

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

UTERUS PROLAPSUSUNDA ROLÜ OLAN BAZI GENLERİN
EKSPRESYONLARININ WESTERN BLOT ANALİZİ İLE DOĞRULANMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Seniha Mutlu KONUK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Handan AK

İZMİR

EKİM 2012

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'de uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca bilgi ve becerisini hoşgörü ile paylaşan ve bana her konuda yol gösterici olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Handan Ak'a,

Bilgi, deneyim ve desteklerini özveriyle aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Eser Sözmen, Prof. Dr. H. Oya Bayındır, Prof. Dr. Taner Onat, Prof. Dr. Dilek Özmen, Prof. Dr. Sara Habif, Prof. Dr. Işıl Mutfak, Prof. Dr. Nevbahar Turgan, Prof. Dr. Gülinnaz Ercan, Prof. Dr. Ferhan Sağın, Prof. Dr. Hikmet Hakan Aydın, Prof. Dr. Yasemin Akçay, Prof. Dr. Zuhale Parıldar, Doç. Dr. Ceyda Kabaroğlu ve Doç. Dr. Burcu Barutçuoğlu'na,

EÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD'den Prof. Dr. Niyazi Aşkar ve Uzm. Dr. Burak Zeybek'e,

Tezimin çalışmaları sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Uzm. Biyokimyager Ali Burak Özkaya'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım tüm uzman, asistan, teknisyen ve biyokimyager arkadaşlarıma,

Sevgi ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Candan Ö. Candan, Hidayet Emre, Dr. Eda Alkaya, Dr. Özge Öztürk ve Dr. Emine Bozkurt'a,

Her zaman yanımda olan aileme,

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Seniha Mutlu KONUK

ÖZET

Pelvik organ prolapsusu (POP) pelvisteki organların desteklenmesinde rol oynayan bağ, kas ve sinir dokularının yapısal ve/veya fonksiyonel bozukluğu sonucu bu organların normal anatomik yerlerinden aşağıya doğru yer değiştirmeleridir. POP tüm dünyada milyonlarca kadını etkilemektedir. POP hayatı tehdit eden bir hastalık olmasa da hastaların hayat kalitelerini belirgin olarak bozmakta, iş, aile ve cinsel yaşamlarında sınırlılıklara neden olmaktadır.

POP'un etiyolojisi multifaktöryeldir. Ancak predispozan faktörlere sahip her kadında POP gelişmez. POP fizyopatolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. POP'ta altta yatan nedenin bağ dokusu hastalığı olduğu düşünülmektedir. Bu sebeplerle, POP patofizyolojisinde yer alan proteinlerin belirlenmesi erken tanı ve tedavi açısından yeni ufuklar açacaktır.

Tez çalışmamda, ilerlemiş POP (evre 3-4) nedeni ile opere olan hastalar ile kontrol grubu hastalara ait (evre 0-1) uterosakral ligament dokularında versikan ve CREB5 (*cAMP response element binding protein 5*) proteinlerinin ekspresyon değişimleri *Western blot* yöntemi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak, ileri evre POP'lu hastalarda artmış versikan ve CREB5 ekspresyonları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, POP'un progresyonunda hasarlı bağ dokusunun tamir mekanizmalarındaki bozukluğun önemli rol oynadığını göstermektedir.

ABSTRACT

Pelvic organ prolapse (POP) is downward displacement of pelvic organs from their normal anatomic location due to structural and/or functional impairment of connective tissues muscles and neural tissues supporting those organs. POP affects millions of women all over the world. Even if POP is not a life threatening disease, it significantly impairs patients' quality of life, and causes limitations in their work, family and sexual lives.

Etiology of POP is a multi-factorial one but the development of the disease does not occur in all predisposed women. Therefore physiopathology of POP is still unclear. Connective tissue disorders are thought to be underlying cause of POP. Consequently, identification of POP physiopathology related proteins would expand our knowledge regarding to the development of novel early diagnosis and treatment strategies.

In this thesis, expression variations of versican and CREB5 (cAMP response element binding protein 5) proteins in uterosacral ligament tissues of patients operated due to advanced POP (phase 3-4) and of control patients were determined by western blot techniques.

Elevated versican and CREB5 expressions were detected in tissues obtained from advanced POP patients. This findings suggest that impairment of mechanisms which are responsible for repairing damaged connected tissue plays a crucial role in POP progression.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
ŞEKİL KAYNAKLARI	xi
TABLO DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pelvik organ anatomisi	3
2.1.1. Kemik pelvis	3
2.1.2. Pelvik tabanın kas desteği	4
2.1.3.Endopelvik fasya	8
2.2. Pelvik Organ Prolapsusu	11
2.2.1. Pelvik Organ Prolapsusu Tanımı ve Sınıflandırma	11
2.2.2. POP Olan Hastalarının Değerlendirilmesi	14
2.2.3. Epidemiyoloji	17
2.2.4. Pelvik Organ Prolapsusu Risk Faktörleri	18

2.2.5. Pelvik Organ Prolapsusu Patofizyolojisi	20
2.3. Ekstrasellüler Matriks, Bağ Dokusu ve POP	23
2.3.1 Fibröz proteinler	24
2.3.2 Adeziv glikoproteinler	26
2.3.3. Proteoglikanlar	26
2.3.3.1. Versikan	29
2.3.3.2. CREB ve CREB5	35
2.3.3.3. Pelvik Organ Prolapsusunda Bağ Dokusu Değişiklikleri	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Gereç	41
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu Seçimi	41
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	41
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	42
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	43
3.1.4.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	43
3.1.4.2. Western Blot Yönteminde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	43
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Doku Homojenizasyonu	45

3.2.2. Protein Tayini	46
3.2.3. Western Blot	46
3.2.4. Dansitometrik Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1. Demografik Bulgular	51
4.2. Protein Tayini Sonuçları	52
4.3. Western Blot Analizi Sonuçları	54
4.4. Dansitometrik Analiz Sonuçları	57
5.TARTIŞMA	59
6. KAYNAKLAR	65

KISALTMALAR DİZİNİ

POP: Pelvik Organ Prolapsusu

APS: Amonyum Persülfat

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametilen-1,2-diamin

MMP: Matriks Metalloproteinazlar

CREB5: cAMP yanıt elementine bağlanan protein-5 (*Cyclic AMP responsive element binding protein 5*)

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

gh: Genital Hiyatus

pc: Perineal Cisim

TIMP-1: Doku kaynaklı Metalloproteinaz İnhibitörü-1

LOX: Lizil Oksidaz enzimi

GAG: Glikozaminoglikanlar

AGEs: İleri glikasyon son ürünleri (Advance glycation end products)

HA: Hyaluronik asit

VCAN: Versikan

CSPG2: Kondroitin Sülfat Proteoglikan 2 (*chondroitin sulfate proteoglycan core protein 2*, versikan)

EGF: Epidermal büyüme faktörü

cbEGF: Kalsiyum bağlayan EGF benzeri bölgeler

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

CS: Kondroitin sülfat

AML: Akut Miyeloid Lösemi

KVH: Kardiyovasküler hastalık

ASMC: Arteriyel düz kas hücresi

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

CRE: cAMP Yanıt Elementi

ATF1: Aktive edici Transkripsiyon Faktörü-1

BDNF: Beyin kaynaklı nörotropik faktör

bZIP: Bazik lösin Fermuar (*Basic Leucine Zipper*)

ADAMTS: *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (sodium lauryl sulfate)

PVDF: Poliviniliden florid [poly(1,1-difluoroethylene)]

BCA: Bisinkoninik Asit [2-4(carboxyquinolin-2-yl)quinoline-4-carboxylic acid]

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

ESM: Ekstra Sellüler Matriks

MRI: Manyetik Rezonan Görüntüleme

EMG: Elektromiyografi

POP-Q: Pelvik Organ Prolapsusu Derecelendirme

HCl: Hidroklorik Asit

NaCl: Sodyum Klorür

PBS: Fosfat Tamponu (*Phosphate buffered saline*)

NaOH: Sodyum Hidroksit

TBS: Tris Tamponu (*Tris buffered saline*) (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil.1. Os sakrum ve pelvis kemeri

Şekil.2. Pelvik taban kaslarının üstten görünümü

Şekil.3. Pelvik organlar ve destekleri

Şekil.4. Pelvisin bağ dokusu

Şekil.5. POP-Q sırasında kullanılan anatomik işaretleri gösteren çizim

Şekil.6. Tam vajina prolapsusunun çizimi ve karşılık gelen POP-Q skora şeması (A)
Normal desteği olan kadınlarda bulunan ölçümler (B)

Şekil.7. Ekstrasellüler matriks ve hücreler arası etkileşimler

Şekil.8. Gevşek ve gergin durumlarda elastin lifleri

Şekil.9. Proteoglikan kümesi

Şekil.10. Tekrarlayan disakkarit birimi

Şekil.11. Proteoglikanların hyalektan ailesi üyeleri

Şekil.12. Versikan izoformlarının yapısı

Şekil.13. Versikanın diğer moleküllerle etkileşimi

Şekil.14. CREB bZIP-Somatostatin CRE kompleksinin yapısı

Şekil.15. Western blot yönteminde ilgili proteinlerin görünür hale gelmesinde izlenecek yol

Şekil.16. BCA yöntemi standart kalibrasyon eğrisi

Şekil.17. Versikan ve beta-aktin proteinlerine ait western blot bantları

Şekil.18. CREB5ve beta-aktin proteinine ait western blot bantları

Şekil.19. Hasta ve kontrol grubunda versikan proteinine ait bantların dansitometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Şekil.20. Hasta ve kontrol grubunda CREB5 proteinine ait bantların dansitometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması

ŞEKİL KAYNAKLARI

Şekil.1. Sobotta J, İnsan Anatomisi Atlası. (K. Arıncı, Çev.). Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., İstanbul 2001, s.263.

Şekil.2. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.779.

Şekil.3. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.873.

Şekil.4. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.789.

Şekil.5. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.534.

Şekil.6. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.535.

Şekil.7. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (N. Kılıç, Çev.). Palme Yayıncılık, Ankara 2005, s.313.

Şekil.8. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. (E. Ulukaya, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2007, s.49 .

Şekil.9. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. (E. Ulukaya, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2007, s158.

Şekil.10. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. (E. Ulukaya, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2007, s155.

Şekil.11. Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versikan with its binding partners. Cell Research 2005, 15(7):483-494.

Şekil.12. Wight TN, Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. Current Opinion in Cell Biology 2002, 14(5):617-623.

Şekil.13. Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versikan with its binding partners. Cell Research 2005, 15(7):483-494.

Şekil.14. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. The structure of a CREB bZIP·Somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. The Journal of Biological Chemistry 2000, 275(45):35242-35247.

Şekil.15. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG: The structure of a CREB bZIP·Somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. The Journal of Biological Chemistry 2000, 275(45):35242-35247.

Şekil.16. Çavdar Z, Kolon ve Rektum Kanserlerinde Endostatinin Matriks Metalloproteinaz 2 Üzerine Gösterdiği Etkinin Araştırılması (Doktora tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2008

TABLO DİZİNİ

Tablo.1. Kollajen tipleri

Tablo.2. Resolving Jeli (%12) (2 jel)

Tablo.3. Stacking Jeli (%12) (2 jel)

Tablo.4. Hastaların demografik ve klinik verileri

Tablo.5. BCA yöntemine göre elde edilen protein tayini sonuçları

Tablo.6. Western blot yönteminde jele yüklenecek protein miktarına yönelik hesaplamalar

Tablo.7. Dansitometrik analiz sonuçları elde edilen versikan ve β -aktin protein bantlarına ait semikantitatif sonuçlar

Tablo.8. Dansitometrik analiz sonucu elde edilen CREB5 ve beta-aktin protein bantlarına ait semikantitatif sonuçlar

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pelvik organ prolapsusu (POP) pelvisteki organların desteklenmesinde rol oynayan bağ, kas ve sinir dokularının yapısal ve/veya fonksiyonel bozukluğu sonucu bu organların normal yerlerinden aşağıya doğru yer değiştirmeleridir. Pelvik organ prolapsusu tüm dünyada milyonlarca kadını etkilemektedir. Yapılan çalışmalar 80 yaşına gelmiş kadınların yaklaşık % 11'nin POP nedeni ile opere olduğunu ve bu kadınların yaklaşık %29'unda 5 yıl içinde yeniden operasyona ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir[1]. Hastalığın, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yıllık tedavi maliyeti 1 milyar \$'dan fazladır [2]. POP hayatı tehdit eden bir hastalık olmasa da hastaların hayat kalitelerini belirgin olarak bozmakta, iş, aile ve cinsel yaşamları sınırlamaktadır. POP'a tıbbi yaklaşımda, semptomlar ilerledikten sonra tedavi etmek yerine, semptomlar henüz ortaya çıkmadan koruyucu önlemlerin alınabilmesi daha yararlı olabilmektedir. Bu da ancak etken faktörlerin yeterince aydınlatılabilmesi sayesinde gerçekleşebilir.

POP etiyolojisi multifaktöryeldir. Gebelik, vaginal doğum, yaş, menopoz, kronik olarak artmış karın içi basınç (KOA, kabızlık, obezite), pelvik taban travması, genetik faktörler (ırk, bağ dokusu bozuklukları), histerektomi, konjenital faktörler patogeneizde rol oynamaktadır. Ancak bu predispozan faktörlere sahip her kadında POP ortaya çıkmamaktadır. Pelvik organ desteği, *m. levator ani* ve pelvik taban bağ dokusu arasındaki kompleks ilişkiler aracılığı ile sürdürülmektedir. Bağ dokusu ve bağ dokusu onarım anormalliklerinin, kadınları prolapsusa yatkın hale getirebileceğini ileri süren kanıtlar bulunmaktadır [3-5]. Ancak, POP fizyopatolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bağ dokusu büyük oranda kollajen, elastik fibriller, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. POP ile ilgili en çok araştırma bağ dokusunun en önemli komponenti olan kollajen üzerine yapılmıştır [4, 6-11]. Bununla beraber, farklı kollajen ölçüm yöntemleri kullanan bu çalışmalarda pelvik organ prolapsusu olan hastaların vajina ve pelvik duvar destek dokularının toplam kollajen miktarı ile ilgili çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Ayrıca, POP'ta kollajen dışındaki diğer ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple, POP patofizyolojisinde yer alan proteinlerin belirlenmesi erken tanı ve tedavi açısından yeni ufuklar açacaktır. Kondroitin sülfat proteoglikan ailesinin bir üyesi olan versikanın ekstrasellüler matrikste önemli rolü bulunmaktadır [12]. Versikanın bağ dokusunun yeniden yapılması ile ilişkili olduğunu düşündüren veriler mevcuttur [13-16]. Versikan geni promotöründe cAMP yanıt elementi (CRE) içermektedir [12]. Bu nedenle

cAMP yanıt elementine bağlanan protein (CREB) ailesi üyeleri tarafından regüle edilmesi muhtemeldir.

Tüm bu bilgiler ışığında; bu çalışmada, ilerlemiş POP (evre 3-4) nedeni ile opere olan hastaların ve kontrol grubunun (evre 0-1) uterosakral ligament dokularında versikan ve versikan proteininin transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu olması muhtemel CREB5 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

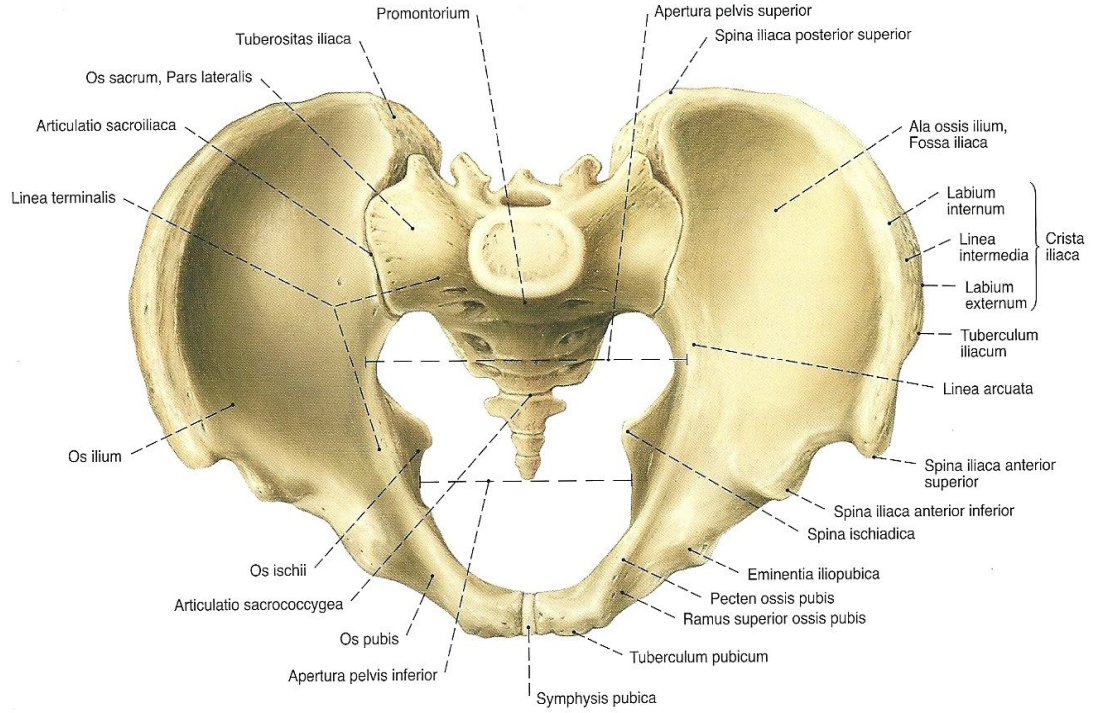
Pelvik organ prolapsusu (POP) pelvisteki organların desteklenmesinde rol oynayan bağ, kas ve sinir dokularının yapısal ve/veya fonksiyonel bozukluğu sonucu bu organların normal yerlerinden aşağıya doğru yer değiştirmeleridir. Bu durum pelvik relaksasyon olarak da adlandırılmaktadır.

2.1. Pelvik organ anatomisi

Uterus, mesane, vajen, rektum gibi pelvik organların normal pozisyonlarının sağlanmasında birbiriyle ilişkili birçok anatomik yapı rol oynamaktadır. Burada pelvik tabanı oluşturan kasların, fasyaların, pelvik ligamentlerin ve bunların bağ dokularının çok önemli görevleri bulunmaktadır. Bu destek yapılarındaki bozulma, pelvik organların anatomik konumlarında yer değiştirmeye ve fonksiyonlarında bozulmaya neden olmaktadır.

2.1.1. Kemik pelvis

Kemik pelvis, kas ve fasyaların yapıştığı pelvik tabana destek sağlayan iskelettir. Kemik pelvis, dört kemiğin birleşmesinden meydana gelir: *os coxae* (iki tane), *os sacrum* ve *os coccygis*. *Os coxae* üç ayrı kemiğin birleşmesinden oluşmuştur: *os ilium*, *os ischium* ve *os pubis* [17]. Sağ ve sol koksa kemikleri önde ve orta hatta *symphysis pubis* aracılığı ile birleşirler. *Os sacrum* ise pelvisin arka duvarında iki *os coxae* arasında bulunur. *Os sacrum*'un alt ucuna *os coccygis* tutunmuştur. *Os coccygis*'in alt ucu ise serbest olarak sonlanmaktadır. *Os coxae* pelvisin ön ve yan kısımlarını, *os sacrum* ve *os coccygis* ise arka kısmını oluşturur.



Şekil.1. Os sakrum ve pelvis kemeri (Sobotta, J. İnsan Anatomisi Atlası. (K. Arıncı, Çev.). Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş., İstanbul 2001, s.263)

2.1.2. Pelvik tabanın kas desteği

Pelvik taban kasları sürekli aktif halde bulunup değişen şartlara göre gerginliklerini ayarlarlar. Pelvik taban kaslarının gevşemesi ile mesane boşaltımına izin verilir, kasılmasıyla ise üriner ve fekal kontrol sağlanır. Doğumda da önemli rolleri bulunmaktadır.

Pelvik taban kasları pelvik ve ürogenital diaframın içinde bulunur. Bunlar perinenin alt yapılarıdır. Perinenin topografik anatomisine bakılacak olursa ciltten karın içine doğru şu yapılar yer alır [18]:

A- Cilt ve cilt altı yağ dokusu

B- Yüzeyel kas ve fasya tabakası (1. musküloaponörotik tabaka):

a. *Fascia perinei superficialis* (Colles fasyası)

b. Kaslar: *M. Bulbocavernosus*, *m. ischiocavernosus*, *m. transversus perinei superficialis*, *m. sphincter ani externus*

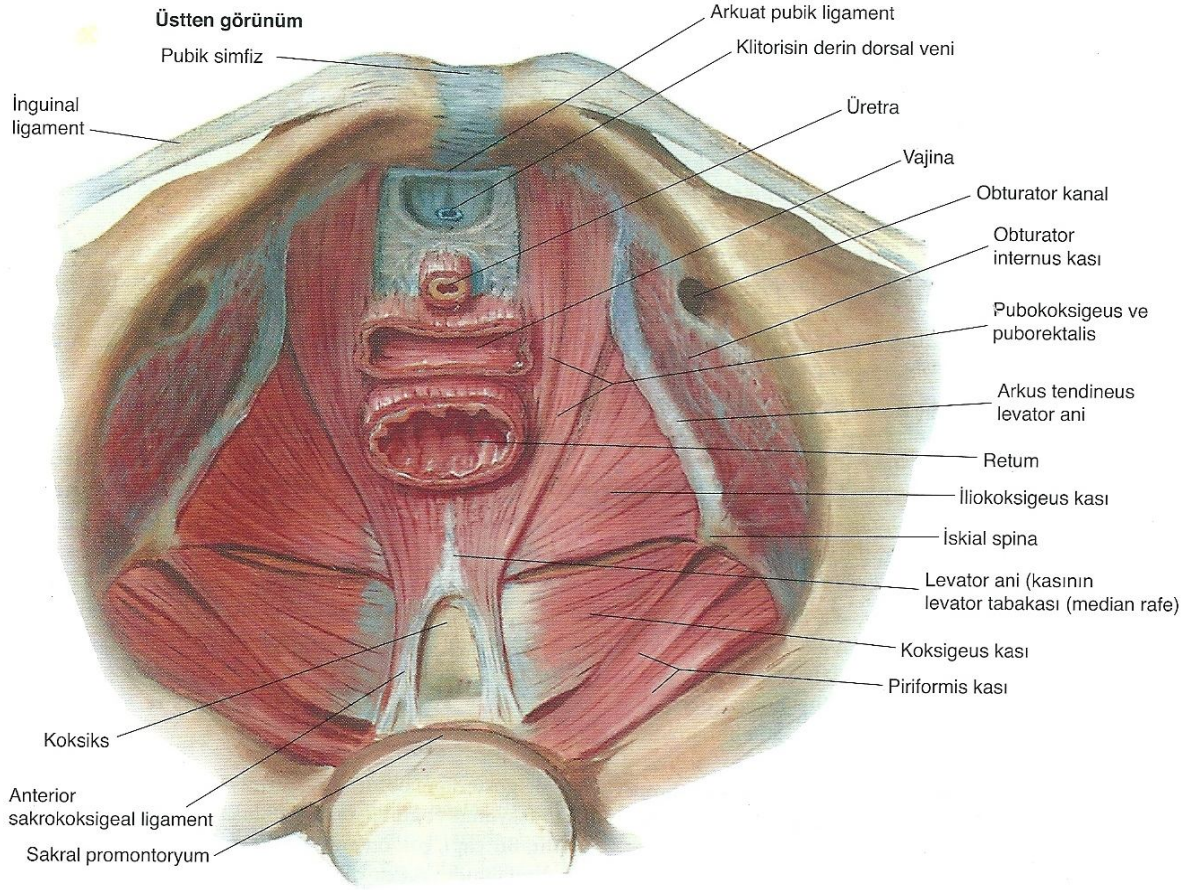
c. *Fascia perinei profundus*

- C- Derin kas ve fasya tabakası (2. Musküloaponörotik tabaka, *diaphragma urogenitale*):
 - a. İnferior fasya (*membrana perinei*)
 - b. Kaslar: *M. transversus perinei profundus*, *m. sphincter urethra*
 - c. Süperior fasya
- D- *Diaphragma pelvis*
 - a. İnferior fasya
 - b. Kaslar: *M. levator ani* (*pubococcygeus*, *iliococcygeus*, *puborectalis*), *m. coccygeus*
 - c. Süperior fasya
- E- Endopelvik fasya (*fascia pelvis visceralis*)
- F- Periton

Pelvik diafram: Pelvik yapıları destekleyen fibromusküler yapıdır. *Apertura pelvis inferior*'u arkadan kapatır. Pelvik diafram bir çift *m. levator ani*, bir çift *m. coccygeus* ve bunları üstten ve alttan örten fasyalardan oluşmaktadır. Pelvik diaframın altında perineal membran ve perineal cisim de pelvik tabana katkıda bulunur. Huni şeklinde olan pelvik diafram erkekte üretra ve anal kanal, kadında üretra, vagina ve anal kanal ile delinmektedir [19].

M. levator ani ince geniş bir kas olup pelvik diaframın en önemli kasıdır ve pelvik organ desteğinin önemli bir bileşenini oluşturur. Pelvis döşemesinin büyük bir bölümünü kapatarak adeta pelvik organların üzerine oturduğu bir raf gibi görev yapar. Fizyolojik olarak normal levator ani kası, kasılmasını sabit bir durumda devam ettirir. Batın içi zorlamalara karşı abdominopelvik içeriğin yükünü destekleyen solid bir taban sağlar [19].

M. levator ani, farklı başlangıçları ve insersiyonları, bu nedenle farklı fonksiyonları olan birkaç kasın birleşiminden oluşan kompleks bir ünedir. Medialde *pubococcygeus*, lateralde *iliococcygeus* ve rektumu çevreleyen *puborectalis* adlı üç kısımdan oluşur [20].



Şekil.2. Pelvik taban kaslarının üstten görünümü (Schorge JO, Schaffer JJ, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.779)

M. pubococcygeus kasın esas parçasıdır. *Corpus ossis pubis*'in arkasında başlayıp *os coccygis* ve *ligamentum anaococcygeum*'a tutunur [21]. *Ligamentum anaococcygeum*, anal kanal ve *os coccygis*'in tepesi arasında yer alan fibroz bir yapıdır. Kadında *m. pubococcygeus*'un medialde kalan liflerinin bir kısmı vajina ve anüsü çevreleyerek perinede sonlanır. Kadınlarda, levator ani kasının vajinaya tutunan kas lifleri, pelvik bir kasın kasılması süresince üretranın yükseltilmesinden sorumludur. İnter-sfinkterik kanalda anüsle birleşen lifler anüsü yükseltirler ve *m. pubococcygeus* ve *m. puborectalis* liflerinin geri kalanı ile birlikte, ürogenital açıklığın daralmasını devam ettirirler [19].

