



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**WNT ANTAGONİSTLERİNİN PRE- ve POSTİMLANTASYON
DÖNEMLERİNDE SIÇAN ENDOMETRİUMUNDAKİ
İMMÜNOLOKALİZASYONU**

**Dr.İsmet CESUR
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**SİVAS
2010**



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**WNT ANTAGONİSTLERİNİN PRE- ve POSTİMLANTASYON
DÖNEMLERİNDE SIÇAN ENDOMETRİUMUNDAKİ
İMMÜNOLOKALİZASYONU**

**Dr. İsmet CESUR
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Doç.Dr. Celal KALOĞLU
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**SİVAS
2010**

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından.....Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza**Üye****Üye****Üye**

Bu tez,tarih vesayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Mehmet ŞENCAN**Tıp Fakültesi Dekanı**

Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010 1-2 sayılı kararı ile kabul edilerek yürürlüğe girmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim ve öğretim süresince her konuda yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmam sırasında desteklerinin yokluğunu hissetmediğim Anabilim Dalımız Sayın Öğretim Üyelerine başta tez danışmanım Sayın Doç.Dr.Celal KALOĞLU'na, bölüm başkanımız Sayın Prof.Dr.Emel KOPTAGEL'e, Sayın Prof.Dr.H.Eray BULUT'a ve Sayın Doç.Dr.Serpil SARAYDIN hocalarıma en kalbi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum. Sayın Prof.Dr.Osman KOPTAGEL hacama özellikle teşekkür etmek istiyorum.

Projeye mali destek sağlayan CÜBAP birimine teşekkür ediyorum.

Uzmanlık eğitim ve öğretim süresince ve tez çalışması sırasında desteğini hep hissettiğim çok kıymetli, fedakar ve vefakar eşim Dr.Fatma CESUR hanımefendiye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Mutluluk kaynağımız, herşeyimiz biricik çocuklarımız Abdurrahman Enes CESUR ve Enise Berra CESUR sizleri çok seviyorum.

ÖZET**WNT ANTAGONİSTLERİNİN PRE- VE POSTİMLANTASYON
DÖNEMLERİNDE SIÇAN ENDOMETRİUMUNDAKİ
İMMÜNOLOKALİZASYONU****Dr. İsmet CESUR****Tıpta Uzmanlık Tezi-Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı****Danışman Öğretim Üyesi: Doç.Dr.Celal KALOĞLU****Sivas-2010**

Memelilerde implantasyon, birçok sinyal moleküllerinin blastosist ile reseptiv endometrium arasındaki haberleşmede rol aldığı karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Son zamanlarda implantasyonda fonksiyonları belirlenen Wnt protein ailesi, embriyonun şekillenmesi, epitelyal mezenşimal transformasyon, anjiogenez, apoptoz gibi temel gelişim süreçlerinin yanı sıra erişkinde de homeostazis ve kök hücre regülasyonunda görev alırlar. Bu fonksiyonlarını birçok sinyal molekülleri ile etkileşerek gerçekleştirirler. Ayrıca Wnt'lerin fonksiyonları diğer sinyal moleküllerinin yanı sıra bazı antagonist moleküllerce de kontrol edilmektedir. Antagonist moleküller, plazma membranındaki reseptörlerine bağlanarak fonksiyon gören Wnt'lere veya reseptörlerine bağlanarak Wnt sinyal yollarını kontrol ederler.

Bu çalışmada, pregnant sıçan endometriumunda periimplantasyon sürecinde ve nonpregnant sıçan endometriumunda Wnt antagonistlerinin (Dkk-1, sFRP-1 ve WIF-1) immunolokalizasyonu belirlenerek, olası rolleri araştırılmıştır. Uterus dokularından alınan parafin kesitlere H-E ve IF boyamalar uygulanmıştır. Dkk-1'in nonpregnant sıçan endometriumunda, pregnant sıçan endometriumunda, endometrial bazal stromada, pregnant sıçan endometriumunda ayrıca desiduada, sFRP-1 ve WIF-1'in, nonpregnant sıçan endometriumunda, miyometrium, luminal epitel, bez epiteli ve endotelde, pregnant sıçan endometriumunda ayrıca desidual lokalizasyonlarda ekspresyonları gösterilmiştir.

Sonuç olarak, Wnt antagonistlerinin nonpregnant sıçan endometrium homeostazisinde, pregnant sıçan endometriumunda gerçekleşen trofoblast invazyonu, desidualizasyon, anjiogenez, apoptoz ve plasantasyon olaylanmalarında rol oynayabilecekleri kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Wnt, Wnt antagonistleri, implantasyon, rat

ABSTRACT**IMMUNOLOCALISATION OF SECRETED WNT ANTAGONISTS IN THE RAT ENDOMETRIUM DURING PRE- AND POSTIMPLANTATION PERIODS****Dr. İsmet CESUR****Proficiency Thesis of Medicine - Department of Histology-Embryology****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Celal KALOĞLU
Sivas-2010**

Implantation in mammals is one of the complex biological events related to the communication between several signal molecules, blastocyst and the receptive endometrium. Recently, Wnt protein family functioning in implantation play roles in basic developmental processes such as embryonal configuration, epithelial mesenchymal transformation, angiogenesis and apoptosis along with homeostasis and stem cell regulation processes in adults. They achieve those functions by interacting with several signal molecules. Furthermore Wnt functions are controlled by some antagonist molecules as well as other signal molecules. Antagonist molecules controls Wnt signal pathways by preventing the receptor–ligand interaction of Wnt receptors on plasma membrane via either binding to Wnts or to Wnt receptors.

In the present study, the possible roles and the immunolocalization of Wnt antagonists (Dkk-1, sFRP-1 and WIF-1) were determined in pregnant and in non-pregnant rat endometrium. Paraffin sections were stained by using haematoxyline-eosine and immunoflourescence methods. The expressions of Dkk-1 in perimetial-myometrial connective tissue and in endometrial basal stromal region of non-pregnant rat endometrium as well as in decidual region of pregnant rat endometrium were determined. In addition, the expressions of sFRP-1 and WIF-1 in myometrium, luminal epithelium, glandular epithelium and endothelium of non-pregnant rat endometrium as well as decidual immunolocalizations in the pregnant rat endometrium were determined.

In conclusion, it could be suggested that the Wnt antagonists might play crucial roles in non-pregnant rat endometrial homeostasis, trophoblast invasion, decidualization, angiogenesis, apoptosis and placentation in pregnant rat endometrium.

Keywords: Wnt, Wnt antagonists, implantation, rat

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Uterus Histolojisi	3
2. 2. Fertilizasyon ve Preimplantasyon Embriyo Gelişimi	4
2. 3. Preimplantasyon Dönemde Endometrial Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler	6
2. 4. İmplantasyon	7
2. 4. 1. Yakınlaşma (Appozisyon)	7
2. 4. 2. Bağlanma (Adhezyon)	8
2. 4. 3. Penetrasyon ve İnvazyon	10
2. 5. Plasantasyon ve Plasenta tipleri	12
2. 6. Postimplantasyon Uterin Cevap	14
2. 7. Wnt Gen Ailesi ve Wnt Proteinleri	17
2. 7. 1. İntraselüler Sinyal Yolları	22
2. 7. 2. Wnt Sinyal Yolunun Ekstraselüler Antagonistleri ve/veya İnhibitörleri veya Modülatörleri	27
2. 8. Wnt Proteinlerin Fonksiyonları	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3. 1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları	34
3. 2. Kullanılan Cihazlar	34
3. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3. 4. Doku Preparasyonu	35
3. 5. Işık Mikroskopi	36
3. 6. İmmünofloresan Mikroskopi	36
4. BULGULAR	37
4. 1. Grup-1 Bulguları	37
4. 1. 1. Östrus siklusu bulguları H-E	37
4. 1. 2. Östrus siklusu evrelerinde Wnt antagonistlerinin immunolokalizasyonları	39
4. 2. Grup-2 Bulguları	47
4. 2. 1. Gebeliğin 5. günü	47
4. 2. 2. Gebeliğin 6. günü	53

4. 2. 3. Gebeliğin 7. günü	58
4. 2. 4. Gebeliğin 8. günü	67
4. 2. 5. Gebeliğin 9. günü	78
5. TARTIŞMA	86
5. 1. Dkk-1	86
5. 1. 1. Gelişimde Dkk-1	86
5. 1. 2. Dkk-1 ve Apoptozis	89
5. 1. 3. Dkk-1 ve Tümör	89
5. 1. 4. Dkk-1 ve kemik dokusu homeostazisi	90
5. 2. sFRP-1	90
5. 2. 1. sFRP-1 ve Anjiogenez	91
5. 2. 2. sFRP-1, Apoptozis ve Tümör	92
5. 2. 3. Endometriumda sFRP-1	92
5. 3. WIF-1	93
5. 3. 1. WIF-1, Gelişim, Tümör, Anjiogenez	94
5. 4. Endometriumda Dkk-1, sFRP-1 ve WIF-1'in rollerinin önemi	95
6. SONUÇLAR	97
7. ÖNERİLER	98
8. KAYNAKLAR	99
9. EKLER- YEREL ETİK KURUL KARARI	117

SİMGE ve KISALTMALAR

APC	Adenomatous polyposis coli
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CBP	CREB-binding protein
COX	Cyclooxygenase
CRD	Cysteine-rich domain
CREB	cAMP-response element-binding protein
CSF	Koloni stimulan faktör
Daam1	Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1
DHH	Desert Hedgehog
Dkk	Dickkopf
Dsh	Dishevelled
E ₂	östrojen (östradiol)
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
Fzd	Frizzled
GSK	Glycogen syntase kinase
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hCG	Human chorionic gonadotropin
HH	Hedgehog
HSPGs	Heparan sülfat proteoglikanlar
IF	İmmünofloresan
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-BP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IHH	Indian Hedgehog
IHK	İç hücre kitlesi
IL-1	İnterlökin-1
LE	Luminal epitel
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
LEH	Luminal epitel hücreleri
LIF	Lökosit inhibe edici faktör

LRP	Low-density lipoprotein-reseptor-related-protein
MAP	Mitogen-activated protein
MGA	Mid-preimplantasyon gen aktivasyonu
MMP	Matrix metalloproteinases
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NLK	Nemo-like kinase
P	Progesteron
PCP	Planar cell polarity
PG	Prostaglandin
PKC	Protein kinase C
PTF	Pituitary transcription factor
RTK	Receptor tyrosine kinase
RYK	Receptor-like tyrosine kinase
sFRP	secreted frizzled related protein
SHH	Sonic Hedgehog
TCF	Transcription factor
TGF	Transforming growth factor
TH	Trofoektoderm hücreleri
TIMPs	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
Tr	Trofoblast
Wg	Wingless
WIF	Wnt inhibitör faktör
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZGA	Zigotik genom aktivasyonu
ZP	Zona pellusida

TABLOLAR ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 2.1.	Wnt genlerin kromozomal lokasyonları	17
Tablo 4.1.	Östrus siklus evrelerinde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları	40
Tablo 4.2.	Gebeliğin 5.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları	48
Tablo 4.3.	Gebeliğin 6.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları	54
Tablo 4.4.	Gebeliğin 7.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları	61
Tablo 4.5.	Gebeliğin 8.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları	69
Tablo 4.6.	Gebeliğin 9.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları	75
Şekil 2.1.	Çeşitli türlerde implantasyon tipleri	10
Şekil 2.2.	Çeşitli türlerde invazyon tipleri	12
Şekil 2.3.	Plasental bariyer tipleri	13
Şekil 2.4.	Wnt reseptörleri ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu	21
Şekil 2.5.	Wnt/ β katenin sinyal yolu, sitoplazmik süreç	23
Şekil 2.6.	Wnt/ β katenin sinyal yolu, nüklear süreç	24
Şekil 2.7.	Wnt sinyal yolları	26
Şekil 2.8.	Wnt reseptörleri	27
Şekil 2.9.	Wnt sinyal yolları antagonist molekülleri ve reseptörleri	30
Şekil 2.10.	Kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yollarında antagonist moleküllerin etki mekanizmaları	30
Şekil 4.1.	Östrus siklus evreleri H-E	38
Şekil 4.2.	Diöstrus-proöstrus evrede Dkk-1'in immünolokalizasyonları	41
Şekil 4.3.	Östrus-metöstrus evrede Dkk-1'in immünolokalizasyonları	42
Şekil 4.4.	Diöstrus-proöstrus evrede sFRP-1'in immünolokalizasyonları	43
Şekil 4.5.	Östrus-metöstrus evrede sFRP-1'in immünolokalizasyonları	44
Şekil 4.6.	Diöstrus-proöstrus evrede WIF-1'in immünolokalizasyonları	45
Şekil 4.7.	Östrus-metöstrus evrede WIF-1'in immünolokalizasyonları	46
Şekil 4.8.	Gebeliğin 5.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E	47
Şekil 4.9.	Gebeliğin 5.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları	50
Şekil 4.10.	Gebeliğin 5.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları	51
Şekil 4.11.	Gebeliğin 5.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları	52
Şekil 4.12.	Gebeliğin 6.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E	53
Şekil 4.13.	Gebeliğin 6.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları	55

Şekil 4.14.	Gebeliğin 6.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları	56
Şekil 4.15.	Gebeliğin 6.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları	57
Şekil 4.16.	Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E (1)	59
Şekil 4.17.	Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E (2)	60
Şekil 4.18.	Gebeliğin 7.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları	64
Şekil 4.19.	Gebeliğin 7.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları	65
Şekil 4.20.	Gebeliğin 7.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları	66
Şekil 4.21.	Gebeliğin 8.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E (1)	68
Şekil 4.22.	Gebeliğin 8.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E (2)	69
Şekil 4.23.	Gebeliğin 8.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları	72
Şekil 4.24.	Gebeliğin 8.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları(1)	73
Şekil 4.25.	Gebeliğin 8.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları(2)	74
Şekil 4.26.	Gebeliğin 8.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları(1)	75
Şekil 4.27.	Gebeliğin 8.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları(2)	76
Şekil 4.28.	Gebeliğin 8.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları(3)	77
Şekil 4.29.	Gebeliğin 9.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E (1)	79
Şekil 4.30.	Gebeliğin 9.gününde ışık mikroskopi bulgular H-E (2)	80
Şekil 4.31.	Gebeliğin 9.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları	83
Şekil 4.32.	Gebeliğin 9.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları	84
Şekil 4.33.	Gebeliğin 9.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları	85

1. GİRİŞ

Memelilerde implantasyon, blastosist aşamasındaki embriyo ile reseptiv endometrium arasındaki diyalog sonucu meydana gelen en karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Bu süreçte, blastosist tarafından uterinal dokuda birçok genin ekspresyonu indüklenir, sonrasında blastosiste komşu epitelde adhezyonu sağlayan yeni moleküller açığa çıkar, endometrial stroma hücreleri epiteloid karakterli decidua hücrelerine farklılaşırken ekstraselüler matriks kompozisyonu da tamamen değişir (1). Özellikle kemiricilerde ileri derecede invaziv özelliklere sahip blastosistin antimezometrial alana adhezyonundan sonra implantasyon bölgesinde anjiogenez, plasantasyon, matriks yıkımı, invazyon kontrolü ve apoptozu yönlendiren yeni moleküllerin katılımıyla süreç daha da karmaşık bir hal alır (2-4).

Son çalışmalarda, implantasyon esnasında embriyo uterus haberleşmesinde daha önceden tanımlanmış birçok moleküle ilave olarak Wnt'lerin de potansiyel bir araç oldukları ileri sürülmüştür (5). Omurgalı ve omurgasızlarda birçok temel gelişim süreçleri ve erişkinlerdeki homeostaziste önemli rolleri üstlenen Wnt sinyal molekülleri (6) sisteinden zengin yüksek korunaklı glikozillenmiş protein ailesidir (7). Bu protein ailesinin ilk üyesi olan Wnt-1, Drosophila segment polarite geni Wingless (Wg) olarak ve bundan bağımsız bir şekilde kemirgenlerdeki protoonkogeni Int-1 olarak tanımlanmış, sonraları aminoasit dizilimindeki yüksek benzerlik nedeniyle ikisi birleştirilerek Wnt adı verilmiştir (8).

Wnt proteinleri, fonksiyonlarını plazma membranında yerleşmiş özel reseptörleri üzerinden intraselüler kanonikal ve non-kanonikal olmak üzere iki esas haberleşme yolağı aracılığıyla gerçekleştirirler. Kanonikal Wnt'ler hücre membranında Frizzled reseptör ailesi ve düşük yoğunluklu lipoprotein ilişkili proteinden (LRP5/6) oluşan bir reseptör kompleksini kullanırlar (9). Bu bağlanma sonucu intrasitoplazmik Wnt/ β -catenin yolağı fonksiyon görmeye başlar. Sitoplazmada biriken unfosforile β -catenin nükleusa geçerek TCF/LEF transkripsiyon faktörleri aracılığıyla Wnt hedef genlerini aktive eder. Non-kanonikal Wnt'ler ise Fz/planar cell polarity (PCP) yoluna benzeyen, Wnt/ Ca^{+2} yolunu kullanırlar ve non-kanonikal Wnt yolu, Fz reseptör stimülasyonu sonucu β -catenin'den bağımsız olarak Ca^{+2} salınımı, protein kinaz C'nin ve Ca^{+2} –

calmodulin bağımlı protein kinaz II'nin aktivasyonunu aracılığı ile fonksiyon görürler. Non-kanonikal Wnt'ler gastrulasyon sürecinde PCP yolu üzerinden hücre hareketlerini yönlendiren bir aktivite gösterirler (7, 10). Bu temel fonksiyonlarına ek olarak Wnt glikoproteinleri, BMP, Shh, Notch gibi diğer bazı haberleşme molekülleri ile etkileşerek (11) epitelyal mezenşimal transformasyon, anjiogenez, apoptoz, erişkin dokuda kök hücre regülasyonu, *Drosophila*'da segmentasyon, *Xenopus*' ta aksis şekillenmesi ve miyogenezde de önemli rol üstlenirler (12). *Xenopus* ve civcivde yapılan çalışmalardan sonra, Wnt sinyal yolağını sFRP (secreted frizzled related protein) ve Dkk (dickkopf) olmak üzere iki Wnt antagonist protein ailesi tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. sFRP üyeleri Wnt' lere direkt bağlanarak Wnt' lerin reseptör kompleksine bağlanma yeteneklerini değiştirerek, Dickkopf sınıfı üyeleri ise Wnt reseptör kompleksinin LRP5 ve LRP6 bileşenlerine bağlanarak Wnt sinyal yolunu inhibe ederler. Böylece sFRP üyeleri, hem kanonikal hem de non-kanonikal yolu inhibe ederken, Dickkopf sınıfı spesifik olarak non-kanonikal yolu inhibe ederler (7). Wnt sinyal yolağı antagonistleri tarafından oluşturulan bu kontrol mekanizmaları temel embriyo gelişim süreçlerinin doğru yönlendirilmesi erişkinde dokuların normal yapı ve fonksiyonlarının korunmasında önemli gözükmektedir. sFRP üyelerinden sFRP-1' in sıgırlarda damar oluşumu (13), civcivlerde koryoallantoik membranda anjiogenezde ve endotel hücrelerinin kapillere göçünde saptanırken (14), sFRP-2' nin retinal patolojide (15), sFRP-4 meme ve endometrial kanserlerde (16), WIF-1' in ise insan retina gelişimi (17) ve *Xenopus* embriyolarında eksen indüksiyonu ve somitogenezde (7) etkileri gösterilmiştir. Dkk sınıfı üyelerinden Dkk-1, ekstremite gelişimi sırasında hücre ölümüne programlanmış bölgelerde gösterilmiş ve Dkk-1 eksikliğine bağlı olarak parmak füzyonu ve ektopik parmak gözlenmiştir (7). Bununla birlikte tüm Wnt antagonistlerinin Wnt sinyal yolağını inhibe ederek fonksiyon gösterdiğini söylemek zordur. Örneğin Dkk-3 ve Soggy'nin kanonikal yolağı inhibe etmediği bilinmektedir (18). Bu nedenle konuyla ilgili pek çok cevaplanmamış soru vardır.

Bu çalışmada, Wnt antagonistlerinin periimplantasyon sürecinde sıçan endometriumundaki immüno lokalizasyonlarının gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Uterus Histolojisi

Uterus; fundus, korpus ve serviks olmak üzere üç bölgeye sahiptir. Korpus ve fundus benzer histolojik özelliklere sahipken, serviks bazı önemli yapısal farklılıklar gösterir. Nispeten kalın olan uterus duvarı üç tabakadan oluşur.

Perimetrium; en dışta bulunan ve uterusun, bazı bölümlerinde ya seroza (peritoneal mezotel, bağ dokusu ve mezotelyum) ya da adventisya özelliğindeki tabakasıdır.

Miyometrium; uterus kası, bağ doku ile ayrılmış birbirine bağlı düz kas demetleri şeklinde tasarlanmış en kalın tabakadır. Miyometrium uterusun işleviyle ilişkili olarak sınırları tam ayırt edilemeyen 3-4 tabaka şeklinde düzenlenmiştir. Düz kas demetleri, iç ve dış tabakada longitudinal, büyük kan damarlarının bulunduğu orta tabakalarda ise oblik ve sirküler seyir gösterir. Gebelik sırasında hem hipertrofi hem de hiperplazi gösteren ve pek çok düz kas hücresi, protein salgıyan hücrelerin ince yapı özelliklerini kazanarak aktif olarak kollajen sentezlerler. Böylece uterusun kollajen içeriği önemli ölçüde artar.

Endometrium; en içte özelleşmiş mukoza tabakasıdır. Tek katlı silyalı ve salgılayıcı prizmatik luminal epitel ve basit tübüler yapıdaki bezler ile hücreden son derece zengin stroma ya da lamina propriadan oluşur. Çoğunlukla tip III kollajen lif içeren bağ dokusu, fibroblastlardan zengin ve bol miktarda temel madde içerir. Basit tübüler bez epiteli luminal epitele benzese de silyalı hücreler az sayıdadır (19-23)

Endometrium tabakası iki bölüme ayrılabilir. Miyometriuma komşu olan bazal bölüm (stratum bazale), lamina propria ve uterus bezlerinin başlangıç kısmını içerir. Bezlerin geri kalan kısmını ve luminal epiteli içeren kısım ise fonksiyonel bölümdür (süperfisyal bölüm, stratum fonksiyonalis). Menstruel siklus sırasında siklik değişiklikler fonksiyonel tabakada izlenirken (dökülme sonrası bazal tabakadan rejenerasyon), bazal tabaka hemen hemen değişmeden kalır. Endometriumdaki bu değişiklikler, siklusa bağlı olarak meydana gelir ve blastosist implantasyonu ve gelişmesi için uygun bir uterinal ortamın oluşturulmasını sağlar (19-23).

2. 2. Fertilizasyon ve Preimplantasyon Embriyo Gelişimi

Ovulasyonla atılan ovum fallop tüpüne alınarak uterus yönünde ilerler. Ejekülat ile atılan spermier kapasitasyonunu tamamladıktan sonra uterus boyunca ilerler ve ovum ile fallop tüpünün ampulla bölgesinde karşılaşıarak fertilizasyonun aşağıdaki evrelerini gerçekleştirirler (21-23).

- Korona radiatanın geçilmesi
- Zona pellusidanın geçilmesi
- Sperm ve oosit plazma membranı füzyonu
- Oositin II. mayoz bölünmeyi tamamlaması
- Erkek pronukleusun oluşumu
- Erkek dişi pronukleusların membranlarının yıkımı

Fertilizasyonun temel sonuçları olarak;

- Sekonder oosit II. mayoz bölünmeyi tamamlayarak II. polar cisimciği oluşturur

- Diploid kromozom sayılı ($2n:46$) zigot oluşur
- Maternal ve paternal kromozomlar arasında crossing over ile çeşitlilik sağlanır

- Embriyonun cinsiyeti belirlenir
- Zigot yarıklanmaya başlar

Preimplantasyon embriyo gelişimi, fertilizasyondan implantasyona kadar olan embriyo gelişimi periyodunu içerir. Dinamik genetik programın tümünü içeren bu periodda, üç temel olay göze çarpar (21-23),

- Fertilizasyon ve yarıklanma
- Hücre polaritesinin kurulması ve kompaksiyon
- Blastosiste farklanma

Fertilizasyon ve yarıklanma: Yarıklanma, zigotun ardıardına geçirdiği mitoz ile hücre sayısındaki artıştır. Fertilizasyondan yaklaşık 30 saat sonra başlar ve oluşan hücreler blastomer olarak adlandırılır. Yarıklanma ile blastomer hacmi giderek azalır (23).

Preimplantasyon embriyo gelişiminde ovuma ait önemli bir özellik, maternal RNA ve proteinlerin depolanmış olmasıdır. Ovumda depolanmış olan

transkriptlerin degradasyonu fertilizasyon ile tetiklenir ve 2 hücreli evrede bu aktivite % 90 oranda tamamlanmıştır (24). Gelişimin devam etmesi için gerekli olan ve zigotta gerçekleşen transkripsiyon ile zigotik genom aktivasyonu şekillenir. Embriyonik gelişimin evrelerine paralel olarak, programlanmış farklı gen ekspresyonları upregüle ve/veya downregüle olmuşlardır. 2-4 hücreli evrede pik yapan ZGA (zigotik genom aktivasyonu) ve 8 hücreli evrede pik yapan MGA (mid-preimplantasyon gen aktivasyonu; blastomer polaritesi ve kompaksiyonu sırasında interselüler glikoprotein adhezyon moleküllerinin ekspresyonu) 2 önemli transkripsiyon olaylarıdır (25-29).

Hücre polaritesinin kurulması ve kompaksiyon: Totipotent özellikteki blastomerler simetrik bir düzenlenim gösterirler, her bir blastomer 8-16 hücreli bir yavru üretebilir. Ancak son çalışmalar bu hücrelerin erken evreler de dahil olmak üzere asimetric potansiyellerinin olduğunu açığa çıkarmıştır. 8 hücreli evreyi takiben blastomerler birbirleriyle sıkı bağlantılar kurarak şekil değiştirirler ve kompakt bir hücre topluluğu durumuna gelirler (kompaksiyon, kompaktizasyon). Fertilizasyondan 3 gün sonra 16 hücreli (12-32 hücreli) morula evresine gelindiğinde içteki hücreler dıştaki hücrelerden ayrılır ve içteki hücreler iç hücre kitlesini (IHK), dışta tek sıra halindeki yassı trofoblast hücreleri ise dış hücre kitlesini oluştururlar. Geç morula evresinde prekürsör totipotent hücrelerden OCT4 etkisiyle farklılaşan pluripotent iç hücre kitlesini, CDX2 transkripsiyon faktörü etkisiyle farklılaşanlar ise multipotent trofoektodermi oluştururlar (30).

Blastosiste farklılaşma: Fertilizasyondan 4 gün sonra embriyo geç morula evresinde uterus kavitesine ulaşır ve uterus sıvısı ZP'nin içerisine girerek morulanın içerisinde içi sıvı dolu hücrelerarası boşluklar oluşturmaya başlar. Erken blastosist evresinde artık IHK'nin (embriyoblast) konumu, embriyonik ve abembriyonik kutupları belirlemiştir ve IHK embriyonik kutbu oluşturmuştur. Hücrelerarası boşlukların birleşmesiyle de tek bir boşluk (blastosel) oluşur.

Pluripotent yeteneğe sahip iç hücre kitlesi hücreleri, diğer transkripsiyon faktörleri (NANOG, GATA6) etkisi altında, multipotent primitif endoderm ve pluripotent epiblast hücreleri oluşturmak üzere farklılaşırlar. Blastosel büyümüştür ve bu evrede blastosist geç blastosist olarak adlandırılır (30).

6.günde ZP'den kurtulan blastosistin (Hatching), yassılaşımiş trofoektodermi ile reseptiv uterus endometriumu luminal epiteli ile etkileşimi gerçekleşir.

2. 3. Preimplantasyon Dönemde Endometrial Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler

Endometriumun proliferasyon fazından sekretuar faza geçişi implantasyon için gerekli reseptivitenin elde edilmesinde önemlidir. Primer endokrin gereksinim progesteron hormonunun varlığıdır. Endometrium midsekretuar fazda 10-14 mm kalınlıktadır ve sekretuar aktivite tepe noktasına gelmiştir. Endometrial bez epiteli hücrelerinin glikojen ve lipid içeriği artmıştır. Endometrial luminal epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde pinopod oluşumu gözlenir (22).

Stromal değişiklikler östrojen ve progesteron etkisi altında otokrin ve parakrin etkilerle meydana gelir. Stromal bağ doku desidüaya farklanırken, stromal hücreler de daha büyük ve poligonal hücreler olarak izlenen desidüal hücrelere farklanırlar. Desidüalizasyon olarak tanımlanan bu endometrial stromal reaksiyon, implantasyon olmasa da implantasyon penceresi döneminde endometrial stromada gerçekleşmektedir. Desidüal hücreler siklusun 22-23. günlerinde ilk olarak kan damarlarını çevreleyen alanlarda, artmış mitotik aktiviteleri, sitonükleer genişlemeleri ve bazal membran oluşumu ile karakterize predesidüal hücreler olarak ayırt edilebilirler. İmplantasyon olmadığı takdirde geçici bir doku olarak izlenir. İmplantasyonun gerçekleşmesi ile desidüal reaksiyon devamlılık gösterir (22).

Uterin Reseptivite ve İmplantasyon Penceresi

Endometrial reseptivite ve implantasyon penceresi, 28 günlük normal bir siklusun 20-24. günleri arasındaki süreyle sınırlandırılmıştır. Yapılan çalışmalar uterin reseptivite döneminde ovarial hormonlar ile birlikte lipid mediatörler, morfogenler, homeobox transkripsiyon faktörler, büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren sinyal moleküllerinin lokal olarak üretildiğini göstermiştir. Uterin reseptivitede etkili başlıca hormonlar östrojen ve progesterondur. Tüm memeli türlerinde yapılan çalışmalarda implantasyon ve gebeliğin devamı için progesteronun varlığının zorunlu olduğu gösterilmiştir (30).

Progesteron aynı zamanda endometrial reseptiviteyi indükler ve implantasyon penceresi süresince izlenen pinopodlar bu dönemdeki en önemli morfolojik belirteçlerden biridir (16-19). Ancak başarılı bir implantasyon için endometrial reseptivite belirteçlerinin ortaya çıkması, embriyo kaynaklı sinyallere de bağlıdır (22, 30).

Pinopodlar;

- İmplantasyon penceresi süresince LE apikal yüzeyinde izlenir
- Progesteron indüksiyonu ile oluşurlar
- Yumuşak protrüzyona sahiptirler
- Uterin kavitedeki sıvıyı absorbe ederler
- Blastosistin LE ile temasının sağlanmasında fonksiyon görürler

2. 4. İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonun uterin duvara tutunması (nidasyon) ve luminal epiteli geçerek endometrial stromaya gömülmesi işlemi olarak tanımlanabilir. İmplantasyon süreci üç evreyi içermektedir.

2. 4. 1. Yakınlaşma (Appozisyon)

Embriyo ile uterus arasında fertilizasyondan 1-2 gün sonra başlayan bir diyalog söz konusudur. Bu diyalog süreci implantasyon zamanına kadar devam eder ve başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesiyle yavrunun intrauterin yaşamı boyunca da devam edecektir.

İmplantasyon, blastosistin uterin kaviteye ulaşmasından 2-4 gün sonra gerçekleşir. İnsanda implantasyon sahası genellikle midsagittal planda, uterus üst arka duvarıdır. Uterin kaviteye ulaşan blastosist LE ile yakınlaşır ve temas kurmak için hazırlanır. Blastosistin büyümesi ve kontraksiyonu ile blastosist ZP'dan hatching yaparak LE ile kontakt kurar. Bu kontakt için blastosist trofoektoderminin farklılaşmış olması yani blastosist aktifleşmiş implantasyon yeteneğini kazanmış olması gereklidir.

Kemirgenlerde bu süreç jeneralize stromal ödem nedeniyle uterin kavitenin kapanması ve TH ile LEH'deki interdigitasyonların kurulması ile sonuçlanır. Appozisyon evresinde TH ve LEH arasındaki etkileşim sonucunda

trofoblastlar (Tr) ve LEH'nde yüzey adhezyon molekülleri sentezlenir. Ayrıca bu evrede embriyo uterus ilişkisinin erken moleküler markerlerinden biri HB-EGF'dir (31). Progesteron ise bu evrede, hazırlık aşaması ve kapanma için zorunlu bir hormondur.

2. 4. 2. Bağlanma (Adhezyon)

Trofoektoderm-Luminal Epitel Etkileşimi; Bağlanma evresi için adheziv sinyal sistemleri gereklidir. Yapılan çalışmalarda birçok glikoprotein ve karbonhidrat ligand ve reseptörlerin varlığı LEH ve Tr'da gösterilmiştir. Bu süreçte ilişkisi olduğu gösterilen önemli adhezyon molekülleri; integrinler, selektinler, galectinler, heparan sülfat proteoglikanlar (HSPGs), mucin-1, kadherinler (E, P) ve trophinin-tastin-byistin kompleksidir (32-34). İnsan uterusunda integrin- $\alpha\beta3$ reseptiv faz sırasında LEH'de lokalize olmuş ve integrin- $\alpha\beta3$ 'ün bozuk ekspresyonu, tekrarlayan gebelik kayıpları ve infertilite ile ilişkilendirilmiştir (32). Son araştırmalarla selektin oligosakkarid ligandların, reseptiv LE'de ekspresyonu ve L-selektin moleküllerin, Tr hücre yüzeyinde varlığı gösterilmiştir (35). İnsanda implantasyonda özellikle selektin adhezyon sisteminin önemli olduğu ve implantasyon sürecinde bağlanma evresinin başlangıç adımını, selektin adhezyon sisteminin oluşturulması olduğu gösterilmiştir.

İmplantasyon sırasında endometrium, koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-1), lökosit inhibe edici faktör (LIF) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler üretmektedir. CSF-1 ekspresyonu ve CSF-1 reseptörleri desidüada fazla olmak üzere insan endometriumunda ve preimplantasyon evrede embriyoda bulunmaktadır. CSF-1 gen-mutant farelerde düşük implantasyon oranları ve fetal viabilite nedeniyle infertildirler (36). LIF, CSF-1 gibi benzer ekspresyon gösterir. LIF gen-mutant farelerde blastosist implantasyonu başarısız olmuştur (37-38). IL-1 reseptör blokajı da implantasyonu engellemektedir. Ayrıca, LIF'e bağlı olarak, HB-EGF ve COX2 ekspresyonunun bağlanma evresinde önemli olduğu görülmüştür (39-40). EGF, HB-EGF ve LIF gibi büyüme faktörlerinin uterusu üretilmesi ile Hoxa-10 varlığında COX ekspresyonuna imkan sağlar. PG sentezinde major enzimler olan COX'lardan COX2'nin bu süreçte önemli olduğu, PG'lerden özellikle prostasiklinin uterusun blastosisti kabul etme yeteneğinde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte LE'deki

HB-EGF ekspresyonu implantasyon sürecinde belki de maternal ilk değişikliklidir. Buna bağlı olarak blastosist HB-EGF'ye cevap olarak Tr'de EGF reseptörleri içermektedir (41, 42). İmplantasyon sırasında adhezyon kaskadında türe özgü spesifik değişiklikler de gösterilmiştir.

Adhezyon evresinin ilerleyen aşamaları, integrinler, kadherinler ve selektinleri de içeren tüm adhezyon molekülleri ile ilişkilendirilmektedir ve erken embriyo adhezyon molekülleri üzerinden, hücre adhezyonunu sağlayan özellikle laminin ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin ekspresyonu endometrial stromada gerçekleşmektedir (43). İmplantasyon aşamasında desidüalize endometriyumda artmış laminin izoformlarına trofoblastların tutunması önemli bir bulgudur (44). Diğer taraftan, hücre-hücre, hücre matriks etkileşimi, hücre göçü, farklılaşma gibi bir çok olayda görev alan integrinler de endometrial siklusa bağlı değişiklik gösterir ve implantasyon döneminde en üst düzeyde eksprese olurlar.

Trofoblastik göçte, hücre-hücre iletişiminde etkili diğer moleküllerden biri de efrinlerdir. Efrinler, tirozin kinaz hücre membran reseptörlerine bağlanarak etki gösteren peptidlerdir. Efrin ekspresyonu hem endometrial hücrelerde hem de blastosistte saptanabilmektedir (45).

Preimplantasyon embriyo yüzey özelliklerindeki değişikliklerin araştırıldığı çalışmalarda, blastosistin LE'e tutunmasının sadece yüzey özelleşmelerine bağlı olması mümkün gözükmemektedir (46). Blastosist TH'den ve benzer şekilde endometriyum LEH ve stromal hücrelerden çeşitli faktörlerin otokrin, parakrin ve jukstakrin olarak salınması preimplantasyon evrede embriyo-uterus diyalogunda rol alıyor olabilirler.

Blastosistin endometriyum ile daha yakın kontakt kurmasıyla, LE mikrovillusları kısalır ve LE apikal yüzeyi ile bağlantı kurulur. Artık hücre membranlarının son derece birbirine yakın temasta olduğu ve bağlantı komplekslerinin kurulduğu bir evreye erişilmiştir. Başka bir ifadeyle, fizyolojik diyalog süreci artık, bağlanma evresi ile başlayan fiziksel diyalog süreci ile devam etmektedir (23).

2. 4. 3. Penetrasyon ve İnvazyon

Blastosistin tutunması sonrasında TH'nin, LEH'ne penetrasyonu ve devamında trofoblastların farklılaşarak subepitelyal endometrial stromaya

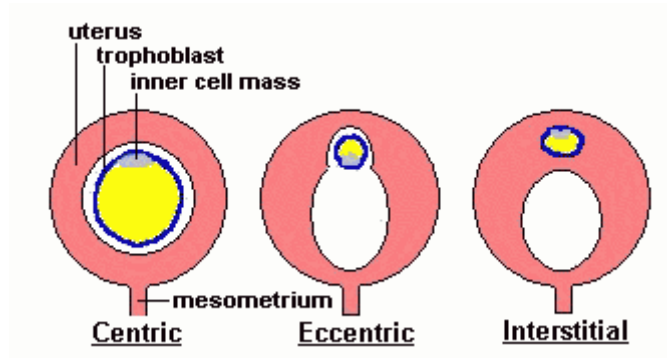
invazyonu periimplantasyon sürecinde üçüncü bir evredir. Ancak implante blastosistin, TH'i ile endometrial LEH'i arasında implantasyon sürecinin penetrasyon ve invazyon evresi, memeli türler içerisinde 2 farklı şekilde gerçekleşmektedir.

Noninvasive İmplantasyon

Bağlanma evresinde implantasyon süreci duraklar ve noninvasive implantasyon 2 farklı tipte izlenir.

- **Sentrik noninvasive implantasyon:** Gelişen büyüyen embriyo bağlanma evresinden sonra uterus boşluğu içerisinde merkezde yerleşim gösterir. Örnek olarak; ruminantlar, at ve domuz

- **Eksentrik noninvasive implantasyon:** Uterus boşluğunun bir kenarına doğru yaklaşmış eksentrik yerleşimli embriyo implantasyonudur. Genellikle mezometriumun karşıt alanında (antimezometrial kutup) yerleşim gösterir. Örnek olarak sıçan, fare verilebilir (47).



Şekil 2. 1. Çeşitli türlerde implantasyon tipleri (47).

İnvasive (İnterstisyel) İmplantasyon

İmplantasyon endometrial stromaya invazyon süreci ile devam eder. Maternal-fetal kontakt kurulması şeklindeki bu implantasyon tipi çoğu memeli türlerde izlenmektedir (İnsan, diğer primatlar ve kobaylar) (47). Bu memeli türlerinde invasive implantasyon 3 farklı şekilde gerçekleşmektedir.

Yer değiştirme (displacement) tip invasive (interstisyel) implantasyon: Çoğu rodentlerde gözlenen bu invasiv implantasyon tipi, uterin bezler arasında konumlanan blastosistin bağlanma bölgesinde ki uterus

endometriumu LEH'de lokal apoptozu ve apoptotik hücrelerin fagositozunu içerir (48). LEH'deki lokal apoptozun indükleyici faktörleri TH ve/veya farklılaşmış stromal hücreler (desidüal hücreler) tarafından sağlanıyor olabilir.

