

1-1-2000

## Distributions and Possible Roles of Laminin, Fibronectin and Their Receptor Subunits Integrin $\beta$ 4 and $\alpha$ 5 in Remodelling of Extracellular Matrix during Decidualization in Rats

ÜMİT ALİ KAYIŞLI

MEVLÜT ASAR

RAMAZAN DEMİR

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology>



Part of the [Biology Commons](#)

---

### Recommended Citation

KAYIŞLI, ÜMİT ALİ; ASAR, MEVLÜT; and DEMİR, RAMAZAN (2000) "Distributions and Possible Roles of Laminin, Fibronectin and Their Receptor Subunits Integrin  $\beta$ 4 and  $\alpha$ 5 in Remodelling of Extracellular Matrix during Decidualization in Rats," *Turkish Journal of Biology*. Vol. 24: No. 3, Article 1. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol24/iss3/1>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Biology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact [academic.publications@tubitak.gov.tr](mailto:academic.publications@tubitak.gov.tr).

## Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matriksin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri İntegrin $\beta 4$ ve $\alpha 5$ 'in Dağılımları ve Muhtemel Rollerini\*

Ümit Ali KAYIŞLI, M. ASAR, R. DEMİR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kampüs, Antalya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.01.1999

**Özet:** Gebelik sürecine hazırlanan endometriyumdaki hücreler ve bunların ürünü olan stromal matriks elemanları, endometriyal kabullenmeye bağlı olarak, yapısal farklılaşmaya giderler. Endometriyal desidualizasyonla ortaya çıkan bu yapısal farklılaşmada, 'ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinin ve adhezyon moleküllerinin rol almaları kaçınılmaz bir olgudur' hipotezine bağlı olarak, ESM molekülleri laminin ve fibronektin ile adhezyon proteinleri integrin  $\alpha 5$  ve  $\beta 4$ 'ün ortaya çıkış ve değişen dağılımlarının incelenmesi ile desidualizasyon ve implantasyondaki rollerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bunun için ergin 40 adet gebe hayvandan, gebeliğin 4-8. günlerinde disseke edilmek üzere 5 deney grubu oluşturuldu. Implantasyon alanlarından alınan 6-8  $\mu$ m kalınlığındaki parafin doku seri kesitleri immunohistokimyasal teknikleri ile boyandı.

Desidual reaksiyon alanı (DRA) ilk olarak gebeliğin 4. gününde görüldü. Gebeliğin 4 ve 5. gününde fibronektinin DRA'nın merkezinde ve 6-8. günlerde ise primer desidual reaksiyon alanında (PDRA) yoğunlaştığı gözlemlendi. İntegrin  $\alpha 5$ , 6. güne kadar fibronektine benzer bir boyanma göstermesine rağmen, bu günden sonra PDRA'da oldukça zayıftı. Lamininin başlangıçta lümen ve bez bazal laminalarında ve DRA'nın periferinde yoğun olarak boyanırken, 6. günden sonra lamininin sekonder desidual reaksiyon alanında (SDRA) yoğunlaştığı ve tüm gebelik günlerinde integrin  $\beta 4$ 'e paralel bir immunoreaktiviteye sahip olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, sıçan uterusu endometriyumunda desidual reaksiyonun gebeliğin 4-8. günleri arasında görüldüğünü ve sadece laminin ve fibronektin değil, aynı zamanda integrin  $\alpha 5$  ve  $\beta 4$ 'ün de desidual doku yapılına ve implantasyon olayına aktif olarak katıldıklarını söyleyebiliriz.

**Anahtar Sözcükler:** Laminin, fibronektin, integrin, desidualizasyon, implantasyon.

### Distributions and Possible Roles of Laminin, Fibronectin and Their Receptor Subunits Integrin $\beta 4$ and $\alpha 5$ in Remodelling of Extracellular Matrix during Decidualization in Rats

**Abstract:** In the endometrium preparing for pregnancy, the stromal matrix components of the cells and their products begin structural differentiation due to endometrial receptivity. According to the hypothesis that 'extracellular matrix (ECM) proteins and adhesion molecules take roles in the structural differentiation as a result of endometrial decidualization', our aim was to determine the roles of ECM

\* Ü.A. KAYIŞLI'nın master tezinden adapte edilmiş olup, Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 96.03.0122.01 nolu proje ile desteklenmiştir.

molecules laminin, fibronectin and adhesion proteins integrin  $\alpha 5$  and  $\beta 4$  in the decidualization and implantation by examining the emergence and changing distribution of these proteins.

In this study, five experimental groups, consisting of 40 pregnant animals on pregnancy days 4-8, were used. Paraffin tissue serial sections that were 6-8  $\mu$ m in thickness from the implantation areas were stained by immunohistochemical techniques.

Decidual reaction area (DRA) was first observed on pregnancy day 4. Fibronectin was observed densely in the center of the DRA on pregnancy days 4, 5 and in the primary decidual area (PDRA) on pregnancy days 6-8. Although integrin  $\alpha 5$  had a similar staining to fibronectin up to pregnancy day 6, it was very weak in PDRA after that day. While laminin was dense in the basal lamina of the lumen and glandular epithelium and in the periphery of the DRA at the beginning, it was observed to be dense in the secondary decidual area (SDRA) after pregnancy day 6 and to have parallel immunoreactivity to integrin  $\beta 4$  on all pregnancy days.

In conclusion, we can say that decidual reaction appears on pregnancy days 4-8 and not only laminin and fibronectin but also integrin  $\alpha 5$  and  $\beta 4$  take part actively in decidual tissue formation and implantation events in the endometrium of rat uterus.

**Key Words:** Laminin, fibronectin, integrin, decidualization, implantation.

## Giriş

Gebeliğin preimplantasyon döneminde, ovaryal hormonlar ile blastosist ve uterus arasındaki sinyal mekanizmalarının etkisi altındaki uterinal stroma, gelişen blastosiste cevap olarak desidual reaksiyon adı verilen bir dizi olaylar sonunda bazı değişikliklere gider. Prolifere olan endometriyal stromal fibroblastlar morfolojik ve fizyolojik farklılaşmalar gösterirken (1, 2), ekstrasellüler matris (ESM) moleküllerinin yapısı da yeniden şekillenir (3). Bu dönemde desidual hücrelerin sekresyon ve sentez aktivitelerinin artışına bağlı olarak ESM moleküllerinin endometriyal stromadaki dağılımlarında ve kompozisyonunda büyük değişiklikler gözlenir (3-6). İmplantasyon için uygun ortamın hazırlanmasında, endometriyal stromanın, özellikle de ESM yapısının, yeniden nasıl şekillendiği tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca desidualizasyon olaylarında, ESM moleküllerinin katıldığı sinyal mekanizmaları hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır (1, 3, 4, 7).

ESM proteinlerinin hücrelerle etkileşimleri sonunda proliferasyon, differensiyasyon, migrasyon ve adhezyon gibi hücre fonksiyonlarının düzeni ve dinamiği üzerinde bazı görüşler ile sürülmüştür (7, 8). ESM proteinlerinden laminin, embriyonal gelişimin erken devrelerinde çoğu zaman görülmez; ancak, daha sonra bazal membranda ortaya çıkar (9). Laminin polipeptitlerinin 2, 4, 8 ve 16 hücreli morulanın kompakt ve kompakt olmayan aşamalarında gözlenmesi, embriyogenezin erken dönemlerinde hücre göçü, adhezyonu ve farklılaşması gibi olaylara katıldığı ve bu molekülün hücre büyümesi ile hücre iskeletinin organizasyonunda da rol aldığını göstermektedir (9). Laminin bu fonksiyonlarını, üzerinde bulunan belli bölgelere hücre yüzey reseptörlerinin ve diğer ESM moleküllerinin bağlanmasıyla gerçekleştirdiği sanılmaktadır. İmplantasyon döneminde blastosist üzerinde morfolojik olarak saptanabilen tüm membranlarda laminin bulunması bu kanıyı güçlendirmiştir (7, 9).