M. puborectalis, *m. pubococcygeus*'un daha alt seviyesinde ve medialde uzanan kastır. Bu kas lifleri de pubiste sonlanır [22]. İki taraftan gelen lifler *flexura anorectalis*'i arkadan çevirerek U harfi şeklinde rektal askıyı oluştururlar. *M. puborectalis*'in fonksiyonu anorektal

bileşkeyi pubise doğru çekmektir. Bu kasın anal sfinkter kompleksinin bir bölümü olduğu ve fekal kontinansın devamlılığına katkı sağladığı düşünülmektedir [20].

M. iliococcygeus, m. levator ani'nin en ince ve en arkadaki kısmıdır ve öncelikle destekleyici bir role sahiptir. *Arcus tendineus, m. levator ani* ve *spina ischiadica*'ların yan tarafından başlar. Lifler içe ve arkaya doğru yönelerek *os coccygis* ve *ligamentum anaococcygeum*'a yapışırlar [21].

M. coccygeus, pelvik diaframın arka kısmının küçük bir parçasını teşkil eder. *Spina ischiadica* ve *ligamentum sacrospinale*'den başlar. 5. sakral vertebranın yan taraflarına ve *os coccygis*'e tutunur.

Pelvik diafram, *fascia superior* ve *inferior diaphragmatis pelvis* ile üst ve alttan kapalıdır, pelvik organlarını yerinde tutar.

Levator tabaka, esas olarak *M. iliococcygeus*'un insersiyonunun oluşturduğu, anüs ve *os coccygis* arasındaki bölgeyi tanımlamak için kullanılan klinik bir terimdir. Levator kaslarının bu kısmı rektum, üst vajina ve uterusun geri kalan kısmına destekleyici bir raf oluşturmaktadır.

Levator tabaka, normal desteği olan bir kadında, ayakta dururken hemen hemen horizontal plana paralel uzanır. Levator tabaka desteğinin görevi, pelvik ligamentler ve fasyadaki bağ dokusunun aşırı gerilme ya da esnemesini önlemektir. Buna göre, levator kaslarındaki nöromusküler yaralanma er geç levator tabaka ve ürogenital açıklıkta sarkma ya da vertikal eğikliğe neden olabilir. Sonuç olarak, vaginal aks daha dik olur ve serviks, hiatus açıklığının üzerine yönelir. Bu değişimin mekanik etkisi, pelvik organları destekleyen bağ dokusunda basınç artışıdır. Ürogenital açıklığın boyutundaki artışın, pelvik organ prolapsusunun şiddetindeki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [23].

Ürogenital diafram: Pelvik diaframın hemen altında anterior pelvik çıkımda bulunan fibromusküler bir yapıdır. *Fascia diaphragma urogenitalis superior* ve *inferior* arasında kalan aralıktır. İki fasya arasında üretranın bir kısmı, vajenin bir kısmı, *m. sphincter urethrae, m. transversus perinei profundus*, damarlar ve sinirler bulunmaktadır. Ürogenital diafram, üretra ve vajenin desteklenmesinde rol oynamaktadır [24].

Pelvik tabanın innervasyonu: Pelvik diafram kasları esas olarak S₂₋₅ köklerinden çıkan somatik efferentler tarafından innerve edilmektedirler. Kasın pelvik ya da üst yüzeyi, *m. levator ani*'nin de siniri olan doğrudan S₂₋₅'den çıkan efferentler tarafından uyarılmaktadır

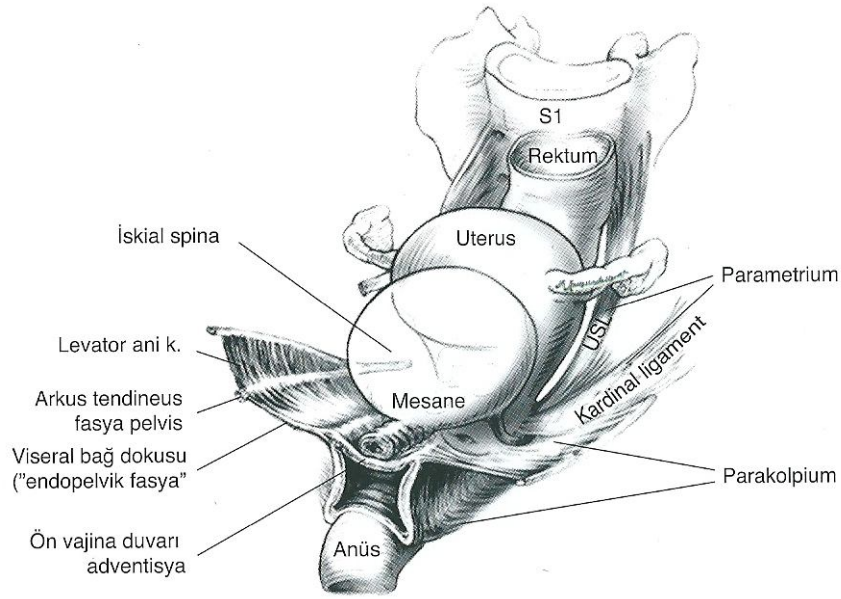
[25]. Perine ya da alt yüzey, pudental sinirin dalları ile uyarılmaktadır. *M. levator ani*'nin çizgili üretral ve anal sfinkterlerden ayrı innervasyonu, bazı kadınlarda neden pelvik organ prolapsusu, diğerlerinde üriner ya da fekal inkontinans geliştiğini açıklayabilir [26].

2.1.3.Endopelvik fasya

Pelvis tabanının en üst kısmı, periton altı perivasküler bağ dokusu ve zayıf gözenekli doku endopelvik fasyadır. Bu doku, pelvis duvarları ile pelvik organları birleştirir. Fibröz bir doku olan endopelvik fasyadaki kollajen lifler, elastin, düz kas lifleri, fibroblastlar ve vasküler dokular bütünleşerek ağsal bir yapı oluşturur. Endopelvik fasya, uterus, mesane ve vajeni pelvik duvara asar [19]. Uterusa yakın kısmına *parametrium*, vajene yakın kısmına *parakolpium* denir [27]. *Parametrium* içinde endopelvik fasyanın bağ dokusu lifleri yoğunlaşarak kardinal ve uterosakral ligamentleri oluşturur. Bu ligamentler uterusun yerinde tutulmasında görev alır [19]. *Parakolpium* içindeki endopelvik fasya liflerinin yoğunlaşması ile pubovezikoservikal fasya oluşur [27]. Bu fasya özellikle sistoselin ve üriner stres inkontinansın önlenmesinde önemlidir. Benzer şekilde endopelvik fasya rektum ile vagen arasında yoğunlaşarak rektovajinal fasyayı oluşturur. İki taraftan gelen endopelvik fasya ile ön vajinal duvarın bu şekildeki bağlantısı mesane boynu ve proksimal üretra için de adeta bir hamak görevi yapar [28].

Uterin destek: Uterus ve serviksin ana desteği, levator ani kası ve serviksin yan duvarlarını pelvis duvarına birleştiren bağ dokusunun etkileşimi ile sağlanır. Uterusun yan duvarı ile birleşen bağ dokusu parametrium, kardinal ligament ve uterosakral ligamenti oluşturur. Bu ligamentler visseral bağ dokusu yoğunlaşmalarıdır ve pelvik organ desteğine yardımcı olurlar [19].

Ligamentum cervicale transversus veya *Mackenrodt* ligamentleri olarak da adlandırılan kardinal ligamentler, serviks uteri ve vajinanın forniks lateralisinden başlayıp pelvisin lateral duvarına uzanır. Öne uzanan lifleri mesaneyi taşıyan *ligamentum puboservikale* ile, arkaya uzanan lifleri *ligamentum sacrouterina* ile devam eder. Kardinal ligament içerisinde uterus ve anterior vajinayı besleyen hipogastrik damarlar bulunur. Uterosakral ligamentler ile beraber serviks ve anterior vajinanın elevasyonu ve arkaya fiksasyonundan sorumludurlar.

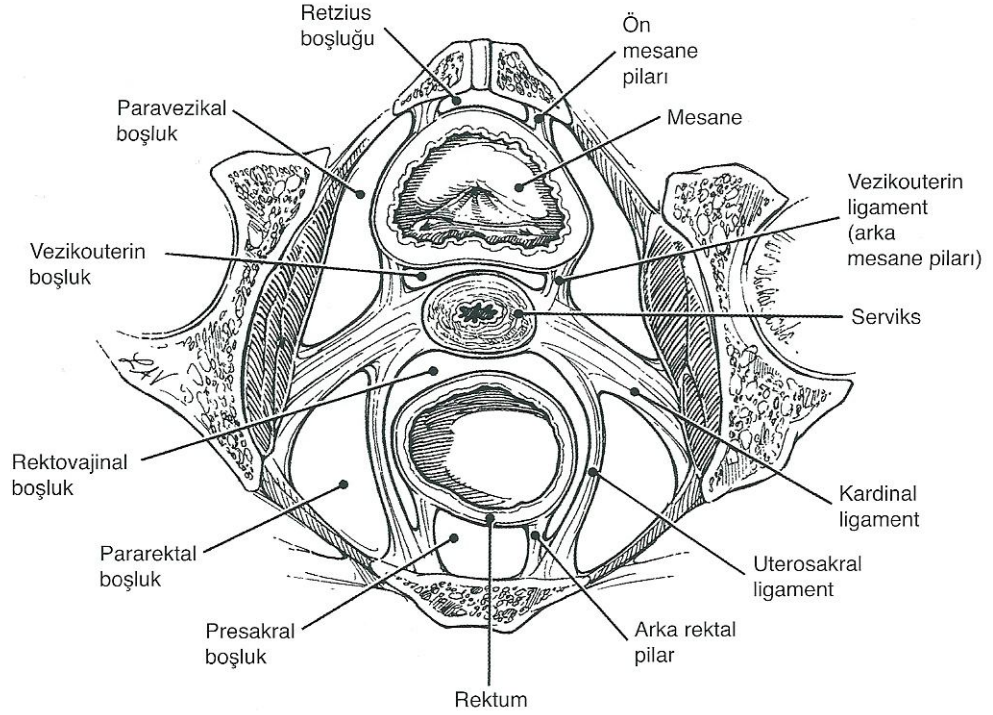


Şekil.3. Pelvik organlar ve destekleri (Schorge JO, Schaffer JJ, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.783)

Uterosakral ligamentler serviksin supravaginal kısmından rektumun yanlarına doğru uzanır. Rektumu yanlardan sardıktan sonra S₂₋₃ vertebraların üzerini örten fasyada sonlanır. Sakruma doğru, arkadan pelvik organları destekleyen bu ligamentler, uterus ve anterior vajinanın dışa ve aşağıya hareketini kısıtlamaya yardımcı olurlar.

Round ve broad ligamentler ise uterus ve adneksleri pelvis duvarına bağlasalar da, bu organların desteklenmesine katkıda bulunmazlar.

Vajinal destek: Vajinanın temel desteğini, *m. levator ani* ve vajinanın yan duvarlarını pelvik duvarlarla birleştiren bağ dokusu arasındaki etkileşim sağlar. DeLancey [27] vajinal bağ dokusu desteğini üç düzeyde tanımlamıştır:



Şekil.4. Pelvisin bağ dokusu (Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.789)

Üst vajinal destek pelvik tabanı yukarı asmak için üst vajinayı uterosakral ve kardinal ligamentler ile uterus, sakrum ve pelvik yan duvarlara asar. Histerektomiden sonra vajinal apekse bağ dokusu desteği sağlarlar. Üst destek düzeyi defektlerinin klinik belirtisi, histerektomi sonrası oluşan vajinal *cuff* prolapsusudur.

Orta vajinal destek *sipina ischiadica*’larda, kardinal/uterosakral kompleks ile komşu, paravajinal bağlantılardan oluşur. Bunlar, vajina yan duvarlarının öne doğru *arcus tendineus fascia pelvis*’e, arkaya doğru *arcus tendineus rektovaginalis*’e olan bağ dokusu bağlantılarıdır. Orta destek düzeyi defektlerinin klinik belirtileri, ön ve arka vajinal duvar prolapsusu ve stres üriner inkontinanstır.

Distal vajinal destek düzeyini perineal cisim, yüzeysel ve derin perineal kaslar ve fibromusküler bağ dokusu oluşturur. Bunlar birlikte vajinanın distal üçte birini ve introitusu destekler. Perineal cisim, distal vajinal desteğin yanı sıra anal kanalın uygun fonksiyonu için de gereklidir. Bu bağlantıların vajinanın destek bileşenlerinin en güçlüsü olduğu düşünülmektedir. Bu düzeydeki destek kusuru, ön ve arka vajina duvarının prolapsusu, genişlemiş introitus ve perine sarkması ile sonuçlanabilir.

2.2. Pelvik Organ Prolapsusu

Pelvik organ prolapsusu sonucu önde üretra ve mesane, ortada uterus ve vajina, arkada rektum bulundukları yerden daha aşağı bir seviyeye kaymaktadır. Bu organların yer değişikliği ile meydana gelen sarkmalar çeşitli semptomlara yol açabilmektedir. Bu semptomlar hayatı tehdit etmese de kadınların günlük aktivitelerini ve hayat kalitelerini belirgin olarak etkilemektedir [29]. Hasta kendi isteği ile sosyal ve fiziksel aktivitelerini kısıtlamakta, bu nedenle seksüel ve mesleki yaşamı etkilenmektedir. Pelvik organ prolapsusu son yıllarda artan yaşam beklentisi ile birlikte kadınlar için önemi artan bir sağlık problemi haline gelmiştir. Hayatı tehdit eden bir hastalık olmasa da hayat kalitesinin bozulmasına yol açabildiğinden mutlaka değerlendirilmeli ve tedavi edilmelidir.

2.2.1. Pelvik Organ Prolapsusu Tanımı ve Sınıflandırma

Prolapsus, vajina duvarlarının dışarı çıkması ya da bombeleşmesi ile sonuçlanan, pelvik organlardan birinin normal yerinden aşağıya doğru yer değiştirmesidir. Sistosel, sistoüretrosel, uterin prolapsus, rektosel ve enterosel terimleri dışarı çıkışın yerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu terimler tam olarak doğru değildir ve yanlış yönlendirir çünkü aslında görünenden çok, prolabe olduğu varsayılan yere odaklanmaktadır. Prolapsusu tanımlamak için gerçekte ne görüldüğünün tanımlanması klinik olarak daha yararlı olur: ön vajinal duvar prolapsusu, apikal vajinal duvar prolapsusu, servikal prolapsus, arka vajinal duvar prolapsusu, perine prolapsusu ve rektal prolapsus [18].

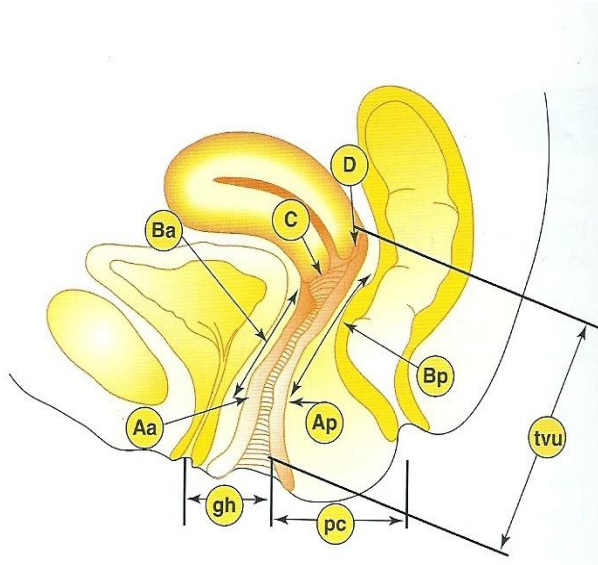
Pelvik Organ Prolapsus Derecelendirmesi (POP-Q): Geleneksel klinik sınıflamadaki yetersizlik sonucu 1996 yılında Uluslararası Kontinans Derneği (International Continence Society), Pelvik Organ Prolapsusu Derecelendirme sistemini (POP-Q) resmen kabul etmiş [30] ve günümüzde POP-Q sistemi pelvik organ prolapsuslu hastaları değerlendirmede standart bir sistem olmuştur.

Bu sistem, kadının pelvik organ desteğinin bir seri alana özgü ölçümlerini içerir. Her bir segmentteki prolapsus, tutarlı bir şekilde saptanabilen sabit bir anatomik işaret olan himene göre ölçülür. Himen düzlemi referans alınarak, ikisi ön vajina duvarında (Aa ve Ba noktaları), ikisi apikal vajinada (C ve D noktaları) ve ikisi de arka vajina duvarında (Ap ve Bp noktaları) olmak üzere altı nokta saptanır. Tüm POP-Q noktaları, toplam vajina uzunluğu (tvu) dışında, hasta *Valsalva* manevrası yaparken ölçülür ve maksimum dışarı çıkış saptanmalıdır.

Sabit referans noktasına göre tanımlanmış noktalar:

Aa noktası: Vajen ön duvarı orta hattında eksternal üretral meatustan itibaren 3 cm proksimalde yer alır. Bu, üretrovezikal çizginin proksimaline karşılık gelmektedir. Himenle ilişkisi açısından bu noktanın pozisyonu, tanım olarak -3'ten (normal destek) +3 cm'ye (Aa noktasının maksimum prolapsusu) uzanır.

Ba noktası: Bu nokta vajinal kaf veya ön vajinal forniksten Aa noktasına kadar üst ön vajina duvarının herhangi bir kısmının en distal pozisyonunu yansıtır. Prolapsus yokluğunda -3 cm'dir.



Şekil.5. POP-Q sırasında kullanılan anatomik işaretleri gösteren çizim (Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.534)

C noktası: C ve D noktaları normal yerleşimli alt üreme sisteminin en proksimal yerleşimini yansıtır. C noktası, serviksin en distal kenarı ya da total histerektomiden sonra vajinal kafın önde gelen kenarındaki bir noktayı tanımlar.

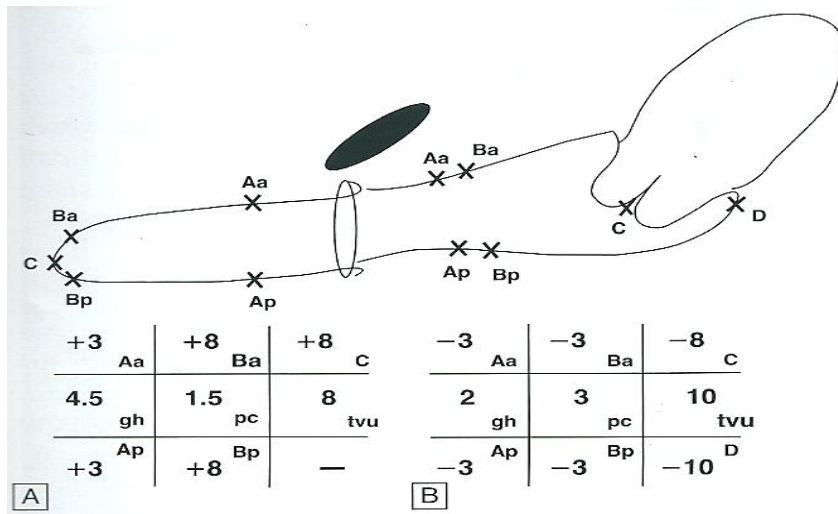
D noktası: Serviksi olan bir kadındaki arka forniksin konumunu yansıtan bir noktayı tanımlar. Serviks yokluğunda kullanılmaz. Bu nokta uterosakral ligamentin proksimal arka servikse tutunma düzeyini yansıtır. TVU, C veya D noktası en son konuma getirildiğinde cm olarak vaginanın en derin ölçümüdür.

Ap noktası: Himenin 3 cm proksimalinde yer alan arka vagina duvarının orta hattındaki bir noktayı tanımlar. Tanıma göre -3 ile +3 arasında değer alabilmektedir.

Bp noktası: Vajinal kaf ya da arka vajinal fornixten Ap noktasına kadar üst arka vajina duvarındaki herhangi bir kısmın en distal konumunu yansıtır. Tanımlamaya göre prolapsus yokluğunda -3 olmaktadır.

Genital hiatus (gh) ve perineal cisim (pc): Himene ek olarak geri kalan ölçümler gh ve pc içerir. Genital hiatus, eksternal üretral meatusun ortasından arka himenal halkanın orta hattına kadar ölçülür. Perineal cisim ise genital hiatusun arka tarafından orta-anal açıklığa kadar ölçülür.

POP-Q ile Değerlendirme: Himen düzleminin sıfır olarak tanımlanmasıyla, himene göre bu noktaların anatomik konumu santimetre olarak ölçülür. Himenin üzerinde ya da proksimalinde yer alan noktalar negatif numara ile tanımlanır. Himenin altında ya da distalinde yer alan noktalar ise pozitif bir numara kullanılarak kaydedilir. Ölçümler 3x3 tablo kullanılarak düzenlenebilir.



Şekil.6. Tam vajina prolapsusunun çizimi ve karşılık gelen POP-Q skorlama şeması (A) Normal desteği olan kadınlarda bulunan ölçümler (B) (Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.535)

Evreleme: Elde edilen spesifik sonuçlarla POP-Q evrelemesi yapılabilir. Prolapsusun en şiddetli kısmına göre sınıflandırma yapılmaktadır.

Evre 0: Prolapsus gösterilemez. Aa, Ap, Ba, Bp noktalarının tümü -3 cm'dedir ve C veya D noktaları ise $-tvu$ cm değeri ile $-(tvu-2cm)$ arasındadır.

Evre 1: Prolapsusun en alt noktası himen seviyesinin >1 cm üzerindedir.

Evre 2: Prolapsusun en alt noktası himen seviyesinin ≤ 1 cm üst veya altındadır.

Evre 3: Prolapsusun en alt noktası himen seviyesinden >1 cm alttadır fakat total vajinal uzunluğun 2cm eksiğinden daha fazla dışarıya sarkmamıştır.

Evre 4: Alt genital traktusun total eversiyonu sözkonusudur. Prolapsusun en distal noktası en az $(Tvu-2cm)$ seviyesine kadar dışarıya sarmıştır. Birçok hastada en distaldeki bölüm serviks veya vajinal kaf skarıdır.

POP-Q sisteminin önemli bir dezavantajı karmaşık olması, uzun süre alması ve öğrenilmesinin zor olmasıdır. Lateral kompartman defektlerinin değerlendirilmesindeki yetersizlik de bir diğer dezavantajdır. Bununla birlikte POP-Q muayenesi, POP spesifik bölgesini tanımlamanın yanı sıra postoperatif sonuçları daha doğru belirlemekle birlikte uniform ve güvenilir sonuçlar almayı sağlayan standart ölçüm sistemidir.

2.2.2. Pelvik Organ Prolapsusu Olan Hastaların Değerlendirilmesi

POP ile ilişkili semptomlar

Pelvik organ prolapsusu birçok anatomik, fonksiyonel sistemi kapsar ve sıklıkla genitoüriner, sindirim ve kas-iskelet sistemi ile ilişkili semptomlara neden olmaktadır. Orta ya da ilerlemiş prolapsusu olan birçok kadında rahatsız edici semptomlar yoktur. POP'lu kadınlarda vajinal dolgunluk veya pelvik bası hissi gibi bir semptom görülebileceği gibi birkaç şikayet bir arada olabilir. Ellerkmann ve arkadaşları 237 POP'lu kadınla yaptıkları bir çalışmada, olguların %63'ünde şişlik semptomları, %73'ünde üriner inkontinans, %86'sında sık idrara çıkma veya sıkışma hissi, %62'sinde boşaltma disfonksiyonu, %31'inde fekal inkontinans saptamışlardır [31]. Vajinal dolgunluk semptomları dışındaki semptomlar prolapsusa spesifik değildir. Bu nedenle semptomların prolapsustan mı yoksa diğer etiyolojilerden mi kaynaklandığı dikkatle incelenmelidir. POP nadiren ciddi mortalite ve morbiditeye neden olur ancak hastaların hayat kalitesini oldukça kısıtlayabilen bir hastalıktır. Bu nedenle ilk değerlendirmede semptomlar ve günlük yaşam aktiviteleri üzerine olan etkileri incelenmelidir.

Dolgunluk semptomları: En sık görülen iki semptom vajina ya da perinede dışarı çıkma hissi ya da görülmesi ve pelvik bası hissidir. Prolapsusun ilerlemesi ile dolgunluk semptomlarında kötüleşme görülür [31].

Üriner semptomlar: POP olan hastalarda sıklıkla eş zamanlı stres üriner inkontinans, sıkışma üriner inkontinansı, sık idrara çıkma, sıkışma hissi, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu, zayıf ya da uzamış idrar akışı, tam boşaltamama hissi, işemeyi başlatma ya da tamamlamak için prolapsusun elle düzeltilmesi, işemeye başlamak ya da tamamlamak için pozisyon değiştirme gibi üriner sistem semptomları vardır.

Sindirim sistemi semptomları: POP olan kadınlarda sıklıkla kabızlık vardır. Gaz ya da sıvı/katı dışkı inkontinansı, tam boşaltamama hissi, defekasyon için güçlü ıkınma, defekasyona sıkışma, tam defekasyon için parmakla boşaltma, defekasyona başlamak ya da tamamlamak için vajina ya da perineyi destekleme, defekasyon sırasında blokaj ya da obstrüksiyon hissi görülebilen diğer semptomlardır. Rektumu boşaltmak için arka vajina duvarının perineal cismin ya da distal rektumun parmakla bastırılma gereksinimi, arka vajina duvarı prolapsusuyla ilişkili en sık rastlanan defekasyon semptomudur [31, 32].

Cinsel fonksiyon bozukluğu: POP olan kadınlarda cinsel fonksiyon bozukluğu sık görülür. Disparoni, azalmış lubrikasyon, azalmış duyarlık, azalmış uyarılma ya da orgazm bu semptomlardan bazılarıdır.

Pelvis ve sırt ağrısı: POP olan birçok kadın vagina, mesane, rektum, pelvis ve sırtta ağrıdan yakınır, ancak doğrudan ilişkiyi gösteren çok az kanıt vardır.

Birçok çalışmada hastalığın evresi ile semptomların varlığı ve şiddeti arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur (dolgunluk semptomları hariç) [31, 33, 34].

Fizik muayene

Fizik muayene pelvis dışı patolojileri belirlemek için tüm sistemlerin değerlendirilmesi ile başlar. Sistemik hastalıklar tedavi seçimini etkileyebilir.