Kaynaşma-birleşme (fusion) tip invasive (interstisyel) implantasyon:

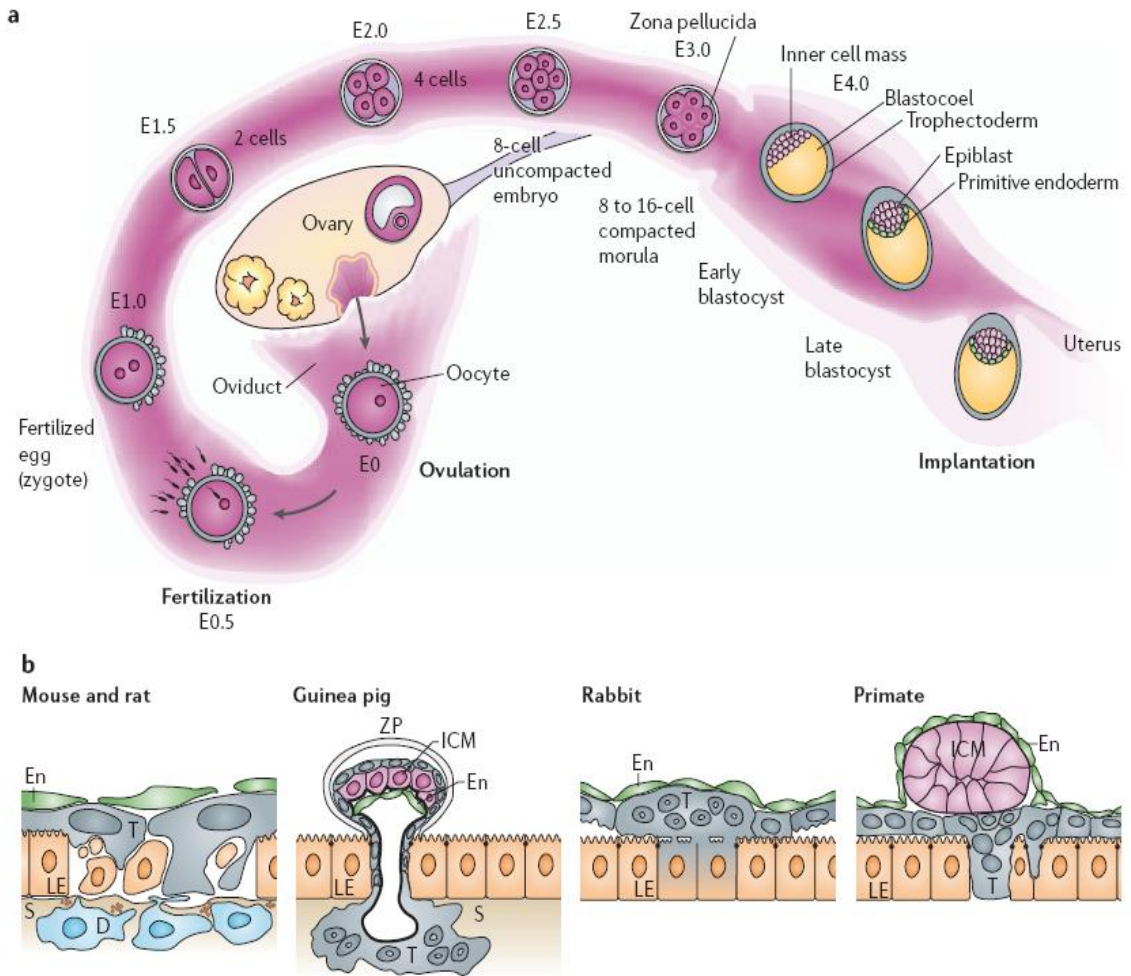
Penetre TH'nin apikal plazma membranı ile uterin LEH apikal plazma membranının kaynaşması sonucu birleşmiş sinsisyum ve simplazma formundaki invasive (interstisyel) implantasyon tipidir (48).

Zorla girme (intrusive) tip invasive (interstisyel) implantasyon:

TH'nin, LEH boyunca ve subepitelyal stromaya zorla girmesi ve göçü sonucunda uterin duvar içerisine blastosistin yerleşmesi şeklindeki invasive (interstisyel) implantasyon tipidir (48).

İnvazyon evresinde;

- Trofoblastların fagositoz yapma yetenekleri, invaziv yapıları
- LEH'nin uzaklaştırılması veya uterin duvardan LEH'nin dökülmesi
- TH kaynaklı enzimlerin (ürokinaz, proteaz) maternal hücre yıkımına neden olması (MMP aktivasyonu ile interselüler matriks komponentleri olan kollajen, elastin ve glikoproteinlerin yıkımı)
- Trofektodermin implante olduğu yüzeyindeki TH'nin adheziv, diğer TH'nin nonadheziv olması
- Büyüme faktörleri ve sitokinlerin aracılığı ile yüksek trofoblastik proliferasyon ve TH migrasyonu
- Matriks bileşenlerine bağlanabilmek için erken trofoblastik invazyonda integrin ekspresyonu, laminin için reseptör ekspresyonu
- Aktif göç edebilen trofoblastların, göç edemeyen trofoblastlardan farklı integrin profiline sahip olmaları
- Stromal hücrelerin trofoblastlardan uzaklaşmaları (temas inhibisyonu)
- İmmun tolerans (immün allo-tolerans), maternal immün sistemin implantasyon bölgesinde baskılanması major belirleyici faktörlerdir (49-60).



Şekil 2. 2. Çeşitli türlerde invazyon tipleri (30)

2. 5. Plasentasyon ve plasenta tipleri

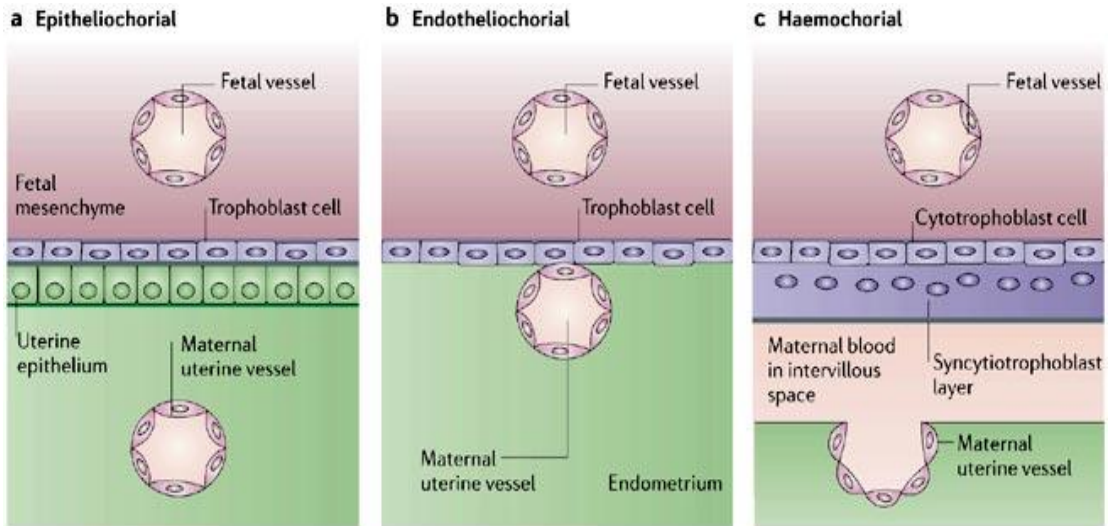
A. Yapısal sınıflandırma

- Diffuz; allantokoriyonun neredeyse tüm uterus yüzeyini kapladığı plasenta formasyonudur (örnek olarak; at, domuz)
- Kotiledonari; endometrium ile allantokoriyonun ilişkisi, çok sayıda ve birbirinden ayrı kotiledon yapılarının ayrı ayrı endometrium ile ilişkide olduğu plasenta formu (örnek olarak; ruminantlar)
- Zonari; fetus etrafında komplet ya da inkomplet bir bant formunda izlenen plasenta (örnek olarak; kedi, köpek, ayı, fil)
- Diskoid; diskoid şekilli, tek parça formundaki plasenta (örnek olarak; primatlar ve rodentler)

B. Fonksiyonel sınıflandırma

Plasental bariyeri oluşturan yapıların özelliklerine göre yapılan sınıflandırmadır.

- Epitheliochorial; plasental bariyer; uterin damar endotelini, endometrial bağ doku, endometrial epitel, koriyonik epitel, fetal bağ doku, fetal kapiller endotelini (inek, at, domuz)
- Endotheliochorial; plasental bariyer; uterin damar endotelini, koriyonik epitel, fetal bağ doku, fetal kapiller endotelini (kedi, köpek)
- Hemochorial; plasental bariyer; sinsitium, fetal kapiller endotelini (insan, rodentler) (61)



Şekil 2. 3. Plasental bariyer tipleri (61)

Plasentasyon süreci endometrial stromaya trofoblastik invazyon ile başlar. Trofoblastlar potansiyel olarak invaziv kapasiteleri olan hücrelerdir. İnvazyon kontrolsüz olursa uterus ve uterus duvarı boyunca bir yayılım söz konusu olur. Ancak endometrium lokal olarak salgılanan faktörlerin (sitokinler ve proteaz inhibitörler) etkisi ile trofoblast invazyonunu kontrol altına alarak sınırlandırır. Ayrıca endometrial stromal hücrelerin farklılığı ile oluşan desidual hücre tabakası da trofoblastik invazyonu sınırlamaktadır.

Trofoblastik aktivitenin kontrolü; büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, enzimlerin, plazminojen aktivatör ve inhibitör faktörlerin arasındaki denge ile sağlanır (IGF, IGF-BP1, CSF-1, LIF, IL-1, MMP, TIMPs, TGF- β , PAI-1, hCG) (62-63).

2. 6. Postimplantasyon Uterin Cevap

Implantasyon sonrası uterusda meydana gelen değişiklikler;

Stromal hücreler ve desidualizasyon

Endometrial stromal hücreler ve ekstraselüler matriks bileşenleri menstruel siklusun midsekretuar fazı sırasında implantasyona hazırlık için değişiklikler gösterir (desidualizasyon). Örneğin; hyaluronan artar, tip IV kollajen azalır, tip I ve tip III kollajenin üretimi azalır. Normal siklus döneminde geçici olarak izlenen desidualizasyon, implantasyonun gerçekleşmesiyle implantasyon bölgesinde daha belirgin olmak üzere tüm endometriyumda gerçekleşen bir reaksiyon olarak izlenir. Birden fazla blastosistin implante olması durumunda implantasyon alanları, ayrı desidualizasyon ve plasantasyon alanları ile birbirinden ayrılır (4).

Desidualizasyonun karakteristik özellikleri

- Endometrial stromal hücrelerde büyüme, genişleme (iri, poligonal hücreler)
- Uterin spiral arterlerin büyümesi
- Makrofaj ve büyük granüler lenfosit ya da uterin natural killer hücrelerin endometrial stromaya infiltrasyonu
- Endometrial stromal bağ dokuda farklanma

Desidual hücrelerin ve oluşturdukları desiduanın özellikleri

- Sitoplazmik glikojen ve lipit içerikleri fazladır
- Sinsityotrofoblastlara yakın yerleşimlilerin dejenere olması ile embriyo için besin kaynağı sağlarlar
- Plasenta yapısına katılırlar
- Embriyo rejeksiyonunun önlenmesi sağlar
- Trofoblastik invazyonun kontrolü sağlar

- Birden fazla blastosist implantasyonunda, implantasyon bölgeleri birbirlerinden ayırtebilir (gebede USG ile ayırtebilebilir)
- Doğum olayında plasentanın ayrılmasını sağlarlar

Postimplantasyon Uterin Gelişim

İmplantasyon alanındaki uterin stromal hücreler bağlanmayı takiben normal siklus döneminde izlenen predesidualizasyonun tamamlanması için değişime uğrarlar (desidualizasyon). Kemirgenlerde implantasyon bölgesi antimezometrial lokalizasyonlu olacak şekildedir ve embriyo antimezometrial endometrial stromal yatağa gömülür. Dolayısıyla desidualizasyon antimezometrial kutupta başlar mezometrial kutba doğru devam eder. Fonksiyonel plasenta (koriaallantoik plasenta) oluşumuna kadar desidua embriyoyu besinsel olarak destekler (ektoplasental kon bölgesi). Ayrıca desidualizasyon sırasında endometriumda, süreçte çok önemli olan çok sayıda sinyal molekülleri eksprese edilir (sitokinler, homeobox transkripsiyon faktörler, hücre siklus molekülleri, ekstraselüler matriks remodeling faktörler ve lipid mediatörler). Gebelik sırasında uterusta gerçekleşen dinamik hücresel ve moleküler değişiklikler, yeni hücre tiplerinin yerleşimini, polarite ve sınırlarını belirlemede bir koordinasyon içerisindedirler. Yani antimezometrial ve mezometrial kutuplarda gerçekleşen farklı hücresel ve moleküler değişiklikler implantasyon bölgesinin belirlenmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla uterus-embriyo aksının kurulma yönelimi belirlenmektedir (30).

Koriyonun embriyonik ve abembriyonik kutuplarda gösterdiği yapısal değişiklikler, desiduanın yapısını da etkiler. Desiduanın koriyon frondozuma komşu kısmı desidua bazalidir. Desidual plak olarak da adlandırılan desidua bazalis, lipid ve glikojenden zengin iri poligonal hücrelerden meydana gelmiş sıkı bir tabakadır. Desidua bazalis koriyona sıkıca tutunmuştur (21).

Abembriyonik kutup üzerindeki desidua kısmı desidua kapsülarisdir. Plasentasyon bölgesinin dışında kalan endometrial stomada da desidualizasyon izlenir ancak bu plasentasyon bölgesindeki gibi tam bir desidualizasyon değildir ve desidua paryetalis olarak adlandırılır (21).

Desidua kapsülaris daha sonra, konseptusun gelişerek uterus boşluğunu doldurmasıyla dejenere olur ve desidua kapsülarisin altındaki koriyon leva desidua paryetalis ile kaynaşır (21).

Ekstraselüler Matriks Değişiklikleri

Desidüalizasyon sırasında stromal fibroblastlar desidüal hücrelere farklılaşırlar ve her bir hücrenin etrafında varlığı aşıkâr olan bazal membran ve ekstraselüler matriks bileşenleri; laminin, entactin, tip IV kollajen ve heparan sülfat proteoglikanlarda değişiklikler izlenir. Ekstraselüler matriks bileşenleri, MMPs'lerin ve TIMPs'lerin etkileri ile trofoblastik hücrelerin davranış ve fonksiyonlarını etkilerler (4, 62).

İmplantasyon ve desidüalizasyon sırasında uterin anjiogenez

Reproduktif siklus ve gebelik sırasında over ve uterusta mevcut vasküler yataktan yeni kan damarları gelişimi gerçekleşmektedir. Normal bir implantasyon, desidüalizasyon ve plasantasyon sürecinde vasküler permeabilitede artış ve neovaskülarizasyon görülür. Bu süreçlerde östrojen ve progesteron hormonlarının potansiyel etkileri söz konusudur. Vasküler permeabilite ve anjiogenezin regülasyonu, anjiogenik faktörleri, vazoaktif faktörleri ve hormonları (vascular endothelial growth factor (VEGF) ve VEGF reseptörlerini, insulin benzeri büyüme faktörlerini (IGF), anjiopoetinleri, fibroblast growth faktörlerini (FGF), plasenta growth faktör, TGF- β ve hCG'yi içerir (30, 64).

Kemirgenlerde implantasyonun başlamasının dikkat çekici ilk işareti blastosistin bağlanacağı alanda anjiogenez ve endometrial vasküler permeabilitedeki artıştır. Bu aşama intravenöz "blue dye solution" injeksiyonu sonrasında uterusta farklı mavi bantlar olarak gözlenebilmektedir (65, 66). VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor ya da FGF2) ve anjiopoetin embriyogenez sırasında anjiogenez için anahtar mediatörlerdir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda östrus siklusu sırasında uterusta VEGF ekspresyonu ve VEGF regülasyon mekanizmasının implantasyonda rollerinin olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca VEGF'nin regülasyonu da ovarian steroid hormonlar etkisi altındadır. İmplantasyon öncesinde VEGF, LEH'ne yakın lokalizasyonda eksprese edilirken, implantasyonun başlaması ile stromal bölgede, implantasyon sonrasında ise desidüalizasyon alanlarında yaygın olarak eksprese edilmiştir. İmplantasyon sürecinde aktif olarak anjiogenez gerçekleşmektedir ve muhtemelen VEGF aracılık etmektedir. bFGF'nin (bazik fibroblast büyüme faktörü), uterusta endometrial ve miyometrial vasküler bazal

laminalarda, stromal ve ekstraselüler matriks hücreleri ile glandular ve yüzey epiteli bazal laminalarında immunohistokimyasal analizlerle lokalizasyonları gösterilmiştir. Ayrıca implantasyon ve desidualizasyonda anjiogenez ile ilgili yapılan çalışmalarda FGF araştırılmış ve bFGF'ün periimplantasyon sürecinde ve gebelik sırasında progesteron ve prolaktin etkisiyle ekspresyonlarının up-regüle olduğu gösterilmiştir. Kemirgenlerde anjiogenezin gerçekleştiği periimplantasyon süreci ve gebelik sırasında bFGF ve bFGF reseptörlerinin ekspresyonları artmıştır ve gebelik sırasında uterin sekresyonlarda büyüme faktörlerin varlığı embriyonik gelişimin düzenlenmesinde FGF'ün de rol oynayabileceğini göstermiştir. Anjiopoetinler ise VEGF ve prostaglandinler (PG) ile ilişkili sinyal yolları ile etkileşim içerisindedirler (30, 67-69).

2. 7. Wnt Gen Ailesi ve Wnt Proteinleri

Wnt terimi, *Drosophila melanogaster* **wingless (Wg)** geni ve farede 15. kromozom üzerindeki Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) geni olan **int-1** geninin adlarından türetilmesi ile oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalarda çeşitli türlerde 100'den fazla Wnt geni gösterilmiştir. İnsanda 19 Wnt geni tanımlanmıştır. Bunlar 13 alt aile ve bazı izoformlardan oluşmaktadırlar (70-75).

Wnt Gen Organizasyonu

Wnt gen ürünleri olan Wnt proteinleri, salgılanmış glikoprotein moleküller olarak eksprese edilmişlerdir. Her Wnt geni için kromozomal lokasyon belirlenmiştir (tablo 2.1.) (75).

Wnt Proteinlerinin Yapısal Özellikleri

Wnt genleri strüktürel olarak, korunmuş zengin sistein kalıntıları ile karakterize, salgılanmış bir glikoprotein ailesidir. Wnt proteinleri bütün memelilerde yaklaşık olarak 350-400 aminoasit (aa) uzunluğundaki yaklaşık olarak 39-112 kDa moleküler ağırlığa sahip salgısal proteinlerdir. Korunmuş 22-24 sistein kalıntısı içeren büyük domainlere sahiptirler ve bilinen major Wnt proteinlerinde tam olarak korunmuş sisteinden zengin domainler izlenmektedir (70, 74, 75). Wnt proteinleri amino terminal sinyal dizisine sahiptirler. Karboksi terminal bölgesi ise korunmuş sistein kalıntılarında zengin bir bölgedir. Bu

bölge sinyal aktivitesi ve farklı Wnt'lerin özgüllüğünün belirlenmesinde rol oynamaktadır. Çok sayıda molekül içi disülfid bağları içeren Wnt'ler kıvrımlı bir yapıdadır.

Tablo 2.1. Wnt genlerin kromozomal lokasyonları

Wnt'ler	KL	Wnt'ler	KL
Wnt1	12q13	Wnt7b	22q13.3
Wnt2	7q31	Wnt8a/D	5q31
Wnt2b/13	1p13,	Wnt8b	10q24
Wnt3	17q21	Wnt10a	2q35
Wnt3a	1q42.13	Wnt10b/12	12q13.1
Wnt4	1p35	Wnt11	11q13.5
Wnt5a	3p14-P21	Wnt14	1q42
Wnt5b	12p13.3	Wnt15	17q21
Wnt6	2q35	Wnt16	7q31
Wnt7a	3p25		

KL: kromozomal lokasyon

Wnt Proteinlerin Sentezlenmesi: Wnt gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda; Wnt'lerin transkripsiyonel, RNA splicing, post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyeleri gösterilmiştir. Patolojik durumların olmadığı şartlarda gerçekleşen bu kusursuz ve sıkı regülasyon, Wnt'lerin hedef hücrelerde ve dokularda doğru fonksiyon görmesini sağlamak içindir. Her bir Wnt proteini birçok temel gelişim süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (76).

Nuklear transkripsiyon sonrasında, N-terminal hidrofobik sinyal peptidleri içeren immatür Wnt proteinleri prekürsörler olarak endoplazmik retikuluma (ER) yönlendirilirler. ER'da sinyal peptidinden ayrılır, glikozilasyon ve lipid eklenmesi ile modifiye edilerek hedef hücreler üzerindeki biyolojik aktiviteleri üst düzeye çıkarılır (76).

Wnt Proteinlerin Etki Mekanizmaları: Reseptörleri, İntraselüler Sinyal Yolları

Hedef hücre ve dokularda Wnt'lerin kabul edilmesi ve intraselüler bir dizi reaksiyonu gerçekleştirmeleri hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörleri aracılığı ile sağlanır. Bu reseptörler 2 farklı aile üyeleri olarak, Frizzled (Fzd) ve LDL (low-density lipoprotein)-reseptor-related-protein (LRP) aileleridir. Wnt proteinler yalnızca Fzd reseptörlerine veya Fzd-LRP koreseptör kompleksine bağlanarak etki gösterirler. Wnt protein ailesi üyelerinin bazıları Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine, bazıları sadece Fzd reseptörüne spesifik göstererek, reseptör ligand etkileşimini gerçekleştirirler. Wnt proteinler hedef hücre ve dokularda bulunduğu sürece spesifik reseptörleri üzerinden bazı intraselüler sinyal yollarını aktive ederler. Ancak Wnt proteinlerin bu aktiviteleri bazı moleküllerce düzenlenmektedir. Bu düzenlenme olayında fonksiyon gören ekstraselüler moleküller burada antagonist moleküller olarak ifade edilecektir (70-76).

Frizzled (Fzd) Ailesi

İlk olarak *Drosophila*'da tanımlanmışlardır. İnsanda 10 Fzd reseptörü (Fzd1-10) tanımlanırken, çeşitli türlerde de ayrıca gösterilmiş diğer Fzd reseptörleri de vardır. Fzd proteinleri 500-700 aa uzunluğundadır, ekstraselüler amino terminal ve intraselüler karboksi-terminal domainlere sahiptirler. Fzd proteinler, 7 kez geçişli transmembran reseptörlerdir. 7 hidrofobik domain içeren bu proteinler, plazma membranında α -helix transmembran formunda yerleşmişlerdir.

Ekstraselüler N-terminal uçta sisteinden zengin (CRD; cysteine-rich domain) bölge ve ayrıca 40-100 aa'lık hidrofilik bağlayıcı bölge bulunmaktadır. CRD domain, Wnt molekülleri için uygun bağlanma bölgesidir.

İntraselüler carboxy-terminal **PDZ** domaini [PDZ; PSD-95 (a 95 kDa protein involved in signaling in the post-synaptic density), Dlg (the *Drosophila* discs large protein), and ZO1 (the zonula occludens 1 protein involved in maintaining epithelial cell polarity)] farklı uzunluklara sahiptir. 7.hidrofobik domainden sonra gelen intrasitoplazmik kısımda 2 aa'lık bölge yüksek derecede korunaklı bir bölgedir ve burası intraselüler Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonu için zorunludur. Ayrıca intraselüler domain, Dishevelled (Dsh) için bağlanma bölgesi içerir (70-76).

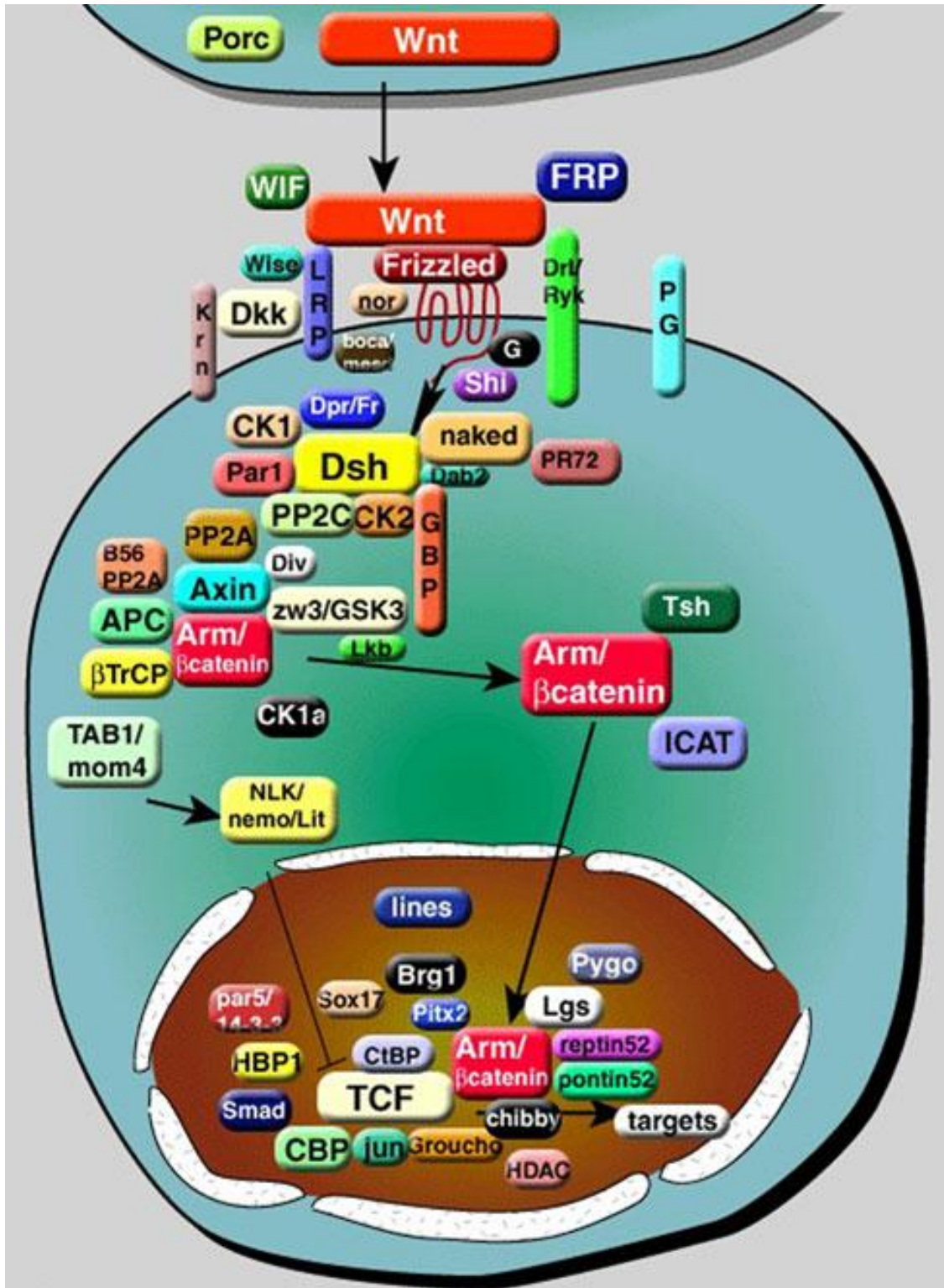
LDL (Low-Density Lipoprotein) Reseptör Ailesi ve LDL-Reseptor-Related-Protein (LRP) Ailesi

LDL reseptör ailesinin bilinen 13 üyesi vardır. Çeşitli doku ve/veya hücre tiplerinde çeşitli transport ve sinyal fonksiyonlarında görev yapmaktadırlar. Bütün üyeleri tek geçişli transmembran proteinlerdir ve sisteinden zengin komplementler içerirler.

LDL-reseptor-related-protein (LRP) ailesi üyelerinden LRP5 ve LRP6 homolog protein reseptörlerdir. LRP5 ve LRP6 aynı zamanda Fzd reseptörleri ile koreseptor proteinlerdir. Ekstraselüler domainlerine birkaç farklı molekül bağlanabiliyor ise de özellikle Wnt'ler ve Dickopff'lar için özgülükleri vardır. Ayrıca 6 aralıklaştırıcı domainle boşluk oluşturulmuş 4 EGF-like domain içerirler. 3. ve 4. EGF-like domain Dickopff-1 için, Wnt bağımlı 1. ve 2. EGF-like domain Fzd için bağlanma bölgeleridir. İntraselüler domaini ise Aksin için bağlanma bölgesi içerir (77, 78).

Ayrıca Wnt'ler için alışılmadık bazı reseptörler bulunmaktadır. Bunlar Kripto [ya da FRL1 (fibroblast growth factor receptor ligand-1); EGF-CFC (Epidermal Growth Factor-Crypto FRL Cryptic) ailesi üyesi] reseptörü (EGF-like domain ve CFC domain içerirler), RTK (reseptör tirozin kinaz) alt familyasından transmembran tirozin kinaz reseptörü Derailed (Drl) veya RYK (receptor-like tyrosine kinase or receptor related to tyrosine kinases) ve diğer bir başka tirozin kinaz reseptörü Ror2'dir (79).

Daha önce yapılan in-vivo deneylerde Wnt proteinler, onların farklı intraselüler sinyal yollarını aktifleştirmelerine dayanılarak "kanonikal ve nonkanonikal Wnt'ler" diye iki sınıfta gruplandırılmıştı. Bununla birlikte bazı Wnt'lerin hem kanonikal hem de nonkanonikal özelliklere sahip olduğu da görülmüştü (7).



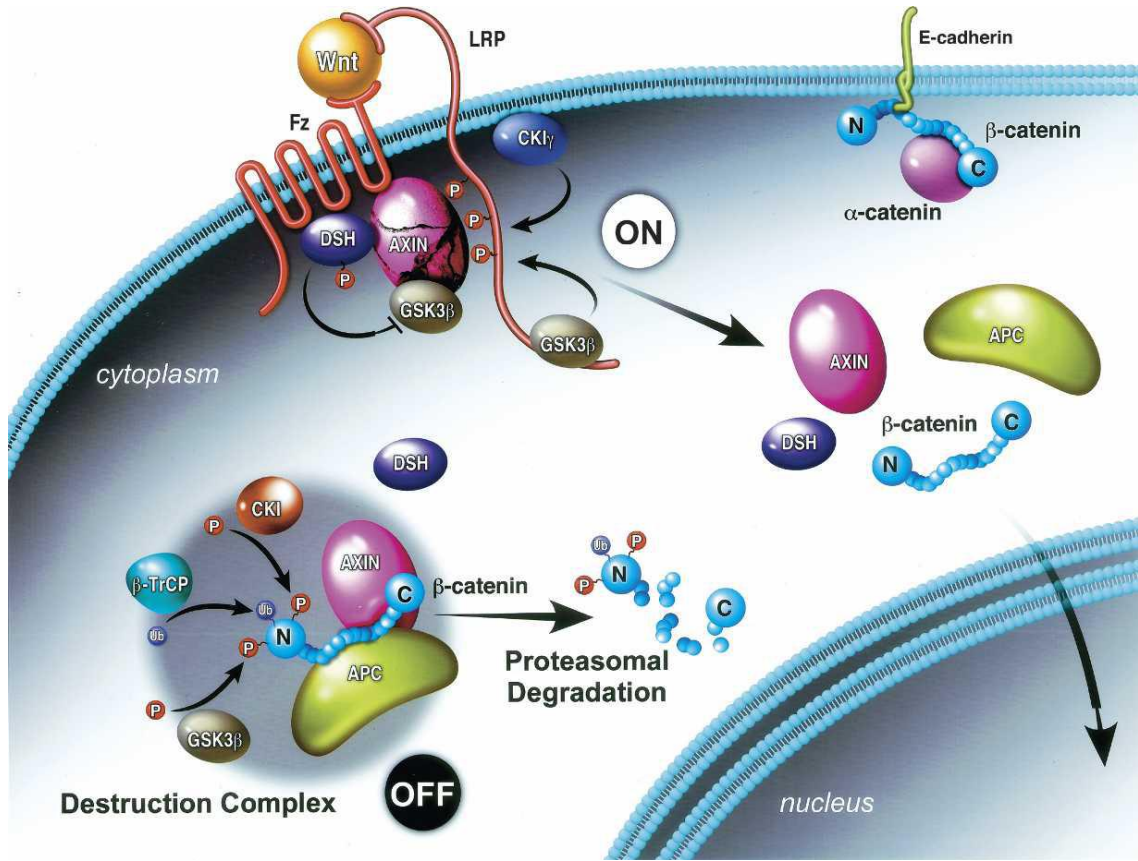
Şekil 2. 4. Wnt reseptörleri ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu (80)

2. 7. 1. İntraselüler Sinyal Yolları

Bazı Wnt proteinler Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine, bazıları Fzd reseptörlere ve bazıları da diğer Wnt reseptörlere ve koreseptörlere özgüllük göstermektedirler. Wnt proteinler özgül reseptörlerine bağlanarak bazı intraselüler sinyal yollarını aktive ederler. Bunun sonucunda açığa çıkan ürünler Wnt'lerin etkilerini göstermek üzere fonksiyon göreceklerdir. Bu açıdan mevcut çalışmalardan hareketle, Wnt'lerin en az 3 intraselüler sinyal yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. Bunlar kanonikal (Wnt/ β -katenin) sinyal yolu, non-kanonikal sinyal yollarıdır (Wnt/ Ca^{+2} , Wnt/polarity veya Wnt/planar cell polarity (PCP) (75-82).

Kanonikal Sinyal Yolu

Wnt'lerin Fzd/LRP koreseptör kompleksine bağlanması sonucunda aktifleşen Wnt/ β -katenin-TCF/LEF intraselüler sinyal yoludur. β -katenin kaderinlerin intraselüler domainine ve sitozolik protein komplekslere bağlı olarak bulunmaktadır. Fzd reseptörünün intraselüler domaini, Dsh ile LRP5/6 reseptörünün intraselüler domaini, aksin (tumor suppressor protein) ile fiziksel olarak etkileşim gösterebilmektedir. APC (Adenomatous polyposis coli, tumor suppressor protein), GSK-3 α/β (glycogen syntase kinase), β -katenin, Aksin, CKI (CK1 γ (caseine kinase 1 family member) sitoplazmik kompleks (cytoplasmic destruction complex) halde bulunurlar ki kanonikal Wnt sinyal yolunun önemli aktörüdürler. Wnt yokluğunda ve/veya Wnt'lerin Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine bağlanması engellendiğinde kanonikal sinyal yolu aktifleşemez ve APC, GSK-3 β , CKI, β -katenin, aksin kompleksinde β -katenin'in fosforilasyonu ve ubikütinasyon ile proteozomal degradasyonu gerçekleşir. Wnt'lerin varlığında ve özgül reseptörlerine bağlanması ile Dsh fosforile olarak Fzd reseptörünün intraselüler domainine bağlanır, kompleks aksin'in fosforilasyonu ile LRP5/6 reseptörünün intraselüler domainine bağlanır. Böylece β -katenin'in sitozolik akümüülasyonu ve nükleer transportu gerçekleşir. Sitozolik serbest β -katenin ayrıca kaderinlerin intraselüler domainine α -katenin ile birlikte bağlanmaktadır (75-82).



Şekil 2.5. Wnt/βkatenin sinyal yolu, sitoplazmik süreç (81)

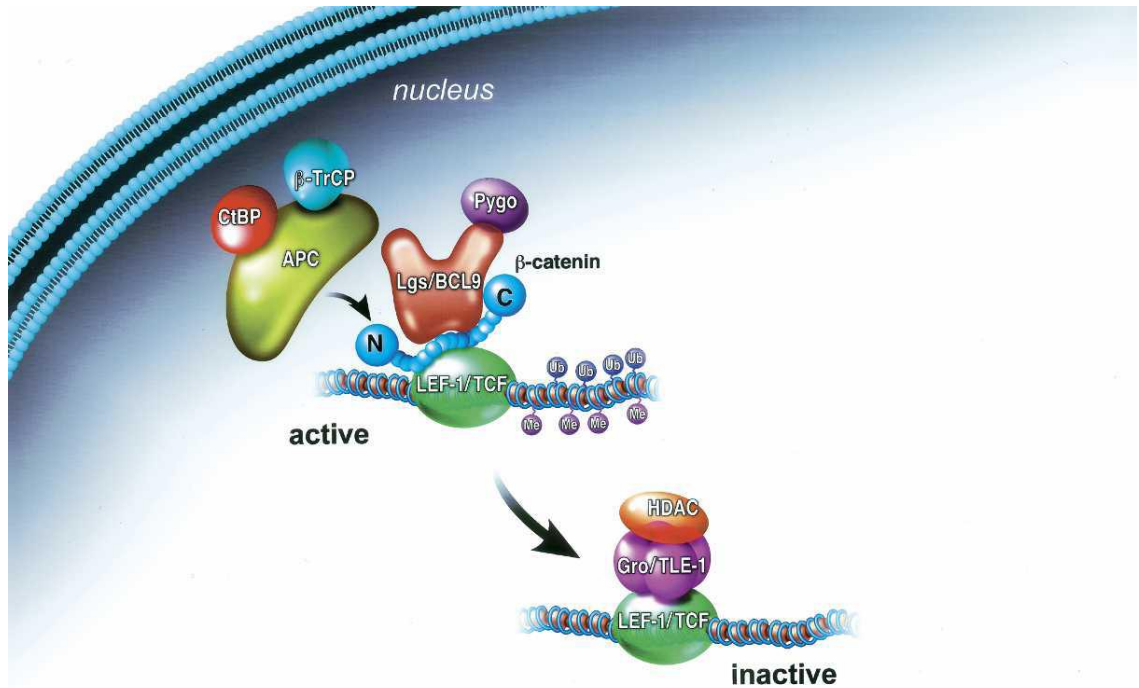
β-katenin'in Nüklear Aktivitesi

β-katenin transkripsiyon faktörleri TCF/LEF (T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor) ailesi aktivasyonunu sağlayarak hedef genlerde transkripsiyon gerçekleşir. Nüklear β-katenin yokluğunda TCF/LEF, transkripsiyonal repressorler Groucho ve histone deasetilaz ile represiv kompleks oluşturmak suretiyle Wnt hedef genlerin transkripsiyonu engellenir. Ne zaman β-katenin nükleusa girer, represiv kompleksteki repressorler ile yer değiştirdiğinde ise Wnt hedef genlerde transkripsiyon aktivitesi gerçekleşir. β-katenin/TCF/LEF kompleksine bazı DNA-binding proteinler katılarak transkripsiyon aktivitesini sağlarlar. Bunlar, histone asetilaz CBP/p300 (CBP; CREB-binding protein, (CREB; cAMP-response element-binding protein), Brg1 (Brg; Brahma-related gene, SWI/SNF chromatin-remodelling complex family member), Lgs (Legless; Bcl9 (B-cll CLL lymphoma-9) oncoprotein homoloğu) ve Pygo (Pygopus) gibi transkripsiyon aktivatörleridir. Ayrıca DNA-binding proteinler Prop1 ve Pitx2'de diğer

transkripsiyon aktivatörler olarak gösterilmiştir (Prop1 (Pit1) ve Pitx2, homeobox genlerden Pitx gen ailesi (veya PTF; pituitary transcription factor family) üyeleridir).

β -katenin'in nüklear aktivitesinin negatif regülasyonu, mitogen-activated protein (MAP) kinase-related protein kinase NLK (Nemo-like kinase) ile sağlanır ki, TCF fosforilasyonu gerçekleşir ve β -katenin/TCF/LEF kompleksinin DNA'ya bağlanma afinitesi azalır ve ayrıca β -katenin antagonistleri olan Chibby ve ICAT (katenin inhibitörü) β -katenin'e bağlanarak kompleksden ayrılmasına neden olmaktadır.

Sonuçta, kanonikal sinyal yolu aktivitesi ile Wnt hedef genlerde, spesifik hücre siklus genlerinde ve PTF genlerinde transkripsiyon gerçekleşir. Transkripsiyon ürünlerinin aktiviteleri de, Wnt proteinlerin neden olduğu fonksiyonlarını ve etkilerini göstereceklerdir (75-82).



Şekil 2. 6. Wnt/ β katenin sinyal yolu, nüklear süreç (81)

Nonkanonikal Sinyal Yolları

Nonkanonikal sinyal yolları, Wnt proteinlerin Fzd reseptör ailesi üzerinden gerçekleştirdiği Wnt/PCP (planar cell polarity) ve Wnt/Ca⁺² ile ROR2 [receptor tyrosine kinase (RTK)'ların Ror ailesinden]-JNK (cJun N-terminal kinases) sinyal yolu ve RYK (receptor-like tyrosine kinase)-Src sinyal yolu gibi koreseptörler üzerinden aktifleştirdiği β -katenin'den bağımsız intraselüler sinyal yollarıdır (75-82).

Wnt/polarity veya Wnt/planar cell polarity (PCP) sinyal yolu

Wnt proteinlerin Fzd reseptörlere bağlanması ile "Rho/Rac small GTPases" aktivitesi sağlanırken, bunun sonucu olarak gelişim sırasında gerçekleşen önemli morfogenetik olaylarda, gen ekspresyonu ve takip eden hücre iskeleti organizasyonunun sağlanması ve ayrıca hücre ve doku polaritesinin düzenlenmesi gerçekleşir.

