

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MİSSED ABORTUS VE İSTEMLİ EVOKUASYON OLGULARININ
ENDOMETRİYUMLARINDA
PROPROTEİN KONVERTAZ DAĞILIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu KAHRAMAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Manisa – 2013

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burcu KAHRAMAN'ın Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “Missed Abortus ve İstemli Evokasyon Olgularının Endometriyumlarında Proprotein Konvertaz Dağılımı” başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek KABUL kararı verilmiştir.

/ /2013

İmza

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN (Tez Danışmanı)

.....

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

.....

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Yeşim BÜLBÜL BAYTUR

.....

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../2013 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. M. İbrahim TUĞLU

Enstitü Müdürü

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MİSSED ABORTUS VE İSTEMLİ EVOKUASYON OLGULARININ
ENDOMETRİYUMLARINDA
PROPROTEİN KONVERTAZ DAĞILIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu KAHRAMAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Manisa – 2013

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve bu tezin ortaya çıkmasında yardımını esirgemeyen, her daim sabır ve anlayışla destek olan çok değerli Hocam Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN'e,

Bölüme adım attığım andan itibaren gerek eğitimim gerek özel hayatımla ilgili tüm sıkıntılı anlarımda desteğini esirgemeyen, mesleğime dair bana birçok şeyi öğreten Sayın Hocam Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e,

Asistanlık hayatım boyunca desteğini esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sevinç İNAN'a,

Eğitimim boyunca her zaman destek olduğu gibi tezimde grafiklerimi yapmam konusunda da desteğini esirgemeyen, yoğun iş temposunda bana zaman ayıran Enstitü Müdürümüz Sayın Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya,

Tezimde istatistik hesaplamalarımı yapmama yardımcı olan Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erhan ESER'e,

Bu zorlu süreçte her daim beni dinleyen, üzüntüme ve sevincime ortak olan, beni her zaman destekleyen ASİSTAN ARKADAŞLARIM ve canım DOSTLARIM'a,

Maddi, manevi desteğini esirgemedi bütünü kararlarımda arkamda duran canım ABİM'e,

Ve herşeyden önemlisi her türlü kapisimi çeken, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, hayattaki yegane yoldaşım canım ANNEM'e ve uzaklardan sevgisini her daim hissettiğim, her zaman ona layık olmaya çalıştığım canım BABAM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burcu KAHRAMAN

MİSSED ABORTUS VE İSTEMLİ EVOKUASYON OLGULARININ

ENDOMETRİUMLARINDA

PROPROTEİN KONVERTAZ DAĞILIMI

ÖZET

Amaç: Missed abortus ve istemli gebelik evokuasyonu yapılan olguların desidua ve plasenta örneklerinde, birçok hücrel faaliyetlerde rol oynayan TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü-alfa), TGF- β 2 (Tümör Büyüme Faktörü-beta 2), IGF-I (İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü-I), POMC (Pro-opiomelanokortin), FOXO3A (Forkhead box O3A) ile proprotein konvertaz ailesi üyelerinden PC4 (Proprotein Konvertaz 4), PC6 (Proprotein Konvertaz 6), PC7 (Proprotein Konvertaz 7) ve FURİN moleküllerinin dağılımlarını karşılaştırarak, missed abortus etiolojisindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başvuran, gebeliğin sonlandırılması kararı verilmiş missed abortus tanılı ve 10 hafta altı gebelik evokuasyonu istemi ile başvuran 10'ar hasta alındı. Her iki hasta grubundan endometriyal ve plasental doku örnekleri klasik doku takibi yöntemi ile bloklandı ve seri kesitleri alındı. Materyaller iki gruba ayrılarak incelendi. Seri kesitlerin birinci grubuna IHC uygulandı ve TNF- α , TGF- β 2, IGF-I, POMC, FOXO3A, PC4, PC6, PC7 ve FURİN primer antikoları ile immünohistokimyasal boyamalar uygulandı. Boyanan hücre sayısı H-Skor tekniği ile hesaplandı. Seri kesitlerin ikinci grubundan mRNA elde edildi ve PCSK4, PCSK5, PCSK7, FURİN ve ACTB (AB applied biosystems Taqman Gene Expression Assays) primerleri kullanılarak RT-PCR ile gen ekspresyon düzeylerine bakıldı.

Bulgular: Missed abortus grubunda ortalama yaş 28.7 (18- 41) iken istemli evokuasyon grubunda ortalama yaş 27.5 (21-37)' dir. Obstetrik özgeçmiş bakımından her iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Histokimyasal incelemede missed abortus grubunda desidual hücrelerin daha iri olduğu ve sitoplazmalarında çok sayıda vakuol bulunduğu gözlemlendi. İmmünohistokimyasal incelemelerde missed abortus grubuna ait desidual hücrelerde FURİN, PC4, IGF-I, POMC ve FOXO3A immunoreaktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu ve immunoreaktiviteleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,005$) bulunduğu tespit edildi. Plasenta örneklerinin değerlendirilmesinde ise TNF- α , TGF- β , IGF-I ve POMC immunoreaktivitelerinin missed abortus grubunda hem sinsiyo trofoblast hem de sitotrofoblast hücrelerinde arttığı gözlemlendi ve aralarında anlamlı fark

($p < 0,005$) bulundu. Ayrıca PC4, PC6, FOXO3A ve FURİN'in missed abortusta yalnızca sınıtyotroblastik hücrelerde arttığı ve aralarında anlamlı fark ($p < 0,005$) bulunduğu saptandı. PC7'nin ise her iki grupta benzer şiddette eksprese olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, missed abortus olgularına ait desidua ve plasenta örneklerinde hücre proliferasyonu, invazyonu, migrasyonu, farklılaşması ve sağ kalımında rol oynayan TNF- α , TGF- β , IGF-I, FOXO3A faktörlerinin artışı ve bu faktörlerin öncül formlarının posttranslasyonel modifikasyon yolu ile aktif formuna dönüşmesinde rol oynayan POMC, PC4, PC6 ve FURİN artışı ile paralellik göstermesi, bu faktörlerin fetal yaşam son bulduğu halde düşüğün gerçekleşmesini engellediğini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: Missed abortus, proprotein konvertaz, POMC, FOXO3A, TNF- α , TGF- β , IGF-I, PC4, PC6, PC7, FURİN

**DISTRIBUTION OF PROPROTEIN CONVERTASES
IN ENDOMETRIUM OF MISSED ABORTION AND VOLUNTARY FIRST
TRIMESTER EVACUATION CASES**

ABSTRACT

Aim: In this study, we have compared distribution of TNF- α (Tumour Necrosis Factor-alfa), TGF- β 2 (Tumour Growth Factor-beta 2), IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I), POMC (Pro-opiomelanocortin), FOXO3A (Forkhead box O3A) and members of proprotein convertase family; PC4 (Proprotein Convertase 4), PC6 (Proprotein Convertase 6), PC7 (Proprotein Convertase 7) and FURIN molecules that have lots of cellular functions, in decidua and placenta samples of missed abortion and voluntary evacuation cases to investigate the effects in the etiology of missed abortion.

Materials and Methods: Decidual materials were collected from patients that are diagnosed missed abortion (n=10) and legal voluntary evacuation cases (n=10) under 10 gestastational week. Endometrial and placental tissue samples were blocked by tissue processing and taken serial sections from each sample. Materials were divided into two groups for examination. TNF- α , TGF- β 2, IGF-I, POMC, FOXO3A, PC4, PC6, PC7 and FURIN primary antibodies were performed by immunohistochemical staining to first group of serial sections. The number of stained cells was calculated using H-Score technique. Also mRNA nucleic acids were acquired from the second group of serial sections and gene expression levels of PCSK4, PCSK5, PCSK7, FURIN and ACTB (AB applied biosystems Taqman Gene Expression Assays primers) were performed by using RT-PCR.

Results: Missed abortion group mean age was 28.7 (18- 41) and control group mean age was 27.5 (21-37). There is no significant difference between the two groups in terms of obstetric history. In histochemical examination, at missed abortion group larger decidua cells with lots of vacuoles viewed. In immunohistochemical examination at decidual cells of missed abortion group; FURIN, PC4, IGF-I, POMC and FOXO3A immunoreactivities were detected higher then control group. Between the two groups significantly (p <0.005) difference was found in terms of FURIN, PC4, IGF-I, POMC and FOXO3A immunoreactivities. Detection of placental cells, the immunoreactivities of TNF- α , TGF- β , IGF-I and POMC were found higher both syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells of missed abortus group and significantly difference (p<0,005) were determined between two groups. Also high

immunoreactivities of PC4, PC6, FOXO3A and FURIN molecules were established only in syncytiotrophoblastic cells of missed abortus group and significantly difference ($p < 0,005$) were determined between two groups. As for that PC7 was observed similarly into the two groups.

Conclusion: In this study, it is concluded that increment of TNF- α , TGF- β , IGF-I, FOXO3A factors which play important roles in proliferation, invasion, migration, differentiation and survival of cells in the decidua and placenta samples, and paralleling increment of POMC, PC4, PC6 and FURIN which have roles to translate these factors into active forms from precursors via posttranslational modifications, reason of proceeding decidualization, placentation and preventing from abortion in spite of concluding the fetal life.

Key words: Missed abortion, proprotein convertase, POMC, FOXO3A, TNF- α , TGF- β , IGF-I, PC4, PC6, PC7, FURIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	IV
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ	XIII
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ	XIV
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Uterus	4
2.2. Menstrual Siklus	5
2.3. İmplantasyon	8
2.3.1. Endometriyumdan Salınan Sinyaller	10
2.3.1.1. TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β)	10
2.3.1.2. IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)	10
2.3.1.3. Sitokinler	11
2.3.1.3.1. TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü- α).....	11
2.3.1.3.2. IL-1 (İnterlökin-1)	12
2.3.1.3.3. IL-6 (İnterlökin-6)	12

2.3.1.3.4. LIF (Lösemi İnhibitör Faktör).....	12
2.3.1.3.5. CSF-1 (Koloni Stimüle Eden Faktör)	13
2.3.1.4. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) Ailesi	13
2.3.1.4.1. EGF	13
2.3.1.4.2. HB-EGF (Heparin Bağlayıcı EGF benzeri Büyüme Faktörü) 13	
2.3.1.4.3. TGF- α (Tümör Büyüme Faktörü- α).....	13
2.3.1.5. MUC-1 (Mucin-1)	14
2.3.2. Embriyodan Salınan Sinyaller	14
2.4. Desidualizasyon.....	15
2.5. Plasentasyon	15
2.6. Proteolitik Enzimler	17
2.6.1. Proprotein Konvertazlar	17
2.6.2. Proprotein Konvertazların Tarihçesi.....	20
2.6.2.1. Furin'in Bulunuşu	21
2.6.2.2. PC1/3 ve PC2'nin Bulunuşu	21
2.6.2.3. PC4'ün Bulunuşu	22
2.6.2.4. PC6'nın Bulunuşu	23
2.6.2.5. PC7'nin Bulunuşu	23
2.6.2.6. PCSK9'un Bulunuşu	23
2.6.3. Proprotein Konvertazların Fonksiyonları	24
2.6.3.1. Furin'in Fonksiyonları.....	24

2.6.3.2. PC1/3 ve PC2'nin Fonksiyonları.....	24
2.6.3.3. PC4'ün Fonksiyonları	25
2.6.3.4. PC6'nin Fonksiyonları	25
2.6.3.5. PC7'nin Fonksiyonları	26
2.6.3.6. SKI-1/S1P'nin Fonksiyonları	26
2.6.3.7. PCSK9'un Fonksiyonları	27
2.6.4. Proprotein Konvertazların Hastalıklarla İlişkisi	27
2.6.5. Terapötik Ajanlar Olarak Proprotein Konvertazlar	30
2.7. Pro-opiomelanokortin (POMC)	31
2.8. FOXO3A.....	32
2.9. Abortuslar	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	43
3.2. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü.....	44
3.3. RT-PCR Protokolü.....	47
4. BULGULAR	53
4.1. Histokimyasal Bulgular	53
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	53
4.3. RT-PCR Bulguları	60
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR	78

7. RESİMLER	83
8. TABLOLAR	94
9. KAYNAKLAR	100



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PR A	Progesteron Tip A Reseptörü
PR B	Progesteron Tip B Reseptörü
EVT	Ekstravillöz Trofoblast Hücreleri
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β)
LIF	Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor)
SMC/Muc 4	Sialomusin Kompleksi
IGF	İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor)
IGFBP	İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein (Insulin-like Growth Factor Binding Protein)
IGF-IR	İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü-I Reseptörü (Insulin-like Growth Factor-I Receptor)
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü- α (Tumour Necrosis Factor- α)
IL-I	İnterlökin-I
IL-Ira	İnterlökin-I Reseptör Antagonisti
IL-IR T1	İnterlökin-I Reseptör Tip 1
IL-IR T2	İnterlökin-I Reseptör Tip 2
MMP	Matriks Metalloproteinaz
CSF-I	Koloni Stimüle Edici Faktör-I (Colony Stimulating Factor-I)
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
TGF-α	Tümör Büyüme Faktörü- α (Tumour Growth Factor- α)
ErbB	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGFR/ ErbB-	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HER2/ ErbB-	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HER3/ ErbB-	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HER4/ ErbB-	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
MUC-1	Musin-1
EPF	Erken Gebelik Faktörü (Early Pregnancy Factor)

PIF	Preimplantasyon Faktörü (Preimplantation Factor)
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör (Platelet Activating Factor)
IFN-γ	İnterferon- γ
hCG	İnsan Koryonik Gonadotrofin (Human Chorionic Gonadotrophin)
PG	Prostaglandin
PGI₂	Prostasiklin I ₂
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandin F _{2α}
ESM	Ekstrasellüler Matriks
uNK	Uterin Natural Öldürücü Hücre (Uterine Natural Killer Cells)
HLA	İnsan Lökosit Antijen (Human Leukocyte Antigen)
ESC	Endometriyal Stromal Hücreler (Endometrial Stromal Cells)
IL-11	İnterlökin-11
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
PTM	Posttranslasyonel Modifikasyon
PC	Proprotein Konvertaz (Proprotein Convertase)
PACE	İkili temel amino asit \pm klavaj edici enzim (Paired Basic Amino Acid \pm Cleaving Enzyme)
LPC	Lenfoma Proprotein Konvertaz
SKI-1/S1P	Subtilizin/Keksin İzoenzim 1/Site-1 Proteaz
PCSK 9	Proprotein Konvertaz Subtilizin/Keksin 9
R	Arjinin
K	Lizin
C	Sistein
TGN	Trans-Golgi Ağı (Trans-Golgi Network)
Kex2p	Maya Konvertaz Keksinini (Yeast Convertase Kexin)
Pro-K1	Öldürü Toksin Öncülü (Pro-killer Toxin)
RT-PCR	Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Polimerase Chain Reaction)

POMC	Pro-opiyomelanokortin Hormonu
ACTH	Adrenokortikotrofik Hormon (Adrenocorticotrophic Hormone)
β-LPH	Lipotrofin β
α-MSH	Melanosit Stimüle Edici Hormon- α (Melanocyte Stimulating Hormone- α)
ANF	Atriyal Natriüretik Faktör
HepG2	Karaciğer Hepatosellüler Kanser Hücre Hattı (Liver Hepatocellular Carcinoma Cells)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
mRNA	Mesenger Ribonükleik Asit
cDNA	Komplementer DNA
bp	Baz Çifti
KO	Knock-out
TIMPs	Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (Tissue Inhibitors Of Metalloproteinases)
HSPGs	Heparin Sülfat Proteoglikanları
NARC-1	Nöral Apoptosis Düzenleyici Konvertaz (Neural Apoptosis Regulated Convertase-1)
LDLR	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü (Low Density Lipoprotein Receptor)
APOB	Apolipoprotein B
BMP	Kemik Morfojenik Protein (Bone Morphogenic Protein)
proPACAP	Pitüiter Adenilat Siklaz Aktive Edici Peptit (Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide)
proBDNF	Beyinden Derive Edilen Nörotrofik Faktör Öncülü (Pro-brain-derived Neurotrophic Factor)
proCCK	Kolesistokin Öncülü (Precursor of Cholecystokinin)
H.E	Hematoksilen-Eozin

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin Hematoksilen-Eozin boyamasına ait görüntüler.
- Resim 2.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin İmmunohistokimya-negatif kontrol boyamasına ait görüntüler.
- Resim 3.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin TNF- α immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 4.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin TGF- β immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 5.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin POMC immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 6.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin IGF-I immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 7.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin FOXO3A immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 8.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin FURİN immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 9.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin PC6 immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 10.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin PC4 immunoreaktivitesine ait görüntüler.
- Resim 11.** İstemli düşük ve missed abortus grubuna ait plasenta ve desidua örneklerinin PC7 immunoreaktivitesine ait görüntüler.

ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ

- Şekil 2.1.1.** Uterusun şematik gösterimi
- Şekil 2.2.1.** Menstrual siklusun şematik gösterimi
- Şekil 2.3.1.** İmplantasyonun şematik gösterimi
- Tablo 2.5.1.** Villöz trofoblast oluşumunun şematik gösterimi
- Şekil 2.6.1.1.** Proprotein Konvertazların primer yapılarının şematik gösterimi
- Şekil 2.6.2.1.** Proprotein Konvertazların salgı yolağının şematik gösterimi
- Şekil 2.8.1.** FOXO transkripsiyon faktörlerinin hücreler ve organizmadaki rollerinin şematik gösterimi
- Tablo 4.2.1.** Kontrol ve missed-abortion grubuna ait desidua örneklerinin immunoreaktivitelerinin istatistiksel karşılaştırılması
- Tablo 4.2.2.** Kontrol ve missed-abortion grubuna ait non-desidua örneklerinin immunoreaktivitelerinin istatistiksel karşılaştırılması
- Tablo 4.2.3.** Kontrol ve missed-abortion grubuna ait sitotrofoblast örneklerinin immunoreaktivitelerinin istatistiksel karşılaştırılması
- Tablo 4.2.4.** Kontrol ve missed-abortion grubuna ait sinsityotrofoblast örneklerinin immunoreaktivitelerinin istatistiksel karşılaştırılması
- Tablo 4.2.5.** Kontrol ve missed-abortion grubuna ait stroma örneklerinin immunoreaktivitelerinin istatistiksel karşılaştırılması
- Tablo 4.2.6.** Kontrol Grubu Placenta ve Endometriyum Hücreleri H-skor Histogramı
- Tablo 4.2.7.** Missed-abortion Grubu Placenta ve Endometriyum Hücreleri H-skor Histogramı
- Tablo 4.2.8.** Sitotrofoblast Hücreleri H-skor Histogramı
- Tablo 4.2.9.** Sinsityotrofoblast Hücreleri H-skor Histogramı
- Tablo 4.2.10.** Stromal Hücreler H-Skor Histogramı
- Tablo 4.3.1.** Nükleik asit (mRNA) konsantrasyonlarına ait nanodrop ölçüm sonuçları

1. GİRİŞ

Gebeliğin, fetusun hayatta kalmaya yetecek kadar gelişmesinden önce herhangi bir yolla sonlanmasına veya ağırlığı 500 gr'dan az olan fetusun doğurtulmasına abortus (düşük) adı verilmektedir. 1977'de Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (World Health Organization) (WHO) gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini kriter alarak getirdiği tanıma göre ise; 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir (1).

Spontan abortusların çoğu embriyonun ölümünden sonraki bir-üç hafta arasında gerçekleşir. Başlangıçta desidua bazaliste kanama meydana gelir ve implantasyon yerinde inflamasyon ve nekroz oluşur. Abortus nedeniyle olan vajinal kanamalar birinci ve ikinci trimesterde olan kanamalar arasında ilk sırada yer almaktadır. Abortuslar kanama yapması dışında neden olduğu obstetrik komplikasyonlar sebebiyle de önemli bir patolojidir (2).

Missed abortus; fetusun uzun süredir ölmüş olduğu halde uterus kavitesi dışına atılmaması, inutero olarak kalması olarak tanımlanır. İntrauterin fetal viabilite kaybının olduğu ancak diğer abortus tiplerinde görülen kanama, servikal dilatasyon gibi bulguların olmadığı durumdur. Ölü fetusun atılmama nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Günümüzde ultrasonografinin yaygın kullanımıyla ve β -hCG'nin yükselmediğinin saptanmasıyla hastalara missed abortus tanısı kolayca konulabilmektedir. Etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılmamış olan missed abortusların oluşum mekanizmaları için, diğer abortus tiplerinde olduğu gibi, kromozom anomalileri, enfeksiyonlar, immunolojik faktörler, endokrin bozukluklar, ilaç kullanımı ve çevresel faktörler sayılabilir. Missed abortusta etiyoloji tam olarak belirgin olmamasına rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalarda, hücre proliferasyonu ve invazyonu ile embriyonik gelişim arasındaki yakın ilişkiden söz edilmektedir (3).

Embriyonun implantasyonu, birçok türde üremenin en kritik basamağı olarak kabul edilir. İmplantasyon, büyüyen fetus ile maternal sirkülasyon arasındaki ilişkiyi sağlayacak olan plasentayı oluşturacak şekilde, maternal endometriyal yüzeye blastokistin tamamen bağlanmasını sağlayan temel biyolojik olaydır (4,5). Başarılı implantasyon, reseptif bir endometriyum ile blastokistin gelişim aşamasında, maternal ve embriyonik doku arasında senkronize diyaloga sahip normal ve fonksiyonel bir embriyo gerektirir (6,7).

Gebeliğin devam etmesi için plasentasyonun ve desidualizasyonun gerçekleşmesi ve devam etmesi gerekmektedir. Erken fetomaternal ilişkiyi sağlayan, ovaryan hormonların

etkisi altında çok sayıda aracı molekül tanımlanmıştır. Bu moleküller; adezyon molekülleri, sitokinler, büyüme faktörleri, lipidler gibi birçok molekülleri içermektedir. İmplantasyon, gebeliğin başarısı için gerekli olan bir seri kompleks sinyal olaylarını içerir (6,8). TGF- β , IGF-I, TNF- α , POMC, FOXO3A gebeliğin devamlılığında önemli rol oynayan moleküllerdir.

TGF- β , büyüme faktörleri ailesinin bir üyesi olup, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozisi ve doku şekillenmesi ile ilişkilidir (9). TGF- β süperailisi üyeleri endometriyumda fazla miktarda eksprese edilmektedir. Hamileliğin oluşumu, desidualizasyon, proliferasyon ve menstruasyonu içeren hücresel olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (10). IGF-I sistemi, endometriyal proliferasyon, farklılaşma ve embriyo-endometriyum etkileşiminde önemli rol oynamaktadır (11). IGF-I ve IGF-II çok güçlü mitojenik ve differansiyasyon etkiye sahip büyüme faktörleridirler (12).

TNF- α , üreme organları, preimplantasyon embriyoları ve endometriyum gibi çeşitli dokularda eksprese olan çok yönlü sitokinlerdendir. Endometriyumda fibroblastlar, immunkomponent hücreler, glandular epitelyal hücreler ve vasküler hücreler gibi TNF- α eksprese eden çeşitli hücre tipleri mevcuttur (13).

Adrenokortikotrofin (ACTH) prekürsörü olan pro-opiomelanokortin (POMC) ilk olarak hipofizin ön ve ara lobunda tespit edilmesine rağmen deri, merkezi sinir dokusu ve plasentayı içeren bir dizi dokuda eksprese edilmektedir (14).

FOXO3A (forkhead box, class O, 3a) esas olarak hematopoetik hücrelerde eksprese olan bir transkripsiyon faktörüdür (15). Forkhead transkripsiyon faktörlerinin FoxO ailesi; stres direnci, metabolizma, hücre-siklus arresti, hücre sağ kalımı ve apoptozisi içeren hedef genlerin up-regülasyonu ile tümör süpresyonu ve uzun yaşam için önemli rol oynar (16).

Yapılan çalışmalarda; insanda yaklaşık 20,500 adet protein kodlayan gen olduğu gösterilmiştir. Genoma uygun sentezlenen proteinler, posttranslasyonel modifikasyon (PTM) olarak ifade edilen bir mekanizma ile değiştirilerek proteinlerin çeşitliliğini ve etkilerini artırmaktadırlar. Proteinlerin veya peptitlerin PTM'u; spesifik enzimatik basamaklar veya yolaklar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yaygın olarak görülen diğer bir geri dönüşsüz mekanizma olan proteoliz yolu ile de birden çok ürün elde edilebilir. Protein ya da peptit ürünleri bir ya da birden fazla proteaz ile kesilerek son biyoaktif formlarına modifiye olabilirler (17). Bu proteolitik enzim sınıfından biri de proprotein konvertaz'lardır ve 9 üyeden oluşmaktadır. Bunlar; PC1/3, PC2, FURIN, PC4, PC5, PC6 (PACE4; PC5/6), PC7

(PC7/LPC8/lenfoma proprotein konvertaz), SKI-1/S1P, PCSK 9'dur (18). Proprotein konvertazlar embriyogenezis, sindirim, homeostazis, immün cevap, doku yenilenmesi, hücre aktivasyonu ve apoptozisi içeren birçok fizyolojik işlemde rol oynamaktadır (19).

Çalışmamızda; missed abortus ve istemli gebelik evokuasyonu yapılan olguların endometriyum ve plasenta doku örneklerinde; hücre farklılaşması, invazyonu, proliferasyonu gibi birçok önemli role sahip olan TNF- α , TGF- β 2, IGF-I, POMC, FOXO3A ve bu moleküllerin aktif forma dönüşmesini sağladığı düşünülen PC4, PC6, PC7 ve FURİN proprotein konvertazlarının dağılımları karşılaştırıldı. Böylece bu moleküllerin missed abortus etiyojisindeki olası rolünü ortaya koyarak, gebeliğin devamlılığının sağlanması ve missed abortus gelişimini önleme konusundaki çalışmalara yol gösterici olması amaçlandı.

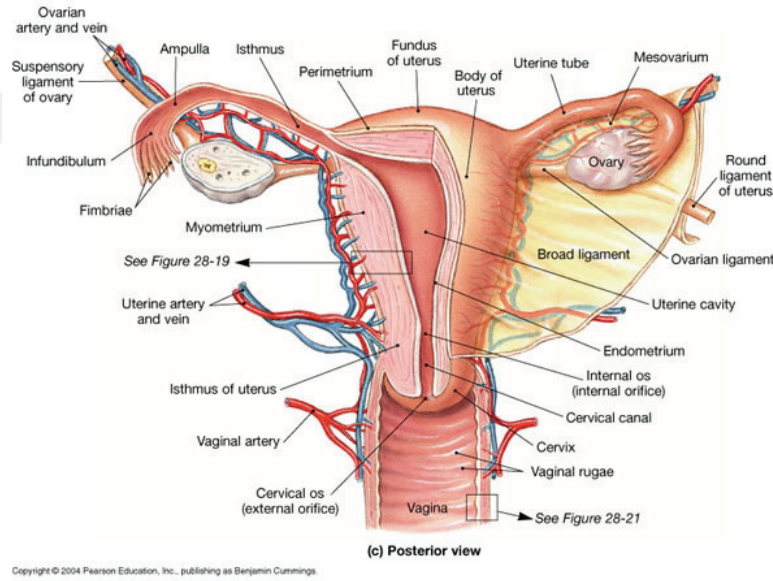


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

İnsan uterusu; pelvikte mesane ve rektum arasında yerleşmiş, lümeni olan, armut şeklinde bir organdır. Nulipar bir kadında, ağırlığı 30-40 gr, uzunluğu 7,5 cm, genişliği 5 cm ve kalınlığı ise 2,5 cm civarındadır. Düz şekilli olan lümeni uterin tüpler ve vajina ile devam eder. Uterin tüplerde meydana gelen fertilizasyondan sonra, blastokistin implantasyonunun gerçekleştiği yerdir. İmplantasyondan sonra doğuma kadar uterus; fetusun gelişimi, beslenmesi ve korunmasını sağlar. Anatomik olarak, korpus ya da gövde ve serviks olmak üzere 2 bölgeye ayrılırken, histolojik olarak 3 tabakaya ayrılır. Tabakalar, lümeden dışa doğru sırasıyla şu şekildedir (20) (Şekil: 2.1.1).

1. Endometriyum
2. Miyometriyum
3. Perimetriyum



Şekil 2.1.1.: Uterusun şematik gösterimi.

Endometriyum, uterusun mukozasıdır, en içte yer alır ve implantasyona hazırlık amacı ile her ay siklik değişiklikler gösterir. İnsanda siklik değişiklikler 28 günde tamamlanırken, siklusun ortalarında (14. Gün) ovulasyon gerçekleşir, bundan 4-5 gün sonra implantasyon gerçekleşir ve siklus durur, endometriyumdan ve embriyodan salınan çok sayıda mediyatör gebelik boyunca endometriyumun büyüyüp, farklılaşmasına sebep olur (6,7).

Miyometriyum, kalın bir kas tabakası olup, uterin t p ve vajinanın kas tabakasıyla devam eder. İ, orta ve dış olmak üzere 3 kas tabakasından oluşmaktadırdır. İ ve dış tabakada uzunlamasına ya da oblik seyirli kas lifleri bulunur. Vasküler tabaka (orta tabaka) kalındır ve sirküler seyirli kas lifleri ile çok miktarda kan damarı içerir. Normalde miyometriyumu oluşturan düz kas hücreleri 50  m. uzunluğunda iken, gebelikte bu hücreler hipertrofiye ve hiperplaziye uğrar ve 500  m. uzunluğa kadar erişebilirler. Gebelik sırasında fibriller ve bağ dokusu miktarı artarken, sonrasında uterus genellikle orjinal ölçülerine döner (8,20).

Perimetriyum, uterusu dışarıdan saran, bağ dokusu tarafından desteklenen, kan damarından zengin, tek sıralı mezotelyal hücrelerden oluşan seröz tabakadır. Mezotelyumun altında, belirgin bir elastik doku tabakası mevcuttur (8,10).

2.2. Menstrual Siklus

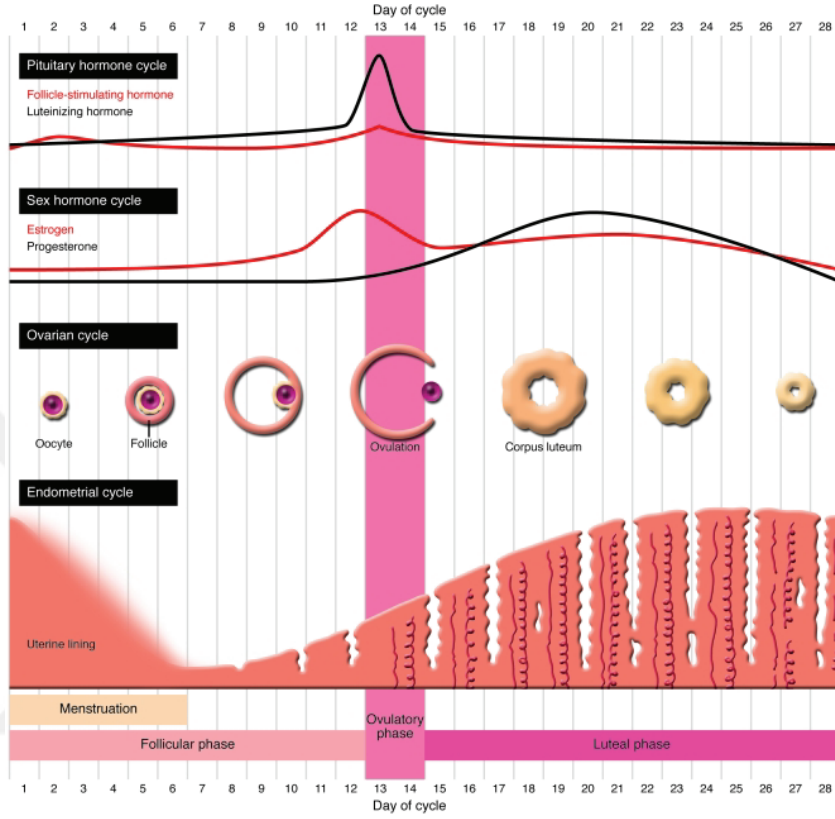
Reprodüktif yaşam boyunca, endometriyum, embriyo implantasyonu ve sonrasında embriyonik ve fetal gelişime hazırlanmak için her ay siklik değişiklikler gösterir. Siklus boyunca, ovaryan folliküllerin maturasyonu ile eş zamanlı olarak endometriyumun sekretuvar aktivitesinde değişiklikler meydana gelir. Her siklusun sonu endometriyumun kısmi bozulması ve mukozal damarlardan kanamanın gerçekleşmesi ile karakterizedir. Doku ve kanın vajinadan boşaltılması 3–5 gün sürer ve bu sürece menstruasyon veya menstrual siklus adı verilir (20) (Şekil 2.2.1.).

Endometriyum, reprodüktif yaşam boyunca, yapısal ve fonksiyonel olarak farklılık gösteren 2 tabaka içerir. Bunlar; menstruasyonda atılan ve endometriyumun kalın kısmı olan fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonalis) ile menstruasyon boyunca tutulan ve fonksiyonel tabakanın yenilenmesi için kaynak oluşturan bazal tabaka (stratum bazalis) dır (6,7).

Menstrual siklusun fazları boyunca, endometriyum kalınlığı 1 mm'den 6 mm'ye kadar değişiklik gösterir. Endometriyum, sekretuvar ve silli hücrelerden oluşan basit prizmatik epitel ile çevrilidir. Yüzey epiteli lamina propriya içerisine invajine olur ve endometriyal stroma uterin bezleri meydana getirir. Daha az miktarda silli hücre içeren bu basit tübüler bezler, endometriyumun daha derinine doğru dallanma gösterirler (6,8,20).

Uterin arterinden dallanan 6-10 kadar arkuat arter miyometriyumda anastomozlaşırlar. Radyal arter olarak adlandırılan bu arterlerin dalları, endometriyumun bazal tabakasına girerek burayı besleyen küçük düz dallar verirler. Radyal arterin yukarıya doğru devam eden

ana dalı kıvrımlı bir hale gelir ve spiral arter adını alır. Spiral arterlerin arteriyolları ile oluşan segmentlere lakuna ismi verilir. Düz arterler ile spiral arterlerin proksimal kısmı menstrual siklus boyunca değişiklik göstermezken, spiral arterlerin distal kısmı östrojen ve progesteron etkisiyle her siklusta yıkım ve yenilenmeye maruz kalırlar (20).



Şekil 2.2.1.: Menstrual siklusun şematik gösterimi (21)

Menstrual siklus, aynı zamanda ovaryumdaki steroid sekresyonunu düzenleyen hipofizin pars distalisinden salgılanan gonadotropinler tarafından kontrol edilir (20).

Menstrual siklus 4 fazdan oluşmaktadır (6,7);

1. Menstrual faz
2. Proliferatif faz (Foliküler evre)
3. Sekretuar faz (Progestasyonel evre)
4. İskemik faz

1. **Menstrual Faz:** Siklusun 1-5 günleri arasındaki dönemdir. Bu dönemde endometriyumun fonksiyonel tabakası iskemi olur ve bu tabaka nekroz sonucu yıkılır ve atılır. Buna karşılık, endometriyumun bazal tabakasında beslenme bozulmadığı için dökülme olmaz ve bu bölgeden endometriyumun yenilenmesi gerçekleşir (22).
2. **Proliferatif Faz:** 5-14. günler arasını kapsayan bu fazda, bazal bölgedeki hücrelerde hızla proliferasyon gözlenir ve menstrual siklus sırasında dökülen epitel ve altındaki bağ dokusu hızla yenilenir. Proliferasyonun yanısıra bu dönemde ortaya çıkan yeni dokuların beslenmesini sağlamak için anjiyogenezis aktiftir, öte yandan apoptotik faktörler baskılanmıştır. Siklusun bu fazı sırasında endometriyal dokunun yeterli şekilde gelişimi, sekretuvar faz endometriyumu sırasında implantasyon için dokunun maturasyonunun senkronizasyonu açısından önemlidir. Bu fazda artan östrojen hücrelerin proliferasyonunu uyarır ve dökülen endometriyumun fonksiyonel tabakası yenilenir (22).
3. **Sekretuvar Faz:** Bezlerin geliştiği, endometriyumun implantasyona hazırlandığı bu faz siklusun 14-27. günlerini kapsar. Menstrual siklusun ikinci yarısında, proliferasyonu baskılayan ve hücre farklılaşmasını uyarıcı progesteron önemli rol oynar. Progesteron, Tip A (PR A) ve Tip B (PR B) reseptörleri aracılığıyla fonksiyon göstermektedir. PR A, PR B için baskılayıcı olarak da işlev görmektedir. PR B glandular hücrelerde azalırken, stromadaki miktarında önemli değişiklik olmaz. Bundan dolayı implantasyon döneminde progesteronun etkisi stromal kompartmanda PR B aracılığı ile olmaktadır (23). Östrojenin etkisiyle gelişmiş olan bezler, progesteronun etkisiyle, implantasyondan önce embriyonun en büyük besin kaynağı olan glikoproteinleri salgılar. Bezler fazlasıyla kıvrıntılı, spiral bir hale gelir ve epitel hücreleri nukleuslarının altında glikojen depolanmaya başlar. Daha sonra glikojen miktarında düşme olur. Glikoprotein salgı ürünleri, bezlerin lümenini genişletir. Bu fazda endometriyum, salgı ürünlerinin birikmesi ve stromadaki ödemin bir sonucu olarak maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır. Sekretuvar faz sırasında mitoz bölünmelere nadir olarak rastlanır. Spiral arterlerin uzaması ve kıvrılması devam ederken, miyometriyumun düz kas hücre kontraksiyonu, embriyonun implantasyonunun tehlikeye girmemesi için progesteron tarafından inhibe edilir (22).

Östrojen ve progesteronun ardarda yarattığı etkiyle, stromal hücreler, glikojenden zengin, geniş, soluk renkli desidual hücrelere dönüşürler. Blastokist implantasyonu bu

dönüşümü uyarır. Bu hücrelerin fonksiyonları kesin olarak bilinmemesine rağmen, embriyonun beslenmesi için gerekli besin ortamını sağladıkları ve gebeliğin sonunda plasentanın uterus duvarından ayrılması için özel bir tabaka oluşturdukları açıktır (20,23).

- 4. İskemik Faz:** Siklusun 27-28. günlerini kapsar. Sekresyon fazının sonunda progesteron seviyesi düşer, endometriyumda spiral arterlerde kontraksiyon oluşur, bezler salgılayamaz, endometriyum büzülür ve iskemi gerçekleşir (24).

2.3. İmplantasyon

Erkek üreme hücresi olan spermatozoon ile dişi üreme hücresi olan oositin birleşerek zigotu oluşturmasına fertilizasyon denir (25). Fertilize insan ovumu uterin mukozaya gömülü hale gelmek için, uterin tüpten uterin kaviteye doğru geçerken bir seri değişikliğe uğrar. Zigot, hücre büyümesi olmaksızın bir seri mitoz bölünmeyi takiben yarıklanır. Embriyo başlangıçta, oogenezis boyunca ovumun sitoplazmasında biriken maternal makromoleküllerin kontrolü altındadır. Daha sonra gelişim, çeşitli büyüme faktörleri, hücre bağlantı bileşenleri, ve blastokistin normal gelişiminde rol oynayan diğer makromolekülleri kodlayan embriyonik genom aktivasyonuna bağlı olarak devam eder (4,5,6).

Zigot bir seri mitotik bölünme sonucunda, dut görünümünü alır ve morula olarak isimlendirilir, hücreler ise blastomer adını alırlar. Fertilizasyondan sonraki 3. gün boyunca 12-16 hücreli hale gelen ve hala zona pellusida ile sarılı olan morula, uterin kaviteye girer. Yaklaşık bir gün boyunca morula, uterusda serbest halde durur ve hücre bölünmesine, gelişmeye devam eder. Erken embriyo, merkezinde hücre kitlesi yerleşmiş, içi boş bir küre olan blastokisti meydana getirir. Bu iç hücre kitlesi (inner cell mass) embriyonun dokularını meydana getirirken, hücrelerin etrafını saran tabaka, dış hücre kitlesi (outer cell mass), ise trofoblast ve sonrasında plasentayı meydana getirir. 1-2 gün sonunda zona pellusida kaybolur ve dış hücre kitlesi trofoblast, iç hücre kitlesi ise embriyoblast olarak isimlendirilir (4,5,20).

Blastokistin endometriyal epitelyuma tutunmasına implantasyon, bu kısa periyoda ise implantasyon penceresi denilmektedir (20) (Şekil 2.3.1.).

Embriyonun implantasyonu, birçok türde üremenin en kritik basamağı olarak kabul edilir. İmplantasyon, büyüyen fetus ile maternal sirkülasyon arasındaki ilişkiyi sağlayacak olan

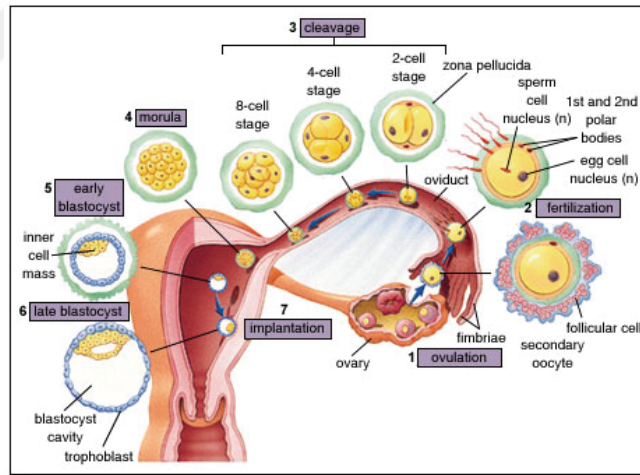
plasentayı oluşturacak şekilde, maternal endometriyal yüzeye blastokistin tamamen bağlanmasını sağlayan temel biyolojik olaydır (4,5).

Başarılı implantasyon, reseptif bir endometriyum ile blastokistin gelişim aşamasında, maternal ve embriyonik doku arasında senkronize diyaloga sahip normal ve fonksiyonel bir embriyo gerektirir (6,7).

