

TC
KARADENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANA BİLİM DALI

Yönetmen: Prof.Dr. Aydın İnal

LUTEAL FAZ DEFEKTİ ,VE ENDOMETRİOZİSİ OLAN İNFERTİL
KADINLARDA ENDOMETRİUM ESTROJEN VE PROGESTERON RESEPTÖR
KONSANTRASYONLARI

Uzmanlık Tezi

Dr.Ömer Ferit Saraçoğlu

Trabzon
Temmuz 1985

İÇİNDEKİLER

- 1)- Önsöz
- 2)- Özet
- 3)- Giriş ve Amaç
- 4)- Genel Bilgiler
- 5)- Materyal ve Metod
- 6)-Sonuçlar

KISALTMALAR

- R : Reseptör
E2 : Estradiol
P : Progesteron
ER : Estrojen Reseptörü
PR : Progesteron Reseptörü
Ka : Afinite sabitesi
Kd : Çözünüm sabitesi
[R] : Serbest reseptör konsantrasyonu
[Ro] : Toplam reseptör konsantrasyonu
[HR] : Bağlı reseptör konsantrasyonu
S : Svedberg ünitesi
DNA : Deoksiribonükleik asit
RNA : Ribonükleik asit
m : Mesaj taşıyan
LPD : Luteal Faz Defekti
DES : Dietilstilbesterol
MOPS: Morfolinopropan sülfonik asit
BSA : Sığır serum albumini
CPG : Kortikosteroid bağlayan globulin
ng : Nanogram
pg : Pikogram
fem.: Fentamol

ÖNSÖZ

Modern jinekolojinin bir yandan doğum kontrol yöntemlerini geliştirmeye çalışırken diğer yandan infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilmeleri için uğraşması bir çelişki gibi görünmektedir. Ancak bir Çin atasözü olan "Çocuksuz bir aile meyvesiz bir ağaca benzer" cümlesi, ve tüm dünyada infertilitenin önemli bir sosyal ve psikolojik problem nedeni olduğu düşünüldüğünde konunun çözümü için harcanan çabaların az bile olduğu görülür.

İnfertilitenin bilinen nedenleri olmakla birlikte ,bu nedenlerin çoğunun başlangıcı ve gelişim mekanizmaları yeterince açık değildir. Üzerinde çalışmaların yoğunlaştığı nedenler arasında luteal faz defektleri ve endometrioziste yer almaktadır.

Bizimde bu araştırmaya başlarken amacımız infertiliteye yol açabildikleri kesinlikle bilinen endometriozis yada

luteal faz defekti olan kadınlarda endometrial estrojen ve progesteron reseptörlerinin konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını göstermekti. Planlanan bu çalışma Amerika Birleşik Devletleri, Güney Alabama Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümünde ve bu kliniğe ait üreme endokrinolojisi laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Tezimi planlamamda ve hazırlanmasında daima destek ve yardımını gördüğüm sayın hocam Prof.Dr. Aydın İnal'a teşekkür etmek isterim. Ayrıca Amerika Birleşik Devletlerinde gözetimi altında bu çalışmayı gerçekleştirdiğim sayın Prof.Dr. Sezer Aksel'e, laboratuvar direktörü sayın R.R.Yeoman, PhD a teşekkürü borç bilirim.

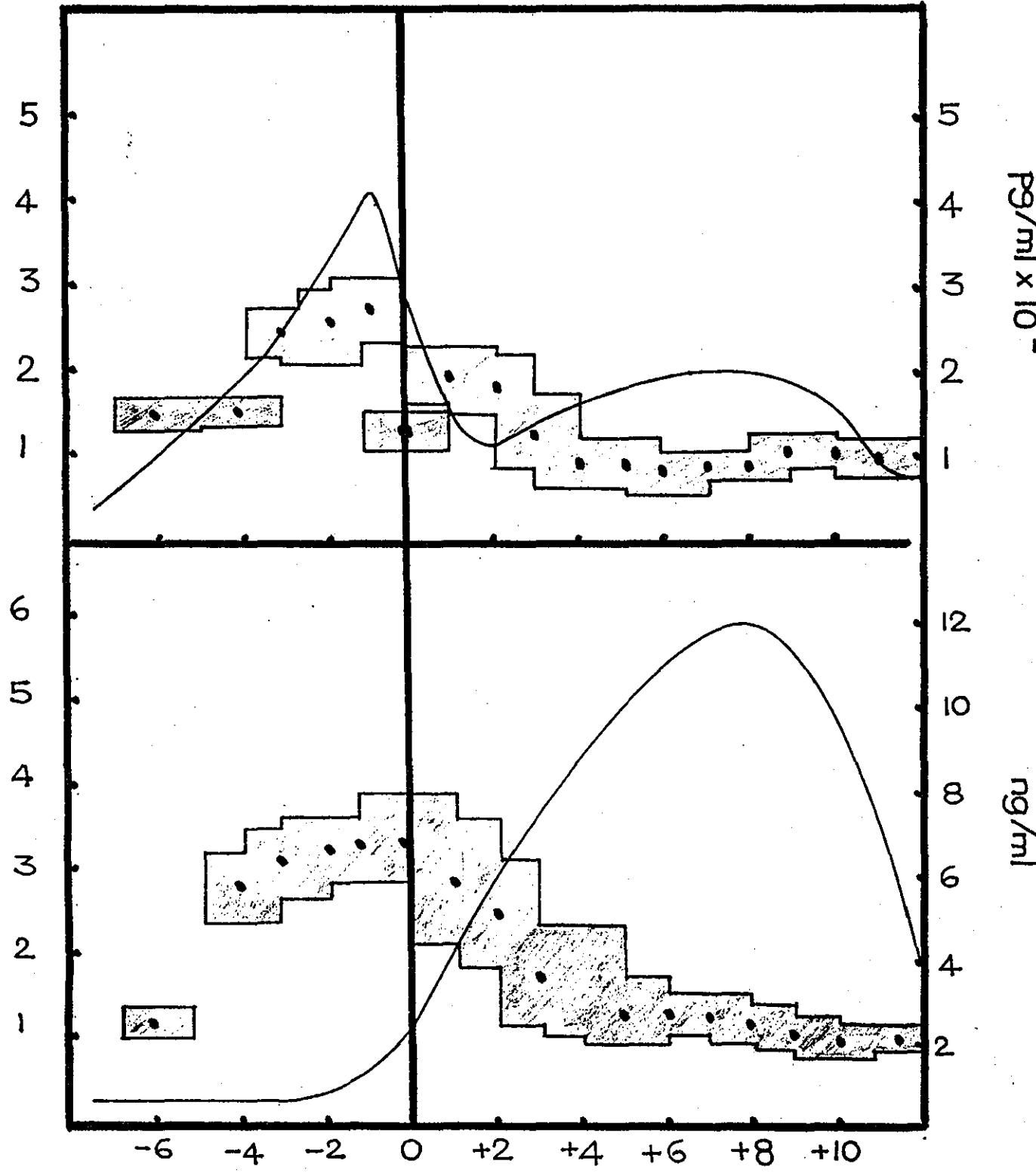
GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan endometriyumunda sitoplazmik estrogen ve progesteron reseptörlerinin ölçümünden kısa bir süre sonra , bu proteinlerin dolaşımdaki estradiol ve progesteron konsantrasyonuna bağlı olarak menstrual siklus boyunca değişim gösterdiğide bulunmuştur (5,25,28,31,56,62). Estrogen ve progesteron reseptörlerinin konsantrasyonları folliküler fazda artan periferik estradiol konsantrasyonuna paralel olarak yükselmekte, luteal dönemdeyse artan progesteronun etkisiyle düşmektedir (5,9,14,25,44,46,47,62). Ancak literatürde endometriol estrogen ve progesteron reseptörlerinin periferik hormon seviyelerinden etkilenmediğini gösteren rapörlarda mevcuttur (30,56,76).

Endometriyumun yetersiz gelişmesinin endometrial progesteron reseptörlerindeki bir bozukluk, yada yetersizlik

nedeniyle olabileceği ilk kez 1979 yılında Keller ve arkadaşlarınca (52) bildirilmiştir. Bunu takiben Laatikainen ve arkadaşları (58), ve Gautray ve arkadaşları da (34) yetersiz endometrial gelişmenin azalmış serum progesteron seviyesine değil ama yetersiz progesteron reseptörü gelişmesiyle ilgili olduğunu gösterdiler. Ancak bu araştırmacıların aksine McRae ve arkadaşlarıysa 1984 yılında yayınladıkları çalışmalarında (76) normal ve yetersiz luteal fonksiyonları olan hastalarda endometriyumda sitoplazmik estrogen ve progesteron reseptörlerinin konsantrasyonları arasında önemli bir farkın bulunmadığını bildirdiler.

Bu çalışma bugüne kadar çeşitli araştırmacıların elde etmiş olduğu zıt sonuçlara açıklık getirebilmek için planlandı. Normal ve yetersiz luteal fonksiyon gösteren kadınlardan ve endometriozise bağlı infertilitesi olan hastalardan elde edilen endometrial dokularda estrogen ve progesteron reseptör konsantrasyonları ölçülerek infertilite hastalarında reseptör tayinlerinin klinik önemi gözden geçirildi.



GENEL BİLGİLER

İnsan vücudunda sınırlı sayıdaki hücreler bugünkü bilgilerimize göre 50 kadar hormonun yapımından sorumludur. Vücuttaki diğer hücrelerse hormon üretmemelerine rağmen bir veya birden çok hormonun hedef hücresidir.

Klasik görüşlere göre her hormon belirli bir hücre grubunu etkilemektedir. Örneğin tiroid uyarıcı hormon (TSH) tiroid bezindeki asiner hücreleri, adrenokortikotropik hormon (ACTH) adrenal korteksteki hücreleri, luteinize edici hormon (LH) gonadları etkiler. Ancak geliştirilen yeni tekniklerin sonucunda biyokimyasal bilgilerimizdeki artışlar hormonların daha geniş bir hücre grubunu etkilediğini düşündürmektedir.

