

**T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN ENDOMETRİYUM STROMA HÜCRELERİNDE
İN-VİTRO DESİDUALİZASYON
GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

Biyolog Ebru KARAKAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2010

T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN ENDOMETRİYUM STROMA HÜCRELERİNDE
İN-VİTRO DESİDUALİZASYON
GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ

Biyolog Ebru KARAKAŞ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2010

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Adı ve Soyadı

Bio. EBRU KARAKAŞ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ.....	4
4.1.1. İntegrinler.....	4
4.1.2. Kaderinler.....	6
4.1.3. Selektinler.....	7
4.1.4. İmmünglobulin (Ig) Süper Ailesi.....	7
4.2. β KATENİN.....	8
4.2.1. β -Katenin/WNT Sinyal yolu.....	8
4.3. ENDOMETRİYUM.....	10
4.3.1. Endometriyal Reseptivite.....	10
4.4. İMPLANTASYON.....	12
4.4.1. Apozisyon.....	12
4.4.2. Adezyon.....	14
4.4.3. İnvazyon.....	15
4.5. DESİDUALİZASYON.....	16
4.5.1. İn Vitro Desidualizasyon Modelleri.....	18
4.6. CRL-4003 HÜCRE SOYU.....	20
4.7. AKT SİNYALİZASYONU.....	21
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	23
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	24
5.2.1. Hücre Kültürü.....	24
5.2.2. Desidualizasyonun Belirlenmesi.....	24
5.2.2.1. β -katenin İmmünohistokimyası.....	24
5.2.2.2. AKT İmmünohistokimyası.....	25
5.2.2.3. BrdU İmmünohistokimyası.....	25

5.2.3. Mikroskopik İnceleme.....	26
6. BULGULAR.....	27
6.1. DESİDUALİZASYON	27
6.2. β KATENİN EKSPRESYONU	28
6.3. AKT EKSPRESYONU	29
6.4. STROMAL VE DESİDUAL HÜCRELERDE PROLİFERASYON	30
7. TARTIŞMA.....	32
8. SONUÇ	35
9. TEŞEKKÜR	36
10. KAYNAKLAR	37

SİMGE VE KISALTMALAR

AEC	: Aminoetilkarbazol
APC	: Adenomatöz polipozis koli
BrdU	: Bromodeoksiüridin
cAMP	: 3'-5'-siklik adenozin monofosfat
DAB	: Diaminobenzidin
Dkk	: Dickkopf
DNaz-1	: Deoksiribonükleaz-1
DSH	: Dishevelled
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
Fzd	: Frizzled
GSK-3β	: Glikojen sentetaz kinaz 3 β
h TERT	: Ters transkriptaz aktivitesine sahip katalitik alt birim
HB-EGF	: Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü
ICAM	: Hücreler arası adezyon molekülü
Ig	: İmmünglobulin
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1
IL	: İnterlökin
IL-11Rα	: IL-11 reseptör α zinciri
LH	: Luteinizan hormon
LIF	: Lösemi inhibitör faktör
LRP	: Lipoprotein reseptör ilişkili protein
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NCAM	: Nöral hücre adezyon molekülü
pAkt	: Fosfo-Akt
PDK1	: Fosfoinosit bağımlı kinaz-1
PECAM	: Platelet hücre adezyon molekülü
PH	: Plekstrin homoloji bölgesi
PI3K	: Fosfoinositid 3 kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfat

PIP3	: Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfat
PKB	: Protein kinaz B
RGD	: Arg-Gly-Asp
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog geni
SFRP	: Frizzled İlişkili Protein
SIBLING	: Küçük integrin bağlayıcı ligand, N-bağlı glikoprotein
TCF/LEF	: T hücre transkripsiyon faktörü/ Lenfoid çoğaltıcı faktör
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
TIMP	: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü
TNF-α	: Tümör nekrozu faktörü- α
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü

Araştırma Projesi Nosu : HE/0442009

1. ÖZET

Bu çalışmada, endometriyal stromal hücrelerin in-vitro ortamda 3'-5'-siklik adenozin monofosfat (cAMP), progesteron ve östrojene bağlı olarak desidual hücrelere farklılaşması ve bu süreçte rol aldığı düşünülen β -katenin ve Akt sinyal yolları ile hücre proliferasyonunda meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Deney, 17- β -östradiol, progesteron, cAMP, 17- β -östradiol+progesteron ve 17- β -östradiol+progesteron+cAMP ile üç gün kültüre edilen hücre gruplarında gerçekleştirildi. Morfolojik değerlendirmenin ardından hücre kültüründe farklılaşan desidual hücrelerce sentezlenmesi beklenen prolaktin hormon düzeyleri biyokimyasal olarak ölçülerek farklılaşma teyit edildi. Morfolojik ve biyokimyasal incelemeler sonucunda desidualizasyona özgü değişikliklerin cAMP uygulanan gruplarda meydana geldiği saptandı. Ancak üç günlük farklılaşma süreci sonunda β -katenin ekspresyonunun henüz gerçekleşmediği tespit edildi. Birçok hedef proteinin aktivasyonunda rol alan Akt ekspresyonunun da kontrol ve deney gruplarında sabit kaldığı izlendi. Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde S fazına özgü bir işaretleyici olan bromodeoksiüridin (BrdU) immünohistokimyası uygulandı. Desidualizasyona özgü değişikliklerin izlendiği cAMP uygulanan hücre gruplarında hiç BrdU pozitif hücre izlenmedi. Östrojen inkübasyonu uygulanan gruplarda ise BrdU pozitif S faz hücre oranlarının sadece progesteron uygulanan gruba göre artmış olduğu izlendi.

Birden fazla etkenin bir arada görev almasıyla gerçekleşen desidualizasyon sürecinin erken evresinde β -katenin ve Akt sinyal yolunun etkin rol oynamadığı, östrojen hormonu inkübasyonu ile artan S faza özgü BrdU işaretli hücre oranının, desidualizasyonun oluşturulduğu deney gruplarında izlenmemesi ise farklılaşma sürecinde proliferasyonun baskılandığı gerçeğiyle uyumlu bulundu.

2. SUMMARY

In this study, the endometrial stromal cells in vitro 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), progesterone and estrogen depending on the differentiation of decidual cells and to investigate β -catenin and Akt signaling pathways are thought to be involved in this process with the changes in cell proliferation are intended.

Experiment, in cell lines was cultured with 17- β -estradiol, progesterone, cAMP, 17- β -estradiol+progesterone and 17- β -estradiol+progesterone+cAMP for three days was materialized. After morphological evaluation, differentiation was confirmed by measuring levels of prolactin hormone was expected to be synthesized by differentiated decidual cells in cell culture biochemically. As a result of morphological and biochemical investigations desidualization-specific changes occurred in the groups treated with cAMP. However, at the end of a three-day differentiation process, expression of β -catenin was determined to be not taken place. Akt expression that is involved activation of many target proteins was viewed to be remained stable in the control and experimental groups. To assess cell proliferation, S-phase specific marker bromodeoxyuridin (BrdU) immunocytochemistry was performed. Some groups treated with cAMP that was viewed desidualization-specific changes weren't observed any BrdU-positive cells. The rates of BrdU-positive S phase cells in the groups treated with estrogen incubation were found to be higher than the group received only progesterone.

β catenin and Akt signaling pathway not playing an active role in the early stage of desidualization process that is occurred to take part in a combination of multiple factors, S-phase specific marker BrdU-positive cell ratio that is increased by estrogen incubation not being observed in the experimental group which was created desidualization was found compatible with the fact that the suppressed proliferation in the process of differentiation.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan endometriyumunu oluşturan epitelial ve stromal hücrelerin östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında implantasyona hazırlık amacıyla çoğalma ve farklılaşma geçirdiği bilinmektedir (1).

Uterusun lümene bakan katmanını oluşturan endometriyum, menstrual kanama ve yenilenmenin birbirini takip ettiği istisna bir dokudur. Apoptotik faktörlerin etkisiyle gerçekleşen hücre ölümünün ardından östrojenin kontrolü altında başlayan proliferasyonla birlikte dokuda yenilenme olayı başlar (2). Progesteron salınımıyla birlikte glandular hücreler sekresyon fazına geçerken, stromal hücreler desidual hücrelere farklılaşır. Desidualizasyon adını alan bu süreç, steroid hormonlar, 3'-5'-siklik adenozin monofosfat (cAMP), sinyal yolları ve büyüme faktörlerinin bir arada işlev görmesiyle gerçekleşen fizyolojik bir olaydır (3). B-katenin, hücre-hücre adezyonunda ve Wnt sinyal yolağında görev alan intrasellüler proteindir (4). İmplantasyon sürecinde trofoblast ve endometriyal hücrelerde yer alan adezyon moleküllerinin ekspresyon düzey ve yerleşiminde değişiklik meydana gelmektedir. B-kateninin hücre diferansiyasyonunda etkin olduğu bilinmektedir. Ancak desidual hücrelerde eksprese edilen wnt proteinleri ve β -kateninin rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hücre içi sinyal iletiminde önemli bir yere sahip olduğu bilinen Akt molekülü fosforilize olarak aktif formuna dönüşür. Aktive olmuş Akt, sitozolde birçok hedef proteinin fosforilasyonunda ya da nukleusa translokasyonu sonucu hücre sağ kalımı düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri ve diğer protein kinazları içeren, çok sayıda proteinin fosforillenmesinde görev alır (5). Endometriyal stromal hücreler ve desidual hücrelerce eksprese edilen Akt molekülünün farklılaşma sürecindeki görevi henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Çalışmamızda östrojen, progesteron ve cAMP'nin farklı kombinasyonlarının endometriyal stromal hücrelere uygulanmasının ardından, in vitro desidualizasyon modelinin oluşturulabilmesi amacıyla endometriyuma ait stromal hücrelerden elde edilen ve uygun bir hücre modeli olarak kabul edilen CRL-4003 hücre soyu kullanıldı. Çalışmamızın amacı insan endometriyumunda gerçekleşen desidualizasyon sürecinde, β -katenin ve Akt sinyal yolları ile hücre proliferasyonunda gelişen değişikliklerin tanımlanmasıyla implantasyon başarısı ve plasentanın gelişiminde büyük öneme sahip olan desidual dokunun oluşum sürecinin aydınlanmasına katkı sağlamaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Gelişmiş canlılarda bütünlüğün korunabilmesi ve canlının yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi amacıyla, farklı hücre grupları bir araya gelerek organize olurlar. Hücreler arasındaki bu birlikteliği sağlayan faktörlerden biriside adezyon molekülleridir. Adezyon molekülleri, hücre yüzeyinde yer alan, hücre-hücre ya da hücre-ekstrasellüler matriks komponentleri arasındaki etkileşimlerde görev alan transmembran konumlu proteinlerdir. Yapışma özelliği ile doku bütünlüğünü sağlaması, seçici bir bariyer oluşturarak hücreleri koruması, hücrenin proliferasyon ve farklılaşmasını kontrolü, immün ve inflamatuvar yanıtı oluşturması, hücre göçü ve tümör metastazını gerçekleştirmesi, embriyogenezisi düzenlemesi ve hücre iskeleti aracılığıyla hücre hareketini sağlaması adezyon moleküllerinin başlıca görevleri arasındadır (6, 7). Hücre adezyon molekülleri homofilik ve heterofilik olmak üzere iki farklı tipte etkileşim gösterir. Bir hücrenin yüzeyinde yer alan adezyon molekülünün, diğer bir hücrenin yüzeyinde bulunan aynı türden adezyon molekülüne bağlanması homofilik bağlantı iken, farklı türden bir adezyon molekülüne bağlanması heterofilik etkileşime örnektir (8). Adezyon molekülleri dört farklı grupta incelenirler; integrinler, kaderinler, selektinler ve immünglobulin (Ig) süper ailesi üyeleri. Bunun dışında laminin, CD44, CD36 ve fibronektin ise adezyon görevi gören fakat sınıflandırılmaya katılmayan adezyon molekülleridir (6).

4.1.1. İntegrinler

İntegrinler, birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlı α ve β ile simgelenen iki alt üniteden oluşan heterodimer yapılardır (9). Yapılan çalışmalarda, 18 α ve 8 β alt ünitesinin değişik kombinasyonlarından oluşmuş 24 farklı integrin tanımlanmıştır (10). İntegrinler, hücre iskeleti proteinlerinden oluşan intrasellüler ligandlarıyla, hücre dışı matriks komponentlerinden oluşan ekstrasellüler ligandlarıyla ve Ig süper ailesi üyeleri ile bağlantı kurabilir. İntegrinlerin adezyonu için gerekli olan Ca^{2+} ya da Mg^{2+} zincirinde yer alan N ucuna bağlanır. Ekstrasellüler matriks komponentleri ve diğer hücrelerin yüzeyinde yer

alan adezyon molekülleri ise, reseptörleri olan heterodimer yapıdaki integrinlerin iki alt ünitesinin birbirine homolog olarak konumlandığı bölgesinde yer alan NH₂ ucuna bağlanır (11).

