme ve yumurtalık karsinom hücreleri dahil bir dizi hücre tipleri için güçlü bir mitojendir. HB-EGF primer sıçan ventriküler miyositleri için bir hipertrofik faktördür. Öte yandan HB-EGF, FGF-1, FGF-2 ve VEGF gibi diğer heparin bağlayıcı büyüme faktörlerinin aksine endotel hücreleri için mitojenik değildir. Bir raporda HB-EGF'nin endotel hücrelerinde mitojen değil iken teşvik edici olduğu, ayrıca kollegen jel içinde endotel hücre tüp benzeri yapılarını oluşturduğu bildirilmiştir. Parakrin faaliyetlerinin yanı sıra HB-EGF kendisini üreten ve yanıt veren keratinositler, ürethelial hücreler ve gastrik endotel hücreleri için otokrin büyüme faktörüdür. Keratinositler için otokrin büyüme faktörü aktivitesi, anti-HB-EGF antikoru tarafından, keratinosit çoğalmasının kısmi engellenmesiyle ortaya konmuştur (75, 89).

HB-EGF hücre hareketinin güçlü bir uyarıcısıdır. HB-EGF'nin, düz kas hücreleri yüzey heparin sülfat proteoglikanları ile kısmen etkileşimi sonucu sığır aortik düz kas hücreleri için ve EGF reseptör alt tipine (HER4/erbB4) sahip olan fare 3t3 fibroblastlar için kemotaktik olduğu, aksonal yaralanmadan sonra insülin benzeri büyüme faktörü 1 ile beraber HB-EGF'nin astrositlerin yoğun rastgele göçünü stimüle ettiği bildirilmiştir (31, 75).

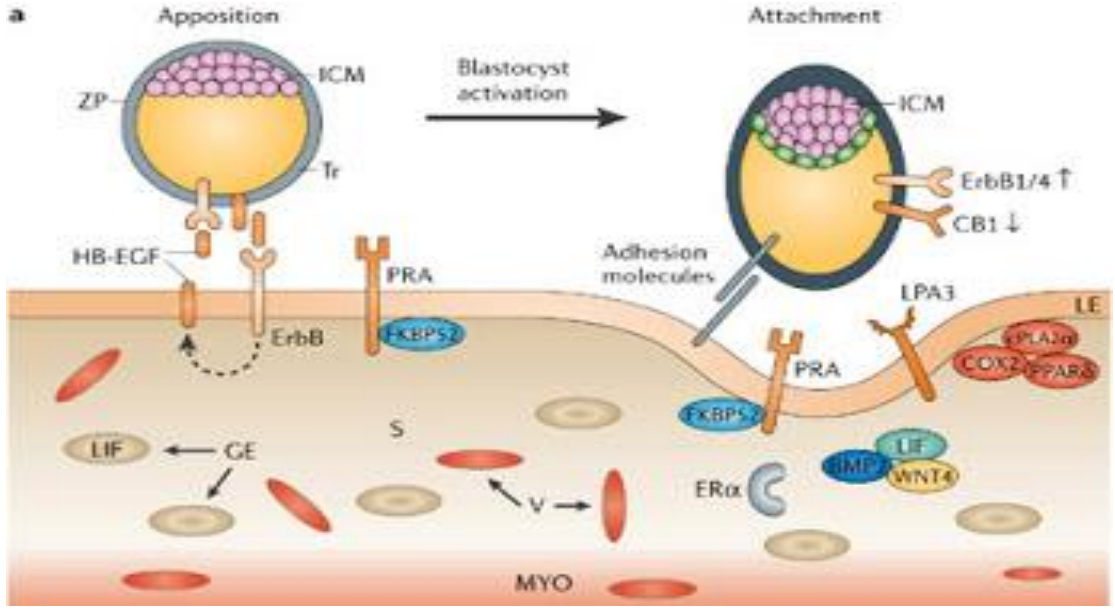
HB-EGF diğer büyüme faktörü ve büyüme faktörü reseptör genlerinin transkripsiyonunu uyararak hücreleri dolaylı olarak uyarabilir. Örneğin; düz kas hücrelerinde HB-EGF güçlü düz kas hücreleri mitojenleri PDGF ve FGF-2 'nin mRNA düzeylerinde bir artışa neden olur. HB-EGF; TGF-a, keratinositlerdeki AR ve BTC

epitelyal hücreler ve kolon adenokarsinom hücreleri gibi diğer EGF benzeri ligantların mRNA düzeylerinde artışa da neden olur (75). HB-EGF blastosist implantasyonu, yara iyileşmesi, tümör gelişimi, yumuşak kas hücresi hiperplazisi, anjiyogenez ve üreme gibi çeşitli biyolojik süreçlerin katılımcısıdır (11).

2.7.7. Gebeliğin Erken Dönemlerinde HB-EGF'nin Rolü

Uterus lümen epitelinde HB-EGF, transmembran ve çözünür form halinde olup bir jukstakrine ve parakrin sinyal mekanizması olarak rol alır (60). Sıçan uterusunda, HB-EGF ekspresyonu gebeliğin kurulması için gerekli aktiviteler olan steroid hormonlar, östrodiol ve progesteron tarafından düzenlenir (75). Sıçanların progesteron tedavisi uterus stromal hücrelerinde HB-EGF gen ekspresyonunu uyarmakta, lümen ve bez epitel hücrelerinde ise HB-EGF ekspresyonu önlemektedir (75, 105). Öte yandan östrodiol tedavisi HB-EGF ekspresyonunu stromal hücrelerinde değil epitel hücrelerinde uyarmaktadır. Sıçan uterusunda steroid hormonların mitojenik etkilerine HB-EGF'nin aracılık ettiği öne sürülmektedir. Overektomi uygulanmış farelerin uterus stromal hücrelerinin progesteron ile muamelesinin, blastosist yapışması sırasında meydana gelen çoğalma, büyüme ve farklılaşmaya benzer şekilde bir etkiye neden olduğu östradiolün ise uterus epitel hücrelerinde HB-EGF ekspresyonunu düzenlediği belirtilmektedir (75, 94, 101). HB-EGF'nin desidualizasyondan sonra stromal hücrelerin çoğalmasını stimüle eden otokrin/parakrin faktör olarak rol aldığı öne sürülmektedir (24). İnsan uterusunda HB-EGF implantasyon penceresinin hemen öncesinde artış göstermektedir (85). Kemirgenlerde HB-EGF ekspresyonu uterusun alıcılığı, embriyo oluşumu ve blastosist implantasyonunda işlev görmektedir (20). Uterusta fare blastosist implantasyonu çiftleşmeden sonraki 4. gün oluşur. Fare uterusunda HB-EGF ekspresyonu blastosist implantasyonu ile mekânsal ve zamansal olarak ilişkilidir (24).

HB-EGF'nin blastosist implantasyonunun hemen öncesinde uterusunda ekspres edildiği ve blastosist yapışmasını, gelişimini, büyümesini ve farklılaşmasını desteklediği bildirilmektedir (75).



Şekil 2.7. Gebeliğin erken dönemlerinde HB-EGF (91).

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 boyunca sıçanlara, ayrı kabinlerde standart yem ve 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) aynı kafes içinde birlikte bırakıldı. Ertesi sabah tekrar vajinal smearde sperme rastlanan dişi sıçanlar gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Gebeliğin 0., 1., 3., 5. ve 7. Günlerinde gruptaki sıçanlara rompun (5mg/kg) ve ketamin (60mg/kg) kombinasyonu ile 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 HB-EGF immünlokalizasyonları belirlendi. Çalışmada kullanılan sıçanlar aşağıdaki tabloda olduğu gibi deney gruplarına dahil edildi.

Tablo 3.1. Deney Grupları

Deney Grupları	
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 mikroskobik 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 H₂O₂ solüsyonunda (25dk) bekletildi. Tekrar PBS+%0,2 Tween 20 solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler, 1/100µ oranında dilüe edilen primer Mouse monoclonal HB-EGF antikoru 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 akabinde mikroskop altında DAB kromojeni (10dk) uygulandı. Daha sonra kesitler distile suda (5dk) yıkandı 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
HB-EGF (H-1) Mouse Monoclonal IgG _{2a}	Santa Cruz Biotecnology	Sc-365182
Biotinlated Link Streptavidin-HRP	Dako	K0609
DAP+ Chromogen DAP+ Substrate	Dako	K3468

Tablo 3.3. Sitrat Buffer 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 (PBS) (1000ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
Na ₂ HPO ₄	1,48gr
KH ₂ PO ₄	0,43
NaCl	7,2gr
Distile su	1000ml

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

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
PBS	500ml
Tween 20	0,5ml

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

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
PBS	500ml
Tween 20	0,25ml

4. BULGULAR

Yapılan çalışmada, sıçanlarda gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde alınan uterus doku kesitleri HB-EGF'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- 4.10 arasında gösterildi. Gebelik günlerine ait bölge tanımlamaları Öner H ve arkadaşlarının (70) daha önce yaptıkları çalışma referans alınarak yapılmıştır

HB-EGF İmmunlokalizasyonu

0.Gün: Endometriyum ve myometriyum normal yapıda gözlemlendi. Endometriyumda HB-EGF immunlokalizasyonu lümen ve bez epitel hücrelerinin sitoplazmalarında, myometriyum ve kapiller duvarında güçlü şekilde (+++) gözlenirken, supepitelyal ve endometriyal stromada gözlenmedi (-). Gebeliğin 5. gününe kadar desidual reaksiyon alanı oluşmamıştı (Şekil 4.1, 4.2).