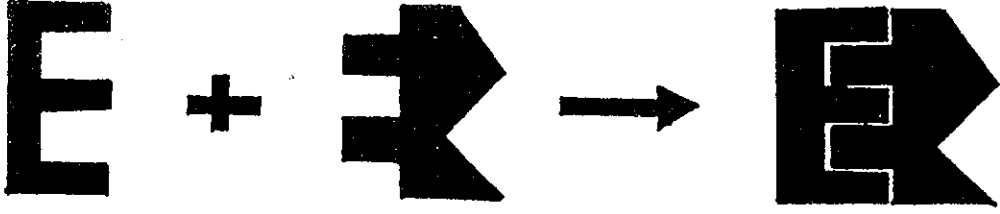
Hormonlar bir hücrenin belirli fonksiyonları yapabilmesi için gerekli olan sinyaller şeklinde düşünülebilir. Ancak bu

sinyale verilecek cevaplar tümüyle hücrenin yapısıyla ilgilidir. Örneğin insülin yağ hücrelerinde glikoz naklini ve lipid biyosentezini uyarırken karaciğer hücresinde amino asit naklini, ve glikojen yapımını uyarmakta, pankreas hücrelerinde glukagon yapımını inhibe etmekte, ve beyin omurilik sıvısına verildiğinde iştahı azaltıp, kilo kaybına neden olmaktadır.

Hormonlar dolaşımında oldukça düşük konsantrasyonlarda (genellikle 10^{-9} - 10^{-12} mol) bulunur. Tüm hücreler dolaşımdaki hormonlarla eşit konsantrasyonlarda karşılaşır, ancak belirli hormonlara belirli hücre grupları cevap verebilir. Bunun nedeniyse cevap veren hücrelerde hormona karşı reseptör adı verilen , özel algılayıcı proteinlerin bulunmasıdır (4,37,42,72,81,82). Reseptörler diğer tüm hormonların arasından kendilerine özgü biyoaktif hormonu bağlarlar. Bu reseptörün yaklaşık 1 milyar molekül arasında kendine özgü bir molekülü bulabilme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Biyolojik aktivitenin görülebilmesi için belirli sayıda reseptörün hormonla bağlanması gerekir.. Ancak bu sayının alt sınırının ne olduğu bilinmemektedir.

Hormonlar etkilerini hücre zarı seviyesinde , adenil siklaz enzim sistemini aktive ederek (peptid ve glukoprotein hormonlar) yada hücre içine girdikten sonra sitoplazmada reseptörleriyle birleşerek gösterirler (küçük steroid hormonlar). Hücre zarında yada sitoplazmada hormonun reseptöre bağlanabilmesi için üzerinde reseptör üzerindeki

bir bölgeyi tamamlayıcı yapılara sahip olması gerekir (Şekil 1)(37,81,82). Bu yapıların birbirine uygunluğunu tanımlamada afinite terimi kullanılır, ve Ka ile gösterilir.



Sekil 2- Hormonların reseptör üzerindeki yapıları tamamlaması.

$$\text{Afinite (Ka)} = \frac{[\text{HR}]}{[\text{H}][\text{R}]} \quad (1)$$

$$[\text{H}] = [\text{Ho}] - [\text{HR}] \quad (2)$$

$$[\text{R}] = [\text{Ro}] - [\text{HR}] \quad (3)$$

Eşitlik 1 de görüldüğü gibi matematiksel olarak afinite hormon-reseptör kompleksi konsantrasyonunun serbest hormon ve reseptör konsantrasyonlarına oranına eşittir. Hormon ve reseptör konsantrasyonlarıysa eşitlik 2 ve 3 te görüldüğü gibi hesaplanır. Bu formüllerde [R] ;serbest reseptör konsantrasyonunu, [Ro]; toplam reseptör konsantrasyonunu, [HR] ise bağlı reseptör konsantrasyonunu göstermektedir.

Biyokimyasal terminolojide afiniteden bahsedilirken genellikle çözünüm afinitesi (Kd) kullanılır. Çözünüm afinitesi eşitlik 4 de görüldüğü gibi kolayca hesaplanabilir;

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad (4)$$

Afinitenin sıfır olması herhangi bir aktivitenin olmadığını gösterir. Hormonun yada derivatilerinin etkili olabilmesi için $K > 0$ olmalıdır.

Hormonların reseptörlerine bağlandıktan sonra biyolojik cevap oluşturabilme yeteneği intrinsek aktivite olarak tanımlanır. Tüm aktif hormonların yada analoglarının afinitelerine ilaveten intrinsek aktivitelerinin de > 0 olması gerekir. Intrinsek aktiviteleri ve afiniteleri > 0 olan analoglara agonist, < 0 olanlara antagonist adı verilir.

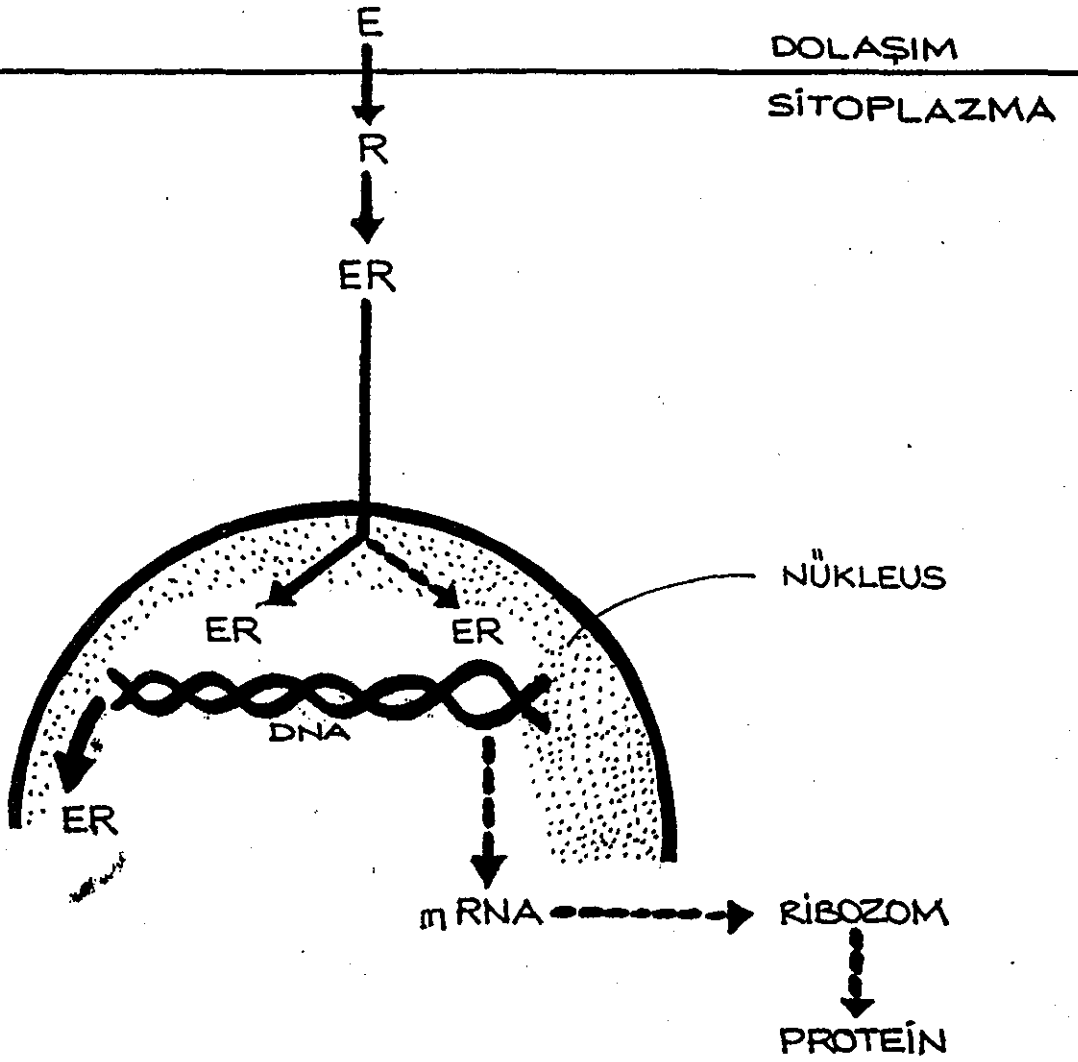
Reseptörlerin yapıları konusundaki bilgilerimiz oldukça sınırlı olmakla birlikte hormonlardan çok daha karmaşık olduklarını bilmekteyiz (38,42,72). Hormonlar nadiren çift zincirli oldukları halde reseptörler genellikle çift peptid zincirine sahiptir. Hormonların molekül ağırlıkları genellikle 300-50 000 Dalton ken reseptörlerinki 30 000- 1 000 000 Dalton arasında değişmektedir (38,64). Reseptörlerin oldukça sağlam bir yapısı vardır. Ortamda deterjanlar olmadığı sürece hiçbir sıvıda çözünmezler. Oldukça spesifik olan reseptörlerin hormon bağlama kapasiteleri sınırlıdır. Bu nedenledirki hormon konsantrasyonlarındaki en küçük değişiklikten bile etkilenirler.

Reseptörler hücre zarında, yada hücre içinde olabilirler. Hücre içinde plazmada, çekirdek zarında, endoplazmik retikülumlarda, yada Golgi cisimciği gibi diğer membranoz

yapılar üzerinde bulunurlar (37,72,81,82). Reseptörlerinde vucuttaki diğer proteinler gibi yapımları ve yıkımları söz konusudur. Şayet bir hücredeki reseptör konsantrasyonu değişmiyorsa bu yıkım ve yapımın eşit olduğunu gösterir. Yapım ve yıkım olayı okadar hızlıdır ki hücredeki toplam reseptör konsantrasyonu birkaç dakika içinde değişebilmektedir(72).