Ekstrasellüler matriks komponentlerinden fibronektin, laminin ve kollajen IV'ün içerdiği kısa amino asit dizileri integrinler için tanınma ve bağlanma bölgesi oluşturur. İntegrin ailesinin birden fazla üyesi tarafından tanınan Arg-Gly-Asp (RGD) amino asit dizisi ilk tanımlanan bağlanma dizisidir (12). İntegrinler, hücreleri ekstrasellüler matrikse bağlamalarının yanı sıra fokal adezyonlar ve hemidesmozomların görüldüğü bazal yüz bağlantılarında da görev alır. Fokal adezyon bağlantılarda, integrinler ekstrasellüler alanda yer alan kısımlarıyla hücreler arası proteinlere bağlanır. Transmembranik yapıdaki integrinlerin β alt ünitesinin sitoplazmik yüzdeki kısmı ise, hücre iskeleti elemanı olan aktin filaman demetlerine bağlı talin, vinkulin ve α -aktinin gibi hücre iskeleti proteinlerine bağlanarak hücre iskeleti ve hücre dışı matriks arasındaki kararlı bağlantıya aracılık eder. Hemidesmozomlar ise, bu bağlantı türüne spesifik olan $\alpha 6\beta 4$ integrini aracılığıyla gerçekleşen, epitel hücrelerinde görülen kararlı bağlantılardır. $\alpha 6\beta 4$ integrini, bazal yüzde laminin ile etkileşirken, sitoplazmik yüzde plektin aracılığıyla ara filamanları bazal laminaya bağlayarak epitel hücrelerini bazal laminaya sabitletler (8).

Hücre yüzey reseptörü olan integrinler, bağlantı komplekslerinde görülen adezyon görevleri dışında ekstrasellüler matriks proteinleriyle olan etkileşimleri sonucu hücreleri migrasyon ve farklılaşma gibi olaylara yönlendirmektedir. Endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşüm sürecinde birçok integrinin miktar ve yerleşiminde farklılıklar gözlenmesi, integrinlerin desidualizasyon sürecinde rol alabileceklerini düşündürmüştür. Endometriyal stromal hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada, sekresyon evresinin ortalarına doğru stromal hücrelerin yüzeyinde $\alpha 5\beta 1$ integrinin ekspresyonu saptanmıştır. Desidual hücreler tarafından eksprese edilen insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1), içerdiği RGD amino asit dizisi aracılığıyla $\alpha 5\beta 1$ integrine bağlanarak gebelik için gerekli olan desidualizasyon sürecini indükleyebilmektedir (13, 14). Reseptif fazın spesifik belirteci olan $\alpha 5\beta 3$ integrin ve ligandı, küçük integrin bağlayıcı ligand, N-bağlı glikoprotein (SIBLING) ailesinin üyesi olan osteopontin, farklılaşma sürecine katılan adezyon moleküllerindedir. İmplantasyon penceresi döneminde, endometriyal stromal hücrelerdeki ekspresyon düzeylerinde artış gözlenen osteopontin, içerdiği RGD amino asit tanınma dizisi ile reseptörü $\alpha 5\beta 3$ integrine bağlanır. $\alpha 5\beta 3$ integrin ve ligandı

osteopontinin desidual alandaki artışları, stromal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için her ikisinin de gerekli olduğunu düşündürmektedir (15, 16).

4.1.2. Kaderinler

Kaderinler, Ca^{2+} 'a bağımlı olarak gerçekleşen hücre-hücre adezyonunda görev alan transmembranik yerleşimli proteinlerdir. Moleküler ağırlıkları 120.000–140.000 kDa arasında değişen yaklaşık 80 üyesi bulunmaktadır (17, 18). Moleküler yapısına bakıldığında, kaderinler N ve C terminal uçları içerir. Ca^{2+} bağlantısının gerçekleştiği N-ucu hücre dışında yer alırken, α -katenin, aktin gibi sıkı bağlantılarda görev alan proteinlerle kompleks oluşturan β -kateninin bağlanacağı C- terminal ucu ise sitozol kısmında yer almaktadır (17). Kaderinler, sinir sisteminde iki nöronun birbiriyle bağlantı kurduğu sinaps bölgelerinde, morula evresindeki embriyonun blastomerleri arasındaki bağlantılarda ve doku bütünlüğünü oluşturan hücreler arasındaki kalıcı bağlantılarda rol oynar (19). Kaderinler buldukları dokulara göre başlıca üç grupta incelenirler.

1. E-Kaderin (Epiteliyal) : Epitel hücrelerinde eksprese olur. Blastomerler arasında ve epitel hücrelerinin yan yüzlerinde görülen zonula adherens ve desmozom gibi sıkı bağlantı kompleksleri, E-kaderinler arasında gerçekleşen homofilik etkileşimler aracılığıyla oluşmaktadır. Zonula adherens bağlantıda, transmembranik bir protein olan E-kaderin, intrasellüler yüzde aktin filamanları ile ilişkili proteinlerle etkileşim halinde bulunan β -katenine bağlanarak, hücre iskeleti elemanlarının da dahil olduğu kararlı adezyon bağlantısını gerçekleştirir (20). Desmozomal bağlantı ise, E-kaderinler arasındaki etkileşimin, hücre membranının altında yer alan desmoplakin ve plakoglobulinlerden oluşan plak aracılığıyla gerçekleştiği bağlantı türüdür (21).

2. N-Kaderin (Nöral) : Nöral dokularda, kalp, akciğer, böbrek ve kas hücrelerinde, gözün lens tabakasında, embriyonik mezoderm ve nöroektodermal hücrelerde bulunur (6).

3. P-Kaderin (Plasental) : Esas olarak plasentada eksprese olur. Çok katlı epitel dokunun bazal katmanındaki E-kaderin ile birlikte olan ekspresyonları gözlenmektedir (6).

Epiteliyal hücrelerdeki lokalizasyonları ile adezyon sürecine katılan Cad-11, desidualizasyonla paralel işleyen süreçte endometriyal stromal hücrelerde yüksek düzeylerde eksprese edilmeye başlamıştır. Steroid hormonlarınca ekspresyonları düzenlenen Cad-11'in desidual alanda maksimum seviyelere yükselmesi, endometriyal

stromal hücrelerin desidual hücelere farklılaşması sürecinde Cad-11'in etkin rol oynadığını göstermiştir (22, 23).

4.1.3. Selektinler

Selektinler, lökositlerin kan trombositleri ya da endotel hücreleri ile gerçekleştirdiği geçici bağlantılara aracılık eden adezyon molekülleridir. Ligandları, hücre yüzeyinde yer alan karbonhidratlardır. Selektinler buldukları hücelere göre üç alt gruba ayrılır (24).

1. E-Selektin: İnterlökin-1 (IL-1) ve Tümör nekrozu faktörü- α (TNF- α) gibi inflamatuvar uyarılar ile aktive olmuş endotel hücresi üzerinde eksprese olur. Lökositlerin endotel hücelerine olan adezyonuna aracılık eder (25).

2. L-Selektin: Lökositlerin yüzeyinde yer alır. Lökositler, kandan enfeksiyonlu doku bölgesine olan göçünü kapiller duvarındaki endotel hücelerine tutunarak başlatır. Transmembranik yerleşimli olan L-selektin endotel hücelerinin yüzeyindeki karbonhidrat ligadlarına bağlanarak ilk etkileşimi gerçekleştirir. Sonrasındaki aşamada ise lökositlerin yüzeyinde yer alan integrinler endotel hücelesinin yüzeyinde bulunan Ig süper ailesi üyelerinden olan hüceler arası adezyon molekülüne (ICAM) bağlanarak oluşturduğu kararlı bağlantı ile kapiller duvarını aşarak alttaki dokuya geçer (24).

3. P-Selektin: Endotel hücelerinin Weibel-Pallade cisimciklerinde ve trombositlerin α granüllerinde depolanan P-selektin, trombin, histamin ve spesifik inflamatuvar sitokinlerince uyarılmasının ardından hızlı bir şekilde hücre yüzeyine taşınır (26).

4.1.4. İmmünglobulin (Ig) Süper Ailesi

İmmünglobulinlere benzer yapısal bölümler içerdiklerinden ötürü bu şekilde adlandırılırlar. Çoğunlukla integrinlerle gerçekleşen heterofilik bağlantılardan sorumludurlar. Ig süper ailesi üyeleri, lökositlerin diapedezi sırasındaki endotel hüceleriyle olan adezyonda, miyelinizasyonun düzenlenmesinde, sinir sisteminin gelişimi ve yenilenmesinde rol oynarlar (27). Ig süper ailesi üyelerinden olan ICAM, endotel hüceleri ve lökositler üzerinde eksprese edilir ve lökositlerin göçü için esastır. Endotelde yer alan vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM) ise, endotel duvarından gerçekleşen lökositlerin göçü ve adezyonunda rol oynar (28). Hem heterofilik hem de homofilik

adezyonu sağlayan n6ral h6cre adezyon molek6l6 (NCAM) sinir h6crelerinde eksprese olur. İNFLAMASYON, h6cre-h6cre adezyonu ve l6kositlerin diapedez s6recine katılan Ig s6per ailesinin diğer bir 6yesi olan platelet h6cre adezyon molek6l6 (PECAM), monosit, trombosit, n6trofil ve endotel h6creleri tarafından eksprese edilir (6).

4.2. β KATENİN

Katenin ailesinin (α -katenin, β -katenin, γ -katenin) bir 6yesi olan β -katenin, h6cre iskeleti elemanları ile kaderinler arasındaki h6cre-h6cre adezyonunda ve h6creler arası sinyalizasyonda rol alan intrasell6ler proteinlerdir. Epitelial h6crelerin sitoplazmasında ve plazma membranında yer alan β -katenin, 781 aminoasitten meydana gelen 92 kD'luk bir proteindir (29). β -kateninin molek6ler yapısı; DNA ile aktivasyona girdiği 100 aminoasitlik bir karboksi-terminal uę, fosforilizasyon işlevinin yapıldığı serin/treonin içeren 130 aminoasitlik bir amino uę, adenomat6z polipozis koli (APC), aksin, T h6cre transkripsiyon fakt6r6/ Lenfoid ęođaltıcı fakt6r (TCF/LEF) ve birlikte adezyon s6recine katıldığı kaderin molek6l6 ile etkileşime geğeceği 42 aminoasitten oluşan arm benzeri tekrar b6lgelerinden (drosophila segment polarite geni olan armadilloda g6r6len tekrar b6lgeleri) oluşur (30, 31).

β -katenin, Wnt sinyal yolu aracılığıyla gen ekspresyonu ve h6creler arası adezyonda 6nemli g6revler 6stlenir. E-kaderinler ile birlikte zonula adherens bağlantılarında g6rev alan β -katenin, epitel doku b6t6nl6đ6n6n devamını sağlar. Embriyo gelişimi s6recinde, h6cre diferansiyasyonunda ve malign t6m6r transformasyonunda etkin rol oynar. Wnt sinyal yolağında yer alan β -katenin, APC, aksin ve Tcf-1 gibi t6m6r supress6r6 g6revi g6ren d6zenleyici molek6llerin birinde oluşacak mutasyon, kanser s6recini başlatan etkenler arasında g6sterilmektedir (4, 32).

4.2.1. β -Katenin/WNT Sinyal yolu

Wnt sinyal yolunun en 6nemli efekt6r6 olan β -katenin etkilerinin ortaya ıkması amacıyla, ilk olarak Wnt sinyal yolunun aktive olması gerekir. Sinyalizasyonun aktif hale gelmesi, Wnt proteinlerinin frizzled (Fzd) ailesine ait h6cre y6zey resept6rlerine ve LRP5/6 (Lipoprotein Resept6r İlişkili Protein 5 ve 6) ko-resept6rlerine bağlanmasının

ardından gerçekleşir (33). Wnt proteinleri, hücre proliferasyonu, embriyogenezis, hücrelerin farklılaşma ve polarizasyon süreçlerinde rol oynayan sinyal proteinleridir (34, 35).

Wnt sinyal yolu aktif hale geldiğinde, ligand-reseptör etkileşimi, sitoplazmada yer alan Dishevelled (DSH) proteinini aktive ederken, aksinin yıkımına neden olur. DSH aktivasyonunun ardından, β -katenin fosforilasyonunu sağlayacak olan Glikojen sentetaz kinaz 3 β (GSK-3 β) inaktif hale geçer. Fosforilasyonu gerçekleşmeyen β -katenin, sitoplazmada birikir. β -kateninin sitoplazmadaki birikimi iki mekanizmayı tetikler. İlkinde; transmembranik protein olan kaderinin sitozoldeki C- terminal ucuna bağlanan β -katenin, hücreler arası zonula adherens bağlantılarında görev alır. Diğer bir etkisi ise; β -katenin nukleusa transloke olur ve ardından DNA'ya bağlı TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ailesi ile etkileşime geçerek, wnt hedef genlerinin ekspresyonunda direkt bir düzenleyici olarak rol oynar (33, 36).

Wnt sinyal yolunun aktivasyonu iki mekanizma ile düzenlenir. Frizzled ilişkili proteinler (SFRP), Fzd reseptör ailesinin ligandları ile bağlandığı ekstrasellüler bölgelerine benzer yapısal özellik gösterirler. SFRP'ler Wnt proteinlerine bağlanır ve Fzd reseptörlerinin Wnt proteinleri ile olan etkileşimini engelleyerek Wnt sinyal yolu aktivasyonunu inhibe eder. Wnt sinyalizasyonunu inhibe eden diğer protein ise, Dickkopftur (Dkk). Dkk proteinleri LRP5/6 ko-reseptörlerine bağlanarak, Wnt'nin LRP5/6 ko-reseptörleriyle olan etkileşimini inhibe eder ve Wnt yolunu aktif hale getirecek sinyal oluşmaz (37).

Wnt sinyalizasyonu oluşmazsa, DSH de aktive olamayacağından kazein kinaz 1, aksin ve APC'ye bağlanan β -katenini serin 45 bölgesinden işaretler. Yıkım için işaretlenen β -katenin, GSK-3 β aracılığıyla amino ucundan fosforilize edilir. Bir poliubikuitin zinciri, fosforilize olmuş β katenine ubikuitin ligaz kompleksi ile tutunur. Poliubikuitin-fosforlanmış β katenin kompleksi ise, proteozom tarafından tanınarak yıkılır (38, 39).