Diğer bir ESM proteini olan fibronektin; kollagen, fibrin ve heparan sülfat gibi ESM moleküllerine ve hücrelere bağlanan birçok fonksiyonel bölge içerir. Fibronektin ile hücreler arasındaki etkileşme, genelde bu molekül üzerindeki belli anahtar dizileri tanıyıp bağlanan özelleşmiş reseptörler aracılığı ile gerçekleşir. Bu protein üzerinde en iyi bilinen fonksiyonel

bölgeler RGD (arjinin-glisin-aspartat), LDV (lösin-aspartat-valin) ve REDV (arjinin-glutamat-aspartat-valin) segmentleridir (10). Hücre bağlayıcı RGD segmentindeki bir mutasyonla, bu alana bağlanan hücrelerin adhezyon yeteneğinin yok olduğu ve hücre göçünün inhibe edildiği gözlenmiştir. Fibronektin üzerindeki IIICS bölgesine fibroblastlar ilgi duymadığı halde, göç eden nöral krest ve melanoma hücreleri ile aktive olmuş T ve bazı B lenfositleri bağlanabilir (10). Fibronektinin gastrulasyonda embriyonal hücre göçü için bir substans görevi yaptığı, yine bu molekülün hücre farklılaşması ve hücre-hücre adhezyonunda da rol aldığını bildiren birçok bulgu vardır. Örneğin, embriyogenezin morula aşamasında iç hücre kitlesinde fibronektin varlığı, bu molekül ile sıkı ilişkide bulunan trofoblast hücrelerinin daha hareketli olabileceğini düşündürmüştür (9, 11, 12). Laminin ve fibronektin, trofoblastik invazyonun seyrinde rol oynayan önemli faktörler olarak kabul edilmeleri, konuya yeni bir boyut getirmektedir (13, 14).

Adhezyon moleküllerinin bir grubunu oluşturan integrinler, ESM proteinlerinin hücre membranındaki reseptörleri olarak görev yaparlar ve bir integrin proteini  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden meydana gelen heterodimerik bir glikoproteindir (11, 15). Birçok adhezyon reseptörünün ESM proteinleri ile olan etkileşimleri hücre içi sinyal mekanizmalarını çalıştırarak hücreleri proliferasyona, farklılaşmaya veya göçe yönlendirdiği ve gebelik süresince integrinlerin geçici ve dinamik bir ekspresyon modeli gösterdikleri rapor edilmiştir (16-18).

Bu kaynak bilgilerimiz ESM proteinlerinin hücrelerarası sinyal mekanizmalarında önemli görevler aldıklarını göstermektedir. Erken gebelik döneminde desidualizasyona katılan ESM proteinlerinin kompozisyonu ile bu moleküllerin hücrelerle ve başka moleküllerle etkileşim mekanizmaları hakkındaki bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Kaldı ki desidual stromal dokulardan kaynaklandığı bilinen birçok sekretuar ve yapısal proteinin orijini henüz tartışmalıdır (19).

Gebelik sürecine giren endometriyumda ESM proteinleri ile adhezyon reseptörleri, gebeliğin habercisi olan desidualizasyonun belirleyicileri olabilirler. ESM proteinlerinin ve adhezyon moleküllerinin desidualizasyon sürecinde rol almaları kaçınılmaz bir olgu olmalıdır. Bu hipotez esas alınarak sunulan bu çalışmada, gelişen desidual reaksiyona bağlı olarak, farklı gebelik yaşlarındaki sıçan uterusu endometriyal stromasında laminin ve fibronektin ile bu moleküllerin adhezyon reseptör alt birimleri integrin  $\beta 4$  ve  $\alpha 5$ 'in değişen dağılımlarına bakılarak, desidualizasyon ve implantasyon olaylarındaki rollerinin belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

Araştırmada daha önce çiftleşmemiş ve deneye girmemiş ortalama ağırlıkları 230-260 gr olan ergin, 40 adet dişi ve 20 adet erkek sıçan (*Ratus norvegicus*) kullanıldı. Hayvanlar da normal yem ve musluk suyu ile beslendiler. Östrüs devresinde bulunan sıçanlar, dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde bir gece kafeste bırakıldılar. Ertesi sabah vajinal simirinde spermiyum belirlenen dişi sıçanlar gebeliğin sıfırncı gününde kabul edildiler.

Gebe hayvanlardan, gebeliğin 4, 5, 6, 7 ve 8. günlerinde disseke edilmek üzere 5 deney grubu (her grupta 8 hayvan) oluşturuldu. Her deneyin sonunda eter anestezisi uygulanan hayvanlara, femoral venden tuzlu suda çözülmüş 1 ml %1'lik evans mavisi verildi ve 15 dakika sonra karın ön duvarı açılarak mavi renge boyanan uterus bölgelerinden toplanan doku örnekleri

(2), Holland fiksatifinde (1000 ml distile suda 100 ml % 40 formalin, 5 ml glasiyal asetik asid, 40 gr pikrik asid, ve 2.5 gr bakır asetat) 4 saat tesbit edildi. Dehidratasyon ve şeffaflaştırma işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Doku bloklarından 6-8  $\mu$ m kalınlığında normal ve poli-L-lisin kaplı lamlara alınan seri kesitlere sıra ile oryantasyon için hematoksil-eozin ve immunohistokimyasal boyama teknikleri uygulandı.