İmplantasyon işlemi 3 basamakta sınıflandırılabilir (26), bunlar:

1. Apozisyon
2. Adezyon
3. İnvazyon

Blastokist, uterus sekresyonlarında 1-3 gün kaldıktan sonra implantasyon sürecinin ilk basamağı olan apozisyona hazırlanır. *Apozisyon* terimi fertilizasyon sonrası blastokistin uterusu ulaşarak implante olacağı uygun yeri seçmesi ile karakterizedir. Blastokistin uterin luminal epitelyuma tutunmasıdır (27).



Şekil 2.3.1.: İmplantasyonun şematik gösterimi.

Adezyon terimi, uterusu bulunan blastokistin endometriyum sekretuar fazına denk düşen dönemde epitel yüzeyine tutunması anlamını taşır. Adezyon aşaması gebelikte belki de en önemli aşamadır. Bu dönemde adezyon moleküllerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir (27). Bu moleküller; Kaderinler, Selektinler, Ig süper ailesi ve İntegrinler olmak üzere 4 ana grupta toplanırlar. Desidualize endometriyum ve erken embriyo; ekstrasellüler matriks komponentlerini, özellikle de laminin ve fibronektini eksprese ederler ki bunlar adezyon molekülleri aracılığıyla hücre adezyonunu sağlarlar (28).

İnvazyon terimi, embriyonun endometriyal bağ dokusuna bazal membranı yok ederek penetre olmasıdır. Ovulasyondan 8 gün sonra proteolitik işlemler sonrası gelişir. Trofoblastlar maternal kan damarlarına penetre olurlar. İmplantasyon bölgesindeki trofoblastlar, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastları oluşturarak maternal damarları invaze ederler. Spiral arterlerin duvarları destrükte edilerek sinüzoidal keseler oluşur (28).

Ekstravillöz trofoblast hücreleri (EVT) ile uterin dokusuna invazyon insanda başarılı bir gebeliğin oluşması için önemlidir. EVT invazyonu sıkı düzenlenmiş, büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren bir seri faktör tarafından kontrol edilir ancak bu düzenlenmenin altında yatan mekanizmalar tam olarak çözülememiştir (29).

İmplantasyon, gebeliğin başarısı için gerekli olan bir seri kompleks sinyal olaylarını içerir. Erken fetomaternal ilişkiyi sağlayan, ovaryan hormonların etkisi altında çok sayıda aracı molekül tanımlanmıştır. Bu moleküller; adezyon molekülleri, sitokinler, büyüme faktörleri, lipidler gibi birçok molekül içerir (6,8). Başlıca endometriyumdan salınan ve embriyodan salınanlar olmak üzere iki bölümde incelenmektedir.

2.3.1. Endometriyumdan Salınan Sinyaller

2.3.1.1. Dönüştürücü Büyüme Faktörü – β (Transforming Growth Factor– β , TGF- β)

TGF- β , büyüme faktörleri ailesinin bir üyesi olup hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozisi ve doku şekillenmesi ile ilişkilidir (9). TGF- β süperailisi üyeleri endometriyumda fazla miktarda eksprese edilmektedir. Hamileliğin oluşumu, desidualizasyon, proliferasyon ve menstruasyonu içeren hücresel olayların düzenlenmesinde rolü vardır (10). TGFlerin immun baskılayıcı oldukları ve LIF/IL-6 yolaklarını etkileyerek (30,31) in vitro olarak kültüre edilmiş insan endometriyal hücrelerinin biçimlenmesinde rol oynadıkları bilinmektedir. Ayrıca TGF- β 1 ve nadiren TGF- β 2 veya TGF- β 3 fare blastokistinin gelişmesinde rol oynamaktadır (31,32). Aynı zamanda TGF- β ların hormonal düzenlenme altında anti-adheziv bir glikoprotein olan “sialomusin”i ve böylece sialomusin kompleksini (SMC/Muc4) baskıladığı, dolayısıyla implantasyon için uygun ortamı hazırladığı da ileri sürülmektedir (31,33). Bu yüzden, TGF- β ailesi üyeleri implantasyonda oldukça önemli yer tutarlar (31).

2.3.1.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor, IGF)

IGF sistemi IGF-I ve IGF-II, hücre membran reseptörleri ve 6 çeşit IGF bağlayıcı proteinden oluşmaktadır. IGF’in faaliyeti, insülin-benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein

(IGFBP) reseptörleri ile düzenlenmektedir. IGF-I sistemi, endometriyal proliferasyon, farklılaşma ve embriyo-endometriyum etkileşiminde önemli rol oynamaktadır (11).

Steroid hormonların uterusu etkilerinin IGFler tarafından düzenlenen otokrin ve parakrin etkiler tarafından sağlandığı bilinmektedir. IGF-I, insülin-benzeri peptitlerin bir üyesidir. IGF-I ve IGF-II çok güçlü mitojenik ve differansiyasyon etkiye sahip büyüme faktörleridir. IGF-I'in uterusuaki ekspresyonunun östrojen tarafından düzenlendiği bilinmektedir (12). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda östrojenin, uterusu epitelindeki mitojenik etkisinin, ağırlıklı olarak stromada üretilen IGF-I'in parakrin etkisine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (34). Ayrıca yapılan çalışmalar, gebelik boyunca maternal veya fetal doku tarafından üretilen IGFlerin hem uterusu hem de plasental/fetal büyümeyi ve gelişmeyi etkilediğini göstermektedir (35).

IGF-I ve reseptörünün mitogenezis ve tümör oluşumunda anahtar role sahip olduğu bildirilmiştir. Fonksiyonel bir IGF-I reseptörü (IGF-IR)'nün hücre büyümesi için gerekli olduğu, in vivo ve in vitro koşullarda dönüşmüş hücrelerin hayatta kalabilmesi için önemli role sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (36), ayrıca IGF-IR anti-apoptotik etkiye sahiptir. Büyüme faktörlerinin hücre döngüsünde rol oynadıkları bilinmektedir, IGF-I hücrenin G1 fazından S fazına geçişinde gereklidir (37). IGF-IR ekspresyonu ve aktivasyonu, tümör başlangıcı ve ilerlemede tipik ayırıcıdır (38).

Fonksiyonel IGF-IR'nin hücre büyümesi için gerekli olduğu, in vitro ve in vivo ortamlarda hücrelerin dönüşümünde kritik rol oynadığı bilinmektedir (36). Tümör hücrelerinde, IGF-I tek başına veya IGF-II ile birlikte, hem otokrin/parakrin büyüme faktörü hem de apoptozis inhibitörü olarak rol oynar (37).

2.3.1.3. Sitokinler

2.3.1.3.1. Tümör Nekroz Faktörü- α (Tumour Necrosis Factor- α , TNF- α)

TNF- α , üreme organları, preimplantasyon embriyoları ve endometriyum gibi çeşitli dokularda eksprese olan çok yönlü sitokinlerdendir. Endometriyumda fibroblastlar, immunkomponent hücreler, glandular epitelyal hücreler ve vasküler hücreler gibi TNF- α eksprese eden çeşitli hücre tipleri mevcuttur (20).

TNF- α , pre- ve periimplantasyonda yüksek derecede eksprese olmasına karşın gebelik esnasında limitli eksprese olmaktadır (39). İnsan, fare ve ratlarda TNF- α 'nın yüksek

ekspresyonu, aynı zamanda meydana gelen yavru sayısını azaltır veya implantasyonu engeller (40). Bununla birlikte, TNF- α (LIF, TGF- β , IL-1, IL-6 ve IGFBP-1'e benzer şekilde) MMP-2 ve MMP-9 sekresyon ve aktivasyonunu önemli derecede etkiler (41), böylece erken ve geç trofoblast invazyonunu destekler. Ancak, TNF- α Knock-Out farelerle yapılan çalışmalarda normal implantasyonun kusursuzca gerçekleştiği dolayısıyla normal implantasyon için, TNF- α 'ya çok ihtiyaç olmadığı ileri sürülmüştür (13).

Proliferasyon, transformasyon ve endometriyal döküntünün kontrolünde rol oynayan östrojen ve progesteron aynı zamanda TNF- α ekspresyonunu da regüle etmekte, dolayısıyla TNF- α , endometriyumun siklik değişikliklerinde önemli rol oynamaktadır (42).

2.3.1.3.2. İnterlökin-1 (IL-1)

IL-1 ailesi; interlökin-1 α (IL-1 α) ve interlökin-1 β (IL-1 β) olmak üzere iki agonist, interlökin-1 reseptör antagonist (IL-1ra) olmak üzere 1 antagonist ve interlökin reseptör tip 1 ve 2 (IL-1R T1, IL-1R T2) olmak üzere de iki membran bağlayıcı reseptörden oluşur. IL-1 ve TNF- α 'nın üretilmesi, metalloproteinazların (MMP) üretilmesini uyarır. Ayrıca implantasyon ve preimplantasyon süresince embriyo gelişiminde ilk olarak ortaya çıkar (43). IL-1, hücre migrasyonu, kanserli hücre invazyon ve metastazında rol oynamasının (44) yanısıra blastokistin endometriyumda eksprese edilen ilk sinyallerinden biridir (43).

2.3.1.3.3. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6; inflamatuvar cevapta ve kazanılmış immünitede T hücre farklılaşmasının yönetilmesinde önemli role sahip, multifonksiyonel bir sitokindir. IL-6 kadın üreme sisteminde, gestasyonel dokuda yaygın olarak eksprese edilir. Embriyo implantasyonunun ve plasental gelişimin düzenlenmesinde birçok fonksiyona sahip olup, gebelik toleransının gelişmesinde immün adaptasyonlar kadar önemlidir (45). Ayrıca IL-6'nın ekstrasvillöz hücre invazyonunun kontrolünde rol oynadığı ileri sürülmektedir (29).

2.3.1.3.4. Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor, LIF)

LIF bir IL-6-tip sitokin olup, farelerde implantasyon için kritik olduğu gösterilmiş birçok sitokinden birisidir (46). LIF mRNA ve proteini, blastokist implantasyonundan hemen önce murin endometriyal glandular epitelde maksimum seviyede eksprese edilir (47). Aynı şekilde kadınlarda LIF, uterusun blastokist implantasyonuna uygun hale geldiği sekretuar fazın

ortalarda luminal ve glandular epitelde yüksek seviyede eksprese olur Gebelik boyunca ise LIF mRNA ve proteini ilk trimesterde desidualda eksprese edilir (46).

2.3.1.3.5. Koloni Stimüle Edici Faktör-1 (Colony Stimulating Factor-1, CSF-1)

CSF-1, disülfid bağlarıyla bağlı glikozillenmiş bir homodimerdir. CSF-1 çeşitli hücre tiplerinde hücre farklılaşması, yaşamı ve proliferasyonunu düzenlemektedir. CSF-1 luminal ve glandular epitelde, hamilelik boyunca artış göstermektedir. Menstrual siklus sırasında ise insan endometriyumunda proliferatif faza kıyasla sekretuar fazda daha yüksek seviyede eksprese edilmektedir (48).

2.3.1.4. Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) Ailesi

2.3.1.4.1. EGF

Epidermal büyüme faktörü ailesi; EGF, amfirogulin, nörogulin ve dönüştürücü büyüme faktöründen (transforming growth factor- α , TGF- α) oluşur. Tüm bu faktörler yüksek derecede homologtur ve EGF reseptörüne bağlanarak EGF-benzeri aktivite gösterebilirler.

Transmembran proteini olan EGF ailesi üyeleri, proteolitik işlemlerle aktif formlarına kavuşurlar. Bunlar tirozin kinaz reseptörleri ailesi aracılığıyla sinyallenirler ve reseptör ErbB ailesi; EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 ve HER4/ErbB-4 olmak üzere 4 farklı reseptör içerir (48,49).

2.3.1.4.2 Heparin Bağlayıcı-Epidermal Büyüme Faktörü (Heparin-Binding-EGF, HB-EGF)

İmplantasyon zamanında kritik olarak görev alan faktörlerden biri de HB-EGF'dir (49). HB-EGF tarafından düzenlenen çok çeşitli hücrel aktivitenin plasental dokuların oluşması gibi embriyonik gelişimde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Stromal hücrelerdeki HB-EGF regülasyonu, desidualizasyon için uterusun hazırlanmasında temel rol oynayabileceğini göstermektedir (50).

2.3.1.4.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (Transforming Growth Factor- α , TGF- α)

EGF'e benzer şekilde proliferasyon, migrasyon, farklılaşma ve hücrelerin remodelinginde rol oynar. Fonksiyonunu EGF reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. TGF- α 'nın implantasyonda ve desidualizasyonda rolü olduğu bilinmektedir (51).

2.3.1.5. Musin-1 (MUC-1)

MUC1, üreme sistemi epitelinin yüzeyinde bulunan bir transmembran musin glikoproteinidir ve hücre yüzeyinin mikroorganizmalardan, degradatif enzimlerden korunmasında rol oynar. Ayrıca hem normal hem de malign koşullarda hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinde inhibitör olarak görev yapar (52).

İnsanlarda MUC-1 ekspresyonu embriyonun tutunduğu bölgede ve altındaki epitelyum hücrelerinde bulunmaz iken komşu hücrelerde ekspresyonu devam etmektedir. Bunun sebebinin MUC-1'in antiadheziv etkisinin azalması sonucu uterus epiteli ile blastokistin başarılı implantasyonunu sağlamak olduğu düşünülmektedir. Fare, rat ve domuz gibi bazı memelilerde ise, insanların aksine, blastokist implantasyonu süresince uterus epitelinin apikal yüzeyinde MUC-1 ekspresyonunun azalarak devam ettiği gösterilmiştir (53).

2.3.2. Embriyodan Salınan Sinyaller

Erken hamilelik faktörü (Early Pregnancy Factor, EPF), preimplantasyon faktörü (Preimplantation Factor, PIF), trombosit aktive edici faktör (Platelet Activating Factor, PAF), büyüme faktörleri, interferon gama ve insan koryonik gonadotropin (Interferon Gama-IFN γ , human Chorionic Gonadotropin-hCG) ve prostaglandin embriyodan salınan ve implantasyonu etkileyen faktörlerdendir.

EPF, büyüme ve immün düzenleyici özellikte, embriyonik yaşamın devamı ve büyümesi için gereklidir (54). PIF ise preimplantasyon evresindeki embriyolarda üretilmektedir(55). Antijenik stimülasyon sonucu bazofillerden salınan PAF farelerde fertilizasyondan kısa bir süre sonra varolan geçici trombositopeniden sorumludur(56). Prostaglandin'in prostasiklin I₂ (PGI₂), prostaglandin E₂ (PGE₂) ve prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) olmak üzere alt tipleri mevcuttur. PG konsantrasyonunun implantasyonun başlangıcıyla ilgili olarak endometriyal vasküler permeabilitenin artış gösterdiği alanlarda arttığı bildirilmiştir (57). IFN γ normal insan uterin endometriyumunda immün yanıtın oluşması, büyümesi ve farklılaşmasında rol oynarken (58), hCG progesteron ve östrojen varlığında desidualizasyonun devamından sorumludur (59).

2.4. DESİDUALİZASYON

İnsanda desidualizasyon, menstruasyonun sekretuvar fazında (14-27. günler) gerçekleşir. Farelerde ise implantasyondan sonra yaklaşık 5. günde (e5) başlar ve e7,5'ta maksimum seviyesine ulaşır (60). Desidualizasyon boyunca, endometriyumun stromal hücreleri; çoğalır, boyutları ve komşu hücrelerle sıkı bağlantı kompleksleri sayıca artar ve desidual hücelere farklılanırlar (61).

Bazı primatlar, kemirgenler ve yarasalarda, stromal fibroblastlar desiduayı oluşturmak için gelişen spiral arteriyollerin etrafını sararlar. Hücreler genişler, daha yuvarlak hale gelir ve laminin, kollajen IV ile fibronektinden zengin desidual-spesifik ekstrasellüler matriks (ESM) ile dolarlar. Ayrıca bu hücreler, trofoblast invazyonunun maternal düzenlenmesinde kuşkusuz rol oynayan çok sayıda sitokin, büyüme faktörü ve immünomodülatör ajan üretmeye başlarlar. Ek olarak, desidua, çok sayıda uterin-spesifik doğal killer hücreler (uNK) ve makrofajların küçük popülasyonları ile karakterize immün bir çevreye sahiptir (62,63).

Desidua tarafından üretilen kemokinler ve sitokinlerin (özellikle interlökin-15), desidual hücrelerin uterin-spesifik fenotipinin oluşması ve kuvvetlendirilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (64). Spesifik inflamatuvar ve sitotoksik lenfositlerin haricinde, uNKlar ve fetal trofoblastlar (insan lökosit antijen aracılığıyla; HLA-G) arasındaki tanımlanmış etkileşimler, embriyo implantasyonu için uygun bir çevre yaratırlar (63,65).

Desidual stroma fibronektinden zengindir ve migrant ekstrasellüler trofoblastik hücreler kendi ekstrasellüler matrikslerini ve fibronektinlerinin bir kısmını salgırlar (66,67).

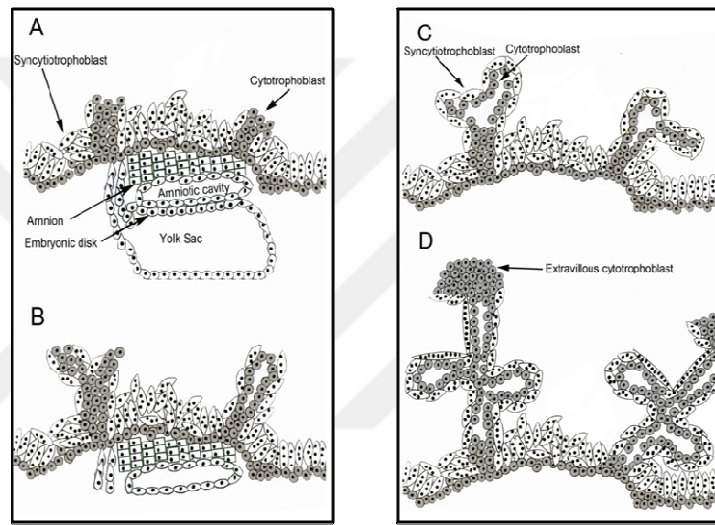
Blastokistin başarılı bir şekilde implante olması ve sonrasında fonksiyonel bir plasentanın gelişmesi, endometriyal stromal hücrelerin (ESC) yeterli desidualizasyonuna bağlıdır (68). Ovarian hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri (ör: interlökin 11, IL-11, relaksin, prostaglandin E2, aktivin A ve kortikotrofin-saliverici hormon) gibi lokal ve geçici olarak üretilen ürünlerin yanısıra henüz tam olarak tanımlanamamış birçok molekölün etkileşimleri desidualizasyonda kritik rol oynamaktadır (69).

2.5. PLASENTASYON

Memeli embriyoları plaseenta olmadan gelişemezler. Gelişimin başlangıcında plaseental hücrelerin prekürsörlerini içeren üç temel ekstraembriyonik hat gelişir, bunlar: trofoblast, ekstraembriyonik endoderm ve ekstraembriyonik mezodermdir (70).

Blastokist implante olurken, daha fazla trofoblast endometriyuma temas eder ve iki tabakaya farklılanır (Şekil 2.5.1). Tek çekirdekli bir hücre tabakası olan sitotrofoblast mitotik aktiviteye sahiptir ve artan sinsityotrofoblast kitlesi haline gelen yeni trofoblast hücrelerini oluşturur ki sinsityotrofoblast hücreleri sitotrofoblast hücrelerinin kaynaşması ve hücre zarlarının kaybolmasıyla oluşur. Sinsityotrofoblast hızlı bir genişlemeyle hücre sınırlarının fark edilmediği çok çekirdekli bir hücre kitlesi halinde sinsityum oluşturur (71).

Gelişim boyunca, trofoblast embriyoyu uterusu bağlar (implantasyon) ve besin taşınması için gerekli olan vasküler bağlantıları oluşturur. Ayrıca plasenta, embriyonun gelişimi için gerekli olan maternal endokrin, immün ve metabolik koşulları optimize eder (61).



Şekil 2.5.1.: Villöz trofoblast oluşumunun şematik gösterimi (72).

Plasental hücrelerin yarattığı inflamatuvar cevabın yayılmasında, birçok sinyal molekülü ve eş zamanlı yolakların rol oynadığı tespit edilmiştir. Gelişimin erken evrelerinden itibaren, plasenta hücrelerinin sekretuar aktivitesinin sitokinlerin ve inflamatuvar moleküllerin sistemik seviyelerinin artışında katkısı bulunduğu açıktır. Plasental aktivite, özellikle invazyon ve implantasyondan sorumlu immün cevabın gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Birçok plasental sitokin, gebeliğin devam etmesindeki rolü hala net olarak bilinmemektedir. Bir ihtimal, bunlar gebeliğin üçüncü trimesteri boyunca, düşük seviyede sistemik inflamasyon gelişmesine katkıda bulunuyor olabilirler (73).

Trofoblastın implantasyon kusuru IVF denemelerinde başarısızlığın en önemli nedenidir. Başarısız IVF sikluslarının yaklaşık üçte birinden embriyonun kendisi sorumlu iken geri kalan

üçte ikisinden uterus reseptivitesindeki defektler ve embriyo ile endometriyum arasındaki iletişim kusurları sorumludur (7).

2.6. Proteolitik Enzimler

İnsan genom projesinin tamamlanması ve sekansının bulunması ile, kodlanmış proteinlerin yapısı ve fonksiyonları hakkında son yıllarda önemli bilgiye ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda; insanda yaklaşık 20,500 adet protein kodlayan gen olduğu gösterilmiştir. Genoma uygun sentezlenen proteinler, posttranslasyonel modifikasyon (PTM) olarak ifade edilen bir mekanizma ile değiştirilerek proteinlerin çeşitliliğini ve etkilerini artırmaktadırlar. Proteinlerin veya peptitlerin PTM'u; spesifik enzimatik basamaklar veya yolaklar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu işlemler sırasında proteinlere kovalent, geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak yapısal bir element eklenmektedir (17).

Yaygın olarak görülen diğer bir geri dönüşümsüz mekanizma olan proteoliz yolu ile de birden çok ürün elde edilebilir. Protein ya da peptit ürünleri bir ya da birden fazla proteaz ile kesilerek son biyoaktif formlarına modifiye olabirler (17,18).

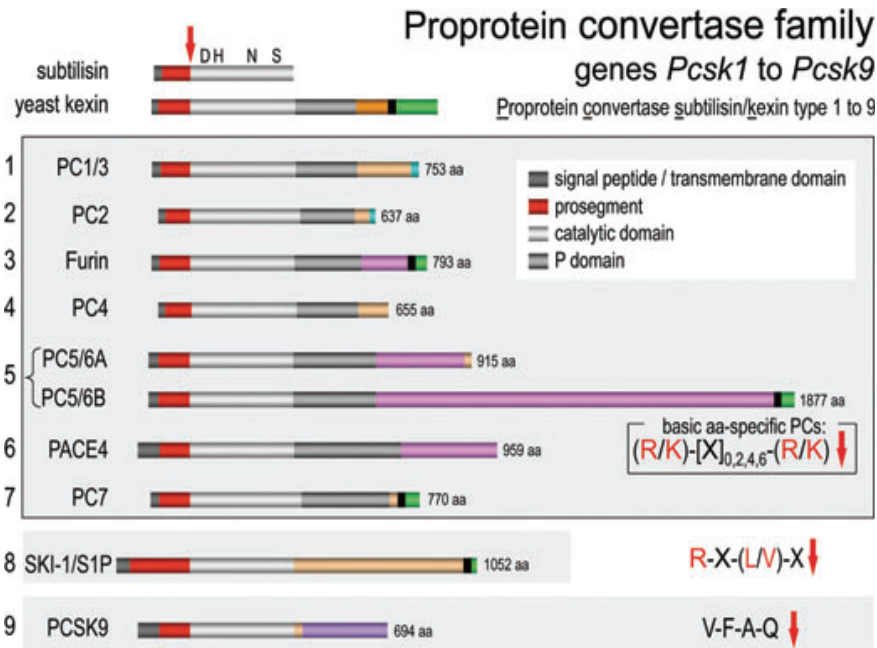
2.6.1. Proprotein Konvertazlar

İnsan ve fare genomlarının analizinde, 5 büyük proteolitik enzim sınıfından birine ait, yaklaşık 600 farklı proteazın varlığı gösterilmiştir. Serin proteazlar bunların arasında en bol bulunanıdır. Tripsin/kimotripsin katlanması ile ilişkili olanlar ve bakteriyel subtilizin grubuna yakın olanlar olmak üzere 2 büyük aileye ayrılmaktadır (17). Serin proteazlar embriyogenezis, sindirim, homeostazis, immün cevap, doku yenilenmesi, hücre aktivasyonu ve apoptozisi içeren birçok fizyolojik işlemde rol oynamaktadır. Yapısal benzerliklerine, substrat spesifitelerine, aktif bölgelerindeki düzenlenmelerine ve değişken düzende histidin, aspartat ve serin kalıntılarını -katalitik triad- içermelerine göre 13 klan ve 40 gruba ayrılmışlardır. Bununla birlikte, serin proteazların küçük bir ailesi olan proprotein konvertazlar, insanlarda ve diğer organizmalarda kritik hücre yolakları içeren çeşitli fonksiyonların aktivasyonunda rol oynarlar (19).

Protein konvertazlar (PC); memelilerde bulunan sekretuar serin proteinazlardır. Bunlar bakterideki subtilizin-benzeri enzimlerle ilişkilidirler. Proprotein konvertaz ailesi 9 üyeden oluşmaktadır. Bunlar (18);

- PC1/3,
- PC2,
- FURIN, (PACE)
- PC4,
- PC5,
- PC6 (PACE4; PC5/6),
- PC7, (PC7/LPC8/lenfoma proprotein konvertaz)
- SKI-1/S1P,
- PCSK 9'dur

Bunlardan 7 tanesi yapısal ve biyokimyasal olarak birbirlerine ve büyük olasılıkla türedikleri bakteriyel, maya proteinlerine –subtilizin ve keksin- benzer çekirdek üyelerdir. Büyüklükleri çok az farklılık gösterir ve farklı biyokimyasal fonksiyonlar gösteren, benzer yapıda kalıp domainlerden oluşurlar (19) (Şekil 2.6.1.1.).



Şekil 2.6.1.1. Proprotein konvertazların primer yapılarının şematik gösterimi (18).

Bilinen diğer iki proprotein konvertaz, subtilizin/keksin izoenzim1/ site-1 proteaz (SK1/S1P) (74) ve proprotein konvertaz subtilizin/keksin 9 (PCSK9) diğerlerinden çok sonra tanımlanmış ve farklı domain yapılarından dolayı farklı subfamilyalara dahil edilmişlerdir (19).

Protein konvertazlar, prodomainleri aracılığıyla hücre boyunca korunan inaktif prekürsörler –zimojenler- olarak sentezlenirler. Prodomainler, protein katlanmasına ve aktivasyonuna katkıda bulunurlar (19) ve intramoleküler, otoproteolitik ve ilk ayrışma basamağının bir bölümü olan sonraki proseslere katkı sağlarlar. Bu proses, çekirdek proprotein konvertazların endoplazmik retikulumdan çıkması, sonrasında aktivasyonlarını tamamlamaları için bunu izleyen trans-Golgi ağı-endozomal kompartmanlar ph- ve kalsiyum-bağımlı ayrışma olayı için gereklidir (19,75).

Furin'in proses domainlerine ait kristal yapının açıklanması, diğer 6 çekirdek proprotein konvertazın yapılarının modelinin oluşturulmasına ve katalitik domainde negatif yüklü amino asit rezidularının bir araya gelişinin açıklanmasına yol açmıştır. Bu düzenlenme, büyük olasılıkla, PClerin temel substrat motiflerine olan spesifitelerini (76) ve farklı proprotein konvertazların yük dağılımlarındaki eşleşmenin, bu moleküllerin göreceli substrat seçiciliğinde bir faktör olabileceğini açıklamaktadır (77).

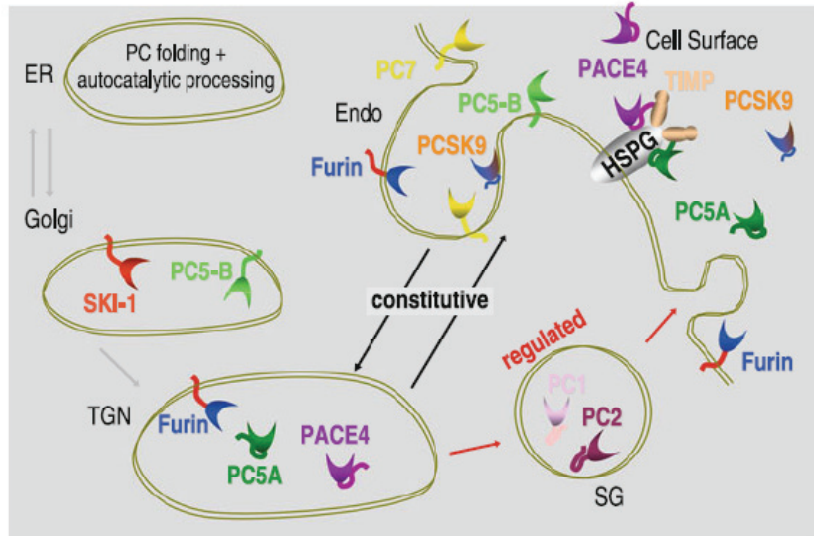
Protein konvertazlar genellikle, tercih ettikleri substrat ayrışma bölgesine göre sınıflandırılırlar 7 çekirdek enzim, proteolizin gerçekleştiği temel motiflere göre prekürsör proteinleri aktive ederler. Bu motif genellikle arjinin (R), lizin (K) rezidülerini veya diğer amino asitlerin yanında $[R/K-(X)_n-R/K-R\downarrow]$ şeklinde olabilir. X sistein'den (C) başka bir amino asidi, n 0,2,4 veya 6 sayılarını, aşağıya doğru olan ok ise ayrışma bölgesini göstermektedir. Bu ayrışma bölgelerinde bazı çeşitlilikler sözkonusu olabilir. SK1/SP1 ayrışma için temel bir rezidüye ihtiyaç duymaz. PCSK9 ise transtan ayrıştırmaması yönüyle tektir, direkt substratı etkiler (19).

Sekretuar granüllerde lokalize olan PCSK1 ve PCSK2'nin kabul edilmesiyle birlikte proprotein konvertazların, proteinlerin sekresyonunda görev aldıkları kesinleşmiştir. Furin ile PCSK5 ve PCSK7 gibi yaygın olarak dağılım gösteren proprotein konvertazlar, trans-golgi ağı, hücre yüzeyi ve endozomlar boyunca, hücrenin farklı kompartmanları arasında geçiş yaparak proproteinlerin işlenmesinde görev alırlar (78). Protein konvertazlar, hücrelerde eş zamanlı olarak eksprese edilir ve farklı birçok proteini aktive ederler (19).

2.6.2. PROPROTEİN KONVERTAZLARIN TARİHÇESİ

Fizyolojik olarak önemli olan proteinlerin, inaktif bir prekürsör molekülün post-translasyonel ayrışma ile aktif hale gelmesine ihtiyaç duydukları fikri, ilk olarak 1967’de, proinsülinin keşfi ile ispat edilmiştir (79). Çeyrek asır sonra, mayadaki subtilizin-benzeri keksin endoproteazın, memelideki proses enzim analogu olan furin’in bulunması diğer proprotein konvertazlar ve spesifik substratlarının bulunması çalışmalarına hız kazandırmıştır (80). 20 yıldan fazla zaman geçtikten sonra, bu enzimlerin, insan homeostazisinde ve endokrinopati, neoplastik hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıkları içeren çeşitli patofizyolojik durumlarda, önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Dolayısıyla, bu enzimler insanlardaki çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek potansiyel teröpatik ajanlar olarak gösterilmişlerdir (19).

İlk proprotein konvertaz, 22 yıllık bir çalışmanın sonunda 1989-1990’lı yıllarda bulunmuştur ve 14 seneden daha az bir zamanda 9 üyesinin tamamı tanımlanmıştır. 1960’lı yılların ortalarında yapılan araştırmalar; sekretuar yolak içerisinde, proproteinlerin ve prohormon prekürsörlerinin başlangıçta sınırlı olarak kesilmesini sağlayan proteolitik bir mekanizmanın olması gerektiğini göstermektedir. Bu kesilme işlemi, trans-Golgi ağı (trans-Golgi network=TGN), hücre yüzeyi, endozomlar, salgı granülleri olmak üzere 4 farklı kompartmanda gerçekleşir. Bu kompartmanların seçimi, substrata göre değişiklik gösterir (Şekil 2.6.2.1.).



Şekil 2.6.2.1.: Proprotein konvertazların salgı yolağının şematik gösterimi (18)

Proteinlerin oluşum sürecinde bu şekilde ayrılması, limitli proteolizinin zaman ve mekana göre kontrolüne izin vermektedir (18).

1970-1980'ler boyunca, enzimlerin saflaştırılmasında kullanılan metotların sınırlı oluşu ve aktivitelerinin izlenmesi için kullanılan substratların hassasiyeti ve spesifitesi, sınırlı başarılarla sebep olmuştur. 1984'de maya konvertaz keksin (Kex2p=yeast convertase kexin)'in bulunması, memeli proprotein konvertazın ilk prototipinin moleküler ve genetik olarak tanımlanmasını sağlamıştır. Keksin, pro-K1 öldürücü toksin (killer toxin) prekürsörünü ve bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin pro- α faktörünü ayrıştırır. Keksin, ökaryotik-tripsin benzeri enzimlerden ziyade bakteriyel subtilazlar ile daha yakından ilişkisi olan bir serin proteinazdır (17,18).

Bu da tripsin-kimotripsin serin proteinazların aktif bölgelerinin ortak sekanslarından elde edilen dejenere oligonükleotitler ile aynı kökten gelen memeli PC'ları tanımlamak için yapılan RT-PCR analizlerinin başarısızlıkla sonuçlanmasına dair birçok şeyi açıklamaktadır. Memeli pro-opiomelanokortin (POMC); ACTH, beta-endorfin ve memeli hücrelerinde çok fazla eksprese olan keksin'in prekürsörüdür. POMC prosesinin analizi, membrana-bağlı tip I keksin ile memeli proprotein konvertazlar arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Daha sonra, yapılan RT-PCR analizleri ile benzer memeli PC'ları tanımlanmıştır (18).

2.6.2.1. Furin'in Bulunuşu

1986 yılında, Wim Van de Ven ile Anton Roebroek tarafından "fur gen" (fes/fps upstream region, fes bir onkogendir) olarak klonlanmış ve 1988'de Robert Fuller ve ekibi tarafından yapılan tartışmalar sonucunda bir memeli keksin homoloğu olarak ortaya koyulmuştur. Furin geni (PCSK3 = proprotein convertase subtilisin kexin type 3), insanda 15. kromozomda, fes/fps bölgesine yakın yer alır (18).

2.6.2.2. PC1/3 ve PC2'nin Bulunuşu

Birçok polipeptit hormon prekürsörün, immatür salgı granüllerindeki işlemleri asidik ortamda gerçekleşir. Bu da benzer enzimlerin pH'ı 5-6 olan asidik ortamlarda aktifleşeceği fikrini doğurmuştur. Ancak biyokimyasal yöntemlerle yapılan çalışmalar, proteaz seviyelerinin düşük olması ve substratların hassasiyetlerini yitirmelerinden dolayı başarısız olmuştur. Daha sonra, 1983 yılında Kary B. Mullis tarafından RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) (RT-PCR, bir DNA parçasına ait mRNA'dan reverse transkriptaz

aktivitesiyle, tek ya da bir çok kopya oluşturulmasını sağlar) tekniğinin bulunmasıyla beraber, birçok polipeptit hormon prekürsörün düzenlenmesinde rol oynayan 2 adet PC tanımlanabilmiştir. Tanımlama işlemleri için domuzdan alınan hipofiz ve kalp atriyumundan elde edilen ekstraktlar mRNA kaynağı olarak kullanılmıştır (18).

Hipofiz dokusunun seçilmesinin sebebi, anterior lobta pro-opiomelanokortin (POMC)'den ACTH ve β -LPH'nin ve intermediyal lob'ta α -MSH ve β -endorfin'in üretilmesidir. Bu üretim işlemleri diğer farklı konvertazlara benzer. Kalp atriyumunda ise aktif atriyal natriüretik faktör (ANF)'ün oluşmasında prokürsörlük eden proANF gösterilmiştir. Daha sonra proANF konvertaz, tripsinin bir tipi; membrana bağlı tip-II serin proteaz olan "korin" olarak isimlendirilmiştir (18).

Çalışmalar devam ederken, Robert Fuller tarafından yayınlanan bir makalede furin'in bir memeli keksin homoloğu olabileceği fikri öne sürülmüştür. Buradan yola çıkarak, aktif subtilaz bölgeleri çevresinden dejenere oligonükleotitler, sıçan kalp atriyumundan izole edilen furin sekansı ile hipofizin anterior ve nörointermediyet loblarından elde edilen, 2 yeni subtilizin-benzeri enzimin katalitik domainlerini kodladığı tahmin edilen 2 adet DNA parçası dizayn edilmiştir. Bu pituitar konvertazların cDNA'ları klonlanmış, PC1 ve PC2 adı verilmiştir. Bu konvertazlar sırasıyla, farede 13. (Pcsk1, PC1 gen) ve 2. (Pcsk2, PC2 gen) kromozomda, ortolog insanda ise 5 (PCSK1) ve 20. (PCSK2) kromozomda bulunurlar. Başka bir grup çalışmacı, insan insulinomundan keksine dayalı dejenere oligonükleotitleri kullanarak PC2 ve daha sonra PC1 klonlamıştır ancak PC1'e PC3 ismini vermiştir. Sonrasında enzim PC1/3 olarak isimlendirilmiştir. Devamında yapılan çalışmalar bu iki enzimin daha çok pro-nöral ve endokrin peptitlerin prosesinden sorumlu olduklarını göstermiştir (18), bu nedenle çalışmamızda kullanılmamışlardır.

2.6.2.3. PC4'ün Bulunuşu

1991 yılında, çeşitli dokulardan elde edilen mRNA'larla PC ailesinin diğer üyeleri için RT-PCR tekniği ile yapılan araştırmalarda, sıçan testisinde 3 farklı PC için potansiyel kodlama yapan yaklaşık 600 bp cDNA tanımlanmıştır. Bunlar PC4, PC5/6 ve PACE4 olarak bilinirler. Bundan kısa bir süre sonra, yayınlanan bir makalede, insan hematoma HepG2 hücre hattından PACE4'ün bütün cDNA sekansının ve osteosarkomadan da cDNA kütüphanesinin tamamlandığı bildirilmiştir (82). Daha sonra PC4 (83) ve P5/6 (84) enzimleri üzerine yoğunlaşmış ve PC4'ün yalnızca erkek testikular germline pakiten spermatositleri ve

spermatidleri çevresinde eksprese edildiği anlaşılmış ve 1997 yılında PC4 ekspresyonu olmayan KO farelerde yapılan çalışmalarda, PC4 yoksunluğuna ilişkin bulgular ilk olarak değerlendirilebilmiştir (18).

2.6.2.4. PC6'nın Bulunuşu

PC5A, 1993 yılında Nakayama ve grubu tarafından tanımlanmış ve PC6 enzimi olarak isimlendirilmiştir. Şimdilerde ise PC5/6 olarak ifade edilmektedir. PC5/6 ve PC6 allelleri açısından aynı oldukları için çalışmamızda PC5 primer-prob kullanılmıştır. PC5/6 ve PACE4, kendi primer yapılarına ve metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMPs = tissue inhibitors of metalloproteinases), heparin sülfat proteoglikanları (HSPGs)(85), birçok durumda endotelial ve lipoprotein lipaz gibi (86) inaktif HSPG-bağlı proteinler ve adhezyon moleküllerine, C-terminal Sis-zengin domainleri aracılığıyla hücre yüzeyine bağlanabilme yeteneklerine göre sınıflandırılır (18).

2.6.2.5. PC7'nin Bulunuşu

1996 yılında bulunan, temel amino asit-spesifik PC'lerdendir. Geni (PCSK7), insanda 11. kromozomda, farede 9. kromozomda yer alır. PC7 insan lenfoma kütüphanesinden klonlandığı için LPC (lenfoma PC) olarak da anılır (87). Doku dağılımı için yapılan analizlerde PC7'nin her zaman birçok doku ve hücre hattında eksprese edildiği gözlenmiştir (88). PC7, en eski ve filogenetik olarak en çok korunmuş olan konvertazdır. PC7'nin, in vivo fizyolojik fonksiyonları ve PC ailesinin diğer üyeleriyle ilişkileri henüz kanıtlanmamıştır (18).

2.6.2.6. PCSK9'un Bulunuşu

PCSK9'un orjinal adı "nöral apoptozis-düzenleyici konvertaz (neural apoptosis-regulated convertase, NARC-1) dır (89). İki Fransız aile üzerinde yapılan araştırmalarda, PCSK9 geninde meydana gelen tek-nokta mutasyonları ile otozomal dominant hiperkolesterolemi arasında bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur (90). Bu yüzden PCSK9, LDLR (LDL reseptörü) ve APOB (apolipoprotein B)'dan sonra kalıtsal hiperkolesterolemi (90) ile ilişkisi olan üçüncü gendir (18). PClerin bazı genetik varyantlarını veya fazla ekspresyonlarını kapsayan bazı patolojik durumların gerçekleşmesi 2010 yılında PCSK9'un hiperkolesterolemi, ateroskleroz ve metabolik sendrom ile ilişkili insan kardiyovasküler hastalıklarının ilk klinik denemesinin yapılmasına yol açmıştır (17).

2.6.3. PROPROTEİN KONVERTAZLARIN FONKSİYONLARI

2.6.3.1. FURİN'in Fonksiyonu

Yaygın olarak eksprese edilen Furin, yapısal salgı proteinlerin oluşumunda görev yapan temel PC'dir (17). Özellikle katalitik serin subtilaz domaininde, furin ile keksin arasında göze çarpan benzerlikler mevcuttur. Yapılan analizler, membrana bağlı tip I furin prosesinin intraselüler TGN (trans-Golgi ağı), hücre yüzeyi ve/veya endozomlarda gerçekleştiğini göstermektedir. Bu endozomlar; büyüme faktörleri ve reseptörleri, enzimler, memeli, viral ve parazitik orjinli yüzey glikoproteinleri, kan koagülasyon faktörleri ve bazı polipeptit hormonları içeren salgılanmış substratlardan oluşurlar. Membrana bağlı furin, hücre yüzeyinden endozomlar aracılığı ile TGN'ye döner. Bu yolak, furin'in sitozolik ucundaki çeşitli sinyallerle kontrol edilir. Furin'in en iyi substratlarından bir tanesi RX(R/K)R↓EL sekansını içermektedir. Bu sekans, endojen furin ile kesilen viral glikoproteinler ve memeli proteinlerinin stratejik bölgelerinde yer alır (18).

