T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SEBEBİ AÇIKLANAMAYAN İNFERTİL OLGULARDA Wnt/β-KATENİN YOLAĞININ YERİ ve ÖNEMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Burcu KARA

DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER

Manisa - 2010

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Emine Esra NAL'ın Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı **" İmmunohistokimyasal Olarak DNA Fragmantasyonu ve Glycodelin Dağılımının sperm Morfolojisi ve Hasta Kliniği İle İlişkisi"** başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretmenliğini ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek KABUL kararı verilmiştir. 12/01/2011

Jüri Üyesi İmza
Prof. Dr. Sevinç İNAN (Tez Danışmanı)

Jüri Üyesi İmza
Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU

Jüri Üyesi İmza
Yrd. Doç. Dr. Enis CEZAYİRLİ

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun …/…/…. tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Yüksek lisans eğitimim boyunca, manevi desteği ile her an yanımda olan, engin bilgi ve deneyimi ile yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve bu tezin ortaya çıkmasında en büyük pay sahibi değerli ve çok sevgili hocam sayın Doç. Dr. Seda VATANSEVER'e,

Her zaman bilgi birikiminden yararlanabildiğim sevgili hocam, Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Sevinç İNAN'a, deneyimleri ile bizlere her zaman yeni bakış açısı kazandıran sayın hocam Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN'e ve bölümdeki her türlü sıkıntımızı dinleyen, bazı anlarda farklı yaklaşımları ile bizleri neşelendiren sayın hocam Doç. Dr. İbrahim TUĞLU'ya,

Yüksek lisans eğitimine birlikte başladığımız ve asistanlık süreci boyunca yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli asistan arkadaşım Emine Esra NAL'a ve yine birlikte çalıştığım diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezimin deney aşamasında, örneklerimi elde etme konusunda oldukça katkıları ve yardımları olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Polikinliği asistan ve uzmanlarına, sayın Doç. Dr. Yeşim BAYTUR ve sayın Yrd. Doç. Dr. Yıldız UYAR'a

Sıkıntılı zamanlarımda, tüm fedakarlığı ile yardımlarıma koşan ve sabrını, desteğini her an yanımda hissettiğim değerli eşim Emre Efe TIRPANCI'ya,

Maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana verdikleri emeklerin ve sabrın karşılığını asla ödeyemeyeceğim canım, annem, babam ve kardeşime, en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Günümüze kadar tanımlanmış 19 adet farklı tipi bulunan Wnt ailesinin üyeleri, hücre polaritesinin belirlenmesi, çoğalması, apoptozis ve hücre göçünü içine alan hem embriyonik hem de patolojik olayların kontrolünde görev alır. Wnt sinyali iki ana mekanizma tarafından kontrol edilir. Birincisi hücre yüzeyinde bulunan Frizzled (Fzd) reseptörü ile oluşan Wnt/Fzd kompleksinin Dishevelled (Dvl) aktive etmesi sonucunda, glikojen sentaz kinaz-3β (GSK-3β) fosforilasyonu ile β-kateninin komplekse bağlanmasını sağlayan Axin aktivasyonudur. Böylelikle β-katenin hücre içerisinde çekirdeği aktive ederek gen transkripsiyonunun başlamasını sağlar. İkincisi ise β-kateninden bağımsız gerçekleşen yolak olup, Dvl aktive edilerek hücre içerisindeki profilin, Rac ve Rho aktivasyonu sonucunda sitoplazmik olaylar kontrol edilir. Hücre transkripsiyonunu etkilemeden sitoplazmik olarak Wnt sinyal yolağının, epiteliyal-mezenşimal hücrelar arası iletişimde de rol oynadığından bu yolak, hem implantasyon hem de endometriyal siklusda araştırma konusu olmuştur.

Başarılı bir impalantasyon; implantasyon aşamasına gelmiş blastokist ve reseptif uterusa bağlıdır. İmplantasyon sırasında hem embriyodan hem de endometriyumdan salgılanan faktörler implantasyonun gerçekleşmesinde esas rol oynayan etmenlerdir. İnfertil vakalarda ovaryum ve/veya sperme ait problemlerin yanısıra, fertilizasyon gerçekleşmesine rağmen implantasyonun gerçekleşmediği durumlar, sebebi açıklanamayan infertil vakalar olarak değerlendirilir. Wnt/β-katenin yolağının normal endometriyal siklusun proliferasyon ve erken sekresyon evrelerinde ekspresyonları daha önceki çalışmalarda gösterilmesine rağmen, sebebi açıklanamayan infertil vakalarda endometriyal ekspresyonuna ait literatür bilgisine rastlanmamıştır. Çalışmada, sebebi açıklanamayan infertil olgularda endometriyal siklusun proliferasyon ve sekresyon evrelerinde Wnt/β-katenin sinyal yolağınun varlığı ve rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç ile kontrol ve infertil grubu hastaların proliferasyon ve sekresyon döneminde alınan örnekleri, %10 luk formalin solüsyonu içinde tespit edildikten sonra rutin parafin takip protokolü uygulandı. Alınan kesitler histokimyasal analiz

için hematoksilen-eozin ile boyanır iken, Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 dağılımları indirekt immunoperoksidaz yöntemi ve in situ hibridizasyon tekniği ile incelendi.