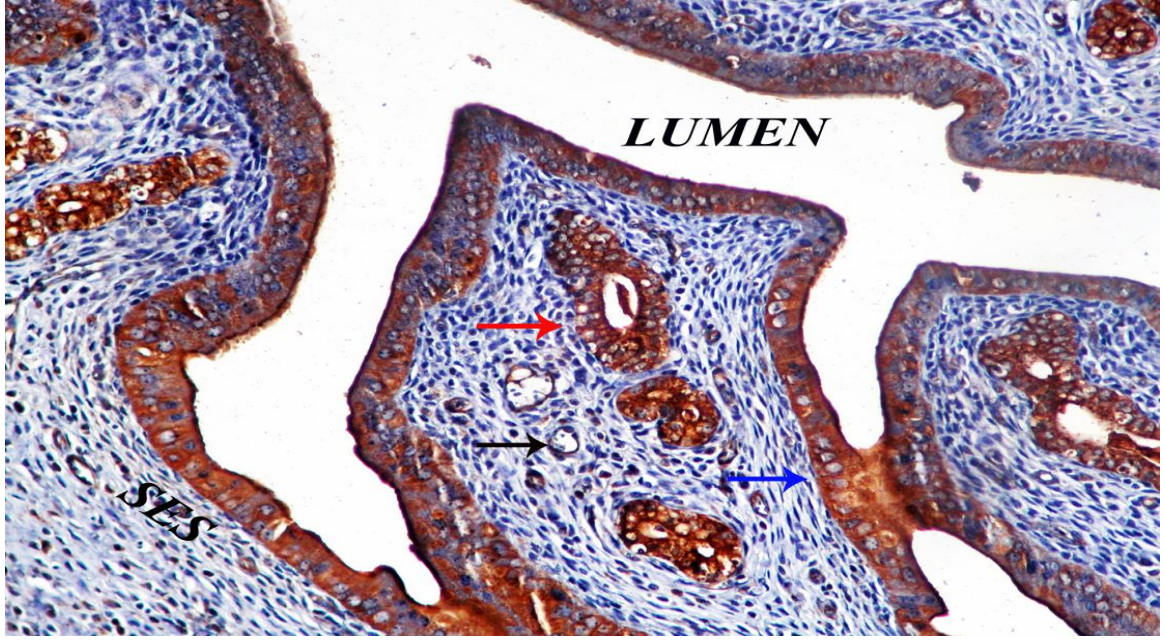
1.Gün: Gebeliğin 1. gününde uterusun mikroskobik yapısı 0. gün ile benzerlik taşımakla birlikte, HB-EGF immunpozitif boyanmanın lümen ve bez epitelleri ile kapillerlerde 0. Gün ile benzerlik gösterdiği ve güçlü (+++) olduğu, myometriyumda boyanma şiddetinin biraz azaldığı ve orta şiddette (++) olduğu gözlemlendi. 0. Günden farklı olarak 1. Günden itibaren supepitelyal ve endometriyal stroma hücrelerinde de immun reaksiyon orta şiddette (++) mevcuttu (Şekil 4.3, 4.4).

3. Gün: Gebeliğin 3. gününde uterusun mikroskobik yapısı, HB-EGF immunpozitif alanları ve boyanma şiddeti 1. gün ile benzerlik göstermekte idi (Şekil 4.5, 4.6).

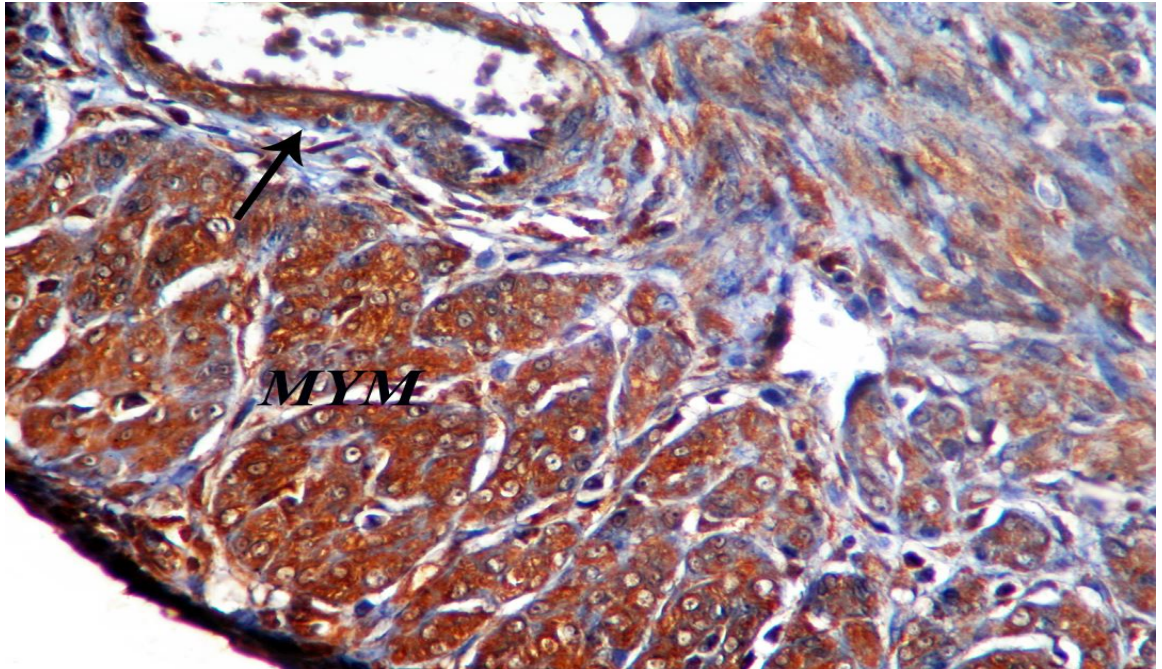
5. Gün: En belirgin yapısal değişiklik bezlerin küçülmüş, sayılarının oldukça azalmış, kapillerlerin miktarının ise artmış olduğu idi. İmplantasyonun ilk belirleyici işaretlerinden biri olan desidual reaksiyon alanı, primer desidual reaksiyon alanı (PDR) şeklinde antimezometriyal bölgeden mezometriyal alana doğru lümen epitelinin altında yayılmış, ancak lümen epitelinden stromaya doğru dar bir alanda gözlenmeye başlandı. HB-EGF immunreaktivitesi lümen ve bez epitellerinde, myometriyumda ve

kapillerlerde güçlü (+++), PDR ve bu alanın dışındaki endometriyal stromal alanlardaki hücrelerde orta (++) şiddette gözlendi (Şekil 4.7, 4.8).

7. Gün: Uterus lümeni iyice küçülmüş, epiteli incelmış, endometriyal stromadaki hücreler tamamen desidua hücrelerine dönüşmüş, lümeni çevreleyen PDR alanının dışında mezometriyal alana doğru sekonder desidual reaksiyon alanı (SDR) belirginleşmişti. Bezler oldukça küçük, çok az sayıda ve myometriyuma yakın yerleşimde idi. HB-EGF immunreaktivitesi SDR alanına göre PDR alanında daha yoğun ve güçlü (+++) gözlendi. Lümen epitelinde ve kapillerlerde hafif şiddette (+) olan HB-EGF reaksiyonu bez epitelinde güçlü (+++) şekilde idi (Şekil 4.9, 4.10).



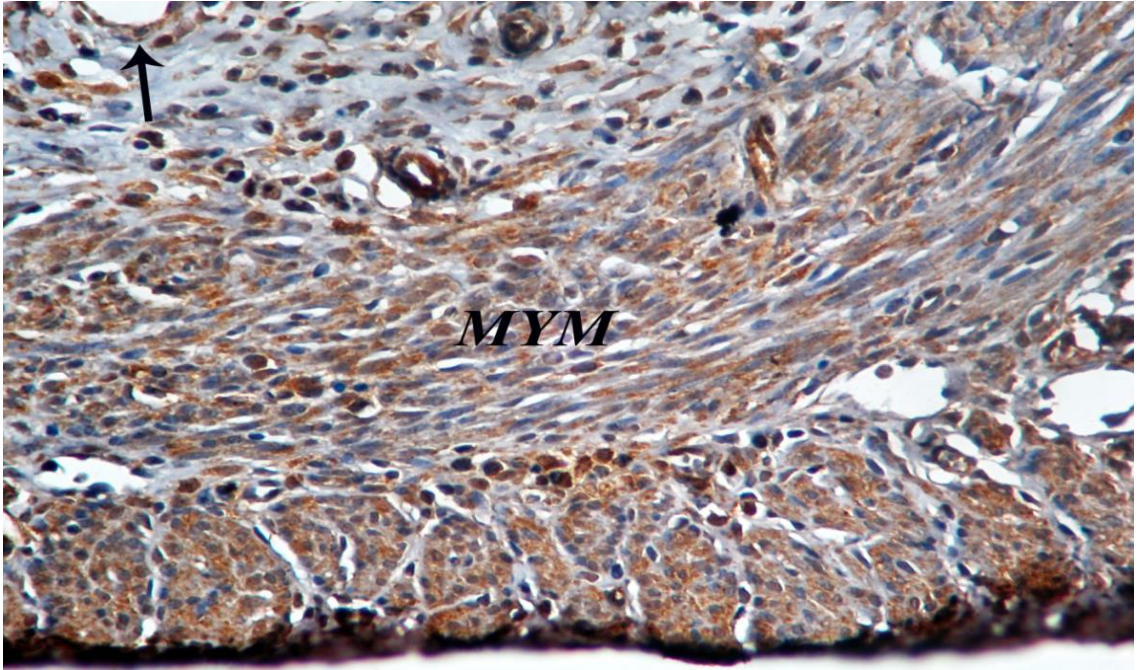
Şekil 4.1. Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.



