

T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İMLANTASYONDA ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN ROLÜ

Araş.Gör.Seren Gülşen Giray

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
YÜKSEK LİSANS TEZİ

132566

Danışman: Doç.Dr.M.Kemal Özbilgin

Manisa - 2003

132566

**YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU DÖKÜMANTASYON MERKEZİ TEZ
VERİ FORMU**

Tez No: 132566

Konu:

Üniv.Kodu

Tez Yazarının

Soyadı: GİRAY

Adı: SEREN GÜLŞEN

Tezinin Türkçe Adı: **İmplantasyonda Adezyon Moleküllerinin Rolü**

Tezinin İngilizce Adı: **The Role of Adhesion Molecules In Implantation**

Tezin Yapıldığı Yer:

Üniversite: **Celal Bayar**

Enstitü: **Sağlık Bilimleri**

Yılı: **2003**

Tezin Türü: **1. Yüksek lisans**

Dili: **Türkçe**

2. Doktora

3. Tıpta Uzmanlık

4. Sanatta Yeterlilik

Sayfa Sayısı: **157**

Tez Danışmanı:

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DÖKÜMANTASYON MERKEZİ**

Ünvanı: **Doç.Dr.**

Adı: **Kemal**

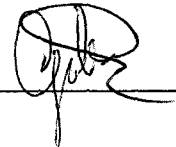
Soyadı: **ÖZBİLGİN**

Türkçe Anahtar Kelimeler:

1. İmplantasyon
2. Adezyon Molekülleri
3. Endometriyal Receptivite
4. İntegrinler
5. Büyüme Faktörleri

İngilizce Anahtar Kelimeler:

1. Implantation
2. Adhesion Molecules
3. Endometrial Receptivity
4. İntegrins
5. Growth Factors

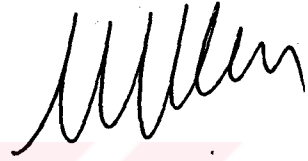


TUTANAK

Histoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Seren Gülşen GİRAY'ın 'İmplantasyonda Adezyon Moleküllerinin Rolü' başlıklı tezini incelemek üzere tez değerlendirme jürisi 21.11.2003 Cuma günü saat 10:30'da Temel Tıp Bölüm Başkanı Dr. Ahmet ÖZBİLGİN'in odasında toplanmıştır.

Jüri üyeleri tarafından incelenen tezin kabulüne oy birliği ile karar verilmiştir.

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Kemal ÖZBİLGİN



Jüri Üyesi: Doç. Dr. Sevinç İNAN

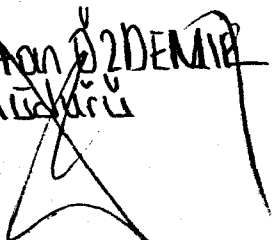


Jüri Üyesi: Doç. Dr. Tuncay VAROL



CBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 5.12.2003 tarih ve 20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim ÖZDEMİR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında ve yüksek lisans eğitimim süresince, bilimsel kimliğimin oluşmasına katkıda bulunan, sabırla ve anlayışla her türlü yardımını sunan ve her zaman desteğini aldığım Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Doç.Dr.Kemal ÖZBİLGİN'e;

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimin oluşum sürecinde her türlü yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz Doç.Dr.Sevinç İNAN ve Yard.Doç.Dr.Seda VATANSEVER'e;

Çalışmalarım sırasında hiçbir yardımını esirgemeyen ve her zaman desteğini hissettiren asistan arkadaşım Serap CİLAKEK'e ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm güzelliklerini ve zorluklarını birlikte paylaştığım asistan arkadaşlarım Meryem KATIRCIOĞLU, Burcu NARLIKUYU, İsmail ÇETİN ve Can KÖSE'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca hep yanımda olan asistan arkadaşım Aynur ÇETİNKAYA'ya, tez yazımında bana yardım eden arkadaşlarım Ayşe GÜNEY ve Hilay ÖZTAN'a;

Tez çalışmalarımın öncesinde ve sonrasında bilgi birikimlerini ve her türlü imkanlarını sunan Yard.Doç.Dr.Tümer PALA'ya, en sıkışık dönemlerimde bana yol gösteren ve yardımcı olan Doç.Dr.Tamer ŞANLIDAĞ'a;

Tüm çalışmalarımızda desteğini her zaman hissettiğimiz rektörümüz sayın Prof.Dr.Cemil ÖZCAN'a;

Bu yoğun dönemde bana her türlü desteği veren ve yaşamım boyunca bana çok şanslı olduğumu hissettiren anneme, babama ve sevgili kardeşime

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

ÖZET

İmplantasyon, iki farklı organizma olan embriyo ve anne endometriyumu arasında gerçekleşen ve birbirini takip eden üç fazdan oluşan (uterusa geçiş, adezyon ve invazyon) biyolojik bir olaydır. Embriyo ve endometrium arasındaki bu karşılıklı ilk sosyal ve fiziksel etkileşim, üreme tıbbının hala çözemediği bir paradokstur. İmplantasyonun en çok merak uyandıran yönü ise, ilk bakışta sadece iki organizmanın teması gibi düşünülse de, bugün bile hala hepsi çok net ortaya çıkarılamamış yüzlerce molekül ve mekanizmanın kontrolü altında olduğu gerçeğidir. Adezyon molekülleri bu konunun en ilgi çekici ve karmaşık yönünü temsil etmektedir. Bu çalışmanın amacı sıçan endometriyumlarında, reseptif ve implantasyon aşamasında rol alan adezyon moleküllerini ve implantasyona etkilerini araştırmaktır.

Bu amaçla çalışma grubu olarak belirlenen (n=20) dişi sıçanlar gebeliklerinin 5., 6. ve 7. günlerinde sakrifiye edilmek üzere deneye alındı. Histolojik çalışmalar sonucu desidual reaksiyona ilk olarak gebeliğin 5. gününde rastlandı. Reseptif dönem olarak kabul edilen 6. gündeki, genişlemiş desidual reaksiyon alanlarında TGF- α , laminin, kollajen IV, fibronektin, integrin $\alpha 3$, αv , $\beta 1$ yoğun olarak gözlemlendi. İmplantasyon dönemi olarak kabul edilen gebeliğin 7. gününde, endometrium epitelinde ve trofoblast hücrelerinde laminin, $\alpha 3$, $\beta 1$, TGF- α , IL-1 β ve TNF- α immünoaktivitelerinin oldukça arttığı görüldü. Anti-adeziv molekül olan MUC1'in ise gebe olmayan normal uterus epitelinde çok yoğun bir reaksiyon gösterirken, gebeliğin 6. gününde azalarak 7. günde ise tamamen ortadan kaybolduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, gebeliğin 5. gününde desidualizasyonun henüz başlamış olduğu ve 6. günde bu alanda yoğun olarak gözlenen laminin, kollajen IV ve fibronektinin desidual hücrelerin proliferasyonunda önemli rol oynadığı kanısına varıldı. Normal uterus kuvvetli eksprese edilen MUC1 molekülünün ise, 6. günde azalarak embriyonun tutunmasını sağlayan adezyon moleküllerinin açığa çıkmasını sağladığı ve bu açığa çıkan moleküllerden laminin, kollajen IV, fibronektin, integrin $\alpha 3$, αv ve $\beta 1$ 'in adezyon fazında önemli rol oynadığı, TGF- α , kollajen IV, IL-1 β ve TNF- α 'nın ise invazyon fazında fonksiyon gösterdiği ortaya çıkarıldı.

SUMMARY

Implantation is a biologic phenomena which requires a communication between two different organisms and consists of three consecutive phases: apposition, adhesion and invasion. This first social and physical interaction between the embryo and the endometrium is a paradox that the reproductive medicine has not yet been resolved. The most curious aspect of implantation is that at first sight, it occurs under the control of hundreds of molecules and mechanisms which have not been clearly described. Adhesion molecules represent the most interesting and most complicated aspects of this matter. The aim of this study is investigate the effects of adhesion molecules which play a role during the endometrial receptivity and implantation stages in rat endometrium.

With this purpose, female rats (n=20) at the fifth, sixth, and seventh gestational days were sacrificed (experimental gorup) to study the period of implantation. Histological studies revealed that the first decidual reaction was observed on the fifth pregnancy day. TGF- α , laminin, collagen IV, fibronectin, integrin $\alpha 3$, αv , $\beta 1$ were stained strongly during the sixth day of pregnancy that was considered to be the receptive period in the enlarged desidual reaction regions. During the seventh day that was considered to be the implantation period, increased immunoreactivities of laminin, $\alpha 3$, $\beta 1$, TGF- α , IL-1 β and TNF- α in the epithelium of endometrium and trophoblast cells were observed. While immunoreactivity of MUC-1, an anti-adhesive molecule, was observed strongly in the normal uterus epithelium, it was decreased on the sixth day, and disappeared on the seventh day.

In conclusion, the decidualization process just begins on the fifth day of gestation and laminin, collagen IV and fibronectin that has observed to be intensively expressed in this region on the sixth day may play a major role in the proliferation of decidual cells. MUC1 molecule which is strongly expressed in the non-pregnant uterus has decreased on the sixth day and allowed the release of the adhesion molecules enabling the attachment of the embryo. While adhesion molecules of laminin collagen IV, fibronectin, integrin $\alpha 3$, αv and $\beta 1$ play an important role in the adhesion phase, TGF- α , collagen IV, IL-1 β and TNF- α display function in the invasion phase.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Resimler Dizini	x
Tez Metni	
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 İmplantasyon	2
2.2 Apozisyon	2
2.2.1 Ovaryal ve Endometriyal Siklus	3
2.2.1.1 Oogeneze	3
2.2.1.2 Follikülogenez	3
2.2.1.3 Ovulasyon	5
2.2.1.4 Endometriyal Siklus	6
2.2.1.5 Fertilizasyon	9
2.2.2 Endometriyumdan Salınan Sinyaller	12
2.2.2.1 EGF ailesi	13
2.2.2.2 LIF	18
2.2.2.3 Sitokinler	20
2.2.2.4 MUC-1	24
2.2.3 Embriyodan Salınan Sinyaller	27
2.2.3.1 EPF	27
2.2.3.2 PIF	27
2.2.3.3 PAF	28
2.2.3.4 Büyüme Faktörleri	28
2.2.3.5 Sitokinler	29
2.2.3.6 Prostaglandin	29

2.2.3.7 hCG ve IFN- δ	30
2.2.3.8 LIF	30
2.3 Adezyon	31
2.3.1 Adezyon molekülleri	33
2.3.1.1 Kaderinler	34
2.3.1.2 Selektinler	36
2.3.1.3 Ig süperaillesi	36
2.3.1.4 Ekstrasellüler matriks proteinleri	38
2.3.1.4.1 Glikozaminoglikanlar	38
2.3.1.4.2 Yapısal Glikoproteinler	41
2.3.1.4.3 İntegrinler	49
2.3.1.4.3.1 Endometriyal integrinler	55
2.3.1.4.3.2 Embriyonik integrinler	59
2.4 İnvazyon	61
2.4.1 İnvazyon Faktörleri	63
2.4.1.1 Matriks Metalloproteinazlar	64
2.4.1.2 Plazminojen Aktivatörleri	65
3.MATERYAL VE METOD	66
3.1 Işık Mikroskopik Gereç ve Yöntemi	67
3.2 İndirek İmmünohistokimya Yöntemi	69
4.BULGULAR	72
4.1 Histokimyasal Bulgular	72
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular	77
5.TARTIŞMA	83
6.SONUÇLAR	99
7.KAYNAKLAR	101
8.RESİMLER	130

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CAM:	Hücre adezyon molekülü
CSF-1:	Koloni stimüle edici faktör
E2:	Östrojen
EC:	Hücre dışı (ekstraselüler)
ECM:	Ekstrasellüler matriks
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
EMA:	Epitelyal membran antijeni
EPF:	Erken gebelik faktörü
FAK:	Fokal adezyon kinaz
FRP:	Folikül düzenleyici protein
FSH:	Folikül stimüle edici hormon
GAG:	Glikozaminoglikan
GMG:	Granüllü bez hücreleri
GnRH:	Gonadotropin salgılatan hormon
HB-EGF:	Heparini bağlayan epidermal büyüme faktörü
hCG:	İnsan koriyonik gonadotropini
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
HIP:	Heparan sülfat proteoglikan etkileşim proteini
HSPG:	Heparan sülfat proteoglikan
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP:	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
IL:	İnterlökin
IL-1R TI ve T2:	İnterlökin tip1 ve tip2 reseptörü
IL-1ra:	İnterlökin-1 reseptör antagonisti
INF δ :	İnterferon gama
IVF:	İn vitro fertilizasyon
LH:	Luteinize edici hormon

LIF: Lösemi inhibe edici faktör

MMP: Matriks metalloproteinaz

MT-MMP: Membran tip matriks metalloproteinaz

MUC-1: Musinojen-1

OMI: Oosit matürasyon inhibitörü

P4: Progesteron

PAF: Trombosit aktive edici faktör

PAI: Plazminojen aktivator inhibitörleri

PDGF: Trombositlerden farklılaşan büyüme faktörü

PEM: Polimorfik epitelyal musin

PGF_{2α}: Prostaglandin F_{2α}

PGFE₂: Prostaglandin E₂

PIF: Preimplantasyon faktörü

RGD: Arginine, glycine, aspartate aminoasit dizisi

RT-PCR: Polimeraz zincir reaksiyonunda zıt kopyalama

TGF- α ve β : Dönüştürücü büyüme faktörü alfa ve beta

TNF- α : Tümör nekrotik faktör

TPA: Serine tip proteinaz

uPA: Ürokinaz tip proteinaz

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ZP: Zona pellusida

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 4.1: Kontrol Grubu (KG): Gebelik olmayan sıçan uterusunda H.E boyanması.	130
Resim 4.2: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda mesometrium kısmında H.E boyanması.	130
Resim 4.3: Deney Grubu (DG) : Gebeliğin 5. gününde sıçan uterusunda H.E boyanması.	131
Resim 4.4: D.G.: Gebeliğin 5. gününde uterustaki GMG hücreleri.	131
Resim 4.5: D.G.: Gebeliğin 6. gününde sıçan uterusunda H.E boyanması.	132
Resim 4.6: D. G.: Gebeliğin 6. gününde desidual hücreler ve GMG hücreleri.	132
Resim 4.7: D. G.: Gebeliğin 7. gününde sıçan uterusunda H.E boyanması.	133
Resim 4.8: D. G.: Gebeliğin 7. gününde implante embriyonun H.E boyanması.	133
Resim 4.9: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda PAS boyanması.	134
Resim 4.10: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterusta PAS boyanması.	134
Resim 4.11: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki PAS boyanması.	135
Resim 4.12: D. G.: Gebeliğin 7. gününde lümen epitelinin ve embriyonun Pas boyanması.	135
Resim 4.13: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Masson Trikrom boyanması.	136
Resim 4.14: D. G.: Gebeliğin 6. gününde Masson Trikrom boyanması.	136
Resim 4.15: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Masson Trikrom boyanması.	137
Resim 4.16: D. G.: Gebeliğin 7. gününde lümen epitelinde ve embryoda Masson Trikrom boyası.	137
Resim 4.17: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda MUC-1 boyanması.	138
Resim 4.18: K. G.: Uterus lümen epitelinde ve stromada MUC-1 boyanması.	138
Resim 4.19: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterusta MUC-1 boyanması.	139
Resim 4.20: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki MUC-1 boyanması.	139

Resim 4.21: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Laminin boyanması.	140
Resim 4.22: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki Laminin boyanması	140
Resim 4.23: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Laminin boyanması.	141
Resim 4.24: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Kollajen IV boyanması.	142
Resim 4.25: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki Kollajen IV boyanması.	142
Resim 4.26: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Kollajen IV boyanması.	143
Resim 4.27: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Fibronektin boyanması.	144
Resim 4.28: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki Fibronektin boyanması.	144
Resim 4.29: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Fibronektin boyanması.	145
Resim 4.30: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda TGF- α boyanması.	146
Resim 4.31: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki TGF- α boyanması.	146
Resim 4.32: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki TGF- α boyanması.	147
Resim 4.33: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda IL-1 β boyanması.	148
Resim 4.34: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki IL-1 β boyanması.	148
Resim 4.35: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki IL-1 β boyanması.	149
Resim 4.36: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda TNF- α boyanması.	150
Resim 4.37: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki TNF- α boyanması.	150
Resim 4.38: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki TNF- α boyanması.	151
Resim 4.39: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda integrin β 1 boyanması.	152
Resim 4.40: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki β 1 boyanması.	152
Resim 4.41: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki integrin β 1 boyanması.	153
Resim 4.42: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda integrin α 3 boyanması.	154
Resim 4.43: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki integrin β 1 boyanması.	154
Resim 4.44: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki integrin α 3 boyanması.	155
Resim 4.45: K. G.: Gebelik olmayan sıçan uterusunda integrin α v boyanması.	156
Resim 4.46: D. G.: Gebeliğin 6. gününde uterustaki integrin α v boyanması.	156
Resim 4.47: D. G.: Gebeliğin 7. gününde uterustaki integrin α v boyanması.	157

1.GİRİŞ

Embriyonun anne endometriyumuna ulaşması ile başlayan, tutunması ve gömülmesi ile tamamlanan implantasyon süreci gebeliğin gerçekleşmesinin en önemli aşamasıdır. İmplantasyon, hem embriyonun hem de endometriyumun katıldığı oldukça karmaşık olaylar zinciri sonucunda gerçekleşmektedir. İmplantasyona etki eden çok sayıda faktörden söz edilmesine rağmen, henüz nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir.

İmplantasyonun gerçekleşmesini sağlayan faktörler hem anneye hem de embriyoya bağlı olabilir. Bu faktörlerden bir veya daha fazlasının eksikliği implantasyon bozukluğuna, dolayısı ile infertiliteye neden olacaktır. İnfertilite vakalarının tedavisi için uygulanan in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemiyle en kaliteli embriyolar seçilip verilmesine rağmen, embriyoların implantasyon şansı ancak % 20-30' dur (1,2). Toplumda % 10 oranında rastlanılan infertilite vakalarının çoğunun tedavisi, implantasyona etki eden faktörlerin tam olarak açıklanabilmesi sonucunda mümkün olabilecektir.

Birbirinden immünolojik ve genetik olarak tamamen farklı iki organizmanın birleşerek implantasyonu gerçekleştirebilmesi için, hem endometriyumun reseptif hale gelmesi, hem de embriyonun blastosist aşamasına gelerek endometriyuma ulaşması gerekmektedir. Bu mekanizmada, ovaryan steroidlerden sitokinlere, adezyon moleküllerinden Hox genlerine kadar hayli karmaşık ve hepsi birbiriyle bir şekilde ilişkili bir çok faktör rol oynamaktadır. Bu konuda yapılan pek çok klinik çalışma olmasına rağmen, implantasyon dönemine ait adezyon moleküllerinin rolü hakkındaki bilgiler hala yeterli değildir (3-10).

Bu çalışmada, implantasyon araştırmaları için en uygun model olarak kabul edilen ratlarda preimplantasyon ve implantasyon dönemindeki endometriyum ve embriyodaki adezyon molekülleri değişikliklerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İMPLANTASYON

İmplantasyon, embriyo ve endometriyumun aktif olarak eşzamanlı katıldığı dinamik bir hazırlık ve karşılaşma süreci sonucunda, embriyonun uterus duvarına tutunup gömülme işleminin tamamlanması olayıdır (11).

Menstrüel periyod içinde, ovulasyondan yaklaşık 7-8 gün sonra endometriyumun implantasyona hazırlanması hormonların kontrolü altındadır. Sekresyon döneminde artış gösteren progesteron (P4), endometriyumun hazırlığı için tek başına yeterli değildir. İmplantasyonun gerçekleşmesi için belli düzeyde östrojen (E2) seviyesine de ihtiyaç duyulmaktadır (12,13). Bu hormonların etkisi altında olan endometrial dokuda 'implantasyon penceresi' adı verilen değişiklikler ortaya çıkmaktadır.

İmplantasyon temel olarak: **Apozisyon** (Blastosistin birçok önemli aşamadan geçerek uterusu ulaşması ve implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçmesi), **Adezyon** (Ovulasyondan 7-8 gün sonra zonasından ayrılmış blastosistin endometrial epitel yüzeyine bağlanması) ve **İnvazyon** (Embriyonik trofoblastın endometriyuma penetre olması, bazal membranı yok ederek stromaya girmesi) adı verilen 3 belirgin, bağlantılı ve ardışık evre sonucunda gerçekleşir.

İmplantasyona etki eden faktörlerin anlaşılabilmesi ancak implantasyonun her üç aşamasının bilinmesi ile mümkün olabilecektir.

2.2 APOZİSYON

Apozisyon, fertilizasyondan sonra blastosist haline gelmiş olan embriyonun uterusu ulaşmasını ve implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçmesini tanımlayan terimdir. Blastosistin uterus kavitesine yerleşmesi, implantasyonun ve gebeliğin ilk adımıdır. Bu ana işlem: gamet matürasyonu, fertilizasyon, embriyo yarıklanması ve uterusu giriş aşamaları sonucunda gerçekleşir (Şekil 2.2.1). Bu nedenle implantasyonun mekanizmalarını inceleyebilmek için, önce bu aşamaları gözden geçirmek gereklidir.

2.2.1 Ovaryal ve Endometriyal Siklus

2.2.1.1 Oogenez

Oogenez, oogonyumlardan farklılaşan dişi gamet oositlerin, üretimi ve matürasyonu anlamına gelmektedir. Oosit yapımı ve matürasyonu uzun bir süreçte gerçekleşir: fetal hayatta başlar ancak fertilizasyon sırasında tamamlanır. Bu nedenle oogenez prenatal ve postnatal olmak üzere iki ayrı dönemde incelenir.

Prenatal dönem: Vitellus kesesi duvarından köken alan primordiyal üreme hücreleri dişi gonadına ulaşır ve oogonyumlara farklılaşır. Oogonyumların bir kısmı mitozla çoğalmasına devam ederken, bir kısmı da büyüyerek primer oositlere dönüşür. Oluşan primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. 7. ayda ovaryum yüzeyinde sadece birinci mayoz bölünmeye girmiş primer oositler bulunur ve etraflarındaki yassı epitelle birlikte primordial follikül adını alır.

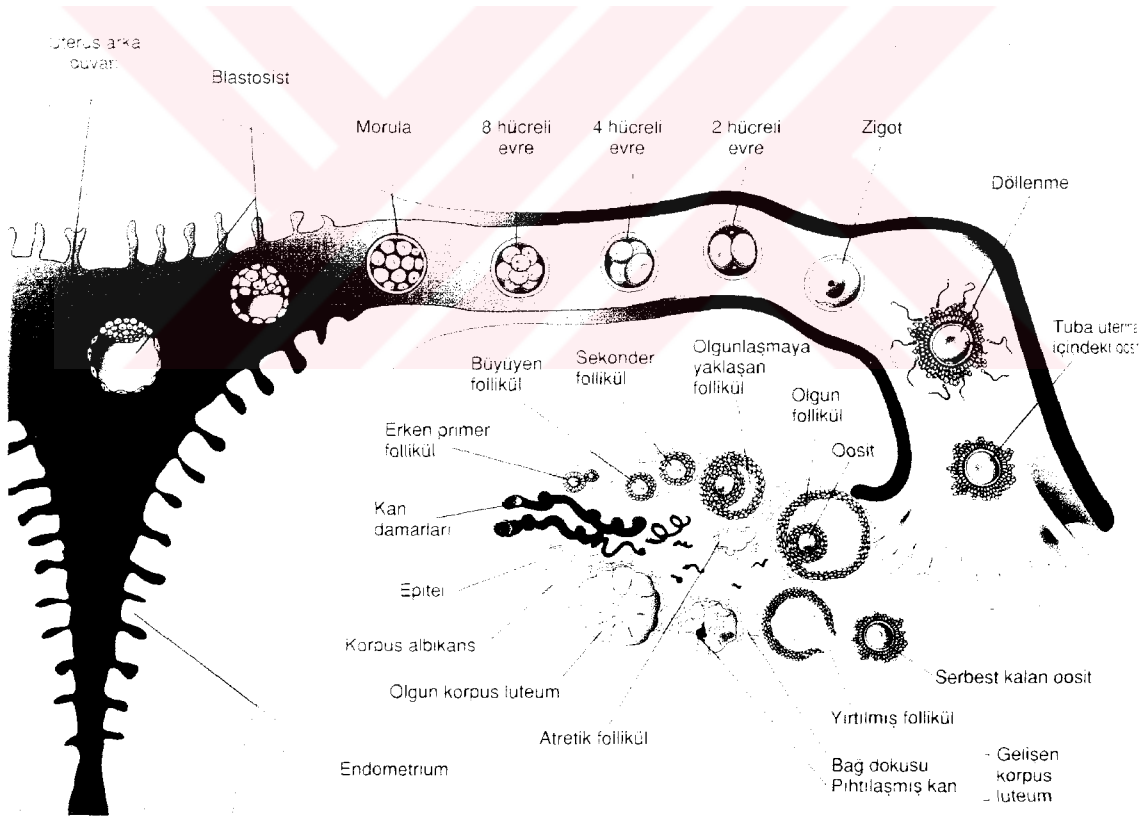
Postnatal dönem: Doğuma yakın fetusun overlerinde (birinci mayozun profazında), diploten adı verilen istirahat döneminde duraklamış yaklaşık 700 bin - 2 milyon civarında primer oosit bulunmaktadır. Bu oositler puberteye kadar bu durumda kalırlar ve bu dönemden itibaren metafaz bölünmesini devam ettirirler. Follikül hücreleri tarafından salınan oosit maturasyon inhibitörü (OMI: Oosit Maturation Inhibitor) adlı bir madde hücrelerin bölünmesini baskılar. Reprodüktif dönem boyunca 400-500 civarı oosit matürasyona ulaşarak ovulasyonla atılır (14).

2.2.1.2 Follikülogenez

Overlerin korteksine yerleşmiş olan folliküllerin sayı ve gelişim evresi dışının üretkenlik durumu ve yaşı ile ilgili olarak değişkenlik gösterir. Folliküller gelişmekte olan ve dinlenme döneminde olanlar olarak ikiye ayrılır. Gelişen folliküller ise primer, sekonder, tersiyer ve atretik olarak sınıflandırılır. Overlerden salgılanan follikül düzenleyici protein (FRP: Follicular Regulatory Protein) hangi follikülün gelişeceğini belirleyen ana faktördür (15).

Her ovaryal siklusa 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal follikül olgunlaşmaya başlar ancak tek bir oosit olgunlaşarak ovulasyon ile atılır. Bu olayda etkili faktör, hipofizden salgılanan gonadotropinlerdir (FSH ve LH).

Menstrüel siklusun başlangıcında ilk salgılanan folikül stimulan hormon (FSH: Follicule Stimulating Hormone)'dur. Bu hormon granüloza hücrelerinden aromatzasyon sonucu östrojen (E2) üretimini sağlar (16). Follikül içi artan östrojen konsantrasyonu granüloza hücreleri için çoğalmayı stimule eden bir faktördür. Aynı zamanda artmış kan östrojen seviyesi hipofizi etkileyerek luteinizan hormon (LH: Luteinizing Hormone) pikine neden olur. LH ise teka hücrelerinden androjen üretimini gerçekleştirir (13). Teka tabakası interna ve eksterna olarak farklılaşır. İki hücre-iki gonadotropin sistemi şeklinde açıklanan teoriye göre, sekonder ve tersiyer follikülde FSH reseptörleri yalnız granüloza hücrelerinde, LH reseptörleri yalnız teka hücrelerinde bulunur (17,18).



Şekil 2.2.1 Apozisyon fazı: gamet matürasyonu, fertilizasyon, embriyo yarıklanması ve uterusu giriş aşamalarını içerir.

2.2.1.3 Ovulasyon

Ovulasyon, FSH ve LH hormonlarının etkisiyle hızla büyüyen olgunlaşan graaf follikülündeki oositin overlerden atılmasıdır. Oosit çevresindeki kumulus ooforus hücreleri zona pellusida çevresinde yeni bir düzen içine girerek korona radiatayı oluşturur. Oosit, etrafındaki granüloza hücreleriyle birlikte kumulus ooforus bölgesinde bir miktar sıvıyla birlikte serbest kalarak, over yüzeyinde gezinmeye başlar. Oositin tam overden atıldığı anda artık birinci mayoz bölünme tamamlanır ve sekonder oosit ikinci mayoz bölünmesine başlar.

Ovaryan folliküller belirgin bir steroid hormon siklusuna sahiptir. Teka interna ve eksterna hücreleri östrojen, progesteron ve androjen sentezi için gerekli enzimleri içerirler. Preovulatuvar faz başında granüloza hücreleri östradiol ve androstenedion salgırlar. Östradiol major steroiddir ve granüloza hücrelerinin ileri gelişimi için önemlidir (16). Ovulasyonun gerçekleşmesi için FSH ile stimule olan hücrelerin çoğalması, östradiol sentezinin artması ve LH ile indüklenen steroidogenezin olması gereklidir (13). Serum östradiol seviyeleri artınca FSH salınımı baskılanmakta, östrojenin yüksek seviyelere ulaşması ile birlikte ortalama 14-24 saat sonra LH piki gerçekleşmektedir. LH piki follikül rüptürüne neden olan olayları başlatır. LH pikinden ortalama 10-12 saat sonra ovulasyon gerçekleşmektedir (14,19,20). Pozitif ve negatif feedback mekanizmaları pitüiter ve hipotalamus düzeyinde etkili olmaktadır. Ovulasyon sonrası ise LH'nin etkisi ile granüloza hücreleri progesteron ve östradiol sekrete eden hücrelere dönüşürler. Teka hücreleri ise primer olarak androstenedion ve az miktarda östradiol sentez ederler. Androstenedion granüloza hücrelerine taşınarak östrojen prekürsörü olarak kullanılır (21). FSH yüksek seviyede iken stromal doku östradiol üretir. FSH ve LH yüksek seviyede ise progesteron, androstenedion ve testosteron üretir. Bu durum menopozdaki yüksek androstenedion salınımını açıklar.

Ovulasyon sonrası ise yalnız LH yüksekliği devam eder, bu da korpus luteumun devamlılığı için gereklidir. Progesteron seviyelerine paralel olarak FSH üzerine negatif etkisi olan inhibin salınımı başlar (22). Midluteal faza gelindiğinde progesteron, östradiol ve inhibin maksimum seviyelerine ulaşırlar (23). Bundan sonra gebeliğin gerçekleşmesine göre; ya korpus luteum gelişmeye devam edecek ya da gebelik gerçekleşmezse regrese olacaktır.

2.2.1.4 Endometriyal siklus

Endometriyum 28 günde bir kendini yenileyen dinamik bir dokudur. Menarş ile başlayan endometriyumun siklik değişiklikleri hormonal kontrol altındadır. Hipotalamus hücreleri tarafından üretilen gonadotropin salgılatan hormonun (GnRH:Gonadotropin Releasing Hormone) hedefi ön hipofizdeki bazofilik hücrelerdir. Bazofilik hücrelerin bir tipi olan gonadotroplar hipotalamustan salgılanan hormonların etkisi ile gonadotropinler olan FSH ve LH'ın salgılanmasına neden olur (24) (Şekil 2.2.2). Bu hormonlar menstruasyona neden olan, endometriyal siklustan sorumlu östrojen ve progesteronun ovaryum tarafından salınmasını sağlar (25). Endometriyumda bulunan östrojen ve progesteron reseptörleri bu hormonlara karşı cevap oluşmasında rol oynar. Steroid yapıda olan bu hormonların reseptörleri protein yapıdadır ve yüksek affiniteye sahiptirler.

Menstrüasyon fazı

Birçok kadında menstrüel kanama 4 ± 1 gün sürer. Siklusun 28. günü endometriyumun yüzey epitelinin altındaki stromada kan göllenmeleri ve inflamatuvar bir yapı oluşur. Siklusun 2. günü fonksiyonel tabakada belirgin dejeneratif değişiklikler başlar (24). Fonksiyonel tabaka dökülürken bu alanlar bazal tabakadan köken alan hücreler tarafından yeniden döşenmeye başlar. Menstrüasyon döneminde serum östrojen ve progesteron seviyeleri düşük seviyelerdedir ve bazal tabakada mitotik aktivite artmıştır. Siklusun 4. gününde uterusun hemen hemen $2/3$ 'ü yeni epitelle döşenmiştir (26).

Proliferasyon fazı

Östrojen sekresyonunun artması ile ortaya çıkan proliferasyon fazı ovaryan folliküllerin büyümesi ile ilişkilidir. Östradiol, DNA-promotor enzim olan timidilat sentetazı artırmakta ve böylece DNA sentezine neden olmaktadır. Böylece 6. günde tüm kavite reepitelize olur ve endometriyal mukoza kalınlaşır (27). Bu dönemde stromada vaskülarizasyon izlenirken, başlangıçta bezlerdeki belirginleşen mitoz, 7-11. günlerde stromal, vasküler hücrelerde de çok belirgin hale gelir. Artmış mitotik aktivite

embriyo implante olacağı için fonksiyonel tabakanın üst 1/3'ünde daha belirgindir. Endometriyumun alt bölgelerinde ise bezler büyüyüp genişler ve sekretuar fonksiyon hızlanır.

Bu dönemde hücre reseptörlerinde ve morfolojisinde de değişiklikler gerçekleşir. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin sayısı artarken, endometriyal epitel ve bezlerde silyalar ve mikrovilluslar artar (28). Bu değişiklik östrojen bağımlı bir olaydır.

Sekresyon fazı

Ovulasyon gerçekleşikten sonra, östrojen ve progesteron birlikte hareket eder ve endometriyumda sekretuar değişikliklere neden olurlar. Bu dönemin ilk morfolojik belirtisi ovulasyonun 3. gününde yani siklusun 16. gününde bez epitel hücrelerinin bazalinde ortaya çıkan küçük silindirik vakuollerdir. Bu progesteronun etkisi olmayıp ovulatuvar olmayan, yalnızca östrojene maruz kalmış endometriyumda da görülür. Bu dönemde elektron mikroskopik incelemede bu hücrelerde dev mitokondriler ve nükleolar kanal sistemi gözlenir (29). Nükleolar kanal sistemi yalnızca postovulatuvar olarak ve progesteron etkisiyle nükleer membranların katlanması sonucu ortaya çıkar. İntrasellüler glikoprotein sentezinin artması sonucu bezler genişler ve 19-20. günlerde apokrin tipte bir sekresyon bez lümenine salınır. Bu yapısal değişiklikleri glikoproteinlerin ve peptidlerin endometriyal kaviteye salgılanması takip eder. Endometriyal sekresyonlara plazmanın transudasyonu da katılır ve siklusun 21. günü pik yapar. Bu dönemde bezlerde mitoz çok azalmıştır.

Mid ve geç luteal faza geçildiğinde progesteron düzeyi artar ve progesteronun hücreleri istirahat fazına geçirici etkisi nedeni ile mitoz inhibisyonu belirginleşir. Endometriyal siklusun 21. gününde bezlerden çok stromadaki değişiklikler göze çarpar. Değişiklikler, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ve prostaglandin E_2 ($PGFE_2$) aracılığı ile olmakta ve östrojen $PGF_{2\alpha}$ 'yı, progesteron ise her ikisini stimule etmektedir (30). Bu değişiklikler sonucunda stromada ödem olduğu ve spiral arterlerin kıvrımlar yaptığı gözlenir. Yapılan in vitro rat deneylerinde endometriyumda ince damarların duvarlarında fenestralar olduğu gösterilmiştir (31).

Arteriollerin etrafındaki fibroblastlarda predesidual transformasyon siklusun 23. günü başlar. 25. günde tüm stroma yüzeyel epitelinin kompakt tabakasını birlikte

kapsayan stromal reaksiyon oluşur. 27. günde reaksiyon fonksiyonel tabakanın üst kısımlarını da kapsar. Bu değişiklikler predesidualizasyon adı altında toplanır.

Ovulasyon sonrası 7-13 (siklusun 21-27.) günler arasına implantasyon dönemi veya implantasyon penceresi adı verilir. Bu dönemde implantasyon için maksimum hazırlık yapılır ve endometriyum reseptivitesi en yüksek seviyededir (8).

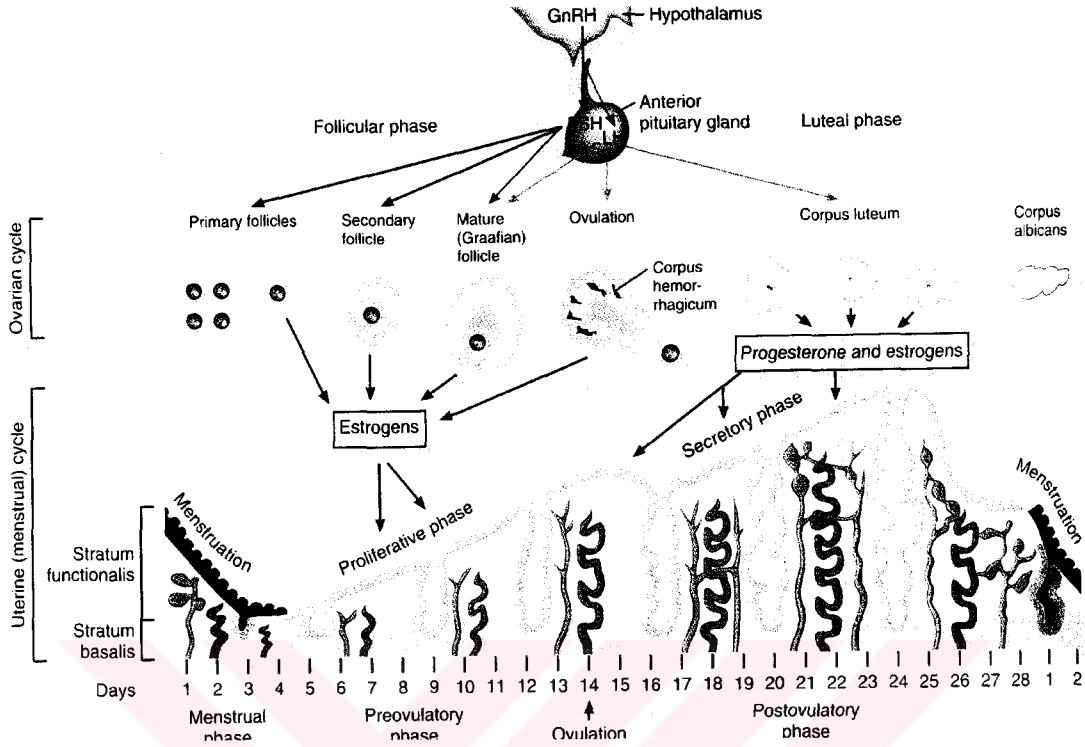
Endometriyal yıkım fazı

Fertilizasyon olmadığında trofoblastlardan insan koriyonik gonadotropini (hCG: Human chorionic gonadotrophin) desteği olmayacağından korpus luteum dejenerasyona uğrar, östrojen ve progesteron seviyeleri düşmeye başlar. Östrojen ve progesteron çekilmesi endometriyumda vazomotor reaksiyon, apoptozisin gerçekleşmesi, doku kaybı ve menstruasyon olaylarını başlatır (24).

Sekretuar faz başında lizozom içinde olan asit fosfataz ve güçlü litik enzimler progesteron seviyelerindeki düşmeyle birlikte membran stabilizasyonlarını koruyamazlar. Hücrelerden açığa çıkan enzimler sitoplazmaya salınır böylece endometriyal hücre yıkımı başlar. 26. günde ise polimorfonükleer lökositler ekstravaze olurlar. Doku yıkımı ile birlikte nekroz ve vasküler tromboz gözlenir. 28. günde ise spiral arteriyoller dilate olurlar. Yüksek seviyelerdeki $PGF_{2\alpha}$, vazokonstriksiyonu ve myometrium kasılmasını stimule ederek menstruasyonu başlatır (32).

Endometriyal yıkımdaki en önemli adımlardan biri de hücre-hücre adezyon moleküllerinin anahtar proteinlerinden olan kadherinlerin çözülmesidir. Endometriyal hücreler birbirleriyle bağlanırken transmembran proteinleri olan kadherinleri kullanırlar. Bu hücreler, hücre içinde aktin filamentlerine katenin arcılığıyla bağlanır (33). Ayrıca endometriyal yıkım sırasında, ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerini ve bazal membranı sindiren matriks metalloproteinazlar içerilir.

Bu metalloproteinazlardan kollajenazlar intersitisyel ve bazal membran kollajenlerini; jelatinazlar kollajeni; stromelysinler fibronektin, laminin ve glikoproteinleri sindirirler. İnsan endometriyumunda metalloproteinazların ekspresyonu menstrüel siklusla bağlantılıdır. Progesteronun çekilmesi ile birlikte endometriyal hücreler metalloproteinaz sekresyonunu indükler (34).



Şekil 2.2.2 Endometriyal ve ovaryan siklus hormonal kontrol altındadır.

2.2.1.5 Fertilizasyon

Fertilizasyon spermatozoanın sekonder oositle birleşmesi ve kaynaşmasıdır. Sperm dişi üreme kanallarında 24-48 saat canlı kalırken, sekonder oosit ovulasyondan sonra 12-24 saat canlı kalır (24). Dişi genital üreme kanalları içine giren spermatozoa başlangıçta oositi dölleyecek yetenekte değildir. Dölleme yeteneğini kazanmak için, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu denilen değişimleri geçirmek zorundadır.

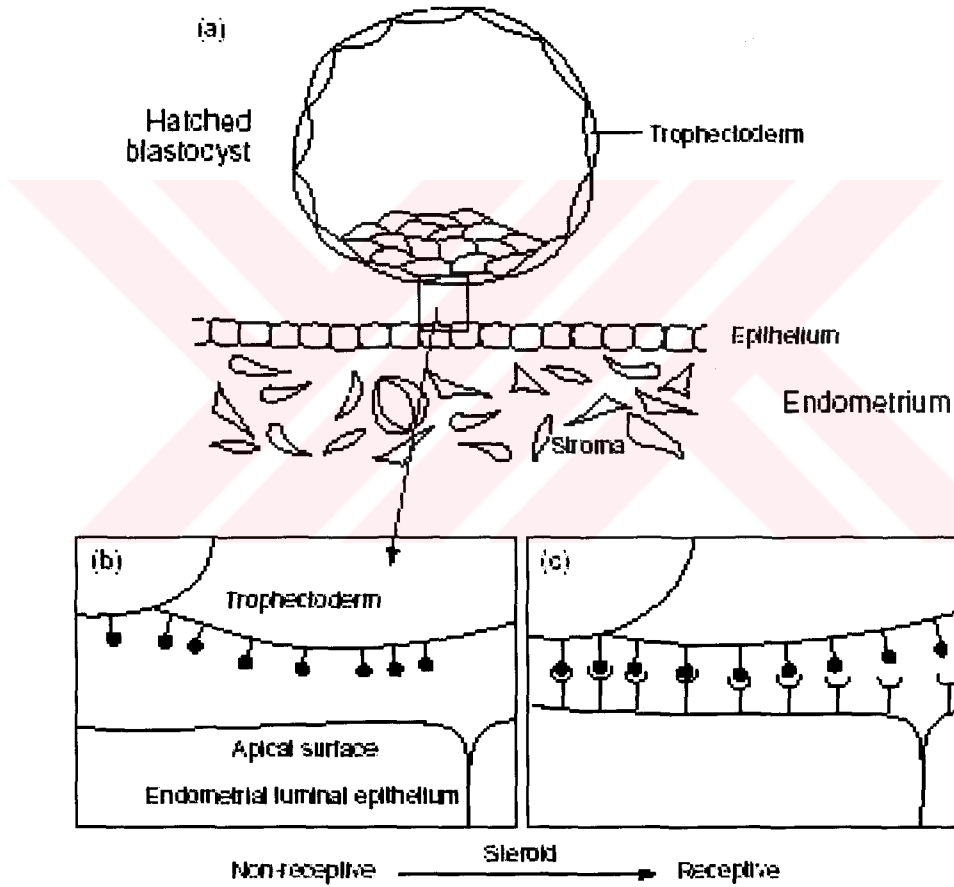
Kapasitasyon; Bu süre içinde spermatozoanın akrozomal bölgesini çevreleyen plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıf ve seminal plazma proteinleri ortadan kaldırılır ve fertilizasyon için uygun hale gelir. **Akrozom reaksiyonu;** spermin zona pellusidaya bağlanmasının ardından oluşur ve zona proteinleri tarafından başlatılır. Bu reaksiyon, zona pellusidaya spermin penetrasyonu için gerekli olan, tripsin benzeri maddeler, akrozin ve diğer bazı enzimlerin salgılanmasıyla en üst noktaya ulaşır (35).

Fertilizasyon üç evrede gerçekleşir: Spermatozoanın korona radiatayı delip geçmesi; zona pellusidayı delip geçmesi; oosit ve sperm hücre zarlarının kaynaşması. Spermin akrozomundan salgılanan enzimlerin etkinliğiyle ovumun etrafındaki korona radiata hücreleri dağılır. Spermin ve ovumun üzerindeki karbonhidrat yapılı reseptörler birleşmeyi sağlar. Zona pellusida (ZP) spermin ovuma bağlanmasını kolaylaştıran ve akrozom reaksiyonunu başlatan glikoprotein yapısında ZP1, ZP2, ZP3 adlı 3 glikoproteinden oluşmuş bir zardır (36). Sperm başındaki bu glikoproteine özel reseptörler bağlanmayı sağlar. Bağlanınca akrozin ve nöramidaz enzimleri zona pellusidayı eritir. Zona pellusidanın geçirgenliği spermin başının oositin yüzeyine temas etmesiyle değişir ve oosit hücre zarı ile sperm hücre zarı birleşip zona reaksiyonunu başlatırlar.

Zona reaksiyonu ilk sperm geçtikten sonra başka spermin geçişine izin vermez. Sperm baş ve kuyruğu ile içeri girmiş (37), bu arada oosit II. mayozunu bitirmiştir. Dış ve erkek pronukleusu erir ve bu dönemde iki pronukleus morfolojik olarak ayırt edilemez. Çekirdek zarlarının birleşmesi ile ortaya çıkan hücreye zigot adı verilir.

46 kromozomlu zigot yarıklanma (cleavage) denilen hızlı mitoz dönemine girerek hücre sayısını hızla arttırır. Her yarıklanma bölünmesi sonrasında oluşan bu hücrelere blastomer denir ve sekiz-hücre evresine kadar gevşek bir hücre kümesi halindedir. Üçüncü yarıklanmadan sonra blastomerler daha sıkı temasa geçerek, birbirlerine daha sıkı bağlarla tutunan kompakt bir hücre topu haline gelirler ve bu aşamaya kompakşın adı verilir. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra, kompakşına uğramış olan embriyo yeniden bölünerek 16-hücreli morula haline dönüşür ve hCG salgılamaya başlar. Morulanın iç hücreleri embriyo dokularını oluşturacak iç hücre kitlesine, dış hücreleri ise daha sonra plasentayı oluşturacak trofoblastlara dönüşürler. Fertilizasyondan sonra yaklaşık 24-48 saat içinde erken gebelik faktörü (EPF: Early Pregnancy Factor) salgılanmaya başlar. Anne kanında bu ölçülebilen en erken gebelik testini oluşturur (38). Bu arada blastosist uterusu ulaşmış ve hücrelerarası boşlukların birleşmesiyle blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur. Bu dönemdeki embriyoya da blastosist denir. Blastosistin iç tarafında kutuplaşmış olan iç hücre kütlesi embriyoblast, dış hücre kütlesi ise trofoblast adını alır (24).

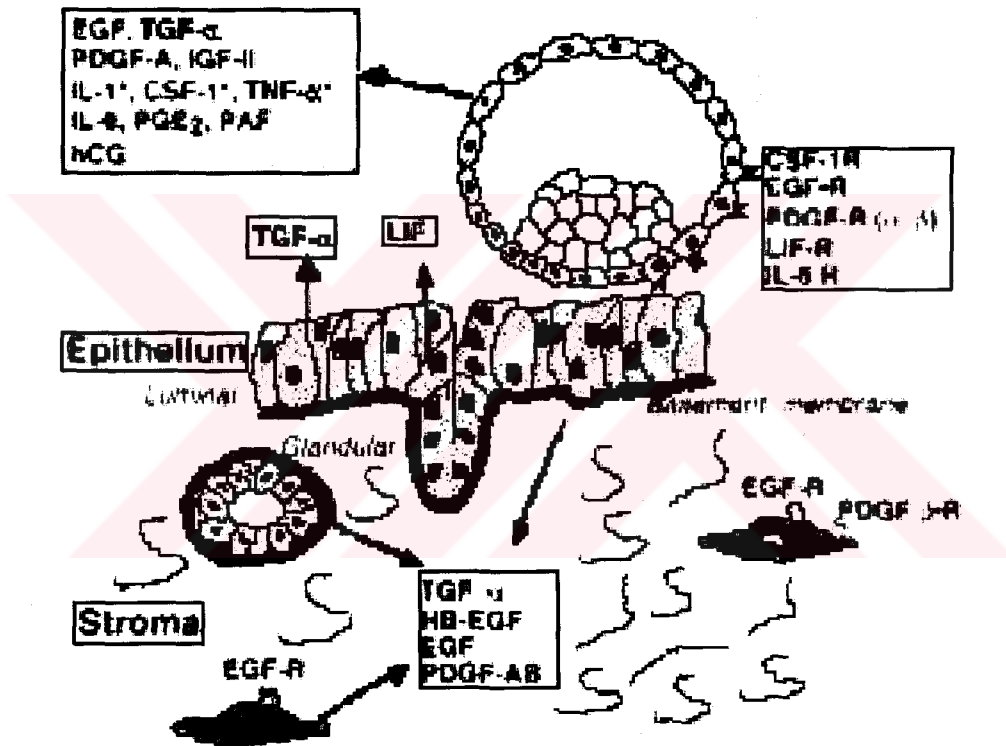
Embriyonun implantasyona hazırlık aşamasında karşılıklı ve eş zamanlı olarak her iki organizmadan da bir takım sinyaller salınır. Endometriyumdan ve embriyodan salınan bu sinyaller uterusun reseptif olmayan aşamadan reseptif aşamaya geçişini sağlayarak, implantasyon mekanizmasının gerçekleşmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir (Şekil 2.2.3).