Histokimyasal analiz sonucunda, lumen ve bez epitellerinin her iki grupta ve her iki mentsrual fazda histolojik özelliklerini taşıdıkları izlendi.

İmmunohistokimyasal analiz sonucunda, Wnt7a dağılımının proliferasyon döneminde, infertil olgularda luminal epitelde, kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu, bununla beraber sekresyon döneminde kontrol grubundaki negatifliğe rağmen, infertil olgularda sekresyon döneminde luminal epitelde ekspresyonun olduğu gözlendi. β-katenin immunoreaktivitesinin ise hem kontrol hem de infertil gruplarda proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde, luminal ve bez epiteli ile birlikte stromada da negatif olduğu saptandı. Fzd6 immunoreaktivitesi kontrol ve infertil gruplarda proliferasyon döneminde stromada gözlenir iken, her iki grupta diğer bölgelerde immunoreaktivitelerin benzer olduğu izlendi. Dkk1 immunoreaktivitesi ise her iki grup ve her üç bölgede hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde benzer olduğu ve pozitif şiddette olduğu saptandı.

İn situ hibridizasyon analizi sonucunda, Wnt7a ekspresyonunun her iki grupta proliferasyon döneminde luminal ve bez epitellerinde farklı iken, stromada benzer idi. Sekresyon döneminde luminal epitelde Wnt7a ekspresyonu infertil gruplarda daha fazla iken, bez epiteli ve stromadaki Wnt7a ekspresyonlarının kontrol grubu ile benzer olduğu saptandı. β-katenin ekspresyonları her iki grupta proliferasyon dönemide luminal ve bez epitellerinde farklılık olduğu gözlenirken, stromada her iki grupta da ekspresyonun olmadığı izlendi. Sekresyon döneminde luminal ve bez epitelinde β-katenin ekspresyonunun infertil gruplarda, kontrol grubuna oranla daha fazla iken, stromadaki β-katenin ekspresyonlarının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği saptandı. Fzd6 ekspresyonunun hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde her iki grupta da benzer olduğu izlendi. Dkk1 ekspresyonunda her iki grupta ve her iki dönemde benzer olduğu saptandı.

Bu bulgular sonucunda, Wnt7a proliferasyon döneminde salgılandığı ve endometriyumu implantasyon için hazırladığı, fakat, infertil olgularda da Wnt7a'nın

salgısının kontrol grubuna oranla daha fazla olması, Wnt7a'nın epiteliyal ekspresyonu, embriyonun maternal doku tarafından reseptivitesi için gerekli olduğunu düşündürdü. β-katenin ekspresyonun kontrol ile infertil gruplar arasında fark gözlenmemesi, infertil olgularda değişmediğini gösterdi. Fzd6 ekspresyonun her iki grupta benzer ve esas olarak stromada olması, implantasyon aşamasında adezyonunu tamamlamış embriyonun stromal dokuda ilerleyebilmesi için gerekli olduğu düşündürdü. O nedenle infertil olgularda hem epiteliyal Wnt7a, hem de stromal Fzd6 ekspresyonundaki azalmadan dolayı implantasyon başarısız olmuş olabilir. Buna ilaveten, infertil gruplarda hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde Dkk1 ekspresyonunun negatif olması, Wnt7a ekspresyonuda az olmasına bağlı olarak inhibitör salgısının tetiklenemediğini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: Wnt, β-katenin, Fzd, Dkk, implantasyon, infertilite, immunohistokimya, in situ hibridizasyon.

ABSTRACT

To date, the members of Wnt family, which are 19 different types, play a role during cell polarity, proliferation, apoptosis and cell migration during control of both embryonic and pathologic conditions. Signaling of Wnt is control with two different pathways. The first one that the activation of Dishevelled (Dvl) via occurring of Wnt/Fzd complex after triggering of Frizzled (Fzd) cell surface receptor is activate the actin, which provide the connection of β-catenin to complex after fosforilation of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β). After that, the β-katenin trigger to nucleus and transcription starts. The second one that, it is β-catenin independent pathway and activate profillin, Rac and Rho and then cytoplasmic pathways for cell differentiation is controlled. Because of the role of the Wnt signaling pathways during epithelial-mesenchimal cell interaction without triggering of cell transcription, it was evaluated during both implantation and endometriyal cycles.

Success of the implantation depends on blastocytes which processed for implantation and receptive uterus. Secretion of growth factors from both embryo and endometriyum play a role during implantation. In infertility, as well as problems of ovarian and/or sperm, in some cases, fertilization complete, but, implantation can not be occur. In this situation called unexplained infertility. While Wnt/ β-catenin signaling pathway was observed in proliferation and early secretion phases of normal endometriyal cycle in previous studies, there was still no information about expressing of them in unexplained infertile patients endometriyum. In this study, the role and distribution of Wnt/ β-catenin signaling pathway were aimed in proliferation and early secretion phases of endometriyal samples from unexplained infertile patients.