Wnt'ler Fzd reseptörüne bağlandıktan sonra, Fzd reseptörün intraselüler domaini Dsh ile bağlanır ve Daam1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1) Dsh'e bağlanarak Rho-RhoK (Rho-kinase) sinyal yolunu aktifleştirir.

Wnt proteinlerin bazılarının Fzd reseptöre bağlandıktan sonra, Fzd reseptörün intraselüler domaini Dsh ile bağlanır ve Rac-JNK sinyal yolu aktivitesi gerçekleşir (75-82).

Wnt/Ca⁺² sinyal yolu

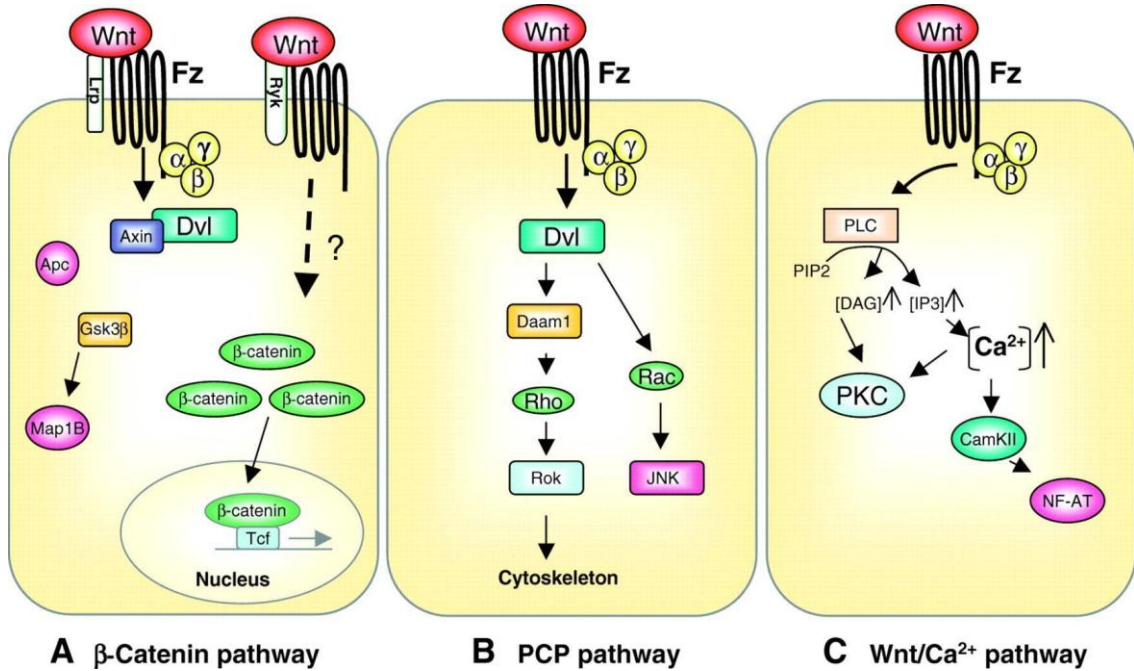
Bazı Wnt proteinler de Fzd reseptöre bağlandıktan sonra, Fzd reseptörün intraselüler domaini Dsh ile bağlanır ve ayrıca heterotrimeric G protein (G $\alpha\beta\gamma$) ve phospholipase C stimülasyonu gerçekleşir. Böylece intraselüler Ca⁺² salınımı artar, siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyesi azalır. Bu sonuçlar, intraselüler Wnt/Ca⁺² sinyal yolunun aktifleşmesinin, PKC (protein kinase C) ve CamKII (Ca⁺²-calmodulin-dependent protein kinase II) gibi kalsiyuma duyarlı enzimlerin aktivitesinin sağlanması ile gerçekleştiğini göstermektedir. Sonuçta transkripsiyon faktörlerinden NFAT (nuclear factor of activated T-cells) aktivitesi ile hedef genlerde transkripsiyon gerçekleşir. Wnt/Ca⁺² sinyal yolu, hücre akibeti ve hücre hareketinde etkileri olan sinyal yoludur (75-82).

Diğer İntraselüler Wnt Sinyal Yolları

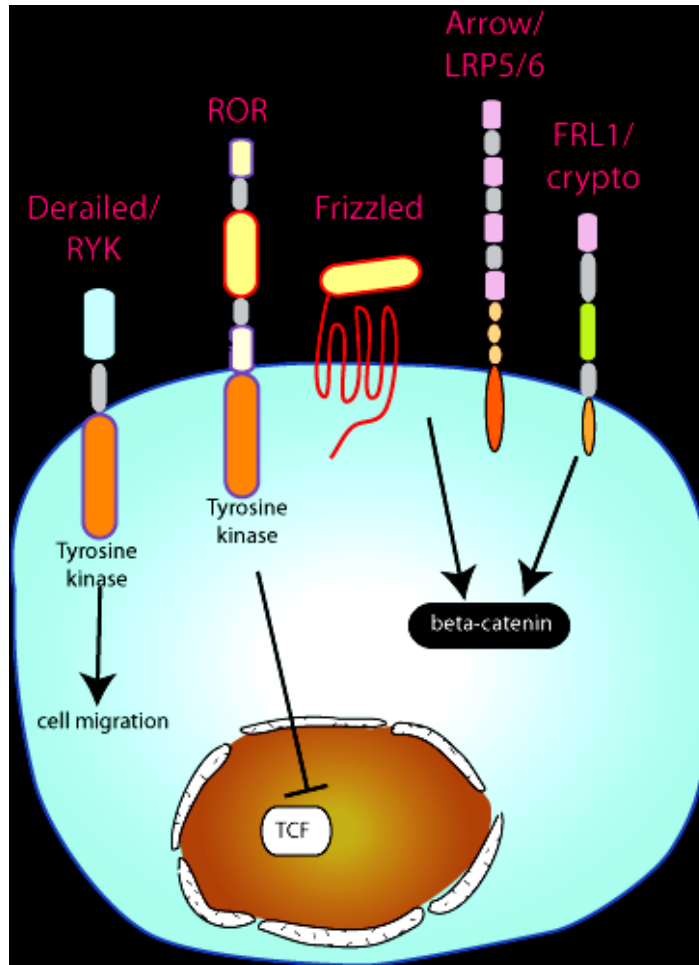
Bunlar, Wnt-Ryk-Src (Src; tirozin kinaz ailesi üyesi Src ailesi) ve Wnt-Ror2-JNK sinyal yollarıdır. Bu yollar henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Ryk ve Ror2 reseptörler yapısal olarak Fzd reseptörlerinden farklıdır. Ryk ve Ror2 reseptörler tek geçişli transmembran protein reseptörlerdir ve ayrıca ekstraselüler ve sitozolik domainleri de bazı farklılıklar içerir.

Ryk ve Ror2 reseptörler Fzd reseptörler ile etkileşim içerisinde olabilirler ve bu alternatif Wnt sinyal yollarının, diğer intraselüler Wnt sinyal yolları regülasyonu üzerine olası etkileri olabilir.

Kripto, EGF-CFC reseptörü, olasılıkla Fzd reseptörler ile birlikte β -katenin aktivasyonu sağlarlar. Ayrıca, intraselüler Wnt sinyal yolları, HH (Hedgehog), SHH (Sonic Hedgehog), IHH (Indian Hedgehog), DHH (Desert Hedgehog), BMP (Bone Morphogenetic Protein), FGF gibi bazı faktörlerin sinyal yolları ile etkileşim gösterirler (75-82).



Şekil 2. 7. Wnt sinyal yolları (82)



Şekil 2. 8. Wnt reseptörleri (83)

2. 7. 2. Wnt Sinyal Yolunun Ekstraselüler Antagonistleri ve/veya İnhibitörleri veya Modülatörleri

Wnt sinyal yolunun ekstraselüler antagonistleri 2 genel sınıfa ayrılabilir. Her iki sınıfta, reseptör ligand etkileşimini engelleyen, etkileyen molekülleri içermektedir. Bu iki sınıf, Dickkopf ve sFRP (secreted frizzled-related protein) aileleridir (7).

Dickkopf Ailesi

Dickkopf (Dkk) ailesi üyeleri (Almancada dick=thick, kopf=head) Wnt reseptör kompleksi olan Fzd/LRP5/6'nın LRP5/LRP6 komponentine bağlanarak Wnt sinyalini inhibe eder. Dolayısıyla Dickkopf ailesi üyeleri spesifik olarak kanonikal Wnt sinyal yolunu inhibe ederler. Wnt proteinlerin Fzd/LRP5/6 reseptörüne bağlanması ile birlikte, eş zamanlı olarak Dkk

proteinler de Wnt koreseptörü olan LRP5/6 reseptörüne bağlanırlar. Sonuçta ya Wnt/Fzd/LRP5/6 reseptör ligand oluşumu engellenerek ya da Wnt/Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine Dkk'larında eklenmesiyle reseptör kompleksinde gerçekleşen transformasyon ile kanonikal Wnt sinyal yolunu inhibe ederler (7).

Dkk ailesi üyeleri LRP5/6 reseptörü haricinde tek geçişli transmembran protein olan Kremen (Krm) reseptör ailesine de bağlanarak etki gösterirler. Ancak Dkk proteinler Kremen reseptörlerine ve LRP5/6 reseptörlerine birlikte bağlanabilmektedirler. Sonuçta Dkk/LRP5/6/Krm üçlü kompleksi oluşmaktadır. Oluşan bu kompleks, Wnt/LRP5/6/Fzd sinyal kompleksindeki LRP5/6 reseptörünün Dkk ve Krm ile birlikte endositozuna neden olarak plazma membranındaki Wnt reseptörlerinin internalizasyon ile yok edilmesini sağlamak suretiyle Wnt sinyal yolunu inhibe ederler. Kanonikal sinyal yolunda, sitozolik destruksiyon kompleksindeki aksin'in, LRP reseptörünün intraselüler domainine fiziksel olarak bağlanması ve plazma membranında toplanmasıyla β -kateninin sitozolik akümülyasyonu ve nükleer transportu sağlanıyordu. Dolayısıyla Dkk/LRP5/6/Krm kompleksinin internalizasyonu, aksin'in plazma membranında toplanmasını inhibe ederek kanonikal sinyal yolunu inhibe eder. Bununla birlikte Dkk proteinlerin bu aktiviteleri, Dkk'ların nonkanonikal sinyal yollarını aktive edebileceğini akla getirmektedir. Çünkü, Dkk'lar Wnt reseptörlerinden LRP ailesine bağlanarak, Wnt/Fzd/LRP kompleksinin aktivitesini inhibe ediyor, oluşan Dkk/LRP5/6/Krm kompleksi internalize oluyor yani Fzd-LRP etkileşimi engelleniyor ve plazma membranında Wnt/Fzd reseptör kompleksi kalıyor. Dolayısıyla Wnt/Fzd aktivitesi ile gerçekleşen nonkanonikal sinyal yolları aktifleşiyor olabilirler (7).

Dkk ailesinin 5 üyesi vardır. **Dkk-1**, Dkk-2, Dkk-3, Dkk-4 ve Soggy (Dkk-3 related protein)'dir. Dkk ailesi, bağlayıcı bir kısımla birbirinden ayrılmış sisteinden zengin 2 domain (cys-1, cys-2) içerirler. Cys-2, ailenin üyeleri arasında özellikle korunmuş bir domaindir ve 10 sistein kalıntısı içerir (7).

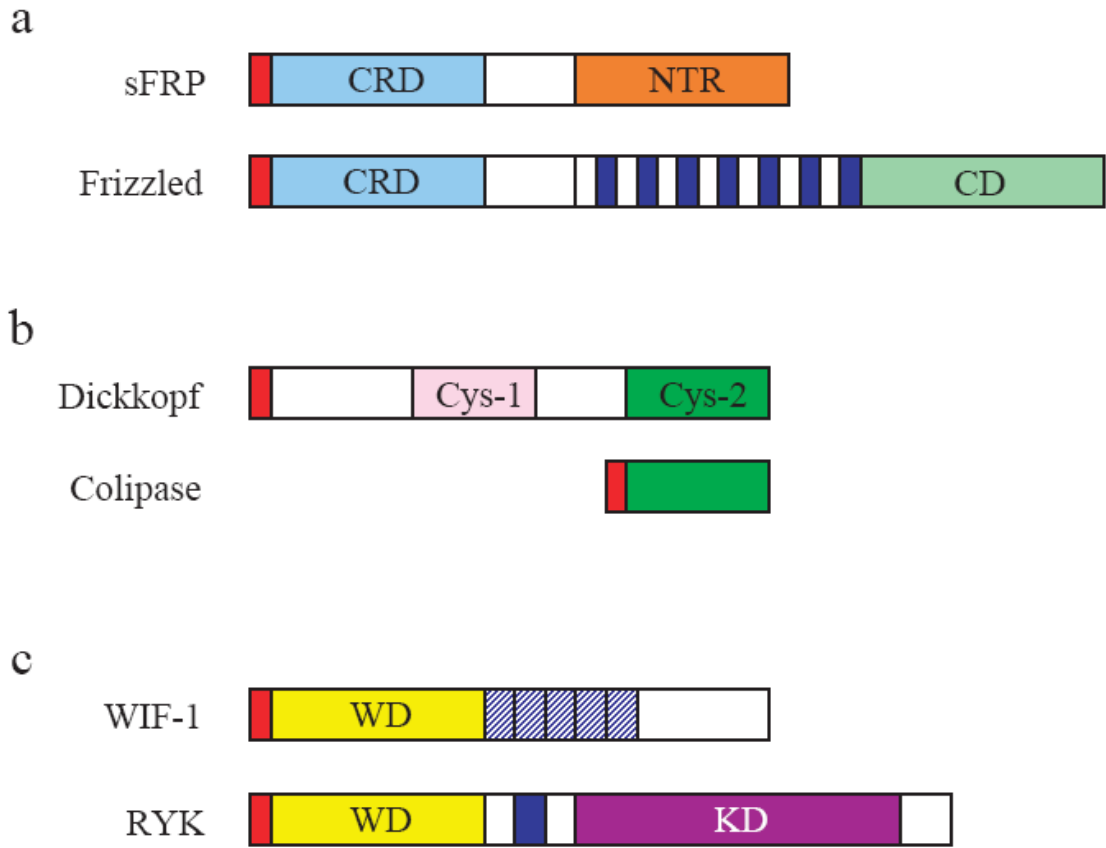
Dkk ailesi kolipazlar ile yapısal benzerlik gösterirler. Aynı disülfid bağlama profiline ve benzer kıvrımlara sahiptirler. Kolipazlar pankreatik lipazlarca yapılan lipid hidrolizi için esansiyeldirler ve lipid miçelleriyle etkileşirler. Dkk'lar ve kolipazlar arasındaki bu yapısal benzerlik lipid etkileşimi gibi genel bir fonksiyon içerse de, bu tam olarak bilinmemektedir (7).

sFRP (Secreted Frizzled-Related Protein) Ailesi

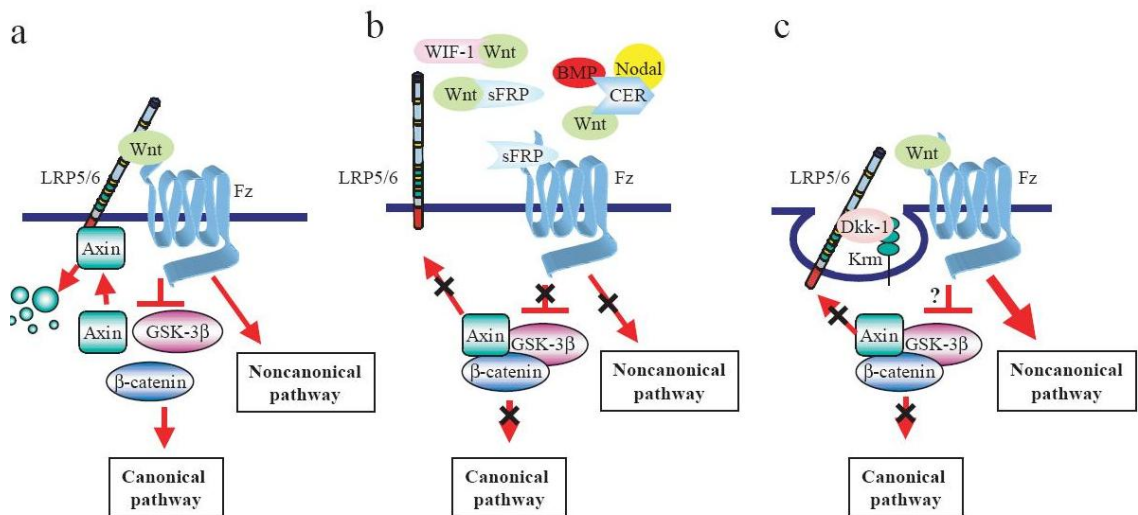
sFRP ailesi üyeleri, antagonist etkilerini, Wnt proteinlerin reseptörlere bağlanma yeteneklerini değiştirerek ve bunu ya Wnt'lere direkt olarak bağlanarak ya da reseptörlerdeki Wnt bağımlı bölgelere bağlanarak gerçekleştirirler. sFRP ailesinin bilinen 8 üyesi vardır. Bunlardan bazıları yapılan eşzamanlı çalışmalarla keşfedildiği için farklı isimlendirmeler alabilmektedirler. **sFRP-1** (FRP, SARP-2, FrzA, SFRP-1), sFRP2 (SARP1, SFRP2), sFRP3 (FrzB, Fritz, FRZB), sFRP4 (FrzB-2, SFRP4), sFRP5 (SARP3, SFRP5), **WIF-1**, Cerberus ve Coco sFRP ailesi üyeleri olarak bilinmektedirler. sFRP'ler ile WIF-1, Cerberus ve Coco sFRP ailesinin iki altgrup üyeleridir. Ayrıca bu gruba dahil edilen ve 3. bir altgrup olarak kabul edilen Sizzled, Sizzled2 ve Crescent moleküller de vardır ancak bunlar henüz memelilerde tanımlanamamışlardır (7).

sFRP proteinler N-terminal CRD domainler içerirler. Fzd proteinler ile % 30-50 oranında benzerlik gösterirler ve korunmuş 10 sistein kalıntıları içerirler (84). sFRP'ler Wnt sinyalini ya CRD domainlerinin Wnt ligandlar ile ya da C-terminal domainlerin Fzd CRD domainleri ile etkileşerek sFRP/Fzd nonfonksiyonel kompleks oluşturmak suretiyle antagonize ederler (85, 86). Bundan dolayı sFRP'ler heriki Wnt sinyal yolunda (kanonikal ve nonkanonikal) inhibe edebilirler. sFRP'ler ayrıca NTR (Netrin) domain içerirler. NTR domainde 6 sistein kalıntısı vardır ve ayrıca NTR domain, metalloproteazlar ve bazı kompleman proteinlerin doku inhibitörlerinde de bulunmuştur (87).

sFRP'ler organizmanın gelişiminin sınırlandırılmasını, morfogenetik proteinler olan Wnt'lerin aktivitesinin hızını sınırlayarak kolaylaştırırlar. Dolayısıyla sFRP ekspresyon gradyenti, Wnt protein aktivitesinin gradyentini oluşturabilir ve sFRP'lerin ekspresyon paternlerinin örtüşmesi ile Wnt'ler tarafından sFRP ekspresyonunun regüle edildiğide söylenebilir. Bununla birlikte sFRP'lerin antagonist ya da agonist olarak etki edebilecekleri ve ayrıca sFRP'lerin her biri bağlanacağı Wnt'lere spesifite gösterebilmeleri, sFRP'lerin Wnt'lere bağlanmak suretiyle onları her zaman inhibe etmeleri veya Wnt'lerin yüksek reseptör konsantrasyonlu bölgelere transportuna neden olmaları gibi konular hakkında daha çok bilgi edinmemiz gereken noktalardır (7).



Şekil 2. 9. Wnt sinyal yolları antagonist molekülleri ve reseptörleri (7)



Şekil 2. 10. Kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yollarında antagonist moleküllerin etki mekanizmaları (7)

2. 8. Wnt Proteinlerin Fonksiyonları

Wnt gen ailesi morfogon olarak organizmada gelişimsel programın tam ve uyumlu bir şekilde gerçekleşmesinde fonksiyon görmektedirler. Bu yüzden sentez ve sekresyon aşamalarındaki sıkı regülasyon önem kazanmaktadır.

Wnt protein ailesi, embriyogenez sürecinde, embriyonun şekillenmesi, epitelyal mezenşimal transformasyon, anjiogenez, apoptoz gibi temel gelişim süreçlerindeki etkilerinin yanı sıra erişkinde de homeostazis ve kök hücre regülasyonunda görev almaktadırlar. Wnt proteinleri kök hücrelerde farklılaşma, proliferasyon, migrasyon, polarizasyon, yaşam ve apoptozunda fonksiyon görmektedirler (88). Wnt proteinlerinin bu fonksiyonları diğer sinyal moleküllerinin yanı sıra bazı inhibitör ve/veya antagonist veya modülatör moleküllerce de kontrol edilmektedir.

Wnt'ler ve Apoptoz

Hücrelerin üç seçeneği vardır. Bunlar mitoz, farklılaşma ve apoptozdur. Erişkin doku homeostazisinde, implantasyon ve embriyogenez sürecinde apoptoz çok önemli bir yere sahiptir. Programlı hücre ölümü olarak anlaşılandırılan apoptoz, fizyolojik ve patolojik durumlarda gözlemlenebilir. Apoptotik süreç, bir çok indükleyici ajanların etkilerini, süreçte rol alan modülatörleri (Bcl-2, sitokrom-c, p53, seramid vs.) ve efektörleri (kaspazlar) içerir (89-90).

Wnt gen ekspresyon ürünlerinden bazıları apoptoz sürecinde modülatör fonksiyonları olan faktörlerin aktivitesinde etkilidirler. Wnt'ler, β -katenin, GSK-3 β , c-myc, cyclin D1, E2F1, p300, p53 üzerinden Bcl-2'yi etkilerler. Bcl-2, mitokondriden sitokrom-c'nin serbestleşmesini engeller. Böylece apoptoz sürecinde oluşan ve kaspazları (sistein proteazlar) aktive eden apoptozom kompleksi [sitokrom-c+kaspaz-9+Apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör)] oluşamaz ve sonuçta apoptoz engellenir. Wnt'ler ayrıca, kaspazların aktivitesini etkileyen APC üzerinden de apoptozu etkilerler.

Wnt'ler ve AngiogeneZ

Wnt'ler parakrin faktörler olarak endotelyal, mural ve epitelyal olmak üzere çeşitli hücreler tarafından sentezlenebilirler ve Wnt/Fzd sinyal yolu üzerinden endotelyal hücreleri etkilerler. Wnt ligandlar ve Fzd reseptörler

endotel ve damar düz kas hücrelerinde endojen olarak bulunurlar. İnsanda pulmoner arter düz kas hücrelerinde, dermal mikrovasküler hücrelerde ve insan umbilikal ven endotel hücrelerinde Wnt ve Fzd varlığı gösterilmiştir (10, 91).

Wnt hedef genlerin (β -katenin/TCF/LEF1 kompleksi) transkripsiyon ürünleri içerisindeki; hücre siklusunda fonksiyon gören faktörler (c-myc, cyclin D1 vs), ekstraselüler matris bileşenleri (fibronektin, cadherin vs.), IL8 ve MMP'ler ile çeşitli büyüme faktörleri (FGF, VEGF vs.) anjiogenez ile ilişkilendirilebilecek ürünlerdir. Wnt/ β -katenin aktivitesi çoğalma, farklanma, göç, olgunlaşma, canlılık, morfogenez ve apoptozda etkilidir ve anjiogenezde (embriyonik anjiogenezde, neovaskülarizasyonda) Wnt/ β -katenin aktivitesi anjiogenez faktör olarak rol oynamaktadır. (10, 91).

Wnt'lerin Hastalıklar İle İlişkisi

Wnt'ler embriyogenez sırasında gelişimsel program dahilinde gerçekleşen hücre-hücre etkileşimi temelinde çoğalma, farklanma, göç, olgunlaşma ve apoptoz olaylarında kritik rollere sahiptirler. Wnt'ler, embriyoda gastrulasyon sürecinde gerçekleşen doğru aks indüksiyonu, doğru ve simetrik morfogenez ile nörolasyon, somitogenez, segmentasyon, organogenez ve embriyonik vasküler gelişim olaylanmaları için kök hücreleri kılavuzlayan önemli aktörlerdendir. Ayrıca embriyogenez sürecine ilave olarak, erişkin kök hücre homeostazisinde, normal hücre siklus sürecinde, hücre iskeleti, hücre-hücre adhezyon kompleksi (kaderin/katenin), apoptoz ve rejenerasyonda etkindirler. Wnt sinyal yollarının aktivitelerinin katkısıyla gerçekleşen bu olaylanmalar ayrıca Wnt sinyal yollarının sıkı regülasyonu (Wnt antagonistleri, diğer sinyal yolları ve molekülleri ile etkileşim) ile doğru bir şekilde fonksiyon görmesi sonucunda sağlanmaktadır. Ancak sinyal yollarındaki bir anormallik veya mutant moleküller normal işleyişi bozarak patolojik tablolara yol açarlar. Tümörögenizde, bazı hastalıklarda ve bazı kalıtsal hastalıklarda bu aberrant Wnt sinyal yolları gösterilmiştir. Burada olay ligand, reseptör ve süreçte rol alan moleküllerin ekstraselüler antagonist moleküller, Wnt sinyal yolu ile ilişkili intraselüler moleküller (sitoplazmik destruksiyon kompleks) kromozomal lokasyonlarındaki translokasyonlar ve sentez aşamalarındaki her bir süreçte (transkripsiyonel, post-transkripsiyonel modifikasyon, RNA splicing,

translasyon, posttranslasyonel modifikasyon) oluşabilen bir mutasyon ve/veya kaybı (yokluğu, azlığı) sonucu patolojik tabloların ortaya çıkmasıdır.

Tümörün oluşumu, progresyonu ve metastazında β -katenin'in upregülasyonu önemli ve kritik bir süreçtir. Wnt sinyal yolu ile ilişkili moleküllerdeki mutant değişiklikler, sitoplazmik ve nükleer β -katenin birikimine neden olurlar ve artan β -katenin aktivitesi ile hedef gen ürünlerin (hücre siklusu, adhezyon, protoonkogen ve anjiogenik faktörler) etkilerini arttırmırlar. Çeşitli türlerde ve insanda bu familyal ya da sporadik olabilen mutasyonlar gösterilmiştir. Kansere tedavisinde moleküler hedeflerden biride Wnt/ β -katenin sinyal yoludur ve anti-kanser droglardan, potansiyel Wnt sinyal inhibitörleri de gösterilmiştir (73, 79, 80, 92-95).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Bu çalışmada, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen, erişkin “*Wistar Albino*” dişi ratlar kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu’ndan 04.12.2008 tarih ve B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/283 sayılı onay belgesi alınmıştır.

Deney Grupları

GRUP-1: 2 hafta boyunca 12 saatlik aydınlık ve karanlık periyotlar sağlanarak gebelik oluşturulmayan normal östrus siklusunun sağlandığı hayvan grubu. Normal östrus siklusuna girdiği kabul edilen hayvanlara, 5. günden sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde (diöstrus, proöstrus, östrus ve metöstrus) ve her gün için 5 hayvan olmak üzere yüksek doz anestezi madde (sodyum penta-barbital) intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulandı ve uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

GRUP-2: 2 hafta boyunca 12 saatlik aydınlık ve karanlık periodlar sağlanarak, normal östrus siklusunun sağlandığı ve gebelik oluşturulacak hayvan grubu. 5. günden sonra dişi ratlar gebelik sağlanması için erkek rat kafeslerine alındı. Ertesi gün vajinal plak oluşumuna bakılarak vajinal tıkaç görülen ratlar gebe kabul edilerek ayrı kafeslere alındı. Vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edildi. Gebe hayvanlara, gebeliğin 5., 6., 7., 8. ve 9. günlerinde ve her gün için 5 hayvan olmak üzere, yüksek doz anestezi madde (sodyum penta-barbital) intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulandı ve implantasyon bölgeleri incelenmek üzere alındı.

3. 2. Kullanılan Cihazlar

- Ben Mari (Leica, Germany)
- Doku Takip Cihazı (Leica, Germany)
- Embedding Oven (MKN Taab, UK)
- Floresan Mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan)
- Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)

- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Mikro Dalga Fırın (Arçelik MD 554 İntellwave, Türkiye)
- Mikropipetler (10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl, Gilson, USA)
- Mikrotom (Leica, Germany)
- Ph Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)

3. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Antikorlar
 - primer antikorlar;
 - Dkk-1 (G-18): sc-30785 S.Cruz Bio.,
 - Rabbit anti-human sFRP-1: NBP1-02432 Novus Bio.,
 - WIF-1 (K-16): sc-30791, S.Cruz Bio.,
 - sekonder antikorlar;
 - Donkey anti-goat IgG-FITC: sc-2024, S.Cruz Bio.,
 - Goat anti-rabbit IgG-Cy3: AP132C-Millipore
- Crystal Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- DAPI (Sigma, 32670)
- Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- Gel Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)
- Large Volum Ultra Clean Diluent (Lab Vision, UK)
- Large Volum Ultra V Blok (Lab Vision, UK)
- Normal donkey serum (Multicell- Kat. No: 035110)
- Normal goat serum (Multicell- Kat. No: 053110)
- Paraformaldehit (Sigma, USA)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Sodyum borohidrid (NaBH₄) (Merck, Germany)
- Triton X-100 (Sigma, USA)

3. 4. Doku Preparasyonu

Ötenazi sonrasında uterus dokuları, % 4'lük paraformaldehid ile 6-8 saat veya % 10'lük tamponlu formaldehid ile 30-36 saat süre ile fikse edildikten

sonra dehidrasyon ve şeffaflandırma basamaklarını takiben parafinde bloklandı.

3. 5. Işık Mikroskopi

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

3. 6. İmmünofloresan Mikroskopi

Parafine gömülü doku örneklerinden lamlara alınan 4-5 µm'lik kesitlere ksilol ile deparafinizasyon, azalan konsantrasyonlardaki etil alkol serileri ile rehidrasyon yapılan kesitler distile suda yıkandı ve mikrodalga fırında 95 °C' de 10 mM sitrat buffer pH:6 da 5 dakika antijen retrieval uygulandı. Kesitler, PBS-Triton-X 100 ile 2x5 dakika yıkandı. Normal serum (Normal donkey serum, Multicell- Kat. No: 035110., Normal goat serum, Multicell- Kat. No: 053110) ile nonspesifik boyanmaların engellenmesi için 20 dakika oda ısısında inkübe edilen kesitler +4 °C'de 1 gece PBS ile 1:100 oranda dilüe edilen primer antikolar ile inkübe edildi. PBS-Triton-X 100 ile 2x5 dakika yıkama yapıldı. Bundan sonraki aşamalar oda ısısı ve karanlık ortamda gerçekleştirildi. Kesitler, PBS ile 1:500 oranda dilüe edilen sekonder antikolar ile 37° C de 30 dakika inkübe edildi ve PBS-Triton-X 100 ile 2x5 dakika yıkama yapılan kesitlere 5 dakika DAPI (200nm/ml) ile nükleer boyama yapıldı. PBS-Triton-X 100 ile 2x5 dakika yıkama yapıldıktan sonra kapatma mediumu ile kesitler kapatıldı ve uygun filtreler kullanılarak Floresan mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan) ile görüntülendi. Negatif kontrol kesitlere primer antikor inkübasyonu yapılmayarak diğer aşamalar aynı şekilde uygulandı.

4. BULGULAR

4. 1. Grup-1 bulguları

Gebelik oluşturulmayan hayvan grubunda, sıçanlardaki östrus siklusu evrelerinin histolojik özelliklerine göre, diöstrus, proöstrus, östrus ve metöstrus olarak siklus evreleri değerlendirildi. Her evre için, hematoksilen-eozin boyama ile ışık mikroskopide genel morfolojiye ait bulgular ve Wnt antagonistlerinden Dkk-1, sFRP-1 ve WIF-1 için immünofloresan boyamalar ile immünofloresan mikroskopi bulguları elde edildi.

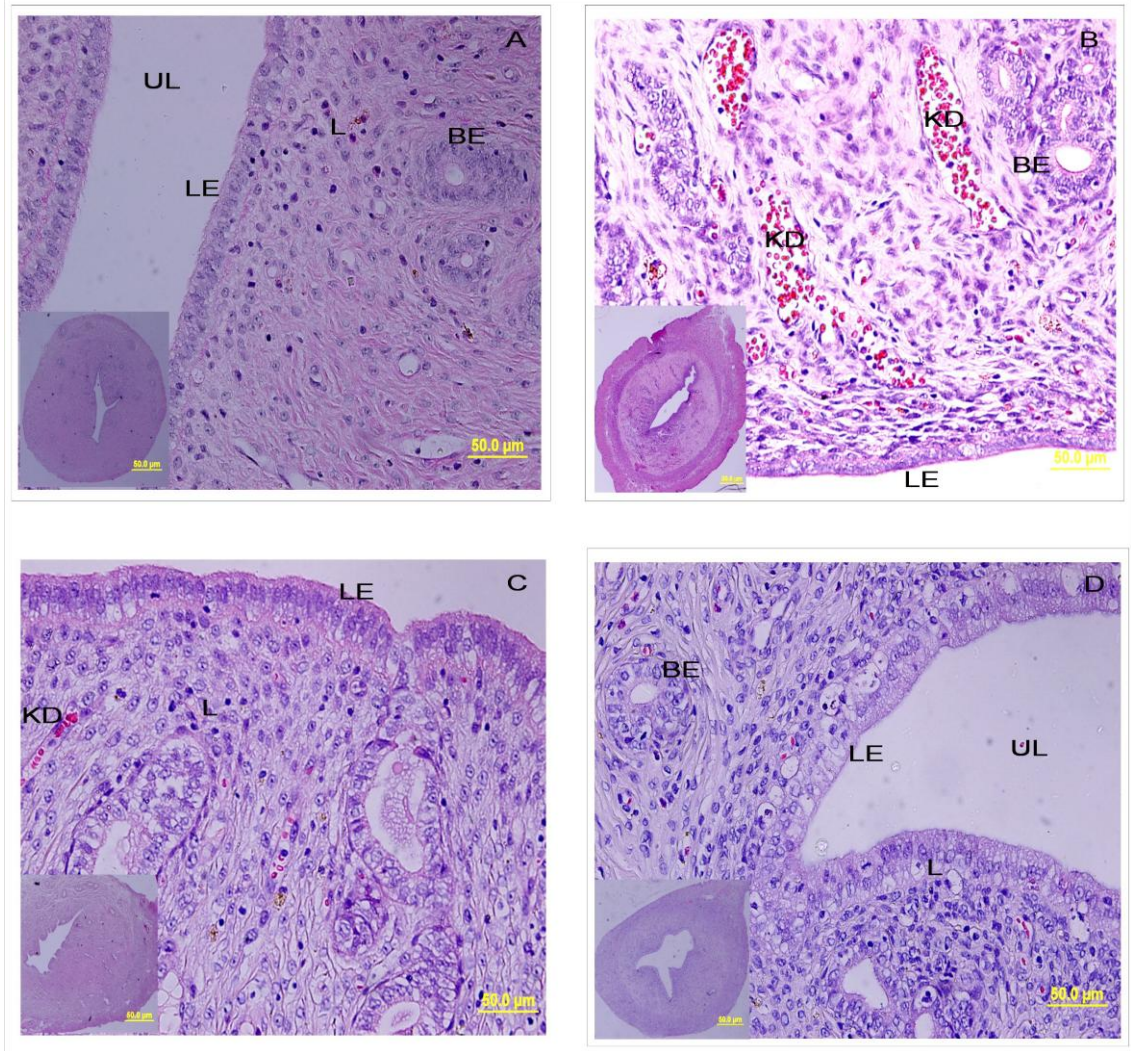
4. 1. 1. Östrus siklusu bulguları H-E

Diöstrus evresinde; uterus lümeni yarık şeklinde, kübik-prizmatik luminal epitel, mitotik figür ve nadir dejeneratif hücreler, atrofik ve kollabe endometrial bezler, stromal ödem ve stromada polimorfonükleer lökositler izlendi (Şekil 4.1. A).

Proöstrus evresindeki uterus; lümen epiteli daha çok prizmatik yapıda gözlenirken, epitel hücrelerinde mitotik figürler varlığını sürdürüyordu. Bu evrede dejenerasyon gözlenmezken, mukozada sadece birkaç lökosit izlendi. Endometrial bezler hipertrofik olup vaskülarizasyon ve ödem artışı belirgindi (Şekil 4.1. B).

Östrus evresinin erken döneminde; bez ve luminal epitelde hücrel dejenerasyonlar, mitotik aktivite kaybı ve lökosit infiltrasyonu gözlenirken geç östrus evresinde luminal dilatasyon, luminal epitele kadar uzanan stromal vaskülarizasyon artışı izlendi (Şekil 4.1. C).

Metöstrus evrede; bez ve luminal epitelde vakuolar dejenerasyonlar devam ederken, mitotik aktivitenin tekrar başlaması ve değişken olabilen lökosit infiltrasyonu, azalan vaskülarizasyon izlendi (Şekil 4.1. D).



Şekil 4. 1. Östrus siklusu evreleri: A-diöstrus, B-proöstrus, C-östrus, D-metöstrus (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, KD: Kan Damarı)

4. 1. 2. Östrus siklusu evrelerinde Wnt antagonistlerinin immunolokalizasyonları

(Tablo 4.1 de eksprese oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Dkk-1; östrus siklusunun bütün evrelerinde, luminal epitel ve subluminal stromada zayıf ekspresyonu izlenirken, subluminal bölgeden bazal endometriuma doğru stromada, artan ekspresyonu görüldü (Şekil 4.2. 1a-c, 2a, Şekil 4.3. 2a, 2d). Endometrial bez epitelinde zayıf ekspresyonu görülen Dkk-1'in, endometrial bezlerin etrafındaki stromada kuvvetli ekspresyonu vardı (Şekil 4.2. 1d-e, 2b, Şekil 4.3. 2b). Stromal kan damarlarında, gerek kapillerlerde gerekse arteriollerde, endotelial bir ekspresyonu izlenmezken, kan damarları etrafındaki stromada kuvvetli immünolokalizasyonu görüldü (Şekil 4.2. 1e, 2f). Miyometrial düz kas tabakalarında ekspresyonu tesbit edilmedi (şekil 4.2. 1a,1c, 2d-e, 2h, Şekil 4.3. 1d, 2c). Perimetrial bağ dokuda, miyometriumun vasküler tabakasının bağ dokusunda, miyometrial kan damarlarının etrafındaki bağ dokuda ve mezometrial bağ dokuda kuvvetli immünoreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.2. 1c, 2g, Şekil 4.3. 1a, 2e).

sFRP-1; östrus siklusu boyunca bütün evrelerde, luminal epitel ve endometrial bez epitelinde kuvvetli ekspresyonu görüldü (Şekil 4.4. 1a-c, 2a, Şekil 4.5. 1a, 1f, 2a, 2c). Stromal kan damarlarında, arteriolar ve kapiller endotelinde belirgin şekilde eksprese idi (Şekil 4.4. 1d, 2f, Şekil 4.5. 2h). Subluminal stromada diğer stromal alanlara göre daha kuvvetli bir ekspresyon izlenirken (predesidüal hücre lokalizasyonlarında), stromada genel olarak zayıf ekspresyonu izlendi (Şekil 4.4. 1c, 2e, Şekil 4.5. 1f, 2d). Miyometriumun vasküler tabakasında kapiller ve arteriol endotelinde eksprese idi. Perimetrial, mezometrial ve miyometrial bağ dokuda sFRP-1'in ekspresyonu izlenmezken, miyometrial düz kas tabakalarında zayıf ekspresyonu vardı (Şekil 4.4. 1e, Şekil 4.5. 1d, 2f). Ayrıca, bu sayılan lokalizasyonlardaki sFRP-1 ekspresyonları, proöstrus evrede diğer evrelerden daha kuvvetli bir şekilde izlendi (Şekil 4.4. 2a-f).

