



TC.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN
ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ MATRİX
METALLOPROTEİNAZ EKSPRESYONUNDAKİ ROLÜ**

Rasim HAMUTOĞLU

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

SİVAS-2019

TC.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN
ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ MATRİX
METALLOPROTEİNAZ EKSPRESYONUNDAKİ ROLÜ

RASİM HAMUTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HÜSEYİN ERAY BULUT

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. H. Eray BULUT

ye Prof. Dr. Celal KALOğLU

ye Prof. Dr. Birkan YAKAN

ONAY

Bu tez çalışması, 11.01.2019 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri yeleri 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-725), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ MATRIX METALLOPROTEİNAZ EKSPRESYONUNDAKİ ROLÜ

Rasim HAMUTOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Histoloji-Embriyoloji A.D.

Danışman: Prof.Dr. H. Eray BULUT

2019, 181 sayfa

İmplantasyon süreci, uterus ve implante embriyo arasında karmaşık ve senkronize moleküler ve hücrel olayları içerir.

Wnt- β katenin sinyal yolağı pre-implantasyon embriyo gelişimi, implantasyon için blastosist aktivasyonu, uterus gelişimi ve desidualizasyon gibi çoklu implantasyon ve desidualizasyon olaylarında oldukça kritik rollerde görev alır.

İmplantasyon sırasında, matriks metalloproteinazların, endometriumda ve embriyo invazyonunda desidualizasyona eşlik eden doku yeniden şekillenmesinde rol oynadığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, peri-implantasyon döneminde sıçan endometriumunda Wnt- β katenin sinyal yolağı aracılığıyla matriks metalloproteinaz ailesinden MMP-2 (Jelatinaz-A), MMP-7 (Matrilisin-1) ve MMP-9 (Jelatinaz-B) proteinlerinin immüno lokalizasyonları belirlenerek 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 tüm endometrium mRNA'sında Wnt'ler ve β -katenin'in yanı sıra MMP-2, MMP-7 ve MMP-9'un ekspresyon varlığını göstermiştir. MMP-2, MMP-7 ve MMP-9'un ifadesi özellikle

östrus ve/veya metaöstrus evresinde daha yüksekti. Özellikle östrus siklusunda MMP-7 mRNA'sı için çok kuvvetli sinyaller tespit edildi. Gebelik sırasında endometrial MMP ekspresyon seviyesinde 7,5. günden 9,5. güne doğru gidildikçe bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte, 7,5. gün gebe uterusunda Wnt7a'nın mRNA düzeyi saptanmadı.

İmmüno Floresan analizlerinin sonuçlarına göre, peri-implantasyon sürecinde gebe olmayan sıçan endometriumunda Wnt'lerin ve MMP-2 ile MMP-9'un tüm evreler boyunca genellikle endometrial bazal stromada ve kan damarlarının endotelinde, β -kateninin tüm evreler boyunca endometriumun bütün bölgelerinde, MMP-7'nin ise çoğunlukla luminal epitel, endometrial bez epiteli ve kan damarlarının endotelinde lokalizasyonları gösterilmiştir. Gebe sıçan uterusunda çalışılmış olan bütün proteinlerin gebelik süresi boyunca anti-mezometrial ve mezometrial desidual lokalizasyonlarda ekspresyonları gösterilmiştir.

Sonuç olarak, kanonikal Wnt- β katenin sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonları arasındaki önemli farklılık ve matriks kompozisyonundaki bu değişikliklerin, östrus siklusu homeostazisinde ve başarılı embriyo implantasyonunda gerçekleşen desidualizasyon, trofoblast invazyonunun kontrolü ve plasantasyon gibi süreçlerde önemli roller üstlendiği savını güçlendirmiştir.

Anahtar kelimeler: İmplantasyon, Wnt, MMP-2, MMP-7, MMP-9, Endometrium, Sıçan, İmmüno Floresan, Real-Time PZR

ABSTRACT

THE ROLE OF WNT- β CATENIN SIGNALING ON THE MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSION IN THE RAT ENDOMETRIUM DURING PERI-IMPLANTATION PERIOD

Rasim HAMUTOĞLU

Master of Sciences Thesis

Department of Histology-Embryology

Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT

2019, 181 pages

The implantation process involves complex and synchronized molecular and cellular events between the uterus and the implanted embryo.

The Wnt- β catenin signaling pathway (canonical pathway) plays a critical role in multiple implantation and decidualization events such as pre-implantation embryo development, blastocyst activation for implantation, uterine growth and decidualization.

During implantation, matrix metalloproteinases are known to play a role in tissue remodeling associated with decidualization in endometrium and embryonic invasion.

In the present study, we aimed to investigate the possible roles and immunolocalizations of MMP-2 (Gelatinase-A), MMP-7 (Matrylsin-1) and MMP-9 (Gelatinase-B) proteins through the Wnt- β catenin signaling pathway in the rat endometrium during peri-implantation period. Paraffin sections were stained by using haematoxyline-eosine and immunofluorescence methods. The mRNA expressions of these proteins were also determined by using Real-Time PCR, obtained fragments by scraping the uterine endometrium through curettage.

Real-Time PCR analysis showed expression of MMP-2, MMP-7 and MMP-9 as well as Wnts and β -catenin in all endometrium mRNA during the peri-implantation period. The expression of MMP-2, MMP-7 and MMP-9 was higher, especially in the

estrous and/or metaestrous. In particular, very strong signals for MMP-7 mRNA were detected in the estrous cycle. During pregnancy, an increase in endometrial MMP expression level was observed from 7.5th day to 9.5th day. However, Wnt7a mRNA was not detected on the 7.5th day of pregnancy.

According to the findings of our immunofluorescence analysis, during the peri-implantation period, Wnt3, Wnt7a, MMP-2 and MMP-9 in the non-pregnant rat endometrium were usually found in the endothelial basal stroma and endothelium of the blood vessels in all stages of estrous cycle; β -catenin in all parts of the endometrium throughout all stages; and MMP-7 has been shown in the localization of the luminal epithelium, endometrial glandular epithelium and endothelium of the blood vessels. All proteins studied in pregnant rat uterus have been shown to be expressed in anti-mesometrial and mesometrial decidual localizations during pregnancy.

In conclusion, significant differences between the expression of canonical Wnt- β catenin signaling pathway proteins and changes in matrix composition were considered to play crucial roles in processes such as decidualization, trophoblast invasion control and placentation in estrous cycle homeostasis and in a successful embryo implantation.

Key Words: Implantation, Wnt, MMP-2, MMP-7, MMP-9, Endometrium, Rat, Immunoflorescence, Real-Time PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteğiyle her an yanımda olan, engin bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, tezin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olan, önerileriyle bana yol gösteren değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız, **Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT** ve değerli hocam **Prof. Dr. Celal KALOĞLU**'na teşekkürlerimi sunarım.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan ve bilgi birikiminden yararlanabildiğim, değerli hocam **Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Yardımları ile yanımda olan ve desteğini esirgemeyen **Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN** ve **Dr. Öğr. Üyesi Erkan GÜMÜŞ**'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her dakika yanımda olan, çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri ve desteklerini esirgemeyerek tezimin oluşturulmasında büyük katkı sağlayan **Ozan ÖNDER** ve **Tuğba DAĞDEVİREN**'e çok teşekkür ederim.

Moleküler çalışmalarında bilgilerini ve yardımlarını eksik etmeyen **Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ**'a ve analizlerimizi itina ile yapan ve bilgi birikimleriyle çalışmamıza katkı sağlayan **Merve Nur AYDEMİR** ve eşi **H. Bilal AYDEMİR**'e teşekkürlerimi sunarım.

Dostlukları ve güleryüzlü halleriyle yanımda olan ve çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen **Arş. Gör. Berna ÖZDENOĞLU KUTLU**, **Meral ŞAHİN** ve birlikte çalıştığım diğer Histoloji-Embriyoloji bölümünden değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca sıkıntılı dönemlerimde tüm fedakârlığı ile yardımlarıma koşan ve sabrını, desteğini her anımda hissettiğim değerli eşim **Merve HAMUTOĞLU**'na çok teşekkür ederim. Hayatımın her anında maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, bana verdikleri emeğin ve sabrın karşılığını asla ödeyemeyeceğim canım babam **Ferid HAMUTOĞLU** ve annem **Levziye HAMUTOĞLU**'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Kardeşlerim **Dr. Nazire Burçin HAMUTOĞLU**, **Umurcan HAMUTOĞLU** ve **Canan HAMUTOĞLU**'na telefonun ucundan dahî olsa verdikleri güven, moral ve manevi desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Rasim HAMUTOĞLU

SİVAS, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR/SİMGELER.....	xii
TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Uterus	5
2.2. İnsanlarda Üreme Fizyolojisi	8
2.2.1. Proliferatif Evre	8
2.2.2. Sekretuar (Luteal) evre	9
2.2.3. Menstrual evre	9
2.3. Ratlarda Östrus Siklusu.....	10
2.4. Pre-implantasyon Embriyo Gelişimi ve İmplantasyon	11
2.5. Pre-implantasyon Döneminde Endometrial Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler.....	13
2.6. Uterin Reseptivite ve İmplantasyon Penceresi.....	14
2.7. İmplantasyon	15
2.7.1. Apozisyon	15
2.7.2. Adezyon	16
2.7.3. İnvazyon.....	17
2.8. Desidualizasyon	19
2.9. Post-İmplantasyon Uterin Gelişim.....	20
2.10. İmplantasyonda Rol Oynayan Moleküller.....	21
2.10.1. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (hCG).....	21
2.10.2. İntegrinler.....	21

2.10.3.	Osteopontin.....	22
2.10.4.	Musinler.....	23
2.10.5.	L-Selektin.....	24
2.10.6.	E-Kadherin.....	24
2.10.7.	Trofonin.....	25
2.10.8.	Ovaryan Hormonlar.....	25
2.10.9.	Sitokinler ve Büyüme Faktörleri.....	26
2.10.10.	Homeobox Genler <i>HOXA10</i> ve <i>HOXA11</i>	27
2.10.11.	İmmunoglobulin Süperailesi.....	27
2.11.	Wnt- β Katenin Sinyal Yolağı.....	28
2.11.1.	β -Katenin Bağımlı Sinyal Yolağı.....	29
2.11.2.	Pre-implantasyon Embriyo Gelişiminde Wnt Sinyali.....	30
2.11.3.	İmplantasyon ve Desidualizasyon Sırasında Wnt Sinyal Yolağı.....	31
2.12.	Matriks Metalloproteinazlar.....	32
2.12.1.	MMP-2.....	35
2.12.2.	MMP-9.....	35
2.12.3.	MMP-7.....	36
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	37
3.1.	Kullanılan Deneş Hayvanları ve Deneş Grupları.....	37
3.2.	Kullanılan Cihazlar:.....	38
3.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler:.....	38
3.4.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:.....	39
3.5.	Doku Preparasyonu.....	40
3.6.	Işık Mikroskopi:.....	40
3.7.	İmmunofloresan Boyama Protokolü:.....	40
3.8.	Semikantitatif Skorlama Yöntemi:.....	41

3.9.	Real Time-PZR Uygulamaları	41
3.9.1.	Total RNA İzolasyonu	42
3.9.2.	cDNA Eldesi	43
3.9.3.	Primerler	44
3.9.4.	Standart PZR Uygulamaları	45
3.9.5.	Real-Time PZR	45
4.	BULGULAR	49
4.1.	Grup-1 Bulguları	49
4.1.1.	Vajinal Sürüntü Bulguları	49
4.1.2.	Östrus Siklusu Işık Mikroskopi Bulguları	50
4.1.3.	Östrus Siklusu İmmünfloresan Bulguları	53
4.2.	Grup-2 Bulguları	84
4.3.	Real-Time PZR Uygulamaları	118
5.	TARTIŞMA	123
6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	146
7.	KAYNAKLAR	148
8.	EKLER	163
ÖZGEÇMİŞ	164

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
MMP	Matriks metalloproteinaz
ECM	Ekstraselüler matriks
CTB	Sitotrofoblast
TIMP	Metalloproteinaz spesifik doku inhibitörleri
EVT	Ekstravillöz trofoblast
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
FSH	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinizan hormon
TE	Trofoektoderm
IHK	İç hücre kitlesi
PE	Primitif endoderm
EGA	Embriyonik genom aktivasyonu
LIF	Lösemi inhibitör faktörü
DKK	Dickkopf proteinleri
hCG	İnsan koryonik gonadotropin hormonu

TD	Trilaminar disk
RM	Reichert membranı
GTC	Dev trofoblast hücreleri
EPC	Ektoplasental koni



TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsanda uterus yerleşimi ve komşulukları	6
Şekil 2.2. Sıçanda uterusun yerleşimi	7
Şekil 2.3. İnsan endometriumunun tabakaları.....	7
Şekil 2.4 Endometrial siklus ve hormonal kontrolü	10
Şekil 2.5. İnsan ve fare pre-implantasyon embriyolarında gelişim zamanlaması ve hücre akıbeti kararları.	12
Şekil 2.6. Trofoblast invazyonunda rol alan proteinaz kaskadı.....	19
Şekil 2.7. Fare modelinde implantasyonla ilişkili sitokinler ve büyüme faktörlerinin aracılık ettiği reseptif endometriumun blastosistin trofoektoderm hücreleri ve luminal epitelial hücreler arasındaki etkileşimler.	23
Şekil 2.8. Wnt/β katenin sinyal yolağı.....	30
Şekil 2.9. Peri-implantasyon olaylarında Wnt sinyali.	32
Şekil 2.10. MMP'lerin yapısı.....	34
Şekil 3.1. Real-Time PZR cevap eğrileri.....	46
Şekil 4.1. Kontrol grupları olan östrus sikluslarının karşılaştırılması	50
Şekil 4.2. Östrus siklusundaki evrelere ait ışık mikroskobik bulgular	52
Şekil 4.3. Proöstrus evresinde <i>Wnt3</i> immünolokalizasyonları	55
Şekil 4.4. Proöstrus evresinde <i>Wnt7a</i> immünolokalizasyonları	56
Şekil 4.5. Proöstrus evresinde <i>β-katenin</i> immünolokalizasyonları.....	57
Şekil 4.6. Proöstrus evresinde <i>MMP-2</i> immünolokalizasyonları	58
Şekil 4.7. Proöstrus evresinde <i>MMP-7</i> immünolokalizasyonları	59
Şekil 4.8. Proöstrus evresinde <i>MMP-9</i> immünolokalizasyonları	60
Şekil 4.9. Östrus evresinde <i>Wnt3</i> immünolokalizasyonları	63
Şekil 4.10. Östrus evresinde <i>Wnt7a</i> immünolokalizasyonları	64

Şekil 4.11. Östrus evresinde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları	65
Şekil 4.12. Östrus evresinde <i>MMP-2</i> immüno­lokalizasyonları	66
Şekil 4.13. Östrus evresinde <i>MMP-7</i> immüno­lokalizasyonları	67
Şekil 4.14. Östrus evresinde <i>MMP-9</i> immüno­lokalizasyonları	68
Şekil 4.15. Metaöstrus evresinde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	71
Şekil 4.16. Metaöstrus evresinde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları.....	72
Şekil 4.17. Metaöstrus evresinde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları	73
Şekil 4.18. Metaöstrus evresinde <i>MMP-2</i> immüno­lokalizasyonları.....	74
Şekil 4.19. Metaöstrus evresinde <i>MMP-7</i> immüno­lokalizasyonları.....	75
Şekil 4.20. Metaöstrus evresinde <i>MMP-9</i> immüno­lokalizasyonları.....	76
Şekil 4.21. Diöstrus evresinde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	79
Şekil 4.22. Diöstrus evresinde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları.....	80
Şekil 4.23. Diöstrus evresinde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları	81
Şekil 4.24. Diöstrus evresinde <i>MMP-2</i> immüno­lokalizasyonları.....	82
Şekil 4.25. Diöstrus evresinde <i>MMP-7</i> immüno­lokalizasyonları.....	83
Şekil 4.26. Diöstrus evresinde <i>MMP-9</i> immüno­lokalizasyonları.....	84
Şekil 4.27. Gebeliğin 7,5. günündeki ışık mikroskop bulguları	84
Şekil 4.28. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları	90
Şekil 4.29. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Wnt7a</i> immüno­lokalizasyonları	91
Şekil 4.30. Gebeliğin 7,5. gününde <i>β-katenin</i> immüno­lokalizasyonları.....	92
Şekil 4.31. Gebeliğin 7,5. gününde <i>MMP-2</i> immüno­lokalizasyonları	93
Şekil 4.32. Gebeliğin 7,5. gününde <i>MMP-7</i> immüno­lokalizasyonları	94
Şekil 4.33. Gebeliğin 7,5. gününde <i>MMP-9</i> immüno­lokalizasyonları	95
Şekil 4.34. Gebeliğin 8,5. gününde ışık mikroskop bulguları.....	97
Şekil 4.35. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Wnt3</i> immüno­lokalizasyonları.....	101

Şekil 4.36. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Wnt7a</i> immünolokalizasyonları.....	102
Şekil 4.37. Gebeliğin 8,5. gününde <i>β-katenin</i> immünolokalizasyonları.....	103
Şekil 4.38. Gebeliğin 8,5. gününde <i>MMP-2</i> immünolokalizasyonları.....	104
Şekil 4.39. Gebeliğin 8,5. gününde <i>MMP-7</i> immünolokalizasyonları.....	105
Şekil 4.40. Gebeliğin 8,5. gününde <i>MMP-9</i> immünolokalizasyonları.....	106
Şekil 4.41. Gebeliğin 9,5. gününde ışık mikroskop bulguları.....	108
Şekil 4.42. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Wnt3</i> immünolokalizasyonları.....	112
Şekil 4.43. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Wnt7a</i> immünolokalizasyonları.....	113
Şekil 4.44. Gebeliğin 9,5. gününde <i>β-katenin</i> immünolokalizasyonları.....	114
Şekil 4.45. Gebeliğin 9,5. gününde <i>MMP-2</i> immünolokalizasyonları.....	115
Şekil 4.46. Gebeliğin 9,5. gününde <i>MMP-7</i> immünolokalizasyonları.....	116
Şekil 4.47. Gebeliğin 9,5. gününde <i>MMP-9</i> immünolokalizasyonları.....	117
Şekil 4.48. Gebelik günlerinde <i>GAPDH</i> , <i>β-katenin</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>Wnt7a</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri	119
Şekil 4.49. Östrus siklusundaki <i>GAPDH</i> , <i>β-katenin</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>Wnt7a</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri	120
Şekil 4.50. Gebelik günlerinde <i>GAPDH</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> ve <i>Wnt3</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri	121
Şekil 4.51. Östrus siklusundaki <i>GAPDH</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> ve <i>Wnt3</i> genlerinin amplifikasyon eğrileri	122
Tablo 3.1. Real-Time PZR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları.....	44
Tablo 4.1. Proöstrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , <i>β-katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immünolokalizasyonları.....	54
Tablo 4.2. Östrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , <i>β-katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immünolokalizasyonları.....	62

Tablo 4.3. Metaöstrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immüno­lokalizasyonları.....	70
Tablo 4.4. Diöstrus evresinde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immüno­lokalizasyonları.....	78
Tablo 4.5. Gebeliğin 7,5. gününde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immünoboyanmasının hücre­sel dağılımı.....	89
Tablo 4.6. Gebeliğin 8,5. gününde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immünoboyanmasının hücre­sel dağılımı.....	100
Tablo 4.7. Gebeliğin 9,5. gününde <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> immünoboyanmasının hücre­sel dağılımı.....	111
Tablo 4.8. <i>Wnt3</i> , <i>Wnt7a</i> , β - <i>katenin</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> ve <i>MMP-9</i> proteinlerinin östrus sik­lus­u ve gebelik günlerine ait <i>Ct</i> de­ğer­leri.....	118

1. GİRİŞ

Memelilerde implantasyon; hem embriyodan hem de endometriumdan köken alan hücresel, hormonal ve moleküler faktörlerin rol aldığı kompleks ve hala tam aydınlatılmamış bir süreçtir. Embriyonun öncelikle desidua içerisine yerleşip sonra da annenin dolaşım sistemine plasentayı oluşturmak için ulaşmasını kapsayan bir seri işlem olarak tanımlanmaktadır. Bu esnada endometrium ile embriyo arasında büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve prostoglandinler ile oluşan karmaşık bir diyaloglar zinciri vardır. Embriyo bu etkenlerle epitele yapışmakta, bazal membrana doğru inmekte ve stromaya invaze olmaktadır.

Peri-implantasyon periyodu sırasında, sitokinler gibi bazı moleküller, büyüme faktörleri ve hormonlar embriyo ve maternal endometrium arasında gerçekleşen iletişimde kilit rol üstlenirler.

Wnt sinyal iletimi, embriyo gelişimi ve doku oluşumu için gerekli olan başlıca sinyal yollarından birisidir. Yapılan çalışmalar bu sinyal yolağında ortaya çıkan sorunların kusurlu embriyo ve dokuların oluşumuna neden olduğunu göstermiştir (Logan ve Nusse, 2004). Dolayısıyla, Wnt sinyal yolağının bozulması gelişim bozukluklarına ve kansere neden olmaktadır (Logan ve Nusse, 2004).

Embriyo implantasyonu ve uterus desidualizasyonu ile ilişkili sayısız sinyal molekülleri ve yolları araştırılmış olmasına karşın, embriyo-uterus arasındaki etkileşimler hala tam olarak bilinmemektedir. Memeli implantasyonunda Wnt sinyal yolağının rolünün öneminin anlaşılması küresel genomik mikroarray taraması ve transgenik fare modellerinin kapsamlı uygulamaları sayesinde elde edilmiştir (Zhang ve Yan, 2016). Son yıllardaki araştırmalar, Wnt sinyal yolağının pre-implantasyon embriyo gelişimi, implantasyon için blastosist aktivasyonu, uterus gelişimi ve desidualizasyon gibi çoklu implantasyon ve desidualizasyon olaylarında oldukça kritik bir role sahip olduğuna dair artan sayıda kanıt sağlamıştır (Zhang ve Yan, 2016).

Wnt gen ailesinin en az 19 üyesi insanlar ve farelerde tanımlanmıştır. Bu ailenin her bir üyesi çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve göç gibi farklı hücresel fonksiyonlarda anahtar bir rol üstlenir. Wnt proteinleri; frizzled proteinleri ve lipoprotein reseptör-ilişkili proteinler 5 ve 6 (LRP5/6) olan iki reseptör ailesine bağlanarak klasik kanonikal Wnt

sinyal yolağını aktive eder. Sonuç olarak, stabilize edilmiş β -katenin sitoplazmada birikir ve Tcf/Lef transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girmek için çekirdeğin içine transloke olur, böylece hedef genlerin transkripsiyonu etkilenir (Chen vd., 2009).

Wnt genleri; doğumdan sonra dişi üreme sisteminin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını başlatan epitelyal-mezenşimal etkileşimleri yönlendirmede kritik bir role sahiptir. Ayrıca bu genler embriyogenez ve erginlik sırasında belirli bir ekspresyon modeli sergilemektedir (Carta ve Sassoon, 2004; Kikuchi vd., 2011).

Spesifik Wnt sinyal yolağı üyeleri üreme hormonları tarafından kontrol edilen endometriumdaki siklik değişimlere (menstrual döngü) ilaveten desidualizasyon ve endometrial bez oluşumları gibi endometrial olaylarda önemli olduğu belirtilmiştir (Tepekoy vd., 2015). Kanonikal (Wnt- β katenin) yolakla aktive olan **Wnt1**, **Wnt3**, **Wnt3a**, **Wnt7a** ve **Wnt8** ile non-kanonikal yolakla aktive olan **Wnt2**, **Wnt4**, **Wnt5a**, **Wnt5b**, **Wnt6**, **Wnt7b** ve **Wnt11** farelerde, insanlarda ve koyunlarda perimplantasyonda önemli roller oynadığı kanıtlanmıştır (Hayashi vd., 2007; Chen vd., 2009; Sonderegger vd., 2010). Wnt sinyal üyeleri ayrıca menstrual döngünün farklı fazlarında farklı ekspresyonlar göstermektedir.

β -katenin hem glandular hem de stromal hücrelerde eksprese edilir ve endometrial siklusun hem proliferatif hem de sekresyon fazı sırasında yüksek seviyede eksprese edilir. Ayrıca GSK-3 β ve Dvl-1 de bu fazlarda eksprese edilir (Tulac vd., 2003).

Uterus gelişimiyle de ilişkili olan Wnt gen ailesinin en önemli üyelerinden biri Wnt7a'dır. Wnt7a ve Wnt5a uygun uterus bez oluşumu için gereklidir, ayrıca Hoxa-10 ve Hoxa-11 gibi bazı Hox genlerinin regülasyonunda görev alır (Miller ve Sassoon, 1998).

Uygun Wnt7a ve β -katenin ekspresyonu üreme süreci sırasında spesifik zaman noktalarında gereklidir ve bu proteinlerin ifadelerinin bozulması, embriyo implantasyonu için gerekli reseptif aşamayı başarmak için uterusun hazırlanmasında kusurlara sebep olarak doğurganlık bozukluklarına neden olabilir (Mohamed vd., 2005; Jeong vd., 2009; Spencer vd., 2012).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstraselüler matriks (ECM) ve bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip ve aktif bölgesinde çinko iyonu (Zn^{+2}) içeren multijen bir proteinaz enzim ailesidir. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için organik olarak organomerküriyel bileşenlerle aktive olmaları gereklidir. Substrat özgüllüklerine göre 4 alt gruba ayrılırlar, bunlar kollajenaz, stromelisinler, membran-tipi matriks metalloproteinazlar ve jelatinazlardır (Matrisian, 1992). Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenez, yara iyileşmesi, embriyogenez, embriyo implantasyonu gibi fizyolojik durumlarda ve aynı zamanda tümör hücre invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Daha önceden tanımlanmış matriks metalloproteinazların 7 üyesine ilaveten, bugün 18 den fazla enzim bildirilmektedir (Catania vd., 2007).

MMP-2 ve MMP-9 bazal membranın önemli bir yapısal bileşeni olan Tip IV kollajeni degrade eden jelatinazlardır (Catania vd., 2007). Önceki çalışmalar MMP-2 ve MMP-9'un rolünün hücre invazyonunda ekstraselüler matriksin bir bileşeni olarak göstermiştir (Zhao vd., 2011).

İnsan pre-implantasyon embriyosu, bazal endometrial membranlarının temel bileşeni olan kollajen IV'ü degrade edebilme özelliğine sahip MMP'leri üretirler ve bu proteinaz aktivitesi zamanla kültürde artış gösterir (Puistola vd., 1989). İnvaziv ilk trimester insan sitotrofoblastları (CTBs) *in vitro* koşullarda ECM degradasyon aktivitesini gösteren bir takım MMP'leri sentezler. Sadece MMP'lerden bazıları non-invaziv hücrelerde geç gestasyonda bulunurlar (Fisher vd., 1989). Tip IV kollajenazlar arasında, 72 kDA ağırlığındaki Jelatinaz A (MMP-2) non-invaziv fibroblastlar tarafından üretilirken, 92 kDA ağırlığındaki Jelatinaz B (MMP-9) CTB'ler için oldukça özgündür ve invazyon için anahtar bir role sahiptir (Fisher vd., 1989; Librach vd., 1991; Bischof vd., 1995). Diğer verilerde, *in situ* extravillöz trofoblast (EVT) hücreleri tarafında eksprese edilen MMP-2 ve MMP-9'un trofoblast invazyonunun düzenlenmesinde önemli olduğu belirtilmiştir.

Bazı faktörler MMP'leri inhibe etmektedir. Bunların arasında, metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMPs) *in vivo* koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesinde kritik rollere sahiptir. Ovulasyon, implantasyon, gestasyon, laktasyon ve involüsyon dahil üremeyi içeren pek çok süreç TIMP ve/veya MMPs aktivasyonuna

gerek duymaktadır. Fonksiyonel MMP-9 ve TIMP-1'in fertilizasyondan sonra blastosist implantasyonu sırasında ifade seviyeleri artmaktadır. Blastosistin luminal epitel ve stromaya invajinasyonun sağlanması MMP'ler ile ilişkilidir. Sıçan embriyosu gelişimi sırasında MMP'lerin ana gruplarından olan kollajenaz, jelatinaz ve stromelisin ifade seviyeleri embriyonun uterus duvarına implante olduğu sırada kademeli olarak artış gösterir. TIMP-1 mRNA miktarında bu dönemde 6-8. günlerde gözlenen pik, embriyo gelişiminde en fazla invazyonun gözlendiği dönemle uyumludur (Khokha ve Waterhouse, 1994; Murray ve Lessey, 1999).

MMP ekspresyonu ilginç bir şekilde dokunun tipine göre farklılık gösterir. MMP ekspresyonunun en kayda değer değişimi insan endometriumu ya da doğum sonrası fare uterusu gibi yoğun döngüsel yapılanma geçiren dokularda geliştiği ortaya çıkmıştır.

Endometrium değişmeye başladığında ve östrojen hormonu seviyesi progesterona göre nispeten arttığında, insan endometrium luminal epitel hücrelerinde MMP'lerin yüksek aktivitesi; menstrual döngünün proliferatif, geç sekretuar ve menstrual fazları sırasında gözlenmiştir. Özellikle ekstrakorporeal fertilizasyon durumunda başarılı embriyo implantasyonunun, uterus durumuna ve MMP'lerin aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir. MMP ekspresyonu, içeriği ve aktivitesi seks hormonları tarafında regüle edilir. Progesteron ve östrojen endometrial hücre kültürlerinde metalloproteinazların aktivitesini düşürürler fakat hormonların yoksunluğu durumunda, menstruasyon döngüsü sırasında uterin luminal epiteli için tipik olan endometrial hücrelerini morfolojik değişimlerini takiben metalloproteinaz aktiviteleri dramatik bir şekilde artar (Natoli vd., 2005). Bu çalışmada sıçan endometriumunda peri-implantasyon döneminde *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aracılığıyla immüno lokalizasyonları belirlenerek immüno floresan yöntemi ile olası rollerinin araştırılması ayrıca uterus endometriumu küretaj yolu ile kazınarak alınan parçalardan bu proteinlerin mRNA ekspresyonlarının Real-Time PZR ile incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile insan implantasyonunda ortaya çıkan sorunların giderilmesi için bir hayvan modeli üzerinden yorum yapılabilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

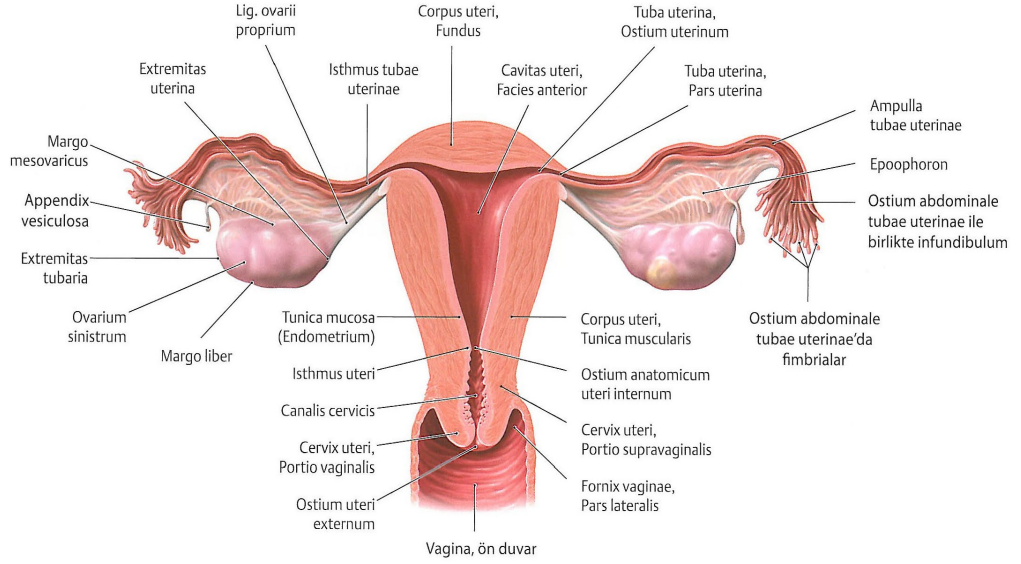
2.1. Uterus

Uterus; pelvis boşluğu içinde rektumun önünde, mesanenin ise arkasında yer alan armut şekilli ve kalın duvarlı müsküler bir organdır. Doğurmamış bir erişkinde, boyu 8 cm, genişliği 5 cm ve kalınlığı 2.5 cm'dir (Yıldırım, 2015). Uterusun tuba uterinaya superolateral yönden ve vajinaya inferior yönden bağlanan bir lümeni bulunur. Organın en büyük kısmı olan **gövdeye** sağ ve sol tuba uterinolar girer ve bunların arasındaki kavisli üst kısım **fundus** adını alır. Uterus **istmus**'ta daralır ve silindirik bir yapı olan **serviks** içinde sonlanır. Serviksin lümeni yani **servisk kanalı** her bitimde daralmış açıklıklara sahiptir: **iç ağız** (internal os) ana uterin lümene ve **dış ağız** (eksternal os) vajinaya açılır.

Ovaryum ve tuba uterinolar ile ilişkide olduğu bağlar ve mezenterler ile desteklenen uterus duvarı 3 esas tabakaya sahiptir:

- Dıştaki bağ dokusu tabakası olan **perimetrium**, bağlar ile devam eder. Bazı bölgeler adventisyal olsa da mezotel ile çevrili seroza büyük kısmını oluşturur.
- **Kas duvarı** ya da **miyometrium**, bağ dokusu ile desteklenmiş, düz kas içeren kalın bir kas tabakasıdır. Düz kasın iç ve dış tabakalardaki lifleri genellikle organın uzun eksenine paralel düzenlenmiş birbirine karışmış tabakaları oluştururken, orta tabaka dairesel bir oluşum gösterir. Dairesel tabaka, zengin damar yapısından dolayı genellikle **stratum vaskülare (st. vaskülare)** olarak adlandırılır.
- **Endometriumun** lamina propriası ya da stroması bol miktarda fibroblast ve ara madde ile birlikte esas olarak demetler oluşturmamış Tip III kollajen içerir. Tek katlı prizmatik epiteli hem silli hem de salgılayıcı hücreler içerir. Salgılayıcı hücreler endometriumun tüm kalınlığı boyunca uzanan çok sayıda **uterus bezlerini** döşer. Endometriumun iki konsantrik tabakası bulunur:

- a. **Fonksiyonel tabaka (St. funksionalis):** Yüzeysel işlevsel tabaka ara maddeden zengin süngerimsi bir lamina propriaya sahiptir ve yüzeysel epiteliyle birlikte bezlerin uzunluğunun büyük bir bölümünü içerir. Menstrual siklus sırasında hormonal değişikliklerin bir sonucu olarak, ayda bir dökülmesi ve yenilenmesi söz konusudur.
- b. **Bazal tabaka (St. bazalis):** Yaklaşık 1 mm veya daha az kalınlıkta, menstruasyon sırasında değişmeden kalan, endometriyumun miyometriuma komşu derin tabakasıdır. **Endometrial bezler** fonksiyonel tabaka döküldükten sonra endometriyum epitelinin yenilenmesi için (re-epitelizasyon) bir kaynak oluşturan bazal hücreleri içerir.

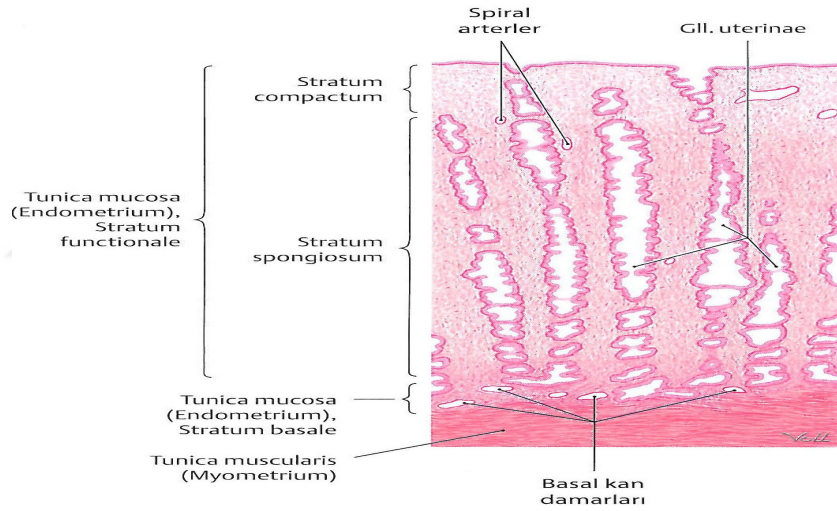


Şekil 2.1. İnsanda uterus yerleşimi ve komşulukları (Yıldırım, 2015)

Sıçanlarda ise uterus; fetusların embriyonik gelişmesini gerçekleştirdiği iki adet uterus boynuzuna ayrılır ve serviks üzerinde iki uterin boynuzun birleştiği kısa bir uterus gövdesinden oluşur.



Şekil 2.2. Sıçanda uterusun yerleşimi (Siyah ok: Uterin boynuzlar; mavi ok: uterin gövde)



Şekil 2.3. İnsan endometriyumunun tabakaları. İnsan endometriyumu, fonksiyonel tabaka (st. fonksiyonalis) ve bazal tabaka (st. basalis) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Fonksiyonel tabaka her döngüde yeniden düzenlenir, bazal tabaka ise sabit kalır. Endometriyumun apikal yüzeyi tek bir luminal epitelyal hücre tabakası ile kaplanır ve lümen invajinasyonları uterus bezlerini oluşturur. Altta yatan stromal hücreler, endometriyumun çoğunluğunu oluşturur ve bazal tabakadaki kök-benzeri hücreler, fonksiyonel tabakadan her devrenin rejenerasyonuna izin verir. Endometriyum, altta yatan miyometriumdaki kan damarlarından kaynaklanan fonksiyonel tabaka içindeki spiral arterlerle vaskülarize edilir (Muter vd., 2015).

Endometriyum embriyonun invazyonuna izin veren, menstrual siklus ve gebelik süresince değişime uğrayan dört farklı hücre grubu içerir; bunlar luminal ve glandular epitelyal hücreler, çoğu fibroblast olan stromal hücreler, endotelyal hücreler ve endometriyuma göç eden immün sistem hücreleridir. Epitelyal hücrelerde gerçekleşen

morfolojik değişimler embriyonun adezyon sürecine katılırken, stromal hücreler proliferasyon evresindeki östrojen kaynaklı ilk gelişiminin ardından geç-sekresyon evresinde progesteronun etkisi altında desidual hücelere farklılaşır (King, 2000; Horne ve Blithe, 2007). Endometrial stromal hücrelerin trofoblast invazyonu için reseptif bir substrat sağladıkları ayrıca oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları sağlayarak ve allojenik fetusun immünolojik toleransına yardımcı olarak embriyo implantasyonunu destekledikleri gösterilmiştir (Weimar vd., 2013).

2.2. İnsanlarda Üreme Fizyolojisi

Östrojen ve progesteron dişi üreme sistemini kontrol ederler. Epitel hücrelerinin ve bağ dokusunun çoğalması ve farklılaşması bu hormonların etkisiyle gerçekleşir. Menopozdan sonra bu hormonların sentezinde görülen azalma, üreme organlarında genel bir gerilemeye neden olur.

Puberte sonrasında, hipofizin ön lobunun uyarısıyla ovaryum hormonları menstrual siklus sırasında endometriumun döngüsel-yapısal değişiklikler geçirmesine neden olur. Menstrual döngü, ergenlikten menopoza kadar devam eden kadınlarda ortalama 28 gün boyunca tekrarlayan olaylar serisidir. Menstrual döngü 3 evreden oluşur:

2.2.1. Proliferatif Evre

Menstruasyondan sonra, uterus mukozası ince olup, taşıdığı bezler düz ve dar lümenlidir. Yenilenme fazının başlangıcı ovaryum foliküllerinin arasından küçük bir grubun hızla büyümesine denk gelir; bu foliküller döngünün başında pre-antral folikülden antral folikül aşamasına geçiş aşamasında olan foliküllerdir. Teka internaları geliştiğinde bu foliküller aktif olarak östrojen salgılamaya başlar ve östrojenlerin plazmadaki birikimleri giderek artar, bu da endometriumun proliferasyonunu sağlar (Çiçek vd., 2004).

Östrojenin uyarıcı etkisiyle hem epitelde hem de lamina propriadaki hücrelerde mitoz bölünme gerçekleşir ve menstruasyon sırasında kaybedilen endometriumun kalınlığı tekrardan oluşmaya başlar. Spiral arterler uzar, spiral tübüler bezlerin epitel hücreleri yukarıya doğru göç eder ve bezler kıvrımlı bir şekil alır, bu evreye '**proliferasyon evresi**' denir.

Yenilenme fazı sırasında endometrium tek katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Artan östrojen; folikül uyarıcı hormon (FSH) salgısını baskılar, ancak östrojen salgısı belli bir düzeye gelince lüteinizan hormon (LH) salgısını uyarır ve LH'nin ani artışıyla ovulasyon meydana gelir (Çiçek vd., 2004; Kierszenbaum, 2006).

2.2.2. Sekretuar (Luteal) evre

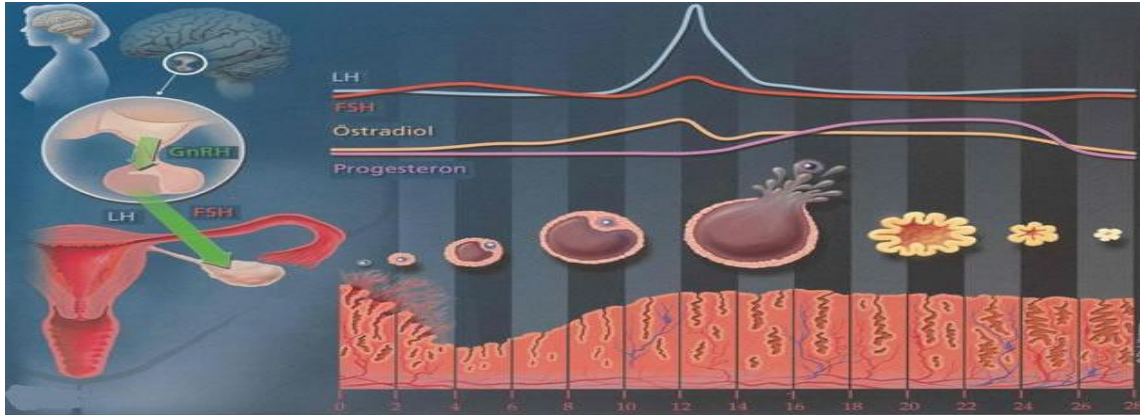
Ovulasyondan sonra korpus luteum tarafından üretilen progesteronun etkisiyle sekretuar evre başlar. Bu fazın önemli özelliklerinden biri üretilen progesteron nedeniyle, östrojenin etkisiyle gelişmiş olan bezlerin son derece kıvrımlı bir hale gelmesidir. Endometriumda yer alan epitel hücreleri vaskülarize olur ve glikojen biriktirir. Luteal evrenin ilerlemesiyle depolanan glikojen vakuelleri hücrenin tabanından lümenine hareket eder ve bezler salgılarını artırır. Daha sonra glikojen miktarı azalır ve glikoprotein salgı ürünleri bezlerin lümenini genişletir. Bu fazda endometrium, salgıların birikmesi ve stromadaki ödem sonucu maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır. Bu evreye '**sekresyon evresi**' denir (Carlos ve Carniero, 2003; Çiçek vd., 2004).

Eğer fertilizasyon gerçekleşmişse, embriyo uterusu taşınır ve ovulasyondan yaklaşık 7 gün sonra salgılama evresinde bulunan uterus epiteline tutunur.

Embriyo implantasyonunun tehlikeye girmemesi için progesteron miyometriumun düz kas hücrelerindeki kasılmaları baskılar.

2.2.3. Menstrual evre

Oositin döllenişi ve embriyonun tutunması gerçekleşmediği zaman, korpus luteumun işlevi yaklaşık 14 gün sonra sona erer. Bunun sonucunda kandaki progesteron ve östrojen düzeyleri hızla düşer. Bu, spiral arterlerde kasılmalara neden olur, kan akımı engellenir ve oluşan iskemi damar duvarının ve endometriumun fonksiyonel tabakasının bir kısmının ölümüne/nekrozuna neden olur. Kasılmaların yukarısında bulunan kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Endometriumun fonksiyonel tabakasının bir kısmı ayrılır ve endometriumun bazal tabakası, interstisyel sıvı kaybına bağlı olarak büzülür (Sadler, 2005). Bu evreye '**menstrual evre**' adı verilir.



Şekil 2.4. Endometrial siklus ve hormonal kontrolü. Burada normal menstrual döngünün seyrini görebilirsiniz. Paralel olarak, döngünün her aşamasında değişiklik gösteren kadın hormonlarının seyrini göreceksiniz (Reinhard ve Stoll, 2006).

2.3. Ratlarda Östrus Siklusu

İnsanlarda yaklaşık 28 gün süren menstrual siklusun, ratlarda 4-5 günde gerçekleşmesinden dolayı, sıçanlar ile yapılan çalışmaların çok kısa sürede tamamlanabilmesi sağlanmaktadır. Kısa bir döngü uzunluğu, kemirgenlerin üreme döngüsü sırasında meydana gelen değişikliklerini araştırmak için ideal bir hayvan modelidir ve tarihsel olarak ratlar, tercih edilen türler olmuştur. Bu da rat modelinin bir avantajı olarak görülmektedir. 4 alt dönemi kapsayan siklus döneminde proöstrus yaklaşık 12 saat, östrus evresi 9-15 saat, metaöstrus evresi 21 saat ve diöstrus evresi ise ortalama 57 saat sürer (Mülazımoğlu vd., 2005).

Proöstrus evresinde; LH ve östradiol en yüksek düzeye ulaşır. Östradiol, evrenin başlangıcında en düşük düzeydeyken evrenin ortalarına doğru en yüksektir. Proöstrus evresinde endometrium yüzey epitelinin proliferasyon hızı azalmaya başlar ancak yine de maksimum proliferasyon gerçekleşir. Bu aşamada, uterus luminal epitel hücrelerinin boyutları artarak yüksek prizmatik hücrelere dönüşür (Mendoza-Rodriguez vd., 2002). Mitotik figürler evrenin sonunda yok olmasına rağmen, bezlerin sadece sınırlı veya epitelyal hücre dejenerasyonu olmadan (dikkate değer endometrial epitelyal hücre dejenerasyonunun görünümü, proöstrusun sonunu/östrusun başlangıcını işaret eder) ve epitel tabakası ve küçük enflamatuar hücre infiltrasyonu ile birlikte sık görülen mitozlar vardır. Endometrial damarlar daha belirgin hale gelir ve stromada ödem görülebilir, lümen genellikle evrenin sonuna doğru belirgin bir şekilde genişler. Östrus evresine

geçerken östradiol düzeylerinde hafif bir azalma olur. FSH'da da yavaş bir artış görülür (Mendoza-Rodriguez vd., 2002).

Östrus evresinde; LH hormonunun en yüksek düzeye ulaşması sonucu ovulasyon gerçekleşir. Bu durum proöstrus-östrus geçişi arasında gerçekleşmektedir. Uterus yüzey epitelinde proliferasyon yoktur ancak hücre boyutu maksimum uzunlukta olduğu için epitelde kalınlaşma görülmektedir. Epitelin bazı yerlerinde yalancı çok katlı epitel de izlenir. Bu evrede epitelde apoptotik hücreler görülmektedir (Mendoza-Rodriguez vd., 2002). Bu şekilde endometrial epiteldeki değişiklikler östrusun başlangıcını tanımlamaktadır; önce bezlerde hücresel dejenerasyon/nekroz ortaya çıkar, ardından da uterus yüzey epiteli oldukça belirgin hale gelir. Bunu mitotik aktivite ve lökosit infiltrasyon kaybı eşlik eder. Uterus boşluğu iyice genişlemiş ve sıvı birikimi de artmıştır. Yüzey epitelindeki bu değişiklikler uterusun blastosist implantasyonun gerçekleşmesini sağlar (Orchard ve Murphy, 2002).

Metaöstrus evresinde; kan damarları ve bezlerde azalma görülmektedir. Ayrıca değişken bir lökosit infiltrasyonu vardır. Progesteron hormonu evrenin ortalarından itibaren yüksektir. Bu fazda korpus luteum oluşumu gerçekleşir (Hubscher vd., 2005).

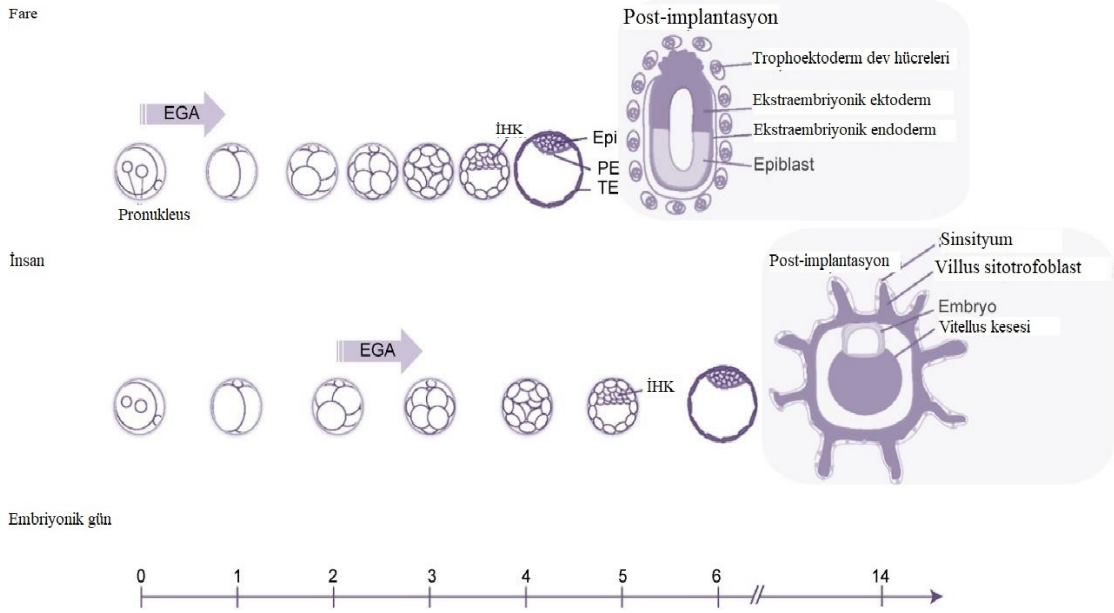
Diöstrusun başlangıcında, uterus inaktiftir ve boynuzlar belirgin bir damarlanmaya sahip değildir ve genellikle yarı benzeri bir lümeneye sahiptirler. Başlangıçta birkaç mitotik aktivite vardır ve bezler özellikle inaktiftir, ancak evrenin ilerlemesi sırasında mitotik aktivitede bir miktar artış vardır. Ayrıca, sonuna doğru, subepitelyal stromada hafif bir ödem görülebilir. Bu aşama sırasında, östrojen (E2) seviyesi artmaya başlar (Walmer vd., 1992). Progesteron sekresyonu bu evre boyunca yüksektir.

Farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem vajinal sürüntüdür. Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile ilintili hücre tiplerinin (epitelyal veya kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır.

2.4. Pre-implantasyon Embriyo Gelişimi ve İmplantasyon

Bir blastosist oluşumuyla sonuçlanan pre-implantasyon embriyo gelişimi ve farklılaşması, implantasyon için gerekli bir süreç olan embriyonik genomun aktivasyonunu gerektirir. Embriyonik genomun aktivasyonu üzerine, embriyo bir blastosist oluşturmak üzere hızla büyümeye başlar. Bir insan blastosist pre-implantasyon embriyo gelişimi 5. ve 6. günler arasında oluşur ve tipik olarak yaklaşık

256 hücre içerir. Buna karşılık, 3. ve 4. günler arasında oluşturulan bir fare blastosist hücrelerinin, bir hücre bölünmesinin daha az olduğu ve yaklaşık 164 hücre içerdiği düşünülmektedir (Niakan vd., 2012). Bu gecikmiş embriyo gelişimi, embriyonik genom aktivasyonu (EGA), sıkışma ve blastosist oluşumunun zamanlamasında bir gecikme içerir.



Şekil 2.5. İnsan ve fare pre-implantasyon embriyolarında gelişim zamanlaması ve hücre akıbeti kararları. Embriyonik genom aktivasyonu (EGA), iç hücre kitlesi (İHK), epiblast (Epi), primitif endoderm (PE), trofoektoderm (TE) (Niakan vd., 2012).

Blastosist evresinde embriyolar olgunlaşır ve implantasyon yeterliliğini kazanmak için zona pellusida'dan kurtulur. Farklılaşmış ve genişlemiş blastosist üç hücre tipinden oluşur: dış polarize epitel trofoektoderm, ilkel endoderm ve pluripotent iç hücre kütlesi (İHK). İHK uygun embriyo için gelecek hücre soylarını sağlar (McLaren, 1990; Hogan vd., 1994) ve gelişim sürecindeki ilk epitel hücre tipi olan trofoektoderm, uterin luminal epitel ile ilk fiziksel ve fizyolojik bağlantıyı sağlar. Benzer morfolojik özelliklere sahip içi boş bir hücre kütlesi olarak görülen keseli blastosistlerde İHK tanımlanamaz. Trofoektoderm oluşumu ve ardından trofoblast dokuya dönüşmesi implantasyonun başlatılması ve hamileliğin gerçekleşmesi için çok önemli adımlardır. Trofoblast hücreleri, konseptus ve maternal fizyolojiyi otokrin, parakrin ve/veya jukstakrin şekilde etkileyen çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar üretirler (Petraglia vd., 1998; Roberts vd., 1999).

Pre-implantasyon embriyo gelişimi normalde zona pellusida'da gerçekleşir. Bununla birlikte, çeşitli deneysel manipölasyonlar ile zona pellusida'nın çıkarılması, *in vitro* koşullarda embriyonik gelişimi engellemez (Sherman, 1978), bu glikoprotein bariyerinin gelişimin ilerlemesi için esas teşkil etmediğini düşündürmektedir. Zona pellusida'nın yapışkan olmayan doğasının, embriyoların tuba uterinaya ve buradan uterusu doğru yolculuklarını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Fareler ve sıçanlarda, üreme sistemi içinde yer alan blastosist aşamasındaki normal embriyonik gelişim, ovaryan östrojen ve progesteronun varlığını gerektirir (McLaren, 1971). Bu hormonların yokluğunda embriyo sayısı azalmış ve embriyo başına düşen hücre sayısı azalmıştır (Bowman ve McLaren, 1970), ancak östrojen ve progesteron tedavisi bu kusurları tersine çevirir (Roblero ve Garavagno, 1979). Çünkü östrojen ve/veya progesteronun doğrudan pre-implantasyon embriyosuna etki ettiğine dair ikna edici bir kanıt yoktur (Paria vd., 1998). Embriyonik gelişimin, bu hormonların etkisi altındaki üreme sisteminden kaynaklanan büyümeyi teşvik eden faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, kültür ortamında normal gelişim, implantasyon öncesi embriyoların kendi büyüme faktörlerini üretebildiklerini göstermektedir (Paria ve Dey, 1990). Aslında, embriyo içerisinde birkaç büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri ekprese edilir ve bu faktörlerin embriyonik gelişim ve fonksiyonlar üzerindeki çoğalma ve farklılaşma etkileri gözlemlenmiştir (Paria ve Dey, 1990; Carson vd., 2000; Paria vd., 2000).

2.5. Pre-implantasyon Döneminde Endometrial Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler

İmplantasyon için gerekli reseptivitenin elde edilmesinde endometriumun proliferasyon fazından sekretuar faza geçişi oldukça önemlidir. Primer endokrin gereksiniminin temelini progesteron hormonunun varlığı oluşturmaktadır. Endometrium orta-sekretuar fazda 10-14 mm kalınlığında olup sekretuar aktivite tepe noktasına ulaşmıştır. Endometrial bez epiteli hücrelerinin glikojen ve lipid içeriği artarken, endometrial luminal epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde pinopod oluşumu gözlenir (Günalp, 2007).

Östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında otokrin ve parakrin yollarla stromada değişiklikler meydana gelir. Stromal bağ doku desiduaya farklılaşırken, stromal hücreler de daha büyük ve poligonal hücreler olarak izlenen desidual hücrelere

farklanırlar. Desidualizasyon olarak tanımlanan bu endometrial stromal reaksiyon, implantasyon olmasa da, implantasyon penceresi döneminde endometrial stromada gerçekleşmektedir. Desidualizasyon sürecinde stromal hücreler, kollajen-IV, heparan sülfat, proteoglikan ve laminin-2 ve laminin-4 içeren bir ekstrasellüler matriks üretir. Desidual hücrelerin mitotik aktiviteleri artar ve sitonükleer genişlemeleri ve bazal membran oluşumu ile tanımlanan predesidual hücreler olarak ayırt edilebilirler ve ilk olarak siklusun 22-23. günlerinde kan damarlarını çevreleyen alanlarda görülürler. İmplantasyon olmadığı takdirde desidua geçici bir doku olarak gözlenir. İmplantasyonun gerçekleşmesi ile desidual reaksiyon devamlılık gösterir (Güenalp, 2007; Aplin vd., 2008).

2.6. Uterin Reseptivite ve İmplantasyon Penceresi

Endometrial reseptivite kavramı, endometriumun embriyo implantasyonuna izin verdiği ve blastosistin uterus yüzey epiteline sabitlenerek içine nüfuz ettiği süreçtir. Bu süreç sırasında, endometrial ve embriyonik hücreler arasında kompleks ve senkronize etkileşimler gerçekleşir. İnsanlarda reseptivite periyodu, düzenli bir menstrual döngünün 20 ilâ 24. günleri arasında (ovulasyon sonrası LH pikinden 6 ilâ 10 gün sonrası) gerçekleşir (Lessey, 2011; Rashid vd., 2011). Uterin reseptivitenin anahtarı, blastosist büyümesini, bağlanmayı ve sonraki implantasyon olaylarını sürdüren dinamik ve tam kontrollü moleküler ve hücrel olaylardır. Bu dinamik süreç, uterus reseptivitesini belirtmek için ovaryan steroidleri ile birlikte çalışan sitokinler, homeobox transkripsiyon faktörleri ve gelişimsel genleri kapsayan çeşitli genleri içerir.

Ovaryan steroidleri olan progesteron ve östrojen, uterus reseptivitesini yönlendiren başlıca hormonlardır. Bu hormonların senkronize üretimi, blastosistin bağlanmasını ve implantasyon sürecini başlatmasını sağlayan uterusun yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine aracılık eder.

Bir dereceye kadar, uterin reseptivitenin penceresi esnektir ve farklı hormonal ortamlarda modifiye edilebilir. Farelerde, blastosist normal uterin reseptivite penceresinin dışında implantasyonu başlatabilir (Song vd., 2007). Örnek olarak, blastosistler yalancı gebeliğin 5. gününde transfer edildiğinde reseptif olmayan uterusu bağlanma reaksiyonunu başlatabilirler, ancak normal blastosistler 6. günde yalancı gebelikteki uterusu transfer edildiğinde implantasyon gerçekleşmez (Song vd., 2007). Ekzojen progesteron takviyesi, implantasyon penceresini 6. günde sürekli lösemi

inhibitör faktör (LIF) ekspresyonu ile uzatabilir (Song vd., 2007). Bununla birlikte, bu ertelenmiş embriyo implantasyonu, farelerde doğumdan önceki embriyonik ölümlere yol açar ve genellikle insanlarda erken gebelik kaybı riskiyle ilişkilidir (Wilcox vd., 1999). Progesteron ayrıca endometrial reseptiviteyi indükler ve implantasyon penceresi süresince izlenen pinopodlar bu süreçte morfolojik varlıkları ile implantasyon penceresini karakterize etmektedirler. Pinopodlar, endometrial epitelin apikal yüzeyinde bleb (büyük kabarıklık) benzeri çıkıntılardır (Usadi vd., 2003). Bu yapılar birkaç mikrometre genişliğindedir ve uterus lümeninde mikrovillus seviyesinin üzerine çıkmaktadır. Pinopod ekspresyonu, varsayılan implantasyon penceresine karşılık gelen menstrual döngüde maksimum 2 günlük kısa bir süre ile sınırlıdır (Aghajanova vd., 2003). Progesteron indüksiyonuyla oluşan ve implantasyon penceresi süresince luminal epitel yüzeyinde izlenen pinopodlar, blastosistin luminal epitel ile temasının sağlanmasında görev alırlar ve uterin boşluktaki sıvının absorpsiyonunda rol oynamaktadırlar (Dey vd., 2004; Wang ve Dey, 2006; Ovalle ve Nahirney, 2009). Üstelik blastosist implantasyonuna yönelik endometrial reseptivite için ifadesi gerekli bir homeobox geni olan Hoxa-10, pinopod gelişiminde önemli bir role sahiptir. Gerçekten de, Hoxa-10 ifadesini bloke etmek, pinopodların sayısını önemli ölçüde azaltır. Hoxa-10, endometrial stromal hücre (ESC) proliferasyonu ve epitelyal hücre morfogenezini düzenleyerek endometriumda ikili bir rol üstlenir (Bagot vd., 2001).