#### İmmunohistokimyasal protokol

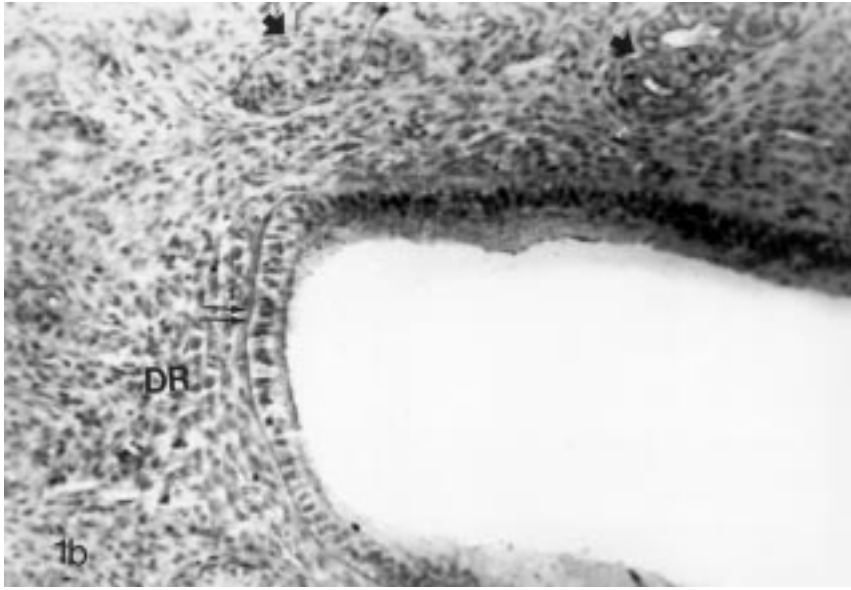
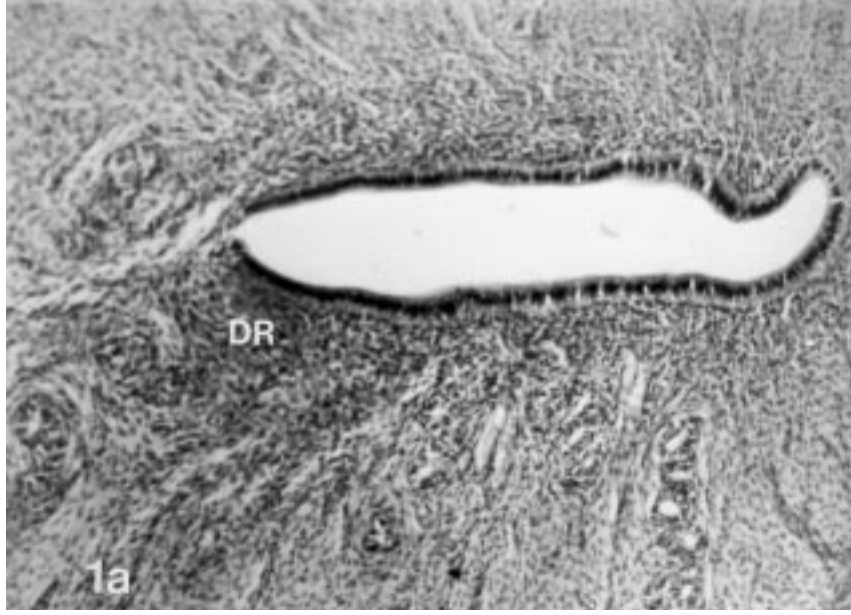
Poli-L lisin'li lamlara alınan doku kesitleri 60 °C'de bir gece, 70 °C'de 1 saat bekletildi, deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra distile suda ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, pH: 7.2-7.4) yıkandı. Kesitlere 10 dakika Proteinaz K (Proteinase K, Dako S 3004) enzimi uygulandı ve antijenik maskelenmenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponu (pH: 6.1 lt distile suda 2.1 gr sitrik asid ve 15 ml NaOH) içinde mikrodalga fırınına verildi. Fırın dışına alınan kesitler distile su ve PBS'den geçirildi ve üzerine hidrojen peroksit (Biogenex HK 111-5K, % 6) damlatıldı. Distile su ve PBS'de yıkanan kesitler, anti-fibronektin (1/400 dilue, Sigma F 3646), anti-laminin (1/200 dilue, Serotec AHP 239), anti-integrin  $\alpha 5$  (1/1500 dilue, Boehringer Ingelheim BMS4095) ve anti-integrin  $\beta 4$  (1/1500 dilue, Boehringer Ingelheim BMS4075) primer antikolarıyla 60 dakika inkübe edildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlere sıra ile 30'ar dakika biyotinli sekonder antikor (Super sensitive detection kit for rat; anti-rabbit Ig; Biogenex GP 900-9R, kullanıma hazır) ve streptavidin-peroksidaz kompleksi (Super sensitive label for animal detection; Biogenex GP 900-9R) uygulandı. Distile su ve PBS'de geçirilen kesitler, aminoetilkarbizol (AEC; Biogenex HK 129-5K) ile boyandı ve akar musluk suyunda yıkandı. Daha sonra zıt boyama için Mayer'in hematoksileninde 30 saniye bırakıldı, suda yıkandı ve kapatma solüsyonu ile kapatıldı (19).

İmmunohistokimya uygulanan doku kesitleri, ışık mikroskopunda oryantasyon amaçlı kesitlerle kıyaslı olarak değerlendirildi.

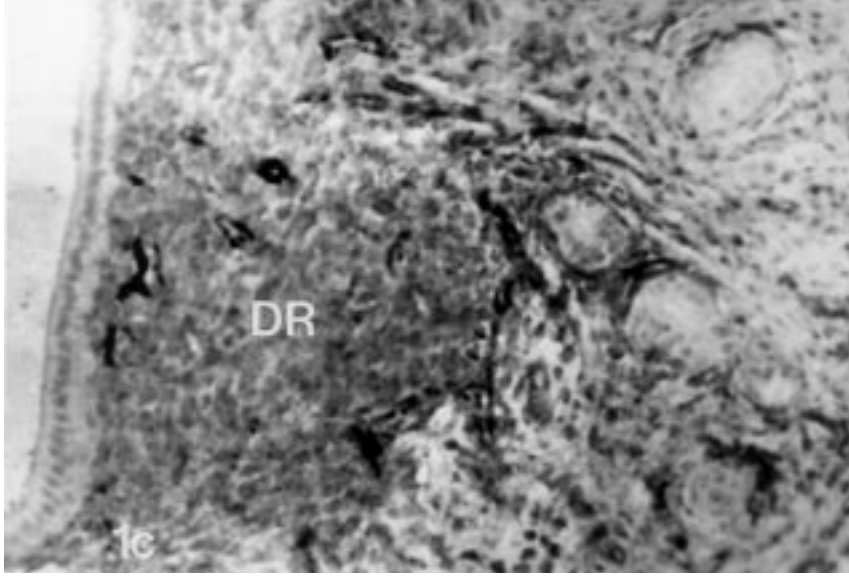
#### Bulgular

Gebeliğe ilk yanıtı oluşturan desidual reaksiyon, gebeliğin 4. gününde uterusun antimezometriyalinde lümen epitelinin altında küçük bir alanda gözlemlendi (Şekil 1a). Laminin, bez ve lümen epitel bazal laminaında normal, desidual reaksiyon alan (DRA)'larında zayıf bir immunoreaktivite gösterirken (Şekil 1b), DRA'ındaki hücrelerde ve ESM'de fibronektin immunoreaktivitesi oldukça yoğundu (Şekil 1c). Bu dönemde laminin reseptörü integrin  $\beta 4$ 'ün immunoreaktivitesi, lümen ve bez epitel ile desidual reaksiyon olmayan alan (DROA)'lardaki hücrelerde yoğun, DRA'ında ise oldukça zayıf olarak gözlemlendi (Şekil 2). Diğer taraftan integrin  $\alpha 5$  DRA'ında, bez ve lümen epitelinde yoğun iken, DROA'larda çok zayıf bir immunoreaktivite gösterdi.

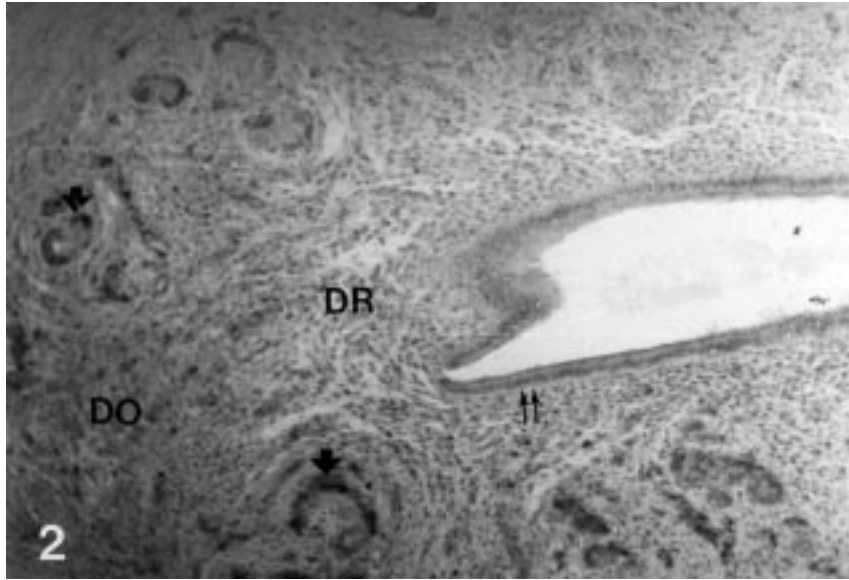
Gebeliğin 5. gününde, uterusun antimezometriyal bölgesinde gelişen DRA'nın lümen çevresinde koniye benzer bir şekilde yayıldığı gözlemlendi (Şekil 3a). Bu devrede laminin immunoreaktivitesi DRA'nın merkezine göre periferik bölgede lokalize olan hücrelerinde ve ESM'inde daha kuvvetli idi (Şekil 3b). Ayrıca, laminin bez epitel ve damar duvarı bazal laminalarında kuvvetli, lümen epitel bazal laminaında zayıf boyandı. DRA'nın periferinde