The proliferation and secretion phase samples from control and infertile patients were done routine paraffin embedding protocol after fixing in 10% formalin solution. The sections were stained with hematoxylene-eosine for histochemical analyses, distribution of Wnt7a, β-catenin, Fzd6 and Dkk1 was examined using indirect immunohistochemistry and in situ hibridization tecniques.

After histochemical analyses, epithelium both luminal and glandular was

observed histological features in both proliferative and early secretory phases.

After Immunohistochemical analysis, the distribution of Wnt7a in the luminal epthelium during proliferation phase was more detectable control groups then infertile patients, however, despite the negativity in the control group in the secretion phase, the expression was observed in luminal epithelium during the secretuar phase of infertile patients. The immunoreactivity of β-catenin in both the proliferative and secretory phases in both control and infertile groups was negative in the luminal and glandular epithelium with the stroma. In proliferative phase, the immunoreactivity of Fzd6 was detectable in stroma in both control and infertile groups, the immunoreactivity was found to be similar in both groups. İmmunoreactivity of Dkk1, in both groups and all three regions was similar during both proliferation and secretion phase and the intensity of immunoreactivity was moderate.

After in situ hybridization analysis, the expression of Wnt7a was different in the luminal and glandular epithelium of both groups during in the proliferation phase, while it was similar in stroma. In secretory phase the expression of Wnt7a was higher in the luminal epithelium in infertile groups, the expression in glandular epithelium was similar with control groups. β-catenin expressions was different in luminal and glandular epithelium from both groups in proliferative phase, the expression was negative in stroma. In secrotory phase, β-catenin expression in the luminal and glandular epithelium was higher in infertile group than the control group, while β-catenin expression in stroma was similar with the control group. The expression of Fzd6 was similar in both proliferation and secretory phase in both groups. Dkk1 expression was similar in both groups and in both phases.

As a result, Wnt7a was secreted during proliferation phase and prepared to endometriyum for implantation, but, in infertile patients the increased of secretion of Wnt7a than control group, epithelial expression of Wnt7a was need for maternal receptivity for embryo. β-catenin expression is observed no difference between control and infertile groups, showed that it was not changed in infertile group. The expression of Fzd6 was similar in both groups, mainly in stroma, it was required

for invasion of embryo which completed adhesion. Therefore, because of decreased expression of both the epithelial Wnt7a and stromal Fzd6 in infertile patients, the implantation may be failed. In addition, the infertile groups, during both the proliferative and secretory phase, the expression of Dkk1 was negative, depending on decreased Wnt7a suggests that the secretion was inhibited.

Key words: Wnt, β-catenin, Fzd, Dkk, implantation, infertility, immunohistochemistry, in situ hybridization

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR …….. I
ÖZET …….. II
ABSTRACT…….. V
İÇİNDEKİLER……... VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ …….. XI
RESİMLER DİZİNİ …… XII
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ…… XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ……. 1
1.1. Dişi Üreme Sistemi…….. 6
1.1.1. Ovaryum……..... 7
1.1.2. Korpus luteum…… 8
1.1.3. Tuba uterina…… 9
1.1.4. Uterus…….. 10
1.1.4.1. Perimetriyum……..... 11
1.1.4.2. Miyometriyum…….. 11
1.1.4.3. Endometriyum……. 11
1.1.5. Fertilizasyon…… 17
1.1.6. Zigotun yarıklanması……. 21
1.1.7. İmplantasyon…….. 22
1.1.7.1. İmplantasyon mekanizması…….. 24
1.1.7.2. İmplantasyonu kontrol eden endometriyal ve embriyonal faktörler…… 26
1.2. Doğurganlığı Etkileyen Faktörler ve İnfertilite…….. 29
1.2.1. İnfertilite…… 29
1.2.2. İnfertilite nedenleri……. 30
1.2.3. Sebebi açıklanamayan infertilite……. 31
1.3. Wnt Proteini…….. 32
1.4. β –katenin……. 33