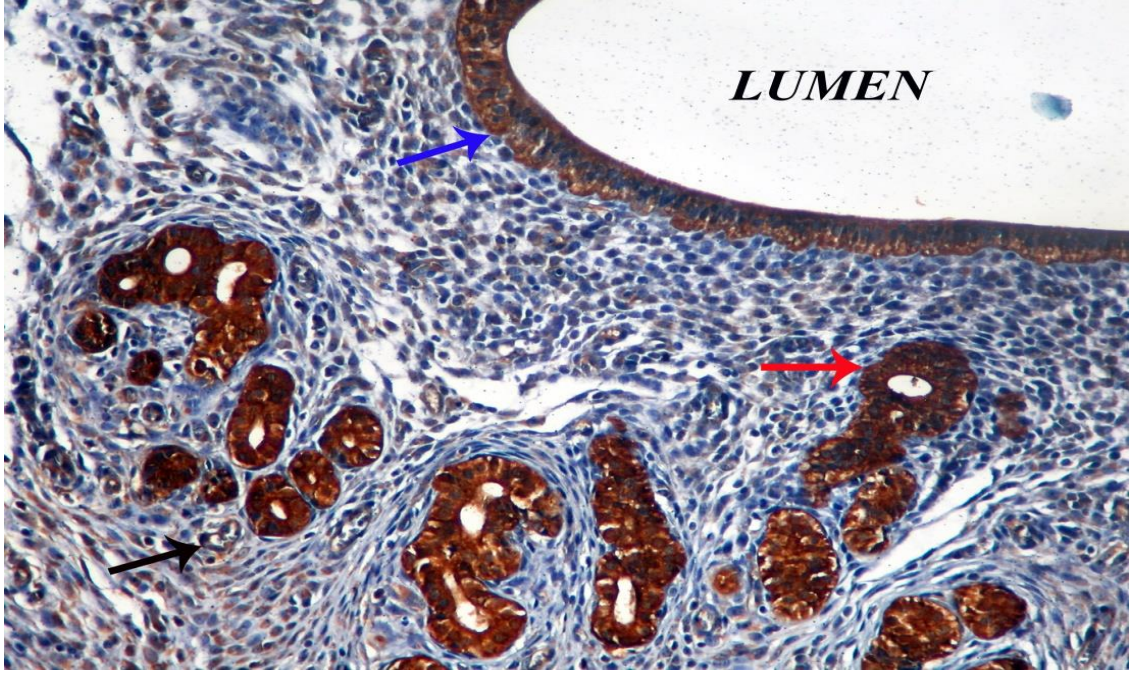
Şekil 4.2. Gebeliğin 0. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; Siyah ok: Kapillar. X400.



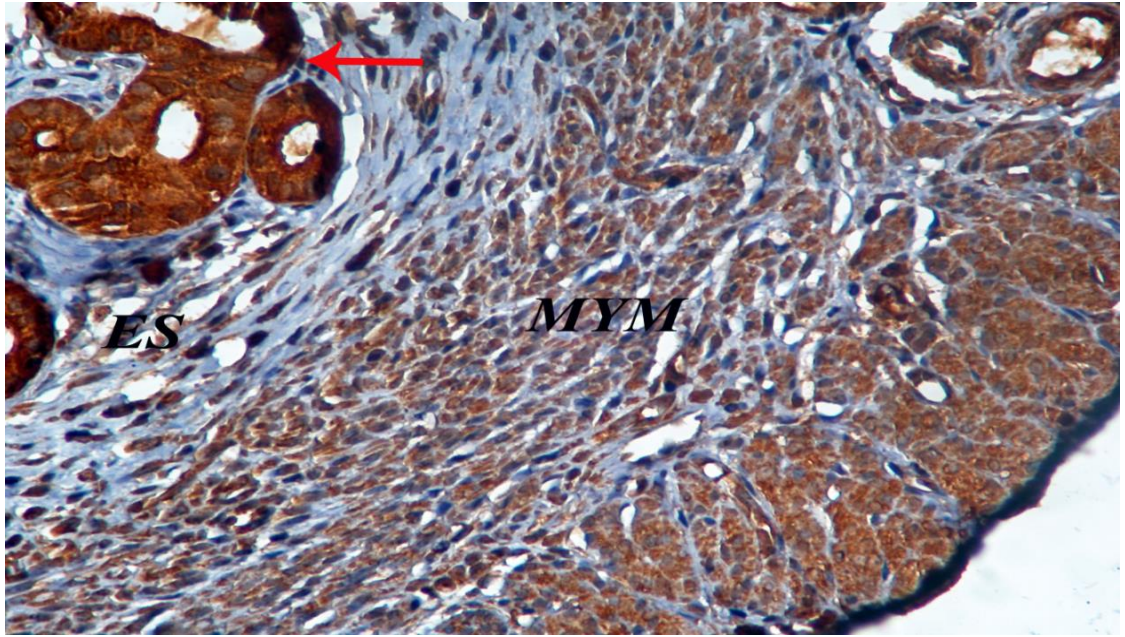
Şekil 4.3. Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. SES: Subepitelyal stroma; ES: Endometriyal stroma; Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.



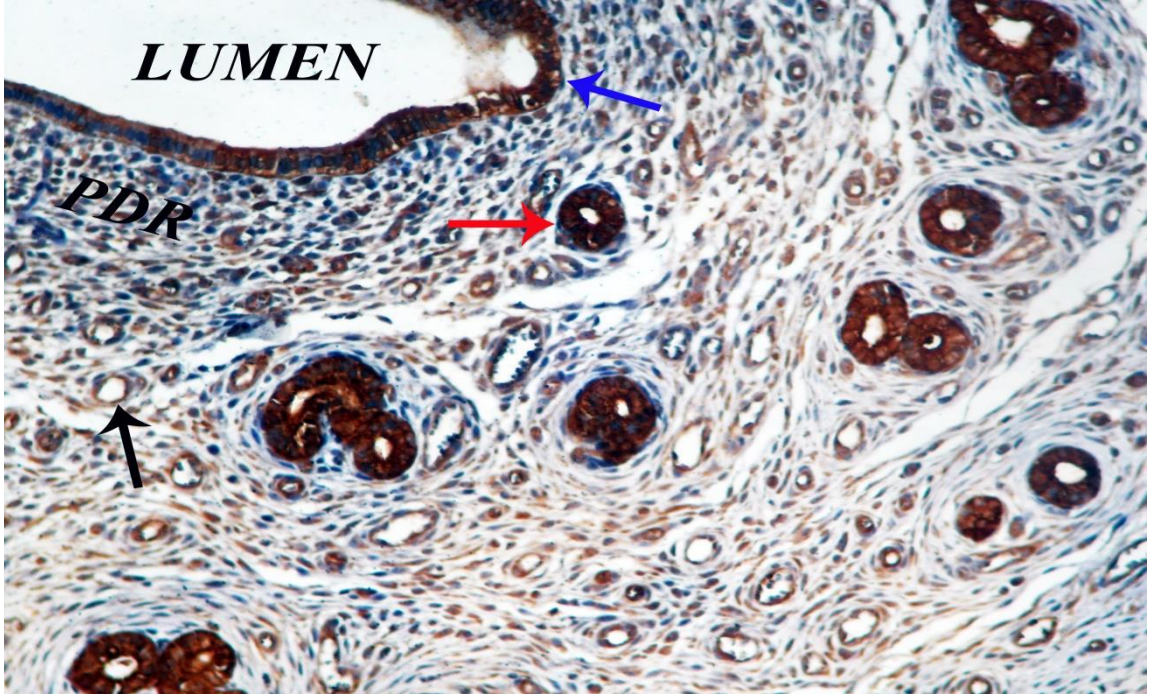
Şekil 4.4. Gebeliğin 1. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; Siyah ok: Kapillar. X400.



