

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

**FARELERDE ERKEN GEBELİK BOYUNCA
UTERUSTA BAZI NOTCH SİNYAL YOLAĞI
ÜYELERİNİN EKSPRESYONU**

İmren EDİZER

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

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

FARELERDE ERKEN GEBELİK BOYUNCA UTERUSTA BAZI NOTCH SİNYAL YOLAĞI ÜYELERİNİN EKSPRESYONU

İmren EDİZER

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013.02.0122.008)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 13 Mart 2015

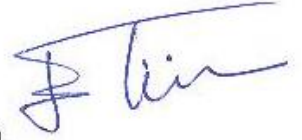
Tez Danışmanı : **Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Necdet DEMİR**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve / kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi ve ilerlemesinde birçok faktör rol almaktadır. Fertilizasyondan sonra embriyonun preimplantif dönem gelişimi ve implantasyon ile desidualizasyonun sağlıklı gelişimi, başarılı gebeliğin kurulmasında temel oluşturmaktadır. Bu olaylar heterojen hücre toplulukları içeren uterusda gerçekleşir. Preimplantif gelişimini sağlıklı tamamlayan embriyo, senkronize bir şekilde hazırlanmış ve reseptif hale gelmiş uterusu implante olabilmektedir.

Notch sinyali, hücre kaderinin belirlenmesinde ve birçok hücresel mekanizmada rolü olan, evrimsel olarak korunmuş hücreler arası bir sinyal yolağıdır. Notch sinyali doğrudan hücre-hücre temasıyla aktive olur ve embriyonik gelişimde apoptoz, hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre soyu kararı gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde gereklidir.

Erken gebelikte uterus reseptivitesinin ve desidualizasyonun kurulmasında Notch sinyal yolağı üyelerinin etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, farelerde erken gebelik dönemlerinde, aktif Notch1 (NICD1) ve aktif Notch2 (NICD2) ile Notch sinyal yolağı hedef genlerinden olan HEY1 ve HES5'in uterusdaki dağılımlarının ve ekspresyon miktarlarının incelenmesi amaçlandı.

Bu amaçla, östrus fazı, gebeliğin 1., 4., 5. ve 8. günlerinde olan fare uterus dokuları alındı ve immünohistokimyasal gözlemler için %10'luk formalin ile fiks edilerek parafin takibe alındı. Elde edilen parafin bloklardan 5-7 µm kalınlığında alınan kesitlerde, immünohistokimyasal yöntemle NICD1, NICD2, HEY1 ve HES5 proteinlerinin immüno lokalizasyonları belirlendi. Western Blot analizleri için, taze uterus dokuları kullanıldı ve bu yöntemle aynı proteinlerin ekspresyon miktarları belirlendi.

Elde edilen bulgulara göre; NICD1 immüno boyanması tüm gruplarda doku genelinde eksprese olurken HEY1 ile paralel şekilde gebeliğin 5. gününde artış gösterdiği; NICD2 ve HES5 immüno boyanmasının yoğunluğunun NICD1 ve HEY1'e göre daha az olduğu, NICD2'nin gebeliğin 5. gününde artış göstererek özellikle blastosiste ait olan yapılarda ve PDB'de yoğunlaştığı, 8. günde ise SDB'de çok yoğunlaştığı, ayrıca özellikle gebe olmayan östrus fazındaki fare uterusunda yoğun miktarda bulunan gebeliğin 1, 4 ve 5. günlerinde sayıları gittikçe azalan mast hücrelerinde NICD2 immüno boyanmasının çok yoğun olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, NICD1, NICD2, HEY1 ya da HES5 aracılı Notch sinyal yolağının fare uterus dokusunun gebelik için hazırlanması, implantasyon olayının gerçekleşmesi, embriyo gelişim sürecinin kontrolü için gerekli olabileceği söylenilebilir.

Anahtar Kelimeler: Fare, Erken gebelik, Uterus, NICD1, NICD2, HEY1, HES5

ABSTRACT

There are many factors that have roles at appropriate establishment and progress of mammalian pregnancy. After fertilization, the proper development of preimplantation embryo, implantation and decidualization acts a major role for setting up a successful pregnancy. These events happen at uterus that has heterogeneous cell types. The embryo that complete its preimplantation development properly is able to implant the receptive uterus that is prepared synchronised with preimplantive embryo.

Notch signaling is an intercellular signalling pathway that is evolutionarily conserved and is involved in determination of cell fate and many cellular mechanisms. Notch signalling is activated by directly cell-cell contact and is required for organising of many biological function as apoptosis, cell proliferation, differentiation, cell fate.

The effects of Notch signalling pathway members on uterus receptivity and setting up decidualization at early pregnancy is not completely explained. In this study, it is aimed to analyse the distribution and the expression levels of the active Notch1 (NICD1), the active Notch2 (NICD2) and the target genes of Notch signalling pathway HEY1 and HES5 in the uterus on early pregnancy.

To that end, the uterus tissues from estrus stage female mice, female mice at the 1st, 4th, 5th and 8th days of pregnancy are collected and fixed with 10% formaline and prepared for paraffin sections. The immunolocalisation of NICD1, NICD2, HEY1 ve HES5 proteins are determined on the sections that are 5-7 µm-thick via immunohistochemical method.

It was observed that in early pregnant uterus NICD1 is generally expressed in the tissue and has higher levels on the 5th day of pregnancy synchronised with HEY1; the immunostaining intensities of NICD2 and HES5 are lower than NICD1 and HEY1; the expression of NICD2 is increased on 5th day of pregnancy and is gathered on blastocyst and primary decidualization zone, on the 8th day of pregnancy its expression is increased on secondary decidualization zone, and also NICD2 is very intensively stained on mast cells that are exist in the uterus tissue of the female mice at the stage of estrus and gradually decreased on the 1st, 4th and 5th days of pregnancy.

In conclusion, the members of Notch signalling pathway, NICD1 and HEY1 may be required for preparing the mice uterus for pregnancy, implantation and controlling the process of embryo development.

Key Words: Mouse, Early pregnancy, Uterus, NICD1, NICD2, HEY1, HES5

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına ve çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, desteğini esirgemeyen ve beni yalnız bırakmayan sevgili ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Uterusun Gelişimi	5
2.2. Uterusun Histolojik Yapısı ve Siklik Değişiklikleri	6
2.2.1. Miyometriyum	6
2.2.2. Endometriyum	6
2.2.3. Uterusta Döngüye Bağlı Değişiklikler	6
2.2.3.1. Proliferatif (Çoğalma), Foliküler ya da Östrojenik faz	7
2.2.3.2. Salgılama/Sekretuar ya da Luteal Faz	7
2.2.3.3. Gebelikte Endometriyum	8
2.3. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi	8
2.3.1. Ovaryum	8
2.3.2. Ovidukt	8
2.3.3. Uterus	8
2.3.4. Vajina ve Klitoris	9
2.4. Farelerde Uterus Histolojisi	9
2.5. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi	10
2.5.1. Farelerde Uterus Reseptivitesi	11
2.5.2. Farelerde Reseptif Uterusta Vasküler Geçirgenlik Değişiklikleri	12
2.5.3. Farelerde Desidualizasyon	13
2.6. İmplantasyon	13
2.6.1. İmplantasyonun Safhaları	14
2.6.2. İmplantasyonun Tipleri ve Zamanlaması	15
2.6.3. Farelerde İmplantasyon ve Plasentasyon	15
2.6.4. Farelerde Preimplantasyon Evresinde Embriyo Gelişimi	16

2.6.5.	Farelerde Preimplantasyon ve İmplantasyon Evresinde Uterus Histolojisi	16
2.6.6.	Farelerde İmplantasyon Evresinde Embriyo Gelişimi Ve Plasantasyon	19
2.6.7.	Farelerde Erişkin Plamenta Yapısı	25
2.6.7.1.	Yapısı	25
2.6.7.2.	İnsan Plamentası ile Benzerlikleri ve Farklılıkları	29
2.7.	Notch Sinyal Yolağı	31
2.7.1.	Notch Reseptörleri	32
2.7.2.	Notch Ligandları	33
2.7.3.	Notch Sinyal Yolağı	34
GEREÇ VE YÖNTEM		36
3.1.	Denekler, Doku Temini ve Hazırlanması	36
3.2.	İmmünohistokimyasal Gözlemler	37
3.2.1.	İmmünohistokimyasal Protokol	37
3.2.2.	İstatistiksel Analiz	39
3.2.3.	Semikantitatif Değerlendirme	39
3.2.4.	Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler	39
3.3.	Western Blot	39
3.3.1.	Protein İzolasyonu	39
3.3.2.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	40
3.3.3.	Blotlama	41
BULGULAR		43
4.1.	Rutin Işık Mikroskopik Bulgular	43
4.2.	İmmünohistokimyasal Bulgular	46
4.3.	Vimentin	46
4.4.	NICD1	47
4.5.	NICD2	55
4.6.	HEY1	62
4.7.	HES5	69
TARTIŞMA		76
SONUÇLAR		82
KAYNAKLAR		83
ÖZGEÇMİŞ		92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADAM	:	Disintegrin Ve Metaloproteaz Domeyn
amz	:	Anti-Mezometriyal Kutup
ANK	:	Ankyrin Tekrarı
Arg/Lys	:	Arjinin/Lizin
be	:	Bez Epiteli
bHLH	:	Sarmal-İlmek-Sarmal
bl	:	Blastosist
CBF1	:	Sentromer Bağlayıcı Faktör
CBP	:	CREB-Bağlayıcı Protein
CR	:	Sistein Zengin
CSL	:	CBF1, Su(H) ve LAG1
DII	:	Delta-Benzeri
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DSL	:	Delta, Serrate ve LAG-2
E₂	:	Östrojen
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
EGF-R	:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
em	:	Embriyo
EPK	:	Ektoplasental Koni
FGF4	:	Fibroblast Büyüme Faktör 4
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	:	Gonadotropin Salıcı Hormon
HB-EGF	:	Heparin-Bağlı EGF Benzeri Büyüme Faktörü
HD	:	Heterodimerize Edici Domeyn
H-E	:	Hematoksilen-Eozin
IGF2	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
İHK	:	İç Hücre Kitlesi
k	:	Kapsül
LE	:	Lümen Epiteli
LH	:	Lüteinize Edici Hormon
LNR	:	Lin12-Notch Tekrarları
ml	:	Miyometriyumun Longitudinal Kas Tabakası
MMP	:	Matriks Metalloproteinazlar
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
ms	:	Miyometriyumun Sirküler Kas Tabakası
mz	:	Mezometriyal Kutup
NICD1	:	Notch1 Hücre İçi Domeyn
NICD2	:	Notch2 Hücre İçi Domeyn
NK	:	Doğal Öldürücü
NRR	:	Negatif Düzenleyici Bölge
P₄	:	Progesteron
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDB	:	Primer Desidual Bölge
PEST	:	Prolin/Glutamik Asit/Serin/Tironin
RAM	:	RBP _j κ İlişkili Birim

RT-PCR	:	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S1	:	Birinci Bölge
S2	:	İkinci Bölge
S3	:	Üçüncü Bölge
S4	:	Dördüncü Bölge
SDB	:	Sekonder Desidual Bölge
str	:	Stroma
TE	:	Trofoektoderm
uPA	:	Ürokinaz Tip Plazminojen Aktivatör
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ZP	:	Zona Pelusida
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Dişi farede genital sistem anatomisini gösteren çizim	9
2.2.	Farelerde gebelik günlerine göre uterus reseptivitesi	12
2.3.	Chicago mavisi enjeksiyonu sonrası uterusu mavi bantlar şeklinde görülen implantasyon bölgeleri	13
2.4.	Fare plasentasyonunun erken safhaları	16
2.5.	Gebe olmayan farelerde uterusun morfolojisini gösteren çizim	17
2.6.	Farelerde gebeliğin 3,5. ve 5,5. gününde uterusun longitudinal kesitlerinin hematoxilen eozin boyanmasıyla gösterilmesi	17
2.7.	Farelerde gebeliğin 6,5. gününde uterusun morfolojisini gösteren çizim	18
2.8.	Farelerde gebeliğin 7,5. gününde uterusun morfolojisini gösteren çizim	19
2.9.	Fare plasentasının gelişimi	20
2.10.	Blastosistin preimplantif ve postimplantif gelişimi	21
2.11.	Blastosist ve endometriyal lümen epitelinin karşılıklı gelmesi (apozisyon) ve blastosistin endometriyum lümen epiteline tutunmasını gösteren çizim	22
2.12.	Sıçan ve farede plasental gelişim	25
2.13.	Farelerde term plasentanın genel görünümü	26
2.14.	Gebeliğin geç dönemlerinde olan fare uteroplantal yapısının şematik görünümü	26
2.15.	3 sıra halinde düzenlenmiş labirent trofoblast hücreleri	27
2.16.	Gebeliğin 17.gününde labirentin detaylı görünümü	27
2.17.	Gebeliğin 15.gününde spongiyotrofoblast tabakasında glikojen hücreleri ve maternal duvarlara invaze olan trofoblastik dev hücreler	28

2.18.	İnsan ve fare plasentalarının karşılaştırmalı anatomisi	31
2.19.	Notch yapısını gösteren şematik çizim ve memelilerdeki değişik Notch subtiplerinin yapılarına ait şematik görünüm	33
2.20.	Drosophila ve memelilerde Notch ligandlarının yapılarına ait şematik görünüm	34
2.21.	Drosophila ve memelilerde Notch sinyal yolağını özetleyen şematik görünüm	35
3.1.	Vajinal simir örneklerin Geimsa boyamaları	36
3.2	Chicago mavisini enjekte edilmiş 5 günlük ve 8 günlük gebe hayvanın uterusu	37
4.1	Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusunun histolojik görünümü	43
4.2	1 günlük gebe fare uterusunun görünümü	44
4.3	4 günlük gebe fare uterus görünümü	44
4.4	5 günlük gebe fare uterus görünümü	45
4.5	8 günlük gebe fare uterus görünümü	46
4.6	Gebelik gruplarına ait uterus dokularında anti-vimentin immünoboyanması	47
4.7	Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda NICD1 ekspresyonu	48
4.8	1 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu	49
4.9	4 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu	50
4.10	5 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu	51
4.11	8 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu	52
4.12:	Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda NICD1 H-SCORE analizine ait grafik	54

4.13:	Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda NICD1 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda NICD1 ekspresyon düzeylerinin karşılaştmasını gösteren grafik (b)	54
4.14:	Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda NICD2 ekspresyonu	55
4.15	1 günlük gebe fare uterusunda NICD2 ekspresyonu	56
4.16	4 günlük gebe fare uterusunda NICD2 ekspresyonu	57
4.17	5 günlük gebe fare uterusunda NICD2 ekspresyonu	58
4.18	8 günlük gebe fare uterusunda NICD2 ekspresyonu	59
4.19:	Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda NICD2 H-SCORE analizine ait grafik	61
4.20:	Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda NICD2 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda NICD2 ekspresyon düzeylerinin karşılaştmasını gösteren grafik (b)	61
4.21	Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda HEY1 ekspresyonu	62
4.22	1 günlük gebe fare uterusunda HEY1 ekspresyonu	63
4.23	4 günlük gebe fare uterusunda HEY1 ekspresyonu	64
4.24	5 günlük gebe fare uterusunda HEY1 ekspresyonu	65
4.25	8 günlük gebe fare uterusunda HEY1 ekspresyonu	66
4.26	Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda HEY1 H-SCORE analizine ait grafik	68
4.27	Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda HEY1 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda HEY1 ekspresyon düzeylerinin karşılaştmasını gösteren grafik (b)	68
4.28	Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda HES5 ekspresyonu	69
4.29	1 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu	70

4.30	4 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu	71
4.31	5 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu	72
4.32	8 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu	73
4.33	Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda HES5 H-SCORE analizine ait grafik	75
4.34	Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda HES5 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda HES5 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (b)	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1	Kontrol E1, E4, E5 ve E8. günlerde NICD1 immünoboyanmasının hücresel dağılımı	53
4.2	Kontrol E1, E4, E5 ve E8. günlerde NICD2 immünoboyanmasının hücresel dağılımı	60
4.3	Kontrol E1, E4, E5 ve E8. günlerde HEY1 immünoboyanmasının hücresel dağılımı	67
4.4	Kontrol E1, E4, E5 ve E8. günlerde HES5 immünoboyanmasının hücresel dağılımı	74

GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Memelilerde gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde çok sayıda faktör rol alır. Fertilizasyon, preimplantif dönem embriyo gelişimi, implantasyon ve desidualizasyonun sağlıklı olarak gerçekleşmesi başarılı bir gebeliğin olmazsa olmazlarıdır. Bu olayların gerçekleştiği uterus, değişen östrojen (E_2) ve progesteron (P_4) salgılarına özgün biçimde yanıt veren heterojen hücre popülasyonlarından oluşur. Ancak pre-implantif gelişimini sorunsuz bir şekilde gerçekleştiren embriyo uterusu implante olacaktır. İmplantasyon için blastosistin sağlıklı olarak gelişmesinin yanı sıra uterusun da reseptif halde olması gerekir. Farelerde uterus reseptivitesi gebelik boyunca sınırlı bir zaman diliminde gerçekleşir. Bu türlerde uterus pre-reseptif (nötral), reseptif ve non-reseptif fazlara ayrılabilir [1, 2]. Gebe farede uterus sadece 4. günde (implantasyon günü) reseptif olur, 5. günde uterus non-reseptif olur ve blastosistin varlığına yanıt vermez. İmplantasyon sürecinde, embriyo ve uterus hücreleri arasında kompleks etkileşimler gerçekleşir. İmplantasyon sürecinin temel olayları şu şekilde sıralanabilir:

1. Preimplantasyon evresindeki embriyonun blastosist aşamasına ve uterusun reseptif faza senkronize bir şekilde gelmesi [3],
2. Semiallogenik embriyonun annenin immünolojik yanıtlarından kaçması [4],
3. Blastosistin uterusu yakınlığı alanda artan kapiler geçirgenlik ve kan akışı [3],
4. Blastosistin uterus lümen epiteline ilk tutunmasını takiben yakındaki endometriyal stromanın lokal desidualizasyonu [3, 5]
5. Embriyonik trofoblastlarca kontrollü uterus invazyonu [6]

Enders ve Schlafke'ye göre implantasyon 3 safhaya ayrılabilir: apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon (içine girme) [7, 8]. Apozisyon, embriyonik trofoektoderm hücreleri ile lümen epitelinin birbirlerine yaklaştıkları safhadır. Adezyon safhasında trofoektoderm ile lümen epiteli arasındaki ilişki blastosistin yıkama ile uzaklaştırılmasına izin vermeyecek kadar ilerlemiştir. Penetrasyon safhasında trofoektoderm lümen epiteline invaze olur. Bu aşamalarda, hem embriyo hem de uterustaki hücre tiplerinde proliferasyon, farklılaşma, göç ve yeniden şekillenme olayları görülür. Bu kritik olaylar P_4 ve E_2 tarafından aracılık edilen geçici ve hücre tipine spesifik etkileşimlere bağlıdır.

Farede preovulatuvar E_2 salgılanması gebeliğin ilk iki günü boyunca lümen ve bez epiteli hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlar. Buna karşın yeni oluşan korpora luteadan salgılanan P_4 , preovulatuvar E_2 salgısı ile birleşerek gebeliğin 3. gününde proliferasyonun epitelden stromaya kaymasını sağlar. Stromal hücre proliferasyonu gebeliğin 4. gününde (implantasyon günü) salgılanan preimplantasyon

ovaryan östrojen salgısı ile etkili hale getirilir. Preimplantasyon ovaryan östrojenin salgılanması ve blastosistin olduğu bölgede endometriyal kapiler geçirgenliğin artışı daha sonra stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşmasında gereklidir.

Desidual hücre reaksiyonu ilk olarak blastosistin implante olduğu anti-mezometriyal bölgede gerçekleşir. Farede blastosisti çevreleyen farklılaşan stromal hücreler gebeliğin 5. gününde önce primer desidual bölgeyi (PDB) oluştururlar. Bu bölge avaskülerdir ve desidual hücrelerle sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Altıncı günde, PDB'nin çevresinde sekonder desidual bölge (SDB) oluşur. Bu süreçte, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) sentezi SDB'de yüksek olmasına karşın PDB'de düşüktür. PDB sekizinci güne kadar ilerleyen şekilde dejenere olur. Sekizinci günde SDB desidua kapsülaris adı verilen ince bir hücre tabakasına dönüşür. Mezometriyal desidual hücreler sonunda desidua bazalisi oluştururlar. Desiduanın fonksiyonları, gelişen embriyoya besin sağlamak, embriyoyu annenin immünolojik yanıtlarından korumak ve uterus stromasına trofoblast invazyonunu düzenlemektir [9, 10].

Notch sinyali, evrimsel olarak korunmuş hücreler arası bir sinyal yolağı olup gelişim süresince uygun hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Notch sinyali, Notch reseptörleri ile onların ligandları olan Delta ya da Jagged arasındaki etkileşimler sonucunda hücre-hücre bağlantılarıyla aktive olur. Notch sinyali embriyonik gelişim boyunca apoptoz, hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre soyu kararı ve erişkinde kendini yenileyen organların homeostazı gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde gereklidir. Notch sinyali; lateral inhibisyon, lateral indüksiyon, kök hücre devamlılığı ve terminal farklılaşma gibi gelişimsel kararlarda anahtar olan çeşitli mekanizmalar üstünde etkilidir. Lateral inhibisyon eşit miktarda Notch reseptör ve ligand eksprese eden bir grup eşdeğer hücrenin azar azar ya Notch reseptörünü ya da Notch ligandını eksprese etmeye başladığı nörogenez süresince gerçekleşir. Lateral indüksiyon durumunda, Notch ligandı yakın çevredeki farklı bir hücre tarafından sağlanır. Lateral indüksiyona örnek, timik stromal hücrelerin indükleyici sinyali sağladığı durumda ortak lenfoid progenitörünün öncül T hücrelerine geliştiği lenfopoezistir. İndükleyici sinyalin yokluğunda, örneğin, kemik iliğinde ortak lenfoid progenitör kemik iliği stromal hücrelerinin yardımıyla B hücrelerine farklılanır. Notch sinyali ayrıca kök hücre durumunu korur. Buna örnek Notch sinyalinin çukur progenitör hücrelerini farklılanmadan koruduğu ince bağırsaktır. Diğer taraftan, Notch sinyali ayrıca derideki keratinositlerde gözlemlendiği gibi hücre döngüsü duraklamasını tetikleyerek terminal farklılaşma programını çalıştırabilir. Notch sinyalleri son derece pleiotropiktir dolayısıyla birçok dokuyu etkiler [11].

Notch sinyali Notch reseptörleri ile bunların ligandları arasındaki etkileşimin sonucu olarak hücre-hücre bağlantısı üzerinden etki gösterir. Notch reseptörleri eksprese eden hücreler Notch sinyalini alır. İnsan ve farelerde dört adet Notch geni bulunur. Bütün türlerde Notch reseptörleri, Notch sinyal alıcısı hücrede gen regülasyonuna öncülük eden ardışık olayları tetikleyen ligandlara bağlanan tek geçişli transmembran proteinlerdir. Memelilerde tüm Notch reseptörleri (Notch 1-4) ve ligandları (Jagged 1-2 ve Delta-like 1, 3 ve 4) transmembran proteinlerdir, dolayısıyla hücre dışı ve hücre içi domeynlere ayrılırlar. Notch ligandları Notch reseptörleri ile etkileşim için gerekli olan bir N-terminal DSL (Delta, Serrate ve LAG-2) domeyni ile karakterizedir. Ligandların hücre dışı domeynleri değişen sayılarda epidermal büyüme faktörü (EGF) tekrarları içerirler. Ligandlar, sistein zengin (CR) domeynin varlığına

ya da yokluğuna bağlı olarak Delta ya da Delta-like (Dll) ve Serrate (memelilerde Jagged) olmak üzere iki sınıfa daha ayrılırlar [12].

Notch ilk olarak endoplazmik retikulumda tek bir polipeptid öncülü olarak sentezlenir ve sonra trans-Golgi'deki furin benzeri konvertaz tarafından iki parçalı bir proteine yarıklanır. Hücre dışı domeynine ligand bağlanması Notch reseptöründe iki proteolitik yarıklanma olayını başlatır. İlk yarıklanma ADAM-ailesi metalloproteazları tarafından katalizlenirken, ikincisi presenilin, nikastrin, PEN2 ve APH içeren bir enzim kompleksi olan γ -sekretaz aracılığıdır. İkinci yarıklanma, Notch hücre içi domeyni (NICD) serbest bırakır. NICD, daha sonra nukleusa transloke olarak DNA-bağlayıcı protein CSL (CBF1, Su(H) ve LAG-1'den ismini alan) (CBF1, RB-J olarak da adlandırılır) ile birlikte çalışır [12]. Ligand olmadığında, nukleer NICD olmadığı için, RBP-J korepresör komplekslerin temini aracılığıyla Notch hedef genlerini baskılar. NICD'nin RBP-J'ye bağlanması baskılanmış durumdan aktif duruma değişimde hayati önemdedir. NICD ilk olarak RBP-J'den korepresörleri (N-CoR, SHARP, CtBP gibi) ayırarak RBP-J bağlanma bölgesi içeren promotorları inaktive eder ve ardından bir koaktivatör kompleks olan Mastermind/MAML ve p300/CBP'yi toplayarak Notch hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder [11].

Notch aktivasyonunu takiben, NICD nukleusa girer ve doğrudan hedef genlerin ekspresyonlarını düzenler. Notch hedeflerinin arasında, en iyi tanımlananı E(spl)/HES sınıfının bHLH (basic-helix-loop-helix) genleridir. Bununla birlikte, Notch'a yanıt hücre tipleri arasında çok büyük değişkenlik gösterir, örneğin, Notch bazı durumlarda hücre proliferasyonunu bazı durumlarda ise apoptozu başlatır. Farklı yanıtlar diğer yollarla etkileşim sonucu ortaya çıkıyor olabilir [12].

Notch reseptörleri aracılı sinyallerin çeşitli sonuçları olmasına karşın, çeşitli hücrel ve gelişimsel durumlarda sınırlı sayıda Notch hedef geni tanımlanmıştır. Hairy/enhancer of split (Hes) genleri çeşitli hücre tiplerinde Notch tarafından düzenlenen yüksek oranda korunmuş proteinlerdir [13, 14]. Hairy/Enhancer of split ailesi genleri ilk olarak *Drosophila* embriyolarında bu genlerin fonksiyon eksikliği epidermal öncüllerinin eksikliğinde artan miktarda nöroblastların varlığını gösterdiği için nörojenik genler olarak tanımlanmıştır [15, 16]. Yapılan çalışmalar bu genlerin doğrudan Notch hedef genleri olduğunu ortaya koymuştur. Hes1, Hes5 ve Hes7'nin promotorları Hey1, Hey2 ve HeyL (Hes'in alt ailesi, YRPW motifi ile ilişkili) Notch1'in aktif formu tarafından aktive edilebilir [17-19]. Hes ve Hey (aynı zamanda Hesr, Chf, Hrt, Herp ya da gridlock olarak da adlandırılır) proteinleri transkripsiyonel baskılayıcılar olarak işlev gören helix-loop-helix (sarmal-ilmek-sarmal) transkripsiyon faktörleridir. Fare ve sıçan genomlarında yedi Hes (Hes1-7) [20-22] ve üç Hey geni (Hey1,2,L; ayrıca Hrt1,2,3; Hesr1,2; Herp2,1 ya da Chf2,1 olarak da belirtilir) tanımlanmıştır [23-25]. Hes1, Hes5 ve Hes7 Notch yolağı tarafından indüklenebiliyorken [22, 26], Hes2, Hes3 [18] ve Hes6 [27] Notch sinyalinden bağımsız görülmektedir ve Hes4 hakkında veri yetersizdir. Hey gen ailesinin tüm üyeleri Notch tarafından indüklenebilir [19, 24, 25] ve evrim süresince sıkı şekilde korunmuştur [14].

Cormier ve arkadaşları (2004) preimplantif dönem (döllenmemiş yumurtadan geç blastosist aşamasına kadar) fare gelişimi boyunca *Notch 1-2-3-4*, *Jagged 1-2*, *Delta-like(Dll) 1-3-4* mRNA'larını RT-PCR yöntemi kullanarak analiz etmişlerdir.

Notch1,2, Jagged1-2 ve Dll-3 mRNA'larının tüm evrelerde (oosit, 1 ve 2 hücreli aşama, morula, blastosist, hatched blastosist); *Notch4* ve *Dll-4* mRNA'larının 2 hücreli aşamadan hatched blastosist aşamasına kadar olan evrelerde sentezlendiğini göstermişlerdir. Ayrıca *Notch3* ve *Dll-1* mRNA'larının 2 hücreli embriyolar ile hatched blastosistte ve morula evresinde bazen zayıf olarak gözlenmesi evreye bağlı eksprese edildiklerini göstermektedir. Araştırmacılar bu transkriptlerin ayrıca embriyonik ve trofoblast kök hücrelerinde de bulunduğunu göstermişlerdir [28].

Chu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2011) ticari bir γ -sekretaz inhibitörünü (DAPT) fare embriyosu kültür ortamına eklediklerinde NICD1 miktarı ve hatch olabilen blastosist sayısının düştüğünü bulmuşlardır [29]. Bu çalışmalar Notch ailesi üyelerinin pre-implantif dönem fare gelişimindeki rolünü göstermektedir.

Steroid hormonlarca indüklenen uterus, hücre döngüsünün ilerlemesi, stromal fibroblastların apoptoza gitmekten kurtarılması ve başarılı desidualizasyonun gerçekleşmesinde Notch sinyali önemlidir [30]. Afshar ve arkadaşları (2012) Notch1 geni uterusu kondisyonel/seçici olarak silinmiş fareleri-Notch1^{d/d} kullandıkları çalışmada oluşturdukları yapay desidualizasyon sonucunda Notch1^{d/d} farelerde desidua yaş ağırlığının kontrol grubuna oranla daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca desidualizasyonda rol aldığı bilinen *Bmp2* ve *Wnt4* mRNA'ları Notch1^{d/d} desiduada kontrole oranla daha az eksprese edilmiştir. Afshar ve arkadaşları Notch1^{d/d} uterusu proliferasyona özgü Ki67, cdk6 ve siklin D2 ile siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21 ve antiapoptotik gen Bcl2'in azalması ve proapoptotik Bad ile kaspaz3'ün artması sonuçlarını da elde etmişlerdir. Bununla birlikte aynı araştırmacılar kontrol ve Notch1^{d/d} yavru sayılarını benzer bulmuşlardır. Buradan da anlaşılmaktadır ki bu araştırmacıların Notch1 aktivasyonu ile ilişkili bulguları kısmen çelişkilidir. Sonuç olarak, Notch1 ve Notch1 dışında kalan diğer Notch ailesi üyelerinin erken gebelik boyunca fare uterusundaki ekspresyonu ile ilgili bilgiler henüz yetersiz olup araştırılmayı beklemektedir. Dolayısıyla Notch sinyal yolağı üyelerinin erken gebelik süresince eksprese edilip edilmediği şayet eksprese ediliyorsa lokalizasyon bölgelerinin hangi bölgeler olduğu henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olup araştırılması gereken bir konu olmayı sürdürmektedir. Şayet bu konu araştırılırsa Notch sinyal yolağı üyelerinin erken gebelik süresince gebeliğin sürdürülmesi açısından etken olup olmadığı konusuna da katkı sağlayabilecektir.

Sonuç olarak, diğer dokularda olduğu gibi, erken gebelik dönemi fare uterus dokusunda da Notch sinyal yolağının etken olabileceği düşünülerek, bu çalışmada, Notch sinyal yolağı belirteçlerinden, aktif Notch 1(NICD1), aktif Notch 2(NICD2), Hey1 ve Hes5 ekspresyonlarının erken gebelik dönemi fare uterus dokularında araştırılması hedeflendi.

Hipotez: Farelerde, Notch sinyal yolağı üyelerinden NICD-1, NICD-2, Hey-1 ve Hes-5, implantasyon ve desidualizasyon süreçlerinde, uterus dokularında eksprese edilir ve bu süreçte önemli rolleri vardır.

Amaç: Farelerde, Notch sinyal yolağı üyeleri olan NICD-1, NICD-2, Hey-1 ve Hes-5'in implantasyon ve desidualizasyon dönemlerinde uterus dokularında eksprese edilip edilmediğinin gösterilmesi ve lokalizasyonlarının belirlenmesi.

GENEL BİLGİLER

2.1. Uterusun Gelişimi

Mezodermden köken alan genital sistem dişi ve erkek embriyoda mezonefrik ve paramezonefrik kanallar olarak iki çift genital kanala sahiptir. Paramezonefrik kanal, ürogenital kabarıklığın ön – yan yüzeyindeki sölom epitelinin uzunlamasına bir girintisi halinde belirir. Kanal kranial uçtan sölom boşluğu içine huni şeklinde bir yapıyla açılır. Önce mezonefrik kanalın lateralinde uzanır ve onu çaprazladıktan sonra kaudomedial yönde gelişmeye devam eder. Orta hatta diğer paramezonefrik kanala aksi yönden yaklaşır. Başlangıçta bir septumla ayrılmış olan bu iki kanal, daha sonra birleşerek uterus kanalını oluştururlar. Birleşmiş olan kanalların kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarına doğru ilerleyerek paramezonefrik ya da Müller tüberkülü denilen küçük bir şişkinliği yapar [31].

Mezonefrik kanallar Müller tüberkülü'nün her iki yanından ürogenital sinus'a açılırlar. Dişi embriyolarda, mezonefrik kanallar testosteron yokluğu nedeniyle gerilerken, paramezonefrik kanallar, erkek embriyolarda sertoli hücreleri tarafından salgılanan Anti-müllerian (Müller baskılayıcı) hormon yokluğu nedeniyle dişiliğe farklılıklar [31].

Paramezonefrik kanallar dışında esas genital kanalları oluştururlar. Başlangıçta her bir kanalda üç bölüm gözlemlenir: 1- Karın boşluğuna açılan kranial vertikal bölüm 2- Mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal bölüm 3- Karşı taraftan gelen eşiyle birleşen kaudal vertikal bölüm. Ovaryumların aşağı inmesiyle paramezonefrik kanalların ilk iki bölümünden tuba uterinalar gelişir. Kaudal kısımlar uterusu oluşturmak üzere kaynaşırlar. Başlangıçta birleşen bu kanallardan oluşan dikey septum daha sonra dejenere olarak ortadan kalkar. Paramezonefrik kanalın ikinci bölümü mediakaudal yönde hareket ettiğinde, ürogenital şişkinlikler giderek daha transvers bir düzleme gelmeye başlar [31, 32].

Kanallar orta hatta birleştikten sonra, geniş bir transvers pelvik katlantı oluşur. Kaynaşmış haldeki paramezonefrik kanalların lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan bu katlantıya ligamentum latum uteri denir. Bu ligamentin üst sınırında tuba uterinalar, arka yüzünde de ovaryumlar yer alır. Uterovaginal taslaktan uterusun fundus, korpus, isthmus ve endometriyum epiteli ile bezleri gelişir. Endometriyum stroması ve miyometriyum komşu splenik mezodermden köken alır[31].

Uterusun farklı yapılarının gelişmesi 3. Trimesterde gerçekleşir. Temel yapı 1. Trimesterin sonunda oluşur. Bezlerin ve kas tabakalarının başlangıç oluşumu gebeliğin ortalarında gözlenir.

2.2. Uterusun Histolojik Yapısı ve Siklik Değişiklikleri

Uterus armut şeklinde bir organ olup, bir gövde(korpus), aşağıda uterus kavitesinin daraldığı iç ağız (internal os) ile iç ağızdan aşağıya doğru uzanan silindirik bir yapı olan serviksten oluşur. Uterus gövdesinin kubbe biçimli kısmına fundus ismi verilir.

Uterus duvarı nispeten kalındır ve üç katmandan oluşur. Dışta, uterusun farklı bölümlerine göre ya seroza (bağ dokusu ve mezotelyum) ya da adventisya (bağ dokusu) yer alır. Diğer uterus katmanları ise kalın bir düz kas tabakası olan miyometriyum ile endometriyum ya da uterus mukozasıdır [33].

2.2.1. Miyometriyum

Miyometriyum bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden oluşan uterusun en kalın tabakasıdır. Düz kas demetleri sınırları iyi belirlenemeyen dört tabaka oluşturur. Birinci ve dördüncü tabaka esas olarak longitudinal, yani organın uzun eksenine paralel yerleşmiş liflerden oluşur. Orta tabakalar ise daha büyük kan damarlarını içerir.

Gebelik sırasında, miyometriyum hem hiperplazi (düz kas hücrelerinin sayısında) hem de hipertrofi (hücresinin boyutlarının artması) sonucu çok büyür. Gebelik sırasında pek çok düz kas hücresi protein salgısı yapan hücrelerin ince yapı özelliklerini gösterir ve aktif olarak kolajen sentezler. Böylece uterusun kolajen içeriği önemli ölçüde artar[33].

2.2.2. Endometriyum

Endometriyum, epitel ile basit tübüler bezler içeren lamina propriyadan oluşur. Bezler miyometriyuma yakın alt bölümlerinde bazen dallanmalar gösterir. Endometriyum epiteli tek katlı silyalı ve salgılayıcı silindirik epiteldir. Uterus bezlerinin epiteli yüzey epiteline benzemekle birlikte, bezlerde silyalı hücreler çok azdır.

Lamina propriyada bağ dokusu fibroblastlardan zengindir ve bol miktarda temel madde içerir. Bağ dokusu lifleri çoğunlukla tip III kolajenden oluşmuştur.

Endometriyum iki bölüme ayrılabilir: 1- bazalis, miyometriyuma komşu olan en alttaki bölümdür; lamina propriya ve uterus bezlerinin başlangıç kısmını içerir. 2- fonksiyonalis, lamina propriya ve bezlerin geri kalanı ve yüzey epitelini içerir. Fonksiyonalis aylık döngüler sırasında büyük değişiklikler geçirirken, bazalis hemen hemen değişmeden kalır.

Endometriyumu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir. Arkuat arterler miyometriyumun orta tabakalarında dairesel olarak yerleşmiştir. Bu damarlardan endometriyumu besleyen iki grup damar çıkar: Bazalisi besleyen düz arterler ve fonksiyonalise kan taşıyan kıvrımlı/spiral arterler[33].

2.2.3. Uterusta Döngüye Bağlı Değişiklikler

Östrojen ve progesteron dişi üreme sisteminin organlarını kontrol ederler. Epitel hücrelerinin ve bağ dokusunun çoğalması ve farklılaşması bu hormonların

etkisiyle gerçekleşir. Menopozdan sonra bu hormonların sentezinde görülen azalma, üreme organlarında genel bir gerilemeye neden olur.

Puberte sonrasında, hipofizin ön lobunun uyarısıyla ovaryum hormonları menstrüel siklus sırasında endometriyumun döngüsel yapısal değişiklikler geçirmesine neden olur.

Menstrüel döngü ortalama 28 gündür. Menstrüel faz ortalama 3-4 gün sürer. Daha sonra çoğalma (proliferasyon) ve salgılanma/sekretuar (luteal) evre gelir. Sekretuar (salgılanma) faz ovulasyonla başlar ve yaklaşık 14 gün sürer. Yenilenme fazının süresi değişkendir, ortalama 10 gün sürer[33].

