

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

**PROSTAGLANDİN E₁ (PGE₁) ANALOĞU
(MİSOPROSTOL) UYGULANAN GEBE SIÇAN
SERVİKSİNDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-3
(MMP-3) VE KOLLAJEN DAĞILIMI**

Fatma Nur ÇELİK

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2007

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

**PROSTAGLANDİN E₁ (PGE₁) ANALOĞU
(MİSOPROSTOL[®]) UYGULANAN GEBE SIÇAN
SERVİKSİNDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-3
(MMP-3) VE KOLLAJEN DAĞILIMI**

Fatma Nur ÇELİK

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Mevlüt ASAR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005.02.0122.004)

“ Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”

Antalya, 2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
15/06/2007

Tez Danışmanı:

Prof.Dr. Mevlüt ASAR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üyeler:

Prof.Dr. Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. İsmail Üstünel
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yrd.Doç.Dr. Mehmet ŞİMŞEK
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, enstitü yönetim kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve enstitü yönetim kurulununtarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Nurettin OĞUZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Servikal olgunlaşma doğum için hayati önem taşıyan bir süreçtir. Klinikte, servikal olgunlaşmayı tetiklemek için kullanılan ajanlardan en yaygını ise sentetik bir prostaglandin E1 analogu olan misoprostol'dür. Uterus serviksini bağ dokusu; kollajenler, elastin, proteoglikanlar ve hyaluronik asitten ibaret tipik bir bağ dokusudur. Ekstraselüler matriks (ESM)'in yıkılması, termde servikal olgunlaşmada ve dilatasyonda çok önemlidir. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler)'in bu olaylarda önemli rol oynadığı düşünülür. Endopeptidazlar olan MMP'ler belirli ESM proteinlerini enzimatik yoldan sindirebilme yeteneğindedir. Günümüzde 28 tip MMP tanımlanmıştır. MMP-3'ün de dahil olduğu alt grup olan stromelizinler, kollajeni yıkıma götürebilir. MMP-3, çok sayıda ESM komponenti üzerindeki etkisinden dolayı servikste anahtar regülatör enzim olmaya güçlü bir aday olarak görülmektedir.

Araştırmada, *Rattus norvegicus* türü dişi ve erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bir gece dişi/erkek oranı 2/1 olan kafeslerde bekletilen hayvanlara ertesi gün vajinal simir uygulanmıştır. Simiri sperm pozitif olan sıçanlar gebeliğinin 0. gününde kabul edilmiştir. Çalışmalar için östrusta, gebeliğin 12,16, 20 ve doğum sonrası 0. günlerinde 5 kontrol; 12,16,20 ve doğum sonrası 0. günlere ait ve 1,5 ve 3,0 µg misoprostol uygulanma dozuna bağlı olarak da 2 farklı kategoride olmak üzere 8 deney grubu oluşturulmuştur.

Çalışmamızda, gebelik süresinde ve termde sıçan serviksini yeniden yapılanmasında prostaglandinlerin MMP'ler üzerinden ESM yapısını etkileyip etkilemedikleri araştırılmıştır. Bunun için oral olarak farklı dozlarda misoprostol uygulanan gebe sıçan serviksinde MMP-3'ün ve matrikste yaygın bulunan kollajen I ve IV'ün immunohistokimyasal olarak dağılımlarına keza transmisyon elektron mikroskobu (TEM) düzeyinde ultrastrüktürel yapıdaki değişikliklere bakılmıştır.

Sonuç olarak, immunohistokimyasal bulgulardan çalışma gruplarında kollajen I proteininin lamina propriyada kuvvetli, kas çevresinde zayıf reaksiyon verdiğini gözledik. Aksine MMP-3 antikoru reaksiyonu lamina propriyada zayıf, kas çevresinde orta ve kuvvetli reaksiyon gösterdi. TEM'de düşük doz misoprostolün yüksek doza göre fibril çapı, merkez ve perifer fibriller arası aralık değerlerini önemlilik düzeyinde daha fazla etkilediğini gördük.

Anahtar kelimeler; Sıçan, Servikal olgunlaşma, MMP-3, Kollajen I, Kollajen IV, Misoprostol,

ABSTRACT

Cervical ripening is a crucial process leading to delivery. In clinic the most common agent to trigger the cervical ripening is misoprostol which is a synthetic prostaglandin E1 analog. The connective tissue of the cervix uteri is a typical connective tissue consisting of collagen, elastin, proteoglycans and hyaluronic acid. The degradation of extracellular matrix (ECM) is very important in term, cervical ripening and dilatation. Matrix Metalloproteinases (MMPs) are thought to play a critical role in these events. MMPs which are members of endopeptidases have the capability to digest ECM proteins through enzymatic activity. 28 types of MMPs are defined at the present time. The sub group of stromelysins, which include MMP-3 are capable of degrading collagens. MMP-3 is considered to be a strong candidate as a key regulator enzyme in cervix uteri due to its effect on many ECM components.

In our study, female and male *Rattus norvegicus* rats were used. Rats were kept in cages where female/male proportion was 2/1 for one night and next day vaginal smear was performed. Female rats with sperm positive smears were accepted to be on day 0 of pregnancy. For our study, 5 control groups were generated, in estrus cycle, 12th, 16th, 20th days of pregnancy and post partum 0 day; and 8 experimental groups were generated on the 12th, 16th, 20th days of pregnancy and post partum 0 day using 1,5 and 3,0 µg misoprostol treatment.

In our study, whether prostaglandins affect the ECM structure via MMPs during pregnancy and remodelling at the rat cervix in term was studied. In order to perform this, the distributions of collagen type I and IV, which are extensively present in ECM, and MMP-3 were studied by means of immunohistochemistry in pregnant rat cervix which was exposed to misoprostol at various dosages. Moreover, ultrastructural changes were investigated by transmission electron microscopy (TEM).

In conclusion, in our immunohistochemical results we observed that collagen I protein were expressed densely in lamina propria while it was weak around the surroundly muscle. In contrast, the expression of MMP-3 antibody were weak in lamina propria where it was intermediate and dense around the surrounding the muscle. Our TEM results revealed that the effect of low dosage misoprostol were more effective on fibril diameter, and on the distance between central and peripheral fibrils when compared to high dosage misoprostol.

Key Words; Rat, Cervical ripening, MMP-3, collagen I, collagen IV, Misoprostol

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Mevlüt ASAR' a,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkan ve desteği sağlayan hocam sayın Prof. Dr. Ramazan DEMİR'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her aşamada bana destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve çalışanlarına,

TEMGA Ünitesi bünyesinde yapılan çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen TEMGA Ünitesi Başkanı Doç.Dr. Necdet DEMİR'e ve çalışanları; Arife DEMİRTOP ve Hakan ER'e

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

Son olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesi esnasında her zaman yanımda olan çok değerli aileme ve dostlarıma, en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	Sayfa
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi-ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi-xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ	
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1-3
TEMEL BİLGİLER ve KAYNAK	
2.1. Dişi Üreme Sistemi	4
2.1.1. Serviks	4-5
2.2. Ekstraselüler Matriks	6
2.2.1. Esas Madde	6
2.2.2. Glikoz Amino Glikanlar	7-8
2.2.3. Proteoglikanlar	8
2.2.3.1. Proteoglikanların Fonksiyonu	9-10
2.2.4. Tutunucu Glikoproteinler	10-11
2.2.5. Lifler	11
2.2.5.1. Kollajen Lifler: Yapı ve Fonksiyon	11-14
2.2.5.2. Kollajen Sentezi	14-16
2.2.5.3. Elastik Lifler	16
2.2.6. Bazal Membran	16
2.2.7. Bazal Lamina	16-18
2.2.8. Lamina Retikularis	18
2.2.9. İntegrinler	18-19
2.3. Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)	19
2.3.1. Metalloproteinazların Genel Yapısı	19-21
2.3.2. MMP'lerin İşlevleri	23
2.3.3. Dinlenim Durumundaki Metalloproteinazların Aktivasyonu	25-26
2.3.4. Post-Transkripsiyonel MMP Düzenlenmesi	26
2.3.5. MMP Sekresyonunun Düzenlenmesi	26
2.4. Prostaglandinler (PG'ler)	26-27
2.4.1. Prostaglandinlerin Biyokimyası	27
2.5.1.1. Prostaglandin Biyosentezi	27
2.4.1.2. Diğer Terminal Prostaglandin Sentazlar	28
2.4.2. Prostaglandinlerin Yapısı	28
2.4.3. Prostaglandinlerin İşlevleri	28-29

2.4.4.	Prostaglandinlere Aspirin ve Diğer Analjezik Antienflamtuvar Ajanların Etkileri	29
2.4.5.	Sentetik Prostaglandinler ve Klinikte Kullanım Alanları	29
2.4.5.1.	PGE ₁ Analöü : Misoprostol	29-30
2.5.	Servikal Olgunlaşma	31-33
2.5.1.	Servikal Olgunlaşma ve Steroid Hormonlar	33-34

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.	Servikal Olgunlaşma Modelinin Oluşturulması	35
3.2.	Doku Temini ve Hazırlanması	36
3.3.	Işık Mikroskopu Çalışması	36
3.4.	İmmünohistokimyasal Protokol	37
3.5.	TEM Protokolü	37-38
3.6.	İstatistiksel Analiz	38
3.6.1.	Semikantitatif Değerlendirme	38

BULGULAR

4.1.	Işık Mikroskopik Bulgular	39-40
4.2.	Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal Bulgular	41
4.2.1.	Östrus	41
4.2.1.1.	Kollajen I	41
4.2.1.2.	Kollajen IV	41
4.2.1.3.	MMP-3	41
4.2.2.	12 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	42
4.2.2.1.	Kollajen I	42
4.2.2.2.	Kollajen IV	42
4.2.2.3.	MMP-3	42-43
4.2.3.	16 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	43
4.2.3.1.	Kollajen I	43
4.2.3.2.	Kollajen IV	43
4.2.3.3.	MMP-3	44
4.2.4.	20 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	44
4.2.4.1.	Kollajen I	44
4.2.4.2.	Kollajen IV	44
4.2.4.3.	MMP-3	45
4.2.5.	Doğum Sonrası O. Günde Sıçan Serviksi	45
4.2.5.1.	Kollajen I	45
4.2.5.2.	Kollajen IV	45
4.2.5.3.	MMP-3	46
4.3.	Deney I Grubu İmmünohistokimyasal Bulgular	49

4.3.1.	12 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	49
4.3.1.1.	Kollajen I	49
4.3.1.2.	Kollajen IV	49
4.3.1.3.	MMP-3	49
4.3.2.	16 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	50
4.3.2.1.	Kollajen I	50
4.3.2.2.	Kollajen IV	50-51
4.3.2.3.	MMP-3	51
4.3.3.	20 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	51
4.3.3.1.	Kollajen I	51-52
4.3.3.2.	Kollajen IV	52
4.3.3.3.	MMP-3	52
4.3.4.	Doğum Sonrası O. Günde Sıçan Serviksi	53
4.3.4.1.	Kollajen I	53
4.3.4.2.	Kollajen IV	53
4.3.4.3.	MMP-3	53
4.4.	Deney I Grubu İmmünohistokimyasal Bulgular	57
4.4.1.	12 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	57
4.4.1.1.	Kollajen I	57
4.4.1.2.	Kollajen IV	57
4.4.1.3.	MMP-3	57
4.4.2.	16 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	58
4.4.2.1.	Kollajen I	58
4.4.2.2.	Kollajen IV	58
4.4.2.3.	MMP-3	59
4.4.3.	20 Günlük Gebe Sıçan Serviksi	59
4.4.3.1.	Kollajen I	59
4.4.3.2.	Kollajen IV	60
4.4.3.3.	MMP-3	60
4.4.4.	Doğum Sonrası O. Günde Sıçan Serviksi	61
4.4.4.1.	Kollajen I	61-62
4.4.4.2.	Kollajen IV	62
4.4.4.3.	MMP-3	62
4.5.	TEM Bulguları	67
4.5.1.	Morfolojik Bulgular	67-69
4.5.2.	Kantitatif Bulgular	69-71
TARTIŞMA		78-79
SONUÇLAR		80
KAYNAKLAR		81-86
ÖZGEÇMİŞ		87

SIMGE ve KISALTMALAR DIZINI

µg	: Mikro gram
µm	: Mikro metre
BDMA	: Benzil Dimetil Amin
C	: Karbon
COX	: Siklooksijenaz
DAB	: 3' Diamino Benzidin
DDSA	: Dodesinil Süksinik Anhidrat
EFA	: Essential Fatty Acids
EGF	: Epidermal Growth Factor
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
FDA	: Food and Drug Administration
FGF	: Fibroblast Growth Factor
g	: gram
GAG	: Glikozaminoglikan
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HSV	: Herpes Simpleks Virus
IGF-I	: Insulin Like Growth Factor-I
IHK	: İmmünohistokimya
kg	: kilo gram
M	: Molarite
MBP	: Major Membran Protein
ml	: mililitre
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
NAPDH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PAS	: Periodic Acid Schiff
PBS	: Fosfat Borat Tamponu
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PG	: Prostaglandin
PGH	: Prostaglandin H Sentaz
Pro-MMP	: Matriks Metalloproteinazların inaktif formu
RGD	: Arjinin- Glisin- Aspartik Asit
SC	: Santa Cruz
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskopu
TGF- β	: Tranforma Growth Factor beta
TIMP	: Tissue Inhibitor Metalloproteinase
TNF- α	: Tumour Nekrosis Factor-alfa
TXAS	: Tromboksan A sentaz
UV	: Ultra V

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.1.1.	Sıçan Uterus ve serviksi	4
2.2.1.1.	Bağ doku	6
2.2.2.1.	GAG molekülü	7
2.2.3.1.	Fetal sığır kıkırdağında agrekan proteini	9
2.2.5.1.1.	Kollajen fibriller	12
2.2.5.2.1.	Kollajen sentezinin hücre içi ve hücre dışı basamakları	15
2.2.7.1.	Deride bazal lamina	17
2.2.9.1.	Tipik bir integrin molekülünün yapısı	19
2.3.1.1.	MMP'lerin bileşen yapılarına göre sınıflandırılması	22
2.4.1.1.1.	Prostaglandin sentez basamakları	28
2.4.5.1.1.	Misoprostolün yapısı	31
3.2.1.	Dişi sıçanın abdominal diseksiyonu	37
4.1.1.	Sıçan serviksini hematoksilen eozin boyanmaları	41
4.2.1.	İmmünohistokimya Boyanmalarının Negatif Kontrolleri	42
4.2.1.1.	Östrus evresindeki sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	43
4.2.2.1.	12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	44
4.2.3.1.	16 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	45
4.2.4.1.	20 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	46
4.2.5.1.	PP 0. günde sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	47
4.2.2.	Kontrol grubunda kollajen-I, -IV ve MMP-3 antikollarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri histogramı	49
4.3.1.1.	1,5 µg misoprostol uygulanan 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	51
4.3.2.1.	1,5 µg misoprostol uygulanan 16 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	52
4.3.3.1.	1,5 µg misoprostol uygulanan 20 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	53

4.3.4.1.	1,5 µg misoprostol uygulanan PP 0. günde sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	55
4.3.1.	1,5 µg misoprostol uygulanan deney grubunda kollajen-I, -IV ve MMP-3 antikollarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri histogramı	57
4.4.1.1.	3,0 µg misoprostol uygulanan 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	59
4.4.2.1.	3,0 µg misoprostol uygulanan 16 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	60
4.4.3.1.	3,0 µg misoprostol uygulanan 20 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	61
4.4.4.1.	3,0 µg misoprostol uygulanan PP 0. günde sıçan serviksinde kollajen I, kollajen IV ve MMP-3 boyanmaları	62
4.4.1.	3,0 µg misoprostol uygulanan deney grubunda kollajen-I, -IV ve MMP-3 antikollarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri histogramı	65
4.2.2.	Tüm çalışma gruplarının kollajen I antikoru HSCORE değerleri histogramı	66
4.2.3.	Tüm çalışma gruplarının kollajen IV antikoru HSCORE değerleri histogramı	67
4.2.4.	Tüm çalışma gruplarının MMP-3 antikoru HSCORE değerleri histogramı	68
4.5.1.1.	Kontrol Grubu Östrus ve Gebeliğin 12. Gününde TEM Mikrografları	69
4.5.1.2.	Kontrol Grubu Gebeliğin 20. ve PP 0. Gününde TEM Mikrografları	70
4.5.1.3.	Düşük ve Yüksek Doz Misoprostol Verilen Deney Gruplarına Ait TEM Mikrografları	71
4.5.2.1.	Enine Kesitte Sıçan Serviksine Ait Kollajen Lif TEM Mikrografi	72
4.5.2.2.	Kontrol Grubu TEM Ölçümlerinin Ortalama Değerleri Histogramı	73
4.5.2.3.	Düşük Doz Misoprostol Verilen Deney Grubunun TEM Ölçümlerinin Ortalama Değerleri Histogramı	74
4.5.2.4.	Yüksek Doz Misoprostol Verilen Deney Grubunun TEM Ölçümlerinin Ortalama Değerleri Histogramı	75
4.5.2.5.	Tüm Gruplarda Ortalama Kollajen Lif Çapı Değerleri Histogramı	76

4.5.2.6.	Tüm Gruplarda Ortalama Kollajen Lif Merkezi Fibriller Arası Aralık Değerleri Histogramı	77
4.5.2.7.	Tüm Gruplarda Ortalama Kollajen Lif Perifer Fibriller Arası Aralık Değerleri Histogramı	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.2.2.1.	Glikozaminoglikan Tipleri	8
2.3.2.1.	MMP'ler, Substratları ve Ekspresyon Profilleri	24
4.2.1.1.	Kontrol grubunun immün boyanma yoğunlukları	48
4.2.1.2.	Kontrol grubunda HSCORE değerleri	49
4.3.1.1.	1,5 µg misoprostol uygulanan deney grubunun immün boyanma yoğunlukları	56
4.3.1.2.	1,5 µg misoprostol uygulanan deney grubunda HSCORE değerleri	57
4.4.1.1.	3,0 µg misoprostol uygulanan deney grubunun immün boyanma yoğunlukları	64
4.4.1.2.	3,0 µg misoprostol uygulanan deney grubunda HSCORE değerleri	65
4.2.1.	Tüm çalışma gruplarında Kollajen I HSCORE değerleri	66
4.2.2.	Tüm çalışma gruplarında Kollajen IV HSCORE değerleri	67
4.2.3.	Tüm çalışma gruplarında MMP-3 HSCORE değerleri	68
4.5.2.1.	Kontrol grubunda kollajen fibril ölçüm değerleri	73
4.5.2.2.	1,5 µg misoprostol uygulanan deney grubunda kollajen fibril ölçüm değerleri	74
4.5.2.3.	3,0 µg misoprostol uygulanan deney grubunda kollajen fibril ölçüm değerleri	75
4.5.2.4.	Tüm çalışma gruplarında kollajen fibril çapları ölçüm değerleri	76
4.5.2.5.	Tüm çalışma gruplarında merkezi kollajen fibrilleri arası ölçüm değerleri	77
4.5.2.6.	Tüm çalışma gruplarında periferik kollajen fibrilleri ölçüm değerleri	78

GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Serviks uterus korpusundan morfolojik ve fonksiyonel olarak homojen olmayışıyla ayrılan kompleks bir organdır [1, 2]. Proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan yapılmış stromasında hakim lif tipi kollajendir. Stromasının diğer elemanlarını bağ dokusu, kas lifleri (%10-15) ve elastik lifler oluşturur. Ekstrasellüler stromada her yönde uzanan kollajen, serviksin gerilme direncinden, elastin, elastisitesinden sorumludur. Bağ dokusunun amorf matriksi dokuda bütünlüğü sağlar. Düz kas bütün servikte düzensiz bir dağılım gösterir. Kollajen servikal dokunun yaklaşık %70'idir. Bunun hemen hemen %62-80'i tip I kollajen, kalanı da tip III kollajendir. Kollajen tip IV daha azdır, bazal laminada ve damar duvarında bulunur [1-5].

Servikte gebelik boyunca birbirini takip eden iki zıt fonksiyon gerçekleşir. Terme kadar olan dönemde serviks konseptin uterusu tutunabilmesi için gerilmelere karşı dirençli olmak, kapalı ve rijid kalmak zorundadır. Termde de bunun aksine, esneklik kazanıp doğuma uyum sağlayabilmek için hızla fonksiyon ve yapı değişikliğine gider. Kısacası, gebelik serviksi yumuşayıp esnekleşerek genişler ve termde servikal olgunlaşma olarak bilinen bir bozulmaya gider. Kollajenin degradasyonu ve yeniden düzenlenmesi gebelik esnasında ve doğumda uterus serviksinin yumuşamasında ve yeniden yapılanmasında çok önemlidir [6, 7].

ESM'nin yıkılması termde servikal olgunlaşmada ve dilatasyonda çok önemlidir. Servikal olgunlaşma esnasında ESM'nin yeniden düzenlenmesinden sorumlu biyokimyasal mekanizmalar hala günümüzde tam olarak anlaşılmış değildir. Yine de enzimatik degradasyonla ve/veya proteoglikan konsantrasyonunun artmasıyla yani "dilüsyonla" kollajen liflerin çözülmesi olayı servikal direncin azalmasıyla sonuçlandığı için servikal olgunlaşmanın özünü teşkil eder [1, 2, 6, 8, 9].

MMP'ler serviksin yeniden yapılanmasında rol alan bir grup proteazdır ve aktivitesi MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından düzenlenir. MMP'ler belli ESM proteinlerini enzimatik yoldan sindirebilme yeteneğindeki çinko bağımlı endopeptidazlardır. Substratları kollajenlerden proteoglikanlara ve bir çok glikoproteine kadar değişir. Bugüne kadar bu ailenin 28 üyesi tanımlanmıştır [10, 11].

MMP'ler ya salgılanır ya da hücre membranına bağlı olarak bulunurlar. MMP'ler salgılanma yolunda ve hücre dışında görev yapar. Latent proenzim

olarak sentezlenir ve aktif olabilmek için proteazlara, denatürantlara ya da ısıya gereksinim duyarlar. Hemen hemen tüm MMP'ler ESM'nin bazı proteinlerini sindirebilme yeteneğindedir [12].

MMP-3, MMP-10 ve MMP-11 in dahil olduğu stromelizinler, kollajeni ve proteoglikanları yıkıma götürebilir. MMP-3'ün fibronektin, elastin, laminin ve jelatin üzerinde de aktif rolü vardır. MMP-3'ün bir başka önemli özelliği pro MMP'leri aktif enzimlere (örneğin MMP-1, -3, -7, -8, -9 ve -13) değiştirebilme yeteneğinde olmasıdır. MMP-3 çok sayıda ESM komponenti üzerindeki etkisinden ve olayların başlatılmasındaki rolünden dolayı servikste anahtar regülatör enzim olmaya güçlü bir aday olarak görülmektedir [6, 11, 13].

Prostaglandin(PG)'lerin servikal olgunlaşmaya katıldıklarına ve bir çok yoldan ESM komponentlerini düzenlediklerine dair bulgular vardır. Prostaglandinlerin sitokin sentezini tetiklediği ve proteaz aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir. Örneğin, PGE₂'nin glikozaminoglikan (GAG)'ları ve kollajenaz aktivitesini stimüle ettiği, keza hyaluronik sentaz aktivitesini arttırdığı ifade edilmiştir. Aksine, prostaglandinler bazı araştırmacıların bildirdiği gibi gerçek anlamda kollajenaz aktivitesini stimüle etmeyebilirler. Servikal olgunlaşma esnasında PGE₂ servikste bir kemotaktik etki kombinasyonunda görev alabilir; buna bağlı olarak küçük damar duvarları genişleyebilir ve serviksin lenfosit infiltrasyonunda bir artış olabilir. PGE₂ indükeli servikal olgunlaşma çalışmalarında enzimatik kollajen yıkımında, kollajen olmayan protein sentezinde ve hyaluronik asit konsantrasyonunda artışlar olduğu bildirilmiştir [14, 15].

Servikal olgunlaşmayı düzenleyen mekanizmalar hakkında çok az bilgi vardır. Çalışmaların bulguları olgunlaşmanın serviksin kollajen ve proteoglikan kompozisyonu değişiklikleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Kısacası, doğuma yakın servikal gerilme gücündeki azalma kollajen fragmentasyonu artışına ve proteoglikan kompozisyonu değişikliklerine bağlanmaktadır [6].

Servikal olgunlaşma eksikliği doğumun indüklenmesini ve hızını olumsuz yönde etkileyen önemli engellerden biridir [6]. Kadın Doğum uzmanları günümüzde doğumun en kısa zamanda indüklenmesi ve sezeryan doğum oranının en aza indirgenmesi için uterus serviksini olgunlaştıracak çeşitli ajanlar ve metotlar kullanırlar. Servikal olgunlaşma için günümüzde kabul edilebilen metotlar sentetik prostaglandin E₁ (PGE₁) ve prostaglandin E₂ (PGE₂) analogları, oksitosin infüzyonu ve mekanik servikal dilatörlerdir. Prostaglandin E₁ analogu olan misoprostol bugün servikal olgunlaşmada çok yaygın olarak kullanılan ajanlardan biridir [9, 16].

Literatürden anlaşıldığına göre PG'ler gebelik süresinde ve termde serviksin yeniden yapılanmasında kollajen sentezinin azalmasına ve kollajen

fragmantasyonu artışına neden olmaktadır [17]. MMP'lerin ise bu olaylara ESM düzeyinde katıldıkları bildirilmiştir. Nitekim MMP'lerin kollajenler, fibronektin ve elastinler üzerinde aktif etkilerinin olduğu ifade edilmiştir. Ancak prostaglandinlerin ESM üzerindeki etkilerini MMP'ler üzerinden yapıp yapmadıkları açık olarak bilinmemektedir. Bu konuda çok az sayıda olan çalışmalar da oldukça tartışmalıdır. Bu nedenle termde servikal olgunlaşmayla ilgili PG'lerin katıldığı bu olaylar zincirinin sırası ile mekanizmalarının açıklanmasına şiddetle ihtiyaç vardır [18, 19]. Çünkü, bu tür çalışmalara odaklanan araştırma sonuçlarının yukarıda belirtilen klinik uygulamalara da katkılarının olacağı açıktır.

Bu çalışmada, gebelik süresinde ve termde sıçan serviksini yeniden yapılanmasında prostaglandinlerin MMP'ler üzerinden ESM yapısını etkileyip etkilemedikleri araştırıldı. Bunun için oral olarak farklı zamanlarda ve farklı dozlarda misoprostol uygulanan sıçanların serviksinde MMP-3 ün ve matrikste yaygın olarak bulunan kollajen tip I ve IV'ün ışık mikroskobu düzeyinde immünohistokimyasal olarak dağılımlarına, TEM düzeyinde genelde kollajen yapısındaki ultrastrüktürel değişikliklere bakıldı. Kontrollerle kıyaslı olarak elde edilen sonuçlardan misoprostol, MMP-3 ve kollajenler arasındaki ilişkiler belirlenmeye çalışıldı.

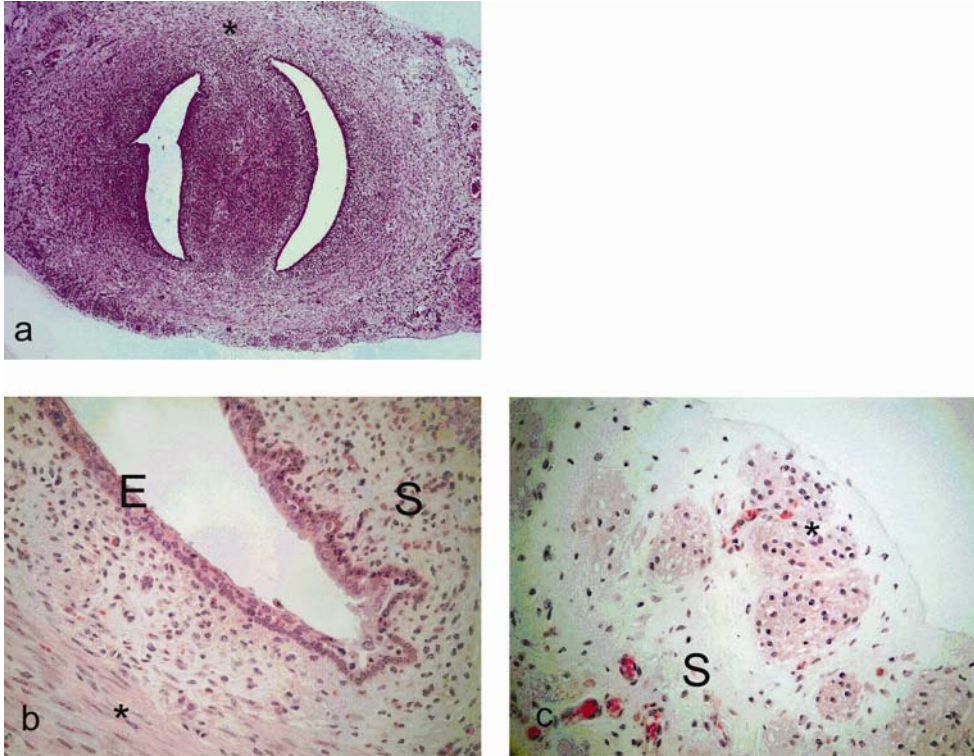
TEMEL BİLGİLER VE KAYNAK

2.1 Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi internal üreme organları ile dış genital yapılardan oluşur. İnternal üreme organları ergin insanda çift olan ovaryum ve ovidukt ile uterus ve vajinadan ibarettir. Bu organlar sıçanda da benzer histolojik yapılardan oluşur.

2.1.1 Serviks

Dişi Üreme organlarından serviks, uterusun vajinaya uzanan son kısmıdır. Uzunluğu insanlarda yaklaşık 3 cm'dir. Üst kısmında internal os denilen bir açıklıkla uterus boşluğuyla, alt kısmında eksternal os denilen bir açıklıkla vajinayla bağlantılıdır. Kanal yüzeyinden lümene plika palmaata denilen oldukça düzensiz yüzeyli mukoza katlantıları uzanır. Mukoza 2-3 mm kalınlığındadır ve korpus mukozasından farklıdır. Mukoza yüzeyi mukus salgılayan basit prizmatik epitelle döşelidir [20].



Şekil 2.1.1.1 Sıçan uterus serviksi . a: genel görünüm , b: epitel, stroma (S) ve enine kas tabakası (*), c: Uzunlamasına kas tabakası (*) ve kas tabakaları arasında yer alan stroma (S) objektif büyütmesi aX5 b,cX20.Hematoksilen-eozin

Serviksin dış yüzeyi yani vajinaya uzanan kısmında ise epitel çok katlı yassı ve non keratinizedir. Vajinaninkine benzer. Serviks duvarı çoğunlukla

sıkı bağ dokusundan yapılmıştır. Bu doku içinde elastik lifler ve birkaç düz kas lifi de bulunur. Düz kas lifi oranı sıçanda daha yüksektir. (Şekil 2.2.1.1.) Servikal mukozada dallı servikal bezler bulunur. Bezler sayıca endometriyumda olanlardan daha azdır. Genelde mukusla doludurlar ve servikal kanal eksenine oblik düzenlenirler. Bez epiteli yüzey epiteline benzer. Mukus salgılayan hücreler arasında izole silli hücreler bulunur. Servikal mukoza menstural siklusta değişmesine rağmen, mensturasyonda dökülmez [20, 21].

Eksternal os'a yakın kanalı döşeyen basit prizmatik epitelden vajinaya uzanan porsiyö vajinalis üzerinde sürekli olan çok katlı yassı epitele ani bir geçiş vardır. Doğumdan sonra prizmatik epitel adacıkları porsiyö vajinalis üzerinde endoserviksten yayılabilir. Bu yerler inflamasyona duyarlı alanlardır. Keza vajinal akıntı (deşarj) artışının genel nedenlerinden biridir. Bu ektopik prizmatik epitel alanlarına servikal erozyon alanları denilir. Eğer tedavi edilmezse servikal kansere neden olur. Kadınlarda bu, bütün servikal kanser vakalarının % 10'unu oluşturur. Servikal epitelin yüzeyel yassı hücreleri sürekli olarak vajina sıvısına döküldükleri için vajinal simirde sitolojik çalışma yapılabilir. Bu teknik kanserin erken teşhisinde anormal hücre tayini için kullanılır [20, 21].

Menstural siklusun ortasında ovulasyon zamanında, servikal bezler seröz sıvı salgılar. Bu sıvı spermatozooanın uterusu girmesini kolaylaştırır. Diğer zamanlarda ve gebelik zamanında servikal bez salgıları daha viskoz olur ve serviksin dışı açıldığı yerde bir plak oluşturur. Böylece spermin ve mikroorganizmaların uterusu girmesi önlenir. Progesteron hormonu servikal bez salgılarının viskozitesindeki değişiklikleri düzenler [20].

Doğum zamanında bir başka hormon olan relaksin servikal duvardaki kollajen parçalanmasını indükler. Bu da serviksin yumuşamasıyla ve servikal genişlemenin kolaylaştırılmasıyla sonuçlanır [20].

Endoserviksten salgılanan mukus lizozim enzimi içerir. Bu enzim bakteri hücresi duvarı proteoglikanlarını yarıklar. Bunun aşağı üreme organlarının lokal savunmasına katkıda bulunduğuna inanılır. Deney hayvanlarında lizozim üretiminin hormonlardan etkilendiği sanılır. Çünkü lizozimin hücre içi konsantrasyonu östrusta en yüksektir. Henüz gösterilmemesine rağmen aynı sonuçlar siklusun ortasındaki kadınlarda da gerçek olabilir [20, 21].

2.2 Ekstraselüler Matriks (ESM)

Çok hücreli organizmaların hücreleri dokular olarak bilinen yapısal ve fonksiyonel beraberlik oluşturmak üzere birleşir. Vücudun 4 temel dokusundan her biri (epitel, bağ, kas ve sinir dokusu) özgün tanımlanan özelliklere sahiptir. Fakat, bütün dokular hücrelerden ve hücreler tarafından

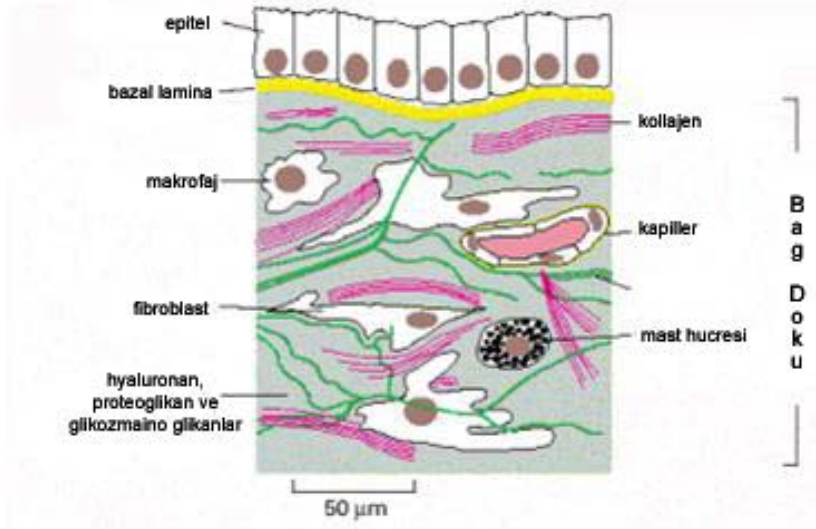
sentezlenerek hücreler arasına bırakılan, büyük molekül birleşimi olarak bilinen, ekstrasellüler matriksten yapılmıştır [20].

Bazı dokular, örneğin epitelde çok az miktardaki ESM, hücre kılıfını oluşturur. Bunun aksine bağ dokusu, (Şekil 2.2.1.1) çoğunluk ESM'nin oluşturduğu sınırlı sayıda hücreden oluşur. Hücreler, çevre moleküllere tutunan özel bağlantılar oluşturarak ESM ile ilişkilerini devam ettirirler [20].