Furin, tüm dokularda çok yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Bu nedenle birçok proteinin aktif formunun oluşmasında büyük role sahiptir. Öte yandan, lipoprotein ve endotelyal lipazlar ile proprotein konvertazlardan PCSK9'un inaktivasyonunda rol oynar. Furin'in çeşitli fizyolojik fonksiyonları mevcuttur. Dolayısıyla, furin eksikliğinde hayvanlarda ciddi gelişim bozuklukları veya anomaliler gözlemlenir (18,91).

İn vivo olarak, çok az sayıda spesifik furin substratı tanımlanmış olmasına rağmen TGF- β ailesinin bazı üyelerinin (TGF- β 1, BMP4) prosesinin en iyi furin tarafından gerçekleştirildiği göze çarpmaktadır (18). Furin yaygın olarak nöroendokrin dokuda eksprese edilir ve farklı subselüler kompartmanlarda bulunur (92).

Furin'in embriyogenezis, homeostazis ve hastalıklarda önemli rolleri vardır. Ancak furin aktivitesi yetişkinlerde ölümcül hastalıklara yol açabilmektedir (93). Furin; tümör büyümesi, yayılımı ve metastazında rol oynamasının yanısıra baş, boyun, meme ve akciğer kanserlerinin invazyon ve proliferasyonunun gelişmesinde de rol oynadığı bilinmektedir (92).

2.6.3.2. PC1/3 ve PC2'nin Fonksiyonu

PC1/3 ve PC2, nöral ve endokrin hücrelerin sekretuar yolak ile düzenlenmesinde rol oynayan prohormonlar ve pronöropeptidlerin temel aktivatörleridirler. PC1/3 ve PC2 birçok prekürsörün fonksiyonel hormonlara dönüşmesini sağlar. Örnek; pro-opiomelanokortin,

proinsülin, promelanin konsantre hormonu, Sekretogranin II, proenkefalin, prodinorfin, prosomatostatin, kromogranin A ve B, proPACAP, ve nörotrofik faktör proBDNF. PC2 çeşitli nöroendokrin prekürsörlerin işlemcisi olarak bilinir ve bu prekürsörlerin birçoğu (prosomatostatin, nöronal proCCK, nörotensin, nöromedin N, prodinorfin, proorfalinin FQ/nosiseptin ve POMC – derive eden peptitler gibi) PC2- yoksun farelerde tam olarak işlenmezler. PC2'nin aksine, PC1/3 genin bozulması, çeşitli gelişim anomalileri ve birçok yavrulamanın baskılanması ile sonuçlanır (17,18,19).

PC2, POMC ve proenkefalinin ayrışmasında rol oynar dolayısıyla acının algılanması açısından önemlidir. Öte yandan PC1/3 ise ince bağırsakta emilim fonksiyonu göstermesi açısından önemlidir (17,18).

2.6.3.3. PC4'ün Fonksiyonu

PC4'ün yalnızca erkek testikular germline pakiten spermatositleri ve spermatidleri çevresinde eksprese edildiği anlaşılmıştır. Bu da PC4'ün üremede spesifik fizyolojik bir fonksiyon oynayabileceği fikrini doğurmuştur. Spermatid çevresinde akrozomal granüllerde, uzamış spermatidlerin akrozomal tepelerinde ve akrozomun üzerini örten sperm plazma membranında PC4'ün varlığı saptanmıştır (94). Dişi farelerde PC4, ovaryumdaki makrofaj-benzeri hücrelerde eksprese edilir ve seviyeleri, inflamasyonda olduğu gibi, aktif makrofajlar tarafından baskılanır. Ayrıca, PC4'ün insan plasentasında da eksprese edildiği gösterilen bulgular arasındadır. Erkek farelerdeki PC4'ün, fertilizasyonun başarılı olmasında ve erken embriyonik gelişimin desteklenmesinde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (18).

2.6.3.4. PC6 (PC5/6 veya PACE4)'nin Fonksiyonu

MSS'nde, PC5/6' nın, nöronal onarım ve migrasyona yardımcı nöral adhezyon molekülü prosesinde rol oynadığı gösterilmiştir (95). PC5/6, ekzonlarının farklı eklenmeleri ile meydana gelen PC5/6A (soluble 915 aa) (96.) ve PC5/6B (tip-I membran bağımlı, 1877 aa) olmak üzere iki mRNA transkripti olarak eksprese edilir. PC5/6 mRNA'nın doku dağılımı için qPCR ile yapılan kantitatif analizler, ince bağırsak ve böbreğin PC5/6B açısından en zengin kaynaklar olduğunu gösterirken, PC5/6A'nın diğer tüm dokularda yaygın olarak eksprese edildiğini göstermektedir. PC5/6B, furin ve PC7'den farklı olarak transmembran domain ve sistosolik kuyruk içermesinin yanısıra endozomlar aracılığıyla hücre yüzeyinden TGN'ye geri dönen bir sıklusa sahiptir (97). Farklı kompartmanlara yapılan bu geçişler, bu enzimin sistosolik kuyruklarındaki çeşitli sinyaller ve bunların spesifik sinyallerle

etkileşimleri tarafından kontrol edilir. Çalışmalarda sunulan veriler, PC5/6 ve PACE4'ün tek doku-spesifik fonksiyon gösterdikleri yönündedir. PC5/6 mRNA yalnızca nöronal hücrelerde tespit edilirken, PACE4 mRNA'nın hem nöronal hem de glial hücrelerde eksprese edildiği bulunmuştur (18).

PC5/6 ekspresyonu, ilk olarak ekstra-embriyonik dokularda olmak üzere erken embriyonik gelişim boyunca gözlemlenmiştir (98). Embriyonun 9. gününde (E9), özellikle maternal-embriyonik geçiş bölgesinde diğer konvertazlar eksprese edilmezken, PC5/6 eksprese edilmektedir (18).

2.6.3.5. PC7'nin Fonksiyonu

PC7 yaygın olarak eksprese edilir ve multipl prekürsörlerin (büyüme faktörleri ve reseptörleri, proteazlar, adezyon molekülleri, enfeksiyöz virüs ve parazitlerin yüzey glikoproteinleri) meydana getirilişindeki temel işlemlerde bulunur (17).

Ayrıca, PC7 yüksek oranda immün sistemde eksprese edilir. PC7 mRNA'nın yokluğunda MHC-I'in lizozomal bozunmasına yol açar, dolayısıyla PC7'nin antijen sunmada rol oynadığı düşünülmektedir. PC7 tümör oluşumunda da rol oynar (18).

Filogenetik olarak en çok korunmuş proprotein konvertaz olmasına rağmen zimojen aktivasyon mekanizması ve fizyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (99).

2.6.3.6. SKI-1/S1P'nin Fonksiyonu

SKI-1 veya diğer adıyla S1P, endoplazmik retikulumda gerçekleşen strese karşı cevabı veya kolesterol ve yağ asit sentezinin düzenlenmesini (100) olumsuz yönde etkileyen membrana-bağlı transkripsiyon faktörlerini aktive eder. SKI-1'in bilinen diğer substratları; viral glikoproteinler, beyin-türevi nörotrofik faktör (BDNF) ve somatostatin'dir. SKI-1 inhibisyonu, kolesterol ve yağ asit sentezini içeren anahtar metabolik yollarda büyük değişikliklere yol açar (101)

In vivo olarak denenen küçük moleküllü SKI-1 inhibitörlerinin kolesterol ve yağ asit sentezini azalttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla bunların; dislipidemi ile diyabet, obezite ve metabolik sendromlarla ilişkili kardiyometabolik risk faktörleri için potansiyel yeni bir sınıf terapötik ajanlar olabilecekleri düşünülmektedir (18). Ayrıca SKI-1'in, Lassa virüs (102) ,

lenfositik koryomeninjitis virüs (103) ve Kırım-Kongo kanamalı ateş virüs (104) glikoproteinleri gibi kanamalı ateş virüslerinin aktivasyonunda kritik bir öneme sahip olduğu gösterilmiştir. SKI-1'in in vivo fizyolojik rolü hakkında çok az bilgi mevcuttur (18).

2.6.3.7. PCSK9'un Fonksiyonu

PCSK9'un sadece bir substratı vardır, kendisi. Aktivitesi, onun katalitik fonksiyonunu kapsamamaktadır. PCSK9, yerleşik endozomal/lizozomal proteazlar ile LDL reseptörünün bozunmasını artırarak LDL dolaşımının plazma seviyesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (17).

PCSK9'da meydana gelen nokta mutasyonlar; ya kalıtsal hiperkolesterolemi veya hipokolesterolemi ile ilişkilidir (18).

2.6.4. Proprotein Konvertazların Hastalıklarla İlişkisi

Günümüzde proprotein konvertazların yapı ve biyokimyası bilinmesine rağmen, ayırt edici "hüresel içeriği" – ekspresyon paternlerinin çok fazla çeşitlilik göstermesi, birbirini etkileyen moleküller ve bu enzimlerin fonksiyonlarına etki eden diğer hüresel mikroçevresel etkiler- olmadığından, her bir proprotein konvertazın spesifik substratlarla olan bağlantısını belirlemek için yapılan in vitro çalışmalar sonuçsuz kalmıştır (105). Bu sebeple, farelerde, koşullu gen-knockout ve doku-spesifik-knockout modellerde, proprotein konvertazların homeostazis ve fonksiyonları baskılandığında oluşan patojenik sonuçlarla ilişkisinin olup olmadığı aydınlatılmıştır. Spesifik dokularda gen fonksiyonunun tamamen baskılanması, sıklıkla normal olmayan fenotiplerin oluşmasına sebep olur (19).

Proprotein konvertazlar; neoplastik transformasyon, proliferasyon, yayılma ve metastaz patogenezeğine katkı sağlar. Çok sayıda kanıtlanmış ve tahmin edilen proprotein konvertaz substratlarının - büyüme faktörleri, reseptörler, matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve adezyon molekülleri gibi - proseslerinin birbirleriyle ilişkili kompleks bir ağ boyunca gerçekleştiği bilinmektedir (106).

Çeşitli insan kanserleri ve tümör-hücre hatlarında, deneysel koşullarda büyüme ve invaziv olma ile ilişkilendirilen proprotein konvertaz ekspresyonlarının yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir (107).

Diğer konstitütif salgılanan proprotein konvertazların, --furin, PC5, PC6 ve PC7-- yüksek seviyede ekspresyonlarının, baş ve boyun, göğüs, büyük hücreli akciğer kanserleri ve birçok tümör-hücre hattı ile ilişkili oldukları göze çarpmaktadır (19).

MMPlerin proprotein konvertaz ekspresyonu, açıkça ortaya çıkmayan malign fenotipin saptanmasını sağlayan belirli mekanizmalar içermesine rağmen, invaziv potansiyele sahip kanserlerin yanısıra PC6-transfekte, non-tümörjenik, mürin cilt hücre hatlarındaki benign keratinositlerin malign dönüşümüne de katkıda bulunur (19).

Proprotein konvertazların, tümör ilerlemesinde ve aktif substratları arasındaki kompleks etkileşimler aracılığıyla metastazda önemli rolleri olabilir (92,108). TGF- β 'nin tümör-supresyon fonksiyonu (92) olmasına rağmen tümör- hücre proliferasyonu; TGF- β , platelet-derive büyüme faktörü ve IGF-I ile reseptörünün ve proprotein konvertaz aktivasyonunun artışına bağlı olabilir (19).

Tümörün ilerlemesi ve invaziv hale gelmesi; tümör mikro çevresinde integrinler ve ilişkili adhezyon moleküllerinin proprotein konvertaz aktivasyonu aracılığıyla hücre adhezyonunda sinyal-transdüksiyon-aracılı değişiklikler (109); neoplastik büyümenin esasları olan anjiyogenez ve lenfanjiyogenez sağlayan vasküler endotelial büyüme faktörünün proprotein konvertaz aktivasyonu (110); ve furin, PC6 ve diğer yaygın dağılım gösteren proprotein konvertazların aktivasyonu sonucu MMP ekspresyonunun artışı (105,110) gibi birçok faktörle ilişkili olabilir. Membran tip 1 MMP (64), ADAM (disintegrin ve metalloproteinaz) (111) ve stromelinin 3 (112) içeren proprotein konvertaz-bağımlı MMP ailesinin enzimleri, ekstraselüler matris bazal membranının bozulması ve yıkılmasını sağlayarak metastatik yayılımı destekler (19).

Bazı patojenler hayatta kalabilmek için konakçı protein-proses mekanizmalarına uyum sağladıklarından, proprotein konvertazlar çeşitli enfeksiyöz hastalıkların patogenezinde de kritik öneme sahiptirler. Antraks toksini ve Aeromonas hidrofila furin ve PC6 gibi proprotein konvertazları kullanırlar (19).

Patojenik virüslerin büyük bir kısmı, zarf glikoproteinlerini ayrıştırmak böylelikle konakçı hücre membranı ile birleşebilen olgun proteinler meydana getirebilmek için konakçı proprotein konvertazlarını –özellikle furin- kullanırlar. İnsan immün yetmezliği virüs tip I (HIV I) ve influenza A virüsleri proteolitik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Mevsimlik virüsler ve bunların düşük patojenlikleri genellikle konakçı tripsin-benzeri proteazlar ile işlenirlerken,

H5N1 gibi yüksek ölüm oranına sahip hastalıklara sebep olan suşları içeren yüksek patojen avian (kuşlara ait) influenza virüsleri furin gibi yaygın proprotein konvertazlar tarafından işlenirler. İnfluenza virüslerinin virulansı, direkt olarak proprotein konvertazlarının ayrışma motiflerinin yapısı ile ilişkilidir (19,113).

Bunların dışında RSV (respiratory syncytial virus) (114), kızamık ve diğer paramiksovirusler ile Sitomegalovirüs, Ebola, Ebola alttürü olan Reston, Marburg ve son olarak insan papillomavirüsü furin aktivasyonuna ihtiyaç duyarlar.

Proprotein konvertazlar aynı zamanda lipit bozuklukları ve ateroskleroz ile de ilişkilidirler. PCSK9, düşük yoğunluklu hepatik lipoprotein (low density lipoprotein-LDL) reseptörünün bozunmasını artırır, ancak bilindiği anlamda intrinsik katalitik aktivite ile etki etmek yerine LDL reseptörüne sıkıca bağlanarak işlem yapar ve sonra muhtemelen halihazırda bulunan hidrolazlara bağlanır. Reseptör-aracılı endositoz, LDL kolesterol kleransında primer yoldur, PCSK9'un overekspresyonu LDL kolesterol sirkülasyon seviyesini artırır (19).

Artan proprotein konvertaz fonksiyonu ile ilişkili PCSK9 tek nokta mutasyonları, LDL kolesterolün yüksek plazma seviyeleri ile ilişkili ailesel otozomal dominant hiperlipidemi ile sonuçlanabilir ve bu (ailesel otozomal dominant hiperlipidemi) erken miyokardiyal enfarktüs ve felç riskini artırır (90). Fonksiyon kaybına sebep olan mutasyonlar, murin knockout modellerde olduğu gibi, LDL reseptör seviyelerinin yükselmesi ile sonuçlanır. Bu da statinler tarafından geliştirilen bir yolak ile, dolaşımdaki lipoproteinlerin kleransının artmasına ve kolesterol seviyelerinin azalmasına sebep olur. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, hiperkolesterolemi ve çok düşük miktarda PCSK9 sekresyonu arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

Siyah bireyler üzerinde yapılan geniş çaplı bir çalışmada, söz konusu mutasyonların, 15 yıldan daha fazla bir sürede %88 oranında artan koroner kalp hastalıklarıyla bir ilişkisi olduğu kaydedilmiştir (19).

Proprotein konvertazların, senil plakların gelişmesinde dolaylı yoldan rol oynadığı için Alzheimer başta olmak üzere, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi vardır. Bu lezyonların esas bileşeni olan β -Amiloid sekretaz enzimleri (β -site amiloid prekürsör protein-klavaj enzim 1; BACE-1 ve β -sekretaz) tarafından katalizlenen bir işlem ile amiloid prekürsör proteininin endoproteolizi sonucu üretilir (115). Furin ve diğer proprotein konvertazlar, plakların adım adım gelişimi için bir ön koşul olan BACE-1 prekürsörünü aktive

ederler (116). İlave veriler, PC7 veya furin'in Alzheimer hastalığının patogenezinde β -sekretaz yolağını azaltarak, karşıt bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler (19)

2.6.5. Terapötik Ajanlar Olarak Proprotein Konvertazlar

Çeşitli patolojik proseslerde önemli katkıları olmasından dolayı, proprotein konvertazlar potansiyel terapötik hedefler olarak gösterilmektedir. Proprotein konvertaz fonksiyonlarının nonspesifik inhibisyonu teorik olarak homeostazi için zararlı olabilirse de, proprotein konvertaz-substrat eşleşmesinin fazlalığı, kısmen bu zararı hafifletebilir (117). Bu nedenle, proprotein konvertazların spesifik, terapötik olarak hedeflenmesi geçerli bir strateji olabilir ve bu in vitro ve sınırlı in vivo veriler ile desteklenmiştir.

In vitro çalışmalar, proprotein konvertazların malign proseslerde çeşitli rolleri olduğunu ve tedavide kullanılacak potansiyel hedefler olduklarını göstermiştir (92,106). Ciddi immün yetmezliği olan aşılınmış farelerin ve invaziv skuamoz-hücre karsinoma hatlarının, bir furin inhibitörü ile transfekte edilmesi tümör büyümesi ve yayılmasını azaltmıştır (118). Furinin kognat inhibitörü olan ve kimyasal olarak sentezlenen prodomaininin in vitro kullanımı da benzer sonuçlara sebep olmuştur (119). In vivo çalışmalar da, proprotein konvertazların kanser tedavisinde kullanılacak potansiyel hedefler olduklarını desteklemektedir.

Bir çalışmada, proto-onkogen aktivasyonu ile ilişkili furin inaktivasyonunun, farelerde tükrük bezi tümör gelişimini geciktirdiği (120) ve diğer bir çalışma da PC5'in intestinal tümör oluşumunda koruyucu bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür (121). Proprotein konvertazların hedeflenen girişimleri, tümör metastazının önlenmesinde yeni yaklaşımlar sağlayabilir.

Bu enzimlerin küçük moleküllu inhibitörlerinin, transgenik fare modellerinde deri tümörlerinin metastaz insidansını (122) ve prekürsör membran tip 1 MMP ekspresyonu yapan hücre hatlarında hücre hareketliliğini dolayısıyla metastatik potansiyeli azalttığı gösterilmiştir (123).

Scamuffa ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, kolon-karsinoma hücre hatlarında moleküler olarak hedeflenen proprotein konvertaz aktivitesinin IGF-I ve reseptörü ile adhezyon moleküllerini içeren, tümör metastazında önemli birçok substratın prosesinin azalmasına sebep olduğu ve in vivo olarak karaciğere metastazların gelişme kapasitesini azalttığı rapor edilmiştir (124).

Endojen PCSK9 inhibitörü olarak bilinen aneksin A2 (125), bu proprotein konvertazın aktivitesini engelleyen yeni bileşiklerin geliştirilmesine sebep olabilir. Son veriler, antisens oligonükleotitlerin veya RNA interferens teknolojisinin kullanılması ile, farelerde, PCSK9 ekspresyonunun azaldığını göstermektedir (17).

Yaklaşık 2 hafta için Cynomolgus maymunlarına devamlı uygulanan PCSK9 ile LDL reseptörünün etkileşimini engelleyen insana uygun monoklonal antikorun tek bir enjeksiyonu, LDL kolesterolün serum seviyesinin hızlıca alt sınırın da %80 daha altına düşmesine sebep olmuştur (126).

2.7. Pro-opiomelanokortin (POMC)

Adrenokortikotrofin (ACTH) prekürsörü olan pro-opiomelanokortin 30 yıldan fazla bir süre önce tanımlanmıştır. İlk olarak hipofiz ön ve ara lobunda tespit edilmesine rağmen deri, merkezi sinir dokusu ve plasentayı içeren bir dizi dokuda eksprese edilmektedir. POMC sentezlendikten sonra post-translasyonel işlemlere uğrayarak ACTH üretiminin yanı sıra biyolojik olarak aktif olan birçok peptidin üretilmesinde de rol oynar. Bu işlem dokuspesifiktir, neticede aynı prekürsörden dokuya bağımlı olarak farklı peptid kombinasyonları elde edilmektedir. Bu peptitlerin pigmentasyondan, adrenal fonksiyona hatta beslenmenin düzenlenmesine kadar birçok biyolojik olayda rolü vardır. POMC'nin bu kompleks düzeyi, tek bir proteinin post-translasyonel modifikasyon ile çok çeşitli roller oynamasına sebep olan prohormon prosesine tipik bir model oluşturmaktadır (127).

POMC hipofiz, beyin, deri ve diğer periferik dokularda lokalize olmuştur. Bir hücrede gösterilen bu özgün enzim profili, sentezlenen ve salgılanan hormonal ligand (melanokortin) doğasını belirlemektedir: melanotropik peptitler (α -MSH β -lipotropin, λ -MSH), kortikotropin (ACTH), çeşitli endorfinler (örn; metenkefalin) (14).

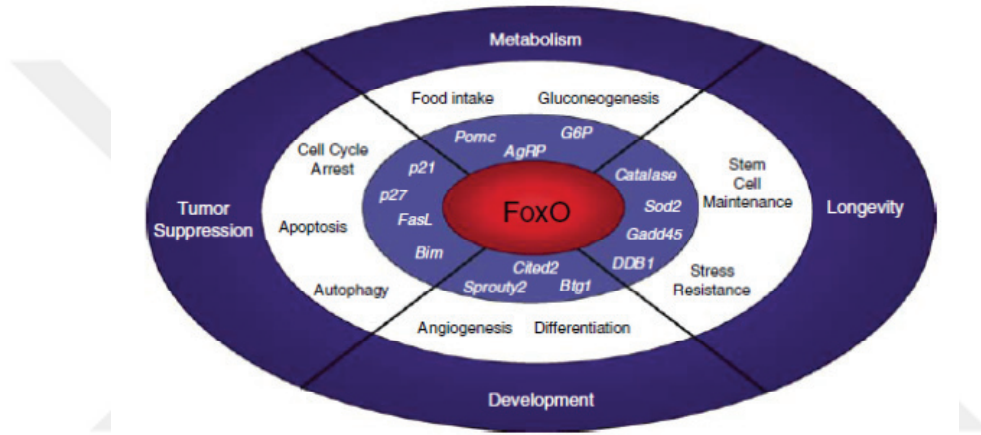
İnsan plasentasında en az birkaç opioid reseptörünün bulunduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Belisle S ve arkadaşları 1988 yılında yaptıkları çalışmada, k opioid reseptörlerinin homojen bir popülasyonunun insan plasentasındaki varlığını tespit etmişlerdir. (128). Ayrıca opioid peptitlerin insan plasental villus dokusunda sentezlendiği gösterilmiştir. Bunlar β -endorfin (129), metenkefalin (130) ve multipl dinorfinleri (131) içermektedir.

Opioid reseptörlerin ve peptitlerin plasentadaki fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Trofoblast dokusundan asetilkolin (132) ve hCG (133) sekresyonunu

düzenleyen, insan plasental laktojenin serbest bırakılmasını sağlayan (128) plasental opioid reseptörleri göstermek için farklı in vitro sistemler kullanılmıştır (61).

2.8. FOXO3A

FOXO3A (forkhead box, class O, 3a) esas olarak hematopoetik hücrelerde eksprese olan bir transkripsiyon faktörüdür (15). FOXO3A (FKHRL1); FOXO1a (FKHR), ve FOXO4a (AFX)'yı içeren ve büyüme faktör reseptör-indükleyici tarafından aktive edilen fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT (veya protein kinaz B) sinyal yolağı tarafından düzenlenen memeli forkhead transkripsiyon faktörleri ailesindedir (134).



Şekil 2.8.1: FOXO transkripsiyon faktörlerinin hücrelerde ve organizmadaki rollerinin şematik gösterimi (16).

Forkhead transkripsiyon faktörlerinin FoxO ailesi; stres direnci, metabolizma, hücre-siklus arresti ve apoptozisi içeren hedef genlerin up-regülasyonu ile tümör süpresyonu ve uzun yaşam için önemli rol oynar. FoxO transkripsiyon faktörleri spesifik-gen ekspresyon programları içinde insülin, büyüme faktörleri, besinler ve oksidatif stresi içeren çeşitli çevresel uyarıları etkilerler. Bu çevresel uyarılar ilk olarak FoxO'nun sub-sellüler lokalizasyonunu düzenleyerek transkripsiyonel aktivitesini ve DNA-bağlanma özelliklerini kontrol ederler. FoxO aktivitesinin kontrolü yaşlanmanın önlenmesi ve kanser, nörodejeneratif hastalıklar ile diyabeti içeren yaşa bağlı hastalıkların oluşmasını önlemede kritik role sahiptir (15,16).

FoxO proteinleri ayrıca kan, kas ve adipoz dokuda hücre farklılaşmasında, gelişmelerinde rol oynayabilecek şekilde düzenlemeler yapar (135) ve bu transkripsiyon faktörleri insülin,

IGF-I, diğ er büyüme faktörleri, nörotrofinler, besinler, sitokinler ve oksidatif stres uyaranları gibi çok çeşitli eksternal uyaranlar tarafından düzenlenirler (16).

Forkhead ailesinin transkripsiyon faktörlerinin post-translasyonel düzenlenmesi asetilasyon/deasetilasyon mekanizması ile yapılır (136). Ayrıca FOXO3A transkripsiyonel aktivitesi ubikuitinasyon ve fosforilasyonu içeren birçok mekanizma tarafından düzenlenir (15). AKT aktivasyonu, forkhead transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna sebep olur. FOXO3A fosforilasyonu kendisinin nukleustan sitozole yeniden dağılmasına olanak verir, böylece DNA'ya bağlanması ve transkripsiyonel aktivitesi azalır. Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalar; fosforilasyonunun azaltılması ve nukleer içeriğinin artırılması sonucu FOXO3A'nın aktifleştirilmesinin, farklı hücre tiplerinde apoptotik proteinlerin ekspresyonunu veya hücre siklus arrestini uyardığını göstermektedir (134).

FOXO3A eksikliği olan farelerde ve insan lenfositlerinin kullanıldığı in vitro ölçümlerde; FOXO3A fosforilasyonunu indükleyen AKT, ERK ve IKK kinaz aktivitelerinin artmasına bağlı olarak CD34+ kök hücreleri, T hücre progenitörleri ve matür merkezi hafıza CD4+ T hücrelerinin korunduğ u gösterilmiştir. FOXO3A transkripsiyon aktivitesinin fosforilasyon ile kontrolü, ayrıca, BTG-1 ekspresyonu aracılı gerçekleşen eritroid seri farklılaşması ve Bcl-6 ile Bim aracılı B-hücre progenitörlerinin farklılaşması için gereklidir (15).

STAT3; lenfosit sessizliğinde ve T-hücre aktivasyonunun baskılanmasında rol oynayan FoxO1 ve FOXO3A'nın sub-sellular lokasyonunun kontrol mekanizmalarına katkıda bulunur (15,16).

İlginç olan bir diğ er fonksiyonu ise, FOXO3A yolağının, IL-6 ve TNF- α gibi anahtar pro-inflamatuvar moleküllerin üretimini artırarak dendritik hücrelerin fonksiyonlarını düzenlemesi ve IL-5 stimülasyonu ile natural killer hücrelerin hayatta kalmalarını sağlamasıdır. Tüm bu gözlemler FOXO3A sinyal yolağının, hematopoezisin tüm basamaklarında rol oynadığını göstermektedir (15).

FOXO3A, pro-apoptotik genlerin (Bim, Noxa, Puma, FasL ve TRAIL gibi), anti-proliferatif genlerin (p21, p27, p130, siklin G2 ve GADD45'i içeren), serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda rol oynayan genlerin (superoksit dismutaz ve katalaz), glukoz metabolizmasını düzenleyen genlerin (glukoz-6-fosfataz gibi), ve diferansiyasyon işleminde görev alan genlerin (Bcl-6 ve BTG-1'i içeren) transkripsiyonunu indükler (15). FOXO3A, nöronlarda NGF iptalinden sorumlu BIM (BCL2 interacting mediator of cell

death) ekspresyonunun düzenlenmesinde önemlidir ve AKT-FOXO3A aksisindeki değişikliklerin, hipoksi-iskemi'den veya ER stresinden sorumlu nöronlardaki BIM ekspresyonunu etkilediği rapor edilmiştir (134). Ayrıca FOXO3A, sitokinlerin geri çekilmesinden ve diğer sitotoksik uyarılardan sorumlu olan PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. ER stres durumunda FOXO3A defosforilasyona ve nükleer translokasyona yönelir, bu modifikasyon ile transkripsiyonel olarak aktive olur (15,134).

PTEN, insan tümörlerinde yaygın olarak mutasyona uğrayan genlerden biridir ve FOXO proteinlerinin PTEN tümör supresif aktivitesinin, her ne kadar hedef molekülleri ve mekanizmaları tam olarak anlayamamış olsa da, önemli “downstream efektörleri” olduğu rapor edilmiştir (137).

FOXO3A DNA hasarını düzenler ve DNA onarım mekanizmalarını stimüle eder. Aynı zamanda FOXO transkripsiyon faktörleri tümör nekrozis faktör reseptör ligand ve Fas ligandın düzenlenmesinde rol oynar (138).

Fareler ve insanlardaki FOXO3A transkripsiyonel aktivitesinin down-regülasyonu, ayrıca aterosklerotik plak oluşumu ve artrit gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkilidir. Diğer taraftan Foxo3 aktivitesini arttıran koşullar Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara, hipoksi/iskemi veya felçten sonra beyin hasarına ve kardiyomiyosit disfonksiyonlarına sebep olur (15).

Ayrıca FOXO3A'nın yüksek oranda fosforile olmuş ve sitoplazmik olarak ayrılmış formunun akut miyelojen lösemi (AML)'de prognostik değerinin olduğu bildirilmiştir. İnsan tümörlerinde, p53'ün aksine FOXO3A mutasyonları henüz tam olarak bulunamamıştır (139).

FOXO3A yolağının düzenlenmesindeki bozukluk, meme, kolorektal, gastrik ve lösemi, lenfoma, myeloma gibi pankreatik birçok hastalıkla ilişkilidir. Birçok tümörün microRNA-155, imatinib, tamoksifen, ve tüm trans retinoik asitler gibi kimyasal ilaçlarla tedavisinin, Bim, Puma ve TRAIL ekspresyonunun artmasına bağlı olarak FOXO3A'nın pro-apoptotik aktivitesinin indüklenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Essafi ve arkadaşları yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada kanser hücrelerindeki ekzojen FOXO3A proteinlerinin dağılımının çeşitli kanserlerin tedavisinde yeni bir potansiyel terapötik strateji olabileceğini göstermişlerdir (15).

2.9. ABORTUSLAR

Gebeliğin, fetusun hayatta kalmaya yetecek kadar gelişmesinden önce herhangi bir yolla sonlanmasına veya ağırlığı 500 gr'dan az olan fetusun doğurtulmasına abortus (düşük) denir. 1977'de Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (World Health Organization) (WHO) gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini kriter alarak getirdiği tanıma göre ise; 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir (1). Spontan abortusların çoğu embriyonun ölümünden sonraki bir-üç hafta arasında gerçekleşir. Başlangıçta desidua bazaliste kanama meydana gelir ve implantasyon yerinde inflamasyon ve nekroz oluşur. Abortus nedeniyle olan vajinal kanamalar birinci ve ikinci trimesterde olan kanamalar arasında ilk sırada yer almaktadır. Abortuslar kanama yapması dışında neden olduğu obstetrik komplikasyonlar sebebiyle de önemli bir patolojidir.

Abortusların sınıflandırılması;

A) Oluş zamanlarına göre:

1) Subklinik abortus (Belirlenemeyen abortus): Bu tip abortus fekdasyondan hemen sonraki günlerde gerçekleşir ve kadın gebe kaldığını fark etmeden ya zamanında bir menstrüel kanama ya da birkaç gün geciken bir menstrüel kanama ile gebelik sonlanır.

2) Erken abortus: Onikinci gebelik haftasının sonuna kadar oluşan, çoğunlukla kromozomal anomalilerin yol açtığı abortus tipidir. Abortusların %80 den fazlası ilk 12 haftada olmaktadır. Sonraki dönemde düşük oranlarında hızlı bir düşüş olur (140).

3) Geç abortus: Gebeliğin 13-20 haftaları arasında oluşan abortuslardır.

B) Tamamlanma şekline göre:

1) Komplet abortuslar: Embriyo veya fetus ve eklerinin tamamen uterus kavitesi dışına atılmasıdır.

2) İnkompaket abortuslar: Embriyo veya fetus ve eklerinin bir kısmının uterus kavitesi dışına atılıp, bir kısmının ise kavitede kaldığı durumdur (141).

C) Oluş şekillerine göre:

1) Spontan abortuslar: Gebeliğin 20. gestasyonel haftadan önce herhangi bir mekanik ya da farmakolojik müdahale ve zorlama olmadan sonlanmasıdır. Kadın yaşı arttıkça spontan abortus riski artar (142).

2) Zorlanmış (provake) abortuslar: İki grupta incelenir;

a) Medikal abortus (Terapötik abortus): Maternal ağır sistemik hastalıklar, böbrek hastalıkları, kalp hastalıkları, gebelik psikozu, sarılık, kanser veya fetusda anomali tespiti, gebelikte teratojenik ilaç kullanılması, genetik hastalık saptanması, pelvise aşırı radyasyon uygulanması, fenilketonuri-galaktozemi gibi doğuştan metabolik hastalıkların varlığı gibi tıbbi endikasyonlar nedeniyle gebeliğin sonlandırılmasıdır.

b) İstemli (Kriminal, Elektif) Abortuslar: Ortada anne ve fetus açısından hiçbir tıbbi sorun yokken, istenmeyen bir gebelik olgusunun 20. gebelik haftasından önce sonlandırılmasıdır.

D) Klinik seyrine göre abortuslar beş grupta incelenir;

1) Abortus imminens (Düşük tehdidi)

2) Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük)

3) Missed abortuslar

4) Habituel abortuslar

5) Septik abortuslar

1) Abortus imminens (Düşük tehdidi): Yirminci gebelik haftasından önce vajinal kanama olması şeklinde tanımlanır. Erken gebelikte kanaması olan kadınların yaklaşık yarısında abortus olur (143).

2) Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük): Kaçınılmaz veya tam olmayan düşüklerde, fetal yaşam devam edemez ve bu nedenle gebeliği korumaya yönelik eylemler endike değildir. Daha fazla maternal kanama veya enfeksiyon komplikasyonlarını önlemek için uterus boşaltılarak gebelik sonlandırılır.

3) Missed abortus: Fetusun uzun süredir ölmüş olduğu halde uterus kavitesi dışına atılmaması, inutero olarak kalması olarak tanımlanır. İntrauterin fetal viabilite kaybının

olduğu ancak diğer abortus tiplerinde görülen kanama, servikal dilatasyon gibi bulguların olmadığı durumdur. Ölü fetusun atılmama nedeni kesin bilinmemektedir. Günümüzde ultrasonografinin yaygın kullanımıyla ve β -hCG'nin yükselmediğinin saptanmasıyla hastalara missed abortus tanısı kolayca konulabilmektedir.

Missed abortusun en önemli komplikasyonu dissemine intravasküler koagülasyondur (DIC). Plasentadaki yüksek miktardaki tromboplastin aktivatörü, DIC'i tetikleyen en önemli faktördür. DIC riski gestasyonel yaş ve fetal ölümün üzerinden geçen süre ile direkt ilişkilidir. Dört haftadan önce risk çok düşüktür. Missed abortus tedavisi cerrahi ya da medikal olarak uterusun boşaltılmasıdır.

4) Habitüel abortuslar (Rekürren abortus): Son menstrüasyon tarihinden itibaren 20. gebelik haftasından önce klinik olarak fark edilmiş, üç veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanır. Etyolojide anatomik anomaliler %12–16, endokrinolojik sorunlar %17–20, enfeksiyonlar %0.5–5, antifosfolipid antikör sendromu dahil immunolojik faktörler %20–50 oranında tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili bulunmuştur.

5) Septik abortuslar: Şahsın kendisi veya başkaları tarafından paramedikal aletler kullanılarak düşük yaptırılarak (kriminal abortus), genital organlarda enfeksiyon meydana gelmesi ile sonuçlanan düşük şekline septik abortus denir (144).

İNSİDANS:

Klinik olarak fark edilmiş gebeliklerin yaklaşık olarak %12-15'i, 4. ile 20. gebelik haftaları arasında abortus ile sonlanır. Hassas insan koryonik gonadotropin (hCG) kitlerinin kullanıldığı çalışmalarda implantasyondan sonraki gebelik kayıplarının gerçek oranı % 31 olarak bulunmuştur (141). Geçmişteki obstetrik öyküsünden bağımsız olarak, klinik olarak tanınmış spontan gebelik kaybı riski yaşla birlikte artmaktadır. 30 yaşın altındaki kadınlarda risk %7-15 iken, 35-40 yaş arası risk %17-28 dir. 40 yaş sonrası kadınlarda risk %34-52'dir (145,146). Eğer tanımlanmış ve fark edilmeyen gebelik kayıpları göz önüne alınırsa, 40 yaş üstü kadınlardaki gebelik kaybı %75 veya daha fazla olabilir.

PATOLOJİ:

Desidua bazalis içine kanama ve kanamaya bitişik dokularda nekrotik değişiklikler genellikle abortusa eşlik eden durumlardır. Gebelik ürünü kısmen veya tamamen desidua bazalisten ayrılır ve böylece uterus yabancı cisimi atmak için kontraksiyonlara başlar (147).

Tüm abortus materyallerinin histolojik incelemesinde plasental villuslarda dejenerasyon görülmüştür (148). Kapsül değişken kalınlıktadır ve dejenere koryonik villus her yanına dağılmıştır.

TEŞHİS:

Tanıda öncelikle yapılması gereken dikkatli bir öykü almaktır. Son adet tarihi özellikle sorgulanmalı ve adet düzeni mutlak sorulmalıdır. Bu hastaların ayırıcı tanısında olası servikal polipler, vajinit, servikal karsinom, gestasyonel trofoblastik hastalık, ektopik gebelik, alt genital traktüs travmaları ve yabancı cisim düşünülmelidir. Eğer gebelik önceden biliniyorsa gebelikte yapılan muayene ve laboratuvar bulguları sorgulanmalıdır.

Ultrasonografi, erken gebelik kayıplarının tanısında en çok bilgi veren ve ayırıcı tanı yapmayı sağlayan basit ve ucuz bir tanı aracıdır. İlk trimester kanamalarının değerlendirilmesinde temel bir role sahiptir. Çünkü gebeliğin intrauterin olup olmadığı; intrauterin ise, embriyonun canlı olup olmadığını en kısa yoldan gösteren yöntemdir.

hCG sinsityotrofoblastlarda üretilen bir glikoproteindir. hCG'nin ikiye katlanma zamanı gestasyonel yaşla korelasyon gösterir (149). Serum progesteronu; hCG seviyelerine bakılma ve ultrasonografi yapma imkanı olmayan yerlerde, normal ve anormal gebeliklerin öngörülmesinde kullanılabilir (150).

ETYOLOJİ:

Abortusların %80'den fazlası ilk 12 hafta içinde olur ve bu oran bundan sonra hızla düşer (142). Etiyolojiyi fetal, maternal, paternal nedenler olarak üçe ayırabiliriz. Fetusa ait sebepler malformasyonlar ve kromozom anomalileridir. Maternal faktörler arasında enfeksiyonlar, immunolojik faktörler, endokrin bozukluklar, uterus anomalileri, kronik debilizan hastalıklar, ilaç kullanımı, çevresel faktörler, travma ve laparotomi sayılabilir.

1) Fetusa ait faktörler: Erken abortusların neredeyse yarısına kromozomal anomaliler neden olur. Kromozomal anomalilerin yaklaşık dörtte birinin annedeki, %5'inin de babadaki gametogenez hatalarına bağlı olduğu söylenmiştir (151). Otozomal trizomi, ilk trimester abortuslarıyla ilgili en sık rastlanan kromozomal anomalidir.

2) Maternal faktörler: Anneye ait faktörler daha ziyade birinci trimester sonu ile ikinci trimester abortuslarına sebep olur.

a) Enfeksiyonlar: Enfeksiyonlar gebelik kayıplarının potansiyel sebepleri arasında yer almakla beraber çok tartışmalı bir konudur. Düşüklerde spesifik enfeksiyöz ajanların risk faktörü olarak ileri sürüldüğü periyodik raporlara rağmen bakteriyel veya viral enfeksiyonların tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olduğu konusunda kesin kanıtlar yoktur. Enfeksiyöz organizmaların gebelik kaybına yol açmasında mekanizmalar halen belirsizdir.

Bazı virüslerin doğrudan fetusu ve plasentayı infekte ederek, villus enfeksiyonu ve doku hasarı ile gebelik kaybına yol açtığı düşünülmektedir. Patolojik organizmalara karşı oluşan immun yanıt gebelik kaybı ile ilişkili olabilir. Başka bir teori ise fetusun otoimmün olarak reddini önleyen mekanizma enfekte olmuş plasentanın tanınmasını ve enfeksiyondan temizlenmesini önleyerek patojen mikro organizmanın engellenmeden çoğalmasını sağlayabilir (152,153).

b) Endokrin bozukluklar: Tiroid hastalığı, diabetes mellitus, polikistik over sendromu ve luteal faz defektleri artmış gebelik kaybı riskini etkileyen faktörler arasındadır. Tiroid hastalığı olan kadınlarda sıklıkla ovulatuvar disfonksiyon ve luteal faz defekti gibi üreme anormallikleri bulunur (154). Metabolik regülasyonu iyi olan diyabetik kadınların gebelik kaybı yaşama ihtimali nondiyabetik kadınlardan fazla değildir. Fakat ilk trimesterde artmış kan glukoz ve glikolize hemoglobin seviyeleri olan diyabetik kadınlar, spontan düşükler için önemli ölçüde artmış risk altındadır. Hem spontan abortus hem de major konjenital malformasyonlar insüline bağımlı diyabeti olan kadınlarda artmıştır (155).