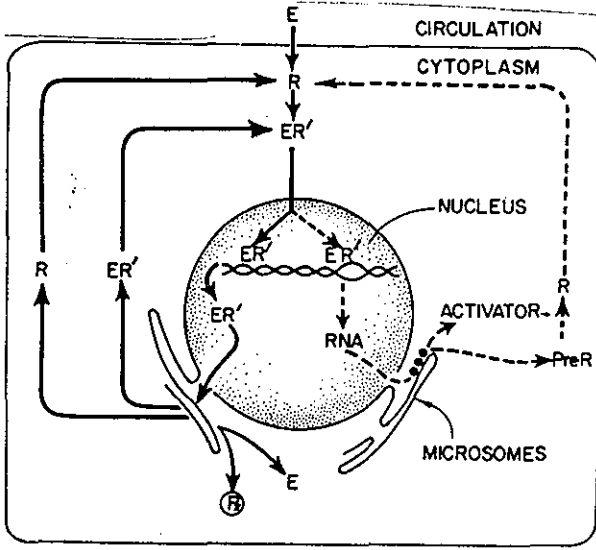
Ligand hücre içerisine girdikten sonra sitoplazma içerisinde serbest halde bulunan reseptörlere bağlanarak nükleusa doğru ilerlerler(Sekil 3). Bu harekete translokasyon adı verilir (37,72,81,82,84). Nükleusa gelen hormon-reseptör kompleksleri inaktif durumdadır. Bu nedenle taşıdıkları mesajları DNA ya iletmezler (78).

Transformasyon olayı nükleer translokasyonu takiben ortaya çıkar. Bu konunun kinetiği üzerinde yapılan çalışmalar (64) göstermiştir ki nükleusa giren estrogen reseptörlerinin aktive olmamış formları süroz gradientlerde 4-Svedberg ünitesi (S) gelmektedir. Nükleusa giren 4-S komplekslerinin konsantrasyonu 1 saat kadar sabit kaldıktan sonra gittikçe artan bir hızla 5-S komplekslerine dönüşürler (50,64,66,103). 4-S formlarının molekül ağırlığı 70 000 ken bir dimer olan 5-S formlarının molekül ağırlığı 132 000 dir (69). Nükleusa normalde sadece küçük moleküllerin girişi mümkünken 5-S gibi



Sekil 3_ Hormonun hücre içine girdikten sonra reseptörle birleşerek translokasyonu.

Bağlanma olayı hücre içi ısısının , reseptör konsantrasyonunun ve iyonik yapının bir fonksiyonudur. (49,86,100,102,103). Translokasyon hücre içine girişten daha yavaş bir işlemdir (85), buda bağlanmayı takiben oluşan kompleksin nükleusa iletilildiğinin delilidir. Translokasyon sonunda başlangıçtaki sitoplazmik reseptör konsantrasyonuna bağlı olarak sitoplazma ve nükleus arasında bir denge oluşur (105,106).



Şekil 4 serbest kalan reseptörler yeniden sitoplazmaya geçerek hücre içine girişi devam eden estradiole bağlanabilirler

Progesteron reseptörleride bir dimer olup 6-S yapısındadır (13,24,97). Molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 200 000 dir ve birbirinden ayrı iki altyapıdan oluşur. Bu altyapılardan biri DNA ya karşı yüksek bir afiniteye sahipken diğeri kromatin üzerindeki histon olmayan asidik proteinlere bağlanır (13,80,102). Kromatine bağlanan kısımlar nükleus içine girdikten sonra bağlanacağı noktaları arayarak bulmaktadır.

Nükleus içerisine giren hormon reseptör kompleksleri 1 saatin sonunda maksimum seviyeye ulaşırlar (35,100). Reseptörlerin geçici olarak sitoplazmadan nükleusa geçişleri çeşitli in vivo ve in vitro araştırmalarla gösterilmiştir (21,105). Kromatin heterojen bir yapıya sahip olduğundan muhtemel protein-protein, yada protein-nükleik asit etkileşimleri nedeniyle nükleus içerisine giren reseptör hormon komplekslerinde taşıdıkları mesajları DNA ya iletebilmeleri için bazı değişiklikler olmaktadır. Bir anlamda aktivasyon olarak adlandırılabilen bu olaylara transformasyon denilir (16,41,78). Transformasyonu reseptör

hormon komplekslerinin DNA ya bağlanması izler (32,39,53,59,101,102,115).

DNA ya mesajların iletilme işlemine transkripsiyon adı verilir. Transkripsiyon hücrede DNA nın replikasyonuna, bölünmeye ve mRNA sentezine,ve subsellüler bir yapı olup içeriğinde proteinler, nukleik asit ve fosfolipidler bulunan hücre matriksinde artmaya yol açar (3,6,7,39,40,61,73,98,105). Oluşan mRNA larında görevi ribozolarda hormonun etkisini gösterebilmesi için gerekli olan yeni proteinlerin yapım emrini taşımaktır.

Kısa bir süre önce sitoplazma ve nükleusta yer alan ,özel, estrogen bağlayan proteinler saptanmıştır (1,2,23,29,60). Bunlar Tip-I ve Tip-II olmak üzere iki gruptur. Tip-I reseptörleri bildiğimiz klasik estrogen reseptörleridir. Tip-II sitoplazmik proteinlerinin Tip-I reseptörlerinden farkıysa translokasyonlarının söz konusu olmamasıdır. Ancak dışarıdan estrogen verildiğinde bu proteinlerin nükleustaki konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir (1,2). Tip-II reseptörlerinin özellikleri ve fonksiyonlarının ne olduğu tam olarak bilinmeyen, ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılan bir konudur.

Daha önce belirtildiği gibi normalde sitoplazmik ve nükleer reseptör konsantrasyonları arasında belirli bir denge vardır (107). Ancak geçtiğimiz yıl sonlarında yapılan yeni bazı çalışmalar (111) göstermiştir ki istirahat halindeki estrogen reseptörleri nükleus içinde yada nükleus zarı

üzerinde yer almaktadır. Bu yeni teori günümüze gelinceye kadar yapılmış tüm araştırmaları, ve sitoplazmik reseptör kavramını ve değerini reddeden bir tutum içerisindedir. Ancak henüz konu tam anlamıyla açıklığa kavuşmadığından mevcut sonuçların değersiz olduğunu kabul etmek şimdilik anlamsızdır.

Ortamdaki estradiol konsantrasyonunun artışı hücre içerisinde sitoplazma ve nükleus arasındaki anlatılan dengenin bozulmasına yol açar. Yeni reseptör proteinlerinin yapımını artırırılar (=rplenishment)(17,18,19,51,62,94). Ancak verilecek çeşitli kimyasal maddelerle (Cycloheximide, Actinomycin-D, protein yada RNA sentezini inhibe eden maddeler) reseptör yapımını durdurabilmektedir(72).

şekil 4 de görüldüğü gibi nukleusa giren hormon reseptör kompleksleri yıkıma uğradıktan sonra serbest kalan reseptörler yeniden sitoplazmaya geçerek hücre içine girişi devam eden estradiole bağlanabilirler (89). Bu işleme "recycling" adi verilir. Böylece dolaşımda sürekli olarak mevcut olan hormonun etkisinin devamı sağlanmış olur. Reseptör yarı ömrünün estradiol etkisiyle uzaması , hücre içinde hormon birikiminide önlemiş olur.

Estrojenin etkisinin aksine progesteron hücre içinde kendi reseptörleri ve estrojen reseptörlerinin konsantrasyonları üzerinde negatif bir düzenleyici etki gösterir (9,14,44,46,92). Ancak progesteronun estrojen reseptörlerine bağlanmak için estradiolle kompetisyona

girmesi söz konusu değildir (69,72). Progesteronun kendi reseptörleri ve estrogen reseptörleri üzerindeki etkileri ortamda estradiol varken görülmektedir. Yani reseptör konsantrasyonlarının kontrolünde dominant olan hormon progesterondur (5,9,14,25,43,44,46,47,62).

Sitoplazmik progesteron reseptörlerinin konsantrasyonu progesteron verildikten yaklaşık 1 saat sonra en düşük seviyeye inmektedir (108). 9-12 saat sonra yükselmeye başlamakta ancak 27-72 saat sonra yeniden en düşük seviyeye inmektedir. Sitoplazmanın aksine nükleustaysa reseptör konsantrasyonu 1 saat sonra en yüksek değere ulaşmaktadır (109). Bu değişiklikler liganda, bağlanma afinitesindeki azalmalara, veya kalsiyuma bağımlı proteoliziste artmaya bağlı olmaksızın gelişmektedir. Ancak reseptör konsantrasyonundaki düşmeye rağmen progesteronun biyolojik etkileri normalen devam eder.

Estrojene hassas olan dokuların pek çoğunda progesteron reseptörleride bulunmaktadır ve yapılan estrogen tedavileri bunlarında seviyelerinde artmaya neden olur (47,63,69,83,104). Normal menstrual siklus sırasında hormon seviyelerinde çeşitli dalgalanmalar mevcuttur (Şekil 1). Bu dalgalanmaların etkileri reseptör konsantrasyonlarında kolayca yansımakta ,ve folliküler fazla luteal faz arasında gerek estrogen gerekse progesteron reseptörlerinin farklı konsantrasyonlarda olmasına neden olmaktadır (59,60,63). Şekil 1 de de görüldüğü gibi folliküler fazda yükselmeye

başlayan estradiol seviyesine paralel olarak estrogen ve progesteron reseptörlerinin konsantrasyonu artmaya başlar ve ovulasyonu takiben en üst seviyeye ulaşırlar. Ancak corpus luteumun progesteron sekresyonu arttıkça progesteronun etkisi baskın hale geçerek luteal dönemde gittikçe azalan reseptör konsantrasyonlarına neden olur.

Çalışmalar göstermiştir ki follüküler fazda endometriumda hücre içerisine giren estradiolün ancak % 80-90 ı nükleusa ulaşabilmektedir (20,22,106). Ancak luteal faz için bu değer sadece % 20-30 dur (12).

Normalde androjenlerde hedef hücrelerde estrogen reseptörlerinin nükleer translokasyonuna neden olmaktadır (33,55,87,88,90,91,96). Böylece hücre büyümesi ve progesteron reseptörlerinin sentezide uyarılmış olur (116).

Yaş ilerledikçe estrogen ve progesteron reseptörlerinin bağlama kapasiteleri aynı kalmakla birlikte sayılarında azalma başlamaktadır (10,45). Yinede azalan sayı dolaşımdaki estradiol ve progesteronun normal biyolojik cevaplarının oluşabilmesi için yeterli olmaktadır. Ancak progesteronun estrogen reseptörleri üzerindeki etkisi zayıflar . Bu zayıflamada reseptörlerin moleküler yapılarındaki değişiklikler etkili olmaktadır. Çünkü genç uteruslarda estrogen reseptörleri 8-S yapısındayken yaşlı uteruslarda 4-5 S yapısındadır (93).

