



Hyaluronik Asitin Endometrium Dokusunda $\alpha V\beta 3$ İntegrin ve Metalloproteinaz Ekspresyonuna Etkisi

Hatice Oruç Demirbağ¹, Nazlı Çil², Gülçin Abban Mete², Semih Tan²

1 Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

2 Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

Geliş: 28.10.2020; Revizyon: 12.02.2021; Kabul Tarihi: 15.02.2021

Öz

Amaç: Amacımız hyaluronik asitin menstrüel siklus boyunca $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonuna ve matriks metalloproteinaz-2 ekspresyonuna etkisini araştırmaktır.

Yöntemler: Çalışmamızda 48 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar iki gruba ayrılarak her gruptan 6 sıçana çift taraflı ovariektomi yapıldı. Deney grubu sıçanlara 12mg/kg (0,6 ml) hyaluronik asit verildi. 24 saat sonra ovariektomi yapılmayan sıçanların menstrüel döngüleri servikal dislokasyon yapılmadan önce vajinal smear yöntemiyle belirlendi. Östrus (n=6), diöstrus (n=6) ve proöstrus (n=6) dönemlerindeki sıçanların ve ovariektomi yapılan sıçanların (n=6) uterusları alındı. Kontrol grubunda da sıçanların menstrüel döngüleri vajinal smear yöntemiyle belirlendi. Östrus (n=6), diöstrus (n=6) ve proöstrus (n=6) dönemlerindeki sıçanların uterusları ve ovariektomi yapılan sıçanların (n=6) uterusları servikal dislokasyon yapılarak alındı. Dokulara rutin doku takibi yapıldıktan sonra elde edilen parafin bloklardan kesitler alındı. αV , $\beta 3$ ve matriks metalloproteinaz-2 reaksiyonunun belirlenmesi için immunohistokimya yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızın en önemli bulgusu östrus, diöstrus ve ovariektomi gruplarında izlendi. Bu gruplarda αV ve $\beta 3$ integrin hem lümen epitel hücrelerinde hem de bez epitel hücrelerinde zayıf/negatif boyanma göstermişti. Hyaluronik asit uygulanan deney grubunda ise her iki fazda da lümen ve bez epitel hücrelerinin pozitif reaksiyon göstermesi oldukça ilginçti. Boyanma östrus grubunda hem nükleer hem de sitoplazmik olurken diöstrus grubunda yalnızca sitoplazmikti. Ayrıca östrus fazında stromal hücre reaksiyonu deney ve kontrol grubunda aynı idi. Her iki grupta da stromal hücrelerde reaksiyon izlenmezken liflerde reaksiyon zayıftı.

Sonuç: Yapılan deneysel çalışmada hyaluronik asitin αV , $\beta 3$ integrin ve matriks metalloproteinaz-2 immünreaktivitesini arttırdığını gördük.

Anahtar kelimeler: Hyaluronik asit, matriks metalloproteinaz, $\alpha V\beta 3$ integrin

DOI: 10.5798/dicletip.

Correspondence / Yazışma Adresi: Nazlı Çil, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Pamukkale, Denizli, Türkiye e-mail: ncil@pau.edu.tr

Tablo: αV , $\beta 3$ integrin subünitleri ve MMP-2 ekspresyonlarının H skor analizleri sonuçları, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SD: Standart Sapma