2.2.3.1. Proliferatif (Çoğalma), Foliküler ya da Östrojenik faz

Menstrüasyondan sonra, uterus mukozası incedir. Yenilenme fazının başlangıcı ovaryum foliküllerinin arasından küçük bir grubun hızla büyümesine denk gelir; bu foliküller döngünün başında preantral folikülden antral folikül aşamasına geçiş aşamasında olan foliküllerdir. Teka internaları geliştiğinde bu foliküller aktif olarak östrojen salgılamaya başlar ve östrojenlerin plazmadaki birikimleri giderek artar.

Östrojenler endometriyum üzerinde etki ederek hücre çoğalmasına yol açar ve menstrüasyon sırasında kaybedilen endometriyumun yeniden oluşmasını sağlar.

Yenilenme fazı sırasında endometriyum tek katlı silindirik epitel ile kaplıdır. Tek katlı silindirik epitelden oluşan bezler, dar lümenli düz tübüller oluşturur. Bu hücrelerde salgılama aktivitesine hazırlık olarak, granüllü endoplazma retikulumu sisternalarının sayısı ve Golgi kompleksi boyutları giderek artar. Yenilenme fazı sonunda endometriyum 2-3 mm kalınlığa ulaşır[33].

2.2.3.2. Salgılama/Sekretuar ya da Luteal Faz

Sekretuar faz ovulasyondan sonra, korpus luteum tarafından salgılanan progesteronun etkisiyle başlar. Progesteron, östrojenin etkisi ile gelişmiş olan bezler üzerinde etki göstererek bezleri daha da uyarır. Epitel hücreleri çekirdeğin altında glikojen depolamaya başlar. Daha sonra glikojen miktarı azalır ve glikoprotein salgı ürünleri bezlerin lümenini genişletir. Bu fazın önemli özelliklerinden biri bezlerin son derece kıvrımlı bir hale gelmesidir. Bu fazda endometriyum, salgıların birikmesi ve stromadaki ödemin sonucu maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır. Sekretuar faz sırasında mitoz bölünmeler enderdir.

Döllenme gerçekleşmişse, embriyo uterusu taşınır ve ovulasyondan yaklaşık 7-8 gün sonra salgılama evresinde bulunan uterus epiteline tutunur. Uterus bezlerinin salgısının, tutunmadan/implantasyondan önce embriyonun gereksinimleri için başlıca beslenme kaynağını oluşturduğu düşünülmektedir.

Embriyonun implantasyonunun tehlikeye girmemesi için progesteron miyometriyumun düz kas hücrelerinde kasılmaları baskılar.

Oositin döllenmesi ve embriyonun tutunması gerçekleşmediği zaman, korpus luteumun işlevi yaklaşık 14 gün sonra sona erer. Bunun sonucunda kandaki progesteron ve östrojen düzeyleri hızla düşer. Bu, spiral arterlerde kasılmalara neden

olur, kan akımı engellenir ve oluşan iskemi damar duvarının ve endometriyumun işlevsel tabakasının bir kısmının ölümüne/nekrozuna neden olur. Kasılmaların yukarısında bulunan kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Endometriyumun işlevsel tabakasının bir kısmı ayrılır ve endometriyumun geri kalanı, interstisyel sıvı kaybına bağlı olarak büzülür.

Menstrüel döngü sonunda endometriyum genellikle ince bir tabaka haline gelir. Hücreleri, mukozayı yeniden oluşturmak üzere bölünmeye başlar ve endometriyum yeni bir döngüye hazır hale gelir[33].

2.2.3.3. Gebelikte Endometriyum

Tutunma/implantasyon gerçekleşirse embriyonik trofoblast hücreleri HCG üretmeye başlar ve bu korpus luteumu progesteron salgılamayı sürdürmesi için uyarır. Gebelik oluştuğunda menstrüasyon gelişmez ve gebelik boyunca menstrüel döngü engellenir. Progesteron uterus bezlerini daha geniş, daha kıvrımlı ve salgılamaya evresine göre daha fazla salgı üretebilir hale getirir[33].

2.3. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi

Dişi farede genital sistem bir çift ovaryum, oviduktlar, uterus, serviks, vajina, klitoris ve klitoral bezden oluşur [34] (Şekil 2.1).

2.3.1. Ovaryum

Ovaryumlar, böbreklerin posterolateral kutuplarına yerleşmiştir, her biri mezovaryum ile dorsal vücut duvarına tutunur ve ince şeffaf bir elastik kapsül ya da bursa ile çevrelenmiştir. Mezovaryumdaki kan damarları ve sinirler hilus denilen bölgeden ovaryuma girer ve ovaryumu terkeder [34] (Şekil 2.1).

2.3.2. Ovidukt

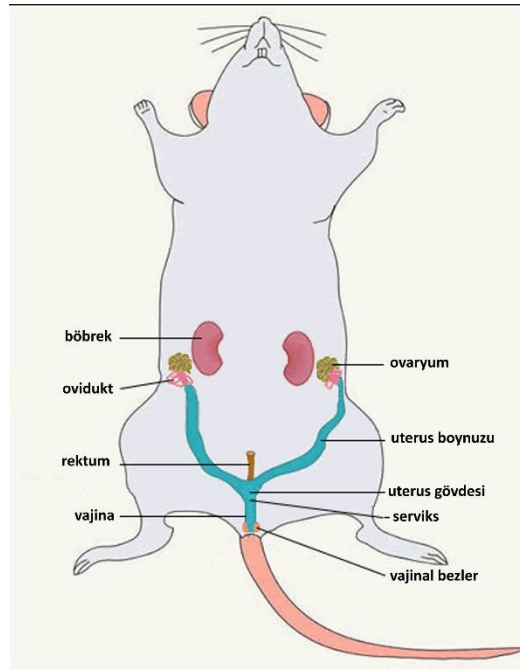
Ovidukt periovaryan boşluğu uterus boynuzuna bağlayan 1.8 cm uzunluğunda dar kıvrımlı bir tüptür. Dorsal vücut duvarından mezotubaryum tarafından ayrılır. Mezotubaryum mezovaryum, ovaryan bursa ve uterus mezometriyumu ile devam eden çift katlı bir membrandır. 3 segmentten oluşur; bir isthmus, bir ampulla, bir infundibulum ve fimbriya. Oviduktun intramüsküler kısmı uterus duvarı içinde kalır. İsthmus Oviduktun dar kısmını oluşturur ve ampullaya kadar uzanır. Ampulla infundibulum ile isthmusu birbirine bağlayan kısımdır. Infundibulumdan itibaren ovidukt fimbriya adı verilen saçak benzeri yapılarla periovaryan boşluğa açılır [34] (Şekil 2.1).

2.3.3. Uterus

Fare uterusu iki lateral boynuzdan oluşan bikornuat yapıdadır ve korpus adı verilen gövdeye bağlanır. Boynuzlar, dorsal vücut duvarından kan, lenf damarları ve sinirlerin bulunduğu geniş ligamentler ya da mezometriyum ile ayrılır. Uterusun gövde kısmı kraniyal kısım olup medyan septum tarafından ayrılan iki boşluk içerir. Bölünmemiş kaudal kısımdan vajina boşluğuna çıkan boyun ya da serviks kısmı oluşur. Serviks ve vajinanın duvarları dorsal ve ventral olarak devamlıdır ancak lateral olarak vajina lümeninin anterior olarak derin fornikslere (tavanlara) uzandığı bölgelerde devamlı değildir (Şekil 2.1). Uterus boynuzları, oviduktlardan posteromedial olarak mesanenin dorsal pozisyonuna uzanarak korpusu oluşturmak üzere birleşirler [34] (Şekil 2.1).

2.3.4. Vajina ve Klitoris

Farelerde vajina kısa, kaslı bir organdır ve uterusun korpusundan üretranın dorsalindeki dış açıklığa uzanır. Vajina dorsalde rektum, ventralde ise üretraya gevşek şekilde bağlanmıştır. Vajinal açıklığın anterior duvarında, ventrale uzanan küçük yükselti klitoristir. Vajinal açıklığın anterior ve lateral yüzeyleri, deri ve kıl ile kaplıdır. Klitoris ucunda bulunan fazla derin olmayan çöküntü şeklindeki klitoral fosaysa, üretra açılır. Küçük armut şekilli klitoral bezler, anterolateral olarak subkutan bağ doku içerisine gömülmüştür, herbirinden çıkan kanallar klitoral fossanın lateral duvarındaki açıklığa uzanır [34][32][33][33][4] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Dişi farede genital sistem anatomisini gösteren çizim[34]

2.4. Farelerde Uterus Histolojisi

Uterus boynuzlarının mukozası gebe olmayan farelerde endometriyum olarak adlandırılır. Kas tabakası ile çevrili olan endometriyum, kan damarları ve sinirler tarafından iyi bir şekilde desteklenir. Epiteli, endometriyal stromaya çıkıntı yapan dallı tübüler bezlere uzanan basit prizmatik epiteldir. Endometriyal stroma, birçok küçük polihedral hücre içeren retiküler dokudan oluşur. Endometriyumu saran kas tabakası miyometriyum adını alır ve içte sirküler, dışta longitudinal yerleşimli düz kas tabakaları ve bunların arasındaki vasküler gevşek bağ dokusu olan stratum vaskulozumdan oluşur. Dıştaki seroza, mezometriyum ile devamlılık halindedir. Uterus boynuzları orta hatta bir araya gelerek, korpusun lümenine uzanan medyan septumu oluşturmak için mediyal duvarlar birleşir. Uterus boynuzlarının korpusla birleştiği bölgede, endometriyumun prizmatik epiteli kademe kademe çok katlı yassı epitele değişir. Gövdenin lamina propriyası uterus boynuzlarına göre daha fazla fibröz yapı içerir. Gövdenin ve serviksin üst kısımlarının duvarını tamamlayan sirküler ve longitudinal düz kas demetleri bulunur. Serviksin alt kısımlarının duvarı ise gebelik ve

doğumu kolaylaştırmak için daha gevşek ve dağınık olan kollajen liflerden meydana gelmektedir[34].

2.5. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi

Benzer üreme sistemine sahip olan memelilerde üreme sistemi, hipotalamustan salınan gonadotropin salıcı hormon (GnRH); hipofizden salınan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinize edici hormon (LH) ve ovaryumdan salınan östrojen (E₂) ve progesteron (P₄)'un etkisi altındadır. Ancak, türler arasında fonksiyonel açıdan önemli farklılıklar vardır. Bu farklılardan biri östrus siklusuna sahip olan hayvanların siklus boyunca gebeliğin gerçekleşmemesi durumunda endometriyumlarını reabsorbe etmeleridir. Menstrüel siklusa sahip hayvanlar ise menstrüasyon boyunca endometriyumlarını dökerler. Östrus siklusuna sahip türlerde dişiler genelde sikluslarının sadece östrus fazı boyunca aktifken menstrüel siklusa sahip dişilerin sikluslarının herhangi bir zamanında seksüel olarak aktif olabilmeleri, diğer bir farktır.

Fareler, puberte başlangıcından yaşlılığa kadar döngüsel aktivite gösterirler ve mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlardır. Farelerde östrus siklusu 4 faz içerir ve siklus süresi 4-5 gündür [36]. Östrus siklusu 2 ovaryan fazda incelenebilir: foliküler ve luteal faz. Proöstrus ile östrusu içeren foliküler fazda, ovaryan folikül gelişimi olur. Luteal faz ise metaöstrus ile diöstrusu içerir ve korpus luteumun oluşarak fonksiyon gördüğü fazdır.

Proöstrus

Farede seksüel siklus evrelerinde genital organlarda çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir. Proöstrusta; ovaryumda foliküller büyümeye başlar. Bu faz yaklaşık olarak 1 gün sürmektedir. E₂ ve P₄'ün etkisi altında endometriyum gelişmeye başlar. Vajina kırmızı-pembe renkte, nemlidir. Dişi henüz seksüel olarak reseptif değildir [36-38].

Östrus

“Kızgınlık” evresi olarak da adlandırılan östrusta, dişi seksüel olarak reseptiftir. Bu fazda gonadotropik hormonların düzenlemesiyle foliküller olgunlaşır ve östrojen en büyük etkisini gösterir. Fareler fizyolojik değişiklikler ile seksüel olarak reseptif davranış gösterirler. Lordosis refleksi östrus fazını belirten bir işarettir ve dişiler arka ayakları üzerinde esneyerek poterior pelvisi yukarı kaldırır. Östrusta; ovulasyon görülür. Vajina, proöstrustakinden daha açık renktedir ve ödem belirgindir [36, 37]. Uterus dolaşımdaki yüksek östrojen nedeniyle biriken sıvı ve vasküler geçirgenlikteki artıştan dolayı proöstrus ve östrus fazları boyunca şiş durumdadır.

Metöstrus

Bu faz ovaryumda progesteron üreten korpus luteumun aktivitesi ile karakterizedir. Östrojen stimülasyonu azalır ve korpus luteum oluşmaya başlar. Uterus dokusunda şişlik ve hiperemi azalmıştır, epitelde dejenerasyonlar görülür. Vajinada ödem azalmış, kuru ve solgun bir görünümü vardır. Beyaz hücre döküntüleri görülür [36, 37].

Diöstrus

Gebeliğin gerçekleşmemesi halinde diöstrus fazı korpus luteumun gerilemesiyle son bulur. Endometriyum tabakası dökülmez ancak gelecek siklus için yeniden şekillenir. Diöstrusta; ovaryumda folliküller gelişmeye başlamıştır. Uterus dokusunda şişlik kaybolmuş olup solgun görünümlüdür. Vajina da benzer görünümde olup kapalıdır. Yaş ve kuru uterus ağırlıkları diöstrusta en az ve proöstrusta en fazladır[36, 37].

Farelerde çiftleştirme iki şekilde yapılabilir:

1. Monogami: Bir dişi fare ile erkeğin birleştirilmesidir.

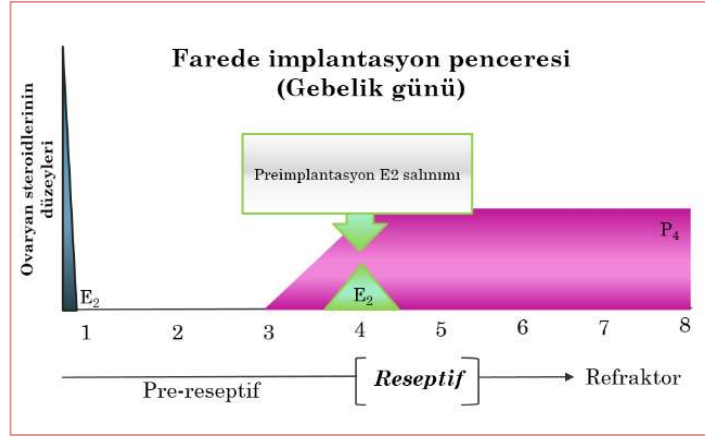
2. Poligami: Bir erkek ile 2-4 dişi farenin bir kafeste birleştirilmesiyle gerçekleştirilen çiftleştirmedir.

Çiftleşme, östrus ve ovulasyon çoğu kez fotoperiyodun gece fazında oluşur. Çiftleşmeden sonra sperm ve yardımcı bezlerin koyulaştırıcı salgıları ile vajinal salgının pıhtılaşmasıyla oluşan balmumu gibi bir tıpa görülür. Buna vajinal plak (çiftleşme tıpası) denir. Vajinal plak çiftleştirmeden 24-36 saat sonra atılır.[37].

2.5.1. Farelerde Uterus Reseptivitesi

Uterus, değişen E_2 ve P_4 salgılarına özgün biçimde yanıt veren heterojen hücre popülasyonlarından oluşur. Fare ya da sıçan uterusunda blastosist implantasyonu için uterus reseptivitesinde etkili olan hücresel ve moleküler olaylar, E_2 ve P_4 'ün uygun oranlarda bulunmasına bağlıdır[1, 39]. Erişkin overektomize fare ya da rat uterusunda E_2 lümen ve bez epitelinin proliferasyonu ve farklılaşmasını uyarırken stromada bu olaylar için hem E_2 hem de P_4 'e ihtiyaç vardır [1].

Farede ovulasyondan hemen önce E_2 salgılanması gebeliğin ilk iki günü boyunca lümen ve bez epiteli hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlar. Yeni oluşan korpora luteadan salgılanan P_4 preovulatuvar E_2 salgısı ile birleşerek gebeliğin 3. gününde proliferasyonun epitelden stromaya kaymasını sağlar. Stromal hücre proliferasyonu implantasyonun gerçekleştiği gün olan gebeliğin 4. gününde salgılanan preimplantasyon ovaryan östrojen salgısı ile etkili hale getirilir(Şekil 2.2). Preimplantasyon ovaryan östrojenin salgılanması ve blastosistin olduğu bölgede endometrial kapiler geçirgenliğin artışı daha sonra stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşmasında gereklidir.



Şekil 2.2. Farelerde gebelik günlerine göre uterus reseptivitesi.

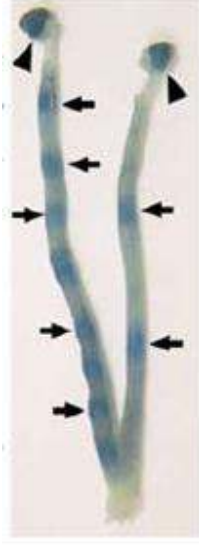
Fare ve sıçanda uterus reseptivitesi gebelik boyunca sınırlı bir zaman diliminde gerçekleşir. Bu türlerde uterus pre-reseptif (nötral), reseptif ve non-reseptif fazlara ayrılabilir [1, 2].

Gebe ya da yalancı gebe farede uterus sadece 4. günde reseptif olur, 5. günde uterus non-reseptif olur ve blastosistin varlığına yanıt vermez ya da desidual reaksiyon oluşturmak amacıyla yapılan travmatik uyarılara yanıt vermez. [1, 2].

Fare ve sıçanda hem progesteron hem de östrojen implantasyonun gerçekleşmesi için gereklidir. P₄, tavşan, kobay, hamster ve domuzda implantasyon için gereklidir ancak E₂ gerekli değildir. Embriyonik kökenli E₂'nin bu türlerde implantasyonda rol alabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, preimplantasyon evresindeki tavşan ve domuz embriyolarının östrojen oluşturma kapasiteleri gösterilmiştir [40]. Progesteron, primatlarda implantasyon için gereklidir ancak E₂'nin rolü tam olarak bilinmemektedir.

2.5.2. Farelerde Reseptif Uterusta Vasküler Geçirgenlik Değişiklikleri

İmplantasyona dair gözlenebilen en erken belirti, blastosistin endometriyuma yaklaştığı bölgede (apozisyon) endometrial vasküler geçirgenlikteki artıştır. Bu vasküler cevap, makromoleküler boyaların hayvanın sakrifikasyonundan 5-10 dakika önce intravenöz enjeksiyonu ile görünür hale getirilebilir. Uterus boyunca implantasyon bölgeleri mavi bölgeler halinde görülür [41-45] (Şekil 2.3). Fare ve sıçanlarda progesteron tarafından hazırlanmış uterus implantasyon süresince gerçekleşen bölgesel vasküler değişiklikler için östrojen gereklidir.



Şekil 2.3. Chicago mavisi enjeksiyonu sonrası uterusu mavi bantlar şeklinde görülen implantasyon bölgeleri. Ok başları ovaryumları, oklar implantasyon bölgelerini göstermekte [46].

2.5.3. Farelerde Desidualizasyon

Desidual hücreler farklılaşmamış stromal hücrelerden köken alır [47]. Desidualizasyon süreci gebeliğin beşinci günü sabahında yaygın bir stromal hücre proliferasyonu ile başlar ve bu hücrelerin bölgesel olarak desidual hücrelere farklılaşmasıyla devam eder. Bu hücreler altıncı günden sekizinci güne kadar poliploidi özelliği kazanırlar[48-50]. Stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşması reaksiyonu ilk olarak blastosistin implante olduğu anti-mezometriyal bölgede gerçekleşir. Farelerde antimezometriyal bölgedeki desidual hücreler 5. günde öncelikle primer desidual bölgeyi (PDB) oluştururlar[51]. Desidual hücrelerle sıkıca paketlenmiş olan bu bölge avaskülerdir. 5. günden sonra 6. gün boyunca PDB yanındaki stromal hücreler proliferasyona devam ederler ve poliploid desidual hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler sekonder desidual bölgeyi (SDB) oluştururlar. Bu sırada, SDB’de Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) sentezi yüksek iken PDB’de düşüktür. SDB, 7. günün sonunda gelişimlerini tamamlarlar [49, 51]. Sekizinci güne kadar PDB ilerleyen şekilde dejenere olur. Sekizinci günde, SDB desidual kapsülaris adı verilen ince bir hücre tabakasına dönüşür. Mezometriyal desidual hücreler sonunda desidual bazalisi oluştururlar. Desidualın işlevleri gebelikte büyük önem taşır. Çünkü desidualın, gelişen embriyoya besin sağlamak, embriyoyu annenin immünolojik yanıtlarından korumak ve uterus stromasına trofoblast invazyonunu düzenlemek gibi rolleri vardır[9, 10].

2.6. İmplantasyon

En basit anlamıyla implantasyon, embriyonun uterusu yerleşmesi sürecidir. Embriyonun uterusu olan karşılıklı iletişiminin birçok ayrıntısı henüz ortaya çıkarılamamıştır ve hala büyük bir merak konusudur. İmplantasyon süreci ve embriyonun uterus ile ilk etkileşimleri, memelilerde türden türe farklılık gösterir. İnsan implantasyonunun incelenmesinde etik kısıtlamalar olması ve embriyo-uterus etkileşiminin moleküler düzeyde incelenmesinin zor olması, çalışmaların deney

hayvanları üzerinde yapılma zorunluluğunu getirmektedir. Bu yüzden bu konuda elde edilen bilgilerin çoğu özellikle fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalara dayanmaktadır.[52].

İmplantasyon sürecinde embriyo ve uterus hücreleri arasında birçok karmaşık etkileşimgerekli. İmplantasyon sürecinde gerekli olan temel olaylar şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Uterus reseptif duruma gelmesi sağlanırken senkronize bir şekilde, preimplantasyon aşamasındaki embriyonun blastosist aşamasına gelmesi [1]
- 2- Semiallogenik embriyonun annenin immünolojik yanıtlarından kaçması, [4]
- 3- Blastosistin uterusu yakınlığı alanda kapiler geçirgenlik ve kan akışının artması, [1]
- 4- Blastosistin uterus lümen epiteline tutunmasının hemen ardından çevresindeki endometriyal stromanın bölgesel desidualizasyonu [1, 53]
- 5- Embriyonik trofoblastlar tarafından gerçekleştirilen kontrollü uterus invazyonu [54]

Bu durumlar, hem embriyo hem de uterustaki hücre tiplerinde zamana ve bölgeye bağımlı olarak proliferasyon, farklılaşma, göç ve yeniden şekillenme gibi hücresel olayları içerir. Bu kritik olaylar progesteron (P_4) ve östrojen (E_2) tarafından aracılık edilen geçici ve hücre tipine özgün etkileşimlere bağlıdır. Progesteron/östrojen bağımlı bu süreçlerin moleküler ve hücresel mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır.

2.6.1. İmplantasyonun Safhaları

Enders ve Schlafke, implantasyonun 3 safhaya ayrılabilceğini göstermiştir: apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon (içine girme) [8, 55]. Apozisyon, embriyonik trofoektoderm hücreleri lümen epiteline yakınlığının gerçekleştiği safhadır. Sonraki safha olan adezyon safhasında trofoektoderm ile lümen epiteli arasındaki ilişki blastosistin yıkama ile uzaklaştırılmasına izin vermeyecek kadar ilerlemiştir. Son safha olan penetrasyon safhası trofoektodermin lümen epiteline invaze olmasını içerir.

Memelilerde özellikle kemirgenlerde, apozisyon başlamadan önce stromal ödem oluşur. Apozisyon, implantasyon başlangıcında, trofoektodermin mikrovillusları ile lümen epitelinin karşılıklı olarak birbirlerine doğru parmaklı çıkıntılar oluşturma olayıdır. Stromal ödem, uterus lümeninin daralmasına neden olarak trofoektodermin mikrovillusları ile lümen epitelinin parmaklı çıkıntılar oluşturma (apozisyon) ve birbirlerine yakınlıklarına (adezyon) neden olur. Tutunma reaksiyonu sonucunda blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir. Mavi renkteki bazı makromoleküler boyaların intravenöz enjeksiyonu ile bu durum gözlemlenebilir. Lümenin kapanması olayı gebelik süresince uterusun tamamında gerçekleşir ve blastosist varlığından bağımsızdır. Uterusun bu şekilde hazırlanması olayı için P_4 yeterlidir. Çünkü bu olay bu olay blastosist olmasa da gerçekleşebilirken P_4 olmadığında gerçekleşmez. Ardından gerçekleşen adezyon olayı için ise E_2 gereklidir.

İmplantasyon zamanı, antimezometriyal lümen epiteline blastosistin hangi mekanizmayla ve nasıl yönlendirildiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Farede blastosistler, lümenin kapanmasının başlamasıyla birlikte uterus eksenini boyunca lümenin antimezometriyal tarafı boyunca yerleşirler. Zona ile çevrili olan blastosistler lümenin daralmasından kısa bir süre sonra iç hücreleri rastgele yönlendirilmiş halde implantasyon bölgesinde bulunurlar. Tutunma olayı başladığında, blastosistler iç hücre kitleleri mezometriyal kutba bakacak şekilde yerleşirler. Bu gözlemler, blastosist yüzeyindeki trofoektodermin tümünün lümen epiteline tutunma potansiyeli olduğunu ve tutunmanın zona pellusida kaybının hemen ardından rastgele bir biçimde gerçekleştiğini göstermektedir. Farklı deliller, iç hücre kitlesinin serbest hareketinin blastosistin doğru yönlendirilmesini sağladığını ileri sürmektedir [56, 57].

Farelerde tutunma reaksiyonunun ilk belirtisi gebeliğin 4. gününün (vajinal plak=1.gün) gece saatlerinde (20⁰⁰-24⁰⁰) görülür [1]. Fare ve insanlarda lümen epiteli hücreleri tutunmadan sonra apoptoza gider [58], blastosistin etrafındaki stroma hücreleri desidualizasyona gider ve sonuçta embriyo antimezometriyal stroma içine gömülmüş olur.

2.6.2. İmplantasyonun Tipleri ve Zamanlaması

Farklı blastosist-uterus etkileşimlerini temel alan Bonnet [59], implantasyonu merkezi, ekzentrik ve intersisyal olmak üzere 3 sınıfa ayırmıştır. Yüzeysel implantasyon olarak da bilinen merkezi implantasyon tavşan, dağ gelinciği ve bazı keselilerde görülür. Bu canlılarda blastosist implantasyondan önce yoğun şekilde genişler. Fare, sıçan ve hamsterlarda ekzentrik implantasyon görülür. Blastosistleri küçük olan bu canlılarda blastosistler az bir genişleme gösterirler. Bu türlerde implantasyon bölmesi uterus epitelinin invaginasyonu ile oluşur. Kobay, şempanze ve insanda intersisyal tipte implantasyon görülür ve blastosist subepitel stromal dokuya gömülür.

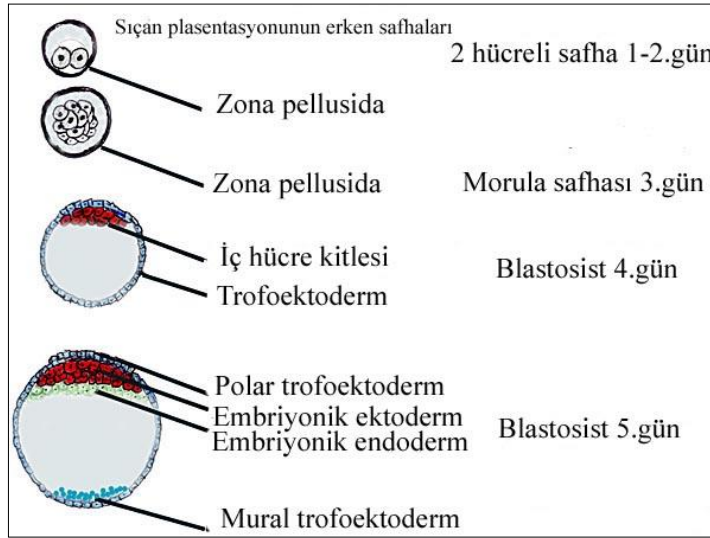
Elektron mikroskopi ile yaptıkları çalışmalara dayanarak Schlafke ve Enders [60] implantasyonu üçe ayırmıştır: araya girme, yer değiştirme ve kaynaşma (füzyon). Araya girme modelinde trofoblast hücreleri lümen epiteli boyunca penetre olarak bazal laminaya ulaşır ve geçer. Bu model insanlarda ve kobaylarda görülür. Kemirgenlerde görülen yer değiştirme modelinde lümen epitelinin, altındaki bazal laminadan ayrılmasıyla trofoblastların epitel boyunca yayılması kolaylaştırılır. Kaynaşma modelinde ise trofoblast hücreleri simplazma oluşturmak üzere lümen epiteli ile bağlantı kurar ve bu model tavşanlarda görülür.

2.6.3. Farelerde İmplantasyon ve plasantasyon

Fareler kemirgen ailesinin bir üyesidir. *Mus musculus* türü farelerin ağırlıkları 10-25 gr arasında değişir, uterusları iki boynuzlu (bikornat) olup östrus süreleri 20 saat civarındadır. Gebelik süresi genelde 21 gün olup yavru sayısı 2 ile 22 arasında değişebilir [61]. Sıçan ve fare gibi kemirgen ailesinin iki üyesi için plasental gelişimin detayları öyle benzerdir ki ikisi birlikte düşünülebilir. Her iki türdeki birbirlerine son derece benzerlik gösteren plasental gelişim sürecinin sadece süreleri farklılık gösterir. Aynı olaylar sıçanda fareye göre biraz daha geç gerçekleşir. Çünkü gebelik süresi sıçanda yaklaşık 21 gün iken farede 19 gün kadardır [62].

2.6.4. Farelerde preimplantasyon evresinde embriyo Gelişimi

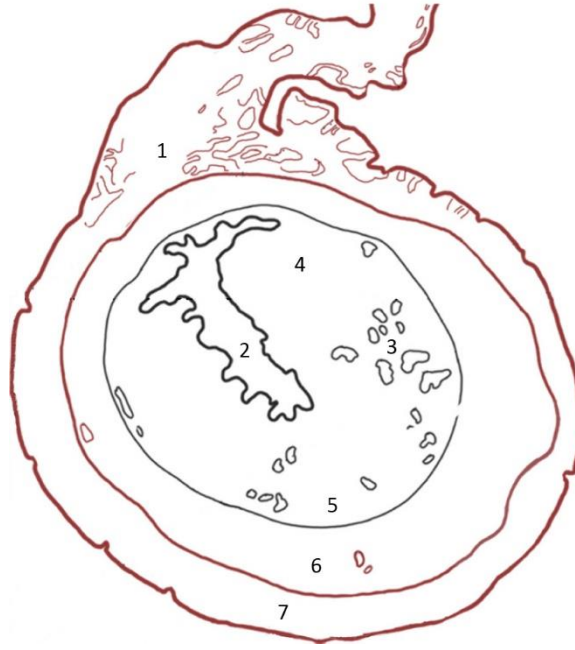
Farelerde genel olarak gebeliğin 1. gününde zigotik, 1-2. günlerde 2 hücreli, 3. günde morula ve 4. gün civarında blastosist evreleri görülür. 4. günün sonunda blastosist trofoektoderm (TE) ve iç hücre kitlesine (İHK) farklılaşır. 5. günde TE tabakası, trofoektoderm hücrelerinin iç hücre kitlesine komşuluk yapıp yapmamalarına göre 2 bölgeye ayrılır: mural ve polar trofoblastlar. Polar trofoblastlar iç hücre kitlesinin üzerinde yer alır, mural trofoblastlar ise blastosöl boşluğunu çevreler [61] (Şekil 2.4.). Postimplantasyon evresinde trofoektoderm hücrelerinin bu her iki grubunun kaderleri farklıdır. Ancak her ikisi de trofoblast dev hücrelerini meydana getirir.



Şekil 2.4. Fare plasantasyonunun erken safhaları [61].

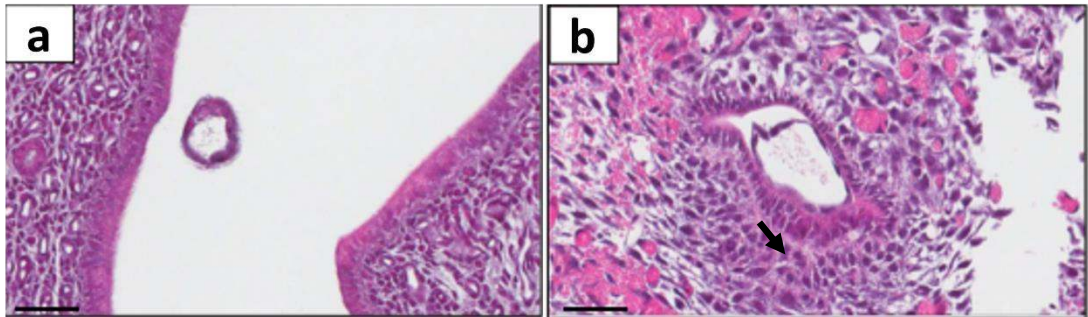
2.6.5. Farelerde Preimplantasyon ve İmplantasyon Evresinde Uterus Histolojisi

Gebe olmayan ve gebeliğin 1. günündeki fare uterusunda temel olarak üç yapı gözlenir; endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum. Uterusa ait kan damarları uterusu mezometriyumdan girer. Perimetriyum tarafından sarılan miyometriyum iki belirgin düz kas tabakasından oluşur; içte sirküler, dışta longitudinal düz kas lifleri. Miyometriyum, endometriyumu çevreler. Endometriyum uterus lümen epiteli, bez epiteli, endometriyal stromal hücreler ve immün(lenfositler, dentritik hücreler, makrofajlar, NK hücreleri) hücrelerden oluşur [63] (Şekil 2.5).



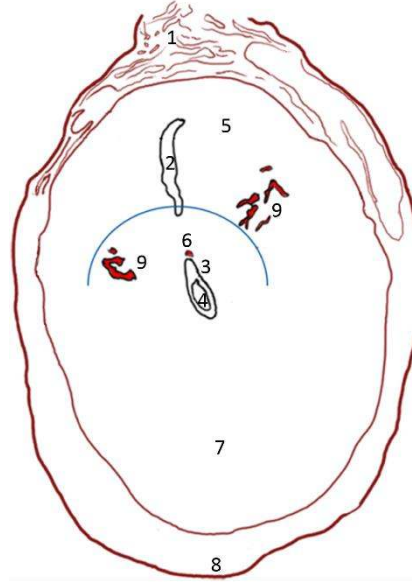
Şekil 2.5. Gebe olmayan farelerde uterusun morfolojisini gösteren çizim.1) Mezometriyum, 2) Uterus lümeni, 3) Uterus bezleri, 4) Mezometriyal endometriyum, 5) Anti-mezometriyal endometriyum, 6) Miyometriyum (sirküler), 7) Miyometriyum (longitudinal) [63]

Gebeliğin 4. günündeki gebe fare uterusunda, lümen geniş olup içinde blastosist bulunmaktadır (Şekil 2.6.a.). 5. günde uterus lümeni, uzamış olan blastosistin çevresini kuşatmaya başlar. Bu sırada, stromal hücreler desidual hücrelere farklılaşır. İlk desidual hücrelerin farklılaştığı bölge, primer desidualizasyon bölgesi (PDB) olarak adlandırılır [63] (Şekil 2.6.b.).



Şekil 2.6. Farelerde gebeliğin 3,5. ve 5,5. gününde uterusun longitudinal kesitlerinin hematoksilen eozin boyanmasıyla gösterilmesi. a) 3,5. gün: Blastosistin uterus lümeninde tutunmadan önceki görünümü, b) Blastosistin anti-mezometriyal desiduaya tutunması ve invazyonu. Ok işareti: Primer Desidual Bölge [63]

6. günde; implantasyon bölgesindeki desidualizasyon, antimezometriyal bölgeden mezometriyal bölgeye doğru ilerler. Bez yapıları azalmıştır ve sadece mezometriyal bölgede gözlenir. Maternal desiduaya, trofoblast invazyonu başlar. Antimezometriyal bölgede, Embriyo invazyonu, tamamlanır ve lümen tarafında epitelyum altındaki gelişen desidua ile çevrelenir [63] (Şekil 2.7.).

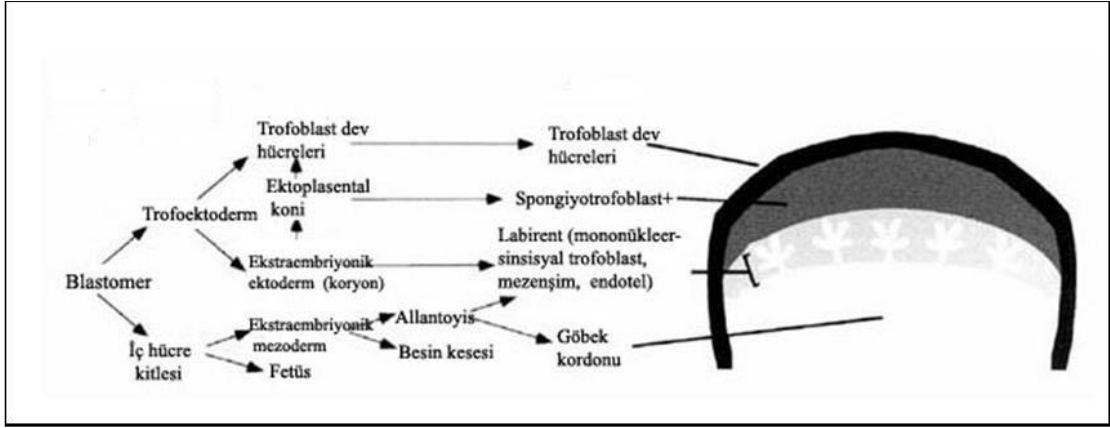


Şekil 2.7. Farelerde gebeliğin 6,5. gününde uterusun morfolojisini gösteren çizim. 1) Mezometriyum, 2) Uterus lümeni, 3) İmplantasyon kriptası, 4) Embriyo, 5) Mezometriyal endometriyum, 6) Primer desidual bölge, 7) Anti-mezometriyal desidua, 8) Miyometriyum, 9) Lateral vasküler sinüsler [63]

Gebeliğin 8. Gününde; implantasyon bölgesi, gebeliğin daha erken dönemlerine oranla daha büyük bir alan kaplar. Bu bölgede, embriyo ve ekto plasental koni'nin de içinde yer aldığı ekstraembriyonik yapılar gözlenir. İlk olarak 6. günde gözlenen lateral sinüsler, daha da gelişmiştir ve kolaylıkla gözlenebilir [63] (Şekil 2.8.).