Bağ dokusunun ESM'si, vücudun çoğu yerinde bulunur, içinde liflerin yatakladığı hidratlı jel benzeri esas maddeden oluşur. Birincisi baskı güçlerine karşı koyar, ikincisi gerilme güçlerine direnç gösterir. Hidrasyon suyu doku sıvısıyla taşınan besinlerin ve atık ürünlerin esas maddeden hızlı geçişine izin verir [20].

2.2.1 Esas madde

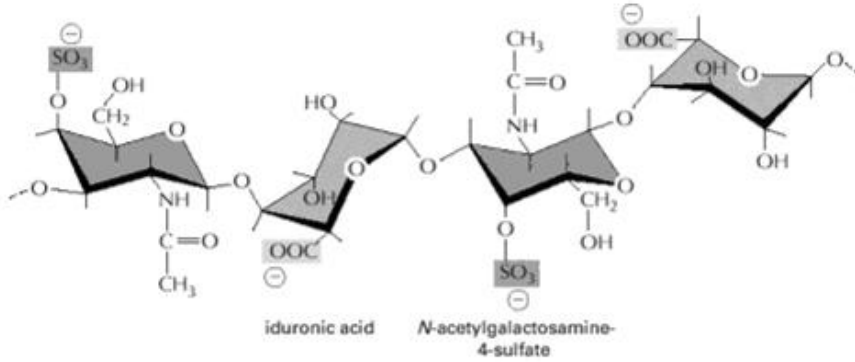
Esas madde glikozaminoglikanlardan, proteoglikanlardan ve tutunucu glikoproteinlerden yapılmıştır. Bu üç büyük molekül ailesi birbirleriyle, epitel ve bağ dokusunun hücreleri ve lifleriyle çeşitli etkileşimler oluşturur [20].



Şekil 2.2.1.1 Tipik bir bağ doku modeli. Epitel altında uzanan bağ doku içinde kapillerler, kandan geçen serbest hücreler (makrofaj, mast hücresi), makromoleküller ve lifler (kollajen, elastin) yer almaktadır. [22]

2.2.2 Glikozaminoglikanlar (GAG)

Glikozaminoglikanlar uzun esnek olmayan dallanmamış polisakkaritlerdir ve tekrar eden disakkarit birimleri zincirlerinden oluşur (Şekil 2.2.2.1.) [20].



Şekil 2.2.2.1 Bir GAG yapısında,tekrar eden disakkaritler ve moleküler yapıları. Amino şekerde yer alan sülfat grubu ve kationları tutan negatif yüklü karboksil grupları [22].

Tekrar eden iki disakkaritten biri amino şekerdir (N-asetilglukozamin ya da N-asetilgalaktozamin); diğeri bir üronik asittir (glukronik veya iduronik) (Çizelge 2.2.2.1). Amino şekeri genelde sülfatlıdır ve bu şekerlerden sodyum gibi kationları tutan negatif yüklü karboksil grupları uzanır. Esas maddedeki yüksek sodyum konsantrasyonu doku sıvısını tutar. Bu şekilde hücre içi matriks hidratlanır ve baskı yapan güçlere karşı direnmede yardımcı olur [22].

ESM'nin büyük GAG'lerinin biri dışında hepsi sülfatlıdır ve her biri 300'den daha az tekrar eden disakkarit biriminden yapılmıştır. (Çizelge 2.2.2.1) Sülfatlı GAG'ler keratan sülfat, heparan sülfat, heparin, kondroitin 4-sülfat, kondroitin 6-sülfat ve dermatan sülfat içerirler. Bu GAG'ler genelde proteoglikanları oluşturan protein moleküllerine kovalent bağlarla bağlanırlar. Tek sülfatsız GAG hiyaluronik asittir, bu da 25000 kadar tekrar eden disakkarit birimine sahip olabilir. Bu, proteoglikanlar bağlanmasına rağmen protein molekülleriyle kovalent bağlantılar yapmayan büyük bir moleküldür [20, 22].

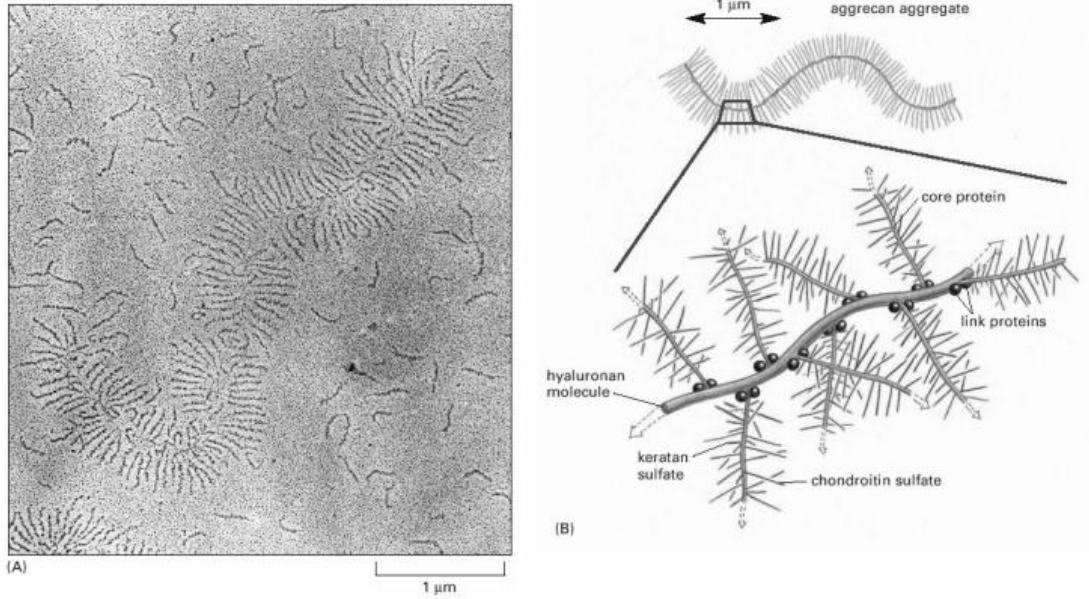
Çizelge 2.2.2 Glikozaminoglikan (GAG) Tipleri [20]

GAG	Moleküler Ağırlık (Dalton)	Tekrarlayan Disakkaritler	Sülfatlı amino şeker	Proteine bağ	Vücuttaki yerleşimi
Hyaluronik asit	10^7-10^8	Glukuronat ve N-asetil-glukozamin	Yok	Yok	Pek çok bağ doku, sinoviyal sıvı, kıkırdak, dermis
Keratan sülfat	10000-30000	Galaktoz ve N-asetil-glukozamin	N-asetil-glukozamin	Var	Kıkırdak, kornea, intervertebral disk
Heparan sülfat	15000-20000	Glukuronat (veya iduronat) N-asetil-galaktozamin	N-asetil-galaktozamin	Var	Kan damarları, akciğer, bazal lamina
Heparin	15000-20000	N-asetil-glukozamin	N-asetil-glukozamin	Yok	Mast hücreleri granülü, karaciğer, akciğer, deri
Kondroitin-4-sülfat	10000-30000	Glukuronat ve N-asetil-galaktozamin	N-asetil-galaktozamin	Var	Kıkırdak, kornea, kemik, kan damarları
Kondroitin-6-sülfat	10000-30000	Glukuronat ve N-asetil-galaktozamin	N-asetil-galaktozamin	Var	Kıkırdak, Wharton Peltesi, kan damarları
Dermatan Sülfat	10000-30000	Glukuronat (veya iduronat)	N-asetil-galaktozamin	Var	Kalp kapakçıkları, deri, kan damarları

2.2.3 Proteoglikanlar

Sülfatlı GAG'ler bir protein özüyle kovalent bağlar oluşturdukları zaman proteoglikanlar denen bir büyük molekül ailesi oluşturur. Bunlardan çoğu büyük bölgeleri işgal eder. Bu büyük yapılar bir şişe fırçasına benzer. Şöyle ki fırçanın eksenini protein öz oluşturur. Bunun yüzeyinden de üç yönde çeşitli sülfatlı GAG'ler uzanır (Şekil 2.2.3.1.)[20].

Proteoglikanlar çeşitli büyüklükte 50000 Dalton'dan (dekorin ve betaglikan) 3 milyon Dalton'a (agrekkan) kadar olabilir. Proteoglikanların protein özleri granüllü endoplazmik retikulum (GER)'da yapılır. GAG grupları da Golgi Aparatı'nda proteine kovalent olarak bağlanır. Sülfasyon ve epimerizasyon da (şeker ünitelerinin C atomları etrafındaki çeşitli grupların yeniden düzenlenmesi) Golgi Aparatı'nda yapılır [20].



Şekil 2.2.3.1 Fetal Siğır kırırkağında agrekan proteini: (A) agregasyon gösteren bir agrekan molekülüne ait elektron mikrografi. Ayrıca pek çok serbest agrekan proteini de gözlenmektedir. (B) Şematize edilmiş dev yapılı agregasyon sergileyen bir agrekan molekülü (A). 100 adet egrekan monomeri içerir. Hyaluronana kovalent olmayan bağlarla bağlanır. 2 adet bağlayıcı protein ile hem öz proteine hem de proteoglikan hyaluronan zincire bağlanır. Molekülü stabilize eder. Bağlayıcı proteinler hyaluronan bağlayıcı protein ailesinden hücre yüzey proteinleridir. Bu yapı yaklaşık olarak bakteri büyüklüğünde olan büyük moleküler ağırlığa sahip bir makromoleküldür [22].

Çoğu proteoglikanlar, özellikle kırırda ve bağ dokusunda bulunan bir makromolekül olan agrekan hyaluronik aside bağlanır (Şekil 2.2.3.1.)[20].

Burada agrekanın öz proteini hyaluronik asidin şeker gruplarına bağlantı proteinleriyle bağlanır. Hyaluronik asit 20µm uzunluğunda olduğu için bu ilişki sonucunda büyük bir hacmi işgal eden bir agrekan kompoziti oluşur. Bu birkaç 100 milyon Dalton büyüklüğünde bir molekül kitlesidir. Bu büyük molekül ESM'nin jel durumundan sorumludur ve suyun hızlı difüzyonuna karşı bir bariyer oluşturur [20].

2.2.3.1 Proteoglikanların Fonksiyonu

Proteoglikanların çok sayıda fonksiyonu vardır. Büyük hacim işgal ederek baskılara direnç gösterir, mikroorganizmaların ve metastatik hücrelerin hızlı hareketini geciktirir. Bazal laminayla ilişkili olarak, değişik por büyüklükleriyle ve yük dağılımlarıyla makro moleküllere karşı moleküler filtreler oluştururlar. Proteoglikanlar belli sinyal molekülleri için (örneğin TGF-β) bağlanma yerleri oluşturur. Bu sinyal moleküllerini bağlayarak ya moleküllerin hedeflerine erişmesini engeller ya da sinyal moleküllerini

konsantre ederek spesifik bir noktada fonksiyonlarının artışı sağlayabilir [20, 22].

Bazı proteoglikanlar, örneğin sindekanlar ESM'ye salgılanma yerine hücre membranına bağlı kalabilir. Sindekanların öz proteinleri transmembran protein gibi davranır ve sitoskeletin aktin filamentlerine bağlanır. Bunların hücre dışı kısımları ESM bileşenlerine bağlanır ve böylece hücrenin, matriksin makromoleküler bileşenine bağlanmasını sağlar. Ek olarak, fibroblast membranındaki sindekanlar fibroblast büyüme faktörlerini (FGF) bağlayıp komşuluğundaki membran FGF reseptörlerine takdim ettiği için ko-reseptörler olarak fonksiyon yapar [22].

2.2.4 Tutunucu Glikoproteinler

Hücrelerin hücreler arası matriks bileşenlerine tutunma kabiliyeti büyük ölçüde tutunucu glikoproteinlerin vasıtasıyla olur. Bu büyük makromoleküllerin birkaç domeni vardır. Bunlardan en azından biri genelde hücre yüzeyine, biri kollajen liflere ve biri de proteoglikanlarla bağlanır. Bu şekilde tutunucu glikoproteinler dokuların çeşitli komponentlerini birbirine bağlar. Büyük tip tutunucu proteoglikanlar fibronektin, laminin, entaktin, tenasin, kondronektin ve osteonektindir [20, 22].

Fibronektin her biri yaklaşık 220000 Dalton olan benzer iki polipeptid alt ünitesinden yapılmış büyük bir dimerdir. Polipeptid alt üniteleri birbirine karboksil uçlarından disülfid bağlarıyla bağlanmışlardır. Bu "V" şeklindeki makromolekülün her bir kolunda çeşitli hücre dışı bileşenler (örneğin kollajen, heparin, heparan sülfat, hiyaluronik asit) ve hücre membranı integrinleri için bağlayıcı yerler vardır. Hücre membranına tutunması için özgün olan fibronektin bölgesi arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) sekansı olarak bilinen üç rezidü sekansına sahiptir. Bu aminoasit sekansı çoğu tutunucu glikoproteinlerde integrin bağlanma yeri özelliğindedir [20].

Fibronektin çoğunlukla bağ dokusu hücresi olan fibroblastlar tarafından üretilmekle beraber, plazma fibronektini olarak kanda da mevcuttur. Üstelik hücre yüzey fibronektini olarak, geçici süreyle plazma membranına bağlanabilir [20].

Fibronektin, keza gelişen organizmanın göç eden hücrelerinin hedeflerine erişmesinde embriyonik hücrelerin göç yollarını işaretlemek için kullanılır [20].

Laminin üç büyük polipeptid zincirinden (A, B ve B₂) oluşan çok büyük bir glikoproteindir (950000 Dalton). B zincirleri, A zinciri etrafına sarılır ve bir uzun ve üç kısa zincirden ibaret bir yapı oluşturur. Üç zincir de disülfid bağlarının yerinde bulunur. Laminin yerleşimi bazal laminayla sınırlıdır, bu

glikoprotein heparan sülfat, tip IV kollajeni, entaktin ve hücre membranı için bağlanma yerine sahiptir [20, 23].

Sülfatlı glikoprotein olan entaktin molekülün üç kısa kolunun birbiri ile buluştuğu yerde laminin molekülüne bağlanır. Entaktin de tip IV kollajene bağlanır ve lamininin kollajen ağına bağlanmasını kolaylaştırır.

Tenasin büyük bir glikoproteindir. Disülfid bağlarıyla birlikte tutulan 6 polipeptid zincirinden oluşur. Merkezden radyal uzanan altı ayaklı bir böceğe benzer. Transmembran proteoglikan sindekanlar : keza fibronektin için bağlanacak yerler vardır. Tenasinin dağılımı genelde embriyonik dokularla sınırlıdır ve spesifik hücre göçü yollarını işaretlemek için kullanılır [20, 23].

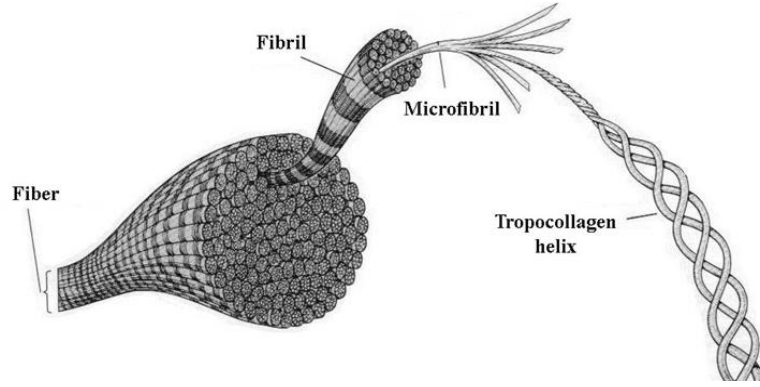
2.2.5 Lifler

ESM lifleri bu maddeye gerilme direnci ve esneklik sağlar. Klasik histoloji morfolojisi ve histolojik boyalara olan reaksiyona göre üç tip tanımlanır: Kollajen, retiküler ve elastik lifler [20].

Retiküler liflerin kollajenden yapıldığı bilindiği halde tarihsel nedenlerden ötürü hala retiküler lif terimi kullanılır [23].

2.2.5.1 Kollajen Lifler : Yapı ve Fonksiyon

ESM'nin baskı güçlerine mukavemet gösterme kabiliyeti GAG'larla proteoglikanların oluşturduğu hidratlı matriks varlığına bağlıdır. Halbuki gerilme direncine sert elastik protein olan kollajen lifleri mukavemet gösterir. Bu protein ailesi vücutta bütün proteinlerin yaklaşık %20'sini oluşturur ve çok bol bulunur. Kollajen esneyebilen bir lifdir [23] ve gerilme gücü aynı çaplı çelik telinkinden daha büyüktür. Büyük bir kollajen lif topluluğu canlıda parlak renkte beyaz görünür. Bu nedenle kollajen lif demetlerine beyaz lifler de denir. Bağ dokusu kollajen lifleri genelde 10µm'den daha küçük çaplıdır ve boyanmadığında renksizdir. Hematoksilen ve eozin ile boyandığında uzun dalgalı pembe lif demetleri olarak görülürler. Ağır metallerle boyalı kollajen liflerin elektron mikograflarında 67 nm'lik düzenli aralıklarda enine bantlar görülür. Bu durum bu liflere hastır. Bu lifler, 10-300 nm çapında ve birbirine paralel düzenli daha ince fibrillerden oluşturulur (Şekil 2.2.5.1.1.)[20, 23]



Şekil 2.2.5.1.1 Her biri yaklaşık 280nm uzunluğunda olan kollajen fibriller ve 1,5nm çapında daha küçük alt üniteler olan tropokollajen molekülleri. Her tropokollajen molekülü bir biri etrafında üçlü heliks yapısında sarılan üç polipeptid zincirinden oluşur. Her α zincirinde 1000 aminoasit vardır ve amino asitlerin üçte biri glisin, kalan büyük kısmı prolin, hidroksiprolin ve hidroksilizinden oluşur.

Fibriller de her biri yaklaşık 280nm uzunluğunda ve 1,5nm çapında daha küçük alt üniteler olan tropokollajen moleküllerinde yapılmıştır. Her tropokollajen molekülü bir biri etrafında üçlü heliks yapısında sarılan üç polipeptid zincirinden oluşur. (Şekil 2.2.5.1.1.) Her α zincirinde 1000 aminoasit vardır ve amino asitlerin üçte biri glisin, kalan büyük kısmı prolin, hidroksiprolin ve hidroksilizinden oluşur. Glisin daha küçük olduğundan, 3 α zinciriyle yakın ilişkili olduğu sanılır; hidroksiprolinin hidrojen bağları 3 α zincirini birlikte tutar ve hidroksilizin kollajen moleküllerinin birbirine bağlanmasını ve fibril oluşmasını sağlar [20].

Kollajen, evrimi boyunca yüksek düzeyde korunmuş olan amino asit kompozisyonlu tek bir protein olarak düşünülürse de, gelişen analiz metotları ile vücudun çeşitli dokularından ekstrakte edilen kollajende farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle kollajen, yakın ilişkide olan fakat genetik olarak farklılıklar gösteren, moleküler organizasyonda belli ortak özellikleri paylaşan fakat α zincirlerinin amino asit kompozisyonu ve sırası farklı olan bir protein ailesi olarak bilinir. Bugüne kadar 15 tip kollajen belirlenmiştir [23].

Tip I kollajen dermiste, kemikte, tendonda, fasiada ve organ kapsülünde olmak üzere çok yaygındır. Fibrilleri enine çizgildir. Fibril çapı yaklaşık 50-90 nm'dir. Kollajen lifleri ve lif demetlerini oluşturmak üzere agregatlaşır. Lifler esnektir fakat gerilmeye karşı büyük direnç gösterir. Bu tip kollajenlerden oluşan tendonda kırılma gücü her cm^2 'de birkaç 100 kilograma erişir [23].

Tip II kollajen, hyalin ve elastik kıkırdaklarda, intervertebral diskin nukleus pulposusunda ve gözün vitröz cisminde bulunur. Bol olan esas maddesini, içinde yataklanan çok ince fibriller oluşturur. Daha büyük lifler

oluşturulmaz. Sadece polarize mikroskopta ya da pikro-siriyusla boyandıktan sonra görülebilir [22, 23].

Tip III kollajen, gevşek bağ dokusunda, kan damarları duvarlarında; çeşitli bezlerin stromasında ve dalakta, böbrekte ve uterusunda boldur. Çapları 0,5-2 μm 'dir. Geleneksel olarak retiküler lifler denilen arjirofilik lifleri oluşturur. Mikroskopik olarak görülebilen kollajen I, II ve III'e intersitisiyal kollajenler de denilir. Floresan etiketli antikolarla boyanmış doku kesitlerinde büyük gruplar oluşturdukları görülür. Gümüş tuzlarıyla ya da periyodik asit schiff (PAS) ile boyanır [23].

Tip IV kollajen, genelde epitel tabakasının bazal laminasıyla sınırlı olan özel bir formdur. Laminin ve heparan sülfat proteoglikanlarıyla birlikte çok ince filamentlerden yapılmış prokollajen molekülleriyle kapalı bir ağ oluştururlar. 67nm'lik bir periyoda sahiptir. Tip I kollajenle ilişkilidir. Bu ağ epiteli fiziksel olarak destekler ve makromoleküller için seçici bir filtrasyon bariyeri oluşturur [23].

Tip V kollajen, yaygın olarak görülür fakat çok küçük alanlarda yerleşiktir. Düz ve çizgili kas liflerinin dış laminasıyla ve epitel bazal laminasıyla ilişkilidir. Fakat bunların yapılarında integral komponent olarak bulunmaz. Keza lifler içinde ve arasındaki bağlanma yerlerinde ara kollajenlerle ilişkisi vardır. 67nm de bir periyodu vardır [23].

Tip VI kollajen, her iki ucunda globular domeynleri bulunan, uzunluğu yaklaşık 100nm olan bir heliks segmentinden ibaret kısa bir zincir molekülüdür. Tetramerleri oluşturan bu moleküller, uzunluğu boyunca 110nm'lik periyotlarda yumrular ya da taneler olan, 5-10 nm çapında ince fibriller oluşturmak üzere ucuca polimerize olabilir. Bu kollajen vücutta az miktarlardadır ve tip I ve III kollajenlerin bulunduğu çoğu yerde bulunur. Böbrekte, karaciğerde ve uterusunda total kollajenin %5'inden daha azdır. Fakat gözün korneasında total kollajenin %25'ine kadar çıkar. Yapısal rolü kesinlikle bilinmemektedir [23].

Tip VII kollajen, çoğu epitelin bazal laminasıyla ilgilidir. Fakat derinin dermo-epidermal komşuluğunda çok bol bulunur. Molekülleri kollajen ailesinin en büyüğüdür, bazıları 800 nm uzunluğuna erişir. Tip VII kollajen agregatları epitel bazal laminasından çıkıp burada sonlanan çizgili tutturucu fibrilleri oluşturur. Böylece derminin alt tip I ve tip III kollajen lifleri etrafında bağlantılar oluşturur. Bazal laminadan çıkan diğer fibriller epitel altındaki bağ dokusunda tip IV kollajenin tutturucu plaklarında son bulur. Bunlar epiteli dermise sıkıca tutturarak stabilizeyi sağlar [23].

Tip VIII kollajen ilk olarak endotel hücresi salgısı olarak belirlendiği için bazen endotelial kollajen olarak da adlandırılır. Bu hücrelerin yüzeyi ile yakın

ilişkidedir, fakat ilişki önemi bilinmemektedir. Kornea epitelinin tipik bazal laminası olan desement membranının en büyük bileşenidir.

Tip IX kollajen, çoğunlukla kıkırdakta bulunur. Fibriller kollajenlerden farklıdır ve supramoleküler agregat oluşturmaz. Proteoglikanları uzaklaştırmak için hyaluronidazla sindirilen kıkırdakta, floresan etiketli antikor bu kollajenin bağ dokusunun tip II kollajenle birlikte yayıldığını gösterir. Çapraz yaptıkları yerlerde birbirleriyle bağlanarak matrikste tip II kollajeni liflerinin üç yönlü düzeninin sürekliliğini sağladıklarına inanılır [23].

Tip X kollajen de kıkırdakta sınırlı olup endokondral kemik oluşumuyla ilgili hipertrofik kondrositleri saran matrikste bulunur. Matriksin kalsifikasyonunda bazı rollerinin olduğuna inanılır [23].

Tip XI kollajen kıkırdaktaki tip II kollajenle ilişkilidir. Fonksiyonu bilinmez. Tip XII kollajen, tip IX kollajenin bazı özelliklerine sahiptir. Fakat şimdiye kadar dokulardaki lokasyonu ve fonksiyonu hakkında çok az bilgi vardır. Tip XIII-XV kollajenler hakkında da çok az bilgi mevcuttur [23].

2.2.5.2 Kollajen Sentezi

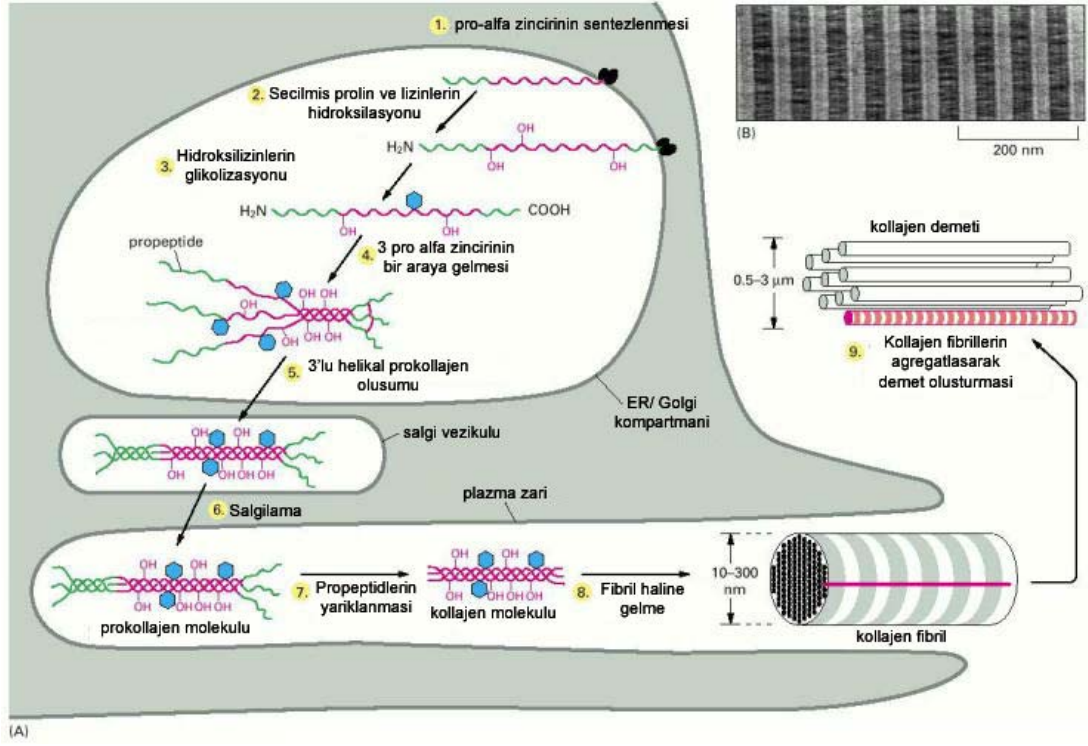
Kollajen sentezi preprokollajen zincirleri olarak GER'de yapılır. Bunlar, amino ve karboksil ucunda propeptidler olarak bilinen amino asit sekansına sahip alfa zincirleridir. Preprokollajen zincirleri sentezlenirken GER sisternalarına girerek modifiye olur. İlk, molekülü GER'e yönlendiren sinyal sekans uzaklaştırılır; bazı prolin ve lizin kısımları hidroksilazlanır (peptidil prolin hidroksilaz ve peptidil lizin hidroksilaz enzimleriyle). Bu şekilde hidroksiprolin ve hidroksilizin oluşur; daha sonra hidroksilizin glikozilatlaşır [22]. (Şekil 2.2.5.2.1.A;1-3)

Üç preprokollajen molekülü birbiriyle sıkı bir heliks yapısı oluşturmak üzere bir araya gelir ve prokollajen molekülünü oluşturur. (Şekil 2.2.5.2.1.A; 4,5) Propeptidlerle stabilize kazandığına inanılır. Propeptidler hücre içinde prokollajen molekülünün çözünebilir özelliğinin devam etmesini ve kollajen lif oluşturmak üzere birleşmesini önler [22].

Prokollajen molekülleri; Golgi Aparatı'na gitmek üzere transver vezikülleriyle GER'den ayrılır. Golgi Aparatı'nda oligosakkaritlerin eklenmesiyle ileri düzeyde modifikasyon gerçekleşir. Modifiye prokollajen molekülleri Golgi ağında paketlenir, hemen hücre dışına atılır [20, 22]. (Şekil 2.2.5.2.1.A;6)

Prokollajen ekstrasellüler çevreye girerken proteolitik enzimler olan prokollajen peptidazlar amino ve karboksil uçlarında propeptidleri yarıklarlar (Şekil 2.2.5.2.1.A;7) Yeni oluşan molekül kısadır (280nm uzunluğunda) ve tropokollajen (kollajen) molekülü olarak bilinir. Tropokollajen molekülleri spesifik baş-kuyruk yönünde ve düzenli bir sıra oluşturacak şekilde birleşirler Kollajen tiplerinin (tip- I, -III, -V ve -VII) 67nm'lik bantlarını (Şekil 2.2.5.2.1.B)

oluşturarak fibrillere şekillenirler (Şekil 2.2.5.2.1.A;8). Fibril yapısının düzeni ve sürekliliği komşu tropokollajen moleküllerini lizin ve hidroksilizin kısımları arasında oluşturulan kovalent bağlarla kuvvetlendirilir [20].



Şekil 2.2.5.2.1 A: Kollajen sentezinin hücre içi ve dışı basamakları. 1,2, ve 3. basamakta preprokollajenin GER'de yapılma aşamaları. Amino ve karboksil ucunda propeptidler olarak bilinen amino asit sekansına sahip alfa zincirlerinin oluşumu. 4,5; üç preprokollajen molekülü birbiriyle sıkı bir heliks yapısı oluşturmak üzere bir araya gelir ve prokollajen molekülünü oluşturur. Propeptidler hücre içinde prokollajen molekülünün çözünebilir özelliğinin devam etmesini ve kollajen lif oluşturmak üzere birleşmesini öner. 6; Prokollajen moleküllerinin Golgi Aparatı'na gitmek üzere transver vezikülleriyle GER'den ayrılması. Golgi Aparatı'nda oligosakkaritlerin eklenmesi, ileri düzeyde modifikasyon gerçekleşmesi. Modifiye prokollajen moleküllerinin hücre dışına atılması. 7,8; prokollajen molekülünün propeptidlerinin yarıklanması ve geride kalan kollajen molekülünün fibril içine katılması. 9; kollajen fibrillerin agregasyona uğrayarak demet yapısını oluşturması. **B:** Meydana gelen kollajen molekülünün TEM'de görüntüsü[22].

Üç yönde tropokollajen molekülleri birleşirken bir sırada ardışık moleküllerin başları ve kuyrukları arasındaki aralıklar (gap aralıkları) (her 67nm'de) tekrarlanarak düzenlenir, fakat komşu sıralarda birleşmez. Benzer şekilde, komşu sıralarda başlar ve kuyruklar üst üste gelecek şekilde (overlap bölgeleri) düzenlenme olur. Elektron mikroskopunda kullanılan ağır metal boyalar esasen gap bölgelerinde depolanır. Sonuçta, elektron mikroskopunda kollajen karanlık ve açık alanlar olarak gözlenir. Karanlık bantlar ağır metalle dolu olduğu için gap bölgelerini temsil ederken, overlap

bölgelerinin bulunduğu açık bantlar ağır metal bölgelerinin bulunmadığı yerlerdir (Şekil 2.2.5.2.1.B)[20].

Kollajen fibrillerinin ve lif demetlerinin düzeni bunları sentezleyen hücreler tarafından tayin edilir. Prokollajen plazmalemmmanın katlantıları içine ve çukurcuklara salgılanır. Buralar özel yönde şekillenen fibrillerin düzenlendiği yerlerdir. Fibril oryantasyonu hücrelerin fibriller üzerinden şekillenmesiyle daha da gelişir. Uygun özellik kazanır [20].

Fibriller yapı tip IV kollajende yoktur. Çünkü propeptidler prokollajen moleküllerinde uzaklaştırılmaz. Tip IV kollajende prokollajen molekülleri dimerler oluşturmak üzere birleşir ve keçeye benzer bir ağ oluşturur [20].

2.2.5.3 Elastik Lifler

Bağ dokusu elastisitesi büyük oranda ESM'deki elastik liflerin varlığına bağlıdır. Bu lifler genelde yuvarlak uzun ve gevşek bağ dokusu içinde dallanmıştır. Fakat ligamentlerde pencereci kılıflarda kaba demetler oluşturabilir. Böyle demetler ligamentum flavada ve vertebral sütunda bulunur. Konsantrik kılıflar daha büyük kan damarlarının duvarlarında bulunur [20].

Elastik lifler bağ dokusu fibroblastlarında keza kan damarlarının düz kaslarında sentezlenir. Bunlar glisin ve prolince zengin bir protein olan elastinden yapılmıştır. Keza, nadir aminoasitlerden desmozin ve izodesmozin de içerir. Bu iki amino asit elastin moleküllerinin enine bağını oluşturur. Bu ise elastik liflere yüksek düzeyde elastisite kazandırır öyle ki bu lifler dinlenme halindeki uzunluklarının %150'si kadar gerilebilir. Gerildikten sonra, elastik lifler eski haline yani dinlenme uzunluğuna döner [20].

Elastik lif özü elastinden yapılmıştır ve bir mikrofibril kılıfıyla sarılmıştır. Bunların herbiri yaklaşık 10nm çapındadır ve glikoprotein olan fibrillerden yapılmıştır. Elastik lif oluşması esnasında mikrofibriller ilkin şekillenir ve elastin mikrofibrillerle çevrilmiş aralıklarda depolanır [20, 22].

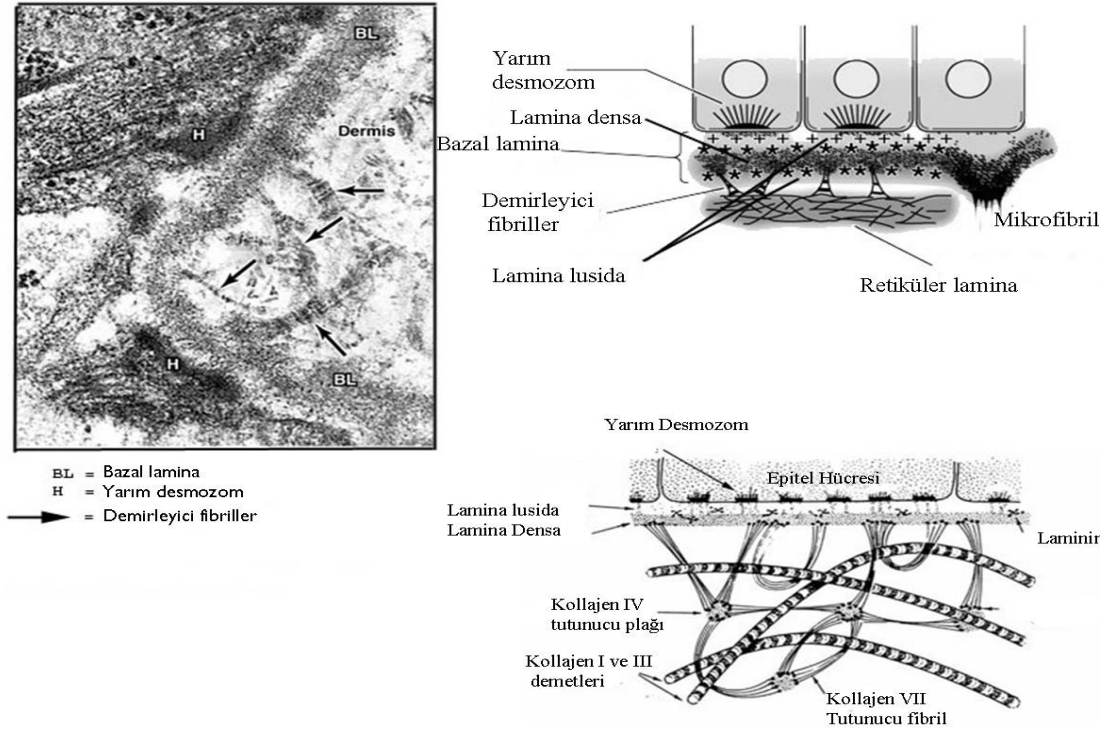
2.2.6 Bazal Membran

Bazal membran epitel ve bağ dokusu arasındaki ara yüzeyde dar, hücreci bir bölgeyi işgal eder. PAS reaksiyonuyla ve GAG'ları belirleyen başka histolojik boyalarla iyi boyanır. Yapısı bazal membrana benzeyen eksternal lamina düz ve iskelet kas hücrelerini adipositleri ve schwan hücrelerini çevirir [20].