Perine muayenesi: İlk pelvik muayene hasta litotomi pozisyonundayken gerçekleştirilir. Vulva ve perine atrofi bulguları, lezyonlar ya da diğer anomalilerin saptanması için muayene edilir. Sakral reflekslerin nörolojik muayenesi pamuklu çubuk kullanarak gerçekleştirilir. POP muayenesi vaginaya spekulum yerleştirmeden önce hastaya valsalva manevrası yapmasının istenmesiyle başlar. Bu “el kullanılmayan” yaklaşım gerçek anatomiye daha doğru gösterir. Spekulum muayenesiyle yapılar, yapay olarak kaldırılır,

desteklenir ya da yeri değiştirilir. Üç önemli sorunun yanıtı aranır: 1) Sarkma himenin ötesine gelmekte midir? 2) Prolapsusun önde gelen kısmı nedir? 3) Batın içi artışıyla birlikte genital hiatus belirgin olarak genişlemekte midir?

Vajinal muayene: Vajinanın spekulum incelemesi ile anterior, posterior ve lateral vajenin iyi bir görüntüsü elde edilmelidir. Vajinal desteğin spesifik defektlerini de görerek POP-Q ölçümleri daha iyi yapılır. Rektovajinal muayene posterior ve superior vajinal segment değerlendirmesi için yapılmalıdır. Rektal muayenedeki parmağın anteriorda vajinaya doğru yer değiştirmesi enterosel ve rektosel arasındaki ayrımı yardım eder. Diğer pelvik patolojileri tanımlamak için bimanuel muayene uygulanır. Ayrıca pelvik taban kasları da değerlendirilmelidir.

Tedaviye yaklaşım

Tedavi semptomla yöneliktir. Prolapsusun kötüleşip kötüleşmeyeceği ya da semptomların gelişip gelişmeyeceğini öngörmek zordur. Bu nedenle yakınma yoksa genellikle prolapsus için tedavi gerekmez. Ancak belirgin prolapsusu ya da rahatsız edici semptomları olan kadınlarda cerrahi ya da cerrahi olmayan tedavi seçilebilir. Tedavi seçimi semptomların tipi ve şiddetine, yaşa, eşlik eden hastalıklara, gelecekteki cinsel fonksiyon ve/veya fertilitate isteğine ve nüks için risk faktörlerine bağlıdır.

Yaş tercih edilecek tedavi yöntemini belirlemede çok önemlidir. Genç hastalarda histerektomi yerine daha konservatif tedavi şekillerini düşünmek gerekir. Yaşı ileri, ciddi sistemik hastalıkları olan birine cerrahi ve genel anestezinin riskleri düşünülerek cerrahi dışı tedavi yöntemleri önerilebilir.

Hafif derecede pelvik relaksasyonu olan hastaların çoğu asemptomatiktir ve bu durumda genellikle cerrahi tedavi endike değildir. Ama hastaya bu patolojinin zamanla ilerleyip girişim gerektirebileceği söylenmeli, bu durumu hızlandırabilecek kronik konstipasyon, öksürük gibi durumlar için önlem alınmalıdır.

Çocuk isteği varsa konservatif tedavi yöntemleri tercih edilmelidir. Cerrahi sonrası gebelikler ve özellikle vajinal doğumlar pelvik relaksasyon cerrahisinin etkisini ortadan kaldırabilmektedir.

Aktif cinsel hayatı olan hastalarda vajeni oblitere eden teknikler uygun değildir.

Konservatif tedavi yöntemleri arasında vajinal destekleyici araç uygulamaları, hormon replasman tedavisi, Kegel pelvik taban egzersizleri ve fonksiyonel elektrik stimülasyonu vardır.

2.2.3. Epidemiyoloji

Pelvik organ prolapsusu tüm dünyada milyonlarca kadını etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Subramanian ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre 2005 yılında Almanya'da her 1000 kadından 0,87'si, Fransa'da 1,14'ü ve İngiltere'de 1,13'ü POP nedeni ile opere edilmiştir. Tahmini maliyet Almanya'da 144.236.557 €, Fransa'da 83.067.825 € ve İngiltere'de 81.030.907 € olarak bulunmuştur [35]. Pelvik organ prolapsusu postmenapozal kadınlarda histerektomi endikasyonunun önde gelen nedenlerinden biridir ve tüm yaş gruplarındaki histerektomi prosedürlerinin %15-18'ini oluşturur [36].

Pelvik organ prolapsusunun gerçek insidansını saptamak güçtür, çünkü hastaların çoğu bu durumu kadın olmanın ve yaşlanmanın doğal bir sonucu olarak kabul ederek hekime başvurmamaktadır. Genital prolapsus bulguları kadın popülasyonunda sık bulunmasına rağmen özellikle hafif formları semptom vermeyebilir. Bu da hekime başvuruyu önleyerek gerçek sıklığı saptamamızı engellemektedir. Hastalığın prevalansını ve insidansını doğru bir şekilde hesaplayan güvenilir epidemiyolojik çalışmaların sayısı azdır [37].

Yapılan çalışmaların çoğu klinik bulguları olan hastaları kapsamaktadır. Genel popülasyonda pelvik organ prolapsusu ile ilgili yapılmış epidemiyolojik çalışma sayısı azdır [38]. Veriler sınırlı olsa da çalışmalar pelvik organ prolapsusu prevalansının yaşla linear olarak arttığını göstermiştir [1, 39]. İsveç'te yapılan bir araştırmaya göre rutin jinekolojik muayeneye gelen 20-59 yaş arasındaki kadınların %30,8'inde herhangi bir derecede POP bulguları saptanmıştır. Aynı çalışmada, POP görülme oranı 20-29 yaş arası kadınlarda %6,6 iken 50-59 yaş arası kadınlarda %55,6 olarak bulunmuştur [40]. ABD'de *Women's Health Initiative* tarafından yapılan bir çalışmada 50-79 yaş arası kadınların %41'inde POP saptanmıştır. Bu kadınların %34'ünde sistosel, %19'unda rektosel, % 14'ünde uterin prolapsus görülmüştür [41]. 18-83 yaş arası rutin jinekolojik muayeneye gelen 1006 kadının yer aldığı çok merkezli bir çalışmada %24 hastada evre 0 (prolapsus yok), %38 hastada evre 1, %35 hastada evre 2 ve %2 hastada evre 3 pelvik organ prolapsusu bildirilmiştir [42].

POP için insidans verileri cerrahi müdahale çalışmaları ile sınırlıdır. Büyük ölçekli bir retrospektif çalışmaya göre 80 yaşına gelmiş kadınların yaklaşık % 11,1'i POP nedeni ile opere olmuştur. Cerrahi tedavi en çok 60-69 yaş arasındaki kadınlara uygulanmıştır [1]. POP nedeni ile opere olan kadınların yaklaşık %29'unda 5 yıl içinde yeniden operasyon ihtiyacı doğduğu gösterilmiştir [1, 43].

2.2.4. Pelvik Organ Prolapsusu Risk Faktörleri

POP'un birçok nedenden kaynaklandığı ve yıllar geçtikçe yavaş yavaş ilerlediği kabul edilmektedir. Gebelik, vajinal doğum, yaş, menopoz, kronik olarak artmış karın içi basınç (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kabızlık, obezite), pelvik taban travması, genetik faktörler (ırk, bağ dokusu bozuklukları), histerektomi, konjenital faktörler patogeneizde rol oynamaktadır. Ancak her faktörün öneminin ağırlık derecesi bilinmemektedir.

Doğum: Vajinal doğum POP gelişiminde en sık bildirilen risk faktörüdür. Birçok çalışmada, çocuk doğurmanın bir kadında POP gelişmesi olasılığını arttırdığı açıkça gösterilmiştir [39, 44-45]. 17 000 kadını içeren Oxford aile planlaması kohort çalışmasında 60 yaş altı kadınlarda artan vajinal doğum sayısı pelvik organ prolapsusu ile en güçlü ilişkisi olan risk faktörü olarak bulunmuştur. Nullipar kadınlarla karşılaştırıldığında iki doğum yapan kadınlarda POP nedeni ile hastaneye yatışların 8 kat fazla olduğu gösterilmiştir [45]. Pelvik Organ Destek Çalışması'nda (Pelvic Organ Support Study = POSST) doğum sayısının artışı prolapsus gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca POP riski her vaginal doğumla birlikte 1,2 kat artmıştır [39]. Sezaryen doğum prolapsus gelişimine karşı koruyucu gibi gözükmemektedir. 3050 kadını içeren bir çalışmanın bulgularına göre bir veya daha fazla vajinal doğum yapanlarda semptomatik pelvik organ prolapsusu gelişme riski sadece sezaryen doğum yapanlara göre anlamlı olarak yükselmiştir [44]. Pelvik taban disfonksiyonunu önlemek için elektif sezaryen konusu tartışılmaktadır. Çoğu araştırmacı, pelvik taban disfonksiyonunu primer olarak önlemek amacıyla yapılacak elektif sezaryenin potansiyel risk ve yararlarını tanımlamak için daha fazla klinik çalışmaya gereksinim olduğunu kabul etmektedir [46].

Makrozomi, doğumun ikinci evresinin uzaması, epizyotomi, anal sfinkter laserasyonu, epidural analjezi, forseps kullanımı, eylemin oksitosin ile uyarılması gibi faktörlerin her biri de risk faktörü olarak önerilmiştir. Bu konuda ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Ancak fetus doğum kanalından geçerken oluşan tüm olayların toplamının POP'a yatkınlık oluşturacağı öngörülebilir.

Gebeliğin mi yoksa doğumun kendisinin mi pelvik organ prolapsusuna yatkınlık oluşturduğu konusunda fikir birliği bulunmamaktadır. Yapılan küçük bir vaka-kontrol çalışmasına göre, gebe olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında gebeliğin POP evresinde ilerleme ile ilişkili olduğu bulunmuştur [47]. Başka bir çalışmada önemli oranda gebe nullipar kadın ilk trimesterde evre 0 veya 1 iken, üçüncü trimesterde evre 1 veya 2'ye ilerleme göstermiştir [48].

Obstetrik faktörler ile pelvik organ prolapsusu arasında kuvvetli bir ilişki olmasına rağmen vajinal doğum yapan kadınların büyük çoğunluğunda semptomatik prolapsus görülmemektedir. POP gelişen olguların çoğunda da semptomatik hastalık vajinal doğumdan çok uzun bir süre sonra ortaya çıkmaktadır.

Uzamış eylem ve baş-pelvis uyumsuzluğu vakalarında sezaryenin daha sık kullanılması ve etkin aile planlaması yöntemleri ile paritenin azaltılması, pelvik destek dokularının doğuma bağlı hasarlarının azaltılmasında veya önlenmesinde önemli rol oynayabilir.

Yaş: İlerleyen yaşın POP gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. POP için hem insidans hem de prevelans yaşın ilerlemesi ile artmaktadır [38]. POSTT çalışmasına göre yaşamın her on yılı için prolapsus riski %100 artar. 20-59 yaş arasındaki kadınlarda POP sıklığı her on yılda yaklaşık iki kat artmaktadır [39]. Yaşlanma kompleks bir süreçtir. İlerleyen yaşla birlikte POP sıklığında artma fizyolojik yaşlanma ve hipoöstrojeneminin yanı sıra dejeneratif olaylardan da kaynaklanabilir.

Geçirilmiş cerrahi operasyonlar: Cerrahi travma POP'a yol açabilen bir diğer nedendir. Cerrahi sırasında direkt olarak pelvik desteği oluşturan dokular hasara uğrayabilir. Bu hasarın fark edilmemesi ya da uygun şekilde tamir edilmemesi durumunda POP ortaya çıkabilir. Ayrıca cerrahi sırasında pelvik sinirlerde oluşabilen yaralanmalar da pelvik destek dokularında innervasyon defektine bağlı atrofi ve fonksiyon bozukluğu yaratarak POP'ta rol oynayabilir.

Histerektomi takip eden pelvik organ prolapsusu riskini arttırabilir, ancak semptomatik prolapsus gelişimi tipik olarak prosedürden yıllar sonra ortaya çıkar [1, 45]. Oxford aile planlaması çalışmasında daha önce histerektomi geçiren kadınlarda POP nedeni ile cerrahi tedavi yapılma insidansı yılda %2,9 olarak bulunmuştur [45]. POP cerrahisi için kümülatif risk histerektomi sonrası üçüncü yılda %1'den on beşinci yılda %5'e yükselmiştir. 20 yaş ve üzeri 149 554 kadını içeren bir retrospektif kohort çalışmasında histerektomi ile POP cerrahisi arasındaki ortalama zaman 19.3 yıl olarak bulunmuştur [43].

Kalıtım: Kalıtsal veya genetik faktörler POP gelişiminde rol oynayabilir. Yapılan bir çalışmada annesinde veya kız kardeşinde prolapsus olan kadınlarda POP görülme riskinin arttığı bildirilmiştir [49]. Ayrıca, POP prevalansında belirgin ırksal farklılıklar vardır [50]. Bu pelvisin yapısı ve bağ dokusunun kalıtsal farklılıkları ile açıklanabilir. Siyah kadınlar en düşük, Hispanik kadınlar en yüksek riske sahiptir. Çoğu beyaz kadının tipik pelvisi jinekoid

pelvistir. Oysa siyah kadınlar çoğunlukla dar bir pubik arka ve android veya antropoid pelvise sahiptir. Bu şekiller, jinekoid pelvis ile karşılaştırıldığında POP'a karşı koruyucudur.

Artmış batın içi basınç: Kronik olarak artmış batın içi basıncının POP patogenezinde rol oynadığına inanılmaktadır. Kronik öksürüğe neden olan hastalıklar, obezite, kitle oluşturan pelvik patolojiler, asit oluşumuna yol açan hastalıklar, kronik kabızlık, tekrarlayan ağırlık kaldırma varsa POP daha kolay ortaya çıkmaktadır. Bu durumda pelvik organlar sürekli aşağıya doğru itilir ve pelvik taban kasları sürekli olarak basınca maruz kalır. Fazla kilolu (vücut kitle indeksi 25-30 kg/m²) ve obez (>30 kg/m²) kadınlar POP gelişimi için yüksek risk taşımaktadır [41, 42]. Ağırlık kaldırmayla ilişkili bir çalışmada, tekrarlayan ağırlık kaldırmaları gereken hastabakıcılarda prolapsus için cerrahi geçirme riskinin arttığı gösterilmiştir [51]. Sigara içme ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının da POP gelişimi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır [1, 52].

Bağ dokusu bozuklukları: Bağ dokularında oluşan hasarlar veya bağ dokusunun kalite ve miktarlarındaki değişiklikler POP'a yol açabilmektedir. Bağ dokusu bozuklarının bazıları kalıtsaldır ve özellikle daha erken yaşlarda ve nulliparlarda görülen prolapsuslardan sorumludurlar (Ehler-Danlos sendromu gibi). Yapılan bir çalışmada Marfan sendromlu kadınların üçte birinde, Ehler-Danlos sendromlu kadınların dörtte üçünde POP öyküsü bildirilmiştir [53].

Konjenital nedenler: POP'un çok az bir kısmı konjenitaldir. Meningomyelosel gibi nörolojik defekte yol açan durumlara bağlıdır [54, 55]. Pelvik tabanda kısmen veya tamamen denervasyon ve buna bağlı pelvik kaslarda atrofi söz konusudur.

2.2.5. Pelvik Organ Prolapsusu Patofizyolojisi

Pelvik tabanın miksiyon, defekasyon, cinsel yaşam, doğum gibi çok önemli fonksiyonları vardır. Pelvik organ desteği, *m. levator ani* ve pelvik taban bağ dokusu arasındaki kompleks ilişkiler aracılığı ile sürdürülmektedir. Bu komponentlerin birinin veya ikisinin bozulması ya da disfonksiyonu destek kaybına ve sonunda pelvik organ prolapsusuna neden olur.

M. levator ani kasılmasını sabit durumda devam ettirerek genital hiatusu kapatır ve pelvik organlar için stabil bir platform sağlar. *M. levator ani*'nin tonusu normalse ve vaginanın derinliği yeterli ise üst vagina ayakta duran bir kadında hemen hemen horizontal olarak uzanır. Bu, batın içi basınç artışları sırasında, üst vaginanın levator düzlemine karşı bastırıldığı bir "kapak-sübap" etkisi oluşturur. Denervasyon veya direkt kas hasarı sonucu

levator ani kasının normal tonusunun kaybolması levator horizontal düzleminin zayıflamasına, ürogenital hiatusun açılmasına neden olur ve pelvik organları prolapsus için yatkın hale getirir [56, 57]. Yeterli *levator ani* desteği olmadığında, pelvis içeriklerinin visseral fasyal tutunma alanları üzerinde gerilim meydana getirdiği ve sonuçta tutunmanın zayıfladığı düşünülmektedir. Bu şekilde anatomik değişiklikler pelvik organ prolapsusu olan kadınlarda, normal desteği olanlara göre daha sık görülmektedir [56].

M. levator ani hasarı, doğrudan kas dokusunun yaralanması ya da sinir desteğinin hasarlanmasından kaynaklanabilir. Eylem ve vajinal doğum bu tip bir hasara neden olma potansiyeline sahiptir. Vajinal doğum sonrası levator ani kas kompleksinin pubovisseral ve iliokoksigeal bölgelerindeki görünebilir defektler primipar kadınlarda MRI ile %20 oranında saptanırken, nulliparlarda gözlenmemiştir. Bu bulgular vajinal doğumun levator ani kas yaralanması aracılığı ile pelvik organ prolapsusu oluşumuna katkıda bulunduğunu desteklemektedir [58, 59].

Levator ani kaslarının doğrudan yaralanmasının doğumun ikinci aşamasında oluştuğuna inanılır. Fetal baş, pelvis tabanını gererken kasta belirgin gerilme meydana gelir. Yapılan çalışmalarda en fazla gerilimin medial pubokoksigeal kaslarda olduğu gösterilmiştir [60]. Tunn ve arkadaşları, MR kullanarak yaptıkları bir çalışmada vajinal doğumdan iki hafta sonraki görüntülere kıyasla doğumdan hemen sonra ürogenital ve levator ani hiatus alanlarının arttığını bulmuşlardır. Bu levator ani kaslarının bazı kadınlarda vajinal doğumdan sonra yeniden şekillendiğini ve iyileştiğini göstermektedir. Ancak bazı olgularda kalıcı gerilim yaralanmasının oluşma olasılığı da vardır. Klinik gözlemlerde multipar kadınlarda nulliparlara oranla genişlemiş olarak saptanan genital hiatuslar bunun kanıtıdır.

Vajinal doğum sonrası sinir hasarını araştırmak için yapılan pudental sinir terminal motor gecikme süreleri (PNTML) ve elektromiyografi (EMG) çalışmaları ile pudental nöropatinin vaginal doğumla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır [61]. Weidner ve arkadaşları 58 primipar gebe kadına 3. trimesterde, postpartum 6. hafta ve 6. ayda levator ani EMG'si yaparak, levator ani kasında nöromusküler hasarı postpartum 6. haftada %24 ve postpartum 6. ayda %29 olarak saptamışlardır [62]. Ek olarak, defekasyonla kronik gerilme de pelvik kas denervasyonu ile ilişkilidir [63, 64]. Aşırı gerilme ve perineal iniş, pudental sinirleri gerebilir ve nöropati meydana gelebilir.

Pelvisin bağ dokusu, polisakkarit bir ekstraselüler matriks içerisinde örülmüş kollajen, elastin, düz kas ve mikroliflerden oluşur. Pelvik organları kuşatan bağ dokusu, pelvisin ve içeriklerinin anatomik desteğini sağlar. Vajina ve uterusu normal anatomik pozisyonlarında

tutarken aynı zamanda vissera hareketliliğine izin vererek dışkı ve idrar depolanmasına, koitusa, doğuma ve defekasyona olanak sağlar. Vajinal doğum veya histerektomi sırasında, kronik gerilme ile veya yaşlanma ile birlikte bu konnektif doku bağlantılarında ayrılma veya gevşeme meydana gelir [57]. Bağ dokusu ve bağ dokusu onarım anormalliklerinin, kadınları prolapsusa yatkın hale getirebileceğini ileri süren kanıtlar bulunmaktadır [3-5]. Eklem hipermobilitesi olan kadınlarda prolapsus prevalansı, normal eklem mobilitesi olanlara göre daha yüksektir [65]. Benzer şekilde Ehler-Danlos sendromu ya da Marfan Sendromu gibi bağ dokusu bozuklukları olan kadınlar pelvik organ prolapsusu için daha yüksek risk taşımaktadır [53, 65]. Pelvik organ prolapsusu olan kadınların prolabe olan dokularındaki kollajenin incelenmesi sonucu, kollajen içeriğinde yapısal, biyokimyasal ve niceliksel farklılıklar bulunmuştur [66]. Bununla beraber bu değişimlerin bir sebep mi yoksa sonuç mu olduğu belirsizdir. Knock-out farelerle yapılan çalışmalar, anormal elastin homeostazının da anormal doku cevabı yolu ile prolapsus gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir [67]. Ayrıca, pelvik tabanın fasya ve bağ dokuları, pelvik dokuların yaşlanması ve nöroendokrin sinyalleri kaybetmesi sonucunda da gücünü yitirebilir [68].

Vajina duvarı skuamöz epitelyum, düz kas tabakası ve adventisia'dan oluşur. Tüm elemanlar kollajen, elastin lifleri ve düz kas içeren ekstrasellüler matrikse yerleşmiştir. Bu bileşenlerin anormallikleri vajina disfonksiyonu ve POP gelişimine katkıda bulunabilir. Vajinal duvarın düz kas bütünlüğü prolapsusu olan kadınlarda bozulmaktadır. Vajinal duvar düz kas liflerinin disfonksiyonu, vajina yan duvarının pelvis yan duvarına tutunmasını etkileyebilir. Prolapsuslu kadınların ön ve arka vajina duvarı apeks kaslarının düz kas kısmı azalmış olarak bulunmuştur [69].

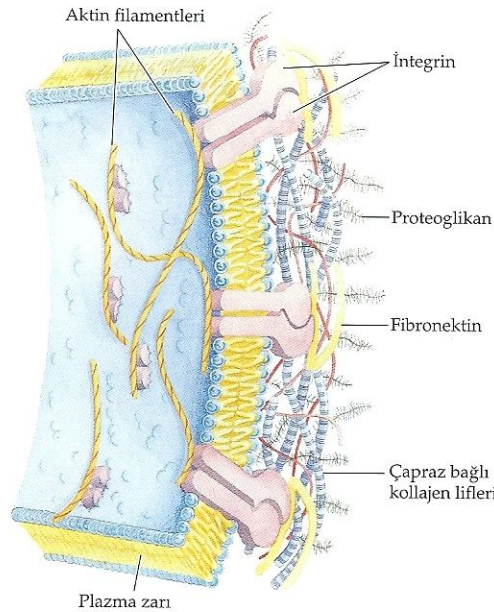
Kemik pelvisin yerleşim ve şekil farklılıkları da pelvik organ prolapsusu gelişimi ile ilişkilidir. Özellikle lumbar lordoz kaybı ve daha az vertikal yerleşimli pelvik girim görülmesi basıncın direkt pelvik tabana doğru yönelmesine neden olabilmektedir [70, 71]. Benzer olarak geniş transvers pelvik girimi olan kadınlarda karın içi basıncı pelvik tabana daha geniş bir alanda yansıdığı için bu kadınlar pelvik organ prolapsusu için artmış risk taşır [72, 73]. Biçim ve yerleşim farklılıkları aynı zamanda doğum sırasında annenin yumuşak doku hasarını ve sinir zedelenmesini de etkileyen önemli faktörlerdir.

2.3. Ekstrasellüler Matriks, Bağ Dokusu ve POP

Fibröz bir doku olan bağ dokusu vücudun en çok çeşitlilik gösteren dokusudur. Farklı bölgelerde farklı yapı ve fonksiyonda olabilmektedir. Diğer dokuları saran, destekleyen ve organlarda yapısal bütünlüğü sağlayan bağ dokusunun ana bileşenleri; hücreler ve ECM'dir. Başlıca bağ dokusu hücreleri fibroblastlar, makrofajlar, yağ hücreleri ve lökositlerdir. Fibroblastlar, ECM'nin üretilmesinden sorumludurlar.

ECM, hücrelerin arasında bulunan, onları bir arada tutan ve destekleyen, hücrelere oksijen ve besin difüzyonu için gözenekli bir yapı sağlayan jel yapısında kompleks bir oluşumdur. Hücreler ECM'yi oluşturan bileşenlerle sıkı bir ilişki içindedirler. Bu sebeple ECM çok sayıda fizyolojik - patofizyolojik role sahiptir. İskelet oluşturma, destek sağlama, dokular arasında bağ oluşturma, hücre adezyonu, farklılaşması, migrasyonu, proliferasyonu gibi olaylarda rol alırlar [74, 75].

ECM, yapısal olarak fibröz proteinler, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşmaktadır.



Şekil.7. Ekstrasellüler matriks ve hücreler arası etkileşimler (Nelson DL, Cox MM. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (N. Kılıç, Çev.). Palme Yayıncılık, Ankara 2005, s.313)

2.3.1. Fibröz proteinler

Kollajen ve elastin ECM'nin ana fibröz proteinleridir.

Bağ dokusunun temel bileşeni olan kollajen miktar olarak insanlarda tüm proteinlerin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Temel fonksiyonu organ ve dokuları şekillendirmek, gerilmeye karşı direnç sağlamaktır.

28 tip kollajen tanımlanmıştır [76].