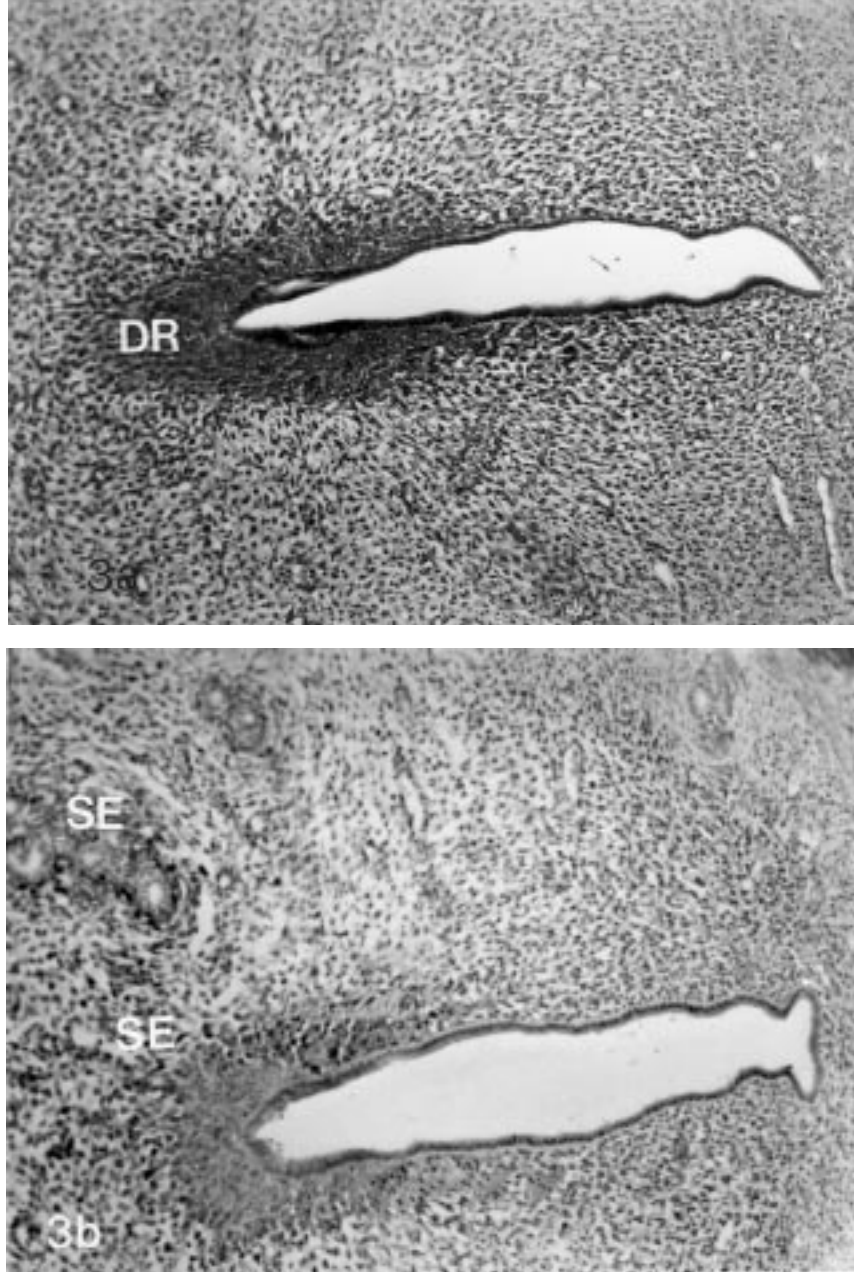
Şekil 1. Gebeliğin 4. gününde, (a) uterus antimezometriyalinde endometriyal desidual reaksiyon alanı (DR); (b) orta derecede laminin immunoreaktivitesi gösteren bez (tek ok) ve lümen epiteli (çift ok) bazal laminaları ile nispeten daha zayıf bir laminin immunoreaktivitesi gösteren desidual reaksiyon alanı (DR).



Şekil 1. (c) Fibronektinin immunoreaktivitesini gösteren desidual reaksiyon alanı (DR) gözlenmektedir. a: X25; b ve c: X50.



Şekil 2. Gebeliğin 4. gününde, desidual reaksiyon alanında (DR) zayıf, bez (tek ok) ve lümen epiteli (çift ok) ile desidual reaksiyon olmayan alanlarda (DO) kuvvetli integrin  $\beta 4$  immunoreaktivitesi gözlenmektedir. X25.



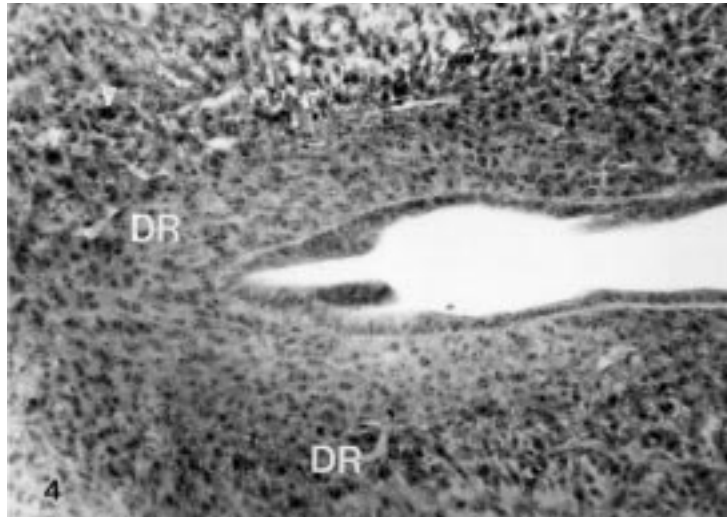
Şekil 3. Gebeliğin 5. gününde, (a) uterus duvarında koni şeklinde gelişen endometriyal desidual reaksiyon alanı (DR); (b) kuvvetli laminin immunoreaktivitesi gösteren stromal elemanlar (SE).



fibronektin boyanması lamininin aksine, hücrelerde ve ESM'de oldukça zayıf, merkezdeki hücrelerde ve ESM'de ise çok daha yoğundu (Şekil 3c). Integrin  $\beta 4$  lümen epitelinde ve DROA'larında, integrin  $\alpha 5$  ise DRA'larında ve lümen epitelinde kuvvetli boyandı (Şekil 4).