1.5. Fzd Reseptörü…….. 34
1.6. Dkk İnhibitörü…… 34
1.7. Wnt Sinyal Mekanizması…… 35
1.7.1. β –katenin bağımlı Wnt sinyal yolağı (Kanonikal yolak)…… 36
1.7.2. β –katenin bağımsız Wnt sinyal yolağı (Non-kanonikal yolak)…… 37
1.8. Wnt Proteininin Salgılanması……. 40
1.8.1. Wnt proteinlerinin hücreler arası taşınması ……... 41
1.9. Wnt Alımı …….. 41
1.10. Sitoplazmadaki Kanonikal Wnt Sinyalizasyonu ……. 42
1.11. Çekirdekte Oluşan Kanonikal Wnt Sinyalizasyonu…… 43
1.12. Wnt-β-katenin Yolağının İmplantasyon ve Embriyonik Gelişimde Yeri ve Önemi…… 45
2. GEREÇ VE YÖNTEM…… 47
2.1. Örneklerin Eldesi…….. 47
2.2. Örneklerin Hazırlanması……. 50
2.3. Histokimyasal İnceleme…….. 51
2.4. İmmunohistokimyasal İnceleme…… 52
2.5. İn Situ Hibridizasyon Tekniği ile İnceleme…….. 54
2.6. İstatistiksel Değerlendirme……. 56
2.7. Kullanılan Kimyasallar…… 56
3. BULGULAR…… 58
3.1. Histokimyasal Sonuçlar…….. 58
3.2. İmmunohisokimyasal Sonuçlar …… 59
3.2.1. Wnt7a immunoreaktivitesi…… 60
3.2.2. β-katenin immunoreaktivitesi…… 62
3.2.3. Fzd6 immunoreaktivitesi…… 64
3.2.4. Dkk1 immunoreaktivitesi…… 67
3.3. İn Situ Hibridizasyon Analiz Sonuçları…… 74

3.3.1. Wnt7a ekspresyonu……... 74
3.3.2. β- katenin ekspresyonu……. 77
3.3.3. Fzd6 ekspresyonu…….. 80
3.3.4. Dkk1 ekspresyonu…….. 83
4. TARTIŞMA……... 89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 102
6. KAYNAKLAR…….. 106

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC : Adenomatosis poliposis coli

DAP : Diaminobenzidin kromojen

DEPC : Dietilprokarbonat

Dvl/Dsh : Dishevelled

EGF-R : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü

FSH : Follikül Stimüle Eden Hormon

Fzd : Frizzled

GIFT: Gamet Intrafallopian Transfer

GnRH : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

GSK3 β : Glikojen Sentetaz Kinaz 3 Beta

HB-EGF: Heparin Bağlı Epiteliyal Büyüme Faktörü Benzeri Faktör

HCG : İnsan Koryonik Gonadotropini

IVF : İn Vitro Fertilization

LH: Luteinize Edici Hormon

PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu

PCP: Planar Cell Polarity

ROCK: Rho Kinaz

SRY: Seks Belirleyen Y Bölgesi

TBF: Testis Belirleyici Faktör

TCF/LEF : T Hücre Transkripsiyon Faktörü/ Lenfoid Çogaltıcı Faktör

TGF-α: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-α

Wls: Wntless

Wnt: Wingless Protein

β-TrCP β: Transdusin Tekrarları içeren Protein β

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: β-katenin'in tetiklediği mekanizmalar…….. 2

Şekil 1.2: Wnt sinyalinin yokluğunda (a) ve varlığında (b) gerçekleşen mekanizmalar……. 3

Şekil 1.3: Follikül gelişimi ve korpus luteum…… 9

Şekil 1.4: Ovarin ve Endometriyal Siklus……. 14

Şekil 1.5: Endometriyal Siklusun Hormonal Kontrolü…… 17

Şekil 1.6: Fertilizasyon ve Tuba Uterinanın Ampulla Bölgesi……... 18

Şekil 1.7: Fertilizasyon…… 20

Şekil 1.8: Zigotun Yarıklanması……. 21

Şekil 1.9: Trofoblast ve İç Hücre Kitlesi 22

Şekil 1.10: İmplantasyon sırasında blastokistin pozisyonu ve endometriyuma invazyonu…….. 24

Şekil 1.11: İmplantasyonun apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarında oluşan ardışık üç evresi…….. 25

Şekil 1.12: İmplantasyon Sırasında Fötal ve Maternal Faktörler…….. 28

Şekil 1.13: Wnt varlığında ve yokluğundaki sinyalizasyon mekanizmaları. 36

Şekil 1.14: Kanonikal Yolak…… 37

Şekil 1.15: Non-kanonikal veya β-kateninden bağımsız yolağın birincisi Planar cell polarity (PCP) yolağı……. 38

Şekil 1.16: Wnt/ Kalsiyum Sinyali……... 39

Şekil 1.17: Wnt Üretiminde Çoklu Geçişli Transmembran Proteinleri……. 41

Şekil 1.18: Wnt'nin Çeşitli Moleküller ile Etkileşimi……. 42

Şekil 1.19: Sitoplazmadaki Kanonikal Wnt yolağı…… 43

Şekil 1.20: Wnt Sinyalimde Nüklear Faktörler…….. 44

Şekil 4.1: Kontrol grubunda prolifersyon ve sekresyon fazında endometriyumdan salınan faktörlerin immunoreaktivitesinin dağılımları….. 97

Şekil 4.2: İnfertil grubunda prolifersyon ve sekresyon fazında endometriyumdan salınan faktörlerin immunoreaktivitesinin dağılımları….. 97

Şekil 4.3: Kontrol grubunda prolifersyon ve sekresyon fazında endometriyumdan salınan faktörlerin ekspresyonlarının dağılımları……. 98

