



TC.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN
ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ
ANGİOGENETİK FAKTÖRLER ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

Ozan ÖNDER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

SİVAS-2019

TC.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN
ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ
ANGİOGENETİK FAKTÖRLER ÜZERİNDEKİ ROLÜ

OZAN ÖNDER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. CELAL KALOĞLU

2019- SİVAS

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Celal KALOğLU

Üye Prof. Dr. H. Eray BULUT

Üye Prof. Dr. Emel KOPTAGEL

ONAY

Bu tez çalışması, 27.02.2019 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Zübeyda AKINPOLAT

SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Bu çalışma (T-719), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.



“Hayattaki en değerli varlıklarım olan yeğenlerim ”

Eylül, Kuzey ve Emek’e...

ÖZET

PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ ANGİOGENETİK FAKTÖRLER ÜZERİNDEKİ ROLÜ

Ozan ÖNDER

Yüksek Lisans Tezi

Histoloji-Embriyoloji A.D.

Danışman: Prof.Dr. Celal KALOĞLU

2019, 183 sayfa

Memelilerde implantasyon, blastosist aşamasındaki embriyo ile reseptif endometrium arasındaki diyalog sonucu meydana gelen en karmaşık biyolojik olaylardan biridir.

Wnt proteinleri, fonksiyonlarını plazma membranında yerleşmiş özel reseptörler üzerinden intraselüler kanonikal ve non-kanonikal olmak üzere iki esas haberleşme yoluyla aracılığıyla gerçekleştirirler.

İmplantasyon sırasında, çalışılan Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin proteinlerinin, endometriumda ve embriyo invazyonu sırasında vasküler proliferasyonda, endotel ve çevresindeki matriks ve mezenşim arasındaki karşılıklı etkileşime aracılık etmekte kritik rol oynadığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, sıçan endometriumunda östrus siklusu ve gebelik günlerinde Wnt- β katenin sinyal yoluyla Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin proteinlerinin immüno lokalizasyonları belirlenerek anjiogenezdeki olası rollerinin araştırılması amaçlandı. Uterus dokularından alınan kesitlere hematoksilin&eoizin (H&E) ve immünfloresan (IF) boyamalar uygulandı. Ayrıca uterus endometriumu küretaj yoluyla kazınarak alınan parçalardan bu proteinlerin mRNA ekspresyonları Real-Time PZR yöntemi ile belirlendi.

Real-Time PZR analizleri, peri-implantasyon döneminde sıçan endometriumunda Wnt3, Wnt7a, β -katenin, Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin proteinlerinin

mRNA'larının ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir. Wnt7a, β -katenin, Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin'in ifadeleri özellikle östrus ve/veya metaöstrus evrelerinde daha yüksekti. Özellikle östrus siklusunda β -katenin ve VE-kadherin mRNA'sı için metaöstrusta; ET-1 için ise östrus evresinde çok kuvvetli sinyaller tespit edildi. İlerleyen gebelik günlerinde ise çoğunlukla bütün proteinlerin mRNA'sında ifade artışı söz konusudur.

İmmünfloresan analizlerinin sonuçlarına göre, peri-implantasyon sürecinde sıçan endometriumunda Wnt'lerin ve Ang-1 ile ET-1'in tüm östrus evreleri boyunca genellikle endometrial luminal epitelde ve kan damarlarının endotelinde, β -kateninin hemen hemen endometriumun bütün bölgelerinde, VE-kadherin'nin ise çoğunlukla endometrial bazal stroma ve kan damarlarının endotelinde lokalizasyonları gösterildi. Gebe sıçan uterusunda ise çalışılmış olan bütün proteinlerin artan gebelik günlerine bağlı olarak ekspresyon ifadelerinde bir artış söz konusudur.

Sonuç olarak, Wnt- β katenin sinyal yolağının çalışılan anjiogenetik faktör proteinleri üzerinde etkili bir rolünün olması, östrus siklusundaki değişimlerin ve embriyo implantasyonunda gerçekleşen anjiogenik olayların önemli bir modülatörü olabileceği ve insan endometriumunda implantasyon, desidualizasyon ve plasantasyon gibi kritik fonksiyonları üstlenebileceği düşüncesini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: İmplantasyon, Wnt, ET-1, Ang-1, VE-kadherin, Endometrium, Sıçan, İmmünfloresan, Real-Time PZR

ABSTRACT

THE ROLE OF WNT- β CATENIN SIGNALING ON THE ANGIOGENETIC FACTORS IN THE RAT ENDOMETRIUM DURING PERI-IMPLANTATION PERIOD

Ozan ÖNDER

Master of Sciences Thesis

Department of Histology-Embryology

Supervisor: Prof. Dr. Celal KALOĞLU

2019, 183 pages

Implantation in mammals is one of the most complex biological events that occurs as a result of the dialogue between the blastocyst stage embryo and the receptive endometrium.

Wnt proteins carry out their functions through two major pathways, intracellular canonical and non-canonical, via specific receptors on plasma membrane.

Ang-1, ET-1 and VE-cadherin proteins are known to play critical roles during implantation, in mediating the interaction between the endothelium and its surrounding matrix and the mesenchyme in vascular proliferation during endometrial and embryonal invasion.

In the present study, we aimed to investigate the angiogenesis in the rat endometrium by determining the immunolocalization of Ang-1, ET-1 and VE-cadherin proteins along with Wnt/ β catenin proteins in the estrous cycle and pregnancy. Paraffin sections were stained by haematoxyline-eosine and immunofluorescence methods. The mRNA expressions of these proteins from fragments by scraping the uterine endometrium through curettage were also determined by using Real-Time PCR.

Real-Time PCR analysis showed the expression levels of mRNAs of Wnt3, Wnt7a, β -catenin, Ang-1, ET-1 and VE-cadherin proteins in rat endometrium during peri-implantation period. The expressions of Wnt7a, β -catenin, Ang-1, ET-1 and VE-cadherin were higher in the estrous and/or metaestrous stages. The mRNA of β -catenin

and VE-cadherin were detected as very strong in the metaestrous stage, while the ET-1 mRNA was very strong in the estrous stage of estrous cycle. On the days of progressing pregnancy, there is mostly an increase in the expressions of mRNA of all proteins.

According to the findings of immunofluorescence analysis, during the peri-implantation process, Wnts, Ang-1 and ET-1 were usually found in endometrial luminal epithelium and blood vessel endothelium in almost all regions of rat endometrium in the estrous cycle; β -catenin in all parts of the endometrium throughout all stages; and VE-cadherin was mostly localized in the endometrial basal stroma and blood vessels in endothelium. There is an increase in expressions of all proteins studied in pregnant rat uterus, depending on the progressing pregnancy days.

In conclusion, the role of Wnt- β catenin signaling pathway on angiogenic factor proteins may be a crucial modulator of angiogenic events in estrous cycle and the embryo implantation and support the idea that they can modulate critical functions such as implantation, decidualization and placentation in the human endometrium.

Key Words: Implantation, Wnt, ET-1, Ang-1, VE-cadherin, Endometrium, Rat, Immunoflorescence, Real-Time PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni birçok konuda aydınlatan, yardımcı olan danışman hocam, **Prof. Dr. Celal KALOĞLU**'na,

Her zaman yakın ilgi ve yardımlarını eksik etmeyen hocalarım, **Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT** ve **Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN**'a,

İhtiyacım olan yardım ve desteği eksiksiz sunan ve esirgemeyen **Yrd. Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ** ve **Yrd. Doç. Dr. Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN**'a,

Tez çalışmam süresince emeklerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen değerli kardeşim **Arş. Gör. Rasim HAMUTOĞLU**'na ve her daim yanımda olup desteklerini esirgemeyen **Tuğba DAĞDEVİREN** ve **Arş. Gör. Berna ÖZDENOĞLU KUTLU**'ya,

Moleküler çalışmalarımız aşamasında bizden desteğini esirgemeyen **Doç. Dr. Ertan Mahir Korkmaz** hocam ve çalışmamız süresince desteğini esirgemeyen **Merve Nur Aydemir** ve eşi **H. Bilal Aydemir**'e,

Tez çalışmamız boyunca bizden emeklerini esirgemeyen başta **Meral Şahin** olmak üzere tüm Cumhuriyet Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi personellerine,

Hayatımın her anında iyisiyle ve kötüsüyle benimle olan ve bu yolda bana destek olan candan öte kardeşlerim; **Eren Aydın, Emre Güler, Utku Önder, Berkcan Önder, Kemal Yıldız, Çağan Ekerer, Onur Aydoğan, Emre Aydın ve Ömer Çaygöze**'e,

Hayatımın her safhasında hep anlayışla davranıp, bu zaman zarfı boyunca anlayış kavramının aslında ne kadar önemli olduğunu bana gösterdikleri için, bana her konuda seçme hakkı tanıyıp kararlarımın saygı duydukları ve sonuna kadar bana güvendikleri için **canım ailem**'e...

Teşekkür ederim.

Ozan Önder

SİVAS, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR/SİMGELER	xiii
TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Uterus Yapısı ve Menstrual Siklus.....	4
2.2. Ratlarda Östrus Siklusu.....	8
2.3. Endometrial Anjiogenez.....	9
2.4. Pre-implantasyon Embriyo Gelişimi.....	9
2.5. İmplantasyon.....	12
2.5.1. Embriyo İmplantasyonu İçin Gerekli Maternal Hormonal Ortam.....	13
2.6. Desidualizasyon	15
2.7. Plasantasyon.....	16
2.7.1. Farelerde ve İnsanlarda Plasental Gelişim.....	17
2.8. Wnt- β Katenin Sinyal Yolağı.....	19
2.8.1. Kanonikal Yolak.....	21
2.8.2. Wnt Sinyal Yolağı ve Anjiogenez.....	23
2.8.3. Menstrual Siklus ve Gebelik Sırasında Hormonal Düzenleme ve Wnt İlişkisi.....	24
2.8.4. Pre-implantasyon Döneminde Endometrial Luminal Epitel ve Bez Epitelindeki Değişiklikler.....	25
2.9. Anjiogenez	26
2.9.1. Menstrual Siklusta Anjiogenez.....	26
2.9.2. Endometrial Reseptivite ve Anjiogenez	28

2.9.3.	Angiopoietin-1	29
2.9.4.	Endotelin-1	29
2.9.5.	VE-Kadherin (Cdh5).....	31
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1.	Kullanılan Deneş Hayvanları ve Deneş Grupları	35
3.2.	Deneş Grupları.....	35
3.3.	Kullanılan Cihazlar.....	36
3.4.	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler:.....	36
3.5.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:.....	38
3.6.	Doku Preparasyonu	38
3.7.	Işık Mikroskopi	38
3.8.	İmmunofloresan Boyama Protokolü	38
3.9.	Semikantitatif Skorlama Yöntemi:.....	39
3.10.	Real Time-PZR Uygulamaları	40
3.10.1.	Total RNA İzolasyonu	40
3.10.2.	cDNA Eldesi	41
3.10.3.	Primerler	42
3.10.4.	Standart PZR Uygulamaları.....	44
3.10.5.	Real-Time PZR	44
4.	BULGULAR	48
4.1.	Grup-1 Bulguları	48
4.1.1.	Proöstrus Evresi	48
4.1.2.	Östrus Evresi.....	57
4.1.3.	Metaöstrus Evresi	64
4.1.3.	Diöstrus Evresi.....	73
4.2.	Grup-2 Bulguları	81

4.2.1. Gebelik Işıık Mikroskop ve İmmünfloresan Bulguları.....	81
4.3. Real-Time PZR Uygulamaları	112
5. TARTIŞMA.....	118
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	140
7. KAYNAKLAR.....	142
8. EKLER.....	164
ÖZGEÇMİŞ	165



KISALTMALAR/SİMGELER

Dvl/Dsh	Dishevelled proteini
Fzd	Frizzled proteinleri
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
LRP	Lipoprotein-reseptör ilişkili protein
TCF	T hücre faktörü
HOX	Homeobox proteinleri
ECM	Ekstraselüler matriks
ESAMA	Endotelial hücre seçici adezyon molekülü A
EGA	Embriyonik genom aktivasyonu
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
FSH	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinizan hormon
TE	Trofoektoderm
ICM	İç hücre kitlesi
PE	Primitif endoderm
EGA	Embriyonik genom aktivasyonu
DKK	Dickkopf proteinleri
hCG	İnsan koryonik gonadotropin hormonu
TD	Trilaminar disk
RM	Reichert membranı
GTC	Dev trofoblast hücreleri

EPC	Ektoplasental koni
APC	Adenomatöz polipozis koli
Axin	Axis inhibisyon proteini
LEF	Lenfoid artırıcı bağlanma faktörü
CK1α	Kazein kinaz 1 α
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
DES	Dietil Besterol
PRL	Prolaktin hormonu
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör ile aktifleştirilmiş reseptör γ

TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan uterusu	5
Şekil 2.2. İnsanda menstrual döngü	7
Şekil 2.3. Farelerde plasental gelişimi.....	19
Şekil 2.4 Kanonikal Wnt/ β katenin sinyal yolağının Şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.5. Hücre içi proteinler ile VE-kadherin etkileşiminin Şematik gösterimi.....	34
Şekil 3.1. Real-Time PZR cevap eğrileri.....	45
Şekil 4.1. Proöstrus evresi vajinal sürüntü bulguları	48
Şekil 4.2. Proöstrus evresi H&E bulguları.....	49
Şekil 4.3. Proöstrus evresinde <i>Wnt3</i> immünolokalizasyonları	51
Şekil 4.4. Proöstrus evresinde <i>Wnt7a</i> immünolokalizasyonları	52
Şekil 4.5. Proöstrus evresinde β - <i>katenin</i> immünolokalizasyonları.....	53
Şekil 4.6. Proöstrus evresinde <i>ET-1</i> immünolokalizasyonları	54
Şekil 4.7. Proöstrus evresinde <i>Ang-1</i> immünolokalizasyonları	55
Şekil 4.8. Proöstrus evresinde <i>Cdh5</i> immünolokalizasyonları	56
Şekil 4.9. Östrus evresi vajinal sürüntü bulguları.....	57
Şekil 4.10. Östrus evresi H&E bulguları	57
Şekil 4.11. Östrus evresinde <i>Wnt3</i> immünolokalizasyonları	59
Şekil 4.12. Östrus evresinde <i>Wnt7a</i> immünolokalizasyonları	60
Şekil 4.13. Östrus evresinde β - <i>katenin</i> immünolokalizasyonları	61
Şekil 4.14. Östrus evresinde <i>ET-1</i> immünolokalizasyonları.....	62
Şekil 4.15. Östrus evresinde <i>Ang-1</i> immünolokalizasyonları.....	63
Şekil 4.16. Östrus evresinde <i>Cdh5</i> immünolokalizasyonları.....	64
Şekil 4.17. Metaöstrus evresi vajinal sürüntü bulguları.....	64

Şekil 4.18. Metaöstrus evresi H&E bulguları	65
Şekil 4.19. Metaöstrus evresinde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	67
Şekil 4.20. Metaöstrus evresinde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları.....	68
Şekil 4.21. Metaöstrus evresinde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları	69
Şekil 4.22. Metaöstrus evresinde <i>ET-1</i> immüno­lokalizasyonları	70
Şekil 4.23. Metaöstrus evresinde <i>Ang-1</i> immüno­lokalizasyonları	71
Şekil 4.24. Metaöstrus evresinde <i>Cdh5</i> immüno­lokalizasyonları.....	72
Şekil 4.25. Diöstrus evresi vajinal sürüntü bulguları.....	73
Şekil 4.26. Diöstrus evresi H&E bulguları	73
Şekil 4.27. Diöstrus evresinde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	75
Şekil 4.28. Diöstrus evresinde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları.....	76
Şekil 4.29. Diöstrus evresinde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları	77
Şekil 4.30. Diöstrus evresinde <i>ET-1</i> immüno­lokalizasyonları	78
Şekil 4.31. Diöstrus evresinde <i>Ang-1</i> immüno­lokalizasyonları.....	79
Şekil 4.32. Diöstrus evresinde <i>Cdh5</i> immüno­lokalizasyonları.....	80
Şekil 4.33. Gebeliğin 7,5. günündeki ışık mikroskop bulguları	82
Şekil 4.34. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları	85
Şekil 4.35. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları	86
Şekil 4.36. Gebeliğin 7,5. gününde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları.....	87
Şekil 4.37. Gebeliğin 7,5. gününde <i>ET-1</i> immüno­lokalizasyonları.....	88
Şekil 4.38. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Ang-1</i> immüno­lokalizasyonları	89
Şekil 4.39. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Cdh5</i> immüno­lokalizasyonları	90
Şekil 4.40. Gebeliğin 8,5. gününde ışık mikroskop bulguları	92
Şekil 4.41. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	96
Şekil 4.42. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları.....	97

Şekil 4.43. Gebeliğin 8,5. gününde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları.....	98
Şekil 4.44. Gebeliğin 8,5. gününde <i>ET-1</i> immüno­lokalizasyonları.....	99
Şekil 4.45. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Ang-1</i> immüno­lokalizasyonları.....	100
Şekil 4.46. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Cdh5</i> immüno­lokalizasyonları.....	101
Şekil 4.47. Gebeliğin 9,5. gününde ışık mikroskop bulguları.....	103
Şekil 4.48. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	106
Şekil 4.49. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları.....	107
Şekil 4.50. Gebeliğin 9,5. gününde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları.....	108
Şekil 4.51. Gebeliğin 9,5. gününde <i>ET-1</i> immüno­lokalizasyonları.....	109
Şekil 4.52. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Ang-1</i> immüno­lokalizasyonları.....	110
Şekil 4.53. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Cdh5</i> immüno­lokalizasyonları.....	111
Şekil 4.54. Gebelik günlerindeki <i>GAPDH</i> , <i>β-katenin</i> , <i>ET-1</i> ve <i>Wnt7a</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri.....	113
Şekil 4.55. Östrus siklusundaki <i>GAPDH</i> , <i>β-katenin</i> , <i>ET-1</i> ve <i>Wnt7a</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri.....	114
Şekil 4.56. Gebelik günlerindeki <i>GAPDH</i> , <i>Cdh5</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>Wnt3</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri.....	115
Şekil 4.57. Östrus siklusundaki <i>GAPDH</i> , <i>Cdh5</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>Wnt3</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri.....	116
Tablo 3.1. Real-Time PZR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları.....	43
Tablo 4.1. Proöstrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , <i>β-katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> immüno­lokalizasyonları.....	49
Tablo 4.2. Östrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , <i>β-katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> immüno­lokalizasyonları.....	58
Tablo 4.3. Metaöstrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , <i>β-katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> immüno­lokalizasyonları.....	65

Tablo 4.4. Diöstrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> immünolokalizasyonları.....	74
Tablo 4.5. Gebeliğin 7,5. günündeki <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> proteinlerinin immünolokalizasyonları.....	83
Tablo 4.6. Gebeliğin 8,5. günündeki <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> proteinlerinin immünolokalizasyonları.....	93
Tablo 4.7. Gebeliğin 9,5. günündeki <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> proteinlerinin immünolokalizasyonları.....	104
Tablo 4.8. <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>ET-1</i> , <i>Ang-1</i> ve <i>VE-kadherin</i> proteinlerinin östrus siklusu ve gebelik günlerine ait <i>Ct</i> değerleri.....	112

1. GİRİŞ

Memelilerde implantasyon, blastosist aşamasındaki embriyo ile reseptif endometrium arasındaki diyalog sonucu meydana gelen en karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Bu süreçte, blastosist tarafından uterinal dokuda birçok genin ekspresyonu indüklenir. Sonrasında blastosiste komşu epitel ile adezyonu sağlayan yeni moleküller açığa çıkar. Endometrial stroma hücreleri epiteloid karakterli desidua hücrelerine farklılaşırken ekstraselüler matriks kompozisyonu da tamamen değişir (Kaloğlu vd., 2003).

Endometrial stromal hücreler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, Wnt proteinlerinin ekspresyon düzeyleri desidualizasyon süresince artış göstermektedir. Desidualizasyon süresince aktif hale gelen Wnt/ β katenin sinyal yolunun, endometrial stromal hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunu stimüle ettiği düşünülmektedir (Rider vd., 2006; Herington vd., 2007).

Wnt proteinleri, fonksiyonlarını plazma membranında yerleşmiş özel reseptörler üzerinden intraselüler kanonikal ve non-kanonikal olmak üzere iki esas haberleşme yoluyla aracılığıyla gerçekleştirirler. Kanonikal Wnt'ler, hücre membranında Frizzled reseptör ailesi ve düşük yoğunluklu lipoprotein-ilişkili proteinden (LRP/5-6) oluşan reseptör kompleksini kullanırlar (Goodwin ve D'Amore, 2002). β -katenin olarak da bilinen kanonikal Wnt yolağının, programlı hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarını, hücre farklılaşmasını ve hücrenin son durumunu gelişim ve neoplazinin başlama ve devamındaki programlanmış olayları da düzenlediği bilinir (Croxatto vd., 1978; Lessey ve Lovely, 2000). Wnt sinyalinin aktivasyonu, embriyonik gelişim sırasında beyin mikrovaskülaritesinde ve damarların birçok türünde gözlenmiştir.

Wnt- β katenin sinyal yolağı, deneysel olarak bloke edildiğinde bu sinyal yolağının engellenmesi sürecine müdahale olarak implantasyon bölgesinde kritik bir fonksiyon üstlenmektedir (Mohamed vd., 2005). Yapılan son çalışmalarda, implantasyon esnasında embriyo-uterus haberleşmesinde daha önceden tanımlanmış birçok moleküle ek olarak Wnt'lerin de potansiyel bir araç oldukları ileri sürülmüştür (Lessey ve Lovely, 2000). Birkaç Wnt proteinleri (Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7a) erişkin uterusu yüksek seviyede eksprese edilirler (Hayashi vd., 2011; Li vd., 2013; Wang vd., 2013). Erişkin fare uterusunda Wnt4'ün yoksunluğu uterus luminal epitelinde hipertrofiye ve implantasyon başarısızlığına yol açar (Franco vd., 2011). Erişkin fare uterusunda Wnt5a'nın inaktivasyonu, fertilizasyon başarısızlığına yol açar (Cha vd., 2014). Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, desidualizasyonun normal gebelik ve desidualizasyon olayları için uygun miktarda Wnt5a'ya gereksinim duyduğu ileri sürülmektedir (Wang vd., 2013).

Yapılan çalışmalar, organa özgü endotelial hücre farklılaşmasında ve embriyodaki vasküler morfogenezde Wnt sisteminin önemli rolünün olduğunu belirtmektedir (Matsumura vd., 1997; Bach vd., 1998; Dejana vd., 2009).

Anjiogenez, iskemik dolaşım hastalığı ve karsinogenez gibi çeşitli patofizyolojik durumlar dışında vasküler gelişim ve yara iyileşmesinde de anahtar bir rol üstlenmektedir. Üreme siklusu ve gebelik sırasında over ve uterusunda mevcut vasküler yataktan yeni kan damarları gelişimi gerçekleşmektedir. Normal bir implantasyon, desidualizasyon ve plasantasyon sürecinde vasküler permeabilitede artış ve neovaskülarizasyon görülür. Bu süreçlerde östrojen ve progesteron hormonlarının potansiyel etkileri söz konusudur. Vasküler permeabilite ve anjiogenezin düzenlenmesi; anjiogenik faktörleri, vazoaaktif faktörleri ve hormonları, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve VEGF reseptörlerini, insülin-benzeri büyüme faktörlerini (IGF), angiopoietinleri, fibroblast büyüme faktörlerini, TGF- β ve hCG'yi içerir (van Gijn vd., 2002; Franco vd., 2009).

Kemirgenlerde implantasyonun başlamasının dikkat çekici ilk işareti blastosistin bağlanacağı alanda anjiogenez ve endometrial vasküler permeabilitedeki artıştır (Matsumoto vd., 2006; Wang vd., 2006). İmplantasyon sürecinde aktif olarak anjiogenez gerçekleşmektedir ve muhtelemen VEGF aracılık etmektedir. Angiopoietinler ise VEGF ve prostaglandinler ile ilişkili sinyal yolları ile etkileşim halindedir (Paria vd., 1993; Tranguch vd., 2005; Franco vd., 2009).

Anjiogenez'de VE-kadherin uygulamasının ilk kanıtları, *in vitro* anjiogenez çalışmalarında fonksiyon-engelleyici antikolar kullanılarak türetilmiştir (Longjiang vd., 2001; Torry vd., 2007). Embriyolar ve vitellus kesesindeki VE-kadherin yeterizliğinde vaskülarizasyon süreci anjiogenik filizlenme işareti olmadan çok ilkel bir aşamada bloke edilir (Gory-Faure vd., 1999). VE-kadherin aktivitesi, erişkinlerde vasküler proliferasyon için gereklidir. β -katenin hücre-hücre adezyon bağlantılarında kadherinlere (Endotelial hücrelerde VE-kadherin ve N-kadherin) bağlanır ve hücre iskeleti ile olan etkileşimini stabilize eder. Bu yolla, β -katenin hücre-hücre adezyonu ve doku bütünlüğünü stabilize etmeyi sağlar (Meng ve Takeichi, 2009; Stepniak vd., 2009).

Endotelin-1, endotelinlerin büyük ailesinin bir üyesi olan 21 amino asitten oluşmuş bir peptittir. Ailenin 3 üyesi de (Endotelin-1, -2, -3) çok çeşitli dokularda üretilmektedir ve vazomotor düzenleyicilerdir (Knowles vd., 2005).

Endothelin-1, endotel ve perivasküler hücreler üzerinde doğrudan anjiogenik etkilere sahiptir. Aynı zamanda hipoksi indüklenebilir faktör vasıtasıyla güçlü bir proanjiogenik maddedir. Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) artması yoluyla dolaylı bir etkiye sahiptir.

Angiopietin-1 (Ang-1) geni angiopietin ailesine ait salgılanan bir glikoproteini kodlar. Bu ailenin üyeleri vasküler gelişim ve anjiogenezde önemli roller oynamaktadır. Bütün angiopietinler benzer affinite ile tirozin protein kinaz reseptörüne bağlanır. Bu gen tarafından kodlanan protein, tirozin fosforilasyonunu indükleyen reseptörü aktive eden bir glikoproteindir. Endotel ve çevresindeki matrix ve mezenşim arasındaki karşılıklı etkileşime aracılık etmekte kritik rol oynar ve endotel geçirgenliğini engeller. Bu protein ayrıca kan damarlarının olgunlaşmasına ve stabilitesine katkıda bulunur ve kalbin erken gelişimine katılabilir.

Bu çalışmada, peri-implantasyon sıçan embriyosunda Wnt- β katenin sinyal yolağı aracılığıyla Ang-1, VE-kadherin ve Endotelin-1'in immünofloresan yöntemi ile immüno lokalizasyonları belirlenerek anjiogenezdeki etkilerinin araştırılması ayrıca uterus endometriumu küretaj yolu ile kazınarak alınan parçalardan bu proteinlerin mRNA ekspresyonları Real-Time PZR ile incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus Yapısı ve Menstrual Siklus

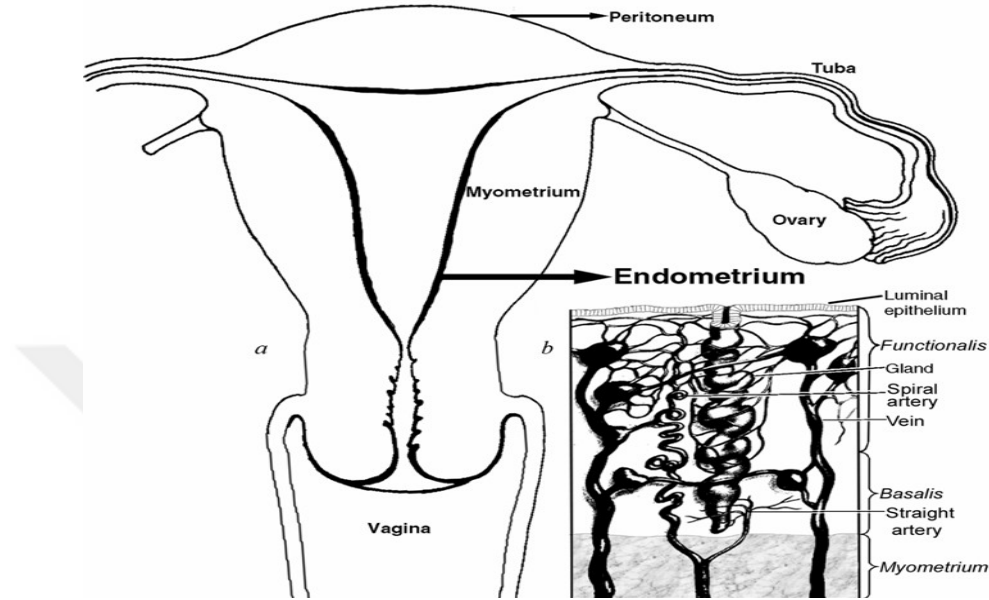
Uterus dıştan içe doğru sırasıyla peritona bitişik olan perimetrium, çok sayıda damar ile düz kaslardan oluşan miyometrium ve en içte endometrium tabakasından oluşur (Şekil 2.1). Endometrial stroma, bezler ve damarlardan oluşur (Stevens ve Lowe, 1992). Endometrium ise arterler, venler ve lenfatik damarları içeren çok zengin vasküler bir ağaca sahiptir (Blackwell ve Fraser, 1981).

Endometriuma giden kan akımı, aralıklarla doğrudan içeriye giren radyal dallar veren arkuat arterlerden gelir. Radyal arterler, endometriuma girmeden önce terminal dalları düz ve spiral arterioller olmak üzere iki ayrı arteriyole (küçük arter) ayrılır. Bunlardan, kısa olan düz arterioller, endometriumun sadece bazal tabakasını beslemekte ve terminal gövdesinin az çok yatay kollarında sona ermektedir. Bu arterioller siklik hormonal değişikliklerden etkilenmez, böylece sürekli olarak sirkülasyon sağlarlar ve sağladıkları alan menstruasyonda yer almaz. Sürekli olarak beslenen bazal tabaka, tüm epitel tabakasının yeniden ortaya çıktığı bez kalıntılarını, ara dönem boyunca meydana getirir.

Diğer taraftan spiral arterioller, endometriumun yüzeyine ulaşır ve normal döngü boyunca hormonal uyarılara yanıt olarak belirgin değişiklikler gösterir. Dalları, salgı bezlerine ve stromaya ulaşır. Stromada yer alan yapılar proliferasyona uğradığında, spiral arterioller proliferatif fazda kayda değer uzamaya maruz kalırlar. Spiral arteriollerin büyüme hızının, arteriollerin kıvrılmasına katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Östrojen üretiminin ilk preovulatuvar pikiyle başlayan interstisyel ödem sıvısının eşzamanlı birikimi olmasaydı bu sarmal yapılar daha da belirgin olurdu.

Döllenmiş, implantasyona hazır bir blastosistin yokluğunda, korpus luteum, döngünün bitiminden birkaç gün önce dejenere olmaya başlar. Bu duruma, östrojen ve progesteronun dolaşımdaki konsantrasyonların da bir azalma ve ardından sürece interstisyel sıvının emilmesi eşlik eder. Endometrium küçülür, daha yoğun hale gelirken spiral arterleri eğilmeye zorlar. Azalan bir dolaşım, hatta durağanlık durumu ortaya çıkar. Menstrual kanamanın başlangıcından 4 ilâ 24 saat önce, Endotelinin (ET) dahil olabileceği (Marsh vd., 1996) yoğun vazokonstriksiyon ortaya çıkar (Markee, 1940). Vazokonstriksiyon, önceki eğilme ile birlikte, ciddi iskemiye ve bu

nedenle endometriumun yüzeysel kısımlarının nekrozuna yol açar. Endometrial stromal hücrelerin, progesteron konsantrasyonundaki hızlı düşüşün bir sonucu olarak kaybına inanılmaktadır (Irwin vd., 1991).



Şekil 2.1. İnsan uterusu; boşluğa bakan kısımda yer alan endometrium (a), her ikisinin de kan damarları içerdiği bir bazal ve fonksiyonel tabakadan oluşur (b).

Endometrium sürekli olarak yenilenmekte ve steroid hormonlar tarafından etkilenmektedir, bu durum menstrual döngü sırasında her zaman değişiklik gösterir. Menstrual döngü üç aşamadan oluşur: (i) östrojen hormonu etkisi altındaki proliferasyon fazı; (ii) progesteronun etkisi altındaki sekretuar faz; (iii) korpus luteum kaybının bir sonucu olarak progesteron hormonunun azalmasının etkisi altında bilinen menstruasyon fazı. Menstrual döngüye yanıt olarak ortaya çıkan bu değişikliklerin tümü endometriumda morfolojik değişikliklere neden olur (Noyes vd., 1950).

Araştırmalar, anjiyogenezin endometriumda embriyonun implantasyonu için uygun bir ortam yaratabileceğini ve başarılı implantasyon için bir ön koşul olduğunu göstermektedir. Vasküler gelişim ve endometrium arasındaki koordinasyon, embriyo yüzeyi ve maternal yüzey arasındaki iletişime bağlıdır (Snijders vd.,1992) .

Endometrium iki tabakadan oluşur ve steroidal hormonlar için hedef bir dokudur. Yüzey tabakası, menstrual döngü boyunca dökülen ve tekrar proliferatif fazda bazal tabaka tarafından tamir edilen fonksiyonel bir tabakadır. Proliferatif faz genellikle

östrojenin etkisi altındadır ancak menstruasyonun ikinci yarısı progesteronun etkisi altındadır ve erken/orta/geç sekretuvar fazın oluşumundan sorumludur (Şekil 2.2).

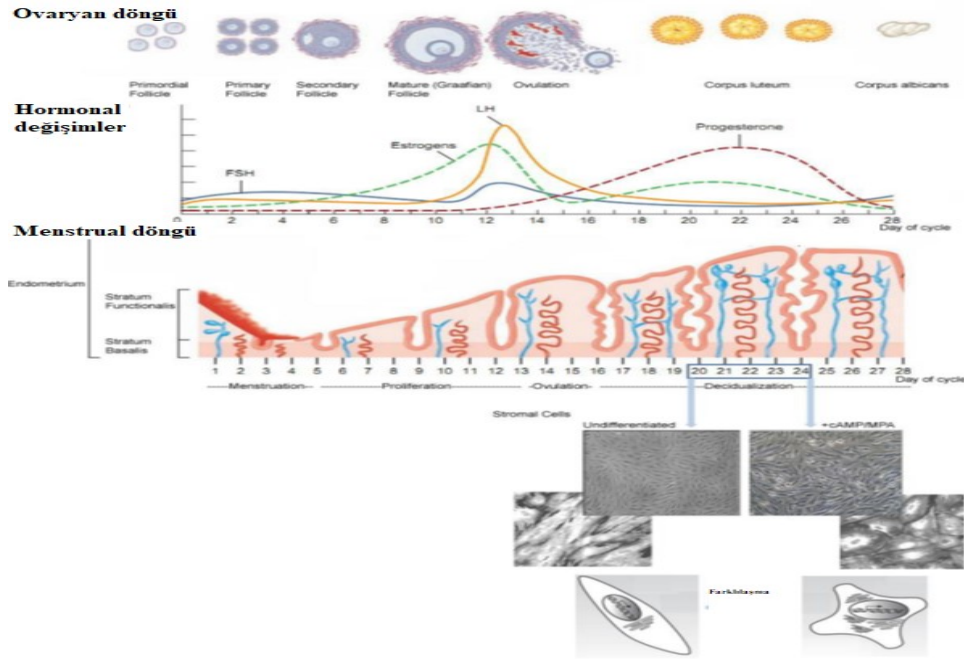
Dişiler, yumurtalık steroid hormonu seviyelerinin dalgalanması sonucu endometriumda meydana gelen döngüsel modifikasyonlar nedeniyle üreme özelliği kazanırlar. Bu değişiklikler, menstrual döngüyü oluşturan proliferasyon, farklılaşma, enflamasyon, apopitoz ve rejenerasyonun farklı aşamalarına neden olur.

Proliferatif faz, 28 günlük bir döngünün 5-13 günlerini kapsar ve ovaryum folikülünde bulunan granüloza hücrelerinin östrojen üretiminin artması nedeniyle endometrial epitelin 1-2 ilâ 7-8 mm kalınlaşmasına neden olur. Kalınlaşma, spiral arterlerin uzaması ve sırasıyla endotel ve epitel hücrelerinin çoğalmasıyla dar uterus bezlerinin oluşumu ile birlikte ortaya çıkan endometrial stromal hücre bölmesinin mitotik proliferasyonundan kaynaklanmaktadır (Gray vd., 2001; Brosens vd., 2002).

Sekretuvar fazı, artmış serum östrojen düzeyleri, bir progesteron üretimini teşvik etmek için korpus luteum üzerinde etkili olan bir luteinizan hormon (LH) artışı meydana getirdiğinde başlatılır. Progesterondaki bu ovulasyon sonrası yükselme, proliferatif süreci durdurur ve oldukça koordineli bir farklılaşma sürecini başlatır. Sekretuvar evre, bu yeni kalınlaşmış endometrial epiteli, geniş morfolojik ve fizyolojik değişimler yoluyla embriyo implantasyonu ve gelişimini destekleyebilen reseptif bir fenotip ile donatır. Spiral arterler oldukça sarmal hale gelirken, rahim bezleri genişler, sarılır ve glikojen bakımından zengin bir salgıya yol açar. Lokal ödem bölgeleri stromal tabaka içinde meydana gelir, hücre dışı matriks önemli ölçüde yeniden şekillenir ve uterin doğal öldürücü hücreler (uNK) olarak adlandırılan özelleşmiş doğal bağışıklık hücrelerinin bir akışı vardır (Gellersen ve Brosens, 2003; Hanna vd., 2006; Gellersen ve Brosens, 2014). Varsayılan implantasyon penceresinin kapanması ile aynı zamana denk gelen döngünün 23. günü, stromal fibroblastlar özelleşmiş desidual hücrelere dönüşür. Trofoblast türevli insan koryonik gonadotropin (hCG) varlığında implante bir embriyo korpus luteumu korur ve bu destekleyici ortamın sürdürülmesine izin veren progesteron üretimini sürdürür. Embriyo yokluğunda korpus luteum dejenere olur ve proteolitik bozulma ve menstrual kanama ile sonuçlanan bir olaylar zincirini başlatan progesteron seviyelerinin düşmesine neden olur.

Menstruasyon, adet öncesi tüm hücre popülasyonunun %40'ını oluşturan endometrial kompartımandaki yüksek lökositlerin vurguladığı enflamatuvar bir yanıtı taklit eder (Salamonsen vd., 2002). Lökositler, pro-enflamatuvar sitokinlerin salınmasına yardımcı olurken matriks metalloproteinazlar (MMP), hücre dışı matriksin (ECM) bozulmasına neden olur. Lokal prostaglandinler, iskemiye yol açan spiral arterlerin ani daralmasına ve yüzeysel endometrial desidual hücrelerin dökülmesine neden olur.

Menstruasyon, hamilelik yokluğunda implantasyon için bir endometrial onarım döngüsünü yeniden başlatma işlemi olarak görülür. Menstruasyonun neden evrimsel olarak avantajlı olacağı konusunda çeşitli teoriler olmuştur. Menstruasyonun sürekli reseptif bir endometriumu desteklemenin metabolik basınçlarını hafiflettiği veya uygun olmayan bir konsepte gereksiz maternal yatırım yapılmasını önlediği olabilir (Teklenburg vd., 2010a). Uterus ön hazırlanmanın teorisi, endometriumun ve bunun vaskülatürünün döngüsel dökülmesi ve yenilenmesi ile ilişkili tekrarlanan enflamasyon ve oksidatif stres olaylarına maruz kalmanın endometriumun plasentasyon için hazırlanmasına ve hiper enflamasyona karşı korunmasına hizmet ettiğini göstermektedir (Brosens vd., 2009).



Şekil 2.2. İnsanda menstrual döngü

2.2. Ratlarda östrus siklusu

Üreme döngüsünün aşaması, kısa bir östrus döngüsüne sahip olan sıçan gibi bir türdeki yumurtalık foliküllerinin görünümüne bakarak kolayca belirlenemez. Neredeyse tüm gelişim evrelerinde foliküller genellikle döngünün tüm aşamalarında yumurtalıklar içinde bulunur. Ancak korpus luteumun oluşumu, ilerlemesi ve gerilemesi biraz senkronizedir ve bir yardımcı olarak kullanılabilir (Yuan ve Foley, 2002). Her bir korpus luteum 12 ilâ 14 gün boyunca morfolojik olarak devam ettiğinden, üç veya daha fazla korpus luteumun, önceki ovaryan döngülerinden ayrı bir yumurtalıkta mevcut olabileceği not edilmelidir (Long ve Evans, 1922; Yuan ve Foley, 2002). Bu nedenle, korpus luteum morfolojisinin, östrus siklusu için doğru bir araç olarak kullanılması kafa karıştırıcı olabilir. Ancak, kesin olmasa da, korpus luteumların belirli morfolojilerinin varlığı evrelemeyi desteklemek için kullanılabilir.

Proöstrus aşamasında uterin endometrial epitelin boyu artarak prizmatik bir hal alır. Mitotik figürler evre sonunda kaybolmasına rağmen, çok az enflamatuar hücre infiltrasyonu, luminal epitel ve bezlerin epitelyal dejenerasyonların çok az ya da hiç olmadığı sık mitoz olayı vardır. Endometrial damarlama daha belirgin hale gelir ve stroma ödem gösterebilir, lümen genellikle evrenin sonuna doğru belirgin şekilde dilate olur. Endometrial proliferasyonun olduğu bu evrede LH ve östradiol seviyesi en yüksek seviyeye ulaşır.

Östrus evresinde endometrial epiteldeki değişiklikler östrusun başlangıcını tanımlamaktadır, ilk önce bezlerde hücrel dejenerasyon/nekrozun ortaya çıkması, ardından oldukça belirgin hale gelen luminal epitel ortaya çıkmaktadır. Buna mitotik aktivite kaybı ve lökosit infiltrasyonu eşlik eder. Luminal dilatasyon geç östrusta kalabilir, ancak genellikle bu durum bu şekilde olmaz. Bazı endometrial epitelyal mitotik aktivite östrusun sonuna kadar devam eder. Ovulasyonun olduğu bu evrede LH hormonu seviyesi en üst düzeye ulaşmıştır.

Metaöstrus sırasında, uterus endometrial epitelinde devam eden vakuolar dejenerasyonu ve aynı zamanda belirgin bir mitotik aktivite dönüşü gösterir, bu yüzden ikisi de birlikte görülür. Ayrıca değişken bir lökosit infiltrasyonu vardır. Bu evrede östradiol ve progesteron düzeyleri düşmüştür.

Diöstrusun başlangıcında uterus küçük ve inaktiftir ve boynuzlarda belirgin bir damarlanma yoktur ve genellikle yarık benzeri lümen görülür. Bunlar ara sıra dejenere hücreleri gösteren düşük kübik veya prizmatik epitel ile kaplıdır. Aşama başlangıcında az sayıda mitoz vardır ve bezler özellikle inaktiftir, ancak fazın ilerlemesi sırasında aktivitede bir miktar artış vardır. Ayrıca, fazın sonuna doğru, endometrial epitele bitişik stromada hafif bir ödem görülebilir. Bu evrenin erken dönemlerinde östradiol salınımı düşüktür geç diöstrus evresine doğru gidildikçe kademeli olarak östradiol seviyesinde bir artış görülür.

2.3. Endometrial Anjiogenez

Endometrial kan damarlarının onarımı ve yeni bir endometrial damar ağının kurulması, menstrual döngü sırasında kritik olaylardır. Menstruasyondan sonra yırtılmış damarlar ve bezler, parçalanmış stromal bileşenlerle çevrili künt uçlarını bırakır. Anjiyogenik aktivite, kan kaybını en aza indirmek ve endometrial fonksiyonu yeniden oluşturmak için, menstrasyon sırasında ve hemen sonrasında oldukça yoğundur. Çoğu çalışma, menstrual döngü sırasında değişen bir endometrial anjiyogenez yoğunluğunu göstermiştir (Gargett ve Rogers, 2001). Bulgular menstrasyon döngüsü sırasında üç farklı anjiyogenik aktivite pikinin olduğunu, menstrasyonda vasküler onarım sırasında birinci pik, proliferatif faz sırasında ikincisi ve spiral arteriollerin önemli büyüme ve kıvrılmasının sergilendiği erken sekretuar fazda üçüncü pikin olduğunu göstermiştir (Gargett vd., 1999). Buna rağmen, proliferatif endotel hücrelerinin sayısı açısından değerlendirilen anjiyogenik aktivite, endometriyal anjiyogenezin menstrual döngü sırasında oldukça sabit olduğunu göstermektedir (Rogers vd., 1993).

2.4. Pre-implantasyon Embriyo Gelişimi

Memeliler, çoğunlukla fare embriyolarının çalışmaları, erken embriyo gelişimine ilişkin temel görüşler sağlamıştır (Wang ve Dey, 2006). Ancak türe özgü farklılıklar, bu bulguların insanlarda implantasyon öncesi embriyo gelişimi hakkındaki anlayışımızla sınırlı olduğu anlamına gelir. Yardımcı üreme teknolojilerinin özellikle doğurganlık problemlerini tedavi etmek için, insanda implantasyon ve embriyo gelişimi konusundaki bilgilerimizin temelini oluşturmuştur. Fertilizasyon sırasında oosit ve spermin füzyonunu, pronukleusların göçü ve singamisi izler. Bağlı

transkripsiyonel durgunluk, implantasyon öncesi embriyo gelişiminin ilk aşamasını karakterize eder, burada genetik ve epigenetik modifikasyonlar ve bir dizi hücreyel bölünme, tamamen maternal olarak kalıtsal materyale bağlıdır. Bu faz, insanlarda 1000'den fazla maternal transkriptin down-regülasyonunu ve bozulmasını içerir ve nihayet büyük bir embriyonik genom aktivasyon dalgası (EGA) ile sona erer. EGA aktivasyonunun zamanlaması farelerde 2-hücre aşaması, domuzlarda 4 hücreli aşama ve koyunlarda 8 hücreli aşamadan önce değişkenlik göstermektedir (Braude vd., 1988; Crosby vd., 1988). 8 hücreli evrenin ötesinde, insan embriyoları kompaksiyona maruz kalır, bu sayede morulaya ait dış hücreler sıkışma ve boşluk kavşaklarıyla sıkı bir şekilde bağlanır. Bu, kesintiye uğramış radyal simetrimin ilk göstergesidir ve bu noktadan sonra morfolojik kontrol noktaları, hücre numarasının aksine embriyo gelişim zamanlamasının bir fonksiyonu haline gelir. Blastosist gelişimi, sonraki hücre bölünmeleri ve bir blastösol boşluğunun oluşumuyla karakterize, böylece; sıvı dolu blastösöl boşluğunu çevreleyen ayrı bir iç hücre kitlesi (ICM) ve dış trofoektoderm (TE) katmanı ile karakterizedir. İmplantasyondan önce ICM, fetüsü oluşturacak olan erken epiblast ve vitellus kesesini oluşturan ekstraembriyonik endoderm hücrelerine yol açacak olan ilkel endoderm olarak ayrılır. İnsan implantasyon öncesi gelişimi büyük ölçüde embriyonun tuba uterina boyunca uterus boşluğuna doğru geçişi sırasında meydana gelir. Embriyoların blastosist aşamasına ulaştığı zaman (5. gün), tuba uterinadan çıktığı ve endometriumla temas ettiği düşünülmektedir. 6. ve 7. günler arasındaki periyodik kasılmalar ve genişlemeler, blastosistin koruyucu glikoprotein kabuğundan (zona pellusida) çıkmasına aracılık eder. Hatchinge uğramış blastosist ve implantasyonda endometriyumun başarılı bir şekilde adezyonu, insan embriyosunun daha sonraki hayatta kalması ve gelişmesi için gereklidir ve 8. gün civarında meydana geldiği düşünülmektedir.

İnsan ve fare embriyoları benzer şekilde, belirgin ICM ve TE ile bir blastosist oluşturmak üzere hücre bölünmelerine uğrarlar. İnsan ve farenin pre-implantasyon embriyolarının morfolojik benzerliğine rağmen, gelişim zamanları ve hücre sayıları açısından önemli farklılıklar vardır. Bir insan blastosisti, preimplantasyon embriyo gelişiminin 5. ve 6. günü arasında oluşur ve tipik olarak yaklaşık 256 hücre içerir. Buna karşılık, 3. ve 4. günlerde oluşan bir fare blastosistinin hücrelerinin, daha az hücre bölünmesi geçirdiği ve yaklaşık 164 hücre içerdiği düşünülmektedir (Niakan

vd., 2012). Bu gecikmiş embriyo gelişimi, EGA'nın zamanlamasında bir gecikme, kompaksiyon ve blastosist oluşumunu içerir. Türler özgü farklılıklar, implantasyon sonrası dönemde ve trofoektoderm hücre kaderlerinin ve invaziv kapasitenin benzer şekilde farklı olduğu implantasyon sürecine kadar uzanır. Her iki türde de ICM, epiblast (Epi) ve ilkel endoderm (PE) katmanlarına farklılaşırken, TE plasenta'nın trofoblast popülasyonunu oluşturur. Epiblast fetüsün tüm dokularını oluştururken, PE vitellus kesesini oluşturan ekstraembriyonik endodermi oluşturur. İnsanlarda, trofoektoderm hücreleri, çok çekirdekli sinsityotrofoblast hücrelerin çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olan plasental sitotrofoblast hücreleri ve desidualize endometrial hücrelere invaze olan ekstravillous trofoblastları oluşturur (Norwitz vd., 2001, Moffett ve Loke, 2006). Farelerde, insanlarda görülen erken invazyondan farklı olarak, TE hücreleri, bir endo-reduplikasyon işlemi yoluyla poliploid dev trofoblast hücrelerine tomurcuklanan, ekstraembriyonik ektoderm hücrelerinin proliferatif bir kök hücre havuzu üretir (Simmons vd., 2007). İnsan ve fare embriyoları arasında gözlenen gelişimsel farklılıklar, benzersiz gen ekspresyon paternleri (Dobson vd., 2004; Wang vd., 2004; Zeng ve Schultz, 2005; Bell vd., 2008), epigenetik modifikasyonlar (Beaujean vd., 2004; Fulka vd., 2004), genetik instabiliteye yatkınlık (Vanneste vd., 2009; Vanneste vd., 2011) ve insanlarda uzun süreli transkripsiyonel sessizlik süresi (Braude vd., 1988; Flach vd., 1982) içeren temel moleküler tutarsızlıklar ile açıklanabilir.

İmplantasyon türler arasında belirgin farklılık gösterir. Yapılan çalışmalarda hayvan modellerinde 'invazyon' aşamasındaki embriyonik trofoblast ile endometrial luminal epitel ve stromal hücreler arasındaki fiziksel etkileşimlerin karşılaştırılmasında bu süreç önemli yer tutar. İnsan implantasyonu için kullanılan birincil hayvan fare modelidir. Yaklaşık 10 embriyo tek bir implantasyon olayı içine implante edilir. Bu durum, maternal olarak kontrol edilen embriyonik duraklama sürecini gerektirir; böylece embriyo gelişiminin askıya alınması implantasyonu geciktirir (Lopes vd., 2004). Böylece, implantasyon için endometrial hazırlığa göre embriyo gelişiminin koordinasyonu sağlanır. Çoklu embriyoların implantasyonu uterus ödemi ve lümen kapanmasına neden olurken, uterin boynuz boyunca benzersiz embriyo aralığı mekanizmaları gerçekleşir (Wang ve Dey, 2006). Buna karşılık, insan implantasyonu genellikle, gelişimi üzerinde bilinen bir maternal kontrole sahip olmayan tek ve

oldukça invaziv bir embriyo kabulünü içerir. İnsanlarda tamamen uterin kapanma özelliği yoktur ve embriyo, uterus boşluğu içerisinde farklı bir apozisyon süreci gerektiren “serbest yüzer bir cisim” olarak tanımlanmıştır (Genbacev vd., 2003). Plasentasyon ve gebeliğin türler arası çeşitliliği de evrimsel bir farklılık göstermektedir. Bu durum, insan maternal-embriyo arayüzünde sıkı bir embriyo seçimi için rol sunmaktadır.

2.5. İmplantasyon

Blastosist, implantasyonu başlatmak için ilk olarak maternal endometrium ile fiziksel ve fizyolojik etkileşime katılır (Red-Horse vd., 2004; Wang ve Dey, 2006). Normal implantasyon için ve gebeliğin başarısı için iki yönlü bir etkileşim gereklidir, çünkü bu düzenin bozulması, gebelikte potansiyel kayıp ile birlikte desidualizasyon ve plasentasyon da dahil olmak üzere sonraki gelişim süreçleri için olumsuz sonuçlar doğuracaktır. (Wilcox vd., 1999; Song vd., 2002; Ye vd., 2005; Chen vd., 2011). Klinik olarak kabul edilen gebelik öncesi peri-implantasyon periyodunda meydana gelen erken gebelik kaybı, insanlarda göreceli olarak yaygın bir olgudur (Norwitz vd., 2001; Cockburn ve Rossant, 2010). Örneğin, doğal bir süreçte bile, belirli bir menstrual döngüde gerçekleşen başarılı hamilelik şansı yaklaşık %30 ile sınırlıdır (Zinaman vd., 1996). Tüm konseptusların sadece %50-60'ı 20 haftalık gebeliğin ötesine geçmektedir (Norwitz vd., 2001). Gebelik kayıplarının %75'inin temel nedeni implantasyon başarısızlığıdır (Wilcox vd., 1988). Ayrıca, dünya çapında 7 çiftin 1'i infertilite sıkıntı yaşamaktadır (Forti ve Krausz, 1998). İnfertilitenin altında yatan birçok nedenin üstesinden gelen *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF-ET) teknolojisindeki önemli gelişmelere rağmen, gebelik başarı oranları, esas olarak implantasyon başarısızlığına bağlı olarak nispeten düşük kalmaktadır (Wilcox vd., 1993; Norwitz vd., 2001; Miller vd., 2012). Bu nedenle, embriyo implantasyonunun gizemlerini araştırarak bu küresel meseleyi ele almak zorunludur. Başarılı implantasyon, implantasyon yetkinliğinin blastosist tarafından alınması ile uterus endometriumunda reseptif bir durum arasında senkronizasyonu gerektirir (Dey vd., 2004; Tranguch vd., 2005b; Wang ve Dey, 2006). Bu iki olay, özellikle de ovaryan östrojen ve progesteron gibi maternal hormonlar tarafından hassas bir şekilde düzenlenir (Conneely vd., 2002; Curtis Hewitt vd., 2002). Moleküler ve genetik kanıtlar, ovaryan hormonlarının, sitokinler, büyüme faktörleri, homeobox

transkripsiyon faktörleri, lipid mediatörleri ve morfojen genleri dahil olmak üzere lokal olarak üretilen sinyalleme molekülleri ile birlikte, implantasyonun karmaşık sürecini belirlemek için otokrin, parakrin ve justakrin etkileşimleri yoluyla işlev gördüğünü göstermektedir (Dey vd., 2004). Bununla birlikte, erken gebelikte embriyo-uterin etkileşimlerini yöneten moleküler sinyal yollarının hiyerarşik yapısı araştırılmaya devam edilmektedir. Blastosist ve uterus arasındaki çapraz etkileşim sadece kısa bir süre boyunca, yani "implantasyon penceresi" olarak ortaya çıkabilir (Yoshinaga, 1980; Rogers ve Murphy, 1989; Paria vd., 1993; Ma ve vd., 2003). İmplant embriyoya yanıt olarak, uterin çevredeki stroma embriyonik büyümeyi ve invazyonu gerçekleştirmek için desidualizasyon olarak bilinen bir süreç olan hücresel transformasyona uğrar (Lim ve Wang, 2010). Lokal olarak indüklenen desidua, embriyonun hayatta kalmasını desteklemek için olumlu bir geri dönüşüm sağlar. Desiduanın ayrıca yarı allojenik embriyoya yanıt olarak maternal immün reaksiyona karşı bir bariyer işlevi gördüğü düşünülmektedir. Farelerde gen-susturma modelleri, implantasyonun geçici moleküler temelini oluşturmak için kullanılan değerli bilgiler sağlar. Embriyo implantasyonu, birçok sinyalleme molekülünü kesin olarak düzenlenmiş bir programa entegre eden dinamik bir gelişimsel süreç olduğu için, implantasyon başarısızlığını düzeltmek ve kadınlarda gebelik oranlarını iyileştirmek için yeni stratejiler üretmek üzere bu süreçleri yöneten yolların hiyerarşik mekanizmasını anlamak önemlidir.

2.5.1. Embriyo İmplantasyonu İçin Gerekli Maternal Hormonal Ortam

Erişkin memelilerin çoğunda implantasyon, ovulasyondan sonra belirli bir zaman aralığında gerçekleşir (Finn ve Martin, 1974). İnsanlarda bu, menstrual siklusun luteal fazı sırasında, kemirgenlerde ise östrus döngüsünün diöstrus fazındadır. Bu süreçte östrojen ve progesteronun başlıca hormonlar olduğu iyi bilinmektedir. Dinamik dalgalanma düzeylerine göre, üreme döngüsü üç aşamaya ayrılır (Finn ve Martin, 1974; Wang ve Dey, 2006). İlk aşama, östrojen düzeylerinin çok yüksek olduğu kadınlarda proöstrus veya foliküler fazdır (Yoshinaga vd., 1969; Michael, 1976). İkinci aşama, her iki hormon seviyesinin ovulasyondan hemen sonra düşük olduğu bir dönemdir. Son olarak, korpus luteumdan hem progesteron hem de östrojen hormonlarının salgılandığı luteal evredir. Embriyo implantasyonu luteal fazda gerçekleşir. Örneğin, embriyo implantasyonu 4. günün gece yarısında

gerçekleşirken, farelerde bu aşamada, gebeliğin 4. gününde (gün 1= vajinal tıkanma günü) bir preimplantasyon östrojen artışının eşlik ettiği yeni oluşan corpus luteumun gelişmiş bir sekresyonundan ötürü, progesteron seviyesi giderek artmaktadır. (McCormack ve Greenwald, 1974; Wang ve Dey, 2006). Preimplantasyonda ovaryum steroid profillerine dayanarak, dışardan östrojen ve progesteron verilerek, ovaryumları alınmış farelerin uterusu reseptif bir duruma getirilebilir (Lim vd., 1997; Paria vd., 1999b). Bu hormonlar farelerde ve sıçanlarda implantasyon için uterusun hazırlanmasını yönlendirir (Harper ve Walpole, 1967; Roblero vd., 1987; Vinijsanun ve Martin, 1990). Embriyo implantasyonu öncesi progesteron ve luteal fazda iki östrojen dalgalanmasının rolü hala tartışılırken, progesteronun neredeyse tüm implantasyon için gerekli olduğu kabul edilmektedir (Finn ve Martin, 1972; Dey vd., 2004; Tranguch vd., 2006; Wang ve Dey, 2006). Progesteronun tek başına implantasyona aracılık ettiği düşünülmüştür. Bununla birlikte, fareler ve sıçanlarda normal progesteron salgılanması ile isteğe bağlı geciken bir implantasyonun gözlenmesi, implantasyonda yer alan başka bir hormon olabileceğini de düşündürmektedir (Whitten, 1955; Mantalenakis ve Ketchel, 1966; Yoshinaga ve Adams, 1966; McLaren, 1968; Malafaya vd., 2008). Bu şüphe, küçük bir östrojen dozunun enjekte edilmesiyle emziren sıçanlarda indüklenebileceğine dair kanıtlarla desteklenmektedir (Krehbiel, 1941). Bu bulgular, preimplantasyon östrojen sekresyonunun, blastosist implantasyonu için progesteronla hazırlanan bir reseptif uterusu doğru çok önemli olduğunu göstermektedir.

Çoğu türde preovulatör fazda östrojen salgılanması nedeniyle, proöstrus östrojenin implantasyondan hemen sonraki yanıtı optimize ettiği düşünülmektedir (Barkley vd., 1979). Özellikle, implantasyonda yumurtalık östrojen gereksinimi türe özgüdür. Gine domuzu, rhesus maymunu, tavşan ve hamster gibi türlerde progesteron tek başına implantasyon için yeterlidir (Heap ve Deanesly, 1967; Kwun ve Emmens, 1974; Psychoyos, 1973, 1986). Bununla birlikte, bu türlerin implantasyonunda östrojenin katılımı tamamen gözardı edilmeyebilir. Bu türdeki blastosistlerin, implantasyonu başlatmak için lokal olarak östrojen sentezleyebildiği ve salgılayabileceği şeklinde bir hipotez önerilmiştir (Dey vd., 2004; Wang ve Dey, 2006). Bununla uyumlu olarak, hamster ve tavşanın blastosistinde östrojen sentezi için bir enzim olan aromataz bulunurken, bu enzim farelerde bulunmaz (Dickmann vd., 1975;

Hoversland vd., 1982a; Sengupta vd., 1983; Sholl vd., 1983; Reese vd., 2008). İmplantasyon sırasında blastosist-uterus bağlantısının, insanlarda veya primatlarda ovaryan östrojen gerektirip gerektirmediği belirsizdir. Orta-luteal östrojenin gebelik oluşumu için önemli olduğuna dair kanıtlar vardır (Rao vd., 2007). Son yıllarda, genetik olarak tasarlanmış fare modelleri, embriyo implantasyonu sırasında progesteron ve östrojenin rollerini anlamak için değerli ipuçları sağlamıştır.