Son yıllarda endometriyal stromal hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda, desidualizasyon süresince Wnt proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde artış gözlenmiştir. Wnt sinyal yolu inhibitörü olan Dkk'in progesteron tarafından düzenlenen ekspresyon seviyeleri sekresyon fazının ortalarında pik yaparken, desidualizasyonun başladığı geç sekresyon evresinde ekspresyon düzeylerinde azalma görülmüştür (37). Stromal hücrelerde progesteron tarafından indüklenerek aktif hale gelen Wnt/ β katenin sinyal yolu aracılığıyla,

sitoplazmadaki β katenin miktarında artış başlar. Sitoplazmada biriken β kateninin nukleusa olan translokasyonu ise östrojenin etkisiyle gerçekleşmiştir. Desidualizasyon sürecinde aktif hale gelen β katenin/Wnt sinyal yolunun, endometrial stromal hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyonunu stimüle ettiği düşünülmektedir (39, 40).

4.3. ENDOMETRİYUM

Uterus duvarı histolojik olarak üç farklı tabakadan meydana gelir. Uterusun lümenine bakan iç tabaka endometriyum, düz kas dokusundan yapılı olan en kalın tabaka miyometriyum, en dışta yer alan seroza katmanı ise perimetriyum adını alır. Endometriyum tabakasını, tek katlı silli prizmatik epitelden oluşan lamina epitaliyalis ve epitel tabakasının altında uzanan uterus bezlerini içeren lamina propriya oluşturur (41). Endometriyum yapı ve fonksiyonları bakımından birbirlerinden farklı olan iki alt tabaka içerir. Menstrual siklus sürecinde ovaryum steroidlerine yanıt olarak değişikliğe uğrayan ve menstrual kanama ile birlikte dökülen üst 2/3'lük kısım fonksiyonel tabaka adını alırken, miyometriyumun üzerinde ince bir şerit halinde yer alan 1/3'lük kısım ise bazal tabakadır. Bazal arterleri ve endometriyal bezlerin taban kısımlarını içeren bazal tabaka, menstruasyonla dökülen fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlar (1).

Endometriyum embriyonun invazyonuna izin veren, menstrual siklus ve gebelik süresince değişime uğrayan dört farklı hücre grubu içerir; luminal ve glandular epiteliyal hücreler, çoğu fibroblast olan stromal hücreler, endoteliyal hücreler ve endometriyuma göç eden immün hücrelerdir. Epiteliyal hücrelerde gerçekleşen morfolojik değişimler embriyonun adezyon sürecine katılırken, stromal hücreler proliferasyon evresindeki östrojen kaynaklı ilk gelişiminin ardından geç-sekresyon evresinde progesteronun etkisi altında desidual hücrelere farklılaşır (42, 43).

4.3.1. Endometriyal Reseptivite

Endometriyum menstrual siklus süresince yeniden yapılanma gösterir ve sadece çok kısa bir süre için reseptif özellik sergiler. Ovaryumda gelişmekte olan foliküllerin granüloza hücreleri tarafından salınan östrojenin etkisi altında gerçekleşen proliferasyon evresinde, apoptotik faktörler baskılanarak endometriyal dokuda mitoz ve anjiyogenezis

başlar (2). Ovulasyonun ardından rüptüre olan folikülden geriye kalan granüloza ve teka interna hücrelerinin, luteinizan hormonu (LH) etkisi altında luteal hücrelere farklılaşması sonucu gelişen korpus luteum tarafından salınan progesteron, endometriyal hücrelerde proliferasyonu baskılayarak, morfolojik ve biyokimyasal değişimlerle karakterize olmuş sekresyon evresini başlatır (42, 44). Endometriyum, kendisi için yabancı olan blastosistin doku içerisine kabulü için sekresyon evresinin ortalarına doğru kısa süreliğine reseptif hale gelir. İmplantasyon penceresi dönemi adını alan bu süreç menstrual siklusun 20-24. günleri arasına ya da LH hormonun pik yapmasının ardından 6-10. günler arasına denk gelen ve 48 saatten daha az süren bir zamanı kapsar (45). Endometriyuma reseptif özellik kazandıran morfolojik ve biyokimyasal değişimler, implantasyon penceresi dönemine spesifik olan belirteçleri ortaya koyar. Morfolojik farklılaşmaya örnek olan pinopod adlı yapılar endometriyal reseptivitenin değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Pinopodlar, endometriyuma ait olan epiteliyal hücrelerin apikal membranında yer alan mikrovilluslarda ve membran altı yapılar olan sitoskeletonlarda, progesterona bağlı olarak gerçekleşen yapısal değişimler sonucu ortaya çıkan geniş ve düz membran uzantılarından oluşur (7, 46). Homeobox gen ailesinin bir üyesi olan HOXA-10'nun ekspresyon düzeyleri implantasyon penceresi döneminde belirgin bir artış gösterir. Blastosistler için önemli tutunma alanları olan pinopodların gelişimi için esas olan HOXA-10'nun endometriyozis, polikistik over sendromu gibi kadın infertilitesi olgularında ekspresyon düzeylerinin azaldığı, buna bağlı olarakta implantasyon başarı oranlarında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (47). Endometriyumun reseptif fazındaki luminal epitelde, implantasyon sürecinde rol alan $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 5\beta 3$ integrinlerinin ekspresyonları saptanmıştır. İmplantasyon penceresinin açılması ile reseptif fazın en önemli biyokimyasal belirteci olan $\alpha 5\beta 3$ integrinin ekspresyon seviyeleri, luminal epitelin apikal yüzeyinde eksprese olmaya başlayan heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve epidermal büyüme faktörünün (EGF) indüklemesi ile artış gösterir. $\alpha 5\beta 3$ integrini, progesteron tarafından ekspresyonu düzenlenen osteopontin üzerindeki RGD serilerine bağlanarak trofoblast hücreleri ve luminal epitel hücreleri arasındaki ilk hücre-hücre etkileşimini başlatır (15, 16). Açıklanamayan infertilitenin nedenleri arasında gösterilen $\alpha 5\beta 3$ integrin ekspresyon düzeylerine bakılarak uygun implantasyon zamanı belirlenip, IVF programının başarı oranlarının arttırılabileceği düşünülmektedir. Başarılı bir implantasyon, aktive olmuş

blastosistin endometriyumun reseptif fazındaki luminal epitel ile etkileşime geçmesi ile gerçekleşmektedir (48).

4.4. İMPLANTASYON

Embriyo gelişimi, matür bir oositin sperm tarafından dölleniş ile başlar. İki hücreli evreye ulaşan zigot bir seri mitotik bölünme geçirir. Sekiz hücre evresine kadar gevşek bir hücre kümesi yapısı sergileyen blastomerler, üçüncü yarıklanmanın ardından adezyon molekülleri aracılığıyla birbirlerine sıkı bağlarla bağlanarak kompakt duruma geçerler. Fertilizasyondan 3 gün sonra kompakt haldeki embriyo bir bölünme daha geçirerek 12-16 hücreli olan morula (dut) şeklini alır. İç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesinden oluşan morulanın iç hücre kitlesi embriyoya ait olan dokuları verirken, dış hücre kitlesi ise plasentayı oluşturacak olan trofoblastları verir. Fertilizasyonun yaklaşık 4. gününde morula uterus boşluğuna ulaşır. Uterusta yer alan sıvı embriyoya ait hücreler arası boşluklarda birikmeye başlar ve blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur. Bu evreden itibaren blastosist adını alan embriyonun iç hücre kitlesi embriyoblast, dış hücre kitlesi trofoblast olarak isimlendirilir (49, 50).

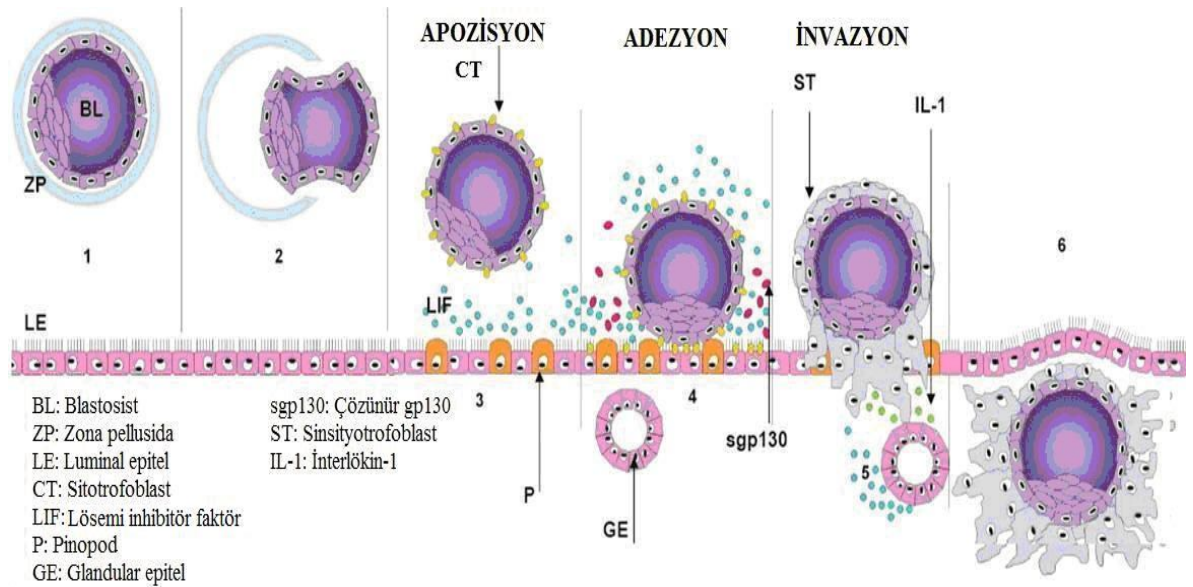
İmplantasyon, uterus boşluğunda gelişmekte olan blastosist ve ovaryum steroid hormonlarınca hazırlanan endometriyumun karşılıklı etkileşimleri sonucunda gerçekleşen bir süreçtir (48). Fetus ve anne arasındaki ilk etkileşim, östrojen ve progesteronun etkisi altında bulunan adezyon molekülleri, sitokinler, büyüme faktörleri, metalloproteinazlar ve homeobox genler gibi birçok faktörün zincirleme bir şekilde birbirini indüklemesiyle gerçekleşen kompleks bir olaydır (51, 52). İmplantasyon, apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarını içeren ardışık üç evrede gerçekleşir (Şekil 1).

4.4.1. Apozisyon

Apozisyon, gelişmekte olan embriyonun ovulasyonu takiben 4. günde uterus boşluğuna ulaşarak, zona pellusidasını kaybetmesinin ardından implantasyon için uygun yeri seçtiği evredir (52). Zona pellusidanın erimesinden hemen sonra blastosistin trofoblast hücreleri L-selektin ekspresyonuna başlar. L-selektin, endometriyumun luminal epiteli üzerinde yer alan oligosakkarid ligandları ile etkileşime geçerek blastosisti yavaşlatır.

Böylece integrinler aracılığıyla embriyo ve anne arasında kurulacak olan adezyonun gerçekleşmesine olanak sağlar (53, 54).

Anti-adeziv özelliği ile bilinen musin ailesinin bir üyesi olan MUC-1, blastosistin luminal epitel üzerinde tutunacağı bölgeyi seçmesi konusunda etkin rol oynar. Endometriyumun reseptif fazında luminal epiteldeki ekspresyon düzeylerinde artış görülen MUC-1'in, blastosistin parakrin etkisinin ardından implantasyon alanında lokal olarak kaybı gözlenir ve böylece adezyonu engelleyen etken ortadan kaldırılarak embriyonun implantasyonuna izin verilir. Bir bariyer görevi gören MUC-1, embriyonun implantasyon için en uygun yere tutunmasını sağlamasının yanında embriyoyu annenin immün sistemine karşı korur (55). Apozisyon aşamasında luminal epitel hücreleri tarafından maksimum düzeylerde eksprese edilen lösemi inhibitör faktör (LIF), trofoblast hücrelerinin yüzeyinde lokalize olan reseptörleri ile etkileşimleri vasıtasıyla implantasyon sürecine yardımcı olan faktörler arasında sayılmaktadır (56).



Şekil 1: İmplantasyon.

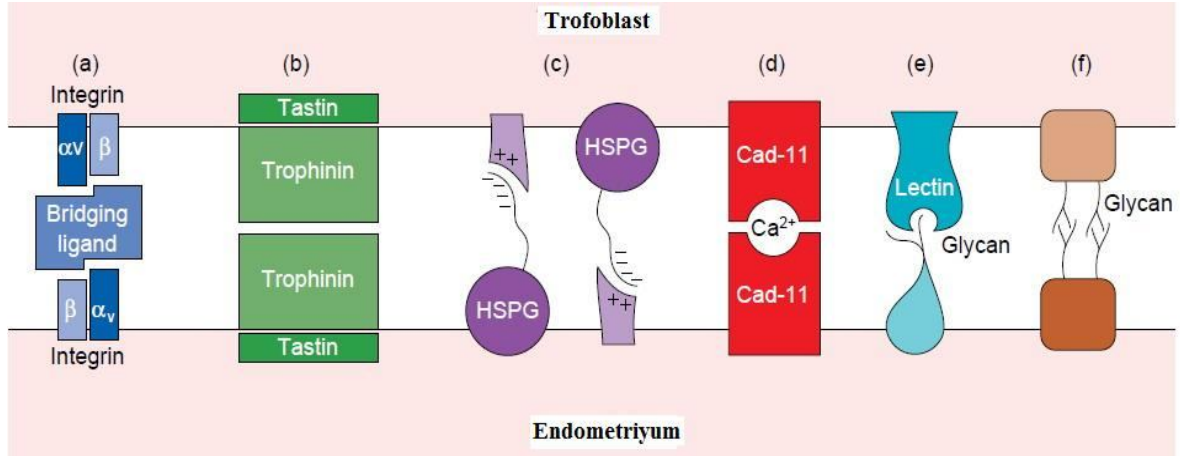
1) Zona pellusida ile çevrelenmiş blastosist. **2)** Zona pellusidanın ayrılması. **3)** Apozisyon aşaması. Pinopodlar blastosistler için tutunma yüzeyi oluşturur. Endometriyumda LIF ekspresyonu, sitotrofoblast hücrelerinin yüzeyinde LIF reseptörleri yer alır. **4)** Adezyon evresi, sgp130 ve LIF reseptörlerinin miktarlarında artış izlenmektedir. **5)** Blastosist tarafından eksprese edilen IL-1, glandular epitelin LIF ekspresyonunu uyarır. **6)** İmplantasyonun tamamlanmasının ardından implantasyon penceresi kapanır (56).