2.7. İmplantasyon

İmplantasyon, blastosistin uterus endometriumu ile yakın fiziksel ve fizyolojik temas içine girdiği bir süreçtir. Embriyo implantasyonu, uterus ve embriyodaki birçok faktör tarafından düzenlenen son derece karmaşık bir fizyolojik süreçtir ve altında yatan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. İmplantasyon; apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarını içeren üç ardışık evrede gerçekleşir:

2.7.1. Apozisyon

Apozisyon, blastosistin endometrial yüzeye ilk yapışmasıdır. Memelilerde, özellikle kemirgenlerde apozisyon fazı başlamadan önce stromal bir ödem meydana gelir. Stromal ödem, uterus lümeninin daralmasından dolayı trofoektodermin mikrovillusları ile luminal epitelin parmak benzeri çıkıntılar oluşturması ve birbirine yakınlaşmalarına neden olur. İnsanlarda, blastosist implantasyonunun ilk basamağı olan apozisyon

safhası, fertilizasyondan sonra yaklaşık 6 ilâ 7. günler arasında gerçekleşir. Bu aşamada implante blastosist yaklaşık 250 hücreden oluşur ve bu hücrelerin çoğu blastosist boşluğunu çevreleyen dış çeperi ve iç hücre kütlelerini kapsar (Benirschke vd., 2006). Bu dış çeper, mononükleotid trofoblast hücrelerinden (trofoektoderm hücreleri olarak da adlandırılır) oluşur. İmplantasyon, trofoblastların apikal plazma membranlarının, uterus epitelinin apikal plazma membranlarına tutunması ile başlar. Bu süreç paradoksik bir fenomen olarak ele alınmıştır çünkü epitelin apikal plazma membranları normalde yapışkan olmayan (non-adeziv) olarak tanımlanmıştır (Benirschke vd., 2006). Buna rağmen blastosistin trofoektoderm hücrelerinin yapışkanlığı ve uterus epitelinin apikal plazması, implantasyon penceresi olarak tanımlanan kısa bir membran fazı için tutarlıdır. Bu zamandan itibaren, uterus epitel hücreleri oldukça salgılayıcı bir hale gelir ve bağlanmadan önce bile blastosisti etkileyebilecek olan çeşitli düzenleyici moleküller uterus lümenine salınırlar (Dimitriadis vd., 2010). Hem trofoektodermde hem de uterus epitelyal hücrelerinde çok sayıda hücre adezyon molekülü tanımlanmıştır ve DNA metilasyonundaki değişiklikler, murinlerde uterin stromal hücre desidualizasyonuna katkıda bulunur (Gao vd., 2012). Ancak, güncel bilgiler bu olayı özellikle de maternal-fetal ara yüzündeki immünolojik tanımayı tam olarak açıklamak ya da çoğaltmak için yeterli değildir (PrabhuDas vd., 2015).

2.7.2. Adezyon

Adezyon, blastosistin yaklaşık 6. günde embriyoblast kutbunun (iç hücre kısmının yer aldığı taraf) üzerinde yer alan trofoblastik hücrelerin adezyon molekülleri aracılığıyla endometriumun luminal epiteline tutunduğu evredir. Reseptif fazın morfolojik belirteci olan pinopodlar embriyolar için tutunma alanları oluşturarak bu sürece katılır (Achache ve Revel, 2006). İmplantasyonun bu aşamasında luminal epitel hücrelerinin apikal membranı ile trofoblast hücrelerinin plazma membranları arasında 20 nm'lik mesafe kalacak şekilde birbirlerine paralel olarak konumlanırlar. Her iki yüzeyde de ekspresyon düzeylerinde artış gözlenen adezyon molekülleri ve ligandları fetal-maternal etkileşimi gerçekleştirir. Bu süreçte adezyon molekülü grubundan biri olan integrinler en önemli rolü üstlenirler. Hem luminal epitel hücrelerinin hem de trofoblastik hücrelerin yüzeyinde ekspresyonu gözlenen $\alpha\beta3$ integrini ve ligandı osteopontin implantasyon aşamasındaki ilk hücre-hücre etkileşiminde görev alır (Dominguez vd., 2005). $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta4$ ve $\alpha5\beta5$ integrinleri de adezyon sürecine katılan diğer adezyon molekülleridir

(Dey vd., 2004). Adezyon fazı döneminde (PrabhuDas vd., 2015) meydana gelen hücresel olayları taklit etmek veya düzenlemek için çok daha fazla bilgi gereklidir çünkü her iki hücre tipi de hücre içi yapışma gerektirse de, hücreler hücre içi gevşeme ve harekete ihtiyaç duyar.

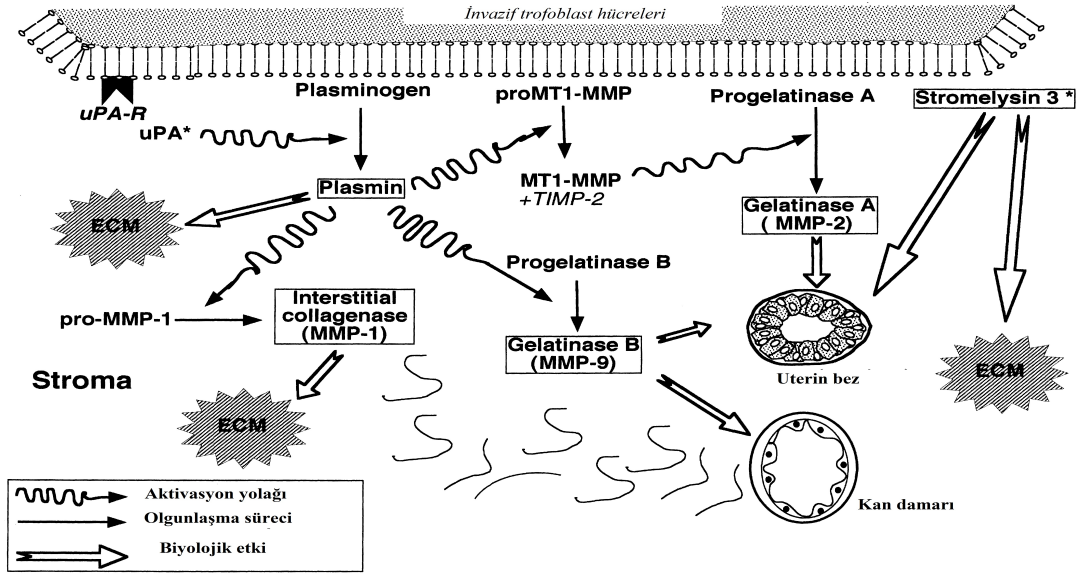
Blastosistin gelişimi için esas faktör olan E-kadherin, adezyon süresince trofoektoderm tarafından yüksek düzeylerde eksprese edilirken, adherens bağlantı komplekslerinin diğer elemanları ise luminal epitelin yüzeyinde eksprese olur. E-kadherinler bağlantı kompleksleri aracılığıyla gerçekleştirdiği homofilik hücre-hücre etkileşimi ile adezyon sürecine katılır (Paria vd., 1999). Kadherin ailesi üyelerinden olan Cad-11, adezyon sürecinde luminal epitel ile direkt etkileşime geçen sinsityotrofoblast ve ekstravillöz yapıdaki sitotrofoblast hücrelerin yüzeyinde lokalize olur. Luminal ve glandular epitel hücrelerinin yüzeyinde de eksprese olan Cad-11, blastosistin endometriuma olan adezyonunda rol oynar (Maccalman vd., 1996).

Transmembranik bir protein olan trofonin, farklı hücreler arası homofilik bağlantılarda görev alır. Trofonin adezyon işlevini sitoplazmik proteinler olan tastin ve bystine bağlanarak oluşturduğu kompleks aracılığıyla gerçekleştirir. İmplantasyon süresince ve plasental gelişimin ilk dönemlerinde trofoblast hücreleri ve desidual hücrelerin yüzeyinde gözlenen trofonin kompleksi, implantasyon sürecinde yerini alır (Nadano vd., 2002).

2.7.3. İnvazyon

İnvazyonun kontrolü, trofoblastların etkisi altında olup anne ile vasküler bir ilişki kurmak için trofoblastların luminal epitel ve bazal laminadan geçerek endometrial stroma içerisine doğru penetre olmaları ile karakterizedir. İnvazyon, birçok memeli türünün gelişmesinde, özellikle de invaziv veya invaziv olmayan trofoektodermelerde (TE), invaziv TE hücreleri (plasental villus trofoblastlar), desiduayı ve miyometriyumun iç üçte birini işgal ettikleri, ardından da uterin arteri yeniden modellemeye başladıkları zamandır (PrabhuDas vd., 2015). Trofoblast invazyonu, implantasyon ve plasentasyon sırasında oldukça önemli bir olaydır ve bu olay sadece blastosistin daha fazla invazyonundan sorumlu değildir, aynı zamanda gelişmekte olan plasentanın desteklenmesi ve gebeliğe adapte olabilmek için utero-plasental arterlerin yeniden modellenmesinden de sorumludur (Benirschke vd., 2006). Bu evre sayesinde

embriyonun yaşamını devam ettirmesi için gereken maternal vasküler yatağın işgali ve gelişmiş plasental sistemin oluşumu sağlar (Güzeloğlu-Kayışlı vd., 2007). İmplantasyonun çok erken aşamalarında blastosistin implante embriyonik kutbunun trofoblastları proliferasyonun arttığını göstermektedir, bu da çift katmanlı trofoblast ile sonuçlanır. Doğrudan desiduya bakan dış katmandaki komşu mononükleotid trofoblastların birleşmesiyle, sinsityotrofoblast oluşur: bu gelişmekte olan desiduanın ekstraselüler matriksinin enzimatik bölünmesinden sorumlu trofoblast tipidir ve fertilizasyonun 14. gününe kadar trofoblast invazyonunun ilerlemesine olanak sağlar (Benirschke vd., 2006). Bundan sonra, çoğalan ve göç eden sitotrofoblastlar sinsityotrofoblast trabekülü yoluyla trofoblastik kabuğa ulaşır ve sonunda desidual stromaya penetre olur. Dolayısıyla, çok erken invazyon süreçleri sinsityotrofoblast tarafından yürütülürken, fertilizasyonun 15. gününde, ekstrasillöz trofoblastlar (EVT) olarak da adlandırılan mononükleer çekirdekli sitotrofoblastlar, uterus dokusunu miyometriyumun iç üçte birine kadar istila eder. Bu bağlamda, trofoblast invazyonu üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunun, mononükleer çekirdekli trofoblast hücre dizileri kullanılarak gelişmiş implantasyon süreçlerini tanımladığı unutulmamalıdır (Kervancıoğlu-Demirci vd., 2016). Bu invazyona yanıt olarak, endometrial stromal hücreler desidualizasyona uğrar. Çoğu hamilelikte, embriyo tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG), ovulasyondan 8-10 gün sonra anne serumunda saptanabilir (Enders, 2000; Sharkey ve Smith, 2003). Bu aşamada sinsityotrofoblastlara invazyon yeteneği kazandıran ve plazminojenin, plazmine dönüşümünü sağlayan matriks metalloproteinazların salınmasına yol açan plazminojen aktivatörünün kısıtlayıcı basamağı, desidual hücrelerin majör ürünü olan plasminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)'dir (Gonzales vd., 1996).



Şekil 2.6. Trofoblast invazyonunda rol alan proteinaz kaskadı. Trofoblast uPA, MMP-1, MMP-9 ve MT1-MMP'yi doğrudan aktive eden plazmini aktive eder. Bu son MT1-MMP, MMP-2'yi aktive eder (Lala ve Hamilton, 1996). (*) Stromelisin-3 ve uPA ayrıca sinsiyotrofoblastta eksprese edilir.

2.8. Desidualizasyon

Endometrial stromal hücrelerin özelleşmiş desidual hücrelere dönüşme sürecini kapsayan desidualizasyon, hamileliğin kurulmasında kritik bir adımdır. İnsanlarda desidualizasyon, menstrual siklusun orta-sekretuar fazı sırasında endometrial stromal hücrelerin proliferatif genişlemesi ile başlar (Wang vd., 2010). Mitotik genişlemeden sonra bu hücreler, erken embriyonun desteklenmesi, maternal bağışıklığın düzenlenmesi ve trofoblast invazyonunun düzenlenmesi de dahil olmak üzere, erken gebelikte birçok fonksiyona hizmet eden desidual hücrelere farklılaşır (Cha vd., 2012). Desidualizasyon süreci, uzamış stromal hücreler epiteloïd hale geldikçe, desidual hücrelerin karakteristik 'Arnavut kaldırımı' görünümünü benimseyerek, morfolojik bir dönüşümü içerir (Gellersen ve Brosens, 2014). Bu dönüşüm desidual hücre farklılaşmasının bir göstergesidir ve desidual hücre sekretuar fonksiyonlarının indüksiyonu ile korelasyon gösterir (Lane vd., 1994). Desidual hücreler, yüksek derecede salgılayıcıdır, maternal ve embriyonik süreçleri düzenleyen çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar üretir. Erken desidualizasyon sırasında, endometrial stromal hücreler, uterus doğal katil (uNK) hücrelerinin takviyesine katkıda bulunan sitokinlerin bir çeşidini salgılamak, daha sonraki gebeliklerde bu hücrelerin salgıları baskın olarak anti-enflamatuardır

(Vinketova vd., 2016). Her ikisi de trofoblast invazyonunu desteklediği ve trofoblastın maternal dokuya aşırı invazyonunu önlediğinden, desidual hücreler trofoblast invazyonunun düzenlenmesinde ikili bir rol oynarlar (Sharma vd., 2016). Ayrıca, desidual hücreler, implantasyon bölgeleri yakınında geliştirilmiş, desidual ve trofoblast hücrelerinin çok hücreli dallarının organizasyonuna katkıda bulunan göçmen ve invaziv davranışı sergilemektedir (Grewal vd., 2008; Gellersen vd., 2010]. Bu işlevlerin başarılı bir şekilde uygulanması, hamilelik boyunca anne ve fetus sağlığı için kritik öneme sahiptir. Desidualizasyondaki erken defektler pre-eklampsi (gebelik zehirlenmesi), intrauterin büyüme kısıtlaması ve plasenta invazyon anomalisi dahil olmak üzere hamileliğin sonraki aşamalarında patolojilere katkıda bulunabilir (Cha vd., 2012). Bu nedenle, başarılı desidualizasyonu kolaylaştıran moleküler sinyal yollarının anlaşılması, sağlıklı gebeliklerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir.

2.9. Post-İmplantasyon Uterin Gelişim

Blastosist etrafını saran uterin stromal hücreler bağlanmadan sonra desidualizasyona uğrar ve sonunda embriyo anti-mezometrial stromal yatağa gömülür. Desidualizasyonun bir fonksiyonu, fonksiyonel bir plasenta oluşturulmadan önce gelişen embriyoya beslenme desteği sağlamaktır. Sitokinler, homeobox transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü molekülleri, ekstraselüler matriks yeniden modelleme faktörleri ve lipid mediyatörleri dahil çeşitli sinyal molekülleri, desidualizasyon sırasında endometriumda ifade edilir ve bu işlem için çok önemlidir.

Erişkin fare uterusu, hamilelik sırasında dinamik hücresel ve moleküler değişiklikler geçirir, ancak bu değişiklikler yeni hücre tiplerinin, örneğin desidual hücrelerin ve sınırlarının tahsisini belirlemek için nasıl koordine edilir, büyük ölçüde bilinmemektedir. Desidualizasyon anti-mezometrial kutupta başlar, daha sonra mezometrial kutba, muhtemel plasentasyon bölgesine uzanır. Bu durum implantasyonu, embriyonik eksenle hizalayarak antimezometrial-mezometrial (AM-M) doğrultuda yönlendirir (Wang ve Dey, 2006). WNT sinyallemesinin, kemik morfogenetik protein (BMP) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) ile işbirliği içinde, implantasyonun AM-M doğrultuda yönlendirilmesine yardımcı olduğu ve desidualizasyon sırasında bu sınırları belirlediği düşünülmektedir (Daikoku vd., 2004).

2.10. İmplantasyonda Rol Oynayan Moleküller

Uterin endometrial hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması da peri-implantasyon sırasında kritik adımlardır. Ekstraselüler matriks (ECM), adezyon molekülleri, lipid mediyatörleri ve transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere bu sürece birçok molekül dahil olmaktadır. Başarılı embriyo implantasyonu, uterus ve embriyo arasındaki hücrel ve moleküler karışmalara bağlıdır; bununla birlikte, altta yatan moleküler yolların aydınlatılması, onların karmaşıklığı ile engellenmiştir.

2.10.1. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (hCG)

hCG, konseptusun bilinen ilk hormonal sinyalidir. hCG mRNA'sı, 8-hücreli evreye (Jurisicova vd., 1999) kadar erken transkribe olurken, blastosist, implantasyondan önce hCG'yi eksprese etmeye başlar (Bonduelle vd., 1988; Lopata ve Hay, 1989). hCG, sinsityotrofoblast tarafından implantasyondan sonra giderek artmaktadır (Hoshina vd., 1985). Fertilizasyondan 10 gün sonra anne kanında belirgin hCG seviyeleri ölçülebilir. Plasenta tarafından hCG üretiminin zirveye çıkması, 10 ilâ 11. gebelik haftaları arasında ulaşılmaktadır; daha sonra hormonun üretimi 12. haftaya kadar düşerek o noktada sabit kalır. hCG, korpus luteumdan sonra devam eden progesteron üretimini sağlar (Zimmerman vd., 2001; Berndt vd., 2006).

2.10.2. İntegrinler

İntegrinler, α ve β alt-birimlerinin non-kovalent birleşmesiyle oluşturulan bir transmembran glikoproteinleri ailesidir. Her alt birim bir ekstraselüler alan, bir transmembran bölgesi ve bir intraselüler alan içerir. ECM bileşenleri, salgılanmış glikoproteinler ve diğer hücreler için reseptörler olarak görev yaparlar. Ligand bağlanmasına yanıt olarak integrinlerin fokal adezyon bölgelerine birleştirilmesi, bir hücre iskeleti proteinleri ve hücre içi sinyalleşme komplekslerinin oluşturulmasına yol açar (Arnaout vd., 2007).

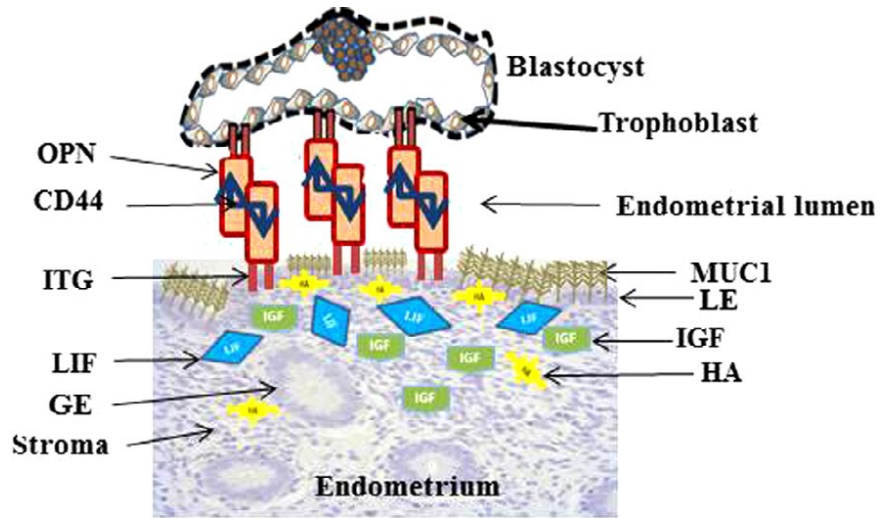
İntegrinin implantasyondaki rollerinin, hücrelerin integrinin hücre dışı matrikse eklenmesi (Maartens ve Brown, 2015) ya da embriyodan ECM'ye bir sinyal iletimini başlatarak integrinin implantasyon için kritik olan genlerin transkripsiyonuna ve translasyonuna yol açtığı varsayılmaktadır (Lessey ve Arnold, 1998). İmplantasyonun iki ana ögesi olan maternal endometrium ve blastosistin integrini ifade ettiği

bildirilmiştir (Sun vd., 2013). Bu nedenle, implantasyonda integrinlerin oynadığı roller çok önemlidir.

İntegrinler, menstrual döngü sırasında ve insan gebeliklerinin erken evrelerinde endometrial hücrelerde dinamik zamansal ve mekansal ekspresyon modelleri geçirir (Lessey vd., 1994). Memelilerde birçok integrin izoformu vardır, ancak sadece üç izoform olan $\alpha1\beta1$, $\alpha4\beta1$ ve $\alpha v\beta3$ 'ün özellikle implantasyonda yer aldığı ve $\alpha v\beta3$ 'ün diğerlerine göre daha göze çarpan roller oynadığı bulunmuştur (Illera vd., 2003). İnsanda, bu izoformların, endometriumun yapısal ve fizyolojik olarak blastosistlere implante edilmesine yardımcı olduğunda, implantasyon penceresi (20-24. gün) sırasında endometriumda eksprese edildiği gösterilmiştir. $\alpha2\beta1$ ve $\alpha3\beta1$ integrinleri, menstrual döngü sırasında yapısal olarak eksprese edilir ve kollajen ve interstisyel ECM'nin diğer bileşenleri için reseptörler olarak, menstruasyondan sonra yeniden epitelizasyonda kullanılabilir. $\alpha1\beta1$ ve $\alpha4\beta1$ integrinleri döngünün 20-24.günleri arasında eksprese edilirler.

2.10.3. Osteopontin

Salgılanmış fosfoprotein-1 (SPP1) olarak da bilinen Osteopontin (OPN), bir arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) motifi içeren ve multimerizasyon yeteneğine sahip, 25 ilâ 75 kDa arasında değişen moleküler kitle varyantlarını elde etmek için geniş fosforilasyon, glikozilasyon ve parçalanma geçirebilen bir glikoproteindir (Johnson vd., 2003; Kariya vd., 2014). Hücre göçünün yanı sıra hücre-hücre adezyonuna ve hücre-ECM iletişimine aracılık etmek suretiyle hücre yüzey reseptörlerini bağlayarak çok sayıda işlevi vardır. OPN progesteron tarafından düzenlenir ve ağırlıklı olarak apikal luminal epitel (LE) ve glandular epitel (GE) hücrelerine immüno lokalize olduğunda, siklusun sekretuar fazında maksimum seviyeye ulaşır (Apparao vd., 2001; Quenby vd., 2007). OPN, $\alpha4\beta1$, $\alpha v\beta3$, $\alpha v\beta5$, $\alpha v\beta6$ ve CD44'ün spesifik varyantlarını (v3, v6) içeren çoklu bağlanma ortaklarına sahiptir. İfadesindeki artış, insanlarda orta-sekretuar faz sırasında luminal epitelde integrin $\alpha v\beta3$ 'ün artmış ifadesi ile eşleşir. Böylece, embriyo bağlanmasını desteklemek için luminal epitelyumun apikal yüzeyinde $\alpha v\beta3$ ve CD44 içeren reseptörler ile OPN kompleksleri meydana gelebilir. OPN ayrıca fare endometriumunda da ifade edilmektedir (White vd., 2006).



Şekil 2.7. Fare modelinde implantasyonla ilişkili sitokinler ve büyüme faktörlerinin aracılık ettiği reseptif endometriyumun blastosistin trofoektoderm hücreleri ve luminal epitelyal hücreler arasındaki etkileşimler. İmplantasyon sırasında, endometriyumda sitokinlerin ve ITG, OPN, LIF, IGF, HA ve CD44 gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunda artış olurken, MUC-1'in embriyo sinyaline yanıt olarak endometrial LE implantasyon bölgesinde azaldığı öne sürülmektedir. ITG aynı zamanda blastosist tarafından üretilir. CD44; küme domaini 44, GE; glandular epitel, HA; hiyalüronan, IGF; insülin benzeri büyüme faktörü, ITG; integrin, LIF; lösemi inhibitör faktörü, LE; luminal epitel, MUC-1; musin-1, OPN; osteopontin. (Raheem, 2018).

2.10.4. Musinler

Epitelyumun apikal hücre yüzeyleri, glikokaliks denilen musin karbonhidratın kalın tabakasıyla kaplanan çok sayıda mikrovilli içerir. Glikokaliks hücre yüzeylerini kayganlaştırır ve nemlendirir, aynı zamanda epitelyal hücreleri mikroorganizmalardan ve degradatif enzimlerden korur. Ek olarak, musinler hem hücre-hücre hem de hücre-hücre dışı matriks etkileşimlerini inhibe eder. İnsan luminal ve glandular uterus epitelinin apikal yüzeyi bol miktarda eksprese edilen MUC-1 ve diğer musinlerle kaplıdır (Aplin vd., 2001).

MUC-1, büyük bir N-terminal hücre dışı alanı, bir transmembran bölgesi ve kısa bir C-terminal sitoplazmik alanı (Brayman vd., 2004) içeren bir Tip-1 zar proteindir. MUC-1'in sitoplazmik alanı, β -katenin dahil, sinyalleme molekülleri ile birleşir ve hücre sinyallemesinde MUC-1 için potansiyel bir rolü olduğunu öne sürmektedir (Carson, 2008).

Endometrial epitelyal hücrelerde MUC-1 ekspresyonu transkripsiyonel düzeyde steroid hormonlar ve diğer faktörlerle düzenlenir (Brayman vd., 2007). Sıçanlarda MUC-1,

embriyo implantasyonundan önce, musinler tarafından yapılan glikokaliksin hücre yapışmasını inhibe ettiği ve bu nedenle blastosistlerin uterus epitelyumuna yapışmadan önce aşağı-regüle edilmesi gerektiği düşüncesi ile tutarlı olarak, uterusun tamamında aşağı-regüle edilir (De Souza vd., 1998).

İnsan endometriumunda, MUC-1 erken sekretuar fazda veya implantasyon penceresinde önemli ölçüde artmıştır (Hey vd., 1994). MUC-1 insanlarda embriyo implantasyonu bölgesinde *in vivo* çalışılmamış olmasına rağmen, *in vitro* implantasyon modelleri, MUC-1'in insanlarda embriyo bağlanma bölgesinde de aşağı-regüle olduğunu göstermektedir (Meseguer vd., 2001). Bu, implante edilmiş blastosist üzerinde eksprese edilen veya salınan bir veya daha fazla faktörün, insanlarda komşu endometrial epitelyumdan MUC-1'in aşağı regülasyonu için sinyalleri tetiklediğini göstermektedir.

2.10.5. L-Selektin

Selektinler bir grup karbonhidrat bağlayıcı proteinlerdir. Hem insanda hem de farede üç selektin gen bulunur ve bunların E-selektin, P-selektin ve L selektin olarak bilinen ürünleri hematopoietik hücrelerde eksprese edilir. Enflamasyon sırasında E-selektin endotelial yüzeyde eksprese edilir, P-selektin aktive olmuş trombosit üzerinde eksprese edilir ve L-selektin ise lenfositlerde yapısal olarak eksprese edilir (Rosen, 2004).

Daha önce selektinlerin sadece hematopoietik hücrelerde eksprese edildiği düşünülse de, insan blastosistlerinin yüzeyinde L-selektin bulunmuştur (Genbacev vd., 2003). Ayrıca, L-selektin ligand oligosakkaritleri, MECA79 ve HECA452 antijenleri (Mitoma vd., 2009) olarak antikolar tarafından tespit edilebilir. Bu antijenler, insan uterusunda luminal ve glandular endometrial epitel üzerinde immünohistokimyasal olarak saptanmıştır (Genbacev vd., 2003; Lai vd., 2005; Margarit vd., 2009).

2.10.6. E-Kadherin

Kadherin süper ailesinin üyeleri, ektodomainde yaklaşık 110 amino asit dizisi tekrarlarını paylaşan transmembran glikoproteinlerdir. Kalsiyum bağımlı homotipik veya heterotipik bağlanma ile hücre-hücre etkileşimine aracılık ederler (Stemmler, 2008).

E-kadherin, epitelyal hücrelerin plazma membranının lateral tarafındaki birleşme yerlerinde bulunur (Xie vd., 2007; Fukuda ve Sugihara, 2008). İnsan embriyo implantasyonunun ultrayapısı, aslında trofoektoderm hücrelerin ve endometrial epitelyal

hücrelerin apikal hücre yüzeyi arasında yer alan desmozom-benzeri bir yapı olan komşu bağlantı yerinin bir formasyonunu ortaya çıkarmıştır (Fukuda ve Sugihara, 2012a).

2.10.7. Trofonin

Trofonin, insan trofoblastik ve endometrial hücre çizgilerinin adezyonundaki ilişkilerine bağlı olarak tanımlanan apikal bir transmembran glikoproteinidir (Fukuda ve Sugihara, 2008). Trofonin, TRO geninden (aynı zamanda MAGE-D3 olarak da bilinir) türetilen üç membran proteininden biridir (Kim vd., 2014). Trofonin, sitoplazmik partnerleri olan bystin, tastin ve ErbB4 proteinleri (Fukuda ve Sugihara, 2012b) ile sinerji içinde kompleksler oluşturarak kalsiyumdan bağımsız homofilik hücre adezyonuna aracılık eder ve trofoblast aktivasyonu için moleküler bir anahtar görevi görür. Trofonin siklik endometriumdan yoksun olmasına rağmen, koryonik gonadotropin (implante embriyo tarafından üretilen) ve interlökin (IL)-1 β kombinasyonu, luminal epitelinde trofoninin lokal regülasyonuna yol açan bir jukstakrin sinyali verir (Sugihara vd., 2008). Farelerde trofonin, hem blastosist hem de uterus tarafından, çiftleşme sonrası 3.5 ilâ 5.5 gün sonra eksprese edilir; ancak, erken implantasyon sırasında kesinlikle gerekli değildir (Fukuda ve Sugihara, 2008).

2.10.8. Ovaryan Hormonlar

Ovaryan steroidler, progesteron ve östrojen, blastosist implantasyonu için başlıca faktörlerdir. Progesteron, tüm memelilerde implantasyon ve hamilelik bakımı için gereklidir, östrojen gereksinimi ise türe özgüdür (Dey vd., 2004). İnsanlarda proliferatif faz östrojeni, progesteron eylemi için endometriumun hazırlanmasında rol oynar (Huet-Hudson ve Dey, 1990) çünkü postmenopozal bir kadında ekzojenöz östrojenin ardışık uygulanması, ardından progesteron ilavesi, bir donör embriyonun başarılı implantasyonu için yeterlidir (Bulun ve Adashi, 2003). Daha sonra, sitokin ve büyüme faktörü üretimi dahil olmak üzere endometrial dokudaki lokal hormonal mekanizmaların ve epitelyal hücrelerde LIF-LIFR-gp130-STAT3 sinyalleme gibi eylemlerin östrojen ve progesteronun nihai kontrolü altında olduğu izlenmektedir.

Östrojen ve progesteronun uterin etkileri esas olarak nükleer östrojen ve progesteron (ER ve PR) reseptörleri tarafından yürütülür (Carpenter ve Korach, 2006). Son yıllarda ER (ER α ve ER β) ve PR (PR-A ve PR-B) izoformlarının keşfi ve selektif silinmesinin

etkisi ile ilgili çalışmalar, uterus biyolojisi ve implantasyonunda izoform spesifik fonksiyonlarına kanıt sağlamaktadır (Guzeloglu-Kayisli vd., 2007).

2.10.9. Sitokinler ve Büyüme Faktörleri

LIF, interlökin-6 ve interlökin-11 (IL-6 ve IL-11), biyolojik etkilere yol açmak için hedef hücrelerdeki sinyal çevirici reseptör ünitesi gp130'u paylaşan sitokinlerin tek bir ailesinin üyeleridir. Bu üç sitokin implantasyonda anahtar rol oynar. IL-6 tipi sitokin ailesinin bir üyesi olan LIF, hücre proliferasyonunun uyarılması, farklılaşma ve hayatta kalma gibi blastosist gelişimi ve implantasyonu için gerekli olan tüm fonksiyonları içeren çeşitli işlevlere sahiptir (Laird vd., 2006). İlk olarak, farelerde tanımlanan LIF geninin hedefinin bozulmasının implantasyon başarısızlığı gösterdiği, implantasyonda kusurlu infertil kadınlarda LIF ekspresyonu/sekresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Tawfeek vd., 2012). LIF aynı zamanda trofoblast invazyonunun bir öncüsüdür (Suman vd., 2013a; 2013b).

IL-6 ve IL-11, implantasyon için gerekli olan pleiotropik sitokinlerdir. Desidualizasyon sırasında IL-11 ekspresyonu artar (Godbole ve Modi, 2010), rekombinant IL-6 ve IL-11 *in vitro* insan endometrial hücrelerinin desidualizasyonunu destekler (Dimitriadis vd., 2005; Menkhorst vd., 2010). IL-6 ve IL-11 de trofoblast invazyonunun promotörleridir (Suman vd., 2009; Modi vd., 2011; Champion vd., 2012; Suman vd., 2013a). Feto-maternal aralıkta bulunan IL-1 ise trofoblast hücreleri ve desidualize stromal hücreler tarafından üretilir. Farelerde IL-1 reseptör antagonisti implantasyon öncesi verildiğinde implante olmuş embriyoların sayısında ciddi azalma görülmüştür. Bu durum IL-1'in embriyo implantasyonundaki önemini göstermiştir (Mutluay ve Öner, 2016). IL-1, trofoblastlardaki *MMP-9* aktivasyonunu ve endometrial stromal hücrelerin ekspresyonunu stimüle eder. Böylece feto-maternal aralıkta yer alan sitokinlerden IL-6, *MMP-2* ve *MMP-9* aktivitesini uyararak trofoblast aktivasyonunu indüklerken, IL-10 ise *MMP-9* ve trofoblast invazyonunu baskılar (Staun-Ram ve Shalev, 2005).

Tümör büyüme faktörü- β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi birçok büyüme faktörü, immün hücreler üzerindeki doğrudan etkilerinden dolayı implantasyon için kritik araçlar olarak ortaya çıkan pro-enflamatuar sitokinlerdir (Dimitriadis vd., 2005; Omwandho vd., 2010).

2.10.10. Homeobox Genler *HOXA10* ve *HOXA11*

HOX genleri, progesteronun bazı işlevlerine aracılık ederek endometrial büyüme, farklılaşma ve reseptivite için gereklidir. Hem Hoxa-10 hem de Hoxa-11, insan endometrial epitelyal ve stromal hücrelerinde eksprese edilir ve bunların ekspresyonu, embriyo implantasyonu ve yüksek östrojen ve progesteron seviyeleri ile çakışarak, orta ve geç-sekretuar fazlarda anlamlı olarak daha yüksektir (Xu vd., 2014).

Transkripsiyon faktörleri olarak, *HOX* genleri, endometriumun doğru gelişmesine ve implantasyona karşı reseptiviteye yol açan diğer hedef genleri düzenler. İmplantasyon penceresine özgü bir dizi moleküler ve morfolojik belirteçler; pinopodlar, $\beta 3$ integrin ve insülin benzeri büyüme faktörü-bağlayıcı protein-1 dahil olmak üzere *HOX* genleri tarafından düzenlenir (Modi ve Godbole, 2009). Tüm *HOX* hedefleri de embriyoya yanıt olarak endometriumlarda modüle edilir (Nimbkar-Joshi vd., 2009).

2.10.11. İmmunoglobulin Süperailisi

İmmünoglobulin süper ailesinin (IgSF) üyeleri, hücre-hücre adezyon reseptörleri veya sinyal transdüksiyon reseptörleri veya her ikisi gibi davranarak hücre davranışının kontrolünde rol oynarlar (Aricescu ve Jones, 2007). IgSF üyeleri, homofilik bağlanmada rol oynayabilir veya heterofilik hücre-hücre yapışmasına aracılık ederek integrinler için ligandlar olarak hareket edebilir.

IgSF ailesinden biri olan Basigin (BSG), hücre yüzeyinde çoklu bağlanma partnerleri olan yüksek glikozillenmiş bir transmembran proteindir. Hem farelerde hem de sıçanlarda, basigin, gebeliğin 1. gününde, östrojen etkisi altında luminal epitelyumda eksprese edilir (Xiao vd., 2002a). İnsan endometriyumunda, hem glandular hem de stromal hücrelerde güçlü ekspresyon ile luminal (lateral) epitelyal yüzeylerde zayıf bir şekilde ifade edilir. İmmünfloresan ve hücre yüzeyi proteomik analizi ile Ishikawa hücrelerinde orta derecede apikal dağılım gözlemlenir. Menstrual siklus bağımlı moleküler varyantlar insan endometriyumunda gözlenmiştir (Noguchi vd., 2003).

Aktive edilmiş lökosit hücre adezyon molekülü (ALCAM yada CD166) ise endometrial luminal ve glandular epitelyal hücre yüzeyleri ve aynı zamanda blastosist hücre yüzeyi üzerinde eksprese edilir (Fujiwara vd., 2003).

2.11. Wnt- β Katenin Sinyal Yolağı

Wnt ailesi, embriyogenezdeki rolleri ile ön planda olan salgılanmış, sistein açısından zengin glikoproteinden oluşur (Cadigan vd., 1998). Wnt genleri doğumdan sonra dişi üreme sisteminin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını başlatan epitelyal-mezenşimal etkileşimlerin yönlendirilmesinde kritik roller oynamaktadır. Buna ek olarak, bu genler embriyogenez ve yetişkinlik döneminde belirli bir ifade şekli sergilerler (Kikuchi vd., 2011). Wnt'lerin, embriyonik gelişim sırasında hücre akıbetinin belirlenmesi, farklılaşmayı, çoğalmayı ve apoptozu düzenlediği doğrulanmıştır (Clevers, 2006). Wnt sinyali ayrıca tümör supresyonu, onkogenез ve homeostaz ile de ilişkilendirilmiştir (Chien vd., 2009). Araştırma birikimi, bu yolun işlev bozukluğunun kanser, anjiyogenez, vasküler, otoimmün, enflamatuvar, nörolojik, kemik ve diğer dejeneratif bozukluklar gibi bir dizi insan hastalığına bağlı olduğunu göstermiştir (Chien vd., 2009; Kikuchi vd., 2011; Maruotti vd., 2013).

Wnt sinyal yolağı, Wnt ligandları, G-proteine bağlı transmembran frizzled reseptörleri (FZD) ve düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) ko-reseptörlerini içerir. Şimdiye kadar 19 Wnt ligandı (Wntl, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16), 10 FZD (FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10) ve 2 LRP (LRP-5 ve LRP-6) memelilerde tanımlanmıştır (Wodarz ve Nusse, 1998). Wnt gen ailesinin uterus gelişimine katılan en önemli üyelerinden biri Wnt7a'dır. Wnt7a, uygun uterinal bez oluşumu için gereklidir. Wnt7a embriyogenez sırasında uterin boynuzun radyal eksenini boyunca doğrudan büyüme gösterir ve yetişkinlikte uygun uterin formasyonu, blastosist implantasyonu ve doğurganlık için kritik önem taşır (Spencer vd., 2012). Üreme süreci sırasında, belirli zaman noktalarında uygun Wnt7a ve β -katenin ekspresyonu gereklidir ve bu proteinlerin ifade şekillerinin bozulması, embriyo implantasyonunda gerekli reseptif safhayı elde etmek için uterusun hazırlanışındaki kusurlardan kaynaklanan fertilitе bozukluklarına neden olabilir (Spencer vd., 2012). Hem β -katenin hem de Wnt7a mutant farelerinin doğurganlık kusurları vardır (Nayeem vd., 2015). Embriyo implantasyonu, muhtemelen endometrial bezlerin yokluğu ve bu sürecin başarısı için gerekli

büyüme faktörlerinin salgılanmasının sonucu olarak Wnt7a mutant farelerde görülmez. Benzer şekilde, desidual reaksiyon β -katenin mutant farelerde anormaldir (Dunlap vd., 2011; Nayeem vd., 2015).

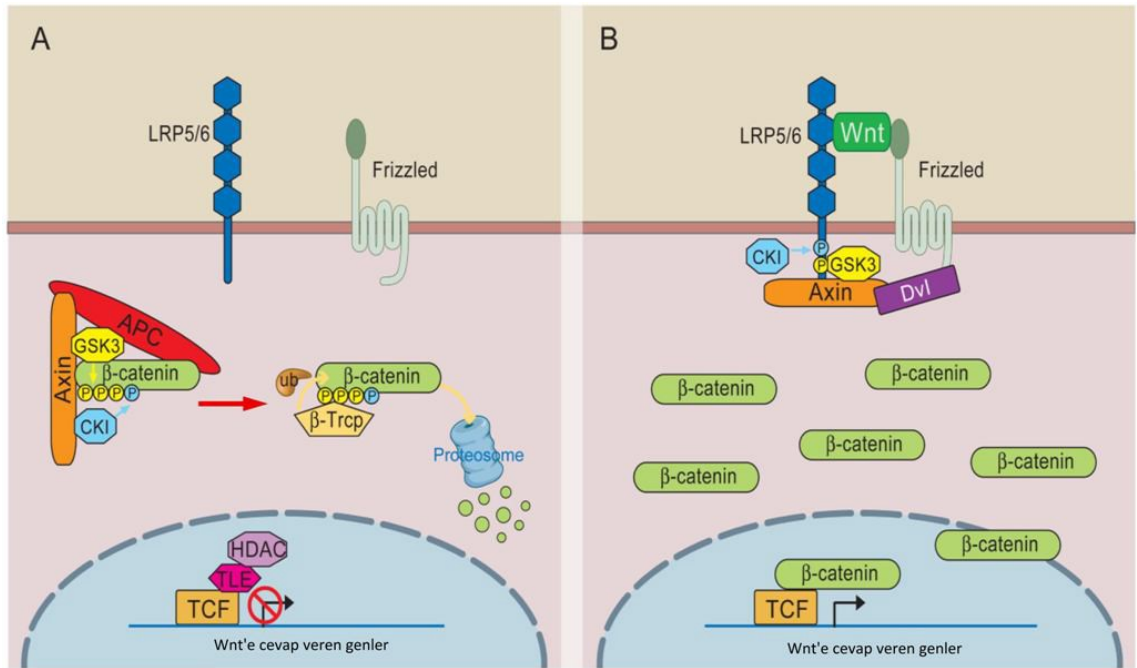
Wnt sinyal sistemi ya β -katenin bağımlı (kanonikal yolak) ya da β -katenin bağımsız (non-kanonikal yolak) sinyal yollarına ayrılabilir (Saito-Diaz vd., 2013; Astudillo ve Larrain, 2014). Kanonikal yolak, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını düzenleyen, β -katenin: T-hücre spesifik transkripsiyon faktör/lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü (TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid factor) aracılı gen ekspresyonunu tetiklemektedir. Non-kanonikal Wnt sinyal iletimi hücre içi kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) ve Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) aracılığıyla kontrol edilmektedir (Daniels ve Weis, 2005; Gordon ve Nusse, 2006). Bu sinyal yolağı, gen ekspresyonunda anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan aktive edilmiş T hücre nükleer faktörü (NF-AT) aracılı gen ekspresyonunu tetiklemektedir (Öztürk, 2011). Belirtilen iki sinyal yolağının birbirine çok bağılı olduğunu ve birbirlerini çapraz regüle ettiğini akılda tutmak da önemlidir (Aberle vd., 1997).

2.11.1. β -Katenin Bağımlı Sinyal Yolağı

Wnt/ β -katenin veya kanonikal Wnt sinyal yolağı olarak da adlandırılan β -katenin bağımlı yolak, hedef gen ekspresyonunu aktive etmek için çekirdeğe giren sitoplazmik protein β -katenin ile karakterize edilen çeşitli türler arasında oldukça korunmuş bir yoldur (Saito-Diaz vd., 2013; Astudillo ve Larrain, 2014). β -katenin hem hücre-hücre dışı matriks yapışmasına katılan kadherin bağlayıcı bir proteindir hem de kanonikal sinyal yolağında merkezi bir oyuncu olan çok işlevli bir proteindir (Liu vd., 2002).

Wnt stimülasyonunun yokluğunda, sitoplazmik β -katenin; aksial inhibisyon proteini (Axin), adenomatöz polipozis koli (APC), glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) ve kazein kinaz-1 α (CK-1 α) ile bir çoklu-protein yıkıcı kompleksinin oluşturulması yoluyla, proteozomda ubikinleştirilir ve degrade olur (Bilic vd., 2007). Sitoplazmik aktif β -katenin düşük seviyede tutulur ve toplam β -katenin esas olarak hücre-hücre dışı matriks yapışmasına katılır (Liu vd., 2002). Aktif β -kateninin düşük seviyesinde, transkripsiyon faktörü T-hücre faktörü/lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü (TCF/LEF), transkripsiyon baskılayıcılarına neden olan Groucho ve histon deasetilaz'a (HDAC) bağlanır

(Sonderegger vd., 2010). Wnt ligandları, hücre-yüzey ko-reseptörleri olan FZD ve LRP5/6'ya bağlandığında, β -katenin bağımlı sinyal yolağı tetiklenir (Şekil 2.8b). Ayrıntılı olarak, Wnt stimülasyonu, LRP ve Dsh'nin fosforilasyonunu ve Axin/APC/GSK-3 β /CK-1 α yıkım kompleksinin parçalanmasını indükler ve sonuçta, sitozolde β -katenin birikiminin gerçekleşmesine neden olur (Rao ve Kühl, 2010; Saito-Diaz vd., 2013). Böylece, biriken β -katenin çekirdeğe translokasyon yaparak Wnt hedef genlerinin transkripsiyonel bir eş-düzenleyicisi olarak işlev görür (Şekil 2.8b).



Şekil 2.8. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı (Peifer ve Polakis, 2000)

Farelerde, peri-implantasyon periyodunda β -katenin ekspresyonu, endometriyumun luminal ve glandular epiteline, daha sonra desidualizasyon işlemi sırasında sekonder desidual bölgeye, subepitelyal stroma ve uterusun anti-mezometrial bölgesine sınırlandırılmıştır (Herington vd., 2007).

2.11.2. Pre-implantasyon Embriyo Gelişiminde Wnt Sinyali

Memelilerde implantasyon öncesi embriyo gelişimi, oosit büyümesinin tamamlanmasından fertilizasyon ve döllenmiş zigotların morula evresine kadar bir dizi kritik olayı kapsar (Kemp vd., 2005). Çeşitli Wnt ligandları, FZD reseptörleri ve ilgili regülatörler sıçan pre-implantasyon embriyosunda saptanabilir ve Wnt

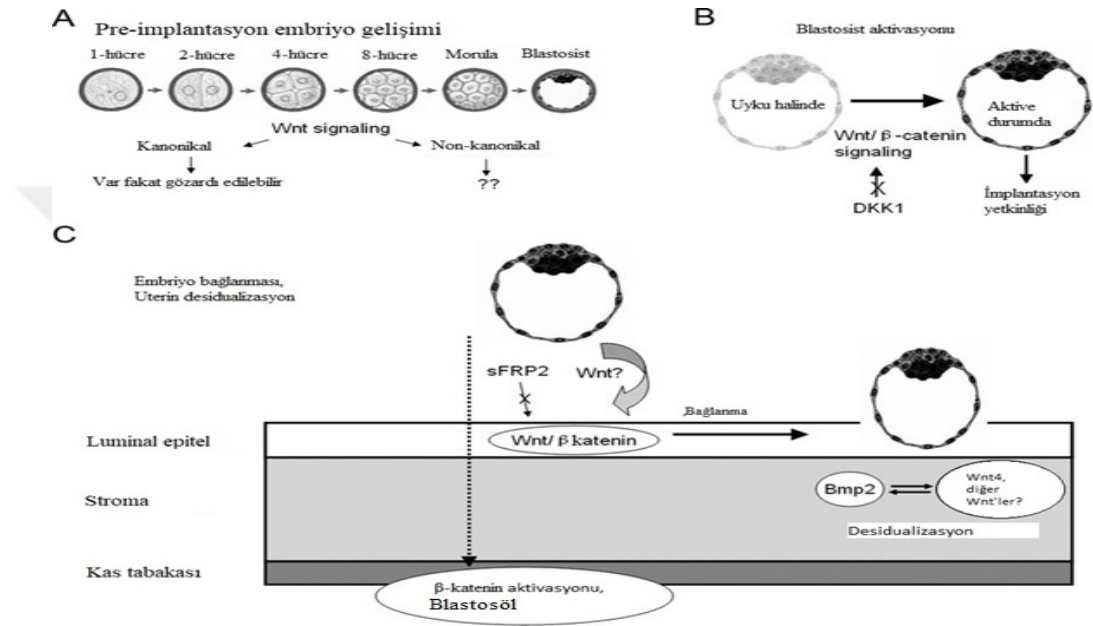
sinyalizasyonunun erken gebelik sırasında etkin olduğunu düşündürmektedir (Xie vd., 2008).

Kanonikal Wnt sinyali, pre-implantasyon periyodu sırasında entegre olmasa da, pre-implantasyon embriyo gelişiminde non-kanonikal Wnt sinyalizasyonunun potansiyel rolüne dair artan sonuçlar ilginç bir bakış açısı sunmaktadır. Önceki bir çalışmada, sıçan peri-implantasyon embriyolarında Wnt ailesinin bileşenlerinin benzersiz ekspresyon profilleri gösterilmiştir ve bu alternatif Wnt sinyal yollarının pre-implantasyon döneminde rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Kemp vd., 2005). Wnt/PCP ve Wnt-cGMP/Ca⁺² yollarında harekete geçtiği bilinen çoklu moleküller için transkriptler ve/veya proteinler, pre-implantasyon gelişimi sırasında bulunmaktadır (Kemp vd., 2005). Wnt/PCP sinyalinin düzenlenmesi, gelişmekte olan blastosist kümelerinin ayırt edilmesine ve tek bir iç hücre kitlesi oluşturmaya olanak sağladığı için, normal pre-implantasyon gelişimde yer aldığı gösterilmiştir (Wansleben ve Meijlink, 2011). Kanonikal ve non-kanonikal yollara Wnt sinyalini yaymada merkezi bir arabulucu olarak, üç sıçan Dsh geni (Dsh1, Dsh2 ve Dsh3) genellikle, pre-implantasyon dönemi embriyoda farklı uzaysal-zamansal lokalizasyonlarla ifade edilmiştir (Hayashi vd., 2011; van der Horst vd., 2012; Cooke vd., 2013). Dsh-GFP füzyon proteinlerinin aşırı ekspresyonu, 4-hücre aşamalı sıçan embriyolarının morfoloji ve adezyon özelliklerinde dramatik bir bozulmaya neden olmuştur, dolayısıyla üreten blastosistte bir tutarlılık eksikliğine yol açmıştır (Takano vd., 2007). Dsh proteinlerinin aynı zamanda hücre polaritesi ve non-kanonikal Wnt sinyal yolağı aracılığıyla hücre adezyonunun önemli düzenleyicileri olduğu göz önüne alındığında, yukarıda bahsedilen bu çalışmalar, pre-implantasyon dönemi embriyo gelişimi sırasında non-kanonikal Wnt sinyalizasyonunun esas olabileceği konseptini güçlendirmiştir.

2.11.3. İmplantasyon ve Desidualizasyon Sırasında Wnt Sinyal Yolağı

Embriyonik gelişim, implantasyona uygun bir blastosiste, reseptif aşamaya senkronize uterinal transformasyona ve aktive edilmiş blastosist ile reseptif uterus arasındaki özel ilişkiye bağlı olarak, başarılı bir implantasyon ve dolayısıyla gebelik için gereklidir (Lloyd vd., 2003). Embriyo implantasyonu ve uterin desidualizasyon ile ilgili birçok sinyal molekülü ve yolak araştırılmış olmasına rağmen, embriyo-uterus etkileşiminde gerçekleşen hiyerarşik diyaloglar halen belirsizdir (Zhang ve Yan, 2016). Wnt sinyal

yolunun memeli implantasyonundaki önemli rolü hakkındaki artan bir anlayış, küresel genomik mikrodizin taramasının ve transgenik fare modellerinin kapsamlı bir şekilde uygulanmasıyla elde edilmiştir. Son yıllardaki araştırmalar, Wnt sinyalizasyonunun pre-implantasyon embriyo gelişimi, implantasyon için blastosist aktivasyonu, uterus gelişimi ve desidualizasyon gibi çoklu implantasyon ve desidualizasyon olaylarında kritik olduğuna dair artan sayıda kanıt sağlamıştır.



Şekil 2.9. Peri-implantasyon olaylarında Wnt sinyali (Chen vd., 2009) (A) Zigottan blastosiste kadar peri-implantasyon embriyo gelişimi, birçok Wnt ligandının, reseptörünün ve ilgili regülatörlerin geniş ekspresyonunu içerir. Bununla birlikte, bu işlemler sırasında Wnt sinyalinin kesin rolü hala tanımlanmayı beklemektedir. (B) Blastosist aktivasyonu, normal embriyo implantasyonu için uterus reseptivitesinin transformasyonunu senkronize eden çok önemli bir adımdır. Wnt sinyali, implantasyon için blastosist yetkinliğini belirleyen bu süreci sağlayan gerekli bir yol olarak gösterilmiştir. (C) Embriyo implantasyonunu başlatmak için Wnt-β katenin sinyali normal embriyo-uterin etkileşimi için gereklidir. Wnt sinyali ayrıca implantasyon sonrası desidualizasyon sürecine aktif olarak katılmaktadır. Wnt sinyali ve embriyo boşluğu (blastosöl) arasındaki olası ilişki ilgi çekicidir ve araştırılmalıdır. DKK, Dickkopf ailesi proteinleri (Wnt antagonistleri); sFRP, salgılanmış Fzd ilişkili protein (Wnt ligand bağlayıcı protein).

2.12. Matriks Metalloproteinazlar

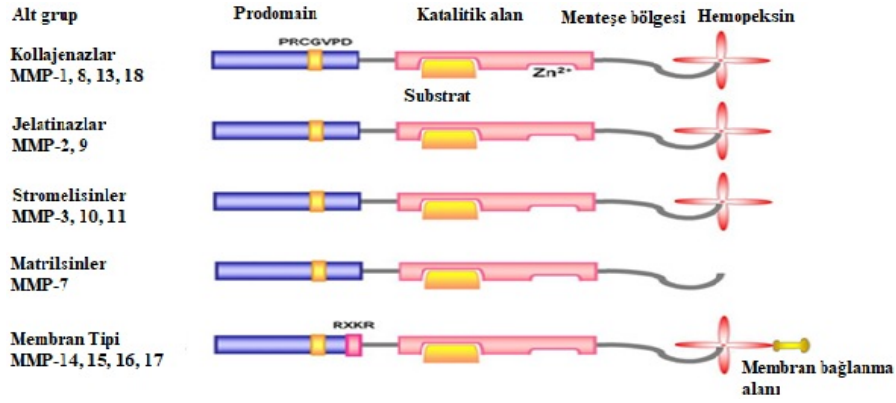
Ekstrasellüler matriks (ECM), doku onarımı ve yeniden modelleme, bazı komponentlerin gelişimi, morfogenez ve çeşitli sinyalleme aktiviteleri gibi kritik süreçleri yürütmek için zaman zaman dejenerasyona uğrar (Visse ve Nagase, 2003; Nagase vd., 2006). ECM bozunmasından sorumlu olan elemanlar matriks

metalloproteinaz (MMP)'dir. Bu proteazlar, tam olarak koordine edilmiş mekanizmaların yürütülmesi amacıyla çeşitli hücrel ortamların üretilmesi için ECM bileşenlerinin ayrıştırılmasıyla ilgilidir. MMP'ler, transkripsiyonel seviyeden aktivasyonlarına, diğer ECM bileşenleriyle iletişimin spesifik moleküller tarafından inhibisyonuna kadar değişen farklı aşamalarda düzenlenir. Düzenlemedeki olası hatalarda proteazların kontrol edilmeyen aktivitesi artrit, kanser, kronik doku ülseri, fibrozis, anevrizmalar, nefrit, ensefalomyelit (Newby, 2005), ateroskleroz (Visse ve Nagase, 2003) vb. gibi çeşitli kusurlara yol açabilir.

MMP'ler tüm yaşam formlarında bulunur ve homolog protein sekansları paylaşan büyük bir çinko bağımlı endoproteinaz ailesi içerir. MMP'ler; substrat spesifiteleri ve domain yapısına göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilysinler, membran tipi MMP'ler (MT-MMP) olmak üzere 20'den fazla proteolitik enzimden oluşan bir ailedir (Amalinei vd., 2010; Bonnans vd., 2014).

MMP'ler genellikle bir prodomain, katalitik bölge, menteşe bölgesi ve hemopeksin bölgesinden oluşur (Şekil 2.10).

- Prodomain, ilk bölge olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir ve yapı olarak 80-90 aminoasit içeren aminoterminal bir propeptiddir (Sethi vd., 2000).
- Katalitik bölge, histidin kalıntıları içeren, bakteriyel metalloproteinazlardan termolizine analog olan ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir (Sethi vd., 2000).
- Menteşe bölgesi, prolinden zengin bölgedir, katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.
- Hemopeksin bölgesi, HEM bağlayan moleküllerin dizinine çok benzediği için bu adı almıştır. Bu bölge disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. *MMP-7* harici bütün metalloproteinazlarda vardır. Bunun dışında; Jelatinaz A ve B, sisteinden zengin jelatin bağlayan ekstra bir bölge içerirler (Evans vd., 1997).



Şekil 2.10. MMP'lerin yapısı. MMP, bir prodomain, katalitik alan, menteşe bölgesi ve hemopeksin alanından oluşur. Katalitik alanda, MMP bir Zn⁺² bağlanma bölgesi ve spesifik substrat için bir bağlanma bölgesi içerir. MMP, prodomain bölgesinde sistein değişirme motifi olan PRCGXPD'ye sahiptir. Matrisinlerin bir hemopeksin alanı yoktur. MT-MMP, ilave bir transmembran bağlama alanına sahiptir.

Matriks metalloproteinaz ailesi aşağıdaki özelliklere sahiptir (Gordon vd., 1993; Ennis ve Matrisian, 1994; Nagase ve Fields, 1996).

1. Hücre dışı matriksin en az bir bileşenini parçalayan proteinazlardır.
2. Zn⁺² iyonu içerirler ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilirler.
3. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktive olmaları gereklidir. *In vitro* olarak organomerküriyel bileşenlerle aktive olabilirler.
4. Metalloproteinazlar, spesifik doku inhibitörleri (TIMP'ler) ile inhibe olurlar.
5. Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu gösterilmiştir.

Çoğu MMP, insan endometriumunda eksprese edilir (Goffin vd., 2003; Vassilev vd., 2005). Fonksiyonları proliferatif ve sekretuar fazlar sırasında ince doku yeniden modellemesinden ve özellikle blastosist implantasyonunda menstruasyon sırasında çok miktarda bulunan ECM yıkımına kadar uzanır. *MMP-9* mRNA seviyesi menstrual fazda stromal hücrelerde artar, ancak protein stromal, epitelyal ve enflamatuar hücrelerde döngü boyunca bulunur (Goffin vd., 2003; Cornet vd., 2005). *MMP-7* mRNA seviyesi, menstruasyonda kuvvetli bir şekilde artar ve daha sonra proliferatif faz sırasında yükselmeye devam eder (Goffin vd., 2003; Vassilev vd., 2005). Bununla birlikte, *MMP-7* epitelyal hücrelerde ağırlıklı olarak lokalize olmakla birlikte, geç sekretuar fazda ve menstruasyondaki stromal odaklarda desidualize hücrelerde de bulunur. Bu MMP'lerin aksine, *MMP-2* mRNA seviyesi, menstrual döngü boyunca oldukça önemlidir ve menstruasyonda hafif bir artış gösterir (Goffin vd., 2003).

