

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM A.D.

**METOTREKSATIN EMBRİYONAL İMPLANTASYON ÜZERİNE
ETKİSİNİN RAT MODELİ ÜZERİNDE DENEYSEL ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi
Dr. Gökhan ERDİL

Trabzon, 2018

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM A.D.

**METOTREKSATIN EMBRİYONAL İMPLANTASYON ÜZERİNE
ETKİSİNİN RAT MODELİ ÜZERİNDE DENEYSEL ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi
Dr. Gökhan ERDİL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süleyman GÜVEN

Trabzon, 2018

ÖNSÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan değerli anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Hasan BOZKAYA'ya,

Eğitimime ve tezime olan katkılarından dolayı değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Süleyman GÜVEN'e,

Uzmanlık eğitimim süresince her yönden desteklerini gördüğüm değerli hocalarım, Prof. Dr. E. Seda GÜVENDAĞ GÜVEN, Prof. Dr. Mehmet Armağan OSMANAĞAOĞLU, Doç. Dr. Cavit KART ve Doç. Dr. Turhan ARAN'a,

Mesleğe ilk adımı attığımız günden öncesi ve sonrasında desteklerini hep hissettiğim, kendisi ile uzun ve zorlu mücadeleleri bir hayat felsefesi olarak benimsediğimiz dostum Yrd. Doç. Dr. Mustafa Emre ERCİN'e,

Sevgi ve destekleriyle hep yanımda olan annem Naide ERDİL, babam Mehmet ERDİL, kardeşim Mustafa ERDİL ve bu süreçte hep yanımda olan ve desteğini esirgemeyen, amcam Prof. Dr. Tayyip Sabri ERDİL'e sonsuz teşekkürler.

Dr. Gökhan ERDİL
Trabzon, 2018

ÖZET

Üreme meydana gelebilmesi için bir blastosistin endometriyuma implantasyonda başarılı olması gerekir. İmplantasyon, adet döngüsünün sekresyon aşaması sırasında " implantasyon penceresi " olarak bilinen çok kısa sürede ortaya çıkar. Bu pencere sırasında, embriyo kendisini endometriuma yapıştıracak ve annenin kan dolaşımına erişmesini sağlayacaktır. Bu süreç çok karmaşıktır ve başarılı olabilmek için, hem embriyo hem de reseptif endometriyumda olaylar iyi senkronize edilmelidir

Metotreksat, dihidrofolat redüktazı inhibe eden ve böylece tetrahidrofolatın sentezini kısıtlayan bir folik asit antagonistidir. Tetrahidrofolat, timidat sentezi ve de novo pürin sentezinde önemli bir kofaktör olduğu için, metotreksat DNA sentezini engeller ve antiproliferatif bir etkiye sahiptir. Metotreksat, malignite, romatizmal bozukluklar ve sedef hastalığı ile intrauterin gebeliğin sonlandırılmasında kullanılmıştır. Son zamanlarda, metotreksat ektopik gebelik için standart bir tedavi haline gelmiştir.

Deneyimizde sıçanlar her grupta 8'er tane rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Başarılı embriyo-endometrial etkileşimler için hayati önem arzettiği hipotezi ile hareket ederek, MUC-1 (Mucin-1) ve Glikodelin-A glikoproteinlerinin implantasyon sürecindeki immunhistokimyasal değişikliklerinin tespiti açısından, gebe sıçanlarda MTX'ye maruz bırakıldıktan sonra endometriumdaki ardışık histopatolojik değişiklikleri ve embriyonal implantasyon üzerine etkilerini MUC-1 ve GdA biyomarkerlarının düzeyleri aracılığıyla inceledik.

Sonuç olarak gebe ratlarla kontrol grubunun karşılaştırılmasında; uterin luminal, glandüler ve desidial epitelde GdA ve MUC-1 için H-skorumları karşılaştırıldığında gebe ratlarda olgularında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Metotreksat ile müdahale edilen implantasyon sürecinde ilgili biyomarkerların düzeylerindeki azalmanın tespit edilmişliği, MUC-1 ve GdA'nın başarılı bir gebelik üzerinde hayati önem arzettiği hipotezini desteklemiştir.

SUMMARY

A blastocyst has to be successfully implanted to the endometrium for reproduction to occur. Implantation can occur during only a very short time period, known as the “window of implantation,” during the secretory phase of the menstrual cycle. The embryo fuses itself to the endometrium, giving it access to the maternal blood supply. This process is very complicated, and, events must be well synchronized in both the embryo and the receptive endometrium.

Folate metabolism antagonist, methotrexate (MTX), a structural analog of folic acids, inhibits the reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate, resulting in the inhibition of DNA and RNA synthesis. This results in MTX-mediated inhibition of cell proliferation. MTX has been used in the treatment of neoplastic diseases, gestational trophoblast disease, and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Crohn’s disease, psoriasis, and psoriatic arthritis. MTX is also used in the medical management of ectopic pregnancy and for medical termination of pregnancy.

In the experiment, the rats were divided into 4 groups, each group consisting of 8 rats . There is a hypothesis that MUC-1 (Mucin-1) and GdA (Glikodelin-A) glycoproteins are vital for successful embryo-endometrial interactions. We examined the effects of folate metabolism antagonist MTX on embryonal implantation through the levels of MUC-1 and GdA biomarkers with the pregnant and non-pregnant rats.

In conclusion, changes in the biomarkers involved in the implantation process with methotrexate have supported the hypothesis that MUC-1 and GdA are crucial for successful pregnancy. Concomitant reductions in MUC-1 and GdA levels were observed with negative effects of methotrexate on implantation.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	47

GİRİŞ

Üreme meydana gelebilmesi için bir blastosistin endometriyuma implantasyonda başarılı olması gerekir. İmplantasyon, adet döngüsünün sekresyon aşaması sırasında " implantasyon penceresi " olarak bilinen çok kısa sürede ortaya çıkar. Bu pencere sırasında, embriyo kendisini endometriuma yapıştıracak ve annenin kan dolaşımına erişmesini sağlayacaktır. Bu süreç çok karmaşıktır ve başarılı olabilmek için, hem embriyo hem de reseptif endometriyumda olaylar iyi senkronize edilmelidir. İnfertilite nedenlerinden biri embriyo implantasyon başarısızlığı olup bu durum embriyo, endometriyum veya her ikisi ile ilgili faktörlerden kaynaklanabilir. Mevcut görüntüleme teknikleri klinisyenlere noninvaziv olarak endometriumu gözlemleme şansını vermesine rağmen, endometrial reseptivite halen, mevcut değerlendirme tekniklerine eşlik etmek hususunda yetersiz kullanılabilirlik düzeyinde kalmaktadır. (1)

Müsin 1 (MUC-1) bir glikoproteindir. Ekspresyonun zamanında inhibisyonu, uterus reseptivitesi için çok önemlidir (2) ve endometriyuma bakteri ve proteolitik saldırılara karşı yağlanma ve koruma sağladığı düşünülmektedir (3-4). Buna bağlı olarak yapılan çalışmalarda fertil bayanlardaki düzeyinin infertil bayanlara göre daha yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür. Ek olarak, MUC-1 blastosist implantasyon tutunma fazında önemli rol oynayan hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu gizler gibi görünmektedir (5). Bu nedenle, implantasyon penceresi dediğimiz süreçte nispeten düşük seviyelerde MUC-1'in implantasyon sırasında başarılı embriyo-endometrial etkileşimler için hayati olduğu hipotezi mevcuttur (5).

Plasental protein 14 (PP14) olarak da bilinen Glycodelin A (GdA), implantasyon ve erken gebelik sırasında en bol glikoproteindir (6). Bu glikoprotein sperm-zona etkileşimini inhibe ettiği görülmektedir (7) ve implantasyon için endometriyumun hazırlanmasında hayati bir rol oynadığı iddia edilmektedir (8). Ek olarak, GdA'nın düşük gebelik düzeyleri, alışılmış düşük (9, 10), tekrarlayan düşük (11) ve açıklanamayan infertilite ile ilişkili olduğu için, sağlıklı bir hamileliğin korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir (12).

Folik asit metabolizma antagonisti olan metotreksat (MTX), dihidrofolatın tetrahidrofolata indirgenmesini antaggonize DNA ve RNA sentezini inhibe eder (13;14). Bu, MTX aracılı hücre proliferasyonunun inhibisyonu, hücre döngüsünün

bozulması ve duyarlı hücrelerde apoptozu indüklemeye ile sonuçlanır (15). MTX neoplastik hastalıkların tedavisinde, gestasyonel trofoblast hastalıklar ve romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, Crohn hastalığı, sedef hastalığı ve psoriatik artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. (16; 17; 15). MTX, ektopik gebeliğin medikal tedavisinde ve gebeliğin tıbbi sonlandırmasında da kullanılır (18; 19). İnsanlarda, gebelik sırasında maternal MTX maruziyeti düşükler, neonatal malformasyonlar ve gelişimsel gecikmelere neden olur (20; 21). MTX, sıçanlar, fareler ve tavşanlarda embriyotoksik ve teratojeniktir (22; 23; 24) ve rhesus maymunlarında düşüğe neden olur.

Bu çalışmada, gebe sıçanlarda MTX'ye maruz bırakıldıktan sonra endometriumdaki ardışık histopatolojik değişiklikleri araştırdık. Folat metabolizma antagonisti MTX ile müdahale edilen ratlarda ilacın, embriyonal implantasyon üzerine etkilerini MUC-1 ve GdA biyomarkerlarının düzeyleri aracılığıyla inceledik.

GENEL BİLGİLER

Dünya çapında 7 çiftin 1'i kısırlıkla mücadele etmektedir. (26). Örneğin, olağan bir kabulle bile, belirli bir adet döngüsünde gerçekleşen başarılı hamilelik şansı yaklaşık % 30 ile sınırlıdır (27). Tüm sperm ovum karşılaşmalarının sadece yüzde 50 ila 60'ı 20 haftalık gebeliğin ötesine geçmektedir (28). Kaybolan gebelikler arasında implantasyon başarısızlığı temel neden olarak yaklaşık % 75'e ulaşmaktadır (29). İnfertilitenin altta yatan nedenlerinin üstesinden gelen in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF ET) teknolojisindeki önemli gelişmelere rağmen, hamilelik başarı oranları temelde implantasyon başarısızlığına bağlı olarak nispeten düşük kalmaktadır (30; 31). Bu nedenle, embriyo implantasyonunun gizemlerini araştırarak bu küresel meseleyi ele almak zorunludur.

Plasentanın ve fetüsün gelişimi, fertilizasyonla başlayıp süreklilik arz eden bir süreçtir. Gelişimin ilk üç günü fallop tüpü içerisinde gerçekleşir. Döllenmeden dört gün sonra morula (blastomere hücrelerinin bir miktarı) rahim içine girer. Döllenmeden sonraki beşinci gün sıvı birikimi ve hücrelerin kutuplaşması ile morula, blastokist haline gelir. Blastosist, plasentayı ve fetal zarları oluşturacak bir dış hücre tabakasına (trofoblast), embriyoyu oluşturacak bir kutupta bir iç hücre kütesine ve sıvı dolu bir boşluğa sahiptir. İç ve dış hücre kitleleri çoğalır ve genişler, blastosist zona kabuğundan çıkana kadar sıvı boşluğu büyür. Başlangıçta oksijen ve metabolik substratlar sağlayan uterus salgıları kısa süre içerisinde gelişimin desteklenmesi için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, kuluçkadan 24 saat sonra (döllenmeden yaklaşık 6 gün sonra), blastosist rahim endometriumuna implante olur ve büyümenin devam etmesi için gereken substratlara (glikojen doldurulmuş stromal hücreler) erişim sağlar

İmplantasyon, blastosistin optimal bir lokasyonda (tipik olarak uterusun orta ila üst ön veya arka duvarı), yapışma ve invazyonunu içerir.

Erken embriyo gelişimi implantasyona giden yolculuğu başlatır. Erkek ve dişi gametlerin (fertilizasyon) oviditin ampullar bölümünde birleşmesinden sonra, diploit bir zigot oluşur. Tek hücreli zigot, daha sonra uterusu ulaşmak için, ampulla geri kalan kısmından geçerken, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamalarına mitotik olarak bölünür. (32; 33)

Blastosist, implantasyonu başlatmak için maternal endometrium ile fiziksel ve fizyolojik etkileşime katılır (34,35). Normal implantasyon için iki yönlü bir karşılaşma gereklidir. Gecikmeler, desidualizasyon ve plasentasyon dahil olmak üzere sonraki gelişim için olumsuz sonuçlar doğuracaktır. (36; 37; 38; 39). Hamilelik öncesi periimplantasyon periyodunda meydana gelen erken gebelik kaybı, insanlarda göreceli olarak yaygın bir olgudur (40; 41).

Başarılı implantasyon, implantasyon yetkinliğinin blastosist tarafından alınması ile uterus endometriyumunda reseptif bir durumla senkronizasyonu gerektirir (42; 43; 44). Bu iki olay, özellikle de yumurtalık östrojeni ve progesteron gibi maternal hormonlar tarafından hassas bir şekilde düzenlenir (45; 46). Moleküler ve genetik kanıtlar, yumurtalık hormonlarının, sitokinler, büyüme faktörleri, homeobox transkripsiyon faktörleri, lipid mediyatörleri ve morfojen genleri dahil olmak üzere lokal olarak üretilen sinyalleme molekülleri ile birlikte, implantasyonun karmaşık sürecini belirlemek için otokrin, parakrin ve jukstakrin etkileşimleri yoluyla işlev gördüğünü gösterir (47). Bununla birlikte, erken gebelikte embriyo-uterus etkileşimlerini yöneten moleküler sinyal yollarının hiyerarşik yapısı, derinlemesine araştırılmaya devam etmektedir. Blastosist ve uterus arasındaki etkileşim sadece kısa bir süre içinde, yani “implantasyon penceresi” nde meydana gelir. (48; 49; 50; 51). İmplant embriyonuna yanıt olarak, çevredeki uterin stroma embriyonik büyümeyi ve istilayı karşılamak için desidualizasyon olarak bilinen bir süreç olan hücrel transformasyona uğrar (52). Lokal olarak indüklenen desidua, embriyonun hayatta kalmasını desteklemek için olumlu bir geri besleme sağlar. Decidua'nın yarı allojenik embriyoya maternal immünolojik yanıtlara karşı bir bariyer işlevi gördüğü düşünülmektedir. Bununla birlikte, implantasyon sırasında blastosistin maternal immün sürveyanstan nasıl kurtulduğu hala net değildir. İleri teknolojilerin ortaya çıkmasıyla birlikte, insanlarda olduğu gibi farelerde de implantasyonu kontrol eden moleküler ağların çözülmesi için çeşitli çalışmalarda, embriyo ve uterus implantında gen ve protein ekspresyonunun geniş çaplı analizleri gerçekleştirilmiştir (53).

Bununla birlikte, deneysel zorluklar ve etik kısıtlamalar nedeniyle, insan implantasyonu hakkındaki anlayışımız, özellikle fare modelleri başta olmak üzere hayvansal modellere dayanmaktadır. Gen knockout fare modelleri, implantasyonun geçici moleküler temelini oluşturmak için kullanılan değerli bilgiler sağlar. Embriyo implantasyonu, birçok sinyalleme molekülünü kesin olarak düzenlenmiş bir programa entegre eden dinamik bir gelişimsel süreç olduğundan, implantasyon başarısızlığını düzeltmek ve kadınlarda gebelik oranlarını iyileştirmek için yeni stratejiler üretmek için bu süreçleri yöneten yolların hiyerarşik detayını anlamak önemlidir.

Memelilerin çoğunda, implantasyon, korpus luteum tam olarak oluştuğunda ovülasyondan sonra belirli bir zaman aralığında gerçekleşir (54). İnsanlarda bu, menstrüel siklusun luteal fazı sırasında, kemirgenlerde ise, östrojen döngüsünün dijest fazındadır. Bu süreçte östrojen ve progesteronun başlıca hormonlar olduğu iyi bilinmektedir. Dinamik dalgalanma düzeylerine göre, üreme döngüsü üç aşamaya ayrılır (54; 55). İlk aşama, östrojen düzeylerinin çok yüksek olduğu kadınlarda proest veya foliküler fazdır (56; 57). İkinci aşama, her iki hormon seviyesinin yumurtlamadan hemen sonra düşük olduğu bir dönemdir. Son olarak, luteal evrede ise hem progesteron hem de östrojen corpus luteum'dan salgılanır. Embriyo implantasyonu luteal fazın sonuna doğru gerçekleşir. Örneğin, farelerde bu aşamada, gebeliğin 4. gününde (gün 1 = vajinal tıkanma günü) östrojen bir preimplantasyon dalgalanması eşliğinde yeni oluşmuş corpora luteumun gelişmiş bir salgısı nedeniyle, progesteronun seviyesi kademeli olarak artar. Embriyo implantasyonu 4. gün gece yarısında gerçekleşir (58; 59). Preimplantasyonda yumurtalık steroid profillerine dayanarak, eksojen östrojen ve progesteron ile priming, yumurtalıkları alınmış farelerin rahmine reseptif bir durum verebilir (60; 61). Bu hormonlar farelerde ve sıçanlarda implantasyon için uterusun hazırlanmasına yön verebilir (62; 63; 64). Embriyo implantasyonu öncesi progesteron ve luteal fazdaki östrojen dalgalanmasının rolü hala tartışılırken, progesteronun neredeyse tüm implantasyonda gerekli olduğu düşünülmektedir (65; 66; 67, 68).

Başlarda progesteronun tek başına implantasyona aracılık ettiği düşünülmüştür. Bununla birlikte, normal progesteron salgılanmasıyla farelerin ve sıçanların implantasyonunun afakültatif geciktirilmiş olması, implantasyonda yer

alan başka bir hormonun olabileceğini düşündürmektedir (69; 70; 71; 72; 73). Bu şüphe, küçük bir östrojen dozunun enjekte edilmesiyle emziren sıçanlarda implantasyonun indüklenebildiğini kanıtlamaktadır (74). Daha sonraki çalışmalar, luteal östrojenin normal implantasyondaki rolüne dair doğrudan kanıt sağlar (75, 76). Ovariyektominin luteal faz östrojeninden önce veya sonra geciktirilmesinin, gecikmiş implantasyonun indüksiyonu için kritik olduğunu göstermiştir. Örneğin, yumurtalık östrojen sekresyonundan sonra ovariyektomi uygulandığında blastosist normal olarak implante edilirken, östrojen sekresyonundan önce ovariyektomi gerçekleşirse, embriyo implante edilemez ve uterus gecikmiş implantasyon durumuna girer. Progesteron takviyesi ile blastosist hareketsiz kalır, ancak eksojen östrojen tarafından implante edilmesine yol açabilir (77). Bu bulgular, preimplantasyon östrojen sekresyonunun, blastosist implantasyonu için progesteronla hazırlanmış bir reseptif uterus için çok önemli olduğunu göstermektedir. Çoğu türde östrojen salgılanması nedeniyle, proestöz östrojenin implantasyondan hemen sonraki yanıtı optimize ettiği düşünülmektedir (78).

Özellikle, implantasyonda yumurtalık östrojen gereksinimi türlere özeldir. Gine domuzu, rhesus maymunu, tavşan ve hamster gibi türlerde progesteron tek başına implantasyon için yeterlidir (79; 80; 81; 82; 83, 84). Bununla birlikte, bu türlerin implantasyonunda östrojenin katkısı tamamen dışlanamaz. Bu türdeki blastosistlerin, implantasyonu başlatmak için lokal olarak östrojen sentezleyebildiği ve salgılayabileceği bir hipotez önerilmiştir (85; 86). Bununla uyumlu olarak, hamster ve tavşanın blastosistinde östrojen sentezi için bir enzim olan aromataz bulunurken, böyle bir aromataz enzimi farelerde yoktur (87). İmplantasyon sırasında blastosist-uterus bağlantısının, insanlarda ovaryan östrojeni gerektirip gerektirmediği belirsizliğini korumaktadır.