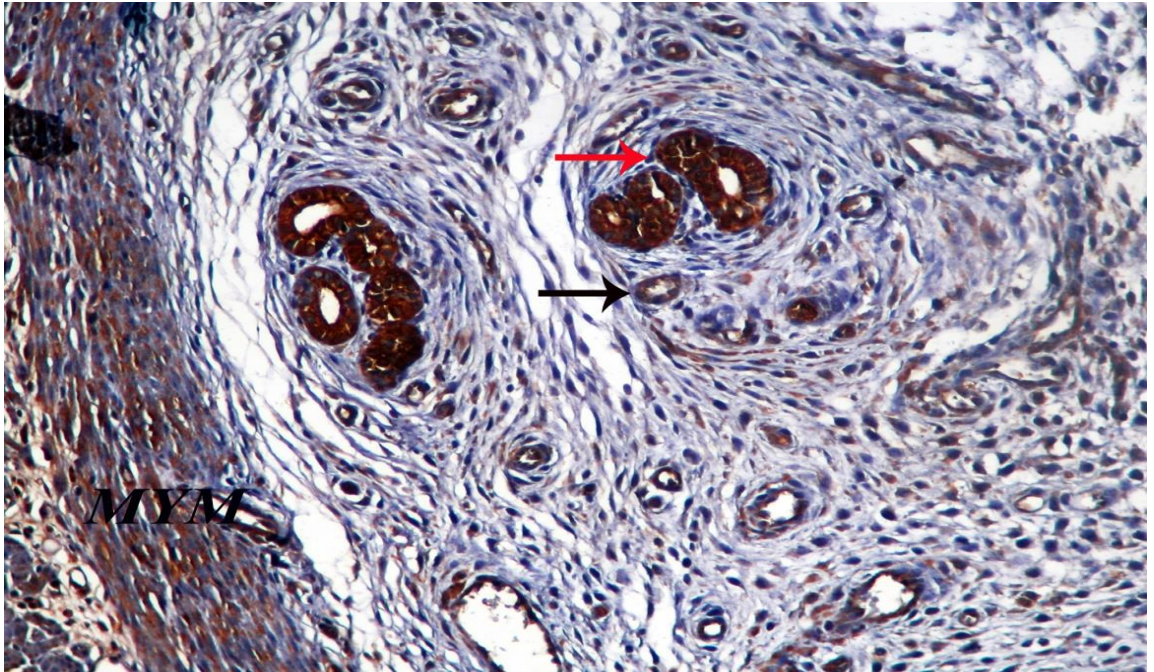
Şekil 4.5. Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.



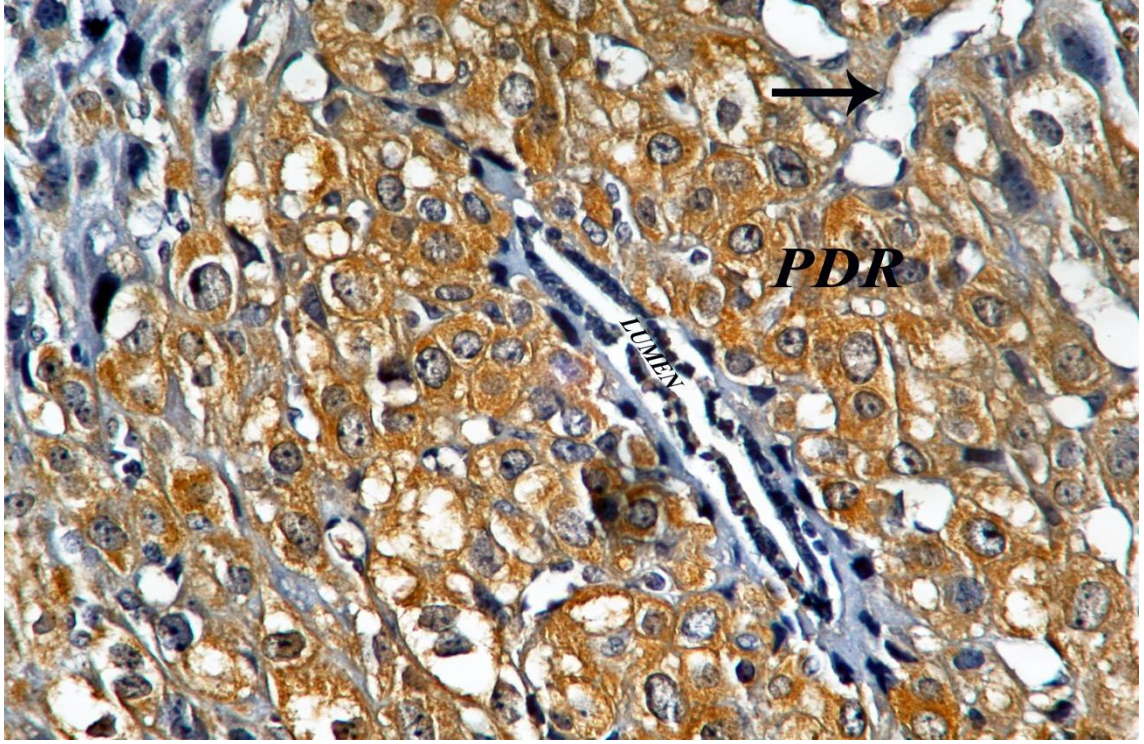
Şekil 4.6. Gebeliğin 3. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. ES: Endometriyal stroma; MYM: Myometriyum; Kırmızı ok: Bez epiteli. X400.



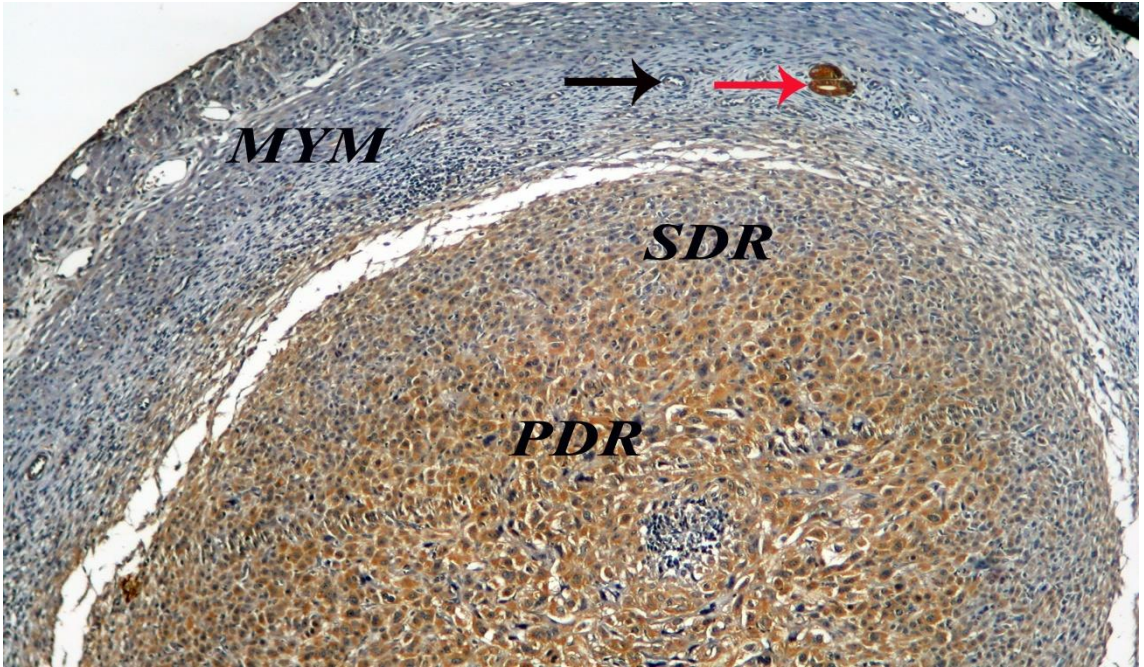
Şekil 4.7. Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. PDR: Primer desidual reaksiyon alanı; Mavi ok: Lümen epiteli; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200



Şekil 4.8. Gebeliğin 5. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; Kırmızı ok: Bez epiteli; Siyah ok: Kapillar. X200.



Şekil 4.9. Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. PDR: Primer desidual reaksiyon alanı; Siyah ok: Kapillar. X100.



Şekil 4.10. Gebeliğin 7. gününe ait sıçan uterus dokusunda HB-EGF immunreaksiyonu. MYM: Myometriyum; PDR: Primer desidual reaksiyon alanı; SDR: Sekonder desidual reaksiyon alanı; Siyah ok: Kapillar; Kırmızı ok: Bez epiteli. X100.

Tablo 4.1. Gebe sıçanların uterus dokusunda HB-EGF immunreaktivitesinin gebelik günlerine göre semikuantitatif analizi

Gebelik Günleri	Lümen Epiteli	Bez Epiteli	SES	ES	MYM	PDR	SDR	Kapillar
0. Gün	+++	+++	-	-	+++	Yok	Yok	+++
1. Gün	+++	+++	++	++	+++	Yok	Yok	+++
3. Gün	+++	+++	++	++	+++	Yok	Yok	+++
5. Gün	+++	+++	PDR	++	+++	++	Yok	+++
7. Gün	+	+++	PDR	SDR	-	+++	++	+

5. TARTIŞMA

İmplantasyonun başlatılması, alıcı bir uterus ile implantasyona uygun blastosist arasındaki karşılıklı etkileşim sonucudur (93).

Uterus alıcılığı; blastosist aktivasyonu ve blastosistin uterus ile etkileşimi sonucunda gerçekleşir. İmplantasyonla ilgili birçok sinyal molekülü tespit edilmiştir (Carson, Paria ve ark). Bunların arasında EGF ailesinin bir üyesi olan HB-EGF implantasyon süresinde oldukça etkili bir ekspresyona sahiptir (93).

Yapılan çalışmalar; HB-EGF'nin bir büyüme faktörü olarak blastosistin büyümesinde ve implantasyona aracılık etmesinde önemli rol oynayabileceğini işaret etmektedir (Pria ve ark Das ve ark, Raab ve ark, Yoo ve ark, Martin ve ark) (74).

HB-EGF'nin fare, insan ve hamster dahil olmak üzere birçok türde blastosist büyümesinde işlev gördüğü öne sürülmektedir (93).