Şekil 2.2.3 (a) Zonasından ayrılmış olan blastosist iç hücre kümesi en yakın olacak şekilde endometriyal lümen epiteline yaklaşır. (b) Epitelde reseptif olmayan fazdan reseptif faza geçiş direkt veya indirekt hormonal aktivite tarafından sağlanır. (c) Reseptif faza geçiş ile epitelyal apikal yüzeyde adezyon moleküllerinin açığa çıkması aynı zamana denk gelmektedir.

2.2.2 ENDOMETRİYUMDAN SALINAN SİNYALLER

Pre ve periimplantasyon dönemi boyunca östrojen ve progesteron, endometriyumun implantasyona hazırlanmasını ve reseptivitesini düzenlerler. Bu düzenlenmenin sonucunda memeli endometriyumunda yüzlerce molekülün salınımı tetiklenir (Şekil 2.2.4).



Şekil 2.2.4 İmplantasyondan önceki embriyo-maternal yaklaşma. Birçok büyüme faktörü ve reseptörleri embriyo ve endometriyumdan eksprese edilir. EGF-reseptör ligandları ve LIF endometriyum tarafından eksprese edilir. Uterus epitelyal hücreleri, TGF- α ve LIF eksprese ederken, stromal hücreler EGF ve EGF reseptörlerini baskın olarak eksprese ederler.($\star$ ile gösterilen faktörler 2-8 hücreli embriyoda da tespit edilmiştir)

2.2.2.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ailesi

EGF (Epidermal Growth Factor)

Büyüme faktörlerinin EGF ailesi: EGF, dönüştürücü büyüme faktörü- α ve - β (TGF- α & - β : Transforming Growth Factor), heparin bağlayan büyüme faktörü (HB-EGF: Heparin Binding Growth Factor), betasellülin ve amfiregülini içerir (39). EGF, 6 kDa ağırlığında olup çeşitli hücrelerin proliferasyonunu stimüle eden ve potent mitojen olarak bilinen bir büyüme faktörüdür. EGF, bütün büyüme faktörleri gibi, hücrelerin yüzeyindeki düşük-kapasiteli reseptörlere, spesifik yüksek bir affiniteyle bağlanır. Mezodermal ve ektodermal orjinli hücreler, keratinositler ve trofoblastlar üzerinde proliferatif etkiye ve bazı kanser türleri üzerinde negatif etkiye sahiptir. EGF ailesi üyeleri, endometriyumun stromal ve bez kısımlarının farklılaşması ve büyümesinde önemli rol oynamaktadır (40) (Şekil 2.2.4).

EGF'in insanlarda normal endometriyal siklusa bulunmadığı halde, gebelikte desiduada ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (41). Maymunlarda yapılan bir deneyde de insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I: Insulin-like Growth Factor-I) ve EGF'in endometriyumun bez epiteline bulundukları ve implantasyon bölgesinde değişikliklere uğradıkları gösterilmiştir (42). Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada kemirgenlerde implantasyon penceresi boyunca EGF ve EGF-benzeri moleküllerin kompleks bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (43). EGF veya TGF- α geni yok edilmiş farelerde yapılan araştırmalarda embriyo implantasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Fakat reseptör geninin delesyonu implantasyon bozukluklarına neden olmaktadır. EGF reseptörü yok edilen mutant -/- farelerin plasental defektler göstererek midgestasyon aşamasında öldükleri gözlenmiştir (44)

Ayrıca EGF'in bir östromedin olarak fonksiyon gösterdiği ileri sürülmüş ve in vivo olarak fare genital bölgesinin gelişme ve farklılaşmasını stimüle eden östrodiolun yerine geçebileceği gösterilmiştir (45). Johnson ve Chattergee östradiol yerine EGF'i intrauterin uyguladıklarında, blastosistlerin implantasyonu gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir (46). EGF'in bir diğer fonksiyonu ise embriyo gelişimini stimüle etmektir. Machida ve arkadaşları EGF ve TGF- α 'nın trofoblast gelişimini in vitro ortamda belirgin olarak stimüle ettiğini göstermişlerdir (47).

HB-EGF (Heparin Binding Growth Factor)

HB-EGF implantasyon penceresine yakın bölgede eksprese edilen EGF-benzeri moleküllerden biridir. HB-EGF salgılanmış bir membran-bağlanma büyüme faktörü olarak, embriyonik EGF reseptörünü bağlar ve embriyonun bağlanmasını ve farklılaşmasını kolaylaştırır (48). HB-EGF'in ekspresyonu blastosiste en yakın lümen epitelinde artar ve epitelin yüzeyinde heparine bağlanır. Bu büyüme faktörü, insan endometriyumu tarafından implantasyon penceresinin başladığı sırada eksprese edilir (49). İnsanlarda, ratlarda ve farelerde, HB-EGF'in uterus reseptivitesi boyunca geçici olarak eksprese edildiği birçok çalışmayla gösterilmiştir (49,50,51) (Şekil 2.2.4).

Ayrıca yapılan araştırmalarda, kültür ortamlarına HB-EGF'in eklenmesi ile yardımcı üreme teknikleri siklusunda insan embriyosunun kalitesinin arttırıldığı gösterilmiş ve insan endometriyumunda uterus reseptivitesinin diğer belirleyicilerini arttıran bir parakrin faktör olarak rol alabileceği düşünülmektedir (52).

TGF- α (Transforming Growth Factor-Alpha)

TGF- α , primer kaynağı tümör hücreleri olan ancak aktif makrofajlar, keratinositler ve bazı epitel hücrelerinde de tanımlanan büyüme faktörüdür. TGF- α kendi reseptörünü bağladığı gibi EGF reseptörüne de bağlanır ve bu etkileşimin büyüme faktörünün dönüştürücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (47).

TGF- α 'nın ekspresyonu, implantasyon periyodu boyunca memeli türlerine göre değişikliklik göstermektedir. Farelerde preimplantasyon periyodu sırasında uterusun myometriyal, stromal ve epitelyal hücrelerinden salınır (53,54) (Şekil 2.2.4). İnsanda ise EGF ve TGF- α desidualizasyon boyunca hücresel ve stromal proliferasyonu artırır (55). Koyunlarda, TGF- α ekspresyonu gebeliğin 15. ve 30. günleri arasında uterusu gözlenirken, EGF gözlenmemiştir (56). Domuz ve sığır embriyolarında gebeliğin 9. gününden 16. gününe kadar EGF gözlenirken (57), TGF- α ise domuz blastosistinin trofoblast hücrelerinde ve koyun embriyolarının endodermik hücrelerinde gözlenmiştir (58).

Yapılan deneylerde, anti TGF- α antikoru intralümen enjeksiyonundan sonra implantasyonun gerçekleşmemesi TGF- α 'nın implantasyon sırasında önemli rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (59). Fakat bazı çalışmalarda ise, TGF- α geni yok edilmiş farelerde de implantasyonun gerçekleşebildiği görülmüş ve bunun sebebi periimplantasyon boyunca uterusda EGF-bağımlı diğer büyüme faktörlerinin TGF- α 'dan daha fazla eksprese edilmesi ve implantasyon başarısızlığının EGF ailesinin diğer büyüme faktörleri tarafından telafi edilmesi nedenine bağlanmıştır (60).

TGF- α , yalancı gebelik görülen ratlarda kuvvetli bir desidual cevaba yol açmaktadır ve EGF ile karşılaştırıldığında bu etki 100 kez daha kuvvetlidir (59). Ayrıca Campbell ve arkadaşları tarafından TGF- α enjeksiyonunun steroidogenezisi inhibe ettiği rapor edilmiştir (61).

TGF- β (Transforming growth factor-beta)

TGF- β glikoproteinleri hücrelerin büyüme ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik rol oynayan hücre-sinyal moleküllerinin bir ailesidir. TGF- β , birçok sistein kalıntıları ile 225 kDa disulfid zincirli homodimer protein yapısı içeren 5 farklı izoformdan oluşur. Memelilerdeki izoformları olan TGF- β 1, β 2, β 3, β 4, β 5 özel genler tarafından kodlanır, fakat %75 amino asit dizisi paylaşırlar ve ortak orjinli genleri gösteren önemli yapısal özellikleri vardır (62). TGF- β ailesi aktivin A, B ve AB proteinleri ile inhibin A ve inhibin B proteinlerini içerir (63).

TGF- β 'nın parakrin ve otokrin etkileri yanı sıra endokrin etkileri de bulunmaktadır. Bu aktiviteler çok geniş olmakla birlikte 3 kategoride toplanabilir (62).

- 1-Hücre yaşamını belirleme ve hücre siklus devamının inhibisyonu,
 - 2-Ekstrasellüler matriks depozisyonunun indüksiyonu ve integrin ekspresyonunun düzenlenmesi,
 - 3-İmmünolojik düzenleme mekanizmaları.
- İlk iki özellik embriyonik gelişimde ve yetişkin doku yenilenmesinde merkezidir.

TGF- β immün cevabın düzenlenmesinde anahtar rolü oynayan faktörlerdendir. Lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücreleri içeren immün hücreler üzerinde proliferatif etkiler göstermektedir (64). TGF- β 'nın faaliyeti, sadece hedef hücrelerin değil, aynı zamanda diğer sitokinlerin bulunduğu ortamın farklılaşması ve sınırlandırılmasına bağlı olarak kompleks ve paradoksalıdır. Örneğin TGF- β , interlökin-2 (IL-2 Interleukine-2) aracılı lenfosit proliferasyonunu, sitokin sentezini ve sitolitik aktiviteyi inhibe ederken, interferon δ (INF δ) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α : Tumor Necrosis Factor α) TGF- β sinyalini inhibe ederler. Ayrıca, TGF- β 'nın proinflatuar sitokin ekspresyonunda baskılayıcı etkileri de vardır, örneğin TGF- β NK hücrelerde TNF- α ve INF δ 'nın sentezini inhibe eder (65).

İmplantasyonla ilgili olarak; TGF- β 1, transforme olmamış fibroblastlarda bağlanma olmaksızın farklılaşmayı indüklemeye yeteneğindedir. TGF- β 1 ve β 2 RNA'sı koyunların hem endometriyum hem de plasentasında gösterilmiş ve endometriyumun yapılanmasını ve ekstrasellüler matriksin depozisyonunu etkileyerek koriyon ve allantoinin oluşumunda önemli role sahip oldukları ileri sürülmüştür (66). TGF- α , EGF ve TGF- β 1'in plasental neovaskülerizasyonda rol oynayan anjojenik faktörler olduğu bilinmektedir (62). İnsan plasental dokularıyla yapılan hücre kültürlerinde TGF- β türlerinin trofoblastik hücre büyümesi ve farklılaşmasını indüklediği, ayrıca farelerde TGF β 1, β 2 ve β 3 genlerinin mezodermik yapıların gelişimini indüklediği gösterilmiştir (67).

IGF (Insulin Like Growth Factor)

IGF sistemi, implantasyonun yürütülmesinde ve endometrial siklusa anahtar rolü oynayan önemli büyüme faktörlerindendir (68). IGF-I ve IGF-II olmak üzere 2 alt ünitesi vardır.

IGF-I (Somatomedin C) yapısal olarak insülinle bağlantılı bir büyüme faktörüdür. IGF-I, hücrelerin büyüme hormonuna verdiği cevap sırasında ortaya çıkan en önemli protein olup özellikle kemik büyümesi üzerine hücresel aktivite dizilerinde fonksiyon gösterir. IGF-I yapısal benzerlikleri yönünden insüline göre, insülin reseptörünü daha düşük bir affiniteyle bağlayabilir. IGF-I ekspresyonu menstrüel siklus

boyunca değişen östrojen seviyeleriyle bağlantılıdır (69). Bu da IGF-I sentezinin östrojen tarafından düzenlendiğini ve endometriyumun östrojeni indükleyen büyüme faktörü tarafından desteklendiğini göstermektedir. Maymunlarla yapılan çalışmada IGF-I'in, östrojen ve östrojen + progesterona cevapta myometriyal büyümenin primer düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (70).

IGF-I proliferatif ve erken sekretuar endometriyumda baskın olarak salınırken, IGF-II orta ve geç sekretuar fazda görülür ve gebeliğin erken safhasında desiduada varlığını devam ettirir (71). IGF-II'nin orta-geç sekretuar fazda endometriyumda bol miktarda eksprese edilmesinin nedeni olarak progesteron faaliyetine aracı olduğu düşünülmektedir (72). Bu hormonal fonksiyonların yanı sıra, IGF-II invaze trofoblastta ve villuslarda çok miktarda eksprese edilir.

IGF-II sadece embriyonik ve neonatal dokularda eksprese edilir (Şekil 2.2.4). Doğumu takiben IGF-II'nin seviyesi belirgin olarak düştüğü için IGF-II'nin fetal büyüme faktörü olduğu düşünülmektedir. IGF-II reseptörü, lizozomal enzimlerin lizozomlarla birleşmesinden sorumlu mannose-6-fosfat reseptörü olarak da tanımlanır.

IGFBP (Insulin Like Growth Factor Binding Protein)

IGF'lerin biyolojik faaliyeti, IGFBP ailesi tarafından ayarlanır. IGFBP-1, 2, 3 ve 4 endometriyal stromal hücreler tarafından üretilir. IGFBP'nin sentezlenmesi ve salınımının insülin, IGF'ler ve relaksin tarafından düzenlendiği bilinmektedir (73).

Pre-implantasyon embriyolarının IGF ve IGFBP sentezlemeye başladığı gösterilmiş ve bu büyüme faktörlerinin etkilerinin implantasyondan önce başladığı ve implantasyonun hazırlanmasında ve yürütülmesinde anahtar rolü oynadığı ileri sürülmüştür (72). Han ve arkadaşlarına göre IGF-II ve IGFBP plasental gelişim ve fonksiyonu için, maternal desidual hücreler ve fetal trofoblastlar arasında hücre-hücre iletişimi için kullanılır (74). IGFBP-1, ilk tanımlandığında 'plasenta protein 12' olarak, ardından 'gebelik-bağılantılı α -globülin' olarak isimlendirilmiştir (75).

IGFBP-1, ilk orta-luteal faz endometriyumunda görülmeye başlar, gebeliğin ilk trimestrinde desiduada, amniyotik sıvıda ve dolaşımda en yüksek seviyede üretimine ulaşır ve 3. trimesterde belirgin olarak düşer (76). IGFBP-1'in desidual üretiminde morfolojik ve histolojik değişiklikleri progesteron tarafından artırılır.

IGF'lerin IGFBP'lerine bağlanması sekretuar fazda ve gebelik boyunca endometriyumda mitojenik aktiviteyi sınırlar. Ayrıca, desidual IGFBP-1, trofoblast invazyonunun kontrol edilmesine katkıda bulunur. Giudice tarafından, IGFBP-I'in desidualize endometriyal stromal kültürde trofoblast invazyonunu inhibe ettiği ve bununla trofoblast invazyonunda maternal direnç olduğu düşünülmektedir (76).

IGFBP ekspresyonunun yüksek seviyesi IGF üzerine indirekt etki yaparak implantasyonu önler. Ayrıca IGFBP-I ilk trimester trofoblastlara spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanma sırasında trofoblasttaki $\alpha 5\beta 1$ integrinini bağlar. Ayrıca fibronektine trofoblast bağlanmasını inhibe eder (76).

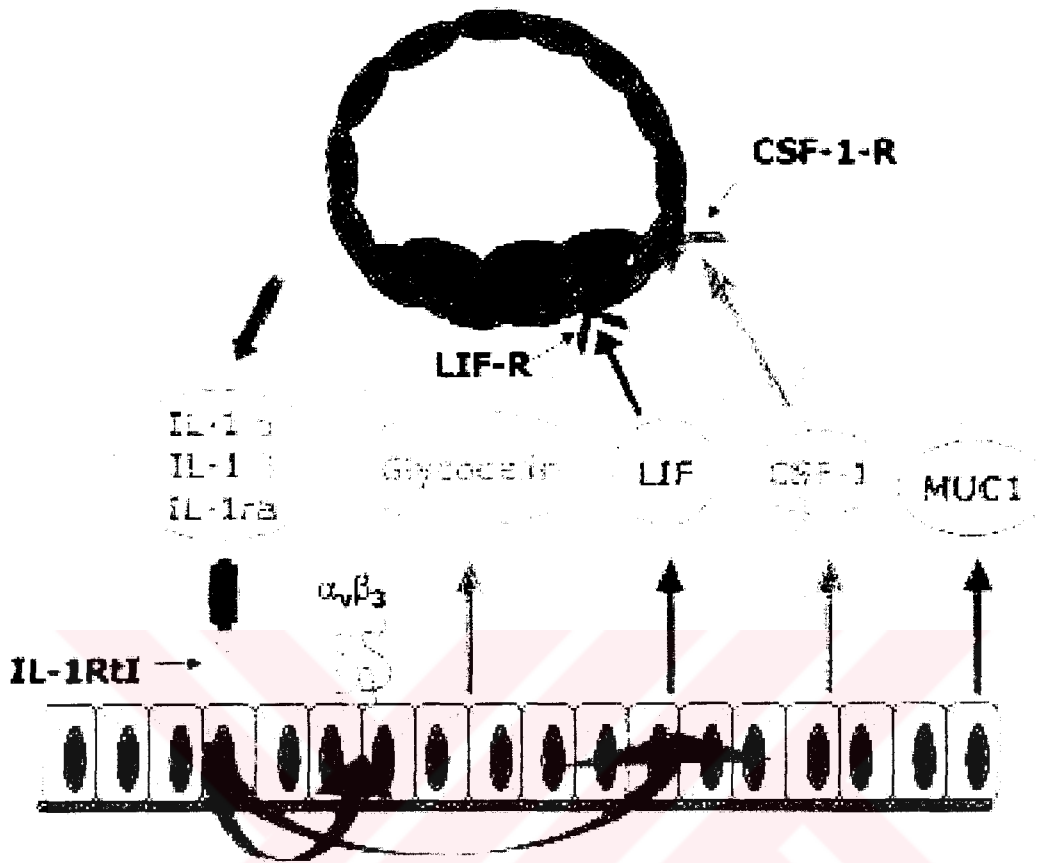
2.2.2.2 LIF (Leukemia Inhibitory Factor)

Lösemi inhibe edici faktör (LIF: Leukemia Inhibitory Factor), interlekin-6 ailesinden bir sitokindir ve bir çok farklı tip hücre üzerinde etkilere sahiptir (77). LIF reseptörlerini eksprese eden hücreler arasında, nöronlar, megakaryositler, makrofajlar, adipositler, hepatositler, osteoblastlar, myoblastlar gelmektedir.

Her memeli türü, kendi LIF'ine sahiptir ve bugüne kadar, farelerde, insanlarda, koyunlarda, domuzlarda ve ratlarda tespit edilmiştir (78). LIF reseptör kompleksi LIF reseptör β zinciri ve gp 130 reseptörlerinden oluşur (79).

Endometriyum implantasyonunun gerçekleşmesi için gerekli olduğu düşünülen sitokinleri özellikle de LIF'i salgılar (Şekil 2.2.5). Gebeliğin gerçekleşmesinde çok önemli bir rolü olduğu için bu glikoproteinle ilgili bir çok araştırma yapılmıştır (77-81). Bunlardan en önemlisi Stewart ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptıkları bir çalışmadır. LIF geni eksik farelerin embriyolarının normal olarak implante olamadıklarını görmüşler ve LIF'i peritoneal enjekte etmişlerdir. Sonuçta bir desidual cevap ortaya çıkmış ve embriyoların implante oldukları tespit edilmiştir (81).

Yapılan çalışmalarla yetişkin farenin endometriyal bezlerinde yüksek miktarlarda LIF'in eksprese edildiği gösterilmiştir (82). Farede, LIF'in bez ekspresyonu ilk ovulasyon sırasında artar ve menstrüel siklus boyunca düzenlenir. Vajinal plağın görüldüğü 1. gün bazal seviyeye düşer. Ardından 4. gün ekspresyonunda maksimal artış olur ve 5. gün tekrar bazal seviyeye düşer. LIF ekspresyonundaki artış ve düşüşler, östrojen seviyelerindeki değişikliklerle paralellik göstermektedir (83).



Şekil 2.2.5 İmplantasyondan önce blastosist ve endometriyum arasındaki etkileşimde açığa çıkan IL-1 α ve β , IL-1RT1 ve IL-1ra, LIF ve LIF-R, CSF-1 ve CSF-1-R, glikodelin, integrinler ve MUC1 gibi faktörlerin lokalizasyonu. IL-1'in embriyonik sekresyonu ve lümen epitelindeki IL-1 ile IL-R'nün bağlanması lokalizasyon değişikliklerini indükler ve integrin ile LIF ekspresyonunu artırır. Ayrıca blastosist lümen epitelinde MUC1'in yıkılmasını sağlayabilir.

İnsanda farklı menstrüel fazlardaki uterus dokularından alınan endometriyum, northernblat ile mRNA yöntemi ile incelendiğinde LIF seviyelerinin proliferatif fazda düşük, ovulasyondan sonra yüksek olduğu tespit edilmiştir (84,85).

LIF ile ilgili diğer bir araştırmada, Arıcı ve arkadaşları doz ve zaman bağımlı yöntemle, kültürdeki endometriyal stromal hücrelerdeki LIF ekspresyonunun, IL-1 α , TNF- α , trombositlerden farklılaşan büyüme faktörü (PDGF: Platelet Derived Growth

Factor), TGF ve EGF'in indükleyicileri olduğunu göstermişlerdir. Interferon δ ise LIF ekspresyonunu inhibe eder (85).

Piccini ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, LIF'in IL-4 ve Progesteron tarafından up-regule edildiğini göstermişlerdir. Normal menstruasyon gören kadınlarda LIF sekresyonu, ovaryan büyüme faktörlerinin etkisi altındadır ve ovaryan fonksiyonu olmayan kadınlarda bu faktörler yoktur (86).

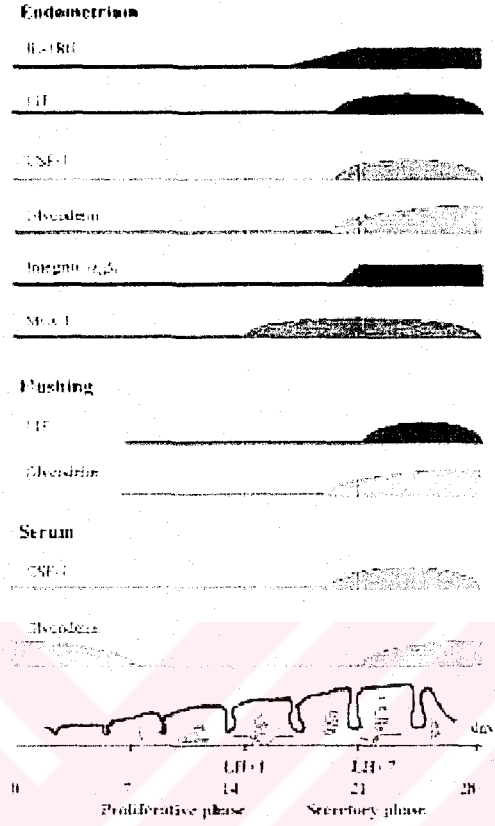
İnsanlarda LIF'in implantasyon periyodunda ilk ortaya çıkışı LH+7. gündür (LH'in pik yaptığı gün) (Şekil 2.2.6). Laird ve arkadaşları yaptıkları çalışmada LH+0'ıncı günden LH+6. güne kadar uterus sıvısında LIF gözlememişlerdir. LH+12. günde pik yaparken, LH+14. günde azaldığını tespit etmişler ve LIF'in fertil kadınlarda, infertil kadınlara göre belirgin olarak daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir (87).

LIF'in HOXA genleriyle de arasında ilişki bulunmaktadır. HOXA-10 (88), HOXA-11, Cox-2 (89) ve IL-2 reseptör (90) geni yok edilmiş farelerde desidualizasyon ve implantasyon defektleri görülmüş, ayrıca HOXA-11 geni eksik olan farelerde, LIF'in eksik olduğu tespit edilmiştir (91).

2.2.2.3 Sitokinler

Sitokinler fonksiyonları feedback mekanizması tarafından kontrol edilen glikoproteinlerdir. Doğal fonksiyonları düzenleyerek parakrin ve otokrin işlemlerde kısa süreli rol alırlar. Sitokinler, yüksek bir afiniteyle hücre yüzey reseptörlerinin etkileşimi ve hücre genlerin transkripsiyonunu düzenlerler. Bu değişmiş transkripsiyon, hücre davranışındaki değişikliklerle sonuçlanır.

Sitokinlerden IL-1, IL-6, koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-I: Colony-stimulating factor-1) ve TNF- α 'nın implantasyonda önemli role sahip oldukları düşünülmektedir.



Şekil 2.2.6 Blastosist ile endometriyum arasındaki etkileşiminde rol alan faktörlerin menstrüel sıklusa göre değişen dağılımlarının profili.

IL-1 (Interleukin-1)

IL-1, immün cevabı belirleyen başlıca interlökinlerden biridir. En önemli fonksiyonu antijenlere karşı T hücrelerinin aktivasyonunu arttırmaktır. T hücrelerinin aktivasyonu sonucunda IL-2 ve IL-2 reseptörünün T hücre üretimi daha da artar. IL-1 sisteminin 2 ligandı (IL-1 α ve IL-1 β) ve bir doğal reseptör antagonisti (IL-1ra) bulunmaktadır. 2 tane IL-1 reseptörü bilinmektedir (IL-1RTI ve IL-1RTII). Tip I reseptörü yaygın olarak eksprese edilir ve ligand bağlanması sinyal dönüşümüyle sonuçlanır. IL-1 sinyali, özellikle Tip I reseptörleri aracılığıyla oluşur. Tip II reseptörü primer olarak lökositlerden eksprese edilir.

İnsanlarda IL-1 ailesinden, IL-1 β , IL-1RTI ve IL-1ra'nin endometriyum, endometriyal sıvı, insan embriyoları ve anne-embriyonik kısım arasında bulundukları

bilinmektedir (92,93,94). İnsan endometriyumunda IL-1 α ve IL-1 β immünoaktivitesi endotelyal hücrelerde gösterilmiş olmasına rağmen, IL-1RTI primer olarak menstrüel siklusta luteal faz boyunca endometriyum epitelinde mRNAsı artan seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (95,96). Gebeliğin 3-9. gününde rekombinant IL-1ra'nın intraperitoneal enjeksiyonu ile implantasyonun tamamen bloklandığı Simon ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (97). Bu da IL-1 sisteminin farede embriyo bağlanmasında önemli rolü olduğunu göstermektedir (Şekil 2.2.4). Fakat bunun tam tersi olarak, fonksiyonel IL-1TI reseptörü eksik olan farelerin normal doğurdukları da gözlenmiştir (98).

Embriyo, endometriyal kaviteye girdiğinde, endometriyal epitelyal hücrelerin varlığına cevap olarak IL-1 sistemini (IL-1 α , IL-1 β ve IL-ra) salgılar (93,94) (Şekil 2.2.5). Blastosist, β 3 integrinin up-regülasyonu ile maternal endometriyal epitel hücreleriyle aktivasyona girer, bu aktivasyon, embriyonik IL-1 α ve IL-1 β 'nın endometriyal epitel IL-1RTI'e bağlanmasıyla tetiklenir (99). Bu IL-1 indüklenmiş endometriyal β 3 up-regülasyonu, fonksiyonel olarak önemlidir. Çünkü blastosistin endometriyal epitelyal hücrelerine yapışma yeteneğini artırır. Bu nedenle endometriyal ve embriyonik IL-1 sistemi arasındaki ayar embriyonik implantasyon için önemlidir (99).

IL-6 (Interleukin-6)

IL-6 makrofajlar, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve aktive T helper hücreleri tarafından üretilir. IL-6, IL-1 ve TNF- α gibi T hücrelerinin aktivasyonunu içeren immün cevapta benzer rolü oynar. IL-6, immünglobülinlerin üretimini ve glukokortikoid sentezini artırır ancak, IL-1, IL-2 ve TNF- α gibi sitokinlerin ekspresyonunu indüklemez (100).

Memelilerin plasenta ve uterusunda, IL-6 geninin ekspresyonu çalışmalarla ortaya konmuştur (101). Bu çalışmalarda IL-6 geni eksik mutant farelerin üreyebildikleri görülmüş, bu nedenle araştırmacılar tarafından IL-6'nın embriyo implantasyonu veya gebeliğin yürütülmesinde gerekli olmadığı düşünülmüştür (102). Ancak, IL-6'nın gebelikte diğer genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde fizyolojik

bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (103). Ayrıca IL-6, domuz blastosistinin bağlanma bölgesine yakın kısımda, lokal ve endometriyal inflamasyon sırasında gözlenmiştir (104).

CSF-1 (Colony Stimulating Factor)

CSF-1, fibroblastlar, monositler, makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından eksprese edilen bir büyüme faktörüdür. İmplantasyon sırasında CSF-1'in endometriyal epitelyal hücreler, stromal hücreler ve trofoblast hücreleri tarafından eksprese edildiği bilinirken (Şekil 2.2.5), CSF reseptörü olan protoonkogen c-fms'in embriyo ve plasentada eksprese edildiği bilinmektedir (105).

CSF-1'in implantasyon sırasında fare uterusunda arttığı ilk olarak Bartocci ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (106). CSF-1'in fertilitede önemli rolü olduğu osteopetrotik farelerde (op/op) yapılan deneylerle gösterilmiştir. Osteopetrotik mutant farelerin CSF-1 geni eksiktir ve infertildirler. Bu fareler, fertil erkeklerle çiftleştirildiklerinde implantasyon hataları gözlenmiştir. (107). Osteopetrotik erkek farelerde ise libido ve sperm sayısında azalma görülmüştür. Dişi farelerde ise östrosiklusunun uzadığı ve zayıf bir ovulasyonun gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu etkiler, sekonder olarak gonadlarda steroidogenezis bozukluklarına, bu da makrofaj davranışlarının değişimine neden olur (108). Ayrıca Kauma ve arkadaşları tarafından menstrüel siklus boyunca CSF-1 ve c-fms'in özellikle geç sekretuar fazda ve gebeliğin erken dönemlerinde arttığı gözlenmiştir (109) (Şekil 2.2.6).

TNF- α (Tumor Necrosis Factor)

TNF- α aktif makrofajlar tarafından üretilen 17 kDa'luk polipeptittir. IL-1 gibi immün cevabı değiştiren önemli sitokinlerdendir. Yine IL-1 gibi diğer otokrin büyüme faktörlerinin ekspresyonunu indükler, büyüme faktörlerine karşı verilen hücresel cevabı artırır ve proliferasyona yol açan sinyal yolunu indükler (110). TNF- α , EGF ve PDGF ile bazı hücre tipleri üzerinde sinerjistik etkiye sahiptir. Diğer büyüme faktörleri gibi, TNF- α , birçok interlökin ve nükleer protoonkogenlerin ekspresyonunu indükler.

TNF- α 'nın farklı trofoblast tabakaları tarafından eksprese edildiği gösterilerek, implantasyonda önemli rolü olan sitokinler arasında sınıflandırılmıştır (111,112) (Şekil

2.2.4). Kültürü yapılan blastosistin gelişmekte olan trofoektoderminde TNF- α 'nın spesifik bağlanması gerçekleşmesi, trofoblast büyümesinde biyolojik etkileri olduğunu ve implantasyonun gerçekleşmesinde kritik rol oynadığını göstermektedir. Yelavarthi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, gebeliğin 5. gününde TNF- α mRNA'sını uterus lümen epitelinde göstermişlerdir (112). Pampfer ve arkadaşları indirekt immüno Floresan tekniği ile TNF- α 'nın fare blastosistine özellikle de iç hücre kitlesine bağlandığını göstermişlerdir (113). Ayrıca TNF- α 'nın trofoektoderm hücreleri üzerine inhibe edici etkisi yokken, iç hücre kitlesinin proliferasyonu üzerine inhibe edici etkisi olduğunu bulmuşlardır (113). Hampson ve arkadaşları ise, ilk trimester insan plasentasının sinsityotrofoblast ve ekstrasitotrofoblastına düşük afiniteli TNF- α reseptörünün bağlanmasını göstermişlerdir (114). Chen ve arkadaşları, TNF- α transkriptlerinin ve proteinlerinin ilk trimester insan plasentasının desidual hücrelerinde ve sinsityotrofoblastlarda bulunduğunu göstermişlerdir (111). TNF- α 'nın sinsityotrofoblasta spesifik bağlanması sonucu, sitokinlerin uteroplasental yapıda otokrin ve parakrin rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle plaseenta tarafından hCG gibi hormonların salgılanmasına sitokinlerin aracı olabileceği düşünülmektedir.

2.2.2.4 MUC1

MUC1 moleküler ağırlığı 250-500 kDa büyüklüğünde olan, moleküler yapısı antiadeziv özelliğiyle bağlantılı bir glikoproteindir (115). MUC1 geni kromozom 1'in uzun kolunun 21. bandına yerleşmiş, endometriyum epitelinin hücre yüzey bağlantılı bir sekretuar ürünüdür. Ayrıca, polimorfik epitelyal musin (PEM), episalin ve epitelyal membran antijeni (EMA) olarak bilinen çeşitleri vardır (115). MUC1'in fare genindeki aminoasit dizileri 16 tekrar içerirken, insanlarda 20'den 125'e kadar çeşitlilik göstermektedir (116). İnsanlardaki MUC1'in yüksek sayıda O-glikosilasyon sitelerinin varlığı, bu molekülün yüksek polimorfik genetik çeşitlilik taşıdığını gösterir.

Musinler hücre yüzeyini enzimatik olarak dirençli hale getirirlerken reseptörleri, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks adezyon çiftlerinin girişini sınırlar ve hücreleri, immün sistemden korurlar. MUC1 eksprese eden hücrelerde, adezyon ve antiadezyon kuvvetleri arasında hassas bir denge vardır. Yani MUC1 selektin

ligandlarını taşıdığı için integrinlerin aracılık ettiği hücre adezyonunu arttırabilirken, ekspresyonunu arttırarak anti-adezyon fonksiyonu da gösterir.

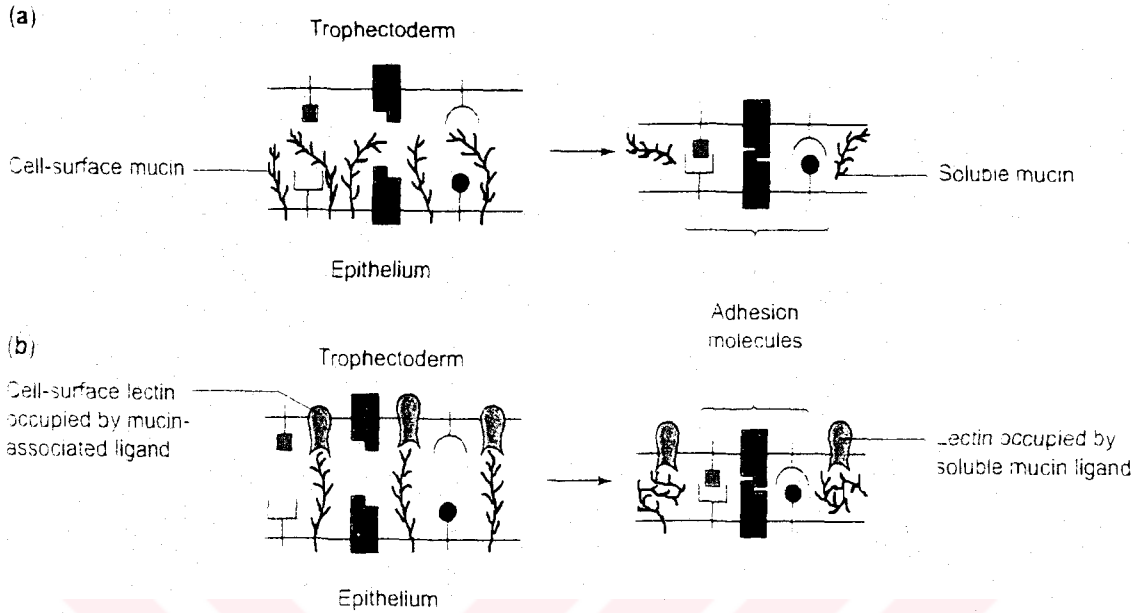
MUC1'in endometriyumda ekspresyonu menstrüel sıklusa göre ve türden türe çeşitlilik gösterir. Yapılan çalışmalara göre MUC1 epitel hücrelerinden özellikle apikal hücre yüzeyindeki mikrovillus ve silyalardan kuvvetlice eksprese edilir. İmplantasyon fazı boyunca yüzey epitelinde down-regule edilir (118,119,120).

Farelerde MUC1 musin formu antiadeziv bariyerdir ve ovulasyondan sonra progesteron tarafından kontrol edilen down-regulasyonu embriyo bağlanması için gereklidir (118,121). Farelerde, MUC1 ekspresyonunda azalma hem mRNA hem de protein seviyesinde görülür ve MUC1 ekspresyonu uterus reseptivitesiyle tam ters olarak bağlantılıdır. Bu bulgulara dayanarak MUC1'in down-regulasyonunun blastosist tarafından üretilen sinyaller aracılığıyla gerçekleştirildiği düşünülmektedir (119). Ancak sadece insanlarda bu durum tam tersidir. Apozisyon fazı boyunca MUC1 ekspresyonu endometriyum epitelinde maksimum seviyededir, implantasyon boyunca direnir (Şekil 2.2.6), sadece implantasyonun gerçekleşeceği bölgede lokal olarak azaldığı tespit edilmiştir (115). Menstrüel siklusu iyi tespit edilmiş kadınlardan alınan endometriyal örneklerde MUC1 proteini ve mRNA seviyelerinin implantasyon penceresi boyunca azalmadığı, farelerde de tam tersinin gerçekleştiği gösterilmiştir (115,122).

MUC1 ektodomeinleri, geniş ve yaygın yapılardır ve blastosistin endometriyum lümenine bağlanması sırasında ilk karşılaştığı hücre yüzey bileşenleridir (117). Bir çok çalışmada MUC1'in insan ve diğer memelilerin implantasyonundaki rolü araştırılmakta, fakat gerçek rolü tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte fonksiyonun 2 şekilde gerçekleştiği hipotezi vardır:

1-Çözünebilir MUC1 implantasyon fazında hücre yüzeyinden proteolitik yıkılma veya uçları birbirine yapışma sonucu ortadan kalkar ve böylece serbest kalan adezyon molekülleri arasında bağlanma gerçekleşir (Şekil 2.2.8-a).

2-Trofoektoderimde bulunan hücre yüzey lektinlerine, endometriyal musindeki glikan yapıları primer olarak bağlanır ve böylece serbest kalan diğer adezyon sistemlerinin arasında sekonder bağlanma görülür (Şekil 2.2.8-b).



Şekil 2.2.8- (a) MUC1'in proteolitik yıkılma veya uçlarının bağlanması sonucu ortadan kalkması. (b) Trofoektoderm yüzey lektinleri ile endometriyal musindeki glikanların bağlanmasıyla oluşan ortadan kalkma hipotezi.

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, infertil kadınlarda, MUC1'in küçük allel geni yüzünden embriyo başarısızlıkları görüldüğü hipotezi savunulmaktadır (116). Horne ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, açıklanamayan infertilitesi olan ve IVF siklusunda en az 3 başarısızlığa uğrayan 10 kadından alınan kan örneklerindeki DNA ekstratları normal 10 kadıninkine kıyaslandığında, küçük MUC1 allellerine daha fazla rastlamışlardır (116). İnfertil kadınlarda bu allellerin büyüklüklerinin arasındaki farkların embriyoda implantasyon bozukluklarına yol açtığını bulmuşlardır ve buradan çıkarttıkları sonuca göre açıklanamayan infertilitenin MUC1'de polimorfizm ile bağlantılı olabileceğini ve O-glikosilasyon sitelerinin sayısında önemli bir azalmanın implantasyon bozukluklarına yol açabileceğini öne sürmüşlerdir (120,123).

Sonuç olarak MUC1 anti-infektif özelliği olduğu kadar, düşük standart blastosistin lümen epiteline adezyonunu önleyen seçici bir bariyer olarak rol oynar. Tekrarlayan düşük olgularında, gelişimsel kuvveti azalmış embriyoların implantasyonuna izin verildiği için MUC1 eksikliği olduğu düşünülmektedir (120).

2.2.3 EMBRİYODAN SALINAN SİNYALLER

2.2.3.1 EPF (Early Pregnancy Faktör)

EPF sadece gebeliğe spesifik bir faktör değildir. Preimplantasyon embriyoları, embriyonal organlar, plasenta, kanser dokuları, rejenere organlar ve kültür medyumunda bir çok hücre tarafından eksprese edilir (124). Son zamanlarda stres proteini olarak adlandırılan 'chaperonin 10' olarak bilinmektedir.

Anti-EPF antikorumları ile immünize edilen farelerde implantasyon oranlarının azaldığı görülmüştür (125). Bu da EPF'nin embriyo veya implantasyon sitesi üzerinde direkt etkisi olduğunu göstermektedir (Şekil 2.2.4). Lokalizasyon çalışmaları EPF antikorumlarının, çoğunlukla trofoektoderimde ve az bir bağlanma ile iç hücre kütlesinde lokalize olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, EPF hem immünosupresif ajan, hem de büyüme faktörü olarak nitelendirilebilir (126).

Klinik çalışmalarda, EPF'nin fertilizasyondan sonra maternal sistemde kısa süre ortaya çıktığı ve embriyonun yaşamını devam ettirmesiyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca EPF moleküllerinin, mitojenik stimülasyondan sonra lenfositler tarafından eksprese edilen spesifik reseptörlere bağlanması aracılığıyla T ve B hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı da bilinmektedir (127). Embriyoda EPF-benzeri aktivitenin varlığı, in vitro fertilizasyona maruz kalan hastaların gebeliklerinin başarıyla doğru orantılıdır. Aynı zamanda EPF, IVF'ten sonraki embriyonik hücre bölünmesi ve folliküler gelişime yardımcı olmak için FSH ve estradiol ile etkileşime geçebilir (128).

Sonuç olarak, EPF gebelikte immün cevapla ilişkilidir veya daha genel olarak organizmanın proliferasyonu ile ilişkilidir. Fakat EPF embriyoya spesifik olmadığından, implantasyondan önce embriyonun yaşamasında limitli bir klinik role sahiptir.

2.2.3.2 PIF (Preimplantation Factor)

PIF, hücresel immün-sistemi ayarlayan embriyo kökenli faktördür. Lenfosit / Platelet bağlayıcı fonksiyon gösterir. İnsan ve fare embriyo kültürlerinde 2 hücreli aşamada gösterilmiştir (129) ve embriyo transferinden sonraki 4 gün boyunca ve intrauterin inseminasyonundan 5-6 gün sonra maternal sirkülasyonda ortaya çıkarılmıştır (130). Gebelik başarısızlıkla sonuçlandığında PIF, hCG'nin azalmasından

önce hızla dolaşımdan kaybolur (130). Son çalışmalara göre PIF 5 farklı memeli tipinde: insan, fare, domuz, at ve ineklerin edometriyumunda ortaya çıkarılmıştır (131). Bu çalışmalara göre, PIF immün sistemin ayarlanmasında da görev almaktadır ve gebeliğin devamı ve embriyonun yaşaması için gerekli çevrenin oluşmasını sağlar.

2.2.3.3 PAF (Platelet Activating Factor)

Fertilizasyondan kısa bir süre sonra embriyoyu çevreleyen ortamda ortaya çıkarılmış, düşük moleküler ağırlıklı asetilgliserofosfolipidlerin bir sınıfıdır. PAF, farede fertilizasyondan kısa bir süre sonra varolan geçici trombositopenia'den sorumludur (132). Gebelikte PAF folliküler sıvıda, endometriyum ve embriyonik sıvıda bulunur (133). PAF'ın gebelik dışındaki olaylarda; örneğin hücre-hücre ilişkisi, damar geçirgenliğindeki değişiklikler ve inflamatuvar reaksiyonun aktivasyonunda önemli fonksiyonu vardır (134). Bu faktör beyaz kan hücreleri, trombositler ve endotelial hücreler tarafından eksprese edilir (133).

PAF'ın gebeliğin erken safhalarında devam ettirilebilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarla yüksek kalitedeki embriyoların zayıf kalitedeki embriyolara göre daha fazla PAF salgıladıkları gösterilmiştir (135). PAF'ın embriyo tarafından en fazla salınımı 2 hücreli aşamada gerçekleşir ve bu aşamanın ardından azalır (136) (Şekil 2.2.4). Embriyonik kültürlerde PAF'la ilgili çeşitli sonuçlar bildirilmiştir. Bazı durumlarda hiç etkisi olmadığı, bazı durumlarda ise fare embriyonik hayatını etkilediği ve blastosist hacmini arttırdığı rapor edilmiştir (136).

Embriyo tarafından PAF sisteminin ekspresyonu komplekstir. 4 hücreli aşamada, oositte bulunduğundan daha fazla seviyede PAF oluşarak embriyonal gelişimi hızlandırır. Tam tersi olarak, PAF asetilhidrolaz reseptör transkriptleri IVF'ten sonra embriyolarda tanımlanmamıştır. Bu da, kültür koşullarının reseptör ekspresyonunu değiştirdiğini göstermektedir (137). Deneysel çalışmalarda, çiftleşmeden önce PAF'ın farelere enjeksiyonuyla implante embriyoların sayısında azalma görülmüştür (138).

2.2.3.4 Büyüme Faktörleri

Embriyo gelişiminde, EGF ve TGF- α 'nın 8 hücreli erken blastosist aşamasında eksprese edildiği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. EGF reseptörü fare ve insan

preimplantasyon embriolarında eksprese edilir ve EGF ailesinin, embriolarda protein sentezi ve blastosist gelişiminde etkileri vardır (139,140) (Şekil 2.2.4).

Diğer büyüme faktörlerinden TGF- β 'nın varlığı blastosist büyümesine kolaylık sağlar, ayrıca iyi kalitede olan embrioların TGF- β salgıladıkları bilinmektedir (67). TGF- β ailesinin bir çok üyesi, özellikle TGF- β 1, β 2, β 3 ve Aktivin A, erken embriolarda mezodermal farklılaşmanın potent indükleyicileridir (141). IGF-II'nin morula ve blastosist aşamalarında eksprese edildiği bulunmuştur. Pre-implantasyon embriolarında IGF-II ve IGFBP transkriptlerinin gösterilmesi, bu büyüme faktörlerinin etkisinin implantasyondan önce fetal gelişimde başladığını göstermektedir (72).

2.2.3.5 Sitokinler

Yapılan çalışmalarla CSF-1, 2-8 hücreli erken blastosist aşamasında gösterilmiştir (142) (Şekil 2.2.4). IL-1, IL-6 ilk 48 saat boyunca IVF'ten sonra embriyo kültür sıvısında gösterilmiştir. Embriyoda sitokin üretiminin hangi faktörlerden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir, ancak granüloza, kumulus ve sperm hücrelerinin sentezlediği düşünülmektedir (143). Kültürü yapılan erken embriyo ve oositin medyumunda IL-1 α , enzim-bağılı immünosorbent assay (elisa) yöntemiyle ortaya çıkarılmıştır. İnsan blastosistindeki IL-6'nın transkriptleri ve reseptörü RT-PCR (Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction)'la ortaya çıkarılmıştır (144). Morula aşamasından önce de TNF- α 'nın varlığı gösterilmiştir (113).

2.2.3.6 Prostaglandin

Prostaglandinler, hem epitelyal ve stromal hücreler hem de insan embrioları tarafından üretilirler ve endometriyumda prostaglandin içeriği geç sekretuar fazda en üst seviyeye ulaşır. Endometriyumda üretilenlerin başında prostaglandin F2 α gelmektedir ve myometriyal kasılmalarda kuvvetli bir tetikleyicidir (145) (Şekil 2.2.4). Preimplantasyon yapıları tarafından prostaglandin üretimi implantasyondan sonra azalır, bu da supresyonu sağlayan aktif bir mekanizmanın varlığını göstermektedir (146). Prostaglandinlerin üretimi östrojen desteği ile gerçekleşmektedir, fakat sekretuar endometriyumda ortaya çıkan artış progesteron seviyesiyle bağlantılıdır (146).

2.2.3.7 hCG ve IFN- δ (Human Chorionic Gonadotropin ve Interferon Gama)

Bu iki hormonal karakterin bazı sinyalleri trofoblast için spesifiktir. Ayrıca korpus luteumun ve korpus luteum tarafından salınan progesteronun devamından sorumludur. hCG üretimi ilk 7-9. haftaları boyunca gebeliğin devamlılığını ve progesteronun salınımını sağlar. Shi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, hCG trofoblast hücre motilitesini ayarlamaktadır, embriyo implantasyonunun erken safhası boyunca trofoblastların fonksiyonunlarını düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır (147).

İnterferon- δ , IFN-a, INF-b ve INF-w tip 1 interferonlar olarak gruplara ayrılırlar ve antiviral aktivitelerinden primer olarak sorumludurlar. IFN- δ primer olarak CD8+T hücrelerinden salgılanır. Hemen hemen bütün hücreler IFN- δ için reseptör eksprese ederler ve artmış yüzey class 1 MHC proteinlerine bağlanırlar. IFN- δ kemirgenlerde trofoblastlara spesifik bir sinyaldir ve korpus luteum ile korpus luteumun ürettiği progesteronun devamından sorumludur (148,149).