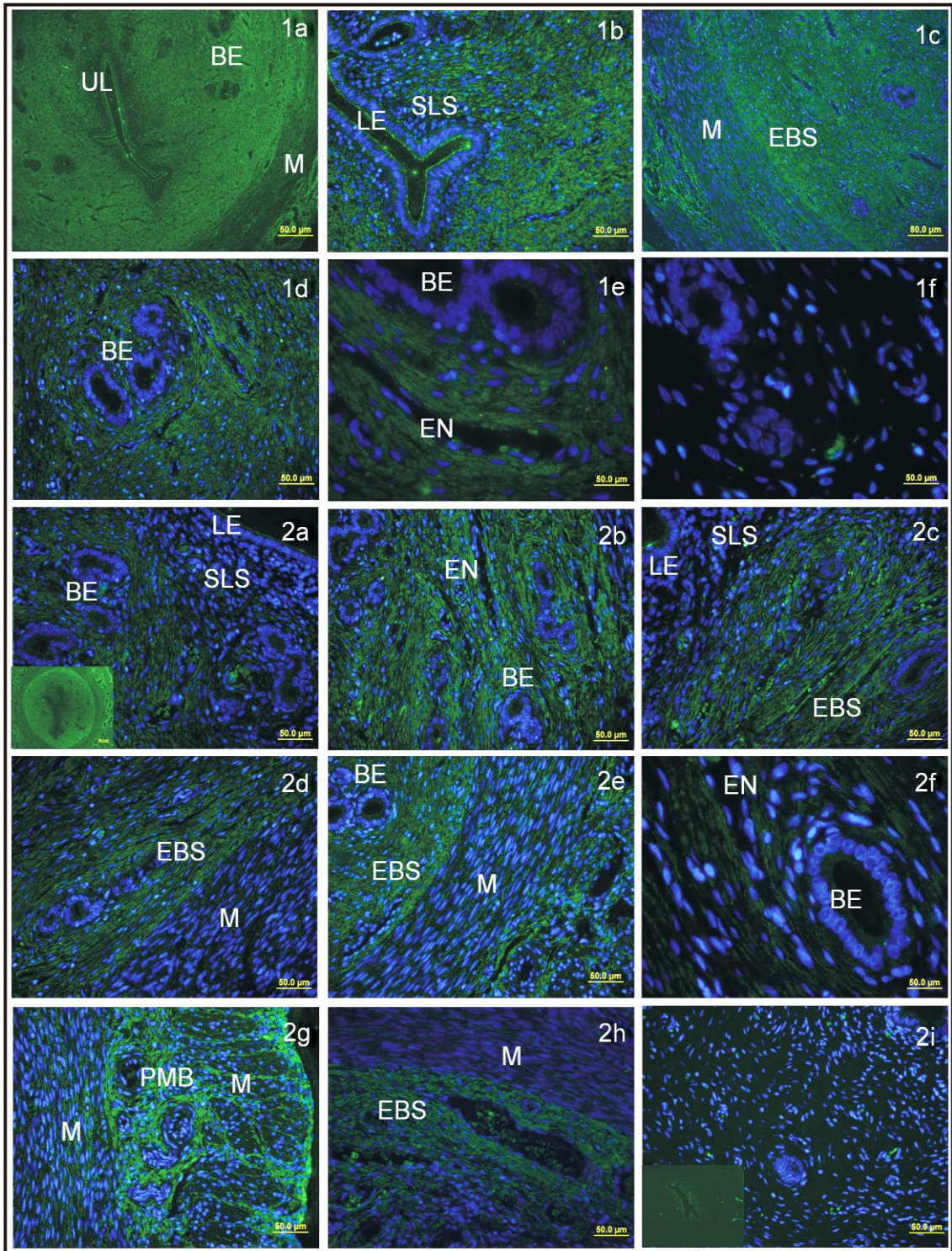
WIF-1; östrus siklusu boyunca bütün evrelerde, luminal epitel ve endometrial bez epitelinde ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.6. 1c, 1d, 2c, 2e, Şekil 4.7. 1a, 2c). Stromal kan damarlarında kapiller ve arteriol endotelinde belirgin ekspresyonu izlendi (Şekil 4.6. 1e, 2c, Şekil 4.7. 1d, 1f). Stromada bütün alanlarda, genel olarak aynı kuvvette bir ekspresyon vardı (Şekil 4.6. 1c,

2a, Şekil 4.7. 1a, 2d). Miyometriumun vasküler tabakasında kapiller ve arteriol endotelinde eksprese idi ve perimetrial, mezometrial ve miyometrial bağ dokuda ekspresyonu izlenmezken, miyometrial düz kas tabakalarında sFRP-1'e göre daha kuvvetli bir ekspresyonu vardı (Şekil 4.6. 1f, 2a, 2d, 2f, 2g, Şekil 4.7. 1c, 2a). .

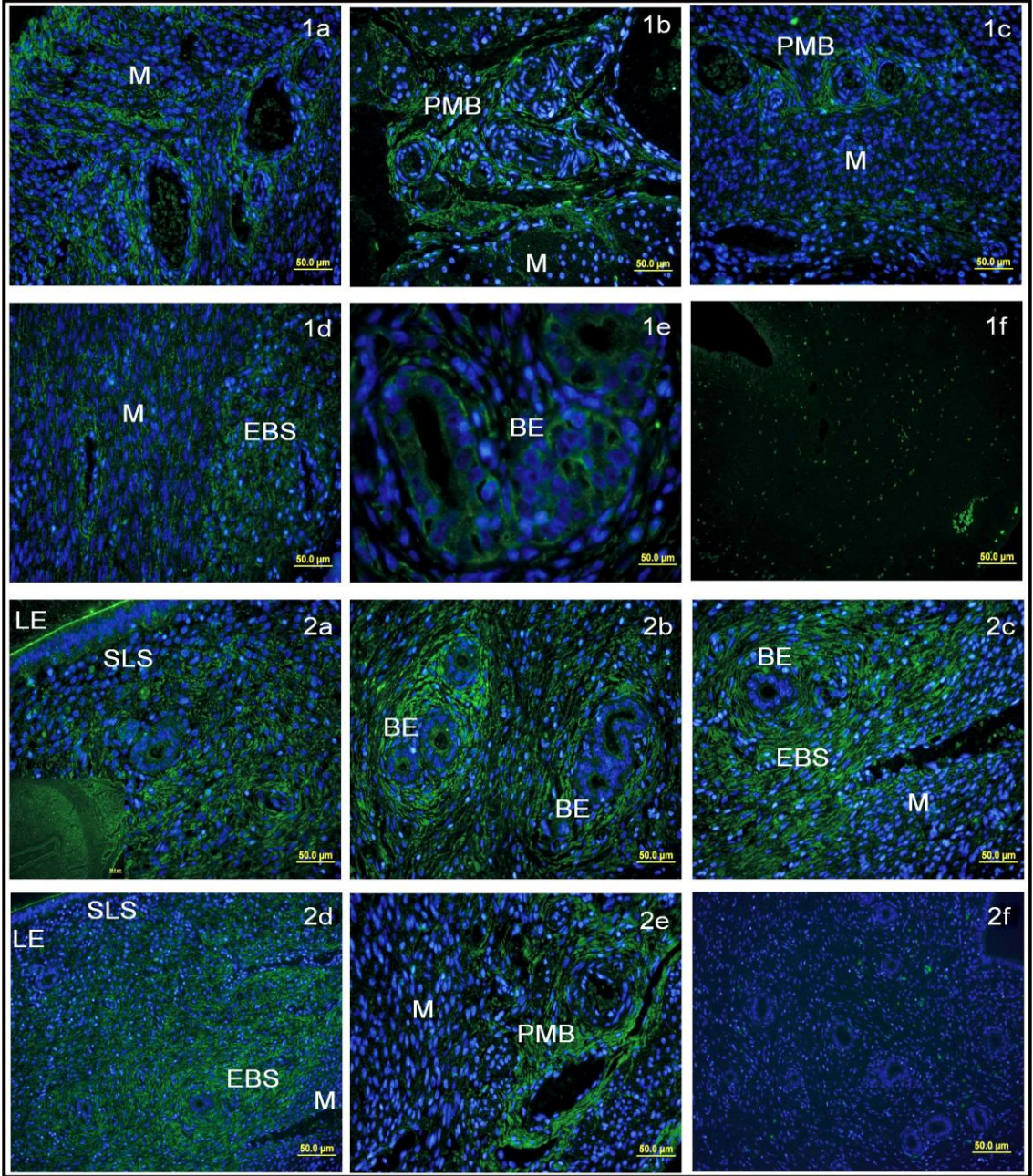
Tablo 4. 1. Östrus siklusu evrelerinde Wnt antagonistlerinin immunolokalizasyonları

	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
Dkk-1	+ ³	-	+	+	+	+ ³	-
sFRP-1	-	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+	+ ²
WIF-1	-	+ ²	+ ²	+ ²	+	+	+ ²

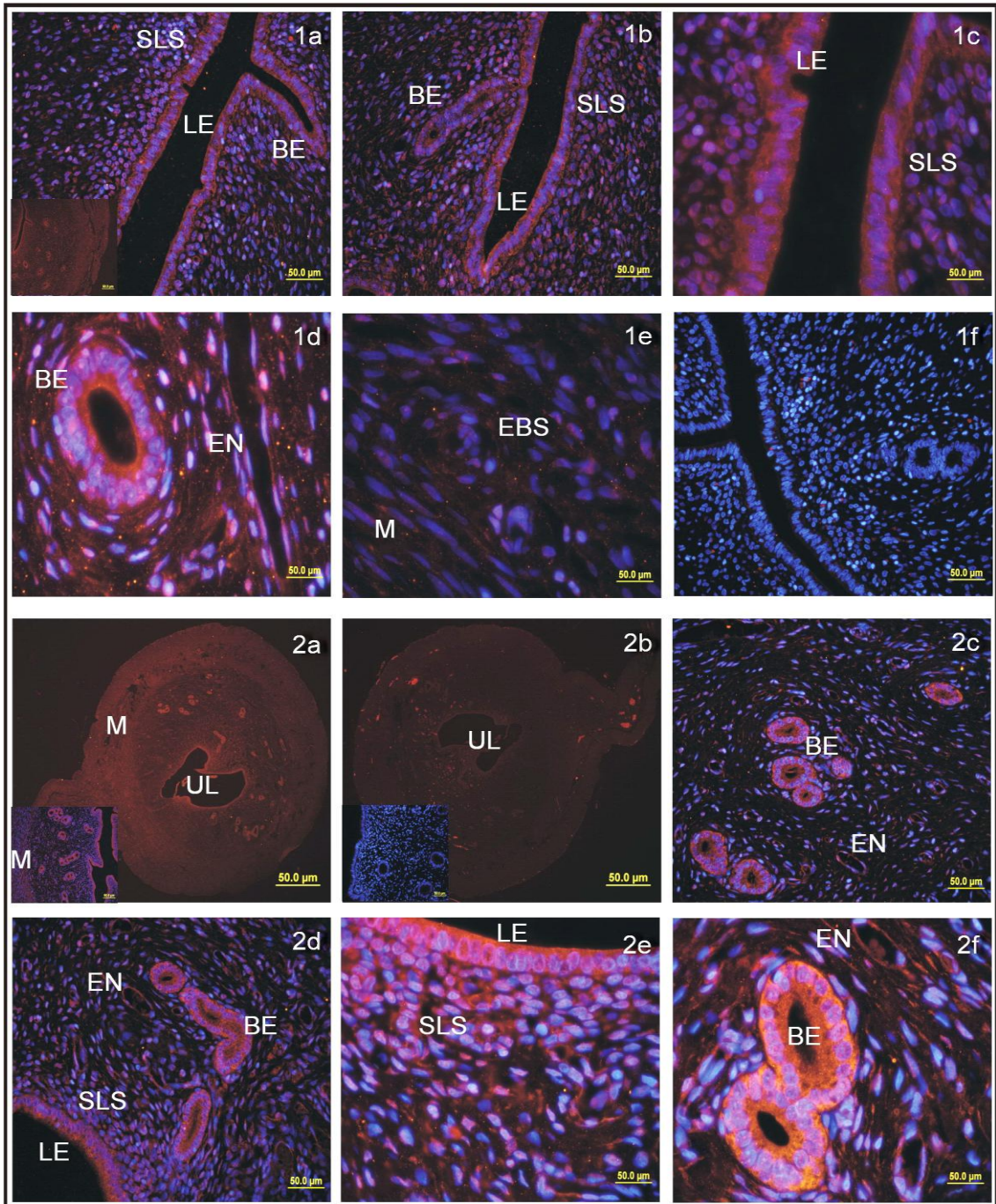
PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları, LE; Luminal epitel, BE; Bez epiteli, STR; Stroma, SLS; Subluminal stroma, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, +³; Kuvvetli ekspresyon, +²; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok



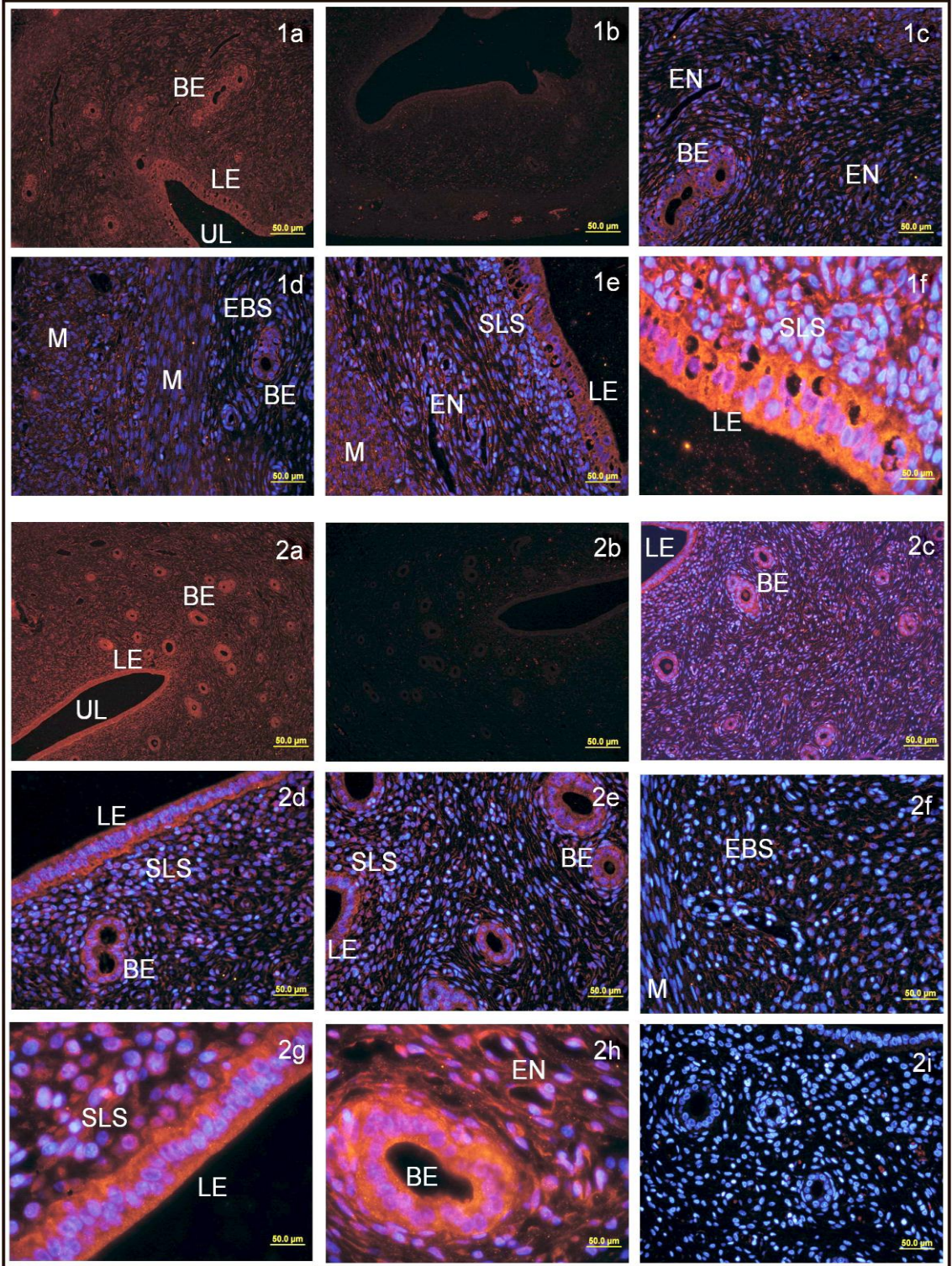
Şekil 4. 2. 1a-f; diöstrus, 2a-i; proöstrus evrede Dkk-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; 1f, 2i (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EBS: Endometrial Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



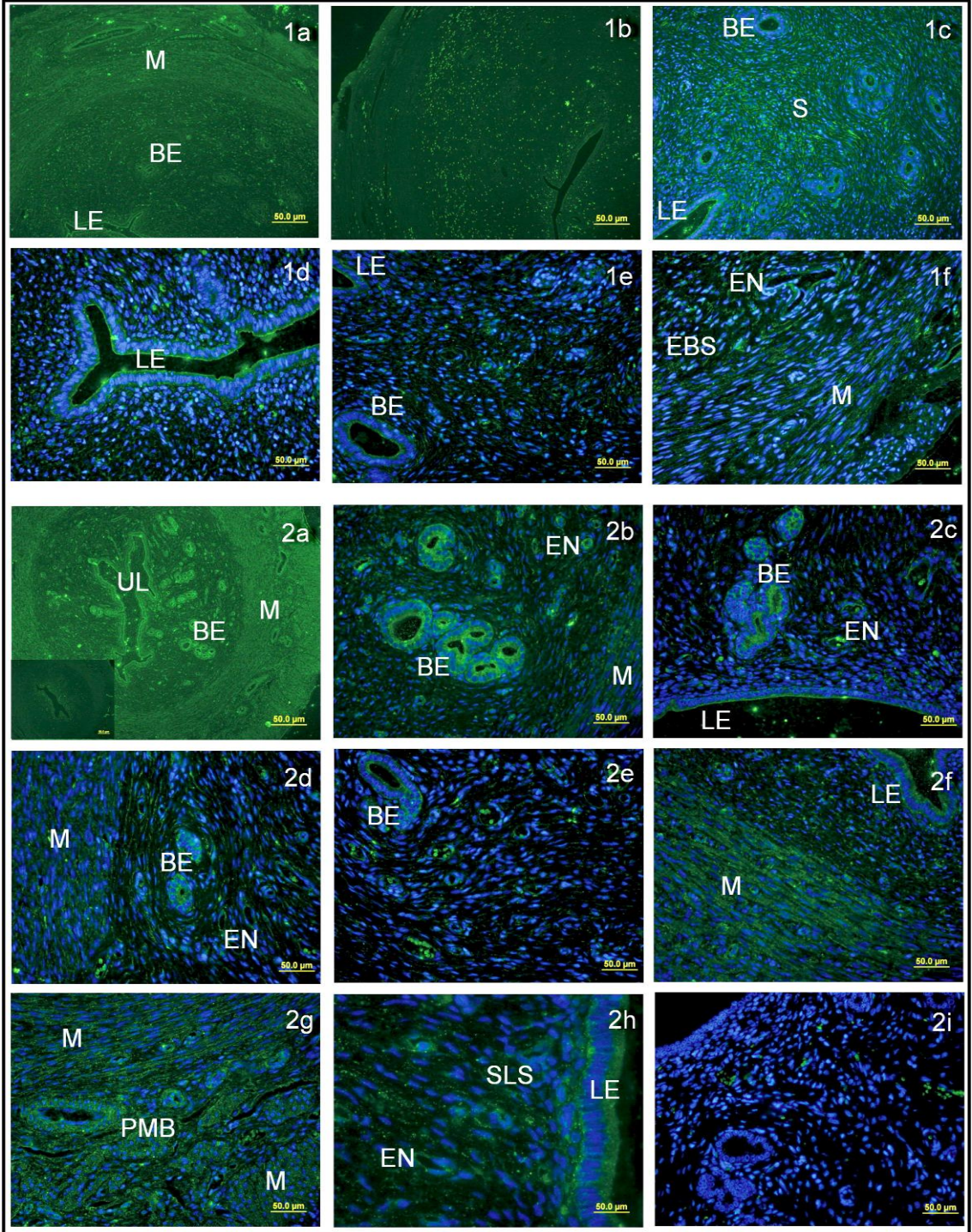
Şekil 4. 3. 1a-f; östrus, 2a-f; metöstrus evrede Dkk-1'in immüno lokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; 1f, 2f (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EBS: Endometrial Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



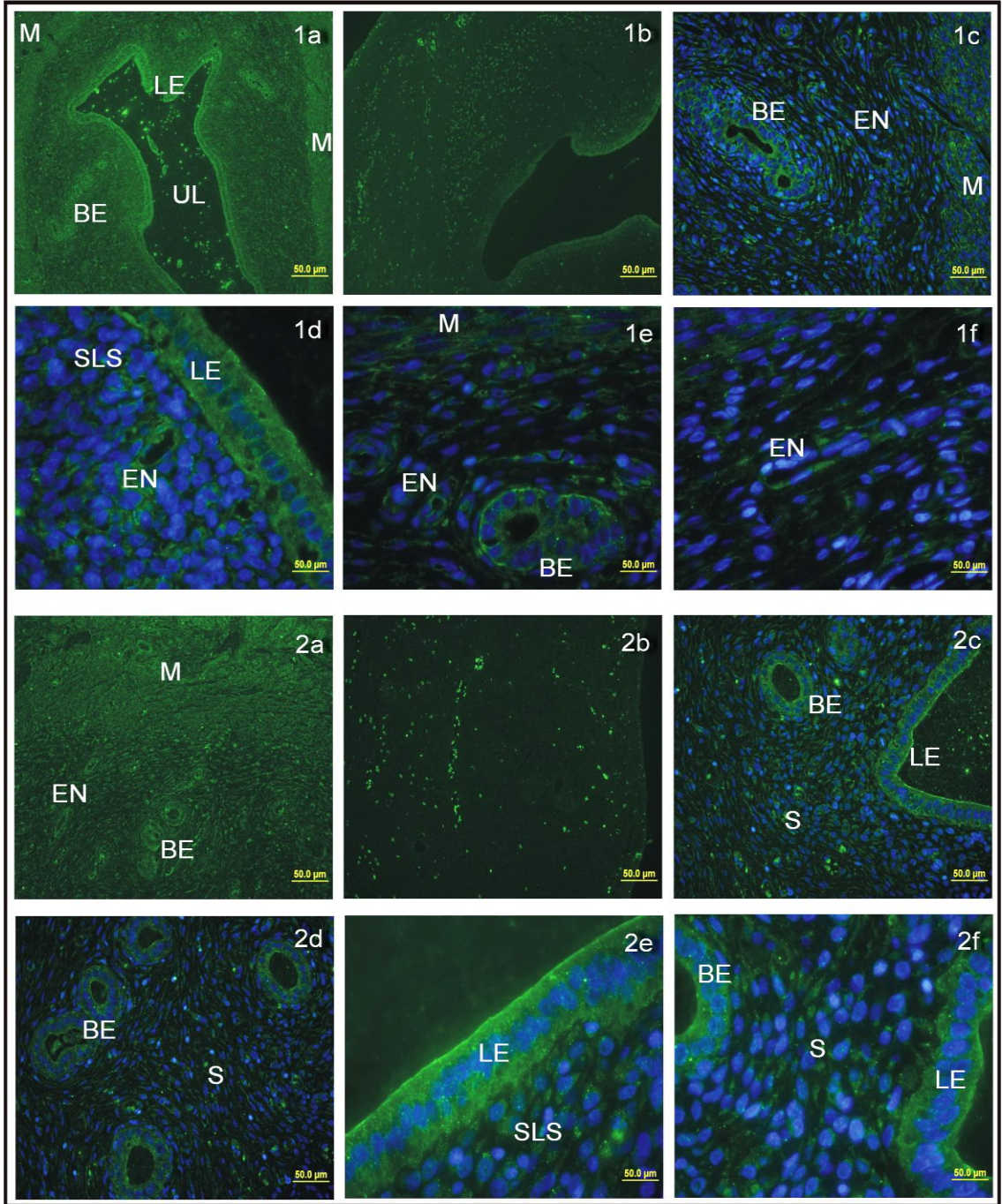
Şekil 4. 4. 1a-f; diöstrus, 2a-f; proöstrus evrede sFRP-1'in immüno lokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; 1f, 2b (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EBS: Endometrial Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



Şekil 4. 5. 1a-f; östrus, 2a-i; metöstrus evrede sFRP-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; 1b, 2b, 2i (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EBS: Endometrial Bazal Stroma, EN: Endotel)



Şekil 4. 6. 1a-f; diöstrus, 2a-i; proöstrus evrede WIF-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; 1b, 2i (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EBS: Endometrial Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku, S: Stroma)

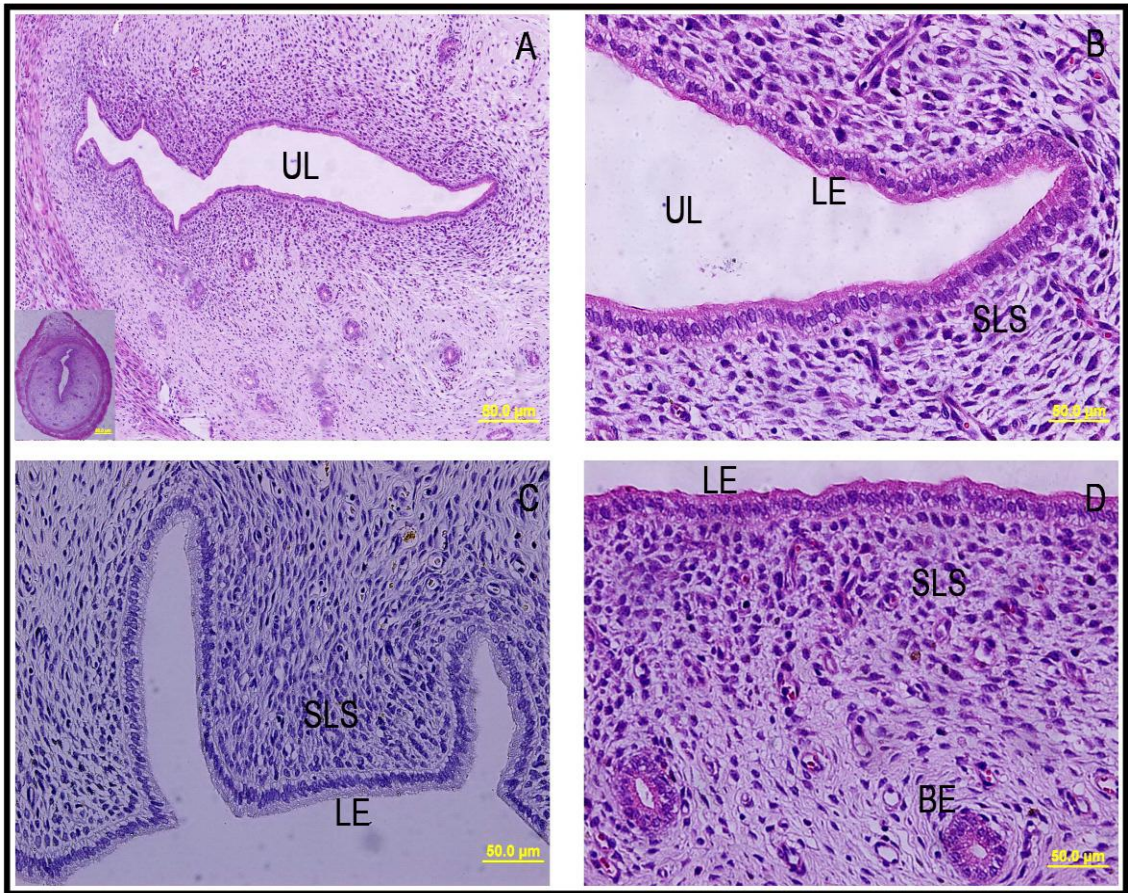


Şekil 4. 7. 1a-f; östrus, 2a-i; metöstrus evrede WIF-1'in immüno lokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; 1b, 2b (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L: Lökosit, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EBS: Endometrial Bazal Stroma, EN: Endotel, S: Stroma)

4. 2. Grup-2 bulguları

4. 2. 1. Gebeliğin 5. günü

Işık mikroskopi bulguları; epitel ve subluminal stroma; dejenerasyon ve vakuolizasyonun olmadığı prizmatik ve kübik uterus lümen epitelini, apikal yüzeyde artmış silya ve nadiren intraepitelyal, bazal membran ve subluminal yerleşimli lökositler izlendi. Subluminal stromanın diğer stromal bölgelere göre hücreden zengin olduğu ve uzantılı-iğsi küçük stromal hücrelerin daha büyük ve toparlak predesidüal hücrelere farklandığı görüldü. Luminal epitele kadar uzanan bir yüksek vaskülarizasyon izlenmedi. Endometrial bezler; bez epitelinde dejenerasyon ve vakuolizasyon izlenmedi. Hipertrofi ve dilatasyon başlamıştı. Stroma; küçük iğ şekilli stromal hücreler ve lökositler görüldü. Yoğun bir vaskülarizasyon izlenmedi (Şekil 4.8. A-D).



Şekil 4. 8. Gebeliğin 5.gününde ışık mikroskopi bulgular (H-E). (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, SLS: Subluminal Stroma)

Gebeliğin 5.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları;

(Tablo 4.2 de eksprese oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Dkk-1; luminal epitel ve bez epitelinde zayıf ekspresyonları izlenirken endometrial stromada, subluminal stromal bölgeden başlayarak, bazal endometriuma gidildikçe artan bir ekspresyonu izlendi (Şekil 4.9. A-C). Ancak, bu stromal ekspresyon östrus siklus evrelerindeki ekspresyonlara göre daha zayıftı. Perimetrial ve miyometriumun vasküler tabakasının bağ dokularında kuvvetli immünoreaksiyonları görüldü (Şekil 4.9. D). Subluminal stromal alanda, östrus siklusu evrelerinden farklı olarak, predesidüal hücrelerin lokalizasyonlarında ekspresyonu görüldü (Şekil 4.9. E-F). Stromal arteriolar endotelde ve kapiller kan damarlarında endotelde zayıf immünolokalizasyonları izlendi (Şekil 4.9. E-F). Miyometrial düz kas tabakalarında ekspresyonu izlenmedi (Şekil 4.9. C-D).

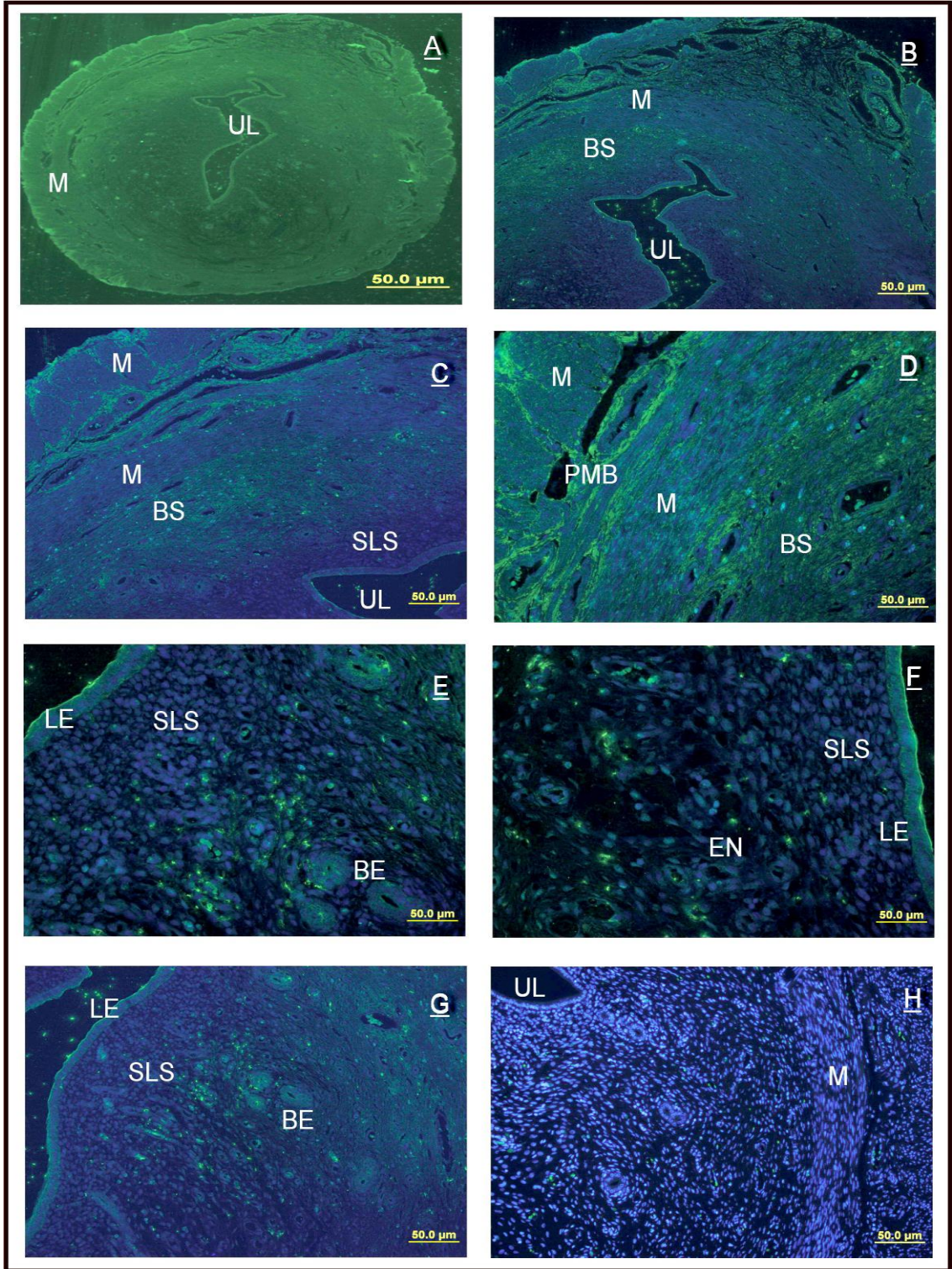
sFRP-1; luminal epitel ve bez epitelinde, miyometrial düz kas tabakalarında eksprese edildi (Şekil 4.10. A, D, F). Subluminal alanda, predesidüal hücrelerin lokalize olduğu stromada daha kuvvetli olmak üzere, bütün stromal alanlarda ekspresyonu izlendi (Şekil 4.10. C, E). Stromal ve miyometriumun vasküler tabakasındaki, arteriollerde ve kapiller kan damarlarında endotelial ekspresyonları izlenirken perimetrial ve miyometriumun vasküler tabakasının bağ dokusunda bir immünoreaksiyon izlenmedi (Şekil 4.10. B, D, G).

WIF-1; luminal epitel ve bez epitelinde daha kuvvetli olmak üzere, miyometrial düz kas tabakalarında eksprese edildi (Şekil 4.11. A, B, D, F). Stroma ve miyometriumda, arteriolar ve kapiller kan damarlarında endotelial immunoreaksiyonları izlendi (Şekil 4.11. C, G). Perimetrial ve miyometriumun vasküler tabakasının bağ dokusunda eksprese edilmedi (Şekil 4.11. F). Endometrial stromanın bütün bölgelerinde östrus siklusu evrelerine göre daha zayıf bir immünolokalizasyon görüldü.

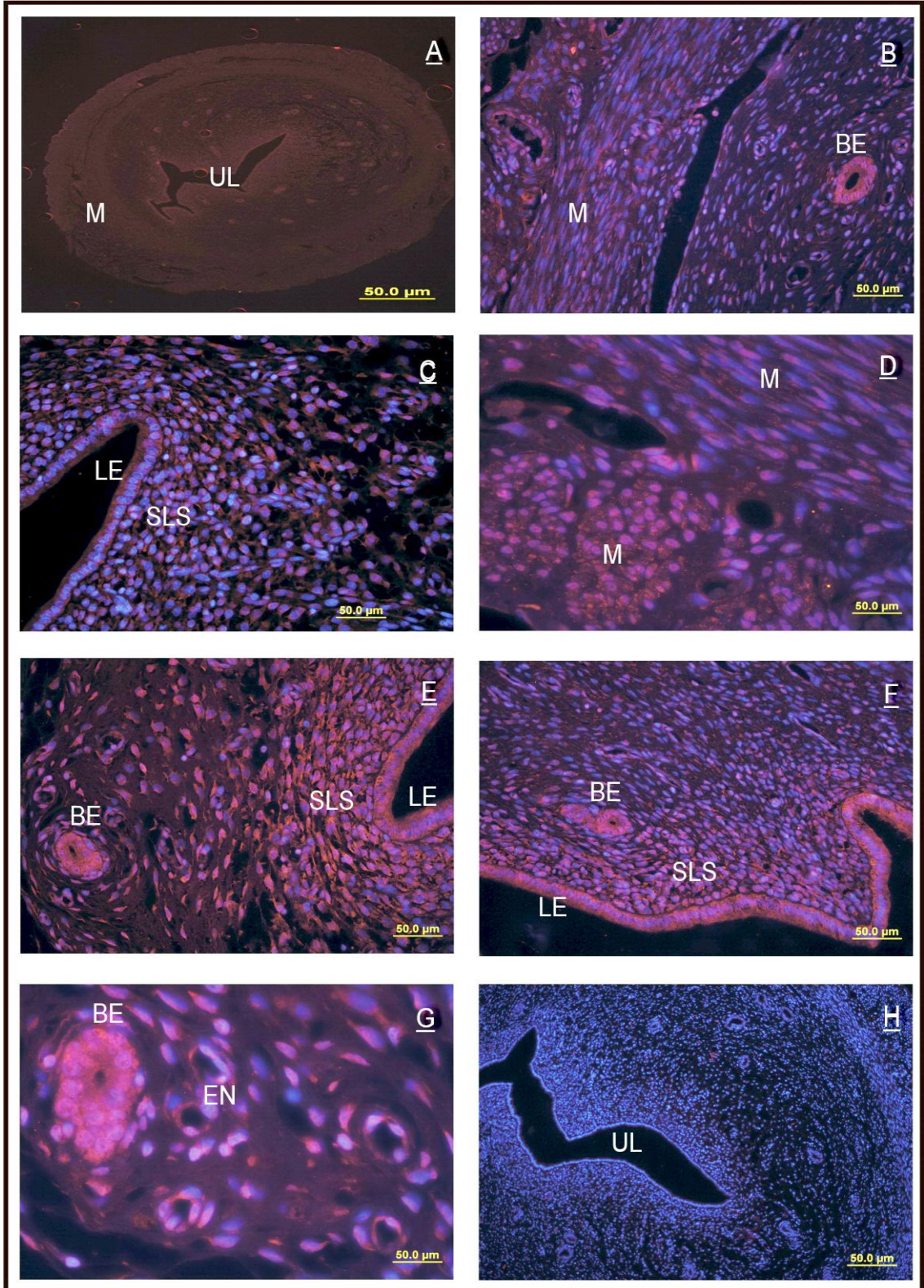
Tablo 4. 2. Gebeliğin 5.gününde, Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları

5.GÜN	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
Dkk-1	+ ³	-	+	+	+	+ ³	-
sFRP-1	-	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+	+ ²
WIF-1	-	+ ²	+ ²	+ ²	+	+	+ ²

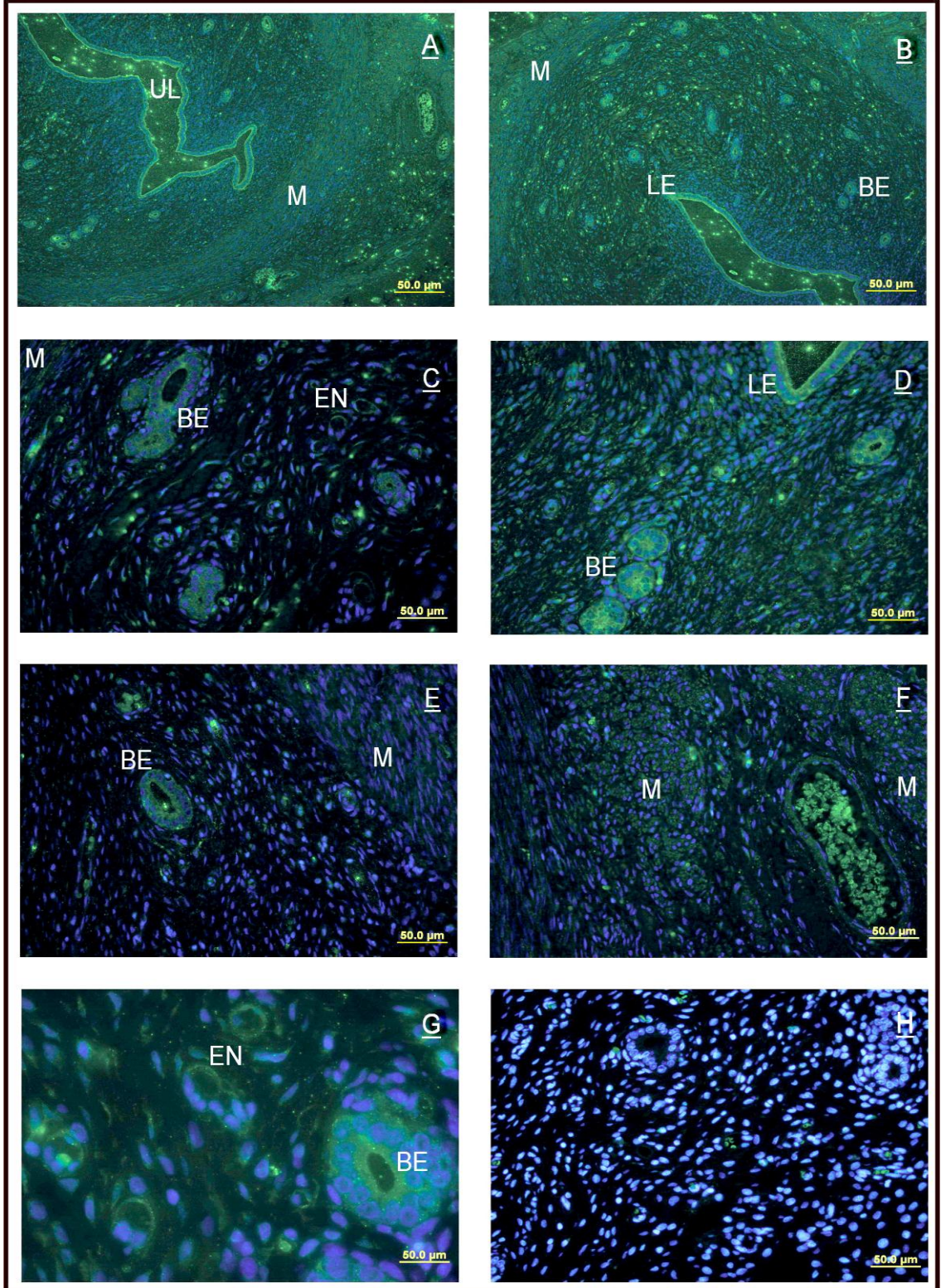
PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları, LE; Luminal epitel, BE; Bez epiteli, STR; Stroma, SLS; Subluminal stroma, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, +³; Kuvvetli ekspresyon, +²; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok



Şekil 4. 9. Gebeliğin 5.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; H (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, BS: Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



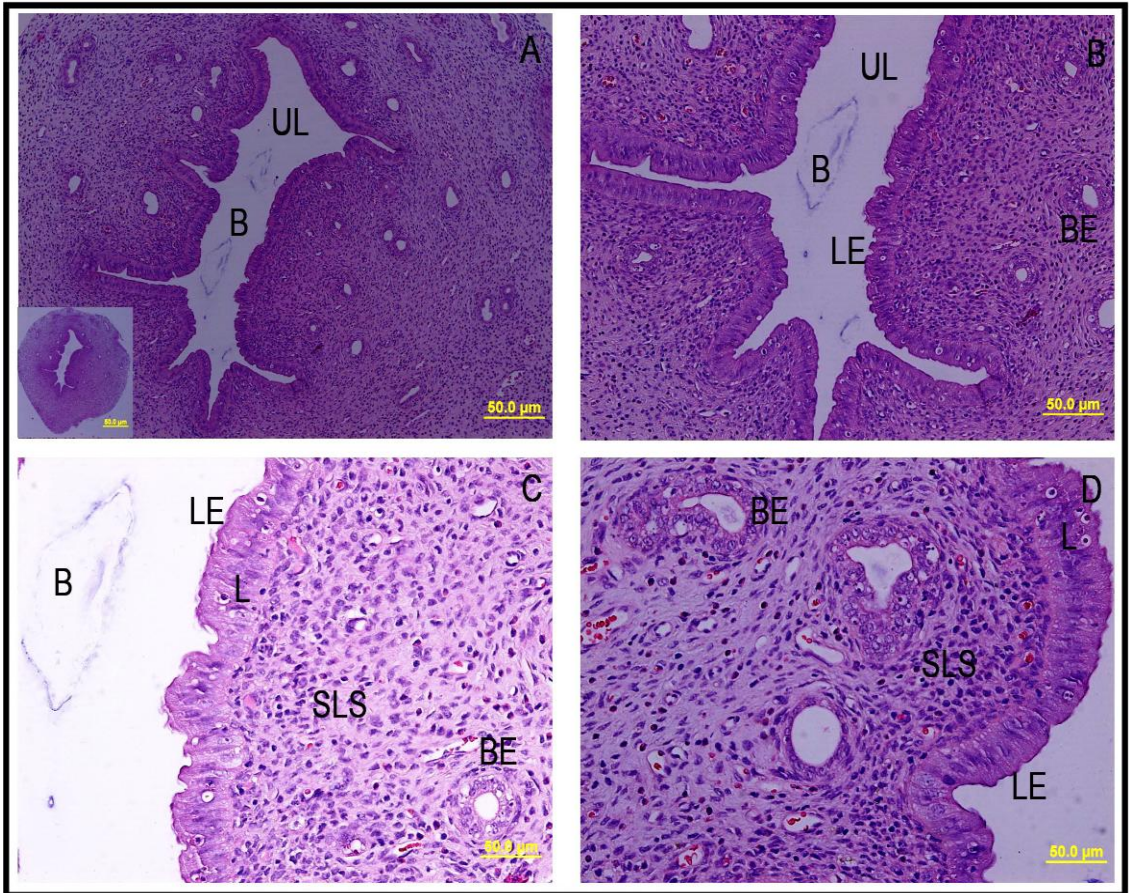
Şekil 4. 10. Gebeliğin 5.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; H (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



Şekil 4. 11. Gebeliğin 5.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; H (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)

4. 2. 2. Gebeliğin 6. günü

Işık mikroskopi bulguları; epitel ve subluminal stroma; luminal epitel prizmatikti, apikal yüzeyde daha da artmış silya ve intraepitelyal, bazal membran ve subluminal yerleşimli lökositlerde artış izlendi. Subluminal stromada, predesidüal hücre farklılığı yanında artmış lökosit infiltrasyonu ve artan vaskülarizasyon görüldü. Endometrial bezler; daha dilate idi, bez epitelinde intraepitelyal ve bazal membrana yakın yerleşimli lökositler vardı. Stromada; küçük iç şekilli stromal hücreler, artmış lökosit infiltrasyonu ve vaskülarizasyonda artış izlendi (Şekil 4.12. A-D).