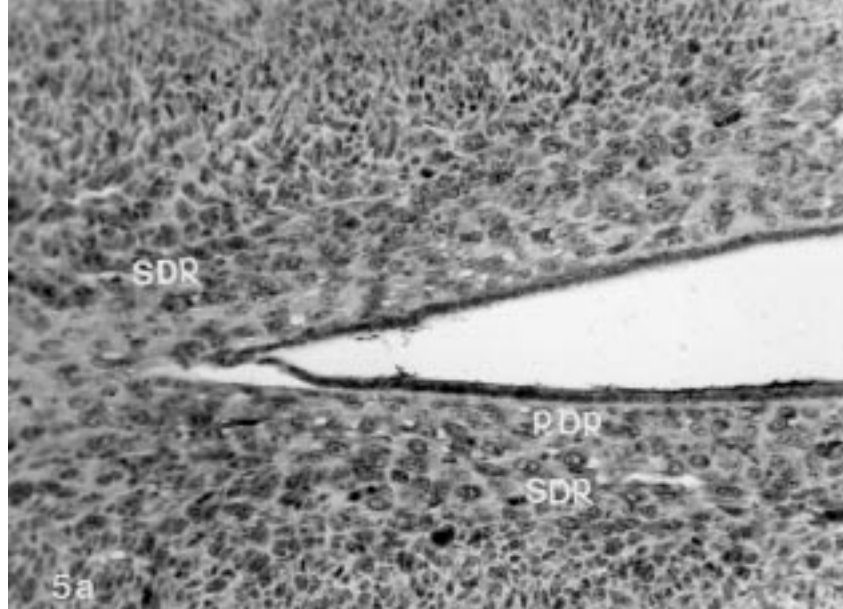
Şekil 3. (c) Kuvvetli fibronektin immunoreaktivitesi gösteren endometriyal desidual reaksiyon alanı (DR) görülmektedir. a, b, c: X25.



Şekil 4. Gebeliğin 5. gününde, desidual reaksiyon alanında (DR) kuvvetli integrin  $\alpha 5$  immunoreaktivitesi ve integrin  $\alpha 5$  pozitif bazı hücrelerde mitotik figürler (ok başı) gözleniyor. X50.

Gebeliğin 6. gününde, antimezometriyal alandan mezometriyal alana doğru giderek bir yayılma gösteren DRA'nın primer ve sekonder DRA'lara farklılaştığı görüldü. ESM yapısında büyük değişikliklerin belirgin olduğu bu devrede, lamininin sekonder desidual reaksiyon alan (SDRA)'ında daha yoğun olmak üzere, DROA'lara doğru yayıldığı ve özellikle hücre içi boyanmaların belirgin olduğu gözlemlendi. Lümen epitelinin bazal membranı sürekli olmayıp kesintiliydi ve lamininin ile zayıf boyanmıştı (Şekil 5a). Fibronektin immunoreaktivitesi primer desidual reaksiyon alan (PDRA)'ın sadece embriyoyu çevreleyen bölgesiyle, SDRA'nın bütünündeki hücreler ve ESM'de kuvvetliydi. Bu bölgelerde sık mitotik figürlere rastlandı ve blastosistin desidual stroma ile ilişkide olduğu gözlemlendi (Şekil 5b). Desidual hücrelerdeki integrin  $\beta 4$  boyanması 5. gündeğine göre daha kuvvetli iken (Şekil 6a), integrin  $\alpha 5$  PDRA'ında zayıf, SDRA'da ise oldukça yoğun ve integrin  $\alpha 5$  pozitif hücrelerin bazılarında mitotik figürler gözleniyordu (Şekil 6b).

Gebeliğin 7. ve 8. günlerinde, primer ve sekonder desidual reaksiyon alanları daha da belirginleşmişti. Bu günlerde lamininin immunoreaktivitesi PDRA'ına kıyasla SDRA'nın ESM'sinde çok daha kuvvetli idi (Şekil 7a). Gebeliğin 7. gününde fibronektin immunoreaktivitesinin PDRA ve DROA ESM ve hücrelerinde kuvvetli olmasının aksine, SDRA'da zayıf görünmesi ilginçti. Bu durum gebeliğin 8. gününde çok daha belirgin bir hal almıştı (Şekil 7b). Diğer taraftan integrin  $\beta 4$  7. günden itibaren SDRA'daki hücrelerde çok yoğun olarak boyandı. Bu günlerde integrin  $\alpha 5$  immunoreaktivitesi PDRA'ındaki hücrelerde yok denecek kadar zayıf iken, SDRA'daki mevcudiyeti devam etmekteydi (Şekil 8).



Şekil 5. Gebeliğin 6. gününde, (a) desidual reaksiyon alanlarının ayrılması, primer ve sekonder desidual reaksiyon alanları (PDR, SDR) ve kuvvetli lamininin immunoreaktivitesi gösteren sekonder desidual reaksiyon alanı (SDR).



Şekil 5. (b) blastosisti çevreleyen dar doku şeridinde (DD) ve sekonder desidual reaksiyon alanında (SDR) kuvvetli fibronektin immunoreaktivitesi gözleniyor. a: X50; b: X25.

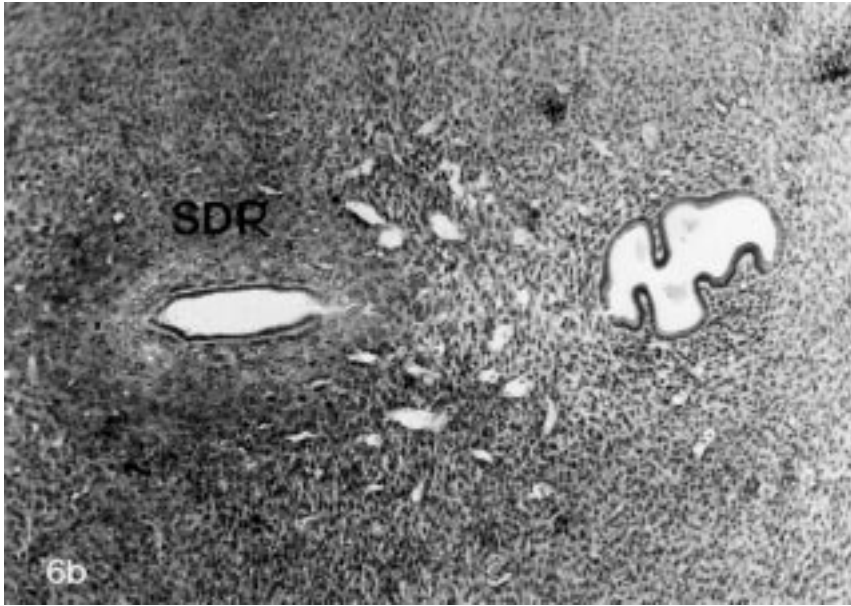
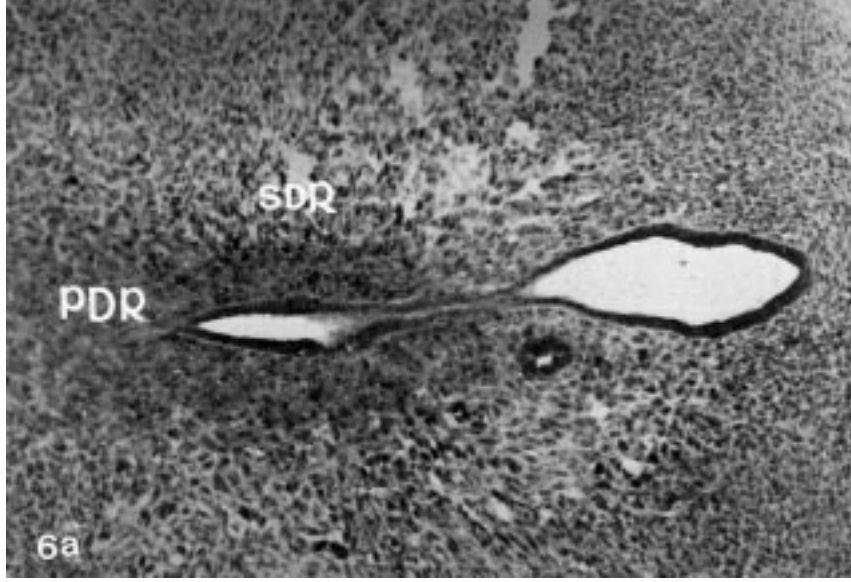
Gebeliğin 5. gününde mezometriyala doğru daralmaya başlayan uterus lümeninin 8. günde tamamen kaybolduğu ve yine bu devrede antimezometriyalda, lümenin yeniden oluşmaya başladığı görüldü (Şekil 9).