Wang ve arkadaşlarının hamsterlarda gebeliğin 4. gününde HB-EGF'nin uterus ve embriyodaki lokalizasyonu ve HB-EGF'nin ErbB1 ile ErbB4 üzerindeki etkisine baktıkları çalışmada, gebeliğin 4. gününde, HB-EGF'nin blastosistlerin hem trophoctoderm hem de iç hücre kitlesinde mevcut olduğu konfokal mikroskopi ile gösterilmiştir. İmmun boyamanın çoğunlukla sitoplazmada olmasına rağmen blastosist hücre yüzeyinde de lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların, HB-EGF'nin ErbB1 ve ErbB4 üzerinde etkilerini incelemeleri sonucunda ise, HB-EGF'nin gebeliğin 4. gününde uterus ve blastosistte ErbB1 ve ErbB4'ün otofosforilizasyonunu indüklediği, blastosistte ErbB'lerin HB-EGF sinyaline tepki olarak belirgin bir şekilde aktif olduğu ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak ErbB1 ve ErbB4 aracılığı ile HB-EGF sinyalinin implantasyon sırasında uterus ve blastosistin karşılıklı etkileşiminde potansiyel rol oynadığı bildirilmiştir (93).

İnsanlar da ve kemiricilerde yapılan çalışmalarda, HB-EGF'nin endometriyal döngü boyunca uterus stromal ve epitel hücrelerinde farklı şekillerde ekspre edildiği belirtilmektedir. Örneğin Leach ve arkadaşları 18-35 yaş aralığında 3 ay boyunca hormonal tedavi görmemiş ve myom ya da servikal patoloji gösteren insanlardan histerektomi ile alınan dokularda yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, insan endometriyumunda, HB-EGF seviyesinin endometriyumun blastosist implantasyonu

için alıcı dönemi olan 20-24. günlerinde, endometriyal bezlerde ve uterus kan damarları içerisindeki endotel hücrelerinde maksimum olduğunu, siklusun 10-18. günlerinden itibaren progesteron seviyesindeki artışla beraber HB-EGF ekspresyonunun arttığı, ardından döngünün 26. gününe kadar hızlı bir düşüş gösterdiğini ifade etmişlerdir. Tersine, HB-EGF'nin stromal hücrelerdeki birikiminin preovulasyon döneminde, siklusun 13. gününde maksimum seviyeye ulaştığı sonrasında ise azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca stromal hücrelerde sitoplazmik HB-EGF immunboymasının siklusun 15. gününde en yoğun olduğu, sonrasında 22. güne doğru azaldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda 6-8 hafta iken gebeliği sonlanan kişilerden aldıkları örneklerde trofoblast ve desidua HB-EGF ekspresyonuna bakmışlar ve HB-EGF'nin hem trofoblast hem de sinsisyotrofoblastlarda mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar HB-EGF'nin endometrial siklus boyunca ovarial steroid hormonların etkisi altında ekspre olduğunu ve hem uterus hem de trofoblastlardaki mevcudiyetinin; mitogenezis, trofoblast invazyonu, hipoksiye karşı hücrel koruma ve vasküler yenilenme gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol aldığını düşündürmüştür (54).

Yoo ve arkadaşlarının gebe ve gebe olmayan insan endometriyumunda ve plasentada HB-EGF proteininin ve mRNA'sının immunohistokimyasal ve RNase protection assays (RPA) tekniği kullanarak ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada, HB-EGF mRNA ekspresyonunun menstrual siklusun proliferatif fazında endometriyumda düşük, salgı fazında ise yüksek olup gebelik esnasında implantasyon penceresinin hemen öncesinde ve dolaşımdaki progesteron seviyesinin yüksek olduğu gebeliğin 18-19. günlerde ise en yüksek seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar HB-EGF proteininin proliferatif evrede endometriyum stromasında, orta salgılama evresinde lümen epitelinin apikal yüzeyinde yoğun olarak lokalize olduğunu bulgulamışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar; insan endometriyal HB-EGF mRNA ekspresyonunun implantasyonda, hemen önce arttığını, implantasyon penceresi esnasında lümen epitelinde lokalize olduğunu ve erken plasentasyon evresinde plasental dokularda mevcut olduğunu, bu nedenle de HB-EGF'nin insan embriyo implantasyonu ve erken plasentasyon ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (98).

Benzer bir RNase koruma analizi çalışmasında, insanda menstrual siklusta, HB-EGF ekspresyonunun proliferatif fazda düşük, ovulasyon sonrasında erken ve orta salgılama evreleri arasında ise en yüksek seviyede olduğu bulgulanmıştır (57).

HB-EGF'nin insan embriyo gelişimi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, 2-7 günlük embriyoların bulunduğu kültür ortamına 1nM veya 100 nM HB-EGF eklenmiş ve 1nM HB-EGF'nin embriyoların blastosist evresinde ki gelişimini %40,7 etkilediği, 100 nM HB-EGF'nin ise bu oranı %71,0'e yükselttiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak HB-EGF oranının insan embriyolarının gelişimi üzerindeki etkisinin önemi bildirilmiştir (62).

Benzer bir çalışmada, 5-8 haftalık dişi CF1 fareler üzerinde yapılmış ve gebeliğin 4. gününde toplanan blastosistlerin kültür ortamında HB-EGF varlığında gelişimi izlenmiş, 4. gündeki blastosistlere 1 nM HB-EGF ilavesinin gebeliğin 5. gününde trofoblast farklılaşmasını hızlandırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, HB-EGF'nin hücre içi Ca^{+2} düzeyini yükselterek preimplantasyon gelişimini düzenleyip düzenlemediğini araştırmak için 1 nM HB-EGF'nin uygulanmasından sonra kültür ortamındaki blastosistlerde gebeliğin 5. gününde hücre içi Ca^{+2} düzeylerini ölçmüşler ve HB-EGF eklenmesinden 1 dakika sonra Ca^{+2} seviyesinin arttığını ve preimplantasyon gelişiminin etkili bir şekilde hızlandığını bildirmişlerdir (92).

İn vitro çalışmalarda, HB-EGF'nin stromal hücre çoğalmasında ve çift çekirdek oluşumunda potansiyel bir oyuncu olduğu belirtilmiştir. Örneğin; Tan ve arkadaşları çalışmalarında, yetişkin dişi CD-1 farelerde vazektomi edilmiş erkek fareler kullanarak yalancı gebelik oluşturmuş ve yalancı gebeliğin 4. gününde topladıkları fare uterus stroma hücrelerini kültür ortamında HB-EGF ile muamele etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, kültür ortamında HB-EGF ile muamele edilen uterus stromal hücrelerinde DNA sentezinin uyarıldığı, ancak mitotik siklusda artışa neden olmaksızın DNA sentezini artırdığı için poliploidi oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Farelerde HB-EGF ile muamele edilen stromal hücrelerde gözlenen poliploidinin çift çekirdek oluşumu ile beraber olduğu ve bu sonuçların HB-EGF'nin uterus stroma hücrelerinin büyümesinde çift çekirdek oluşumunda ve poliploidide etkili bir düzenleyici olduğunu işaret ettiği bildirilmiştir (86).

Tamada ve arkadaşlarının dişi sıçanlarda yaptıkları çalışmada, gebeliğin 4. gününde 8 hücreli embriyolar 5-15'erli gruplar halinde kültürlenmiştir. Kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda HB-EGF (0, 10 ya da 100 ng/ml) eklenerek embriyoların her 24 saatte bir gelişimi gözlenmiştir. Kültür ortamına HB-EGF'nin eklenmesiyle

blastosist sahasında embriyo gelişiminin HB-EGF konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, aynı çalışmada, sıçanlarda implantasyonun gecikmesini sağlamak için gebeliğin 3. gününde overektomi uyguladıkları sıçanlara 3-8. günler arasında günlük 2 mg progesteron enjeksiyonu yapmışlar ve takip eden 8. günde farklı konsantrasyonlarda HB-EGF'yi uterus boynuzuna intraluminal olarak enjekte etmişlerdir. Çalışma sonucunda HB-EGF'nin implantasyonu geciktirilmiş sıçanlarda implantasyona neden olduğu, sıçan başına implantasyon saha sayısının HB-EGF konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını öne sürmüşlerdir (85).

Atlı ve arkadaşları, gebe ve östrustaki kısırakların endometriyumunda HB-EGF mRNA ekspresyonunu incelemek için yaptıkları çalışmada; östrustaki kısıraklardan ovulasyon gününde, geç diöstrusta ve luteolizis sonrası evrelerde, gebe kısıraklarda ise gebeliğin 14. 18. 22. ve 60. günlerinde endometriyumdan biyopsiler alınmıştır. Real time PCR'ın kullanıldığı bu çalışmada östrus siklusunda, HB-EGF mRNA seviyesinin ovulasyon günündeki seviyesine göre geç diöstrus ve luteolizis evrelerinde anlamlı bir değişiklik göstermediği, gebe endometriyumunda ise, HB-EGF mRNA'nın gebeliğin 14. ve 22. günlerinde aynı seviyede olup bu seviyenin 18. günde arttığı, 60. gününde de en yüksek seviyede olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar HB-EGF ve mRNA ekspresyonunun östrojen ve progesterondan etkilenmediği ve embriyonik faktörlerin HB-EGF ve mRNA'sının düzenlenmesinde steroid hormonlardan daha etkili olduğunu düşünmüşlerdir (12).