Şekil 4. 12. Gebeliğin 6.gününde ışık mikroskopi bulgular (H-E). (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, L : Lökosit, B : Blastosist, BE: Bez Epiteli, SLS: Subluminal Stroma)

Gebeliğin 6.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları;

(Tablo 4.3 te eksprese oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Dkk-1; luminal epitel ve bez epitelinde zayıf ekspresyonları izlenirken endometrial stromada subluminal stromal bölgeden başlayarak, bazal endometriuma gidildikçe artan ekspresyonu izlendi (Şekil 4.13. A, B, D). Bu ekspresyon 5. güne göre daha kuvvetliydi. 5. güne benzer şekilde perimetrial, mezometrial ve miyometriumun vasküler tabakasının bağ dokularında kuvvetli immünoreaksiyonlar görüldü (Şekil 4.13. C). Miyometrial düz kas tabakalarında ekspresyonu izlenmedi (Şekil 4.13. B, C, D, G). Arteriolar endotelde ve kapiller endotelde zayıf bir immünolokalizasyon izlendi (Şekil 4.13. C, E, G).

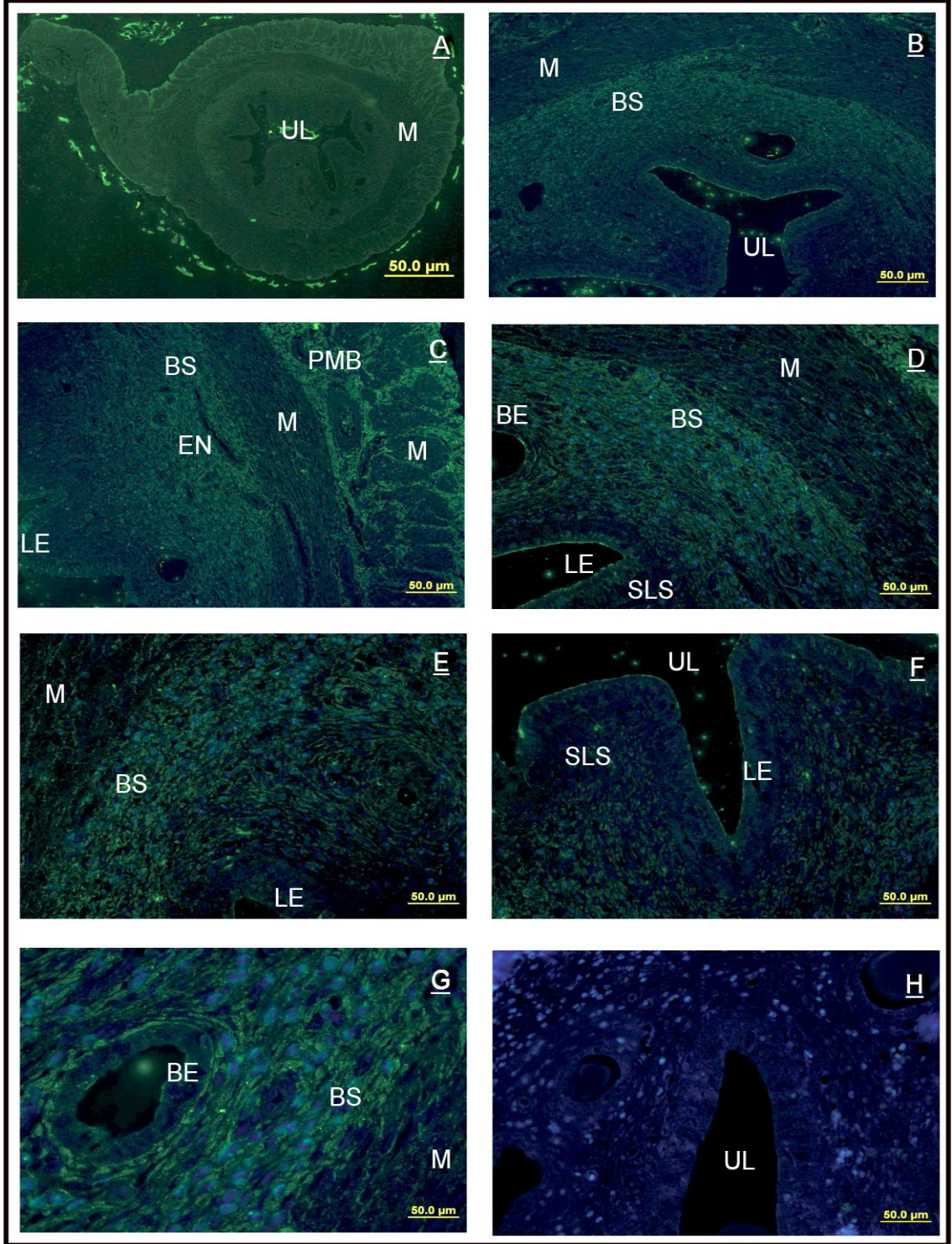
sFRP-1; 5. günden farklı olarak, endometrial stromanın bütün alanlarında zayıf ekspresyonu izlenirken, diğer bulgular aynı özellikteydi (Şekil 4.14. A-H).

WIF-1; luminal epitel, bez epiteli ve miyometrial düz kas tabakalarında 5. güne göre daha kuvvetli bir ekspresyon izlendi (Şekil 4.15. A-G). Miyometrial düz kas tabakalarındaki ekspresyon artışı daha belirgindi (Şekil 4.15. F). Endometrial stromanın bütün bölgelerinde 5. güne benzer şekilde bir ekspresyonu izlenirken stroma ve miyometriumda, arteriolar ve kapiller kan damarlarında endotelial ekspresyonları izlendi (Şekil 4.15. E, G).

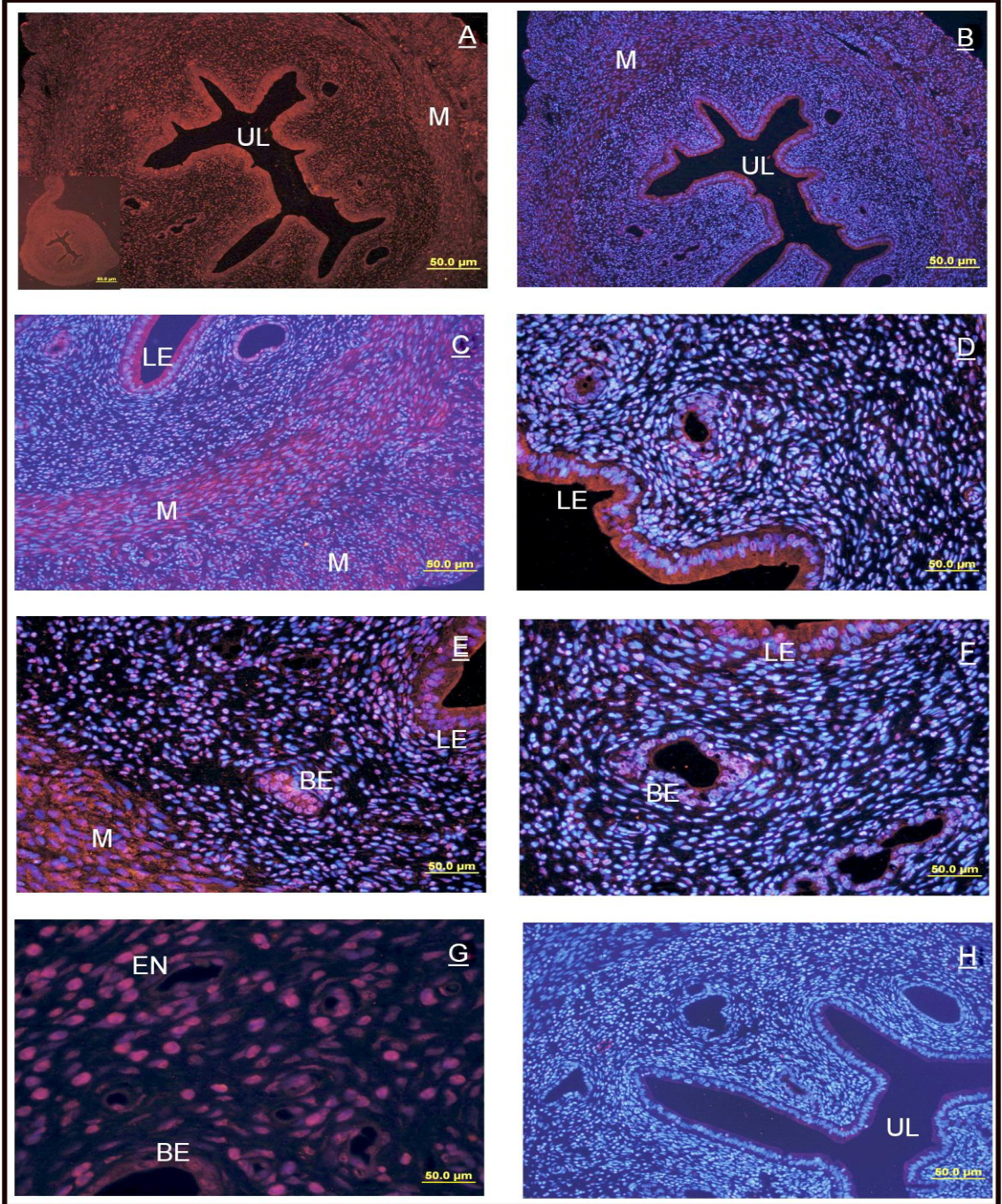
Tablo 4. 3. Gebeliğin 6. gününde, Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları

6.GÜN	PMB	M	ENDOMETRİUM				
			LE	BE	STR		EN
					SLS	BS	
Dkk-1	+ ³	-	+	+	+	+ ³	+
sFRP-1	-	+ ²	+ ²	+ ²	+ ²	+	+ ²
WIF-1	-	+ ²	+ ²	+ ²	+	+	+ ²

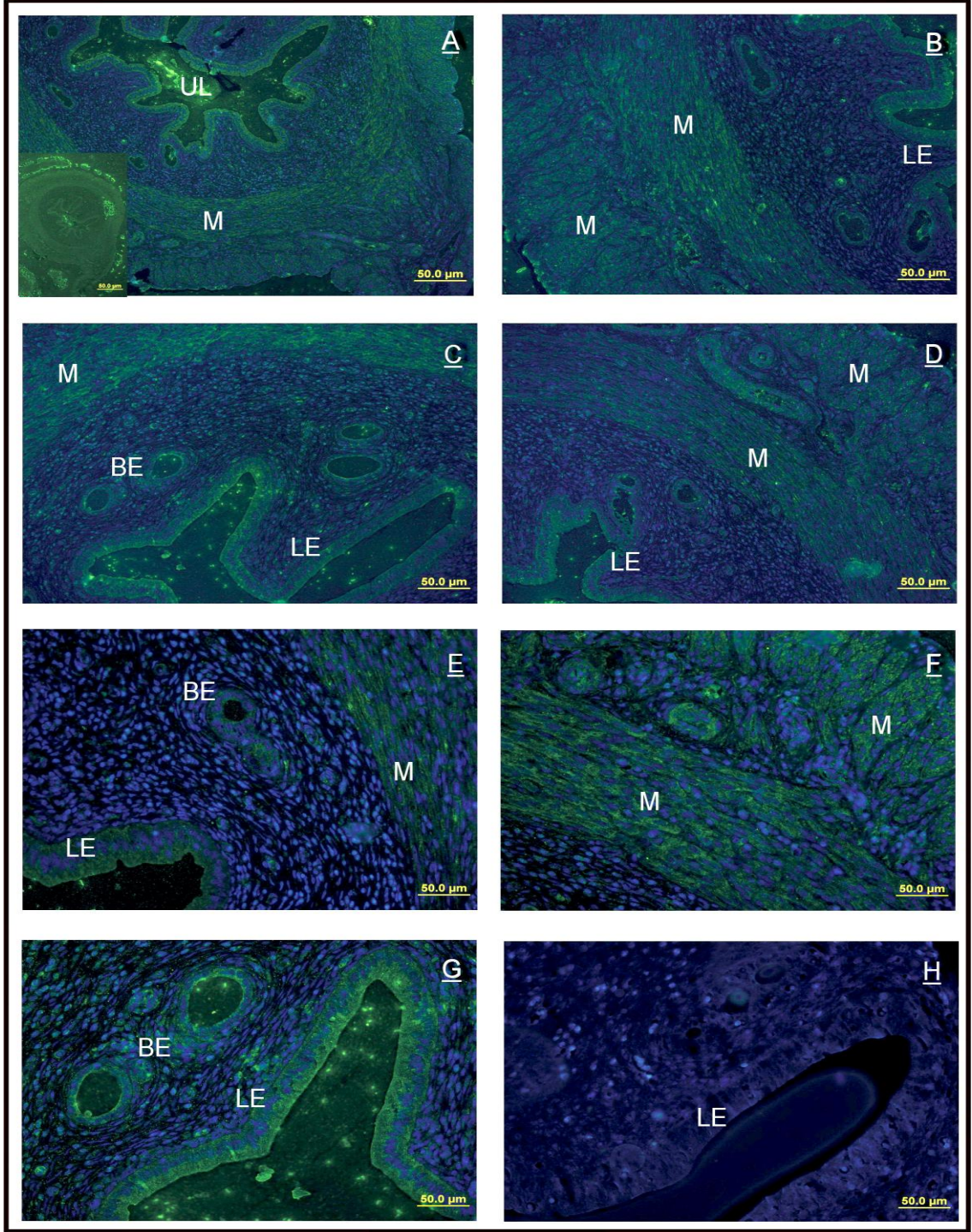
PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları, LE; Luminal epitel, BE; Bez epiteli, STR; Stroma, SLS; Subluminal stroma, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, +³ ; Kuvvetli ekspresyon, +² ; Orta kuvvetteki ekspresyon, + ; Zayıf ekspresyon, - ; Ekspresyon yok



Şekil 4. 13. Gebeliğin 6.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; H (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, M: Miyometriyum, SLS: Subluminal Stroma, BS: Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



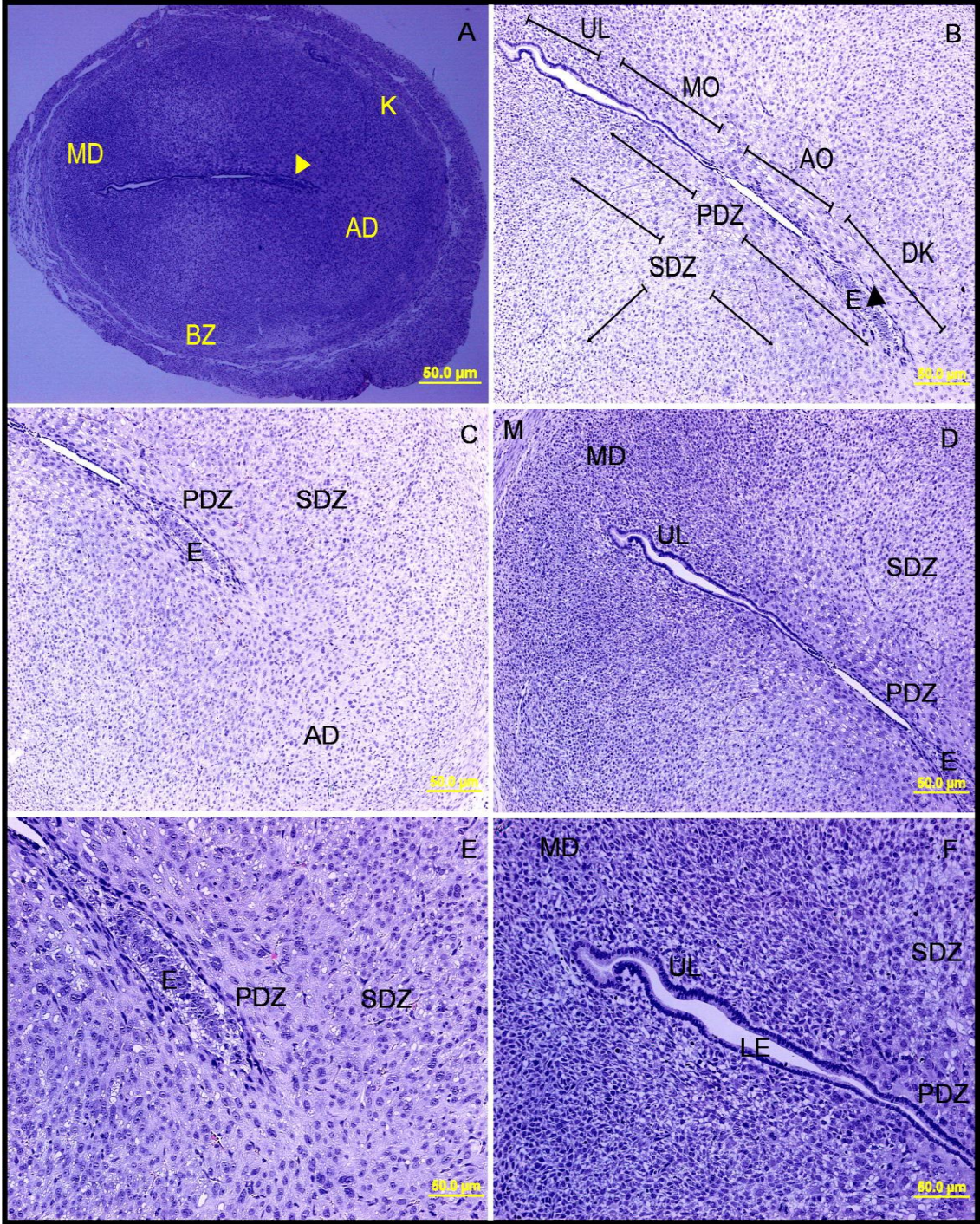
Şekil 4. 14. Gebeliğin 6.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; H (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, SLS: Subluminal Stroma, BS: Bazal Stroma, EN: Endotel, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



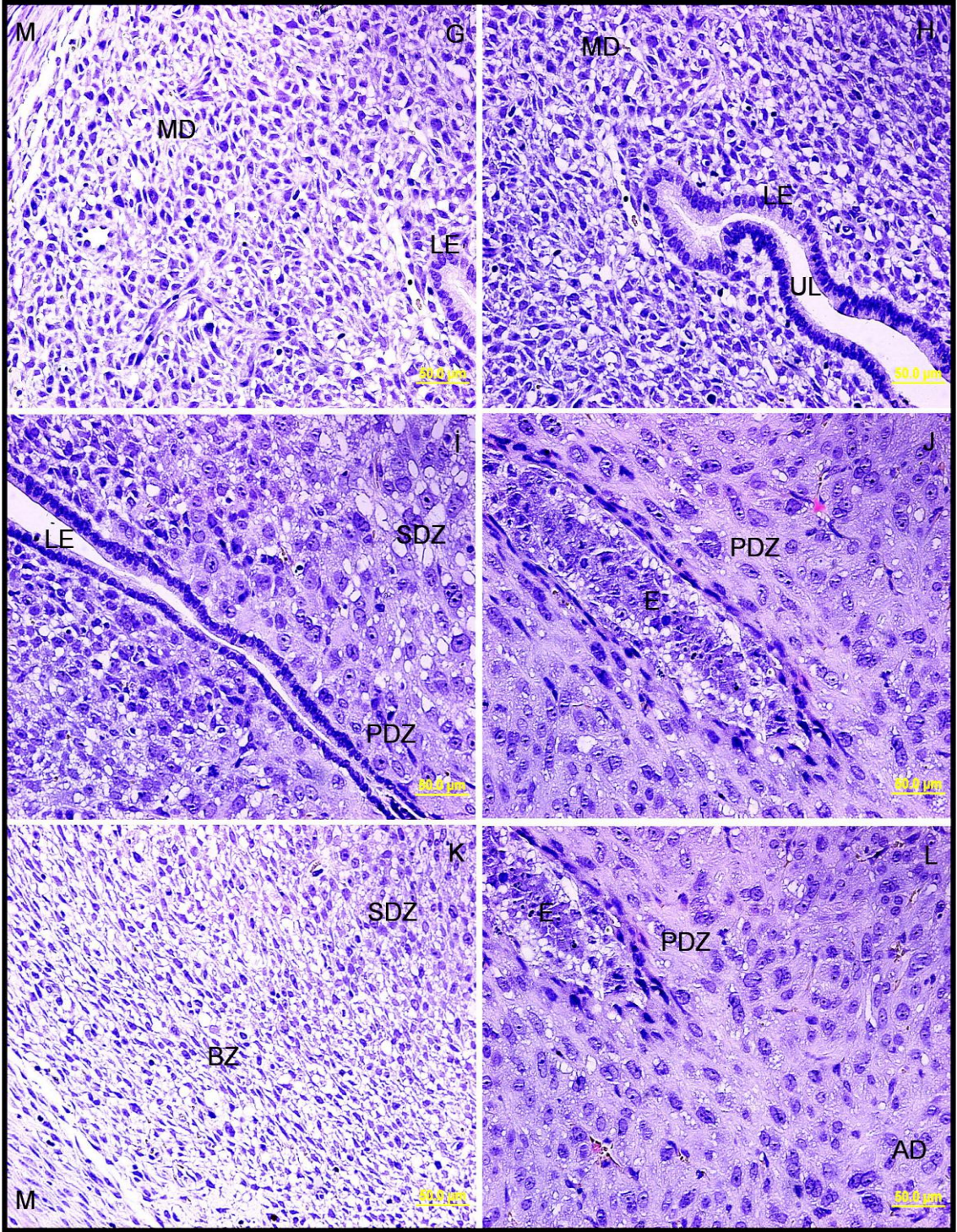
Şekil 4. 15. Gebeliğin 6.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; H (UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BE: Bez Epiteli, M: Miyometrium, EN: Endotel)

4. 2. 3. Gebeliğin 7. günü

Işık mikroskopi bulguları; bu dönemde, blastosist apozisyon ve ataşman sonrasında antimezometrial lokalizasyon göstererek, bu bölgede implantasyon zonu veya desidüal kript alanını oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.16. A, B). Implantasyon bölgesi, blastosisti içeren bir antimezometrial oda, bunu sınırlayan luminal epitel kapanması ile karakterize mezometrial oda ve bunun devamında ise uterus lümen alanları ile iyi ayırt edilebiliyordu (Şekil 4.16. B, C). Implantasyon alanındaki luminal epitel, antimezometrial odadan mezometrial oda ve uterus lümeni boyunca, koyu boyanıp yassı, kübik ve alçak prizmatik morfolojiye sahipti (Şekil 4.16. D, Şekil 4.17. H, İ). Desidual kript bölgesinde ise epitelde dejeneratif değişikliklerin olduğu, bazı alanlarda tamamen ortadan kalktığı gözlemlendi (Şekil 4.16. C, Şekil 4.17. J, L). Antimezometrial ve mezometrial odayı çevreleyen subepitelyal alanda 3-4 hücre sırasından oluşan, sıkıca biraraya gelmiş, büyük poligonal desidual hücrelerin primer desidual zonu şekillendirirken (Şekil 4.16. D-F) antimezometrial bölgede bu zonun dışında büyük poligonal hücrelerden oluşan sekonder desidual zon belirgindi (Şekil 4.16. D-F). Sekonder desidual zonun dışında ise olgun desidual hücrelere farklılaşma aşamasında predesidual hücreler, iç şekilli farklılaşmamış stromal hücreler ve endometrium ile miyometrium sınırında bir iki sıra sıkıca biraraya gelmiş stromal hücrelerin oluşturduğu kapsül benzeri yapı belirgindi (Şekil 4.16. A, Şekil 4.17. G, K).



Şekil 4. 16. Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskopi bulgular-1 (H-E). (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, MO: Mezometrial Oda, AO: Antimezometrial Oda, DK: Desidual Kript, UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BZ: Bazal Zon, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, Ok başları sarı-siyah: Embriyo)



Şekil 4. 17. Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskopi bulgular-2 (H-E). (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BZ: Bazal Zon, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)

Gebeliğin 7.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları;

(Tablo 4.4 de eksprese oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Dkk-1; Bu dönemde Dkk-1 genel olarak antimezometrial ve lateral desidual reaksiyon alanları ile desidüel kript bölgesinde güçlü bir ekspresyona sahipti (Şekil 4.18. A-E). Embriyo bölgesinin çevresinde zayıf olmak üzere, embriyonun lateral alanlarından mezometrial ve bazal yönlere doğru uzanan sekonder desidual zonda gittikçe artış gösteren bir immünolokalizasyona sahipti (Şekil 4.18. B,C). Mezometrial odada stromal hücrelerin henüz farklanmadığı uterus lümeni etrafı ve primer desidüel zonun dışındaki stromal hücrelerde Dkk-1 ekspresyonu izlenmezken (Şekil 4.18. A, D) uterus lümen epitelinde çok zayıf bir lokalizasyona, primer desidual zonda ise güçlü bir ekspresyona sahipti (Şekil 4.18. E). Endometrial bazal stromada yerleşmiş bezlerin epitelinde zayıf bir immünofloresan reaksiyon gösteren Dkk-1'in bezlerin etrafındaki bağ dokuda kuvvetli ekspresyonu izlendi (Şekil 4.16. C, G). Miyometrial düz kas tabakalarında ise çok zayıf bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.18. H).

Bu dönemde Dkk-1, interimplantasyon bölgelerinde luminal epitel ve bez epiteli ile yüzeyel stromda zayıf bir immünolokalizasyon gösterirken, derin stromada, perimetrial ve miyometrial bağ dokuda, özellikle miyometriyumun vasküler tabakasında damar etrafındaki bağ dokuda kuvvetli bir ekspresyona sahipti (Şekil 4.18. İ).

sFRP-1; Gebeliğin 7.gününde sFRP-1 genel olarak desidual kript, primer desidüel zon ve bazal stroma hariç tüm desidual reaksiyon alanında güçlü bir immünoreaksiyon gösterdi (Şekil 4.19. A). Antimezometrial alanda yassılaştırmış desidual hücrelerde sFRP-1 ekspresyonu izlenmezken, sekonder desidual hücrelerde ve ekstraselüler matriksde güçlü bir lokalizasyon gözlemlendi (Şekil 4.19. B, C). Bazal bölgede, en bazaldeki stromal hücreler bir reaksiyon göstermezken predesidual hücrelere farklılaştıkça artan bir sFRP-1 ekspresyonuna sahipti (Şekil 4.19. C, H). Bu alanda özellikle poligonal şekil kazanan predesidual hücrelerde sitoplazmik lokalizasyon belirgindi (Şekil 4.19. G, H). Bu dönemde mezometrial odayı çevreleyen desidual hücrelerde güçlü uniform bir dağılım gösteren sFRP-1, buradan luminal epitel bölgesine gidildikçe azalan bir ekspresyona sahipti ve subluminal bölgede ise bir immünoreaksiyon gözlenmedi (Şekil 4.19. E, F). Kapsül yapısını oluşturan,

sıkıca biraraya gelmiş hücrelerde çok zayıf bir ekspresyon gözlenirken bu bölgeye komşu bazal stromadaki kapillerler endotelinde, miyometrial kas hücrelerinde ve kapiller endotelinde de sFRP-1 lokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 4.19. E)

Interimplantasyon bölgesinden geçen kesitlerde ise, luminal epitel ve bez epitelinde daha güçlü olmak üzere subluminal stromada zayıf bir sFRP-1 immunolokalizasyonu izlenirken, bazal stroma ve miyometriumdaki kan damarı endoteli ile miyometriumdaki iç sirküler kas tabakalarında daha güçlü bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.19. H, İ).

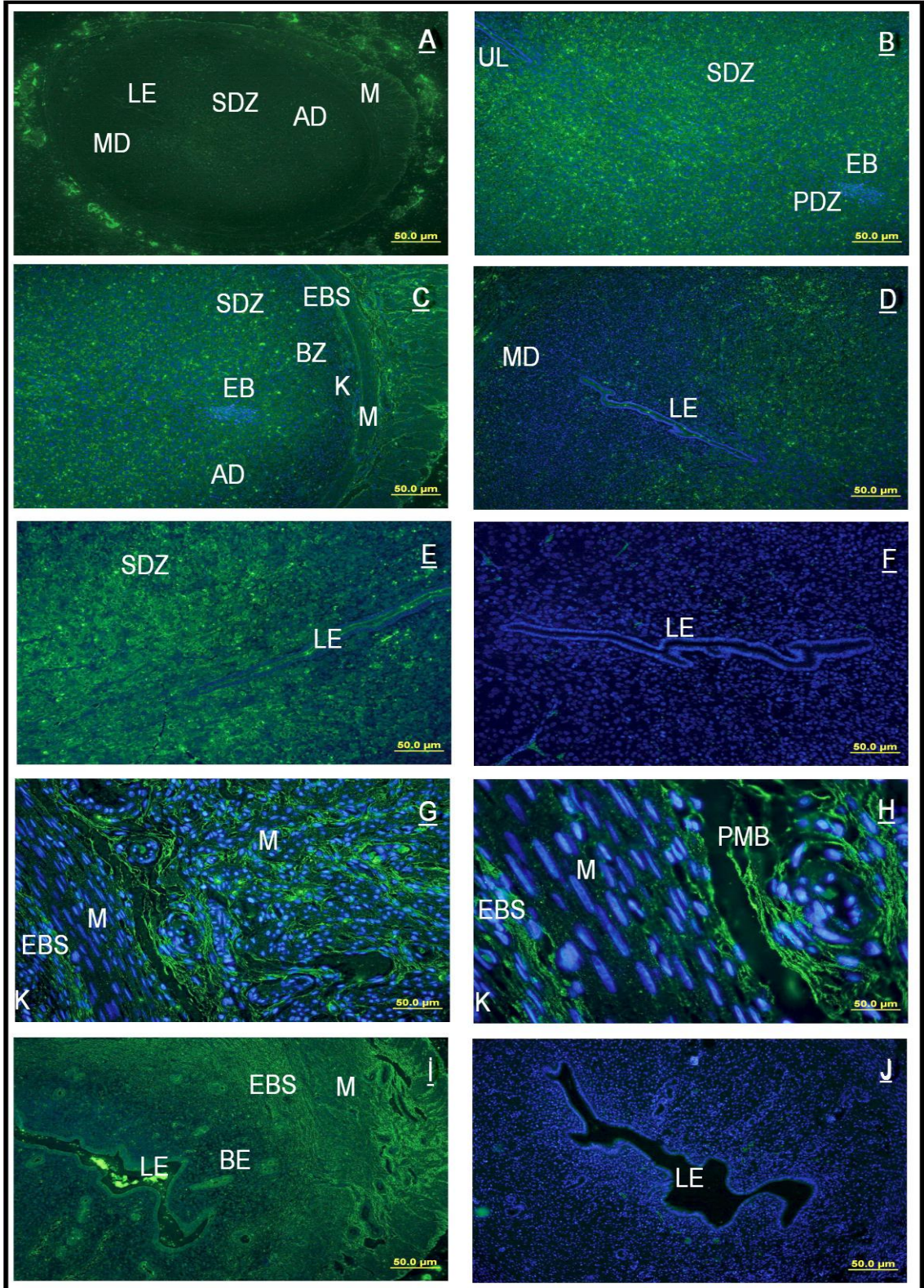
WIF-1; Gebeliğin 7. gününde WIF-1 ekspresyonu daha çok antimezometrial desidual reaksiyon alanında yaygın olmasına rağmen mezometrial oda çevresindeki dar bir alanda immunolokalizasyon gösterdi (Şekil 4.20. A). Antimezometrial bölgedeki desidual kript bölgesinde immunoreaksiyon gözlenmezken, primer desidual zonda zayıf, sekonder desidual zonda ise ekstraselüler matriks ve desidual hücrelerde daha güçlü bir ekspresyon izlendi (Şekil 4.20. B). Mezometrial oda çevresinde ekstraselüler ve endotelial reaksiyon gösteren WIF-1, bu bölgeden luminal epitel bölgesine gittikçe azalan bir ekspresyona sahipti (Şekil 4.20. C, D). Luminal epitel ve mezometrial alanların geri kalan bölgelerinde ise WIF-1 ekspresyonu negatifti (Şekil 4.20. D). Bu bölgede biraz derin desidual alanlarda yalnızca kapiller endotelipozitif bir reaksiyona sahipti (Şekil 4.20. E). Bu dönemde bazal bölgede, kapsül dışındaki endometrial stromadaki yapılarda herhangi bir reaksiyon gözlenmezken, farklılaşan predesidual hücrelerde sitoplazmik, daha poligonal predesidual hücrelere geçiş alanında ise hem sitoplazmik hem de ekstraselüler ekspresyonu belirgindi (Şekil 4.20. F). Miyometrial iç sirküler kaslardaki zayıf ekspresyonuna karşın uterusun diğer tabakalarında WIF-1 immunolokalizasyonu gözlenmedi (Şekil 4.20. A, F).

Interimplantasyon bölgesinde, WIF-1 ekspresyonu luminal epitel ve bez epiteli ile stromal kapiller endoteli ile sınırlı kalmıştı (Şekil 4.20. G, İ).