Progesteron, MMP-indükleyici faktörlerin (sitokinler gibi) ekspresyonunu önleyerek sekretuar fazda kompleks bir rol oynar. MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8 ve MMP-10 gibi MMP'lerin transkripsiyonunun bastırılması; kültür hücrelerinde ve doku eksplantlarında gösterildiği gibi *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonunu orta derecede inhibe eder (Cornet vd., 2005; Vassilev vd., 2005; Slayden ve Brenner, 2006).

MMP'ler gebelikte, implantasyon esnasında spiral arter yenilenmesinde (Kelly vd., 2003), implantasyon sürecinde büyüme faktörleri (TGF- β ve IGF), sitokinler ve anjiogenik faktörlerin (Endotelin-1) bioaktivitesinin düzenlenmesinde, desidualizasyonda (Chen vd., 2009; Montagnana vd., 2009) ve trofoblast invazyonunda (Benirschke vd., 2006) önemli rol oynarlar. Desidualizasyon esnasında uterin stromal hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasının kısmen MMP'ler ve TIMP'ler tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Chen vd., 2009). Gebelik esnasında trofoblastik ve desidual dokular tarafından üretilen TIMP'ler de aktive olmuş MMP'ler üzerine inhibe edici etki göstermek suretiyle doku yenilenmesinde önemli rol oynarlar ve trofoblastların invaziv potansiyelini sınırlandırarak embriyo invazyonunu kontrol altında tutarlar.

2.12.1. MMP-2

Jelatinaz-A olarak da bilinen *MMP-2* genellikle denatüre kollajenleri (jelatinler) sindirirler. *MMP-2*'nin latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa ağırlığındadır (Sethi vd., 2000). Jelatinazlar (yani, *MMP-2* ve *MMP-9*), katalitik alanları içinde bir fibronektin benzeri sekans içerir ve bu MMP'lerin jelatine bağlanmasına ve jelatinin ayrılmasına yönelik güçlü bir kabiliyet kazandırır. Jelatine ek olarak, hem jelatin hem de stromelinler, tip IV kollajen, laminin ve fibronektini içeren bazal membranın ana bileşenlerini parçalar. *MMP-2*'nin katalitik aktivitesi, kollajen tip I, II ve III'ü denatüre etmede kollajenazlarınkine benzemektedir (Nagase vd., 2006).

2.12.2. MMP-9

Jelatinaz-B olarak da bilinen *MMP-9* birçok hücre tipi ile yapısal olarak ifade edilir ve geniş spektrumlu ECM moleküllerinin degradasyonunda önemli roller oynamaktadır (Fanjul-Fernandez vd., 2010). Gelişmekte olan foliküllerin çevresinde ve ovulasyon öncesi folliküllerin tepesinde gözlenen jelatinolitik aktivitenin *MMP-2* ve *MMP-9*'a karşılık geldiğine inanılmaktadır (Goldman ve Shalev, 2004). *MMP-9*, jelatin ve tip-IV bazal membran kollajeni için substrat spesifiktir. Latent formu 92 kDa, aktif formu 86

kDa ağırlığındadır (Evans vd., 1997). Diğer substratları tip I, III, V kollajen, elastin (Ennis ve Matrisian, 1994; Evans vd., 1997) ve fibronektindir (Sethi vd., 2000).

MMP-2 ve *MMP-9*'un substrat spesifiteleri benzerdir, ancak büyüme faktörü reseptörlerinden kaynaklı farklı cevap verirler (Nagase ve Woessner, 1999).

2.12.3. MMP-7

Matrisin-1 olarak da bilinen *MMP-7* hemopeksin alanından yoksundur. Ek metalloproteinaz (Ennis ve Matrisian, 1994; Evans vd., 1997) olarak da bilinen *MMP-7* molekülünün latent formu 28 kDa, aktif formu 19 kDa ağırlığındadır (Ennis ve Matrisian, 1994; Evans vd., 1997). Metalloproteinaz ailesinde stromelisinlerin bir alt grubu olarak bilinir ve jelatin, elastin, fibronektin, laminin ve entaktini parçalama özelliği nedeni ile stromelisinlere benzer geniş substrat spesifisitesi gösterir (Ennis ve Matrisian, 1994). Epitel hücreleri tarafından sentezlenen ve E-kadherin, pro-TNF- α , Fas ligandı, pro- α -defensin vb. gibi hücre yüzey moleküllerini hedef alan *MMP-7* enzimi bir dizi ekstraselüler matriks bileşeni üzerinde etkilidir (Visse ve Nagase, 2003). *MMP-7* ekspresyonu, tümör mikroçevresinin hipoksik bölgelerinde mevcut olduğunda tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) tarafından yükseltilir (Burke vd., 2003). Bu proteinaz, endotel hücre göçü ve proliferasyonunda rol oynar (Lewis ve Pollard, 2006).

Özel olarak glandular yapıların epitelinde ve monosit kökenli makrofajlarda bulunur. Duktal yapılardan lümene salınımı olmaktadır ve bu esas işlevinin duktusların tıkanmasını önlemek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ortamdaki bakteri yükü arttıkça matrisin de artmaktadır. Matrisin, pro-defensinleri etkin form olan defensinlere parçalayarak epitelyal bağışıklıkta önemli rol almaktadır. Matrisin ayrıca hava yolları epitelinin tamirinde önemli rol almaktadır. Çoğu karsinomda matrisin tespit edilmiştir ve özellikle tümör adalarında saptanmıştır. Buna karşın diğer matriks metalloproteinazlar ise genellikle tümörü çevreleyen stromada tespit edilmiştir (Tüzün vd., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen vücut ağırlığı yaklaşık 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 65202830/10 sayılı onay belgesi (EK-1) alınmıştır.

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 (proöstrus, östrus, metaöstrus, diöstrus) ve hergün için 1 hayvan olmak üzere 3mg/kg Xylazine HCL+ 90mg/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 siklus zamanları vajinal sürüntü 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 3mg/kg Xylazine HCL+ 90mg/kg Ketamine HCL intraperitoneal yolla verilerek anestezi altında uygun yöntemlerle uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

Ölüm sonrası alınan uterus dokularına *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerini göstermek amacıyla immünfloresan incelemeler için rutin takip protokolleri uygulandı.

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

3.2. 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-10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl (Gilson, USA)
- ❖ Santrifüj
- ❖ Thermal cycler
- ❖ Nanodrop
- ❖ Elektroforez (Thermo Fischer, Germany)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler:

- ❖ Antikorlar
 - Primer antikorlar;
 - MMP-2 (2C11): sc-13594 S. Cruz Bio.,
 - MMP-7: ab5706 Abcam
 - MMP-9 (E-11): sc-393859 S. Cruz Bio.,
 - Wnt7a (E-9): sc-365665 S. Cruz Bio.,
 - Wnt3 (D-9): sc-74537 S. Cruz Bio.,
 - β-katenin (E-5): sc-7963 S. Cruz Bio
 - 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
- ❖ RNA-later (Qiagen, Germany)
- ❖ Antibody Diluent Reagent (Invitrogen, USA)

3.4. 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.

3.5. Doku Preparasyonu

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

3.6. 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.

3.7. 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 epitoplara 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°C’de nemli karanlık ortamda gece boyu inkübe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikörler ve kullanıldıkları seyreltme oranları; MMP-2 (1:100), MMP-7 (1:100), MMP-9 (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 (Alexa Flour 568): ab175473 abcam ve Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Flour 488): ab150077) oda ısısında 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 4 kez 3’er dakika yıkandı.
- 0.5 μ g/ml DAPI (Sigma, USA) ile oda ısısında 5 dk çekirdek boyaması yapıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 5 dakika yıkandı.
- Kapatma mediumu ile kapatma yapıldı.

3.8. Semikantitatif Skorlama Yöntemi:

Peri-implantasyon periyotlarında uterus dokularında görüntülenen *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* ekspresyonlarının şiddeti semikantitatif skorlama yöntemi ile belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi. Bütün kesitler birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından incelenerek, uterus dokusunda *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* antikörlerinin boyanma derecelerine göre; boyanma olmamış ise negatif (-), hafif derecede boyanma olmuş ise (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++), kuvvetli derecede boyanma olmuş ise (+++), çok kuvvetli derecede boyanma olmuş ise (++++) boyanma olarak uterus dokuları değerlendirildi.

3.9. Real Time-PZR Uygulamaları

Oluşturulan kontrol ve gebelik grubundan alınan uterus dokuları ötenazi sonrası çift taraflı kesilerek açıldı ve endometrium dokusu zarar görmeden kazındı. Kazınan örnekler RNA-later içerisine konulduktan sonra -20°C’de bekletildi. *MMP-2*, *MMP-7*, *MMP-9*, *Wnt3*, *Wnt7a* ve β -*katenin* proteinlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, Invitrogen) 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.

3.9.1. 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 içerisine konulmak şartıyla alınmış olan dokuların bulunduğu ependorf tüpler -20°C 'den alınarak çalışma ortamına konulmuştur.

- 7ml Lizis buffer ve 70 μl β -merkaptoetanol homojenizasyon tamponu hazırlandı.
- Hazırlanan tampondan 600 μl dokuların olduğu ependorf tüplere aktarıldı.
- Daha sonra örnekler homojenize 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 RNaz 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 İnvitrogen firmasının Superscript II RT ile ReverseTranskriptaz PZR kitleri kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. 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 12 μL '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) Real-Time PZR'nin başarılı olup olmadığını ölçmek için genin ekzon dizilerinden tasarlanan primerler ile standart PZR yapılmıştır.

3.9.3. Primerler

Gerçek zamanlı kantitatif PZR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metoddur. Real-Time PZR’da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin 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 amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Bu çalışmada kendi hazırladığımız primerler kullanılmıştır. Gen ekspresyonları incelenen genlere ait özgül primerlerin dizisi, T_m 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)	T _m Değeri (°C)	T _A Değeri (°C)	Erişim No	Dizi Yeri
<i>Wnt3</i> Forward	AGTCTCGTGGCTGGGTGGA	19	61.6	56.7	XM_006246487	922-940
<i>Wnt3</i> Reverse	TTGGGCTCGCAGAAGTTAGG	20	60.5			1011-1030
<i>Wnt7a</i> Forward	GGGACTATGACCCGAAAGC	20	62.5	58	NM_001100473	251-270
<i>Wnt7a</i> Reverse	GGATCTGTTACAGATGATGCTC	23	60.9			358-380
<i>β-katenin</i> Forward	AGCTTCCAGACACGCCATCAT	21	61.2	58	XM_008766691	1350-1370
<i>β-katenin</i> Reverse	CGGTACAACGGGCTGTTTCTAC	22	64.2			1426-1447
<i>MMP-2</i> Forward	CAGGGAATGAGTACTGGGTCTATT	24	63.6	57.6	NM_031054	1904-1927
<i>MMP-2</i> Reverse	ACTCCAGTTAAAGGCAGCGTCTAC	24	65.2		BC074013	1999-2022
<i>MMP-7</i> Forward	ACTCATGAACTTGCCACTCTC	22	62.1	58	NM_012864	665-686
<i>MMP-7</i> Reverse	TTTCCATATAACTTCTGGATGCCT	24	60.3			784-807

MMP-9 Forward	ATCTCTTCTAGAGACTAGGAAGGAG	25	64.1	58	NM_031055	2221- 2245
MMP-9 Reverse	CAAGCTGATTGGTTCGAGTAGC	22	62.1			2329- 2350
GAPDH Forward	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	20	62.5	58	NM_017008.4	1-20
GAPDH Reverse	GCCAAATCCGTTACACCCG	19	59.5			87-105

3.9.4. Standart PZR Uygulamaları

Real-Time PZR’da 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 gradyent uygulanmıştır. Buna göre tüm primerler 50-58°C aralığında gradyente 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 10X 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 , 1,2M betain, %0,1’lik Triton X-100 ve 100-500 ng kalıp DNA eklenmiştir. Standart PZR uygulamaları aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir:

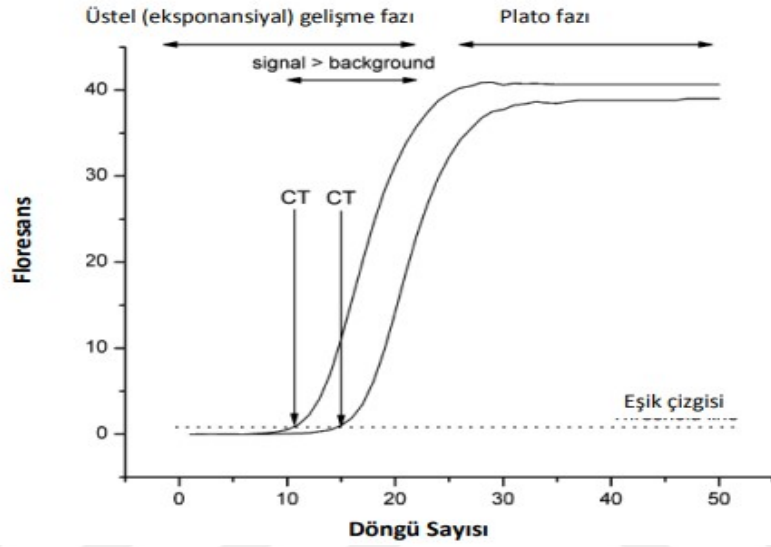
Başlangıç denatürasyonu: 94°C’de 3 dk
-35 döngü
Denatürasyon: 94°C’de 45 sn
Bağlanma: 50-58°C’de 30 sn
Uzama: 72°C’de 45 sn
Son uzama: 72°C’de 10 dk
Son sıcaklık: 12°C

Her bir primerin uygun T_A değeri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

3.9.5. 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 rapörtör *GAPDH*'tir.



Şekil 3.1. Real-Time PZR cevap eğrileri (Kubista vd., 2006)

Kontrol ve gebelik gruplarından elde edilen total RNA'lerden sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBER Green-I boyasının floresan ışığa 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-fusion 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.

Bileşen	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	cDNA: 100ng-100 fg
Nükleaz içermeyen su	-	-	
Total hacim	20 µl	10 µl	

- Master miks 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

Deney hayvanlarından vajinal sürüntü alınarak östrus siklusunun evreleri belirlendi ve hematoksilin&eoizin boyaması yapılarak genel morfolojiye ait yapılar gözlemlendi. Ayrıca *Wnt3*, *Wnt7a*, *β-katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerinin periimplantasyon döneminde sıçan endometriumundaki ekspresyonları belirlenmiş ve semikantitatif skorlama yöntemiyle elde edilen bulgular Tablo 4.1-4.7’de verilmiştir.

4.1. Grup-1 Bulguları

4.1.1. Vajinal Sürüntü Bulguları

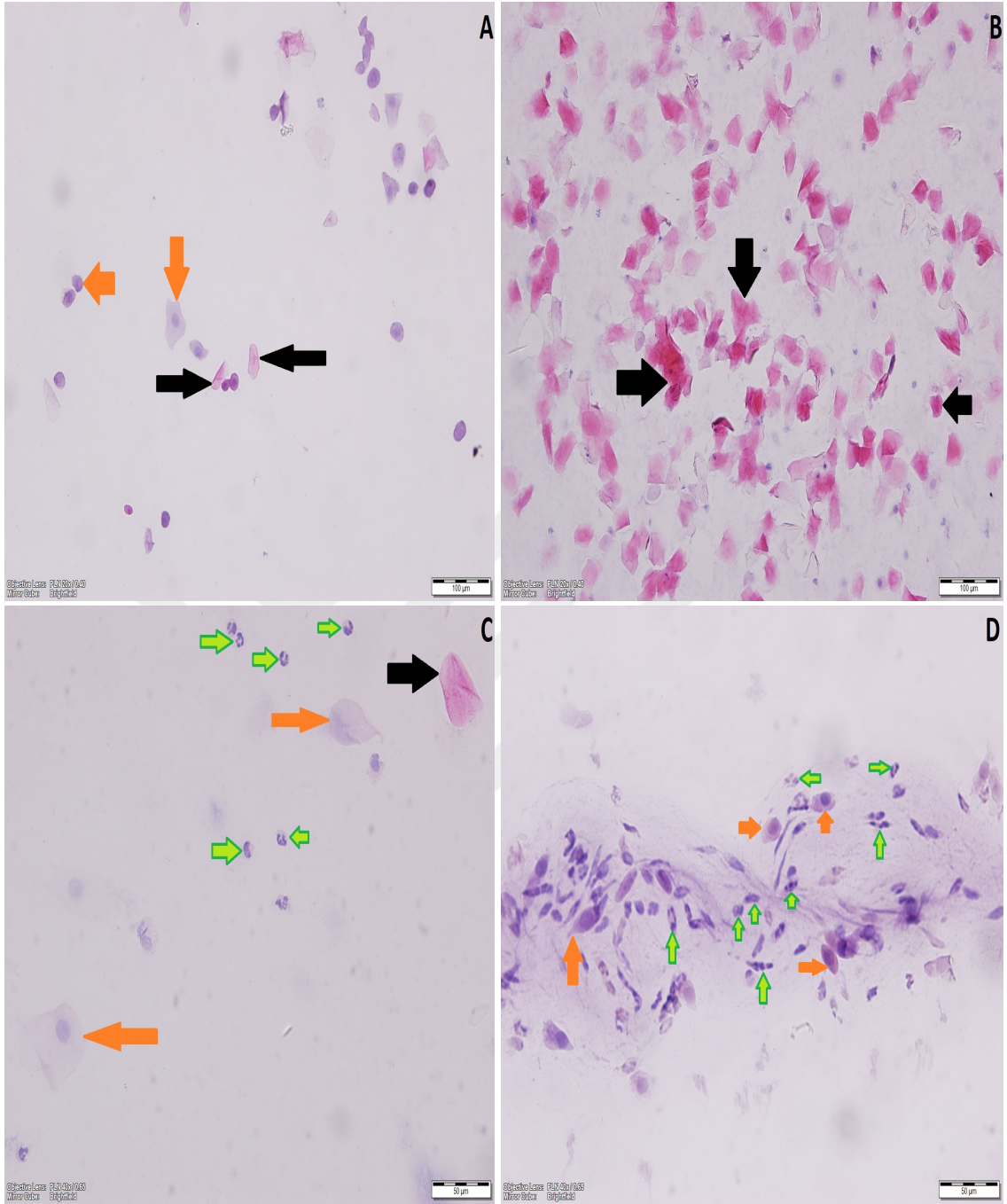
Deney sonunda östrus siklusunun tespiti için alınan vajinal sürüntüler ışık mikroskobu vasıtasıyla belirlendi. Boyama işlemi için hematoksilin&eoizin boyası kullanıldı.

Proöstrus evresinde çekirdekli epitel hücrelerinin baskınlığı bulundu. Bu hücreler kümeler halinde veya ayrı ayrı görünebilir. Bazen kornifiye epitel hücreleri de görüldü. Lökositler ise gözlenmedi (Şekil 4.1-A).

Östrus evresinde belirgin bir şekilde kornifiye epitel hücreleri görüldü. Çok sayıdaki bu hücreler kümeler halinde görüldü. Görünür bir çekirdek bulunmaz. Sitoplazması granüllü ve şekli düzensizdir (Şekil 4.1-B).

Metaöstrus evresinde lökositlerin ve birkaç çekirdekli epitelyal ve/veya kornifiye epitelyal hücrelerin baskın olduğu hücre tiplerinin bir karışımı vardı (Şekil 4.1-C).

Diöstrus evresi ağırlıklı olarak lökositlerden ve çekirdekli epitel hücrelerinden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.1-D).



Şekil 4.1. Kontrol grupları olan östrus sikluslarının karşılaştırılması. A) Proöstrus, B) Östrus, C) Metaöstrus, D) Diöstrus. Çekirdekli epitel hücreleri (turuncu ok), kornifiye hücreler (siyah ok), lökositler (yeşil ok).

4.1.2. Östrus Siklusu Işık Mikroskopi Bulguları

Gebelik oluşturulmayan hayvan grubunda *Rattus norvegicus* cinsi sıçanlardaki östrus siklusu evreleri histolojik özelliklerine göre değerlendirildi. Proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus evreleri için hematoksilin&eoizin boyaması ile ışık mikroskopide genel morfolojiye ait veriler ve *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9*

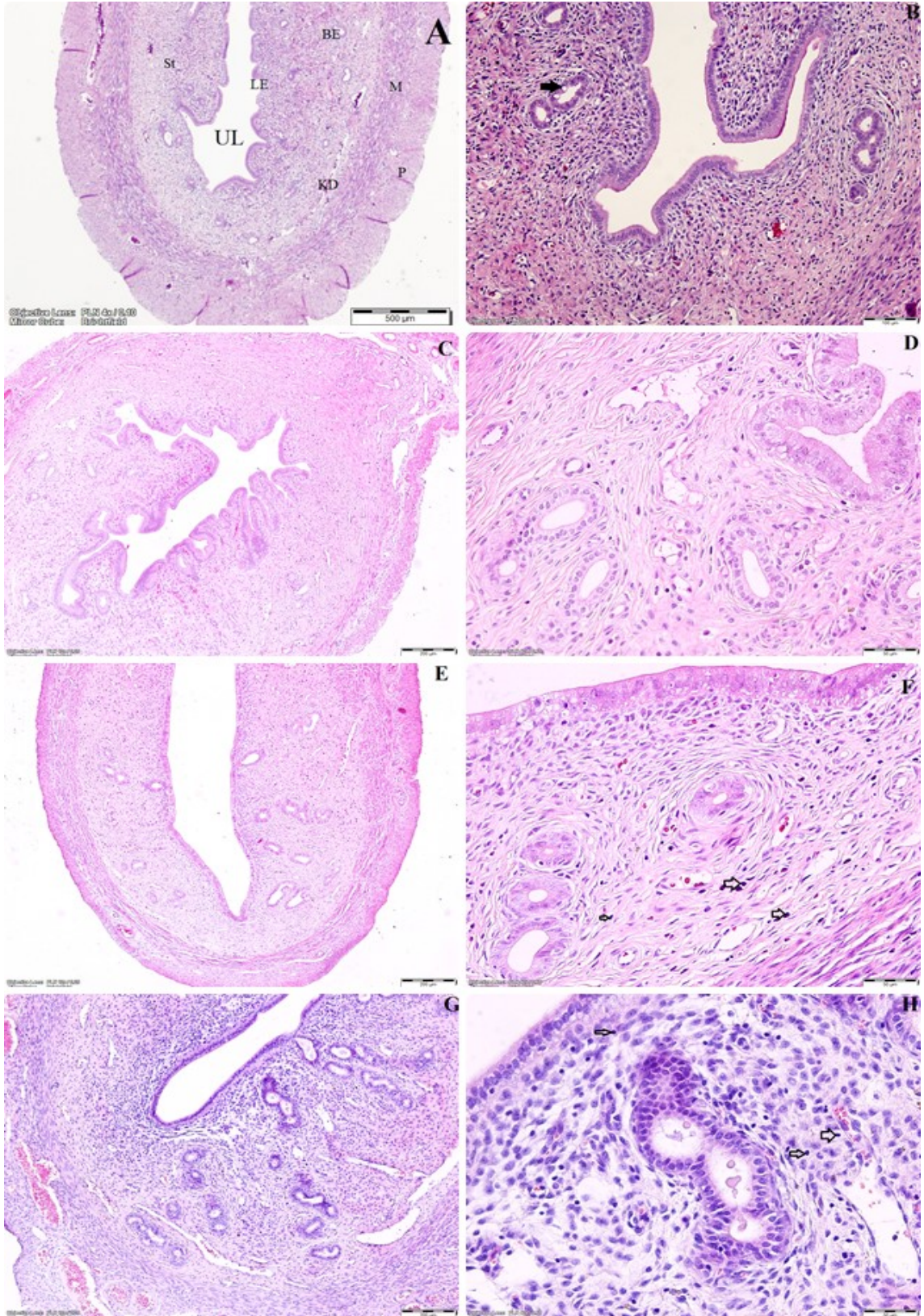
proteinleri için immünfloresan boyamalar ile immünfloresan mikroskop verileri elde edildi.

Proöstrus evresinde, lümen girintili-çıkıntılıdır. Epiteli tek katlı prizmatik epitel olarak görülmektedir. Endometrial bezler çoğunlukla bazal stromada konumlanmıştır. Endometrial bez epitelinin arasında glikojen içeriği artmış hücreler bulunmaktadır (siyah ok) ve bezlerin boyutlarının küçük olduğu izlenmiştir (Şekil 4.2 A-B).

Östrus evresinde, lümen girintili-çıkıntılıdır. Epitelin bazı yerlerinde yalancı çok katlı epitel de izlenmektedir. Ayrıca uterus bezlerinin bazal stromaya kadar indiği gözlenmiştir. Uterus lümenindeki bu değişimler blastosist implantasyonun gerçekleşmesine de olanak sağlar (Şekil 4.2 C-D).

Metaöstrus evresinde, lümen düz bir şekilde görülmektedir. Luminal epitel hücrelerinde glikojen içeriği artmıştır. Glandular ve luminal epitelde dejenerasyonlar gözlenirken, değişken olabilen lökosit infiltrasyonu ve az damarlanma gözlenmiştir (Şekil 4.2 E-F).

Diöstrus evresinde, lökosit infiltrasyonu fazladır. Epitel tek katlı prizmatik epitel görünümündedir. Bu evrede, uterin bezlerin sayısı bir miktar artış göstermiştir ve bezler kıvrımlı bir hal almaktadır (Şekil 4.2 G-H).



Şekil 4.2. Östrus siklusundaki evrelere ait ışık mikroskopik bulgular (H&E). A-B; proöstrus, C-D; östrus, E-F; metaöstrus, G-H; diöstrus (BE: Bez epiteli, KD: Kan damarı, LE: Luminal epitel, M: Miyometrium, P: Perimetrium, UL: Uterus lümeni)

4.1.3. Östrus Siklusu İmmü Floresan Bulguları

Çalışmada yer alan proteinlerin **proöstrus** evresinde eksprese oldukları lokalizasyonlar Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Wnt3 luminal epitelde orta derecede ekspresyon gösterirken endometrial bezlerde zayıf ekspresyon göstermektedir. Kan damarı etrafındaki stromada ve endotelde kuvvetli immülokalizasyonu gözlemlendi. Ayrıca subluminal stromadan endometriumun bazal stromasına doğru gidildikçe ekspresyon seviyesinin aynı olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.3 A-E).

Wnt7a’nın luminal epitel ve endometrial bezlerde ekspresyonu gözlemlenmedi. Kan damarının endotelinde ve kan damarının etrafındaki stromada orta kuvvette ifade artışı gözlemlendi. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru giderken ise kuvvetli dereceden çok kuvvetli dereceye doğru ekspresyon artışı görülmektedir (Tablo 4.1) (Şekil 4.4 A-E).

β-katenin’in luminal epitel ve endometrial bezlerde orta derecede ekspresyona sahip olduğu gözlemlendi. Kan damarı endotelinde ve stromasında da kuvvetli derecede ekspresyon gözlemlenirken, subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe ekspresyonun aynı oranda kuvvetli olduğu görüldü (Tablo 4.1) (Şekil 4.5 A-E).

MMP-2 luminal epitel ve bez epitelinde ekspresyon göstermedi. Kan damarı endotelinde ve kan damarını çevreleyen stromada ise kuvvetli ifade artışı gözlemlendi. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe *MMP-2*’nin ifade seviyesinin zayıftan kuvvetli dereceye doğru arttığı belirlendi (Tablo 4.1) (Şekil 4.6 A-E).

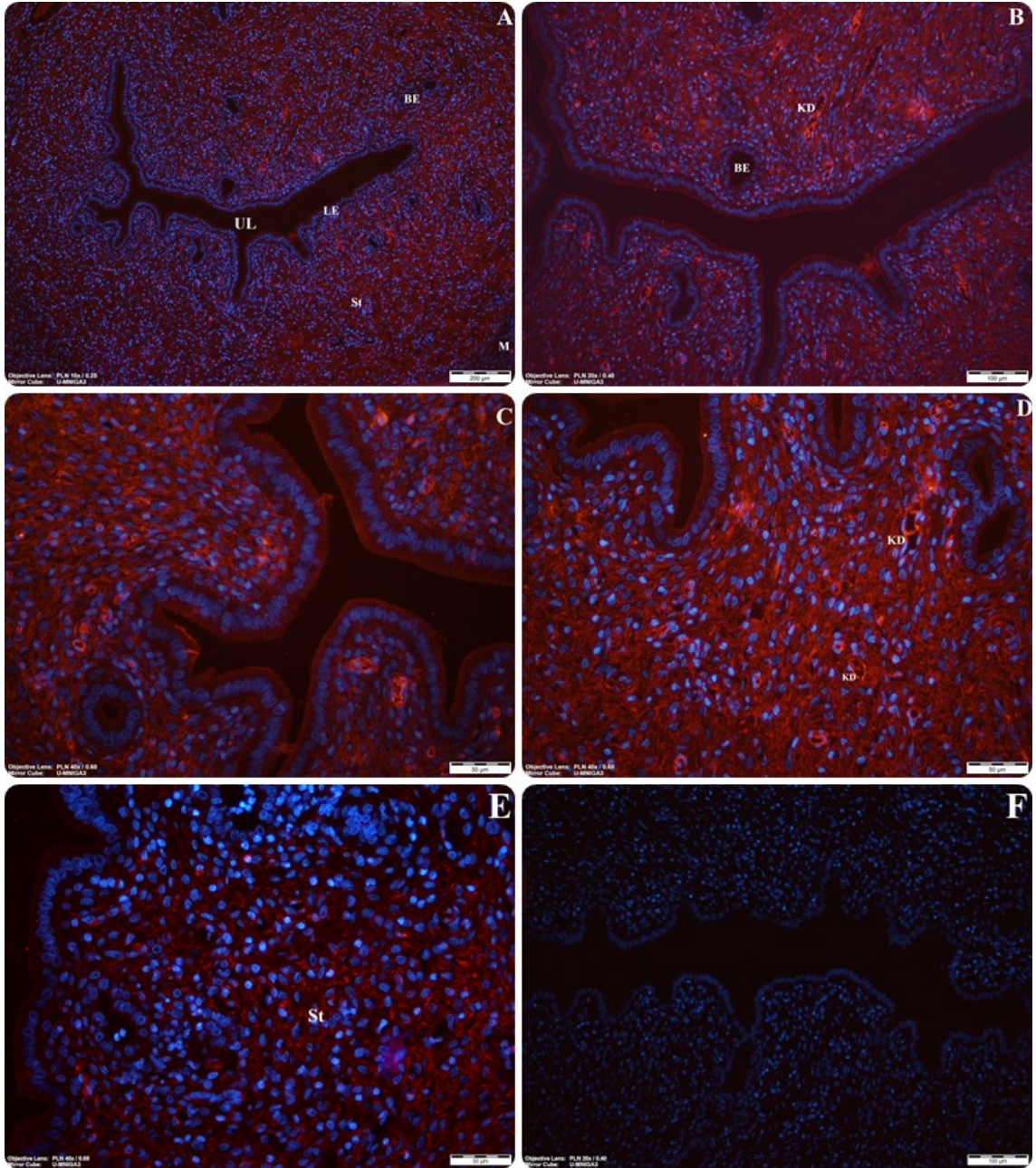
MMP-7 luminal epitel ve bez epitelinde orta derecede ekspresyon gösterdi. Kan damarının endotelinde ise ifade seviyesi çok kuvvetli olarak belirlendi. Subluminal stroma ve bazal stromada aynı kuvvette zayıf ekspresyon gözlemlenirken, stromal hücrelerin sitoplazmasında ise *MMP-7*’nin çok kuvvetli oranda lokalize olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.7 A-D).

MMP-9’un luminal epitelde zayıf ifade artışı gözlemlenirken bez epitelinde ekspresyonu gözlemlenmedi. Kan damarı endotelinde ve onu çevreleyen stroma bölgesinde kuvvetli ifade seviyesi izlendi. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe *MMP-9*’un ifade düzeyinin kuvvetli bir biçimde arttığı görüldü (Tablo 4.1) (Şekil 4.8 A-E).

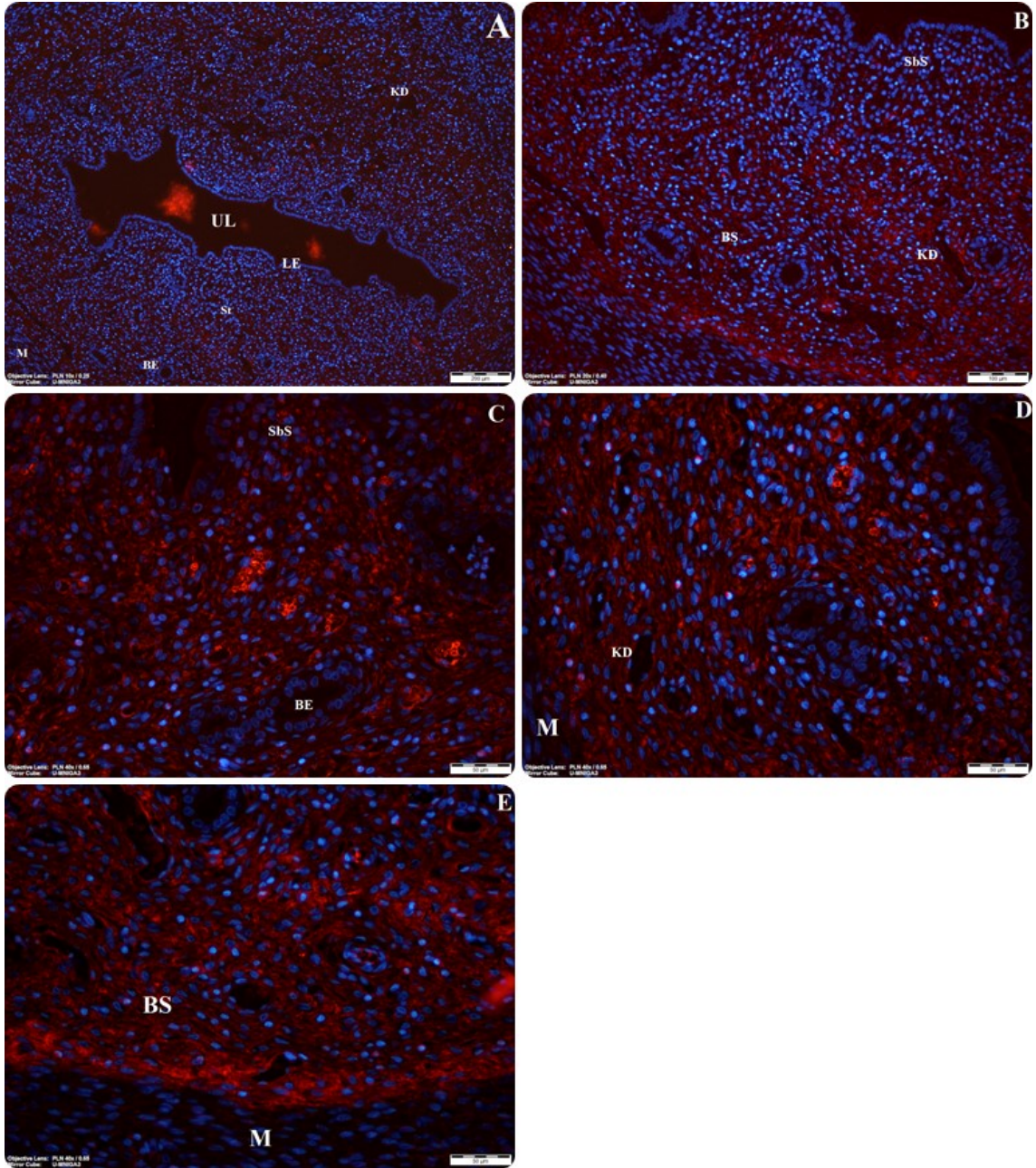
Tablo 4.1. Proöstrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immüno lokalizasyonları

Proöstrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	++	+	+++	+++	+++
<i>Wnt7a</i>	-	-	+++	++++	++
β - <i>katenin</i>	++	++	+++	+++	+++
<i>MMP-2</i>	-	-	+	+++	+++
<i>MMP-7</i>	++	++	+	+	++++
<i>MMP-9</i>	+	-	++	+++	+++

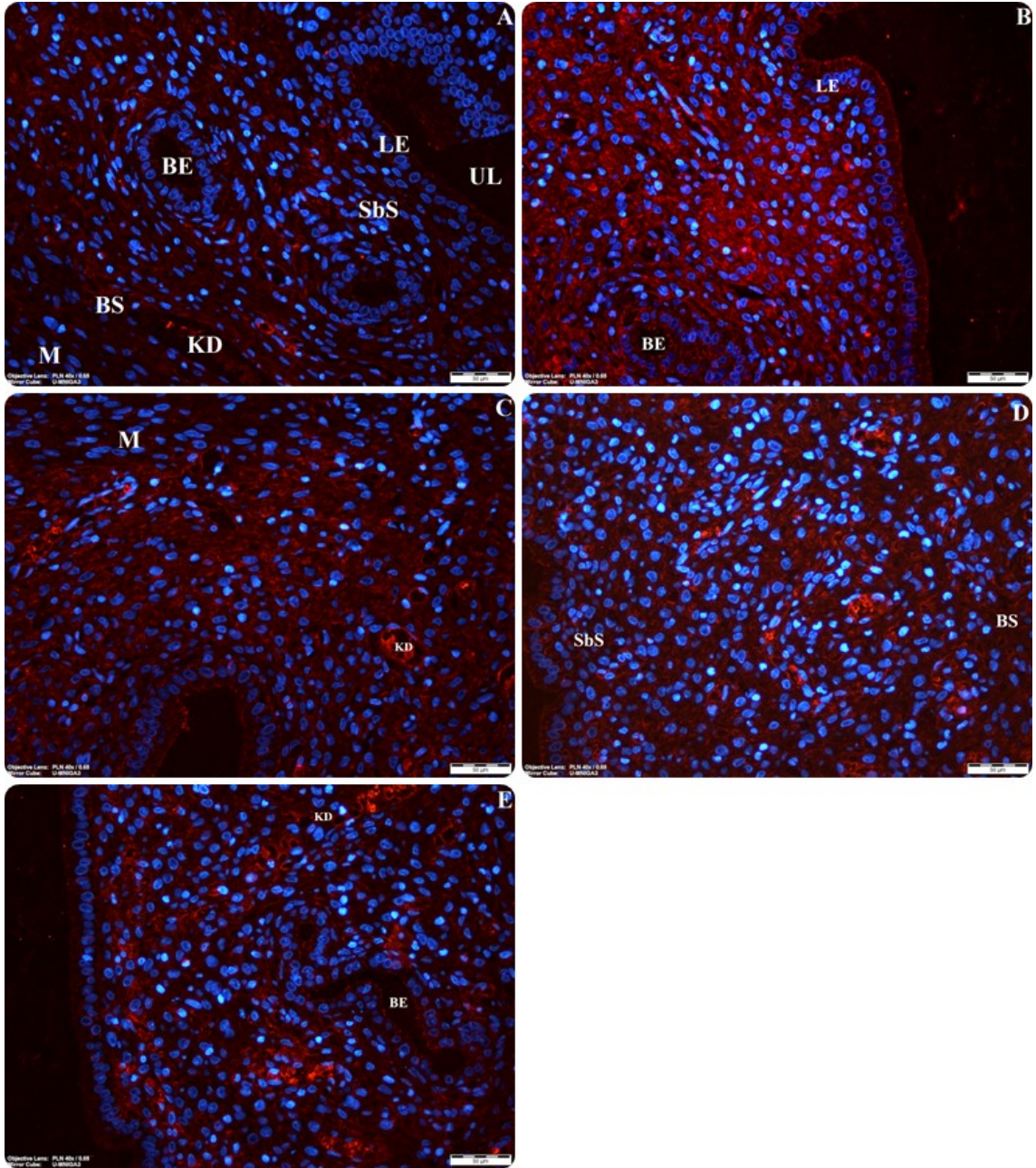
++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok



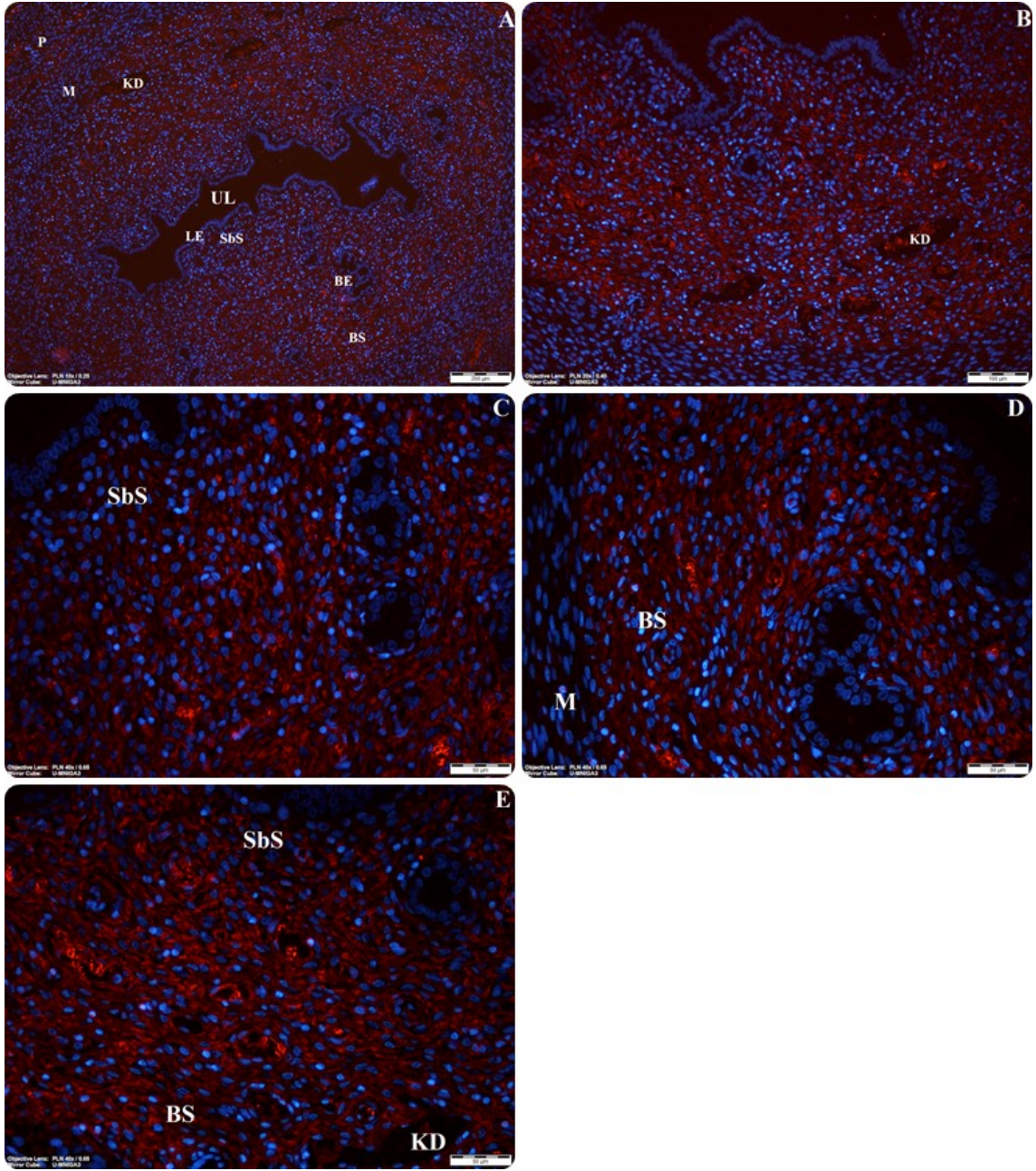
Şekil 4.3. Proöstrus evresinde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). Negatif kontrol (F). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; St: Stroma; M: Miyometrium).



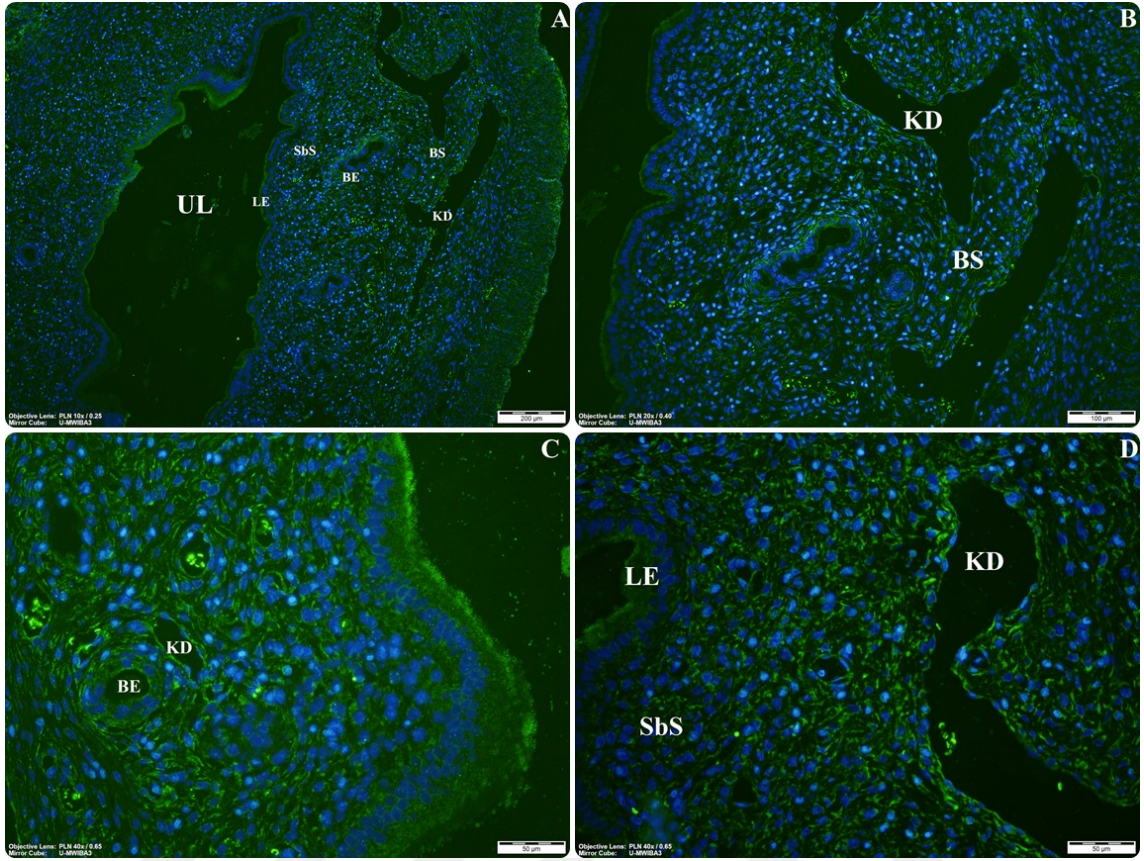
Şekil 4.4. Proöstrus evresinde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; SbS: Subluminal stroma).



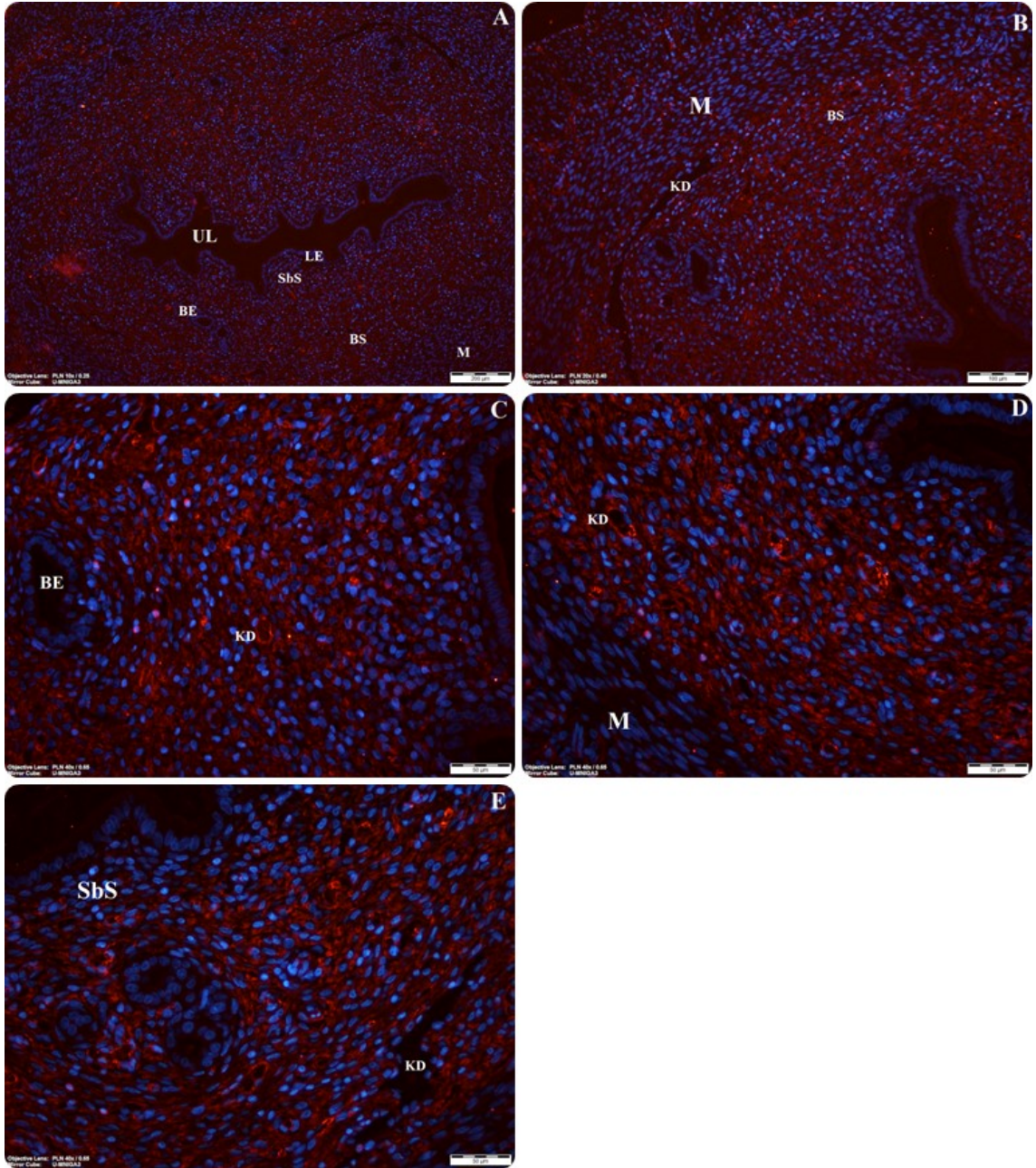
Şekil 4.5. Proöstrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; SbS: Subluminal stroma).



Şekil 4.6. Proöstrus evresinde *MMP-2* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; SbS: Subluminal stroma).



Şekil 4.7. Proöstrus evresinde *MMP-7* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; SbS: Subluminal stroma).



Şekil 4.8. Proöstrus evresinde *MMP-9* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; SbS: Subluminal stroma).

Çalışmada yer alan proteinlerin **östrus** evresinde eksprese oldukları lokalizasyonlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Wnt3’ün luminal epitelde ekspresyon düzeyi orta derece olarak gözlenirken, bez epitelinde ekspresyonu gözlenmedi. Kan damarı endotelinde ve kan damarı etrafındaki stromada çok kuvvetli *Wnt3* immünolokalizasyonu görülmektedir. Ayrıca subluminal

stromadan endometriyumun bazal stromasına doğru çok kuvvetli ekspresyon artışı gözlenmektedir (Tablo 4.2) (Şekil 4.9 A-D).

Wnt7a luminal epitel ve bez epitelinde zayıf kuvvette ekspresyon gösterirken, endometrial bezleri çevreleyen stromada orta derecede ekspresyon gösterdi. Kan damarının endotelinde ve onu çevreleyen stroma bölgesinde ise çok kuvvetli ekspresyon gözlenmiştir. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru giderken de çok kuvvetli derecede ekspresyon artışı vardı (Tablo 4.2) (Şekil 4.10 A-D).

β -katenin luminal epitelde orta kuvvette ifade edilirken, endometrial bez epitelinde ve damar endotelinde kuvvetli ekspresyonu görülmektedir. Stroma bölgesinde ise subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe ekspresyon seviyesi giderek artmaktadır (Tablo 4.2) (Şekil 4.11 A-E).

MMP-2'nin luminal epitelde zayıf ifade seviyesi gözlenirken, bez epitelinde ekspresyonu gözlenmedi. Kan damarı endotelinde ve stromasında kuvvetli ekspresyon gözlenirken, subluminal stromadan bazal stromaya doğru ekspresyon seviyesinin çok kuvvetliye doğru arttığı gözlendi (Tablo 4.2) (Şekil 4.12 A-E).

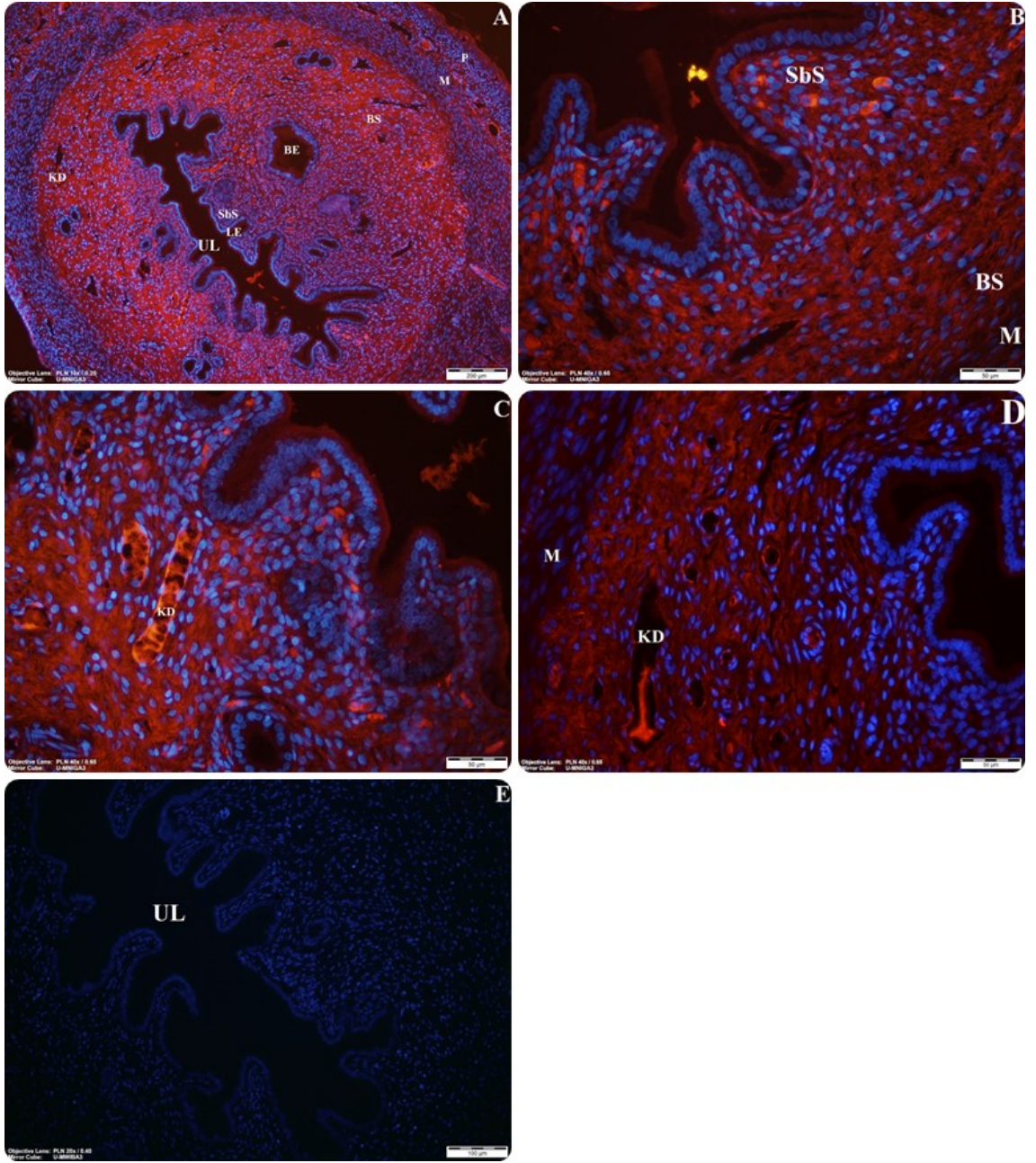
MMP-7'nin luminal epitel ve bez epitelinde çok kuvvetli ekspresyonu gözlendi. Kan damarı endotelinde kuvvetli ekspresyon görülmektedir. Stromada bütün alanlarda genel olarak aynı olmak üzere zayıf bir ekspresyon vardı fakat stromal hücrelerin sitoplazmasında *MMP-7* ifadesi oldukça fazla olarak bulunmuştur (Tablo 4.2) (Şekil 4.13 A-D).

MMP-9 luminal epitel ve bez epitelinde zayıf ekspresyon gösterirken, bez epitelinin etrafındaki stromada orta kuvvette ekspresyona sahipti. Kan damarının endotelinde ve etrafındaki stromada ise çok kuvvetli ekspresyon görülmektedir. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe orta kuvvetten çok kuvvetliye doğru bir ifade artışı gözlenmiştir (Tablo 4.2) (Şekil 4.14 A-E).