Yapılan bir çalışmada, EGF ailesi üyesi olan HB-EGF'nin maymunlarda gebeliğin erken dönemlerinde ve menstrual siklus sırasında uterus üzerinde immunohistokimyasal düzeyde etkili olduğu bildirilmiştir. Yue ve arkadaşları Rhesus cinsi maymunlarda gebeliğin 1, 6, 9, 12, 16, 20 ve 25. günlerinde HB-EGF proteininin çoğunlukla bez epiteli, uterus lümen epiteli ve myometriumda lokalize olduğunu, ekspresyon miktarının 16. ve 20. günlerde en yüksek seviyede olduğunu ve 25. günde azalmaya başladığını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, menstrual siklusun orta ve geç luteal fazı boyunca HB-EGF boyama seviyesinin uterus stromasında düşük, myometriumda ise hem poliferatif hem de sekresyon fazında mevcut olduğunu fakat sekresyon fazında daha belirgin olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, HB-EGF'nin maymunlarda erken gebelik esnasında implantasyonda ve

menstrual siklus esnasında bez gelişiminde önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (100).

CD-1 farelerde yapılan in situ hibridizasyon çalışmasında, HB-EGF mRNA'sı preimplantasyonda, gebeliğin 1-8. günleri arasında araştırılmıştır ve gebeliğin 1. gününde HB-EGF mRNA sinyallerinin lümen ve bez epitelinde heterojen bir dağılım gösterdiği, bu dağılımın menstrual siklusun preovulatuere fazındaki östrojen salgısı tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir. Gebeliğin 2. ve 3. günlerinde sinyallerin neredeyse kaybolduğu, 4. gün tekrar tespit edildiği ve mRNA sinyalinin lümen epiteli boyunca uterus mesometrial kutbuna doğru dağıldığı gözlenmiştir. Gebeliğin 7. ve 8. günlerinde ise HB-EGF mRNA birikiminin anti mesometrial bölgedeki sekonder desidual hücrelerinde olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar aynı farelerde yaptıkları immunohistokimyasal çalışmalarında, HB-EGF'nin gebeliğin 1. gününde uterus lümen ve bez epitelinde, 5. günde ise implantasyon penceresi boyunca blastosisti çevreleyen lümen epitelinde mevcut olduğunu, blastosistte ekspre olmadığını bildirmişler ve bu bulguları Western Blot ile de desteklemişlerdir. Bu bulgular ışığında araştırmacılar, HB-EGF'nin paracrin bir mekanizma ile gebeliğin 4. günde belirmesini, blastosistin lümen epiteline tutunmak için zona pellucidadan kurtulması ile ilişkilendirmişlerdir (24).

Zang ve arkadaşları progesteronun sıçan uterus stromal hücrelerinde HB-EGF mRNA üzerine indükleyici bir etkiye sahip olduğunu gösteren başka bir çalışmalarından yola çıkarak yaptıkları çalışmada, progesteronun HB-EGF üzerindeki etkisinin bir progesteron antagonisti olan onapristone ile bloke olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar suni olarak uyarılan sıçan desiduasında HB-EGF mRNA'sının arttığını, stromal hücrelerin maksimum mitotik aktivite sergilediğini gözlemlemişlerdir. Onapristone ile muamele edilen sıçanlarda ise desidual uyarımın başarısız olduğu, bununla stromal hücre duyarlılığını inhibe ettiğini bildirmişler. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar, HB-EGF'nin desidual uyarıyı sağlamak üzere stromal hücre proliferasyonunu otokrin/paracrin bir yolla etkilediğini ileri sürmüşlerdir (101).

Zhang ve arkadaşlarının sıçanlarda overektomi sonrası, dolaşımdaki steroidleri temizlemek için 10 gün boyunca bekletilmiş ve ardından 200 ng östrojen ve 5 mg progesteron uygulanmış yetişkin sıçanlarda yaptıkları başka bir çalışmada; overektomi sonrası 12-16. saatlerde HB-EGF seviyesinin düşük olduğu, 200 ng östrojen

uygulamasının 2. ve 24. saatlerde HB-EGF mRNA ekspresyonunu lümen epitelinde belirgin bir şekilde uyardığı, 5mg progesteron uygulamasının ise 4. ve 24. saatlerde HB-EGF mRNA ekspresyonunu uterus lümen epitelinde önemli derecede bastırdığı tespit edilmiştir. Östrojen ve progesteronun hücre poliferasyonu üzerine etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada normalde G1 fazında ekspre olan cyclin D1 mRNA'nın östrojen verilmesini takiben uterus lümen epitel hücrelerinde önemli derecede arttığı, overektomiden 12 saat sonra ise azaldığı tespit edilmiştir. Normalde G2 ve M fazında ekspre edilen cyclin B1 mRNA'nın ise östrojen verilmesini takiben 16 saate kadar tespit edilmediği, 24. saatte ekspre olduğu, progesteron muamelesi sonunda ise uterus lümen epitel hücrelerinde belirmediği bildirilmiştir. HB-EGF ekspresyonunun bu bulgular ile paralellik göstermesi, uterus epitel hücre poliferasyonunun steroid düzenlenmesinde önemli bir araç olduğunu düşündürmektedir (103).

HB-EGF'nin bir formu olan transmembran HB-EGF (tmHB-EGF); HB-EGF mRNA'nınine benzer bir şekilde uterus lümen epitelinde bulunup, tmHB-EGF hücre-hücre temasını yönlendiren jukstakrin aktivitesine sahiptir. Örneğin; Raab ve arkadaşları CD-1 fareleri üzerinde; gebeliğin 5. gününde yaptıkları çalışmada tmHB-EGF'nin ekspresyonunu incelemişler, incelemelerinin sonucunda tmHB-EGF'nin gebeliğin 5. gününün sabahında blastosisti çevreleyen uterus lümen epitelinde mevcut olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak tmHB-EGF'nin sadece blastosist yerleşim yeri olan uterus lümen epitelinde sentezlendiği ve tmHB-EGF'nin jukstakrin aktivitesi sayesinde implantasyon süresince uterusu blastosist yapışmasında rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır (76).

Erken gebelik döneminde HB-EGF'nin implantasyon esnasındaki ekspresyonuna ilişkin çalışmalar genellikle insanlar üzerinde ve hamster, kısırak, maymun gibi diğer türler üzerindedir. Sıçanlarda yapılan çalışmalar ise, kısıtlı ve daha çok kültür ortamında ya da farklı deneysel modeller üzerine kurgulanmış olup gebe sıçan uterus dokusundaki immunekspresyonuna ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışma ile gebeliğin erken dönemlerinde sıçan uterus dokusunda HB-EGF'nin immunlokalizasyonlar ve ekspresyon düzeyleri gebeliğin farklı günlerinde karşılaştırılarak, bu büyüme faktörünün preimplantasyon ve implantasyon dönemlerindeki rolü ve moleküler mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır. Sıçanlarda gebeliğin erken dönemleri olan 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan uterus doku örnekleri

immunohistokimyasal olarak incelendiğinde HB-EGF'nin gebeliğin ilk gününden 5. gününe kadar uterus lümen ve bez epitellerinde yoğun şekilde lokalize olduğu 7. günde ise implantasyonun ilerlemesiyle beraber uterus lümen epitelinde boyanma şiddetinin azaldığı gözlemlendi. Gebeliğin ilk 5. günü boyunca subepiteryal ve endometriyal stromada orta şiddette HB-EGF immunlokalizasyonu mevcuttu. Myometriyum ve kapillerdeki HB-EGF immunreaksiyonu ise gebeliğin 7. gününe doğru giderek azalmıştı. Gebeliğin 7. gününde uterus stromasında desidual reaksiyonun ilerlemesiyle beraber primer ve sekonder desidual alanları belirginleşmişti. HB-EGF immunreaksiyonu blastosisti çevreleyen PDR alanında SDR alanına göre daha şiddetliydi.