Son yıllarda, genetik olarak tasarlanmış fare modelleri, embriyo implantasyonu sırasında progesteron ve östrojenin rollerini anlamak için değerli ipuçları sağlamıştır. Progesteronun fonksiyonu, PRA ve PRB (88) olmak üzere iki izoformu olan PR (Pgr geni tarafından kodlanan) reseptörü aracılığıyla gerçekleştirilir. Her iki izoform da uterusda eksprese edilir (89). Hem PRA hem de PRB eksik olan dişi fareler, yumurtalık ve uterus fonksiyonlarında birçok defekt ile kısır olup (90), bu fonksiyonlar PRB eksikliği olan kadınlarda normaldir (91). Bu da

esansiyel progesteronun rolü olduğunu gösterir. Uterin regüle edilmiş fonksiyonlara öncelikle PRA aracılık eder. Östrojen, öncelikli olarak nükleer östrojen reseptörleri aracılığıyla uterusu işlev görür (92). ER ayrıca ER α (Esr1 geni tarafından kodlanmış) ve ER β (Esr2 geni tarafından kodlanmış) olarak bilinen iki izoforma sahiptir (93). ER'ler için knockout fareleri kullanan önceki çalışmalar, uterus biyolojisindeki farklı fonksiyonlarını göstermiştir (94). ER α knockout fareler implantasyonu destekleyemediğinden, ER α erken gebelik sırasında östrojen sinyallemesinin en önemli araçlarıdır (95). ER β knockout farelerde normal implantasyon ile ilgili sorun olmamasına rağmen, artan kanıtlar, uterus biyolojisinde de önemli olduğunu göstermektedir (96). Örneğin, ER β endometrial endotelde eksprese edilir ve anjiyojenik ve vazomotor değişikliklerin düzenlenmesi yoluyla implantasyona katılabilir (97). Bununla uyumlu olarak, infertilitesi olan kadınlarda ER β ekspresyon düzeyi anlamlı olarak daha düşüktür (98). Buna ek olarak, ER β 'nin miyometriyum ve serviksteeki yüksek ekspresyonu nedeniyle insanlarda doğum başlangıcında güçlü bir oyuncu olduğuna inanılmaktadır (99).

Blastosist tarafından implantasyon yetkinliğinin kazanılması, başarılı implantasyon için bir ön şarttır . Farelerde, blastosist zona pellucidadan kaçır ve gebeliğin 4.5. gününde uterus epiteline bağlanır (100). Bununla birlikte, bu süreç gecikmeli implantasyonda kesintiye uğrar. Emziren farelerde ve sıçanlarda fakültatif gecikme dışında (101), implantasyon gecikmesi, doğal olarak, yaklaşık 100 memeli türünde, özellikle mustelidler ve keselilerdeki zorunlu gecikme olarak ortaya çıkar (102). Ancak hamster, kobay, tavşan ve domuz gibi bazı türlerde gecikmiş implantasyon meydana gelmez. Bu fenomenin insanlarda olup olmadığı belirsizdir. Gecikmiş implantasyon deneysel olarak farelerde ve sıçanlarda ovariyektomi ile preimplantasyon öncesi östrojen dalgalanmasından önce progesteronun enjeksiyonu ile sağlanabilir (103), bu da implantasyon çalışması için güçlü bir model sağlar.

Gecikmiş implantasyon sırasında blastosist, uterusu bağlanmayı başlatmak için metabolik olarak uykuda ve yetersizdir (104). Embriyolar blastosistlere dönüşmelerine ve zona dissolusyonuna uğramalarına rağmen, subnormal metabolik aktivitesi ile inaktif olma, düşük DNA sentezi ile hücre bölünmelerini azaltma belirtileri gösterirler (105). Hareketsiz blastokistlerde trofoblast hücrelerinin ultrastrüktürel gözlemleri birçok morfolojik yapı değişikliğini ortaya koymaktadır.

Örneğin, ribozomlar monozom haline gelir, endoplazmik retikulum daha az profillidir ve Golgi cihazı iyi gelişmemiştir (106). Blastosist, bu uyku halini uterus boşluğu içinde günler hatta haftalar boyunca koruyabilir (107). Ancak uygun şartlar altında, blastosist, tutunması ve invazyonu ile gelişimini sürdürmek için hızla aktive edilir. Aktif blastosist aynı zamanda uykuda blastosisten farklı morfolojik değişiklikler gösterir. Örneğin, aktive edilmiş trofoblast hücrelerinde, sitoplazmada biriken glikojen granülleri ile daha mikrovilluslu ve daha düzensiz bir yüzey gözlenir (108). Kemirgen gecikmeli implantasyon modeli ve blastosist transfer teknikleri kullanılarak, uykuda blastosistlerin alıcı uterusu implant yapamadıkları gösterilmiş ve blastosistin etkinlik durumunun farelerde implantasyonun “penceresini” belirlediği düşüncesine dikkat çekilmiştir (109). Bununla birlikte, blastosistlerin uzun bir süre boyunca uykuya daldıkları ve hayatta kaldıkları ya da implantasyon yetkinliğini elde etmek için nasıl yeniden aktif hale geldikleri hala büyük ölçüde bilinmemektedir.

İmplantasyon iki yönlü bir etkileşim olduğundan, embriyoları hedefleyen uterus sekresyonlarında büyümeyi engelleyen bir madde olduğu speküle edilmiştir (110). Bu hipotezin desteklenmesinde geciktirilmiş bir blastosist, implantasyonda bir farenin uterus kavitesinde yer değiştirirse, gecikmiş haline döner (111). Birkaç in vitro deney bu görüşü desteklemektedir. Örneğin, glikoz ve / veya arginin ve leösinin ortamdaki tüketilmesi blastosist büyümesini engeller (112). Bu gözlemler, blastosist aktivasyonu hakkındaki ipuçları için değerli olsa da, altta yatan moleküler ve hücre mekanizmaları hala bilinmemektedir.

cDNA mikroarray teknolojisinin ve genomik diziliş yaklaşımlarının ortaya çıkması, olası ve hareketsiz blastosistlerin arasındaki gen-gen ekspresyonu analizini mümkün kılmıştır (113). Hamatani ve arkadaşları, 229 genin, fizyolojik durumların moleküler olarak ayırt edilebildiğini düşündüren, uykuda ve aktive edilmiş blastosistler arasında farklı olarak ifade edildiğini bulmuşlardır. Değiştirilmiş genlerin başlıca fonksiyonel kategorileri, hücre döngüsü, hücre sinyali ve enerji metabolik yollarını içerir.

Plasental memelilerde uterus, ortam blastosist implantasyonu için uygun olduğunda, spatiotemporal olarak sınırlanmış bir “pencere” sırasında blastosist

implantasyonuna karşı duyarlanır (114). Farelerde, bu süre gebeliğin 4. günü ile sınırlıdır. Rahim bu dönemden önce implantasyonu başlatamaz (1–3. Günler). Alıcı durumdan hemen sonra uterus spontan bir refrakter faza (5. gün) girer, burada uterus ortamı blastosist sağkalımı için uygun değildir (115). Benzer şekilde, insanlarda reseptivite periyodu düzenli bir adet döngüsünün 20 ila 24. günleri arasında gerçekleşir (yumurtlama sonrası LH artışından 6 ila 10 gün sonra) (116). Uterin reseptivitenin anahtarı, blastosist büyümesini, bağlanmayı ve sonraki implantasyon olaylarını tahrik eden dinamik ve hassas kontrollü moleküler ve hücrel olaylardır. Bu dinamik süreç, uterus alıcılığını belirtmek için yumurtalık steroidleri ile birlikte çalışan sitokinler, homeobox transkripsiyon faktörleri ve gelişimsel genleri içeren çeşitli genler mevcuttur.

Yumurtalık steroidleri progesteron ve östrojen, uterus reseptivitesini yönlendiren başlıca hormonlardır. Progesteron ve östrojenin senkronize üretimi, blastokistin implantasyon sürecini başlatmasını sağlayan uterusun yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine aracılık eder. Farelerde hamileliğin 1. gününde, preovulatar ovaryan östrojenin etkisi altında, uterus epitel hücreleri, 2. güne kadar bir ölçüde devam eden yaygın proliferasyona maruz kalırlar. Yeni oluşturulmuş corpora luteumdan salgılanan progesteron seviyeleri, 3. günden itibaren stromal hücre proliferasyonunu başlatır. (117). 4. gününde, uterusun pre-reseptif evreye girdiği zaman, uterusun alıcıya ulaşması için az miktarda östrojen üretimi çok önemlidir. Uterus epitel hücreleri yavaş yavaş polaritelerini kaybeder ve bu arada epitelyal hücrelerin plazma membranları blastosist yerleşimi yerinde düzleşir (118).

Bir dereceye kadar, uterus reseptivite penceresi esnektir ve farklı hormonal ortamlarda modifiye edilebilir. Farelerde blastosist, uterus reseptivitesinin normal “penceresi” dışında implantasyonu başlatabilir. Örneğin, blastokistler yalancı gebeliğin 5. gününe transfer edildiğinde alıcı olmayan uterusu bağlanma reaksiyonunu başlatabilir, ancak normal blastosistlerin yalancı gebeliğin 6. gününde uterusu transfer edildiğinde implantasyon gerçekleşmeyecektir (119). Ekzojen progesteron takviyesi, implantasyon penceresini 6. günde sürekli LIF ekspresyonu ile uzatılabilir. Bununla birlikte, bu ertelenmiş embriyo implantasyonu, farelerde doğumdan önce embriyonik ölümlere yol açar ve genellikle insanlarda erken gebelik kayıpları ile ilişkilidir (120).

Östrojen, implantasyon için uterus reseptif penceresinin süresini belirleyen kritik bir belirleyicidir. Gecikmiş implantasyon modelinde farklı dozlarda östrojenlerin kullanılmasıyla, östrojen uterusun reseptif penceresini düşük bir eşikte uzatır, fizyolojik olarak daha yüksek seviyeler implantasyon penceresini hızlı bir şekilde kapatır ve uterusu refrakter bir duruma dönüştürür (121). Her ne kadar blastosist bağlanma reaksiyonunun insanda östrojen gerektirip gerektirmediği hâlâ belirsiz olsada, IVF'de klomifen sitrat ile over stimülasyonundan kaynaklanan yüksek östrojen seviyelerine maruz kalma, implantasyon başarısızlığına yol açtığı düşünülmektedir(122). IVF sikluslarındaki bu azalmış implantasyon oranı, yüksek östrojen seviyelerine maruz kaldığında endometriyum ve blastosist arasındaki asenkronizasyona bağlı olabilir (123).

Çalışılan sitokinlerden, LIF implantasyon için uygundur . LIF reseptörü, gp130'u diğer sitokin reseptörleri ile ortak bir sinyal transdüksiyonu ortağı olarak paylaşır. LIF ekspresyonu başlangıçta uterus bezlerinde ve daha sonra bağlanma reaksiyonu sırasında blastosisti çevreleyen stromal hücrelerde 4. günde bifaziktir (124). Bu ekspresyon paterni, LIF'nin uterus preparasyonunda ve daha sonra ek reaksiyonunda çift rol oynadığını gösterir. Yaşam boyu kusurlu dişi fareler implantasyon bozukluğu sergiler ve LIF ile bu eksiklik giderilebilir (125). Üstelik, uterusdaki LIF etkilerinin farmakolojik olarak bloke edilmesi, uterusun sinyal molekülü ve transkripsiyon aktivatörünün (STAT) 3 fosforilasyonunu önemli ölçüde azaltır ve implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanır (126). İmplantasyonda LIF sinyalizasyonunun önemi, gp130 ve STAT3'ün inaktivasyonunun implantasyon başarısızlığına neden olduğu gözlemleriyle daha da kanıtlanmıştır (127). İnsanlarda LIF, sekretuar endometriyumun glandüler epitelyumunda yüksek düzeylerde eksprese edilir, luminal ve glandüler epitelde orta sekretuar fazda belirgin bir artış görülür (128). Kadınlarda blastosist implantasyonu için optimal bir LIF seviyesinin gerekli olduğu bildirilmiştir (129). Dahası, klinik kanıtlar, LIF eksikliğinin, kadınlarda açıklanamayan tekrarlayan düşük ve infertilite ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Dey 130). Genel olarak, embriyo implantasyonunun kritik bir belirleyicisi olan LIF'nin işlevini anlamamızda önemli kazanımlar elde edilmiştir.

Embriyo implantasyonu, luminal ve glandüler epitelyal ve stromal hücreler de dahil olmak üzere blastosist trofektoderm ve çeşitli endometriyal hücre tipleri arasında bir dizi fiziksel ve fizyolojik etkileşimi içeren dinamik bir gelişimsel olaydır (131). İmplantasyon üç aşamadan geçer: apozisyon, adezyon/attachment ve penetrasyon. Giriş aşamasında, trofektoderm luminal epitelyum ile yakınlaşır. Uterin lümeninin kapatılmasıyla trofektoderm ve lümen epitelyumu arasına sıkı sıkıya bağlanma başlatılır. Farelerde, bağlanma reaksiyonu, gece yarısında hamileliğin 4. gününde, lokalize bir endometriyal vasküler geçirgenlik artışı ile meydana gelir. Makromoleküler mavi boyanın intravenöz enjeksiyonu, bu vasküler permeabiliteye bağlı olarak uterus kornuası boyunca blastosist implantasyon bölgelerini açıkça işaretleyecektir (132). Tutunma reaksiyonundan sonra, implante edilen embriyo, lümen epitelyumu içinden stromal yatağa nüfuz etmeye başlar. Bu nedenle, implantasyon, yumurtalık steroidlerinin birincil etkisi altında blastosist ve uterus arasındaki hücre-hücre etkileşimlerinin bir sonucudur.

Preimplantasyon dönemi boyunca uterus lümen sıvısı, preimplantasyon embriyolarının uterus kornusuna taşınması için bir ortam sağlar ve gebeliğin 4. gününde uterus lümen sıvısının emilmesi, uterus kavitesi içinde luminal kapanma ve blastosist apozisyonunu kolaylaştırır. Farelerde ve sıçanlarda, ovaryan östrojen sıvı salgılanmasını uyarırken, progesteron bağlanma reaksiyonundan önce sıvı emilimine neden olur. Kistik fibroziste transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR), cAMP ile aktive edilmiş bir Cl-kanalı ve epitelyal Na⁺ kanalı (ENaC) arasındaki etkileşim, uterus sıvı sekresyonunu ve reabsorpsiyonu düzenleyen ana mekanizma olarak bilinmektedir(133). Önceki çalışmalar, ENaC'nin öncelikle luminal ve glandüler epitellerin apikal membranına lokalize olduğunu gösterirken, CFTR baskın olarak stromal hücrelerde eksprese edilir (134) . Östrojen CFTR ekspresyonunu indüklemekte, ancak uterus lümeninde sıvı birikimi ile sonuçlanan ENaC'yi baskılamakta, buna karşın progesteron, bu iki genin uterusu sıvı reabsorpsiyonu için düzenlenmesine ters etki etmektedir. CFTR ekspresyonu farelerde inflamasyon ile anormal şekilde upregüle edildiğinde anormal rahim sıvısı birikimi ve implantasyon başarısızlığı da gözlenmiştir (135).

İnvaze olan embriyolar, ENaC'yi aktive ettiği bilinen bir serin proteaz olan tripsini serbest bırakır (136). En yeni bir çalışma, fare uterusunda ENaC'nin aktivasyonunun,

PG üretimi ve salınımı gereksinimi nedeniyle implantasyon için kritik olduğunu göstermektedir. Memeli epitelinde sodyum transportunun önemli bir regülatörü olan serum glukokortikoid indüklenbilir kinaz-1 (SGK1) ile ilgili bir çalışma yapılmıştır (137). SGK1, direkt olarak ENaC'yi aktive ve ubiquitin ligazını inhibe ederek ENaC ekspresyonunu arttırarak işlev gösterir, nöral prekürsör hücresi, gelişimsel olarak downregüle edilmiş protein (NEDD) 4-2'yi ifade etmiştir (138). Farelerde, Sgk1 mRNA seviyeleri, endometriyal reseptivite penceresi sırasında luminal epitelyumda geçici olarak azalmaktadır (139). Aşırı eksprese eden Sgk1 vektörünün intraluminal verilmesi, ENaC α alt ünitesinin belirgin şekilde upregülasyonu ile normal implantasyonu ortadan kaldırmaktadır (140). Bu bağlamda SGK1, implantasyondan önce rahim sıvısı emilimine elverişli olan, ENaC'nin uygun ekspresyonunu ve aktivitesini modüle etmek için önemli bir enzim olarak işlev görür. Genel olarak, bu bulgular, telafi edici bir ifade profilinin ve uterus CFTR ve ENaC'nin dengeli aktivitesinin, blastosist uygulamasının kolaylaştırılması için maksimum sıvı emilimi ve uterus lümeninin kapatılabildiği bir moleküler mekanizma sağladığını gösteren yeni bir kanıt çizgisi ekler.

Adezyon moleküllerinin, implantasyon sırasında blastosist apozisyonu ve tutunmasında kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Önceki çalışmalar, integrinler, trofinin-tastin kompleksi, selektinler ve kaderinler gibi bir grup adezyon molekülünün bu süreçlere dahil olduğunu göstermiştir (141).

İntegrinler çok yönlüdür ve fibronektin, osteopontin, vitronektin ve diğerleri dahil olmak üzere hücre dışı ligandlarda arginin-glisin aspartik asit (RGD) sekanslarını bağlama yeteneğine sahiptir (142). İntegrinleri içeren bir tutturma mekanizması, embriyonik ve uterus hücre yüzeylerindeki reseptörler arasındaki açıklık için iki işlevli bir köprüleme ligandını gerektirebilir (143). Pek çok integrin, $\alpha v \beta 3$, $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha v \beta 5$ ve $\alpha v \beta 6$ dahil olmak üzere implantasyon sırasında önemli rollere sahip olduğu öne sürülmüştür (144). Bu integrinler arasında, integrin $\beta 3$ alt birimi en yaygın olarak hem insanlarda hem de farelerde incelenmiştir. İnsan endometriyumunda, integrin $\beta 3$ alt birimi, orta sekretuar fazda luminal ve glandüler epitelyumda yüksek oranda eksprese edilir ve endometriyal reseptivitede potansiyel fonksiyonunu gösterir. Gerçekten de, integrin $\alpha v \beta 3$ 'ün anormal ekspresyonunun infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir (145). Peptitler, trofektoderm-luminal epitelyum etkileşimine aracılık ettiği düşünülmektedir (146). Integrin sinyallemesinin blastosist implantasyonu sırasında fosfoinositid sinyallemesini ve hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu başlatmak için fosfolipaz C-y'nin aktivasyonu yoluyla ekstraselüler matrikslere trofoblast yapışmasını modüle ettiğini gösteren kanıtlar vardır (147). “Dıştan içe” integrin sinyalleme, hücre dışı matris kompozisyonuna bağlı olarak uygun “içten dışa” integrin mobilizasyonu seçilebilir. Son kanıtlar, trofektodermdeki integrin $\beta 3$ ekspresyonunun, implantasyon için reaktivasyon sırasında tersine dönme ile blastokist durgunluğu sırasında microRNA letal-7a (let-7a) tarafından bastırılabilirliğini göstermektedir (148).