MATERYAL VE METHOD

HASTA SEÇİMİ :

Bu çalışma Güney Alabama Üniversitesi , İnsan Haklarını Koruma Komitesince onaylandıktan sonra , adı geçen üniversiteye bağlı Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümüne infertilite şikayetiyle başvuran 72 kadın hastada yapılmıştır.

Çalışmada yer verilen tüm hastaların bazal vucut ısısı çizelgeleri incelenip ,post koital test , histerosalpingogram, endometrial biopsi, ve laparoskopi yapılarak infertilitenin nedeni araştırıldı.Araştırma sonuçlarına göre hastalar üç gruba ayrıldı. Bunlar ; 1)-Gününe uygun endometrial biopsileri olan ,normal siklik kadınlar (N=40), 2)- Luteal faz defekti olan , normal siklik kadınlar (N=22), 3)- Hafif yada orta derecede endometriozisi

olan, normal siklik kadınlar (N=12).

ENDOMETRIAL BİOPSİ :

Tüm hastalarda endometrial biopsiler bazal vucut ısısı çizelgelerine göre, beklenen adetten 2-4 gün önce xylocainle lokal anestezi uygulanarak , Novak küretiyle mümkün olduğunca reseptör açısından en zengin kısım olduğu bilinen fundus bölgesinden alındı (107). Elde edilen endometrial dokuların bir kısmı hemen kuru buz üzerinde dondurulurken (114), geri kalanı formalin içerisinde tespit edilerek histolojik tanı amacıyla patoloji bölümüne gönderildi. Kuru buz üzerinde üreme endokrinolojisi bölümü laboratuvarlarına taşınan dokular reseptör analizleri yapılincaya kadar -80 °C de muhafaza edildiler.

Biopsilerin histolojik incelemelerinde Noyes, Hertig, ve Rock'un (79) kriterlerine göre saptanan adet günüyle ,biopsinin alındığı gün arasındaki farkın 2 den fazla olduğu hastalarda luteal faz defekti olduğu kabul edilerek takip eden siklusta yeniden endometrial biopsi alındı. Yeniden luteal faz defekti bulunan hastalarını tanısı kesinleştiğinden Grup 2 içerisinde çalışmaya alındı.

Histolojik incelemelerin sonucuna göre luteal dönem üç eşit faza ayrıldı. Bunlar ;16-19, 20-23, ve 24-27. günlerdir. İncelemelerde siklus günü 22-23 olarak saptanan dokular 24-27. günler grubuna, 19-20 olanlarsa 20-23. günler grubuna ilave edildi.

SERUM ÖRNEKLERİ :

Hastaların tamamından biopsiyle aynı günde venöz kan örnekleride alınarak pıhtılaşması beklenip santrifüje edildi. Elde edilen serumlar estradiol ve progesteron ölçümleri yapılmaya kadar -20°C de saklandı.

KULLANILAN MADDELER :

Laboratuvarda kullanılan tüm maddeler Fisher Scientific Company den (Fairlawn, New Jersey, ABD) alındı. 17-[2,4,6,7- H]-Estradiol (90-115 Ci/m mol) ve (1,2-H)-Progesterone (40-60 Ci/m mol) New England Nuclear Chemical Şirketinden (Boston, MA, ABD) alındı. Diethylstilbesterol (DES), sodyum molibdat , sığır serum albumini ve monitiyogliserol Sigma Şirketinden (St.Louis, MO, ABD), kortizol ve progesteron Steraloids Şirketinden (Wilton, NH, ABD) satın alındı. Asit buffer materyali olan morfolinopropan-sulfonik asit (MOPS) Calbiochem-Behring Şirketinden (La Jolla ,California, ABD) ve Dekstran T-70 Pharmacia Şirketinden (Piscataway, New Jersey, ABD) getirtildi. Asseylerde kullanılan buffer materyali 0.01 M MOPS, 0.0015 M EDTA, 0.02 M sodyum molibdat, % 0.02 sodyum azid, 0.001 M monitiyogliserol ,ve % 10 luk gliserolden 23°C sıcaklıkta , pH 7.6 olacak şekilde hazırlandı. Gliserol spesifik progesteron bağlama aktivitesini sabit tutabilmek amacıyla (110), sodyum molibdat ise proteolitik aktiviteyi

inhibe etmek amacıyla kondu (27). Bağlı steroidleri serbest olanlardan ayırabilmek için assay buffer solusyonu ve % 0.5 lik Norite-A, % 0.05 lik Dekstran T-70 ve % 1 lik sığır serum albumini eklenerek hazırlanan dekstranla kaplanmış charcoal solüsyonu kullanıldı.

ENDOMETRİAL CYTOSOLLERİN HAZIRLANMASI :

Tüm işlemler 0-4°C de yapıldı (114). Yaklaşık olarak her biri 50-250 mg gelen endometrial biopsi örnekleri 1 ml buffer içeren polikarbonattan yapılmış ultrasantrifüj tüpleri içerisinde ince uçlu bir makas yardımıyla küçük parçalar halinde kesildi. Hazırlanan örnekler aynı tüplerde ve buz banyosu içerisinde Polytron homojenizatörü ile homojenize edildi. Bu amaçla 5.5 a ayarlanan homojenizatörle 3-8 saniye süreyle çarpıldı. Çarpma işleminden sonra 1 dakika ara verilerek , işlem herbir örnek için üç kez tekrarlandı. Elde edilen homojenizatlar Spinco SW 50.1 rotoru ile Beckman L 5-65 ultrasantrifüjü (Beckman Instruments, Palo Alto, California, ABD) içinde 45 dakika süreyle 35 000 devir/dakikada (115 000 kez g) çevrildi. Yüzeide toplanmış lipid tabakası bozulmaksızın tüplerin üstünde kalan berrak süpernatant (cytosol) alınarak çökeltiiler atıldı (27). Elde edilen cytosolün bir kısmı alınarak Coomassie-mavisi boya bağlama methodunun Bradford tarafından modifiye edilmiş şekliyle örnekteki protein miktarını ölçmede kullanıldı (11). Geri kalan cytosol ise bekletilmeksizin estrojen ve progesteron reseptörlerinin ölçülmesinde kullanıldı.

SİTOPLAZMIK RESEPTÖR ASSEYLERİ :

Gerek estradiolün gerekse progesteronun bağlanmasını ölçmede önceden bilinen dekstran kaplı charcoal tekniği ufak bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı (55).

Tüm endometrial cytosoller protein konsantrasyonları 0.5 mg/ml nin üzerinde olacak şekilde buffer solusyonuyla seyreltildi. Elde edilen cytosollerin 90 mikrolitresi estrogen reseptörlerini ölçebilmek için artan konsantrasyonlarda (0.5-0.8 nM) ³H-Estradiol eklenerek , ortamda 100 misli diethylstilbesterol varken ve yokken +4 °C de gece boyunca (17-19 saat) inkübe edildi. Progesteron reseptörleri için yine 90 mikrolitre cytosol içine gittikçe artan 6 değişik konsantrasyonda (1.25-25 nM) ³H-Progesteron eklenip ortamda 100 misli radyoaktif olmayan progesteron varken ve yokken +4 °C de 17-19 saat inkübe edildi. Ayrıca ³H-Progesteronun kortikosteroid bağlayan globulin (CBG) ,yada benzeri proteinlerle bağlanmasını önlemek amacıyla tüm progesteron tüplerine fazladan 100 mislide kortizol ilave edildi.

İnkübasyonlar 0.5 ml lik mikrotüplerde (Sarsted Inc., Princeton, New Jersey, ABD)her bir tüpe 10 mikrolitre ³H-steroid eklenerek yapıldı. Mevcut cytosolün miktarına göre ³H-steroidlerle 4 ila 6 ayrı konsantrasyon hazırlanarak Scatchard analizi uygulandı (95). Dokunun çok az olduğu durumlarda asseyler 45 mikrolitre cytosol ve 5 mikrolitre ³H-steroid kullanılarak yine 3-6 değişik konsantrasyonla

yapıldı. Steroidlere ait son konsantrasyonları saptamadaysa ³H-steroidlere ilave olarak 45 yada 90 mikrolitre buffer solüsyonu (cytosol yerine) kullanıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda her tüpe 100 mikrolitre % 1 lik sığır albumini içeren dekstran kaplı charcoal eklendi. Karışımlar vortekslendikten sonra yeniden +4°C de 10 dakika süreyle inkübe edildi. Bu sürenin bitiminde tüpler bir Eppendorf mikrosantrifüjünde (Brinkman Instrument Company, Fairlawn, New Jersey, ABD) 5 dakika süreyle santrifüje edildi. Mikrotüplerdeki süpernatanın 100 mikrolitresi (45 mikrolitre cytosol kullanıldığında 50 mikrolitre) alınarak bir sayım tüpünde 4 cc de sayım sıvısı (Scintiverse, Fisher Scientific Company, Fairlawn, NJ, ABD) eklenip karıştırıldı. Karışımlardaki radyoaktivite sayım etkinliği % 32-42 arasında değişen, ve sayımı bir tritium quench eğrisine göre belirleyen Beckman LS 7500 sıvı sintilasyon sayacında (Beckman Instruments, Palo Alto, California, ABD) sayıldı.

İnhibitör (diethylstilbesterol veya progesteron) içeren ve içermeyen tüpler arasındaki bağlama farkı reseptöre özgü bağlanmayı gösterir. Elde edilen bu sonuçlar Scatchard methoduna göre (95) analiz edilerek bağlanma noktalarının sayısı ve çözünüm sabitesi olan Kd bulundu. Sonuçlar birim olarak hem estrojen hemde progesteron reseptörleri için femtomol/miligram protein şeklinde hesaplandı. Sadece protein konsantrasyonu 0.5 mg/ml nin üzerindeki cytosollerin reseptör içerdiği kabul edildi. Hesaplanan reseptör konsantrasyonu

5-10 femtomol estrojen ve progesteron/miligram cytosol protein olduğunda dokuda reseptör yok kabul edildi.