Tablo.1. Kollajen tipleri (Smith C, Marks AD, Lieberman M. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım. (ME İnal, Çev.). Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara 2007, s.908)

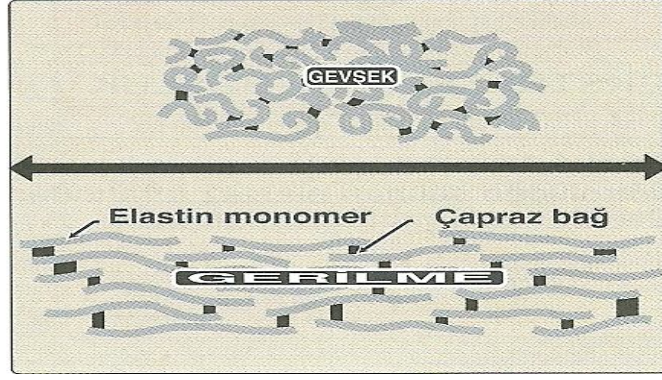
Kollajen tipi	Gen	Doku dağılımı	Hastalıklar
I	COL1A1, COL1A2	Deri, kemik, tendon, kornea	Osteogenezis imperfekta, Ehler – Danlos sendromu
II	COL2A1	Kıkırdak, vitröz sıvı, anulus fibrozus	Kollajenopati
III	COL3A1	Granülasyon dokusu, fetal deri, tendon, aorta, kornea	Ehler – Danlos sendromu, Dupuytren kontraktürü
IV	COL4A1, COL4A6	Bazal membranlar	Alport sendromu, Goodpasture sendromu
V	COL5A1, COL5A3	Deri, kemik, tendon, kıkırdak	Ehler – Danlos sendromu
VI	COL6A1, COL6A3	Deri, kemik, tendon, kıkırdak	Atopik dermatit
VII	COL7A1	Dermal – epidermal bileşke	Epidermolizis bülloza distrofi
VIII	COL8A1, COL8A2	Kornea, bazı endotelial hücreler	Posterior polimorfus korneal distrofi 2
IX	COL9A1, COL9A3	Kıkırdak, vitröz sıvı	Multiple epifizal distrofi 2
X	COL10A1	Hipertrofik ve mineralize kıkırdak	Schmid metafizal distrofi
XI	COL11A1, COL11A3	Kıkırdak, vitröz sıvı	Kollajenopati
XII	COL12A1	Kollajen I içeren bağ dokuları	-
XIII	COL13A1	Hücre yüzeyleri, epitelyum hücreleri	-
XIV	COL14A1	Kollajen I içeren dokular	-
XV	COL15A1	Endotel hücreleri	-
XVI	COL16A1	Birçok dokuda	-
XVII	COL17A1	Epidermal hücre yüzeyi	Büllöz pemfigoid, epidermolizis bülloza
XVIII	COL18A1	Endotel hücreleri	-
XIX	COL19A1	Birçok dokuda	-
XX	COL20A1	-	-
XXI	COL21A1	-	-
XXII	COL22A1	-	-
XXIII	COL23A1	-	-
XXIV	COL24A1	-	-
XXV	COL25A1	-	-
XXVI	EMID2	-	-
XXVII	COL27A1	-	-
XXVIII	COL28A1	-	-

Tip I kollajen deri, kemik, tendon, ligaman ve matür skar dokusunda yüksek miktarda bulunur. Esnektir ve gerilmeye, strese karşı dirençlidir. Tip III kollajen ise daha çok esneyebilirlik ve gerilebilirlik özelliği bulunan ve periyodik olarak strese maruz kalan dokularda yaygındır [77]. Tip III kollajen vajina ve destek dokunun primer kollajen subtipidir. Ayrıca embriyoya özgü kollajendir, doğumda derinin major kollajenidir. Hem tip I hem de tip III kollajen yara tamiri sırasında granülasyon dokusunda bulunur [78, 79]. Tip V kollajen az miktarda bulunan bir kollajen tipi olup, tip I kollajen ile aynı özellikleri taşımaktadır. Yara iyileşmesinde ve fibrillogenезде önemli rolleri vardır [80]. Tip V kollajenin vajen ve destek dokudaki rolü ise tam olarak bilinmemektedir.

Kontrollü çaplara sahip lifler oluşturmak için tip I kollajen, tip III ve tip V kollajen ile kopolimerize olur. Bu lifler dokunun biyomekanik karakteristiğini etkiler [80]. Tip III ve tip V kollajendeki artış lif boyutunu düşürerek bağ dokusunun mekanik gücünü azaltır. Tip I kollajenin tip III ve tip V kollajen toplamına oranı, o dokunun gerim kuvvetinin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Ligametteki yüksek oran daha büyük bir kuvvetin göstergesi iken düşük oran doku gevşekliğine neden olabilir.

Kollajen olgunlaşmasında iki önemli mekanizma vardır. Birincisi divalan çapraz bağların matür (trivalan) çapraz bağlara dönüşmesidir [81]. İkinci olarak olgun, yavaş metabolize olan kollajen nonenzimatik glikasyona duyarlıdır. *Maillard* reaksiyonu olarak da bilinen bu reaksiyon, nispeten düşük turnover'ı olan kollajene rastgele glikoz eklenmesini içerir. Bu glikasyon ürünleri intermoleküler çapraz bağlar oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Bu ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) yaşla biriktikleri saptanmıştır. Bu overmatür kollajen daha katı ve daha kırılıgandır [81, 82].

Dokuların mekanik özellikleri aynı zamanda elastin miktarına da bağlıdır. Elastin elastiki özellikleri olan bir bağ dokusu proteindir. Normal uzunluğunun birkaç katına kadar uzatılabilir ancak gerilme kuvveti ortadan kalkınca orijinal şekline geri döner.



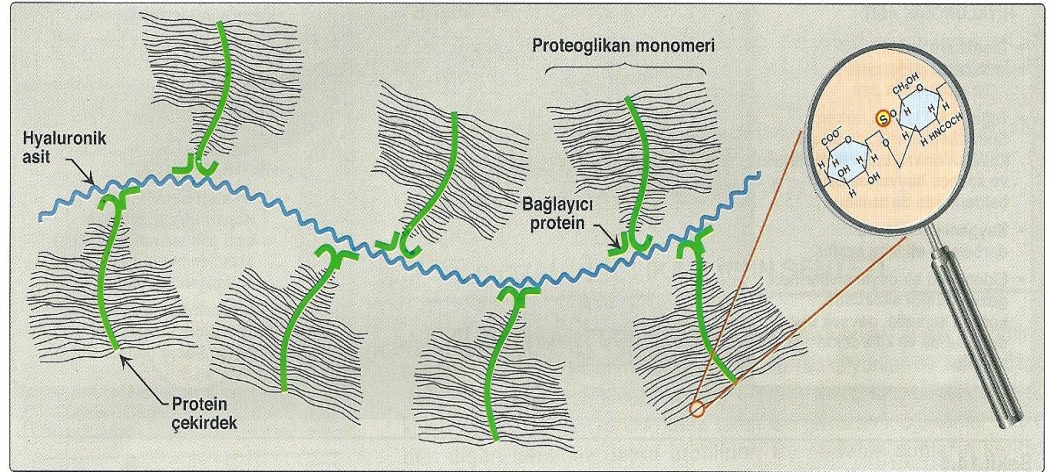
Şekil.8. Gevşek ve gergin durumlarda elastin lifleri (Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. (E. Ulukaya, Çev.). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2007, s.49)

2.3.2. Adezif glikoproteinler

Adezif glikoproteinler fibronectin, laminin, tenaskin, entaktin, vitronektin gibi proteinleri içermektedir. Yapılarında kollajenlere ve glikozaminoglikanlara (GAG) bağlanma bölgeleri içerdiklerinden ECM'nin şekillenmesini, hücre yüzeyindeki özel reseptörlere bağlanma noktaları içermeleri sebebi ile de hücrelerin ECM'ye bağlanmasını sağlarlar.

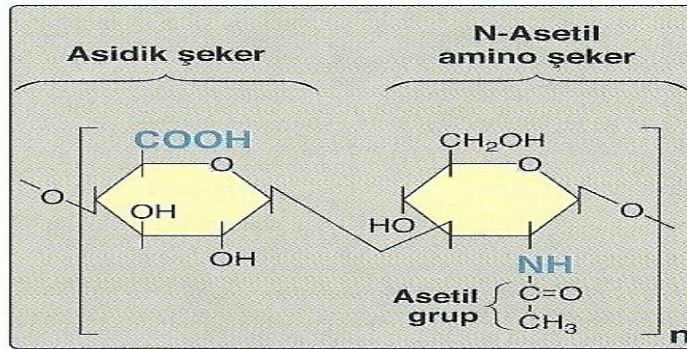
2.3.3. Proteoglikanlar

Proteoglikanlar, hyaluronik asit (HA) dışındaki GAG zincirlerine (kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparin ve heparan sülfat) kovalent olarak bağlanmış bir çekirdek proteinden oluşan makromoleküllerdir. Proteoglikanların kollajen, fibronectin ve diğer ECM glikoproteinlerine göre çok daha yüksek bir polisakkarit/protein oranına sahip oldukları görülmektedir. Çok az miktarda protein içermelerine karşın %95'ten fazla karbonhidrat içerirler.



Şekil.9. Proteoglikan kümesi (Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. (E. Ulukaya, Çev.). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2007, s.158)

Proteoglikanların GAG bileşenleri: Glikozaminoglikanlar, vücutta en fazla bulunan heteropolisakkarit grubudur. Altı değişik tür GAG vardır: *hyaluronik asit*, *kondroitin sülfat*, *dermatan sülfat*, *keratan sülfat*, *heparin* ve *heparan sülfat*. Proteoglikanlardaki polisakkarit zincirleri, spesifik GAG disakkaritlerinin uzun, tekrarlayan, lineer polimerlerinden oluşur. Tekrarlayıcı disakkaritler amino şeker (iki monosakkaritten biri her zaman N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamin) ve çoğunlukla çeşitli bölgelerde sülfatlanmış üronik asit (d-glukronik asit veya l-iduronik asit) üniteleri içerirler. Keratan sülfat, N-asetilglukozamin ve galaktoz içeren tekrarlayan disakkaritlerden oluşan tek GAG'dır. Hyaluronik asit ise diğerlerinden farklı olarak sülfat grupları taşımayan GAG'dır.

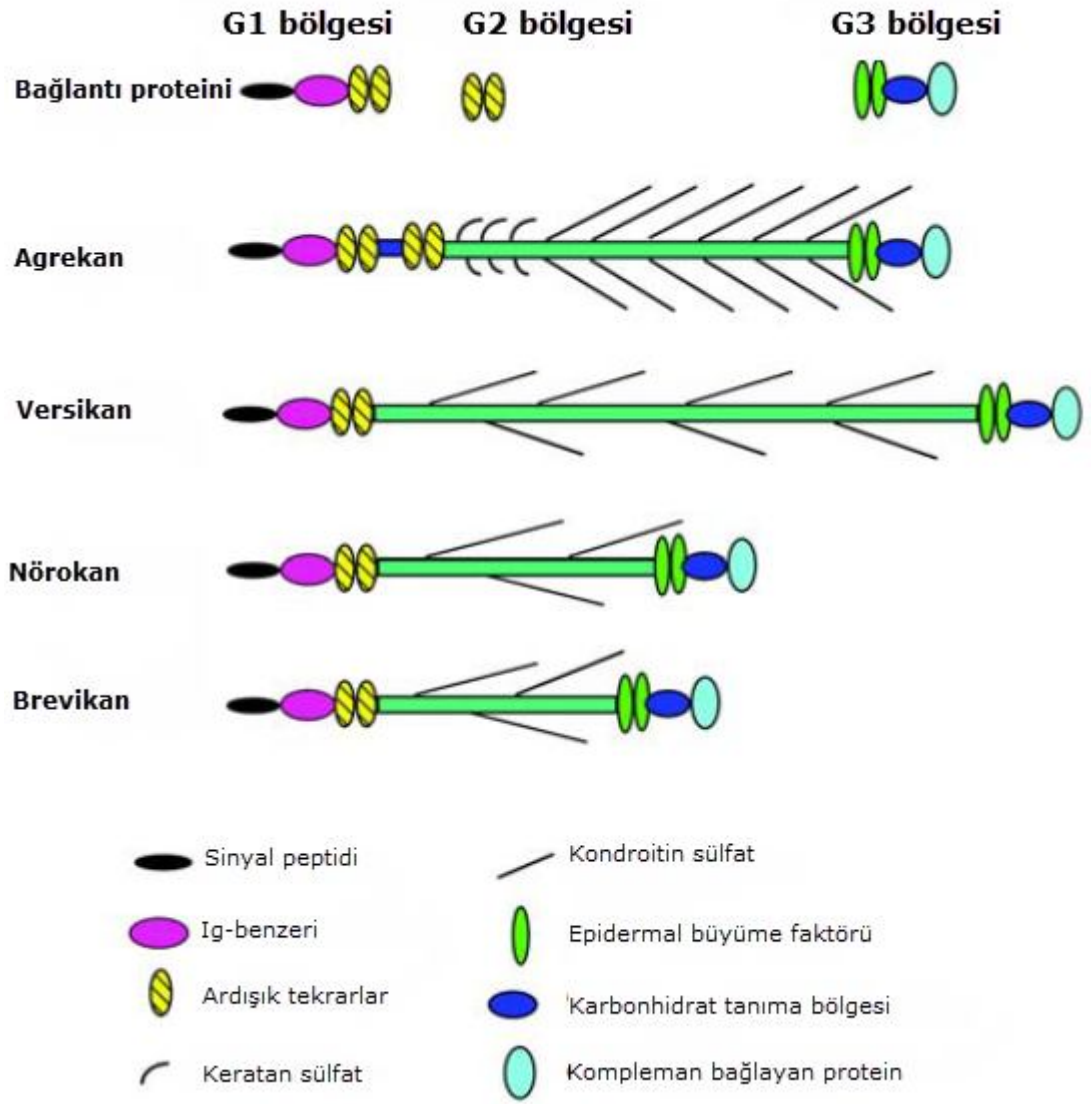


Şekil.10. Tekrarlayan disakkarit birimi (Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. (E. Ulukaya, Çev.). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2007, s.155)

GAG'lar negatif yüklü yapılardır. Tüm şekerlerin fizyolojik pH'de negatif yüklü olan karboksilat grupları ve sülfat grupları ile asidik şekerler yapıya güçlü negatif doğasını kazandırır. GAG'lar negatif yükleri sayesinde birbirlerini iterler ve aralarında oluşan boşluğa su molekülleri girer. Böylece GAG'ların jel yapıları oluşur. Ayrıca GAG yapısındaki çok sayıda negatif yük, proteoglikanların belirli büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli pozitif yüklü moleküllere bağlanmasına olanak sağlar [83]. Proteoglikanlar hücre fonksiyonlarını değiştirme yeteneği taşıyan ECM bileşenlerinden biridir. Proteoglikanların moleküler çeşitliliği çekirdek proteinler, O ve N bağlı oligosakkaritler ile çeşitli tip ve sayıdaki GAG zincirlerinin kombinasyonlarının çokluğundan kaynaklanır. Spesifik yapısal karakteristikleri GAG'lara biyolojik fonksiyon çokluğu açısından yapısal temel sağlar [84]. Proteoglikanlar hücre proliferasyonu, adhezyonu, migrasyonu ve farklılaşması gibi hücresel olayları etkileyerek ve doku organizasyonunda rol alarak çok sayıda biyolojik fonksiyon sergiler. Büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve sitokinlerle etkileşerek hücre sinyalizasyonunda yer alırlar [85].

Proteoglikanların sınıflandırılması: Proteoglikanlar lokalizasyonlarına göre üç temel sınıfa ayrılabilir: Ekstrasellüler olarak salgılananlar, hücre yüzeyi ile ilişkili olanlar ve intrasellüler olanlar. Ekstrasellüler olarak salgılananlar, büyük agrekan proteoglikanlar (Hyalektanlar), küçük lösinden zengin proteoglikanlar ve bazal membran proteoglikanlarını içerir. Hücre yüzeyi ile ilişkili proteoglikanların iki ana alt grubu sindekanlar ve glipikanlardır [85]. Serglipin ise bugüne kadar tanımlanmış tek intrasellüler proteoglikandır [86, 87]

Hyalektan ailesinin üyeleri versikan, agrekan, neurokan ve brevikandır. Hyalektanlar, hyaluronana bağlanma yeteneklerinden dolayı bu adı almışlardır [88]. N-terminal globular bölgeleri (G1) aracılığı ile hyaluronana bağlanırlar. GAG zincirlerinin çoğunu santral bölge taşır ve C-terminal globuler bölge (G3) lektin benzeri aktivite gösterir [89]. Hyalektanlar multiple domainler taşırlar. Çeşitli hücre aktivitelerine aracılık ederler [90-92].

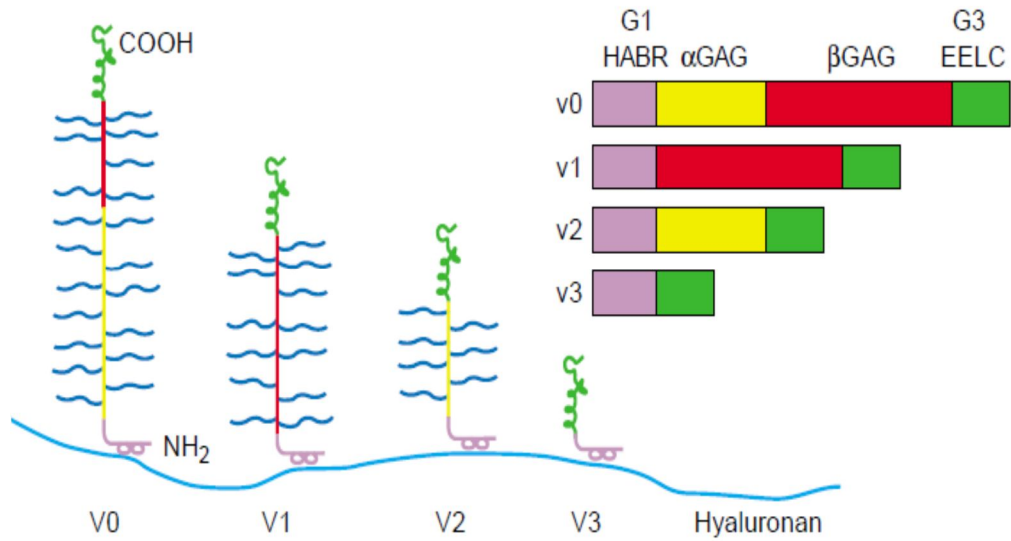


Şekil.11. Proteoglikanların hyalektan ailesi üyeleri (Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee Aj, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Research* 2005, 15(7):483-494)

2.3.3.1. Versikan

Versikan (VCAN) aynı zamanda kondroitin sülfat proteoglikan 2 (CSPG2) olarak da adlandırılan, hyalektan ailesinden bir proteoglikandır. Versikan vücuttaki tüm doku ve organların ECM'sinde fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. Bu biyolojik aktivitelerdeki çeşitliliğini ve önemini göstermektedir. Versikan kromozom 5q12-14'de lokalize tek bir gen tarafından kodlanmaktadır [93]. İnsan VCAN geni 90-100 kb'lık 15 ekzondan oluşmaktadır.

Versikan diğer hyalektanlarla birlikte, bir N-terminal G1 bölgesi, bir C-terminal G3 bölgesi ve G1 ile G3 arasında kondroitin sülfat zinciri bağlanma alanlarından oluşur. G1 bölgesi, immuglobulin benzeri motif ile bunu takip eden hyaluronana bağlanan iki ardışık proteoglikan tekrarından oluşur. G3 bölgesi, iki epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrar, bir karbonhidrat tanıma bölgesi (lektin benzeri motif) ve kompleman bağlayıcı proteinden oluşur. Bu bağlanma G3 selektin ailesine yapısal olarak benzer niteliktedir [94].



Şekil.12. Versikan izoformlarının yapısı (Wight TN: Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Current Opinion in Cell Biology* 2002, 14(5):617-623)

Molekül ağırlıkları 370, 262, 280 ve 72 kDa olan dört adet versikan *splice* izoformu olduğu gösterilmiştir (V0, V1, V2, V3) [95-97]. Bu izoformlar arasındaki yapısal fark GAG bağlanma bölgelerinden kaynaklanmaktadır. Her bir izoform farklı uzunluklarda GAG bağlanma bölgesi ve buna eşlik eden farklı sayıda bağlanmış GAG zinciri içerir [98].

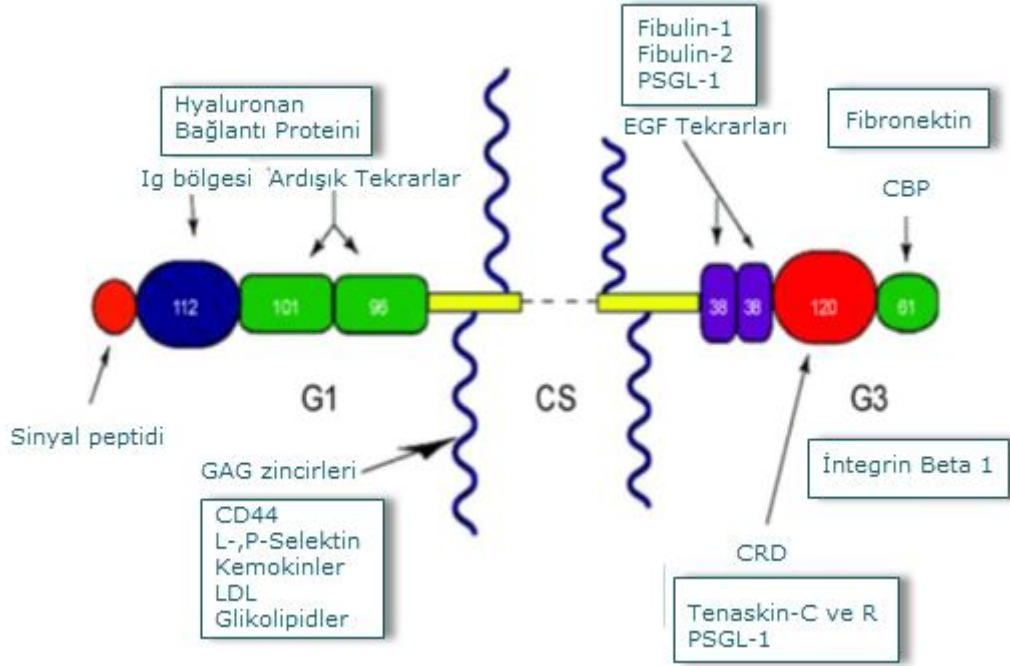
V0 en büyük versikan izoformudur. CS-α (GAG-α) ve CS-β (GAG-β) denilen iki adet GAG bağlanma bölgesi içerir [96]. V1 izoformu sadece GAG-β, V2 izoformu ise sadece GAG-α içerir. V3 izoformu yalnızca G1 ve G3 bölgelerinden oluşur, GAG bağlanma bölgeleri yoktur [99]. Yetişkin insanda dokuların %15'inden azında dört izoformun da anlamlı ölçüde transkribe edildiği gösterilmiştir [100]. V0 izoformu çoğunlukla erken embriyolojik gelişimde görülürken [101] az oranda da erişkin dokularda mevcuttur [100]. Yapılan çalışmalar V1 ve V2'nin farklı fonksiyonlara sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

V1'in hücre proliferasyonunu arttırdığı ve NIH-3T3 fibroblastları apoptozisten koruduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, V2 hücre proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozise direnç fonksiyonu yoktur [102]. V0 ve V1 kanserli dokularda baskın olarak bulunan formlardır [103-105]. V3 izoformunun primer endotelial hücre kültürlerinde proinflamatuvar sitokinleri ya da büyüme faktörlerinin aktivasyonunu takiben eksprese edildiği bulunmuştur [100]. Arteriyel düz kas hücrelerinde V3'ün aşırı üretimi kültür kabına hücrelerin artmış adhezyonu ile sonuçlanmış ancak yara yerinde V3'ün migrasyonu yavaşlattığı ve proliferasyonu azalttığı görülmüştür [106].

Versikanda GAG bağlanma bölgeleri başına GAG yan zincirlerinin sayısı sabittir. GAG- α (12-17 CS zinciri) ve GAG- β (5-8 CS zinciri) içerir [96]. Ancak karbonhidrat sayısı, büyüklüğü ve kompozisyonu sadece GAG bağlanma bölgelerinin uzunluğundan etkilenmez. G1 ve G3 bölgeleri, hücre ve doku tipinden de etkilenebilir. Örneğin, G1 versikanda GAG zinciri bağlanmasını baskımlarken, G3 ise desteklemektedir [107]

Disintegrin ve ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) gibi proteazlar, MMP ve plazmin versikanı fragmanlarına ayırabilmektedir [85].

Versikanın yapısı komplekstir. Negatif yüklü kondroitin sülfat zincirleri ve G1, G3 bölgelerinin diğer proteinlerle etkileşimi yolu ile adezyon, proliferasyon, migrasyon, apoptoz ve ECM bütünlüğünü sağlama gibi çeşitli hücrel olaylara dahil olduğu gösterilmiştir [12, 85, 108]. Öte yandan versikan tek başına hareket etmez. Versikan hyaluronan, tip1 kollajen, tenaskin-R, fibulin 1 ve 2, fibrilin 1, fibronektin, P ve L selektin ve kemokinler gibi ECM bileşenlerine bağlanır. Ayrıca CD 44, integrin b1, EGFR, P-selektin glikoprotein ligand [85, 98] ve *toll like* reseptörlere [109] de bağlanmaktadır. Versikanın etkilerinin birçoğu ilişkide bulunduğu bu proteinler ile olan etkileşimleri aracılığı ile gerçekleşmektedir.



Şekil.13. Versikanın diğer moleküllerle etkileşimi (Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee Aj, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Research* 2005, 15(7):483-494)

Versikan ve ECM Kurulumu

POP'un bağ dokusu ve bağ dokusu tamir mekanizmasının yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bağ dokusu, nedeni ne olursa olsun hasara ve giderek artan mekanik yüke yanıt olarak yeniden yapılanma (remodeling) gösterir. Çeşitli ECM komponentlerinin yıkılması ve tekrar kurulması sırasındaki anormallikler pelvik organ prolapsusunun patogenezinde rol oynuyor olabilir.

Doku *remodeling*'i için pek çok molekülün karşılıklı etkileşmesi gereklidir. Versikan bu yeniden yapılanmada kilit proteinlerden biridir. Diğer ECM proteinlerinden bazıları ile etkileşime girerek ECM bütünlüğünü sağlamada merkezi bir rol oynar. Versikanın *domain* yapısı kendisini protein-protein ya da protein-karbonhidrat gibi farklı tiplerde etkileşimlere açık hale getirmektedir.

Bu etkileşimlerin en önemlilerinden biri versikanın N-terminal bölgesi (G1) ile hyaluronan (HA) arasındaki etkileşimdir. HA üretimi; hücre proliferasyonu, inflamasyonu, doku yeniden yapılanması ve tümör hücre invazyonu olan alanlarda artış gösterir. Bu

molekül, hücre davranışını özellikle hücre yüzey proteini olan CD 44'e bağlanarak düzenler [110]. Versikanın HA'ya bağlanması, versikanın G1 bölgesindeki ardışık tekrarlar aracılığı ile olmaktadır. Bu etkileşim başka bir protein (link protein) ile stabilize edilmektedir [111]. Versikan, HA, CD 44'ün kültürü yapılmış fibroblastların perisellüler matriksinde beraber lokalize olduğu tespit edilmiştir [112]. Versikan, hem HA ve hem de CD44 ile etkileşime girerek kompleksler oluşturmakta ve bu kompleksler, ECM'nin vizkoelastik yapısını arttırarak mekanik güçlere uyum sağlamasına olanak sağlamaktadır [113].