2.2.3.8 LIF (Leukemia Inhibitory Factor)

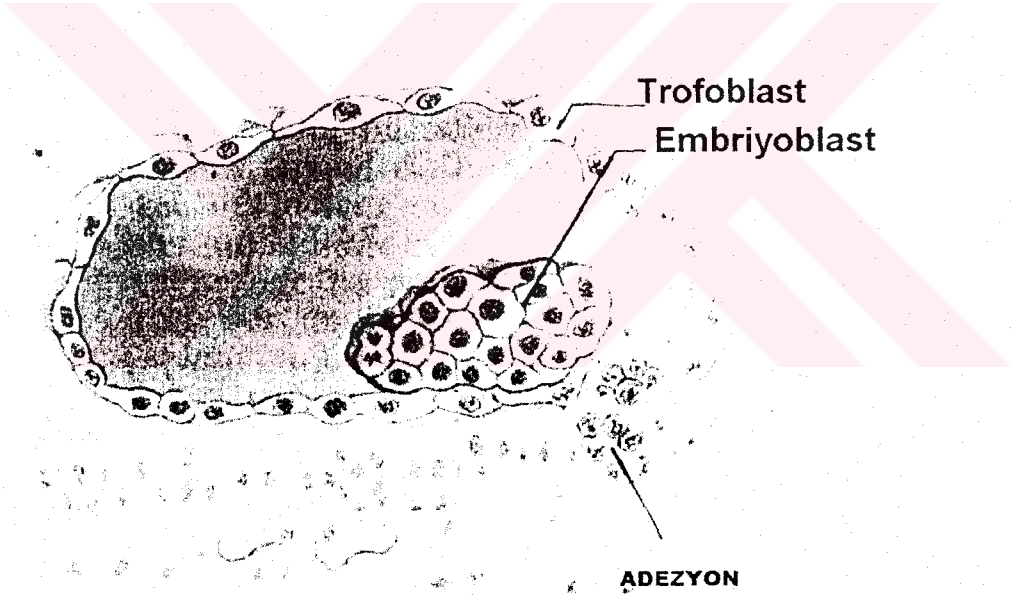
LIF embriyolarda trofoblast farklılaşmasını etkileyerek, adeziv fenotipliğini ayarlar. Ayrıca implantasyon boyunca hem embriyonik dokulardan, hem de uterus epitelinin parakrin sinyallerinin salınmasına neden olur (80). Farelerde LIF, endometriyum epitelinin ve embriyodan bağımsız bir şekilde eksprese edilmesine karşın, Stewart ve arkadaşları tarafından implantasyonunun LIF'in uterusdaki ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (81). LIF'in, embriyolardaki post implantasyon gelişiminde önemli olduğu, LIF reseptörlerindeki gen delesyon çalışmalarıyla gösterilmiştir (150).

Yapılan deneylerle LIF'in fare (151) ve inek (152) embriyolarında blastosist formasyonunu arttırdığı ve koyunlarda ise (153) implantasyon oranını arttırdığı gösterilmiştir.

Dunglison ve arkadaşları IVF uygulanan hastaların embriyolarına LIF ekleyerek (1.000 iv/ml) blastosist formasyonunun %18 den %44'e çıktığını ve optimal kalitesinin %10'dan %33'e çıktığını bulmuşlardır (154).

2.3 ADEZYON

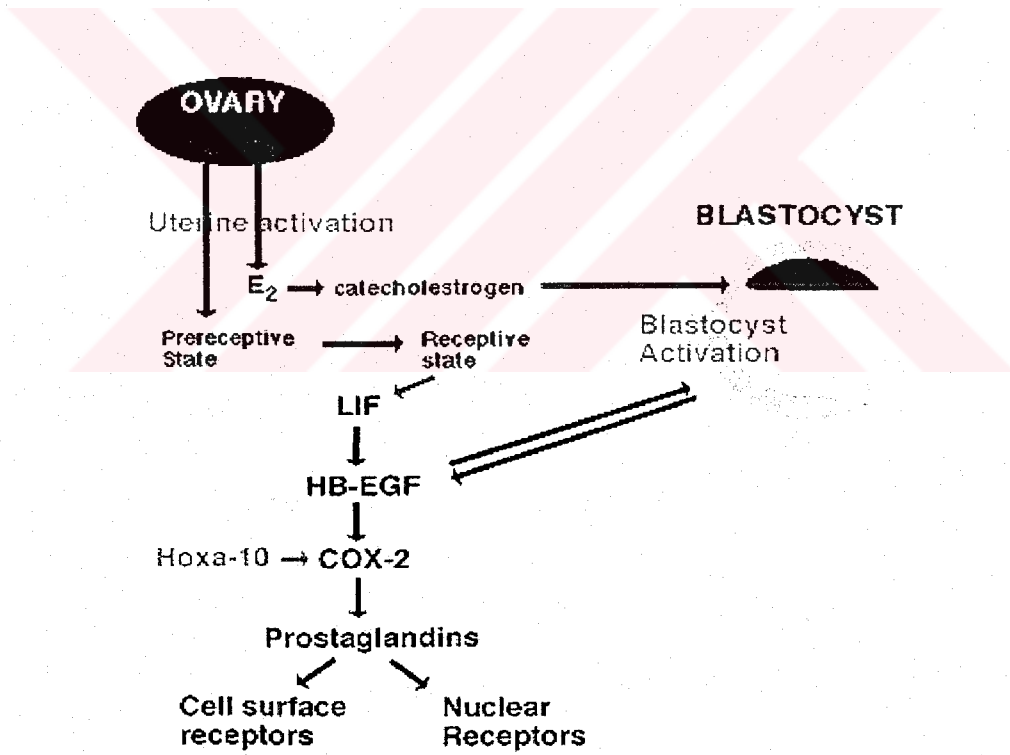
Blastosist uterus lümeninde 2-3 gün kalır ve bu arada enzimatik olarak gevşeyen zona pellusidasından sıyrılır (hatching). Gelişiminin 6.-7. günü epitel yüzeyine yerleşen blastosistin tutunması endometriyum sekretuar faza girdiği zaman gerçekleşir. Temas noktasında trofoblast hücreleri dışta sinsityotrofoblast içte sitotrofoblast tabakalarına farklılaşarak endometriyum epiteline penetre olurlar. İç hücre kitlesi trofoblast boşluğunun iç duvarı boyunca tutunma bölgesine göç eder, bu şekilde blastosist embriyonel kutuptan endometriyuma sokulmuş olur (Şekil 2.3.1).



Şekil 2.3.1 Blastosistin embriyonel kutuptan endometriyuma adezyonu.

İmplantasyonda adezyonun, gebeliğin gerçekleşebilmesi için en önemli aşama olduğu düşünülmektedir. Ovulasyon sonrasında progesteron ile prereseptif dönem başlatılır. Ancak progesteron implantasyon hazırlığı için tek başına yeterli değildir. Östrojen seviyelerinin de belli düzeyde var olması ile reseptif dönem dediğimiz implantasyon dönemi gerçekleşir (8,155,156).

Östrojen ve progesteronun etkisi ile endometriyum ve blastosistten salınan faktörler EGF, HB-EGF, LIF, IL1, IL6, CSF, HOXA 10 ve 11 genlerinin varlığında siklooksijenaz enzimlerinin (cox) ekspresyonunu indüklerler (35,88,89). Bu genler de endometriyumun preresptif fazdan reseptif faza geçmesine ve adezyonun başlatılmasına yol açarlar (Şekil 2.3.2). Trofoblast ve uterus epitelinin adezyonu biyolojik bir paradoksu temsil eder. Genetik olarak farklı iki epitel olan blastosist ve endometriyum epitelinin apikal kutuplarından yapıştıkları görülür. Bu yapışmanın mekanizması halen çok net açıklanamamıştır. Ancak bu mekanizmanın gerçekleşmesinde adezyon moleküllerinin anahtar rolü oynadıkları kesin olarak bilinmektedir (6).

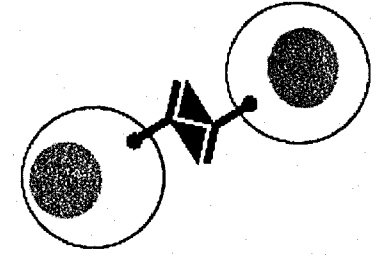


Şekil 2.3.2 P4 ve E2 'nin etkisi ile implantasyon sırasında uterusun preresptif aşamadan reseptif aşamaya geçişinin moleküler mekanizması.

2.3.1 ADEZYON MOLEKÜLLERİ

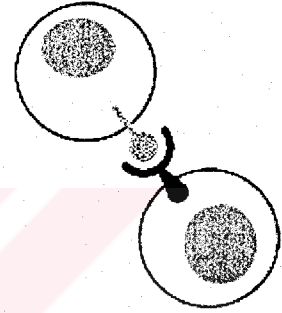
Adezyonu sağlayan moleküller arasında çeşitli biçimde bağlantılar kurulabilir. Bu bağlantılar 3 çeşittir (Şekil 2.3.3).

1-Homofilik bağlanma: Hücre üzerindeki molekül, karşı hücrenin aynı tür diğer molekülüne doğrudan bağlanır.



HOMOPHILIC BINDING

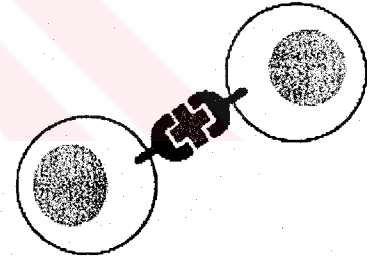
2-Heterofilik bağlanma: Hücre yüzeyindeki molekül karşı hücrenin farklı tür molekülüyle bağlanır.



HETEROPHILIC BINDING

3-Bir ekstrasellüler molekül vasıtasıyla bağlanma:

Bir hücredeki hücre yüzey reseptörü, karşı hücrenin reseptörüne ekstrasellüler salınmış bağlayıcı molekül (ligand) aracılığı ile bağlanabilir.

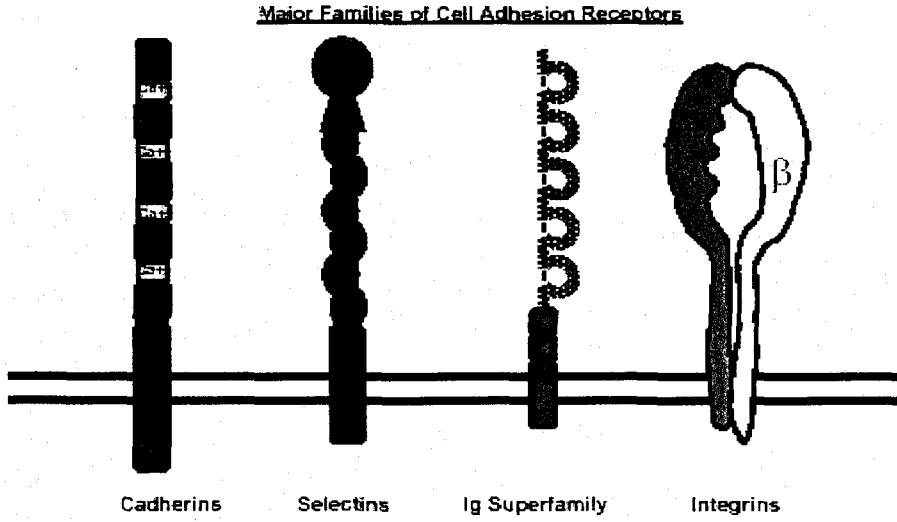


BINDING THROUGH AN EXTRACELLULAR LINKER MOLECULE

Şekil 2.3.3 (a) Homofilik bağlanma,
(b) Heterofilik bağlanma,
(c) Bir ekstrasellüler molekül vasıtasıyla bağlanma.

Adezyon molekülleri ise 4 grup altında toplanmaktadır (Şekil 2.3.4).

- 1-Kaderinler
- 2-Selektinler
- 3-Ig süperailesi
- 4-İntegrinler ve diğer ECM bileşenleri



Şekil 2.3.4 (a) Kaderinler, (b) Selektinler, (c) Ig süper ailesi, (d) İntegrinler

2.3.1.1 Kaderinler

Kaderinler, gelişim süresince hücre taşınmasında ve adezyonunda önemli rol oynayan kalsiyum bağımlı transmembran homofilik adezyon reseptörleridir (157) (Şekil 2.3.5). Klasik kaderin ailesinin bir çok üyesi bulunmaktadır. Her biri köken aldıkları dokuya göre isimlendirilmiştir, örneğin e-kaderin ilk epitelyal dokuda, n-kaderin sinir sisteminde, p-kaderin ise plasentada bulunmuştur, ancak daha sonra diğer dokularda da gösterilmişlerdir. E-kaderinin epitelyal tümör hücre metastazını ve invazivliğini baskılayan bir rol oynadığı düşünülmektedir (158). Kaderinler fonksiyonel adezyon aktivitesi göstermek için, kateninler denilen sitoplazmik plak proteinleri ve sitoiskeletle kompleks formu almaktadırlar (159). Klasik kaderinlerin sitoplazmik bölgeleri, adeziv mekanizmanın kimyasal ve mekanik dönüşümünde önemli rol oynayan 170 aminoasit dizisi içerirler. Sitoplazmik bölgede α ve β katenin proteinleri kompleks form alırlar. Bu proteinlerden α -katenin, aktin sitoiskeletini kaderine bağlama özelliği nedeniyle kaderin-aracılı hücre adezyonunda fonksiyon gösterir. β -katenin ise α -katenin ile kaderinin zincir oluşturması için aracı olarak adezyonda rol

alır Ayrıca, morfogenez boyunca sinyal olayları için fiziksel adezyonda görev alarak sinyal dönüşümüne katılır (160).

Kaderinlerin belirgin yapısal özelliklerinden biri, hücre bağlanmasına katkıda bulunduğu düşünülen hücre dışı (EC: ekstra hücresel) domeinlerini içermesidir. Klasik kaderinlerin hücre dışı domeinleri EC1 den EC5'e isimlendirilen 5 alt domeine ayrılmıştır. Yüksek çözünürlük yapısındaki bu domeinler hücreler arasında homofilik adeziv bağlanmayı gerçekleştirirler (161,162). Bu homofilik bağlanmaya göre; kaderin molekülleri, plazma membranından adeziv bağlanma yüzeyine direkt uzanan, birbirine paralel dimerlerden oluşur (162). Her bir dimerin terminal ucunda EC domeini bulunur ve karşısındaki hücrenin adeziv bağlanma bölgesinde bulunan anti-paralel oryantasyondaki diğer 2 dimer ile etkileşime girer. Bu kaderin dimerleri arasındaki homofilik bağlanmaya fermuar modeli denir.

E-kaderin, uterus ve diğer epitelyal hücrelerin adezivlik ve polarize fenotipinin devamında anahtar rolü oynamaktadır (163). E-kaderin implantasyon sitesinde, uterusda eksprese edilen glikoproteinlerdendir. Fare uterusu gebeliğin 4. günü reseptif hale gelir ve reseptif endometriyumun belirleyicisi olarak e-kaderinin dağılımı hormonal ve diğer stimülatörlerin etkisi altında değişir (164).

E-kaderini pozitif olan stromal hücreler, trofoblastın stromaya invazyonunda rehber olan epitelyal hücreler gibi davranırlar. İnvazyonun mezometriyal kutuptan antimezometriyal kutba ilerlemesinin devamlılığı e-kaderin ekspresyonun değişmesiyle bağlantılıdır. İmplantasyonun gerçekleşmesinde, e-kaderin gibi adezyon molekülleri trofoblastın endometriyuma hücre göçünün devamında ve sınırlandırılmasında kritik rol oynarlar (165).

Kaderinlerin fonksiyonlarını etkileyen faktörlerin arasında bulunan kalsitonin Kemik ve böbrekte kalsiyum homeostasını düzenleyen peptid yapıda bir hormondur (166). İmplantasyon sırasında ratların reseptif endometriyumundan eksprese edilir (167). Yapılan in vitro çalışmalarda kalsitoninin eksojen olarak uygulanmasıyla, gebe ratların endometriyum epitelinde e-kaderinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (167). Bu nedenle kalsitoninin implantasyon boyunca, e-kaderin gibi bağlantı komplekslerinin düzenlenmesinde kritik rol oynadığı düşünülmektedir (168).

2.3.1.2 Selektinler

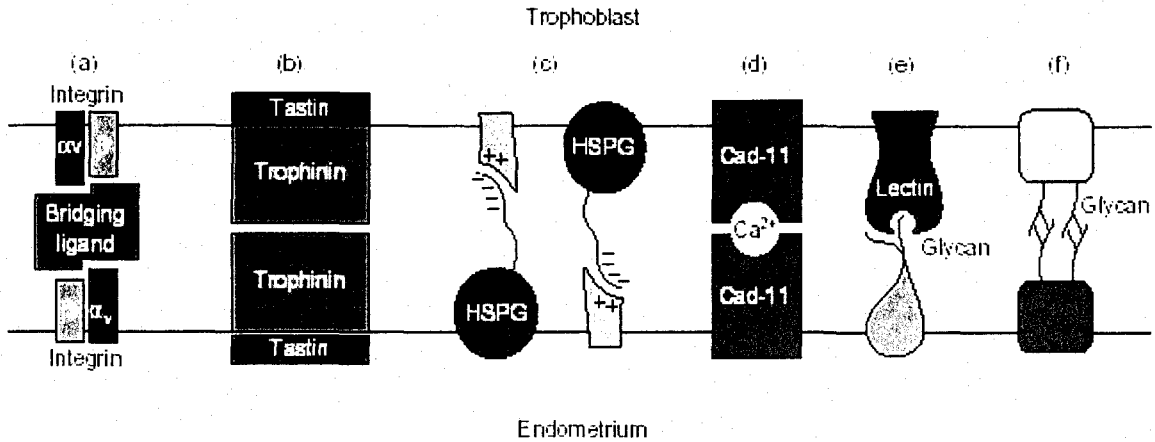
Selektinler, inflamasyonda ve immün yanıtta önemli yeri olan, endotelial hücreler ve lökositler arasında heterofilik etkileşimlere (lökositin endotelium boyunca göçünü artırarak) aracılık eden adezyon molekülleridir. Selektinler, kalsiyum bağımlı tek lektin domainleriyle tanımlanırlar ve karşısındaki hücrenin spesifik karbonhidrat gruplarını bağlarlar. Selektinler, fukosilat karbonhidratları, özellikle de Lewisx ve mucinleri bağlayan proteinlerdir. Endotelial (E)-selektin, lökosit (L)-selektin ve platelet (P)-selektin olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar. Herbir selektin reseptör molekülü: bir lektin benzeri N-terminal domaini, onu takiben EGF benzeri motif, bir transmembran domain ve sitoplazmik uç içerir.

L selektin (CD 62L) genel olarak lökositlerde eksprese edilir ve endotelial hücrelerde aktive edilir. E selektin (CD 62E) sitokin aktivasyonundan sonra endotel hücrelerinden üretilir ve nötrofiller, monositler, eozinofiller, lenfositler ve bazı tümör hücrelerinde reseptörleri vardır. P selektin (CD 62P) plateletlerin granüllerinde veya endotelial hücrelerin Weibel-Palade cisimciklerinde depolanır ve salınır. Bir kısım P selektin ise sitokin aktivasyonundan sonra eksprese edilir.

İmplantasyonda L, E ve P selektin olmak üzere 3 türü önemlidir. P selectin yarıklanma aşamasındaki insan preimplantasyon embriolarında (169), L ve E selektin fare blastosistinde gösterilmiştir (170,171). Ancak bu selektinlerin yok edildiği mutant farelerde embriyonik gelişimlerin ve implantasyonun normal olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (170,171,172).

2.3.1.3 Ig Süperaillesi

Ig süper ailesi hücre adezyon molekülleri (CAM) kalsiyum bağımsız transmembran glikoproteinleridir. Disülfid bağları ile birarada tutulan geniş ekstrasellüler globüler-domainlerle tanımlanan adezyon reseptörleri içerirler. Bu grubun çoğu üyesi homofilik hücre-hücre adezyonunda içerilirler ve embriyonik gelişimde önemli rol oynadıkları düşünülür (173). Her Ig süper ailesi CAM'ü ekstrasellüler domaine sahiptir. Bu domain, sistein kalıntıları biriktiren birçok Ig-benzeri intra-zincir disülfid bağlı bir ilmik, bir transmembran domain ve sitoiskeletle etkileşime geçen intrasellüler domain içerir.



Şekil.2.3.5 İmplantasyon sırasında endometriyal epitelyal hücreler ile trofoektoderm arasındaki bağlanma çeşitleri. (a) α_v integrinin, bir bifonksiyonel ekstrasellüler ligand aracılığıyla bağlanması, (b) Homotipik bağlanma gösteren trophinin-trophinin adezyonunun sitoplazmik tastinin de gerekli olduğu bir bağlanma, (c) Bir hücre yüzey proteoglikanı HSPG'nin heparan sülfat zincirleriyle, karşı hücre yüzeyinde bir temel protein ile heterotipik bağlanma. Bu bağlanma iki yönde de gerçekleşebilir. (d) Kaderin 11'ler arasında homotipik bağlanma. (e) Endometriyal glikoprotein glikan ile bir embriyonik lektin arasında heterotipik bağlanma. (f) Glikan-glikan bağlanmasına dayanan Lewis Y tip ve H tip glikanlar arasındaki bağlanma.

Genel olarak, integrinleri veya diğer Ig süper ailesi hücre adezyon moleküllerini bağlarlar. Alt grupları intersellüler adezyon molekülü (ICAM), vasküler-hücre adezyon molekülü (VCAM-1), platelet-endotelyal-hücre adezyon molekülü (PeCAM-1), nöral-hücre adezyon molekülü (NCAM) dür. İntersellüler adezyon moleküllerinden olan ICAM-1 ve ICAM-2 aktif endotelyal hücreler tarafından eksprese edilir ve integrin reseptörlerine bağlanırlar. VCAM-1 damar endotel hücrelerinde tanımlanırken, PECAM-1 ise nötrofiller, monositler, plateletler ve geniş miktarlarda endotelyal hücrelerde tanımlanmıştır. NCAM'ın ilk olarak lökositlerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Ancak baskın olarak sinir dokularında eksprese edilir ve NCAM'ın 4 farklı formu olduğu bulunmuştur. Glikosilasyonun farklı miktarları, özellikle sialeik asidin miktarları, molekülün adezivliğini değiştirebilmektedir.

İmplantasyon sitesinde görülen hücre adezyon molekülleri ICAM-1, NCAM ve VCAM-1'dir. Bu proteinlerin hepsi gelişimin erken implantasyon basamağında bulunmaktadır fakat blastosistte gösterilememiştir (174).

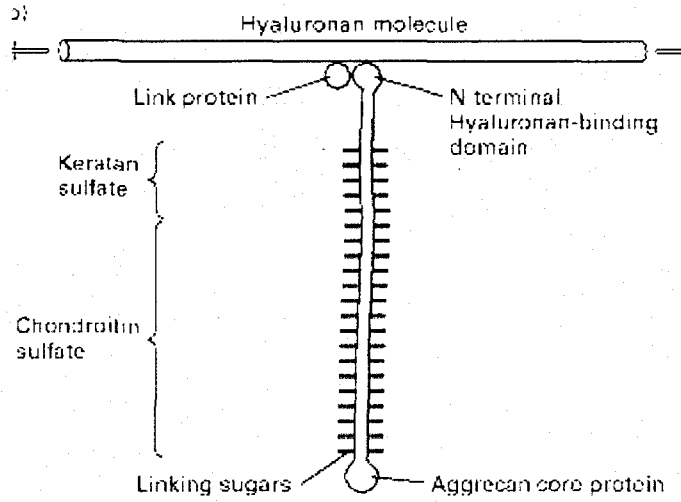
2.3.1.4 Ekstrasellüler Matriks Proteinleri

İmplantasyon, hücre göçü, invazyon gibi bir çok biyolojik olay ve birçok makro molekülden meydana gelmiş ekstrasellüler matriks denilen bir ağ tarafından kontrol edilir (10,175). Bu matriks, hücreler tarafından lokal olarak salınan ve birleşen bir çok proteoglikanlar ve yapısal glikoproteinlerden oluşur (176). Bu çalışmanın esas konusu olan implantasyonun adezyon molekülleriyle ilgili safhasının daha iyi anlaşılabilmesi için ekstraseluler matriksin ve proteinlerinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin tanımlanması gereklidir.

Ekstrasellüler matriks esas olarak 2 temel makromolekülden oluşur bunlardan birincisi; bir polisakkarit olan ve proteoglikan proteinlerine kovalent bağlanan glikozaminoglikanlar, diğeri ise karbonhidratların bağlandığı bir protein kökü içeren bileşikler olan yapısal glikoproteinlerdir.

2.3.1.4.1 Glikozaminoglikanlar

Glikozaminoglikanlar (GAG) genellikle, bir üronik asit ve bir de heksozamin tarafından oluşturulan tipik biçimde tekrarlayan disakkarit birimlerinden meydana gelmiş doğrusal polisakkaritlerdir. Genellikle bu şekilde isimlendirilmelerinin nedeni, tekrarlayan disakkarit yapısında 2 şekerden birinin daima aminoşeker olmasıdır. Bu disakkaritin bir şekeri N-asetil glukozamin veya N-asetil galaktozamin iken ikinci şekeri genellikle glukoronik asit veya iduronik asittir (Şekil 2.3.6). Glikozaminoglikanlar, negatif yüklü sülfat ve karboksil grupları yüzünden hidrofiliktirler. Bu nedenle suyu çekerek hidrat jelatin matriks formunun oluşmasına neden olurlar. Böylece GAG zincirleri ekstrasellüler boşluğun çoğunu doldurarak, dokulara mekanik destek sağlayan suda çözünabilir moleküllerin hızlı difüzyonuna ve hücrelerin göçüne izin verir. Glikozaminoglikanlarda 4 temel grup ayırt edilmiştir: Bunlar hyaluronik asit, kondritin sülfat ve dermatan sülfat, heparan sülfat veya heparin keratan sülfattır.



Şekil 2.3.6 Bir proteoglikan molekülü, çekirdek proteine kovalent bağlanan çok sayıda glikozaminoglikanlardan oluşur. Çekirdek protein glikozaminoglikan zincirlerine ekolarak, birçok N ve O zincirli oligosakkarit zincirleri içerir.

Glikozaminoglikanların kombinasyonlarıyla çok çeşitli proteoglikan oluşabilir. Bu proteoglikanlar plazma membranına gömülebilirler, membran fosfolipitlerine kovalent bağlanabilirler ya da reseptör proteinlerine bağlanırlar. Proteoglikanlar ve kollajen, hücreleri ekstrasellüler matrikse (ECM) bağlamak için adeziv glikoproteinlerle (fibronektin ve laminin) güçlendirilmiş reseptör proteinlere (integrinler) bağlanabilirler.

Trofoblast ve lümen epitelinin ilk etkileşime girdiği anda, bu karbonhidrat temelli antikor ve lektin bağlayıcı proteoglikanların adezyonda rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (177). Bazıları gebeliğin periimplantasyon periyodu veya doğum siklusu boyunca eksprese edilir. Endometriyal epitelde düzenlenen bu yapılar H-tip-1 antijen ($\text{Fuc } \alpha 1\text{-2Glc } \beta 1\text{-3GlcNac } \beta 1$) dir (178). Bu salgılama fare lümen epitelinde östrojenin etkisi altındadır (179). H-tip-1 antijen tam implantasyon zamanı gebeliğin 4. gününe kadar düzenli olarak lümen epitelinin yüzeyinden eksprese edilir ve trofoektodermle etkileşime neden olabilir (179). İmplantasyon oluşmazsa, bu H-tip-1, reseptif peryottan sonra gözden kaybolur. Ayrıca H-tip-1 antijen insan glandular ve lümen epiteli tarafından da salgınır ve luteal fazda folliküler fazdan daha fazladır (180).

Diğer karbonhidrat temelli antikor, Le-y karbonhidrat antijen ($\text{Fuc}\alpha\text{-2Gal}\beta\text{-4}[\text{Fuc}\alpha\text{-3}]\text{GlcNAc}\beta\text{-1}$) farede blastosist yüzeyinde ve lümen epitelinde bulunmaktadır (181). Bu nedenle Le-y karbonhidrat antijeninin fare blastosistinin lümen epiteline yapışmasında katkıda bulunduğu sonucuna varılmaktadır. Ayrıca insanda da endometrium epitelinde salındığı ortaya çıkarılmıştır.

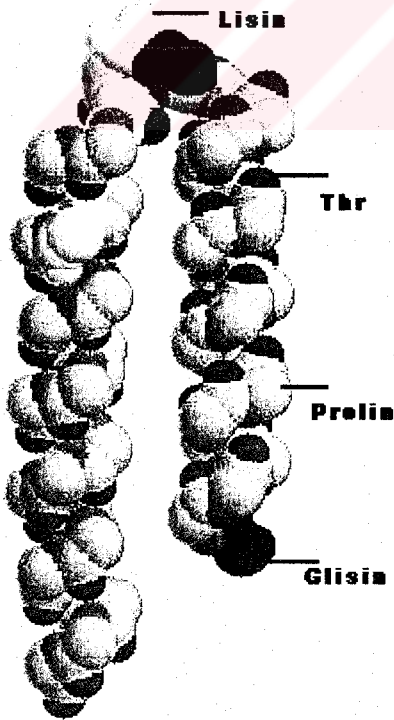
İmplantasyonda rol oynayan önemli bir molekül olan heparan sülfat proteoglikan membran-bağlayıcı ve ECM-bağlantılı formlarıyla implantasyon sitesinde yer alır (182). Blastosist ile lümen epiteli adezyonunda, bu moleküllerin etkileşiminin özelliği, dokuya özel esas protein salınımı ve karakteristik tekrarlayan disakkaritlerin (Glc-GlcNAc) karışık modifikasyonları temeline dayanmaktadır. Blastosist heparan sülfat proteoglikanının (HSPG) transmembran formu olan sindikanı da salgılar, fakat trofoektoderm yüzeyinde az miktarda görülmüştür ve gen delesyonundan sonra yokluğu infertilitede etkili değildir (183). HSPG'nin bazal membran formu olan perlekan'ın, zonasından ayrılan blastosistin etrafını sararak blastosiste yapışma yeteneği kazandırdığı gösterilmiştir (183). Bu nedenle HSPG trofoektodermin lümen epiteline bağlanmasında köprü (ligand) görevi görür ve fare embriyoları HSPG-bağlayıcı proteinlere bağlanabilir. İnsanda, zonadan ayrılmış blastosistler tarafından perlekan veya diğer ECM-bağlantılı HSPG'nin salınıp salınmadığı bilinmemektedir. Bunun yanında HSPG bağlayıcı protein olan, heparan sülfat proteoglikan etkileşim protein (HIP) reproduktif siklus boyunca insan endometriyal epiteli RL-95 hücreleri tarafından salındığı gösterilmiştir (184).

Ayrıca lümen epiteli veya trofoektodermdeki diğer adezyon molekülleri de HSPG'ı bağlayarak blastosist bağlanmasında fonksiyon görebilirler. Örneğin, nöral adezyon moleküllerinden N-CAM, HSPG'ı bağlayabildiği ve yarıklanma evresindeki insan embriyolarında ve fare blastosist trofoektoderminde bulunduğu gösterilmiştir (185). İmplantasyon sırasında embriyo tarafından lümen epitelinde salınımı arttırılan HB-EGF'in HSPG ile etkileşime girdiği de gösterilmiştir (48).

2.3.1.4.2 Yapısal Glikoproteinler

Kollajen

İnsan vücudunda en çok bulunan ve yüksek karakteristik özellik gösteren kollajenler fibröz protein ailesindendir. Bağ dokusu hücreleri tarafından salınır ve karakteristik özelliği, bükülemeyen üçlü sarmal heliks yapısıdır. α zinciri denilen 3 kollajen polipeptit zinciri, birbirleri etrafında düzenli süper heliks oluşturacak şekilde bükülmüşlerdir (Şekil.2.3.7). Kollajenlerin 3'lü heliks sarmalının oluşmasında prolin, glisin ve lizin denilen önemli aminoasitler yer almaktadır. Prolin halka yapısında olduğu için, her bir α zincirinin helikal biçimini sabitleştirir. Glisin küçük bir aminoastittir. α zincirinin santral bölgesine üç helikal α zincirinin düzenli olarak ve sıkıca bir araya gelip kollajen süper heliksini oluşturmasını sağlar. Diğer amino asit lizin, farklı fibrillerin lizin residueslarının arasında kovalent bağlanmanın gelişmesine izin verir ve bu çapraz bağlanma şekli kollajene farklı bir gerilebilme özelliği kazandırır.



Şekil.2.3.7 Kollajen bükülemeyen üçlü sarmal heliks yapısındadır. α zinciri denilen 3 kollajen polipeptit zinciri, birbirleri etrafında düzenli süper heliks oluşturacak şekilde bükülmüşlerdir.

Bu zamana kadar 20 α zinciri ve bunların kombinasyonlarıyla 10 tip kollajen molekülü ayırt edilmiştir. Tip 1, 2 ve 3 bağ dokularında bulunan ana tip fibriller kollajenlerdir. Kollajen IV molekülleri özellikle bazal laminada bulunur. Fibril oluşturmak yerine, bütün bazal laminada ağlar oluşturup tabaka halinde birleşerek büyük yer kaplarlar. Kollajen IV bir çok yönle fibriller kollajen molekülünden farklıdır. Düzenli Gly-x-y tekrarlayan amino asit dizisi, birçok kollajen molekülünün üçlü sarmal yapısını bozacak şekilde helikal olmayan diziler tarafından kesilir. Bu nedenle fibril formundaki kollajenden daha esnektir. Tip 4 prokollojen molekülleri, sekresyondan sonra yarıklanmaz, salınan moleüller yarıklanmamış propeptidleri aracılığı ile çok tabakalı ağ oluşturmak amacıyla birleşirler. Elektron mikroskopik çalışmalar, bu moleüllerin, karboksil terminal peptidlerinin kafa kafaya birleşmesiyle kafes görünümlü çok tabakalı ağ yapısını oluşturduğunu göstermektedir. Kollajen molekülleri arasındaki disülfid ve diğer kovalent çapraz bağları bu bağlantıyı sağlamlaştırır.

Yapısal protein olarak bazal membranda yer alan kollajen IV'ün, aynı zamanda da trofoektoderm ile endometriyum lümen epitelinin yapışabilmesi için integrinler arasında ligand görevi görerek implantasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir (186). Bazı araştırmacılara göre; kollajen IV preimplantasyon safhası boyunca endometriyum lümen epiteli bazal membranında varlığını sürdürürken, trofoblastın lümen epiteline penetre olduğu sırada, geçici bir süreliğine bazal laminanın yıkımına paralel olarak salınımı azalmaktadır (187). Buna karşılık stromadaki desidual hücrelerde kan damarları ve salgı bezlerinde, ayrıca ekstra embriyonik endoderm hücrelerinin visseral ve pariyetal tabakalarında artmaktadır (188).

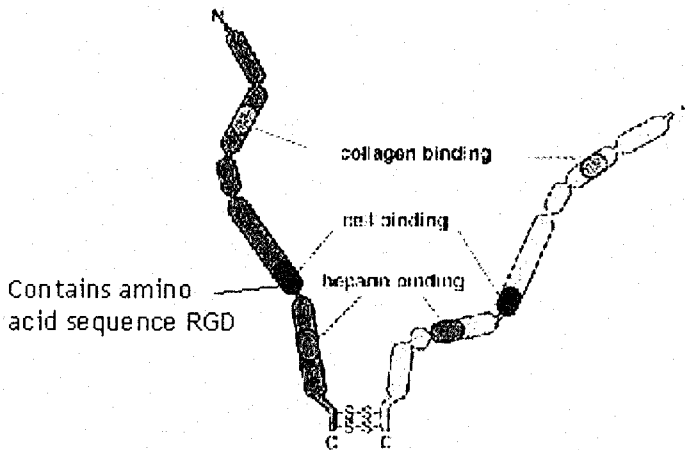
Endometriyum lümen epitelindeki bazal laminada yapısal glikoprotein olarak bulunan kollajen IV'ün embriyonik dokularla direkt olarak etkileşime geçmediği, bununla birlikte implantasyon sırasında $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ integrinlerinin bağlanmayı gerçekleştirebilmesi için ligand görevi gördüğü öne sürülmektedir (189).

Fibronektin

İmplantasyonda çok önemli bir rolü olan diğer bir ECM bileşeni olan fibronektin, hücre matriks adezyonunda rol oynayan önemli bir adeziv glikoproteindir. Fibronektin iki aynı alt ünitenin birleşmesinden oluşmuş bir dimerdir. Bu alt üniteler karboksil uçlarının yakınındaki disülfid bağlarıyla birleşirler ve esnek polipeptid zincir bölgelerinden ayrılmış bir çok globüler alan oluşturacak şekilde kıvrılırlar (Şekil 2.3.8). Fibronektinin üç formu vardır;

- 1- Çözülebilir dimerik form: Plazma fibronektin denilen bu form dolaşım sistemi ve diğer vücut sıvılarında akımı sağlar.
- 2- Hücre yüzey fibronektini: Hücrelerin yüzey kısımlarından bağlanmalarını sağlar.
- 3- Matriks fibronektini: Ekstraselluler matrikste çözünmeyen fibril formlarından oluşur.

Fibronektinin birden fazla globüler alanları vardır ve farklı roller oynayan çok fonksiyonlu bir moleküldür. Örneğin bir bölgesi kollajeni bağlarken diğeri heparini, diğeri ise üzerindeki spesifik reseptörlerle farklı hücreleri bağlayabilir (Şekil 2.3.8). Bu reseptör bağlayıcı bölgeleri, fibronektin reseptörleri tarafından tanınan RGD (arginine, glycine, aspartate) tripeptid dizisini içerir. Böylece fibronektin matriksin organizasyonuna katkıda bulunarak hücrelerin matrikse bağlanmasına yardım eder.



Şekil 2.3.8 Fibronektin disülfid grupları tarafından bağlanan bir dimerdir. Kollajen I'e, heparan sülfata, diğer proteoglikanlara ve hücre membran reseptörlerine bağlanan bir dizi sarmal bölge oluşturur.

Fibronectin sadece hücre adezyonu için değil ayrıca hücre göçü için de önemlidir. Göç eden bir hücre sabit bir hale gelmeksizin matrikse de sıkı tutunması gerektiği için, fibronectine bağlanması gerekmektedir. Bu bağlanma hassas bir ayarla olmalıdır. Fibronectinin hücre göçünde önemli fonksiyonu olduğunu kanıtlamak için yapılan bir çalışmada, hücre-yüzey fibronectin reseptörüne spesifik bir antikor embriyoya mikroenjeksiyon yoluyla verildiğinde, embriyoda hücre göçünün bloklandığı görülmüştür (190).

Fibronectin, laminin, kollajen ve entaktin desidualizasyon boyunca endometriyal ECM'de biriken proteinlerdir (191). Aynı zamanda bu glikoproteinler uterusu trofoblast invazyonunun hücre adezyon aktivitesini arttırırlar. İn vitro kültür ortamında, fare trofoblast hücrelerinin, özellikle fibronectin, laminin, kollajen, vitronectin ve entaktin artmış tabakaya yapıştıkları gösterilmiştir (192).

Bazı araştırmacılar, blastosist farklılaşması boyunca trofoektodermin apikal yüzeyinin adezyonunu incelemek için, in vitro ortamda gelişen sağlam blastosistin fibronectin bağlanma aktivitesini araştırmışlar ve fibronectinin kuvvetli bağlanması için salındıktan sonra 3 saat sabit kalması gerektiğini bulmuşlardır (193). Fibronectin üretiminin artmasının bağlanma eğilimini arttırmadığı görülmüştür. Bu olay reseptör veya reseptör kümelerinin artmasıyla veya metabolik enerji ve sitoskelet bütünlüğüyle bağlantılıdır.

Fibronectin bağlanma yapısı, blastosist farklılaşması için gereklidir, çünkü peri-implantasyon blastosistinde ilk hücrel değişikliklerin meydana gelmesinde ölçüdür. Fibronectinin bağlanma aktivitesi, uterusu adeziv olan ve implantasyon penceresinde embriyonun oryantasyonunu sağlayan ilk bölgeyi belirler (193).

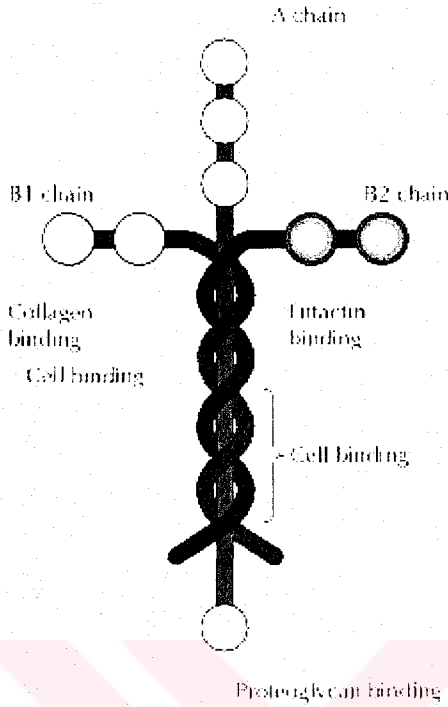
Blastosist farklılaşması ve trofoblastların yayılmasıyla ilişkili olarak trofoektoderm hücrelerinin apikal yüzeylerinin yapışkanlığını ölçmek için, in vitro kültür boyunca fibronectin bağlanması gözlenmiştir. Embriyolar ECM olmadan 96 saat kültür edildiklerinde, zamanla fibronectin reseptörlerinin azalmasından dolayı adezyon yeteneklerinin azaldığı gözlenmiştir (169).

İntegrinlerin fibronektin bağlama aktivitesine aracılık ettiği bilinmektedir. Primer trofoblast hücrelerinde bulunan bütün fibronektin-bağlayan integrinler hücre bağlayan domeinlerinin merkezinde RGD dizisini taşırlar ve tüm preimplantasyon gelişimi boyunca görülürler (9). Fibronektin bağlama aktivitesi peptidler içeren RGD dizisi veya integrin alt ünitelerinin karşıtı olan antibadiler ($\alpha 5$, $\beta 1$, αv ve $\beta 3$) tarafından baskılanır (193). Stephens ve arkadaşları $\beta 1$ alt ünitesi eksik transgenik farede implantasyonun başlayıp kısa süre sonra embriyonun öldüğünü, fakat trofoblast hücrelerinin in vitro ortamdaki fibronektin tabakasında normal olarak büyüebildiğini göstermişlerdir (194). Yapılan araştırmalarda, fibronektinin $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha v\beta 5$ gibi integrin çeşitleri tarafından tanındığı bilinmektedir (195,196). Çoğu fibronektin-bağlayan integrinler preimplantasyon gelişim boyunca salındığı için, güçlü bağlama aktivitesini gerçekleştirmek amacıyla bu integrinlerle birlikte fibronektin proteininin de eksprese edilmesi gerekmektedir.

Hücre membranlarında, perisellüler matrikste ve desidual hücrelerin sitoplazmasında fibriller ve noktasal tarzda fibronektinin varlığı gösterilmiştir (197). Bu çalışmaların sonuçları trofoblast hücre kolonlarında yer alan fibronektinin, trofoblastın maternal dokulara adezyonunu attırdığını ve trofoblast migrasyonunu kolaylaştırdığını göstermektedir (197).

Laminin

Laminin, oldukça uzun 3 polipeptid zincirinin disülfid bağlarıyla bağlanarak haç biçimini aldığı kompleks bir moleküldür. Bu zincirler A zinciri (moleküler ağırlığı 400 kd) ve benzer iki B zinciri (moleküler ağırlığı 210 kd B1 ve moleküler ağırlığı 200 B2) dir. Bu farklı zincirlerin birbirleriyle olan bağlarına göre farklı laminin tipleri oluşur. Laminin üzerinde farklı hücre yüzey reseptörleri için adezyon tanıyıcı ve diğer ekstrasellüler matriks proteinleri için bağlayıcı aminoasit dizileri vardır (Şekil 2.3.9). Bu bölgelerden biri lamininin uzun kolu ile geniş globüler domeini arasındaki bağlama bölgesine yakındır. Bir diğeri ise laminin merkezine yakın olan ikinci motor aminoasit dizisidir. Bu alanlara bağlanan reseptörlerin en başında integrinler, lektinler, kollajen IV gelmektedir.

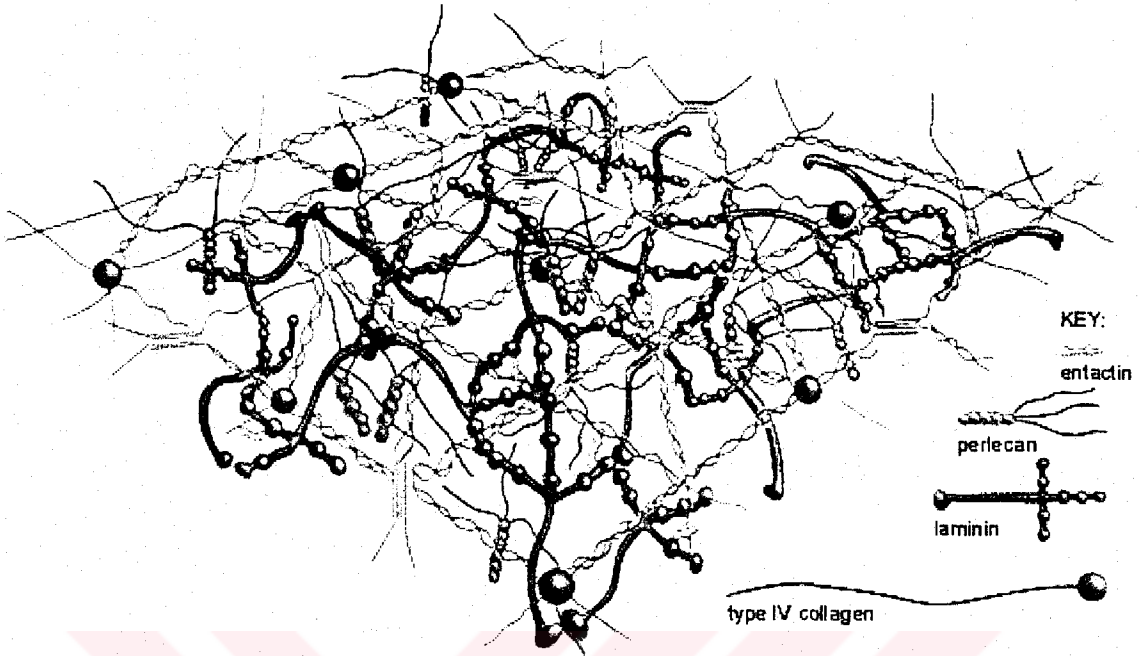


Şekil.2.3.9

Birbirine haç şeklinde dolaşmış durumdaki üç polipeptidden oluşan laminin yapısını gösteren şematik çizim. Molekölün üzerinde hücre membran reseptörleri, kollajen IV, proteoglikanlar ve entaktin ile yüksek affinite gösteren bölgeler görülmektedir

Laminin bazal laminada bulunan en önemli adezyon proteinidir. Bazal lamina başlıca kollajen IV, proteoglikanlar ve lamininden oluşan epitel tabakası altında devam eden ince tabakaların birleşiminden meydana gelir. Bazal lamina hücreleri ve hücre tabakalarını birbirinden ayıran ve yapısal destek sağlayan, hücre ve moleküllerin taşınmasında düzenleyici geçici bariyer olarak iş gören bağ dokusu tabakasıdır. Bazal laminaya elektron mikroskopla bakıldığında iki tabaka göze çarpar; lamina lusida ve altında lamina densa. Bazı durumlarda lamina retikularis denilen 3. bir tabaka da göze çarpar. Bazı bilim adamları bu 3 tabakaya birden bazal membran adını vermişlerdir. Yapılan ışık mikroskopik çalışmalarda lamina densada kollajen IV ile proteoglikan molekülleri bulunmakta iken, lamina densenin plazma membran kısmında lamininin bulunduğu düşünülmektedir.

Lamininler bazal membranda entaktin, nidojen gibi diğer adezyon molekülleriyle de sıkıca birleşirler ve çok yönlü etkileşimin sonucu olarak çapraz bağ formunu oluştururlar (Şekil.2.3.10).



Şekil.2.3.10 Laminin, entaktin, perlekan ve kollajen IV gibi adezyon molekülleri sıkıca birleşirler ve çok yönlü etkileşimin sonucu olarak bazal laminada çapraz bağ formunu oluştururlar.

Lamininin önemli biyolojik aktiviteleri arasında; hücre göçünün yönlendirilmesi, hücre yapışmasının güçlendirilmesi, birçok hücre tipinde hücre büyümesinin ve farklılaşmasının stimülasyonu ve hücre iskeletinin organizasyonu sayılabilir. Laminin ve kollajen IV bazal membrandaki proteinlerin %70-80'ini oluşturur. Burada kollajen bu yapının temelini oluştururken, multidomein yapılı laminin ise daha çok diğer bazal membranlarla ve hücrelerle etkileşir. Lamininin kısa kolunun uçlarındaki globüler bölgeler kendi molekül yapısı ile bağ kurarken, kısa ve uzun kolların terminal globüler yapıları kollajen IV'e bağlanır. Uzun kolun globüler yapısı ise temel aminoasitleri içerir ve heparin, perlekan ve hücre membranına bağlı diğer heparan sülfat proteoglikanlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Lamininin $\beta 1$ ve $\gamma 1$ zincirlerinin embriyonal mezenşimin gelişimine katıldığı ve domeinin III'teki Cys-

zengin bölgelerin bu aktiviteyi stimüle ettiği görülmüştür. A zincirinin sentral bölgesindeki Arg-Gly-Asp (RGD) aminoasit dizisi anjiyogenezi stimüle eder. Bir çok laminin-hücre etkileşimi uzun kolun uç bölgesinde ya da yakınında meydana gelir. Uzun kolun uç bölgesinde lokalize olan E8 dizisi hücre yapışması ve mezenşimal hücrelerin polarizasyonu için gereklidir.

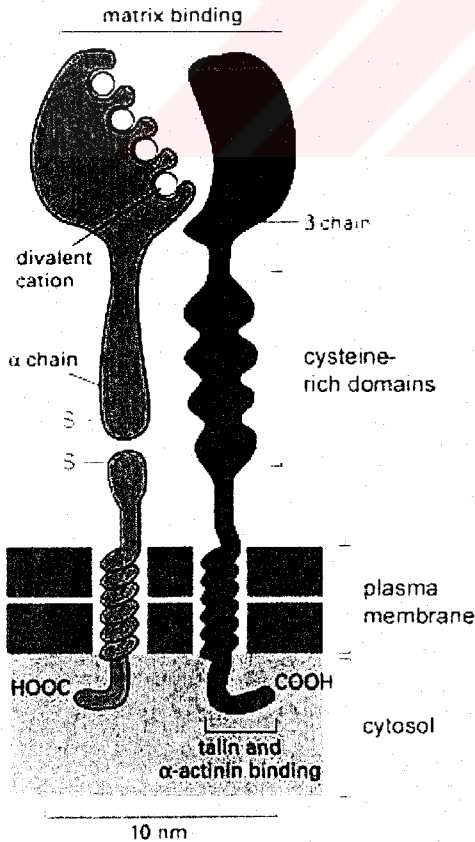
Gebe olmayan uterusun bazal membranında lamininin lokalizasyonu ilk kez 1988 yılında Karkavelas tarafından gösterilmiştir (198). Glasser ve arkadaşları laminin ve desidual dokulardaki dağılımı üzerine araştırma yapmışlar ve desidual dokularda laminine rastlarken desidual olmayan stromal dokuların bazalinde laminine ait bir kanıt bulamamışlardır (199). Lamininin fare embriyosunda ilk olarak 8 hücreli aşamasında ortaya çıktığı gösterilmiştir (200). Clark ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, sıçan embriyosunda gebeliğin 6. gününde laminin primer desidual zonda ortaya çıkmakta, 7. gününde ise epitelyal bazal membranda, damarlarda ve bez epitelinde görülmektedir (201). Epitelyal ve kan damarlarının bazal membranlarında 7. ve 8. gündeki değişikliklerin, plasantanın gelişimiyle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (202).