Şekil 4.4: İnfertil grubunda prolifersyon ve sekresyon fazında endometriyumdan salınan faktörlerin immunoreaktivitesinin dağılımları….. 98

RESİM VE TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.1: Kontrol Grubu Hastalara Ait Bilgiler…….. 48

Tablo 2.1.2: İnfertil Grubu Hastalara Ait Bilgiler…… 49

Tablo 2.2: Parafin Takibi Protokolü……. 50

Tablo 2.3: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü…….. 51

Tablo 2.4.1: İndirek İmmunohistokimya Protokolü…… 53

Tablo 2.4.2: İmmunohistokimya Analizinde Kullanılan Antikorlar…… 54

Tablo 2.5.1: İn Situ Hibridizasyon Protokolü……. 55

Tablo 2.5.2: İn Situ Hibridizasyon Analizinde Kullanılan Problar…… 56

Resim 3.1: Kontrol ve infertil gruplara ait proliferasyon ve sekresyon dönemlerindeki endometriyumun histokimyasal görünümü. X400…….. 60

Resim 3.2: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Wnt7a immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400.. 61

Resim 3.3: İnfertil grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Wnt7a immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400.. 62

Resim 3.4: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki β-katenin immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı X400…….. 63

Resim 3.5: İnfertil grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki β-katenin immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı X400…….. 64

Resim 3.6: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Fzd6 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı X400…. 66

Resim 3.7: İnfertill grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Fzd6 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı X400…. 67

Resim 3.8: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Dkk1 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı X400…. 69

Resim 3.9: İnfertil grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Dkk1 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı X400…. 70

Resim 3.10: Kontrol infertil ve grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki immunohistokimya boyamasının negatif kontrolleri X400…. 71

Tablo 3.1: Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon ve sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 immunohistokimyasal yoğunluklarının dağılımları……. 72

Tablo 3.2: Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon ve sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 immunohistokimyasal dağılımlarının HSCORE değerleri……. 73

Resim 3.11: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Wnt7a ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları X400…….. 76

Resim 3.12: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Wnt7a ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları X400……. 77

Resim 3.13: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait β-katenin ekpresyonunun luminal be bez epitelindeki dağılımları X400…….. 79

Resim 3.14: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait β-katenin ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400... 80

Resim 3.15: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Fzd6 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400. ……... 82

Resim 3.16: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Fzd6 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400…… 83

Resim 3.17: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Dkk1 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400……. 85

Resim 3.18: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Dkk1 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400…… 86

Resim 3.19: İnfertil ve kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki, in situ hibridizasyon tekniği ile negatif kontrol boyamaları. X400……. 87

Tablo 3.3: Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde alınan örneklerde, in situ hibridizasyon tekniği sonucu Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 ekspresyonlarının dağılımları…….. 88

1. GİRİŞ VE AMAÇ

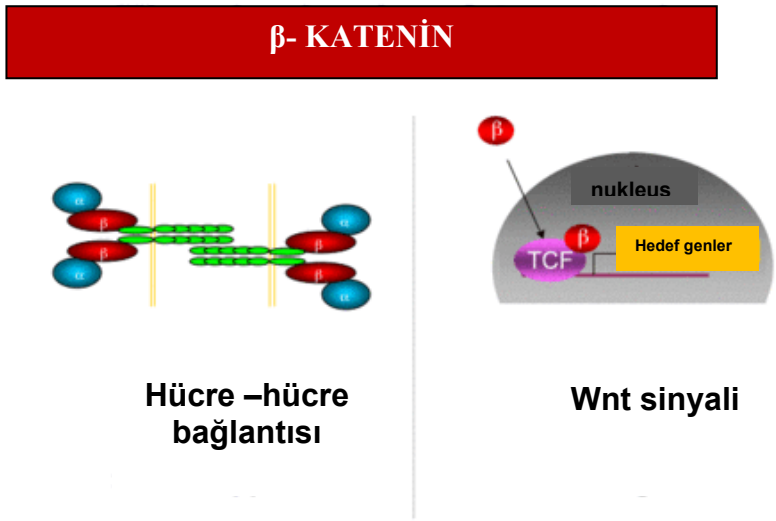
Wnt geni, yaklaşık 25 yıl önce ilk olarak int-1 adı ile farenin tümörlü meme dokusundan klonlanmış olan bir gen olup daha sonra Drosophila'da bulunan Wingless geninin int-1 geni ile sekans ve fonksiyon benzerliği gösterdiği saptanarak, 1991 yılında bu iki gen ismi birleştirilmiş ve literatüre Wnt geni olarak geçmiştir (1,2).