Versikan, ECM proteinlerinden fibulin-1 ve fibulin-2 ile de etkileşime girmektedir. Fibulinler ekstrasellüler liflerde, bazal membranlarda ve elastik liflerde eksprese edilmektedir [114]. Yetişkinlerde elastik liflerin bir parçası olan mikrofibrillerle ilişkili oldukları saptanmıştır. Versikan, fibulin-1 ve 2'ye kalsiyuma bağımlı bir şekilde C-terminal lektin benzeri bölgesi aracılığı ile bağlanır [115, 116]. Bu bağlanmada fibulin-1 ve 2'nin kalsiyum bağlayan EGF benzeri bölgelerin (cbEGF) rol oynadığı gösterilmiştir [98].

Fibrilin, tropoelastin yığıntılarına iskelet oluşturur. Mikrofibrillerde versikan için muhtemel bağlanma alanı, fibrilin-1 içerisindeki bir bölgedir. Bu bölge cbEGF 11 ve 21 *domainleri* arasındadır [115]. İnsan geninde bu bölgede görülen mutasyonlar pelvik organ prolapsusunun da risk faktörleri arasında yer alan bir hastalık olan marfan sendromu ile sonuçlanabilir.

Fibulinin, versikan ile fibrilin arasında bir köprü vazifesi gördüğü, elastik liflerin kurulumunda önemli olan son derece düzenli multimoleküler yapıları oluşturduğu düşünülmektedir [98]. Fibulin gen ekspresyonunda azalmanın POP ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [117-120].

Versikan molekülünün parçası olan kondroitin sülfatın (CS), elastik lif kurulumunu inhibe ettiği düşünülmektedir. CS'den yoksun versikan *splice* varyantının (V3) aşırı ekspresyonunun, tropoelastin ekspresyonunu arttırdığı ve uzun dönem kültürlerde elastik lif birikimi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Versikanın bu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, çalışmalar sonucu elde edilen veriler versikanın CS içeren formlarının elastik lif kurulumunu inhibe ettiğini desteklemektedir. Elastik fibrillerin uygun sentez, yıkım ve rejenerasyonu pelvik organ desteğinin devam ettirilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Versikan, gelişimsel olaylarla ilişkili ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında da rol oynamaktadır. Gebelik ve involüsyon sırasında insan servikal bağ dokusunda kapsamlı bir yeniden yapılanma gerçekleşmektedir. Versikan, gebelik sırasında bu dokuda artış göstermektedir. En yüksek konsantrasyonuna vajinal doğumun hemen sonrasında ulaşır. Ancak

involüsyon esnasında dramatik bir düşüş sergiler. Versikan, gebelikte daha gevşek ve geçici bir ECM oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Versikanın Hastalıklarla İlişkisi

Kanser:

Bugüne kadar beyin tümörleri, melanoma, osteosarkom, lenfoma, AML, testis tümörleri, meme ca, prostat ca, kolon ca, AC ca, pankreas ca, over ca, endometrium ca gibi birçok malignitede versikan düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Versikan meme, prostat ve başka birçok kanser tipinde prognoz ve survi ile ilişkili bulunmuştur [103, 121-124].

Yapılan çalışmalar versicanın kanser hücre motilitesini [105, 125], proliferasyon [126]ve metastazı [127] attırdığını göstermiştir. Kanser hücreleri, hücre yüzeyi CD44 ekspresyonu ve motiliteyi destekleyen HA/ versican agregatları yolu ile polarize periselüler bir kılıf oluştururlar [128]. Bu agregatlar hücre şekil değişikliklerini kolaylaştırır ve hücre proliferasyonunu destekler. Hem G1 hem de G3 versican bölgelerinin NIH-3T3 fibroblast hücre kültüründe ve tümör hücrelerinde hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [125, 129-131]. G1 bölgesi hücre adhezyonunu destabilize ederek proliferasyonu stimüle eder. G3 bölgesi EGFR aktivasyonu yoluyla proliferasyonu indükler. G1 ve G3 bölgeleri tümör büyüme hızını, tümör gelişimini ve metastazı farklı yollardan kontrol edebilir.

İnvaziv kanserlerde yapılan çalışmalarda versicanın interstisyel dokularda yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu durum negatif prognostik faktör olarak kabul edilmiştir [124].

Kanserde versikan tümör progresyonunu ve hasta sağ kalımını gösteren bir biyomarker olarak değerlendirilebilir. Ayrıca versicanın düzenlenmesinin ve içeriğinin anlaşılması tümör mikroçevresini hedefleyen kanser tedavisi açısından yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir.

Kardiyovasküler Hastalıklar:

Versican normal kan damarlarının ECM'sinde bulunur ve vasküler hastalıkların tüm formlarında dramatik olarak artar. Son yayınlarda versican ile aterosklerotik lezyonlar arasında anlamlı bir ilişki olduğu ortaya koyulmuştur [108].

Versikan diğer moleküllerle etkileşime girerek arteriyal düz kas hücrelerinin (ASMC) adezyon, proliferasyon ve migrasyonunun düzenlenmesinde (remodeling) rol oynamaktadır [108, 132].

Elastik lif sentezinin bozulması ASMC'lerde subendotelyal proliferasyona neden olmakta ve obstrüktif vasküler hastalık ortaya çıkmaktadır. Versikan, CS zincirleri aracılığı ile elastik lif sentezini inhibe etmektedir [133].

Versikanın vasküler duvarda düşük dansiteli lipoproteinlere (LDL) bağlandığı ve bunları tuttuğu gösterilmiştir [134].

Bu verilere dayanarak versikanın ateroskleroz ve restenoz patogenezinde anahtar bir molekül ve yeni bir tedavi ajanı olabileceği düşünülmektedir.

Bağ Dokusu Hastalıkları:

Osteoartritte [13], intervertebral disk patolojilerinde [13], karpal tünel sendromunda [14] ve çeşitli tendinopatilerde [14-16], patolojik dokularda normal dokulara kıyasla versikan miktarında artış tespit edilmiştir.

Bu versikan artışının, muhtemelen onarım cevabının yansıması olduğu ve versikanın bağ dokusu *remodeling*'i ile ilgili olduğu düşünülmektedir [13-16].

Versikan Ekspresyonunun Regülasyonu

Versikan gen ekspresyonu tipik bir TATA box içeren bir promoter tarafından düzenlenir ve AP2, CCAAT *enhancer* protein cAMP yanıt elementi (CRE) de dahil olmak üzere birkaç transkripsiyon faktörü için potansiyel bağlanma bölgeleri içermektedir [135]. CREB5, CRE'ye bağlanan transkripsiyon faktörlerinden biridir.

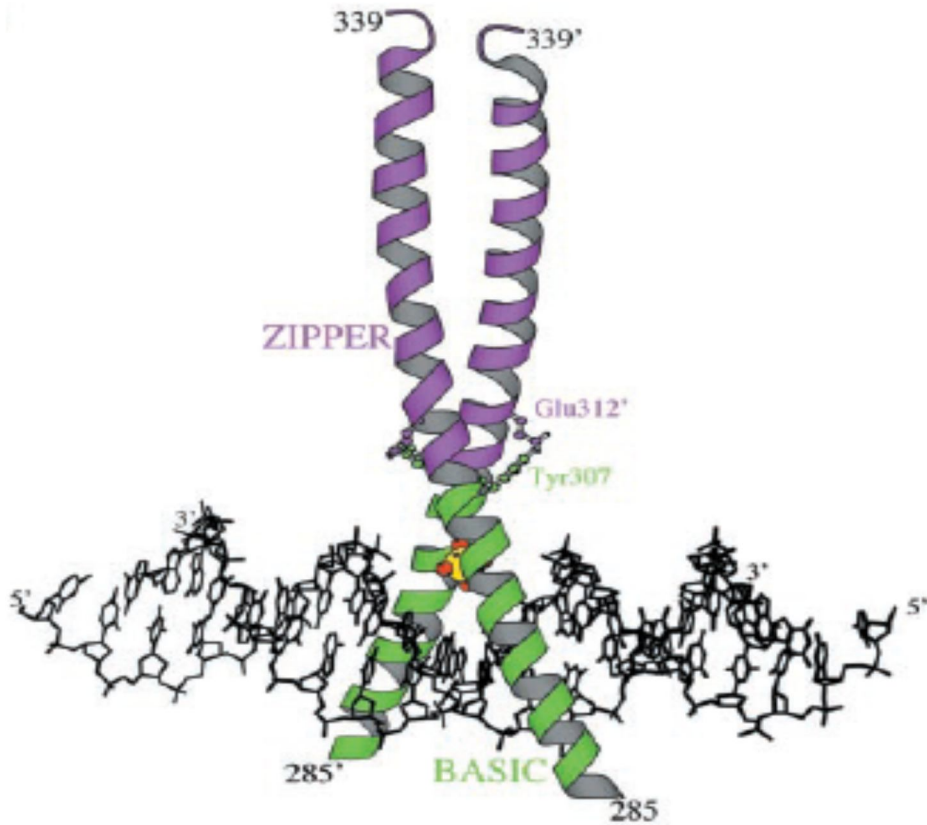
2.3.3.2. CREB ve CREB5

CREB (cAMP yanıt elementine bağlanan protein), CREB/ATF 1 (Aktive edici Transkripsiyon Faktörü 1)/CREM (cAMP yanıt elementi modülatör) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. CRE (cAMP yanıt elementi) denilen belli DNA dizilerine bağlanarak cAMP, büyüme faktörü ve kalsiyum bağımlı gen ekspresyonuna aracılık eder [136].

CREB, *basic/leucine zipper* (bZIP) yapısında transkripsiyon faktörüdür. CREB geni pek çok türde farklı dokularda eksprese edilmektedir [137, 138]. CREB proteinleri bir

homodimer olarak ve CREB/ATF 1/CREM ailesinin diğer üyeleri ile bir arada heterodimer olarak oktanükleotid CRE'ye (TGANNTCA) bağlanmaktadır [137].

İstirahat halindeki hücrelerde CREB fosforillenmemiş şekilde transkripsiyonel olarak inaktif fakat DNA'ya bağlanabilir durumdadır. Hücre aktivasyonu sonucu CREB serin rezidülerinden (ser133) fosforillenerek CREB aktivasyonunda koaktivatör olan CREB bağlayıcı protein (CBP) ile etkileşime girer ve transkripsiyonel aktivitesi indüklenir [139].



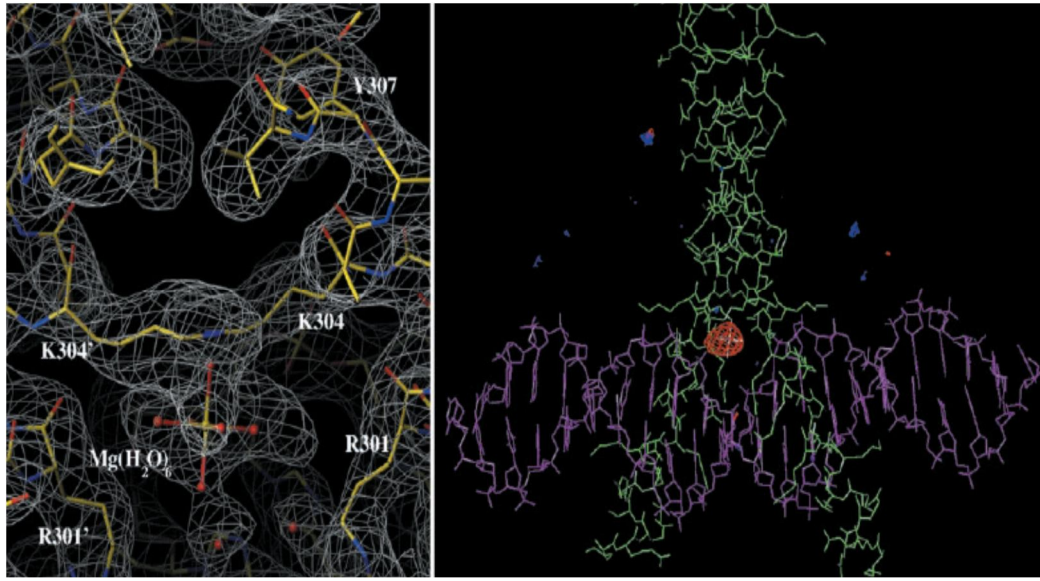
Şekil.14. CREB bZIP-Somatostatin CRE kompleksinin yapısı (Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG: The structure of a CREB bZIP-Somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(45):35242-35247)

CBP, CREB'in *TATA box*'taki RNA polimeraz II kompleksini stabilize ya da aktive etmesine olanak sağlayan bir köprü olarak görev alır [136].

cAMP yolağı; hücrelerin hormonlara, büyüme faktörlerine ve nörotransmitterlere cevabına aracılık eden bir sinyalizasyon yolağıdır. c-fos, nörotropin BDNF (beyin kaynaklı

nörotropik faktör), tirozin hidroksilaz, bir çok nöropeptid (somatostatin, enkefalin, VGF, kortikotropin salgılatıcı hormon) CREB tarafından transkripsiyonları düzenlenen genlerden bazılarıdır. CREB fonksiyonları ayrıca büyüme faktörü bağımlı hücre viabilitesi, glukoz homeostazı, öğrenme ve hafıza ile ilgilidir [140].

CREB1, CREB2 (ATF4), CREB3, CREB5 genleri, cAMP yanıt elementine bağlanan proteinleri kodlayan genlerdir [141-144].



Şekil.15. CREB bZIP divalan katyon bağlama ceplerinin elektron dansite haritaları (Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG: The structure of a CREB bZIP·Somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(45):35242-35247)

CREB5

cAMP yanıt elementine bağlanan protein 5, insanlarda CREB5 geni tarafından kodlanmaktadır. cAMP cevap elementine bağlanan protein ailesinin bir üyesidir ve bZIP DNA bağlayan bölgeler içermektedir. Homodimer olarak ya da CREB1 ile beraber heterodimer olarak cAMP cevap elementine (CRE) spesifik olarak bağlanmakta ve CRE bağımlı trans-aktivatör olarak fonksiyon göstermektedir [144, 145].

CREB5'in moleküler fonksiyonları, nükleozid, nükleotid ve nükleik asit metabolizması, mRNA transkripsiyonu, mRNA transkripsiyon regülasyonu, sinyal transdüksiyonu ve intrasellüler sinyal kaskadı gibi biyolojik prosesler ile ilişkilidir [146].

2.3.3.3. Pelvik Organ Prolapsusunda Bağ Dokusu Değişiklikleri

Vajen ve destek dokuların bağ dokusu yapısı, fibriler komponent (kollajen ve elastin) ile nonfibriler komponentten (nonkollajenoz proteinler, hyaluronan ve proteoglikanlar) oluşmaktadır. *Arkus tendineus* dışında bu dokular belirli miktarda düz kas da içermektedir. Bu dokuların biyokimyasal özelliklerini fibriler elemanların oluşturduğu düşünülmektedir. Proteoglikanlar kendilerini çevreleyen kollajen fibriller arasında ağsal bir yapı oluşturarak fibrillerin kendi pozisyonunda kalmasını sağlar ve kendilerini çevreleyen su moleküllerine karşı direnç oluşturur [147]. Bağ dokusu anormallikleri ya da bağ dokusu onarım bozuklukları kadınları prolapsus gelişimine yatkın hale getirebilir.

Vajen ve destek dokusunda tip I, tip III, tip V kollajen bulunmaktadır ve bunların yumuşak doku kuvvetinin başlıca etmenleri olduğu düşünülmektedir.

Pelvik organ prolapsuslu hastalarda total kollajen içeriği ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. [4, 6, 7, 9, 10, 148]. Çalışmalar, yaşı ve pariteden bağımsız olarak prolapsuslu hastaların uterin ligamentlerinde total kollajen miktarının azaldığını [8, 11, 149], buna karşılık tip III kollajen miktarının arttığını [9, 10, 150, 151] göstermektedir.

Barbiero ve arkadaşları [152], pelvik organ prolapsusu olan ve olmayan kadınları karşılaştırdıkları çalışmalarında, prolapsusu olan hastaların parametriumlarının daha kısa, daha ince ve daha düzensiz kollajen lifleri içerdiğini göstermişlerdir. Jackson ve arkadaşları [4] yaptıkları çalışmada pelvik organ prolapsusunun immatür çapraz bağların oranındaki anlamlı artışla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Pentosidinin (AGEs) prolapsuslu dokuda anlamlı olarak arttığını ve pentosidin konsantrasyonlarının hem POP olan hem de olmayan grupta yaşı artışı ile yükseldiğini saptamışlardır.

Kollajen sentezi ve yıkımı arasındaki denge, konnektif dokunun yeniden yapılanması (remodelling) sırasında doku bütünlüğünün ve gerilme gücünün korunmasında önemlidir. Aşırı yıkım bağ dokunun patolojik yıkımına neden olur. Bağ dokusu yıkılımı, matriks metalloproteinazlar (MMP) olarak adlandırılan çinko bağımlı endopeptidazlar tarafından sağlanmaktadır. MMP'lerin temel substratları kollajen (I, III), elastin, jelatin ve damar duvarının önemli ekstrasellüler bileşenleri olan proteoglikanlardır. MMP'ler önce zimojenler olarak salınırlar, daha sonra proteolitik yıkım sonucunda aktif hale getirilirler ve kendilerine yüksek afiniteli, geri-dönüşsüz bir şekilde bağlanarak nonkovalent kompleksler oluşturan doku inhibitörleri ile inhibe edilirler. MMP fonksiyonları, protein sentezi ve aktiviteleri düzenlenerek kontrol edilir [153, 154].

Jackson ve ark. [4] yaptıkları çalışmada, prolapsuslu dokularda MMP-2 ve MMP-9'u anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlar ve kollajenin metabolik *turnover*'ının arttığını öne sürmüşlerdir. Moalli ve ark. [10], kontrollerle kıyaslandığında pelvik organ prolapsusulu kadınlarda aktif MMP-9'un anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Kollajen tip III artışı ile beraber aktif MMP-9 artışı, hasar sonrası yeniden yapılanan bir doku ya da giderek artan mekanik yüke uyum sağlamak için yeniden yapılanan bir dokuya özgüdür. Philips ve ark. [155] pro-MMP-2 ekspresyonunda artış saptarken, bir başka çalışmada Gabriel ve ark. [151] MMP-2 ekspresyonunda artış saptamışlardır. Chen ve ark. [156], yaptıkları çalışmada artmış MMP-1 mRNA ekspresyonu ile birlikte azalmış doku kaynaklı metalloproteinaz inhibitörü 1 (TIMP-1) mRNA ekspresyonu saptamışlardır. TIMP-1, MMP-1 ve MMP-9'a bağlanır. Azalmış TIMP-1 ile birlikte olan artmış metalloproteinaz ekspresyonu, POP'lu hastaların vajina ve destek dokusunda bağ dokusu yıkılımının arttığı bir duruma işaret eder.

Vajinal desteğin sağlanmasında elastinin önemi Marfan sendromu ve *cutis laxa* gibi genetik hastalıklar sayesinde anlaşılmıştır. Marfan sendromu'nda fibrillin gen mutasyonu, *cutis laxa*'da ise elastin ve fibulin-5 genlerinde mutasyonlar gösterilmiştir. Her iki bağ dokusu hastalığında da POP insidansının arttığı görülmüştür [53, 157]. Birçok dokuda elastin homeostazı için lizil oksidaz enzimi (LOX) gereklidir. LOXL1'den yoksun farelerle yapılan çalışmalarda, bu farelerin yetişkin dokularda elastin polimerleri sentezleyemedikleri, doğumdan sonra üreme kanalında olgun elastin liflerini yenileyemedikleri gözlenmiştir. Bu farelerde spontan prolapsus geliştiği sonucuna varılmıştır [67, 158]. Farelerle yapılan bu çalışmalar, bozulmuş elastik lif homeostazının önemini ortaya koymuştur. POP'lu kadınlarla yapılan çeşitli çalışmalarda da dokularda elastin içeriğinin azaldığı gösterilmiştir [159-161]. Elastik fibrillerin uygun sentez, yıkım ve rejenerasyonu pelvik organ desteğinin devam ettirilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Pelvik organ prolapsusu ile ECM proteinleri olan kollajen, elastin ve MMP ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma olmakla birlikte ECM'nin diğer bileşenlerinin POP ile ilişkisine yönelik yeterli bilgi bulunmamaktadır. ECM bileşenlerinin POP patofizyolojisindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışma ile pelvik organ prolapsusu gelişimi ve progresyonundan sorumlu mekanizmaların tanımlanabilmesi amacı ile POP'lu hastaların uterosakral ligamentlerinde, ECM proteoglikanı olan versikanın ve transkripsiyon faktörü olan CREB5 proteininin ekspresyonlarının artışları incelenmiştir. Bu sayede POP gelişiminde hangi değişikliklerin

meydana geldiğinin ve bu değişikliklere neden olan moleküler mekanizmaların belirlenmesinde bir adım atılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu Seçimi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran pelvik organ prolapsusu (POP) tanısı alan hastalar çalışma grubu olarak seçilmiştir. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı'na 2010-2011 tarihleri arasında başvuran hastalardan pelvik organ prolapsusu son evrelerde olan hastalar hasta grubu ve pelvik organ prolapsusu olmayan veya hastalığın ilk evresinde olan hastalar kontrol grubu olarak seçildi. Çalışmaya başlamadan önce Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındı.

Çalışma öncesi hasta tanımlamaları oluşturabilmek amacıyla hastaların yaş, kilo, boy, BMI gibi demografik verileri; menopozal durum, parite (doğum sayısı) gibi reproduktif bilgileri kaydedildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Kimyasallar:

Akrilamid (Bio-rad 161-0158)
Amonyum persülfat (APS) (Bio-rad 161-0700)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Bio-rad 161-0301)
Tris baz (Sigma T-1378)
Tetrametilendiamin (TEMED) (Bio-rad 161-0801)
Tris-HCl
Merkaptoetanol (Bio-rad 161-0710)
Gliserol (Sigma G-5516)
Glisin (Sigma G-8898)
Etanol (MERCK)
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
EDTA (Spectrum E-1045)
PBS (Tuzlu fosfat tamponu) (Bio-rad 161-0780)

Triton X-100 (Bio-rad 161-0407)
TWEEN-20 (Applichem A4974)
Proteaz inhibitör kokteyl (Sigma P-8820)
Nonil fenoksipolietanol (NP40)
Metanol
Sodyum deoksikolat
Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma S-8045)
Hidroklorik asit (HCl) (Sigma T-5941)
BCA Protein Assay Reaktifi (bisinkoninik asit) (Thermo 23228)
Yağsız süt tozu (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Blotting-Grade Blocker 161-6404)
Laemmli sample buffer (Bio-rad 161-0737)
Kodak GBX developer/replenisher
Kodak GBX fixer
Restore Western Blot Stripping tamponu (Thermo 21059)
Brom fenol blue (USB 12370)

Sarf Malzemeleri:

Eppendorf (1,5ml)
Otomatik pipet (1000-100-10µl)
Filtreli pipet ucu (1000-100-10µl)
Kurutma kağıdı
Polivinidinit-florür membran (PVDF)
Watman kağıdı
Sünger ped
Homojenizasyon tüpü
Falkon tüpü (15ml, 50ml)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi (METTLER AJ100)
Otomatik pipetler
Çeker ocak
Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20 °C, -80°C) (Uğur, Ariston, Thermo)

Santrifüj (Thermo IEC CL31R Multispeed)
Mikrosantrifüj (Eppendorf AG 22331)
Homojenizasyon cihazı (Xiril Dispomix)
Küçük poliakrilamid jel sistemi (Bio-Rad)
Güç kaynağı (Bio-Rad Power Pac Basic)
Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 800R)
Orbital *shaker* (Stuart)
pH metre PT-10 (Sartorius)
Spektrofometre (multiskan-Ex Thermo)
Mixmate (Eppendorf)

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.4.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Doku Homojenizasyon Çözeltisi (RİPA,100 ml)

50 mM TRIS (0,607g, pH=7,4) ve 150 mM NaCl (0,8767 g, 80 ml) saf suda karıştırıldı. pH, NaOH çözeltisi ile 7,4'e ayarlandı. Çözelti saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra proteaz kokteyl inhibitör tabletinden bir tane ilave edildi, 4 mM EDTA, %1 NP40 ve % 0.5 sodyum dioksikolat eklenerek homojenizasyon çözeltisi hazırlandı.

3.1.4.2. Western Blot Yönteminde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Stacking Jel Solüsyonu (1 L, 1X)

0,5 M Tris-HCl (78,8 g) 600 ml saf su ile çözüldükten sonra pH=6,8'e ayarlandı. Çözelti balon jode saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Resolving Jel Solüsyonu (1 L, 1X)

0,25 M Tris-Baz (30 g) 600 ml saf su ile çözüldükten sonra pH=8,8 olacak şekilde ayarlandı. Çözelti balon jode saf su ile 1 litreye tamamlandı.

%10 SDS Çözeltisi (100 mL)

10 g SDS, 100 ml'lik balon jodede saf su ile çözölüp, 100 ml'ye tamamlandı.

Yürütme Transfer Tamponu (1 L, 10X)

0,25 M 30 g Tris-baz, 144 g glisin 600 ml saf suda çözölüp, pH=7.4e ayarlandı. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Yürütme Tamponu (1L, 1X)

100 ml stok 10X yürütme transfer tamponu üzerine 900 ml saf su eklendi. Bu karışımın içine 1ml %10'luk SDS eklenerek 1X yürütme tamponu hazırlandı.

Transfer Tamponu (1L)

200 ml Metanol, 100 ml stok 10X yürütme transfer tamponu ve 700 ml saf su ile 1 litre transfer tamponu hazırlandı.

TBS (1L, 10X)

0,2 M Tris-Baz (24,2 g) ve 80 g sodyum klorür (NaCl) 600 ml saf suda çözölüp, pH=7,4'e ayarlandı. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlandı.

TBST (1L, 1X)

Hazırlanan TBS stoğundan 100 ml alınarak, 900 ml su ile 1 litreye tamamlandı. Daha sonra 1ml TWEN-20 eklenerek çözelti hazırlandı.

%0,1'lik Brom Fenol Mavisi

1mg brom fenol mavisi 1 ml saf suda çözölerek hazırlandı.

Tris Çözeltisi (4X Laemmlı Yükleme tamponu için)

1,5 M Tris-Baz (3,64 g) 15 ml saf suda çözölerek pH=6,8e ayarlandı. Çözeltiye saf su eklenerek hacim 20 ml'ye tamamlandı.

4X Laemmli Tamponu

1,5 ml'lik eppendorf vial'ine 167 µl 1,5 M tris çözeltisi (pH 6.8), 23 µl saf su, 400 µl gliserol, 200 µl %40'luk SDS, 200 µl β-merkaptotanol, 10 µl %0,1'lik brom fenol mavisi eklenerek hazırlandı.

Süt Tozu Çözeltisi (%5, 100ml) (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Blotting-Grade Blocker 170-6404)

100 ml TBST çözeltisi içinde 5 g süt tozu çözülerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Doku Homojenizasyonu

Doku homojenizasyonu aşağıda belirtilen protokol uygulanarak yapıldı.