Trofinin ve tastin, doğrudan bağlayan bir ara ürün proteiniyle hücre yapıştırma kompleksi oluşturur . Önceki çalışmalar trofinin-byistin tastin kompleksinin, kendi apikal hücre zarlarında trofoblastlar ve endometriyal epitel hücreleri arasında benzersiz bir homofilik adhezyon mekanizmasına aracılık ettiğini göstermiştir (149). Bir intrinsik zar proteini olan trofinin, embriyoların trofektoderm hücrelerinde ve periimplantasyon periyodu sırasında farelerde uterus epitelyal hücrelerinde eksprese edilir (150). İnsanlarda, trofinin ekspresyonu erken sekretuar fazda endometriyal epitelyumun apikal plazma membranları ile sınırlandırılmıştır.(151). İnsan olmayan bir primat modelinde, rhesus maymun blastokistinin trofektodermde trofinin kuvvetle eksprese edilir . Blastosist kaynaklı insan koryonik gonadotropin (hCG), embriyo uterin implantasyonu sırasında eşzamanlı gelişimleri için yöneten spatiotemporal mekanizmaların göstergesi olan trofinin endometriyal ekspresyonunu indükler (152). Byistin, periimplantasyon periyodu sırasında fare uterusunda lümen ve glandüler epitelyumda eksprese edilir ve kuluçkadaki blastosistlerinde tespit edilir (153). Bununla birlikte, implantasyon sırasında blastosisten ekspresyonu kaybolur, bu da blastosist aktivasyonu için yokluğunun uygun olduğunu düşündürmektedir. Gerçekten de trofinin homofilik bağlanmasını taklit eden trofinin bağlayıcı peptit olan GWRQ tarafından trofininin byistinden ayrıştırılması, insan embriyo implantasyonunda trofektoderm aktivasyonunu tetiklemek için ErbB4'ün aktivasyonuna izin verir (154). Aynı zamanda, trofininin homofilik ligasyonu, PKC-ty'nın tirozin fosforilasyonunu ve onun uterin epitelyal hücrelerinde nükleer translokasyonunu indükleyerek, trofoblast

invazyonu için elverişli olan apoptoza yol açmaktadır (155). Bu bulgular, trofikinin, dinamik ligasyonu ve etkileşimli proteinler bystin ve tastin yoluyla ayrışması yoluyla, implantasyon sırasında blastosistin uterus epitelyal hücrelerine bağlanmasına aracılık ettiğini ve hem maternal hem de embriyonik hücrelerde temel fizyolojik değişiklikleri başlattığını göstermektedir.

Karbonhidrat bağlayıcı bir protein olan L-selektin, insan blastokistlerinin uterus epitelyumuna ilk yapışmasına aracılık eden bir sistemin parçası olarak önerilmiştir (156). L-selektin daha önce sadece hematopoetik hücrelerde lenfositler ve yüksek endotelial venüller arasındaki adezyondaki temel rolü nedeniyle eksprese olduğu düşünülmüştür. Şaşırtıcı bir şekilde, insan trofoblastları da fonksiyonel L-selektin eksprese ederken, ligand oligosakkaritleri esas olarak pinopodlarda, blastosist adezyonunun başladığı endometrial epitelyumun apikal hücresele uzantılarında saptanmaktadır (157). Bu bulgular insan blastosistlerinde L-selektin ve endometriyal epitel üzerindeki oligosakkarit ligandları arasındaki potansiyel etkileşimin insan implantasyonunda başlangıç adımı olduğunu göstermektedir. L-selektin'i spesifik antikolarla bloke etmek, trofoblastların endometriyal epitele yapışmasını engeller. Ayrıca, L-selektin ligandlarının endometriyal ekspresyonu, doğal döngülerdeki fertil ve infertil kadınlar arasında önemli ölçüde farklıdır (158). L-selektin ligantlarının ekspresyonu, başarılı implantasyon şansını azaltır. (159). Salgı endometriyumundaki L-selektin ligandlarının yüksek ekspresyonu, insanlarda embriyo implantasyonu için güçlü endometriyal reseptivite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir(160). Bununla birlikte, fukozillenmiş oligosakkaridler L-selektin ligandının sentezinden sorumlu olan fukosiltransferazlardan yoksun olan gen knockout fareleri fertil olup, L-selektin de dahil olmak üzere fukozile karbonhidratların farelerde implantasyon için gözardı edilebildiğini, ancak uterus epitel hücrelerinde eksprese olduklarını düşündürmektedir (161).

Ca²⁺ 'ya bağlı bir transmembran adezyon molekülü olan e-kaderin, sitoplazmik kateninle etkileşimi aracılığıyla hücre iskeletinde hücre içi adezyon ve dinamik değişikliklere aracılık eder (162). E-kaderin kritik bir faktördür, çünkü E-kadherin geninden yoksun embriyolar trofektoderimde adezyon kavşaklarını kuramaz ve periimplantasyon döneminde ölür (163). Maternal tarafta, E-kaderin implantasyondan önce luminal epitelde yüksek oranda eksprese edilir, fakat

blastokist invazyonu stromaya geçmeden önce geçici olarak downregüle edilir, bu da embriyo implantasyonu sırasında epitelyal hücreler arasındaki adhezyon kavitelelerinin yeniden düzenlenmesinin kritik bir olay olduğunu gösterir (164). Fare uterus epitelindeki hücre-hücre kavşaklarının E-kaderin downregülasyonu yoluyla gevşemesinin blastosist bağlanmasının ön şartı olduğuna dair kanıtlar vardır (165). Gerçekten de, E-kaderin, implantasyon başarısızlığını gösteren rahim spesifik Msx1 / Msx2 ablated farelerin luminal epitelinde sürekli olarak eksprese edilmektedir (166). Benzer şekilde, yakın zamandaki bir gözlem, endometriozisli kadınlarda orta kademe endometriyumun endometriyal epitel hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını göstermektedir (167). E-cadherinin uterus spesifik olarak silinmesi, kusurlu implantasyon ve desidualizasyondan kaynaklanan kadın infertilitesine neden olur. Eksik olan fareler, adezyon bağlantılarını ve uterus epiteliumunda sıkı bağlantıları kaybederek, embriyo bağlanmasını ve invazyonu destekleyemeyen düzensiz bir hücresel yapı oluştururlar (168). Bu bulgular, toplu olarak, E-kaderin, implantasyon için embriyonik ve rahim hazırlığı sırasında kritik rol oynadığını göstermektedir.

Uterin dokusu üç ana katmandan oluşur: bir dış kas tabakası, iç lümen epiteli ve aralarındaki stromal yatak (169). Östrojen ve progesteronun senkronizasyonu, epitel ve stromada morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin eşlik ettiği uterusu reseptif duruma yönlendirir. Bu iki hormonun, iki ana endometriyal hücre tipi üzerindeki farklı etkilerini ve uterus alıcılığı için gerekli olan stromal epitelyal etkileşimlerin moleküler temelini nasıl uyguladıklarının anlaşılmasına yoğun ilgi gösterilmiştir (170).

ER, erişkin uterus epitelial ve stromal hücrelerinde eksprese edilir ve başlangıçta östrojenin, ilgili bölmelerde doğrudan ER üzerinden işlevini sürdürdüğü varsayılmıştır. Östrojenin, ER'yi eksprese etmeyen neonatal fare uterus epiteliumunun proliferasyonunu stimüle ettiği bulgusu, östrojenin indirekt epitelyal mitojenezi dolaylı olarak uyurabileceğini göstermektedir (171). Yetişkin ER α eksikliği olan farelerin ve neonatal ER bozulmamış tip farelerin uterusu kullanılarak stroma-epitelium ayırma / rekombinasyon sistemlerinin (172) kullanılması, daha önceki bir çalışmada, östrojenin neden olduğu epitelyal proliferasyonun stromal ER'nin aracılık ettiği bir parakrin olayı olduğunu, epitelyal ER ile ilişkili olmadığını

göstermiştir (173). Dokuya özgü knockout tekniği, östrojene karşı rahim duyarlılığını sistematik olarak incelemek için mükemmel bir yaklaşım sağlar. Wnt7a-Cre ve ER-loxp fare modelleri kullanılarak uterus epitelindeki ER α 'nın seçici olarak silinmesi (UtEpieaERKO), stromal ERa'nın östrojen kaynaklı epitelyal proliferasyondan sorumlu olduğunu göstermektedir (174). Bununla birlikte, hemen ortaya çıkan bir soru, stromal ER α yoluyla östrojen etkisinin epitelyal proliferasyonu nasıl uyardığıdır.

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) 1, EGF veya TGF α gibi polipeptit büyüme faktörlerinin parakrin etkileri, östrojenlere karşı uterus tepkilerinin bütünleyici bileşenleri olduğuna inanılmaktadır. Uterin stromasında östrojen tarafından indüklenen ve aktive edilen bir anahtar büyüme faktörü olan IGF1, luminal epitelyumda IGF1 reseptör sinyalleme yoluyla östrojen kaynaklı uterus epitelyal DNA sentezi için gereklidir (175). Önceki bir çalışma, uterus epitelyal hücrelerinin östrojen ile uyarılan proliferasyonunun IGF1 knockout farelerinde olumsuz etkilendiğini göstermiş ve bu da, IGF1'in endometriyumda östrojen etkisine aracılık etmedeki rolünü göstermektedir (176). Bu çalışmalar, altta yatan stromada sadece fonksiyonel ERa'yı gerektiren östrojen aracılı epitelyal proliferasyonun bir parakrin mekanizmasını desteklemektedir. Östrojen tedavisinden sonra, PR epitelyumda dramatik olarak downregüle edilir ve wild tip ve UtEpieaERKO farelerinde stromada artmış olurken, ER antagonistisi ICI 182,780 (ICI) bu etkiyi her iki genotipte de inhibe eder. Uterus epitelyal PR'nin östrojen kaynaklı down regülasyonu için stromal ER α 'nın da gerekli olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, östrojenin, stromal ER α üzerinde, IGF1 gibi parakrin faktörlerinin üretilmesi yoluyla uterus epitelyumunun proliferasyonunu stimüle etmesini etkilediğini göstermektedir.

Uterin epitelyal ER α , östrojen kaynaklı epitelyal proliferasyonu için ikincil olmasına rağmen, tam biyolojik ve biyokimyasal yanıtlar için gereklidir. Çünkü uterus epitelyal ERa'nın selektif silinmesi, başlangıç proliferasyonundan sonra östrojen ve epitelyal apoptozise yanıt olarak, uzamış uterus ağırlık artışına yol açar (177). Laktoferrin (LF) ve Mucin-1 gibi sekretuar ürünlerle gösterildiği gibi uterus epitelinin farklılaşması hem stroma hem de epitelyumda fonksiyonel ERa'yı

gerektirir ve ER α artı sentez yolu ile bir parakrin / otokrin etkisi salgılanan faktörlerin direkt etkileri olabilir. (178). Bu gözlemler, uterus epitelinin farklılaşmasının hem epitel hem de stromada fonksiyonel ER gerektirdiğini düşündürmektedir.

PR-null uteri, rahimde PR'nin önemli bir modülatör etkisine atfedilen, uzun östrojen tedavisine maruz kalan yumurtalıkları alınmış farelere benzer bir fenotipik özellik gösterir (179). PR-null ve wild tip farelerden uterin dokuları kullanarak rekombinasyon deneyleri, stromal PR'nin, estrojenin endometriyal epitelyum üzerindeki proliferatif etkisini hafifletmek için gerekli olduğunu göstermektedir. Son yıllarda PR ile progesteron aktivitesine aracılık eden çok sayıda gen tespit edilmiştir. İmmünofilin FK506 bağlayıcı protein-4 (FKbp52), uygun uterin PR fonksiyonu için gerekli olan bir eş-şaperon uterus stromasında PR ile örtüşen bir ifadeye sahiptir (180). Fkbp52- / fareler, epitelyumda abartılı bir östrojenik etki ile implantasyon başarısızlığı gösterirler. Histolojik ve hücresele düzeyde Fkbp52 - / - uteri, gebeliğin 4. gününde anormal epitelyal proliferasyonu ve daha düşük stromal proliferasyonu sergiler ve progesteron direnci fenomenine işaret eder. Ayrıca, ER aktivitesi çoğunlukla etkilenmez ve Fkbp52 null kadınlarda yüksek dozda progesteron tedavisi ile implantasyon defekti kurtarılabilir (181).

Nükleer reseptör süperfamilyasının bir üyesi olan tavuk ovalbumin upstream promoter transkripsiyon faktörü II (NR2F2 olarak da bilinen Coup-TFII), uterus stromasında yüksek oranda eksprese edilir ve ekspresyonu progesteron ile kontrol edilir. İHH-PTCH1 epitelyumdan stromaya sinyal verir (182). Ek olarak, Coup-TFII geninin uterus koşullu knockout edilmesi implantasyon ve desidualizasyon başarısızlığı ve artmış epitelyal östrojen reseptör aktivitesi ile sonuçlanır (183). Bu bulgular stromal Coup-TFII'nin implantasyon ve desidualizasyon sırasında gerekli bir PR aracı olduğunu göstermektedir.

Temel heliks-loop-helix transkripsiyon faktörü, kalp ve nöral krest türevleri, transkript 2 (Hand2) eksprese eder. Bu durum fare uterusunda progesteron-yanıtlı transkripsiyonun mikrodizi gen profillemesi analizi ile açıklanır. Progesteron, uterus stromasında Hand2 ekspresyonunu indükler. Uterus hücrelerinde Hand2'nin seçici ablasyonu, sürekli fibroblast büyüme faktörü (FGF) ekspresyonunu ve preimplantasyon östrojen kaynaklı epitelyal proliferasyonun uyarılmasındaki

aktivitelerini indükleyerek farelerde implantasyon başarısızlığına yol açmaktadır (184). Bu bulgu, Hand2'nin, implantasyon için uterus reseptivitesini teşvik eden steroid sinyallemeyle başlatılan uterus stromal epitelyal iletişimin kritik bir regülatörü olduğunu gösterir.

Stromal PR'nin, progesteron aktivitesini, epitelyumun östrojene proliferatif tepkisini karşılaması için aracılık ettiği kavramına rağmen, uterus biyolojisinde epitelyal PR'nin spesifik rolleri büyük ölçüde göz ardı edilmiştir. Uterus epitelyal PR ablasyonu için Wnt7a-Cre / PRloxP fare modellerini kullanan yeni bir çalışma, epitelyal PR'nin, epiteldeki progesteron hedef genlerinin transkripsiyonunu doğrudan regüle ederek, epitelyal PR'nin zorunlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca, epitelyal PR'nin kaybı, bozulmuş desidualizasyon ve kontrolsüz östrojen kaynaklı epitelyal hücre proliferasyonu nedeniyle tam bir gebelik yetmezliği ile sonuçlanır (185), epitelin normal stromal-desidual transformasyon için gerekli olduğunu vurgular. Bu bulgu, epitelyal PR'nin stromal-epiteliyal etkileşimin temel bir düzenleyicisi olduğunu açıkça göstermektedir. Sonuç olarak, progesteron, epitelyumun proliferatif yanıtını östrojene karşı antagonize ederken, stromal proliferasyonu indükleyen epitelyal ve stromal PR'leri etkilemektedir.

Kadın üreme yolunun ilk gelişimi, gastrulasyondan hemen sonra embriyojenez sırasında ortaya çıkar (186). Laboratuvar kemirgenlerinde, evcil hayvanlarda ve insanlarda, doğumda uterus tam olarak gelişmemiş veya diferansiye olmamıştır; Bu nedenle, postnatal uterus morfojenezi, erişkin hayatta normal rahim fonksiyonları için kritik bir olaydır. Uterin bezlerinin, blastosist sağkalımı ve implantasyonunun yanı sıra gebeliğin kurulması ve bakımı için gerekli olan uterus sekresyonlarının başlıca kaynağı olduğu düşünülmektedir (187). Uterin model kullanılarak, uterus bezinin ve hamileliğin erken dönemdeki salgılanmasının, konsepsiyon sağkalımı için gerekli olduğu gösterilmiştir (188). Moleküler ve genetik çalışmalar, büyüme faktörleri, sitokin faktörleri ve uterus bezleri tarafından üretilen potansiyel histotrofik faktörlerin endometriyal fonksiyonu düzenleyebildiğini göstermiştir.

Uterin adenogenezisi olarak bilinen luminal epitelden endometriyal bezlerin koordine gelişimi, postnatal uterus morfojenezi sırasında baskın bir olaydır. Adenogenez süreci, tomurcuklanma, penetrasyon ve dallanma olmak üzere üç tipik

adımı içerir. Luminal epitelyumdan elde edilen glandüler epitelyum farklılaşır ve tomurcuklanır, ardından glandüler tüplerin uterus stromasına nüfuz etmesi ve daha sonra glandüler elementler endometriyal stroma boyunca dallanma ve kıvrılmalarını sağlar (189). Farelerde, postnatal 5.günde (PND) epitelyal invaginasyonlar veya salgı tomurcukları ortaya çıkar, PND 7'de yeni ortaya çıkan endometriyal bezler bulunur ve luminal epitelyumdan endometrial stromaya uzanan kompleks bezler, PND 12. günde oluşturulur (190). Buna karşılık, insanlarda endometrial bez gelişimi anne karnındaki fetal gelişim sırasında başlar, doğumdan 6 yaşına kadar devam eder ve ergenlik döneminde tamamen gelişir (191).

Uterus bezleri tarafından salgılanan ürünlerden, LIF en önemli moleküllerden biridir. Membranla ilişkili LIFR ve gp130'un, LIF sinyalleşmesi için gerekli olduğu iyi belgelenmiştir (192). Farelerde, LIFR'nin ekspresyonu, preimplantasyon periyodu sırasında luminal epitelyum ile sınırlıdır ve implantasyon meydana geldiğinde 5. günde oldukça yoğun kalmaktadır . Buna karşılık gp130, 4. günde gland ve stromada eksprese edilir, ancak ekspresyon, 5. günde, LIFR'ye benzer olarak luminal epitelyumdan indüklenir (193). Bağlanma yerinde luminal epitelyumdaki LIFR ve gp130'un bu örtüşen ifade modeli, uterus epitelyal hücreleri üzerinde etkili olan glandüler LIF'nin parakrin yapısı için sağlam kanıtlar sağlar (194). Lif - / - farelerde lüminal epitelde gp130 aktivasyonunun başarısızlığı, LIF-güdümlü glandüler-epitelyal etkileşimin normal implantasyon için gerekli olduğu fikrini güçlendirir. Üstelik, Msx1 ekspresyonu periimplantasyon periyodu sırasında Lif null farelerinde epitelyumda devam ettiği için, Glandüler Liyom, uterus lümen epitelindeki Msx1 ekspresyonunun aşağı regülasyonu için esastır (195). Karşılık gelen şekilde, glandüler epitelyumdaki Lif ekspresyonu, aynı zamanda, Lif ve Msx1 genleri arasında düzenleyici bir döngü olduğunu akla getiren uterus Msx1 geni kaybıyla da azalır. Bununla birlikte, Msx1 delesyonundan kaynaklanan implantasyon başarısızlığı, LIF'nin uygulanmasıyla kurtarılamaz, bu da aynı düzenlemenin aynı mekanizma tarafından aracılık edilmediğine işaret eder (196). Msx1 ve LIF arasındaki dikkate değer pozitif-negatif geri bildirim döngüsü, bir dereceye kadar implantasyon sırasında glandüler-epitelyal etkileşimlerin karmaşıklığını yansıtmaktadır.

Uterus bezleri stromal yatak içine gömüldüğünden, glandüler kaynaklı sinyalleme parakrin tarzında stromal fonksiyonu etkileyebileceği gibi bunun tersi de düşünülebilir.

Forkhead box A2 (Foxa2) (Foxa2), özellikle uterus glandüler epitelyumda eksprese edilir (197). Farelerde bu genin uterin spesifik ablasyonu, embriyo invazyonu ve desidualizasyonu destekleyemeyen defektif uterus bezi oluşumu ve disfonksiyonel uterin stroma ile sonuçlanır. Özellikle, Foxa2 eksikliğinde uterusda LIF ekspresyonu belirgin bir şekilde azalırken, rekombinant LIF'nin uygulanması, null dişilerdeki desidualizasyonu kısmen geri yükleyebilir (198), Foxa2'nin normal glandüler LIF ekspresyonu için gerekli olabileceği düşünülmektedir. Wnt7a'yı sistematik olarak eksik olan fareler, wild tipteki basit kolon yapısının tersine, bezlerden yoksun bir sığ stroma tabakası ile çevrelenmiş tabakalı bir lümen epiteline sahiptir (199). Doğumdan sonra Wnt7a'nın koşullu uterin ablasyonu, endometrial bez gelişimini bozar ve blastokist implantasyonunun başarısız olmasına neden olur. Her iki Foxa2 ve LIF, periimplantasyon döneminde, Wnt7a - / - uterusda ciddi şekilde azalmaktadır (200). Bu bulgular toplu olarak implantasyon sırasında normal stromal fonksiyon için endometriyal bezden türetilen sinyallerin gerekliliğini vurgulamaktadır.