4.4.2. Adezyon

Adezyon, fertilizasyonun ardından ~6. günde blastosistin embriyoblast kutbunun (iç hücre kısmının yer aldığı taraf) üzerinde yer alan trofoblastik hücrelerin adezyon molekülleri aracılığıyla endometriyumun luminal epiteline tutunduğu evredir. Reseptif fazın morfolojik belirteci olan pinopodlar embriyolar için tutunma alanları oluşturarak adezyon sürecine katılır (7). İmplantasyonun bu aşamasında luminal epitel hücrelerinin apikal membranı ile trofoblast hücrelerinin plazma membranları aralarında 20 nm'lik mesafe kalacak şekilde birbirlerine paralel olarak konumlanırlar. Her iki yüzeyde de ekspresyon düzeylerinde artış gözlenen adezyon molekülleri ve ligandları fetal-maternal etkileşimi gerçekleştirir (Şekil 2). Bu süreçte en önemli rolü üstlenen adezyon molekülü grubunu integrinler oluşturur. Hem luminal epitel hücrelerinin hem de trofoblastik hücrelerin yüzeyinde ekspresyonu gözlenen $\alpha 5\beta 3$ integrini ve ligandı osteopontin implantasyon aşamasındaki ilk hücre-hücre etkileşiminde görev alır (53). $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ ve $\alpha 5\beta 5$ integrinleride adezyon sürecine katılan diğer adezyon molekülleridir (57).

Blastosistin gelişimi için esas faktör olan E-kaderin, adezyon süresince trofoektoderm tarafından yüksek düzeylerde eksprese edilirken, adherens bağlantı komplekslerinin diğer elemanları ise luminal epitelin yüzeyinde eksprese olur. E-kaderinler bağlantı kompleksleri aracılığıyla gerçekleştirdiği homofilik hücre-hücre etkileşimi ile adezyon sürecine katılır (58). Kaderin ailesi üyelerinden olan Cad-11, adezyon sürecinde luminal epitel ile direkt etkileşime geçen sinsityotrofoblast ve ekstravillöz yapıdaki sitotrofoblast hücrelerin yüzeyinde lokalize olur. Luminal ve glandular epitel hücrelerinin yüzeyinde de eksprese olan Cad-11, blastosistin endometriyuma olan adezyonunda rol oynar (23).

Transmembranik bir protein olan trofinin, farklı hücreler arası homofilik bağlantılarda görev alır. Trofinin adezyon işlevini sitoplazmik proteinler olan tasin ve bystine bağlanarak oluşturduğu kompleks aracılığıyla gerçekleştirir. İmplantasyon süresince ve plasental gelişimin ilk dönemlerinde trofoblast hücreleri ve desidual hücrelerin yüzeyinde gözlenen trofinin kompleksi, implantasyon sürecinde yerini alır (59).



Şekil 2: İmplantasyon sürecinde rol oynayan adezyon moleküllerinin şematik gösterimi (12).

4.4.3. İnvazyon

İnvazyon; trofoblast ve epitelyal hücrelerden salınan laminin, fibronektin ve integrin gibi adezyon moleküllerinin etkileşimleri sonucu gerçekleşen adezyonun ardından, embriyonun endometriyumun bazal membranını yok ederek desidual değişimin gerçekleştiği stromaya geçtiği evredir (2). İnvazyon aşamasında ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yıkımı matriks metalloproteinazlarca (MMP) gerçekleştirilir. Ekspresyon düzeylerinde artış gözlenen MMP-2 ve MMP-9 invazyon aşamasında görev alır. MMP'lerin aktivitesi matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) tarafından kontrol edilir (60). Yüksek metastatik potansiyele sahip kanser hücreleri ile ilişkili sitokinlere dahil olan IL-6, hamileliğin ilk dönemlerinde amniyotik sıvıda gözlenmiştir. İnvaziv özellik gösteren sitotrofoblast hücreleri tarafından eksprese edilen IL-6, MMP-2 ve MMP-9'un ekstrasellüler matriks bileşenleri üzerindeki etkilerini arttırabilme özelliğine sahiptir (61, 62). İmplantasyon penceresi süresince luminal epitel hücreleri tarafından eksprese edilen LIF, sitotrofoblast hücreleri üzerinde eksprese olmuş reseptörlerine bağlanmasının ardından sitotrofoblast hücrelerinin sinsityotrofoblast hücrelerine farklılaşma sürecini indükleyerek invazyon aşamasında rol oynar. Endometriyal bezler tarafından da eksprese edilen LIF'in düşük ya da yüksek düzeydeki ekspresyonları açıklanamayan infertilitenin nedenleri arasındadır (56).

Blastosistin stromaya olan invazyonu birçok faktör tarafından sınırlandırılır. Desidua da maksimum seviyede eksprese edilen transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β),

ekspresyonunda artış sağladığı TIMP-1 aracılığıyla metalloproteinazlarca gerçekleştirilen invazyonu inhibe eder (2, 63). Sitotrofoblast hücreleri tarafından eksprese edilen insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2) blastosistin stromaya olan invazyonunu stimüle eder. Desidual hücreler tarafından eksprese edilen IGFBP-1 ise, yüksek affinite gösterdiği IGF peptidleri ile gerçekleştirdiği etkileşimler sonucu IGF'nin etkisini inhibe eder ve invazyonu durdurur (64). Sitotrofoblast hücrelerinin yüzeyinde eksprese olan $\alpha 5\beta 1$ integrini için RGD tanınma dizisi içeren IGFBP-1, $\alpha 5\beta 1$ integrini ile gerçekleştirdiği etkileşim sonucunda sitotrofoblastların invaziv etkisini ortadan kaldırır (2). Menstrual siklusun sekretuar fazında, IL-6 sitokin ailesinin üyelerinden biri olan IL-11, tüm endometriyal hücrelerde ve daha yüksek düzeylerde desidual hücrelerde eksprese edilmektedir. Etkilerini IL-11 reseptör α zinciri (IL-11R α) ve sinyalizasyon bileşeni transmembranik glikoprotein olan gp130'dan oluşan heterodimerik yapıdaki reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir (65). Desidual reaksiyonun ilerlemesi, desidual hücre sınırlarının kaybı ile karakterizedir. Yapılan bir deneyde ortama IL-11'in eklenmesinin ardından desidual hücrelerin sınırlarının kaybolduğunun gözlenmesi, IL-11'in desidualizasyon sürecinin ilerlemesinde rol aldığını göstermiştir. IL-11 reseptörünü kodlayan gende meydana gelen bir mutasyon sonucu desidual dokunun gelişiminde aksama gözlenmiştir. Trofoblastın stromaya olan invazyonunu kontrol eden desidual dokuda gerçekleşen defekt infertiliteye neden olmaktadır (51).

4.5. DESİDUALİZASYON

Endometriyal stromal kompartımanın, embriyonun implantasyonu ve plasentanın gelişimi için geçirmiş olduğu farklılaşma süreci desidualizasyon adını alır. Desidualizasyon terimi latince dökülmek anlamına gelen 'decidere' fiilinden köken almıştır. Desidualizasyonun gerçekleştiği stromal kompartımanda endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere değişimi yanında, spiral arterlerde genişleme ve anjiyogenezis, endometriyal bezlerde sekresyon fazına geçme ve artan sitokinlerin etkisiyle monosit ve uterus doğal öldürücü hücrelerinin ortama göçü gerçekleşmektedir (66). Desidual reaksiyon blastosistin varlığından bağımsız olarak gelişir. Trofoblastın stromaya olan invazyonu ve plasentanın gelişimi aşamalarında progesteron seviyesindeki artış desidual dokunun bütünlüğünü devam ettirir. Gebelik gerçekleşmemesi halinde, progesteron

seviyelerindeki düşüş kaskad sistemini tetikler ve menstrual kanamayla birlikte desidualizasyonun başladığı endometriyumun yüzeysel tabakası dökülür. Blastosistin uterustaki varlığında ise, desidualizasyon endometriyumun bazal kompartımanına doğru ilerlemektedir (67). 28 günlük menstrual siklus sürecinin 23. gününde endometriyal stromal hücreler morfolojik ve biyokimyasal farklılaşmalar geçirerek desidual hücelere dönüşmeye başlarlar (3). Değişim ilk olarak spiral arterler etrafındaki stromal hücrelerde gözlenir, ardından otokrin ve parakrin sinyal yolları ile tüm endometriyal kompartımana yayılır (68). Progesteron başta olmak üzere relaksin, cAMP, gonadotropinler, prostaglandin ve çeşitli büyüme faktörleri endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonunu indükler (3). Endometriyal stromal hücreler iğ şeklinde fibroblastik hücre fenotipine sahiptir. Değişim sürecinde ilk olarak hücrelerin nukleusları genişler ve sitoplazma miktarları artar. Ekspresyon özelliklerinden ötürü protein sentezi ve sekresyon işlevlerinin gerçekleşeceği golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum organellerinde de genişleme görülür. Desidual hücreler miyofibroblastik karaktere sahip polihedral bir görünüm kazanır (23, 66). Stromal kompartımandaki desidualizasyon ilerlerken, ekstrasellüler matriksteki farklılaşma ile birlikte desidual hücrelerin sınırları daha az belirgin hale gelir. Ekstrasellüler matriks esas olarak laminin, heparan sülfat, tip IV kollajen ve proteoglikanlardan zengin bir yapı kazanır (69). Değişim sonucunda desidual hücreler endometriyal stromal hücrelerden farklı olarak prolaktin, IGFBP-1 ve ekstrasellüler matriks proteinleri eksprese etmeye başlar (70). Ovulasyon sonrası progesteron seviyelerindeki yükselişin yaklaşık 10. gününde endometriyal stromal kompartımanın yüzeyinde gözlenen prolaktin, desidual değişimin ilk işaretçisidir. Gebelik esnasında, amniyon sıvısındaki prolaktin düzeylerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Hipofiz kaynaklı olan anne ve fetusa ait prolaktinden farklı bir moleküler yapı sergileyen amniyon sıvısındaki prolaktin, desidual hücreler tarafından eksprese edilmektedir. Desidual kaynaklı olan prolaktinin, amniyotik sıvı miktarının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (71). Desidual alanda fosforillenmiş şekilde bulunan IGFBP-1 ise, endometriyumun proliferasyonunu düzenleyen IGF-I üzerinde inaktif etki göstererek, endometriyal fiziyojyiyi belirlemede potansiyel etkiye sahiptir. IGFBP-1'in hücre göçünü ve adezyonunu stimüle etmesi, trofoblastın miyometriyuma invazyonunu ise inhibe etmesi diğer görevleri arasındadır (13, 72). Endometriyal stromal hücrelerin farklılaşma süreci ilk olarak implantasyon bölgesindeki stromal hücrelerde başlar ve ardından tüm

endometriyuma yayılır. Desidual hücre sayısının artması ile birlikte, desidualizasyon bölgesi üç farklı tabakalanma gösterir. Embriyonun implantasyonunun gerçekleştiği, plasentanın altında yer alan endometriyum desidua bazalis, abembriyonik alanda embriyonun üzerini örten endometriyum bölgesi desidua kapsülaris, implantasyon alanının dışında kalan miyometriyumun iç yüzeyini döşeyen endometriyum bölgesi ise desidua pariyetalis adını alır (49). Desidual doku, özellikle implantasyon ve erken gebelik süreçlerinde trofoblast hücreleri ve miyometriyum arasında immünolojik bir bariyer oluşturarak inflamatuvar sinyallere ve oksidatif strese karşı embriyoyu korumakla görevlidir (68).