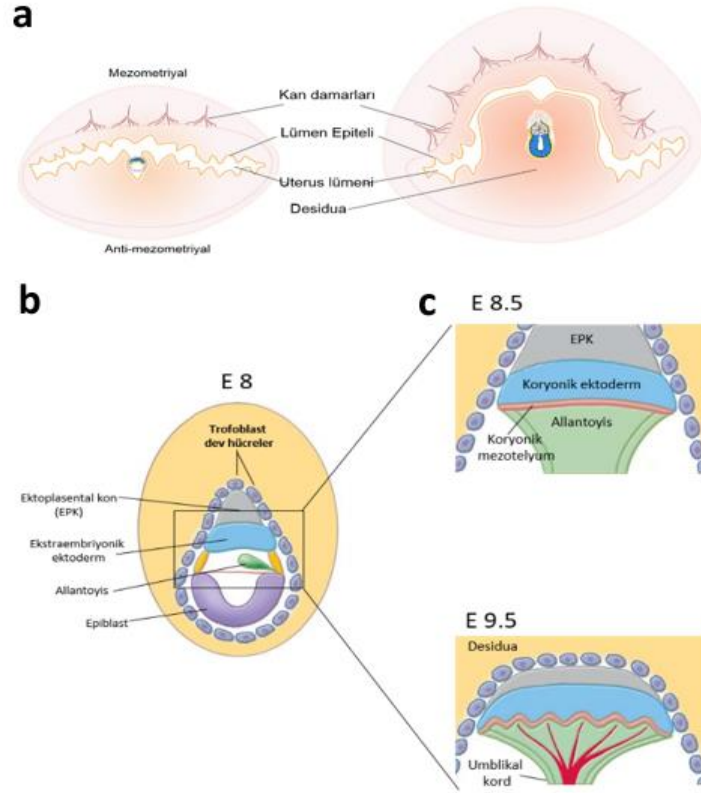


2.6.6. Farelerde İmplantasyon Evresinde Embriyo Gelişimi Ve Plasentasyon



Şekil 2.9. Fare plasentasının gelişimi [64].

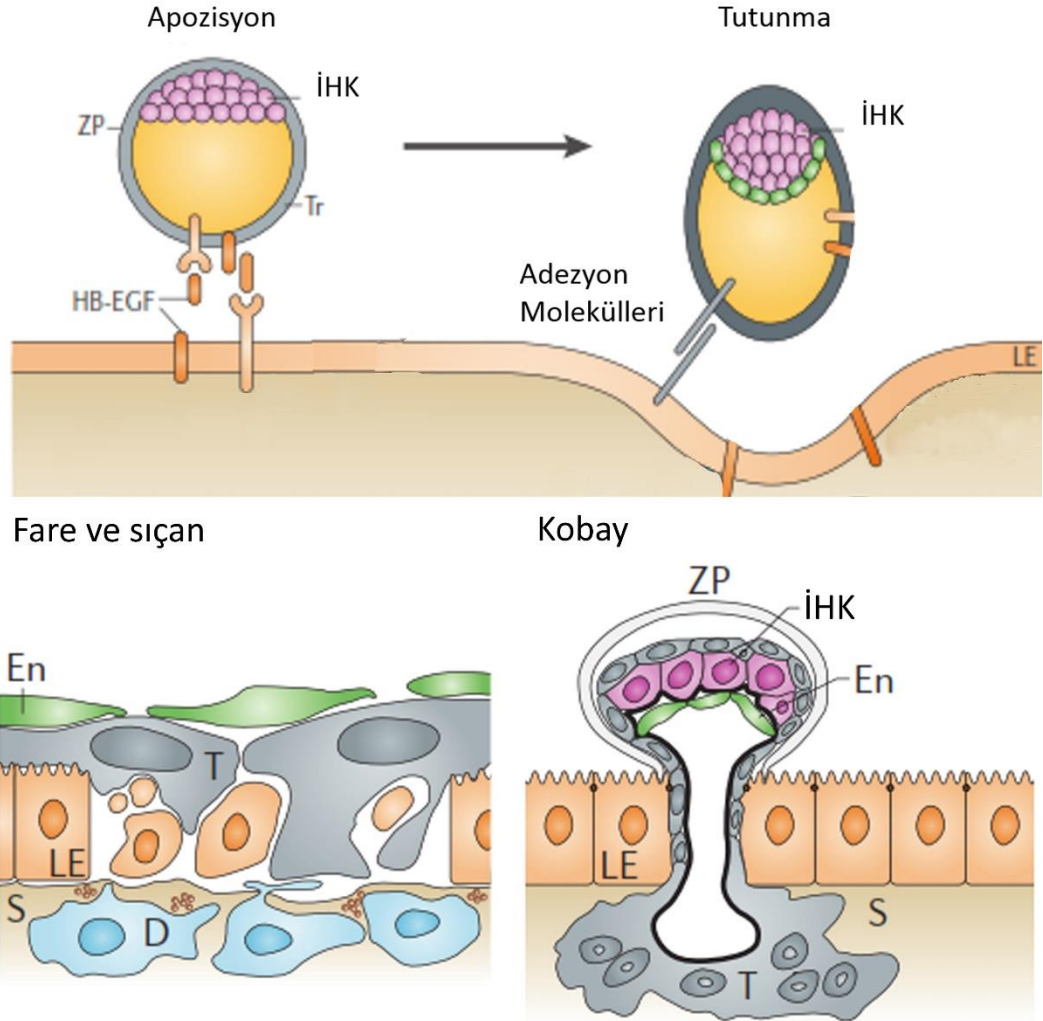
Farelerde implantasyon, genellikle 5. günün sonunda blastosistin desidual kriptaya yerleşimiyle başlar [66]. Desidual kriptalar, uterus lümeninin antimezometriyal bölgesindeki sık çukurları şeklindedir. Definitif (olgun) plaseenta mezometriyal bölgeye doğru oluşur ve o bölgede varlığını sürdürür [67, 68] (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Blastosistin preimplantif ve postimplantif gelişimi (a), anti-mezometriyal desiduaya tutunması ve invazyonu (b), 8-9,5 günler arası yapıların gelişimi (c) [67, 68].

Preimplantasyon evresinde İHK'den uzaktaki mural trofoblastlar, primer trofoblast dev hücre oluşumunu başlatabilmek için bölünmelerini durdururlar ancak DNA'larını replike etmeye devam ederler [69].

İmplantasyonun apozisyon, tutunma ve penetrasyon aşamalarında, öncelikle apozisyon bölgesinde, blastosistin mural trofoblastları Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R) eksprese eder. Buna karşılık, uterus endometriyal epitelyum hücreleri, heparin-bağlı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF) salgırlar. HB-EGF, heparansülfat proteoglikanlarına ve trofoektoderm yüzeyindeki EGF reseptörüne yüksek bağlanma afinitesi gösterir. Membran bağlı veya çözülebilir HB-EGF'nin EGF-R'ye bağlanması, reseptör otofosforilasyonunu uyarır. Trofoblast hücrelerinin sitoplazmik çıkıntıları, uterusun epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki pinopod adını alan küçük çıkıntılarla bağlanırlar ve endometriyum lümenini döşeyen hücrelerin interselüler alanına girerler. Penetrasyon, apoptoz sonucu endometriyum hücrelerini bağlayan desmozomların sayıca giderek azalmasıyla kolaylaştırılır [70, 71] (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Blastosist ve endometriyal lümen epitelinin karşılıklı gelmesi (apozisyon), blastosistin endometriyum lümen epiteline tutunmasını ve invazyonunu gösteren çizim. İHK: İç hücre kitlesi, ZP: Zona pelusida, T: Trofoektoderm, HB-EGF: heparin-bağlı EGF benzeri büyüme faktörü, LE: Lümen epiteli, D: Desidual hücre, S: Stroma, En: Embriyonik endoderm [71].

Uterus epitel hücreleri reseptif fazda değiştirilmiş bir sitoplazmik/membran yapısına sahiptir. Hücre apikal bir polarite kazanır ve adezyon (yapışma) moleküllerini bulundurur. Trofoblastın tutunmasında bu moleküller görev alır ve trofoblast bağlanmasıyla epitel hücrelerinde implantasyonun gelişmesini sağlayan sinyallenmeler gerçekleşir [70].

İmplantasyonda; kaderinler, immünglobulin süper ailesi üyeleri, integrinler ve selektinler gibi çeşitli adezyon (yapışma) molekülleri önemli roller alır [72].

Kaderinler kalsiyum bağımlı homotipik veya heterotipik bağlanmayla hücre-hücre etkileşiminde aracı rol üstlenir [73]. E-kaderin hem uterus lümen epitelinde hem de trofoektoderimde bulunmaktadır [74]. E-kaderinin embriyo implantasyonunda önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. E-kaderinden yoksun olan farelerde implantasyonun başarısız olduğu gösterilmiştir [75, 76]. Endometriyumda, E-kaderin epitel hücrelerin lateral plazma mebranında yerleşiktir ve adherens bağlantılarının kurulmasında ve devamlılığında önemlidir [77-79]. E-kaderinler ikili etki gösterirler. İmplantasyondan önce yapışkanlığın sağlanmasında etkili olduğundan ekspresyonu gereklidir. Blastosist invazyonunun gerçekleşmesi için epitel hücrelerinin ayrılmasını sağlamak için ekspresyonu azalır[72].

Musinler implantasyonda görevli olan diğer bir adezyon molekül ailesidir. MUC1 ekspresyonu menstrüel döngüde sekretuar fazda yüksektir [80-82]. *in vitro* yapılan bir çalışmada embriyoların epitel hücrelere bağlandığı bölgelerde MUC1'in temizlendiği, böylece tutunma için uygun ortamın hazırlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir [83]. Lümen epiteli yüzeyinde bulunan bir diğer müsin MUC16, hücre-hücre adezyonu engeller. Bu musinin implantasyon sürecinde yüzeyden temizlenmesinin trofoblast adezyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir [84].

İmmünglobulin süper ailesi üyeleri, hücre-hücre adezyonu reseptörü olarak hücre davranışını kontrol etmektedir [85]. Bu ailenin üyelerinin de hücre-hücre adezyonunda bağlanmada etkili olarak trofoblast tutunmasında etkili olabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [72].

Adezyonda görevli moleküllerden olan integrinlerin de implantasyonda rolleri olduğu gösterilmiştir [86-92]

İntegrin β_1 alt ünitesinden yoksun fare blastosistlerinin implante olamadıkları gösterilmiştir [93]. $\alpha_v\beta_6$ integrinleri implantasyon sırasında trofoktoderimde eksprese edilir [94, 95]. Bu integrinin engellendiği farelerde implantasyonun başarısız olduğu gösterilmiştir [96, 97].

İmplantasyonda etkili olan diğer bir adezyon molekül ailesi selektinlerdir. L-selektinin blastosiste eksprese olduğu ve endometriyum yüzeyindeki oligosakkaritlerle olan ilişkisinin önemli olduğu gösterilmiştir [98]. L-selektin ligandları endometrial lümen ve bez epitelinde yerleşiklerdir ve implantasyon penceresinde ekspresyonları artar [99-101]. Bu değişen L-selektin ekspresyonu implantasyonun ilerlemesiyle ilgilidir [102].

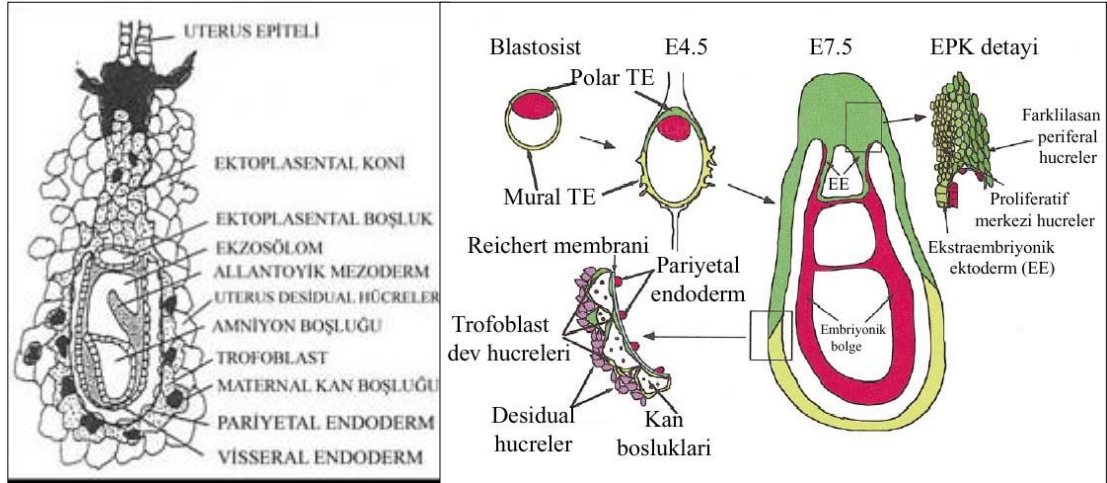
İmplantasyon sonrasında primer trofoblast dev hücreleri komşuluk yaptığı maternal endometriyumu aşındırarak embriyonun periferinde anastomozlaşan kan sinüsleri ağının oluşmasında yardımcı olur. Bu kan sinüsleri tek bir hücre tabakası şeklinde yapılmış olan trofoblast dev hücreleri ile birlikte Reichert membranı komşuluğunda dizilirler. Bu hücreler embriyonun gelişimini sağlayan definitif (olgun) koryoallantoyik plasenta oluşmasından önceki evrede embriyonik bölgeye besin ve O_2 geçişini kolaylaştırmak için özelleşmiştir, oldukça düz ve pencerelidir. Primer trofoblast dev hücreleri definitif (olgun) plasentaya katılmazlar.

Zıt olarak, polar trofoektoderm alttaki İHKnin ürettiği fibroblast büyüme faktör 4 (FGF4)'ün etkisiyle proliferatif fazda tutulur. Prolifere olan polar trofoektoderm,

İHK'yi blastosölük kaviteye iterek gelişimin yumurta silindiri (egg cylinder) denilen safhasını oluşturur. Bu hücreler apikal olarak göçeder, birbirlerinin üzerine yığılırlar ve implantasyondan sonra 7.5 gün civarında 2 ekstraembriyonik yapıyı oluştururlar. Bunlardan biri ektoplasental koni (EPK) diğeri ise ekstraembriyonik ektodermdir. EPK, sekonder trofoblast dev hücreleri ve daha sonra koryoallantoyik plasentanın spongiyotrofoblastını oluştururlar. Sekonder trofoblast dev hücreleri ektoplasental koninin sınırındaki trofoblast hücrelerinin bölünmeyi durdurarak DNAlarını sürekli replike (endoreduplikasyon) etmeleri sonucu oluşurlar. Sekonder trofoblast dev hücreleri konseptusu çevrelemek üzere göç ederler ve bağlantı zonunun maternal yüzeyini sınırlarlar.

İHK içerisinde gelişen primitif endoderm hücreleri blastosöl boşluğunu döşemek üzere mural trofoektodermin iç yüzeyi üzerine göç ederler ve pariyetal endodermi oluştururlar. Diğer taraftan yumurta silindirinin üzerindeki primitif endoderm hücreleri visseral endodermi oluşturur. Bu iki hücre tipi morfolojik olarak oldukça farklıdır, pariyetal endoderm hücreleri küçük-iğ şekilli hücrelerdir, ekstraselüler matriks salgılayarak pariyetal yolk sak üzerinde aktif olarak göç ederler. Visseral endoderm hücreleri ise yumurta silindirinin yüzeyi üzerinde prizmatik bir epitel tabakası oluştururlar [62] [65] (Şekil 2.12a) ve (Şekil 2.12b).

Pariyetal endoderm, Reichert membranı denilen sadece kemirgenlerde görülen kollojen, laminin ve distroglikanica zengin kalın bir bazal membran tabakası salgılar [103]. Reichert membranı, pariyetal endoderm hücreleri ve trofoblast arasında homojen bir membran olarak fonksiyon görür. Bir bazal membranın tüm morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine sahip olan bu yapı muhtemelen koruyucu bir tabaka olarak davranır [104-106]. Maternal/fötal yüzeyin bütünlüğünün sağlanması ve erken postimplantasyon periyodunda difüzyonel maternal kökenli besinler için karşılıklı değişim tabakasını oluşturur. Farede yolk sak'ın pariyetal endodermi ile döşeli trofoblastı maternal kan ile yıkanır. Trofoblast dev hücreleri, Reichert membranı ve pariyetal endodermi içeren bu yapılar pariyetal yolk sakı oluşturur. Pariyetal yolk sak plasental fonksiyon gören en erken yapıdır. Postimplantasyon evresindeki embriyoda pariyetal yolk sak uterus ile direkt olarak kontakt kuran ekstraembriyonik membrandır. Gebeliğin geç dönemlerinde trofoblast, pariyetal endoderm ve üzerindeki maternal doku dejenere olur böylece visseral endoderm uterus lümenine açık duruma gelir, bu yapı inverted yolk sak plasenta adını alır.



a

b

Şekil 2.12. Sıçan ve farede plasental gelişim. a: Sıçan plasentasının, b: 7.5 günlük fare plasentasının şematik görünümü [62, 65].

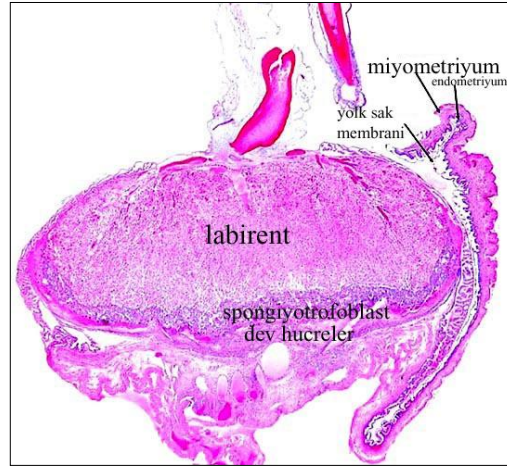
2.6.7. Farelerde erişkin plasenta yapısı

2.6.7.1.Yapısı

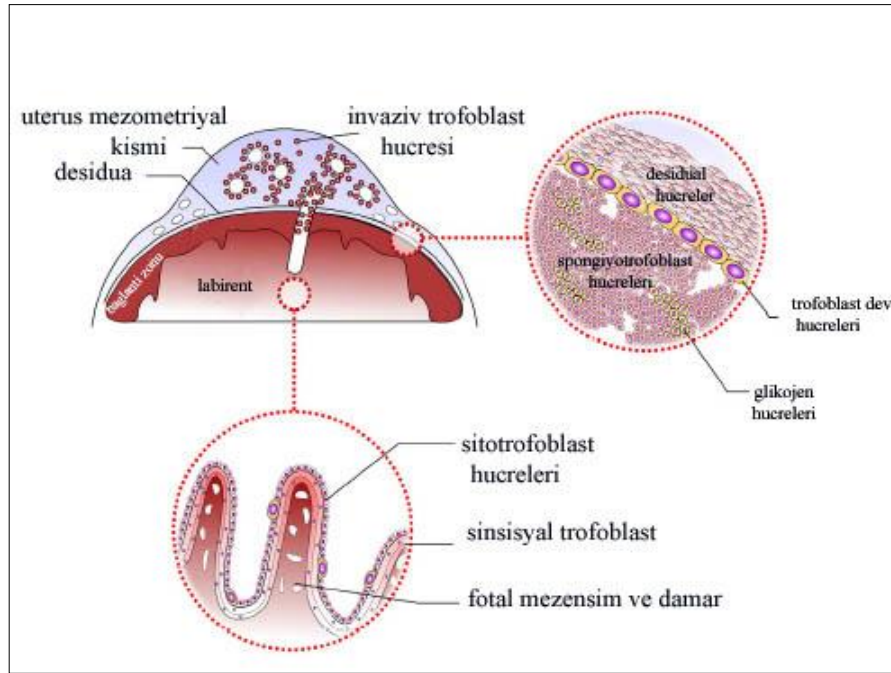
Farelerde 12. gün civarında plasenta artık tamamen oluşmuş ve fonksiyoneldir.

Gebeliğin ikinci yarısında gözlenen ve tamamen oluşmuş olan bu plasentada hücresel özelliklere bağlı olarak embriyodan maternal bölgelere doğru 4 kısım görülür [107-110] [61] (Şekil 2.13) ve (Şekil 2.14).

- 1-Labirent
- 2-Spongiyotrofoblast
- 3-Trofoblast dev hücreleri
- 4-Desidua katmanı



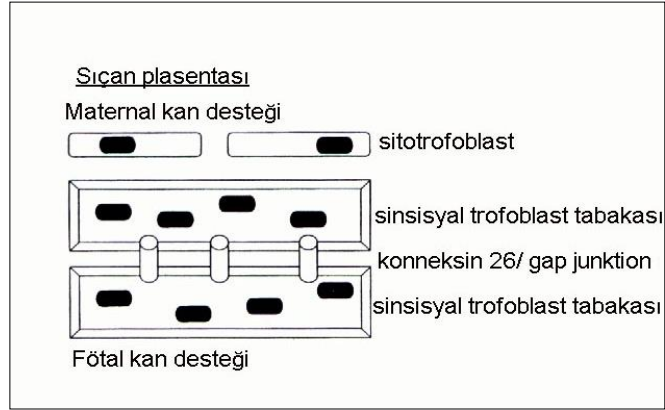
Şekil 2.13. Farelerde term plasentanın genel görünümü [61]



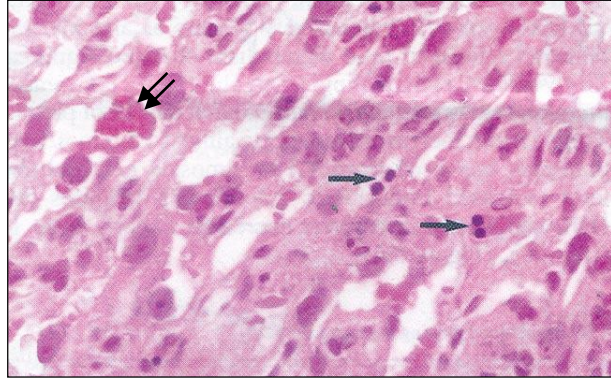
Şekil 2.14. Gebeliğin geç dönemlerinde olan fare uteroplantal yapısının şematik görünümü [110].

1-Labirent: Plasentanın fetal ve maternal kısımlarının kaynaştığı bir alandır. Yavruya ait damarlar ve anne kanının karşı karşıya bulunduğu bir bölgedir. Bu katman koryo-allantoyik plasenta bariyerini oluşturan bölümdür [107-109]. Fare plasentanın labirent tabakası E8.5da oluşmaya başlar. Besin ve gaz değişimi için geniş yüzey alanı sağlayabilmek amacıyla dallanma gösteren bir yapı şeklindedir.

Bu bölgede 2-3 sıralı epitel hücre kordonları şeklinde düzenlenmiş trofoblast hücreleri anne kanı ile karşı karşıyadır. Mezenşim hücreleri yavruya ait damarların çevresinde yoğunlaşmıştır. Bu bölge içinde maternal ve fetal kan birbirinden bağımsız bir şekilde sirkülasyondayken diğer taraftan aynı zamanda iki taraf arasında fizyolojik değişime izin verir [111, 112] [61] (Şekil 2.15) ve (Şekil 2.16).



Şekil 2.15. 3 sıra halinde düzenlenmiş labirent trofoblast hücreleri [112].



Şekil 2.16. Gebeliğin 17.gününde labirentin detaylı görünümü. Şekilde maternal kana ait nükleussuz eritrositler (çift oklarla) ile nükleuslu fötal eritrositler (tek oklarla) görülmektedir [61].

Labirent değişim alanı zıt akım prensibine göre kurulur. Bundan dolayı küçük maternal kan kapillerlerindeki kan feto-plasental dolaşımında kapiller kan akımına zıt yönde akar. Bu katmanın hücresel özellikleri gebelik boyunca değişkenlik gösterir [107, 113, 114].

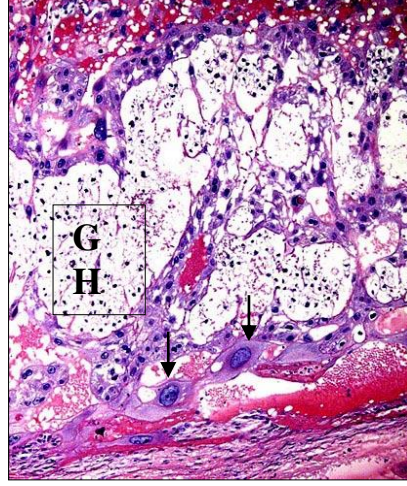
Gebeliğin son günlerinde mezenşim doku ve trofoblast hücrelerinin miktarındaki azalma ile yavruya ait damarların endotel hücreleri anne kanı ile temas eder ve ilişki en ileri düzeye ulaşır.

2-Spongiyotrofoblast: Fötal kısma ait damarların bulunmadığı, sadece anneye ait damarların yer aldığı katman olarak bilinir. Diğer adı trofospongiyum olan spongiyotrofoblastlar, glikojen hücreleri ve dev hücreler bağlantı zonu olarak adlandırılır [107-109, 111, 115] [61] (Şekil 2.17).

Gelişimin erken postimplantasyon evrelerinde ekto-plasental konideki trofoblast hücreleri, koryon ve trofoblast dev hücrelerinin dış tabakası arasında uzanır. Gen ekspresyon çalışmaları ekto-plasental koni hücrelerinin daha sonra spongiyotrofoblastlara dönüştüğünü göstermektedir. Örneğin Tpbp/4311 ve Flt-1 [116]

genleri ektoplasental koni ve spongiyotrofoblastta eksprese edilir ama trofoblast dev hücreleri ekstraembriyonik ektoderm ya da labirentte eksprese edilmez.

Polar trofoektodermin oluşturduğu ektoplasental boşluğu döşeyen ekstraembriyonik ektoderm ekstraembriyonik mezoderm kökenli allantoyis ile birlikte definitif (olgun) plasentayı oluşturur. E10.gün civarında ektoplasental koninin genişlemesi ve düzleşmesi sonucu uterusu doğru labirent tabakasının komşuluğunda yer alan spongiyotrofoblast tabakası oluşmaya başlar.



Şekil 2.17. Gebeliğin 15.gününde spongiyotrofoblast tabakasında açık boyanan glikojen hücreleri (GH) ve maternal duvarlara invaze olan trofoblastik dev hücreler (oklarla) görünmektedir[61].

Bu bölge fötal kan içermez ama labirentin içine ve dışına maternal kan taşıyan ve zigot kökenli trofoblast hücrelerinin döşediği maternal kan kanalları bu bölgenin içerisinde geçmektedir [111, 117, 118].

Spongiyotrofoblast hücreleri plasental laktojen gibi hormonlar, proliferin gibi anjiyogenik faktörler, VEGF [119] matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi doku yeniden şekillenme faktörleri [120] ve ürokinaz tip plazminojen aktivatör (uPA) gibi birçok gen ürünü üretirler. Bu hücrelerin protein hormonlar sentezlemelerinden dolayı bunların maternal metabolizmayı etkiledikleri düşünülmektedir.

E13' ten sonra glikojen trofoblast hücreleri fare plasentasında gruplar halinde görülmeye başlar [121]. Bunlar oldukça vakuollü hücrelerdir, büyük miktarlarda glikojen içerirler, sitoplazmaları açık görünür. Spongiyotrofoblast hücrelerinin karakteristiği olan genler eksprese etmeleri örneğin Tpbp/4311, bunların spongiyotrofoblast hücrelerinin farklılaşmış bir alt tipi olduğunu gösterir.

Glikojen hücrelerinin sayısı gebeliğin farklı evrelerinde değişir. E13-16. günlerde spongiyotrofoblast hacminin yaklaşık %50 si ve E17-18. günlerde %25 ini oluştururken E19-21. günlerde sadece birkaç glikojen hücresi saptanabilmiştir. Geç gebelik boyunca sayılarındaki dramatik azalmanın hücre ölümünden mi yoksa desidua bazalise dereceli olarak invazyonlarından mı ya da her ikisi nedeniyle mi olduğu henüz tam anlaşılabilmemiş değildir.

Fare plasentası glikojen hücrelerinin IGF2 gibi protein yapıdaki hormonları sentezlemeleri ve salgılamaları gerçeği föto-maternal etkileşimleri etkileyebileceklerini göstermektedir [122, 123]. Ayrıca, bu hücreler spongiyotrofoblastların salgılama davranışlarını etkileyebilirler çünkü onlarla yakın etkileşim içindedirler ve trofoblastlarca salgılanan plasental laktojen hormonunun bir indükleyicisi olarak salgılanan calyoclin proteinini eksprese ederler.

3-Trofoblast Dev Hücreleri: Gelişim boyunca ilk farklılaşan hücreler olup iri boyutları ve yüksek DNA miktarlarıyla tanımlanmışlardır. Endoreduplikasyon adı verilen olayla mitoz gerçekleşmeksizin birçok defa DNA replikasyonu gerçekleştirilerek poliploid bir yapı kazanırlar [124]. Trofoblast dev hücreleri implantasyon zamanında invaziv hücrelere farklılaşırlar; uterus epitel hücrelerini fagosite ederler, uterus stromasına penetre olarak maternal kan ile vasküler bağlantılar yaparlar. İnsanlarda hücre invazyonuna aracılık eden hücre adezyon molekülleri ve matriks degrade eden proteinlerfarelerde trofoblast dev hücrelerince eksprese edilir [125]. Daha sonra annede lokal immün sistem, ovaryum, metabolizma ve kan hücre üretimini düzenleyen bazı sitokinler ve hormonlar üretirler [126]. Gebeliğin devamı ve koryoallantoyik plasentanın oluşumu, vaskülarizasyonu için gereken plasental laktojenler, proliferinler ve proliferin ilişkili proteinler gibi hormonlar ve büyüme faktörleri eksprese ederler. İnsanlarda invaziv ekstrasitotrofoblast hücreleri ve farelerde trofoblast dev hücreleri matriks parçalayan enzim MMP9, hücre adezyon molekülü $\alpha 1\beta 1$ integrin [127] ve transkripsiyon faktörü Stra13 ekspresyonunu paylaşırlar.

4-Desidua katmanı: Gebeliğin erken dönemlerinde endometriyumda şekillenen desidua hücreleri katmanıdır. Gebeliğin son dönemlerinde bu katmanın fibrotik ve atrofik bir yapı kazandığı görülür.

2.6.7.2. İnsan Plasentası ile Benzerlikleri ve Farklılıkları

Sınıflandırma

Fare ve insan plasentaları fötal plasenta/labirentin şekli nedeniyle her iki türde diskoid olarak sınıflandırılır. Fareler tek bir kotiledona sahiptir oysaki insanlar çoklu kotiledonlara sahiptir, bunlar tek bir diske benzeyen sağlam bir demet oluştururlar.

Her iki plasenta tipi de koryo-allantoyiktir. Maternal ve fötal yapılar arasındaki tabaka sayısına göre fare hemotrikoryal, insan ise hemomonokoryal plasentaya sahiptir [128] (Şekil 2.18).

Farelerde yolk sak konseptüsün temel ekstraembriyonik membranı olarak tüm fetüsü çevreler. Bu, koryoallantoyik plasenta olgunlaşana kadar tek değişim yapısıdır ve gebeliğin geç dönemine kadar temel değişim tabakası ve koruyucu tabaka olarak devam eder. İnsanda yolk sak fetüsü çevrelemez, sadece birkaç hafta varlığını sürdürür ve değişim fonksiyonunda büyük ölçüde kalıntıdır.

İnvazyon

İnsan ve fare plasentasında genel olarak 2 tip invazyon görülür; endovasküler ve intersisyal invazyon [117]. Trofoblast dev hücre-spesifik gen Plf (proliferin kodlar) eksprese eden trofoblast dev hücreleri maternal spiral arterler ile ilişkiye geçerek erken post-implantasyon periyodu boyunca invaze olurlar. Bu endovasküler invazyon olarak

adlandırılır. Zıt olarak glikojen trofoblast hücreleri E13ten sonra maternal desiduanın intersisyumuna yayılır ve spiral arterlerle yakın ilişki göstermez. Bu ise intersisyal invazyondur.

İnsanlarda, uterusu trofoblast hücre invazyonunun iki modeli olduğu kabul edilmektedir: gebeliğin 15. haftasından önce desidua boyunca intersisyal invazyon ve takibinde endovasküler invazyon [129]. İnsanlardaki bu iki tip invazyonun farelerdeki iki tip invazyona karşılık gelip gelmediği açık değildir. Endovasküler ve intersisyal invazyonun gerçekleşme sırası zıt gibi görünmektedir.

İnsan plasentasında trofoblast invazyonu normalde miyometriyumun iç 3. tabakasına kadar (daha derine değil) uzanır [111, 130]. Fare plasentasında trofoblast invazyonu desidua bazalis boyunca görülür ancak miyometriyuma kadar uzadığı rapor edilmiştir [118, 121].

Dev Hücreler ve Ekstravillöz Trofoblastlar

Fare plasentasının en dış hücre tabakası implantasyona ve invazyona aracılık eden primer trofoblast dev hücrelerinden oluşur. İnsanlarda invazyon işlemi invazif ekstravillöz trofoblast hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Trofoblast dev hücreleri ekstravillöz trofoblastlara analogtur, her ikisi de poliploit ve invazivdir ve benzer gen ekspresyonu gösterirler. Bununla birlikte kemirgen trofoblast dev hücreleri insan ekstravillöz sitotrofoblast hücrelerinden daha az invaziftir. Bu hücreler sinsisyotrofoblast hücrelerinden farklıdır, sinsisyotrofoblastlar hücre döngüsünden çıkan ve her nükleusu diploid kalarak çok çekirdekli sinsisyumu oluşturmak üzere birleşen hücreler tarafından oluşturulur.

Fötal Plasenta ve Labirent

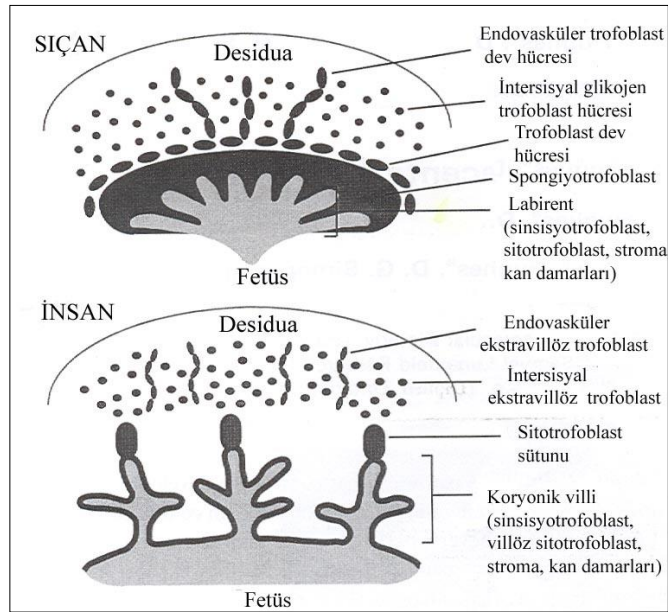
İnsan fötal plasentası fare labirentine fonksiyonel olarak analogtur çünkü burası fötal ve maternal kanın fizyolojik değişim için yakın ilişki içinde dolaşımda oldukları bölgedir. Her iki türde de bu bölge fötal yüzünde ekstraselüler matriks tarafından desteklenen bir trofoblast tabakası tarafından sınırlanır ve koryonik plak olarak bilinir. Koryonik plağın zıt yüzeyinden koryonik villi olarak bilinen birçok ağaç benzeri yapı çıkar. Hem insan hem fare plasentalarında villi maternal kan ile direkt kontakta uzanan sinsisyotrofoblast ile kaplıdır.

İki yapı, koryonik plağın ana dallarından olan dallanmalarında farklılıklar gösterirler. İnsan plasentası villöz tiptedir. Çünkü, koryonik villi sayısız dal ve altdal içeren bir ağaca benzer. Diğer taraftan fare labirentinin ana koryonik çıkıntılarının dalları çok daha fazla birbirine bağlantılıdır. Bu farklılığın bir sonucu olarak insan fötal plasentasında maternal kanın dolaştığı boşluk (intervillöz boşluk) fare labirentinden daha geniştir [121, 131-133].

Bazal Plak ve Bağlantı Zonu

İnsan bazal plağı ve bunun faredeki homoloğu bağlantı zonu, fötal plasenta/labirentin maternal yüzünü sınırlar. Her iki türde de bu zon zigot kökenli sitotrofoblastlar (sinsiyotrofoblast değil) içerir ama herhangi fötal kan ya da fötal kan damarları içermez.

İnsanda erken gebelik süresince çok tabakalı sitotrofoblastik sütunlar morfolojik bir gradient gösterirler: desidua bazalise en yakın hücreler vakuollü ve glikojence zengindir (distal hücreler) ve kalanı (proksimal hücreler) eozinofilik bir sitoplazma ve düşük miktarda glikojen içerir. Bu durumda farelerdeki bağlantı zonunun glikojen hücreleri insan sitotrofoblastik sütunlarının distal hücrelerine analog olduğu önerilebilir. Benzer şekilde fare spongiyotrofoblastları, insan sitotrofoblastik hücre sütunları proksimal trofoblastlarına analog olabilir. Bu hipotetik senaryo 3 kanıtla desteklenmektedir. Birincisi hem insan sitotrofoblastik hücre sütunlarının proksimal hücreleri ve hem de fare spongiyotrofoblastlarından invaziv trofoblastların geliştiği belirtilmektedir. Örneğin insanlardaki invaziv ekstrasvillöz trofoblast ve farelerdeki invaziv glikojen hücreleri. İkincisi, ilerleyen gebelikte birlikte sütunların boyutlarındaki dereceli azalma ve E22-36. haftalar arasında kaybolmaları olayı fare glikojen hücrelerinin geç gebelik boyunca bağlantı zonundaki dramatik düşüşlerine benzetilebilir. Bu düşüş olayı, fare glikojen hücrelerini oluşturan spongiyotrofoblastlardaki düşüş ile ilişkili bir olaydır. Üçüncüsü, insan sitotrofoblastik hücre sütunlarının proksimal hücreleri-erken gebelik dönemindeki fare spongiyotrofoblastları gibi IGF2 [123, 134] ve p57 [122, 135] eksprese ederler [128] (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. İnsan ve fare plasentalarının karşılaştırmalı anatomisi [128].