Şekil 5 ve 6 da luteal faz defokti saptanan bir normal siklik kadında endometrial dokudaki estrojen ve progesteron reseptörlerine bağlanmayı temsil eden Scatchard grafikleri görölmektedir. Grafikler bağlama ile ilgili elde edilen her iki hormona ait bilgilerin lineer regresyon analizine göre tek bir doğru çizdiğini işaret etmektedir. Nispeten düşük olan çözünüm sabiteleriye bağlanma afinitesini göstermektedir.

Serum estradiol ve progesteron konsantrasyonları ise daha önceden gösterilmiş methodlara uygun olarak radioimmunoassay yöntemleriyle ölçüldü (26).

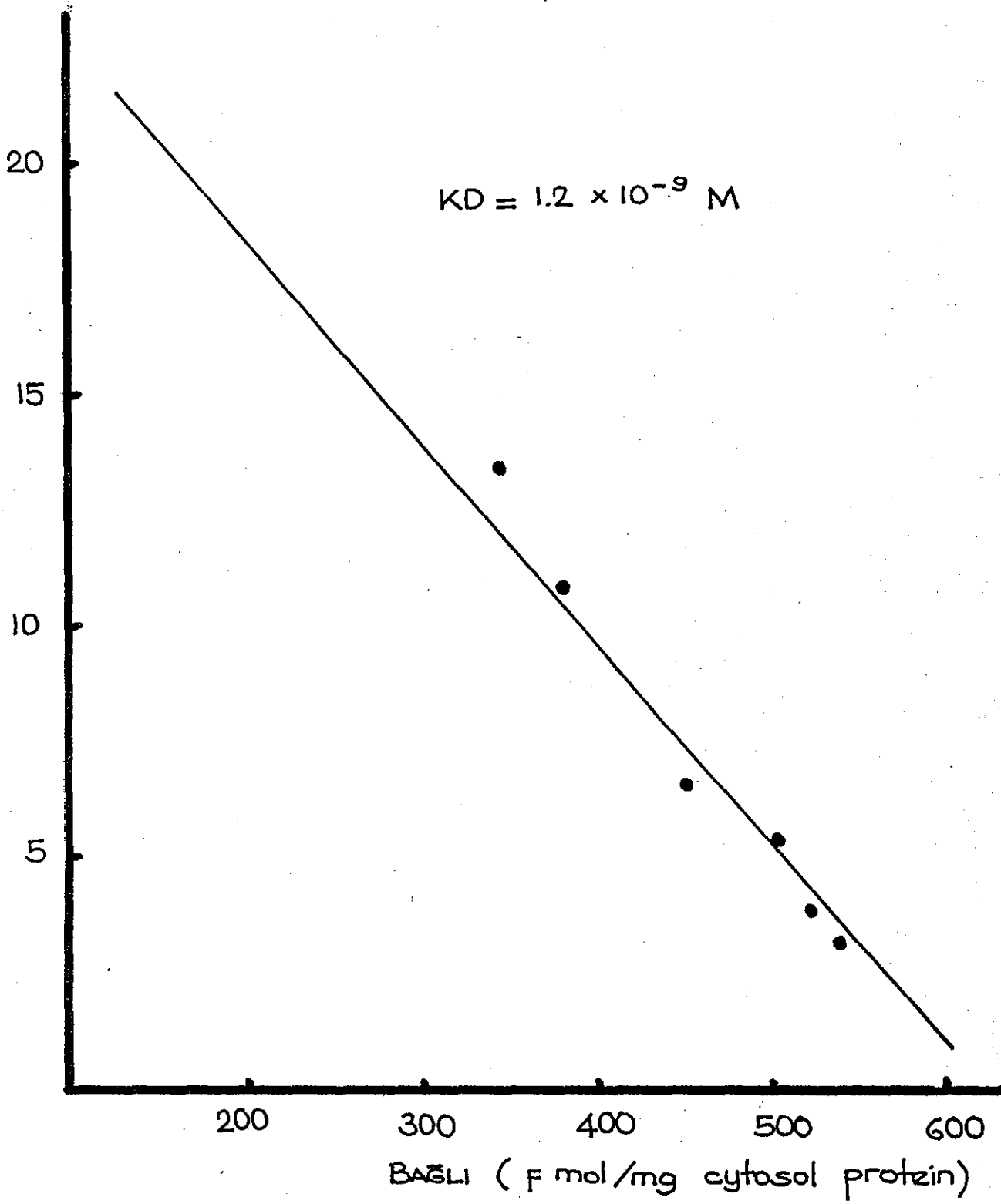
Elde edilen sonuçların istatistiksel önemini saptayabilmek amacıyla öğrenci t-testi ,tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve kompüterize lineer regresyon methodları kullanılarak gruplar karşılaştırıldı.

SONUÇLAR

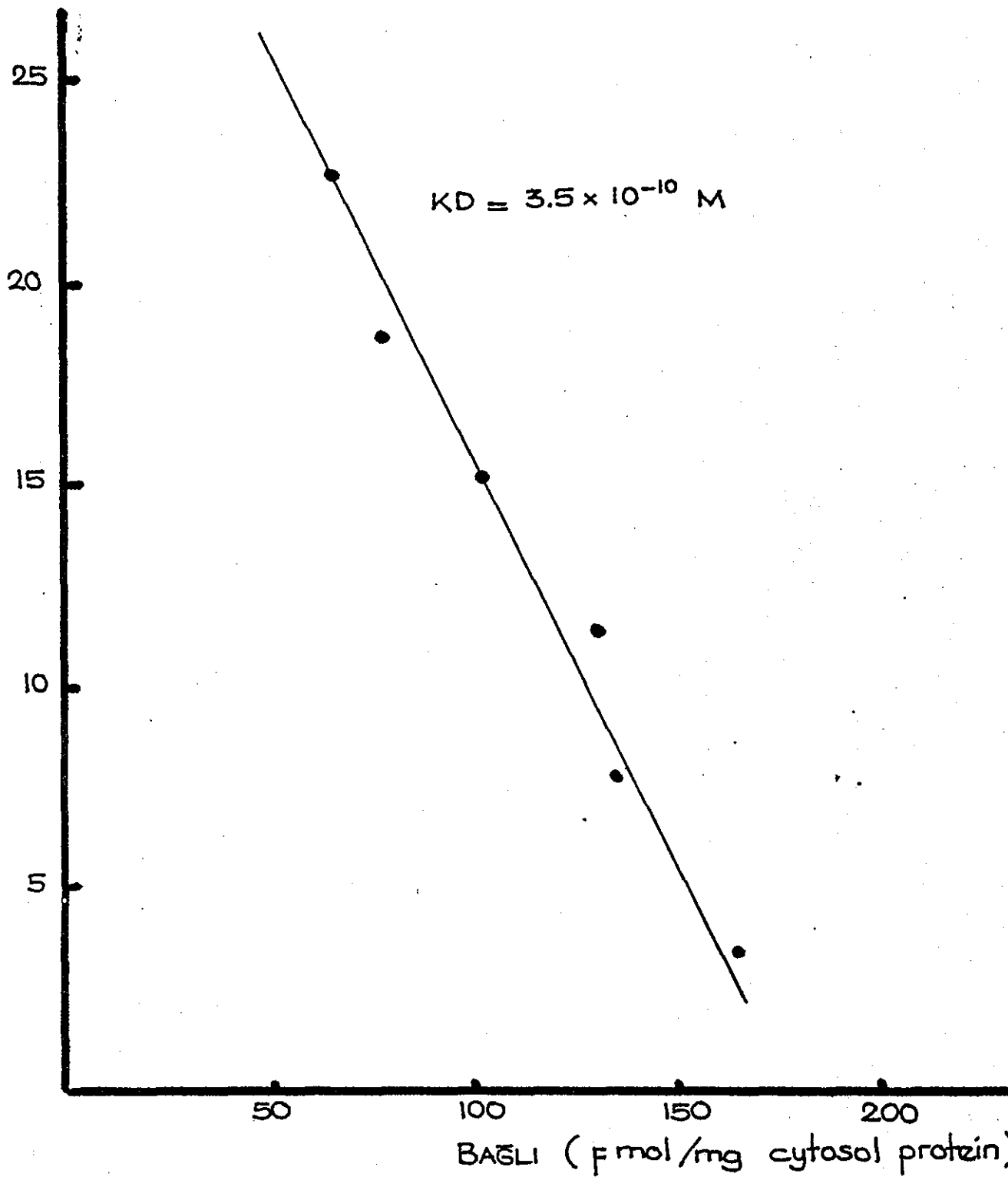
Kontrol grubu ,luteal faz defekti ve endometriozisi olan hastaların sayısal dağılımı Tablo I de görülmektedir. Kontrol grubunda ve endometriozisli hastalarda 16-19. günlerde hasta olmadığından herhangi bir istatistiksel analiz mümkün olmadı. Buna karşılık luteal faz defekti olan hastaların çoğunluğu 16-19. ,yada 20-23. günlerde yer aldı. Luteal faz defekti saptanan 20 hastanın sadece 2 si 23-24. günlerde yer aldı, ve bu hastalarda aynı günde mensturasyonda başladı. Bu nedenlerdendirki luteal faz defekti olan hastalarla kontrol grubu arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapılamadı. Aynı şekilde siklusun 20-23. günlerinde olan endometriozisli hastaların sayılarının yetersizliği nedeniyle (N=2), bu grup içinde istatistiksel karşılaştırma uygulanamadı.