Ovulasyondan gebeliğin 7-9. haftalarına kadar geçen süredeki erken gebeliğin devamı korpus luteumdan progesteron üretimine bağlıdır. Gebeliğin onuncu haftasından önce oluşan gebelik kayıpları progesteronun normal düzeyde üretimi veya kullanımı ile ilişkili bir dizi değişiklikten kaynaklanabilir. Luteal faz yetmezliği ve luteal faz defektleri belli başlı luteal fonksiyonların uygunsuzluğu ile özellikle potansiyel implantasyon bölgelerindeki endometriyum gelişiminin yetersiz veya uygunsuz olması sonucunda kötü obstetrik sonuçlara yol açar. Luteal faz defektlerinin bazılarında luteinizan hormonunun fazla salgılanmasını da içeren çeşitli sebepler vardır. Birçok çalışma artmış LH seviyeleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında ilişki saptamıştır. Geçmişte bu ilişki, LH'nin kendisinin yan etkilerine ya da polikistik over sendromlu kadınlarda LH'nin indüklediği hiperandrojenizme dayandırılmıştır (156).

c) Beslenme bozuklukları: Çok ileri derecedeki beslenme bozukluklarının abortusa yol açabileceği vurgulanmaktadır. Diyetle herhangi bir besin eksikliğinin ya da tüm besinlerin orta derecedeki eksikliğinin abortusta rolü olduğuna dair kesin bir veri yoktur.

d) Toksik etkenler: Birçok çalışma sigara içimi ve düşük riski arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Bu çalışmalar genel olarak sigara içmenin doza bağımlı bir şekilde spontan abortus riskini attırdığı sonucunu desteklemektedir. Sorumlu mekanizmalar belli değildir fakat sigara dumanındaki nikotin, karbondioksit, siyanür dahil bazı maddelerin vazokonstriktif ve antimetabolik etkileri plasental yetmezliğe yol açabilir (157). Gebeliğin ilk sekiz haftasında, sık alkol kullanımı hem spontan abortus hem de fetal anomalilere neden olabilir (158). Maternal kafein tüketimi ile düşük riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çoğu çalışma ağır kafein tüketiminin (günde 300mg'dan fazla- üç fincan kahveye eş değer), spontan abortus riskinde hafif (iki kattan az) bir artış ile ilişkili olduğunu bulmuştur (159).

e) Genital organ anomalileri, pozisyon bozuklukları ve tümörleri: Uterin anomaliler uzun zamandır gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlar ile ilişkilendirilmektedir. Konjenital uterin malformasyonlu kadınlardaki gebelik kayıplarının patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Fakat genel olarak azalmış intrauterin hacimle veya vasküler desteğin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (160). Uterus kavitesini çok küçülten konjenital anomaliler (füzyon bozuklukları, bikornuat uterus, uterin septum v.s) myom, fibromyomlar (özellikle submuköz ve intramural olanlar) genelde geç abortus insidansında artışa neden olurlar. Bikornuat uteruslu kadınlarda yapılan çalışmalarda düşük oranı yaklaşık %30 olarak bulunmuştur. Konjenital uterin anomalilerle ilişkili olarak oluşan servikal yetmezlik insidansı bikornuat uterusu olanlarda en yüksektir (161).

f) Travmalar: Gebeliğin 14. haftasından önceki dönemlerdeki elektrik çarpmaları, amniyosentez girişimleri, ateşli ve delici silah yaralanmaları, trafik kazaları ve ekstra genital orjinli peritonitis tabloları sayılabilir (144).

g) İmmünolojik hastalıklar: İmmun tolerans sistemi yetersiz olan olgularda fetus immunolojik olarak reddedilir. Sorumlu immunolojik mekanizma gebeliğin sonlandığı devreye bağlı olarak değişir. Preimplantasyon döneminde ve implantasyonun sonuna kadar (13. gün) hücrel immun mekanizma erken abortuslardan sorumludur. Kan grubu uyumsuzluklarında özellikle ABO, Rh, Kelly ve subgrup uyumsuzlukları abortusa neden olur. Paternal ve maternal orjinli antijenlerin bazen benzerlikleri, bazen de farklılıkları abortusa

neden olabilir (162). İmplant olan fetusun annenin bağışıklık sistemi tarafından fark edilmesini önlemeye yönelik birçok mekanizma var ise de hem insan hem de hayvan çalışmaları fetal antijenlere karşı oluşmuş bağışıklık cevaplarının varlığını göstermiştir. Bu cevabın maternal fetal yüzeyde kontrolü kritik öneme sahiptir.

Progesteronun üreme sistemindeki bağışıklığı baskılayıcı etkisini, implante olan semiallojenik fetusun devamlılığının sağlanmasında kısmen sorumlu olduğu öne sürülmektedir (163). Gebeliğe özgü antijenlere karşı humoral cevap oluşur ve tekrarlayan gebelik kayıpları olan hastalarda endometriyum antijenlerine karşı gelişmiş bir humoral cevap oluşabilir (164).

3) Paternal faktörler: Bu konuda çok az şey bilinmektedir. Spermdeki transloke kromozomlar abortusa yol açabilmektedir. Steril erkeklerden elde edilen sperm örneklerinin %40'ında adenovirus ya da herpes simplex virüsü bulunmuştur. Gametlerin fertilizasyon öncesi kadın genital sisteminde yaşlanması abortus ihtimalini arttırmaktadır. Oligospermi veya hiperspermi, sperm DNA içeriğinin anormal miktarda azalmasına yol açarak abortusa neden olabilir (144).

TEDAVİ:

Spontan abortus tanısı kesin olarak konduktan sonra üç yaklaşım uygulanabilir:

- Cerrahi tedavi
- Medikal tedavi
- İzleyici yaklaşım

Cerrahi teknikler:

1) Dilatasyon ve Küretaj: Ülkemizde ve dünyada en sık uygulanan, çok etkili ve güvenli bir tedavi şeklidir. Gebelik canlı değilse, hastanın ateşi, enfeksiyon bulguları, inatçı ve fazla miktarda kanaması varsa veya takip olanakları kısıtlıysa gereklidir. Küretaj materyali patolojik değerlendirmeden geçirilmeli, gerekli durumlarda genetik değerlendirme yapılmalıdır.

2) Histeretomi, histerektomi: Günümüzde bir abortus yöntemi olarak kullanılmaz. Histeretomi prensip olarak küçük bir sezaryen ameliyatı, histerektomi ise tıbbi endikasyon varsa uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemler postoperatif morbidite yüksekliği nedeniyle fazla kullanılmaz.

Medikal tedavi: Cerrahi tedaviden kaçınan, spontan rezolusyon için beklemeyen olgular için bir seçimdir. Abortus indüksiyonu sırasında dilatasyon nedeniyle meydana gelebilecek servikal travmaların önüne geçebilmek için serviksin önceden hazırlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla PGE1 (mizoprostol) kullanılması önerilmektedir.

Oksitosin perfüzyonu, intraamniotik hipertonic maddeler (hipertonik tuz solüsyonu ve hipertonic üre), rivanol, RU-486(mifepriston) ve prostaglandinler medikal abortus yaptırmak için kullanılan yöntemlerdir

İzleyici yaklaşım: Hastada cerrahi girişimi zorunlu kılan komplikasyonların hiçbiri yoksa konservatif kalınabilir. Olguların çoğunda 72 saat içinde olay sonuçlanır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan insan doku örnekleri, histokimyasal, immunohistokimyasal boyama için gerekli sarf ve kimyasal malzemeler ile hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen RT-PCR çalışması, Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2012/010 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başvuran, gebeliğin sonlandırılması kararı verilmiş missed abortus tanılı ve 10 hafta altı gebelik evokasyonu istemi ile başvuran 10'ar hasta alındı. Her iki hasta grubundan endometriyal ve plasental doku örnekleri klasik doku takibi yöntemi ile bloklandı ve seri kesitleri alındı. Materyaller iki gruba ayrılarak incelendi. Seri kesitlerin birinci grubuna IHC uygulandı ve TNF- α , TGF- β 2, IGF-I, POMC, FOXO3A, PC4, PC6, PC7 ve FURİN primer antikoları ile immünohistokimyasal boyamalar uygulandı. Boyanan hücre sayısı H-Skor [$\sum \pi (i + 1)$] tekniği ile hesaplandı. Seri kesitlerin ikinci grubundan mRNA elde edildi ve PCSK4, PCSK5, PCSK7, FURİN ve ACTB (AB applied biosystems Taqman Gene Expression Assays) primerleri kullanılarak RT-PCR ile gen ekspresyon düzeylerine bakıldı.

3.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ

Kullanılan Malzemeler:

- Ksilen (Sigma-Aldrich, St. Louis USA.)
- Alkol (Sigma-Aldrich, St. Louis USA.)
- Hematoksilen (Invitrogen, Paisley, UK.)
- Asit alkol
- Eozin (Surgipath, Cambridgeshire, UK.)
- Entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany)

Boyama Yöntemi

Boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

1. Ksilen I (30 dak.)
2. Ksilen II (30 dak.)
3. % 95 alkol (2 dak.)
4. % 80 alkol (2 dak.)
5. % 70 alkol (2 dak.)
6. % 60 alkol (2 dak.)
7. Akar su (5 dak.)
8. Hematoksilen (5 dak.)
9. Akar su (5 dak.)
10. Asit alkol (1-2 saniye)
11. Akar su (5 dak.)
12. Eozin (3 dak.)
13. Akar su (5 dak.)
14. % 80 alkol (1 dak.)
15. % 95 alkol (2 dak.)
16. Havada kurutma (1-2 dak.)
17. Ksilen (1 saat)
18. Entellan ile kapama

3.2. İNDİREKT İMMUNOHİSTOKİMYA PROTOKOLÜ

Kullanılan Malzemeler:

- Ksilen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.)
- Alkol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.)
- PBS (Fosfat Buffer Solüsyonu) (Kat. No: 041M8227, Sigma-Aldrich, St. Louis,USA.)

- Tripsin (Kat. No: 00-3008; Invitrogen, Paisley, UK.)
- İmmunohistokimya kalemi (Kat. No: 00-8877; Invitrogen, Paisley, UK.)
- % 3'lük Hidrojen Peroksidaz (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sekonder Antikor (Histostain Plus Bulk Kit; Invitrogen, Paisley, UK.)
- DAB Kit (DAB-Plus Substrate Kit; Invitrogen, Paisley, UK.)
- Mayer's Hematoksilen Solüsyonu (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA.)
- Entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany)

Primer Antikorlar

- Anti-Furin antikor (Katalog No; NB100-1903, Novus Biologicals)
- Anti-PC4 antikor (Katalog No; ab23594, abcam)
- Anti-PC6 antikor (Katalog No; ab39873, abcam)
- Anti-PCSK7 antikor (Katalog No; HPA043181, SIGMA)
- Anti-TNF- α antikor (Katalog No; NBP1-47581, Novus Biologicals)
- Anti-TGF- β 2 (Katalog No; NBP1-74549, Novus Biologicals)
- Anti-IGF-I antikor (Katalog No; NB100-92556, Novus Biologicals)
- Anti-POMC antikor (Katalog No; PAB17131, Novus Biologicals)
- Anti-FOXO3A antikor (Katalog No; NBP1-19826, Novus Biologicals)

Boyama Yöntemi

İmmunohistokimyasal yöntemle boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

19. Ksilen (30 dak)
20. Ksilen (30 dak)
21. % 95 alkol (2 dak)
22. % 80 alkol (2 dak)
23. % 70 alkol (2 dak)
24. % 60 alkol (2 dak)
25. Distile su (15 dak)

26. Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip dokuların kurummasını ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla, immunohistokimya kalemi ile çevresine daire çizildi. Üzerine PBS damlatıldı.
27. Tripsin (10 dk 37°C Etüv'de)
28. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3X5 dk)
29. %3'lük Hidrojen Peroksidad (5 dak)
30. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3X5 dk)
31. Bloking solüsyonu damlatıldı (1 saat)
32. Primer Antikor damlatıldı, bir gece +4 °C'de bekletildi
33. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3X5 dk)
34. Biyotinlenmiş sekonder antikor uygulandı (30 dk)
35. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3X5 dk)
36. Enzimle işaretli (peroksidad) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) uygulandı (30 dk)
37. PBS'le yıkama gerçekleştirildi (3X5 dk)
38. DAB boyaması yapıldı (4 dk)
39. Distile su ile yıkandı
40. Mayers hematoksilen (3 dk)
41. Distile su ile yıkandı
42. %80 etil alkol (1 dk)
43. %90 etil alkol (1 dk)
44. Ksilen (30 dk)
45. Entellan ile kapatıldı

İmmunohistokimyasal yöntemle boyanan preparatlar, boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++), orta (++), ve zayıf (+) olarak tanımlandı. Gruplara ait desidua ve plasenta örneklerinin, primer antikorlarla boyanması sonucu elde edilen immunoreaktivite sonuçları H skor değerleri hesaplanarak Mann Whitney istatistik test yöntemi ile karşılaştırıldı. $p < 0,05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.3. RT-PCR (real-time polimerase chain reaction) PROTOKOLÜ

1. RNA Purifikasyon Kit (Norgen Biotek Corporation; Kod:25300)

- Digestion Buffer (20 ml)
- Binding Solution (20 ml)
- Enzyme Incubation Buffer (6 ml)
- Wash Solution (22 ml)
- Elution Solution (6 ml)
- Proteinase K (12 mg)
- Dnase I (200 µl)
- Mini Spin Columns (50)
- Collection Tubes (50)
- Elution Tubes (1,7 ml) (50)
- Product Insert (1)
- 95-100 % Etanol
- Ksilen (histolojik derecede)
- B-mercaptoethanol (opsiyonal)

A. Purifikasyon Yöntemi

1. Deparafinizasyon

- a. Parafin bloklardan 20 µm kalınlığında 10-20 kesit alındı
- b. RNase-free mikrosantrifuj tüplerine transfer edildi
- c. Örneklerin üstüne 1 ml ksilen eklenerek vortekslendi
- d. 50 °C'de, 5 dakika inkübe edildi
- e. Örnekler 14,000 x g (~14,000 RPM)' de, 2 dakika boyunca santrifüj edildi
- f. Pelletler yerinden oynatılmayacak şekilde ksilen uzaklaştırıldı
- g. 1 ml %95-100 etanol eklenerek, vorteks yapıldı
- h. Örnekler 14,000 x g (~14,000 RPM)'de, 2 dakika boyunca santrifüj edildi
- i. Pelletler yerinden oynatılmayacak şekilde etanol uzaklaştırıldı
- j. 1g ve 1i arasındaki basamaklar ikinci kez tekrarlandı
- k. Pelletler yaklaşık 10 dakika, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı (etanolün tamamen uzaklaşması beklendi)

2. Lizat Hazırlanması

- a. Örnekler; 300 µl Digestion Buffer ve 10 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi
- b. 55 °C'de 15 dakika, sonrasında 80°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra birkaç defa vortekslendi
- c. 300 µl Binding solution eklendi ve vortekslendi
- d. 600 µl % 95-100 etanol eklendi ve vortekslendi

3. RNA'nın Kolona Bağlanması

- a. Toplama tüplerine, kolonlar yerleştirildi

- b. 600 µl etanol eklenmiş lizatlar kolonlara alındı ve 14,000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi
- c. Toplama tüplerine geçen sıvı döküldü ve kolonlar yeniden tüplere yerleştirildi
- d. Lizatlar kolonlara tümüyle tutunana dek 3b ve 3c basamakları tekrar edildi

Opsiyonel basamak (Rezidüel DNA'nın uzaklaştırılması) :

96 µl'lik Enzyme Incubation Buffer içerisine 4 µl RNase-free DNase I eklenerek DNase I mixture hazırlandı

- a. Kolonlara 400 µl Wash solution eklenerek 2 dakika santrifüj edildi ve dipte kalan sıvı uzaklaştırıldı
- b. Kolonlara, hazırlanan DNase I mixture'dan 100 µl eklendi ve 14,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi
- c. Santrifüj işleminden sonra, toplama tüpünde toplanan sıvı, pipetle geri kolonun üstüne ilave edildi
- d. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı
- e. Santrifüj edilmeden 4. basamağa geçildi

4. Kolonların Yıkınması

- a. Kolonların üstüne 400 µl Wash Solution eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi
- b. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı ve spin kolonlar, toplama tüplerine yerleştirildi
- c. Kolonlar, 400 µl Wash solution eklenip 1 dakika santrifüj edilerek 3. kez yıkandı
- d. Aşağıda toplanan sıvı uzaklaştırıldı ve spin kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi
- e. Resin kuruyuncaya dek, kolonlar 2 dakika döndürüldü ve toplama tüpleri uzaklaştırıldı

5. RNA Elution (ayrıştırılması)

- a. Kolonlar 1,7 mL'lik ayrıştırma tüplerine yerleştirildi
- b. Üstlerine 50 µl Elution solution eklendi
- c. Önce 200 x g (~2,000 RPM)'de 2 dakika, takiben 14,000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan ayrıştırılan kısmın hacmi not edilerek tüm hacmin elde edilip edilemediği kontrol edildi.

6. RNA'nın saklanması

Saflaştırılan RNA -20 °C'de muhafaza edildi.

B. cDNA Sentezi

Kullanılan Malzemeler:

Primer (50 µM Oligo(dT)) (AB applied biosystems Taqman Gene Expression Assays)

- PCSK5 (Assay ID: Hs00196400_m1)
- PCSK7 (Assay ID: Hs00237114_m1)
- PCSK4 (Assay ID: Hs00399493_m1)
- FURIN (Assay ID: Hs00965485_g1)
- ACTB (Assay ID: Hs01060665_g1)
- RNA
- 5 mM dNTPs mix
- RNase-free water
- 5 x cDNA Buffer
- RNase Inhibitor 20 U/ µl

- 100 mM DTT
- BM Reverse Transcriptase (RNA bağımlı DNA polimeraz)
- RNase H (2 U/ μ l)

cDNA sentez yöntemi:

1. 0,2 ml'lik tüplere, hazır primer (50 μ M Oligo(dT)), RNA, dNTPs mix ve RNase-free sudan oluşan RNA mix(35 μ l) hazırlandı
2. RNA mix önce 65 °C'de 5 dakika ısıtılıp, ardından 5 dakika buz üstünde bekletildi
3. 5 x cDNA buffer vortekslendi
4. Buz üstünde master reaction mix (35 μ l) hazırlandı ve pipetaj edildi
 - Master reaction mix içeriği; 5 x cDNA buffer, RNase inhibitör (20 U/ μ l), 100 mM DTT ve BM Reverse Transcriptase
5. Master reaction mixten 7 μ l pipet ile alınıp 13 μ l'lik RNA mix üzerine ilave edildi (buz üstünde)
6. Örnekler önceden hazırlanmış thermal cycler içine yerleştirildi ve 60 dakika 50 °C'de inkübe edildi
7. Sonrasında 85 °C'de 5 dakika inkübe edildi
8. 1 μ l RNase H eklendikten sonra 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi
9. Ve PCR için cDNA elde edildi

C. PCR Reaction Mix hazırlanışı (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG,96-well plate)

- 25 μ l hacim için;
1. 5 μ l, 5 x TaqMan polimeraz enzim kullanıldı
 2. 1,25 μ l TaqMan MGB probes, FAM dye-labeled eklendi

3. RNase-free su içinde dilüe edilmiş 3+15,75 µl cDNA ilave edildi
- Applied Biosystems, ABI 7500 Real-Time PCR cihazı kullanıldı
 - Thermal cycler koşulları; (45-47 cycle yapıldı)
 1. Başlangıç düzeni, HOLD → 13 dakika, 95 °C
 2. Denature, Anneal/Extend – CYCLE → 15 saniye, 95 °C, 1 dak, 60°C



4. BULGULAR

4.1. Histokimyasal Bulgular

Çalışmada kullanılan kontrol ve missed abortus grubuna ait preparatların ilk histokimyasal incelemeleri Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile yapıldı. Preparatlarda, endometriyum tabakasında stromal hücrelerin her iki grupta da; geniş sitoplazmalı, poligonal şekilli desidual hücrelere dönüştüğü gözlemlendi (Resim 1; A,B)

Her iki grubun plasentasının Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde ise, koryonik plaklar gözlemlendi. Koryonik plakların oluşturduğu koryonik villuslar trofoblastik hücreler tarafından çevrelenmekte idi. Koryonik epitelin dışta daha koyu boyalı sinsityotrofoblast ve içte daha açık boyalı sitotrofoblastlardan oluştuğu gözlemlendi. Koryonik villusların merkezinde mezenşimal doku yer almaktaydı. Bu bölgelerde fusiform şekilli mezenşimal hücreler bulunmaktaydı (Resim 1; C,D)

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

TNF – α

Kontrol grubuna ait desidua örneklerinin TNF- α antikor ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, desidua hücrelerinin oldukça yoğun immunoreaktivite ($216,66 \pm 11,69$) verdiği gözlemlendi. Missed-abortus grubuna ait örneklerde ise immunoreaktivitenin kontrol grubuna kıyasla daha düşük yoğunlukta ($128,33 \pm 11,69$) olduğu ve iki grup arasında anlamlı bir fark ($p < 0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.1.) (Resim 3; A,B).

Yapılan incelemelerde, kontrol grubuna ait non-desidua bölgede zayıf immunoreaktivite ($38,16 \pm 8,15$) gözlenirken, missed-abortus grubunda biraz daha yoğun bir immunoreaktivite değeri ($61,50 \pm 9,04$) saptandı ve iki grup arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) gözlemlendi (Tablo 4.2.2.) (Resim 3; A,B).

Kontrol grubuna ait koryon örneklerinin TNF – α antikor ile boyanması sonucu sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastlara kıyasla daha zayıf boyandığı gözlemlendi. Kontrol grubu sitotrofoblast immunoreaktivitesinin ($12,16 \pm 1,94$), missed-abortus grubu immunoreaktivitesine ($44,83 \pm 4,30$) göre daha zayıf olduğu ve iki grup arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2.3.) (Resim 3; C,D). Oldukça güçlü immunoreaktivite veren sinsityotrofoblastlar kıyaslandığında ise, kontrol grubu immunoreaktivitesinin

(146,33±4,22), missed-abortion grubuna göre zayıf olduğu (314,00±10,65) ve aralarında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.4.) (Resim 3; C,D).

Kontrol grubuna ait stromal hücrelerde ise zayıf immunoreaktivite (15,16±2,04) gözlenirken, missed-abortion grubuna ait örneklerde kıyasla daha yoğun bir immunoreaktivite (43,33±2,80) gözlemlendi ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edildi (Tablo 4.2.5.) (Resim 3; C,D).

TGF-β2

Desidual TGF-β2 immunoreaktivitesi incelendiğinde, desidual hücrelerin kontrol grubunda yoğun (266,00±8,60) olarak boyandığı gözlemlendi. Missed-abortion grubunda ise desidual hücrelerin TGF-β2 immunoreaktivitesinin yoğun (158,33±6,05) olduğu ancak kontrol grubuna kıyasla daha az boyandığı ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2.1.) (Resim 4; A,B).

Non-desidual hücrelerin immunoreaktivitesi incelendiğinde, hem missed-abortion grubundaki immunoreaktivitenin (37,00±8,48) hem de kontrol grubuna ait immunoreaktivitenin (38,16±8,63) zayıf olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) olmadığı tespit edildi (Tablo 4.2.2.) (Resim 4; A,B).

Kontrol grubuna ait koryon örneklerinin incelenmesinde ise, sitotrofoblastın zayıf immunoreaktivite (10,33±1,63) gösterdiği saptanırken, missed-abortion grubuna ait sitotrofoblastın, kontrol grubuna kıyasla güçlü immunoreaktivite (24,66±2,33) gösterdiği ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu saptandı (Tablo 4.2.3.) (Resim 4; C,D). Koryon villuslarını oluşturan sinsiyo trofoblastlar açısından TGF-β2 immunoreaktivitesi değerlendirildiğinde ise, kontrol grubuna ait örneklerde yoğun (51,66±3,61) boyanma olduğu ancak missed-abortion grubuna ait örneklerin oldukça güçlü immunoreaktiviteye (240,00±13,75) sahip oldukları tespit edildi. Her iki grup arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada anlamlı fark ($p<0,05$) bulundu (Tablo 4.2.4.) (Resim 4; C,D).

Kontrol grubuna ait stromal hücrelerin (15,66±1,03), missed-abortion grubuna ait hücelere (10,33±1,50) kıyasla daha güçlü immunoreaktivite gösterdikleri ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu saptandı (Tablo 4.2.5.) (Resim 4; C,D).

POMC

Desidual POMC immunoreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna ait desidual hücrelerin (211,83±15,03), missed-abortion grubuna ait desidual hücrelerden (290,83±41,03) daha zayıf boyandığı ve iki grup istatistiksel olarak kıyaslandığında aralarında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.1.) (Resim; A,B).

Örneklere ait non-desidual bölgeler incelendiğinde ise, non-desidual hücrelerin, desidual hücrelere kıyasla oldukça zayıf immunoreaktivite gösterdikleri ve kontrol grubunun (12,33±1,63), missed-abortion grubuyla (34,50±9,66) karşılaştırıldığında daha az boyandığı ve her iki grup arasında non-desidual bölgelerin boyanması açısından anlamlı bir fark ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.2.) (Resim 5; A,B).

Koryon villusları oluşturan sinsityotrofoblast ve sitotrofoblastların POMC immunoreaktivitesi incelendiğinde ise, her iki hücre grubunun da yoğun immunoreaktivite verdiği gözlemlendi. Gruplar arası fark incelendiğinde ise kontrol grubu sitotrofoblast immunoreaktivitesinin (13,33±2,16), missed-abortion grubuna ait örneklere (196,16±5,34) kıyasla oldukça zayıf olduğu ve her iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.3) (Resim 5; C,D). Kontrol grubuna ait sinsityotrofoblast örneklerinin (226,00±5,51), missed-abortion grubuna ait örneklere (322,66±7,00) kıyasla daha az yoğun boyandıkları ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu gözlemlendi (Tablo 4.2.4.) (Resim 5; C,D).

Stromal hücrelerde ise missed-abortion grubuna ait hücrelerde zayıf immunoreaktivite (26,16±1,32) gözlenirken, kontrol grubuna ait hücrelerde oldukça yoğun immunoreaktivite (214,33±6,28) gözlemlendi ve her iki grup arasında anlamlı bir fark ($p<0,05$) bulundu (Tablo 4.2.5.) (Resim 5; C,D).

IGF-I

IGF-I antikoru ile immunohistokimyasal olarak boyanan kontrol grubuna ait desidual hücreler incelendiğinde, hücrelerin zayıf immunoreaktivite (42,83±5,03) gösterdikleri saptanırken, missed-abortion grubuna ait hücrelerin, kontrol grubundan daha yoğun bir immunoreaktivite (98,33±4,08) gösterdikleri saptandı ve iki grup arasında istatistiksel olarak yapılan yorumlamada anlamlı fark ($p<0,05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.2.1.) (Resim 6; A,B).

Non-desidual bölgelerin değerlendirilmesinde ise, hem kontrol grubunda ($17,16 \pm 6,36$) hem de missed-abortion grubunda ($19,16 \pm 5,41$) oldukça zayıf immunoreaktivite gözlenirken, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.2.2.) (Resim 6; A,B).

Kontrol grubuna ait sitotrofoblast örnekleri incelendiğinde, bu hücrelerin zayıf immunoreaktivite ($12,50 \pm 1,64$) gösterdikleri, missed-abortion grubuna ait sitotrofoblastların ise kontrol grubuna kıyasla daha yoğun immunoreaktivite ($43,50 \pm 3,08$) gösterdikleri ve her iki grup arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.3.) (Resim 6; C,D). Sinsityotrofoblast örneklerinde ise, sitotrofoblasta benzer şekilde, kontrol grubu zayıf immunoreaktivite ($32,66 \pm 2,16$) gösterirken, missed-abortion grubunun daha fazla immunoreaktivite ($57,16 \pm 3,18$) gösterdiği ve iki grup arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunduğu saptandı (Tablo 4.2.4.) (Resim 6; C,D).

Stromal hücrelerin IGF-I immunoreaktiviteleri incelendiğinde, hem kontrol ($16,66 \pm 1,96$) hem de missed-abortion ($13,50 \pm 2,66$) grubuna ait örneklerde zayıf boyanma olduğu ve her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi (Tablo 4.2.5.) (Resim 6; C,D).

FOXO3A

FOXO3A antikoru ile boyanan örneklerin desiduaları incelendiğinde missed grubu desidualasının kontrol grubuna kıyasla daha yoğun immunoreaktivite gösterdiği saptandı (sırasıyla; $255,83 \pm 12,41$) ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0,05$) bulundu (Tablo 4.2.1.) (Resim 7; A,B).

Non-desidual bölgeler incelendiğinde ise her iki grup için immunoreaktivitenin desidual bölgeye kıyasla daha zayıf olduğu ve kontrol grubu ile missed grubu non-desidualı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Tablo 4.2.2.) (Resim 7; A,B)

Koryon villusları oluşturan sinsityotrofoblast ve sitotrofoblastların FOXO3A immunoreaktiviteleri incelendiğinde ise kontrol grubu sitotrofoblastı immunoreaktivitesinin ($18,83 \pm 1,47$), missed grubuna ($11,00 \pm 1,26$) kıyasla daha güçlü olduğu gözlemlendi. (Tablo 4.2.3.) (Resim 7; C,D) Sinsityotrofoblastlar incelendiğinde ise, sitotrofoblastların aksine, FOXO3A immunoreaktivitesinin oldukça güçlü olduğu ve missed grubunun kontrol grubuna kıyasla daha güçlü immunoreaktivite gösterdiği gözlemlendi (sırasıyla $322,00 \pm 6,06$;

254,00±8,17) ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.2.4.) (Resim 7; C,D)

Kontrol grubu stroması ile missed abortus grubu stroması immunoreaktivitesi kıyaslandığında ise her iki grubun da zayıf immunoreaktivite ($13,00±1,89$; $13,00±1,67$) gösterdiği ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Tablo 4.2.5.)(Resim 7; C,D)

FURİN

Kontrol grubunda FURİN antikoruna ile indirekt immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış preparatların incelenmesinde desidual hücrelerde orta derecede immunoreaktivite gözlenirken ($131,16±3,54$), missed-abortus grubunda yoğun immunoreaktivite gözlemlendi ($227,5±11,72$) ve bu iki grup arasında anlamlı fark ($p< 0,05$) tespit edildi (Tablo 4.2.1.) (Resim 8; A,B).

Preparatlarda, non-desidual bölgede yapılan incelemelerde ise hem kontrol hem de missed-abortus grubunda oldukça zayıf bir immunoreaktivite gözlemlendi (sırasıyla; $28,50±8,09$; $25,00±14,38$) ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.2.2.) (Resim 8; A,B).

Plasental bölgede yapılan immunohistokimyasal incelemede, kontrol grubunda koryonik villusların yapısını oluşturan sinsityotrofoblast ve sitotrofoblastlar değerlendirildiğinde, sinsityotrofoblastta sitotrofoblasta kıyasla daha yoğun immunoreaktivite gözlemlendi (sırasıyla; $81,5±4,08$; $13,83±1,72$) (Tablo 4.2.3.) (Resim 8; C).

Missed-abortus grubuna ait örneklerde de sinsityotrofoblastın sitotrofoblasta kıyasla oldukça yoğun immunoreaktiviteye sahip olduğu gözlemlendi (sırasıyla; $322,67±3,26$; $12,00±189$) (Resim 8; D).

Kontrol grubu ve missed-abortus grubuna ait plasental bölgelerin immunohistokimyasal değerlendirmelerinde ise, missed-abortus grubuna ait sinsityotrofoblast immunoreaktivitesinin ($322,67±3,26$), kontrol grubuna ($81,50±4,08$) kıyasla oldukça güçlü olduğu ve aralarında anlamlı bir fark ($p<0,05$) bulunduğu tespit edilirken, sitotrofoblast immunoreaktivitesinin her iki grupta da benzer olduğu gözlemlendi (Tablo 4.2.4.) (Resim 8; C,D).

Ayrıca plasental villusların stroması değerlendirildiğinde, her iki grup arasında bir fark bulunmadığı ve FURİN immunoreaktivitesinin oldukça zayıf olduğu tespit edildi (Tablo 4.2.5.) (Resim 8; C,D).

PC6

Kontrol ve missed-abortion grubunda PC6 antikoru ile indirekt immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış desidual bölgelerde yoğun immunoreaktivite gözlenirken (sırasıyla; $136\pm 4,56$; $144,16\pm 13,57$), iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.2.1.) (Resim 9; A,B).

Non-desidual bölgelerde ise, her iki grupta da desidual bölgeye kıyasla daha zayıf immunoreaktivite gözlemlendi ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.2.2.) (Resim 9; A,B).

Kontrol grubuna ait sitotrofoblastta yoğun immunoreaktivite ($75,00\pm 6,06$) gözlenirken, missed-abortion grubunda oldukça zayıf immunoreaktivite ($13,00\pm 2,75$) gözlemlendi ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.2.3.) (Resim 9; C,D). Sinsityotrofoblastta, sitotrofoblastın aksine, kontrol grubunda orta derecede immunoreaktivite ($118,33\pm 7,52$) gözlenirken, missed-abortion grubunda oldukça yoğun immunoreaktivite ($268,17\pm 9,43$) gözlemlendi ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulundu (Tablo 4.2.4.) (Resim 9; C,D).

Plasentada bulunan stromal hücrelerin immunohistokimyasal değerlendirmelerinde ise, missed-abortion grubunda ($13,66\pm 1,63$) kontrol grubuna kıyasla daha zayıf PC6 immunoreaktivitesi ($45,66\pm 5,71$) saptandı ve iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2.5.) (Resim 9; C,D).

PC 4

Kontrol grubunun PC 4 antikoru ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde desidual hücrelerde düşük düzeyde immunoreaktivite ($67,66\pm 5,68$) gözlenirken, missed-abortion grubuna ait örneklerde yoğun immunoreaktivite ($121,50\pm 11,89$) gözlemlendi ve iki grup arasında PC4 immunoreaktivitesi açısından anlamlı fark ($p< 0,05$) tespit edildi (Tablo 4.2.1.) (Resim 10; A,B).

Non-desidual bölgede yapılan incelemelerde ise immunoreaktivitenin her iki grup için de oldukça zayıf olduğu ve aralarında bir fark bulunmadığı gözlemlendi (Tablo 4.2.2.) (Resim 10; A,B).

Kontrol grubuna ait sinsityotrofoblast immunoreaktivitesi ($48,83 \pm 5,74$) ile missed-abortion grubuna ait sinsityotrofoblast immunoreaktivitesi ($281,83 \pm 23,28$) kıyaslandığında, aralarında anlamlı bir fark ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2.4.) (Resim 10; C,D). Ancak sinsityotrofoblastlara ait FURİN immunoreaktivitesinin oldukça zayıf olduğu ve iki grup arasında bir fark bulunmadığı gözlemlendi (Tablo 4.2.3.) (Resim 10; C,D).

Plasental villusların stromalarında yapılan incelemelerde ise kontrol grubu ile missed-abortion grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) tespit edildi. Missed-abortion grubuna ait stromal hücreler orta derecede immunoreaktivite ($27,50 \pm 3,08$) gösterirken, kontrol grubunun oldukça zayıf immunoreaktivite ($11,66 \pm 1,36$) gösterdiği saptandı (Tablo 4.2.5.) (Resim 10; C,D).

PC7

Kontrol grubu desidua örneklerinde yapılan PC7 immunohistokimyasal incelemeler sonucunda zayıf immunoreaktivite ($29,50 \pm 2,88$) gözlemlendi. Missed-abortion grubuna ait örneklerin desidual bölgelerinde de zayıf immunoreaktivite ($31,66 \pm 5,31$) gözlemlendi ve iki grup arasında fark bulunamadı (Tablo 4.2.1.) (Resim 11; A,B).

Non-desidual bölgelerde yapılan immunohistokimyasal incelemelerde kontrol ve missed-abortion grupları arasında fark saptanamadı ve zayıf immunoreaktivite (sırasıyla; $18,33 \pm 2,33$; $13,16 \pm 2,40$) gözlemlendi (Tablo 4.2.2.) (Resim 11; A,B).

PC7 antikoru ile boyanmış plasenta örnekleri incelendiğinde, kontrol grubu sitotrofoblastların orta derecede boyandığı ($26,83 \pm 5,19$), missed-abortion grubu sitotrofoblastların ise zayıf derecede boyandığı ($12,83 \pm 2,56$) gözlenirken, iki grup arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.2.3.) (Resim 11; C,D). Aynı şekilde kontrol grubu sinsityotrofoblastların da, missed-abortion grubuna kıyasla daha kuvvetli boyandığı (sırasıyla; $26,50 \pm 3,93$; $10,83 \pm 1,32$) gözlemlendi (Tablo 4.2.4.) (Resim 11; C,D). Buna karşılık kontrol grubu plasentada bulunan stromal hücrelerin immunoreaktivitesinin, missed-abortion örneklerinden daha zayıf boyandığı (sırasıyla; $5,66 \pm 1,50$; $12,33 \pm 2,06$) gözlemlendi ve aralarında anlamlı fark ($p < 0,05$) tespit edildi (Tablo 4.2.5.) (Resim 11; C,D).

4.3. RT-PCR Bulgular

Her iki gruba da ait plasenta ve desidua örneklerinin parafinize bloklarından alınan kesitlerden mRNA purifikasyonu sonucu farklı konsantrasyonlarda nükleik asit elde edildi (Tablo 4.3.1.) Syber Green boyasına kıyasla oldukça spesifik bir primer prob olan, FAM boyası ile işaretlenmiş TaqMan MGB problemleri ile gen ekspresyon düzeyleri saptanmaya çalışıldı. Bunun için Applied Biosystems, ABI 7500 Real-Time PCR cihazı kullanıldı. Sonuçta Ct (cycle threshold) değerleri üzerinden gruplar arasında ekspresyon farkı değerlendirilmeye çalışıldı ancak house-keeping gen olarak kullanılan β -aktin geni ekspresyon olmasına rağmen, proprotein konvertazlara (Furin, PC4, PC6, PC7) ait, immunohistokimyasal bulgularımızı destekleyecek, anlamlı gen ekspresyonlarına rastlanmadı.

Yapılan çalışmada cDNA sentezi esnasında herhangi bir hata olup olmadığını değerlendirmek amaçlı aynı örneklerle ait farklı tüplerde cDNA sentezi yapıldı ve bu örneklerle ait β -aktin Ct değerleri aynı bulundu. Dolayısıyla cDNA sentezinde herhangi bir problem olmadığı kanaatine varıldı.

Çalışmada farklı cDNA konsantrasyonları denendi ve konsantrasyonun artmasıyla ters orantılı olarak daha düşük β -aktin Ct değerleri elde edildi. Ayrıca her örnekten 2 tekrarlı RT-PCR yapıldı ve benzer sonuçlar alındı. Bu iki sonuca dayanarak RT-PCR'in yapılması aşamasında herhangi bir sorun olmadığı düşünüldü.

Sonuç olarak doku alındıktan sonra formalin ile fiksasyonu, doku takip serisinden geçirilmesi ve mRNA eldesi için yeniden ksilen ile muamelesi esnasında mRNA'ların degrade olduğu ve bu durumun sonuçları olumsuz etkilediği, proprotein konvertazlara ait genler için anlamlı Ct değerlerinin tespit edilememesine sebep olduğu düşünüldü.

Çözüm olarak ise; taze doku örnekleri veya çalışmada gönüllü olan hastalara ait kan örnekleri ile RT-PCR çalışmasının tekrarlanması gerektiğine karar verildi.