2.7. Notch Sinyal Yolağı

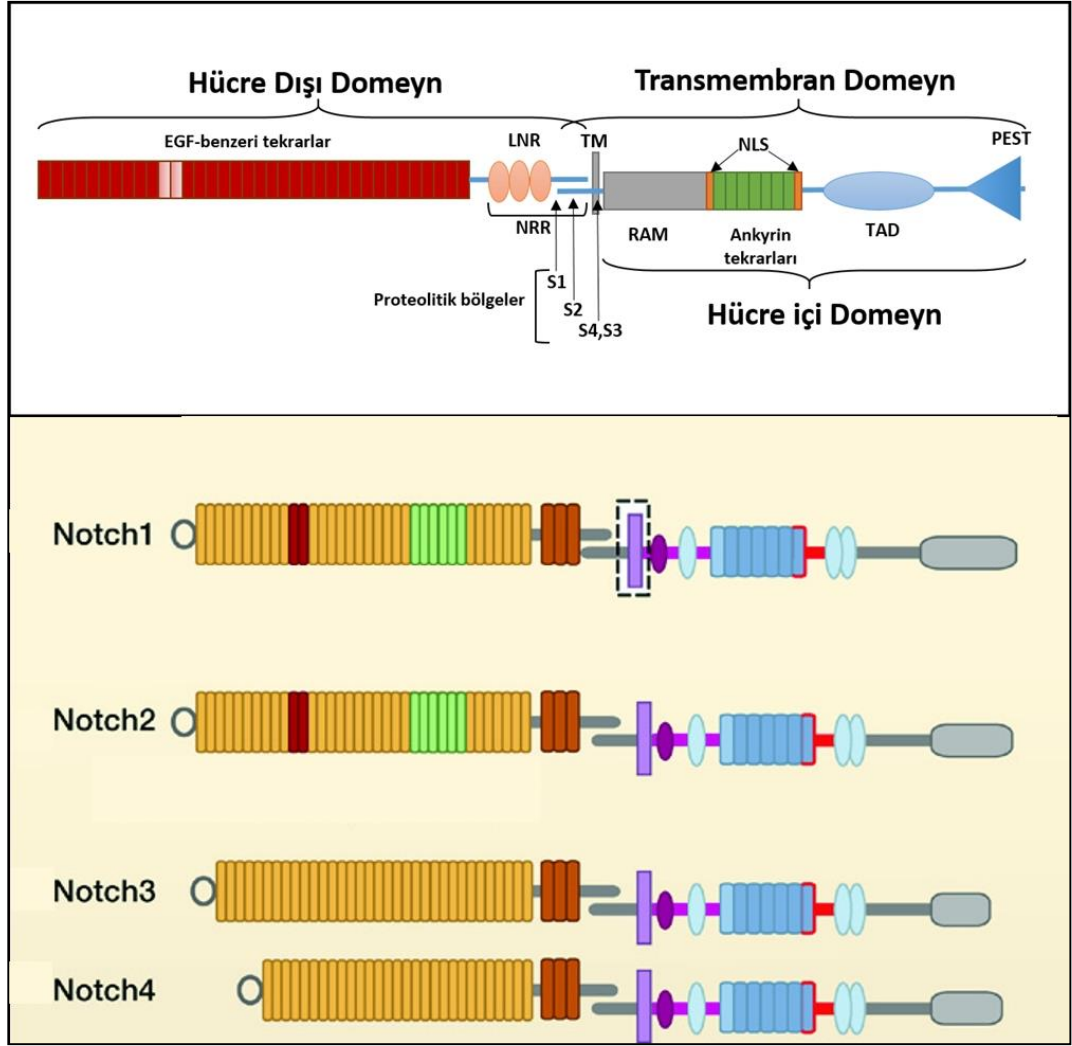
Notch sinyali, evrimsel olarak korunmuş hücreler arası bir sinyal yolağı olup gelişim süresince uygun hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Notch sinyali, Notch reseptörleri ile onların ligandları olan Delta ya da Jagged arasındaki etkileşimler sonucunda hücre-hücre bağlantılarıyla aktive olur. Embriyonik gelişim boyunca apoptoz, hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre soyu kararı ve erişkinde

kendini yenileyen organların homeostazı gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde gereklidir. Notch sinyali; lateral inhibisyon, lateral indüksiyon, kök hücre devamlılığı ve terminal farklılaşma gibi gelişimsel kararlarda anahtar olan çeşitli mekanizmalar üstünde etkilidir. Lateral inhibisyon eşit miktarda Notch reseptör ve ligand eksprese eden bir grup eşdeğer hücrenin azar azar ya Notch reseptörünü ya da Notch ligandını eksprese etmeye başladığı nörogenez süresince gerçekleşir. Lateral indüksiyon durumunda, Notch ligandı yakın çevredeki farklı bir hücre tarafından sağlanır. Lateral indüksiyona örnek, timik stromal hücrelerin indükleyici sinyali sağladığı durumda ortak lenfoid progenitörünün öncül T hücresine geliştiği lenfopoezdir. İndükleyici sinyalin yokluğunda, örneğin, kemik iliğinde ortak lenfoid progenitör kemik iliği stromal hücrelerinin yardımıyla B hücresine farklılanır. Notch sinyali ayrıca kök hücre durumunu korur. Buna örnek Notch sinyalinin çukur progenitör hücrelerini farklılanmadan koruduğu ince bağırsaktır. Diğer taraftan, Notch sinyali ayrıca derideki keratinositlerde gözlemlendiği gibi hücre döngüsü duraklamasını tetikleyerek terminal farklılaşma programını çalıştırabilir. Notch sinyalleri son derece pleiotropiktir dolayısıyla birçok dokuyu etkiler [11].

2.7.1. Notch Reseptörleri

Drosophila melanogaster Notch reseptörü genlerinin ilk olarak tanımlandığı organizmadır ve sadece bir tane Notch reseptörüne sahiptir. *Caenorhabditis elegans*'ta iki tane Notch reseptörü bulunurken memelilerde dört tane Notch reseptörü tanımlanmıştır. Tüm Notch reseptörlerinin hücre dışı domeynleri, Notch ligandlarıyla etkileşimde rolü olan 29-36 ardışık epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri tekrarlar içerir. Birçok EGF tekrarı kalsiyum iyonlarına bağlanır ve Notch'un yapısının belirlenmesinde ve liganda bağlanması için gerekli afinitenin sağlanmasında önemli rolü vardır [136]. EGF tekrarlarını negatif düzenleyici bölge (NRR) takip eder. Bu bölge, Lin12-Notch tekrarları (LNR) ve heterodimerize edici domeyni (HD) içerir. NRR, ligand yokluğunda reseptör aktivasyonunun engellenmesinde önemli bir role sahiptir. Birinci bölge (S1) aktivasyon sırasında hücre dışı domeynin transmembran kısmından ayrılmasını sağlayan ilk yarıklanmanın olduğu bölgedir. [137]

Notch transmembran domeyn, 3-4 arjinin/lizin (Arg/Lys) bakiyelerini içeren C-terminal dizisine sahiptir. Hücre içi domeyn 12-20 aminoasitten oluşan bir RBPjk ilişkili birim (RAM), yedi ankyrin tekrarı (ANK) ile bu iki bölge arasında bir bağlayıcı içerir ve bu bölge nükleusta transkripsiyon faktörleri ile bağlanan kısımdır. Bu bölgeyi transaktivasyon domeyni ve prolin/glutamik asit/serin/tironin (PEST) bölgesi takip etmektedir [137] (Şekil 2.19).

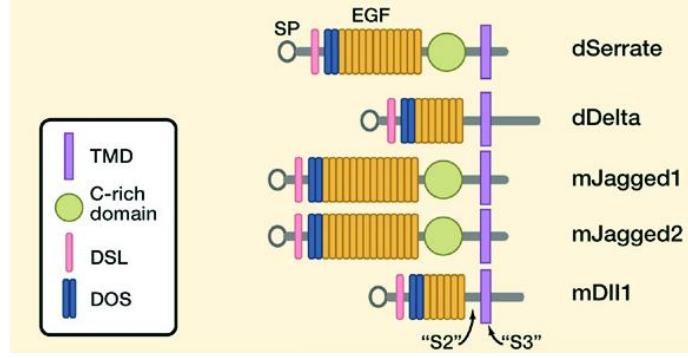


Şekil 2.19. Notch yapısını gösteren şematik çizim ve memelilerdeki değişik Notch subtiplerinin yapılarına ait şematik görünüm[137]

2.7.2. Notch Ligandları

Notch ligandları genel olarak üç yapısal öge içerir; N-terminal DSL (Delta/Serrate/LAG-2) domeyni, DOS (Delta ve OSM-11-benzeri proteinleri) olarak adlandırılan değişen sayılarda ardışık EGF tekrarları ve kalsiyum bağlayan veya bağlamayan EGF benzeri tekrarlar [138, 139]. Ligandlar, sistein zengin (CR) domeynin varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak Delta ya da Delta-like (Dll) ve Serrate (memelilerde Jagged) olmak üzere iki sınıfa daha ayrılırlar [12] (Şekil 2.20).

Notch sinyali Notch reseptörleri ile bunların ligandları arasındaki etkileşimin sonucu olarak hücre-hücre bağlantısı üzerinden etki gösterir. Notch reseptörleri eksprese eden hücreler Notch sinyalini alır. İnsan ve farelerde dört adet Notch geni bulunur. Bütün türlerde Notch reseptörleri, Notch sinyal alıcısı hücrede gen regülasyonuna öncülük eden ardışık olayları tetikleyen ligandlara bağlanan tek geçişli transmembran proteinlerdir[12].



Şekil 2.20. *Drosophila* ve memelilerde Notch ligandlarının yapılarına ait şematik görünüm[137]

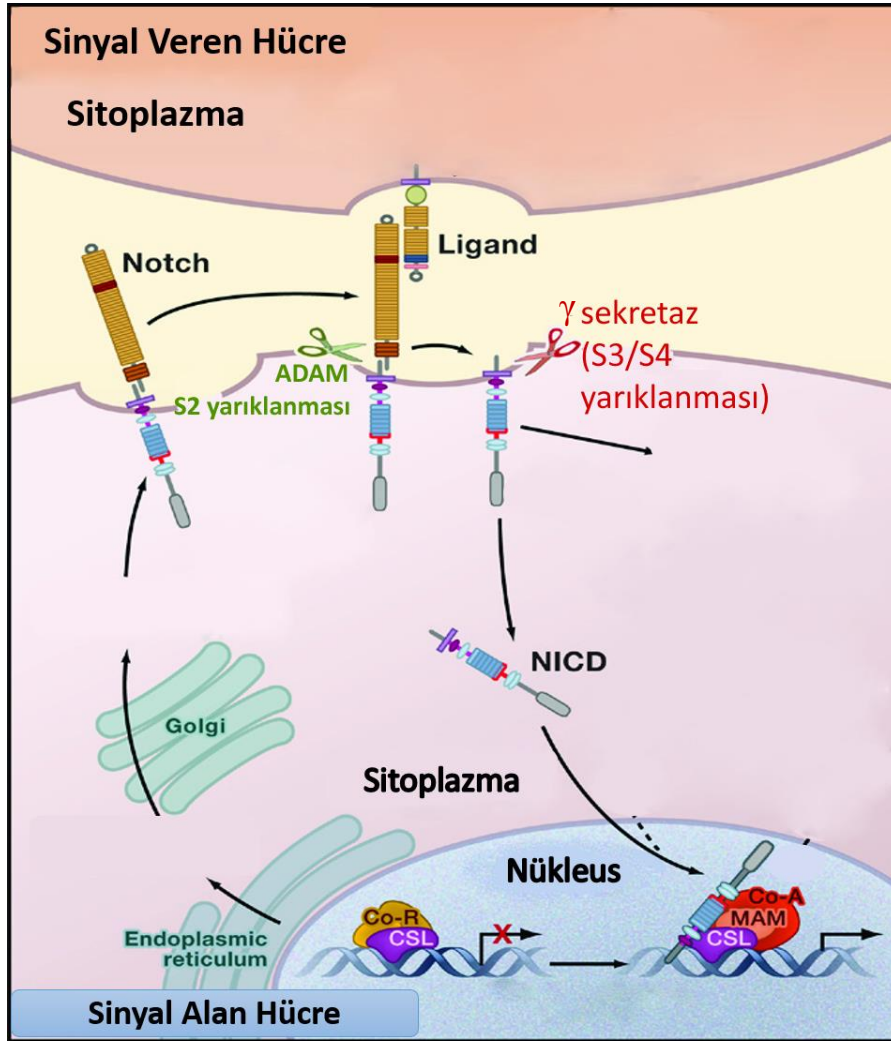
2.7.3. Notch Sinyal Yolağı

Notch ilk olarak endoplazmik retikulumda tek bir polipeptid öncülü olarak sentezlenir ve sonra trans-Golgi'deki furin benzeri konvertaz tarafından iki parçalı bir proteine yarıklanır. Hücre dışı domeynine ligand bağlanması Notch reseptöründe iki proteolitik yarıklanma olayını başlatır. İlk yarıklanma ADAM-ailesi metalloproteazları tarafından katalizlenirken, ikincisi presenilin, nikastrin, PEN2 ve APH içeren bir enzim kompleksi olan γ -sekretaz aracılığıdır. İkinci yarıklanma, Notch hücre içi domeyni (NICD) serbest bırakır. NICD, daha sonra nükleusa transloke olarak DNA-bağlayıcı protein CSL (CBF1, Su(H) ve LAG-1'den ismini alan) (CBF1, RB-J olarak da adlandırılır) ile birlikte çalışır [12]. Ligand olmadığında, nükleer NICD olmadığı için, RBP-J korepresör komplekslerin temini aracılığıyla Notch hedef genlerini baskılar. NICD'nin RBP-J'ye bağlanması baskılanmış durumdan aktif duruma değişimde hayati önemdedir. NICD ilk olarak RBP-J'den korepresörleri (N-CoR, SHARP, CtBP gibi) ayırarak RBP-J bağlanma bölgesi içeren promotorları inaktive eder ve ardından bir koaktivatör kompleks olan Mastermind/MAML ve p300/CBP'yi toplayarak Notch hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder [11] (Şekil 2.21).

Notch aktivasyonunu takiben, NICD nükleusa girer ve doğrudan hedef genlerin ekspresyonlarını düzenler. Notch hedeflerinin arasında, en iyi tanımlananı E(spl)/HES sınıfının bHLH (basic-helix-loop-helix) genleridir. Bununla birlikte, Notch'a yanıt hücre tipleri arasında çok büyük değişkenlik gösterir, örneğin, Notch bazı durumlarda hücre proliferasyonunu bazı durumlarda ise apoptozu başlatır. Farklı yanıtlar diğer yolaklarla etkileşim sonucu ortaya çıkıyor olabilir [12].

Notch reseptörleri aracılı sinyallerin çeşitli sonuçları olmasına karşın, çeşitli hücrel ve gelişimsel durumlarda sınırlı sayıda Notch hedef geni tanımlanmıştır. Hairy/enhancer of split (Hes) genleri çeşitli hücre tiplerinde Notch tarafından düzenlenen yüksek oranda korunmuş proteinlerdir [13, 14]. Hairy/Enhancer of split ailesi genleri ilk olarak *Drosophila* embriyolarında bu genlerin fonksiyon eksikliği epidermal öncüllerinin eksikliğinde artan miktarda nöroblastların varlığını gösterdiği için nörojenik genler olarak tanımlanmıştır [15, 16]. Yapılan çalışmalar bu genlerin doğrudan Notch hedef genleri olduğunu ortaya koymuştur. Hes1, Hes5 ve Hes7'nin promotorları Hey1, Hey2 ve HeyL (Hes'in alt ailesi, YRPW motifi ile ilişkili) Notch1'in aktif formu tarafından aktive edilebilir [17-19]. Hes ve Hey (aynı zamanda Hesr, Chf, Hrt, Herp ya da gridlock olarak da adlandırılır) proteinleri transkripsiyonel

baskılayıcılar olarak işlev gören helix-loop-helix (sarmal-ilmek-sarmal) transkripsiyon faktörleridir. Fare ve sıçan genomlarında yedi Hes (Hes1-7) [20-22] ve üç Hey geni (Hey1,2,L; ayrıca Hrt1,2,3; Hesr1,2; Herp2,1 ya da Chf2,1 olarak da belirtilir) tanımlanmıştır [23-25]. Hes1, Hes5 ve Hes7 Notch yolağı tarafından indüklenebiliyorken [22, 26], Hes2, Hes3 [18] ve Hes6 [27] Notch sinyalinden bağımsız görülmektedir ve Hes4 hakkında veri yetersizdir. Hey gen ailesinin tüm üyeleri Notch tarafından indüklenebilir [19, 24, 25] ve evrim süresince sıkı şekilde korunmuştur [14].



Şekil 2.21. Drosophila ve memelilerde Notch sinyal yolağını özetleyen şematik görünüm[137]

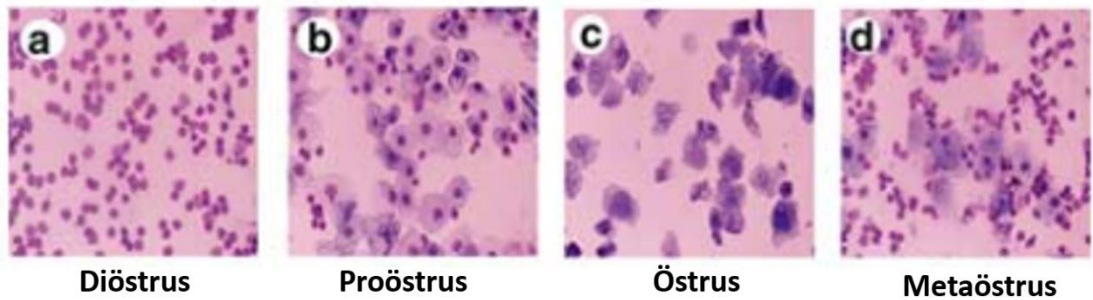
GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Denekler, Doku Temini ve Hazırlanması

Bu araştırmada Akdeniz Üniversitesi ‘Deney Hayvanları Ünitesi’nden temin edilen daha önce hiç deneye girmemiş ve çiftleşmemiş Balb/C ırkı 50 dişi ve 7 erkek fare kullanıldı. 6-8 haftalık Balb/C ırkı dişi fareler su ve besin kısıtlaması olmaksızın 12’şer saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu. İki ya da üç dişi fare bir Balb/C ırkı erkek fare ile aynı kafeste bırakılarak çiftleşmeleri sağlandı ve ertesi gün vajinal plak kontrolü yapıldı. Vajinal plağın görüldüğü dişiler gebeliğin 1. gününde kabul edilerek deney grupları oluşturuldu:

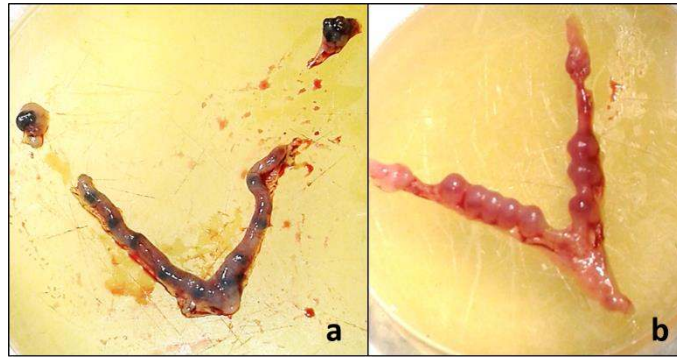
1. Grup (Kontrol): Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fareler (n=10)
2. Grup (E1): Gebeliğin 1.günü sakrifiye edilecek dişi fareler (n=10)
3. Grup (E4): Gebeliğin 4. günü sakrifiye edilecek dişi fareler (n=10)
4. Grup (E5): Gebeliğin 5. günü sakrifiye edilecek dişi fareler (n=10)
5. Grup (E8): Gebeliğin 8.günü sakrifiye edilecek dişi fareler (n=10)

1. grupta bulunan gebe olmayan östrus fazındaki dişi fareler ile 2, 3, 4 ve 5. gruplarda belirtilen gebelik tarihlerinde sakrifiye edilen gebe farelere ait uterus ve implantasyon bölgeleri toplandı. Gebe olmayan dişi farelerin östrus fazında olduklarından emin olmak için vajinal simir yapıldı. Simirlerinde skuamöz (kabuksu) yapıda olan, büyük, çekirdeksiz epitelyal hücrelerin baskın olduğu fareler deneye dahil edildi (Şekil 3.1c).



Şekil 3.1: Vajinal simir örneklerin Geimsa boyamaları. **a.** Diöstrus, **b.** Proöstrus, **c.** Östrus, **d.** Metaöstrus [140]

1. gün gebe dişilerin gebe olduklarından emin olmak için oviduktları parçalanarak 1 hücreli embriyoların olup olmadığı gözlemlendi. Bir hücreli embriyo görülen dişiler deneye dahil edildi. Gebeliğin 4. günündeki dişilerin gebe olup olmadığını belirlemek için uterus boynuzlarından biri PBS ile yıkanarak, yıkama sonrası elde edilen tubal sıvı mikroskop altında incelendi ve blastosistin olup olmadığı belirlendi. Blastosist görülen deneklerin yıkanmayan diğer uterus boynuzu alındı. Gebeliğin 5. gününde dişilerin gebe olup olmadığını belirlemek için dişilere kuyruk veninden Chicago Blue enjeksiyonu yapıldı, fareler 3-4 dakika sonra sakrifiye edildi. İmplantasyon bölgeleri mavi bantlar şeklinde gözlenen farelerin gebe olduğu doğrulanarak mavi bant görülen dişiler deneye dahil edildi. Mavi bant şeklinde görülen implantasyon bölgeleri alındı (Şekil 3.1.2a). Gebeliğin 8. gününde implantasyon bölgeleri çıplak gözle görülebilmektedir (Şekil 3.1.2b). İmplantasyon bölgesi görülen dişiler deneye dahil edildi. Sakrifiye edilen farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinin bir kısmı Western blot yöntemi uygulanmak üzere sıvı nitrojende saklandı, diğer bir kısmı ise %4'lük formalin içerisine alınarak fikse edilerek rutin histolojik takip gerçekleştirildi ve immünohistokimya yöntemi uygulandı.



Şekil 3.2: a. Chicago mavisi enjekte edilmiş 5 günlük gebe hayvan uterusu. b. 8 günlük gebe hayvanın uterusu.

3.2. İmmünohistokimyasal Gözlemler

3.2.1. İmmünohistokimyasal Protokol

Uterus ve implantasyon bölgeleri %10'luk formalin fiksativisi içerisinde 12-24 saat fikse edilip, ardından 3 saat boyunca çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra sırasıyla %70, 80 ve 90'lık etanol serilerinde 24 saat boyunca tutuldu. %100'lük etanolde 3 saat tutulduktan sonra ksilol içerisinde yaklaşık 5 dakika tutularak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Şeffaflaştırılan dokular 3 saat boyunca 56°C'lik etüvde bulunan parafin içerisinde tutulduktan sonra parafin içeren kalıplara koyularak oda sıcaklığında parafinin donması sağlandı. Parafine gömülü uterus dokuları tahta kalıplar üzerine yapıştırılarak blokler hazırlandı. Blokler mikrotoma yerleştirilerek 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı, su banyosunda düzleşmeleri sağlandıktan sonra süperfrost lamalar üzerine aktarıldı. Kesitler gece boyunca oda ısısında kurutuldu.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **1X PBS (Phosphate Buffer Saline):**
2 litre distile su içinde aşağıdaki kimyasallar çözüldü.
2,85 gr Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) (#567547; Merck)
0,8 gr Potasyum Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (# M1048771000; Merck)
16 gr Sodyum Klorür (NaCl) (#1.06400.1000; Merck)
2M NaOH ile pH=7,4 olacak şekilde ayarlandı.
- **Sitrik Asit Tamponu:**
900ml distile su içerisinde 2,1 gr Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (#1.0044.1000; Merck) çözüldü ve 2M NaOH ile pH=6,0 olacak şekilde ayarlandı.
- **%3'lük H_2O_2 Solüsyonu:**
Şale içerisinde 82 ml metanol (CH_3OH) (#1.06009.2500; Merck) ve 8 ml %30'luk H_2O_2 (#18312; Sigma Aldrich) karıştırılarak hazırlandı.
- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; Thermo Scientific/LabVision)
- **Primer Antikor:**
- **Sekonder Antikor:** Biotinli Anti-Rabbit IgG (keçiye üretilmiş) (#BA-1000; Vector Laboratories)
- **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi:** Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) (#85-9043; Invitrogen)
- **Kromojen:** Diaminobenzidine tabletleri (#D4168; Sigma)
- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer Hematoksilen (#1.09249.1000; Merck)
- **Kapatma Solüsyonu:** Kaisers Gliserin Jelatin (#1.09242.0100; Merck)

Bir gece önceden 56°C'lik etüvde bekletilen kesitler ertesi sabah deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildi ve her birinde 5 dakika olacak şekilde %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Kesitler distile suda çalkalandı ve fosfat tamponlu tuz tamponunda (PBS; pH: 7,2-7,4) üç kez 5'er dakika yıkandı. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna (pH:6,0, 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) konularak mikrodalga fırında 4+3 dakika 750W'ta kaynatıldı. Kesitler 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı.

Soğuyan kesitler 5 dakika PBS'ten geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3'lük hidrojen peroksit [82 ml metanol içinde 8 ml %30'luk H_2O_2 (#18312; Sigma Aldrich)] ile 20 dakika inkübe edildi. PBS'te yıkanan kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilerek oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan İmmünoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (UV block Thermo Ultra UV Block, LabVision Corporation TA-125UB) ile 7 dakika muamele edildi. Serumun fazlası alınarak kesitler, NICD-1 (aktif Notch-1) (ab8925; Abcam) 1:400, NICD-2 (aktif Notch-2) (ab52302; Abcam) 1:100, Hey-1 (ab22614; Abcam) 1:100, Hes-5 (ab107593; Abcam) 1:100 ve Vimentin (ab8978; Abcam) 1:400 proteinlerinin primer antikorları ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine izotip kontroller uygulandı. Ertesi gün kesitler PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı. Daha sonra, 45 dakika biyotinlenmiş sekonder antikorla [Biotinli Anti-Rabbit IgG (1:500)] ve 20 dakika HRP-konjuge streptavidin kompleksi (#85-9043; Invitrogen) ile oda ısısında nemli ortamda inkübe

edildi. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı. Sinyalleri geliştirmek için dokular 2 dakika Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni (#D4168; Sigma) ile muamele edilerek musluk suyunda yıkandı. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve Kaisers jelatin (#1.09242.0100; Merck) kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Kesitler Axioplan mikroskopunda (Zeiss, Almanya) incelendi ve fotoğraflandırıldı.

3.2.2. İstatistiksel Analiz

HSCORE Analizi ve semikantitatif değerlendirme:

İmmünohistokimyasal boyanmaların, semi kantitatif değerlendirilmelerinde HSCORE analizi kullanıldı. İki kişi tarafından her bir uterus dokusu için Axioplan mikroskopunda (Zeiss, Almanya) 400X orijinal büyütmede 5 farklı alandaki immüno pozitif hücre sayımları yapıldı. Her gruptan rastgele üçer kesit seçildi. İmmüno pozitif her hücrenin boyanma yoğunluğu, boyanma şiddetine göre: negatif 0, zayıf pozitif (+), pozitif +, kuvvetli pozitif ++ ve çok kuvvetli pozitif +++ olarak derecelendirildi. Her bir doku için gözlemlenen HSCORE değeri yoğunluk kategorileri ile çarpılarak toplandı [$HSCORE = \sum P_i (i+1)$, i, yoğunluk skoru ve P_i , hücrelerin yüzde değerleri]. Daha sonra HSCORE değerleri grafiklendirildi. Tüm deney gruplarına ait HSCORE değerlendirilmeleri birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından uygulandı. Çalışma grupları karşılaştırılarak, istatistiksel anlamlılık değeri, $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

Elde edilen bulguların istatistiksel analizi student's t-test ile karşılaştırıldı. 0.001' den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (ortalama $\pm$ standart hata sapması).

3.2.3. Semikantitatif Değerlendirme

Tüm deney gruplarında pozitif immünoreaktif hücrelerin immünoboyanma yoğunlukları da semikantitatif olarak [0: Negatif; (+):Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++: Çok kuvvetli pozitif] şeklinde değerlendirildi.

3.2.4. Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler

Her grubun uterus örneklerinden 5er mikron kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-Eozin boyaması yapılarak ışık mikroskobu (Axioplan Zeiss, Almanya) ile incelendi.

3.3. Western Blot

Sıvı nitrojenle dondurulan uterus dokularına ait örnekler çözündürülüp protein izolasyonu yapılarak NICD1, NICD2, HEY1 ve HES5 proteinlerinin ekspresyon miktarlarını belirlemek ve erken gebelikteki ekspresyonlarını karşılaştırmak amacıyla Western Blot yöntemi kullanıldı.

3.3.1. Protein İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Lizis Tampon Solüsyonu (Lysis Buffer):**
0,01 M Tris

0,6gr Tris (#1.08387.2500; Merck) 40 ml distile suda çözüldü. pH HCl ile 7,4'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Sodyum-ortovanadate

0,184 gr Na-orthovanadate (#L4390; Sigma), 10 ml Tris (pH:10) (0,1M tris:0,6gr/50ml) ile ateş üzerinde çözüldü.

- **Proteaz İnhibitör Kokteyli** (#P8340; Sigma)

Uterus ve implantasyon bölgelerinin bulunduğu ependorf tüpleri -80°C'den çıkarılarak buz üzerine koyuldu. Dokular tartılarak cam tüpler içerisine alındı ve doku örnekleri, 0.2 gr dokuya 600µl liziz tamponu ve 10µl proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde inkübe edilerek sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Tüm örnekler 15000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları alındı. Bu lizatların içerdiği protein miktarları BCA kiti kullanılarak tespit edildi.

3.3.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Kullanılan Solüsyonlar:

- **%30 Akrilamid-Bisakrilamid:**
15,4 gr 37,5:1 oranındaki akrilamid-bisakrilamid(#161-01-25; Biorad) 40ml distile suda çözüldü.
- **4X Tris-HCl/SDS pH=6,8:**
6,05 gr Tris (#1.08387.2500; Merck) 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH HCl ile 6,8'e ayarlandı. Distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Üzerine 0,4 gr SDS (#161-0301; Biorad) eklendi.
- **4X Tris-HCl/SDS pH=8,8:**
18,15 gr Tris (#1.08387.2500; Merck) 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH HCl ile 8,8'e ayarlandı. Distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Üzerine 0,4 gr SDS eklendi.
- **%10'luk Amonyum Persülfat (APS):**
0,1 gr APS (#7727-54; Amresco) 1 ml distile su içerisinde çözüldü.
- **N,N,N'',N'''-Tetramethylethylenediamidine(TEMED)(#T-7024; Sigma)**
- **5X Elektroferez Yürütme Solüsyonu:**
9 gr Tris
43,2 gr Glisin (#5.00190.1000; Merck)
3 gr SDS
600 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 8,3-8,6 olmalıdır.
1X Elektroferez Yürütme Solüsyonu
5X stok solüsyondan 180 ml alındı ve 720 ml distile su ile 900 ml'ye tamamlandı.

Jel elektroforezi için proteinlerin ağırlıklarına göre belirlenen yüzdede poliakrilamid jel hazırlandı.

- **%10'luk Tris-HCl Jel**
Ayrıştırıcı (Seperating)Jel:
5,00 ml %30 akrilamid-bisakrilamid
3,75 ml 4X tris-HCl/SDS, pH:8,8
6,25 ml distile su
- **%15'lik Tris-HCl Jel**
Ayrıştırıcı (Seperating)Jel:

7,5 ml %30 akrilamid-bisakrilamid
3,75 ml 4X tris-HCl/SDS, pH:8,8
3,75 ml distile su

- **%7,5'lik Tris-HCl Jel**

Ayrıştırıcı (Seperating)Jel:

3,75 ml %30 akrilamid-bisakrilamid
3,75 ml 4X tris-HCl/SDS, pH:8,8
7,5 ml distile su

Hazırlanan solüsyonlar 15 ml'lik falkon tüp içerisinde yukarıdaki oranlarda karıştırıldı ve homojenizasyonu sağlandı. Daha sonra polimerizasyonu sağlayan %10'luk APS'den 0,05 ml, TEMED'ten 0,01 ml eklendi. Hızlı bir şekilde pipetleme yapılarak karıştırıldı iki cam arasına döküldü ve polimerizasyonu sağlandı.

Toplayıcı (Stacking) Jel:

650 µl %30 akrilamid-bisakrilamid
1250 µl 4X tris-HCl/SDS, pH:6,8
3030 µl distile su

Yukarıdaki solüsyonlar 15ml'lik falkon içerisinde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyonu sağlayacak olan; 25 µl %10'luk Amonyum-persülfat (APS) ve 5 µl TEMED solüsyonları eklendi. Seri bir şekilde pipetleme yapıldı ve jel karışımı cam plaka arasına döküldü. Yaklaşık 30 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

Hazırlanan protein lizatları içerdikleri protein miktarına göre örnekler gerekli miktarda distile su ve lemlile karıştırıldı ve 5 dakika boyunca 100°C'lik suda kaynatıldı.

Jeller Western Blot tankının içine yerleştirildi. Tanka elektroforez solusyonu eklenerek her kuyucuğa 10 µl örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde konuldu. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlandı. 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika boyunca elektroforez gerçekleştirildi.

Elektroforez bitiminde öncelikle PVDF (polivinilidin diflorür) membran metanolde yaklaşık 30 saniye bekletildi. Daha sonra sırasıyla üst üste 1 adet sünger, 3 adet filtre kâğıdı, jel, 1 adet PVDF membran, 3 adet filtre kâğıdı ve 1 adet sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı.

3.3.3. Blotlama

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Transfer Tampon Solüsyonu (Blotting Buffer):**

3 gr Tris
4,3 gr Glisin

800 ml distile su içerisinde çözüldü. pH7,8-8 arasında olmalıdır. Solüsyona daha sonra 200 ml metanol (#1.06009.2500; Merck) eklendi. +4°C'de soğutularak kullanıldı.

- **10X Tris Tamponlu Tuz (Tris Buffer Saline-TBS) Solüsyonu**

60,55 gr Tris (#1.08387.2500; Merck)
87,66 gr Sodyum Klorür (NaCl) (#1.06400.1000; Merck)
800 ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7,4'e ayarlandı.
1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **1X Tris Tamponlu (Tris Buffer Saline-TBS)-Tween 20 Solüsyonu**

100 ml 10X TBS solüsyonuna 900 ml distile su eklenerek 1X TBS hazırlandı. Daha sonra 1 litre 1X TBS'e 1 ml Tween-20 (#8.22184.0500; Merck) eklenerek TBS-T çalışma solüsyonu elde edildi.

- **Bloklama Solüsyonu: %5'lik Bovine Serum Albumin (BSA)**

5 gr BSA 100 ml TBS-T içerisinde çözölererek hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu: %5'lik Süt tozu**

5 gr süt tozu 100 ml TBS-T içerisinde çözölererek hazırlandı.

- **Chemiluminescent Solüsyonu**

Sandviç Western Blot tankına koyularak, üzerine transfer solüsyonu eklendi ve tank güç kaynağına bağlanarak 32 voltta +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı.

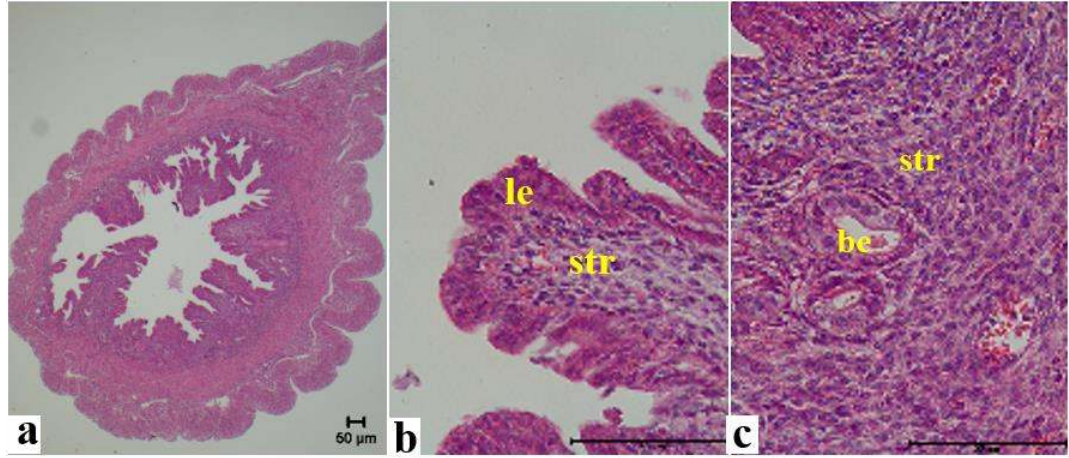
Ertesi gün membran, kullanılacak primer antikorun sulandırıldığı bloklama solüsyonuna göre %1 Tween-20 ilave edilmiş Tris tamponlu tuz solüsyonu (TBS) ile hazırlanan %5'lik yağsız kuru süt tozu ya da %5'lik BSA ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı. NICD1(1/250) ve NICD2(1/250) primer antikorları %5'lik BSA içinde Hey-1 (1/250) ve Hes-5(1/250) ise %5'lik yağsız kuru süt tozu içinde sulandırılarak membranlar üzerine koyuldu ve gece boyu karıştırıcı üzerinde +4 °C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membranlar, primer antikor için uygun olan bloklama solüsyonu ile sulandırılmış horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla Peroxidase labeled Anti Rabbit (1/2000) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı. Film, geliştirici ve tespitten geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu. Böylece, farelerde implantasyon ve desidualizasyon evrelerinde NICD-1 (aktif Notch-1), NICD-2 (aktif Notch-2), Hey-1 ve Hes-5 protein ekspresyon miktarları belirlendi ve kantitatif olarak protein seviyeleri karşılaştırıldı.

BULGULAR

4.1. Rutin Işık Mikroskopik Bulgular

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan, kontrol grubu (K) ve gebeliğin 1., 4., 5. ve 8. günleri (sırasıyla E1., E4., E5. ve E8)'ne ait sıçan uterusu doku örnekleri, ışık mikroskopu ile incelendi;

Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusu (K)'nda, temel olarak endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum yapılarının bulunduğu, endometriyumun lümen epiteli, dallı tübüler bezler ve aralarında stromal hücrelerini içerdiği, miyometriyumun içte sirküler, dışta longitudinal düz kas tabakalarından oluştuğu, uterus lümen epitelinin tek katlı prizmatik hücrelerden oluştuğu, uterus lümeninin bu evrede oldukça geniş, düzensiz ve girintili çıkıntılı görünüm sergilediği; uterin bezlerin yer yer salgı materyali içerdikleri, perimetriyum tabakasının mezometriyum ile süreklilik gösterdiği belirlendi (Şekil: Şekil 4.1)

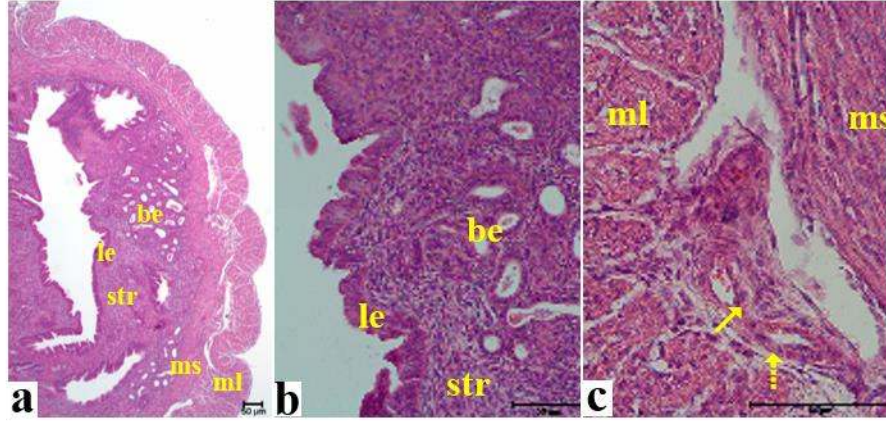


Şekil 4.1: Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusunun histolojik görünümü. **a:** Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubuna ait uterus kesitinin total görünümü (H-E, X5), **b:** Uterus lümen epiteli (**le**) ve endometriyal stroma (**str**) (H-E, X40), **c:** Endometriyal stroma (**str**) ve bez epiteli (**be**)(X40).

Gebeliğin 1.günü (E1)'nde; uterus dokusunun, kontrol grubundaki gebe olmayan ve östrus fazındaki fare uterusunun histolojik özelliklerine benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil: 4.2).

Gebeliğin 4. günü (E4)'nde, özellikle endometriyum tabakasında gebe olmayan östrus fazındaki ve gebeliğin 1. günündeki uterus dokularına göre gözle görülür bir kalınlaşma olduğu, uterus lümeninin daraldığı ve mezometriyumun

karşısında dar bir kanal şeklinde yer aldığı, mezometriyal ve antimezometriyal bölgelerin belirginleşmeye başladığı gözlemlendi(Şekil: 4.3).