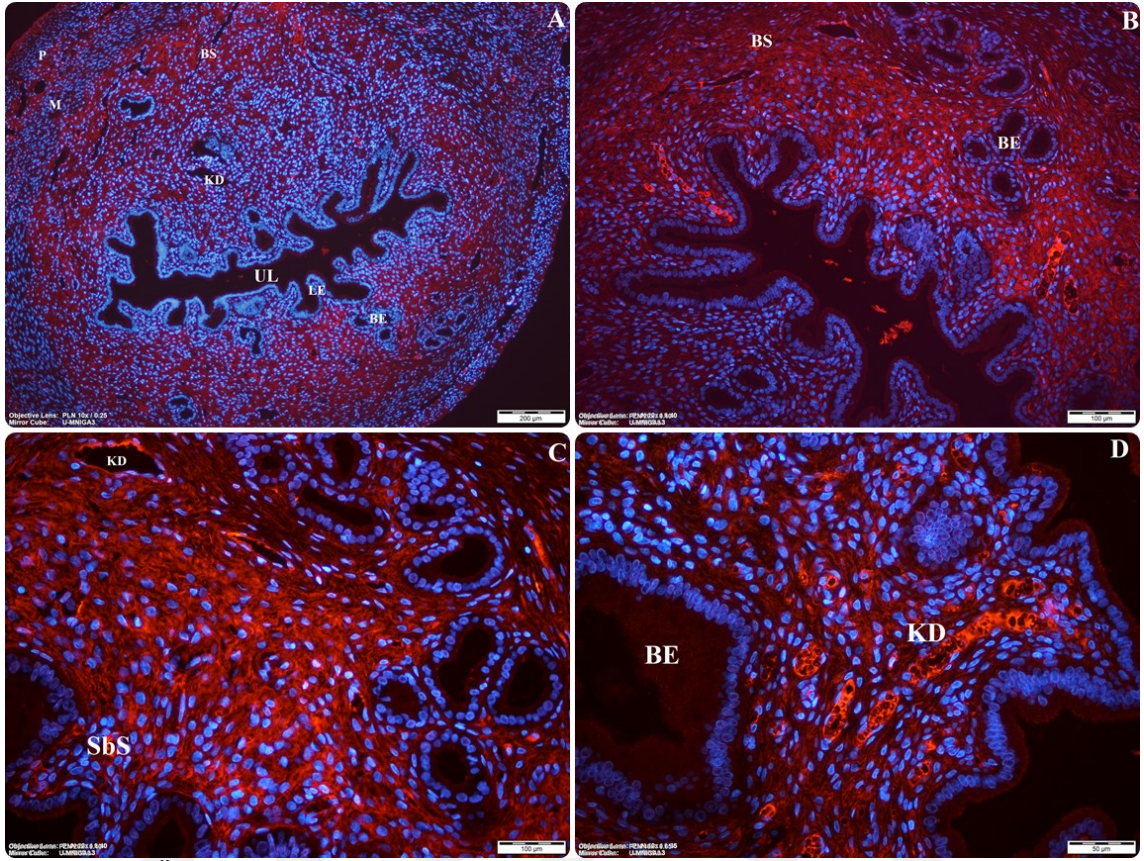
Tablo 4.2. Östrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immüno lokalizasyonları

Östrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	++	-	+++	++++	++++
<i>Wnt7a</i>	+	+	+++	++++	++++
β - <i>katenin</i>	++	+++	+	+++	+++
<i>MMP-2</i>	+	-	+++	++++	+++
<i>MMP-7</i>	++++	++++	-	+	+++
<i>MMP-9</i>	+	+	++	++++	++++

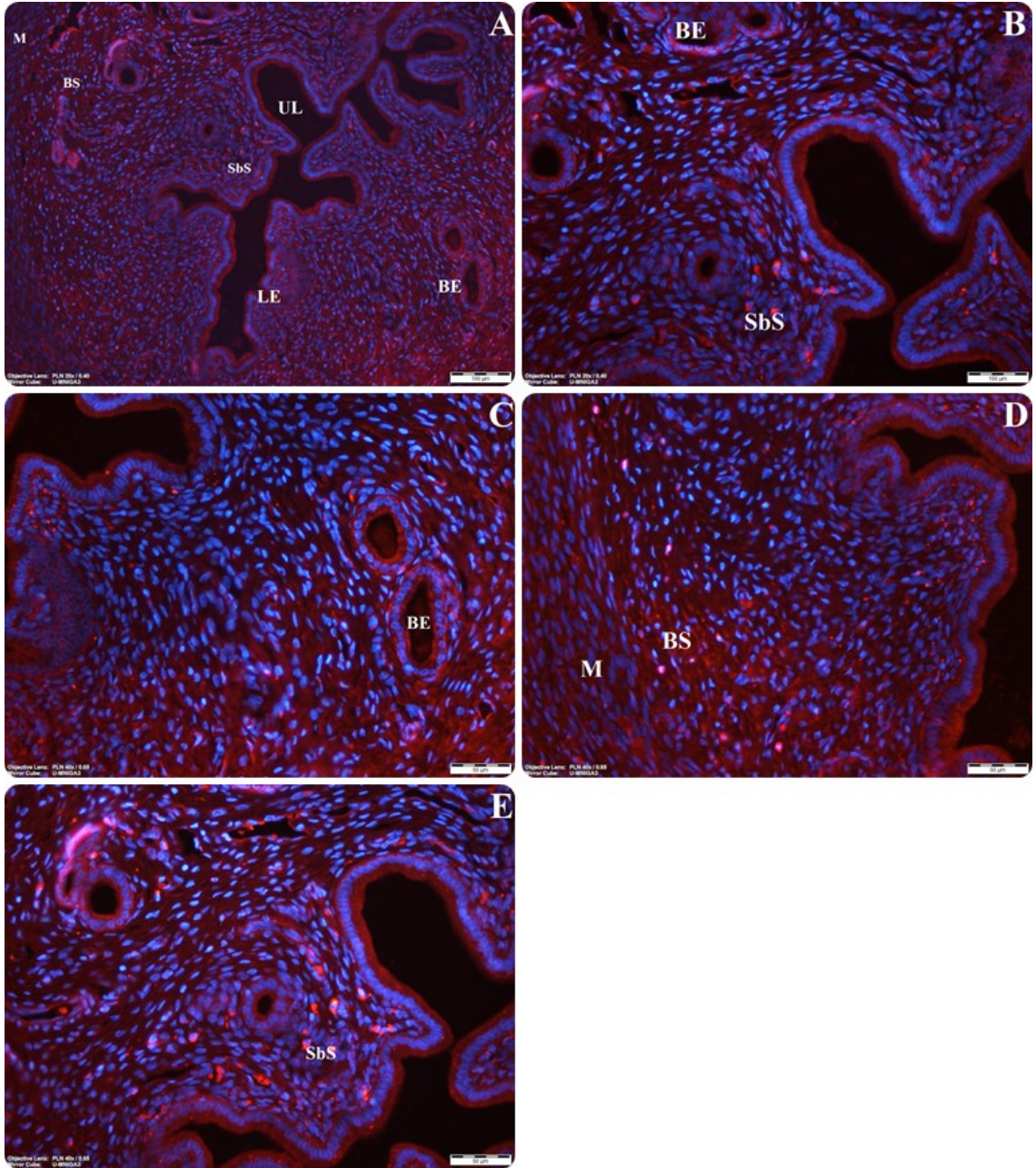
++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok



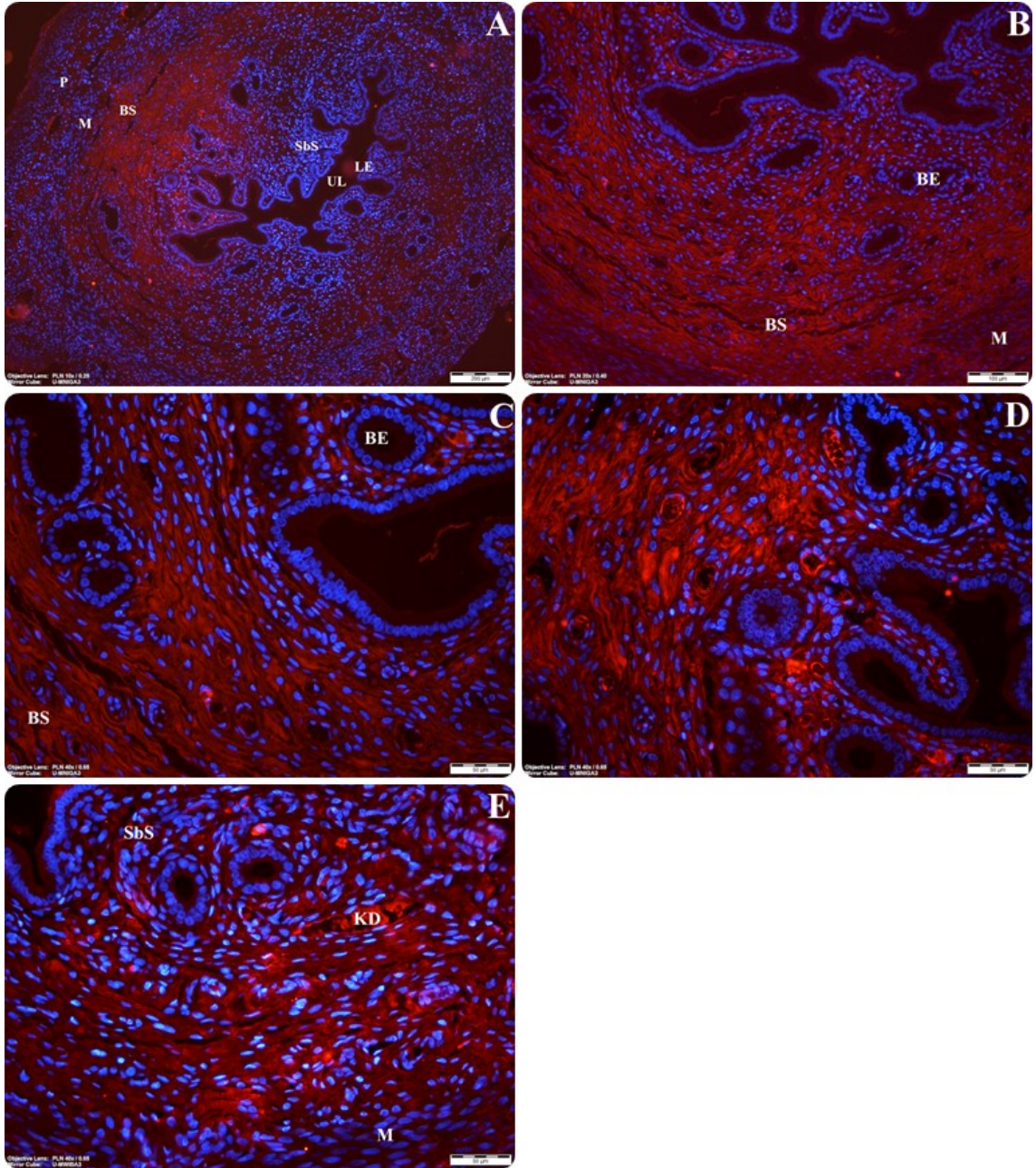
Şekil 4.9. Östrus evresinde *Wnt3* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D). Negatif kontrol (E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; P: Perimetrium).



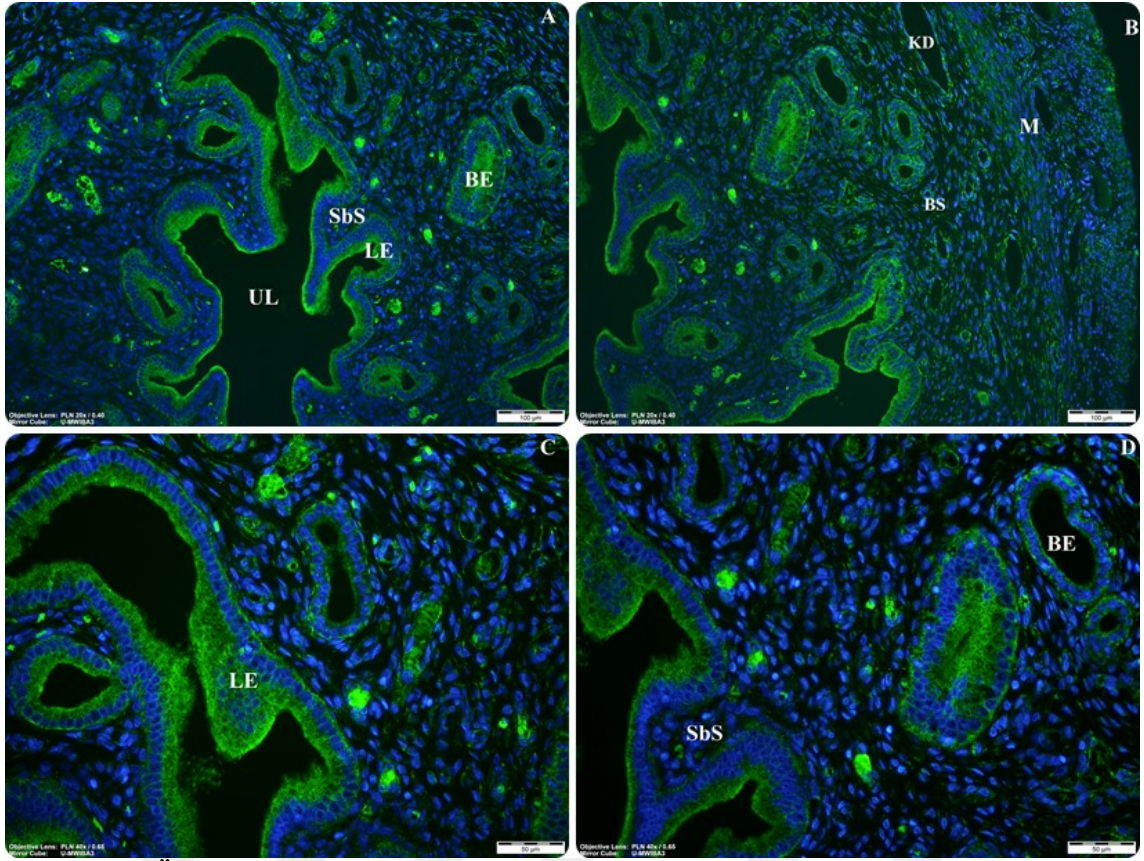
Şekil 4.10. Östrus evresinde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; P: Perimetrium).



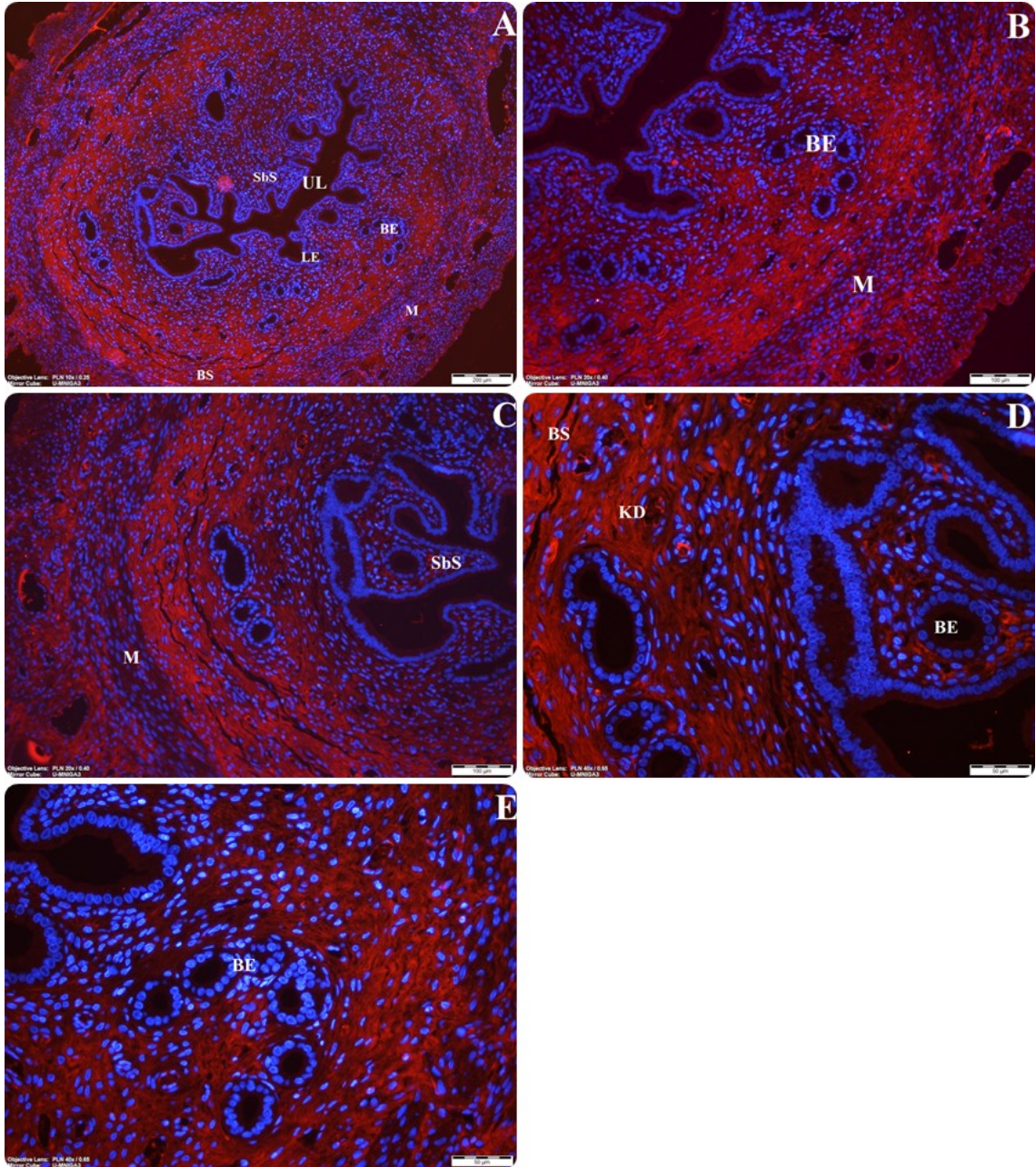
Şekil 4.11. Östrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; Sbs: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.12. Östrus evresinde *MMP-2* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; P: Perimetrium).



Şekil 4.13. Östrus evresinde *MMP-7* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.14. Östrus evresinde *MMP-9* immünolocalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).

Çalışmada yer alan proteinlerin **metaöstrus** evresinde eksprese oldukları lokalizasyonlar Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Wnt3’ün luminal epitelde ve bez epitelinde zayıf derecede lokalize olduğu gözlemlendi. Kan damarı endotelinde ve kan damarını çevreleyen stroma bölgesindeki ekspresyon şiddeti yer yer kuvvetli olarak görülürken, *Wnt3* ekspresyon şiddetinin subluminal

stromadan bazal stromaya doğru kuvvetli derecede arttığı görüldü. Ayrıca stroma bölgesinde fazla sayıda lökosit yoğunluğu bulunmaktadır (Tablo 4.3) (Şekil 4.15 A-E).

Wnt7a'nın luminal epitelde orta derecede ifade artışı görülürken, bez epitelinde zayıf ekspresyonu gözlemlendi. Endometrial bezleri çevreleyen stromada ise orta kuvvette ekspresyon vardı. Ayrıca kan damarının endotelinde ve kan damarını çevreleyen stroma bölgesinde kuvvetli ekspresyon belirlendi. Subluminal stroma ve bazal stromadaki *Wnt7a*'nın genel olarak güçlü ekspresyonu bulunmaktadır (Tablo 4.3) (Şekil 4.16 A-D).

β-katenin luminal epitel ve bez epitelinde çok kuvvetli ekspresyon gösterdi. Bu kısımlarda özellikle epitel hücrelerinin birbirine komşu bölgelerinde yer aldığı gözlemlendi. Kan damarının endotelinde ve bunu çevreleyen stroma bölgesinde çoğunlukla orta kuvvette ifade artışı gözlenirken, yer yer zayıf ekspresyon bölgeleri de görülmüştür. Stromanın bütün alanlarında ise genel olarak orta derecede bir lokalizasyon olduğu görülmektedir. (Tablo 4.3) (Şekil 4.17 A-E).

MMP-2 luminal epitel ve bez epitelinde zayıf lokalizasyon gösterdi. Damar endotelinde de zayıf derecede ifade seviyesi izlenirken, bazal stroma bölgesindeki kan damarlarını çevreleyen stroma bölgesinde ise yer yer orta derecede ekspresyon gözlemlendi. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru *MMP-2* ekspresyon şiddetinin orta kuvvetten kuvvetli dereceye doğru arttığı görüldü (Tablo 4.3) (Şekil 4.18 A-D).

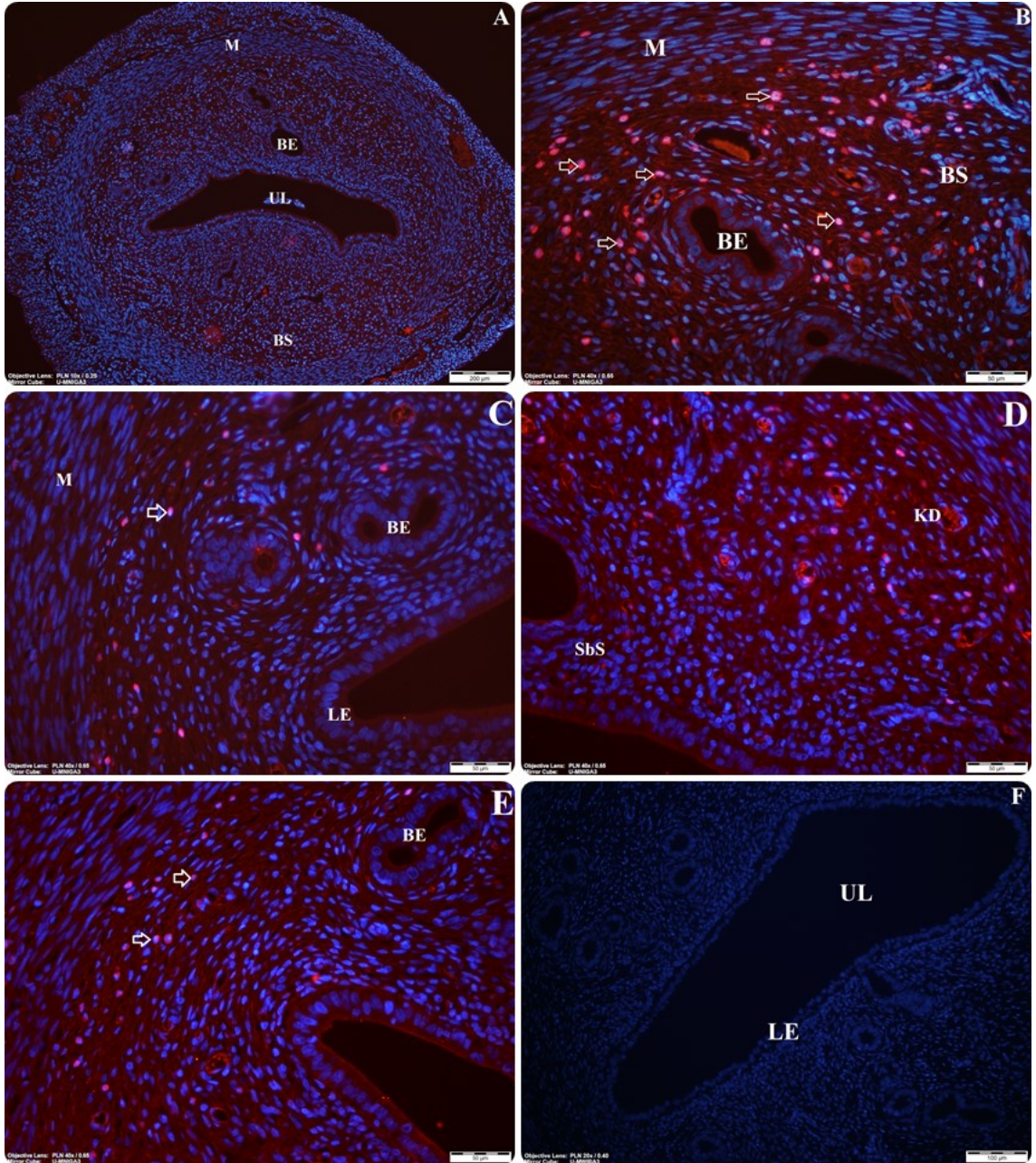
MMP-7'nin luminal epitelde zayıf ifade seviyesi görülürken, bez epitelinde ekspresyon izlenmedi. Damar endotelinde orta kuvvette ifade artışı görüldü. Kan damarını çevreleyen stroma bölgesinde ve subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe çok kuvvetli ifade artışı gözlenmiştir (Tablo 4.3) (Şekil 4.19 A-D).

MMP-9 luminal epitel ve bez epitelinde zayıf ekspresyona sahipken, bez epitelinin etrafındaki stromada orta kuvvette ekspresyon gözlemlendi. Kan damarının endotelinde ve etrafındaki stromada ise zayıf kuvvette ekspresyon görülmektedir. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe orta derecede ifade artışı vardır (Tablo 4.2) (Şekil 4.20 A-E).

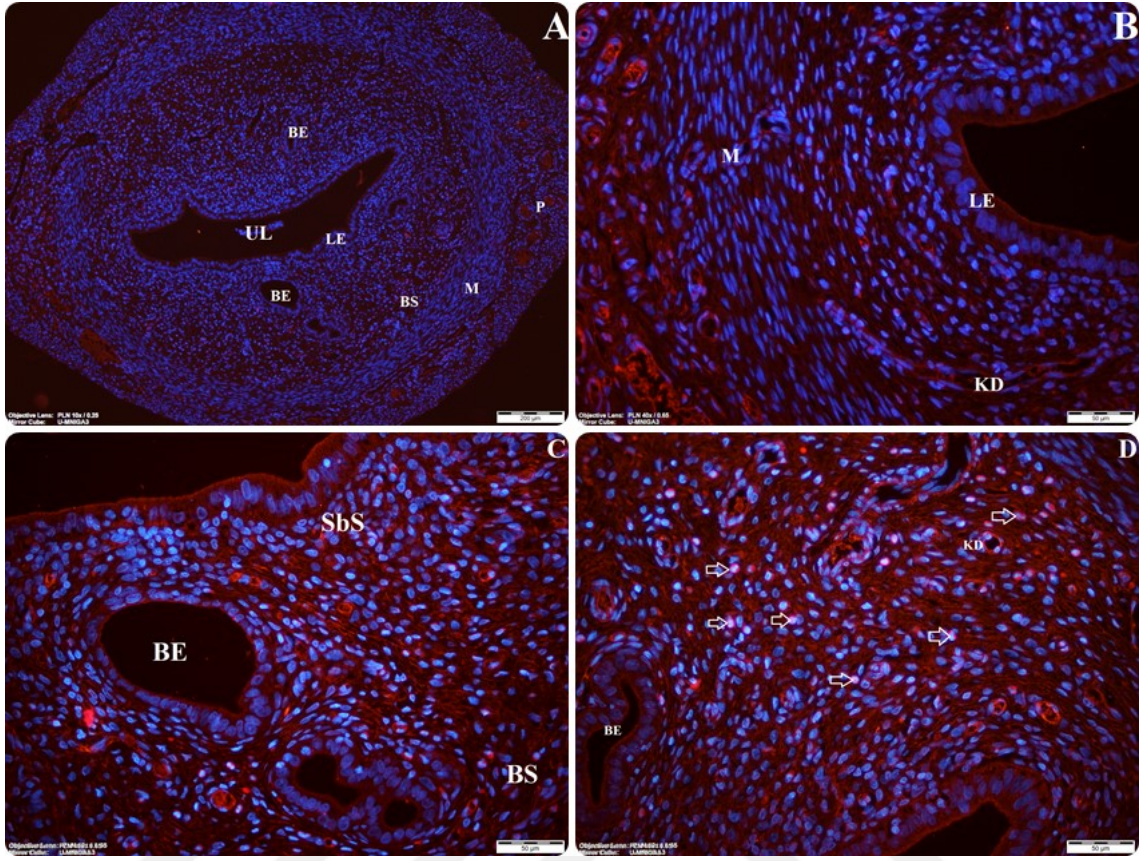
Tablo 4.3. Metaöstrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immüno lokalizasyonları

Metaöstrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	+	+	++	+++	+++
<i>Wnt7a</i>	++	+	+++	+++	+++
β - <i>katenin</i>	++++	++++	++	++	+++
<i>MMP-2</i>	+	+	++	+++	+
<i>MMP-7</i>	+	-	++	++++	++
<i>MMP-9</i>	+	+	+	++	+

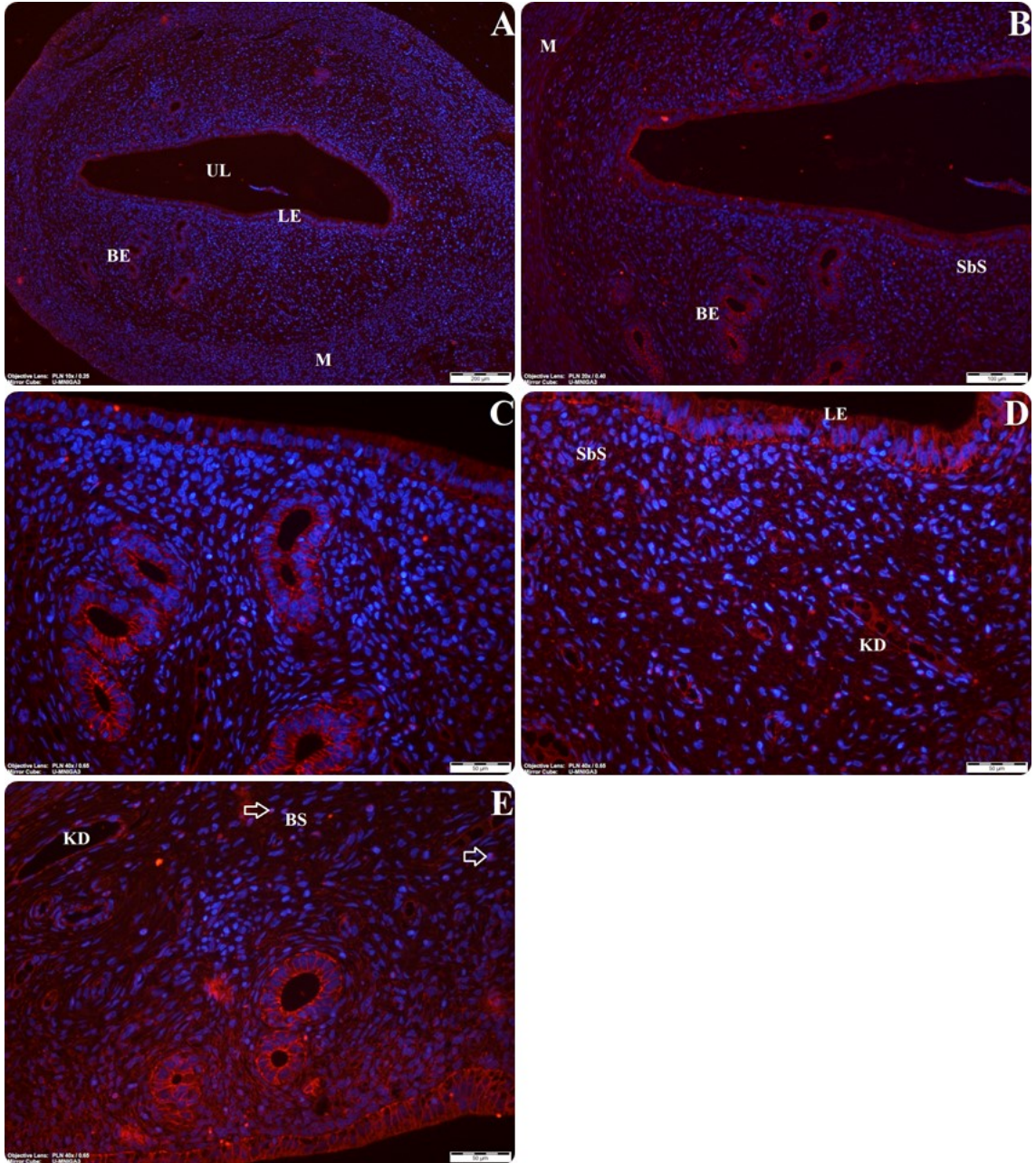
++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok



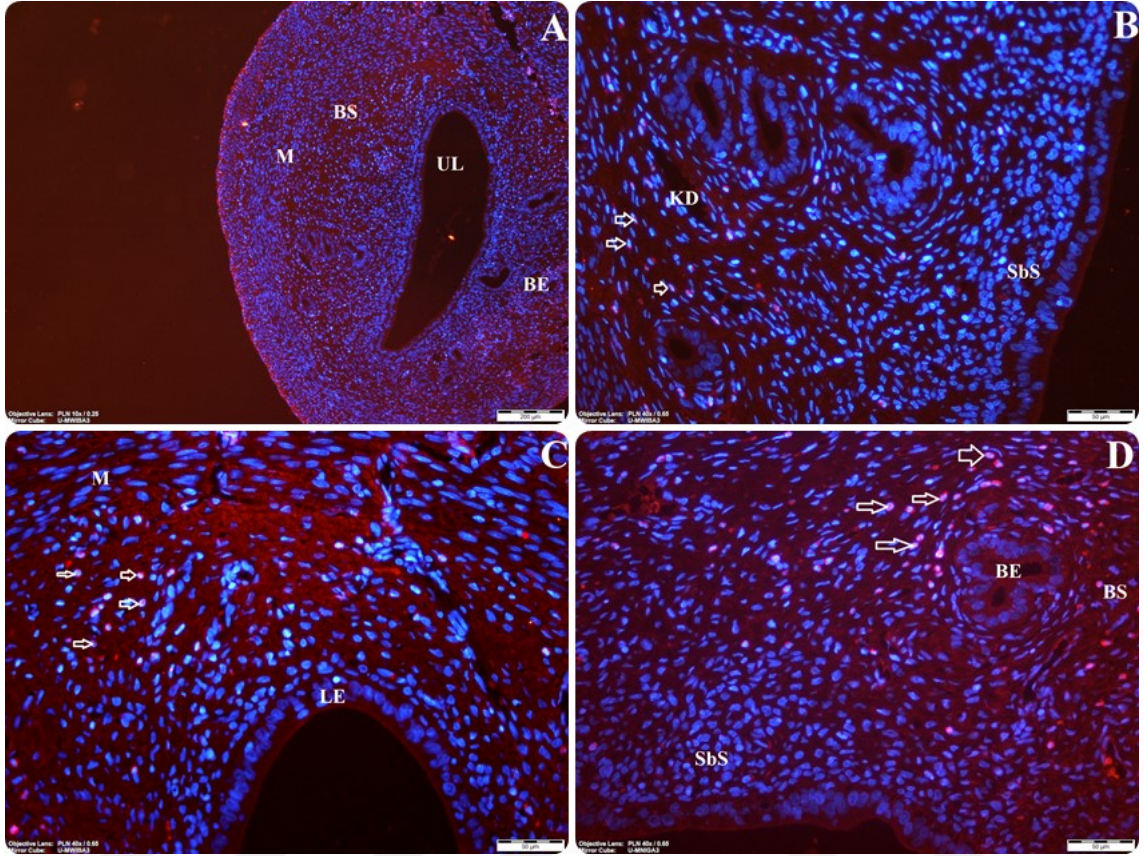
Şekil 4.15. Metaöstrus evresinde *Wnt-3* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). Negatif kontrol (F). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



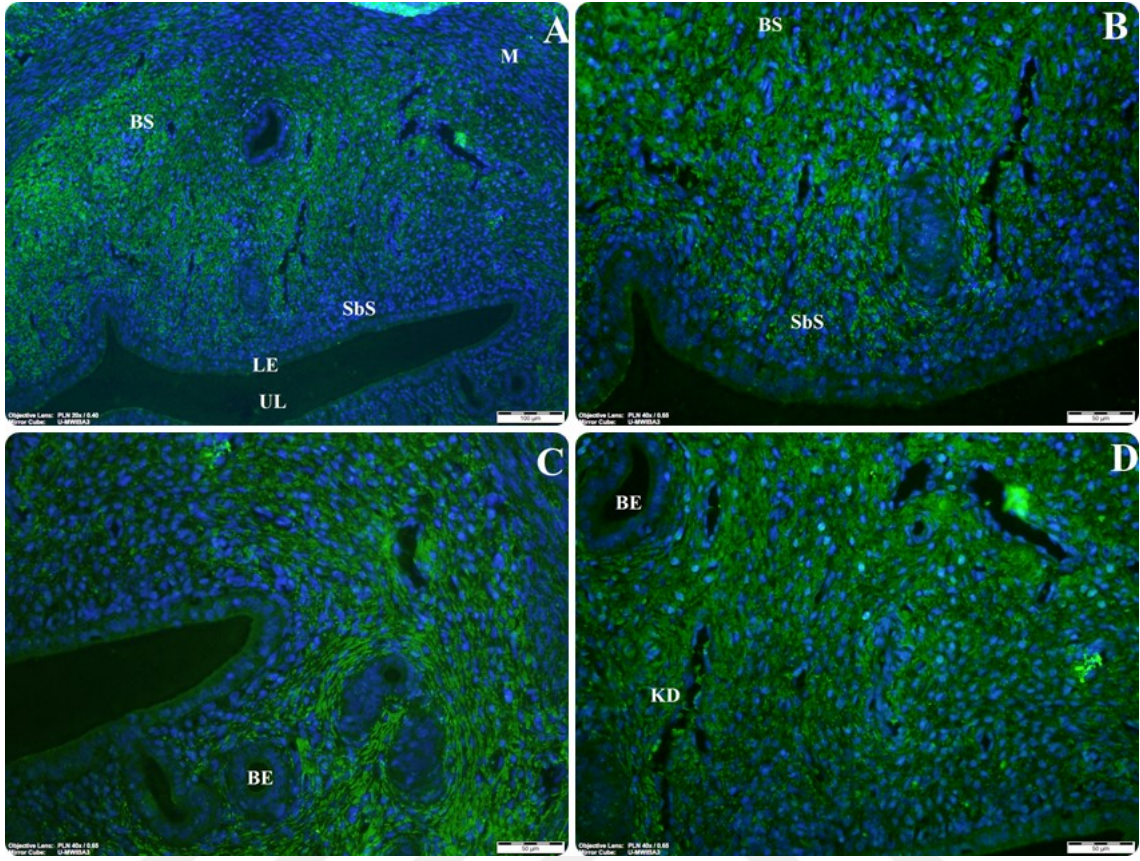
Şekil 4.16. Metaöstrus evresinde *Wnt-7a* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium; P: Perimetrium).



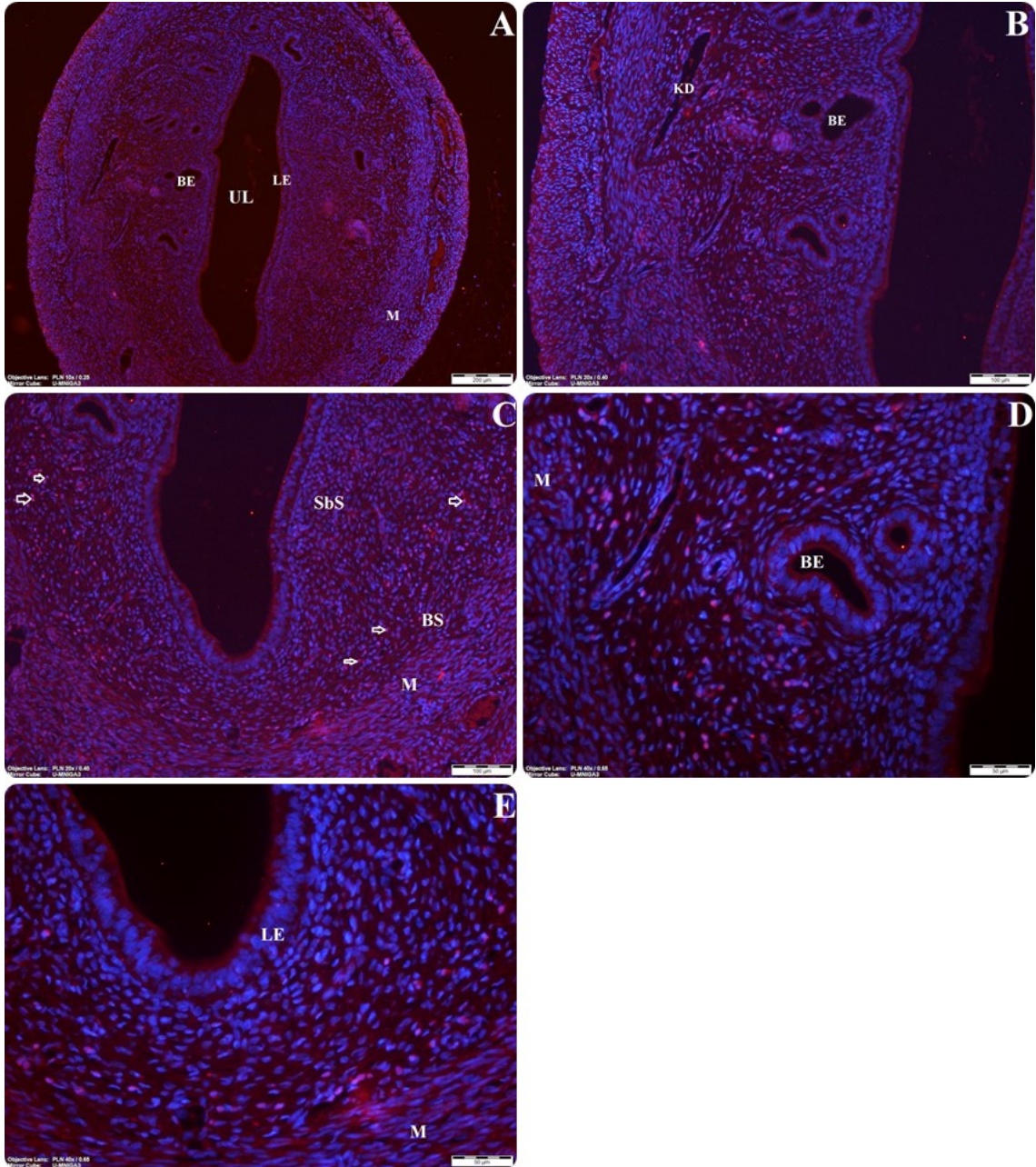
Şekil 4.17. Metaöstrus evresinde β -*katenin* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.18. Metaöstrus evresinde *MMP-2* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.19. Metaöstrus evresinde *MMP-7* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.20. Metaöstrus evresinde *MMP-9* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).

Çalışmada yer alan proteinlerin **diöstrus** evresinde eksprese oldukları lokalizasyonlar Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Wnt3’ün luminal epitelde immünolokalizasyonu izlenmedi. Bez epitelinde ise zayıf bir şekilde ekspresyon görüldü. Kan damarı endotelinde orta şiddette ekspresyon gözlenirken, kan damarını çevreleyen stroma bölgesindeki ekspresyon şiddeti ise orta kuvvette ve yer yer kuvvetli şekilde gözlemlendi. *Wnt3* ekspresyon şiddetinin subluminal

stromadan bazal stromaya doğru zayıftan çok kuvvetli dereceye kadar arttığı görüldü. (Tablo 4.4) (Şekil 4.21 A-D).

Wnt7a luminal epitelde ekspresyon göstermezken, bez epitelinde zayıf bir ekspresyona sahipti. Kan damarı endotelinde zayıf şiddette ekspresyon gözlenirken kan damarını çevreleyen stroma bölgesindeki ekspresyon şiddeti orta kuvvette ve yer yer kuvvetli olarak gözlendi. *Wnt7a* ekspresyon şiddetinin subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildiğinde zayıftan çok kuvvetli dereceye arttığı görülmektedir. Ayrıca stroma bölgesinde yer yer lökosit yoğunluğu (beyaz ok) bulunmaktadır (Tablo 4.4) (Şekil 4.22 A-D).

β -katenin luminal epitelde zayıf kuvvette ekspresyon gösterdi. Bez epitelinde ve onu çevreleyen stroma bölgelerinde ise kuvvetli **β -katenin** immüno lokalizasyonu vardı. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe ekspresyon seviyesinin artmaya başladığı ve bazı yerlerde çok kuvvetli ekspresyondan bahsedilebilir. Kan damarı endotelinde orta derecede ekspresyon görülürken, bunu çevreleyen stroma bölgesinde ise yer yer kuvvetli ekspresyon olduğu söylenebilir. (Tablo 4.4) (Şekil 4.23 A-E).

MMP-2 luminal epitel ve bez epitelinde orta kuvvetli lokalizasyon gösterdi. Kan damarı endotelinde yer yer kuvvetli ekspresyon varken, kan damarını ve bez epitelini çevreleyen stroma bölgesinde ise çoğu alanda çok kuvvetli ekspresyon gözlendi. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru **MMP-2** ekspresyon seviyesi şiddetinin ortadan kuvvetli dereceye doğru arttığı belirlendi. Ayrıca stroma bölgesinde yer yer lökosit yoğunluğu (beyaz ok) bulunmaktadır (Tablo 4.4) (Şekil 4.24 A-D).

MMP-7 luminal epitelde orta kuvvetli ekspresyona sahipti. Bez epitelinde ise ekspresyon şiddeti çok kuvvetli olarak görülmektedir. Kan damarının endotelinde zayıf derecede ekspresyon varken, kan damarını ve bez epitelini çevreleyen stroma bölgelerinde yer yer orta kuvvette **MMP-7** immüno lokalizasyonu gözlendi. Subluminal stroma ve bazal stroma bölgelerinde çoğunlukla zayıf kuvvette ekspresyon olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen stromal hücrelerin sitoplazmalarında (beyaz ok) **MMP-7** ifade seviyesi çok yoğun şekilde görülmektedir (Tablo 4.4) (Şekil 4.25 A-E).

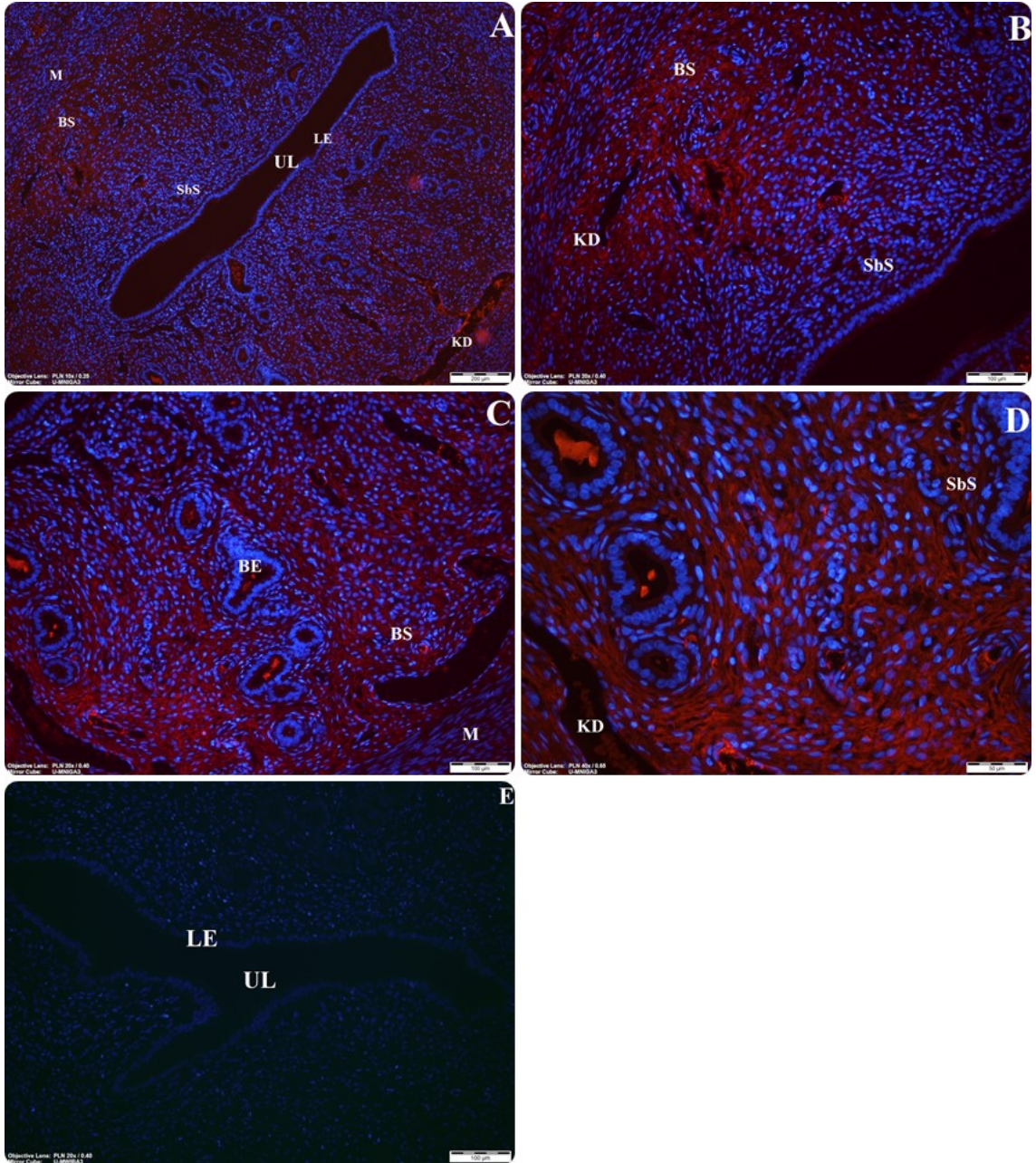
MMP-9 luminal epitel ve bez epitelinde zayıf ekspresyon gösterirken, bez epitelinin etrafındaki stromada kuvvetli ekspresyon vardı. Kan damarının endotelinde genel olarak kuvvetli ekspresyon izlenirken, kan damarı etrafındaki stromada yer yer çok kuvvetli ekspresyon görülmektedir. Subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe de

ifade seviyesi çok güçlü bir şekilde artmıştır. Ayrıca stroma bölgesinde yer yer lökosit yoğunluğu (beyaz ok) bulunmaktadır (Tablo 4.4) (Şekil 4.26 A-E).

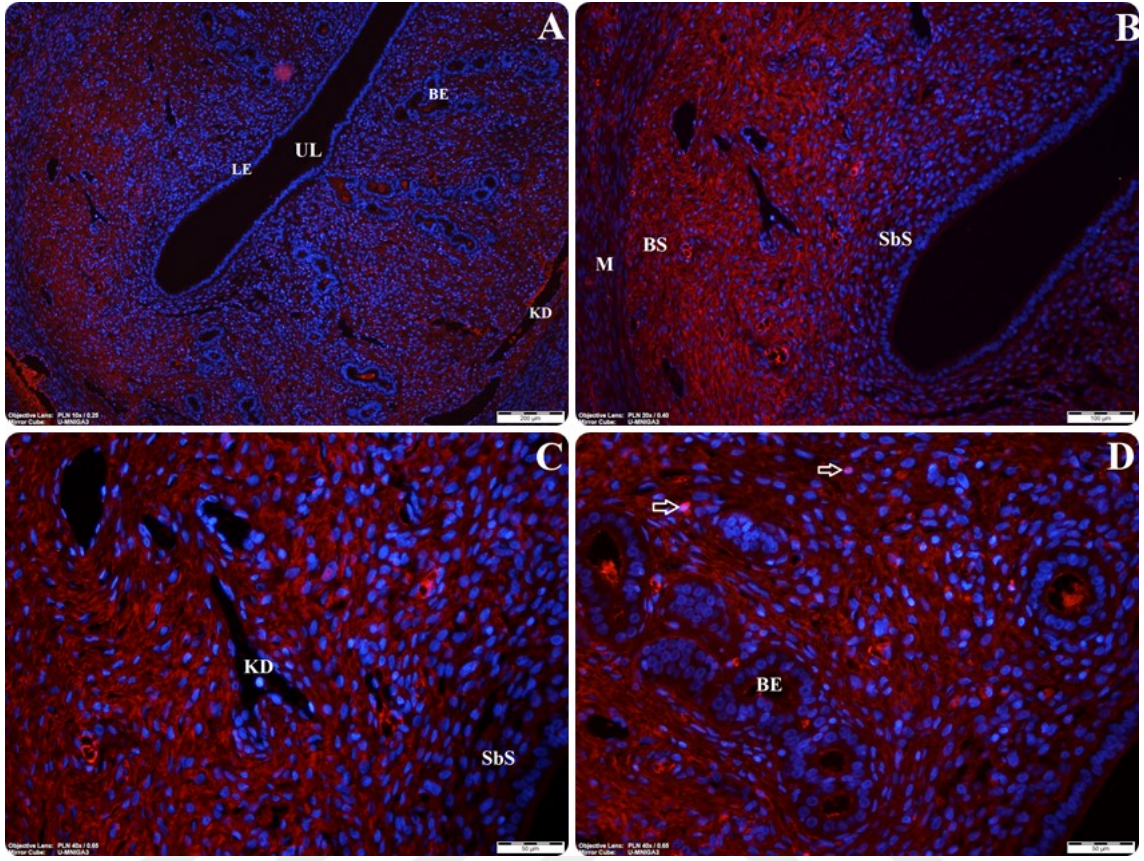
Tablo 4.4. Diöstrus evresinde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immüno lokalizasyonları

Diöstrus Evresi	Endometrium				
	Luminal epitel	Bez epiteli	Stroma		Endotel
			Subluminal stroma	Bazal stroma	
<i>Wnt3</i>	-	+	+	+++	++
<i>Wnt7a</i>	-	+	+	++++	+
β - <i>katenin</i>	+	+++	++	+++	++
<i>MMP-2</i>	++	++	++	+++	+++
<i>MMP-7</i>	++	++++	-	+	+
<i>MMP-9</i>	+	+	+++	++++	+++

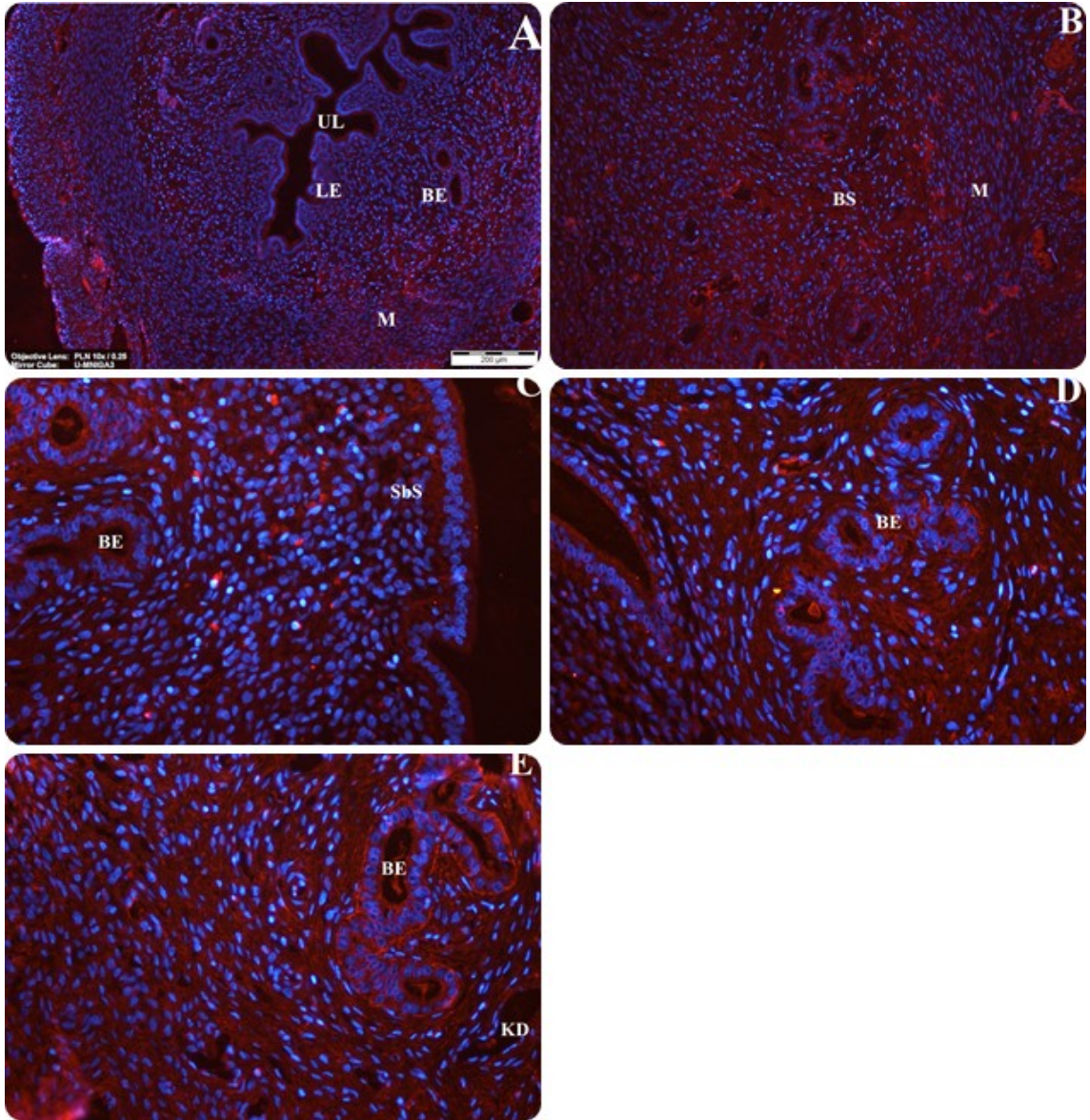
++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok



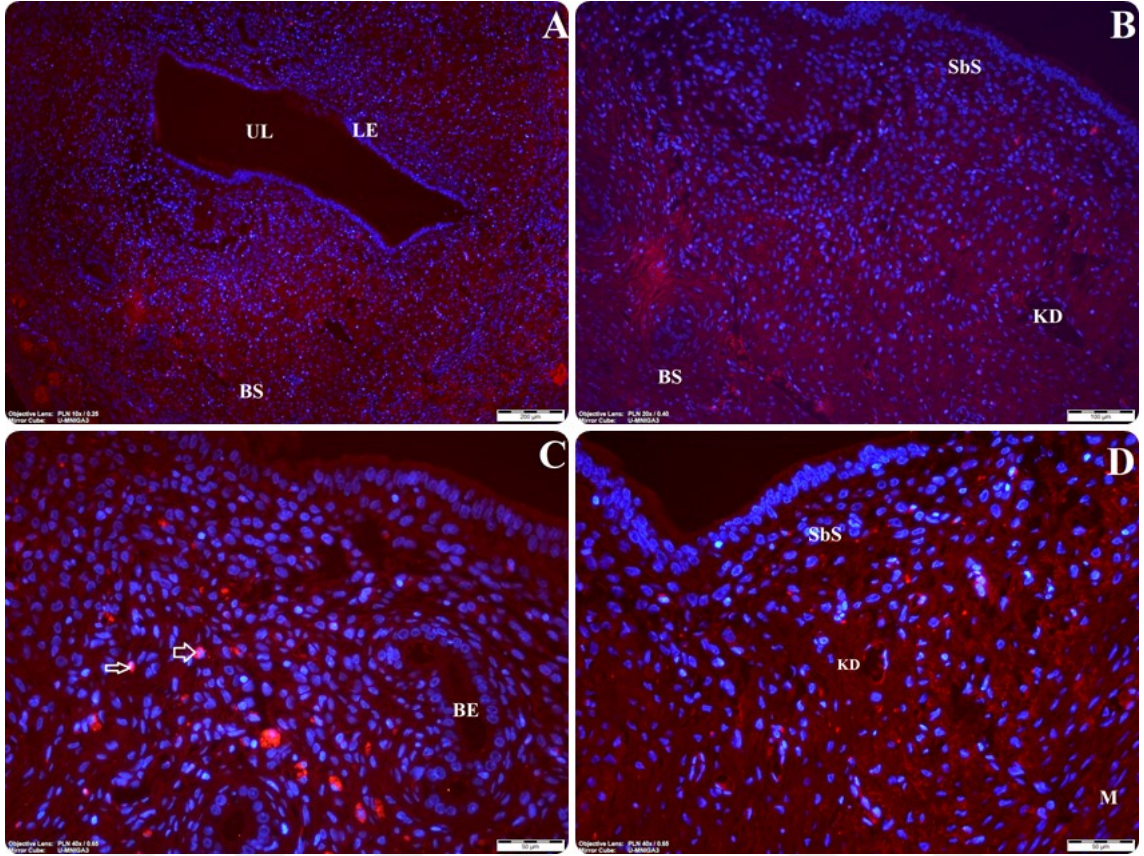
Şekil 4.21. Diöstrus evresinde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). Negatif kontrol (E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; Sbs: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



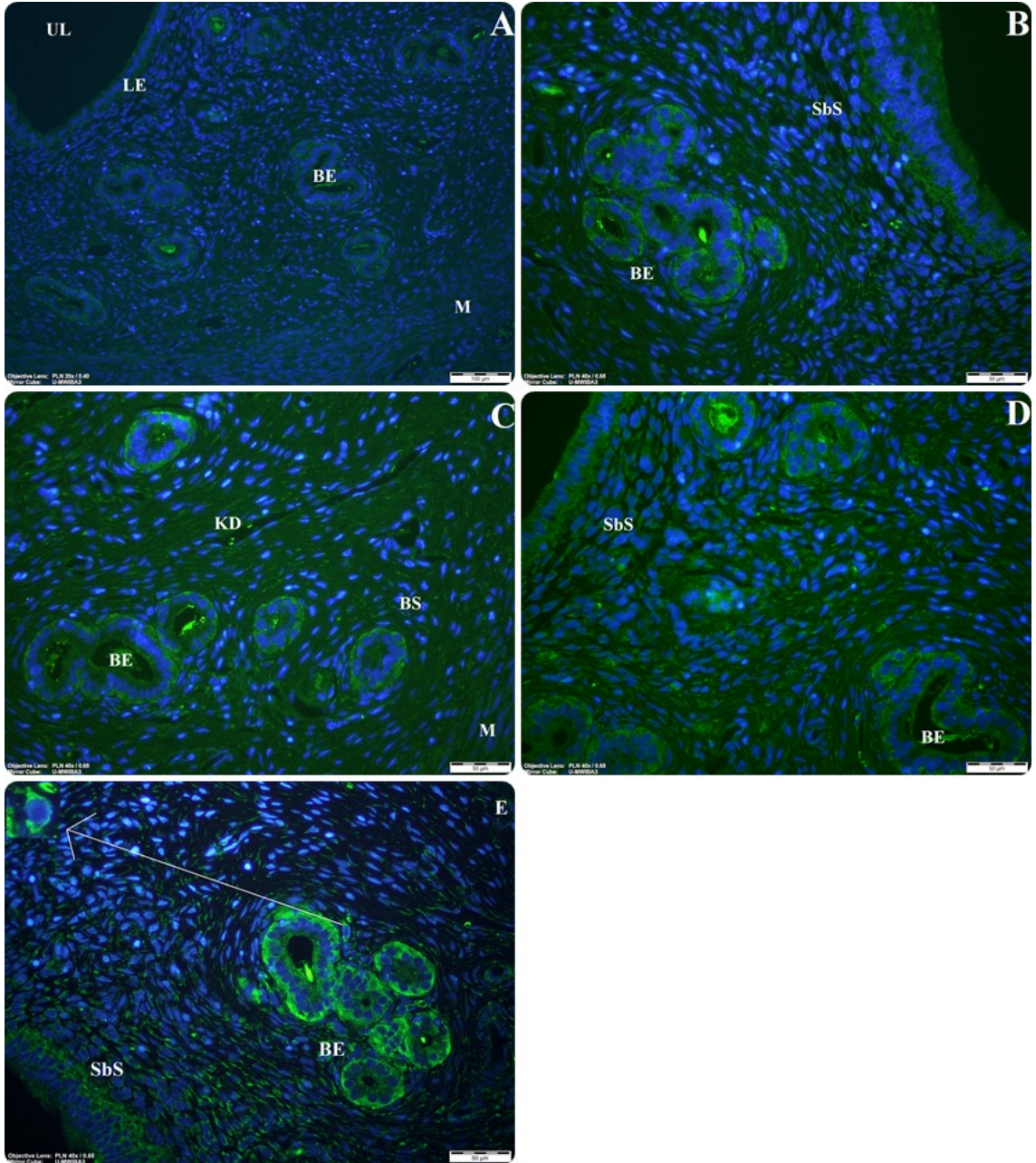
Şekil 4.22. Diöstrus evresinde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



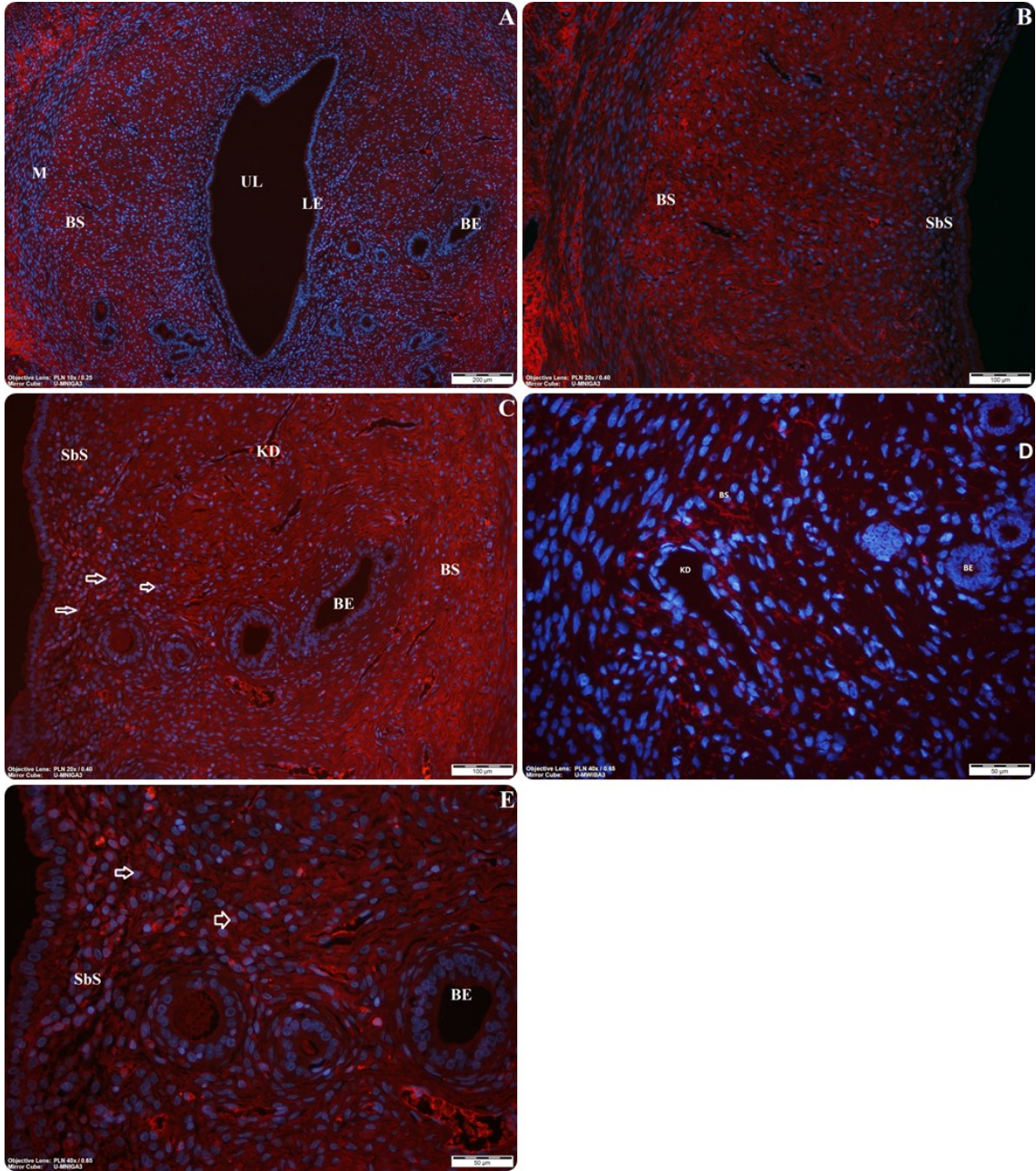
Şekil 4.23. Diöstrus evresinde β -katenin immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.24. Diöstrus evresinde *MMP-2* immünolokalizasyonları (A, B, C, D). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epiteli; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.25. Diöstrus evresinde *MMP-7* immüno lokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; Sbs: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).