Günümüze kadar insanda tanımlanmış olan 19 adet Wnt geni bulunmaktadır (1,2). Bu genler evrimsel açıdan oldukça korunmuştur. Örneğin, insanda bulunan Wnt1 geni tarafından kodlanan proteinin, farelerde % 98 oranında aminoasit benzerliği gösterdiği saptanmıştır (3). Wnt genleri tarafından kodlanan Wnt protein ailesi üyelerinden her biri, yaklaşık 350 aminoasitten meydana gelmiştir ve 23-25 adet sistein rezidusune sahiptir. Wnt polipeptid zinciri oluştuktan sonra, N terminalinde bulunan hidrofobik sinyal sekansları ile endoplazmik retikulum (ER)'a hedeflenir. Son şeklini almamış olan Wnt, ER'de ve Golgi 'de çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar geçirerek Wnt sinyal yolağında görev alacak hale gelir (4).

Wnt sinyal yolağı, embriyonik gelişim süresi boyunca, hücre polaritesinin belirlenmesi, hücre çoğalması, apoptozis, hücre göçü ve organogenez gibi gelişim süreçlerinin işleyişini kontrol eden bir yolaktır (5). Embriyonik gelişim sürecinde Wnt sinyal yolakları ve antagonistlerinin ekspresyonu değişmekle birlikte, bölgesel farklılıklar gözlenmektedir. Embriyonik gelişim dışında Wnt sinyal yolakları, kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, primer kemik oluşumu, karsinogenez, kök hücrelerin yenilenmesi gibi birçok hücresel olayın düzenlenmesinde de rol oynar (5).

β-katenin, birçok fonksiyona sahip adaptör protein veya transkripsiyon faktörüdür (6). Hücreler arası sıkı bağlantılarda E-kaderin kompleksinin tamamlayıcı bir bileşenidir. Hücre içinde biriken β-katenin başlıca iki mekanizmayı tetikler (6). Bunlardan birincisi, hücre membranındaki N-kaderin'in hücre içi bölümüne bağlanarak, hücreler arasındaki bağlantıyı güçlendirip

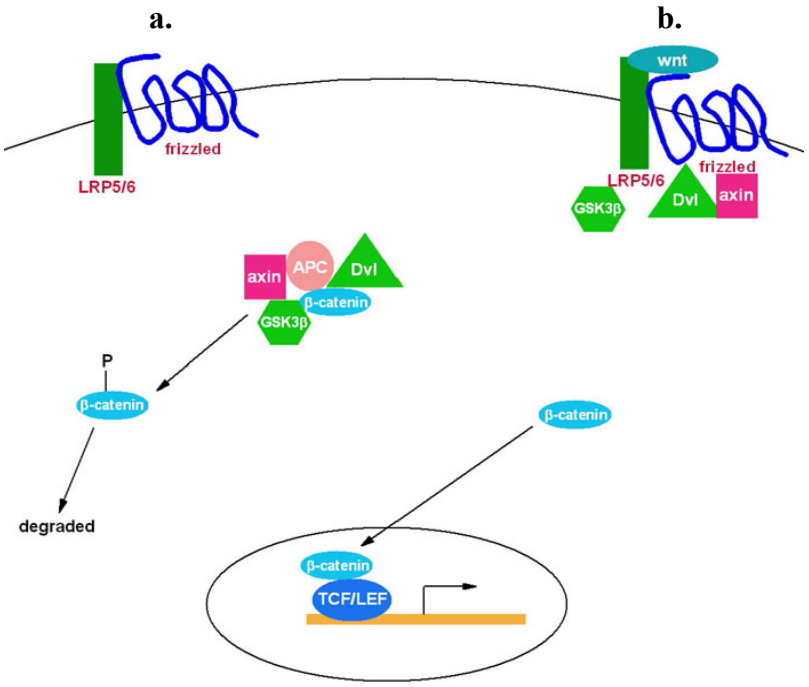
stabilizasyonu gerçekleştirmek, ikincisi ise, hücre çekirdeği içine girerek "TCF/LEF' transkripsiyon faktörlerine bağlanarak, Wnt sinyal yolağınun hedef aldığı genlerin transkripsiyonlarına olanak sağlamak olarak iki tür mekanizmayı aktive eder (Şekil 1.1) (5, 7).



Şekil 1.1: β-katenin'in tetiklediği mekanizmalar (8)

Wnt/β-katenin sinyal mekanizması inaktif veya aktif durumda olabilir. İnaktif Wnt sinyal yolağında, Wnt hücre zarındaki Fzd ve LRP5/6 reseptorlerine bağlanamaz (9,10). Dolayısıyla, sinyal mekanizmasının aktivasyonunda önemli rol oynayan fosforillenme işlemi gerçekleşemez. Fosforillenme reaksiyonları gerçekleşmediği için, yıkıcı kompleks aktif durumdadır. Bu yıkıcı komplekse, sitozolde bulunan β-katenin bağlanır ve aktif halde bulunan GSK3 tarafından fosforillenir. Sonuçta, çekirdeğe girecek β-katenin ortamda olmadığından sinyal yolağınun hedef genlerinin transkripsiyonu baskılanmış olur. Bu durumda, Wnt sinyal yolağı inaktif halde bulunmuş olacaktır (10-13). Aktif Wnt sinyal yolağında, Wnt'nin hedef hücre zarında bulunan reseptorlerine bağlanması ile, hücrede fosforillenme reaksiyonu uyarılır. β-katenini fosforolize eden kompleks bu reaksiyonlar sonucu parçalanır. Fosforillenmeyen β-katenin, proteozomlarda

parçalanamaz ve sitozolde birikir. Biriken β-kateninin bir kısmı, çekirdek zarından çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktörlerini (TCF/LEF-1) aktive eder ve Wnt sinyal yolağının hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 1.2) (11). Bu aktivasyonla, hem sinyal yolağında gorev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir, hem de proliferasyonda, hücre siklusunda, farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur (11, 13, 14). Sitozolde biriken β-kateninin diğer bir kısmı ise hücreler arası bağlantıda önemli rol oynayan E-kaderinin sitozol içindeki kısmına bağlanır (14, 15).