### Tartışma

Östrüs dönemlerinden geçen kemiricilerin siklik dönemleri ile gebelik başlangıcı evrelerini belirleyen zaman dilimleri üzerinde farklı görüşlerin olması, deney modelinde kullanılan denek türünün individual özellikleri ile konunun karmaşıklığından ileri gelir.

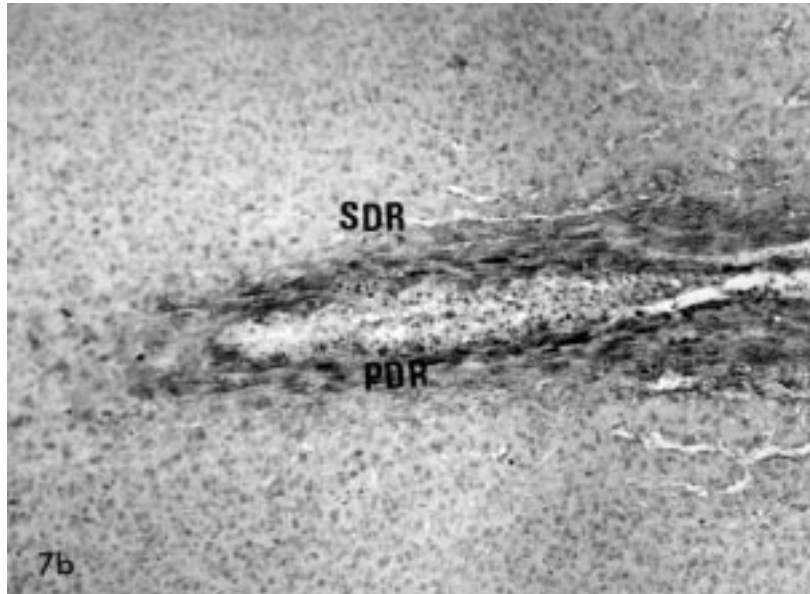
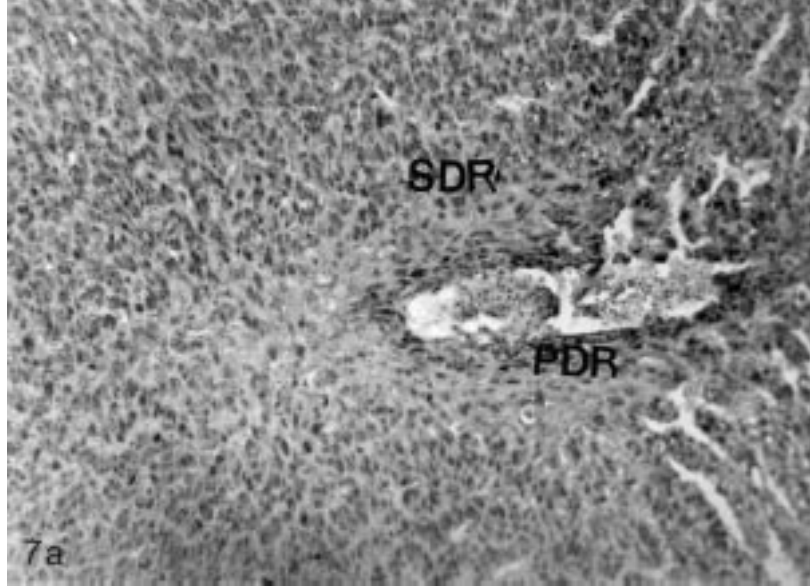
Desidualizasyon ile ilgili değişik görüşleri olan Abrahamson ve Zorn (1), blastosistin lümen epiteli bazal laminasıyla kontak kurduktan sonra stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşmaya başladığını ileri sürerler. Welsh ve Enders (2), desidualizasyonun gebeliğin 6. gününde antimezometriyal bölgede lümen epiteline komşu küçük bir alanda sınırlı kaldığını ifade ederlerken, Kramer (21) hormonların etkisi altında gelişen sıçan endometriyumunda desidual hücrelerin ilk olarak gebeliğin 4.5. gününden itibaren görüldüğünü, 4.5–6.5. günlerde de stromal dokuda desidual reaksiyonun yaygınlaştığını bildirmiştir.

Sıçan endometriyumunda ilk desidual reaksiyonu belirleyen gebeliğin 4. günündeki bulgularımız, yukarıda belirtilen literatür bilgisine dayalı bulguların yeniden gözden geçirilmesi

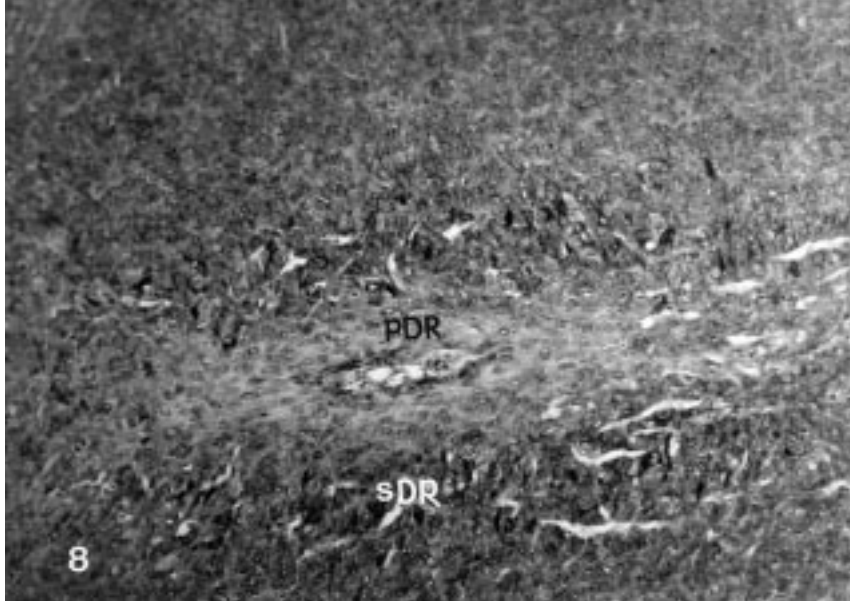


Şekil 6. Gebeliğin 6. gününde. (a) primer (PDR) ve sekonder desidual reaksiyon alanlarında (SDR) integrin  $\beta$ 4 immunoreaktivitesi; (b) sekonder desidual reaksiyon alanında (SDR) yoğun integrin  $\alpha$ 5 immunoreaktivitesi görülmektedir. a: X25; b: X50.

Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matriksin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri Integrin b4 ve a5'in Dağılımları ve Muhtemel Rollerini



Şekil 7. Gebeliğin 8. gününde, (a) laminin immunoreaktivitesi embriyoyu çevreleyen primer desidual reaksiyon alanda (PDR) zayıf, sekonder desidual reaksiyon alanda (SDR) kuvvetli; (b) fibronektin immunoreaktivitesi embriyoyu çevreleyen primer desidual reaksiyon alanda (PDR) kuvvetli, sekonder desidual reaksiyon alanda (SDR) zayıf olduğu görülüyor. a ve b: X25.