İmplantasyon süreci üç temel adımdan oluşur: ilk adım apozisyon aşamasıdır. Bu adımın karakteristik özelliği pinopodların görülmesidir. Pinopodlar uterus epitelinin yüzeyinde bulunan küçük tümseklerdir (Sharkey ve Smith, 2003). Bir sonraki adım gezici blastosist ve reseptif endometrium arasındaki bağlantının başlangıcında olan adezyondur. Adezyon büyüme faktörleri ve hormonların lokal etkisi ile desteklenir (Tabibzadeh ve Babaknia, 1995) ve blastosistin bağlanmasına katılan endometrial hücrelerden oluşan luminal epitelyumdaki değişikliklerle ortaya çıkar (Fazleabas ve Strakova, 2002). İmplantasyonun üçüncü aşaması invazyondur. Bu süreç, embriyonun luminal epitele penetrasyonunu ve anneye endometrial stromadaki vasküler bağlantı ile sonuçlanmasını içerir. Bu faz sırasında endometrium ovaryal hormonların etkisi altında çok önemli değişiklikler geçirir (Oborna vd., 2004). İnsan endometrial reseptivitesi muhtemelen korpus luteumun dejenrasyonu ile sonuçlanır (Grahamm ve Lala, 1992; Clark, 1993).

2.6. Desidualizasyon

Desidualizasyon işlemi, endometriumun implante olan embriyoyu desteklemek için geçirmesi gereken kapsamlı yeniden şekillenme sürecini belirtir. Desidualizasyon süreci her şeyden önce uzun stromal fibroblastların yuvarlak, salgısal desidua hücrelerine morfolojik dönüşümü ile karakterize edilir. Bu işlem, *in vivo* olarak karakteristik desidual hücre morfolojisi geç luteal fazda daha belirgin hale gelmesine rağmen, endometrium ile geçici olarak bir reseptif fenotip elde etmekle çakışan döngünün orta luteal fazında başlatılır. “İmplantasyon penceresi” luteinizan hormonun (LH) yükselmesinden yaklaşık 6 gün sonra başlar ve 2-4 günden daha uzun sürmeyeceği düşünülür.

Desidualizasyon, östrojen hücrelerinin progesteronda post-ovulatuvar bir artışa duyarlı hale getirilmesi ve luteal fazda hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP)

seviyelerinin yükselmesiyle uyarılır. Bu yeniden modelleme işlemi, ilk olarak endometrium boyunca uzamadan önce terminal spiral arter bölgelerinde başlatılır ve spesifik immün hücreleri ile birlikte olur (Gellersen ve Brosens, 2003).

Sinyal yolağının karmaşık bir sistemi, transkripsiyon faktörleri ve çapraz etkileşim desidual reaksiyonun temelini oluşturmaktadır (Christian vd., 2002). Elde edilen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler dramatiktir ve prolaktin (PRL), insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1'in (IGFBP-1) salgılanmasını ve NODAL sinyal yolu inhibitörü LEFTY2, BMP2 (kemik morfogenetik protein 2) ve WNT4 (wingless tip MMTV entegrasyon bölgesi ailesi, üye 4) gibi birçok faktörü içerir (Gellersen ve Brosens, 2003; Gellersen vd., 2007; Gellersen ve Brosens, 2014).

2.7. Plasentasyon

Plasenta, memeli embriyosunun uterus ortamında hayatta kalmasını sağlayan hayati bir organdır. Fetal ve maternal ortamlar arasında bir arayüz görevi görür, anne ve bebek arasında gaz, besin ve atık ürünlerinin değişimi için gereklidir. Ek olarak, plasenta gebelikle ilişkili hormonların ve büyüme faktörlerinin önemli bir kaynağı olarak işlev görür ve fetüsün immün korunmasında rol oynar. Hem farelerde hem de insanlarda plasenta veya bileşenlerinin gelişimini etkileyen herhangi bir genetik veya çevresel travma plasental yetmezliği, fetal büyüme geriliği ve ölüme yol açabilir. Plasentadaki en önemli hücre tipleri, fetal ve maternal kan sistemlerini yakın temasa sokmak için gereken ana yapısal ve fonksiyonel bileşenleri sağlayan trofoblast soyunun hücreleridir. Embriyo ve maternal bileşenler maternal damar sistemi ve uterin desidual hücrelerinden kaynaklanır. Bu nedenle, plasental birimin bütünlüğü, embriyonik, trofoblast veya maternal komponentlerdeki kusurlardan etkilenebilir.

Temel olarak faredeki hedeflenen mutasyonların analizinden kaynaklanan plasenta gelişiminin genetik kontrolü konusundaki anlayışta önemli gelişmeler olmuştur. Birçok hedef mutasyonla ilişkili embriyo ölümünün plasenta kusurlarını içerdiği gösterilmiştir (Cross, 2000).

Bu, gen ailelerinin özellikle trofoblast-spesifik üyeleri olarak tanımlanan ve trofoblast gelişiminde rolleri olduğu tahmin edilen ve plasentada yer alması beklenmeyen, örneğin, nükleer hormon reseptörü, PPAR γ (peroksizom proliferatör

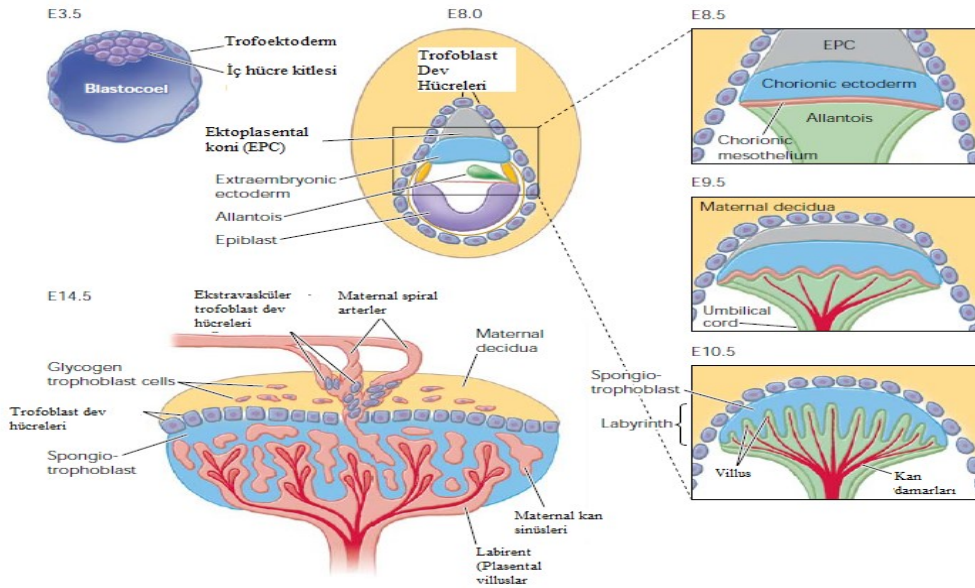
ile aktifleştirilen reseptör γ), birçok genin rol oynadığı tahmin edilen temel sarmal-döngü-sarmal (bHLH) genleri, Mash2 ve Hand1 gibi genleri içerir (Barak vd., 1999). Gelişim sırasında veya yetişkinlerde diğer hücre soylarında rol oynayan genler, genellikle plasenta gelişiminde de işlev görür.

Plasental gelişim için bir gene ihtiyaç duyulursa, hedeflenen mutant embriyo daha sonra fenotipler ortaya çıkmadan önce ölebilir. Bu, bir genin fetusta veya yetişkinlerde işlevini çalışmakla ilgilenen araştırmacılar için elverişsizdir. Bununla birlikte, plasental gelişim ile ilişkili olanlar için plasentanın genetik bozulmaya karşı olan duyarlılığı, yeni moleküler içgörülere sahip altın değerinde bir bilgi birikimi sağlamaktadır. Trofoblast soyunun başlatılmasından ve korunmasından olgun plasentanın karmaşık fonksiyonlarına kadar plasenta gelişiminin ana aşamalarının çoğu için düzenleyici genler bulunur (Cross, 2000). Bu genetik çalışmalar, üç bölme arasındaki etkileşimlerin sinyalleşmesinin kritik önemini göstermiştir: embriyonik / fetal, trofoblast ve maternal. Trofoblast hücreleri ile maternal uterin ve vasküler dokular arasındaki etkileşimler vardır. Bu genetik çalışmalar, embriyonik/fetal, trofoblast ve maternal gibi üç bileşen arasındaki etkileşimlerin sinyalleşmesinin kritik önemini göstermiştir. Trofoblast hücreleri ve maternal uterin ve vasküler dokular arasındaki etkileşimler, hem kemirgen hem de insan plasentasası için başka yerlerde geniş ölçüde incelenmiştir (Damsky ve Fisher, 1998; Cross vd., 2002).

2.7.1. Farelerde ve İnsanlarda Plasental Gelişim

Her ne kadar insan ve fare plasentalarının mimari ayrıntılarında biraz farklılık olsa da, genel yapıları ve plasental gelişimin altında yatan moleküler mekanizmaların oldukça benzer olduğu düşünülmektedir (Rossant ve Cross, 2001). Sonuç olarak, fareler giderek artan bir şekilde plasental gelişimin temel unsurlarını incelemek için bir model olarak kullanılmaktadır. Farelerde plasenta gelişimi, blastosistte embriyonik gün (E) 3.5'te başlar, trofoektoderm katmanı iç hücre kütesinden (Cross vd., 1994) ayrılır. İmplantasyon sırasında (E4.5), iç hücre kütesiyle temas etmeyen fare trofoektoderm hücreleri, insan ekstra villöz sitotrofoblast hücrelerine benzeyen trofoblast dev hücreleri olur (Rossant ve Cross, 2001). Bu hücreler bölünmeyi durdururlar, ancak poliploid olmak üzere DNA'yı (endoreduplikasyon) kopyalamaya devam ederler. Buna karşılık, iki diploid hücre tipi, iç hücre kütesine hemen bitişik

olan hücreler olan polar trofoektodermden ortaya çıkar: bunlar ekstraembriyonik ektoderm ve ektoplasental koni hücreleridir (Rossant ve Cross, 2001). Daha sonra, ekstraembriyonik ektoderm, koryon tabakasının trofoblast hücrelerinde ve ardından labirentte gelişecektir. Gelişmekte olan labirent, spongiotrofoblast adı verilen ektoplasental koni kökenli bir tabaka ile yapısal olarak desteklenir. Labirent ve dış dev hücre tabakası arasına sıkıştırılmış kompakt bir hücre tabakası oluşturur ve insan plasentasının (Rossant ve Cross, 2001) sitotrofoblast hücre sütununa karşılık gelir. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde, glikojen içerikli trofoblast hücreleri, spongiotrofoblast tabakası içinde farklılaşmaya başlar ve daha sonra uterus duvarını (Adamson vd., 2002) yaygın şekilde istila ederler. Plasentanın vasküler kısmı, E8.0 (Cross vd., 2003)'te embriyonun arka ucundan uzanan ekstraembriyonik mezodermden (allantois) türetilmiştir. E8.5'te, koryon ve allantois koryoallantoik bağlanma denilen bir süreçte birleşir. Kısa süre sonra koryon, villusları oluşturmak için katlanmaya başlar ve allantoisten fetal kan damarlarının büyüdüğü bir boşluk yaratır (Cross vd., 2003). Bu zamanda, koryonik trofoblast hücreleri iki labirent hücre tipinde farklılaşmaya başlar. Trofoblast hücrelerinin füzyonu ile oluşan çok çekirdekli sinsityotrofoblast hücreleri, kılcal damarların fetal endotelini çevreler. Bir mononükleer trofoblast hücre tipi, maternal kan sinüslerini gösterir. Trofoblast ve fetal vaskülatür birlikte labirentin (insan koryon villusuyla karşılaştırılabilir) geniş ölçüde dallanmış bir villuslarını oluşturur; bunlar doğuma kadar büyür ve daha geniş bir şekilde dallanır (E18.5-19.5) (Adamson vd., 2002). Maternal ve fetal kan, besin taşınımını en üst düzeye çıkarmak için labirent içinde ters akım olarak akar (Adamson vd., 2002). Eğer labirent uygun modellenme, dallanma ve dilatasyon ile uygun şekilde vaskülarize edilmezse plasental perfüzyon bozulur, bu da zayıf oksijen ve besin difüzyonu ile sonuçlanır (Pardi vd., 2002).



Şekil 2.3. Farelerde plasental gelişim (Watson ve Cross, 2005). Ekstraembriyonik soyların kökeni embriyonik günde (E) 3.5'te blastosist oluşumu ile başlar. E8.0'da, korioallantoik bağlanma meydana gelir, bunu takiben içinde besin alışverişinin gerçekleştirildiği yoğun bir villus oluşturmak için labirentin morfogenezini oluşturur (E8.5-10.5). Olgun plasenta (E14.5) üç katmandan oluşur: Labirent, spongiotrofoblast ve maternal desidua.

2.8. Wnt-β Katenin Sinyal Yolağı

Yüksek oranda korunan Wnt sinyal yolu, embriyogenez sırasında hücre-hücre etkileşimlerinin kritik bir aracıdır (van Amerongen ve Nusse, 2009). Böylelikle, blastosist ve uterus arasındaki karmaşık etkileşimle ilişkili olduğu implantasyon sürecine dahil olduğu varsayılır. Wnt sinyali, farklı işlevlerine göre kanonikal ve nonkanonikal yollara ayrılabilir (van Amerongen ve Nusse, 2009). Kanonikal Wnt yolağına göre, Wnt ligandları, frizzled (Fzd) reseptörü ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle bağlanmış protein (LRP) Lrp5/6 ortak reseptörleri kompleksi ile birleşerek sinyallerini iletirler (Logan ve Nusse, 2004). Bu bağlanma, yolun aktive edilmesinden önce sürekli proteazom aracılı bozunma altında olan sitoplazmik β-katenin'i serbest bırakacaktır (Metcalf ve Bienz, 2011). Daha sonra sitoplazmik birikmiş β-katenin, nükleusa translokasyona uğrayacak ve hedef genlerin transkripsiyonunu yönlendirmek için lenfoid artırıcı bağlanma faktörü/T hücresine özgü transkripsiyon faktörü (LEF/TCF) ile bir kompleks oluşturacaktır (Behrens vd., 1996). Non-kanonikal yolak, β-katenin'den bağımsızdır, sadece Fzd reseptörlerini içerir ve Ca⁺²/Planar Hücre Polaritesi (PCP) yolu, Rho sinyali ve Wnt-PKA sinyali

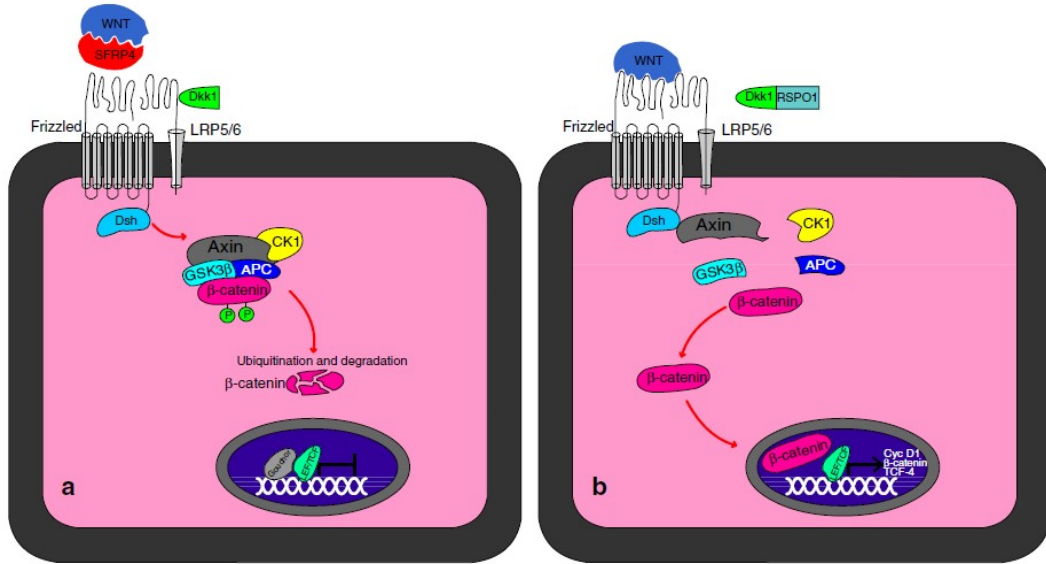
dahil olmak üzere aşağı akım efektörleri farklıdır (Barrow, 2006; Semenov vd., 2007). Sistein bakımından zengin ligand bağlayıcı alanda Fzd reseptörlerine benzer sekans işaretlemelerine sahip olan ve transmembran bölgesinden yoksun olan salgılanmış Fzd ile ilgili proteinler (sFRP'ler), Wnt proteinlerinin biyoaktivitelerini inhibe edecektir (Rattner vd., 1997; Suzuki vd., 2004). Alternatif olarak, ko-reseptör Lrp5/6, Kremen ile etkileşime girerek hücre yüzeyi LRP reseptörlerini down-regüle etmek için Dickkopf proteinleri (Dkks) tarafından da düzenlenebilir (Glinka vd., 1998; Bafico vd., 2001; Mao vd., 2001; Semenov vd., 2001; Mao vd., 2002; Mao ve Niehrs, 2003).

Wnt ailesinin proteinlerinin, reseptörlerinin, hücre dışı antagonistlerinin ve hücre içi sinyal bileşenlerinin karmaşıklığı ve fazlalığı, hücre içi ve hücreler arası Wnt mekanizmalarının doğasını, gelişim sırasında bu sinyal yolunun oryantasyonunu belirlediğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda, farelerde periimplantasyon periyodu sırasında erken embriyolarda ve uterusu Wnt yolu elemanlarının spesifik ekspresyon modelleri ortaya çıkmıştır (Paria vd., 2001a; Hamatani vd., 2004a; Mohamed vd., 2004; Zeng vd., 2004; Wang vd., 2004c; Kemp vd., 2005; Mohamed vd., 2005) ve blastosist oluşumunda kanonikal Wnt sinyalleşmesinin dağıtılabılır rolü iyi çalışılmış ve daha önce gözden geçirilmiştir (Chen vd., 2009; Sonderegger et.al., 2010). Özellikle, implantasyon sırasında, blastosist yetkinliği için kanonikal Wnt sinyali gereklidir. SFRP molekülü ile Wnt yoluna müdahale etmek de implantasyon sürecini bozar (Mohamed vd., 2005). Adenoviral aracılı Dkk1 stratejisini kullanarak, yapılmış olan çalışmada, kanonikal Wnt/ β katenin sinyalleşmesinin susturulması için uterusu negatif yönde etkilemediğini, ancak farelerde implantasyon için blastosist yetkinliğini önemli ölçüde engellediğini açıkça göstermiştir (Xie vd., 2008). Blastosistlerde bu yolun önemi, gecikmiş implantasyon modeli ile, nükleer β -katenin sinyalleme aktivitesinin, hareketsiz ve yeniden aktive edilmiş blastosistler arasında farklı olduğunu göstermektedir (Xie vd., 2008). Dahası, *Wnt3a* trofoektoderm hücrelerinde β -kateninin hücre içi birikimini ve nükleer translokasyonunu indükleyebilir (Xie vd., 2008). Toplu olarak, bu bulgular Wnt sinyalleşmesinin implantasyon için blastosist yetkinliğini belirleyen en az bir yol olduğuna dair doğrudan kanıt oluşturmaktadır.

2.8.1. Kanonikal Yolak

Wnt/ β katenin veya kanonikal Wnt sinyal yolu olarak da adlandırılan β -katenin'e bağımlı yolak, hedef gen ekspresyonunu aktive etmek için çekirdeğe giren sitoplazmik protein β -katenin ile karakterize edilen çeşitli türler arasında yüksek oranda korunan bir yoldur (Aberle vd., 1997; Saito-Diaz vd., 2013). β -katenin hem hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks yapışmasına katılan bir kadherin bağlayıcı proteindir hem de bu kanonikal sinyal yolundaki merkezi bir oyuncu olan çok işlevli bir proteindir (İkeda vd., 2002). Wnt stimülasyonunun yokluğunda, sitoplazmik β -katenin, ubiquitinleştirilir ve axis inhibisyon proteini (Axin), adenomatous polipozis koli (APC), glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) ve kazein kinaz 1 α (CK1 α) ile bir multiprotein yıkım kompleksi oluşturarak proteozomda parçalanır (Şekil 2.3a) (Hurliston ve Clevers, 2002; Liu vd., 2002; Bilic vd., 2007). Sitoplazmik aktif β -katenin düşük bir seviyede tutulur ve toplam β -katenin esas olarak hücre-hücre ve hücre- ekstraselüler matriks yapışmasında rol oynar (İkeda vd., 2002). Düşük bir aktif β -katenin seviyesinde, transkripsiyon faktörü T hücre faktörü/lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü (TCF/LEF), transkripsiyonun baskılanmasına neden olan transkripsiyon inhibitörleri Groucho ve histon deasetilaza (HDAC) bağlanır (Daniels ve Weis, 2005). Wnt ligandları, hücre yüzeyi ko-reseptörlerine FZD ve LRP5/6'ya bağlandığında, β -katenin-bağımlı yol tetiklenir. Ayrıntılı olarak Wnt stimülasyonu, LRP ve Dsh'nin fosforilasyonunu ve Axin/APC/GSK3 β /CK1 α yıkıcı kompleksinin bozulmasını indükler ve son olarak sitozolde β -katenin bozulmasına ve birikmesine neden olur (Sonderegger vd., 2010; Revel vd., 2011). Bu nedenle, biriken β -katenin çekirdeğe transloke olur ve Wnt hedef genlerinin transkripsiyonel bir yardımcı düzenleyicisi olarak görev yapar. Groucho ve HDAC TCF/LEF'den uzaklaşır ve cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein (CREB)-bağlayıcı protein (CBP) transkripsiyon faktörü veya bununla yakından ilişkili homolog p300 ve diğer transkripsiyonel ko-aktivatörler ile transkripsiyonel olarak aktif bir kompleks oluşturur, transkripsiyon faktörü ailesi TCF/LEF'in Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu düzenlemesini sağlar (Rao ve Kühl, 2010; Kikuchi vd., 2011). C-myc, c-jun, siklin D1, CD44, matrilisin, matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) ve ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR) gibi TCF/LEF hedef genleri daha sonra hücre çoğalmasına ve göçüne katılır (Şekil 2.3b) (Rattner vd., 1997; Glinka

vd., 1998). Wnt sinyallerinin iki ana antagonist sınıfından olumsuz etkilenebileceğine dair önemli kanıtlar vardır; bunlar salgılanmış FZD ile ilgili proteinler (sFRP'ler) ve Dickkopf (Dkk) ailesi proteinleri'dir. sFRP'ler yapısal olarak FZD ailesinin hücre dışı alanlarına benzer ve Wnt'lerin FZD reseptörlerine bağlanmasını önlemek için hücre dışı Wnt ligandları ile doğrudan etkileşime girebilir [29]. Diğer sınıf, LRP reseptörlerinin Kremen aracılı endositoz yoluyla hızlı bir şekilde çıkarılmasını sağlamak için LRP5/6 ko-reseptörleri ile doğrudan ilişkili Dkk familyası proteinlerinden oluşur (Mao vd., 2001; Semenov vd., 2007; Dijksterhuis vd., 2014). Ek olarak, bu kanonik Wnt sinyalleşme yoluğında Axin2, FZD, TCF1 ve diğer Wnt yolu bileşenlerinin β -katenin-bağımlı ekspresyonu yoluyla bir geri besleme düzenlemesi gözlemlenebilir (Rattner vd., 1997).



Şekil 2.4. Kanonik Wnt/ β katenin sinyal yolağının şematik gösterimi (Tepekoy vd., 2014)

Son araştırmalar, embriyoda ve organa özel endotel hücre farklılaşmasında Wnt sisteminin vasküler morfogenezdeki önemli rolünün altını çizmektedir (Van Gijin vd., 2002; Cohen vd., 2008; van de Schans vd., 2008; Zerlin vd., 2008; Dejana vd., 2009). Wnt sinyali, hücre akıbeti, proliferasyon ve genel organogenez dahil olmak üzere gelişimin temel yönlerini düzenler (Clevers vd., 2006; van Amerongen vd., 2008; Angers ve Moon, 2009; Franco vd., 2009; Kikuchi vd., 2009; Macdonalt vd., 2009).

β -katenin hücre-hücre bağlantı kavşaklarında kadherinlere (endotelial hücrelerde VE-kadherin ve N-kadherin) bağlanır ve sitoskeleton ile etkileşimlerini stabilize eder. Bu şekilde, β -katenin, hücre-hücre yapışmasını ve doku bütünlüğünü stabilize ederek etkisini gösterir (Meng ve Takeichi, 2009; Stepniak vd., 2009). Kadherinler, β -katenin komplekse bağlanmasını teşvik edebilir ve bu şekilde Wnt sinyalini sınırlar. Bu nedenle, Wnt sinyali, hücreler arası bağlantılarla dolaylı olarak module edilir. (Taddi vd., 2008; Heuberger ve Birchmeier, 2010)

2.8.2. Wnt Sinyal Yolağı ve Anjiyogenez

Wnt sinyali endotel hücre çoğalması ve anjiyogenez için gereklidir. Son zamanlarda anormal neovaskülarizasyon ile bazı patolojik koşullarda Wnt sinyalinin rolleri ortaya çıkmıştır. (Logan ve Nusse, 2004; Masckauchán ve Kitajewski, 2006). Wnt sinyalleşmesinin damar oluşumundaki rolü, hayvan modellerinde veya insanlarda Wnt/Fzd genlerindeki bozulma ve mutasyonlardan kaynaklanan fenotiplere dayanılarak oluşturulmuştur. Wnt-2 ve Wnt-7b genlerinin bozulması farelerde plasental ve pulmoner vaskülatürlerde kusurlara neden olur (Monkley vd., 1996; Shu vd., 2002). Fzd-5 knock-out gen fenotipi, embriyonik plasentadaki kılcal pleksusun düzensizleştirmesinden dolayı öldürücüdür (He vd., 1997).

Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar Wnt ligandlarının ve reseptörlerinin anjiyogenezde önemli rollerini göstermiştir. Wnt sinyal yolu aynı zamanda endotel hücre büyümesi ve sağkalımının doğrudan bir aracıdır (Wright vd., 1999). Primer endotelial hücrelerin yüzeyinde birkaç Fzd reseptörü bulunur ve bu hücreler Wnt ligandlarının uyarılmasına yanıt verir (Cheng vd., 2003; Masckauchán vd., 2005; Zerlin vd., 2008).

Dahası, Wnt sinyali, çeşitli pro-anjiyogenik faktörleri up-regüle eder. Örneğin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gen promoter bölgesi yedi TCF/LEF bağlama bölgesi içerir (Easwaran vd., 2003). Kolon kanseri hücrelerinde VEGF, Wnt/ β -katenin sinyalinin ektopik aktivasyonunun bir sonucu olarak up-regüle edilir (Zhang vd., 2001; Easwaran vd., 2003). Wnt sinyal yolu, tümör anjiyogenezinde VEGF aşırı ekspresyonunu zayıflatmak için potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edilir (Hu vd., 2009). İnterlökin-8 (IL-8), Wnt/ β -katenin sinyalinin başka bir hedefidir (Masckauchán vd., 2005). IL-8, endotel hücre proliferasyonunu ve

sağkalımını indükler. IL-8, anjiyogenez sürecine katılan MMP-2 ve MMP-9'un her ikisinde aşırı ekspresyonunu indükler (Li vd., 2003). Bu nedenle, Wnt/ β katenin yolağının anjiyogenik etkisi, aynı zamanda pro-anjiyogenik faktörlerin indüklenmesi yoluyla da olabilir (Zhang ve Ma, 2010).

2.8.3. Menstrual Siklus ve Gebelik Sırasında Hormonal Düzenleme ve Wnt İlişkisi

Menstrual döngü sırasında, endometriumdaki sinyal yollarının dengesi steroid hormonlarına farklı şekilde maruz kalmaya göre değişir. Wnt sinyalizasyon elemanları ayrıca menstrual döngünün farklı aşamalarında farklı ekspresyon seviyeleri sergiler. Östrus siklusunun farklı evrelerinde ve gebelikte farklılaşan Wnt gen ekspresyon profilleri farklı türlerde tanımlanmıştır (Atli vd., 2011; Kiewiz vd., 2011). Domuz östrus siklusu ve gebeliği sırasında, Wnt5a'nın gen ekspresyon seviyeleri hamilelik sırasında ve karşılık gelen östrus siklusu gününde değişkenlik göstermiştir. Wnt7a östrus siklusunun ve erken hamileliğin farklı evrelerinde farklı şekilde ifade edilmiş olsa da, Wnt4 ve β -katenin gen ifadeleri seviyesi siklik ve hamile domuzların endometriumunda belli bir seviyede tutulmuştur (Kiewiz vd., 2011). Bununla birlikte, uterus luminal epitelinde östrojen (E2) içeriği ve genç dişi domuzların siklik kan serumunda progesteron (P4) seviyesi Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, β -katenin ve Cdh1 gen ekspresyonu ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon göstermez. Ayrıca, ayrı ayrı veya aynı anda eklenen farklı E2 veya P4 konsantrasyonları ile muamele edilen endometrial doku uygulamasının Wnt5a, Wnt7a, β -katenin ve Cdh1 gen ekspresyonu üzerinde etkisi gösterilememiştir (Kiewiz vd., 2011) Dietilstilbestrol (DES) maruziyeti, yenidoğan fare uterusunda Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt11, Wnt16 ve FZD10 ekspresyonunu baskılamıştır (Hayashi vd., 2011)

LRP-6 ve FZD6 ifadeleri ayrıca insan endometriumunda da bulunur. Proliferatif ve sekretuar faz sırasında eşit şekilde ifade edildiği belirlenmiştir (Tulac vd., 2003). sFRP4'ün mRNA seviyelerinin, tekrarlanan implantasyon başarısızlığında (RIF) endometriumda menstrual döngünün sekretuar fazı sırasında düşük olması nedeniyle Wnt reseptörüne bağlı proteinlerin de endometrial fonksiyonlarla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Revel vd., 2011).

β -katenin endometrial siklusun hem proliferatif hem de sekretuvar fazları sırasında hem glandular hem de stromal hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir. β -katenin dışında, Wnt sinyalinin diğer hücre içi modülatörleri, GSK-3 β ve Dishevelled homolog-1'in (Dvl-1) de proliferatif ve sekretuvar fazında insan endometriumunda eksprese edildiği bulundu (Tulac vd., 2003). Menstrual siklusun evrelerinde ve gebeliğin farklı düzeylerinde hormonların Wnt sinyalizasyonu üyelerinin ifadesi üzerindeki etkisi, bu hormonlar ile Wnt yolu arasındaki etkileşimi göstermektedir. Wnt sinyalinin doğrudan hormonlardan mı yoksa hormonal regülasyonun kontrolü altında değişen diğer mekanizmalardan mı etkilendiği tespit edilmelidir.

2.8.4. Pre-implantasyon Döneminde Endometrial Luminal Epitel ve Bez Epitelindeki Değişiklikler

Luminal epitel (LE), embriyonik gelişim sırasında mezenşim invazyonu yoluyla endometrial bezleri oluşturur ve bu süreç stroma boyunca geniş bir epitel bezi ağı ile sonuçlanır (Cooke vd., 2013). Yetişkin kadınlarda, menstrual siklusun sekretuvar aşamasında, bu endometrial bezlerin daha da gelişmesi meydana gelir. Uterus bezlerinin hamileliği desteklemek için gerekli olduğuna dair kanıt sağlanmıştır (Gray vd., 2001). Son çalışmalar, Wnt sinyalinin endometrial bez oluşumunu kontrol ettiği ve spesifik Wnt sinyal komponentlerinin yoksunluğunun implantasyon başarısızlığından dolayı kısırlığa neden olduğunu göstermektedir (Stewart vd., 1992; Dunlap vd., 2011). Kanonikal Wnt ligandı olan Wnt7a'nın yalnızca endometrial LE'de eksprese edildiğinden, epitelyal Wnt genlerinden birisi olarak tanımlandı (Mericskay vd., 2004). Wnt7a'nın fare uterusunda doğum sonrası yoksunluğunun, endometriyal bez morfogenezinin bozulmasına bağlı olarak kısırlığa neden olduğu bulundu.

Wnt genlerinin de hücre adezyon molekülleri ile de ilişkilidir. Bir çalışmada kadherin-1 (Cdh1) yoksunluğu, epitelyal Wnt genlerinde (Wnt7a ve Wnt11) ve Wnt reseptörlerinde (FZD6 ve FZD10) bir azalmaya neden olurken, stromal Wnt4 ve epitelyal Wnt7b'de arttığı gösterilmiştir (Reardon vd., 2012). Wnt ligandlarının yanı sıra, Wnt sinyal yolağının önde gelen hücre içi efektörü olan β -katenin'in de, düzgün çalışmasına katkıda bulunan Cdh1 ile de ilişkilidir (Nagafuchi ve Takeichi, 1989). β -katenin, Cdh1'in sitoplazmik alanına bağlanır (Ozawa vd., 1989). β -katenin yada

aşağı-akım hedef genlerinin silinmesi, yenidoğan uterusunda bez oluşumunu bozar. (Jeong vd., 2009; Shelton vd., 2012). İnsan endometriumundaki β -katenin ve Cdh1 genlerinin steroid hormonlarından etkilenmediği ve diğer çalışmaların östrus döngüsünün fazından bağımsız olduğu gösterilmiştir. (van der Linden vd., 1995; Tulac vd., 2003). Öte yandan β -katenin, 16, 18 ve 20. günlerde koyun epitel hücrelerinde daha yüksek mRNA ifadesini göstermiştir (Hayashi vd., 2007; Satterfield vd., 2007). Fare uterusunda, β -katenin ekspresyonundaki denge, uygun endometrial bez oluşumu için gereklidir (Jeong vd., 2009). Wnt sinyali, endometrial bez oluşumu için gereklidir ve LE hücrelerinin adezyonunda rolleri olduğu ileri sürülür.

2.9. Anjiyogenez

Anjiyogenez, önceden var olanlardan yeni kan damarlarının oluşumu, normalde fetal gelişim, yara iyileşmesi ve dişi üreme sisteminde görülen fizyolojik bir süreçtir (Findlay, 1986; Folkman ve Shing, 1992). Anjiyogenezin ovaryan ve endometrial fonksiyonundaki kritik rolü, anjiyogenez inhibitörü olan AGM-1470'in, gebe olmayan farelere uygulandığında hem korpus luteum hem de endometriumun büyümesini büyük ölçüde geciktirdiğinin belirlenmesiyle ortaya koymuştur (Klauber vd., 1997).

2.9.1. Menstrual Siklusta Anjiyogenez

Genel olarak anjiyogenez sürecinin üç adımda gerçekleştiği kabul edilir (i) menstrual döngünün ardından yırtılmış olan kan damarlarının restorasyonu; (ii) Proliferatif faz ve endometriumun hızlı büyümesi; (iii) sekretuar faz ve spiral arteriollerin evrimi ve sub-epitelyal kılcak damar ağlarının gelişimi (Gargett ve Rogers, 2001; Gambino vd., 2002). Ovariectomi yapılmış maymunlar üzerinde yapılan çalışmaya göre, transpirasyon sonrası artmış anjiyogenez mevcuttu ve progesteron hormonun 8-10. günde (orta-proliferatif faz) azalması sonucu, östrojen ve progesteron ile tedavi edilen yapay bir menstrual döngüye neden oldu. Bu artış hormondan yoksun grupta gözlenmedi, fakat östrojene bağımlılık gösterdi (Nayak ve Brenner, 2002). Araştırmacılar, damarların sekretuar aşamasında sabit bir oranda oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Maymunlar üzerinde yapılan ilk çalışmalar, en yüksek vasküler proliferasyonun proliferatif fazın ortasında meydana geldiğini göstermiştir, bununla

birlikte orta sekretuar fazda ikinci bir proliferasyon dalgası meydana gelir (Ferency vd., 1979).

Genel olarak, insan ve diğer memelilerin endometrial yüzey alanında vasküler proliferasyon görülür (Goodger ve Rogers, 1994). Endometriumda kan damarı büyümesi karmaşık mekanizmalardan oluşur. Araştırmacılar, kadınlardan endometrium kesitlerinde filizlenme, penetrasyon ve uzama dahil olmak üzere üç anjiyogenez mekanizmasını karşılaştırdılar (Gargett vd., 1999; Gambino vd., 2002). Sonuçlar, (i) Filizlenmenin en yaygın mekanizma olduğunu ve bazal membranın parçalanması, proliferasyon, endotelial hücrelerin göçü, mevcut damarlardan tomurcuk oluşumu ve son olarak lümen formasyonu gibi diğer işlemlerden oluştuğunu gösterdi. (ii) Penetrasyon işlemi, bölünen hücreler içeri doğru göç ettikçe bir damar içindeki endotelial hücrelerin proliferasyonuna bağlıydı. (iii) Uzama, uzunlamasına büyüme ile mevcut damarların yeniden yapılandırılmasından kaynaklanıyordu. (Gargett vd., 2001; Punyadeera vd., 2006). Araştırmacılar ayrıca, damarların uzamasının, erken ve orta sekretuar faz sırasında uterusun endometrial anjiyogenezinde ana mekanizma olduğunu belirtmişlerdir (Gambino vd., 2002). Döngünün proliferatif fazında ve döngünün ortasında erken sekresyon döneminde, yeni damarların uzunluk yoğunluğu en üst seviyededir. Ayrıca, uzunluk-hacim oranına dayanan yeni kan damarları, erken proliferatif fazda ve orta-geç proliferatif fazda daha hızlı büyümüştür. Bu modeller, endometriumun her bir bölgesinde benzerdi ve sonuçlar, östrojen hormonunun proliferatif faz sırasında vasküler uzamaya ve sekretuar faz sırasında vasküler yeniden modellenmeye neden olduğunu göstermiştir. Diğer araştırmacılar ayrıca erken proliferatif faz sırasında da damar uzaması hakkında kanıtlar sunmuşlardır (Punyadeera vd., 2006). Hayvan modelleri, yapay indüksiyon yöntemlerinde kullanılan ovaryumdan salgılanan steroidlerin anjiyogenezde spesifik faktörlerin rolünü incelemek için kullanılmıştır. Rhesus maymun modelinde kullanıldığında, anjiyogenez, menstrual fazda endotelial hücrelerin proliferasyonu sırasında östrojene en yüksek bağımlılığa sahipti. Ayrıca östrojen ve progesteronun azaltılması ve ortamdaki uzaklaştırılması endotelial hücre proliferasyonunu azaltır (Gambino vd., 2002).

Başka bir fare çalışmasında, ovariektomi sonrasında, belirgin bir şekilde endotel hücre proliferasyonu azalmıştır, ancak geri östradiolün verilmesi, bir günde proliferasyonu önemli ölçüde arttırmıştır. Çalışmanın 2-3. günü bir azalma ile ilişkiliydi. Bu oran steroidal tedaviden sonraki 2-3. gün anjiogenezde progesterona bağlı olarak ikincil bir artış ile ilişkiliydi (Heryanto ve Rogers, 2002). Bu çalışmada dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta ise, ovariektomi sonrası endometriumda vasküler yoğunluğun yüksek olması; steroid ile yapılan kontrast tedavisinde vasküler yoğunluğun artmış olması ve ödemin endometriumun bir parçası olmasıdır (Heryanto ve Rogers, 2002).

2.9.2. Endometrial Reseptivite ve Anjiogenez

Kısırlık dünya çapında önemli sorunlardan biri olarak bilinir. İstatistiklere göre, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde dokuz çiftten biri, implantasyon başarısızlığından etkilenmektedir (Krüssel vd., 2003). Üreme döneminde en önemli faktörlerden biri implantasyon penceresidir. İmplantasyon penceresinin zamanı geçtikten sonra, embriyo endometrial dokuya bağlanamaz. Bu nedenle, başarılı implantasyon için en kritik konu implantasyon penceresi sırasında embriyonun uterus boşluğuna zamanında girişidir (Ma vd., 2003). Embriyonun başarılı implantasyonu çeşitli otokrin, parakrin ve endokrin faktörler arasındaki etkileşimin sonucu olarak ortaya çıkan dinamik bir süreçtir (Wang vd., 1998). Ayrıca implantasyon, üreme döneminde birçok faktör tarafından desteklenen en karmaşık temel adımlardan biridir. Embriyo implantasyonu sırasında, endometriumun özellikle de apikal yüzeyi, genelde endometrial reseptivite olarak bilinen morfolojik, moleküler ve biyokimyasal değişikliklere maruz kalmaktadır (Paulus vd., 2002; Khan vd., 2004). Anjiyogenez, implantasyon ve desidualizasyonda rol oynayabilecek önemli biyolojik olaylardan biridir. Menstrual döngü ve gebelik sırasında erişkin kadınlarda uterus ve ovaryumda anjiyogenez görülür (Ferrara vd., 1998). Vasküler geçirgenliğin ve anjiyogenezin artmasının, başarılı implantasyon, desidualizasyon ve plasentasyon için kritik rolleri olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalar implantasyonda farklı tiplerdeki hücrelerin (trofoblast, makrofajlar ve uterusun doğal öldürücü (uNK) hücreler) ve çözümlü ürünlerin (VEGF, FGF, TGF- β ve anjiyopietin reseptörleri) anjiyogenezde rol oynadığı gösterilmiştir (Gargett ve Rogers, 2001; Gambino vd., 2002).

2.9.3. Angiopoietin-1

Dolaşımdaki östrojen ve progesteron, öncelikle endometrial büyüme ve regresyonun genel kontrolünü düzenlerken, steroidlerin bu dokuda doğrudan vasküler büyüme düzenleyicileri olma olasılığı düşük görünmektedir. Çeşitli gruplar, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF), insan menstrual siklusunda ve endometriumunda siklus döngüsü boyunca eksprese edildiğini göstermiştir (Shifren vd., 1996; Torry vd., 1996; Krüssel vd., 1999; Möller vd., 2001). Şimdiye kadar, insan endometriumunda anjiyogenik büyüme faktörlerinin başka bir grubu olan anjiyopietinlerin ekspresyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Angiopoietinler anjiyogeneze rol alan protein büyüme faktörleridir ve şimdiye kadar dört üye tanımlanmıştır: Ang1, Ang2, Ang3 ve Ang4. Anjiyogeneze yer alan en önemli tipler, özellikle endometriyal damarların oluşumunda rol oynayan Ang-1 ve Ang-2'dir (Kayışlı vd., 2006; Seval vd., 2008). Ang-2, tirozin kinaz (Tie-2) reseptörü aracılığıyla aktive edilir ve VEGF etkisini artırır, ekstraselüler matriks ile teması azaltır ve endotelial hücre aktivitesine neden olur. Diğer taraftan, Ang-1 vasküler düz kas hücreleri tarafından eksprese edilir ve Tie-2 reseptörü ile zıt bir etkiye sahiptir. Perisitler tarafından yeni oluşan kan damarlarının sürdürülebilirliğine yol açar ve ayrıca endotelial apoptozu inhibe eder (Kayisli vd., 2006; Seval vd., 2008). Bu vasküler rekonstrüksiyon döneminde VEGF, Ang-1'de düzenlenmiş bir azalmaya yol açar. Bu durumun aksine, Ang-2 seviyesi artar ve yeni oluşan damarların değişkenliğine ve rekonstrüksiyonuna neden olur (Tertemiz vd., 2005).

2.9.4. Endotelin-1

Endotelinler (ET'ler) 21 amino asitten oluşan peptitlerdir, ilk olarak vasküler endotelin ürünleri olarak gösterilen ET-1, ET-2 ve ET-3 den oluşan bir aileyi içermektedirler (Yanasiva vd., 1988; İnove vd., 1989). Sonraki çalışmalar, ET'lerin meme, paratiroid ve adrenal bez gibi çeşitli dokulardan endotel olmayan hücrelerde de bulunduğunu göstermiştir (Baley vd.,1990; Fuji vd., 1991; Hinson vd., 1991). Bu bileşiklere çok çeşitli fizyolojik özellikler ve farmakolojik etkiler atfedilmiştir. Başlangıçta ET'ler vasküler etkilerinden dolayı güçlü vasokonstriktörler olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, *in vivo* ET uygulaması, endotelial kaynaklı vazodilatatörlerin parakrin salınımını tetikleyerek başlangıçta düşük

konsantrasyonlarda hipotansiyona neden olmuştur (Yanagsiva vd., 1988; DeNucci vd., 1988). Vasküler düz kaslara bağlanarak vazokonstriksiyon etkilerine ek olarak, ET'ler miyometriyum ve diğer düz kas tipleri üzerinde güçlü kasılma eylemleri uygularlar (Kozuka vd., 1989; Meher vd., 1991). Ayrıca peptitler fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri ve diğer hücreler için mitojenik veya ko-mitojeniktir (Brown ve Lütte, 1989; Weissberg vd., 1990). ET eylemleri, farklı hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak aracılık eder. İnsanda iki tip alt ET reseptörü bulunur. Bunlar ET-A ve ET-B'dir (Webb, 1991). ET-A reseptörü ET-1 ve ET-2 için seçicidir; etkinin vasküler düz kas üzerindeki ET-A reseptörüne bağlanmasının, ET'lerin baskılayıcı/pressör eylemlerini uyguladığı mekanizma olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, ETB reseptörü üç ET izoformunu benzer afinite ile bağlar. Ligandın ET-B'ye bağlanması, ET'lerin parakrin tarzında prostaglandinleri veya nitrik oksitleri serbest bırakmasına izin verebilir (Takayanagi vd., 1991).

İnsan amniyon sıvısında (Sunnergren vd., 1990), insan uterusu (Economos vd., 1991) ve tavşan uterusunda (Orlando vd., 1990; Maggi vd., 1991) ET-1 mRNA'sı bulunmuştur, ancak insan üreme organlarında immünoreaktif ET-1'in doku seviyesi değerleri hakkında çok az şey bilinmektedir .

ET-1, çeşitli arterlerin ve damarların endotelial hücrelerinin sitoplazmasında bulunur. İmmünoreaktif ET özellikle periferik ve merkezi sinir sistemi içindeki nöronların yanı sıra insan epitel hücrelerinde de bulunur (Cameron vd., 1992; Marciniak vd., 1992).

Çok çeşitli epitelyumlar tarafından üretilen ve yoğun vazokonstriksiyonun yanı sıra çeşitli eylemlere sahip olan ET'ler, sadece endoteliumun değil, üreme sistemi içindeki diğer hücre tiplerinin de parakrin mediyatörleri olarak işlev görebilirler. ET'lerin üreme dokularındaki rolü geniş çapta araştırılmamıştır. Çoğu çalışma, uterus vasküler yatağının lokal kontrolüne yada normal ve hipertansif gebelikte ET benzeri immünoreaktivitenin (ET-IR) amniyotik sıvı konsantrasyonlarının ve dolaşımlarının ölçümlerine odaklanmıştır. Başka bir çalışmada, ET-1 mRNA'sı Northern blot analizi (Fujii vd., 1991) kullanılarak sığır yumurtalığı içinde gösterilmiştir, fakat peptidin lokalizasyonu ve folikülogenez veya lokal vasküler kontrolün düzenlenmesi gibi olası işlevler test edilmemiştir. ET'ler hipotalamo-hipofizyer ekseninde bir rol

oynayabilir. İmmünohistokimya kullanılarak ET-IR, sıçan ve domuzun posterior hipofizindeki hipotalamik supraoptik ve paraventriküler nöronlara ve terminallerine lokalize olmuştur. Domuzdaki ET-IR'nin yapısı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ET-1 olarak tanımlandı ve *in situ* hibridizasyon, domuz paraventriküler nöronlarda ET-1 mRNA'sının varlığını doğruladı (Yoshizawa vd., 1990). Sıçanlarda, su yoksunluğunun ET-IR'yi posterior hipofizden tamamen tüketmesinin, ET'lerin su dengesinin kontrolünde rol oynadığını göstermiştir. Benzer şekilde diğer yapılan çalışmalarda sıçan hipofiz bezinde ET-1, ET-2 ve ET-3'e karşı immünoreaktivite gösterdi, (Matsumoto vd., 1989) ve önerilen fonksiyonel rol, hem *in vitro* hem de *in-vivo* olarak yapılan çalışmalarda sıçan ve köpekte arginin-vazopressin salınmasını stimüle eden ET-1 tarafından desteklendi. (Goetz vd., 1988; Shichiri vd., 1989). Anterior hipofiz hücrelerinin parakrin kontrolünde de ET-1 için bir rol önerilmiştir. Endotelin-1, sıçan hipofiz hücrelerinden FSH ve LH salınımının uyarılmasında gonadotropin releasing hormon (GnRH) kadar güçlü olmuştur. ET-1'den değil, GnRH'den sonra gonadotropin salınımı, GnRH antagonisti tarafından inhibe edildi ve her iki durumda da ortak bir sinyal iletim mekanizması ile uyarılmanın aracılık ettiği görülmüştür (Stojilkovic vd., 1990).

2.9.5. VE-Kadherin (Cdh5)

VE-kadherin, hücre dışı alanları boyunca homofilik adeziv aktivite geliştiren kadherin ailesine aittir (Wheelock ve Johnson, 2003). VE-kadherin gibi klasik kadherinler, C-terminal alanlarının β -katenin/ α -katenin veya plakoglobin/ α -katenin kompleksleri ile etkileşimi yoluyla aktin ile ilişkilidir. (Wheelock ve Johnson, 2003). VE-kadherin'in hücre iskeleti ile bağlantısı, özellikle plakoglobin dahil olduğunda, güçlü hücre-hücre etkileşimi sağlar.

VE-kadherin sekansı öncelikle homologdur, ancak ailenin diğer üyelerine kıyasla birkaç farklılığa sahiptir (Breviario vd., 1995). Karboksi terminal bölgesi iki hücre içi proteinlerden olan β -katenin ve plakoglobine bağlanır. Bu proteinler armadillo ailesine aittir ve α -katenin bağlanarak aktin hücre iskeletine kadherinlerin sabitlenmesini sağlar.

VE-kadherin promotor bölgesindeki 2500 bp'lik bir dizinin, yetişkin farelerin endotelinde ve vasküler gelişim sırasında, *in vitro* ve *in vivo* olarak gen

transkripsiyonunu yönlendirdiği bulunmuştur. VE-kadherin ekspresyonu, hemen hemen her türlü damar tipinin endoteli için spesifiktir. Promotör bölgesi, transkripsiyonu bir hücre-çizgisine bağlı bir şekilde destekleyen proksimal bir alan ve endotel dışı hücrelerde transkripsiyonu ortadan kaldıran iki negatif kontrol bölgesi gibi transkripsiyonel düzenleme için önemli üç alan içerir. Proksimal bölgelerde Sp1, Sp3 ve Ets dahil olmak üzere transkripsiyonel faktörler için birkaç bağlanma bölgesi bulunmuştur (Gory vd., 1998).

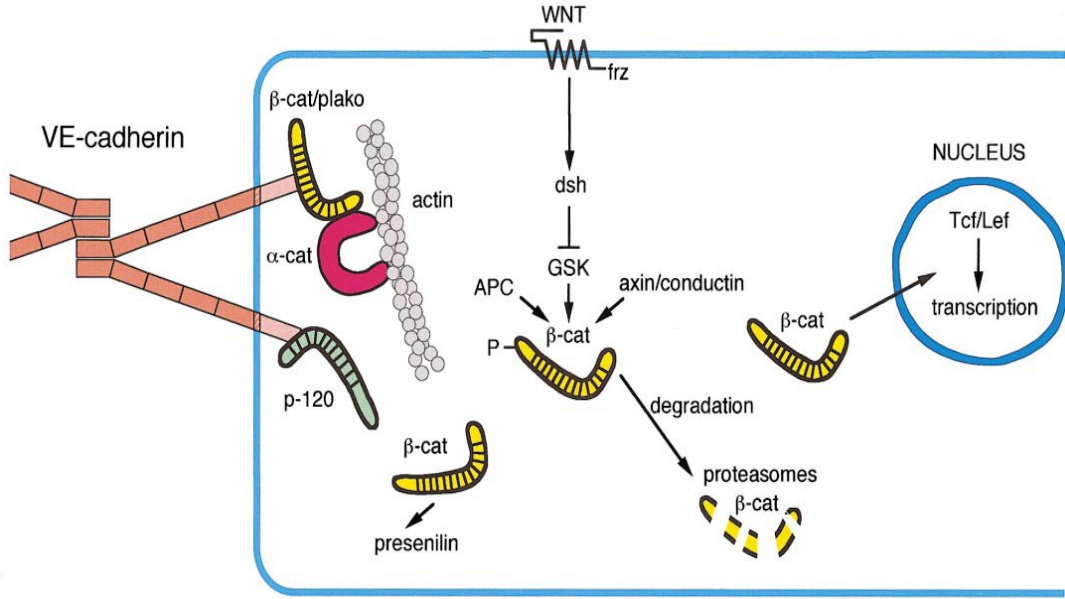
VE-kadherinin doku spesifitesinin, biri sitotrofoblast olan birkaç istisnası vardır. İnsan plasentasının kurulması sırasında sitotrofoblastlar uterus ve vaskülatürünü istila eder, fetusu anneye bağlar ve plasentaya kan akışı sağlar. Spiral arteriyolları invaze eden sitotrofoblastlar, maternal endotelinin yerini alır ve trombosit endotel hücre adezyon molekülleri (PECAM), vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM), integrin $\alpha\beta3$ ve VE-kadherin gibi endotel hücrelerinin tipik olan bir dizi adezyon molekülünü eksprese eder (Zhou vd., 1997).

HücreSEL fenotipi tam olarak bilinmemekle birlikte ilginç bir şekilde pre-eklampside sitotrofoblastlar, VE-kadherin de dahil olmak üzere endotel markörlerinin çoğunu eksprese etmez ve vasküler invazyonu yüzeysel kalır. Ek olarak, hemoanjiyogenik potansiyele sahip VE-kadherin-pozitif progenitör hücreler, totipotent embriyonik kök hücrelerin *in vitro* farklılaşmasıyla veya E9.5 embriyolarının vitellus kesesinde izole edilmiştir. Bu hücreler hemopoietik progenitörlere farklılaşırken VE-kadherin ekspresyonunu kaybederler (Nishkawa vd., 1998).

Anjiyogenezdeki VE-kadherin uygulamasının ilk kanıtları, *in vitro* anjiyogenezde fonksiyon bloke edici antikorlar kullanılarak yapılan deneylerden kaynaklanmaktadır (Matsumura vd., 1997, Bach vd., 1998). VE-kadherin eksikliği olan embriyolar ve vitellus keselerinde, vaskülarizasyon işlemi, anjiyogenik filizlenme belirtisi olmadan çok ilkel bir aşamada bloke edilmiştir (Gory-Faure vd., 1999). Örneğin, vitellus kesesi kanı adaları (blood island) normal şekilde oluşur, ancak orta-gestasyonda fetal ölüme kadar vasküler dallanma geçirmemiştir, bu da gelişimsel anjiyogenez için VE-kadherinin gerekli olduğunu gösterir. Daha yakın bir zamanda tümör anjiyogenezini, VE-kadherine karşı olan antikorlar tarafından bloke edilebildi; bu da, VE-kadherin

aktivitesinin yetişkinlerde vasküler proliferasyon için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Corada vd., 2002, Liao vd., 2002).

β -katenin ve/veya plakoglobine bağlanmadan sorumlu hücre içi alanı olmayan kesik bir VE-kadherini eksprese eden fareler, VE-kadherin bulunmayan farelere benzer bir fenotip sunar (Carmeliet vd., 1999). Kadherinlerin ve özellikle VE-kadherinin hücre içi sinyalleri aktardığı yol hala bilinmemektedir. VE-kadherin-katenin kompleksi dinamiktir ve bileşimi hücrelerin işlevsel durumuna göre değişebilir (Lampugani vd., 1997). Birleşmenin erken aşamalarında VE-kadherin tirozin ile fosforile edilir ve temel olarak p120 ve β -katenin ile bağlantılıdır. Kavşak olgunlaştığında VE-kadherin içindeki tirozin kalıntıları fosforilasyonu gevşetme eğilimindedir ve p120 ve β -katenin kompleksinden kısmen kopar ve yerine plakoglobin ile yer değiştirir (Lampugani vd., 1995). Daha da önemlisi p120 kavşaklarından ayrıldığında β -katenin sinyalizasyon için uygun hale gelebilir. Daha yakın zamanlarda, β -katenin'in presenilin'i bağlayabildiği bulunmuştur. Bu bağlanma, β -katenin'i stabilize eder ve nöronal apoptozu önler (Zhang vd., 1998). Presenilin, Alzheimer hastalığı ile ilişkili patojenik mutasyonlar sunduğunda ilginç bir şekilde bağlanma engellenir. Bütün bunları hesaba katmakla birlikte, β -katenin'in endotel hücrelerinde spesifik rolü hala büyük ölçüde bilinmemektedir ve bilgilerin çoğu diğer hücrelerin sistemlerinin analogisinden gelir. Endotel hücreleri, hem VE-kadherin hem de N-kadherinin yüksek miktarlarını ifade eder, ancak VE-kadherin ekspresyonundan yoksun hücreler vasküler yapılar oluşturamazlar (Vittet vd., 1997). VE-kadherin ekspresyonundan yoksun hayvanlar ciddi bir vasküler fenotip sunar (Carmeliet vd., 1999; Gory-Faure vd., 1999) ve erken dönemde ölürlür. Bütün bunlar, kadherinlerin aynı hücre tipinde spesifik ve örtüşmeyen fonksiyonlara sahip olabileceğini, farklı ve hala bilinmeyen sinyal proteinlerini bağlayabildiklerini veya aktivasyonlarını farklı kinetik ve/veya yoğunluğu ile modüle edebildiklerini göstermektedir.



Şekil 2.5. Hücre içi proteinler ile VE-kadherin etkileşiminin şematik gösterimi (Knudsen vd., 19995). VE-kadherin, sitoplazmik alanı boyunca β -katenin, plakoglobin ve p120'ye bağlanır. Plakoglobin ve β -katenin, kompleksin aktin hücre iskeletine bağlanmasını teşvik eden α -katenin'i bağlar. α -katenin, şekilde gösterildiği gibi doğrudan F-aktin'e bağlanabilir. Bu bağlanma aynı zamanda α -aktinin veya vinkulin (Weis vd., 1998) ile de olabilir. Fzd reseptörlere bağlanma yoluyla Wnt büyüme faktörleri Dsh'i aktive eder, bu sırada glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β)/Zeste beyazı-3 inhibe eder. Wnt aktivasyonunun yokluğunda, APC ve axin işbirliği ile hareket eden GSK-3 β β -katenin fosforilasyonunu indükler. Fosforile edildikten sonra, β -katenin hızla ubiquitinleşir ve protezomlarda parçalanır. Aksine, GSK-3 β inhibe edildiğinde, β -katenin sitoplazmada stabilize edilir ve Tcf ve Lef gibi yüksek mobilite grubunun (HMG) transkripsiyon faktörlerini bağladığı çekirdeğe transloke olabilir. Alternatif olarak, β -katenin, presenilin ile birleşebilir ve muhtemelen hücre apoptozunu modüle etmede rol oynayabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen yaklaşık vücut ağırlığı 200-220 gram arasında değişen 8 haftalık *Wistar* albino cinsi 10 adet erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar deney süresince standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 02.02.2017 tarih ve 65202830/11 sayılı onay belgesi (EK-1) alınmıştır.

3.2. Deney Grupları

Grup-1: Çalışmada kullanılan hayvanlar oda ısısında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyotlar sağlanarak gebelik oluşturulmayan normal östrus siklusunun sağlandığı gruptur. Normal östrus siklusuna girdiği kabul edilen hayvanlara 5. Günden sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde (diöstrus, proöstrus, östrus, metaöstrus) ve hergün için 1 hayvan olmak üzere 3 mg/kg Xylazine HCL+ 90 mg/kg Ketamine HCL intraperitoneal yolla verilerek anestezi altında uygun yöntemlerle uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

Grup-2: Çalışmada kullanılan hayvanlar oda ısısında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyotlar sağlanarak normal östrus siklusunun sağlandığı ve gebelik oluşturulacak olan hayvan grubudur. Östrus siklusları vajinal smear ile belirlendi. Östrus evresinde olan dişi sıçanlar gebelik oluşması için erkek sıçanların kafeslerine alındı. Ertesi gün vajinal plak oluşumuna bakılarak vajinal plak görülen sıçanlar gebe kabul edilip ayrı kafeslere alındı. Vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edildi. Gebe hayvanlara, gebeliğin 7,5., 8,5. ve 9,5. günlerinde hergün için 2 hayvan olmak üzere 3 mg/kg Xylazine HCL+ 90 mg/kg Ketamine HCL intraperitoneal yolla verilerek anestezi altında uygun yöntemlerle uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

Mikroskopik değerlendirme için alınan kesitler, Olympus (BX51, Japan) marka mikroskopta değerlendirilip, uygun alanlardan fotoğraflar çekildi.