Tablo 4.3.1.:

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type
1	22,9	ng/µl	0,573	0,304	1,88	0,59	RNA
1	24	ng/µl	0,599	0,313	1,91	0,57	RNA
2	56	ng/µl	1,399	0,726	1,93	1,09	RNA
2	56,7	ng/µl	1,418	0,741	1,91	1,09	RNA
3	40,8	ng/µl	1,021	0,53	1,93	0,29	RNA
3	41,3	ng/µl	1,032	0,537	1,92	0,29	RNA
4	138,6	ng/µl	3,465	1,849	1,87	1,4	RNA
4	141,7	ng/µl	3,542	1,887	1,88	1,4	RNA
5	105,7	ng/µl	2,642	1,383	1,91	1,42	RNA
5	107,4	ng/µl	2,684	1,419	1,89	1,41	RNA
6	193,7	ng/µl	4,843	2,492	1,94	1,31	RNA
7	32,6	ng/µl	0,816	0,468	1,74	0,83	RNA
7	32,6	ng/µl	0,815	0,47	1,73	0,82	RNA
8	81	ng/µl	2,024	1,09	1,86	1,06	RNA
8	81,9	ng/µl	2,047	1,132	1,81	1,06	RNA
9	69,1	ng/µl	1,727	0,917	1,88	1,19	RNA
9	70,8	ng/µl	1,771	0,957	1,85	1,18	RNA
10	67,1	ng/µl	1,676	0,924	1,81	1,14	RNA
10	66,7	ng/µl	1,668	0,914	1,83	1,14	RNA
11	33,3	ng/µl	0,833	0,445	1,87	1,02	RNA
11	34,1	ng/µl	0,852	0,47	1,82	1	RNA
12	83,7	ng/µl	2,094	1,125	1,86	1,25	RNA
12	84,4	ng/µl	2,111	1,126	1,87	1,25	RNA
13	40,9	ng/µl	1,022	0,578	1,77	0,86	RNA
13	42	ng/µl	1,049	0,59	1,78	0,85	RNA
14	88,3	ng/µl	2,208	1,141	1,93	0,7	RNA
14	91	ng/µl	2,275	1,199	1,9	0,69	RNA
15	452,3	ng/µl	11,307	5,957	1,9	1,61	RNA
15	457,8	ng/µl	11,446	6,04	1,9	1,61	RNA
16	13,8	ng/µl	0,346	0,196	1,76	0,52	RNA
16	14	ng/µl	0,349	0,217	1,61	0,49	RNA
17	88,6	ng/µl	2,215	1,166	1,9	1,2	RNA
17	90,3	ng/µl	2,257	1,204	1,87	1,19	RNA
18	433	ng/µl	10,826	5,66	1,91	1,59	RNA
18	441,9	ng/µl	11,048	5,776	1,91	1,58	RNA
19	61,8	ng/µl	1,546	0,84	1,84	1,12	RNA
19	62,5	ng/µl	1,562	0,863	1,81	1,1	RNA
20	90,1	ng/µl	2,252	1,26	1,79	1,31	RNA
20	92,4	ng/µl	2,309	1,299	1,78	1,3	RNA
21	368,7	ng/µl	9,217	4,798	1,92	1,45	RNA
21	373,8	ng/µl	9,345	4,885	1,91	1,44	RNA
22	149,1	ng/µl	3,726	1,981	1,88	1,55	RNA
22	151	ng/µl	3,774	2,01	1,88	1,55	RNA
23	538,9	ng/µl	13,471	6,94	1,94	1,58	RNA
23	536,1	ng/µl	13,404	7,085	1,89	1,6	RNA
24	85,1	ng/µl	2,127	1,199	1,77	1,07	RNA
25	597,4	ng/µl	14,934	7,774	1,92	1,52	RNA
25	595,5	ng/µl	14,887	7,577	1,96	1,54	RNA
26	33,2	ng/µl	0,831	0,433	1,92	0,56	RNA
26	33,1	ng/µl	0,827	0,448	1,84	0,55	RNA
27	449	ng/µl	11,224	5,801	1,93	1,59	RNA
27	451,3	ng/µl	11,282	5,834	1,93	1,59	RNA
28	110,4	ng/µl	2,759	1,49	1,85	1,08	RNA
28	112,2	ng/µl	2,805	1,53	1,83	1,08	RNA
29	48,8	ng/µl	1,22	0,652	1,87	0,94	RNA
29	50	ng/µl	1,25	0,681	1,84	0,91	RNA

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada gebeliğin devamlılığında rol oynayan moleküller (TNF- α , TGF- β , IGF-I, POMC, FOXO3A) ile bunların aktif forma geçmesini sağlayan proprotein konvertazların (PC4, PC6, PC7, FURİN) normal gebelik ve missed abortus gruplarına ait desidua ve plasentalarındaki dağılımları immunohistokimyasal teknik ile incelendi.

TNF- α 'nın organizmada yaygın bir molekül olduğu, birçok organda bulunduğu, bir pleiyotropik inflamatuvar sitokin olup, hem doku dejenerasyonunda hem de rejenerasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (165). TNF- α 'nın dokular üzerindeki yapıcı ve yıkıcı etkisinin eksprese edilen miktara bağlı değişiklik gösterdiği ileri sürülmektedir (166). TNF- α 'nın uterus ve plasentada da bulunduğu, erken gelişim döneminde önemli görevler üstlendiği bilinmektedir (165). Daha önce yapılan çalışmalarda da TNF- α mRNA'sının uterin stromal hücrelerde, makrofajlarda (167), uterin NK hücrelerinde, T-hücrelerde (168) ve endotelial hücrelerde (169) eksprese edildiği gösterilmiştir (165). Desidual dokularda ve izole desidual stromal hücrelerde TNF- α proteininin varlığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (170,171). Erken gebelik döneminde eksprese edilen TNF- α 'nın, TNFR2-IgG füzyon protein aracılığı ile proinflamatuvar sinyallerden koruduğu gösterilmiştir (172). Buna karşılık TNF- α 'nın içinde bulunduğu makrofajlar tarafından sentezlenen Tip I sitokinlerin (TNF, IFN- γ VE IL-12) spontan abortus vakalarında arttığı (173, 174), bu artışın spontan abortusa neden olduğu ve TNF- α 'nın abortusu tetikleyen en güçlü sitokin olduğu bildirilmiştir (175). Bu çalışmada kontrol grubu desiduasında H-skor değerleri $216,66 \pm 11,69$ bulundu ve bu değer spontan abortusa neden olmadığı göz önüne alındığında, bazal TNF- α ekspresyonu olarak değerlendirildi. TNF- α immunoreaktivitesinin missed abortus grubunda ($128,33 \pm 11,69$), kontrol grubu desiduasında gözlenen immünoreaktiviteden bile az olması ise, abortusu tetikleyen mekanizmaların harekete geçmesini engellediğini ve böylece missed abortus vakalarında tahliyenin gerçekleşmesini engelleyici rol oynadığını düşündürdü.

TNF- α ile boyanmış preparatların plasenta örneklerinin incelenmesinde sinsityotrofoblastlardaki immunoreaktivitenin oldukça belirgin olduğu, ayrıca missed grubuna ait doku örneklerinin sinsityotrofoblast immunoreaktivitesinin kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın trofoblastik hücrelerin proliferasyonu, invazyonu ve differansiyasyonu üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir (167). Asley King ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tüm trofoblastik hücrelerde TNF- α salınımının olduğunu ve otokrin yolla trofoblastların büyümesi ve farklılaşmasında rol oynadığını ileri

sürmüşlerdir (176). Yang Y ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada, normal ve malign sitotrofoblast hücrelerinde TNF geninin eksprese olduğunu ve plasenta gelişiminde proliferasyonu ve invazyonu hızlandığını bildirmişlerdir (177). Bu çalışmada da hem kontrol hem de missed grubu sinsityotrofoblastların yüksek düzeyde TNF- α eksprese etmesi trofoblast fonksiyonlarının devam ettiğinin bir belirtisi olarak değerlendirildi. Missed grubunda bu hücrelerin immunoreaktivitesinin daha fazla olması embriyonun atılımının engellenmesinde rolü olabileceğini düşündürdü. Pijnenborg ve arkadaşları erken dönemde gebelik plasentalarında yaptıkları çalışmada, TNF- α ekspresyonunun çoğalan anchoring villuslarda, invaze intersitisiyal trofoblastlarda ve invaze olan endovasküler trofoblastlarda gözlemişler ve erken dönem invazyonunda rol oynadığını bildirmişlerdir (178). Bununla beraber, TNF- α 'nın EVT'lerin invazyonu üzerine olan etkileri tartışmalıdır. Bass ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın villöz trofoblast invazyonuna etkisinin olmadığını ileri sürmüştür (179,180). Buna karşılık TNF- α 'nın EVT invazyonunu inhibe ettiğini bildiren yayınlar da bulunmaktadır (181, 182). Otun 2011 yılında yaptığı çalışmada TNF- α 'nın invazyona olan inhibitör etkisinin doza bağlı olduğunu rapor etmiştir. TNF- α 'nın EVT hücreleri ile kültür ortamında 72 saat muamele edildiğinde apoptotik değişiklikler görülmediğini bildiren yayınlar da bulunmasına rağmen (183), bir çok araştırmacı TNF- α 'nın apoptozisi indükleyerek trofoblast invazyonunu engellediğini ileri sürmektedir (179, 184, 185, 186). Min Li ise 2011 yılında feto-maternal bileşkede yer alan IL-1, EVT invazyonunu matriks proteinazlarını ve leptin sekresyonunu artırarak gerçekleştirdiğini ve TNF- α ile IL-1 arasındaki dengenin EVT invazyonunu kontrol ettiğini bildiren bir çalışma yayınlamıştır (187).

TGF- β 2'nin endometriyumda eksprese edildiği ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis ve remodelingde rol oynadığı, ayrıca menstruasyon, proliferasyon, desidualizasyon ve gebelik sırasında düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir (188). Rebecca L Jones 2006 yılında, TGF- β 'nin preimplantasyon döneminde ekspresyonunun, endometriyumu implantasyona hazırlarken, embriyo üzerine de gelişimini ve farklılaşmasını düzenleyici etkisi bulunduğunu bildirmiştir. TGF- β 'nin uterin epitelyal hücreler tarafından eksprese edildiği ve böylece implantasyonda rol oynadığı da bilinmektedir (189). TGF- β 'nin implantasyon sırasında hassas bir dengede bulunduğu ve eksik veya fazla salınmasının implantasyonu etkilediği de bildirilmiştir (189,190). Bu çalışmada TGF- β 2 immunoreaktivitesinin hem kontrol grubu ($266,00 \pm 8,60$), hem de missed abortus grubu ($158,33 \pm 6,05$) desidualarında, her iki grubun non-desidual alanlarına (sırasıyla; $38,16 \pm 8,63$; $37,00 \pm 8,48$) göre daha fazla

bulunduğu gözlemlendi ve desidualizasyonda ve gebeliğin devam etmesinde rol oynadığı düşünüldü. Simpson ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada desidual hücrelerin interasellüler olarak TGF- β 2 ekspresyonu ettiğini ayrıca transforme olan desidual hücreler ile myometrial spiral etrafında ekstrasellüler olarak bulunduğunu bildirmiştir (191). Bir TGF- β blokörü olan SB431542'nin verilmesi sonucunda desidualizasyonda % 77 lik azalma olduğu gösterilmiş ve TGF- β nin desidualizasyon üzerine çok önemli etkisi olduğunun bir belirtisi olarak değerlendirilmiştir (10). Hücre kültürü çalışmalarında progesteron ile indüklenmiş desidualizasyonun TGF- β verilmesi ile daha da ilerlediği de gösterilmiştir (10). Sadece TGF- β değil aynı zamanda TGF- β ailesinin diğer bir üyesi olan Makrofaj İnhibitör Sitokin-1 (Macrophage Inhibitory Cytokine-1, (MIC-1)'n de desidualizasyonu kolaylaştırıcı etkisi olduğu bilinmektedir (192).

Bu çalışmada kontrol grubunda desidual alanlardaki TGF- β 2 ekspresyonunun ($266,00 \pm 8,60$), missed abortus grubuna ($158,33 \pm 6,05$) göre daha fazla bulunduğu ve gebeliğin devamında önemli rol oynadığı düşünüldü. TGF- β 2 nin 7-19 haftalar arasında hem plasenta yatağında, hem de desiduada ekspresyonunun arttığı ve trofoblast invazyonunu kontrol ettiği bildirilmiştir (191). Bununla beraber literatür incelendiğinde 90'lı yıllarda yapılan çalışmalarda TGF- β ailesinin plasentasyon ve desidualizasyon için etkilerine dair verilen bilgiler farklılıklar (193) göstermektedir. Simpson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TGF- β ekspresyonundaki farklılıkların kullanılan antikörlerin çok spesifik olmamasından kaynaklandığını ileri sürmektedir (191).

Bu çalışmada missed abortus grubu desiduasında TGF- β 2 immunoreaktivitesi, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu. Ogasawara ve arkadaşları sporadik düşüklerde plazma TGF- β 1 seviyesinin yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak immunohistokimyasal çalışmalar ile plazma düzeyleri arasında uyumsuzluk bulunmaktadır. Ball ve arkadaşları bu durumun non plasental bölgelerdeki desidual hücrelerden, desidual lenfositlerden veya gebeliğe karşı oluşan sekonder cevaba bağlı olabileceğini ileri sürmüştür. Ayrıca spontan gebeliklerde oluşan dejeneratif değişiklikler oksidatif strese ve TGF- β immunolokalizasyonunda artışa neden olmaktadır (194). Bu çalışmada missed abortus vakalarında henüz dokuda dejenerasyon gözlenmemesi nedeni ile TGF- β immunoreaktivitesi artışı olmadığı ileri sürülebilir.

TGF- β ailesinin plasentadaki dağılımı farklılıklar göstermektedir. TGF- β 1'in plazma düzeyi ile düşükler arasında bir ilişki olduğu (195) ve villöz trofoblastlarda TGF- β 3'ün

ekspresyonunun artmasının preeklampsiye neden olduğu ileri sürülmektedir (196). Bu çalışmada da kontrol grubu sito ve sinsityotrofoblastlarında oldukça düşük düzeyde TGF- β 2 immunoreaktivitesi gözlemlendi (sırasıyla; $10,33\pm 1,63$; $51,66\pm 3,61$). Missed abortus grubunda sinsityotrofoblastlarda ($240,00\pm 13,75$) belirgin bir artış gözlenirken sitotrofoblastlar ($24,66\pm 2,33$) arasındaki fark daha az gözlemlendi. İnsanlarda da plasenta tutunma bölgesinde bulunan uterin supresör hücrelerin eksprese ettiği TGF- β 2'nin düşüklere neden olduğu bilinmektedir (197). Ayrıca fareler üzerinde yapılan çalışmada uteroplazental bölümdaki TGF- β 2 azalmasının gebelik kayıplarına neden olduğu rapor edilmiştir (198). Bu nedenle bizim çalışmamızda missed abortus vakalarındaki TGF- β 2 artışının, düşüğün gerçekleşmemesini ve embriyonun tahliyesini engellediğini düşündürdü (199). Ball ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sitotrofoblast adalarında TGF- β 2 ekspresyonunun öploid ve anöploid erken düşüklerde arttığını göstermiştir ve bu adaların desidüaya temasının olmaması nedeni ile artışın invazyon kontrolü ile ilişkili olmadığını ileri sürmüştür (200).

POMC bir prohormon olup ACTH ve alfa MSH'ın prekürsörüdür. POMC gen ekspresyonu, dolaşımdaki CRH tarafından düzenlenir ve ACTH salınımı ile sonuçlanmaktadır. Rat uterusunda POMC, proenkephalin (PENK) ve prodinorfin (PDYN)' in hem peptidinin hem de mRNA'sının bulunduğu, ayrıca opiyoid reseptörlerinin varlığı gösterilmiş ve gebelik sırasında opiyoid sistemin maternal adaptasyon ve uterin motiliteyi düzenlediği bildirilmiştir (201). Gebeliğin son döneminde uterin kontraksiyon artması ile opiyoidlerin birlikte plazma konsantrasyonunda da artış olduğu tespit edilerek gebelikte analjezi kontrolünde de rol oynadığı bildirilmiştir (202). Bu çalışmada her iki gruba ait desidüal alandaki hücrelerdeki POMC immunreaktivitesinin (kontrol; $211,83\pm 15,03$ ve missed; $290,83\pm 41,03$) fazla olması, miyometriyal kontraksiyonu inhibe ederek düşüğün gerçekleşmesini engellediği düşünüldü. Klinik uygulamalarda, düşük tehditleri vakalarında POMC'nin son ürünü olan ACTH verilerek düşüklerin tedavi edilmesine çalışılmaktadır (203). Ayrıca CRH'un miyometrial tonusunun major düzenleyicisi olduğu ve miyometriyumda CRH reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (204,205,206). PGE2 üzerinden etkisini gösteren CRH'un, gebeliğin başlangıcında POMC aracılığı ile miyometriyal tonusu azalttığı, böylece gebeliğin devamlılığını sağlarken, gebeliğin son döneminde PGE2'yi arttırarak miyometriyum kontraksiyonunu arttırdığı da bilinmektedir (204,207,208).

Bu çalışmada POMC immunoreaktivitesinin, her iki gruba ait desidüal alanda, nondesidüal (kontrol; $12,33\pm 1,63$ ve missed; $34,50\pm 9,66$) alanlara göre daha fazla bulunduğu gözlemlendi ve uterin büyüme ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Gebelik döneminde uterusu

geçekleşen büyümenin hem hipertrofi hem de hiperplazi ile gerçekleştiği (209), opiyoidlerin sinir sistemi hücrelerinin differansiasyonuna ve çoğalmasına neden olduğunu göz önüne alındığında POMC'nin uterusun gebelik sırasında hücrelerde gözlenen hipertrofi ve hiperplaziden de sorumlu olabileceği bildirilmiştir (209).

Bu çalışmada hem kontrol hem de missed abortus grubu desidularında oldukça yüksek düzeyde POMC ekspresyonu gözlemlendi, missed abortus grubunda desidual hücrelerin sayısının daha fazla olmasının yanı sıra POMC ekspresyonu daha fazla bulundu ve POMC'nin desidual hücrelerin proliferasyonunun yanı sıra, differansiasyonuna etkisi de göz önüne alındığında POMC'nin desidualizasyon üzerine etkisinin de olabileceği düşünüldü. POMC'nin desidualizasyona etkisi ile ilgili yayın sayısı oldukça kısıtlıdır, buna karşılık POMC ile CRH arasında pozitif korelasyon bulunduğu bilinmektedir (210). CRH'un desidualizasyon için gerekli olduğu ve hem fare, hem de insan stromal hücrelerden eksprese edildiği bilinmektedir (204,211,212). Hücre kültürü çalışmalarında CRH, desidualizasyonu progesteron, relaksin ve östrojen varlığında provoke etmektedir (204,213). CRH inflamatuvar cevabı başlatarak insanda ve farelerde endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmesi sırasında önemli rol oynamaktadır (214). CRH'un desidualizasyon üzerine olan direkt etkisinin yanı sıra, progesteronun desidualizasyona etkisini de PGE2, IL-1 ve IL-6 üretimini değiştirerek sitümüle etmektedir (215). POMC; desidualizasyon sırasında stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmesini arttırmasının yanı sıra periferden de yeni desidual hücrelerin stromaya eklenerek stromanın büyümesini arttırmaktadır. Bazal bölgelerdeki stromal hücrelerin opiyoid reseptörlerinden κ reseptörü taşıdığı ve desiduaya katılımda rol oynadığı bildirilmiştir (216).

CRH'un sadece desidualizasyon değil aynı zamanda FasL'yi regüle ederek invazyonu ve implantasyonu kontrol ettiği gösterilmiştir. Maternal desiduada CRH, FasL'yi azaltarak aktif T lenfosit sayısını azaltmakta ve immun cevap oluşmasını engellemektedir. Nitekim CRH inhibe eden Antalarmin verilerek farelerde yapılan implantasyon çalışmasında FasL'de ve implantasyon bölgesinde azalma dolayısıyla yaşayan embriyo sayısında azalma gözlenmiştir (217).

POMC'nin missed abortus plasentasında; hem sitotrofoblastlarda ($196,16 \pm 5,34$) hem de sinsiyo trofoblastlarda ($322,66 \pm 7,00$) kontrol grubuna (sırasıyla; $13,33 \pm 2,16$, $226,00 \pm 5,51$) göre daha fazla eksprese edildiği gözlemlendi ve hem gebeliğin devamlılığında, hem de missed abortusta fetüsün atımının engellenmesinde önemli rol oynadığı düşünüldü. İn vitro çalışmalarda trofoblastik hücrelerin POMC sentezlediği ve POMC fragmantlarını

(β LPH, ACTH ve α -MSH) ortama verdiği gösterilmiştir (218). POMC'nin plasentada gestasyonel dönemin erken döneminde bulunduğu ve ikinci trimesterde 10 kat arttığı bilinmektedir. Anne kanındaki POMC'nin de plasenta kaynaklı olduğu ve çoğul gebeliklerde miktarının daha da arttığı gösterilmektedir. Gebelikten sonra ise POMC miktarının 48 saatte düşmüş olması (219). POMC'nin gebelik üzerine etkisinin olduğunun bir belirtisi olarak değerlendirildi.

Gebelik sırasında ACTH ve kortizol seviyesi hem annede hem de plasentada dramatik olarak yükselmektedir (220). POMC plasental kortizon seviyesini de kontrol ederek gebeliğin devam etmesinde önemli rol oynamaktadır. Her iki gruba ait doku örneklerinin incelenmesinde POMC ekspresyonunun, missed abortus grubu sinsityotroblastlarında ($322,66 \pm 7,00$) sitotrofoblastlara ($196,16 \pm 5,34$) göre daha fazla eksprese olduğu ve bu ekspresyonun steriyogenezis ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Plasental CRH ekspresyonunun sinsityotrofoblastlar tarafından gerçekleştirildiği (221), plasental CRH lokalizasyonunun, fetal ACTH salınımının ve fetal adrenal steroidogenezisi arttırdığı bildirilmiştir (222).

Fetoplasental niten steriyogenezis kapasitesi oldukça güçlüdür ve plazma kortizol seviyesi gebelikte, gebe olmayanlara göre 2-3 kez artmaktadır (223). Plasenta tarafından arttırılan östrojen seviyesi, karaciğerden kortizon bağlayıcı globulin üretimini artırır ve kortizon klirensini azaltır, böylece total kortizol seviyesini yükseltir (224). Kortizon seviyesinin düşüklüğü gebelikte bağdaşmamaktadır. Adrenal yetmezliği olan kadınların gebelik oranı ancak 1:3000'dir. Adrenal yetmezliği olan vakalar kortizon uygulamaları ile tedavi edildiğinde ise gebelik normal olarak devam etmektedir (225).

IGF'nn hücre migrasyonu, invazyonu, proliferasyonu, tümör oluşumu ve apoptoziste rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada yapılan immunohistokimyasal değerlendirmelerde desidual bölgenin (kontrol; $42,83 \pm 5,03$ ve missed; $98,33 \pm 4,08$), non-desidual bölgeye (kontrol; $17,16 \pm 6,36$ ve missed; $19,16 \pm 5,41$) kıyasla daha yoğun immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda IGF-I immunoreaktivitesinin uterin luminal epiteli, glandular epitelyum ve endometriyal stromal hücrelerde oldukça güçlü eksprese edildiği, buna karşılık myometriyum ve kan damarlarında orta derece eksprese edildiği bildirilmiş ve IGF-I'in uterin hücre proliferasyonunda otokrin düzenleyici olarak rol oynadığı fikri ileri srlmştir (226,227). Kapur ve arkadaşları erken gebelik boyunca uterin IGF-I ekspresyonunun, ovaryan steroidlerin primer düzenleyicisi olduğunu belirtmişlerdir (228).

Bu çalışmada örneklerle ait desidual alanların, IGF-I immunoreaktivitesi açısından, non-desidual alanlara kıyasla daha güçlü boyandığı gözlemlendi ve desidualizasyonda önemli rol oynadığı düşünüldü. IGF-I'in ağırlıklı olarak stromada eksprese edildiği (229,230), özellikle gestasyonun 5. gününde stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşması sırasında oldukça fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. Ghahary ve arkadaşları gen ekspresyonu düzeyinde yaptıkları bir çalışmada, endometriyumda IGF-I mRNA'sının hem epitelyal hem de stromal hücrelerde bulunduğunu ve miyometriyuma ait longitudinal kas ile sirküler düz kas hücrelerinde çok yaygın eksprese olduğunu göstermişlerdir (231). Uterin stromada desidualizasyon geliştiği takdirde, IGF-I mRNA ekspresyonunun non-desidual alan, dış stroma ve miyometriyal tabakada sınırlandırıldığı, desidual zonlarda ise ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (12). Jale Öner ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada, gestasyonun 2. gününde IGF-I immunoreaktivitesinin zayıf olduğu, 3. günde biraz arttığı ve 5. günde desidualizasyonun başlangıcı ile beraber maksimum seviyesine ulaştığı gösterilmiştir. Gestasyonun ilk gününden 5. gününe kadar desidual hücre maturasyonuna paralel, IGF-I ekspresyonunun artışının gözlenmesi (12). IGF-I'in desidualizasyon üzerine etkisinin bir kanıtı olarak değerlendirildi.

Missed abortus ve istemli düşük vakalarına ait desidual alanlar karşılaştırıldığında ise, missed abortus grubuna ait örneklerin IGF-I ile daha fazla boyandığı gözlemlendi bu da missed abortusta fetüsün ölmesine rağmen gebeliğin sonlanmamasında IGF-I'in rolü olabileceğini düşündürdü.

Bu çalışmada desidual alanların yanı sıra plasenta örneklerinde de IGF-I ekspresyonu gözlemlendi. Sinsityotrofoblastlardaki IGF-I immunoreaktivitesinin, sitotrofoblast hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu, stromal hücrelerde ise sitotrofoblastakine benzer ölçüde olduğu gözlemlendi. Gebeliğin ilk trimesterinde plasental fibroblastların IGF-I ürettikleri ve bunun trofoblast hücrelerinin migrasyonunu desteklediği in vitro olarak gösterilmiştir (232). Yapılan çalışmalarda IGF-I'in ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin migrasyonunu $\alpha 5\beta 3$ – integrin yolağı ile birlikte sağladığı gösterilmiştir (67,233). İntegrinlerin adhezyon ve migrasyonda rol oynadıkları dolayısıyla embriyo implantasyonu ve plasentasyonunda önemli yere sahip oldukları bilinmektedir. Ekstrasvillöz trofoblastik hücrelerden salınan fibronektin ile $\alpha 5\beta 1$ - integrinin düzenlenmesi ile birlikte IGF-I bu hücrelerin invazyon ve migrasyonunu aktive eder (67).

Bizim çalışmamızda elde edilen immunohistokimyasal değerlere göre sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerine ait immunoreaktivitenin missed abortus grubunda arttığı gözlemlendi. Bu artış missed abortus grubunda plasental hücrelerin uterusu, kontrol grubuna kıyasla IGF-I'in etkisiyle çok daha fazla invajine olduğunu ve fetüsün gebelik devam ediyormuş gibi vücuttan atılmadan kalmasında IGF-I'in rol oynayabileceğini düşündürdü.

İnsanlarda, Forkhead transkripsiyon faktörlerinin alt birimi olan FoxO; FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) ve FoxO6 olmak üzere 4 üyeden oluşur. Bu transkripsiyon faktörleri sitoplazmada inaktif iken nukleusa geçtiklerinde aktif hale gelirler ve hücre siklusu, apoptozis, anjiyogenezis ve inflamasyonun düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. Bu çalışmada FOXO3A immünoreaktivitesi desidual alanlarda (kontrol; $133,33 \pm 17,43$ ve missed; $255,83 \pm 12,41$) nondesidual alanlara (kontrol; $30,33 \pm 4,32$ ve missed; $39,66 \pm 14,30$) göre artmış olarak gözlemlendi ve gebeliğin devamlılığında rol oynayabileceği düşünüldü. Foxo ailesinin endometriyumdaki ekspresyonu farklılık göstermektedir. FOXO3'ün, H_2O_2 indüklenmiş desidual hücrelerde artmadığı buna karşılık undifferansiyel hücrelerde arttığı, desidual hücrelerde FOXO3 seviyesinin %40-60 oranında daha düşük olduğu ve desidualizasyonu baskıladığı ileri sürülmüştür (234). FOXO1'in endometriyal dokuda menstrual siklus sırasında dalgalanma gösterdiği, gebelik gerçekleştiği takdirde ekspresyonunun daha da arttığı, ayrıca cAMP ile indüklenmiş desidual bölgelerde de artış gösterdiği tespit edilmiş ve implantasyon ile desidualizasyonun gerçekleşmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (235). Foxo ailesinin bir üyesi olan FOXO4'ün endometriyumda eksprese olmadığı bildirilmiştir (234,236).

FOXO ailesinin, hücrelerin kaderleri üzerlerine olan etkisi hormonal ve çevresel faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Desidualizasyonun gerçekleşebilmesi için FOXO1'in hücrelerden PRL ve IGF-BP-1 ekspresyonunu tetiklemesi gerekmektedir. FOXO1 aynı zamanda progesteron yokluğunda Bim ekspresyonunu arttırarak apoptozisi indüklemektedir (236). FOXO3'ün, hücrelerin apoptozise veya differansiyasyona gidişi ile ilgili rolü henüz tam olarak netleşmemiştir. FOXO transkripsiyon faktörlerini aktive eden farklı gen grupları olduğu ve fonksiyonlarını sıkı kontrol altında tuttuğu bilinmektedir. FOXO3A'nın düşük oksidatif stres koşullarında hücre survivalını arttırdığı (234,237-239) ayrıca proapoptotik sinyallerin varlığında hücre ölümü için anahtar mediyatör olarak rol oynadığı da bildirilmiştir(234). Gebelik sırasında desidual hücrelerde Fas-L ve C-FLIP eksprese olmaktadır, bu artış desidual hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik olmayıp, maternal

immuntoleransın sağlanması için aktif T hücrelerin ortadan kaldırılması ile ilişkili olabilir (51). Ayrıca FOXO3'ün aşırı ekspresyonu T hücrelerinden salınan sitokinleri inhibe ederek gebeliğin devamlılığında önemli rol oynamaktadır (240,241). 2011 yılında Lappas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bakteriyel endotoksin ile oluşturdukları inflamasyonu, nikotin amid ve FOXO3 ile ortadan kaldırdıklarını böylece gebeliğin devam ettirilebileceğini bildirmiştir (240).

FoxO proteinlerinin, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunu IκB ekspresyonunu up-regüle ederek de koruduğu (242) ve FOXP3'ün self-toleransın gelişmesinde ve böylece otoimmün hastalıklardan korunmada önemli role sahip olduğu da bildirilmiştir (243). Bu nedenle bu çalışmada missed abortus vakalarında FOXO3A immunoreaktivitesinin artmış olması desidualizasyondan çok, hücrelerin hafif oksidatif strese olan direnç artışını sağlamasına yönelik olabileceğini düşündürdü. Missed abortus vakalarında embriyonun yaşamsal özelliklerini kaybetmiş olmasına rağmen henüz tam bir inflamasyon gelişmemesi nedeni ile embriyo atılımı gerçekleşmemektedir. Bu sırada düşük düzeydeki oksidatif stresin, FOXO3'ün hücrelerin sağ kalımına olan etkisini arttırmasına bağlı olarak hücreler yaşamaya devam ediyor ve embriyo atılımı engelleniyor olabilir. Endometriyal dokuda aşırı oksidatif stresin hücre ölümüne neden olarak preeklampsi yolu ile gebelik kayıplarına ve fetal büyüme geriliklerine neden olduğu (234,244), bu tür vakalara gebelik sırasında antioksidan verildiği bilinmektedir. Bu nedenle riskli preeklampsik vakalarda C ve E vitamini verilmesinin preeklampsi insidansını azalttığı randomize çalışmalarda gösterilmiştir (234)

Kontrol ve missed abortus grubuna ait plasenta örneklerinin incelenmesinde FOXO3 immünoreaktivitesinin her iki grupta da oldukça düşük olduğu ancak missed abortus grubunda hafif artış gösterdiği gözlemlendi. Sinsityotrofoblastların maternal kan ile direkt temasta olduğu ve plasenta fonksiyonlarını yerine getirmede oldukça önemli rol oynadığı bilinmektedir. FOXO3A'nın gebelik komplikasyonlarında önemli rol oynadığı, sinsityotrofoblastlardaki artışının apoptozise neden olarak IUGR ve preeklampsiye neden olduğu bildirilmiştir (204,245). FOXO3A'nın bu etkisi sinsityotrofoblastlardaki bozuklukların anneden fetusa besin maddelerinin geçişini engellemesi yolu ile olmaktadır (246). Ayrıca FOXO proteinlerinin aktivasyonunun glukoz metabolizmasını bozduğu (247) bilinmektedir. Bu nedenle FOXO3A'nın sinsityotrofoblastlardaki ekspresyonunun apoptozisi engelleyerek gebeliğin devamlılığında rol oynayabileceği düşünüldü.

Yapısal bir proprotein konvertaz olan furin proteini endometriyumda yaygın olarak bulunmaktadır. Furin'in, endometriyal luminal ve glandular epitelde, stromal fibroblastlarda, endotel ve lökositlerde immunolokalize olduğu gösterilmiştir (248). Bizim çalışmamızda kontrol grubu desidua örneklerinin furin monoklonal antikoru ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, furin ekspresyonunun özellikle desidual hücreler ($131,16 \pm 3,54$) olmak üzere desidua bazalis stromasında yaygın olarak bulunduğu gözlemlendi. Furin'in menstrual siklus ve gebeliğin birinci trimesterinde eksprese edildiği ve desidualizasyon sırasında bu ekspresyonun devam ettiği bildirilmiştir (248). Furinin; IL-11, prostaglandin E2, relaksin (249), IGF-I (250), insülin reseptörü (251), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (252), α -integrinler (253), matriks metalloproteinazlar(254) gibi birçok substratın; TGF β -1(255), aktivin A (256), Mülleriyan inhibe edici madde (257), BMP4 (258) ve Nodal (258) gibi TGF β -ilişkili moleküllerin aktif formuna dönüşmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (259). Stoikos ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada insan endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonunda TGF- β 'nın BMP2 ile birlikte önemli rol oynadığını buna karşılık BMP4 ekspresyonunda ise minimal artış olduğunu bildirmiştir (260). Bu nedenle bu çalışmada furin ekspresyonunun artmış olmasının, desidualizasyon patogenezinde rol oynayan TGF- β artışına neden olarak desidualizasyonun gerçekleşmesinde rol oynayabileceği düşünüldü.

Literatür taramasında missed abortuslu vakalarda furin ekspresyonu ile ilgili bilgilere ulaşılamamaktadır. Missed abortus grubu desidua örneklerinin immunohistokimyasal tekniklerle incelenmesinde, furin ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi (kontrol; $131,16 \pm 3,54$ ve missed; $227,50 \pm 11,72$). Bu nedenle bizim çalışmamızda furin ekspresyonunun missed abortus grubu desiduasında artmış olması, missed abortus patogenezinde furinin rolü olabileceğini düşündürdü.

Gebelik boyunca fetus ve anne arasındaki iletişimin sağlanması prekürsörleri furin tarafından aktive edilen MMPler, epitelyal büyüme faktör ailesi, adhezyon molekülleri ve TGF β süperailisini içeren bir seri proteinler tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (261). MT1-MMP'in hücre migrasyonu, anjiogenezis ve tümör metastazı üzerine etkisi olduğu (262) ve zimojen olarak sekrete edilen MT1-MMP'in furin tarafından aktive edildiği bilinmektedir. Plaiser ve arkadaşları missed abortus üzerine yaptığı çalışmada desidual alanlarda membran-tip matriks metalloproteinaz (MT1-, MT2-, MT3- and MT5-MMP) artışı olduğunu rapor etmişlerdir (263).

Yaygın olarak eksprese edilen Furin, yapısal salgı proteinlerinin oluşumunda görev yapan temel PC'dir (17). Bu çalışmada; furinin kontrol grubu plasentasında; özellikle sinsityotrofoblastlarda ($81,50\pm 4,08$) eksprese edildiği tespit edildi. Bu da furinin, gebeliğin devamlılığında trofoblast fonksiyonlarında rol oynayabileceğini düşündürdü. Zhou ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada maymunlarda ve insanlarda erken gebelik döneminde trofoblastların furin ekspresyonlarında artış olduğunu, furin knocking down yapılan grupta ise invazyon ve migrasyonun bozulduğunu bildirmişlerdir (264) İnsan plasentasındaki villus ve sinsityotrofoblastlardaki furin ekspresyonu birinci trimesterde üçüncü trimestere kıyasla oldukça yüksektir, bu da erken gebelik boyunca plasentasyonda ve sinsityotrofoblastların oluşumunda furinin önemli fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir (261).

Furinin tümör büyümesi, invazyonu ve metastazında rol oynadığı; baş, boyun, meme ve akciğer kanserlerinin invazyon ve proliferasyonunun gelişmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (92). Bizim çalışmamızda furin ekspresyonunun missed abortus grubuna ait sinsityotrofoblastlarda ($322,67\pm 3,26$), kontrol grubuna ($81,50\pm 4,08$) kıyasla oldukça artmış olduğu gözlemlendi. Salamonsen ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada MT1-MMP'in implantasyon sırasında trofoblast invazyonunu kontrol ettiğini bildirmişlerdir (10). Bu nedenle bizim çalışmamızda furinin; muhtemelen MT1-MMP ile birlikte invazyon üzerine etki ederek missed abortus grubunda plasentanın ayrılmamasını ve gebeliğin devam etmesini sağlıyor olabileceği düşünüldü.

Roebroek AJ (1998) ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları çalışmada furin mRNA'sını plasentanın asıl kısmını oluşturan koriyon ve ekstraembriyonik dokularda eksprese edildiğini göstermişlerdir. Furin eksikliğinde endotel hücrelerinin terminal differensiyasyonunun gerçekleşmediği, endotel hücreleri prekürsörlerinden FLK-1 eksprese edilmesine rağmen büyük damar gelişiminin gerçekleşmediği (265) göz önüne alındığında missed abortusta furin ekspresyonunun fazla olmasının, kan damarlarının gelişiminin devam etmesine neden olduğu ileri sürülebilir. Furin ayrıca hücre hücre adezyonunda da rol oynamaktadır (266). Furinin koriyoanantoik füzyonda VCAM-1 ve Alfa4 integrin ekspresyonunu artırarak hücre bağlantılarını arttırdığı rapor edilmiştir (267). Bu çalışmada missed abortuslu vakalarda furin ekspresyonunun artmış olması kan damarlarının gelişimini ve hücre invazyonlarının devamını sağlayarak embriyo tahliyesinin engellenmesine etki yaptığı da ileri sürülebilir.

Özellikle sinsityotrofoblastların farklılaşmasında furinin rolü olduğu rapor edilmiştir. Bu işlem sırasında sinsitin 1 ve 2 'nin rol oynadığı, böylece trofoblastların invazyon kapasitesini kontrol ettiği bilinmektedir (261). Bu nedenle furin, sinsityotrofoblastların differansiyasyonunu sağlayarak ve invazyonunu kontrol ederek missed abortusta düşüğün gerçekleşmesini engelliyor olabilir.

Çeşitli dokularda yaygın olarak eksprese edilen PC6, ilk olarak ekstra-embriyonik dokularda olmak üzere erken embriyonik gelişim boyunca gözlemlenmiştir(248). Embriyonun 9. gününde, özellikle maternal-embriyonik geçiş bölgesinde diğer konvertazlar eksprese edilmezken, PC6 eksprese edilmektedir (18,19). Bizim çalışmamızda kontrol ve missed grubunun PC6 monoklonal antikor ile boyanmış desidualarının immunohistokimyasal incelemelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Buna karşılık desidual bölge (kontrol; $136,00 \pm 4,56$ ve missed; $144,16 \pm 13,57$) ile non desidual bölge (kontrol; $23,66 \pm 5,50$ ve missed; $35,33 \pm 4,80$) arasında anlamlı bir fark gözlemlendi, bu da PC6'nın normal desidualizasyonda olduğu kadar missed abortus desidualizasyonunda da rol oynadığını düşündürdü. Okada ve arkadaşları PC6'nın desidualizasyonda önemli olduğunu ve eksiliğinde desidualizasyonun gözlenmediğini bildirmişlerdir (268) PC6; siklus ve gebeliğin birinci trimesteri boyunca stromal ve glandular kompartmanlarda eksprese edilir. Endometriyumun implantasyon için hazırlanmasında PC6 önemli role sahiptir (248). PC5/6 mRNA ekspresyonunun birçok endokrin ve non-endokrin dokuda gözlemlendiğini, ancak implantasyon bölgesinde ekspresyonun daha fazla olduğunu buna karşılık gebe olmayan uterusunda ve implantasyon öncesi erken gebelik döneminde de düşük seviyede eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Farelerde 4.5-5.5 günlerde PC6 geninin dramatik olarak arttığı ve uterustaki ilk morfolojik değişikliklerden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. PC5/6 ekspresyonunun özellikle desidual hücrelerin etrafında ve antimezometriyal tarafta olduğu, PC5/6 inhibe olduğu takdirde implantasyonun gerçekleşmediği (269) rapor edilmiştir.

Desidualizasyon sırasında IGF, VEGF, EGF, TGF- β , nöromodulatörler, renin/anjyotensin ailesi, integrinler, matris proteinazları eksprese olmaktadır. Bu moleküllerin inaktif formda salınmakta olduğu ve daha sonra proteolitik enzimler aracılığı ile aktif forma geçtikleri bilinmektedir (268). Desidualizasyonda rol oynayan diğer bir faktör de progesteron reseptörüdür. Okada ve arkadaşları yaptıkları çalışmada desidual embriyonik kök hücreleri PC6 ile muamele ettiklerinde progesteron reseptörünün arttığını rapor etmişler ve PC6'nın; proteolitik fonksiyonlarını göz önüne alarak desidualizasyonda rol oynayan EGF ve aktivin A'nın aktive edilmesinde rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (268). Nie ve arkadaşları 2008 yılında

yaptıkları bir çalışmada desidual hücreleri iki boyutlu jel elektroforezi yaparak incelediklerinde PC6'nın kaldezmon, tropomiyozin-2 ve tropomiyozin-4 proteinlerinin klavajına neden olarak aktif formuna dönüşmesinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Kaldezmon ve tropomiyozin yapısal bir protein olup aktin filaman reorganizasyonunda rol oynamaktadır. PC6'nın aynı zamanda desidual hücrelerde yapısal remodelinge de neden olduğunu bildirmişlerdir (270). Bu nedenle yaptığımız çalışmada, literatürle uyumlu olarak, PC6 immunoreaktivitesinin desidual alanlarda, non-desidual alanlara kıyasla fazla olması PC6'nın desidualizasyonda önemli rol oynadığını düşündürdü.

PC6'nın normal gebelikteki rollerini araştıran çalışmalar olmasına rağmen missed abortus vakalarında etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada missed abortus grubunda, normal gebeliklere benzer ekspresyon gözlenmesi, aralarında istatistiksel farkın olmaması PC6'nın her iki grup desiduasında benzer miktarda salgılandığını ve benzer fonksiyonlar gösterdiğini düşündürdü. Ayrıca PC6'nın, desidualizasyonda rol oynayan diğer moleküllerle birlikte, missed abortus vakalarında desidualizasyonun gerçekleşmesini sağladığı ve bu nedenle fetal yaşam sona ermesine rağmen fetüsün atılmasına engel olarak gebeliğin devam etmesinde rol oynadığı düşünüldü.

Kontrol grubu plasentasında PC6 ekspresyonunun sinsityotrofoblastlarda ($118,33 \pm 7,52$) sitotrofoblastlara ($75,00 \pm 6,06$) kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu da PC6'nın plasentasyonda, özellikle sinsityotrofoblast proliferasyonu ve invazyonunda rol oynuyor olabileceğini düşündürdü. Tsuji ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada insan ve rat plasentadaki birçok biyoaktif proteinin (büyüme faktörleri, adhezyon faktörleri ve peptid hormonlar), PC6 aktivitesi ile düzenleniyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir (271).