Thomas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre blastosist implantasyonu boyunca uterus lümen epitelinin devam eden yapısı bozulmuştur (203). Bu bozulma, desidual hücre farklılaşması ve trofoblast hücrelerinin yayılmasıyla yakından ilişkilendirilir. Laminin ve kollajenin lokalizasyonunun azalması gebeliğin 6. gününde ilk olarak trofoblastın etrafında görülmüş ve lümen epiteli bazal membranın boyanmasının azalması, lümenin üçte birlik antimesometrial girişinde görülmüştür. 7. günde uterus lümen epiteli bazal membranının, yarı yarıya kaybolmasının desidual hücre dağılımıyla yakından bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (203).

Lümen epitelindeki bazal membranın kaybolmasıyla birlikte, stromanın yakınındaki desidual hücrelerde laminin ve kollajen IV'ün arttıkları ayrıca trofoblastın bazal membranında da lokalize oldukları gösterilmiştir (204).

2.3.1.4.3 İntegrinler

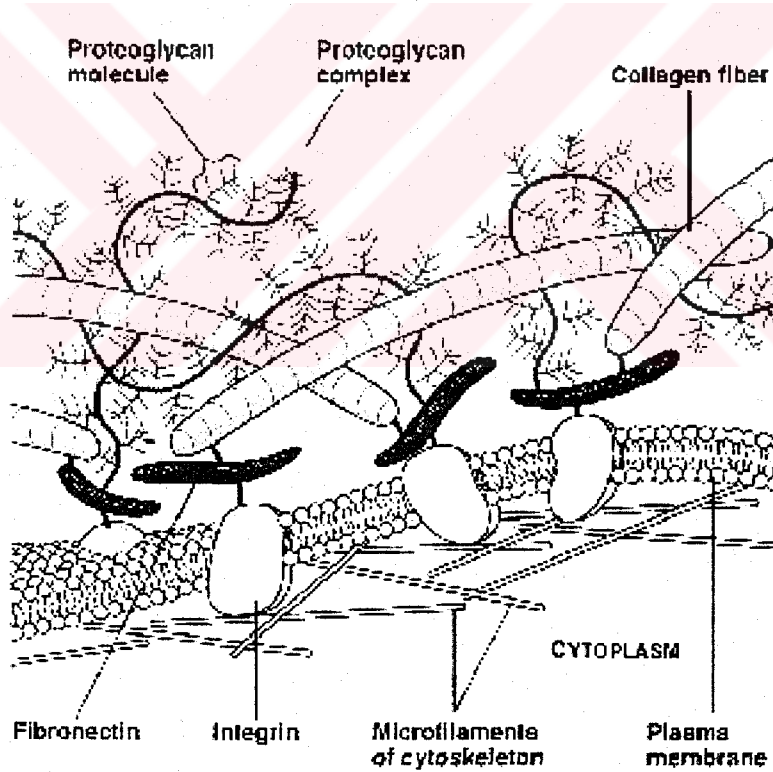
Hücrelerin ECM'e ve birbirlerine bağlanmasından sorumlu, fokal kontaktlar veya fokal adezyonlar olarak adlandırılan ve özel hücre bağlanma sitelerini oluşturan, başlıca hücre yüzey reseptörleridir. İntegrin kümeleri, hücre dışında ECM bileşenlerinden fibronektin, laminin veya kollajenin RGD bölgesine bağlanıp, hücre içinde sitoskelet myoflamentleri (talin proteini aracılığıyla) ile bağlantı kuran ve transmembran zinciri olarak görev alan proteinlerdir. İntegrinler α ve β denilen farklı ağırlık ve büyüklükte iki polipeptid zincirinin nonkovalent birleşmesiyle oluşmuş kompleks yapıdır (Şekil.2.3.11). En az farklı 17 α ünitesi ve 8 β ünitesi vardır ve bugüne kadar 20 çeşidi gösterilen yüzlerce heterodimerik integrin kombinasyonu bulunmuştur (Tablo 2.3.1). Bu transmembran polipeptidleri membran dış yüzeyinde ligand bağlamak ve nonkovalent bir bağlanma bölgesi oluşturmak için birbirleriyle birleşirler. Membran iç yüzeyinde ise spesifik sitoskeletal protein için bağlanma bölgesi oluştururlar.



Şekil.2.3.11 İntegrinlerin genel yapısı:

Transmembran proteinlerinin iki alt grubu olan α ve β 'nin nonkovalent birleşiminden oluşur. İntegrin α alt birimi disülfid bağlarıyla birarada duran bir ağır ekstrasellüler zincir ve bir hafif transmembran zincirinden oluşur. Ekstrasellüler α ağır zinciri divalent katyonları bağlamaktadır. β zinciri tekrarlayan sistein-zengin bölgeler içerir.

İntegrinler ekstrasellüler matrikste bağlandıkları bileşenlere göre isimlendirilirler. Örneğin en çok bilineni fibronektin reseptörüdür. Bir plazma membran glikoproteini olarak ilk ortaya çıkanlardandır ve fibronektin molekülünü bağlar. RGD hücre bağlayıcı dizisi içeren küçük bir peptidi vardır. Reseptör, hücrenin içindeki aktin sitoiskeletin ve ekstrasellüler matriksteki fibronektinin arasında ilişkiyi sağlayan bir transmembran zinciri olarak fonksiyon görür (Şekil.2.3.12). Diğer birçok matriks reseptörlerinin (kollajen, laminin) fibroblast fibronektin reseptörüyle benzer olduğu ortaya çıkarılmıştır. İntegrin olarak tanımlanan bu proteinler içerdikleri α ve β zincirleriyle, fibronektin reseptörüne homologdurlar ve çoğu bağlandıkları matriks bileşenlerinin RGD dizisini tanırlar.



Şekil.2.3.12 İntegrinler hücrenin içindeki aktin sitoiskeletin ve ekstrasellüler matriksteki fibronektinin arasında ilişkiyi sağlayan bir transmembran zinciri olarak fonksiyon görür.

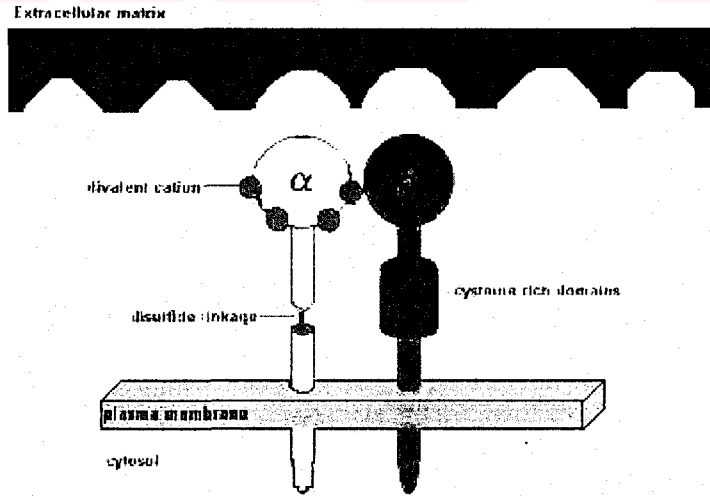
İntegrinlerin α alt ünitesi ligand bağlanmasını ve ekstrasellüler konformasyonu ayarlarken, hücre içi domeini sitoiskelet proteinleriyle ilişkili olan β alt ünitesi, sitoiskeletal organizasyonun oluşumu, gen ekspresyonu, proliferasyonu, hücresel göç ve farklılaşmanın belirlenmesinde düzenleyici rol oynar. Bu etkiler β ünitesinin hücre içi domeininin fosforilasyonu tarafından düzenlenir. Büyüme faktörü reseptörlerinden farklı olarak, integrin hücre içi domeinlerinin tirozin-kinaz ve fosfotaz aktivitesi yoktur (204). Bu nedenle mesajı iletmek için, integrin hücre içi domeini protein kinazlarla bölünmelidir. Fokal Adezyon Kinaz (FAK), bağlanmayı takip eden 30 sn içinde aktive olan sitosolik tirozin kinazdır. ECM proteinlerine bağlanmaları sırasında, sitoplazmik kısmında uygun değişiklikler gerçekleşir ve Fokal Adezyon Kinaz (FAK) enzimi vasıtasıyla sitoplazmik proteinlerle iletişimini değiştirir. Bu enzim, hedef proteinleri fosforilize ederek farklı hücresel cevaplara neden olan zincir reaksiyonunu başlatır. Ayrıca hücre içi sinyal yollarını aktive ederek gen ekspresyonunu kontrol eder ve adeziv etkileşime verilen cevap sırasında hücre davranışını belirlerler. Örneğin, integrinin fibronektine bağlanması sırasında FAK olarak isimlendirilen nonreseptör proteini aktive eder, bu da seçilmiş gen gruplarının transkripsiyonunun artmasıyla sonuçlanır. FAK fosforilasyonu $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 3$ altüniteleri tarafından gerçekleştirilir.

2 altünitenin ekstrasellüler bölgesi, fibronektin, laminin, kollajen IV, vitronektin gibi birçok ECM proteininde bulunan, arginin-glisin-aspartik asit tripeptid (RGD) dizisini tanıyan bir divalent katyon bağlanma bölgesi içerir. RGD dizisinin konformasyonu, integrinin hücre içi ve dışı tüm moleküller arasında bağlantılarının gerçekleşmesi için önemlidir (Şekil.2.3.13).

İntegrinlerin α ve β alt üniteleri ayrı ayrı adezyonda rol aldıkları gibi birleşerek de farklı ligandları bağlarlar. Genel olarak $\beta 1$ ve $\beta 3$ alt üniteleri fibronektin, kollajen ve laminin ligandlarını içererek hücre-ekstrasellüler matriks arasında bulunmasına karşılık $\beta 2$ alt ünitesi hücre-hücre adezyonunda içerilir. Yaygın olarak bulunan $\beta 1$ alt ünitesi en az 9 farklı α alt ünitesiyle nonkovalent bir şekilde birleşir (205,206). α - β birleşimleri, çeşitli ECM proteinleri için ligand bağlanmalarını belirler (Tablo 2.3.1). Örneğin $\alpha 5 \beta 1$ gibi klasik fibronektin reseptörü olanlar, sadece tek bir ECM proteini ile etkileşime girerlerken bazı integrinler, birçok farklı ECM proteinini tanırlar ($\alpha 3 \beta 1$ veya $\alpha v \beta 3$

gibi). Hücreler çoğunlukla özel ECM protein ligandlarıyla etkileşime girebilecek çoklu integrinleri eksprese ederler (206). Bazı durumlarda iki integrin, ligand molekülünü farklı bölgelerinden tanıyarak, tek bir ligandı paylaşabilirlerken bazende iki integrin ECM proteininin aynı bölgesinden bağlanırlar (207). Bu nedenle, çoğu integrin özel adeziv ligandlar için kuvvetli spesifik değildir. Aynı ligandın aynı bölgesini bağlayan iki integrin, aslında benzer hücresel fonksiyon gösterirler. Ligandların büyük çoğunluğu, hücre-substrat adezyonunda içerilir. Fibronektinler, hücre kümelenmesinde aracılık edebilirler ve bazı integrinler immünoglobülin ailesinin membran proteinlerini tanırlar (204). Integrinlerin gereğinden fazla ve eş zamanlı salınımının paradoksal olduğu görülmektedir.

İntegrinler immünoloji, yara iyileşmesi, tümör metastazı ve embriyogenezis gibi çeşitli işlemlerde de içerilir. Bu önemli moleküllerin, hücre şeklinin ve polaritesinin yürütülmesinde önemli fonksiyonu vardır. Ayrıca, hormon reseptivitesi ve gen transkripsiyonuna form verir. Ayrıca hücrelerin oryantasyonu, sitoskeletal organizasyonu, iyon transportu, lipid metabolizması, kinazların aktivitesi, hücre proliferasyonu, hücreleri apoptozisten koruyan sinyallerin üretilmesi ve ECM farklılaşması gibi bazı hücre fonksiyonlarında da görev alırlar.



Şekil.2.3.13 İntegrinler ekstrasellüler matriks ve diğer adezyon molekülleri için reseptör görevi görürlerken RGD dizilerini tanırlar.

Tablo 2.3.1 İntegrin heterodimerleri ve kullandıkları ekstrasellüler matriks ligandları

Alt üniteler		Ligandlar
β1	α1	Kollajen, Laminin
	α2	Kollajen, Laminin
	α3	Fibronektin, Kollajen, Laminin
	α4	Fibronektin, VCAM-1
	α5	Fibronektin
	α6A	Laminin
	α6B	Laminin
	α7	Laminin
	α8	Fibronektin, Vitronektin, Tenaskin
	α9	Tenaskin
	αv	Fibronektin, Vitronektin, Kollajen, Fibrinojen, Faktör 8
β2	αL	ICAM-1, ICAM-2
	αM	Fibrinojen, Faktör X, ICAM-1
	αx	Fibrinojen
β3	αIIb	Fibrinojen, Fibronektin, Vitronektin, Faktör 8, Thrombospondin
	αv	Vitronektin, Fibronektin, Vitronektin, Kollajen, Thrombospondin, Osteopontin, Perlekan, Faktör 8
β4	α6A	Laminin
	α6B	Laminin
β5	αv	Vitronektin, Fibronektin, Fibrinojen
β6	αv	Vitronektin, Fibronektin, Tenaskin
β7	α4	Fibronektin, VCAM-1
β8	αv	Vitronektin

İntegrinler ve Fertilizasyon

İntegrinlerin üreme döngüsünün her aşamasında rolü olduğu bilinmektedir. Memeli fertilizasyonu hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini içerir. Oositi kaplayan ECM proteinleri, spermatozoanın zona pellusidaya bağlaması sırasında da fonksiyon görürler. Bu etkileşim spermin zona pellusidaya penetre olmasına izin veren akrozom reaksiyonunu tetikler. Fare ve insan spermi, kollajen, laminin ve integrini içeren çeşitli ECM molekülleriyle kaplı bölgelere yapışır (208). Ayrıca fibronektin bandı spermin başının ekvatorial bölgesini çevreler burası fertilizasyon sırasında oositin plazma membranıyla etkileşime geçen ilk kısımdır (209). Fare oositi yüzeyinde $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ olan üç $\beta 1$ grubu integrini eksprese ettiği gösterilmiştir (210). Bu reseptörler, ligand tanıma dizisi olan aminoasit tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) yi tanır. Yapılan çalışmalara göre integrin ligandları spermin yüzeyinde de bulunmaktadır. Sperm yüzeyindeki α - β antijenlerinin bileşimi, sperm ve oosit plazma membranları arasında bağlanma ve birleşmede ortaya çıkan integrin-bağlanma bölgeleri içerir (211). İntegrin altünitelerinin özel yapılarındaki farklılıklara rağmen, $\alpha 6\beta 1$ integrin bütün memeli türlerindeki oositlerin yüzeyinde vardır. Bu fonksiyon-bloke anti- $\alpha 6$ monoklonal antibadisinin sperm bağlanmasını yok ettiği deneylerle gösterilmiştir (212). İntegrinlerin iyi bilinen dönüştürücü sinyaller olması nedeniyle (206) spermin oositte bulunan $\alpha 6\beta 1$ 'e bir ligand aracılığıyla bağlanması embriyonun gelişimini başlatıcı bir anahtar olduğunu göstermektedir.

Embriyonik bağlanma ve invazyondan önce, üreme yaşına gelmiş kadınların endometriyumunu, ovaryan hormonlara cevap olarak, siklik rejenerasyona uğrarlar. Menstrüel siklus boyunca, endometriyumun reseptif hale gelmesi zor ve kompleks bir olaydır. İntegrinler, maksimum uterus reseptivitesi sırasında fonksiyonel belirleyiciler olarak kabul edilmektedirler ve infertilite riski olan kadınlarda veya implantasyon başarısızlığı temeline dayanan, tekrarlanan düşüklerde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. İntegrin salınımı, menstrüel siklus boyunca, erken gebelik, plasentasyon, pre ve post implantasyon embriyosunda gerçekleşmektedir (206).

İntegrinlerin implantasyon sırasındaki ekspresyonları çok geniş bir liste olmasına rağmen, endometriyumun apikal lümen yüzeyinde bulunanlar ve embriyonun dış yüzeyinde bulunanlar olarak incelenmesi daha doğru olacaktır.

2.3.1.4.3.1 Endometriyal İntegrinler

Endometriyumun kompleks yapısı, moleküllerin farklı düzenlenmesine neden olur. Bu özelliği hücre dağılımına, hücre iç hareketine ve hücrelerin birbiriyle ve endometriyal ağı oluşturan integrin, kollajen, fibronektin, laminin ve diğer matriks proteinleriyle etkileşimine neden olur. İnsan endometriyumunu embriyonik implantasyon için menstrüel siklus boyunca gelişimsel değişikliklere uğrayan ve bu değişikliklerin erken gebelik döneminde gerçekleştiği bir dokudur (213,214). Bu endometriyal değişiklikler sırasında, implantasyon ve gebelik için spesifik hücre-hücre ve hücre-substrat ilişkisi gerekmektedir.

Yapılan birçok çalışmada, immünohistokimyasal yöntemler kullanarak, insan endometriyal dokularının farklı menstrüel siklus aşamalarında, α ve β integrin alt ünitelerinin dağılımı gösterilmiştir (213-218). İnsan endometriyal bez epitelinde bir çok integrin alt ünitesi gözlenmiştir. $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$ ve $\beta 5$ alt üniteleri sürekli eksprese edilirlerken, bazı integrinler endometriyal siklusta bölgesel ve geçici değişikliklere uğramaktadır ve bu ekspresyon dağılımı bazı tip infertilite problemleriyle bağlantılı olabilmektedir (213,218,219). Örneğin $\alpha 1$, $\alpha 9$, αv , $\beta 3$ ve $\beta 6$ alt üniteleri farklı aşamalarda düzenlenme gösterirler. Bunlarda αv ekspresyonu ovulasyondan sonra artar, $\alpha 1$ ekspresyonu da ovulasyondan sonra artar ancak, geç sekretuar fazda azalır, $\alpha 9$ ovulasyondan sonra bez epitelinde görülür, $\beta 3$ 19. günde (LH+6) aniden bezlerde ortaya çıkar ve $\beta 6$ sekretuar fazda fonksiyoneldir (220). $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$ ve $\beta 6$ alt üniteleri lümen epitelinde görülen integrinlerdir (221). Bezlerde olduğu gibi $\alpha 1$ sekretuar fazda upregüle edilir (221). $\alpha 9$ bezlerin tam aksine lümen epitelinde sürekli eksprese edilir (222). $\beta 5$ 'in beklenmedik bir apikal dağılımı vardır ve lümen epiteli ve stroma tarafından eksprese edilir (223). $\beta 3$ ise proliferatif ve erken sekretuar fazda gözlenmez (222).

β alt ünitesinin en önemli integrini olan $\beta 1$ 'in ekspresyonu menstrüel siklusla bağlantılı olarak değişir; erken proliferatif fazda bez epitelinde baskındır, orta-sekretuar fazda stromal hücrelerde salınır. Yapılan birçok çalışmada $\beta 1$ integrinlerinin salınımının insan endometriyumunda, implantasyon sırasında arttığı gösterilmiştir (214,218).

$\beta 1$ integrinler hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerine aracılık ettikleri için bağlanma siteleri denilen Agr-Gly-Asp (RGD) tripeptidi için kontakt bölgeler içerirler (223). Bu tripeptid siteleri integrin ligandlarında da bulunur ve bağlanma çapraz-zincir bağ eğilimi ile gerçekleştirilir.

Yapılan çalışmalar, $\beta 1$ integrinlerin, insan endometriyumunda implantasyon sırasında arttığını göstermektedir (10,214). Ayrıca desidual hücrelerdeki $\beta 1$ integrinlerin embriyo gelişiminde ve bağlanmadan sonraki farklılaşmada önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (224,225). RGD-bağlayan integrinlerin aktivitesi, primer fare trofoblastik hücrelerinin göç ve adezyon fonksiyonunun gerçekleşmesinde önemli role sahiptir. $\beta 1$ integrinler, desidual hücrelerin üzerinde embriyoların büyümesinde, blastosist gelişiminde ve bağlanmayı takiben farklılaşmasında önemlidir (224,225).

$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ ve $\alpha v\beta 3$ gibi çok sayıda integrin heterodimerleri endometriyal epitelde ortaya çıkarılmıştır ve $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ özellikle stromal hücreler tarafından eksprese edilirler (220,222). $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 4\beta 1$ dışında bu proteinlerin çoğu menstrüel siklus düzenlenmesi gösterirler. $\alpha 4\beta 1$ orta-proliferatif ve orta-sekretuar faz arasında bez epitelinde en yüksek miktarda eksprese edilir. Fakat $\alpha 1\beta 1$ implantasyon-fazı bağlantılı değişiklikler gösterir. Ekspresyonu erken ve orta sekretuar fazda epitel ve stromada sınırlanır, sadece predesidual aşamada eksprese edilir. $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ üç integrinin sekretuar faz boyunca endometriyumda önemli miktarlarda eksprese edildiği bulunmuştur (219). Bez epitelinde, sadece implantasyon penceresiyle uyumlu siklusun 20-24. günü boyunca eksprese edilirler.

Vitronektin reseptörü olan spesifik integrin $\alpha v\beta 3$, normal menstrüel siklusun 19. gününden sonra endometriyal epitelyal hücrelerde ortaya çıkar. İmplantasyon işleminde önemli rol oynadığı bilinen $\alpha v\beta 3$ integrinin ekspresyonunun ilk belirtileri implantasyon penceresinin açılmasıyla başlamaktadır (213). $\alpha v\beta 3$ epitelyal integrini, vitronektin, fibronektin, faktör VIII ve osteopontinde bulunan RGD aminoasit dizisini tanır ve bağlanırlar. Bu dizinin, trofoblast bağlanması ve büyümesiyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir .

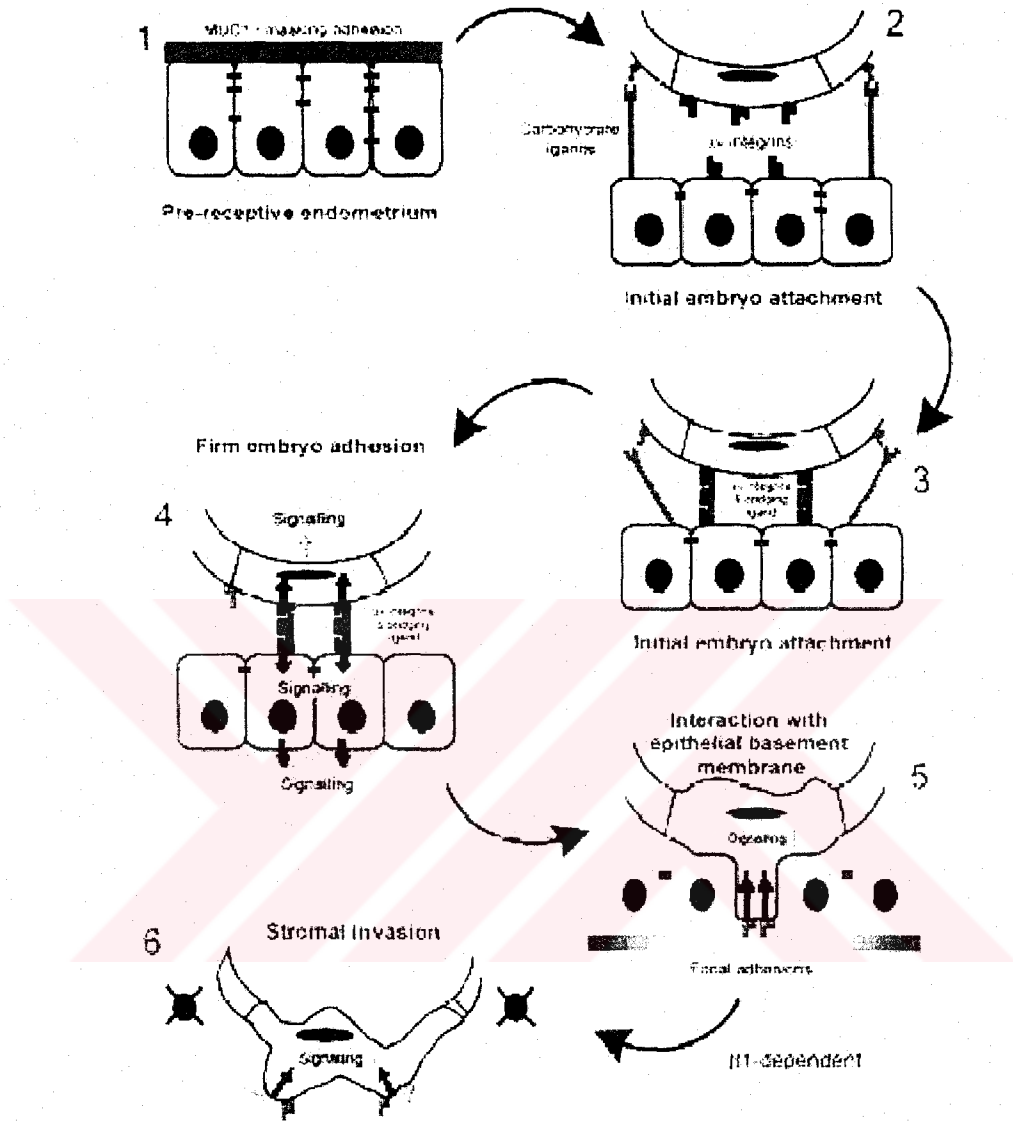
$\alpha\beta 3$ integrini, insan endometriyumunun lümen yüzeyinde eksprese edilir ve bu integrin pinopodlar olarak bilinen reseptif zamanı ortaya çıkaran kabartılarda lokalize olur (219). Lümen epitelinin apikal yüzeyinde lokalizasyonu bu integrinin embriyo-endometriyal etkileşimini ilk başlatan olduğunu düşündürmektedir (Şekil 2.3.14).

Desidual İntegrinler

Erken gebelik döneminde hormonal stimülasyon altında aktif bir şekilde salgı yapan dokuya dönüşen uterus desidual iç bölgesi, normal stromadan farklılık gösterir. Maternal desidua, fetal trofoblastla direkt etkileşime girer ve bu nedenle, blastosistin implantasyonu için elverişli bir ortam sağlamaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda sitometrik analizler kullanılarak desidual hücrelerden $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ alt üntelerinin yüksek seviyelerde salındığı, $\alpha 5$ ve $\alpha 6$ alt üntelerinin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (213). Ayrıca $\beta 1$ integrinlerin biosentezi, kültür edilmiş desidual hücrelerin metabolik etiketlenmesi ve SDS-PAGE elektroforezi ile spesifik antikor kullanılarak hücre ekstraktlarının immüno-precipitasyonu ile gösterilmiştir (213). İnsan endometriyumunda $\beta 1$ integrinlerin ekspresyonu artar ve erken gebelik boyunca desiduada yüksek kalır. İnsan desidual hücrelerinde bulunan $\beta 1$ integrinler, ECM iskeletiyle ve hücre içi sitoskeletal yapılarla bağlantıya geçerek, implantasyonun erken safhası boyunca embriyodan türeyen ECM proteinlerinin organizasyonuna aracılık edebilir (195).

$\beta 1$ integrinler, insan desidual hücrelerinin in vitro ortamda sürekliliğini devam ettirebilir. $\beta 1$ zincirini tanıyan bir monoklonal antikorun artan konsantrasyonlarıyla desidual hücreler inkübe edildiğinde, desidual tabakaların çoğalmasının durduğu görülmüştür (214). İnsan desiduasında $\beta 1$ integrinlerin ekspresyonunun varlığı, menstrüel siklusla bağlantılı olduğu birçok çalışmayla gösterilmiştir (217,218,221,225). Bu veriler $\beta 1$ integrinlerin in vitroda olduğu kadar in vivo'daki desidual hücrelerin devamlılığına da katılabileceğini göstermektedir.



Şekil 2.3.14 Trofoblast ve uterus lümen epiteli arasındaki etkileşimin şematik görüntüsü. (1) Pre-reseptif endometriyumda lümen epiteli lateral hücre yüzeyinde dağılmış desmozomlar ve epitelin apikal yüzeyinde yoğun yerleşmiş olan MUC1 proteini gözlenmektedir. (2) Reseptif endometriyumda lateral lümen epiteli adezyon komplekslerinin yeniden organizasyonu ve apikal karbonhidrat ligandlarının blastosistinkilerle birbirine geçmesiyle integrinler bağlanma için uygun hale gelir. (3) Bağlanma ligandları aracılığıyla integrinlerin heterofilik bağlanması. (4) Ligand reseptör etkileşimi aracılığıyla hücre adezyonu boyunca potansiyel sinyal üretimi. (5) $\beta 1$ integrinler vasıtasıyla trofoektodermin lümen epiteline penetrasyonu ve ekstrasellüler matriksle etkileşimi. (6) $\beta 1$ integrin aktivitesinin devamı ve stromada invazyon işlemi.

2.3.1.4.3.2 Embriyonik İntegrinler

Memeli embriyoları yarıklanma ve blastosist formasyonunun ilk periyodundan sonra, büyüme ve gelişmelerini devam ettirmek amacıyla, dış besin kaynakları ile bağlantı kurmak zorundadırlar. Bu nedenle; epitelyal trofoektodermin invaziv trofoblastlara dönüşmeye başlaması geç blastosist aşamasında olur ve adeziv davranışta değişiklik ve motilitenin başlaması gerçekleşir. Bağlanma yeteneği trofoblast farklılaşması boyunca kazanılır, bu koşullar altında kültürdeki erken blastosistler yapışmaz ve yayılmaz. Gelişen embriyo kültürlerinde, büyümenin ilk işaretleri, embriyonun zona pellusida sıyrılmasından 10-15 saat sonra görülür. Bu da hareketsiz trofoektoderm hücrelerinin, substrat üzerinde bağlanma ve yayılmayı takiben, çıkıntı göstermesiyle aynı zamana denk gelir (220). Ekstrasellüler matriks molekülleri ile trofoblast etkileşimleri, adezyon reseptörlerinden integrin ailesine bağlıdır (220). Yapışkan ve göç eden özellikteki trofoblastta, implantasyon sırasında meydana gelen değişiklikler, integrin reseptörlerinin ekspresyonu ve dağılımının değişmesinden kaynaklanır (9).

Gelişmekte olan blastosist aşamasında trofoblast ve endoderm hücreleri çok kuvvetli bir etkileşim gösterirler ve bu nedenle reseptörlerin çeşitliliğine oldukça fazla ihtiyaç duyulabilirler. Fare embriyolarının, gelişimin başlangıç döneminde ECM bileşenlerini ve reseptörlerini fazla miktarlarda ürettikleri gösterilmiştir (9,215). $\alpha 2$, $\alpha 6A$ ve $\alpha 7$ ekstra embriyonik dokulara spesifiktir. $\alpha 1$ integrin alt ünitesi sadece trofoblast büyümesinden sonra ortaya çıkmakta ve bu nedenle ekspresyonun ECM ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. $\alpha 1$, $\alpha 6A$ ve $\alpha 7$ alt üniteleri ekstra embriyonik konide ve farklılaşan sekonder trofoblastta ortaya konmuştur (9,226).

ECM proteinlerinin üzerinde fare blastosist büyümesi, trofoblastta yer alan birçok integrinin ekspresyonu tarafından sağlanır. Fibronektin-aracılı trofoblast hücre adezyonu ve göçü, merkezi hücre bağlanma domeininde RGD tanıma sitesi ile hücresel reseptörlerin etkileşimiyle sağlanır. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, sağlam fibronektinden oluşan substratlarda belirgin bir gelişim gözlenmiştir (194). Yelian ve arkadaşları, trofoblast hücrelerinin fibronektine yapışmasını kullanarak $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\alpha 11b$, $\beta 1$ ve $\beta 3$ gibi birçok RGD-bağımlı integrin alt ünitesini tanımlamışlardır (195).

Fibronektin üzerinde blastosist gelişimi $\beta 1$, $\beta 3$ ve $\alpha 5$ altünitelerinin karşıtı antikorlar tarafından inhibe edilir (194). Buradan yola çıkarak $\beta 1$ ve $\beta 3$ integrinlerinin, trofoblastın fibronektine adezyonunda fonksiyonel rol oynadığı sonucu çıkarılmaktadır.

Birçok $\beta 1$ ve αv integrin heterodimerleri bağlanma sırasında fare blastosistinden eksprese edilir. Özellikle $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ ve $\alpha 3$ integrinlerinin fertilizasyondan sonra fare blastosistinin gelişiminde devam eden bir ekspresyonları vardır (9). Trofoblast gelişiminde $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 11b$, βv ve $\beta 3$ integrinlerinin lokalizasyonu bilinmektedir (194). Aynı zamanda αv ve $\beta 1$ integrinlerin yayılmakta olan trofoblast sınırlarındaki fokal adezyonlarda bulunabileceği düşünülmektedir. Fassler ve Meyer tarafından $\beta 1$ alt ünitesi yok edilen embriyoların blastosist aşamasına normal geldiği fakat implantasyonda başarısızlık gösterdikleri bulunmuştur (227). Ayrıca bu $\beta 1$ geni eksik embriyoların iç hücre kitlesinin morfogenezisinde belirgin eksiklikler gösterdikleri bilinmektedir. Hynes tarafından $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ veya αv geni eksik embriyolarda implantasyon yetersizlikleri gözlenmemesi, $\beta 1$ 'in önemini daha da vurgulamaktadır (196). Bu çalışmalar farelerde olduğu kadar insanlarda da yapılmıştır. Campbell ve arkadaşları tarafından insan oositlerinin ve erken post fertilizasyon embriyolarının $\alpha 3$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ ve $\beta 5$ integrin altünitelerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (113). Bu integrinler arasında en önemlisi olduğu düşünülen $\alpha v\beta 3$ 'ün blastosistin eksternal yüzeyinde olması, ilk adezyonu başlattığını düşündürmektedir. αv veya $\beta 3$ integrinlerin nötralize antikorları uterusu enjekte edildiğinde implantasyon bölgelerinde istatistiksel olarak belirgin bir azalma görülmüştür (113).

α ve β heterodimerleri birleşik integrinler olarak da embriyolarda eksprese edilirler. Özellikle 3 temel integrin olan $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ 'ün gelişimin erken safhası boyunca devamlı eksprese edildikleri gösterilmiştir. Oysa diğer $\beta 1$ bağlantılı α alt üniteleri ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6A$, $\alpha 7$) gelişimsel düzenlenen bir ekspresyon gösterirler (9). Başka bir veriye göre insan blastosistleri $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha v\beta 5$ integrinlerini eksprese ederler (170). Ayrıca embriyo daima, $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 1$ integrinleri vasıtasıyla fibronektin ile, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ integrinleri vasıtasıyla laminin ile, $\alpha v\beta 3$ integrini vasıtasıyla vitronektin ile kuvvetli etkileşime girer.

2.4 İNVAZYON

Başarılı bir implantasyon için bağlanmayı takiben invazyon işlemi gerçekleşmelidir. İnvazyon için extrasellüler matrikste enzimatik sindirim gerçekleşirken, eş zamanlı olarak desidual dokularda neoanjiogeneze ve kontrollü homeostazis gerçekleşmektedir. Gelişimin 8. gününde blastosist, endometriyum stromasına tamamen gömülmüş durumdadır. Bu sırada trofoblast tek çekirdekli sitotrofoblast ve çok çekirdekli sinsityotrofoblast olarak iki tabakaya ayrılır. Sinsityotrofoblast tabakasında bölünme görünmezken, sitotrofoblastta mitoz bölünme göstererek sinsityotrofoblasta göç ederler. Aynı zamanda iç hücre kitlesi veya embriyoblastın hücreleri, blastosist boşluğuna bitişik küçük kübik hücrelerden oluşan hipoblast tabakası ve amnion boşluğuna bitişik yüksek silindirik hücrelerden oluşan epiblast tabakası olarak iki tabakaya ayrılır. Bu iki tabakaya birden bilaminar germ diski adı verilmektedir. Ekstra sitoplazmik boşlukların sınırlarını sinsityotrofoblastlar oluşturur. Embriyo implante olurken endometriyal bağ dokusunda, implantasyona karşı bir reaksiyon olarak kabul edilen desidua reaksiyonu başlar. Desidual reaksiyonun primer fonksiyonu immünolojik olarak antikordan korunmuş bir yer sağlamaktır. Stromal hücreler genişler poligonal hale gelir ve desidual hücreler adını alır. Bu hücreler sitoplazmalarında glikojen ve lipid biriktirirler. Bu yeni hücrelerin bazıları bitişikindeki sinsityotrofoblastların penetrasyonu ile dejenere olur. Sinsityotrofoblast embriyonik beslenmeye zengin bir kaynak sağlayan dejenere olan bu hücreleri yutar.

Bu aşamadan sonra embriyoya besin transferi için laküner ağ oluşmaya başlar. 12 günlük embriyoda, bitişik sinsityotrofoblastik lakünalar süngerimsi bir hal alarak birbirleriyle kaynaşırlar. Laküner ağ örgüsü özellikle embriyonik kutup çevresinde plasentanın intervillöz alanının primordial kısmında yoğunlaşmıştır. İmplant olmuş embriyo etrafında endometriyal kapillerler basit kapillerlerden daha geniş ve ince duvarlı terminal damarlar olan sinuzoidleri oluşturmak üzere tıkanır ve dilate olur. Böylece sinsityotrofoblast sinuzoidleri aşındırır ve maternal kan laküner ağ içersine geçer. Dejenere olmuş endometriyal stromal hücreler ve bezler maternal kan ile beraber embriyonik beslenme için zengin bir kaynak sağlar.

Trofoblast ve endometriyumda bu değişiklikler oluşurken, ekstra embriyonik mezoderm artar ve içersinde izole olmuş boşluklar belirir. Bu boşluklar büyük bir kavite olan ekstraembriyonik kölomu oluşturmak üzere hızla birleşirler. Bu sıvıyla dolu kavite bağlantı sapı yoluyla, koryona bağlandığı yer hariç amniyon ve vitellus kesesini sarar. Ekstraembriyonik kölom oluşurken primer vitellus kesesinin büyüklüğü azalır ve daha küçük bir sekonder vitellus kesesi oluşur.

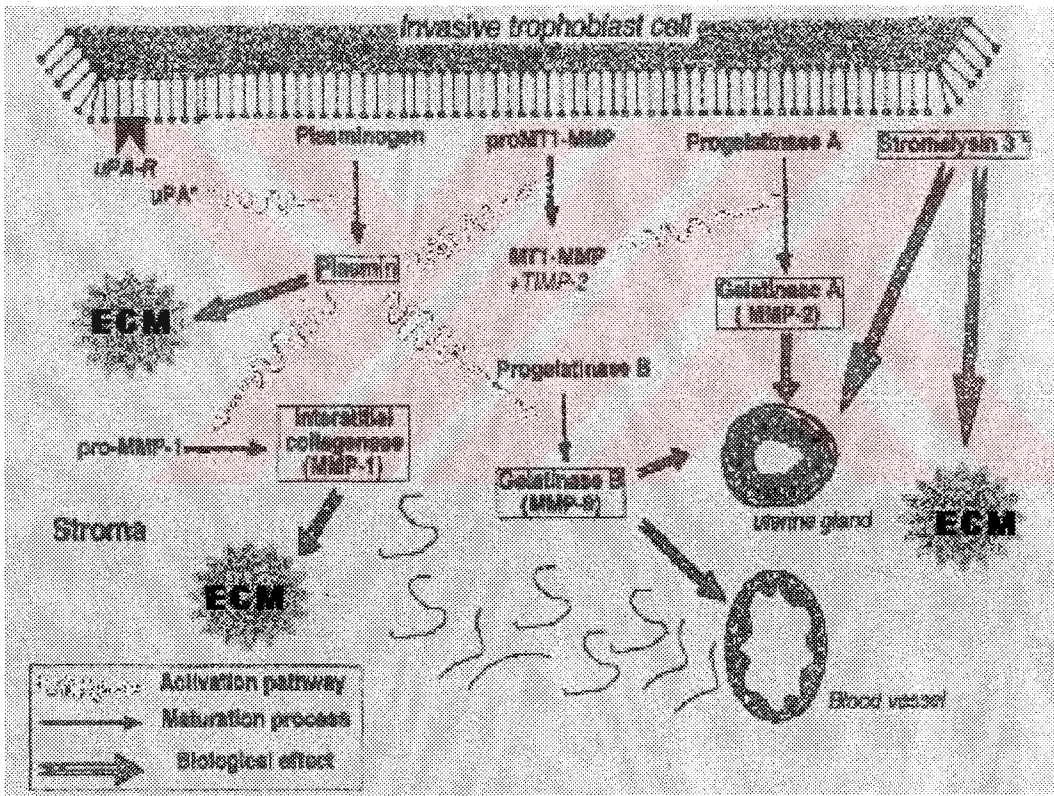
Trofoblast invazyonuna kolaylık sağlayan ve ürokinaz plazmin aktivatörü ile metalloproteinaz-9 aktivitesini düzenleyen en önemli faktörlerin başında LIF ve EGF gelmektedir. Diğer faktörlerden CSF-1, IGF ve Th sitokinler IL-1 ve CSF-1 trofoblast hücre büyümesini ve fonksiyonunu artırırken, IGFBP-1 ve Th-1 sitokinler IFN- δ ve TNF- α trofoblast büyümesini sınırlayabilirler (228). Bu sitokinler ve büyüme faktörleri hCG'yi (229) ve trofoblast hücrelerinden progesteron üretimini etkiler (230).

İnvazyon sırasında trofoblastın gelişiminde de bazı faktörler önemli rol oynarlar. Örneğin VEGF, PDGF, PAF ve anjiopoietinler vasküler gelişimin erken basamakları için kritik faktörlerdir. Hepatosit büyüme faktörü (HGF: Hepatosit Growth Faktör) mezenşim ve mezenşim c-met, tirozin kinaz reseptörü tarafından üretilir ve epitelyal hücrelerden salınır. Sitotrofoblastın farklılaşmasına ve büyümesine katılır ve aynı zamanda invazyonun derinliğini ayarlar (231).

Trofoblast büyümesinde apoptotik faktörler de görev almaktadır. TNF- α ve TGF- β apoptozisin indükleyicileridirler. Ayrıca maternal embriyonik etkileşimde homeotik (HOXA) genler de rol almaktadır. Uterusda HOXA geni salınımı gonadal steroidler tarafından düzenlenir (232). Uterusdaki gonadal steroidler stromal hücre proliferasyonunu düzenleyen HOXA-9, HOXA-10, HOXA-11 salınımını düzenlerler. Aynı zamanda HOXA-11, LIF salınımını kolaylaştırır. Uterustaki HOXA-10 ve LIF, desidualizasyonu kolaylaştıran prostaglandin reseptör salınımını etkileyebilir. IL-11'in son zamanlarda desidualizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir, IL-11 geni yok edilen farelerde desidualizasyon eksikliği görülmüştür (232).

2.4.1 İNVAZYON FAKTÖRLERİ

İnvazyon, ovulasyondan 8 gün sonra blastosistin stromaya gömülmesiyle gerçekleşen, kontrollü proteolitik işlemdir. Memeli türlerinde, bazal membran yıkılması gereken ilk bariyerdur ve trofoblast stromal bölümü istila ederek maternal kan damarlarına penetre olur. Bu faaliyet serine yıkımına neden olan proteinazlar sayesinde gerçekleşir (16). Bunlar matriks metalloproteinazlar ve plazminojen aktivatörleridir (Şekil.2.4.1).



Şekil.2.4.1 Trofoblast invazyonu proteinaz ailesi tarafından gerçekleştirilir. Sinsityotrofoblasttan uPA plasmini aktive eder, bu da MMP-1, MMP-9 ve MT1-MMP'yi aktive eder. Daha sonra MT1-MMP, MMP-2'yi aktive eder.

2.4.1.1 Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstrasellüler matriksin birçok bileşenine karşı proteolitik aktiviteye sahip, çinko bağımlı endopeptidazlardır (233). Çoğu inaktif enzimler olarak salınır, ekstrasellüler matrikste aktive edilir ve aktive edilmiş enzimler ekstrasellüler matriksi sindirir. Yapısal özelliklerine göre 3 gruba ayrılırlar; Kollajenazlar, jelatinazlar ve stromelysinler.

Kollajenazlar, MMP-1 ve MMP-8'i içerir. Bu enzimler kollajen I, II, III, VII ve X'u sindirir. İnsan preimplantasyon embriyosu, endometriyumun bazal membranında kollajen IV'ün azalmasına neden olan MMP'lar üretir ve bu proteinaz aktivitesinin kültür sırasında yükseldiği görülmüştür. İnvaziv insan sitotrofoblastları ilk aşamada birçok MMP'ları sentezler. Bu MMP'lardan bazıları gebeliğin sonraki aşamalarında invaziv olmayan hücrelerde görülür.

Jelatinazlar, kollajen IV'ü ve denatüre kollajeni sindirirler. Bu grupta, 72000 jelatinaz (jelatinaz A veya MMP-2) invaziv olmayan fibroblastlar tarafından üretilirken, 92000 jelatinaz (jelatinaz B veya MMP-9) sitotrofoblastlar tarafından üretilir ve invazyon için kritiktir (234). Yapılan çalışmalara göre MMP-2 ve MMP-9 mRNA'ları ekstrasellüler trofoblast hücreleri tarafından eksprese edilir ve trofoblast invazyonuna aracılık eden önemli proteinazlardandır (235). İn situ hibridizasyon ile MMP-9 mRNA'sının gebeliğin 6.5 ve 7.5 günündeki implante embriyoyu çevreleyen trofoblast dev hücrelerinde bol bulunduğu gösterilmiştir (236). MMP-2'nin aktivasyonu trofoblastın yüzeyinde meydana gelir ve aktif membran tip MT1-MMP2 aracılığıyla gerçekleşir. MT-1-MMP ve intersitisyel kollajenaz olan MMP-1 insan trofoblast hücreleri tarafından eksprese edilir (237).

Stromelysinler, fibronektin, laminin, kollajen IV, V, VII ve proteoglikanların yıkımına neden olurlar. Stromelysin-3 insan ekstrasellüler trofoblast hücrelerinde ve sinsityotrofoblastın villusunda eksprese edilir. Ardından desidual yatağın distal bölgelerini istila ederek $\alpha1\beta1$ integrinini eksprese eder (238).

2.4.1.2 Plazminojen Aktivatörleri

Ekstrasellüler matriksin yıkımında geniş bir proteolitik faaliyetle, plasminojenin plasmine dönüşümünü katalizleyen bu proteinazlar urokinaz tip (uPA) olarak adlandırılır.

uPA tarafından aktive edilen plazmin kuvvetli bir proteinazdır. Ayrıca intersitisyel prokollejenazı (pro-MMP-1), projelatinaz B (pro-MMP-9) ve pro MT1-MMP'yi aktive edebilir (237). MT-MMP daha önce de bahsedildiği gibi MMP-2'nin aktivasyonuna neden olur (239). Kültür çalışmalarında insan trofoblast hücrelerinin uPA reseptörlerini eksprese ettikleri görülmüştür (240). Böylece bu reseptörler uPA'yı bağlayarak trofoblast hücre yüzeyinde plasminojenin aktivitesini arttırabilirler. uPA reseptörlerinin polarize ekspresyonu, göç eden ekstravillus trofoblast hücrelerinin yakınlarında lokalize olmuştur. Bu nedenle reseptörler trofoblast migrasyonuna direkt katılabilirler. Ayrıca ürokinaz reseptörleri villus trofoblastın apikal yüzeyinde eksprese edilirler ve burada intervillus boşluklarında plazmin generasyonuna ve fibrin uzaklaşmasına kolaylık sağlayabilirler (241).

İmmünoreaktif uPA ve PA sisteminin inhibitörleri, plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI) -1 ve -2, erken insan implantasyon sitelerinde özellikle invaziv ekstravillus trofoblast hücrelerinde ve sinsityotrofoblastlarda mevcuttur (242). uPA / PAI-1 komplekslerinin arttırılması ve azaltılmasına, düşük yoğunluktaki lipoprotein reseptör-bağımlı protein tarafından aracılık edildiği düşünülmektedir. Böylece trofoblast yüzeyinde inaktif proteinaz kompleksini yok eder ve trofoblastın invazyonunun devamına izin verir.

Bu enzimler ilk olarak inaktif proenzimler olarak salgılanırlar ve sekonder olarak aktive edilirler. Aktive edilmiş enzimlerin fonksiyonu metalloproteinazların doku inhibitörleri olarak isimlendirilen lokal inhibitörler tarafından kontrol edilir. Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre insan sitotrofoblast hücreleri, trofoblast dev hücreleri gibi invaziv süreç boyunca farklılaşırken MMP-9 ürettikleri gösterilmiştir. MMP-9 ve TIMP-3 sitotrofoblast farklılaşması boyunca eksprese edilir ve invaziv faz boyunca up-regule edilir (243). Ayrıca, trofoblastik MMP'lar ve sitotrofoblast invazyonu EGF, IL-1, LIF ve TGF- β gibi endometriyal parakrin faktörlerin kontrolü altındadır ve bu sitokinler MMP-9' u indüklerler (244).

3.MATERYAL VE METOD

DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEM

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen seksüel olgunluğa erişmiş ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen Wistar albino dişi sıçanlar; 22°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve aydınlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak; stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındılar.

Sıçanların sikluslarının belirlenmesi için günlük vajinal smearlar alındı. Smear fırçalarıyla alınan vajinal sürüntüler H-E boyası ile boyanarak incelendi. Proöstrus döneminde oldukları saptanan dişi sıçanlar bir gece uygun şartlarda kafeste çiftleşmeye bırakıldılar. Ertesi gün servikal sürüntüde sperm tespit yöntemiyle gebe olarak kabul edilen hayvanlar ayrı kafeslere alındı. Ayrı kafeslere alındıkları gün 0,5. gün olarak kabul edilip; gebeliklerinin 5. 6. ve 7. gününde servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilen sıçanların uterusları çıkarılıp tespit solüsyonuna (% 10 formalin) alındı.