	αV İntegrin			$\beta 3$ İntegrin			MMP-2		
	Kontrol Mean±SD	Deney Mean±SD	P	Kontrol Mean±SD	Deney Mean±SD	P	Kontrol Mean±SD	Deney Mean±SD	P
Proöstrus									
Lümen Epiteli	232,83±2,31	244,00±29,45	0,872	139,66±14,90	114,50±4,92	0,005	127,66±35,65	140,00±14,89	0,261
Bez epiteli	262,16±16,01	243,66±15,46	0,054	93,50±10,63	41,16±17,12	0,004	129,16±45,12	140,00±14,89	0,054
Stroma	145,16±20,50	81,00±26,79	0,004	129,50±53,27	105,83±22,05	0,521	129,50±53,27	105,83±22,05	0,016
Östrus									
Lümen Epiteli	2,83±1,83	274,33±11,21	0,004	1,33±0,51	251,16±13,94	0,003	1,1667±,40	249,83±12,85	0,003
Bez epiteli	1,66 ±0,81	175,666±13,23	0,004	1,33±0,51	258,83±15,36	0,003	1,5000±,54	262,66±18,16	0,003
Stroma	59,00±28,19	63,1667±4,99	0,749	60,83±7,11	62,83±8,10	0,171	60,83±7,11	62,83±8,10	0,699
Diöstrus									
Lümen Epiteli	1,169±1,83	265,0000±13,89	0,004	1,50±,83	175,66±13,23	0,003	1,50±,83	177,33±15,56	0,003
Bez epiteli	1,50 ±0,83	13,2312±85,40	0,003	105,16±11,03	165,00±6,03	0,004	97,83±3,48	163,16±11,90	0,004
Stroma	121,50±9,13	119,0000±12,69	0,74	124,00±9,63	103,16±42,35	0,33	125,83±8,15	126,00±7,42	0,87
Overioktomi									
Lümen Epiteli	1,16±,40	169,33±17,21	0,003	1,00±0,00	126,66±7,68	0,002	1,00± 0,00	120,83±10,22	0,002
Bez epiteli	1,00±,00	152,83±8,61	0,002	1,00±0,00	122,50±5,68	0,002	1,00±,00	121,33±8,31	0,002
Stroma	21,66±7,03	13,66±5,20	0,044	14,16±5,11	14,33±5,50	1	14,50±6,77	19,16±8,40	0,335

TARTIŞMA

Bu çalışmada ekstrasellüler matrikste bulunan ve birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynayan

glikozaminoglikanlardan HA'nın, sıçan endometriyumunda $\alpha V\beta 3$ integrini ve hücre göçünde rol oynayan MMP-2 ekspresyonuna etkisi ışık mikroskopik olarak incelendi. Bunun

içinde serum fizyolojik ve HA uygulanan gruplarda endometriyumda αV , $\beta 3$ subünitlerinin ve MMP-2'nin antikorları kullanarak immün boyama yapıldı.

Endometrium, adezyon moleküllerinden olan integrinlerin bol miktarda bulunduğu bir bölgedir ve endometriyumda integrinlerin ekspresyonları menstrüel siklus boyunca değişkenlik gösterir¹⁵. Sıçanlarda östrus siklusunun proöstrus evresinde östrojen pik yaparken östrus evresinde azalır, diöstrus evresinde östrojen bazal seviyeye inerken progesteron artar¹⁶. Foliküler fazda, yüksek östrojen seviyesi integrin ekspresyonunu inhibe ederken, sekretuar fazda progesteronun yükselmesi östrojenin oluşturduğu inhibe edici etkiyi ortadan kaldırır ve belirgin integrin artışı gözlenir¹⁷. Endometriyumda bulunan ve menstrüel siklusa hormonlara bağlı şekilde ekspresyonu değişen integrinlerden biri olan $\alpha V\beta 3$ reaksiyonunu progesteronun uyardığı, östrojenin ise inhibe ettiği belirtilmiştir. Progesteron ve östrojenin varlığında ise bu integrinin ekspresyonunun fazla olduğu saptanmıştır¹⁸. Ayrıca integrinlerin alt birimlerinden olan $\alpha 4$, αV , $\beta 1$ ve $\beta 3$ 'ün endometriyumda tüm bölgelerde periyodik olarak eksprese edildiği bilinmektedir¹⁹. Sülz ve ark. yapmış oldukları çalışmada kadınlardan elde ettikleri fallop tüp ve endometrium dokularında integrin subünitlerinin dağılımını incelemişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada endometriyumda αV ekspresyonunu hem foliküler hem de sekretuar fazda lümen ve bez epitelinde saptamışlardır. $\beta 3$ ekspresyonu ise foliküler fazda lümen ve bez epitelinde bulunmazken sekretuar fazda gözlemişlerdir²⁰. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara ve bilgilere paralel olarak αv ekspresyonu kontrol ve deney grubumuzda insanlardaki foliküler faza denk gelen proöstrus evresinde ve sekretuar evreye denk gelen diöstrus evresinde hem lümen hem de bez epitelinde gözlenmiştir. Sülz ve ark. yapmış oldukları çalışmadan farklı olarak bizim