Şekil 4.26. Diöstrus evresinde *MMP-9* immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). (UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; BE: Bez epitel; KD: Kan damarı; SbS: Subluminal stroma; BS: Bazal stroma; M: Miyometrium).

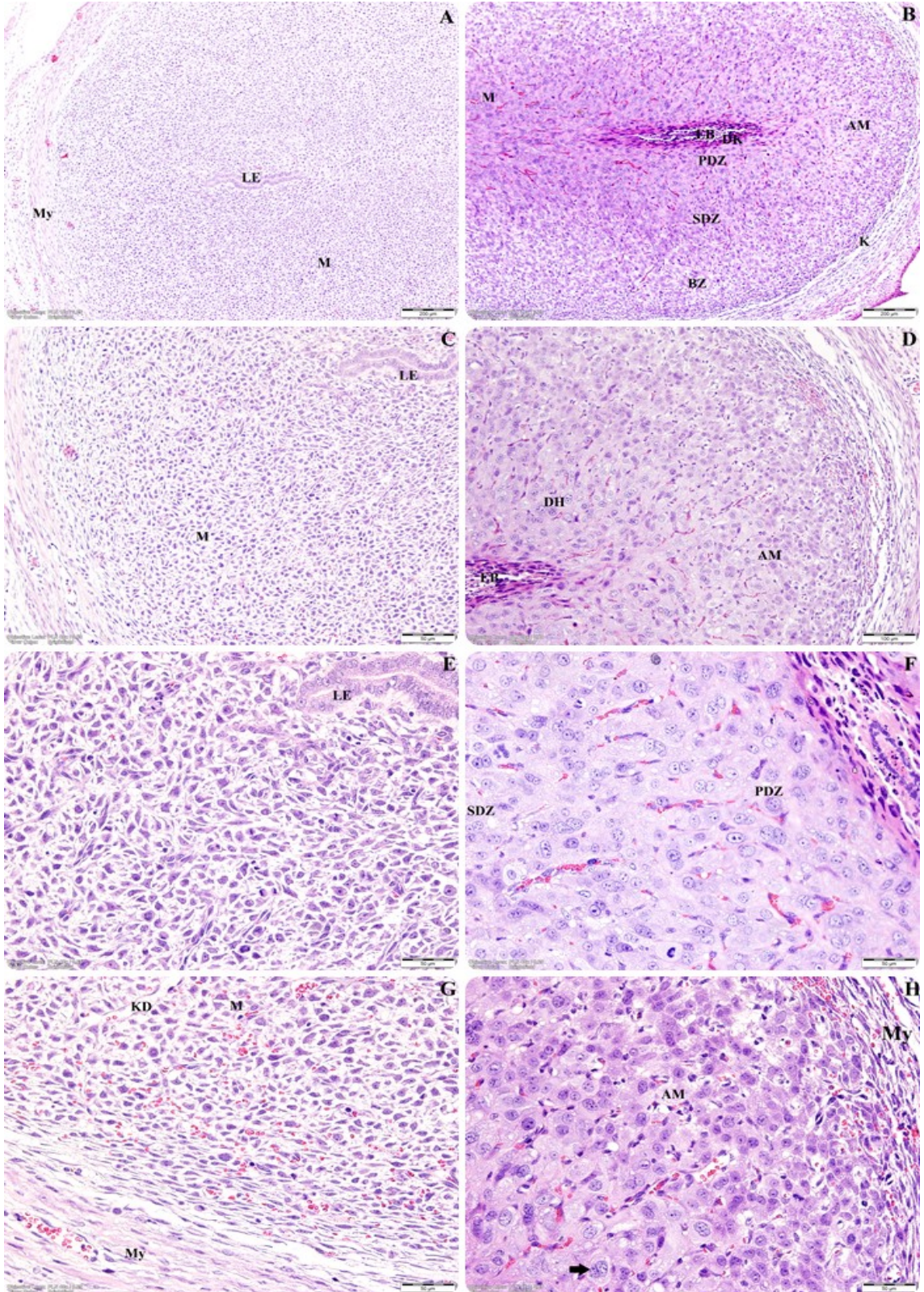
4.2. Grup-2 Bulguları

Gebelik oluşturulmuş hayvan grubunda *Rattus norvegicus* cinsi sıçanlardaki histolojik özellikler değerlendirildi. 7,5., 8,5. ve 9,5. günlerdeki gebelik sonuçları için hematoksilin&eoziin boyaması ile ışık mikroskopide genel morfolojiye ait veriler ve *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinleri için immünfloresan

boyamalar ile immünfloresan mikroskop verileri elde edildi. Kantitatif Real-Time PZR ve immünfloresan yöntemleri kullanılarak gebeliğin 7,5., 8,5. ve 9,5. günlerinde post-implantasyon gelişim sırasında bu proteinlerin uterusu dinamik olarak eksprese edildiğini gözlemledik.

4.2.1. Gebeliğin 7.5. günü

Işık mikroskop bulgularında; embriyonun tamamen anti-mezometrial bölgeye yerleştiği ve embriyo etrafında desidual kripta alanı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.27-B). Embriyo bölgesinin, iri çekirdekli ve poligonal şekilli desidual hücrelerden oluşan primer desidual bölgeyle çevrili olduğu görülmektedir (Şekil 4.27-F). Primer desidual bölgenin dışında yine poligonal şekilli desidual hücrelerden oluşan sekonder desidual bölge izlenmektedir (Şekil 4.27-F). Desidual hücrelerin çoğu birden fazla nukleolusa ve ökromatik bir nukleusa sahiptir (Şekil 4.27-F,H). Ayrıca anti-mezometrial bölgedeki bazı hücrelerin nukleuslarının birden fazla olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 4.27-H-siyah ok). Sekonder desidual bölgenin dışında ise miyometriuma komşu kapsül kısmında, gelişmiş desidual hücrelere farklılaşma aşamasındaki pre-desidual hücrelerin varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.27-D). Vaskülarizasyon zonu primer desidual bölgede görülmezken, sekonder desidual bölgede yer yer lokalize olduğu ve mezometrial bölgeye doğru yayıldığı görülmektedir. Uterus lümeni çevresindeki luminal epitel hücrelerinin çoğunlukla prizmatik şekilli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27-E). Luminal epitel etrafında ise farklılaşmamış stromal hücreler yer almaktadır (Şekil 4.27-C,E). Son olarak, gebeliğin bu gününde implantasyon bölgelerinde endometrial bezler hemen hemen hiç görülmemektedir.



Şekil 4.27. Gebeliğin 7,5. günündeki ışık mikroskop bulguları (A-H). (AM: Anti-mesometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; LE: Luminal epitel; My: Miyometrium; KD: Kan damarı; DH: Desidual hücreleri; DK: Desidual kript).

Çalışmada yer alan proteinlerin **gebeliğin 7,5. gününde** eksprese oldukları lokalizasyonlar Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Gebeliğin 7,5. günü immünlöresan bulgularında;

Wnt3 immünreaktivitesinin embriyo bölgesinde orta derecede olduğu gözlemlendi. Embriyo etrafını saran primer desidual bölge ve onun dışındaki sekonder desidual bölgedeki ekstraselüler matriks ve desidual hücrelerde de *Wnt3* immünlökalizasyonu orta derecede bir etkiye sahipken, bazal bölgeye doğru gidildikçe kuvvetli bir artış gösteren ifade seviyesine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.28-G). İmmünlöresan çalışmaları ayrıca *Wnt3* ekspresyonunun 7,5. günde mezometrial bölgede oldukça kuvvetli pozitif reaksiyon verdiğini göstermektedir. Luminal epitel ve mezometrial bölgede miyometriuma yakın konumda yer alan kan damarlarının endotelinde kuvvetli bir ifade seviyesi izlenirken (Şekil 4.28-F), bazal bölgedeki stromada ifade seviyesi çok yüksekti (Şekil 4.28-H).

Wnt7a'nın embriyo bölgesinde orta derecede bir ifade seviyesi vardı. Embriyo çevresinde yer alan primer desidual bölgede yer alan hücrelerde kuvvetli bir lokalizasyon görülürken, bu bölgenin dışında yer alan sekonder desidual bölgede lokalizasyon zayıftı (Şekil 4.29-E). Anti-mezometrial bölgenin miyometriuma komşu bazal bölgesinde ise ifade seviyesinin orta derecede olduğu görüldü. Luminal epitelde *Wnt7a* immünreaktivitesi oldukça zayıfken (Şekil 4.29-C), mezometrial bazal bölgede yer alan kan damarlarının endotelinde ve bu damarlarının etrafında yer alan ekstraselüler matriks bölgelerinde çok kuvvetli lokalizasyonlar görülmektedir (Şekil 4.29-G).

β -katenin'in embriyo bölgesinde kuvvetli lokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 4.30-C). Embriyo etrafını çevreleyen primer desidual bölgede yer alan desidual hücrelerde ve matriks alanlarında kuvvetli ekspresyon belirlenirken, bu bölgeden anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe ifade seviyesinin zayıfladığı görülmektedir (Şekil 4.30-C). *β -katenin* embriyo bölgesinin yanı sıra luminal epitel, luminal epitel etrafındaki farklılaşmamış stromal hücreler, mezometrial desidua ve mezometrial bazal bölgede yer alan ekstraselüler matriks ile miyometriuma komşu kan damarlarının endotelinde oldukça güçlü lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.30-E,F).

MMP-2 embriyo bölgesinde orta derecede bir ifade seviyesine sahipti (Şekil 4.31-E). Anti-mezometrial bölgede yer alan embriyo çevresindeki primer desidual bölgede ifade

seviyesi orta derecede; sekonder desidual bölge ve bazal bölgede ise *MMP-2* immünreaktivitesinin oldukça zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 4.31-A). *MMP-2* ifade seviyesinin, gebeliğin 7,5. gününde özellikle mezometrial alanlarda anti-mezometrial alanlara göre daha fazla immün boyanmasının olduğu belirlenmiştir. Luminal epitel ve onun etrafında yer alan farklılaşmamış stromal hücrelerin sitoplazmalarında ifade seviyesi ise orta derecede tespit edildi (Şekil 4.31-F). Mezometrial bazal bölgede miyometriuma komşu kan damarlarının endotelinde ve onu çevreleyen stroma bölgesinde ise kuvvetli bir lokalizasyon görüldü (Şekil 4.31-H).

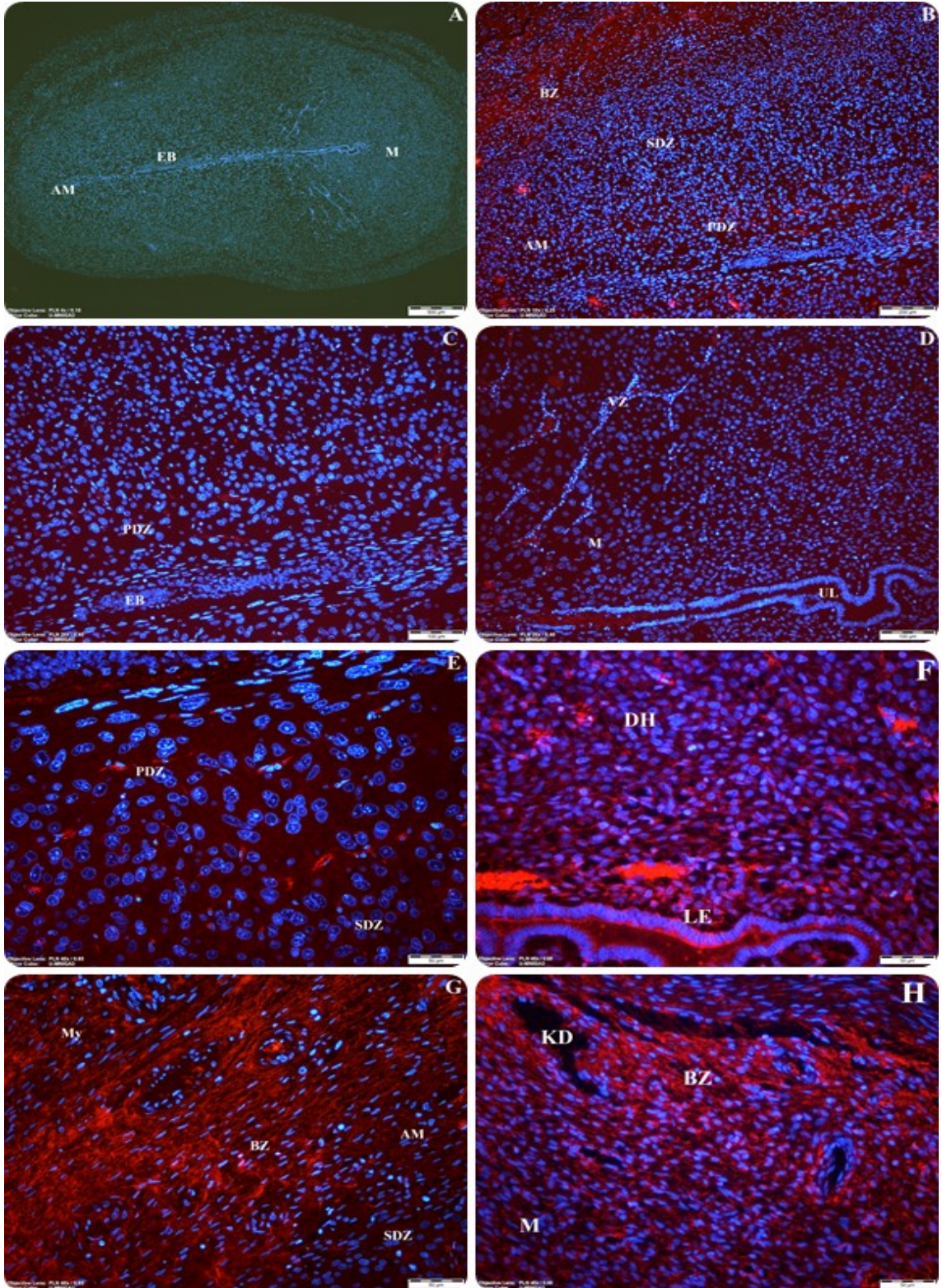
MMP-7 embriyo ve desidual kript bölgesinde kuvvetli bir ekspresyon gösterdi (Şekil 4.32-F). Embriyo bölgesinin çevresindeki anti-mezometrial bölge kısımlarında genellikle orta derecede bir ifade seviyesi gözlenirken, sekonder desidual alanda bu biraz daha zayıftı. Fakat sekonder desidual bölge içerisinde yer alan desidual hücrelerin sitoplazmalarında güçlü bir lokalizasyon bulunmaktadır (Şekil 4.32-E,G). Ayrıca desidual hücrelerin yakınında yer alan kan damarlarının endotelinde de güçlü bir reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4.32-F). Mezometrial bölgedeki alanlar ile karşılaştırıldığında, anti-mezometrial bölgede *MMP-7* immünreaktivitesinin biraz daha fazla olduğunu söyleyebiliriz. Luminal epitelde zayıf bir reaksiyon varken, mezometrial bazal bölgede yer alan miyometriuma komşu kan damarlarının endotelinde ve ekstraselüler matrikste orta derecede bir ifade seviyesi görüldü. Ayrıca mezometrial bazal bölgedeki farklılaşmamış stromal hücrelerin sitoplazmalarında yoğun bir boyanma vardı (Şekil 4.32-H).

MMP-9'un esas olarak embriyo bölgesi dışında, sekonder desidual alandaki hücre gruplarında kuvvetli pozitif reaksiyon vermesine karşın, primer desidual bölge ve anti-mezometrial bazal bölgede immün boyanması orta kuvvette görüldü (Şekil 4.33-C,E,F). Embriyo bölgesinde ise zayıf bir *MMP-9* immünolokalizasyonu gözlemlendi. Luminal epitel ve onun çevresinde yer alan tam olarak farklılaşmamış stromal hücrelerde boyanma zayıfken, mezometrial bazal bölgede yer alan bu hücrelerin immünreaktivitesi orta derecede görülmektedir (Şekil 4.33-G). Ayrıca bu bölgede yer alan kan damarlarının endotelindeki boyanma şiddetinin kuvvetli olduğu da belirlenmiştir (Şekil 4.33-H).

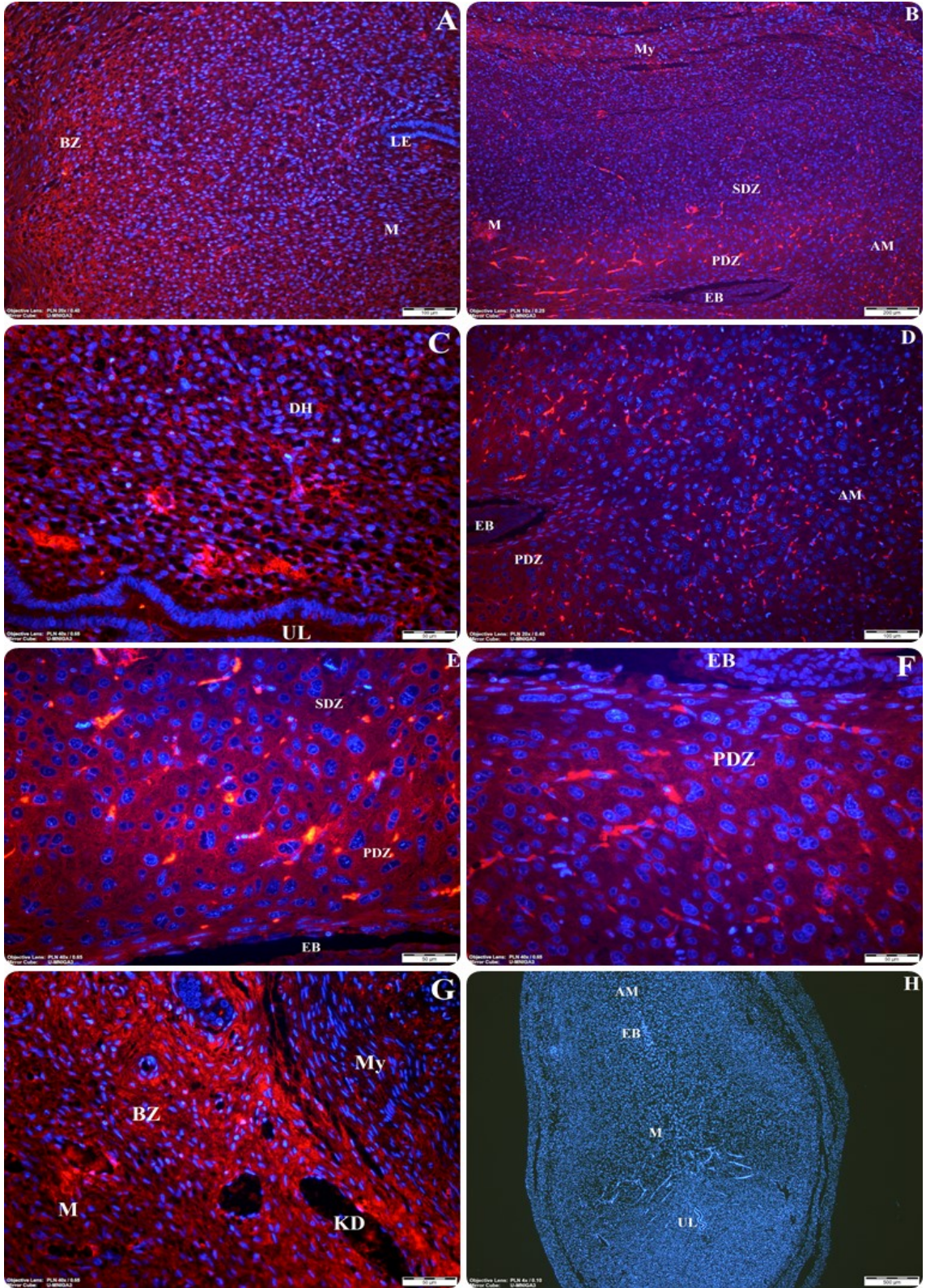
Tablo 4.5. Gebeliğin 7,5. gününde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immünboyanmasının hücresele dağılımı

7.5. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL BÖLGE				MEZOMETRİAL BÖLGE		
	DESİDUA				DESİDUA		
	EB	PDZ	SDZ	BZ	LE	KD	BZ
<i>Wnt-3</i>	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>Wnt-7a</i>	++	+++	+	++	+	+++	++++
β - <i>katenin</i>	+++	+++	++	+	+++	+++	++++
<i>MMP-2</i>	++	++	+	+	++	+++	+++
<i>MMP-7</i>	+++	++	+	++	+	++	++
<i>MMP-9</i>	+	++	+++	++	+	+++	++

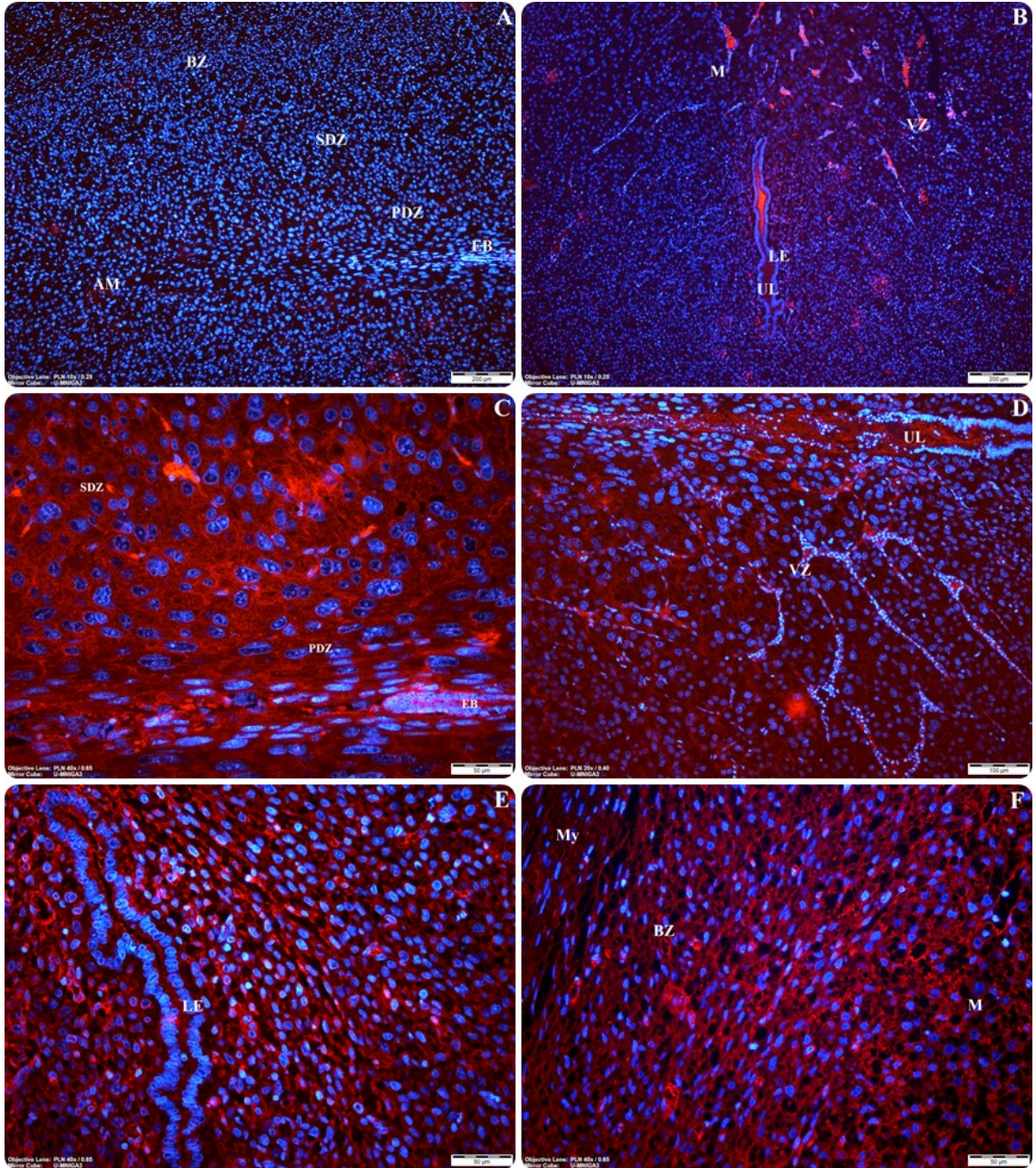
EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; LE: Luminal epitel; KD: Kan damarı. (++++; Çok kuvvetli ekspresyon, +++; Kuvvetli ekspresyon, ++; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; ekspresyon yok)



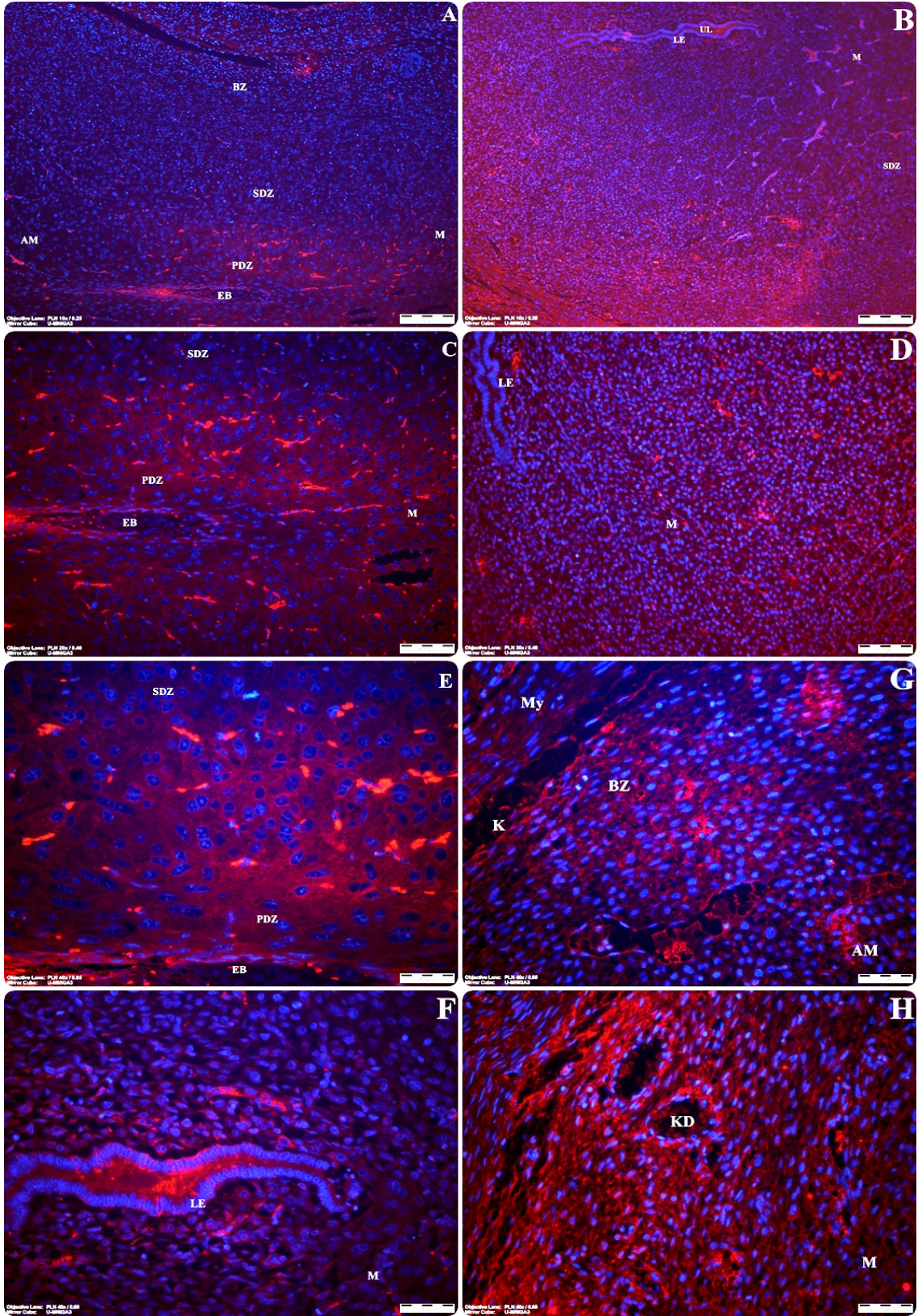
Şekil 4.28. Gebeliğin 7,5. gününde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; KD: Kan damarı; DH: Desidual hücreler; VZ: Vaskülarizasyon zonu; My: Miyometrium; UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel).



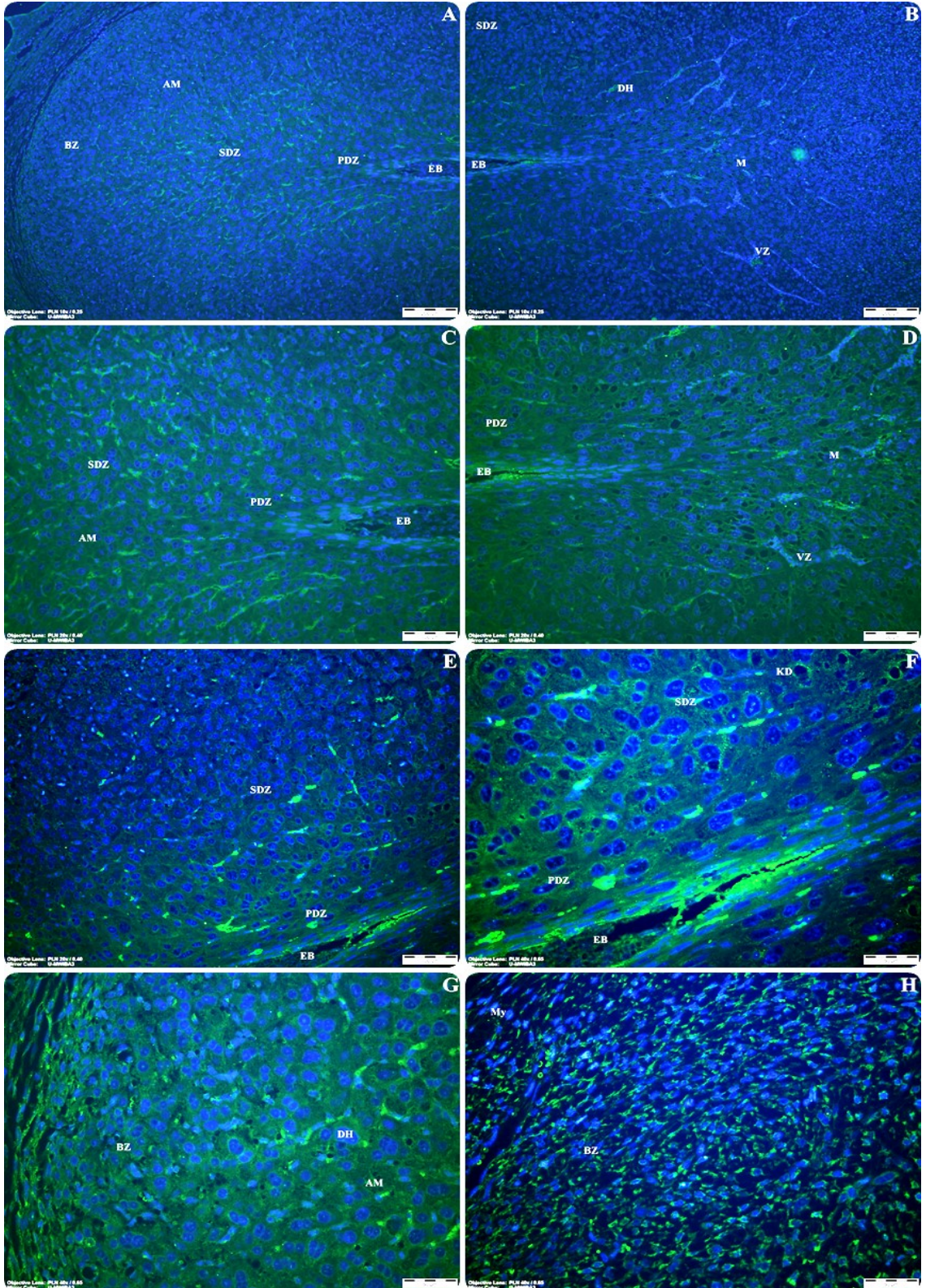
Şekil 4.29. Gebeliğin 7,5. gününde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A-G). Negatif kontrol: H. (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; KD: Kan damarı; DH: Desidual hücreler; My: Miyometrium; UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel).



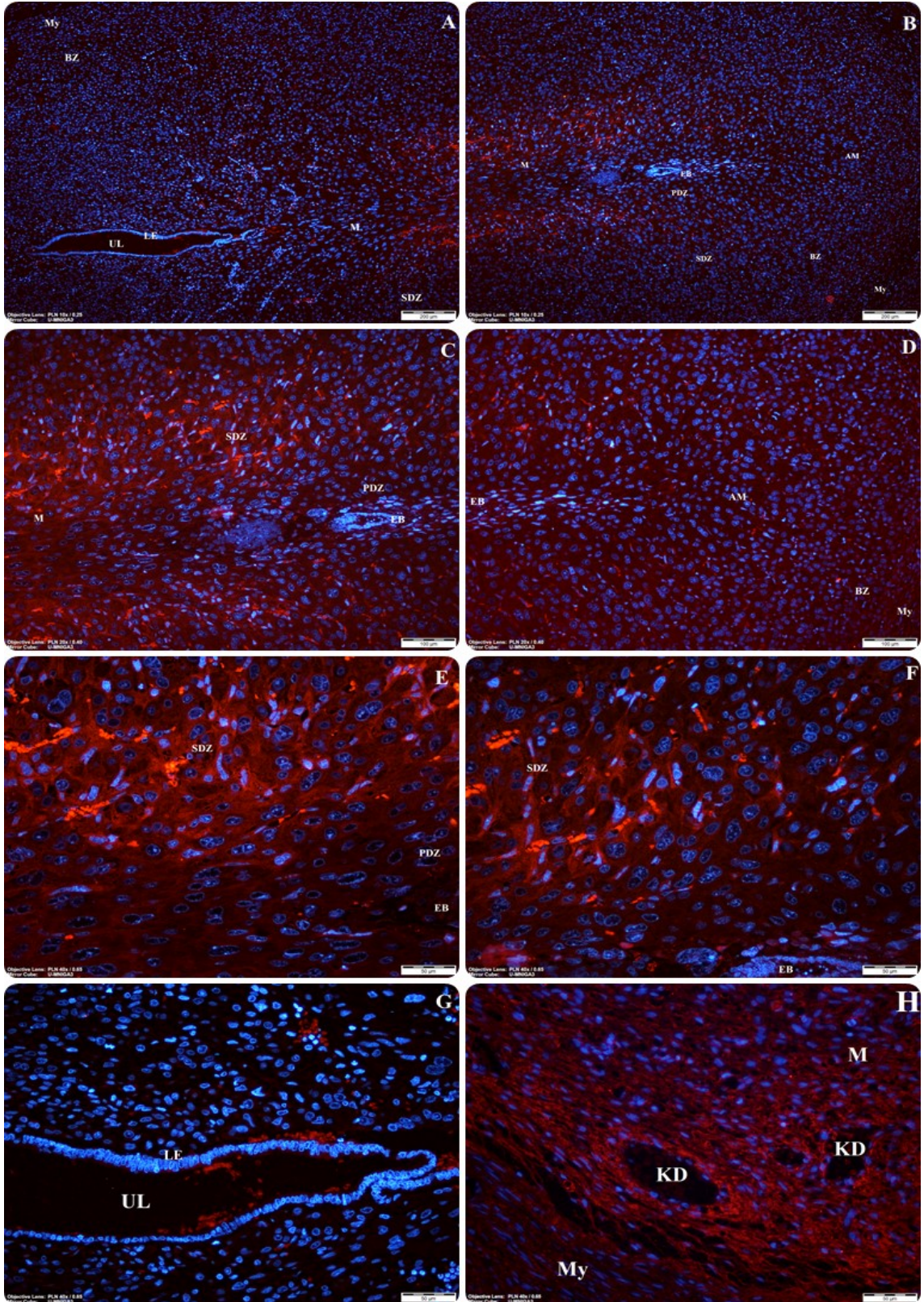
Şekil 4.30. Gebeliğin 7,5. gününde β -katenin immünolokalizasyonları(A-F). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; VZ: Vaskularizasyon zonu; My: Miyometrium; UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel).



Şekil 4.31. Gebeliğin 7,5. gününde *MMP-2* immüno lokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; KD: Kan damarı; My: Miyometrium; UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel).



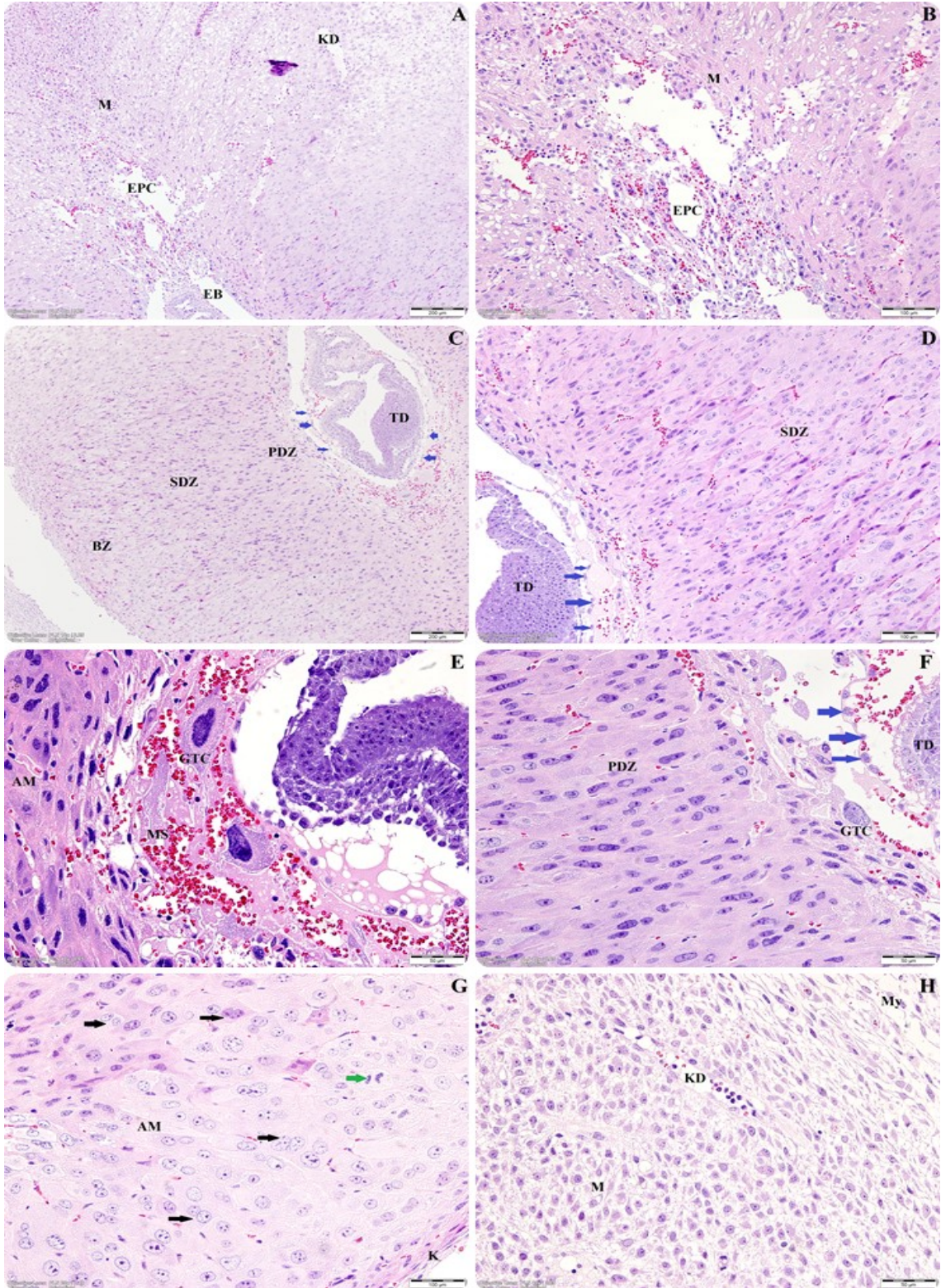
Şekil 4.32. Gebeliğin 7,5. gününde *MMP-7* immüno lokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; KD: Kan damarı; DH: Desidual hücreler; My: Miyometrium; VZ: Vaskularizasyon zonu).



Şekil 4.33. Gebeliğin 7,5. gününde *MMP-9* immüno lokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; K: Kapsül; KD: Kan damarı; My: Miyometriyum; UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel).

4.2.2. Gebeliğin 8,5. günü

Işık mikroskop bulgularında; anti-mezometrial bölgenin genişlediği fakat mezometrial bölgenin anti-mezometrial bölgeye göre daha geniş bir alanda yer aldığı, sekonder desidual bölgenin ise primer desidual bölgeye oranla daha fazla yer kapladığı, implantasyonu tamamlanmış olan embriyonun etrafının tamamen endometrial kısımlarla çevrili olduğu ve embriyo bölgesinden primer ve sekonder kısımlara doğru düzenlenim gösteren iri çekirdekli ve poligonal şekilli desidual hücrelerin oluşturduğu implantasyon bölgesi gözlenmektedir. Desidual hücreler, her birinin iki veya daha fazla sayıda belirgin nukleoluslara sahip ve çoğunlukla ökromatik olan nukleuslar içermektedir (Şekil 4.34-F,G). Buna karşın, bazal bölgeye komşu dar bir alanda ise pre-desidual hücreler bulunmaktadır (Şekil 4.34-G). Bu dönemde ayrıca anti-mezometrial bazal bölge ile miyometrium arasında yer alan yassılaştırmış stromal hücrelerden oluşan ve implantasyon bölgesini sınırlayan kapsül yapısı çok net bir şekilde izlenmektedir (Şekil 4.34-C,G). Gebeliğin 8,5. gününde gebeliğin daha erken dönemlerine göre daha fazla alan kaplayan implantasyon bölgesinde trofoblast invazyonu ile karakterize ve etrafında maternal kan damarlarının bulunduğu ektoplasental koni, parietal ve visseral endoderm yapıları, amniyon boşluğu ve parietal endoderm hücreleri ile trofoblast arasında bir membran olarak görev yapan Reichert membranının ortaya çıktığı belirlenmiştir (Şekil 4.34-B,E,F). Reichert membranının dışında ise embriyo bölgesinde mezometrial-anti-mezometrial eksen boyunca düzenlenim gösteren ve desidual hücrelerle yakın ilişki halinde olan dev trofoblast hücrelerinin varlığı göze çarpmaktadır (Şekil 4.34-E,F). Anti-mezometrial bölgede bazı desidual hücrelerin çekirdeklerinin birden fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.34-G-siyah ok). Ayrıca bu bölgede yer alan bazı hücrelerin mitoz bölünme geçirdikleri oldukça belirgin olarak izlenmektedir (Şekil 4.34-G-yeşil ok). Mezometrial bölgede bulunan desidual hücreler ise 7,5. güne nazaran daha poligonal şekilli olarak görülmektedir fakat çoğunlukla stromal hücreler bulunmaktadır. Maternal kan damarlarının ise anti-mezometrial bölgede fazlalaştığı ve mezometrial kutba doğru genişlediği izlenmiştir. Ekstraselüler matriks 7,5. güne göre artmıştır.



Şekil 4.34. Gebeliğin 8,5. gününde ışık mikroskop bulguları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; KD: Kan damarı; K: Kapsül; MS: Maternal sinüzoid; Mavi ok: Reichert membranı; Siyah ok: Çok çekirdekli hücreler; Yeşil ok: Mitoz bölünme geçiren hücreler).

Çalışmada yer alan proteinlerin **gebeliğin 8,5. gününde** eksprese oldukları lokalizasyonlar Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Gebeliğin 8,5. günü immünlloresan bulgularında;

Wnt3'ün embriyo çevresindeki primer desidual bölgede 7,5. güne göre daha kuvvetli ekspresyonunun olduğu fakat sekonder desidual bölge ve anti-mezometrial bazal bölgede ekspresyon seviyesinin zayıf olduğu belirlenmiştir. Primer ve sekonder desidual bölgelerde bulunan kan damarlarının endotelinde kuvvetli immünreaktivite gözlemlendi. İmplantasyon bölgesini sınırlayan kapsül yapısında yer alan hücrelerde yer yer kuvvetli, çoğunlukla orta derecede ifade seviyeleri bulunmaktadır. Mezometrial bazal bölgede yer alan kan damarlarının endotelinde ve onu çevreleyen stroma kısmında ise ekspresyon şiddeti kuvvetli olarak görülmektedir. Embriyoyu oluşturan hücrelerde orta derecede ekspresyon gözlenirken, ektoplasental koniyi oluşturan hücrelerde ve gelişim boyunca ilk farklılaşan hücreler olan ve iri boyutları ile karakterize dev trofoblast hücrelerinde kuvvetli *Wnt3* immünolokalizasyonu tespit edilmiştir. Reichert membranında ise orta seviyede bir ekspresyon bulunmaktadır.

Wnt7a ifade seviyesinin embriyo çevresindeki primer desidual bölgeden anti-mezometrial bölgenin dış kısımlarına doğru gidildikçe orta dereceden zayıf ifade seviyesine doğru azaldığı görülmektedir. Mezometrial bölge, bazal zonda yer alan hücrelerde ve etrafını çevreleyen stroma bölgesinde kuvvetli bir immünolokalizasyon görülmektedir. Ayrıca bu bölgedeki kan damarlarının endotelinde yer alan hücrelerde de kuvvetli lokalizasyon tespit edilmiştir. Embriyo bölgesini oluşturan hücrelerde zayıf bir ifade seviyesi gözlenirken, ektoplasental koni ve dev trofoblast hücrelerinde çok kuvvetli bir *Wnt7a* immünreaktivitesi bulunmaktadır. Reichert membranında ise bu durum orta derece olarak belirlenmiştir.

β-katenin'in doku genelinde özellikle embriyo bölgesinde ve çevresinde 7,5. güne göre daha yüksek yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Yapılan gözlemlere göre, primer desidual bölgede *β-katenin* immünolokalizasyonunun kuvvetli olduğu, sekonder ve bazal bölgeye doğru gidildikçe ekspresyon şiddetinin orta dereceye kadar gerilediği görülmektedir. *β-katenin*'in özellikle embriyo bölgesinde çok kuvvetli pozitif yoğunlukta olduğu, ektoplasental koni ve dev trofoblast hücrelerinde ise kuvvetli pozitif yoğunlukta olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Reichert membranında ise bu durum orta derece olarak belirlenmiştir. Mezometrial bölgeye baktığımızda ise 7,5. güne göre

karşılaştırıldığında aynı ekspresyon değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Mezometrial bazal bölgede çok kuvvetli immünreaktivite gösterdiği, aynı şekilde bu bölgede yer alan kan damarlarının endotelinde ve etrafındaki stroma bölgesinde kuvvetli ifade seviyesine sahip olduğu görülmektedir.

MMP-2'nin embriyo çevresindeki anti-mezometrial alanda primer desidual bölgedeki hücre gruplarının kuvvetli pozitif reaksiyon verdiği fakat sekonder ve anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe bu etkinin azaldığı görülmektedir. Mezometrial bölgede yer alan kısımlarda ise 7,5. günle kıyasladığımızda aynı şiddette reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Mezometrial bazal bölgedeki ve bazal bölge içerisinde yer alan kan damarlarının endotelindeki *MMP-2* immünreaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu tespit edilmiştir. Embriyo hücrelerinde ekspresyon şiddetinin zayıf olduğu fakat embriyo çevresinde yer alan dev trofoblast hücreleri ve anti-mezometrial kutuptaki ekto plasental koni hücrelerinde kuvvetli lokalizasyon izlenmiştir. Reichert membranında ise bu durum orta derece olarak belirlenmiştir.

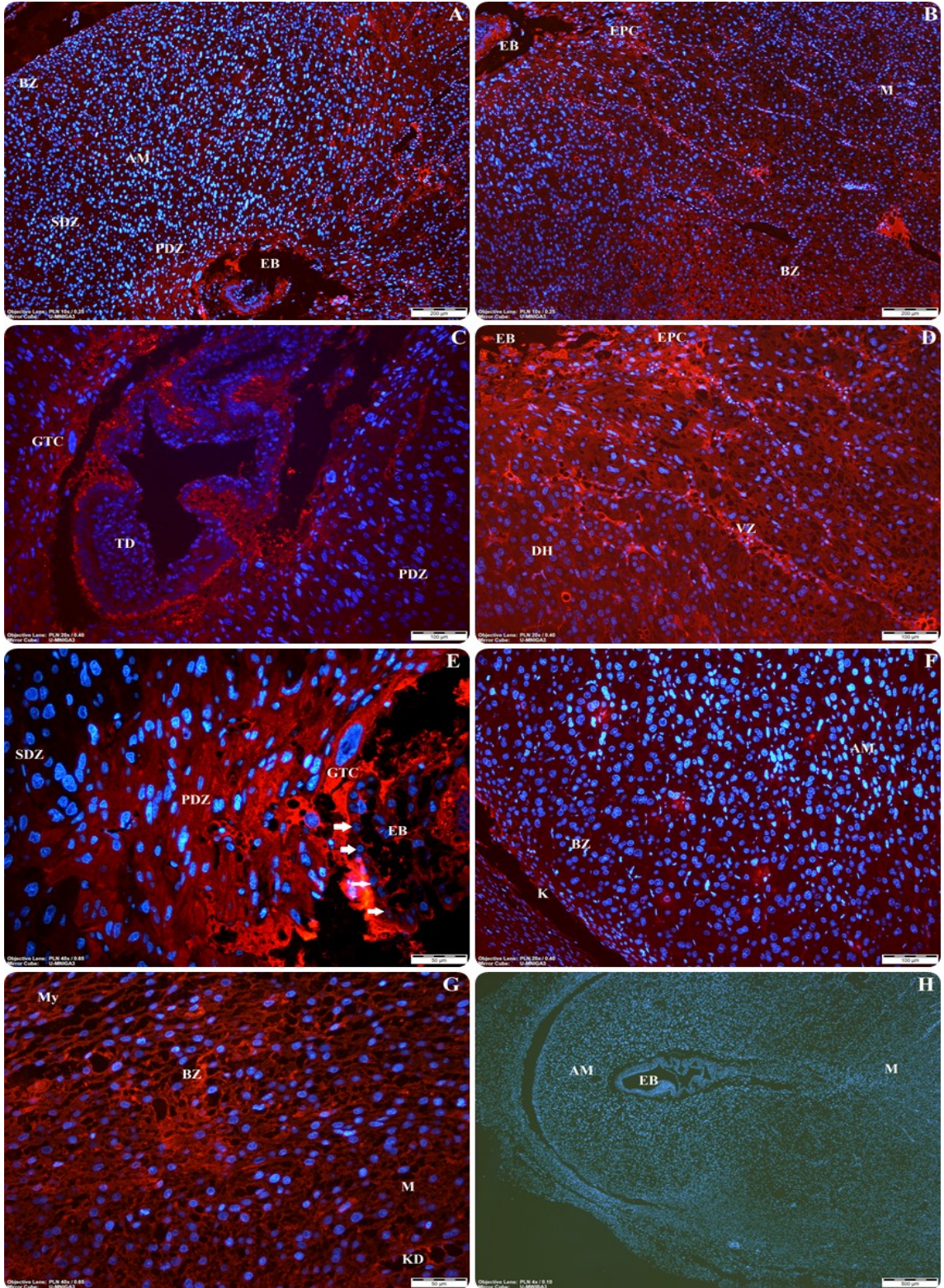
MMP-7 immünboyanması özellikle desidual hücrelerin sitoplazmalarında primer desidual bölgeden sekonder ve anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe orta dereceden çok kuvvetli ekspresyon şiddetine doğru arttığı belirlenmiştir. Ayrıca embriyo hücrelerinde, dev trofoblast hücrelerinde, ekto plasental koni hücrelerinde, Reichert membranında ve anti-mezometrial bölgede yer alan kan damarlarının endotelinde kuvvetli *MMP-7* immünreaktivitesi gözlenmiştir. İmplantasyon bölgesini sınırlayan kapsül yapısındaki hücrelerde kuvvetli immünolokalizasyon tespit edilmiştir. Mezometrial bölge alanlarında ise ekstraselüler matrikste zayıf bir ekspresyon şiddeti görülürken bu bölgede yer alan çoğunlukla farklılaşmış desidual hücrelerin sitoplazmalarında ekspresyon şiddeti çok kuvvetliydi. Bu bölgedeki kan damarlarının endotelini oluşturan hücre gruplarında da kuvvetli ifade seviyesi gözlenmektedir.