Kontrol grubu olarak, vajinal smear yöntemi ile siklusları tespit edilen ve östrus döneminde oldukları saptanan sıçanların aynı yöntemle uterusları alınarak tespit solüsyonunda bekletildi. 24-48 saat sonra rutin parafin doku takibi işleminin ardından alınan 5 mikronluk kesitlerde histokimya ve immünohistokimya boyamaları yapıldı.

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 2003-69 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama için gerekli kimyasal malzemeler Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2002-14 nolu proje ile desteklenmiştir.

3.1 IŞIK MİKROSKOBİK GEREÇ VE YÖNTEMİ

Parafin Takibi

1-Fiksasyon:24-48 saat % 10 formalin	
2-24 saat akarsuda yıkama	
3- %60 etil alkol	30 dk
4- %70 etil alkol	30 dk
5- %80 etil alkol	30 dk
6- %95 etil alkol	30 dk
7- %100 etil alkol I'de	1 saat
8- %100 etil alkol II'de	1 saat
9- ksilen-alkol'de	30 dk
10- ksilen I' de	45 dk
11- ksilen II'de	45 dk
12- ksilen-parafinde	30 dk
13-60°C'lik etüvde erimiş parafinde	1 saat
14- parafin II'de	1 saat
15- parafin III'de	1 saat bekletildiler

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek bloklandı. Işık mikroskopunda incelemek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 mikronluk seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümüne histokimyasal yöntemlerle Hematoksilen-Eosin (Lot = 110203 & Lot = 090203, Surgipath), Periodik Asit-Schiff (Lot = 395, Sigma), Masson Trikrom (Lot = 410210, Bio- optica) boyaları uygulandı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immünohistokimya boyaması yapıldı.

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

Hematoksilen-Eozin Boyası

1-Ksilen I	30dk
2-Ksilen II	30dk
3-% 95 alkol	2dk
4-%80 alkol	2dk
5-%70 alkol	2dk
6-%60 alkol	2dk
7-Akar su	5dk
8-Hematoksilen	3dk
9-Akarsu	5dk
10-Asit-alkol	1sn
11-Akarsu	2dk
12-Eozin	4dk
13- %80 alkol	2dk
14-%95 alkol	2dk
15-Ksilen	30-60dk
16-Entellan ile kapama	

PAS boyası

1- Ksilen I	30dk
2-Ksilen II	30dk
3-% 95 alkol	2dk
4-%80 alkol	2dk
5-%70 alkol	2dk
6-%60 alkol	2dk
7-Distilesu	5dk
8-Periodik asit solusyonu	5dk
9-Distile su	30sn
10-Schiff's Reagent solusyonu	15dk (Karanlık ortamda)
11-Akar suda	5dk
12-Hematoksilen	1dk

13-Akar su	5dk
14- %80 alkol	2dk
15-%95 alkol	2dk
16-Ksilen	30-60dk
17-Entellan ile kapama	

Masson Trikrom Boyası

1-Deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra	
2-Distile su	5dk
3-A solusyonundan ardından B solusyonu	10dk
4-Yıkamadan boya dökülür üzerine C solusyonu	4dk
5-Distile suda yıkama, üzerine D solusyonu	4dk
6-Distile suda yıkama ve üzerine E solusyonu	10dk
7-Yıkamadan boya dökülür ve üzerine F solusyonu	5dk
8- Distile suda	5dk
9- %80 alkol	2dk
10-%95 alkol	2dk
11-Ksilen	30dk
12-Entellan ile kapama	

3.2 İNDİREK İMMÜNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

Kullanılan Malzemeler:

Ksilen

Alkol

PBS (Fosfat Buffer Solusyonu)

Tripsin (1/19)(50 ml Tris base + 950 ml NaCl)

Dakopen (Dako, Lot = 8260, Glostrup, Denmark)

%3 Hidrojen Peroksidaz (Dako, Lot = 438, Denmark)

Primer Antikorlar:

1. MUC1 Ab-5 (MH1, Mouse Mab, Lot = 1630R209, Neomarkers, CA)
 2. Laminin (Developed in Rabbit, Lot = 59H4839, Sigma, USA)
 3. Collagen IV (C-1926) (Lot = 51K4856, Sigma, USA)
 4. Fibronectin Ab-11 (Mouse Mab, Lot = 1351R106, Neomarkers, CA)
 5. TGF- α Ab-1 (Clone MF9) (Lot = 670PO10, Neomarkers, CA)
 6. IL-1 β (R-20) (Goat polyclonal IgG, Lot = B262, Santa Cruz Biotechnology, CA)
 7. TNF- α (1E8-G6) (Mouse monoclonal IgG, Lot = F042, Santa Cruz Biotechn., CA)
 8. İntegrin β 1 (Ab-1) (Monoclonal mouse IgG, Lot = D09400-3, Oncogene, Germany)
 9. İntegrin α 3 (Ab-1) (Monoclon. mouse IgG, Lot = D01258-3, Calbiochem, Germany)
 10. İntegrin α v (Human, Type2 Mouse, Lot = B31539, Calbiochem, Germany)
- Sekonder Antikor Kit (Biotinylated IgG, Lot = 20570999, Zymed, South San Francisco)
- Mayers Hematoksilen (Lot = 72804E, Richard- Allan Scientific,CA)
- Entellan (Lot = 1866, Merck)

Boyama Yöntemi

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

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

8-Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, Dakopenle çevresine daire çizildi. Bu işlem dokuların kurumasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı.

- 9- 1/19'luk (95cc CaCl₂ + 5cc tripsin) tripsinde 15 dakika bekletildi.
- 10-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 11-%3'lük Hidrojen Peroksidaz'da 5 dakika tutuldu.
- 12-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 13-Blocking solution damlatıldı, 1 saat bekletildi.
- 14-Dokulara Primer Antikor damlatılıp 1 gece +4°C'de nemli ve karanlık ortamda bekletildi. (Bizim çalışmamızda primer olarak laminin, kollajen tipIV, fibronectin, MUC1, TGF α , IL-1 β , TNF- α , β 1, α 3, α v kullanıldı)
- 15-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 16-Biyotinlenmiş sekonder antikor uygulandı.(Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No:85-9943) 30dk
- 17- PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 18-Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dk uygulandı.
- 19-PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 20-DAP boyaması yapıldı 3 dk.
- 21-Distile su ile yıkandı.
- 22-Mayers hematoksilene zıt boyama yapıldı 1-2 dk.
- 23-Distile su ile yıkandı
- 24-%80 etil alkol 2 dk.
- 25-%90 etil alkol 2 dk.
- 26-Ksilen 30 dk.
- 27-Entellan ile kapatıldı.

4. BULGULAR

4.1 Histokimyasal Bulgular

Normal Uterus

Gebe olmayan sıçan uterusundan transvers alınan 5 mikronluk kesitlerde, Hematoksilen-Eozin boyasıyla yapılan preparatlar mikroskopta 4X10 ve 10X10'luk büyütmelemlerde incelendiğinde 3 tabaka ayırt edilmekteydi. Uterusu en dıştan saran seroza (perimetriyum) tabakası, ortada musküler tabaka (myometriyum) ve en içte mukoza (endometriyum) tabakası gözlemlendi. Ayrıca perimetriyumun devamı olarak, uterusu giren bütün damarların bir araya geldiği mezometriyal kısım ayırt edildi (Resim 4.1).

Perimetriyum incelendiğinde, serozayı bağ dokusu tarafından desteklenen tek sıralı mezotelyal hücrelerin oluşturduğu gözlemlendi. Bu tabakanın bağ dokusu hücrelerinden ve kan damarından zengin olduğu dikkati çekmekteydi. Damarlar organa, mezometriyal kısmından girmektedir (Resim 4.2).

Myometriyumun ise uterusun en kalın tabakası olup düz kas hücrelerinden oluştuğu ve kas liflerinin bağ dokusu tarafından demetler halinde ayrıldığı gözlemlendi. Bu özel hücreler mekik şeklinde, geniş ve uzundu. Hücrelerin tam ortasına yerleşmiş tek çekirdek içerdikleri tespit edildi. Yer yer nükleuslar spiral şekilde de gözlenebilmekteydi (Resim 4.2). Bu kas kitlesi kendi arasında da 2 tabaka halinde gözlemlendi. 1- İç vasküler tabaka: Çoğunlukla sirküler düzenlenmiş liflerden oluşmuştur, 2- Dış vasküler tabaka: Longitudinal kas lifleri ile çok sayıda kan damarından oluşmuştur.

Endometriyum, uterusun lümenini kaplayarak, myometriyum tabakasına sıkıca yapışmış mukoza tabakası olarak ayırt edilmekteydi. Endometriyum tabakasında çeşitli tübüler uterus bezleri, ince bir lamina propria ve endometriyal stroma gözlemlendi. Yüzey epiteli basit prizmatik epitelten oluşmuştu ve bu epiteldeki bazı hücrelerin silyalara sahip olduğu izlendi. Uterus bezleri yüzey epitelinin altında, stroma boyunca

uzanmaktaydı ve bu bağ dokusu tarafından birbirlerinden ayrılmışlardı. Stromal hücreler ise düzensiz biçimde yerleşmişlerdi. Geniş ve oval nükleuslarıyla mezenşimal hücrelere benzedikleri tespit edilmişti. Bu hücrelerin, epitelin altında, retiküler liflerin oluşturduğu kafesin arasında yoğunlaşarak bazal lamina formunu oluşturdukları gözlemlendi. Ayrıca stromada net ayırt edilmemekle birlikte lenfositler, granüler lökositler ve makrofajlar gözlemlendi. Endometriyum siklik değişikliklere göre fonksiyon değiştiren bir tabaka olduğu için kan damarları bakımından oldukça zengin olduğu dikkati çekti. Uterus arterlerinden birçok dalın myometriyumun orta tabakasına (vasküler tabaka) penetre olarak, myometriyumun içinde dairesel olarak dağıldıkları gözlemlendi. Bu arterlerin endometriyumun yüzey kısmında kapiller yatak meydana getirdikleri ve endometriyumun bazal ve yüzey damarları olarak bölümlere ayrıldıkları izlendi. Uterusta venöz sistemin ise düzensiz bir form gösterdiği tespit edildi. Myometriyal-endometriyal sınır kısmında geniş venler gözlenirken, lenf damarlarının endometriyumun yüzey zonu dışında bütün tabakaları boyunca bol bulunduğu gözlemlendi.

Gebeliğin 5. Gününde Uterus

Gebeliğin 5. gününde uterusda belirgin olarak ilk desidual reaksiyon gözlemlendi. Bu desidual alan lümen epitelinin mezometriyal kısmında lokal olarak küçük bir bölgeyle sınırlıydı (Resim 4.3, Resim 4.4). Desidual hücrelerin arasında granülfü bez (GMG: Granulated Metrial Gland) olduğu düşünülen hücreler de bulunmaktaydı (Resim 4.3, Resim 4.4). Lümen epiteli, stroma ve myometriyum tabakalarında gebe olmayan uterusu göre farklılık gözlenmemekteydi.

Gebeliğin 6. Gününde Uterus

Gebeliğin 6. gününde sıçan uterusunun Hematoksilen-Eozin ile boyanmış transvers kesiti incelendiğinde, gebe olmayan uterus dokusunda ayırt edilen 3 tabaka da görülmekteydi. Uterusu en dıştan seroza (perimetriyum) tabakasının sardığı, ortada musküler tabaka (myometriyum) ve en iç tabakada mukoza (endometriyum) ayırt edildi. Gebeliğe hazırlık aşaması olarak teşhis edilen 6. günün en belirgin özelliği; normal sıçan uterusunda mezometriyal kısımda çok sayıda arter ve ven gözlenirken, 5. günde başlayan desidualizasyonun, gebeliğin 6. gününde oldukça belirgin bir alanı

kaplamasıydı (Resim 4.5). Bu alanın etrafının en dıştan perimetriyum ve hemen altında ise myometriyumun en dış tabakası olan, longitudinal kas tabakasından oluşan dış vasküler tabaka ile sarıldığı dikkati çekmekteydi. Desidualizasyonun 5. günde gelişmeye başladığı bu alanda, stromal hücrelerin içlerinde glikojen ve lipid biriktirerek daha da genişledikleri tespit edilmişti (Resim 4.6).

Myometriyum tabakasında ise, östrojenin artan seviyesine cevap olarak düz kas hücrelerinin boyutlarının (hipertrofi) ve sayısının (hiperplazi) artmaya başladığı izlendi. Ayrıca myometriyumun iç vasküler tabakası ile çok sayıda kan damarı içeren orta vasküler tabaka arasındaki sınırdaki plasentasyonu başlatacağı düşünülen granüllü metrial bez (GMG) hücreleri olarak adlandırılmış yapıların stromada azalmaya başladığı tespit edildi (Resim 4.6). Endometriyumda ise, lümen boyunca prizmatik epitel hücrelerinin uzandığı ve bu tabakadaki bezlerin implantasyona hazırlık amacıyla genişleyip ve şişmiş oldukları gözlemlendi.

Gebeliğin 7. Gününde Uterus

Gebeliğin 7. gününde sıçan uterusunun Hematoksilen-Eozin ile boyanmış transvers kesiti incelendiğinde, GMG hücrelerinin aktive olmasıyla, desidual hücrelerin daha da genişleyerek ve sayıca artarak uterus lümeninin etrafını sardığı tespit edildi. Aynı zamanda embriyonun anti-mezometriyal yönde desidual yatağa doğru ilerleyerek implantasyonun gerçekleştiği tespit edildi (Resim 4.7). Mezometriyumun, tekrar kan damarlarının ve bağ dokusu elemanlarının yer aldığı bir yapı haline dönüştüğü görüldü. Uterusu en dıştan seroza (perimetriyum) tabakası sarmaktaydı. Perimetriyumun hemen altında longitudinal kas tabakasından oluşan dış vasküler tabaka, sirküler liflerden oluşan iç kas tabakası olan iç-vasküler tabakanın incelmış ve genişlemiş olarak uzandığı tespit edildi. Bu kas liflerinin implantasyon sırasında boyutlarının ve uzunluklarının arttığı belirlendi. Myometriyumun altında düz kas tabakasına komşu olarak bulunan stromal ödem alanı gözlenmekteydi. İmplantasyon alanında stromal hücrelerin proliferasyon olduğu, içlerinde glikojen ve lipid biriktirerek genişledikleri izlendi. Desidual hücreler adını alan bu polihedral şekilli geniş hücrelerin, sitoplazmalarındaki glikojen nedeniyle pembeye boyandıkları gözlemlendi.

Embriyonun gömülmüş olduğu bu desidual yatağın, embriyoya komşu olan primer desidual zon ve myometriyuma komşu olan sekonder desidual zon olarak iki kısma ayrıldığı belirlendi (Resim 4.7). Desidual reaksiyonun sekonder zonunda bol miktarda uterus bezleri ve dilate kan damarları görüldü. Embriyonun yerleşmiş olduğu boşluğun yolk kesesi kavitesi (vitellus boşluğu) olduğu tespit edildi. Embriyoda ise birkaç tabaka ayırt edildi. Embriyoyu en dıştan primer embriyonik endoderm hücrelerinin pariyetal tabakasının sardığı, içten ise primer embriyonik endoderm hücrelerinin visseral tabakasının kapladığı gözlemlendi. Bu visseral ve pariyetal embriyonik endoderm tabakalarının arasında Reichert's membranı uzanmaktaydı. Trofoblastın soluk renkli düz apikal yüzey hücrelerinden oluşmuş epitelyal tabaka içerdiği izlendi. Bu merkezi zon boyunca, bazal laminanın fetal kısmında sıkı hücresel yapılar devam etmekteydi. Bir ekto plasental koni ile içte ekstraembriyonik ektoderm ve dışta embriyonik ektoderm hücrelerinden oluştuğu ayırt edilirken, bu iki tabakanın ortasında ise proamniyotik kavitenin (boşluğun) geliştiği tespit edildi (Resim 4.8).

Uterus lümen epitelini hem mezometriyal hem de antimezometriyal kısımda gözlemlendi. Fakat ilk implantasyon bölgesi olan implantasyon odasının merkezi duvarlarında yıkıldığı dikkati çekmekteydi. Desidual hücrelerin arasından iç hücre kitlesinin devam ettiği, bazal lamina boyunca penetre olduğu ve bazal laminanın embriyonik kısmında sitoplazmanın düz bir yayılma formu aldığı izlendi. Gebeliğin 7. gününde, implantasyon bölgesinde trofoblast ile desidua arasında bazal lamina gözlenmedi. Desidual hücrelerin bazal laminanın büyük kısmına penetre oldukları tespit edildi. Sadece uterus lümeninin bir kısmında kalıntı olarak bir bazal lamina gözlemlendi. Ayrıca desidual hücrelerin endometriyal epitel hücrelere ve bazal lamina sıklıkla yapıştıkları izlendi. Desidual hücreler oldukça genişlemiş poligonal şekilli idi ve mezometriyal-antimezometriyal eksen boyunca uzandıkları gözlemlendi. Sitoplazmalarının içinde bol glikojen ve lipid içerdikleri ve çekirdeklerinin ökromatik olduğu tespit edildi.

PAS Boyası

Kuvvetli bir glikojen boyası olan PAS boyası ile boyadığımız gebe olmayan normal sıçan uterusunu incelediğimizde lümen epiteli ve bez epitelinde, PAS pozitif boyanma gözlenmedi, buna karşılık uterusun her iki myometriyum tabakasının ve stromanın kuvvetli pozitif boyandığı gözlemlendi (Resim 4.9). Gebeliğin 6. gününde ise uterus epitelinin altındaki bazal membranda, stroma ve myometriyumun iç vasküler tabakasında kuvvetli PAS pozitif reaksiyon gerçekleştiği izlendi. Ayrıca desidual hücreler ve GMG hücrelerinin içindeki granüllerin de kuvvetli PAS pozitif boyandığı dikkati çekmekteydi (Resim 4.10). Gebeliğin 7. gününde ise embriyoya en yakın zon olan primer desidual zonda kuvvetli PAS pozitif reaksiyon tespit edildi (Resim 4.11). Ayrıca lümen epitelinde, embriyoyu saran primer ekstra embriyonik endodermin pariyetal tabakası ve Reichert's membranında kuvvetli PAS pozitif reaksiyon gözlemlendi (Resim 4.12).

Masson Trikrom Boyası

Kollajen lif boyası olan Masson Trikrom ile boyanan gebe olmayan uterusu incelediğimizde kollajen liflerin mezometriyal kısımdaki kan damarlarının arasındaki bağ dokusunda ve epitelin altındaki stromanın arasında mavi renkte boyandığı tespit edildi. Kırmızıya boyanan diğer yapılar: myometriyum tabakasındaki düz kaslar, uterus lümen ve bez epiteli ile bağ dokusu hücreleri olarak gözlemlendi (Resim 4.13). Gebeliğin 6. gününde mezometriyum kısmındaki maviye boyanan kollajen liflerin ortada desidual hücrelerin gelişmeye başlamasından dolayı kenara itilmeye başladığı, aynı şekilde stromanın arasındaki kollajen liflerin myometriyumun iç kas tabakasının altına itilmeye başladığı tespit edildi (Resim 4.14). 7. günde ise stromanın altındaki kollajen liflerin iç sirküler myometriyal düz kaslara paralel olarak tamamen kenara itilmiş olduğu ve bir miktar da mezometriyum kısmında kaldığı gözlemlendi (Resim 4.15). Embriyonun gömüldüğü desidual yatakta da hiç kollajen lifin gözlenmediği tespit edildi (Resim 4.16).

4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda implantasyonda rol alan moleküller günlere ve boyanma şiddetlerine göre farklı dağılımlar göstermişlerdir (Tablo 4.1).

MUC1

Bariyer protein olan anti-MUC1 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusu incelendiğinde, uterus epitelinde şiddetli (+++) boyanma gözlenirken (Resim 4.17), bez lümen epitelinde ve stromada zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (Resim 4.18).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümeninde orta şiddetli (++) bir immünoreaksiyon gözlenirken ve stromada boyanma zayıftı (+). Mezometrial kısımdaki GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual hücrelerde ise kuvvetli (+++) boyanma gözlemlendi (Resim 4.19).

Gebeliğin 7. gününde, uterus epitelinde, trofoblast hücrelerinde ve desidual hücrelerde belirgin bir boyanma gözlenmezken ($\pm$) bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde zayıf (+) boyanma olduğu tespit edildi (Resim 4.20).

Laminin

Bazal membran proteinlerinin en büyüğü olan laminini göstermek amacıyla, anti-laminin primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunu incelediğimizde, uterus ve bez lümen epitelinde ve bazal membranında zayıf (+), stromada ise orta şiddetli (++) immünoreaksiyon gözlemlendi (Resim 4.21).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümen epitelinde ve bazal membranında, stromada, GMG hücrelerinde ve özellikle desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual alanda oldukça şiddetli (+++) laminin boyanması vardı (Resim 4.22).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast hücreleriyle, uterus lümen epitel hücrelerinin bazalinde ve apikalinde oldukça yoğun (+++) immünoreaksiyon olduğu ve desidual hücrelerde belirsiz ($\pm$) iken bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde normal (++) boyanma olduğu tespit edildi (Resim 4.23).

Kollajen IV

Diğer bazal membran proteini olan anti-kollajen IV primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunda, uterus ve bez lümen epiteli ve bazal membranında zayıf (+) immünoreaksiyon olduğu, stromada ise normal (++) boyanma olduğu gözlemlendi (Resim 4.24).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümen epiteli ve bazal membranında, stromada, GMG hücrelerinde ve mezometriyum bölgesindeki desidual alanda oldukça kuvvetli (+++) immünoreaksiyon vardı (Resim 4.25).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast ve uterus lümen epitel hücrelerinde zayıf (+) boyanma gözlenirken, embriyonun gömülü olduğu desidual yataktaki desidual hücrelerde ve aralarındaki damarların endotellerinde orta şiddetli (++) boyanma olduğu tespit edildi (Resim 4.26).

Fibronektin

Ekstrasellüler matriks proteini anti-fibronektin primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunda, uterus ve bez lümen epiteli ile bazal membranlarında belirgin olmayan ($\pm$) boyanma olduğu, stromada ise orta şiddetli (++) immünoreaksiyon olduğu gözlemlendi (Resim 4.27).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümen epiteli ve bazal membranında immünoreaksiyon zayıf (+) bir artış gösterirken, stromada, GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual hücrelerde kuvvetli (++) bir immünoreaksiyon tespit edildi (Resim 4.28).

Gebeliğin 7. gününde, uterus lümen epiteli, trofoblast ve desidual hücrelerde belirsiz ($\pm$) bir boyanma gözlenirken, bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde zayıf (+) bir immünoreaksiyon vardı (Resim 4.29).

TGF- α

Büyüme faktörü olan anti-TGF primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunu incelediğimizde, uterus epitelinde kuvvetli (++) boyanma gözlenirken, stromada zayıf (+) bir immünoreaksiyon tespit edildi (Resim 4.30).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümen epitelinde ve stromada normal (++) immünoreaksiyon gözlenirken, GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual hücrelerde şiddetli (+++) bir boyanma vardı (Resim 4.31).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast hücrelerinde, lümen epitelinin apikalinde, desidual hücrelerde ve bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde oldukça şiddetli (+++) immünoreaksiyon tespit edildi (Resim 4.32).

IL-1 β

Sitokinlerden anti-IL-1 β primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunda, uterus epiteli ve bez lümen epitelinde belirsiz ($\pm$) bir immünoreaksiyon olduğu, stromada ise zayıf (+) boyanma olduğu gözlemlendi (Resim 4.33).

Gebeliğin 6. gününde, stromada zayıf şiddetli (+) immünoreaksiyon gözlenirken, uterus lümen epitelinde, GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual hücrelerde orta şiddetli (++) boyanma gözlemlendi (Resim 4.34).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast hücrelerinde, uterus lümen epitel hücrelerinin apikalinde, desidual hücrelerde ve bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde oldukça şiddetli (+++) boyanma vardı (Resim 4.35).

TNF- α

Sitokinlerden anti-TNF- α primer antikor ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunda, uterus epiteli ve bez lümen epitelinde belirsiz ($\pm$) immünoreaksiyon olduğu, stromada ise zayıf (+) boyanma olduğu tespit edildi (Resim 4.36).

Gebeliğin 6. gününde, stromada zayıf şiddetli (+) immünoreaksiyon gözlenirken, uterus lümen epitelinde, GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual hücrelerde orta şiddetli (++) boyanma gözlemlendi (Resim 4.37).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast hücrelerinde ve uterus lümen epitel hücrelerinin bazalinde ve apikalinde şiddetli (+++) immünoreaksiyon gözlenirken, desidual hücrelerde ve bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde orta şiddette (++) boyanma olduğu tespit edildi (Resim 4.38).

β 1 integrini

Anti- β 1 integrini ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunu incelediğimizde, uterus epiteli ve bez lümen epitelinde ve stromada belirgin immünoreaksiyon olmadığı ($\pm$) gözlemlendi (Resim 4.39).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümeninde zayıf immünoreaksiyon (+) gözlenmeye başlarken, stromada orta şiddetli (++) bir boyanma gözlemlendi. Desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki GMG hücreleri ve desidual hücrelerde ise oldukça şiddetli (+++) immünoreaksiyon artışı vardı (Resim 4.40).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast hücrelerinde ve uterus lümen epitel hücrelerinin bazalinde yoğun bir boyanma (+++) dikkat çekiciydi. Desidual hücrelerde belirsiz ($\pm$) boyanma gözlenirken, bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde orta şiddetli (++) reaksiyon olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.41).

$\alpha 3$ integrin

Anti- $\alpha 3$ integrini ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunda, uterus lümen epitel, bez epitelinde ve stromada belirsiz ($\pm$) bir boyanma olduğu gözlemlendi (Resim 4.42).

Gebeliğin 6. gününde, uterus lümeninde immünoreaksiyon zayıf (+) olarak gözlenirken, stromada orta şiddetli (++) , GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesindeki desidual hücrelerde orta şiddetli (+++) boyanma gözlemlendi (Resim 4.43).

Gebeliğin 7. gününde, trofoblast hücrelerinde ve uterus lümen epitel hücrelerinin bazalinde ve apikalinde yoğun bir boyanma (+++), desidual hücrelerde ise oldukça belirsiz ($\pm$) boyanma gözlenirken, bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde orta şiddetli (++) reaksiyon tespit edildi (Resim 4.44).

αv integrin

Anti- αv integrini ile indirek immünohistokimyasal yöntemle boyanmış gebe olmayan sıçan uterusunu incelediğimizde, uterus ve bez lümen epitelinde ve stromada belirsiz ($\pm$) bir immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (Resim 4.45).

Gebeliğin 6. gününde uterus lümen epitelindeki boyanma orta şiddetli (++) iken, stromada, GMG hücrelerinde ve desidualizasyonun başladığı mezometriyum bölgesinde ki desidual hücrelerde şiddetli (+++) boyanma gözlemlendi (Resim 4.46).

Gebeliğin 7. gününde trofoblast hücrelerinin büyük bir kısmında belirsiz bir immünoreaksiyon gözlenirken ($\pm$), uterus lümen epitel hücrelerinin yalnızca bazalinde orta şiddetli (++) immünoreaksiyon olduğu gözlemlendi. Embriyonun yerleşmiş olduğu alandaki desidual hücrelerde belirsiz bir boyanma gözlenirken ($\pm$) bu hücrelerin aralarındaki damarların endotellerinde şiddetli (++) immünoreaksiyon olduğu tespit edildi (Resim 4.47).

Tablo 4.1 Adezyon moleküllerinin implantasyonda günlere göre dağılımı

		Lümen epiteli	Trofoblast	Desidua	Damar	Stroma
MUC1	Kontrol	+++				+
	6. gün	++		+++		+
	7. gün	±	±	±	+	
Laminin	Kontrol	+				++
	6. Gün	+++		+++		+++
	7. Gün	+++	+++	±	++	
Kollajen-IV	Kontrol	+				++
	6. gün	+++		+++		+++
	7. gün	+	+	++	++	
Fibronektin	Kontrol	±				++
	6. Gün	+		+++		+++
	7. Gün	±	±	±	+	
TGF α	Kontrol	++				+
	6. Gün	++		+++		++
	7. Gün	+++	+++	+++	+++	
IL-1 β	Kontrol	±				+
	6. Gün	++		++		+
	7. Gün	+++	+++	+++	+++	
TNF- α	Kontrol	±				+
	6. Gün	+		++		+
	7. Gün	+++	+++	++	+++	
β 1 integrin	Kontrol	±				±
	6. Gün	+		+++		++
	7. Gün	+++	+++	±	++	
α 3	Kontrol	±				±
	6. Gün	+		++		++
	7. Gün	+++	+++	±	++	
α v	Kontrol	±				±
	6. Gün	++		+++		+++
	7. Gün	++	±	±	++	

5. TARTIŞMA

Blastosistin endometriyuma implantasyonu oldukça karmaşık olaylar zinciri sonunda gerçekleşmektedir. Embriyo ve anne tarafından sentezlenen bir çok molekül embriyoyu veya uterusu etkileyerek implantasyonun gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (3,5,6,7). İmplantasyonu gerçekleştirmek için endometriyumda ortaya çıkan değişiklikler luteal fazın sonlarına doğru görülmeye başlar ve 'İmplantasyon penceresi' adı verilen bu değişikliklerin tümü, maksimum uterus reseptivitesini temsil eder (8). Bunu gerçekleştirmek için embriyodan salınan sinyallere cevap olarak, anne serumunda gebeliğe özel proteinler salınırken, uterusu morfolojik, biyokimyasal ve immünolojik değişiklikler de meydana gelir. Embriyonun implantasyonuna eşlik eden kompleks invazyon işlemi, embriyo ve anne arasındaki desidualize endometriyum ve trofoblast hücreleri tarafından kontrol edilir. Bu sırada meydana gelen bir inflamatuvar reaksiyon ve uygun immün cevap embriyonun red edilmesini önlerken ve feto plasental ünitenin gelişmesine izin vermektedir.

Memelilerde implantasyonun gerçekleşmesi senkronize olarak embriyonik gelişime ve uterusun reseptif faza hazırlanmasına bağlıdır (245,246). İnsanlarda senkronizasyon uzun ve toleranslıdır, bu faz 20-24. günler arasında 5 gün devam ederken, kemirgen türlerinde reseptif faz 24 saatten daha az sürmektedir (247). Ratların reseptif fazlarının kısa olması nedeni ile implantasyon sırasında hem embriyonik hem de endometriyumdaki değişiklikler kolaylıkla takip edilebilmektedir. Bu nedenle de embriyo implantasyonundaki hassas dengeyi en iyi yansıtan model olarak kabul edilmektedirler. Uterustaki reseptif faza geçiş desidualizasyonla aynı zamana denk gelmektedir (248) ve ratlarda reseptif faz sırasında tespit edilen değişikliklerden bazıları: stromal hücre popülasyonunun uterus desidual hücrelerine dönüşümü ve embriyonun antimezometriyal tarafa doğru gömülmesidir (249,250). Gebeliğin belirteci olarak kabul edilen desidualizasyon sürecinin başlangıç günleri hakkında farklı görüşler öne sürülmektedir. Beverley desidual hücrelerin sıçan endometriyumunda ilk olarak 4,5. günde gözlendiğini 5,5.-6,5. günlerde de desidual alanın belirgin bir hal aldığını rapor etmiştir (251). Welsh ve Enders ise sıçanlarda desidualizasyonun ilk olarak gebeliğin 6. gününde ortaya çıktığını bildirmişlerdir (252). Bu alanda yapılan çalışmalarda

sıçanlarda gebeliğin başlangıç günlerinin farklı olduğunun ileri sürülmesi bu konunun tartışmaya açık olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada, ilk desidual farklılaşma ratların gebeliklerinin 5. gününde uterusun mezometriyal kısmında tespit edilmiştir (Resim 4.3). Bu bölgenin lümen epitelinin altında çok küçük bir alanla sınırlı olması desidual reaksiyonun henüz başlamış olduğunu göstermektedir. Gebeliğin 6. gününde bu desidual alandaki stromal hücrelerin sitoplazmalarında glikojen ve yağ granüllerinin biriktiği tespit edilmiştir (Resim 4.5). 6. günde embriyonun uterus lümeniyle henüz etkileşime geçmemiş olması implantasyonun daha başlamadığını, uterusun ise tam reseptif fazda yani implantasyona hazırlık aşamasında olduğunu düşündürmüştür. Gebeliğin 7. gününde ise embriyonun implantasyona uterusun mezometriyal kısımdan başladığı ve antimezometriyal kısma doğru ilerlediği tespit edilmiştir (Resim 4.7). Bu durum, mezometriyal kısımdan köken alan desidual hücrelerin eş zamanlı olarak embriyo ile birlikte antimezometriyal kısma proliferasyon olarak ilerlediğini ve embriyonun etrafını sardığını düşündürmüştür. Böylece çalışmamızda, sıçan gebeliğinin 6. günü reseptif faz, 7. günü ise implantasyon fazı olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada kompleks karbonhidrat boyası olarak bilinen PAS ile boyanmış gebeliğinin 5. ve 6. günlerindeki endometriyumda, myometriyumun iç vasküler tabakasındaki sınırda yerleşim gösteren içinde büyük granüllere sahip oldukça iri GMG hücreleri tespit edilmiştir (Resim 4.4, Resim 4.6). İlk olarak 1891 yılında Duval tarafından tanımlanan, gebe fare uterusunda embriyo implante olduktan kısa bir süre sonra implantasyonun gerçekleştiği bölgenin karşı tarafında sitoplazmik granüllere sahip bu geniş hücreler (253), son yıllarda fare ve ratlarda GMG hücreleri olarak isimlendirilmiştir. Bu hücrelerin granülleri perforin ve litik proteinler içermesi nedeni ile azurofiliktir ve peryodik asit schiff (PAS) pozitif reaksiyon vermektedir (254,255,256). GMG hücrelerinde gözlemlenen PAS pozitif reaksiyon veren bu granüllerin stromada yıkıma neden olduğu ve böylece implantasyonun kolayca gerçekleşmesinde ve plasenta gelişiminde rol oynayabilecekleri düşünülmüştür. Çalışmamızda bu hücrelerin gebe olmayan endometriyumda görülmeyp sadece 5. ve 6. günde yani implantasyona hazırlık evresinde ortaya çıkması stromal hücrelerin transformasyonundan sorumlu olduklarının ve implantasyondan hemen sonra ortadan

kalkmaları implantasyonun gerçekleşmesinde kritik rol oynadıklarının önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

PAS ile boyanmış 6. ve 7. gün preparatlarında mezometriyal kısımdaki lümen epitelinin apikalinde boyanmanın kontrol grubuna göre artmış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda uterusun myometriyum tabakasının tamamında ve uterus lümeninin bazal membranında zayıf bir PAS boyanma gözlenirken (Resim 4.9), gebeliğin 6. gününde uterus epitelinin apikalinde ve bazal membranında ve myometriyumun iç sirküler tabakasında kuvvetli bir PAS pozitif reaksiyon tespit edilmiştir (Resim 4.10). Bu bulgular, uterusun implantasyona hazırlık safhasında, embriyonun bağlanmasını sağlayabilmek için, glikojen bakımından zengin hale gelerek karbonhidrat ligandlarının miktarını maksimum seviyeye getirdiğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda endometriyumdan salınan çok sayıda PAS pozitif molekülün varlığı bildirilmiştir (178-183). Endometriyal epitelde salınan bu yapılardan birinin H-tip-1 antijen (Fuc α 1-2Glc β 1-3GlcNac β 1) olduğu bilinmektedir (178). Bu antijenin gebeliğin 4. gününden itibaren düzenli olarak lümen epitelinin apikalinden eksprese edilerek için bağlanma sırasında ligand görevi gösterdikleri ve implantasyonun gerçekleşmediği durumlarda gözden kayboldukları bilinmektedir (181). İmplantasyon sırasında trofoektoderm ile lümen epiteli arasında ligand görevi gören diğer disakkarit HSPG'dır ve karakteristik tekrarlayan disakkaritlerin (Glc-GlcNAC) karışık modifikasyonlarıyla oluşmaktadır (182,183). Carson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, implante olan fare blastosistinin ve uterusun yüzeyinin HSPG kaplanmış olduğunu göstermişlerdir (182).

Gebeliğin 7.gününde ise embriyonun primer embriyonik endoderminin visseral ve pariyetal tabakalarında, desidual yatağın iç zonunda, endometriyum epitelinin apikalinde ve myometriyumun iç sirküler tabakasında kuvvetli PAS pozitif boyanma gözlenmesi (Resim 4.12), bazal membranda implantasyon sırasında önemli değişikliklerin meydana geldiğini ve bu değişikliklerin implantasyonun yönü ve yapılanması hakkında bilgi verdiğini düşündürmüştür. Ancak embriyonun yerleşmiş olduğu desidual yatağın dış zonunda çok fazla bir boyanma gözlenmemiştir. Özellikle 7. günde endometriyum epitelinin mezometriyal kısmındaki bazal membranda PAS boyanmasının görülmeyp, antimezometriyal tarafta kuvvetli boyanma gözlenmesi, antimezometriyal bazal membranın içeriğini oluşturan glikoproteinlerin

ekspresyonlarının arttığını ve bu nedenle adezyonun bu tarafa doğru gerçekleştiğini düşündürmüştür. Bu bulgular bazal membran değişikliklerinin implantasyonda önemli rol oynadığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. İmplantasyon sırasında endometriyum epitelinin apikalinde açığa çıkan oligosakkaritlerin, adezyonu sağlamak ve invazyon sırasında embriyonik gelişimi desteklemek amacıyla salınımlarının arttığı düşünülmektedir.

Bu oligosakkaritlerin yüzeyde karbonhidrat tabakası olarak yerleşmelerinin nedeni olarak, uterus epiteli tarafından eksprese edilen transmembran ve hücre yüzey bağlantılı proteinler ve birçok yağların, oligosakkarit zincirleri ile bağlanarak ve glikozillenerek yüzeye atıldıkları düşünülmektedir. Sonuç olarak yüzeyde bir karbonhidrat tabakası oluştururlar. Bu tabakanın MUC1 denilen anti adeziv bariyerin ortadan kalkmasıyla aktif hale geçtiği ortaya çıkarılmıştır (119).

Memeli embriyosunun endometriyum epitelinin glikokaliksinde ilk anti-adezyon moleküllerinin oluşturduğu bariyer ile karşılaştığı bilinmektedir (116). Anti-adezyon molekülleri implantasyon sırasında oluşturdukları doğal bariyeri yıkarak, epitelyal adezyon moleküllerinin bağlanmayı gerçekleştirmelerini kolaylaştırması gerekmektedir (118). Musinler içinde en çok dikkati çeken MUC1'dir. MUC1 hücrelerde adezyon ve anti-adezyon kuvvetleri arasındaki hassas dengeyi oluşturur. Yani karbonhidrat bileşenleri gibi MUC1, selektin ligandlarını taşıdığı için integrin aracılı hücre adezyonunu arttırabilirken, ekspresyon miktarını arttırarak anti-adezyona doğru değiştirebilmektedir. Birçok türde, örneğin insanlarda, tavşanlarda ve domuzlarda MUC1 konsantrasyonu ovulasyondan sonra artarken implantasyon boyunca sabit kalır ve implantasyonun gerçekleşeceği bölgede lokal olarak azalır (115). Farelerde ise MUC1 epitel hücrelerinden kuvvetlice eksprese edilirken, implantasyon fazı boyunca yüzey epitelinde down-regule edilir (118,121). Bu bulgulara dayanarak MUC1'in ekspresyonundaki bu azalma blastosist tarafından üretilen sinyallerin vasıtasıyla gerçekleştirildiği düşünülmektedir (119,120).

Çalışmamızda gebe olmayan sıçan endometriyum lümen epitelinde yoğun bir MUC1 immünoreaksiyonu gözlenmiştir (Resim 4.18). Kontrol grubunda MUC1'in kuvvetli salınımlarının, implantasyondan önce epiteli koruyan bir bariyer oluşturduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. MUC1'in endometriyumda ekspresyonu menstrual

siklusla bağlantılı olarak çeşitlilik göstermekle birlikte, siklusun proliferatif ve sekretuar fazlarında eksprese edildiği bilinmektedir (121). 6. günde ise epiteldeki ekspresyonun yavaş yavaş azaldığının gözlenmesi (Resim 4.19), implantasyonun kolaylaştırılmasına yönelik olabilir. MUC1'in ekspresyonunu azaltan sinyaller, uterus boşluğunda bulunan blastosist tarafından üretilen lokal faktörlere bağlı olabilir. Böylece lümen epitelinin küçük bir kısmını adeziv hale getirirken diğer kısımlar antiadeziv kalabilir. Bu nedenle embriyo uterusu girdiğinde endometriyumda MUC1'in lokal olarak azaldığı ve adezyon moleküllerinin açığa çıktığı yere bağlanacağını, yani embriyonun uterustaki yapışma bölgesini belirlediğini düşündürmektedir. 7. günde ise endometriyum epitelinde ve trofoektoderimde MUC1 immünoreaktivitesi gözlenmemiştir (Resim 4.20). İmplantasyondan sonra MUC1'in fonksiyonu kalmadığı için düşük seviyede eksprese edildiği düşünülmektedir. Surveyor ve arkadaşları da farelerde yaptıkları çalışmada MUC1'in epitel hücrelerinden kuvvetlice eksprese edilirken, implantasyon fazı boyunca yüzey epitelinde ve desidual alanda ekspresyonunun tamamen azaldığını göstermişlerdir (118).

İmplantasyon sırasında MUC1 ortadan kalktığı zaman, trofoblast ve endometriyum epitelindeki adezyon molekülleri birbirine bağlanma aşamasına girmektedirler. Bu moleküllerden integrinler, eşleşebilmeleri için aralarında ligand görevi gören proteinlere ihtiyaç duyarlar. Bunlardan en sık eksprese edilenlerinin fibronektin (192), laminin (192), entaktin (200), tip IV kollajen (188) ve HSPG (183) olduğu bildirilmiştir. Bu moleküller implantasyonda yalnızca ligand görevi görmezler, aynı zamanda endometriyal epitelin altında bazal membranı oluşturan yapısal proteinler olarak da rol oynamaktadırlar.

İmmünohistokimyasal yöntemlerle yaptığımız incelemede normal sıçan uterusunda lamininin endometriyum epiteli bazal membranı ve stromal hücreler boyunca boyandığı gözlenmiştir (Resim 4.21). Bu proteinin uterusun bazal membranında yer alan diğer glikoproteinlere göre daha belirgin boyanma göstermesini, ekstrasellüler matriksin en büyük ve önemli moleküllerinden biri olmasına bağlamaktayız. İmplantasyonun gerçekleştirilmesi amacıyla laminin ekspresyonundaki ilk artışın reseptif fazda geliştiği ve bu artışın implantasyonun devamını getirecek önemli bir aşama olduğu düşünülmektedir. Lamininin gebeliğin reseptif aşamasındaki

lokalizasyonu ile ilgili çeşitli bulgular tespit edilmiştir. Blankenship ve arkadaşları farelerde gebeliğin 5. gününde uterus epiteli bazal membranında laminin immunoreaksiyonu gözlemişler (257), Kayışlı ise sıçanların gebeliğinin 5. gününde bazal membranda ve desidual alanda artmış bir immunoreaksiyon tespit etmişlerdir (258). Clark ve arkadaşları da ratların gebeliklerinin 5. gününde uterus epitelinin embriyoya yakın kısmında lokalizasyonun artmış olduğunu gözlemişlerdir (201). Bizim çalışmamızda ise lamininin stromada ve bazal membrandaki bu sabit lokalizasyonunun gebeliğin reseptif fazına denk gelen 6. günde değişmeye başladığı tespit edilmiştir. Endometriyum epitelinde, mezometriyum kısmındaki proliferen olan hücrelerde ve epitel altındaki yoğunlaşmış stromada şiddetli bir laminin immünoreaksiyonu gözlenmiştir (Resim 4.22). Bu bulgulara dayanarak, 6. günde reseptif aşamada uterusun implantasyona hazırlık amacıyla ekstrasellüler matriksin formasyonunun değiştiği ve implantasyon sırasında integrinlerin bağlanabilmesi için ligand görevi amacıyla lamininin ekspresyonunun arttığı sonucuna varılmıştır.

Gebeliğin 7. gününde implantasyon sırasında lümen epitelinde laminin ekspresyonunun devam ettiği tespit edilmiştir (Resim 4.23). Buradan da lamininin sadece implantasyona hazırlıkta rol alan protein olmadığı, implantasyonun devamında da rol oynadığı düşünülmüştür. Ekstrasellüler matriksin önemli bileşenlerinden olan laminin, invazyonun kontrolünde de rol oynayan faktörlerdendir. Clark ve arkadaşları tarafından farelerde 7. günde epitelyal bazal membranda, damarlarda ve bez epitelinde laminin ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (201). Buna karşılık Yamada ve arkadaşları laminin ekspresyonunun implantasyon sırasında azaldığını, bunun nedeni olarak da implantasyonu kolaylaştırmak için bazal membranın yıkılmaya başladığını rapor etmişlerdir (259). Ancak bizim yaptığımız çalışmaya göre lamininin bazal membranda ve lümen epitelinde devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum implantasyon periyodu boyunca ekstrasellüler matriksin ve bazal membranın yeniden yapılanmasının, implantasyonun başarısı ve plasantasyonun devamı için gerekli olduğunu düşündürmüştür.

Ayrıca gebeliğin 7. gününde primer desidual zonda zayıf bir laminin immünoreaktivitesi gözlenirken, sekonder zonda bir miktar artması ve myometriyuma yakın desidual olmayan mezometriyal alanlarda ekspresyonunun daha artmış olması

dikkat çekicidir. Bu durum, primer desidual alanın periferinden başlayarak, sekonder desidual alana doğru lamininin yıkıldığını, desidual olmayan alanda laminin sentezi ve fonksiyonunun devam ettiğini göstermektedir. Ayrıca mezometriyal alandaki bu artış, plasentanın gelişimiyle bağlantılı olarak plasental damarların desteklenmesiyle açıklanabilmektedir.

Gebeliğin 7. gününde lamininin trofoblastlarda da ekspresyonun devam ettiği tespit edilmiştir. Bu glikoprotein, trofoblastların proteolitik aktivitelerini, hücre membranı üzerinde bulunan yüzey reseptörleri aracılığıyla kontrol ettiği rapor edilmiştir (257). Enders ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmaya göre de; lamininin gebeliğin 5. gününde trofoblastın bazal membranında lokalize olduğu tespit edilmiştir (204). Bu nedenle trofoblast yüzey reseptörlerinin spesifik ligandlara bağlanması ile hücrelerin invaziv davranışının ve proteaz sekresyonunun inhibe veya stimüle edildiği düşünülebilir. Buradan yola çıkarak lamininin trofoblastın farklılaşması ve proliferasyonunda önemli rol oynayabileceği ve endometriyal matriksin ve burada rol alan adezyon proteinlerinin, invazyon için potansiyel bir regülatör olduğu sonucuna varılabilmektedir.

Kollajen IV ile yaptığımız immünohistokimyasal boyamada kontrol grubunda özellikle epitel altındaki bazal membranda yoğun olmak üzere, endometriyal stromanın bütün alanında homojen bir boyanma tespit edilmiştir (Resim 4.24). Kollajen IV'ün uterus epitelinin, bezlerinin ve vasküler kan damarlarının bazal membranlarını oluşturan temel glikoproteinlerden biri olduğu bilinmektedir (186,259,261,262). Bu da kollajen IV'ün bazal membranda bir ağ örgüsü olarak eksprese edilmesi ve çoklu hücre bağlanma siteleri içermesiyle açıklanabilmektedir. Gebeliğin 6. günde kollajen IV immünoreaksiyonu epitelin altındaki bazal membranda ve mezometriyal kısımdaki gelişmekte olan desidual hücrelerin etrafında artmış olarak gözlenmiştir (Resim 4.25). Bu yapısal proteinin, özellikle bazı integrinlerin bağlanabilmeleri için ligand görevi görmek ve aynı zamanda bazal membranın formasyonunda rol almak amacıyla, reseptif aşamada ekspresyonunda hareketlenmeler başladığını ve maksimum bir artış gösterdiğini düşündürmüştür.

Gebeliğin 7. gününde kollajen IV boyanması implante olan trofoblastlarda, uterus epitelinde ve desidual hücrelerde gözlenmezken iç ve dış myometriyal

tabakalarda ve mezometriyum kısmında gözlenmiştir (Resim 4.26). İlk yapılan çalışmalarda bazal membranın yıkıldığı ileri sürülmüşse de (188), daha sonraki yapılan çalışmalarda bazal lamina kompozisyonunun modifiye olduğu ileri sürülmektedir (257). Domuzlarda bazal membran kompozisyonunda herhangi bir modifikasyon gözlenmezken, keçilerde kan damarları çevresinde ve trofoblastlara komşu uterus epitelinin bazal membranında kollajen IV eksikliği bildirilmiştir (260,264). Sığırlarda ise implantasyon peryodunda hem kollajen IV hem de lamininin azaldığı bildirilmiştir (259,262). Bizim çalışmamızda ise gebeliğin 7. gününde implantasyon sırasında kollajen IV'ün bazal membranında azalmaya başlaması ve zamanla yok olması, implantasyon bölgesindeki artacak olan kan damarları gelişimi, trofoblast hücrelerinin diferansiyasyonu ve trofoblastik invazyonun gerçekleşeceği bu bölgenin ekstrasellüler matriksindeki yapısal değişikliğin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu değişikliklerin kollajen liflerin katabolize olarak, desidual zonda yıkılmaya başlayıp tamamen iç vasküler kas tabakasının altına itildiği için gerçekleştiği düşünülmüştür. Bu yıkılmanın sebebi, desidual doku proliferasyonunun gerçekleşmesi ve desidualizasyon süresince hücresel adezyona izin verilmesi olarak söylenebilir. İmplantasyon boyunca kollajen IV'ün mezometriyal kısımda artmış olması ise plasental damarların desteklenmesi ile bağlantılı olabileceğini düşündürmüştür.