3.3. Kullanılan Cihazlar:

- ❖ Doku takip cihazı (Leica, Germany)
- ❖ Gömme fırını (MKN Taab, UK)
- ❖ Ben Mari (Leica, Germany)
- ❖ Mikrotom (Leica, Germany)
- ❖ pH Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- ❖ Floresan Mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- ❖ Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)
- ❖ Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 554 İntellwave, Türkiye)
- ❖ Mikropipetler- 10ul, 20ul, 200ul ve 1000ul- (Gilson, USA)
- ❖ Santrifüj
- ❖ Thermal cycler
- ❖ Nanodrop
- ❖ Elektroforez (Thermo Fischer, Germany)

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler:

- ❖ Antikorlar
 - Primer antikorlar;
 - ET-1 :ab2786, UK
 - VE-kadherin (F-8): sc-9989 S.Cruz Bio, ABD

- Ang-1 : bs-0800R-A555, ABD
- Wnt7a (E-9): sc-365665 S. Cruz Bio. ABD
- Wnt3 (D-9): sc-74537 S. Cruz Bio., ABD
- β -katenin (E-5): sc-7963 S. Cruz Bio ABD
- Sekonder antikorlar;
 - Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Flour 568): ab175473
Abcam
 - Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Flour 488): ab150077
Abcam
- ❖ SuperBlock (Sky Tech Lab, USA)
- ❖ DAPI (Sigma, USA)
- ❖ Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- ❖ Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)
- ❖ Phospate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- ❖ EDTA (Sigma, USA)
- ❖ Formaldehit (Merck, Germany)
- ❖ Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Germany)
- ❖ Di sodyum hidrojen fosfat (Merck, Germany)
- ❖ Paraformaldehit (Merck, Germany)
- ❖ Triton X-100 (Biotech, Canada)
- ❖ Hidrojen peroksit (Sigma, USA)
- ❖ BSA(Bovine Serum Albumine) (CapriCorn Scientific, USA)
- ❖ Tris EDTA Buffer (Ambion, USA)
- ❖ Entellan (Merck, Germany)
- ❖ Sodyum sitrat (Merck, Germany)
- ❖ Etil alkol
- ❖ RNAlater (Qiagen, Germany)
- ❖ Antibody Diluent Reagent (Invitrogen, USA)

3.5. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:

i. % 10'lük Tamponlanmış Nötral Formalin (pH: 7.0)

- ❖ Formaldehit 100cc
- ❖ Distile Su 900cc
- ❖ NaH₂PO₄ 4g
- ❖ Na₂HPO₄ 6.5g

ii. %4'lük Paraformaldehit (pH 7.4)

- ❖ Distile Su 850ml
- ❖ Paraformaldehit 40gr
- ❖ 10N NaOH 0.1ml
- ❖ 10X PBS Stock 100ml

iii. Yıkama Çözeltisi

- ❖ 1000 ml PBS içinde 1ml Triton X-100 çözünerek hazırlandı.

3.6. Doku Preparasyonu

Ötenazi sonrasında alınan uterus dokuları %10'lük tamponlanmış nötral formalinde en az 48 saat ve %4'lük paraformaldehitte +4 derecede 24 saat süre ile fikse edildi. Doku takip cihazı ile artan dereceli etanol ile dehidrasyon yapıldıktan sonra ksilolle şeffaflandırılıp parafin içinde bloklandı.

3.7. Işık Mikroskopi

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica marka mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitlere genel morfolojiyi göstermek amacıyla hematoksilin-eozin boyama uygulaması yapıldı ve Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskopu ile uygun görüntüler alındı.

3.8. İmmunfloresan Boyama Protokolü:

Parafine gömülü doku örneklerinden alınan 3-4 µm'lik seri kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulandı.

- Ksilolde deparafinizasyon
- %100'lük alkol..... 2' dk
- %100'lük alkol..... 2' dk

- %95'lik alkol..... 2' dk
- %80'lik alkol..... 2' dk
- %70'lik alkol..... 2' dk
- Distile su 5 dk yıkandı.
- Mikrodalga fırında 2 defa 5'er dakika sırasıyla maksimum güçte ve 550W'da 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH=6) içerisinde epitoplardan açığa çıkarılması gerçekleştirildi.
- Pappen (Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) ile örneklerin etrafı çizildi.
- Kesitler yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 2 kez 3'dk yıkandı.
- Kesitlerin immünoglobulinin nonspesifik taşınmasını engellemek için SuperBlock (Sky Tech Lab, USA) çözeltisinde oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. (Serum Bloklama)
- Kesitler primer antikörlerle +4 derecede nemli karanlık ortamda gece boyu inkübe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikörler ve kullandıkları seyreltme oranları; ANG-1 (1:100), EDN-1 (1:100), VE-KADHERİN (1:100), Wnt7a (1:100), Wnt3 (1:100), β -katenin (1:100). Bütün primer antikörler pH=7.4 olan antibody diluent reagent (Invitrogen, USA) çözeltisi ile sulandırıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
- Sekonder antikör Goat Anti-Mouse IgG H&L (1/100) (Alexa Flour 568): ab175473 abcam ve Goat Anti-Rabbit IgG H&L (1/100) (Alexa Flour 488): ab150077 abcam) oda ısısında 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
- 0.5 ug/ml DAPI (Sigma, USA) ile oda ısısında 10 dk çekirdek boyaması yapıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 5 dakika yıkandı.
- Kapatma medyumuyla kapatma yapıldı.

3.9. Semikantitatif Skorum Yöntemi:

Peri-implantasyon periyotlarında uterus dokularında görüntülenen ET-1, Ang-1 ve VE-kadherin ekspresyonlarının şiddeti semikantitatif skorum yöntemi ile belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi. Bütün kesitler

birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından incelenerek, uterus dokusunda ET-1, Ang-1 ve VE-kadherin antikorlarının boyanma derecelerine göre; boyanma olmamış ise negatif (-), hafif derecede boyanma olmuş ise (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++) , yoğun derecede boyanma olmuş ise (+++) boyanma olarak uterus dokuları değerlendirildi.

3.10. Real Time-PZR Uygulamaları

Oluşturulan kontrol ve deney grubundan alınan uterus dokuları ötenazi sonrası çift taraflı kesilerek açıldı ve endometrium dokusu zarar görmeden kazındı. Kazınan örnekler RNAlater içerisinde konulduktan sonra -20°C’de bekletildi. ET-1, Ang-1, VE-kadherin, Wnt3, Wnt7a ve β -katenin proteinlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, İnvitrogen) kullanılarak total RNA eldesi gerçekleştirildi. Bu proteinlerden elde edilen RNA’lardan cDNA kiti (Superscript II RT, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak cDNA’lar elde edildi ve bu proteinlerin ekspresyonu relatif kantitasyon kullanılarak Real-Time-PZR yöntemiyle belirlendi. PZR amplifikasyonu Biorad CFX Connect cihazıyla uyumlu *Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix* kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada housekeeping gen (GAPDH) iç kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen ct değerleri (cycle treshold, RFU (relative frequency of unit)/cycle)), referans GAPDH geni baz alınarak karşılaştırıldı.

3.10.1. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için İnvitrogen RNeasy Mini Kit kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak olan malzemeler otoklavlanmış ve daha sonra UV Crosslinker’da sterilize edilmiştir. Sterilize edilen malzemeler ayrıca DEPC (Dietilpirokarbonat) içeren suyla yıkanmış ve olası RNaz kontaminasyonu engellenmiştir. Buz içerisinde konulmak şartıyla alınmış olan dokuların bulunduğu ependorf tüpler -20°C’den alınarak çalışma ortamına konulmuştur.

- 7 ml Lizis buffer ve 70 μ l β -merkaptoetanol homojenizasyon tamponu hazırlandı.
- Hazırlanan tampondan 600 μ l dokuların olduğu ependorf tüplere aktarıldı.
- Daha sonra örnekler homojenizasyon makinesinde edildi.

- Örnekler 26,000 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant temiz bir RNaz içermeyen tüpe aktarıldı.
- ~700 µl %70'lik etanol eklendi.
- Kolon tüplere ~700 µl örnek aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 12,000 x g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve aynı toplama tüpleri kolon tüplere yeniden yerleştirildi.
- Bütün lizat hacmi işleme tabi tutulana kadar tekrarlandı.
- Kolon tüplere 700 µl Wash Buffer I eklendi.
- Oda sıcaklığında 12,000 x g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon tüplere yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.
- Kolon tüplere 500 µl Wash Buffer II eklendi.
- 12,000 x g'de 15 sn santrifüj edildi.
- Bütün yıkama hacmi işleme tabi tutulana kadar tekrarlandı.
- Kolon tüplerin merkezine 30-100 µl RNAaz içermeyen su eklendi.
- Oda sıcaklığında ~12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.

Total RNA izolasyonu sonrasında µl'sinde kaç nanogram RNA olduğunu saptamak için nanodrop cihazında ölçüm gerçekleştirilmiş ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır. İzole RNA'lar -80°C'de muhafaza edilmek üzere saklanmıştır. RNA'dan cDNA sentezi için Invitrogen firmasının Superscript II RT ile ReverseTranskriptaz PZR kitleri kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.10.2. cDNA Eldesi

Çoğunlukla gen ifadesi çalışmaları için gerçekleştirilen Real-Time PZR, genellikle RNA virüslerinden elde edilen Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak ortamda var olan RNA moleküllerini komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca Real-Time PZR ile kombine bir şekilde floresan işaretli boyalar kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması ile gen ifade düzeyi çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

Protokol:

Bileşen		Hacim (µL)
Gene Özgü Primer (GSP) (2 pmol)	→	1 µL
1 ng-5 µg total RNA	→	5 µL

dNTP karışımı (her birinden 10mM) → 1 µL
Son hacim ddH₂O ile 12µL'ye tamamlanmıştır.

- a) Karışım 65°C'de 5 dk inkübe edilip hemen buz üstüne alınmıştır.
- b) 4 µL 5x First Strand Buffer ve 2 µL 0,1M DTT eklenmiştir ve karışım dikkatli bir şekilde karıştırılarak 42°C'de 2 dk inkübe edilmiştir.
- c) 1 µL (200 ünite) Superscript II RT eklenip karıştırılmış ve son hacim 20 µL'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.
- d) 42°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- e) Reaksiyonu durdurmak ve enzimi inaktive edebilmek için 70°C'de 15 dk reaksiyon karışımı bekletilmiştir.
- f) RT-PZR'nin başarılı olup olmadığını ölçmek için genin ekzon dizilerinden tasarlanan primerler ile standart PZR yapılmıştır.

3.10.3. Primerler

Gerçek zamanlı kantitatif PZR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottür. "Real-Time PZR"da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probın verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Bu çalışmada floresan boya olarak SYBRGreen kullanıldı. Real-Time PZR tekniğinin sorunsuz çalışabilmesi için uygun primer seçimi oldukça önemlidir. Primerlerin cDNA'ya özgül olarak bağlanması ve primer-dimer ya da özgül olmayan amplikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Bu çalışmada kendi hazırladığımız primerler kullanılmıştır. Gen ekspresyonları incelenen genlere ait özgül primerlerin dizisi, Tm değeri, erişim numaraları ve dizi yerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Real-Time PZR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları

Gen	Primer dizisi (5'→3')	Uzunluk (bp)	Tm Değeri	T _A Değeri	Erişim No	Dizi Yeri
Wnt3 Forward	AGTCTCGTGGCTGGGTGGA	19	61.6	56.7	XM_006246487	922-940
Wnt3 Reverse	TTGGGCTCGCAGAAGTTAGG	20	60.5			1011-1030
Wnt7a Forward	GGGACTATGACCCGAAAGC	20	62.5	58	NM_001100473	251-270
Wnt7a Reverse	GGATCTTGTTACAGATGATGCTC	23	60.9			358-380
β katenin Forward	AGCTTCCAGACACGCCATCAT	21	61.2	58	XM_008766691	1350-1370
β katenin Reverse	CGGTACAACGGGCTGTTTCTAC	22	64.2			1426-1447
ET-1 Forward	TCTTCTCTGCTGTTTGTGGCTT	24	63.6	58	XM_017600453	630-653
ET-1 Reverse	AGATGATGTCCAGGTGGCAGA	21	61.2		XM_017600453	807-827
Ang-1 Forward	ACAATGACAGTTTTCTTCCTTTG	25	60.9	51,6	XM_006241609	449-473
Ang-1 Reverse	AGTG TAGGCACATTGCCCATGT	22	62.1			562-583
VE-kadherin Forward	GTCTCTGAGTACTTCCTTA	19	53	50.5	NM001107407	368-386
VE-kadherin Reverse	TACCTGGTGCGTAAACACA	19	55			478-496
GAPDH Forward	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTT	20	62.5	58	NM_017008.4	1-20
GAPDH Reverse	GCCAAATCCGTTACACCG	19	59.5			87-105

3.10.4. Standart PZR Uygulamaları

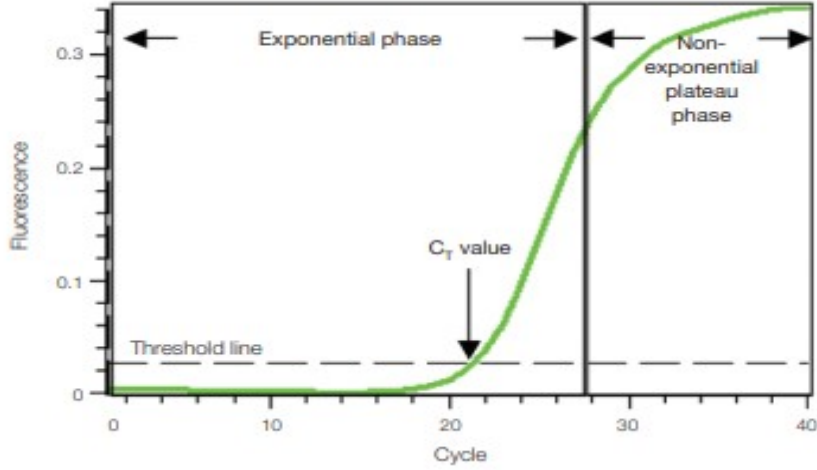
Real-Time PZR’de uygun T_A değerlerinin saptanması standart PZR ile belirlenmiştir. Her bir gen bölgesine ait PZR reaksiyonu sırasında primer bağlanma (annealing) sıcaklığı (T_A), her bir primerin T_M değerlerinden hareket edilerek hesaplanmıştır. Bu aşamada öncelikli olarak her bir primer çifti için tahmin edilen T_M değerlerinden ortalama 3-4°C altına inilmiş ve bu sıcaklığa $\pm 4^\circ\text{C}$ ’lik bir gradiyent uygulanmıştır. Buna göre tüm primerler 50-58°C aralığında gradiyente tabî tutulmuştur.

Tüm standart PZR reaksiyonları 50 µL son hacimde hazırlanmıştır. 50 µL’lik reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas, Hannover, MD), 5 µL 10^x reaksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P-40), primer çiftlerinden her birinden 10 pmol (Macrogen), 0,25 mM her bir dNTP (MBI Fermentas), 3 mM MgCl_2 , 1,2 M betain, %0,1’lik TritonX-100 ve 100-500 ng kalıp DNA eklenmiştir. Standart PZR uygulamaları aşağıdaki koşullar altından gerçekleştirilmiştir:

Başlangıç denatürasyonu:	94°C’de 3 dk
-35 döngü	
Denatürasyon:	94°C’de 45 sn
Bağlanma:	50-58°C’de 30 sn
Uzama:	72°C’de 45 sn
Son uzama:	72°C’de 10 dk
Son sıcaklık:	12°C
Her bir primerin uygun T_A değeri Çizelge’de gösterilmiştir.	

3.10.5. Real-Time PZR

Real-time PZR, oluşan ürüne bağlanan ürüne ışınım veren raportöre gereksinim duyar. Raportör oluşan ürün miktarını yansıtan floresan sinyal oluşturur. PZR döngüleri sonucunda oluşan kısa sekanslara *Amplikon* adı verilir. Başlangıç Real-Time PZR döngülerinde sinyal zayıftır. Sinyalin güçlenmesi amplikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik seviyeye ulaşması için gereken döngü sayısına *CT* (*threshold cycle*= eşik değer döngü) adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri *Ct* değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak artar (Kubista vd., 2006). Bizim çalışmamızda kullandığımız raportör *GAPDH*’tir.



Şekil 3.1. Real-Time PZR cevap eğrileri

Kontrol ve deney gurplarından elde edilen total RNA'lerden sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBER Gren I boyasının floresan ışıma özelliği kullanılarak real-time PZR gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Biorad CFX Connect cihazıyla uyumlu *Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix* kullanılmıştır. Standart PZR'da olumlu sonuç alınmış primerler ve rapörtör gen olarak da *GAPDH* geni primerleri kullanılmıştır.

İçerik; antibody-mediated hot-start Sso7d-füzyon polimeraz, referans boyalar, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I boyası, enhancer, stabilizatör.

Tüm bileşenler eritilerek oda sıcaklığına getirilir, karıştırılıp santifüjlenir. Işıktan koruyarak buzda saklanır.

- Önerilen şekilde PZR hazırlanır.

BİLEŞEN	20 µl için	10 µl için	Final Konsantrasyon
Süpermix(2x)	10 µl	5 µl	1x
OligoF	1 µl	0,5 µl	250-500 nM
OligoR	1 µl	0,5 µl	260-500 nM
Template	1,5-2 µl	1 µl	
Nükleaz içermeyen su	-	-	
Total hacim	20 µl	10 µl	

• Master mixi karıştırılıp homojenize olduğundan emin olunur. Her tüpe oligolardan eşit miktarda dağıtılır.

• DNA ve gerekirse su eklenir ve tüpler filmle kapatılır. 30 sn vorteksleyip santrifüjlenir.

- Program kurulur, PZR tüpü yüklenir ve program başlatılır.

Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu: cDNA için
95-98 °C'de 30 sn

Amplifikasyon için denatürasyon:
95-98 °C'de 5-15 sn
45-50 döngü
Bağlanma : T_A 'da 15-30 sn

Real-Time PZR'da genel olarak anlamlı floresan işaret kaçınıcı döngüden itibaren sayaçlar tarafından algılanabiliyorsa o değer üzerinden kalitatif olarak hedef nükleotid dizisinin miktarı hakkında yorum yapma imkanı oluşur. Reaksiyon sonrası elde edilen ct (cycle treshold, RFU (relative frequency of unit/cycle) değerlerinin yorumlanması şu şekildedir; Ct değeri 18-24 arasında ise reaksiyon oldukça başarılıdır, örnek içerisinde hedef nükleotid dizisi oldukça fazla; ct değeri 24-30 arasında ise reaksiyon başarılıdır, hedef nükleotid dizisi orta seviyede mevcut, ct değeri 30-34 arasında ise reaksiyon az da olsa başarılıdır, örnek içerisinde hedef nükleotid dizisinin az; ct değeri 34 ve yukarısında ise reaksiyon başarılı sayılmaz,

ortamda herhangi bir kontaminasyon ya da çok az miktarda hedef nükleotid dizisi vardır (Schmittgen ve Livak, 2008). Ct değerleri üzerinden $2^{\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplanmıştır. Buradaki amaç, genlerin ifade düzeylerinin nispi artış ya da azalışının belirlenmesidir.



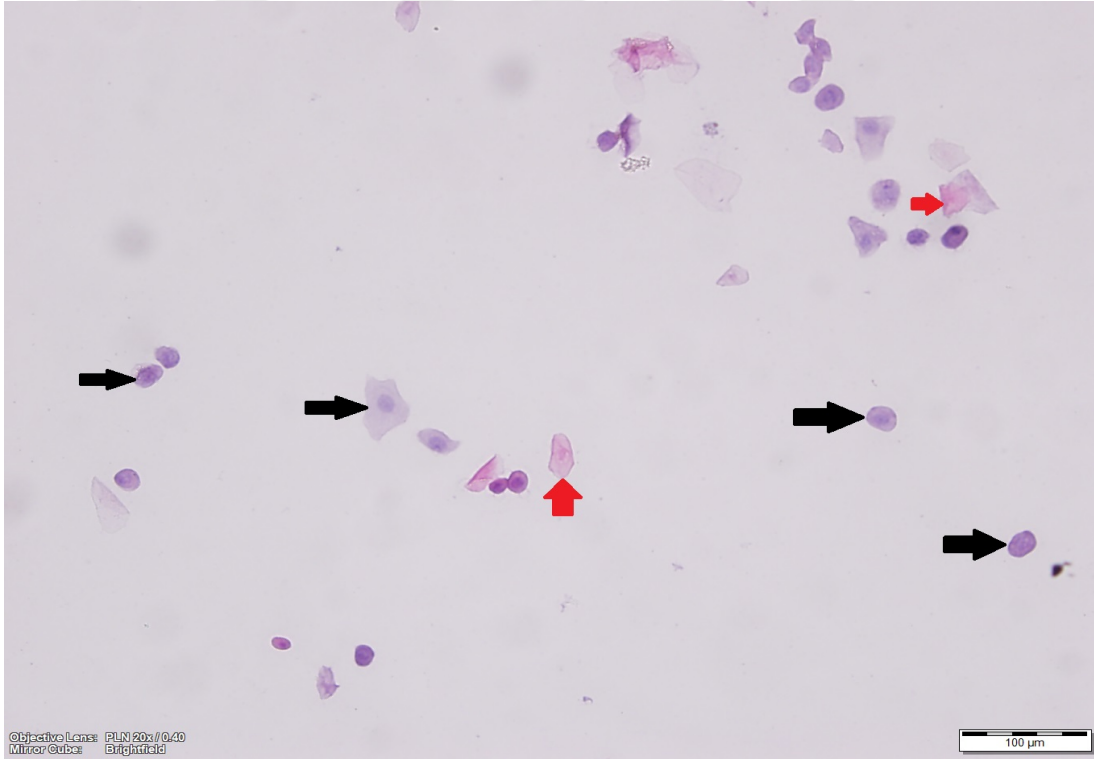
4. BULGULAR

Wnt3, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Ve-kadherin* proteinlerinin peri-implantasyon döneminde sıçan endometriumundaki ekspresyonları semi-kantitatif skorlama yöntemiyle belirlenerek sonuçlar Tablo 4.1-4.7’de verilmiştir.

4.1. Grup-1 Bulguları

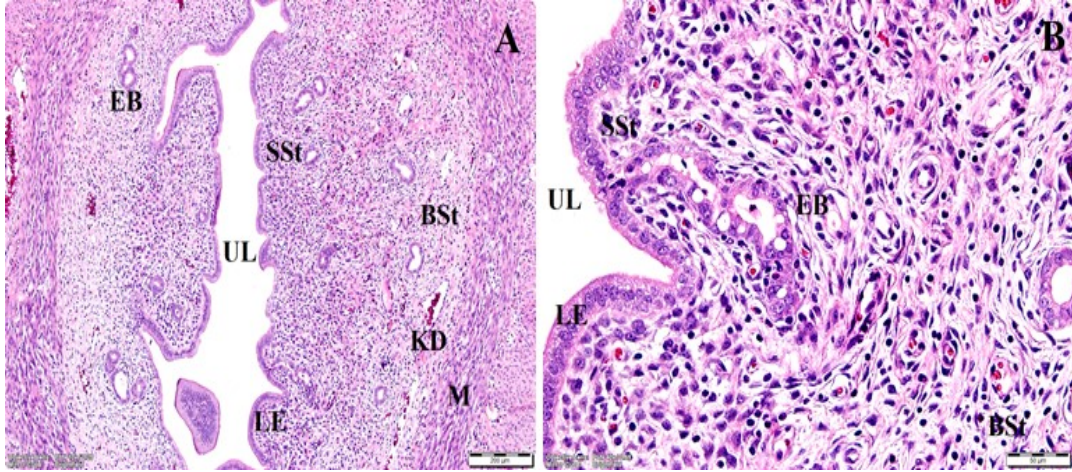
4.1.1. Proöstrus Evresi

Proöstrus evresinde vajinal sitolojide çekirdekleri koyu boyanmış epitel hücrelerine rastlandı. Bu hücrelerde keratin bulunmamaktadır. Bu dönemde keratinleşmemiş çekirdekleri belli olan hücre ve yassı hücre grupları baskın formda izlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Proöstrus evresi vajinal sürüntü bulguları (H&E). Kırmızı ok: Epitel hücreleri; Siyah ok: Keratinleşmemiş çekirdekli hücreler.

Proöstrus siklusunda rat uterusundan alınan histolojik kesitlerde tek katlı prizmatik epitel görüldü. Epitel hücreleri koyu boyanmış hücrelerden oluşmaktaydı. Endometrial bezler hipertrofik özellikte olup stromada damarlanmalar belirgindi (Şekil 4.2 A-B).



Şekil 4.2. Proöstrus evresi H&E bulguları(A,B). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium)

Wnt3, *Wnt7a*, β -*katenin*, *Et-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* proteinlerinin proöstrus evresindeki immüno Floresan bulguları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Proöstrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* immüno lokalizasyonları

Proöstrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Endometrial bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	+	+	++	++++	++++
<i>Wnt7a</i>	++	++	++	+++	+++
β - <i>katenin</i>	++++	++++	+++	+++	++++
<i>ET-1</i>	+++	+++	++	+++	++++
<i>Ang-1</i>	+++	+++	+	+	++
<i>VE-kadherin (cdh5)</i>	+	+	+++	+++	++++

++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok

Wnt3; bu evrede endometrial luminal epitelde zayıf ekspresyon görülmektedir. Endometrial bezlerin epitelinde de zayıf ekspresyon görülürken (Şekil 4.3 A-B), bez epitelini çevreleyen stroma bölgesinde kuvvetli ekspresyon şiddeti bulunmaktadır. Subluminal stromada orta derecede bir ifade seviyesi izlenirken, subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe *Wnt3* ekspresyon şiddetinin gittikçe çok kuvvetli bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Stromada yer alan kan damarlarının endotelinde ise kuvvetli bir ekspresyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.3 C-D).

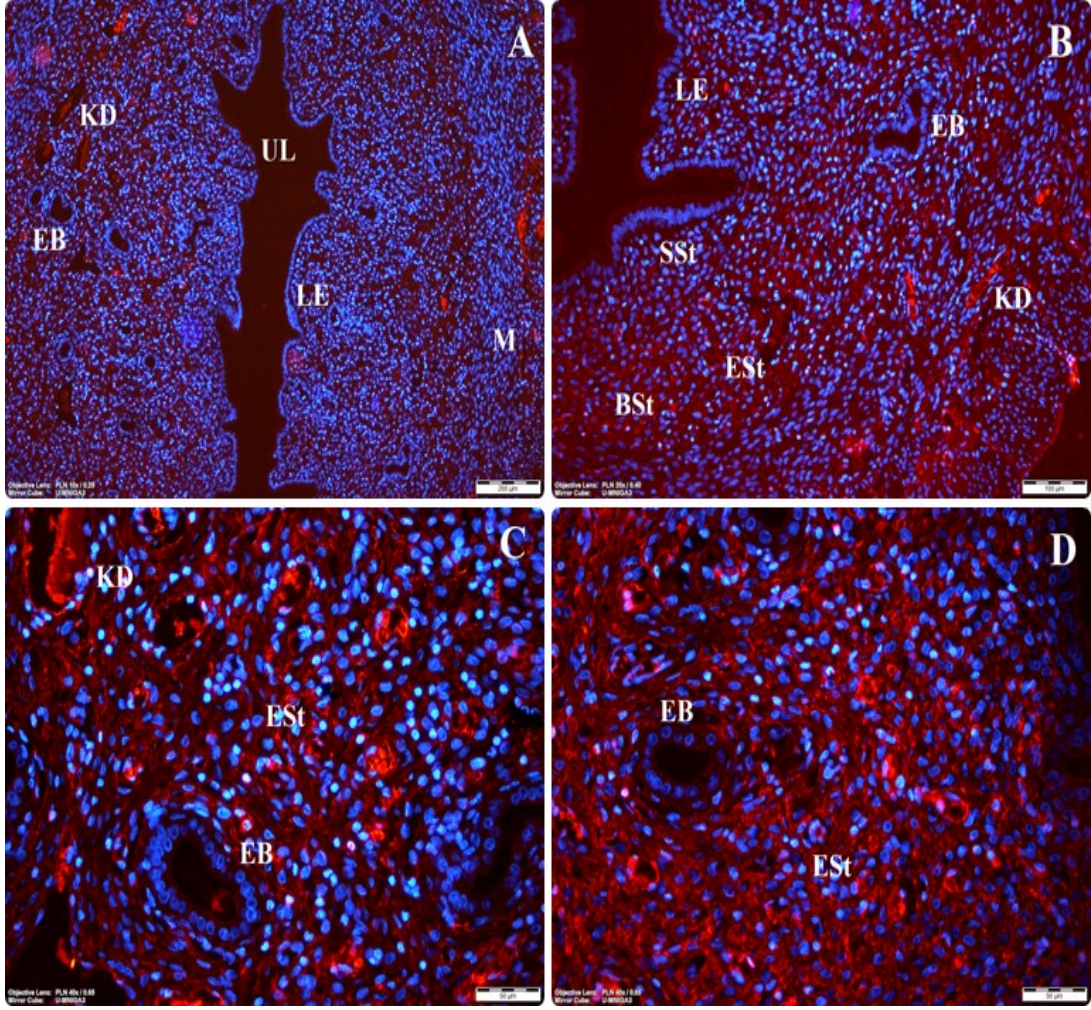
Wnt7a; bu evrede luminal epitel, endometrial bez epiteli ve subluminal stromada orta seviyede bir ekspresyon görülmektedir. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe ekspresyon seviyesinde bir artış görülmüştür. Ayrıca stromada yer alan kan damarlarının endotelinde de kuvvetli bir ekspresyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4 B-C).

β -katenin; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelindeki hücrelerin membranlarında ve komşu iki hücre arasındaki lateral sınırlarında çok kuvvetli ekspresyon şiddeti izlenirken, subluminal stroma ve bazal stromada aynı derecede kuvvetli bir ekspresyon şiddeti olduğu görülmektedir. Ayrıca stromada yer alan kan damarlarının endotelinde de çok kuvvetli bir ekspresyon olduğu izlenmektedir (Şekil 4.5 C-D).

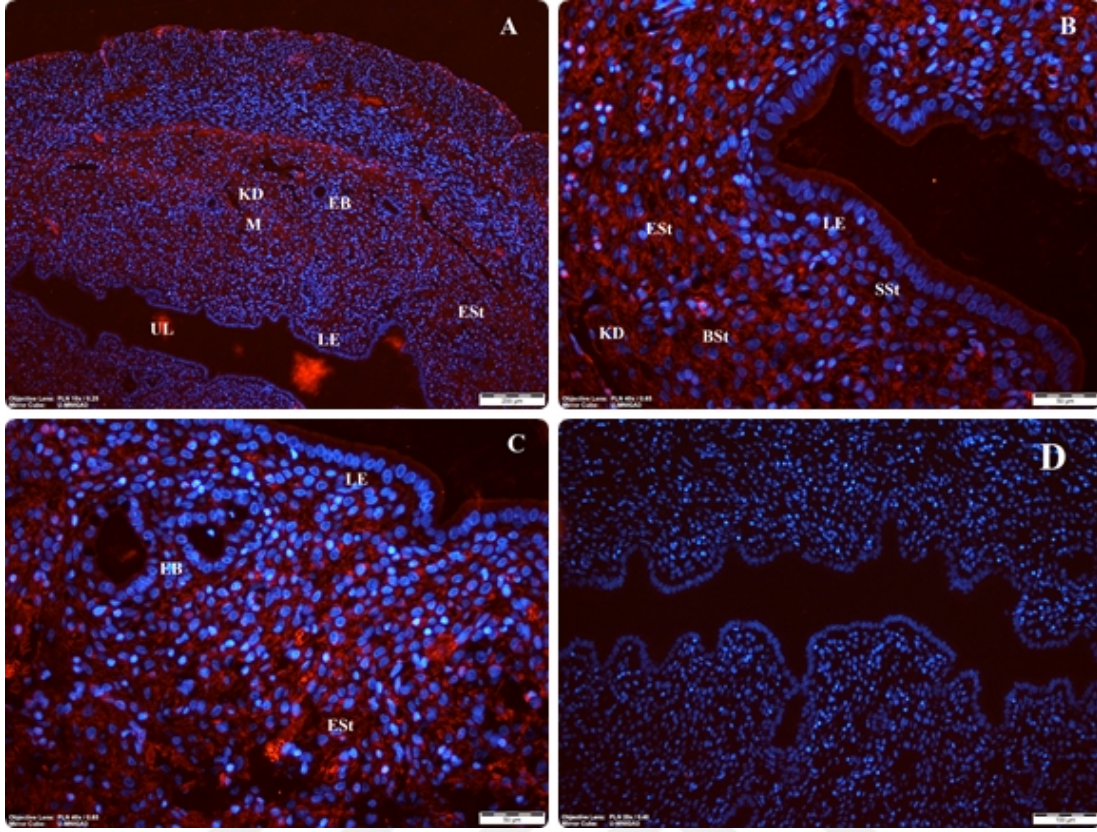
Endotelin-1; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epiteli hücrelerinin apikalinde kuvvetli derecede ekspresyon izlenirken (Şekil 4.6 E), subluminal stromada ekspresyon seviyesi orta derece ifade seviyesine kadar azalmıştır. Bazal stromadaki ekspresyon ifadesinde ve bazal stromadaki kan damarları endotelinde kuvvetli şiddette ekspresyon olduğu saptandı (Şekil 4.6 D-F).

Angiopietin-1; bu evrede luminal epitel ve bez epiteli hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli derecede bir ekspresyon olduğu görülmektedir. Subluminal stromada ve bazal stromada zayıf dereceli bir ekspresyon seviyesi izlenmiştir, ancak subluminal stroma ve bazal stromadaki stromal hücrelerin sitoplazmasında çok kuvvetli bir ekspresyon olduğu görüldü (Şekil 4.7 D). Bazal stromada bulunan kan damarı endotelinde ise orta şiddette bir ekspresyon olduğu izlenmiştir (Şekil 4.7 C).

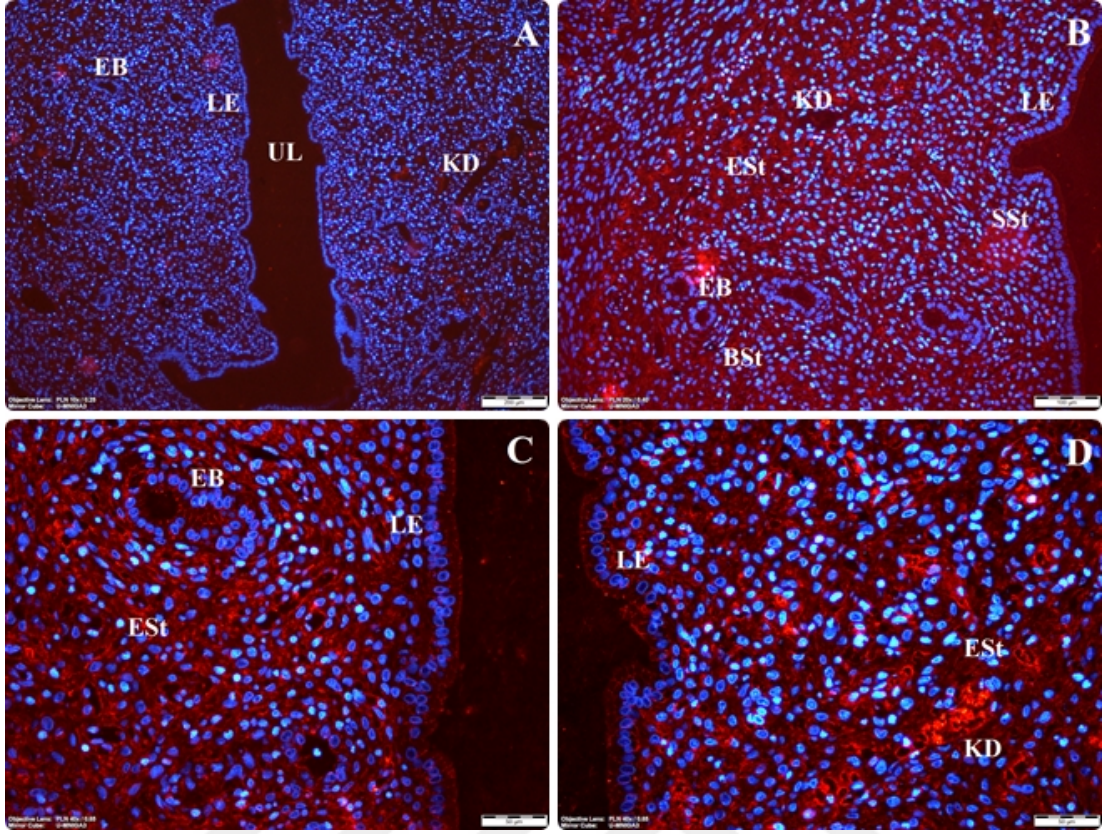
Ve-kadherin(Cdh5); bu evrede luminal epitel ve bez epitelinde zayıf şiddette bir ekspresyon olduğu görülmüştür. Subluminal stroma ve bazal stromada kuvvetli derecede bir ekspresyon seviyesi izlenmiştir (Şekil 4.8 D-E). Bazal stromadaki kan damarları endotelinde çok kuvvetli seviyede ifade edildiği görülmektedir (Şekil 4.8 E).



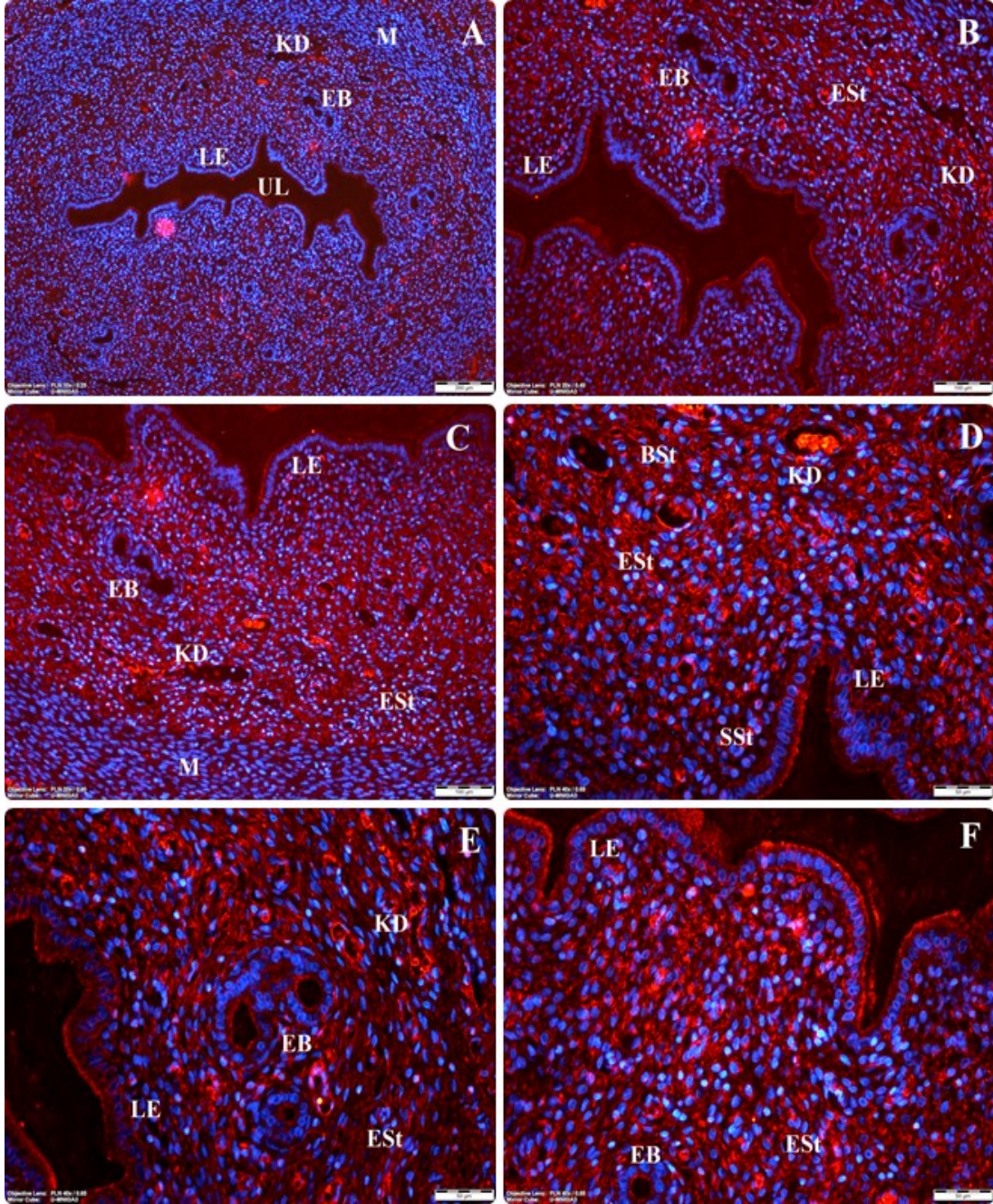
Şekil 4.3. Proöstrus evresinde *Wnt3* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



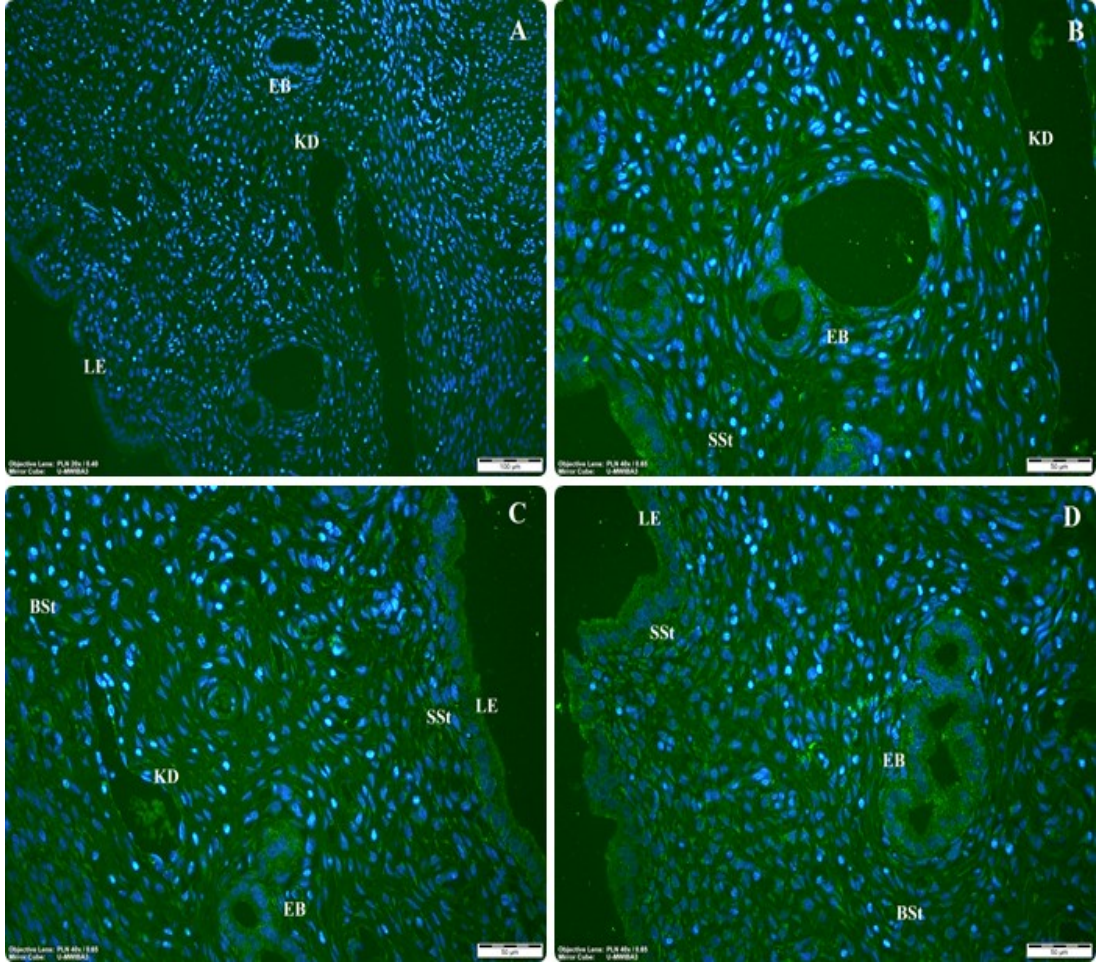
Şekil 4.4. Proöstrus evresinde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A, B, C). Negatif kontrol (D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



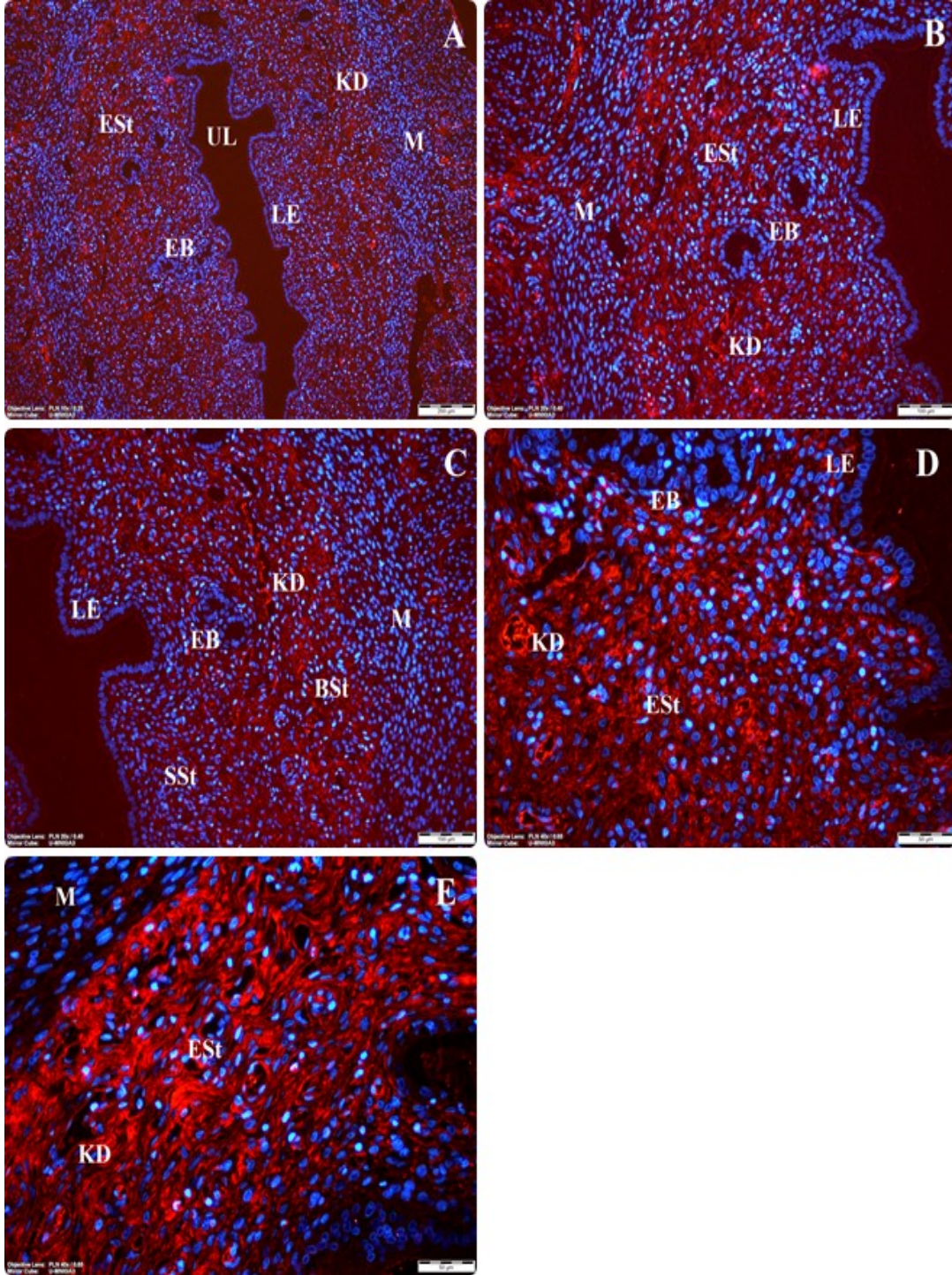
Şekil 4.5. Proöstrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Beaz; KD: Kan damarı; ESSt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometriyum).



Şekil 4.6. Proöstrus evresinde *ET-1* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E, F). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



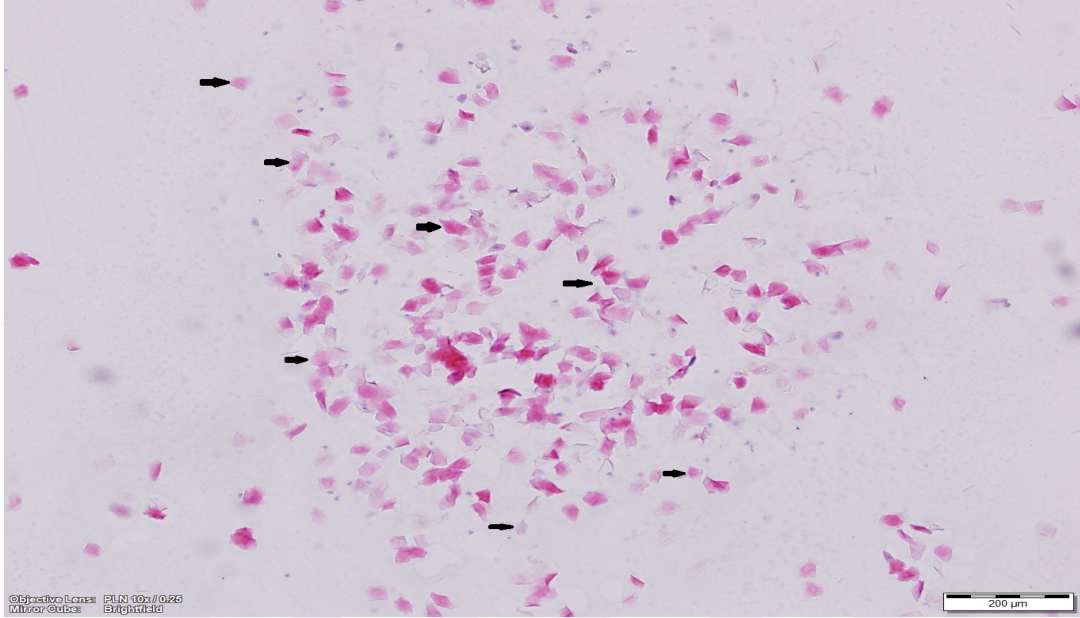
Şekil 4.7. Proöstrus evresinde *Ang-1* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.8. Proöstrus evresinde *Cdh5* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).

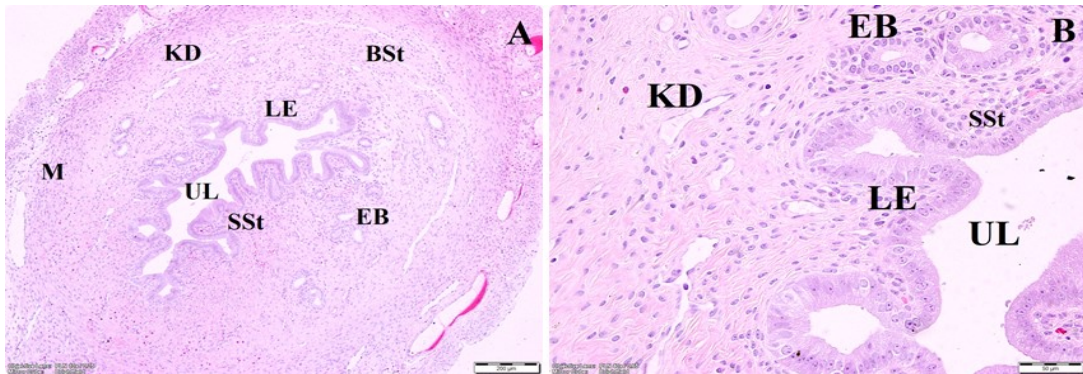
4.1.2. Östrus Evresi

Östrus evresinin vajinal sitolojisi incelendiğinde, çekirdeklerini kaybetmiş keratinize kornifiye epitel hücrelerine rastlanmıştır ve bu hücre grupları baskın bir şekilde gözlenmiştir. Ayrıca bu evrede lökositlere rastlanmamıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Östrus evresi vajinal sürüntü bulguları (H&E). Siyah ok: Keratinleşmiş hücreler.

Östrus evresinde rat uterusunda alınan histolojik kesitlerde epitel tek katlı prizmatik olarak izlendi. Epitel hücrelerinin çekirdekleri açık renkte boyanmış hücrelerden oluşmaktaydı. Luminal epitele kadar uzanmış damarlanmalar mevcuttu (Şekil 4.10 A-B).



Şekil 4.10. Östrus evresi H&E bulguları (A,B). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).

Wnt3, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* proteinlerinin östrus evresindeki immünfloresan bulguları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Östrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* immüno lokalizasyonları

Östrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Endometrial bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	++	++	++	++++	++++
<i>Wnt7a</i>	+	+	+++	++++	++++
β - <i>katenin</i>	++++	++++	+	+++	+++
<i>ET-1</i>	+++	+++	++	+++	++++
<i>Ang-1</i>	+++	++++	++	+++	+++
<i>VE-kadherin (Cdh5)</i>	+	+	+	+++	+++

++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok

Wnt3; bu evrede luminal epitel, endometrial bez epiteli ve subluminal stromada orta şiddette bir ekspresyon ifadesi görülürken; bazal stromada ekspresyon şiddetinde kuvvetli bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.11 B-C). Ayrıca bazal stromada bulunan kan damarı endotelinde de kuvvetli bir ekspresyon ifadesine sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11 D).

Wnt7a; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde zayıf ekspresyon ifadesi izlenmiştir. Subluminal stromada kuvvetli bir ekspresyon ifadesi izlenirken, bazal stromada çok kuvvetli şiddette bir ekspresyon ifadesi görülmüştür (Şekil 4.12 A-C). Bazal stromada bulunan kan damarı endotelinde de çok kuvvetli şiddette bir ekspresyon olduğu izlenmiştir (Şekil 4.12 B).

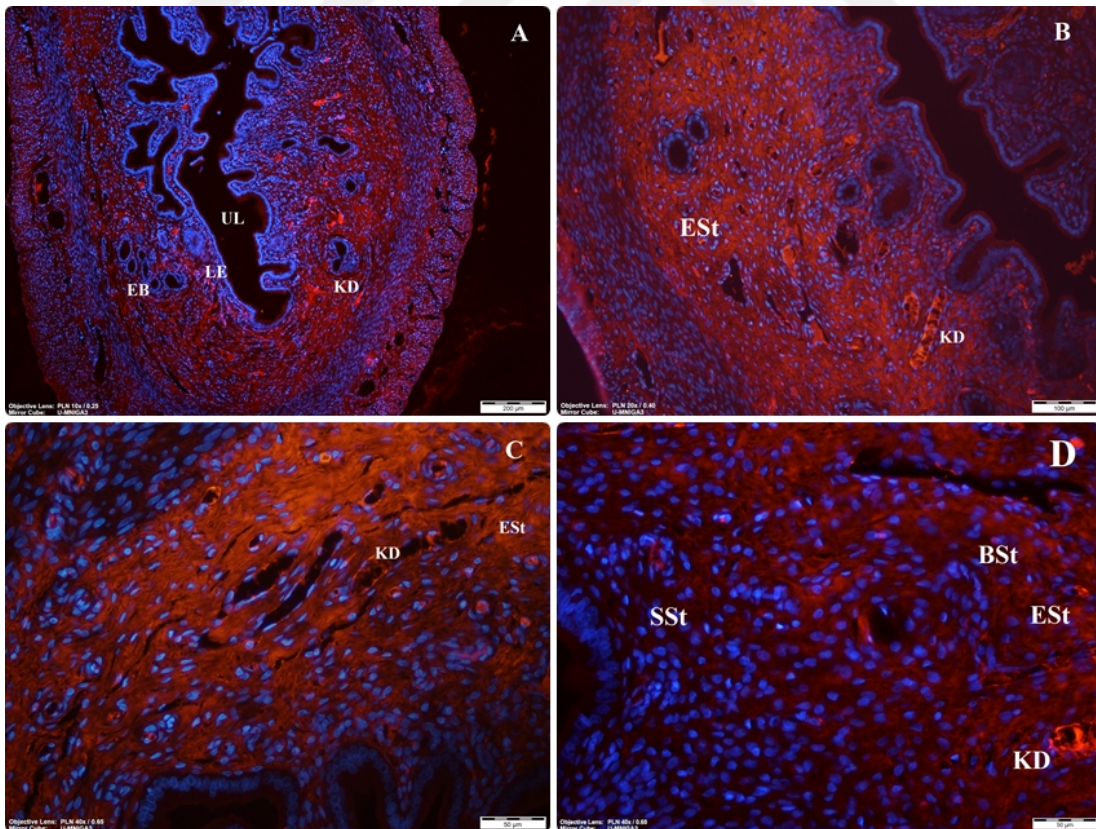
β -*katenin*; bu evrede luminal epitel ve bez epiteli hücrelerinin bazo-lateral ve apikal sınırlarında çok kuvvetli bir ifade seviyesi izlenirken, subluminal stroma ve bazal stromada zayıf bir ekspresyon seviyesine doğru artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.13 B). Bazal stromada bulunan kan damarı endotelinde ise kuvvetli ekspresyon görüldü (Şekil 4.13 C).

Endotelin-1; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epiteli hücrelerinin apikal yüzünde sitoplazmasında kuvvetli şiddette bir ekspresyon şiddeti izlenmiştir (Şekil 4.14 C). Subluminal stromada orta şiddette ekspresyon ifadesi bulunurken bazal

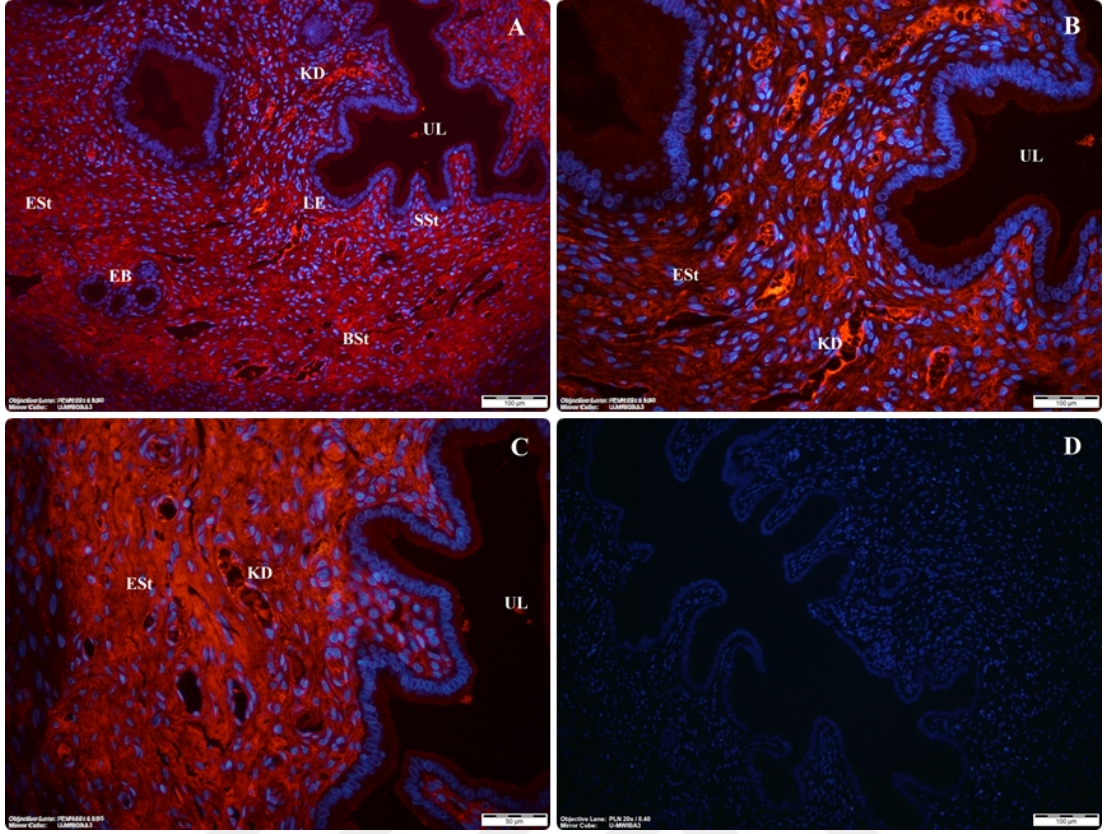
stromada kuvvetli bir ekspresyon düzeyi izlenmiştir (Şekil 4.14 E). Bazal stromada yer alan kan damarlarında ise çok kuvvetli bir ifade seviyesi görülmektedir (Şekil 4.14 D).

Angiopoietin-1; bu evrede luminal epitelin sitoplazmasında kuvvetli şiddette bir ekspresyon düzeyi bulunurken, endometrial bez epiteli hücrelerinin sitoplazmasında çok kuvvetli şiddette bir ifade seviyesi izlenmiştir (Şekil 4.15 B-D). Subluminal stromada orta şiddette bir ifade düzeyi görülürken, bazal stromada kuvvetli bir ekspresyon görülmektedir. Bazal stromada bulunan kan damarlarında ise kuvvetli bir ekspresyon düzeyi olduğu görülmektedir (Şekil 4.15 C).