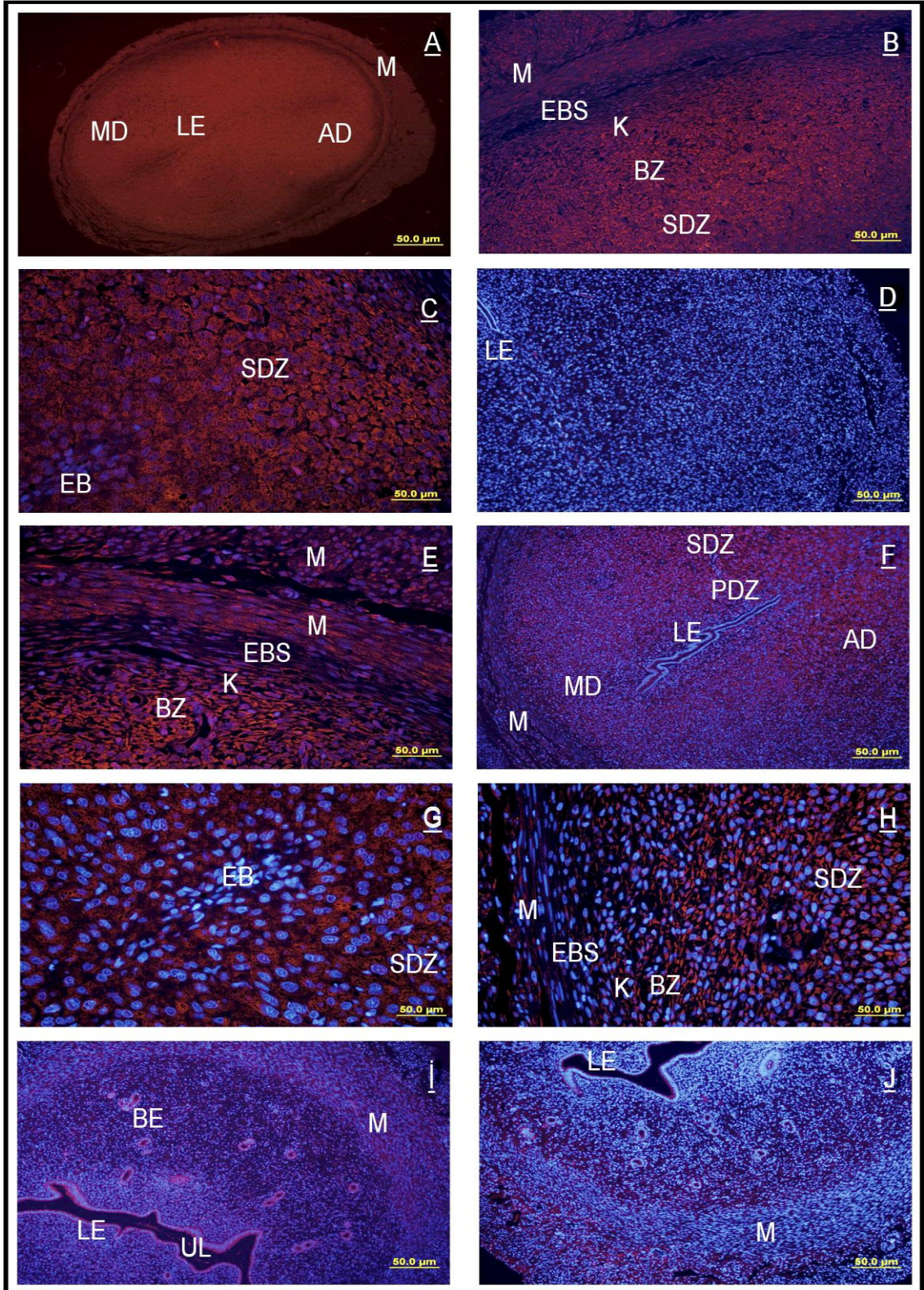
Tablo 4. 4. Gebeliğin 7. gününde, Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları

7.GÜN	DESİDÜA								PMB	M	ENDOMETRİUM (interimplantasyon)				
	EB	PDZ	SDZ	BZ	DK	DS	EBS	LE			BE	STR		EN	
												SLS	BS		
Dkk-1	+	+	+ ²	-	-	-	+ ³	+ ³	-	+	+	+	+ ³	+	
sFRP-1	+	+ ²	+ ²	+ ²	+	+	-	-	+	+	+	+ ²	+	+ ²	
WIF-1	+	+ ²	+ ²	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+ ²	

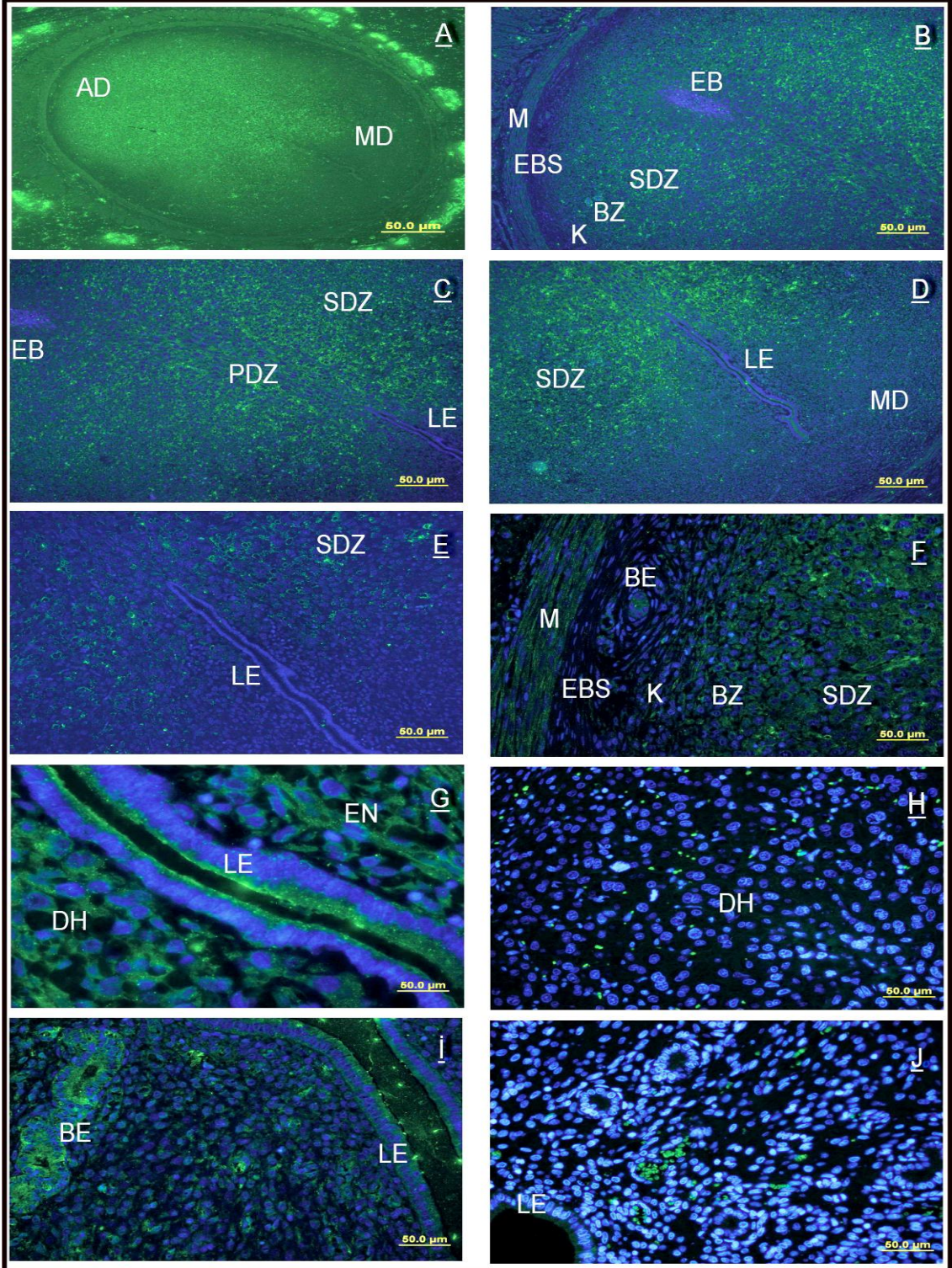
EB; Embriyo bölgesi, PDZ; Primer desidüal zon, SDZ; Sekonder desidüal zon, BZ; Bazal zon, DK; desidüal kapsül, DS; Desidüal sinüzoid, EBS; Endometrial bazal stroma, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları, LE; Luminal epitel, BE; Bez epiteli, STR; Stroma, SLS; Subluminal stroma, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, +³; Kuvvetli ekspresyon, +²; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok



Şekil 4. 18. Gebeliğin 7.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; F, J (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BZ: Bazal Zon, K: Kapsül, EB: Embriyo Bölgesi, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, EBS: Endometrial Bazal Stroma, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)



Şekil 4. 19. Gebeliğin 7.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; D, J (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BZ: Bazal Zon, K: Kapsül, EB: Embriyo Bölgesi, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, EBS: Endometrial Bazal Stroma, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)

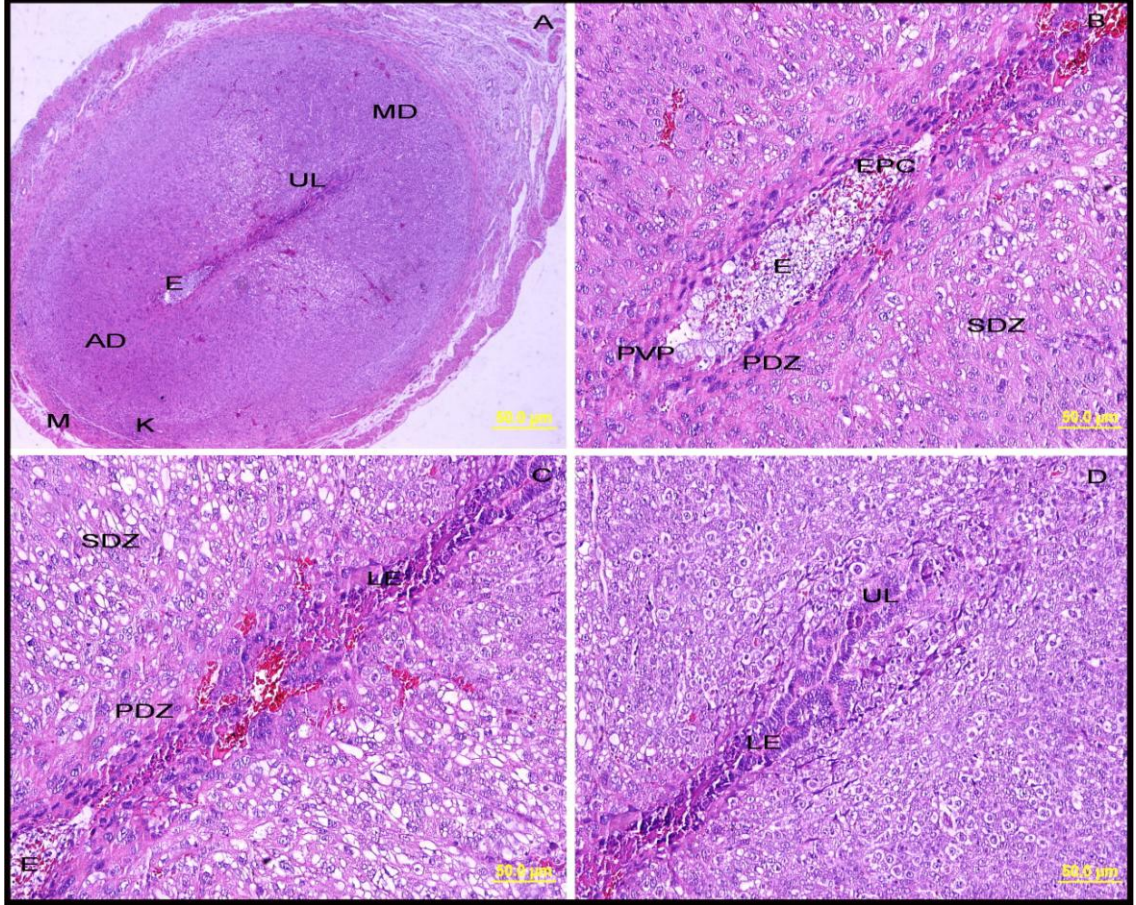


Şekil 4. 20. Gebeliğin 7.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; H, J (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, BZ: Bazal Zon, K: Kapsül, BE: Bez Epiteli, DH: Desidual Hücre, EB: Embriyo Bölgesi, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, EBS: Endometrial Bazal Stroma, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku)

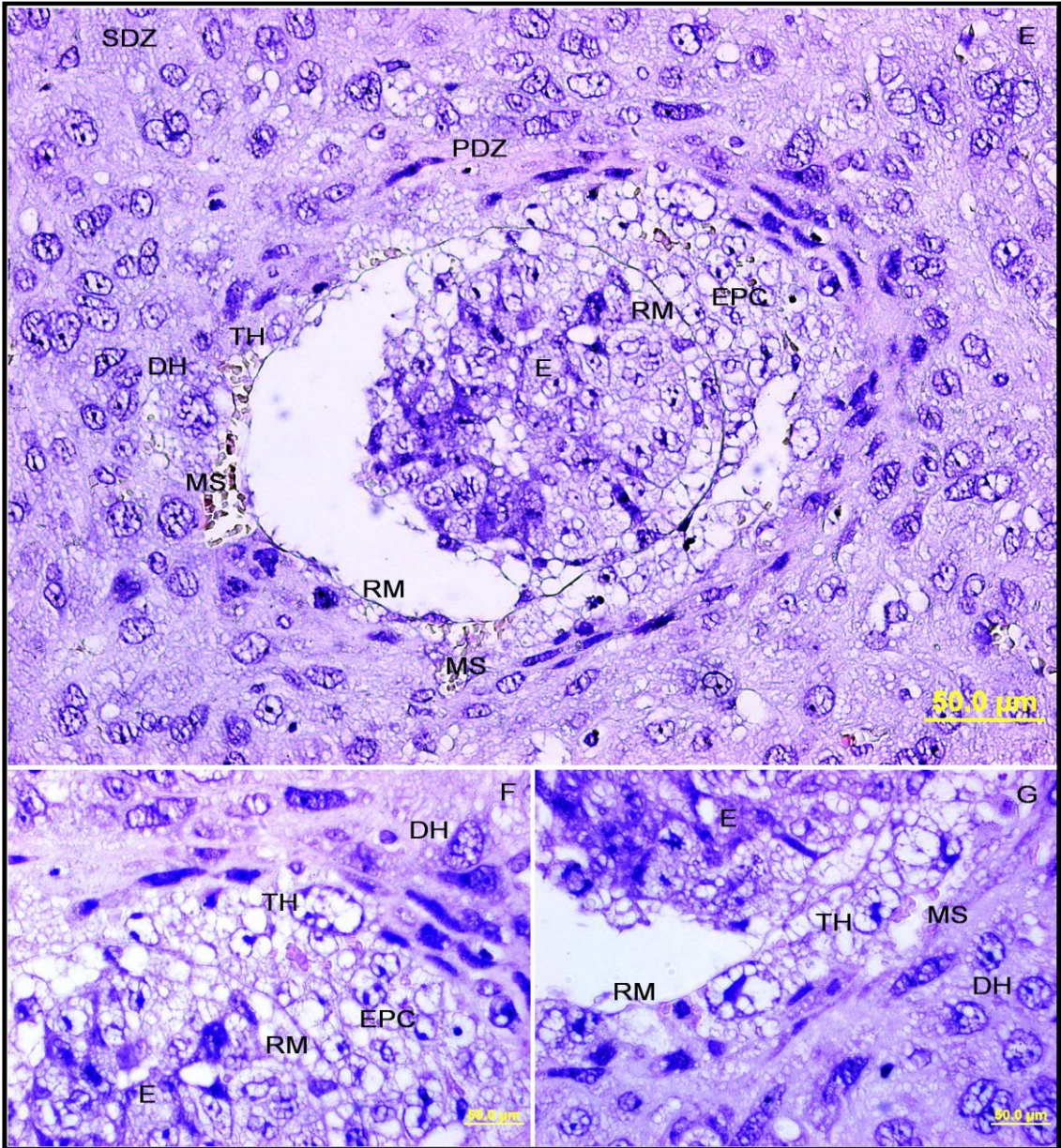
4. 2. 4. Gebeliğin 8. günü

Işık mikroskopi bulguları; bu dönemde antimezometrial desiduanın genişlediği, blastosistin tamamen gömüldüğü ve embriyo bölgesinden periferde doğru ışınsal şekilde düzenlenim gösteren büyük çoğunluğu olgun desidual hücrelerden oluşan implantasyon zonu gözlenirken bazal zonda ise sekonder desidual zonun genişlemesi ile dar bir alanda farklılaşma aşamasındaki stromal hücreler bulunuyordu ve bazal zonun luminal epitele komşu bölgesinde ve miyometriumun içteki sirküler kas tabakasına komşu bölgesinde daha belirgin olmak üzere, sıkıca bir araya gelmiş yassılaştırmış stromal hücrelerin oluşturduğu, implantasyon zonunu sınırlayan bir kapsül yapısı şekillenmişti ayrıca, uterus lümeni epiteli etrafında ve lümene açılan ve ışınsal şekilde embriyo çevresinde daha fazla olmak üzere antimezometrial desiduada artmış vaskülarizasyon izlendi ve embriyo çevresinden itibaren lateral ve mezometrial yöne doğru uzanan desiduada ekstraselüler matriks artmıştı (Şekil 4.21. A-D).

Embriyo çevresinde uterin epitel dejenerasyonu artmıştı ve embriyonun antimezometrial kutbunda, trofoblast invazyonu ile karakterize ve yakınında maternal kan damarlarının bulunduğu ektoplasental kon şekillenmeye başlamış, ektoplasental kon alanında vaskülarizasyon artmıştı (Şekil 4.21. B). Parietal endodermin hemen dışında embriyonun etrafında Reichert membranı belirmişti. Reichert membranı dışındaki 1-2 tabakalı trofoblast hücreleri, desidual hücreler ve maternal kan damarları ile direkt temas halindeydi (Şekil 4.22. E-G). Mezometrial kutupta epitel dejenerasyonu daha belirgindi ve trofoblast invazyonu izlendi ayrıca mezometrial kutupta bazı desidual hücrelerde dejenerasyonlar görüldü ve mezometrial desidual hücreler 7. günden farklı olarak daha poligonal bir görünüme sahipti, iç şekilli stromal hücreler izlenmiyordu (Şekil 4.21. B-D).



Şekil 4. 21. Gebeliğin 8.gününde ışık mikroskopi bulgular-1 (H-E). (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometrium, EPC: Ektoplasental Kon, PVP: Pirimitif Vitellüs kesesi Plasentası, UL: Uterus Lümeni, LE: Luminal Epitel, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)



Şekil 4. 22. Gebeliğin 8.gününde ışık mikroskopi bulgular-2 (H-E). (E: Embriyo, RM: Riechert Membranı, TH: Trofoblast Hücreleri, DH: Desidual Hücreler, EPC: Ektoplasental Kon, MS: Maternal Sinüzoid, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)

Gebeliğin 8.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları;

(Tablo 4.5'te eksprese oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Dkk-1; gebeliğin bu gününde Dkk-1'in, primer ve sekonder desidüal zonda 7. güne göre daha kuvvetli bir ekspresyonu izlenirken embriyo çevresinde de 7. güne göre artmış bir immünoreaksiyon görüldü (Şekil 4.23. B, C, G, H). Mezometrial alanda stromal hücrelerin farklanmadığı stromada ve çepeçevre dar bir bölge şeklinde izlenen desidüal bazal zonda ve kapsüler yapıyı da içine alan alanlarda ekspresyon izlenmedi ancak, miyometriumun içteki sirküler düz kas tabakasına komşu endometrial bazal stromada kuvvetli immünolokalizasyonu vardı (Şekil 4.23. D, E). Primer ve sekonder desidüada sinüzoid endotelinde ekspresyonu izlenmezken, luminal epitelde ve luminal epitelin hemen çevresindeki desidüal stromada zayıf ekspresyonu izlendi ve implantasyon bölgesini sınırlayan kapsül yapısında, perimetrial ve miyometrial bağ dokuda kuvvetli immünoreaksiyon devam ediyordu (Şekil 4.23. H).

Embriyo çevresinde ışınal şekilde düzenlenim gösteren maternal sinüzoidlere komşu trofoblastik ve desidüal hücre alanlarında, antimezometrial kutuptaki ekto plasental kon ve mezometrial kutuptaki desidüal alanlarda immünofloresan lokalizasyonları izlendi (Şekil 4.23. G, İ, J).

Interimplantasyon alanlarındaki ekspresyonları, 7. gündeki bulgularla aynı özellikteydi (Şekil 4.23. A).

sFRP-1; 8.günde sFRP-1'in, embriyo çevresindeki primer desidüal zonda immünolokalizasyonu zayıf bir şekilde izlenirken, sekonder desidüal zonda ekstraselüler matriksin artış gösterdiği alanlarda daha az olmak üzere kuvvetli immünoreaksiyon alanları izlendi ve desidüal bazal zonda 7. günden farklı olarak kapsüler bölgeyi de içeren kuvvetli bir immünoreaksiyonu görüldü (Şekil 4.24. A-C). Ayrıca kapsüler yapının dışındaki endometrial bazal stromada ekspresyonu izlenmezken, endometrial bazal stromadaki bez epitelinde, arteriol ve kapiller endotelinde eksprese edildi (Şekil 4.24. A, Şekil 4.25. İ). Miyometrial düz kas tabakalarında ekspresyon devam ediyordu ancak desidüal alanlardaki kadar kuvvetli değildi (Şekil 4.24. A, Şekil 4.25. İ). Desidüal sinüzoid endotelinde ve miyometriumun vasküler tabakasında arteriol ve kapiller kan damarlarında endotelial ekspresyonları görüldü, bağ doku lokalizasyonları izlenmedi (Şekil 4.24. E, Şekil 4.25. G, H).

Embriyo çevresindeki trofoblastik lakünelardaki sinüzoid endotelinde ve

trofoblastik lakünelara komşu, trofoblastik ve desidüal hücre alanlarında ekspresyonu izlendi ayrıca embriyoblastik hücrelerde (iç hücre kitlesi ve endodermal hücreler) ekspresyonları görüldü (Şekil 4.24. E, F).

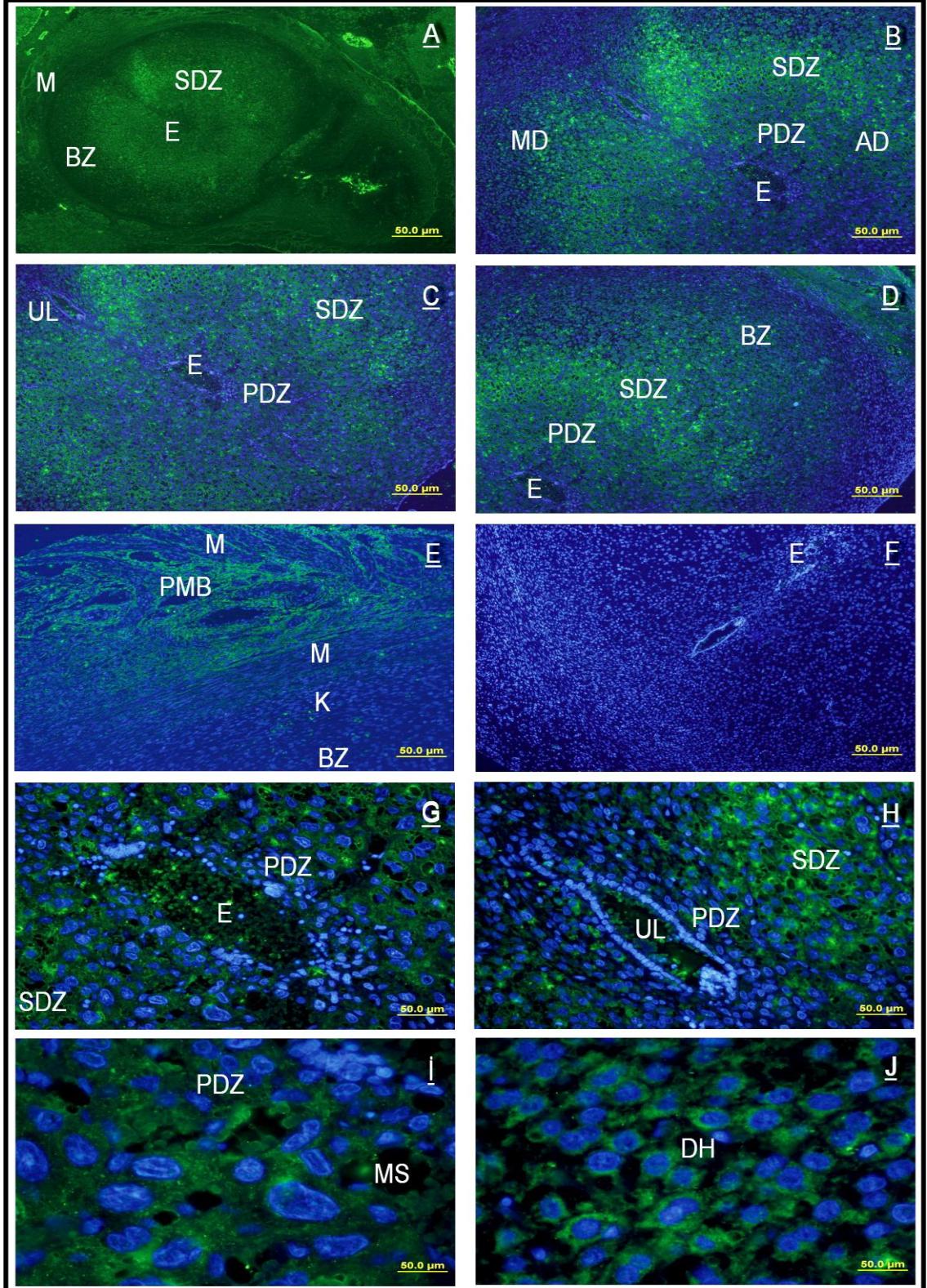
Interimplantasyon alanlarında 7. günden farklı bir bulgu elde edilmedi (Şekil 4.25. J).

WIF-1; gebeliğin bu gününde WIF-1'in, embriyo çevresindeki primer desidual zonda zayıf immünolokalizasyonu izlenirken, sekonder desidual zonda kuvvetli bir ekspresyon vardı ve kapsüler bölgeyi de içeren desidual bazal zonda zayıf bir immünoreaksiyon izlendi (Şekil 4.26. A-C, Şekil 4.27. F, G). Embriyo çevresindeki, trofoblastik ve desidüal hücre alanlarında zayıf bir immünoreaksiyon izlendi (Şekil 4.26. A, E, F). Luminal epitelde (Şekil 4.28. İ, J), desidual sinüzoidal kapiller endotelinde (Şekil 4.27. E), endometrial bazal stromada bez epitelinde, arteriol ve kapiller endotelinde (Şekil 4.27. H), miyometrial düz kas tabakalarında ve miyometriumun vasküler tabakasındaki arteriol ve kapiller endotelinde (Şekil 4.27. F, G), kuvvetli immünofloresan lokalizasyonları izlendi. Interimplantasyon alanlarındaki ekspresyonları, 7. günde bulgularla aynı özellikteydi (Şekil 4.26. L).

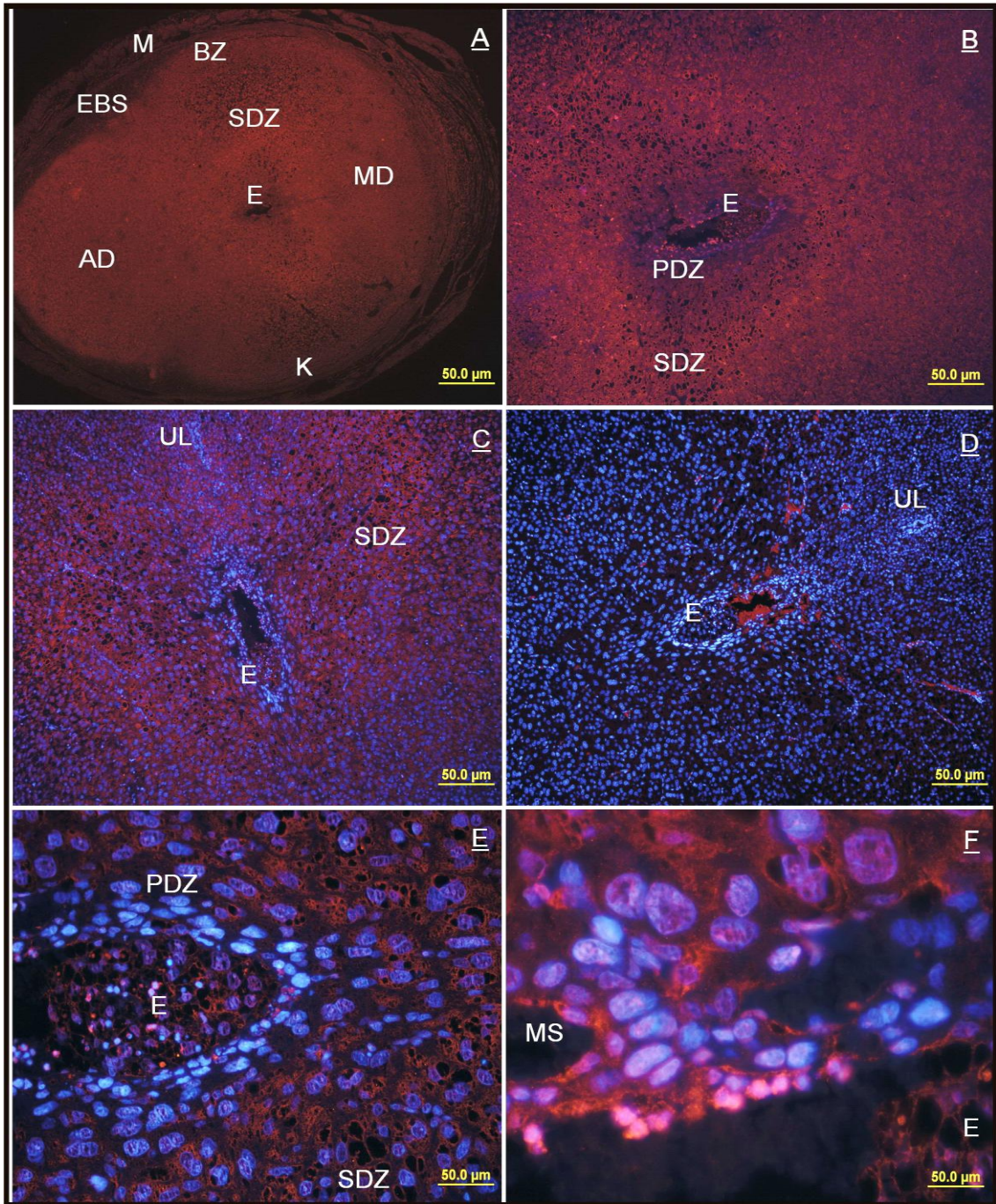
Tablo 4. 5. Gebeliğin 8. gününde, Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları

8.GÜN	DESİDÜA							PMB	M	ENDOMETRİUM (interimplantasyon)				
	EB	PDZ	SDZ	BZ	DK	DS	EBS			LE	BE	STR		EN
												SLS	BS	
Dkk-1	+	+ ²	+ ³	-	-	-	+ ³	+ ³	-	+	+	+	+ ³	+
sFRP-1	+	+ ²	+	+ ³	+ ³	+	-	-	+ ²	+	+	+ ²	+	+ ²
WIF-1	+	+	+ ²	+	+	+	+	-	+ ²	+	+	+	+	+ ²

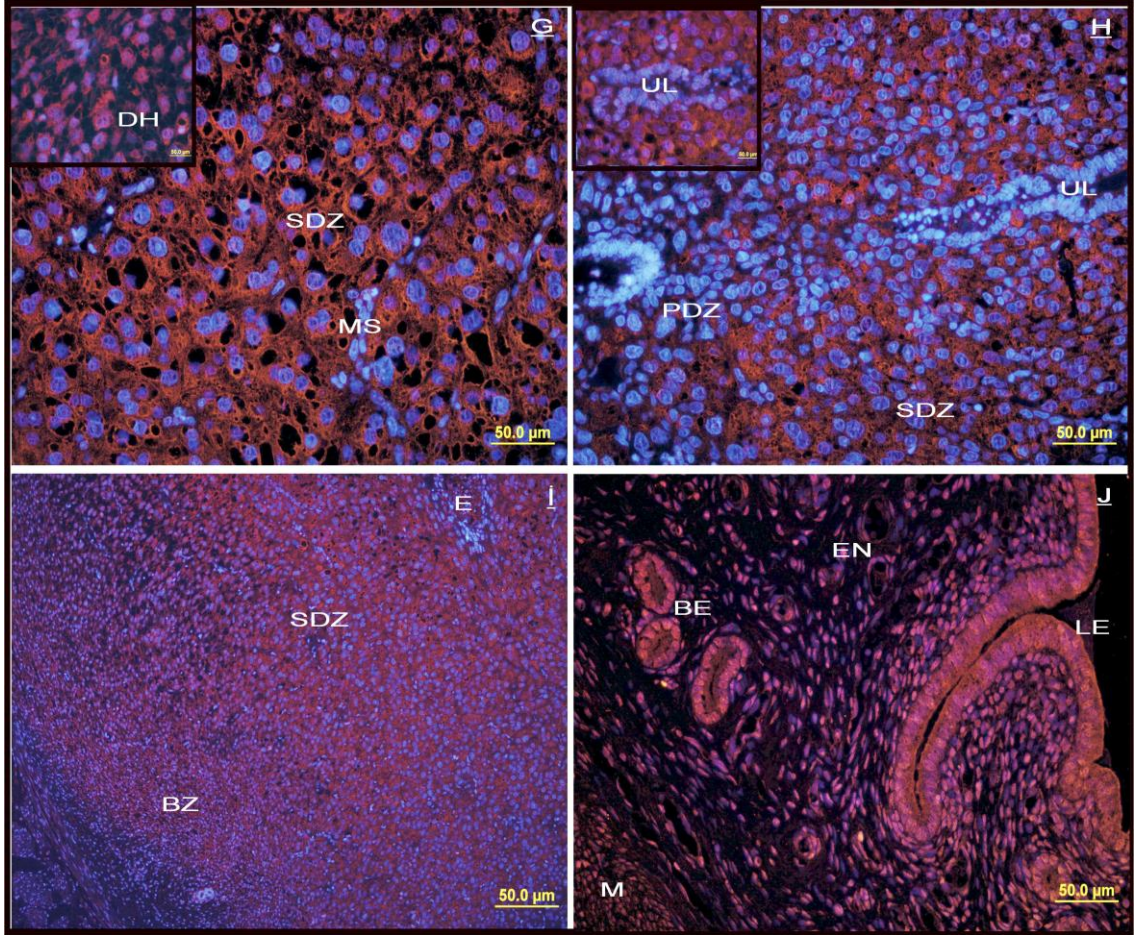
EB; Embriyo bölgesi, PDZ; Primer desidüal zon, SDZ; Sekonder desidüal zon, BZ; Bazal zon, DK; desidüal kapsül, DS; Desidüal sinüzoid, EBS; Endometrial bazal stroma, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları, LE; Luminal epitel, BE; Bez epiteli, STR; Stroma, SLS; Subluminal stroma, BS; Bazal stroma, EN; Endotel, +³; Kuvvetli ekspresyon, +²; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok



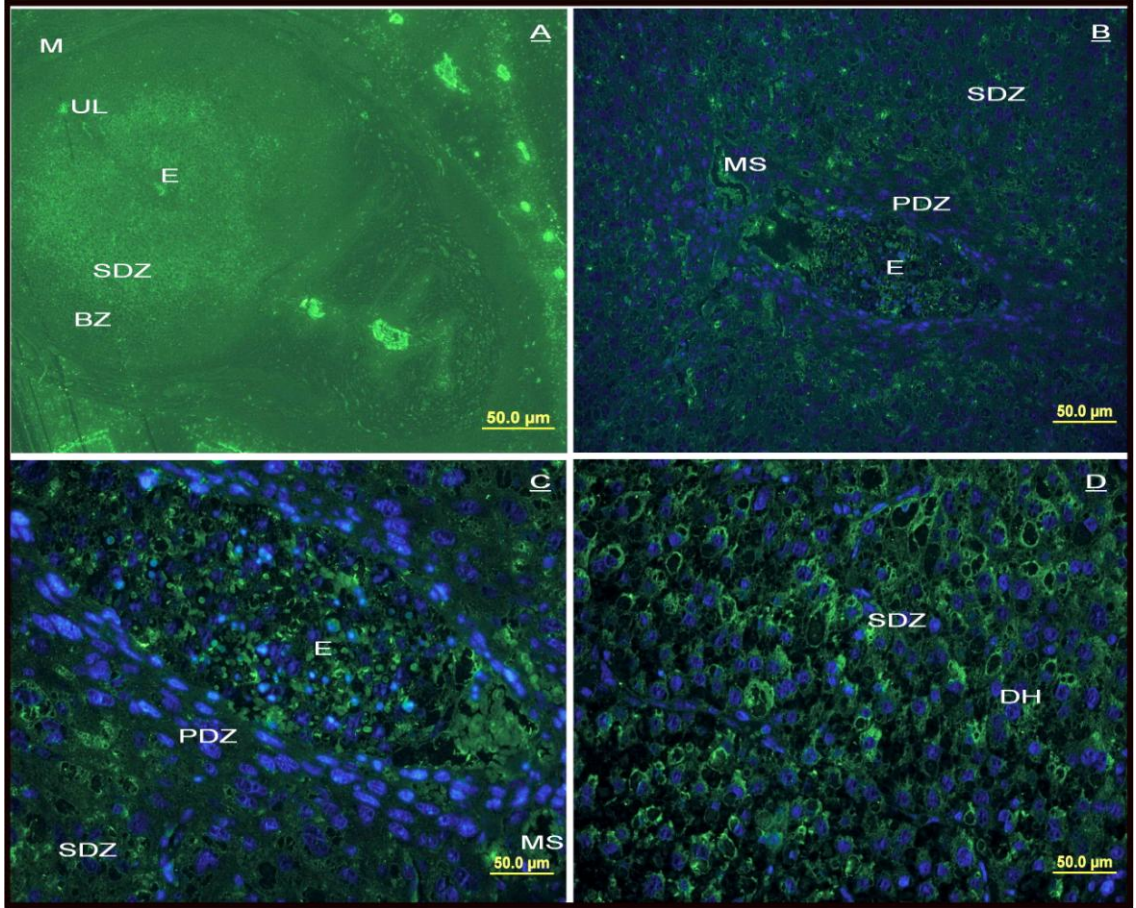
Şekil 4. 23. Gebeliğin 8.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesit; F (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, MS: Maternal Sinüzoid, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)



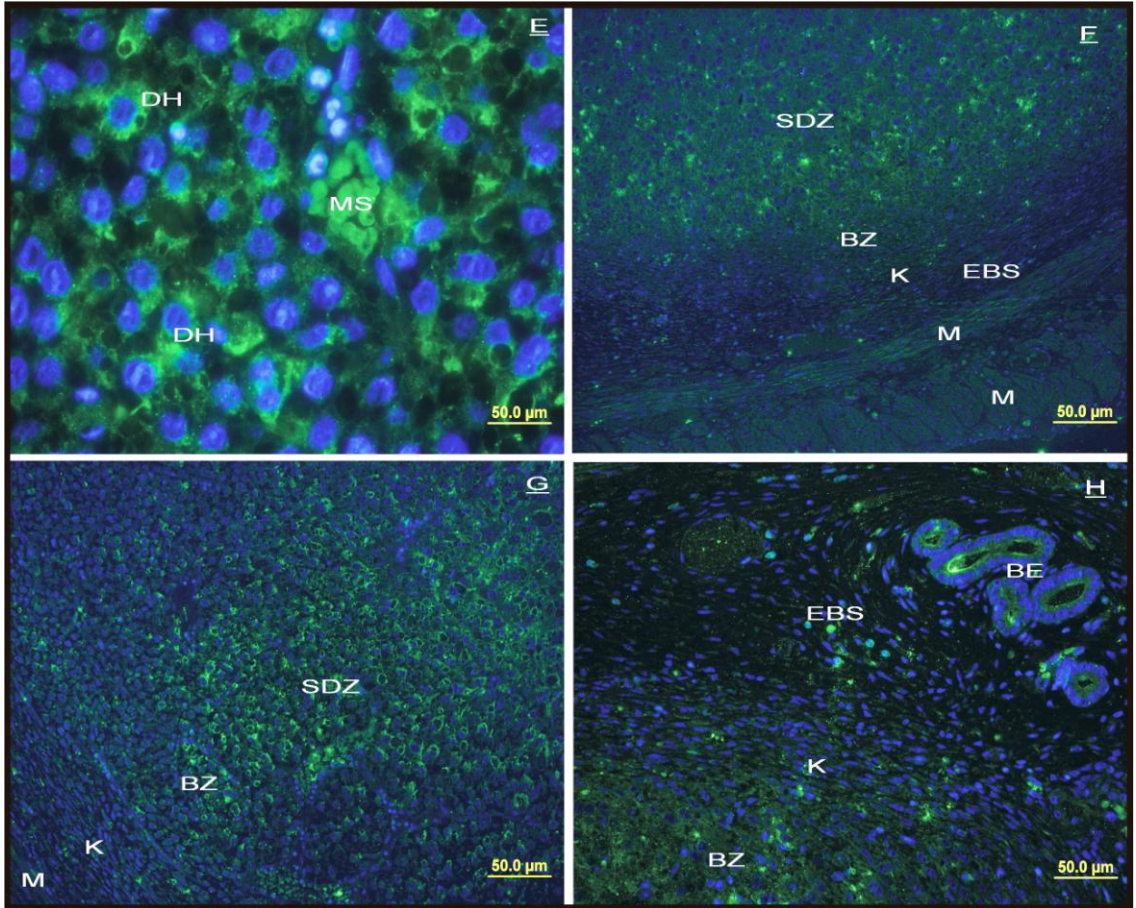
Şekil 4. 24. Gebeliğin 8.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları (1). Negatif kontrol kesit; D (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, MS: Maternal Sinüzoid, EBS: Endometrial Bazal Stroma, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)