Şekil 1.2: Wnt sinyalinin yokluğunda (a) ve varlığında (b) gerçekleşen mekanizmalar (16)

Wnt sinyal yolakları, kanonikal veya β-katenin bağımlı yolak ve non-kanonikal veya β-katenin bağımsız yolak olmak üzere iki ayrı mekanizmayı içerir (5). Kanonikal veya β-katenin bağımlı yolak, çekirdekte zonula adherens ile ilişkili β-katenin proteininin birikimi sonucu translokasyonun tetiklenmesidir. Tüm çok hücreli organizmalarda, hücre kaderinin belirlenmesi ve aksis tanımlanmasında etkilidir (5). Non-kanonikal yolak veya β-katenin'den bağımsız

yolak olarak tanımlanmaktadır ve iki farklı sınıfa ayrılır. Bunlar, Planar cell polarity (PCP) yolağı veya Wnt/Ca yolağıdır (4). Planar cell polarity (PCP) yolağı, non-kanonikal Wnt yolağının, büyüme ve nöral tüp kapanması boyunca hücre polaritesi ve dorsal mezodermal hücrelerin hareketinde de düzenleyici olduğu gösterilmiştir (5). Wnt/Ca yolağı, mekanizmasının çok iyi bilinmesede, özellikle omurgalı erken fötal dönemde hücre göçü ile ilgili genlerin ekspresyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak Wnt ve ilgili moleküllerin aktivasyonu ile hücresel birçok olay kontrol edilebilmektedir, hem embriyonik hem de erişkin dönemde, birçok ciddi hastalıkların oluşum sürecinde rol oynadığı düşünülen Wnt sinyal yolağının ve bu yolda rol oynayan moleküllerin aydınlatılması oldukça önemlidir (4).

Wnt sinyali, endometriyal ve plasental fonksiyonlarda, endometriyal ve gebelik ile ilişkili hastalıklarda gözlenen değişikliklerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (18). Ayrıca, overlerin gelişimi ve fonksiyonlarında ve burada bulunan değişik hücre tiplerinin farklanmasında da önemli rolü vardır (19). Bununla beraber Wnt/β-katenin sinyal yolağındaki kontrolsüz salınımın, ovarian granüloza hücre tümör gelişimine neden olduğu da gösterilmiştir (20).

Endometriyumunda, Wnt ailesi genlerinin ve inhibitörlerin farklı ekspresyonları, menstrual siklusun proliferasyon ve sekresyon fazları sırasında, epitel ve/veya stromadan salgılandığı gösterilmiştir (18). Örneğin, Wnt7a insan endometriyumunda luminal epitelden ekprese olduğu, bez epiteli ve stromada daha az eksprese edildiği ve proliferasyon ve sekresyon fazlarında anlamlı bir bir farklılık olmadığı yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir. β-katenin endometriyal siklusun hem proliferasyon hem de sekresyon fazı boyunca bez epitelinde ve stromada artmış olarak şiddetli eksprese edildiği belirtilmiştir (18). Fzd6 ekspresyonu hem proliferasyon hem de sekresyon fazlarında, bez epitelinde stromaya göre daha fazla olduğu gösterilmiştir(18). Dkk1 siklusun sekresyon fazının ortalarına doğru artış gösterdiği, Dkk1'in pregesterona bağlı indüksiyonunda Wnt sinyali inhibe olduğu, bu da desidulizasyonda yolağın baskılanmasında rol oynadığı belirtilmiştir (18).

İmplantasyonda ise Wnt sinyal yolağı hem uterusdan hem de uterusa ulaşmış blastokist tarafından indüklenir (20). Periimplantasyon periodu boyunca uterusta sinyal aktivitesinin dinamik bir yapısı olduğu da gösterilmiştir (20).

Uterustaki Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivasyonu, implantasyondan önce embriyodan salınan sinyaller ile tetiklendiği gösterilmiş olup, uterustaki faaliyet göstermeyen blastokistin tekrar aktive olması ve Wnt/β-katenin sinyalinin tetiklenmesi için östrojen enjeksiyonunun gerekli olduğu bulunmuştur (20). Özellikle Wnt7a ekspresyonunun implantasyon sırasında olduğu, bununla beraber implantasyon sırasında sFRP proteinlerinin Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (22).