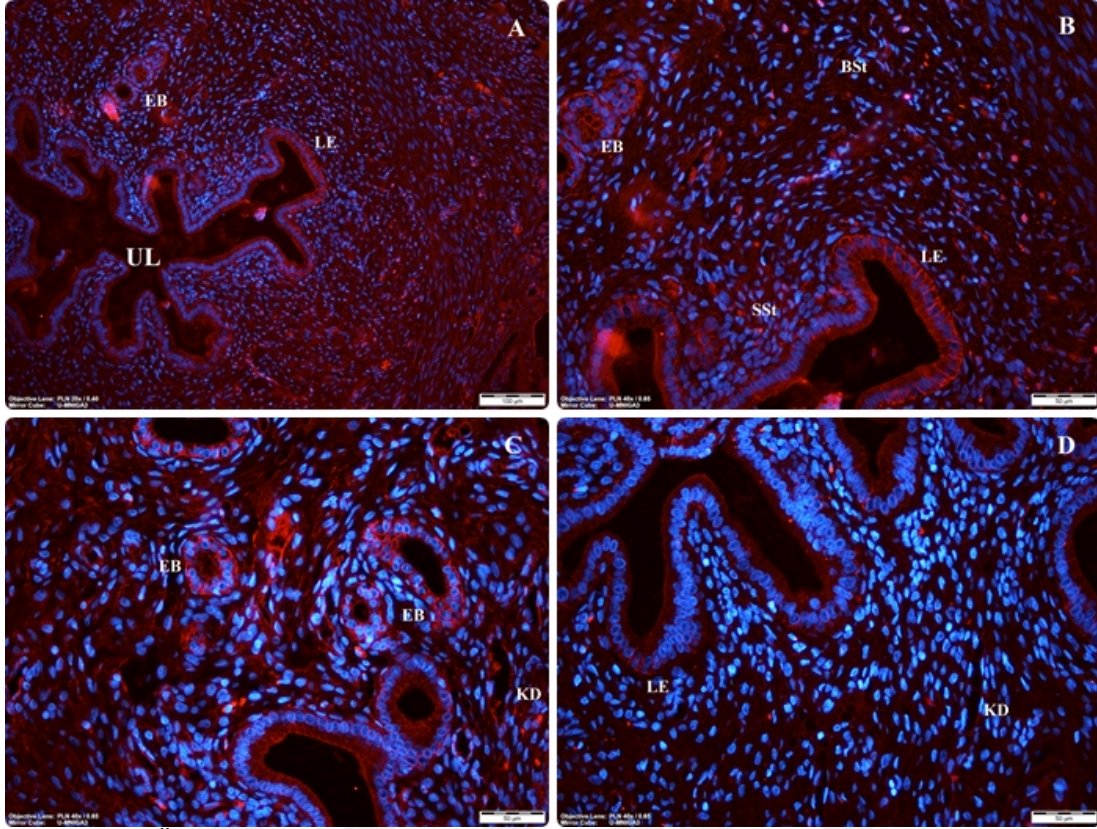
VE-kadherin(Cdh5); bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde zayıf derecede bir ekspresyon seviyesi izlenmiştir. Subluminal stromada orta şiddette bir ekspresyon görülürken bazal stromada kuvvetli şiddette bir ekspresyon ifadesi görülmüştür (Şekil 4.16 B-D). Bazal stromada bulunan kan damarlarında ise yine kuvvetli bir ekspresyon düzeyi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.16 C).



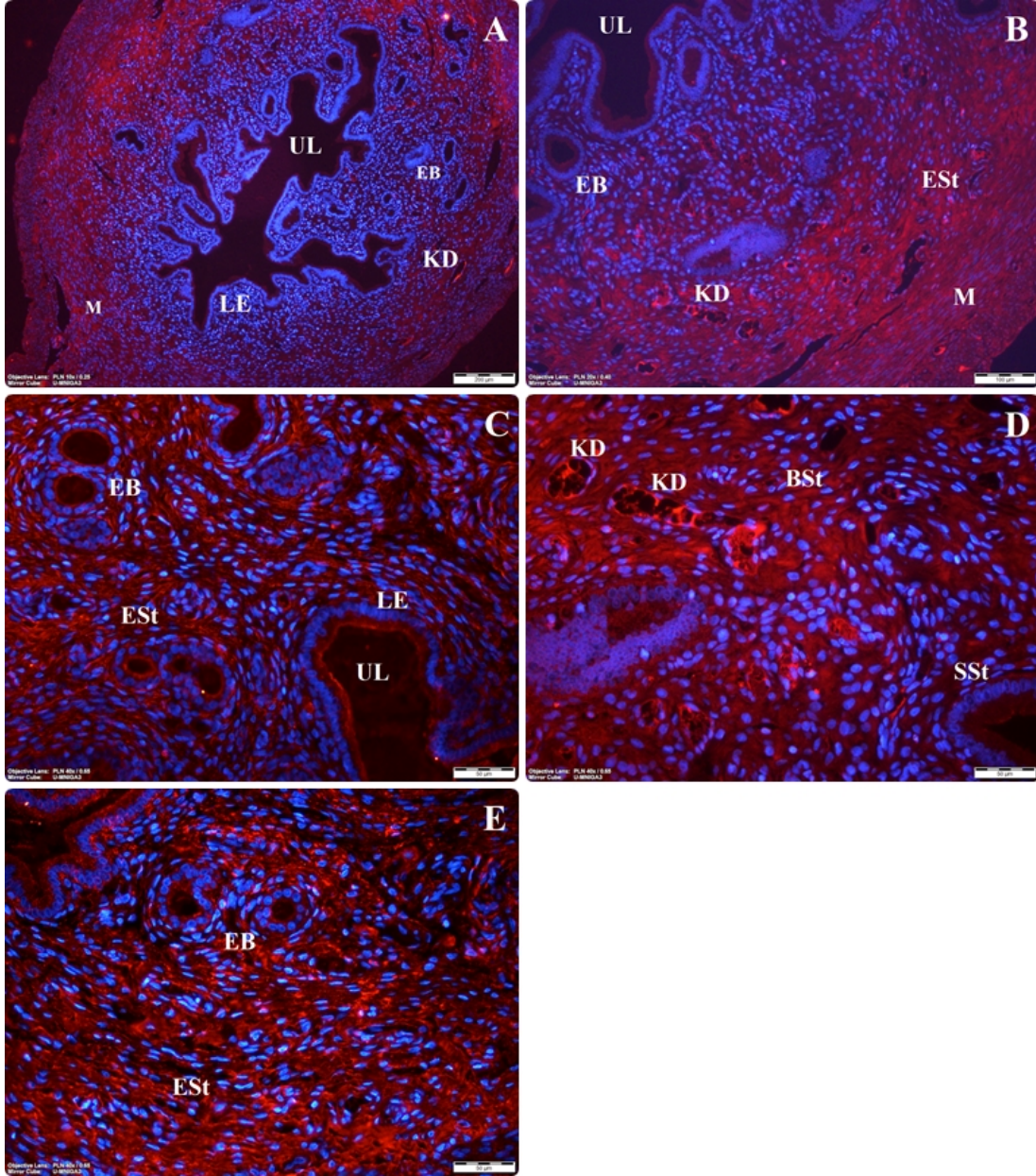
Şekil 4.11. Östrus evresinde *Wnt3* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



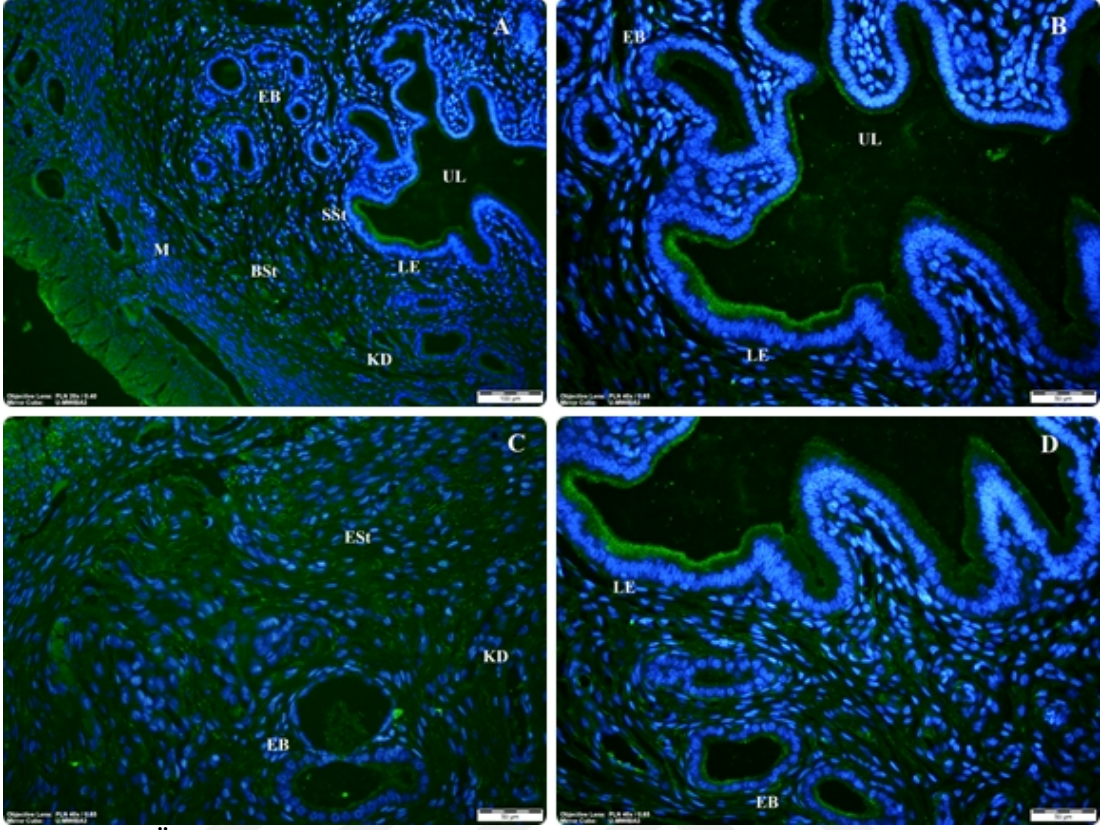
Şekil 4.12. Östrus evresinde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A, B, C). Negatif kontrol (D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



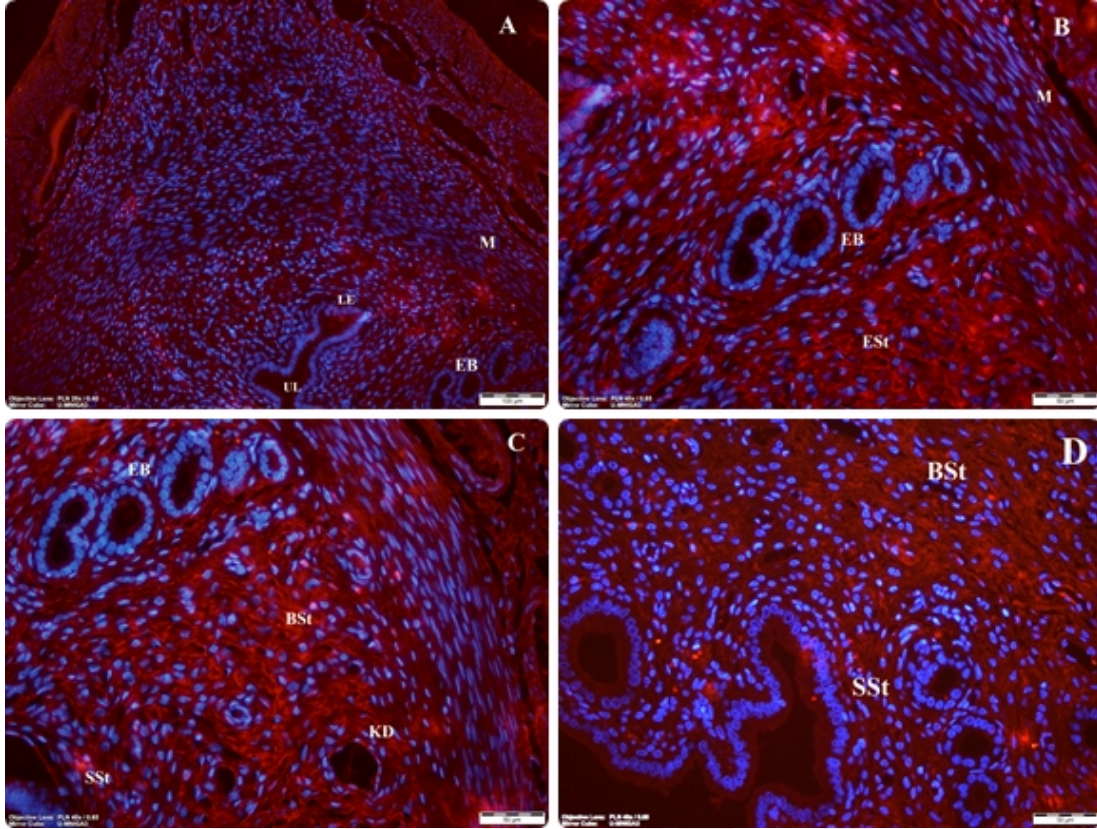
Şekil 4.13. Östrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.14. Östrus evresinde *ET-1* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESst: Endometrial stroma; SSst: Subluminal stroma; BSst: Bazal stroma; M: Miyometrium).



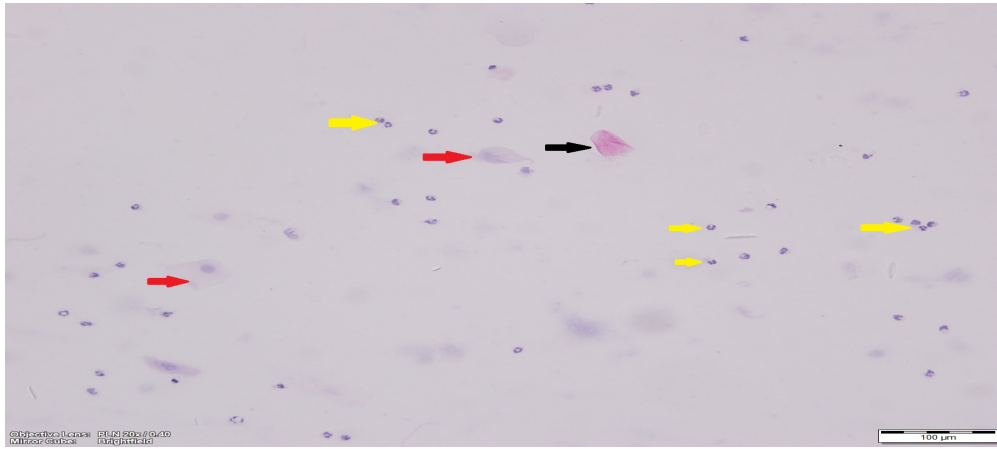
Şekil 4.15. Östrus evresinde *Ang-1* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESSt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.16. Östrus evresinde *Cdh5* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESSt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).

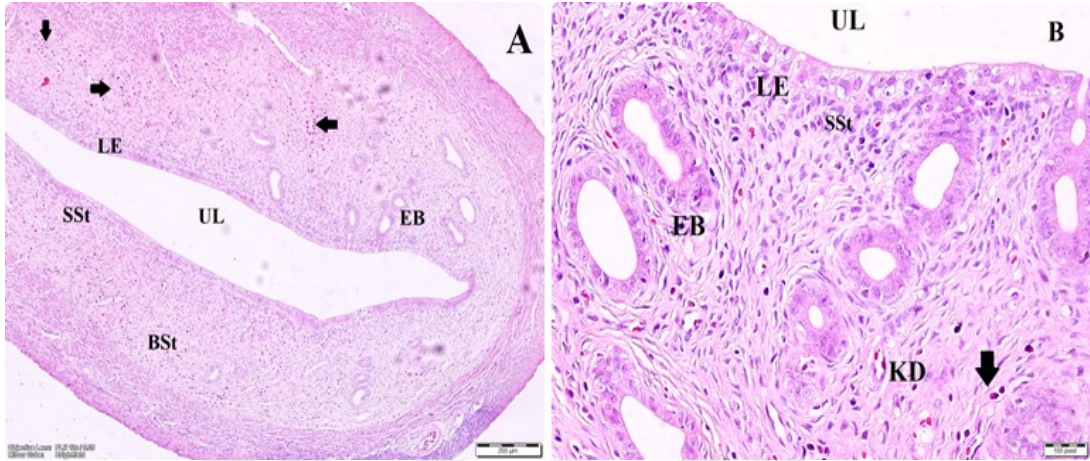
4.1.3. Metaöstrus Evresi

Metaöstrus evresi vajinal sitolojisi incelendiğinde en belirgin olarak bol sayıda lökosit varlığıydı. Bununla birlikte çekirdeğini kaybetmiş kornifiye epitel ve çekirdekli epitel hücreleri saptanmıştır (Şekil 4.17)



Şekil 4.17. Metaöstrus evresi vajinal sürüntü bulguları (H&E). Siyah ok: Keratinleşmiş hücreler; Kırmızı ok: Çekirdekli epitel hücreleri; Sarı ok: Lökositler.

Metaöstrus evresinde rat uterusundan alınıp hazırlanan histolojik preparatlarda luminal epitel düzgün tek katlı prizmatik olarak izlendi, epitel hücrelerinin çekirdeği koyu boyanma özelliği göstermişti. Luminal epitelde vakuoller izlendi. Lökosit infiltrasyonuna bağlı olarak birçok yerde lökosit hücreleri izlendi. Damarlanma ve endometrial bezlerde azalma görüldü.



Şekil 4.18. Metaöstrus evresi ışık mikroskop bulguları (A,B) (H&E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; EST: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometriyum).

Wnt3, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Ve-kadherin* proteinlerinin metaöstrus evresindeki immünofloresan bulguları Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Metaöstrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Ve-kadherin* immünolokalizasyonları

Metaöstrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Endometrial bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	+	+	+++	++++	+++
<i>Wnt7a</i>	++	++	+++	++++	++++
β - <i>katenin</i>	++++	++++	+	+	+++
<i>ET-1</i>	+	+	++	++	+++
<i>Ang-1</i>	++++	+++	++	++	+++
<i>VE-kadherin (Cdh5)</i>	++	++	++	+++	+++

++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok

Wnt3; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde zayıf seviyede bir immünolokalizasyona sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.19 C). Subluminal stromada *Wnt3* ekspresyonunun şiddeti kuvvetli iken, bazal stromaya doğru gidildikçe

ekspresyon düzeyinde artış olup çok kuvvetli seviyelere çıkmıştır. Bazal stromadaki kan damarları endotelinde kuvvetli düzeyde bir ekspresyon ifadesi olduğu saptanmıştır. Ayrıca bazal stroma bölgesinde bol miktarda lökosit izlenmiştir (Şekil 4.19 B-D).

Wnt7a; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde orta düzeyde bir ekspresyon düzeyi görülmektedir. Subluminal stroma ve bazal stromada **Wnt7a**'nın kuvvetli bir ekspresyon seviyesine olduğu görülmektedir (Şekil 4.20 C). Bazal stromada bulunan kan damarları endotelinde çok kuvvetli ekspresyon şiddeti olduğu gözlenmektedir. Ayrıca yine bazal stromada bol miktarda lökosit olduğu saptanmıştır (Şekil 4.20 D).

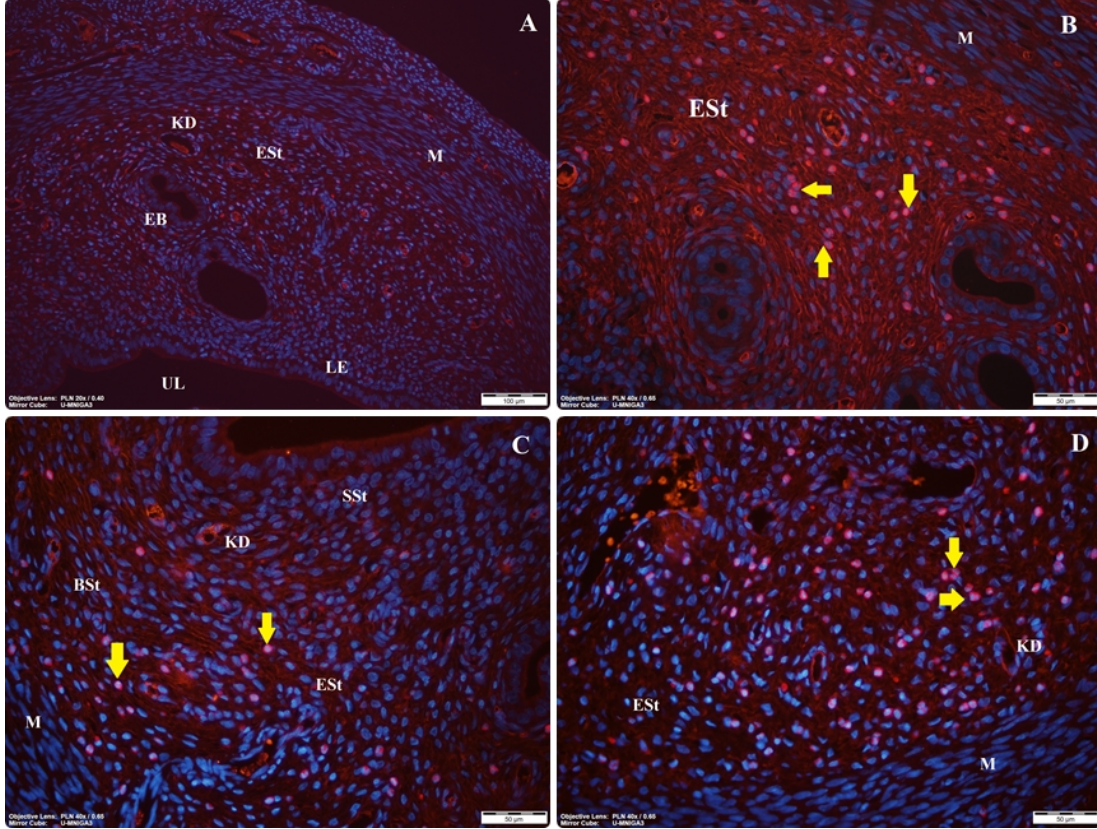
β -katenin; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelindeki hücrelerin bazo-lateral ve apikal sınırlarında **β -katenin** ekspresyon düzeyinin çok kuvvetli seviyede olduğu görülmektedir (Şekil 4.21 B-D). Subluminal stroma ve bazal stromada kuvvetli düzeyde bir ekspresyon olduğu görülmektedir. Bazal stromada bulunan kan damarlarında da kuvvetli düzeyde bir ekspresyon seviyesi saptanmıştır (Şekil 4.21 C).

Endotelin-1; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epiteli hücrelerinde zayıf seviyede bir ekspresyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.22 C). Subluminal stromada ve bazal stromada orta düzeyde bir ekspresyon ifadesi izlenmektedir. Bazal stromadaki kan damarlarında ise **ET-1**'in kuvvetli bir ekspresyon ifadesine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.22 B-D).

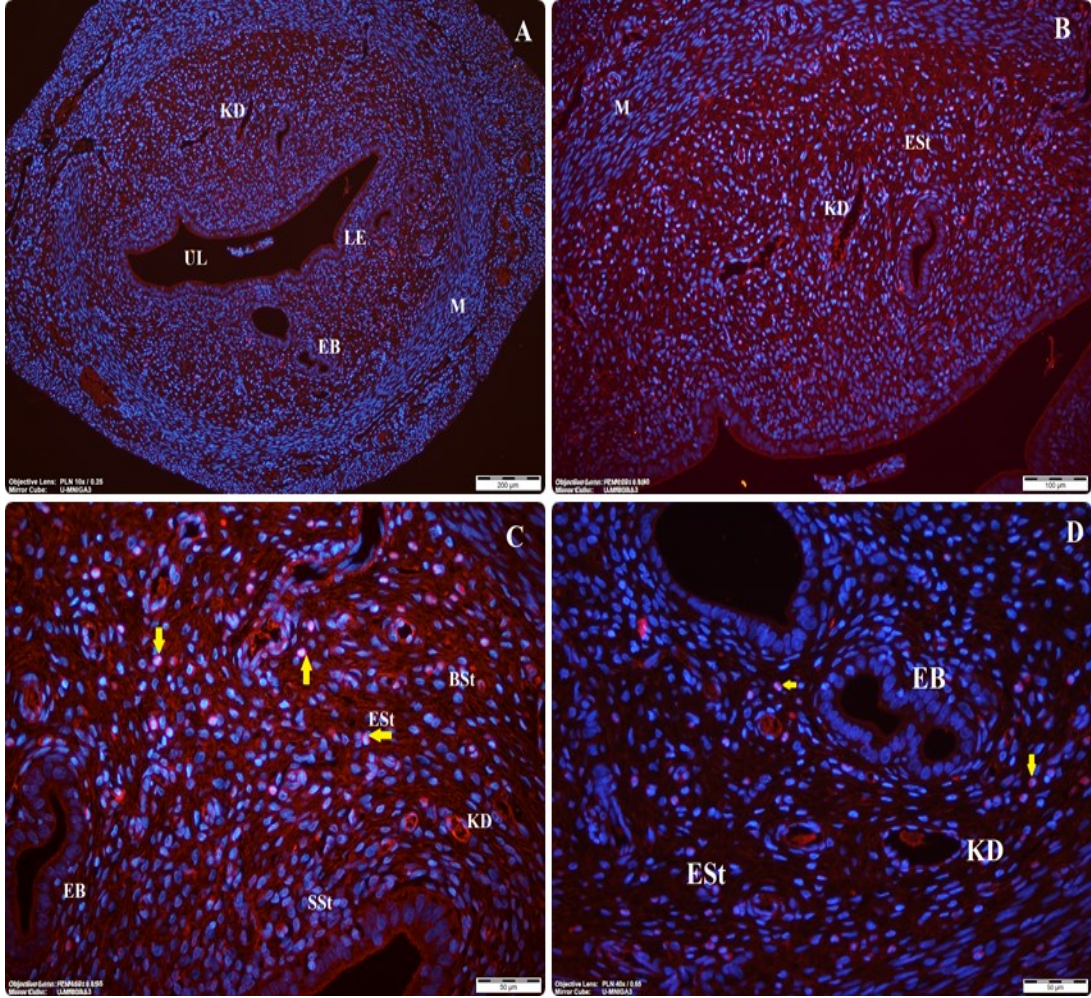
Angiopoietin-1; bu evrede luminal epitelde **Ang-1**'in çok kuvvetli seviyede bir ekspresyona sahip olduğu görülmektedir. Endometrial bezlerin epitelinde ise kuvvetli bir ekspresyon düzeyinin olduğu görülmektedir (Şekil 4.23 C-D). Subluminal stroma ve bazal stromada orta derecede bir ekspresyon olduğu görülürken, bazal stromada yer alan kan damarlarının endotelinin etrafındaki stromal hücrelerde ise kuvvetli derecede bir ekspresyon olduğu saptanmıştır (Şekil 4.23 D).

Ve-kadherin(Cdh5); bu evrede lumina epitel ve endometrial bez epiteli hücrelerinde orta düzeyde bir ekspresyon seviyesi gözlenmektedir (Şekil 4.24 B). Subluminal stromada orta düzeyde bir ekspresyon seviyesi görülürken, bazal stromada

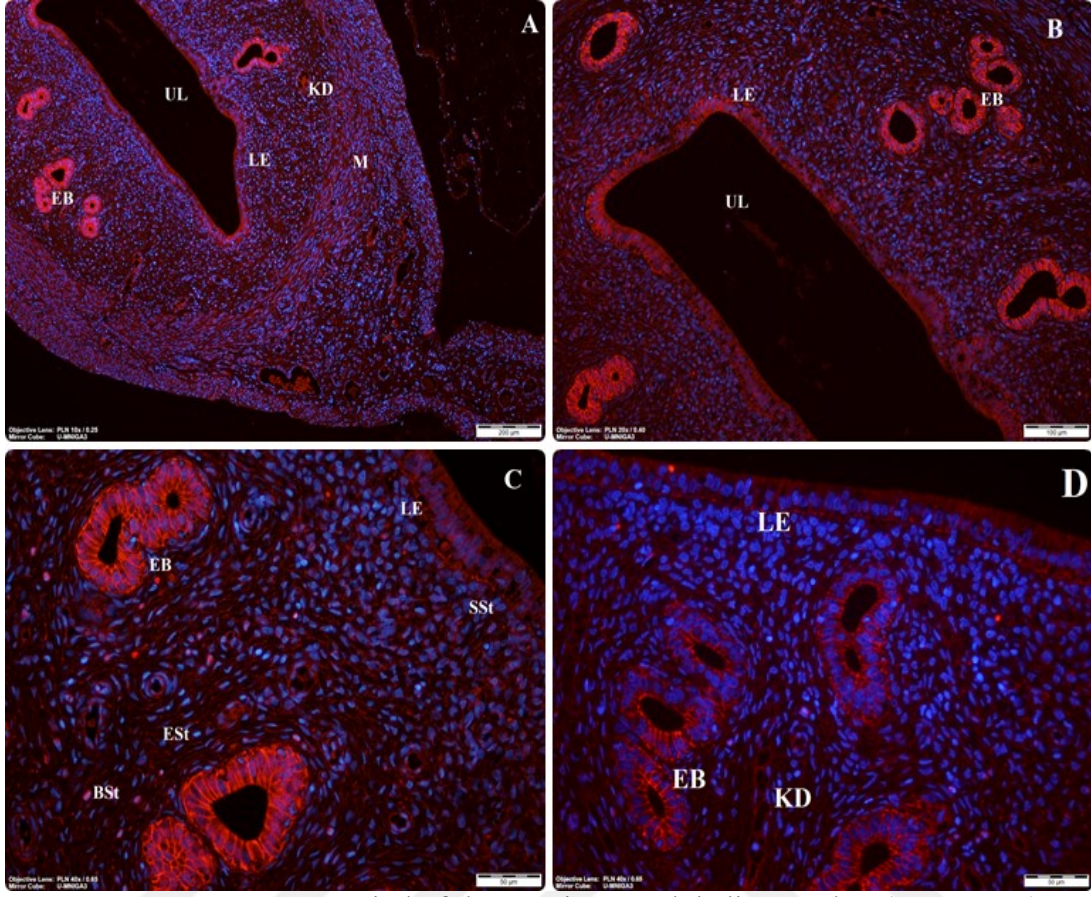
ekspresyon şiddetinin kuvvetli seviyede olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24 C-F). Bazal stromada bulunan kan damarları endotelinde de kuvvetli bir ekspresyon olduğu görülmektedir. Ayrıca bazal stromada bol miktarda lökosit bulunmaktadır (Şekil 4.24 E).



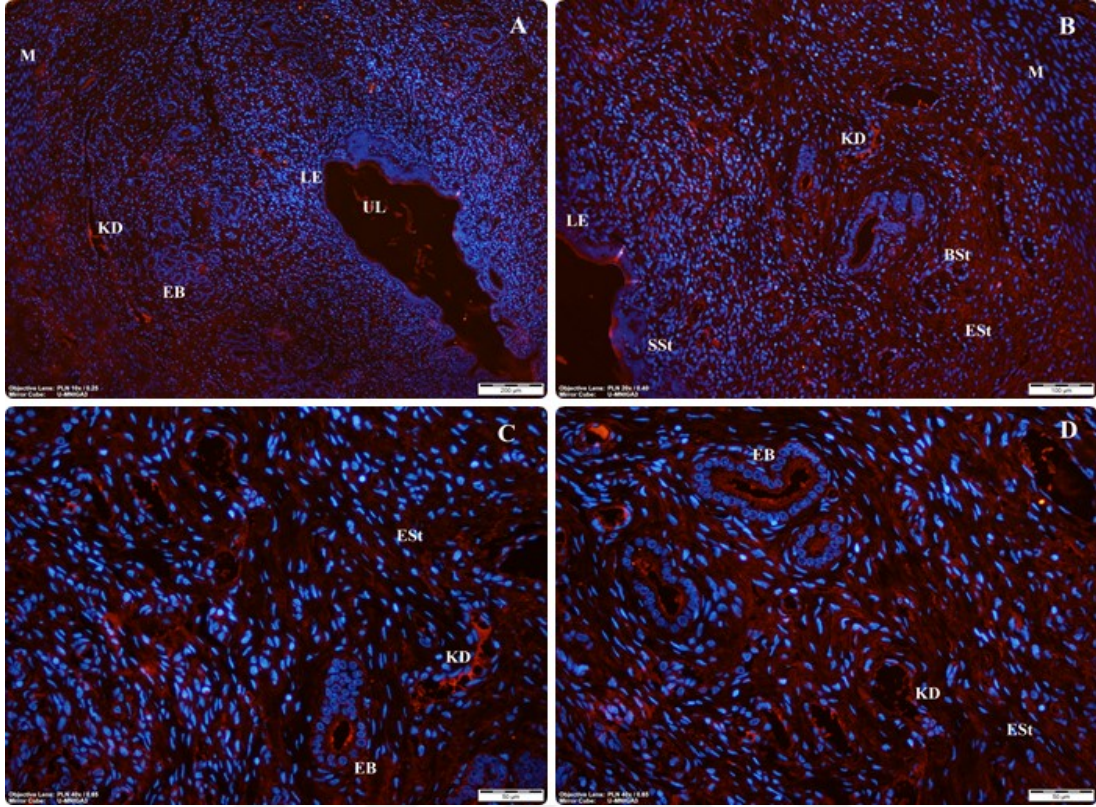
Şekil 4.19. Metaöstrus evresinde *Wnt-3* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSSt: Bazal stroma; M: Miyometrium; Sarı ok: Lökositler).



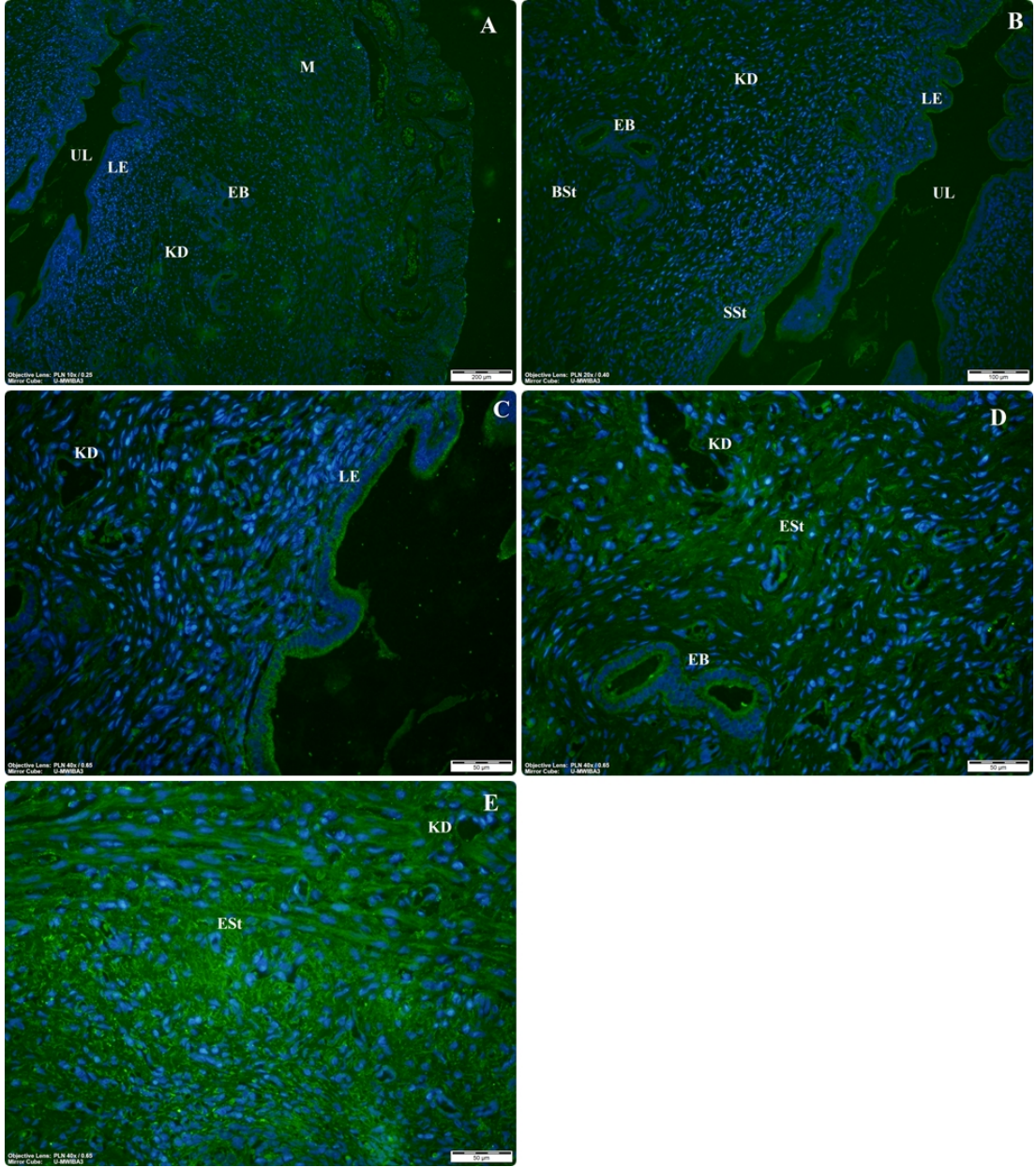
Şekil 4.20. Metaöstrus evresinde *Wnt-7a* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium; Sarı ok: Lökositler).



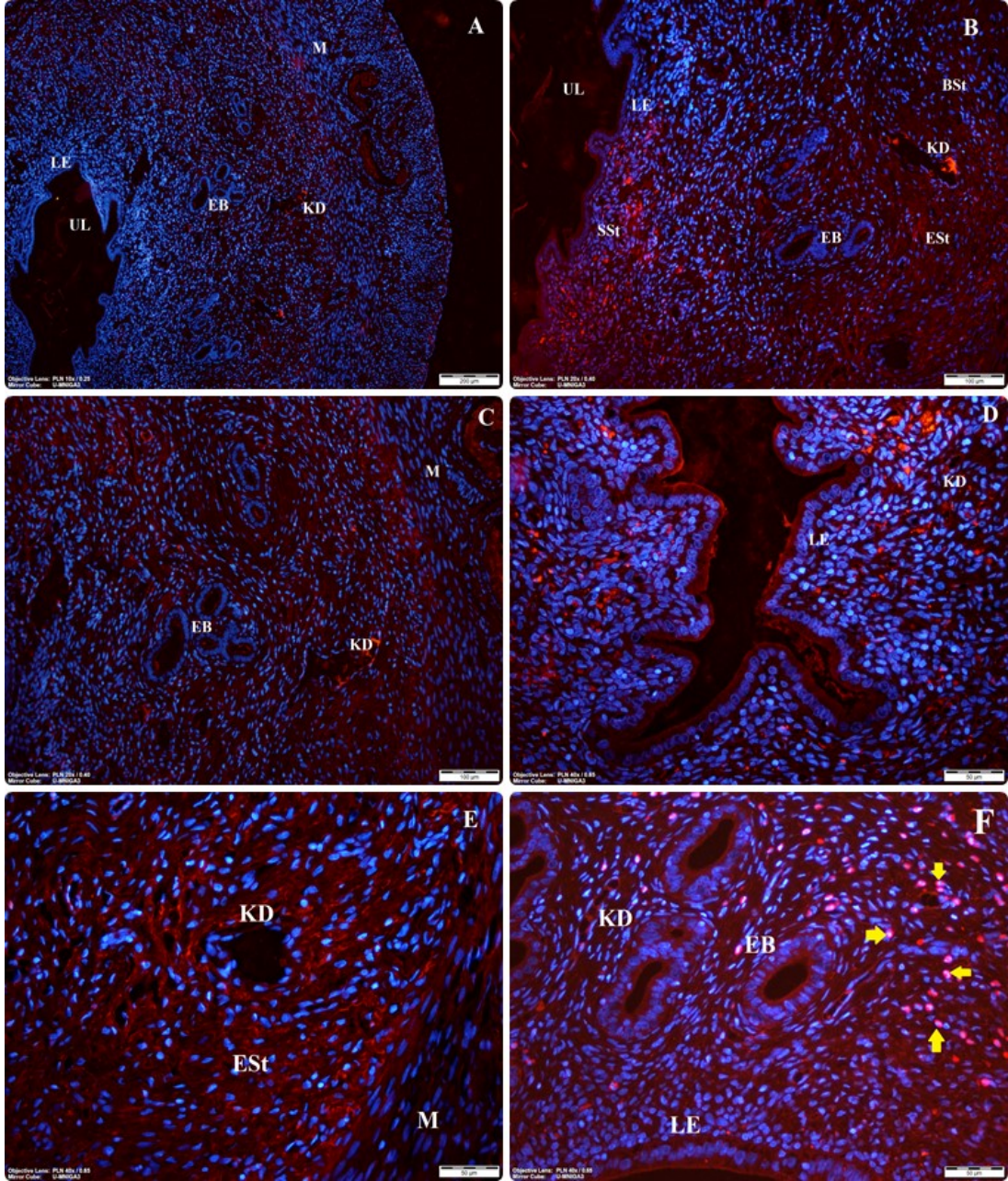
Şekil 4.21. Metaöstrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESst: Endometrial stroma; SSst: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.22. Metaöstrus evresinde *ET-1* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; EST: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



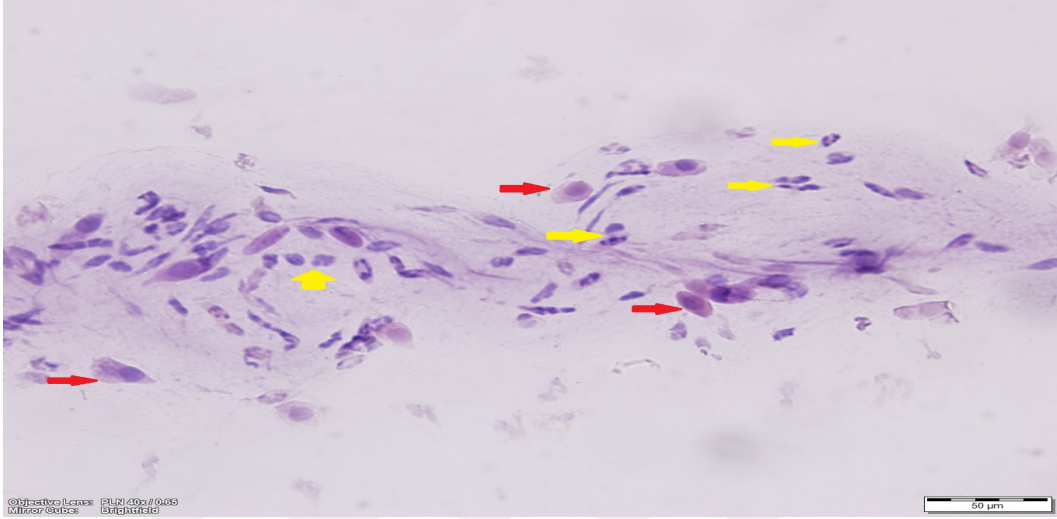
Şekil 4.23. Metaöstrus evresinde *Ang-1* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.24. Metaöstrus evresinde *Cdh5* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D, E, F). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; EST: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium; Sarı ok: Lökositler).

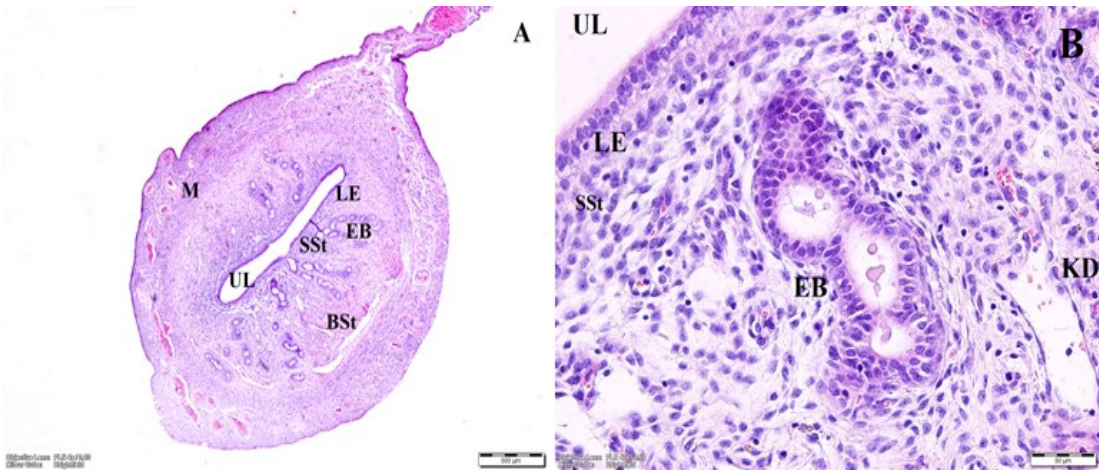
4.1.4. Diöstrus evresi

Diöstrus evresi vajinal sitoloji incelendiğinde ağırlıklı olarak lökositler izlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Diöstrus evresi vajinal sürüntü bulguları (H&E). Kırmızı ok: Çekirdekli epitel hücreleri; Sarı ok: Lökositler.

Diöstrus evresinde rat uterusundan alınan kesit örneklerinde luminal epitelin yer yer kübik ve prizmatik olduğu izlendi. Epitel hücrelerinin çekirdeği koyu boyanmış mitotik aktivitesi yüksek hücrelerden oluşmaktaydı. Endometrial bezler atrofik görünümlüydü ve bezlerin lümeninde salgıları izlendi (Şekil 4.26 A-B).



Şekil 4.26. Diöstrus evresi H&E bulguları (A,B). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).

Wnt3, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Ve-kadherin* proteinlerinin diöstrus evresindeki immünofloresan bulguları Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Diöstrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Ve-kadherin* immüno lokalizasyonları

Diöstrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Endometrial bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	++	++	++	+++	++
<i>Wnt7a</i>	+	+	++	+++	++++
β - <i>katenin</i>	++++	++++	+++	+++	+
<i>ET-1</i>	+++	+++	++	++	++++
<i>Ang-1</i>	++++	++++	+	+	+++
<i>VE-kadherin (Cdh5)</i>	-	-	++	+	++++

++++ ; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok

Wnt3; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde orta düzeyde bir ekspresyon izlendi (Şekil 4.27 C). Subluminal stromada da orta düzeyde bir ekspresyon seviyesi izlenirken, bazal stromada kuvvetli seviyede ekspresyon şiddeti görülmüştür. Kan damarı endotelinde ise orta düzeyde bir ekspresyon vardı (Şekil 4.27 B-D).

Wnt7a; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde *Wnt7a* immünreaktivitesinde çok zayıf şiddette bir ekspresyon söz konusuydu (Şekil 4.28 B). Subluminal stromada orta düzeyde bir ekspresyon düzeyi mevcut iken, bazal stromada kuvvetli bir şiddette ekspresyon düzeyi gözlemlendi. Bazal stromadaki kan damarlarının endotelinde ise çok kuvvetli bir ekspresyon olması dikkat çekiciydi (Şekil 4.28 C-D).

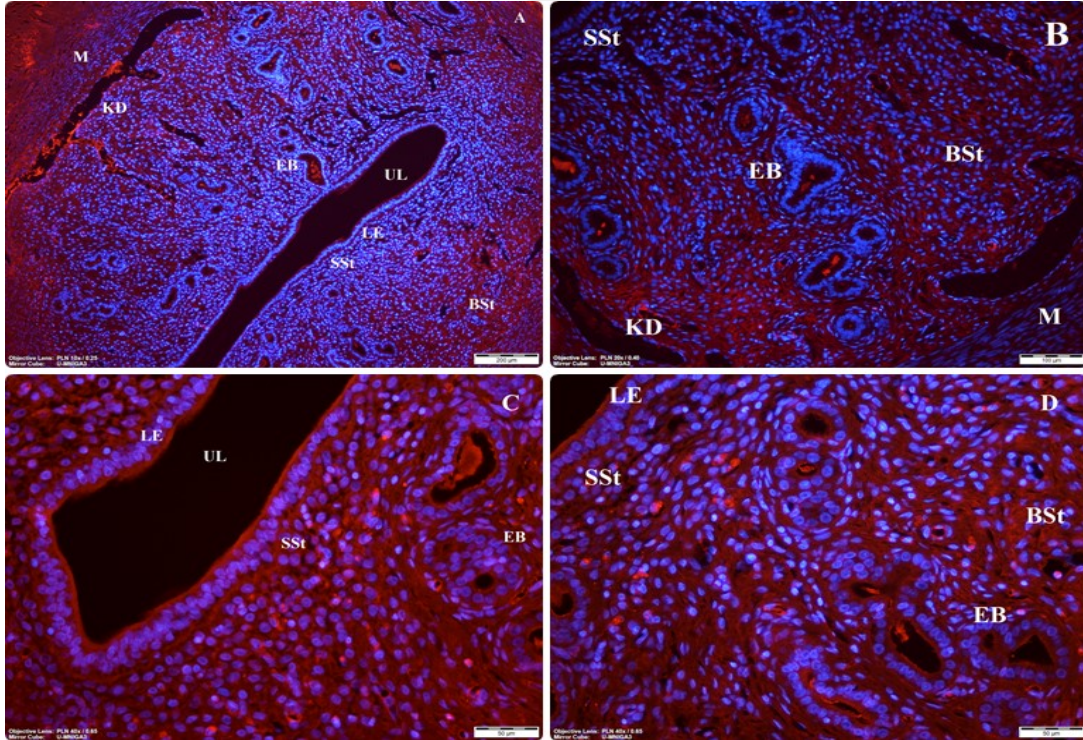
β -*katenin*; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epiteli hücrelerinin bazolateral ve apikal sınırlarında çok kuvvetli bir ekspresyon şiddeti olduğu görülmektedir (Şekil 4.29 B-D). Subluminal ve bazal stromada kuvvetli seviyede bir ekspresyon izlenirken, bazal stromada bulunan kan damarları endotelinde ise zayıf şiddette bir ekspresyon düzeyi olduğu saptandı (Şekil 4.29 C).

Endotelin-1; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde *ET-1* immüno lokalizasyonunun özellikle bazal yüzde kuvvetli şiddette ekspresyon olduğu

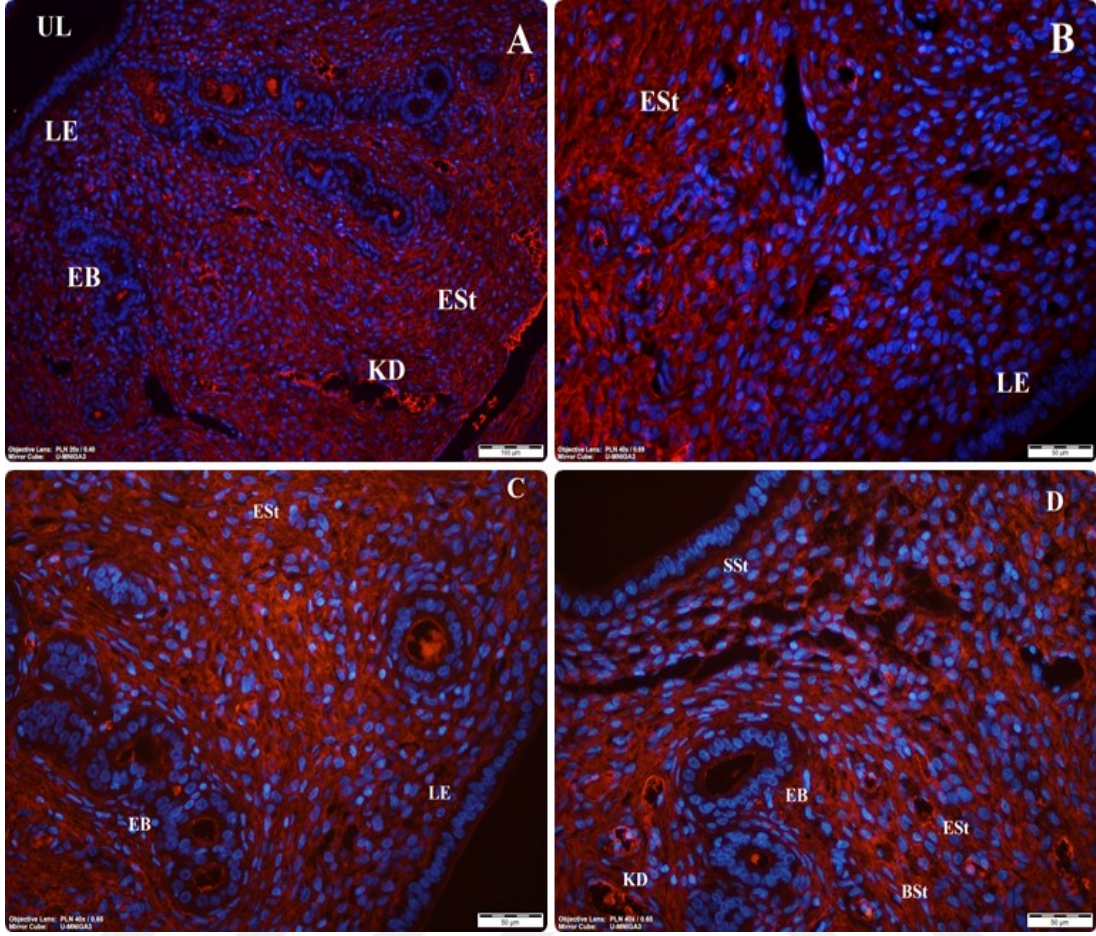
görülmüştür (Şekil 4.30 C). Subluminal stroma ve bazal stromada kuvvetli bir ekspresyon seviyesi izlenirken, bazal stromada bulunan kan damarlarının endotelinde ise çok kuvvetli şiddette bir ekspresyon düzeyine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.30 C-D).

Angiopoietin-1; bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epiteli hücrelerinin özellikle bazal bölgesinde *Ang-1*'in çok kuvvetli düzeyde ifade seviyesi izlenmiştir (Şekil 4.31 B-C). Subluminal stromada zayıf bir ekspresyon görülürken, bu bölgede yer alan hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli bir ekspresyon şiddeti olduğu görülmektedir. Bazal stromada bulunan kan damarlarının endotelinde de kuvvetli bir ifade düzeyi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.31 D).

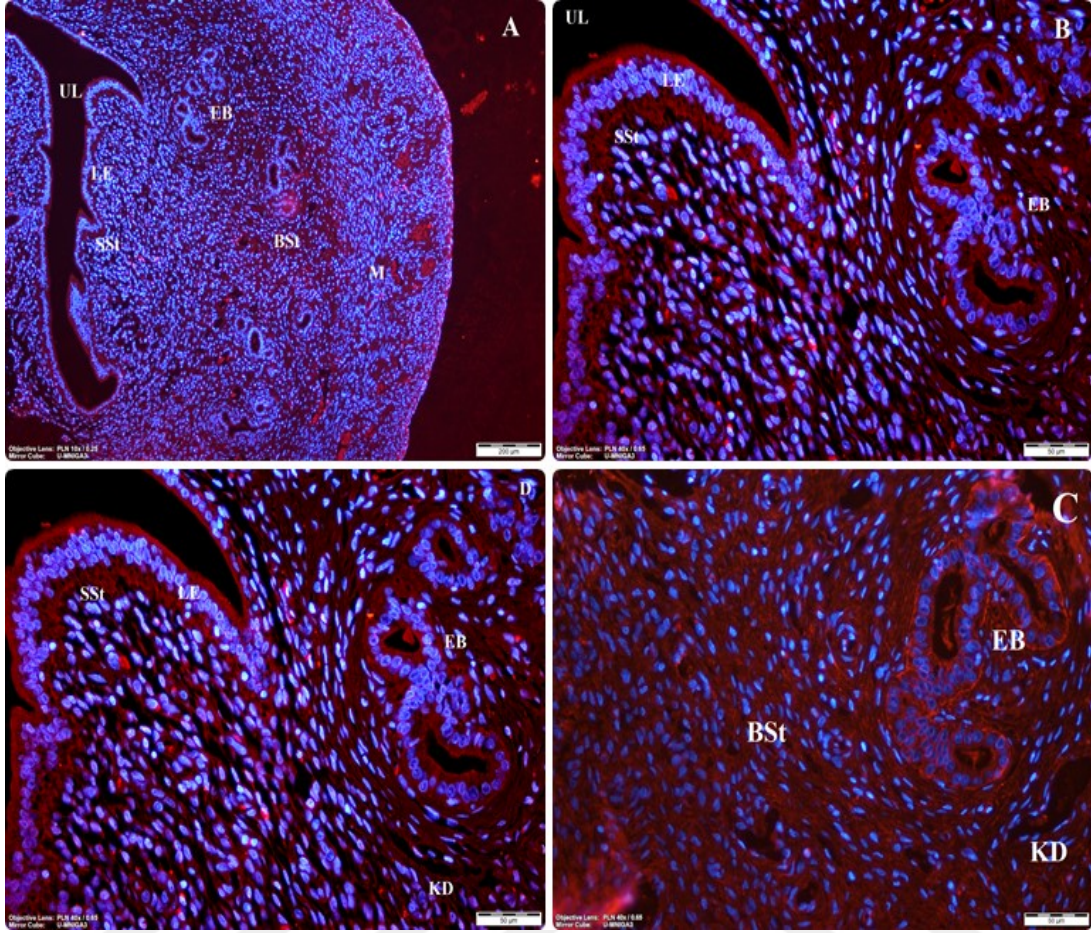
Ve-kadherin (Cdh5); bu evrede luminal epitel ve endometrial bez epitelinde negatif olduğu görülmüştür (Şekil 4.32 B). Subluminal stromada ve bazal stromada zayıf ekspresyon varlığı söz konusu iken; bazal stromada bulunan kan damarlarının endotelinde ise çok kuvvetli bir *Cdh5* immüno lokalizasyon belirlenmiştir (Şekil 4.32 C-D).