çalışmamızda $\beta 3$ ekspresyonu diöstrus evresine ilave olarak proöstrus evresinde de gözlenmiştir. Diöstrus evresinde αv ve $\beta 3$ ekspresyonunun HA uygulanan grupta kontrolden daha yüksek olması bu evrede HA'nın αV ve $\beta 3$ ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Östrus evresinde ve ovariectomi yapılan gruplarda kontrol grubunda αV ve $\beta 3$ ekspresyonu gözlenmezken HA uygulamasından sonra αv ekspresyonunun gözlenmesi östrojen ve progesteronun seviyesinin azaldığı ya da ortamda ovaryumdan kaynaklı hormonların olmadığı durumlarda HA'nın αV ve $\beta 3$ ekspresyonu üzerine etki edebileceğini düşündürmüştür.

Gonzalez ve ark. fertil kadınlardan farklı menstrüel siklus fazlarında aldıkları endometriyal biyopsilerden izole ettikleri stromal ve epitel hücrelerinde αV ve $\beta 3$ integrinlerinin ekspresyonunu flow sitometri ile belirlemişlerdir. Stromal hücrelerde αV ve $\beta 3$ ekspresyonunun proliferatif ve sekretuar fazda benzer şekilde eksprese edildiğini saptamışlardır²¹. Gonzalez ve ark. yaptıkları çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da insanlardaki proliferatif ve sekretuar faza denk gelen proöstrus ve diöstrus evrelerinde hem kontrol hem de deney grubunda αV ve $\beta 3$ ekspresyonunun stromal hücrelerde eksprese edildiği saptanmıştır. Ancak HA uygulaması sonrası stromal hücrelerdeki αV ve $\beta 3$ ekspresyonunda bir artış gözlenmemiştir. Bu da bize HA uygulamasının stromal hücrelerdeki αV ve $\beta 3$ ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmadığını düşündürmektedir.

MMP'ler protein bileşenlerini parçalayan çinko bağımlı enzimlerdir. Bu enzimler dokuların yeniden şekillenmesinde ve bozulmasında görev alırlar. Uzun zaman MMP'lerin fizyolojik görevlerinin sadece ECM bileşenlerini bozarak hücre göçünü sağlamak olduğu düşünülmekteydi. Ancak son senelerde yapılan çalışmalar MMP'lerin sadece ECM bileşenlerinin düzenlenmesinden sorumlu olmadığını aynı zamanda büyüme faktörleri ve reseptörleri,