Tümör baskılayıcı p53, embriyonik implantasyon ve desidual gelişim için çok önemlidir. P53'ün kaybı uterin LIF düzeylerini düşürürken, ekzojen LIF'nin desteklenmesi p53- / dişilerde normal implantasyonu geri yükler (201). Kodon 72'de (arginin / prolin) tek bir nükleotid polimorfizmi (SNP) taşıyan insan p53 knock-in fareleri kullanılarak yapılan deneyler, arjinin alleli olan farelerin, implantasyon sırasında, prolin alleli olanlara göre daha yüksek uterin LIF seviyeleri sergilediğini ortaya koymaktadır (202), p53'ün Lif'in transkripsiyonunu düzenleyebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, p53'ün öncelikle periimplantasyon periyodu sırasında uterus stromal hücrelerinde eksprese olduğunu belirtmek gerekir (203), Lif başlangıçta uterus glandüler epitelyumdan eksprese edilir. Bu çalışmalar stroma sinyallerinin implantasyon sırasında rahim bezlerinin fizyolojik işlevini de etkileyebileceğini göstermektedir.

İmplantasyona cevaben, implantasyon embriyonunu çevreleyen stromal hücreler, poliploidi desidual hücrelere geniş bir proliferasyona ve daha sonra farklılaşmaya maruz kalır (204). Farklılaşan stromal hücreler, başlangıçta, 5. günde

öğleden sonra fetüsü kapatan bir avasküler primer desidual bölge (PDZ) oluşturur (205). PDZ'nin yanındaki stromal hücreler çoğalmaya devam eder ve daha sonra iyi vasküle olmuş ikincil desidual bölgeden (SDZ) farklılaşmaya devam eder. Gelişmekte olan embriyonun beslenmesinin sağlanması ve kontrolsüz trofoblast invazyonunu önleyen ve embriyonun maternal rejeksiyondan fonksiyonel plasentanın oluşumundan önce korunmasını sağlayan bir bariyer sağlamak için tamamen geliştirilmiş bir desiduanın önemli olduğuna inanılmaktadır (206).

Trofoblastlar desidua içerisinde derinleştikçe, vakuoller fertilizasyondan sonraki 13. güne kadar lakünaları oluşturacak şekilde birleşir ve kaynaşır. Lakunar boşluk nihayetinde intervillöz boşluk haline dönüşür.

Progenitör sitotrofoblast hücre plasentanın kök hücresidir. Bu hücreler, gebelik boyunca proliferere olup, sinüs tirofoblastları (dış hücre katman) veya ekstravillöz sitotrofoblastlar (iç hücre katman) haline gelebilen villöz sitotrofoblast oluşturmak üzere iki yol boyunca ayrılırlar. Syncytiotrophoblast, gazların, besin maddelerinin ve atık ürünlerin taşınması ve placentanın, fetus ve maternal sistemleri düzenleyen steroid hormonların sentezi gibi çeşitli işlevleri bulunan özel bir epitelidir. Ekstravillöz trofoblast (EVT), proliferatif ve invaziv bir bileşene sahiptir. Invaziv ve de proliferatif olmayan bir migratuar EVT de vardır. Bu hücreler, hücre adalarını, septumu, koriyonik plakayı ve koryon laeve'i oluştururlar.

Gebeliğin dört ila beşinci haftasında (adet kanalı) EVT, bazalde proliferatif trofoblast ve kolonun distal kısmında invaziv trofoblast bulunan kolonların içine yönelir. Decidua'yı istila eden invaziv EVT'ye interstisyel EVT, buna karşılık spiral arterleri istila eden ve yenilenen EVT'ye endovasküler EVT denir. Endovasküler invazyon (intramural veya intra-arteriyel) vasküler düz kas ve endotel hücrelerinin replasmanını veya yer değiştirmesini içerir ve dar spiral arterleri geniş uteroplental arterlere dönüştürür. Genişlemiş spiral arterler ile endometrial damarlar arasındaki anastomozlar maternal sinüzoidleri oluşturur ve bu da sonunda laküner sistemin düşük dirençli vasküler ağına kanı dağıtarak uteroplental dolaşımı sağlar. Invasion sırasında EVT, farklılaşma ve invazyon sürecindeki aşamayı ve rolünü belirleyen spesifik proteinleri eksprese eder. Bunlar, integrin hücre-hücre dışı matriks antijenleri, matriks metaloproteinazlar (MMPLer), transforme edici büyüme faktörü-β

(TGF- β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve VEGF reseptörleri gibi sinyal iletim proteinleri ve insülin benzeri büyüme faktörü 2'yi (IGF-2) içerir.

Desidua ve miyometrumu invazyonunda, EVT, hücre dışı matrikste, MMP proteaz ailesinin birkaç üyesini kullanır. Bu MMP'lerin aktiviteleri doku inhibitörleri (TIMP'ler) tarafından düzenlenir. Tüm MMP'lerin bir inhibitörü olarak TIMP-1 ve desidual hücrelerde ve EVT'lerde TIMP-2 bulunmuştur. Hepatosit büyüme faktörü (HGF), met reseptörü ve MMP-9'u indükleyerek trofoblast invazyonunu uyarır. Desidua, trofoblast invazyonunu modüle eden lokal etkili faktörlerin (sitokinler, proteaz inhibitörleri) salınması ile sınırlanamayan EVT invazyonunu önler.

Tromblastik kabuk uteroplasental damarların uçlarını gebeliğin erken dönemlerinde tıkar, öyleki gebeliğin çok erken döneminde plasental doku histiotrofik beslenme ile desteklenen düşük oksijenli bir ortamda gelişir [207,208]. Histiotrof, desidua'da endometrial bezler tarafından üretilen, maternal ve fetal dokular arasındaki boşlukta biriken hücre dışı bir materyaldir. Başlangıçta blastokistin trophoctodermi tarafından fagositize edilir, daha sonra plasentanın trofoblastı veya yolk sac kesesinin endodermi tarafından fagositize edilir. Bu ortamın gelişmekte olan embriyoyu oksijen kaynaklı serbest radikallerin teratogenezine karşı koruduğu düşünülmektedir [209]. Gestasyonun 10-14. haftalarında, trofoblastik tıkaçlar yerinden çıkar. Kan, gaz ve besin değişimini (diğer bir deyişle hemotrofik beslenme: maternal ve fetal dolaşım arasında kan yoluyla taşınan materyallerin değiş tokuşu) kolaylaştırmak için aralıklı alana akar. Artmış kan akışı, intraplasental oksijen konsantrasyonunu üç katına kadar artırır ve bu durum bazı gebeliklerde ciddi oksidatif stres sonucuyla düşük yapmaya kadar neden olabilir. (210)

Oksijen, aynı zamanda trofoblast invazyonunun önemli bir regülatörüdür. Transkripsiyon faktörü hipoksi-indüklenebilir faktör 1'in ve invazyonun bir inhibitörü olan TGF- β 3'ün ekspresyonu, oksijen gerginliğindeki değişikliklere paraleldir. Bu nedenle, ilk trimesterda, plasental yataktaki oksijen gerginliği düşük olduğunda ve trofoblast invazyonu ortaya çıktığında bu değerler yüksektir ve daha sonra, damar boşluğuna kan akışı sağlandığında ve oksijen gerginliği arttığında, gebeliğin 10 ila 12 haftasında düşer. In vitro, düşük oksijen basıncı (hipoksi), EVT yolağında trofoblast farklılaşmasını indükler [211].

Plasental gelişimin ikinci haftasında sitotrofoblastın çekirdeği olan bir sentezotrofoblast tabakası laküner boşluğa yerleşerek birincil mezenkimal villi oluşturur. Daha da geliştirildiğinde, embriyonik mesodermin iç çekirdeğini alırlar ve ikincil villi haline gelirler. 21üncü güne kadar embriyonik mezoderm, daha sonra göbek bağı ve embriyo içinde gelişen damarlara bağlanan kan damarlarına ayrılır ve böylece üçüncül villi oluşturur. Bazı villuslar maternal decidua'ya bağlanırken, diğerleri lacunada serbestçe yüzerler. Embriyonik dolaşım her zaman anne dokusundan, kan trofoblast tabakasıyla ayrılır.

Villous sitotrofoblast hücreleri birinci trimester civarında plasental villus çevresinde süreklilik arzeden bir katman (Langhans tabakası) oluşturur ve üst hücelere sürekli sinsityum olan sinsityotrofoblast hücreleri bağışlarlar. Geç gebelikte az sayıda villus sitotrofoblast hücresi bulunur. Term gebelikte, sinsityotrofoblastın yüzey alanı 12 ila 14 m² arasındadır. Sinsityotrofoblast turnoveri, villöz sitotrofoblast füzyon ve apoptozun oranları ile kontrol edilir. İnsan endojen defektif retrovirüs HERV-W türevi protein, sinsitin sinsityotrofoblastta yüksek seviyede eksprese edilir. Sitotrofoblast füzyonundan ve trofoblastın sinsitizasyonundan sorumludur [212]. Preeklampitik gebeliklerde azalmış sinsipin ekspresyonu görülmektedir [213]. Göreceli bir hipoksi veya maternal anemi ile komplike olan yüksek riskli gebeliklerde, sitotrofoblast hücrelerinin çoğalması ve artmış sinsityotrofoblast oluşumu, değişim için plasental yüzey alanının miktarını arttırır.

Plasentalın kan damarları tarafından işgal edilen oranı gebelik boyunca besinsel taşınmayı kolaylaştırmak için artar. İnsan plasental vasküler gelişiminin üç aşaması vaskülogenezisin başlangıç safhası, ardından dallanma ve daha sonra anjiyogenezistir. İki göbek arteri ve bir ven, ikincil damar ağlarına bölünür ve ana damar köküne girmeden önce üçüncül damara daha bölünür. Daha sonra bu kaplar rami chorii (ara villi) oluşturmak üzere iki ila beş kez bölünür ve daha da bölünerek ramuli chorii oluştururlar; bunlardan bazıları terminal villada, fonksiyonel değişim ünitesi biriminlerinde son bulur. Terminal villi her biri, gaz ve besin değişimi zamanını maksimize etmek, direnci ve yavaş kan akışını azaltmak için kılcal halkalar ve ara sıra sinüsoidler oluşturan 3-5 kılcal damar içerir. Oksijen, aynı zamanda villöz vaskülojenezi de düzenler [214].

Otonom innervasyonunun yokluğunda, plasenta ve göbek bağına vasküler reaktivitesi, hümmoral ve otokrin / parakrin faktörlerle olur. Göbek kordonu, koriyonik plaka damarları ve villöz damarların tümünde çeşitli mediatör ailelerine cevapta bölgesel farklılıklar görülür. Otonom innervasyonunun yokluğunda, plasenta ve göbek bağı vasküler reaktivite hümmoral ve otokrin / parakrin faktörlerin gereğidir. Çeşitli mediatör ailelerine tepki olarak bölgesel farklılıklar, göbek kordonu, koriyonik plaka damarları ve villöz damarların tümünde görülür. Önemli mediatörler, renin-anjiyotensin sistemi, endotelin, nitrik oksit, karbon monoksit, histamin, serotonin, prostaglandinler, natriüretik peptitler, paratiroid hormonu, adrenomedulin, ürokortin ve kortikotropin salan hormonu içerir. Diyabetle komplike gebelikler ve preeklampside bu faktörlerin birçoğunun üretim ve cevabi yanıt düzeylerinde değişikliğe dair çok sayıda kanıt vardır.

Plasental vaskülatürde tromboz gebelik kaybına neden olabilir. Trofoblast yüzeyi antikoagulan aktiviteye sahiptir. Sinsitizasyon sonrası, negatif yüklü fosfolipidler (PS) trofoblast yüzeyinde eksprese edilir ve bu potansiyel olarak koagülasyonun iç yolağını harekete geçirir. Ca^{2+} / fosfolipid bağımlı protein ailesinin bir üyesi olan Annexin A5, negatif yüklü fosfolipidlere bağlanarak plasentanın villöz trofoblastının trombozu ve homeostaz düzenleyicisi olarak trofoblast yüzeyi üzerinde anti-pıhtılaşma, koruyucu bariyer görevi görür[215]. Aksine antifosfolipid antikorlarının anneksin A5'in hareketlerine karşı olduğu ve kan pıhtılaşmasına yol açtığı ve bu nedenle normal trofoblast fonksiyonunu bozduğu düşünülmektedir [216]

Müsin 1 (MUC-1) bir glikoproteindir. Ekspresyonun zamanında inhibisyonu, uterus reseptivitesi için çok önemlidir (217) ve endometriyuma bakteri ve proteolitik saldırılara karşı yağlanma ve koruma sağladığı düşünülmektedir (218). Buna bağılı olarak yapılan çalışmalarda fertil bayanlardaki düzeyinin infertil bayanlara göre daha yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür. Ek olarak, MUC-1 blastosist implantasyon tutunma fazında önemli rol oynayan hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu gizler gibi görünmektedir . Bu nedenle, implantasyon penceresi dediğimiz süreçte nispeten düşük seviyelerde MUC-1'in implantasyon sırasında başarılı embriyo-endometriyal etkileşimler için hayati olduğu hipotezi mevcuttur . (219).

Plasental protein 14 (PP14) olarak da bilinen Glycodelin A (GdA), implantasyon ve erken gebelik sırasında en bol glikoproteindir (220). Bu glikoprotein sperm-zona etkileşimini inhibe ettiği görülmektedir (221) ve implantasyon için endometriyumun hazırlanmasında hayati bir rol oynadığı iddia edilmektedir. Ek olarak, GdA'nın düşük gebelik düzeyleri, alışılmış düşük, tekrarlayan düşük ve açıklanamayan infertilite ile ilişkili olduğu için, sağlıklı bir hamileliğin korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir (222).

İmplantasyon sırasında blastosist ve uterus arasındaki karşılıklı etkileşimler konusundaki anlayışımız, süreçte yer alan çok sayıdaki molekülün tanımlanması yoluyla ilerlemiştir. Bu keşifler buzdağının görünen yüzü olabilir. Son gelişmeler, implantasyon kalitesinin devam eden gebeliğin kalitesini belirlediği şeklinde yeni ortaya çıkan bir kavramı vurgulamaktadır

Embriyo implantasyonu, blastosist ve uterus arasındaki ilk fiziksel etkileşimi başlatır, böylece hem embriyo hem de uterusun tüm sonraki gelişimini programlayabilir. Bu erken aşamada herhangi bir hata erken gebelik kaybı veya çeşitli gebelik komplikasyonlarına önemli ölçüde sebep olacaktır (223). Embriyo transfer tekniğini kullanan önceki çalışmalar, implantasyon penceresinden sonra transfer edilen normal fare blastokistlerinin, implantasyon başarısızlığı ve fetal absorpsiyonda dramatik bir artış sergilediğini göstermektedir. (224). Bu görüş, genetik olarak tasarlanmış fare modellerinden elde edilen bulgular ile daha da desteklenmektedir.

Bu yeni kavramın klinik önemi yüksektir, çünkü erken gebelik kaybı riski insanlarda daha sonraki implantasyonlarda artar (225). Normal adet döngüsünde veya IVF tedavisi sırasında kadınlarda, normal pencerenin ötesinde implantasyon meydana gelirse, gebelik kaybı sıklıkla görülür ve bu da implantasyonun ertelenmesi ile okült gebelik başarısızlığının yüksek bir ilişkisini gösterir (226). Bununla birlikte, bu veriler ayrıca, birkaç güne kadar, örn. yumurtlamadan 6–8 gün sonra, insan implantasyonu olumsuz sonuçlara neden olmadan, anne ve embriyonik bileşenler arasındaki etkileşimlerin ne zaman ortaya çıkacağı konusundaki belirsizlikleri hesaba katmak üzere memeli gelişimine programlanması gereken önlemleri vurgular. Bu nedenle bağımsız olarak gelişmekte olan embriyo ve dişi üreme sistemini senkronize

etme zorunluluğu, yerel mikroçevrede önemli unsurlara karşı fizyolojik cevapların hızlı transkripsiyon sonrası düzenlemesi yoluyla kolaylaştırılmıştır (227).

İlginç bir şekilde, yakın zamanda yapılan bir çalışma, geçici adrenoseptör aktivasyonunun neden olduğu anormal implantasyonun normal zaman implantasyonunu koruduğunu, ancak embriyo gelişimini bozduğunu göstermiştir. Başarılı hamilelik için doğru zamanda ve doğru yerde implantasyon ön şarttır. Üstelik, IVF gebelikleri sıklıkla, ikiz bir sendromun yüksek riski ile komplike hale gelmekte olup, bunların bir nedeni, embriyonun implantasyonda kalabalık olması ve ikiz tarafından bir fetusun daha sonra rezorpsiyonu olabilir (228). Plasenta previa, plasentanın servikse yakın veya tamamen kaplandığı bir insan gebelik komplikasyondur (229), insan gebeliklerinin yaklaşık% 0.5'ini etkiler. . Ve bu komplikasyon için bir risk faktörü de anormal embriyo aralığı olabilir (230). Bu nedenle, fare modellerinde embriyo aralığının nasıl ortaya çıktığı sorusu cevapları, ikiz ikiz sendrom ve plasenta previa gibi insanlarda gebelik hastalığının etiolojisine ipuçları sağlayacaktır.

Embriyo-uterus etkileşimlerini yöneten moleküler sinyal yolları hakkında anlaşılan çoğu şey hayvan modelleri kullanılarak elde edilmiştir, çünkü insan deneyleri insan embriyoları ile ilgili etik değerlendirmeler ve kısıtlamalarla sınırlıdır (231). İnsanlar ve kemirgenler evrimsel olarak farklı olsalar da, embriyo implantasyonu açısından birçok fizyolojik benzerliği paylaşırlar. Örneğin blastosist kuluçkalama veya zona pellucida çözünmesi, her iki türde de, uterus lümenindeki blastosistin doğru temasını ve yönlendirilmesini sağlamak için oluşur (232). Blastosist yerleştirme sonrası, blastosist eki her iki türün de tanımlanmış bir implantasyon penceresi içinde gerçekleşen tam olarak düzenlenmiş bir embriyo rahim diyalogunu başlatır (233). Luminal epitelyumun altında yatan stroma hücreleri, hem insanlarda hem de farelerde embriyoların gelişimini korumak ve desteklemek için, trofoblast penetrasyonu üzerine geniş desidualizasyona maruz kalır, ancak stromal desidual dönüşüm, menstrüel siklusun orta sekretuar fazı sırasında kadınlarda bir embriyodan bağımsız olarak başlar. Bu benzerlikler, fare modelleri kullanılarak gerçekleştirilen implantasyon araştırmalarındaki muazzam ilerlemelerin değerini güçlendirmektedir.

Metotreksat, dihidrofolat redüktazı inhibe eden ve böylece tetrahidrofolatın sentezini kısıtlayan bir folik asit antagonistidir. Tetrahidrofolat, timidat sentezi ve de novo pürin sentezinde önemli bir kofaktör olduğu için, metotreksat DNA sentezini engeller ve antiproliferatif bir etkiye sahiptir.

Metotreksat, malignite, romatizmal bozukluklar ve sedef hastalığı ile intrauterin gebeliğin sonlandırılmasında kullanılmıştır. Son zamanlarda, metotreksat ektopik gebelik için standart bir tedavi haline gelmiştir. Ektopik gebelik olarak intrauterin gebeliğin yanlış teşhisi, devam eden gebeliğin 50 mg / m²'lik (maternal vücut yüzey alanı) metotreksatın doz seviyelerine maruz kalmasına neden olabilir. Deneysel hayvan çalışmaları farelerde, sıçanlarda, tavşanlarda ve maymunlarda embriyo ölümüyle metotreksat tedavisini ilişkilendirmiştir. Yapısal malformasyonlar en çok 19.2 mg / kg maternal doz seviyesinde tavşanlarda gözlenmiştir. Tavşanlarda anormallikler, hidrosefali, mikroftalmi, yarı dudak ve damak, mikrognati, displastik sakral ve kaudal omurgalı, fokomeli, hemimeli, sindaktili ve ektoaktili içerir. Gebelik sırasında metotreksat maruziyetinin insan vaka raporlarına dayanarak, büyüme yetersizliği, mikrosefali, kafatası kemiklerinin hipoplazisi, geniş fontanelleri, koronal veya lambdoidal kraniosinosis, kabarık saç derisi kılı, geniş burun köprüsü, sığ supraorbital sırt, düşük kulaklar, maksiller hipoplazi, epikantal kıvrımlar, kısa kollar, hipodaktili ve sindaktili içeren bir metotreksat embriyopatisi tarif edilmiştir. Bu sendrom, doğumdan 6 ila 8 hafta sonra ve 10 mg / hafta veya daha yüksek doz seviyeleriyle ilişkili olabilir. Ektopik gebeliğin yanlış tanısı ilişkili metotreksat maruziyetine dair yeni vaka raporları, gebe kalmadan 6 hafta önceki tedaviyi kapsamaktadır ve bu erken maruziyetlere bağlı olarak ayrı bir sendromun önerisini ortaya çıkarmıştır. Fallot tetralojisi ve belki de diğer nöral krest hücrelerle ilişkili anormallikler bu erken sendromun özellikleri olabilir. Metotreksat vaka raporlarının ve serilerinin bir analizi, metotreksat-maruz kalan çocuklarda beklenenden daha fazla pulmoner atrezi, kraniosinosis ve ekstremit eksiklikleri olduğu yönünde destek sağlamaktadır.