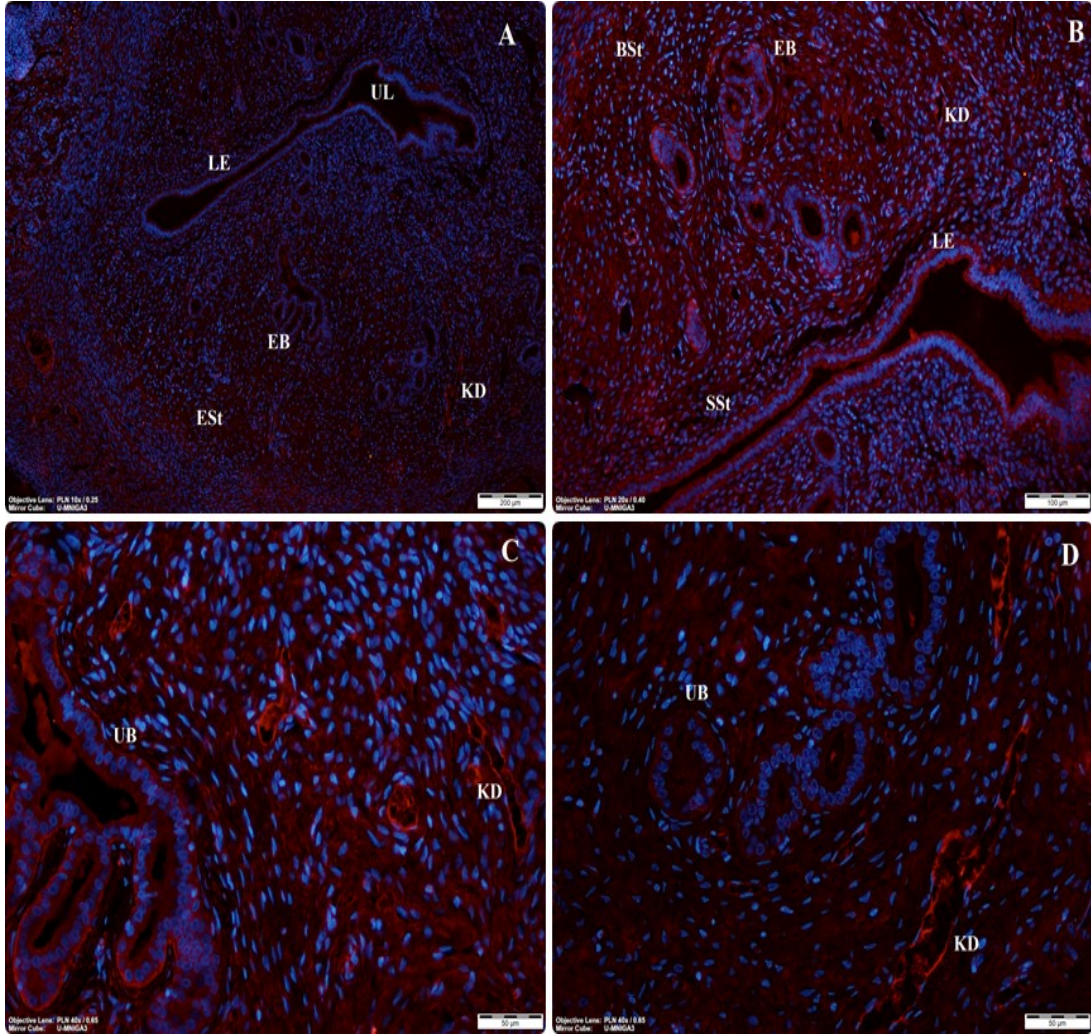
Şekil 4.27. Diöstrus evresinde *Wnt3* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



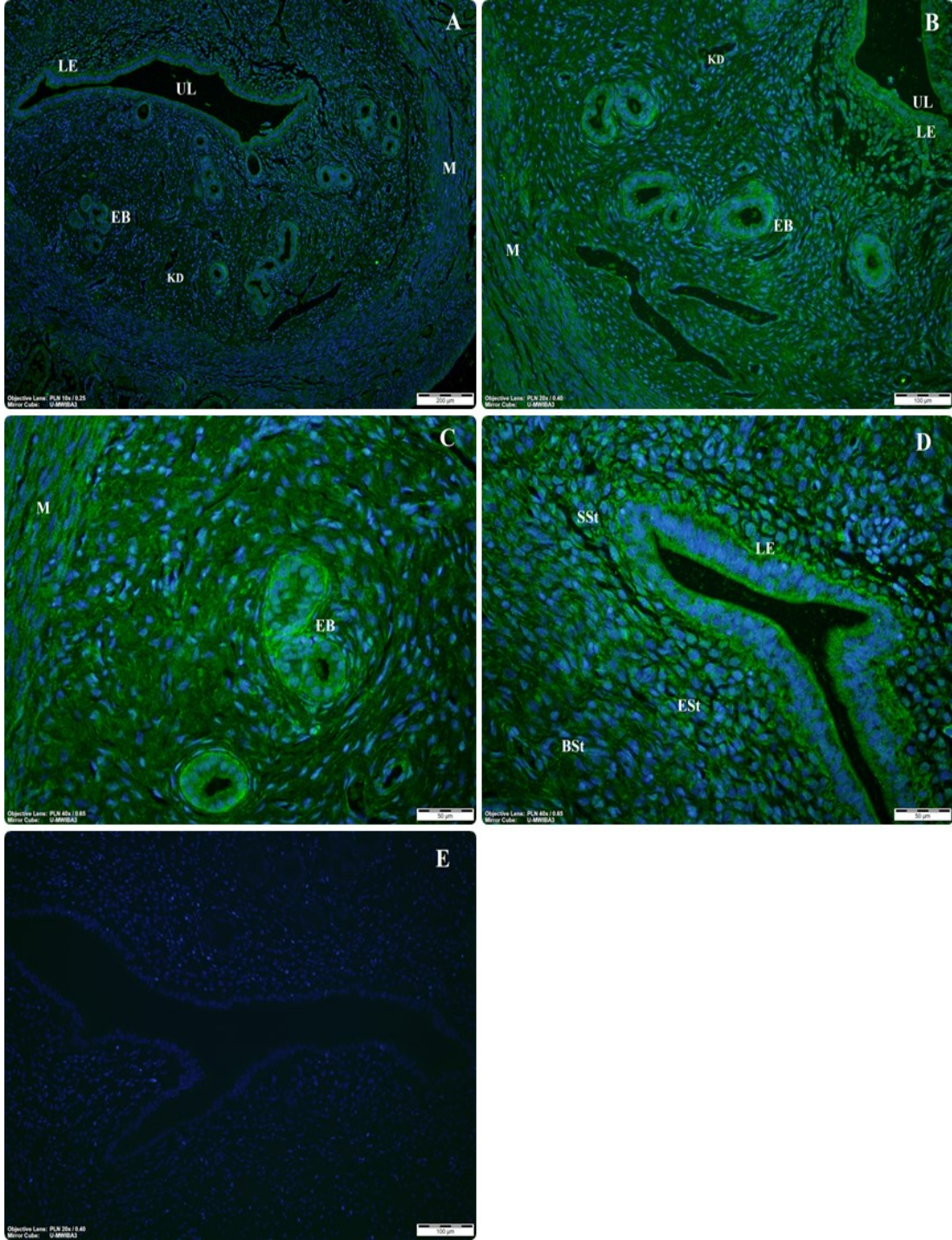
Şekil 4.28. Diöstrus evresinde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



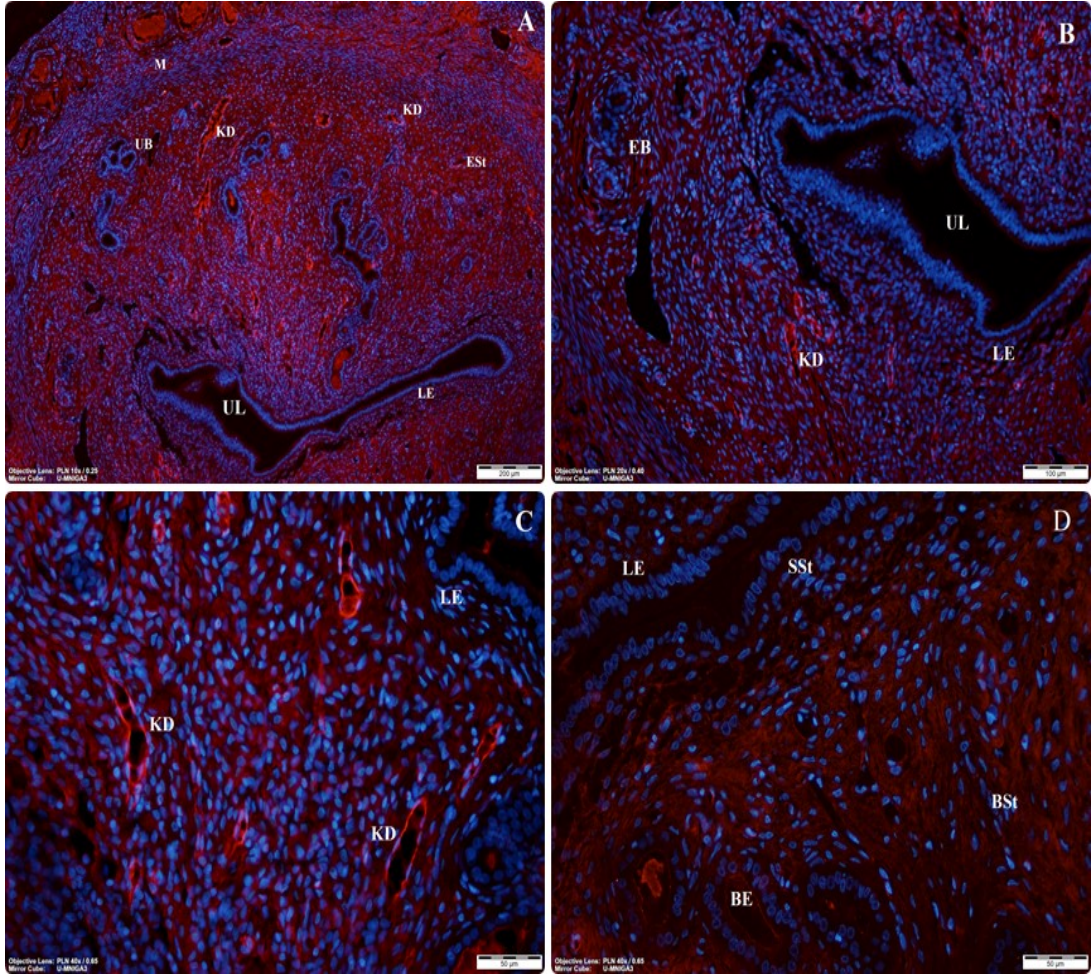
Şekil 4.29. Diöstrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.30. Diöstrus evresinde *ET-1* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.31. Diöstrus evresinde *Ang-1* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). Negatif kontrol (E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ES: Endometrial stroma; SS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).

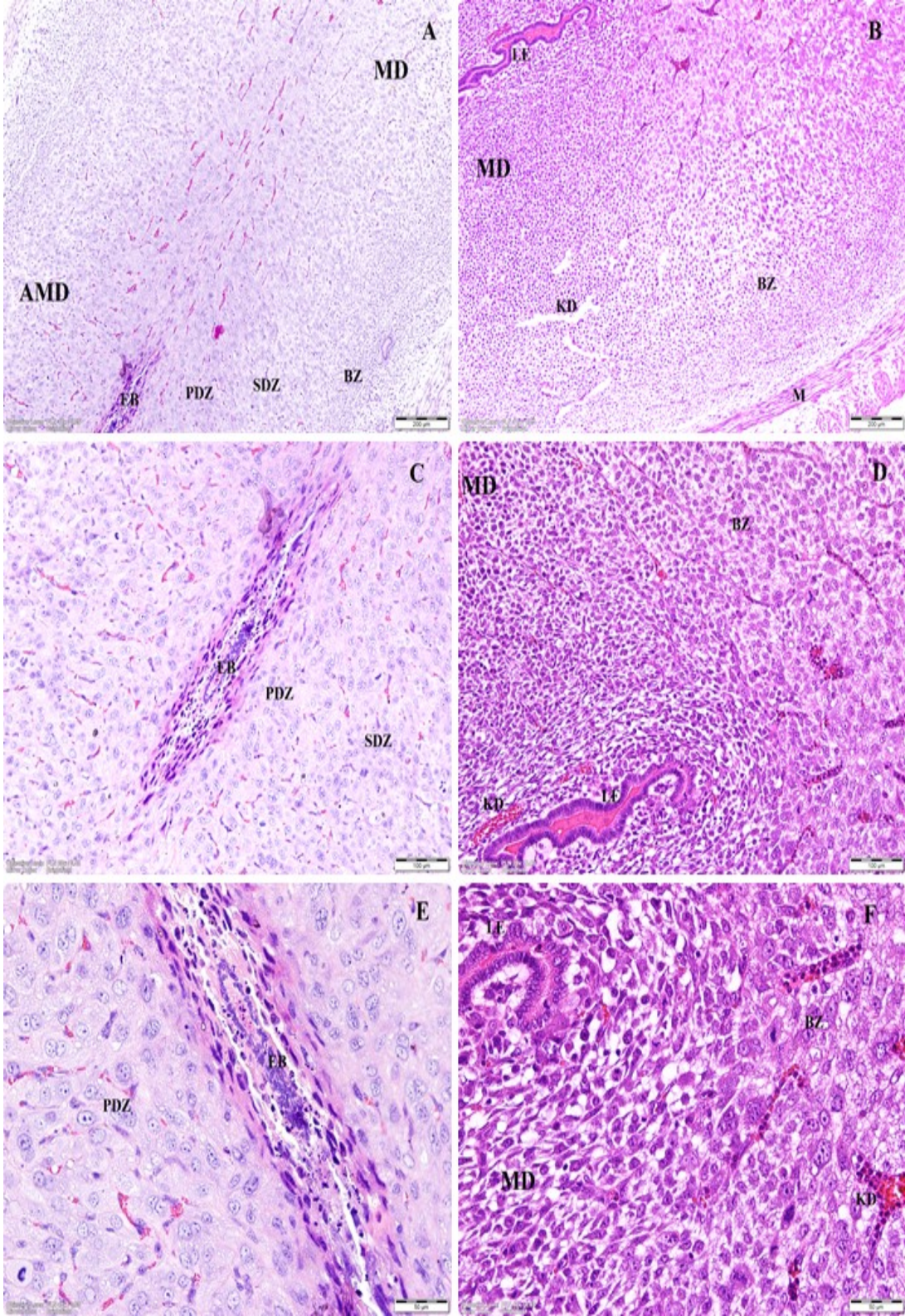


Şekil 4.32. Diöstrus evresinde *Cdh5* immüno lokalizasyonları (A,B,C,D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; EB: Endometrial Bez; KD: Kan damarı; ESt: Endometrial stroma; SSt: Subluminal stroma; BSt: Bazal stroma; M: Miyometrium).

4.2. Grup-2 Bulguları

4.2.1. Gebelik Işık Mikroskop ve İmmünfloresan Bulguları

Rutin ışık mikrokopi bulgularında, gebeliğin 7,5. gününde implantasyon bölgesi embriyoyu içeren antimezometrial alan, uterin lümen ve etrafında farklılaşmamış stromal hücrelerden oluşan mezometrial alandan oluşmaktaydı (Şekil 4.33 A-B). Antimezometrial alanda uterin epitelin tamamen kaybolduğu embriyonun etrafını çeviren primer desidual zon hücrelerinin sıkıca bir araya gelerek embriyonun uzun eksenine paralel yassı koyu çekirdekli hücrelerden oluştuğu ve eozinofilik olarak boyandığı izlendi (Şekil 4.33 C-E). Sekonder desidual zonda ise ökromatik bir veya iki çekirdeğe sahip olgun desidual hücreler çoğunlukla, çok çekirdekli olarak izlenirken zengin düzenlenmiş kan damarları dikkat çekiciydi. Buna karşın primer desidual zonda kan damarları kollabe olarak gözlemlendi (Şekil 4.33 C-E). Mezometrial bölgede uterin lümen epiteli başlangıçta prizmatik yapıda ve lümen açık gözükürken antimezometrial alana doğru gidildikçe kapanan bir lümeni çevreleyen, düşük boylu prizmatik çekirdekli epitel hücreleri dikkat çekiciydi. Mezometrial alanda uterin lümeni çevreleyen yıldız şekilli stromal hücrelerle bazale doğru mitotik hücreler dikkat çekiciydi. Ayrıca ekstraselüler matriks antimezometrial bazal zonda azdı.



Şekil 4.33. Gebeliğin 7,5. günündeki ışık mikroskop bulguları (H&E). (A,B,C,D,E,F) (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; LE: luminal epitel; KD: Kan damarı; SH: Stromal hücreler)

Tablo 4.5. Gebeliğin 7,5. günündeki *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* proteinlerinin immünolokalizasyonları

7,5. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL BÖLGE				MEZOMETRİAL BÖLGE			
	DESİDUA				DESİDUA			
	EB	PDZ	SDZ	BZ	LE	KD	BZ	SH
<i>Wnt-3</i>	++	+	+	++++	+++	++++	+++	+++
<i>Wnt-7a</i>	++	+++	++	+	+	++++	++++	+++
β - <i>katenin</i>	++	+	++++	+++	+++	++	+++	+++
<i>ET-1</i>	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++
<i>Ang-1</i>	++	+++	++	++	*	+++	+++	++++
<i>VE-kadherin</i>	+	++	++	++	++	+++	+++	++

++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok, *; Kesit yüzeyinden geçmedi

İmmünfloresan bulgularında;

Wnt3; gebeliğin 7,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde yer alan embriyo bölgesi, primer desidual zon ve sekonder desidual zondaki immünolokalizasyon düzeyi zayıf olup, antimezometrial alandaki bazal zonda ise çok kuvvetli bir ekspresyon seviyesi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.34 C-D-E). Mezometrial desidua bölgesinde luminal epitel, bazal zon ve burada yer alan stromal hücrelerde kuvvetli ekspresyon görülürken kan damarlarının endotelinde ise çok kuvvetli ekspresyon olduğu saptandı (Şekil 4.34 F).

Wnt7a; gebeliğin 7,5. gününde antimezometrial desidual alanda, embriyo bölgesinde orta şiddette ekspresyonu söz konusu iken primer desidual zonda kuvvetli, sekonder desidual zonda ise orta dereceli bir ekspresyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4.35 A-C). Mezometrial desidual alanda luminal epitelde zayıf bir ekspresyona sahipti. Mezometrial bazal zonda ve bu bölgede bulunan stromal hücrelerin kuvvetli şiddette bir ifadesi söz konusu iken, kan damarlarının endotelinde ***Wnt7a***'nın çok kuvvetli bir ifadesi olduğu saptandı (Şekil 4.35 E-F).

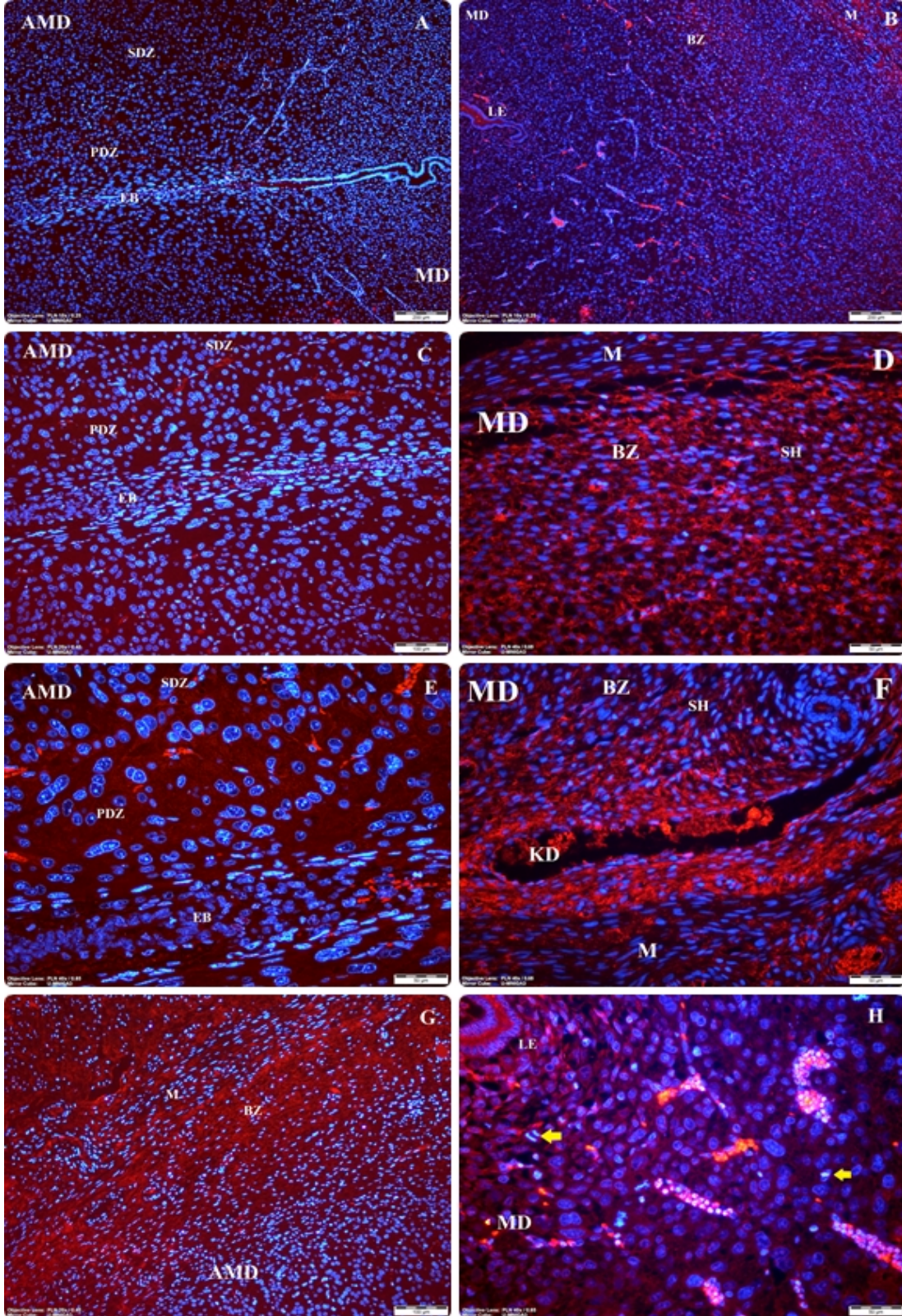
β -*katenin*; gebeliğin 7,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde yer alan embriyo bölgesinde ve primer desidual zonda orta seviyede izlenirken. Sekonder desidual zonda yer alan desidual hücrelerde çok kuvvetli seviyede ekspresyon olduğu

gözlemlendi. (Şekil 4.36 E-G) Antimezometrial desidual alandaki bazal zonda kuvvetli şiddette bir ifadeye rastlandı. Mezometrial desidual alanda luminal epitel, bazal zon ve burada yer alan stromal hücrelerde kuvvetli immün reaktiviteye sahip iken burada yer alan kan damarı endotelinde orta şiddette bir immünreaktivite gösterdiği saptandı (Şekil 4.36 D-F).

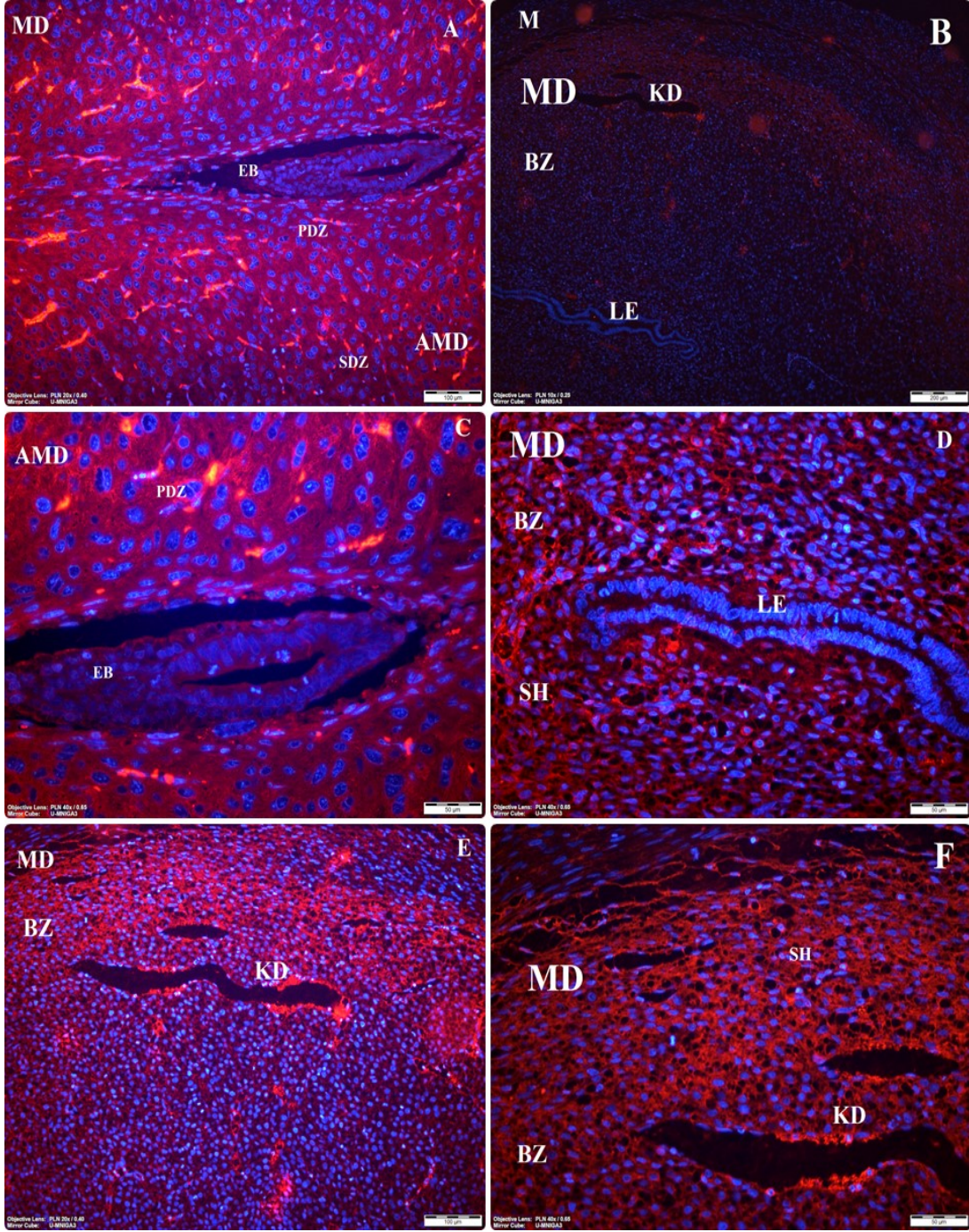
Endotelin-1; gebeliğin 7,5. gününde antimezometrial desidual alanda bulunan embriyo bölgesinde orta şiddette ekspresyon görülürken; primer desidual zonda çok zayıf olarak izlenirken; **ET-1** ekspresyonu sekonder desidual zonda ile primer desidual zon sınırı (iç sekonder desidual zonda) güçlü bir ekspresyona sahipken sekonder desidual zonda orta şiddette bir ekspresyon olduğu saptandı (Şekil 4.37 C-E). Mezometrial desidual alanda bulunan luminal epitel, kan damarı endoteli ve bazal zonda kuvvetli şiddette ekspresyon izlendi. Bazal zonda bulunan stromal hücrelerde ise orta şiddette bir ekspresyon olduğu saptandı. Mezometrial bazal zonda bulunan kan damarlarında **ET-1**'in kuvvetli ifadesi görüldü (Şekil 4.37 D).

Angiopietin-1; gebeliğin 7,5. gününde antimezometrial desidual bölgede bulunan embriyo bölgesinde **Ang-1**'in orta şiddette bir immünreaktivite görüldü. Primer desidual zonda zayıf bir immünreaktivite görülürken, primer desidual zon ve sekonder desidual zon sınırı (iç sekonder desidual zon sınırında) güçlü şiddette bir immünreaktivite görüldü (Şekil 4.38 B-E). Sekonder desidual zonda orta seviyede ekspresyon varlığı izlendi. Mezometrial desidual bölgede kan damarları endotelinde ve bazal zonda kuvvetli bir ekspresyon görülürken, bazal zonda bulunan stromal hücrelerin sitoplazmasında çok kuvvetli şiddette ekspresyon olduğu görüldü (Şekil 4.38 G).

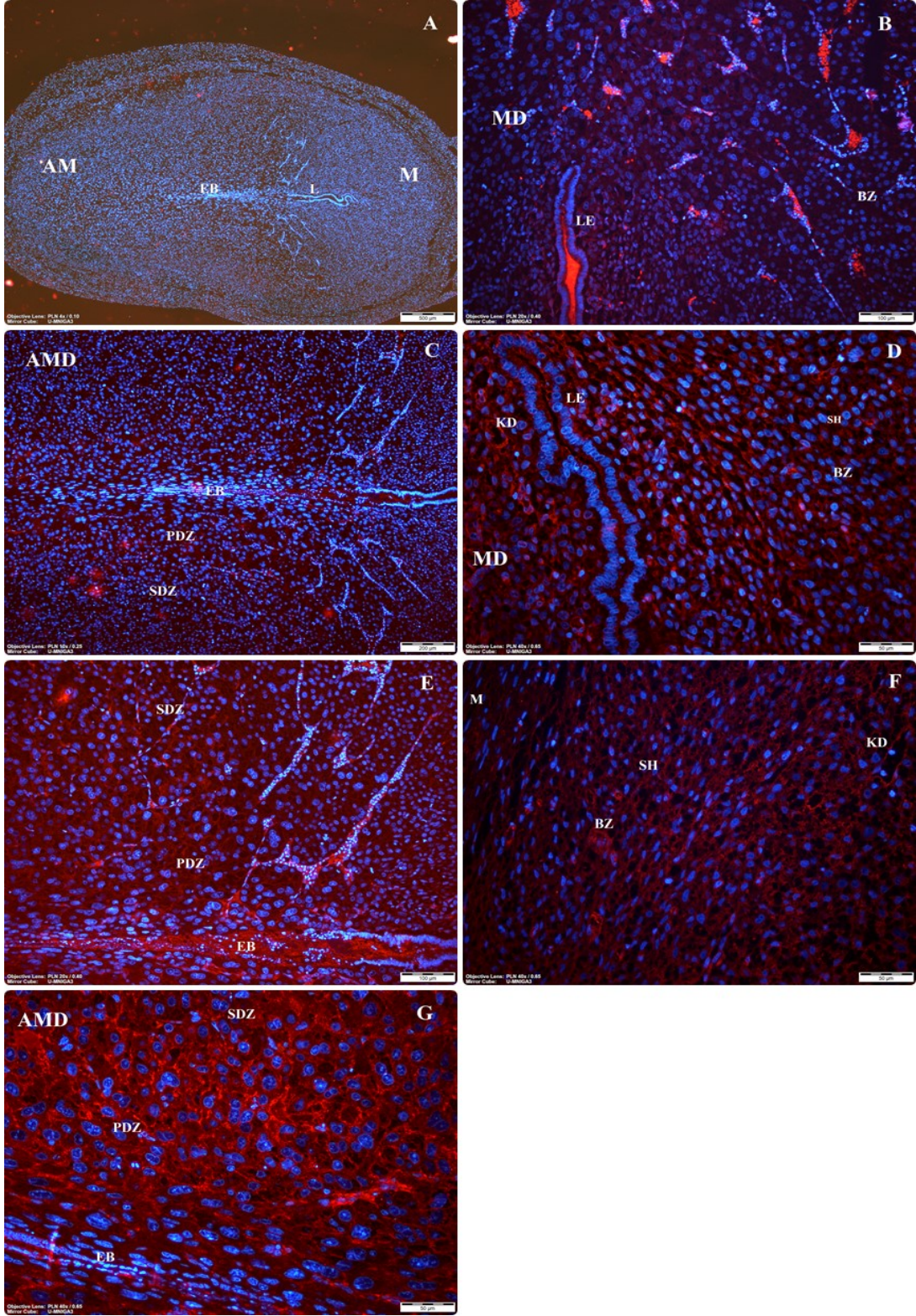
Ve-kadherin (Cdh5); gebeliğin 7,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde bulunan embriyo bölgesinde zayıf bir ekspresyona sahip olduğu görüldü. Primer desidual zon, sekonder desidual zon ve bazal zonda orta dereceli **Cdh5** ifadesi olduğu saptandı (Şekil 4.39 C-D). Mezometrial desidua bölgesinde de luminal epitelde, orta dereceli **Cdh5** ifadesi görülürken mezometrial alandaki kan damarları endotelinde ve bazal zonda kuvvetli bir **Cdh5** ifadesi olduğu görüldü. Bazal zonda bulunan stromal hücrelerde ise orta dereceli bir ifade düzeyi gözlemlendi (Şekil 4.39 G).



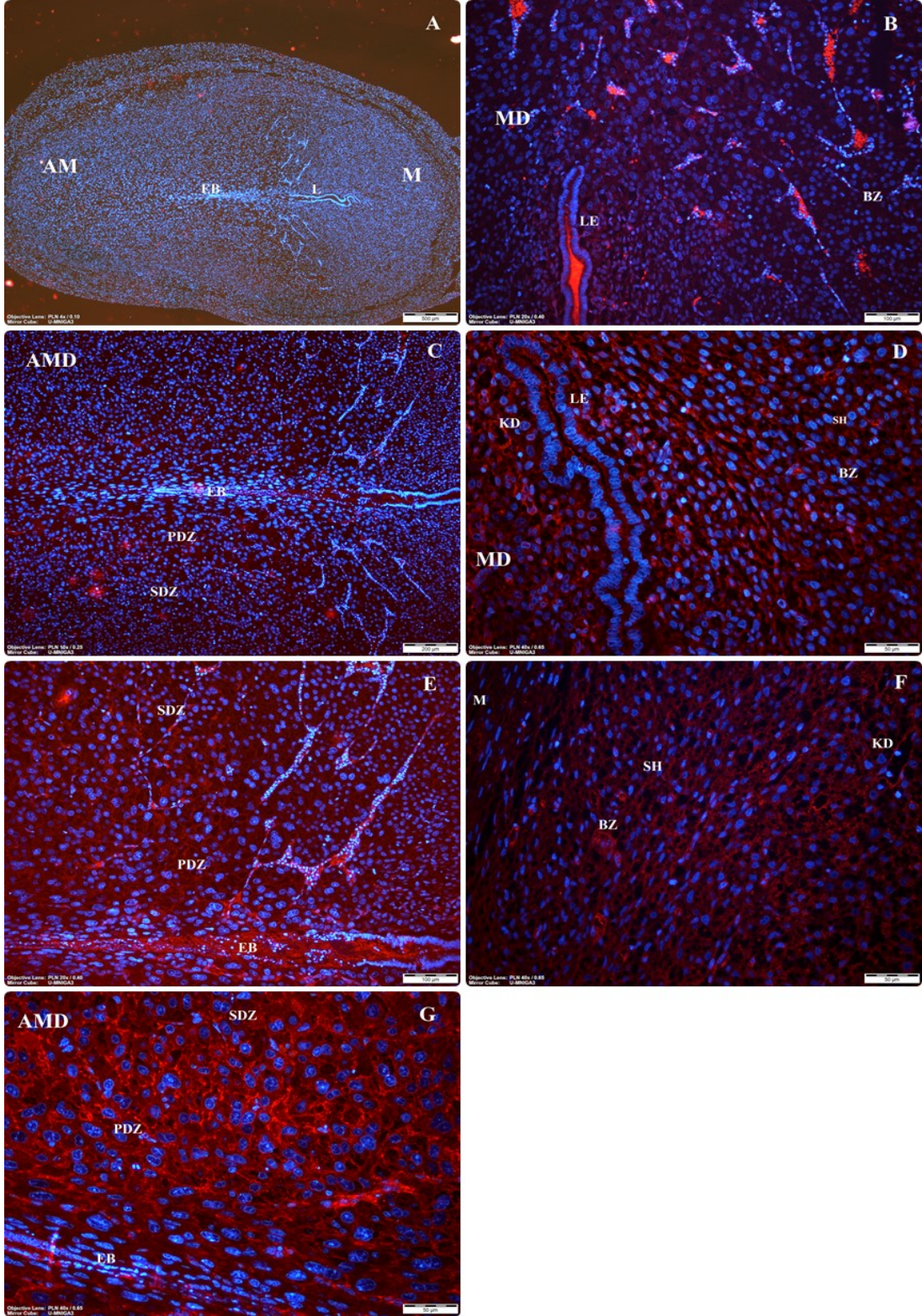
Şekil 4.34. Gebeliğin 7,5. gününde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G,H). (AMD: Antimezometrial desidua, MD: Mezometrial desidua, EB: Embriyo bölgesi, PDZ: Primer desidual zon, SDZ: Sekonder desidual zon, BZ: Bazal zon, LE: luminal epitel, KD: Kan damarı, SH: Stromal hücreler)



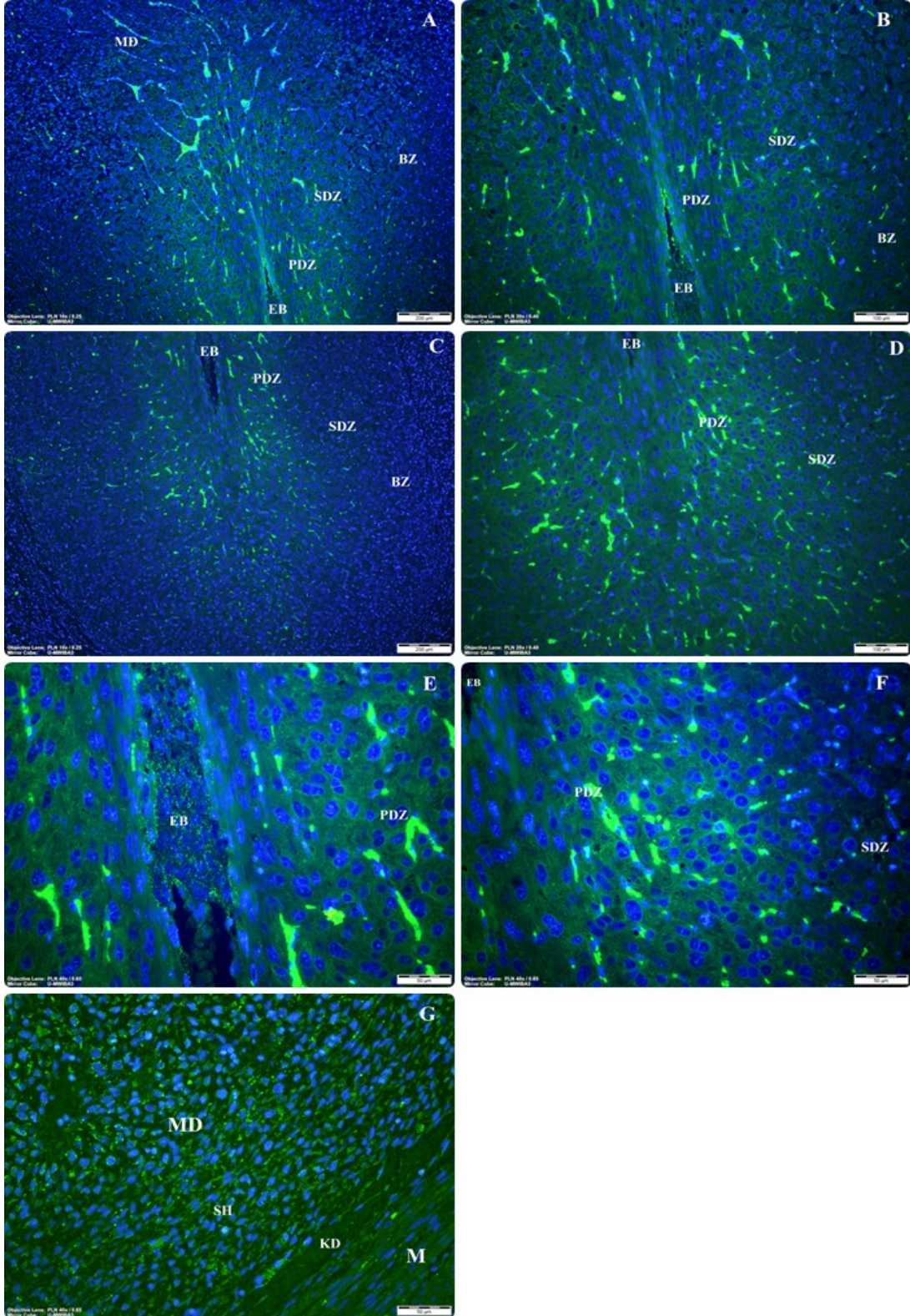
Şekil 4.35. Gebeliğin 7,5. gününde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F). (AMD: Antimezometrial desidua, MD: Mezometrial desidua, EB: Embriyo bölgesi, PDZ: Primer desidual zon, SDZ: Sekonder desidual zon, BZ: Bazal zon, LE: luminal epitel, KD: Kan damarı, SH: Stromal hücre)



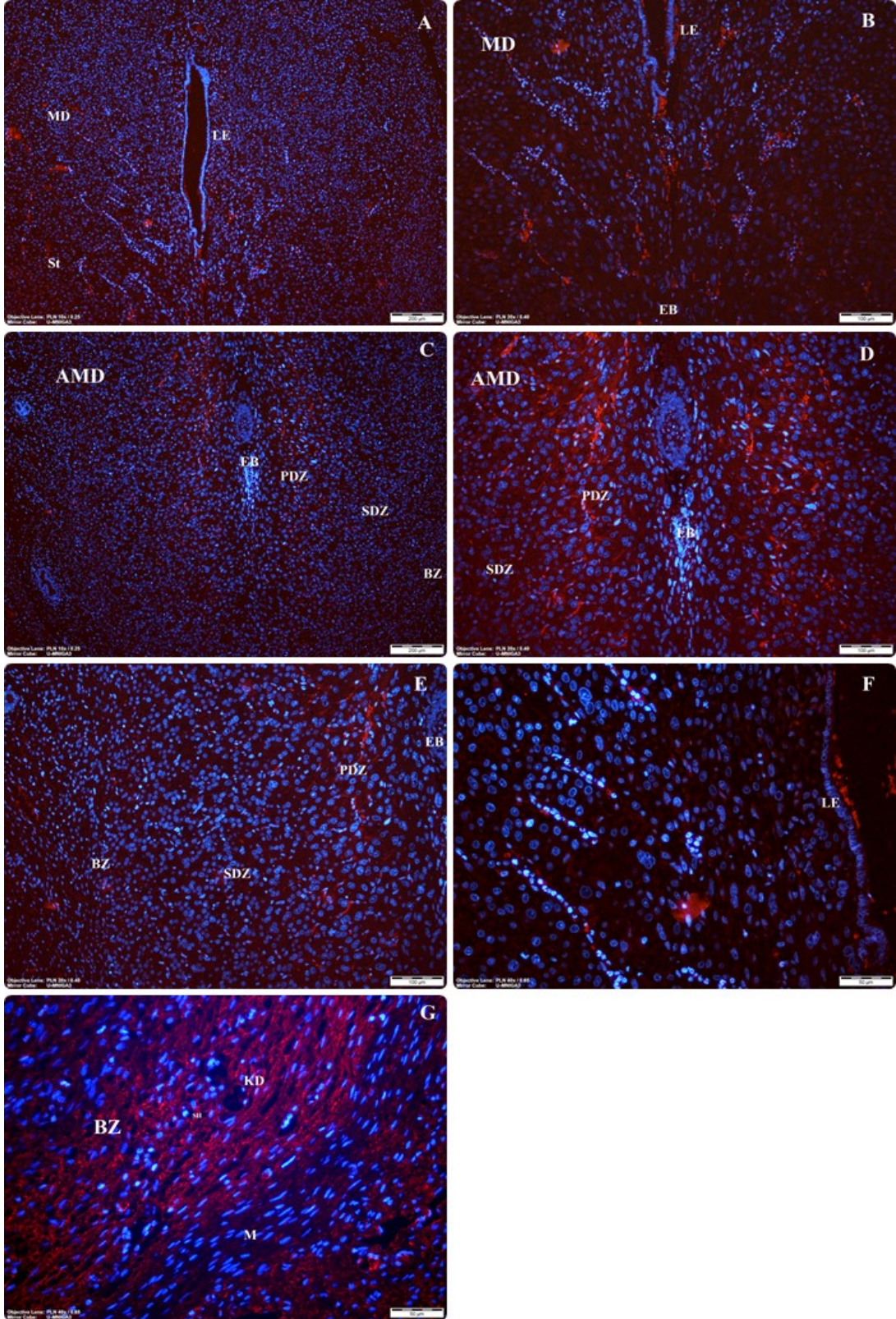
Şekil 4.36. Gebeliğin 7,5. gününde β -katenin immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua, MD: Mezometrial desidua, EB: Embriyo bölgesi, PDZ: Primer desidual zon, SDZ: Sekonder desidual zon, BZ: Bazal zon, LE: luminal epitel, KD: Kan damarı, SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.37. Gebeliğin 7,5. gününde *ET-1* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua, MD: Mezometrial desidua, EB: Embriyo bölgesi, PDZ: Primer desidual zon, SDZ: Sekonder desidual zon, BZ: Bazal zon, LE: luminal epitel, KD: Kan damarı, SH: Stromal hücreler)



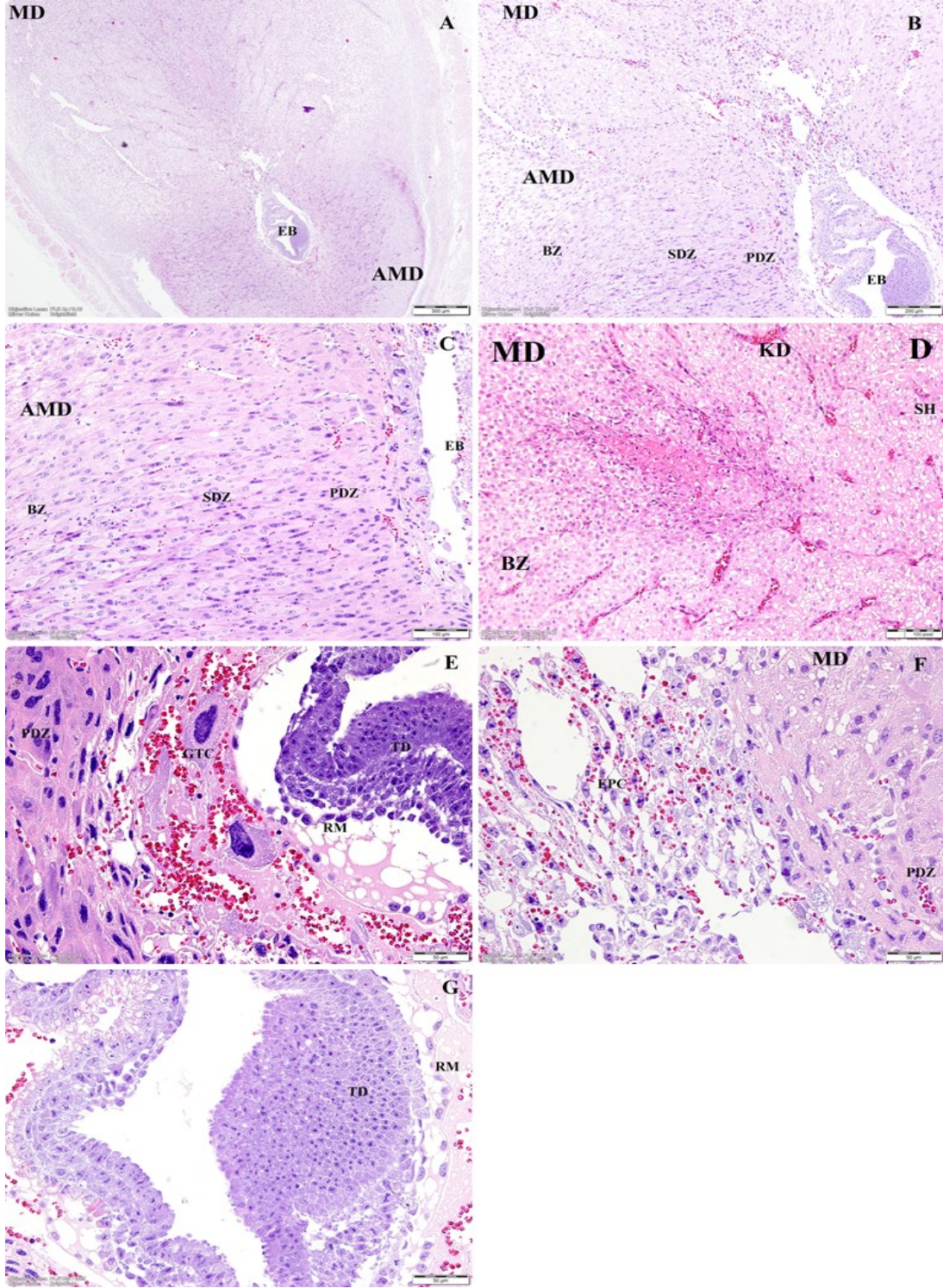
Şekil 4.38. Gebeliğin 7,5. gününde *Ang-1* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua, MD: Mezometrial desidua, EB: Embriyo bölgesi, PDZ: Primer desidual zon, SDZ: Sekonder desidual zon, BZ: Bazal zon, LE: luminal epitel, KD: Kan damarı, SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.39. Gebeliğin 7,5. gününde *Cdh5* immüno lokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidia, MD: Mezometrial desidia, EB: Embriyo bölgesi, PDZ: Primer desidual zon, SDZ: Sekonder desidual zon, BZ: Bazal zon, LE: luminal epitel, KD: Kan damarı, SH: Stromal hücreler)

Gebeliğin 8,5. Günü

Hematoksilen&eoziin bulgularında gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial desidual alanda bir genişleme söz konusu idi ve embriyonun tamamen gömülü olduğu görüldü. Embriyonun etrafında Reichert membranı oldukça belirgin olup, hücreleri tek sıralı bir dizilim göstermekteydi. Reichert membranının dış katmanında trofoblast hücreleri ve maternal kan damarlarıyla direkt temas halindeydi. Bu dönemde embriyo trilaminar disk yapısında izlenirken oldukça belirgindi hücrelerin çekirdekleri koyu boyalı mitotik aktivitesi yüksek hücrelerdi. Embriyo bölgesinin hemen altında dev trofoblast hücreleri görüldü, bu hücreler iri çekirdekleri ve bol sitoplazmasıyla oldukça iyi ayırt edilebiliyordu. Embriyonun mezometrial bölgeye bakan kutbunda ise ektoplasental koni oldukça net bir şekilde görüldü ve bu bölgede bulunan vasküler yapılar ile temas halindeydi (Şekil 4.40 B-C-D). Primer desidual zondaki desidual hücreler 7,5. güne oranla sitoplazması bol ve iri hücrelerdi. Bu hücrelerin iki ya da daha fazla nükleolus içerdiği ve çoğunlukla bir nükleusa sahip ökromatin özellikteydi. Sekonder desidual zon bu gebelik gününde oldukça büyük bir hacim kaplıyordu. Hücreler iri ve sitoplazması boldu, hücrelerin nükleusları iki ya da fazla nükleolus içeriyordu. Bazal zon daha dar bir alana sahipti ve hücreler yassılaştırmış formdaydı ve farklılaşmış desidual hücrelerdi. Mezometrial alanda epitel dejenerasyonu çok net bir şekilde izlenmişti, lümen tamamen kapanmış bir şekilde görülüyordu. Mezometrial desidual hücreler artık 7,5. gündeki gibi yıldızimsı görünümde değil poligonal şekilde görülüyordu. Kan damarları da oldukça belirgin bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.40 F-G).



Şekil 4.40. Gebeliğin 8,5. günündeki ışık mikroskop bulguları (H&E). (A,B,C,D,E,F,G) (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarı; SH: Stromal hücreler)

Tablo 4.6. Gebeliğin 8,5. günündeki *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* proteinlerinin immünolokalizasyonları

8,5. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL BÖLGE					MEZOMETRİAL BÖLGE				
	DESIDUA					DESIDUA				
	EMBRYO BÖLGESİ				PDZ	SDZ	BZ	KD	BZ	SH
	TD	RM	GTC	EPC						
<i>Wnt-3</i>	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
<i>Wnt-7a</i>	++	+++	++++	++++	++	++	++	+++	++	++
β - <i>katenin</i>	++++	+	++++	++++	++++	++++	++	+++	++	++
<i>ET-1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++++	+++	+++	++
<i>Ang-1</i>	+++	+++	+++	+++	++	++++	+++	+++	+++	++++
<i>VE-kadherin</i> (<i>Cdh5</i>)	+	++	+++	++++	++	++	++++	++++	+++	++

++++ ; Çok kuvvetli ekspresyon, +++ ; Kuvvetli ekspresyon, ++ ; Orta kuvvetteki ekspresyon, + ; Zayıf ekspresyon, - ; ekspresyon yok

Wnt3; gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial desidual alanda bulunan embriyo bölgesinde trilaminar disk ve Reichert membranında orta şiddette bir ekspresyon görülürken, dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ekto plasental koninin olduğu bölgede kuvvetli ekspresyon olduğu görüldü (Şekil 4.41 A-B-C). Primer desidual zonda ***Wnt3***'ün kuvvetli bir ifadesi söz konusu iken sekonder desidual zonda ve bazal zonda zayıf bir ifade seviyesi olduğu görüldü. Mezometrial desidua bölgesinde bulunan kan damarları endotelinde, bazal zonda ve stromal hücrelerde kuvvetli immünreaksiyon olduğu görüldü (Şekil 4.41 D).

Wnt7a; gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde bulunan embriyo bölgesinde bulunan trilaminar disk hücrelerinde orta dereceli bir immün reaksiyon görüldü. Reichert membranında kuvvetli ekspresyon görülürken dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ekto plasental konin bulunduğu bölgede çok kuvvetli bir ifadesi olduğu görüldü (Şekil 4.42 B-C). Primer desidual zon, sekonder desidual zon ve bazal zonda orta seviyede ifadesi olduğu izlendi. Mezometrial desidual bölgede bulunan kan damarları endotelinde kuvvetli seviyede ekspresyon olduğu görüldü. Bazal zon ve bu bölgede bulunan stromal hücrelerde orta seviyelerde bir ekspresyon olduğu saptandı (Şekil 4.42 D).

β-katenin; gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial desidua alanda embriyo bölgesinde yer alan trilaminar disk hücrelerinin hücreler arası bölgelerinde çok kuvvetli seviyede ifadesi görülmüştür. Reichert membranında zayıf immünoreaktivite görüldü (Şekil 4.43 C). Dev trofoblast hücrelerinde ve ekto plasental koninin bulunduğu bölgede çok kuvvetli seviyede ekspresyon olduğu gözlemlendi. Primer desidua zonu ve sekonder desidua zonda çok kuvvetli pozitif reaksiyon verdiği gözlemlendi. Bazal zonda orta şiddette bir immün reaksiyon görüldü. Mezometrial desidua bölgesinde bulunan kan damarları endotelinde kuvvetli bir ekspresyon olduğu saptandı. Bazal zonda ve stromal hücrelerde orta şiddette ***β-katenin*** ifadesine rastlanmıştır (Şekil 4.43 D-E-F).

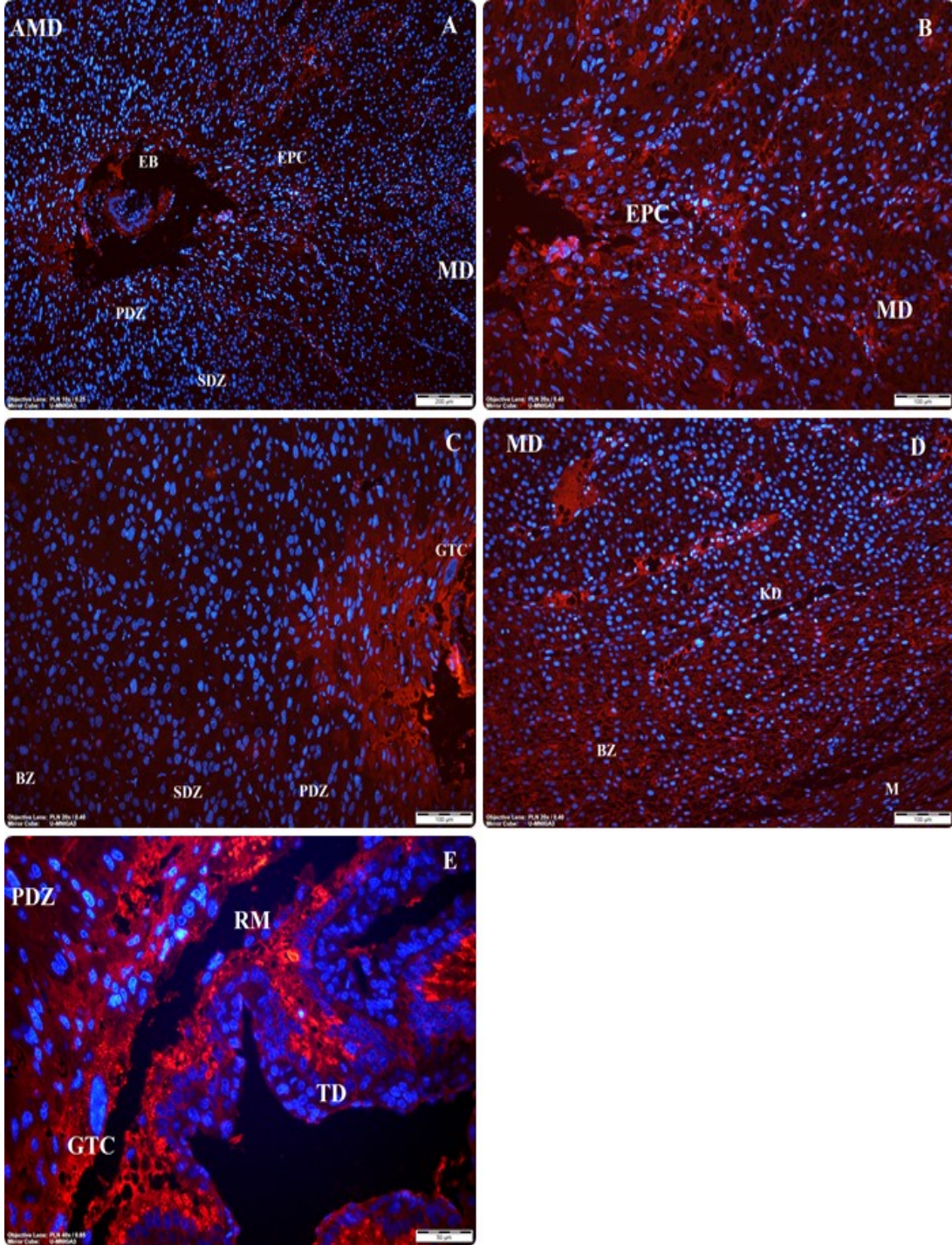
Endotelin-1; gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde bulunan embriyo bölgesinde bulunan trilaminar disk, Reichert membranında, dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ekto plasental koninin olduğu bölgelerde kuvvetli şiddette immün reaksiyon olduğu saptandı (Şekil 4.44 C-G). Primer desidua zonda güçlü, sekonder desidua zonda orta şiddette bir ekspresyon görülürken, bazal zonda çok kuvvetli bir ekspresyon olduğu saptandı. Mezometrial desidua bölgesinde bulunan kan damarları endotelinde ve bazal zonda ***ET-1***'in kuvvetli bir ifadesi söz konusu iken bazal zonda bulunan stromal hücrelerde orta şiddette bir ifadesi olduğu görüldü (Şekil 4.44 D-F).

Angiopietin-1; gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde bulunan embriyo bölgesinde trilaminar disk hücreleri, dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında, Reichert membranında ve ekto plasental konin olduğu bölgelerde ***Ang-1***'in kuvvetli bir immün lokalizasyon gösterdiği saptandı (Şekil 4.45 C-D-E). Primer desidua zonda orta şiddette ekspresyon görülürken, sekonder desidua zonda ise çok kuvvetli bir ekspresyon varlığı görülmüştür. Mezometrial desidua alanda bulunan kan damarları endotelinde ve bazal zon matriksinde kuvvetli bir ifadeye sahip olduğu görüldü. Stromal hücrelerde ise çok kuvvetli ekspresyona sahip olduğu görüldü (Şekil 4.45 F).

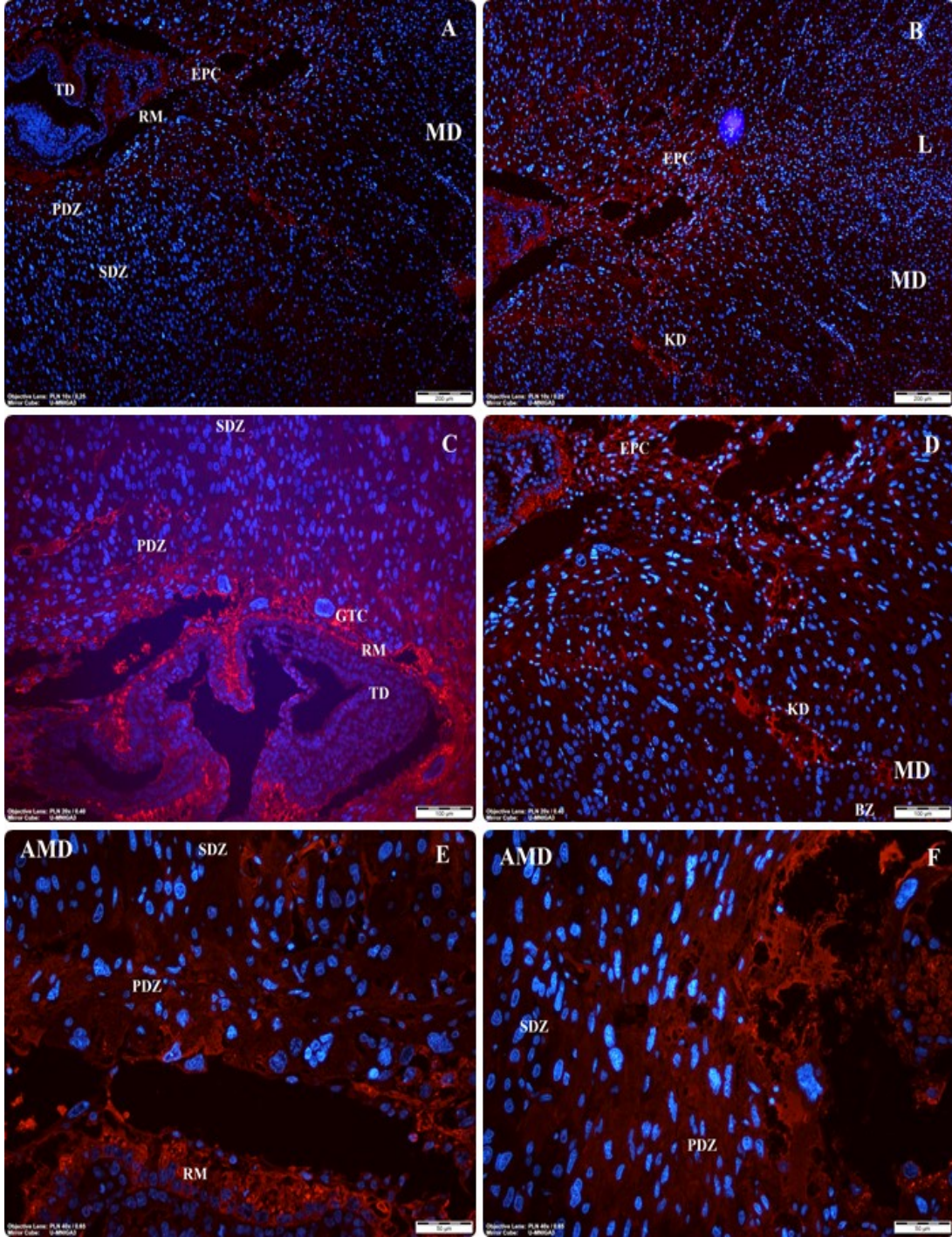
Ve-kadherin(Cdh5); gebeliğin 8,5. gününde antimezometrial alanda yer alan embriyo bölgesindeki trilaminar disk hücrelerinde zayıf şiddette ifadesi olduğu görüldü. Reichert membranında ***Ve-kadherin*** immünolokalizasyonunun orta şiddette

ifadesine rastlandı. Dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli bir ekspresyon görülürken, ektoplasental koninin olduğu bölgede ise çok kuvvetli immünreaktivite gösterdiği saptandı (Şekil 4.46 A-B-C-D). Primer ve sekonder desidual zonda *Cdh5*'in orta şiddette pozitif reaksiyon verdiği görülürken, bazal zonda çok kuvvetli bir pozitif reaksiyon olduğu izlendi. Mezometrial desidual alanda bulunan kan damarları endotelinin çok kuvvetli immünfloresan yanıt verdiği görülmüştür. Bazal zondaki matriks hücrelerinde kuvvetli immünolokalizasyon görülürken, stromal hücrelerde orta dereceli bir immün lokalizasyon izlenmiştir (Şekil 4.46 G).