Tablo I de görüldüğü gibi endometriozisi ve luteal faz

PROGESTERON



ESTRADIOL



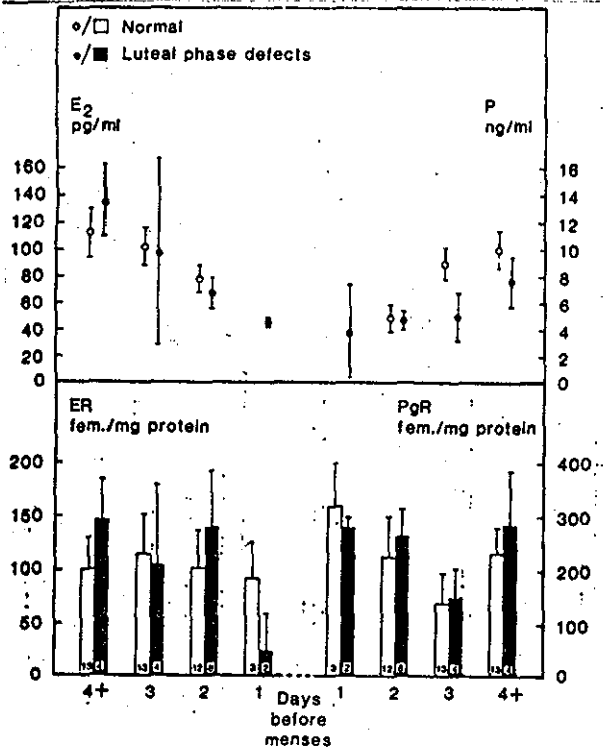
defekti olan hastalarla kontrol grubundaki kadınlarda endometrium cytosol estrogen reseptör konsantrasyonları farklı değildi. Ancak istatistiksel olarak fark önemsiz olduğu halde luteal faz defekti olan hastalar grubunda 20-23. günlerde estrogen reseptörlerinin kontrol grubundan daha yüksek olma eğilimi gösterdiği bulundu. Luteal faz defekti grubunda endometriumun 20-23. günlerde olduğu saptanan hastalarda progesteron reseptör konsantrasyonu normal kontrollerden önemli oranda ($p<0.05$) yüksekti. Endometriozisli hastalardaysa böyle bir eğilim gözlenmedi, elde edilen değerler kontrol grubundan önemli oranda farklı değildi. Endometriumu 24-27. günlerde olan hastalardaysa tüm gruplarda hem estrogen hemde progesteron reseptörlerinin aynı düzeylerde olduğu bulundu.

Tablo II de çalışmada yer alan tüm luteal faz defekti, endometriozisi olan hastalara ve normal kontrol grubundaki kadınlara ait serum estradiol ve progesteron seviyeleri görülmektedir. Luteal faz defekti olan hastalarda 20-23. günlerdeki serum estradiol ve progesteron seviyeleri (ortalama+standart hata) kontrol grubunda bulunan değerlerle karşılaştırıldığında önemli oranda düşük olduğu bulundu. Endometriozis grubunun serum estradiol ve progesteron seviyeleri ise normalden önemli oranda farklı değildi.

Alınan serum örneklerinin günü adet döneminin sonuna yaklaştıkça luteal faz defekti grubunda estradiol ve progesteron konsantrasyonlarının düştüğü dikkati çekti.

Endometriyumun histolojik tarihlendirilmesine bakılmaksızın kontrol ve luteal faz defekti gruplarında yer alan hastalar "adet öncesi gün" şeklinde düzenlendiğinde estradiol ve progesteron seviyelerindeki düşmeler daha belirgin olarak izlendi (Sekil 7). Bu düzenlemedeki amaç luteal faz defekti grubunda düşük estradiol ve progesteron seviyelerinin adet öncesi endometrial estrogen ve progesteron reseptörleri üzerine kümülatif bir etkisinin olup olmadığını saptamaktır. Her ne kadar luteal faz defekti grubunda yüksek progesteron reseptörü seviyelerine doğru yükselme eğilimi izlendiysede iki grup arasında lineer regresyon analizi yapıldığında farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu.

Hastalar mevcut defektin şiddetine göre gruplandırıldığında, ölçülen reseptör konsantrasyonlarıyla defekt arasında herhangi bir ilgi saptanamadı.



Sekil 7 hastalar "adet öncesi gün" şeklinde düzenlendiğinde estradiol ve progesteron seviyeleri endometrial estrogen ve progesteron reseptörleri

TABLO I- Luteal faz defekti, endometriozisi ve normal luteal fonksiyonu olan kadınlarda endometrial oytosol ER ve PgR konsantrasyonları (Fentomol/mg protein)

GRUP	OVULASYON SONRASI GÜNLER			
	16-19	20-23	24-27	
Kontrol	ER	—	73 $\bar{+}$ 35	119 $\bar{+}$ 16
	PgR	—	135 $\bar{+}$ 50 (N=5)	253 $\bar{+}$ 33 (=35)
Luteal Faz Defekti (N=20)	ER	219 $\bar{+}$ 61	126 $\bar{+}$ 32	148 $\bar{+}$ 57
	PgR	369 $\bar{+}$ 146 (N=4)	243 $\bar{+}$ 30* (N=14)	161 $\bar{+}$ 67 (N=2)
Endometriozis (N=12)	ER	—	177 $\bar{+}$ 140	180 $\bar{+}$ 33
	PgR	—	311 $\bar{+}$ 17 (N=2)	205 $\bar{+}$ 60 (N=9)

* Kontrollerden önemli derecede farklı

TABLO II- Luteal faz defekti, endometriozisi ve normal

luteal fonksiyonu olan kadınlarda serum E₂ (pg/ml) ve P (ng/ml) konsantrasyonları.

GRUPLAR		Ovulasyon sonrası günler		
		16-19	20-23	24-27
Luteal Faz defekti (N=18)				
	E2	164 ± 11	69 ± 12*	—
	P	5,9 ± 0,3	4,3 ± 0,6*	—
Endometriozis (N=11)				
	E2	—	120 ± 22	74 ± 12
	P	—	6,0 ± 0,6	5,7 ± 3,4
Kontrol (N=40)				
	E2	—	110 ± 20	94 ± 24
	P	—	9,7 ± 2,7	7,7 ± 0,7

* Kontrollerden önemli
derecede farklı

TARTIŞMA

Blastosistin endometriuma implante olarak gelişebilmesi için endometriumun dolaşımdaki estrojen ve progesteronların etkisiyle gebeliğe hazır hale gelmiş olması gerekir (28). Daha önce yapılan çalışmalar endometriumun gebeliğe yeterince hazırlanamadığı hastalarda -luteal faz defekti- gebelik oranıyla serum estradiol ve progesteron seviyeleri arasında yakın bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (36,99). Dolaşımdaki estradiol ve progesteronun endometrial hücrelerce alınarak gerekli biyolojik cevabın oluşturulabilmesi içinse bu hormonlara özgü reseptörlerin varlığı şarttır. Ancak histolojik tarihlendirmeye ölçülen endometrial maturasyonun estrojen ve progesteron reseptör seviyeleriyle olan ilişkisi yeterince açık değildir. Şayet reseptör seviyeleri luteal fazda tümüyle dolaşımdaki estradiol ve progesteron konsantrasyonlarının kontrolü altında olsaydı endometrial

matürasyondaki gecikmeler dolaşımdaki hormon seviyesine olduğu kadar hormona ait reseptör konsantrasyonunada yansıtılması gerekirdi.

Endometriozisli kadınlar endometriyumun periton yüzeyinde de büyüme potansiyeli göstermesi nedeniyle özel bir grup teşkil etmektedir. Ayrıca bu grupta yer alan hastalarda % 12 oranında luteal faz defektinede rastlanmaktadır. Daha önce yapılan araştırmalarda endometriotik lezyonlar ve endometriumda estrogen ve progesteron reseptörlerinin miktarları ölçülmüş, düşük konsantrasyonlar yada değişik reseptör dağılımları saptanmıştır (8,48). Ancak endometrial dokuda luteal fazın ortasında ve sonunda reseptör konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler yeterince açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar endometriozise bağlı infertilitesi olan kadınlarda luteal dönemde endometrial cytosol estrogen ve progesteron reseptörlerinin konsantrasyonlarının normal , siklik fertil kadınlardan önemli oranda farklı olmadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada elde edilen periferik estradiol ve progesteron sonuçları önceden belirtildiği gibi luteal faz yetmezliği olan kadınlarda relatif bir yetmezliğin olduğunuda teyid etmektedir. Ancak bu relatif hormon eksikliğine rağmen luteal faz defekti olan kadınlarda 20-23. günlerdeki endometrial estrogen reseptör konsantrasyonları normal, progesteron reseptör konsantrasyonlarıysa normalden önemli derecede fazla bulundu. Sonuçlarımız daha önce yapılmış ,

luteal faz yetmezliği olan kadınlarla normal sıklık kadınlar arasında endometrial seks steroid reseptörleri arasında fark olmadığını gösteren çalışmalara zıt düşmektedir (34,58,76). Ancak her üç çalışmadada çalışılan gruplardaki hasta sayısının azlığı ,ve elde edilen sonuçların alt ve üst sınırları arasında geniş bir aralığın bulunması önemli olan farkın görülmesini engellemiş olabilir. Ayrıca uterus içinde değişik lokalizasyonlardaki reseptör konsantrasyonunda değişiklik göstermektedir (107). Fundusta en yüksek reseptör konsantrasyonu varken en düşük değere servikal kanalda rastlanmaktadır. Elde edilen sonuçların alt ve üst sınırı arasındaki geniş aralığın ve normalden farkın önemsiz oluşunun nedeni ,biopsilerin uterusun değişik kısımlarından alınması olabilir.

Azalmış periferik progesteron konsantrasyonuna rağmen progesteron reseptör seviyesindeki artış normal endometrial cevabı temsil etmektedir. Çünkü daha önce yapılmış olan çalışmalar progesteronun hem kendi reseptörlerinin hemde estrogen reseptörlerinin seviyesinde düşmeye yol açtığını göstermiştir (5,28,62). Bu nedenle azalan progesteron seviyelerine verilecek cevap reseptör konsantrasyonunda artış şeklinde olacaktır. Bizim çalışmamızda luteal disfonksiyonlu hastalarda elde ettiğimiz sonuçlarda relatif hormon eksikliğine bağlıdır. Progesterondaki eksiklik endometriyumun gelişmesinde gecikmeye yol açmakla birlikte estrogen ve progesteron reseptörlerinin yeterli, hatta fazla oluşu mevcut hormonların uygun durumdaki reseptörlere yeterince

başlanamadığı dūřüncesini doğurmaktadır. Luteal faz defektlerinin düzeltilmesinde progesteron verilmesiyle elde ettiğimiz başarılarda bu hastalarda reseptör seviyelerinin yeterli olduğunun önemli bir delilidir. O halde luteal faz defekti olan hastalardaki endometrial gelişme geriliğinin nedeni yetersiz reseptör seviyeleri değil , ama azalmış olan ovarian steroidogenezistir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar göstermiştirki alınan endometrial doku örneklerinde seks steroidi reseptörlerinin ölçülmesinin klinik uygulamalardaki önemi sınırlıdır. İnfertilite hastalarının tetkiklerindeki en kolay ve geçerli method yine beklenen mensturasyondan kısa bir süre önce alınmış olan endometrial doku örneklerinin histolojik muayenesidir.