Elde ettiğimiz bulgular immunohistokimyasal düzeyde ve semiquantitatifdir, daha sonra yapılacak Western Blot gibi kantitatif çalışmalarla desteklenmesi hipotezimizi teyit edecek olmakla birlikte mevcut bulgularımız HB-EGF'nin sıçan uterus dokusunda preimplantasyon, implantasyon ve desidualizasyonda önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile gebeliğin erken dönemlerinde sıçan uterus dokusunda Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü'nün (HB-EGF) ekspresyonu immunohistokimyasal teknik ile araştırılarak gebeliğin erken dönemlerindeki etkileri hakkında yeni bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla gebeliğin 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerinde alınan uterus doku örneklerinde HB-EGF immun boyaması yapılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen bulgular immunohistokimyasal düzeyde ve semiquantitatif olup HB-EGF'nin preimplantasyon, implantasyon ve desidualizasyon dönemlerinde bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir. Çalışmamızın devamında mevcut yöntemimiz Western Blot tekniği ile desteklenerek daha ayrıntılı bir quantitatif sonuçlar elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abraham JA, Damm D, Bajardi A, Miller J, Klagsbrun D, Ezekowitz RA** (1993): Heparin-binding EGF-like Growth Factor Characterization of Rat and Mouse cDNA Clones, Protein Domain Conservation Across Species, and Transcript Expression in Tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* **190(1)**, 125–133.
2. **Achache H, Revel A** (2006): Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod update* ., **12**, 731-746.
3. **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., s:8-14.
4. **Akçalı S, Balcıoğlu İC, Şanlıdağ T, Limoncu E, Özensoy Töz S, Özbel Y** (2004): Visseral Leishmaniasis Olgularında İmmunglobulin İzotip ve IgG Subtiplerinin Dağılımı. *Parazitoloji Derg.*, **28 (2)**, 73-76.
5. **Akkuş D, Sönmez MF** (2012): Cell Adhesion Molecule: Nectin. *Sağ Bil Derg.*, **21(3)**, 205-211.
6. **Aksun SA, Özmen D, Bayındır O** (2001): Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin Tıp Bilimleri.*, **21**, 332-342.
7. **Alattia JR, Tong KI, Takeichi M, İkura M** (2002): Cadherins. *Methods Mol Biol.*, **172**, 199-210.
8. **Anonim:** [http://en.wikipedia.org/wiki/ErbB_\(20.04.2015\)](http://en.wikipedia.org/wiki/ErbB_(20.04.2015)).
9. **Anonim:** [http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin-binding_EGF_\(20.04.2015\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin-binding_EGF_(20.04.2015)).
10. **Anonim:** <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/11/Yrd.-Doç.-Dr.-M.-Bülent-ERTUĞRUL-2-Yara-Onarımında-Epidermal-Büyüme-Faktörü.pdf> (07.06.2016).
11. **Arkonac BM, Foster LC, Sibinga NE, Patterson C, Lai K, Tsai JC, Lee ME, Perrella MA, Haber E** (1998): Vascular endothelial growth factor induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.*, **273**, 4400–4405.
12. **Atlı MO, Güzeloğlu A, Kurar E, Kayış SA, Aslan S, Semacan A, Çelik S** (2012): Expression of Epidermal Growth Factor (EGF) and Heparin-Binding EGF

- (HB-EGF) mRNA in Mare Endometrium. *Kafkas Üniv. Veteriner Fak Derg.*, **18(3)**, 463-467.
- 13. Bahar L, Baykal T** (2008): Endometriyal Reseptivitenin İmplantasyondaki Rolü. *Mersin Univ Sağlık Bilimleri Derg.*, **1(2)**, 1-6.
 - 14. Besner G, Higashiyama S, Klagsbrun M** (1990): Isolation and Characterization of a Macrophage-derived Heparin Binding Growth Factor. *Cell Regul.*, **1(11)**, 811-819.
 - 15. Blitek A, Waclawik A, Kaczmarek MM, Stadejek T, Pejsak Z, Ziecik AJ** (2006): Expression Of Cyclooxygenase-1 ve 2 İn The Porcine Endometrium During The Qestrous Cycle And Early Pregnancy. *Reprod Dom Anim.*, **41**, 251-257.
 - 16. Brosens JJ, Hayashi N, White JO** (1999): Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endoc.*, **140**, 4809-4820.
 - 17. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA** (2002): The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol.*, **187**, 1416-1423.
 - 18. Bulgurcuoğlu S, Özsait B, Attar E** (2003): Büyüme Faktörlerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkisi. *Artemis.*, **4(1)**, 18-26.
 - 19. Castro-Rendon WA, Castro-Alvarez JF, Guazman-Martinez C, Bueno-Sanchez JC** (2006): Blastocyst-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res.*, **39(11)**, 1373-85.
 - 20. Chobotova K, Muchmore ME, Carver J, Yoo HJ, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, Mardon HJ** (2002): The Mitogenic Potential of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor in the Human Endometrium Is Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor and Is Modulated by Tumor Necrosis Factor- α . *By The Endocrine Society*, doi: **10**, 1210-020069.
 - 21. Cook PW, Ashton NM, Karkaria CE, Siess DC, Shipley GD** (1995): Differential effects of a heparin antagonist (hexadimethrine) or chlorate on amphiregulin, basic fibroblast growth factor, and heparin-binding EGF-like growth factor activity. *J Cell Physiol.* **163(2)**, 418-429.

22. **Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL** (1996): Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci.*, **93**, 3115-3120.
23. **D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD** (2007): Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biol Repro.*, **77** (3), 433-41.
24. **Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, Dey SK** (1994): Heparin-binding EGF-like Growth Factor Gene is Induced In The Mouse Uterus Temporally By The Blastocyst Solely at The Site of its Apposition: A Possible Ligant For İnteraction with Blastocyst EGF-receptor in Implantation. *Development.*, **120**, 1071–1083.
25. **Demir R** (1995): *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*, Palme Yayınevi, Ankara, s:100-120.
26. **Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G** (2007): The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update.* **13**, 365-377.
27. **Ehrhardt C, Kneuer C, Bakowsky U** (2004): Selectins-an emerging target for drug deliver. *Pharmacol Res.*, **56**, 527-549
28. **Ekizceli G, İnan S, Öktem G, Onur E, Özbilgin K** (2015): Sıçan İmplantasyon Dönemi Boyunca Uterusların Histolojik Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniv Tıp Derg.*, **41**(3), 125-129.
29. **Elter K, Oral E** (2000): İmplantasyon fizyolojisi ve implantasyonu etkileyen faktörler. *Obstetrik ve Jinekolojik Sürekli Eğit Derg.*, **4**, 48-63.
30. **Emekli S** (2010): Endometriyum hücrelerinde lityumun etkilerinin incelenmesi İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Uzmanlık Tezi., 7-8.
31. **Faber-Elman A, Solomon A, Abraham JA, Marikovsky M, Schwartz M** (1996): Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation. *J Clin Invest.*, **97**(1), 162-171.
32. **Fazlıoğulları Z** (2011): Antiemetiklerin Rat Embriyoları Gelişimi Üzerinde Toksik ve Teratojen Etkilerinin İn Vitro Kültür Ortamında Araştırılması. Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.*, s:17, 109.

33. **Gellersen B, Brosens J** (2006): Cyclic Amp and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Mol Endocrinal.* **36**, 389-398.
34. **Goishi K, Higashiyama S, Klagsbrun M, Nakano N, Umata T, Ishikawa M, Mekada E, Taniguchi N** (1995): Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol Biol Cell.*, **6**, 967–980.
35. **Gökçimen A, Temel S** (2004): İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *SDÜ Tıp Fak Derg.*, **11 (4)**, 25-33.
36. **Güç D** (2004): Adhezyon molekülleri. *ANKEM Derg.*, **18 (Ek 2)**, 158-163
37. **Gündüz E, Demirsoy A, Türkan İ.** (2010): *Biyoloji*. Palme Yayıncılık, 6. Baskı Çeviri, Ankara. s: 990.
38. **Güneş H** (1999): Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri. *Tr J of Biology.*, **23**, 283–292.
39. **Harem İŞ** (2013): Trofoblastların Yapısal Özellikleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, **2**, 48-53.
40. **Harem İŞ, Sarı EK, Koçak Harem M, Sözmen M** (2013): Bıldırcın (Coturnix Coturnix Japonica) Oviduktunda Fibroblast Büyüme Faktörü-2 ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Ekspresyonu. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, **2(1)**, 6-11.
41. **Hassa O, Aştı RN** (1997): *Embriyoloji*, Genişletilmiş 3.Baskı, Yorum Basın Yayın Sanayi Limited Şirketi, Ankara, s:27-28.
42. **Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegard M, Nayak N, Genbecev-Krtolica O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J, Fazleabas AT, Fisher SJ, Giudice LC** (2006): Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immuneand angiogenic modulators. *Biol Reprod.*, **76 (1)**, 102-117.
43. **Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M** (1991): A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science.*, **251**, 936–939.
44. **Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham JA, Klagsbrun M** (1992): Structure of Heparin-binding EGF-like Growth Factor. *The J of Biol Chem.*, **267(9)**, 6505-6212.

- 45. Hua F, Li C-H, Wang H, Xu H-G** (2013): Relationship Between Expression Of Cox-2, Tnf-A, Il- And Autoimmune-Type Recurrent Miscarriage. *Asian Pacific J of Trop Med.*, **12**, 990-994.
- 46. Kansas GS** (1996): Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood.*, **88**, 3259-87.
- 47. Kaya S** (2009): Yardımlı üreme teknikleri uygulamalarında serviko-vajinal lavaj ve serumdan implantasyon belirteci olarak glikodelin ve makrofaj-koloni stimulan faktör bakılmasının klinik ve prognostik önemi Başkent Üniversitesi Kadın Doğum ve Doğum Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi., 21-22.
- 48. Kennedy TG, Brown KD, Vaughan JT** (1993): Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine corpora lutea. *Endoc.*, **132**, 1857–1859.
- 49. Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH** (2007): Prostaglandins And The Initiation Of Blastocyst Implantation And Desidualization. *Reproduction.*, **134**, 635–643.
- 50. Kılıç A** (2012): Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor and Dermatological Side Effects. *Turk J Dermatol.*, **6**, 168-74.
- 51. King A** (2000): Uterine leukocytes and decidualization *Hum Reprod Update.*, **6**, 28-36.
- 52. Köse O** (2013): Uterin Myomlarda Patofizyolojik Özellikler *KÜ Tıp Fak Derg.*, **15 (2)**, 29-36.
- 53. Kutlu U** (2006): Oksijen Konsantrasyonunun İmplantasyon Öncesi Embriyo Gelişimi Ve Gebelik Oranı Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı. s:11.
- 54. Leach RE, Khalifa R, Ramirez ND, Das SK, Wang J, Dey SK, Romero R, Armant DR** (1999): Multiple Roles for Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor Are Suggested by Its CellSpecific Expression during the Human Endometrial Cycle and Early Placentation. *The J of Clin Endoc & Met.*, **84(9)**, 0021-972.