Işık mikroskopuyla görülebilen bazal membran elektron mikroskopuyla iki kısımlı olarak daha iyi tanımlanır. (Şekil 2.2.7.1.) Bazal lamina epitel hücrelerinden, lamina retikularis de bağ dokusu hücrelerinden, sentezlenir [22].

2.2.7 Bazal Lamina

Bazal laminanın elektron mikrografları iki bölge gösterir: Lamina lusida epitelin hemen altında 50nm kalınlığında elektron açık ve lamina densa 50nm kalınlığında elektron yoğun bir bölgedir (Şekil 2.2.7.1.)[20].



Şekil 2.2.7.1 **A:**Bazal Lamina: Deride, bazal lamina ve pinositik vezikül. X28000. TEM mikrografı. **B:** Bazal laminanın şematize çizimi. Epitel hücreleri altında uzanan lamina densa ve lamina lusida bölümleri görülmektedir. **C:** Kollajen tip IV ve diğer kollajen moleküllerinin bazal laminada yerleşimi. [24]

Lamina lusida, çoğunlukla ekstrasellüler glikoproteinlerden lamininin ve entaktin keza epitel hücre membranından bazal laminaya uzanan integrinlerden yapılmıştır [20].

Lamina densa, tip IV kollajeni ağından yapılmıştır. Lamina densenin yan taraflarında bulunan lamina lusida ve lamina retikularisde bir proteoglikan olan perlekanla örtülmüştür [20].

Bu ağ yanlardan bir proteoglikan olan perlekanla sarılmış haldeki; lamina lusida ve lamina retikularis ile üstü örtülü durumdadır. Perlekan protein özünden uzanan heparan sülfat yan zincirleri bir polianyon oluşturur [20].

Lamina densaya bakan lamina retikularisde de fibronektin vardır. Laminin, tip IV kollajene heparan sülfata ve epitel hücre membranı integrinlerine bağlanan domeynlere sahiptir. Bu şekilde epitel hücreleri bazal

laminaya tutunurlar. Bazal lamina, fibronektin, tutturucu fibriller (tip VII kollajen) ve mikrofibriller (fibrillin) dahil birkaç substratla retiküler laminaya iyice tutunduğu sanılır. Bütün bunlar bağ dokusu fibroblastlarında yapılır [20].

Bazal lamina hem bir moleküler filtre görevinde bulunur hem de epitel için esnek fakat sıkı bir destek olarak işlev görür. Filtre etme özelliği sadece tip IV kollajen ile değil heparan sülfatla da ilişkilidir. Tip IV kollajenin oluşturduğu ağın spesifik porları filtre görevinde bulunur. Halbuki heparan sülfat negatif elektrikle yüklüdür ve negatif elektrik yüklü moleküllerin geçişini sınırlar. Bazal laminanın bir başka fonksiyonu da yüzeyinden hücrelerin göçüdür. Yaralanmada epitel yenilenirken ya da motor sinirlerin rejenerasyonu esnasında miyonöronal bağlantılar yeniden kurulurken hücre göçü izlenebilir [20].

2.2.8 Lamina Retikularis

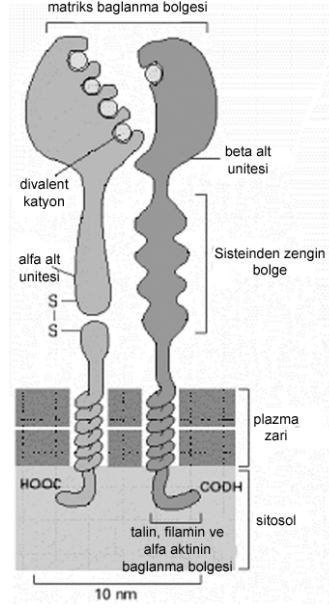
Lamina retikularis (Şekil 7) değişen kalınlıkta bir bölge olup fibroblastlar tarafından sentezlenen tip I ve tip III kollajenlerden yapılmıştır. Bazal lamina ile bağ dokusu arasındaki ara yüzeydir ve kalınlığı epitel yüzeyine uygulanan sürtünme güçlerine göre değişir. Bu yüzden deride oldukça kalındır ve akciğer alveol epiteli altında ise oldukça incedir [20].

Bağ dokusunun tip I ve tip III kollajen lifleri lamina retikularisin mikrofibrilleri ve tutturucu fibrilleriyle etkileşerek bağlar kurarlar. Üstelik kollajen liflerin bazik grupları lamina densa GAG'larının asidik gruplarıyla bağlanırlar. Ek olarak kollajen bağlayıcı domeynler ve fibronektinin GAG domeynleri bazal laminanın lamina retikularise tutunmasına ileri düzeyde yardımcı olurlar. Böylece epitelyal kılıf bazal lamina ve lamina retikularisten yapılmış hücreler arasında ara yüzey altındaki bağ dokusuna bağlanır [20].

2.2.9 İntegrinler

İntegrinler transmembran proteinlerdir. Ligandlarla bağlar oluşturdukları için hücre membran reseptörlerine benzerler. Ama reseptörlerin aksine sitoplazmik bölgeleri hücre iskeletine bağlanırlar. Ligandları, sinyal verici moleküller değildir fakat kollajen, laminin ve fibronektin gibi ESM moleküllerinin yapısal üyeleridirler. Üstelik bir integrin ve ligandı arasındaki ilişki bir reseptör ve ligandı arasındaki ilişkiden çok zayıftır. İntegrinler reseptörlerden daha çok sayıdadır ve böylece bağ zayıflığını kompanse eder, keza ESM yüzeyi boyunca hücre göçüne izin verir [22].

İntegrinler, alfa ve beta glikoprotein zincirlerinden yapılmış heterodimerlerdir (yaklaşık 250000 dalton). Karboksil uçlarına hücre iskeletinin talin ve alfa aktinini bağlanır. Amino uçlarında ESM'nin bağlayıcı yerleri vardır [20, 22]. (Şekil 2.2.9.1.)



Şekil 2.2.9.1 Tipik bir integrin molekülünün yapısı. Hücre dışındaki matriks proteinlerine hücrenin ve aktin hücre iskeletinin bağlanabilmesi için transmembran bağlayıcıları vardır. [22].

İntegrinler hücre iskeletini ESM'ye bağladıkları için transmembran bağlayıcılar olarak bilinir. İntegrin molekülünün alfa zinciri Ca^{+2} ya da Mg^{+2} u bağlar. Bunlar ligandla bağlanan özel bağ dokusunun devamı için gerekli olan divalent katyonlardır [22]. (Şekil 2.2.9.1.)

Ligand özgünlüğü, hücresel dağılımı ve fonksiyonu farklı olan çok sayıda integrin vardır. Bazısına genelde ligand reseptör denilir (örneğin laminin reseptör, fibronektin reseptör) [20, 22].

2.3 Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)

2.3.1 Metalloproteinazların Genel Yapısı

Proteolitik enzimler, terminal veya internal peptid bağlarını kırmalarına göre sırasıyla ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar olarak sınıflandırılırlar.

Endopeptidazların çoğu katalitik mekanizmaları ve inhibitör duyarlılıkları göz önüne alınarak, serin, sistein, aspartik endopeptidazlar veya metalloproteinazlar olarak sınıflandırılırlar [25]

MMP'ler çeşitli hücre yanı substratlarını işleyen veya yıkan, çoklu bir gen ailesine ait 25'ten fazla salgısal ve hücre yüzey enzimleridir. MMP'ler biz enzim ailesidir, dokunun yeniden modellenmesinde görev alır.

MMP'lerin hedefleri arasında; diğer proteinazlar, proteinaz inhibitörleri, pıhtılaşma faktörleri, kemotaktik moleküller, latent büyüme faktörleri, büyüme faktörlerini bağlayıcı proteinler, hücre yüzey reseptörleri, hücre-hücre

adezyon molekülleri ve bütün ESM proteinleri gösterilebilir. Bu nedenle MMP'ler birçok biyolojik işlemi düzenleyebilme yeteneğindedir [25] .

Hücre dışı proteinazlar birçok gelişimsel ve patolojik işlemler için gereklidir. Bir hücrenin çevresi ile ilişki kurması, çok hücreli organizmaların gelişebilmeleri ve normal olarak işlev görebilmeleri için ESM proteinlerini parçalayabilme yeteneği gereklidir [25]. Bu durum; 1962 yılında Gross ve Lapiere'in [26], gerilemekte olan iribaş kuyruğu tarafından üretilen diffüze olabilen enzimlerin fibrillar kollajen jelleri parçalayabildiğini göstermelerinden çok önceleri bilinen bir gerçektir. O zamandan bu yana hidradan insana kadar çeşitli türlerde tanımlanan bu enzim ailesine katalitik aktivitelerinde metal iyonlarına bağımlılıklarından, ESM'nin yapısal proteinlerini parçalayabilme yeteneklerinden ve özgün evrimsel dizileri nedeniyle topluca "Matriks Metalloproteinazlar" veya "matriksin" ler adı verildi [27]. ESM substratlarına ek olarak MMP'ler, aynı zamanda hücre yüzey moleküllerini ve diğer perisellüler non matriks proteinleri de parçalarlar ve bu sayede hücre davranışını çeşitli yollardan düzenleyebilirler [28]. MMP'ler; modifiye ettikleri birçok protein gibi, embriyonik gelişim, doku morfogenez, yara iyileşmesi, inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alırlar [11, 29].

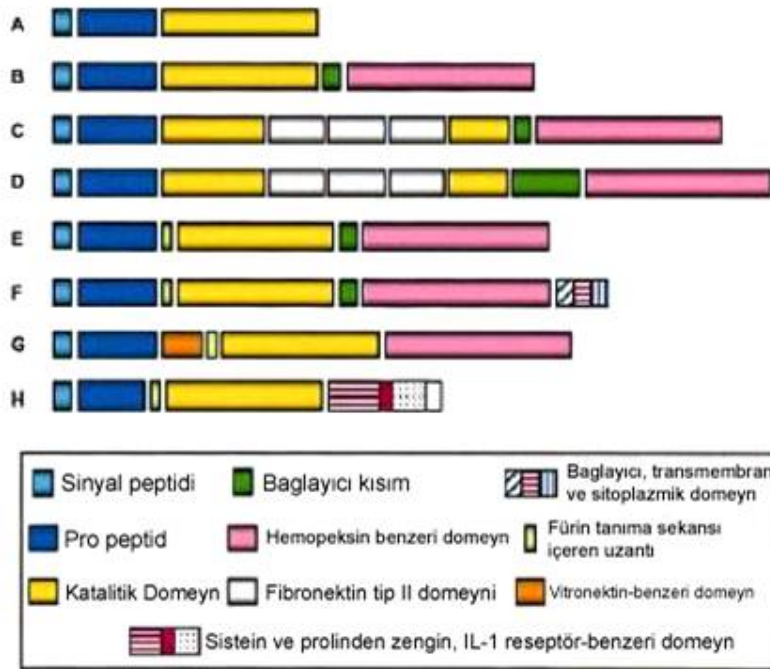
MMP'lerin hücre kaderini ve keza gelişmenin sonuçlarını bu kadar etkileyebilmeleri, beraberinde çok sıkı bir şekilde kontrol edilmelerini gerektirmektedir. MMP'lerin aktif olmayan zimojenler olarak salgılandıklarının [30] ve daha sonra aktivite kazandıklarının öğrenilmesi, kollajenolitik aktivitenin ilk kez gösterilmesinden çok sonradır.

Metalloproteinazlar dizi içeriklerine bağlı olarak da beş üst aileye ayrılırlar. Bunlardan Metzincin, katalitik bileşeninde çinkoyu bağlayan yüksek oranda korunmuş üç histidin ve aktif çinko alanının altına yerleşmiş bir metionin döngüsü içerir [27].

Çinko bağlayıcı motifleri, HEBXHXBGBXHZ içerir: (H) histidin, (E) Glutamik asid, (G) Glisin, (B) değişken hidrofobik rezidü, (X) değişken rezidü, (Z) aile özgün amino asidi temsil etmektedir. Metzincinler Z dizilerine göre daha ileri 4 multigen ailesine ayrılır. Serralizinler, Astasinler, ADAM/adamalizinler ve MMP'ler. Birkaç MMP hariç tüm MMP'lerde bu Z dizisi serin'dir [27].

MMP ailesinin birçok üyesi yapısal açıdan ele alındığında; evrim süresince iyi korunmuş üç ayrı bileşenden oluştuğu gözlenir: bir amino-terminal propeptid, bir katalitik domeyn ve karboksi-terminal ucunda bir de hemopeksin-benzeri bir domeyn (Şekil 2.3.1.1.) [31]. Propeptid; çinko atomuyla etkileşen ve yaklaşık 80-90 amino asit içeren bir sistein dizisi içerir.

Tüm MMP'ler durgun formda üretildiğinden, propeptidin proteoliz ile uzaklaştırılması zimojen enzimin aktivasyonu ile sonuçlanır [31]. Katalitik domeyn; iki çinko iyonu ve en az bir kalsiyum iyonu içerir. İki çinko iyonundan biri aktif kısımda yer alır ve MMP'lerin katalitik işlemlerinde görev yaparlar. Yapısal çinko iyonu olarak bilinen ikinci çinko iyonu ve kalsiyum iyonunun rolleri hakkında çok az bilgi vardır [32]. MMP'lerin hemopeksin-benzeri domeynleri büyük ölçüde korunmuştur ve plazma proteinlerinden hemopeksin ile sekans benzerlikleri göstermesi nedeniyle bu şekilde isimlendirilmiştir [31]. Bu domeynin substrat bağlamada ve TIMP'lerle etkileşimde fonksiyonel rol oynadıkları gösterilmiştir [33, 34]. Bu temel domeynlere ek olarak MMP ailesi; içerdikleri fazladan veya eksik fonksiyonel ve yapısal domeynlere göre farklı alt gruplara ayrılır (Şekil 2.3.1.1.)



- A- Minimal domeynli MMP'ler (MMP-7, MMP-26)
- B- Hemopeksin domeyni içeren MMP'ler (MMP-1, -3, -8, -10, -12, -13, -18, -19, -20)
- C- Jelatin-Bağlayıcı MMP'ler (MMP-2 / Jelatinaz A)
- D- Jelatin-Bağlayıcı MMP'ler (MMP-9 / Jelatinaz B)
- E- FÜRİN-aktive salgısal MMP'ler (MMP-11, MMP-28)
- F- Transmembran MMP'ler (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP)
- G- Vitronektin-benzeri domeyn içeren, bağlayıcı içermeyen MMP'ler (MMP-21)
- H- Sistein / Prolinden zengin, IL-1 reseptör-benzeri domeyn içeren MMP'ler (MMP-23)

Şekil 2.3.1.1 MMP'lerin bileşen yapılarına göre sınıflandırılması

2.3.2 MMP'lerin İşlevleri

Günümüze kadar 25 omurgalı MMP ve 22 insan homoloğu MMP tanımlanmıştır [88-90] Bunlara ek olarak çeşitli omurgasız MMP'leri de tanımlanmıştır. Her omurgalı MMP'si farklı, fakat çoğu zaman örtüşen substrat özgünlüklerine sahiptir ve ESM'nin hemen hemen tüm bileşenlerini parçalayabilirler (Çizelge 2.3.2.1.) [35]. MMP isimlendirmesi basit olmakla birlikte açık değildir [36]. Bu enzimlerin birçoğunun birden çok ismi vardır. Basit olarak MMP'ler; 4 grupta sınıflandırılır [37].

- 1) **Jelatinazlar:** Jelatinaz A ve B (sırasıyla MMP-2 ve MMP-9)' yi içerir ve tip IV kollajen, tip V kollajen ve denatüre kollajenleri (jelatinleri) parçalayabilirler.
- 2) **Kollajenazlar:** İnterstisyel kollajenaz (MMP-1), nötrofil kollajenaz (MMP-8), kollajenaz-3 (MMP-3) ve kollajenaz-4 (MMP-18, insan) ' ü içerir. Kollajenazlar; tip I, II, III, VII ve X kollajeni (ESM' nin interstisyel kollajenleri) parçalayabilirler.
- 3) **Stromelizinler:** En geniş substrat spesifitesine sahip olup, tip I, IV, V, VII kollajen, laminin, fibronektin, jelatinler, elastin ve proteoglikanları parçalayabilirler. Stromelizin -1 (MMP-3) ve Stromelizin-2 (MMP-10) benzer yapı ve substrat özgünlüğüne sahiptir. MMP-3 ve MMP-10 kültürde ve *in vivo* keratositlerde ve fibroblastlarda ekspresyon edilir. MMP-3 aynı zamanda meme bezi gelişiminde stromal hücrelerde de üretilir ve önemli ESM yeniden modellenmesi ve alveolar apoptoz gerçekleşirken yoğun şekilde laktasyon sonrası meme involüsyonunda up-regüle edilir. MMP-3 hedef hücrenin farklılaşma konumuna göre apoptozu veya proliferasyonu tetikleyebilir. Ayrıca bu enzim doğal tümör promotörü olarak anjiyogenez tetikler. Durgun MMP-1 için potansiyel aktivatördür [38]. MMP-3 gibi proteoglikanaz aktivitesi olan metalloproteinazların, glikozaminoglikan yan zinciri ile protein etkileşimini bozduğu düşünülür [39]. Proteoglikanların merkezi proteinleri doğrudan kollajen fibrillere bağlanır ve onun glikozaminoglikan yan zincirlerinin diğerleri ile etkileşime girerek fibril aralıklarını ve doku hidrasyonunu düzenlediği düşünülmektedir.
- 4) **Membran tip (MT)- MMP'ler:** Membrana bağlı MMP'lerdir. MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP ve MT6-MMP tanımlanmıştır.

Çizelge 2.3.2.1 MMP'ler, Substratları ve Ekspresyon Profilleri

Enzim	Substratları	Ekspresyon ve Görev
Kollajenazlar		
Kollajenaz-1 (MMP-1)	Kollajen I, II, III, VII, VIII, X, agrekan	Gelişim, doku tamiri
Kollajenaz -2 (MMP-8)	Kollajen I, II, III, agrekan, serpin, a2M	Lökositler ve kıkırdak
Kollajenaz -3 (MMP-13)	Kollajen I, II, III, IV, IX, X, XIV, jelatin, fibronektin, laminin, tenascin C, agrekan, fibrillin, osteonektin, serpin	Kemik gelişimi, İnvaziv tümörler
Stromelizinler		
Stromelizin-1 (MMP-3)	Kollajen tip IV, V, VII, IX, X, XIV, fibronektin, elastin, jelatin, laminin, agrekan, nidogen, fibrillin, osteonectin, a1PI, MBP, decorin	Keratinositler Fibroblastlar
Stromelizin-2 (MMP-10)	Kollajen tip IV, V, IX, X, XIV, fibronektin, elastin, jelatin, laminin, agrekan, nidojen	Keratinositler ve fibroblastlar
Stromelizin -3 (MMP-11)	a1PI	İnsan invaziv kanserleri
Metalloelastazlar	kollajen tip IV, jelatin, fibronektin, laminin, MBP, elastin, vitronektin, nidojen, a1PI, fibrillin, plasminojen, apolipoprotein A, proteoglikanlar	makrofajlar
Matrilizinler		
Matrilizin-1 (MMP-7)	Kollajen tip IV, elastin, fibronektin, laminin, nidojen, tenasin, osteonektin, MBP, dekorin, versikan, a1PI	Kanal epitel hücrelerinde Ekzokrin bezler
Matrilizin -2 (MMP-26)	Kollajen tip IV, jelatin, fibronektin, fibrin, fibrinojen, tip I jelatin, a1PI, b-kazein,	Uterus ve plasenta Üreme sürecinde
Jelatinazlar		
Jelatinaz A (MMP-2)	Kollajen I, IV, V, VII, X, jelatin, fibronektin, tenasin, fibrillin, osteonektin, MBP, dekorin, a2M	Degredasyon Fibriller kollajenazlarla yarıklanma
Jelatinaz B (MMP-9)	Kollajen tip IV, V, VII, XI, XIV, XVII, jelatin, elastin, fibrillin, osteonektin, fibronektin,	Kollajenazlar, invazyon Malign tümörlerde
MMP-28	ND	Testis, akciğer, keratinositler

MMP'ler: embriyonik gelişim, blastosist implantasyonu, organ morfogenez, sinir büyümesi, ovülasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterus involüsyonu, endometrial siklus, kıl folikülü siklusu, kemik modellenmesi, yara iyileşmesi, anjiyogenez, apoptoz vs. gibi birçok normal biyolojik işlemin yanı sıra, arthirit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik hastalıklar, periodontal hastalıklar, kan-beyin bariyerinin yıkılması, deri ülserasyonu, gastrik ülser, korneal ülserasyon, karaciğer fibrozu, fibrotik akciğer hastalığı gibi çeşitli patolojik işlemlerde de aktif olarak rol oynarlar [40]. Her ne kadar MMP'lerin ana fonksiyonu doku rezorpsiyonu ve hastalıkların gelişimi sırasında ESM'nin ortamdan kaldırılması olsa da, MMP'ler özgün proteoliz yoluyla bazı ESM makromoleküllerinin biyolojik fonksiyonlarını değiştirebilirler. Örneğin amniyon epitelyal hücreleri doğumdan hemen önce Tip I kollajenin kollajenazlarca yıkılmasından dolayı apoptotik hücre ölümüne gider [41]. Transgenik hayvan modelleri ve gen transfer teknikleriyle MMP'lerin biyolojik ve patolojik fonksiyonlarına yeni

yaklaşımlar sağlanmıştır [42]. Trofoblast dev hücrelerinde MMP-9'un ekspresyonu, fare blastosist büyümesi ve erken implantasyon basamaklarında [42-44] ve daha sonraki embriyonal iskelet dokusu gelişiminde kritik görünmektedir [45] .

MMP'lerin üremedeki fonksiyonlarına ilişkin ilk çalışmalar materyal eldesinin kolaylığı açısından daha çok primat [46-48], fare [42, 49] ve sıçan [50, 51] gibi hayvanların gebelik veya menstrual siklus endometriyumlarına aittir. Endometriyumda menstruasyon dolayısıyla sürekli bir doku yıkımı ve yenilenmesi gerçekleştiğinden, araştırmacılar ilkin endometriyumda sentezlenen MMP'ler üzerinde yoğunlaşmışlardır. MMP aktivitesinin uterustaki ilk varlığı; sıçanda postpartum dönem sırasında gösterilmiştir [52].

MMP'lerin tek fonksiyonu ESM'yi sindirmek yoluyla hücre göçünü ve doku modellenmesini sağlamak değildir. ESM, yapısal ve bariyer fonksiyonlarının yanı sıra birçok ek rollere sahiptir. Örneğin, bazal membran, epitel hücrelerin hayatta kalmasını ve büyümesini sağlarken, ESM de çeşitli biyolojik olarak aktif moleküller için bir rezervuar olarak görev alır. MMP'ler tarafından ESM komponentlerinin proteolizi bu fonksiyonları değiştirebildiği gibi, tamamen farklı biyolojik aktif elemanların ortaya çıkmasına da neden olabilir [53]. Birçok MMP (MMP-1,2,3,7,11 gibi), Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi birçok büyüme faktörünün aktivitesini, bu faktörleri bölmek suretiyle direkt olarak düzenleyebilir [31, 53]. Tüm bu nedenlerden dolayı matriksin parçalanması MMP'lerin ne tek, ne de ortak fonksiyonel özelliğidir.

MMP'ler normal veya patolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için doğru zamanda, doğru hücre ve perisellüler yerleşimde, doğru miktarda bulunmalı ve düzgün bir şekilde aktive veya inhibe edilmelidirler [25]. Bu nedenle MMP'ler transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde sıkıca kontrol edilmelerinin yanı sıra, protein düzeyinde aktivatörleri, inhibitörleri, salgılanımlarını etkileyen faktörler veya hücre yüzey lokalizasyonları ve kendi yıkımları yoluyla da kontrol edilir .

2.3.3 Dinlenme Durumundaki Metalloproteinazların Aktivasyonu

Tüm diğer proteolitik enzimler gibi MMP'ler, inaktif proenzimler veya zimojenler olarak sentezlenirler. Bu latent durum, propeptid domeynin C-terminal ucu yakınlarında çiftleşmemiş bir sistein sülfhidril grubu tarafından sağlanır. Bu sülfhidril grubu aktif çinko iyon alanı için dördüncü ligand olarak görev görür. Aktivasyon; sistein-çinko (Cys-Zn⁺² , sistein switch) etkileşiminin bozulmasını ve propeptid domeynin uzaklaştırılmasını gerektirir [25, 54]. Böylece tiyol grubu MMP hedefindeki molekülün peptid bağlarını hedefleyen bir su molekülü ile değiştirilir. Sekrete edilen pro-MMP'ler, *in vitro* koşullarda başka proteinazlar ve SH-reaktif ajanlar, civa bileşikleri, reaktif oksijen ve denatürantlar gibi non-proteinaz ajanlar tarafından aktive edilirler [13]. *In*

vivo'da pro-MMP'lerin çoğu doku veya plazma proteinazları ya da fırsatçı bakteri proteinazları ile aktive edilir.

Hücre kültürlerinde MMP ekspresyonunun hücre spesifik indüksiyonu da belirlenmiştir. Örneğin, forbol esterleri fibroblastlarda MMP-10 yerine MMP-3v ekspresyonunu indüklerken, keratinositlerde bunun tersi bir durum söz konusudur [55].

2.3.4 Post-Transkripsiyonel MMP Düzenlenmesi

Post-transkripsiyonel mekanizmalar da MMP ekspresyonu üzerinde etkili olabilmektedir. Örneğin MMP-1 ve MMP-3 'ü kodlayan mRNA transkriptleri forbol esterleri ve EGF ile stabilize edilirken, MMP-13 transkriptleri PDGF ve glukokortikoidler stabilize, TGF- β ile destabilize edilirler [56][110]. Post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesi, alternatif kırılma ve alternatif poliadenilasyon ile de sağlanır.

2.3.5 MMP Sekresyonunun Düzenlenmesi

Her ne kadar MMP'lerin çoğu translasyonun hemen ardından salgılansa da önemli ölçüde sekretuar kontrol da mevcuttur. MMP-8 (kollajenaz-2, nötrofil kollajenaz) ve MMP-9 kemik iliğinde farklılaşan granüositler tarafından sentezlenir ve dolaşımdaki nötrofillerin sırasıyla spesifik ve jelatinaz (tersiyer) granüllerinde depolanırlar ve inflammatuar mediatörler aracılı nötrofil aktivasyonunu takiben salınır. [57]. Makrofajlarda plazmin ve trombin MMP-12 sekresyonunu indükler fakat transkripsiyon oranını değiştirmez [58].

2.4 Prostaglandinler (PG'ler)

Prostaglandinler "Eikosanooidler" olarak tanımlanan 20 karbonlu hormonların en geniş ailesidir. Bu isim Yunancadan köken almıştır. Yunanca "eikosi" 20 sayısına karşılık gelmektedir. PG'lere ek olarak bu hormon grubu, prostasiklinler, tromboksanlar ve lökotrienleri içerir. Bu moleküllerin tamamı araşidonik asitten köken alır. Araşidonik asit ise fosfolipitler ve diaçilgliserolden sentezlenir. [59]

Prostaglandin ismi ise prostat bezinden köken almıştır. 1930 yılında İsveçli fizyolojist Ulf von Euler ve bağımsız olarak M.W. Goldblatt bu molekülü insan semeninde tanımlamış ve prostatik salgının bir kısmı olduğuna inanmışlardır.[59] Gerçekte bu salgı semene, seminal vezikül aracılığıyla salgılanır. Daha sonraları bu molekülün pek çok dokuda farklı işlevler görmek amacıyla üretildiği gösterilmiştir.

Steroid hormonlara zıt olarak lipidler bazen de hücre yüzey reseptörleri ile etkileşen sinyal moleküllerine kaynak oluşturur. Hücre yüzey reseptörlerine bağlanan primer yağda çözünen hormonlar PG'lerdir. 9 farklı sınıfta incelenen en az 16 farklı PG tanımlanmıştır. Bu sınıflar PGA'dan, PGI'ya doğru adlandırılmıştır. [60]

PG'ler kısa ömürlü olmaları nedeniyle lokal hormonlardır. Hormon benzeri olmalarına rağmen taşınmaz. Kimyasal mesajcılar gibi çalışır. Hem sentezlendikleri hem de 7 transmembran (serpentin tipi) reseptörlerle bağlandıkları hücrenin aktivitelerini değiştirir. Bu etkinin doğası hücreden hücreye çeşitlilik gösterir. Ayrıca bu etki, insülin ve glukagon gibi etkisi küresel olarak aynı kalmış hormonlarla çelişkili özellikler sergiler. PG'ler inflamasyonu tetikler, bazı organlarda kan akışını düzenler, membrandan iyon taşınmasını kontrol eder, sinaptik transmisyonu düzenler ve uykuya teşvik eder[61].

1981 yılında aspirin benzeri araçların PG sentezini geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiğini bulan Sune K. Bergström, Bengt I. Samuelsson ve John R. Vane 1982 yılında bu buluşla Nobel Tıp ödülüne layık olmuşlardır. [59]

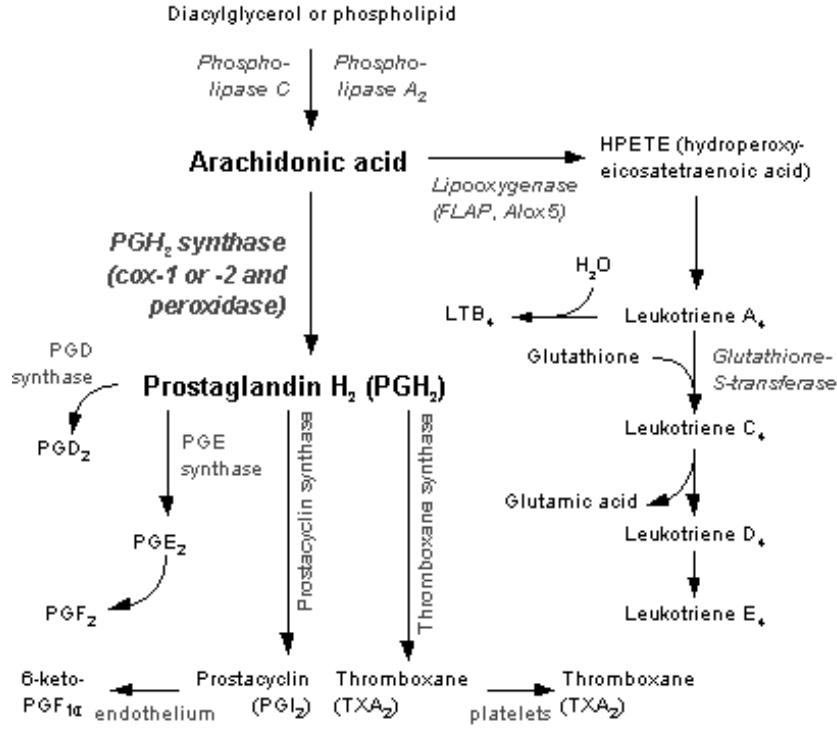
2.4.1 Prostaglandinlerin Biyokimyası

2.4.1.1 Prostaglandin Biyosentezi

PG'ler hemen hemen tüm doku ve organlarda bulunur. Bu moleküller endotel, platelet ve uterus hücrelerinde başta olmak üzere otokrin ve parakrin düzenleyicilerdir. Hücrede "vazgeçilmez yağ asitleri" (EFAs) olarak bilinen üç molekülden sentezlenirler.

1. Gama linoleik asit
2. Araşidonik asit
3. Eikosapentanoik asit

Ara ürünler fosfolipaz A2 tarafından üretilir. Bunun ardından siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz yolları devreye girer. Bunun sonucundan lökotrienler, prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar oluşacaktır. COX yolağından tromboksan, prostasiklin ve PGE₂, D ve F; lipooksijenaz yolağından ise makrofaj ve özellikle lökositlerde lökotrienler sentezlenir [59]. (Şekil 2.4.1.1.1)



Şekil 2.4.1.1.1 Fosfolipidlerin, fosfolipaz A₂ ile hidrolizi sonucu araşidonic asit meydana gelir. Araşidonic asit iki alternatif yolla metabolize edilebilir. Birincisi, prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanları; ikincisi ise lökotrienleri meydana getirir. Araşidonic asitten köken alan bu sentez mekanizmasının ilk basamağını araşidonic asitin PGH₂ 'ye dönüştürülmesi oluşturur.

2.4.1.2 Diğer Terminal Prostaglandin Sentazlar

Terminal prostaglandin sentazlar diğer prostaglandinlerin oluşumundan sorumlu enzimler olarak tanımlanmıştır. Örneğin, hematopoeitik ve lipokalin prostaglandin D sentaz (hPGDS ve lPGDS) PGD₂ ve PGH₂ sentezinden sorumludur. Benzer olarak prostasiklin (PGI₂) sentaz (PGIS) PGH₂'yi PGI₂'ye dönüştürerek aktivite gösterir. Ayrıca bir Tromboksan sentaz (TxAS) enzimi de keşfedilmiştir. Prostaglandin F sentaz (PGFS), NADPH varlığında, PGH₂den PGD₂ and PGF_{2α} ve bu moleküllerden de 9α,11β-PGF_{2α,β} oluşumunu katalizler. Bu enzim kristalize edilmiş; PGD₂ ve bimatoprost (sentetik PGF_{2α}) üretiminde kullanılmıştır [59].

2.4.2 Prostaglandinlerin Yapısı

Doymamış karboksilik asit yapısındadır. 20 karbonlu 5 halkalı bir iskelet içerirler. Bu halkalar çift bağlı keton ve alkol gruplarını barındırır. Hormon yapısında ve işlevinde olsalar bile yapılarının bozulmaya olan yatkınlıkları nedeniyle asla kanla taşınmazlar. Lokal hormonlar olarak çalışırlar.

2.4.3 Prostaglandinlerin İşlevleri

Pek çok farklı fizyolojik etkileri vardır. Benzer yapısal özelliklerinin yanında yan zincirlerinde oluşan çok küçük farklılıklar dokuya özgün işlevleri kazanmalarından sorumludur. Ayrıca aynı PG'ler farklı dokularda farklı işlevler yaparlar. Bilinen en önemli işlevleri düz kasta meydana getirdikleri etki ile damar genişlemesinden sorumlu olmaları ve kan basıncını düşürmeleridir. Potansiyel etkilerinin araştırılmasında alınan yol neticesinde geçtiğimiz on yılda kardüovasküler hastalıklarda ve viral enfeksiyon durumlarında (HSV ve HIV-1) kullanılmak üzere terapotik ajanlar olarak önerilmiştir.