- 1- Hastalardan cerrahi operasyonla alınan ve derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edilen dokular çıkartıldı.
- 2- Dokular buz üzerinde neşter yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
- 3- Parçalanmış dokular her bir örnek ayrı olacak şekilde dispomix homojenizasyon tüpüne alındı.
- 4- Homojenizasyon tüpündeki dokunun üzerine 1ml homojenizasyon buffer (RİPA) eklendi.
- 5- Homojenizasyon tüplerindeki dokular, Xiril Dispomix homojenizasyon cihazında 4000 rpm'de 15sn 3x2 programıyla homojenize edildi.
- 6- Homojenize edilen dokular 1000 rpm +4 °C'de 5dk santrifüj edildi.
- 7- Santrifüj aşamasının ardından homojenizasyon tüpünde dipte biriken sıvı pipet yardımıyla 1,5ml'lik eppendorf vial'e aktarıldı.
- 8- Eppendorf vial'e aktarılan örnekler +4 °C 600 rpm'de karıştırılarak bir gece bekletildi.
- 9- Örnekler 14000-15000 rpm de +4 °C'de 30dk santrifüj edildi.
- 10- Santrifüj işleminden sonra doku lizatını içeren süpernatant 1,5ml'lik Eppendorf vial'lere aktarıldı.

3.2.2. Protein Tayini

Doku lizatlarının total protein konsantrasyonları, alkali çözeltideki proteinlerin Cu^{+2} 'den Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve daha sonra Cu^{+1} 'in bisinkoninik asit (BCA) ile verdiği renkli kompleksin 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanan BCA yöntemi ile hesaplandı.

BCA yöntemi aşağıdaki protokole göre uygulandı:

- 1- 96 kuyucuklu plakta (well-platte) hazırlandı.
- 2- 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonlarındaki standart çözeltilerden, seyreltikten derişige doğru kuyucuk başına 25 μl konuldu. Standartlar dört tekrarlı çalışıldı.
- 3- Örnekleri 1:5 seyreltme yapılarak toplam hacim 25 μl olacak şekilde plağa konuldu. Tüm örnekler dört tekrarlı çalışıldı.
- 4- Standartlar ve örnekler 96 kuyucuklu plak (well-platte)'ta hazırlandıktan sonra BCA reaktifi hazırlandı.
- 5- Reaktif, bisinkoninik asit ve bakır (II) sülfat ile hazırlandı.
- 6- Hazırlanan reaktiften örnek ve standartların bulunduğu her kuyucuğa 200 μl eklendi.
- 7- 37°C'de 30 dakika orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Protein tayini sonucu elde edilen veriler, western blot analizi yapılacak örneklerin seçiminde kullanıldı. Protein konsantrasyonları en yüksek olan dört hasta ve dört kontrol örneği western blot yapılmak üzere seçildi.

3.2.3 Western Blot

Protein tayini işlemi sonucu seçilen örneklere, poliakrilamid jel elektroforezi hazırlanarak western blot protokolü uygulandı.

Poliakrilamid jeller hedef proteinlerin molekül büyüklüğüne göre % 12 olacak şekilde hazırlandı.

Tablo.2. Resolving Jeli (%12)

H ₂ O	3,44 ml
<i>Resolving</i> Jel Tamponu	2,60 ml
%30 Akrilamid	3,96 ml
%10 SDS	100 µl
%10 Amonyum persülfat (APS)	50 µl
TEMED	15 µl

İlk olarak % 12'lik resolving jel karışımı hazırlandı (Tablo.2.). Jelin içeriğini oluşturan maddeler 15 ml'lik falkon tüpünde hazırlandı. İlk önce H₂O, resolving jel buffer, % 30 akrilamid ve % 10 SDS tablo.2.'de belirtilen hacimde konuldu. Daha sonra % 10 amonyum persülfat (APS) ve TEMED aynı anda jel karışımına eklendi. APS ve TEMED katalizör görevi görüp jelin donmasını sağlayacak maddeler olduğu için jel karışımına eklendi. Jel hazırlama düzeneğine her bir jel için 3,5 ml olacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düzgün bir yüzey olması ve hava almaması için 150 µl saf su konuldu.

Tablo.3. Stacking Jeli (%12)

H ₂ O	3,0 ml
<i>Stacking</i> Jel Tamponu	1,0 ml
%30 Akrilamid	750 µl
%10 SDS	50 µl
%10 Amonyum persülfat (APS)	25 µl
TEMED	5 µl

Resolving jel polimerleştikten sonra üst kısmında bulunan su kurutma kağıdı yardımıyla çekildi. Daha sonra *stacking* jel hazırlandı (Tablo.3.). *Stacking* jel hazırlanırken H₂O, yürütme jel tamponu, % 30 akrilamid ve % 10 SDS belirtilen hacimlerde 15ml'lik falkon tüpüne konuldu. Ardından % 10 amonyum persülfat (APS) ve TEMED aynı anda jel karışımına eklendi. Bu karışımdan her jel için 1,5 ml olacak şekilde *resolving* jelin üstüne eklendi. *Stacking* jel karışımı eklendikten hemen sonra taraklar yerleştirildi.

Jel polimerleştikten sonra elektroforez sistemi kuruldu. Jeller taraklı kısım iç kısma bakacak şekilde düzeneğin içine yerleştirildi. Jellerin arası, kabın yarısı dolacak şekilde 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.

Örnekler hazırlandıktan sonra denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. 95 °C, 700 rpm’de 5 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra jeldeki taraklar çıkartıldı. İlk dört kuyucuğa en yüksek protein miktarı içeren dört hasta grubunun protein örneği yüklendi, hasta gruplarından sonraki kuyucuğa *marker* ve son dört kuyucuğa en yüksek protein miktarını içeren dört kontrol örneği yüklendi. Hasta ve kontrol gruplarının örneklerine yapılan hesaplamalara göre tüm örneklerin protein miktarları eşit olacak şekilde örnek, toplam hacmin dörtte biri kadar laemmli tamponu ve su eklenerek toplam hacim 22 µl, markır ise 10 µl olacak şekilde yükleme yapıldı.

Bu işlemlerden sonra elektroforez sisteminin kapağı kapatıldı. Brom fenol-blue *stacking* jeli geçene kadar yaklaşık ilk 15-20 dakika 70 voltta yürütme işlemi yapıldı. Daha sonra yürütme işlemi sonlanıncaya kadar 110 voltta devam edildi. Yürütme işlemini sonlandırmak için brom fenol-blue takip edildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra transfer işlemi için sandviç yöntemi uygulandı.

- 1- Polivinil florid (PVDF) membran uygun boyutta kesilerek önce % 100 metanol ile yaklaşık bir dakika doyuruldu. Daha sonra transfer çözeltisi ile yaklaşık 10 dakika dengelendi.
- 2- Stacking jel uzaklaştırıldı.
- 3- Filtre kağıtları ve membran, jel ile aynı büyüklükte kesildi.
- 4- İki adet filtre kağıdı transfer tamponu ile ıslatılıp, en alta yerleştirilerek üzerine membran konuldu.
- 5- Membran üzerine jel yerleştirildikten sonra transfer solüsyonu ile ıslatılmış diğer iki filtre kağıtları konuldu (+ yüklü blok).
- 6- Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

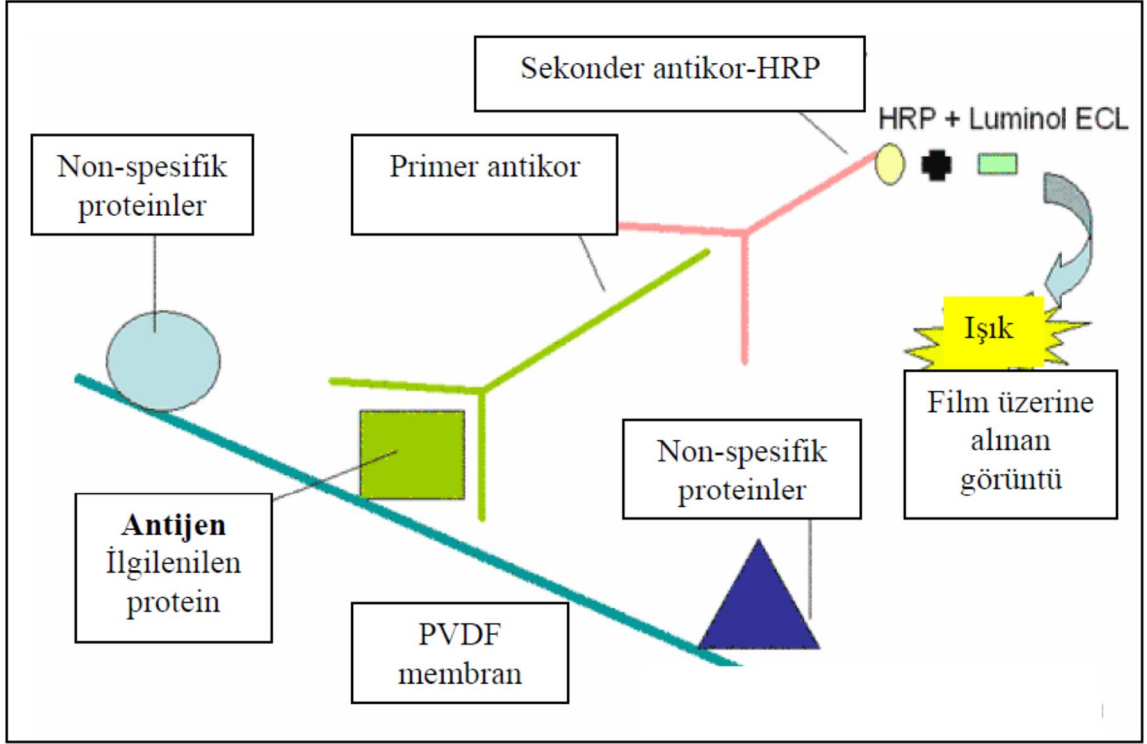
Daha sonra transfer düzeneğine yerleştirildi. Düzeneğin içine üstünü kaplayacak şekilde transfer tamponu eklendi. Gece boyunca 100 mA, +4 °C’de bekletildi. Transfer tamamlandığında güç kaynağı kapatıldı. Membran kurutma kağıtları arasından jelden ayırılarak alındı.

Transfer işlemi bittikten sonra membrana bloklama solüsyonu olan %5'lik süt tozu çözeltisi ile muamele edildi. Orbital karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Daha sonra 1 saat 30°C 100 rpm'de inkübasyon işlemine devam edildi. Membran süz tozu çözeltisinde, membrana spesifik olmayan bağlantıların giderilmesi için süt tozunda bulunan kazein ile doyurularak bloklama işlemi gerçekleştirildi.

Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra membranlara primer antikor uygulandı. Membranların birine anti-versican (rabit, Sigma) diğerine anti-CREB5 (rabbit, Sigma) uygulandı. Bu işlem bloklama solüsyonuna 1:2000 kat seyreltme ile primer antikor eklenerek yapıldı. Membran bu karışımla *Eppendorf mixmate*'de 300 rpm'de bir gece bekletildi. Primer antikor aşamasını tamamlandıktan sonra membran üç defa 5'er dakika yıkama solüsyonu (TBST) ile orbital karıştırıcıda yıkandı. Böylece ortamdaki zayıf bağlanan veya bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılmış oldu.

Yıkama aşamalarından sonra, bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanan *horseradish peroksidaz* (HRP) işaretli sekonder antikor (anti-rabbit) ile membran 1,5 saat orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Sekonder antikor, bloklama solüsyonu içinde 1:5000 kat seyreltme yapılarak hazırlandı. Bu işlemden sonra membran üç kez yıkama solüsyonu (TBST) ile 5'er dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra, membran bir kemilüminesans reaktifi ile geliştirildi. Geliştirme işlemini takiben membran hiperfilme aktırıldı. Film, *developer* solüsyonu ile geliştirilip fiksatif solüsyonu ile fiksasyon işlemine tabi tutularak spesifik proteinler görüntülendi.

Görüntüleme işleminin ardından membran kurumadan önce membrandaki primer ve sekonder antikorun kaldırılması için sıyırma (stripping) işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo) kullanılarak yapıldı. Sıyırma işleminde ilk olarak membran kemilüminesans substratlarından arındırılmak için yıkandı. Daha sonra *Restore Western Blot Stripping Buffer* kullanılarak oda sıcaklığında 5-15 dakika inkübe edildi. Inkübasyon işleminden sonra membran yıkama tamponu ile yıkandı. Bu işlemin ardından primer beta-aktin (mouse) sonra da sekonder beta-aktin (mouse) ile muamele edildi.



Şekil.16. Western blot yönteminde ilgili proteinlerin görünür hale gelmesinde izlenecek yol (Çavdar Z, Kolon ve Rektum Kanserlerinde Endostatinin Matris Metalloproteinaz 2 Üzerine Gösterdiği Etkinin Araştırılması (Doktora tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2008)

3.2.3. Dansitometrik Analiz

Western blot yöntemi sonucunda elde edilen bantların yoğunluğunu belirlemek için dansitometrik analiz yapıldı. Analiz için kullanılan programın prensibi; istenilen bandın alanı ile pikselini çarparak semi kantitatif bir sonuç vermeye dayanmaktadır.

Bu çalışmada semi kantitatif analiz için elde edilen bantların dansitometrik analizleri *UVP Bioimaging system with LabWorks 4.6 Image Acquisition Software* kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için her bandın alan (mm^2) ve optik dansitesi (O.D/mm^2) tayin edildi. Bandın yoğunluğu; “Alan yoğunluğu = alan x optik dansite” formülünden hesaplandı.

4. BULGULAR

Bu çalışma ile POP'lu hastaların uterosakral ligamentlerinde, ECM proteoglikanı olan versikanın ve transkripsiyon faktörü olan CREB5 proteininin ekspresyon farklılıkları araştırılmıştır. Çalışma grubun Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran pelvik organ prolapsusu olan ve olmayan hastalar oluşturmaktadır. Hasta grubu ileri evre pelvik organ prolapsusu olan hastalardan, kontrol grubu ise ilk evre pelvik organ prolapsusu olan ve pelvik organ prolapsusu olmayan hastalardan oluşmuştur. Çalışmanın ilk evresinde 11 hastadan alınan uterosakral ligament örneklerinde doku homojenizasyonu işleminden sonra elde edilen lizatlarla yapılan protein tayini sonucunda en yüksek protein miktarına sahip 4 hasta ve 4 kontrol seçildi. Daha sonra hasta ve kontrol gruplarında Western blot yöntemi ile versikan ve CREB5 proteinlerinin ekspresyonlarına bakıldı.

4.1. Demografik Bulgular

Çalışmanın ilk evresini oluşturan 11 hastanın demografik bilgileri Tablo.4.'de verilmiştir.

Tablo.4. E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'na başvuran hastaların demografik ve klinik bilgileri

Hasta numaraları	Yaş	BMI	Evre	Normal Doğum	Menopoz
1	47	27,3	4	1	Yok
2	67	29,2	3	2	Var
3	52	29,4	4	2	Var
4	68	27,9	4	2	Var
5	65	-	1	-	Var
6	55	29,1	1	3	Var
7	61	-	0	3	Var
8	62	-	0	-	Var
9	51	-	0	3	Var
10	53	-	0	2	Var
11	81	-	0	2	Var

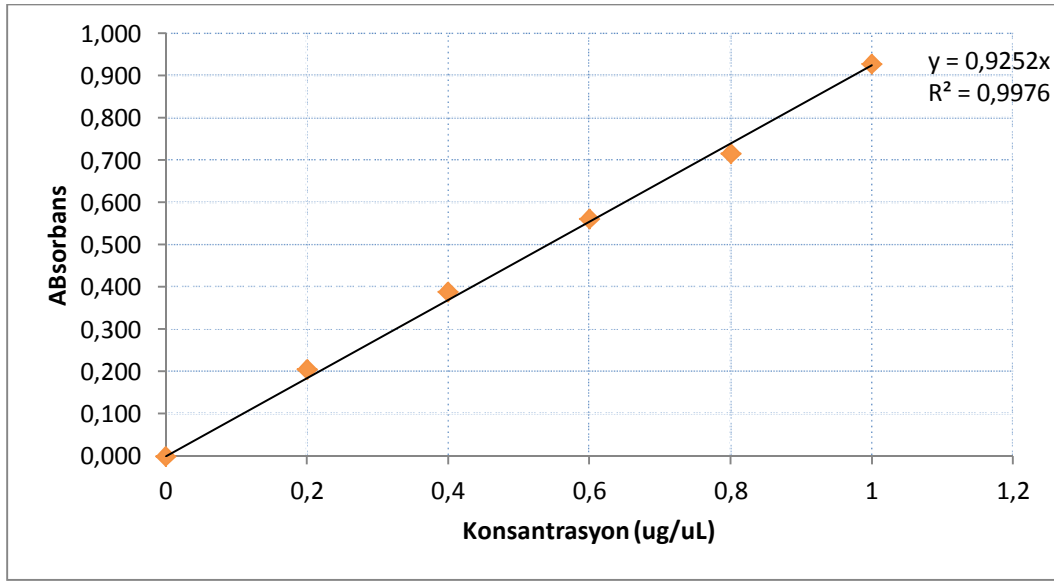
4.2. Protein Tayini Sonuçları

Pelvik organ prolapsusu (POP) hastalarından alınan dokuların homojenizasyonu sonucunda elde edilen lizattan protein miktarını ölçmek amacıyla protein tayini yapıldı. BCA yöntemi ile yapılan protein tayini sonuçları ve hesaplamaları Tablo.5.' de verilmiştir. Absorbans değerleri kullanılarak çizilen standart eğrisinden protein miktarları hesaplandı. Protein miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), absorbans değerlerinin standart kalibrasyon grafiğinde oluşturulan standart çizgisinin eğimine bölünmesi ve bu sonucun dilüsyon sayısı ile çarpımı sonucu hesaplandı.

BCA yöntemine göre elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda hesaplanan protein konsantrasyonlarına göre en yüksek protein miktarı içeren dört hasta ve dört kontrol örneği western blot analizi yapılmak üzere seçildi.

Tablo.5. BCA yöntemine göre elde edilen protein tayini sonuçları (Her örnek 1:5 oranında sulandırılarak dört kere çalışılmıştır.)

		absorbans									
	(ug/uL)	1	2	3	4	Ortalama	Std Sapma	Konsantrasyon		5X	
Std	0	0,001	0,000	- 0,003	0,003	0,000	0,003	0,000	ug/uL		
Std	0,2	0,202	0,195	0,214	0,213	0,206	0,009	0,2	ug/uL		
Std	0,4	0,367	0,383	0,407	0,401	0,390	0,018	0,4	ug/uL		
Std	0,6	0,570	0,589	0,596	0,489	0,561	0,049	0,6	ug/uL		
Std	0,8	0,725	0,741	0,749	0,653	0,717	0,044	0,8	ug/uL		
Std	1	0,905	0,964	0,941	0,903	0,928	0,030	1	ug/uL		
Örnek	1	0,269	0,235		0,327	0,277	0,047	0,299	ug/uL	1,497	ug/uL
Örnek	2	0,364	0,453		0,542	0,453	0,089	0,490	ug/uL	2,448	ug/uL
Örnek	3	0,631	0,642	0,800	0,764	0,709	0,085	0,767	ug/uL	3,833	ug/uL
Örnek	4	0,850	1,012		1,151	1,004	0,151	1,086	ug/uL	5,428	ug/uL
Örnek	5	1,008	0,964	1,069	1,089	1,033	0,057	1,116	ug/uL	5,580	ug/uL
Örnek	6	0,635	0,801	0,688	0,665	0,697	0,072	0,754	ug/uL	3,768	ug/uL
Örnek	7	0,865	0,863	0,858	0,887	0,868	0,013	0,938	ug/uL	4,692	ug/uL
Örnek	8	0,549	0,630	0,666	0,694	0,635	0,063	0,686	ug/uL	3,430	ug/uL
Örnek	9	0,071	0,074		0,077	0,074	0,003	0,080	ug/uL	0,400	ug/uL
Örnek	10	0,284	0,339	0,275	0,248	0,287	0,038	0,310	ug/uL	1,548	ug/uL
Örnek	11	0,343	0,365	0,382	0,377	0,367	0,017	0,396	ug/uL	1,982	ug/uL



Şekil.17. BCA yöntemi standart kalibrasyon eğrisi

BCA yöntemi sonuçlarına göre 5 (K2), 6 (K1), 7 (K3), 8 (K4) numaralı hastalar kontrol grubu, 1 (H1), 2 (H2), 3 (H4), 4 (H3) numaralı hastalar da çalışma grubu olarak seçildi.

4.3. Western Blot Analizi Sonuçları

Western blot analizi, pelvik organ prolapsusu hastalarında *versikan* ve *CREB5* proteinlerinin ekspresyonundaki değişimin gözlenmesi amaçlanarak yapıldı.

Protein tayini sonucunda elde edilen protein konsantrasyonları göz önünde bulundurularak membrana yüklenecek protein miktarı hesaplandı. Her örnek için ayrı ayrı yapılan hesaplamaların sonucu tablo.6.'da verilmiştir. Bu hesaplamalar yapılırken ilk önce jeldeki kuyucuğa yüklenmek istenen protein miktarı (μg) belirlendi. Hesaplamalar her kuyucuğa 25 μg protein yüklenecek şekilde yapıldı. Protein konsantrasyonu yüklenmek istenen protein miktarına bölününce μl cinsinden alınması gereken protein miktarı belirlendi. Toplam hacim 22 μl olacak şekilde belirlendi. Toplam hacmin dörtte biri kadar *Laemmli* tamponu eklendi. Protein ve *laemmli* tamponun üzerine saf su eklenerek hacim 22 μl 'ye tamamlandı.

Tablo.6. Western blot yönteminde jele yüklenecek protein miktarı hesaplamaları

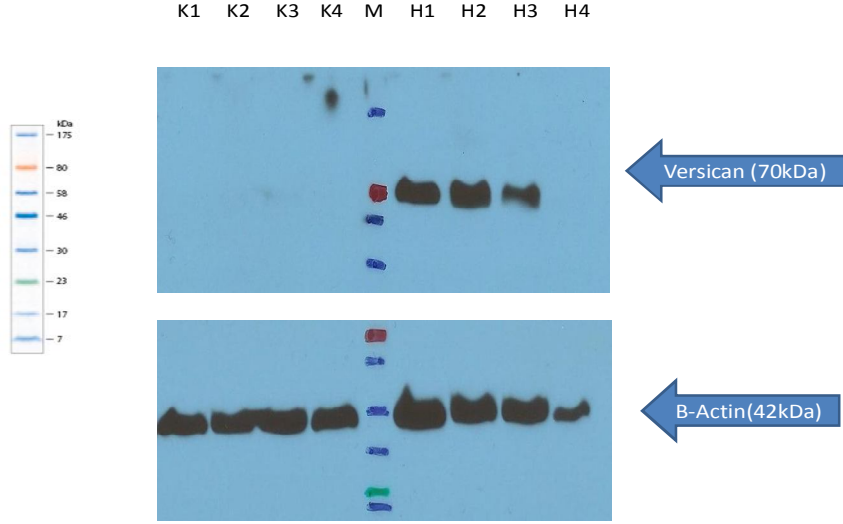
Konsantrasyon	1,497	ug/uL	Örnek	1	Konsantrasyon	3,768	ug/uL	Örnek	6
Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5	Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5
Sample	16,70	uL	41,75	uL	Sample	6,63	uL	16,59	uL
Laemmli	5,50	uL	13,75	uL	Laemmli	5,50	uL	13,75	uL
Su	-0,20	uL	-0,50	uL	Su	9,87	uL	24,66	uL
Toplam	22,00	uL	55,00	uL	Toplam	22,00	uL	55,00	uL
Konsantrasyon	2,448	ug/uL	Örnek	2	Konsantrasyon	5,580	ug/uL	Örnek	5
Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5	Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5
Sample	10,21	uL	25,53	uL	Sample	4,48	uL	11,20	uL
Laemmli	5,50	uL	13,75	uL	Laemmli	5,50	uL	13,75	uL
Su	6,29	uL	15,72	uL	Su	12,02	uL	30,05	uL
Toplam	22,00	uL	55,00	uL	Toplam	22,00	uL	55,00	uL
Konsantrasyon	5,428	ug/uL	Örnek	4	Konsantrasyon	4,692	ug/uL	Örnek	7
Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5	Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5
Sample	4,61	uL	11,52	uL	Sample	5,33	uL	13,32	uL
Laemmli	5,50	uL	13,75	uL	Laemmli	5,50	uL	13,75	uL
Su	11,89	uL	29,73	uL	Su	11,17	uL	27,93	uL
Toplam	22,00	uL	55,00	uL	Toplam	22,00	uL	55,00	uL
Konsantrasyon	3,833	ug/uL	Örnek	3	Konsantrasyon	3,430	ug/uL	Örnek	8
Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5	Protein	25,00	ug	Sayısı	2,5
Sample	6,52	uL	16,31	uL	Sample	7,29	uL	18,22	uL
Laemmli	5,50	uL	13,75	uL	Laemmli	5,50	uL	13,75	uL
Su	9,98	uL	24,94	uL	Su	9,21	uL	23,03	uL
Toplam	22,00	uL	55,00	uL	Toplam	22,00	uL	55,00	uL

Western blot protokolü uygulanırken anti-versican (rabbit) ve anti-creb5 (rabbit) antikorları kullanıldı. Kontrol amaçlı anti- β -actin (mouse) kullanıldı.

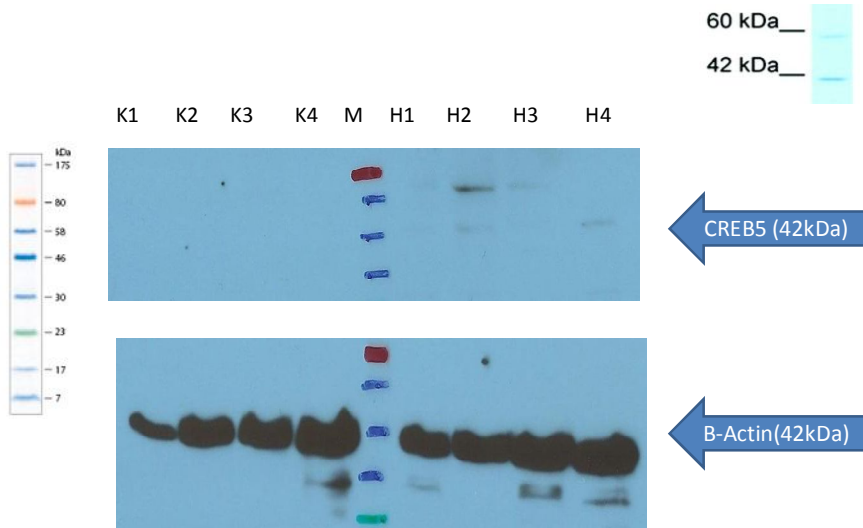
Western blot işlemi sonucunda elde edilen bantlarda kontrol amaçlı kullanılan β -aktinin (42kDa) hem hasta hem de kontrol grubunda eksprese olduğu görülmüştür.