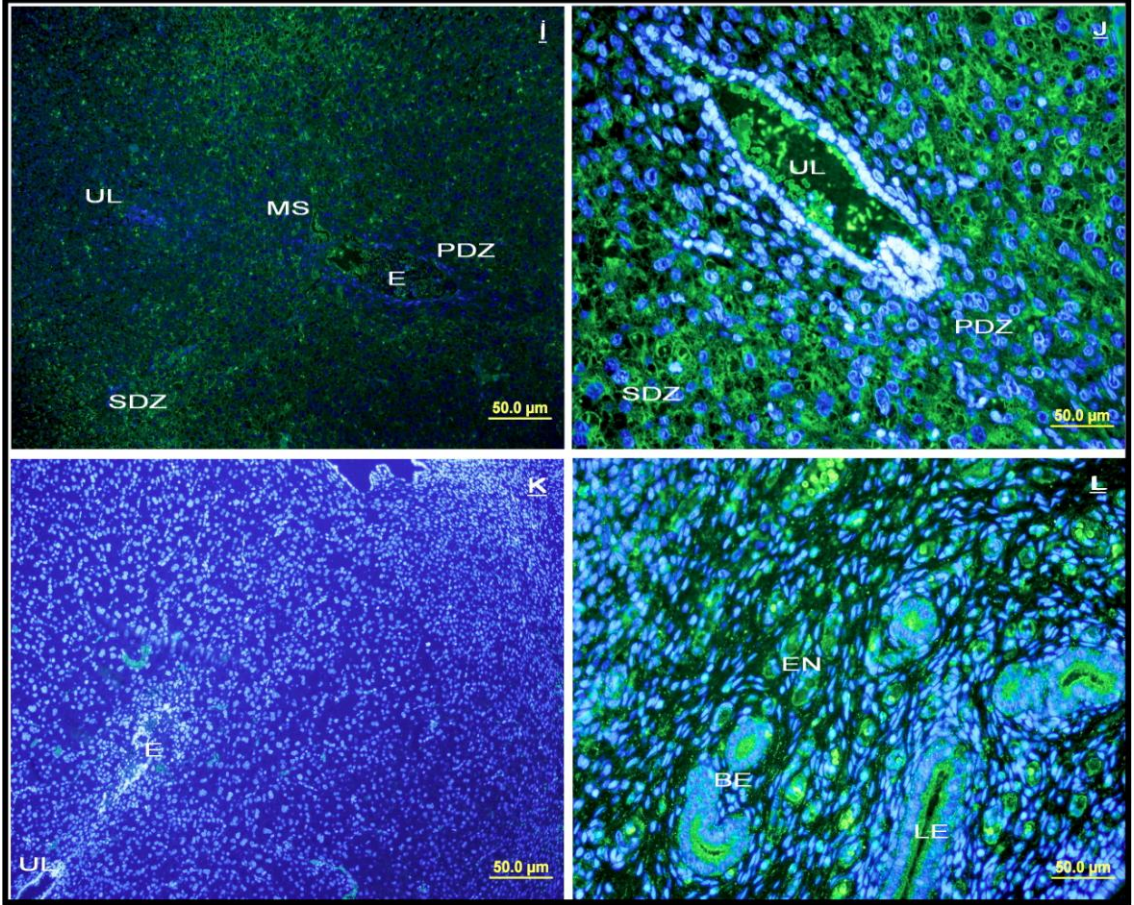
Şekil 4. 25. Gebeliğin 8.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları (2). (M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, MS: Maternal Sinüzoid, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, BE: Bez Epiteli, EN: Endotel, LE: Luminal Epitel)



Şekil 4. 26. Gebeliğin 8.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları (1). (M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, MS: Maternal Sinüzoid, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)



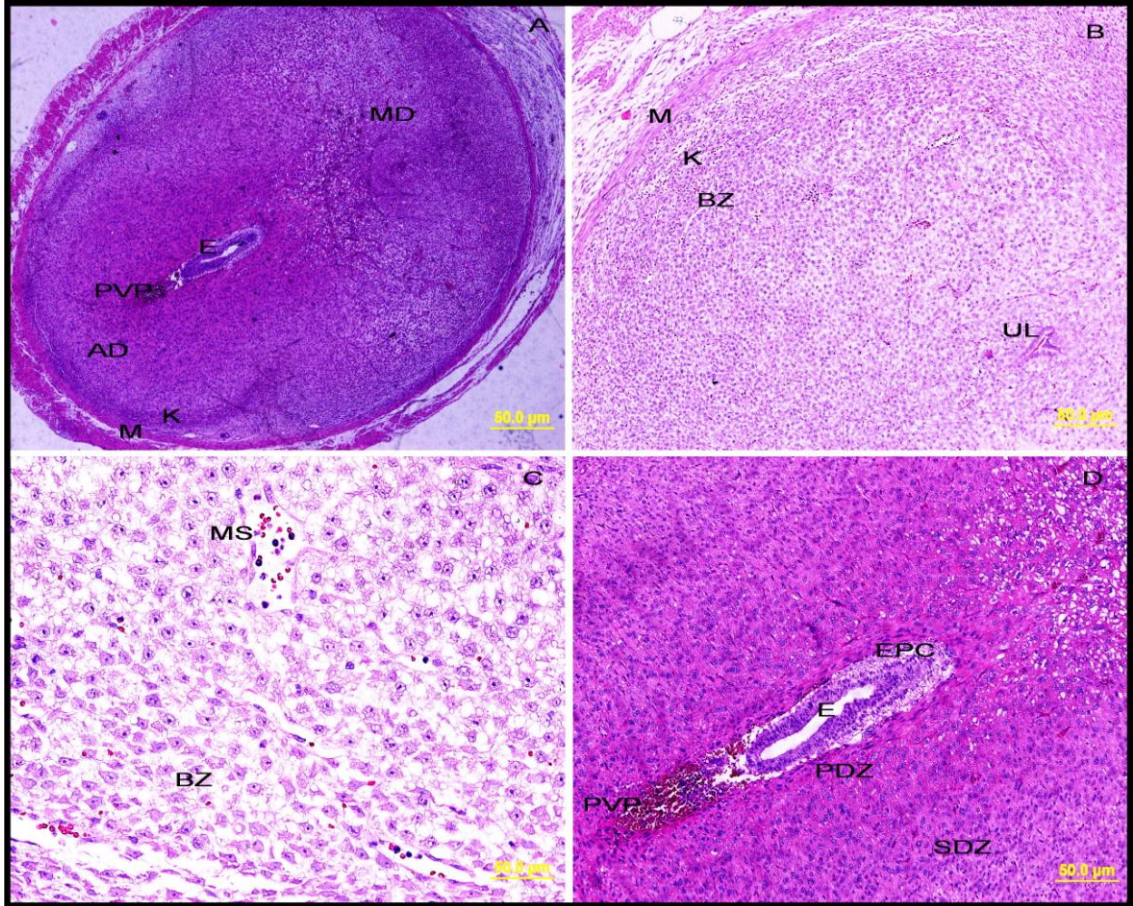
Şekil 4. 27. Gebeliğin 8.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları (2). (K: Kapsül, M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, MS: Maternal Sinüzoid, EBS: Endometrial Bazal Stroma, UL: Uterus Lümeni, BE: Bez Epiteli, E: Embriyo, SDZ: Sekonder Desidual Zon)



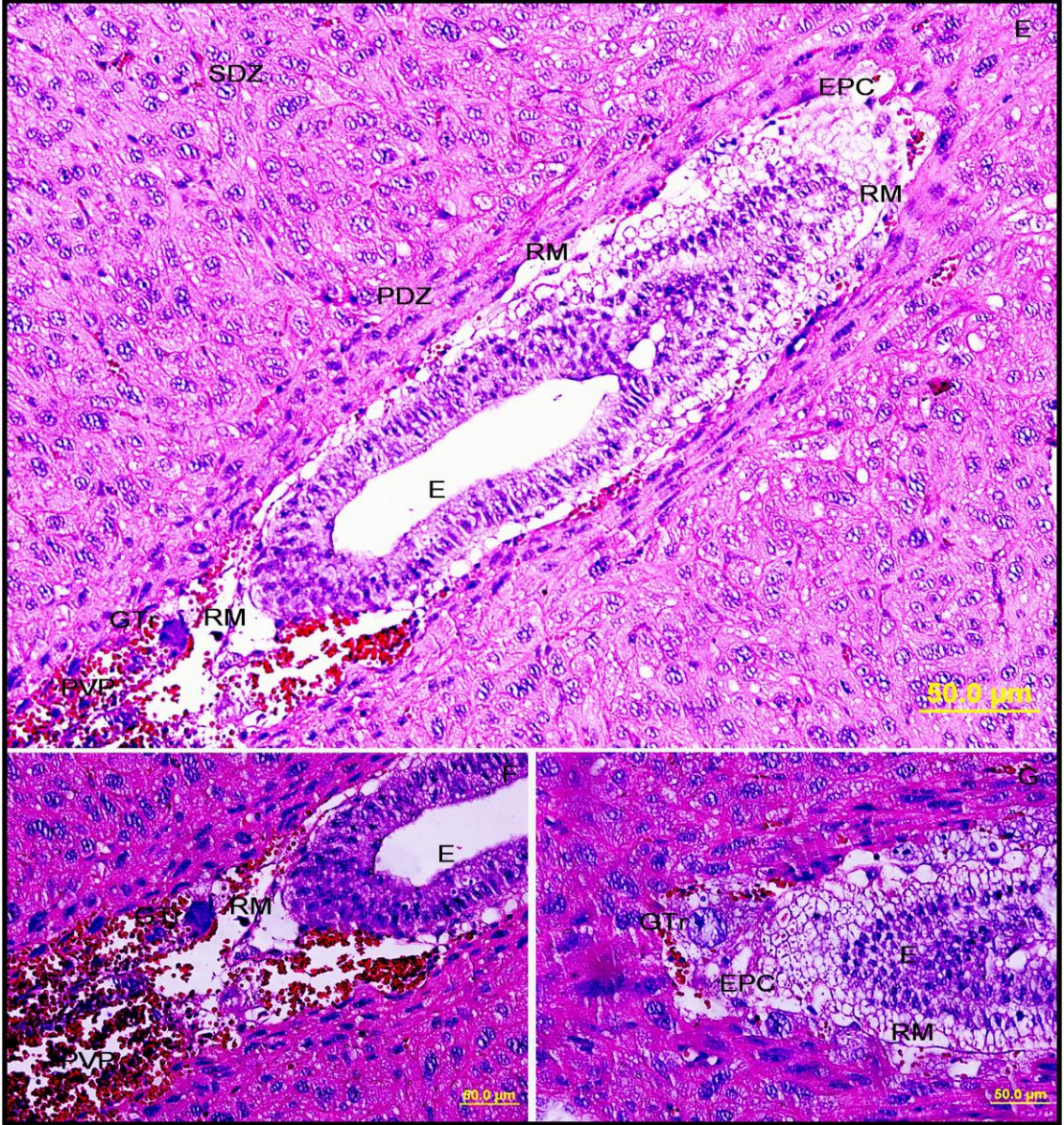
Şekil 4. 28. Gebeliğin 8.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları (3). Negatif kontrol kesit; K (MS: Maternal Sinüzoid, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, LE: Luminal Epitel, EN: Endotel, BE: Bez epiteli)

4. 2. 5. Gebeliğin 9. günü

Işık mikroskopi bulguları; gebeliğin bu döneminde, implantasyon bölgesindeki stromal hücrelerin büyük bölümü sadece antimezometrial alanda değil, mezometrial bölgede de desidual kücelere farklılaşmıştı (Şekil 4.29. A-D). Mezometrial bölgede, mezometrial oda epitelinin tamamı ile uterin lümen epitelinin büyük kısmı ortadan kalkmış, bu alanlar artmış zengin kan damarları ve desidual hücrelerce doldurulmuştu (Şekil 4.29. A-C). Bu dönemde desidual reaksiyon alanlarını sınırlayan desidual kapsülde önceki dönemlere göre oldukça belirgindi (Şekil 4.29. A, B). Antimezometrial bölgede ise embriyo ve embriyo çevresindeki dokularda da belirgin değişiklikler izlendi (Şekil 4.29. A, D, Şekil 4.30. E, F). Embriyonik tabakalar daha belirgin olarak izlenirken, Reichert membranı dışındaki trofoblast hücreleriantimezometrial kutupta kan damarları ile temas kurarak vitellus kesesini, mezometrial kutupta ise ektoplasental konu şekillendirdikleri gözlemlendi (Şekil 4.30. E-G). Bu dönemde embriyoyu lateralden sınırlayan sıkıca biraraya gelmiş desidual hücelere karşın, antimezometrial kutupta dev trofoblast hücrelerinin zengin kan damarları ile ilişki kurarak vitellus kesesi sirkülasyonunu başlattığı gözlemlendi (Şekil 4.30. E-G). Mezometrial kutupta ise ektoplasental konunun dış sınırındaki trofoblast hücrelerinin kan damarları ile bağlantı kurmaya başlaması ve primitif korioallantoik plasentayı şekillendirmeye başlaması dikkat çekiciydi (Şekil 4.30. E-G).



Şekil 4. 29. Gebeliğin 9.gününde ışık mikroskopi bulgular-1 (H-E). (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometrium, BZ: Bazal zon, MS: Maternal Sinüzoid, EPC: Ektoplasental Kon, PVP: Pirimitif Vitellüs kesesi Plasentası, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)



Şekil 4. 30. Gebeliğin 9.gününde ışık mikroskopi bulgular-2 (H-E). (E: Embriyo, RM: Riechert Membranı, EPC: Ektoplasental Kon, PVP: Primitif Vitellus kesesi Plasantası, GT: Dev Trofoblastlar, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon)

Gebeliğin 9.gününde Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları;

(Tablo 4.6'da eksprese oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Dkk-1; Bu dönemde, Dkk-1 ekspresyonunun daha çok antimezometrial bölge ile sınırlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.31. A, B, D). Bu bölgede embriyo etrafındaki desidual alanda Dkk-1 ekspresyonu izlenmezken veya çok zayıf olarak izlenirken (Şekil 4.31. A, J), sekonder desidual zonun dar bir alanındaki immünolokalizasyonu varlığını sürdürüyordu (Şekil 4.31. A-D). Bu bölgeye komşu desidual kapsül ve bazal zonda herhangi bir immünoreaksiyon gözlenmezken miyometriuma sınır bazal stromada kuvvetli ekspresyon izlendi (Şekil 4.31. C, D). Dkk-1'in miyometrial ve perimetrial bağ dokusundaki kuvvetli ekspresyonu bu dönemde de devam ediyordu (Şekil 4.31. A-D, G). Mezometrial alanın genelinde çok zayıf bir ekspresyonu izlenirken, subluminal dar bir alanda lokalize olarak gözlemlendi (Şekil 4.31. E, F). Sekonder desidual zonda, ekstraselüler matriksde ve desidual hücrelerde sitoplazmik immünolokalizasyonları izlenirken maternal sinüzoidlerde bir immünoreaksiyon görülmedi (Şekil 4.31. H, İ).

sFRP-1; Gebeliğin 9.gününde sFRP-1 embriyo çevresinde biraz daha zayıf olmak üzere tüm desidual dokuda güçlü bir ekspresyon gösterdi (Şekil 4.32. A-C). Embriyo çevresindeki 3-4 sıra yassılaştırmış desidual hücrelerde çok zayıf bir immünolokalizasyon izlenirken (Şekil 4.32. D, E) bunlar dışındaki desidual hücrelerde kuvvetli sitoplazmik bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.32. D, K). Bu dönemde, dikkat çekici diğer bir özellikte embriyonik diskteki germ tabakalarındaki güçlü sFRP-1 ekspresyonuydu (Şekil 4.32. E, J). Ayrıca embriyo etrafındaki Reichert membranı ile (Şekil 4.32. E) dev trofoblast hücrelerinde de güçlü bir immünolokalizasyon izlendi (Şekil 4.32. E, J). sFRP-1 immünolokalizasyonu desidual hücrelerde sitoplazmik ve ekstraselüler özellikte güçlü olarak izlendi (Şekil 4.32. K, L). Ayrıca bu dönemde desidual kapillerlerde pozitif reaksiyon gösterirken (Şekil 4.32. H) desidual kapsülde oldukça kuvvetli bir sFRP-1 ekspresyonu, kapsül dışındaki bazal endometriumdaki bez epitelinde, kapiller endotelde ve stromal hücrelerde daha zayıf immünolokalizasyon gözlemlendi (Şekil 4.32. G, H, L).

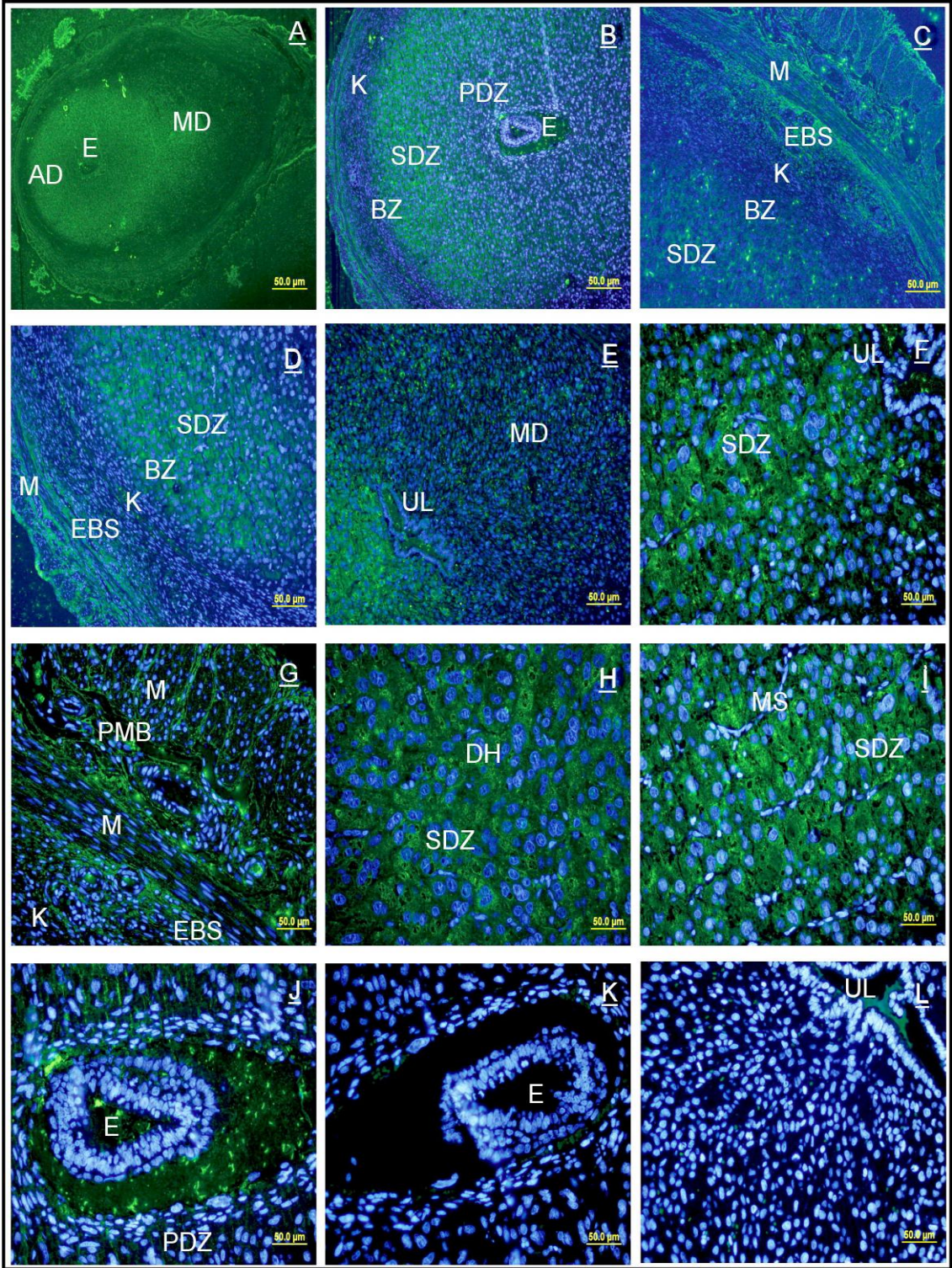
WIF-1; Gebeliğin 9.gününde WIF-1 ekspresyonu antimezometrial ve mezometrial alanda izlendi (Şekil 4.33. A). Genelde antimezometrial sekonder desidual zonda daha güçlü olmak üzere belirtilen diğer alanlarda WIF-1 daha

zayıf, uniform bir lokalizasyona sahipti (Şekil 4.33. B-D). Kapsüler yapıyı da içine alan desidual bazal zon alanlarında çok zayıf bir ekspresyon gözlenirken, kapsül dışındaki miyometriuma komşu stromada ve epitelinde, kapiller endotelde pozitif lokalizasyon izlendi (Şekil 4.33. B, G, H). Embriyonik bölgelerden geçen kesitlerde, embriyonik germ tabakaları, Reichert membranı ve trofoblast hücrelerinde zayıf bir immünoreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.33. E, F, J). Bu dönemde mezometrial bölgenin uterin epiteli çevresindeki desidual alanda zayıf bir WIF-1 ekspresyonu olmasına karşın hemen subepitelyal alandaki desidual hücre ve kan damarlarında güçlü bir WIF-1 reaksiyonu gözlenmesi dikkat çekiciydi (Şekil 4.33. D, G, İ).

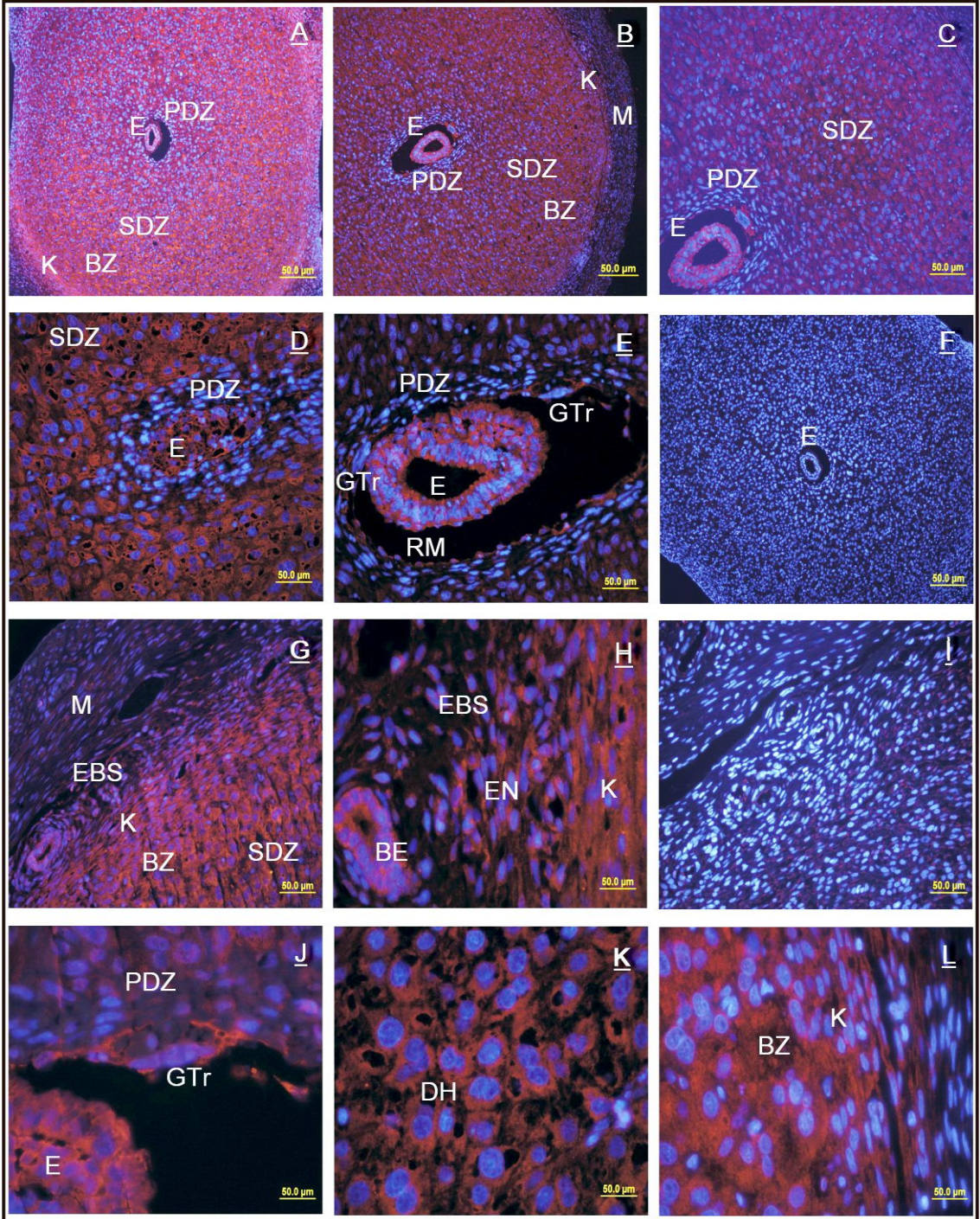
Tablo 4. 6. Gebeliğin 9. gününde, Wnt antagonistlerinin immünolokalizasyonları

9.GÜN	DESİDÜA							PMB	M
	EB	PDZ	SDZ	BZ	DK	DS	EBS		
Dkk-1	+	+	+ ²	-	-	-	+ ³	+ ³	-
sFRP-1	+	+	+ ²	+ ³	+ ³	+	-	-	+
WIF-1	+	+	+ ²	+	+	+	-	-	+

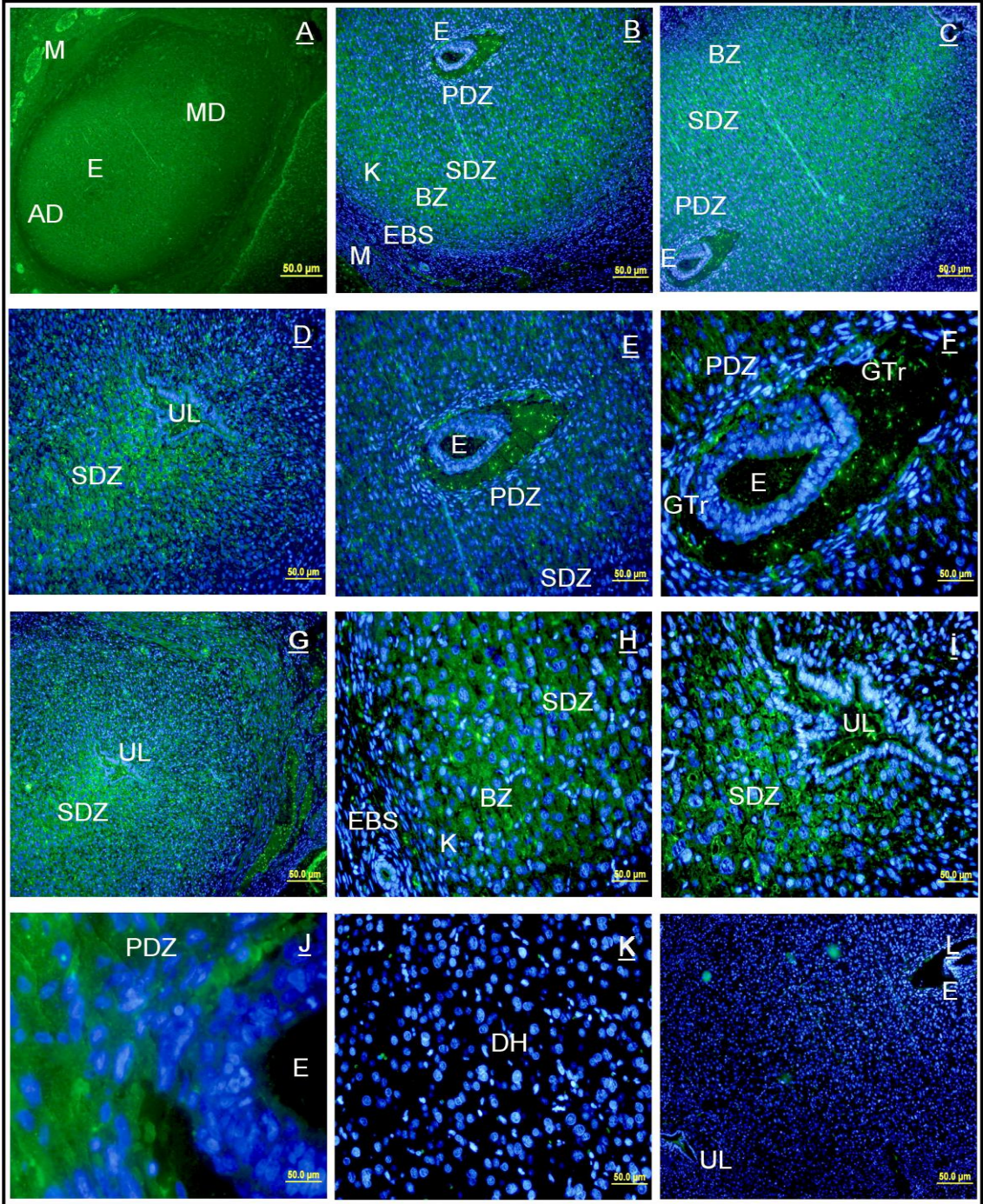
EB; Embriyo bölgesi, PDZ; Primer desidual zon, SDZ; Sekonder desidual zon, BZ; Bazal zon, DK; desidual kapsül, DS; Desidual sinüzoid, EBS; Endometrial bazal stroma, PMB; Perimetrial-Miyometrial bağ doku, M; Miyometrial düz kas tabakaları
³; Kuvvetli ekspresyon, ²; Orta kuvvetteki ekspresyon, +; Zayıf ekspresyon, -; Ekspresyon yok



Şekil 4. 31. Gebeliğin 9.gününde Dkk-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; K, L (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, MS: Maternal Sinüzoid, EBS: Endometrial Bazal Stroma, PMB: Perimetrial Miyometrial Bağ doku, UL: Uterus Lümeni, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, BZ: Bazal Zon)



Şekil 4. 32. Gebeliğin 9.gününde sFRP-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; F, İ (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometrium, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, EBS: Endometrial Bazal Stroma, RM: Riechert Membranı, BE: Bez Epiteli, E: Embriyo, EN: Endotel, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, GTr: Dev Trofoblast)



Şekil 4. 33. Gebeliğin 9.gününde WIF-1'in immünolokalizasyonları. Negatif kontrol kesitler; K, L (MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, K: Kapsül, M: Miyometriyum, BZ: Bazal Zon, DH: Desidual Hücreler, EBS: Endometrial Bazal Stroma, UL: Uterus Lümeni, BE: Bez Epiteli, E: Embriyo, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, GTr: Dev Trofoblast)

5. TARTIŞMA

Organizmada gerçekleşen her biyokimyasal olay mükemmel bir düzen içerisinde cereyan etmektedir. Tasarımı ve işleyişi oldukça karmaşık olan bu olaylanmalardan birisi olan implantasyon biyolojisi, birçok sinyal molekülünün kompleks etkileşimini içermektedir. Bilinmeyen yönleriyle implantasyon biyolojisi, araştırmacıların daima ilgilendiği bir çalışma alanı olmuştur. *In Vitro* fertilizasyon ve PCR tekniklerinin birlikte kullanılması ve bu alanlardaki gelişmeler, genetik ve moleküler taramaların yapılmasını sağlamasının yanısıra, blastosist ve endometrial doku kültürü çalışmaları ile birlikte, implantasyon sürecindeki etkili sinyal moleküllerinin keşfedilmesini de sağlamış olacaktır. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda, implantasyon sürecinde Wnt proteinlerinin de etkili oldukları ileri sürülmüştür (5).

Wnt sinyal yollarının, gelişimsel ve patolojik süreçlerde büyük yer tuttuğu gösterilmiştir. Hücre-hücre etkileşimi ile belirlenen hücre akibetinde önemli rolleri rapor edilmiştir. Wnt sinyal yolu ile ilişkili moleküller; Wnt ligandları, Fzd ve LRP reseptörleri, heparan sülfat proteoglikanlar, Wnt sinyal yolu inhibitörleri ve hücre içi zıt yönde etkili faktörleri içerir. Wnt ligandlardan Wnt 2, 3, 4, 5A, 7A, 7B, 10B ve Wnt sinyal antagonistlerinden sFRP-1, sFRP-4, WIF-1, Dkk-1 mRNA'larının varlığı, insan endometriumunda rapor edilmiştir. (96).

Bu çalışmada kanonikal Wnt sinyal yolu antagonisti Dkk-1, kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yolları antagonist moleküllerinden sFRP-1 ve WIF-1 proteinlerinin periimplantasyon sürecinde sıçan endometriumundaki immunolokalizasyonları araştırılarak sonuçlar ayrı ayrı tartışılmıştır.

5.1. Dkk-1

266 amino asitli bir protein olan Dkk-1'in, sisteinden zengin 2 domaini vardır ve bu domainler yüksek derecede korunmuş 10 sistein kalıntı içerirler (97). *Drosophila melanogaster*'de yapılan çalışmalarda, Dkk-1'in LRP6 reseptörüne yüksek afinite ve spesifite gösterdiği öne sürülmüştür (18).

5.1.1. Gelişimde Dkk-1

Dkk-1'in, "Spemann's organizer" den gastrulasyon sırasında morfogonlar ve diğer bazı antagonist moleküllerle (Wnt'ler, BMP'ler, SHH, sFRP'ler,

Cerberus, WIF'ler, Sizzled, Crescent, Follistatin, Noggin gibi) birlikte salgılandığı gösterilmiştir (98, 99). Gastrulasyon sürecinde hücre hareketlerini yönlendiren Wnt morfogonların (diğer morfogonlarla birlikte ve antagonist moleküllerin regülasyonu ile embriyonik eksenin morfogenezinin belirlenmesi; anteriorizasyon, posteriorizasyon, ventralizasyon, dorsalizasyon) sinyal yolunun negatif regülatörü olduğu gösterilmiştir (100).

Dkk-1'in organ gelişimindeki rolü üzerine yapılan çalışmalarda, karakteristik gelişimsel fonksiyonunun, baş gelişimini tetikleyici aktivitesine sahip olduğu ileri sürülmüştür (98). Epiteyal-mezenşimal transformasyonda (kalp, diş, saç, kıl folikülü, ekstremitte ve kemik doku) ekspresyonlarının artmış olduğu gösterilmiştir (101). Dkk-1, ekstremitte tomurcuklarında apoptoz bölgelerinde eksprese edildiği saptanmış ve ekspresyonunun eksikliğinde parmaklarda füzyon ve ektopik parmak gelişimi gösterilmiştir (74). Benzer şekilde, knock-out farede Dkk-1'in yokluğunda parmaklarda füzyon ve ektopik parmak oluşumu gösterilmiştir (102). Desidual hücreler tarafından salgılanan Dkk-1'in, trofoblast hücre invazyonunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (103). Embriyoda prekordal mezodermden salgılanan Dkk-1'in, anterior nöral katlantıda nöral krista oluşumunu engellediği gösterilmiştir (104). Embriyonik gelişimde nöral farklılaşma için kanonikal Wnt sinyal yolunun inhibisyonunun gerekli olduğu rapor edilmiştir (105). Kraniofasial gelişimde kas, kıkırdak, kemik, dil farklılaşma bölgelerinde yaygın ekspresyonu gösterilmiştir (106).

Wnt sinyalinin adipogenezde önemli fonksiyonlarının olduğu, adipojenik farklılaşma sırasında Wnt reseptörlerinin ekspresyonu gösterilmiş ve insan preadipositlerinde, adipogenezin regülatörü olarak Dkk-1'in etkili olabileceği rapor edilmiştir (107). Farklı bir çalışmada yine, adipojenik farklılaşmada Dkk-1'in artmış ekspresyonu gösterilmiştir (74).

Postimplantasyon sürecinde, endometrial stromal hücrelerin morfolojik olarak çok farklı desidual hücrelere farklılaşmaları süreci, projenitör hücre farklılaşması gibidir. Yani, iç şekilli, uzantılı, küçük hücreler morfolojik ve fonksiyonel olarak çok farklı, iri, poligonal hücreler şeklinde izlenmektedirler. Wnt'lerin fonksiyonları göz önüne alındığında bu süreçte de rol oynayabilecekleri akla gelmektedir. Elde ettiğimiz bulgular, desidual farklılaşmada kanonikal Wnt'lerin rol aldığını ve antagonist moleküllerce de Wnt'lerin bu aktivitelerinin kontrol edildiğini göstermiştir.

Bazı Wnt ligandlar blastosist aşamasındaki fare embriyolarında gösterilmiştir (74). Ayrıca, morula ve erken blastosist evresindeki fare embriyolarında düşük Dkk-1 ekspresyonu rapor edilmiş ve bu evrede Wnt sinyalinin önemli rol oynadığı öne sürülmüştür (108). Periimplantasyon sürecinde, luminal ve glandular epitelde ekspresyonları gösterilmiş ve ayrıca, özellikle subluminal stromada olmak üzere, gebeliğin 4. gününe kadarki preimplantasyon sürecinde stromada artan ekspresyonu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, desidualizasyon bölgelerinde gebeliğin 7. gününe kadar artan ekspresyonları ve farklılaşmamış stromal alanlarda ise Dkk-1 ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu lokalizasyonlardaki ekspresyonları östrojen (E₂) ve progesteron (P) hormonları ile ilişkilendirilmiştir (108).

Bizim bulgularımız, sıçan endometriumunda Dkk-1'in, normal siklus evreleri boyunca luminal epitel, bez epiteli ve subluminal stromada zayıf eksprese olduğu, subluminal stromadan bazal stromaya gidildikçe artan ve miyometrial komşulukta pik yapan bir ekspresyonunun olduğu şeklindedir. Ayrıca, preimplantasyon döneminde bu stromal ekspresyonların şiddetinin azaldığı, postimplantasyon dönemde desidüal farklılaşma alanlarında (PDZ, SDZ) desidüal ve pre-desidüal hücrelerde eksprese olduğu ve farklılaşmamış stromal hücrelerin bulunduğu desidüal bazal zonda ve desiduayı sınırlayan kapsül yapısında ekspresyonunun olmadığı ancak, kapsül yapısının çevresindeki endometrial bazal stromada kuvvetli ekspresyonunun olduğu yönündedir. Buna ilaveten, interimplantasyon bölgelerinin, preimplantasyon sürecine benzer ekspresyonlara sahip olduğu gözlenmiştir.

Plasantasyon sürecinde trofoblast invazyonunun bazal desidua ile sınırlandırılması ve birden fazla embriyonun implantasyonunun gerçekleşebildiği fare ve sıçan endometriumunda implantasyon bölgelerinin birbirinden izole edilmesi, desidualizasyonun sınırlandırılması ile sağlanacaktır. Dolayısıyla bir yandan desiduanın yeterli oranda gelişmesinin yanısıra gelişimde kontrol edilecek. Bulgularımız ışığında desiduanın gelişiminde kanonikal Wnt'lerin de rollerinin olduğu, trofoblast invazyonu ve desidualizasyonun sınırlandırılmasında kanonikal Wnt sinyal yolu antagonistlerinin etkisinin olduğu ve nihayet Dkk-1'in bu saydığımız lokalizasyonlardaki ekspresyonları ile bu süreci kontrol ettiği ileri sürülebilir.

5.1.2. Dkk-1 ve apoptoz

Dkk-1'in apoptozdaki rolü ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, Dkk-1'in Wnt/ β -katenin sinyal yolunu inhibe etmesinin, apoptoz indüksiyonu için bir mediatör olabileceği öne sürülmektedir (68). UV'nin neden olduğu genotoksik stres ve kemoterapotik ajanların, Dkk-1 ekspresyonunu arttırdığı ve Dkk-1'in glioma hücrelerini ceramide bağımlı apoptoza duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir (109). Hepatik stellat hücrelerde Dkk-1'in yüksek ekspresyonunun, apoptoz ile hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (96). Dkk-1'in kanonikal Wnt sinyal yolağını inhibe edebildiği, kültüre edilmiş nöronlarda, BCL2 ekspresyonunun azalması, BAX'ın indüksiyonu ve TAU hiperfosforilasyonuna bağlı hücre ölümü ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sıçanlarda Dkk-1'in lokal infüzyonunun hipokampusun CA1 bölgesinde, nöronal hücre ölümüne ve astrositozise, nukleus bazalis magnoselülariste kolinerjik nöronların ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir (110). Kraniofasial gelişimde apoptoz bölgelerinde Dkk-1'in yaygın ekspresyonu gösterilmiştir (111).

Çalışmamızda, Dkk-1'in korioallantoik plasenta gelişim bölgelerindeki desiduada ve sekonder desidüal alanlardaki ekspresyonu açıkça gösterilmiştir. Dolayısıyla Wnt'lerin, stromal hücrelerin desidüal hücrelere farklanmasında ve çoğalmalarında, desidüal ve trofoblastik apoptozda rollerinin olduğu ve bu sürecin kanonikal Wnt sinyal yolu antagonisti Dkk-1 tarafından kontrol edildiği ileri sürülebilir.