REFERENCES

1- Anderson JN, Peck Jr EJ, Clark JH : Nuclear receptor-estrogen complex : relationship between concentration and early uterotrophic responses. *Endocrinology* 92:1448, 1973.

2- Anderson JN, Peck Jr EJ, Clark JH : Estrogen induced uterine responses and growth: relationship to receptor-estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinology* 96:160, 1975.

3- Andre J, Raynaud A, Rochefort H : Characterization of the estradiol receptor extracted from nuclei by micrococcal nuclease. *Biochemistry* 17:3619, 1978.

4- Baulieu E-E, Atger M, Best-Belpomme M, Corvol P, Courvalin J-C, Mester J, Milgrom E, Robel P, Rochefort H, deCatalogne D : Steroid hormone receptors. *Vitam Horm* 33:649, 1975.

- 5- Bayard F, Damilano S, Robel P, Baulieu EE : Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 46:635, 1978.
- 6- Berezny R, Coffey DS : Nuclear matrix : isolation and charecterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol* 73:616, 1977.
- 7- Berezny R, Coffey DS : Nuclear protein matrix : association with newly synthesized DNA. *Science* 189:291, 1975.
- 8- Bergqvist A, Rannevik G, Thorell J : Estrogen and progesterone cytosol receptor concentration in endometriotic tissue and intrauterine endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 101:53, 1981.
- 9- Bhakoo HS, Katzenellenbogen BS : Progesterone modulation of estrogen-stimulated uterine biosynthetic events and estrogen receptor levels. *Mol Cell Endocrinol* 8:121, 1977.
- 10- Blaha GC, Leawitt WW : Uterine progesterone receptors in the aged golden hamster. *J Gerontol* 33:810, 1978.
- 11- Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt Biochem* 72:248, 1978.
- 12- Brush MG, Taylor RW, King RJB : Uptake of estrogen by human endometrium. *J Endocrinol* 39:599, 1967.
- 13- Buller ER, Schwartz RC, Schrader WT, O'Malley BW : Progesterone binding components of chick oviduct. XII. In vitro effect of receptor subunits on gene transcription, in

1
vitro. J Biol Chem 251:5173, 1976.

14- Catt KJ, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Katikineni M, Nozu K, Dufan ML : Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. Recent Prog Horm Res 36:557, 1980.

15- Chen TJ, Leawitt WW : Nuclear progesterone receptor in hamster uterus : Measurement by [3H]progesterone exchange during the estrous cycle. Endocrinology 104:1588, 1979.

16- Chamness GC, Jennings AW, McGuire WL : Estrogen receptor binding to isolated nuclei. A non saturable process. Biochemistry 13:327, 1974.

17- Cidlowski JA, Muldoon TG : Estrogen regulation of cytoplasmic receptor populations in estrogen responsive tissues of rat. Endocrinology 95:1261, 1974.

18- Cidlowski JA, Muldoon TG : Estrogenic regulation of cytoplasmic estrogen receptor levels in responsive tissues of the rat. Endocrinology 98:833, 1976.

19- Cidlowski JA, Muldoon TG : The dynamics of intracellular estrogen receptor regulation as influenced by 17 β -estradiol. Biol Reprod 18:234, 1978.

20- Clark JH, Paszko Z, Peck Jr EJ: Nuclear binding and retention of the receptor estrogen complex : relation to the agonistic and antagonistic ^{1974 1975} properties of estriol . Endocrinology 100:91, 1977. ^{Clayton}

21- Clark JH, Peck Jr EJ : Nuclear retention of receptor-estrogen complex and nuclear acceptor sites. Nature 260:635, 1976.

22- Clark JH, Markeverich B, Upchurch S, Eriksson H, Hardin JW : Nuclear binding of the estrogen receptor. Heterogeneity of sites and uterotropic response. In: Leavitt WW, Clark JH (eds) Steroid Hormone Receptor Systems. Plenum Press, New York, p 17.

23- Clark JH, Hardin JW, Upchurch S, Eriksson H : Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus. J Biol Chem 253:7630, 1978.

24- Coty WA, Schrader WT, O'Malley BW : Purification and characterization of the chick oviduct progesterone receptor A subunit. J Steroid Biochem 10:1, 1979.

25- Davis ME, Wiener M, Jacobson HI, Jensen EV : Estradiol metabolism in pregnant and nonpregnant women. Am J Obstet Gynecol 87:979, 1963.

26- Diamond E, Aksel S, Speir BR : Endometrial estrogen and progesterone receptors in patients with dysfunctional bleeding. Seminars in Reproductive Endocrinology 2:351, 1984.

27- Diamond EJ, Aksel S, Hazelton JM, Jennings RA, Abee CR : Seasonal changes of serum concentrations of estradiol and progesterone in Bolivian Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). Am J Primatology 6:103, 1984.

28- Edman CD : The effects of steroids on the endometrium. Seminars in Reproductive Endocrinology 1:179, 1983.

29- Eriksson H, Upchurch S, Hardin JW, Peck Jr EJ, Clark JH : Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nucleus of the rat uterus. Biochem Biophys Res Commun 81:1,

1978.

30- Evans LH, Martin JD, Hahnel R : Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 38:23, 1974.

31- Feil PD, Glasser SR, Toft DO, O'Malley BW: Progesterone binding in the mouse and rat uterus. *Endocrinology* 91:738, 1972.

32- Franceschi RT, Kim K-H : Isolation of estrogen receptor in complex with a discrete nuclear subfraction from hen oviduct . *J Biol Chem* 254:3637, 1979.

33- Garcia M, Rochefort H : Androgens on the estrogen receptor. II. Correlation between nuclear translocation and uterine protein synthesis. *Steroids* 29:111, 1977.

34- Gautray JP, DeBrux J, Tajchner G, Robel P, Mouren M : Clinical investigation of the menstrual cycle. III. Clinical, endometrial and endocrine aspects of luteal defect. *Fertil Steril* 35:296, 1981.

35- Giannopoulos G, Gorski J : Estrogen receptors . Quantitative studies on transfer of estradiol from cytoplasmic to nuclear binding sites . *J Biol Chem* 246:2524, 1971.

36- Goldstein D, Zuckerman H, Harpaz S, Barkai J, Gera A, Gordon S, Shalev E, Schwartz M : Correlation between estradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency. *Fertil Steril* 37:348, 1982.

37- Gorski J, Gannon F : Current models of steroid hormone action : a critique. *Annu Rev Physiol* 38:425, 1976.

- 38- Grady WW, Schrader WT, O'Malley BW : Activation, transformation, and subunit structure of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* 3:141, 1982.
- 39- Hamilton TH : Control by estrogen of genetic transcription, and translation. *Science* 161:649, 1968.
- 40- Hardin JW, Clark JH, Glasser SR, Peck Jr EJ : RNA polymerase activity and uterine growth : differential stimulation by estradiol, estriol, and nafoxidine. *Biochemistry* 15:1370, 1976.
- 41- Higgins SJ, Rousseau GG, Baxter JD, Tomkins GM : Nuclear binding of steroid receptors : comparisons in intact cells and cell free systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3415, 1973.
- 42- Higgins SJ, Gehring U : Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Adv Cancer Res* 28:313, 1978.
- 43- Hsueh AJW, Peck Jr EJ, Clark JH : Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology* 98:438, 1976.
- 44- Hsueh AJW, Peck Jr EJ, Clark JH : Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 254:337, 1975.
- 45- Hsueh AJW, Erickson GF, Lu KF : Changes in uterine estrogen receptors and morphology in aging female rats. *Biol Reprod* 21:793, 1979.
- 46- Isomaa V, Isotalo H, Orava M, Torkkeli T, Janne O : Changes in nuclear and cytosol progesterone receptor concentrations in the rabbit uterus and their relation to induction of progesterone regulated uteroglobulin. *Biochem*

Biophys Res Commun 88:1237, 1979.

47- Isomaa V, Isotalo H, Orava M, Janne O : Regulation of nuclear and cytosol progesterone receptors in rabbit uterus by estrogen ,antiestrogen and progesterone administration. Biochem Biophys Acta 585:24, 1979.

48- Janne O, Kauppila A, Kokko E, Lantto T, Ronnberg I, Vihko L : Estrogen and progestine receptors in endometriosis lesions : Comparison with endometrial tissue. Am J Obstet Gynecol 141:562, 1981.

49- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER : A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc Natl Acad Sci USA 59:532, 1968.

50- Jensen EV, Numata M, Brecher PI, DeSombre ER : Hormone receptor interaction as a guide to biochemical mechanism. In Smellie RMS (ed) The Biochemistry of Steroid Hormone Action. Academic Press, London, 1971, p 133.

51- Jensen EV, Suzuki T, Numata M, Smith S, DeSombre ER : Estrogen-binding substances of target tissues. Steroids 13:417, 1969.

52- Keller DW, Wiest WG, Askin FB, Johnson LW, Strickler RC : Pseudocorpus luteum insufficiency : a local defect of progesterone action on endometrial stroma. J Clin Endocrinol Metab 48:127, 1979.

53- Klyzejko-Stefanowicz L, Chiu J-F, Tsai Y-H, Hnilica LS : Acceptor proteins in rat androgenic tissue chromatin. Proc Natl Acad Sci USA 73:1954, 1976.