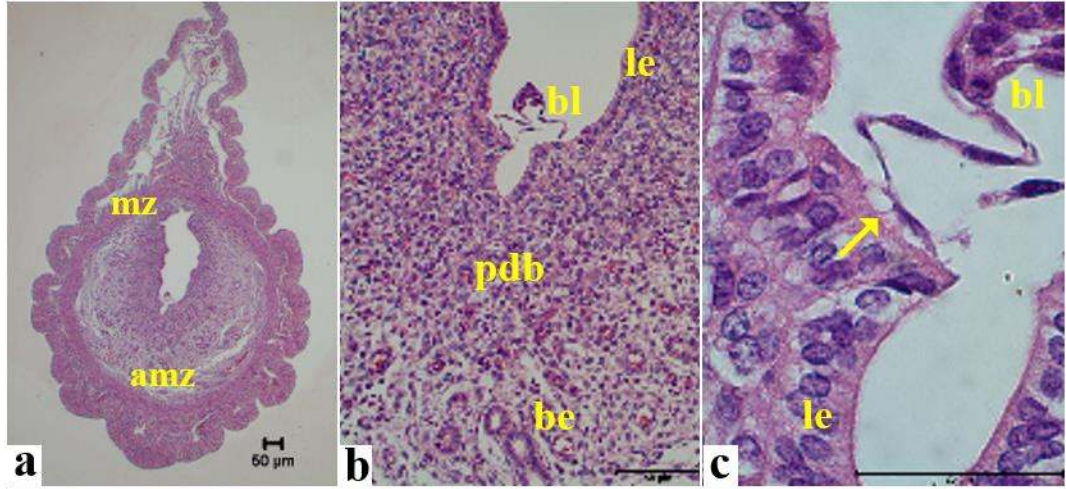


Şekil 4.2: 1 günlük gebe fare uterusunun görünümü (H-E, X10). **a:** 1 günlük gebe fare uterusunda lümeniden itibaren içten dışa doğru tüm katmanlar görülmektedir (H-E, X2,5), **b:** 1 günlük gebe fare grubuna ait uterusunda lümen epiteli ve bez yapılarının detaylı görünümü (H-E, X40), **c:** 1 günlük gebe fare grubuna ait uterusunda miyometriyal alanların detaylı görünümü (H-E, X40). (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi, **↗:** kan damarına ait endotel hücresi)



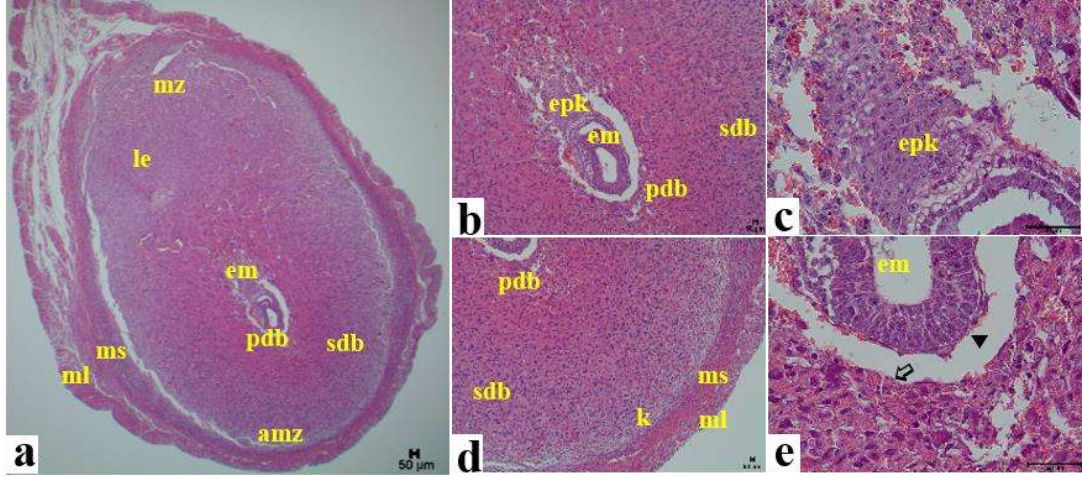
Şekil 4.3: Gebeliğin 4. günü (E4)'nde, özellikle endometriyum tabakasında gebe olmayan östrus fazındaki ve gebeliğin 1. günündeki uterus dokularına göre gözle görülür bir kalınlaşma olduğu, uterus lümeninin daraldığı ve mezometriyumun karşısında dar bir kanal şeklinde yer aldığı, mezometriyal ve antimezometriyal bölgelerin belirginleşmeye başladığı gözlenmektedir (H-E, X5). **lü:** uterus lümeni; **e:** endometriyum; **mz:** mezometriyal bölge; **amz:** antimezometriyal bölge.

Gebeliğin 5. günü (E5)'nde, mezometriyal ve antimezometriyal bölgelerin tamamen ortaya çıktığı, antimezometriyal bölgenin mezometriyal bölgeye oranla daha geniş bir alan kapladığı, antimezometriyal alanda desidualizasyonun gerçekleştiği ve primer desidual bölgenin ortaya çıktığı, antimezometriyal alanda blastosistin mural trofoblastlarının uterus lümeni epiteli ile kontakt yaptığı ve apozisyonun gerçekleşmekte olduğu belirlendi (Şekil: 4.4).



Şekil 4.4: 5 günlük gebe fare uterus görünümü. Şekilde, mezometriyal ve antimezometriyal bölgelerin tamamen ortaya çıktığı, antimezometriyal bölgenin mezometriyal bölgeye oranla daha geniş bir alan kapladığı (Şekil **a**; H-E, X5), antimezometriyal alanda desidualizasyonun gerçekleştiği ve primer desidual bölgenin ortaya çıktığı (Şekil **b**; H-E X40), antimezometriyal alanda blastosistin mural trofoblastlarının uterus lümeni epiteli ile kontakt yaptığı ve apozisyonun gerçekleşmekte olduğu (Şekil **c**; H-E, X100) görülmektedir. (**mz**: mezometriyal bölge; **amz**: antimezometriyal bölge; **le**: uterus lümen epiteli; **be**: endometriyal bezler; **pdb**: primer desidual bölge; **bl**: blastosist; **↗**: blastosiste ait trofoektoderm hücreleri ile lümen epitel hücreleri arasındaki bağlantılar).

Gebeliğin 8. günü (E8)'nde, mezometriyal bölgenin antimezometriyal bölgeye oranla daha geniş olduğu, primer desidual bölgenin (PDB) gerilediği ve sekonder desidual bölgenin (SDB) ortaya çıktığı, implantasyonunu tamamlamış olan embriyonun üzeri tamamen endometriyal alanlarla çevrelenmiş olduğu ve uterus lümeni ile ilişkisinin kesildiği, ektoplasental koni, amniyon boşluğu, pariyetal ve visseral endoderm yapılarının ortaya çıktığı belirlendi (Şekil: 4.5).



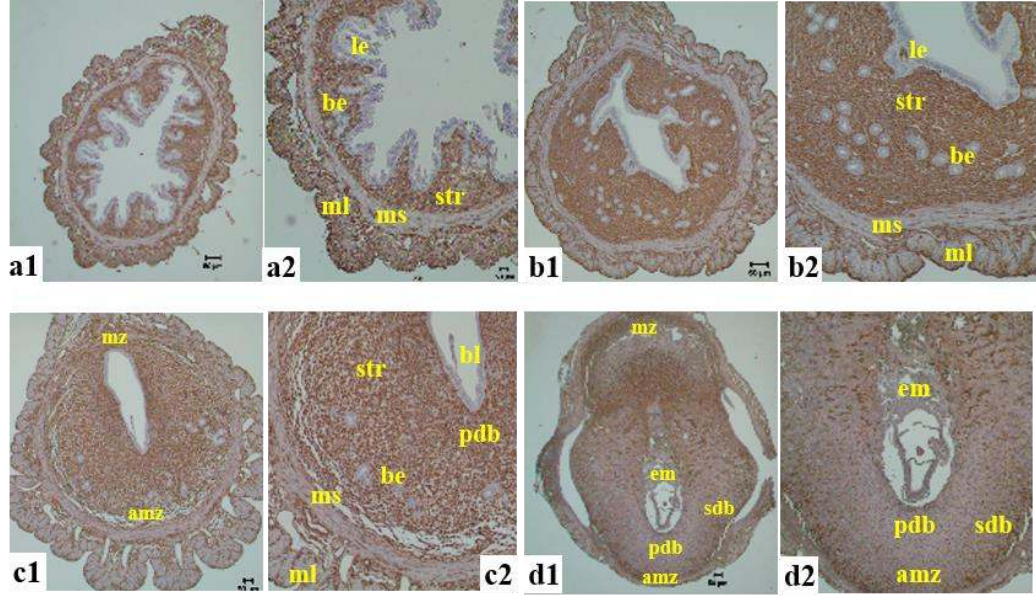
Şekil 4.5: Gebeliğin 8. günü (E8)'nde, mezometriyal bölgenin antimezometriyal bölgeye oranla daha geniş olduğu, primer desidual bölgenin (PDB) gerilediği ve sekonder desidual bölgenin (SDB) ortaya çıktığı, implantasyonunu tamamlamış olan embriyonun üzeri tamamen endometriyal alanlarla çevrelenmiş olduğu ve uterus lümeni ile ilişkisinin kesildiği, ektoplasental koni, amniyon boşluğu, pariyetal ve visseral endoderm yapılarının ortaya çıktığı gözlenmektedir. **5a:** Total görünüm (H-E, X2,5); **5b:** Embriyo ve mezometriyal bölge (H-E, X20); **5c:** Ektoplasental koni (H-E, X40); **5d:** Antimezometriyal bölge (H-E, X20); **5e:** Pariyetal ve visseral endoderm hücreleri (H-E, X40). (**mz:** mezometriyal kutup; **amz:** antimezometriyal kutup; **em:** embriyo; **pdb:** primer desidual bölge; **sdb:** sekonder desidual bölge; **le:** uterus lümen epiteli; **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası; **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası; **↔:** pariyetal endoderm hücreleri; **▼:** visseral endoderm hücreleri; **epk:** ektoplasental koni; **k:** kapsül).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Her bir antikor için kontrol grubu ve erken gebeliğin farklı günlerinde (E1, E4, E5, E8) elde edilen uterus dokularında NICD1, NICD2, HEY1 ve HES5 immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

4.3. Vimentin

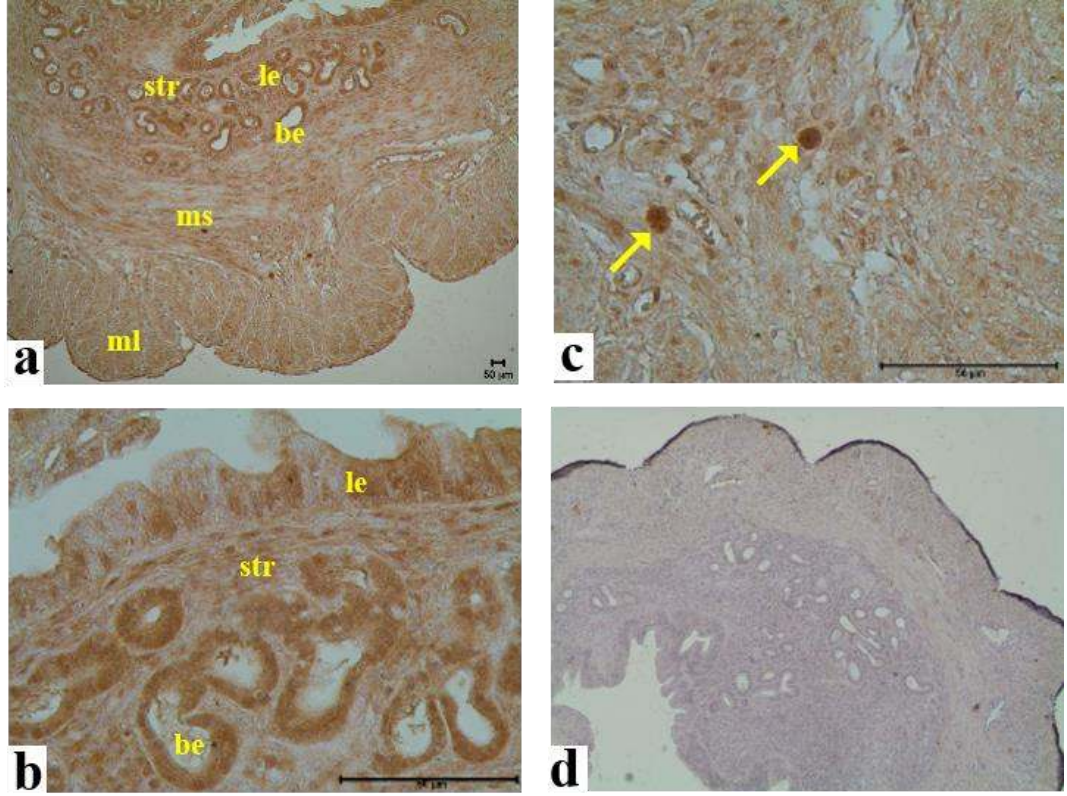
Kontrol ve gebelik gruplarına ait uterus dokularında ektodermal kökenli trofoblastlar ile mezodermal kökenli diğer doku ve hücreleri ayırt edebilmek amacıyla anti- vimentin antiodisi immünoboyanması uygulandı. Sonuçta plasental ve mezodermal kökenli diğer dokulara ait sınırlar çok açık bir biçimde ayırt edilebildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Gebelik gruplarına ait uterus dokularında mezodermal kökenli doku ve hücreleri ayırt edebilmek amacıyla uygulanmış anti-vimentin immünoboyanması gözlenmektedir. Şekilde, mezodermal kökenli doku ve hücreler pozitif gözlenirken diğer doku ve hücre alanları negatif gözlenmektedir. **a:** 1 günlük gebe fare uterusu dokusu (**a1:** X2,5; **a2:** X20), **b:** 4 günlük gebe fare uterusu dokusu (**b1:** X5; **b2:** X20), **c:** 5 günlük gebe fare uterusu dokusu (**c1:** X5; **c2:** X20), **d:** 8 günlük gebe fare uterusu dokusu (**d1:** X2,5; **d2:** X20).

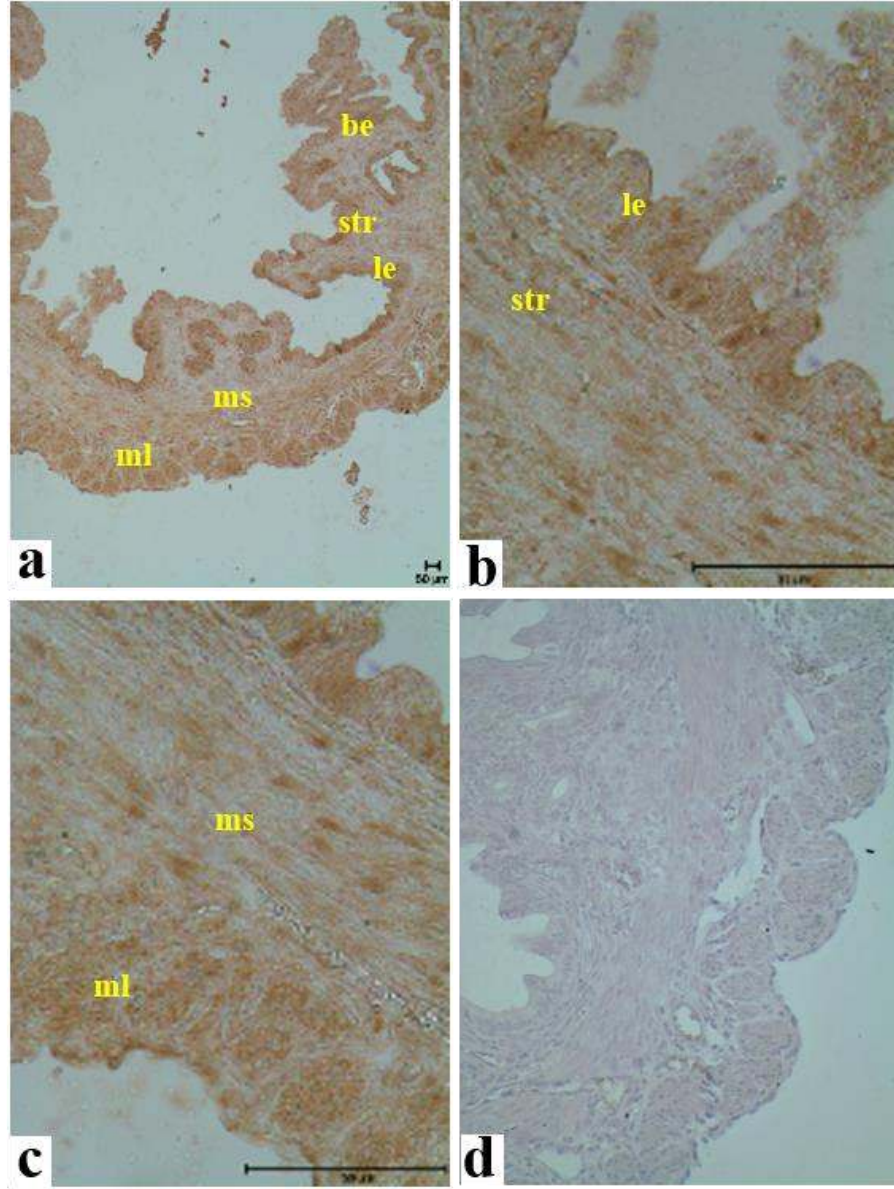
4.4. NICD1

Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusu (K)'nda, NICD1 immünoboyanması uterus epiteli, endometriyal bezler, endometriyal stroma, kan damarları, miyometriyal düz kas hücreleri, perimetrium ve mast hücrelerinde gözlemlendi. Uterus epiteli, endometriyal bezler, perimetrium ve mast hücrelerindeki immünoboyanma yoğunluğu, diğerlerine göre daha yoğun (Şekil 4.7).



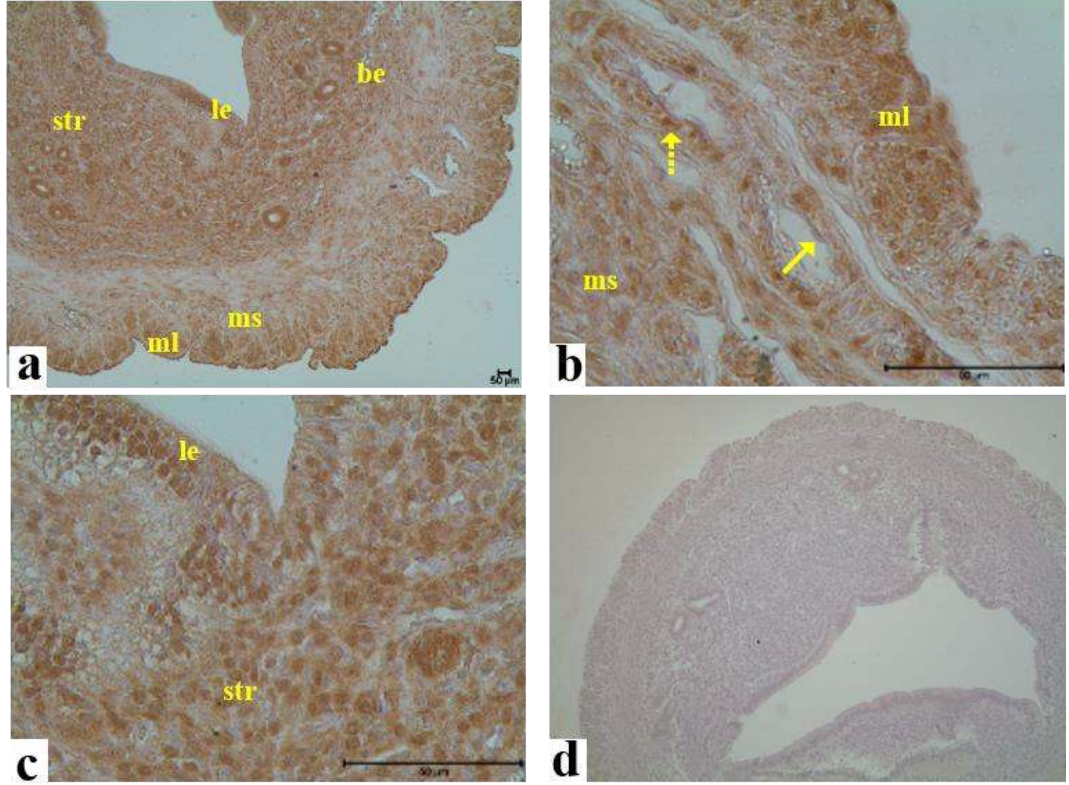
Şekil 4.7: Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda NICD1 ekspresyonu. Şekilde, uterus epiteli, endometriyal bezler, endometriyal stroma, kan damarları, miyometriyal düz kas hücreleri, perimetrium ve mast hücrelerinde NICD1 immüno boyanmasının değişik yoğunluklarda gözlemekle birlikte, uterus epiteli, endometriyal bezler, perimetrium ve mast hücrelerindeki immüno boyanma yoğunluğunun, diğerlerine göre daha yoğun olduğu gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarının total görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma ve bezler (X40); **c:** Miyometriyal alanlar ve mast hücreleri (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↗:** mast hücreleri).

Gebeliğin 1.günü(E1)'nde NICD1 immüno boyanması yoğunluğu, uterus epiteli ve endometriyal bez epiteli hücreleri, kan damarları, perimetrium ve mast hücrelerinde gebe olmayan östrus fazındaki fare uterus dokusundaki immüno boyanma yoğunluğuna benzerlik gösterirken, endometriyal stromal hücrelerde kontrol grubuna oranla daha az yoğun gözlemlendi. Semikantitatif değerlendirmelerimize göre, immüno boyanma yoğunluğu uterus epiteli ve bez epitelinde kuvvetli pozitif, endometriyal stromal hücreler, kan damarları endotel hücreleri ve miyometriyum sirküler düz kas katında zayıf pozitif yoğunlukta idi (Şekil: 4.8).



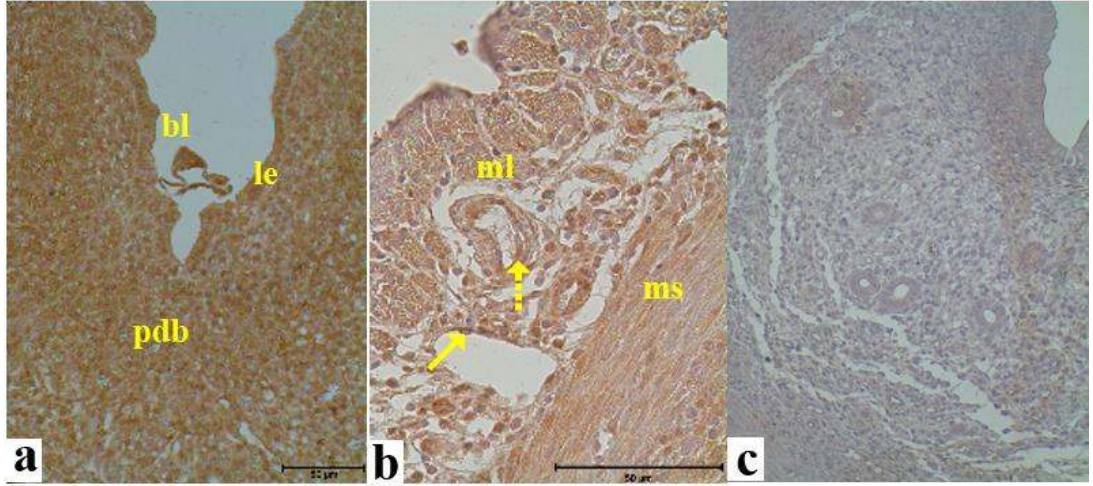
Şekil 4.8: Gebeliğin 1.günü(E1)'nde, uterus epiteli ve bez epitelinde yoğun, endometriyal stromal hücreler, kan damarları endotel hücreleri ve miyometriyum sirküler düz kas katında zayıf pozitif yoğunlukta NICD1 immünoboyanması gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarının total görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma ve bezler (X40); **c:** Miyometriyal alanlar ve mast hücreleri (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası).

Gebeliğin 4. günü(E4)'nde, NICD1 immünoboyanması, endometriyal bez epiteli hücreleri, endometriyal stromal hücreler, miyometriyumun longitudinal düz kas katı hücreleri ve perimetriyal hücrelerde kuvvetli pozitif, kan damarlarına ait endotel hücrelerinde ve miyometriyumun sirküler düz kas katı hücreleri zayıf pozitif (Şekil: 4.9).



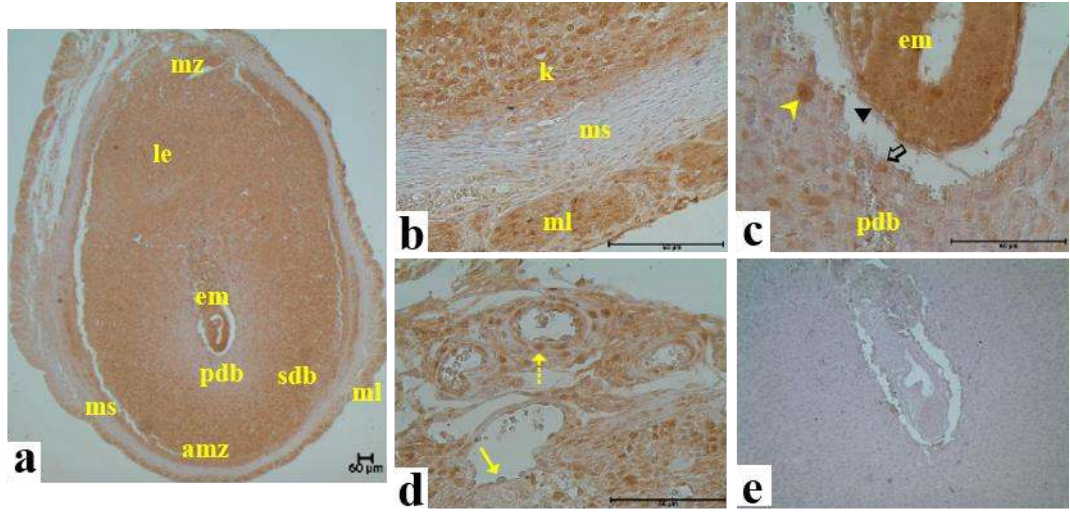
Şekil 4.9: 4 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu. Şekilde, endometriyal bez epiteli hücreleri, endometriyal stromal hücreler, miyometriyumun longitudinal düz kas katı hücreleri ve perimetriyal hücrelerde yoğun NICD1 immünoboyanması gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarının total görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma ve bezler (X40); **c:** Myometriyal alanlar (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, ↗: Kan damarına ait endotel hücresi, ↑: kan damarına ait düz kas hücresi)

Gebeliğin 5. günü (E5)'nde; NICD1 immünoboyanması bu çalışmada incelenen tüm gruplar içerisinde en yoğun boyanmaydı. Bu dönemde, NICD1 immünoboyanması, İmplantasyon bölgesi olan antimezometriyal uterinal alanlarına ilaveten embriyoya ait olan trofoblastlar ve iç hücre kitlesinde de gözlemlendi. Antimezometriyal uterinal alanlardan uterus epiteli, endometriyal bezler, primer desidual bölge, miyometriyum ve perimetriyumda kuvvetli pozitif, primer desidual bölge dışındaki miyometriyal alanlara komşu bölgelerdeki endometriyal stromal alanlarda pozitif; blastosiste ait trofoektoderme ait mural trofoblastlar ve iç hücre kitlesine ait hücrelerde ise çok kuvvetli pozitifliği (Şekil: 4.10).



Şekil 4.10: 5 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu. Şekilde, antimezometriyal uterinal alanlardan uterus epiteli, endometriyal bezler, primer desidual bölge, trofoektoderme ait mural trofoblastlar ve iç hücre kitlesine ait hücrelerde ise çok yoğun NICD1 immüno boyanması gözlenmektedir. **a:** Endometriyal stroma ve bezler (X40); **b:** Myometriyal alanlar (X40); **c:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **s:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **l:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi, **em:** embriyo, **pdlb:** primer desidual bölge).

Gebeliğin 8.günü (E8)'nde; NICD1 ekspresyonunun doku genelinde E5. Güne göre daha düşük yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Yapılan gözlemlere göre; E8. günde uterus epiteli ve endometriyal bez epitelinde NICD1 immüno boyanmasının olmadığı, PDB'de ekspresyonun pozitif olduğu, SDB, embriyonik bölge, ekto plasental koni ve trofoblast dev hücreleri, miyometriyuma ait olan longitudinal düz kas katı hücreleri ve perimetriyumda kuvvetli pozitif yoğunlukta gözlemlendi. Ayrıca, visseral endodermdde zayıf pozitif, pariyetal endodermdde ise immüno boyanma gözlenmedi (Şekil: 4.11).



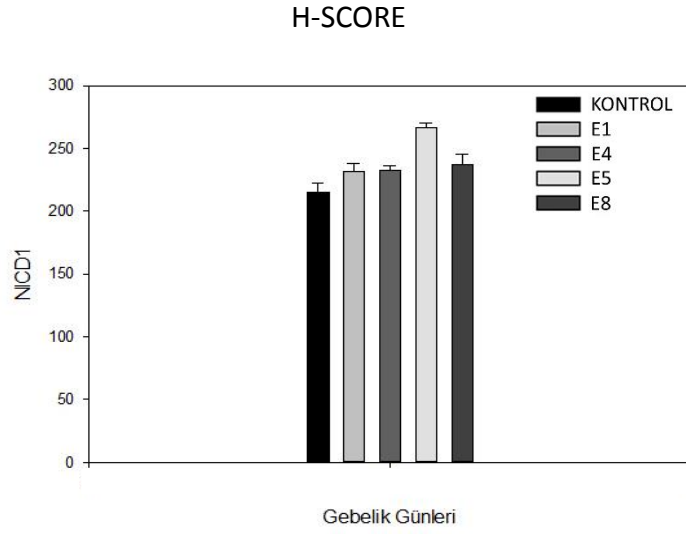
Şekil 4.11: 8 günlük gebe fare uterusunda NICD1 ekspresyonu. Şekilde, NICD1 ekspresyonunun doku genelinde E5. güne göre daha düşük yoğunlukta olduğu gözlenmektedir **a:** 8 günlük gebe fare uterusu total görünümü (X2,5); **b:** Miyometriyum ve perimetriyum katları (X40); **c:** Kan damarları (X40); **d:** Ektoplasental koni (X40); **e:** Kontrol. (**mz:** mezometriyal kutup, **amz:** antimezometriyal kutup, **em:** embriyo, **pdb:** primer desidual bölge, **sdb:** sekonder desidual bölge, **le:** uterus lümen epiteli, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **k:**kapsül, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi, **pdb:** primer desidual bölge, **epk:** ektoplasental koni **em:** embriyo, **⇐:** pariyetal endoderm hücreleri, **▼:** visseral endoderm hücreleri, **▲:** trofoblast dev hücresi).

Kontrol grubu ve gebeliğin farklı günlerinde (E1, E4, E5, E8) elde edilen uterus dokularında NICD1 immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.1’de özetlendi.

ÇALIŞILAN ALAN		GEBELİK GÜNLERİ				
		K	E1	E4	E5	E8
UterusEpiteli		++	++	++	++	-
Endometriyal bezler		++	++	++	++	Ø
Endometriyal stroma		+	(+)	++	+	+
Blastosist	İç Hücre Kitlesi	Ø	Ø	Ø	+++	Ø
	Trofoektoderm	Ø	Ø	Ø	+++	Ø
Pariyetal Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Visseral Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	(+)
Embriyonik bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	++
Trofoblastlar		Ø	Ø	Ø	Ø	++
Kan Damarları	Endotel	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Düz kas hücreleri	+	+	+	++	++
Primer Desidual Bölge		Ø	Ø	Ø	++	+
Sekonder Desidual Bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	++
Miyometriyum	Sirküler kas tabakası	+	(+)	(+)	+	-
	Longitudinal kas tabakası	(+)	+	++	++	++
Perimetriyum		++	++	++	++	++

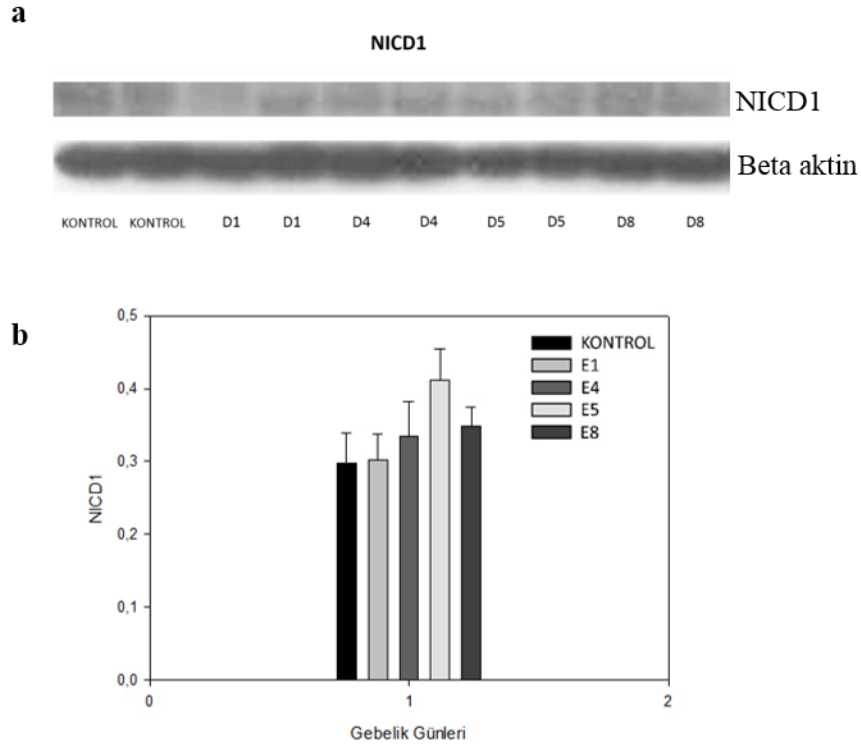
Tablo 4.1: Kontrol E1, E4, E5 ve E8. günlerde NICD1 immünoboyanmasının hücresel dağılımı. Ø: Yapı mevcut değil; -: Negatif; (+):Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++: Çok kuvvetli pozitif

NICD1 immünoboyanma pozitif hücre sıklığı HSCORE analizine göre değerlendirildiğinde; NICD1 immünoboyanması pozitif hücre sıklığının, gebelik günlerinde, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan ölçüde daha yüksek olduğu, E5'te ise diğer gebelik günlerine göre gözle görülür bir fazlalık olduğu ancak bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil:4.12).



Şekil 4.12: Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda NICD1 pozitif hücre sıklığını gösteren grafik ($p < 0.001$).

Western Blot bulgularına göre; NICD1 ekspresyonunun gebeliğin 4., 5. ve 8. günlerinde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. (Şekil: 4.13).

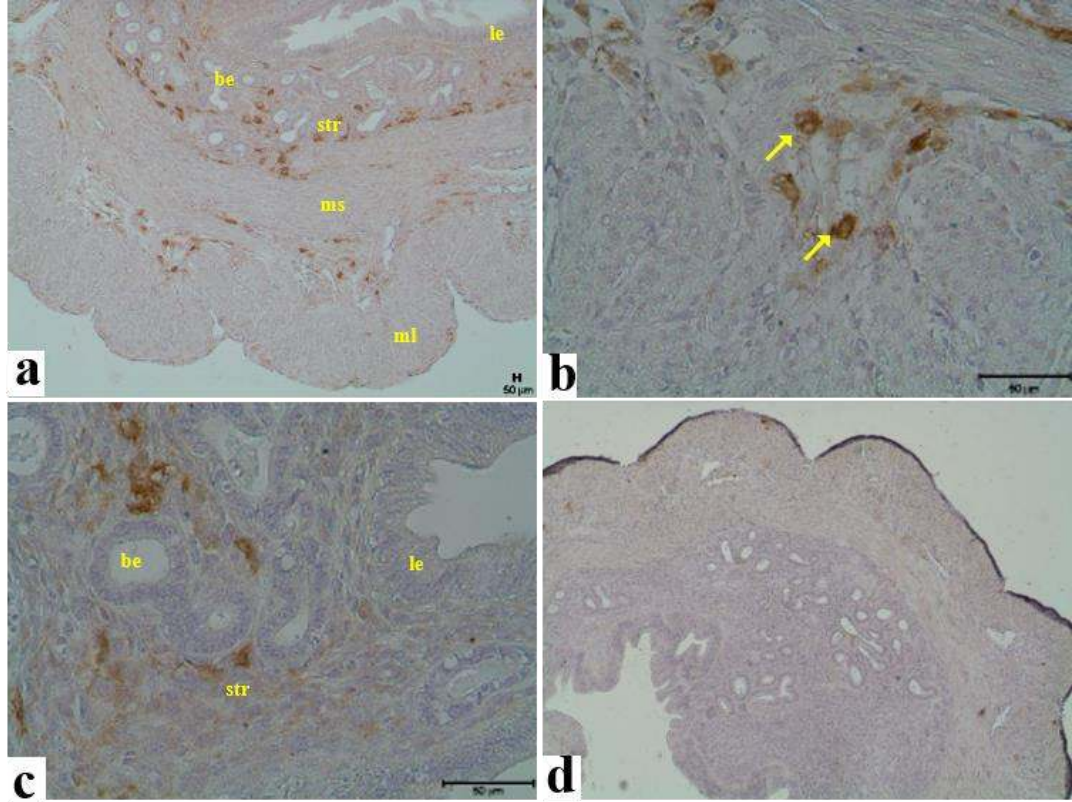


Şekil 4.13: Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda NICD1 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda NICD1 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (b) ($p < 0.001$).

4.5. NICD2

Semikantitatif bulgulara göre; NICD2 immünoboyanması yoğunluğu NICD1 immünoboyanması yoğunluğu ile kıyaslandığında, tüm uterus dokusunda genelde daha düşük yoğunlukta idi. Bununla birlikte, bu grupta, mast hücrelerinde NICD1 immünoboyanması yoğunluğuna oranla daha yoğun NICD2 immünoboyanması gözlemlendi.