Şekil 8. Gebeliğin 7. gününde, integrin  $\alpha 5$  immunreaktivitesi embriyoyu çevreleyen primer desidual reaksiyon alanında (PDR) zayıf, sekonder desidual reaksiyon alanında (SDR) daha yoğun görülmektedir. X50.



Şekil 9. Gebeliğin 8. gününde, antimezometriyalde yeniden oluşmuş uterus lumeni (L) gözlenmektedir. X12.5.

gerektiğini telkin etmektedir. Bu devrede, DRA'nın lümen epiteline komşu küçük bir alanda görülmesi, blastosistin uterus bazal laminası ile ilişkiye girmesine (1) gerek olmadan reaksiyonun başlayabileceğini göstermektedir. Nitekim gebeliğin 5. ve 6. günlerinde bu küçük alanın gelişerek uterus endometriyumunun mezometriyaline doğru genişlediğini belirleyen gözlemlerimiz, Kramer'in (21) bulgularına paralellik gösterirken, Abrahamson ve Zorn'un (1) sonuçları ile uyuşmamaktadır. Çünkü, bu çalışmanın bulguları gebeliğin 4-5. günlerinde lümen epitelinin bir bütün olduğu ve blastosistin lümen epiteliyle fiziksel bir temasa henüz geçmediğini göstermektedir. Diğer taraftan ratlarda blastosist epitel ile olan kontakın gebeliğin 5. gününden sonra gerçekleştiği elektron mikroskopik olarak gösterilmiştir (22, 23). Gebeliğin 6. gününde blastosistin endometriyal stroma ile etkileşmeye girmesi, desidualizasyon sürecinin blastosist-epitel kontakından önce başlamasını engelleyen bir süreç değildir; fiziksel kontaktan önce desidualizasyonun başlaması doğal sayılmalıdır. Ayrıca, gebelik yaşına bağlı olarak yaygınlaşan DRA'nın, embriyo ile ilişkili alanlara ve oluş önceliğine göre farklılaşmaları mümkündür. Nitekim bazı araştırmacılar gibi (2-4), biz de, PDRA ve SDRA ayrımını blastosist implantasyonunun görüldüğü gebeliğin 6. gününden itibaren ortaya çıktığını gözledik.

Welsh ve ark. (2) gebeliğin 6. gününde daralmaya başlayan uterus lümeninin 10. günde kapandığını ve 12. günde yeniden oluşmaya başladığını bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmanın bulguları, gebeliğin 5. gününde daralma gösteren uterus lümeninin 8. günde tamamen kapandığını ve aynı günün sonunda yeniden oluşmaya başladığını gösterdi. Lümenin kapanma ve yeniden oluşma sürecine girmesi, zaman dilimleri bağlamında bildirilenlerle uyumlu olmadığı (2) gibi, bu sonucun endometriyal stromada gelişen ve yayılan desidual reaksiyonun siklik dinamiği ile ilişkili olduğunu telkin etmektedir.

Sıçan uterusunda lümen epitel bazal membranı, desidual reaksiyondan ve implantasyondan etkilenen yapılardandır. Araştırmacıların da ifade ettiği gibi (3, 13, 14) gebeliğin 5. gününden itibaren bu yapının giderek bozulmaya başladığı, uyguladığımız immunohistokimyasal tekniklerin sonuçları ile azalan laminin immunoreaktivitesinden açık olarak anlaşılmaktadır. Öyle ki, zayıf laminin immunoreaktivitesine paralel olarak gebeliğin 6. gününde endometriyum bazal membran yapısında yer yer kesintilerin olması bu ifadeleri doğrulamaktadır. Blankinship ve ark. (24) ile Zorn ve ark. (25) da çalışmalarında lümen epitel bazal laminasında ve desidual alanda bazal lamina komponentlerinin azaldığını rapor etmişlerdir. İmplantasyonun başlangıcında lümen epitel bazal laminasında ve desidual alanda görülen gebelik yaşına bağlı olarak laminin immunoreaktivitesindeki bu azalma, proteolitik enzimlerin etkisine ve laminin yapısındaki konformasyonel değişikliklere bağlanabileceği yönündeki görüşleri (3, 13, 14, 24-26) kuvvetlendirilmektedir.

Grinnell ve ark. (5), gebeliğin 1-6. günleri arasında fibronektinin önce arttığını ve daha sonra ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Ayrıca, gebeliğin 6. gününde total fibronektin mRNA seviyesinin arttığı ve buna zıt olarak, subepitelyal alanda fibronektinin azalırken, mezometriyalde arttığı rapor edilmiştir (27). Nitekim bazal membranın sürekliliğini yitirdiği gebeliğin 6. gününde, laminin PDRA'nın bütününde, fibronektin ise bu alanın periferinde çok zayıf boyanırken, embriyoyu çevreleyen dar doku şeridinde yeniden kuvvetli bir fibronektin immunoreaktivitesinin başlaması oldukça ilginçtir. Gebeliğin 6-8. günlerinde fibronektin PDRA'da varlığını sürdürürken,

lamininin bu alanda zayıf immunoreaktivite göstermesi, bu devrede lamininin blastosist invazyonuna karşı bir engel oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, lamininin trofoblastik invazyonu inhibe ettiğini, fibronektinin hızlandırdığını bildiren araştırmacıların (28, 29) bulgularıyla da desteklenmektedir. Tominaga'nın (30) erken sekresyon fazındaki düşük seviyeli laminin ve fibronektin bulguları, bizim düşük laminin ve yüksek fibronektin immunoreaktivitesini bildiren bulgularımızla da kısmen uyumludur. Ayrıca, implantasyonu takiben konseptusa proksimal stromada fibronektinin yokluğunu bildiren Grinnell'in (5) bu bulgusu ile de uyuşmamaktadır.

Babiarz ve ark. (4) fare desidual hücreleri ile yaptıkları çalışmada integrin  $\alpha 5\beta 1$ 'in desidual hücrelerin ve lumen epitelinin morfolojik farklılaşmalarını desteklediğini bildirmişlerdir. Lessey ve ark. (16,31) ise desidualizasyonda  $\alpha 4$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  integrin alt birimlerinin rol aldığını rapor etmişlerdir. DRA'nın ortaya çıktığı gebeliğin 4. gününde ve ilk olarak gebeliğin 6. gününde gözlenebilen SDRa'da fibronektin ve integrin  $\alpha 5$  immunoreaktivitesinin kuvvetli olması, bu iki proteinin desidual reaksiyonun başlatılmasında ve stromal yapılanmada önemli faktörlerden biri olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda gebeliğin 6. günden itibaren gözlenen SDRa ESM'indeki belirgin laminin ve integrin  $\beta 4$  immunoreaktivitelerindeki artış, desidual hücrelere ait perisellüler lamina oluşmasıyla ilişkili olabilir. Nitekim gebeliğin 6. gününe kadar DRA'larında oldukça zayıf reaksiyon gösteren laminin ve integrin  $\beta 4$ 'ün desidual hücre matürasyonuna paralel olarak artış gösterdiğini belirleyen bulgularımız, konuya yeni bir tartışma boyutu getirebilir.