4.5.1. İn Vitro Desidualizasyon Modelleri

Desidualizasyon üzerine yapılan ilk çalışmalarda, endometriyumdan elde edilen biyopsilerden oluşturulan primer hücre kültürleri kullanılmıştır. Biyopsi örneklerinin alınacağı hastaların işlemde önceki 3 ay içerisinde hormon tedavisi görmemiş olmasına, düzenli menstrual siklusa sahip olmasına ve endometriyal herhangi bir fonksiyon bozukluğunun olmamasına dikkat edilerek, endometriyuma ait doku parçaları iki farklı yöntemle elde edilir. Endometriyal doku örnekleri menstrual siklusun proliferatif veya sekresyon fazındaki hastalardan kürtaj yoluyla ya da benign jinekolojik nedenlerden ötürü histerektomi ameliyatı geçirecek olan hastalardan işlem sırasında alınabilmektedir. Toplanan endometriyal dokular antibiyotik içeren steril bir medyum içerisine alınır. Doku parçaları, kan hücrelerini uzaklaştırmak amacıyla iki kez medyum ile yıkanır. Seçilen doku örnekleri mekanik olarak küçük parçalara kesilmesinin ardından, kollajenaz ve deoksiribonükleaz-1 (DNaz-1) içeren medyum içerisinde 37 °C'de 1 saat inkübe edilerek enzimatik olarak parçalanır. İnkübasyonun ardından endometriyal hücreler filtre edilerek endometriyal stromal hücrelerin epiteliyal hücrelerden ayrıştırılması işlemi başlar. Filtre içerisinden geçen endometriyal stromal hücreler, santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet iki kez medyum ile yıkanır ve santrifüj edilir. Ardından plastik flasklara hücrelerin ekimi yapılır. Endometriyal stromal hücrelerin, epiteliyal hücrelere kıyasla yüzeye daha hızlı yapışma özelliğinden faydalanarak 30 dakikalık inkübasyonun ardından medyum aspire edilerek epiteliyal hücreler ortamdaki hücrelerden uzaklaştırılır (73, 74). Kültürdeki stromal hücre oranlarının belirlenmesi için vimentin (stromal hücreler için) ve

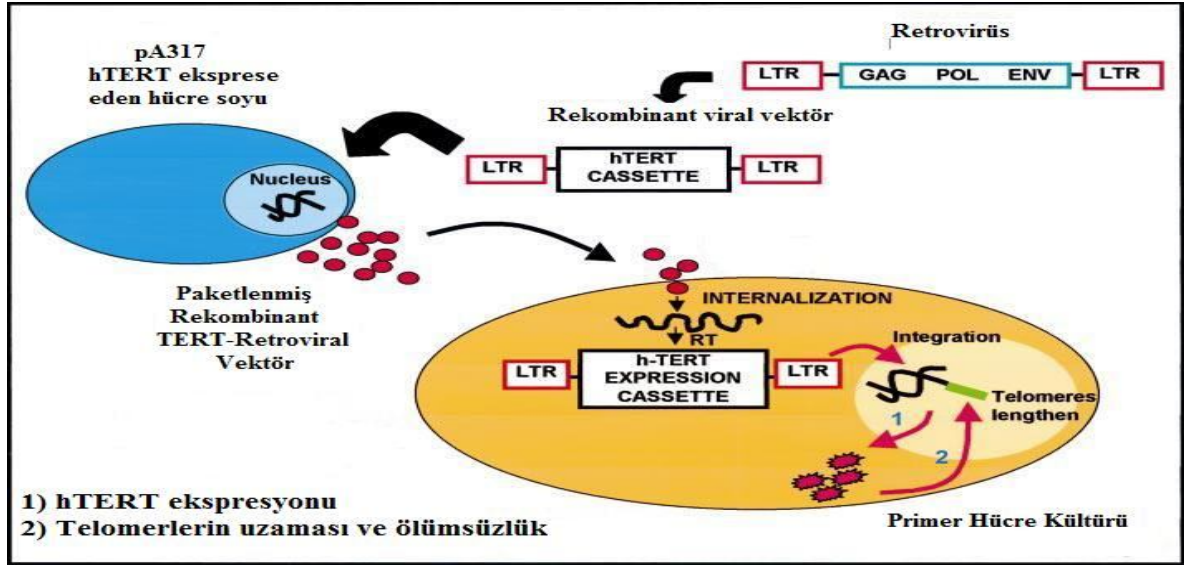
sitokeratin (epitelial hücreler için) immünohistokimyasal işaretleyici olarak kullanılabilir (69). Hücreler konfluent oluncaya kadar 37°C'de %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörlere yerleştirilir. Konfluent olan hücreler tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılır ve stromal hücrelerin kültür kaplarına ekimi gerçekleştirilir (70).

Laboratuvar koşullarında izole edilen endometriyal stromal hücreler, progesteron ve östrojen gibi steroid hormonların yanı sıra, yalnızca cAMP ile muamele edilerek desidualizasyon süreci oluşturulabilir (74). Desidualizasyon üzerine yapılan çalışmaların bir kısmında östrojen ve progesteronun süreci başlatmak için yeterli olduğu savunulurken, birçok çalışmada cAMP'nin steroid hormonlarla kombine edilerek kullanımı gözlenmiştir (70). Endometriyal stromal hücrelerin farklılaşma süreci, desidual hücrelere spesifik olan morfolojik ya da biyokimyasal değişimlere bakılarak kontrol edilebilir. Desidual hücrelerin morfolojik değişimi faz kontrast mikroskopunda gözlenebilir. Desidual hücreler tarafından üretilen prolaktin ve IGFBP-1'in kültür medyumundaki konsantrasyon düzeyleri biyokimyasal olarak ölçülerek, oluşturulan in vitro desidualizasyon hakkında bilgi sahibi olunabilir (3, 75).

Primer hücre kültürleri sınırlı bir bölünme yeteneğine sahiptir. Bu durum kromozomların ucunda yer alan DNA tekrar dizilerinin oluşturduğu telomer adlı yapıların, her replikasyon sonrası kısalması ile açıklanmaktadır. İnsanlarda ve diğer memelilerde TTAGGG telomer tekrar dizisi bulunur. Somatik hücrelere ait telomerler her bölünmenin ardından 10-200 baz çifti kısalır (76). Ters transkriptaz aktivitesine sahip katalitik bir alt birim (h TERT) ve telomerik DNA'nın sentezi için kalıp RNA taşıyan telomeraz enzimi, kromozomal DNA'nın 3' ucunda yer alan telomer tekrar dizisini bir birim öteye uzatarak telomer dizisinin kısalmasını önler (8).

Primer hücreler belirli bir bölünme kapasitesine sahip olduklarından ötürü uzun periyotlarda planlanan in vitro çalışmalar için elverişli değildir. Yapılan çalışmalarda hücrelerin yaşam sürelerinin belirlenmesinde mitotik bir saat olarak kabul edilen telomeraz enziminin, katalitik alt birimini kodlayan DNA parçasının primer hücrelere transfeksiyonu ile ölümsüz hücre soyları elde edilmiştir (Şekil 3). Retroviral sistem aracılığıyla gerçekleşen bu transfeksiyonun ardından oluşan yeni hücre soyları telomeraz ekspresyonuna başlayarak sınırsız bölünme yeteneği kazanır (77, 78). Hücre bankalarının laboratuvarlarında geliştirilen hücre soylarının yaşam koşulları, karyotipi, gösterdiği reaksiyonlar, ekspresyon değerleri, reseptör dağılımları gibi özellikleri belirlenerek, bu

merkezlerden dağıtımı gerçekleştirilmektedir. Hücre soyları geliştiren kişinin adıyla ya da kısaltılmış kod numaraları ile adlandırılmaktadır.



Şekil 3: Primer hücre kültürlerinin hTERT retroviral vektörler ile enfekte edilmesiyle geliştirilmiş yeni ölümsüz hücre soyları (79).

Geliştirilen hücre soyları primer hücre kültürlerine kıyasla birden fazla avantaj sunmuştur. İnsan hücreleri ile yapılacak olan çalışmalarda elde edilen doku parçaları ile geliştirilen primer kültürlerde, materyal toplanması sırasında hem uygun ve yeterli hasta sayısının bulunmasında hem de etik konularda birçok problemle karşı karşıya kalınmaktadır. Hücre soyları ile çalışmalara hemen başlanabilirken, primer hücrelerin doku parçalarından izole edilmesi süreci çalışma için büyük bir zaman kaybına sebep olmaktadır. Primer hücreler uzun periyotta oluşturulan protokollerde yaşamlarını yitirirken, telomerase ekspresyonu ile ölümsüz olma özelliği kazanan hücre soyları uzun süreli hazırlanan protokollerde reaksiyonlara yanıt oluşturabilmektedir. Primer hücre kültürlerinin elde edilebilmesi için birçok laboratuvar ekipmanı ve elemana ihtiyaç duyulurken, hücre soyları ile direkt olarak çalışmaya başlanabilmektedir.

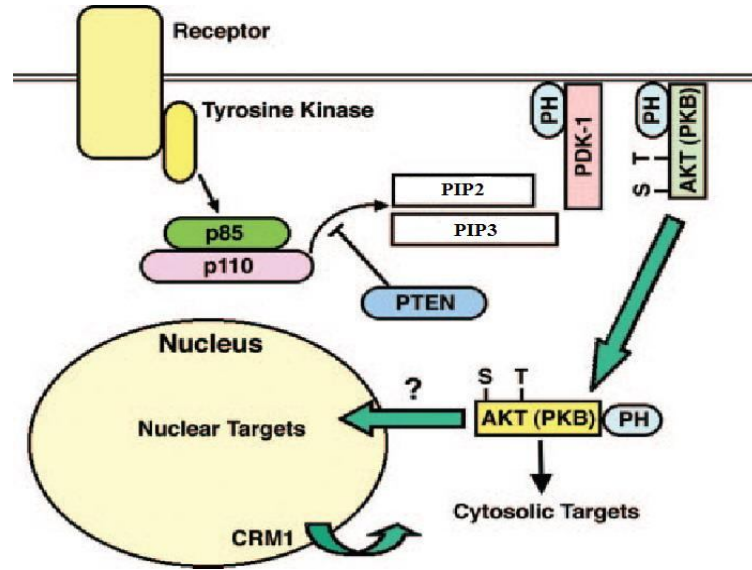
4.6. CRL-4003 HÜCRE SOYU

CRL-4003 hücreleri endometriyal stromal hücrelerden türetilmiştir. Uterusunda miyom bulunan hastalardan alınan biyopsi örnekleri ile hazırlanan primer hücrelere

telomeras enzimi transfeksiyonu ile elde edilen CRL-4003 hücreleri, fibroblast benzeri morfolojiye sahiptir. Primer hücreler gibi steroid hormonlara ve cAMP'ye yanıt oluşturarak desidual hücrelere farklılaşma özelliğine sahip olan CRL-4003 hücreleri, desidualizasyon çalışmalarında tercih edilen bir hücre soyudur (77, 80).

4.7. AKT SİNYALİZASYONU

Akt, bir protein-serin/treonin kinazdır. Protein kinaz B (PKB) olarak bilinen Akt, hücre içi sinyal iletiminde merkezi role sahip bir sinyal molekülüdür (81). Akt proteinlerin moleküler yapısı, bir N-terminal plekstrin homoloji bölgesi (PH), bir merkezi katalitik bölge ve bir C-terminal düzenleyici bölgeden oluşur. 14q32, 19q13, 1q43 kromozomlarında lokalize olmuş üç farklı gen tarafından kodlanan ve aynı yapısal özelliklere sahip Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) ve Akt3 (PKB γ) formları bulunmaktadır (82).



Şekil 4: AKT sinyalizasyonu (81)

Bir zar fosfolipidi olan, fosfatidilinositol 4, 5 bifosfat (PIP2), hücre içi sinyal iletiminde önemli bir yere sahip olan Akt gibi ikinci mesajcı yolların başlatılmasını sağlar. PIP2, fosfolipidlerin bir araya gelerek oluşturdukları çift tabakalı plazma membranının iç bölümünde nadir olarak rastlanan fosfolipidlerdendir (8). PIP2, fosfoinositid 3 kinaz (PI3K) enzimi tarafından üçüncü pozisyonundaki inositolünden fosforillenerek aktif formuna dönüşür. PI3K, 85kDa'luk bir SH2 bölgesi ve 110 kDa'luk

katalitik alt ünitelerden meydana gelir. PI3K enzimi, G proteinleri tarafından ya da SH2 bölgesine bağlanan reseptör protein-tirozin kinazlar tarafından aktive edilir. PIP2 fosforilasyonu sonucunda ikinci mesajcı olan fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfat (PIP3) oluşur. PIP3'ün hedefi, hücre sağ kalım sinyal iletiminde görev alan Akt'nin P13K sinyal yolağına girmesini sağlamaktır. PIP3, Akt'nin plekstrin homoloji bölgesine bağlanarak, Akt'nin plazma membranı iç yüzüne taşınmasını sağlar. Böylece diğer bir PIP3'e bağlı olarak bulunan fosfoinosit bağımlı kinaz-1 (PDK1) ile yakın konuma gelir. PDK1, Akt'yi fosforile ederek aktif hale getirir. Aktive olmuş Akt, sitozolde şaperon proteinleriyle etkileşim halinde olan birçok hedef molekülün fosforilasyonunda ya da nukleusa translokasyon olarak, hücre sağ kalımını düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri ve diğer protein kinazları içeren, çok sayıda hedef proteinin fosforillenmesinde görev alır (5, 8, 82).

Desidualizasyonda birden fazla hücre içi sinyal molekülünün görev aldığı bilinmesine rağmen, bu süreç tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Çeşitli hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesinde görev alan Akt molekülünün, endometrial stromal hücrelerdeki varlığının keşfi desidualizasyon sürecinde rolü olduğu olasılığını arttırmıştır.