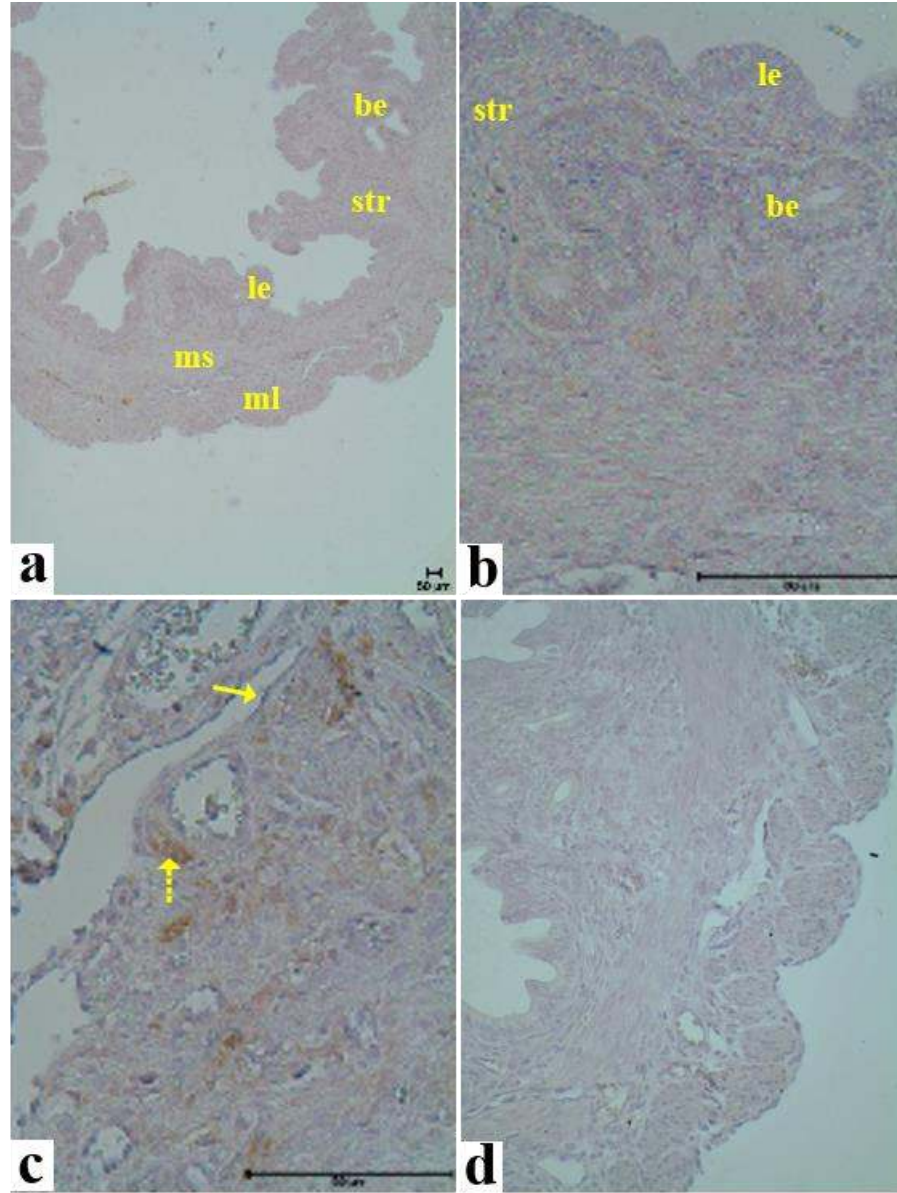
Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusu(K)'nda, NICD2 immünoboyanması, uterusu oluşturan tüm alanlarda negatif olmasına rağmen, mast hücrelerinde çok kuvvetli pozitif yoğunlukta olması dikkat çekiydi (Şekil: 4.14).



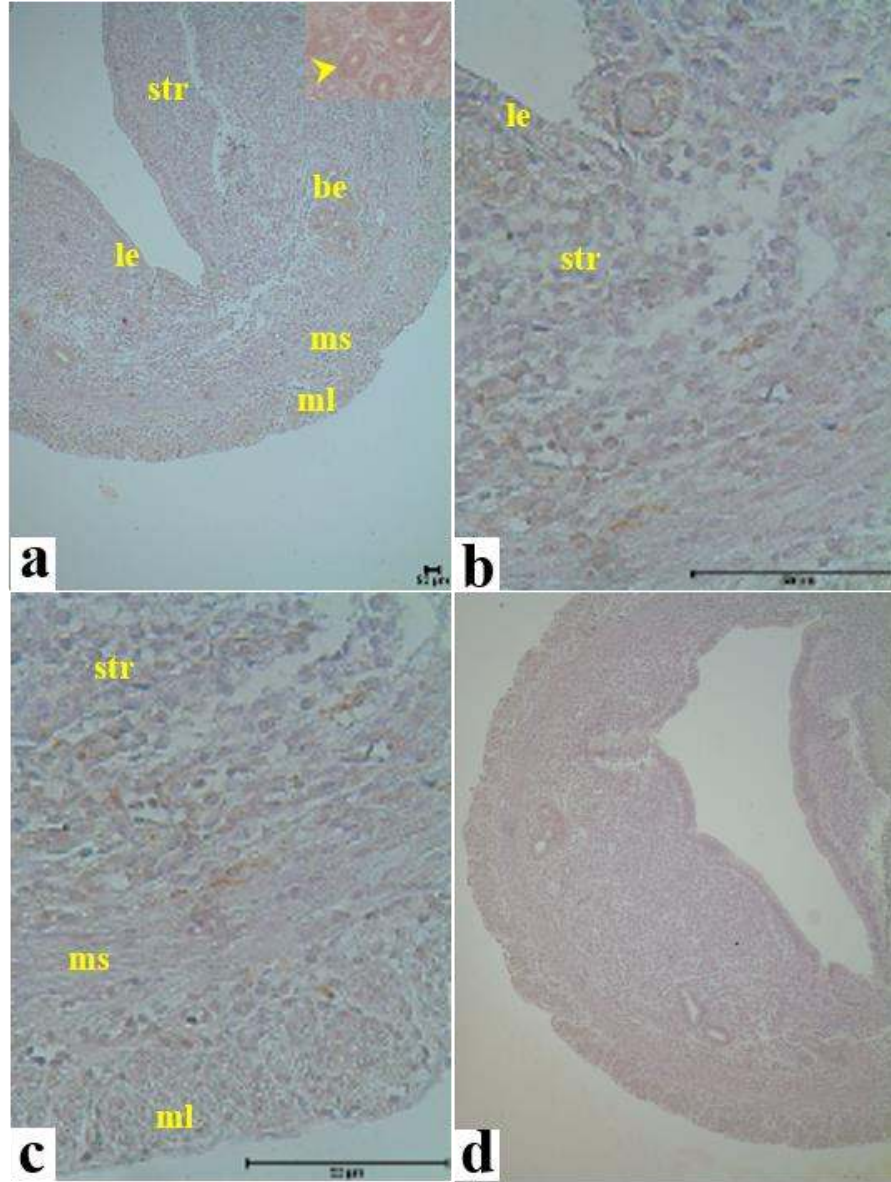
Şekil 4.14: Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda NICD2 ekspresyonu. Şekilde, uterusu oluşturan tüm alanlarda negatif olmasına rağmen, mast hücrelerinde çok kuvvetli pozitif yoğunlukta NICD2 immünoboyanması(oklarla) gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarı genel görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma (X40); **c:** Miyometriyal alanlar (X40); **d:** Kontrol.

Gebeliğin 1.günü (E1)'nde; NICD2 immünoboyanması, gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusundaki gibi tüm alanlarda negatifti. Mast hücrelerinde NICD' immünoboyanması, kontrol grubu uterus dokularındakilere oranla daha zayıftı (Şekil: 4.15).

Gebeliğin 4. günü (E4)'nde: NICD2 immünoboyanması endometriyal bez epiteli, stromal hücreler ve kan damarlarına ait düz kas hücreleri ve mast hücrelerinde zayıf pozitif iken diğer tüm alanlarda negatifti. (Şekil: 4.16).

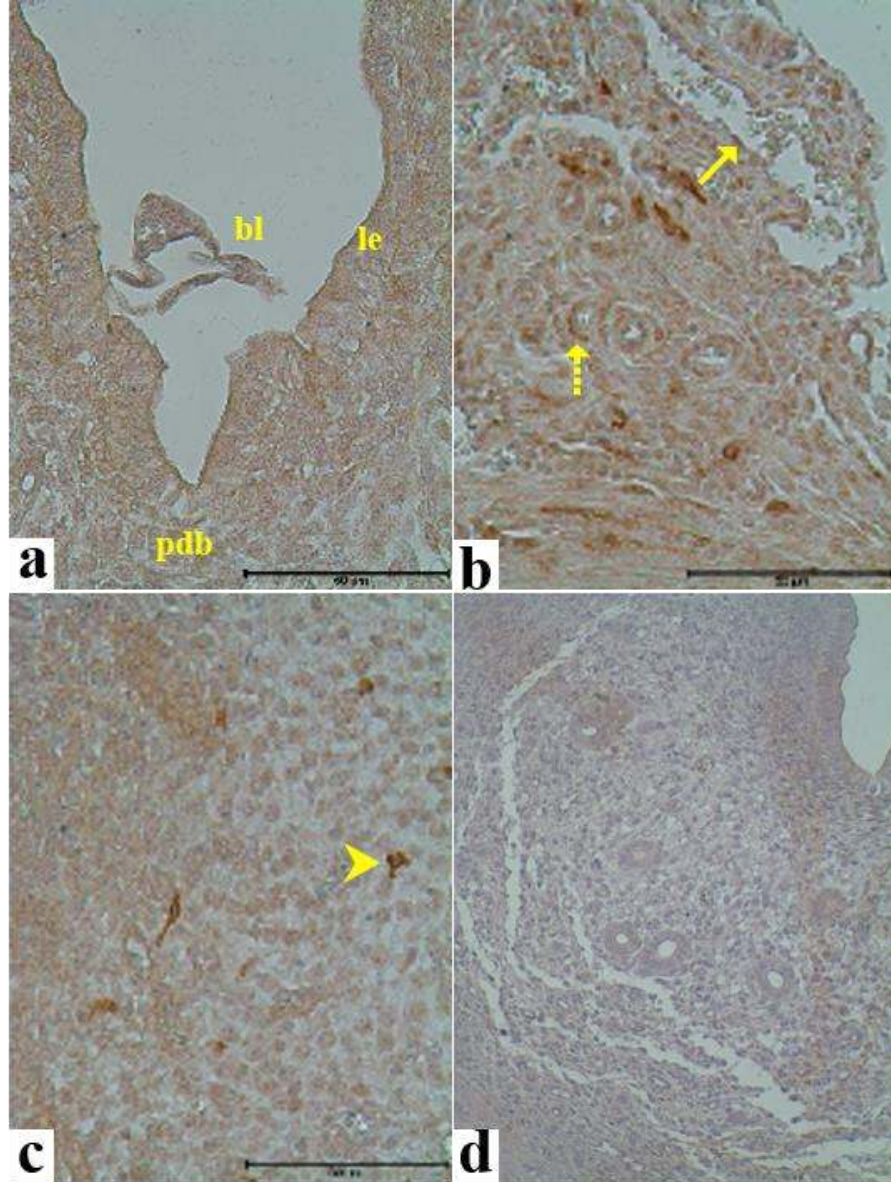


Şekil 4.15: 1 günlük gebe fare uterusunda NICD2 ekspresyonu. Şekilde, gebeliğin 1. gününde; NICD2 immüno boyanması, gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusunda olduğu gibi tüm alanlarda negatif olmasına rağmen, mast hücrelerinde, kontrol grubu uterus dokularındakilere oranla daha zayıf NICD2 immüno boyanması (oklarla) gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarı genel görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma (X40); **c:** Myometriyal alanlar (X40); **d:** Kontrol.



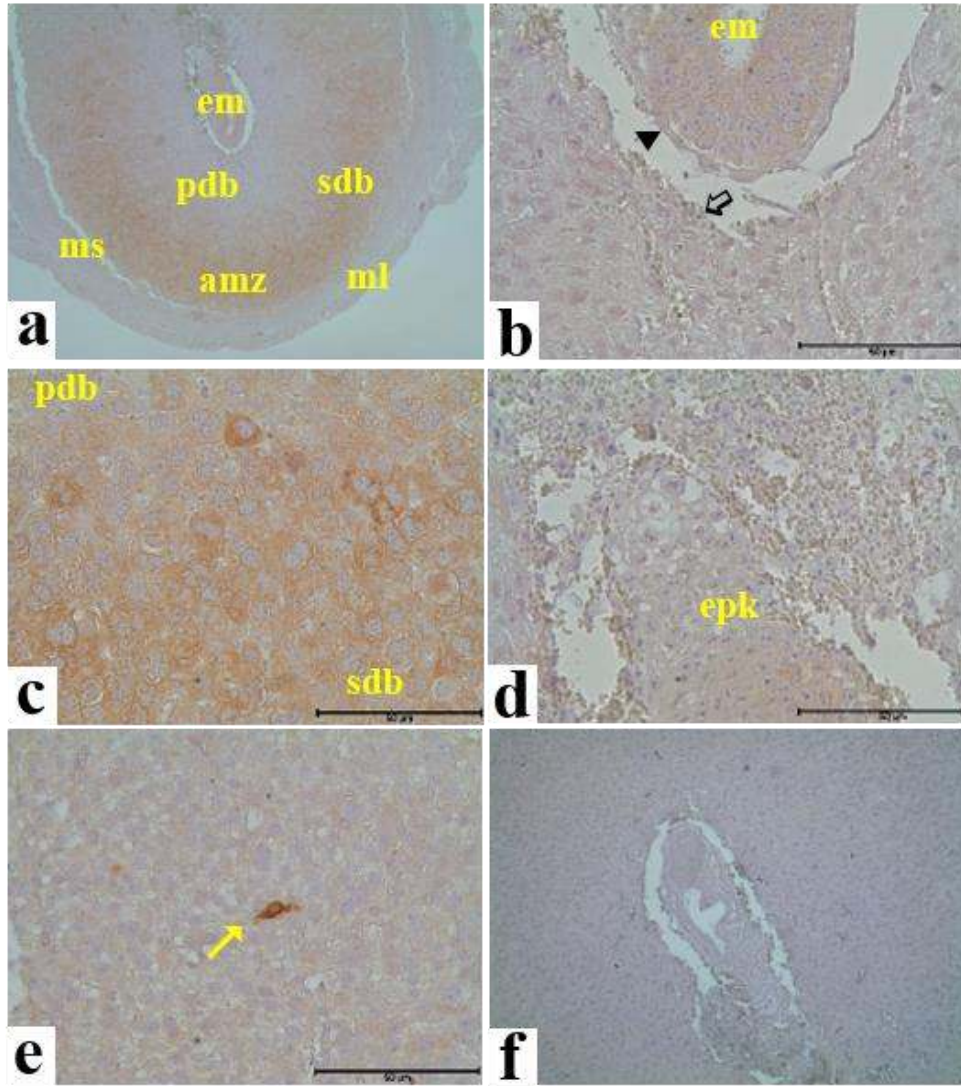
Şekil 4.16: 4 günlük gebe fare uterusunda tüm alanlarda zayıf NICD2 ekspresyonu gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarı genel görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma (X40); **c:** Myometriyal alanlar (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası ►: endometriyal bezler).

Gebeliğin 5. günü (E5)'nde; NICD2 immüno boyanması, uterus epiteli, endometriyal bezler, primer desidual bölge ve miyometriyumun sirküler kas tabakasında pozitif; primer desidual bölge dışındaki miyometriyal alanlara komşu bölgelerdeki endometriyal stromal alanlarda, blastosiste ait olan trofoektoderm hücreleri ve iç hücre kitlesine ait hücrelerde, kan damarlarına ait düz kas hücreleri ve miyometriyuma ait longitudinal kas tabakasında zayıf pozitif olarak gözlemlendi. Diğer alanlarda negatifti. Uterus epitelindeki NICD2 immüno boyanmaları daha çok epitelyum hücrelerinin apikal sitoplazmik alanlarında lokalizeydi. Mast hücrelerinde ise çok kuvvetli pozitif NICD2 immüno boyanması mevcuttu (Şekil: 4.17).



Şekil 4.17: 5 günlük gebe fare uterusunda NICD2 ekspresyonu. Şekilde, blastosiste(bl) ait olan trofoektoderm hücreleri(okla) ve iç hücre kitlesi (ihk), uterus epiteli(le) primer desidual bölge(pdp), miyometriyumun sirküler kas tabakasında(ms) ve kapiller endotel hücrelerinde (oklarla) pozitif, Mast hücrelerinde ise çok kuvvetli pozitif(çift oklarla) NICD2 immünoboyanması gözlenmektedir. **a:** Apozisyon aşamasında olan blastosist ve endometriyal stroma (X10); **b:** kapiller görüntüleri (X40); **c:** Miyometriyal alanlardaki mast hücreleri (X40); **d:** Kontrol.

Gebeliğin 8.günü (E8)'nde; genel olarak SDB hücreleri hariç diğer tüm alanlarda negatif ile zayıf pozitif arasında değişen NICD2 immünoyoğunluğu gözlemlendi. SDB hücreleri yoğun NICD2 eksprese etmekteydi. Ayrıca mast hücrelerinde de kuvvetli pozitif immünoboyanma gözlemlendi (Şekil: 4.18).



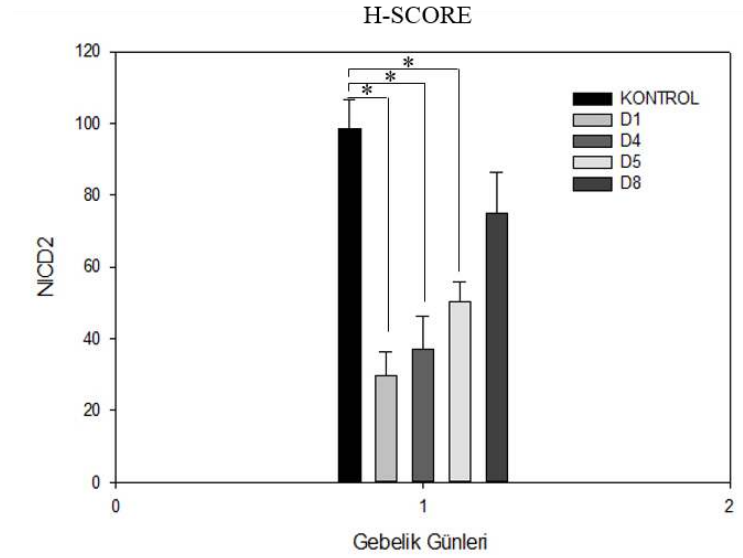
Şekil 4.18: 8 günlük gebe fare uterusunda genel olarak sekonder desidual bölge(sdb) hücreleri hariç diğer tüm alanlarda negatif ile zayıf pozitif arasında değişen NICD2 immüno yoğunluğu. **a:** Antimezometriyal bölgenin genel görünümü (X5); **b:** Antimezometriyal bölgeye komşu alanda pariyetal ve viseral endoderm (X40); **c:** Antimezometriyal bölgede sekonder desidual bölge (X40); **d:** Mezometriyal bölgede ekto plasental koni (X40); **e:** Mast hücresi (X40); **f:** Kontrol. (**pdb:** primer desidual bölge, **epk:** ekto plasental koni, **↗:** Mast hücresi).

Kontrol grubu ve gebeliğin farklı günlerinde (E1, E4, E5, E8) elde edilen uterus dokularında NICD2 immüno boyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.2.'de özetlendi.

ÇALIŞILAN ALAN		GEBELİK GÜNLERİ				
		K	E1	E4	E5	E8
UterusEpiteli		-	-	-	+	-
Endometriyal bezler		-	-	(+)	+	Ø
Endometriyalstroma		-	-	(+)	(+)	(+)
Blastosist	İç Hücre Kitlesi	Ø	Ø	Ø	(+)	Ø
	Trofoektoderm	Ø	Ø	Ø	(+)	Ø
Pariyetal Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Visseral Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Embriyonik bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	(+)
Trofoblastlar		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Kan Damarları	Endotel	-	-	-	-	-
	Düz kas hücreleri	-	-	-	(+)	-
PrimerDesidual Bölge		Ø	Ø	Ø	+	-
SekonderDesidual Bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	++
Miyometriyum	Sirküler kas tabakası	-	-	-	+	-
	Longitudinal kas tabakası	-	-	-	(+)	-
Perimetriyum		-	-	-	-	-

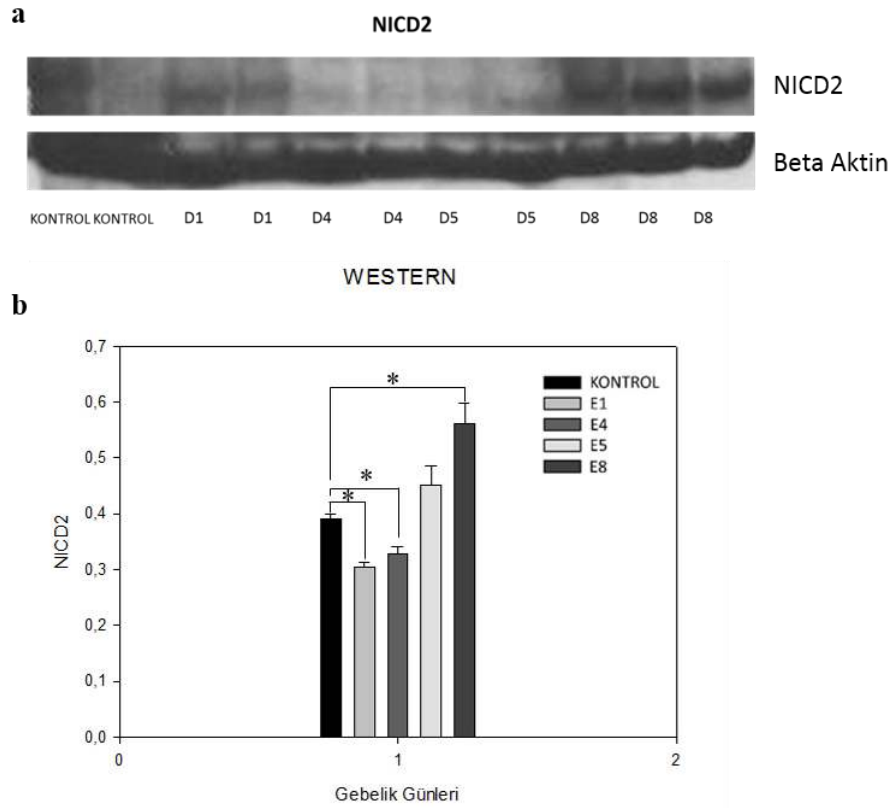
Tablo 4.2: Kontrol E1, E4, E5 ve E8. günlerde NICD2 immünoboyanmasının hücresel dağılımı. Ø: Yapı mevcut değil; -: Negatif; (+):Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++: çok kuvvetli pozitif

H-Score bulgularına göre; NICD2 ekspresyonunun gebeliğin 1., 4. ve 5. günlerinde kontrol ve gebeliğin 8. günlerine göre anlamlı derecede azalmış yoğunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil: 4.19).



Şekil 4.19: Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda NICD2 pozitif hücre sıklığının özellikle E5 ve E8. günde kontrol grubunda artışı gözlenmektedir ($p<0.001$).

Western Blot bulgularına göre; NICD2 ekspresyonunun gebeliğin 1. ve 4. günlerinde azaldığı; 5. ve 8. günde arttığı gözlemlendi. 5. günde gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, diğer farklılıklarda ise istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi. (Şekil: 4.20).

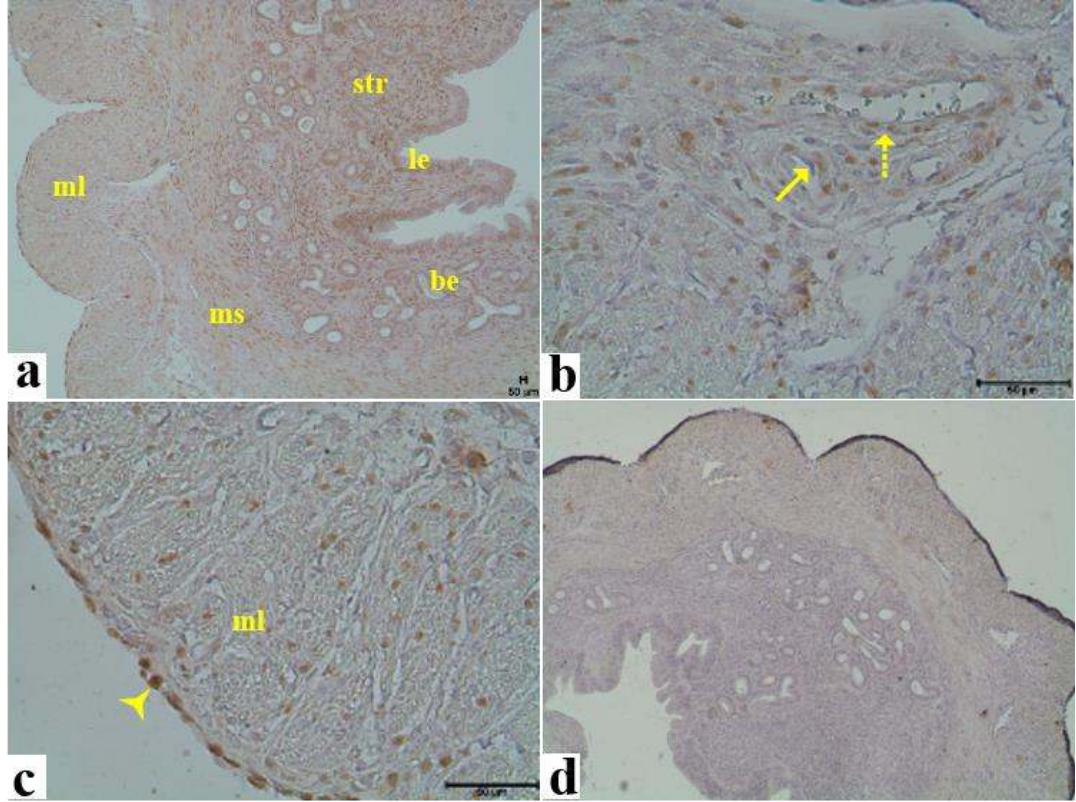


Şekil 4.20: Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda NICD2 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda NICD2 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (b) ($p<0.001$).

4.6. HEY1

HEY1 immüno boyanmasının genelde 5.günde belirgin oranda artış gösterdiği ve bu yönden NICD1 immüno boyanması ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda;

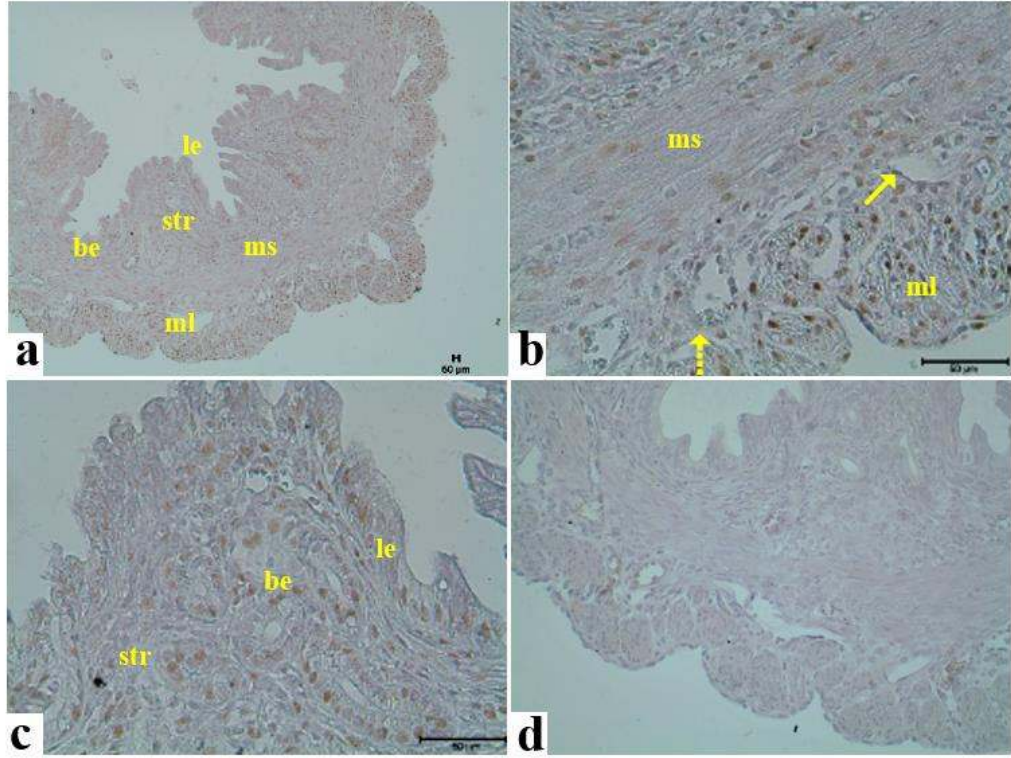
Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusu (K)'nda; HEY1 immüno boyanmasının lümen epiteli, endometriyal bez epiteli, kan damarlarına ait düz kas hücreleri ve miyometriyuma ait sirküler ve longitudinal kas tabakalarında pozitif, endometriyal stromal hücrelerde kuvvetli pozitif ve perimetriyal alandaki serozal hücrelerde çok kuvvetli pozitif yoğunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil: 4.21).



Şekil 4.21: Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda HEY1 ekspresyonu.

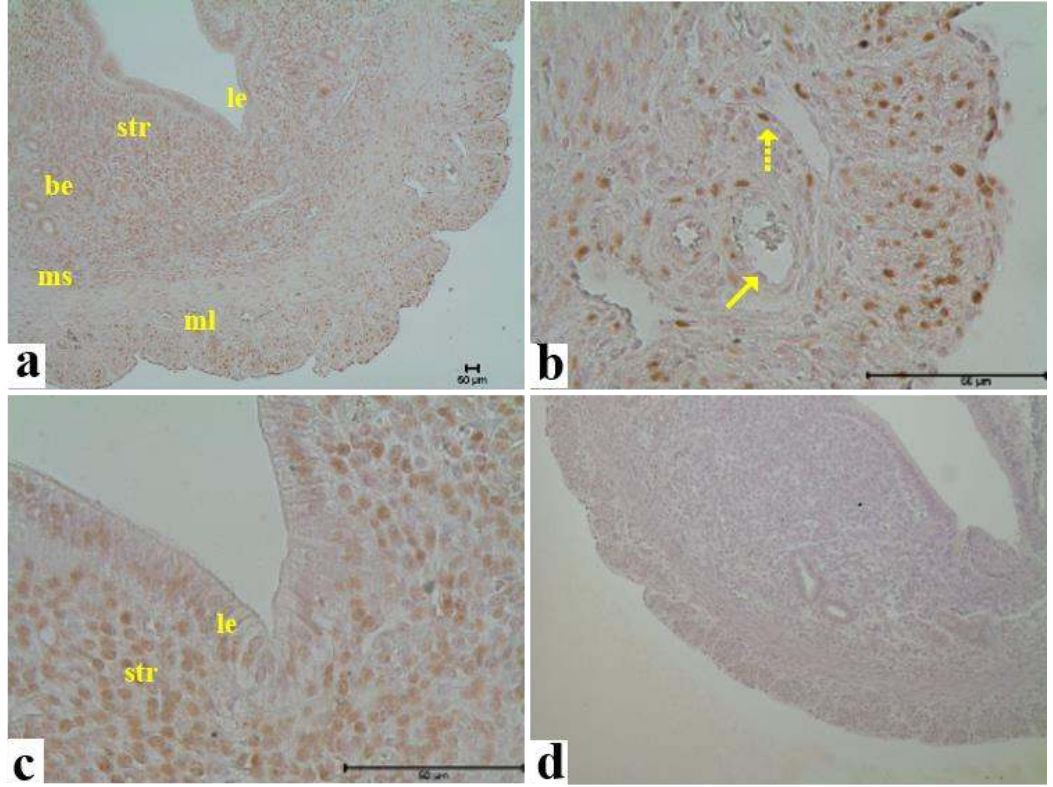
Şekilde, endometriyal stromal hücrelerde ve perimetriyal alandaki serozal hücrelerde diğer alanlara göre daha yoğun HEY1 ekspresyonu gözlenmektedir. **a:** Uterus duvarının genel görünümü (X10); **b:** Miyometriyal ve perimetriyumdaki serozal hücreler (X40); **c:** Miyometriyal alandaki kan damarları (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi, **▲:** perimetriyuma ait serozal hücre).

Gebeliğin 1.günü (E1)'nde; HEY1 immüno boyanmasının perimetriyal alanlar hariç, diğer alanlarda zayıf pozitif ya da pozitif olduğu, miyometriyuma ait longitudinal kas tabakasında kuvvetli pozitif ve perimetriyumda çok kuvvetli pozitif olduğu gözlemlendi(Şekil: 4.22).



Şekil 4.22: 1 günlük gebe fare uterusunda HEY1 ekspresyonu. Şekilde, miyometriyuma ait longitudinal kas tabakası ve perimetriyumda diğer alanlara göre çok daha belirgin HEY1 immünoyoğunluğu izlenmektedir. **a:** Uterus duvarının genel görünümü (X10); **b:** Lümen epiteli ve endometriyal stroma (X40); **c:** Miyometriyal alanlar ve kan damarları (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, ↗: Kan damarına ait endotel hücresi, ↑: kan damarına ait düz kas hücresi).

Gebeliğin 4. günü (E4)’nde:miyometriyumun longitudinal kas tabakası hariç diğer tüm alanlarda gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusunda gibi eksprese olduğu; longitudinal kas tabakasında ise kuvvetli pozitif ve perimetriyumda çok kuvvetli pozitif HEY1 immünoboyanması olduğu gözlemlendi (Şekil: 4.23).

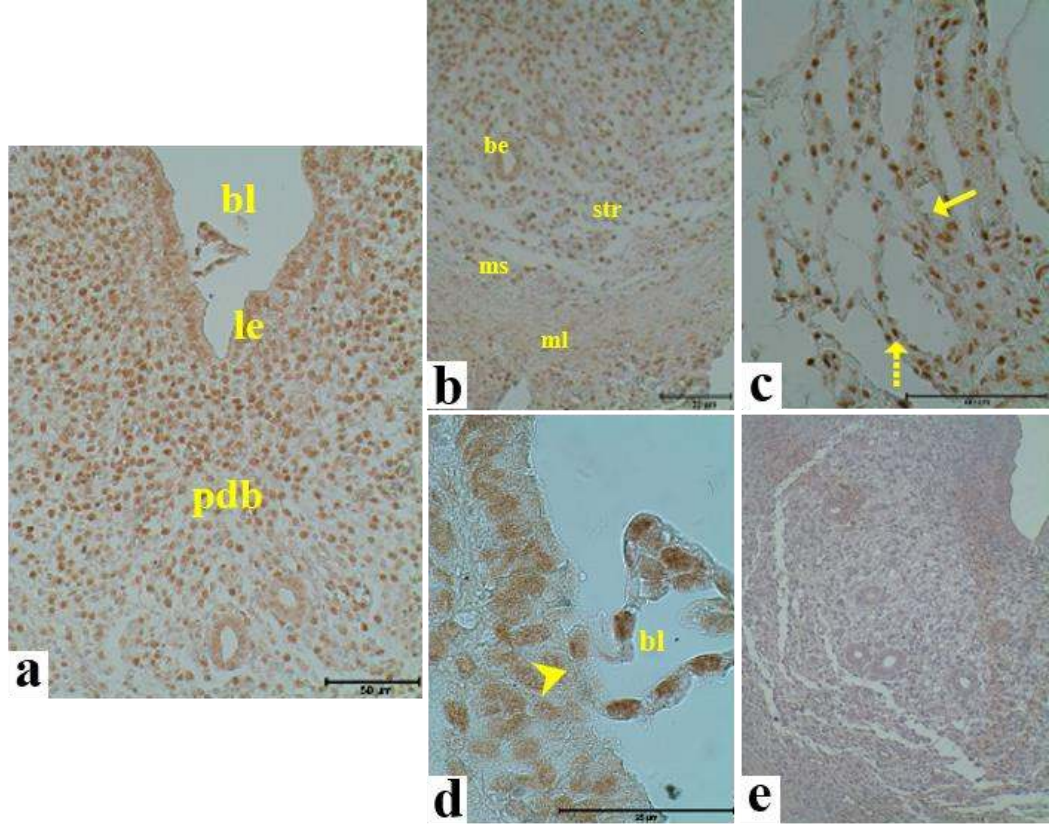


Şekil 4.23: 4 günlük gebe fare uterusunda miyometriyumun longitudinal kas tabakası hariç diğer tüm alanlarda değişik yoğunluklardaki HEY1 ekspresyonu gözlenmektedir.

a: Antimezometriyal bölgeye ait uterus duvarının genel görünümü (X10);

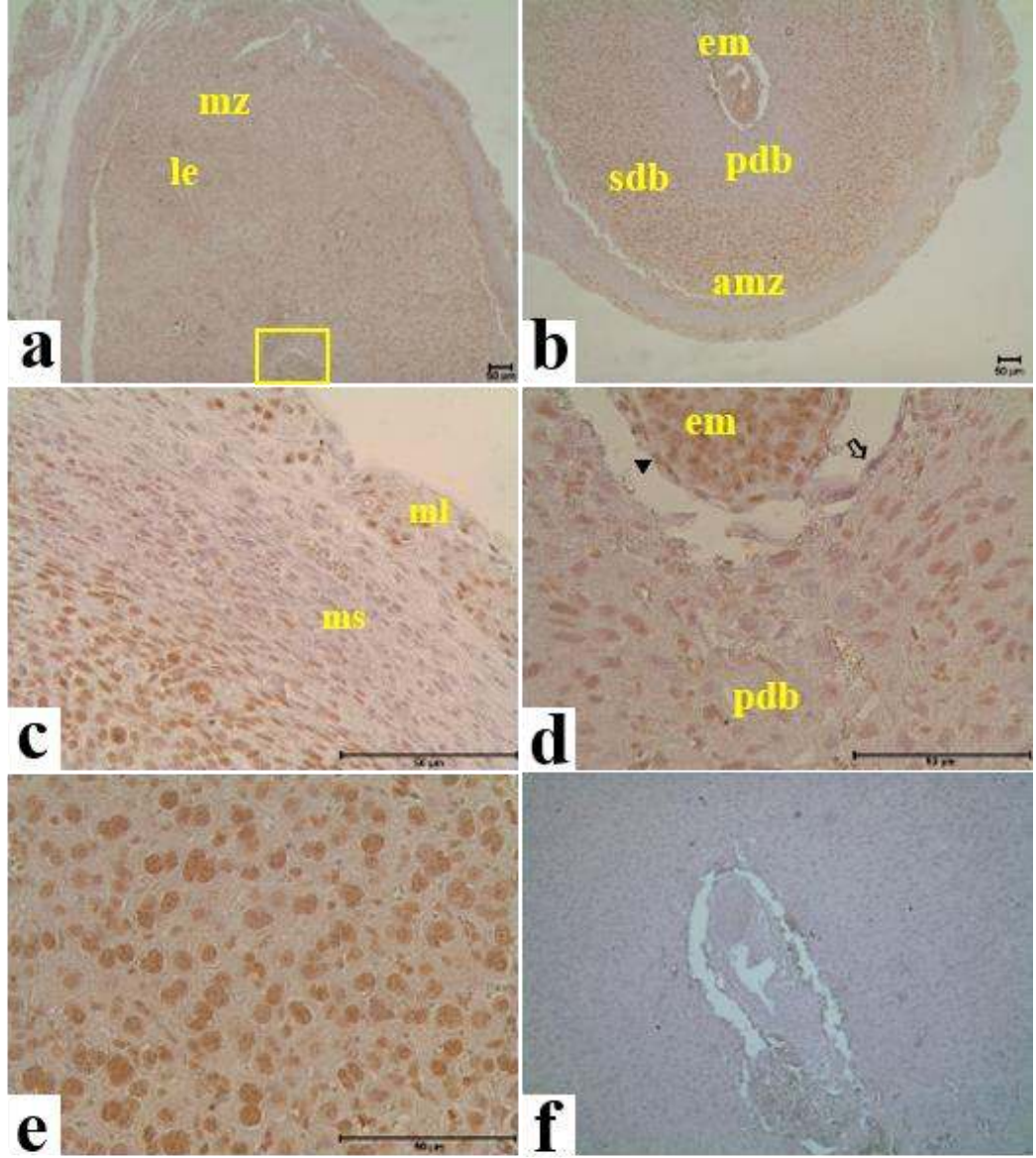
b: Lümen epiteli ve endometriyal stroma (X40); **c:** Miyometriyal alanlar ve kan damarları (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi).