Fibronektinin her yeni reaksiyon alanında lamininden daha kuvvetli olması ve reaksiyon alanının matürasyonuna paralel olarak immunoreaktivitesinin azalması, ayrıca bu alanlarda bazı integrin  $\alpha 5$  pozitif desidual hücrelerde sık mitozların görülmesi reaksiyona giren hücrelerin proliferasyon ve differansiyasyonunda bu molekülün kullanıldığı izlenimi vermektedirler. ESM moleküllerinin adhezyon molekülleri ile etkileşerek hücreleri bu gibi olaylara yöndendirdikleri gözlenmiştir (32). Nishida ve ark. (13) fibronektin ile reseptörünün etkileşmesinin, uterin siklusu takiben epitelyal hücre tamirinde ve migrasyonunda rol aldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, endometriyal stroma ve blastosist yüzeyindeki integrinlerin, adhezyon reseptörleri olarak fertilizasyon, implantasyon ve embriyogenezde önemli rollerinin olduğu ve özellikle  $\beta 1$  integrinin desidual hücre farklılaşmasında rol aldığı rapor edilmiştir (33, 34). Desidualizasyon süresince ESM'nin yeniden modellenmesinde, hücrel modifikasyonlara paralel olarak adhezyon moleküllerinde dinamik ve geçici bir ekspresyon modeli gösterdikleri de bildirilmiştir (17, 18). Erken gebelik süresince EMS proteinlerinin neden kısa süreli ani değişiklikler gösterdikleri henüz açıklanmış değildir. Ancak, bu dönemde hücrelerde hızlı transformasyonların olduğu da bir gerçektir.

Sonuç olarak, sıçan uterusunda desidual reaksiyonun ilk olarak gebeliğin 4. gününde görüldüğü, ESM moleküllerinden laminin ve fibronektin ile bu proteinlerin reseptör alt birimleri  $\beta 4$  ve  $\alpha 5$  integrinlerin desidual doku yapılanmasına ve implantasyon olaylarına aktif olarak katıldıkları, özellikle fibronektinin desidual reaksiyon ve implantasyon olaylarının başlatılmasında önemli anahtar moleküllerden biri olabileceği, bu çalışmanın sonuçlarına bakılarak söylenebilir. Ancak, gebelik süresince ESM proteinlerinin desidual dokunun yeniden modellenmesinde hangi molekülleri araç olarak kullandıklarının iyi anlaşılabilmesi, ESM ile etkileşen adhezyon



Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matrisin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri Integrin  $\beta 4$  ve  $\alpha 5$ 'in Dağılımları ve Muhtemel Roller

moleküllerinin moleküler biyokimyası ile hücreleri proliferasyonuna, differansiyasyona, göçe veya invazyona yönlendiren sinyal mekanizmalarının belirlenmesi için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

### Kaynaklar

1. Abrahamsohn PA, Zorn MT. Implantation and Decidualization in Rodents. *J. Exp. Zoo.* 266: 603-628, 1993.
2. Welsh AO, Enders AC. Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. *Am. J. Anat.*, 167: 463-477, 1983.
3. Clark DE, Hurst RP, McLennan IS, Myers DB. Immunolocalization of collagen type I and laminin in the uterus on days 5 to 8 of embryo implantation in rat. *Anat. Rec.*, 237: 8-20, 1993.
4. Babiarz B, Romagnano L, Afonso S, Kurila G. Localization and expression fibronectin during mouse decidualization in vitro: Mechanisms of cell: matrix interactions. *Dev. Dyn.*, 206: 330-342, 1996.
5. Grinnell F, Head JR, Hoffpauir J. Fibronectin and cell shape in vivo: studies on the endometrium during pregnancy. *J Cell Biol.*, 94: 597-606, 1982.
6. Martello EM, Abrahamsohn PA. Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. *Acta. Anat.*, 127: 146-50, 1986.
7. Albert E. The extracellular matrix in development. Organization of the early vertebrate embryo, Ed. By Nikolas Z., Plenum Press, New York, Chapter 4, 149-167, 1995.
8. Mulholland J, Aplin JD, Ayad S, Hong L, Glasser SR. Loss of collagen type VI from rat endometrial stroma during decidualization. *Biol. Reprod.*, 46: 1136-43, 1992.
9. Zagris N, Stavridis V. The expression of the genes for laminin in the early embryo. Organization of the early vertebrate embryo, Ed. Zagris N., Plenum Press New York, 169-183, 1995.
10. Yamada K M. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. Cell biology of extracellular matrix. Second edition, Ed. Elizabeth D. Hay, Plenum Press. New York, Chapter 4, 111-46, 1991.
11. Darnel J. Molecular Cell Biology, 3<sup>rd</sup> edition; Scientific American Books, Oxford, Chapter 24, 1124-97, 1995.
12. Mueller S C, Chen W T. Cellular invasion into matrix beads: Localization of  $\beta 1$  integrins and fibronectin to the invadopodia. *J. of Cell Science.* 99: 213-226, 1991.
13. Bischof P, Martelli M, Campana A. The regulation of endometrial and trophoblastic metalloproteinases during blastocyst implantation *Contracept. Fertil. Sex.*, 22: 48-52, 1994.
14. Blankenship T N, Given R L. Penetration of the uterine epithelial basement membrane during blastocyst implantation in the mouse. *Anat. Rec.*, 231: 196-204, 1992.
15. Bischof P, Redard M, Gindre P, Vassilakos P, Campana A. Localization of alpha 2, alpha 5 and alpha 6 integrin subunits in human endometrium, decidua and trophoblast. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 29; 51: 217-226, 1993.
16. Nishida T, Murakami J, Otori T. Expression of fibronectin receptor (integrin) in the uterus of rats in relation to the estrous cycle. *Histochemistry*, 96: 279-83, 1991.

17. Fazleabas AT, Bell SC, Fleming S, Sun J, Lessey BA. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during menstrual cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 56: 348-56, 1997.
18. Albers A, Thie M, Hohn HP, Denker HW. Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during menstrual cycle. *Acta Anat.*, 153: 12-19, 1995.
19. Glasser SR, Lampelo S, Munir MI, Julian J. Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. *Differentiation*, 35: 132-142, 1987.
20. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem Cytochem.*, 29: 577-580, 1981.
21. Kramer B. Changes in vascular permeability and desiduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins. *Anat. Rec.*, 242: 20-24, 1997.
22. Demir R, Üstünel I, Demir N. Light and electron microscopical observations on cellular interactions during initial stages of implantation and trophoblastic invasion in rats. *Placenta*, 10: 464-465, 1989.
23. Demir R. Functional differentiation of the blastocystic ring trophoblast cells in the rat. *Biomedical Reviews*, 8: 127-132, 1997.
24. Blankenship TN, Given RL. Loss of laminin and type 4 collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse. *Anat. Rec.*, 243: 27-36, 1995.
25. Zorn TM, Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Collagen remodelling during decidualization in the mouse. *Cell Tissue Res.*, 244: 443-48, 1986.
26. Aplin JD. The cell biology of human implantation. *Placenta*, 17: 269-75, 1996.
27. Rider V, Carlone DL, Witrock D, Oliver N. Uterine Fibronectin mRNA content and localization are modulated during implantation. *Dev. Dyn.*, 195: 1-14, 1992.
28. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher JS. Distribution patterns of extracellular matrix component and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J. Clin. Invest.*, 89: 210-22, 1992.
29. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 120: 3657-3666, 1994.
30. Tominaga T. Studies on the mechanism of embryo implantation. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 48: 591-603, 1996.
31. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil. Steril.*, 6: 497-506, 1994.
32. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84: 345-357, 1996.
33. Sueka K, Schiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yosimura Y. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. *Fertil. Steril.*, 67: 799-811, 1997.
34. Yoshimura Y. Integrins: expression, modulation and signaling in fertilization, embryogenesis and implantation. *Keio J. Med.*, 46: 16-24, 1997.