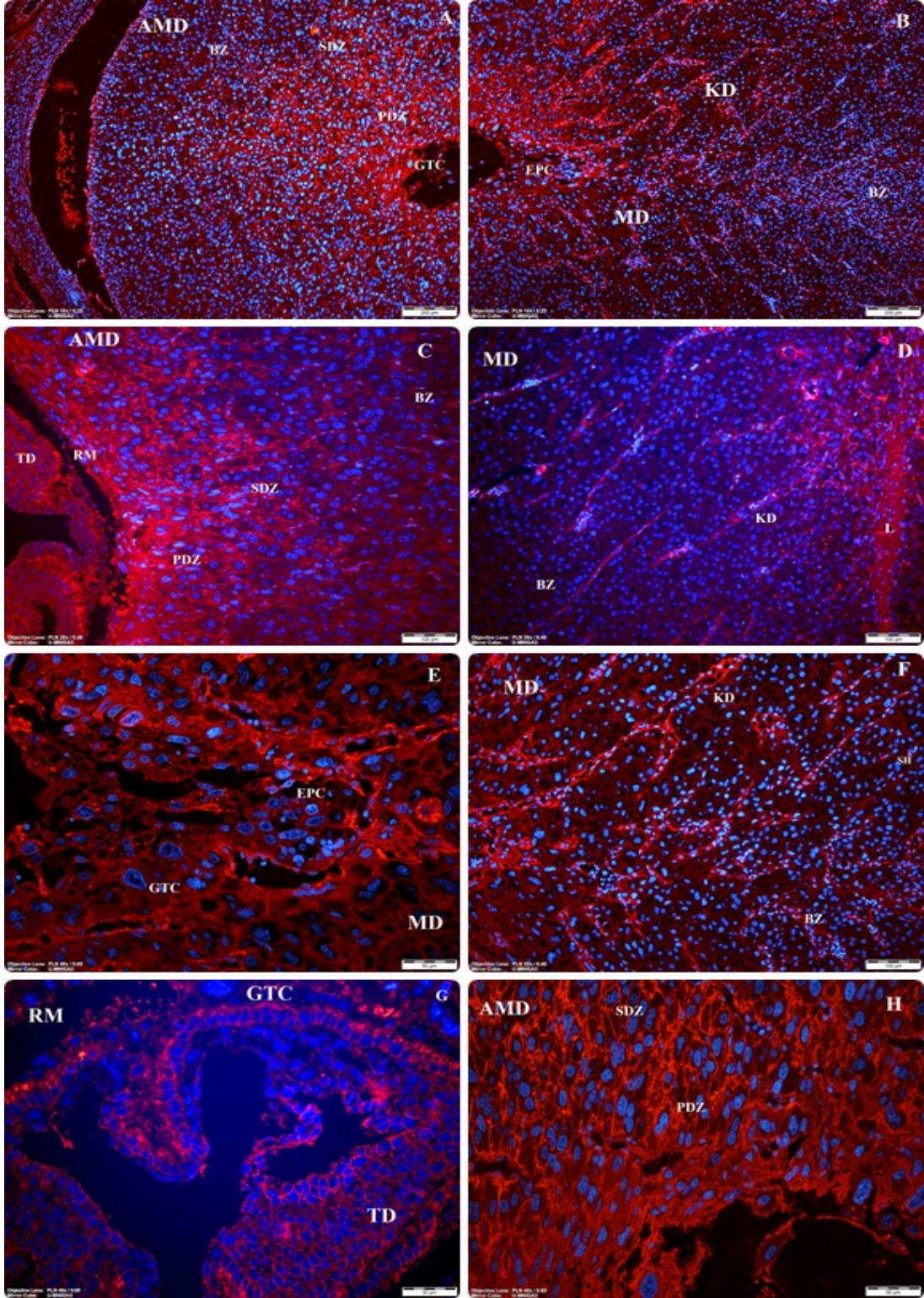




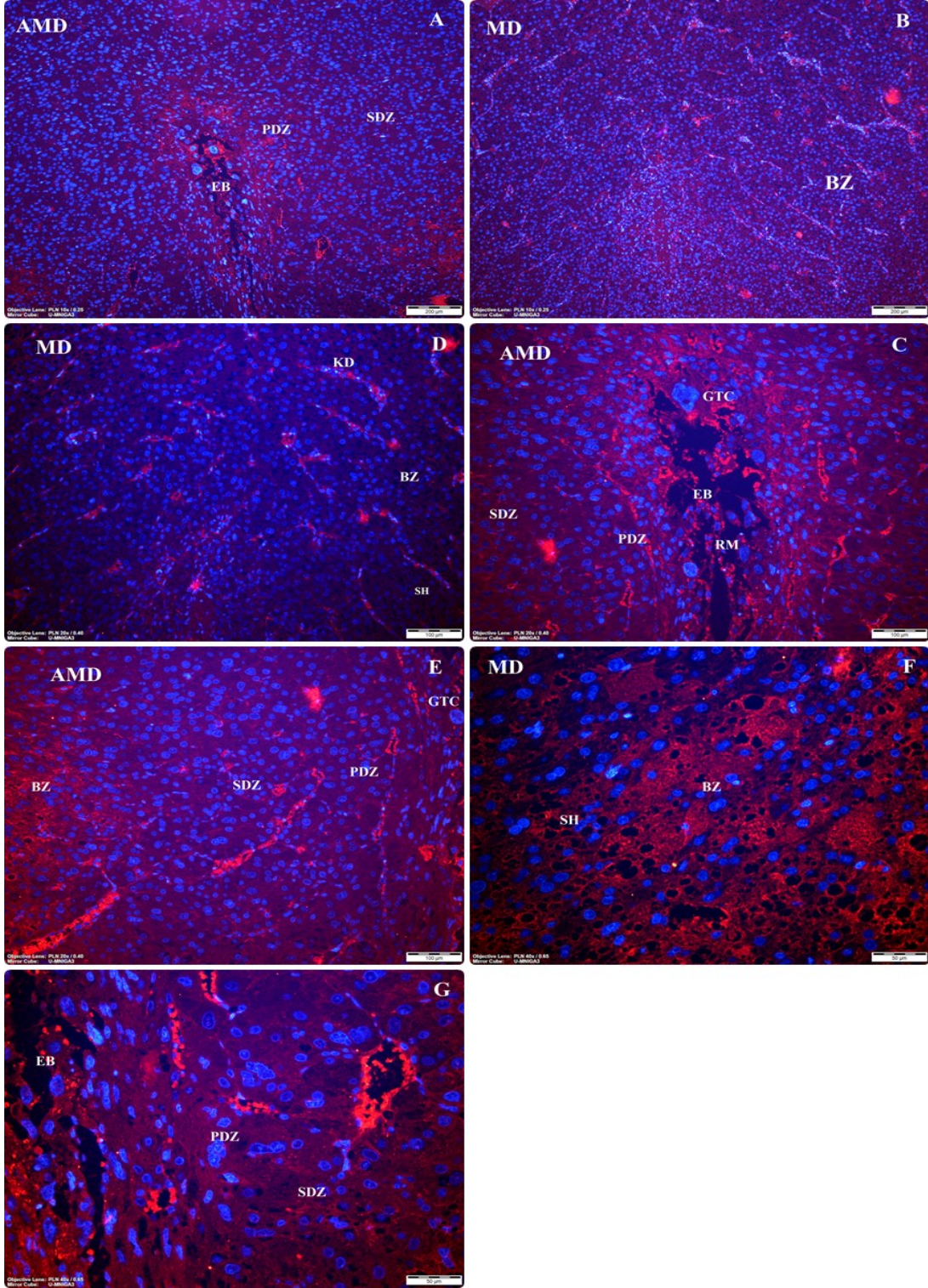
Şekil 4.41. Gebeliğin 8,5. günündeki *Wnt3* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E) (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarı; SH: Stromal hücreler)



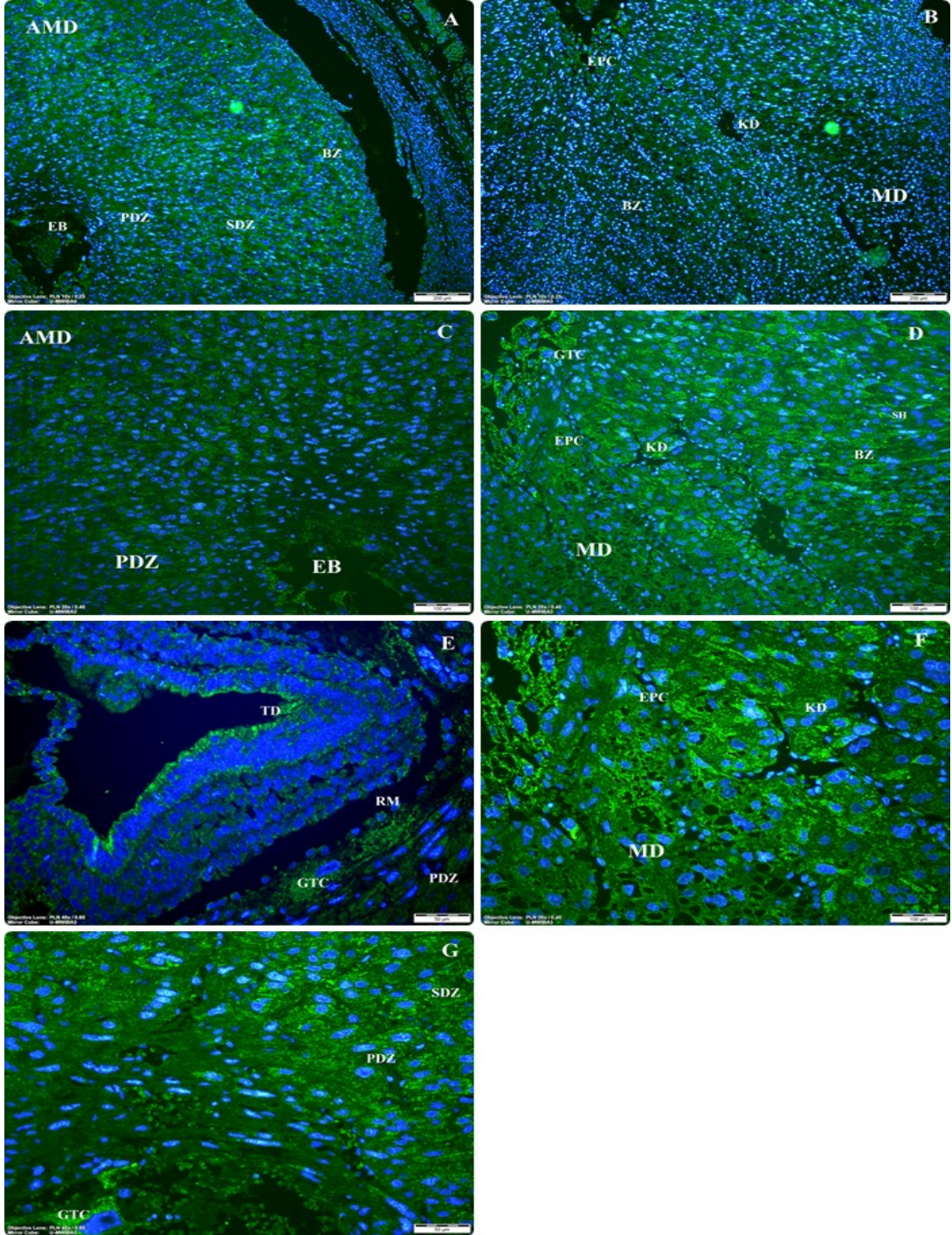
Şekil 4.42. Gebeliğin 8,5. Gününde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F) (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarı; SH: Stromal hücreler)



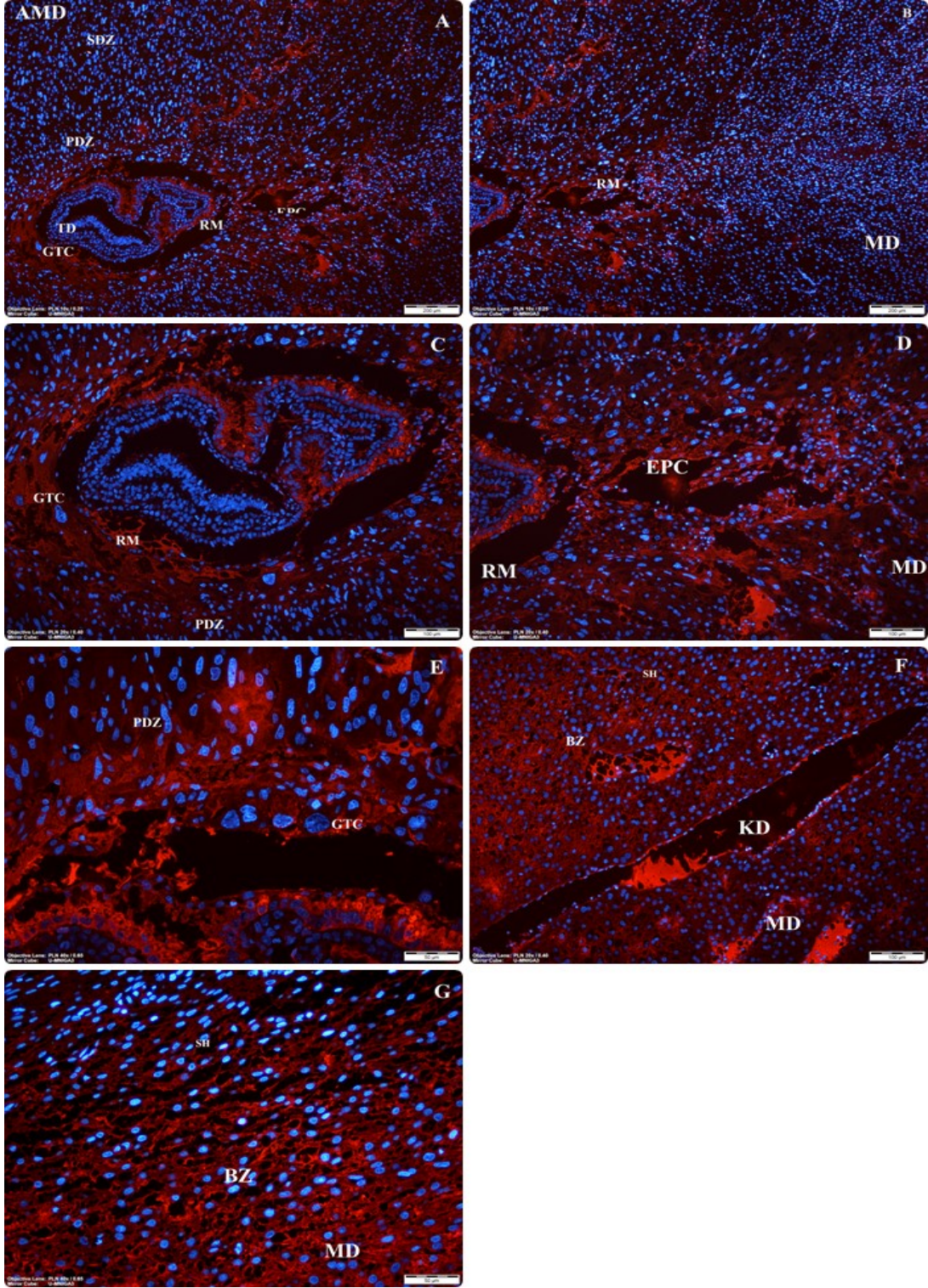
Şekil 4.43. Gebeliğin 8,5. Gününde β -katenin immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G,H) (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarı; SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.44. Gebeliğin 8,5.Gününde *ET-1* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



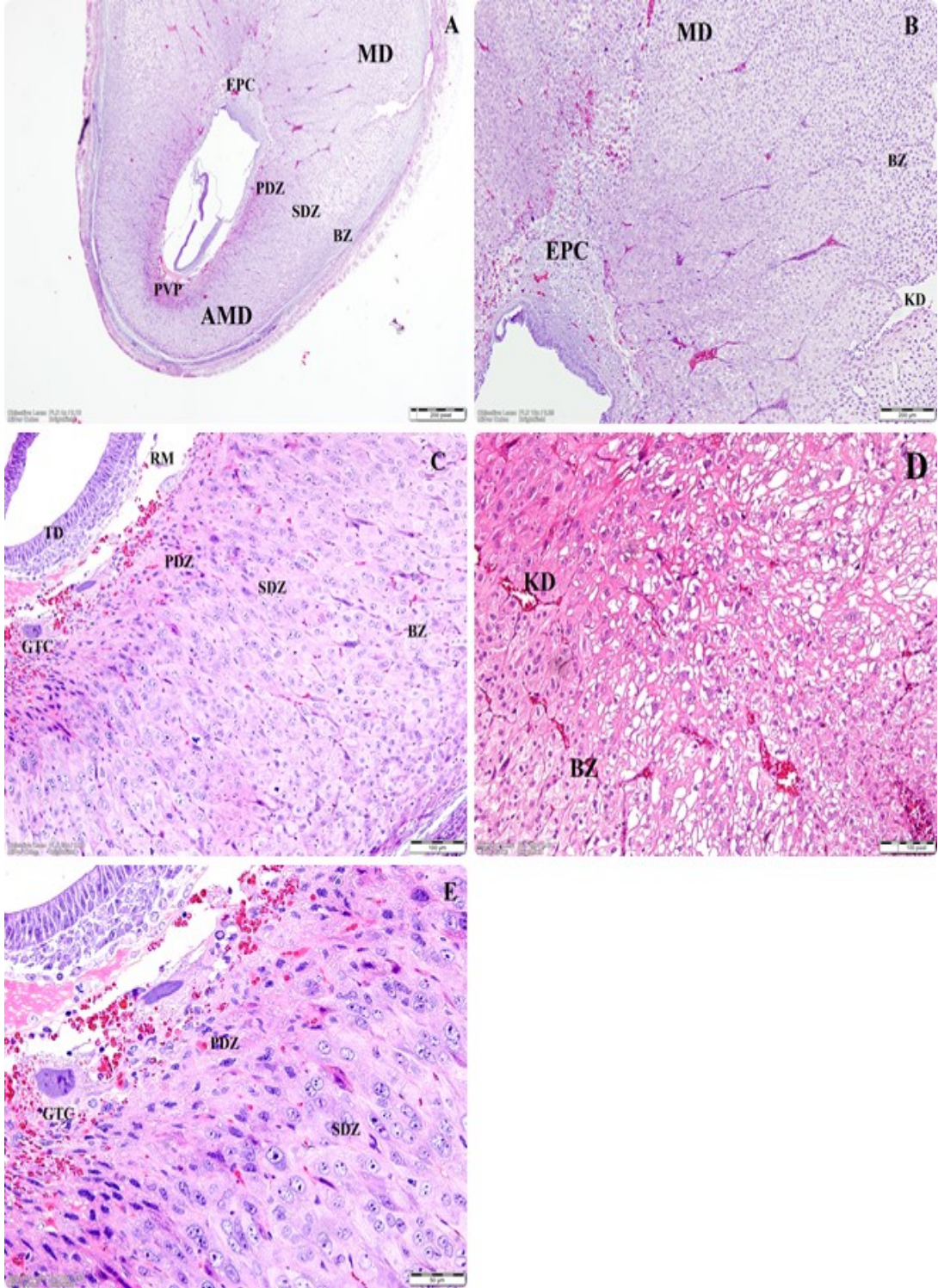
Şekil 4.45. Gebeliğin 8,5. gününde *Ang-1* immüno lokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.46. Gebeliğin 8,5. Gününde *Cdh5* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)

Gebeliğin 9,5. Günü

Gebeliğin 9,5.gününde uterus ve embriyonun hacminin arttığı, embriyo bölgesinin genişlediği ve antimezometrial alana daha fazla yayıldığı gözlemlendi. Embriyonun etrafında Reichert membranı oldukça belirgindi ve tek sıralı hücrelerden oluşuyordu. Reichert membranının dış katmanında trofoblast hücreleri ve maternal kan damarlarıyla temas halinde izlendi. Embriyo bölgesinin hemen alt kısmında büyük çekirdekleriyle dikkat çeken dev trofoblast hücreleri oldukça dikkat çekiciydi. Bu hücrelerin çekirdekleri koyu boyalı ve sitoplazması oldukça boldu. Embriyo bölgesinin dış kısmında dikkat çekici olaylardan biri de dejenere olan desidual hücreler ve burada konumlanan kapiller ağların varlığıydı (Şekil 4.47 C-E). Bu dönemde ektoplasental kon antimezometrial alana doğru daha fazla yayılmış ve bölgedeki büyük kan damarlarıyla ilişki yüzü artmıştır. Bölgede ektoplasental kona yönelmiş büyük mezometrial kan damarları dikkat çekiciydi. Ektoplasental konun hemen karşı kutbunda ise vitellus kesesi plasentası başka bir dikkat çeken yapılardandı. Primer desidual zon ve sekonder desidual zondaki desidual hücreler bir önceki gündeki gibi benzer morfolojik özellikler taşıyordu. Mezometrial alanda lümen tamamen ortadan kalkmış ve kaybolmuştu, bu alanların yerini desidual hücreler ve zengin kan damarına bırakmıştı. Mezometrial alanda dikkat çekici noktalardan biri ise farklılaşmamış desidual hücreler yerini desidual hücrelere bırakmıştır (Şekil 4.47 B-D).



Şekil 4.47. Gebeliğin 9,5. günündeki ışık mikroskop bulguları (H&E). (A,B,C,D,E) (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarı; SH: Stromal hücreler)

Tablo 4.7. Gebeliğin 9,5. günündeki *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Ve-kadherin* proteinlerinin immünolokalizasyonları

9,5. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL BÖLGE							MEZOMETRİAL BÖLGE		
	DESIDUA							DESIDUA		
	EMBRYO BÖLGESİ				PDZ	SDZ	BZ	KD	BZ	SH
	TD	RM	GTC	EPC						
<i>Wnt-3</i>	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>Wnt-7a</i>	+++	++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++
β - <i>katenin</i>	+++	++	+++	+++	+++	+	++++	+++	+++	+++
<i>ET-1</i>	+++	+++	++++	++++	+++	+	++++	+++	+++	++++
<i>Ang-1</i>	++++	+++	++++	+++	+++	++	++++	+++	++	++++
<i>VE-kadherin</i> (<i>cdh5</i>)	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ + + + ; Çok kuvvetli ekspresyon, + + + ; Kuvvetli ekspresyon, + + ; Orta kuvvetteki ekspresyon, + ; Zayıf ekspresyon, - ; ekspresyon yok

Wnt-3; gebeliğin 9,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde bulunan embriyo bölgesinde bulunan trilaminar disk hücrelerinde ve Reichert membranında orta dereceli bir ekspresyon varlığı söz konusu iken dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ektoplasental koninin olduğu bölgede kuvvetli şiddette bir ekspresyon görüldü (Şekil 4.48 E). Primer desidual zon ve sekonder desidual zonda orta şiddette bir ekspresyon görülürken, bazal zonda kuvvetli şiddette bir ifadesinin olduğu gözlemlendi. Mezometrial desidua bölgesindeki kan damarları endoteli, bazal zon ve stromal hücrelerde ***Wnt-3***'ün kuvvetli bir immün reaksiyon verdiği saptanmıştır.

Wnt-7a; gebeliğin 9,5. gününde antimezometrial alanda bulunan embriyo bölgesindeki trilaminar disk hücrelerinde, dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ektoplasental konin olduğu bölgede kuvvetli pozitif immün reaksiyon görülmüştür (Şekil 4.49 E). Reichert membranında ***Wnt-7a***'nın orta şiddette bir ifadesine rastlanmıştır. Primer desidual zon ve sekonder desidual zonda ***Wnt7a***'nın zayıf ekspresyonu söz konusu iken bazal zonda orta şiddette bir ekspresyon olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.49 C). Mezometrial desidual bölgede bulunan kan damarları endotelinde orta şiddette bir ifadesi görülürken, bazal stroma ve stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli ifadesi olduğu görülmüştür.

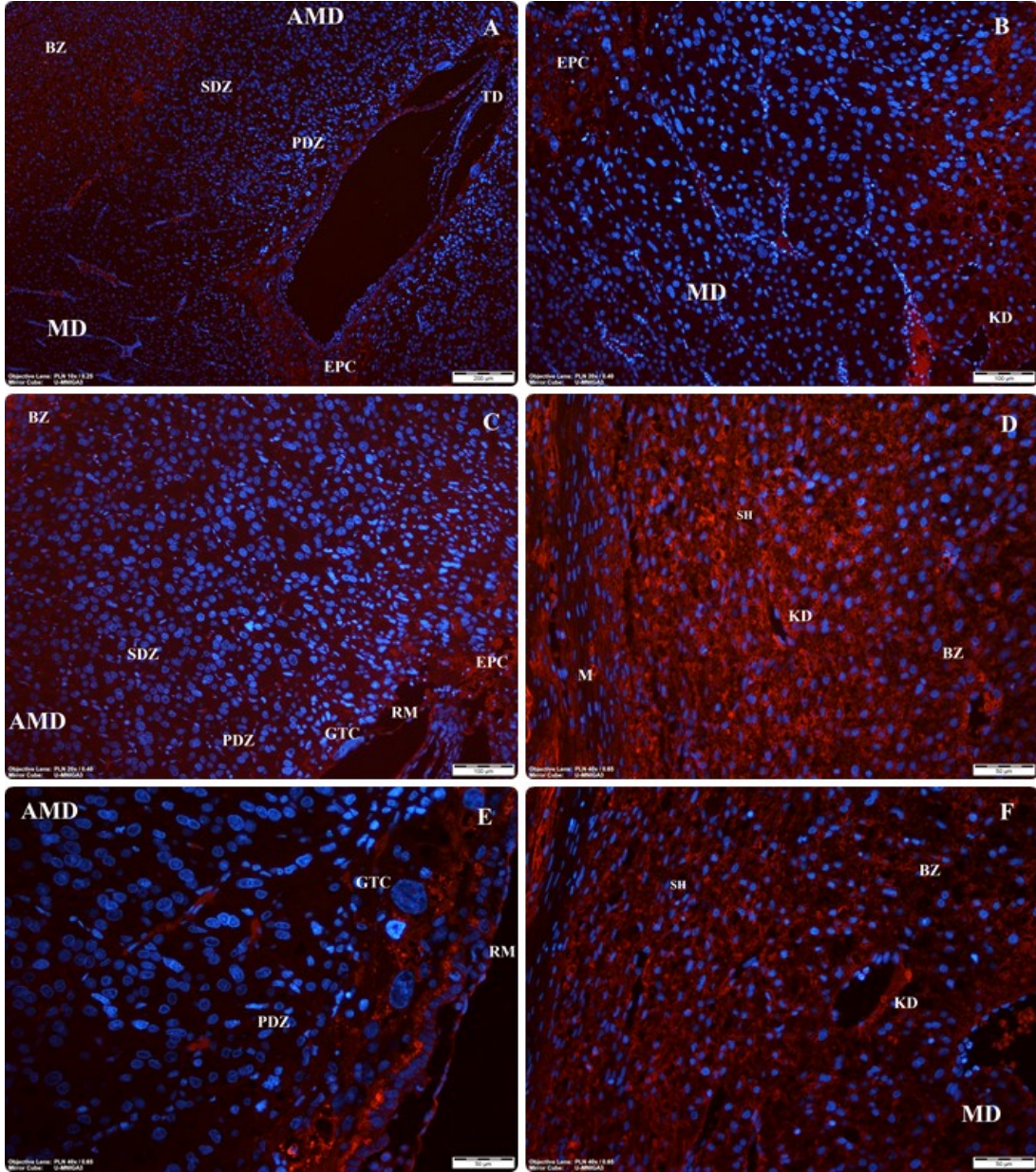
β-katenin; gebeliğin 9,5. gününde antimezometrial desidual alanda yer alan embriyo bölgesinde, trilaminar disk hücrelerinin hücre yüzeyinde, dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ektoplasental koninin olduğu bölgede ***β-katenin***'in kuvvetli bir immünolokalizasyona sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.50 G). Reichert membranında orta dereceli bir ekspresyona sahip olduğu saptanmıştır. Primer desidual zon ve sekonder desidual zonda kuvvetli ekspresyon olduğu görülürken, bazal zonda çok kuvvetli ekspresyon varlığı görülmüştür (Şekil 4.50 C). Mezometrial desidual bölgede bulunan kan damarları endotelinde, bazal zonda ve stromal hücrelerde kuvvetli şiddette immünolokalizasyon görülmüştür.

Endotelin-1; gebeliğin 9,5. gününde antimezometrial bölgede bulunan embriyo bölgesindeki trilaminar disk bölgesi ve Reichert membranında ***ET-1***'in kuvvetli şiddette pozitif immün reaksiyon verdiği görülmüştür (Şekil 4.51 E). Dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında ve ektoplasental koni hücrelerinin bulunduğu bölgede çok kuvvetli şiddette ifadesine rastlanmıştır. Primer desidual zonda kuvvetli bir ifadeye sahipken sekonder desidual zon ve bazal zonda çok kuvvetli ifadesi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.51 A-B-C). Mezometrial desidua bölgesinde bulunan kan damarları endotelinde ve bazal zonda kuvvetli ekspresyon görülmüştür. Bazal zonda bulunan stromal hücrelerde çok kuvvetli ekspresyon varlığı saptanmıştır.

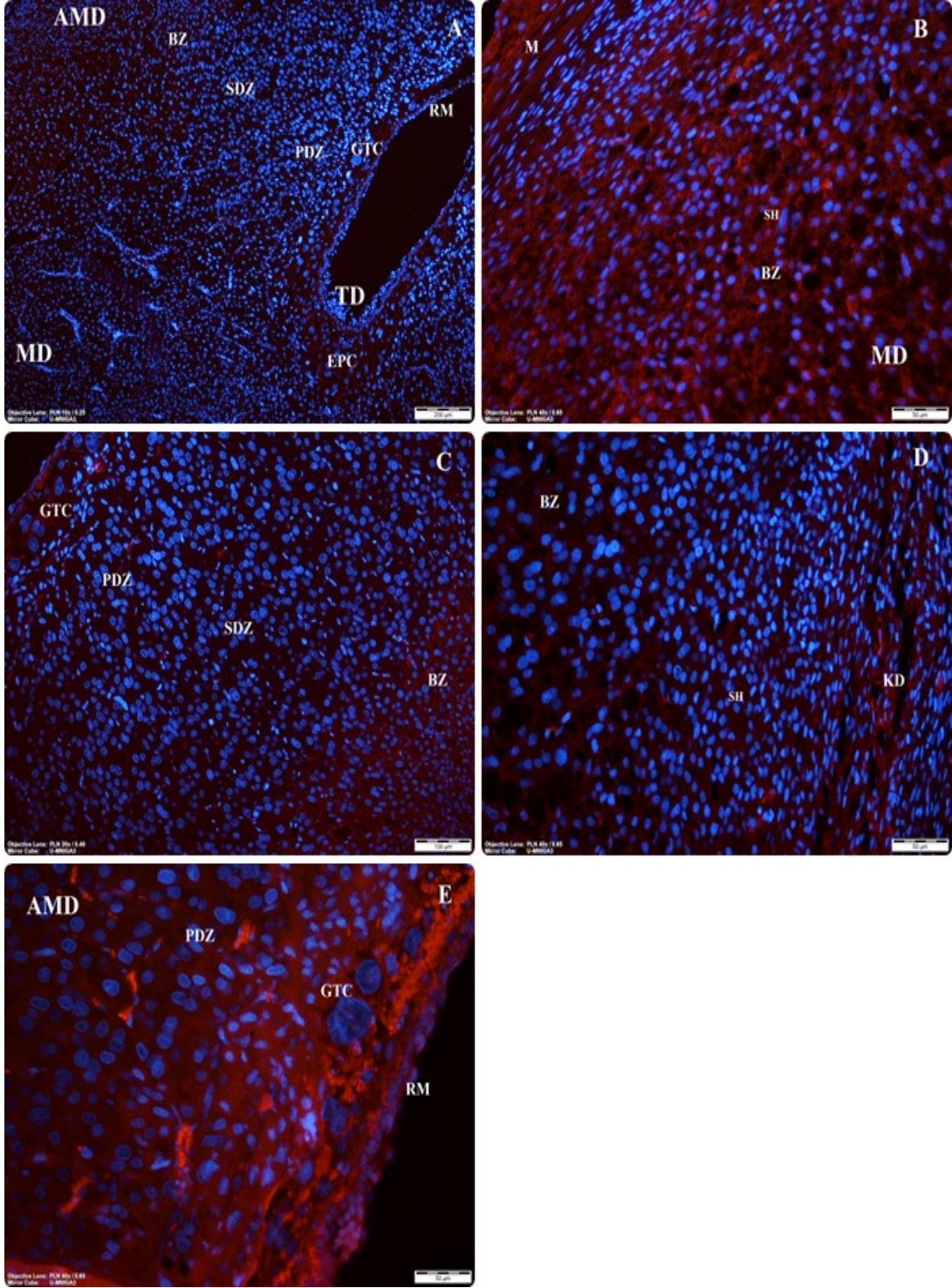
Angiopoietin-1; gebeliğin 9,5. gününde antimezometrial desidual bölgede bulunan embriyo bölgesinde trilaminar disk hücrelerinin sitoplazmasında ve dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında çok kuvvetli şiddette ifadesi olduğu görülmüştür. Reichert membranı ve ektoplasental koninin bulunduğu alanda kuvvetli ekspresyonu izlenmiştir. Primer desidual zonda ***Ang-1*** kuvvetli immün reaksiyon verirken sekonder zonda orta dereceli, bazal zonda ise çok kuvvetli derecede bir immün reaksiyon verdiği saptanmıştır (Şekil 4.52 A-B-C-E). Mezometrial desidua bölgesinde bulunan kan damarları endotelinde kuvvetli ekspresyon görülmüştür. Bazal zonda orta dereceli bir immün lokalizasyon görülürken bazal zonda bulunan stromalar hücrelerin sitoplazmasında çok kuvvetli immün lokalizasyonu olduğu görülmüştür.

Ve-kadherin (Cdh5); gebeliğin 9,5. gününde antimezometrial desidua bölgesinde bulunan embriyo bölgesinde bulunan trilaminar disk hücreleri, Reichert membranı ve

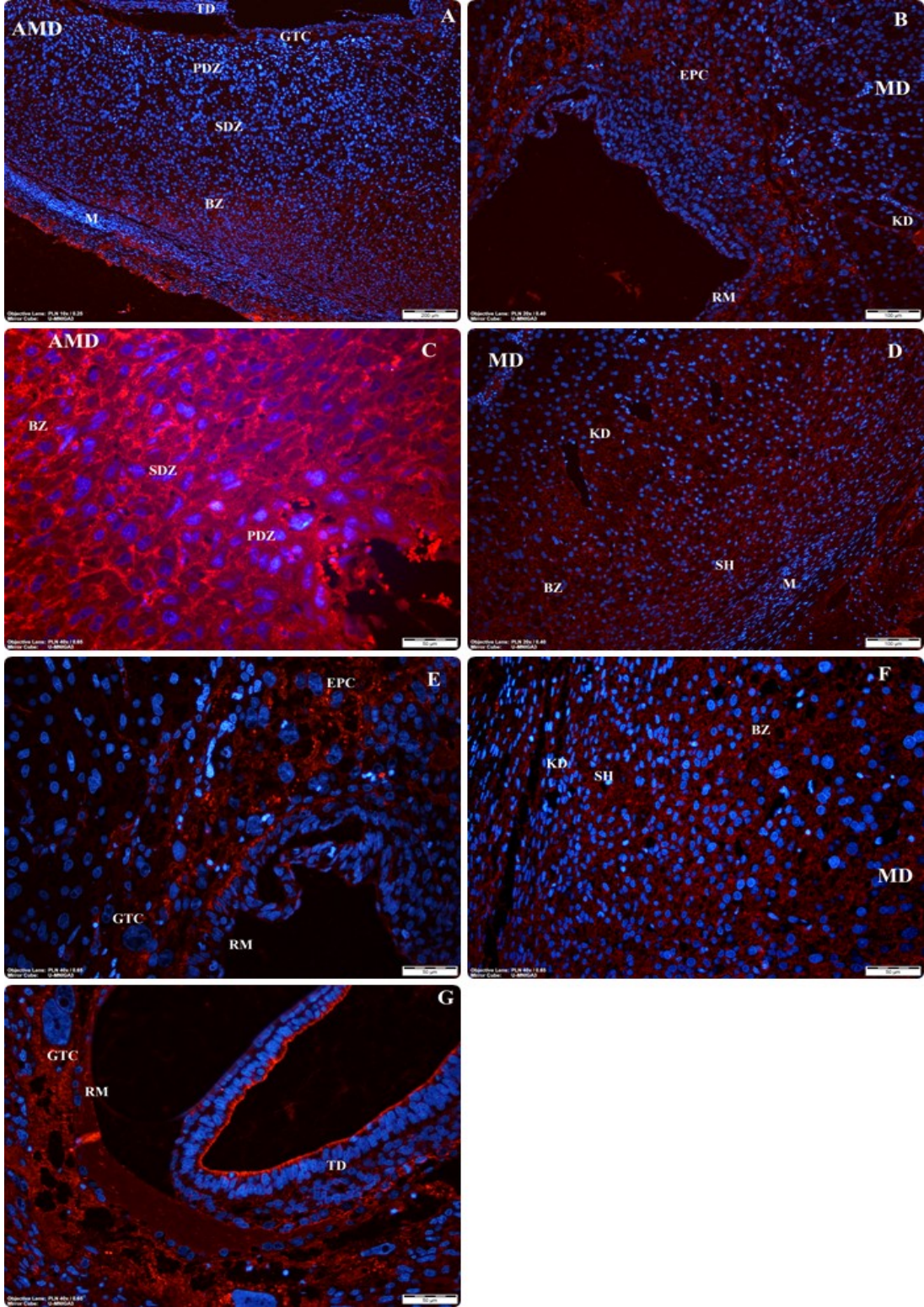
dev trofoblast hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli bir ekspresyon söz konusu iken ektoplasental koninin bulunduğu alanda orta şiddette ekspresyon varlığı görülmüştür (Şekil 4.53 E). Primer desidual zon, sekonder desidual zon ve bazal zonda kuvvetli immün reaksiyon görülmüştür (Şekil 4.53 A-B-C). Mezometrial desidua bölgesinde bulunan kan damarları endotelinde, bazal zonda ve bazal zonda bulunan stromal hücrelerde kuvvetli pozitif immün reaksiyon saptanmıştır.



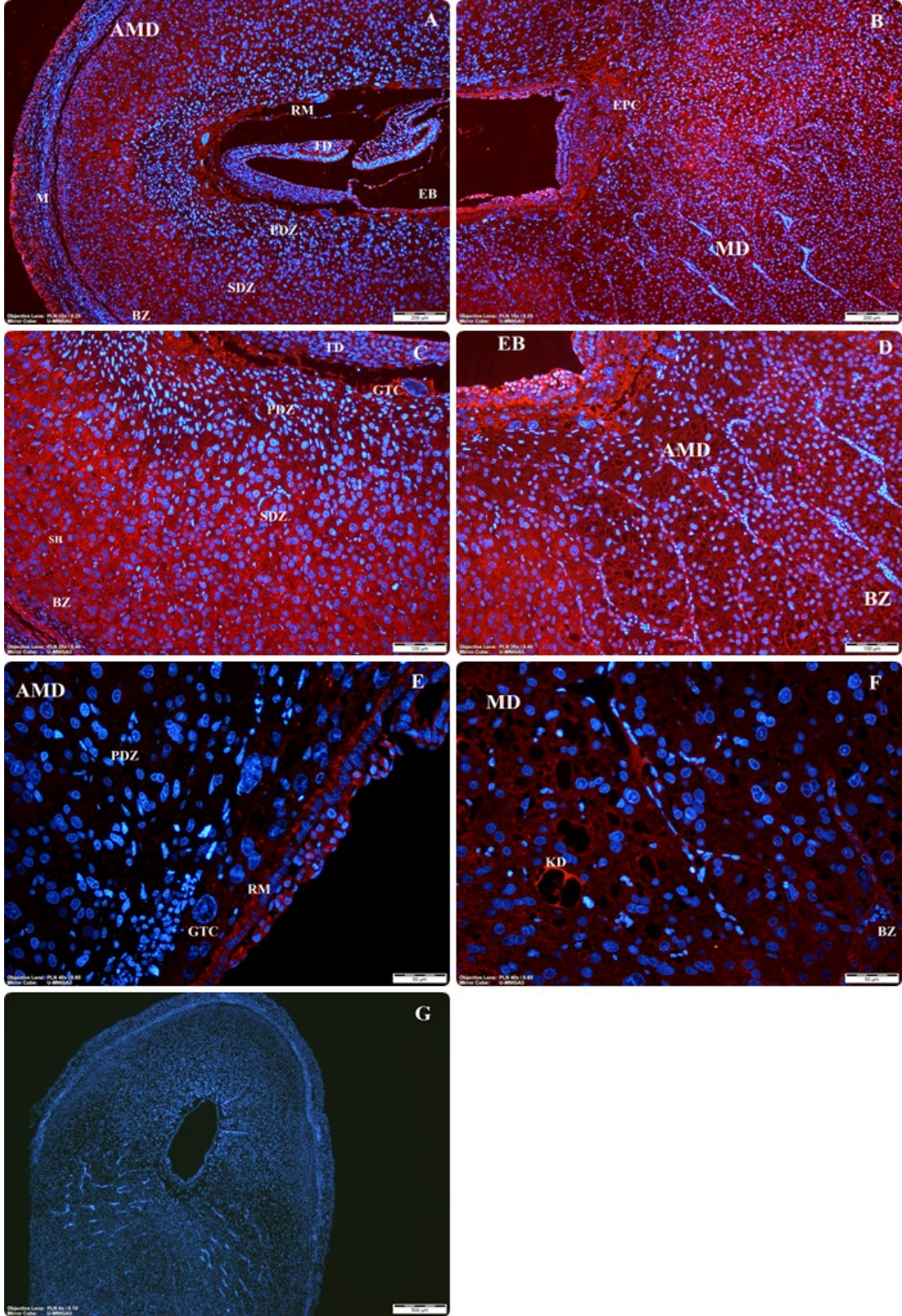
Şekil 4.48. Gebeliğin 9,5. gününde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



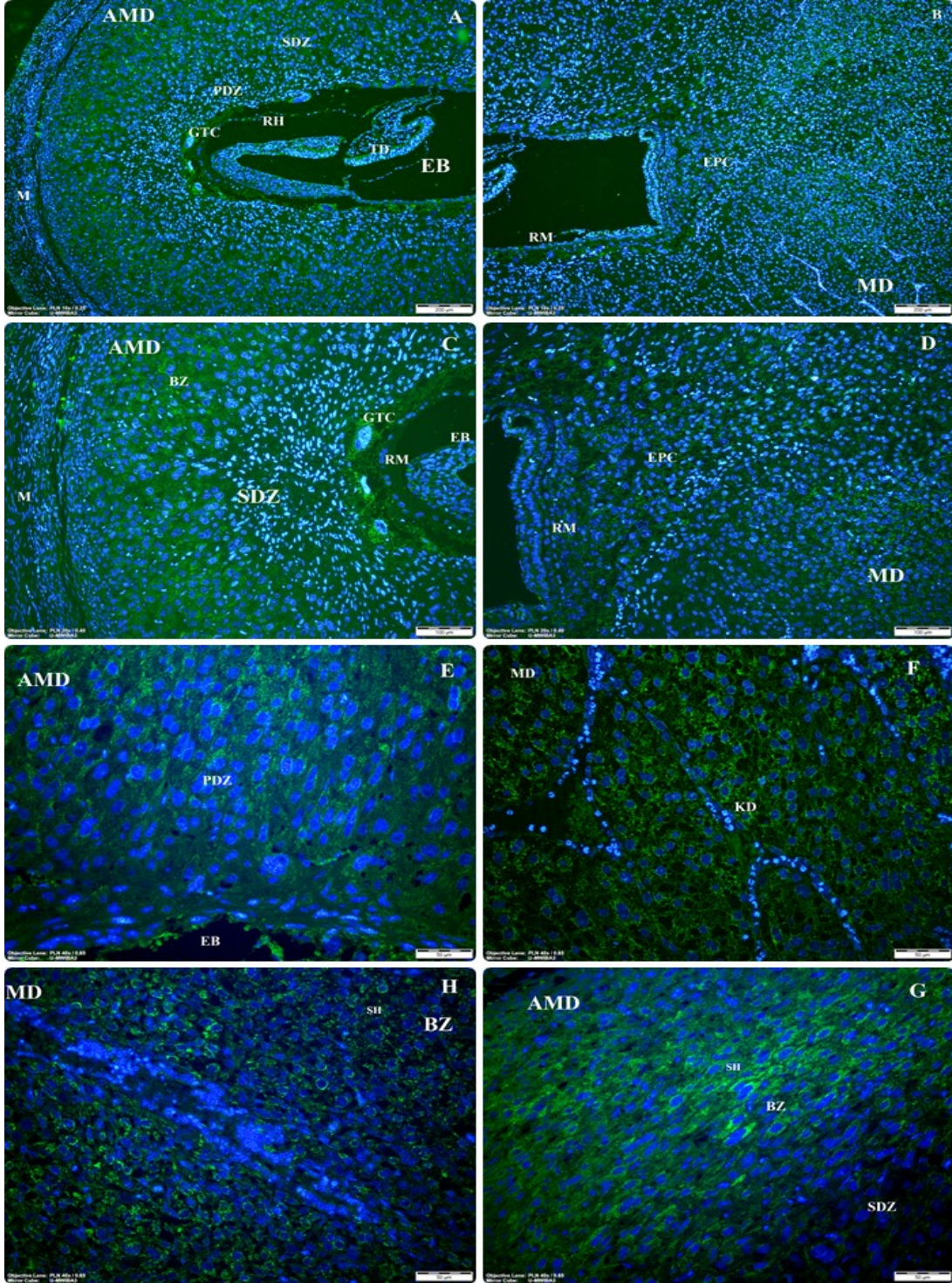
Şekil 4.49. Gebeliğin 9,5. gününde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



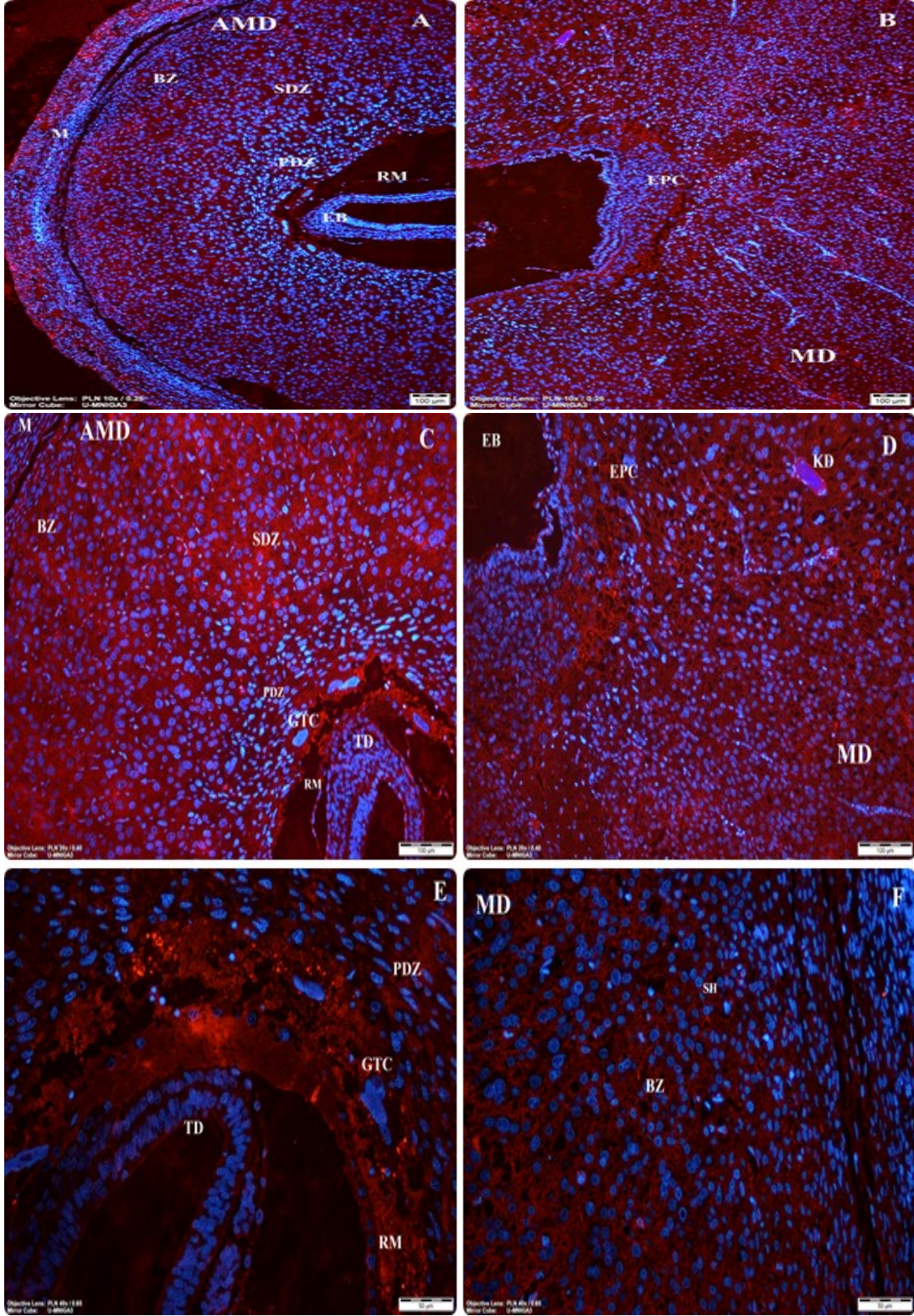
Şekil 4.50. Gebeliğin 9,5. gününde β -katenin immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.51. Gebeliğin 9,5. gününde *Et-1* immünolokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD: Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.52. Gebeliğin 9,5. gününde *Ang-1* immüno lokalizasyonları (A,B,C,D,E,F,G H). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)



Şekil 4.53. Gebeliğin 9,5. gününde *Cdh5* immüno lokalizasyonları (A,B,C,D,E,F). (AMD: Antimezometrial desidua; MD: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; TD; Trilaminar disk; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; EPC: Ektoplasental koni; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; KD: Kan damarları; SH: Stromal hücreler)

4.3. Real-Time PZR Uygulamaları

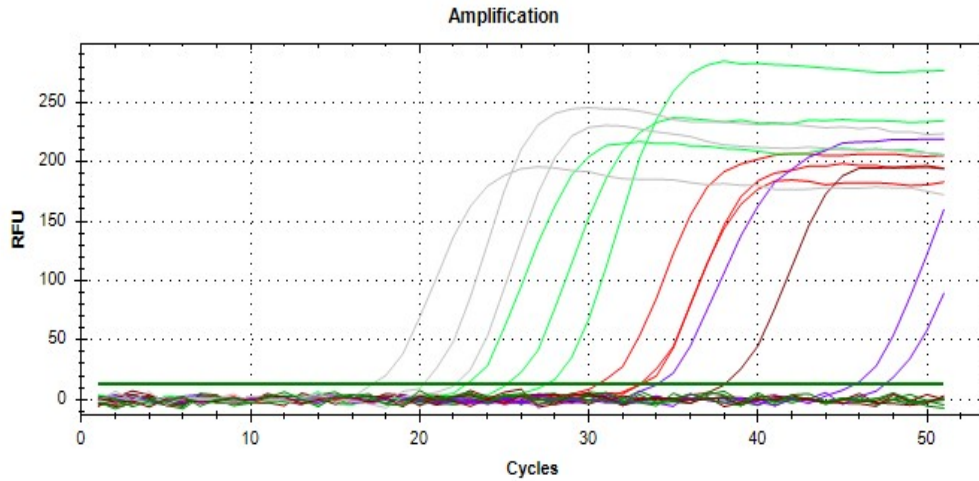
Real-Time PZR, kontrol ve deney grubu uterus dokularında *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* transkriptlerinin genel düzeylerindeki değişiklikleri değerlendirmek için kullanıldı ve referans gen olarak *GAPDH* ile normalizasyon sağlandı. Uterus dokularından alınan cDNA örneklerinden *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *Cdh5* primerleri ile yapılan Real-Time PZR sonrası elde edilen *Ct* değerleri Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *ET-1*, *Ang-1* ve *VE-kadherin* proteinlerinin östrus siklusu ve gebelik günlerine ait *ct* değerleri

GEN/EVRE	Deney Grubu			Kontrol Grubu (Östrus Siklusu)			
	7,5. GÜN	8,5 GÜN	9,5. GÜN	Proöstrus	Östrus	Metaöstrus	Diöstrus
<i>Wnt3</i>	28,54	28,07	24,07	28,75	31,06	29,27	29,97
<i>Wnt7a</i>	45,75	32,81	34,08	29,37	25,36	25,04	31,59
β - <i>katenin</i>	27,50	25,16	22,77	24,10	22,14	20,84	26,44
<i>ET-1</i>	33,05	33,11	30,56	28,55	23,54	27,81	30,89
<i>Cdh5</i>	28,48	27,12	23,84	28,33	28,18	24,68	32,22
<i>Ang-1</i>	29,09	26,52	24,23	28,62	30,21	28,57	28,70

Ct değerleri: (18-24) → kırmızı, (24-30) → turuncu, (30-34) → yeşil, (*ct* ≥34) → mavi

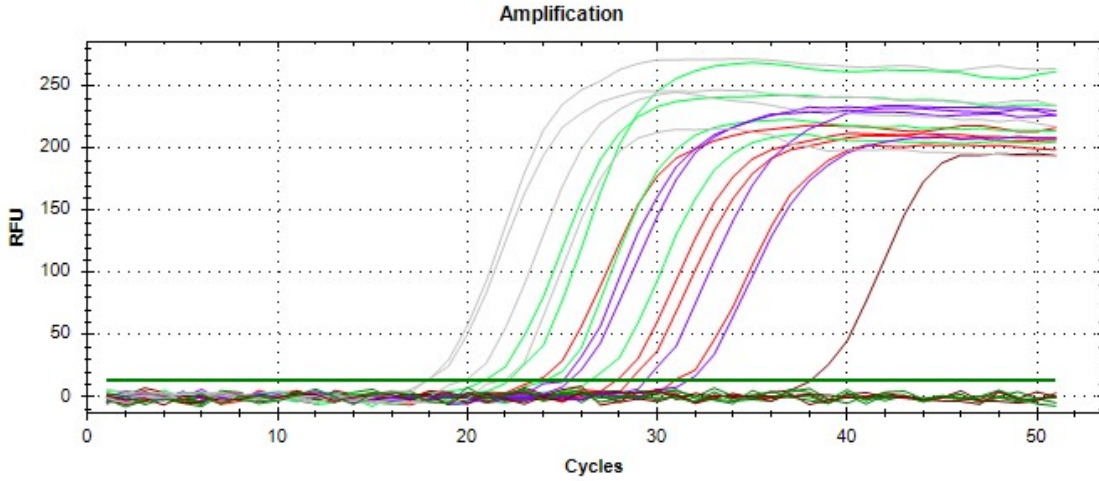
Real-Time PZR reaksiyonu sonucunda kontrol ve deney grubundaki her gen için spesifik amplifikasyon eğrileri gözlendi (Şekil 4.54-4.57).



Şekil 4.54. Gebelik günlerindeki *GAPDH*, *β-katenin*, *ET-1* ve *Wnt7a* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *β-katenin*: yeşil; *Edn-1*: kırmızı; *Wnt7a*: mor)

Devam eden gebelik günlerinde;

- *Wnt7a* geninin ekspresyonuna bakıldığında 7,5. gün gebe uterusunda ifadesi izlenmezken, 8,5 gündeki ekspresyonu 9,5. güne göre karşılaştırıldığında 2.41 katlık artış olduğu görülmüştür.
- *β-katenin* geninin ekspresyonuna bakıldığında devam eden gebelik günlerinde sürekli bir artış olduğu ve 9,5. günde en yüksek ifadesine ulaşmıştır. 7,5. günden 8,5. güne doğru gidikçe 5.06 katlık bir artış olduğu 8,5. günden 9,5. güne doğru ise 5.2 katlık bir artış izlenmiştir.
- *ET-1* gen ifade düzeyinde 7,5. günden 8,5. güne doğru gidildikçe ekspresyonunda 1.06 katlık bir azalma söz konusu iken, 9,5. gündeki gen ifade düzeyi 7,5. güne göre 5,85 katlık artış olduğu saptanmıştır.

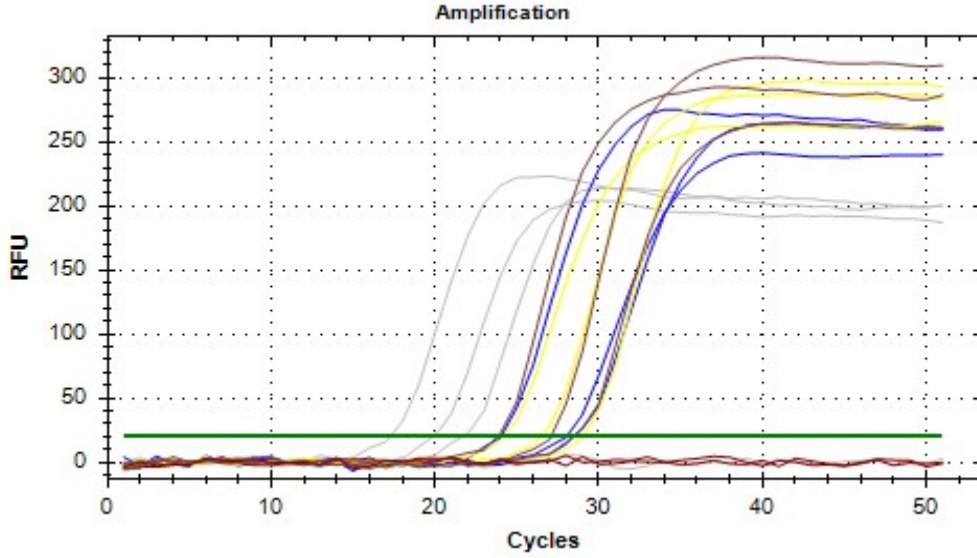


Şekil 4.55. Östrus siklusundaki *GAPDH*, *β-katenin*, *ET-1* ve *Wnt7a* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *β-katenin*: yeşil; *Edn-1*: kırmızı; *Wnt7a*: mor)

Kontrol grubu olan östrus siklusuna baktığımız zaman;

- Östrus siklusunu Real-Time PZR bulgularına bakıldığında en yüksek ekspresyon oranının metaöstrus evresinde en düşük ifade seviyesi ise diöstrus evresinde karşımıza çıkmaktadır. Prosöstrus evresinden östrus evresine gidildikçe ekspresyon ifadesinde 16.11 katlık bir artış görülmüştür. Östrus evresinden metaöstrus evresine gidildikçe 1,24 katlık artış olduğu görülmüştür. Metaöstrus evresinden diöstrus evresine gidildiğinde *Wnt 7a* ekspresyon ifadesinde 93.7 katlık bir azalma söz konusudur.
- *β-katenin* geni Real-Time PZR bulgularındaki ekspresyon seviyelerine bakıldığında, en yüksek ifade seviyesinin metaöstrus evresinde olduğu görülmüştür. Östrus siklusunu döngüsü boyunca diöstrus, proöstrus, östrus evrelerinden metaöstrus evresine doğru sırasıyla gidildikçe *β-katenin* ekspresyonunun giderek arttığı görülmüştür. Proöstrus evresi diöstrusa göre 5.06 kat oranında bir ekspresyona sahiptir. Östrus evresinde *β-katenin* ekspresyonu proöstrusa göre 3.89 kat daha fazla eksprese olmuştur. Metaöstrus evresindeki ekspresyonu östrus evresine göre 2,4 kat daha fazla eksprese olmuştur.
- *ET-1* östrus siklusunu boyunca en yüksek ekspresyonunu östrus evresinde verdiği görülmüştür. Burdan yola çıkarak östrus evresine göre karşılaştırma yapıldığında, östrus evresinde *ET-1*'in proöstrus evresine göre 32,22 kat daha fazla eksprese olduğu görülmüştür. Metaöstrus evresi östrus evresiyle

karşılaştırıldığında ekspresyonunda 19.29 katlık bir azalma olduğu görülmüştür. Östrus evresi, diöstrus evresine göre karşılaştırıldığında östrus evresinde *ET-1* 163,14 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır.