Gebeliğin 5. günü (E5)'nde; HEY1 immünoboyanması, uterus epiteli hücrelerinde kuvvetli pozitif iken, endometriyal bezler ve primer desidual bölge dışındaki miyometriyal alanlara komşu bölgelerdeki endometriyal stromal alanlarda, kan damarlarına ait endotel hücrelerinde ve miyometriyuma ait sirküler düz kas tabakası hücrelerinde pozitif olarak gözlemlendi. Diğer tüm alanlarda ise immünoboyanmanın çok kuvvetli pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil: 4.24).



Şekil 4.24: 5 günlük gebe fare uterusunda blastosiste ait trofoblastlar, uterus epiteli hücreleri, endometriyal bezler, primer desidual bölge ve kan damarlarına ait düz kas hücrelerinde belirgin HEY1 ekspresyonu gözlenmektedir. **a:** Antimezometriyal kutupta blastosist, lümen epiteli ve endometriyal stroma (X20); **b:** Myometriyal alanlar (X40); **c:** Mezenteriyum içerisindeki kan damarları (X40); **d:** Blastosist apozisyonunun detaylı görünümü (X100); **e:** Kontrol. (**bl:**blastosist, **le:** uterus lümen epiteli, **pdb:** primer desidual bölge, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi, **➤:** kaynaşmış olan embriyonun trofoblast hücresiyle uterus lümen epitel hücresi).

Gebeliğin 8.günü (E8)'nde; HEY1 immünoboyanması, uterus epiteli, embriyonik bölge, kan damarlarının düz kas hücreleri, sekonder desidual bölge ve miyometriyumun longitudinal kas tabakasında kuvvetli pozitif olarak gözlemlendi. Sekonder desidual bölge dışındaki miyometriyal alanlara komşu bölgelerdeki endometriyal stromal alanlarda, bazı dev trofoblast hücrelerinde, kan damarlarının endotel hücrelerinde, primer desidual bölge ve miyometriyumun sirküler kas tabakasında zayıf pozitif olarak gözlenirken perimetriyal alandaki serozal hücrelerde çok kuvvetli pozitif olarak gözlemlendi(Şekil: 4.25).



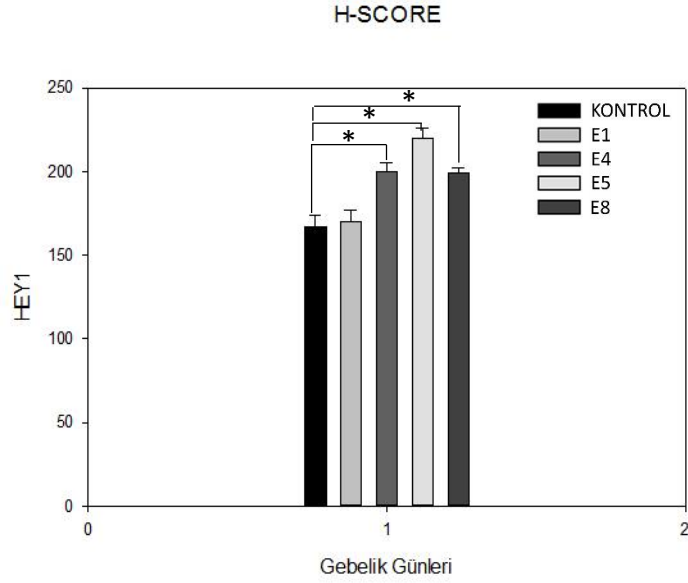
Şekil 4.25: 8 günlük gebe fare uterusunda HEY1 ekspresyonu. Şekilde, uterus epiteli, embriyonik bölge, kan damarlarının düz kas hücreleri, sekonder desidual bölge ve miyometriyumun longitudinal kas tabakası ve perimetriyuma ait serozal hücrelerde diğer bölgelere göre daha yoğun HEY1 immünoboyanması gözlenmektedir. **a:** Mezometriyal bölge (X2,5); **b:** Mezometriyal bölgede yer alan ektoplasental koni (X40). **c:** Antimezoteriyal bölge (X10); **d:** Antimezoteriyal bölgede yer alan embriyoya ait pariyetal ve viseral endoderm (X40); **e:** Antimezometriyal bölgeye ait sekonder desidual bölge (X40); **f:** Kontrol. (**mz:** mezometriyal kutup, **le:** uterus lümen epiteli, **em:** embriyo, **pdb:** primer desidual bölge, **sdb:** sekonder desidual bölge, **↔:** pariyetal endoderm hücreleri **▼:** visseral endoderm hücreleri, **epk:** ektoplasental koni, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası).

Kontrol grubu ve gebeliğin farklı günlerinde (E1, E4, E5, E8) elde edilen uterus dokularında HEY1 immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo: 4.3.'de özetlendi.

ÇALIŞILAN ALAN		GEBELİK GÜNLERİ				
		K	E1	E4	E5	E8
UterusEpiteli		+	(+)	+	++	++
Endometriyal bezler		+	(+)	+	+	Ø
Endometriyalstroma		++	+	++	+	(+)
Blastosist	İç Hücre Kitlesi	Ø	Ø	Ø	+++	Ø
	Trofoektoderm	Ø	Ø	Ø	+++	Ø
Pariyetal Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Visseral Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Embriyonik bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	++
Trofoblastlar		Ø	Ø	Ø	Ø	(+)
Kan Damarları	Endotel	(+)	(+)	(+)	+	(+)
	Düz kas hücreleri	+	+	+	+++	++
PrimerDesidual Bölge		Ø	Ø	Ø	+++	(+)
SekonderDesidual Bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	++
Miyometriyum	Sirküler kas tabakası	+	+	+	+	(+)
	Longitudinal kas tabakası	+	++	++	+++	++
Perimetriyum		+++	+++	+++	+++	+++

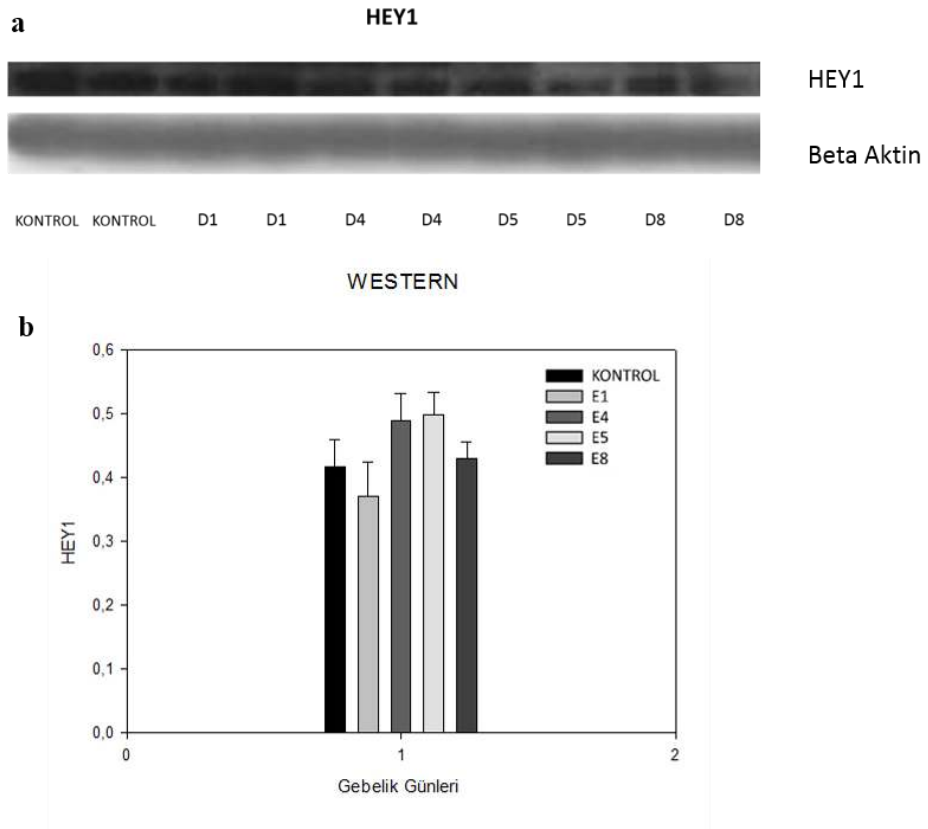
Tablo 4.3: Kontrol, E1, E4, E5 ve E8. günlerde HEY1 immünoboyanmasının hücresel dağılımı. Ø: Yapı mevcut değil; -: Negatif; (+):Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++: Çok kuvvetli pozitif

Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, HEY1 ekspresyonunun 4. ve 5. günde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu; diğer gruplarda ise benzer yoğunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil: 4.26).



Şekil 4.26: Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda HEY1 pozitif hücre sıklığının özellikle E4, E5 ve E8. günde kontrol grubunda artışı gözlenmektedir ($p < 0.001$).

Western Blot analizine göre; HEY1 ekspresyonunun gebeliğin 1. ve 8. gününde azaldığı; 4. ve 5. günlerinde arttığı ancak bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil: 4.27).

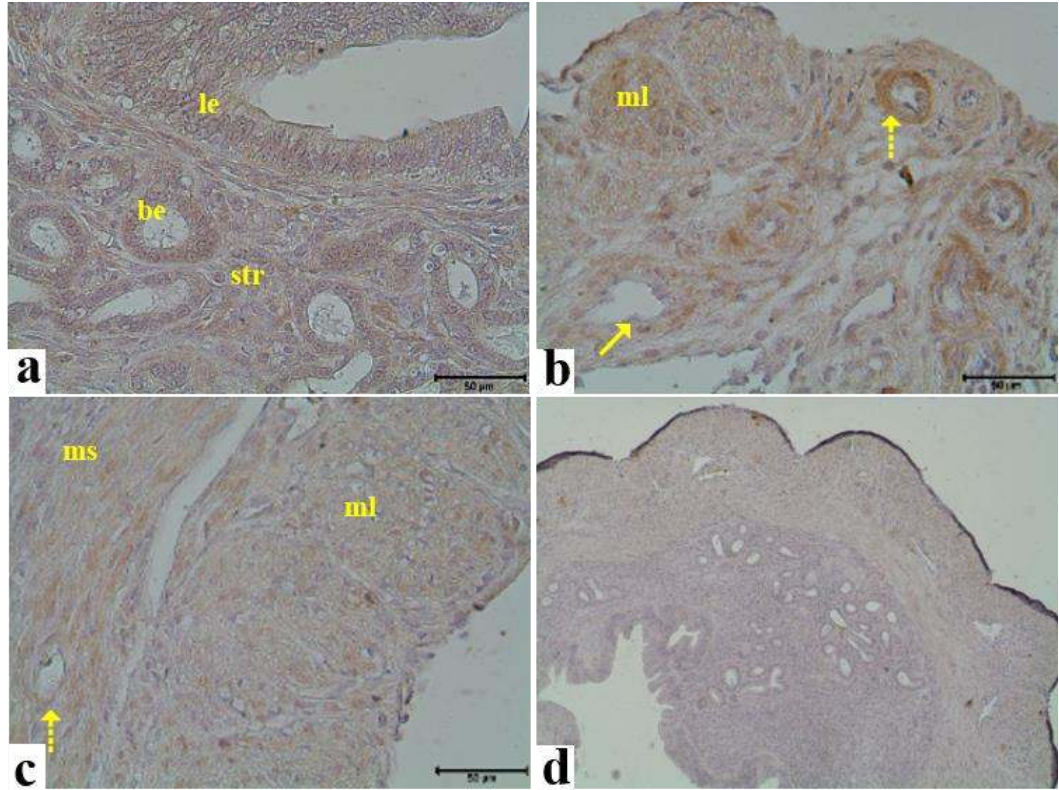


Şekil 4.27: Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda HEY1 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda HEY1 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (b) ($p < 0.001$).

4.7. HES5

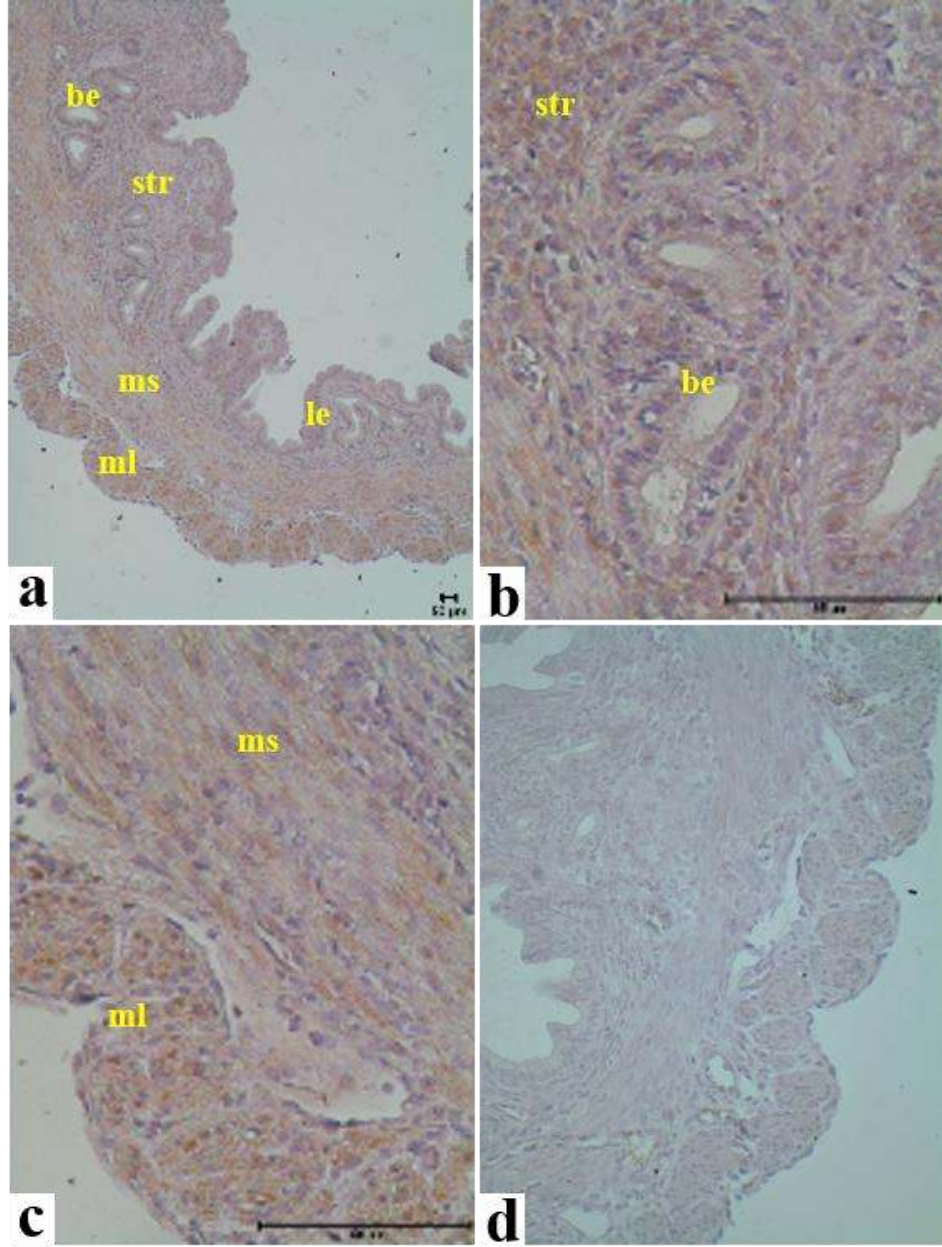
Genel olarak, tüm gruplarda HES5 immünoboyanması yoğunluğunun çalışılan diğer belirteçlere oranla daha az olduğu belirlendi. Yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda;

Gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusu (K)'nda; HES5 immünoboyanması, uterus epiteli, bez epiteli ve endometriyal stromal hücrelerde negatif gözlenirken, miyometriyal ve perimetriyal alanlarda daha zayıf pozitif yoğunlukta gözlemlendi(Şekil: 4.28).



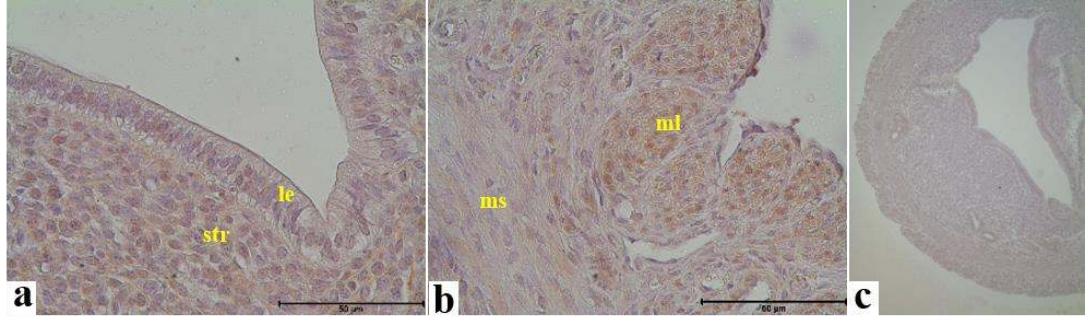
Şekil 4.28: Gebe olmayan östrus fazındaki kontrol grubu uterusunda HES5 ekspresyonu. Şekilde, miyometriyal ve perimetriyal alanlarda özellikle damar duvarına ait düz kas hücrelerindeki HES5 immünoboyanması izlenmektedir. **a:** Uterusun mukozal alanları (X10); **b:** Miyometriyal ve perimetriyal alanlar (X40); **c:** Miyometriyal alanlarda yer alan kan damarları (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi).

Gebeliğin 1.günü (E1)'nde; HES5 immünoboyanması uterus epiteli, bez epiteli, endometriyal stromal hücreler ve perimetriyuma ait serozal hücrelerde zayıf pozitif gözlenirken, miyometriyumun heriki kas katında da pozitif yoğunlukta gözlemlendi (Şekil: 4.29).



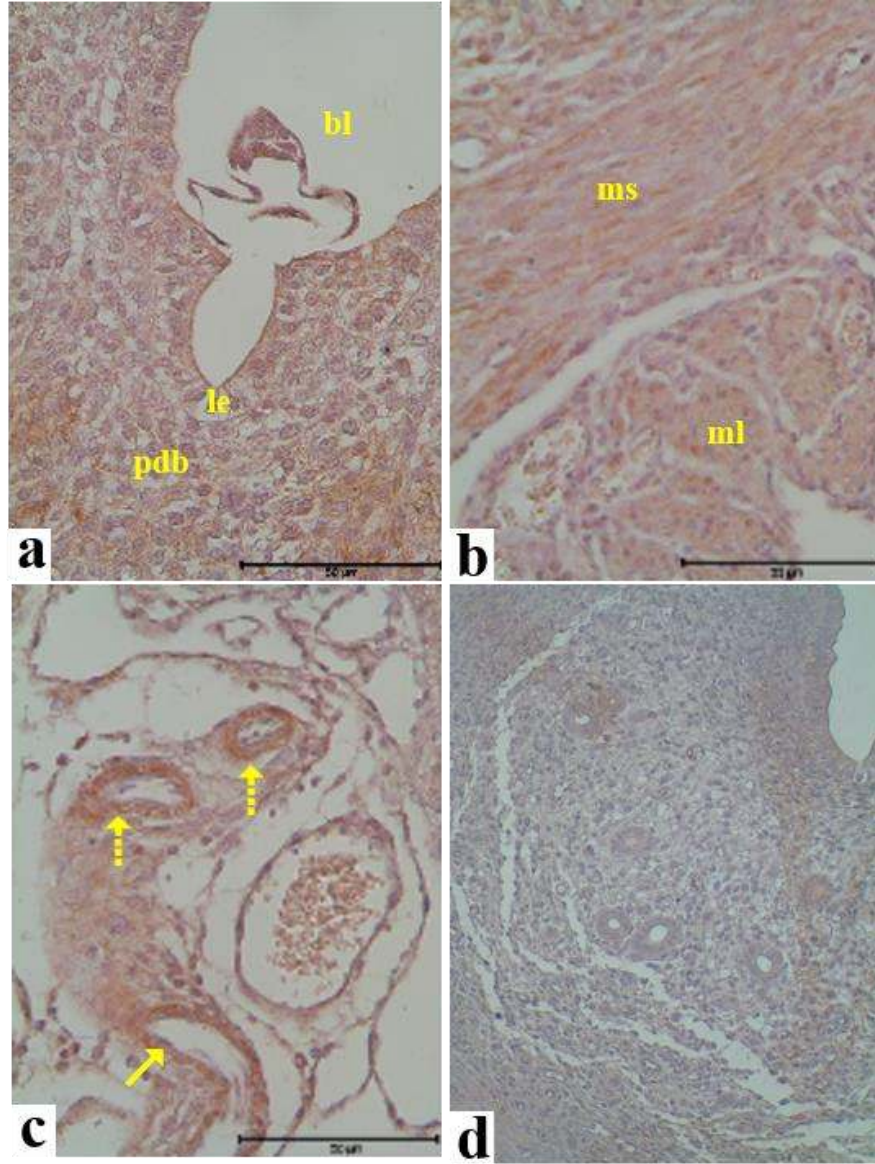
Şekil 4.29: 1 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu. Şekilde, miyometriyumun her iki kas katında da diğer uterus bölgelerine göre daha yoğun HES5 ekspresyonu gözlenmektedir. **a:** Uterusun total görünümü (X10); **b:** Endometriyal stroma (X40); **c:** Miyometriyum ve perimetriyum (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **be:** endometriyal bezler, **str:** endometriyal stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası).

Gebeliğin 4. günü (E4)'nde: HES5 immünoboyanması, bez epiteli ve endometriyal stromal hücrelerde pozitif iken diğer tüm alanlarda zayıf pozitif olarak gözlemlendi(Şekil: 4.30).



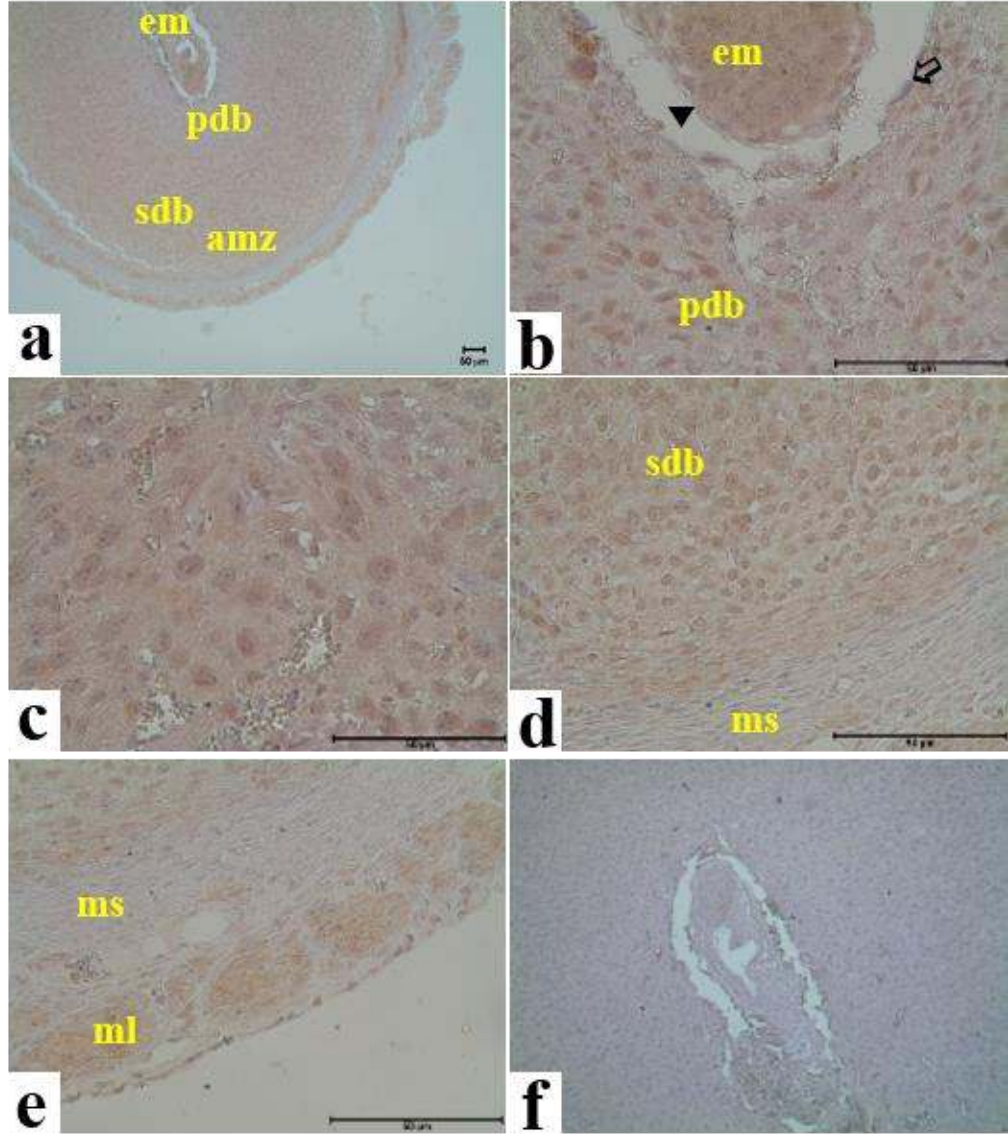
Şekil 4.30: 4 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu. Şekilde, endometrial stromal hücreler ve miyometriyumun longitudinal kas katındaki diğer alanlara göre daha yoğun HES5 ekspresyonu gözlenmektedir. **a:** Endometrial stroma(X40); **b:** Miyometriyum ve perimetriyum alanları (X40); **c:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **str:** endometrial stroma, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası).

Gebeliğin 5. günü (E5)'nde; HES5 immünoboyanması, uterus epiteli, endometrial stromal hücreler ve perimetriyumda zayıf pozitif olarak gözlenirken; bez epiteli ve PDB hücrelerinde negatif olarak gözlendi. Embriyoya ait iç hücre kitlesi, trofoektoderm ve miyometriyumda pozitif olarak gözlendi (Şekil: 4.31).



Şekil 4.31: 5 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu. Şekilde, Blastosistin iç hücre kitlesi, trofoektoderm, uterus epiteli, bez epiteli ve kan damarlarında diğer alanlara göre daha yoğun görünen HES5 immünoboyanması gözlenmektedir. **a:** Uterus lümeni, apozisyon halindeki blastosist, endometriyum(X20); **b:** Miyometriyum ve perimetriyum (X40); **c:** kan damarları (X40); **d:** Kontrol. (**le:** uterus lümen epiteli, **em:** embriyo, **pdb:** primer desidual bölge, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **↗:** Kan damarına ait endotel hücresi, **↑:** kan damarına ait düz kas hücresi).

Gebeliğin 8.günü (E8)'nde; HES5 immünoboyanması, uterus epiteli, pariyetal endoderm ve visseral endodermde ve miyometriyumun sirküler kas tabakasında negatif iken; endometriyal bezler, sekonder desidual bölge ve sekonder desidual bölge dışındaki miyometriyal alanlara komşu bölgelerdeki endometriyal stromal alanlarda pozitif. Primer desidual bölge ile miyometriyumun longitudinal kas tabakasında ve perimetriyumda zayıf pozitif (Şekil: 4.32).



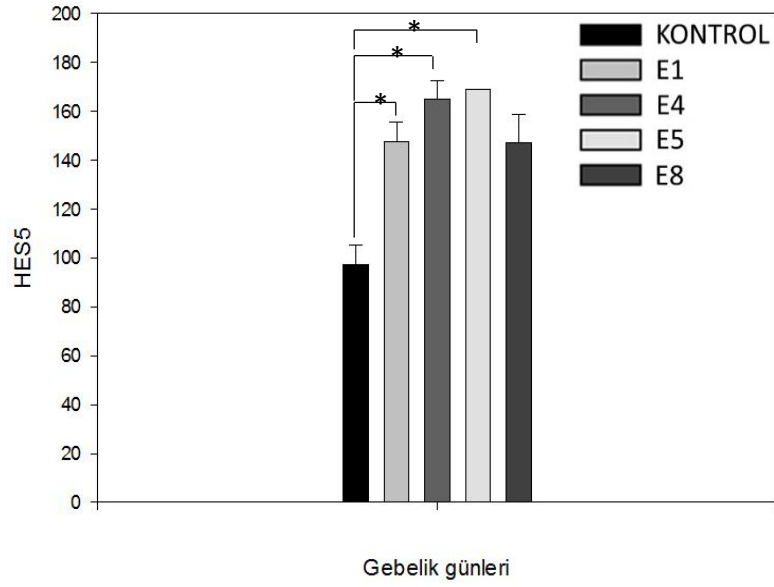
Şekil 4.32: 8 günlük gebe fare uterusunda HES5 ekspresyonu. Şekilde, sekonder desidual bölge ve sekonder desidual bölge ile miyometriyal alanlar arasında kalan stromal alanlarda diğer alanlara göre daha yoğun HES5 immünoboyanması gözlenmektedir. **a:** Antimezometriyal bölge (X2,5). **b:** Antimezoteriyal bölgede yer alan embriyoya ait pariyetal ve viseral endoderm (X40). **c:** Antimezoteriyal bölgede yer alan sekonder desidual bölge ile miyometriyuma komşu stromal alanlar(X40). **d:** Miyometriyum ve perimetriyum katları (X40). **e:** Ektoplasental koni (X40); **f:** Kontrol. (**amz:** anti-mezometriyal kutup, **em:** embriyo, **pdb:** primer desidual bölge, **sdb:** sekonder desidual bölge, **↔:** pariyetal endoderm hücreleri **▼:** visseral endoderm hücreleri, **ms:** miyometriyumun sirküler kas tabakası, **ml:** miyometriyumun longitudinal kas tabakası, **epk:** ektoplasental koni).

Kontrol grubu ve gebeliğin farklı günlerinde (E1, E4, E5, E8) elde edilen uterus dokularında HES5 immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo: 4.4.'de özetlendi.

ÇALIŞILAN ALAN		GEBELİK GÜNLERİ				
		K	E1	E4	E5	E8
UterusEpiteli		-	(+)	(+)	(+)	-
Endometriyal bezler		-	(+)	+	-	+
Endometriyalstroma		-	(+)	+	(+)	+
Blastosist	İç Hücre Kitlesi	Ø	Ø	Ø	+	Ø
	Trofoektoderm	Ø	Ø	Ø	+	Ø
Pariyetal Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Visseral Endoderm		Ø	Ø	Ø	Ø	-
Embriyonik bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	+
Trofoblastlar		Ø	Ø	Ø	Ø	+
Kan Damarları	Endotel	-	-	(+)	-	-
	Düz kas hücreleri	(+)	(+)	(+)	-	(+)
PrimerDesidual Bölge		Ø	Ø	Ø	-	(+)
SekonderDesidual Bölge		Ø	Ø	Ø	Ø	+
Miyometriyum	Sirküler kas tabakası	+	+	(+)	+	-
	Longitudinal kas tabakası	-	+	+	+	(+)
Perimetriyum		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

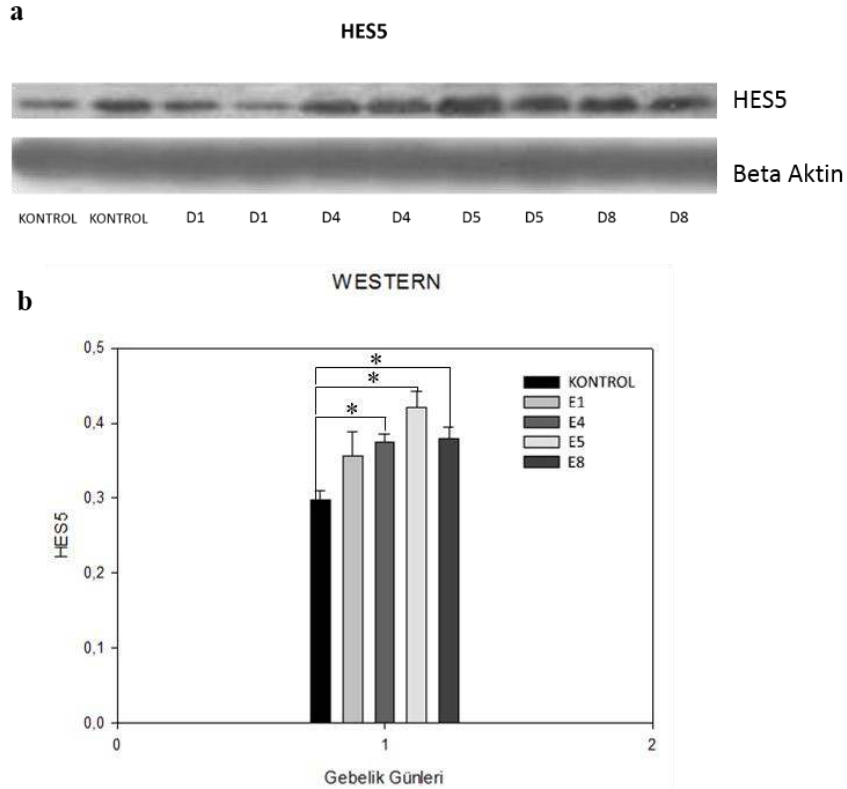
Tablo 4.4: Kontrol, E1, E4, E5 ve E8. günlerde HES5 immünoboyanmasının hücresel dağılımı. Ø: Yapı mevcut değil; -: Negatif; (+):Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++: Çok kuvvetli pozitif

Skorlama sonrası yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, HES5 ekspresyonunun erken gebelikte kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu; 1., 4. ve 5. Günlerde farkın anlamlı olduğu ancak 8. günde anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlendi (Şekil: 4.33).



Şekil 4.33: Kontrol, E1, 4, 5 ve 8. günlerde olan fare uterusunda HES5 pozitif hücre sıklığının özellikle E1, E4 ve E5. günde kontrol grubunda artışı gözlenmektedir ($p<0.001$).

Western Blot analizine göre; HES5 ekspresyonunun gebeliğin 1., 4., 5. ve 8. günlerinde arttığı gözlemlendi. 4., 5. ve 8. günlerde gözlenen artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi (Şekil: 4.34).



Şekil 4.34: Erken gebeliğin farklı günlerinde fare uterusunda HES5 ve beta aktin protein bantları (a) ve erken gebelikte fare uterusunda HES5 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (b) ($p<0.001$).

TARTIŞMA

Memelilerde fertilize olan yumurta, blastosisti oluşturmak üzere birçok hücre bölünmesi geçirir. Bu gelişimsel olaylar, ovaryan östrojen ve progesteronun etkisi altındaki uterusun stromal hücrelerinin proliferasyonu ve farklanması ile senkronize bir şekilde gerçekleşir[71].

Başarılı bir gebeliğin kurulabilmesi için, uygun aşamaya gelmiş blastosistin reseptif endometriyuma implante olması ve işlevsel bir plasenta oluşması gereklidir. İmplantasyondaki ve plasentasyondaki yetersizlik veya yanlışlık infertilitenin en önemli sebeplerindendir [141, 142].

Blastosist ile endometriyum arasındaki etkileşimler implantasyon için kritik öneme sahiptir ve çalışma zorluğundan dolayı insanda bu etkileşimlerin nasıl olduğuna dair çok az bilgi bulunmaktadır [143].

Evrimsel olarak korunmuş, hücrelerarası bir sinyal yolağı olan ve hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı daha önce yapılan birçok değişik çalışmalarda vurgulanan Notch sinyal yolağını oluşturan üyelerinin preimplantif embriyo gelişimi sürecinde ve uterusda başarılı bir desidualizasyonun gerçekleşme sürecinde de önemli olabileceği daha önce vurgulanmıştır[28-30]. Öyle görünmektedir ki, Notch sinyal yolağı blastosist implantasyonu ve gebelik başlangıcı için gerekli olan olmazsa olmaz her iki üyeden hem blastosist ve hem de uterinal dokularda da eksprese olarak gebeliğin başlangıcı ve sürdürülebilmesinde belirgin bir rol oynayabilir. Nitekim son yıllarda yapılan Notch sinyal yolağı ile ilişkili bazı çalışmalar bu görüşümüzü doğrular niteliktedir.

Cormier ve arkadaşları [28], *Notch1,2, Jagged1-2* ve *Dll-3* mRNA'larının oosit, 1 ve 2 hücreli aşama, morula, blastosist, hatched blastosist gibi tüm preimplantif dönem aşamalarında eksprese olduğunu, *Notch4* ve *Dll-4* mRNA'larının ise 2 hücreli aşamadan hatched blastosist aşamasına kadar olan evrelerde sentezlendiğini göstermişlerdir.

Ayrıca, 2008 yılında Cobellis ve arkadaşları [35] Notch ailesi üyelerinin normal ve patolojik endometriyum dokularında eksprese olduğunu göstermişlerdir.

Notch sinyal yolağının proliferasyon, farklanma ve anjiyogenezdeki rolü daha öncesinden bilindiğinden, implantasyon, embriyo-endometriyum ilişkisinde de rolünün olup olmadığı konusu da merak uyandırmış ve bu konulara da odaklanılmaya başlanmıştır.

2007 yılında yapılan bir çalışmada, *in vitro*'da yapılan trofoblast kültürasyonu sonrasında elde edilen trofoblast salgı ürünleri içeren medyum içerisinde kültüre edilen desidual hücrelerde Notch1 hariç diğer Notch sinyal yolağı üyelerinin

genlerinin up-regüle olduğu tesbit edilmiş bunun sonucunda da Notch1 dışındaki Notch ailesi üyelerinin desidualizasyonu düzenleyebileceği vurgulanmıştır [144].

2012 yılında, *in vivo*'da yapılan diğer bir çalışmada ise farelerde Notch sinyal yolağının çalışmasını sağlayan γ -sekretaz'ın inhibitör verilerek inhibe edildiğinde, endometriyal stromal hücre desidualizasyonun bozulduğu ve gebelik kaybına sebep olduğu gösterilmiştir [30].

Bütün bu çalışmalardan anlaşılmaktadır ki, implantasyon ve desidualizasyon süreci için Notch sinyal yolağı gereklidir.

Çalışmamızda gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusunda özellikle NICD1 ve HEY1 immünoboyanmasının NICD2 ve HES5 immünoboyanmasına kıyasla daha yoğun boyandığını gözledik. NICD1 ve HEY1 immünoboyanması lümen epiteli, endometriyal bezler, perimetriumun serozal hücrelerinde yoğun gözlendi. NICD2 ve HEY1 özellikle mast hücrelerinde yoğundu.

Gebeliğin 1.gününde, çalışılan proteinlerin immünolokalizasyonu ve dağılımı östrus fazındaki dişi fare uterusundaki ile benzerlik gösterirken, endometriyumun stromal alanlarındaki immünoboyanma yoğunluğu östrus fazındakine oranla daha yoğundu. Mast hücrelerindeki NICD2 ve HEY1 immünoboyanması gebeliğin 1. gününde de mevcuttu.

Önceden bilindiği gibi fare östrus fazı uterusunda ve gebeliğin 1. gününde, uterus dokusunda vaskülarizasyon maksimum düzeyde, epiteliyal hücreler maksimum derecede gelişmiş durumdadır [145].

2012 yılında yapılan bir çalışmada, östrojenin, farelerde östrus siklusu süresince vajina ve uterus gibi üreme organlarında morfolojik değişikliklere neden olduğu, erişkin farelerde ovariectomi sonrası oluşan östrojen yoksunluğunda vajinal ve uterinal hücrelerde apoptoz yanında atrofinin de eşlik ettiği vurgulanmış, aksine, erişkin farelerde, ovariectomize sonrası östrojen veriminin bu iki organda östrojen bağımlı Hey1, HeyL ve Dll1 gibi hedef genlerin up-regüle olduğu ve buna bağlı olarak hücre proliferasyonunun gerçekleştiği vurgulandı [146].