1. İnflamatuvar cevabı aktiveleştirir, ateş ve ağrı oluşumundan sorumludur. Bir bölgede yaralanma veya hasar meydana geldiğinde beyaz kan hücreleri bölgeye akın ederler ve orada PG sentezi yapar.
2. Kan damarında hasar meydana geldiğinde orada tıkaç meydana getirilir. Tromboksan olarak adlandırılan bir prostaglandin türevi plateletlerin bölgeye akınını ve hasarlı alanı daraltmalarını tetikler. Son olarak PGI₂ üretilir ve tam ters etkiyle oluşturulan pıhtının kaldırılmasına yardımcı olur.
3. Pek çok PG tipi doğum indüklenmesi ve üreme ile ilgili süreçlerde görev alır. PGE₂ uterus kasılmalarına yol açar ve dışardan doğum indüklemelerinde sıkça kullanılır.

4. PG'ler diğer sistemlerde de örneğin; gastrointestinal sistem (asit sentezini inhibe eder ve koruyucu mukus tabakanın sentezini artırır), böbreklerde kan akımını hızlandırır ve lökotrinler astımda bronş daralmasını kontrol eder.

2.4.4 Prostaglandinlere Aspirin ve Diğer Analjezik Antienflamtuvar Ajanların Etkileri

Aspirin COX olarak adlandırılan enzimi inhibe eder. COX-1 ve -2, araşidonik asite eklenen oksijen ve kapanan halka ile prostaglandin üretiminden sorumlu enzimdir. Aspirinin asetil grubu hidrolize olur ve araşidonik asitin alkol grubu ile esterleşerek molekülün aktif enzim halini tetiklemesine engel olur [62, 63].

Bu şekilde ateş ve ağrı durumlarında sağlanan etki aslında COX inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca aspirin istenmeyen menstural kanamaların durdurulmasında da özellikle PGF_{2α} sentezini durdurarak kasılmayı ve kanamayı bununla birlikte bölgede meydana gelen ağrıyı azaltır. Ancak aspirin alımı hasarlı bölgelerde artan istenmeyen kanama da oluşturabilir.

2.4.5 Sentetik Prostaglandinler ve Klinikte Kullanım Alanları

Prostaglandinler laboratuvar ortamında da sentezlenebilir ve günümüzde pek çok formu sentetik olarak üretilen PG'ler klinikte yaygın olarak değişik amaçlarla kullanılır. Bunlarda en sık kullanılanlara bazı örnekler aşağıdaki gibidir.

1. Doğumu indüklemek, düşük ve erken doğum için; PGE₂ (dinopriston) veya PGF₂, mifepriston veya progesteron antagonistleri ile,
2. Kısmi kalp defektlerinde yeni doğanda ductus arteriosusun kapanmasını engellemede,
3. Gıda ve İlaç Birliği (FDA) onaylı olarak peptik ülser önlemede ve tedavide (PGE₁, misoprostol),
4. Raynaud's sendromunda veya üyelerin iskemisinde,
5. Pulmoner yüksek tansiyonda,
6. Glukoma tedavisinde (göz damlalarında bimaprost ile),
7. Erektile disfonksiyon tedavisinde veya operasyon sonrası penil rehabilitasyonda (PGE₁, Alprostadil ile)

Bunun yanında çalışmamızın da temelini oluşturan, bu görevi henüz FDA tarafında onaylanmamasına rağmen yaygın olarak dünyanın hemen hemen her ülkesinde doğum indüklemeye kullanılan misoprostol bu kullanım alanlarının başlıcalarıdır [59].

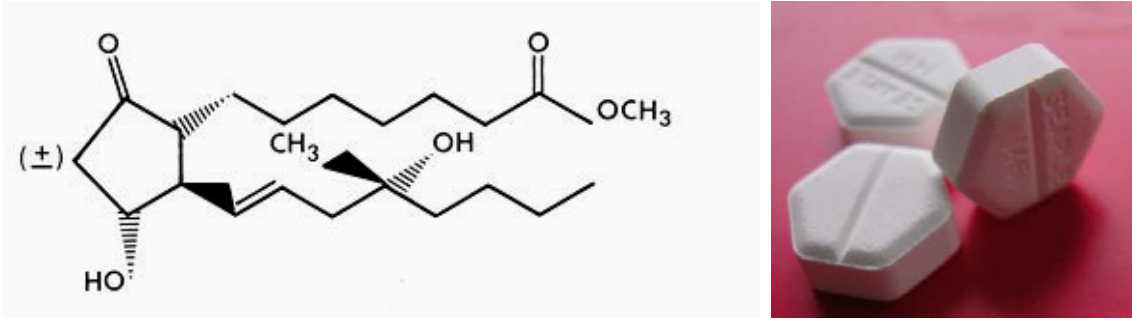
2.4.5.1 PGE1 Analogu : Misoprostol

Son 30 yılda, prostaglandinler ve farklı dozlarının kullanımı servikal olgunlaşma alanında baskındı ancak yeni yeni durağanlaştı. Fakat prostaglandinler geliştirmekte olan ülkelerde hala fiyatları ve saklama koşullarının uygunluğu nedeniyle kullanılmaktadır [64, 65].

Prostaglandinlerin rolleri şimdilerde yeniden ortaya çıkmış ve aslında peptik ülserden korunma ve tedavi olmada geliştirilen PGE₁ analoğu misoprostol üzerinde ilgi yoğunlaşmıştır [66]. En az o kadar etkili, dinoprostone ve placebo ile servikal olgunlaşma ve doğum tetiklemesi çalışmalarında misoprostol en başarılı ilaçtır. [65, 67, 68].

Misoprostol, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış peptik ülser tedavisi ve korunması için hastaların aldığı non-steroid, anti enflamatuvar PGE₁ analoğu bir ilaçtır. Kadın-doğum uygulamalarında da uterotonik ve servikal olgunlaşma aktivitesinden dolayı önemli bir ilaç olmuştur. Misoprostol isteğe bağlı tıbbi ve cerrahi düşüklere, doğum tetiklemesinin ve doğum sonrası kanamaların idaresinde de kullanışlıdır.

Diğer PG preparasyonlarının tersine, misoprostol buzdolabında saklama veya parenteral idare gerektirmez. Misoprostol ayrıca ekonomiktir. [69]



Şekil 2.4.5.1.1 A: Misoprostol'ün moleküler yapısı. **B:** Ticari biçimde satılan 200 mikrogramlık Misoprostol tabletleri.

2.5 Servikal Olgunlaşma

Serviks uterus korpusundan morfolojik ve fonksiyonel olarak homojen olmayışıyla ayrılan kompleks bir organdır [2]. Servikte gebelik boyunca birbirini takip eden iki zıt fonksiyon gerçekleşir. Terme kadar olan dönemde serviks konseptin uterusda tutunabilmesi için gerilmelere karşı dirençli olmak, kapalı ve rijid kalmak zorundadır. Termde de, bunun aksine, esneklik kazanıp doğuma uyum sağlayabilmek için hızla fonksiyon değişikliğine gider. Kısacası, gebelik serviksi yumuşayıp esnekleşerek genişler ve termde servikal olgunlaşma olarak bilinen bir bozulmaya gider [1, 2, 70, 71].

Servikal olgunlaşma uterus kontraksiyonlarından bağımsız olarak gerçekleşen aktif bir biyokimyasal olaydır [9]. Burada inflamatuvar olaylar aktive edilir. Bunlara proinflamatuvar sitokinlerin salınması, beyaz kan hücrelerinin infiltrasyonu, degradatif enzimlerin MMP'ler salınması ve aktivasyonu, ESM proteinlerinin ve glikoproteinlerin değişen sentezi, kollajen dönüşümündeki artış, sıkı düzenli kollajen fibrillerin bozulması, dekorin/kollajen oranındaki değişiklikler [72, 73] ve hyaluronana bağlı olarak hücre dışı sıvının artması dahildir. Çeşitli humoral ajanlar progesteron [74], relaksin [75], prostaglandinler ve proinflamatuvar sitokinler, keza NO gibi lokal düzenleyiciler de dahil pek çok molekül servikal olgunlaşmayla ilgilidir. Aslında servikal olgunlaşma esnasında ESM'nin yeniden düzenlenmesinden sorumlu biyokimyasal mekanizmalar günümüzde hala tam olarak anlaşılmış değildir. Yine de enzimatik degradasyonla ve/veya proteoglikan konsantrasyonunun artmasıyla yani 'dilüsyonla' kollajen liflerin çözülmesi olayı servikal direncin azalmasıyla sonuçlandığı için servikal olgunlaşmanın özünü teşkil eder [76].

Uterus serviksi yukarıda da değinildiği gibi kollajenler, elastin, proteoglikanlar ve hyaluronik asitten ibaret tipik bir bağ dokusudur [77]. Bütün gebelik boyunca bu doku gerilme gücünü sürdürmek zorundadır. ESM'nin yıkılması termde servikal olgunlaşmada ve dilatasyonda çok önemlidir. MMP'ler bu işlerde rol alan bir grup proteazdır [78] ve aktivitesi TIMP'ler tarafından düzenlenir. MMP'ler belli ESM proteinlerini enzimatik yoldan sindirebilme yeteneğindeki çinko bağımlı endopeptidazlardır. Sübstratları kollajenlerden proteoglikanlara ve bir çok glikoproteine kadar değişir. Bugüne kadar bu ailenin 28 üyesi tanımlanmıştır.

Servikal olgunlaşmayı düzenleyen mekanizmalar hakkında çok az bilgi vardır. Çalışmaların bulguları olgunlaşmanın serviksin kollajen ve proteoglikan kompozisyonu değişiklikleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu konuda çalışanlar hyaluronik asidin arttığını, sülfatlı proteoglikanların (örneğin dermatan sülfat, kondroitin sülfat) azaldığını, kollajen fibriller arasındaki bağların zayıfladığını bildirmişlerdir. Kısacası, doğuma yakın servikal gerilme gücündeki azalma kollajen fragmentasyonu artışına [79] ve proteoglikan kompozisyonu değişikliklerine bağlanmaktadır.

Doku gerilme direncini hücresel ve ESM bileşenleri belirler. Servikal ESM [80] esasen kollajen, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan yapıldığından burada gerilme direncinin en büyük iştirakçisi kollajendir. Demetler ya da kılıflar kollajenlerin proteoglikanlar içinde birikip düzenlenmesiyle oluştuğu için proteoglikanlar servikal olgunlaşmada etkili olabilir. Proteoglikanlar kollajen fibriller arasında enine bağların oluşmasında önemlidir. Örneğin, kemikte, kıkırdakta, korneada ve deride kollajen fibril, fibril çapı, fibril uzunluğu ve oryantasyonu farklı olan bu yapılarda gerilme özellikleri de farklı olabilir [16, 81]. Servikal gerilme direncini etkileyen mikrostrüktürel değişikliklerin bilinmesinin serviksin mekanik özelliklerinin araştırılması bakımından da önemi vardır [82].

Biyokimyasal analizlerle kalitatif imaj çalışmaları yardımıyla servikal olgunlaşma zamanında kollajenaz aktivitesine paralel olarak kollajenin fragmente olduğu ve çözünebilir kollajen miktarının arttığı bildirilmiştir [6]. Servikal olgunlaşmanın kollajen aktivitesiyle primer ilişkili olduğunu bildiren bu klasik yaygın görüşe karşı çıkan görüşler de mevcuttur [8]. Bu araştırmacılar ileri gebelikte sıçanda, azalan gerilme gücünü servikte küçük oranda bulunan organize kollajen varlığına bağladılar. Klasik görüşün aksine bu olayda beklenen kollajen fragmentasyon artışı görülmemiştir. Daha ziyade kollajen yapıda fibriller arası aralıkların normale göre arttığı bildirilmiştir [8]. Araştırmacılar burada servikal gerilme direncindeki azalmayı kollajen yarıklanması artışından ziyade enine bağlantıların bozulmasıyla fibril organizasyonu ve oryantasyonundaki düzensizliklerden ileri gelebileceğini rapor etmişlerdir [6, 8].

ESM'nin sürekliliği kollajen oluşumu ve yıkımıyla izlenen dinamik bir olaydır. İleri gebelikte servikal fibroblast apoptozunda bir artış vardır ve bu da yeni kollajen üretiminde azalmaya neden olabilir. Bu nedenle kollajenazlar doğum öncesi servikal olgunlaşmada değil, doğum esnasındaki servikal dilasyonda daha önemli olabilir [6, 8].

Proteoglikanların gerilme direncine katkıları kollajenden az anlaşılmıştır [8]. Bunların tümör oluşumu ve doku tamiri gibi olaylarda fibrillojenesis ve fibril organizasyonunda anahtar rol oynadıkları sanılır. Proteoglikanaz aktiviteli MMP lerin glikozaminoglikan yan zincir protein etkileşimlerini bozduğuna inanılır. Proteoglikanazlarla proteoglikanların bozulması lifi oluşturan kollajen fibrillerin birbirinden ayrılmasına ve gerilme direncinin düşmesine neden olur [8].

MMP'ler ESM dönüşümünden sorumlu bir enzim ailesidir [13, 40]. MMP-2,-3,-7,-9 ve -13 sıçanda gebelik boyunca mevcuttur. MMP-1 insan serviksinde bulunduğu halde sıçanda yoktur. MMP-7 ve-13 ekspresyonunun doğum sonrasında pik yaptığı bildirilmiştir. Bunun uterus involusyonuyla ilişkili olduğu sanılmaktadır. MMP-3 ve -9 gebe tavşanda serviksin yenilenmesiyle ilişkili bulunmuştur [40]. Domuz serviksinde de relaksin

indükeli MMP-2'nin arttığı belirlenmiştir [53, 83]. Gebe sıçanda bir progesteron antagonisti olan mifepriston indükeli servikal olgunlaşmada bir jelatinaz ve tip IV kollajenaz olan MMP-2'nin tip I üçlü helikal kollajen fragmantasyonunu indüklediği gösterilmiştir . Bütün MMP'lerde, MMP-2 hariç, gen transkripsiyonunu düzenleyen promoter elementlerde aynı yapıdadır. MMP-14 ekspresyonunda gebe sıçan serviksinde artış görüldüğü halde bunun istatistiksel yönden önemli olmadığı anlaşılmıştır [11, 50, 83, 84].

MMP-3 ekspresyonu fetal membranlar, uterusun perivasküler dokuları ve miyometriyum dahil bir çok uterus dokusunda gösterilmiştir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda fetal membranların yırtılmasında MMP-3'ün rolü tartışmalıdır. Preterm ve term membran yırtılmaları olan hastalarda fetal membranlarda ve amniyon sıvısında MMP-3'teki artışlar MMP-3'ün bu olaylarda rol alabileceğini göstermektedir [78]. Şimdiye kadar çok az çalışma tarafından gebelik boyunca servikal MMP-3 değerlendirilmiştir [6, 85].

Prostaglandinlerin servikal olgunlaşmaya katıldıklarına inanılır. Prostaglandinlerin bir çok yoldan ESM bileşenlerini düzenlediğine dair bulgular vardır. Prostaglandinlerin sitokin sentezini stimüle ettiği ve proteaz aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir [70, 86]. Örneğin, PGE₂'nin glikozaminoglikanları ve kollajenaz aktivitesini stimüle ettiği, keza hyaluronik sintaz aktivitesini arttırdığı ifade edilmiştir [87]. Aksine, prostaglandinler bazı araştırmacıların bildirdiği gibi gerçek anlamda kollajenaz aktivitesini stimüle etmeyebilir. Servikal olgunlaşma esnasında hyaluronik asit IL-1 sentezini indükleyebilir. Bu şekilde PGE₂ servikte bir kemotaktik etki kombinasyonunda görev alabilir; buna bağlı olarak küçük damar duvarları genişleyebilir ve serviksin lenfosit infiltrasyonunda bir artış olabilir. PGE₂ indükeli servikal olgunlaşma çalışmalarında enzimatik kollajen yıkımında, kollajen olmayan protein sentezinde ve hyaluronik asit konsantrasyonunda artışlar olduğu bildirilmiştir [70, 86, 88].

2.5.1 Servikal Olgunlaşma ve Steroid Hormonlar

Gebe sıçan serviksinde PGE₂'nin 4 farklı reseptörünün (EP-1,-2,-3,-4) olduğu, herbirinin dokuya ve hücreye spesifik eksprese edildiği bildirildi. EP-4'ün servikal dokunun yeniden yapılanmasından sorumlu olduğu sanılmaktadır. Servikal olgunlaşmadan sorumlu reseptörlerin orta gebelikte değil ileri gebelikte ortaya çıktığı gösterildi. Bunlardan EP-4 ekspresyonu ileri gebelikte sıçrama yaparken EP-1 ve EP-3'ün termde erken gebelikte göre daha düşük olduğu belirlendi [85]. EP-2 ekspresyonunun gebelik müddetince değişmediği bildirildi. Bu bulgular PGE₂ indükeli servikal olgunlaşmada EP-4'ün merkezi bir rol oynadığını göstermesi bakımından ilginçtir [85]. Nitekim gebe sıçanda PGE₂ indüklenmesini takip eden 21.günde normal ve PGE₂ uygulanmış hayvanlar arasında servikal gerilme direncinde önemli farkların olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada polarize ışık mikroskopunda normal ve PGE₂ uygulanmış doku kesitlerinde organize fibril alanları ile fragmente olmuş, bozulmuş fibril alanları belirlenmiştir [6].

Sonuçta kontrol hayvanlarına göre PGE₂ indükeli hayvanlarda kollajen organizasyonunda %30 bir azalma belirlenmiştir [16, 69, 86].

Servikal olgunlaşma eksikliği doğumun indüklenmesini ve hızını olumsuz yönde etkileyen önemli engellerden biridir. Kadın doğum uzmanları günümüzde doğumun en kısa zamanda indüklenmesi ve sezeryan doğum oranının en aza indirgenmesi için uterus serviksini olgunlaştıracak çeşitli ajanlar ve metotlar kullanırlar. Servikal olgunlaşma için günümüzde kabul edilebilen metotlar sentetik prostaglandin E₁ (PGE₁) ve prostaglandin E₂ (PGE₂) analogları, oksitosin infüzyonu ve mekanik servikal dilatörlerdir. Servikal prostaglandin E₁ analogu olan misoprostol bugün servikal olgunlaşmada çok yaygın olarak kullanılan ajanlardan biridir [9, 89, 90].

Progesteronun servikal olgunlaşma üzerinde bütün kontrolü sağladığı sanılır. Antiprogestinler, insan dahil bütün türlerde servikal olgunlaşmanın indüklenmesinde de etkili ajanlardır. Kobayda, bir progesteron antagonisti olan promegastonun, onapriston indükeli servikal olgunlaşmayı tamamen bloke etmesi etkinin progesteron reseptörünün aracılığıyla olduğunu gösterir. Fakat, son yapılan çalışmalar sıçanda servikal olgunlaşmanın progesteronun kanda spontan olarak azalmasından kısa süre önce başladığını gösterir. Kobayda, gebelik süresinde östradiol ve östrojen prekürsörü androstendionun olgunlaştırıcı etkilerini, örneğin yüksek progesteron konsantrasyonunda gösterilememiştir. Östradiolün kadınlarda servikal olgunlaşma üzerindeki olumlu etkilerine dair bulgular yoktur [74].

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Servikal Olgunlaşma Modelinin Oluşturulması

Araştırmada, deneye girmemiş ve çiftleşmemiş, ortalama ağırlıkları 250- 300g olan *Rattus norvegicus* türü 90 günlük (120 dişi ve 60 erkek) toplam 180 sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Akdeniz Üniveristesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Yapılacak olan deneyler, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Kullanım ve Bakım Kurulu tarafından incelenerek, çalışmanın bilimsel etik çerçevesinde olduğu ve istenen deney hayvanlarının tahsisinin uygun olduğu kararına varıldı. Normal yem ve musluk suyu ile beslenen sıçanlar dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde kafeslerde 1 gece bırakıldı. Ertesi sabah dişi sıçanlara vajinal simir yapıldı. Simiri sperm pozitif olan sıçanlar gebeliğin 0. gününde kabul edilildi. Dişi sıçanlardan; östrusta, gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası 0. günlerinde 5 kontrol; 12, 16, 20. ve doğum sonrası 0. günlerde ve 1,5 ve 3,0 µg misoprostol uygulama dozuna bağlı olarak 8 deney grubu oluşturuldu. Her çalışma grubunda 8 hayvan vardı. Östrus grubunu oluşturan hayvanlar, vajinal sitolojik örneklerle belirlendi.

İndometasin etanolde (10mg/ml), misoprostol musluk suyunda çözüldü. Öncelikle, indometasin konsantrasyonu 1 ml'de 10 mg olacak şekilde çözüldü. Deney grubunda endojen prostaglandin üretimini inhibe etmek için misoprostol uygulamasından 1 gün öncesi sabahında ve misoprostol uygulamasının yapılacağı günün sabahında erkenden subkutan olarak her hayvana 1mg indometasin enjekte edildi. Bu son indometasin uygulamasından altmış dakika sonra her hayvana birinci deney grubunda 1,5 µg ve ikinci deney grubunda 3 µg oral yolla (gavaj yoluyla) misoprostol verildi. Hayvanlara uygulanan misoprostol dozunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün yetişkin bir dişi insan için belirlediği 60 kg; 400 µg/ 24 saat ilaç uygulaması için kriter olarak alındı [91].

Kontrol hayvanlarına taşıyıcı verildi, belirtilen gebelik yaşlarında servikal doku örnekleri alındı. Misoprostol uygulanan hayvanlardan da uygulamayı takiben 24 saat sonrasında sabahında servikal doku örnekleri toplandı.

3.2 Doku Temini ve Hazırlanması

Kontrol grubu çalışması için östrus, 12 , 16 , 20 , ve doğum sonrası 0. günlerde, deney grubu çalışması için 12 , 16 , 20 ve doğum sonrası 0. günlerde olan hayvanlar eter ile anestezi edildi. Her hayvanın karın ön duvarı açıldı ve uterus boynuzu altında uzanan uterus serviksinden ışık ve TEM için doku örnekleri toplandı.



Şekil 3.2.1 A:Dişi sıçanın abdominal disseksiyonu. **B:**Dişi sıçanın uterusu (ok) ve serviksi (ok başı).

Işık mikroskobu çalışması için alınan servikal doku örnekleri Holland fiksatifinde (1000ml distile suda; % 40 lık 100 ml formaldehit + 5 ml glasiyal asetik asit + 40 gr pikrik asit + 2,5 gr bakır asetat) 4 -12 saat tesbit edildi. TEM için alınan servikal doku örnekleri de %4'lük gluteraldehitte prefiksasyon ve %1'lik OsO₄'te postfiksasyona bırakıldı.

3.3 Işık Mikroskobu Çalışması

Holland fiksatifinde 4 saat tesbit edilen kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait serviks dokusu örnekleri daha sonra 6 – 7 saat akar musluk suyunda yıkandı ve sıra ile %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinde birer gün tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Ardından ksilol içinde 3 kez 5 - 7'şer dakika şeffaflaştırmak üzere bekletilerek 58°C'ye ayarlı etüv içinde bulunan erimiş parafin içine koyuldu. 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutulduktan sonra etüv dışında temiz erimiş parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere rutin ışık mikroskobik ve immünohistokimyasal teknikler uygulandı.

Her iki gruba ait serviks dokusu örneklerinden 5-7 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve seri kesitlerde her iki kesitten biri alınmak üzere her hayvan için 10 kesit toplandı. Kesitlerden bir kısmı ışık mikroskobik oryantasyon amacıyla hematoksilin – eozin ile boyandı ve Axioplan, Zeiss (Almanya) ile incelendi.

3.4 İmmünohistokimyasal Protokol

Alınan 5 µm kalınlığındaki parafin kesitlerden bazıları Poli-L-Lizin kaplı lamlar üzerine alınarak bir gece 56 derecelik etüvde bekletildi. Deparafinasyon için iki kere onar dakika ksilollerden geçirildi ve her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Daha sonra, distile suda çalkalandı ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, Ph: 7.2 -7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 0,2 M borik asit tamponuna (pH:7.0) konularak 60 derecelik etüvde bir gece bekletildi ve etüv dışında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

Bunu takiben çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile sudan ve PBS 'ten geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için kesitler % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dakika inkübe edildi. Distile suda çalkalanıp PBS 'te yıkanan kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklayıcı serumu (LabVision UVBlock) ile 5 dakika muamele edildi serumun fazlası alınarak kesitler, tavşan poliklonal anti-kollajen tip I(Cedarlanes, CL50141AP, Rabbit Anti-Rat, Canada) , tavşan poliklonal anti-kollajen tip IV (Cedarlanes, CL50441AP, Rabbit Anti-Rat, Canada) ve keçi poliklonal anti-MMP-3 (SantaCruz Biotechnology, Inc., SC-6984, Goat Anti-Rat, USA) antikolarıyla oda sıcaklığında iki saat süreyle inkübe edildi. Kullanılan MMP-3 antikoruna, bu enzimin hem pro (inaktif) hem de aktif formunu tanımlar. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun serum (eşek ve keçi) (SantaCruz Biotechnology, Inc., SC-2051, -2053, Goat Anti-Rat, USA) uygulandı. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Bunu sırası ile , 30 dakikalık biyotinli sekonder antikor (SantaCruz Biotechnology, Inc., SC-2051, -2053, Goat Anti-Rat, USA) ve streptavidin – peroksidaz kompleksi (SantaCruz Biotechnology, Inc., SC-2051, -2053, Goat Anti-Rat, USA) ile inkübasyon ve her iki inkübasyon arasında ve son inkübasyonu takiben, tekrar PBS'le üç kere beşer dakika yıkama uygulandı. Ardından sinyali geliştirmek için dokular 3' Diamino benzidin (DAB) kromojeni (K3466, Dako, Denmark) ile muamele edildi ve musluk suyunda yıkandı. Dokular Mayer'in Hematoksilin'inde 10 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra alkol serilerinden geçirilerek ksilole getirildi. 10 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. Boyanmış kesitler Zeiss Axioplan ışık mikroskopunda (Zeiss Oberkochen,Germany) değerlendirildi ve fotoğraflandırıldı.

3.5 TEM Protokolü

TEM çalışması için toplanan kontrol ve deney grubuna ait servikal doku örnekleri pre ve postfiksasyon sonrasında %6,5'lik sakkoroz çözeltisinde yıkandı ve dehidrate edildi. Dehidratasyon devam ederken, %1'lik uranil asetat ile dokulara kontrast vermek amacı ile inkübasyon gerçekleştirildi. Dehidratasyon ise uranil asetat aşamasından sonra, %100'lüğe kadar artan alkol serileri ile propilenoksite kadar devam ettirildi. Bu aşamadan sonra eşit hacimlerde alınarak hazırlanan propilenoksit-araldit (Araldit CY 212, DDSA, BDMA) karışımında dokular oda sıcaklığında, rotatorda 1 gece bırakıldı. Ertesi gün, dokular araldit solüsyonuna alınarak rotatorda 4 saat döndürüldü. Ardından gömme işlemine geçildi. Araldite gömülen dokular polimerizasyon için 60 derecedeki etüvde 48 saat bırakıldı. Kapsüllerden çıkarılan doku bloklarından ultramikrotom (Leica Ultracut UCT, Austria) ile 300 nm'lik kalın ve 70 nm'lik ince kesitler 100 meshlik bakır gridlere alınıp, uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlanarak incelemeye hazırlandı.

Gebeliğin farklı dönemlerine ait serviks kesitlerinde;

1- Işık mikroskopu düzeyinde MMP-3, kollajen tip I ve IV' ün dağılımlarına ve immunoreaktivite şiddetine,

2- TEM düzeyinde serviks ultrastrüktüründeki (hücrelerde ve doku kollajeninde) değişikliklere bakıldı ve fotoğraflandırıldı (TEM LEO 906E, Zeiss Oberkochen, Germany).

3.6 İstatistiksel Analiz

3.6.1 Semikantitatif Değerlendirme

Deney ve kontrol grubuna ait serviks dokularında MMP-3, kollajen tip I ve kollajen tip IV immünboyanması pozitif olan hücre sayılarının değerlendirilmesi HSCORE ile yapıldı. İmmünohistokimyasal tekniklerle boyanan kesitler özel bir oküler skalası kullanılarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Deney ve kontrol gruplarına ait kesitlerden rastgele 3'er kesit seçildi. Her bir kesitte 5 bölge uygun büyütmede (X200) antikorların immünohistokimyasal boyanmalarının analizi için değerlendirildi. Boyanmalar, kesitteki özel boyanmanın yoğunluğu temel alınarak semikantitatif olarak skorlandı.

İmmunoreaktif alanların boyanma yoğunlukları da [-: Negatif; (+): Çok zayıf pozitif +: Zayıf pozitif; ++: Orta; +++: Kuvvetli pozitif; ++++: Çok kuvvetli pozitif] şeklinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızın kontrol ve deney grubunu oluşturan gebe sıçanların serviks dokusunda ışık mikroskobik düzeyde kollajen I, kollajen tip IV ve MMP-3 antikorlarının kas dokusunda, lümen epitelinde, stromada, bezlerde, endotel ve epitel bazal laminaında immün boyanma yoğunluklarına bakıldı. Ayrıca kontrol ve deney gruplarına ait immün boyanma yoğunlukları HSCORE ile semikantitatif olarak değerlendirildi.

Elektron mikroskobik düzeyde, kontrol ve deney gruplarına ait gebe sıçanların serviks dokusunda epitelde ve stromal hücrelerde, keza ekstraselüler matrikste özellikle de kollajen yapısındaki ultrastrüktürel değişikliklere bakıldı.

4.1 Işık Mikroskobik Bulgular

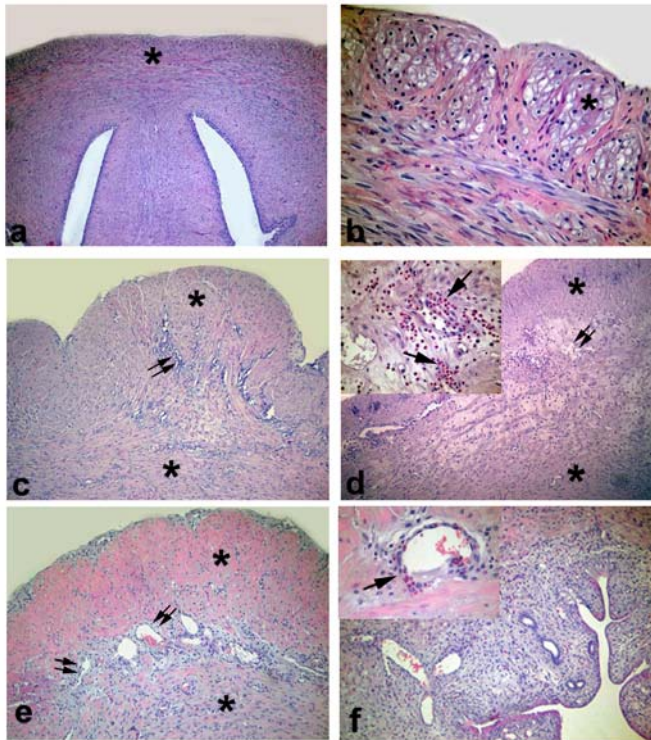
Hematoksilen-eozin ile boyanan östrus sıçanı serviksinden alınan enine kesitlerde, genelde lümen epitelinin uterustan vajinaya doğru tek katlı prizmatikten çok katlı prizmatik yapıya değiştiği, vajinaya komşuluğunda da çok katlı yassı olduğu görüldü. Lamina propria sıkı bağ dokusu görünümündeydi. Lamina propriada bezler vardı. Yüzey ve bez epiteli hücreleri arasında mukus salgılayan hücreler gözlemlendi. Lamina propriayı dıştan enine ve boyuna kas tabakası sarmaktaydı. En dışta seroza tabakası bulunmaktaydı. (Şekil 4.1.1. a,b)

Gebeliğin 12. gününde az da olsa stromada lökositlerde görünüşte bir artış vardı, bazıları epitele penetre olmuştu. Lümendeki mukusta serbest lökositler gözlemlendi. Gebeliğin 16. gününde enine ve uzunlamasına kas tabakaları arasında açılmalar gözlemlendi. İki kas tabakası arasındaki bağ dokusunda keza lamina propriada damarlanma artmıştı. Gebeliğin 20. gününde kas dokusunda ve stromal yapıda 16. güne göre oldukça büyük değişiklikler gözlemlendi. Lümen epiteli mukus hücresi artışı gösteren köpüklü görünümündeydi. Lamina propriada yer yer stromal yapıda açılmalar vardı. Kas demetleri keza kas hücreleri arasında ayrılmalar gözlemlendi. Doğum sonrası sıfırıncı günde lümen epitelinde ve stromada lökosit infiltrasyonu kuvvetliydi ve yaygındı. Bu devrede kas tabakaları keza kas hücreleri arasındaki ayrılmalar oldukça belirgindi. Lamina proprianın ödemli bir yapısı vardı. (Şekil 4.1.1. c,d)

Düşük doz (1,5 µg) misoprostol verilen 12 günlük gebe sıçan serviksinde kontrol grubundakine benzer lökosit infiltrasyonu gözlemlenmedi. Ancak lamina propriada kontrol grubundakinin aksine ödemli bir yapı vardı. Keza kas tabakaları arasındaki ayrılmalar dikkat çekiciydi. Gebeliğin 16. gününde lamina propriada ödemli yapılarda artış gözlemlendi. Bu devrede epitelde ve bağ dokusunda lökosit infiltrasyonu dikkat çekiciydi. Gebeliğin 20.

gününde serviks stromasında yoğun bir lökosit infiltrasyonu vardı. Lamina propriyada ve kas tabakaları arasındaki bağ dokusunda yoğun damarlanma keza ödemli alanlar vardı. (Şekil 4.1.1. e)

Yüksek doz (3,0 µg) misoprostol verilen 12 günlük sıçan serviksindeki histolojik değişiklikler kontrol serviksindeki gibiydi. Gebeliğin 16. gününde lamina propriyada ödemler, keza kas demetleri arasında açıklıklar yoktu. Gebeliğin 20. gününde kas tabakaları arasındaki açıklıklar çok dikkat çekiciydi. Lümen epitelinin mukus hücre sayısı artışıyla ilgili köpüklü bir görünümü vardı. Doğum sonrası sıfırıncı gündeki serviks yapısı lamina propriyada lökosit infiltrasyonunun yüksek olması kas demetleri keza kas hücreleri arasındaki açıklıkların artması ile kontroldekine benzemekteydi. (Şekil 4.1.1. f)



Şekil 4.1.1

Hematoksilen-eozin ile boyanmış sıçan serviksi kesitleri.

a,b: Östrus evresinde sıçan serviksi. Uzunlamasına(*) ve enine yerleşmiş kas tabakalarının ayrıca lamina propriyanın sıkı yapısı dikkat çekmektedir. Morfolojide bir değişime rastlanmamıştır. Objektif büyütmesi aX10, bX40 **c:** Kontrol grubu 20 günlük gebe sıçan serviksi kesiti. Kas tabakaları arasında yer alan bağ dokuda açılmalar (çift ok) görülmektedir. Objektif büyütmesi X10 **d:** kontrol grubu doğum sonrası 0. günde sıçan serviksi. Kas tabakaları aras açılmalar (çift ok) ilerlemiş. İç resim: dokuya yoğun PMNL göçü (ok) izlenmektedir. Objektif büyütmesi X10, iç resimX40 **e:** Düşük doz misoprostol verilen grupta doğum sonrası 0. günde sıçan serviksi. Kas tabakalarının (*) sıkı yapısında açılmalar ve damarlanmada artış (çift ok) görülmektedir. Objektif büyütmesi X10**f:** Yüksek doz misoprostol verilen grupta doğum sonrası 0. günde sıçan serviksi. Lamina propriyanın sıkı yapısında açılmalar ve damarlanmada artış (iç resim, ok) izlenebilmektedir. Objektif büyütmesi X10, iç resimX40

4.2 Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1 Östrus sıçanı serviksi

4.2.1.1 Kollajen tip I

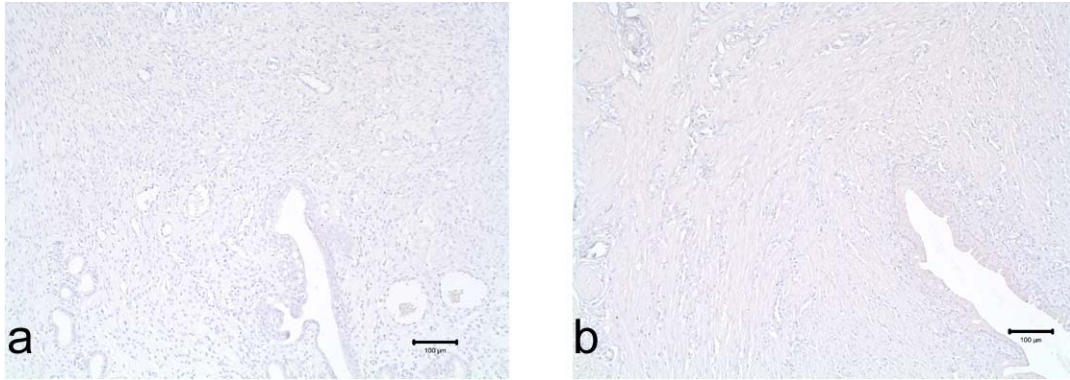
Östrusta bulunan sıçan serviksinde genelde kas dokusu dışında diğer dokularda kollajen tip I antikoruna immün boyanma zayıf şiddetteydi. Kollajen tip I antikoruna ile kuvvetli boyanan kas dokusunun aksine çok katlı prizmatik lümen epitelinde damar endotelinde ve stromada boyanma şiddeti zayıftı. Uzunluğuna kasın bütününde enine kasında bu kasa komşuluğunda kuvvetli kollajen tip I immün boyanması vardı. (Şekil 4.2.1.1.a,d; Çizelge 4.2.1.)