- 54- Korach KS, Muldoon TG : Inhibition of anterior pituitary estrogen-receptor complex formation by low-affinity interaction with 5 dihydrotestosterone. *Endocrinology* 97:231, 1975.
- 55- Korenman SG, Dukas BA : Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 30:639, 1970.
- 56- Kreitmann B, Bugat R, Bayard F : Estrogen and progestin regulation of progesterone receptor concentration in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 49:926, 1979.
- 57- Kurl RN, Borthwick NM : Progesterone receptors in human endometrium. *Europ J Obstet Gyneco Reprod Biol* 13:293, 1982.
- 58- Laatikainen T, Andersson B, Karkkainen J, Wahlstrom T : Progesterone receptor levels in endometria with delayed or incomplete secretory changes. *Obstet Gynecol* 62:592, 1983.
- 59- Leavitt WW, Toft DO, Strott CA, O'Malley BW : A specific progesterone receptor in the hamster uterus : physiologic properties and regulation during the estrous cycle. *Endocrinology* 94:1041, 1974.
- 60- Leavitt WW, Chen TJ, Do YS, Carlton BD, Allen TC : Biology of progesterone receptors. In : O'Malley BW, Birnbaumer L (eds) *Receptors and Hormone Action*. Academic Press, New York, vol 2:157, 1978.
- 61- Leavitt WW, Chen TJ, Allen TC, Johnston JON : Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann NY Acad Sci* 286:210, 1977.
- 62- Levy C, Probel R, Gautray JP, DeBrux J, Verma U,

Descomps B, Baulieu EE, Eychenne B : Estradiol and progesterone receptors in human endometrium: normal and abnormal menstrual cycles and early pregnancy. Am J Obstet Gynecol 136:646, 1980.

63- Liang T, Liao S : Association of the uterine 17 estradiol-receptor complex with ribonucleoprotein in vitro and in vivo. J Biol Chem. 249:4671, 1974.

64- Linkie DM, Siiteri PK : A re-examination of the interaction of estradiol with the target cell receptors. J Steroid Biochem 9:1071, 1978.

65- Markavarich BM, Clark JH : Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei : relationship to uterotrophic response. Endocrinology 105:1458, 1979.

66- Markaverich BM[Clark JH, Hardin JW : RNA transcription and uterine growth : differential effects of estradiol ,estriol and nafoxidine on chromatin RNA initiation sites. Biochemistry 17:3146, 1978.

67- Massol N, Lebeau M-C, Baulieu E-E : Estrogen receptor in hen oviduct chromatin digested by micrococcal nuclease. Nucleic Acids Res 5:723, 1978.

68- Mester J, Baulieu E-E : Dynamics of eostrogen receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus after estradiol administration. Biochem J 146:617, 1975.

69- Milgrom E, Thi L, Atger M, Baulieu E-E: Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptors in the uterus. J Biol Chem 248:6366,

1973.

70- Miller LK, Tuazon FB, En-Mei N, et al.: Human breast tumor estrogen receptor : Effects of molybdate and electrophoretic analysis. *Endocrinol* 108:1369, 1981.

71- Muldoon TG : Characterization of steroid-binding sites by affinity labeling. Further studies of the interaction between 4-mercuri-17 estradiol and specific estrogen-binding proteins in the rat uterus. *Biochemistry* 10:3780, 1971.

72- Muldoon TG : Regulation of steroid hormone activity. *Endocr Rev* 3:141, 1982.

73- Muller RE, Traish AM, Wotiz HH : Interaction of receptor estrogen complex (R-E) with uterine nuclei. *J Biol Chem* 252:8206, 1977.

74- Musliner TA, Chader GJ, Vिलее CA : Studies on estradiol receptors of the rat uterus. Nuclear uptake in vitro. *Biochemistry* 9:4448, 1970.

75- McClaire J, Dietrich FH : *Statistics*, Dellen Publishing Co., California, 2nd ed, 1982, p 385.

76- McRae MA, Blasco L, Lytle CR : Serum hormones and their receptors in women with normal and inadequate corpus luteum function. *Fertil Steril* 42:58, 1984.

77- Notides AC, Nielsen S : The molecular mechanism of in vitro 4S to 5S transformation of the uterine estrogen receptor. *J Biol Chem* 176:303, 1970.

78- Notides AC, Hamilton DE, Auer HE : A kinetic analysis of estrogen receptor transformation. *J Biol Chem* 250:3945, 1975.

79- Noyes RW, Hertig AT, Rock J : Dating the endometrial

biopsy. Fertil Steril 1:3, 1950.

80- O'Malley BW, Means AR : The mechanisms of steroid-hormone regulation of transcription of specific eucaryotic cells . In : Cohn WE, Valkin E (eds) Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Academic Press, New York, vol 19:403.

81- O'malley BW, Brinbaumer L (eds) Receptors of Hormone Action. vol 1, Academic Press , New York, 1977.

82- O'Malley BW, Hardmen JG (eds) Methods in Enzymology, vol 40, Hormone Action, Part E, Nuclear Structure and Function. Academic Press, New York, 1975.

83- O'Malley BW, Sherman MR, Toft DO, Spelsberg TC ,Schrader WT , Steggle AW : A specific oviduct target tissue receptor for progesterone. Adv Biosci 7:213, 1971.

84- Palmiter RD, Moor PD, Mulvihill ER, Emtage S : A significant lag in the induction of ovalbumin messenger RNA by steroid hormones: a receptor translocation hypothesis. Cell 8:557, 1976.

85- Pavlik EJ, Rutledge S, Eckert RL, Katzenellenbogen BS : Localisation of estrogen receptors in uterine cells. Exp Cell Res 123:177, 1979.

86- Rochefort H, Baulieu E-E : Effect of KCl, CaCl₂, temperature and oestradiol on uterine cytosol receptor of oestradiol. Biochimie 53:893, 1971.

87- Rochefort H, Lignon F, Capony F : Formation of estrogen nuclear receptor in uterus: effect of androgens ,estrone and nafoxidine. Biochem Biophys Res Commun 47:662, 1972.

88- Rochefort H, Garcia M : Androgen on the estrogen receptor . I.Binding and in vivo nuclear translocation. Steroids 28:549, 1976.

89- Rosner AL, Schwartz AM, Bray CL, Burstein NA : Accelerated dissociation of estrogen receptor -ligand complexes by estradiol . Evidence by negative cooperativity of binding. Arch Biochem Biophys 198:153, 1979.

90- Ruh TS, Ruh MF : Androgen induction of a specific uterine protein. Endocrinology 97:1144, 1975.

91- Ruh TS, Wassilak SG, Ruh MF : Androgen induced nuclear accumulation of the estrogen receptor. Steroids 24:209, 1974.

92- Saffran J, Loeser BK : Nuclear binding of guinea pig uterine progesterone receptor in cell free preparations. J Steroid Biochem 10:43, 1979.

93- Saiduddin S, Zassehaus HP : Estrous cycles, desidual cell response and uterine estrogen and progesterone receptor in Fischer 344 virgin aging rats. Proc Soc Exp Biol Med 161:119, 1979.

94- Sarff M, Gorski J : Control of estrogen binding protein concentration under basal conditions and after estrogen administration. Biochemistry 10:2557, 1971.

95- Scatchard G : The attractions of proteins for smallmolecules and ions. Ann NY Acad Sci 51:660, 1949.

96- Schmidt WN, Sadler MA, Katzenellenbogen BS : Androgen uterine interaction: nuclear translocation of the estrogen receptor and induction of the uterine induced protein (IP) by high concentrations of androgens in vitro but not in vivo.

Endocrinology 98:702, 1976.

97- Schrader WT, O'Malley BW : Progesterone-binding proteins of chick oviduct. IV. Characterization of purified subunits. J Biol Chem 247:51, 1972.

98- Senior MB, Frankel FR: Evidence for two kinds of chromatin binding sites for the estradiol receptor complex. Cell 14:857, 1978.

99- Shangould M, Berkeley A, Gray J : Both midluteal serum progesterone levels and late luteal endometrial histology should be assessed in all infertile women. Fertil Steril 40:627, 1983.

100- Shyamala G, Gorski J : Estrogen receptors in the rat uterus. Studies on the interaction of cytosol and nuclear binding sites. J Biol Chem 244:1097, 1969.

101- Socher SH, Krall JF, Jaffe RC, O'Malley BW : Distribution of binding sites for the progesterone receptor within chick oviduct chromatin. Endocrinology 99:891, 1976.

102- Spelsberg TC, Steggles AW, Chytil F, O'Malley BW : Progesterone binding components of chick oviduct. V. Exchange of progesterone-binding capacity from target to nontarget tissue chromatin. J Biol Chem 247:1368, 1972.

103- Steggles AW, King RJB : Sedimentation studies on oestrogen receptors . Acta Endocrinol [suppl] 138:36, 1969.

104- Toft DO, O'Malley BW : Target tissue receptors for progesterone : the influence of estrogen treatment. Endocrinology 90:1041, 1972.

105- Traish AM, Muller RE, Wotiz HH : Binding of estrogen

receptor to uterine nuclei. Salt extractable versus salt resistant receptor. *J Biol Chem* 252:6823, 1977.

106- Tseng L, Gurpide E : Nuclear concentration of estradiol in superfused slices of human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 114:995, 1972.

107- Tsibris JCM, Cazenave CR, Cantor B, Notelovitz M, Kalra PS, Spellacy WN : Distribution of cytoplasmic estrogene and progesterone receptors in human endometrium. *Am J. Obstet Gynecol* 132:449, 1978.

108- Walters MR, Clark JH : Cytosol and nuclear compartmentalization of progesterone receptors of the rat uterus. *Endocrinology* 103:601, 1978.

109- Walters MR, Clark JH : Relationship between the quantity of progesterone receptor and the antagonism of estrogen-induced uterotropic response. *Endocrinology* 105:382, 1979.

110- Weichman BM, Notides AC : Estradiol-binding kinetics of the activated and nonactivated estrogen receptor. *J Biol Chem* 252:8856, 1977.

111- Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J : Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307:747, 1984.

112- Weichman BM, Notides AC : Analysis of estrogen receptor activation by its [3H] estradiol dissociation kinetics. *Biochemistry* 18:220, 1979.

113- Williams D, Gorski J : Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in uterus : a model of binding-site distribution

in uterine cells. Proc Natl Acad Sci USA 69:3464, 1972.

114- Woosley JT, Muldoon TG : The thermolability of rat uterine cytosol estrogen receptors : basis for a novel cytosol exchange-denaturation assay. J Steroid Biochem 11:1065, 1979.

115- Yamamoto KR : Characterization of the 4S and 5S forms of estradiol receptor protein and their interaction with deoxyribonucleic acid . J Biol Chem 249:7068, 1974.

116- Zava DT, McGuire WL : Androgen action through estrogen receptor in a human breast cancer cell line. Endocrinology 103:624, 1978.