MMP-9'un mezometrial bölgeye nazaran anti-mezometrial bölgede daha fazla lokalizasyon gösterdiği tespit edilmiştir. *MMP-2* ile benzer şekilde, embriyo çevresindeki anti-mezometrial alanda primer desidual bölgedeki hücre gruplarının kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdiği fakat sekonder ve anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe bu etkinin azaldığı görülmektedir. *MMP-9* esas olarak embriyo çevresindeki dev trofoblast hücrelerinde ve ekto plasental koniyi oluşturan hücrelerde kuvvetli pozitif reaksiyon göstermiştir. Embriyo hücreleri ve Reichert membranında ise

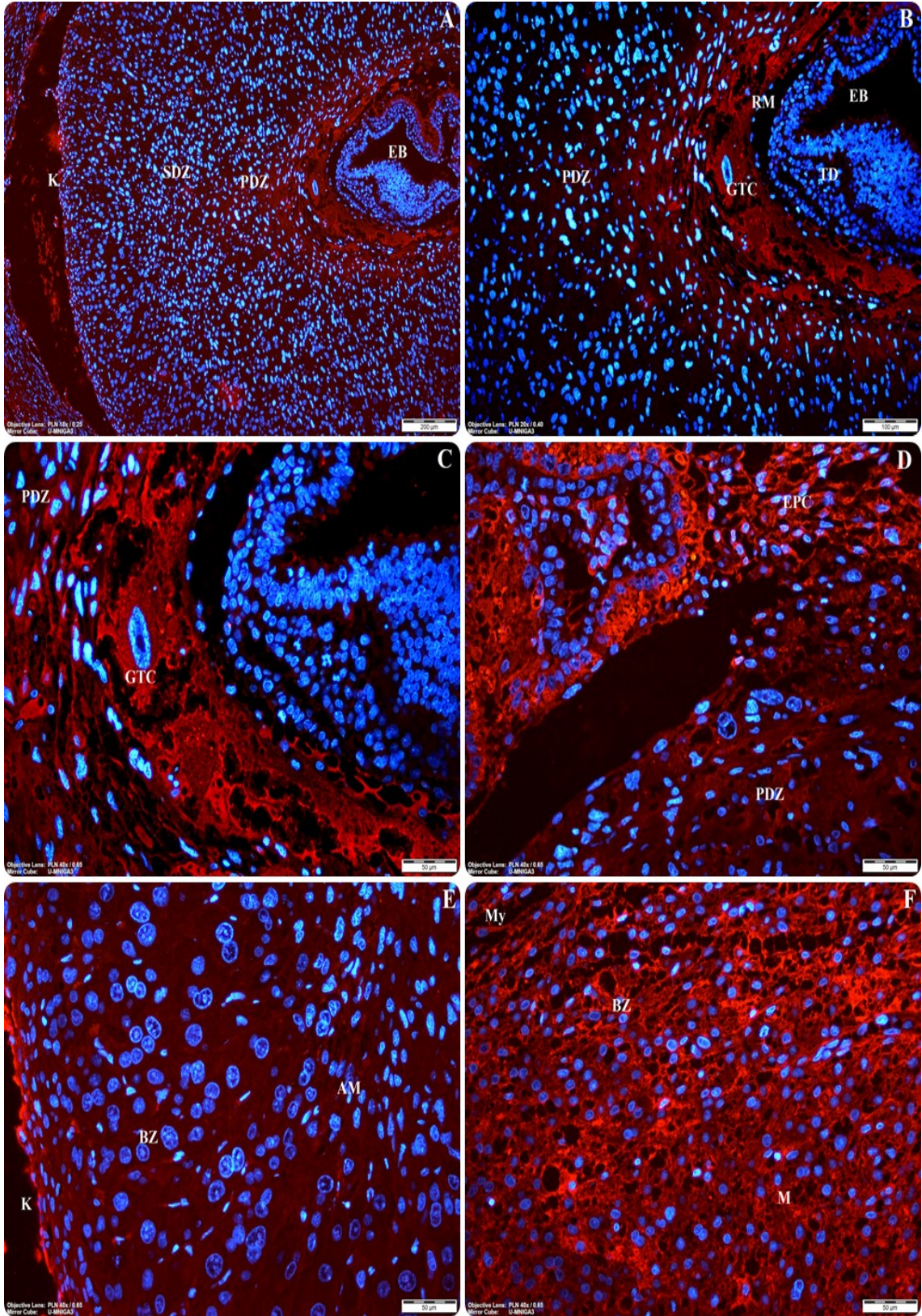
orta derecede bir reaksiyon şiddetinden bahsedebiliriz. Mezometrial bazal bölgeye baktığımızda ise burada yer alan kan damarlarının endotel kısmında ve bazal bölgenin ekstraselüler matriks alanlarında ekspresyon şiddeti zayıf olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Gebeliğin 8,5. gününde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immünboyanmasının hücresel dağılımı

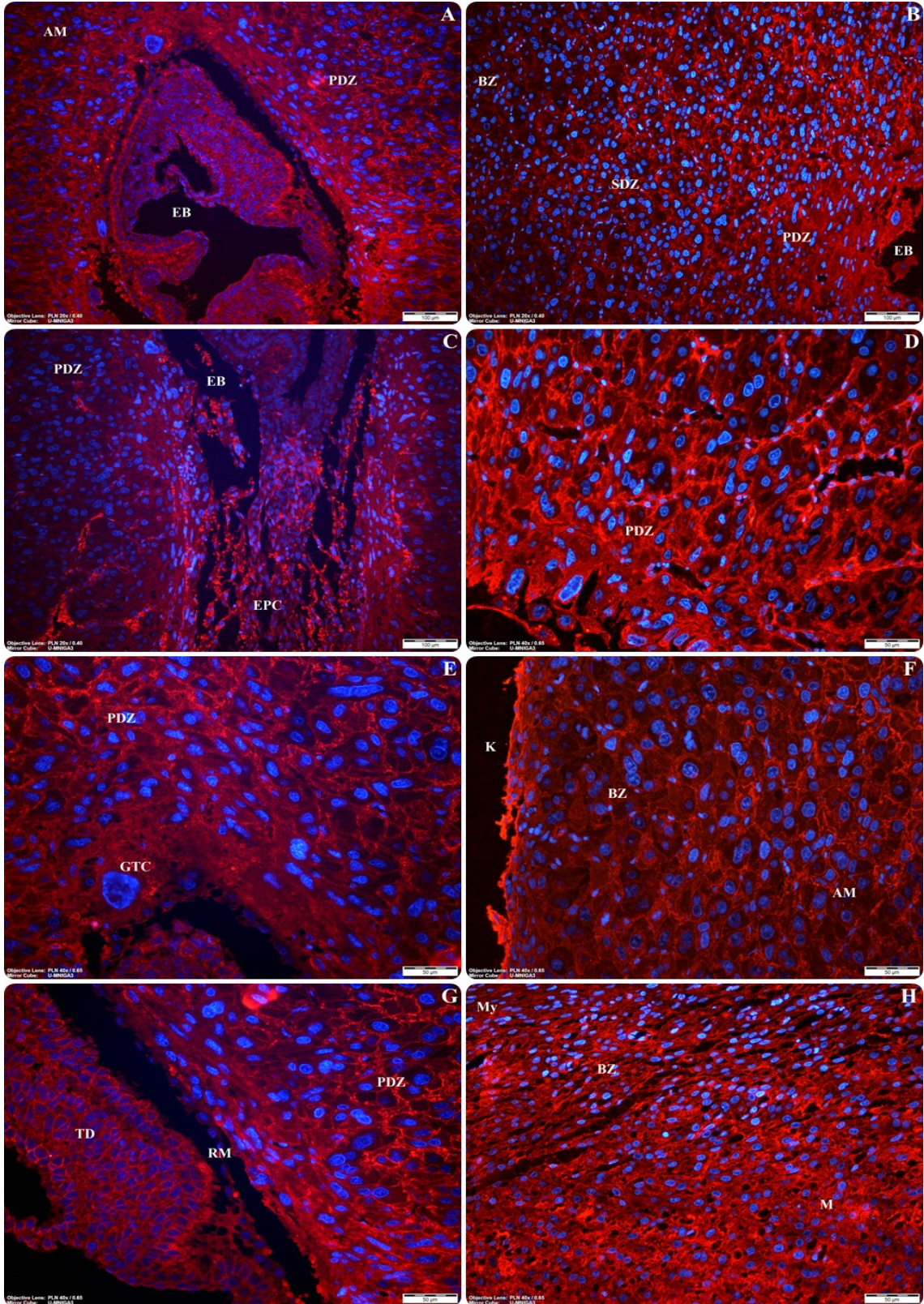
8,5. GÜN	ANTI-MEZOMETRIAL BÖLGE							MEZOMETRIAL BÖLGE	
	DESİDUA							DESİDUA	
	EMBRYO BÖLGESİ				PDZ	SDZ	BZ	KD	BZ
	TD	RM	GTC	EPC					
<i>Wnt-3</i>	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
<i>Wnt-7a</i>	+	++	++++	++++	++	+	+	+++	+++
β - <i>katenin</i>	++++	++	+++	+++	++++	+++	++	+++	++++
<i>MMP-2</i>	+	++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++
<i>MMP-7</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++	++++	+++	+++
<i>MMP-9</i>	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	+



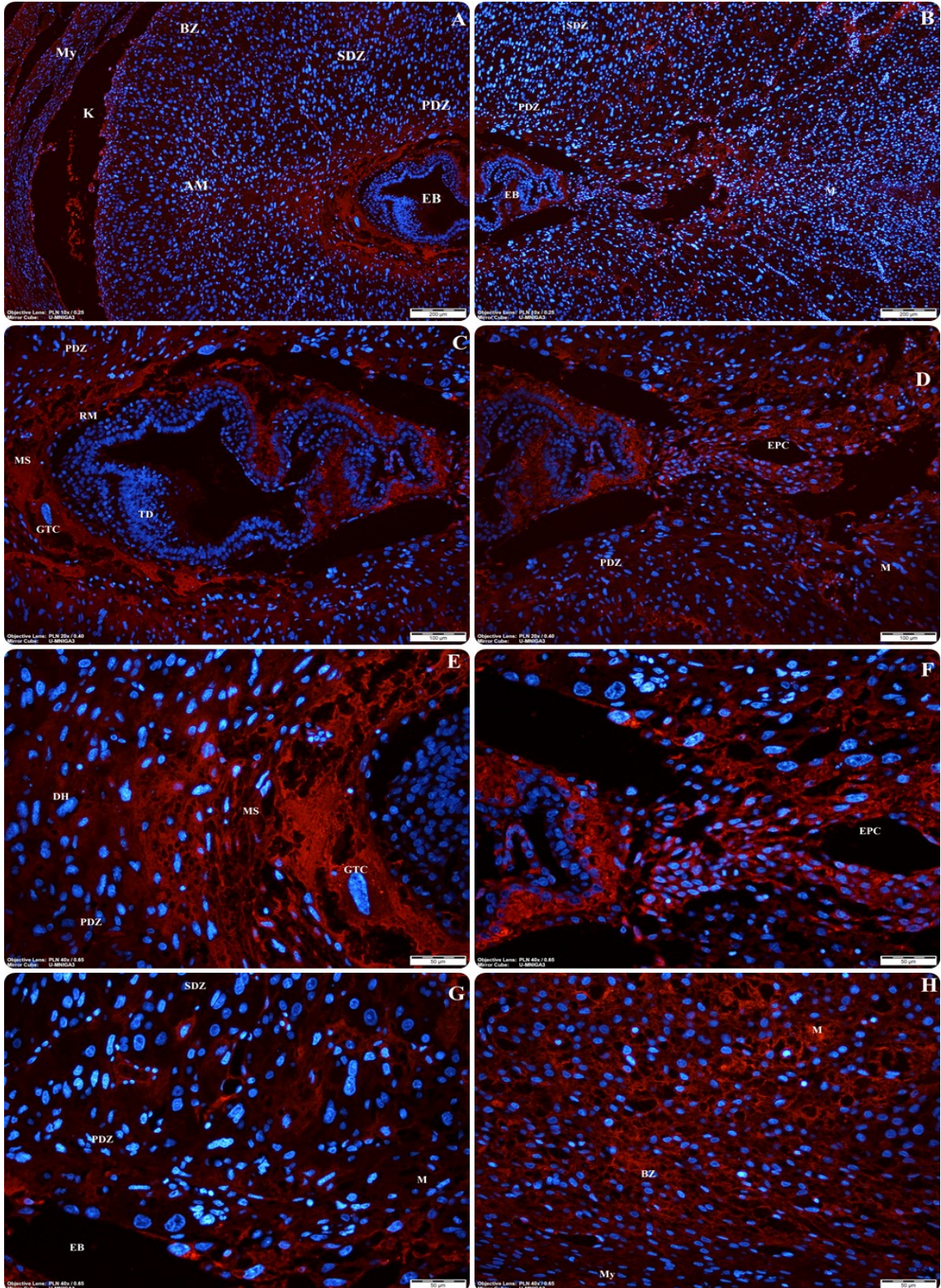
Şekil 4.35. Gebeliğin 8,5. gününde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A-G). Negatif kontrol: H. (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; Beyaz ok: Reichert membranı; VZ: Vaskülarizasyon zonu; KD: Kan damarı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; My: Miyometrium).



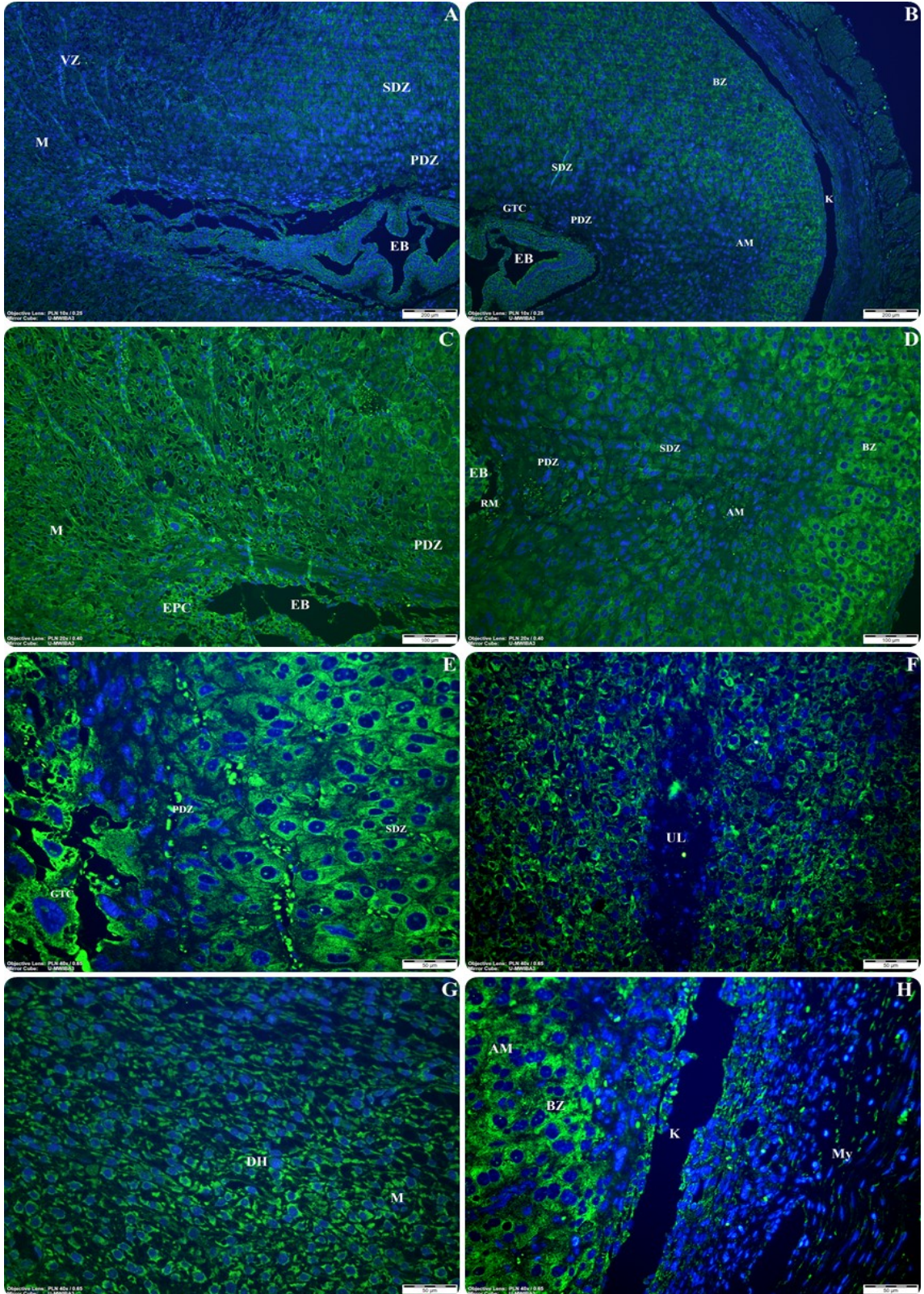
Şekil 4.36. Gebeliğin 8,5. gününde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A-F). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental kon.; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; My: Miyometrium).



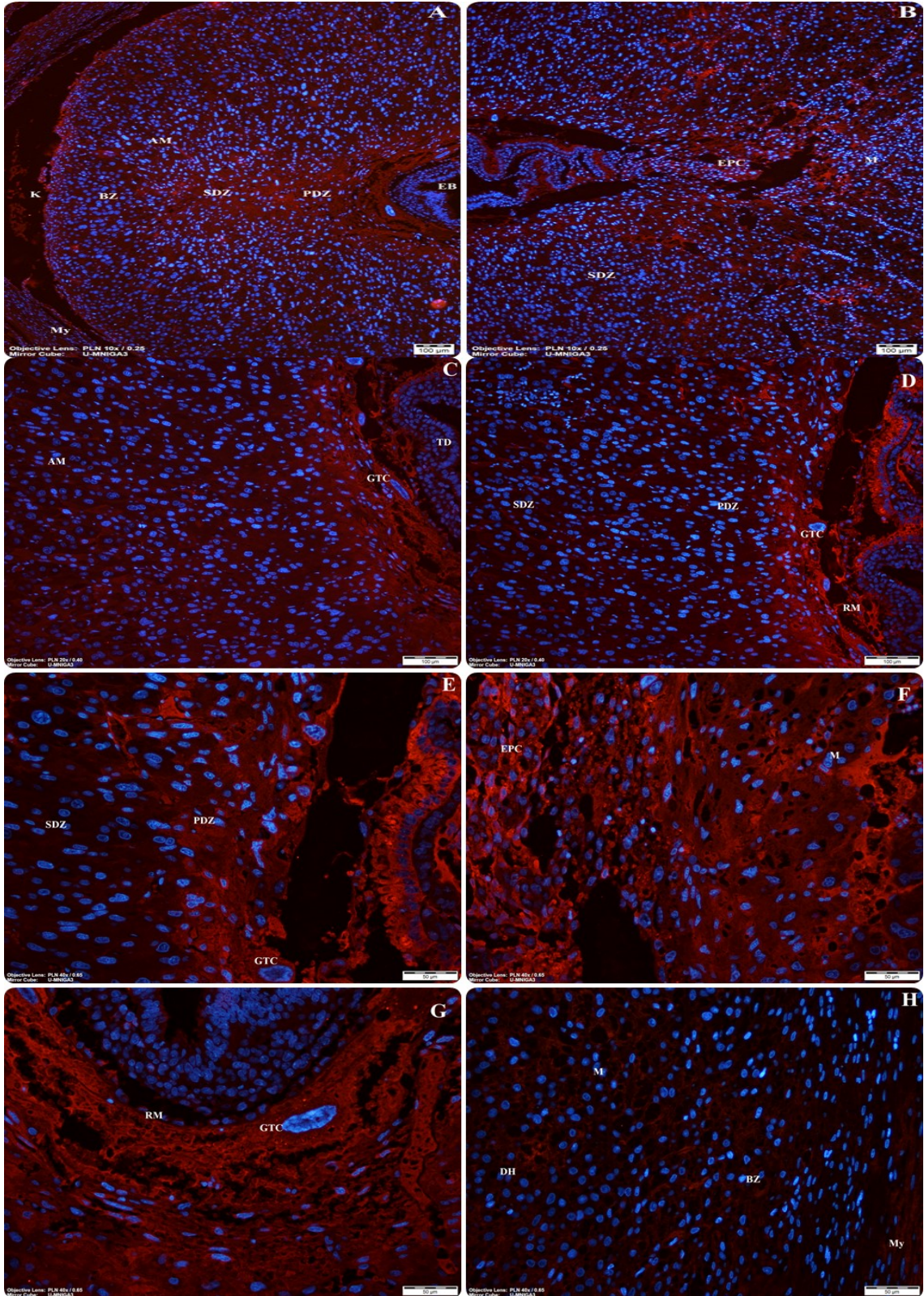
Şekil 4.37. Gebeliğin 8,5. gününde β -katenin immünolokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; My: Miyometrium).



Şekil 4.38. Gebeliğin 8,5. gününde *MMP-2* immünolokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; K: Kapsül; DH: Desidual hücreler; MS: Maternal sinüzoid; EPC: Ektoplasental koni; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; My: Miyometrium).



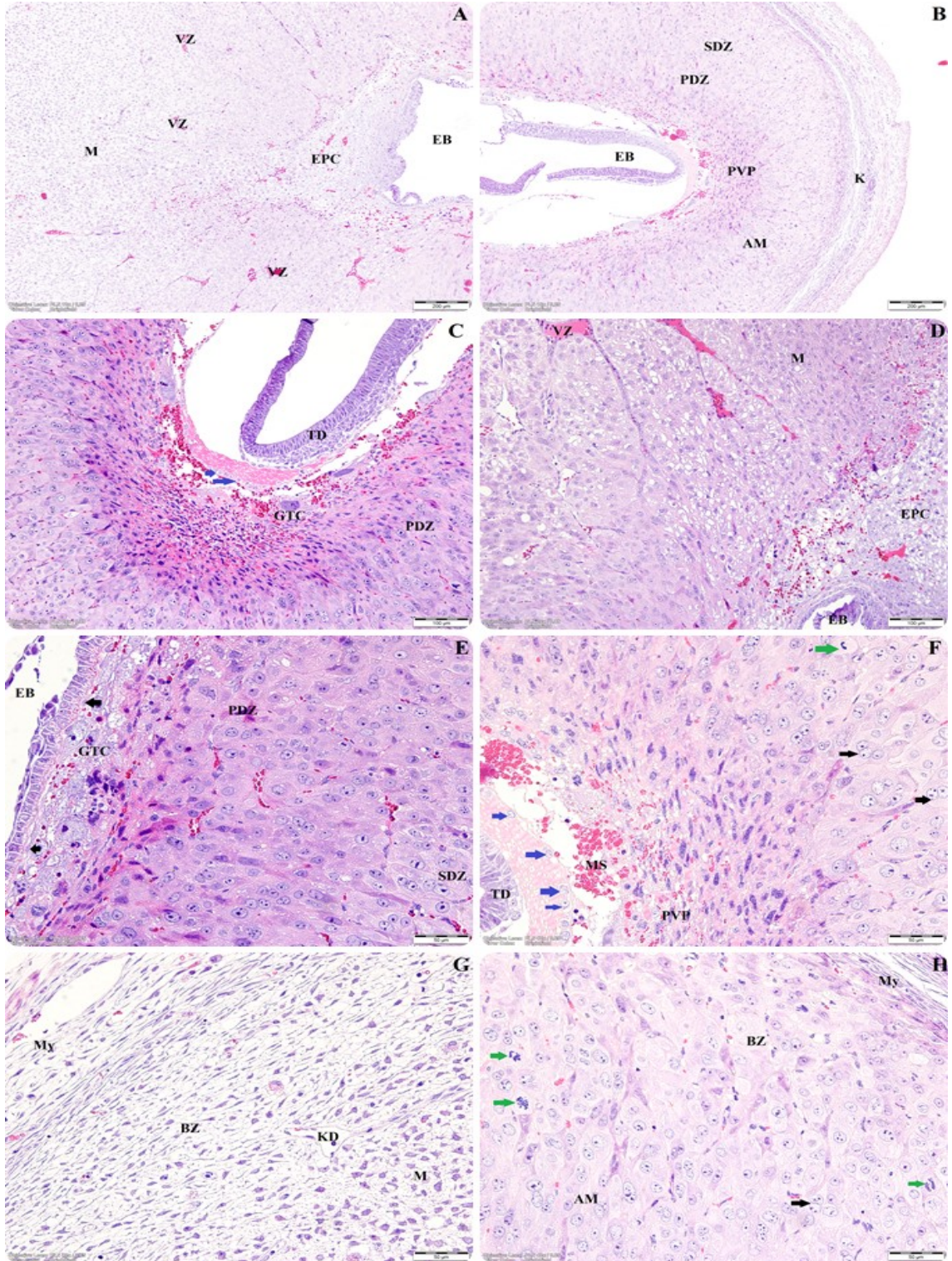
Şekil 4.39. Gebeliğin 8,5. gününde *MMP-7* immüno lokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; K: Kapsül; DH: Desidual hücreler; VZ: Vaskularizasyon zonu; EPC: Ektoplasental koni; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; My: Miyometriyum; UL: Uterus lümeni).



Şekil 4.40. Gebeliğin 8,5. gününde *MMP-9* immüno lokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; K: Kapsül; DH: Desidual hücreler; EPC: Ektoplasental koni; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; My: Miyometrium).

4.2.3. Gebeliğin 9,5. günü

Işık mikroskop bulgularında; uterus ve embriyo hacminin diğer günlere göre gittikçe büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.41-A,B). Büyük fetal amniyotik kavite ve maternal desidua, 9,5 günlük implantasyon bölgelerindeki histolojik kesitlerde göze çarpan özelliklerdir. İmplantasyon bölgesinde çoğunlukla anti-mezometrial bölgede konumlanmış olan farklılaşmış desidual hücrelerin bu dönemde mezometrial bölgede de farklılaşmaya başladığı görülmektedir. Desidual hücreler, iki veya daha fazla sayıda belirgin nukleoluslara sahip ve çoğunlukla ökromatik olan nukleuslar içermektedir (Şekil 4.41-E,F). Anti-mezometrial bölgenin sekonder ve bazal bölgelerinde birden fazla çekirdeğe sahip desidual hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4.41-F,H-siyah ok). Ayrıca bu bölgelerde mitoz bölünme geçiren hücrelerin 8,5. güne göre daha fazla olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.41-F,H-yeşil ok). Anti-mezometrial bölgede yer alan embriyo ve çevresindeki yapılarda bazı değişiklikler gözlenmektedir. Embriyonik tabakalardaki belirgin görünüm devam ederken, Reichert membranı dışında yer alan dev trofoblast hücrelerinin, etrafındaki kan damarları ile etkileşime girerek anti-mezometrial bölgede vitellus kesesini şekillendirdiği izlenmektedir (Şekil 4.41-B,C). Sinüzoidler genişlemiş ve daha bol hale gelmişlerdir. Dev trofoblast hücrelerde ise granül birikimi göze çarpmaktadır (Şekil 4.41-C). Mezometrial bölgede ise ektoplasental koninin dış sınırındaki trofoblast hücrelerinin kan damarları ile temas kurduğu ve primitif koryo-allantoik plasentayı şekillendirmeye başladığı belirlenmiştir.



Şekil 4.41. Gebeliğin 9,5. gününde ışık mikroskop bulguları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; BZ: Bazal zon; EPC: Ektoplasental koni; GTC: Dev trofoblast hücreleri; MS: Maternal sinüzoid; PVP: Primitif vitellüs kesesi plasentası; TD: Trilaminar disk; VZ: Vaskülarizasyon zonu; My: Miyometriyum; KD: Kan damarı; Mavi ok: Reichert membranı; Yeşil ok: Mitoz bölünme geçiren hücreler; Siyah ok: Çok çekirdekli hücreler).

Gebeliğin 9,5. günü immünfloresan bulgularında;

Wnt3 embriyo çevresindeki primer ve sekonder desidual bölgelerde zayıf bir lokalizasyon gösterirken, miyometriuma komşu anti-mezometrial bazal bölgede kuvvetli pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.42-B,G). Bazal bölgedeki kan damarlarının endotelinde de aynı şekilde kuvvetli ekspresyon belirlenmiştir. Mezometrial bazal bölgedeki kan damarlarının endotelinde de kuvvetli ekspresyon görülmektedir (Şekil 4.42-H). Ekstraselüler matriks ve içerisinde yer alan hücrelerin sitoplazmalarında da aynı kuvvette ifade seviyesi izlenmektedir. Embriyo çevresindeki yapılara baktığımız zaman; ektoplasental bölgedeki hücrelerde ve dev trofoblast hücrelerinde kuvvetli reaksiyon varken, Reichert membranında bu durum orta derece ifade şiddeti olarak görülmektedir (Şekil 4.42-E,F). Embriyo hücrelerinde de orta derecede bir ekspresyon görülmektedir.

Wnt7a embriyo çevresinde anti-mezometrial alanlarda diğer günlere oranla daha fazla ekspresyon seviyesine sahiptir. Primer ve sekonder desidual bölgede orta derecede bir ekspresyon gözlenirken, anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe kuvvetli bir ekspresyon artışı bulunmaktadır (Şekil 4.43-A,B,E). *Wnt7a* immünolokalizasyonu desidual hücrelerde sitoplazmik ve ekstraselüler bölgede orta derecede veya kuvvetli olarak izlenmiştir (Şekil 4.43-E). Mezometrial alanın genelinde kuvvetli bir ekspresyon izlenirken, bazal bölgede özellikle kan damarlarının endotelinde çok kuvvetli bir immünreaktivite tespit edilmiştir (Şekil 4.43-F). Embriyo hücrelerinde ve çevresindeki embriyonik yapılarda da kuvvetli bir lokalizasyon bulunmaktadır.

β -katenin primer desidual bölgeden sekonder ve anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe 8,5. günün aksine artan bir ekspresyon şiddeti göstermiştir (Şekil 4.44-D,E). Mezometrial bölge alanlarındaki *β -katenin* immünolokalizasyonlarının, 7,5. ve 8,5. günlerdeki bulgularla aynı özellikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.44-H). Embriyonik hücrelerde çok kuvvetli immünolokalizasyon gözlenirken, embriyo çevresinde yer alan dev trofoblast hücrelerinde ve ektoplasental yapıları oluşturan hücrelerde kuvvetli bir ifade seviyesi tespit edilmiştir (Şekil 4.44-C,G). Reichert membranında ise orta derecede bir immünolokalizasyon bulunmaktadır (Şekil 4.44-C).

MMP-2 primer desidual bölgede orta derecede bir ekspresyona sahipken, gebeliğin bu döneminde bu bölgeye kıyasla sekonder ve anti-mezometrial bazal bölgede boyanma daha zayıf görünmektedir (Şekil 4.45-D,E,G). Anti-mezometrial bölgeyle

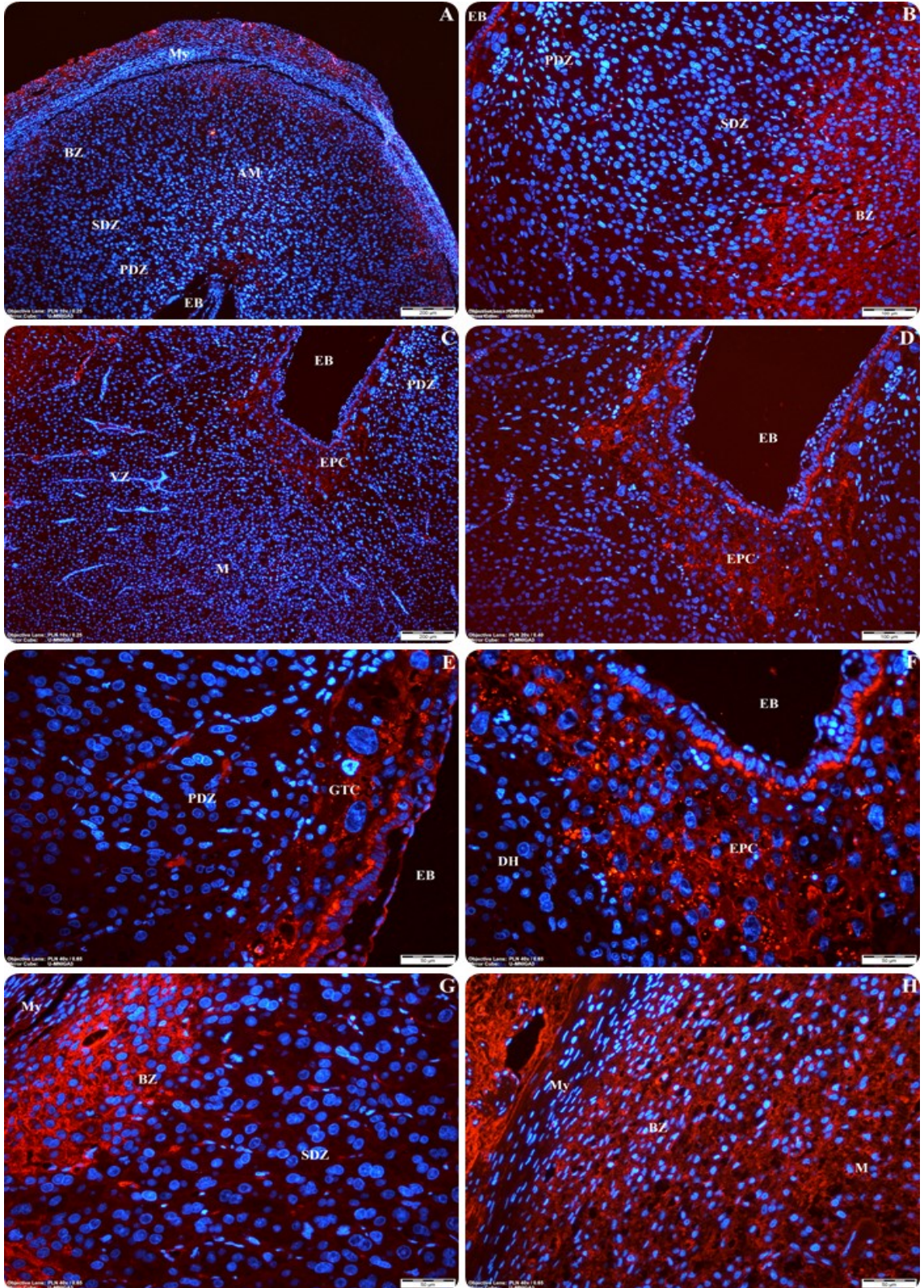
karşılaştırıldığında mezometrial alanlardaki yapıların daha fazla boyandığı görülmektedir. Mezometrial bazal bölgedeki kan damarlarının endotelinde ve ekstraselüler matriks ile içerisinde yer alan stromal hücrelerde kuvvetli bir immünolokalizasyon bulunmaktadır (Şekil 4.45-G). Embriyo bölgesine baktığımız zaman embriyonik hücrelerde kuvvetli ekspresyon belirlenirken, embriyo çevresindeki dev trofoblast hücreleri ve ektoplasental koni hücrelerinde de kuvvetli ekspresyon görülmektedir (Şekil 4.45-C,E,F). Reichert membranında ise orta derecede bir *MMP-2* immünolokalizasyonu bulunmaktadır.

MMP-7 primer desidual bölge haricinde genel olarak bütün alanlarda kuvvetli veya çok kuvvetli bir immünolokalizasyon göstermiştir. Primer desidual bölgeye kıyasla sekonder ve anti-mezometrial bazal bölgede çok kuvvetli bir ekspresyon şiddeti bulunmaktadır (Şekil 4.46-C,E,G). Özellikle bu bölgelerdeki desidual hücrelerin sitoplazmalarında *MMP-7* immünreaktivitesi çok kuvvetli olarak belirlenmiştir (Şekil 4.46-A,G). Bu bölgedeki kan damarlarının endotelinde de aynı kuvvette bir ifade seviyesi izlenmiştir. Mezometrial bölgedeki kan damarlarının endotelinde kuvvetli bir reaksiyon gözlenirken, bu bölgedeki hücrelerin sitoplazmalarında da aynı derecede kuvvetli bir ifade seviyesi bulunmaktadır. Embriyonik hücrelere ve embriyo çevresindeki yapıların tümüne baktığımız zaman oldukça kuvvetli bir *MMP-7* immünreaktivitesi belirgin olarak izlenmektedir.

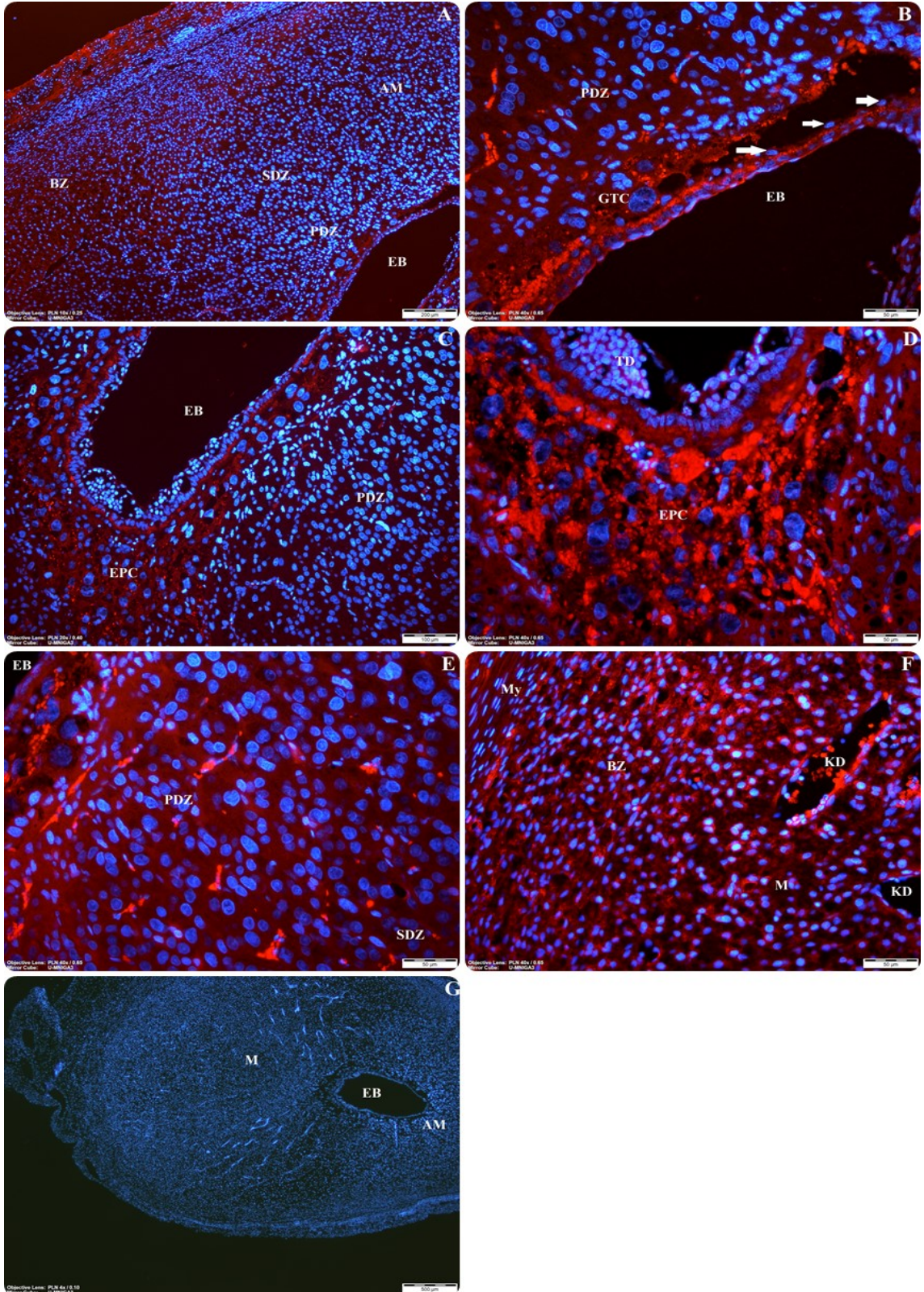
MMP-9'un embriyo bölgesinde ve mezometrial alanlarda daha güçlü reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.47-F,G,H). Primer ve sekonder desidual alanlarda zayıf bir ekspresyon şiddeti bulunurken, anti-mezometrial bazal bölgede ekspresyonun kuvvetli bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.47-E). Embriyo hücrelerinde ve Reichert membranında orta derecede bir ekspresyon gözlenirken, dev trofoblast hücrelerinde ve ektoplasental koni bölgesinde kuvvetli bir ekspresyon görülmektedir (Şekil 4.47-D,F,G). Mezometrial bölgedeki kan damarlarının endotel hücrelerinde immünolokalizasyonu kuvvetli bir şekilde izlenirken, miyometriuma bitişik alandaki bazal bölgede de bu durum aynı şekilde kuvvetli olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.47-H).

Tablo 4.7. Gebeliğin 9,5. gününde *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* immünboyanmasının hücresele dağılımı

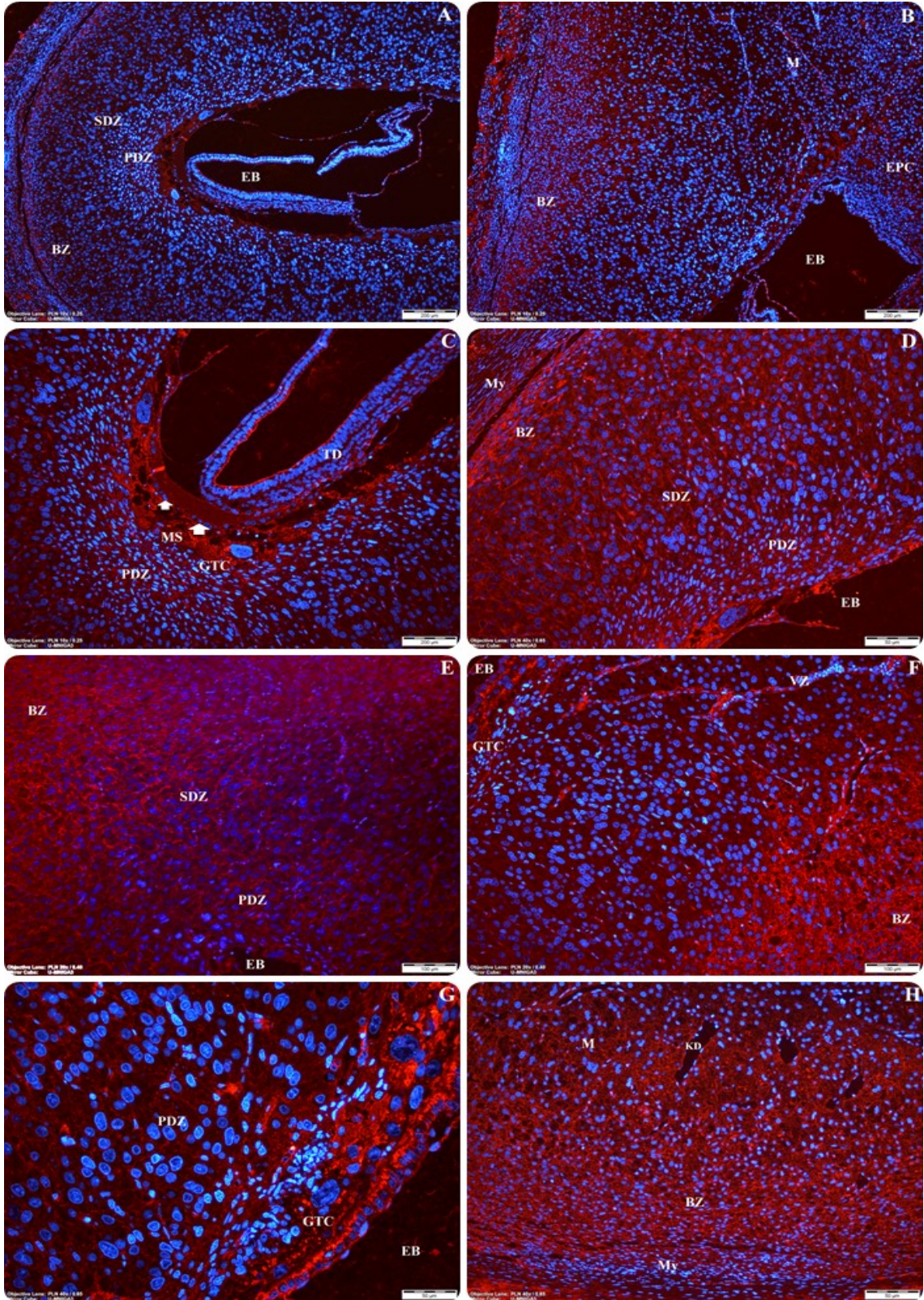
9,5. GÜN	ANTİ-MEZOMETRİAL BÖLGE							MEZOMETRİAL BÖLGE	
	DESİDUA							DESİDUA	
	EMBRİYO BÖLGESİ				PDZ	SDZ	BZ	KD	BZ
	TD	RM	GTC	EPC					
<i>Wnt-3</i>	++	++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
<i>Wnt-7a</i>	+++	++	+++	++++	++	++	+++	++++	+++
β - <i>katenin</i>	++++	++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++++
<i>MMP-2</i>	+++	++	+++	+++	++	+	+	+++	+++
<i>MMP-7</i>	++++	++++	++++	++++	+	++++	++++	+++	+++
<i>MMP-9</i>	++	++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++



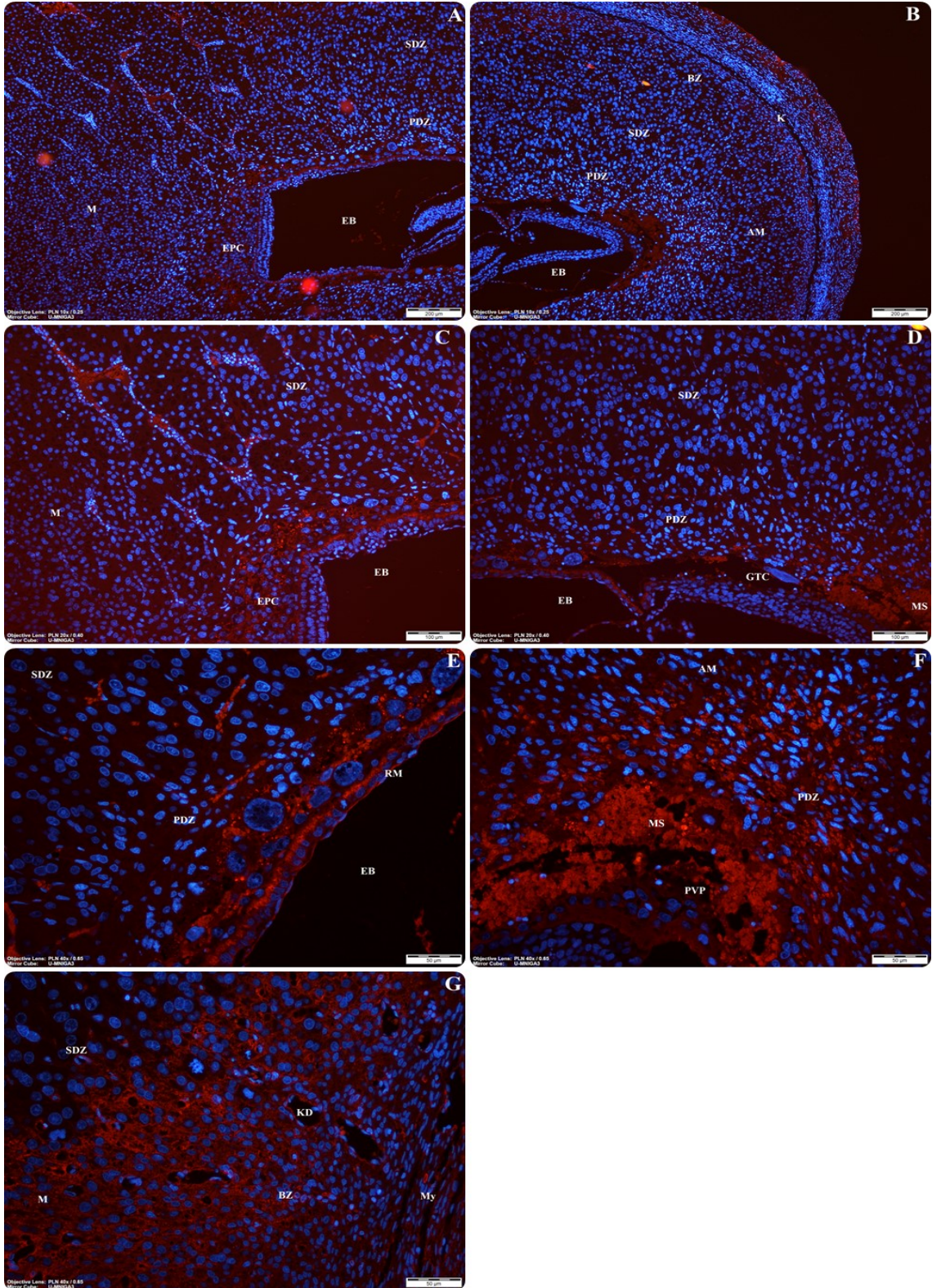
Şekil 4.42. Gebeliğin 9,5. gününde *Wnt3* immünolokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; GTC: Dev trofoblast hücreleri; DH: Desidual hücreler; My: Miyometriyum).



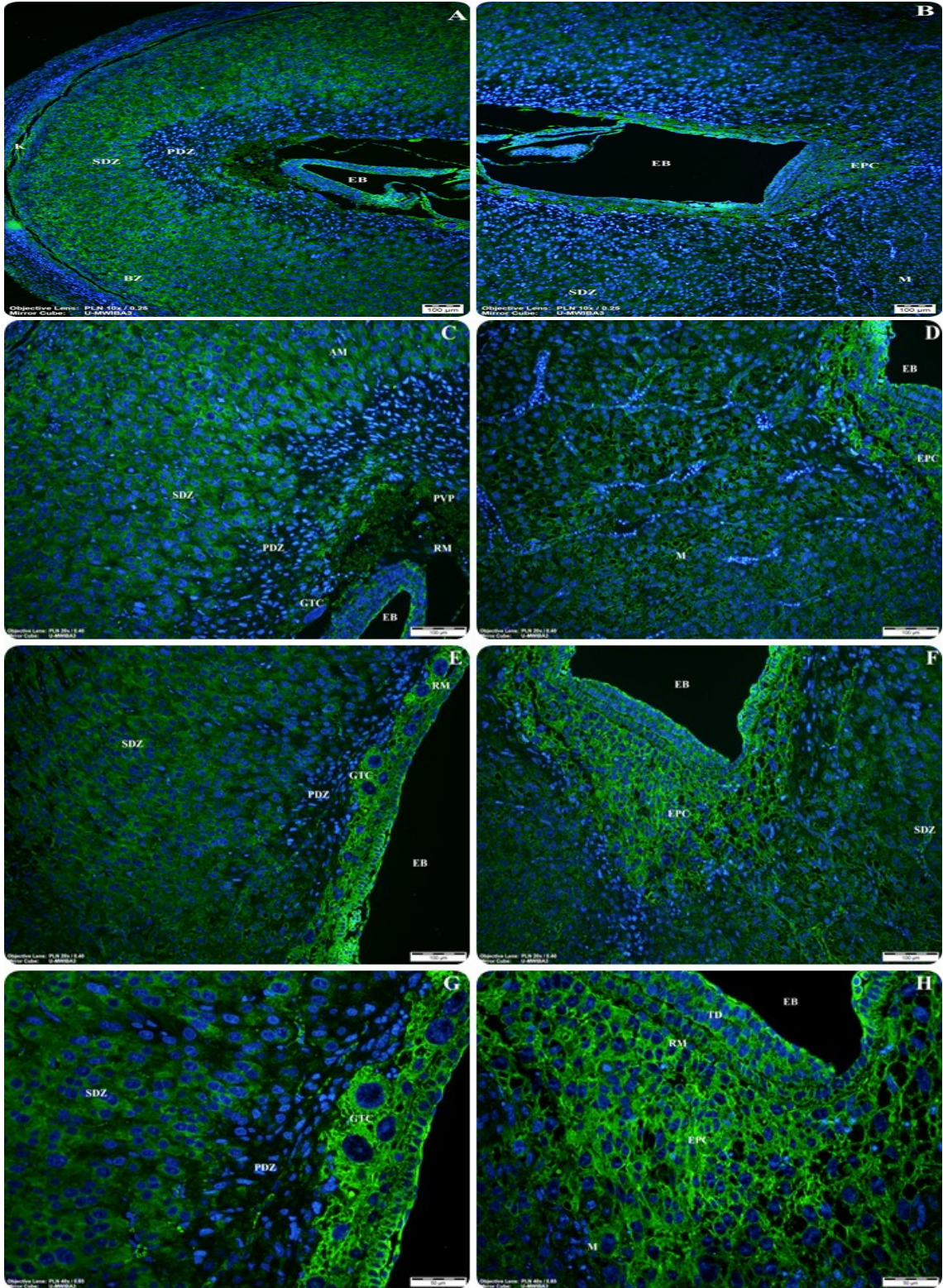
Şekil 4.43. Gebeliğin 9,5. gününde *Wnt7a* immünolokalizasyonları (A-F). Negatif kontrol: G. (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; Beyaz ok: Reichart membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; KD: Kan damarı; My: Miyometrium).



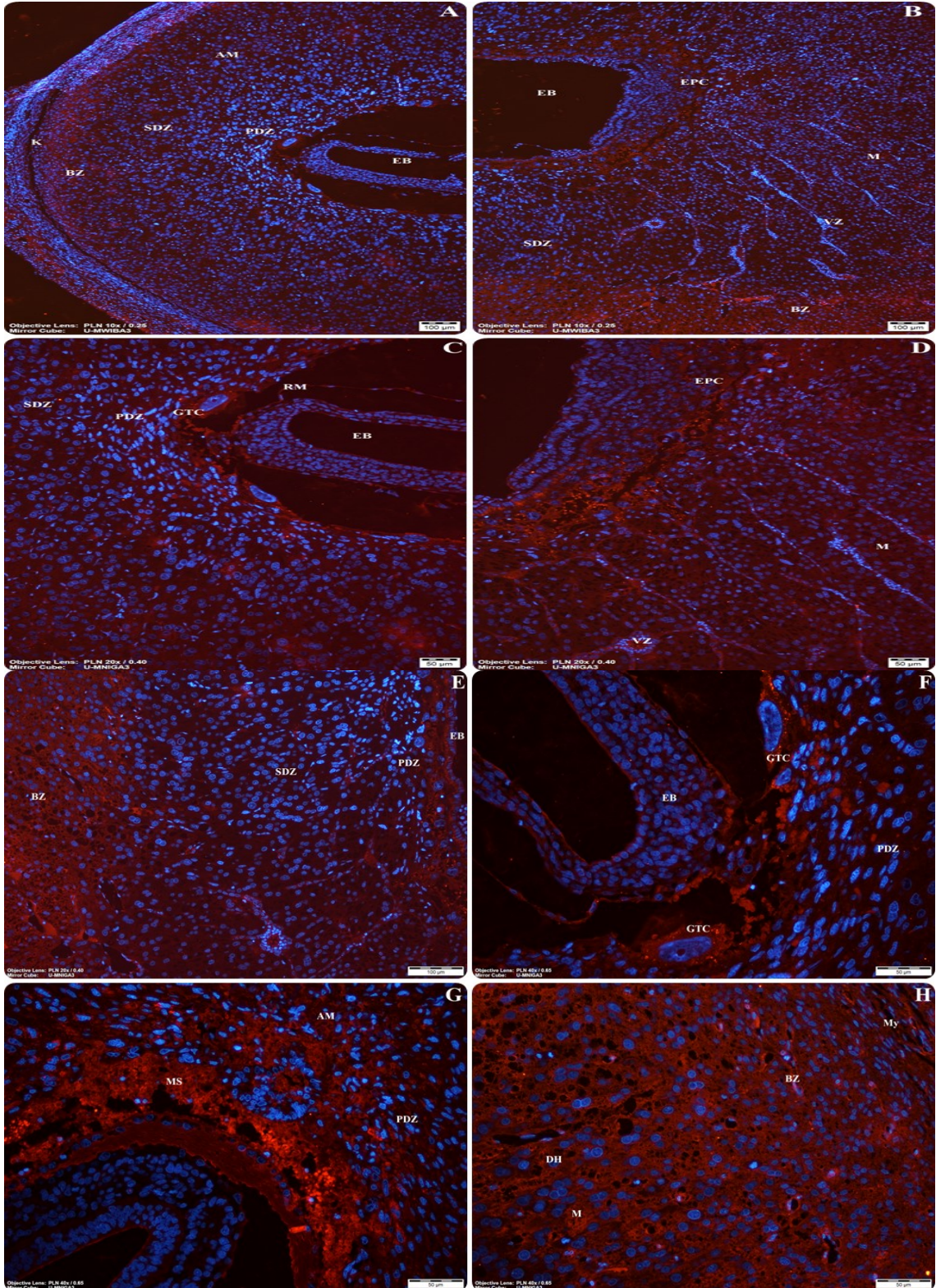
Şekil 4.44. Gebeliğin 9,5. gününde β -*katenin* immünolokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; Beyaz ok: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; TD: Trilaminar disk; DH: Desidual hücreler; VZ: Vaskülarizasyon zonu; KD: Kan damarı; My: Miyometriyum).



Şekil 4.45. Gebeliğin 9,5. gününde *MMP-2* immünolokalizasyonları (A-G). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; K: Kapsül; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; MS: Maternal sinüzoid; PVP: Primitif vitellus kesesi plasentası; KD: Kan damarı; My: Miyometrium).



Şekil 4.46. Gebeliğin 9,5. gününde *MMP-7* immüno lokalizasyonları (A-G). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; K: Kapsül; DH: Desidual hücreler; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; MS: Maternal sinüzoid; PVP: Primitif vitellus kesesi plasentası; VZ: Vaskülarizasyon zonu; UL: Uterus lümeni; LE: Luminal epitel; My: Miyometrium).



Şekil 4.47. Gebeliğin 9,5. gününde *MMP-9* immünolokalizasyonları (A-H). (AM: Anti-mezometrial desidua; M: Mezometrial desidua; EB: Embriyo bölgesi; PDZ: Primer desidual zon; SDZ: Sekonder desidual zon; EPC: Ektoplasental koni; K: Kapsül; DH: Desidual hücreler; RM: Reichert membranı; GTC: Dev trofoblast hücreleri; MS: Maternal sinüzoid; VZ: Vaskularizasyon zonu; My: Miyometrium).

4.3. Real-Time PZR Uygulamaları

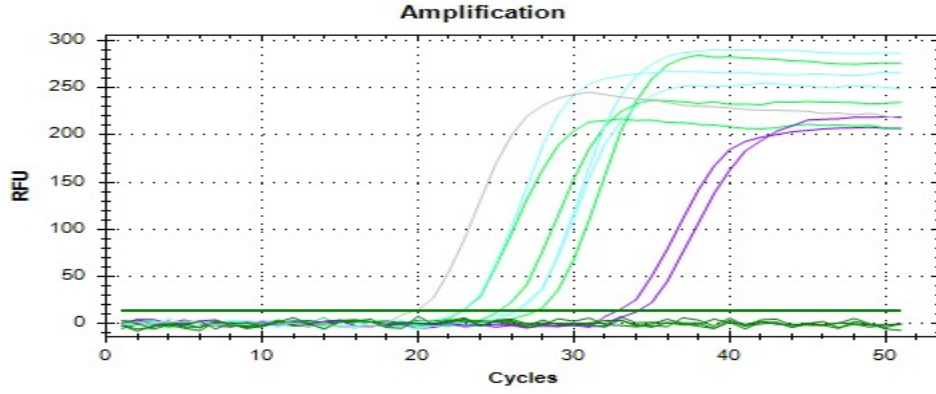
Real-Time PZR, kontrol ve gebelik grubu uterus dokularında *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* transkriptlerinin genel düzeylerindeki değişiklikleri değerlendirmek için kullanıldı ve referans gen olarak *GAPDH* ile normalizasyon sağlandı. *GAPDH*, glikolizin ara basamaklarında gliseraldehit-3-fosfattan iki molekül 1,3-bisfosfogliserat oluşumunu katalizleyen NAD bağımlı bir dehidrojenazdır. Bir housekeeping gen olan *GAPDH*, ifadenin düzeyinin stabilitesinin gösterilmesi için kullanıldı. Uterus dokularından alınan cDNA örneklerinden *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* primerleri ile yapılan Real-Time PZR sonrası elde edilen *ct* değerleri Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. *Wnt3*, *Wnt7a*, β -*katenin*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerinin östrus siklusu ve gebelik günlerine ait *ct* değerleri

GEN/EVRE	Gebelik 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>MMP-2</i>	28,24	26,36	23,41	25,67	24,57	24,05	26,44
<i>MMP-7</i>	26,17	26,35	22,67	20,90	15,47	20,15	25,10
<i>MMP-9</i>	30,15	29,05	26,01	30,14	31,19	28,16	30,32

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

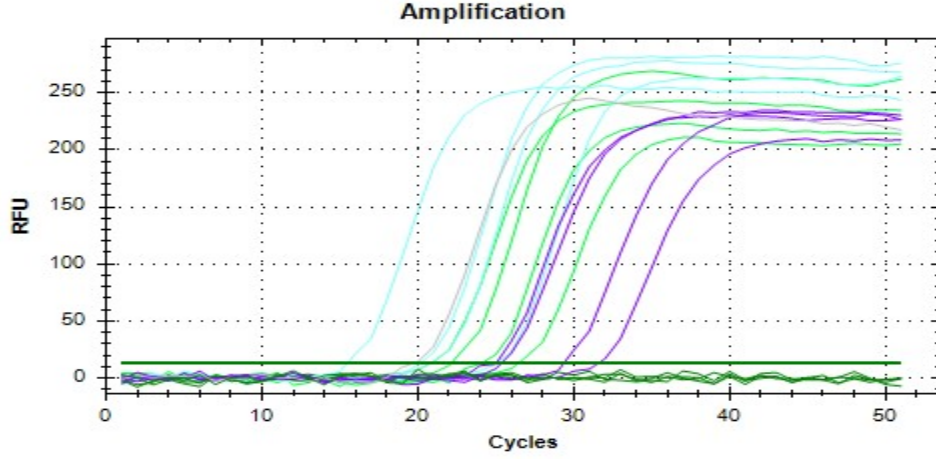
Ct değerlerindeki sayısal veriler ile ekspresyon ifadesinin kuvveti arasında ters bir orantı vardır. Sayısal değer ne kadar büyükse ekspresyon ifadesi o kadar azalır, aksine sayısal değer ne kadar küçükse ekspresyon şiddeti oldukça kuvvetlidir. Real-Time PZR reaksiyonu sonucunda kontrol ve gebelik grubundaki her gen için spesifik amplifikasyon eğrileri gözlendi (Şekil 4.48-4.51).