sitokinler, adezyon molekülleri ve pek çok enzim gibi ECM bileşeni olmayan moleküllerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde de rol aldığını göstermiştir²²⁻²³. İntegrinler gibi MMP'lerin ekspresyonları hormonların kontrolü altındadır. İntegrin ve MMP ekspresyonunu özellikle progesteron homonunu artırmaktadır²⁴. Progesteron hormonu, aşırı ekstrasvillöz trofoblast invazyonunu engellemek için MMP'lerin üzerinde negatif düzenleyici olarak işlev yapar. Mountain ve ark. farelerle yaptıkları çalışmalarında ovariektomi grubunda MMP ekspresyonunun olmadığını, ovariektomiden sonra hormon replasman tedavisi yapılan grupta ise MMP ekspresyonunun arttığını göstermiştir²⁵. Grzechocinska ve ark. yapmış oldukları çalışmada proliteratif (n:12), sekretuar (n:11) ve menstrüasyon (n:25) fazında alınan endometrium biyopsi (n:52) örneklerinde MMP-2, MMP-7 ekspresyonlarına immunohistokimyasal olarak incelemişler ve proliferatif fazda östradiolün artmış serum konsantrasyonu ile MMP-2 ekspresyonunun arttığını göstermişler. Ancak sekretuar fazda ve menstrüasyon boyunca MMP-2 ekspresyonu ile progesteron konsantrasyonu arasında ilişki bulamamışlardır²⁶. Bir diğer çalışmada ise östrojen ve progesteronun MMP aktivitesini attırdığı bildirilmektedir²². Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel sonuçlar elde edilmiştir. MMP-2, stromal hücrelerde, bez ve lümen epitelinde progesteron ve östrojen hormonunun yüksek olduğu proöstrus evresinde eksprese olurken; östrus, diöstrus evresinde ve ovariektomi yapılan grupta ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak HA uygulamasından sonra östrus, diöstrus evresinde ve ovariektomi yapılan grupta ekspresyonu artmıştır.

Deneklerden hormon analizinin yapılmaması çalışmamızın kısıtlılığıdır. İlerleyen çalışmalarda hyaluronik asitin endometriumdaki işlevini daha iyi

anlayabilmek için αV , $\beta 3$ ve MMP-2'nin ekspresyonlarının moleküler yöntemlerle gösterilmesi çalışmamızı daha da güçlendirecektir.

SONUÇLAR

Östrus ve diöstrus evrelerinden elde edilen neticelerin proöstrus evresindeki sonuçlardan farklı olması hem αV , $\beta 3$ integrin alt birimlerinin hem de MMP-2'nin ekspresyonunun endometriumda hormonların kontrolü altında olduğu düşüncesini güçlendirmektedir. Epitel hücrelerindeki αV , $\beta 3$ ve MMP-2'lerin ekspresyonlarının kontrol ve deney grubunu kıyasladığımızda farklı olması, HA uygulamasından sonra östrus, diöstrus evrelerinde ve ovariektomi grubunda αV , $\beta 3$ ve MMP-2'lerin ekspresyonlarının artması HA'nın αV , $\beta 3$ integrin alt birimleri aracılığı ile görev yapıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu yüzden de implantasyondan sorumlu olan bu moleküllerle ileri düzeyde moleküler çalışmaların yapılması infertilite tedavisinde yeni yaklaşımlara ışık tutacaktır.

Çalışmanın Sunulduğu Kongre: Bu çalışma 2. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresinde (UBAK) 2018 yılında sunulmuştur.

Etik Kurul Kararı: Araştırmalar, etik ve insani araştırma ilkelerine uygun olarak yapıldı ve Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (PAUHDEK-2012/001) tarafından onaylandı.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışmada PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011SBE009 proje numarasıyla desteklenmiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Pamukkale University Scientific

Research Projects Coordination Unit through project numbers 2011SBE009.