Ektopik gebelik, fertilize ovumun uterin kavite dışında bir dokuda implante olmasıdır. Tubal, interstisyel, ovarian, servikal, abdominal, intraligamenter veya heterotopik yerleşimli olabilir. En sık olarak tubal ampuller bölgede yerleşir. Ektopik gebelikler tüm gebeliklerin %1-2'sini oluşturur. Giderek artan vakalar pelvik

infeksiyon oranlarının artmasına, artan ovulasyon indüksiyonlarına ve tubal sterilizasyona bağlı olduğu düşünülebilir (234). Diğer faktörler ise rekonstrüktif tubal cerrahi işlemler, hassas Human Koryonik Gonadotropin (β -hCG) ölçümleri, transvaginal ultrasonografi (TV-USG) ve laparoskopik cerrahi işlemlerin yaygın kullanımı ile erken tanı olanaklarının gelişmesi olarak sıralanabilir (235).

Bu çalışmada, gebe sıçanlarda MTX'ye maruz bırakıldıktan sonra endometriumdaki ardışık histopatolojik değişiklikleri araştırdık; folat metabolizma antagonisti MTX ile inhibe olunan embriyonal implantasyon üzerine etkilerini MUC-1 ve GdA biyomarkerlarının düzeyleri aracılığıyla inceledik.

Metotreksat'ın embriyonal implantasyon üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla gebe olmayan ve gebe olan sıçanlara metotreksat uygulanmış ve uygulanmamış grupları oluşturuldu. Karşılaştırmalı olarak metotreksatın, embriyonal implantasyon üzerine etkisinin, endometrium dokusu örneklenerek MUC-1 ve GdA proteinlerinin ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi aracılığıyla araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanlarının Seçimi

Deney hayvanı olarak laboratuvar şartlarına kolay uyum sağlamaları, kısa sürede fazla döl vermeleri ve dayanıklı olmaları sebebiyle ratlar seçildi. Bu amaçla Wistar Albino cinsi dişi ratlar kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan ratlar KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nden elde edildi. İstatistiksel değerlendirme yapabilmek için gerekli minimum sayı esas alınarak, ortalama ağırlıkları 180-220 gr arasında olan, erişkin (yaş aralığı 10-12 hafta) 32 adet Wistar Albino rat kullanıldı.

Deney Hayvanlarının Bakımı:

Ratlar çalışma süresince laboratuvar koşullarında en uygun aralıklarda tutuldu. Ratlar 12 saat aydınlık (07:00- 19:00), 12 saat karanlık (19:00- 07:00) olan ve otomatik olarak klima ile havalandırılan $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik odalarda tutuldu. Çalışmada kullanılan her bir rat ayrı kafeslerde tutuldu. Çalışma boyunca ratlara (sıçanlara) çeşme suyu verildi. Çalışma sürecinde sıçanlar ad libitum şeklinde beslendi. Deney süresi boyunca sıçanların gıda ve su tüketimi takip edildi.

Deney Hayvanlarının Çiftleştirilmesi ve Gruplandırılması

Grup 3 ve 4 için; ratlar kafeslere 4 dişi ve bir erkek olacak şekilde konuldu. Dişi ratlar günlük olarak vaginal smear işlemine tabi tutuldu ve gebelikleri, sabah 08:15-09:00 aralığında alınan vaginal smear'lerin ışık mikroskop incelemesinde spermatozoit bulunması ile belirlendi. Smear de sperm görülen sıçanlar 0,5 günlük gebe olarak kabul edildi.

Sıçanlar her grupta 8'er tane rat olacak şekilde gebe ve gebe olmayan ve metotreksat uygulanan ve uygulanmayan ratlardan olarak 4 gruba ayrıldı;

Grup 1. Kontrol (Metotreksat uygulanmayan ve gebe olmayan),

Grup 2. Metotreksat intramusküler uygulanan ve sonrasında gebe bırakılmayan,

Grup 3. Metotreksat uygulanmayan ve gebe bırakılan,

Grup 4.Metotreksat intramusküler uygulanan ve gebe bırakılan olarak gruplandırıldı.

Grup 2 ve 4 için metotreksat (methotrexate 50mg ampul, Med-İlaç sanayi ve Ticaret A. Ş., İstanbul , Türkiye), intramusküler olarak 50 mg/m² tek doz olarak uygulandı. Hayvanın vücut yüzey alanı 2005 yılında yayınlanan ABD İlaç ve Gıda Dairesi hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçların insan dozu olarak kullanılmasında tavsiye ettiği vücut yüzey alanı üzerinden hesaplanma formülü kullanıldı (Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, 2005). Buna göre ortalama 200 g olan bir sıçan için 50 mg/m² Metotrexate insan uygulama dozuna eşdeğer sıçan dozu 0.2 mg olarak hesaplandı. Enjeksiyon kalça ve bacak bölgesine 0.5 cc'lik standart ince uçlu enjektör yardımı ile yapıldı. Grup 4 ; methotrexate uygulamadan iki ay sonra her 4 dişiye bir erkek olacak şekilde çiftleştirildi. Grup 2 ve 4 için metotrexat uygulamasından ortalama 3 ay sonra doku örnekleri alındı.

Doku örneklerinin elde edilmesi:

Grup 3-4'deki sıçanların gebeliklerinin 5. gününde ketamin/ksilazin (50/10 mg/kg intraperitoneal) anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötenazileri sağlandıktan sonra uterusları çıkartıldı. Grup 1-2'deki sıçanlarda her gün alınan vaginal smear örnekleri ile östrus fazı tespit edildi. Östrus fazı sitolojide; çekirdekli süperfisiyal ve keratinize süperfisiyal hücre değerlendirilmesi yapılarak saptandı buna göre keratinize süperfisiyal hücrelerin daha yoğun olduğu fazda ketamin/ksilazin (50/10 mg/kg intraperitoneal) anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötenazileri sağlandıktan sonra uterusları çıkartıldı.

Histopatolojik İnceleme:

Doku örnekleri histopatolojik değerlendirme yapılması için %10 luk formol içinde 48 saat fikse edildi. Doku parçaları dereceli alkol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırıldı. Dokuların parafin blokları hazırlanarak, bloklardan tam otomatik mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra Hematoksilen&Eozin ile boyandı. Histopatolojik değerlendirme, bu konuda

deneyimli bir patoloji uzmanı tarafından yapıldı. Histopatolojik incelemede öncelikle grup 3 ve 4'de kaç embriyo implante olduğuna bakıldı, embriyo sayısı istatistiksel analiz yapılmak üzere kaydedildi.

İmmünohistokimyasal İnceleme:

İmmünohistokimyasal analiz parafine gömülü doku örneklerinden hazırlanan kesitlerde, tam otomatik boyama cihazı (Ventana Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) ile protokollere uygun olarak çalışıldı. Streptavidin-biotin- peroksidaz tekniği ile sekonder antikorları göstermek için diaminobenzidine (DAB) kromojeni kullanıldı. Bu şekilde Muc-1 (Katalog no: E-AB-13550, ELABSCIENCE,1:100, ABD) ve Glikodelin A (Katalog no: E-AB-15077, ELABSCIENCE,1:150, ABD) antikorları kullanılarak immünohistokimyasal çalışma gerçekleştirildi. Endometrium da MUC-1 ve Glikodelin ekspresyonu düzeyi değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal Skorlama:

İmmünohistokimyasal olarak MUC-1 ve Glikodelin A ile boyanan dokuların histolojik preparatları NikonEclipseNi mikroskopu ile x100 büyütmedeki dijital görüntüleri çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Dijital görüntülerin skorlanması H-skor kullanılarak değerlendirildi (*McCarty KS, Jr., Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, et al. Use of a monoclonal anti-estrogenreceptorantibody in theimmunohistochemical evaluation of humantumors. CancerRes. 1986;46(8 Suppl):4244s-8s)

H-skorun hesaplanması için aşağıdaki denklemi kullanan MS Excel makro dosyası oluşturuldu.

$$H\text{-skor} = \sum (P_i \times i)$$

P_i boyanan hücrelerin yüzdesi gösteren katsayı ve i ise boyanmanın yoğunluğunu (3+ (güçlü), 2+ (orta), 1+ (zayıf), ve 0 (boyanma yok)) ifade etmektedir. H-Skor kullanılarak tüm preparatlarda sitoplazmik ve apikal boyanma randomize seçilen 5

farklı 20x büyüme alanı ayrı ayrı değerlendirildi. Her bir doku örneğinde luminal epitel, glandüler epitel ve desidual epitelde h skorlaması ayrı ayrı yapıldı.

İstatistiksel Yöntem:

İstatistiksel analiz “**IBM SPSS Statistics 23**” istatistik programı kullanılarak yapıldı. İmplantе olan embriyo sayısı ve immünohistokimyasal H-Skorların karşılaştırmasında dağılımlar normal dağılım göstermediğinden ve gruplar 30’un altında öge içerdiğinden non-parametrik testler kullanıldı. Grupların arasında fark olup olmadığı “*Kruskal-Wallis testi*” ile bakıldıktan sonra farklı olan gruplar arasında fark “*Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi*” ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi “ $p \leq 0,05$ ” olarak kabul edildi.

Finansal Destek ve Etik Kurul Kararı:

Tezin bütçesi Araştırma Görevlisi Dr. Gökhan Erdil tarafından karşılanmıştır. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı tez çalışması başlamadan önce alındı (26/07/2017 tarih 2017-29).

Araştırma süresi:

7 ay (01 Eylül 2017- 01 Mart 2018).

BULGULAR

Deneyde her bir gruptaki sıçanların kilosunda istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (Kruskal Wallis varyans analizi, $p=0.136$, Tablo 1).

Tablo 1 : Deneyde her bir gruptaki hayvanların ağırlıkları (gram).

Gruplar	Ağırlık (gram)
1. Kontrol	193.50 ± 9.18
2. Metotrexate uygulanmış ancak gebe değil	197.75 ± 6.73
3. Gebe	201.50 ± 4.34
4. Metotrexate uygulanmış ve gebe	197.62 ± 5.21

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

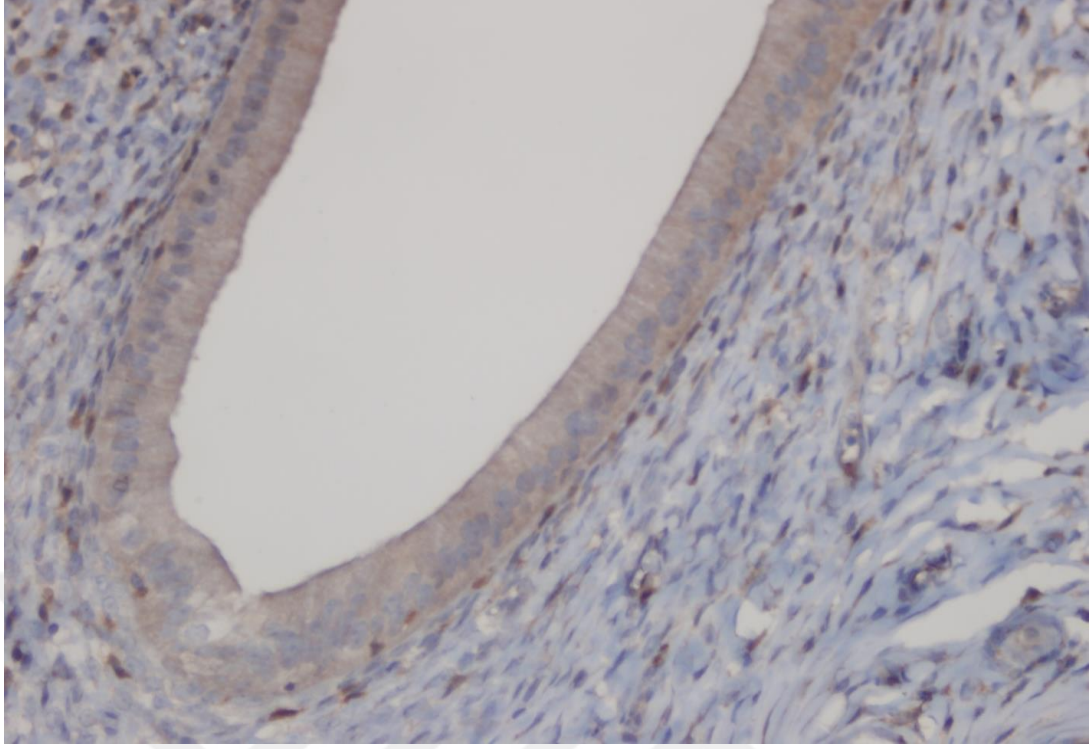
Metotreksatın östrus fazındaki endometriuma etkisinin araştırılması kapsamında gebe olmayan sıçanlarda (grup 1 ve 2'de); uterin luminal, glandüler ve desidual epitelde glikodelin A ve musin-1 için H-skorlarının karşılaştırılması tablo 2'de verilmiştir. Buna göre grup 2'de 1'e göre her üç epitelde glikodelin A ve musin-1 H-skoru istatistiksel anlamlı olarak azalma göstermiştir.

Tablo 2 : Grup 1 ve 2'de glikodelin A ve musin-1 H skorlarının karşılaştırılması.

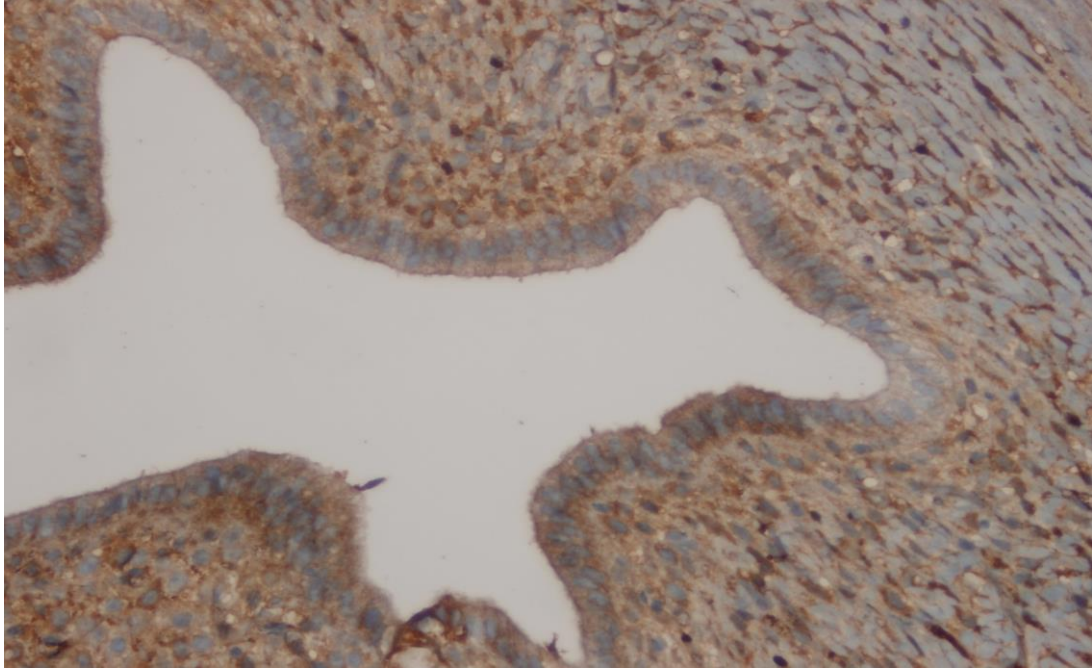
Gruplar	Grup 1	Grup 2	p
Luminal epitelde Glikodelin A H-skoru	59.25 ± 41.82	22.00 ± 12.90	0.028
Glandüler epitelde Glikodelin A H-skoru	99.75 ± 44.66	19.38 ± 21.03	0.001
Desidual epitelde Glikodelin A H-skoru	42.88 ± 30.04	11.50 ± 4.84	0.003
Luminal epitelde Musin-1 H-skoru	94.00 ± 34.32	34.32 ± 13.50	0.010
Glandüler epitelde Musin-1 H-skoru	67.75 ± 65.24	22.50 ± 25.22	0.038
Desidual epitelde Musin-1 H-skoru	69.50 ± 23.59	24.75 ± 3.28	0.001

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

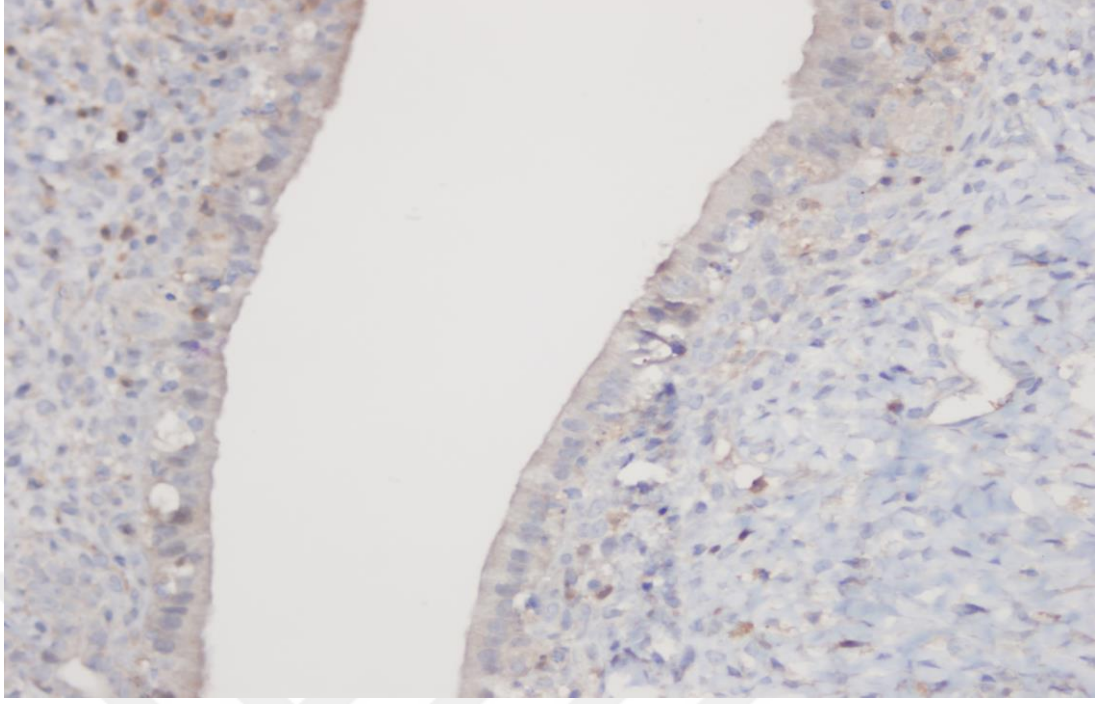
Şekil 1-2'de grup 1 olgusunda, şekil 3-4'de grup 2 olgusunda uterusun mikroskopik kesitinde luminal epitelde glikodelin A ve musin 1 ekspresyonu verilmiştir.