Versikan proteini (70kDa) sonuçlara bakıldığında kontrol grubunda ekspresyon olmadığı, hasta grubunda ise ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu bulgulara ait bantlar Şekil.18.'de verilmiştir.

Creb5 (42kDa) proteinine ait bulgular Şekil.19.'da verilmiştir. Bu bulgular sonucunda kontrol grubunda bu proteine ait bant bulunmadığı, hasta grubuna ait örneklerde ise bant bulunduğuz gözlenmiştir.



Şekil.18. Versikan ve beta-aktin proteinlerine ait western blot bantları



Şekil.19. CREB5ve beta-aktin proteinlerine ait western blot bantları

4.4. Dansitometrik Analiz Sonuçları

Western blot yöntemi sonucunda elde edilen bantların yoğunluğu dansitometrik analiz ile belirlendi. Dansitometrik analiz sonucu elde edilen versikan, CREB5 ve β -aktin proteinlerine ait bantların dansitesi Tablo.7. ve Tablo.8.'de verilmiştir. Bu veriler ile versikan ve CREB5 proteinlerinin bant yoğunlukları, β -aktine ait bant yoğunluklarına oranlanarak protein ekspresyonları sayısal olarak ifade edildi (versikan*, Tablo.7. CREB5*,Tablo.8.). Hasta ve kontrol grubu için elde edilen bu veriler karşılaştırmalı olarak Şekil.20. ve Şekil.21.'de verilmiştir.

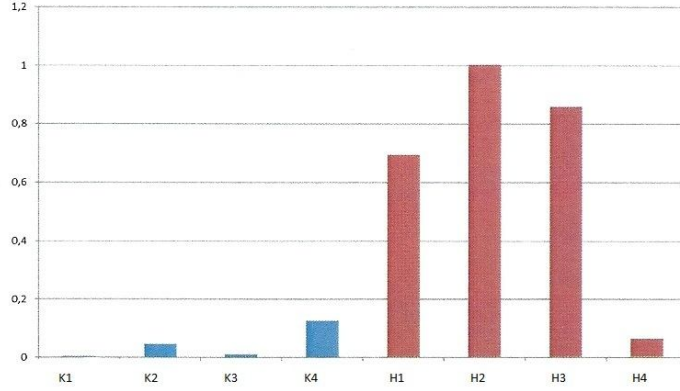
Tablo.7. Dansitometrik analiz sonuçları elde edilen versikan ve beta-aktin protein bantlarına ait sonuçlar

	Optik Dansite		
Örnek	Versican	Beta-Aktin	Versican*
6 (K1)	1208	356950	0,003384
5 (K2)	13899	303450	0,045803
7 (K3)	3979	378540	0,010511
8 (K4)	41427	327450	0,126514
1 (H1)	353600	508680	0,695132
2 (H2)	384070	382500	1,004105
4 (H3)	296220	344680	0,859406
3 (H4)	10191	161650	0,063044

Tablo.8. Dansitometrik analiz sonucu elde edilen CREB5 ve beta-aktin protein bantlarına ait sonuçlar

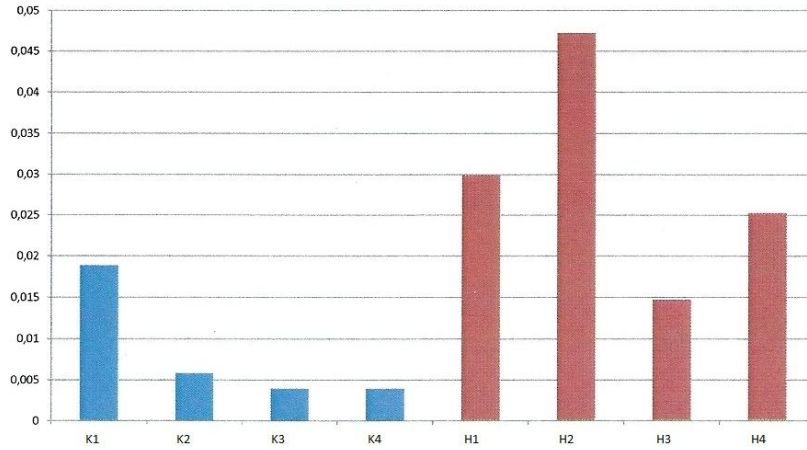
	Optik Dansite		
Örnek	CREB5	Beta-Aktin	CREB5*
6 (K1)	1678	89046	0,018844
5 (K2)	1599	272620	0,005865
7 (K3)	1044	261560	0,003991
8 (K4)	1661	418830	0,003966
1 (H1)	7019	234780	0,029896
2 (H2)	14652	310300	0,047219
4 (H3)	6289	427560	0,014709
3 (H4)	10532	416960	0,025259

Versican



Şekil.20. Hasta ve kontrol gruplarında versikan proteinine ait bantların dansitometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması

CREB5



Şekil. 21. Hasta ve kontrol gruplarında CREB5 proteinine ait bantların dansitometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Elde edilen tüm bu veriler bize pelvik organ prolapsusu hastalığının patogeneğinde versikan ve CREB5 proteinlerinin rol oynayabileceğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Pelvik organ prolapsusu oldukça sık rastlanan, ölüme neden olmayan fakat hayat kalitesini önemli derecede etkileyen bir patolojidir [29]. Pelvik organ prolapsusu olan bir hastada genellikle birden fazla etiyolojik faktör birlikte rol oynar. En önemli faktörlerden biri vajinal doğumdur. Yapılan çalışmalar, vajinal doğumun POP gelişme riskini arttırdığını göstermektedir [38, 43, 44]. Vajinal doğuma bağlı pelvik destek dokularında ve sinirlerde hasar meydana gelebilmektedir. Bu hasarın azaltılmasında, sezaryen doğumun tercih edilmesinin ve aile planlaması uygulamalarının etkili olması olasıdır. POP, bağ dokusu bozukluklarından da kaynaklanabilir. Kalıtsal bağ dokusu bozuklukları, özellikle erken yaşlarda ve doğum yapmamış kadınlarda prolapsusa neden olabilmektedirler [52]. Vücuttaki kollajen miktarı yaşlanma ile paralel olarak azalır. Bu azalma özellikle postmenopozal dönemin başlangıcında en fazladır. Yaşa bağlı olarak meydana gelen bağ dokusu bozuklukları ise perimenopozal ve postmenopozal dönemlerde ortaya çıkan POP'ta rol oynamaktadır. Geçirilmiş cerrahi operasyonlar, POP için bir diğer risk faktörüdür. Cerrahi sırasında meydana gelen hasarların erken fark edilerek uygun şekilde tamir edilmesi, ileride ortaya çıkabilecek prolapsusların önlenmesinde önemlidir. Kalıtsal faktörler de prolapsus gelişiminde rol oynayabilmektedir. Anne veya kız kardeşte prolapsus bulunması POP riskini arttırmaktadır [48]. Kronik olarak karın içi basıncını arttıran durumlar, POP' un ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadır. Kronik öksürüğe neden olan hastalıkların tedavi edilmesi, pelvik kitlelerin cerrahi tedavisi, kronik konstipasyonun düzeltilmesi gibi önlemler de POP'u önlemeye katkıda bulunacaktır.

Genel popülasyonda 20-59 yaş arasındaki kadınların %30,8'inde herhangi bir derecede POP saptanmıştır [40]. POP'un yüksek prevalansına rağmen çoğu kadın sosyokültürel nedenlerle kliniğe başvurmaz ve tanı almadan kalır. POP sonucu ortaya çıkan semptomlar, hastaların sosyal ve fiziksel aktivitelerini etkileyerek psiko-sosyal bozukluklara yol açmaktadır [49]. Ciddi derecede etkilenen kadınlarda, asosyalleşme, depresyon, utanma, suçluluk duygusu, aşağılık kompleksi gibi duygu durum değişiklikleri görülebilmektedir [162]. Ayrıca, POP tedavilerinin ekonomik yükü fazla olup, 1997 yılında sadece ABD'de yaklaşık 225000 hastanın operasyon maliyeti 1 milyar doları aşmıştır [2]. ABD nüfus bürosunun 2010 ile 2050 yılları arasındaki nüfus tahminleri kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda, 2050 yılında ABD'de POP'lu kadınların sayısının 9,2 milyon olacağı tahmin edilmektedir [163]. Bu da tedavi maliyetlerinin katlanarak artacağı anlamına gelmektedir.

POP gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili yapılan araştırmalarda bağ dokusuna odaklanıldığı dikkati çekmektedir. Ancak moleküler düzeyde yeteri kadar açıklanmamıştır. POP'taki moleküler mekanizmaların anlaşılması, POP'un erken evrelerinde tanı ve tedavi için potansiyel hedef sağlayabilir. POP'un muhtemel nedenleri ile ilgili elde edilen bilgiler, POP için bireysel risk değerlendirme modelleri geliştirilmesine yardımcı olacaktır. POP için yüksek risk taşıyan kadınların, basit ve maliyeti düşük koruyucu önlemler alması sağlanarak ileride ortaya çıkabilecek ileri klinik fenotiplerin önlenmesine olanak sağlayacaktır.

Bağ dokusu hasarı ve onarım bozukluğunun, POP gelişimi ve ilerlemesi için önemli olduğu düşünülmektedir [3-5]. ECM bileşenleri bu süreçlerde önemli rol oynamaktadır. ECM elemanlarının POP gelişimine etkileri ve bu etkilerinin hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiğinin belirlenmesi en güncel araştırma alanlarından birisidir. POP patogenezinde çeşitli ECM bileşenlerinin yıkılması ve yeniden kurulması sırasındaki anormalliklerin rol oynayabileceği olasıdır. Bağ dokusu hasarına yanıt olarak ECM komponentlerinin üretimi gerçekleşir. Tamir mekanizmalarındaki bozukluk, ECM komponentlerinin birikimine neden olabilir ve bu süreç POP gelişimi ile sonuçlanabilir.

Bir ECM proteini olan versikanın bağ dokusu yeniden yapılanmasında etkili olduğu bilinmektedir [12], ancak bu etkinin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bilgiler, versikanın POP hastalarının bağ dokularında arttığını ve versikan ile versikan proteininin transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu proteinlerin POP gelişiminde ve ilerlemesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple çalışmamızda, versikan proteini ile versikan proteininin transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu bir protein olan CREB5'in ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Bu amaçla ileri evre POP nedeni ile opere olan hastaların uterosakral ligament doku örneklerinde yapılan versikan ve CREB5 western blot analiz sonuçları, erken evre kontrol grubu hastalarına göre bu proteinlerin ekspresyonlarının arttığı göstermiştir.

Yakın geçmişte yapılan bazı çalışmalarda, bağ dokusu hasarı ile seyreden çeşitli hastalıklarda versikan miktarının, hasarlı dokularda arttığı tespit edilmiştir [13-15]. Tendinopatilerde baskın özellik ECM görünüş ve organizasyonundaki değişikliklerdir. ECM disorganizasyonunun mekanik aşırı yüklenme ile birlikte dejeneratif değişikliklerin ve başarısız iyileşme süreçlerinin sonucu olabileceği düşünülmektedir. Patellar tendinopatilerdeki ECM kompozisyon değişikliklerini inceleyen bir çalışma sonucunda, normal doku ile karşılaştırıldığında tendinopatili dokuların ECM'sinde versikan miktarının arttığı gösterilmiştir [164]. Patellar tendinopatili hastalar ile yapılan bir başka çalışmada,

anormal dokuda versikan sentezinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır [15]. Bu iki çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak atletlerdeki aşırı kullanıma bağlı tendinopatileri araştıran bir çalışmada, artmış versikan içeriğinin patellar tendinopati ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [165]. Tendinopatili hastalar ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, patolojik dokuların normal tendonlara göre farklı kompozisyon, yapı ve metabolizmaya sahip ECM'ler ile karakterize olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu değişikliklerin bir kısmının versikan sentezi sonucu olduğu düşünülmektedir [16].

Küçük arterlerin hızlı ilerleyen hipertrofik *remodeling*'i ve fleksör tenosinovyumda bağ dokusunun yeniden düzenlenmesi ile seyreden bir durum olan idiyopatik karpal tünel sendromunda fleksör tenosinovyumlardaki ECM bileşenlerinin incelendiği bir çalışmada, versikanın bağ dokusunda ve aynı zamanda şiddetli darlık gösteren damarların neointimalarında arttığı tespit edilmiştir [14].

Cs-Szabo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, osteoartritli dokularda normale göre versikan sentezinin arttığı gösterilmiştir. Bu sentez artışının kıkırdığın ilerleyici kaybına sebep olan osteoartritte, subkondral kemik sklerozu ve *remodeling*'in eşlik ettiği onarım cevabının bir yansıması olduğu düşünülmektedir [13].

Tümör hücrelerinin invazyon yapabilmesi için ECM'nin degradasyonu ve yeniden yapılanması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda invaziv kanserlerde versikanın interstisyel dokularda yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Ween ve ark [166] over kanserinde, Carmela ve ark [128] ise prostat kanserinde, kanser hücrelerinin hyaluronan ve versikanı kullanarak perisellüler matriks kurduklarını, böylece motilite ve invazyonlarını arttırdıklarını göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada ise, meme kanserinin invaziv kenarlarının interstisyel dokusunda versikanın artmış ekspresyonu saptanmıştır [124]. Bir başka çalışmada araştırmacılar [127], versikanın meme kanseri lokal-sistemik invazivliğinde ve metastaz gelişiminde önemli rolü olduğunu ortaya koymuşlardır. Wang ve ark [167] yaptıkları çalışma sonucunda, versikan ve *toll-like* reseptör 2 (TLR2) arasındaki etkileşimin inflamasyon ve metastaz arasında bağlantı kurduğunu öne sürmüşlerdir. Endotelyal hücreler ve fibroblastlar üzerindeki *toll-like* reseptör 2'nin versikan tarafından bağlanması bu hücreleri aktive etmektedir. İnflamatuar sitokinlerin salınımı tetiklenmektedir. İnflamatuar hücrelerin, özellikle de makrofajların angiogenezi, ECM degradasyonunu ve yeniden yapılanmasını (remodeling) arttırabileceği ve kanser hücre invazyonunu ilerletebileceği öne sürülmektedir.

ECM yeniden yapılanması, ateroskleroz ve restenozun farklı evrelerinde hasar ve inflammatuar yanıtının bir parçası olarak yer almaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda versikanın

diğer moleküllerle etkileşime girerek arteriyal düz kas hücrelerinin (ASMC) adezyon, proliferasyon ve migrasyonunun düzenlenmesinde (remodeling) rol oynadığı gösterilmiştir [108, 132].

ECM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler içinde MMP'ler önemli bir grubu oluşturmaktadır [153]. Dokunun yeniden şekillenmesi, MMP aktivitesinin modülasyonu ile düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde, MMP aktivitesi ile doku kaynaklı metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) arasındaki denge önem taşımaktadır. MMP ekspresyonu, fizyolojik ve patolojik koşullarda gelişen *remodeling* sırasında artar. MMP ve TIMP arasındaki dengenin MMP aktivitesi yönüne kayması, matriksin kontrolsüz olarak yıkılmasına ve patolojilerin ortaya çıkmasına zemin hazırlar [153].

Daha önceki çalışmalarda kollajen *remodelling*'inin kanıtı olarak farklı MMP'ler araştırılmıştır [4, 10, 151, 155, 156]. Özellikle azalmış TIMP ile birlikte olan artmış MMP ekspresyonu bağ dokusu yıkımının arttığını düşündürmektedir [155].

POP'lu hastalarda versikan ve versikan *remodeling*'i ile ilgili çalışma sayısı ise çok azdır. Versikan birkaç proteaz tarafından yıkılmaktadır; matrilizin [168], plazmin [169], ADAMTS ailesi üyeleri [169, 170], özellikle de ADAMTS1 [171]. ADAMTS1, bir proprotein olarak sentezlenir. MMP'ler (özellikle MMP-15) tarafından aktive olması gerekmektedir [172]. ADAMTS1'in, matriks proteoglikanlarından versikan ve agrekanı yıktığı gösterilmiştir [173]. Pelvik organ prolapsuslu hastalarda yapılan bir gen ekspresyon profili çalışmasında ekstrasellüler bir metalloproteinaz olan ADAMTS1 geninin up-regüle olduğu gösterilmiştir [174]. Yapılacak olan POP çalışmalarında versikan, ADAMTS1 ve diğer MMP'lerin ilişkilerinin moleküler düzeyde araştırılması prolapsus mekanizmalarının aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Doku *remodeling*'i için pek çok molekülün karşılıklı etkileşmesi gerekmektedir. Diğer ECM proteinlerinden bazıları ile etkileşime giren versikanın ECM bütünlüğünü sağlamada potansiyel bir rolü olduğu düşünülmektedir [12]. Versikan çeşitli hastalıklarda doku *remodeling*'i ile ilişkili bulunmuştur, ancak versikanın hangi moleküllerle ve nasıl etkileşime girdiği hala net değildir. Çalışmalar, versikan ile fibulin ve fibrilin arasındaki etkileşimlerin elastik lif kurulumunda önemli role sahip olduklarını göstermektedir [98, 115, 116], ancak versikanın yapısında bulunan kondroitin sülfat zincirlerinin elastik lif kurulumunu inhibe ettiği de gösterilmiştir [133]. Bir başka çalışmada [175], kondroitin sülfat içermeyen V3 izoformunun aşırı ekspresyonunun elastik lif birikimi ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Bu da

patolojik *remodeling*'deki versikan birikiminin bozulmuş elastik lif homeostazına neden olarak POP gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

POP ortaya çıkmasında ve progresyonunda ECM proteoglikanlarının rolünü araştıran yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Özellikle POP gelişiminde versikanın rolüne yönelik çalışmanın olmadığı dikkati çekmektedir. Bizim çalışmamız, pelvik organ prolapsusunda bugüne kadar moleküler düzeyde çalışılmamış bir protein olan versikan miktarının, ileri evre POP hastalarının bağ dokularında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını göstermiştir. Bu da POP gelişiminin hasarlı bağ dokusunun anormal tamiri ile ilgili olduğu ve versikanın pelvik organ prolapsusunun patolojik mekanizmalarında önemli rol oynadığı hipotezimizi desteklemektedir.

CREB5, cAMP cevap elementine bağlanan protein ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyeleri bZIP DNA bağlayan bölgeler içermektedirler. CREB5 proteini homodimer olarak veya cjun ya da CREB1 proteini ile birlikte heterodimer olarak CRE (cAMP yanıt elementi)'ye spesifik olarak bağlanır [144-145]. CREB5 proteini, CRE bağımlı trans-aktivatör olarak fonksiyon göstermektedir [136]. Versikan proteini promotöründe CRE içermektedir ve bu nedenle CREB ailesi üyeleri tarafından regüle edilmesi olasıdır [12].

Literatürde CREB5 ile ilgili az sayıda yayın bulunmaktadır. Martin ve ark. familial hiperkolesterolemili domuzların sağlıklı brakial ve femoral arterlerinde yaptıkları gen ekspresyon profili çalışmasında, versikan ve CREB5'in beraber artışını göstermişlerdir [176]. Bizim çalışmamız pelvik organ prolapsuslu hastalarda versikan ve CREB5'in beraber artışını gösteren ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlar versikanın transkripsiyonal regülasyonunda CREB5'in rolü olduğunu düşündürmektedir. İleride gerçekleştirilecek çalışmalarda CREB5 aktivasyonu ve inhibisyonu ile versikanın ekspresyon değişimleri gösterilerek iki protein arasındaki olası etkileşim daha iyi aydınlatılabilecektir.

Bu projenin orijinalliği versikan ve onun transkripsiyon faktörü olan CREB5 ile ilgili literatürde ilk yayın olmasıdır. Elde ettiğimiz bilgiler ışığında özellikle versikanın ve onun transkripsiyonel regülasyonunun daha kapsamlı araştırılmasının pelvik organ prolapsusunun patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağını düşünüyoruz.

Sonuç olarak; versikan ve versikan proteininin regülasyonundan sorumlu olan CREB5 proteinleri pelvik organ prolapsusu patogenezinde önemli rol oynuyor olabilir. Ancak mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesine olanak sağlayacak daha geniş ölçekli, moleküler düzeyde daha kapsamlı ve uzun süreli çalışmalara ihtiyaç duyulacaktır. POP gelişiminde rol

oynayan mekanizmaların anlaşılması ile hastalığın tedavisi ve koruyucu önlemlerin alınmasıyla bu hastalarda POP ilerlemesini sınırlamak olası olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL: **Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence.** *Obstetrics and Gynecology* 1997, **89**(4):501-506.
2. Subak LL, Waetjen LE, van den Eeden S, Thom DH, Vittinghoff E, Brown JS: **Cost of pelvic organ prolapse surgery in the United States.** *Obstetrics and Gynecology* 2001, **98**(4):646-651.
3. Kerkhof MH, Hendriks L, Brolmann HAM: **Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse-a review of the current literature.** *International Urogynecology Journal* 2009, **20**(4):461-474.
4. Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, Echford SD, Abrams P, Bailey AJ: **Changes in metabolism of collagen in genitourinary.** *Lancet* 1996, **347**(9016):1658-1661.
5. Makinen J, Soderstrom KO, Kiilholma P, Hirvonen T: **Histolojical changes in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse.** *Archives of Gynecology* 1986, **239**(1):17-20.
6. Makinen J, Kahari VM, Soderstrom KO, Vuorio E, Hirvonen T: **Collagen synthesis in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse.** *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 1987, **24**(4):319-325.
7. Liapis A, Bakas P, Pafiti A, Frangos-Plemenos M, Arnoyannaki N, Creatsas G: **Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse.** *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 2001, **97**(1):76-79.
8. Takano CC, Girao M, Sartori MGF, Castro RA, Arruda RM, Simoes MJ, Baracat EC, de Lima GR: **Analysis of collagen in parametrium and vaginal apex of women with and without uterine prolapse.** *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 2002, **13**(6):342-345.
9. Ewies AAA, Al-Azzawi F, Thompson J: **Changes in extracellular matrix proteins in the cardinal ligaments of post-menopausal women with or without prolapse: a computerized immunohistomorphometric analysis.** *Human Reproduction* 2003, **18**(10):2189-2195.
10. Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM, Gordy SC, Meyn LA: **Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse.** *Obstetrics and Gynecology* 2005, **106**(5):953-963.
11. Soderberg MW, Falconer C, Bystrom B, Malmstrom A, Ekman G: **Young women with genital prolapse have a low collagen concentration.** *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica* 2004, **83**(12):1193-1198.
12. Wight TN: **Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology.** *Current Opinion in Cell Biology* 2002, **14**(5):617-623.
13. Sztrolovics R, Grover J, Cs-Szabo G, Shi SL, Zhang YP, Mort JS, Roughley PJ: **The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc.** *Journal of Orthopaedic Research* 2002, **20**(2):257-266.
14. Tsujii M, Hirata H, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K, Morita A, Uchida A: **Involvement of tenascin-C and PG-M/versican in flexor tenosynovial pathology of idiopathic carpal tunnel syndrome.** *Histology and Histopathology* 2006, **21**(4-6):511-518.
15. Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Feller JA, Handley CJ: **Change in Proteoglycan Metabolism Is a Characteristic of Human Patellar Tendinopathy.** *Arthritis and Rheumatism* 2010, **62**(10):3028-3035.
16. Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Handley CJ: **Involvement of Proteoglycans in Tendinopathy.** *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 2011, **11**(2):86-93.

17. Driscoll PA, Ross R, Nicholson DA: **ABC of emergency radiology - The pelvis.** *British Medical Journal* 1993, **307**(6909):927-931.
18. Ayhan A, Durukan T, Günalp S, Gürkan T, Önderoğlu LS, Yaralı H, Yüce K: **Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi.** *Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara* 2008, s900.
19. Wei JT, De Lancey JOL: **Functional anatomy of the pelvic floor and lower urinary tract.** *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2004, **47**(1):3-17.
20. Ashton-Miller JA, Howard D, DeLancey JOL: **The functional anatomy of the female pelvic floor and stress continence control system.** *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 2001, **35**:1-7.
21. Kearney R, Sawhney R, DeLancey JOL: **Levator ani muscle anatomy evaluated by origin-insertion pairs.** *Obstetrics and Gynecology* 2004, **104**(1):168-173.
22. Shelton AA, Welton ML: **The pelvic floor in health and disease.** *Western Journal of Medicine* 1997, **167**(2):90-98.
23. DeLancey JOL, Hurd WW: **Size of the urogenital hiatus in the levator ani muscles in normal women and women with pelvic organ prolapse.** *Obstetrics and Gynecology* 1998, **91**(3):364-368.
24. Oelrich TM: **The striated urogenital sphincter muscle in the female.** *Anatomical Record* 1983, **205**(2):223-232.
25. Matzel KE, Schmidt RA, Tanagho EA: **Neuroanatomy of the striated muscular anal continence mechanism-implications for the use of neurostimulation.** *Diseases of the Colon & Rectum* 1990, **33**(8):666-673.
26. Heit M, Benson JT, Russell B, Brubaker L: **Levator ani muscle in women with genitourinary prolapse: Indirect assessment by muscle histopathology.** *Neurourology and Urodynamics* 1996, **15**(1):17-29.
27. Delancey JOL: **Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1992, **166**(6):1717-1728.
28. Delancey JOL: **Structural support of the urethra as it relates to stress urinary-incontinence - The hammock hypothesis.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1994, **170**(6):1713-1723.
29. Jelovsek JE, Barber MD: **Women seeking treatment for advanced pelvic organ protapse have decreased body image and quality of life.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006, **194**(5):1455-1461.
30. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JOL, Klarskov P, Shull BL, Smith ARB: **The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1996, **175**(1):10-17.
31. Ellerkmann RM, Cundiff GW, Melick CF, Nihira MA, Leffler K, Bent AE: **Correlation of symptoms with location and severity of pelvic organ prolapse.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001, **185**(6):1332-1337.
32. Burrows LJ, Meyn LA, Walters MD, Weber AM: **Pelvic symptoms in women with pelvic organ prolapse.** *Obstetrics and Gynecology* 2004, **104**(5):982-988.
33. Jelovsek JE, Barber MD, Paraiso MFR, Walters MD: **Functional bowel and anorectal disorders in patients with pelvic organ prolapse and incontinence.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005, **193**(6):2105-2111.
34. Kahn MA, Breitkopf CR, Valley MT, Woodman PJ, O'Boyle AL, Mand DI, Schaffer JJ, Grady JJ, Swift SE: **Pelvic Organ Support Study (POSST) and bowel symptoms: Straining at stool is associated with perineal and anterior vaginal descent in a general gynecologic population.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005, **192**(5):1516-1522.
35. Subramanian D, Szwarcensztein K, Mauskopf JA, Slack MC: **Rate, type, and cost of pelvic organ prolapse surgery in Germany, France, and England.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2009, **144**(2):177-181.
36. Keshavarz H, Hillis S, Kieke BA: **Hysterectomy surveillance, united states, 1994-1998.** *American Journal of Epidemiology* 2001, **153**(11):S140-S140.