4.2.1.2 Kollajen tip IV

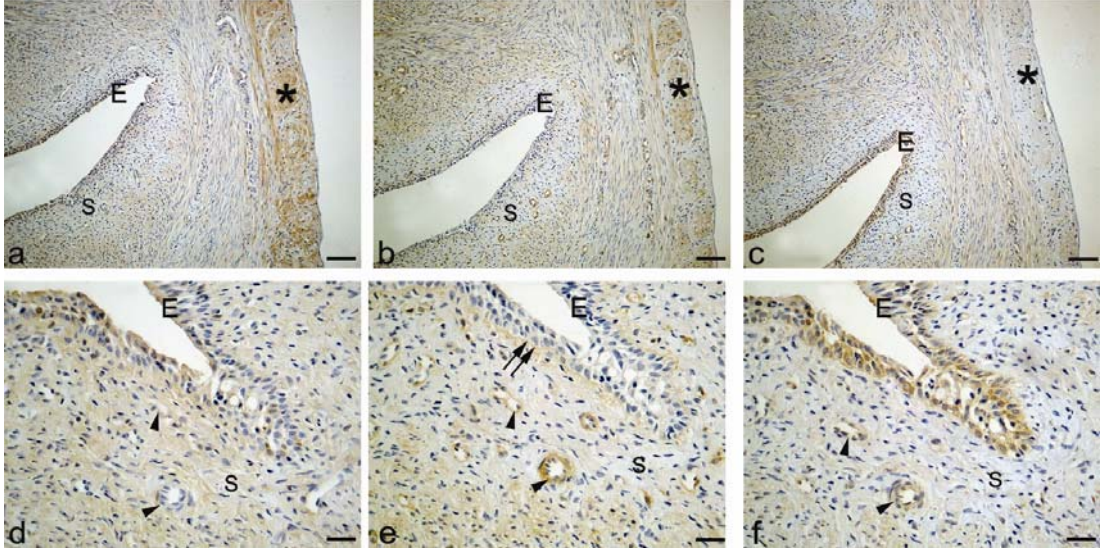
Bu devrede serviksin çok katlı prizmatik lümen epiteli kollajen tip IV antikoruna ile boyanmamıştı. Lümen epiteli bazal laminaşında boyanma zayıftı. Küçük damarlarla ven duvarları kollajen tip IV antikoruna ile zayıf, büyük damar duvarları da orta şiddette boyanmıştı. Enine kas tabakasında zayıf şiddette uzunluğuna kas tabakasında da orta şiddette immün reaksiyon görüldü. Stromada immün boyanma çok zayıftı. (Şekil 4.2.1.1. b,e; Çizelge 4.2.1.)

4.2.1.3 MMP-3

MMP-3 antikoruna ile serviksin çok katlı prizmatik lümen epiteli orta şiddette boyandı. Stromada immün boyanma şiddeti çok zayıftı. Damar duvarında, küçük damar endotelinde keza enine ve uzunluğuna kas tabakalarında MMP-3 antikoruna ile zayıf şiddette immün reaksiyon vardı. (Şekil 4.2.1.1. c,f; Çizelge 4.2.1.)



Şekil 4.2.1 İmmünohistokimyasal boyamalara ait negatif kontroller. a: keçi poliklonal antikor için negatif kontrol, b: tavşan poliklonal antikor için negatif kontrol. Objektif büyütmesi X10



Şekil 4.2.1.1 Östrus evresindeki sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları.
a,d: Kollajen I, epitel hücrelerinde (E), stromal alanda (S), damar endotelinde (ok başı) ve dairesel kas tabakasında (*) zayıf immünpozitif iken uzunlamasına kas tabakasında kuvvetli immünpozitifdir.
b,e: Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) ve serviksın uzunlamasına kas tabakasında (*) orta şiddette immünpozitif iken lümen epitelı bazal lamınası (çift ok) ve enine kas tabakasında (*) zayıf, stromada (S) ise çok zayıf immünpozitifdir. Epitel hücrelerinde (E) immünonegatiftir.
c,f: MMP-3, epitel hücrelerinde (E) orta şiddette immünpozitif iken kas tabakalarında (*), damar duvarında (ok başı) zayıf immünpozitifdir. MMP-3 stromada ise (S) çok zayıf immünpozitifdir.
 Objektif büyütmesi a-cX10, d-eX40

4.2.2 12.günde gebe sıçan serviksi

4.2.2.1 Kollajen I

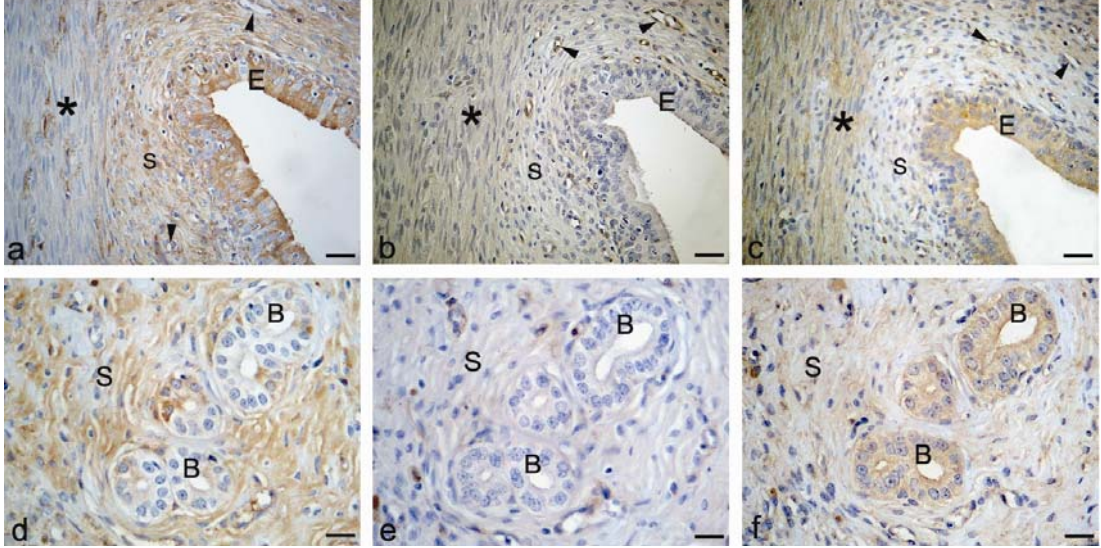
Serviksın çok katlı prizmatik lümen epitelı kollajen tip I antikorı ile kuvvetli boyandı. Mukus hücreleri epitelde açık alanlar halindeydi. Bezlerin az sayıdaki bazı epitel hücrelerinde kollajen tip I boyanması kuvvetliydi. Kollajen tip I antikorı ile kuvvetli boyanan stromada lökosit infiltrasyonu belirgindi. Damar endotelinde zayıf, enine kas tabakasında da çok zayıf şiddette kollajen tip I immün reaksiyonu görüldü. (Şekil 4.2.2.1. a,d, Çizelge 4.2.1.)

4.2.2.2 Kollajen tip IV

Kollajen tip IV antikorı boyanması 12 günlük sıçan serviksinde yoğun değildi. Çok katlı prizmatik lümen epitelı ve bez epitelı bazal lamınasında kollajen tip IV antikorı boyanması çok zayıf şiddetteydi. Damar duvarında ve küçük damar endotelinde orta şiddette bir kollajen tip IV boyanması vardı. Enine ve boyuna kas tabakalarında da epiteldekine benzer çok zayıf şiddette kollajen IV immün boyanması görüldü. (Şekil 4.2.2.1. b,e, Çizelge 4.2.1.)

4.2.2.3 MMP-3

MMP-3 antikoruna ile serviks dokularında genelde boyanma yaygındı. Çok katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde, keza damar endotelinde orta şiddette MMP-3 immün reaksiyonu görüldü. Gebeliğin 12. gününde kas dokusunda orta şiddette olan immün reaksiyon östrus devresine göre daha yüksekti. (Şekil 4.2.2.1. c,f, Çizelge 3)



Şekil 4.2.2.1 Kontrol grubunda 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları.
a,d: Kollajen I, epitel hücrelerinde (E), stromal alanda (S) ve stromal bezlerin epitel hücrelerinde (B) kuvvetli immünpozitif iken dairesel kas tabakasında (*) çok zayıf immünpozitifdir. Damar endotelinde kollajen tip I zayıf immünpozitifdir.
b,e: Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) orta şiddette immünpozitif iken serviks dairesel kas tabakasında (*), lümen ve bez epitel bazal laminalarında (çift ok) çok zayıf immünpozitifdir. Epitel hücrelerinde ise (E) immünonegatifdir.
c,f: MMP-3, kas tabakasında (*), epitel hücrelerinde (E), stromal bezlerde (B) ve damar duvarında orta şiddette immünpozitif iken stromal alanda (S) zayıf şiddette immünpozitifdir. Objektif büyütmesi a-c;X40 d-f;X160

4.2.3 16.günde gebe sıçan serviksi

4.2.3.1 Kollajen I

Bu devrede sıçan serviksini tek katlı prizmatik lümen ve bez epitel kollajen tip I antikoruna ile boyanmamıştı. Ancak 12. günde olduğu gibi stromada kollajen tip I antikoruna immün reaksiyonu kuvvetliydi. Damar duvarında, özellikle vande kuvvetli kollajen tip I immün boyanması vardı. Kas dokusunda ise kollajen tip I immün reaksiyonu negatifti. (Şekil 4.2.3.1.a,d, Çizelge 4.2.1.)

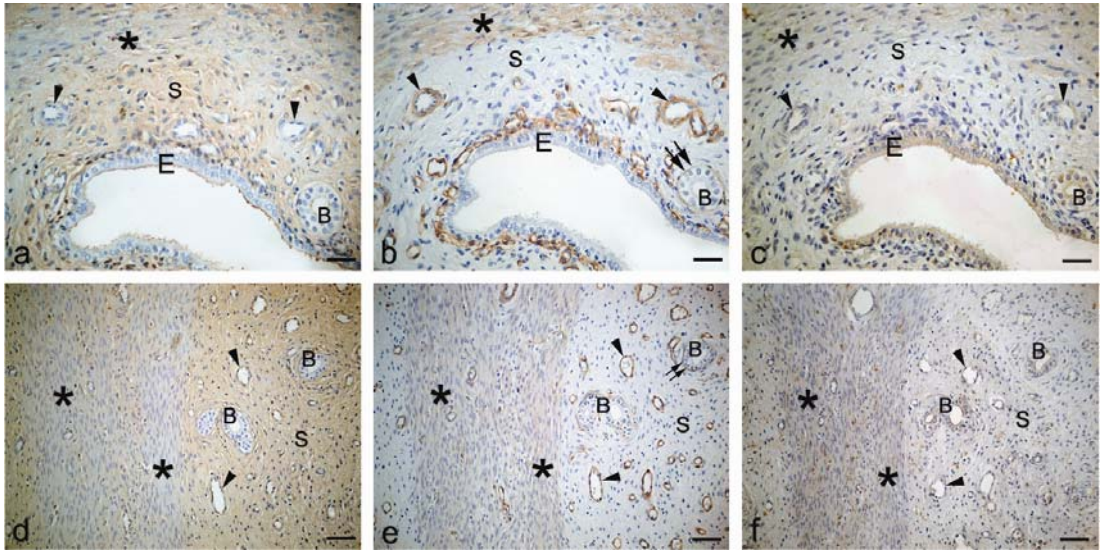
4.2.3.2 Kollajen tip IV

16 günlük gebe sıçan serviksini tek katlı prizmatik lümen epitel bazal laminalarında kollajen tip IV antikoruna ile boyanma olmadığı halde, bez

epiteli bazal laminasında orta şiddette immün reaksiyon görüldü. Stromada boyanma yoktu. Lümen epiteline komşu bağ dokusu damardan zengindi. Damar duvarında kuvvetli immün reaksiyon görüldü. Kas dokusunda da orta şiddette yaygın bir kollajen tip IV immün boyanması vardı. (Şekil 4.2.3.1. b,e, Çizelge 4.2.1.)

4.2.3.3 MMP-3

MMP-3 antikoru ile 16 günlük sıçan serviksinde tek katlı prizmatik lümen ve bez epiteli orta şiddette immün boyandı. Diğer dokulardan damar endotelinde ve kasta zayıf, stromada çok zayıf bir immün reaksiyon vardı. (Şekil 4.2.3.1. c,f, Çizelge 4.2.1.)



Şekil 4.2.3.1 Kontrol grubunda 16 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I (a, d), kollajen IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) ve damar endotelinde kuvvetli immünopozitif iken epitel hücrelerinde (E), stromal bezlerde (B) ve kas tabakasında (*) immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) kuvvetli şiddette immünopozitif iken serviksin dairesel kas tabakasında (*) ve stromal bez epiteli bazal laminasında (çift ok) orta şiddette immünopozitifdir. Kollajen tip IV stromada ise (S) çok zayıf immünopozitif iken epitel hücrelerinde ise (E) immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde (B) orta şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) ve damar duvarında çok zayıf; enine kas tabakasında ise zayıf şiddette immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-c; X80 d-f; 40

4.2.4 20.günde gebe sıçan serviksi

4.2.4.1 Kollajen I

Bu gebelik yaşında gebe sıçan serviksinin çok katlı prizmatik lümen epitelinde kollajen tip I antikoru ile orta şiddette bir boyanma vardı. Stromada ve damar endotelinde kollajen tip I immün reaksiyonu zayıf şiddetteydi. Aksine, kas tabakaları arasındaki bağ dokusunda ve damar endotelinde kuvvetli kollajen tip I immün reaksiyonu görüldü. Uzunlamasına kasta

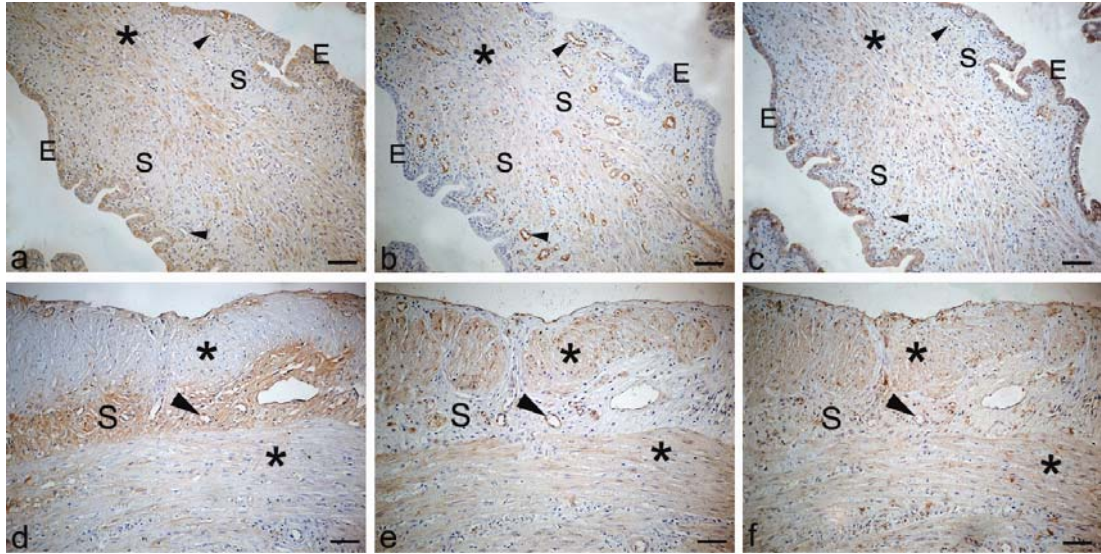
boyanma olmadığı halde enine kasta çok zayıf şiddetteydi. (Şekil 4.2.4.1. a,d, Çizelge 4.2.1.)

4.2.4.2 Kollajen tip IV

20 günlük sıçan serviksinde kollajen tip IV antikoru reaksiyonu damar duvarında ve kas tabakasında, yaygın olarak kuvvetliydi. Stromada kollajen tip IV immün boyanması çok zayıf şiddetteydi. Çok katlı prizmatik epitelin bazal laminası boyanmamıştı. Genelde serviksin immün boyanma reaksiyonu 16. günde benzemekteydi. (Şekil 4.2.4.1. b,e, Çizelge 4.2.1.)

4.2.4.3 MMP-3

MMP-3 antikoru ile çok katlı prizmatik lümen bu gebelik yaşında orta şiddette boyandı. Stromada ve damar endotelinde zayıf şiddette MMP-3 immün boyanması vardı. Enine ve boyuna kas tabakalarında MMP-3 immün reaksiyon şiddeti kuvvetliydi. (Şekil 4.2.4.1. c,f, Çizelge 4.2.1.)



Şekil 4.2.4.1 Kontrol grubunda 20 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) zayıf, dairesel kas tabakasında (*) çok zayıf, damar endotelinde (ok başı) kuvvetli immünopozitif iken epitel hücrelerinde (E) orta şiddette immünopozitifdir. Kollajen tip uzunlamasına kas tabakasında (*) immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı), dairesel ve uzunlamasına kas tabakalarında (*) kuvvetli şiddette immünopozitif iken serviksin ve stromada ise (S) çok zayıf immünopozitifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E) orta şiddette immünopozitif iken kas tabakalarında(*) kuvvetli immünopozitifdir.Stromal alanda (S) zayıf kollajen tip immünopozitivitesi varken damar duvarında (ok başı) ekspresyon çok zayıf şekildedir.Obj. büyütmesi a-f;X20

4.2.5 Doğum Sonrası 0. günde sıçan serviksi

4.2.5.1 Kollajen I

Doğum sonrası serviksin çok katlı prizmatik lümen epitelinde kollajen tip I antikoru boyanması yok denecek kadar azdı. Stromada yaygın olarak

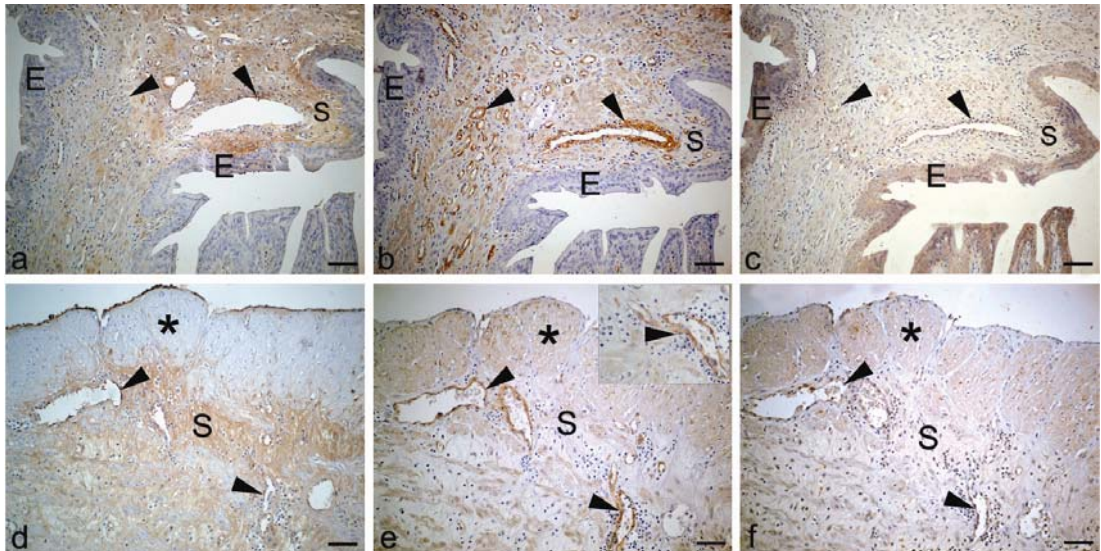
kuvvetli bir immün reaksiyon gözlemlendi. Bağ dokusu bütününde özellikle de damarların çevresinde lökosit infiltrasyonu yoğundu. Bazı damar endotelinde kollajen tip I immün boyanması zayıf şiddetteydi. Kas tabakalarında ise boyanma gözlemlenmedi. (Şekil 4.2.5.1. a,d, Çizelge 4.2.1.)

4.2.5.2 Kollajen tip IV

Stromal dokuda zayıf şiddette olan kollajen tip IV immün reaksiyonu damar duvarında yoğun olarak çok kuvvetli, kas tabakalarında kuvvetliydi. Lökosit infiltrasyonu stromada yaygın olarak çok yoğundu. Genelde doğum sonrası serviksin immün reaksiyonu doğum öncesi 20. gündekine benzemektedir. (Şekil 4.2.5.1. b,e, Çizelge 4.2.1.)

4.2.5.3 MMP-3

MMP-3 antikoru ile doğum sonrasında serviksin çok katlı prizmatik lümen epitel kuvvetli, stroma orta şiddette immün reaksiyon gösterdi. Damar duvarında MMP-3 immün boyanması orta şiddette ve yaygındı. Kas tabakalarında immün boyanma şiddeti kuvvetliydi ve doğum öncesi 20. gündekine benzerdi. (Şekil 4.2.5.1. c,f, Çizelge 4.2.1.)



Şekil 4.2.5.1 Kontrol grubunda doğum sonrası 0. gün sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) kuvvetli immünopozitif iken damar endotelinde ve epitel hücrelerinde (E) çok zayıf immünopozitifdir. Uzunlamasına ve dairesel kas tabakaları (*) immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) çok kuvvetli, uzunlamasına ve dairesel kas tabakalarında (*) ise kuvvetli şiddette immünopozitif iken serviksin stromasında (S) zayıf immünopozitifdir. Epitel hücrelerinde kollajen IV (E) immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E), uzunlamasına ve dairesel kas tabakalarında (*) kuvvetli şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) ve damar duvarında (ok başı) orta şiddette immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-f;X20

Kontrol grubu sıçan serviksinde kollajen tip I antikoru reaksiyonunun embriyonal 12. günde diğer yaşlara göre daha şiddetli olduğu ve bütün dokularda görüldüğü gebeliğin 20. gününde de özellikle stromada daha da

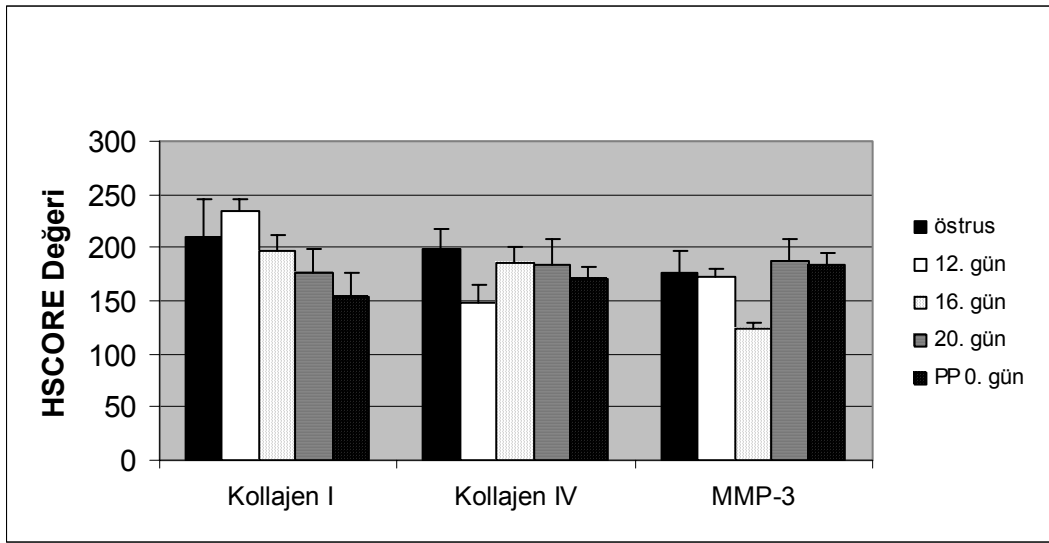
düştüğü gözlendi. Kollajen tip IV antikoru reaksiyonu genelde farklı yaşlarda damar duvarında ve kas tabakasında diğer dokulara göre daha şiddetliydi. Lümen epitelinde ve bez epitelinde gebeliğin 12. gününde çok zayıf şiddette olan kollajen tip I antikoru reaksiyonu 20. günde keza doğumdan sonra gözlenmedi. MMP-3 antikoru reaksiyonu 12. günde östrusa göre artmıştı ve hemen bütün dokularda orta şiddetteydi. 20. günde özellikle kas tabakasında kollajen tip I reaksiyon şiddeti kuvvetliye yükseldi. Bu durum doğumdan sonra sıfırınıcı günde de gözlendi. (Çizelge 4.2.1.)

Çizelge 4.2.1 Kontrol grubunun sıçan serviksinde östrusta, gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası sıfırncı (PP0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikorlarının immün boyanma yoğunlukları.

-: Negatif (+): Çok Zayıf Pozitif +: Zayıf Pozitif ++: Orta +++:Kuvvetli ++++: Çok kuvvetli Φ : Kesitte yapı çıkmamış

	Östrus			12. gün			16. gün			20. gün			PP 0. gün		
	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3
Lümen epiteli	+	-	++	+++	-	++	-	-	++	++	-	++	(+)	-	+++
Lümen epiteli bazal laminası	-	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lamina propriya	+	(+)	(+)	+++	-	+	+++	(+)	(+)	+	(+)	+	+++	+	++
Stromal bezler	Φ	Φ	Φ	+++	-	++	-	-	++	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ
Bez bazal laminası	Φ	Φ	Φ	-	(+)	-	-	++	-	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ
Damar duvarı Endotel/Kas	+/-	++/+++	+/+	+/-	++/+++	++/+++	+++/-	+++/+++	+/-	+++/-	+++/+++	+/-	+/-	++++/++++	++/++
Enine kas	+	+	+	(+)	(+)	++	-	++	+	(+)	+++	+++	-	+++	+++
Uzunlamasına kas	+++	++	+	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ	-	+++	+++	-	+++	+++

Kontrol grubunun sıçan serviksinde östrus, gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası sıfırıncı günlerde kollajen I, -IV ve MMP-3 antikoru boyanma yoğunluklarının ortalama HSCORE değerlerine genel olarak bakıldığında; kollajen tip I antikoru HSCORE değerlerinin östrus ve gebeliğin 12. gününden itibaren 20. ve PP 0. gününe kadar giderek düştüğü görülmektedir. Gebeliğin 20. ve PP 0. günündeki bu değerler 12. güne göre istatistiki olarak da anlamlıdır ($p<0,05$). Kollajen tip IV antikoru HSCORE değerleri de östrustan gebeliğin sonuna doğru düşmektedir. PP 0. günde 20. güne göre daha da düşüktür ve östrusa göre de istatistiki olarak anlamlıdır ($p<0,05$). MMP-3 antikoru HSCORE değerleri ise östrus ve gebeliğin 12. gününe göre gebeliğin 20. ve PP 0. günlerinde artış göstermekle beraber istatistiki olarak anlamlı değildir. (Şekil 4.2.2., Çizelge 4.2.2.)



Şekil 4.2.2 Kontrol grubunun sıçan serviksinde östrusta, gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırıncı (PP 0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikollarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri histogramı. (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.2.2 Kontrol grubunun sıçan serviksinde östrusta, gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırıncı (PP 0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikollarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri. (Ortalama ± Standart sapma).

	Östrus	Gebelik Günleri			PP 0. gün
		12. gün	16. gün	20. gün	
Kol I	210±36,0 ^a	234±11,4 ^{b,c,d}	196±15,1 ^{b,e}	177±22,2 ^c	154±23,0 ^{a,d,e}
Kol IV	198±18,9 ^{f,g}	148±16,4 ^{f,h,i}	185±15 ^h	184±23,2 ⁱ	171±10,8 ^g
MMP-3	176±20,7 ^k	172±8,3 ^l	124±5,4 ^{k,l,m,n}	187±21,6 ^m	184±11,4 ⁿ

^{a-n} $p<0.05$

4.3 Deney Grubu I İmmünohistokimyasal Bulgular

Bu deney grubunda gebe hayvanlara oral yolla 1,5 mikrogram Misoprostol verildi.

4.3.1 12. günde gebe sıçan serviksi

4.3.1.1 Kollajen I

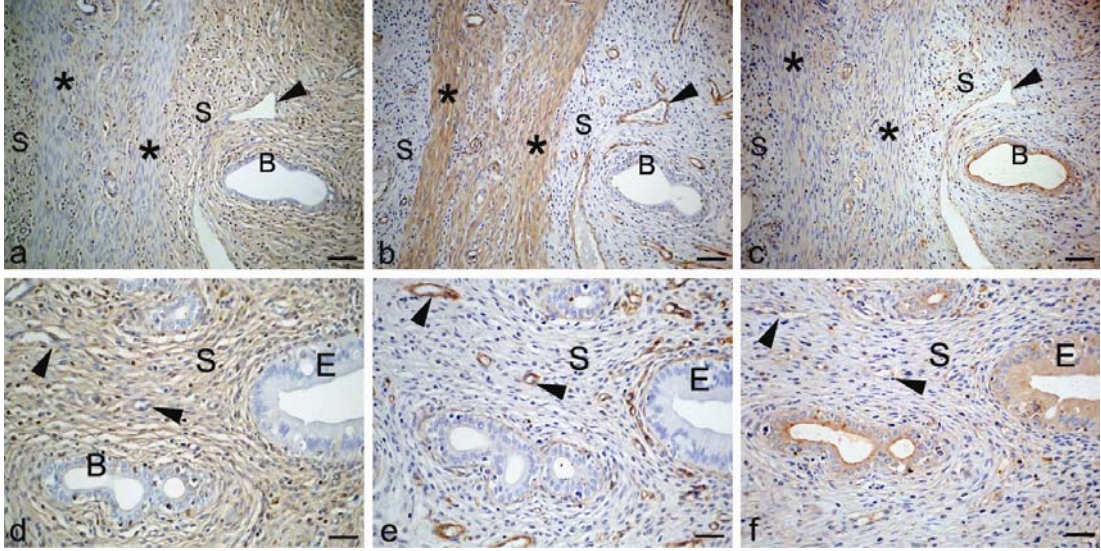
1,5 mikrogram Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde tek katlı prizmatik lümen ve bez epiteli kollajen tip I antikoruna ile immün boyanmadı. Stromada kuvvetli kollajen tip I immün reaksiyonu vardı. Damar endotelinde kollajen tip I ile orta şiddette boyandı. Kas tabakasında immün boyanma çok zayıftı. Stromada ve kasta görülen kollajen tip I reaksiyonu 12. günlük kontrol grubundaki benzerdi. (Şekil 4.3.1.1. a,d, Çizelge 4.3.1.)

4.3.1.2 Kollajen tip IV

Sıçan serviksinde kollajen tip IV antikoruna ile boyanma genelde yaygındı. Tek katlı prizmatik lümen epiteli bazal laminaasında kollajen tip IV reaksiyonu kuvvetliydi. Bez epiteli bazal laminaasında orta şiddette kollajen tip IV reaksiyonu vardı. Stromada çok zayıf, kas tabakasında ve damar duvarında ise çok kuvvetli kollajen tip IV immün reaksiyonu görüldü. 1,5 mikrogram Misoprostol verilen 12 günlük servikste kollajen tip IV immün reaksiyonu aynı yaşdaki kontrole göre daha yoğundu.(Şekil 4.3.1.1. b,e, Çizelge 4.3.1.)

4.3.1.3 MMP-3

MMP-3 antikoruna bu gebelik yaşındaki servikste tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde kuvvetli immün boyanmıştı. Damar endotelinde zayıf, stromada ve kas tabakalarında çok zayıf şiddette MMP-3 immün reaksiyonu vardı. İmmün boyanma yoğunluğu aynı yaşdaki kontrol serviksine göre genelde daha azdı. (Şekil 4.3.1.1. c,f, Çizelge 4.3.1.)



Şekil 4.3.1.1 Düşük doz misoprostol verilen grubun 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen I, kollajen tip IV , MMP-3 immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) kuvvetli ve damar endotelinde orta şiddette immünopozitif iken dairesel kas tabakasında (*) çok zayıf şiddette immünopozitifdir. Epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde (B) ise immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) ve kas tabakasında (*) çok kuvvetli immünopozitif iken lümen epitel bazal laminasında (çift ok) kuvvetli ve stromal bez epitel bazal laminasında (çift ok) orta şiddette immünopozitifdir. Epitel hücrelerinde (E) kollajen tip IV immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde kuvvetli şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) ve enine kas tabakasında (*) ve damar duvarında (ok başı) çok zayıf şiddette immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-c;X20 d-f; X80

4.3.2 16.günde gebe sıçan serviksi

4.3.2.1 Kollajen I

16 günlük sıçan servisinde yoğun boyanma stromada ve damar duvarında görüldü. Tek katlı prizmatik lümen epitel bazal laminası yer yer orta şiddette immün boyanmıştı. Bazı bezlerde kuvvetli kollajen tip I antikoruyla boyanan hücreler vardı. Stroma lümenine komşuluğunda özellikle de bezler çevresinde kollajen tip I antikor ile kuvvetli, kas tabakası komşuluğunda orta şiddette boyandığı gözlemlendi. Damar endotelinde özellikle de kas tabakaları arasındaki venlerde kuvvetli bir kollajen tip I reaksiyonu vardı. Kasta boyanma negatifti. (Şekil 4.3.2.1. a,d, Çizelge 4.3.1.)