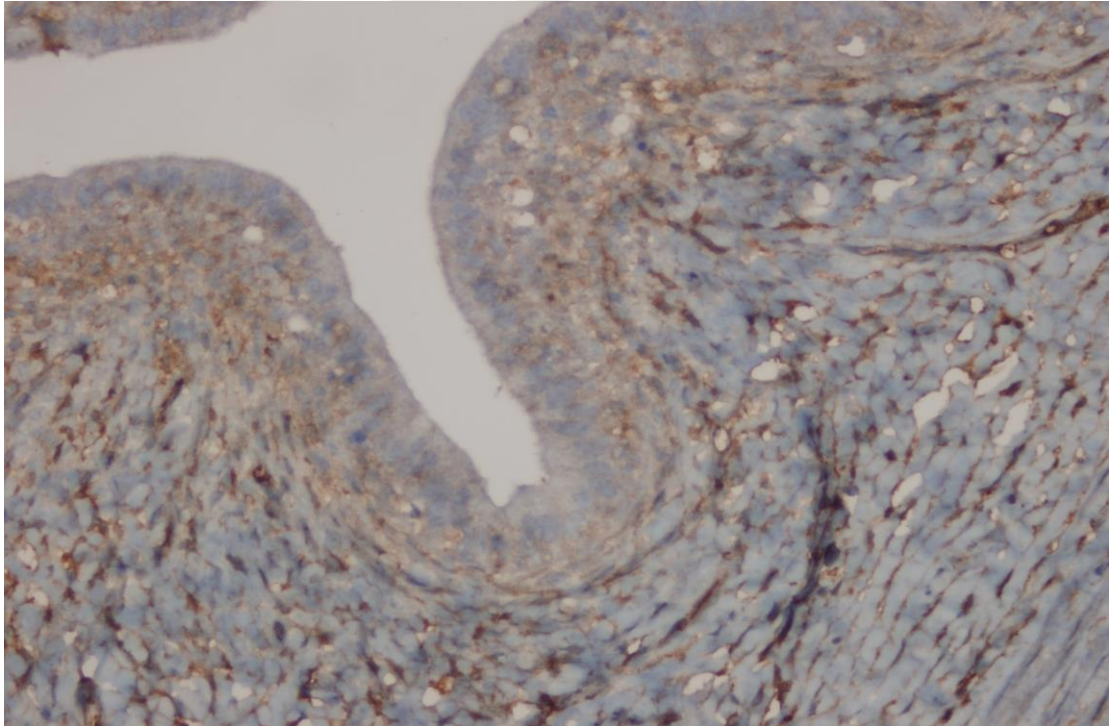
Şekil 1. Grup 1 olgusunda, gebe olmayan uterus luminal epitelde Glikodelin A ekspresyonu, x400.



Şekil 2. Grup 1 olgusunda, gebe olmayan uterus luminal epitelde musin-1 ekspresyonu, x400.



Şekil 3. Grup 2 olgusunda, metotreksat verilmiş gebe olmayan uterus luminal epitelde Glikodelin A ekspresyonu, x400.



Şekil 4. Grup 2 olgusunda, metotreksat verilmiş gebe olmayan uterus luminal epitelde musin-1 ekspresyonu, x400.

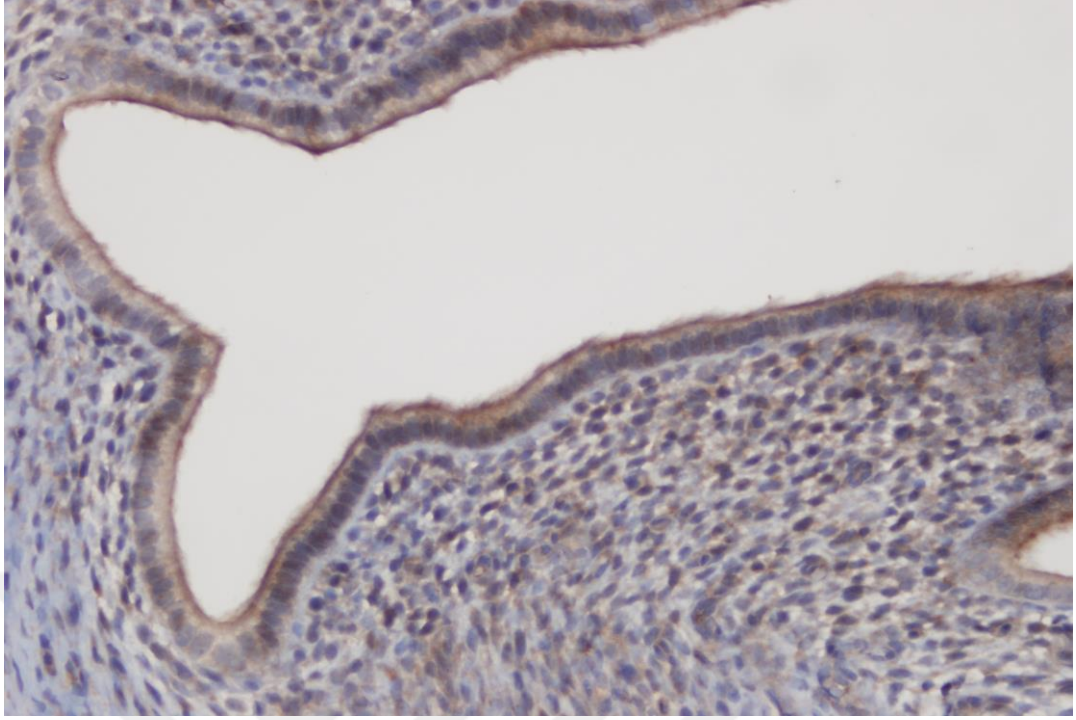
Metotreksatın implantasyona etkisinin araştırılması kapsamında gebe olan sıçanlarda (grup 3 ve 4'de); implante olan embriyo sayısı, uterin luminal, glandüler ve desidual epitelde glikodelin A ve musin-1 için H-skorlarının karşılaştırılması tablo 3'de verilmiştir. Buna göre grup 4'de 3'e göre implante olan embriyo sayısı, her üç epitelde glikodelin A ve musin-1 H-skoru istatistiksel anlamlı olarak azalma göstermiştir. Bu durum iki ay önce uygulanan metotreksatın sıçanlarda implante olan embriyolarda azalma, uterusda glikodelin A ve musin-1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

Tablo 3 : Grup 3 ve 4'de glikodelin A, musin-1 H skorlarının ve implante olan embriyo sayısının karşılaştırılması.

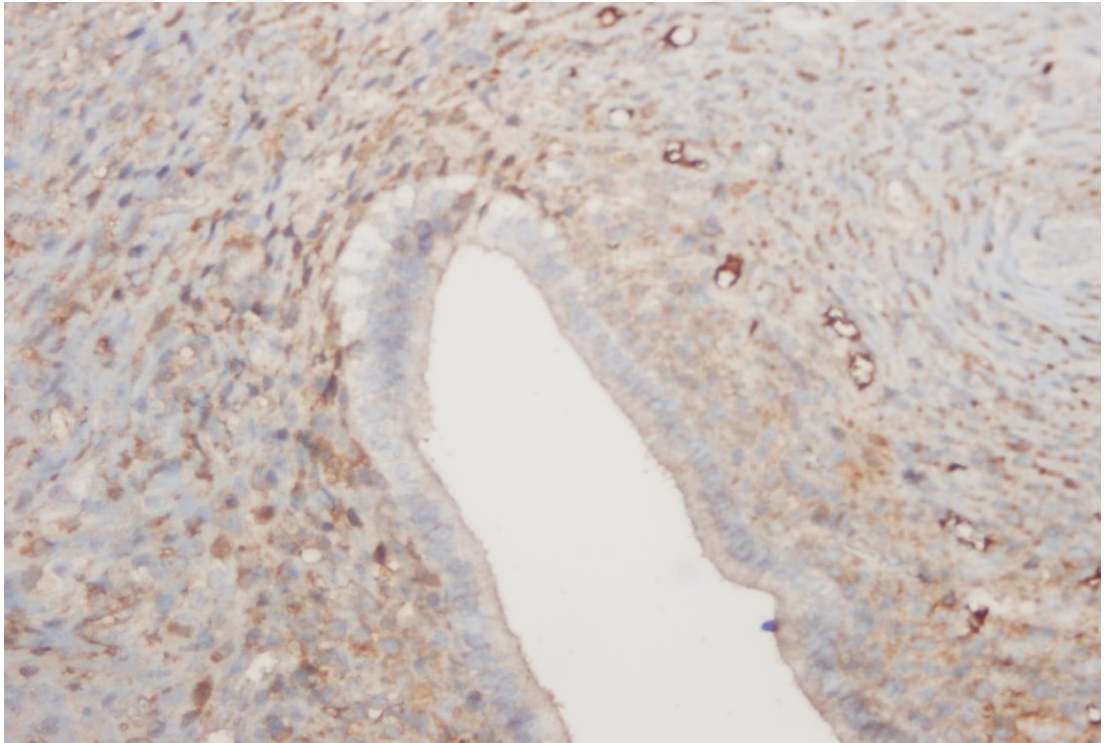
Gruplar	Grup 3	Grup 4	p
Luminal epitelde Glikodelin A H-skoru	236.38 ± 55.77	27.25 ± 21.11	0.005
Glandüler epitelde Glikodelin A H-skoru	172.38 ± 59.12	21.85 ± 24.63	<0.001
Desidual epitelde Glikodelin A H-skoru	126.00 ± 16.09	17.62 ± 11.99	<0.001
Luminal epitelde Musin-1 H-skoru	132.25 ± 13.50	15.75 ± 3.45	<0.001
Glandüler epitelde Musin-1 H-skoru	150.25 ± 34.69	13.50 ± 6.46	<0.001
Desidual epitelde Musin-1 H-skoru	119.75 ± 29.94	17.13 ± 5.49	<0.001
İmplantе olan embriyo sayısı	12.50 ± 2.00	9.25 ± 1.58	<0.001

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

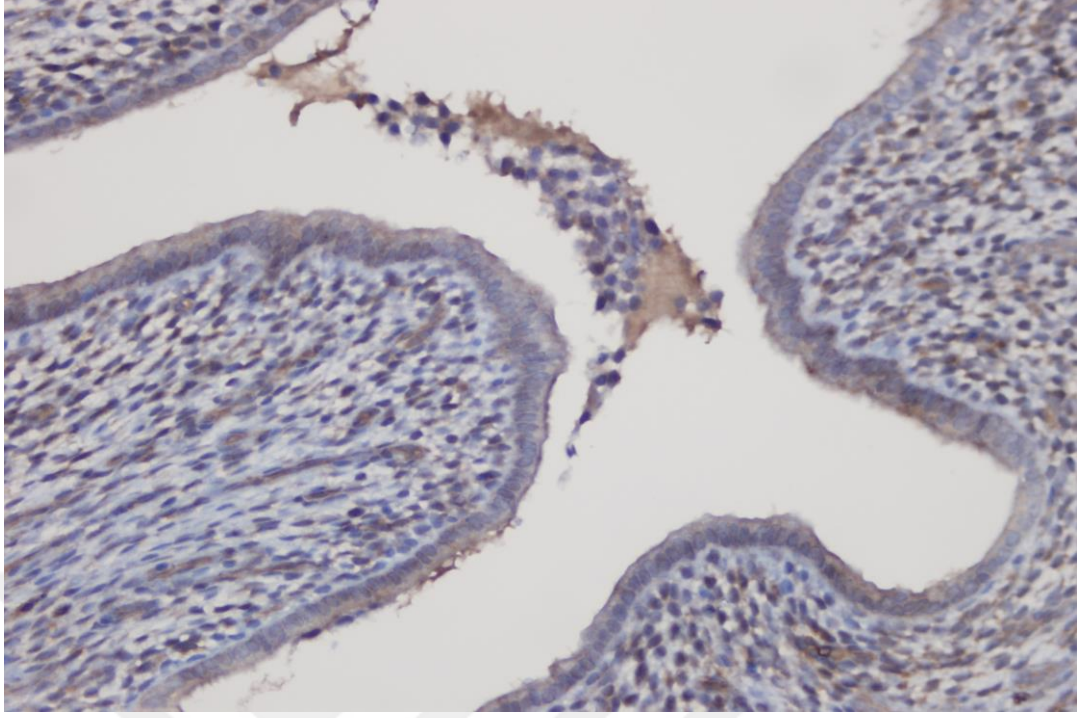
Şekil 5-6'de grup 3 olgusunda, şekil 7-8'de grup 4 olgusunda uterusun mikroskopik kesitinde luminal epitelde glikodelin A ve musin 1 ekspresyonu verilmiştir.



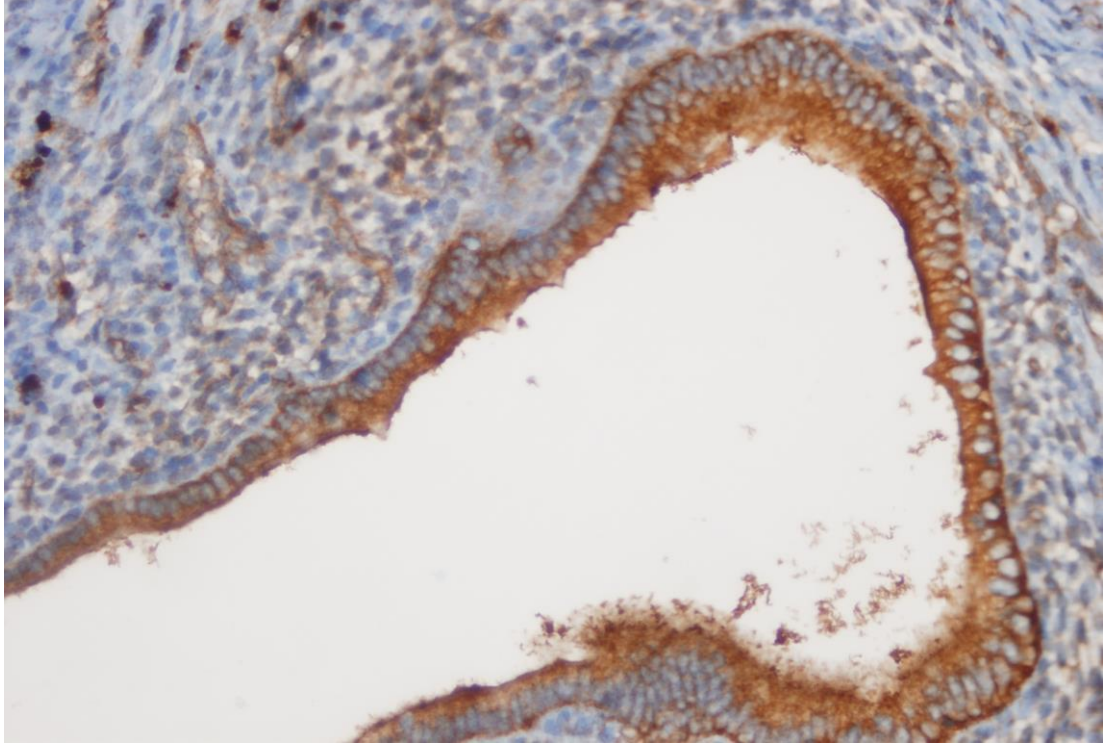
Şekil 5. Grup 3 olgusunda, gebe uterusda luminal epitelde Glikodelin A ekspresyonu, x400.



Şekil 6. Grup 3 olgusunda, gebe uterusda luminal epitelde musin-1 ekspresyonu, x400.



Şekil 7. Grup 4 olgusunda, metotreksat verilmiş gebe uterus luminal epitelde Glikodelin A ekspresyonu, x400.



Şekil 8. Grup 4 olgusunda, metotreksat verilmiş gebe uterus luminal epitelde musin-1 ekspresyonu, x400.

Grup 1 ve 3 olgularında uterin luminal, glandüler ve desidual epitelde glikodelin A ve musin-1 için H-skorları karşılaştırıldığında grup 3 olgularında grup 1'e göre istatistiksel anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Mann-Whitney U testi kullanılarak elde edilen p değerleri tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4 : Grup 1 ve 3'de glikodelin A, müsın-1 H skorlarının karşılaştırılması.

Gruplar	Grup 1	Grup 3	p
Luminal epitelde Glikodelin A H-skoru	59.25 ± 41.82	236.38 ± 55.77	<0.001
Glandüler epitelde Glikodelin A H-skoru	99.75 ± 44.66	172.38 ± 59.12	0.015
Desidual epitelde Glikodelin A H-skoru	42.88 ± 30.04	126.00 ± 16.09	<0.001
Luminal epitelde Musin-1 H-skoru	94.00 ± 34.32	132.25 ± 13.50	0.003
Glandüler epitelde Musin-1 H-skoru	67.75 ± 65.24	150.25 ± 34.69	0.038
Desidual epitelde Musin-1 H-skoru	69.50 ± 23.59	119.75 ± 29.94	0.005

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada gebe ratlarla kontrol grubunun karşılaştırmasında; uterin luminal, glandüler ve desidial epitelde GdA ve MUC-1 için H-skorları karşılaştırıldığında gebe rat olgularında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır. Önceki çalışmalarda MUC-1 ve GdA'nın hem kan hem de doku düzeylerinin, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda, kontrol grubundaki fertil kadınlara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştı. Tek bir serum MUC-1 ve GdA saptaması ile, RIF (tekrarlayan implantasyon başarısızlığı) geliştirme riski yüksek olan hastalar tanımlanabilir şekilde bir yorum getirilmişti. Çalışmamızda elde edilen sonuç gebelik durumunda artan MUC-1 ve GdA değerleri itibariyle yapılan önceki çalışmalarla korelasyon göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada gebe ratlarda GdA düzeylerinin kontrol grubu gebe olmayan ratlara göre daha yüksek oluşu, mevcut bulgular dahilinde geçmiş çalışmalarla örtüşmektedir. MUC-1 düzeyinde ise gebe ratlarda kontrol grubuna göre immunhistokimyasal boyanma bölgelerinde anlamlı istatistiki bir yükseklik saptanmıştır. Bu durum önceki çalışmalardaki fertil bayanlardaki yüksek muc-1 düzeyleriyle korelasyon içerisinde gibi görülmekte aslında gebe bayanlardaki implantasyon penceresi döneminde gözlenen rölatif MUC-1 düşüşü ile çelişmektedir.

MUC-1 glikoproteini, endometrial süperfertilitede rol oynayabilen bir anti adhezyon molekülüdür. Embriyo ve endometriyum arasındaki temas olasılığını sağlamak için MUC-1 ekspresyonu sağlıklı kadınlarda implantasyon “ penceresi sırasında “düşük” seviyelere iner. Diğer yandan, önceki çalışmalarda, implantasyon sırasında, tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda MUC-1 ekspresyonunun endometriyumda, fertil kadınlarla karşılaştırıldığında son derece düşük olduğu ileri sürülmektedir. Bizim çalışmamızda Metotreksat verilmemiş gebe ratlarda da kontrol grubuna göre luminal epitelde MUC-1 ekspresyonu daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. (p=0,010)

Ek olarak, büyük ölçüde azaltılmış MUC 1 ekspresyonu, endometriyal implantasyon sırasında bağışıklık sistemini bozabilir ve böylece implantasyon sürecini olumsuz yönde etkileyebilir. MUC-1, yabancı maddelere karşı bir savunma duvarı görevi gören ve implante edilen embriyoları koruyan bir immünomodülatör olarak T hücrelerinde eksprese edilir . MUC-1 ekspresyonunda aşırı indirgemeler, bu koruyucu etkiyi azaltabilir, böylece embriyolar saldırıya açık hale gelir. Bu nedenle MUC-1, endometriyal reseptivitenin belirlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

MUC-1'in düşük seviyeleri infertil hastalarda endometriyumun embriyo seçim işlevine zarar verebilir, böylece düşük yapma oranlarını artırabilir veya implantasyon oranlarını azaltabilir. MUC-1 ekspresyonunun, hidrosalpinks olan infertil hastaların endometriyumunda önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde, hidrosalpinksli hastalarda endometrial MUC-1 ekspresyonunun anlamlı olarak daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, hidrosalpinkten gelen sıvının MUC-1 seviyesini önemli ölçüde azaltarak sadece embriyoyu değil, endometriyum da olumsuz etkilediğini göstermektedir. Yapılan önceki bir çalışma, RIF'li (tekrarlayan implantasyon başarısızlığı) hastaların kan ve doku MUC-1 düzeylerinin, kontrol grubundaki fertil kadınlardan anlamlı derecede düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgu, aşırı derecede düşük MUC-1 düzeylerinin implantasyon üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Mevut bilgi dahilinde yaptığımız çalışmada Metotreksat'ın antiöstrojenik etkiniliğinin bir yansıması olabileceği sonucuna yorumladığımız bir bulgu olarak; Metotreksat verilmiş gebe ratlarda, Metotreksat verilmemiş gebe rat grubuna göre luminal epitelde MUC-1 ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu görüldü. (p=0,010) Bu durum Methotreksatın implantasyon penceresi olarak bilinen dönemde endometrial yatağa reseptivite açısından olumsuz bir yansıması olabileceğini düşündürmekle beraber folik asit metabolizması antimetaboliti bu ilacın MUC-1 düzeyini gebe ratlarda düşürmüşlüğü'nün yorumu açısından ileri düzey moleküler çalışmalar gerektirdiği açıktır.