KAYNAKLAR

1. Afify AM, Craig S, Paulino AF. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006; 14: 328-33.
2. Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract*. 2020; 6: 5.
3. Cowman MK. Hyaluronan and Hyaluronan Fragments. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2017; 74: 1-59.
4. Teixeira GRC, Verna C, Nader HB, et al. Concentration and distribution of hyaluronic acid in mouse uterus throughout the estrous cycle. *Fertil Steril*. 2009; 92: 785-92.
5. San Martin S, Soto-Suazo M, Zorn TM. Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36: 1067-71.
6. Tammi MI, Oikari S, Pasonen-Seppänen S, et al. Activated hyaluronan metabolism in the tumor matrix - Causes and consequences. *Matrix Biol*. 2019; 78-79: 147-64.
7. AYTEKİN M, ÇAYLAK E. Hiyaluronan, tanı ve tedavideki önemi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*. 2009; 57: 356-64.
8. Liu C, Li Y, Hu S, et al. Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97: e10994.
9. Huang HY. The cytokine network during embryo implantation. *Chang Gung Med J*. 2006; 29: 25-36.
10. Grzechocińska B, Dąbrowski F, Cyganek A, et al. The role of metalloproteinases in endometrial remodelling during menstrual cycle. *Ginekol Pol*. 2017; 88: 337-42.
11. Wang S, Zhou X, Yang J. Integrin $\alpha\beta3$ Is Essential for Maintenance of Decidua Tissue Homeostasis and of Natural Killer Cell Immune Tolerance During Pregnancy. *Reprod Sci*. 2018; 25: 1424-30.
12. Jin ZH, Furukawa T, Degardin M, et al. $\alpha\beta3$ Integrin-Targeted Radionuclide Therapy with ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDFK)-4. *Mol Cancer Ther*. 2016; 15: 2076-85.
13. Prakash M, Kale S, Ghosh I, et al. Hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) induces melanoma cell migration and tumor growth by NF-kappa B dependent MMP-2 activation through integrin $\alpha\beta3$ interaction. *Cell Signal*. 2011; 23: 1563-77.
14. Şen C, Güneş T, Saygı B, et al. Eklem içine uygulanan hiyaluronik asidin erken evreli osteoartritte kıkırdak koruyucu etkisi: Tavşanda deneysel çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2004; 38: 348-52.
15. Kayışlı UA, Asar M, Demir R. Distributions and possible roles of laminin, fibronectin and their receptor subunits integrin $\beta4$ and $\alpha5$ in remodelling of extracellular matrix during decidualization in rats. *Turk J Biol*. 2000; 24: 379-95.
16. Emanuele M, Wezeman F, Emanuele N. Alcohol's Effects on Female Reproductive Function. *Alcohol Research & Health*. 2002; 26: 274-81.
17. Kabir SM, Hosseini A, Valojerdi MR. Endometrial receptivity to implantation in humans biochemical and molecular aspects. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2008; 10: 1-24.
18. Srinivasan KR, Blesson CS, Fatima I, et al. Expression of alphaVbeta3 integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. *Gen Comp Endocrinol*. 2009; 160: 124-33.
19. Bakhteyari A, Zarrin Y, Nikpour P, et al. Diabetes mellitus increased integrins gene expression in rat endometrium at the time of embryo implantation. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2019; 17: 395-404.
20. Sülz L, Valenzuela JP, Salvatierra AM, et al. The expression of αV and $\beta 3$ integrin subunits in the normal human fallopian tube epithelium suggests the occurrence of a tubal implantation window. *Hum Reprod*. 1998; 13: 2916-20.
21. Gonzalez RR, Palomino A, Boric A, et al. A quantitative evaluation of alpha1, alpha4, alphaV and beta3 endometrial integrins of fertile and unexplained infertile women during the menstrual

cycle. A flow cytometric appraisal. Hum Reprod. 1999; 14: 2485-92.

22. Libra M, Scalisi A, Vella N, et al. Uterine Cervical Carcinoma: Role of Matrix Metalloproteinases. Int J Oncol. 2009; 34: 897-903.

23. Varol S, Çevik MU, Acar A, et al. İskemik İnmenin Akut ve Subakut Döneminde Matriks Metalloproteinaz-2 ve Matriks Metalloproteinaz-9 Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Dicle Med J. 2016; 43: 271-4.

24. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. Toxicol Pathol. 2008; 36: 375-84.

25. Mountain DJH, Freeman MB, Kirkpatrick SS, et al. Effect of hormone replacement therapy in matrix metalloproteinase expression and intimal hyperplasia development after vascular injury. Ann Vasc Surg. 2013; 27: 337-45.

26. Grzechocinska B, Dabrowski FA, Cyganek A. Matrix metalloproteinases-2, -7 and tissue metalloproteinase inhibitor-1 expression in human endometrium. Folia Histochem Cytobiol. 2018; 56: 133-140.