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) T HESCs, ATCC CRL-4003
- 2) 17- β -estradiol, Sigma
- 3) Progesteron, Sigma P7556
- 4) DMEM/HAM's F12, Sigma D2906
- 5) cAMP, Sigma B5386
- 6) Goat ABC Staining system, Santa Cruz Sc-2023
- 7) Histostain Plus Kit, Invitrogen 85-8943
- 8) Anti- β catenin primer antikoru, Cell signalling Technology 9562
- 9) Anti-AKT primer antikoru, Santa Cruz Sc-1619
- 10) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 11) Premix, BD 354352
- 12) Charcoal Dextran Treated Fetal Bovine Serum, Hyclone SH30068.03
- 13) Puromycin, Sigma P8833
- 14) AEC Chromogen, Invitrogen TA-060-HAS
- 15) Mounting Medium, Labvision TA-060-UG
- 16) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 17) Na₂HPO₄, Riedel-de Hæn 81890
- 18) NaH₂PO₄, Riedel-de Hæn 8210A
- 19) Metanol, Riedel-de-Haen 24229
- 20) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 21) DMSO, Sigma D 2650

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Hücre Kültürü

İnsan endometriyal stroma hücrelerine telomeraz transfeksiyonu ile geliştirilmiş hücre soyu olan CRL-4003 hücreleri, 1/1 oranında Dulbecco's modified Eagle's/HAM's F12 medyum içerisinde 37°C de %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde kültüre edildi. Kültür medyumuna %1 premix ve %10 charcoal/dextran içeren fetal sığır serumu ilave edildi. Deneyleerde, kontrol grubu hücreler normal medyumları içerisinde tutuldu. CRL-4003 hücrelerinde in vitro desidualizasyonun oluşturulabilmesi amacıyla sadece östrojen, progesteron ve cAMP uygulanan gruplar ile östrojen ve progesteronun, östrojen, progesteron ve cAMP'nin birlikte uygulandığı dört farklı deney grubu oluşturuldu. Östrojen uygulanan deney gruplarında medyum içerisine 10nM 17-β-estradiol eklendi. Progesteron 1μM, cAMP ise 50 μM konsantrasyonda uygulandı.

5.2.2. Desidualizasyonun Belirlenmesi

Deney gruplarında üçüncü günün sonunda östrojen, progesteron ve cAMP'nin yalnız ve kombine etkileri sonucu oluşturduğu desidualizasyona ait morfolojik değişiklikler ışık mikroskopik olarak hematoksilenle boyanmış örneklerde değerlendirildi. Desidualizasyona ait biyokimyasal bir belirteç olan prolaktin değerleri ise üçüncü günün sonunda deney gruplarından toplanan medyum örneklerinde elektrokemiluminesan immün yöntemiyle Cobas e411 cihazında ölçüldü.

5.2.2.1. β-katenin İmmünohistokimyası

β-katenin ekspresyon düzey ve lokalizasyonlarının immünohistokimyasal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler -20 °C de metanol ile 5 dakika fikse edildi. Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek amacıyla non-immün serumla 20 dakika bloking işlemi uygulandı (Histostain Plus Kit, Invitrogen). Anti-β-katenin monoklonal primer antikoru ile 1 saat oda ısısında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında 20 dakika biyotinle işaretli sekonder antikor uygulandı. PBS yıkamalarını takiben streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübasyon yapıldı ve yıkamalar sonrasında

aminoetilkarbazol (AEC) kromojeni uygulandı. İnvirt mikroskopta yapılan incelemede spesifik renk reaksiyonu izlendikten sonra reaksiyon durduruldu ve su bazlı kapatma solüsyonuyla örnekler kapatıldı.

5.2.2.2. AKT İmmünohistokimyası

Akt sinyal molekülünün immünohistokimyasal incelemesi için hücreler lameller üzerine ekildikten 2 gün sonra PBS ile yıkayıp metanol ile 5 dakika -20°C de fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaları engellemek için non-immün serumla (Goat ABC Staining system, Santa Cruz) 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında anti-Akt monoklonal primer antikoru ile 1/150 dilüsyonda oda ısısında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından PBS yıkamalarını takiben biyotinle işaretli sekonder antikor 30 dakika uygulandı. PBS yıkamaları sonrasında AB enzim konjugatıyla (avidin ve biyotinli horseradish peroksidaz) 30 dakika inkübasyon yapıldı. Yıkamalar sonrasında diaminobenzidin (DAB) kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında invert mikroskopta yapılan kontrolün ardından 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra %70, %90, %96, %100 alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Toluenden geçirilen örnekler son olarak kapatma solüsyonuyla kapatıldı.

5.2.2.3. BrdU İmmünohistokimyası

Deney gruplarına ait hücrelerin proliferasyon oranlarının belirlenebilmesi için hücrelere; hücre siklusunun S fazına özgü bir işaretleyici olan bromodeoksiüridin (BrdU) 1mM eklenerek 37°C de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra, metanol ile fikse edilen hücrelerin, çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C de 30 dakika boyunca inkübe edildi ve takiben borat tampon ile (pH:8) nötralize edildi. PBS ile yapılan yıkamalar sonrası, spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için non-immün serumla 20 dakika bloklama işlemi uygulandı. Hücreler, anti-BrdU primer antikoru (Mouse monoclonal- NeoMarkers) ile 0.5/100 dilüsyonda, oda ısısında 1 saat boyunca bekletildi. Primer antikor uygulamasını takiben PBS ile yıkanan hücrelere, sırasıyla; biyotin-bağlı ve streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Histostain Plus Kit, Zymed) 20'şer dakika uygulandı. Spesifik renk reaksiyonunu görüntüleyebilmek amacıyla AEC kromojeni uygulandı.

5.2.3. Mikroskobik İnceleme

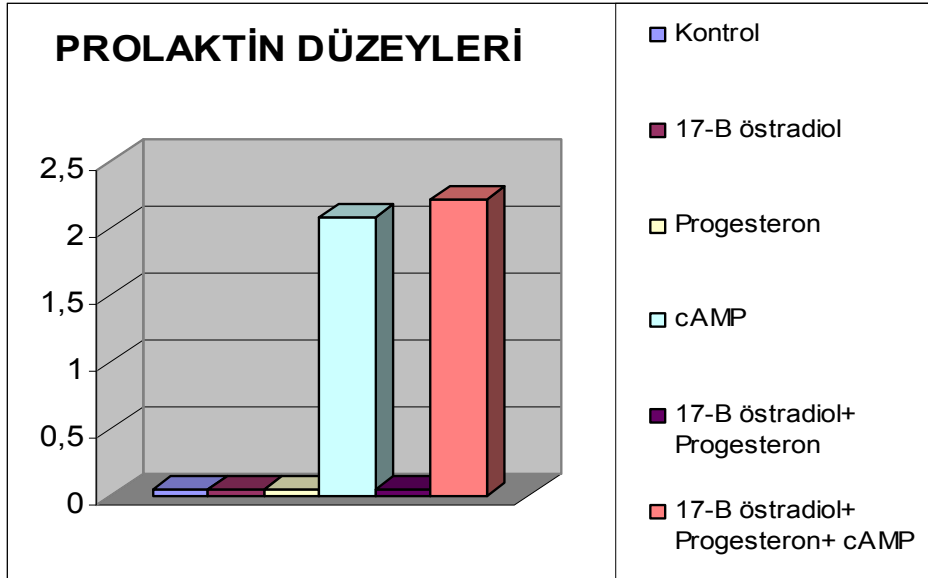
Çalışmalarda, kültüre edilen hücrelerin inceleme ve değerlendirmeleri Olympus X70 invert mikroskopta gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal olarak boyanan hücrelerin inceleme, değerlendirme ve fotoğraflandırma işlemleri ise Olympus BX 50 ışık mikroskobu yardımıyla gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

6.1. DESİDUALİZASYON

Desidualizasyona özgü değişikliklerin incelendiği çalışmamızda deney gruplarımızdan sadece cAMP uygulanan gruplarda morfolojik değişim izlendi. Değişim tipik iğsi stromal hücrelerin genişlemiş sitoplazmalarıyla kaldırım taşı görüntüsüne benzer morfolojik görünüm kazanmaları ile karakterizedydi (Resim 1).

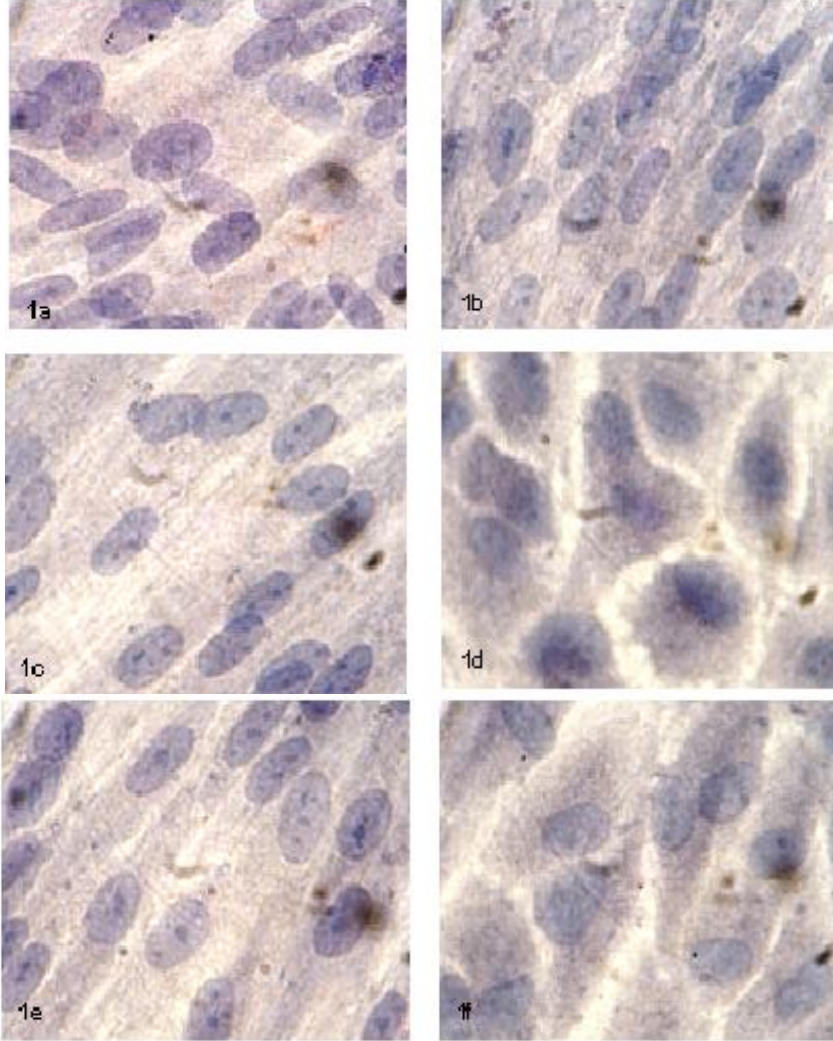
Işık mikroskobunda morfolojik bulguların değerlendirilmesinin yanı sıra biyokimyasal olarak prolaktin düzeyleri ölçülerek desidualizasyona özgü morfolojik değişiklikler teyit edildi. Desidualizasyon modeli gruplarından östradiol grubunda 0,056 (ng/mL), progesteron grubunda 0,051 (ng/mL), östradiol+progesteron uygulanan grupta ise 0,053 (ng/mL) prolaktin ölçüldü ve kontrol grubu değeri olan 0,049 (ng/mL)'ye çok yakın düzeyde üretim saptandı. Prolaktin düzeylerinin morfolojik desidualizasyon bulgularına paralel olarak cAMP ve östradiol+progesteron+cAMP uygulanan gruplarda sırasıyla 2,08 ve 2,22 (ng/mL) düzeylerine yükselmiş olduğu tespit edildi (Şekil 1).



Şekil 1: Kontrol ve deney gruplarında desidualizasyon farklılaşmasının belirteci prolaktin üretim düzeyleri.

6.2. β KATENİN EKSPRESYONU

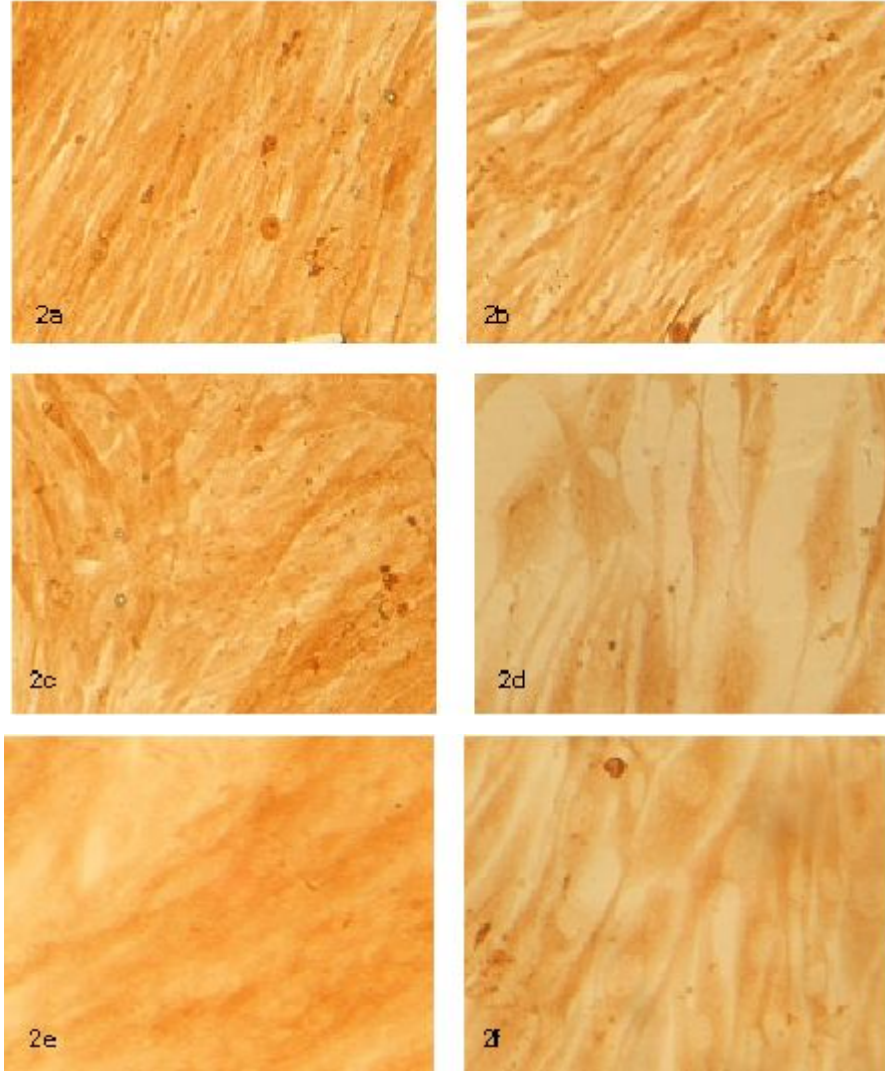
Kontrol ve deney gruplarında β katenin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde çalışma gruplarının hiç birinde β katenine özgü immünboyanma izlenmedi (Resim 1).