Bizim çalışmamızda missed abortus ($268,17 \pm 9,43$) vakalarının sinsityotrofoblastlarındaki PC6 ekspresyonu, kontrol grubuna ($118,33 \pm 7,52$) kıyasla oldukça fazla gözlemlendi. E. Dimitriadis ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada PC6'nın adezyon moleküllerini ve hücre yüzey proteinlerini düzenleyerek epitelyal etkileşimde görev aldığını ve böylece embriyonun tutunmasında ve implantasyonda rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca PC6'nın desidual hücreler tarafından üretilen diğer kemokinler (CX3CL1, CCL14) ve sitokinler (LIF, IL-11) ile birlikte trofoektoderm invazyonunun ve desidua ile plaseenta arasındaki lökosit trafiğinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir (272). Yaptığımız bu çalışmada missed abortus grubuna ait sinsityotrofoblastlarda ekspresyonun

yüksek olması, PC6'nın, plasentanın ayrılmamasında ve gebeliğin devam etmesinde etkili olabileceğini düşündürdü.

Temel olarak germinal hücreler, pakiten spermatositler ve sferik spermatidlerde bulunan PC4, testis ve ovaryan hücrelerde bulunması dolayısıyla diğer konvertazlardan ayrılır ve üreme biyolojisinde önemli rol oynar (273), Bizim çalışmamızda her iki gruba ait desidua örneklerinde (kontrol; $67,66 \pm 5,68$ ve missed; $121,50 \pm 11,89$) non-desidua örneklerine (kontrol; $12,00 \pm 1,89$ ve missed; $14,00 \pm 4,77$) kıyasla yüksek PC4 ekspresyonu gözlemlendi. PC4'ün enzimatik özellikleri ve fizyolojik substratları hakkında ayrıntılı bilgi mevcut değildir. (273). Ancak pro-IGF prekürsörlerinden hem IGF-I'in hem de IGF-II'nin PC4 için potansiyel substratlar olduğu ileri sürülmüştür (273). IGF-I ve IGF-II ekspresyonunun, insan endometriyumunun siklik büyüme ve farklanmasında önemli rol oynadığı (274), otokrin ya da parakrin aracılı olarak proliferasyonu düzenlediği gösterilmiştir. (275). Yaptığımız çalışmada PC4 ile IGF-I ekspresyonu arasında korelasyona rastlanmadı. Bu da PC4'ün; IGF-I'den ziyade IGF-II'yi aktif formuna çevirerek desidualizasyonda rol oynadığını düşündürdü.

Bizim çalışmamızda yapılan immunohistokimyasal incelemede missed abortus grubuna ait desidua örneklerinin ($121,50 \pm 11,89$) PC4 immunoreaktivitesinin, kontrol grubuna ($67,66 \pm 5,68$) kıyasla artmış olduğu gözlemlendi. Bu da PC4'ün, IGF-II ve henüz belirlenmemiş diğer substratlar üzerinden, missed abortusta fetal yaşamın sona ermesine rağmen gebeliğin devam etmesinde rol oynuyor olabileceğini düşündürdü.

Yaptığımız immunohistokimyasal değerlendirmelerde PC4'ün plasentada, özellikle sinsiyo trofoblastlarda (kontrol; $48,83 \pm 5,74$ ve missed; $281,83 \pm 23,28$) eksprese olduğu gözlemlendi ve PC4'ün plasentasyonda rol oynayabileceği düşünüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda PC4'ün plasentada ve invaziv ekstrasvillöz trofoblastlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (276). Bu çalışmada PC4 ekspresyonunun sinsiyo trofoblastlarda yüksek bulunması, diğer birçok proprotein konvertaz gibi PC4'ün de ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin proliferasyon ve invazyonunda rol oynadığını dolayısıyla normal plasentasyon için gerekli bir molekül olduğunu düşündürdü.

Yaptığımız çalışmada missed abortus grubuna ait sinsiyo trofoblast örneklerinde PC4 immunoreaktivitesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi. Bu da desidudadakine benzer şekilde PC4 immunoreaktivitesinin artışının IGF-II ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. IGF-II fetoplantal büyümede önemli rol oynar ve PC4; IGF-II'nin pro-IGF-II formundan aktif

ara formu olan IGF-II'nin oluşmasını, sonrasında da matür IGF-II'nin oluşmasını (277) sağlar. IGF-II, fetüs ve plasentada eksprese edilmektedir (278). Yapılan çalışmalar IGF-II'nin, ekstrasvillöz trofoblast migrasyon-invazyonunu stimüle ederek (279) fetoplasental büyümeyi düzenlediğini (278,280) ve gelişim boyunca plasentadaki alışverişini kolaylaştırdığını (276) göstermektedir. Qing Qiu ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada IGF-II'nin proformundan aktif forma geçmesi için, gebelikle bağlantılı olarak PC4 seviyesinin arttığını ve bu şekilde fetoplasental büyümeyi destekliyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir (276).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda PC4'ün dişi farelerde, ovaryumdaki makrofaj-benzeri hücrelerde eksprese edildiği ve seviyelerinin, inflamasyonda olduğu gibi, aktif makrofajlar tarafından baskılandığı bildirilmiştir (18). Missed abortus grubuna ait desidua ve sinsityotrofoblastlarda PC4 ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla artmış olmasından yola çıkarak, missed abortusta gebeliğin sonlanmasına sebep olabilecek inflamasyonun baskılandığı dolayısıyla gebeliğin devam ettiği fikri ileri sürülebilir.

Birçok proprotein konvertazın fizyolojik fonksiyonları bilinmesine rağmen, bu ailenin 7. ve en çok korunmuş olan üyesi PC7'nin temel fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (281). Bizim çalışmamızda PC7 immunoreaktivitesinin kontrol ve missed grubuna ait hem desidua (kontrol; $29,50 \pm 2,88$ ve missed; $31,66 \pm 5,31$) hem de non-desidua (kontrol; $18,33 \pm 2,33$ ve missed; $13,16 \pm 2,40$) alanlarda çok zayıf olarak eksprese edildiği gözlemlendi ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. PC7'nin her iki gruptaki zayıf ekspresyonu PC7'nin yapısal olarak eksprese olduğu ve bulunan değerlerin bazal değerler olduğu düşünüldü. PC7'nin endometriyumun normal siklik değişiklikleri sırasında eksprese olduğu, ancak in vitro ESC ile çalışmalarda PC7 mRNA'sında desiduaizasyon sırasında artış olmadığı gösterilmiştir ve PC7'nin stromal ve glandular kompartmanda siklus sırasında ve ilk trimerlerde bulunmasının yapısal ekspresyon olduğu bildirilmiştir (248). Stromadaki PC7'nin ekspresyonunun desiduaizasyondan bağımsız olduğu fare deneylerinde de gösterilmiştir (190).

PC7'nin her iki gruptaki düşük düzeydeki ekspresyonu PC7'nin genel hücresel mekanizmaları düzenleme fonksiyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir. Normal gebe ve missed abortus grubu arasında PC7'nin immunoreaktivitesinin değişiklik göstermemesi, her iki grupta PC7'nin düzenlediği benzer immunolojik mekanizmaların çalıştığının bir göstergesi olarak değerlendirildi. Leonhardt RM ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada PC7'nin MHC class I proteinlerin stabil olmayan formlarının düzeltilmesi için gerekli

olduğunu ve MHC-I'in aracılık ettiği antijen presentasyonu için önemli rol oynadığını rapor etmiştir (282). MHC-I proteinlerinin özellikle HLA-G nin immunomodulator etkisi gebeliğin devamı için gereklidir. HLA-G eksikliğinin hem normal hemde invitro fertilizasyon sırasında gebelik riskini azalttığı bildirilmiştir (283). 2012 yılında yapılan bir çalışmada da HLA-G polimorfizmi ve HLA-G protein seviyesindeki değişikliklerin tekrarlayan düşüklerde neden olduğu rapor edilmiştir (284).

Kontrol grubuna ait plasenta örneklerinin PC7 ekspresyonuna bakıldığında ise sitotrofoblast (kontrol; $26,83 \pm 5,19$ ve missed; $12,83 \pm 2,56$) ve sinsityotrofoblastlarda (kontrol; $26,50 \pm 3,93$ ve missed; $10,83 \pm 1,32$) zayıf immunoreaktivite olduğu ve missed abortus grubuna kıyasla hem sitotrofoblastlar hem de sinsityotrofoblastlarda ekspresyonun çok hafif arttığı gözlemlendi. PC7 yapısal bir PC'dir ve bir çok fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Trofoblastik hücrelerin implantasyonu tetiklediği plasenta için gerekli hormonları salgıladığı ve embriyoyu immun sistemden koruduğu bilinmektedir(285).

PC7'nin plasentadaki görevleri tam olarak bilinmemektedir. Koide S ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan plasentası ile plasental koryokarsinoma hücre hattında düşük oksijen konsantrasyonlarında PC7'de artışının olmadığını göstermiş olması plasental PC7'nin yapısal olarak sentezlendiğinin bir belirtisi olarak değerlendirildi. PC7, pro-EGF prosesini indükler ve EGF'in membran-bağımlı EGFR'ne bağlanır, böylece hücrenin hayatta kalması, farklılaşması ve çoğalmasını indüklediği de bilinmektedir. PC7'nin EGF üzerine etkileri göz önüne alındığında, PC7'nin trofoblastik hücrelerin hayatta kalması çoğalması ve farklılaşmasında rol oynadığı ileri sürülebilir (286).

PC7'nin embriyo gelişimi ve implantasyon üzerine de EGF üzerinden etkisi olabilir. EGF ve TGF- α preimplantasyon fare embriyolarında protein sentezini uyarırlar. EGF reseptörlerinin yokluğunda ise iç hücre kitlesi implantasyon döneminde dejenere olur. Yapılan birçok çalışmada EGF reseptörü hasarının implantasyonda başarısızlığa sebep olduğu gösterilmiştir(287). Murin blastokistlerde eksprese edilen EGF reseptörü; EGF, TGF- α ve heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörüne bağlanır. Yaptığımız çalışmada PC7 ekspresyonunun kontrol grubu plasentasında yüksek olması, PC7'nin EGF üzerinden plasantasyonda ve gebeliğin devamında rol oynayabileceğini düşündürdü.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda; missed abortus ve istemli gebelik evokasyonu yapılan olguların endometriyum ve plasenta doku örneklerinde; TNF- α , TGF- β 2, IGF-I, POMC, FOXO3A, PC4, PC6, PC7 ve FURİN dağılımları immunohistokimyasal yöntem ile karşılaştırıldı.

TNF- α immunoreaktivitesi; kontrol grubu desiduasında H-skor değerleri $216,66 \pm 11,69$ olarak bulundu ve bu değer in spontan abortusa neden olmadığı göz önüne alındığında bazal TNF- α ekspresyonu olarak değerlendirildi. TNF- α immunoreaktivitesinin missed abortus grubunda ($128,33 \pm 11,69$), kontrol grubu desiduasında gözlenen immünoreaktiviteden bile az olması ise, abortusu tetikleyen mekanizmaların harekete geçmesini engellediğini ve böylece missed abortus vakalarında tahliyenin gerçekleşmesini engelleyici rol oynadığını düşündürdü.

TNF- α ile boyanmış preparatların plasenta örneklerinin incelenmesinde sinsityotrofoblastlardaki immunoreaktivitenin oldukça belirgin olduğu, ayrıca missed grubuna ait doku örneklerinin sinsityotrofoblast immunoreaktivitesinin kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi. Hem kontrol hem de missed grubu sinsityotrofoblastların yüksek düzeyde TNF- α ekspresyonu etmesi trofoblast fonksiyonlarının devam ettiğinin bir belirtisi olarak değerlendirildi. Missed grubunda bu hücrelerin immunoreaktivitesinin daha fazla olması embriyonun atılımının engellenmesinde rolü olabileceğini düşündürdü.

TGF- β 2 immunoreaktivitesinin hem kontrol grubu ($266,00 \pm 8,60$), hem de missed abortus grubu ($158,33 \pm 6,05$) desidualarında, her iki grubun non-desidual alanlarına (sırasıyla; $38,16 \pm 8,63$; $37,00 \pm 8,48$) göre daha fazla bulunduğu gözlemlendi ve desidualizasyonda, gebeliğ in devam etmesinde rol oynadığı ve missed abortus vakalarında henüz dokuda dejenerasyon gözlenmemesi nedeni ile TGF- β immunorektivitesi artışı olmadığı düşünüldü.

Kontrol grubu sito ve sinsityotrofoblastlarında oldukça düşük düzeyde TGF- β 2 immunoreaktivitesi gözlemlendi (sırasıyla; $10,33 \pm 1,63$; $51,66 \pm 3,61$). Missed abortus grubunda sinsityotrofoblastlarda ($240,00 \pm 13,75$) belirgin bir artış gözlenirken sitotrofoblastlar ($24,66 \pm 2,33$) arasındaki fark daha az gözlemlendi. Missed abortus vakalarındaki TGF- β 2 artışı, düşüğün gerçekleşmemesini ve embriyonun tahliyesini engellediğini düşündürdü.

POMC immunoreaktivitesi her iki gruba ait desidual alandaki hücrelerdeki (kontrol; $211,83 \pm 15,03$ ve missed; $290,83 \pm 41,03$) oldukça yoğun bulundu. Bu da POMC'nin miyometriyal kontraksiyonu inhibe ederek düşüğün gerçekleşmesini engellediğini

düşündürdü. Ayrıca POMC immunoreaktivitesinin, her iki gruba ait desidual alanda, nondesidual (kontrol; $12,33 \pm 1,63$ ve missed; $34,50 \pm 9,66$) alanlara göre daha fazla bulunduğu gözlemlendi ve uterin büyüme ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Hem kontrol hem de missed abortus grubu desidualarında oldukça yüksek düzeyde POMC ekspresyonu gözlenmesi, missed abortus grubunda desidual hücrelerin sayısının daha fazla olmasının yanı sıra POMC ekspresyonunun daha fazla bulunması POMC'nin desidualizasyon üzerine etkisinin de olabileceğini düşündürdü.

POMC'nin missed abortus plasentasında; hem sitotrofoblastlarda ($196,16 \pm 5,34$) hem de sinsityotrofoblastlarda ($322,66 \pm 7,00$) kontrol grubuna (sırasıyla; $13,33 \pm 2,16$, $226,00 \pm 5,51$) göre daha fazla eksprese edildiği gözlemlendi ve hem gebeliğin devamlılığında, hem de missed abortusta fetüsün atımının engellenmesinde önemli rol oynadığı düşünüldü.

Her iki gruba ait doku örneklerinin incelenmesinde POMC ekspresyonunun, missed abortus grubu sinsityotrofoblastlarında ($322,66 \pm 7,00$) sitotrofoblastlara ($196,16 \pm 5,34$) göre daha fazla eksprese olduğu ve bu ekspresyonun steroidogenezis ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Yapılan immunohistokimyasal değerlendirmelerde IGF-I immunoreaktivitesinin desidual bölgede (kontrol; $42,83 \pm 5,03$ ve missed; $98,33 \pm 4,08$), non-desidual bölgeye (kontrol; $17,16 \pm 6,36$ ve missed; $19,16 \pm 5,41$) kıyasla daha yoğun olduğu tespit edildi. Bu da IGF-I'in desidualizasyonda önemli rol oynadığını düşündürdü. Missed abortus ve istemli düşük vakalarına ait desidual alanlar karşılaştırıldığında ise, missed abortus grubuna ait örneklerin IGF-I ile daha fazla boyandığı gözlemlendi, bu da missed abortusta fetüsün ölmesine rağmen gebeliğin sonlanmamasında IGF-I'in rolü olabileceğini düşündürdü.

Sinsityotrofoblastlardaki IGF-I immunoreaktivitesinin, sitotrofoblast hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu, stromal hücrelerde ise sitotrofoblastakine benzer ölçüde olduğu gözlemlendi. Elde edilen immunohistokimyasal değerlere göre sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerine ait immunoreaktivitenin missed abortus grubunda arttığı gözlemlendi. Bu artış missed abortus grubunda plasental hücrelerin uterusu, kontrol grubuna kıyasla IGF-I'in etkisiyle çok daha fazla invajine olduğunu ve fetüsün gebelik devam ediyormuş gibi vücuttan atılmadan kalmasında IGF-I'in rol oynayabileceğini düşündürdü.

FOXO3A immünoaktivitesi desidual alanlarda (kontrol; $133,33 \pm 17,43$ ve missed; $255,83 \pm 12,41$) nondesidual alanlara (kontrol; $30,33 \pm 4,32$ ve missed; $39,66 \pm 14,30$) göre artmış olarak gözlemlendi ve gebeliğin devamlılığında rol oynayabileceği düşünüldü.

Missed abortus vakalarında FOXO3A immünoaktivitesinin artmış olması desidualizasyondan çok, hücrelerin hafif oksidatif strese olan direnç artışını sağlamasına yönelik olabileceğini düşündürdü. Missed abortus vakalarında embriyonun yaşamsal özelliklerini kaybetmiş olmasına rağmen henüz tam bir inflamasyon gelişmemesi nedeni ile embriyo atılımı gerçekleşmemektedir. Bu sırada düşük düzeydeki oksidatif stresin, FOXO3'ün hücrelerin sağ kalımına olan etkisini arttırmasına bağlı olarak hücreler yaşamaya devam ediyor ve embriyo atılımı engelleniyor olabilir.

Kontrol ve missed abortus grubuna ait plasenta örneklerinin incelenmesinde FOXO3A immünoaktivitesinin her iki grupta da oldukça düşük olduğu ancak missed abortus grubunda hafif artış gösterdiği gözlemlendi. FOXO3A'nın sinsityotrofoblastlardaki ekspresyonunun apoptozisi engelleyerek gebeliğin devamlılığında rol oynayabileceği düşünüldü.

Kontrol grubu desidua örneklerinin furin monoklonal antikoru ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, furin ekspresyonunun özellikle desidual hücreler ($131,16 \pm 3,54$) olmak üzere desidua bazalis stromasında yaygın olarak bulunduğu gözlemlendi. Furin ekspresyonunun artmış olmasının, desidualizasyon patogenezinde rol oynayan TGF- β artışına neden olarak desidualizasyonun gerçekleşmesinde rol oynayabileceği düşünüldü.

Missed abortus grubu desidua örneklerinin immunohistokimyasal tekniklerle incelenmesinde, furin ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi (kontrol; $131,16 \pm 3,54$ ve missed; $227,50 \pm 11,72$). Furin ekspresyonunun missed abortus grubu desiduasında artmış olması, missed abortus patogenezinde furinin rolü olabileceğini düşündürdü.

Bu çalışmada; furinin kontrol grubu plasentasında; özellikle sinsityotrofoblastlarda ($81,50 \pm 4,08$) eksprese edildiği tespit edildi. Bu da furinin, gebeliğin devamlılığında trofoblast fonksiyonlarında rol oynayabileceğini düşündürdü. Furin ekspresyonunun missed abortus grubuna ait sinsityotrofoblastlarda ($322,67 \pm 3,26$), kontrol grubuna ($81,50 \pm 4,08$) kıyasla oldukça artmış olduğu gözlemlendi ve furinin; muhtemelen MT1-MMP ile birlikte invazyon üzerine etki ederek missed abortus grubunda plasentanın ayrılmamasını ve gebeliğin devam etmesini sağlıyor olabileceği düşünüldü. Ayrıca missed abortusta furin ekspresyonunun fazla

olmasının, kan damarlarının gelişimini ve hücre invazyonlarının devamını sağlayarak embriyo tahliyesinin engellenmesine etki yaptığı da ileri sürülebilir.

Kontrol ve missed grubunun PC6 monoklonal antikor ile boyanmış desidualarının immunohistokimyasal incelemelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Buna karşılık desidual bölge (kontrol; $136,00 \pm 4,56$ ve missed; $144,16 \pm 13,57$) ile non desidual bölge (kontrol; $23,66 \pm 5,50$ ve missed; $35,33 \pm 4,80$) arasında anlamlı bir fark gözlemlendi, bu da PC6'nın normal desidualizasyonda olduğu kadar missed abortus desidualizasyonunda da rol oynadığını düşündürdü.

Bu çalışmada missed abortus grubunda, normal gebeliklere benzer ekspresyon gözlenmesi, aralarında istatistiksel farkın olmaması PC6'nın her iki grup desiduasında benzer miktarda salgılandığını ve benzer fonksiyonlar gösterdiğini düşündürdü. Ayrıca PC6'nın, desidualizasyonda rol oynayan diğer moleküllerle birlikte, missed abortus vakalarında desidualizasyonun gerçekleşmesini sağladığı ve bu nedenle fetal yaşam sona ermesine rağmen fetüsün atılmasına engel olarak gebeliğin devam etmesinde rol oynadığı düşünüldü.

Kontrol grubu plasentasında PC6 ekspresyonunun sinsityotrofoblastlarda ($118,33 \pm 7,52$) sitotrofoblastlara ($75,00 \pm 6,06$) kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu da PC6'nın plasentasyonda, özellikle sinsityotrofoblast proliferasyonu ve invazyonunda rol oynuyor olabileceğini düşündürdü.

Missed abortus ($268,17 \pm 9,43$) vakalarının sinsityotrofoblastlarındaki PC6 ekspresyonu, kontrol grubuna ($118,33 \pm 7,52$) kıyasla oldukça fazla gözlemlendi. Bu da PC6'nın, plasentanın ayrılmamasında ve gebeliğin devam etmesinde etkili olabileceğini düşündürdü.

PC4 immunoreaktivitesi; her iki gruba ait desidua örneklerinde (kontrol; $67,66 \pm 5,68$ ve missed; $121,50 \pm 11,89$) non-desidua örneklerine (kontrol; $12,00 \pm 1,89$ ve missed; $14,00 \pm 4,77$) kıyasla yüksek gözlemlendi. Yaptığımız çalışmada PC4 ile IGF-I ekspresyonu arasında korelasyona rastlanmadı. Bu da PC4'ün, IGF-II ve henüz belirlenmemiş diğer substratlar üzerinden, missed abortusta fetal yaşamın sona ermesine rağmen gebeliğin devam etmesinde rol oynuyor olabileceğini düşündürdü.

Yaptığımız immunohistokimyasal değerlendirmelerde PC4'ün plasentada, özellikle sinsityotrofoblastlarda (kontrol; $48,83 \pm 5,74$ ve missed; $281,83 \pm 23,28$) eksprese olduğu gözlemlendi ve PC4'ün plasentasyonda rol oynayabileceği düşünüldü. Bu çalışmada PC4

ekspresyonunun sinsityotrofoblastlarda yüksek bulunması, diğer birçok proprotein konvertaz gibi PC4'ün de ekstravillöz trofoblast hücrelerinin proliferasyon ve invazyonunda rol oynadığını dolayısıyla normal plasantasyon için gerekli bir molekül olduğunu düşündürdü.

Missed abortus grubuna ait sinsityotrofoblast örneklerinde PC4 immunoreaktivitesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi. Bu da desiduada benzer şekilde PC4 immunoreaktivitesinin artışının IGF-II ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

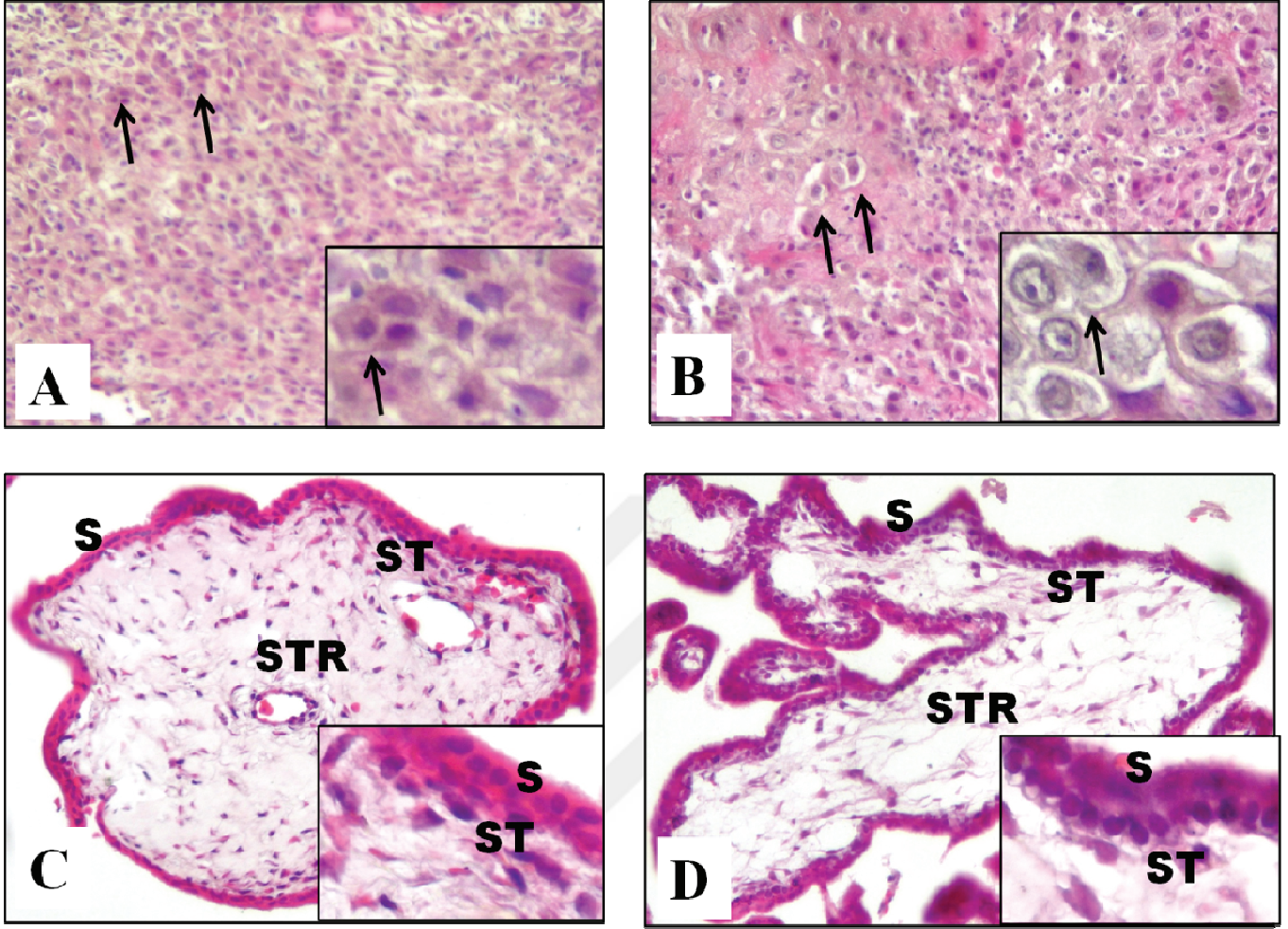
Missed abortus grubuna ait desidua ve sinsityotrofoblastlarda PC4 ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla artmış olmasından yola çıkarak, missed abortusta gebeliğin sonlanmasına sebep olabilecek inflamasyonun baskılandığı dolayısıyla gebeliğin devam ettiği fikri ileri sürülebilir.

Çalışmamızda PC7 immunoreaktivitesinin kontrol ve missed grubuna ait hem desidual (kontrol; $29,50 \pm 2,88$ ve missed; $31,66 \pm 5,31$) hem de non-desidual (kontrol; $18,33 \pm 2,33$ ve missed; $13,16 \pm 2,40$) alanlarda çok zayıf olarak eksprese edildiği gözlemlendi ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. PC7'nin her iki gruptaki zayıf ekspresyonu PC7'nin yapısal olarak eksprese olduğu ve bulunan değerlerin bazal değerler olduğu düşünüldü. PC7'nin her iki gruptaki düşük düzeydeki ekspresyonu PC7'nin genel hücresel mekanizmaları düzenleme fonksiyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir. Normal gebe ve missed abortus grubu arasında PC7'nin immunoreaktivitesinin değişiklik göstermemesi, her iki grupta PC7'nin düzenlediği benzer immunolojik mekanizmaların çalıştığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

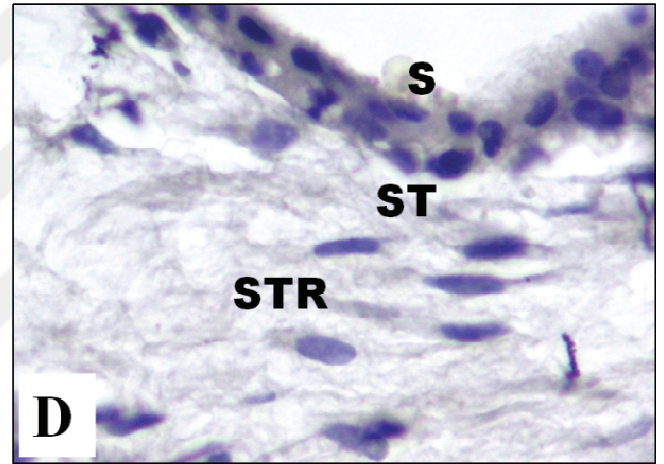
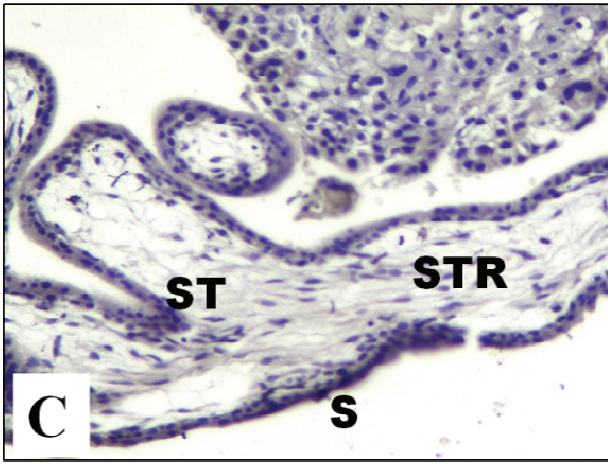
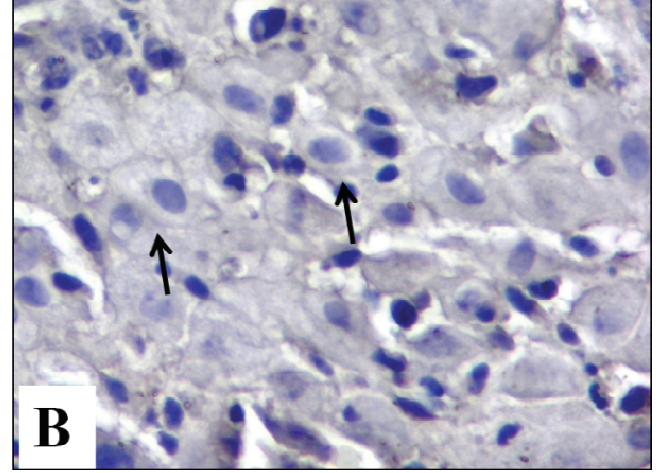
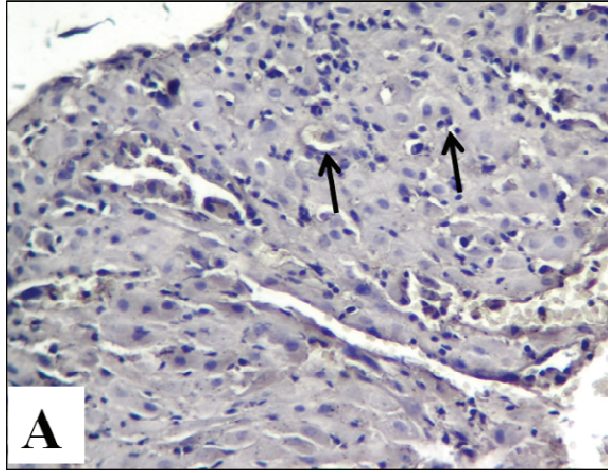
Kontrol grubuna ait plaseenta örneklerinin PC7 ekspresyonuna bakıldığında ise sitotrofoblast (kontrol; $26,83 \pm 5,19$ ve missed; $12,83 \pm 2,56$) ve sinsityotrofoblastlarda (kontrol; $26,50 \pm 3,93$ ve missed; $10,83 \pm 1,32$) zayıf immunoreaktivite olduğu ve missed abortus grubuna kıyasla hem sitotrofoblastlar hem de sinsityotrofoblastlarda ekspresyonun çok hafif arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, missed abortus olgularına ait desidua ve plaseenta örneklerinde hücre proliferasyonu, invazyonu, migrasyonu, farklılaşması ve sağ kalımında rol oynayan TNF- α , TGF- β , IGF-I, FOXO3A faktörlerinin artışı ve bu faktörlerin öncül formlarının posttranslasyonel modifikasyon yolu ile aktif formuna dönüşmesinde rol oynayan POMC, PC4, PC6 ve FURİN artışı ile paralellik göstermesi, bu faktörlerin fetal yaşam son bulduğu halde düşüğün gerçekleşmesini engellediğini düşündürdü.

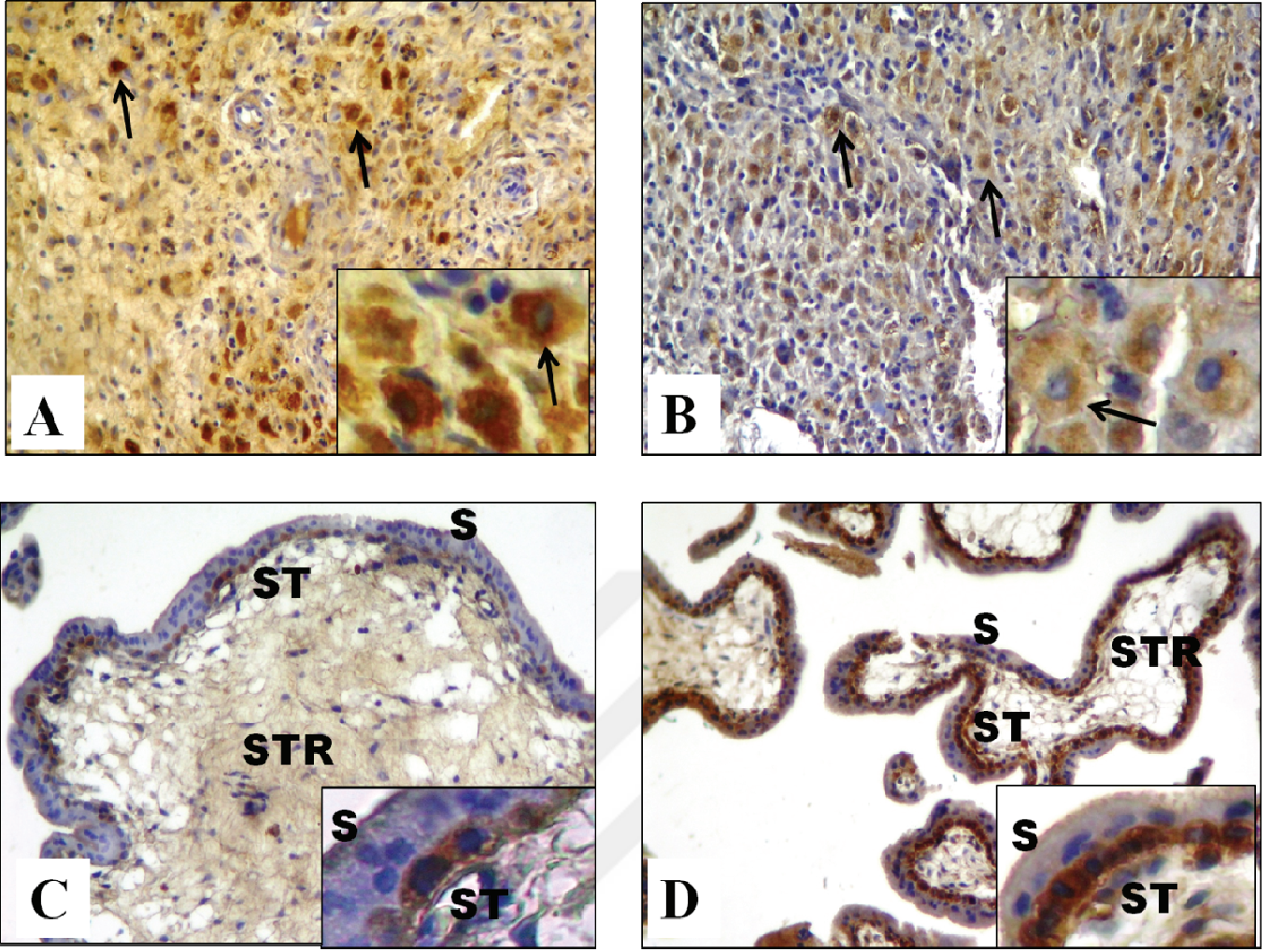
7. RESİMLER



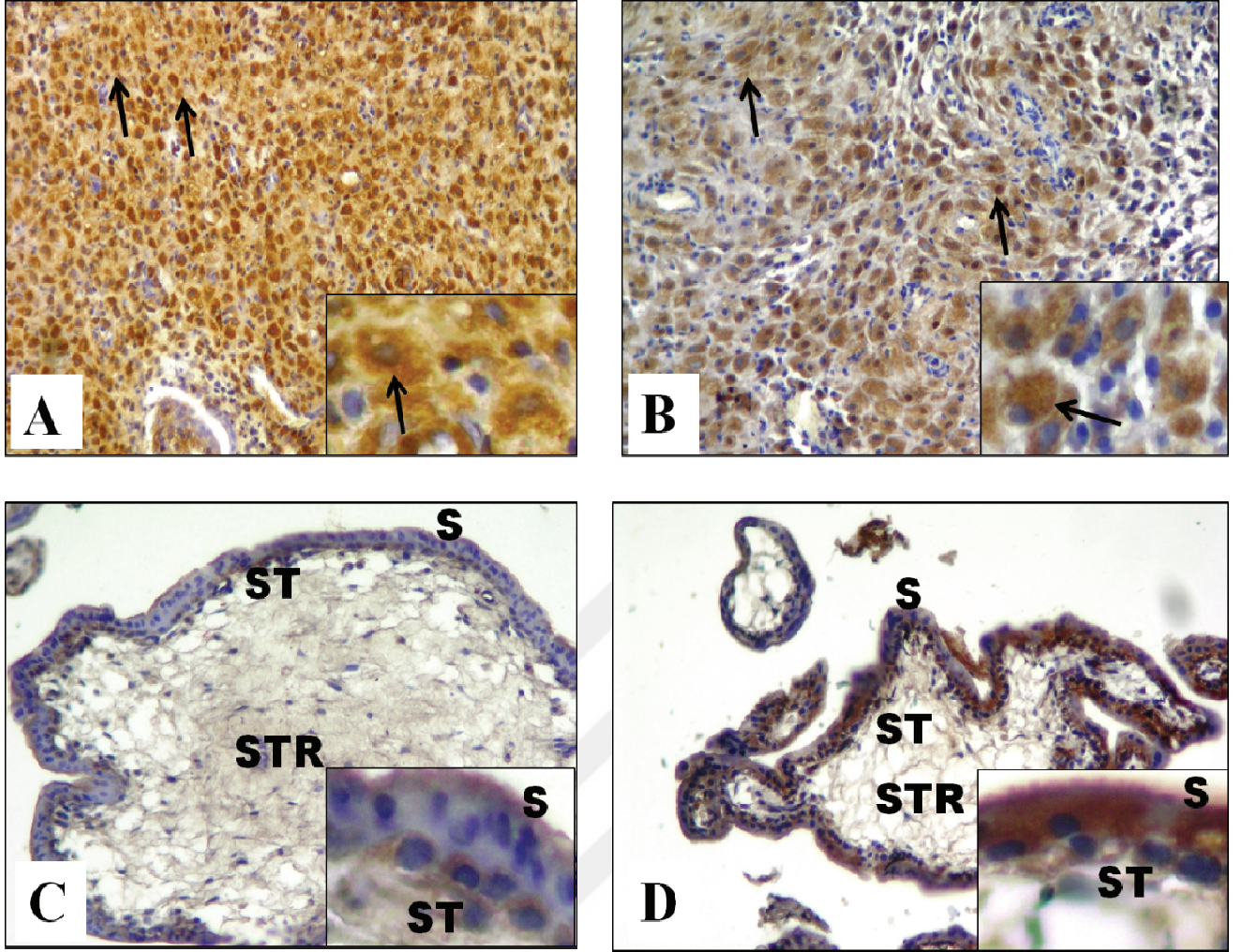
Resim 1: H.E ile yapılan boyamalarda missed abortus grubuna ait desidua örneklerinde (B), kontrol grubuna (A) kıyasla, desidua hücrelerin (ok) daha büyük, poligonal şekilli, vaküollü ve sayıca daha fazla olduğu gözlenmektedir. Her iki gruba ait plasenta örneklerinde (C,D) koryonik villusların merkezinde stromal (STR) hücreler ve çevresinde sitotrofoblastlar (ST) ve sinsityotrofoblastlar (S) görülmektedir (C,D); X200; insert, X400