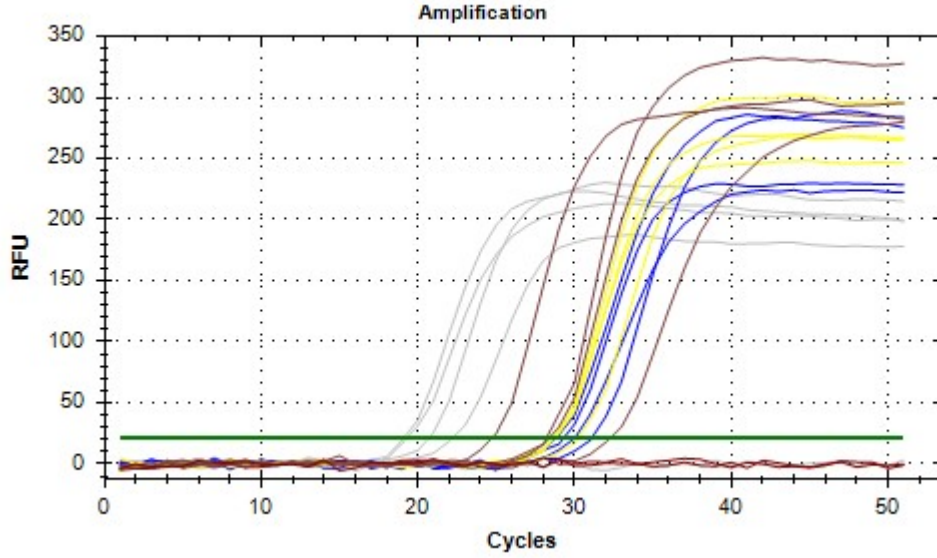


Şekil 4.56. Gebelik günlerindeki *GAPDH*, *Cdh5*, *Ang-1* ve *Wnt3* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *Cdh5*: kahverengi; *Ang-1*: sarı; *Wnt3*: mavi)

Devam eden gebelik günlerinde;

- *Wnt-3* geninin devam eden gebelik günlerinde sırasıyla 7,5., 8,5. ve 9,5. günlerde ifade seviyesinin giderek arttığı görülmüştür ve en yüksek ekspresyon seviyesine 9,5. günde ulaşmıştır. Buna göre kıyaslama yapıldığında 7,5. günden 8,5. güne doğru gidildiğinde *Wnt-3* ekspresyonunun 1.38 kat arttığı görülmüştür. 8,5. günden 9,5. güne gidildiğinde ise 16 katlık bir artış olduğu gözlemlendi.
- *Ang-1* geni devam eden gebelik günlerinde ekspresyon seviyesinde sürekli bir artış olduğu gözlemlendi ve en yüksek ifade seviyesine 9,5. günde ulaştığı görüldü. Buna göre oranlama yapıldığında, 7,5. günden 8,5. güne doğru gidildikçe ifade düzeyinde 5.93 katlık bir artış olduğu görüldü. 8,5. günden 9,5. güne doğru gidildikçe de 4.89 katlık bir artış olduğu hesaplanmıştır.
- *Ve-kadherin (Cdh5)* geninde *Ang-1* ve *Wnt-3* gibi devam eden gebelik günlerinde ekspresyon seviyesinde sürekli anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ve en yüksek ifade seviyesine 9,5. günde ulaşmıştır. Buna göre

Cdh5 geninin devam eden gebelik günlerindeki oranlarına bakıldığında 7,5. günden 8,5. güne doğru gidildiğinde 2,56 katlık bir artış olduğu izlendi. 8,5.günden de 9,5. güne doğru ise 9.71 kat *Cdh5* ifadesinde artış görülmüştür.



Şekil 4.57. Östrus siklusundaki *GAPDH*, *Cdh5*, *Ang-1* ve *Wnt3* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *Cdh5*: kahverengi; *Ang-1*: sarı; *Wnt3*: mavi)

Östrus siklusundaki *Ang-1*, *Cdh5* ve *Wnt3* genlerinin ifade seviyesine baktığımız zaman;

- *Wnt-3* geni östrus siklusu bulgularında en yüksek ifade seviyesinin proöstrus evresinde ulaştığı görülmüştür. En düşük östrus siklusunda olduğu görülmüştür. Oranlara bakıldığında proöstrus evresinden östrus evresine gidildiğinde ekspresyon ifadesinde 4.95 katlık bir azalma görüldü. Östrus evresinden metaöstrus evresine doğru gidildikçe 1.79 katlık bir artış izlenirken, metaöstrus evresinden diöstrus evresine gidildikçede 1.62 katlık bir azalma görülmüştür.
- *Ang-1* genin östrus siklusunda ifade düzeyi en yüksek metaöstrus evresinde olduğu, en düşük ise östrus evresinde olduğu görülmüştür. Buna östrus siklusu sırasına göre oranlama yapıldığında proöstrus evresinden östrus evresine gidildikçe *Ang-1*'in ifade düzeyinde 3.01 katlık bir azalma olduğu görüldü. Östrus evresinden metaöstrus evresine doğru gidilirken 3.11 katlık

bir artış olduğu saptandı. Metaöstrus evresinden diöstrus evresine geçildiğinde ise 1.09 katlık bir azalma söz konusudur.

- *Ve-kadherin (Cdh5)* geni östrus siklusu bulgularına bakıldığında en yüksek ifade seviyesine metaöstrus evresinde ulaşmış olup, en düşük ifade seviyesine ise diöstrus evresinde ulaşmış olduğu görüldü. Siklus döngüsünü takiben oranlara bakıldığında, proöstrus evresinden östrus evresine gidildikçe 1.1 katlık bir artış görüldü. Östrus evresinden metaöstrus evresine geçildiğinde 11.31 katlık bir artış olduğu görülmüştür. Metaöstrus evresinden diöstrus evresine doğru gidildikçede 186.1 katlık azalma olduğu görülmüştür.



5. TARTIŞMA

İmplantasyon süreci embriyo ile endometriumun karşılıklı iyi bir etkileşimini gerektirir. Genel olarak, apozisyon ve adezyon aşamaları implantasyon penceresi sırasında gerçekleştirilirken, invazyon aşaması geç sekretuar fazda meydana gelir. Embriyo ve reseptif endometrium arasındaki etkileşim; sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve hücre adezyon molekülleri tarafından yönetilir. İnsan ve memeli implantasyonunda önemli süreçlerden biride eksitatör ve inhibitör faktörlerin etkisinde sıkıca denetlenen anjiogenezdır. Bu süreçlerin çoğunda iki kilit düzenleyici olarak östrojen ve progesteronun rolü olduğu bilinmektedir. Bu iki steroidal hormon, genlerin ifadesini değiştirerek moleküler olarak implantasyon ve plasentasyon süreçlerini yönetir (Karizbodagh vd., 2017).

Mevcut vasküler yapılardan yeni kan damarlarının oluşumunu ifade eden anjiogenez endotel hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu, bazal membranların degradasyonunu, çevredeki ekstraselüler matriks boyunca migrasyonu ve damarın olgunlaşmasını içerir (Carmeliet, 2003). Embriyogenezin haricinde, yetişkinlerin çoğunda yaralanma olmadığı sürece fizyolojik anjiyogenez oluşmaz. Bununla birlikte, dişi üreme sistemi normal anjiyogenezin meydana geldiği bölgedir ve embriyo implantasyonunun yanı sıra menstrual döngüde de temel bir süreçtir. Endometrial anjiyogenez, arkuat arterlerden kaynaklanan son arteriollerle gerçekleştirilir. Menstrual siklus sırasında proliferatif fazın erken evrelerinde, bu arterioller düzdür, fakat döngü sekretuar faza doğru ilerledikçe, bu arterioller dilate olur ve vasküler düz kas hücrelerinin düzensizliğiyle düşük dirençli vasküler ağa dönüşürler (Kam vd., 1999).

Bu çalışmada peri-implantasyon döneminde sıçan endometriumunun kanonikal Wnt β -katenin yolağının bazı proteinleri ile normal damar fizyolojisi ve plasentasyon süreçlerinde rol alan bazı temel proteinlerin (Ang-1, Et-1, VE-kadherin) immünfloresan dağılımları ve Real-Time PZR ile ifade seviyeleri araştırıldı. Bulgularımız, tüm bu proteinlerin önemli spesifik fonksiyonlar gösterdiğini desteklemekle birlikte, özellikle kanonikal Wnt proteinlerinden bazılarının anjiogenik faktörlerle eş lokalizasyonu ve up-regülasyonları bu bağımsız gibi görünen proteinler arasındaki ilişkiyi göstermemiz açısından önemli olabilir. Bu

hipotezimizi desteklemek için, daha ileri moleküler yöntemlerin kullanımı gerekliyse de mevcut çalışmanın bu ilişkiyi tartışmaya açması önemlidir. Bu hipotezimiz diğer dokulardaki az sayıda çalışma ile desteklenmiş gözükmektedir. Örneğin beyinde Wnt sinyallerinin yokluğunda prematür Sphingosine-1 fosfat reseptör (S1P1) hücre-hücre bağlantılarında VE-kadherin ve ESAMA'yı (Endotelial hücre seçici adezyon molekülü A) düşürdüğü, böylece Wnt sinyallerinin önemli bir modülatörü olabileceğini ileri sürülmüştür (Hübner vd., 2018).

Wnt-β Katenin Sinyal Yolağı

Wnt sinyali ve implantasyon arasındaki ilişki, Wnt ailesi üyelerinin implantasyondan önce hem erken embriyonik gelişimde hem de endometriumun değişmesi için kritik olduğunu ortaya koymaktadır. Spesifik Wnt sinyal yolu üyelerinin, üreme hormonları tarafından kontrol edilen endometriumdaki siklik değişikliklerin yanı sıra, desidualizasyon ve endometrial bez oluşumu gibi uterin olaylar için kritik olduğu gösterilmiştir. (Cadigan vd., 1998).

Wnt3, primitif çizgi oluşumu ve gastrulasyonda önemli rolleri olan, farelerde posterior visseral endodermden ifade edilen ve epiblastta ifade seviyesi belirgin olan bir Wnt sinyal molekülüdür (Rivera-Perez ve Magnuson, 2005). Visseral endodermden türetilen Wnt3'ün, primitif çizgi oluşumunda indüktif bir rol oynadığı hipotezini desteklemek için, embriyodaki epiblast içinde susturulan Wnt3'ün, ilkel çizgiyi oluşturabildiğini ve kısa bir süre sonra gelişemese de gastrulasyonu başlatabildiğini göstermiştir (Tortelote vd., 2013). Şaşırtıcı bir şekilde, Wnt3-epiblast mutant embriyolarında, Wnt3 mRNA'sı geçici olarak posterior visseral endodermden bulunur; bu, posterior visseral endodermden Wnt3 sinyalinin, gastrulasyonun başlamasından sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Tortelote vd., 2013). Yoon ve arkadaşları (2015) ayrıca posterior visseral endodermden Wnt3 fonksiyonunun primitif çizginin oluşumunda gerekli olup olmadığını belirlemek için, Transthyretin-Cre farelerini (TtrCre) kullanarak visseral endodermden Wnt3'ü inaktif etmişlerdir. Buna göre, sadece visseral endodermden Wnt3 bulunmayan embriyoların, primitif çizgiyi belirlediğini göstermektedir. Wnt3 ek olarak epiblastta da etkisiz hale getirilirse, bu etkinin daha da arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlardan posterior visseral endodermden Wnt3 fonksiyonunun embriyo gelişimi için geçilmez

olduğunu ve primitif çizgi ve gastrulasyon oluşumunu düzenlediği sonucuna varmışlardır. Sonuçlar ayrıca anterior visseral endodermin, Wnt3 sinyalinin embriyonun ön tarafına yayılmasının engellenmesinde rol oynadığını ve primitif çizginin epiblastın karşı tarafını sınırladığını gösterdiğini belirlemişlerdir (Yoon vd., 2015).

Çalışmamızda, gebeliğin 7,5. gününde embriyoda yukarıda tanımlanan bölgede Wnt3 ifade seviyesinin orta şiddette olduğu görülmüştür. Ayrıca gebeliğin 8,5. ve 9,5. gününde gözlenen GTC ve EPC hücrelerinin sitoplazmasında ise Wnt3 ekspresyon düzeyinin kuvvetli olduğu belirlenmiştir. Gebeliğin 7,5. ve 9,5. günlerinde embriyo bölgesinin çevresinde yer alan primer desidual zon bölgesinden sekonder desidual zon ve antimezometrial bazal zona doğru gidildikçe kuvvetli bir şekilde artan ekspresyon varlığının söz konusu olduğu, 8,5. günde ise primer desidual zonda kuvvetli immünreaktivite gösterdiği, sekonder ve antimezometrial bazal zon bölgesinde ise ifade seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. Mezometrial bölgeye baktığımız zaman ise çalışmada belirlenen gebeliğin bütün günlerinde mezometrial bazal zonda kan damarı endoteli ve bu bölgede yer alan farklılaşmamış stromal hücrelerinde kuvvetli ekspresyonlar gösterdiği gözlenmiştir. Real-Time PZR bulgularında Wnt3 proteininin artan gebelik bağlı olarak sürekli artış gösterdiği ve 9,5. günde çok yüksek bir ifade seviyesine ulaştığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, Wnt3'ün sadece gastrulasyon ve primitif çizgi oluşumunda yer almadığı, ayrıca implantasyon, desidualizasyon ve plasentasyon olaylarında da önemli roller üstlendiği düşünülmektedir.

Bui ve arkadaşları (1997), yaptıkları çalışmada Wnt2, Wnt3, Wnt4 ve Wnt5a mRNA'larının normal endometrial hücrelerde yüksek seviyede eksprese edildiğini bulmuşlardır. Ayrıca yapılmış olan çalışmada aynı normal endometrial dokularda Wnt7a ve Wnt7b'yi analiz etmişlerdir. Menstrual döngünün sekretuar fazında elde edilen normal bir endometrial dokunun çok güçlü bir Wnt7a ifadesi ürettiğini belirlemişlerdir. Bu sonuçların, insan Wnt genlerinin bir alt kümesinin (Wnt2, 3, 4 ve 5a), hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak endometriumun normal ve malignite durumu arasında ortak bir mRNA ekspresyon modeli sergilediğini gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada, sıçan östrus siklusu immünfloresan bulgularımız

doğrultusunda; östrus siklusunda sıçan uterusunda *Wnt3*'ün immünolokalizasyonu değişiklik göstermektedir. Luminal epitel bölgesinde *Wnt3* immünreaktivitesi çoğunlukla orta seviyede bir ekspresyon göstermiştir. Östrus siklusunun proöstrus ve metaöstrus evrelerinde endometrial bez epiteli bölgesinde zayıf ekspresyon izlenirken, östrus ve diöstrus evresinde ise orta kuvvette bir ekspresyon izlenmiştir. Evrelerin tamamında subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe *Wnt3*'ün artan immünolokalizasyon görüldü. Östrus evresinin sırasıyla proöstrus, östrus, metaöstrus evrelerinde kan damarı endotelinde kuvvetli ve çok kuvvetli immünolokalizasyon görülürken diöstrus evresinde orta şiddetlere kadar azalmıştır.

Tulac ve arkadaşları (2003) ayrıca *Wnt3*'ün de yer aldığı *Wnt* proteinleri, reseptörleri, inhibitörleri ve aşağı-akım efektörlerini (β -katenin gibi) araştırmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre *Wnt3* proteinin proliferatif fazda sekretuar faza göre anlamlı bir şekilde yukarı-regüle edildiğini (4.7 kat artış) gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda östrus siklusu Real-Time PZR bulgularında *Wnt3*'ün bütün evrelerdeki ifade seviyesi birbirine yakın olmakla birlikte en yüksek ifade düzeyinin östrojen hormonundan kaynaklı olduğunu düşündüğümüz proöstrus evresinde olduğu görülmüştür. Östrus, metaöstrus ve diöstrus evreleriyle karşılaştırıldığında sırasıyla 4.95, 1.43 ve 2.32 kat oranla daha fazla artış olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre *Wnt3*'ün östrus siklusu dönemleri boyunca etkili olduğu ve bu evrelerde endometriyumun farklı bölgelerinde farklı ifade seviyeleri gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu da *Wnt3*'ün sadece implantasyon sürecindeki önemli rollerinin yanı sıra implantasyon öncesi dönemde de etkili olduğunu düşündürmektedir.

Wnt7a'nın ekspresyon paterni, kadın üreme sisteminin gelişimi sırasında dinamiktir. *Wnt7a*, doğum öncesi Müller kanalının epiteli boyunca eksprese edilir, ancak doğumdan sonra ve erişkinlerde tuba uterina ve uterin luminal epitel ile sınırlı kalır. Yetişkin uterustaki glandular epitelde veya yetişkin vajinanın epitelinde ise ifade edilmez (Miller ve Sassoon, 1998).

Önceki çalışmalar, *Wnt-7a* mutant dişi farelerin kısır olduğunu ortaya çıkarmıştır (Parr ve McMahon, 1995). *Wnt-7a* mutant uterusu, vajina etkilenmemiş gibi görünse

de, aynı yaştaki heterozigot benzerlerinden daha küçük ve daha incedir (Parr ve McMahon, 1995). Miller ve Sassoon (1998) yaptıkları çalışmada, dişi üreme kanalında Wnt7a eksikliğinin gelişimsel sonuçlarını incelemişlerdir. Tuba uterinanın anterior uterustan net bir sınırlama ile ayrılmadığını ve uterin boynuzun birkaç hücrel ve moleküler özelliğini elde ettiğini gözlemlemişlerdir. Ek olarak, Wnt7a mutant uterusun, uterin bezleri oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Tuba uterina ve uterusta gözlenen değişikliklere, doğum sonrası Hoxa-10 ve Hoxa-11 ifade kaybının eşlik ettiğini; bu durumda da Wnt-7a'nın, erken Hoxa gen ekspresyonu için gerekli olmadığını, ancak ekspresyonun sürdürülmesi için önemli olduğunu ortaya koymuşlardır (Miller ve Sassoon, 1998). Bu sonuçların, Wnt-7a'nın epitelden sinyal göndermesini sağlayan bir mekanizmanın, dişi üreme sisteminin anterior-posterior ve radyal eksenleri boyunca farklı hücrel populasyonların moleküler ve morfolojik sınırlarını koruduğunu gösterdiğini açığa çıkarmışlardır.

Tulac ve arkadaşları (2003) spesifik primerler kullanarak yaptıkları Real-Time PZR deneylerinde insan endometriumunda Wnt-2, **Wnt-3**, Wnt-4, Wnt-5a, **Wnt-7a**, Wnt-8b, Fz-6, LRP-6, FrpHE, Dkk-1, Dvl-1, GSK-3 β ve **β -katenin** ifadesini göstermişlerdir. Bu proteinlerin arasından Wnt-2, Wnt-4, Wnt-5a, **Wnt-7a**, GSK-3 β , **β -katenin**, LRP-6, Fz-6 ve Dvl-1'in proliferatif ve sekretuar faz endometriyumunda eşit şekilde eksprese edildiğini bulmuşlardır. Ayrıca Wnt-7a'nın sadece insan endometriumundaki luminal epitel hücreleri tarafından eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda Real-Time PZR sonuçlarına göre Wnt7a'nın östrus siklusunu takiben proöstrus, östrus ve metaöstrus evrelerine doğru gidildikçe ifade seviyesinin arttığı ve en yüksek ifade seviyesine metaöstrus evresinde ulaştığı belirlenmiştir. Diöstrus evresinde en düşük ifade seviyesine ulaştığı görülmüştür.

Wnt7a'dan yoksun yetişkin fareler canlı, ancak kısırdır ve hipoplastik uterin boynuzları ve bir vajinal septum yolunu içeren dişi üreme kanalında malformasyonlar gösterir (Miller ve Sassoon, 1998; Parr ve McMahon, 1998). Wnt7a'dan yoksun dişi fareler, doğum sonrası gelişim sırasında uterin boynuzunun antero-posterior ve radyal eksenleri boyunca anormal morfogenezi gösterir (Miller vd., 1998). En belirgin özelliği, normal olarak LE'den türetilen uterin bezlerinin olmaması ve mezenkimal türevli uterin stromadaki bir azalmadır, böylece mevcut

fakat azalmış ve düzensiz olan miyometriyumun iç dairesel ve dış uzunlamasına katmanları endometrial LE'ye çok daha yakındır. Böylece, Wnt7a'nın yoksunluğu durumunda, uterusu hem epitelyal hem de mezenkimal farklılaşma bozulur. Wnt7a'nın ablasyonu fetusta paramezonefrik kanal farklılaşmasının bozulmasına yol açmaktadır (Miller ve Sassoon, 1998).

Hayashi ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada, Wnt gen ailesinin altı üyesinin ifadesini (Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11 ve Wnt16) yenidoğan fare uterusunda tanımlamışlardır. Carta ve Sassoon (2004), kadın üreme kanallarında yüksek düzeyde eksprese edilen WNT gen ailesinin üç üyesini tanımlamışlardır (Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a). *In situ* hibridizasyon kullanan az sayıdaki çalışmada, Wnt7a mRNA'sının sadece epitelyal hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Mericskay vd., 2005; Carmon ve Loose, 2008). Ingaramo ve arkadaşları da (2016) yaptıkları çalışmada, Wnt7a ekspresyonunu immünohistokimya ile protein düzeyinde değerlendirmişlerdir. Gaetje ve arkadaşları (2007) ile uyumlu olarak, Ingaramo ve arkadaşlarının (2016) sonuçları Wnt7a proteininin epitelyal (luminal ve glandular) ve stromal hücrelerin çekirdeklerinde ifade edildiğini göstermiştir. Yaptığımız çalışmada, Wnt7a'nın luminal epitel ve glandular epitelde proöstrus, östrus ve metaöstrus evrelerinde orta şiddette bir ekspresyon ifadesi gözlenirken, diöstrus evresinde ifade seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. Endometrial stroma bölgesinde, subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe bütün evrelerde Wnt7a immünreaktivitesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bölgede yer alan kan damarlarının endotel kısmında da çoğunlukla kuvvetli bir ekspresyon görülmüştür.

Wnt7a ayrıca endometrial reseptivite, implantasyon ve desidualizasyonda da oldukça önemli bir Wnt sinyalleme molekülüdür. Hayashi ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada, gebeliğin peri-implantasyonu sırasında fare uterusunda Wnt ve Fzd gen ekspresyonundaki değişiklikleri kapsamlı bir şekilde analiz etmişlerdir. İmplantasyon sırasında uterusu Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11, Wnt16, Fzd2, Fzd4 ve Fzd6 ekspresyonlarını saptamışlardır. Wnt4 mRNA'sının, desidua bölgesinde en fazla miktarda bulunurken, Wnt5a mRNA'sının, desidualizasyon sırasında mezometrial desidua ile sınırlandırıldığını gözlemlemişlerdir. Wnt7a, Wnt7b ve Wnt11

mRNA'larının ise endometrial epitelde bolca tespit edildiğini tespit etmişlerdir. Wnt7a mRNA'sının, 1. günde LE'de tespit edildiği; ekspresyonun 4. gün boyunca kuvvetli kaldığı ve 5. günde implantasyon odası dahil LE'deki bolca arttığını belirlemişlerdir. Mohamed ve arkadaşları (2005) ise implantasyon sırasında nükleer β -katenin aktivasyonunun implantasyon sırasında meydana geldiğini ve Wnt/ β -katenin sinyalleme yoluyla Wnt7a'nın özellikle implantasyon tepkilerini tetiklemede etkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu sonuçlar LE'deki Wnt7a'nın, kanonikal Wnt/ β -katenin sinyalleme yoluyla desidualizasyon işleminin başlatılmasını düzenleyen blastosist-uterin etkileşimleri için kritik bir faktör olduğunu desteklediği söylenebilir. Gerçekten de, Wnt7A, kanonikal Wnt/ β -katenin yolu ile koyun trofoektoderm hücrelerinin proliferasyonunu uyarır (Hayashi vd., 2007). Bizim çalışmamızda, **Wnt-7a**'nın devam eden gebelik günlerinde 7,5. günde antimezometrial alanda bulunan embriyo bölgesinde orta şiddette bir immünreaktivite görülürken embriyonun çevresindeki primer desidual zonda kuvvetli olduğu, sekonder desidual zon ve antimezometrial bazal zona doğru gidildikçe de giderek azalarak zayıf bir immünreaksiyon gösterdiği bulunmuştur. Gebeliğin 8,5 gününde antimezometrial desidual alanda bulunan primer desidual zon bölgesinden sekonder desidual zon ve antimezometrial bazal zona doğru gidildikçe azalan bir immünreaksiyon görüldü. Gebeliğin 9,5. gününde ise antimezometrial desidual zonda bulunan primer desidual zondan sekonder desidual zon ve antimezometrial bazal zona doğru gidildikçe primer ve sekonder desidual zonda orta şiddette bazal zonda ise kuvvetli **Wnt-7a**'nın kuvvetli bir ifadesine rastlanmıştır. Çalışılan belirli gebelik günlerinin tümünde mezometrial bölgede bulunan kan damarları endotelinde, mezometrial bazal zon ve bazal zonda bulunan çoğunlukla farklılaşmamış stromal hücrelerde Wnt7a proteininin kuvvetli şiddette eksprese olduğu gözlemlendi. Ayrıca Real-Time PZR ile yapılmış olan çalışmamızın sonuçlarına göre gebeliğin 8,5. günde en yüksek ifade seviyesine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Wnt genlerindeki bu değişiklikler muhtemelen farelerde implantasyon ve desidualizasyon sırasında kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir.

β -katenin plazma zarında, sitoplazmada ve çekirdekte bulunabilen, Wnt sinyallemesinin anahtar aracıdır ve kadherinlerin adherens kavşağı proteinleri ile

birleşmesine izin veren bir hücre-hücre adezyon molekülü olarak önemli bir role sahiptir (Potter vd., 1999). Sitoplazmada, β -katenin, adenomatöz polipozis koliksin-glikojen sentaz kinaz 3 β kompleksi ile birleşebilir, bu kompleks β -katenin'in bozunmasına yol açar (Willert vd., 1999), oysa serbest, bağlanmamış ve fosforlanmamış formdaki β -katenin formu çekirdeğe girer ve Wnt hedef genlerini aktive eder.

Toplam ve fosforile edilmemiş (aktif) β -katenin, döllenmiş tek hücreli embriyolardan blastosistlere kadar her aşamada eksprese edilmesine rağmen, bazı çalışmalar β -katenin bağımlı yolağın blastosist oluşumu için vazgeçilmez olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. Yapılan genomik knock-out çalışmalarında, heterozigot geçişlerden zigotik β -katenin içermeyen fare embriyosunun normalde blastosistler oluşturabildiğini ve heterozigot bir anneye implante edildiğinde, ancak anterior-posterior eksen oluşumu ve mezodermal bir defektinin yokluğunda kafa yapılarında kusur ile birlikte erken implantasyon sonrası ölümcül olduğunu göstermiştir (Landeira vd., 2015). Bu zigotik β -katenin-delesyon embriyolarının blastosist oluşumunun, kısmen maternal olarak türetilen β -katenin tarafından kurtarılacağı kanısına varılmıştır (Gao ve Chen, 2010). Stepniak ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada ***β -katenin***'in hücre-hücre adherens kavşaklarında kadherinlere (endotelial hücrelerde VE-kadherin ve N-kadherin) bağlandığı ve hücre iskeleti ile etkileşimlerini stabilize ettiğini belirtmişlerdir. Bu şekilde, β -katenin'in hücre-hücre yapışmasını ve doku bütünlüğünü stabilize ederek etki ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Fare modellerinde β -katenin'in knock-out'u ya da tamamen susturulması, uterus uygun bez oluşumunu azaltmıştır. Bu da β -katenin'in desidualizasyon ve infertilite için gerekli bir faktör olduğunu göstermiştir (Jeong vd., 2009). Bu araştırmalar, hormonlar ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere farklı sinyal molekülleri ile etkileşime girerek desidualizasyonu etkileyen Wnt sinyalleşmesinin ligandları, reseptörleri, efektörleri ve inhibitörleri olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, hem Wnt ligandları hem de Wnt inhibitörleri, desidualizasyonda indükleyici rollere sahiptir. Bu nedenle, spesifik Wnt ligandlarının, desidualizasyonu tetiklediği ve bu ligandların Wnt inhibitörleriyle inhibisyonunun, desidua indüksiyonu için gerekli olduğu öne sürülebilir. Dkk-1'in desidual hücrelerdeki spesifik etkisi tanımlanırsa,

desidualizasyon sırasında Wnt ligandları arasında bir denge olduğu anlaşılabilir (Tepekoy vd., 2015). Bizim çalışmamızda, gebeliğin ilerleyen günlerine bağlı olarak β -katenin'in embriyo bölgesinde düzenli bir artış gösterdiği, özellikle gebeliğin 8,5. ve 9,5. günlerinde embriyo bölgesinde ve embriyo bölgesini çevreleyen GTC ile EPC hücrelerinde oldukça kuvvetli ekspresyon şiddeti gösterdiği görülmektedir. Embriyo bölgesinin etrafındaki desidual alanlarda da gebeliğin ilerleyen günlerine bağlı olarak antimezometrial bölgede özellikle primer desidual zon ve bazal zon çoğunlukla kuvvetli ya da çok kuvvetli ekspresyon düzeyleri sergilediği gözlenmiştir. Mezometrial bölgede yer alan kısımların çoğunda ise gebelik günlerine göre değişen çoğunlukla orta ve kuvvetli şiddette ifade düzeyleri izlenmiştir. Real-Time PZR ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmaların sonucuna göre ilerleyen gebelik günlerine bağlı olarak β -katenin ekspresyonunun sürekli artış gösterdiği, özellikle 8,5. günden 9,5. güne doğru gidildiğinde bu ifade düzeyinin oldukça yüksek bir seviyeye çıktığı gözlemlenmiştir.

Tulac ve arkadaşları (2003) β -katenin'in endometrial salgı bezinde olduğu kadar stromal hücrelerde de eksprese edildiğini ve menstrual döngünün hem proliferatif hem de sekretuar fazları sırasında bol miktarda ifade edildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmanın PZR verileriyle tutarlı olduğu kanısına varmışlardır. Nei ve arkadaşları da (1999) yaptıkları çalışmada β -katenin'in menstrual döngünün proliferatif faz sırasında immünolokalizasyonunun olduğu, sekretuar faz sırasında ise bu boyanmanın azaldığı sonucuna ulaşmışlardır.

Bizim çalışmamızda da yukarıdaki çalışmalarla tutarlı olarak, rat uterusunun östrus siklusu boyunca alınan örneklerde β -katenin'in luminal epitel ve bez epitel hücrelerinin bazo-lateral ve apikal yüzlerinde çok kuvvetli immünolokalizasyonu saptanmıştır. Subluminal stroma ve bazal stromada östrus, metaöstrus ve diöstrus evrelerinde zayıf şiddette immünolokalizasyon görülürken proöstrus evresinde ise subluminal stroma ve bazal stromada kuvvetli ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. Real-Time PZR bulgularında ise, β -katenin'in östrus siklusunda en yüksek seviye ifade edildiği dönemin östrus ve metaöstrus evreleri olmakla birlikte metaöstrus evresinde östrus evresine göre 2.4 kat daha fazla eksprese olduğu görülmüştür.

Diöstrus evresinde ise, progesteron hormonundan kaynaklı olduğunu düşündüğümüz, en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Endotel hücre farklılaşması, spesifik gen ekspresyon programlarını aktive edebilen büyüme ve farklılaşma faktörlerinin aracılık ettiği çevre dokuları arasındaki iletişime bağlıdır. Son zamanlardaki çalışmalar, Wnt sisteminin embriyodaki vasküler morfogenez ve organa özgü endotelyal hücre farklılaşmasındaki önemli rolünün altını çizmektedir. Wnt sinyal yolu üyelerinin hem fonksiyon kaybı hem de fonksiyon kazanım deneylerinin, vasküler gelişim ve endotel hücre spesifitesinin belirgin değişikliklerine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca, endoteldeki değiştirilmiş Wnt sinyali retinopatiler, pulmoner arteriyel hipertansiyon, inme vb. gibi patolojik durumlara neden olabilir (Dejana, 2010). Bu alanda devam eden ilerlemeler, bu hastalıkların tedavisi için yeni terapötikler belirleme potansiyeline sahiptir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kanonikal Wnt- β katenin sinyalinin stroma ve miyometriyum (Arango vd., 2005), endometrial bez gelişimi (Jeong vd., 2009), östrojen kaynaklı uterin büyümesi (Hou vd., 2004) ve yetişkin farelerde implantasyon (Mohamed vd., 2005) için mezenkimal farklılaşması için gerekli olduğunu göstermektedir.

Sonuçlarımız, blastosistin endometriyumda Wnt bağımlı β -katenin sinyalini aktive ettiğini ve bu yolun aktivasyonunun implantasyon için gerekli olduğunu ve bu parakrin sinyal mekanizmasının implantasyon için gereken uterus-embriyo etkileşimlerini koordine etmede merkezi bir rol oynadığını gösterdiğini düşündürmektedir.

Anjiogenik Faktörler

İnsan çalışmalarının çoğunda olduğu gibi, anjiyogenik büyüme faktörünün düzenlenmemiş genetik ifadesinin, düşüklerin doğasından sorumlu olup olmadığının kesin olarak belirlenmesi zordur. Kan damarı oluşumunda rol oynayan iki mekanizma vardır: vaskülogenez ve anjiyogenez (Poole ve Coffin, 1989). Vaskülogenez, çoğunlukla fetal büyüme ve gelişme sırasında ortaya çıkar (Takahashi vd., 1999). Anjiyogenez, genellikle tümör oluşumuna yol açan kan damarı oluşumunun patolojik bir şekli olarak düşünülmektedir, süreç VEGF (Flamme vd.,

1997) gibi büyüme faktörü birikiminden meydana gelir, ancak fizyolojik anjiyogenez; yara iyileşmesinde, kemik onarımında ve vaskülogenez ile uyum içinde embriyo implantasyonunda yer alır (Folkman, 1995).

Endotelin-1

Endotelin-1 (ET-1), ilk olarak 1988'de doku kültüründe domuz aortik endotel hücrelerinden izole edilen 21 amino asitlik bir peptittir. Peptidin domuz koroner arterlerinin en güçlü bilinen vazokonstriktörü olduğu gösterilmiştir (Yanagisawa vd., 1988).

Endotelin-benzeri immünreaktivite (ET-IR), hem endometrium hem de miyometriyumda vasküler endotelde ve endometrial-miyometrial kavşağında en fazla boyama yoğunluğu ile endometrial glandular epitelde lokalize edilmiştir (Cameron ve Davenport, 1992). ET'lerin uterus fizyolojisindeki işlevinin daha iyi anlaşılması, menstruasyon ve implantasyon bozuklukları ve erken doğum gibi çeşitli klinik problemlerin yönetimi için ET antagonistlerinin kullanılmasına izin verebilir.

Economos ve arkadaşları (1992), prepro-ET-1 gen ekspresyonu örneği bulmuşlardır. Daha sonra Kubota ve arkadaşları (1995), ET-1'lerin öncüsü olan benzer bir prepro-ET-1 mRNA'sının menstrual döngü boyunca insan endometriumunda eksprese edildiğini ve immünreaktif ET-1'in kültürlenmiş endometrial stromal hücrelerden salındığını göstermişlerdir. Bu bulgular, menstrual döngünün farklı aşamalarında insan endometrial hücreleri tarafından ET-1'in sentezini ve salımını doğruladığını göstermektedir. Yaptıkları çalışmada, prepro-ET-1 mRNA'sının ekspresyon seviyesinin menstrual döngünün aşamasına göre değiştiğini ve en güçlü ifadenin menstruasyon ve proliferatif fazlarda görüldüğünü saptamışlardır. Salamonsen ve arkadaşları (1992), insan endometriumunda ET-1'in immünolokalizasyonunu ve döngü boyunca düşük seviyelerde stromal endometrial boyamayı gözlemlemişlerdir. En güçlü boyanmanın ise, sekretuar faz boyunca luminal epitel ve geç sekretuar faz boyunca glandular epitelde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Kubota ve arkadaşlarının (1995) verileri ile Salamonsen ve arkadaşları (1992) tarafından gözlemlenen ET-1'in immünohistokimyasal lokalizasyonu arasındaki farklılıkların, deneysel tasarımlardaki farklılıklar ile kısmen açıklanabileceğini ve peptitlerin

immünohistokimyasal lokalizasyonunun, aynı hücrelerde peptitlerin sentezini her zaman yansıtmadığını düşünmüşlerdir (Cameron ve Davenport, 1992). Ek olarak, mRNA miktarı ile protein seviyesi arasındaki ilişkinin olmayışı, ET-1'in sekretuar fazında hızlı bir şekilde parçalanması nedeniyle olabilir. İnsan endometriumunda bulunan ve ET'lerin bozulmasını katalize eden membran metalloendopeptidazın (MMEP; enkefalinaz) (Vijayaraghavan vd., 1990), plazmadaki progesteron konsantrasyonu ile oldukça anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Casey vd., 1991). Diğer bir olasılık, prepro-ET-1 mRNA ve ET-1 seviyeleri arasındaki uyumsuzlukların sekretuar fazı dışında düşük bir transkripsiyon oranına bağlı olmasıdır.

Çalışmamızda, **ET-1**'in östrus siklusu immünohistokimyasal yanıtlarına göre luminal epitel ve endometrial glandular epitelin özellikle bazal yüzlerinde östrus siklusunun proöstrus, östrus ve diöstrus evrelerinde güçlü ekspresyona sahipken metaöstrus evresinde zayıf bir ekspresyona sahip olduğu bulundu. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildiğinde östrus siklusunun proöstrus ve östrus evrelerinde bir artış gösterdiği görülürken; metaöstrus ve diöstrus evrelerinde ise bu ifade seviyesinin değişmediği, orta şiddette bir ekspresyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu gözlemler **ET-1**'in Kubota ve Salamonsen'in yaptıkları çalışmalar ile karşılaştırıldığında, sonuçlarımızın Kubota ve arkadaşları ile benzer bir uyumluluk gösterdiğini söyleyebiliriz. **ET-1**'in östrus siklusu Real-Time PZR verilerine göre en yüksek ifade seviyesine östrus evresinde ulaştığı en düşük ifade seviyesine ise diöstrus evresinde olduğu saptanmıştır. Östrus evresindeki ekspresyon düzeyinin oldukça yüksek bir seviyeye ulaştığı da tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada Ohbuchi ve arkadaşları (1995) menstruasyon fazında endometrial immünohistokimyasal **ET-1**'in, proliferatif ve sekretuar fazlarına göre anlamlı olarak arttığını belirlemişlerdir. Sekretuar evrede immünohistokimyasal **ET-1**, pre-menstrual evre sırasında (26-28. günler) sekretuar evresindeki diğer proteine kıyasla (büyük **ET-1**) artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Myometriumda ise immünohistokimyasal **ET-1**'in, proliferatif fazda menstrual ve sekretuar fazlarına göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Tavşan endometrial hücrelerinin primer kültürlerde **ET** salgıladığı bildirilmiştir. Endotelin esas olarak olgunlaşmamış tavşanlarda endometriumun

stromal hücrelerinde gösterilmiştir, oysa Maggi ve arkadaşlarına göre (1999) miyometrial hücreler, immünohistokimyasal analiz ile endotelin için kesinlikle negatiftir. Ayrıca immünoreaktif ET-1 ve ET-2'nin, insan endometrial stromal hücrelerinin ve glandular epitel kültür ortamında bulunduğunu ve endometriumda Northern blot analizi ile prepro-ET-1 mRNA'sını tespit etmişlerdir. İmmünohistokimyasal analizde, endotelin için belirgin bir şekilde pozitif boyama olduğunu, temel olarak fonksiyonel tabakadaki bazı endometrial stromal hücrelerde meydana geldiğini bulmuşlardır. İmmün boyanan stromal hücre popülasyonunun premenstrual ve menstrual evreleri boyunca arttığı görülmüştür (Ohbuchi vd. 1995). Önceki çalışmalarda da insan uterin dokusunda ET-1 ve büyük ET-1 seviyelerini bildirmişlerdir (Ohbuchi vd., 1992). Economos ve arkadaşları (1991), Northern blot analizi ile insan endometriumunda prepro-ET-1 mRNA seviyesinin proliferatif veya sekretuar fazlardan ziyade premenstrual-menstrual fazda daha yüksek olduğunu göstermiştir. Endometrial glandular epitel hücreleri ile ilgili olarak, Ohbuchi ve arkadaşlarının sonuçları (1995), Economos ve arkadaşları (1991) ile Maggi ve arkadaşlarının (1991) gözlemleri ile kabul edilen stromal hücrelere kıyasla fonksiyonel tabakadaki glandular epitel hücrelerinde daha az immüno-lekelenme olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, vasküler endotel hücrelerinde, fonksiyonel katmandaki spiral arterlerin birkaç endotel hücrelerinin, menstrual fazda pozitif olarak boyandığını göstermişlerdir. Bu hücrelerin neden bu evrelerde immüno-pozitif olduğu bilinmemekle birlikte, endometrial stromal hücrelerden, endometrial glandular epitelden ve spiral arterlerin endotelinden elde edilen ET-1'in vazokonstriksiyonunu indüklemek için spiral arterlere ulaşmasının mümkün olduğu kanısına ulaşmışlardır, çünkü ET-1 en güçlü vazokonstriktör peptididir.

ET-1'in insan endometrial hücrelerinde fizyolojik işlevi açıklığa kavuşturulmamıştır. Economos ve arkadaşları (1992), insan endometriumunda ET-1'in biyolojik rollerini şu şekilde bildirmişlerdir: (i) ET-1, endometrial kanamanın durmasını teşvik etmek amacıyla kan kaybını sınırlamak için menstruasyon sırasında görev alır; (ii) Endometriumda üretilen ET-1, miyometriuma ulaşır ve uterus kasılmalarını uyarır (Word vd., 1990); (iii) ET-1, proliferatif fazda stromal hücre büyümesinin yanı sıra yeniden epitelizasyonun (Simonsen vd., 1989; Takuwa vd., 1989) geliştirilmesine hizmet edebilir; ve (iv) Glandular epitel tarafından üretilen ET-1, blastosis

apozisyonu/implantasyonu veya trofoektoderm replikasyonunda rol oynayabilir (Economos vd., 1992). Kubota ve arkadaşları (1992) ilk olarak gebeliğin erken döneminde, desidual hücrelerin ET-1 sentezlendiğini ve salınımını bulmuşlardır. Mevcut sonuçların, ET-1'in, DNA sentezi ile belirlendiği gibi kültürlenmiş endometrial stromal hücrelerin çoğalmasında önemli ölçüde arttırdığını ve ET-1'in, insan endometrial stromal hücreleri için bir mitojen olarak işlev görebileceğini gösterdiğini düşünmektedirler (Kubota vd., 1995).

Uchida arkadaşları (2001) fare uterusundaki ET-1'in önemini anlamak için, çeşitli üreme dönemlerinde ET-1'in gen ekspresyon paternini ve hücresel dağılımını kapsamlı bir şekilde incelemişlerdir. Siklik farelerdeki uterusu, Real-Time PZR ile düşük ve sabit bir ET-1 ekspresyonu düzeyi tespit ettiklerini ve sadece endometrial epitel hücrelerinde soluk immün boyanma gözlediklerini belirtmişlerdir. Koyun rahminde immünreaktif ET-1 düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, ancak östrüstan sonraki 16. günde, bir sonraki östrus aşamasına tekabül eden küçük bir artış olduğu bildirilmiştir (Riley vd., 1994). Bu türler arasında ET-1 ekspresyon paternlerindeki farklılıklar için olası bir açıklama, menstruasyonun insanlarda gözlenmesidir, ancak farede veya koyunlarda östrus döngüsü bulunmaktadır. İnsan menstruasyonuna, kanama, zona işlevselliğinin desidualizasyonu ve rejenerasyon gibi dramatik endometrial değişiklikler eşlik eder. Bununla birlikte, fare ve koyunlarda, endometrial kalınlıktaki artış ve histolojik özelliklerde değişiklik, endometriumun kanaması veya kanama olmadan, östrus etrafında daha az miktarda gözlenir. Yapılan bir çalışmada uterusu ET-1 mRNA düzeyinde gebe sıçanlarda Northern blot analiziyle belirlenen şekilde belirgin bir farklılık olmadığı, ancak her ne kadar analiz sadece iki zaman noktası ile sınırlı olsa da (gebeliğin 14 ve 20. günleri) doğum sonrası erken dönemde büyük bir artış göstermiştir (Kajihara vd., 1996). Bu bulgulardan, uterus kasılması ile doğumdan sonra uterusun kanamanın kesilmesinde ET-1'in çok önemli bir rolü olduğu önerilmektedir. Fare uterusunda ET-1, hamilelik ve doğumdan kaynaklanan uterus değişikliklerinden iyileşmede rol oynayabilir. Bizim çalışmamızda, devam eden gebelik günlerinde ET-1'in immünfloresan yanıtına bakıldığında gebeliğin ilerleyen günlerine doğru antimezometrial desidual bölgede bulunan embriyo bölgesinde ekspresyon şiddetinin artış gösterdiği görülmektedir. Embriyonun etrafında yer PDZ bölgesinde gebeliğin

7,5. gününde en yüksek ifade seviyesi gözlenirken, gebeliğin ilerleyen günlerinde ET-1 immünreaktivitesinin antimezometrial bazal bölgeye doğru yayıldığı ve bu bölgelerde çok kuvvetli ekspresyon şiddetine kadar ulaştığı tespit edilmiştir. Özellikle primer desidual zondaki yüksek ekspresyonu bu dönemde bölgedeki damarların kapanması (kollabe) sırasındaki mekanizmanın vazokonstrüksiyona katılarak bir katkıda bulunması olasıdır. Mezometrial desidua bölgesinde bulunan luminal epitel, kan damarı endoteli, ve bazal zonda çalışılmış belirli gebelik günlerinin tümünde çoğunlukla kuvvetli ifade edildiği görülmüştür. Bu nedenle ET-1 özellikle mezometrial bölgede gelişecek olan koryoallantoik plasentanın şekillenmesine katılarak değişikliklerin düzenlenmesine de katkıda bulunur. 9,5. gündeki Real-Time PZR sonuçları bu varsayımı desteklemektedir. Ayrıca çalışmamızda devam eden gebelik günlerinde ET-1'in Real-Time PZR ile ekspresyon seviyesine bakıldığında ise 7,5. ile 8,5. gün arasında neredeyse aynı düzeyde ekspresyon seviyesi gözlenirken, 9,5. gebelik günündeki ET-1 ifade seviyesinin artış göstererek en yüksek ifade düzeyine ulaştığı belirlenmiştir.

Cameron ve arkadaşları da (1993) yaptıkları çalışmada Endotelin-1, Endotelin-2 ve Endotelin-3 peptitlerinin insan endometriyumunda bulunduğunu göstermişlerdir. Endometriyumda endotelinlerin varlığının, uterus vasküler yatağının lokal kontrolünde rol oynayabileceğini öne sürmektedirler.

Bu bulgular, insan endometriyumunun ET-1 üretebileceğini ve menstruasyon ve implantasyonda ET-1'in önemli bir fizyolojik rolünü gösterdiğini ortaya koymaktadır. ET'ler, endometrial onarım sürecine, tek başlarına ya da lokal olarak yayılan diğer büyüme faktörleriyle uyum içinde katkıda bulunabilirler. ET'lerin gebelikte uterus fonksiyonunun kontrolünde temel bir rol oynadığı görülmektedir.

Sonuç olarak, insan endometrial hücrelerinin ET-1'i sentezlediğini ve salınımını gerçekleştirdiğini ve fonksiyonel olarak fosfoinositid parçalanmasına ve cAMP artışı ile adenilat siklazına bağlanmış ETA ve ETB reseptörlerine sahip olduğunu bulmuşlardır (Kubota vd., 1995). ET-1, endometriyumun yeniden epitelizasyonuna katılabilir. Bu bulgular ET-1'in insan endometrial stromal hücrelerinde potansiyel bir otokrin ve/veya parakrin fonksiyonuna sahip olabileceğini göstermektedir. İnsanlarda endometrial ET-1 üretimini netleştirmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Angiopoietin-1

Vasküler endotel bütünlüğü ve durağan/hareketsiz yapısında meydana gelen değişiklikler özellikle insanda birçok hastalıkla doğrudan veya dolaylı olarak ilişkilidir. Ang-Tie sistemi vasküler stabilitesinin temel düzenleyicisi olarak işlev görür. Angiopoietinler (Ang) anjiyogenezin modülatörleri olarak işlev görür ve şimdiye kadar dört farklı eleman tarif edilmiştir (Ang-1, Ang-2, Ang-3 ve Ang-4) (Valenzuela vd., 1999). Ang-1, Tie-2'ye bağlanarak kan damarlarının olgunlaşmasında rol oynar, böylece perisitleri çekmek için endotelial hücrelerini uyarırken (Dumont vd., 1995; Sato vd., 1995), antagonisti Ang-2, Ang-1'in Tie-2'ye bağlanmasını önler, böylece kan damarı duvarının parçalanmasını teşvik eder.

Ang-1, çeşitli hayvan modellerinde güçlü bir anti-enflamatuar potansiyele sahiptir (Cho vd., 2006). Bununla birlikte, Ang-1 tedavilerinin çok önemli yan etkileri olabilir. Anjiyogenezin ve vasküler yeniden yapılanmanın uyarılmasının yanı sıra, Ang-1 ayrıca pulmoner hipertansiyonu da teşvik eder (Tammela vd., 2005). Ang-1'in kan damarlarının stabilitesini arttırmak için endotelial hücreler ve çevreleyen perisitler ile vasküler düz kas hücreleri arasındaki diyaloga aracılık ederek işlev gördüğü varsayılmaktadır (Yancopoulos vd., 2000).

Maas ve arkadaşları (2001), civciv koryoallantoik membran (CAM) testinde, endometriyumun genel anjiyogenik aktivitesini araştırmışlardır. Erken proliferatif, erken ve geç sekretuar fazlarda, geç proliferatif faza kıyasla belirgin derecede artmış VDI (vasküler yoğunluk indeksi) ile menstrual döngü boyunca anjiyogenik bir potansiyel bulmuşlardır.

Şimdiye kadar endometriyumda anjiopoietin ekspresyonu ile ilgili sadece birkaç çalışma var. Hirchenhain ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada, menstrual siklus boyunca biyopsi yapılan insan endometriyumunda Real-Time PZR ile Ang-1, Ang-2 ve Tie-2'nin mRNA ekspresyonunu belirlemişlerdir. Erken proliferatif, orta-proliferatif, geç-proliferatif, erken-sekretuar, orta-sekretuar ve geç-sekretuar fazları kapsayan 32 endometrial biyopsiden 30'unda angiopoietinlerin mRNA'sını saptadıklarını belirtmişlerdir. Ang-1 mRNA ekspresyonunun menstruasyon döngüsünün sekretuar fazı sırasında önemli ölçüde yukarı-regüle edildiğini ortaya

çıkarmışlardır. Ang-1 mRNA'sının aksine, Ang-2 mRNA ve Tie-2 mRNA'nın ekspresyon seviyelerinin, farklı döngü aşamalarında sadece küçük varyasyonlar gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca Ang-1, Ang-2 ve Tie-2 mRNA'larının ekspresyonu, izole edilmiş endometrial epitelyal ve stromal hücre fraksiyonlarında bulduklarını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, yaptıkları çalışmada sekretuar fazdaki artan Ang-1 ekspresyonunun yeni geliştirilen kan damarlarının stabilize edilmesine hizmet edebileceğini düşünmektedirler (Hirchenhain vd., 2003). Ayrıca spiral arterioller geliştiğinde, post-ovulatuvar faz sırasında Ang-1/Tie-2 sisteminin endometrial damar gelişimi için önemli olduğunu önermektedirler. Çalışmamızın yaptığımız Real-Time PZR verilerine göre, kullandığımız Ang-1 proteininin östrus siklusunun proöstrus, metaöstrus ve diöstrus evrelerinde birbirine çok yakın sonuçlar vererek en yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir.

Hirchenhain ve arkadaşlarının (2003) ayrıca proliferatif ve sekretuar endometriumdaki Ang-1, Ang-2 ve Tie-2 proteininin immünohistokimyasal dağılımını incelemişlerdir. Ang-1 için boyanmanın, stromal hücrelerde, glandular ve luminal epitelde ve endotel hücrelerinde hem proliferatif hem de sekretuar faz endometriumdaki tespit edildiğini bildirmişlerdir. Ang-2 immünreaktivitesini, glandular epitelde ve proliferatif ve sekretuar faz endometriyumunun stromal kompartmanında tespit etmişlerdir. Hem Ang-1 hem de Ang-2 proteinleri ağırlıklı olarak glandular epitel hücrelerinin apikal kısmında bulunduğunu saptamışlardır. Sekretuar faz sırasında gözlenen Ang-1 mRNA artışı, yeni geliştirilen damarların hem stabilizasyonu hem de olgunlaşma ihtiyacını yansıtabilir. Sekretuar faz, kan akışının, embriyonun implantasyonuna hazırlandığı erken ve orta sekretuar safhaları sırasında maksimuma ulaştığı fazdır, ayrıca subepitelyal kapiller pleksusu besleyen, belirgin bir büyüme ve sarmal arteriyoller ile karakterize edilir (Gannon vd., 1997). Hewett ve arkadaşları (2002) ise Hirchenhain ve arkadaşlarından farklı olarak, proliferatif endometriumdaki glandular epitel, stroma ve kan damarlarında Ang-1 immüno lokalizasyonunu tespit etmişlerdir. Boyamanın, sekretuar faz aşamasında, özellikle kan damarlarını çevreleyen stromada daha yoğun olduğunu belirlemişlerdir (Hewett vd., 2002).

Çalışmada **Ang-1** proteini proöstrus ve östrus evresinde luminal epitelin özellikle bazal kısımlarında kuvvetli bir immünreaktivite gösterirken metaöstrus ve diöstrus evresinde çok kuvvetli bir immünreaktivite göstermiştir. Glandular epitelde ise proöstrus evresinde Ang-1'in kuvvetli ekspresyonu görülürken östrus, metaöstrus ve diöstrus evrelerinde çok kuvvetli ekspresyon olduğu saptandı. Subluminal stromada proöstrus ve östrus evlerinde Ang-1 orta şiddette ifade edilirken metaöstrus ve diöstrus evlerinde kuvvetli seviyede ifade edildiği görülmüştür. Bazal stromada östrus siklusunun bütün evrelerinde genelde kuvvetli şiddette ifade edildiği dikkat çekiciydi.

Suri ve arkadaşları (1996), Angiopoietin-1'in normal fizyolojik rolünü anlamaya çalışmak için, Angiopoietin-1 ekspresyonu olmayan fareler tasarlamışlardır ve bu farelerin vasküler gelişimde aslında Tie-2 olmayan farelerde görülenleri andıran eksiklikler gösterdiğini bildirmişlerdir (Sato vd., 1995). Sonuçların, Angiopoietin-1'in gerçekten Tie-2 için birincil bir fizyolojik ligand olduğunu gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Angiopoietin-1, endotel hücre büyümesine veya tübül formasyonuna aracılık edebiliyor gibi görünmese de, Angiopoietin-1'den yoksun farelerin, damar yapılarının yeniden biçimlenmesinde kusurlar sergiledikleri ve daha az dal ve daha homojen büyüklükte damarlar içeren basitleştirilmiş ve daha az karmaşık bir damar yapılarına sahip oldukları görülmektedir (Suri vd. 1996). Vaskülatürün herhangi bir yerinde Angiopoietin-1'in kritik rolleri ile tutarlı olarak, Angiopoietin-1'in ifadesi, daha sonra gelişecek olan çevre kan damarlarında çok daha belirgin ve yaygın görünmektedir (Davis vd., 1996). Alternatif olarak, Angiopoietin-1, farklı vasküler yataklarda, ekspresyon seviyesine ve diğer vasküler modülatörlerin seviyesine bağlı olarak farklı derecelerde gerekli olabilir.

Tie-2 sinyali, implantasyon (Matsumoto vd., 2002) sonrası desidualizasyon sırasında farelerde anjiyogenezi yönlendirir ve Tie-2 ve Ang-1'in inhibisyonu, bozulmuş vaskülatür ve embriyo ölümü ile sonuçlanır (Sato vd., 1995). Rowe ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada, maymunların ilk hamileliğinde Ang-1 mRNA'sının, glandular uterin epitelde ifade edildiğini ve hem maymunlarda hem de farede endometrial spiral arterlerin progesteron bağımlı (Nayak vd., 2005) büyümesinde

anahtar rol oynayabildiğini belirtmişlerdir. Hirchenhain ve arkadaşları da (2003) Ang-1, Ang-2 faktörleri ve Tie-2 reseptörü mRNA'larının tümünün menstrual döngü sırasında endometriyumda eksprese edildiğini belirtse de, insan endometriyumundaki sekretuar faz sırasında sadece Ang-1 tarafından düzenlendiğini ifade etmişlerdir. Geva ve arkadaşları ise (2002) erken insan gebeliği sırasında, Ang-1 mRNA ve Ang-2 mRNA/proteininin sinsityotrofoblastta ifade edildiğini gözlemlemişlerdir. Leonard ve arkadaşları da (2006) Ang-1 ve Ang-2'nin aynı zamanda mezenkimal villideki uterin NK hücreleri, trofoblast, Hofbauer hücreleri ve hemanjiyogenik hücre kordonları ile de ifade edildiğini bulmuşlardır (Leonard vd., 2006).

Devam eden gebelik günlerinde yaptığımız çalışmada Real-time PZR verilerine göre 7.5, 8.5, 9.5. günlerde Ang-1'in giderek artan bir ekspresyona sahip olduğu ve 9.5 günde en yüksek ifade düzeyine sahip olduğu görülmüştür. Devam eden gebelik günlerinde Ang-1'in immünfloresan çalışmalarımız doğrultusunda 7,5. günden 9,5. güne doğru gidilirken sıçan uterusunda antimezometrial alanda bulunan primer desidual zondaki hücrelerde giderek artan bir immün yanıt rastlanmıştır. Sekonder desidual zonda artan genelde kuvvetli bir yanıt söz konusu iken bazal zonda yine artan bir immünfloresan yanıtı sahip olması ve diğer gebelik günlerine göre immün yanıt şiddetinin artması dikkat çekiciydi. Ayrıca mezometrial alanda bulunan kan damarları endotel hücrelerinin etrafındaki stromal hücrelerde ve her üç gebelik gününde kuvvetli eksprese olduğu görüldü. Yine mezometrial desidual bölgedeki bazal zonda 7,5 ve 9,5. günlerde Ang-1 kuvvetli bir şekilde immün yanıtı sahipken 8,5. günde ise orta şiddetteydi.

Bu veriler, Ang-1'in sıçan endometriyumunda vasküler yatakların gelişimini, özellikle koryoallantoik plasentanın şekillenmesinde merkezi bir rol oynayabileceğini gösterebilir. Ayıca antimezometrial bölgedeki sekonder desidual zondaki dağılım yoğunluğu, yerleşik damar oluşumuna ve stabilizasyonuna katkıda bulunabilir. Buna karşın, Ang/Tie-2 reseptör ekseninin plasental/uterin lokalizasyonundaki son gelişmeler ile erken implantasyonla ilişkili vaskülariteyi modüle etmedeki potansiyel rolünü belirlemek için daha ileri klinik çalışmalar gereklidir. Angiopoietinler de dahil olmak üzere çok çeşitli anjiyogenik faktörlerin proteinlerinin mRNA ve protein dağılımının kapsamlı bir şekilde incelenmesine rağmen, endometrial anjiyogenezin

kesin bir şekilde açıklanmasına izin veren bir model ortaya çıkmamıştır. *In vivo* ve *in vitro* deneyler, anjiyopöietinlerin endometrial anjiyogenezdeki spesifik rolünü göstermek ve dahil olan mekanizmaları aydınlatmak için gereklidir.

VE-kadherin

Anjiyogenez sürecinde, VE-kadherin bağlanma kavşağından kaybolur ve epitoplara maskesiz kalır (Corada vd., 2002). Bu durum, anjiyogenezde vasküler geçirgenlikteki sürekli gözlenen artış ile uyum içindedir. Vasküler proliferasyon bağlamında VE-kadherin aktivitelerinin rapor edildiği bildirilmiştir. Migrasyon sırasında VE-kadherin, anjiyogenezde iyileştirmede potansiyel bir mekanizma olan fibrin ile heterofilik adeziv reaksiyonlar geliştirebilir (Martinez vd., 2001). VE-kadherin ayrıca, lümen oluşumunda (Yang vd., 1999) ve aktin hücre iskeletindeki Rho aracılıklı gerilme nedeniyle hücre çoğalmasında da rol oynar (Nelson ve Chen, 2003).

VE-kadherin'in endotelyumdaki pleiotropik fonksiyonları yoğun olarak çalışılmış olmasına rağmen, VE kadherinin anjiyogenezdeki rolü halen iyi araştırılmamıştır. Daha spesifik olarak, endotel göçündeki, (muhtemelen membran uzantıları ve aktin dinamikleri yoluyla) işlevi belirsizdir. VE-kadherin fonksiyonunda stabil durumdan anjiyojenik durumlara geçiş, VE-kadherin tirozin fosforilasyonu ile ilişkilidir (Wallez vd., 2006). Tirozin kinazlar ve VE-kadherin kompleksi ile etkileşime giren ve düzenleyen fosfatazlar arasındaki etkileşim, her bir enzimatik ortağın bireysel aktivitesini netleştirmek için detaylı olarak incelenmelidir.