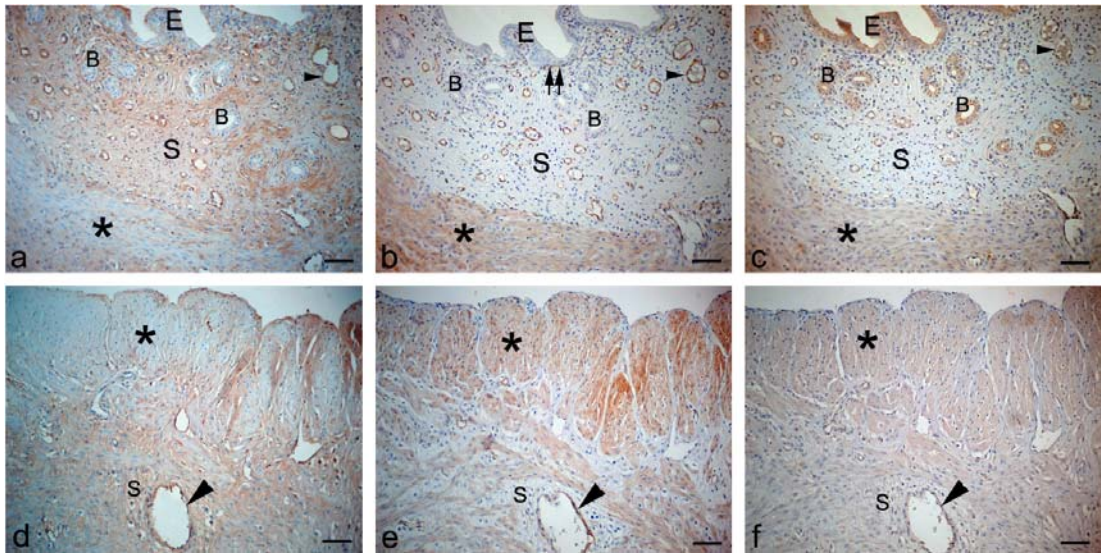
4.3.2.2 Kollajen tip IV

Düşük doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde kollajen tip IV boyanması damar duvarında ve kas tabakalarında yoğundu. Kas tabakalarında kuvvetli; arter ve ven duvarlarında çok kuvvetli kollajen tip IV immünreaksiyonu vardı. Tek katlı prizmatik lümen epitel bazal laminasında orta şiddette olan kollajen tip IV reaksiyonu bez epitel bazal laminasında çok zayıftı. Aynı gebelik yaşındaki kontrole göre lümen epitel kollajen tip IV reaksiyonu daha yoğundu. Genelde kollajen tip IV reaksiyonu şiddeti aynı

deney grubundan 12 günlük servikstekine benzemektedir. (Şekil 4.3.2.1. b,e, Çizelge 4.3.1.)

4.3.2.3 MMP-3

Düşük doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde MMP-3 antikoru reaksiyonu aynı dozu alan 12 günlük serviks boyanmasına benzerdi. Tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde yaygın olarak kuvvetli boyanma reaksiyonu vardı. MMP-3 immün boyanması stromada zayıf şiddette bez çevresinde görüldü. Damar endotelinde boyanma yoğunluğu zayıftı. Kas tabakasında orta şiddette bir MMP-3 reaksiyonu vardı. Kas hariç diğer dokuların immün reaksiyonu aynı yaştaki kontrol grubundakine benzerdi. (Şekil 4.3.2.1. c,f, Çizelge 4.3.1.)



Şekil 4.3.2.1 Düşük doz misoprostol verilen grubun 16 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S), stromal bezlerde (B) ve damar endotelinde (ok başı) kuvvetli immünopozitif iken epitel hücrelerinde (E) orta şiddette immünopozitifdir. Kollajen tip I kas tabakalarında (*) immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) çok kuvvetli, dairesel ve uzunlamasına kas tabakalarında (*) kuvvetli şiddette immünopozitif iken serviksin lümen epitelini bazal lamnasında (çift ok) orta; bez epitelini bazal lamnasında (çift ok) ise zayıf şiddette immünopozitifdir. Epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde (B) ise immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde (B) kuvvetli şiddette immünopozitif iken kas tabakalarında(*) orta şiddette immünopozitifdir. Stromal alanda (S) zayıf MMP-3 immünopozitivitesi varken damar duvarında (ok başı) ekspresyon çok zayıf şekildedir. Objektif büyütmesi a-f;X20

4.3.3 20.günde gebe sıçan serviksi

4.3.3.1 Kollajen I

Kollajen tip I boyanması düşük doz Misoprostol alan serviks stromasında ve damar endotelinde çok yoğundu. Stromada kuvvetli, damar endotelinde çok kuvvetli bir reaksiyon vardı. Tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde keza kasta kollajen tip I immün reaksiyonu gözlenmedi. Stromada

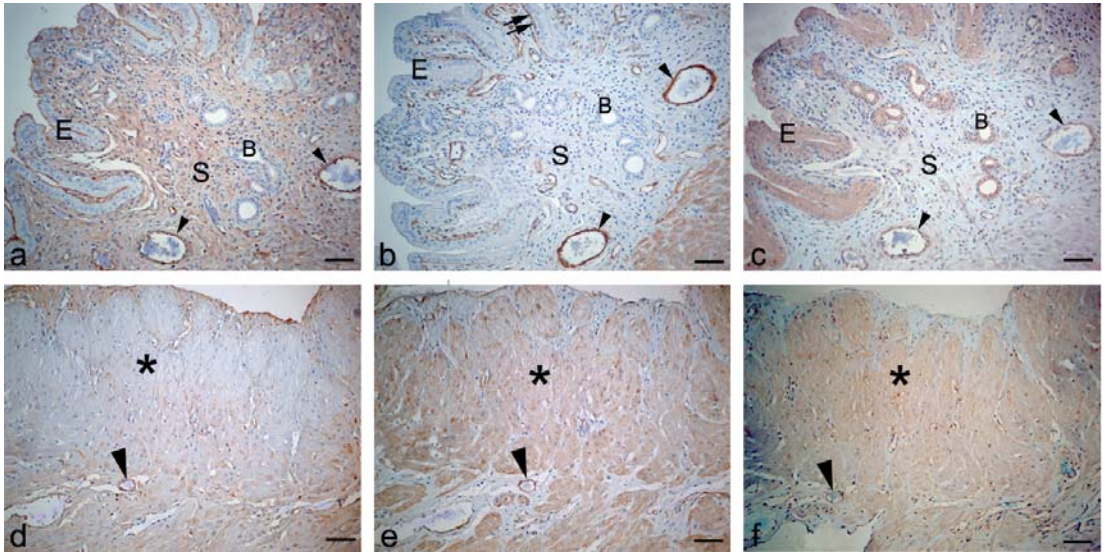
lökosit infiltrasyonu belirgindi. Düşük doz Misoprostol alan 12 günlük serviks dokusunda da benzer kollajen tip I reaksiyonu vardı. (Şekil 4.3.3.1. a,d, Çizelge 4.3.1.)

4.3.3.2 Kollajen tip IV

Düşük doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde kollajen tip IV immün reaksiyonu tek katlı prizmatik lümen epitel bazal lamina ve kas tabakasında kuvvetli, damar duvarında ise çok kuvvetliydi. Bez epitel bazal lamina ve stroma hariç kollajen tip IV immün boyanması genelde aynı yaştaki kontrol serviksine benzerdi. (Şekil 4.3.3.1. b,e, Çizelge 4.3.1.)

4.3.3.3 MMP-3

20 günlük gebe sıçan serviksinde MMP-3 immün reaksiyonu tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde, damar endotelinde keza kas tabakasında, kuvvetliydi. Stromada zayıf şiddetteydi. Damar endotelinde ve kastaki boyanma aynı doz Misoprostol alan 16. güne göre daha yoğundu. (Şekil 4.3.3.1. c,f, Çizelge 4.3.1.)



Şekil 4.3.3.1 Düşük doz misoprostol verilen grubun 20 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen tip I, damar endotelinde (ok başı) çok kuvvetli, stromal alanda (S) ise kuvvetli immünopozitif iken lümen epitelinde (E), stromal bezlerde (B) ve kas tabakalarında (*) immünonegatiftir. **b,e:** Kollajen IV, damar duvarında (ok başı) çok kuvvetli, serviksin dairesel ve uzunlamasına kas tabakaları (yıldız) ve epitel bazal lamina ve epitel bazal lamina (çift ok) kuvvetli immünopozitifdir. Bez epitel bazal lamina (çift ok) ise kollajen IV zayıf şiddette immünopozitifdir. Epitel (E), stroma (S) ve stromal bezler (B) kollajen tip IV içermemektedir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E), uzunlamasına kas tabakasında (*), stromal bezlerde (B) ve damar duvarında (ok başı) kuvvetli şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) ve dairesel kas tabakasında (*) zayıf şiddette immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-f;X20

4.3.4 Doğum Sonrası 0. günde sıçan serviksi

4.3.4.1 Kollajen I

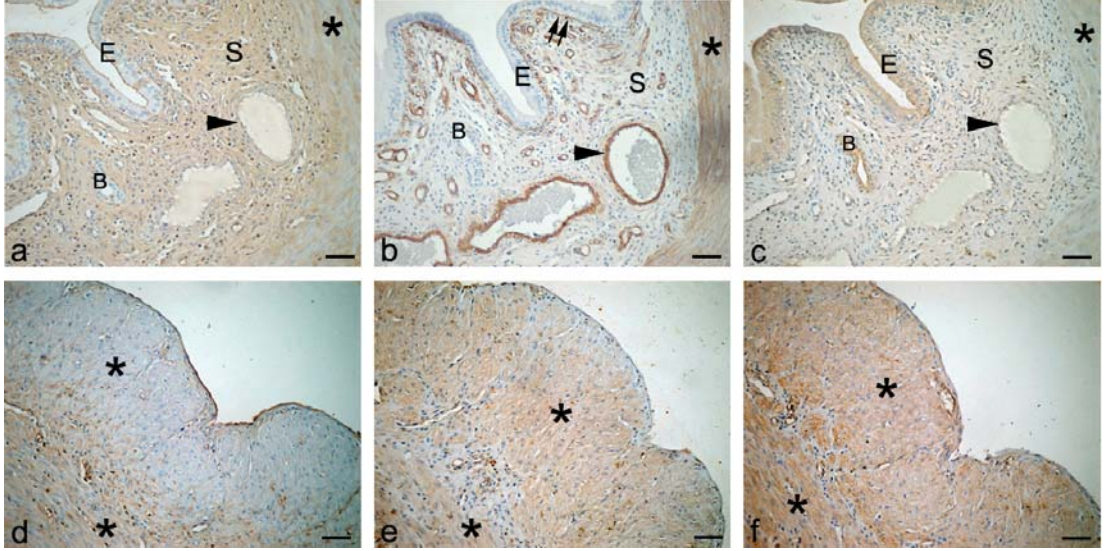
Kollajen tip I antikorları immün reaksiyonu doğum sonrası 0. günde tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde negatifti. Stromada kollajen tip I antikorları ile kuvvetli immün reaksiyon vardı. Damar endotelinde zayıf şiddetteydi. Enine kas boyanmadığı halde uzunlamasına kasta kollajen tip I immün reaksiyonu orta şiddetteydi. (Şekil 4.3.4.1. a,d, Çizelge 4.3.1.)

4.3.4.2 Kollajen tip IV

Doğum sonrası sıçan serviksinde tek katlı prizmatik lümen epitel bazal laminası çok kuvvetli boyanırken, bez epitel bazal laminasında kollajen tip IV reaksiyonu çok zayıf şiddetteydi. Damar duvarında da çok kuvvetli bir kollajen tip IV reaksiyonu vardı. Enine ve boyuna kas tabakalarında immün boyanma kuvvetliydi. Damar duvarında ve kas tabakasındaki boyanma 20 günlük kontrole benzemektedir. (Şekil 4.3.4.1. b,e, Çizelge 4.3.1.)

4.3.4.3 MMP-3

Düşük doz Misoprostol alan servikte MMP-3 immün boyanması aynı dozu alan 20. güne çok benzerdi. MMP-3 immün boyanması tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde keza kas tabakasında kuvvetliydi. Sadece damar endotelinde ve kas tabakalarında zayıf şiddetteydi. (Şekil 4.3.4.1. c,f, Çizelge 4.3.1.)



Şekil 4.3.4.1 Düşük doz misoprostol verilen grubun doğum sonrası 0. gün sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) ve dairesel kas tabakasında (*) kuvvetli immünopozitif iken damar endotelinde (ok başı) zayıf immünopozitifdir. Uzunlamasına kas tabakasında (*), lümen (E) ve stromal bez (B) epitelinde immünonegatifdir.**b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) ve lümen epiteli bazal laminasında çok kuvvetli, uzunlamasına ve dairesel kas tabakalarında (*) ise kuvvetli şiddette immünopozitif iken serviksin stromasında (S) ve bez epiteli bazal laminasında (çift ok) çok zayıf şiddette immünopozitifdir. Lümen epiteli (E) ve stromal bez hücrelerinde (B) kollajen tip IV immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E), stromal bezlerde (B) ve uzunlamasına ve dairesel kas tabakalarında (*) kuvvetli şiddette immünpozitif iken stromal alanda (S) ve damar duvarında (ok başı) zayıf şiddette immünpozitifdir. Objektif büyütmesi a-f;X20

Düşük doz Misoprostol verilen sıçan serviksinde kollajen tip Ireaksiyonu gebelik yaşlarında genellikle kuvvetliydi. 20. günde ve doğumdan sonra lümen ve bez epitelinde kollajen tip Ireaksiyonu gözlenmedi. Kollajen tip IV reaksiyonu lümen epiteli bazal laminasında, damar duvarında ve kas tabakasında olmak üzere bütün yaş gruplarında genelde kuvvetliydi. MMP-3 reaksiyonu ilkin gebeliğin 12. gününde lümen ve bez epitelinde kuvvetli olarak görüldü. Gebeliğin 20. gününde lümen ve bez epiteli dahil damar duvarında ve kas tabakasında da aynı şiddetteydi. Bu ise MMP-3 enzim reaksiyonunun gebeliğin sonuna doğru şiddetlendiğini göstermesi bakımından önemliydi. (Çizelge 4.3.1.)

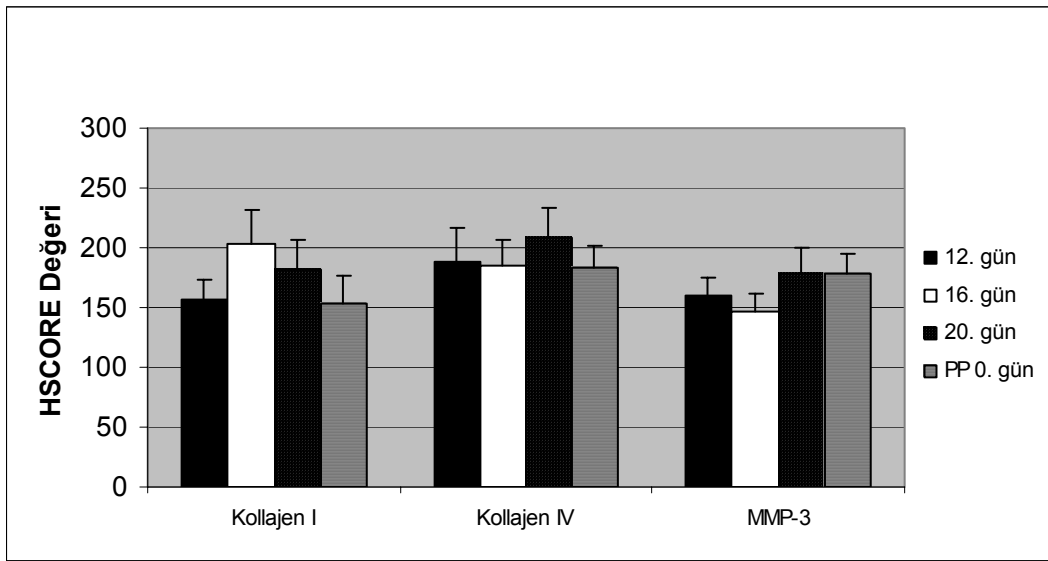
Çizelge 4.3.1. Oral yolla düşük doz misoprostol alan deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası sıfırıncı (PP0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikorlarının immün boyanma yoğunlukları.

-: Negatif (+): Çok Zayıf Pozitif +: Zayıf Pozitif ++: Orta +++:Kuvvetli ++++: Çok kuvvetli Φ: Kesitte yapı çıkmamış

	12. gün			16. gün			20. gün			PP0. gün		
	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3
Lümen epiteli	-	-	+++	++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++
Lümen epiteli bazal laminası	-	+++	-	-	++	-	-	+++	-	-	++++	-
Lamina propriya	+++	-	(+)	+++	-	+	+++	-	+	+++	(+)	(+)
Stromal bezler	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++
Bez bazal laminası	-	++	-	-	+	-	-	+	-	-	(+)	-
Damar duvarı Endotel/ Kas	++/-	++++/++++	+/-	+++/-	++++/++++	+/-	++++/-	++++/++++	+++/>			

Oral yolla düşük doz Misoprostol alan deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası günlerde kollajen tip I, -IV ve MMP-3 antikor boyanma yoğunluklarının ortalama HSCORE değerlerine genel olarak bakıldığında; kollajen tip I antikoru HSCORE değerleri gebeliğin 20. gününde 12. güne göre yüksek olsa da PP 0. günde biraz düşmektedir. PP 0. gündeki bu düşme gebeliğin 16. gününe göre istatistiki olarak da anlamlıdır. ($p < 0,01$)

Kollajen tip IV ve MMP-3 antikorları HSCORE değerleri de gebeliğin 20. gününde diğer yaş gruplarına göre yüksek olmakla birlikte aralarındaki fark istatistiki olarak anlamsızdır. ($p < 0,05$) kollajen tip IV antikoru HSCORE değerleri PP 0. günde 20. güne göre biraz düşmüşse de MMP-3 antikoru HSCORE değerlerinde bir değişme yoktur. (Şekil 4.3.1., Çizelge 4.3.2.)



Şekil 4.3.1 Düşük doz Misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırıncı (PP 0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikorlarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri histogramı. (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.3.2 Düşük doz Misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırıncı (PP 0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikorlarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri. (Ortalama ± Standart sapma). ^{a,b} $p < 0,05$

	Gebelik Günleri			PP 0. gün
	12. gün	16. gün	20. gün	
Kol I	156±18,1 ^a	204±27,0 ^{a,b}	181±25,5	154±23,0 ^b
Kol IV	188±28,8	185±21,2	209±23,5	184±18,1
MMP-3	160±15,8	146±15,1	178±21,6	178±16,4

4.4 Deney Grubu II İmmünohistokimyasal Bulgular

Bu deney grubunda gebe hayvanlara oral yolla 3,0 mikrogram Misoprostol verildi.

4.4.1 12. günde gebe sıçan serviksi

4.4.1.1 Kollajen I

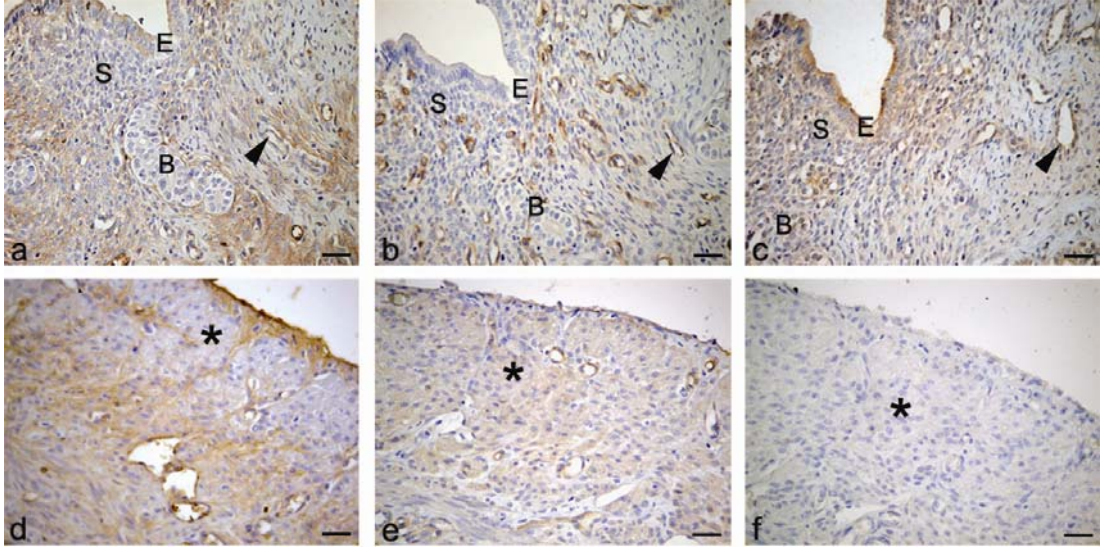
Oral yolla yüksek doz Misoprostol alan 12 günlük sıçan serviksinde kollajen tip I immün reaksiyonunun tek katlı prizmatik lümen epitelinde ve stromada kuvvetli ve yaygın olduğu, arter duvarının kuvvetli ven duvarının zayıf şiddette boyandığı gözlemlendi. Enine ve uzunlamasına kas tabakalarında kollajen tip I immün reaksiyonu zayıf şiddetteydi. Bu grubun kollajen tip I reaksiyonu 12 günlük kontrol grubu serviksine benzemektedir. (Şekil 4.4.1.1 a,d, Çizelge 4.4.1.)

4.4.1.2 Kollajen tip IV

Yüksek doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde kollajen tip IV immün boyanması kas dokusunun orta şiddetteki reaksiyonu dışında aynı yaştaki kontrol grubu serviksine çok benzerdi. Tek katlı prizmatik lümen ve bez epitel bazal lamina kısmında kollajen tip IV boyanması çok zayıftı. Damardan zengin olan stromada boyanma yoktu. Damar duvarındaki kollajen tip IV immün reaksiyonu kuvvetliydi. (Şekil 4.4.1.1. b,e, Çizelge 4.4.1.)

4.4.1.3 MMP-3

Gebe sıçan serviksinde MMP-3 immün reaksiyonu tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde kuvvetli, damar endotelinde orta şiddetteydi. Ve aynı yaştaki kontrol grubuna göre MMP-3 boyanma yoğunluğunda bir artış vardı. Stromada lümen epiteline komşuluğunda orta şiddette olan MMP-3 immün reaksiyonu kas tabakasına doğru zayıflamıştı. Enine ve boyuna kasta MMP-3 immün reaksiyonu negatifti. (Şekil 4.4.1.1. c,f, Çizelge 4.4.1.)



Şekil 4.4.1.1 Yüksek doz misoprostol verilen grubun 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) ve lümen epitelinde (E) kuvvetli; damar endotelinde ise orta şiddette immünopozitif iken kas tabakalarında (*) zayıf şiddette immünopozitifdir. Stromal bezlerde (B) ise kollajen tip I immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) kuvvetli, kas tabakalarında ise orta şiddette immünopozitif iken lümen ve bez epiteli bazal laminasında (çift ok) çok zayıf şiddette immünopozitifdir. Epitel hücrelerinde (E) ve stromal alanda (S) kollajen tip IV immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E), damar duvarında (ok başı) ve stromal bezlerde kuvvetli şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) orta şiddette immünopozitifdir. Kas tabakalarında MMP-3 immünonegatifdir. Objektif büyütmesi a-f; X20

4.4.2 16. günde gebe sıçan serviksi

4.4.2.1 Kollajen I

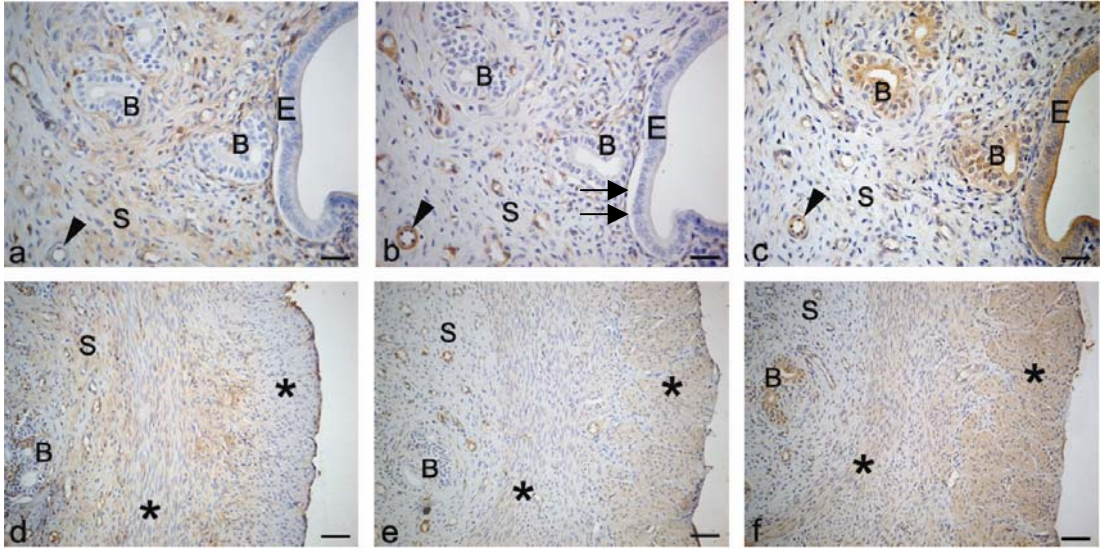
Yüksek doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde tek katlı lümen ve bez epiteli boyanmadı. Kollajen tip I antikoruna ile yüksek doz Misoprostol verilen gebe sıçan serviksinde stroma ve damar endotelinde orta şiddette boyandı. Stromal reaksiyon aynı yaş grubundan kontrol grubunda ve düşük doz Misoprostol verilen servikal dokuda kuvvetliydi. Kas tabakasında kollajen tip I immün reaksiyonu çok zayıftı. (Şekil 4.4.2.1. a,d, Çizelge 4.4.1.)

4.4.2.2 Kollajen tip IV

Yüksek doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde kollajen tip IV immün reaksiyonu genelde zayıftı. Tek katlı prizmatik lümen ve bez epiteli bazal laminasında çok zayıf bir immün reaksiyon vardı. Stroma damardan zengindi. Damar duvarında kollajen tip IV immün reaksiyonu kuvvetliydi. Enine kasta zayıf, uzunlamasına kasta orta şiddette kollajen tip IV immün reaksiyonu vardı. Genelde gebe serviksine kollajen tip IV immün reaksiyonu aynı yaştaki düşük doz Misoprostol verilen grubunkine göre daha düşüktü. (Şekil 4.4.2.1. b,e, Çizelge 4.4.1.)

4.4.2.3 MMP-3

MMP-3 antikoruna ile yüksek doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde yoğun bir boyanma vardı. Tek katlı prizmatik lümen ve bez epiteli MMP-3 antikoruna ile kuvvetli immün boyandı. Çok zayıf şiddette immün boyanmış stromada damar duvarında da MMP-3 reaksiyonu çok zayıftı. Enine kasta zayıf, uzunlamasına kasta orta şiddette MMP-3 boyanması vardı. Buradaki MMP-3 reaksiyonu aynı yaştaki kontrole göre daha kuvvetli olduğu halde düşük doz Misoprostol alan aynı yaştaki gruba çok benzerdi. (Şekil 4.4.2.1. c,f, Çizelge 4.4.1.)



Şekil 4.4.2.1 Yüksek doz misoprostol verilen grubun 16 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d**: Kollajen I, stromal alanda (S), ve damar endotelinde (ok başı) orta şiddette immünopozitif iken kas tabakalarında (*) çok zayıf şiddette immünopozitifdir. Kollajen I, lümen epitelinde (E) ve stromal bezlerde (B) immünonegatifdir. **b,e**: Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) kuvvetli iken dairesel ve uzunlamasına kas tabakalarında (*) orta şiddette; lümen epiteli ve bez epiteli bazal laminasında (çift ok) çok zayıf şiddette immünopozitifdir. Epitel hücrelerinde (E), stromada (S) ve stromal bezlerde (B) ise kollajen tip IV immünonegatifdir. **c,f**: MMP-3, epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde (B) kuvvetli şiddette immünopozitif iken kas tabakalarında (*) ve damar duvarında (ok başı) orta; stromal alanda (S) zayıf şiddette immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-c;X40 d-f;X20

4.4.3 20.Günde Gebe Sıçan Serviksi

4.4.3.1 Kollajen I

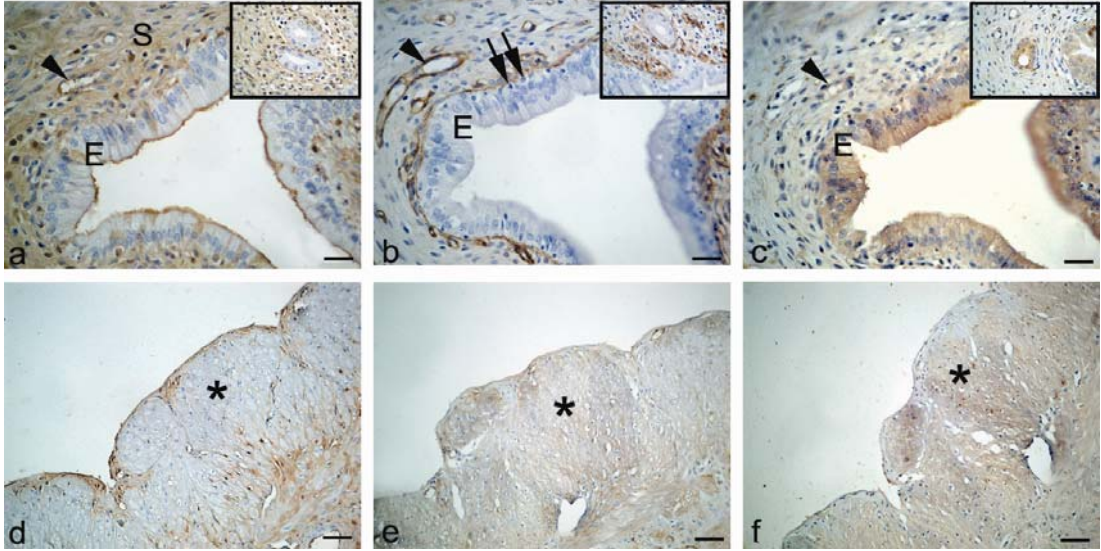
Yüksek doz Misoprostol alan gebe sıçan serviksinde tek katlı prizmatik lümen epitelinde kollajen tip I immün reaksiyonu görülmedi. Stromada ve damar duvarında kollajen tip I immün reaksiyonu kuvvetliydi. Kas tabakası da kollajen tip I antikoruna ile immün boyanmamıştı. Genelde bu grubun kollajen tip I immün reaksiyonu aynı yaştaki düşük doz Misoprostol alan grubunkine çok benzerdi. (Şekil 4.4.3.1. a,d, Çizelge 4.4.1.)

4.4.3.2 Kollajen tip IV

Yüksek doz Misoprostol alan bu yaş grubunda kollajen tip IV boyanması yoğundu. Tek katlı prizmatik lümen epitelini bazal laminasında ve damar duvarında çok kuvvetli, bez bazal laminasında kuvvetli kollajen tip IV reaksiyonu vardı. Stroma zayıf şiddette immün boyanmıştı ve damardan zengindi. Kas tabakasında kollajen tip IV immün reaksiyonu orta şiddetteydi. Yüksek ve düşük doz Misoprostol alan bu yaş gruplarında kollajen IV immün boyanması çok benzerdi. (Şekil 4.4.3.1 b,e, Çizelge 4.4.1.)

4.4.3.3 MMP-3

MMP-3 immün boyanması gebe serviksinde tek katlı prizmatik lümen ve bez epitelinde kuvvetli, kas tabakasında ise orta şiddetteydi. Stromada ve damar endotelinde zayıf şiddette MMP-3 immün reaksiyonu görüldü. MMP-3 immün reaksiyonu genelde aynı yaş grubunda kontrole göre daha kuvvetli, düşük doz Misoprostol alan gruba göre de daha düşük şiddetteydi. (Şekil 4.4.3.1. c,f, Çizelge 4.4.1.)



Şekil 4.4.3.1 Yüksek doz misoprostol verilen grubun 20 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen tip I, damar endotelinde (ok başı) ve stromal alanda (S) kuvvetli immünopozitif iken lümen epitelinde (E), stromal bezlerde (iç şekil) ve kas tabakalarında (*) immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) ve epitel bazal laminasında (çift ok) çok kuvvetli, bez epitelini bazal laminasında (çift ok) ise kuvvetli immünopozitifdir. Kollajen tip IV stromada (S) zayıf şiddette immünopozitif iken uzunlamasına ve dairesel kas tabakalarında (*) orta şiddette immünopozitifdir. Epitel (E) ve stromal bezler (iç şekil) kollajen tip IV negatiftir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E) ve stromal bezlerde (iç şekil) kuvvetli şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) ve damar duvarında (ok başı) zayıf şiddette immünopozitifdir. Kas tabakaları (*) orta şiddette kollajen tip I immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-c;X80 d-f; 40

4.4.4 Doğum Sonrası 0. günde sıçan serviksi

4.4.4.1 Kollajen I

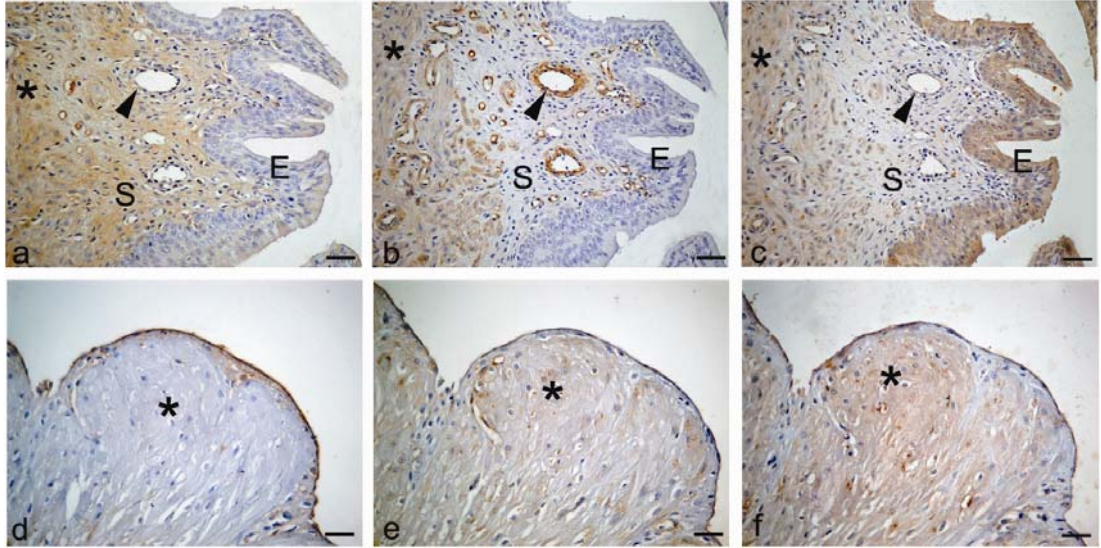
Kollajen tip I reaksiyonu yüksek doz Misoprostol alan bu grupta sadece servikal stromada kuvvetliydi. Damar endotelinde zayıf, çok katlı prizmatik lümen epitelinde çok zayıftı. Uzunlamasına kasta kollajen tip I immün boyanması görülmedi. Enine kasta kuvvetliydi. Kollajen tip I immün boyanması genelde aynı yaştaki kontrol grubuna çok benzerdi. (Şekil 4.4.4.1. a,d, Çizelge 4.4.1.)

4.4.4.2 Kollajen tip IV

Yüksek doz Misoprostol alan serviksinde kollajen IV immün boyanması sadece damar duvarında ve kasta görüldü. Çok katlı prizmatik lümen ve bez epiteli bazal laminasında reaksiyon negatifti. Damar duvarı kollajen tip IV antikoru ile çok kuvvetli enine ve boyuna kas tabakaları orta şiddette immün boyanmıştı. Kollajen tip IV boyanma şiddeti aynı yaştaki kontrol grubuna benzemekteyse de düşük doz Misoprostol alan gruptakinden daha düşüktü. (Şekil 4.4.4.1. b,e, Çizelge 4.4.1.)

4.4.4.3 MMP-3

Doğum sonrası bu grupta MMP-3 antikoru ile çok katlı prizmatik lümen epiteli kuvvetli, enine ve boyuna kas tabakaları da orta şiddette immün boyandı. Damar duvarında zayıf, stromada da çok zayıf şiddette MMP-3 immün reaksiyonu vardı. İmmün boyanma şiddeti genelde aynı yaş grubunda, kontrole ve düşük doz Misoprostol alan gruba göre çok düşüktü. (Şekil 4.4.4.1. c,f, Çizelge 4.4.1.)