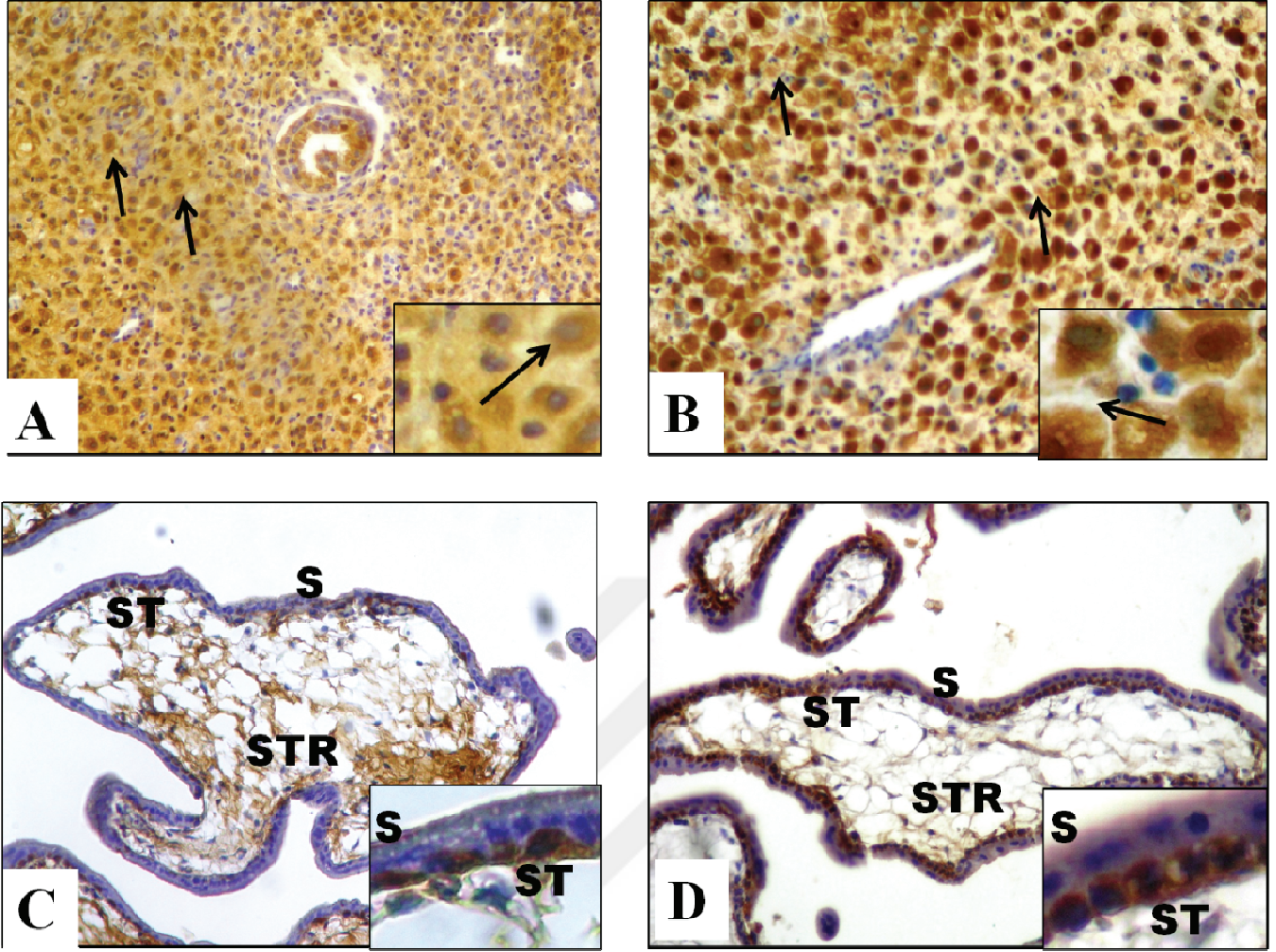
Resim 2: Desidua (A,B) ve plasenta (C,D) örneklerinin immunohistokimya-negatif kontrol boyamasına ait görüntüler. Yapılan immunohistokimyasal boyamalarda negatif kontrollerde spesifik boyanma gözlenmedi. Ok; desidual hücre, STR; plasenta stroma, ST; sitotrofoblast, S; sinsityotrofoblast, (A, C) X200, (B,D) X400



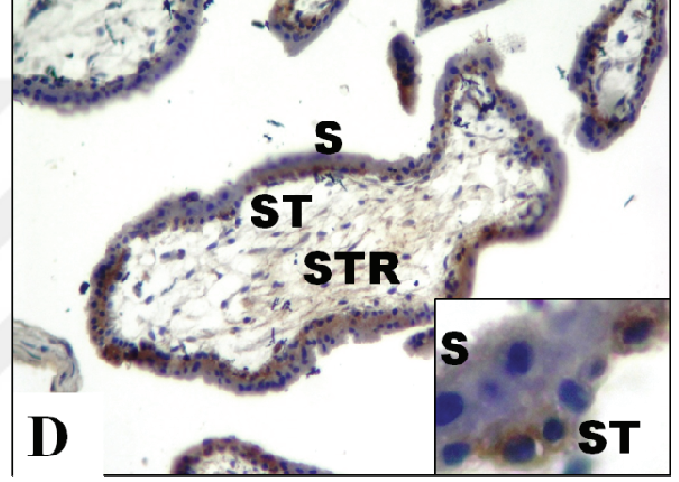
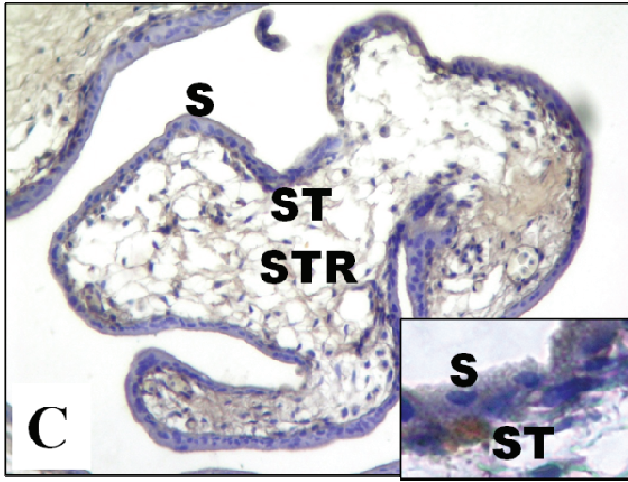
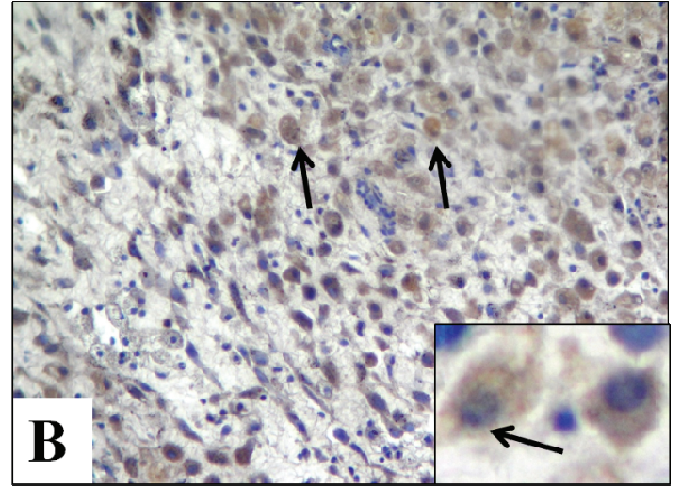
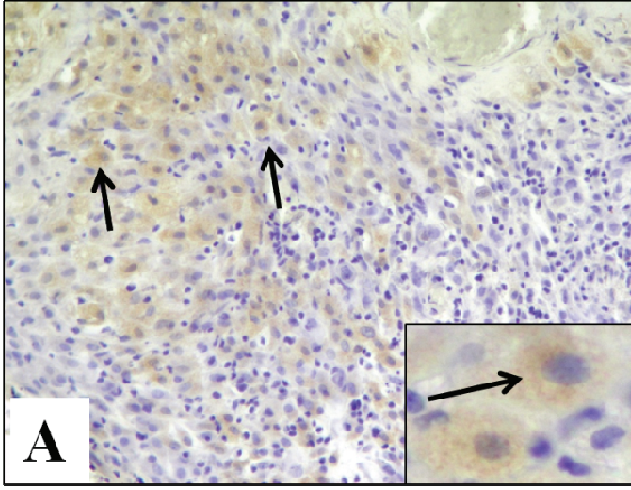
Resim 3: TNF- α monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, desidual hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) yoğun, missed-abortion (B) grubunda daha düşük yoğunlukta immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST) ve sinsityotrofoblastların (S), missed abortus grubu (D) sitotrofoblastlarına (ST) ve sinsityotrofoblastlarına (S) kıyasla daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



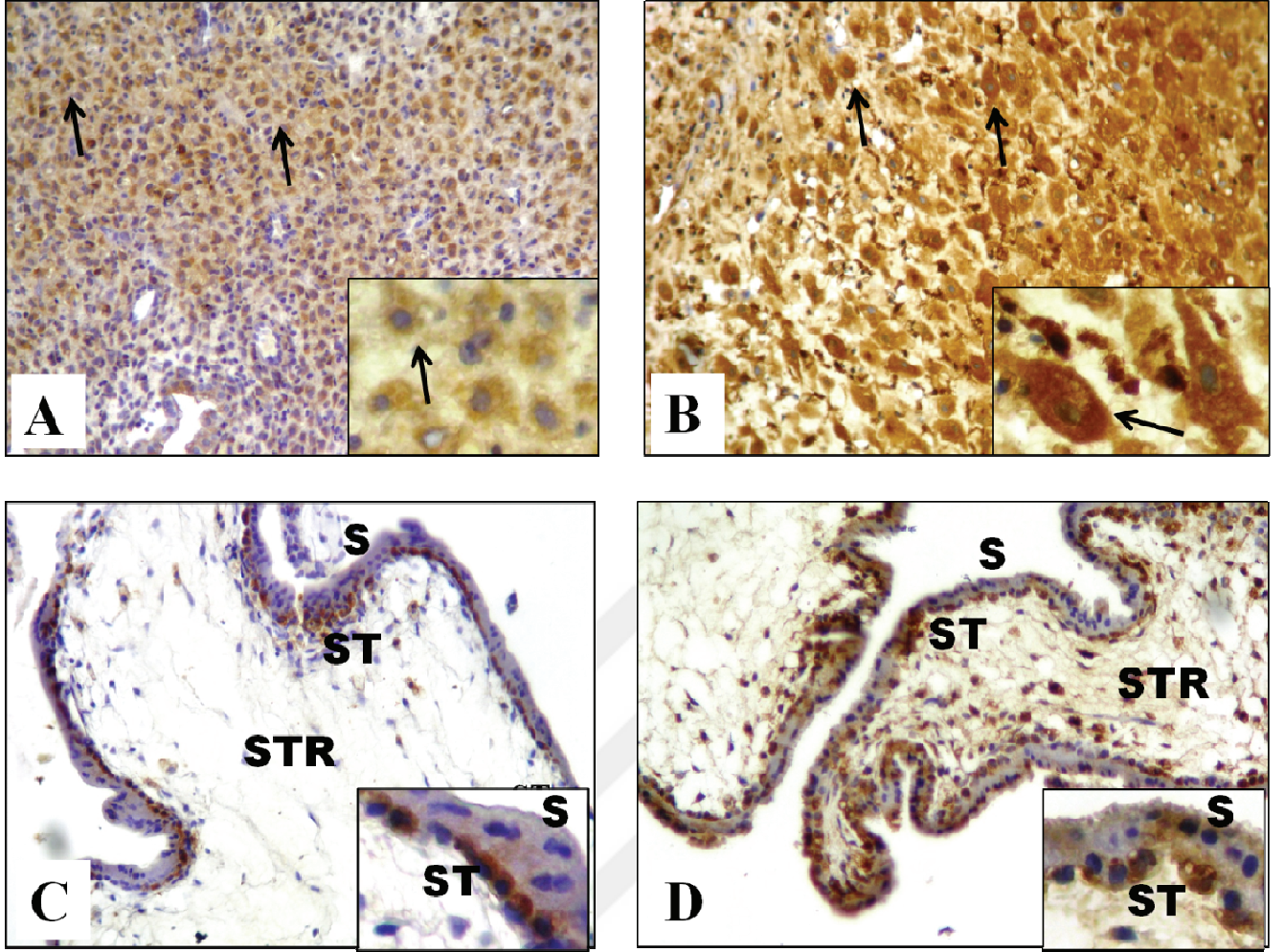
Resim 4: TGF- β 2 monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, desidual hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) yoğun, missed abortus grubunda (B) daha düşük yoğunlukta immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST) ve sinsityotrofoblastların (S), missed abortus grubu (D) sitotrofoblastlarına (ST) ve sinsityotorofoblastlarına (S) kıyasla daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



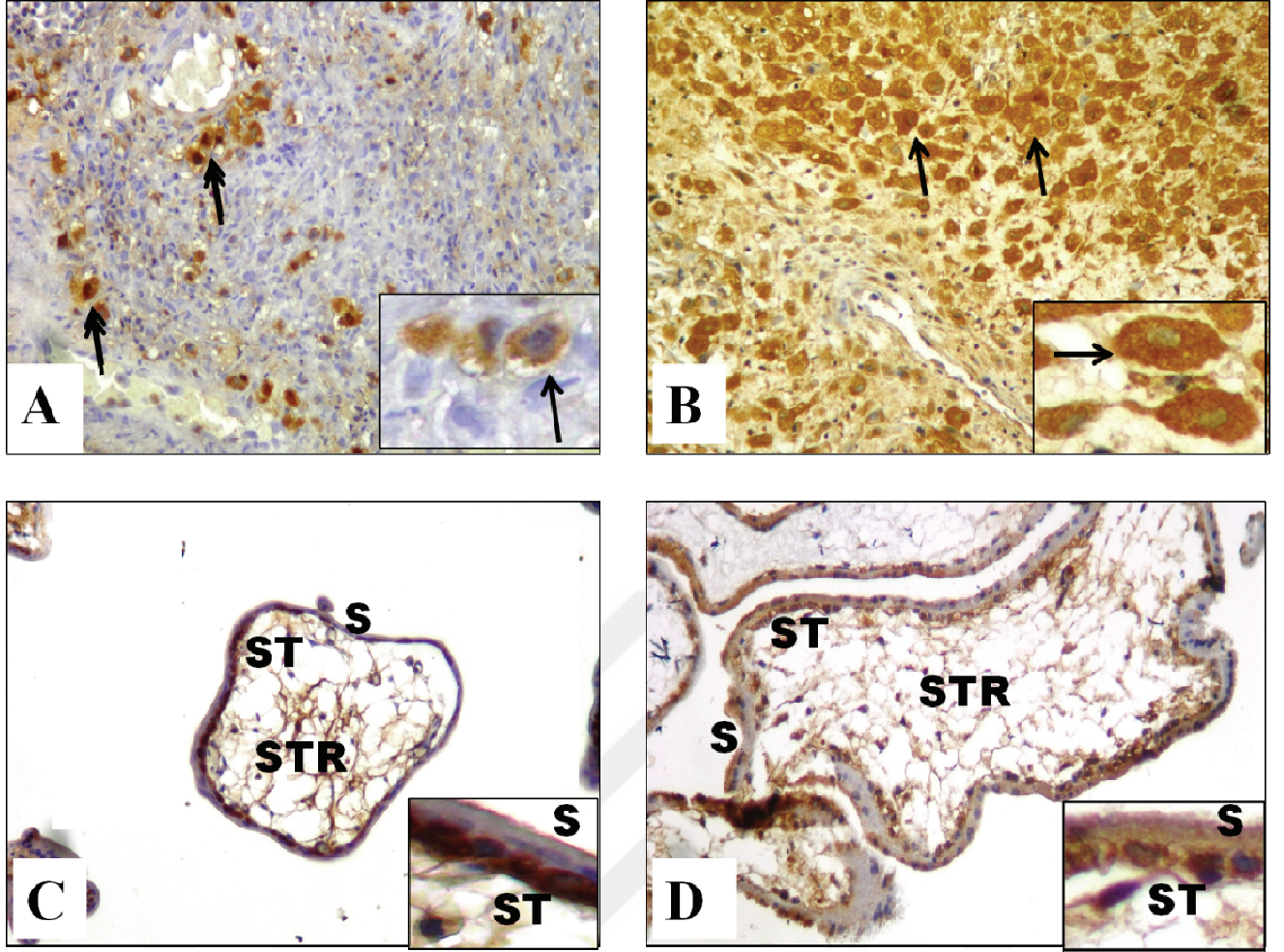
Resim 5: POMC monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, desidua hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) düşük, missed abortus grubunda (B) daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST) ve sinsityotrofoblastların (S), missed abortus grubu (D) sitotrofoblastlarına (ST) ve sinsityotorofoblastlarına (S) kıyasla daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



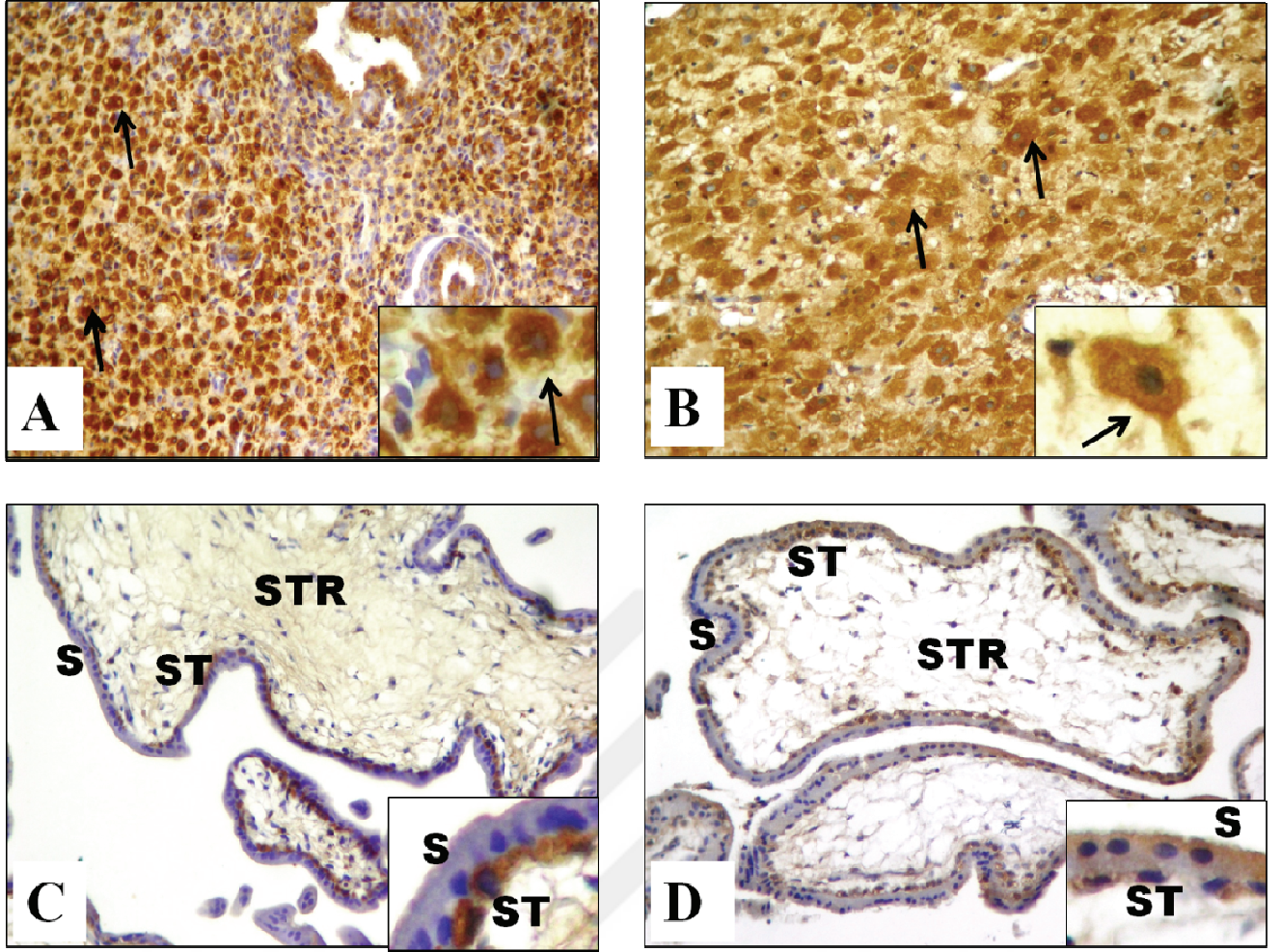
Resim 6: IGF-I monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, desidual hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) düşük, missed abortus grubunda (B) daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST) ve sinsiyo-trofoblastların (S), missed abortus grubu (D) sitotrofoblastlarına (ST) ve sinsiyo-trofoblastlarına (S) kıyasla daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



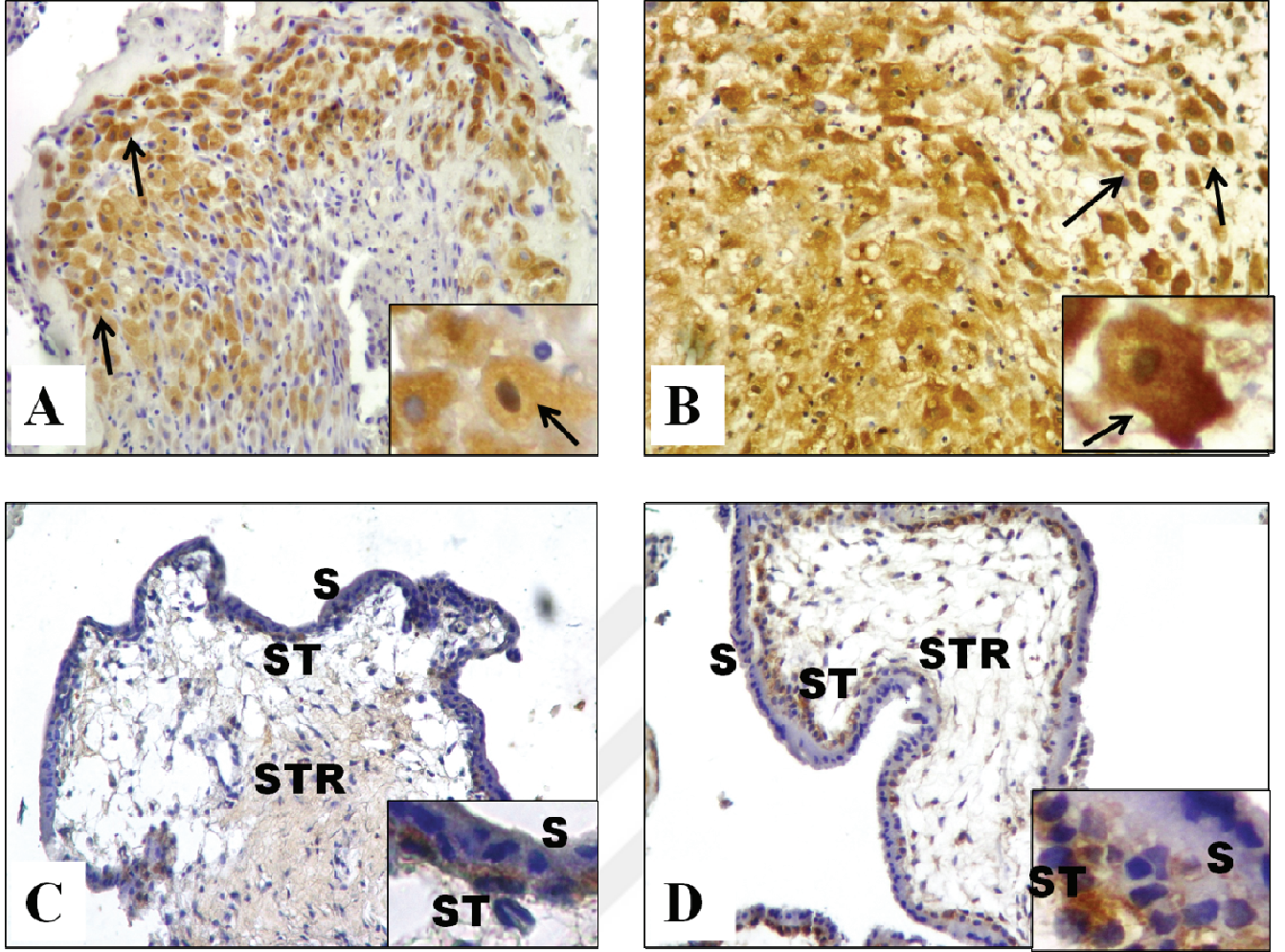
Resim 7: FOXO3A monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, desidual hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) düşük, missed abortus grubunda (B) daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST), missed abortus (D) grubu sitotrofoblastlara (ST) kıyasla daha yoğun immunoreaktivite gösterdiği, sinsityotrofoblastların (S) ise, kontrol grubunda (C) missed abortus grubundan (D) daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



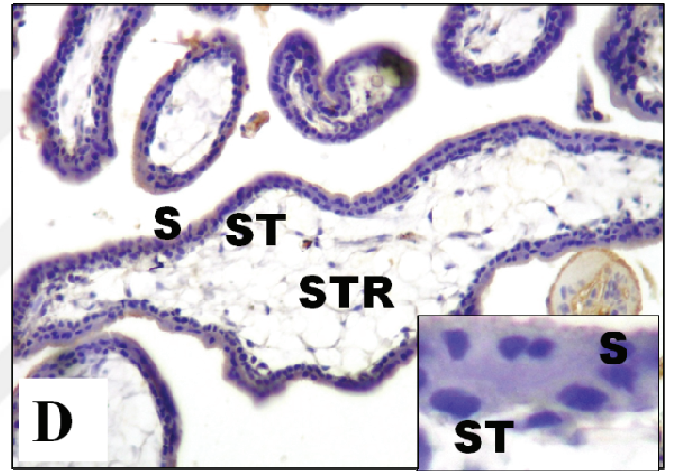
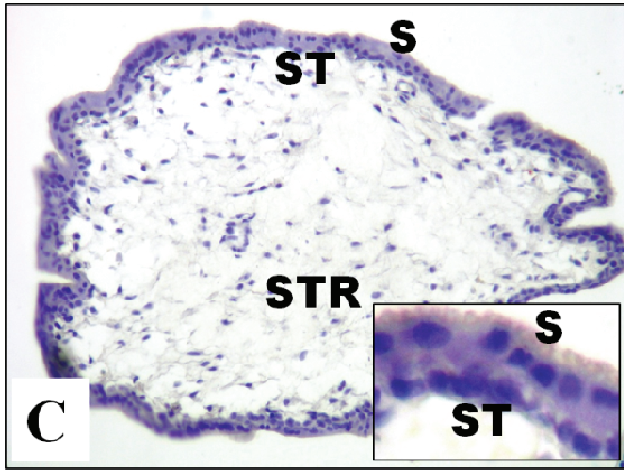
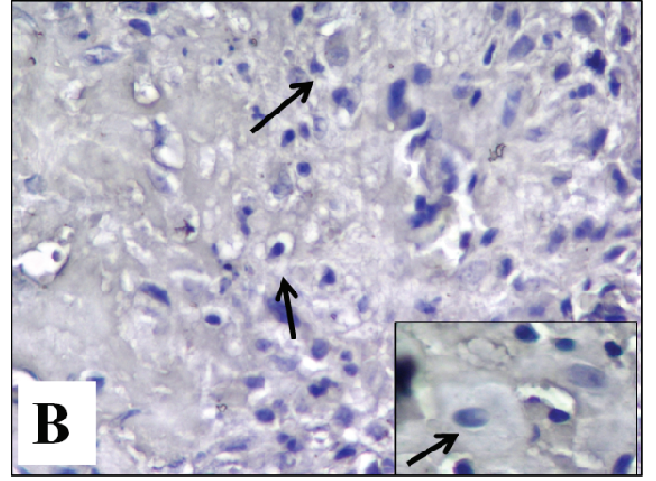
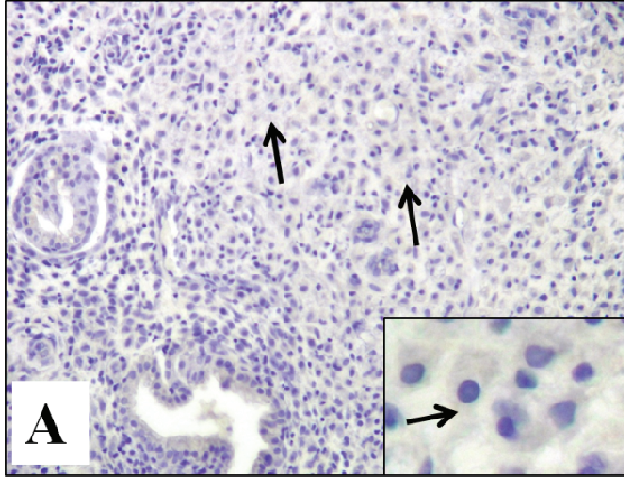
Resim 8: FURİN monoklonal antikoruna ile boyanmış örneklerde, desidual hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) düşük, missed abortus grubunda (B) daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) ve missed abortus grubunda (D) sitotrofoblastların (ST) benzer immunoreaktivite gösterdiği, sinsiyo trofoblastların (S) ise, kontrol grubunda (C) missed abortus grubundan (D) daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



Resim 9: PC6 monoklonal antikoruna boyanmış örneklerde, desidual hücrelerde (ok) hem kontrol grubunda (A) hem de missed abortus grubunda (B) yoğun immunoreaktivite görülmekte ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST), missed abortus grubu (D) sitotrofoblastlarına (ST) kıyasla daha yoğun immunoreaktivite gösterdiği, sinsityotrofoblastların (S) ise, kontrol grubunda (C) missed abortus grubundan (D) daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



Resim 10: PC4 monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, desidial hücrelerde (ok) kontrol grubunda (A) düşük, missed abortus grubunda (B) daha yoğun immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) ve missed abortus grubunda (D) sitotrofoblastların (ST) benzer immunoreaktivite gösterdiği, sinsityotrofoblastların (S) ise, kontrol grubunda (C) missed abortus grubundan (D) daha zayıf immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400



Resim 11: PC7 monoklonal antikoru ile boyanmış örneklerde, her iki gruba ait desidua (A,B) ve plasenta (C,D) örneklerinde zayıf immunoreaktivite görülmektedir. Kontrol grubu (C) sitotrofoblastların (ST) ve sinsityotrofoblastların (S), missed abortus grubu (D) sitotrofoblastlar (ST) ve sinsityotrofoblastlara (S) kıyasla daha yoğun immunoreaktivite gösterdiği görülmektedir. STR; plasenta stroma; X 200, insert; X400

8. TABLULAR

Tablo 4.2.1.

	DESİDUA	
	Kontrol	Missed
TNF α	216,66 \pm 11,69*	128,33 \pm 11,69*
TGF β	266,00 \pm 8,60*	158,33 \pm 6,05*
PC4	67,66 \pm 5,68*	121,50 \pm 11,89*
PC6	136 \pm 4,56	144,16 \pm 13,57
PC7	29,50 \pm 2,88	31,66 \pm 5,31
IGF-I	42,83 \pm 5,03*	98,33 \pm 4,08*
POMC	211,83 \pm 15,03*	290,83 \pm 41,03*
FOXO3A	133,33 \pm 17,43*	255,83 \pm 12,41*
FURIN	131,16 \pm 3,54*	227,50 \pm 11,72*

(* p < 0,05)

Tablo 4.2.2.

	NON-DESİDUA	
	Kontrol	Missed
TNF α	38,16 \pm 8,15*	61,50 \pm 9,04*
TGF β	38,16 \pm 8,63	37,00 \pm 8,48
PC4	12,00 \pm 1,89	14,00 \pm 4,77
PC6	23,66 \pm 5,50	35,33 \pm 4,80
PC7	18,33 \pm 2,33	13,16 \pm 2,40
IGF-I	17,16 \pm 6,36	19,16 \pm 5,41
POMC	12,33 \pm 1,63*	34,50 \pm 9,66*
FOXO3A	30,33 \pm 4,32	39,66 \pm 14,30
FURIN	28,50 \pm 8,09	25,00 \pm 14,38

(* p < 0,05)

Tablo 4.2.3.

SİTOTROFOBLAST		
	Kontrol	Missed
TNF α	12,16 \pm 1,94*	44,83 \pm 4,30*
TGF β	10,33 \pm 1,63*	24,66 \pm 2,33*
PC4	12,00 \pm 1,89	12,50 \pm 2,34
PC6	75,00 \pm 6,06*	13,00 \pm 2,75*
PC7	26,83 \pm 5,19*	12,83 \pm 2,56*
IGF-I	12,50 \pm 1,64*	43,50 \pm 3,08*
POMC	13,33 \pm 2,16*	196,16 \pm 5,34*
FOXO3A	18,83 \pm 1,47*	11,00 \pm 1,26*
FURIN	13,83 \pm 1,72	12,00 \pm 1,89

(* p < 0,05)

Tablo 4.2.4.

SİNSİYOTROFOBLAST		
	Kontrol	Missed
TNF α	146,33 \pm 4,22*	314,00 \pm 10,65*
TGF β	51,66 \pm 3,61*	240,00 \pm 13,75*
PC4	48,83 \pm 5,74*	281,83 \pm 23,28*
PC6	118,33 \pm 7,52*	268,17 \pm 9,43*
PC7	26,50 \pm 3,93*	10,83 \pm 1,32*
IGF-I	32,66 \pm 2,16*	57,16 \pm 3,18*
POMC	226,00 \pm 5,51*	322,66 \pm 7,00*
FOXO3A	254,00 \pm 8,17*	322,00 \pm 6,06*
FURIN	81,50 \pm 4,08*	322,67 \pm 3,26*

(* p < 0,05)

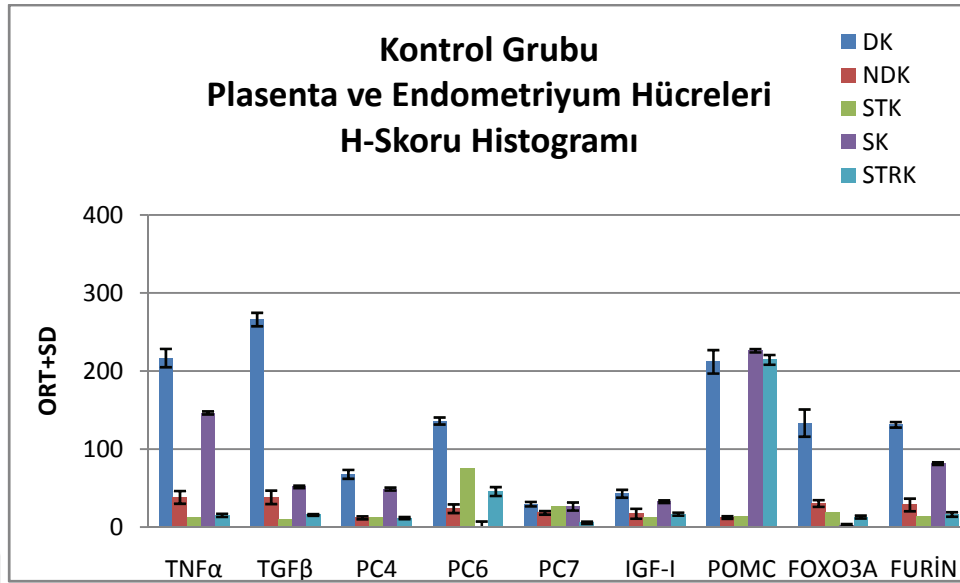
Tablo 4.2.5.

	STROMA	
	Kontrol	Missed
TNF α	15,16 \pm 2,04*	43,33 \pm 2,80*
TGF β	15,66 \pm 1,03*	10,33 \pm 1,50*
PC4	11,66 \pm 1,36*	27,50 \pm 3,08*
PC6	45,66 \pm 5,71*	13,66 \pm 1,63*
PC7	5,66 \pm 1,50*	12,33 \pm 2,06*
IGF-I	16,66 \pm 1,96	13,50 \pm 2,66
POMC	214,33 \pm 6,28*	26,16 \pm 1,32*
FOXO3A	13,00 \pm 1,89	13,00 \pm 1,67
FURIN	16,33 \pm 2,87	14,83 \pm 1,60

(* p < 0,05)

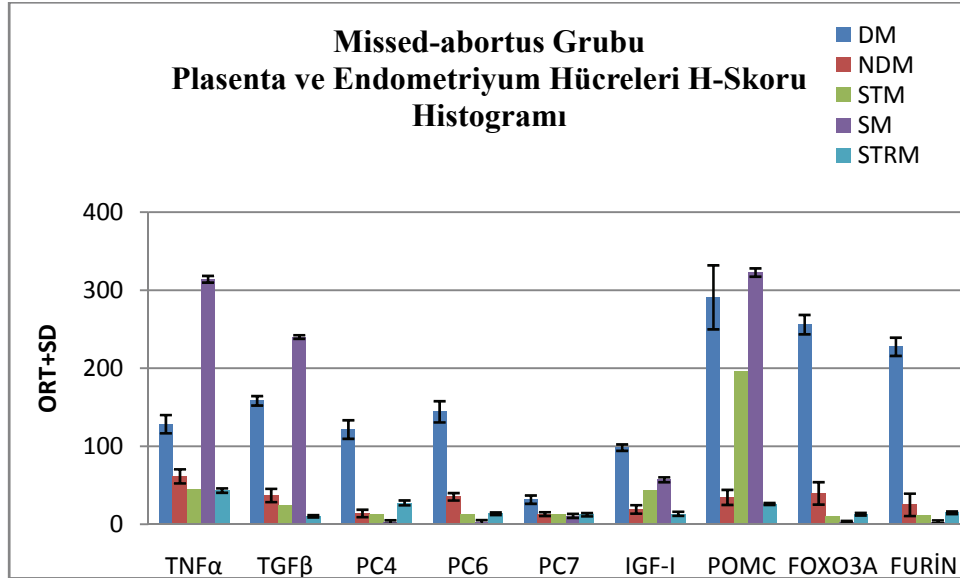


Tablo 4.2.6.



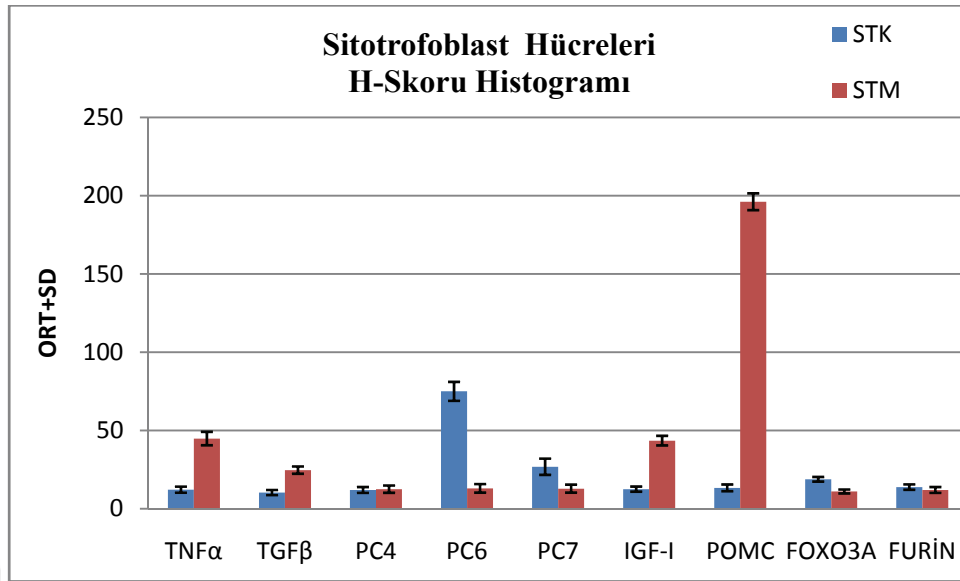
DK; desidua-kontrol, NDK; non-desidua-kontrol, STK; sitotrofoblast-kontrol, SK; sinsityotrofoblast-kontrol, STRK; stroma-kontrol

Tablo 4.2.7.



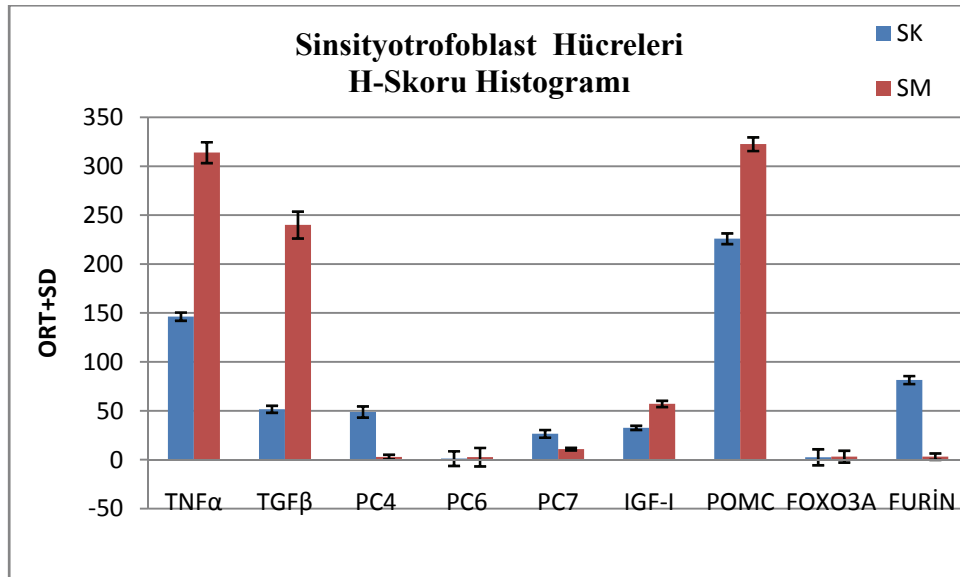
DM; desidua-missed, NDM; non-desidua- missed, STM; sitotrofoblast- missed, SM; sinsityotrofoblast- missed, STRM; stroma-missed

Tablo 4.2.8.



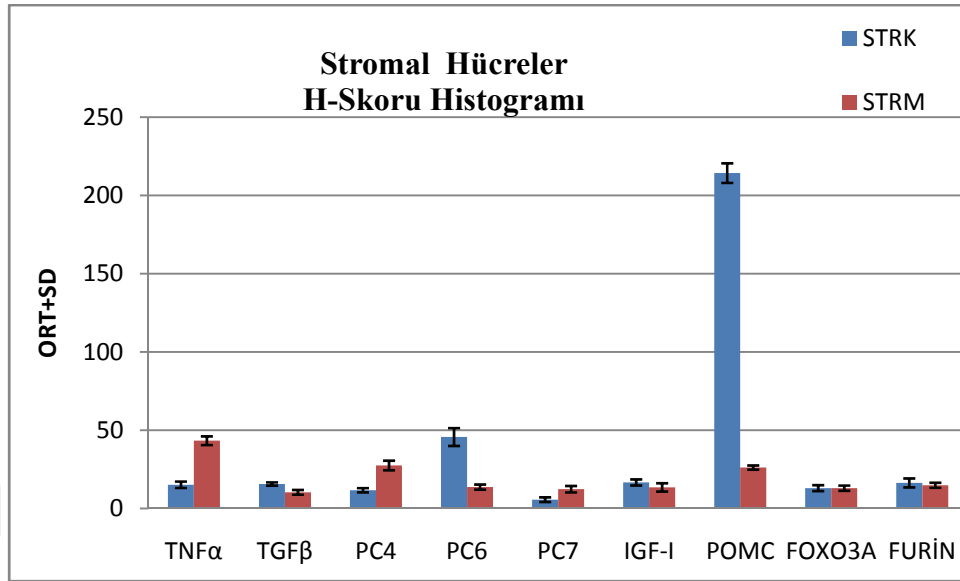
STK; sitotrofoblast-kontrol, STM; sitotrofoblast- missed

Tablo 4.2.9.