Özel kollajen lif boyası olan Masson Trikrom ile yaptığımız boyamada immünohistokimya bulguları ile benzer bulgular gözlenmiştir. Gebelik olmayan normal uterusda kollajen liflerin epitel altındaki stromada ve mezometriyal kısımda dağılmış olarak boyandığı tespit edilmiştir (Resim 4.13). Gebeliğin 6. gününde ise kollajen liflerin uterusun myometriyal tabakasına doğru yer değiştirmeye başladıkları gözlenmiştir (Resim 4.14). Bu kollajen liflerdeki yer değiştirmenin desidual yatağın iyice genişlemesi, hücrelerin proliferasyonu ile gelişmenin rahat gerçekleştirilebilmesi amacına yönelik olabileceği söylenebilir. Gebeliğin 7. gününde ise kollajen liflerin artık tamamen myometriyal tabakanın altına itildikleri ve bir kısmının mezometriyal tarafta lokalize oldukları gözlenmiştir (Resim 4.15). Embriyonun gömülmüş olduğu desidual yatakta kollajen liflerin gözden kaybolmuş olması, desidualizasyon süresince embriyonun invazyonu gerçekleştirebilmesi ve trofoblastlar ile desidual hücreler arasındaki adezyonu kolaylaştırabilmesi amacıyla olduğunu kanıtlamıştır.

Fibronectinin, ekstrasellüler matrikste heparin, tip I, II, III ve V kollajen, fibronectin ve integrin gibi birçok biyolojik makromolekülleri bağlayan ve hücre büyümesi, farklılaşması, şekli ve göçü gibi birçok fonksiyonu düzenleyen yapıştırıcı glikoprotein olduğu bilinmektedir (192). Çalışmamızda, normal sıçan uterusunda fibronectin boyanmasının endometriyum bazal membranında ve stromal hücrelerde homojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Resim. 4.27). Fibronectinin gebe rat uterusundaki immünohistokimyasal lokalizasyonu ile ilgili daha önce çok fazla çalışma yapılmamış, daha çok bu proteinin hücre kültüründeki ekspresyon değişikliklerine ağırlık verilmiştir (190,191,192). Bunun sonucunda fibronectinin bağlanma yapısının blastosist farklılaşması için gerekli olduğu, çünkü peri-implantasyon blastosistinde ilk hücrel değişikliklerin meydana gelmesinde ölçü olduğu kanısına varılmıştır (192,193). Çalışmamızda reseptif faza dahil olan 6. günde ise endometriyum epiteli, endometriyal stroma ve mezometriyumdaki desidual hücrelerde bir miktar artış tespit edilmiştir (Resim 4.28). Bu nedenle fibronectinin adezyon sırasında integrinler arasında ligand görevi görmek amacıyla aktif hale geçtiği kanısına varılmıştır. Bu durum fibronectinin ekstrasellüler matriksin formasyonundaki değişikliğe paralel olarak hücrelerin göçü ve farklılaşmasından sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

İmplantasyon sırasında 7. günde ise, endometriyum epitelinin bazal membranında, desidual hücrelerde ve trofoblastta fibronectinin negatif bir immünoreaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir (Resim 4.29). Fibronectinin implantasyon sırasındaki ekspresyonunda beklenmedik düşüşü, endometriyal değişikliklere ve endometriyumun yenilenmesine bağlanmış olabilir. Ekstrasellüler matriksin primer desidual zonda azalması bazal membran kompozisyonunun değişiminden kaynaklanmaktadır. Böylece bazal membran proteinlerinin ekspresyon miktarları değiştiği için fibronectin gibi yapıştırıcı proteinlere ihtiyaç duyulmadığı yani fibronectinin fonksiyonelliğini kaybettiği sonucu çıkarılmıştır. Benzer olarak, Yamada ve arkadaşları; sığırların periimplantasyon periyodunda maternal villuslarda fibronectinin belirgin olarak azaldığını tespit etmişlerdir (259). Kirby ve arkadaşları tarafından, blastosistin adezyon bileşimindeki fibronectin bağlanma aktivitesinin, uterusda adeziv olan ve implantasyon penceresinde embriyonun oryantasyonunu sağlayan ilk bölgeyi belirlediği rapor edilmiştir (263).

İmplantasyonda desidual cevabı kontrol eden ve reseptif aşamayı düzenleyen diğer önemli moleküllerin büyüme faktörleri olduğu bilinmektedir (40). İmplantasyon peryodu çalışmalarında, TGF- α 'nın ekspresyonunun arttığı, farklı hayvan türlerinde gösterilmiştir (54,56,57). Çalışmamızda, normal uterus dokusunda TGF- α immünoreaksiyonu zayıf gözlenirken (Resim 4.30), gebeliğin 6. gününde endometriyum epitelinde, stromada, mezometriyum kısmında immünoreaksiyonun kuvvetli pozitif olması (Resim 4.31) desidual cevapta TGF- α 'nın önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Taga ve arkadaşları tarafından TGF- α 'nın insan desidualizasyonu boyunca hücresel ve stromal proliferasyonu arttırdığı gözlenmiştir (55), Paria ve arkadaşları tarafından farelerde ve ratlarda periimplantasyon periyodu boyunca uterusun myometriyal, stromal ve epitelyal hücrelerinde tespit edilmiş ve TGF- α 'nın gebe ratlarda EGF'e göre daha büyük bir desidual cevaba yol açtığı rapor edilmiştir (53). Bu nedenle TGF- α 'nın implantasyona hazırlıkta rol aldığını ve desidualizasyon sırasında hücresel proliferasyonun gerçekleşmesini ve ekstrasellüler matriksin reorganizasyonunu sağladığını düşünmekteyiz.

Gebeliğin 7.gününde ise trofoblast hücrelerinde, uterus epitelinde ve desidual hücrelerin aralarındaki kapiller endotellerinde TGF immünoreaksiyonunun oldukça arttığı gözlenmiştir (Resim 4.32). Bu bulgulara göre TGF- α 'nın implantasyonda ve invazyonda da kritik rol oynadığı düşünülmüştür. Johnson ve Chatterjee tarafından, rat uterusunun lümen epitelinde TGF- α 'nın immünohistokimyasal lokalizasyonunun arttığı rapor edilmiştir (46). Tamada ve arkadaşlarının yaptıkları deneye göre anti TGF- α antikorunun intralümen enjeksiyonundan sonra implantasyonun gerçekleşmemesi (59), TGF- α 'nın implantasyon sırasında önemli rol oynadığının bir göstergesidir. Ancak Tamada ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir deneyde, TGF- α geni yok edilmiş farede implantasyon görülmesi TGF- α 'nın fonksiyonunun tam olarak bilinmediğinin bir göstergesidir (59). Ayrıca domuz blastosistinin trofoblast hücrelerinde ve sığır embriyolarının endodermik hücrelerinde ekspresyonunun arttığı ortaya çıkarılmıştır (58). Çalışmamızda desidualdaki kapiller endotel hücrelerinde immünoreaksiyon gözlenmesi TGF- α 'nın endotelyal hücreleri bağlayan potent anjiojenik faktör olduğu ve buna bağlı

olarak endotelial hücrelerin DNA sentezlerini arttırdığından dolayı bu büyüme faktörünün vasküler gelişimde rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Memeli endometriyumunun sitokin üretimi ve hareketi için aktif bir site olduğu bilinmektedir (99,100). Aynı zamanda steroid hormon hareketlerinin lokal düzenlenmesinde kritik rolü olduğu ve implantasyon işleminde rol oynadığı birçok çalışmayla gösterilmiştir (9,97-99).

Çalışmamızda kullandığımız sitokinlerden IL-1 β ve TNF- α 'nın immünoaktiviteleri normal uterus epitel ve stromada zayıf pozitif iken (Resim 4.33, 4.36), 6. günde lümen epitel, bez epitel ve mezometriyum kısmındaki desidual hücrelerde ve aralarındaki kapillerin endotelinde artmıştır (Resim 4.34, Resim 4.37). IL-1 β ve TNF- α ekspresyonundaki bu artışın implantasyona hazırlanan endometriyumda gelişmekte olan bir immün mekanizmanın varlığını işaret ettiğini düşünmekteyiz. Simon ve arkadaşları tarafından da insan endometriyumunda artmış IL-1 α ve IL-1 β immünoaktivitesi endotelial hücrelerde gösterilmiş ve endotelial hücrelerden inflamasyon alanına lökosit girişinden sorumlu molekül olabileceği düşünülmüştür (99). TNF- α 'nın ise hücre büyüme ve farklılaşmanın ayarlanması ve çeşitli yapıların sentezinde görev almak üzere üretilen bir polipeptid olduğu bilinmektedir (110). Gebeliğin 6. gününde uterus bu iki molekülün immünoaksiyonun artmış görülmesi implantasyon için ekstrasellüler matriksin yeniden organizasyonunda ve gelişmekte olan bir immün mekanizmanın varlığında önemli rol oynadığını düşündürdü. İmplant olabilmek için yaklaşan embriyonun göndermiş olduğu moleküler sinyallere karşılık ilk aşamada bir immün mekanizmanın oluştuğunu düşündürmektedir.

Gebeliğin 7. gününde ise trofoblastta, lümen epitelinde ve implante blastosisti çevreleyen epitelde IL-1 β ve TNF- α 'nın immünoaktivitesinin 6. güne göre oldukça arttığı gözlenmiştir (Resim 4.35, Resim 4.38). IL-1 immünoaktivitesinin primer olarak lümen epitel ve bez epitelinde lokalize olduğu ve en fazla olarak implante blastosisti çevreleyen epitelde gözlendiği bilinmektedir (101). Çalışmamızda da IL-1 β immünoaktivitesinin özellikle epitelde ve desidual hücrelerde ve desidual endotelial hücrelerde artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu artışın implantasyonun gerçekleştirilmesiyle yakından bağlantılı olduğunu düşünmekteyiz. Simon ve

arkadaşları tarafından da, IL-1RT1 implantasyon sırasında IL-1 α veya IL-1 β 'ya bağlanarak endometriyal epitelyal integrin ekspresyonunu tetiklediği bunun da adezyonu başlattığı ileri sürülmüştür (92). Chen ve arkadaşları tarafından TNF- α 'nın farklı trofoblast tabakaları tarafından eksprese edildiği ve implantasyonda önemli rolü olan sitokinler arasında sınıflandırıldığı rapor edilmiştir (111). Hampson ve arkadaşlarına göre kültür blastosistinde TNF- α ve CSF-1'in artmış olması trofoblast gelişiminde ve ardından implantasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynayacağının bir göstergesidir (114). Yelavarti ve arkadaşlarına göre TNF- α 'nın lümen epitelinde artmış olması, implantasyonun gerçekleştirilebilmesi için trofoektoderm üzerindeki TNF- α reseptörüyle bağlanabilmesi içindir (112). Ayrıca bu sitokin ve reseptörünün trofoblasta bitişik maternal desidual hücreler ve uterus epiteli tarafından da eksprese edildiği tespit edilmiştir (112). TNF- α 'nın implantasyon sırasında stromada ve endometriyum epitelinde oldukça artmış olması, embriyoya karşı uterusun geliştirdiği bir inflamatuvar immün reaksiyonun işareti olduğunu düşündürmüştür. Ancak Pampfer ve arkadaşlarının blastosistin iç hücre kitlesinde TNF- α 'nın sitotoksik ve dejenere etkisine rastlamamış olmaları (113), TNF- α 'daki bu artışın implantasyonun gerçekleşmesi için desidualizasyonun organizasyonunda rol aldığını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da TNF- α 'nın artmış olması trofoblast büyümesinde biyolojik etkileri olduğunu ve uteroplental ünitenin gelişiminde bir önemli rol oynadığını bu nedenle de implantasyonun gerçekleşmesinde kritik rol oynayan sitokinlerden olduğunu düşündürmüştür.

İmplantasyon sırasında desidual hücrelerde de immünoreaksiyonun bu kadar artmış olması, IL-1 β ve TNF- α 'nın matriks metalloproteinazlarla yakından ilişkili olup invazyon sırasında ekstrasellüler matriksin yıkımında rol oynayabileceğini düşündürdü. Huang ve arkadaşları; IL-1 β ve TGF β 'nin trofoblast invazyonu sırasında embriyo-maternal temas bölgesinde kollajenaz ekspresyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir (265). Bu sonuçlar bize trofoblast hücreleri tarafından sentez edilen IL-1 β 'nin maternal endometriyum içerisinde ekstrasellüler matriksi ve bazal membranı sindirerek embriyonik invazyonu düzenleyebileceğini düşündürmüştür. İmplantasyon ve invazyon süresince, IL-1 β ve TNF- α 'nın ekspresyonun daha fazla olmasının nedeni olarak, aktive

olan stomal hücrelerde kollajenazın ekspresyonunun artmasıyla bağlantılı olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Bu bulgulara dayanarak IL-1 sisteminin, embriyonik gelişimde ve implantasyon işlevi boyunca iletişimde kritik rol oynadığını düşünmekteyiz.

İntegrinler, endometriyal reseptivite denildiğinde akla ilk gelen adezyon molekülleridir. Endometriyumun kompleks yapısı embriyonik implantasyon için menstrual siklus boyunca adezyon moleküllerinin farklı düzenlenmesine neden olmaktadır (213,214). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda bazı integrinlerin implantasyon sırasında diğer adezyon moleküllerine göre, siklusa ve hücreye özgü spesifik dağılım gösterdikleri ve bunun sonucu olarak da implantasyonda moleküler olayların odak noktası oldukları tespit edilmiştir (Resim 2.3.14) (213,214).

Çalışmamızda $\beta 1$ integrini ile yapılan immünohistokimyasal boyamada, kontrol grubunun endometriyum epitelinde, bazal membranında ve ekstrasellüler matriksinde boyanma az olarak gözlenmiştir (Resim 4.39). Endometriyumda $\beta 1$ ekspresyonunun menstrual fazla ilişkili olarak değişikliğe uğramasının hormonal kontrole bağlı olduğu bilinmektedir. (224). Özellikle erken proliferatif fazda bez epitelinde, orta sekretuar fazda stromal hücrelerde eksprese edildiği rapor edilmiştir (214). Gebeliğin 6. gününde ise endometriyum epitelinde, stromada ve mezometriyal kısmındaki desidual hücrelerde $\beta 1$ artmış olarak gözlenmiştir (Resim 4.40). 6. günde desidual hücrelerde ortaya çıkan bu artışın blastosistin dış hücre kitlesinde bulunan $\beta 1$ 'e bağlanmasında etkili rol oynamak üzere reseptif fazla bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. $\beta 1$ 'in implantasyondan önce arttığı bölgelerde, hücre proliferasyonunda, hücresel göç ve farklılaşmasında rol oynadığı bilinmektedir (225). Özellikle desidual hücrelerde $\beta 1$ ekspresyonunun artmasının, blastosist invazyonu sırasında trofoblast hücreleri ile desidual hücreler arasında meydana gelecek adezyonu gerçekleştirebilmesi amacıyla olduğu düşünülmektedir.

Gebeliğin 7.gününde ise hem uterus epitelinde hem de trofoblastlarda $\beta 1$ 'in 6. güne göre kuvvetli boyandığı gözlemlendi (Resim 4.41). $\beta 1$ 'in implantasyon sırasında endometriyumda ve lümen epitelinde arttığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (218,219,221,224,225). Trofoblastlarda $\beta 1$ ekspresyonunun artmış görülmesi, trofoblast proliferasyonunda ve implantasyonda fonksiyon gösterdiğini düşündürmüştür.

Blastosistin trofoektodermindeki trofoblastik dev hücrelerin, bazal laminayı geçtikten sonra da integrin $\beta 1$ reaktivitesi göstermeleri bu hücrelerin, desidual hücreleri çevreleyen perisellüler bazal laminaya bağlanarak meydana gelebilecek etkileşmenin bir göstergesi olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Nitekim, Stephens ve arkadaşları yaptıkları çalışmada $\beta 1$ alt ünitesi yok edilen embriyoların blastosist aşamasına kadar normal geliştiğini göstermişler ve $\beta 1$ integrinin embryo gelişiminde rolü olmadığını ileri sürmüşlerdir (194). Aynı araştırmacılar bu embriyoların implante olmadıklarını tespit etmiş ve $\beta 1$ 'in esas fonksiyonunun implantasyon üzerine olduğunu ve $\beta 1$ eksikliğinde implantasyonun gerçekleşemediğini bildirmişlerdir (194). Sutherland ve arkadaşları $\beta 1$ ve $\alpha 3$ integrinlerinin özellikle fertilizasyondan sonra fare blastosistinin gelişiminde devam eden bir ekspresyonları olduğunu göstermişlerdir (9). Çalışmamızda $\beta 1$ integrinin implantasyon sırasındaki embriyoda görülmesi, yayılmakta olan trofoblast sınırlarındaki fokal adezyonlarda bulunabileceğini düşündürmektedir. $\beta 1$ 'in trofoblast gelişimini artırmasının ise bağlanma ve hücre göçündeki bilinen adeziv rolü ile bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır.

$\alpha 3$ ile yaptığımız immünohistokimyasal boyama ile kontrol grubunun endometriyum epitelinde, bazal membranda ve ekstrasellüler matrikste immünoreaksiyonun zayıf olduğu gözlenmiştir (Resim 4.42). Gebeliğin 6. gününde ise endometriyum epitelinde, stromada ve mezometriyum kısmındaki desidual hücrelerde $\alpha 3$ immünoreaksiyonu arttığı tespit edilmiştir (Resim 4.43). Bu durum $\beta 1$ gibi $\alpha 3$ integrinin de hücre adezyonunda rol oynadığı ve ekstrasellüler matriksin değişiminden sorumlu olduğunu düşündürmüştür. Bizim çalışmamızda $\alpha 3$ 'ün artmış olması, embriyonun uterus epiteline bağlanmasını sağlayan ligand oluşumuyla ilgili olabilir. Tabibzadeh de yaptığı çalışmada $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ integrinlerinin, bez epitelinde ve lümen epitelinde ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir (221). Ayrıca $\alpha 3$ 'ün ovulasyondan sonra lümen epitelinde arttığı Lessey ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (219).

Gebeliğin 7. gününde $\alpha 3$ immünoreaksiyonunun epitel ve trofoblastta artmış olması (Resim 4.44) implantasyonda önemli rol oynayabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. İmplantasyon sırasında trofoblast hücrelerinde $\alpha 3$ ekspresyonun devam etmesi embriyonun proliferasyonu ve diferansiyasyonunda rol aldığını

düşündürebilir. Sutherland ve arkadaşlarının yaptıkları iki çalışmada $\alpha 3$ integrinlerin mRNA'sının preimplantasyon döneminde eksprese edilmeye başladığını, proteininin ise implantasyondan sonra ortaya çıktığını bildirmişlerdir (9,220). Bizim çalışmamızda $\alpha 3$ 'ün 7. günde ortaya çıkması implantasyonla ilişkili rolünü desteklemektedir. Buna karşılık Hynes'in yaptığı çalışmada $\alpha 3$ geni eksik embriyolarda implantasyon yetersizliklerinin gözlenmemesi, bu integrinin implantasyonda tek başına rol oynamadığının bir göstergesidir (196).

αv integrini ile yapılan immünohistokimyasal boyamada kontrol grubuna ait uterusdaki immünoreaktivite zayıf iken (Resim 4.45), gebeliğin 6.gününde lümen epiteli, stroma ve mezometriyum kısmındaki desidual hücrelerde immünoreaksiyonun artmış olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.46). Bulgularımıza göre bu integrin de adezyon fazın gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Tabibzadeh tarafından αv ekspresyonunun ovulasyondan sonra endometriyum epitelinde arttığı gösterilmiştir (221). Sutherland ve arkadaşları fertilizasyondan sonra endometriyal değişim sürecinde de ekspresyonunun devam ettiğini rapor etmişlerdir (9). Aplin ve arkadaşları tarafından ise reseptif fazda bu artışın, insanlarda olduğu gibi farelerde de endometriyal epitelde gözlemlendiği belirtilmiştir (266). Luteal fazla ilişkili olarak, αv integrinin ekspresyonun implantasyonda arttığı, luteal faz yetmezliğinde azaldığı bilinmektedir (220).

Çalışmamızda gebeliğin 7. gününde αv ekspresyonunun endometriyum epitelinde devam ettiği, trofoblast hücrelerinde ise immünoreaksiyonun gözlenmediği tespit edilmiştir (Resim 4.47). İnsan ve kemirgen trofoblastlarında αv ekspresyonuyla ilgili literatürde çalışmaya rastlanmamış olmasına rağmen oosit ve blastosist aşamalarında birçok çalışma dikkati çekmektedir. Ayrıca Bloor ve arkadaşları (169) ile Spanswick'in çalışmalarında (267) blastosist aşamasında embriyoların αv integrini eksprese ettikleri rapor edilmiştir. Ayrıca Tabibzadeh αv integrinin fertilizasyondan sonra fare blastosistinin gelişiminde devam eden ekspresyonunu göstermiştir (221). Campbell ve arkadaşları tarafından insan oositlerinin ve erken post fertilizasyon embriyolarının $\alpha 3$, αv ve $\beta 1$ integrin altünitelerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (268). Ancak çalışmamızda ise trofoblastlardan αv integrinin eksprese edilmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle bu integrinin maternal kaynaklı olduğu ve tam implantasyon

sırasında sadece endometriyumun değişikliğinde rol oynadığı düşünölmüştür. Ayrıca yayılmakta olan trofoblast sınırlarındaki fokal adezyonlarda bulunmadığı kanısına varılmıştır. Hynes ile (196) Bader ve arkadaşlarının (269) yaptıkları çalışmalarda, αv geni eksik embriyolarda implantasyon yetersizliklerinin gözlenmemesi, bizim bulgularımızı desteklemektedir. Buna ilaveten αv 'nin trofoblastların proliferasyonunda ve diferansiyasyonunda fonksiyonunun olmaması, $\beta 1$ 'in trofoblastlardaki ekspresyonunun önemini daha da vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, implantasyon sırasında rol oynayan adezyon moleküllerini incelediğimiz bu çalışmada, desidualizasyonun 5. günde başladığı; laminin, kollajen IV, TGF- α , IL-1 β 'nın 6. günlerdeki reseptif değişikliklerden, lümen epiteli ve trofoblast hücrelerinde artan TGF- α , IL-1 β , TNF- α , $\alpha 3$ ve $\beta 1$ 'in invazyon aşamasından sorumlu olabileceği; MUC1'in ise 6. günde azalıp 7. günde lümen epitelinde kaybolması ile adezyon moleküllerinin ortaya çıkmasını sağladığı sonucuna varıldı.

6.SONUÇLAR

Sıçanlarda implantasyon evresinde blastosist trofoblastı ile uterus epiteli arasındaki etkileşimde adezyon moleküllerinin rolünü saptamak amacıyla, immunohisokimyasal tekniklerle yapılan bu çalışmada, elde edilen sonuçlar şöyle özetlenebilir:

I. Gebeliğin 5. gününde desidualizasyonun uterus lümeninin mezometriyal tarafında henüz başlamış olduğu, 6. günde desidual yatağın oldukça genişleyerek implantasyondan hemen önceki reseptif aşama olarak kabul edilebileceği ve 7. günde embriyo ile desidual yatağın antimezometriyal tarafa doğru ilerlemesiyle implantasyonun gerçekleştiği saptandı.

II. Gebeliğin 6.gününde reseptif fazın belirleyicisi olarak lümen epitelinin apikalinde en kuvvetli immunoreaksiyon gösteren moleküllerin laminin, fibronektin, kollajen IV, TGF- α , IL-1 β olduğu tespit edildi. Reseptif aşamada laminin, fibronektin ve kollajen IV'ün epitelin apikalinde ekspresyonlarının dikkat çekici bir biçimde artması, trofoblast hücrelerinde ve uterus lümen epiteli hücrelerinde bulunan integrin reseptörlerinin bağlanabilmeleri için bir ligand görevi üstlenmesine bağlı olabileceği düşünüldü. IL-1 β 'nin epitelde oldukça artması, yaklaşmakta olan blastosistin uterusu yarattığı inflamatuvar cevabın bir işareti olarak değerlendirildi. TGF- α 'nın 6. günde epiteldeki maksimum artışı ise desidualizasyon süresince hücrel stromal proliferasyonu stimüle eden molekül olduğunu gösterdi. Diğer moleküller MUC1, TNF- α , β 1, α 3 ve α v'nin yalnızca desidual alanda maksimum reaksiyon göstermeleri desidualizasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynayabileceklerini düşündürdü.

III. Gebeliğin 7. gününde trofoblast hücreleri ve uterus lümen epitelinde yoğun bir lokalizasyon gösteren moleküllerin laminin, TGF- α , IL-1 β , TNF- α , β 1 ve α 3 integrin olduğu tespit edildi. Bu moleküllerin implantasyon sırasındaki tutunmayı sağlayan önemli faktör oldukları sonucu çıkarıldı. Laminin ile trofoblast hücrelerinde ve lümen epitelinde boyanma göstermeyen fibronektin ve kollajen IV arasında lokalizasyon ve boyanma yoğunluğu açısından zıt bir ilişkinin olduğu, laminin kendisiyle aynı lokalizasyonu gösteren β 1 ve α 3 integrinleri arasında ligand olabileceği yani, apikalinde bu integrin reseptörlerini bulunduran trofoblastik hücrelerin lümen epiteline geçerken ve geçtikten sonra laminine tutunarak invazyon olayını gerçekleştirebileceği düşünüldü. Fibronektin ise kendisiyle aynı lokalizasyonu gösteren α v'nin bağlanma sırasında ligandı olduğu, her ikisinin de çok az miktar ektoplasental konide immünoreaksiyon göstermelerinin maternal kan damarlarına erişme hedefindeki bu hücrelerin migrasyonunda ve invazyonunda rol alan moleküller olabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. TGF- α , IL-1 β ve TNF- α moleküllerinin implantasyon esnasında trofoblastik, desidüal ve lümen epitel hücrelerinde oldukça şiddetli immünoreaksiyon göstermeleri invazyonun gerçekleşebilmesi için matriks metalloproteinazların kollajeni yıkmasında ve trofoblast hücrelerinin farklılaşması, çoğalması ve göçü için bir uyarıcı olabileceğini düşündürdü.

IV. Bütün bu adezyon moleküllerine göre tam tersi bir mekanizmayla işleyen bariyer proteini olan MUC1'in aslında implantasyonun başlayıp başlamayacağını belirleyen protein olduğu tespit edildi. Diğer adezyon moleküllerinin tersine gebelik olmayan kontrol uterus epitelinde şiddetli bir boyanma gösterip, uterus ve embriyoyu düşük riskinden koruduğu kabul edildi. Bu molekülün endometriyumda 6. günde azalıp 7. günde tamamen ortadan kaybolması ile, sağlam embriyonun implantasyonu gerçekleştirdiği ve gebeliğin devam etme şansının yüksek olduğu sonucu çıkarıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Ezra Y., Schenker JG. Abortion rate in assisted reproduction – true increase? *Early Preg Biol Med* 1995, 1: 171-175.
2. Wilcox AJ., Weinberg CR., O'Connor JF., Baird DD., Schlatterer JP. et al. Incidence of early loss of pregnancy, *New Engl J Med* 1988, 319: 189 – 194.
3. Duc-Gorian P., Mignot TM., Bourgeois C., Ferre F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, *Obstet Gynecol* 1999, 83: 85-100.
4. Cross JC., Werb Z., Fisher S. Implantation and the placenta: Key Pieces of the Development Puzzle, *Science* 1994, 266: 1508-17.
5. Simon C., Moreno C., Remohi J., Pellicer A. Cytokines and embryo implantation, *J Reprod Immunol* 1998, 98: 117-131.
6. Aplin John D. Adhesion molecules in implantation, *Reviews of Reprod* 1997, 2: 84-93.
7. Kimber SJ, Spanswick C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade, *Cell and Develop Bio* 2000, 11: 77-92.
8. Lessey BA., Yeh I., Castelbaum AJ., Fritz MA., Hsanmi AO. et al. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation, *Fertil Steril* 1996, 65: 477-83.
9. Sutherland AE., Calarco PG., Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo, *Develop* 1993, 119: 1175-86.
10. Damsky C., Sutherland A., Fisher S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation and placentation, *FASEB J* 1993, 7: 1320-9.

11. Denker HW. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a biological paradox, *Trophob Resear* 1990, 4: 3-29.
12. Milier SG. Paracrine control of follicular estrogen synthesis, *Sem Reprod Endoc* 1991, 9 : 332-38.
13. Paverstein CJ., Eddy CA., Croxatto HD. Temporal relationship of estrogen, progesterone and LH levels to ovulation in women, *Am J Obstet Gynecol* 1978, 130: 876-85.
14. Blandau RJ. Growth of ovarian follicle and ovulation, *Prog Gynecol* 1970, 5:58-65.
15. DiZerega GS. FRP is follicle regulatory protein, *Nature* 1986, 1:300-323.
16. Hiller SG. Paracrine control of follicular estrogen synthesis, *Reprod Endoc* 1991, 9:332-340.
17. Rosenwaks Z., Muasher SJ., Acosa AA. Use of hMG and/or FSH for multiple follicle development, *Clin Obstet Gynecol* 1986, 29:148-157.
18. Ben-Chetrit A., Gotlieb L., Wong PY., Casper RF. Ovarian response to recombinant human follicle stimulating hormone in luteizing hormone-depleted women: examination of the two cell, two gonadotropin theory, *Fertil Steril* 1996, 65:711-717.
19. Nippold TB., Reame NE., Kelch RP., Marshall JC. The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteizing hormone pulse frequency in the luteal phase of menstrual cycle, *J Clin Endoc Metab* 1989, 69:67-75.
20. Erickson FG., Wallach EE., Frenczy A., Chavez DJ. Follicular growth and development, mechanism of ovulation, endometrial cycle, implantation. Sciarra JJ ed. *Gynecol and Obstet* Vol 5. Philadelphia: Lipincott, 1992, Chapter: 12, 13, 18, 47.

21. McNatty KP., Makris A., Reinhold VN., DeGrazia C., Osathanondh R. et al. Metabolism of androstenedione by human ovarian tissues in vitro with particular reference to reductase and aromatase activity, *Steroids* 1979, 34:429-35.
22. McLachlin RI., Cohen NL., Vale W., Rivier JE., Burger HG. et al. The importance of LH in the control of inhibin and progesterone secretion by the human corpus luteum, *J Clin Endoc Metab* 1989, 68:1078-86.
23. Rossmanith WG., Laughlin GA., Mortola JF., Johnson ML., Veldhuis JD. et al. Pulsatile cosecretion of estradiol and progesterone by mid luteal phase corpus luteum: temporal link to luteinizing hormone pulses, *J Clin Endoc Metab* 1989, 69:67-73.
24. Sadler TW. *Langman's Medical Embriology*. 6th. Maryland: William and Wilkins published. 1990; PP 8-36.
25. Sherman BM., Korenman SG. Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life, *J Clin Invest* 1975, 55:699-704.
26. Vollman RF. The menstrual cycle, In: Friedman E, ed. *Major problems in Obstetrics and Gynecology* Philadelphia WB Saunders Co 1977; PP 189-195.
27. Bartleman GW. The phases of the menstrual cycle and their interpretation in terms of the pregnancy cycle, *Am J Obstet Gynecol* 1957, 74:931-939.
28. Ludwig H., Spornitz UM. Microarchitecture of the human endometrium by scanning electron microscopy: menstrual desquamation and remodeling, In: Buletti C, Gurside E, eds. *The Primate Endomet*, New York, The New York Academy of Sciences, 1991; PP 28-39.
29. Frenczy A., Guralnick M., Endometrial microstructure, *Sem Reprod Endoc* 1983, 1:205-09.
30. Kennedy TG. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat, *Biol Reprod* 1977, 16:286-291.

31. Rogers PAW., Morphy CR., Gannon BJ. Changes in the spatial organization of the uterin vasculature during implantation in the rat, *J Reprod Fertil* 1982, 65: 211-14.
32. Speroff L. *Clin Gynecol Infertil*, Williams and Wilkins published, 1996, 231:50-55.
33. Tabibzadeh S., Babaknia A., Kong QF., Zupi E., Marconi D. et al. Menstruation is associated with disordered expression of Desmoplakin I/II, cadherin/catenins and conversion of F to G actin in endometrial epithelium, *Hum Reprod* 1995, 10:776-785.
34. Rodgers WH., Matrisian LM., Giudice LC., Dsupin B., Cannon P. et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994, 94: 946-950.
35. Gilbert SF. *Develop biol* Sunderland MA., Sinauer Associates, 1991, 80: 45-50.
36. Boldt J., Howe AM., Paekerson JB., Gunter LE., Kuehn E. Carbonhydrate involment in sperm-egg fusion in mice, *Biol Reprod* 1989, 40:887-890.
37. Edwards RG. A decade of in vitro fertilization, *Res Reprod* 1990, 22:1-11.
38. Bose R. An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy, *J Asist Reprod Genet* 1997, 14:497-499.
39. Massaque J., Pandiella A. Membranc-anchored growth factors, *Annu Rew of Bio* 1993, 62:515-541.
40. Guidice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potantial relevance to reproductive medicine, *Fertil and Steril* 1994, 61:1-17.

41. Sakakibara H., Taga M., Saji M. Gene expression of epidermal growth factor in human endometrium during decidualization, *J Clin Endoc Metab* 1994, 79: 223-226.
42. Fazleabas AT., Hild-Petito S., Verhage HG. Secretory proteins and growth factors of the baboon (*Papio anubis*) uterus: Potential roles in pregnancy, *Cell Biol Int* 1994, 18: 1145-1154.
43. Bany BM., Kennedy TG. Regulation by epidermal growth factor of prostaglandin production and cyclooxygenase activity in sensitized rat endometrial stromal cells in vitro, *J Reprod Fertil* 1995, 104:57-64.
44. Threadgill DW., Dlugosz AA., Hansen LA., Tennenbaum T., Lichti U. et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype, *Science* 1995, 269:230-234.
45. Nelson KG., Takahashi T., Bossett NL., Walmer DK., McLachlan JA. Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital tract and differentiation, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 188:21-25.
46. Johnson DC., Chattergee S. Epidermal growth factor replaces estradiol for initiation of embryo implantation in the hypophysectomised rat, *Placenta* 1993, 14:429-438.
47. Machida T., Taga M., Minaguchi H. Effect of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on the mouse trophoblast outgrowth in vitro, *Eur J Endoc* 1995, 133:741-746.
48. Raab G., Kover K., Paria BC., Dey SK., Ezzell RM. et al. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor, *Develop* 1996, 122:637-645.
49. Yoo HJ., Barlow DH., Mardon HJ. Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the

human endometrium: a possible role in blastocyst implantation, *Dev Genet* 1997, 21:102-108.

50. Das SK., Wang XN., Paria BC., Damm D., Abraham JA. et al. Heparin-binding EGF-like growth factor is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the sites of its apposition; a possible ligand for interaction with blastocyst EGF receptor in implantation, *Develop* 1994, 120:1063-1071.
51. Tamada H., Higashiyama C., Takano H., Kawate N., Inaba T. et al. The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation in the rat, *Life Sciences* 1999, 64:1967-1973.
52. Martin KL., Barlow DH., Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium, *Hum Reprod* 1998, 13:1645-1651.
53. Paria BC., Das SK., Huet-Hudson YM., Dey SK. Distribution of transforming growth factor alpha precursors in the mouse uterus during the periimplantation period and after steroid hormone treatments, *Biol Reprod* 1994, 50:481-91.
54. Rappolle DA., Brenner CA., Schulz R., Mark D., Werb Z. Developmental expression of PDGF, TGF- α and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos, *Science* 1988, 242:1823-1825.
55. Taga M., Sakakibara H., Suyama K. Gene expression of transforming growth factor-alpha in human endometrium during decidualization, *J Assist Reprod Genet* 1997, 14:218-222.
56. Gharib-Hamrouche N., Chène N., Martal J. Comparative expression of TGF- α and EGF genes in the ovine conceptus and uterine endometrium in the peri-implantation period, *Reprod Nutr Dev* 1995, 35:291-303.
57. Fischer B. Role of growth factors during preimplantation embryo development: the EGF/TGF- α system in focus, *Reprod Dom Anim* 1996, 31:657-659.

58. Kliem A., Fischer B. Differential localization of the EGF-R and TGF- α in preimplantation embryos of cattle and pig, *Reprod Dom Anim* 1995, 30:269-75.
59. Tamada H., Sakamoto M., Sakaguchi H., Inaba T., Sawada T. Evidence for the involvement of transforming growth factor- α in implantation in the rat, *Life Sci* 1997, 60:1515-1522.
60. Das SK., Lim H., Wang J., Paria BC., BazDresch M. et al. Inappropriate expression of human transforming growth factor (TGF)- α in the uterus of transgenic mouse causes downregulation of TGF- β receptors and delays the blastocyst-attachment reaction, *J Mol Endocrinol* 1997, 18:243-257.
61. Campbell BK., Gordan BM., Scaramuzzi G. The effect of ovarian arterial infusion of transforming growth factor alpha on ovarian follicle populations and ovarian hormone secretion in ewes with an autotransplanted ovary, *J Endocrinol* 1994, 143:13-24.
62. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review, *Eur Cytokine Netw* 1996, 7:363-374.
63. Khalil N. TGF-beta: from latent to active, *Microb Infect* 1999, 1:1255-1263.
64. Letterio JJ., Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 1998 16:137-161.
65. Bellone G., Aste-Amezaga G., Trinchieri M., Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1 *J Immunol* 1995, 155:1066-1073.
66. Doré J., Wilkinson E., Godkin J. Ovine endometrial expression of transforming growth factor β isoforms during the peri-implantation period, *Biol Reprod* 1996, 54:1080-1087.
67. Schimd P., Cox D., Bilbe G., Maier R., McMaster GK. Differential expression of TGF β 1, β 2 and β 3 genes during mouse embryogenesis, *Develop* 1991, 111:117-130.

68. Giudice LN., Mark SP., Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF Binding Protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidua-trophoblast interface, *J Reprod Immunol* 1998, 39:133-48.
69. Zhou J., Dsupin BA., Giudice LC., Bondy CA. Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1723.
70. Adesanya OO., Zhou J., Bondy CA. Sex steroid regulation of IGF system gene expression and proliferation in primate myometrium, *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:1967-1975.
71. Giudice LC., Dsupin BA., Jin IH., Vu TH., Hoffman AR. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua, *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76:1115-19.
72. Han VK. The Ontogeny of Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor and Sex Steroids: Molecular Aspects, *Horm Res* 1996, 45:61-69.
73. Tseng L., Gao J-G., Chen R., Zhu HH., Mazella J. et al. Effect of progestin, antiprogestin and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial cells, *Biol Reprod* 1992, 47:441-448.
74. Han VK., Bassett N. The expression of insulin-like growth factor and IGF-binding protein genes in the human placenta and membranes: Evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface, *J Clin Endoc Metab* 1996, 7:2680-93.
75. Rutanen EM., Koistinen R., Seppala M. Progesterone-associated proteins PPI2 and PPI4 in the human endometrium. *J Stero Biochem* 1987, 27:25-31.
76. Giudice LC. Multifaceted roles for IGFBP-I in human endometrium during implantation and pregnancy, *Ann NY Acad Sci* 1997, 828:146-156.

77. Auernhammer CJ., Chesnokova V., Melmed S. Leukemia inhibitory factor modulates interleukin-1 beta-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, *Endocrinol* 1998, 139:2201-8.
78. Willson TA., Metcalf D., Gough NM. Cross-species comparison of the sequence of the leukaemia inhibitory factor gene and its protein, *Eur J Biochem* 1992, 204:21-30.
79. Hirano T., Matsuda T., Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6-related cytokine subfamily, *Stem Cells (Dayt)* 1994, 12:262-77.
80. Stewart CL. The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals, *Ann N.Y Acad Sci* 1994, 734:157-165.
81. Stewart CL., Kaspar P., Brunet LJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor, *Nature* 1992, 359:76-79.
82. Hilton DJ., Nicola NA., Metcalf D. Distribution and binding properties of receptors for leukaemia inhibitory factor, *Ciba Found Symp* 1992, 167:227-39.
83. Chen JR., Cheng JG., Shatzer T., Sewell L., Hernandez L. et al. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis, *Endocrinol* 2000, 141:4365-4372.
84. Chen DB., Hilsenrath R., Yang ZM., Le SP., Kim SR. et al. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro, *Hum Reprod* 1995, 10:911-918.
85. Arici A., Engin O., Attar E., Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium, *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:1908-14.

86. Piccini MP., Scaletti C., Maggi E., Romagnani S. Role of hormone-controlled cytokines in successful pregnancy, *J Neuroimmunol* 2000, 109:30-3.
87. Laird SM., Tuckerman EM., Dalton CF., Dunpy BC., Li TC., Zhang X. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture, *Human Reprod* 1997, 12: 567-574.
88. Benson GV., Lim HJ., Paria BC. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: Uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression, *Develop* 1996, 122:2687-2696.
89. Chakraborty I., Das SK., Wang J., Dey SK. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids, *J Mol Endocrinol* 1996, 16: 107-122.
90. Robb L., Li RL., Hartley L. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin II is due to a defective uterine response to implantation, *Nature Med* 1998, 4:303-308.
91. Gendron RL., Paradis H., Hsieh-Li HM. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice, *Biol Reprod* 1997, 56: 1097-1105.
92. Tabibzadeh S., Sun XZ. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Hum Reprod* 1992, 7:1214-1221.
93. Sahakian V., Anners J., Haskill S., Halme J. Selective localization of interleukin-1 receptor antagonist in eutopic endometrium and endometriotic implants, *Fertil Steril* 1993. 60:276-279.
94. Paulesu L., King A., Loke YW., Cintonino M., Bellizzi E. et al. Immunohistochemical localization of IL-1 α and IL-1 β in normal human placenta, *Lympho Cyto Res.* 1991, 10:443-448.

95. Simón C., Piquette G., Frances A., Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77:549-555.
96. Simon C., Piquette GN., Frances A., Westphal LM., Heinrichs WL. et al. Interleukin-1 type I receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Fertil Steril* 1993, 59:791-796.
97. Simón C., Frances A., Piquette GN., Westphal LM., Heinrichs WL. et al. Embryonic implantation in mice is blocked by Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), *Endocrinol* 1994, 134: 521-528.
98. Abbondanzo SJ., Cullian EB., McIntyre K., Labow MA., Stewart CL. Reproduction in mice lacking a functional type IL-1 receptor. *Endocrinol* 1996, 137:3598-3601.
99. Simón C., Frances A., Pellicer A., Polan ML. Cytokines in implantation, *Semin Reprod Endocrinol* 1995, 13:142-151.
100. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark SC. et al. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood* 1990, 1:40-7.
101. De M., Sanford TR., Wood GW. Expression of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy, *J Reprod Fertil* 1993, 97:83-89.
102. Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M. et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, *Nature* 1994, 368:339-342.
103. Stephanou A., Handwerger S. Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells, *Endocrinol* 1994, 135:719-723.

104. Anegon I., Cuturi MC., Godard A., Moreau M., Terqui M. et al. Presence of leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 in porcine uterine secretions prior to conceptus attachment, *Cytokine* 1994, 6:493-9.
105. Pampfer S., Daiter E., Barad D., Pollard JW. Expression of the colony-stimulating factor-I receptor (c-fms proto-oncogene product) in the human uterus and placenta, *Biol Reprod* 1992, 46:48-57.
106. Bartocci A., Pollard JW., Stanley ER. Regulation of CSF-1 during pregnancy. *J Experi Med* 1986, 164: 956-961.
107. Pollarda JW., Hunt JWM., Wiktor-Jedrzejczak W., Stanley ER. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility, *Dev Bio* 1991, 148: 273-283.
108. Pollarda JW. Role of CSF-1 in reproduction and development, *Mol Reprod and Dev* 1997, 46: 54-61.
109. Kauma SW., Aukerman SL., Eierman D., Turner T. Colony-stimulating factor-I and c-fms expression in human endometrial tissues and placenta during the menstrual cycle and early pregnancy, *J Clinic Endocrinol and Metabol* 1991, 73: 746-751.
110. Le J., Vilcek J. Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities, *Lab Invest* 1987, 56: 234-248.
111. Chen HL., Yang YP., Hu XL., Yelavarthi KK., Fishback JL. et al Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation, *Am J Pathol.* 1991, 139:327-335.
112. Yelavarthi KK., Chen HL., Yang YP., Cowley BJ., Fishback JL. et al. Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein in rat uterine and placental cells, *J Immunol* 1991, 146:3840-3848.

113. Pampfer S., Wu YD., Vanderheyden I., Hertogh R. Expression of tumor necrosis factor- α (TNF α) receptors and selective effect of TNF- α on the inner cell mass in mouse blastocysts, *Endocrinol* 1994, 134:206-212.
114. Hampson J., McLaughlin PJ., Johnson PM. Low-affinity receptors for tumor necrosis factor- α , interferon- γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are expressed on human placental syncytiotrophoblast, *Immunol* 1993, 79:485-490.
115. Hey NA., Graham RA., Seif MW., Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase, *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78:337-42.
116. Horne AW., White JO., Margara RA., Williams R., Winston RM. et al. MUC 1: a genetic susceptibility to infertility? *Lancet* 2001, 357:1336-7.
117. DeLoia JA., Krasnow JS., Brekosky J., Babaknia A., Julian J. et al. Regional specialization of the cell membrane-associated, polymorphic mucin (MUC1) in human uterine epithelia, *Hum Reprod* 1998, 13:2902-9.
118. Surveyor GA., Gendler SJ., Pemberton L., Das SK., Chakraborty I. et al. Expression and steroid hormonal control of MUC1 in the mouse uterus. *Endocrinol* 1995, 136:3639-47.
119. Meseguer M., Aplin JD., Caballero-Campo P., O'Connor JE., Martin JC. et al. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst, *Biol Reprod* 2001, 64:590-601.
120. Hey NA., Li TC., Devine PL., Graham RA., Saravelos H. et al. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients, *Hum Reprod* 1995, 10:2655-62.

121. Braga VM., Gendlern SJ. Modulation of MUC1 mucin in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation, *J Cell Sci* 1993, 105:397-405.
122. Meseguer M., Pellicer A., Simon C. MUC1 and endometrial receptivity, *Mol Hum Reprod* 1998, 4:1089-1098.
123. Aplin JD., Hey NA., Li TC. MUC1 as a cell surface and secretory component of endometrial epithelium: reduced levels in recurrent miscarriage, *Am J Reprod Immunol* 1996, 35:261-6.
124. Clarke FM. Does "EPF" have an identity? *J Asist Reprod Genet* 1997, 14: 489-491,
125. Athanasas-Platsis S., Morton H., Dungleison GF., Kaye PL. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice in vivo, *J Reprod Fert* 1991, 92:443-451.
126. Cavanagh AC. An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy, *J Asist Reprod Genet* 1997, 14:492-494.
127. Lash GE., Legge M. Early pregnancy factor: an unresolved molecule, *J Asist Reprod Genet* 1997, 14:39-43.
128. Bose R., Lacson AG. Embryo-associated immunosuppressor factor is produced at the maternal-fetal interface in human pregnancy, *Am J Reprod Immunol* 1995, 33:373-380.
129. Roussev RG., Coulam CB., Barnea ER. Development and validation of an assay for measuring preimplantation factor (PIF) of embryonal origin, *Am J Reprod Immunol* 1996, 35:281-287.
130. Coulam CB., Roussev RG., Thomasson EJ., Barnea ER. Preimplantation factor (PIF) predicts subsequent pregnancy loss, *Am J Reprod Immunol* 1995, 34: 88-92.

131. Roussev RG., Coulam CB., Kaider BD., Yarkoni M., Leavis PC. et al. Embryonic origin of preimplantation factor (PIF): biological activity and partial characterization, *Mol Human Reprod* 1996, 2:883-887.
132. O'Neil C. Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization in mice, *J Reprod Fertil* 1985, 73: 559-566.
133. Critser E., English J. The role of platelet-activating factor in reproduction, *In Immunol obstet* W.W. Norton, New York. 1992; PP 202-215.
134. Fuerstrein G., Siren A. Platelet activating factor and shock, *Progress Biochem Pharmacol* 1988, 22:181-199.
135. Velasquez L., Aguilera J., Crozatto H. Possible role of platelet-activating factor in embryonic signaling during oviductal transport in the hamster, *Biol Reprod* 1995, 52:1302-1307.
136. Elias K., Das A., Pardue D., Coulam CB., Critser J. et al. Alteration in platelet count during early pregnancy in the mouse, *Am J Reprod Immunol* 1989, 21:82-86.
137. Stojanov T., O'Neil C. Ontogeny of expression of a receptor for platelet-activating factor in mouse preimplantation embryos and the effects of fertilization and culture in vitro on its expression, *Biol Reprod* 1999, 60:674-682.
138. Spinks NR., Ryan JP., O'Neil C. Antagonists of embryo-derived platelet activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant, *J Reprod Fertil* 1990, 88:241-248.
139. Adamson ED. Activities of growth factors in preimplantation embryos, *J Cell Bio* 1993, 53:280-287.
140. Chia CM., Winston RML., Handyside AH. EGF, TGF- α and EGF-R expression in human preimplantation embryos, *Develop* 1995, 121:299-307.

141. Watson AJ., Hogan A., Hahnel A., Weimer KE., Schultz GA. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo, *Mol Reprod Dev* 1992, 31:87-95.
142. Sharkey AM., Dellow K., Blayney M., Macnamee M., Charnock-Jones S. et al. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos, *Biol Reprod* 1995, 53:974-81.
143. Dinarello CA. The biology of interleukin-1, *Chem of immunol* 1992, 51:1-32.
144. Sharkey A. Cytokines and embryo/endometrial interactions, *Reprod Med Rev* 1995, 4:87-100.
145. Holmes PV., Sjogren A., Hamberger L. Prostaglandin E2 released by pre-implantation human conceptuses, *J Reprod Immunol* 1990, 17:79-86.
146. Maathuis JB., Kelly RW. Concentrations of prostaglandin F2 α and E2 in the endometrium throughout the human menstrual cycle after the administration of clomiphene or an oestrogen-progesterone pill and in early pregnancy, *J Endoc* 1978, 77:361.
147. Shi QJ., Lei ZM., Rao CV., Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts, *Endoc* 1993, 132:1387-95.
148. Roberts RM., Cross JC., Leaman DW. Interferons as hormones of pregnancy, *Endoc Rev* 1992, 13:432-452.
149. Ashkar AA., Croy BA. Interferon-gamma contributes to the normality of murine pregnancy, *Biol Reprod* 1999, 61:493-502.
150. Ware CB., Horowitz MC., Renshaw BR., Hunt JS, Liggitt D. et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death, *Develop* 1995, 121:1283-1299.