Şekil 4.4.4.1 Yüksek doz misoprostol verilen grubun doğum sonrası 0. gün sıçan serviksinde kollajen tip I(a, d), kollajen tip IV (b, e), MMP-3 (c, f) immün boyanmalarının fotomikrografları. **a,d:** Kollajen I, stromal alanda (S) kuvvetli immünopozitif iken damar endotelinde (ok başı) ve lümen epitelinde (E) zayıf immünopozitifdir. Uzunlamasına ve dairesel kas tabakasında (*) kollajen tip I immünonegatifdir. **b,e:** Kollajen tip IV, damar duvarında (ok başı) çok kuvvetli immünopozitif iken uzunlamasına ve dairesel kas tabakalarında (*) ise orta şiddette immünopozitifdir. Lümen epiteli (E) ve stromal alanda (S) kollajen tip IV immünonegatifdir. **c,f:** MMP-3, epitel hücrelerinde (E) ve kas tabakalarında (*) kuvvetli şiddette immünopozitif iken stromal alanda (S) ve damar duvarında (ok başı) zayıf şiddette immünopozitifdir. Objektif büyütmesi a-f;X40

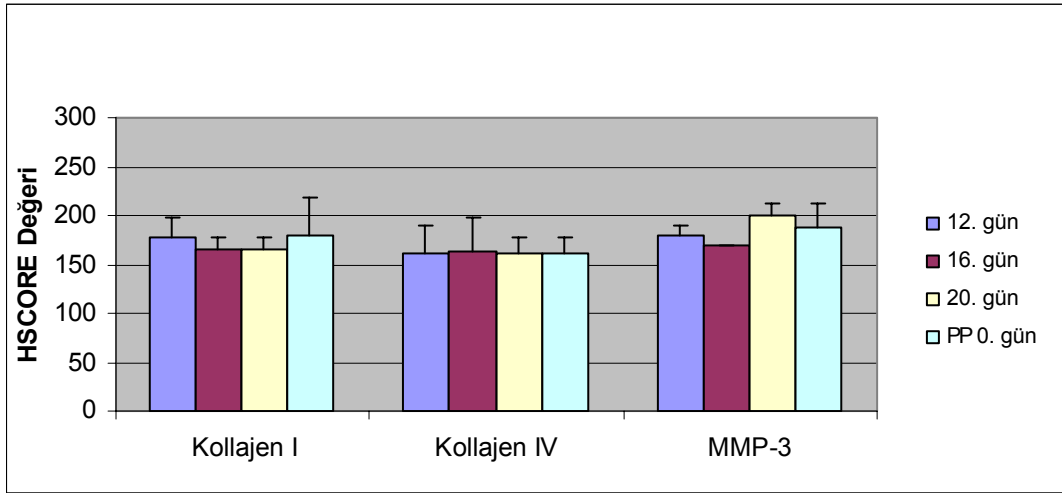
Yüksek doz Misoprostol alan sıçan serviksinde gebeliğin 12. gününde kollajen tip I antikoruna ile bazı dokuların kuvvetli, kasın ise çok zayıf şiddette boyandığı görüldü. Stroma 20. günde de kuvvetli boyandığı halde kasta kollajen tip I reaksiyonu yoktu. Kollajen tip IV antikoruna immünboyanması genelde yaş gruplarında özellikle de damar duvarında yaygındı. MMP-3 reaksiyonu gebeliğin 12. gününde kas dokusu hariç diğer dokularda kuvvetliydi. Gebeliğin 16. gününde kas dokusunda gözlemlendi. Bu devrede lümen ve bez epitelinde keza kas tabakasında reaksiyon genelde kuvvetliydi. (Çizelge 4.4.1.)

Çizelge 4.4.1. Oral yolla yüksek doz misoprostol alan deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası sıfırıncı (PP0) günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikorlarının immün boyanma yoğunlukları.

-: Negatif (+): Çok Zayıf Pozitif +: Zayıf Pozitif ++: Orta +++:Kuvvetli ++++: Çok kuvvetli Φ : Kesitte yapı çıkmamış

	12. gün			16. gün			20. gün			PP0. gün		
	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3	Kol. I	Kol. IV	MMP-3
Lümen epiteli	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	(+)	-	+++
Lümen epiteli bazal laminası	-	(+)	-	-	(+)	-	-	++++	-	-	-	-
Lamina propriya	+++	-	++	++	-	+	+++	+	+	+++	-	(+)
Stromal bezler	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	Φ	Φ	Φ
Bez bazal laminası	-	(+)	-	-	(+)	-	-	+++	-	Φ	Φ	Φ
Damar duvarı Endotel/Kas	++/-	+++/>+++	+++/>+++	++/-	+++/>+++	++/>++	+++/>-	++++/>++++	+/>+	+/>-	++++/>++++	+/>+
Enine kas	+	++	-	(+)	++	++	-	++	++	-	++	+++
Uzunlamasına kas	+	++	-	(+)	++	++	-	++	++	-	++	+++

Oral yolla yüksek doz Misoprostol alan deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20. ve doğum sonrası sıfırıncı günlerde kollajen I, IV ve MMP-3 antikoruna boyanma yoğunluklarının ortalama HSCORE değerlerine genel olarak bakıldığında; kollajen tip I antikoruna HSCORE değerlerinin gebeliğin 12. gününden 20. gününe kadar düştüğü, PP 0. günde yükseldiği görülse de bu değişikliklerin istatistiki anlamı yoktur. Kollajen tip IV antikoruna HSCORE değerlerinde gebeliğin 12. gününe göre genelde anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. MMP-3 antikoruna HSCORE değerleri ise gebeliğin 20. gününde diğer günlere göre yüksektir. Gebeliğin 20. günündeki bu değer 16. güne göre de istatistiki olarak anlamlıdır. ($p < 0,05$) (Şekil 4.4.1., Çizelge 4.4.2.)



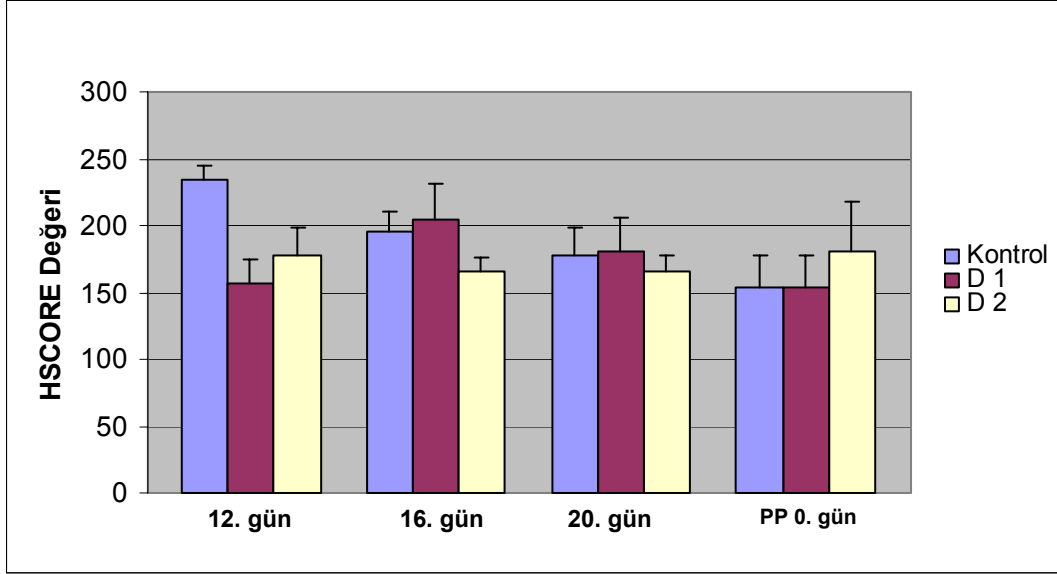
Şekil 4.4.1 Yüksek doz Misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırıncı (PP 0) günlerde kollajen I, -IV ve MMP-3 antikorlarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri histogramı. (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.4.2 Yüksek doz Misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırıncı (PP 0) günlerde kollajen I, -IV ve MMP-3 antikorlarının immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerleri. (Ortalama ± Standart sapma).

	Gebelik Günleri			PP 0.gün
	12. gün	16. gün	20. gün	
Kol I	178±20,1	166±10,8	165±13,2	180±37,4
Kol IV	162±27,0	164±33,6	162±14,8	162±14,8
MMP-3	180±10 ^a	170±0 ^{a,b,c}	200±12,2 ^b	188±23,8 ^c

^{a-c} $p < 0.05$

Kollajen tip I antikoru HSCORE değerleri yüksek doz misoprostol verilen grupta kontrol ve düşük doz misoprostol verilen grupların değerlerine göre genelde daha düşük olduğu görülmektedir. Gebeliğin sonundaki gruplararası HSCORE değerleri arasında istatistiki yönden önemli bir fark olmasa da yüksek doz misoprostol verilen grupta kollajen tip I proteininin biraz daha fazla yıkıma uğradığı görülmektedir. (Şekil 4.2.2., Çizelge 4.2.1.)



Şekil 4.2.2 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (Deney I) ya da yüksek (Deney II) doz misoprostol verilen deney gruplarının kollajen tip I antikoru immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. ($p < 0,01$) (Ortalama \pm Standart sapma).

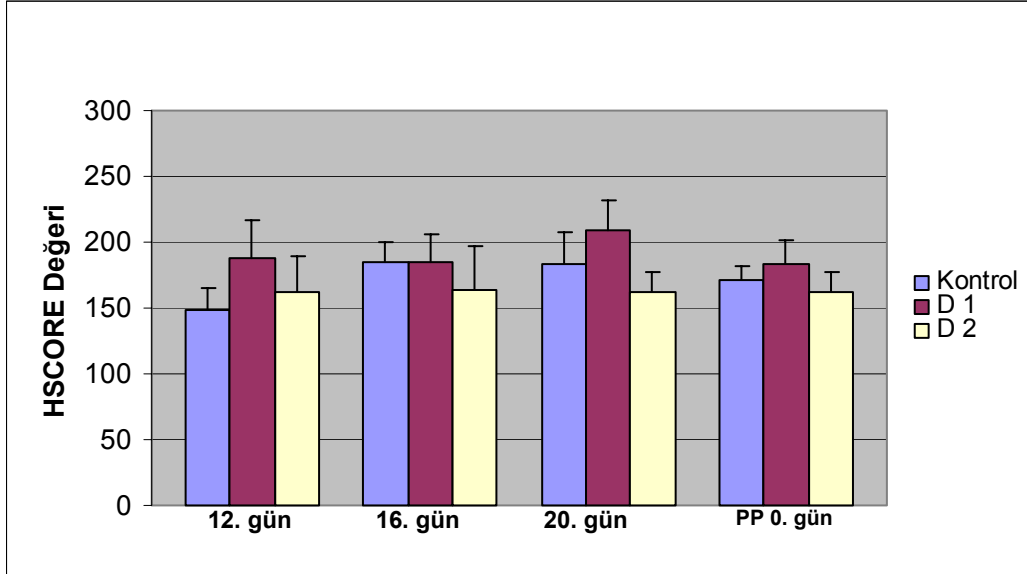
Çizelge 4.2.1. Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (Deney I) ya da yüksek (Deney II) doz misoprostol verilen deney gruplarının kollajen tip I antikoru immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. (Ortalama \pm Standart sapma).

		Kontrol grubu	Deney I	Deney II
Gebelik Günleri	12. gün	234 \pm 11,4 ^{a,b}	156 \pm 18,1 ^a	178 \pm 20,1 ^b
	16. gün	196 \pm 15,1 ^c	204 \pm 27,0 ^d	166 \pm 10,8 ^{c,d}
	20. gün	177 \pm 22,2	181 \pm 25,5	165 \pm 13,2
PP 0. gün		154 \pm 23,0	154 \pm 23,0	180 \pm 37,4

^{a,b,c,d} $p < 0,01$

Düşük doz misoprostol verilen grubun kollajen tip IV antikoru HSCORE değerleri gebeliğin 20. gününde kontrole göre biraz daha yüksektir. Yüksek doz misoprostol verilen grubun değerleri ise kontrole göre daha

düşüktür. Buna göre yüksek doz misoprostol düşük doza göre kollajen tip IV proteini üzerine daha etkili görülmektedir. Gebeliğin 20. gününde yüksek doz misoprostol verilen grubun düşen değeri düşük doz misoprostol verilen grubunkine göre de istatistiki olarak anlamlıdır ($p<0,01$) (Şekil 4.2.3., Çizelge 4.2.2.)



Şekil 4.2.3 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (Deney I) ya da yüksek (Deney II) doz misoprostol verilen deney gruplarının kollajen tip IV antikor immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. ($p<0,01$) (Ortalama \pm Standart sapma).

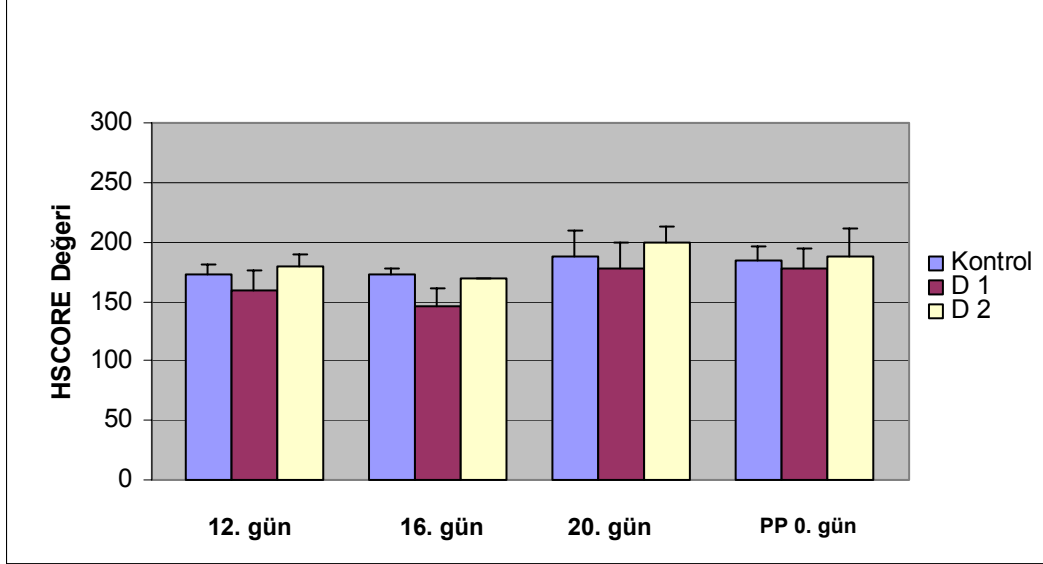
Çizelge 4.2.2 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (Deney I) ya da yüksek (Deney II) doz misoprostol verilen deney gruplarının kollajen tip IV antikor immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. (Ortalama \pm Standart sapma).

		Kontrol grubu	Deney I	Deney II
Gebelik Günleri	12. gün	148±16,4	188±28,8	162±27,0
	16. gün	185±15	185±21,2	164±33,6
	20. gün	184±23,2	209±23,5 ^a	162±14,8 ^a
PP 0. gün		171±10,8	184±18,1	162±14,8

^a $p<0,01$

MMP-3 antikor HSCORE değerlerinin kontrol ve deney gruplarında gebeliğin 12. gününden sonuna doğru arttığı görülmektedir. Kontrolle karşılaştırıldığında yüksek doz misoprostol verilen grubun değerlerinin düşük doz misoprostol verilen grubunkine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Düşük doz misoprostol alan grubun değerleri kontrol değerlerinden de

düşüktür. Bu, yüksek doz misoprostolün MMP-3 üzerinde düşük dozdan daha etkili olduğunu gösterir. Ancak gebeliğin 20. ve PP 0. günlerindeki gruplara ait değerler arasında genelde önemli bir fark yoktur. (Şekil 4.2.4., Çizelge 4.2.3.)



Şekil 4.2.4 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (Deney I) ya da yüksek (Deney II) doz misoprostol verilen deney gruplarının MMP-3 antikorunu immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. ($p < 0,01$) (Ortalama \pm Standart sapma).

Çizelge 4.2.3 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (Deney I) ya da yüksek (Deney II) doz misoprostol verilen deney gruplarının MMP-3 antikorunu immünboyanma yoğunluğu HSCORE değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. (Ortalama \pm Standart sapma).

		Kontrol grubu	Deney I	Deney II
Gebelik Günleri	12. gün	172±8,3	160±15,8	180±10
	16. gün	172±5,4 ^a	146±15,1 ^{a,b}	170±0 ^{a,b}
	20. gün	187±21,6	178±21,6	200±12,2
PP 0. gün		184±11,4	178±16,4	188±23,8

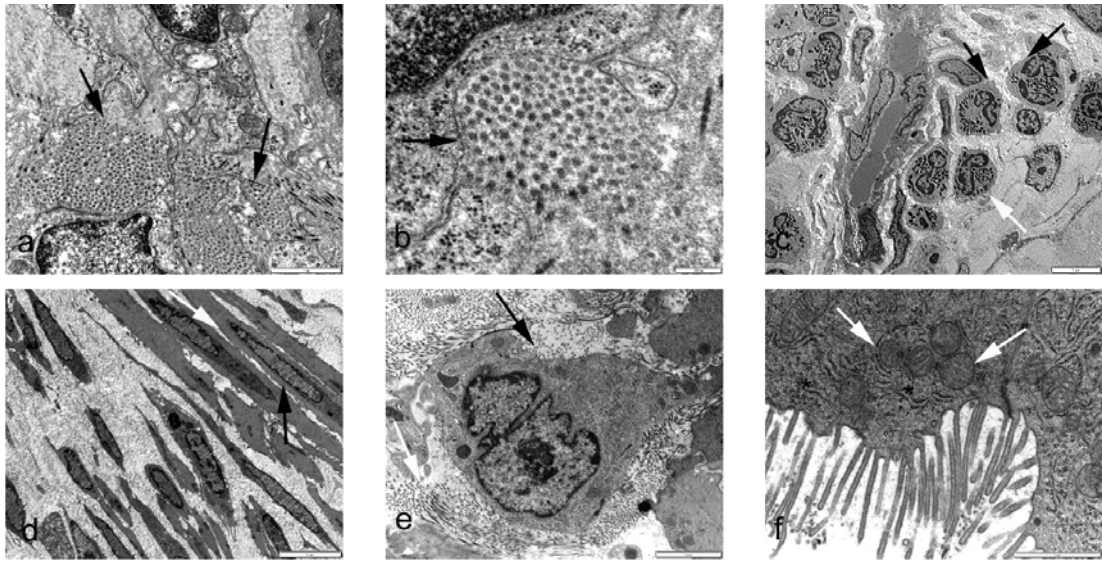
^{a,b} $p < 0,01$

4.5.TEM Bulguları

4.5.1.Morfolojik Bulgular

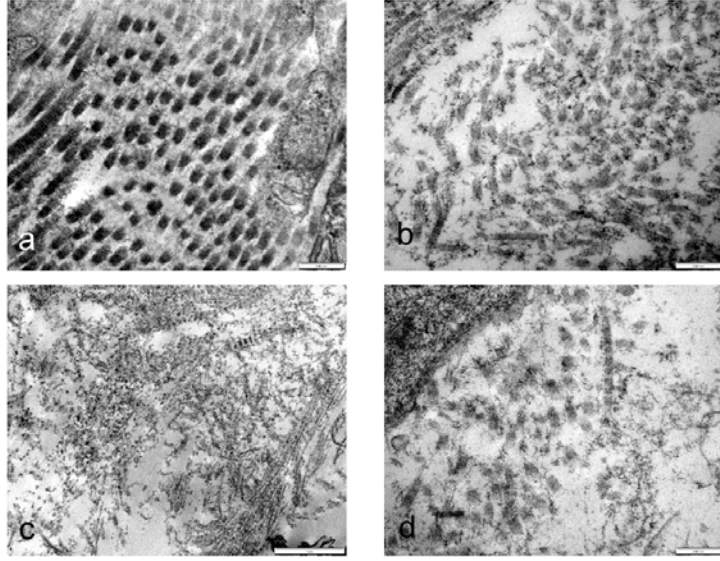
Kontrol ve oral yolla düşük ya da yüksek doz misoprostol verilen deney gruplarına ait serviks dokusu kesitlerindeki ince yapı değişiklikleri kalitatif ve kantitatif olarak TEM’de değerlendirildi.

Kontrol grubunda gebeliğin 12 ve 16. günlerine kadar serviks ince kesitleri morfolojisinde çok önemli değişiklikler gözlenmedi. Genelde kollajen fibriller yoğun, paketlenmiş demetler halindeydi.(Şekil 4.5.1.1.) Fibriller arası amorf madde azdı. Hakim hücre tipi fibroblastlar; uzun nükleuslu birkaç granüllü endoplazmik retikulum bulunan uzantılı hücrelerdi. Düz kas hücreleri mikrofamentlerden zengindi.



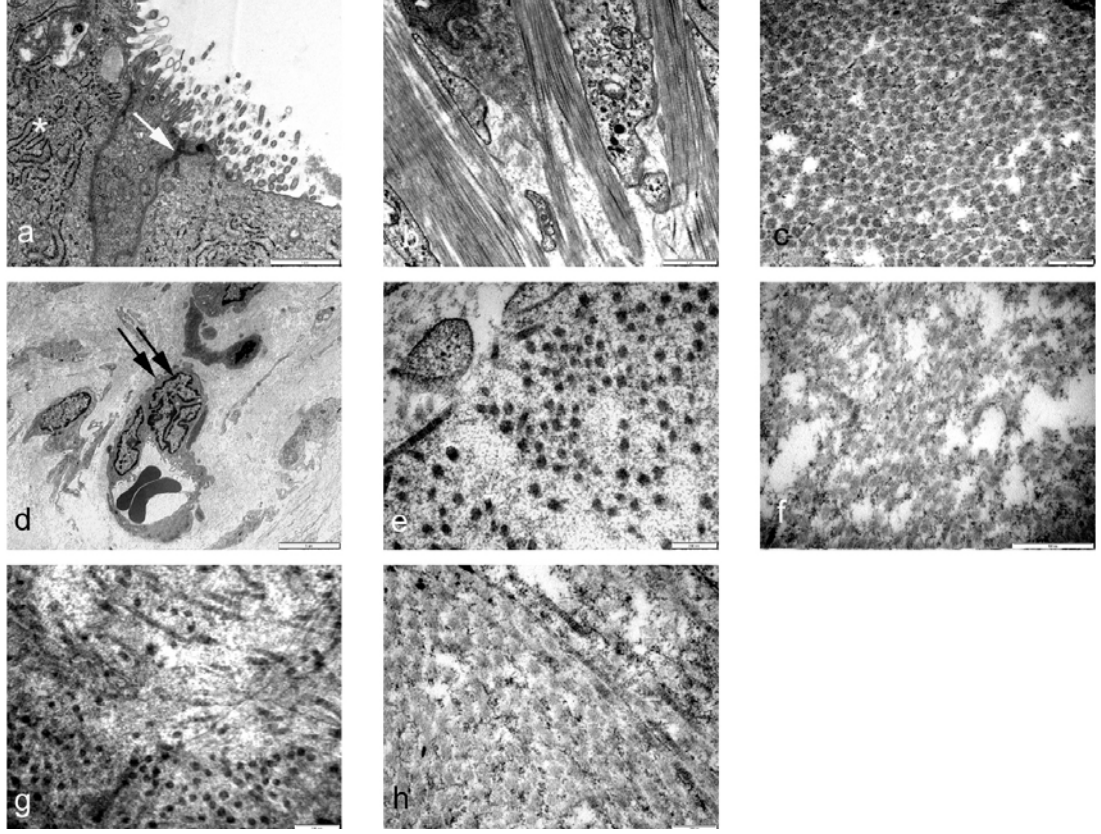
Şekil 4.5.1.1. Kontrol grubunun östrus ve gebeliğin 12. gününe ait sıçan serviksi TEM mikrografları. **a,b:** Östrus evresinde sıçan serviksi stromasında kollajen demetleri (ok). aX12930; bX46460**c:** Östrus evresindeki sıçan serviksi bağ dokusunda eozinofil lökositler (ok) X1670 **d:** 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen liflerle sarılı sıkı ilişkili düz kas hücreleri (ok). X2156 **e:** 12 günlük gebe sıçan serviksinde kollajen liflerle sarılı fibroblastın enine kesiti (ok). X6000 **f:** 12 günlük gebe sıçan serviksinde sili silindirik lümen epiteli. Hücre içlerinde yoğun mitokondri (ok) ve GER (*) ağı görülmektedir. X16700

İlerleyen günlerde, gebeliğin 20 ve doğum sonrası 0. günlerinde servikal olgunlaşma olarak bilinen morfolojik özellikler gözlemlendi. Amorf esas madde artışı (ödem) keza fibröz bağ doku componentlerinde çözümler vardı. (Şekil 4.5.1.2.) Miyometriyum çevresinde ve lamina propriyada serbest hücreler gözlemlendi. Kas hücrelerinde hipertrofi gözlemlendi.



Şekil 4.5.1.2. Kontrol grubunun 20. ve PP 0. günlerine ait sıçan serviksi TEM mikroagrafları. **a,b:** 20 günlük gebe sıçan serviksi stromasında dağılmış(a) ve düzenli yapısı bozulmuş (b) kollajen lif demeti. a,b X46460;**c,d:** PP 0. güne ait sıçan serviksi bağ dokusunda düzenli yapısı bozulmuş kollajen lif demetleri cX12930, dX46460

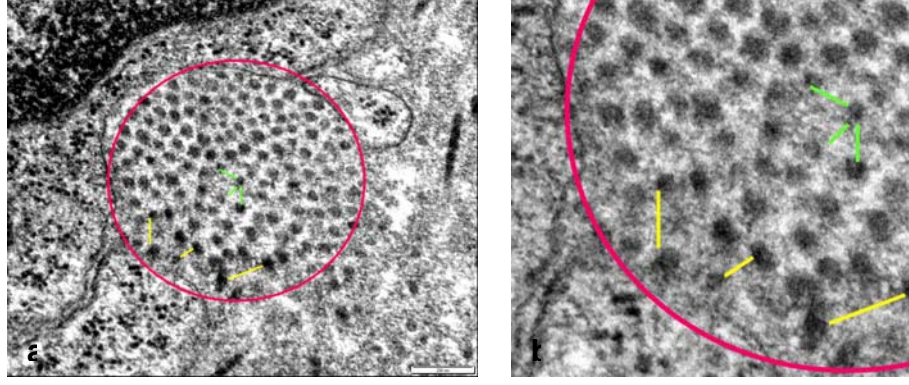
Deney gruplarında da kontroldeki gibi gebeliğin 12 ve 16, günlerinde serviksin ince yapı morfolojisinde önemli bir değişiklik yoktu. Deney grupları kontrolle karşılaştırıldığında gebeliğin 20 ve doğum sonrası 0. günlerinde yüksek doz misoprostolün servikal olgunlaşmaya etkisi düşük doz misoprostol verilen gruba göre daha yüksekti. Yüksek doz misoprostol verilen sıçan serviksi ince kesitlerinde miyometriyumda çözülmüş hipertrofik düz kas hücreleri görüldü. Kas hücreleri arasındaki aralıklar amorf esas madde artışına bağlı olarak artmıştı. Kas hücreleri arasında seyrek de olsa bağlantı kompleksleri vardı. Lamina propriyada da kollajen fibril düzeni bozulmuştu. Ödem oldukça ileriydi. Çünkü kollajen lifler arası açılmıştı. Serbest hücreler keza fibroblastlar vardı. Bunlar da granüllü endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve mitokondriyonları belirgindi. Bu morfolojik değişiklikler normal kontroldekine benzemekteydi. (Şekil 4.5.1.3.)



Şekil 4.5.1.3 Düşük ve yüksek doz misoprostol verilen deney gruplarının gebeliğin 16., 20. ve PP 0. günlerine ait sıçan serviksi TEM mikroagrafları.
a: 16 günlük gebe sıçan serviksinde sili silindirik lümen epiteli. Hücreler arası bağlantı bölgeleri (ok) ve GER (*) ağı görülmektedir. X12930
b: 16 günlük gebe sıçan serviksi bağ dokusunda sıkı paketlenmiş uzunlamasına kollajen demetleri. X10000 **c:** 16 günlük gebe sıçan serviksi bağ dokusunda düzenli yapıda kollajen fibriller . X46460
d: 20 günlük gebe sıçan serviksi bağ dokusunda yerleşik damara ait endotel (çift ok). X2156 **e,f:** 20 günlük gebe sıçan serviksi stromasında dağılmış(e) ve düzenli yapısı bozulmuş (f) kollajen lif demeti. e,f X46460;
g,h: PP 0. güne ait sıçan serviksi bağ dokusunda düzenli yapısı bozulmuş kollajen demeti. g,h X46460

4.5.2.Kantitatif Bulgular

Kollajen liflerde meydana gelen ince yapı değişiklikleri kantitatif olarak değerlendirildi. Bunun için her yaş grubundan hayvanların serviks dokusunda kollajen lifi oluşturan fibrillerin çapları ve lif merkezinde ya da periferinde (dış sınırdaki) bulunan bir fibril ile buna en yakın fibril ya da fibriller arası aralıkların ölçümleri yapıldı.

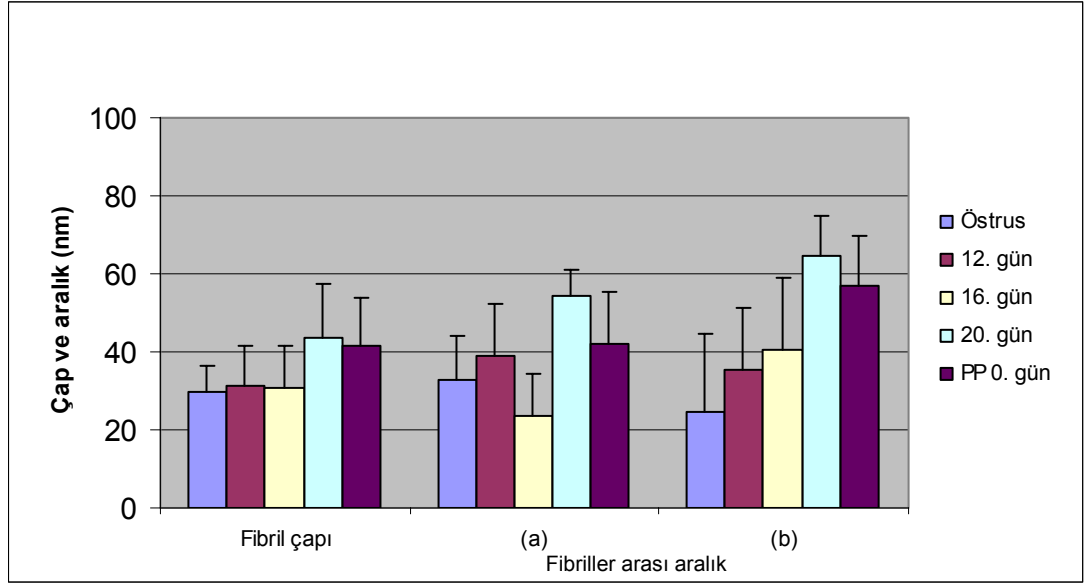


Şekil 4.5.2.1 a: Enine kesitte, sıçan serviksinde kollajen demeti. Pembe halka demetin sınırlarını, yeşil ile işaretli aralık, merkezi fibriller arası aralıktır; sarı ile işaretli aralık ise periferel fibriller arası aralıktır. **b:** Yandaki mikrografın büyütülmüş şeklidir. TEM mikrografı.X46460

Her grup için 10 adet demetten 10 adet çap, 10 adet merkezi fibriller arası aralık ve 10 adet periferel fibriller arası aralık ölçümleri alındı. Tüm ölçümler kaydedildikten sonra varsa anlamlı farkların ortaya konulabilmesi için istatistiksel analizlerle değerlendirildi.

Tüm değerlendirmeler için tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ve sonrasında POST-HOC Tukey testleri kullanıldı. ($p < 0,01$)

Kontrol grubunun serviks dokusunda kollajen fibril çapı östrus ve gebeliğin 12. gününden 20. gününe kadar artmaktadır. 20. güne göre PP 0. günde de anlamlı olarak düşmektedir ($p < 0,01$). 20. ve PP 0. günde de bu değerler östrus ve 12. güne göre de istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). Merkez ve perifer fibrillerarası aralıklarda da östrus ve 12. günden gebeliğin sonuna doğru bir artış görülmektedir. Merkez ve perifer fibrillerarası bu değerler östrus ve 12. gebelik gününe göre de istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,01$). PP 0. günde fibrillerarası aralık değerlerinde 20. güne göre anlamlı bir düşme vardır. (Şekil 4.5.2.2., Çizelge 4.5.2.1.)



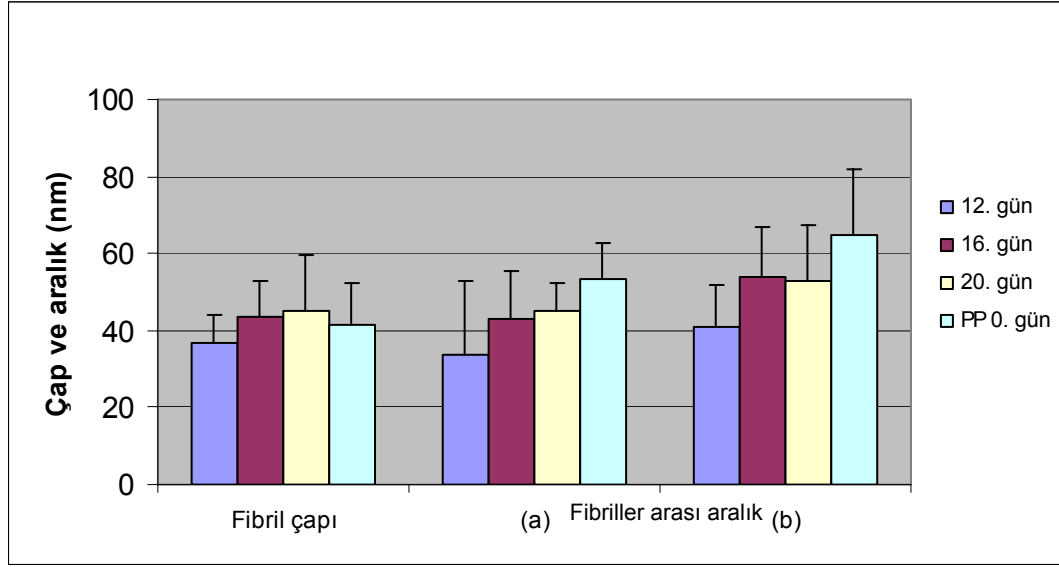
Şekil 4.5.2.2.: Östrusta, gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırncı (PP 0) günlerde kontrol grubunun sıçan serviksinde ortalama fibril çapları ile lif merkezinde (a) ve periferinde (b) ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin histogramı (* $p < 0,01$) (Ortalama \pm Standart sapma).

Çizelge 4.5.2.1. Östrusta, gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırncı (PP 0) günlerde kontrol grubunun sıçan serviksinde ortalama fibril çapları ile lif merkezinde (a) ve periferinde (b) ortalama fibrillerarası aralık değerleri (Ortalama \pm Standart sapma).

	Östrus	Gebelik Günleri			PP0. gün
		12. gün	16. gün	20. gün	
Fibril çapı (nm)	29,7 \pm 6,8 ^{a,b}	31,4 \pm 9,9 ^c	30,8 \pm 10,6 ^{d,e}	43,8 \pm 13,6 ^{a,c,d}	41,4 \pm 12,2 ^{b,c,e}
Merkez fibrillerarası (nm)	32,6 \pm 11,5 ^{f,g,h,k}	38,7 \pm 13,5 ^{f,l,m}	23,6 \pm 10,8 ^{g,i,n,o}	54,2 \pm 26,9 ^{h,m,n,p}	42,1 \pm 23,5 ^{k,o,p}
Perifer fibrillerarası (nm)	24,7 \pm 19,7 ^{r,s,t,u}	35,6 \pm 15,5 ^{r,v,q,x}	40,6 \pm 18,2 ^{s,v,y,z}	64,5 \pm 3,5 ^{t,u,q,y,w}	57,1 \pm 12,3 ^{u,v,x,z,w}

^{a-z} $p < 0,01$

Düşük doz misoprostol verilen grupta ortalama fibril çapı değerlerinin gebeliğin 12. gününde en düşük, 20. gününde de en yüksek olduğu görülmektedir, aralarındaki fark istatistiki olarak da önemlidir ($p < 0,01$). PP 0. günde de 20. güne göre anlamlı bir düşme vardır ($p < 0,01$). Merkez ve perifer fibrillerarası aralık değerlerinde de gebeliğin 12. gününden PP 0. gününe kadar artış görülmektedir. 20. ve PP 0. günlerdeki fibrillerarası bu değerler 12. güne göre de istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). (Şekil 4.5.2.3., Çizelge 4.5.2.2.)