Şekil 4.48. Gebelik günlerindeki *GAPDH*, β -*katenin*, *MMP-7* ve *Wnt7a* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; β -*katenin*: yeşil; *MMP-7*: mavi; *Wnt7a*: mor)

Devam eden gebelik günlerinde;

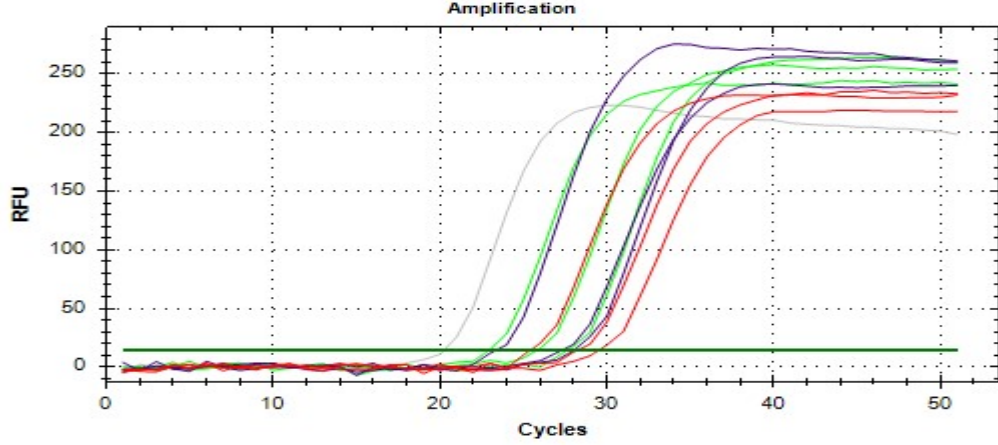
- *Wnt7a* geninde 7,5. gün gebe uterusunda ifade seviyesi izlenmedi. 8,5. gün gebe uterusundaki ifade seviyesi 9,5. gebelik gününe göre 2,41 oranında artış gözlemlendi.
- *MMP-7* geninde 7,5. günden 9,5. güne doğru giderken önce ifade seviyesinde az miktar da olsa bir azalma daha sonra ise artış gözlenmiştir. *MMP-7* geninde 7,5. gün gebe uterusundaki ifade seviyesi 8,5. gün gebe uterusuna göre az da olsa 1.13 oranında artış göstermiştir fakat 9,5. gün gebe uterusundaki ifade seviyesi ise 8,5. güne göre 12.8 oranında artış göstermiştir.
- β -*katenin* geninin 7,5. günden 9,5. güne doğru gidildikçe ifade seviyesinde sürekli olarak artış gözlenmektedir. 8,5. gün gebe uterusundaki gen ifade düzeyi 7,5. güne göre 5.06 oranında; 9,5. gün gebe uterusundaki gen ifade düzeyi ise 8,5. gün gebe uterusuna göre 5.24 oranında artış göstermiştir.



Şekil 4.49. Östrus siklusundaki *GAPDH*, *β-katenin*, *MMP-7* ve *Wnt7a* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *β-katenin*: yeşil; *MMP-7*: mavi; *Wnt7a*: mor)

Kontrol grubu olan östrus siklusuna baktığımız zaman;

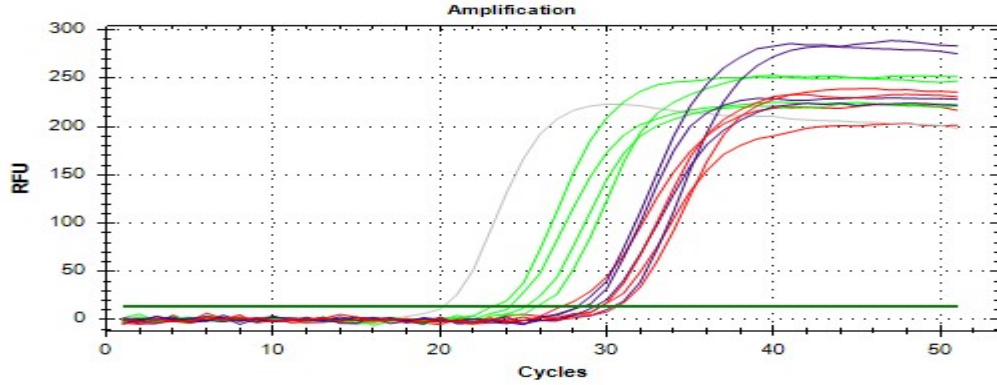
- *Wnt7a* geninde östrus evresindeki ifade seviyesi proöstrus evresine göre 16.11 oranında artış göstermiştir. Östrus evresinden metaöstrus evresine geçişte az miktarda da olsa metaöstrus evresinin ifade seviyesinin artışı (1.24 oranında) gözlenmiştir. En düşük ifade seviyesi ise diöstrus evresinde izlenmiştir. Metaöstrus evresindeki ifade düzeyi diöstrus evresine göre 93.7 kat fazladır. Proöstrus ve östrus evreleriyle karşılaştırıldığında da bu evrelerin diöstrus evresine göre sırasıyla 4.65 ve 75.06 oranında bir artış söz konusudur.
- *MMP-7* geninde östrus evresindeki ifade seviyesi proöstrus evresine göre 43.11 oranında artış göstermiştir. Östrus evresinden metaöstrus evresine geçişte ise 25.63 oranında bir artış göstermiştir. En düşük ifade seviyesi ise diöstrus evresinde izlenmiştir. Metaöstrus evresinden diöstrus evresine geçişte 30.9 kat oranında bir artış gözlemlendi. Proöstrus ve östrus evreleriyle karşılaştırıldığında da bu evrelerin diöstrus evresine göre sırasıyla 18.37 ve 792.35 oranında bir artış söz konusudur.
- *β-katenin* geninde östrus evresindeki ifade seviyesi proöstrus evresine göre 3.89 oranında bir artış göstermiştir fakat metaöstrus evresindeki ifade düzeyi östrusa göre 2.46 oranında artmıştır. Diöstrus evresi ise en düşük ifade seviyesinde bulunmaktadır. Metaöstrus evresinin ifade düzeyi diöstrus evresine göre 48.5 oranında bir artış göstermiştir.



Şekil 4.50. Gebelik günlerindeki *GAPDH*, *MMP-2*, *MMP-9* ve *Wnt3* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *MMP-2*: yeşil; *MMP-9*: kırmızı; *Wnt3*: mor)

Devam eden gebelik günlerinde;

- *MMP-2* geninin 7,5. günden 9,5. güne doğru gidildikçe ifade seviyesinde sürekli olarak artış gözlenmektedir. 8,5. gün gebe uterusunun ifade seviyesi 7,5. gün gebe uterusuna göre 3.68 oranında artış gösterirken, 9,5. gün gebe uterusunun ifade seviyesi 8,5. güne göre 7.72 oranında artış göstermiştir.
- *MMP-9* geninin 7,5. günden 9,5. güne doğru gidildikçe ifade seviyesinde sürekli olarak artış gözlenmektedir. 8,5. gün gen ifade seviyesi 7,5. güne göre 2.14 oranında bir artış göstermiştir. 9,5. gün gebe uterusunun gen ifade seviyesi ise 8,5. güne göre 8.22 oranında artmıştır.
- *Wnt3* geninde ise *MMP-9*'da olduğu gibi 7,5. günden 9,5. güne doğru gidildikçe ifade seviyesinde sürekli olarak artış gözlenmektedir. 8,5. gün ifade seviyesi 7,5. güne göre 1.38 oranında bir artış göstermiştir. 9,5. gün gebe uterusunun ifade seviyesi ise 8,5. güne göre tam 16 oranında artmıştır.



Şekil 4.51. Östrus siklusundaki *GAPDH*, *MMP-2*, *MMP-9* ve *Wnt3* genlerinin amplifikasyon eğrileri (*GAPDH*: gri; *MMP-2*: yeşil; *MMP-9*: kırmızı; *Wnt3*: mor)

Östrus siklusundaki *MMP-2*, *MMP-9* ve *Wnt3* genlerinin ifade seviyesine baktığımız zaman;

- *MMP-2* geninde östrus evresinin ifade seviyesi proöstrus evresine göre 2.14 oranında bir artış gösterdiği gözlenirken metaöstrus evresinin östrus evresine göre ifade düzeyinde 1.43 oranında bir artış görülmektedir. Diöstrus evresi bu genin ifade düzeyinde en düşük orana sahiptir. Metaöstrus evresinin gen ifade düzeyi diöstrus evresine göre 5.24 oranında artış gösterirken proöstrus ve östrus evrelerinin ifade düzeyleri sırasıyla 1.7 ve 3.65 oranında artmıştır.
- *MMP-9* geninde en düşük ifade seviyesinin östrus evresinde olduğu gözlenmiştir. Proöstrus evresindeki gen ifade düzeyi östrus evresine göre 2.07 oranında artmıştır. Metaöstrus evresindeki gen ifade düzeyi de östrus evresine göre 8.16 oranında artış gösterirken diöstrus evresine göre ise 4.46 oranında artış göstermiştir.
- *Wnt3* geninde en yüksek ifade seviyesinin proöstrus döneminde olduğu tespit edildi. Proöstrus evresindeki ifade düzeyi östrus evresine göre 4.95 oranında artmıştır. Metaöstrus evresindeki gen ifade düzeyi ise östrus evresine göre 3.45 oranında artış gösterirken diöstrus evresine göre ise 1,62 oranında artış gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Peri-implantasyon süreci gebeliğin kısa bir zaman aşamasını temsil etmesine karşın bu süreçte meydana gelen olaylar hamilelik ve üreme sağlığının ilerlemesini önemli ölçüde etkileyebilir. Endometrium menstrual siklus boyunca steroid hormonlara yanıt oluşturarak fonksiyonel kısmı dökülen ve yenilenen kompleks ve dinamik bir dokudur. Granüloza hücreleri tarafından salgılanan östrojen hormonunun kontrolü altında başlayan siklus, epitelyal ve stromal hücrelerin çoğalmasını içermektedir. Sekresyon evresinde ise korpus luteumun varlığı altında salgılanan progesteronun, östrojeni ve dolayısıyla çoğalmayı baskıladığı bilinmektedir (Strowitzki vd., 2006).

İmplantasyon insan neslinin devamı için son derece elzem bir biyolojik sistemdir, bu da bizim bilgi birikimimizi birkaç temel fizyolojik süreçte ilerletmemizi gerektirir. Bunlar; bağlanma sırasında trofoblast ve luminal epitel arasında meydana gelen parakrin ve jukstakrin epitelyal-epitelyal etkileşimler; luminal epitel ve stroma arasındaki epitelyal-mezenşimal etkileşim; hücre göçü ve invazyonunu içeren trofoblast-epitelyum-stroma etkileşimleri; vasküler geçirgenlik ve yetişkin anjiyogenez; ve stromal desidualizasyon sırasında düzenlenmiş büyümeyi (çoğalma, farklılaşma, poliploidi ve apoptoz) içerir (Wang ve Dey, 2006). Embriyonun endometrium içine implantasyonu, hamilelik için kritik öneme sahip, oldukça kontrollü bir olaydır. Bu sürecin moleküler temelini anlamak, doğurganlığın düzenlenmesi için önemlidir. Embriyo implantasyonundaki başarısızlık, üreme teknolojilerinin verimliliğinde önemli bir sınırlayıcı faktördür ve implantasyon sürecine katılan moleküllerin bir veya daha fazlası, fertilizasyon sonrası kontrolün anlaşılabilmesi için uygun bir hedef oluşturur (Rechtman vd., 1999). İmplantasyon öncesi ve implantasyon süreçlerinde, yapısal ve fonksiyonel değişimlere maruz kalan embriyo ve uterusu etkileyen sinyal molekülleri, bu işlemlerin başarıyla tamamlanması için etkili rol oynarlar.

İmplantasyondaki olaylar, embriyonik ve endometrial proteomların ekspresyonunu kontrol eden gen transkripsiyonlarındaki değişimlerin düzenlemelerinin bir sonucudur. Tüm bu yaklaşımlar ve bilgilerin, endometrial reseptivite ve embriyo-endometrium diyalogunu bütünsel şekilde anlamak için bir sistem biyolojisi yaklaşımına entegre edilmesi gerekmektedir (Rashid vd., 2011). Blastosistin faaliyet durumu, implantasyon penceresinin tanımlanmasında uterus reseptivitesinin elde edilmesiyle aynı derecede

önemlidir (Paria vd., 1993; Wang ve Dey, 2006). Her ne kadar geniş bir yelpazede sinyalleme molekülleri implantasyon için uterus reseptivitesini belirlerken kritik olarak tanımlanmış olsa da (Wang ve Dey, 2006), blastosist aktivasyonunu düzenleyen sinyalizasyon ağı ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır (Paria vd., 1998; Wang vd., 2003; Hamatani vd., 2004). Ekspresyon çalışmaları, bazı Wnt ligandlarının, morula-blastosist geçişi ve implantasyona doğru blastosist aktivasyonu sırasında rol oynayabileceğine dair önemli kanıtlar sağlamıştır (Mohamed vd., 2004). Sıçanlarda yapılan çalışmalar, insan implantasyonunun moleküler temelini iç yüzünü anlamamızı sağlamıştır. Hem sıçan hem de insan embriyoları, basit, tanımlanmış ortamlarda *in vitro* gelişebilir. Her iki türde de embriyo implantasyonu stromal desidualizasyona yol açar.

İmplantasyon, normal veya patolojik koşullar altında diğer sistemlerde yaygın olan çeşitli sinyal yollarını içerir. Bu nedenle, implantasyon üzerinde yapılan araştırmalar, yalnızca üreme veya gelişim biyologlarına değil, daha geniş bir bilim insanı topluluğuna hitap etmelidir. Örneğin, implantasyon sırasında gerekli olan özelliklerin ve sinyal yollarının birçoğu, tümör oluşumu sırasında da aktiftir-bu farklılık, implantasyon sırasında sıkı düzenlemenin gerçekleşmesidir, oysa aynı yolların düzensizliği tümör oluşumu sırasında ortaya çıkar. Bu nedenle, implantasyonun karışık mekanizmalarının anlaşılması, tümör oluşumundaki karmaşık mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir ve bir gün “hayat ve ölümün ortak bir tehdit tarafından bağlantılı olduğunu” gösterebilir (Wang ve Dey, 2006).

Bu çalışmada peri-implantasyon döneminde sıçan endometriyumunda kanonikal Wnt- β katenin sinyal yolağı aracılığıyla *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerinin immüno lokalizasyonları ve gen ekspresyonları belirlenerek olası rolleri araştırılmış ve sonuçlar ayrı ayrı tartışılmıştır.

Kanonikal Wnt- β Katenin Sinyal Yolağı

WNT'ler, farelerde ve insanlarda implantasyon zamanındaki embriyo-maternal etkileşimler ve östrus döngüsü sırasında önemli rol oynayan glikoproteinlerdir.

Wnt sinyal kaskadları embriyonik gelişim, doku homeostazisi ve kanserin ilerlemesinde temel rol oynar. Primer aks oluşumu, akson rehberliği, hücre motilitesi, proliferasyon ve farklılaşma gibi çeşitli anahtar hücresel süreçleri etkilemektedir (Logan ve Nusse, 2004;

Clevers, 2006; Cadigan ve Peifer, 2009; Clevers ve Nusse, 2012; Niehrs, 2012). İnsan üremesinde, gebelik başlangıcında Wnt sinyalleme sisteminin rolü, desidualizasyon, endometrial fonksiyonun düzenlenmesi ve trofoblast farklılaşmasında çok önemlidir. Wnt sinyal bileşenleri, üreme sistemi dokularının kanserlerinde, endometrioziste ve diğer gebelikle ilişkili komplikasyonlarda bulunmuştur. Bununla birlikte, Wnt sinyal yolu çok çeşitlidir ve sıklıkla kendi kendine ve diğer sinyal yolları ile tahmini zor olan sonuçlarla etkileşir. Bugüne kadar, 7 omurgasız ile birlikte fare ve omurgalılarda en az 19 Wnt geni keşfedilmiştir (Gavin vd., 1990; Sidow, 1992; Graba vd., 1995; Bergstein vd., 1997). Wnt proteinleri, hücre tipleri arasında farklı hücre içi sinyal yolları yoluyla ortaya çıkan çeşitli fonksiyonel etkiler gösterir (Moon vd., 1997; Brandon vd., 2000; Wilson vd., 2001).

Östrus siklusu ve implantasyon sürecinde sıçan endometriumunda Wnt familyasından *Wnt3* ve *Wnt7a* ligandı ile birlikte kanonikal yolda yer alan ***β-katenin*** proteininin endometrial ekspresyonunu ve dokudaki potansiyel rollerini değerlendirdik. Ayrıca Real-Time PZR ile dokudaki gen ekspresyon düzeylerini araştırdık.

Östrus Siklusunda Wnt-β Katenin Sinyal Yolu

İnsanlarda menstrual döngü veya sıçanlarda östrus siklusu uterus içinde meydana gelen ve uterusun hazırlanması için gerekli olan bir dizi değişiklikleri açıklar. İnsanlarda, döngü proliferatif (foliküler) ve sekretuar (luteal) fazlar olarak sınıflandırılır. Menstruasyon döngüsünün proliferatif fazı sırasında, östrojenler Wnt-β katenin sinyalini indükler; fakat sekretuar faz sırasında progesteron farklılaşmaya neden olur ve diğer aktivitelere ek olarak kanonikal Wnt-β katenin sinyalini inhibe eder. Daha sonraki çalışmalar bu genel hipotezi desteklemektedir (Wang vd., 2010; van der Horst vd., 2012). Wnt sinyal yolağının, fareye ait östrus ve proöstrus döngülerinde uterusun en önemli sinyal kümelerinden biri olduğu bulunmuştur (Yip vd., 2013).

İnsan endometriumunda *Wnt-2*, *Wnt-3*, *Wnt-4*, *Wnt-5a*, *Wnt-7a* ve *Wnt-7b* menstrual döngü boyunca yapısal olarak ifade edilir (Bui vd., 1997). Bu gözlemler, birkaç mikroarray çalışmaya ek olarak, Wnt aile genlerinin menstrual döngü sırasında insan endometriumundaki regülasyonunu göstermektedir (Borthwick vd., 2003).

Tulac ve arkadaşları (2003), yaptıkları çalışmada Wnt familyasının insan endometriumunda endokrin-duyarlı bir dokudaki potansiyel rollerini değerlendirmek için, menstrual döngünün proliferatif ve sekretuar fazlarında, birkaç Wnt ligandının (*Wnt-2*, ***Wnt-3***, *Wnt-4*, *Wnt-5a*, ***Wnt-7a*** ve *Wnt-8b*) endometrial ekspresyonu, reseptörler [Frizzled (Fzd)-6 ve düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili protein (LRP)-6], inhibitörler [FrpHE ve Dickkopf (Dkk)-1] ve gerçek zamanlı PZR ile aşağı-akım efektörlerini (Dishevelled-1, GSK-3 β , ve ***β -katenin***) araştırmışlardır. Analiz ettikleri on üç genin, hepsinin sekretuar ve proliferatif endometriumda eksprese edildiğini bulmuşlardır. Uyumlu buldukları başka bir çalışma (Bui vd., 1997) ile kendi çalışmalarını karşılaştırdıklarında; proliferatif ve sekretuar faz endometriumunda *Wnt-2*, *Wnt-4*, *Wnt-5a*, ***Wnt-7a*** ve ***β -katenin*** mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı; buna karşılık, muhtemelen farklı duyarlılıklarla tespit edilmek için farklı deneysel yöntemlere bağlı olarak, önceki çalışmalarda (Bui vd., 1997) bulunmayan, proliferatif fazda sekretuar faza göre ***Wnt-3***'ün anlamlı olarak belirgin yukarı-regülasyonunu (4.7 kat artış) gözlemlediklerini belirtmişlerdir (Tulac vd., 2003).

Çalışmamızda sıçan östrus siklusundaki ***Wnt-3***'ün immünolokalizasyonlarına bakılmış ve gen ekspresyon düzeyi gösterilmiştir. Sıçan endometriumunda ***Wnt-3***'ün östrus siklusunun bütün evreleri boyunca luminal epitel ve bez epitelinde çoğunlukla zayıf şiddette eksprese olduğu, subluminal stromadan bazal stromaya doğru gidildikçe, özellikle proöstrus ve östrus evrelerinde, artan bir immünolokalizasyon gösterdiği ve miyometriuma komşu alanlarda oldukça fazla bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir. Ayrıca ***Wnt-3***'ün proöstrus, östrus ve metaöstrus evrelerinde endotel lokalizasyonlu ekspresyonlarının oldukça yüksek olduğu, diöstrus evresinde ise orta dereceye kadar azaldığı belirlenmiştir. Real-Time PZR verilerine de baktığımız zaman proöstrus evresinin en yüksek ifade seviyesine ait olduğunu göstermiştir. Östrus, metaöstrus ve diöstrus evreleriyle karşılaştırıldığında sırasıyla 4.95, 1.43 ve 2.32 kat oranla daha fazla artışı mevcuttur. Östrus siklusu sürecinde ***Wnt-3*** geniyle alakalı oldukça sınırlı bir bilgi birikimi bulunmaktadır ve bulgularımız bizi, sıçan endometriumunda değişiklik gösteren ***Wnt-3***'ün de etkilerinin olabileceği sonucuna ulaştırmıştır.

Wnt7a, hücre içeriğine bağımlı olan, kanonikal olmayan Wnt yolağının yanı sıra, β -*katenin* yoluyla kanonikal Wnt yolunu da aktive edebilir (Yoshioka vd., 2012). *Wnt7a*, β -*katenin*'i aktive eder ve ECM bozunmasında rol alan aşağı-akım hedef genlerinin artan seviyesine yol açar. *Wnt7a* eksikliğinde ise kanonikal Wnt- β katenin yolağı etkisiz hale gelmektedir (Huang vd., 2018).

Tulac ve arkadaşları (2003), *Wnt7a*'nın sadece luminal epitelde eksprese olduğunu belirtmişlerdir. *Wnt-7a* ekspresyonunun sadece luminal epitelde bulunuyor olması, bu Wnt ligandının epitel fonksiyonunda, epitel-stroma etkileşimlerinde ve implantasyon sırasında epitele embriyonik bağlanma ile ilgili önemli işlevler üstlendiği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca Nusse ve Varmus (1992), yaptıkları çalışmada yetişkin insan endometriumunda bulunan kısıtlı ekspresyonla tutarlı olarak, farelerde *Wnt7a*'nın glandular epitelde değil, özellikle luminal epitelde eksprese edildiğini gözlemlemişlerdir. *In situ* hibridizasyon kullanılarak yapılan başka bir çalışmada da, *Wnt7a* mRNA'sının sadece epitelyal hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Carmon ve Loose, 2008). Kara (2010) ise immünohistokimyasal analiz sonucunda, *Wnt7a* dağılımının proliferasyon döneminde, infertil olgularda luminal epitelde, kontrol grubuna oranla daha fazla olduğunu, bununla beraber sekresyon döneminde kontrol grubundaki negatifliğe rağmen, infertil olgularda sekresyon döneminde luminal epitelde ekspresyonun olduğunu gözlemiştir. *In situ* hibridizasyon analizi sonucunda ise, *Wnt7a* ekspresyonunun her iki grupta proliferasyon döneminde luminal ve bez epitelinde farklı olduğunu, stromada benzer olduğunu belirtmiştir. Sekresyon döneminde luminal epitelde *Wnt7a* ekspresyonunun infertil gruplarda daha fazla iken, bez epiteli ve stromadaki *Wnt7a* ekspresyonlarının kontrol grubu ile benzer olduğunu saptamıştır (Kara, 2010).

Wnt-7a'dan yoksun mutant fareler, uterin bezleri oluşturamaz ve infertildir (Nusse ve Varmus, 1992). Bu hayvanların stromada Hoxa-10 ve Hoxa-11 gen ekspresyonu kaybı vardır, ayrıca stromal *Hoxa* gen ekspresyonunun sağlanması için luminal epitelde *Wnt-7a*'nın gerekli olduğunu gösterir (Miller ve Sassoon, 1998). Gaetje ve arkadaşları (2007) ise, *Wnt-7a* için yaptıkları immün boyama çalışmasında, araştırdıkları tüm endometrial örneklerin glandular ve luminal epitel hücrelerinde tespit edildiğini bulmuşlardır. Endometrial stroma hücrelerinin hemen hemen tüm olgularda *Wnt7a* ekspresyonu

gösterdiği belirtilmiştir. Gaetje'nin çalışmasıyla uyumlu olarak, Ingaramo ve arkadaşları (2006) *Wnt7a* proteininin epitelyal (luminal ve glandular) ve stromal hücrelerin çekirdeklerinde ifade edildiğini göstermiştir. Kiewisz ve arkadaşları da (2011), bazı proteinlerle birlikte *Wnt7a* ve *β-katenin* gen ekspresyonunu ve endometriumda immünfloresan boyama ile protein lokalizasyonunu araştırmışlardır. *Wnt7a* proteininin, hem luminal hem de glandular epitelyal hücrelerde tanımlandığını, ancak *Wnt7a* protein immünreaktivitesinin, östrus döngüsünün ilgili evreleri boyunca değiştiğini gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada ise *Wnt7a* kontrol grubunda östrus ve metaöstrus evresinde luminal epitelde sırasıyla zayıf ve orta derecede ekspresyon gösterirken, stromada bütün evrelerde çok kuvvetli ifade seviyesi gözlenmiştir. Stroma içerisinde yer alan kan damarlarındaki endotel hücrelerinin de çok kuvvetli bir şekilde *Wnt7a* eksprese ettikleri görülmüştür. Çalışmamızın sonuçları ile literatürde bildirilen veriler arasında daha iyi bir karşılaştırmaya olanak sağlamak için, *Wnt7a*'nın ekspresyon modelleri Real-Time PZR kullanılarak doğrulanmıştır. Buna göre, östrus ve metaöstrus evrelerinde *Wnt7a* ekspresyon seviyelerinin diğer evrelere oranla daha fazla olduğu çalışmamızda gözlenmiştir. Diöstrus evresinde ise en düşük ifade seviyesi izlenmiştir. İki farklı metodolojik yaklaşımla onaylama, analizimizin sonuçlarını doğrular niteliktedir. Real-Time PZR sıçan endometriumundaki farklı Wnt aile genlerinin hücre spesifik ekspresyonunu ortaya çıkarmıştır. Burada sunulan veriler sıçan endometriumunda Wnt aile üyelerinin dinamik regülasyonunu ve benzersiz hücrel ekspresyonunu göstermektedir. Hem epitelyal hücrelerde hem de endometriumun stromal hücrelerinde pozitif boyanmanın bu sonuçları, *Wnt7a* ekspresyonunun luminal epitelyal hücrelerle sınırlı olduğu şeklindeki görüşün aksine bir sonucun ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda *Wnt7a*'nın bu lokalizasyonlardaki ekspresyonları *Wnt-3* ile benzerlik göstermektedir. Böylece *Wnt-3* ve *Wnt7a*'nın aynı sinyal yolları üzerinden fonksiyon gördüklerini söyleyebiliriz. Bununla birlikte bulgularımız *Wnt3* ve *Wnt7a*'nın, normal siklus sürecinde endometriumdaki yapısal değişikliklerde kanonikal Wnt aktivitesini kontrol ettiğini düşündürmektedir.

Hücre içi sinyal yollarına baktığımızda, *β-katenin* yolu Wnt sinyali için spesifiktir. Plazma zarında ve sitoplazmada bulunabilen *β-katenin*, Wnt sinyallemesinin anahtar

molekölüdür ve kadherinlerin bağlantı kompleksi proteinleri (zonula adherens) ile birleşmesine izin veren bir hücre-hücre adezyon molekülü olarak önemli bir role sahiptir (Hagen vd., 2004; Gordon ve Nusse, 2006). Ayrıca çekirdeğe transloke olabilen ***β-katenin***, gen ekspresyonunda da görev almaktadır (Hagen vd., 2004; Gordon ve Nusse, 2006). Endometriyumda Wnt-β katenin sinyalizasyonu bir dizi gelişimsel süreçte yer alır. Dahası, Wnt-β katenin sinyallemesi normal menstrual döngünün düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Tulac vd., 2003). Örneğin nükleer ***β-katenin*** boyanma, menstrual döngünün proliferatif fazı sırasında görülür (Nei vd., 1999). Aynı şekilde, Nei ve arkadaşları (1999) ***β-katenin***'in nükleer birikiminin salgılama fazında azaldığını bildirmişlerdir. Jeong ve arkadaşları ise (2008) yaptıkları çalışmada normal uterus fonksiyonu için doğru ***β-katenin*** ekspresyonunun yaşamsal olduğunu göstermiştir. Tulac ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada ***β-katenin***'in, glandular ve stromal hücrelerde eksprese olduğunu bulmuşlardır ve PZR verisi ile tutarlı olarak endometrial siklusun proliferatif ve sekretuar fazları sırasında bol miktarda bulunduğunu ve bu fazlarda endometriyumda eşit miktarda eksprese edildiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda ***β-katenin*** immünreaktivitesinin kontrol grubunda pozitif olduğunu izledik. Özellikle östrus siklusunun metaöstrus evresinde luminal epitel ve bez epiteli hücrelerinin plazma membranlarında çok kuvvetli lokalize olduğu açıkça gözlenmiştir. Bununla birlikte, östrus evresinde de bu bölgelerde kuvvetli pozitif bir reaksiyon bulunmaktadır. Stromal alanlarda yer alan (özellikle bazal stroma bölgesinde) stromal hücrelerde ve kan damarlarının endotel hücrelerinde de kuvvetli pozitif immünreaktivite mevcuttur. Sıçan endometriyumunda ***β-katenin*** mRNA ekspresyonun düzenlenmesi de Real-Time PZR kullanılarak ölçülmüştür. Bu mRNA'ların bütünlüğü ve nispi miktarları, yapısal olarak ifade edilen bir işaretleyici olan *GAPDH* kullanılarak doğrulanmıştır. Buna göre immünfloresan çalışmamızda bazı alanların lokalizasyonlarıyla uyumlu olarak PZR sonuçlarında da metaöstrus evresinin, çok kuvvetli bir ekspresyon sonucuyla, en yüksek ifade seviyesine ulaştığı görülmüştür. Östrus, proöstrus ve diöstrus evreleriyle karşılaştırıldığında sırasıyla bu evrelerden 2.46, 9.57 ve 48.5 kat daha fazla oranda eksprese olduğu hesaplanmıştır. En düşük ifade seviyesi ise diöstrus evresinde izlenmiştir.

Bu çalışmalar ile birlikte, Wnt- β katenin sinyal yolağının endometriyumda mezenşimal-epitelyal etkileşimlere aracılık etmede önemli rol oynadığı söylenebilir. *Wnt3*'ün endometriyum ve endometrial değişikliklerde belirleyici bir rol oynadığı dikkate alınmakla birlikte, bu proteinin erişkin sıçan endometriyumundaki rolünü araştıran çok az çalışmaya rastlanmıştır. Yetişkin endometriyumda epitelde yer alan *Wnt-7a* ekspresyonunun, stroma ve epitel arasındaki hormonal olarak düzenlenen iletişimi etkilediği varsayılmaktadır. Epitelyal hücrelerde *Wnt-7a*'nın özel bir ifadesi varsayımı, *Wnt-7a*'nın bir parakrin etkiye sahip olduğu hipotezine yol açmıştır (Miller ve Sassoon, 1998).

İmplantasyonda Wnt- β Katenin Sinyal Yolağı

İmplantasyon, blastosistin plasenta oluşturmak için endometriuma apozisyonu, adezyonu ve invazyonunu içerdiği dinamik bir süreçtir. Bu süreçte fonksiyonel olarak rol oynayan çok sayıda düzenleyici molekül tespit edilmiştir. Wnt sinyallemesinin embriyogenez, organogenez ve metastazda kritik bir rol oynadığı düşünüldüğünde, Wnt sinyallemesinin implantasyonda da rol oynaması şaşırtıcı değildir. Mohamed ve arkadaşlarının (2005) yapmış olduğu çalışma, Tcf/Lef-LacZ raportör faresini kullanarak Wnt'lerin, implantasyon düzenleyicilerinin kilit bir ailesi olduklarını ilk olarak doğrulayan çalışmadır.

Wnt sinyal yolağı, desidualizasyon ve endometrial bez oluşumu gibi implantasyonla ilgili endometrial değişiklikler için kritik süreçlere dahil edilir. Wnt sinyallemesinin ligandları, reseptörleri ve inhibitörleri dahil olmak üzere endometriyumun döngüsel değişiklikleriyle ilişkili olduğu da önerilmektedir. Embriyo gelişimine dahil olmanın yanı sıra, Wnt sinyallemesinin, embriyo yetkinliği, bağlanma ve trofoblast hücre çoğalması, farklılaşma ve uygun bir invazyon işlemi için göç gibi embriyoları implantasyona hazırlayan süreçler için kritik olduğu da önerilmektedir (Tepekoy vd., 2015).

Genetik çalışmalar, Wnt sinyal yolağının, fare embriyolarında gastrulasyonu kontrol eden moleküler olayların merkezinde olduğunu göstermektedir. *Wnt3*'ün ablasyonu/yoksunluğu, tamamen primitif çizgi ve gastrulasyonun başarısızlığına yol açar (Liu vd., 1999).

Wnt3, erken post-implantasyon fare embriyosunda sırayla ifade edilen bir Wnt sinyalleme molekülüdür. Visseral endoderm, moleküler belirteçlerin ekspresyonu ile ayırt edilebilen birkaç alt populasyona ayrılır (Trichas vd., 2012). Visseral endodermin ikinci bir alt populasyonu, embriyonun arka tarafının üzerindedir. Bu posterior visseral endoderm (PVE) hücreleri, embriyonik 5,5. günden başlayan ve gastrulasyona kadar devam eden *Wnt3*'ü (Liu vd., 1999; Rivera-Perez ve Magnuson, 2005) eksprese eder. Wnt ligandlarının da germ tabakalarının oluşumunda rolleri vardır, çünkü *Wnt3*'ün null mutasyonu fare embriyolarında mezoderm oluşumunda kanonikal Wnt sinyalinin önemini göstermiştir (Kemp vd., 2007).

Kemp ve arkadaşları (2005) yapmış oldukları çalışmada, fare embriyosunda *Wnt3* ve *Wnt7a* dahil olmak üzere birçok Wnt ligandının ekspresyon profillerini araştırmışlardır. Wnt genlerinin ekspresyonlarını analiz etmek için Real-Time PZR ve *in situ* hibridizasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Ekspresyon profiline göre, *Wnt3* ekspresyonu, *in situ* hibridizasyonda gösterildiği gibi gastrulasyonda en yüksektir (Liu vd., 1999). *Wnt7a*'nın erken embriyonik gelişim boyunca ifade edilmediği sonucuna ulaşmışlardır. Bizim çalışmamızda artan belirli gebelik günlerine bağlı olarak Real-Time PZR ile yapmış olduğumuz analizlerin sonucunda *Wnt3*'ün ilerleyen gebelik günleri boyunca artış gösterdiği, özellikle 8,5. günden 9,5. güne doğru ekspresyon ifadesinin çok yüksek bir seviyeye çıktığı gözlenmiştir. İmmünfloresan çalışmalarında yapmış olduğumuz analizlere göre, çalışmış olduğumuz gebeliğin bütün günlerinde *Wnt3*'ün primer desidual bölgeden anti-mezometrial bazal bölgeye doğru gidildikçe artış gösterdiği, embriyo bölgesinde özellikle dev trofoblast hücreleri (GTC) ve ektoplasental koni hücrelerinde (EPC) yüksek bir immünreaktiviteye sahip olduğu, mezometrial bölgede yer alan mezometrial stroma ve farklılaşmamış stromal hücrelerin sitoplazmaları ile birlikte bu bölgede yer alan kan damarlarının endotelinde de aynı derecede yüksek bir ifade seviyesi gösterdiği belirlenmiştir. Literatür araştırmasına göre bu çalışmalar, farede primer aks oluşumunda *Wnt3* gereksinimi için genetik kanıtlar sağlamış olsa da, bizim çalışmamızın sonuçlarına göre *Wnt3*'ün sadece gastrulasyon döneminde ifade edilmediği, implantasyon ve desidualizasyon dönemlerinde de oldukça aktif bir rol üstlendiği söylenebilir.

Wnt7a'nın endometriumun embriyonik gelişimindeki rolü iyi bir şekilde belgelenmiş olmasına rağmen, yalnızca yetişkin endometriumundaki işlevi ile ilgili spekülasyon öneriler mevcuttur (Miller ve Sassoon, 1998; Parr ve McMahon, 1998; Tulac vd., 2003). Faredeki bir *Wnt7a* knock-out deneyine göre, stromada *Wnt7a* yokluğu desidualizasyon sırasında up-regüle edilen Hoxa-10 ve Hoxa-11 kaybına yol açar (Miller ve Sassoon, 1998). Bu durum, *Wnt7a*'nın implantasyon ve desidualizasyonda bir işlevi olduğu hipotezine yol açmıştır. Embriyonik gelişim sırasında, *Wnt7a*'nın ekspresyonu, endometrial bezlerin yeterli gelişiminde yer alan belirleyici adımlardan biridir (Parr ve McMahon, 1998; Miller ve Sassoon, 1998). Ek olarak, *Wnt7a* ekspresyonu miyometriumun normal gelişimi ve endometriumda *Wnt5a* ve *Hoxa* ekspresyonunun sürdürülmesi için bir ön şarttır (Miller ve Sassoon, 1998). Dahası, epitelyal hücrelerde eksprese edilen *Wnt7a* ve stromada eksprese edilen *Wnt5a* arasındaki etkileşim, gelişim ve doğru farklılaşma için çok önemlidir (Mericskay vd., 2004). Embriyonik gelişim sırasında hem fare hem de koyun endometriumunda östrojen maruziyetinin, *Wnt7a* ekspresyonunun aşağı-regülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Miller vd., 1998). Bununla birlikte, insan endometriumunda, *Wnt7a*'nın hormonal düzenlemesinin şimdiye kadar sadece *in vitro* olarak gösterildiği belirtilmektedir (Wagner ve Lehmann, 2006). Nayeem ve arkadaşları (2015), yaptıkları çalışmada *Wnt7a*'dan yoksun mutant farelerin fertilité kusurlarına sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Hayashi ve arkadaşları da (2009), farklı Wnt sinyal bileşenleri arasında *Wnt7a* ile birlikte *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7b*, *Wnt11* ve *Wnt16* ligandlarının implantasyon öncesi ve sonrası fare uterusunda eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Bu genlerin stromal hücre farklılaşmasında da eksprese olduğunu söylemişlerdir. Bu genlerin çoğunun ekspresyonunun ise, reseptif endometrium zamanında (fertilizasyondan 5 gün sonra) en yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Belirtilen genler arasında *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt11* ve *Wnt16*'nın ekspresyonlarının implantasyon olmayan bölgelere kıyasla implantasyon alanlarında arttığı; stromal hücre farklılaşması üzerine ise bu genlerin ekspresyonlarının azaldığı sonucuna ulaşmışlardır. Mohamed ve arkadaşları (2004, 2005) yaptıkları çalışmalarda, *Wnt7a* proteininin aktif blastosist tarafından eksprese edilen bir Wnt ligandı olduğunu ve bu proteinin intrauterin olarak verilmesinin uterin Wnt- β katenin sinyalizasyonunu indükleyebildiğini söylemişlerdir. Bu sonuçlar *Wnt7a*'nın Wnt- β katenin sinyal yolağı aracılığıyla desidualizasyon sürecinin başlatılmasını düzenlemek

için embriyo-uterus preparasyonunu başarılı implantasyona doğru koordine etmede kritik bir rol oynadığı fikrini desteklemektedir. Ek olarak, Hayashi ve arkadaşlarının (2007) yaptığı bir diğer çalışmada ise *Wnt7a*'nın peri-implantasyon dönemi boyunca koyun uterin luminal epitelyumunda geçici olarak eksprese olduğu ve trofoblast hücrelerinde farklı Wnt aktivitelerine yol açabileceği bildirilmiştir.

Mevcut çalışmada, *Wnt7a*'nın sıçan endometriumunda belirli gebelik günlerinde immüno lokalizasyonları araştırılmış ve bu süreçte desidualizasyon alanlarındaki ekspresyonları gösterilmiştir. Ayrıca Real-Time PZR yöntemiyle bu proteininin ekspresyon analizi ölçülmüştür. Çalışmamızda *Wnt7a*'nın gebeliğin farklı günlerindeki implantasyon bölgesinde yer alan embriyo bölgesinde, primer ve sekonder desidual bölgelerde (PDZ ve SDZ), gebeliğin ilerleyen günlerine bağlı olarak PDZ'den anti-mezometrial bazal bölgeye doğru giderek artan lokalizasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca kan damarlarının endotelinde ve mezometrial bazal bölgede yer alan ekstraselüler matriks alanları ve farklılaşmamış stromal hücrelerin sitoplazmalarında güçlü ekspresyonları gösterilmiştir. Real-Time PZR ile yapılan ölçümlerde ise *Wnt7a* mRNA'sının gebeliğin 8,5 ve 9,5. günlerinde eksprese olduğunu göstermiştir.

Wnt3 ve *Wnt7a* ekspresyonlarının sıçan uterusunda gebeliğin belirli günlerindeki implantasyon alanlarında yüksek olduğunun görülmesi üzerine bu faktörlerin özellikle implantasyon öncesi ve sırasında önemli rol oynayabileceği fikrini güçlendirmektedir.

β -katenin proteini (*CTNNB1*) çok fonksiyonlu bir hücre içi proteindir. *β -katenin* 'in iyi bilinen rollerinden birisi, çekirdeğe girmek ve artan sayıda hedef genin ekspresyonunun ortak transkripsiyonel modülatörü olarak görev yapmaktır. *β -katenin* desidualizasyon sırasında endometriumda hücre adezyonunda önemli bir rol oynar (Herington vd., 2007). Farelerde, uterusun mezenşimal kompartmanında *β -katenin*'in koşullu olarak silinmesi, desidualizasyon ve infertilitenin tam bir başarısızlığı ile sonuçlanır, bu da, endometrial stromal *β -katenin*'in steroidle çalıştırılan mezenşimal-epitelyal çapraz-etkileşimi ve desidualizasyon için gerekli olduğunu gösterir (Zhang vd., 2012). Bu nedenle, Wnt- β katenin sinyalinin uygun ve zamanında düzenlenmesi normal desidualizasyon için bir gerekliliktir.

Herington ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada desidualizasyon sırasında fare uterusunda ***β-katenin***'in değişen lokalizasyon ve seviyelerini göstermişlerdir. Buna göre, gebeliğin 3,5. gününde, implantasyonun başlangıcından hemen önce, total ve aktif ***β-katenin***'in, neredeyse sadece endometriyumun glandular ve luminal epitelinde lokalize olduğunu bulmuşlardır. İmplantasyonun başlangıcından hemen sonraki zaman olan gebeliğin 4,5. gününde, implantasyon olan ve olmayan bölgelerde total ve aktif ***β-katenin*** için yüksek seviyede boyanma, glandular ve luminal epitelde görüldüğü sonucuna ulaşmalarına neden olmuştur. Sadece implantasyon bölgesindeki bölümlerde, blastosist fazındaki embriyonun implantasyona başlayacağı uterus lümeninin anti-mezometrial bölgesi çevresinde PDZ boyunca her iki protein için de yüksek bir lokalizasyon seviyesinin olduğu, total ve aktif ***β-katenin***'in PDZ dışında özellikle lümenin mezometrial bölümü çevresinde luminal epitele bitişik endometrial stromadaki bazı hücrelerde lokalize olduğunu ifade etmişlerdir. Gebeliğin 5,5. gününden 7,5. gününe kadar alınan kesitlerde de total ve aktif ***β-katenin***'in glandular ve luminal epiteliumla aynı lokalizasyonu gösterdiği ve ayrıca, gebeliğin 4,5. günü ile karşılaştırıldığında, anti-mezometrial desiduanın daha geniş bir bölgesinde ve mezometrial desidua da yer alan luminal epitelin bitişikindeki hücrelerde de lokalize olduğunu belirlemişlerdir. Gebeliğin 6,5. ve 7,5. günlerindeki implantasyon bölgeleri için ise, total ve aktif ***β-katenin***'in glandular ve luminal epitel, embriyo, anti-mezometrial desidua ve mezometrial desidua kısımlarında lokalize edildiğini göstermişlerdir (Herington vd., 2007). Benzer şekilde Paria ve arkadaşları da (1999) yaptıkları çalışmada gebeliğin 6,5. ve 7,5. günlerinde desidualizasyonun ilerlemesi sırasında, ***β-katenin*** ekspresyonunun, sekonder desidual bölgede, anti-mezometrial bölgedeki subepitelyal stromada ve ayrıca epitelyal hücrelerde bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada ***β-katenin*** immünreaktivitesinin gebeliğin 7,5., 8,5. ve 9,5. günlerindeki implantasyon olan ve olmayan bölgelerde pozitif olduğunu izledik. Gebeliğin belirli günlerinde embriyo bölgesinde, primer desidual bölge, sekonder desidual bölge ve anti-mezometrial bazal bölgede progresif bir artış izledik. Gebeliğin özellikle 8,5. ve 9,5. günlerinde primer ve sekonder desidual bölgenin yanı sıra anti-mezometrial bazal bölgenin bazı kısımlarında yer alan desidual hücrelerin hücre membranlarında çok kuvvetli lokalizasyon gözledik. Mezometrial bölgede yer alan kan damarlarının

endotelinde ve mezometrial bazal stroma ile içerisinde yer alan farklılaşmamış stromal hücrelerinde aynı kuvvette lokalizasyonu takip etmiştir. Herington ve arkadaşları da (2007) gebe uterusunda desidualizasyona uğrayan endometrial stromal hücrelerde aktif ***β-katenin*** immünolokalizasyonunu gözlemlemişlerdir. Böylece sonuçlarımız ***β-katenin*** lokalizasyonunu ve işlevinin desidualizasyona uğrayan sıçan uterusu alanlarında dramatik olarak değiştiğini göstermektedir. Yapılmış olan çalışmalarla benzerlik gösteren çalışmamızın sonuçları, implantasyon sırasında endometriumdaki ***β-katenin***'in kilit rollerinden birinin hücre iskeleti arasındaki bağlantının bir parçası olabileceği fikrine destek sağlayabileceğini öngörmektedir.

Sıçan embriyolarında visseral endodermin distal hücreleri (dVE), embriyonik 5,5. günde şekil değiştirir ve proksimal bölgeye doğru göç eder ve anterior-posterior aks tanımlanır. Gastrulasyon, mezoderm ve primitif çizgi oluşumu ile birlikte 6,5. günde başlar. ***β-katenin*** bulunmayan embriyolarda dVE hücreleri oluşur, fakat bu hücreler proksimal bölgeye doğru hareket edemez. Sonuç olarak embriyo, anterior-posterior aks oluşumunu gerçekleştiremez. Bu durumda ***β-katenin***'in dVE hücrelerinin moleküler düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmektedir. Dahası, hem dVE hem de mezoderm oluşumu epiblastta spesifik olarak ***β-katenin*** ekspresyonuna bağlıdır (Caroline vd., 2007). Diğer taraftan dVE hücreleri proksimale doğru göç ederken, ***Wnt3*** posterior visseral endoderimde eksprese edilir (Rivera-Perez ve Magnuson, 2005). ***Wnt3*** proteininin ifadesi daha sonra primitif çizginin oluşacağı epiblast bölgesini içerecek şekilde genişler. ***Wnt3*** geninin etkisizleştirilmesi de, mezoderm üretemeyen embriyolar ile sonuçlanır. Bu durum ***Wnt3***'ün mezoderm formasyonu için ***β-katenin***'i aktive eden bir sinyal molekülü olduğunu gösterir (Caroline vd., 2007).

Embriyo implantasyonu birçok sinyal yolunu içeren karmaşık bir süreçtir (Hayashi vd., 2009; Mohamed vd., 2005). Embriyogenez sırasında uterus gelişimi ve bez oluşumundaki rollerine ek olarak (Miller ve Sassoon, 1998), ***Wnt7a*** ve ***β-katenin*** endometrial reseptivite ve normal implantasyon için önemlidir (Nayeem vd., 2014). Mohamed ve arkadaşları (2005), implantasyon için uterin Wnt-β katenin sinyal yolağının gerekli olduğunu belirlemiştir. Gottardi ve Gumbiner de (2004a) aktif ***β-katenin***'in, hücre adezyon bağlantılarına da katılabildiğini belirtmişlerdir. Chen ve arkadaşları da (2009) yaptıkları çalışmada, ***β-katenin***'in hücre farklılaşması üzerine

olan etkilerini incelemek amacıyla oluşturulan bir *in vitro* desidualizasyon modeline baktıklarında, Wnt sinyal yoluna ait Wnt proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde, desidual değişimle birlikte izlenen bir artış bildirmişlerdir.

Kiewisz ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları Real-Time PZR sonuçlarının analizinde, Wnt4 ve ***β-katenin*** gen ifadesinin, siklik ve gebe domuzların endometriumunda sabit seviyede tutulduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise ilerleyen gebelik günlerine bağlı olarak ***β-katenin*** mRNA'sı gittikçe artan bir ekspresyon seviyesi göstermiştir. Real-Time PZR çalışmamızın sonuçlarına göre özellikle 8,5. günden 9,5. güne doğru çok yüksek gen ekspresyonu şeklinde bir artış mevcuttur.

Yukarıda belirtilen çalışmalar Wnt- β katenin bileşenlerinin ifade modellerinde türlere özgü varyasyonları ortaya çıkarmaktadır. Bununla birlikte, kesin olarak düzenlenmiş bir Wnt sinyal yolağı, endometrial reseptivite ve normal implantasyon için gereklidir (Chen vd., 2009). Desidualizasyonun ilerlemesi sırasında sıçan uterusunda ***β-katenin***'in rolünü ve düzenlenişini açıkça belirlemek için daha fazla çalışma gereklidir.

Özet olarak, uterus reseptivitesinin, desidualizasyonun ve implantasyonun düzenlenmesi, proliferasyonun, farklılaşmanın, hücre göçünün ve invazyonun dengesini muhafaza etmek için kanonikal yolların hassas regülasyonunun yanı sıra çok sayıda endojen Wnt'ler, reseptörler ve ilişkili faktörleri içerdiği görülmektedir. Wnt proteinlerinin peri-implantasyon olaylarındaki rollerinin aydınlatılmasındaki son gelişmelere rağmen, özellikle *in vivo* hayvan modelleri bağlamında kanonikal Wnt sinyalizasyonu ve diğer implantasyonla ilişkili moleküller arasındaki hiyerarşik ilişki ilgi çekicidir ve daha fazla araştırmayı gerektirir. Wnt sinyallemesinin, özellikle implantasyon öncesi embriyo gelişiminde Wnt- β katenin yolunun, implantasyon, uterus gelişimi ve desidualizasyon için blastosist aktivasyonunun daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlar (Zhang ve Yan, 2016).

Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP), menstrual siklus döneminde insan endometriumunda, özellikle de menstruasyon sırasında önemli ekstraselüler matriks (ECM) yıkımını oluşturmak için eksprese edilir. Döngüsel endometrial doku yıkımı, insan endometriumunun eşsiz bir özelliğidir. Bazı bileşenlerin gelişimi ve çeşitli

sinyalizasyon aktiviteleri gibi kritik süreçleri yürütmek için zaman zaman dejenerasyona uğrayan ECM'lerin bozunmasından sorumlu olan MMP'ler, transkripsiyonel seviyeden aktivasyonlarına ve diğer ECM bileşenleriyle iletişimin spesifik moleküller tarafından inhibisyonuna kadar değişen farklı aşamalarda düzenlenirler. Bu çalışma Wnt- β katenin sinyal yolağının peri-implantasyon döneminde uterus *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* ekspresyonu ve aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yapılmıştır.

Östrus siklusunda Matriks Metalloproteinazlar

Yapısal olarak endometrium, zengin bir vasküler kaynağa sahip olan destekleyici bir stroma ile birlikte glandular ve yüzey epitelinden oluşur. Ovaryan steroid üretimi, gebeliğe hazırlıkta endometrial büyüme ve fonksiyonel farklılaşmanın türe bağlı bir modelini yönlendirir. İnsanlarda, menstrual döngü, üreme ömrü boyunca yaklaşık 400 kez tekrarlanabilir (Speroff vd., 1999). Genel olarak, birçok alt memeli türünün primatlara kıyasla sergilediği östrus döngüsü sırasında çok daha az doku yeniden biçimlenmesi meydana gelir. Bu nedenle kemirgenlerin uterusunda, menstrual siklusun ayırt edici özelliği olan doku kaybı ve yeniden-olgunlaşma süreçlerinde daha sağlam MMP ifadesine kıyasla, MMP'lerin sadece orta düzeyde ifadesi gözlenmiştir (Curry ve Osteen, 2003). Bununla birlikte, kemirgenlerdeki östrus siklusunda *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-11*'in östrus ve proöstrus sırasında en bol miktarda ifade edildiği, oysaki *MMP-3* ve *MMP-10*'un çok daha az oranda ifade edildiği görülen MMP mRNA ekspresyonunun döngüsel değişiklikleri bildirilmiştir (Rudolph-Owens vd., 1997).

İmmünohistokimyasal çalışmalar, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7* ve *MMP-9* dahil olmak üzere birçok MMP proteininin menstruasyon sırasında endometrial endotelial hücrelere lokalize olduğunu göstermektedir (Freitas vd., 1999). Nuttall ve Kennedy (1999) yaptıkları çalışmada, *MMP-3*, *MMP-9* ve *MMP-13* ekspresyonlarını, gebe olmayan sıçan endometriumundan izole edilen stromal hücrelerde göstermişlerdir. Rudolph-Owens ve arkadaşları da (1998) *MMP-7* mRNA'sının ekspresyonunu, menstruasyon sırasında epitelyal hücrelerde, erken onarım olaylarında ve östradiollere yanıt olarak endometriumun bazalis bölgesinden uzayan ve büyüyen glandular yapıların arasında tanımlamışlardır. *MMP-7* ve *MMP-9* mRNA'larının her ikisinin de endometrial epitele lokalize olduğu belirtilmesine rağmen, yapılan diğer çalışmalarda, sadece epitelyal

hücreler tarafından üretilen **MMP-7** ekspresyonunun aksine, **MMP-9** ekspresyonunun stromal, immün ve vasküler hücreler arasında da ortaya çıktığını belirlemişlerdir (Freitas vd., 1999; Rodriguez-Manzaneque vd., 2000). Yaptığımız çalışmada, yukarıda gösterilen örnek çalışmalardaki sonuçlara ek olarak östrus siklusunda **MMP-7**'nin özellikle östrus evresinde luminal ve glandular epitelde çok kuvvetli pozitif immünreaktivite gösterdiği, ayrıca buna ek olarak kan damarlarının endoteli ve stromal hücrelerin sitoplazmasında da **MMP-7** ekspresyonları görülmektedir. **MMP-9** proteininin ise bizim çalışmamızda luminal ve glandular epitel hücrelerinin aksine, östrus siklusundaki bütün evrelerde özellikle endometrial stroma bölgesinde ve kan damarlarının endotel bölgesindeki yassı hücrelerde kuvvetli pozitif ekspresyon seviyesi göstermiştir. Başka bir çalışmada ise *in situ* hibridizasyon analizleri sonucunda endometrial epitelyal ve immün hücreler tarafından oldukça sınırlı bir MMP ekspresyonunun aksine, stromal hücrelerin insan döngüsünün proliferatif ve menstrual fazları sırasında **MMP-2**, **MMP-9** ve **MMP-7** dahil olmak üzere çok sayıda MMP mRNA'sını eksprese ettiğini ortaya koymaktadır (Freitas vd., 1999; Rodriguez-Manzaneque vd., 2000; Maatta vd., 2000). Real-Time PZR analizlerimizin sonucuna bakacak olursak, **MMP-7** mRNA'sının özellikle östrus evresi başta olarak üzere proöstrus ve metaöstrus evrelerinde de çok kuvvetli sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Diöstrus evresinde ise ekspresyon seviyesinin progesteron aktivitesinin artışına bağlı olduğu düşünülerek azaldığı belirlenmiştir. **MMP-9** mRNA'sının ise en yüksek seviyeye metaöstrus evresinde ulaştığı görülmüştür. Diğer evrelerde **MMP-9** mRNA'sının birbirine yakın seviyelerde olmakla birlikte az ekspresyon seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir.

Çoğu MMP, insan endometriyumunda eksprese edilir (Goffin vd., 2003; Vassilev vd., 2005). Fonksiyonları proliferatif ve sekretuar fazlar sırasında ince doku yeniden modellemesinden ve özellikle blastosist implantasyonunda menstruasyon sırasında çok miktarda bulunan ECM yıkımına kadar uzanır. Goffin ve arkadaşlarının (2003) çalışmalarında, **MMP-9** mRNA seviyesinin menstrual fazda stromal hücrelerde arttığı, ancak proteinin stromal, epitelyal ve enflamatuar hücrelerde döngü boyunca bulunduğu sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca **MMP-7** mRNA seviyesinin, menstruasyonda kuvvetli bir şekilde arttığı ve daha sonra proliferatif faz sırasında yükselmeye devam ettiğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte, **MMP-7**'nin epitelyal hücrelerde ağırlıklı olarak

lokalize olmakla birlikte, geç sekretuar fazda ve mensturasyondaki stromal odaklarda desidualize hücrelerde de bulunduğu belirtilmiştir. Bu MMP'lerin aksine, *MMP-2* mRNA seviyesinin de, menstrual döngü boyunca oldukça önemli olduğu ve mensturasyonda hafif bir artış gösterdiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada ise *MMP-2* mRNA ifadesinin Real-Time PZR ile belirlenen ölçümlerinde bütün siklus dönemleri boyunca birbirine yakın ekspresyon seviyelerini gzlememizin yanı sıra östrojen hormonundan kaynaklı olduğunu düşündüğümüz östrus ve metaöstrus evrelerinde, çok kuvvetli ifade seviyelerine sahip olarak, en yüksek düzeye ulaştığı, diöstrus evresinde ise progesteron hormonunun artışından kaynaklı olarak en düşük seviyeye gerilediği belirlenmiştir. İmmünfloresan sonuçlarına baktığımız zaman da *MMP-2*'nin ağırlıklı olarak stroma bölgesindeki matriks kısmında, stromal hücrelerde ve kan damarlarının endotel kısmında eksprese edildiği tespit edilmiştir. Endometrial MMP gen regülasyonunun over steroidlerine yanıt olarak, endometriumda MMP ekspresyonunu etkileyebilen çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin ifade edildiğini de belirtmek gerekir. Steroidler ve lokal dokuya özgü faktörlerin aracılık ettiği karmaşık mekanizmalar, belirli MMP'lerin seçici ekspresyonunu teşvik ederken diğerlerinin ekspresyonunu ya da eylemlerini sınırlamak için birlikte hareket eder (Hulboy vd., 1997). Slayden ve Brenner da (2006) progesteronun MMP-indükleyici faktörlerin (sitokinler gibi) ekspresyonunu önleyerek *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-8* ve *MMP-10* gibi MMP'lerin transkripsiyonunu baskılayarak ve kültürlenmiş hücrelerde *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonlarını orta derecede inhibe ederek sekretuar fazda kompleks bir rol oynadığını ifade etmişlerdir.

Tang ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada, östrus döngüsü ve implantasyon sırasında fare endometriumundaki doku yeniden modelleme olaylarını karakterize etmişlerdir. İlk olarak Real-Time PZR ile belirlenen ölçümlerde *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-12* ve *MMP-14* ekspresyonlarını doğruladıklarını ve *MMP-2* mRNA ifadesinin diöstrus evresinde en yüksek seviyeye ulaştığını, *MMP-7* mRNA'sının ise metaöstrus evresinde pik yaptığını belirlemişlerdir. Bizim alışmamızda ise, *MMP-7*'nin östrus evresinde çok yüksek bir ekspresyon seviyesiyle zirveye ulaştığı, *MMP-2*'nin ise metaöstrus seviyesinde yine yüksek bir ekspresyon seviyesiyle en yüksek düzeye ulaştığı, diöstrus evresinde ise en düşük seviyeye gerilediği bulunmuştur. *MMP-7* ekspresyonundaki belirgin artışın, mensturasyon sırasında insan endometriumunda

ECM lizisinin önde gelen nedeni olarak düşünülmektedir (Goffin vd., 2003). Diğer taraftan, fare endometrial dokuları, insan endometriumundaki gibi menstrual doku bozulmasına ve kanamaya yol açan aşırı ECM yeniden modellemesine uğramaz. Feng ve arkadaşları da (1998) *MMP-7* mRNA'sı ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, çalışmamızdaki verilerle uyumlu olarak, *MMP-7*'nin uterus dokusu konsantrasyonunda siklusun proöstrus ve östrus evreleri sırasında en yüksek seviyede olduğunu tespit etmişler ve bu değerlerin metaöstrus ve diöstrus değerlerinden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

İmplantasyonda Matriks Metalloproteinazlar

Memeli embriyo implantasyonu, trofoblastın maternal endometriumu işgal ederek maternal kan ile temas kurduğu ve hamileliğin oluşumu için kritik önem taşıyan oldukça iyi düzenlenmiş bir süreçtir. Kemirgen çalışmalarında erken gebelik, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-9* (Rechtman vd., 1999; Waterhouse vd., 1993) dahil olmak üzere, çoklu MMP'ler için mRNA ve pozitif immünreaktivite ifadesi ile ilişkilidir.