VE-kadherin, embriyoda, vitellus kesesi mezenşiminin mezodermal hücrelerinde vasküler gelişimin çok erken aşamalarında (E7.5) eksprese edilen endotel spesifik bir kadherindir. Daha sonraki embriyonik aşamalarda VE-kadherin ekspresyonu, endotel hücrelerine neden olan periferik kan adaları tabakası ile sınırlıdır (Breier vd., 1996). VE-kadherin ekspresyonu, hemen hemen her türlü damar tipinin endoteli için spesifiktir. VE-kadherinin doku spesifitesinin, biri sitotrofoblast olan birkaç istisnası vardır. İnsan plasentasının kurulması sırasında sitotrofoblastlar uterus interstitium ve vaskülatürünü istila eder, fetusu anneye bağlar ve plasentaya kan akışı sağlar. Spiral arteriyolleri istila eden sitotrofoblastlar, maternal endotelinin yerini alır ve trombosit

endotel hücre adezyon molekülleri (PECAM), vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM), integrin $\alpha\beta 3$ ve VE-kadherin gibi endotel hücrelerinin tipik olan bir dizi adezyon molekülünü ifade eder (Zhou vd., 1997). VE-kadherinin hücre spesifik ekspresyonu göz önüne alındığında, bu proteinin endotel hücre biyolojisi üzerinde spesifik fonksiyonlar kullandığı düşünülebilir.

VE-kadherin ekspresyonundan yoksun hücreler vasküler yapılar oluşturamazlar. Bütün bunlar, kadherinlerin aynı hücre tipinde spesifik ve örtüşmeyen fonksiyonlara sahip olabileceğini, farklı ve hala bilinmeyen sinyal proteinlerini bağlayabildiklerini veya aktivasyonlarını farklı kinetik ve/veya yoğunluğu ile modüle edebildiklerini göstermektedir (Vittet vd., 1997).

Yaptığımız çalışmada östrus siklusu immüreaksiyon profillerine bakıldığında luminal epitel ve glandular epitel hücrelerinde proöstrus, östrus ve diöstrus evrelerinde zayıf şiddette immün reaksiyon görülürken metaöstrus evresinde lumina epitel ve glandular epitelde **VE-kadherin**'in orta şiddette bir immün yanıt verdiği görüldü. Östrus siklusu Real-Time PZR bulgularına göre VE-kadherin'in en yüksek ifadesi metaöstrus evresinde görülürken, en düşük ifadeye diöstrus evresinde ulaştığı saptanmıştır.

Gebelik günlerine bağlı olarak VE-kadherin'in immünolokalizasyonlarına bakacak olursak, antimezometrial bölgede yer alan embriyo bölgesinde artan gebelik günlerinde ifade seviyesinin kuvvetli seviyeye doğru ulaştığı gözlenmiştir. Embriyo bölgesinin etrafında yer alan desidual alanlarda 7,5. ve 9,5. günde primer desidual zondan antimezometrial bazal zona doğru gidildiğinde sırasıyla aynı düzeyde orta ve kuvvetli şiddette ekspresyon ifadesi izlenmiştir. 8,5. günde ise PDZ'den antimezometrial bazal zona doğru ifade düzeyinin arttığı görülmüştür. Mezometrial desidua alanlarında yer alan kısımlarda ise çalışılmış olan gebeliğin belirli günlerinin hepsinde kuvvetli ve/veya çok kuvvetli VE-kadherin ekspresyonlarının izlediği belirlenmiştir. Peri-implantasyon dönemi gebeliğin 7,5, 8,5, 9,5 günlerinde VE-kadherin'in ilerleyen gebelik günlerine bağlı olarak ekspresyon seviyesinin sürekli artış gösterdiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, VE-kadherin vasküler homeostazında önemli bir rol oynayan bir adezyon proteindir. Bu molekül sadece endotel hücrelerinde bulunur ve hücreye özgü fonksiyonlar uygular. VE-kadherin'den

yoksun hayvanlar veya VE-kadherin'i bloke edici antikorlarla çalışmak, bu proteinin normal vaskülogenez ve anjiyogenez için ve yetişkinlerde vasküler bütünlüğün korunması için gerekli olduğunu gösterir.

Wnt sinyal yolağının vasküler gelişim ve anjiyogenezdeki rolünün araştırılması, son yıllarda belirgin bir artış göstermiştir. Bununla birlikte, sistemin vasküler hücrelerde nasıl çalıştığına ve patolojik koşullarda nasıl etkilenebileceğine dair kısmi bir bilgiye sahibiz. Farklı tipte damarlardan türetilen endotelial hücrelerin farklı tipte reseptörleri eksprese ettiği ve Wnt'lere farklı tepki verdiği düşünülebilir. Ayrıca Wnt, vasküler gelişim ve endotel spesifikasyonunu modüle etmede Notch veya TGF- β gibi diğer sinyal yollarıyla uyumlu olarak hareket edebilir. Aynı Wnt faktörü veya reseptörü, örneğin büyüme faktörleri ile aktivasyon, oksijen seviyeleri, geçirgenlik indüksiyonu, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu vb. gibi endotelial hücrelerde farklı ve bazen zıt tepkilere yol açabilir. Ayrıca, endotelial hücreler sadece Wnt ligandlarını (Goodwin ve D'Amore, 2002) değil, aynı zamanda Wnt sinyalini kontrol edebilen ve dengeleyebilen çözümler Frizzled veya Dkk-1 (Goodwin vd., 2006; Goodwin ve D'Amore, 2002) gibi reseptör inhibitörleri de üretebilir. Tüm bunları dikkate alarak, gelecekteki çalışmalarda kullanılan spesifik koşulları tanımlamak, hücre ve damar tipini tanımlamak ve *in vivo* sistemlerle Wnt yolağının karmaşıklığını deşifre edebilmek için *in vitro* olarak uygulamalar yapmak çok önemlidir. Bu çalışmalar aynı zamanda endotelial hücrelerin birbirine benzemediğini ve fizyolojik ve patolojik uyarılara farklı şekilde tepki veren heterojen bir popülasyon oluşturduğunu da göz önünde bulundurur.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada gebe olmayan östrus siklusundaki sıçan uterusu ile gebeliğin 7,5., 8,5. ve 9,5. günlerindeki sıçan uterusunda Wnt3, Wnt7a, β -katenin, Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin proteinlerinin ekspresyonları immünfloresan ve Real-Time PZR teknikleri ile çalışılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- ✓ Kanonikal Wnt/ β katenin sinyal yolağının, anjiogenezin belirlenmesinde oldukça önemli rol üstlendiği,
- ✓ Anjiogenezde kanonikal Wnt/ β katenin yolağının Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin proteinlerinin indüklenmesinde görev aldığı,
- ✓ Ang-1, ET-1 ve VE-kadherin ekspresyonlarının birbirinden farklı olduğu,
- ✓ Çalışmada kullanılan proteinlerin implantasyon, desidualizasyon ve plasentasyonda rol oynadığı,
- ✓ Devam eden gebelik günlerinde çoğunlukla bütün proteinlerin ekspresyonlarının artış gösterdiği,
- ✓ Östrus siklusu döneminde yer alan östrus ve metaöstrus evrelerinde çoğunlukla proteinlerin yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği, metaöstrus evresini takiben diöstrus evresinde ise çoğunlukla proteinlerin ekspresyon seviyelerinde bir azalma meydana geldiği,
- ✓ Östrus siklusunda immünfloresan sonuçlarına Ang-1'in çoğunlukla endometrial luminal epitel ve bez epiteli ile stroma bölgesinde yer alan kan damarlarının endotel hücrelerinde ekspresyon gösterdiği, ET-1'in Real-Time PZR sonuçlarıyla uyumlu olarak özellikle östrus evresinde endometriumda yer alan bütün bölgelerde kuvvetli ifade seviyeleri gösterdiği, VE-kadherin'in ise siklus boyunca daha çok endometrial bazal stroma ve kan damarlarının endotelinde kuvvetli ekspresyon gösterdiği,
- ✓ Gebelik günlerinde immünfloresan sonuçlarına göre çalışmada kullanılan bütün proteinlerin devam eden gebelik günlerine bağlı olarak ekspresyon ifadelerinde bir artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.
- ✓ İmplantasyonda Wnt sinyalleşmesinin rolünü kanıtlayan fonksiyonel çalışmalar spesifik Wnt ligandlarıyla sınırlıdır. Bu çalışmalar daha fazla Wnt ligandı ve reseptörü içerecek şekilde genişletilmelidir. İşlevsel çalışmalar

sayesinde, spesifik ligandlar, reseptörler, efektörler ve inhibitörler arasındaki ilişki açıkça tanımlanmalıdır. Diğer bir kritik nokta, Wnt ailesi üyelerinin üreme hormonları ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle, büyüme faktörlerini ve bu hormonlarla ilgili diğer mediatörleri içeren daha geniş kapsamlı çalışmaların, bu faktörlerin, implantasyon sürecinde Wnt sinyal yolu ile ilişkileri açısından araştırılması için yapılması gerekmektedir. İmplantasyon sırasında Wnt sinyal yolunun ortaya çıkan rolleri, Wnt ligandları, reseptörleri, efektörleri ve inhibitörleri ile implantasyon için kritik faktörler arasındaki ilişki araştırılarak netleştirilmelidir. İmplantasyon başarısızlığı, insan doğurganlığında ana engel olarak kabul edilir. İmplantasyon başarısızlığının ana nedenleri, çok sayıda raporda ve embriyonik faktörlerde belirtildiği gibi uterus faktörlerinden kaynaklanabilir. İmplantasyon ve peri-implantasyon işlemleri embriyo ve uterus arasında bir etkileşim içerdiğinden, implantasyon başarısızlığından kaçınmak için her iki faktör de dikkate alınmalıdır. Wnt sinyalleme üyelerinin rolleri bu işlemler sırasında daha iyi anlaşılırsa, bu yolun özellikle IVF teknolojileri ile manipülasyonu sayesinde implantasyon engeli aşılabılır.

- ✓ Anjiyogenez, insan implantasyonunda önemli rol oynayan bir süreçtir. Östrojen ve progesteron hormonları anjiyogenez ve implantasyon sürecinde iki önemli düzenleme anahtarlarıdır. Anjiyogenezin etkili ve uyarıcı ilaçlarının, endometrial reseptivitenin özelliklerini geliştirmesi ve ART'de implantasyon başarısızlığını önleyebilmesi beklenmektedir. Moleküler tıp alanındaki son gelişmeler ile insan endometriumundaki anjiyogenezin iyileştirilmesinin ve implantasyon başarısızlığının önlenmesinin sağlanması umulmaktadır.
- ✓ Sonuç olarak endometrial anjiyogenezde Wnt/ β katenin sinyal yolağı aracılığıyla anjiogenetik faktörlerin spesifik rolünü göstermek ve söz konusu mekanizmaları aydınlatmak için *in-vivo* ve *in vitro* deneylerin yapılması gerekmektedir. Dolayısıyla, Wnt sinyallemesinin moleküler detaylarının tasviri, yeni terapötik stratejilerin tasarlanmasında kritik bir kilometre taşı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997). β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 16:3797-804.
- Adamson, S.L., Lu, Y., Whiteley, K.J., Holmyard, D., Hemberger, M., Pfarrer, C., Cross, J.C. (2002). Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol*, 250:358-373.
- Angers, S., Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10:468-477.
- Arango, N.A., Szotek, P.P., Manganaro, T.F., Oliva, E., Donahoe, P.K., Teixeira, J. (2005). Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol*, 288:276-283.
- Atli, M.O., Guzeloglu, A., Dinc, D.A. (2011). Expression of wntless type (WNT) genes and their antagonists at mRNA levels in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 125(1-4):94-102.
- Bach, T.L., Barsigian, C., Chalupowicz, D.G., Busler, D., Yaen, C.H., Grant, D.S., Martinez, J. (1998). VE Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res*, 238:324-334.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., Aaronson, S.A., (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/ Arrow. *Nat. Cell Biol*, 3(7):683-686.
- Baley, P.A., Resink, T.J., Eppenberger, U., Hahn, A.W.A. (1990). Endothelin messenger RNA and receptors are differentially expressed in cultured human breast epithelial and stromal cells. *J Clin Invest*, 85:1320-1323.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 4:585-595.
- Barkley, M.S., Geschwind, I.I., Bradford, G.E., (1979). The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biol. Reprod*, 20 (4):733-738.
- Barrow, J.R., (2006). Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues. *Semin Cell Dev Biol*, 17(2):185-193.
- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., Young, L. (2004). Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of reproduction*, 71(1):185-193.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of b catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592):638-642.
- Bell, C.E., Calder, M.D., Watson, A.J. (2008). Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Molecular human reproduction*, 14(12):691-701.

- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 316:1619-22.
- Blackwell, P.M. Fraser, I.S. (1981). Superficial lymphatics in the functional zone of normal human endometrium. *Microvasc Res*, 21:142-152.
- Braude, P., Bolton, V. Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332(6163):459-461.
- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, U., Gotsch, D., Vestweber, D., Risau, W., Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, 87:630-642.
- Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., Dejana, E. (1995). Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5) an endothelial specific cadherin. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol*, 15:1229-1239.
- Brosens, J.J., Parker, M.G., McIndoe, A., Pijnenborg, R., Brosens, I.A. (2009) . A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 200(6):615-615.
- Brosens, J.J., Pijnenborg, R., Brosens, I.A. (2002). The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *American journal of obstetrics and gynecology*, 187(5):1416-1423.
- Brown K.D., Littlewood J. (1989). Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *Biochem J*, 263:977-980.
- Bui, T.D., Zhang, L., Rees, M.C.P., Biknell, R., Harris, A.L. (1997). Expression and hormone regulation of Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *British Journal of Cancer*, 75(8):1131-1136.
- Cadigan, K.M., Fish, M.P., Rulifson, E.J., Nusse, R. (1998). Wingless repression of drosophila frizzled 2 expression shapes the wingless morphogen gradient in the wing. *Cell*, 93(5):767-77.
- Cameron, I.T., Davenport, A.P., van Papendorp, C., Brown, M.J., Smith, S.K. (1992). Endothelin-like immunoreactivity in human endometrium. *J Reprod Fertil*, 95(2):623-8.
- Cameron, I.T., Plumpton, C., Champeney, R., van Papendorp, C., Ashby, M.J., Davenport, A.P. (1993). Identification of endothelin-1, endothelin-2 and endothelin-3 in human endometrium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:251-255.
- Cameron, I.T., Davenport, A.P. (1992). Endothelins in reproduction. *Reproductive Medicine Review*, 1:99-113.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9:653-660.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Bono, F., Balconi, G., Compernelle, V., Spagnuolo, R., Dewerchin, M., Zanetti, A., Oosthuysse, B.,

- Angelillo, A., Nuyens, D., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Herbert, J. M., Lupu, F., Collen, D., Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98:147-157.
- Carmon, K.S., Loose, D.S. (2008). Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res*, 6:1017-1028.
- Carta, L., Sassoon, D. (2004). Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth. *Biol Reprod*, 71:444-454.
- Casey, M.X., Smith, J.W., Nagai, K.N., Hersh, L.B., Mac Donald, P.C. (1991). Progesterone-regulated cyclic modulation of membrane metalloendopeptidase (enkephalinase) in human endometrium. *J Biol Chem*, 266:23041-23047.
- Cha, J., Bartos, A., Park, C., Sun, X., Li, Y., Cha, S.W., Ajima, R., Hsin-Yi, H.H., Yamaguchi, T.P., Dey, S.K. (2014). Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling. *Cell Reports*, 8:382-392.
- Chen, Q., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Wang, S., Cao, Y., Wang, H., Duan, E., (2009). Embryo–uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Mol Hum Reprod*, 15 (4):215-221.
- Cheng, C.W., Smith, S.K., Charnock-Jones, D.S. (2003). Wnt 1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology. *Exp Cell Res*, 291:415-425.
- Cho, C.H., Sung, H.K., Kim, K.T., Cheon, H.G., Oh, G.T., Hong, H.J., Yoo, O.J., Koh, G.Y. (2006). COMP-angiopoietin-1 promotes wound healing through enhanced angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow in a diabetic mouse model. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.* 103:4946-4951.
- Christian, M., Mak, I., White, J.O., Brosens, J.J. (2002). Mechanisms of decidualization. *Reproductive BioMedicine Online*, 4:24-30.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127:469-480.
- Cockburn, K., Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest*, 120 (4):995-1003.
- Cohen, E.D., Tian, Y., Morrissey, E.E. (2008). Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development*, 135:789 -798.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., DeMayo, F., Lydon, J.P., O'Malley, B.W. (2002). Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res*, 57:339-355.
- Cooke, P.S., Spencer, T.E., Bartol, F.F., Hayashi, K. (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod*, 19(9):547-58.
- Corada, M., Zanetta, L., Orsenigo, F., Breviario, F., Lampugnani, M.G., Bernasconi, S., Liao, F., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Dejana, E. (2002). A monoclonal antibody to

- vascular endothelial- cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*, 100:905-911.
- Crosby, I., Gandolfi, F., Moor, R. (1988). Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2):769-775.
- Cross, J.C. (2000). Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 11:105-113.
- Cross, J.C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Masutani, M., Adamson, S.L. (2002). Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol*, 187(1-2):207-212.
- Cross, J.C., Simmons, D.G., Watson, E.D. (2003). Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann NY Acad Sci*, 995:84-93.
- Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J. (1994). Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, 266:1508-1518.
- Croxatto, H.B., Ortiz, M.E., Diaz, S., Hess, R., Balmececa, J., Croxatto, H.D. (1978). Studies on the duration of egg transport by the oviduct. II. ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol*, 132:629-34.
- Curtis Hewitt, S., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Korach, K.S. (2002). Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization associated signaling is estrogen dependent. *Biol. Reprod*, 67(4):1268-1277.
- Damsky, C.H., Fisher, S.J. (1998). Trophoblast pseudovasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 10:660-666.
- Daniels, D.L., Weis, W.I. (2005). β -Catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12:364-71.
- Dejana, E. (2010). The role of Wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res*, 106:1798-1806.
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., Weinstein, B.M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*, 16:209-221.
- DeNucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, D., Vane, J. R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium derived relaxing factor. *Proc Natn Acad Sci, U.S.A.* 85:9797-9800.
- Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T., Wang, H., (2004). Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*, 25(3):341-373.
- Dickmann, Z., Dey, S.K., Gupta, J.S. (1975). Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72(1):298-300.
- Dijksterhuis, J.P., Petersen, J., Schulte, G. (2014). WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: *IUPHAR review 3. Br J.Pharmacol*, 171:1195-209.

- Dobson, A.T., Raja, R., Abeyta, M.J., Taylor, T., Shen, S., Haqq, C., Pera, R.A.R. (2004). The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Human Molecular Genetics*, 13(14):1461-1470.
- Dumont, D.J., Fong, G.H., Puri, M.C., Gradwohl, G., Alitalo, K., Breitman, M.L. (1995). Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*, 203:80-92.
- Dunlap, K.A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E.B., Song, G., Deng, J.M. (2011). Postnatal deletion of *Wnt7a* inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod*, 85(2):386-96.
- Easwaran, V., Lee, S.H., Inge, L., Guo, L., Goldbeck, C., Garrett, E., Wiesmann, M., Garcia, P.D., Fuller, J.H., Chan, V., Randazzo, F., Gundel, R., Warren, R.S., Escobedo, J., Aukerman, S.L., Taylor, R.N., Fantl, F.J. (2003). Beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res*, 63:3145-3153.
- Economos, K., MacDonald, P.C., Casey, M.L. (1991). Endothelin-1 gene expression and protein biosynthesis in human endometrium: potential modulator of endometrial blood flow. *J Clin Endocrinol Metab*, 74:14-9.
- Fazleabas, A.T., Strakova, Z. (2002). Endometrial function: Cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol*, 186(2):143-147.
- Ferenczy, A., Bertrand, G., Gelfand, M. (1979). Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, 133(8):859-867.
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25(4):581-611.
- Findlay, J.K. (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. *J. Endocrinol*, 111:357-366.
- Finn, C.A., Martin, L. (1972). Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol. Reprod*, 7(1):82-86.
- Finn, C.A., Martin, L., (1974). The control of implantation. *J. Reprod. Fertil*, 39(1):195-206.
- Flach, G., Johnson, M., Braude, P., Taylor, R., Bolton, V. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *The EMBO Journal*, 1(6):681.
- Flamme, I., Frolich, T., Risau, W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*, 173(2):206-10.
- Folkman J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1(1):27-31.
- Folkman, J., Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934.
- Forti, G., Krausz, C. (1998). Clinical review 100: evaluation and treatment of the infertile couple. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 83(12):4177-4188.
- Franco, C.A., Liebner, S., Gerhardt, H. (2009). Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? *Curr Opin Genet Dev*, 19:476-483.
- Franco, H.L., Dai, D., Lee, K.Y., Rubel, C.A., Roop, D., Boerboom, D., Jeong, J.W., Lydon, J.P., Bagchi, I.C., Bagchi, M.K., DeMayo, J.M. (2011). WNT4 is a key

- regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB Journal*, 25:1176-1187.
- Fuji, Y., Moreira J.E., Orlando, C., Maggi, M., Aurbach, G.D., Brandi, M.L., Sakaguchi, K. (1991). Endothelin as an autocrine factor in the regulation of parathyroid cells. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:4235-4239.
- Fulka, H., Mrazek, M., Tepla, O., Fulka, J. (2004) . DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction*, 128(6):703-708.
- Gaetje, R., Holtrich, U., Karn, T., Cikrit, E., Engels, K., Rody, A., Kaufmann, M. (2007). Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. *Fertility and Sterility*, 88:6.
- Gambino, L.S., Wreford, N.G., Bertram, J.F., Dockery, P., Lederman, F., Rogers, P.A. (2002). Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Human Rep*, 17(5):1199-1206.
- Gannon, B.J., Carati, C.J., Verco, C.J. (1997) Endometrial perfusion across the normal human menstrual cycle assessed by laser Doppler fluxmetry. *Hum. Reprod*, 12:132-139.
- Gao, C., Chen, Y.G. (2010). Dishevelled: the hub of Wnt signaling. *Cell Signal*, 22:717-27.
- Gargett, C.E., Rogers, P.A. (2001). Human endometrial angiogenesis. *Reproduction*, 121:181-186.
- Gargett, C.E., Lederman, F.L., Lau, T.M., Taylor, N.H., Rogers, P.A. (1999) Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Hum Reprod*, 14:2080-2088.
- Gellersen, B., Brosens, J.J. (2003). Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *Journal of Endocrinology*. 178(3):357-372.
- Gellersen, B., Brosens, J.J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine review*, 35(6):851-905.
- Gellersen, B., Brosens, I.A., Brosens, J.J. (2007). Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Seminars In Reproductive Medicine*, 25(6):445-453.
- Genbacev, O.D., Prakobphol, A., Foulk, R.A., Krtolica, A.R., Ilic, D., Singer, M.S., Yang, Z.Q., Kiessling, L.L., Rosen, S.D., Fisher, S.J. (2003). Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science Signaling*, 299(5605):405.
- Geva, E., Ginzinger, D.G., Zaloudek, C.J., Moore, D.H., Byrne, A., Jaffe, R.B. (2002). Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin 1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:4213-24.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., Niehrs, C. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391:357-62.

- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391(6665):357-362.
- Goetz, K.L., Wang, B.C., Madwed, J.B., Zhu, J.L., Leadley, J.L. (1988). Cardiovascular, renal and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am J Physiol*, 255:1064-68.
- Goodger, A.M., Rogers, P.A. (1994). Endometrial endothelial cell proliferation during the menstrual cycle. *Human Rep*, 9(3):399-405.
- Goodwin, A.M., D'Amore, P.A. (2002). Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis*, 5:1-9.
- Goodwin, A.M., Sullivan, K.M., D'Amore, P.A. (2006). Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Dev Dyn*, 235:3110-3120.
- Gory, S., Dalmon, J., Prandini, M. E., Kortulewski, T., de Launoit, Y., Huber, P. (1998). Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J. Biol. Chem*, 273:6750-6755.
- Gory-Faure, S., Prandini, M.H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot- Paintrand, I., Vernet, M., and Huber, P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*, 126:2093-2102.
- Grahamm, C.H., Lala, P.K. (1992). Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol*, 70(10 11):867-874.
- Gray, C.A., Taylor, K.M., Ramsey, W.S., Hill, J.R., Bazer, F.W., Bartol, F.F. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod*, 64(6):1608-13.
- Gray, C.A., Bartol, FF., Tarleton, B.J., Wiley, A.A., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Spencer, T.E. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biology of reproduction*, 65(5):1311-1323.
- Gumbiner, BM. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84:345-357.
- Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., Ko, M.S. (2004a). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell*, 6(1):117-131.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T. I., Manaster, I. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine*, 12(9):1065-1074.
- Harper, M.J., Walpole, A.L. (1967). Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. *J. Endocrinol.* 37 (1):83-92.
- Hayashi, K., Yoshioka, S., Reardon, S.N., Rucker, E.B., Spencer, T.E., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., MacLean, J.A. (2011). WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biol Reprod*, 84:308-19.

- Hayashi, K., Burghardt, R.C., Bazer, F.V., Spencer, T.E. (2007). Wnts in the ovine uterus: potential regulation of peri-implantation ovine conceptus development. *Endocrinology*, 148(7):3496-506.
- Hayashi, K., Erikson, D.W., Tilford, S.A., Bany, B.M., Maclean, J.A., Rucker, E.B., Johnson, G.A., Spencer, T.E. (2009). Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biol Reprod*, 80:989-1000.
- He, X., Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., Varmus, H. (1997). A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science*, 275:1652-1654.
- Heap, R.B., Deanesly, R., (1967). The increase in plasma progesterone levels in the pregnant guinea-pig and its possible significance. *J. Reprod. Fertil*, 14 (2):339-341.
- Herington, J.L., Bi, J., Martin, J.D., Bany, B.M. (2007). β -catenin (CTNNB1) in the mouse uterus during decidualization and the potential role of two pathways in regulating its degradation. *J Histochem Cytochem*, 55:963-974
- Heryanto, B., Rogers, P. (2002). Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. *Reproduction*, 123(1):107-113.
- Hewett, P., Nijjar, S., Shams, M., Morgan, S., Gupta, J., Ahmed, A. (2002). Down-regulation of Angiopoietin-1 expression in menorrhagia. *Am. J. Pathol*, 160:773-780.
- Hinson P., Vinson G. P., Kapas S., Teja R. (1991). The role of endothelin in the control of adrenocortical function: stimulation of endothelin release by ACTH and the effects of endothelin-I and endothelin-3 on steroidogenesis in rat and human adrenocortical cells. *J. Endocr*, 128:275-280.
- Hirchenhain, J., Huse, I., Hess, A., Bielfeld, P., De Bruyne, F., Krüssel, J.S. (2003). Differential expression of angiopoietins 1 and 2 and their receptor Tie-2 in human endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 9(11):663-669.
- Hou, X., Tan, Y., Li, M., Dey, S.K., Das, S.K. (2004). Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Mol Endocrinol*, 18:3035-3049.
- Hoversland, R.C., Dey, S.K., Johnson, D.C. (1982a). Aromatase activity in the rabbit blastocyst. *J. Reprod. Fertil*, 66 (1):259-263.
- Hu, J., Dong, A., Fernandez-Ruiz, V., Shan, J., Kawa, M., Martínez- Ansó, E., Prieto, J., Qian, C. (2009). Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 69:6951-6959.
- Hurlstone, A., Clevers, H. T. (2002) cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J*, 21:2303-11.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK- 3 β dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J*. 17:1371-84.
- Ingaramo, P.I., Milesi, M.M., Schimpf, M.G., Ramos, J.G., Vigessi, L., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H., Varayoud, J. (2016). Endosulfan affects uterine development and

- functional differentiation by disrupting Wnt7a and b-catenin expression in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 425:37-47.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K., Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:2863-2867.
- Irwin, J.C., Utian, W.H., Eckert, R.L. (1991) Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, 129:2385-2392.
- Jeong, J.W., Lee, H.S., Franco, H.L., Broaddus, R.R., Taketo, M.M., Tsai, S.Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J. (2009). Beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene*, 28(1):31-40.
- Kajihara, T., Tomioka, Y., Hata, T., Ghazizadeh, M. & Asano, G. (1996) Synthesis of endothelin-1 in rat uterus during pregnancy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44:953-957.
- Kaloğlu, C., Gursoy, E., Onarlioğlu, B. (2003). Early maternal changes contributing to the formation of the chorioallantoic and yolk sac plesantas in rat: a morphological study. *Ant . Histol. Embriyol*, 32:200-206.
- Kam, E.P., Gardner, L., Loke, Y.W., King, A. (1999). The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod*, 14:2131-2138.
- Karizbodagh, P.M., Rashidi, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., Mirzaei, H. (2017). Implantation window and Angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118:4141-4151.
- Kayisli, U., Cayli, S., Seval, Y., Tertemiz, F., Huppertz, B., Demir, R. (2006). Spatial and temporal distribution of Tie-1 and Tie-2 during very early development of the human placenta. *Placenta* 27(6):648-659.
- Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L., Leyns, L., (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev. Dyn.*, 233 (3):1064-1075.
- Khan, R.N., Hamoud, H., Warren, A., Wong, L.F., Arulkumaran, S. (2004). Relaxant action of sildenafil citrate (Viagra) on human myometrium of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 191(1):315-321
- Kiewisz, J., Kaczmarek, M.M., Morawska, E., Blitek, A., Kapelanski, W., Ziecik, A.J. (2011). Estrus synchronization affects WNT signaling in the porcine reproductive tract and embryos. *Theriogenology*, 76(9):1684-94.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A. (2009) Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*, 19:119-129.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., Matsumoto, S. (2011) New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*, 291:21-71.

- Klauber, N., Rohan, R.M., Flynn, E. and D'Amato, R.J. (1997) Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat. Med.*, 3, 443-446.
- Knowles, J., Loizidou, M., Taylor, I. (2005). Endothelin-1 and Angiogenesis in cancer. *Curr Vasc Pharmacol*, 3(4):309-14.
- Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J. Cell Biol*, 130:67-77.
- Kozuka, M., Ito, T., Hirose, S., Takahashi K. and Hagiwara H. (1989). Endothelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage-dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159:317-323.
- Krehbiel, R.H. (1941). The effects of theelin on delayed implantation in the pregnant lactating rat. *Anat. Rec*, 81(3):381-392.
- Krüssel, J.S., Bielfeld, P., Polan, M.L., Simon, C. (2003). Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110:S2-S9.
- Krüssel, J.S., Casan, E.M., Raga, F., Hirchenhain, J., Wen, Y., Huang, H.Y., Bielfeld, P., Polan, M.L. (1999). Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor transmembraneous receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, 5:452-458.
- Kubista, M., Andrade, M.J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3):95-125.
- Kubota, T., Kamada, S., Hirata, Y, Eguchi, S., Imai, T., Marumo, F. and Aso, T. (1992) Synthesis and release of endothelin-1 by human decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75:1230-1234.
- Kubota, T., Taguchi, M., Kamada, S., Imai, T., Hirata, Y., Marumo, F., Aso, T. (1995). Endothelin synthesis and receptors in human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, 1:304 308.
- Kwun, J.K., Emmens, C.W. (1974). Hormonal requirements for implantation and pregnancy in the ovariectomized rabbit. *Aust. J Biol Sci* 27 (3):275-283.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Andriopoulou, P., Esser, S., Risau, W., Dejana, E. (1997). Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110:2065-2077.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: Differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha- catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol*, 129:203-217.
- Landeira, D., Bagci, H., Malinowski, A.R., Brown, K.E., Soza-Ried, J., Feytout, A., Webster, Z., Ndjetehe, E., Cantone, I., Asenjo, H.G., Brockdorff, N., Carroll, T., Merckenschlager, M., Fisher, A.G. (2015). Jarid2 coordinates nanog expression and PCP/ Wnt signaling required for efficient ESC differentiation and early embryo development. *Cell Rep*, 12:573-86.

- Leonard, S., Murrant, C., Tayade, C., van den Heuvel, M., Watering, R., Croy, B.A. (2006) Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification-Facts and hypotheses a review. *Placenta*, 27:S40-6.
- Lessey, B.A., Lovely, L.P. (2000). Implantation In: Kell BA, May JV, De Jonge GJ (Ed). Handbook of the assisted reproduction laboratory 1. Baskı *CRC Press FL*, 33-76.
- Li, Q., Kannan, A., Das, A., DeMayo, F.J., Hornsby, P.J., Young, S.L., Taylor, R.N., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C. (2013). WNT4 acts downstream of BMP2 and function via β -catenin signaling pathway to regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology*, 154:446-457.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., Singh, R.K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*, 170:3369-3376.
- Liao, F., Doody, J.F., Overholser, J., Finnerty, B., Bassi, R., Dejena, E., Kussie, P., Bohlen, P., Hicklin, D.J. (2002). Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res*, 62:2567-2575.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., Dey, S.K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91 (2):197-208.
- Lim, H.J., Wang, H. (2010). Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J. Clin. Invest.*, 120 (4):1004-1015.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X. (2002). Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108:837-47.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet*, 22:361-365.
- Logan, C.Y., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:781-810.
- Long, J.A., Evans, H.M. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif*, 6:1-148.
- Longjiang, S., Hongmei, W., Enkui, D., Cheng, Z. (2001) Expression of vascular endothelial growth factor in rat uterus during peri-implantation. *Chinese Science Bulletin*, 46 (14):1178-1181.
- Lopes, F.L., Desmarais, J.A., Murphy, B.D. (2004). Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction*, 128(6):669-678.
- Ma, W.G., Song, H., Das, S.K., Paria, B.C., Dey, S.K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (5):2963-2968.
- Ma, W.G., Song, H., Das, S.K., Paria, B.C., Dey, S.K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci*, 100(5):2963-2968.

- Maas, J.W.M., Groothuis, P.G., Dunselman, G.A.J., de Goeij, A.F.P.M., Struyker Boudier, H.A.J., Evers, J.L.H. (2001). Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Hum. Reprod.*, 16:1557-1561.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17:9-26.
- Maggi, M., Vannelli, G.B., Peri, A. (1991) Immunolocalization, binding and biological activity of endothelin in rabbit uterus: effect of ovarian steroids. *Am J Physiol*, 260:E292-305.
- Maher, E., Bardequez, A., Gardner, J. P., Goldsmith, L., Weiss, G., Mascarina, M. and Aviv, A. (1991). Endothelin- and oxytocin-induced calcium signaling in cultured human myometrial cells. *J. Clin. Invest*, 87:1251-1258.
- Malafaya, P.B., Santos, T.C., van Griensven, M., Reis, R.L., (2008). Morphology, mechanical characterization and in vivo neo vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. *Biomaterials* 29 (29), 3914–3926.
- Mantalenakis, S.J., Ketchel, M.M., (1966). Frequency and extent of delayed implantation in lactating rats and mice. *J. Reprod. Fertil.*, 12 (2), 391-394.
- Mao, B., Niehrs, C., (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene*, 302(1-2):179-183.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., Niehrs, C., (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417 (6889):664-667.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., Niehrs, C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411 (6835):321-325.
- Marciniak, S.J., Plumpton, C., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Davenport, A.P. (1992) Localization of immunoreactive endothelin and proendothelin in the human lung. *Pulmonary Pharmacol*, 5(3):175-182.
- Markee, J.E. (1940). Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contrib Embryol Carnegie Inst*, 28:219-308.
- Marsh, M.M., Findlay, J.K., Salamonsen, L.A. (1996). Endothelin and menstruation. *Hum Reprod*, 11(2):83-89.
- Martinez, J., Ferber, A., Bach, T.L., Yaen, C.H. (2001). Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci*, 936:386-405.
- Masckauchán, T.N., Kitajewski, J. (2006). Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight. *Physiology (Bethesda)*, 21:181-188.
- Masckauchán, T.N., Shawber, C.J., Funahashi, Y., Li, C.M., Kitajewski, J. (2005). Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* 8:43-51.
- Matera, L., Ciccarelli, E., Cesano, A., Veglia, F., Miola, C., Camanni, F. (1989). Natural killer activity in hyperprolactinemic patients. *Immunopharmacology*, 18:143-6.

- Matsumoto, H., Ma, W.G., Daikoku, T., Zhao, X., Paria, B.C., Das, S.K., Traskos, J.M., Dey, S.K. (2002) Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem*, 277:29260-7.
- Matsumoto, H., Sato, E. (2006) Uterine angiogenesis during implantation and decidualization in mice. *Reproductive Medicine and Biology*, 5:81-86.
- Matsumoto, H., Suzuki, N., Onda, H., Fujino, M. (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164: 74-80.
- Matsumura, T., Wolff, K., Petzelbauer, P. (1997). Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol*, 158: 3408-3416.
- McCormack, J.T., Greenwald, G.S. (1974). Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17beta levels on day 4 of pregnancy in the mouse. *J. Reprod. Fertil*, 41 (2), 297-301.
- McLaren, A. (1968). A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice. *J. Endocrinol*, 42 (3), 453-463.
- Meng, W., Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1:a002899.
- Mericskay, M., Kitajewski, J., Sassoon, D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, 131(9):2061-72.
- Metcalfe, C., Bienz, M. (2011). Inhibition of GSK3 by Wnt signalling – two contrasting models. *J. Cell Sci*, 124(21):3537-3544.
- Michael, S.D. (1976). Plasma prolactin and progesterone during the estrous cycle in the mouse. *R. Soc. Med.*, 254-257.
- Miller, C., Pavlova, A., Sassoon D.A. (1998). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mech Dev*, 76:91-99.
- Miller, C., Sassoon, D.A. (1998). Wnt7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, 125:3201-3211.
- Miller, P.B., Parnell, B.A., Bushnell, G., Tallman, N., Forstein, D.A., Higdon 3rd, H.L., Kitawaki, J., Lessey, B.A., (2012). Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Hum. Reprod.*, 27 (3), 881-888.
- Mohamed, O.A., Jonnaert, M., Labelle-Dumais, C., Kuroda, K., Clarke, H.J., Dufort, D. (2005). Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:8579-8584.
- Mohamed, O.A., Dufort, D., Clarke, H.J., (2004). Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo–maternal signaling at implantation. *Biol. Reprod*, 71 (2), 417-424
- Monkley, S.J., Delaney, S.J., Pennisi, D.J., Christiansen, J.H., and Wainwright, B.J. (1996). Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development*, 122, 3343-3353.

- Mosimann, C., Hausmann, G., Basler, K. (2006) Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with betacatenin/ *Armadillo*. *Cell*, 125:327-341.
- Möller, B., Rasmussen, C., Lindblom, B. and Olovsson, M. (2001) Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod*, 7, 65-72.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M. (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell. Regul*, 1(1):37-44.
- Nayak, N.R., Brenner, R.M. (2002). Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4):1845-1855.
- Nayak, N.R., Kuo, C.J., Desai, T.A., Wiegand, S.J., Lasley, B.L., Giudice, L.C., Brenner, R.M. (2005) Expression, localization and hormonal control of angiopoietin-1 in the rhesus macaque endometrium: potential role in spiral artery growth. *Mol Hum Reprod*, 11:791-9.
- Nei, H., Saito, T., Yamasaki, H., Mizumoto, H., Ito, E., Kudo, R. (1999). Nuclear localization of β -catenin in normal and carcinogenic endometrium. *Mol Carcinog*, 25:207-18.
- Nelson, C.M., Chen, C.S. (2003). VE-cadherin simultaneously stimulates and inhibits cell proliferation by altering cytoskeletal structure and tension. *J Cell Sci*, 116:3571-3581.
- Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C. and Pera, R. A. R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*. 139(5), pp. 829-841.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1/VE-cadherin⁺ cells at a diverging point endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-1757.
- Norwitz, E.R., Schust, D.J., Fisher, S.J., (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N. Engl. J. Med*, 345 (19), 1400-1408.
- Noyes, R., Hertig, A., Rock, J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Obstetrical Gynecol Survey*, 5(4):561-564.
- Oborna, I., Novotny, R., Brezinova, J., Petrova, P., Lichnovsky, V., Fingerova H. (2004) Changes in the development of uterine pinopodes in steroid hormone supplemented cycles. *Physiol Res* 53:423-430.
- Ohbuchi, H., Nagai, K., Kitamura, K., Yamaguchi, M., Ikenoue, T., Mori, N., Araki, S., Toshimori, K. (1992). Endothelin-I in human uterine tissue during the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 10(8):2204-8.
- Ohbuchi, H., Nagai, K., Yamaguchi, M., Ikenoue, T., Mori, N., Kitamura, K., Araki, S., Toshimori, K. (1995). Endothelin-1 endometrium and big endothelin-1 during menstruation increase in human. *Am J Obstet Gynecol*, 173:5.
- Orlando, C., Brand, M.L., Peri, A. (1990). Neurohypophyseal hormone regulation of endothelin secretion from rabbit endometrial cells in primary culture. *Endocrinology*, 126:1780-2.

- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R. (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*, 8(6): 1711-7.
- Pardi, G., Marconi, A.M., Cetin, I. (2002). Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses—a review. *Placenta*, 23:136-141.
- Paria, B.C., Huet-Hudson, Y.M., Dey, S.K., (1993). Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (21), 10159-10162.
- Paria, B.C., Ma, W., Tan, J., Raja, S., Das, S.K., Dey, S.K., Hogan, B.L. (2001a). Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (3):1047-1052.
- Paria, B.C., Tan, J., Lubahn, D.B., Dey, S.K., Das, S.K., (1999b). Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha deficient mice. *Endocrinology*, 140 (6):2704-2710.
- Parr, B.A., McMahon, A.P. (1998) Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, 395:707-710.
- Parr, B.A., McMahon, A.P. (1995). Dorsalizing signal Wnt 7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, 374:350-353.
- Paulus, W.E., Strehler, E., Zhang, M., Jelinkova, L., El-Danasouri, I., Sterzik, K. (2002). Benefit of vaginal sildenafil citrate in assisted reproduction therapy. *Fertil Steril*, 77(4):846-847.
- Poole, T.J., Coffin, J.D. (1989) Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool*, 251(2):224-31.
- Potter, E., Bergwitz, C., Brabant, G. (1999). The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev*, 20:207-239.
- Psychoyos, A., (1986). Uterine Receptivity for Nidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 476(1):36-42.
- Psychoyos, A., (1973). Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam. Horm.* 31:201-256.
- Punyadeera, C., Thijssen, V., Tchaikovski, S., Kamps, R., Delvoux, B., Dunselman, G., de Goeij, A., Griffioen, A., Groothuis, P. (2006). Expression and regulation of vascular endothelial growth factor ligands and receptors during menstruation and post-menstrual repair of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 12(6):367-375.
- Rao, T.P., Kühl, M. (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*, 106:1798-806.
- Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of Frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:2859-63.
- Reardon, S.N., King, M.L., MacLean, J.A., Mann, J.L., DeMayo, F.J., Lydon, J.P. (2012) . CDH1 is essential for endometrial differentiation, gland development, and adult function in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 86(5):141. 1-10.
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., Fisher, S.J., (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal fetal interface. *J. Clin. Invest*, 114 (6), 744-754.

- Reese, J., Wang, H., Ding, T., Paria, B.C. (2008). The hamster as a model for embryo implantation: insights into a multifaceted process. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 19 (2), 194-203.
- Revel, A., Achache, H., Stevens, J., Smith, Y., Reich, R. (2011) MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Hum Reprod*, 26(10):2830-40.
- Rider, V., Isuzugawa, K., Twarog, M., Jones, S., Cameron, B., Imakawa, K., Fang, J. (2006) Progesterone initiates Wnt- β catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. *Endocr J*, 191:537-548.
- Riley, S.C., Butt, A.R., Doughton, B.W., Li, S.X., Zheng, S.H., Findlay, J.K. & Salamonsen, L.A. (1994). Endothelin in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100:451-459.
- Rivera-Perez, J.A., Magnuson, T. (2005). Primitive streak formation in mice is pre-ceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Dev Biol*, 288:363-371.
- Roblero, L.S., Fernandez, O., Croxatto, H.B. (1987). The effect of RU486 on transport, development and implantation of mouse embryos. *Contraception* 36 (5), 549-555
- Rogers, P., Murphy, C. (1989). Uterine receptivity for implantation: human studies, pp. 231-238.
- Rogers, P.A., Au, C.L., Affandi, B. (1993). Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum Reprod*, 8:1396-1404.
- Rossant, J., Cross, J.C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*, 2:538-548.
- Rowe, A.J., Wulff, C., Fraser, H.M.(2003). Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction*, 126:227-38
- Saito-Diaz, K., Chen, T.W., Wang, X., Thorne, C.A. (2013). Wallace HA, Page McCaw A, et al. The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors*. 31:1-31.
- Salamonsen, L.A., Zhang, J., Brasted, M. (2002). Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *Journal of reproductive immunology*. 57(1):95-108.
- Salamonsen, L.A., Butt, A.R., Macpherson, A.M., Rogers, P.A.W., Findlay, J.K. (1992). Immunolocalization of the vasoconstrictor endothelin in human endometrium during the menstrual cycle and in umbilical cord at birth. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 167:163-167.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. and Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 376:70-74.
- Satterfield, M.C., Dunlap, K.A., Hayashi, K., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W. (2007). Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by pregnancy and progesterone. *Endocrinology*. 148(8):3922-31.

- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6):1101-1108.
- Semenov, M.V., Habas, R., Macdonald, B.T., He, X. (2007). Snapshot: noncanonical Wnt signaling pathways. *Cell*, 131:1378.
- Semenov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kuhl, M., Sokol, S., He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* 11(12):951- 961.
- Sengupta, J., Paria, B.C., Manchanda, S.K. (1983). Effect of an estrogen antagonist on development of blastocysts and implantation in the hamster. *J. Exp. Zool*, 225 (1), 119-122.
- Seval, Y., Sati, L., Celik-Ozenci, C., Taskin, O., Demir, R. (2008). The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 29(9):809-815.
- Sharkey, A.M., Smith, S.K. (2003). The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17(2):289-307.
- Shelton, D.N., Fornalik, H., Neff, T., Park, S.Y., Bender, D., DeGeest, K. (2012) The role of LEF1 in endometrial gland formation and carcinogenesis. *PLoS One*, 7(7):e40312.
- Shichiri, M., Hirata, Y., Kanno, K., Ohta, K., Emori, T., Marumo, F. (1989) Effect of endothelin-1 on release of arginine-vasopressin from perfused rat hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun*, 163:1332-37.
- Shifren, J.L., Tseng, J.F., Zaloudek, C.J., Ryan, I.P., Meng, Y.G., Ferrara, N., Jaffe, R.B., Taylor, R.N. (1996) Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 81:3112-3118.
- Sholl, S.A., Orsini, M.W., Hitchins, D.J. (1983). Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus and liver near the time of implantation. *J. Steroid. Biochem*, 19(2):1153-1161.
- Shu, W., Jiang, Y.Q., Lu, M.M., Morrissey, E.E. (2002). Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development* 129, 4831-4842.
- Simmons, D.G., Fortier, A.L., Cross, J.C. (2007). Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Developmental biology*. 304(2):567-578.
- Simonsen, M.S., Wann, S., Mene, P., Dubyak, G.R., Kester, M., Nakazato, Y, Sedor, J.R., Dunn, M.J. (1989) Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest*, 83:708-712.
- Snijders, M.P., De Goeij, A.F., Koudstaal, J., Thunnissen, E.B., De Haan, J., Bosman, F.T. (1992). Oestrogen and progesterone receptor immunocytochemistry in human hyperplastic and neoplastic endometrium. *J Pathol*,166(2):171-177.
- Sonderregger, S., Pollheimer, J., Knöfler, M. (2010) Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation review. *Placenta*, 31:839-47.
- Stadeli, R., Hoffmans, R. Basler K. (2006). Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol*. 16:378-385.

- Stepniak, E., Radice, G.L., Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1:a002949.
- Stevens, A., Lowe, J. (1992) Female reproductive system. In: Foley F (ed) *Histology. Gower medical publishing*, London, UK, 322-347.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359(6390):76-9.
- Stojilkovic, S.S., Merelli, F., Iida, T., Lazar, Z., Catt, K.J. (1990) Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science*, 248: 1663-66.
- Sunnergren, K.P., Wrod, R.A., Sambrook, J.F., MacDonald, P.C., Casey, M.L. (1990) Expression and regulation of endothelin precursor mRNA in avascular human amnion. *Mol Cell Endocrinol*, 68:R7-14.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Katlanabilir, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87:1171-1180.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet*, 36 (4):417-422.
- Tabibzadeh, S., Babaknia, A. (1995). The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol Hum Reprod*,1(4):179–202.
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Brevario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol*, 10:923-934.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., Ashara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 5(4):434-8.
- Takayanagi, R., Kitazumi, K., Takasaki, C., Ohnaka, K., Aimoto, S., Tasaka, K., Ohashi, M., Nawata H. (1991). Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett*, 282:103-106.
- Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Yamashita, K. and Masaki, T. (1989) A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem*, 238:249-252.
- Tammela, T., Saaristo, A., Lohela, M., Morisada, T., Tornberg, J., Norrmen, C., Okie, Y., Pajusola K., Thurston, G., Sudo, T., Herttuala, S.Y., Alitalo, K. (2005). Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood*, 105:4642-4648
- Teklenburg, G., Salker, M., Heijnen, C., Macklon, N.S., Brosens, J.J. (2010a). The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction*, 16(12):886-895.

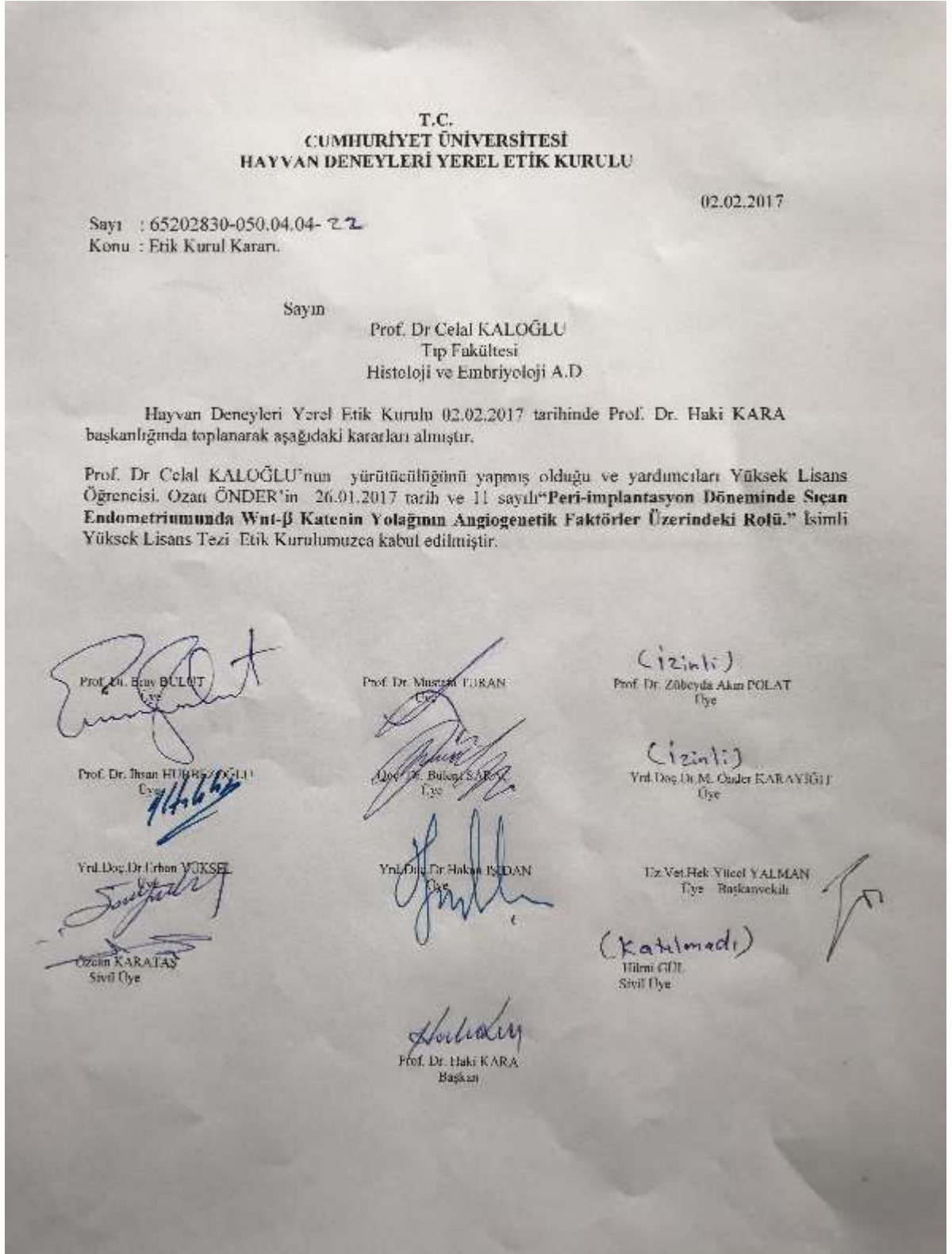
- Tepekoy, F., Akkoyunlu, G., Demir, R. (2015). The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J Assist Reprod Genet*, 32:337-346.
- Tertemiz, F., Kayisli, U.A., Arici, A., Demir, R. (2005). Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol Reprod*, 72(3):727-735.
- Torry, D.S., Leavenworth, J., Chang, M., Maheshwari, V., Groesch, K., Ball, E.R., Torry, R.J. (2007) Angiogenesis in implantation. *J Assisst Reprod Genet*, 24:303-315
- Torry, D.S., Holt, V.J., Keenan, J.A., Harris, G., Caudle, M.R. and Torry, R.J. (1996). Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil, Steril*, 66, 72-80.
- Torry, R.J., Rongish, B.J. (1992). Angiogenesis in the uterus: potential regulation and relation to tumor angiogenesis. *Am J Reprod Immunol*, 27:171-9.
- Tortelote, G.G., Hernandez-Hernandez, J.M., Quaresma, A.J., Nickerson, J.A., Imbal-zano, A.N., Rivera-Perez, J.A. (2013). Wnt3 function in the epiblast is required for the maintenance but not the initiation of gastrulation in mice. *Dev Biol*, 374:164-173.
- Tranguch, S., Daikoku, T., Guo, Y., Wang, H., Dey, S.K. (2005). Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell Mol. Life Sci*, 62 (17):1964-1973.
- Tranguch, S., Smith, D.F., Dey, S.K. (2006). Progesterone receptor requires a co-chaperone for signalling in uterine biology and implantation. *Reprod. Biomed. Online*, 13 (5):651-660.
- Tulac, S., Nayak, N.R., Kao, L.C., Van Waes, M., Huang, J., Lobo, S., Germeyer, A., Lessey, B.A., Taylor, R.N., Suchanek, E., Giulice D.C. (2003). Identification, characterization and regulation of canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8):3860-6.
- Uchide, T., Adur, J., Yoshioka, K., Sasaki T., Temma, K., Saida, K. (2001). Endothelin-1 in smooth muscle cells and mast cells of mouse uterus after parturition. *Journal of Molecular Endocrinology*, 27:165-173.
- Valenzuela, D.M., Griffiths, J.A., Rojas, J., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Zhou, H., McClain, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Huang, T., Papadopoulos, N., Maisonpierre, P.C., Davis, S. and Yancopoulos, G.D. (1999). Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:1904-1909.
- van Amerongen, R., Mikels, A., Nusse, R. (2008). Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal*, 1:9.
- van Amerongen, R., Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136:3205-3214.
- van de Schans, V.A., Smits, J.F., Blankesteyn, W.M. (2008). The Wnt/frizzled pathway in cardiovascular development and disease: Friend or foe? *Eur J Pharmacol*, 585:338-345.

- van der Linden, P.J., de Goeij, A.F., Dunselman, G.A., Erkens, H.W., Evers, J.L. (1995). Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 63(6):1210-6.
- van Gijn, M.E., Daemen, M.J., Smits, J.F., Blankesteyn, W.M. (2002) The wnt- frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 55:16-24.
- Vanneste, E., Melotte, C., Voet, T., Robberecht, C., Debrock, S., Pexsters, A., Staessen, C., Tomassetti, C., Legius, E., D'Hooghe, T. (2011). PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Human reproduction*, 26(4):941-949.
- Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F (2009). Chromosome instability is common in human cleavage stage embryos. *Nature medicine*, 15(5):577- 583.
- Vijayaraghavan, J., Scinli, A.G., Carretero, O.A., Slaughter, C, Mcomaw, C., Hersh, L.B. (1990). The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase24.11 (enkephalinase)/ *Biol. Chem*, 265:14150-14155.
- Vinijsanun, A., Martin, L. (1990). Effects of progesterone antagonists RU486 and ZK98734 on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. *Reprod. Fertil. Dev*, 2 (6):713–727.
- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., and Huber, P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:6273-6278.
- Wallez, Y., Vilgrain, I., Huber, P. (2006). Angiogenesis: Ve-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med*, 16:55-59.
- Wang, H., Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from Mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 7:185-199.
- Wang, Q., Lu, J., Zhang, S., Wang, S., Wang, W., Wang, B., Wang, F., Chen, Q., Duan, E., Leitges M, Kispert, A., Wang, H. (2013) Wnt6 is essential for stromal cell proliferation during decidualization in mice. *Biology of Reproduction*, 88 1–9.
- Wang, W., Van De Water, T., Lufkin, T. (1998). Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. *Development*, 125(4):621–634.
- Wang, H., Dey, S.K., Maccarrone, M., (2006a). Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr. Rev.* 27 (5), 427–448.
- Wang, Q.T., Piotrowska, K., Ciemerych, M.A., Milenkovic, L., Scott, M.P., Davis, R.W., Zernicka-Goetz, M. (2004). A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell*. 6(1):133-144.
- Watson, E.D., Cross, J.C. (2005). Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*, 20:180-193.
- Webb, D.J. (1991). Endothelin receptors cloned, endothelin converting enzyme characterized and pathophysiological roles for endothelin proposed. *Trends Pharmac. Sci*, 12.43-46.

- Weiss, E. E., Kroemker, M., Rudiger, A. H., Jockusch, B. M., Rudiger, M. (1998). Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: Complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J. Cell Biol*, 141:755-764.
- Weissberg, P.L., Witchell, C.J., Davenport, A.P., Heskith, R., Metcalf J.C. (1990). The endothelin peptides, ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b, are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 85:257-262.
- Wheelock, M.J., Johnson, K.R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19:207-235.
- Whitten, W.K. (1955). Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice. *J. Endocrinol*, 13 (1):1-6.
- Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'Connor, J.F., Baird, D.D., Schlatterer, J.P., Canfield, R.E., Armstrong, E.G., Nisula, B.C., (1988). Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med*, 319 (4):189-194.
- Wilcox, L.S., Peterson, H.B., Haseltine, F.P., Martin, M.C. (1993). Defining and interpreting pregnancy success rates for in vitro fertilization. *Fertil. Steril*, 60 (1):18-25.
- Willert, K., Shibamoto, S., Nusse, R. (1999). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases β -catenin from the axin complex. *Genes Dev*, 13:1768-1773.
- Word, R.A., Ka, K.E., Stull, R., Casey, M.L. (1990). Endothelin increases cytoplasmic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 162:1103-1108.
- Wright, M., Aikawa, M., Szeto, W., Papkoff, J. (1999). Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 263:384-388.
- Xie, H., Tranguch, S., Jia, X., Zhang, H., Das, S.K., Dey, S.K., Kuo, C.J., Wang, H. (2008). Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development*, 135 (4):717-727.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411-15.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407:242-248.
- Yang, S., Graham, J., Kahn, J.W., Schwartz, E.A., Gerritsen, M.E. (1999). Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol*, 155:887-895.
- Yoon, Y., Huang, T., Tortelote, G.G., Wakamiya, M., Hadjantonakis, A.K., Behringer, R.R., Rivera-Perez, J.A. (2015). Extra-embryonic Wnt3 regulates the establishment of the primitive streak in mice. *Developmental Biology*, 403:80-88.
- Yoshinaga, K. (1980). Inhibition of implantation by advancement of uterine sensitivity and refractoriness. In: Leroy, F., Finn, C.A., Psychoyos, A., Hubinot, P.O. (Eds.), *Blastocysts-Endometrium Relationships: Progress in Reproductive Biology*. Karger, Basel, Switzerland, pp. 189-199.

- Yoshinaga, K., Adams, C.E. (1966). Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J. Reprod. Fertil*, 12 (3):593-595.
- Yoshizawa, T., Shinmi, O., Giaid, A., Yanagisawa, M., Gibson, S.J., Kimura, S., Uchiyama, Y., Polak, J.M., Masaki, T., Kanazawa, I. (1990) Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. *Science*, 247:462-64.
- Yuan, Y., Foley, G.L. (2002). Female reproductive system. In Handbook of Toxicologic Pathology, 2nd ed., Vol. 2. (W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, and M. S. Wallig, eds.), *Academic Press*, 847-94, London.
- Zeng, F., Schultz, R.M. (2005). RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, 283(1):40-57.
- Zeng, F., Baldwin, D.A., Schultz, R.M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev. Bio*, 272(2):483.
- Zerlin, M., Julius, M.A., Kitajewski, J. (2008). Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis. *Angiogenesis*, 11:63-69.
- Zhang, B., Ma, J. (2010). Wnt pathway antagonists and angiogenesis. *Protein Cell*, 1(10): 898-906.
- Zhang, X., Gaspard, J.P., Chung, D.C. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*, 61, 6050–6054.
- Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V.M., Abramowski, D., Sturchler Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., Yankner, B.A. (1998). Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*, 395:698-702.
- Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., Damsky, C. H. (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest*, 99:2139-2151.
- Zinaman, M.J., Clegg, E., Brown, C.C., O'Connor, J., Selevan, S. (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil. Steril*, 65(3):503.

8. EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Ozan ÖNDER
Doğum Yeri ve Tarihi Sivas 15.12.1990
Medeni Hali Bekar
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji
Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi o.onder987@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Yenişehir lisesi, 2006
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,
2014

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Yüksek Lisans Öğrencisi, 2018