Şekil 4.5.2.3. Gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırinci (PP 0) günlerde düşük doz misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde ortalama fibril çapı ile lif merkezinde (a) ve periferinde (b) ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin histogramı (* $p < 0,01$) (Ortalama \pm Standart sapma).

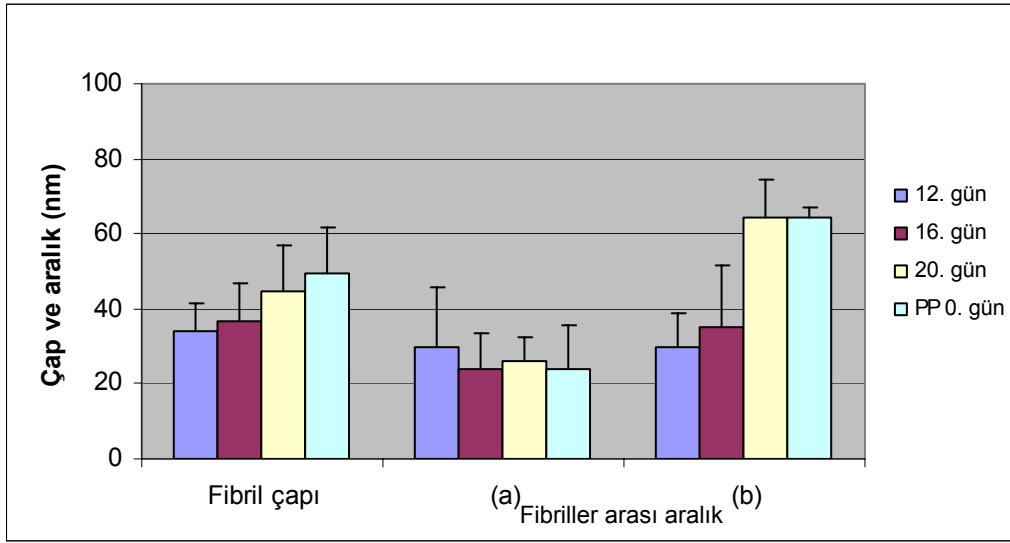
Çizelge 4.5.2.2. Gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırinci (PP 0) günlerde düşük doz misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde ortalama fibril çapı ile lif merkezinde (a) ve periferinde (b) ortalama fibrillerarası aralık değerleri (Ortalama \pm Standart sapma).

	Gebelik Günleri			PP0. gün
	12. gün	16. gün	20. gün	
Fibril çapı (nm)	36,9 \pm 7,1 ^{a,b,c}	42,3 \pm 9,6 ^a	45,0 \pm 14,6 ^{b,d}	41,2 \pm 11,1 ^{c,d}
Merkez fibrillerarası (nm)	33,6 \pm 9,2 ^{e,f,g}	42,9 \pm 12,7 ^{e,h}	45,3 \pm 17,1 ^{f,k}	53,5 \pm 9,3 ^{g,h,k}
Perifer fibrillerarası (nm)	41,1 \pm 2,3 ^{l,m,n}	53,7 \pm 13,9 ^{l,o}	52,9 \pm 14,5 ^m	64,5 \pm 17,0 ^{n,o}

^{a-o} $p < 0,01$

Yüksek doz misoprostol verilen grupta ortalama fibril çapı değerlerinde gebeliğin 12. gününden PP 0. gününe kadar düzenli bir artış görülmektedir. 20. ve PP 0. günlerde yüksek olan bu fibril çapı değerleri artışları 12. güne göre de anlamlıdır ($p < 0,01$). Merkez ortalama fibrillerarası aralık değerleri gebeliğin 12. gününden 20. ve PP 0. gününe kadar düşmektedir. 20. gündeki bu düşük değerler 12. güne göre de istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). Aksine perifer ortalama fibrillerarası aralık değerlerinde gebeliğin 12. gününden PP 0. güne kadar bir artış vardır. PP 0 ve 20. gündeki bu yüksek

değerler 12. güne göre de istatistiki olarak anlamlıdır ($p<0,01$). (Şekil 4.5.2.4., Çizelge 4.5.2.3.)



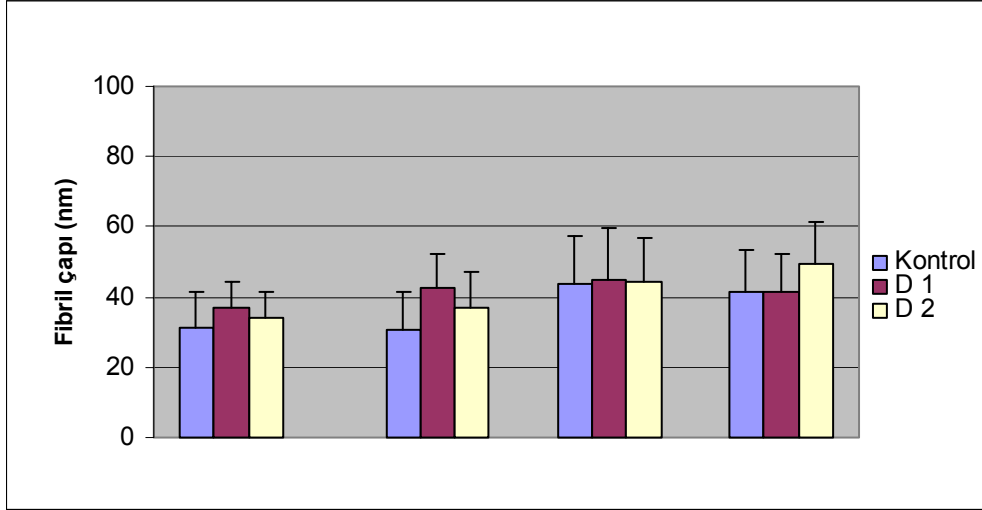
Şekil 4.5.2.4. Gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırncı (PP 0) günlerde yüksek doz misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde ortalama fibril çapı ile lif merkezinde (a) ve periferinde (b) ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin histogramı (* $p<0,01$) (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.5.2.3. Gebeliğin 12, 16, 20 ve doğum sonrası sıfırncı (PP 0) günlerde yüksek doz misoprostol verilen deney grubunun sıçan serviksinde ortalama fibril çapı ile lif merkezinde (a) ve periferinde (b) ortalama fibrillerarası aralık değerleri (Ortalama ± Standart sapma).

	Gebelik Günleri			PP0. gün
	12. gün	16. gün	20. gün	
Fibril çapı (nm)	33,9±7,6 ^{a,b}	36,7±10,1 ^{c,d}	44,4±12,4 ^{a,c}	49,5±12,0 ^{b,d}
Merkez fibrillerarası (nm)	29,8±15,7 ^{e,f}	24,0±9,2 ^{e,g}	25,8±6,5 ^{f,h}	23,7±11,7 ^{g,h}
Perifer fibrillerarası (nm)	29,9±8,9 ^{i,j,k}	35,2±16,2 ^{i,m,n}	64,5±9,9 ^{j,m}	64,2±3,8 ^{k,n}

^{a-n} $p<0,01$

Kontrol ve düşük ya da yüksek doz misoprostol verilen deney hayvanlarının serviks kollajeni kantitatif değerlerine genel olarak bakıldığında; ortalama lif çapı değerleri düşük doz misoprostol verilen grupta daha yüksek olmak üzere, düşük ve yüksek doz misoprostol verilen gruplarda kontrole göre daha yüksektir. Düşük doz misoprostolün fibril çapı artışı üzerinde yüksek doz misoprostole göre daha etkili olduğu görülmektedir. (Şekil 4.5.2.5., Çizelge 4.5.2.4.)



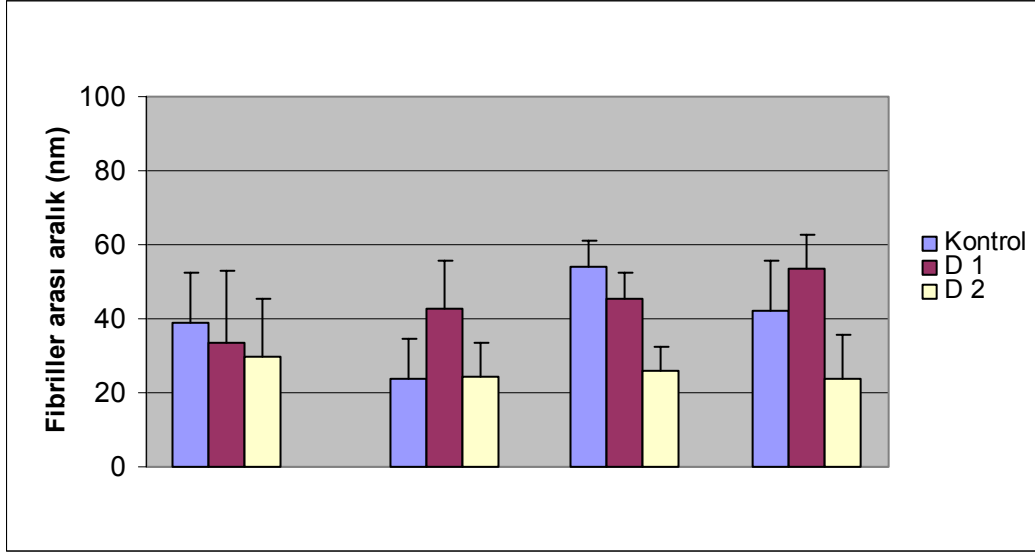
Şekil 4.5.2.5. Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (D I) ya da yüksek (D II) doz misoprostol verilen deney gruplarının ortalama fibril çapı değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması (* p<0,01) (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.5.2.4 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (D I) ya da yüksek (D II) doz misoprostol verilen deney gruplarının ortalama fibril çapı değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. Sayısal değerler nanometre (nm) olarak ifade edilmiştir (Ortalama ± Standart sapma).

		Kontrol	D I	D II
Gebelik Günleri	12. gün	31,4±9,9 ^{a,b}	36,9±7,1 ^a	33,9±7,6 ^b
	16. gün	30,8±10,6 ^{c,d}	42,3±9,6 ^c	36,7±10,1 ^d
	20. gün	43,8±13,6	45,0±14,6	44,4±12,4
PP0. gün		41,4±12,2 ^e	41,2±11,1	49,5±12,0 ^e

^{a-e} p< 0,01

Merkez ortalama fibrillerarası aralık değerleri gebeliğin 12. gününde düşük ya da yüksek doz misoprostol verilen gruplarda kontrole göre anlamlı olarak daha düşüktür (p<0,01). Yüksek doz misoprostol verilen grupta 12. günden PP 0. güne kadar genelde giderek düşen bu değerler düşük doz misoprostol verilen grupta aksine yükselmektedir. Deney gruplarının değerlerine bakıldığında merkez fibrillerarası aralık değerlerinin yüksek olduğu grubun düşük doz misoprostol verilen gruptan daha fazla etkilendiği görülmektedir. (Şekil 4.5.2.6., Çizelge 4.5.2.5.)



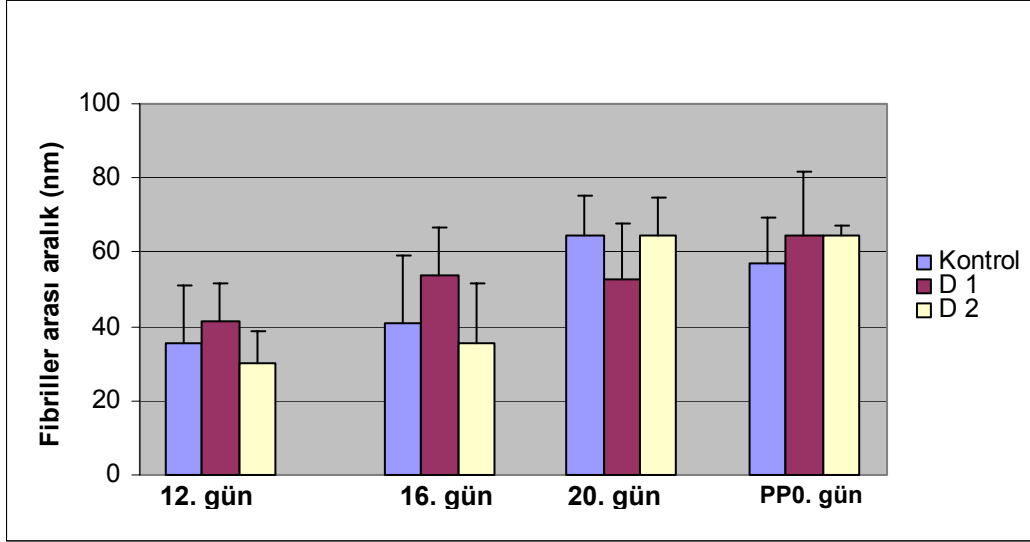
Şekil 4.5.2.6. Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (D I) ya da yüksek (D II) doz misoprostol verilen deney gruplarının merkez ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması (* p<0,01) (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.5.2.5 Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (DI) ya da yüksek (D II) doz misoprostol verilen deney gruplarının merkez ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. Sayısal değerler nanometre (nm) olarak ifade edilmiştir (Ortalama ± Standart sapma).

		Kontrol	D I	D II
Gebelik Günleri	12. gün	38,7±13,5 ^{a,b}	33,6±9,2 ^a	29,8±15,7 ^b
	16. gün	23,6±10,8 ^c	42,9±12,7 ^c	24,0±9,2
	20. gün	54,2±16,9 ^{d,e}	45,3±17,1 ^d	25,8±6,5 ^e
PP0. gün		42,1±13,5 ^{f,g}	53,5±9,3 ^f	23,7±11,7 ^g

^{a-g} p< 0,01

Perifer ortalama fibrillerarası aralık değerleri düşük doz misoprostol verilen grupta gebeliğin 20. günü dışında kontrol ile yüksek doz misoprostol verilen gruba göre genelde daha yüksektir. Düşük doz misoprostol verilen grupta her yaş için yüksek olan bu değerler kontrole göre de istatistiki olarak anlamlıdır. (p<0,01) (Şekil 4.5.2.7., Çizelge 4.5.2.6.)



Şekil 4.5.2.7. Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (D I) ya da yüksek (D II) doz misoprostol verilen deney gruplarının perifer ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması (* p<0,01) (Ortalama ± Standart sapma).

Çizelge 4.5.2.6. Sıçan serviksinde kontrol ve düşük (D I) ya da yüksek (D II) doz misoprostol verilen deney gruplarının perifer ortalama fibrillerarası aralık değerlerinin gebelik yaşına göre karşılaştırılması. Sayısal değerler nanometre (nm) olarak ifade edilmiştir (Ortalama ± Standart sapma).

		Kontrol	D I	D II
Gebelik Günleri	12. gün	35,6±15,5 ^{a,b}	41,1±2,3 ^a	29,9±8,9 ^b
	16. gün	40,6±18,2 ^{c,d}	53,7±13,9 ^c	35,2±16,2 ^d
	20. gün	64,5±3,5 ^e	52,9±14,5 ^e	64,5±9,9
PP0. gün		57,1±12,3 ^{f,g}	64,5±17,0 ^f	64,2±3,8 ^g

^{a-g} p< 0,01

TARTIŞMA

Morfolojisi ve fonksiyonuyla kompleks bir organ olan serviks proteoglikanlardan ve glikozaminoglikanlardan yapılmış stromasında hakim lif tipleri kollajen tip I ve III'tür, kollajen tip IV daha az bulunur. Bir başka ifadeyle servikal dokunun yaklaşık %70'i kollajendir. Bu kollajenin de % 62-80'i tip I, kalanı da tip III kollajendir. Stromasının diğer elemanlarını bağ dokusu ve kas lifleriyle (%10-15) elastik lifler oluşturur [1-6].

Serviks termde ve preterm doğum başlamadan önce yeniden yapılanmaya gider. Prostaglandinler ve analoglarının doğumun indüklenmesinde servikal olgunlaşma için kullanıldığı bilinmektedir[65, 92].

Matriks metalloproteinazlar servikal dokunun yeniden yapılanmasında görev alan önemli enzimlerdir [6, 8]. Bu çalışmada prostaglandin E₁ analogu olan misoprostolün ve fizyolojik servikal olgunlaşmanın MMP'ler üzerinden benzer mekanizmaları kullanıp kullanmadıkları araştırılmıştır.

Serviks yapısında östrüstan gebeliğin 12. gününe kadar önemli bir değişiklik gözlemedik. Diğer araştırmacılar gibi (ref) biz de östrüsta aynı şekilde kontrol ve deney gruplarında ışık mikroskopik düzeyde servikal dokuda kollajen fibrillerin yoğun paketlenildiğinin ve demetler oluşturduğunu gözledik. TEM düzeyinde uzun nükleuslu az sayıda endoplazmik retikulum içeren uzantılı fibroblast hücreleri hakimdi. Gebeliğin sonuna doğru 20. günde servikal olgunlaşma olarak bilinen morfolojik özellikler gözlemlendi. Amorf esas madde artışı yani ödemler, fibröz bağ dokusu komponentlerinde önemli azalmalar ve çözülmeler vardı. Çoğu serbest hücrenin miyometriyuma ve lamina propriyaya infiltre olduğu görüldü. Bu hücreler ESM proteinlerini sindirebilme yeteneğinde olan kollajenaz ve başka enzimlerin kaynağı olabilirler. TEM düzeyinde hipertrofik düz kas hücreleri arasındaki aralıklar artmıştı. Kollajen fibril düzeni bozulmuştu. Lamina propriyadaki morfolojik değişiklikler miyometriyumdakilerle kıyaslandığında termdeki kontrollerdekine benzemekteydi.

Işık mikroskopik immünohistokimyasal bulgulardan kontrol ve deney gruplarında kollajen tip I proteininin genelde lamina propriyada kuvvetli, kas çevresinde ise zayıf reaksiyon verdiğini gözledik. Aksine MMP-3 antikoru reaksiyonu lamina propriyada zayıf, kas çevresinde ise orta ya da kuvvetli reaksiyon gösterdi. Bu bulgulardan servikal olgunlaşmanın lamina propriya ve miyometriyum gibi iki zit bölgede başladığını ve bu kollajenolitik bölgeler birleştiği zaman olgunlaşmanın başarıya ulaşabileceği anlaşılmaktadır.

TEM'de misoprostole cevapta kollajenin ince yapı değişikliğini kantitatif olarak değerlendirdik. Düşük doz misoprostolün yüksek doza göre yaşa bağlı olarak fibri çapı değerlerini önemlilik düzeyinde daha fazla etkilediğini gördük.

Fibril çapındaki bu artışlar olgun fibril varlığına keza normal kollajen dönüşümüne işaret edebilir.

Çalışmamızda düşük doz misoprostol verildikten sonra serviksteki morfolojik değişiklikler merkez ve perifer fibrillerarası aralık değerlerinin genelde gebeliğin 12. gününden 20. ve PP 0. güne kadar artışlarıyla da karakterizedir. Bu, doku suyu artışıyla ilgili olabilir. Bağ dokusunun artan su tutma kapasitesinin uzun zamandır glikozaminoglikanların dağılımına bağlı olduğu ifade edilmektedir [2, 8, 92]. Araştırmacılar glikozaminoglikanların dağılımındaki değişim özellikle de heparan sülfat [93] ve hyalüronik asit konsantrasyonlarındaki artışların servikal olgunlaşmanın özelliklerinden biri olduğunu bildirdiler [94-96]. Bu yüzden, intersistiyal ödemli bölgelerde artan amorf materyal miktarının (esas madde) spesifik glikozaminoglikanlardaki artışa bağlanabilir [97].

Servikte baskın olarak kollajen lifler ya da demetler bulunur. Kollajen fibriller proteoglikanlarla birlikte kollajen demetleri ya da lifleri oluştururlar[20]. Proteoglikanlar kollajen fibrillerin enine bağlarından ve düzeninden sorumludur. Çoğu dokuda örneğin kemik, kıkırdak ve deride farklı gerilme direncinin olması kollajen fibril ve lif çapı keza düzeniyle ilişkilidir [7, 20] .

Bulgularımızda fibrillerarası aralık artışları, enine bağların bozulmasıyla fibril organizasyonunda ve düzenindeki bozukluğu gösterebilir. Üstelik glikozaminoglikanlar yara iyileşmesinde ve doku tamirinde gösterildiği gibi fibrillogenезде ve fibril organizasyonunda anahtar rol oynadıkları sanılmasına rağmen kollajenden daha az anlaşılmıştır. Proteoglikanın öz proteini direk kollajene bağlanır, bunun glikozaminoglikan yan zincirlerinin de fibril aralıklarının ve doku suyunun düzenlenmesi bakımından diğer yan zincirlerle etkileştiği sanılır.

Proteoglikanlar genelde benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir. Proteoglikanların protein özlerinde farklılıklar vardır. Bu kısım fibrillogenезin hızını etkiler. Keza proteoglikan yan zincirleri de farklıdır. Proteoglikanlar fibril boyunca rastgele bağlanmazlar, spesifik bağlanma yerleri vardır. Keza proteoglikan konsantrasyonu ile fibril yüzey alanı arasında da belli bir oran vardır. Dermatan sülfat proteoglikanların farklı kollajen fibriller üzerindeki adaptasyonları ile açık ve koyu bantlar (gap bölgeleri, band bölgesi) oluşturdukları sanılmaktadır [92].

Proteoglikanaz aktivieli MMP'lerin çalışmamızda özellikle MMP-3'ün glikozaminoglikan yan zinciri protein etkileşimlerini bozduğu düşünülebilir. Proteoglikanazlarla proteoglikanların bozulması kollajen fibrillerin çözülmesine, gerilme direncinin düşmesine neden olabilir [6, 8]. MMP-3 ekspresyonu ile fibriller arası aralık artışı arasındaki ilişki misoprostol indükeli servikal olgunlaşmada kollajenazlardan ziyade proteoglikanazların rolünün daha büyük olduğuna işaret edebilir [6].

SONUÇLAR

Sonuç olarak;
Gebelik süresince değişik zamanlarda düşük ya da yüksek doz misoprostol verilen sıçan serviksi olgunlaşmasında;

1. Erken gebelikte (12. gün) servikal dokuda çok küçük değişikliklerin, gebeliğin sonuna doğru (20. gün) kas tabakaları arasında ve lamina propriyada amorf esas madde artışı yani ödemlerin oluşabileceği ,
2. Olgunlaşmanın lamina propriya ve miyometriyum gibi iki ayrı bölgede başlayabileceği,
3. Düşük doz misoprostolün kollajen fibril çapında, keza merkez ve perifer fibrillerarası aralıklarda artışlara neden olabileceği, bunun enine bağların bozulmasıyla ilgili fibril organizasyonunda ve düzenindeki bozukluğa işaret edebileceği,
4. MMP-3 ekspresyonu ile fibrillerarası aralık artışı arasındaki ilişkiden misoprostol indükeli servikal olgunlaşmada kollajenazlardan ziyade proteoglikanazların etkili olabileceği,
5. İleri gebelikte düşük doz misoprostolün etkisinin sıçanda termdeki fizyolojik servikal olgunlaşmada görülenden farklı morfolojik etkide bulunmadığı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod* 1996; 11: 1755-1766.
2. Buhimschi IA, Dussably L, Buhimschi CS, Ahmed A, Weiner CP. Physical and biomechanical characteristics of rat cervical ripening are not consistent with increased collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1695-1704.
3. Cakir L, Dilbaz B, Caliskan E, Dede FS, Dilbaz S, Haberal A. Comparison of oral and vaginal misoprostol for cervical ripening before manual vacuum aspiration of first trimester pregnancy under local anesthesia: a randomized placebo-controlled study. *Contraception* 2005; 71: 337-342.
4. Colon I, Clawson K, Hunter K, Druzin ML, Taslimi MM. Prospective randomized clinical trial of inpatient cervical ripening with stepwise oral misoprostol vs vaginal misoprostol. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 747-752.
5. Gelber S, Sciscione A. Mechanical methods of cervical ripening and labor induction. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49: 642-657.
6. Chien EK, Ji H, Feltovich H, Clark K. Expression of matrix metalloproteinase-3 in the rat cervix during pregnancy and in response to prostaglandin E2. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 309-317.
7. Clark K, Ji H, Feltovich H, Janowski J, Carroll C, Chien EK. Mifepristone-induced cervical ripening: structural, biomechanical, and molecular events. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 1391-1398.
8. Feltovich H, Ji H, Janowski JW, Delance NC, Moran CC, Chien EK. Effects of selective and nonselective PGE2 receptor agonists on cervical tensile strength and collagen organization and microstructure in the pregnant rat at term. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 753-760.
9. Garfield RE, Saade G, Buhimschi C, Buhimschi I, Shi L, Shi SQ, Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 673-695.
10. Woessner J.F. HN. Matrix metalloproteinases and TIMPs protein profile. In. New York: Oxford University Press; 2000.
11. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-1149.
12. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem* 2004; 106: 353-362.
13. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.

14. Osmer R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Szeverenyi M, Kuhn W. Collagenase activity in the human cervix uteri after prostaglandin E2 application during the first trimester. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 42: 29-32.
15. Harkness ML, Harkness RD. Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. *J Physiol* 1959; 148: 524-547.
16. Leppert PC. Cervical softening, effacement and dilatation: a complex biochemical cascade. *J Matern Fetal Med* 1992; 1: 213-223.
17. Yu SY, Tozzi CA, Babiarz J, Leppert PC. Collagen changes in rat cervix in pregnancy--polarized light microscopic and electron microscopic studies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 360-368.
18. Uldbjerg N, Ekman G, Malmstrom A, Olsson K, Ulmsten U. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 662-666.
19. Uldbjerg N, Ulmsten U, Ekman G. The ripening of the human uterine cervix in terms of connective tissue biochemistry. *Clin Obstet Gynecol* 1983; 26: 14-26.
20. Leslie PG, Hiatt, L.J. *Color Textbook of Histology*. W.B. Saunders Company; 1998.
21. Junqueira LC, Kelley, O.R. , Carneiro, J. *Temel Histoloji*. In, 10. baskıdan çeviri ed: Nobel Tıp Kitabevi; 2003: 106-113.
22. Alberts J, Lewis, Raff, Roberts, Walter, . *Molecular Biology of The Cell*. New York:: Garland Science.; 2002,.
23. Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. New York: Chapman & Hall; 1993.
24. http://www.lf3.cuni.cz/histologie/Atlas/detail_el_en.php?preparat=7. In.
25. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
26. Gross J, Lapierre CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48: 1014-1022.
27. Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 1995; 4: 823-840.
28. Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000; 19: 1102-1113.
29. Sternlicht MD, Coussens LM, Vu TH, Werb Z. In *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*. In: NJ Clendeninn KA (ed.) *Biology and regulation of the matrix metalloproteinases.*; 2001: 1-37.
30. Harper E, Bloch KJ, Gross J. The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry* 1971; 10: 3035-3041.

31. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* 1998; 12: 1075-1095.
32. Bode W, Reinemer P, Huber R, Kleine T, Schnierer S, Tschesche H. The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *Embo J* 1994; 13: 1263-1269.
33. Borden P, Heller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7: 159-178.
34. Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389: 77-81.
35. Sternlicht M, Coussens LM, Vu TH, Werb Z. Biology and regulation of the matrix metalloproteinases. In: NJ Clendeninn KA (ed.) *In Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*; 2001: 1-37.
36. Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 275-290.
37. Seval Y. Antalya: Akdeniz Universitesi; 2002. Yüksek Lisans Tezi.
38. Sternlicht. M, A. Lochter, and CJ. Sympson, et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98: 137-146.
39. PJ R. Cartilage proteoglikans structure and potential functions. *Sci Total Environ* 1994; 367: 1010-1016.
40. Parks WCaM, R.P. Matrix metalloproteinases. In. San Diego: Academic Press; 1998.
41. Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon KB, Jeffrey JJ, Strauss JF, 3rd. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98: 1971-1978.
42. Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 1996; 122: 1723-1736.
43. Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet* 1997; 21: 44-54.
44. Demir AY, Doktora tezi, Antalya 1999. İnsan plasentasında fibronektin ve matriks metalloproteinazlarınin dagilimi. Antalya: Akdeniz; 1999.
45. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Association between the expression of murine 72 kDa type IV collagenase by odontoblasts and basement membrane degradation during mouse tooth development. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 1021-1030.

46. Wang H, Li Q, Shao L, Zhu C. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) during early pregnancy. *Biol Reprod* 2001; 65: 31-40.
47. Blankenship TN, King BF. Identification of 72-kilodalton type IV collagenase at sites of trophoblastic invasion of macaque spiral arteries. *Placenta* 1994; 15: 177-187.
48. Young KA, Hennebold JD, Stouffer RL. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 833-840.
49. Waterhouse P, Denhardt DT, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 219-226.
50. Hurst PR, Palmay RD. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 395-402.
51. Rechtman MP, Zhang J, Salamonsen LA. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on endometrial decidualization and implantation in mated rats. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 169-177.
52. Woessner JF, Jr., Taplin CJ. Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J Biol Chem* 1988; 263: 16918-16925.
53. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 534-540.
54. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-160.
55. Windsor LJ, Grenett H, Birkedal-Hansen B, Bodden MK, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J Biol Chem* 1993; 268: 17341-17347.
56. Delany AM, Jeffrey JJ, Rydzziel S, Canalis E. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270: 26607-26612.
57. Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1990; 265: 11421-11424.
58. Raza SL, Nehring LC, Shapiro SD, Cornelius LA. Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *J Biol Chem* 2000; 275: 41243-41250.
59. Wikipedia. Prostaglandins. In.
60. Gawlewicz-Mroccka A, Gielicz A, Mastalerz L, Szczeklik A. [Prostaglandin E2: metabolism, determination in body fluids and the role in aspirin hypersensitivity]. *Pol Arch Med Wewn* 2006; 115: 578-586.

61. McKeage K, Plosker GL, Siddiqui MA. Prostaglandins. *Drugs* 2006; 66: 873-879.
62. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182.
63. Kremer J. From prostaglandin replacement to specific COX-2 inhibition: a critical appraisal. *J Rheumatol Suppl* 2000; 60: 9-12.
64. Votipka JR. Misoprostol for cervical ripening and labor induction. *J Fam Pract* 1997; 45: 20.
65. Elhassan M, Mirghani OA, Adam I. Intravaginal misoprostol vs. dinoprostone as cervical ripening and labor-inducing agents. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 85: 285-286.
66. Wing DA, Gaffaney CA. Vaginal misoprostol administration for cervical ripening and labor induction. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49: 627-641.
67. Fletcher H, Mitchell S, Frederick J, Simeon D, Brown D. Intravaginal misoprostol versus dinoprostone as cervical ripening and labor-inducing agents. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 244-247.
68. Buser D, Mora G, Arias F. A randomized comparison between misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and labor induction in patients with unfavorable cervixes. *Obstet Gynecol* 1997; 89: 581-585.
69. Alisa B. Induction of Labor: The Misoprostol Controversy. *Int. J. Midwifery & Women's Health* 2003; 48: 244-248.
70. Calder AA. Prostaglandins and biological control of cervical function. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1994; 34: 347-351.
71. Calder AA, Embrey MP, Tait T. Ripening of the cervix with extra-amniotic prostaglandin E2 in viscous gel before induction of labour. *Br J Obstet Gynaecol* 1977; 84: 264-268.
72. Fitzpatrick RJD, H. The cervix of sheep and goat during parturition. *Anim. Repro.Sci.* 1979; 2: 209-224.
73. Kleissl HP, van der Rest M, Naftolin F, Glorieux FH, de Leon A. Collagen changes in the human uterine cervix at parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130: 748-753.
74. Cheah SH, Ng KH, Johgalingam VT, Ragavan M. The effects of oestradiol and relaxin on extensibility and collagen organisation of the pregnant rat cervix. *J Endocrinol* 1995; 146: 331-337.
75. Sherwood OD. Uterine contractility mechanism of control. In: *Serono Symposia*; 1990; MA. 237-252.
76. Fosang AJ, Handley CJ. Connective tissue remodelling in the ovine cervix during pregnancy and at term. *Connect Tissue Res* 1988; 17: 277-285.
77. Danforth DN. The fibrous nature of human cervix and non-gravid uteri. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1947; 53: 267-279.
78. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 435-440.
79. Uldbjerg N, Ulmsten U. The physiology of cervical ripening and cervical dilatation and the effect of abortifacient drugs. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1990; 4: 263-282.

80. Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 1995; 38: 267-279.
81. Williams LM, Hollingsworth M, Dixon JS. Changes in the tensile properties and fine structure of the rat cervix in late pregnancy and during parturition. *J Reprod Fertil* 1982; 66: 203-211.
82. Aspden RM. Collagen organisation in the cervix and its relation to mechanical function. *Coll Relat Res* 1988; 8: 103-112.
83. Sternlicht MD, Bergers G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 2000; 4: 609-633.
84. Tenore JL. Methods for cervical ripening and induction of labor. *Am Fam Physician* 2003; 67: 2123-2128.
85. Chien EK, Macgregor C. Expression and regulation of the rat prostaglandin E2 receptor type 4 (EP4) in pregnant cervical tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1501-1510.
86. Arias F. Pharmacology of oxytocin and prostaglandins. *Clin Obstet Gynecol* 2000; 43: 455-468.
87. Greer IA, Millar M, Calder AA. Gemeprost-induced cervical ripening: histological and biophysical effects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 47: 1-9.
88. Breckon J, Papaioannou S, Kon LW, Tumber A, Hembry RM, Murphy G,. Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1880-1890.
89. Chwalisz K. The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. *Hum Reprod* 1994; 9 Suppl 1: 131-161.
90. Chwalisz K, Garfield RE. Role of progesterone during pregnancy: models of parturition and preeclampsia. *Z Geburtshilfe Perinatol* 1994; 198: 170-180.
91. Wing DA, Ham D, Paul RH. A comparison of orally administered misoprostol with vaginally administered misoprostol for cervical ripening and labor induction. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 1155-1160.
92. Timmons BC, Mitchell SM, Gilpin C, Mahendroo MS. Dynamic changes in cervical collagen and epithelial tight junction complex: differentiation occur during cervical ripening and parturition. *Endocrinology* 2007; 148: 1278-1287.
93. Kitamura K, Ito A, Mori Y, Hirakawa S. Glycosaminoglycans of human uterine cervix: heparan sulfate increase with reference to cervical ripening. *Biochem Med* 1980; 23: 159-166.
94. Downing SJ, Sherwood OD. The physiological role of relaxin in the pregnant rat. IV. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans. *Endocrinology* 1986; 118: 471-479.
95. Uldbjerg N, Malmstrom A, Ekman G, Ulmsten U. Proteoglycans from cultures of fibroblast from the human uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 1985; 19: 146-154.

96. Uldbjerg N, Carlstedt I, Ekman G, Malmstrom A, Ulmsten U, Wingerup L. Dermatan sulphate and mucin glycopeptides from the human uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 1983; 16: 199-209.
97. Danforth DN, Veis A, Breen M, Weinstein HG, Buckingham JC, Manalo P. The effect of pregnancy and labor on the human cervix: changes in collagen, glycoproteins, and glycosaminoglycans. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 120: 641-651.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Konya'da doğdu. 1986 yılında ailesiyle birlikte Antalya'ya yerleşti. 1993 yılında Barbaros İlkokulu'ndan, 1996 yılında Atatürk Ortaokulu'ndan ve 1999 yılında Antalya Lisesi'nden mezun oldu. 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirerek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl eylül ayında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ,bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans Programı'na başladı. Halen aynı enstitüde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Fatma Nur Çelik İngilizce bilmektedir.