5.1.3. Dkk-1 ve tümör

Tümör supressör gen p53 ile Dkk-1'in ekspresyonunun bağlı olduğu ve Wnt sinyal yolağı antagonizması ile Dkk-1'in, p53 tümör supresyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (112). Multipl myelomada, Dkk-1'in yaygın olarak eksprese edildiği ve potent bir tümör ilişkili antijen olduğu rapor edilmiştir (74). Dkk-1'in, hepatoselüler karsinoma hücrelerinin metastaz süreci sırasındaki çoğalma ve göç etmelerine, kanonikal Wnt sinyal yolağı ile etkileşimi ile birlikte aracılık edebildikleri gösterilmiştir (113). Meme, akciğer ve böbrek kanserlerinde Dkk-1'in ekspresyonu rapor edilmiştir (114). Hipermetilasyondan dolayı, Dkk-1'in epigenetik inaktivasyonunun, ilerlemiş insan kolorektal kanserlerinde gözlemlendiği belirtilmektedir (115). Prostat kanserinde kemik metaztazı sürecinde, kemik dokuda izlenen osteolitik ve sonrasında görülen osteoblastik

fazlarında, Dkk-1'in osteolitik fazdan osteoblastik faza doğru gidişte azalan ekspresyonu gösterilmiştir (74). Buna ek olarak, erişkin gastrointestinal epitel homeostazisinde önemli olduğu, ince ve kalın barsak epitel yapısının korunmasında temel rol oynadığı ve erişkin gastrointestinal epitelinin yenilenmesinde rol aldığı ileri sürülmektedir (116).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, tümör invazyonu ve metastazi sürecinde Dkk-1'in ekspresyonunun azaldığı, Wnt sinyal yolu aktivitesinin devam ettiği. Bununla birlikte, trofoblastik invazyon, anjiogenez, desidüaya farklılaşma ve desidüal gelişim olaylanmaları tümöröenez sürecine benzetilebilir. Dolayısıyla, implantasyon sürecinde Dkk-1'in ekspresyonları beklenebilecek bir durum olacaktır.

Bu çalışmanın bulguları, normal siklus dönemlerinde siklik olarak görülen endometrial yapısal değişikliklerde ve implantasyonla birlikte desidüalizasyon sürecindeki olaylanmalarda kanonikal Wnt'lerin rollerinin olduğunu ve Dkk-1'in bu süreçleri kontrol ettiğini göstermiştir.

5.1.4. Dkk-1 ve kemik dokusu homeostazisi

Normal kemik doku homeostazisinin negatif regülatörü olduğu gösterilmiştir (117). Dkk-1'in tek allelinin delesyonunun, kemik kitle ve formasyonunda artışa neden olduğu ileri sürülmektedir (118). Dkk-1 ile Wnt sinyalinin inhibisyonunun kemik dokuda osteopeniye neden olduğu rapor edilmiştir (119). Dkk-1 ekspresyonunun inhibisyonu osteoartrit, osteofit oluşumuna yol açmaktadır (120).

Normal siklus evrelerindeki endometrial homeostazisin devamlılığı endometrial değişikliklerin kontrolü ile sağlanmaktadır. Çalışmamızda, Dkk-1'in, östrus siklusu evrelerindeki ve interimplantasyon bölgelerindeki endometrial stromadaki ekspresyonları, bizi kanonikal Wnt aktivitesinin endometrial stromada Dkk-1 tarafından kontrol edildiği sonucuna ulaştırmıştır.

5. 2. sFRP-1

sFRP-1 (FRP, SARP-2, FrzA, SFRP-1) geni, 8q21 kromozom lokasyonludur ve insan tümörlerindeki heterozigotluğun sıkça görülen kayıp bölgesi olduğu gösterilmiştir (121). Yapılan çalışmalarda kültür hücreleri tarafından sentezlenen, salgılanmış sFRP'lerin çoğunlukla plazma

membranında ve/veya ekstraselüler matriksde bulunduğu rapor edilmiştir (122). Bazı Wnt'lerde olduğu gibi, kültür ortamında sFRP-1 salgılanmasının, mediuma heparin ilavesi ile gerçekleştiği ve sFRP'lerin heparan sülfat proteoglikanlarla birlikteliğinin, sFRP/Wnt komplekslerinin stabilizasyonunu ya da antagonist lokalizasyonunu işaret ettiği rapor edilmiştir (86, 122).

Civciv ve kurbağada sFRP-1'in aksonal büyümeyi direkt olarak etkileyerek yönlendirdiği ve modifiye ettiği ve bu aktivitenin Wnt inhibisyonu gerektirmeden, ekstraselüler matriks molekülleri ile modifiye edildiği ileri sürülmektedir (123). Terminal farklılaşma evresine giren miyoblastların aktivitesini durdurduğu da rapor edilmiştir (124).

5. 2. 1. sFRP-1 ve Anjiogenez

Normal dokulardaki hücre gelişimi ile birbirine uymayan sFRP ekspresyonlarının kanıtları vardır. Sığırdaki sFRP-1'in neovaskülarizasyon süresince eksprese edildiği ve vaskülarizasyonun tamamlanması ile ekspresyonun sona erdiği gösterilmiştir (68). Endotel hücrelerinin gelişimini de inhibe ettiği rapor edilmiştir (13). Civcivde korioallantoik membrandaki anjiogeneze neden olduğu ve endotelial hücrelerin kapillerlere göçünü ve organizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (14). Endotel hücrelerinde sFRP-1 için, Fzd ailesi üyelerinden, Fzd-4 ve Fzd-7 reseptörleri tanımlanmıştır (124).

Bu çalışmada, sFRP-1'in normal östrus dönemlerindeki uterus dokularındaki ve periimplantasyon sürecindeki sıçan endometriumundaki immunolokalizasyonları araştırılmıştır. Bulgular, sFRP-1'in normal siklus evreleri boyunca, uterus lümen epiteli ve endometrial bez epiteli ve stromal arteriol ve kapiller endotel lokalizasyonlu ekspresyonlarının olduğunu göstermiştir. Endometriumda siklus boyunca morfolojik ve strüktürel değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Bu endometrial değişiklikler proliferatif, sekretuar fazlar olarak ve sekretuar fazın da prereseptif, reseptif ve refrakter fazları olarak adlandırılmaktadır.

Proliferatif fazda görülen anjiogenezin diğer fazlardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (125). Bununla birlikte, endotelial hücre biyolojisinde VEGF'ler ve FGF'lerin büyük bir yere sahip oldukları bilinmektedir. Ancak, anjiogenez çeşitli sinyal yollarının karşılıklı etkileşimlerini gerektiren kompleks bir süreçtir ve bu süreçte Wnt ailesi üyelerinin rolleri hakkında çok az bilgi vardır (96).

Bulgularımız bizi, endometriumda değişiklik gösteren anjiogenik olaylanmalarda sFRP-1'in de etkili olabileceği dolayısıyla Wnt proteinlerinin etkilerinin olabileceği sonucuna ulaştırmıştır.

5. 2. 2. sFRP-1, Apoptoz ve Tümör

Wnt'lerin gelişim sırasındaki rollerine ek olarak, erişkin dokularındaki hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozda önemli rol oynadıkları ve böylece tümörogenezde Wnt sinyal yollarında hatalı aktivasyonlar olduğu gösterilmiştir (68). sFRP'lerin karsinomalardaki tekrarlayan down regülasyonu ve bazı dejeneratif hastalıklardaki up regülasyonu, sağlıklı dokulardaki Wnt sinyal yolu aktivitesinin kontrolünün önemine işaret eder. Tümör hücreleri sFRP ekspresyonunu, bu proteinlerin apoptozu tetikleyebilmelerine karşılık olarak durdurabilirler (68). Meme kanser hücrelerini, apoptoza neden olan TNF'ye duyarlı hale getirdikleri gösterilmiştir (84). Gastrik kanser hücrelerinde, sFRP-1'in ektopik ekspresyonunun, hücre gelişimini baskıladığı ve apoptoz ile hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir (126). Uterin leiomyomlarda overeksprese olduğu da gösterilmiştir (127).

Çalışmamızda, sıçan gebelik endometriumdaki sFRP-1'in immunolokalizasyonlarına bakılmış normal siklus dönemleri ile periimplantasyon sürecinde desidüalizasyon alanlarında ekspresyonları gösterilmiştir. Ayrıca, gebeliğin farklı günlerinde ve desidüanın farklı alanlarında değişiklik gösteren ekspresyonları da gösterilmiştir. Bu çalışmanın, hızla gelişen ve büyük bölümü hızla dejenere olan desidüadaki, farklılaşma, çoğalma, matürasyon, anjiogenez, desidüanın sınırlandırılması ve apoptotik süreçlerde sFRP-1'in etkili olduğu, dolayısıyla Wnt protein ailesi üyelerinin süreçte rollerinin olduğu sonucunu göstermiştir.

5. 2. 3. Endometriumda sFRP-1

sFRP-1'in kan damarı matürasyonunun ilerlemesini veya endotelial apoptozu önlediği gösterilmiştir (128). Endometrium proliferatif fazda, endotelial hücre proliferasyonunun sekretuar fazdan daha fazla olduğu gösterilmiştir (125). sFRP-1'in endometriumda siklusun bütün fazlarında varlığı gösterilmiş ancak aynı oranda olmadığı ileri sürülmüştür. Siklusun sekretuar fazı ile karşılaştırıldığında, proliferatif fazda daha yüksek olduğu

rapor edilmiştir (96, 125). Ayrıca, sFRP-1'in proliferatif fazdaki yüksek orandaki varlığı ve sekretuar fazda bu oranın azalması durumu, östrojen bağımlı bir transkripsiyon ile kontrol edilebileceği şeklinde rapor edilmiştir (96). sFRP-1'in proliferatif fazdaki endometriumda ekspresyonunun yüksek olması ile endotelial hücre proliferasyonu ilişkilendirilmiştir (125). Ayrıca endometriozisle ilgili bir çalışmada, anahtar sürecin anjiogenez olduğu ve buradaki anjiogenezde sFRP-1'in etkisinin olabileceği ve sFRP-1 ekspresyonunda östrojen ile direkt kontrol edilebildiği öne sürülmüştür (96).

Sıçan gebelik endometriumundan elde ettiğimiz bulgularda, postimplantasyon dönemde sFRP-1'in desidüal zonlardaki ekspresyonunun yanısıra desidüal sinüzoid endotelinde de ekspresyonu gösterilmiştir. Ayrıca, interimplantasyon alanlarında endometrial stromal kan damarlarında endotelial ekspresyonları kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, sıçan endometriumunda normal siklus dönemlerinde de sFRP-1'in endotelial ekspresyonları mevcuttur. Reseptiv fazdaki siklus döneminde ve sonrasında, ayrıca postimplantasyon sürecinde progesteronun yüksek, östrojenin düşük seviyeleri belirlenmiştir. Dolayısıyla desidüalizasyon ve interimplantasyon bölgelerindeki endotelial ekspresyonlar, sFRP-1 transkripsiyonunun östrojene bağımlı olmadığına kanıtı olabilir.

5. 3. WIF-1 (Wnt İnhibitör Faktör-1)

WIF-1, 379 amino asitli bir proteindir. İnsan WIF-1'i, insan retinasından izole edilmiştir. Balık, amfibi ve memelilerde ise korunmuş homolog proteinleri bulunmuştur. WIF-1, Wnt protein ailesi üyelerine bağlanarak Wnt aktivitesini inhibe eder. WIF-1'in Fzd ve sFRP'ler gibi CRD domainine benzer bir domaini yoktur. Ancak *Xenopus* embriyolarına erken dönemde WIF-1 kodlamalı RNA injeksiyonu ile kısmi sekonder aks indüksiyonu ve anormal somitogenez, WIF-1'in Wnt sinyal yolunda rol oynadığını göstermektedir (17).

WIF-1, N-terminal kısımda WIF-domain (WD) ve bundan sonra gelen tenascinine yüksek derecede benzerlik gösteren tekrarlanmış beş EGF benzeri bölge içerir. İlginç olarak RYK ailesinin ekstraselüler domaininde WD bulunmuştur ve bu RYK ailesinin Wnt sinyali içine dahil olmasını sağlamaktadır (129).

5. 3. 1. WIF-1, Gelişim, Tümör, Anjiogenez

WIF-1, fare retinasında “rod” fotoreseptör morfogenezi sırasında ve sonrasında yoğun olarak eksprese edilmiştir. Bununla birlikte WIF-1 proteininin rod üretimini inhibe ettiği, WIF-1'e karşı antikor varlığında rod üretiminin arttığı gösterilmiştir (130). WIF-1, kıkırdak biyolojisinde ekstraselüler Wnt modülatörü olarak rapor edilmiştir (131). Fare embriyonik mezenşimal hücrelerinde, WIF-1'in osteoblastogenez sırasında zayıf ekspresyonunun olduğu ve osteoblastik farklılaşmada ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (132).

İnsan akciğer kanserlerinin çoğunda, WIF-1 ekspresyonunun, WIF-1'in kolaylaşmış hipermetilasyonu yoluyla inhibe edildiği gösterilmiştir (133). WIF-1 ekspresyonunun baskılanmasının tümör gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynadığı ve WIF-1'in Wnt sinyal yolunun potansiyel bir modülatörü olduğu rapor edilmiştir (134). Bununla birlikte özofagus, mide, kolorektal ve pankreatik kanser dokularında, kanser hücrelerinin çoğunda WIF-1 mRNA'sının downregüle olduğu gösterilmiştir (135). Erişkinde gastrointestinal kök hücre çoğalması ve homeostazisinde Wnt sinyalinin önemli bir kontrol mekanizması olduğu ve salgılanmış çözünebilir Wnt antagonistlerinin bu olaylanmaların önemli bileşenleri olduğu rapor edilmiştir (136). Kolorektal kanser hücrelerinde kolaylaşmış hipermetilasyon ile WIF-1'in baskılandığı, bu hücrelerde WIF-1 fonksiyonunun onarılmasının, zayıflamış Wnt sinyaline ve belirgin apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (137). Melanoma hücrelerinde, WIF-1 ekspresyonu inhibe olduğu ve WIF-1 gen transferi ile melanoma hücrelerinde büyümenin inhibe edildiği gösterilmiştir (138). Normal kemik iliğinde WIF-1'in metilasyonunun izlenmediği, kronik lenfositik lösemi ve NSCLC hastalarında hipermetilasyonunun olabildiği gösterilmiştir (139, 140). Ayrıca, hipofiz tümörlerinde WIF-1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (141). Wnt sinyal yolu antagonisti WIF-1'in, gelişim sürecinde, homeostazide ve tümörögenizde rol oynadıkları yapılan bu çalışmalarla gösterilmiştir (130-141). Yani, WIF-1 Wnt sinyal yolu aktivitesini kontrol etmektedir .

Çalışmamızda, WIF-1'in, östrus siklusu evrelerinde endometriumda luminal epitel, bez epiteli, kapillerler ve stromal alanlarda, periimplantasyon sürecinde implantasyon bölgesinde primer ve sekonder desidüal zonlarda, desidüal sinüzoid endotelinde, interimplantasyon alanlarında endometriumda,

normal östrus siklusu evrelerindeki endometrial lokalizasyonlarda ekspresyonları gösterilmiştir. Ayrıca, bu lokalizasyonlardaki ekspresyonları sFRP-1'e benzerlik göstermektedir. Böylece bulgularımız WIF-1 ve sFRP-1'in aynı sinyal yolları üzerinden fonksiyon gördüklerini göstermiştir. Bununla birlikte bulgularımız WIF-1'in, normal siklus sürecinde endometriumdaki yapısal değişikliklerde ve gebelik endometriumunda Wnt aktivitesini, stromal hücre çoğalması, farklanması, anjiogenez ve apoptoz süreçlerinde kontrol ettiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, WIF-1'in normal endometrial dokudaki ekspresyonları, endometrium homeostazisinde ve gebelik endometriumundaki ekspresyonları da periimplantasyon sürecinde rol aldığını, dolaylı olarak bu olaylanmalarda Wnt'lerin rol oynadığını işaret etmektedir.

5. 4. Endometriumda, Dkk-1, sFRP-1 ve WIF-1'in rollerinin önemi

Normal şartlarda yaşamını sürdüren hücrelerin kaderi; mitoz, farklanma ve apoptoz süreci ile belirlenir. Yaşamı boyunca, çoğu keşfedilmemiş karmaşık intra ve ekstraselüler sinyal yollarının aktivitelerini gerçekleştiren hücreler için bu, normal fizyolojik koşullarda gerçekleşen bir hücresel kader yani homeostazisdir. Ancak bu süreçteki bazı kontrol noktalarında ortaya çıkan kırılmalar, patolojik olaylanmalar (anormal mitoz, kök ve projenitör hücre farklanmalarındaki anormallikler ve patolojik apoptoz) ile sonuçlanmaktadır.

Hücrelerdeki reseptör çeşitliliğine bağlı olmakla birlikte Wnt ailesi, embriyo gelişimindeki fonksiyonlarının yanısıra çoğu erişkin dokularında kanonikal ve nonkanonikal sinyal yolları üzerinden, fizyolojik-dinamik olaylanmalar bütünü olan homeostazisde rol oynamaktadırlar.

Dokularda eksprese edilen Wnt ligand konsantrasyonu, Wnt sinyal yollarındaki aktivitesinin sıkı kontrolü ile düzenlenmektedir. Bu kontrol mekanizmasında antagonist moleküllerde rol almaktadır.

Wnt ailesi üyeleri, kanonikal ya da nonkanonikal Wnt'ler olarak ayrılırsa da, aynı Wnt'in her iki yolu da kullanıyor olup olmadığı da açık değildir (68). Ayrıca, desidüal farklılaşma sürecinde elde ettiğimiz bulgular, aynı Wnt'lerin her iki sinyal yolunda kullanıyor olabildiği yönündedir.

Bulgularımızın bütünü ele alındığında; normal östrus siklus evrelerinde, Dkk-1 (kanonikal Wnt sinyal yolu antagonisti) ile sFRP-1 ve WIF-1 (hem

kanonikal hemde nonkanonikal Wnt sinyal yolu antagonistleri) farklı lokalizasyonlarda eksprese edilmiş, postimplantasyon sürecinde desiduada ise farklı bölgelerdeki immünoreaksiyonlarının haricinde, aynı lokalizasyonlarda da eksprese edildiği immünolokalizasyon alanlarıda görülmüştür. Dolayısıyla, Wnt antagonistleri, kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yolları üzerinden aktivitelerini gerçekleştirirken, aynı organ ve/veya dokularda farklı lokalizasyonlardaki ekspresyonları ile görev paylaşımı yapılmış bir planlama içerisinde oldukları ve aynı lokalizasyonlardaki ekspresyonları ile de ortak yürütülen bir çalışma dahilinde fonksiyon gördükleri izlenimi vermişlerdir.

Ayrıca, kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yollarındaki bir sapmanın veya antagonist moleküller tarafından bu sinyal yollarının kontrolündeki bir aksaklığın; implantasyon başarısızlığı, implante olmuş embriyonun gelişim ortamının sağlanamaması (ektoplasental kon oluşumu, korioallantoik plasantasyon, desidüadaki anjiogenez, desidüal ve trofoblastik apoptoz), desidualizasyonun sınırlandırılmaması, trofoblast invazyonunun durdurulamaması gibi patolojik tablolara neden olabileceğini düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR

- Periimplantasyon sürecinde sıçan endometriumunda, Wnt antagonistlerinden Dkk-1, sFRP-1 ve WIF-1'in ekspresyonlarının varlığı, dolayısıyla Wnt proteinlerinin bu süreçte etkili oldukları ve bu süreçte fonksiyon gören Wnt'lerin aktivitelerini, Wnt antagonistlerinin sıkı kontrolü altında gerçekleştirdikleri,
- Başarılı bir implantasyonun gerçekleştirilebilmesinde Wnt proteinleri ve Wnt antagonistlerinin süreçte önemli rollerinin olduğu,
- Desidualizasyon, plasantasyon, anjiogenez ve embriyo gelişiminde Wnt antagonistlerinin, hücre çoğalması, farklılaşması, göç, apoptoz ve homeostaziste etkileri bilinen, Wnt protein ailesi üyelerinin aktivitelerini sınırlandırdıkları ve kontrol ettikleri,
- Bununla birlikte, periimplantasyon sürecinde, Wnt'lerin kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yollarını kullanarak, ayrı ayrı ve/veya aynı sinyal yolunda fonksiyon gördükleri,
- Ayrıca, farklı dokularda farklı lokalizasyonlarda farklı Wnt proteinlerin fonksiyon görebileceği ve/veya farklı sinyal yollarını kullanabildikleri, sonuçlarına ulaşılmıştır.

7. ÖNERİLER

- Wnt protein ailesi üyelerinin, hangi sinyal yolağına veya yolaklarına spesifite gösterdikleri, hangi antagonist moleküllerin hangi Wnt proteinine ve/veya reseptörüne özgü olduğı yapılacak çalışmalarla tam ve kesin olarak açığa çıkarılmalıdır.
- Başarısız implantasyonda, aberrant Wnt sinyal yolağı akla gelecek olan ilk parametreler arasında yer almalıdır. Çünkü, yakın gelecekte bu antagonist moleküllerin, başarılı implantasyon oranını yükseltmede ilaç olarak kullanımı olasıdır.

8. KAYNAKLAR

1. Kaloglu C, Gursoy E, Onarliolu B. Early maternal changes contributing to the formation of the chorioallantoic and yolk sac placentas in rat: A morphological study. *Anat. Histol. Embryol.*, 32, 200–206, 2003.
2. Welsh AO, Enders AC. Chorioallantoic placenta formation in the rat. II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *Am J Anat.*, 192: 347-365, 1991.
3. Kaloğlu C. Gürsoy E. İmplantasyon. *C.Ü. Tıp Fak. Der.*, 19 (3):233-241,1997.
4. Kaloğlu C, Onarliolu B. Sıçan implantasyonunda decidüalizasyon ve ekstrasellüler matriks değişiklikleri. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2000.
5. Mohamed OA, Dufort D, Clarke HJ. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo–maternal signaling at implantation. *Biol Reprod.*, 71:417-424, 2004.
6. Logan CY, Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20:781–810, 2004.
7. Kawano Y and Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 116, 2627-2634, 2003.
8. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, 50: 649–657, 1987.

9. Goodwin AM, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis*, 5: 1–9, 2002.
10. Masckauchán TNH. and Kitajewski J. Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: New angiogenic factors in sight. *Physiology*, 21:181-188, 2006.
11. Clevers RT. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, Apr14;434 (7035):843-50, 2005.
12. Tian Q, Nakayama T, Dixon MP, Christian JL. Post-transcriptional regulation of Xwnt-8 expression is required for normal myogenesis during vertebrate embryonic development. *Development* 126, 3371-3380, 1999.
13. Duplaa C, Jaspard B, Moreau C, D'Amore PA. Identification and cloning of a secreted protein related to the cysteine-rich domain of frizzled. Evidence for a role in endothelial cell growth control. *Circ. Res.*, 84, 1433-1445, 1999.
14. Dufourcq P, Couffinhal T, Ezan J, Barandon L, Moreau C, Daret D, Duplaa C. FrzA, a secreted frizzled related protein, induced angiogenic response. *Circulation*, 106, 3097-3103, 2002.
15. Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ. Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport*, 11, 3963-3967, 2000.
16. Abu-Jawdeh G, Comella N, Tomita Y, Brown LF, Tognazzi K, Sokol SY, Kocher O. Differential expression of frpHE: a novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. *Lab. Invest.*, 79, 439-447, 1999.
17. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM,

- Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 398, 431-436, 1999.
18. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell.*, 7, 801-809, 2001.
 19. O Valle WK, Nahirney PC. *Netter Temel Histoloji*. Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
 20. Junqueira LC, Carneiro J: *Temel Histoloji* (Çeviri Editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S) Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN: 975-420-467-5, 2006.
 21. Sadler TW: *Langman's Medical Embryology*, 10th ed.; Lippincott Williams & Wilkins; Hagerstown, Page Count: 371, 2008.
 22. Günalp S. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve Infertilite*. Sayfa:1330. Güneş Tıp Kitabevleri, 2007.
 23. Moore K, Persaud TVN (Çeviri Editörü: Müftüoğlu S, Pergin A, Kaymaz, F). *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri*. Güneş Tıp Kitabevleri. ISBN: 978-975-277-219-9, 2009.
 24. Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *The Journal Of Biological Chemistry*, 270(38), Issue of September 22, 22077–22080, 1995.
 25. Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development*, 112, 921-932, 1991.

26. Shi CZ. et al. Protein databases for compacted eight-cell and blastocyst-stage mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 34–47, 1994.
27. Zimmermann JW, Schultz RM. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, June 7; 91(12): 5456–5460, 1994.
28. Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Wang X, Hasegawa A, Sun T, Grahovac MJ, Kargul GJ, Lim MK, Cui Y, Sano Y, Tanaka T, Liang Y, Mason S, Paonessa PD, Sauls AD, DePalma GE, Sharara R, Rowe LB, Eppig J, Morrell C, Doi H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development*, Apr;127(8):1737-49, 2000.
29. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell*, Jan;6(1):117-31, 2004.
30. Wang H, Dey SK, Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, March;7, 185-199, 2006.
31. Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, May; 120(5):1071-83, 1994.
32. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol.*, Jul 15;223(2):217-37, 2000.
33. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, 25 (3): 341-373,

2004.

34. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.*, Sep;114(6):744-54, 2004.
35. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, Jan 17;299(5605):405-8, 2003.
36. Pollard JW, Hunt JS, Wiktor-Jedrzejczak W, Stanley ER. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Developmental Biology*, November; 148(1), 273-283, 1991.
37. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*, 359, 76-79,1992. doi:10.1038/359076a0;
38. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey AB, Colin L. Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 3115-3120, 1996.
39. Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Dysregulation of EGF family of growth factors and cox-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in lif deficient mice. *Mol Endocrinol.*, Aug;14(8):1147-61, 2000.

40. Fouladi-Nashta AA, Jones CJ, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, Kimber SJ. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev Biol.*, May 1;281(1):1-21, 2005.
41. Abbondanzo SJ, Cullinan EB, McIntyre K, Labow MA, Stewart CL. Reproduction in mice lacking a functional type 1 IL-1 receptor. *Endocrinology*, Aug;137(8):3598-601, 1996.
42. 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.
43. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update.*, Jul-Aug;2(4):307-21, 1996.
44. Church HJ, Vićovac LM, Williams JD, Hey NA, Aplin JD. Laminins 2 and 4 are expressed by human decidual cells. *Lab Invest.*, Jan;74(1):21-32, 1996.
45. Fujiwara H, Yoshioka S, Tatsumi K, Kosaka K, Satoh Y, Nishioka Y, Egawa M, Higuchi T, Fujii S. Human endometrial epithelial cells express ephrin a1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via eph-ephrin system. *J Clin Endocrinol Metab.*, Dec;87(12):5801-7, 2002.
46. Sobel JS, Nebel L. Changes in Concanavalin A agglutinability during development of the inner cell mass and trophoblast of mouse blastocysts in vitro. *J Reprod Fertil.*, Mar; 52(2):239-48, 1978.
47. Attachment and implantation. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/implant.html>. 03.06.2010

48. Zhou Y, McMaster M and Fisher S. Implantation and placentation: critical events in the establishment and maintenance of human pregnancy.
http://www.spponline.org/images/02dallas/02dallas_Implantationplacentation.pdf 03.06.2010
49. Strickland S, Reich E, Sherman MI. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell*, Oct;9(2):231-40, 1976.
50. Queenan Jr JT., Kao L, Arboleda CE, Ulloa-Aguirre A, Golos TG, Cines DB, Strauss JF. Regulation of urokinase-type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(23), Issue of August 15, 10903-10906, 1987.
51. Milwidsky A, Finci-Yeheskel Z, Yagel S, Mayer M. Gonadotropin-mediated inhibition of proteolytic enzymes produced by human trophoblast in culture. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol 76, 1101-1105 1993
52. Glass RH, Aggeler J, Spindle A, Pederson RA, Werb Z. Degradation trophoblast of extracellular matrix by outgrowths: a model for mouse implantation. *J Cell Biol*. 1983 April 1; 96(4): 1108–1116.
53. Moll UM, Lane BL. Proteolytic activity of first trimester human placenta: localization of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. *Histochemistry*. 1990;94(5):555-60.
54. Glass RH, Spindle AI, Pedersen RA. Mouse embryo attachment to substratum and interaction of trophoblast with cultured cells. *J Exp Zool*. 1979 Jun;208(3):327-36.
55. Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF, IGF-II and IGFBP-1. *Exp*

Cell Res. 1995;217:419–427.

56. Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK. Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res.* 1998 Oct 10;244(1):147-56.
57. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, Dec;120(12):3657-66, 1994.
58. Diamond MS, Springer TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol.*, Jun 1;4(6):506-17, 1994.
59. Clark DA, Slapsys R, Croy BA, Krcek J, Rossant J. Local active suppression by suppressor cells in the decidua. *Am J Reprod Immunol.*, Mar;5(2):78-83, 1984.
60. Salamonsen LA, Doughton BW, Findlay JK. The effects of the preimplantation blastocyst in vivo and in vitro on protein synthesis and secretion by cultured epithelial cells from sheep endometrium. *Endocrinology*, Aug;119(2):622-8, 1986.
61. http://www.nature.com/nri/journal/v6/n8/fig_tab/nri1897_F1.html
03.06.2010
62. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.*, Oct 20;3:56, 2005.
63. Dunk C, Petkovic L, Baczyk D, Rossant J, Winterhager E, Lye S. A novel invitro model of trophoblast-mediated decidual blood vessel remodeling. *Lab Invest.*, Dec; 83(12):1821-8, 2003.
64. Matsumoto H, Sato E. Uterine angiogenesis during implantation and

- decidualization in mice. *Reproductive Medicine and Biology*, 5: 81–86, 2006.
65. Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, Wang H, Dey SK. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell Mol Life Sci.*, Sep;62(17):1964-73, 2005.
 66. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Developmental Biology. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, November; 90, 10159-10162, 1993.
 67. Longjiang S, Hongmei W, Enkui D and Cheng Z. Expression of vascular endothelial growth factor in rat uterus during periimplantation. *Chinese Science Bulletin*, January; 46(1), 2001.
 68. Hyder SM, Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol.*, Jun;13(6):806-11, 1999.
 69. Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet.*, 24:303–315, 2007.
 70. Croce JC, Mcclay DR. Evolution of the wnt pathways. *Methods Mol Biol.*, 469:3-18, 2008.
 71. Barker N. The canonical wnt-bcatenin signalling pathway. *Methods Mol Biol.*, 468:5-15, 2008.
 72. Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA., Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW. Unexpected complexity of the wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, 433, 156-160, 2005.

73. Johnson LM, Rajamannan N. Diseases of wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord.*, 7:41–49, 2006.
74. [http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Wnt family](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Wnt%20family)
75. Miller JR. The Wnts. *Genome Biology*, 3(1):reviews, 3001.1–3001.15, 2001.
76. Tian Q, Jin H, Cui Y, Guo C., Lu X. Regulation of wnt gene expression. *Develop. Growth Differ.*, 47, 273–281, 2005.
77. Huang HC, Klein PS. The frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.*, 5(7):234, 2004.
78. Johnson ML, Harnish K, Nusse R, Van Hul W. LRP5 and Wnt signaling: A union made for bone. *J Bone Miner Res.*, Nov; 19(11):1749-57, 2004.
79. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480, 2006.
80. Monga SPS, Michalopoulos GK. The wnt/ β -catenin pathway. Book chapter, *Signaling Pathways in Liver Diseases, Part-II*: 173-192, 2005.
81. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.*, Jun 1;20(11):1394-404, 2006.
82. Bovolenta P, Rodriguez J, Esteve P. Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development*, 133, 4399-4408, 2006.
83. <http://www.stanford.edu/~rnusse/frizzleds/receptors.html> 03.06.2010
84. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick

- PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94,13636 - 13641, 1997.
85. Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos M, Luyten FP. The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94,11196 - 11200, 1997.
86. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, Cumberledge S, Rubin JS. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, 275,4374 -4382, 2000.
87. Banyai L, Patthy L. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.*, 8,1636 -1642, 1999.
88. Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, Yu X, Cheng L. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, Nov-Dec;23(10):1489-501, 2005.
89. Chen S, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo MW, Kitajewski J, Wang CY. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating b-catenin/T cell factor-mediated transcription. *The Journal of Cell Biology*, January 8; 152(1), 87-96, 2001.
90. Kaga S, Zhan L, Altaf E, Maulik N. Glycogen synthase kinase-3b/b-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 40, 138-147, 2006.

91. Masckauchán TN, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*, 8(1):43-51, 2005.
92. Fuerer C, Nusse R, Derk ten Berge. Wnt signalling in development and disease. *EMBO reports*, 9, 134-138, 2008.
93. Nusse N. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Research*, 18:523-527, 2008.
94. Dihlmann S, von Knebel Doeberitz M. Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer*, Feb 10;113(4):515-24, 2005.
95. Van Scoyk M, Randall J, Sergew A, Williams LM, Tennis M, Winn RA. The Wnt signaling pathway and lung disease. *Transl Res.*, Apr;151(4):175-80, 2008.
96. Cheng CW, Smith SK, Charnock-Jones DS. Transcript profile and localization of Wnt signaling-related molecules in human endometrium. *Fertil Steril.*, Jul;90(1):201-4, 2008.
97. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K. et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, 238,301-313, 1999.
98. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391,357 -362, 1998.
99. Glinka A, Wu W, Onichtchouk D, Blumenstock C, Niehrs C. Head induction by simultaneous repression of Bmp and wnt signalling in

Xenopus. *Nature*, 389, 517–519, 1997.

100. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, Nov 4;23(52):8520-6, 2004.
101. Monaghan AP, Kioschis P, Wu W, Zuniga A, Bock D, Poustka A, Delius H, Niehrs C. Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev.*, Sep;87(1-2):45-56, 1999.
102. MacDonald BT, Adamska M, Meisler MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development*, 131, 2543-2552, 2004.
103. Peng S, Li J, Miao C, Jia L, Hu Z, Zhao P, Li J, Zhang Y, Chen Q, Duan E. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation. *Reproduction*, 135:367–375, 2008.
104. Carmona-Fontaine C, Acuna G, Ellwanger KC, Mayor R. Neural crests are actively precluded from the anterior neural fold by a novel inhibitory mechanism dependent on Dickkopf1 secreted by the prechordal mesoderm. *Dev. Biol.*, 309,208 -221, 2007.
105. Kong XB, Zhang C. Dickkopf (Dkk) 1 promotes the differentiation of Mouse embryonic stem cells toward neuroectoderm. *In Vitro Cell. Dev.Biol., Animal*, 45:185–193, 2009.
106. Nie X. Dkk1, -2, and -3 expression in mouse craniofacial development. *Journal of Molecular Histology*, 36: 367–372, 2005.
107. Park JR. Park, Jung JW, Lee YS, Kang KS. The roles of Wnt antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 41 (6)859–

874, 2008.

108. Li J, , Liu W, Yu-Jing Cao, Peng S, Zhang Y, Duan EK. Roles of Dickkopf-1 and its receptor Kremen1 during embryonic implantation in mice. *Fertility and Sterility*, 90(4):1470-1479, 2008.
109. Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene*, 21: 878-889, 2002.
110. Scali C, Caraci F, Gianfriddo M, Diodato E, Roncarati R, Pollio G, Gaviraghi G, Copani A, Nicoletti F, Terstappen GC, Caricasole A. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis* 24:254–265, 2006.
111. Nie X, Luukko K, Fjeld K, Kvinnsland I.H., Kettunen P. Developmental expression of Dkk1-3 and Mmp9 and apoptosis in cranial base of mice. *Journal of Molecular Histology*, 36: 419-426, 2005.
112. Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*, Mar 30;19(14):1843-8, 2000.
113. Qin X, Zhang H, Zhou X, Wang C, Zhang H, Zhang X, Ye L. Proliferation and migration mediated by Dkk-1/Wnt/ β -catenin cascade in a model of hepatocellular carcinoma cells. *Translational Research*, 150(5),281-294, 2007.
114. Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, Lapointe R. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer*, Feb 26;96(4):646-53, 2007.

115. Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, García JM, Muñoz A, Esteller M, González-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist Dickkopf-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*, Jul 6;25(29):4116-21, 2006.
116. Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, et al. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101: 266–271, 2004.
117. MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, Sharma P, Goldstein SA, He X, Hauschka PV. Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone*, Sep;41(3):331-9, 2007.
118. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res.*, Jun;21(6):934-45, 2006.
119. Li et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*, 39 754–766, 2006.
120. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.*, Feb;13(2):156-63, 2007.
121. Wright K, Wilson PJ, Kerr J, Do K, Hurst T, Khoo SK, Ward B, Chenevix-Trench G. Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene*, 17,1185 -1188, 1998.
122. Finch PW, He X, Kelley MJ, Uren A, Schaudies RP, Popescu NC,

- Rudikoff S, Aaronson SA, Varmus HE, Rubin JS. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94,6770 -6775, 1997.
123. Rodriguez J, Esteve P, Weini C, Ruiz JM, Fermin Y, Trousse F, Dwivedy A, Holt C, Bovolenta P. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci.*, Oct; 8(10):1301-9, 2005.
124. Dufourcq P, Descamps B, Ferreira Tojais N, Leroux L, Oses P, Daret D, Moreau C, Lamazière JMD, Couffinhal T, Duplâa C. sFRP1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem Cells*, Aug 28, 18757297 Cit:4, 2008.
125. Gargett CE, Lederman F, Heryanto B, Gambino LS, Rogers P. Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Hum Reprod.*, Jun;16(6):1065-75, 2001.
126. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, Jul 12;26(32):4699-713, 2007.
127. Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, Orii A, Fujita J, Fujii S. Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. *J Clin Endocrinol Metab.*, Apr;87(4):1729-36, 2002.
128. Barandon L, Couffinhal T, Dufourcq P, Ezan J, Costet P, Daret D, Deville C, Duplâa C. Frizzled A, a novel angiogenic factor: promises for

- cardiac repair. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Jan; 25(1):76-83.
129. Patthy, L. The WIF module. *Trends Biochem. Sci.*, 25,12 -13, 2000.
130. Hunter DD, Zhang M, Ferguson JW, Koch M, Brunken WJ. The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate retinal development. *Mol Cell Neurosci.*, Dec;27(4):477-88, 2004.
131. Surmann-Schmitt C, Widmann N, Dietz U, Saeger B, Eitzinger N, Nakamura Y, Rattel M, Latham R, Hartmann C, von der Mark H, Schett G, von der Mark K, Stock M. Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis. *J Cell Sci.*, Oct 15;122(Pt 20):3627-37, 2009.
132. Cho SW, Yang JY, Sun HJ, Jung JY, Her SJ, Cho HY, Choi HJ, Kim SW, Kim SY, Shin CS. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 inhibits osteoblastic differentiation in mouse embryonic mesenchymal cells. *Bone*, Jun; 44(6):1069-77, 2009.
133. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, Reguart N, Rosell R, McCormick F, Jablons DM. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res.*, Jul 15; 64(14):4717-20, 2004.
134. Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol.* 2003 Oct;201(2):204-12.
135. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Nosho K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers.

Oncogene, Nov 24; 24(53):7946-52, 2005.

136. Byun T, Karimi M, Marsh J L, Milovanovic T, Lin F, Holcombe R F. Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues: potential role in stem cell homeostasis. *J Clin Pathol.*, 58:515-519, 2005.
137. He B, Reguart N, You L, Mazieres J, Xu Z, Lee AY, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene*, Apr 21; 24(18):3054-8, 2005.
138. Lin YC, You L, Xu Z, He B, Yang CT, Chen JK, Mikami I, Clément G, Shi Y, Kuchenbecker K, Okamoto J, Kashani-Sabet M, Jablons DM. Wnt inhibitory factor-1 gene transfer inhibits melanoma cell growth. *Hum Gene Ther.*, Apr; 18(4):379-86, 2007.
139. Chim CS, Fung TK, Wong KF, Lau JS, Liang R. Infrequent Wnt inhibitory factor-1 (Wif-1) methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.*, Sep;30(9):1135-9, 2006.
140. Yang TM, Leu SW, Li JM, Hung MS, Lin CH, Lin YC, Huang TJ, Tsai YH, Yang CT. WIF-1 promoter region hypermethylation as an adjuvant diagnostic marker for non-small cell lung cancer-related malignant pleural effusions. *J Cancer Res Clin Oncol.*, July; 135(7):919-24, 2009.
141. Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Shaw JM, Law AJ, Cook RJ, Little NS, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, McDonald KL. Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology*, Mar; 149(3):1235-42, 2008.

9. EKLER

Yerel etik kurul kararı;

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DENEY HAYVANLARI
ETİK KURULU

Sayı : :B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/283

04/12/2008

Konu : Hayvan Etik Kurul Hk.

Sayın Doç.Dr. Celal KALOĞLU

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA;

04/12/2008 tarih ve 143 sayılı "Wnt antagonistlerinin pre ve postimplantasyon dönemlerinde sıçan endometriumundaki immunolokalizasyonu" isimli Tıpta Uzmanlık Tezi Araştırma Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Doç.Dr. Sinan GÜRSOY (üye)

Yrd.Doç.Dr.Gülay YILDIRIM (üye)

Doç.Dr. Mustafa GÜREÇİK (üye)

Yrd.Doç.Dr. İhsan HUBBEZOĞLU (üye)

Doç.Dr. Taner ERSELCAN (üye)

Yrd.Doç.Dr. Yavuz SİLİĞ (üye)

Prof.Dr.Eray BULUT (üye)

Uzm.Vet.Dr.Yücel YALMAN(Başkan Yrd.)

Yrd.Doç.Dr.Ersin TUNCER (üye)

Prof.Dr. M.Kemal YILDIRIM (Başkan)

Bekir DOĞAN (sivil üye)

Abdullah CEYLAN (sivil üye)