151. Robertson SA., Lavranos TC., Seamark RF. In vitro models of the maternal interface, In: Wegmann TG, Gill TGIII, Nisbet- Brown E, eds. New York: Oxford University Press, 1991; PP 191-206.
152. Marquant-Le Guinne B., Humbolt P., Guillon N., Thibier M. Murine LIF improves the development of IVF cultured bovine morulae, *J Reprod Fertil* 1993, 12:61-68.
153. Fry RC., Batt PA., Fairclough RJ., Parr RA. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos, *Biol Reprod* 1992, 46: 470-4.
154. Dunlison QF., Barlow DH., Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rate of human embryos cultured in serum free medium, *Hum Reprod* 1996, 11: 191-196.
155. Gelety TJ., Buyalos RP. The influence of supraphysiologic estradiol levels on human nidation, *J Assist Reprod Genet* 1995, 12: 406-412.
156. Paria BC., Lim H., Das SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation, *Semin Cell Dev Biol* 2000, 11: 67-76.
157. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator, *Science* 1991, 251: 1451-1455.
158. Birchmeier W., Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in formation of cell junctions and the prevention of invasiveness, *Biochim Biophys Acta* 1994, 1198: 11-26.
159. Kemler R., Ozawa M., Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules, *Curr Opin Cell Biol* 1989, 1:892-897.
160. Rimm DL., Koslov ER., Kebriaci P., Cianci CD., Morrow JS. $\alpha 1$ -(E) Catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 8813-8817.

161. Overduin M., Harvey TS., Bagby S., Tong KI, Yau P. et al. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion, *Science*. 1995, 267: 386-389.
162. Shapiro L., Fannon AM., Kwong PD., Thompson A., Lehmann MS. et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins, *Nature* 1995, 374:327-337.
163. Gumbiner BM. Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions, *Am J Physiol* 1987, 253:749-758.
164. Paria BC., Huet-Hudson YM., Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the mouse receptive uterus, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:10159-10162.
165. Shih IM., Hsu MY., Oldt RJ, Herlyn M., Gearhart JD. et al. The role of E-cadherin in the motility and invasion of implantation site intermediate trophoblast, *Placenta* 2002, 23:706-15.
166. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol* 2000, 81:405-22.
167. Ding YO., Bagchi MK., Bardin CW., Bagchi IC. Calcitonin gene expression in the rat uterus during pregnancy, *Recent Prog Horm Res* 1995, 50:373-8.
168. Zhu LJ., Cullinan-Bove K., Polihronis M., Bagchi MK., Bagchi IC. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation, *Endocrinol* 1998, 139:3923-34.
169. Bloor DJ., Metcalfe AD., Rutherford A., Brison DR., Kimber SJ. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development, *Mol Hum Reprod* 2002, 8:237-45.
170. Arbones ML., Ord DC., Ley K., Ratech H., Maynard-Curry C. et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice, *Immunity* 1994, 1:247-260.

171. Labow MA., Norton CR., Rumberger JM., Lombard-Gillooly KM., Shuster DJ. et al. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins, *Immunity* 1994, 1:709-720.
172. Mayadas TN., Johnson RC., Rayburn H., Hynes RO., Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin deficient mice, *Cell* 1993, 74:541-554.
173. Tian L., Catt JW., O'Neill C., King NJ. Expression of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules on murine embryonic stem cells, *Biol Reprod* 1997, 57:561-8.
174. Lu DP., Tian L., O'Neill C., King NJ. Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos, *Cell Res* 2002, 12:373-83.
175. McDonald JA. Receptors for extracellular matrix components, *Am J Physiol* 1989, 257:331-7.
176. Damsky CH., Werb Z. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information, *Curr Opin Cell Biol* 1992, 4:772-781.
177. Poirier F., Kimber SJ. Cell surface carbohydrates and lectins in early development, *Mol Hum Reprod* 1997, 3:907-918.
178. Sidhu SS., Kimber SJ. Hormonal control of H-type α 1-2 fucosyltransferase mRNA expression in the mouse uterus, *Biol Reprod* 1999, 60:147-157.
179. Kimber SJ., Lindenberg S. Hormonal control of carbohydrate determinants involved in implantation, *J Reprod Fertil* 1990, 89:13-21.
180. Illingworth IM., Kimber SJ. Demonstration of oestrogenic control of H-type-I carbohydrate antigen in the murine endometrial epithelium by use of ICI, *J Reprod Fertil* 1999, 117:89-95.

181. Kimber SJ., Lindenberg S., Lundblad A. Distribution of some Gal β 1-3(4)GlcNac related carbohydrate antigens on the mouse uterine epithelium in relation to the periimplantation period, *J Reprod Immun* 1988, 12:297-313.
182. Carson DD., Tang JP., Julian J. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence, *Dev Biol* 1993, 155:97-106.
183. Smith SE., French MM., Julian J., Paria BC., Dey SK. et al. Expression of heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in the mouse blastocyst is regulated during normal and delayed implantation, *Dev Biol* 1997, 184:38-47.
184. Rohde LH, Carson DD. Heparin-like glycosaminoglycans participate in binding of a human trophoblastic cell line (JAR) to a human uterine epithelial cell line (RL95), *J Cell Physiol* 1993, 155:185-196.
185. Kallapur SG., Akesson RA. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) heparin binding domain binds to cell surface heparan sulphate proteoglycan, *J Neuro Sci* 1992, 33:538-548.
186. Damsky CH., Fitzgerald ML., Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway in vivo, *J of Clin Invest* 1992, 89:210-222.
187. Bernfield M., Banerjee SD., Koda JE., Rapraeger AC. Remodeling of the basement membrane as a mechanism of morphogenetic tissue interaction, In: R.L Trelstad, ed Alan R. Liss. *The role of Extracellular Matrix in Development*, R.L. New York, 1984; PP 545-572.
188. Laurie GW., Leblond CP., Martin GR. Intracellular localization of basement membrane precursors in the endodermal cells of the rat parietal yolk sac: II. Immunostaining for type IV collagen and its precursors, *J Histo Cytochem* 1982, 30:983-990.

189. Adamson ED., Ayers SE. The localisation and synthesis of some collagen types in developing mouse embryos, *Cell* 1979, 13:953-965.
190. Schultz JF., Mayernik L., Rout UK., Armant DR. Integrin Trafficking regulates adhesion to fibronectin during differentiation of mouse peri-implantation blastocysts, *Dev Genet* 1997, 21:31-43.
191. Wartiovaara J., Leivo I., Vaheri A. Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo, *Dev Biol* 1979, 69:247-257.
192. Armant DR., Kaplan HA., Lennarz WJ. Fibronectin and laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts, *Dev Biol* 1986, 116:519-23.
193. Schultz JF., Armant DR. β 1- and β 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor, *J Biol Chem* 1995, 270:11522-11531.
194. Stephens LE., Sutherland AE., Klimanskaya IV., Andrieux A., Meneses J. et al Deletion of β 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality, *Genes Dev* 1995, 9:1883-1895.
195. Yelian FD., Yang Y., Hirata JD., Schultz JF., Armant DR. Molecular interactions between fibronectin and integrins during mouse blastocyst outgrowth, *Mol Reprod Dev* 1995, 41:435-448.
196. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion, *Cell* 1992, 69:11-25.
197. Earl U., Estlin C., Bulmer JN. Fibronectin and laminin in the early human placenta, *Placenta* 1990, 11:223-31.

198. Karkavelas G., Kefalides NA., Amenta PS., Martinez-Hernandez A. Comparative ultrastructural localization of collagen types III, IV, VI and laminin in rat uterus and kidney, *J Ultrastruct Mol Struct Res* 1988, 100:137-155.
199. Glasser SR., Lampelo S., Munir MI., Julian J. Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells, *Differentiation* 1987, 35:132-142.
200. Wu T-C., Wan Y-J., Chung AE., Damjanov I. Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses, *Dev Biol* 1983, 100:496-505.
201. Clark DE., Hurst PR., McLennan IS., Myers DB. Immunolocalization of collagen type I and laminin in the uterus on days 5 to 8 of embryo implantation in the rat, *Anat Rec* 1993, 237:8-20.
202. Welsh A.O., Enders A.C. Chorionallantoic placenta formation in the rat: II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation, *Am J Anat* 1991, 192:347-365.
203. Thomas T., Dziadek M. Differential expression of laminin, nidogen and collagen IV genes in the midgestation mouse placenta, *Placenta* 1993, 14:701-13.
204. Enders AC. Morphological manifestations of maturation of the blastocyst, In: K. Yoshinaga, T. Mori, eds. Alan R. *Development of Preimplantation Embryos and Their Environment* Liss, New York, 1989; PP 211-223.
205. Bossy B., Bossy-Wetzel E., Reichardt L. Characterization of the integrin α_8 subunit, a new integrin β_1 associated subunit, which is prominently expressed on axons and on cells in contact with basal lamina in chick embryos, *EMBO J* 1991, 10:2375-85.

206. Albeda SM., Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules, *FASEB J.* 1990, 4:2868-80.
207. Elices MJ., Urry LA., Hemler ME. Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by ARG-GLY-ASP peptide and by divalent cations, *J Cell Biol* 1991, 112:169-81.
208. De Felici M., Camaioni A., Russo MA., Siracusa G. Selective binding of mouse a human spermatozoa to beads coated with extracellular matrix components, *Mol Reprod Dev* 1990, 27:337-43.
209. Glander HJ., Herrmann K., Haustein UF. The equatorial fibronectin band (EFB) on human spermatozoa: a diagnostic help for male fertility? *Androl* 1987, 19:456-9.
210. Tarone G., Russo MA., Hirsch E. et al. Expression of β_1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte, *Develop* 1993, 117:1369-75.
211. Blobel CP., Wolfsberg TG., Turck CW., Myles DG., Primakoff P. et al. potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion, *Nature* 1992, 356:248-52.
212. Almelda EAC., Huovila A-PJ., Sutherland AE., Stephens LE., Calarco PF. et al. Mouse egg integrin $\alpha_6\beta_1$ functions a sperm receptor, *Cell* 1995, 81:1095-104.
213. Lessey BA., Damjanovich L., Coutifaris C., Castelbaum A., Albelda SM. et al. Integrin adhesion molecules in the human endometrium: correlation with the normal and abnormal menstrual cycle, *J Clin Invest* 1992, 90:188-95.
214. Shiokawa S., Yoshimura Y., Nagamatsu S., Sawa H., Hanashi H. et al. Expression of β_1 integrins in human endometrial stromal and decidual cells, *J Clin Endoc Metab* 1996, 81:1533-40.

215. Sueoka K., Shiokawa S., Miyazaki T., Kuji N., Tanaka M. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation, *Fertil Steril* 1997, 67:799-811.
216. Merviel P., Challier JC., Carbillon L., Foidart JM., Uzan S. The role of integrins in human Embryo implantation, *Fetal Diagn Ther* 2001, 16:364-371.
217. Lessey AB., Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human, *Endoc Metab Disord* 2002, 3:107-117.
218. Klentzeris LD., Bulmer JN., Trejdosiewicz LK., Morrison L., Cooke ID. Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women, *Hum Reprod* 1993, 8:1223-30.
219. Lessey BA., Castelbaum AJ., Buck CA., Lei Y., Yowel CW. et al. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy, *Fertil Steril* 1994, 62:497-506.
220. Sutherland A., Calarco PG., Damsky CH. Expression and function of the integrin family of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and out-growth, *J Cell Biol* 1988, 106:1331-48.
221. Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium during the menstrual cycle, *Hum Reprod* 1992, 7:876-882.
222. Lessey BA., Ilesanmi AO., Lessey MA., Riben M., Harris JE. et al. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation contraception and infertility, *Am J Reprod Immun* 1996, 35:195-204.
223. Haas TA., Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review, *Curr Opin Cell Biol* 1994, 6:656-662.
224. Yoshimura Y., Shiokawa S., Nagamatsu S., Hanashi H., Sawa S. et al. Effects of beta-1 integrins in the process of implantation, *Horm Res* 1995, 44:36-41.

225. Shiokawa S., Yoshimura Y., Nagamatsu S., Sawa H., Hanashi H. et al. Function of β_1 integrins on human decidual cells during implantation, *Biol Reprod* 1996, 54:745-752.
226. MacLaren LA., Wilderman AG. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the α_6 and β_1 integrin subunits in bovine trophoblast, *Biol Reprod* 1995, 53:153-65.
227. Fassler R., Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice, *Genes Dev* 1995, 1:1896-908.
228. Hunt JS. 2000. Cytokine networks in the human placenta, In J. A. Hill, *Cytokine in Hum Reprod*. Wley-Liss. New York 2000 P-P:203-220.
229. Yanushpolsky EH., Ozturk M., Berkowitz R.S. The effects of cytokines on human chorionic gonadotropin production by a trophoblast cell line, *J Reprod Immunol* 1993, 25:235-247.
230. Feinberg BB., Anderson DJ., Stellar MA. Cytokine regulation of trophoblast steroidogenesis, *J. Clin. Endoc. Metab* 1994, 78 : 586-591.
231. Nasu KY. Zhou MT. Upregulation of human cytotrophoblast invasion by hepatocyte growth factor. *J Reprod Fertil* 2000, 55:73-80.
232. Ma LM., Maas. RI. Genetic control of uterine receptivity during implantation. *Sem Reprod Endocrinol* 1999, 17:205-206.
233. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling, *Ternds Genet* 1990, 6:121-125.
234. Fisher SJ., Cui T., Zhang L., Hartmann L., Grahl K. et al. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro, *J Cell Biol* 1989, 109:891-902.

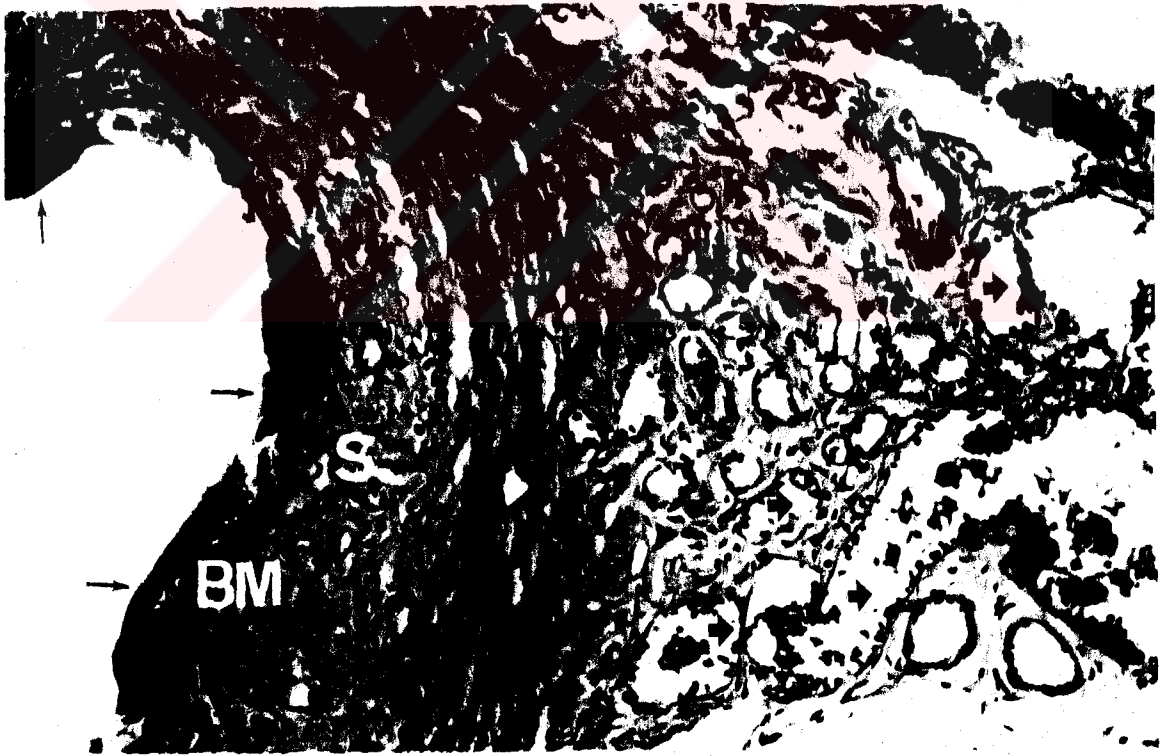
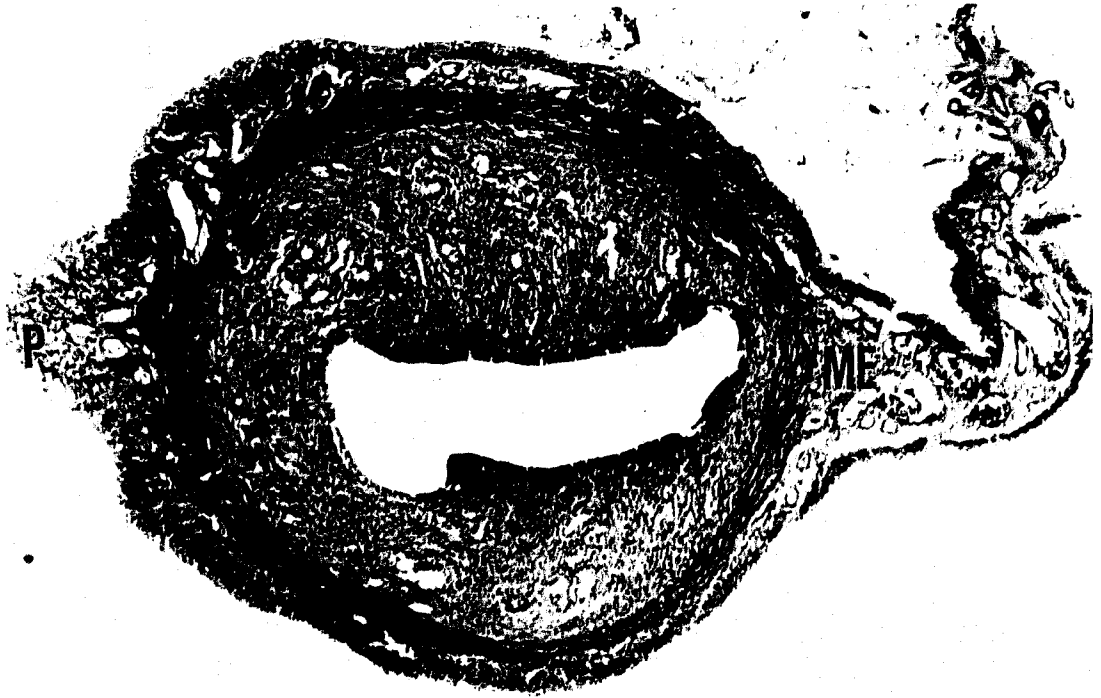
235. Sappino AP., Huarte D., Belin D., Vassalli JD. Plasminogen activators in tissue remodelling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos, *J Cell Biol* 1989, 109:2471-2479.
236. Reponen P., Leivo I., Sahlberg C., Apte SS., Olson BR et al. 92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1, TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation, *Dev Dynm* 1995, 2020:338-396.
237. Lala PK., Hamilton GS. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue, *Placenta* 1996, 17:545-55.
238. Maquoi E., Polette M., Nawrocki B., Bischof P., Noël A. et al. Expression of stromelysin-3 in the human placenta and placental bed, *Placenta* 1997, 18:277-85.
239. Cao J., Sato H., Takino T., Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation, *J Biol Chem* 1995, 270:801-5.
240. Zini JM., Murray SC., Graham CH. et al. Characterization of urokinase receptor expression by human placental trophoblasts, *Blood* 1992, 79:2917-29.
241. Multhaupt HAB., Mazar A., Cines DB., Warhol MJ., McCrae KR. Expression of urokinase receptors by human trophoblast. A histochemical and ultra-structural analysis, *Lab Invest* 1994, 71:392-400.
242. Hofmann GE., Glatstein I., Schatz F., Heller D., Deligdisch L. Immuno-histochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites, *Am J Obstet Gynecol* 1994, 170:671-6.
243. Li L., Chen S., Xing F. Expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 protein in the implantation window phase of endometrium, *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2000, 35:544-6.

244. Bass KE., Morrish D., Roth I., Bhardwaj D., Taylor R. et al. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process, *Dev Biol* 1994, 164:550-61.
245. Heap RB., Flint AP., Gadsby JE., Rice C. Hormones, the early embryo and the uterine environment, *J Reprod Fertil* 1979, 55: 267-75.
246. Fazleabas AT., Strakova Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment, *Mol Cell Endoc* 2002, 186:143-7.
247. Ogle TF. Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy, *Steroids* 2002, 67:1-14.
248. Shelesnyak MC., Marcus GJ. On the incidence of spontaneous decidualization in the rat, *J Reprod Fertil* 1967, 14:497-9.
249. Bell SC. Decidualization and associated cell types: implications for the role of the placental bed in the materno-fetal immunological relationship, *J Reprod Immunol* 1983, 5: 185-94.
250. Heap RB., Flint AP., Gadsby JE. Role of embryonic signals in the establishment of pregnancy, *Br Med Bull* 1979, 35:129-35.
251. Beverley K. Changes in vascular permeability and desiduoma formation during the peri-implantation period of rat in response to exogenous gonadotropins, *Anat Rec* 1997, 242:20-24.
252. Welsh AO., Enders AC. Occulusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy, *Am J Anat* 1983, 167:463-477.
253. Duval M. J. *Anat Physiol* 1891, 27:24-96.
254. Parr EL., Young LHY., Parr MB., Young JDE. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases, *J Immunol* 1990, 145:2365-2372.

255. Peel S. Granulated metrial gland cells, *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1989, 115:101-112.
256. Bulmer D., Stewart I., Peel SJ. Endometrial granulocytes of pregnant hamster, *Anat* 1983, 136:329-337.
257. Blankenship TN., Given RL. Penetrasyon of the uterine epithelial basement membrane during blastocyst implantation in mouse, *Anat Rec* 1992, 31:196-204.
258. Kayışlı UA. Sıçanlarda implantasyon evresinde blastosist trofoblastı ile uterus etkileşmesinin immunohistokimyasal tekniklerle belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniv.* 1997, 31-32.
259. Yamada O., Todoroki J., Takahashi T., Hashizume K. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation, *J Vet Med Sci* 2002, 64:207-14.
260. Guillomot M. Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation, *Placenta* 1999, 20:339-345.
261. DerRest M.V., Garrone R. Collagen family of proteins, *FASEB J* 1991, 5: 2814-2823.
262. Boss A. Immunohistochemical assessment of collagen type I, III, IV and VI in biopsy samples of the bovine uterine wall collected during the oestrous cycle, *Cells Tissues Organs* 2000, 167:225-238.
263. Kirby DR., Potts DM., Wilson IB. On the orientation of the implanting blastocyst, *J. Embryol Exp Morphol* 1967, 17:527-532.
264. Menino Jr., Hogan A., Schultz GA., Novak S., Dixon W. et al. Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig, *Dev Genet* 1997, 21:68-74.

265. Huang HY., Wen Y., Irvine JC. Cytokine mediated regulation of TIMP-1, TIMP-3 and 92-kDa Type IV collagenase messenger RNA expression in human endometrial stroma cells, *J Clin Endoc Metab* 1998, 83:1721-9.
266. Aplin JD., Spanswick C., Behzad F., Vicovac LJ., Kimber SJ. Integrins $\beta 5$, $\beta 3$ and αv in human and fare endometrium: expression in stromal and glandular cells, *Mol Hum Reprod* 1996, 74:2527-534.
267. Spanswick C. Embryo implantation: the role of αv family integrins, *PhD thesis, University of Manchester*. 1998, 21-24.
268. Campbell S., Swann HR., Seif MW., Kimber SJ., Aplin JD. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo, *Hum Reprod* 1995, 10:1871-8.
269. Bader BL., Rayburn H., Cowley D., Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis and organogenesis precede lethality in mice lacking all αv integrins, *Cell* 1998, 9:507-519.

8. RESİMLER



Resim 4.1: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda H.E boyaması. Uterusu oluşturan 3 tabaka: dışta seroza tabakası (perimetriyum) (P), ortada msküler tabaka (myometriyum) (M) ve en içte mukoza (endometriyum) (E) tabakası ayırt edilmektedir. Kan damarlarının bulunduğu mezometriyal bölge (ME). O.B.X 40.

Resim 4.2: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda mezometriyum kısmında H.E boyaması. Prizmatik lümen epitel hücreleri (→) ve bazal membranı (BM), stroma (S), myometriyumdaki spiral şekilli düz kas hücreleri (►), mezometriyal kısımda bol kan damarı ayırt edilmektedir (◆). O.B.X 200.



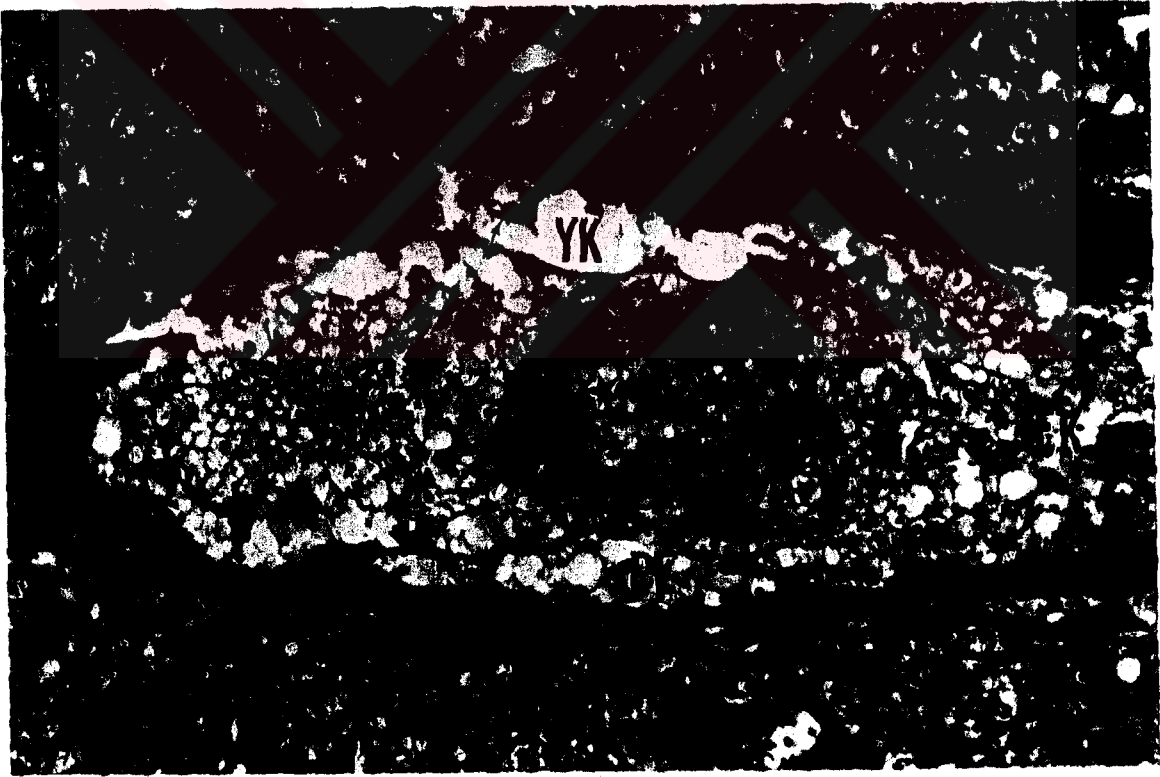
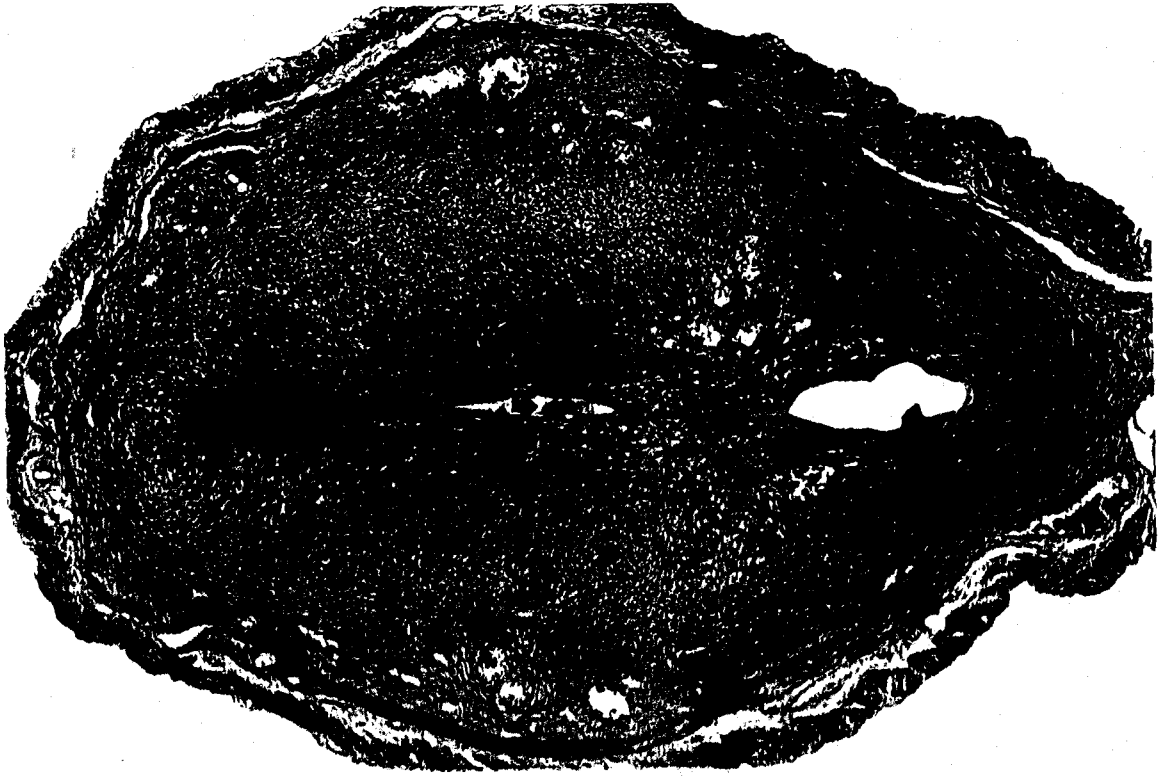
Resim 4.3: Dency Grubu: Gebeliğin 5. gününde sıçan uterusunda H.E boyaması. Uterusu oluşturan 3 tabakanın kontrolle aynı olduğu ancak mezometriyal kısımda desidual hücrelerin (★) ve GMG hücrelerinin (◄) prolifer olmaya başladığı görülmektedir. O.B.X 40.

Resim 4.4: Dency Grubu: Gebeliğin 5. gününde mezometriyal kısımdaki prolifer olmaya başlayan desidual hücreler (★) ve GMG hücreleri (◄). H.E. X 200.



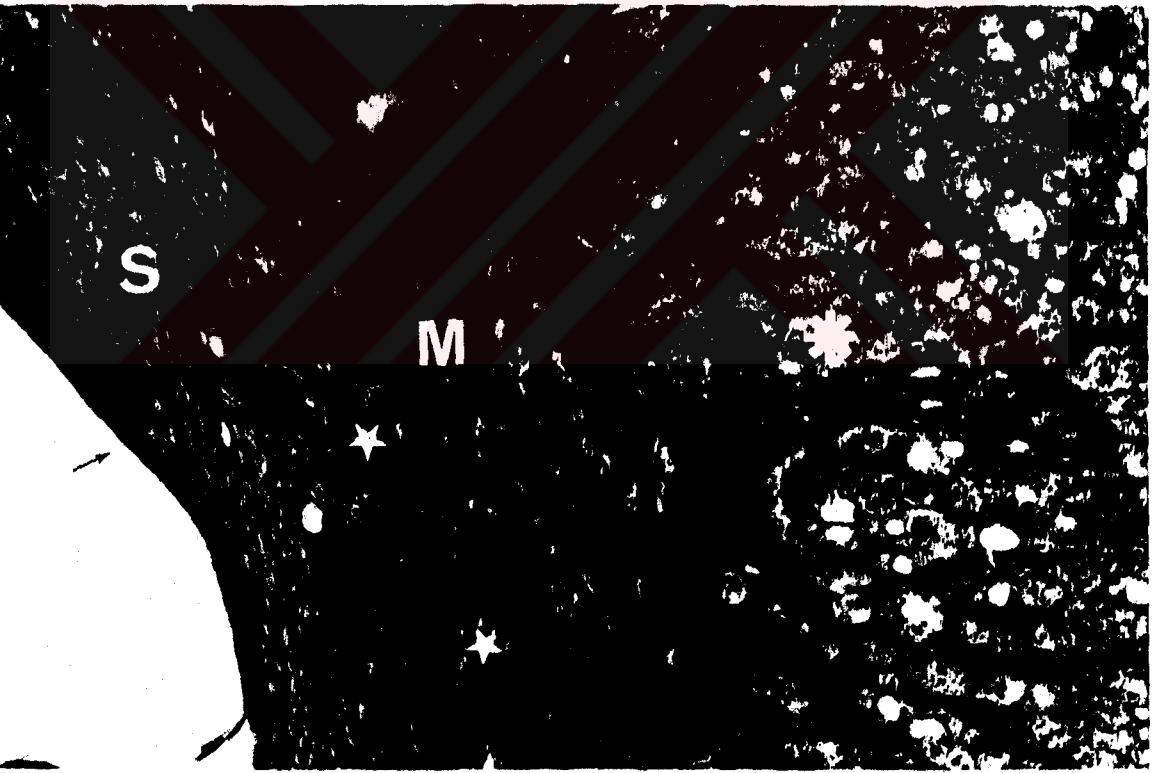
Resim 4.5: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde sıçan uterusunda H.E. boyanması. Myometriyum tabakasındaki (→) düz kas hücrelerinin sayısında ve boyutunda artış gözlenmekte. mezometriyal kısımdaki desidual hücrelerin oldukça çoğalarak desidual alanı (DA) oluşturduğunu görülmektedir. O.B.X 40.

Resim 4.6: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde mezometriyal kısımdaki genişlemiş desidual alan (DA) ve içlerinde glikojen ve lipid biriktiren genişleyen desidual hücreler (*) ve azalan IMG hücreleri (▲). H.E. O.B.X 200.



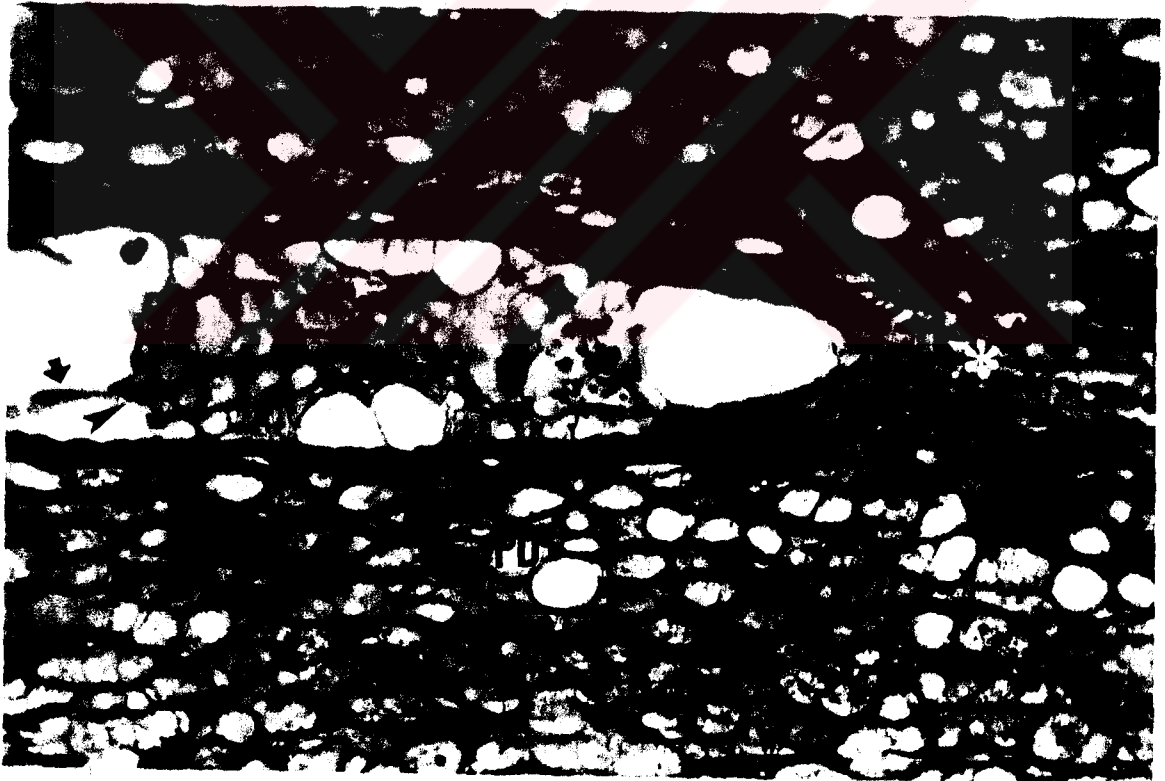
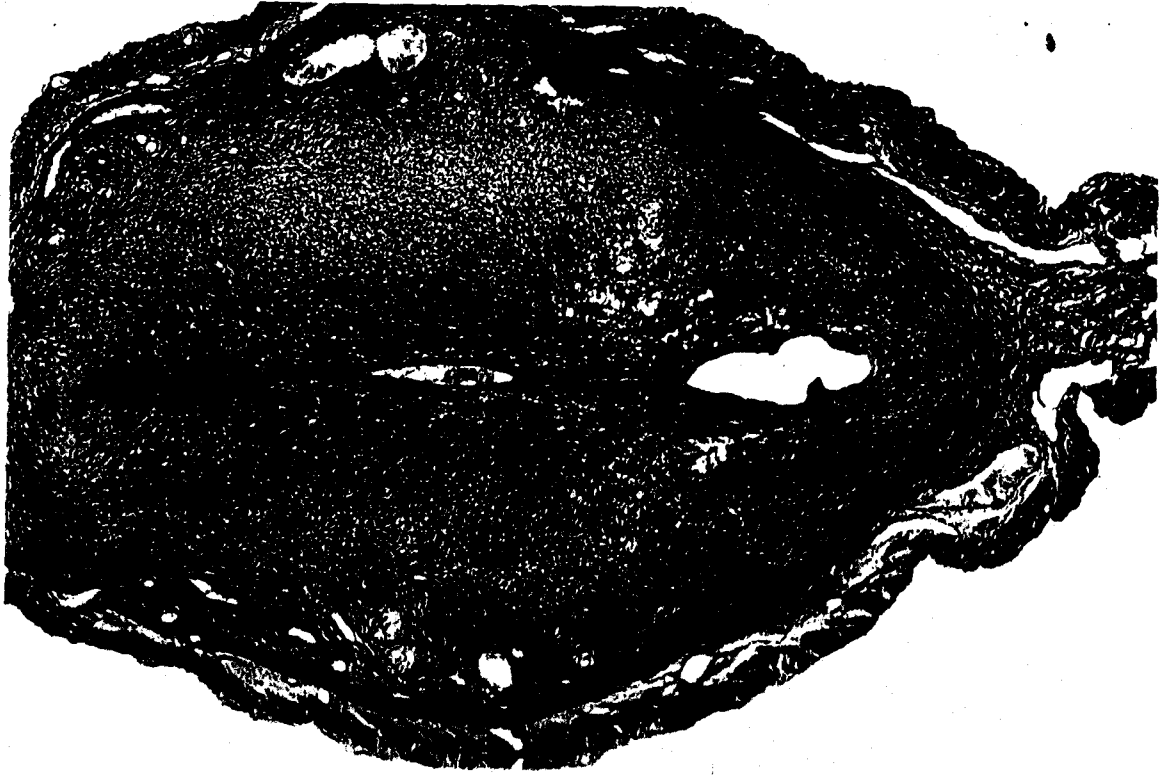
Resim 4.7: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde sıçan uterusunda H.E boyanması. Desidual hücrelerin çoğalarak uterus lümen epitelinin (LE) etrafını sardığı, embriyonun (◆) ise implante olduğu görülmektedir. Embriyonun gömülü olduğu desidual alanın ise primer (PD) ve sekonder (SD) alanlar olarak ikiye ayrıldığı, gözlenmektedir. O.B.X 40.

Resim 4.8: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde implante olan embriyonun H.E boyanması. Embriyonun yerleşmiş olduğu boşluk yolk kesesi kavitesi (YK), en dışta primer embriyonik endoderm hücrelerinin pariyetal tabakası (PE), trofoblastı oluşturan trofoektoderm hücreleri (TE), ektoplasental koni (EK), proamniyotik kavite (★), Richert's membran (◆), sekonder trofoblastik dev hücre (→), O.B.X 400.



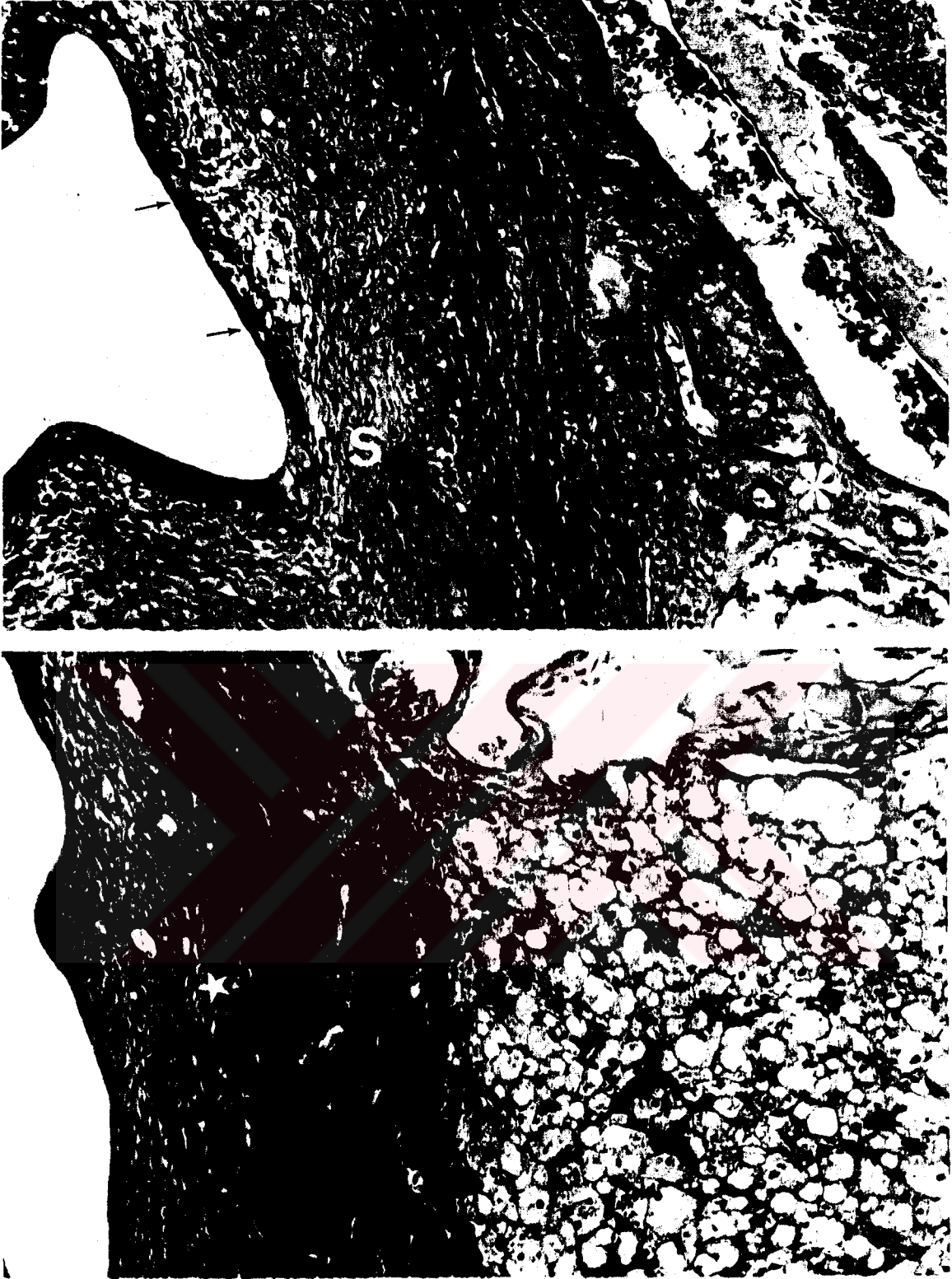
Resim 4.9: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda PAS boyanması. Lumen epitelinde (→) zayıf PAS pozitif boyanma gözlenirken, myometriyum tabakasının (M) ve stromanın (S) kuvvetli pozitif boyandığı izlenmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.10: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus epitelinin altında glikojenin biriktiği (→), stroma (S) ve myometriyum tabakasında (M) kuvvetli PAS pozitif reaksiyon gerçekleştiği, desidual hücreler (*) ve GMG hücrelerinin içindeki granüllerin (★) kuvvetli PAS pozitif boyandığı gözlenmektedir. PAS. O.B.X 200.



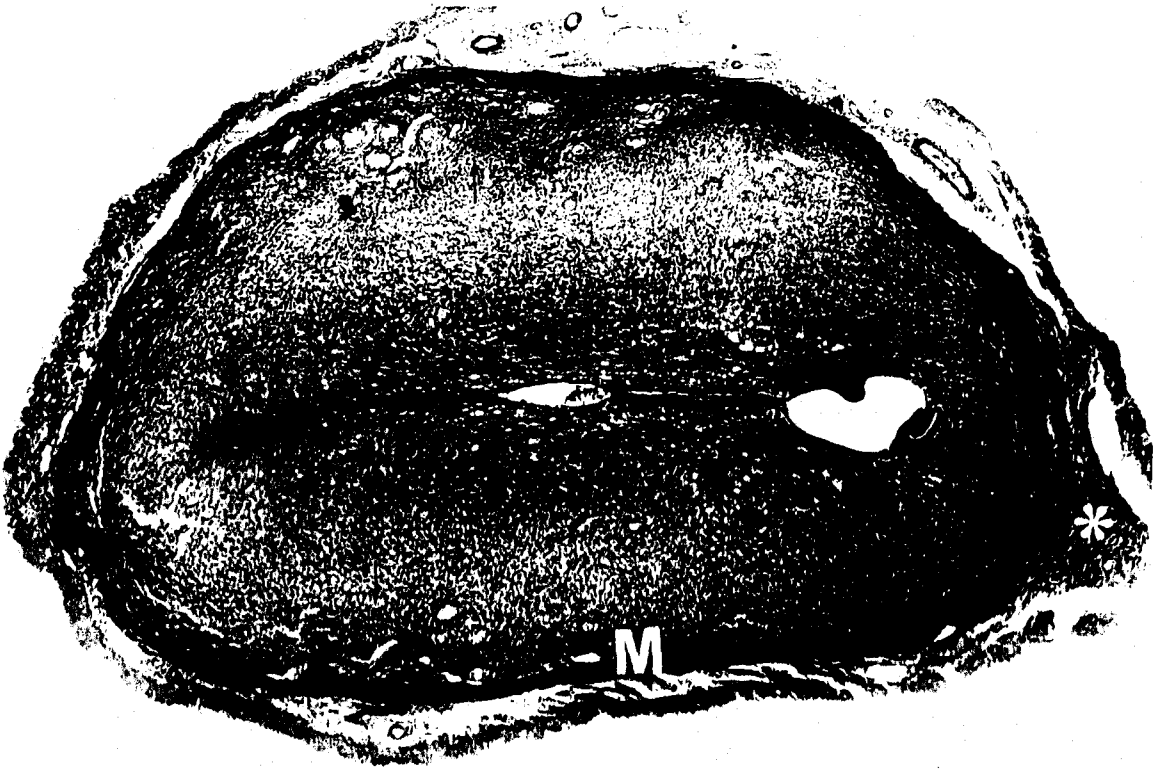
Resim 4.11: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterusdaki PAS boyanması. Sekonder desidual zonda (SD) zayıf boyanma gözlenirken, primer desidual (PD) zonda kuvvetli PAS reaksiyonu görülmektedir (O.B.X 40).

Resim 4.12: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde lümen epitelinin apikalinde (*), embriyoyu saran primer ekstra embriyonik endodermnin pariyetal tabakası (◀), Richert's membranında (▶) ve primer desidual (PD) zonda kuvvetli PAS reaksiyonu görülmektedir (O.B.X 400).



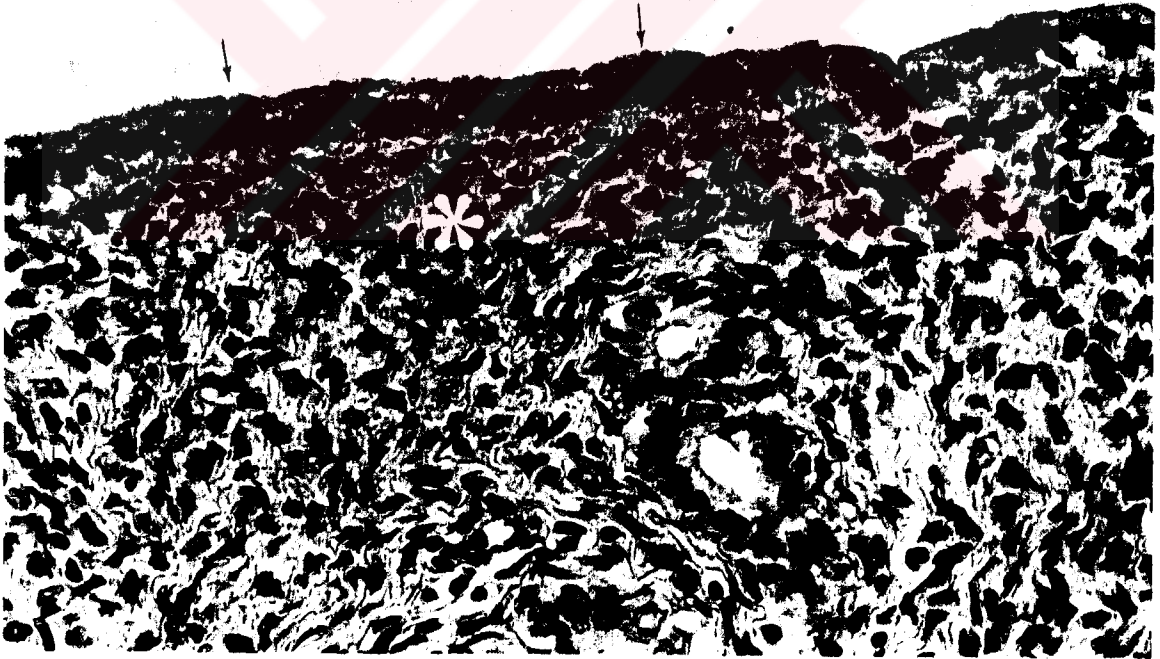
Resim 4.13: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Masson Trichrom boyanması. Mezometriyum kısmındaki kan damarlarının arasındaki (*) ve epitel altında aromadaki (S) kollajen liflerin (mavi renkte boyandığı tespit edilmiştir. Kırmızıya boyanan diğer yapılar myometriyum tabakasındaki düz kaslar (M), uterus lümen epitelini (→) göstermektedir. O.B.X 200.