SK; sinsityotrofoblast-kontrol, SM; sinsityotrofoblast- missed

Tablo 4.2.10.



STRK; stroma-kontrol, STRM; stroma - missed

9. KAYNAKLAR

1. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Williams Obstetrics 20 th edition.
2. Steven G. Gabbe, Jennifer R. Niebyl, Joe Leigh Simpson, Obstetrics, Normal and Problem Pregnancies, 1997;5 th edition, 24:628.
3. John O. Schorge, MD. Joseph I. Schaffer, MD. Lisa M. Halvorson, Gynecology, 2010; 6:141-142.
4. Denker HW, Implantation: a cell biological paradox., 1993; J Exp Zool 266,541–558.
5. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000; 14:757–764.
6. Simon C, Martin JC and Pellicer A., Paracrine regulators of implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000;14,815–826.
7. Hanna Achache and Ariel Reve., Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation Department of Obstetrics and Gynecology, Human Reproduction Update, 2006; Vol.12, No.6 pp. 731–746.
8. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, et all., Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. J Clin Invest 90, 1992 ;188–195.
9. Drummond A, Findlay J. Focus on TGF- β signalling. Society for Reproduction and Fertility, 2006; 132: 177-178.
10. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF- β Superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. Society for Reproduction and Fertility, 2006; 132: 217-232.
11. Rutanen EM. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the endometrium. Effect of intrauterine levonorgestrel delivery. Human Reproduction, 2000; 15:173-181.
12. Oner J, Oner H, Immunolocalization of insulin-like growth factor I (IGF-I) during preimplantation in rat uterus, Growth Horm IGF Res. 2007 Aug;17(4):271-8.
13. Toder V, Fein A, Carp H, Torchinsky A. TNF- α in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? J Assist Reprod Genet. 2003;20:73–81.
14. Hadley ME, Haskell-Luevano C, The proopiomelanocortin system, Ann N Y Acad Sci. 1999 Oct 20;885:1-21.

15. Van Grevenynghe J, Cubas RA, DaFonseca S, et al., Foxo3a: an integrator of immune dysfunction during HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012 Aug-Oct;23(4-5):215-21.
16. Calnan DR, Brunet A, The FoxO code, *Oncogene.* 2008 Apr 7;27(16):2276-88.
17. Seidah NG, What lies ahead for the proprotein convertases?, *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Mar;1220:149-61.
18. Seidah NG, The proprotein convertases, 20 years later, *Methods Mol Biol.* 2011;768:23-57.
19. Andrew W. Artenstein, M.D., and Steven M. Opal, M.D., Proprotein convertases in health and disease, *N Engl J Med* 2011;365:2507-18.
20. Michael H. ROSS, Wojciech Pawlina, *Histology A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*, 2011; Sixth Edition.
21. R. John Aitken, Mark A. Baker, Gustavo F. Doncel, et al., As the world grows: contraception in the 21st century, *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1330-43.
22. Junqueira LCi Carneiro J, Kelley RO(Ed): *Temel Histoloji, Dişi üreme sistemi*, Barış Kitabevi, İstanbul, 1998; 433-435.
23. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff MV. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reproduction Update*, 2006; 12:617-630.
24. Karaöz E. *Özel Histoloji, Genital Sistem Histolojisi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta, 2002; 228.
25. Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji* 6. Baskı, Palme Yayıncılık 1990: 20-36
26. Allen C. Enders, Sandra Schlafke, A morphological analysis of the early implantation stages in the rat, March 1967; Volume 120, Issue 2, pages 185–225.
27. Lee KY., DeMayo FJ. Animal models of implantation, *Society for Reproduction and Fertility* 2004, 679-691.
28. Speroff L., Glass RH., Kase NG, *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Lippincott William & Wilkins 1999: 1097-1149.
29. Champion H, Innes BA, Robson SC, Lash GE, Bulmer JN., Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy, *Mol Hum Reprod.* 2012 Aug;18(8):391-400.
30. Herrler A, von Rango U, Beier HM., Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation, *Reprod Biomed Online.* 2003 Mar;6(2):244-56.

31. Chaouat G, Dubanchet S, Ledée N., Cytokines: Important for implantation?, *J Assist Reprod Genet.* 2007 Nov;24(11):491-505.
32. Chen S, Cao Y, Zeng G, Duan E., Transforming growth factor-alpha promotes mouse blastocyst outgrowth and secretion of matrix metalloproteinases, *Chin Med J (Engl).* 2001 Dec;114(12):1300-4.
33. Idris N, Carraway KL, Regulation of sialomucin complex/Muc4 expression in rat uterine luminal epithelial cells by transforming growth factor-beta: implications for blastocyst implantation. *J Cell Physiol.* 2000 Nov;185(2):310-6.
34. Henemyre, C. E. Markoff, Decidualization and expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-4 in the periimplantation mouse uterus, *Biol. Reprod.* 58, 1998; 801–806.
35. C.Y. Wang, M. Daimon, S.J. Shen, G.L. Engelman, J. Ilan, Insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid in the developing human placenta and in term placenta of diabetics, *Mol. Endocrinol.* 2, 1998; 217–229.
36. Baserga, R., The IGF-I receptor in cancer research, 1999; *Exp. Cell Res.* 253, 1–6
37. Khatib AM, Siegfried G, Prat A, Luis J, Chrétien M, Metrakos P, Seidah NG., Inhibition of Proprotein Convertases Is Associated with Loss of Growth and Tumorigenicity of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells, *J Biol Chem.* 2001 Aug 17;276(33):30686-93.
38. Bruchim I, Werner H., Targeting IGF-1 signaling pathways in gynecologic malignancies, *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Mar;17(3):307-20.
39. Sanford T, De M, Wood G. Expression of colony stimulating factors and inflammatory cytokines in the uterus of CD1 mice during days 1 to days 3 of pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1992;94:213–220.
40. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, et al., Th1/Th2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134:93–119.
41. Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway in TNF- α -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:225–232.
42. Wolff MV, Linke IC, Heid D, et al., Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Molecular Human Reproduction,* 1999; 5:146-152.

43. Jan-S. Krüssel, Jens Hirchenhain, Andrea Schanz, et all., Interleukin-1 and implantation, *Immunology of Pregnancy*, 2006; pp 294-302.
44. Prutsch N, Fock V, Haslinger P, Haider S, et all., The role of interleukin-1 β in human trophoblast motility, *Placenta*. 2012 Sep;33(9):696-703.
45. Prins JR, Gomez-Lopez N, Robertson SA , Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders, *J Reprod Immunol*. 2012 Sep;95(1-2):1-14.
46. Paiva P, Menkhorst EM, Salamonsen LA, Dimitriadis E (2009) Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: Critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20: 319–328.
47. Shuya LL, Menkhorst EM, Yap J, Li P, Lane N, Dimitriadis E., Leukemia Inhibitory Factor Enhances Endometrial Stromal Cell Decidualization in Humans and Mice, *PLoS One*. 2011;6(9):e25288.
48. Kevin Y Lee, Francesco J DeMayo, Animal models of implantation. *Reproduction* December 1, 2004 128679-695.
49. Lim HJ, Dey SK, HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation, *Exp Cell Res*. 2009 Feb 15;315(4):619-26.
50. Jessmon P, Leach RE, Armant DR , Diverse Functions of HBEGF During Pregnancy, *Mol Reprod Dev*. 2009 Dec;76(12):1116-27.
51. Tamada H, Sakamoto M, Sakaguchi H, et all Evidence for the involvement of transforming growth factor-alpha in implantation in the rat., *Life Sci*. 1997;60(17):1515-22.
52. Brayman M, Thathiah A, Carson DD, MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia, *Reprod Biol Endocrinol*. 2004 Jan 7;2:4
53. Paszkiewicz-Gadek A, Porowska H, Sredzińska K., Expression of MUC-1 mucin in full-term pregnancy human placenta, *Adv Med Sci*. 2008;53(1):54-8.
54. Athanasas-Platsis S, Corcoran CM, Kaye PL, et all, Early pregnancy factor is required at two important stages of embryonic development in the Mouse, *Am J Reprod Immunol*. 2000 Apr;43(4):223-33.
55. Rosario GX, Modi DN, Sachdeva G., et all., Morphological events in the primate endometrium in the presence of a preimplantation embryo, detected by the serum preimplantation factor bioassay, *Hum Reprod*. 2005 Jan;20(1):61-71.
56. Chris O'Neill, The role of paf in embryo physiology, *Hum. Reprod. Update* (May/June 2005) 11 (3): 215-228.

57. Ghosh D, Sengupta J., Endocrine and paracrine correlates of endometrial receptivity to blastocyst implantation in the human, *Indian J Physiol Pharmacol.* 2004 Jan;48(1):6-30.
58. Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, et al., IFN- γ is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils, *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):5145-53.
59. Kodaman PH, Taylor HS, Hormonal regulation of implantation, *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004 Dec;31(4):745-66, ix.
60. Abrahamsohn PA, Zorn TM., implantation and decidualization in rodents, *J Exp Zool.* 1993 Sep 1;266(6):603-28.
61. Yanxin Zhu, Jhn E. Pintar, Expression of Opioid Receptors and Ligands in Pregnant Mouse Uterus and Placenta, *Biology of Reproduction* October 1, 1998 vol. 59 no. 4 925-932.
62. Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy, *Reproduction.* 2009 Jul;138(1):177-84.
63. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA., TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta, *Reproduction.* 2006 Aug;132(2):217-32.
64. van der Meer A, Lukassen HG, van Cranenbroek B, et al., Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells, *Mol Hum Reprod.* 2007 Feb;13(2):123-33.
65. King, A. Burrows, T.D., Hiby, et al., (2000) Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta*, 21, 376±387.
66. Aplin JD and Charlton AK (1990) The role of matrix macromolecules in the invasion of decidua by trophoblast. *Trophoblast Res* 4,139–158.
67. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, et al., The role of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin in the IGF-I-induced migration of extravillous trophoblast cells during the process of implantation, *Mol Hum Reprod.* 2004 Feb;10(2):91-7.
68. Dimitriadis E, Menkhorst EM, Salamonsen LA, Paiva P. Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta* 2010; 24: S99–S104.
69. Shuya LL, Menkhorst EM, Yap J, Li P, et al., Leukemia Inhibitory Factor Enhances Endometrial Stromal Cell Decidualization in Humans and Mice, *PLoS One.* 2011;6(9):e25288.

70. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ., Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle, *Science*. 1994 Dec 2;266(5190):1508-18.
71. Moore, Persaud, *Insan Embriyologis* 6. Baski, 2002.
72. Cole LA., hCG, the wonder of today's science, *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Mar 28;10:24.
73. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M., The placenta cytokine network and inflammatory signals, *Placenta*. 2006 Aug;27(8):794-8
74. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, et al., Mammalian subtilisin/kexin isoenzyme SKI-1 a widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1321-6.
75. Anderson ED, Molloy SS, Jean F, The Ordered and Compartment-specific Autoproteolytic Removal of the Furin Intramolecular Chaperone Is Required for Enzyme Activation, *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12879-90.
76. Henrich,S., Cameron,A., Bourenkov,G.P., Kiefersauer,R., Huber,R., Lindberg,I., Bode,W. and Than,M.E. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, 10, 520–526.
77. Els Louagie, Neil A. Taylor,Daisy Flamez, et al., Role of furin in granular acidification in the endocrine pancreas: Identification of the V-ATPase subunit Ac45 as a candidate substrate, August 26, 2008, vol. 105, no.34.
78. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, et al. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys* 2003;420:55-67.
79. Takumi I, Steiner DF, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. Localization of prohormone convertases 1/3 and 2 in the human pituitary gland and pituitary adenomas: analysis by immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, and laser scanning microscopy. *Mod Pathol* 1998; 11:232-8.
80. van de Ven,W.J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland,A.M., van Duijnhoven,H.L., Roebroek,A.J. and Siezen,R.J. (1990) *Mol. Biol. Rep.*, 14, 265–275.
81. Nabil G. Seidah, Michel Chrétien, Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family: Recent developments and future perspectives, Volume 3, Issue 4, May–June 1992.
82. Kiefer, M. C., Tucker, J. E., Joh, R., et al., (1991) Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15 *DNA Cell Biol* 10, 757–69.

83. Seidah, N. G., Day, R., Hamelin, J., et al.,(1992) Testicular expression of PC4 in the rat: Molecular diversity of a novel germ cellspecific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase *Mol Endocrinol* 6, 1559–70.
84. Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., et al., (1993) cDNA structure of the mouse and rat
85. subtilisin/kexin-like PC5: A candidate proprotein convertase expressed in endocrine
86. and nonendocrine cells *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6691–5.
87. Nour N., Mayer G., Mort JS., Salvas A., Mbikay M., Morrison CJ., Overall CM & Seidah NG., 2005 The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Molecular Biology of the Cell* 16 5215–5226.
88. Jin, W., Fuki, I. V., Seidah, N. G., et al., (2005) Proprotein convertases are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase *J Biol Chem* 280, 36551–9.
89. Meerabux, J., Yaspo, M. L., Roebroek, A. J., Van de Ven, W. J., Lister, T. A., and Young, B. D. (1996) A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas *Cancer Res* 56, 448–51.
90. Seidah, N. G., Hamelin, J., Mamarbachi, et al.(1996) cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3388–93.
91. Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N. G., et al., (2003) The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1 *J Biol Chem* 278, 10381–8.
- Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-6.
92. Rachid Essalmani, Josée Hamelin, Jadwiga Marcinkiewicz, et al., Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the Mouse, *Mol Cell Biol*. 2006 January; 26(1): 354–361.
93. Bassi DE, Fu J, de Cicco RL, Klein- Szanto AJP. Proprotein convertases: “master switches” in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* 2005;44:151-61
- Furin at the cutting edge from protein traffic to embryogenesis and disease.
94. Gyamera-Acheampong, C., Tantibhedhyangkul, J., Weerachayanukul, W., et al. (2006) Sperm from mice genetically deficient for the PCSK4 proteinase exhibit

- accelerated capacitation, precocious acrosome reaction, reduced binding to egg zona pellucida, and impaired fertilizing ability *Biol Reprod* 74, 666–73.
95. Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N. G., Kleene, R., and Schachner, M. (2003) The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1 *J Biol Chem* 278, 10381–8.
 96. Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., et al., (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: A candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6691–5.
 97. Xiang, Y., Molloy, S. S., Thomas, et al., (2000) The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments *Mol Biol Cell* 11, 1257–73.
 98. Dong, W., Marcinkiewicz, M., Vieau, D., et al., (1995) Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary *J Neurosci* 15, 1778–96.
 99. Estelle Rousselet, Suzanne Benjannet, Josée Hamelin, et al., The Proprotein Convertase PC7 Unique Zymogen Activation And Trafficking Pathways, *J Biol Chem*. 2011 January 28; 286(4): 2728–2738.
 100. Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver *J Clin Invest* 109, 2002; 1125–31.
 101. De Windt, A., Rai, M., Bernier, L., Thelen, K., Soini, J., Lefebvre, C. et al. Gene set enrichment analysis reveals several globally affected pathways due to SKI-1/S1P inhibition in HepG2 cells *DNA Cell Biol* 26, 2007; 765–72.
 102. Pasquato, A., Pullikotil, P., Asselin, M.C., et al. The Proprotein Convertase SKI-1/S1P: In vitro analysis of lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors *J Biol Chem* 281, 2006; 23471–81.
 103. Beyer, W. R., Popplau, D., Garten, W., et al., Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P *J Virol* 77, 2003; 2866–72.
 104. Pasquato, A., Pullikotil, P., Asselin, M.C., et al. The Proprotein Convertase SKI-1/S1P: In vitro analysis of lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors *J Biol Chem* 281, 2006; 23471–81.
 105. Creemers JWM, Khatib AM. Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci* 2008;13:4960-71.

106. Bassi DE, Mahloogi H, Klein-Szanto AJP. The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog* 2000;28:63-9.
107. Mercapide J, Lopez De Cicco R, Bassi DE, et al., Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. *Clin Cancer Res* 2002;8:1740-6.
108. Pesu M, Watford WT, Wei L, et al. T cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral tolerance *Nature* 2008; 455:246-50.
109. Berthet V, Rigot V, Champion S, et al. Role of endoproteolytic processing in the adhesive and signaling functions of $\alpha\beta 5$ integrin. *J Biol Chem* 2000; 275:33308-13
110. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, et al. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003; 111:1723-32.
111. Hubbard FC, Goodrow TL, Liu SC, et al. Expression of PACE4 in chemically induced carcinomas is associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer Res* 1997; 57:5226-31.
112. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000; 16:83-7.
113. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; 375:244-7.
114. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001; 293:1840-2
115. González-Reyes L, Ruiz-Argüello MB, García-Barreno B, et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9859-64.
116. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC. The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 2009; 29:12787- 94.
117. Bennett BD, Denis P, Haniu M, et al. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's β -secretase. *J Biol Chem* 2000;275:37712-7. [Erratum, *J Biol Chem* 2001; 276:15561.]
118. Roebroek AJ, Taylor NA, Louagie E, et al. Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem* 2004; 279:53442-50.

119. Bassi DE, Lopez De Cicco R, Mahloogi H, et al., Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10326-31.
120. Basak A, Chen A, Scamuffa N, et al., Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Curr Med Chem* 2010; 17:2214-21.
121. De Vos L, DeClerq J, Rosas GG, et al. MMTV-cre-mediated fur inactivation concomitant with PLAG1 proto-oncogene activation delays salivary gland tumorigenesis in mice. *Int J Oncol* 2008; 32:1073-83.
122. Sun X, Essalmani R, Seidah NG, Prat A. The proprotein convertase PC5/6 is protective against intestinal tumorigenesis: in vivo mouse model. *Mol Cancer* 2009; 8:73.
123. Bassi DE, Zhang J, Cenna J, et al., Proprotein convertase inhibition results in decreased skin cell proliferation, tumorigenesis, and metastasis. *Neoplasia* 2010; 12: 516-26.
124. Coppola JM, Bhojani MS, Ross BD, Rehemtulla A. A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia* 2008; 10:363-70.
125. Scamuffa N, Siegfried G, Bontemps Y, et al. Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J Clin Invest* 2008; 118:352-63.
126. Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem* 2008; 283:31791-801.
127. Chan JCY, Piper DE, Cao Q, et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and non human primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:9820-5.
128. Bicknell AB., The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin, *J Neuroendocrinol.* 2008 Jun; 20(6):692-9.
129. Belisle S, Petit A, Gallo-Payet N, et al., Functional opioid receptor sites in human placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:283–289.
130. Liotta AS, Houghten R, Krieger DT. Identification of a beta-endorphin-like peptide in cultured human placental cells. *Nature* 1982; 295:593–595.
131. Sastry BV, Barnwell SL, Tayeb OS, et al., Occurrence of methionine enkephalin in human placental villus. *Biochem Pharmacol* 1980; 29:475–478.
132. Ahmed MS, Randall LW, Cavinato AG, et al., Human placental opioid peptides: correlation to the route of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155:703–706.

133. Ahmed MS, Schoof T, Zhou DH, Quarles C. Kappa opioid receptors of human placental villi modulate acetylcholine release. *Life Sci* 1989; 45:2383–2393.
134. Cemerikic B, Cheng J, Agbas A, Ahmed MS. Opioids regulate the release of human chorionic gonadotropin hormone from trophoblast tissue. *Life Sci* 1991; 49:813–824.
135. Ghosh AP, Klocke BJ, Ballestas ME, Roth KA, CHOP Potentially Co-Operates with FOXO3a in Neuronal Cells to Regulate PUMA and BIM Expression in Response to ER Stress, *PLoS One*. 2012; 7(6):e39586.
136. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128: 2007; 325–339.
137. Frazzi R, Valli R, Tamagnini I, et al., Resveratrol-mediated apoptosis of Hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation, *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1013-21.
138. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer, *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47928-37.
139. Lu M, Zhao Y, Xu F, Wang Y, et al., The expression and prognosis of FOXO3a and Skp2 in human ovarian cancer, *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3409-15.
140. Ye K., Inhibition of I κ B kinase in Notch signaling activates FOXO3a, *Cell Cycle*. 2012 Jul 1;11(13):2417.
141. Harlap S, Shiono PH: Alcohol, smoking and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. 1980; *Lancet* 2:173.
142. Wilcox AH, Weinberg CR, O'Connor JF. Incidence of early loss of pregnancy. *N.Engl.j Med* 1998;319:189-194.
143. Harlap S, Shiono PH, Ramcharan S: A life table of spontaneous abortions and the effects of age, parity and other variables: human Embryonic and fetal death. Academic pres, 1980, p 145.
144. Kışnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürgan T, Önderoğlu LS. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*.
145. Atasü T. Şahmay S. *Jinekoloji* 2. baskı 2001 37:533-545.
146. Maurilus GB, Effect of aging on fertility and pregnancy. *Seminars reprod endocrinol*. 1991; 9:165.
147. Nybo Andersen AM, Wolhlfahrt J, Cristens P, Olsen J, Melbye M, Maternal age and fetal loss: *BR Med J* 2000; 320:1708.

148. Scoott JR, Disaia PJ, Hammond CB, Spellacy WN. Danforth's Obstetrics and Gynecology. 7th edition 10:179.
149. Sperroff L, Glass RH, Kase NG, Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 5th edition.
150. Kadar N, Caldwell BV, Romera R. A method of screening for ectopic pregnancy and its indications. *Obstet gynecol* 1981; 58:162-165.
151. Cowan BD, Vandermolen DT, Long CA, et al. Receiver operator characteristics, efficiency analysis, and predictive value of serum progesterone concentration as a test for abnormal gestations. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1729-1734.
152. Jacobs PA, Hassold TJ: The origin of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion. In Porter IH, Hook EB (eds): *Human embryonic and fetal death*. New York, Academic Press, 1980, 289.
153. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: Factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies, 2003; *Hum Reprod* 18:1724.
154. Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Kerry S, association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks gestation: Prospective community based cohort study, *Br Med J* 2002; 325:1334.
155. Abalowich M, Gutierrez S, Alceraz G, Maccallini G, Garcia A, Levalle O. Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid* 2002; 12:63.
156. Greene MF., Spontaneous abortions and major malformations in women with diabetes mellitus, *Semin Reprod Endocrinol*. 1999;17(2):127-36.
157. Homburg R., Adverse effects of luteinizing hormone on fertility: fact or fantasy, *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1998 Dec;12(4):555-63.
158. Hughes EG, Brennan BG, Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity, *Fertil Steril* 1996; 66:679.
159. Floyd RL, Decoufle P, Hungerfort DW: Alcohol used prior to pregnancy recognition. *Am J Prev Med*. 1999; 17:101.
160. Rasch V, cigarette, alcohol and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion, *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:182.
161. Leible S, Munoz H, Walton R, et al., Uterine artery blood flow velocity waveforms in pregnant women with müllerian duct anomaly: a biologic model for uteroplacental insufficiency, *Am Obstet Gynecol*, 1998; 178:1048.

162. Propst AM, Hill JA, 3rd; Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss, *Semin Reprod Med* , 2000; 18:341.
163. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS Regul Angiogenesis*. 1997; 79: 1–7.
164. Peter U, Uzzo NJ, Chu CR et al. Tonic activation of hypoxia inducible factor 1 alpha in avascular articular cartilage and implications for metabolic homeostasis. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52:3181-3191.
165. Jonathan S. Berek. *Novak's Gynecology* 13. Edition.
166. Haider S, Knöfler M, Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium, *Placenta*. 2009 Feb;30(2):111-23.
167. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10:45–65.
168. Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, et al. Localization of tumour necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 1992;88:174–180.
169. Jokhi PP, King A, Sharkey AM, Smith SK, Loke YW. Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Immunol*. 1994;153:4427–4435.
170. Tabibzadeh S. Ubiquitous expression of TNF-alpha/cachectin immunoreactivity in human endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 1991;26:1–4.
171. Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine*. 1997;9:126–137.
172. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol*. 2006;71:41–56.
173. Carpentier PA, Dingman AL, Palmer TD., Placental TNF- α signaling in illness-induced complications of pregnancy, *Am J Pathol*. 2011 Jun;178(6):2802-10.
174. Duclos AJ, Haddad EK, Baines MG. Presence of activated macrophages in a murine model of early embryo loss. *Am J Reprod Immunol* 1995;33: 354–66.
175. Maes M, Song C, Lin A et al. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 1998;10: 313–8.

176. Fest S, Zenclussen AC, Joachim R, et al., Stress and substance P but not the substance P-metabolite SP5-11 trigger murine abortion by augmenting TNF-alpha levels at the feto-maternal interface, *Scand J Immunol.* 2006 Jan;63(1):42-9.
177. King A, Jokhi PP, Smith SK, et al., Screening for cytokine mRNA in human villous and extravillous trophoblasts using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), *Cytokine.* 1995 May;7(4):364-71.
178. Yang Y, Yelavarthi KK, Chen HL, Pace JL, Terranova PF, Hunt JS. Molecular, biochemical, and functional characteristics of tumor necrosis factor-alpha produced by human placental cytotrophoblastic cells. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5614-24.
179. Pijnenborg R, Immunolocalization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the placental bed of normotensive and hypertensive human pregnancies, *Placenta.* 1998 May;19(4):231-9.
180. Otun HA, Lash GE, Innes BA, et al., Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion, *J Reprod Immunol.* 2011 Jan;88(1):1-11.
181. Bass KE, Morrish D, Roth I, et al., Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process, *Dev Biol.* 1994 Aug;164(2):550-61.
182. Huber AV, Saleh L, Bauer S, et al., TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells, *Placenta.* 2006 Feb-Mar;27(2-3):127-36.
183. Renaud SJ, Postovit LM, Macdonald-Goodfellow SK, et al., Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro, *Biol Reprod.* 2005 Aug;73(2):237-43.
184. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, et al., Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures, *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):812-22.
185. Yui J, Hemmings D, Garcia-Lloret M, et al., Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction, *Biol Reprod.* 1996 Aug;55(2):400-9.
186. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, et al., Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women, *Lab Invest.* 2001 Aug;81(8):1143-52.

187. Seki H, Matuoka K, Inooku H, et al., TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line, *J Obstet Gynaecol Res.* 2007 Aug;33(4):408-16.
188. Li M, Wu ZM, Yang H, Huang SJ., NFκB and JNK/MAPK activation mediates the production of major macrophage- or dendritic cell-recruiting chemokine in human first trimester decidual cells in response to proinflammatory stimuli, *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;96(8):2502-11.
189. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 233–251.
190. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, et al., TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta, *Reproduction.* 2006 Aug;132(2):217-32.
191. Tang M, Mikhailik A, Pauli I, et al., Decidual differentiation of stromal cells promotes Proprotein Convertase 5/6 expression and lefty processing, *Endocrinology.* 2005 Dec;146(12):5313-20.
192. Simpson H, Robson SC, Bulmer JN, et al., Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy, *Placenta.* 2002 Jan;23(1):44-58.
193. Marjono AB, Brown DA, Horton KE, et al., Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy, *Placenta.* 2003 Jan;24(1):100-6.
194. Xuan YH, Choi YL, Shin YK, et al., Expression of TGF-β signaling proteins in normal placenta and gestational trophoblastic disease, *Histol Histopathol.* 2007 Mar;22(3):227-34.
195. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000;157(6):2111–2122.
196. Ogasawara MS, Aoki K, Aoyama T, et al. Elevation of transforming growth factor-beta1 is associated with recurrent miscarriage, *J Clin Immunol.* 2000;20(6):453–457.
197. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest.* 1999;103(12):1641–1650.
198. *Am J Reprod Immunol.* A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor beta-2-producing "suppressor cells" in uterine tissue near the placental attachment site. 1995 Jul;34(1):52-64.

199. Gorivodsky M, Torchinsky A, Zemliak I, Savion S, Fein A, Toder V. TGF beta 2 mRNA expression and pregnancy failure in mice. *Am J Reprod Immunol*. 1999 Aug;42(2):124-33.
200. Rosario GX, Sachdeva G, Manjramkar DD, et al., Endometrial expression of immunomodulatory cytokines and their regulators during early pregnancy in bonnet monkeys (*Macaca radiata*), *Hum Reprod*. 2005 Nov;20(11):3039-46.
201. Ball E, Robson SC, Ayis S, et al., Expression of TGF beta in the placental bed is not altered in sporadic miscarriage, *Placenta*. 2007 Aug-Sep;28(8-9):965-71.
202. Zhu Y, Pintar JE., Expression of Opioid Receptors and Ligands in Pregnant Mouse Uterus and Placenta, *Biol Reprod*. 1998 Oct;59(4):925-32.
203. Facchinetti F, Centini G, Parrini D, et al., Opioid plasma levels during labour. *Gynecol Obstet Invest* 1982; 13:155–163.
204. The effectiveness of adrenocorticotropin repeated doses in high risk pregnancies. Klimek M. Department of Gynecology and Infertility Clinic of Jagiellonian University, Krakow, Poland. *Fetal Diagn Ther*. 2006;21(6):528-31. Epub 2006 Sep 12.
205. Gravanis A, Makrigiannakis A, Zoumakis E, et al., Endometrial and myometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its regulation and possible roles, *Peptides*. 2001 May;22(5):785-93.
206. Grammatopoulos D, Milton NG, Hillhouse EW. The human myometrial CRH receptor: G proteins and second messengers. *Mol Cell Endocrinol* 1994;99:245–50.
207. Hillhouse EW, Grammatopoulos D, Milton NG, Quartero HW. The identification of a human myometrial corticotropin-releasing hormone receptor that increases in affinity during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:736–41.
208. Grino M, Hery M, Paulmyer-Lacroix O, Anglade G. Estrogens decrease expression of the corticotropin-releasing hormone gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in the anterior pituitary of ovariectomized rats. *Endocrine* 1995; 3:395– 8.
209. Hatzoglou A, Gravanis A, Margioris AN, et al., Identification and characterization of opioid-binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80: 418-24.
210. Reynolds SRM. *Physiology of the Uterus*. New York: Hafner Publishing Co.; 1965.
211. Kerdelhué B, Lenoir V, Kolm P, Seltman HJ, et al., ACTH, b-endorphin, substance P, and corticotrophin releasing hormone in plasma and follicular fluid in hormonally

- stimulated menstrual cycles for in-vitro fertilization in the human, *Hum Reprod.* 1997 Feb;12(2):231-5.
212. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Margioris AN, et al., The corticotropin-releasing hormone in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:185–91.
 213. Mastorakos G, Scopa CD, Kao LC, et al., Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1046–51.
 214. Karalis K, Sano H, Redwine J, et al., Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 1991;254:421–4.
 215. Ferrari A, Petraglia F, Gurbide E. Corticotropin releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progestin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;54:251–9.
 216. Nikolaos Vitoratos, Dimitrios C. Apatheodorou, Sophia N. Kalantaridou, “Reproductive” Corticotropin-Releasing Hormone, 31 JAN 2007.
 217. Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 1993; 266:603–628.
 218. Makrigiannakis, A. et al. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat. Immunol.* 2: 2001; 1018–1024.
 219. Liotta AS, Advis JP, Krause JE, et al., Demonstration of in vivo synthesis of proopiomelanocortin-, beta-endorphin-, and alpha-melanotropin-like species in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience* 1984; 4 956–965.
 220. Raffin-Sanson ML, Massias JF, Ankotche A, et al., High precursor level in maternal blood results from the alternate mode of proopiomelanocortin processing in human placenta. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999 Jan;50(1):85-94.
 221. Carr BR, Parker Jr. CR, Madden JD et al. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1981; 139: 416–422.
 222. Leslie Myatt, Role of placenta in preeclampsia, October 2002, Volume 19, Issue 1, pp 103-111.
 223. Majzoub, J.A. & K.P. Karalis. Placental corticotropin-releasing hormone: function and regulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 180(Suppl): 242–246.
 224. Nolten WE, Lindheimer MD, Rueckert PA et al. Diurnal patterns and regulation of cortisol secretion in pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1980; 51: 466–472.

225. Demey-Ponsart E, Foidart JM, Sulon J et al. Serum CBG, free and total cortisol and circadian patterns of adrenal function in normal pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry* 1982; 16:165–169.
226. Lindsay JR & Nieman LK. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and pregnancy: challenges in disease detection and treatment. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 775–799.
227. Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK, Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone, *Biol Reprod.* 1992 Feb;46(2):208-19.
228. Clemmons DR, Underwood LE, Van Wyk B. Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 1981; 67:10- 17.
229. Leof EB, Van Wyk B, O’Keefe EF, Pledger WJ. Epidermal growth factor (EGF) is required only during the traverse of early G in PDGF stimulated density-arrested Balb/c-3T3 cells. *Exp Cell Res* 1983; 147:201-208.
230. Zapf J, Froesch ER, Humbel RE. The insulin-like growth factor (IGF) of human serum: chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role. *Curr Top Cell Regul* 1981; 19:257-309.
231. Psvchoyos A. Endocrine control of egg implantation. In: Greep RO, Astwood EG, Geiger SR (eds.), *Handbook of Physiology*. Washington DC: American Physiological Society; 1973: 187-215.
232. Massague J, Czech MP. The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *Biol Chem* 1982; 257:5038-5046.
233. Tartakover-Matalon S, Cherepnin N, Kuchuk M, Impaired migration of trophoblast cells caused by simvastatin is associated with decreased membrane IGF-I receptor, MMP2 activity and HSP27 expression, *Hum Reprod.* 2007 Apr;22(4):1161-7.
234. Maile LA, Clemmons DR, Integrin-associated protein binding domain of thrombospondin-1 enhances insulin-like growth factor-I receptor signaling in vascular smooth muscle cells *Circ Res.* 2003 Nov 14;93(10):925-31.
235. Kajihara T, Jones M, Fusi L, et al., Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization, *Mol Endocrinol.* 2006 Oct;20(10):2444-55.

236. Fan W., Li S., Li W., et al., FOXO1 Expression and Regulation in Endometrial Tissue during the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy Decidua *Gynecol Obstet Invest* 2012;74:56–63.
237. Labied S, Kajihara T, Madureira PA, et al., Gestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol Endocrinol* 2006; 20:35–44.
238. Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, et al., FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 2004; 23:4802–4812.
239. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al., Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002; 419:316–321.
240. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 306: 2004; 2105–2108.
241. Lappas M, Permezel M, The anti-inflammatory and antioxidative effects of nicotinamide, a vitamin B(3) derivative, are elicited by FoxO3 in human gestational tissues: implications for preterm birth, *J Nutr Biochem*. 2011 Dec;22(12):1195-201.
242. Lin L, Hron JD, Peng SL. Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*. 2004;21:203–213.
243. Oh HM, Yu CR, Dambuzza I, Marrero B., STAT3 interacts with Class O Forkhead transcription Factors in the Cytoplasm and regulates Nuclear/Cytoplasmic localization of FoxO1 and FoxO3a in CD4+ T, *J Biol Chem*. 2012 Aug 31;287(36):30436-43.
244. Katoh H, Zheng P, Liu Y., FOXP3: Genetic and epigenetic implications for autoimmunity, *J Autoimmun*. 2013 Jan 10. pii: S0896-8411(12)00150-3.
245. Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT. FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280:12096–12102.
246. Kim JJ, Buzzio OL, Li S, Lu Z. Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol Reprod* 2005; 73:833–839.
247. Liu JW, Chandra D, Rudd MD, et al., Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS. *Oncogene* 2005; 24:2020–2031.

248. Skurk C, Maatz H, Kim HS, et al., The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 2004; 279:1513–1525.
249. Freyer C, Kilpatrick LM, Salamonsen LA, et al., Pro-protein convertases (PCs) other than PC6 are not tightly regulated for implantation in the human endometrium, *Reproduction*. 2007 Jun;133(6):1189-97.
250. Alam SM, Konno T, Dai G, et al., a uterine decidual cell cytokine ensures pregnancy dependent adaptations to a physiological stressor, *Development*. 2007 Jan;134(2):407-15.
251. Duguay SJ, Jin Y, Stein J, Duguay AN, Gardner P, Steiner DF. Post-translational processing of the insulin-like growth factor-2 precursor. *J Biol Chem* 1998;273:18443±18451.
252. J. Niquet, L. Perez-Martinez, M. Guerra, et al., Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons in vivo, *Dev. Brain Res.* 120, 2000; 49– 56.
253. Komada M, Hatsuzawa K, Shibamoto S, Ito F, Nakayama K, Kitamura N. Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.* 1993 Aug 9;328(1-2):25–29.
254. M Lehmann, V Rigot, N G Seidah, et al., Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin-deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo, *Biochem J.* 1996 August 1; 317(Pt 3): 803–809.
255. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995 May 18;375(6528):244–247. Dubois et al., 1995.
256. A J Roebroek, J W Creemers, I G Pauli, et al., Generation of structural and functional diversity in furin-like proteins in *Drosophila melanogaster* by alternative splicing of the *Dfur1* gene *EMBO J.* 1993 May; 12(5): 1853–1870.
257. Nachtigal MW and Ingraham HA. Bioactivation of Mullerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1996; 7711–7716.
258. Cui, Y., Jean, F., Thomas, G. and Christian, J. L. BMP4 is proteolytically activated by Furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* 1998; (in press).
259. Anton J. M. Roebroek, Lieve Umans, et al., Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin, *Development* 1998; 125, 4863-4876.

260. Stoikos CJ, Harrison CA, Salamonsen LA, A distinct cohort of the TGF β superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization, *Hum Reprod.* 2008 Jun;23(6):1447-56.
261. Zhou Z, Shen T, Zhang BH, et al., The proprotein convertase furin in human trophoblast: Possible role in promoting trophoblast cell migration and invasion., *Placenta.* 2009 Nov;30(11):929-38.
262. Visse R, Nagase H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):827-39.
263. Plaisier M, Dennert I, Rost E, et al., Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. *Hum Reprod.* 2009 Jan;24(1):185-97.
264. Z. Zhou et al., Trophoblast invasion shares many similarities with the invasion of tumor cells, *Placenta* 30, 2009; 929–938.
265. A.J. Roebroek, L. Umans, I.G. Pauli, et al., Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin, December 15, 1998; *Development* 125, 4863-4876.
266. Elices M. J., Osborn L., Takada Y., et al., VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 1990; 577–584.
267. Gurtner G. C., Davis V., Li H., et al., Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* 1995; 9, 1–14.
268. Sophea Heng, Natalie J. Hannan, Luk J.F. Rombauts, et al., PC6 levels in uterine lavage are closely associated with uterine receptivity and significantly lower in a subgroup of women with unexplained infertility, *Human Reproduction*, 2011; Vol.0, No.0 pp. 1–7.
269. Nie G, Li Y, Wang M, et al., Inhibiting uterine pc6 blocks embryo implantation: an obligatory role for a proprotein convertase in fertility. *Biol Reprod* 2005; 72:1029 – 1036.
270. Nie GY, Li Y, Minoura H, et al., Specific and transient up-regulation of proprotein convertase 6 at the site of embryo implantation and identification of a unique transcript in mouse uterus during early pregnancy. *Biol Reprod* 2003; 68:439 – 447.

271. Tsuji et al. The Expression of Proprotein Convertase PACE4 Is Highly Regulated by Hash-2 in Placenta: Possible Role of Placenta-Specific Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Human Achaete-Scute Homologue-2. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1645, 95–104]
272. Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, et al., Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface, *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):313-22.
273. Basak A, Touré BB, Lazure C, et al., Enzymic characterization in vitro of recombinant proprotein convertase PC4, *Biochem J.* 1999 Oct 1;343 Pt 1:29-37.
274. McCampbell A. S, Walker C. L, Broaddus R. R, et al., Developmental Reprogramming Of IGF Signaling And Susceptibility To Endometrial Hyperplasia In The Rat. *Laboratory Investigation.* 2008; 88: 615-626.
275. Zhou J, Dsupin B. A, Giudice L. C, et al. Insulin-Like Growth Factor System Gene Expression In Human Endometrium During The Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79: 1723–1734.
276. Qiu Q, Basak A, Mbikay M, et al., Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11047-52.
277. Hack M, Merkatz IR, Preterm delivery and low birth weight--a dire legacy. *N Engl J Med.* 1995 Dec 28;333(26):1772-4.
278. Wutz A, Barlow DP, Imprinting of the mouse *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Mol Cell Endocrinol.* 1998 May 25;140(1-2):9-14.
279. Irving JA, Lala PK., Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res.* 1995 Apr;217(2):419-27.
280. Fowden AL. The insulin-like growth factors and fetoplacental growth, *Placenta.* 2003 Sep-Oct;24(8-9):803-12.
281. Rousselet E, Benjannet S, Marcinkiewicz E, , et al., Proprotein Convertase PC7 Enhances the Activation of the EGF Receptor Pathway through Processing of the EGF Precursor, *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):9185-95.
282. Leonhardt RM, Fiegl D, Rufer E, et al., Post-endoplasmic reticulum rescue of unstable MHC class I requires proprotein convertase PC7., *J Immunol.* 2010 Mar 15;184(6):2985-98.
283. K.A. Pfeiffer, V. Rebmann, M. Passler, et al., Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization *Hum Immunol*, 61, 2000, pp. 559–564.

284. Shani WS, Loisel DA, Jassem RMSharief M, et all., HLA-G polymorphisms and soluble HLA-G protein levels in women with recurrent pregnancy loss from Basrah province in Iraq, Hum Immunol. 2012 Aug;73(8):811-7.
285. Guilbert, L., Robertson, S.A., Wegmann, T.G. The trophoblast as an integral component of a macrophage cytokine network. Immunol. Cell. Biol. 1993; 71, 49–57.
286. Koide S, Yoshida I, Tsuji A, et all., The Expression of Proprotein Convertase PACE4 Is Highly Regulated by Hash-2 in Placenta: Possible Role of Placenta-Specific Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Human Achaete-Scute Homologue-2, J Biochem. 2003 Sep;134(3):433-40.
287. Loutradis D, Stefanidis K, Kousidis I, et all., Effect of human hydrosalpinx fluid on the development of Mouse embryos and role of the concentration of growth factors in culture medium with and without hydrosalpinx fluid, Gynecol Endocrinol. 2005 Jan;20(1):26-9.