- 55. Lecouter J, Lin R, Ferrara N** (2004): “EG-VEGF: a novel mediator of endocirne-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function”, *Ann N Y Acad Sci.*, **1014**, 50-57.
- 56. Lee SW** (1996): H-cadherin, a novel growth inhibitory function and diminished expression in human breast cancer. *Nature Med.*, **2**, 776-82.
- 57. Lessey BA, Gui Y, Apparoa KBC, Young SL, Mulholland J** (2002): Regulated Expression of Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor (HB-EGF) in the Human Endometrium: A Potential Paracrine Role During Implantation. *Mol Reprod and Develop.*, **62**, 446-455.
- 58. Li T, Perez-Soler R** (2009): Skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Targ Onco.*, **14**, 107-19.
- 59. Lim H, Dey SK, Das SK** (1997): Differential Expression of the *erbB2* Gene in the Periimplantation Mouse Uterus: Potential Mediator of Signaling by Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors. *Endoc.*, **138(3)**, 0013-7227.
- 60. Lim HJ, Dey SK.** (2009): HB-EGF: A Unique Mediator Of Embryo-Uterine Interactions During Implantation. *Exp Cell Res.* **315(4)**, 619-626.
- 61. Marikawa Y, Alarcon VB** (2009): Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.*, **76**, 1019-32.
- 62. Martin KL, Barlow DH, Sargent IL** (1998): Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum free medium. *Hum Reprod.*, **13(6)**, 1645-1652.
- 63. Massague J, Pandiella A** (1993): Membrane-Anchored Growth Factor. *Annu Rev Biochem.*, **62**, 515-41.
- 64. Massague J** (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.*, **67**, 753-91.
- 65. Matur İ** (2009): Fare Embriyoları İle Partenotlarının Gelişimsel Potansiyelleri Ve Morfolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı. Adana. 7-9.
- 66. McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT** (2006): *Veterinary Embryology (Veteriner Embriyoloji)*. Çeviren: Çelik İ, Öznurlu Y. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya, s:86.

- 67. 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 Kitapevi, Ankara, s:23-26
- 68. Moore KL, Persaud TVN (2009):** *The Developing Human: Clinically Oriented Embriyology*, 8th Edition (*Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*). Çeviren: Dalçık H, Yıldırım M. Nobel Matbacılık, 2.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, s:11-36.
- 69. 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.
- 70. Öner H, Öner J, Demir R (2006):** Expression of nidoges in rat uterus and embriyo during decidualization and implantation. *Journal of Morphology*, **267**, 822-830.
- 71. Öner J, Öner H (2013):** Gebelikte Matriks Metalloproteinazlar (MMP) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP). *Selçuk Tıp Dergisi.*, **29 (2)**, 95-99.
- 72. Özer A, Özfiliz N, Yakışık M, Erdost H, Zık B (2005):** *Evcil Hayvan Zigotlarında Yarıklanmalar*. Veteriner Embriyoloji, 2. Baskı, Uludağ Üniv Vet Fak Yayınları., Bursa, s:56-58.
- 73. Özfiliz N, Erdost H, Zık B (2007):** *Embriyoloji*. Editör: Özer A. Veteriner Embriyolojisi, 3.Baskı, Nobel Basım Evi, Ankara, s:32-114
- 74. Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK (1999):** Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Develop.*, **126**, 1997-2005.
- 75. Raab G, Klagsbrun M (1997):** Heparin-binding EGF-like growth factor *BBA.*, **1333**, 179-199.
- 76. Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M (1996):** Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development.*, **122**, 637-645.


- 77. 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.
- 78. Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G** (2003): Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases – a review. *Placenta.*, **24**, 76-85.
- 79. Salman M, Hyder M, George M** (2009): Regulation of Angiogenic Growth Factors in the Female Reproductive Tract by Estrogens and Progestins. *Mol Endoc.*, **13(6)**, 806-811.
- 80. Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E, Hausknecht V, Lockwood CJ** (1995): Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endoc Metab.*, **80**, 2504-2510.
- 81. Soyöz M, Özçelik N** (2007): TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ve sinyal iletimi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, **27**, 426-433.
- 82. Sposito DR, Santos AR** (2011): Histochemecial Study of Early Embryo İmplantation in Rats. *Int J Morphol.*, **29(1)**, 187-192.
- 83. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff MV** (2006): The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod update.*, **12**, 617-630.
- 84. Şensoy E, Öznurlu Y** (2009): Hücre adezyon molekülleri. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg.*, **4**, 57-68.
- 85. Tamada H, Higashiyama C, Takano H, Kawate N, Inaba T, Sawada T** (1999): The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation in the rat. *Life & Sciences.*, **64(22)**, 1967-73.
- 86. Tan Y, Li M, Cox S, Davis MK, Tawfik O, Paria BC, Das SK** (2004): HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation. *Develop Biol.*, **265**, 181-195.
- 87. Terekeci MH, Şahan B, Top C** (2008): Hücre Adezyon Molekülleri. *Nobel Med.*, **4(1)**, 4-10.
- 88. Thomas KA** (1996): “Vascular Endothelial Growth Factor, A Potent and Selective Angiogenic Agent”, *J Biol Chem.*, **271**, 603-606.

- 89. Ushiro S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Taniguchi N, Higashiyama S, Kuwano M** (1996): Heparin Binding Epidermal Growth Factorlike Growth Factor: p91 Activation, Induction of Plasminogen Activator/Plasminogen Activator Inhibitor, and Tubular Morphogenesis in Human Microvascular *Endotelial Cells J Cancer Res.*, **87**, 68-77.
- 90. Vinante F, Antonella Rigo A** (2013): Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor/Diphtheria Toxin Receptor in Normal and Neoplastic Hematopoiesis. *Toxins.*, **5**, 1180-1201.
- 91. Wang H, Dey SK** (2006): Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Rev Gen.*, **7**, 185-199.
- 92. Wang J, Mayernik L, Schultz JF, Armant R** (2000): Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Develop.*, **127**, 33-44.
- 93. Wang X, Wang H, Matsumoto H, Roy SK, Das SK, Paria BC** (2002): Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster. *Develop.*, **129**, 4125-4134.
- 94. Wang XN, Das SK, Damm D, Klagsbrun M, Abraham JA, Dey SK** (1994): Differential Regulation of Heparin-binding Epidermal Growth Factor in the Adult Ovariectomized Mouse Uterus By Progesterone and Estrogen. *Endoc.*, **135**. 1264–1271.
- 95. Westwood FR** (2008): The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Tox Pathology.*, **36**, 375-384.
- 96. Yeler H, Yücetaş Ş, Yılmaz D, Öztürk M, Arıcı S** (1999): Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nin Diş Çekim Yarası İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *Cumhuriyet Üniv Diş Hek Fak Derg.*, Cilt 2, Sayı 1.
- 97. Yetkin D, Yılmaz BC, Yılmaz ŞN** (2013): Diyabetin, implantasyon penceresi dönemindeki fare endometriyumunda laminin ekspresyonuna etkisi. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg.*, **6(3)**, 19-24.
- 98. Yoo HI, Barlow DH, Mardon HJ** (1997): Temporal and Spatial Regulation of Expression of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor in

the Human Endometrium: A Possible Role in Blastocyst Implantation. *Develop Gen.*, **21**, 102–108.

- 99. Yoshizumi M, Kourembanasn S, Temizer DH, Cambriail RP, Quertermou T, Lee M** (1992): Tumor Necrosis Factor Increases Transcription of the Heparinbinding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor Gene in Vascular Endothelial Cell. *The J of Biol Chem.*, **267**, 9467-9469.
- 100. Yue ZP, Yang ZM, Li SJ, Wang HB, Harper MJK** (2000): Epidermal growth factor family in rhesus monkey uterus durin tje menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Reprod and Develop.*, **55**, 164-174.
- 101. Zhang Z, Funk C, Glasser SR, Mulholland J** (1994): Progesterone Legulation of Heparin Binding Growth Factor-Like Growth Factor Gene Expression During Sensitization and Decidualization in the Rat Uterus: Effect of the Antiprogestin. *Endoc.*, **135**, 1256–1263.
- 102. Zhang Z, Funk C, Roy D, Glasser S, Mulholland J** (1994): Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is differentially regulated by progesterone and estradiol in rat uterine epithelial and stromal cells. *Endoc.*, **134**,1089–1094.
- 103. Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J** (1998): Mediators of Estradiol-Stimulated Mitosis in the Rat Uterine Luminal Epithelium. *Endoc.*, **139(3)**, 0013-7227.
- 104. 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 and Develop.*, **62**, 149-158.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı:	Sinem Pekşen	
Doğum Yeri ve Yılı:	İzmir / 18.06.1992	
Medeni Hali:	Bekar	
Yabancı Dili:	İngilizce	
Uyruğu:	T.C.	
Telefon No:	05064995339	
Elektronik Posta:	sinempeksen.07@gmail.com	
İletişim Adresi:	Halıkent Mahallesi Mimar Mühendisler Sitesi C 1 Blok No:8 ISPARTA/ Merkez	

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2014