Glikodelin-A nın sentez ve sekresyonunun progesteron tarafından uyarıldığı gibi, insan uterusunun en yaygın progesteron düzenlenleyici proteindir. Verimli ve infertil kadınlarda kan GdA seviyelerini karşılaştıran çalışmalar çeşitli sonuçlar vermektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada GdA'nın potansiyel olarak pro-

inflatuar olan monositlerde apoptosisi tetiklediğini ileri sürmüştür. Bu nedenle, GdA başarılı bir hamilelik için gerekli olan anti-enflatuar ortamı sürdürmede bir rol oynayabilir.

Bizim çalışmamızda da Metotreksat verilmemiş gebe ratlarda kontrol grubuna göre luminal epitelde Glikodelin-A ekspresyonu daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. (p=0,003) Buda önceki çalışmalarla korelasyon göstermektedir.

Ek olarak, azalmış yumurtalık fonksiyonu GdA üretimini etkileyebilir: önceki çalışmalarda endometriyal biyopsiler E2 ve GdA ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon göstermektedir . Bu gerçek, endometrial gen ekspresyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. GdA konsantrasyonu ve endometriyal olgunlaşma ilişkili görünmektedir. Buna göre, yapılan bir çalışmada, RIF' lı (tekrarlayan implantasyon başarısızlığı) hastalarda GdA'nın kan ve doku düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da Metotreksat verilmiş gebe ratlarda, metotreksat verilmemiş gebe rat grubuna göre luminal epitelde Glikodelin-A ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu görüldü. (p=0,002) Bu anlamda mevcut bulgularımız literatürde tanımlanmış Glikodelin-A fonksiyonu açısından korelasyon göstermektedir.

MUC-1 ve GdA'nın kan ve doku düzeylerinin, fertil kadınlardakine kıyasla, RIF'li kadınlarda aşırı derecede azaldığını ortaya koymaktadır.

Bizim çalışmamızda Metotreksat verilmiş gebe ratlarda kontrol grubuna göre endometrial glandüler epitelde Glikodelin-A ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu görüldü. (p=0,021) Ayrıca Metotreksat verilmiş gebe ratlarda, Metotreksat verilmemiş gebe rat grubuna göre endometrial glandüler epitelde Glikodelin-A ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu görüldü. (p=0,021) Bu durum Metotreksat'ın endometrial reseptivite ve implantasyon üzerine negatif etkisinin mültifaktöriyel endoemtrial reseptivite gerçeğine rağmen, aracılı moleküllerden Glikodelin-A düzeylerini düşürmesi yoluyla olabileceğini doğrular niteliktedir.

Ayrıca çalışmamızdan elde ettiğimiz Metotreksat verilmemiş gebe ratlarda kontrol grubuna göre desidial hücrelerde daha fazla Glikodelin-A ekspresyonu izlendi (p=0,021) sonucumuz, aynı şekilde Glikodelin-A implantasyon üzerine

pozitif etkisinin metotreksat aracılı yollarla negatif etkilenebileceğini göstermektedir.

Mevcut bulguyu destekler bir sonuçta, elde ettiğimiz Metotreksat verilmiş gebe ratlarda, metotreksat verilmemiş gebe rat grubuna göre desidial hücrelerde Glikodelin-A ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu görüldüğü ($p=0,01$) şeklindeki sonuçla desteklenmektedir.



SONUÇ

Yaptığımız çalışmada gebe ratlarla kontrol grubunun karşılaştırmasında; uterin luminal, glandüler ve desidial epitelde Glikodelin-A ve Musin-1 için H-skorları karşılaştırıldığında gebe ratlarda olgularında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuç gebelik durumunda artan MUC-1 ve Glikodelin-A değerleri itibariyle bu moleküllerin implantasyon üzerine etkileri ile ilişkili mekanizmalar dahilinde sağlıklı bir gebelin sürdürülmesi açısından önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda Metotreksat verilmemiş gebe ratlarda kontrol grubuna göre luminal epitelde MUC-1 ekspresyonu daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. (p=0,010)

MUC-1'in düşük seviyeleri infertil hastalarda endometriyumun embriyo seçim işlevine zarar verebilir, böylece düşük yapma oranlarını artırabilir veya implantasyon oranlarını azaltabilir. Mevut bilgi dahilinde yaptığımız çalışmada Metotreksat'ın antiöstrojenik etkinliğinin bir yansıması olabileceği sonucuna yorumladığımız bir bulgu olarak; Metotreksat verilmiş gebe ratlarda, Metotreksat verilmemiş gebe rat grubuna göre luminal epitelde MUC-1 ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu görüldü. (p=0,010) Bu durum Methotreksat'ın implantasyon penceresi olarak bilinen dönemde endometrial yatağa reseptivite açısından olumsuz bir yansıması olabileceğini düşündürmekle beraber folik asit metabolizması antimetaboliti bu ilacın MUC-1 düzeyini gebe ratlarda düşürmüşlüğü'nün yorumu açısından ileri düzey moleküler çalışmalar gerektirdiği açıktır.

Glikodelin-A'nın sentez ve sekresyonunun progesteron tarafından uyarıldığı gibi, insan uterusunun en yaygın progesteron düzenlenleyici proteindir. Verimli ve infertil kadınlarda kan GdA seviyelerini karşılaştıran çalışmalar çeşitli sonuçlar vermektedir. Bizim çalışmamızda da Metotreksat verilmemiş gebe ratlarda kontrol grubuna göre luminal epitelde Glikodelin-A ekspresyonu daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. (p=0,003) Buda önceki çalışmalarla korelasyon göstermektedir.

Çalışmamızda Metotreksat verilmiş gebe ratlarda, Metotreksat verilmemiş gebe rat grubuna göre luminal epitelde Glikodelin-A ekspresyonunun daha düşük

düzyeyde olduğu görüldü. ($p=0,002$) bu anlamda mevcut bulgularımız literatürde tanımlanmış Glikodelin-A fonksiyonu açısından korelasyon göstermekte olup, bu durum Metotreksat'ın endometrial reseptivite ve implantasyon üzerine negatif etkisinin mültifaktöriyel endoemtrial reseptivite gerçeğine rağmen, aracılı moleküllerden Glikodelin-A'nın düzeylerini düşürmesi yoluyla olabileceğini doğrular niteliktedir.

Ayrıca çalışmamızdan elde ettiğimiz Metotreksat verilmemiş gebe ratlarda kontrol grubuna göre desidual hücrelerde daha fazla Glikodelin-A ekspresyonu izlendi ($p=0,021$) sonucumuz, aynı şekilde Glikodelin-A implantasyon üzerine pozitif etkisinin Metotreksat aracılı yollarla negatif etkilenebileceğini göstermektedir.,

Embriyo implantasyonu, blastosist ve uterus arasındaki ilk fiziksel etkileşimi başlatır, böylece hem embriyo hem de uterusun tüm sonraki gelişimini programlayabilir. Bu erken aşamada herhangi bir hata erken gebelik kaybı veya çeşitli gebelik komplikasyonların oluşmamasına önemli ölçüde katkıda bulunacaktır. Embriyo transfer tekniğini kullanan önceki çalışmalar, implantasyon penceresinden sonra transfer edilen normal rat blastokistlerinin, implantasyon başarısızlığında dramatik bir artış göstermektedir. Rahime embriyonun ekiminde kısa bir gecikme olduğu fikri mevcut başarısızlığın sebebi olabileceğini düşündürmektedir. Bu görüş, genetik olarak tasarlanmış fare modellerinden elde edilen bulgular ile daha da desteklenmektedir.

Bu yeni kavramın klinik önemi yüksektir, çünkü erken gebelik kaybı riski insanlarda daha sonraki implantasyonla artar . Normal adet döngüsünde veya IVF tedavisi sırasında kadınlarda, normal pencerenin ötesinde implantasyon meydana gelirse, gebelik kaybı sıklıkla görülür ve bu da implantasyonun ertelenmesi ile okült gebelik başarısızlığının yüksek bir ilişkisini gösterir. Bununla birlikte, bu veriler ayrıca, birkaç güne kadar, örn. yumurtlamadan 6–8 gün sonra, insan implantasyonu olumsuz sonuçlara neden olmadan, anne ve embriyonik bileşenler arasındaki etkileşimlerin ne zaman ortaya çıkacağı konusundaki belirsizlikleri hesaba katmak üzere memeli gelişimine programlanması gereken önlemleri vurgular. Bu nedenle bağımsız olarak gelişmekte olan embriyo ve dişi üreme sistemini senkronize etme

zorunluluğu, yerel mikroçevrede önemli unsurlara karşı fizyolojik cevapların hızlı transkripsiyon sonrası düzenlemesi durumunun önemini gözler önüne sermektedir.

Embriyo-uterus etkileşimlerini yöneten moleküler sinyal yolları hakkında anlaşılan çoğu şey hayvan modelleri kullanılarak elde edilmiştir, çünkü insan deneyleri insan embriyoları ile ilgili etik değerdendirmeler ve kısıtlamalarla sınırlıdır. İnsanlar ve kemirgenler evrimsel olarak farklı olsalar da, embriyo implantasyonu açısından birçok fizyolojik benzerliği paylaşırlar. Örneğin blastosist kuluçkalama veya zona pellucida çözünmesi, her iki türde de, uterus lümenindeki blastosistin doğru temasını ve yönlenmesini sağlamak için blastosist yerleştirme ve aralıktan sonra, blastosist eki her iki türün de tanımlanmış bir implantasyon penceresi içinde gerçekleşen tam olarak düzenlenmiş bir embriyo rahim diyaloğunu başlatır. Luminal epitelyumun altında yatan stroma hücreleri, hem insanlarda hem de farelerde embriyoların gelişimini korumak ve desteklemek için, trofoblast penetrasyonu üzerine geniş desidualizasyona maruz kalır, ancak stromal desidual dönüşüm, menstrüel siklusun orta sekretuar fazı sırasında kadınlarda bir embriyodan bağımsız olarak başlar. Bu benzerlikler, fare modelleri kullanılarak gerçekleştirilen implantasyon araştırmalarındaki muazzam ilerlemelerin ve gereken ileri araştırmaların önemini ve değeri ni güçlendirmektedir.

Her ne kadar implantasyon sırasında blastosist ve uterus arasındaki karşılıklı etkileşimler konusundaki anlayışımız, süreçte yer alan çok sayıdaki molekölün tanımlanması yoluyla ilerlemiş olsada; kompleks moleküler etkileşim ve reseptivite düzeyleri mevcudiyeti nedeniyle sağlıklı gebelik elde edilmesi ve devamı hususunda, fare modelleri kullanılarak gerçekleştirilen implantasyon araştırmalarındaki muazzam ilerlemelerin ve gereken ileri araştırmaların önemini ve değeri ni güçlendirmektedir.

Kaynakça

1. van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 2009;85:4–19.
2. Singh H, Nardo L, Kimber SJ, Aplin JD. Early stages of implantation as revealed by an in vitro model. *Reproduction* 2010;139:905–14.
3. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57: 607–34.
4. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:4.
5. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005;72:216–29.
6. Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002;23:401–30.
7. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppala M. Factors affecting fertilization: Endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63:377–83.
8. Uchida H, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, et al. Histone deacetylase inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation. *Hum Reprod* 2007;22:2615–22.
9. Tomczak S, Briese V, Kunkel S, Muller H. Serum placental protein 14 (PP14) levels in patients with threatened abortion. *Arch Gynecol Obstet* 1996;258: 165–9.
10. Tulppala M, Julkunen M, Tiitinen A, Stenman UH, Seppala M. Habitual abortion is accompanied by low serum levels of placental protein 14 in the luteal phase of the fertile cycle. *Fertil Steril* 1995;63:792–5.

11. Dalton CF, Laird SM, Estdale SE, Saravelos HG, Li TC. Endometrial protein PP14 and CA-125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod* 1998;13:3197–202.
12. Mackenna A, Li TC, Dalton C, Bolton A, Cooke I. Placental protein 14 levels in uterine flushing and plasma of women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 1993;59:577–82.
13. Margolis S, Philips FS, Sternberg SS. The cytotoxicity of methotrexate in mouse small intestine in relation to inhibition of folic acid reductase and of DNA synthesis. *Cancer Research* 1971;31:2037–46.
14. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *New England Journal of Medicine* 1983;309:1094–104.
15. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action
16. Cuellar ML, Espinoza LR. Methotrexate use in psoriasis and psoriatic arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 1997;23:797–809.
17. DeLoia JA, Stewart-Akers AM, Creinin MD. Effects of methotrexate on trophoblast proliferation and local immune responses. *Human Reproduction* 1998;13:1063–9.
18. Creinin MD, Krohn M. Methotrexate pharmacokinetics and effects in women receiving methotrexate 50 mg and 60 mg per square meter for early abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1997;177:1444–9.
19. Lipscomb GH. Medical therapy for ectopic pregnancy. *Seminars in Reproductive Medicine* 2007;25:93–8.
20. Del Campo M, Kosaki K, Bennett FC, Jones KL. Developmental delay in fetal aminopterin/methotrexate syndrome. *Teratology* 1999;60:10–2.
21. Martinez Lopez JA, Loza E, Carmona L. Systematic review on the safety of methotrexate in rheumatoid arthritis regarding the reproductive system (fertility, pregnancy, and breastfeeding). *Clinical and Experimental Rheumatology* 2009;27:678–84.

22. Skalko RG, Gold MP. Teratogenicity of methotrexate in mice. *Teratology* 1974;9:159–64.
23. Tsibangu K, Leroy F, Doumont-Meyvis M. Effects of amethopterin (methotrexate) on the evolution of pregnancy in rats. *Toxicology* 1975;4:65–73.
24. ordan RL, Wilson JG, Schumacher HJ. Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. *Teratology* 1977;15:73–9.
25. Wilson JG, Scott WJ, Ritter EJ, Fradkin R. Comparative distribution and embryo- toxicity of methotrexate in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology* 1979;19:71–80.
26. Forti G, Krausz C. Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(12):4177–4188.
27. Zinaman MJ, Clegg E, Brown CC, O’connor J, Selevan S. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1996; 65(3):503.
28. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1400–1408.
29. Wilcox AJ, Weinberg CR, O’Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1988; 319(4):189–194.
30. Miller PB, Parnell BA, Bushnell G, Tallman N, Forstein DA, Higdon HL, Kitawaki J, Lessey BA. Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Hum Reprod (3).* 2012; 27(3):881–888.
31. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1400–1408.
32. Hustin J, Schaaps JP. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157:162.
33. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta* 2001; 22 Suppl A:S70.
34. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and

- formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004; 114(6):744–754.
35. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(3):185–199.
 36. Chen Q, Zhang Y, Peng H, Lei L, Kuang H, Zhang L, Ning L, Cao Y, Duan E. Transient β -adrenoceptor activation confers pregnancy loss by disrupting embryo spacing at implantation. *J Biol Chem*. 2011; 286(6):4349–4356.
 37. Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A₂α is crucial [correction of A₂α deficiency is crucial] for ‘on-time’ embryo implantation that directs subsequent development. *Development*. 2002; 129(12):2879–2889.
 38. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999; 340(23):1796–1799.
 39. Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. LPA₃-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*. 2005; 435(7038):104–108.
 40. Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest*. 2010; 120(4): 995–1003.
 41. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*. 2001; 345(19):1400–1408.
 42. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004; 25(3):341–373.
 43. Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, Wang H, Dey SK. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell Mol Life Sci*. 2005b; 62(17):1964–1973.
 44. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(3):185–199.

45. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57:339–355.
46. Curtis Hewitt S, Goulding EH, Eddy EM, Korach KS. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod.* 2002; 67(4):1268–1277.
47. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25(3):341–373.
48. Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(5):2963–2968.
49. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(21):10159–10162.
50. Rogers P, Murphy C. Uterine receptivity for implantation: human studies. 1989:231–238.
51. Yoshinaga, K. Inhibition of implantation by advancement of uterine sensitivity and refractoriness. In: Leroy, F.; Finn, CA.; Psychoyos, A.; Hubinot, PO., editors. *Blastocysts-endometrium relationships: progress in reproductive biology.* Karger; Basel, Switzerland: 1980. p. 189-199.
52. Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest.* 2010; 120(4):1004–1015.
53. Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004b; 101(28):10326–10331.
54. Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fertil.* 1974; 39(1):195–206.
55. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(3):185–199.

56. Michael SD. Plasma prolactin and progesterone during the estrous cycle in the mouse. *Royal Society of Medicine*. 1976:254–257.
57. Yoshinaga K, Hawkins R, Stocker J. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*. 1969; 85(1):103–112.
58. McCormack JT, Greenwald GS. Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17beta levels on day 4 of pregnancy in the mouse. *J Reprod Fertil*. 1974; 41(2):297–301.
59. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(3):185–199.
60. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997; 91(2):197–208.
61. Paria BC, Tan J, Lubahn DB, Dey SK, Das SK. Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Endocrinology*. 1999b; 140(6):2704–2710.
62. Harper MJ, Walpole AL. Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. *J Endocrinol*. 1967; 37(1):83–92.
63. Roblero LS, Fernandez O, Croxatto HB. The effect of RU486 on transport, development and implantation of mouse embryos. *Contraception*. 1987; 36(5):549–555.
64. Vinijsanun A, Martin L. Effects of progesterone antagonists RU486 and ZK9873 on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. *Reprod Fertil Dev*. 1990; 2(6):713–727.
65. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004; 25(3):341–373.
66. Finn C, Martin L. Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol Reprod*. 1972; 7(1):82–86.
67. Tranguch S, Smith DF, Dey SK. Progesterone receptor requires a co-chaperone for signalling in uterine biology and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13(5):651–660.

68. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(3):185–199.
69. Malafaya PB, Santos TC, van Griensven M, Reis RL. Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. *Biomaterials.* 2008; 29(29):3914–3926.
70. Mantalenakis SJ, Ketchel MM. Frequency and extent of delayed implantation in lactating rats and mice. *J Reprod Fertil.* 1966; 12(2):391–394.
71. McLaren A. A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice. *J Endocrinol.* 1968; 42(3):453–463.
72. Whitten WK. Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice. *J Endocrinol.* 1955; 13(1):1–6.
73. Yoshinaga K, Adams CE. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil.* 1966; 12(3):593–595.
74. Krehbiel RH. The effects of theelin on delayed implantation in the pregnant lactating rat. *Anat Rec.* 1941; 81(3):381–392.
75. Cochrane RL, Meyer RK. Delayed nidation in the rat induced by progesterone. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957; 96(1):155–159.
76. Whitten WK. Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice; role of the pituitary in implantation. *J Endocrinol.* 1958; 16(4):435–440.
77. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(21):10159–10162.
78. Barkley MS, Geschwind, Bradford GE. The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biol Reprod.* 1979; 20(4):733–738.
79. Harper MJ, Dowd D, Elliott AS. Implantation and embryonic development in the ovariectomized-adrenalectomized hamster. *Biol Reprod.* 1969; 1(3):253–257.