Resim 1: Deney gruplarında β katenin ekspresyonu izlenmedi. Kontrol grubu (1a), 17- β östradiol (1b), progesteron (1c), cAMP (1d) ve 17- β östradiol+progesteron (1e), 17- β östradiol+progesteron+cAMP (1f). cAMP uygulanan gruplarda (1d -1f) desidualizasyona ait morfolojik değişiklikler izlendi. Hematoksilen, X600.

6.3. AKT EKSPRESYONU

Normal ve patolojik pek çok biyolojik süreçte rol oynayan ve hücrenin yaşamsal döngüsü için önemli olan AKT sinyal yolu ve desidualizasyon ilişkisi incelendiğinde kontrol ve deney grupları arasında immünekspresyon seviyelerinde belirgin bir fark izlenmedi (Resim 2).

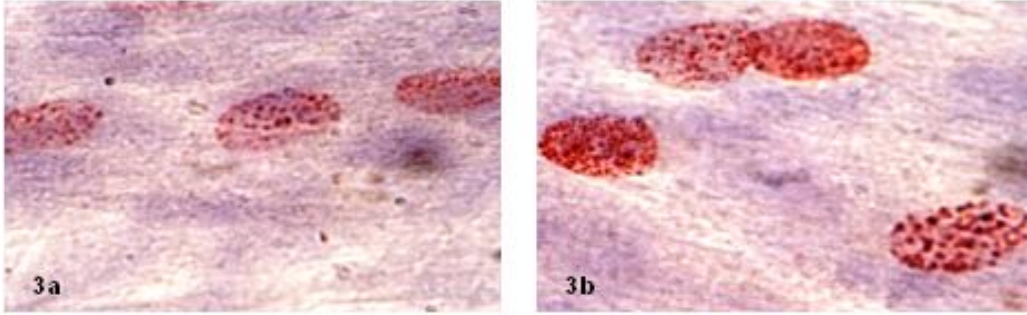


Resim 2: Deney gruplarında AKT ekspresyonu düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık izlenmedi. Kontrol grubu (2a), 17-β östradiol (2b), progesteron (2c), cAMP (2d) ve 17-β östradiol+progesteron (2e), 17-β östradiol+progesteron+cAMP (2f). X200.

6.4. STROMAL VE DESİDUAL HÜCRELERDE PROLİFERASYON

Östrojen, progesteron ve cAMP'nin farklı kombinasyonlarının uygulandığı deney gruplarında, stromal hücrelerde ve farklılaşma geçirmiş desidual hücrelerde proliferasyonun değerlendirilmesi amacıyla S fazındaki hücrelerin işaretlenmesi temeline dayanan BrdU immünohistokimyası uygulandı.

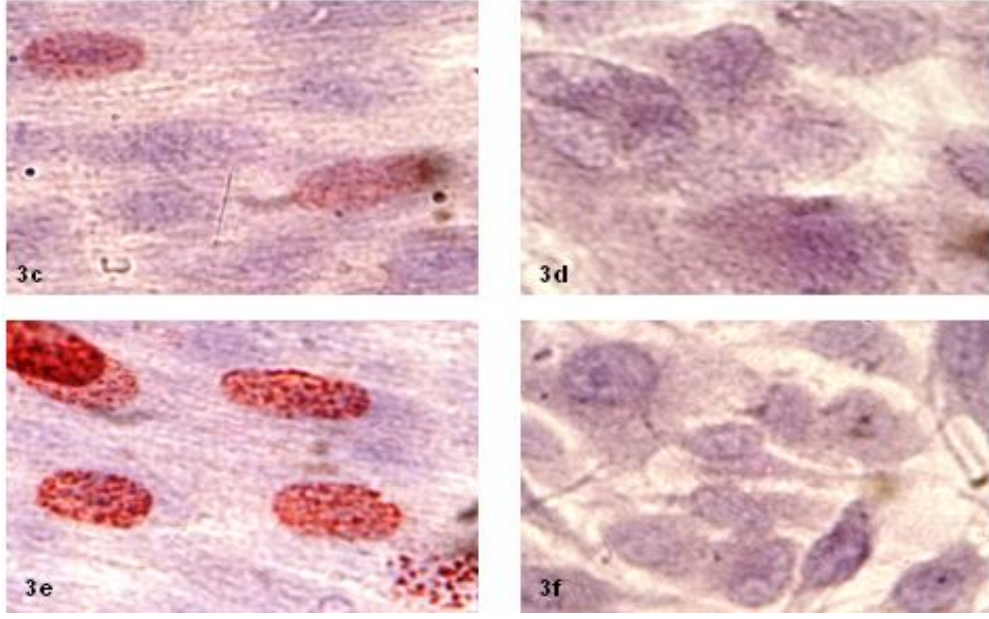
BrdU işaretli S faz hücre oranları değerlendirildiğinde; kontrol grubu (13.90 ± 3.92), 17- β -östradiol inkübasyonu uygulanan hücre grubu (17.10 ± 4.90) ile karşılaştırıldığında BrdU işaretli hücre oranında artış saptandı (Resim 3a ve 3b).



Resim 3a, b: Kontrol grubu endometriyal stromal hücrelerde BrdU işaretli S fazındaki hücreler (a). 17- β -östradiol inkübasyonu uygulanan östrojen grubu hücrelerde işaretli S faz hücreleri ve BrdU inkorporasyonunda artış izlenmekte (b). Hematoksilen, X600.

Progesteron uygulanan deney grubunda (12.10 ± 3.72) S fazındaki hücrelerin oranları kontrol grubuyla benzer bulunurken, 17- β östradiol + progesteron inkübasyonu uygulanan grupta (19.10 ± 5.50) S faz hücre oranında artış izlendi (Resim 3c ve 3e).

Desidualizasyona özgü morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin izlendiği cAMP ve östradiol+progesteron+cAMP gruplarında ise hiç BrdU işaretli hücre izlenmedi (Resim 3d ve 3f).



Resim 3c-f: BrdU pozitif S fazı işaretli proliferatif hücre oranları. Progesteron uygulanan endometriyal stromal hücreler kontrol grubuna benzer proliferatif hücre oranlarına sahipken (3c), 17- β östradiol + progesteron (3e) uygulanan deney grubunda östrojene bağlı işaretli S faz hücre oranında artış izlendi. Desidual değişimin izlendiği cAMP (3e) ve 17- β östradiol + progesteron + cAMP gruplarında (3f) BrdU işaretli hücre izlenmedi. Hematoksilen, X600.

7. TARTIŞMA

Endometriyum menstrual siklus süresince steroid hormonlara yanıt oluşturarak dökülen ve yenilenen kompleks bir dokudur. Granüloza hücrelerince salınan östrojenin kontrolü altında başlayan döngü, epiteliyal ve stromal hücrelerin proliferasyonunu içerir (2). Çalışmamızda sadece 17- β östradiol inkübasyonu uyguladığımız deney grubunun proliferasyon değeri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, işaretli S faz hücre oranının ve BrdU inkorporasyonunun arttığı izlenmiştir. Sekresyon evresinde salınımı başlayan korpus luteum kaynaklı progesteronun, östrojenin etkisini inhibe ederek proliferasyonu baskıladığını bildiren çalışmalar mevcuttur (42, 44). Çalışmamızda sadece progesteron uygulanan hücrelerin proliferasyon değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında inhibisyon gözlenmezken, östrojen ve progesteronun birlikte uygulandığı deney grubunda işaretli S faz hücre oranının ve BrdU inkorporasyonunun arttığı izlenmiştir. Bu sonuç bize, proliferasyonun başlamasında en önemli rolü östrojenin üstlendiğini düşündürmektedir. Endometriyal stromal hücrelerde, proliferasyon fazındaki östrojen kaynaklı ilk gelişimi takiben, progesteron etkisi ile çoğalmanın inhibe olduğu, hücresel değişimin başladığı bilinmektedir (42, 43). Desidual farklılaşmanın izlendiği sadece cAMP ve östrojen+progesteron+cAMP uygulanan deney gruplarında proliferasyon izlenmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç bize desidualizasyon sürecinde endometriyal stromal hücrelerde proliferasyonun durduğunu, morfolojik ve biyokimyasal değişimle karakterize olmuş desidual hücrelere farklılaşmanın başladığını göstermiştir.

Desidualizasyonun en önemli belirteci, desidual hücreler tarafından salınan prolaktin hormonudur. Ovulasyonun ardından yaklaşık 10. günde ortaya çıkan prolaktinin, amniyotik sıvının düzenlenmesinde ve desidualizasyonun devamlılığının sağlanmasında etkin rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur (71). İğsi bir forma sahip olan stromal hücreler farklılaşmanın ardından morfolojik olarak büyük yuvarlak kaldırım taşına benzer görünüme dönüşür (83). Oluşturduğumuz deney gruplarından 3. günde toplanan medyum örnekleri biyokimyasal olarak incelenerek kontrol grubu ile cAMP ve östrojen+progesteron+cAMP uygulanan gruplardaki prolaktin düzeyleri karşılaştırıldığında, desidualizasyonun gerçekleştiği gruplarda anlamlı şekilde artış bulunmuştur. Mikroskopik inceleme sonucu desidual hücrelerdeki morfolojik değişimin

belirlenmesinin yanı sıra prolaktinin biyokimyasal ölçümlerdeki varlığı in vitro desidualizasyonun oluşturulduğunu kanıtlamıştır.

Desidual hücreler üzerine yapılan çalışmaların bir kısmında östrojen+progesteronun birlikte kullanımının in vitro desidualizasyonun başlatılabilmesi için yeterli olduğu savunulurken (70), birçok çalışmada cAMP'nin steroid hormonlarla kombine edilerek kullanılması gerektiği öngörülmüştür (3). Çalışmamızda desidualizasyona özgü değişimin izlendiği deney gruplarına ait prolaktin değerleri sadece steroid hormonların uygulandığı deney grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulunmuştur. Bu sonuç bize in-vitro desidualizasyon oluşumunda cAMP veya cAMP içeren steroid hormon kombinasyonlarının uygun modeller olduğunu göstermiştir.

Adezyon moleküllerinin; hücreler arası kompleks bağlantı yapıları ile doku bütünlüğünün sağlanmasında, embriyonun luminal epitele olan adezyonunun gerçekleşmesinde, hücrelerdeki proliferasyon ve farklılaşmanın kontrolünde ve embriyogenezde etkin rol oynadığı bilinmektedir (6, 7).

Katenin ailesi üyelerinden olan β katenin, Wnt sinyal yolu aracılığıyla aktif hale gelmesinin ardından sitoplazmada birikir. Sitozolde yer alan β katenin, hücre membranı altında yerleşim göstererek hücre iskeleti elemanları ile adezyon molekülü olan kaderinler arasındaki zonula adherens bağlantısına katılır. Ayrıca nukleusa transloke olabilen β katenin, gen ekspresyonunda görev almaktadır (33, 36). β -kateninin hücre farklılaşması üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla oluşturulan in vitro desidualizasyon modellerine bakıldığında, Wnt sinyal yoluna ait wnt proteinlerin ekspresyon düzeylerinde, desidual değişimle birlikte izlenen bir artış bildirilmiştir (35). Wnt sinyal yolu inhibitörü olarak bilinen Dkk ekspresyon seviyelerinin incelendiği diğer bir çalışmada, sekresyon fazında en yüksek değerlerine ulaşan Dkk'nin, desidualizasyonun başlamasıyla birlikte ekspresyon düzeylerinde azalma izlenmiştir (37). Wnt sinyal yolunun steroid hormonların kontrolü altında olduğu düşünülerek yapılan bir çalışmada, progesteronun GSK-3 β ekspresyonunu azaltan etkisiyle Wnt sinyal yolunu aktif hale getirerek, endometriyal stromal hücrelerin sitozolünde β kateninin gözlemlendiği, ardından ortamda östrojenin varlığı ile birlikte sitozoldeki β kateninin nukleusa transloke olduğu bildirilmiştir (40). İn vitro desidualizasyon modellerinde β kateninin yaklaşık beş buçuk gün sonra sitozolde görüldüğü bildirilmiştir (39). Çalışmamızda stromal hücrelerden oluşan kontrol ve deney gruplarımızın 3. gündeki β katenin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, hiçbir çalışma

grubumuzda β katenine özgü immünboyanma izlenmedi. Bu bulgu, beş buçuk gün sonra desidual hücrelerde gözleendiği bildirilen β katenin ekspresyonunun 3. günde henüz başlamadığını ve desidualizasyon sürecinin erken evresinde rol oynamadığını düşündürmektedir.

Hücre içi sinyal iletiminde önemli bir yere sahip olan Akt molekülü, hücre gelişimi, apoptozis, protein ve glikojen sentezi gibi fizyolojik olaylarda görev alan intrasellüler sinyal molekülüdür. Zar fosfolipidlerinden olan PIP2, Akt molekülünün ikinci mesajcı olarak sinyal yolağına girmesini sağlar. PIP2'nin fosforile formu olan PIP3 aracılığıyla PDK1 tarafından fosforile olan Akt, aktif formuna dönüşerek birçok hedef proteinin fosforilasyonunda görev alır. Ayrıca Wnt sinyal yolağında β katenin fosforilasyonundan sorumlu olan GSK-3 β enziminin inhibisyonundan sorumlu olan Akt, sitozolde β katenin birikimini düzenler (5).