37. Weber AM, Abrams P, Brubaker L, Cundiff G, Davis G, Dmochowski RR, Fischer J, Hull T, Nygaard I, Weidner AC: **The standardization of terminology for researchers in female pelvic floor disorders.** *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 2001, **12**(3):178-186.
38. Hunskaar S, Burgio K, Clark A, Lapitan MC, Nelson R, Sillen U, Thom D: **Epidemiology of urinary (UI) and faecal (FI) incontinence and pelvic organ prolapse (POP);** 2005.
39. Swift S, Woodman P, O'Boyle A, Kahn M, Valley M, Bland D, Wang W, Schaffer J: **Pelvic Organ Support Study (POSST): The distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005, **192**(3):795-806.
40. Samuelsson EC, Victor FTA, Tibblin G, Svardsudd KF: **Signs of genital prolapse in a Swedish population of women 20 to 59 years of age and possible related factors.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999, **180**(2):299-305.
41. Hendrix SL, Clark A, Nygaard I, Aragaki A, Barnabei V, McTiernan A: **Pelvic organ prolapse in the Women's Health Initiative: Gravity and gravidity.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002, **186**(6):1160-1166.
42. Swift SE, Tate SB, Nicholas J: **Correlation of symptoms with degree of pelvic organ support in a general population of women: What is pelvic organ prolapse?** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003, **189**(2):372-377.
43. Clark AL, Gregory T, Smith VJ, Edwards R: **Epidemiologic evaluation of reoperation for surgically treated pelvic organ prolapse and urinary incontinence.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003, **189**(5):1261-1267.
44. Lukacz ES, Lawrence JM, Contreras R, Nager CW, Luber KM: **Parity, mode of delivery, and pelvic floor disorders.** *Obstetrics and Gynecology* 2006, **107**(6):1253-1260.
45. Mant J, Painter R, Vessey M: **Epidemiology of genital prolapse: Observations from the Oxford Family Planning Association Study.** *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1997, **104**(5):579-585.
46. Patel DA, Xu X, Thomason AD, Ransom SB, Ivy JS, DeLancey JOL: **Childbirth and pelvic floor dysfunction: An epidemiologic approach to the assessment of prevention opportunities at delivery.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006, **195**(1):23-28.
47. O'Boyle AL, Woodman PJ, O'Boyle JD, Davis GD, Swift SE: **Pelvic organ support in nulliparous pregnant and nonpregnant women: A case control study.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002, **187**(1):99-102.
48. O'Boyle AL, O'Boyle JD, Ricks RE, Patience TH, Calhoun B, Davis G: **The natural history of pelvic organ support in pregnancy.** *International Urogynecology Journal* 2003, **14**(1):46-49.
49. Chiaffarino F, Chatenoud L, Dindelli M, Meschia M, Buonaguidi A, Amicarelli F, Surace M, Bertola E, Di Cintio E, Parazzini F: **Reproductive factors, family history, occupation and risk of urogenital prolapse.** *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 1999, **82**(1):63-67.
50. Schaffer JI, Wai CY, Boreham MK: **Etiology of pelvic organ prolapse.** *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2005, **48**(3):639-647.
51. Jorgensen S, Hein HO, Gyntelberg F: **Heavy lifting at work and risk of genital prolapse and herniated lumbar disc in assistant nurses.** *Occupational Medicine-Oxford* 1994, **44**(1):47-49.
52. Gilpin SA, Gosling JA, Smith ARB, Warrell DW: **The pathogenesis of genitourinary prolapse and stress-incontinence of urine - A histological and histochemical-study.** *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1989, **96**(1):15-23.
53. Carley ME, Schaffer J: **Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers-Danlos syndrome.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000, **182**(5):1021-1023.
54. Shuwarger D, Young RL: **Management of neonatal genital prolapse - Case-reports and historic review.** *Obstetrics and Gynecology* 1985, **66**(3):S61-S63.

55. McGlone L, Patole S: **Neonatal genital prolapse**. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2004, **40**(3):156-157.
56. Singh K, Jakab M, Reid WMN, Berger LA, Hoyte L: **Three-dimensional magnetic resonance imaging assessment of levator ani morphologic features in different grades of prolapse**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003, **188**(4):910-915.
57. DeLancey JOL: **The hidden epidemic of pelvic floor dysfunction: Achievable goals for improved prevention and treatment**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005, **192**(5):1488-1495.
58. DeLancey JOL, Kearney R, Chou Q, Speights S, Binno S: **The appearance of levator ani muscle abnormalities in magnetic resonance images after vaginal delivery**. *Obstetrics and Gynecology* 2003, **101**(1):46-53.
59. Chen LY, Ashton-Miller JA, Hsu Y, DeLancey JOL: **Interaction among apical support, levator ani impairment, and anterior vaginal wall prolapse**. *Obstetrics and Gynecology* 2006, **108**(2):324-332.
60. Lien KC, Mooney B, DeLancey JOL, Ashton-Miller JA: **Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth**. *Obstetrics and Gynecology* 2004, **103**(1):31-40.
61. Snooks SJ, Swash M, Mathers SE, Henry MM: **Effect of vaginal delivery on the pelvic floor - A 5-year follow-up**. *British Journal of Surgery* 1990, **77**(12):1358-1360.
62. Weidner AC, Jamison MG, Branham V, South MM, Borawski KM, Romero AA: **Neuropathic injury to the levator ani occurs in 1 in 4 primiparous women**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006, **195**(6):1851-1856.
63. Lubowski DZ, Swash M, Nicholls RJ, Henry MM: **Increase in pudendal nerve-terminal motor latency with defecation straining**. *British Journal of Surgery* 1988, **75**(11):1095-1097.
64. Snooks SJ, Barnes PRH, Swash M, Henry MM: **Damage to the innervation of the pelvic floor musculature in chronic constipation**. *Gastroenterology* 1985, **89**(5):977-981.
65. Norton PA, Baker JE, Sharp HC, Warenski JC: **Genitourinary prolapse and joint hypermobility in women**. *Obstetrics and Gynecology* 1995, **85**(2):225-228.
66. Boreham MK, Miller RT, Schaffer JI, Word RA: **Smooth muscle myosin heavy chain and caldesmon expression in the anterior vaginal wall of women with and without pelvic organ prolapse**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001, **185**(4):944-952.
67. Liu XQ, Zhao Y, Pawlyk B, Damaser M, Li TS: **Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders**. *American Journal of Pathology* 2006, **168**(2):519-528.
68. Smith ARB, Hosker GL, Warrell DW: **The role of partial denervation of the pelvic floor in etiology of genitourinary prolapse and stress-incontinence of urine - A neurophysiological study**. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1989, **96**(1):24-28.
69. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA: **Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002, **187**(1):56-63.
70. Mattox TF, Lucente V, McIntyre P, Miklos JR, Tomezsko J: **Abnormal spinal curvature and its relationship to pelvic organ prolapse**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000, **183**(6):1381-1384.
71. Nguyen JK, Lind LR, Choe JY, McKindsey F, Sinow R, Bhatia NN: **Lumbosacral spine and pelvic inlet changes associated with pelvic organ prolapse**. *Obstetrics and Gynecology* 2000, **95**(3):332-336.
72. Sze EHM, Kohli N, Miklos JR, Roat T, Karram MM: **Computed tomography comparison of bony pelvis dimensions between women with and without genital prolapse**. *Obstetrics and Gynecology* 1999, **93**(2):229-232.
73. Handa VL, Pannu HK, Siddique S, Gutman R, VanRooyen J, Cundiff G: **Architectural differences in the bony pelvis of women with and without pelvic floor disorder's**. *Obstetrics and Gynecology* 2003, **102**(6):1283-1290.
74. Wu XZ, Chen D, Xie GR: **Extracellular matrix remodeling in hepatocellular carcinoma: Effects of soil on seed? Medical Hypotheses** 2006, **66**(6):1115-1120.

75. Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U: **Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2002, **2**(7):521-528.
76. Ricard-Blum S: **The Collagen Family.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2011, **3**(1).
77. Bailey AJ: **Molecular mechanisms of ageing in connective tissues.** *Mechanisms of Ageing and Development* 2001, **122**(7):735-755.
78. Haukipuro K: **Synthesis of collagen type-I and type-III in re-incised wounds in humans.** *British Journal of Surgery* 1991, **78**(6):708-712.
79. Hibbs MS, Postlethwaite AE, Mainardi CL, Seyer JM, Kang AH: **Alterations in collagen production in mixed mononuclear leukocyte-fibroblast cultures.** *Journal of Experimental Medicine* 1983, **157**(1):47-59.
80. Birk DE: **Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly.** *Micron* 2001, **32**(3):223-237.
81. Bailey AJ, Paul RG, Knott L: **Mechanisms of maturation and ageing of collagen.** *Mechanisms of Ageing and Development* 1998, **106**(1-2):1-56.
82. Paul RG, Bailey AJ: **Glycation of collagen: The basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1996, **28**(12):1297-1310.
83. Spivakkroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I: **Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for R FGF receptor dimerization, activation, and cell-proliferation.** *Cell* 1994, **79**(6):1015-1024.
84. Syrokou A, Tzanakakis G, Tseggenidis T, Hjerpe A, Karamanos NK: **Effects of glycosaminoglycans on proliferation of epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure-function relationship.** *Cell Proliferation* 1999, **32**(2-3):85-99.
85. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK: **Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting.** *Febs Journal* 2010, **277**(19):3904-3923.
86. Iozzo RV: **Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function.** *Annual Review of Biochemistry* 1998, **67**:609-652.
87. Schaefer L, Schaefer RM: **Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules.** *Cell and Tissue Research* 2010, **339**(1):237-246.
88. Bandtlow CE, Zimmermann DR: **Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins.** *Physiological Reviews* 2000, **80**(4):1267-1290.
89. Asperger A, Miura R, Bourdoulous S, Shimonaka M, Heinegard D, Schachner M, Ruoslahti E, Yamaguchi Y: **The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(19):10116-10121.
90. Zhang Y, Wu YJ, Cao L, Lee V, Chen LW, Lin ZS, Kiani C, Adams ME, Yang BB: **Versican modulates embryonic chondrocyte morphology via the epidermal growth factor-like motifs in G3.** *Experimental Cell Research* 2001, **263**(1):33-42.
91. Chen LW, Yang BL, Wu YJ, Yee A, Yang BB: **G3 domains of aggrecan and PG-M/versican form intermolecular disulfide bonds that stabilize cell-matrix interaction.** *Biochemistry* 2003, **42**(27):8332-8341.
92. Ang LC, Zhang Y, Cao L, Yang BL, Young B, Kiani C, Lee V, Allan K, Yang BB: **Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain.** *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1999, **58**(6):597-605.
93. Iozzo RV, Naso MF, Cannizzaro LA, Wasmuth JJ, McPherson JD: **Mapping of the versican proteoglycan gene (CSPG2) to the long arm of human chromosome-5 (5Q12-5Q14).** *Genomics* 1992, **14**(4):845-851.
94. McEver RP: **Selectins.** *Current Opinion in Immunology* 1994, **6**(1):75-84.

95. Shinomura T, Nishida Y, Ito K, Kimata K: **CDNA Cloning of PG-M, a large chondroitin sulfat proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds - Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican.** *Journal of Biological Chemistry* 1993, **268**(19):14461-14469.
96. Dourszimmerrmann MT, Zimmermann DR: **A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in 2 alternative splice variants of human versican.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**(52):32992-32998.
97. Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K, Kimata K: **Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment region in mouse and human tissue.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**(8):3914-3918.
98. Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB: **The interaction of versican with its binding partners.** *Cell Research* 2005, **15**(7):483-494.
99. Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M, Kimata K: **Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**(2):958-965.
100. Cattaruzza S, Schiappacassi M, Ljungberg-Rose A, Spessotto P, Perissinotto D, Morgelin M, Mucignat MT, Colombatti A, Perris R: **Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(49):47626-47635.
101. Perissinotto D, Iacopetti P, Bellina I, Doliana R, Colombatti A, Pettway Z, Bronner-Fraser M, Shinomura T, Kimata K, Morgelin M *et al*: **Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan.** *Development* 2000, **127**(13):2823-2842.
102. Sheng W, Wang GZ, Wang YL, Liang JY, Wen JP, Zheng PS, Wu YJ, Lee V, Slingerland J, Dumont D *et al*: **The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis.** *Molecular Biology of the Cell* 2005, **16**(3):1330-1340.
103. Ricciardelli C, Brooks JH, Suwiat S, Sakko AJ, Mayne K, Raymond WA, Seshadri R, LeBaron RG, Horsfall DJ: **Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer.** *Clinical Cancer Research* 2002, **8**(4):1054-1060.
104. Nikitovic D, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Theocharis AD, Karamanos NK, Tzanakakis GN: **Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms V0 and V1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells.** *Iubmb Life* 2006, **58**(1):47-53.
105. Arslan F, Bosserhoff AK, Nickl-Jockschat T, Doerfelt A, Bogdahn U, Hau P: **The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-beta 2.** *British Journal of Cancer* 2007, **96**(10):1560-1568.
106. Lemire JM, Merrilees MJ, Braun KR, Wight TN: **Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro.** *Journal of Cellular Physiology* 2002, **190**(1):38-45.
107. Yang BL, Cao L, Kiani C, Lee V, Zhang Y, Adams ME, Yang BB: **Tandem repeats are involved in G1 domain inhibition of versican expression and secretion and the G3 domain enhances glycosaminoglycan modification and product secretion via the complement-binding protein-like motif.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(28):21255-21261.
108. Wight TN, Merrilees MJ: **Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis - Key roles for versican.** *Circulation Research* 2004, **94**(9):1158-1167.
109. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M: **Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis.** *Nature* 2009, **457**(7225):102-U108.
110. Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, Stamenkovic I: **Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor- development.** *Journal of Experimental Medicine* 1994, **180**(1):53-66.

111. Matsumoto K, Shionyu M, Go M, Shimizu K, Shinomura T, Kimata K, Watanabe H: **Distinct interaction of versican/PG-M with hyaluronan and link protein.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(42):41205-41212.
112. Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M, Kimata K: **Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts - Implications for their roles in cell-substratum adhesion.** *Journal of Cell Science* 1993, **106**:55-65.
113. Lee GM, Johnstone B, Jacobson K, Caterson B: **The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells.** *Journal of Cell Biology* 1993, **123**(6):1899-1907.
114. Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML: **Fibulins: A versatile family of extracellular matrix proteins.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003, **4**(6):479-489.
115. Isogai Z, Asperger A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP, Sakai LY: **Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(6):4565-4572.
116. Olin AI, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D, Asperger A: **The proteoglycans aggrecan and versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(2):1253-1261.
117. Zhao BH, Zhou JH: **Decreased expression of elastin, fibulin-5 and lysyl oxidase-like 1 in the uterosacral ligaments of postmenopausal women with pelvic organ prolapse.** *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2012, **38**(6):925-931.
118. Takacs P, Nassiri M, Vician A, Candiotti K, Fornoni A, Medina CA: **Fibulin-5 expression is decreased in women with anterior vaginal wall prolapse.** *International Urogynecology Journal* 2009, **20**(2):207-211.
119. Soderberg MW, Bystrom B, Kalamajski S, Malmstrom A, Ekman-Ordeberg G: **Gene expressions of small leucine-rich repeat proteoglycans and fibulin-5 are decreased in pelvic organ prolapse.** *Molecular Human Reproduction* 2009, **15**(4):251-257.
120. Takacs P, Nassiri M, Candiotti K, Yang JF, Yavagal S, Medina CA: **Differential expression of fibulins in the uterosacral ligaments of women with uterine prolapse.** *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2010, **282**(4):389-394.
121. Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y: **Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer.** *Annals of Oncology* 2007, **18**(2):269-274.
122. Labropoulou VT, Theocharis AD, Ravazoula P, Perimenis P, Hjerpe A, Karamanos NK, Kalofonos HP: **Versican but not decorin accumulation is related to metastatic potential and neovascularization in testicular germ cell tumours.** *Histopathology* 2006, **49**(6):582-593.
123. Pirinen R, Leinonen T, Bohm J, Johansson R, Ropponen K, Kurnpula E, Kosma VM: **Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis.** *Human Pathology* 2005, **36**(1):44-50.
124. Suwawat S, Ricciardelli C, Tammi R, Tammi M, Auvinen P, Kosma VM, LeBaron RG, Raymond WA, Tilley WD, Horsfall DJ: **Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer.** *Clinical Cancer Research* 2004, **10**(7):2491-2498.
125. Zheng PS, Wen JP, Ang LC, Sheng W, Vilorio-Petit A, Wang YL, Wu YJ, Kerbel RS, Yang BB: **Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis.** *Faseb Journal* 2004, **18**(2):754-+.
126. LaPierre DP, Lee DY, Li SZ, Xie YZ, Zhong L, Sheng W, Deng Z, Yang BB: **The ability of versican to simultaneously cause apoptotic resistance and sensitivity.** *Cancer Research* 2007, **67**(10):4742-4750.
127. Yee AJ, Akens M, Yang BL, Finkelstein J, Zheng PS, Deng Z, Yang B: **The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis.** *Breast Cancer Research* 2007, **9**(4).
128. Ricciardelli C, Russell DL, Ween MP, Mayne K, Suwawat S, Byers S, Marshall VR, Tilley WD, Horsfall DJ: **Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate**

- cancer cells promotes cell motility. *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(14):10814-10825.
129. Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB: **Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican.** *Journal of Cellular Biochemistry* 1999, **72**(2):210-220.
 130. Cattaruzza S, Schiappacassi M, Kimata K, Colombatti A, Perris R: **The globular domains of PGM/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells.** *Faseb Journal* 2004, **18**(2):779-+.
 131. Zhang Y, Cao L, Yang BL, Yang BB: **The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(33):21342-21351.
 132. Evanko SP, Angello JC, Wight TN: **Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells.** *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999, **19**(4):1004-1013.
 133. Hinek A, Mecham RP, Keeley F, Rabinovitch M: **Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-KD elastin-binding protein in fetal lamb ductus-arteriosus and in cultured aortic smooth-muscle cells treated with chondroitin sulfate.** *Journal of Clinical Investigation* 1991, **88**(6):2083-2094.
 134. Vijayagopal P, Figueroa JE, Fontenot JD, Glancy DL: **Isolation and characterization of a proteoglycan variant from human aorta exhibiting a marked affinity for low density lipoprotein and demonstration of its enhanced expression in atherosclerotic plaques.** *Atherosclerosis* 1996, **127**(2):195-203.
 135. Naso MF, Zimmermann DR, Iozzo RV: **Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional-analysis of its promoter.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**(52):32999-33008.
 136. Shankar DB, Cheng JC, Sakamoto KM: **Role of cyclic AMP response element binding protein in human leukemias.** *Cancer* 2005, **104**(9):1819-1824.
 137. Shaywitz AJ, Greenberg ME: **CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals (vol 68, pg 821, 1999).** *Annual Review of Biochemistry* 2003, **72**:VII-VII.
 138. Wiggan GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P, Arthur JSC: **MSK1 and MSK2 are required for the mitogen-and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts.** *Molecular and Cellular Biology* 2002, **22**(8):2871-2881.
 139. Snowden AW, Perkins ND: **Cell cycle regulation of the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein.** *Biochemical Pharmacology* 1998, **55**(12):1947-1954.
 140. Mayr B, Montminy M: **Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001, **2**(8):599-609.
 141. Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF: **Cyclic-AMP - Responsive DNA-Binding Protein - Structure based on a cloned placental CDNA.** *Science* 1988, **242**(4884):1430-1433.
 142. Ozawa K, Sudo T, Soeda EI, Yoshida MC, Ishii S: **Assignment of the human CREB2 (CRE-BP1) gene to 2Q32.** *Genomics* 1991, **10**(4):1103-1104.
 143. Lu R, Yang P, Ohare P, Misra V: **Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor.** *Molecular and Cellular Biology* 1997, **17**(9):5117-5126.
 144. Zu YL, Maekawa T, Nomura N, Nakata T, Ishii S: **Regulation of transactivating capacity of CRE-BPA by phorbol ester tumor promoter TPA.** *Oncogene* 1993, **8**(10):2749-2758.
 145. Nomura N, Zu YL, Maekawa T, Tabata S, Akiyama T, Ishii S: **Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the CAMP response element-binding protein CRE-BP1.** *Journal of Biological Chemistry* 1993, **268**(6):4259-4266.
 146. Wang L, Huang JX, Jiang MH: **CREB5 Computational Regulation Network Construction and Analysis Between Frontal Cortex of HIV Encephalitis (HIVE) and HIVE-Control Patients.** *Cell Biochemistry and Biophysics* 2011, **60**(3):199-207.

147. Hardingham TE, Fosang AJ: **Proteoglycans - Many forms and many functions.** *Faseb Journal* 1992, **6**(3):861-870.
148. Gabriel B, Gitsch G, Watermann D, Halaska M, Sottner O, Krcmar M, Kolarik D: **The uterosacral ligament in postmenopausal women with or without pelvic organ prolapse.** *Neurourology and Urodynamics* 2006, **25**(6):533-534.
149. Wong MY, Harmanli OH, Agar M, Dandolu V, Grody MHT: **Collagen content of nonsupport tissue in pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003, **189**(6):1597-1599.
150. Moalli PA, Talarico LC, Sung VW, Klingensmith WL, Shand SH, Meyn LA, Watkins SC: **Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fasciae pelvis.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004, **190**(3):620-627.
151. Gabriel B, Watermann D, Hancke K, Gitsch G, Werner M, Tempfer C, zur Hausen A: **Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in uterosacral ligaments is associated with pelvic organ prolapse.** *International Urogynecology Journal* 2006, **17**(5):478-482.
152. Barbiero EC, Sartori MGF, Girao M, Baracat EC, de Lima GR: **Analysis of type I collagen in the parametrium of women with and without uterine prolapse, according to hormonal status.** *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 2003, **14**(5):331-334.
153. Birkedalhansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedalhansen B, Decarlo A, Engler JA: **Matrix metalloproteinases - A review.** *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993, **4**(2):197-250.
154. Moses MA: **The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors.** *Stem Cells* 1997, **15**(3):180-189.
155. Phillips CH, Anthony F, Benyon C, Monga AK: **Collagen metabolism in the uterosacral ligaments and vaginal skin of women with uterine prolapse.** *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2006, **113**(1):39-46.
156. Chen BH, Wen Y, Li H, Polan ML: **Collagen metabolism and turnover in women with stress urinary incontinence and pelvic prolapse.** *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction* 2002, **13**(2):80-87.
157. Judge DP, Dietz HC: **Marfan's syndrome.** *Lancet* 2005, **366**(9501):1965-1976.
158. Alperin M, Debes K, Abramowitch S, Meyn L, Moalli PA: **LOXL1 deficiency negatively impacts the biomechanical properties of the mouse vagina and supportive tissues.** *International Urogynecology Journal* 2008, **19**(7):977-986.
159. Chen B, Wen Y, Polan ML: **Elastolytic activity in women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse.** *Neurourology and Urodynamics* 2004, **23**(2):119-126.
160. Yamamoto K, Yamamoto M, Akazawa K, Tajima S, Wakimoto H, Aoyagi M: **Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri.** *Cell Biology International* 1997, **21**(9):605-611.
161. Klutke J, Ji Q, Campeau J, Starcher B, Felix JC, Stanczyk FZ, Klutke C: **Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse.** *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 2008, **87**(1):111-115.
162. Buchsbaum GM, Chin M, Glantz C, Guzick D: **Prevalence of urinary incontinence and associated brisk factors in a cohort of nuns.** *Obstetrics and Gynecology* 2002, **100**(2):226-229.
163. Wu JM, Hundley AF, Fulton RG, Myers ER: **Forecasting the Prevalence of Pelvic Floor Disorders in US Women 2010 to 2050.** *Obstetrics and Gynecology* 2009, **114**(6):1278-1283.
164. Samiric T, Parkinson J, Ilic MZ, Cook J, Feller JA, Handley CJ: **Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy.** *Matrix Biology* 2009, **28**(4):230-236.
165. Scott A, Lian O, Roberts CR, Cook JL, Handley CJ, Bahr R, Samiric T, Ilic MZ, Parkinson J, Hart DA *et al*: **Increased versican content is associated with tendinosis pathology in the patellar tendon of athletes with jumper's knee.** *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 2008, **18**(4):427-435.

166. Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C: **Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis.** *International Journal of Molecular Sciences* 2011, **12**(2):1009-1029.
167. Wang W, Xu GL, Jia WD, Ma JL, Li JS, Ge YS, Ren WH, Yu JH, Liu WB: **Ligation of TLR2 by Versican: A Link Between Inflammation and Metastasis.** *Archives of Medical Research* 2009, **40**(4):321-323.
168. Halpert I, Sires UI, Roby JD, PotterPerigo S, Wight TN, Shapiro SD, Welgus HG, Wickline SA, Parks WC: **Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(18):9748-9753.
169. Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN: **Versican degradation and vascular disease.** *Trends in Cardiovascular Medicine* 2006, **16**(6):209-215.
170. Apte SS: **A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(46):31493-31497.
171. Sandy JD: **Editorial - A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, **14**(2):95-100.
172. Fu YN, Nagy JA, Brown LF, Shih SC, Johnson PY, Chan CK, Dvorak HF, Wight TN: **Proteolytic Cleavage of Versican and Involvement of ADAMTS-1 in VEGF-A/VPF-Induced Pathological Angiogenesis.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2011, **59**(5):463-473.
173. Torres-Collado AX, Kisiel W, Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzanique JC: **ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(26):17827-17837.
174. Brizzolara SS, Killeen J, Urschitz J: **Gene expression profile in pelvic organ prolapse.** *Molecular Human Reproduction* 2009, **15**(1):59-67.
175. Merrilees MJ, Lemire JM, Fischer JW, Kinsella MG, Braun KR, Clowes AW, Wight TN: **Retrovirally mediated overexpression of versican V3 by arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointima after vascular injury.** *Circulation Research* 2002, **90**(4):481-487.
176. Bahls M, Bidwell CA, Hu J, Krueger CG, Reed JD, Tellez A, Kaluza GL, Granada JF, Van Alstine WG, Newcomer SC: **Gene expression differences in healthy brachial and femoral arteries of Rapacz familial hypercholesterolemic swine.** *Physiological Genomics* 2011, **43**(12):781-788.