80. Heap RB, Deanesly R. The increase in plasma progesterone levels in the pregnant guinea-pig and its possible significance. *J Reprod Fertil.* 1967; 14(2):339–341.
81. Heap RB, Flint AP, Hartmann PE, Gadsby JE, Staples LD, Ackland N, Hamon M. Oestrogen production in early pregnancy. *J Endocrinol.* 1981; (89 suppl):77–94.
82. Kwun JK, Emmens CW. Hormonal requirements for implantation and pregnancy in the ovariectomized rabbit. *Aust J Biol Sci.* 1974; 27(3):275–283.
83. Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm.* 1973; 31:201–256.
84. Psychoyos A. Uterine Receptivity for Nidationa. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 476(1):36–42.
85. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25(3):341–373.
86. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(3):185–199.
87. Dickmann Z, Dey SK, Gupta JS. Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(1):298–300.
88. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67:335–376.
89. Mote PA, Arnett-Mansfield RL, Gava N, deFazio A, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Clarke CL. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. *Endocrinology.* 2006; 147(12):5503–5512.
90. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 1995; 9(18):2266–2278.

91. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*. 2000; 289(5485):1751–1754.
92. Tan J, Paria BC, Dey SK, Das SK. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology*. 1999; 140(11):5310–5321.
93. Kregge JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(26):15677–15682.
94. Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol*. 2005; 67:285–308.
95. Lee SK, Kim JY, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2012b; 67(4):311–318.
96. Wada-Hiraike O, Hiraike H, Okinaga H, Imamov O, Barros RP, Morani A, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(48):18350–18355.
97. Su EJ, Xin H, Monsivais D. The emerging role of estrogen receptor-beta in human reproduction. *Semin Reprod Med*. 2012; 30(1):62–70.
98. Altmae S, Martinez-Conejero JA, Salumets A, Simon C, Horcajadas JA, Stavreus-Evers A. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16(3):178–187.
99. Huang GS, Gunter MJ, Arend RC, Li M, Arias-Pulido H, Prossnitz ER, Goldberg GL, Smith HO. Co-expression of GPR30 and ERbeta and their association with disease progression in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2010; 203(3):242, e241–245.
100. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(3):185–199.

101. Hamlett G. Delayed implantation and discontinuous development in the mammals. *The Quarterly Review of Biology*. 1935; 10(4):432–447.
102. Thom MD, Johnson DDP, Macdonald DW. The evolution and maintenance of delayed implantation in the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *Evolution*. 2004; 58(1):175–183.
103. Yoshinaga K, Adams CE. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil*. 1966; 12(3):593–595.
104. Nieder GL, Weitlauf HM. Effects of metabolic substrates and ionic environment on in-vitro activation of delayed implanting mouse blastocysts. *J Reprod Fertil*. 1985; 73(1):151–157.
105. Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD. Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction*. 2004; 128(6):669–678.
106. Renfree MB, Shaw G. Diapause. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62:353–375.
107. Lee JE, Oh HA, Song H, Jun JH, Roh CR, Xie H, Dey SK, Lim HJ. Autophagy regulates embryonic survival during delayed implantation. *Endocrinology*. 2011a; 152(5):2067–2075.
108. Naeslund G, Lundkvist O, Nilsson BO. Transmission electron microscopy of mouse blastocysts activated and growth-arrested in vivo and in vitro. *Anat Embryol (Berl)*. 1980; 159(1):33–48.
109. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(21):10159–10162.
110. Surani MA. Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implantation and embryonic diapause. *J Reprod Fertil*. 1975; 43(3):411–417.
111. Naeslund G, Lundkvist O, Nilsson BO. Transmission electron microscopy of mouse blastocysts activated and growth-arrested in vivo and in vitro. *Anat Embryol (Berl)*. 1980; 159(1):33–48.

112. Nieder GL, Weitlauf HM. Effects of metabolic substrates and ionic environment on in-vitro activation of delayed implanting mouse blastocysts. *J Reprod Fertil.* 1985; 73(1):151–157.
113. Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004b; 101(28):10326–10331.
114. Yoshinaga K. Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 541:424–431.
115. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol.* 2000; 223(2):217–237.
116. Rashid NA, Lalitkumar S, Lalitkumar PG, Gemzell-Danielsson K. Endometrial receptivity and human embryo implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(Suppl 1):23–30.
117. Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology.* 1989; 125(3):1683–1690.
118. Martin L, Finn CA, Carter J. Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on the luminal epithelium of the mouse uterus. *J Reprod Fertil.* 1970; 21(3):461–469.
119. Song H, Han K, Lim H. Progesterone supplementation extends uterine receptivity for blastocyst implantation in mice. *Reproduction.* 2007; 133(2):487–493.
120. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999; 340(23):1796–1799.
121. Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(5):2963–2968.
122. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian

- stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril*. 2011; 96(2):344–348.
123. Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, Fauser BC. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrinol Metab*. 2004; 15(2):84–90.
124. Song H, Lim H. Evidence for heterodimeric association of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and gp130 in the mouse uterus for LIF signaling during blastocyst implantation. *Reproduction*. 2006; 131(2):341–349.
125. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology*. 2000; 141(12):4365–4372.
126. Menkhorst E, Zhang JG, Sims NA, Morgan PO, Soo P, Poulton IJ, Metcalf D, Alexandrou E, Gresle M, Salamonsen LA, Butzkueven H, Nicola NA, Dimitriadis E. Vaginally administered PEGylated LIF antagonist blocked embryo implantation and eliminated non-target effects on bone in mice. *PLoS One*. 2011; 6(5):e19665.
127. Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, Hirota Y, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of *Msx* homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell*. 2011; 21(6):1014–1025.
128. Leach RE, Jessmon P, Coutifaris C, Kruger M, Myers ER, Ali-Fehmi R, Carson SA, Legro RS, Schlaff WD, Carr BR, Steinkampf MP, Silva S, Leppert PC, Giudice L, Diamond MP, Armant DR. High throughput, cell type-specific analysis of key proteins in human endometrial biopsies of women from fertile and infertile couples. *Hum Reprod*. 2012; 27(3):814–828.
129. Terakawa J, Wakitani S, Sugiyama M, Inoue N, Ohmori Y, Kiso Y, Hosaka YZ, Hondo E. Embryo implantation is blocked by intraperitoneal

- injection with anti-LIF antibody in mice. *J Reprod Dev.* 2011; 57(6):700–707.
130. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25(3):341–373. [PubMed: 15180948]
131. Carson DD. Molecular and cell biology of embryo-uterine interactions: mammalian embryo implantation. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19(2):160.
132. Lundkvist O. Morphometric estimation of stromal edema during delayed implantation in the rat. *Cell Tissue Res.* 1979; 199(2):339–348.
133. Salleh N, Baines DL, Naftalin RJ, Milligan SR. The hormonal control of uterine luminal fluid secretion and absorption. *J Membr Biol.* 2005; 206(1):17–28.
134. Yang JZ, Ajonuma LC, Tsang LL, Lam SY, Rowlands DK, Ho LS, Zhou CX, Chung YW, Chan HC. Differential expression and localization of CFTR and ENaC in mouse endometrium during pre-implantation. *Cell Biol Int.* 2004; 28(6):433–439.
135. He Q, Tsang LL, Ajonuma LC, Chan HC. Abnormally up-regulated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and uterine fluid accumulation contribute to *Chlamydia trachomatis*-induced female infertility. *Fertil Steril.* 2010; 93(8):2608–2614.
136. Kleyman TR, Carattino MD, Hughey RP. ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J Biol Chem.* 2009; 284(31):20447–20451.
137. Fejes-Toth G, Frindt G, Naray-Fejes-Toth A, Palmer LG. Epithelial Na⁺ channel activation and processing in mice lacking SGK1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294(6):F1298–1305.
138. Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev.* 2006; 86(4):1151–1178.

139. Fisher SJ, Giudice LC. SGK1: a fine balancing act for human pregnancy. *Nat Med.* 2011; 17(11):1348–1349.
140. Salker MS, Christian M, Steel JH, Nautiyal J, Lavery S, Trew G, Webster Z, Al-Sabbagh M, Puchchakayala G, Foller M, Landles C, Sharkey AM, Quenby S, Aplin JD, Regan L, Lang F, Brosens JJ. Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. *Nat Med.* 2011; 17(11):1509–1513.
141. Armant DR. Life and death responses to trophinin-mediated adhesion during blastocyst implantation. *Cell Cycle.* 2011; 10(4):574–575.
142. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285(5430):1028–1032.
143. Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat.* 2009; 215(1):3–13.
144. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* 1997; 2(2):84–93.
145. Liu WM, Pang RT, Cheong AW, Ng EH, Lao K, Lee KF, Yeung WS. Involvement of microRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37039.
146. Aplin JD, Spanswick C, Behzad F, Kimber SJ, Vicovac L. Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2(7):527–534.
147. Wang J, Mayernik L, Armant DR. Trophoblast adhesion of the peri-implantation mouse blastocyst is regulated by integrin signaling that targets phospholipase C. *Dev Biol.* 2007b; 302(1):143–153.
148. Liu WM, Pang RT, Cheong AW, Ng EH, Lao K, Lee KF, Yeung WS. Involvement of microRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37039.
149. Suzuki N, Zara J, Sato T, Ong E, Bakhiet N, Oshima RG, Watson KL, Fukuda MN. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with trophinin, tastin, and cytokeratin and may be involved in trophinin-mediated cell

adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(9):5027–5032.

150. Suzuki N, Nadano D, Paria BC, Kupriyanov S, Sugihara K, Fukuda MN. Trophinin expression in the mouse uterus coincides with implantation and is hormonally regulated but not induced by implanting blastocysts. *Endocrinology.* 2000; 141(11):4247–4254.
151. Sugihara K, Sugiyama D, Byrne J, Wolf DP, Lowitz KP, Kobayashi Y, Kabir-Salmani M, Nadano D, Aoki D, Nozawa S, Nakayama J, Mustelin T, Ruoslahti E, Yamaguchi N, Fukuda MN. Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(10):3799–3804.
152. Sugihara K, Kabir-Salmani M, Byrne J, Wolf DP, Lessey B, Iwashita M, Aoki D, Nakayama J, Fukuda MN. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGbeta and IL-1beta. *FEBS Lett.* 2008; 582(2):197–202.
153. Fukuda M, Miyoshi M, Nadano D. The role of bystin in embryo implantation and in ribosomal biogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(1):92–99.
154. Sugihara K, Sugiyama D, Byrne J, Wolf DP, Lowitz KP, Kobayashi Y, Kabir-Salmani M, Nadano D, Aoki D, Nozawa S, Nakayama J, Mustelin T, Ruoslahti E, Yamaguchi N, Fukuda MN. Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(10):3799–3804.
155. Armant DR. Life and death responses to trophinin-mediated adhesion during blastocyst implantation. *Cell Cycle.* 2011; 10(4):574–575.
156. Wang B, Sheng JZ, He RH, Qian YL, Jin F, Huang HF. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am J Reprod Immunol.* 2008; 60(2):127–134.
157. Nejatbakhsh R, Kabir-Salmani M, Dimitriadis E, Hosseini A, Taheripanah R, Sadeghi Y, Akimoto Y, Iwashita M. Subcellular localization of L-selectin ligand in the endometrium implies a novel

- function for pinopodes in endometrial receptivity. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10(1):46.
158. Margarit L, Gonzalez D, Lewis PD, Hopkins L, Davies C, Conlan RS, Joels L, White JO. L-selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects. *Hum Reprod*. 2009; 24(11):2767–2777.
159. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*. 2003; 299(5605):405–408.
160. Shamonki MI, Kligman I, Shamonki JM, Schattman GL, Hyjek E, Spandorfer SD, Zaninovic N, Rosenwaks Z. Immunohistochemical expression of endometrial L-selectin ligand is higher in donor egg recipients with embryonic implantation. *Fertil Steril*. 2006; 86(5):1365–1375.
161. Domino SE, Zhang L, Gillespie PJ, Saunders TL, Lowe JB. Deficiency of reproductive tract alpha(1,2)fucosylated glycans and normal fertility in mice with targeted deletions of the FUT1 or FUT2 alpha(1,2)fucosyltransferase locus. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(24):8336–8345.
162. Goodrich LV, Strutt D. Principles of planar polarity in animal development. *Development*. 2011; 138(10):1877–1892.
163. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R, Solter D, Knowles BB. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development*. 2004; 131(18):4435–4445.
164. Thie M, Rospel R, Dettmann W, Benoit M, Ludwig M, Gaub HE, Denker HW. Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod*. 1998; 13(11):3211–3219.
165. Li Q, Wang J, Armant DR, Bagchi MK, Bagchi IC. Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J Biol Chem*. 2002; 277(48):46447–46455.
166. Nallasamy S, Li Q, Bagchi MK, Bagchi IC. Msx homeobox genes critically regulate embryo implantation by controlling paracrine signaling

between uterine stroma and epithelium. *PLoS Genet.* 2012; 8(2):e1002500.

167. Matsuzaki S, Darcha C, Maleysson E, Canis M, Mage G. Impaired down-regulation of E-cadherin and beta-catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(7):3437–3445.
168. Reardon SN, King ML, MacLean JA, Mann JL, DeMayo FJ, Lydon JP, Hayashi K. CDH1 is essential for endometrial differentiation, gland development, and adult function in the mouse uterus. *Biol Reprod* (2). 2012; 86(5):141, 141–110.
169. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(3):185–199.
170. Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol.* 2004; 67(5):417–434.
171. Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR. Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod.* 1998; 59(3):470–475.
172. Cunha GR. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation.* 2008; 76(6):578–586.
173. Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(12):6535–6540.
174. Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS. Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(45):19272–19277.
175. Zhu L, Pollard JW. Estradiol-17beta regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(40):15847–15851.

176. Sato T, Wang G, Hardy MP, Kurita T, Cunha GR, Cooke PS. Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. *Endocrinology*. 2002; 143(7):2673–2679.
177. Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS. Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(45):19272–19277.
178. Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, Taylor JA, Kurita T, Cunha GR, Cooke PS. Tissue compartment-specific estrogen receptor-alpha participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology*. 1999; 140(1):484–491.
179. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*. 1995; 9(18):2266–2278.
180. Tranguch S, Cheung-Flynn J, Daikoku T, Prapapanich V, Cox MB, Xie H, Wang H, Das SK, Smith DF, Dey SK. Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005a; 102(40):14326–14331.
181. Tranguch S, Wang H, Daikoku T, Xie H, Smith DF, Dey SK. FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *J Clin Invest*. 2007; 117(7):1824–1834.
182. Franco HL, Rubel CA, Large MJ, Wetendorf M, Fernandez-Valdivia R, Jeong JW, Spencer TE, Behringer RR, Lydon JP, Demayo FJ. Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function. *FASEB J*. 2011b
183. Lee DK, Kurihara I, Jeong JW, Lydon JP, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of ERalpha activity by COUP-TFII is essential for successful implantation and decidualization. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(5):930–940.

184. Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK, Bagchi IC. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science*. 2011; 331(6019):912–916.
185. Franco HL, Rubel CA, Large MJ, Wetendorf M, Fernandez-Valdivia R, Jeong JW, Spencer TE, Behringer RR, Lydon JP, Demayo FJ. Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function. *FASEB J*. 2011b
186. Spencer TE, Dunlap KA, Filant J. Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 354(1–2):34–53.
187. Bazer FW. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci*. 1975; 41(5):1376–1382.
188. Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod*. 2001c; 64(6):1608–1613.
189. Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, Ott TL, Bazer FW, Gray CA, Spencer TE. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999; 54:287–302.
190. Brody JR, Cunha GR. Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *Am J Anat*. 1989; 186(1):1–20.
191. Koff AK. Development of the vagina in the human fetus. *Contrib Embryol*. 1933; 24(140):59–91.
192. Narazaki M, Witthuhn BA, Yoshida K, Silvennoinen O, Yasukawa K, Ihle JN, Kishimoto T, Taga T. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(6):2285–2289.
193. Song H, Lim H. Evidence for heterodimeric association of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and gp130 in the mouse uterus for LIF signaling during blastocyst implantation. *Reproduction*. 2006; 131(2):341–349.

194. Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(15):8680–8685.
195. Daikoku T, Song H, Guo Y, Riesewijk A, Mosselman S, Das SK, Dey SK. 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*. 2004; 18(5):1238–1250.
196. Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, Hirota Y, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell*. 2011; 21(6):1014–1025.
197. Besnard V, Wert SE, Hull WM, Whitsett JA. Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr Patterns*. 2004; 5(2):193–208.
198. Bazer FW. Uterine adenogenesis and pregnancy: multiple roles for Foxa2 in mice. *Biol Reprod*. 2010; 83(3):319–321.
199. Miller C, Sassoon DA. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*. 1998; 125(16):3201–3211.
200. Dunlap KA, Filant J, Hayashi K, Rucker EB, Song G, Deng JM, Behringer RR, DeMayo FJ, Lydon J, Jeong JW, Spencer TE. Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod*. 2011; 85(2):386–396.
201. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*. 2007; 450(7170):721–724.
202. Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ, Hu W. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J*. 2011; 25(7):2245–2255.

203. Yue L, Daikoku T, Hou X, Li M, Wang H, Nojima H, Dey SK, Das SK. Cyclin G1 and cyclin G2 are expressed in the periimplantation mouse uterus in a cell-specific and progesterone-dependent manner: evidence for aberrant regulation with Hoxa-10 deficiency. *Endocrinology*. 2005; 146(5):2424–2433.
204. Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*. 2010; 28(1):17–26.
205. Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Paria BC. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Sci*. 2004d; 117(1):53–62.
206. Peng S, Li J, Miao C, Jia L, Hu Z, Zhao P, Zhang Y, Chen Q, Duan E. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation. *Reproduction*. 2008; 135(3):367–375. [PubMed: 18299430]
207. Hustin J, Schaaps JP. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157:162.
208. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta* 2001; 22 Suppl A:S70.
209. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:84.
210. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25:287.
211. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21 Suppl A:S25.
212. Mi S, Lee X, Li X, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000; 403:785.

213. Knerr I, Beinder E, Rascher W. Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:210.
214. Charnock-Jones DS, Burton GJ. Placental vascular morphogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14:953.
215. Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta* 1994; 15:601.
216. Rand JH, Wu XX, Andree HA, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome—a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med* 1997; 337:154.
217. Singh H, Nardo L, Kimber SJ, Aplin JD. Early stages of implantation as revealed by an in vitro model. *Reproduction* 2010;139:905–14.
218. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:4.
219. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005;72:216–29.
220. Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002;23:401–30.
221. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppala M. Factors affecting fertilization: Endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63:377–83.
222. Mackenna A, Li TC, Dalton C, Bolton A, Cooke I. Placental protein 14 levels in uterine flushing and plasma of women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 1993;59:577–82.

223. Dey SK. Reproductive biology: fatty link to fertility. *Nature*. 2005; 435(7038):34–35.
224. Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for ‘on-time’ embryo implantation that directs subsequent development. *Development*. 2002; 129(12):2879–2889.
225. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999; 340(23):1796–1799.
226. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the ‘black box’ of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002; 8(4):333–343.
227. Armant DR. Blastocysts don’t go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol*. 2005; 280(2):260–280.
228. Chen Q, Zhang Y, Peng H, Lei L, Kuang H, Zhang L, Ning L, Cao Y, Duan E. Transient β 2-adrenoceptor activation confers pregnancy loss by disrupting embryo spacing at implantation. *J Biol Chem*. 2011; 286(6):4349–4356.
229. Rao KP, Belogolovkin V, Yankowitz J, Spinnato JA. Abnormal placentation: evidence-based diagnosis and management of placenta previa, placenta accreta, and vasa previa. *Obstet Gynecol Surv* (2). 2012; 67(8):503–519.
230. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(3):185–199.
231. Berlanga O, Bradshaw HB, Vilella-Mitjana F, Garrido-Gomez T, Simon C. How endometrial secretomics can help in predicting implantation. *Placenta*. 2011; 32(Suppl 3):S271–275.
232. Chen Q, Zhang Y, Elad D, Jaffa AJ, Cao Y, Ye X, Duan E. Navigating the site for embryo implantation: Biomechanical and

molecular regulation of intrauterine embryo distribution. *Mol Aspects Med.* 2012

233. Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat.* 2009; 215(1):3–13.
234. Malatyahođlu E. Ektopik Gebelik. *Obstetrik Maternal Fetal Tıp ve Perinatoloji.* Ed: Beksaç S. 1.baskı İstanbul, Medical Network, 2001; 1086–1113.
235. Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly JL, Fernandez H, Gerbaud L, Job-Spira N. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. *Am J Epidemiol* 2003; 157 (3): 185-94.