Bu hayvan çalışmaları büyük ölçüde *MMP-2* ve *MMP-9*'un, hamilelik sırasında fetal hücrelerin invazyonu ile ifade edilen en önemli MMP'leri temsil ettiği konusunda fikir birliğine varmıştır, ancak bu MMP'lerin ekspresyon paternindeki bazı farklılıklar farklı çalışma grupları tarafından rapor edilmiştir. Örneğin, bir başlangıç raporunda, gebe fare uterusunun Northern blot analizi, *MMP-2* mRNA ekspresyonunun 3 ilâ 5. günler arasında yüksek olduğunu gösterirken, *MMP-9* mRNA ekspresyonunun daha sonra ortaya çıktığı gösterilmiştir (Das vd., 1997). Rechtman ve arkadaşlarının (1999) *MMP-2* mRNA düzeylerinin sıçanlarda gebeliğin 3. gününde tepe noktasına ulaştığını, *MMP-9*'un ise sadece 9. günde tespit edildiğini ve ayrıca gebeliğin 7 ve 9. günlerinde, gebe olmayan uterus ve gebeliğin 3. ve 5. günleri ile karşılaştırıldığında implantasyon bölgelerinde total *MMP-7*'de belirgin bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Bell'e göre (1985) epitelin çoğunun dejenerasyona uğradığı 7 ve 9. günlerde implantasyon bölgelerindeki *MMP-7*'nin artması, ek bir hücrel kaynak olabileceğini ve muhtemelen mezenşimal hücrelerden bir epitelyal fenotipe geçişi temsil eden desidual hücrelerin olabileceğini gösterir.

Bany ve arkadaşları (2000) implantasyon ve desidualizasyon esnasında fare uterusunda *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonlarını immunohistokimyasal olarak belirlemişler ve

gebeliğin 4-8. günleri arasında **MMP-2** ekspresyonunun, endometrium stromasında ve implantasyon alanlarında pozitif olduğunu, desidualizasyon alanlarında ise negatif ya da düşük seviyede pozitif olduğunu gözlemişlerdir. Bir başka çalışmada bu MMP'lerin 6 ilâ 8. günler arasında daha yaygın bir şekilde ifade edildiği bildirilmiştir (Hurst ve Palmay, 1999). İmmünohistokimya çalışmaları ayrıca **MMP-9**'un 7. ve 8. günlerde primer desidual dokuda (Hurst and Palmay, 1999) güçlü bir şekilde lokalize olduğunu dolayısıyla bu MMP'lerin desidualizasyonda ve trofoblastik invazyonda rol oynayabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda kullandığımız **MMP-2**, **MMP-7** ve **MMP-9** proteinlerinin artan gebelik günlerine bağlı olarak embriyo bölgesinde artan bir immünreaktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 8,5 ve 9,5. gebelik günlerinde embriyo bölgesinde yer alan dev trofoblast hücreleri, ektoplasental koni ve trilaminar disk bölgelerinde çok kuvvetli **MMP-2**, **MMP-7** ve **MMP-9** immüno lokalizasyonları belirlenmiştir. Kullandığımız metalloproteinaz proteinlerinin çoğunlukla embriyo bölgesini çevreleyen PDZ bölgesinde anti-mezometrial bölgede yer alan diğer alanlardan daha yüksek lokalizasyona sahip olduğu görülmektedir. Fakat **MMP-7** proteininin özellikle 8,5 ve 9,5. gebelik günlerinde SDZ ve anti-mezometrial bazal bölgelerin, PDZ'ye oranla çok daha yüksek immüno lokalizasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bölgelerde yer alan desidual hücrelerin sitoplazmasında oldukça yoğun **MMP-7** boyanması mevcuttur. Mezometrial bölgedeki alanlarda kullandığımız matriks metalloproteinaz proteinlerinin lokalizasyonlarına baktığımız zaman, bütün proteinlerin mezometrial bazal zonda yer alan farklılaşmamış stromal hücreler, kan damarlarının endotel bölgeleri ve ekstraselüler matrikste kuvvetli ve/veya çok kuvvetli immüno lokalizasyonlar gösterdiği belirlenmiştir. **MMP-7** proteininin ise luminal epitel çevresinde ve mezometrial bazal bölgede yer alan farklılaşmamış stromal hücrelerin özellikle sitoplazmasında çok kuvvetli yoğun boyanma göstermiştir. Kanonikal yolakta görev alan ***β-katenin*** proteininin ise gebeliğin 8,5 ve 9,5. günlerde anti-mezometrial bölgede yer alan PDZ, SDZ ve bazal bölgelerdeki desidual hücrelerin hücre membranlarında çok kuvvetli yoğun boyanma gösterdiği tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, *in vitro* desidualizasyona uğramış rat endometrial stromal hücreler **MMP-2** ve **MMP-9** salgırlar (Nuttall ve Kennedy 1999). Bu sonuçlar, desidualizasyon sırasında MMP'lerin işlevlerinin mRNA ifadesiyle değil, MMP'lerin aktivasyonu

düzenlendiğini ve rat endometrial stromal hücrelerin desidualizasyon sırasında MMP'leri aktive edebilecek bazı faktör veya faktörleri ürettiğini göstermektedir.

Zhao ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada, sıçan uterusundaki **MMP-2** ve **MMP-9** aktivitelerini gebeliğin 1. ilâ 7. günlerinde incelemişler ve implantasyon alanı ile inter-implantasyon alanı arasındaki **MMP-2** aktivitesini karşılaştırmışlardır. Aynı zamanda, *in situ* hibridizasyon kullanılarak erken gebelikte (gebeliğin 1-7. günü) **MMP-2**, **MMP-9** ve bunların inhibitörleri olan TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 için mRNA'ların ekspresyonunu da incelemişlerdir. Gebeliğin 1-4. günlerinde, bazal stromal hücrelerde **MMP-2** mRNA için çok güçlü sinyaller saptandığını, fakat sinyallerin 5. günde belirgin şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu **MMP-2** mRNA'sı için zayıf sinyaller de, 1-5. günler arasında epitel hücrelerinde de gözlemlendiğini belirtmişlerdir. **MMP-9** mRNA'sının, sadece uterus epitelyal hücrelerinde ve 1. günde miyometriyumda lokalize olduğunu, bununla birlikte 2. ve 3. günlerde stromal hücrelerde bazı sinyaller gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır. İmplantasyonun ilerlemesi ile birlikte, 6. günde implantasyon bölgesinde implante embriyoyu çevreleyen primer desidual bölgede ve 7. günde implantasyon sahasındaki tüm desidualize stromal hücrelerde (primer ve sekonder desidual bölgeler) her iki **MMP-2** ve **MMP-9** mRNA'sının belirgin bir şekilde saptandığını belirtmişlerdir. **MMP-2** mRNA'larının seviyelerinin, gebeliğin 1-7. günlerinde **MMP-9**'unkinden daha yüksek olduğunu da belirlemişlerdir. Bu sonuçlarla, **MMP-2** ve **MMP-9**'un sıçan embriyo implantasyonunda etkin olabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Mevcut çalışmada peri-implantasyon döneminde sıçan endometriyumunda üç MMP incelendi. Buna göre belirlenen gebelik günlerindeki Real-Time PZR analizlerimizin sonucuna göre her üç MMP'nin de sıçan endometriyumunda gittikçe artan düzeylerde eksprese edildiği gözlemlendi. **MMP-2** ve **MMP-7**'nin artan gebelik günlerine bağlı olarak endometriyumda **MMP-9**'a oranla daha yüksek seviyelerde ifade edildiği belirlenmiştir. Buna göre **MMP-2** ve **MMP-7** proteinlerinin özellikle gebeliğin 9,5. gününde çok yüksek ifade düzeyine ulaştığı sonucuna ulaşılmıştır. Kemirgenlerde **MMP-2**, **MMP-7** ve **MMP-9** ekspresyonunun zamanlamasındaki bazı değişikliklere rağmen, sonuçlar bu MMP'lerin implantasyon için kritik olduğunu göstermektedir.

Kemirgen uterusunda, özellikle implantasyon bölgelerinde **MMP-2**, **MMP-7**, sıçan kollajenazı (**MMP-13**) ve **MMP-3** tespit edilmiştir (Rechtman vd., 1999). Gebe olmayan

endometriumda MMP'lerin varlığı olağandır, çünkü bu doku sürekli olarak yeniden biçimlenmektedir. MMP'ler, insan endometriumunda meydana gelen ve yeniden biçimlenmenin daha belirgin olduğu fakat daha uzun bir süre boyunca meydana geldiği döngüsel değişikliklere katılır (Salamonsen ve Woolley, 1996). Tüm memelilerde implantasyon bölgelerinde aktif yeniden modelleme meydana gelir ve farelerde yapılan çalışmalar, MMP'lerin, implantasyon bölgesinde ve çevresinde doku yeniden şekillenmesinde rol oynadığını göstermiştir (Alexander vd., 1996). Tang ve arkadaşları (2005) ayrıca hamilelik sırasında, MMP'nin ekspresyon seviyesi, 3. günde (*MMP-12*, *MMP-14*), 5. günde (*MMP-7*) veya her iki günde (*MMP-2*, *MMP-3*) implantasyon zamanı boyunca en yüksek düzeyde olduğunu, 9. günde ise bu MMP'lerin ifadesinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Curry ve Osteen (2003) *MMP-3* ve *MMP-7*'yi de içeren MMP'lerin gebelik sırasında fare endometriumunda eksprese edildiğini, bu sonuçlarla tutarlı olarak Das ve arkadaşları da (1997) fare uterusunda, *MMP-2* mRNA'sının subepitelyal stromada 3-5. günlerde yüksek oranda olmak üzere 6. günde sekonder desidual bölgede eksprese edildiğini göstermiştir.

Fare desidularının, *MMP-2* ve *MMP-9*'un aktivitesinin mRNA'sını ifade ettiği ve aktivitesini gösterdiği bildirilmiştir ve *MMP-2*'nin, hamileliğin 7,5. gününde uterusun farklılaşmamış desidual bölgesinde tespit edildiği belirlenmiştir (Alexander vd. 1996). Subepitelyal stromada *MMP-2* mRNA'sının embriyonun bağlanmasından önce ve sonra belirgin ekspresyonu ve 8. gündeki mezometrial kutupta (plasentasyonun olası yeri) lokalizasyonu da bu enzimin plasentasyon sırasında erken desidualizasyon ve neovaskülarizasyona katılabileceğini düşündürmektedir (Clark vd., 1992).

Trofoblast invazyonunun spesifik zamansal özellikleri, MMP'lerin farklı ifadelerine yol açar. Gebeliğin erken aşamalarında, MMP'ler plasenta yatağına sonraki invazyon için ortamı hazırlarlar. 6-8. haftada *MMP-2*'nin yüksek bir ekspresyonu (daha sonra azalan konsantrasyonlarla) *MMP-9* üzerindeki duruma hakim olurken, *MMP-9* ekspresyonunun ise, 8 ilâ 11. haftalar arasında arttığı, hamileliğin sonuna kadar baskın olduğu belirlenmiştir (Staun-Ram vd., 2004), bu da *MMP-2*'nin implantasyon sırasında, *MMP-9*'un ise invazyon sırasında önemli bir rol oynadığı sonucuna yol açmıştır (Sosa vd., 2017). *MMP-2*, *MMP-9* ve inhibitörleri arasındaki denge, trofoblast invazyonunun yeri ve kapsamının belirlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

Trofoblast invazyonunda doğrudan bir role ek olarak, MMP'lerin implantasyon ve plasental gelişimin erken evrelerinde ortaya çıkan endometriumun önemli yeniden biçimlenmesinde merkezi bir rolü olması muhtemeldir. Sıçanlarda, bir blastosistin varlığına yanıt olarak stromal farklılaşma desidual doku oluşumuna yol açar ve fibriler kollajen kaybı ile birlikte olur. İmplantasyon 8. güne ilerledikçe, implantasyon bölgelerindeki total kollajen konsantrasyonunda, implantasyon olmayan bölgeler ile karşılaştırıldığında (Myers vd., 1990), muhtemelen MMP'lerin etkisine bağlı olarak, giderek artan bir azalma vardır. ekstraselüler matriksin tek tek bileşenleri desidual veya desidualize dokuda azalmış veya çok düşük bir ifadeye sahiptir (Nie vd., 1997).

Bu çalışmada, implantasyonun incelenen dönemlerinde sıçan desiduasının oldukça kompleks bir morfolojik yapıya sahip olduğu ve bölgesel farklılıklar içerdiği saptanmıştır. Çalışmamızda implantasyon bölgesinin ardışık günlerde incelenmesi, bölgesel farklılıkların ve desidualizasyona uğrayacak olan stromal hücrelerin morfolojik değişimlerinin daha kolay bir şekilde anlaşılmasına olanak tanımıştır.

Uterusun hücre dışı mimarisinin geniş çaplı yeniden düzenlenmesi, organın genel fizyolojisi açısından kritik öneme sahiptir. Bu yeniden biçimlendirme, kısmen, östrusun veya menstrual döngünün her aşamasıyla ilişkili siklik hormonal işaretler tarafından düzenlenen MMP sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu hormonal sinyaller, yeniden şekillendirilecek matriksin türünü, bölgeye özgü yeri ve matriks bozulmasının derecesini kontrol etmek için bireysel MMP'leri modüle eder (Curry ve Osteen, 2003). MMP'lerin invaziv ve yeniden modelleme süreçleri için önemi göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmanın hedefleri, MMP'lerin kanonikal Wnt- β katenin sinyal yolağı aracılığıyla sıçanlarda erken gebelik sırasında üretilip üretilmediğini belirlemektir. Sonuçlarımız, desidualizasyon ve sonraki implantasyon mekanizmalarının tanımlanması için yararlı bilgiler sağlayabilir. Çalışmalar ayrıca, gebelik döneminde belirli işlevleri yerine getirmek için MMP'lerin zamansal düzenlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

Sonuç olarak Wnt gen sinyalleme mekanizmalarının ilişkilerini ve etkileşimlerini tam olarak bilmemekle birlikte, bu çalışmaların sonuçları, yetişkin sıçan uterusunda çoklu Wnt genlerinin eksprese edildiğini ve implantasyonu düzenlemeye aday olduklarını ve çalışmanın sonuçlarının, implantasyon sırasında her Wnt'nin ve onun sinyal yolunun işlevsel rolünü ortaya çıkarmaya yönelik gelecekteki deneyler için bir temel

sağlayabileceğini söyleyebiliriz. Tüm bu sonuçlar Wnt ailesinin üyelerinden olan ve kanonikal yolağa etki eden *Wnt-3*, *Wnt-7a* ve *β -katenin*'in hem östrus siklusu sırasında hem de implantasyon sürecinde endometriumun yeniden şekillenmesinde rol oynayabileceğini ve sıçan embriyolarının implante olmasıyla birlikte sıçan uterusunda implantasyon bölgelerinde desidualize stromal hücrelerde *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerini ve gen ekspresyonunu indükleyebileceğini göstermektedir. Çalışılmış olan MMP'lerin ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesinde yer alan moleküler sinyalleri tanımlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



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*, *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* proteinlerinin ekspresyonları immünfloresan ve Real-Time PZR teknikleri ile çalışılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- ❖ Peri-implantasyon döneminde sıçan endometriumunda Wnt ailesi üyelerinden *Wnt3* ve *Wnt7a* ile birlikte kanonikal yolda görev alan *β-katenin* proteinlerinin ekspresyonlarının gözlenmesi, bu nedenle kanonikal Wnt-β katenin sinyal yolağının bu süreçte etkili olduğu,
- ❖ Kanonikal Wnt-β katenin sinyal yolağının endometriumun yeniden biçimlendirilmesinde rolü olduğu, dolayısıyla hücre-dışı matriksin bozunmasında önemli bir rol oynayan matriks metalloproteinazları siklus döneminde ve implantasyon sürecinde indükleyebileceği,
- ❖ Başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesinde *Wnt-3*, *Wnt7a*, *β-katenin* ile birlikte *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9*'un önemli rollerinin olduğu,
- ❖ Genel olarak östrus siklusunun diöstrus fazında progesteron artışından kaynaklı olduğunu düşündüğümüz proteinlerin ekspresyon seviyelerinin azaldığı,
- ❖ Gebeliğin ilerleyen belirli günlerinde çoğunlukla bütün proteinlerin ekspresyonlarının artış gösterdiği,
- ❖ Wnt sinyalizasyonun, embriyo yetkinliği, bağlanma ve trofoblast hücre çoğalması, farklılaşma ve göç gibi implantasyon için embriyoyu hazırlama süreçlerinde etkili olduğu bilinerek desidualizasyon olaylarında etkin bir rol oynadığı,
- ❖ *MMP-2*, *MMP-7* ve *MMP-9* ekspresyonlarının birbirinden farklı olduğu,
- ❖ Östrus siklusunda, *Wnt3* ve *Wnt7a*, *MMP-2* ve *MMP-9*'un daha çok endometrial stroma ve kan damarlarının endotelinde eksprese olduğu; *β-katenin*'in ise, luminal ve endometrial bez epitellerinin hücre membranlarında ve hücrelerin komşu olduğu sıkı bağlantı komplekslerinde eksprese olduğu; *MMP-7*'nin ise östrus ve diöstrus evrelerinde daha çok luminal epitel ve bez epitelinde, proöstrus ve metaöstrus evrelerinde ise daha çok stroma ve kan damarlarının endotelinde lokalize olduğu sonucuna varılmıştır.

- ❖ İmplantasyondaki olayların embriyonik ve endometrial proteinlerin gen transkripsiyonundaki değişimleri düzenleyen bir olay dizisinin sonucu olduğu göz önüne alındığında, bu yaklaşımlar ve bilgilerin endometrial reseptivite ve embriyo-endometrium arasındaki karmaşık diyalogu anlayabilmek için bu bölgeye özgü yapılacak olan çalışmalarla daha fazla veri birikimine sahip olunmalıdır.
- ❖ Wnt sinyal yolunun spesifik aktivasyon mekanizmasının bütün resminin anlaşılması, Wnt'lerin, antagonistlerinin veya reseptörlerin moleküler hedefler olarak terapötik kullanımı üzerine yeni bir ışık tutacaktır, çünkü Wnt sinyal yolları gelişim aşamalarında yer almaktadır ve Wnt sinyallerinin yanlış düzenlenmesi, kanserler, enflamatuar hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi yetişkin hastalıklarda rol oynamaktadır.
- ❖ Örtüşen fakat farklı alt tabaka özelliklerine ve hücrelere özgü ifadeler potansiyel olarak benzersiz işlevleri ortaya koymaktadır, ancak bireysel bir MMP'nin potansiyel kaybını telafi etmek için gelişim sırasında çeşitli MMP'ler açıkça ifade edilir. Alternatif olarak, MMP'ler morfogenezde gerekli bir işlev yerine, onarım ve savunmada ve olgun dokularda birincil fonksiyona sahip olabilirler. Daha fazla gelişimsel analiz ve çoklu MMP eksikliğine sahip olan fareler bu sorunun ele alınmasına yardımcı olabilir. Gen-hedefli fareler, araştırmacıların moleküler yolları incelemesinde yardımcı olacak ve translasyonel araştırma yönlerinden bağımsız olarak, transkripsiyon, anjiyogenez, hücre göçü, enflamasyon ve hücre döngüsü kontrolü düzenleyicileri olarak proteolitik ECM (ve ECM olmayan) bölünme ürünlerinin rolünü daha fazla tanımlayacaktır.
- ❖ Bununla birlikte, implantasyonun daha fazla araştırmaya ihtiyacı vardır çünkü çok yönlü ve karmaşık bir süreçtir.
- ❖ MMP'ler için tüm substratların keşfedilmediği açıktır, bu yüzden bu enzimlerin karmaşık biyolojik süreçleri etkileyebileceği birçok yolu anlamaya çalışıyoruz. Pek çok MMP için yetersiz olan farelerin üretimi ve bunların karmaşık genetik modellerinde kullanımı, hangi MMP ailesi üyelerinin terapötik uygulamalar için hedeflendiği hakkında değerli bilgiler sağlayacaktır.

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.
- Achache, H., Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 12:731-746.
- Aghajanova, L., Stavreus-Evers, A., Nikas, Y., Hovatta, O., Landgren, B.M. (2003). Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril*, 79(1):808-814.
- Alexander C.M., Hansell, E.J., Behrendtsen, O., Flannery, M.L., Kishani, N.S., Hawkes, S.P., Werb, Z. (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*, 122:1723-1736.
- Amalinei, C., Caruntu, I.D., Giusca, S.E., Balan, R.A. (2010). Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 51:215-228.
- Aplin, J.D., Fazleabas, A.T., Glasser, S.R., Giudice, L.C. (2008). The Endometrium. Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives. 2 th ed., Informa Healthcare, United Kingdom, Page Count 922.
- Aplin, J.D., Meseguer, M., Simon, C., Ortiz, M.E., Croxatto, H., Jones, C.J. (2001). MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans*, 29:153- 156.
- Apparao, K.B., Murray, M.J., Fritz, M.A., Meyer, W.R., Chambers, A.F., Truong, P.R., Lessey, B.A. (2001). Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:4991-5000.
- Aricescu, A.R., Jones, E.Y. (2007). Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Curr Opin Cell Biol*, 19:543-550.
- Arnaout, M.A., Goodman, S.L., Xiong, J.P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 19:495-507.
- Astudillo, P., Larrain, J. (2014). Wnt signaling and cell-matrix adhesion. *Curr Mol Med*, 14:209-20.
- Bagot, C.N., Kliman, H.J., Taylor, H.S. (2001). Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Dev Dyn*, 222:538-544.
- Bany, B.M., Harvey, M.B., Schultz, G.A. (2000). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. *J Reprod Fertil*, 120:125-134.
- Bell, S.C. (1985). Comparative aspects of decidualization in rodents and humans; cell types, secreted products and associated function. In Implantation of the Human Embryo pp 71-122 Eds RG Edwards, JM Purdy and PC Steptoe. *Academic Press*, London.
- Benirschke, K., Kaufmann, P., Baergen, R.N. (2006). Pathology of the human placenta. In: Fifth Edition ed. New York, NY: Springer, 42-49.
- Bergstein, I., Eisenberg, L.M., Bhalerao, J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Osborne, M.P., Bowcock, A.M., Brown, A.M. (1997). Isolation of two novel WNT genes, WNT14 and WNT15, one of which (WNT15) is closely linked to WNT3 on human chromosome 17q21. *Genomics*, 46:450-458.
- Berndt, S., Perrier d'Hauterive, S., Blacher, S., Péqueux, C., Lorquet, S., Munaut, C., Applanat, M., Hervé, M.A., Lamandé, N., Corvol, P., van den Brûle, F., Frankenne, F., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., Geenen, V., Noël, A., Foidart, J.M. (2006).

- Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J*, 20:2630-2632.
- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M., Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 316:1619-1622
- Bischof, P., Martelli, M., Campana, A., Itoh, Y., Ogata, Y., Nagase, H. (1995). Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Preg Biol Med*, 1:263-269.
- Bonduelle, M.L., Dodd, R., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., Williamson, R., Akhurst, R. (1988). Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from triprounucleate zygotes. *Hum Reprod*, 3:909-914.
- Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15:786-801.
- Borthwick, J.M., Charnock-Jones, D.S., Tom, B.D., Hull, M.L., Teirney, R., Phillips, S.C., Smith, S.K. (2003). Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 9:19-33.
- Bowman, P., McLaren, A. (1970). Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Embryol Exp Morphol*, 24:203-207.
- Brandon, C., Eisenberg, L.M., Eisenberg, C.A. 2000. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood*, 96:4132-4141.
- Brayman, M., Thathiah, A., Carson, D.D. (2004). MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:4.
- Brayman, M.J., Dharmaraj, N., Lagow, E., Carson, D.D. (2007). MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription- γ . *Mol Endocrinol*, 21:2725-2737.
- Bui, T.D., Zhang, L., Rees, M.C., Bicknell, R., Harris, A.L. (1997). Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Br J Cancer*, 75:1131-1136.
- Bulun, S., Adashi, E. (2003). The physiology and pathology of the female reproductive axis. Chapter 16. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Shlomo M, Polonsky KS, eds. Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders Co; 749-811.
- Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K.P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L., Lewis, C.E. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol*, 163:1233-1243.
- Cadigan, K.M., Peifer, M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2):a002881.
- 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.
- Carlos, J.L., Carneiro, J. (2003). Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- 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.
- Caroline, R.K., Hendrickx, M., Willems, E., Wawrzak, D., Metioui, M., Leyns, L. (2007). The roles of Wnt signaling in early mouse development and embryonic stem cells. *Functional Development and Embryology*, 1(1):1-13.

- Carpenter, K.D., Korach, K.S. (2006). Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092:361-373.
- Carson, D.D. (2008). The cytoplasmic tail of MUC1: a very busy place. *Sci Signal*, 1:35.
- Carson, D.D., Bagchi, I., Dey, S.K., Enders, A.C., Fazleabas, A.T., Lessey, B.A., Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Dev Biol*, 223:217-237.
- 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.
- Catania, J.M., Chen, G., Parrish, A.R. (2007). Role of matrix metalloproteinase in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292:905-911.
- Cha, J., Sun, X., Dey, S.K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, 18:1754-1767.
- Champion, H., Innes, B.A., Robson, S.C., Lash, G.E., Bulmer, J.N. (2012). Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 18:391-400.
- Chen, L., Belton Jr, R.J., Nowak, R.A. (2009). Basigin-mediated gene expression changes in mouse uterine stromal cells during implantation. *Endocrinology*, 150:966-76.
- Chen, Q., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Wang, S., Cao, Y., Wang, H., Duan, H. (2009). Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Mol Hum Reprod*, 15:215-221.
- Chien, A.J., Conrad, W.H., Moon, R.T. (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol*, 129:1614-1627.
- Clark, D.E., Hurst, P.R., Myers, D.B., Spears, G.F. (1992). Collagen concentrations in dissected tissue compartments of rat uterus on days 6, 7 and 8 of pregnancy. *J Reprod Fertil*, 94:169-175.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127:469-80.
- Clevers, H., Nusse, R. (2012). Wnt/b-catenin signaling and disease. *Cell*, 149:1192-1205.
- Cooke, P.S., Spencer, T.E., Bartol, F.F., Hayashi, K. (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod*, 19:547-58.
- Cornet, P.B., Galant, C., Eeckhout, Y., Courtoy, P.J., Marbaix, E., Henriët, P. (2005). Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(2):1001-1011.
- Curry, T.E., Osteen, K.G. (2003). Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biology of Reproduction*, 64:1285-1296.
- Çiçek, M.N., Akyürek, C., Çelik, Ç., Haberal, A. (2004). Kadın hastalıkları ve doğum bilgisi üreme fizyolojisi. Güneş Kitabevi, Ankara.
- Daikoku, T., Song, H., Guo, Y., Riesewijk, A., Mosselman, S., Das, S.K., Dey, S.K. (2004). Uterine Msx-1 and Wnt4 signaling becomes aberrant in mice with the loss of leukemia inhibitory factor or Hoxa-10: evidence for a novel cytokine-homeobox-Wnt signaling in implantation. *Mol Endocrinol*, 18:1238-1250.
- Daniels, D.L., Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from TCF/LEF in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12(4):364-371.
- Das, S.K., Yano, S., Wang, J., Edwards, D.R., Nagase, H., Dey, S.K. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet*, 21:44-54.

- DeSouza, M.M., Mani, S.K., Julian, J., Carson, D.D. (1998). Reduction of mucin-1 expression during the receptive phase in the rat uterus. *Biol Reprod*, 58:1503-1507.
- Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T., Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*, 25:341-373.
- Dimitriadis, E., Nie, G., Hannan, N.J., Paiva, P., Salamonsen, L.A. (2010). Local regulation of implantation at the human fetal- maternal interface. *Int J Dev Biol*, 54:313-22.
- Dimitriadis, E., White, C.A., Jones, R.L., Salamonsen, L.A. (2005). Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*, 11(6):613-630.
- Dominguez, F., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., Simon, C. (2005). Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J*, 19:1056-1060.
- Dunlap, K.A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E.B., Song, G., Deng, J.M., Behringer, R.R., DeMayo, F.J., Lydon, J., Jeong, J.W., Spencer, T.E. (2011). Postnatal deletion of *Wnt7a* inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod*, 85:386-396.
- Enders, A.C. (2000). Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18:255-263.
- Ennis, B.W., Matrisian, L.M. (1994). Matrix degrading metalloproteinases. *Journal of Neuro-Oncology*, 18:105-109.
- Evans, J.D., Ghaneh, P., Kawesha, A., Neoptolemos, J.P. (1997). Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion*, 58:520-528.
- Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., Lopez-Otin, C. (2010). Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803:3-19.
- Feng, J., Woessner, J.F., Zhu, C. (1998). Matrilysin activity in the rat uterus during the oestrous cycle and implantation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114:347-350.
- Fisher, S.J., Cui, T., Zhang, L., Hartmann, L., Grahl, K., Guo-Yang, Z., Tarpey, J., Damsky, C.H. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells *in vitro*. *J Cell Biol*, 109:891-902.
- Freitas, S., Meduri, G., Le Nestour, E., Bausero, P., Perrot-Applanat, M. (1999). Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod*, 61:1070-1082.
- Fujiwara, H., Tatsumi, K., Kosaka, K., Sato, Y., Higuchi, T., Yoshioka, S., Maeda, M., Ueda, M., Fuji, S. (2003). Human blastocysts and endometrial epithelial cells express activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166). *J Clin Endocrinol Metab*, 88:3437-3443.
- Fukuda, M.N., Sugihara, K. (2008). An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *J Obstet Gynaecol Res*, 34:129-136.
- Fukuda, M.N., Sugihara, K. (2012a). Cell adhesion molecules in human embryo implantation. *Acta Physiologica Sinica*, 64(3):247-58.
- Fukuda, M.N., Sugihara, K. (2012b). Trophinin in cell adhesion and signal transduction. *Front Biosci*, 4:342-350.
- 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.

- Gao, F., Ma, X., Rusie, A., Hemingway, J., Ostmann, A.B., Chung, D., Das, S.K. (2012). Epigenetic changes through DNA methylation contribute to uterine stromal cell decidualization. *Endocrinology*, 153:6078-6090.
- Gavin, B.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. (1990). Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev*, 4:2319-2332.
- Gellersen, B., Brosens, J.J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*, 35:851-905.
- Gellersen, B., Reimann, K., Samalecos, A., Aupers, S., Bamberger, A.M. (2010). Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod*, 25:862-873.
- 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*, 299:405-408.
- Godbole, G., Modi, D. (2010). Regulation of decidualization, interleukin-11 and interleukin-15 by homeobox A 10 in endometrial stromal cells. *J Reprod Immunol*, 85:130-139.
- Goffin, F., Munaut, C., Frankenne, F., Perrier D'Hauterive, S., Beliard, A., Fridman, V., Nervo, P., Colige, A., Foidart, J.M. (2003). Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod*, 69(3):976-984.
- Goldman S., Shalev, E. (2004). MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology. *Frontiers in Bioscience*, 9:2474-2483.
- Gonzales, D.S., Jones, J.M., Pinyopummintr, T., Carnevale, E.M., Ginther, O.J., Shapiro, S.S., Bavister, B.D. (1996). Trophoblast projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod*, 11:2739-2745.
- Gordon, J.L., Drummond, A.H., Galloway, W.A. (1993). Metalloproteinase inhibitors as therapeutics. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 8:91-94.
- Gordon, M.D., Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 281(32):22429-33.
- Gottardi, C.J., Gumbiner, B.M. (2004a). Distinct molecular forms of b-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol*, 167:339-349.
- Graba, Y., Gieseler, K., Aragnol, D., Laurenti, P., Mariol, M.C., Berenger, H., Sagnier, T., Pradel, J. (1995). DWnt-4, a novel Drosophila Wnt gene acts downstream of homeotic complex genes in the visceral mesoderm. *Development*, 121:209-218.
- Grewal, S., Carver, J.G., Ridley, A.J., Mardon, H.J. (2008). Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:16189-16194.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Basar, M., Arici, A. (2007). Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online*, 15(6):728-39.
- Güenalp, S. (2007). Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve Infertilite. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 1330.
- Hagen, T., Sethi, J.K., Foxwell, N., Vidal-Puig, A. (2004). Signalling activity of β -catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochem J*, 379:471-477.
- Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M.G., Ko, M.S., Dey, S.K. (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:10326-10331.

- 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.
- 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., 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.
- Herington, J.L., Bi, J., Martin, J.D., Bany, B.M. (2007). Beta-catenin (CTNNB1) in the mouse uterus during decidualization and the potential role of two pathways in regulating its degradation. *J Histochem Cytochem*, 55:963-74.
- Hey, N.A., Graham, R.A., Seif, M.W., Aplin, J.D. (1994). The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:337-342.
- Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.
- Horne, F.M., Blithe, D.L. (2007). Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Hum Reprod Update*, 13:567-580.
- Hoshina, M., Boothby, M., Hussa, R., Pattillo, R., Camel, H.M., Boime, I. (1985). Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta*, 6:163-172.
- Huang, X., Zhu, H., Gao, Z., Li, J., Zhuang, J., Dong, Y., Shen, B., Li, M., Zhou, H., Guo, H., Huang, R., Yan, J. (2018). Wnt7a activates canonical Wnt signaling, promotes bladder cancer cell invasion, and is suppressed by miR-370-3p. *J Biol Chem*, 1-27.
- Hubscher, C.H., Brooks, D.L., Johnson, J.R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem*, 80(2):79-87.
- Huet-Hudson, Y.M., Dey, S.K. (1990). Requirement for progesterone priming and its long-term effects on implantation in the mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 193:259-263.
- Hulboy, D.L., Rudolph, L.A., Matrisian, L.M. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod*, 3:27-45.
- Hurst, P.R., Palmay, R.D. (1999). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. *Reprod Fertil Dev*, 11:395-402.
- Illera, M.J., Lorenzo, P.L., Gui, Y.T., Beyler, S.A., Apparao, K.B., Lessey, B.A. (2003). A role for alpha5beta3 integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod*, 68(3):766-71.
- 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.
- Jeong, J.W., Lee, H.S., Franco, H.L., Broaddus, R.R., Taketo, M.M., Tsai, S.Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J. (2008). β -Catenin mediates glandular formation and dysregulation of β -catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene*, 28:31-40.
- Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bazer, F.W., Spencer, T.E. (2003). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod*, 69:1458-1471.

- Juriscicova, A., Antenos, M., Kapasi, K., Meriano, J., Casper, R.F. (1999). Variability in the expression of trophoctodermal markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod*, 14:1852-1858.
- Kara, B. (2010). Sebabi açıklanamayan infertil olgularda Wnt-β katenin yolağının yeri ve önemi. Celal Bayar Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Manisa.
- Kariya, Y., Kanno, M., Matsumoto-Morita, K., Konno, M., Yamaguchi, Y., Hashimoto, Y. (2014). Osteopontin O-glycosylation contributes to its phosphorylation and cell adhesion properties. *Biochem J*, 463(1):93-102.
- Kelly, B.A., Bond, B.C., Poston, L. (2003). Gestational profile of matrix metalloproteinases in rat uterine artery. *Mol Hum Reprod*, 9:351-358.
- 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*, 233:1064-75.
- Kemp, C.R., Willems, E., Wawrzak, D., Hendrickx, M., Agbor, T., Leyns, L. (2007). Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. *Dev Dyn*, 236(7):2011-9.
- Kervancioglu-Demirci, E., Salamonsen, L.A., Gauster, M. (2016). The role of CX3CL1 in fetal-maternal interaction during human gestation. *Cell Adhesion & Migration*, 10:1-2.
- Khokha, R., Waterhouse, P. (1994). The role of tissue inhibitor of metallo- proteinase-1 in specific aspects of cancer progression and repro- duction. *Journal of Neuro-Oncology*, 18:123-127.
- Kierszenbaum, A.L. (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kiewisz, J., Kaczmarek, M.M., Andronowska, A., Blitek, A., Ziecik, A.J. (2011). Gene expression of WNTs, β-catenin and E-cadherin during the periimplantation period of pregnancy in pigs - involvement of steroid hormones. *Theriogenology*, 76:687-699.
- 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.
- Kim, S.W., Yang, H.G., Kang, M.C., Lee, S., Namkoong, H., Lee, S.W., Sung, Y.C. (2014). KIAA1114, a full-length protein encoded by the trophinin gene, is a novel surface marker for isolating tumor-initiating cells of multiple hepatocellular carcinoma subtypes. *Oncotarget*, 5:1226-1240.
- King, A. (2000). Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*, 6:28-36.
- 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.
- Lai, T.H., Shih Ie, M., Vlahos, N., Ho, C.L., Wallach, E., Zhao, Y. (2005). Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril*, 83(1):1297-1302.
- Laird, S.M., Tuckerman, E.M., Li, T.C. (2006). Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproductive BioMedicine Online*, 13:13-23.
- Lala, P.K., Hamilton, G.S. (1996). Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal–fetal dialogue. *Placenta*, 17:545-555.

- Lane, B., Oxberry, W., Mazella, J., Tseng, L. (1994). Decidualization of human endometrial stromal cells in vitro: effects of progesterin and relaxin on the ultrastructure and production of decidual secretory proteins. *Hum Reprod*, 9:259-266.
- Lessey, B., Castelbaum, A., Buck, C., Lei, Y., Yowell, C., Sun, J. (1994). Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril*, 62(3):497-506.
- Lessey, B.A., (2011). Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril*, 96(3):522-529.
- Lessey, B.A., Arnold, J.T. (1998). Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol*, 39(1-2):105-116.
- Lewis, C.E., Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66:605-612.
- Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L., Chiu, K., Corwin, N.M., Esteves, R.A., Grobelyny, D., Galardy, R., Damsky, C.H., Fisher, S.H. (1991). 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, 113:437-49.
- 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*, 108:837-847.
- 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.
- Lloyd, S., Fleming, T.P., Collins, J.E. (2003). Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns*, 3:309-312.
- Logan, C.Y., Nusse, R. (2004). The Wnt Signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:781-810.
- Lopata, A., Hay, D.L. (1989). The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete hCG in culture. *Hum Reprod*, 4:87-94.
- Maartens, A.P., Brown, N.H. (2015). Anchors and signals: the diverse roles of integrins in development. *Curr Top Dev Biol*, 112:233-272.
- Maatta, M., Soini, Y., Liakka, A., Autio-Harmainen, H. (2000). Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Am J Clin Pathol*, 14:402-411.
- Maccalman, C.D., Furth, E.E., Omigbodun, A., Bronner, M., Coutifaris, C., Strauss, J.F. (1996). Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: A role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions? *Dev Dyn*, 206:201-211.
- Margarit, L., Gonzalez, D., Lewis, P.D., Hopkins, L., Davies, C., Conlan, R.S., Joels, L., White, J.O. (2009). L-selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects. *Hum Reprod*, 24:2767-2777.
- Maruotti, N., Corrado, A., Neve, A., Cantatore, F.P. (2013). Systemic effects of Wnt signaling. *J Cell Physiol*, 228:1428-32.
- Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays*, 14(7):455-63.
- McLaren, A. (1971). Blastocysts in the mouse uterus: the effect of ovariectomy, progesterone and oestrogen. *J Endocrinol*, 50:515-526.
- McLaren, A. (1990). The embryo. In: Austin CR, Short RV eds. Re-production in mammals. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1-26.

- Mendoza-Rodriguez, C.A., Merchant-Larios, H., Segura-Valdez, Md. M.L., Moreno Mendoza, N., Cruz, M.E., Arteaga-Lopez, P., Camacho Arroyo, I., Dominguez, R., Cerbon, M. (2002). Expression Of p53 In Luminal And Glandular Epithelium During The Growth And Regression Of Rat Uterus During The Estrous Cycle. *Mol Reprod Dev*, 261:445-452.
- Menkhorst, E., Salamonsen, L.A., Zhang, J., Harrison, C.A., Gu, J., Dimitriadis, E. (2010). Interleukin 11 and activin A synergise to regulate progesterone-induced but not cAMP-induced decidualization. *J Reprod Immunol*, 84:124-132.
- Mericskay, M., Kitajewski, J., Sassoon, D. (2004). WNT5A is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, 131:2061-2072.
- Meseguer, M., Aplin, J.D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J.E., Martin, J.C., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated *in vitro* by the human blastocyst. *Biol Reprod*, 64:590-601.
- 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.
- Mitoma, J., Miyazaki, T., Sutton-Smith, M., Suzuki, M., Saito, H., Yeh, J.C., Kawano, T., Hindsgaul, O., Seeberger, P.H., Panico, M., Haslam, S.M., Morris, H.R., Cummings, R.D., Dell, A., Fukuda, M. (2009). The N-glycolyl form of mouse sialyl Lewis X is recognized by selectins but not by HECA-452 and FH6 antibodies that were raised against human cells. *Glycoconj J*, 26:511-523.
- Modi, D., Godbole, G. (2009). HOXA10 signals on the highway through pregnancy. *J Reprod Immunol*, 83:72-78.
- Modi, D.N., Godbole, G., Suman, P., Gupta, S.K. (2011). Endometrial biology during trophoblast invasion. *Front Biosci (Scholar edn)*, 4:1151-1171.
- 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*, 71:417-424.
- 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 USA*, 102:8579-8584.
- Montagnana, M., Lippi, G., Albiero, A., Scevarolli, S., Salvagno, G.L., Franchi, M., Guidi, G.C. (2009). Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. *J Clin Lab Anal*, 23:88-92.
- Moon, R.T., Brown, J.D., Yang-Snyder, J.A., Miller, J.R. (1997). Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands. *Cell*, 88:725-728.
- Murray, M.J., Lessey, B.A. (1999). Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 17(3):275-90.
- Muter, J., Lucas, E.S., Chan, Y.W., Brighton, P.J., Moore, J.D., Lacey, L., Quenby, S., Lam, E.W., Brosens, J.J. (2015). The clock protein period 2 synchronizes mitotic expansion and decidual transformation of human endometrial stromal cells. *The FASEB Journal*, 29(4):1603-1614.
- Mutluay, D., Öner, J. (2016). Role of Cytokines during Pregnancy. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 23(1):126-131.
- Mülazımoğlu, S.B., İde, T., Aslan, S. (2005). Ratlarda Üreme. *J Clin Anal Med*, 39-44.

- Myers, D.B., Clark, D.E., Hurst, P.R. (1990). Decreased collagen concentration in rat uterine implantation sites compared with non-implantation tissue at days 6-11 of pregnancy. *Reproduction Fertility and Development*, 2:607-612.
- Nadano, D., Nakayama, J., Matsuzawa, S., Sato, T., Matsuda, T., Fukuda, M.N. (2002). Human tastin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. *Biochem J*, 364:669-677.
- Nagase, H., Fields, G.B. (1996). Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. *Biopolymers (Peptid science)*, 40:399-416.
- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69:562-573.
- Nagase, H., Woessner, J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274:21491-21494.
- Natoli, A.K., Medley, T.L., Ahimastos, A.A., Drew, B.G., Thearle, D.J., Dilley, R.J., Kingwell, B.A. (2005). Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. *Hypertension*, 46(5): 1129-1134.
- Nayeem, S.B., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Keelan, J.A. (2014). Role of Wnt signalling in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev*, 1-20.
- Nayeem, S.B., Dharmarajan, A., Keelan, J.A. (2015). Paracrine communication modulates production of Wnt antagonists and COX1-mediated prostaglandins in a decidual-trophoblast co-culture model. *Mol Cell Endocrinol*, 405:52-62.
- 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.
- Newby, A.C. (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, 85:1-31.
- Niakan, K.K., Han, J., Pedersen, R.A., Simon, C., Pera, R.A.R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, 139(5):829-841.
- Nie, G.Y., Butt, A.R., Salamonsen, L.A., Findlay, J.K. (1997). Hormonal and nonhormonal agents at implantation. *Reproduction Fertility and Development*, 9:65-76.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13:767-779.
- Nimbkar-Joshi, S., Rosario, G., Katkam, R.R., Manjramkar, D.D., Metkari, S.M., Puri, C.P., Sachdeva, G. (2009). Embryo-induced alterations in the molecular phenotype of primate endometrium. *J Reprod Immunol*, 83:65-71.
- Noguchi, Y., Sato, T., Hirata, M., Hara, T., Ohama, K., Ito, A. (2003). Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:6063-6072.
- Nusse, R., Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. *Cell*, 69:1073-1087.
- Nuttall, R.K., Kennedy, T.G. (1999). Gelatinases A and B and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 2, and 3 during *in vivo* and *in vitro* decidualization of rat endometrial stromal cells. *Biol Reprod*, 60:471-478.
- Omwantho, C.O., Konrad, L., Halis, G., Oehmke, F., Tinneberg, H.R. (2009). Role of TGF- β s in normal human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod*, 29:101-109.
- Orchard, M.D., Murphy, C.R. (2002). Alterations In Tight Junction Molecules Of Uterine Epithelial Cells During Early Pregnancy In Molecules Of Uterine Epithelial Cells During Early Pregnancy In The Rat. *Acta Histochem*, 104:149-155.

- Ovalle, W.K., Nahirney, P.C. (2009). Netter Temel Histoloji. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Öztürk, I. (2011). Wnt gen ekspresyon düzeyinin apoptotik uyarı verilmiş hücrelerde araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- 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*, 90:10159-10162.
- Paria, B.C., Dey, S.K. (1990). Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:4756-4760.
- Paria, B.C., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Dey, S.K. (2000). Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin Cell Dev Biol*, 11:67-76.
- Paria, B.C., Lim, H., Wang, X.N., Liehr, J., Das, S.K., Dey, S.K. (1998). Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, 139:5235-5246.
- Paria, B.C., Zhao, X., Das, S.K., Dey, S.K., Yoshinaga, K. (1999). Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol*, 208:488-501.
- Parr, B.A., McMahon, A.P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires WNT-7A. *Nature*, 395:707-10.
- Peifer, M., Polakis, P. (2000). Cancer-Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis- a look outside the nucleus. *Science*, 287:1606-1609.
- Petraglia, F., Santuz, M., Florio, P., Simoncini, T., Luisi, S., Plaino, L., Genazzani, A.R., Genazzani, A.D., Volpe, A. (1998). Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J Reprod Immunol*, 39:221-233.
- PrabhuDas, M., Bonney, E., Caron, K., Dey, S., Erlebacher, A., Fazleabas, A., Fisher, S., Golos, T., Matzuk, M., McCune, J.M., Mor, G., Schulz, L., Soares, M., Spencer, T., Strominger, J., Way, S.S., Yoshinaga, K. (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature Immunology*, 16:328-334.
- Puistola, U., Rönberg, L., Martikainen, H., Turpeenniemi-Hujanen, T. (1989). The human embryo produces basement membrane collagen (type IV collagen)-degrading protease activity. *Hum Reprod*, 4(3):309-11.
- Quenby, S., Anim-Somuah, M., Kalumbi, C., Farquharson, R., Aplin, J.D. (2007). Different types of recurrent miscarriage are associated with varying patterns of adhesion molecule expression in endometrium. *Reprod Biomed Online*, 14:224-234.
- Raheem, K.A. (2018). Cytokines, growth factors and macromolecules as mediators of implantation in mammalian species. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6:6-14.
- Rao, T.P., Köhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*, 106:1798-806.
- Rashid, N.A., Lalitkumar, S., Lalitkumar, P.G., Gemzell-Danielsson, K. (2011). Endometrial receptivity and human embryo implantation. *Am J Reprod Immunol*, 66(1):23-30.
- Rechtman, M.P., Zhang, J., Salamonsen, L.A. (1999). Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on endometrial decidualization and implantation in mated rats. *J Reprod Fertil*, 117:169-77.
- Reinhard, H., Stoll, C.F. (2006). Kinderwunschzentrum Berlin.<http://www.kinderwunschzentrum.de/tr/ursachen.shtml>.

- Rivera-Perez, J.A., Magnuson, T. (2005). Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Dev Biol*, 288:363-371.
- Roberts, R.M., Ealy, A.D., Alexenko, A.P., Han, C.S., Ezashi, T. (1999). Trophoblast interferons. *Placenta*, 20:259-264.
- Roblero, L.S., Garavagno, A.C. (1979). Effect of oestradiol-17 *b* and progesterone on oviductal transport and early development of mouse embryos. *J Reprod Fertil*, 57:91-95.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., Graubert, M., Iruela-Arispe, M.L. (2000). Endothelial cell dysfunction following prolonged activation of progesterone receptor. *Hum Reprod*, 15:39-47.
- Rosen, S.D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*, 22:129-156.
- Rudolph-Owens, L., Hulboy, D.L., Wilson, C.L., Mudgett, J., Matrisian, L.M. (1997). Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology*, 138:4902-4911.
- Rudolph-Owens, L., Slayden, O.D., Matrisian, L.M., Brenner, R.M. (1998). Matrix metalloproteinase expression in *Macaca mulatta* endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients. *Biol Reprod*, 59:1349-1359.
- Sadler, T.W. (2005). Langman medikal embriyoloji. Başaklar AC. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Saito-Diaz, K., Chen, T.W., Wang, X., Thorne, C.A., Wallace, H.A., Page-McCaw, A., Lee, E. (2013). The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors*, 31:1-31.
- Salamonsen, L.A., Woolley, D.E. (1996). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endometrial remodelling and menstruation. *Reproductive Medicine Reviews*, 5:185-5203.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6):1101-1108.
- Sethi, C.S., Bailey, T.A., Luthert, P.J., Chong, N.H.V. (2000). Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol*, 84:654-664.
- Sharkey, A.M., Smith, S.K. (2003). The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 17:289-307.
- Sharma, S., Godbole, G., Modi, D. (2016). Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol*, 75:341-350.
- Sherman, M.I. (1978). Implantation of mouse blastocysts in vitro. In: Daniels JC, ed. *Methods in mammalian reproduction*. New York: Academic Press, 247-257.
- Sidow, A., 1992. Diversification of the Wnt gene family on the ancestral lineage of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5098-5102.
- Slayden, O.D., Brenner, R.M. (2006). A critical period of progesterone withdrawal precedes menstruation in macaques. *Reprod Biol Endocrinol*, 4:1-6.
- Sonderegger, S., Pollheimer, J., Knöfler, M. (2010). Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation-review. *Placenta*, 31(10):839-47.
- Song, H., Han, K., Lim, H. (2007). Progesterone supplementation extends uterine receptivity for blastocyst implantation in mice. *Reproduction*, 133(2):487-493.
- Sosa, S.E.Y., Flores-Pliego, A., Espejel-Nunez, A., Medina-Bastidas, D., Vadillo-Ortega, F., Zaga-Clavellina, V., Estrada-Gutierrez, G. (2017). New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*, 18:1448.

- Spencer, T.E., Dunlap, K.A., Filant, J. (2012). Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol*, 354:34-53.
- Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G. (1999). *Clinical Gynecology, Endocrinology and Infertility*, 6th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 125.
- Staun-Ram, E., Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3:56.
- Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., Shalev, E. (2004). Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:59.
- Stemmler, M.P. (2008). Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst*, 4:835-850.
- Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., Wolff, M.V. (2006). The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*, 12:617-630.
- Sugihara, K., Kabir-Salmani, M., Byrne, J., Wolf, D.P., Lessey, B., Iwashita, M., Aoki, D., Nakayama, J., Fukuda, M.N. (2008). Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGBeta and IL-1beta. *FEBS Lett*, 582(2):197-202.
- Suman, P., Malhotra, S.S., Gupta, S.K. (2013a). LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *JAKSTAT*, 2(4):e25155.
- Suman, P., Poehlmann, T.G., Prakash, G.J., Markert, U.R., Gupta, S.K. (2009). Interleukin-11 increases invasiveness of JEG-3 choriocarcinoma cells by modulating STAT3 expression. *J Repro Immunol*, 82:1-11.
- Suman, P., Shembekar, N., Gupta, S.K. (2013b). Leukemia inhibitory factor increases the invasiveness of trophoblastic cells through integrated increase in the expression of adhesion molecules and pappalysin 1 with a concomitant decrease in the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *Fertil Steril*, 99:533-542.
- Sun, Y., Dai, B., Wu, Y., Yang, L., Liu, P., Wang, Z. (2013). Carbon disulfide exposure at periimplantation disrupts embryo implantation by decreasing integrin beta3 expression in the uterine tissue of pregnant mice. *Chem Biol Interact*, 206(2):126-33.
- Takano, M., Lu, Z., Goto, T., Fusi, L., Higham, J., Francis, J., Withey, A., Hardt, J., Cloke, B., Stavropoulou A.V., Ishihara, O., Lam, E.W., Unterman, T.G., Brosens, J.J., Kim, J.J., (2007). Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*, 21(10):2334-49.
- Tang, M., Xu, Y., Julian, J., Carson, D., Tabibzadeh, Z. (2005). Lefty is expressed in mouse endometrium in estrous cycle and periimplantation period. *Human Reproduction*, 20(4):872-880.
- Tawfeek, M.A., Eid, M.A., Hasan, A.M., Mostafa, M., El-Serogy, H.A. (2012). Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility. *BMC Womens Health*, 12:10-16.
- Tepekoy, F., Akkoyunlu, G., Demir, R. (2015). The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J Asisst Reprod Genet*, 32:337-346.
- Trichas, G., Smith, A.M., White, N., Wilkins, V., Watanabe, T., Moore, A., Joyce, B., Sugnaseelan, J., Rodriguez, T.A., Kay, D., Baker, R.E., Maini, P.K., Srinivas, S. (2012). Multi-cellular rosettes in the mouse visceral endoderm facilitate the ordered migration of anterior visceral endoderm cells. *PLoS Biol*, 10(2):e1001256.
- 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.
- Tüzün, Y., Güler, M.A., Oğuz, O., Aksungur, V.L. (2008). Dermatoloji Cilt 1 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Usadi, R.S., Murray, M.J., Bagnell, R.C., Fritz, M.A., Kowalik, A.I., Meyer, W.R., Lessey, B.A. (2003). Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril*, 79:970-974.
- van der Horst, P.H., Wang, Y., van der Zee, M., Burger, C.W., Blok, L.J. (2012). Interaction between sex hormones and Wnt/b-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol*, 358:176-84.
- Vassilev, V., Pretto, C.M., Cornet, P.B., Delvaux, D., Eeckhout, Y., Courtoy, P.J., Marbaix, E., Henriët, P. (2005). Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases Messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(10):5848-5857.
- Vinketova, K., Mourdjeva, M., Oreshkova, T. (2016). Human decidual stromal cells as a component of the implantation niche and a modulator of maternal immunity. *J Pregnancy*, 1-17.
- Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92:827-839.
- Wagner, J., Lehmann, L. (2006). Estrogen modulate the gene expression of Wnt-7a in cultured endometrial adenocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res*, 50:368-372.
- Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., Nelson, K.G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: Correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131:1458-1466.
- Wang, H., Matsumoto, H., Guo, Y., Paria, B.C., Roberts, R.L., Dey, S.K. (2003). Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:14914-14919.
- Wang, H., Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 7(3): 185-199.
- Wang, Y., van der Zee, M., Fodde, R., Blok, L.J. (2010). Wnt/B-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget*, 1:674-684.
- Wang, W., Li, Q., Bagchi, I.C., Bagchi, M.K. (2010). The CCAAT/enhancer binding protein beta is a critical regulator of steroid-induced mitotic expansion of uterine stromal cells during decidualization. *Endocrinology*, 151:3929-3940.
- Wansleeben, C., Meijlink, F. (2011). The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev Dyn*, 240:616-626.
- Waterhouse, P., Denhardt, D.T., Khokha, R. (1993). Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Mol Reprod Dev*, 35:219-226.
- Weimar, C.H., Macklon, N.S., Post Uiterweer, E.D., Brosens, J.J., Gellersen, B. (2013). The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function. *Human Reproduction Update*, 19:542-557.
- White, F.J., Burghardt, R.C., Hu, J., Joyce, M.M., Spencer, T.E., Johnson, G.A. (2006). Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction*, 132:919-929.

- Wilcox, A.J., Baird, D.D., Weinberg, C.R. (1999). Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 340(23):1796-1799.
- Wilson, S.I., Rydstrom, A., Trimborn, T., Willert, K., Nusse, R., Jessell, T.M., Edlund, T. (2001). The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature*, 411:325-330.
- Wodarz, A., Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:59-88.
- Xiao, L.J., Chang, H., Ding, N.Z., Ni, H., Kadomatsu, K., Yang, Z.M. (2002a). Basigin expression and hormonal regulation in mouse uterus during the peri-implantation period. *Mol Reprod Dev*, 63:47-54.
- Xie, H., Tranguch, S., Jia, X., Zhang, H., Das, S.K., Dey, S.K., Kuo, C.J. Wang, H. (2008). Inactivation of nuclear Wnt/b-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development*, 135:717-27.
- Xie, H., Wang, H., Tranguch, S., Iwamoto, R., Mekada, E., Demayo, F.J., Lydon, J.P., Das, S.K., Dey, S.K. (2007). Maternal heparinbinding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:18315-18320.
- Xu, B., Geerts, D., Bu, Z., Ai, J., Jin, L., Li, Y., Zhang, H., Zhu, G. (2014). Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes. *Hum Reprod*, 29:781-790.
- Yıldırım, M. (2015). Prometheus, Anatomi Atlası. 1. Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Yıldırım, M. (2015). Topografik Klinik Anatomi, 9. İngilizce Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Yip, K.S., Suvorov, A., Connerney, J., Lodato, N.J., Waxman, D.J. (2013). Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. *Biol Reprod*, 89:13.
- Yoshioka, S., King, M.L., Ran, S., Okuda, H., MacLean, J.A., McAsey, M.E., Sugino, N., Brard, L., Watabe, K., and Hayashi, K. (2012). WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/ β -catenin pathway. *Mol Cancer Res*, 10:469-482.
- Zhang, L., Patterson, A.L., Zhang, L., Teixeira, J.M., Pru, J.K. (2012). Endometrial stromal beta-catenin is required for steroid-dependent mesenchymal-epithelial cross talk and decidualization. *Reprod Biol Endocrinol*, 10:75.
- Zhang, Q., Yan, J. (2016). Update of Wnt signaling in implantation and decidualization. *Reprod Med Biol*, 15:95-105.
- Zhao, X.L., Sun, T., Che, N., Sun, D., Zhao, N., Dong, X.Y., Gu, Q., Yao, Z., Sun, B.C. (2011). Promotion of hepatocellular carcinoma metastasis through matrix metalloproteinase activation by epithelial-mesenchymal transition regulator Twist1. *J Cell Mol Med*, 15:691-700.
- Zhao, Y.G., Xiao, A.Z., Cao, X.M., Zhu, C. (2002). Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy. *Mol Reprod Develop*, 62:149-58.
- Zimmermann, G., Baier, D., Majer, J., Alexander, H. (2003). Expression of beta hCG and alpha CG mRNA and hCG hormone in human decidual tissue in patients during tubal pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 9:81-89.

8. EKLER

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

02.02.2017

Sayı : 65202830-050.04.04-21
Konu : Etik Kurul Kararı.

Sayın Prof.Dr. Hüseyin Eray BULUT
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji A.D

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02.02.2017 tarihinde Prof. Dr. Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Prof.Dr. Hüseyin Eray BULUT'un yürütücülüğünü yapmış olduğu ve yardımcıları Arş.Gör. Rasim HAMUTOĞLU'un 26.01.2017 tarih ve 10 sayılı **"Peri-implantasyon Döneminde Sıçan Endometriumunda Wnt- β Katenin Yolağının Matriks Metalloproteinaz Ekspresyonundaki Rolü."** isimli Yüksek Lisans Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Eray BULUT Üye Katılmadı	Prof. Dr. Mustafa TURAN Üye	(İzinli) Prof. Dr. Zübeyda Akın POLAT Üye
Prof. Dr. İhsan HUBBEZDOĞRU Üye	Doç. Dr. Bülent SARACI Üye	(İzinli) Yrd.Doç.Dr.M. Önder KARAYIĞIT Üye
Yrd.Doç.Dr.Erhan YÜKSEL Üye	Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN Üye	Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN Üye - Başkanvekili
Ozcan KARATAŞ Sivil Üye		(Katılmadı) Hilmi GÜL Sivil Üye
	Prof. Dr. Haki KARA Başkan	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Rasim HAMUTOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi İSKENDERUN-22.02.1987
Medeni Hali Evli
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji
Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi rasim.hamutoglu@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise İskenderun Lisesi, 2005
Lisans Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2010

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Görevlisi, 2015-20..