Akt ve desidualizasyon arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amacıyla yapılan çalışmalarda, desidual hücrelere farklılaşan endometriyal stromal hücrelerde Akt ve fosforile formu p-Akt varlığı izlenmiştir . İn-vitro model üzerinde incelenen total Akt miktarı sabit kalırken, p-Akt'nin azaldığı bildirilmiş, bunun nedeni olarak 10. kromozom üzerinde lokalize olmuş fosfataz ve tensin homolog geni (PTEN) gösterilmiştir (5,74). Desidual hücrelerde yüksek düzeyde eksprese olan PTEN, fosfataz aktivitesine sahiptir. PTEN, Akt fosforilasyonunu sağlayan PIP3'ü PIP2'ye dönüştürerek P-Akt oluşumunu engellemektedir. Bir diğer çalışmada stromal hücrelerde yalnızca Akt molekülünün var olduğu, p-Akt'nin izlenmediği bildirilmiştir (84). Stromal ve desidual hücrelerde Akt molekülünün tespiti amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, kontrol grubu ile deney gruplarında Akt varlığı gözlenmiş, ancak ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. Bu sonuç stromal hücrelerin yanı sıra desidual hücrelerde de Akt ekspresyonu gerçekleştiği hipotezini teyit etmiştir. Birçok hücre fonksiyonunun yerine getirilmesinde rol oynayan Akt sinyal molekülünün desidual hücrelerde izlenmesi farklılaşma sürecine katıldığını düşündürmektedir.

Desidualizasyon, sinyal molekülleri, büyüme faktörleri, adezyon molekülleri ve steroid hormonların bir arada işlev görmesiyle gerçekleşen kompleks bir süreçtir. İn-vitro desidualizasyon modelleri üzerinde yapılan çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılan bu süreç hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

8. SONUÇ

- Steroid hormonlara yanıt olarak siklik değişikliklere uğrayan endometriyum, oositin fertilize olma olasılığına karşı implantasyon için hazırlanır. Reseptif fazda ilk gelişimini tamamlayan stromal hücreler geç sekresyon evresinde morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirerek desidual hücrelere farklılaşmaya başlar. Desidualizasyon blastosistin varlığından bağımsız olarak gelişir.
- İn vitro desidualizasyonun oluşturulduğu deney grubunda stromal hücreler morfolojik görünüm olarak kaldırım taşına benzer bir yapı sergiledi. Morfolojik farklılaşmanın yanı sıra desidual hücreler tarafından eksprese edilen prolaktin değerlerinin biyokimyasal incelemesi sonucu anlamlı artış bulunması in vitro desidualizasyonun gerçekleştiğini kanıtladı.
- Çalışmamızda, 17-β östradiol uygulanan gruplarda, BrdU işaretli S faz hücre sayısında artış saptandı. Sadece progesteron uygulanan grupta proliferasyon oranında kontrol grubuna göre belirgin bir farklılık gözlenmezken, desidualizasyonun oluşturulduğu cAMP uygulanan gruplarda proliferasyonun tamamen inhibe olduğu saptandı.
- Farklılaşma sürecine katılan moleküllerden biri olarak düşünölen β kateninin desidual hücrelerdeki ekspresyonunun 3. günde henüz başlamadığı izlendi.
- Birçok hücreyel fonksiyonun yerine getirilmesinde rol alan Akt'nin immünositokimyasal ekspresyonunun, endometriyal stromal hücreler ve desidual hücrelerde değişiklik göstermediği belirlendi.
- Östrojen, progesteron ve cAMP kontrolünde gerçekleşen desidualizasyon sürecinde, endometriyal stromal hücrelerde proliferasyonun sonlandığı, desidual hücrelerce eksprese edilen β katenin ve Akt sinyal moleküllerinin diferansiyasyonun erken döneminde rol oynamadığı sonucuna varılmıştır.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimde ve tez çalışmam süresince desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen, deneylerimiz süresince yaşadığımız şanssızlıklara rağmen yılmayan kıymetli hocam Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e,

Çalışmamız için önemli bir bulgunun değerlendirilmesinde biyokimyasal ölçümlerimizi gerçekleştiren Doç. Dr. Uzey GÖRMÜŞ'e,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yanımda olan yardımını ve bilgisini benimle paylaşan değerli arkadaşım Bio. Melike ERSÖZ'e,

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Enstitü sekreterimiz sevgili arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na,

Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren, üzerimde sonsuz bir emeğe sahip sevgili annem, sevgili babam ve tüm ailem'e

TEŞEKKÜR EDERİM.

10. KAYNAKLAR

1. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 2006, 27:17-46.
2. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff MV. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update.* 2006, 12:617-630.
3. Kasahara K, Takakura K, Takebayashi K, Kimura F, Nakanishi K, Noda Y. The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:1281–1286.
4. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Axis: Wnt you like to know?. *Endocr Rev.* 2005, 26:898-915.
5. Stern DF. More than a marker. . . Phosphorylated Akt in prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:6407-6410.
6. Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules. *Vet Pathol.* 1997, 34:61-73.
7. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update.* 2006, 12:731–746.
8. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach.* Boston University, 2006
9. Atabekoğlu CS, Engin Y, Üstün Y, Aytaç R. Üreme fizyolojisi ve adezyon molekülleri. *Ankara Üniversitesi.* 2002, 55:85-92.
10. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines. *Cell* 2002, 110:673–687.
11. Ergüler G, Demir N, Demir R. Adezyon moleküllerinin yapısal özellikleri ve fonksiyonları. *T Klin J Med Sci.* 2002, 22:313-327.
12. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* 1997, 2:84-93.
13. Matsumoto H, Sakai K, Iwashita M. Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells via $\alpha 5\beta 1$ integrin. *Mol Hum Reprod.* 2008, 14:485-489.
14. Kayışlı ÜA, Asar M, Demir R. Ratlarda desidualizasyon süresince ekstrasellüler matriksin yeniden modellenmesinde laminin ve fibronektin ile reseptör altbirimleri integrin $\beta 4$ ve $\alpha 5$ 'in dağılımları ve muhtemel rolleri. *Turk J Biol.* 2000, 24:379-395.

15. Apparao KBC, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR, Lessey BA. Osteopontin and its receptor $\alpha v\beta 3$ integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:4991–5000.
16. Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod.* 2003, 69:1458-1471.
17. Sasaki CY, Lin H, Morin PJ, Longo DL. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res.* 2000, 60:7057–7065.
18. Yagi T, Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 2000,14:1169-1180.
19. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis *Genes Dev.* 2006, 20:3199-3214.
20. Sinha D, Wang Z, Price VR, Schwartz JH, Lieberthal W. Chemical anoxia of tubular cells induces activation of c-Src and its translocation to the zonula adherens. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003, 284:F488–F497.
21. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, 1:a002543.
22. Chen GTC, Getsios S, Maccalman CD. 17β -Estradiol potentiates the stimulatory effects of progesterone on cadherin-11 expression in cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1998, 139:3512–3519.
23. Maccalman CD, Furth EE, Omigbodun A, Bronner M, Coutifaris C, Strauss JF. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: A role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions?. *Dev Dyn.* 1996, 206:201-211.
24. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995, 9:866-873.
25. Asimakopoulos G, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann Thorac Surg.* 1998, 66:2135– 2144.
26. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003, 24:2166–2179.

27. Kunz B, Lierheimer R, Rader C, Spirig M, Ziegler U, Sonderegger P. Axonin-1/TAG-1 mediates cell-cell adhesion by a Cis-assisted trans-interaction. *J Biol Chem.* 2002, 277:4551–4557.
28. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tired L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, 104:1336-1342.
29. Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J, Schneider C. Dismantling cell–cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of β -Catenin. *J Cell Biol.* 1997, 139:759–771.
30. Willert K, Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 1998, 8:95–102.
31. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of β -Catenin adhesion and signaling functions. *Physiol.* 2007, 22:303–309.
32. Ougolkov A, Zhang B, Yamashita K, Bilim V, Mai M, Fuchs SY, Minamoto T. Associations among β -TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, β -Catenin, and NF- κ B in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004, 96:1161–1170.
33. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006, 281:22429–22433.
34. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998, 14:59–88.
35. Chen Q, Zhang Y, Lu J, Wang Q, Wang S, Cao Y, Wang H, Duan E. Embryo–uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Mol Hum Reprod.* 2009, 15:215–221.
36. Hagen T, Sethi JK, Foxwell N, Vidal-Puig A. Signalling activity of β -catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochem J.* 2004, 379:471–477.
37. Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbe NL, Suchanek E, Giudice LC. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91:1453–1461.
38. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *Embo J.* 1997, 16:3797-3804.

39. Herington JL, Bi J, Martin JD, Bany BM. β -Catenin (CTNNB1) in the mouse uterus during decidualization and the potential role of two pathways in regulating its degradation. *J Histochem Cytochem.* 2007, 55:963–974.
40. Rider V, Isuzugawa K, Twarog M, Jones S, Cameron B, Imakawa K, Fang J. Progesterone initiates Wnt- β -catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. *Endocr J.* 2006, 191:537-548.
41. Barberini F, Makabe S, Franchitto G, Correr S, Relucenti M, Heyn R, Familiari G. Ultrastructural dynamics of the human endometrium from 14 to 22 weeks of gestation. *Arch Histol Cytol.* 2007, 70:21-28.
42. Horne FM, Blithe DL. Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Hum Reprod Update.* 2007, 13:567-580.
43. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update.* 2000, 6:28–36.
44. Wang H, Critchley HOD, Kelly RW, Shen D, Baird DT. Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4:407–412.
45. Van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol.* 2009, 85:4–19.
46. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update.* 2009, 15:229-236.
47. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1999, 14:1328–1331.
48. Makrigiannakis A. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online.* 2007, 14:102-109.
49. Sadler TW. Langman’s Medical Embryology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
50. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998.
51. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 2005, 11:613-630.

52. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007, 13:365-377.
53. Dominguez F, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Simon C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J*. 2005, 19:1056–1060.
54. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD and Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal–fetal interface. *Science* 2003, 299:405–408.
55. Meseguer M., Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod*. 2001, 64:590–601.
56. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*. 2008, 14:335-344.
57. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004, 25:341–373.
58. Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, Yoshinaga K. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol*. 1999, 208:488–501.
59. Nadano D, Nakayama J, Matsuzawa S, Sato T, Matsuda T, Fukuda MN. Human tasin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. *Biochem J*. 2002, 364:669-677.
60. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004, 2:59.
61. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000, 14:2123–2133.
62. Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*. 1999, 5:1055–1058.
63. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK. Localization of transforming growth factor- β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod*. 1992, 46:561-572.

64. Fowler DJ, Nicolaides KH, Miell JP. Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 2000, 6:495–504.
65. Dimitriadis E, Salamonsen LA, Robb L. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod*. 2000, 6:907-914.
66. Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol*. 2003, 178:357–372.
67. Brosens J, Gellersen B. Death or survival-progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol*. 2006, 36:389–398.
68. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod*. 2010, 25:862-873.
69. Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod*. 1995, 52:609-615.
70. Brar AK, Kessler CA, Meyer AJ, Cedars MI, Jikihara H. Retinoic acid suppresses in-vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 1996, 2:185-193.
71. Kükner S, Danişman N, Yeşilyurt H, Ergin T, Gökmen O. Preeklampitik gebelerde kan ve amniyotik sıvı prolaktin düzeyleri. *Perinatoloji Dergisi*. 1993, 1:201-204.
72. Rutkute K, Nikolova-Karakashian MN. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 expression during aging. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007, 361:263–269.
73. Chatterjee A, Jana NR, Bhattacharya S. Stimulation of cyclic AMP, 17 β -estradiol and protein synthesis by human chorionic gonadotrophin in human endometrial cells. *Hum Reprod*. 1997, 12:1903-1908.
74. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2003, 9:265-269.
75. Ganef C, Chatel G, Munaut C, Frankenne F, Foidart JM, Winkler R. The IGF system in in-vitro human decidualization. *Mol Hum Reprod*. 2009, 15: 27-38.

76. Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, Hashimoto M, Niwa K, Tamaya T. Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4:173-177.
77. Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, Rahman M, Caze R, Qumsiyeh M, Lockwood CJ. A Novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progestational response. *Endocrinology* 2004, 145:2291–2296.
78. Samalecos A, Reimann K, Wittmann S, Schulte HM, Brosens JJ, Bamberger AM, Gellersen B. Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009, 7:76-87.
79. Condon J, Yin S, Mayhew B, Word RA, Wright WE, Shay JW, Rainey WE. Telomerase immortalization of human myometrial cells. *Biol Reprod.* 2002, 67:506-514.
80. Krikun G, Sakkas D, Schatz F, Buchwalder L, Hylton D, Tang C, Lockwood CJ. Endometrial angiopoietin expression and modulation by thrombin and steroid hormones. *Am J Pathol.* 2004, 164:2101–2107.
81. Shinohara M, Chung YJ, Saji M, Ringel MD. AKT in thyroid tumorigenesis and progression. *Endocrinology* 2007, 148:942–947.
82. Paez JG, Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT Pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res.* 2003, 115:145-167.
83. Mizuno K, Tanaka T, Umesaki N, Ogita S. Establishment and characterization of in vitro decidualization in normal human endometrial stromal cells. *Osaka City Med J.* 1998, 44:105-115.
84. Zhang Q, Liu SH, Erikson M, Lewis M, Unemori E. Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells. *J Cell Biochem.* 2002, 85:536-544.