Resim 4.14: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde mezometriyum kısmında desidual hücrelerin proliferasyonundan dolayı kenara itilmeye başlayan mavi kollajen lifler (*), myometriyumun iç kas tabakasının altına itilmeye başlayan stromanın arasındaki kollajen lifler (*), M.E. O.B.X 200.



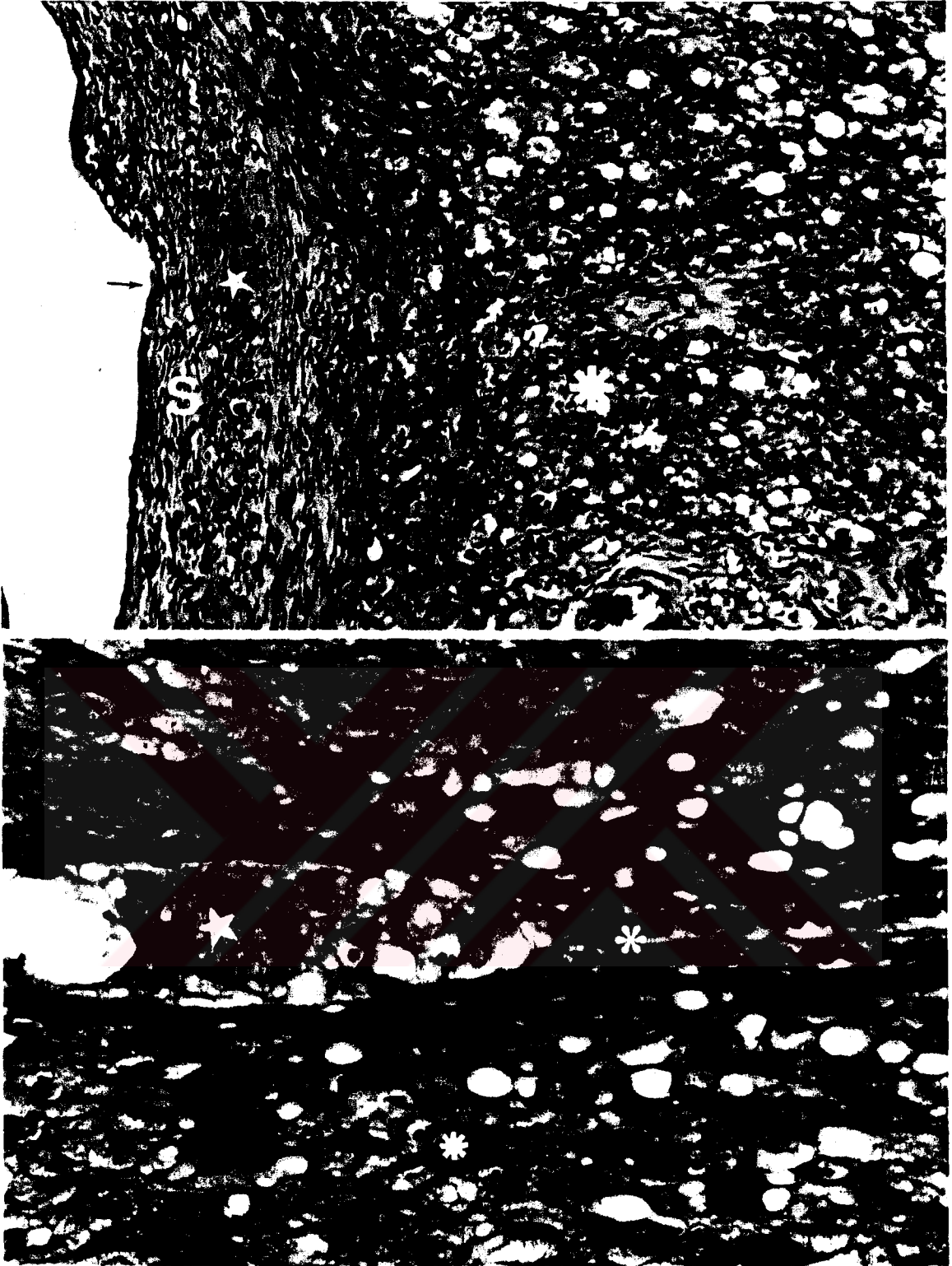
Resim 4.15: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Masson Trikrom boyama. Stromanın altındaki kollajen liflerin iç sirküler myometriyum tabakasına (M) paralel olarak tamamen kenara itilmiş olduğu (→) ve bir miktar da mezometriyum kısmında (*) gözlemlenmiştir. (O.B.X 40).

Resim 4.16: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde lümen epitelinin bazal membranında (*), trofoblast (*) hücrelerinde ve desidual yatakta (D) da hiç kollajen lif görülmemektedir. (M.F.) (O.B.X 200).



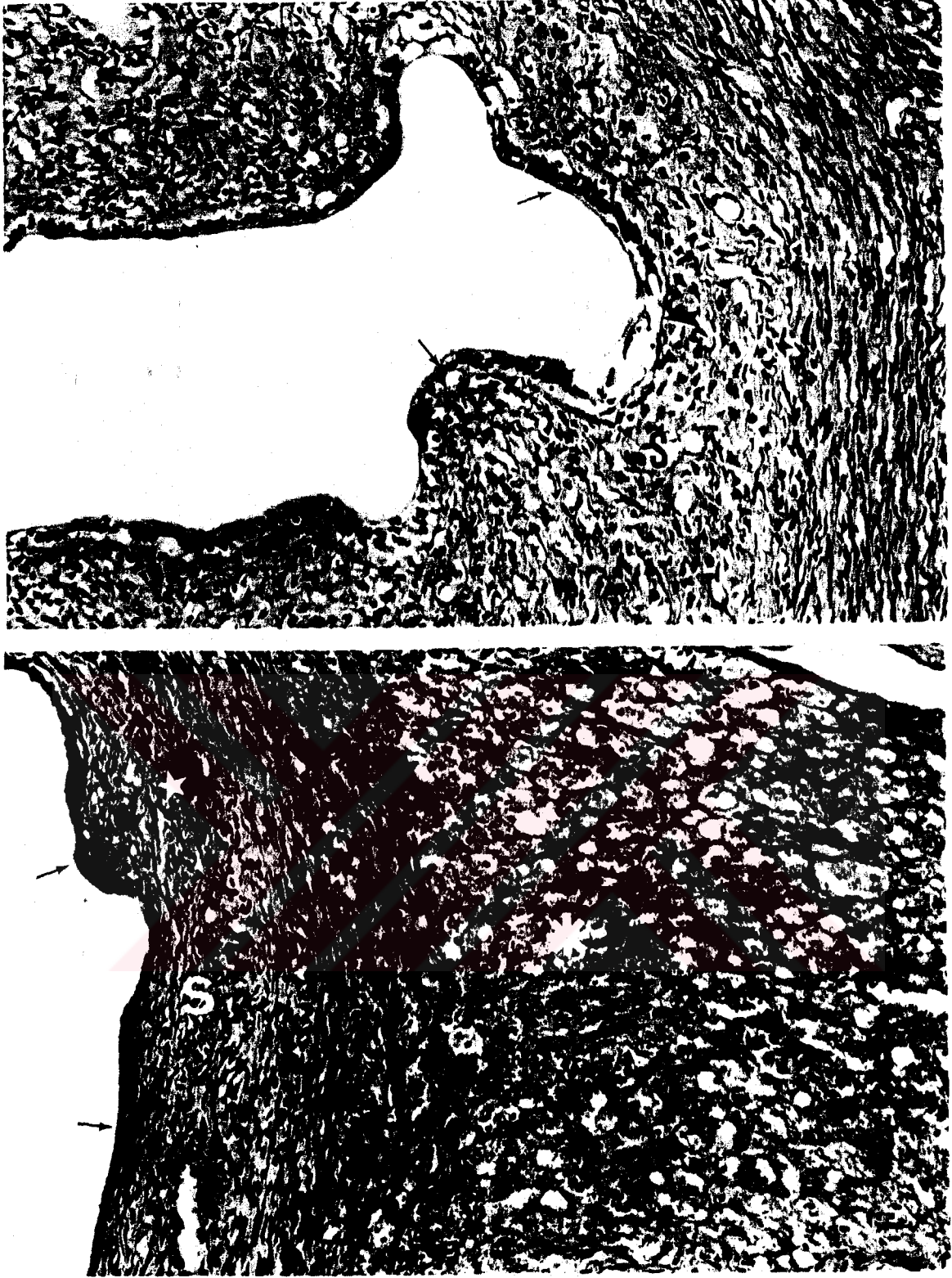
Resim 4.17: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda MUC1 boyanması. Uterus lümen epitelinde (→) yoğun, stromada (*) zayıf boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.18: Kontrol Grubu: Uterus lümen epitelinde (→) yoğun, stromada (*) zayıf MUC1 immunoreaksiyonu. O.B.X 400.



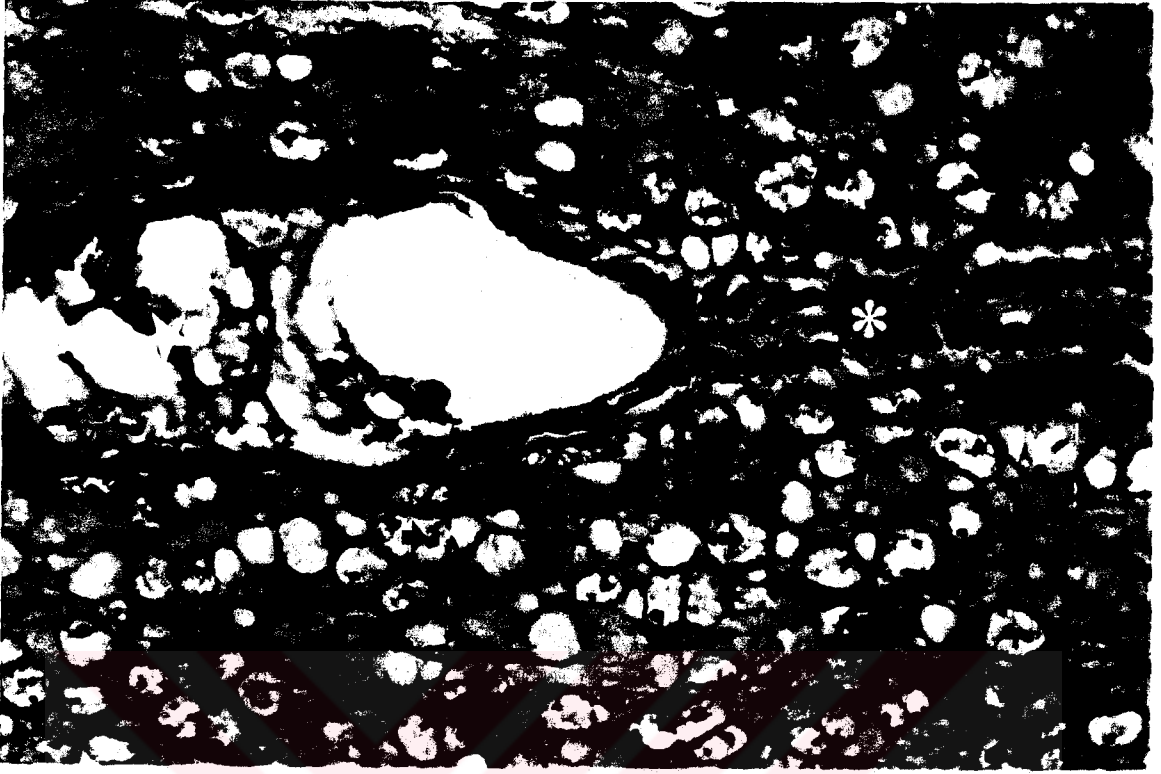
Resim 4.19: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümeninde (→) orta şiddetli, stromada (S) zayıf MUC1 boyanması, GMG hücrelerinde (★) ve mezometriyal bölgedeki desidual hücrelerde (*) kuvvetli boyanma gözlenmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.20: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki MUC1 boyanması. Trofoblast hücrelerinde (★) ve desidual hücrelerde (*) ve lümen epitelinde (*) belirgin bir boyanma gözlenmemektedir. O.B.X 400.

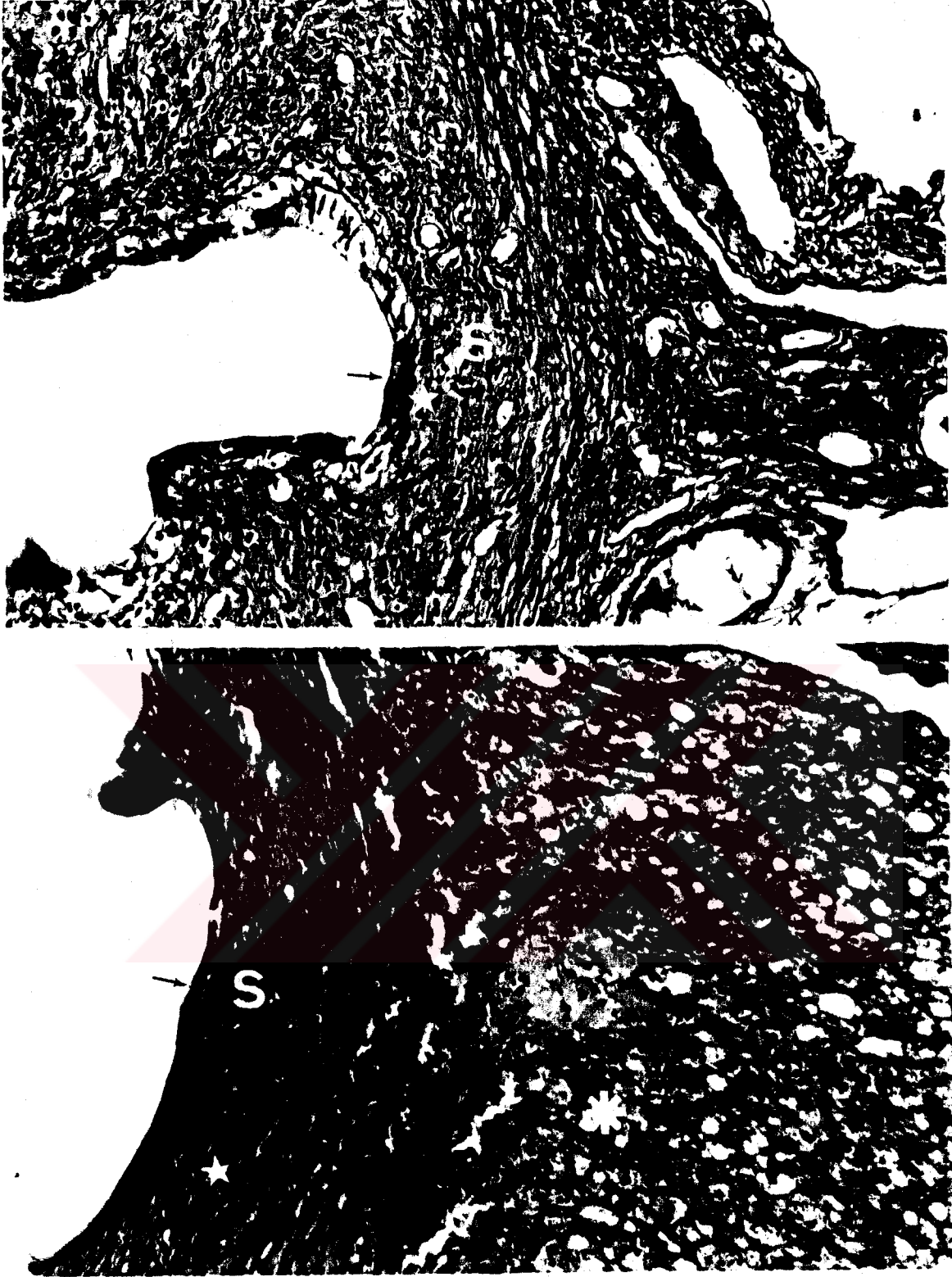


Resim 4.21: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Laminin boyanması. Uterus lümen epitelinde (→) ve bazal membranda (★) zayıf, stromada (S) orta şiddetli boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.22: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümen epitelinde (→), stromada (S), GMC hücrelerinde (★) ve desidua hücrelerde (*) şiddetli Laminin boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.

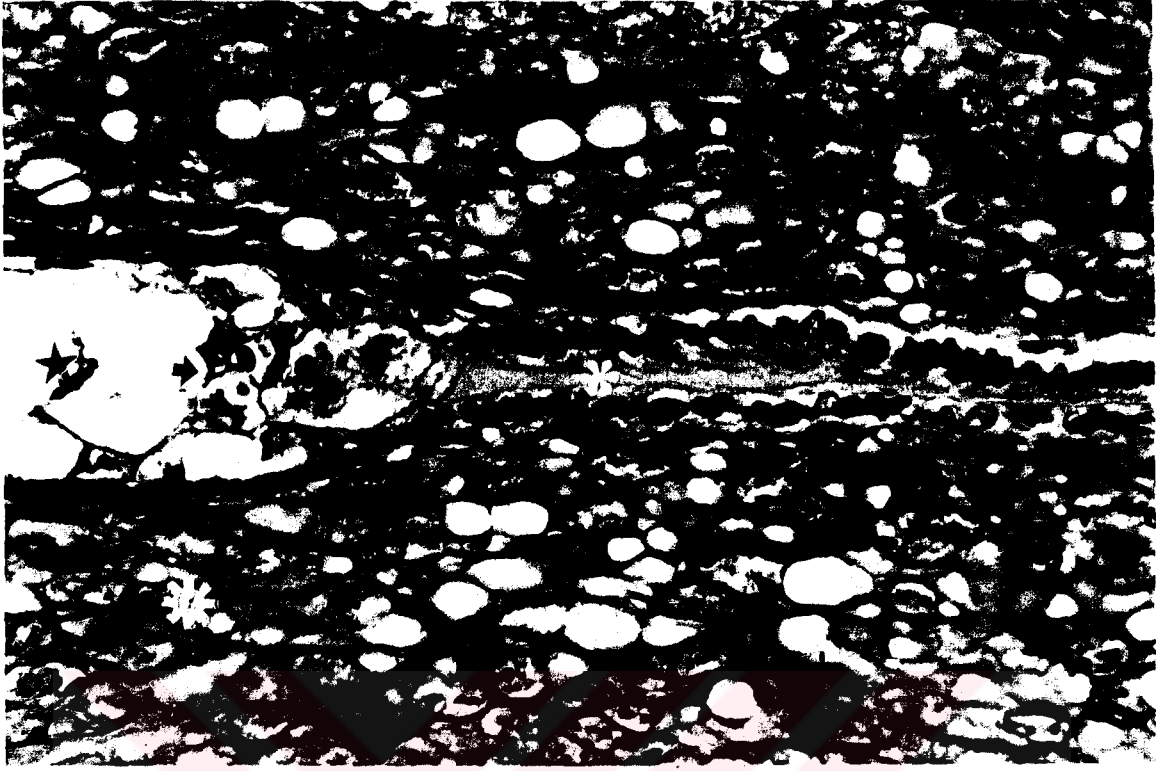


Resim 4.23: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Laminin boyanması. Trofoblast hücrelerinde (*) ve lümen epitelinde (*) kuvvetli boyanma, desidual hücrelerde (■) belığın bu boyanma gözlenmediği tespit edilmiştir. O.B.X 400.

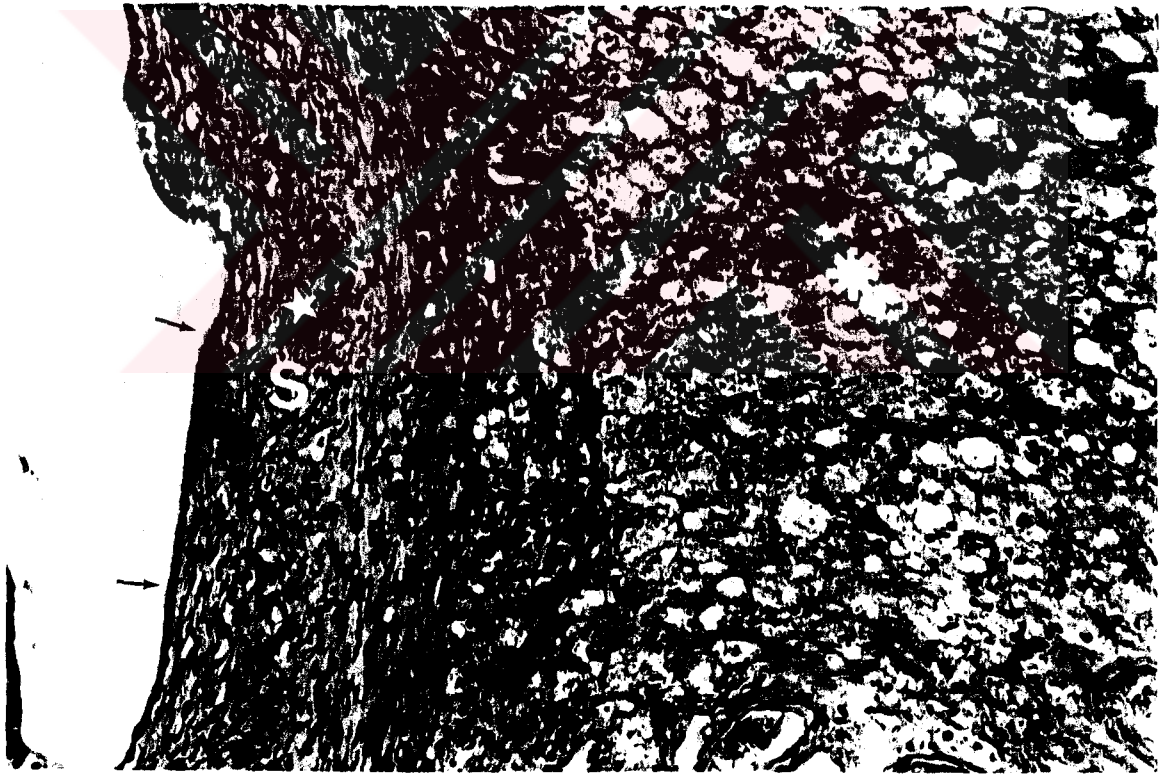


Resim 4.24: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Kollajen IV boyaması. Uterus lümen epitelinde (→) ve bazal membranda (★) zayıf, stromada (S) orta şiddetli boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.25: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümen epitelinde (→), stromada (S), GMG hücrelerinde (★) ve desidial hücrelerde (*) oldukça şiddetli Kollajen IV boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.



Resim 4.26: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterusaki Kollajen IV boyanması. Trofoblast hücrelerinde (*) ve lümen epitelinde (*) zayıf boyanma, embriyonun ektoplasental Lom kısmında (→) desidua hücrelerde (*) ve aralarındaki damar endotelilerinde orta şiddetli (→) boyanma olduğu tespit edilmiştir (O.B.X 400).

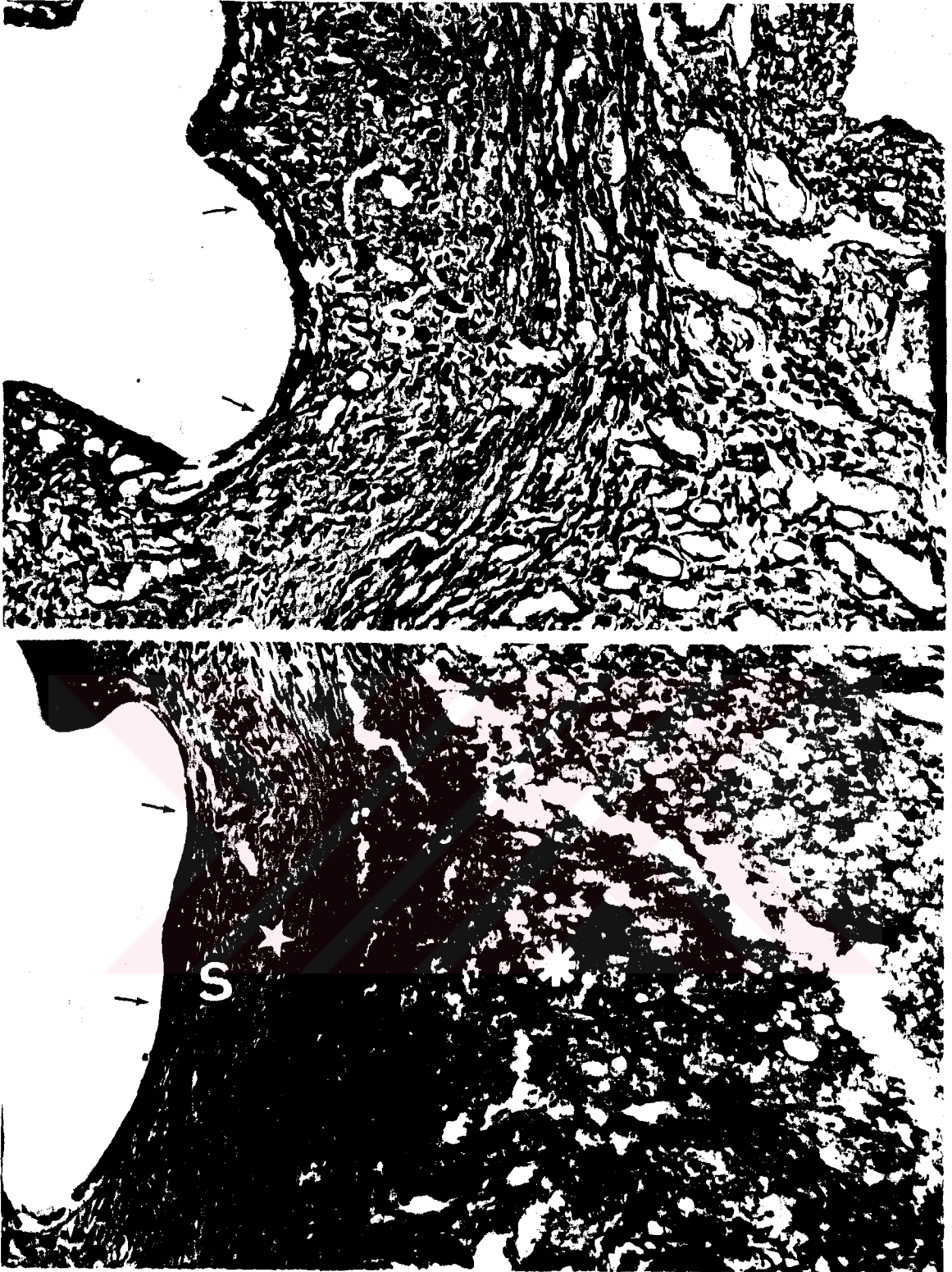


Resim 4.27: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda Fibronektin boyaması. Uterus lümen epitelinde (→) ve bazal membranda (◄) çok zayıf, stromada (S) orta şiddetli boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.28: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümeninde (→) zayıf, stromada (S), GMC hücrelerinde (★) ve desidual hücrelerde (*) kuvvetli Fibronektin boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.

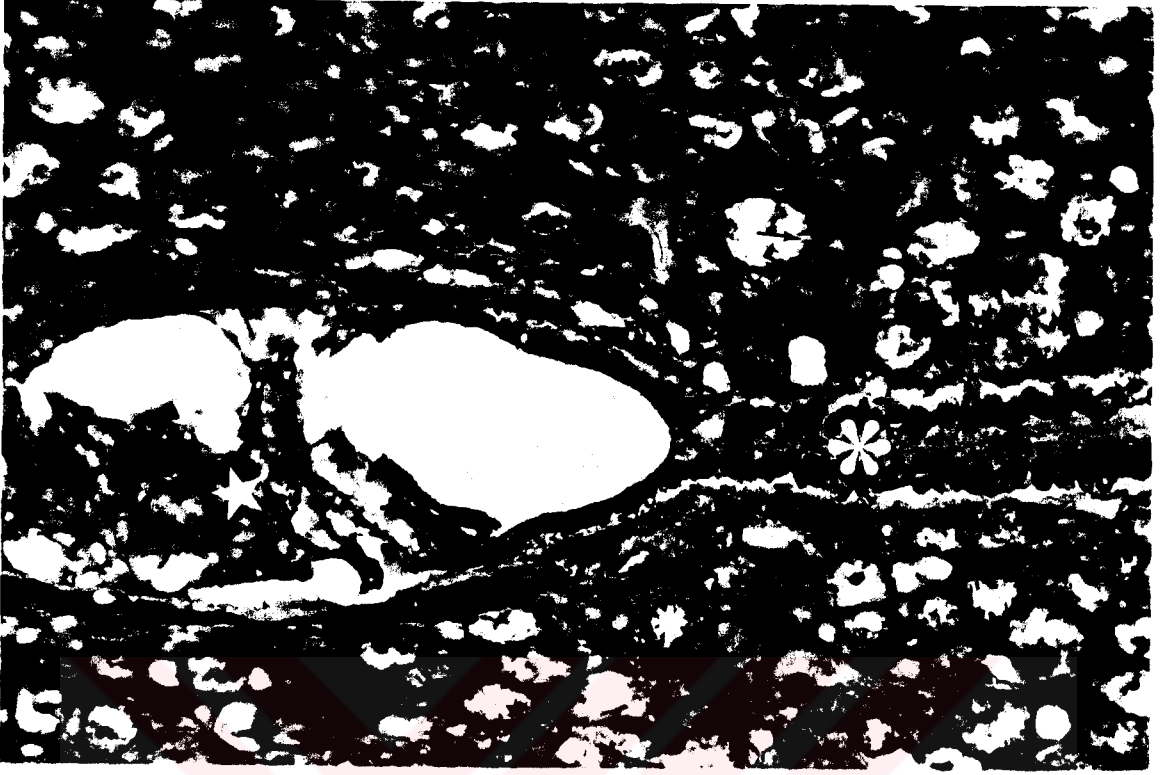


Resim 4.29: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki Fibronektin boyanması. Trofoblast hücrelerinde (★) ve lümen epitelinde (✱) ve desidual hücrelerde (+) oldukça zayıf boyanma ve aralarındaki damar endotellerinde (→) zayıf boyanma olduğu tespit edilmiştir. (O.B.X 400)

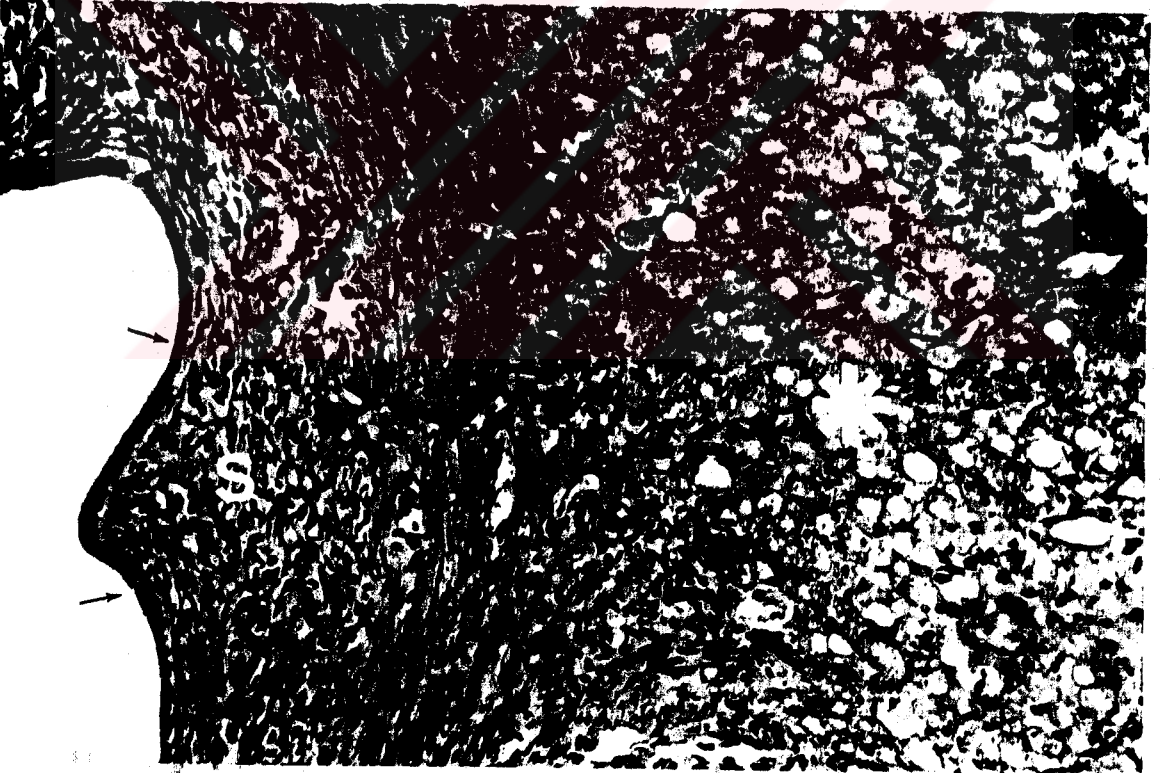


Resim 4.30: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda TGF- α boyaması. Uterus lümen epitelinde (→) kuvvetli, bazal membranda (★) ve stromada (S) zayıf boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.31: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümeninde (→) ve stromada (S) orta şiddetli, GMG hücrelerinde (★) ve desidua hücrelerde (*) şiddetli TGF- α boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.

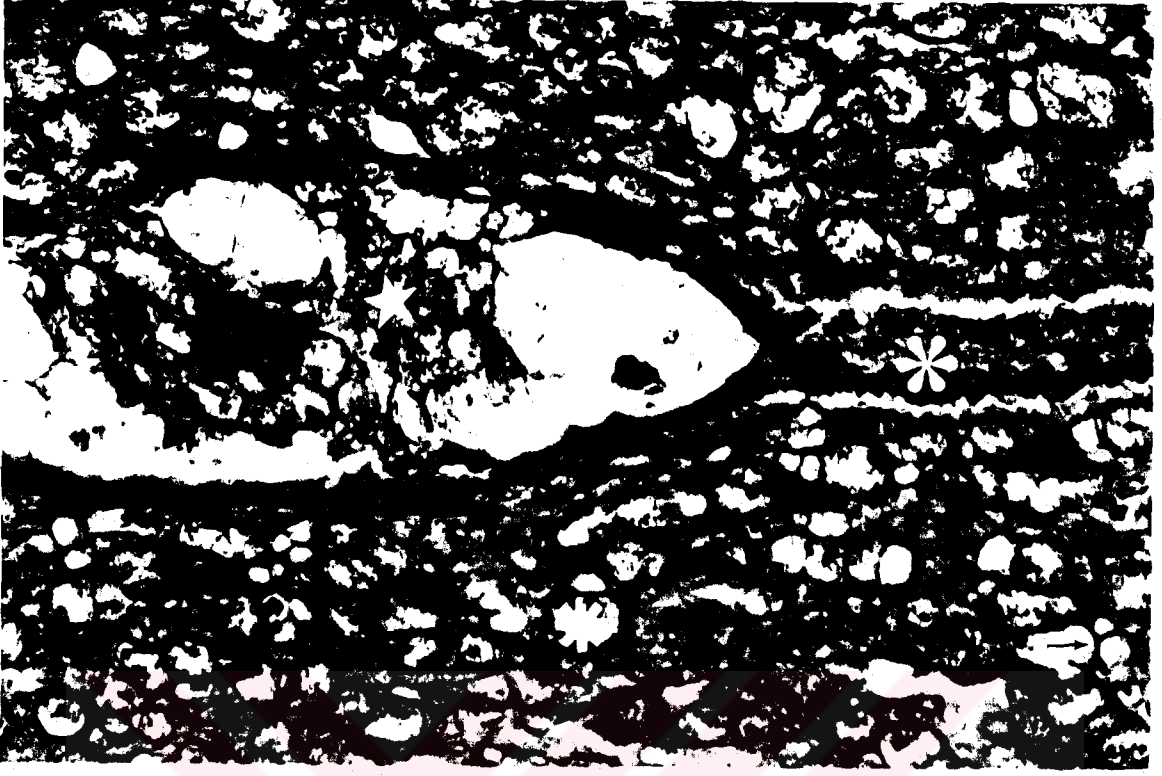


Resim 4.32: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki TGF- α boyanması. Trofoblast hücrelerinde (★) ve lümen epitelinde (✱) ve desidual hücrelerde (✱) ve aralarındaki damar endotelilerinde (→) oldukça şiddetli boyanma olduğu tespit edilmiştir. O.B,X 400



Resim 4.33: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda IL-1 β boyanması. Uterus lümen epitelinde (→) belirsiz, stromada (S) ise zayıf boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.34: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde stromada (S) zayıf, uterus lümen epitelinde (→), GMC hücrelerinde (★) ve desidual hücrelerde (*) orta şiddetli IL-1 β boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.



Resim 4.35: Deney Grubu; Gebeliğin 7. gününde uterustaki II.-I β boyanması. Trofoblast hücrelerinde (*) ve lümen epitelinde (*) ve desidual hücrelerde (*) ve aralarındaki damar endotellerinde (→) oldukça şiddetli boyanma olduğu tespit edilmiştir. O.B.X 400.



Resim 4.36: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda TNF- α boyanması. Uterus lümen epitelinde (→) belirsiz, stromada (S) ise zayıf boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.37: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde stromada (S) zayıf, uterus lümen epitelinde (→), GMC hücrelerinde (★) ve desidua hücrelerde (✱) orta şiddetli TNF- α boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.



Resim 4.38: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki TNF- α boyaması. Trofoblast hücrelerinde (★) ve lümen epitelinde (✱) şiddetli, desidua hücrelerinde (✱) ve aralarındaki damar endotelinde (→) orta şiddetli boyanma olduğu tespit edilmiştir. O.B.X 400.

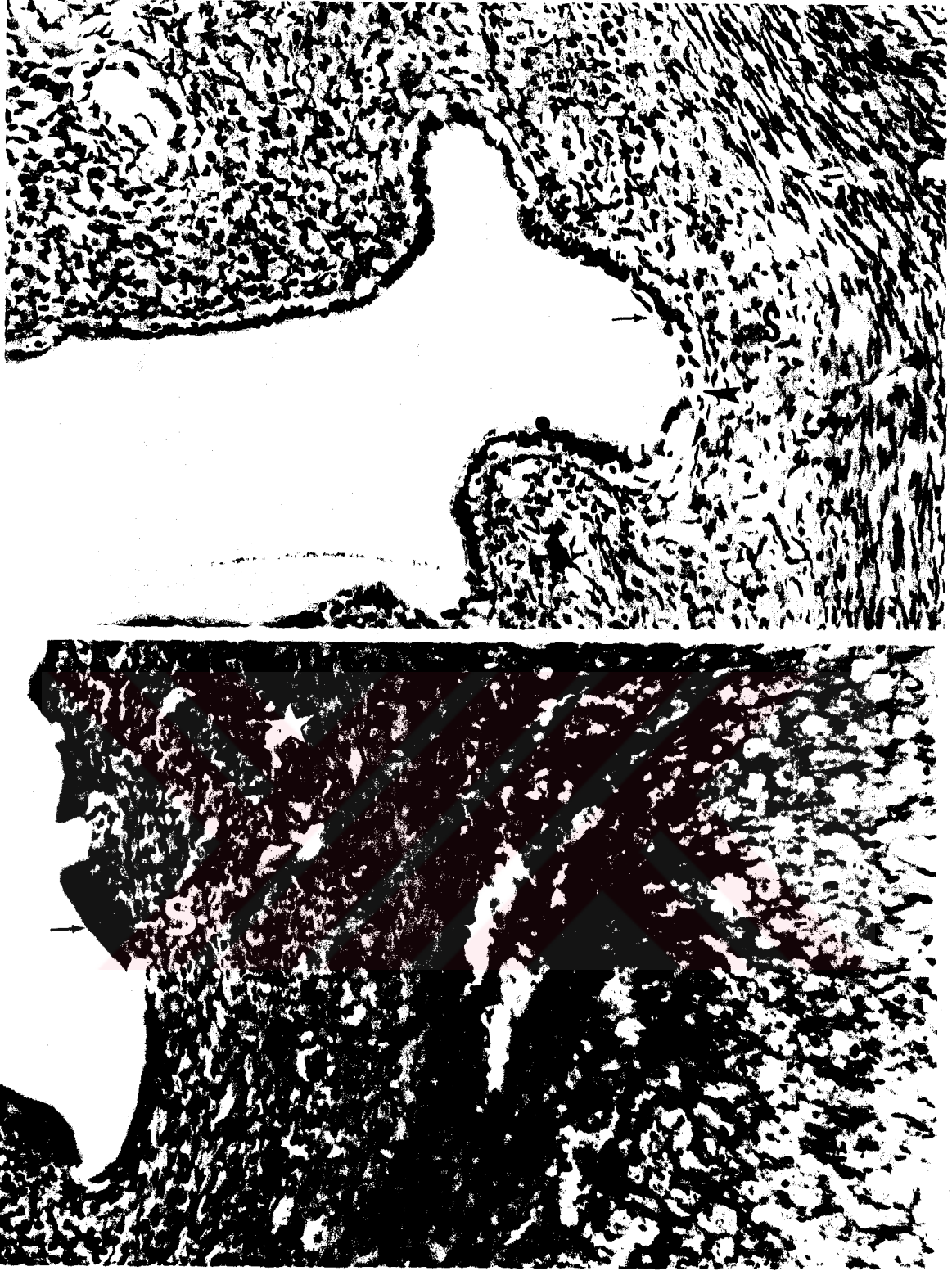


Resim 4.39: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda integrin $\beta 1$ boyaması. Uterus lümen epitelinde (→), bazal membranda (◄) ve stromada (S) çok zayıf bir boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.40: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümeninde (→) zayıf, stromada (S) orta şiddetli, GMG hücrelerinde (★) ve desidual hücrelerde (*) şiddetli integrin $\beta 1$ boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.

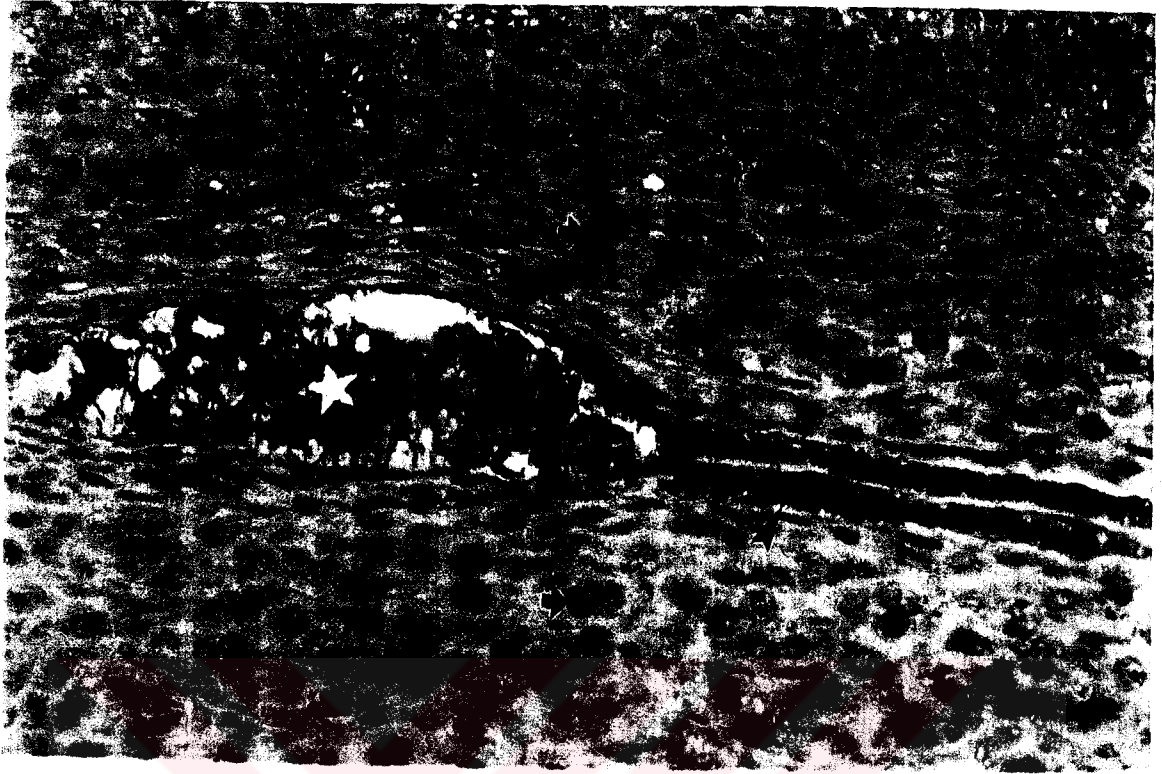


Resim 4.41: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterustaki integrin $\beta 1$ boyanması. Trofoblast hücrelerinde (*) ve lümen epitelinde (►) oldukça kuvvetli boyanma olduğu, desidual hücrelerde (➡) belirgin bir boyanma gözlenmezken, damarların endotelinde şiddetli (→) boyanma olduğu tespit edilmiştir. O.B.X 400.



Resim 4.42: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda integrin $\alpha 3$ boyanması. Uterus lümen epitelinde (→), bazal membranda (◄) ve stromada (S) çok zayıf bir boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.43: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümen epitelinde (→) zayıf, stromada (S) orta şiddetli, GMG hücrelerinde (★) ve desidual hücrelerde (*) şiddetli integrin $\alpha 3$ boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.

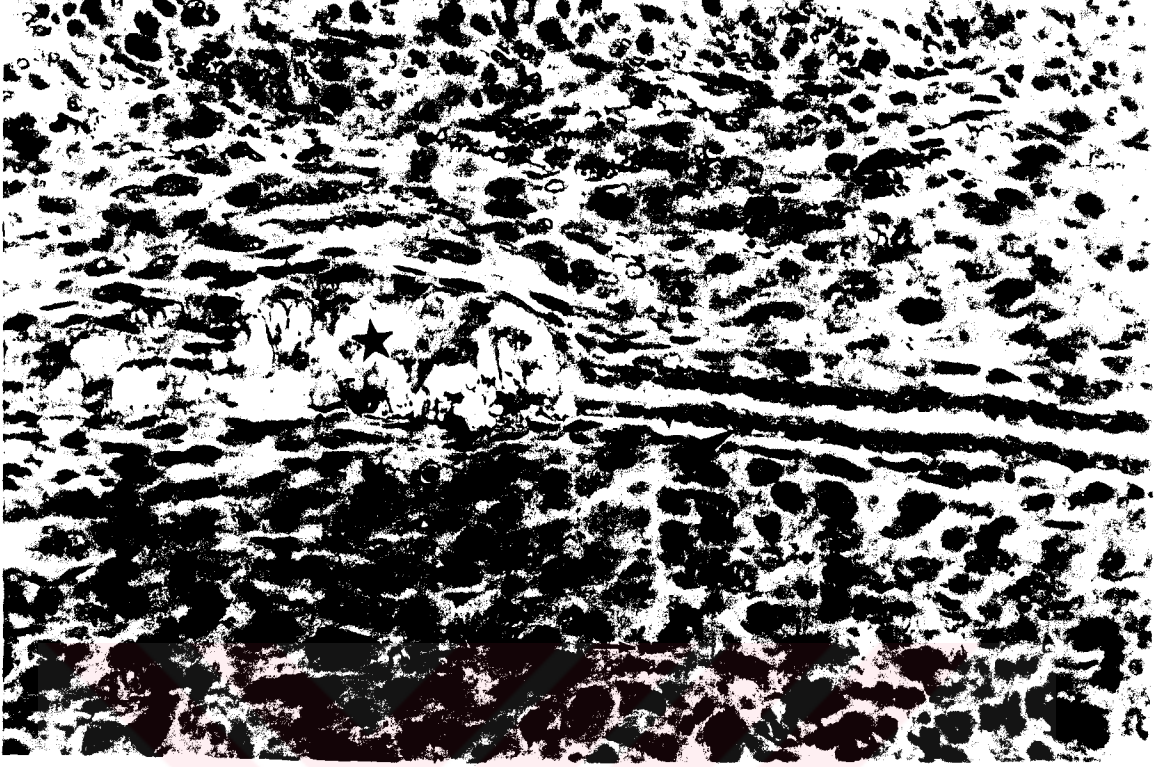


Resim 4.44: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterusdaki integrin αV boyanması. Trofoblast hücrelerinde (★) ve İlimen epitelinde (▶) oldukça kuvvetli boyanma olduğu; decidual hücrelerde (◆) belirgin bir boyanma gözlenmezken, damarların endotelilerinde şiddetli (◆) boyanma olduğu tespit edilmiştir. O.B.X 400.



Resim 4.45: Kontrol Grubu: Gebelik olmayan sıçan uterusunda integrin α v boyanması. Uterus lümen epitelinde ($\rightarrow$), bazal membranda ($\blacktriangleleft$) ve stromada (S) çok zayıf bir boyanma görülmektedir. O.B.X 200.

Resim 4.46: Deney Grubu: Gebeliğin 6. gününde uterus lümen epitelinde ($\rightarrow$) orta şiddetli, stromada (S), GMG hücrelerinde ($\star$) ve desidual hücrelerde ($\ast$) şiddetli integrin α v boyanması gözlenmektedir. O.B.X 200.



Resim 4.47: Deney Grubu: Gebeliğin 7. gününde uterusdaki integrin öz boyaması. Lümen epitelinde (►) kuvvetli boyanma olduğu, desidua hücrelerinde (✦) ve trofoblast hücrelerinde (★) belirgin bir boyanma gözlenmezken, embriyonun ektoplasental koni kısmında (✧) ve damacaların endotelinde (→) şiddetli boyanma olduğu tespit edilmiştir. O.B.X 400.