Van Sinderen ve arkadaşları (2014), bir Notch alt sinyal molekülü olan HES'in menstrüel döngüdeki endometriyumda, lümen ve bez epitelindeki yerleşimlerini göstermişlerdir. Bu ekspresyonun, sekretuar fazda lümen ve bez epitelinde anlamlı derecede yüksek olduğunu da vurgulamışlardır [147].

Bizim bulgularımız daha önceki çalışmaların bulgularıyla uyumludur. Bulgularımıza göre, östrus fazı ve gebeliğin 1. gününde NICD1 ve Hey1'in NICD2 ve HES5'e göre daha aktif rol alarak, eksprese oldukları endometriyal bölgelerde proliferasyonu düzenliyor olabilirler.

Sıçan, hamster ve sığırlarda yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre; neredeyse 60-70 yıldır genelde üreme sistemi ile ilgili kanallarda mast hücrelerinin varlığı ve lokalize olduğu bilinmektedir [148-150]. Hormon aracılı östrus siklusu süresince mast hücrelerinin üretimi ve salınımı tesbit edilmiştir ki bu olay implantasyon için önemlidir. Çünkü bu hücrelerin sekresyonu ve salgıladığı

substanslar implantasyon için gerekli olan doku yeniden şekillenmesi için gereklidir. Farede, uterinal mast hücreleri, östrus fazında en yüksek seviyeye çıkar [151, 152].

2009 yılında Nakano ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, kemik iliği ve periferik dokularda yer alan mast hücrelerinin hücre membranlarında Notch1 ve Notch2 lokalize olduğu belirlenmiş, ayrıca Delta-like 1/Notch sinyalinin mast hücresi yüzeyinde MHC-II ve OX40L ekspresyonunun upregüle olduğu, sonuçta da CD41 T hücrelerinin proliferasyonunun ve bu hücrelerin TH2 hücrelerine diferensiyasyonunun indüklendiği yani Dll1/Notch sinyalinin mast hücrelerini antijen sunan hücrelere dönüştürdüğü vurgulanmıştır [153].

Farelerde 2010 yılında yapılan bir çalışmada; stromal hücrelerde, bir Notch ligandı olan Delta-like 1, bir adezyon molekülü gibi fonksiyon görerek mast hücre membranında bulunan reseptörü Notch2'ye bağlanarak mast hücresi ile stromal hücre adezyonunu düzenlediği belirtilmiştir[154].

Yukarıda verilen bilgilerden yola çıkarak, östrus fazında uterus dokusunda maksimum sayıya ulaştıkları belirtilen mast hücrelerinde eksprese olan Notch2, uterinal dokunun implantasyon için hazırlanması ile ilişkili görevi olabileceği, mast hücrelerinin antijen sunan hücrelere dönüşümü ve bu hücrelerin diğer doku hücreleriyle adezyonunu sağlayabileceği söylenilebilir.

Gebeliğin 4. gününde, daha önceki günlerdekine benzer şekilde, NICD1 ve HEY1 immünoboyanması, NICD2 ve HES5 immünoboyanmasına göre daha yoğun gözlemlendi. Bununla birlikte NICD2'nin mast hücrelerindeki yoğun immünolokalizasyonu bu dönemde de çok belirgindi. NICD1 ve HEY1 immünoboyanması, özellikle endometriyal bez epiteli hücreleri, endometriyal stromal hücreler, miyometriyumun longitudinal katı düz kas hücreleri, vasküler yapılara ait düz kas hücreleri ve perimetriyal hücrelerde yoğundu. NICD2 immünoboyanması, endometriyal bez epiteli, stromal hücreler ve kan damarı düz kas hücrelerinde belirgindi.

Gebe ya da yalancı gebe farede, 4. günde uterus reseptif durumdadır. Gebeliğin 4. gününde, salgılanan preimplantasyon ovaryan östrojen salgısı ile stromal hücre proliferasyonu etkili hale getirilir. Bu dönemde, ovaryan östrojenin salgılanması ve blastosistin olduğu bölgede endometriyal kapiler geçirgenliğinin artışı, daha sonra gerçekleşecek olan implantasyon sürecinde, stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşması işlemi için gereklidir [155, 156].

Reseptif uterusun en önemli görevi, embriyo implantasyonu için hazır olmaktır. Farelerde, uterus bez epiteliden salınan ve E2-indükeli bir sitokin olan Leukemia inhibitor faktör (LIF)'ün, uterin luminal epitelyumundaki reseptörüne bağlanması, nonreseptif fazdan reseptif faza geçişin en önemli göstergesidir. Reseptif fazda, lümen epitelinde, LIF aktiveli sinyal yollarının doğru çalışabilmesi, Igf-1, Vegf, Toll-like reseptörler, aktin sitoskeleti, efrin, integrinler, TGFβ, Wnt ve Notch sinyal yolağı ile ilişkilidir [157]

2012 yılında Afshar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; uterin reseptivitesinin, hormonal endometriyum ile blastosist arasındaki diyalogu gerektirdiği, endometriyal stromal hücrelerin proliferasyonu, apoptozun önlenmesi ve

desidualizasyonun gerçekleşmesi olaylarının implantasyona hazırlık açısından önemli olduğu, Notch familyası transmembran reseptörleri ve bu reseptörlerle ekstrasellüler sinyallerin uyum içerisinde çalışmasının, hücrenin sağ kalımı, hücre-hücre iletişimi, diferensiyasyon, desidualizasyonun tam olarak gerçekleşmesinin temel gereksinimi olduğu vurgulanmış, γ -sekretaz inhibisyonu ile Notch sinyalinin inhibe edilmesinin, desidualizasyonun ve proliferasyonun önemli derecede azalmasına yol açtığı; yani, proliferasyonun spesifik belirteci olan Ki67 miktarının düştüğü, p21, cdk6 ve siklin D aktivitelerinin değiştiği ve cleaved caspase-3, Bad ve Bcl2'i içeren apoptotik profilin arttığı ve tüm bu bulgulardan, preimplantasyon uterus dokusunda başarılı bir desidualizasyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan, stromal fibroblastların apoptozunun önlenmesi ve hücre siklusunun düzenlenmesi olaylarının Notch sinyalinin varlığına gereksinim duyduğu belirtilmiştir [30].

Çalışmamızda gebeliğin 4. gününde özellikle endometriyal bez epiteli hücreleri, endometriyal stromal hücrelerde gözlediğimiz NICD1 ve NICD2 immünoboyanma varlığı, daha önceki çalışmalar eşliğinde tartışıldığında, bu iki belirtecin preimplantasyon uterus dokusunda başarılı bir desidualizasyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan, stromal fibroblastların apoptozunun önlenmesi ve hücre siklusunun düzenlenmesi olaylarına aracılık ettikleri söylenilebilir.

On yılı aşkın bir süredir, birçok çalışmada, Notch reseptörleri, ligandları ve Notch sinyal yolunun hedef genlerinin damarlarda eksprese edildiği ve Notch sinyal yolağının vasküler sistemde kritik bir rol oynadığı belirtilmiştir. Damar duvarı düz kas hücrelerindeki Notch sinyali, vasküler gelişim ve fizyolojisine önemli katkılar sağlar [158].

Endometriyal perivasküler mikroçevre ile ilişkili bir çalışmada, endometriyal perivasküler mikroçevrenin, mezenkimal kök hücre benzeri hücreler bakımından zengin olup bu hücrelerin değişik kemokinleri ve inflamasyon modülatörlerini salgılayarak endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonuna katkı sağladığı belirtilmiştir [159].

Endometriyum dokusundaki vasküler sistem ile ilişkili yukarıda verilen çalışmalardan yola çıkarak, damar duvarında lokalize olduğunu gördüğümüz NICD2, endometriyal dokuda vasküler yapıların gelişimi, bu yapıların fizyolojisi ve endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonuna katkı sağlayabileceği söylenilebilir.

Gebeliğin 5. Gününde, daha önceki günlerde olduğu gibi uterus NICD1 ve HEY1 immünoboyanması, NICD2 ve HES5 immünoboyanmasına göre daha yoğun gözlemlendi. Bununla birlikte NICD2 immünoboyanması implantasyon alanına komşu uterus epitelyum hücreleri, PDB hücrelerinde önceki günlere göre yoğunlaştı. Mast hücrelerindeki yoğun NICD2 immünolokalizasyonu sürmekteydi. Gebeliğin 5. günündeki NICD1 ve HEY1 immünoboyanması gözlenen hücre sıklığı ve bu heriki proteinin ekspresyon miktarları kontrol grubu ve gebeliğin diğer günlerindeki oranla daha yüksekti. Bu dönemde, NICD1 ve HEY1 immünoboyanması, implantasyon bölgesi olan antimezometriyal uterinal alanlarına ilaveten blastosiste ait olan trofoblastlar ve iç hücre kitlesinde de yoğun şekilde gözlemlendi. HES5 immünoboyanması gebeliğin 5. Gününde, özellikle blastosist, implantasyon ile ilişkili

uterinal alanlar ve miyometriyal alanlarda diğer gebelik günlerine göre daha yoğun gözlemlendi.

Daha önceki bilgilerden ve gözlemlerimizden de anlaşıldığı gibi, gebeliğin 5. gününde implantasyon olayı gerçekleşmeye başlamaktadır. Enders ve Schlafke, implantasyonun 3 safhaya ayrılabilceğini göstermiştir: apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon (içine girme) [8, 55].

Apozisyon, embriyonik trofoektoderm hücreleri lümen epiteline yakınlaşmasının gerçekleştiği safhadır. Sonraki safha olan adezyon safhasında trofoektoderm ile lümen epiteli arasındaki ilişki, blastosistin yıkama ile uzaklaştırılmasına izin vermeyecek kadar ilerlemiştir. Son safha olan penetrasyon safhası trofoektoderm lümen epiteline invaze olmasını içerir. Apozisyon, implantasyon başlangıcında, trofoektoderm mikrovillusları ile lümen epitelinin karşılıklı olarak birbirlerine doğru parmaklı çıkıntılar oluşturma olayıdır. Tutunma reaksiyonu sonucunda blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenlik bölgesel olarak artış gösterir. Farelerde tutunma reaksiyonunun ilk belirtisi gebeliğin 4. gününün (vajinal plak=1.gün) gece saatlerinde (20⁰⁰-24⁰⁰) görülür [1]. Fare ve insanlarda lümen epiteli hücreleri, tutunmadan sonra apoptoza gider [58]. Blastosistin etrafındaki stroma hücreleri desidualizasyona gider ve sonuçta embriyo antimezometriyal stroma içine gömülmüş olur.

İmplantasyona dair gözlenebilen en erken belirti, blastosistin endometriyuma yaklaştığı bölgede (apozisyon) endometriyal vasküler geçirgenlikteki artıştır [41-45].

İntegrinleri de içeren adezyon molekülleri blastosistin endometriyal lümen epiteline tutunmasında önemli düzenleyicilerdir [160]. Yapılan bir çalışmada NOTCH1'in farelerde blastosist tutunmasında ve implantasyonda önemli olabileceği gösterilmiştir [29]. Bu durum, endometriyal epitel-trofoektoderm etkileşimlerinde Notch reseptör ve ligandlarının etkisini vurgulamaktadır [156, 161].

İmplantasyon aşaması ile ilişkili tüm bu literatür bilgilerinden yola çıkılarak denilebilir ki, NICD1 ve NICD2 implantasyon sürecinde blastosist tutunmasında, implantasyonda ve stromal alandaki hücrelerin desidual hücrelere dönüşüm sürecinde önemli olabileceği vurgulanabilir.

Gebeliğin 8.günü NICD1 ekspresyonunun doku genelinde E5. Güne göre daha düşük yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Yapılan gözlemlere göre; E8. günde NICD1 immüno boyanmasının uterus epiteli, endometriyal bez epiteli, SDB, embriyonik bölge, ekto plasental koni ve trofoblast dev hücreleri, miyometriyuma ait olan longitudinal düz kas katı hücreleri ve perimetriyumda kuvvetli pozitif yoğunlukta gözlemlendi. NICD2'nin tüm uterus dokusunda mast hücreleri, gebeliğin 5 ve 8. günlerindeki SDB dışında genelde düşük yoğunlukta olduğunu belirledik. Bu dönemde SDB hücrelerinde, NICD1 yanısıra NICD2 immüno boyanması da yoğun gözlemlendi. Mast hücrelerindeki NICD2 immüno boyanması yoğunluğu diğer günlerde olduğu gibi yine gözlenmekteydi.

Yaptığımız literatür taramalarımızda; uterus perimetriyal alanlarında NICD1 ve HEY1 mevcudiyeti ile ilişkili herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmada elde ettiğimiz perimetriyumdaki NICD1 ve HEY1 varlığına ilişkin bulgularımızın

orijinal ve daha önce hiç çalışılmamış olduğunu düşünüyoruz. Bu proteinlerin perimetriyumdaki lokalizasyonları, bu hücrelerin proliferasyonlarıyla ilişkili olabilir.

2011 yılında yapılan bir çalışmada, plasental trofoblastların uterinal damarlara invaze olduğu ve damarların yeniden şekillenmesine yol açtığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, Notch familyası üyelerinin, arteriyal diferensiyasyon/fonksiyonunda önemli bir görev alıp almadıkları araştırılmış ve sonuçta da, plasental trofoblastların bu işlemde arter duvarına invaze olarak sanki damarın kendi hücresi imiş gibi davranıp damarı ve içeriğindeki maternal kanı plasentaya yönlendirdiği, doku kesitlerinin immünoanalizine göre, trofoblast invazyonu süresince, Notch reseptörü/ligand modülasyonunun yavaş yavaş gerçekleştiği, aksine Notch sinyalinin inhibe edilmesi, insan trofoblast kültürü hücrelerinin invazyonunu ve bir arteriyal marker olan EFNB2 ekspresyonunu düşürdüğü, fare plasentalarında, endovasküler trofoblastlarda Notch aktivitesinin çok yüksek olduğu, Notch2'nin ortadan kaldırılmasının, arteriyal invazyonu, maternal kan damarları miktarını ve plasental perfüzyonu düşürdüğü vurgulanmıştır. Sonuç olarak da, Notch sinyalinin trofoblast invazyonu için esas olduğu belirtilmiştir [155].

Yukarıda verilen bilgilerden yola çıkılarak trofoblastlarda görülen NICD1, trofoblast invazyonu, plasental yapının gelişimi ve embriyo gelişimi için önemlidir, Notch sinyal yolağının inhibe edilmesi durumunda trofoblast invazyonu ve gebelik sürecinin engellenebileceği vurgulanabilir.

Desidualizasyonun başladığı süreç olan gebeliğin 5. gününde PDB'inde olduğu gibi, desidualizasyonun tamamlandığı 8. günde aktif desidual bölge olan SDB'nde NICD2 ekspresyonunun yüksek olması, özellikle NOTCH2 aracılı Notch sinyal yolağının desidualizasyon sürecinde aktif olarak rol alabileceğini göstermektedir.

Nitekim daha önce yapılan bir çalışmada, Notch sinyal yolağı ligandlarından biri olan Delta like 4 (Dll4) desidual anjiyogenezde anahtar rol oynadığı belirtilmiştir [162]. Bu bulgu da gösterir ki Notch sinyal yolağı desidualizasyon sürecinde önemli bir anahtar görevi görmektedir.

Yaptığımız literatür taramalarımızda; menstrüel siklus, implantasyon veya gebelik süreci içerisindeki uterus dokularında HES5 mevcudiyeti ile ilişkili herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmada elde ettiğimiz uterus dokusundaki özellikle gebeliğin 5. Günündeki implantasyon alanları ve miyometriyal alanlardaki HES5 varlığına ilişkin bulgularımız orijinal ve daha önce hiç çalışılmamıştır. Bizim bulgularımıza göre; çalışılan diğer proteinler gibi HES5 de, implantasyonun gerçekleştirilmesi ve gebeliğin düzenli bir şekilde sürdürülebilmesi için gereklidir.

Sonuç olarak, yukarıda verilen literatür bilgilerinden ve bizim bulgularımızdan, NICD1, NICD2,HEY1 ya da HES5 aracılı Notch sinyal yolağının farelerde, uterus dokusunun gebelik için hazırlanması, implantasyon olayının gerçekleşmesi, embriyo gelişim sürecinin kontrolü, trofoblast invazyonu, başarılı bir desidualizasyon ve sağlıklı bir gebelik için gerekli olduğu ve tüm bu olaylarda etken bir rol oynayabileceği söylenilebilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada gebe olmayan östrus fazındaki dişi fare uterusu ile, gebeliğin 1., 4., 5. ve 8. günlerindeki fare uterusunda NICD1, NICD2, HEY1 ve HES5'in ekspresyonları immünohistokimyasal ve Western Blot teknikleri ile çalışılarak aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

- 1) NICD1 immünoboyanması yoğunluğunun gebeliğin 5. gününde kontrol grubuna göre artış gösterdiği, protein miktarının da bununla paralellik gösterdiği; NICD1 ekspresyonunun uterus genel olarak uterus epiteli, bez epiteli ve endometriyal stromada yoğun bir şekilde olmak üzere tüm dokularda bulunduğu ancak gebeliğin 8. gününde epitel hücrelerinde ekspresyonun olmadığı,
- 2) NICD2'in gebeliğin ilk günlerinde ekspresyonunun mast hücreleri dışında bulunmadığı, bununla birlikte gebeliğin 5. Gününden başlayarak NICD2 ekspresyonunun desidual hücrelerde de gözlemlendiği,
- 3) HEY1 ekspresyonunun tüm gruplarda daha çok miyometriyal ve perimetriyal hücrelerde gözlemlendiği, bununla birlikte gebeliğin 5.günüden başlayarak blastosist, embriyonal alanlarda da gözlemlendiği,
- 4) HES5 immünoboyanması yoğunluğunun ve protein miktarının çalışılan diğer proteinlere oranla daha düşük olduğu, gebeliğin 5. gününde implantasyon ile ilişkili bölgelerde upregüle olduğu,
- 5) Genel olarak NICD1, NICD2 ve HEY1 ekspresyonlarının HES5'e göre daha yoğun olduğu,
- 6) Genel olarak gebeliğin 5. gününde çalışılan tüm proteinlerin immünoboyanma yoğunlukları ve ekspresyon miktarlarının, önceki günlere göre daha fazla olduğu,
- 7) Sonuç olarak, NICD1, NICD2,HEY1 ya da HES5 aracılı Notch sinyal yolağının farelerde, uterus dokusunun gebelik için hazırlanması, implantasyon olayının gerçekleşmesi, embriyo gelişim sürecinin kontrolünde etken bir rol oynayabileceği sonuçlarına varıldı.

Çalışmamız, sağlıklı bir gebeliğin kurulmasında, temel basamaklardan biri olan desidualizasyonun gerçekleştiği erken gebelikte, Notch sinyal yolağı üyelerinden NICD1, NICD2, HEY1 ve HES5'in uterus dokusunda, immünoboyanma yoğunlukları, dağılımları ve ekspresyon miktarlarındaki değişimleri açısından incelenmesi, dolayısıyla bu sinyal yolağının erken gebelikteki rollerinin aydınlatılmasındaki literatür eksikliğinin giderilmesi bakımından oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Psychoyos, A., *Endocrine Control of Egg Implantation. Handbook of Physiology.*, ed. A.E. In: Greep RO, Geiger SR, eds. . Vol. 187-215. 1973, Washington, DC: American Physiology Society.
2. K, Y., *Inhibition of implantation by advancement of uterine sensitivity and refractoriness.* In: Leroy F, Finn CA, Psychoyos A, Hubinot PO, eds. Blastocyst-endometrium relationships: progress in reproductive biology. Basel, Switzerland Karger, 1980. 7: p. 189-199.
3. Psychoyos A. Endocrine Control of Egg Implantation. Handbook of Physiology. Washington, D.A.P.S.
4. Beer, A.E. and R.E. Billingham, *Immunoregulatory aspects of pregnancy.* Fed Proc, 1978. **37**(10): p. 2374-8.
5. VJ., D., *Decidualization. Cellular Biology of the Uterus.* 1967, Amsterdam: North Holland.
6. Kirby DRS, C.T., *Trophoblast-host Interactions. Epithelial-Mesenchymal Interactions.* 1968, Baltimore: Williams&Wilkins.
7. Enders, A.C.S., S., *A morphological analysis of the early implantation stages in the rat.* Am J Anat 1967. **120**: p. 185-226.
8. Enders, A.C. and S. Schlafke, *Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation.* Am J Anat, 1969. **125**(1): p. 1-29.
9. Krehbiel, R.H., *Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata.* Physiol Zool 1937. **10**: p. 212-238.
10. Huet-Hudson, Y.M., G.K. Andrews, and S.K. Dey, *Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period.* Endocrinology, 1989. **125**(3): p. 1683-90.
11. Borggreffe, T. and F. Oswald, *The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(10): p. 1631-46.
12. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
13. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, *HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway.* J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 237-55.
14. Fischer, A. and M. Gessler, *Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4583-96.
15. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.* Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.

16. Bray, S., *Notch signalling in Drosophila: three ways to use a pathway*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(6): p. 591-7.
17. Jarriault, S., et al., *Signalling downstream of activated mammalian Notch*. Nature, 1995. **377**(6547): p. 355-8.
18. Nishimura, M., et al., *Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of Drosophila hairy and Enhancer of split*. Genomics, 1998. **49**(1): p. 69-75.
19. Maier, M.M. and M. Gessler, *Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 652-60.
20. Sasai, Y., et al., *Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split*. Genes Dev, 1992. **6**(12B): p. 2620-34.
21. Bae, S., et al., *The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation*. Development, 2000. **127**(13): p. 2933-43.
22. Bessho, Y., et al., *Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm*. Genes Cells, 2001. **6**(2): p. 175-85.
23. Leimeister, C., et al., *Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis*. Mech Dev, 1999. **85**(1-2): p. 173-7.
24. Nakagawa, O., et al., *Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13655-60.
25. Iso, T., et al., *HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(17): p. 6071-9.
26. Ohtsuka, T., et al., *Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation*. EMBO J, 1999. **18**(8): p. 2196-207.
27. Koyano-Nakagawa, N., et al., *Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation*. Development, 2000. **127**(19): p. 4203-16.
28. Cormier, S., et al., *Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development*. Gene Expr Patterns, 2004. **4**(6): p. 713-7.
29. Chu, P.W., et al., *Notch 1 signaling pathway effect on implantation competency*. Fertil Steril, 2011. **96**(5): p. 1225-9.
30. Afshar, Y., et al., *Notch1 mediates uterine stromal differentiation and is critical for complete decidualization in the mouse*. FASEB J, 2012. **26**(1): p. 282-94.
31. Sadler, T., *Langman's Medikal Embriyoloji*. 9. baskı. 1993, Ankara: Palme Yayıncılık. 257-265.
32. Moore, K.L. and T.V.N. Persaud, *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. 6. baskı. 2002, İstanbul: Nobel Matbaacılık. 323-329.
33. Luiz Carlos JUNQUEIRA, J.C., *Temel Histoloji*. 10 ed, ed. S.S. Yener Aytekin. 2006: Nobel Tıp Kitabevleri.
34. Mara H. Rendi, A.M., Rochelle L. Garcia, Kelly L. Boyd, *Female Reproductive System*, in *Comparative Anatomy and Histology*. 2012. p. 253-284.

35. Cobellis, L., et al., *The pattern of expression of Notch protein members in normal and pathological endometrium*. J Anat, 2008. **213**(4): p. 464-72.
36. <http://en.wikipedia.org/wiki/Estrus#Estrus>.
37. Sezer, D.Z., *Ergot Alkaloidleri Ve Yarı Sentetik Türevlerinin Uterus Üzerindeki Etki Mekanizmaları* 2005: Kayseri.
38. <http://www.jove.com/video/4389/performing-vaginal-lavage-crystal-violet-staining-vaginal-cytological>.
39. Yoshinaga, K. and M. Takahide. *Development of preimplantation mammalian embryos and their environment*. in *Satellite symposium of the 8th International Congress of Endocrinology*. July 14-16, 1988. Japan.
40. Dey SK, D.D., Hersey RM, Weisz J, Johnson DC, Pakrasi PL, *Physiological aspects of blastocyst uterine interaction*. J Biosci 1984. **6**: p. 23-31.
41. Shelesnyak, M.C., *A history of research on nidation*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **476**: p. 5-24.
42. Kennedy, T.G., *Prostaglandins and uterine sensitization for the decidual cell reaction*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **476**: p. 43-8.
43. Dey, S.K. and D.C. Johnson, *Embryonic signals in pregnancy*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **476**: p. 49-62.
44. Pakrasi, P.L., R. Becka, and S.K. Dey, *Cyclooxygenase and lipxygenase pathways in the preimplantation rabbit uterus and blastocyst*. Prostaglandins, 1985. **29**(3): p. 481-95.
45. Harper, M.J., *Platelet-activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction?* Biol Reprod, 1989. **40**(5): p. 907-13.
46. Morrow, J.D., et al., *Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10721-5.
47. Galassi, L., *Autoradiographic study of the decidual cell reaction in the rat*. Dev Biol, 1968. **17**(1): p. 75-84.
48. Das, S.K., *Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10*. Mol Reprod Dev, 2010. **77**(5): p. 387-96.
49. Ma, X., et al., *Decidual cell polyploidization necessitates mitochondrial activity*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26774.
50. Rahman, M.A., et al., *Hoxa-10 deficiency alters region-specific gene expression and perturbs differentiation of natural killer cells during decidualization*. Dev Biol, 2006. **290**(1): p. 105-17.
51. Tan, J., et al., *Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation*. Mech Dev, 2002. **111**(1-2): p. 99-113.
52. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*, ed. J.A.R.a.Z.R. Edited by E.Y.Adashi. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
53. DeFeo, V.J., *Decidualization. Cellular Biology of the Uterus*. 1967, Amsterdam: North Holland. 191-290.
54. Kirby, D.R.S. and T.P. Cowell, *Trophoblast-host Interactions. Epithelial-Mesenchymal Interactions.*, ed. B.R. In: Fleisch-meyer R, eds. 1968: Baltimore: Williams&Wilkins. 64-77.
55. Enders AC, S.S., *A morphological analysis of the early implantation stages in the rat*. Am J Anat 1967. **120**: p. 185-226.

56. Kirby, D.R.S., *The Biology of the Blastocysts*. 1971, Chicago: University of Chicago Pres. 293-410.
57. Finn, C.A. and D.G. Porter, *The uterus*. Vol. 1. 1975: Acton, MA: Publishing Sciences Group. 157-73.
58. Parr, E.L., H.N. Tung, and M.B. Parr, *Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats*. Biol Reprod, 1987. **36**(1): p. 211-25.
59. Bonnet, R., *Beitrage zur embryologie der wiederkauer, gewonnen am schafei*. Arc Anat Physiol, 1884. **8**: p. 170-230.
60. Schlafke, S. and A.C. Enders, *Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation*. Biol Reprod, 1975. **12**(1): p. 41-65.
61. <http://www.medicine.ucsd.edu/cpa/rat>
62. Enders, A.C. and T.N. Blankenship, *Comparative placental structure*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **38**(1): p. 3-15.
63. Croy, A., *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. 2014: Elsevier.
64. Cross, J.C., et al., *Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **187**(1-2): p. 207-12.
65. Parast, M.M., S. Aeder, and A.E. Sutherland, *Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility*. Dev Biol, 2001. **230**(1): p. 43-60.
66. Blandau, R.J., *Embryo-endometrial interrelationship in the rat and guinea pig*. Anat Rec, 1949. **104**(3): p. 331-59.
67. Watson, E.D. and J.C. Cross, *Development of structures and transport functions in the mouse placenta*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 180-93.
68. Bedzhov, I., et al., *Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1657).
69. Barlow, P.W. and M.I. Sherman, *Cytological studies on the organization of DNA in giant trophoblast nuclei of the mouse and the rat*. Chromosoma, 1974. **47**(2): p. 119-31.
70. KIERSZENBAUM, A.L., *Histoloji ve Hücre Biyolojisi - Patolojiye Giriş*, ed. R. DEMİR. 2002.
71. Wang, H. and S.K. Dey, *Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(3): p. 185-99.
72. Singh, H. and J.D. Aplin, *Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation*. J Anat, 2009. **215**(1): p. 3-13.
73. Stemmler, M.P., *Cadherins in development and cancer*. Mol Biosyst, 2008. **4**(8): p. 835-50.
74. Coutifaris, C., et al., *E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts*. Development, 1991. **113**(3): p. 767-77.
75. Larue, L., et al., *E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8263-7.
76. Riethmacher, D., V. Brinkmann, and C. Birchmeier, *A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 855-9.
77. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, 1996. **84**(3): p. 345-57.

78. Huber, O., C. Bierkamp, and R. Kemler, *Cadherins and catenins in development*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(5): p. 685-91.
79. Poncelet, C., et al., *Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002. **81**(3): p. 195-203.
80. Hey, N.A., et al., *The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(2): p. 337-42.
81. Hey, N.A., et al., *MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients*. Hum Reprod, 1995. **10**(10): p. 2655-62.
82. Hey, N.A., et al., *Transmembrane and truncated (SEC) isoforms of MUC1 in the human endometrium and Fallopian tube*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 2.
83. Meseguer, M., et al., *Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst*. Biol Reprod, 2001. **64**(2): p. 590-601.
84. Gipson, I.K., et al., *MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence*. Biol Reprod, 2008. **78**(1): p. 134-42.
85. Aricescu, A.R. and E.Y. Jones, *Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(5): p. 543-50.
86. Aplin, J.D., *Adhesion molecules in implantation*. Rev Reprod, 1997. **2**(2): p. 84-93.
87. Aplin, J.D., *Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive*. Reprod Biomed Online, 2006. **13**(6): p. 833-9.
88. Lessey, B.A., *Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity*. Hum Reprod, 1998. **13 Suppl 3**: p. 247-58; discussion 259-61.
89. Lessey, B.A., *Endometrial receptivity and the window of implantation*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. **14**(5): p. 775-88.
90. Lessey, B.A., *Adhesion molecules and implantation*. J Reprod Immunol, 2002. **55**(1-2): p. 101-12.
91. Lessey, B.A., et al., *Use of integrins to date the endometrium*. Fertil Steril, 2000. **73**(4): p. 779-87.
92. Aplin, J.D. and S.J. Kimber, *Trophoblast-uterine interactions at implantation*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 48.
93. Basak, S., R. Dhar, and C. Das, *Steroids modulate the expression of alpha4 integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation*. Biol Reprod, 2002. **66**(6): p. 1784-9.
94. Campbell, S., et al., *Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo*. Hum Reprod, 1995. **10**(6): p. 1571-8.
95. Bloor, D.J., et al., *Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**(3): p. 237-45.
96. Illera, M.J., et al., *Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse*. Biol Reprod, 2000. **62**(5): p. 1285-90.
97. Illera, M.J., et al., *A role for alphavbeta3 integrin during implantation in the rabbit model*. Biol Reprod, 2003. **68**(3): p. 766-71.

98. Genbacev, O.D., et al., *Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface*. Science, 2003. **299**(5605): p. 405-8.
99. Hey, N.A. and J.D. Aplin, *Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium*. Glycoconj J, 1996. **13**(5): p. 769-79.
100. Lai, T.H., et al., *Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle*. Fertil Steril, 2005. **83 Suppl 1**: p. 1297-302.
101. Red-Horse, K., et al., *Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 744-54.
102. Wang, B., et al., *High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being*. Am J Reprod Immunol, 2008. **60**(2): p. 127-34.
103. Hogan, B.L., D.P. Barlow, and M. Kurkinen, *Reichert's membrane as a model for studying the biosynthesis and assembly of basement membrane components*. Ciba Found Symp, 1984. **108**: p. 60-74.
104. Clark, C.C., et al., *The embryonic rat parietal yolk sac. Changes in the morphology and composition of its basement membrane during development*. Dev Biol, 1975. **46**(2): p. 243-61.
105. Kulay, L., Jr. and F.F. de Moraes, *A histochemical study on the Reichert membrane of the rat's placenta*. Acta Histochem, 1965. **22**(5): p. 309-21.
106. Wislocki, G.B. and H.A. Padykula, *Reichert's membrane and the yolk sac of the rat investigated by histochemical means*. Am J Anat, 1953. **92**(1): p. 117-50.
107. Davies, J. and S.R. Glasser, *Histological and fine structural observations on the placenta of the rat*. Acta Anat (Basel), 1968. **69**(4): p. 542-608.
108. Jollie, W.P. and S.S. Craig, *The fine structure of placental junctional zone cells during prolonged pregnancy in rats*. Acta Anat (Basel), 1979. **105**(4): p. 386-400.
109. Padykula, H.A. and D. Richardson, *A correlated histochemical and biochemical study of glycogen storage in the rat placenta*. Am J Anat, 1963. **112**: p. 215-41.
110. Soares, M.J., *The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 51.
111. Brosens, I., W.B. Robertson, and H.G. Dixon, *The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy*. J Pathol Bacteriol, 1967. **93**(2): p. 569-79.
112. Knipp, G.T., K.L. Audus, and M.J. Soares, *Nutrient transport across the placenta*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **38**(1): p. 41-58.
113. Jollie, W.P., *Fine Structural Changes in the Junctional Zone of the Rat Placenta with Increasing Gestational Age*. J Ultrastruct Res, 1965. **12**: p. 420-38.
114. Lundkvist, O., O. Nilsson, and S. Bergstrom, *Studies on the trophoblast-epithelial complex during decidual induction in rats*. Am J Anat, 1979. **154**(2): p. 211-29.
115. Jollie, W.P., *Age changes in the fine structure of rat trophoblast giant-cells*. Anat Embryol (Berl), 1981. **162**(1): p. 105-19.

116. He, Y., et al., *Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(4): p. 537-45.
117. Pijnenborg, R., et al., *Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals*. Placenta, 1981. **2**(1): p. 71-91.
118. Redline, R.W. and C.Y. Lu, *Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship*. Lab Invest, 1989. **61**(1): p. 27-36.
119. Achen, M.G., et al., *Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development*. Growth Factors, 1997. **15**(1): p. 69-80.
120. Teesalu, T., et al., *Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation*. Dev Dyn, 1999. **214**(3): p. 248-58.
121. APF., W.F.F., *Placentation*. . Vol. 4. baskı. 1994: Marshall's Physiology Reproduction. .
122. Georgiades, P., et al., *Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4522-7.
123. Redline, R.W., et al., *Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta*. Mol Reprod Dev, 1993. **36**(2): p. 121-9.
124. Zybina, E.V. and T.G. Zybina, *Polytene chromosomes in mammalian cells*. Int Rev Cytol, 1996. **165**: p. 53-119.
125. Cross, J.C., Z. Werb, and S.J. Fisher, *Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1508-18.
126. Linzer, D.I. and S.J. Fisher, *The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(6): p. 837-40.
127. Damsky, C.H., et al., *Integrin switching regulates normal trophoblast invasion*. Development, 1994. **120**(12): p. 3657-66.
128. Cross, J.C., et al., *Genes, development and evolution of the placenta*. Placenta, 2003. **24**(2-3): p. 123-30.
129. Pijnenborg, R., *Establishment of uteroplacental circulation*. Reprod Nutr Dev, 1988. **28**(6B): p. 1581-6.
130. Pijnenborg, R., et al., *Evaluation of trophoblast invasion in placental bed biopsies of the baboon, with immunohistochemical localisation of cytokeratin, fibronectin, and laminin*. J Med Primatol, 1996. **25**(4): p. 272-81.
131. A.M., C., *In Comparative Placentation*. 2000, Academic Press, London. p. 108-160.
132. D, S., *Comparative Placentation*. . 2000, Academic Pres, London. p. 25-57.
133. Steven, D.M., G., *In Comparative Placentation*. . 2000, Academic Pres, London.
134. Leiser, R., et al., *Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans*. Microsc Res Tech, 1997. **38**(1-2): p. 76-87.
135. Chilosi, M., et al., *Differential expression of p57kip2, a maternally imprinted cdk inhibitor, in normal human placenta and gestational trophoblastic disease*. Lab Invest, 1998. **78**(3): p. 269-76.

136. Cordle, J., et al., *Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11785-93.
137. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
138. Komatsu, H., et al., *OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during Caenorhabditis elegans vulval development*. PLoS Biol, 2008. **6**(8): p. e196.
139. Cordle, J., et al., *A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 849-57.
140. Mettus, R.V. and S.G. Rane, *Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice*. Oncogene, 2003. **22**(52): p. 8413-21.
141. Dimitriadis, E., et al., *Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(6): p. 613-30.
142. Koot, Y.E., et al., *Recurrent pre-clinical pregnancy loss is unlikely to be a 'cause' of unexplained infertility*. Hum Reprod, 2011. **26**(10): p. 2636-41.
143. Cuman, C., et al., *Fetal-maternal communication: the role of Notch signalling in embryo implantation*. Reproduction, 2014. **147**(3): p. R75-86.
144. Hess, A.P., et al., *Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators*. Biol Reprod, 2007. **76**(1): p. 102-17.
145. Marcondes, F.K., F.J. Bianchi, and A.P. Tanno, *Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations*. Braz J Biol, 2002. **62**(4A): p. 609-14.
146. Nakamura, T., et al., *Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure*. In Vivo, 2012. **26**(6): p. 899-906.
147. Van Sinderen, M., et al., *Localisation of the Notch family in the human endometrium of fertile and infertile women*. J Mol Histol, 2014. **45**(6): p. 697-706.
148. Likar, I.N., L.J. Likar, and R.W. Robinson, *Mast Cells and Hyaluronic Acid in the Bovine Endometrium*. Nature, 1964. **203**: p. 730-3.
149. Likar, I.N. and L.J. Likar, *Acid Mucopolysaccharides and Mast Cells in the Bovine Uterus at Different Stages of the Sexual Cycle*. Acta Endocrinol (Copenh), 1964. **46**: p. 493-506.
150. Gibbons, A.F. and M.C. Chang, *Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response*. Biol Reprod, 1972. **6**(2): p. 193-203.
151. Aydin, Y., et al., *Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: cyclic changes and contribution to tissue histamine*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 1998. **120**(2): p. 255-62.
152. Woidacki, K., F. Jensen, and A.C. Zenclussen, *Mast cells as novel mediators of reproductive processes*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 29.
153. Nakano, N., et al., *Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 74-81 e1.

154. Murata, A., et al., *A Notch ligand, Delta-like 1 functions as an adhesion molecule for mast cells*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 3905-12.
155. Hunkapiller, N.M., et al., *A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia*. Development, 2011. **138**(14): p. 2987-98.
156. Cuman, C., et al., *Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success*. Hum Reprod, 2013. **28**(5): p. 1161-71.
157. Rosario, G.X., et al., *The LIF-mediated molecular signature regulating murine embryo implantation*. Biol Reprod, 2014. **91**(3): p. 66.
158. Fouillade, C., et al., *Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(2): p. 138-46.
159. Murakami, K., et al., *Decidualization induces a secretome switch in perivascular niche cells of the human endometrium*. Endocrinology, 2014. **155**(11): p. 4542-53.
160. Marwood, M., et al., *Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2915-23.
161. Mazella, J., S. Liang, and L. Tseng, *Expression of Delta-like protein 4 in the human endometrium*. Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 15-9.
162. Garcia-Pascual, C.M., et al., *Inhibition of Delta-like 4 mediated signaling induces abortion in mice due to deregulation of decidual angiogenesis*. Placenta, 2014. **35**(7): p. 501-8.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. 2003 yılında Konaklı Gazi İlköğretim Okulundan, 2007 yılında A. Feyzi Alaettinoğlu Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Kısım'dan mezun oldu. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü bitirerek lisans eğitimini tamamladı. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans Programına başladı.