Wnt/β-katenin sinyali blastokist tam olarak yapıştığı anda endometriyumda geçici bir aktiviteye sahiptir (20). Embriyonun bulunduğu alanda luminal epitelde Wnt/β-katenin sinyal aktivitesi, endometriyal bezlerde de tespit edilmiştir. Bu sonuçlar endometriyal bezlerdeki Wnt/β-katenin sinyal aktivasyonu direk olarak blastokist ile ilişkili olmadığını, fakat embriyo varlığında uterusundaki salgının daha fazla olduğunu göstermektedir. Uterusda blastoksit varlığında gözlenen Wnt/β-katenin sinyali sadece blastokistin bulunduğu yerde saptandığından buradaki sinyalin ve aktivasyonun embriyonun varlığına bağlı olduğu düşünülmüştür (20).

İmplantasyon sırasında endometriyumda gözlenen farklı moleküler düzenlenme sayesinde blastokistin endometriyuma yapışması ve adezyonu gerçekleşir (20). İmplantasyon sırasında blastokistten salgılanan faktörlerinde önemi olmasına rağmen, endometriyal düzenlenim ve embriyonun kabul edilebilirliği daha önemlidir (20). O nedenle endometriyumdan salgılanan implantasyon öncesi faktörlerin belirlenmesi ve analizi implantasyonun değerlendirilebilmesine katkı sağlayacaktır.

İnfertilite kliniklerine başvuran hastalarda, kadın veya erkeğe ait patoloji saptanmamasına rağmen, spontan fertilizasyon ve/veya implantasyon başarızlığından dolayı gebelik gerçekleşememektedir (26). Bununla beraber aşılama veya in vitro sperm enjeksiyonu uygulaması sonrasında embriyonik gelişim sağlanmasına rağmen bazı hastalarda da implantasyonun

gerçekleşememesinden dolayı gebelik oluşamamaktadır. Endometriyumun proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerindeki moleküler dağılımın belirlenmesi ve endometriyumu implantasyona hazırlayıcı tedavilerin uygulanması sonrasında bu moleküllerin dağılımlarının analizi, tedavinin etkinliği ve endometriyumun implantasyona hazırlığının belirlenmesinde önemli yarar sağlayabileceği düşünülmüştür.

Endometriyumun implantasyona hazırlık evresi olan proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde Wnt ve sinyalinde rol oynayan moleküllerin dağılımı bilinmesine rağmen, açıklanamayan infertilite vakalarında bu moleküllerin yeri ve dağılımı konusunda açıklayıcı literatür bilgisi bulunmaması üzerine, çalışmada sebebi açıklanamayan infertil vakalarda Wnt yolağının implantasyonun hazırlık evrelerindeki dağılımın kontrol grupları ile karşılaştırılmalı analizi amaçlanmıştır.

1.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi, internal yerleşimli bir çift ovaryum ve ovaryumlardan uterusa geçişi sağlayan bir çift uterus tüpünden (tuba uterina) oluşur. Uterusun devamında serviks ve vajina bulunmaktadır.

Erişkin dişinin seksüel hayatı boyunca (30-35 yıl), üreme organları üreme yaşamı boyunca hem yapısal hem fonksiyonel olarak siklik değişiklikler gösterir. İnsanlarda bu değişikliklere menstrual siklus adı verilir. Menstrual siklus; temel olarak adenohipofizden salgılanan Follikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH) ile ovaryumlardan salgılanan östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilir (27). Mestrual siklus ortalama 28 gün sürer ve menopoz denilen ovulasyon süresinin bitimine (45-55 yaşlara) kadar her ay devam eder. Bu dönemde ovaryumlarda oosit üretimi durur, oosit üretimini aktive edecek hormonal düzenleme gittikçe zayıflayarak etkinliğini kaybeder (7).

Dişi üreme sistemi organlarının hepsi bir çok önemli görevi yerine getirir. Bunlar; cinsiyet hormonlarının salgılanması, oosit gelişimi ve fertilizasyon için uygun ortamın sağlanması, blastokistlerin taşınması ve implantasyonu, gebelik boyunca fetusun gelişimi ve yenidoğanın beslenmesidir (27).

1.1.1. Ovaryum

Ovaryumlar, uterusun her iki lateral pelvik duvarına yakın yerleşimli, üreme bezleridir, üretikleri östrojen ve progesteron sayesinde sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişiminden ve gebeliğin kontrolünden aynı zamanda oosit üretiminden ve korunmasında görev alırlar (28).

Ovaryumlar, gametogenez ile gametleri, steroidogenez ile steroidleri üretmek üzere iki önemli işlev için özelleşmişlerdir. Oogenez ile oositleri steroidogenez ile östrojen ve progesteronu oluştururlar. Östrojen, iç ve dış genital organların gelişmesi büyümesi ve olgunlaşması için gereklidir. Ayrıca dişi seks karakterlerinin özelliklerinin belirlenmesinde, meme bezlerinin gelişmesinde ve yağ dokusunun birikiminin yönlendirilmesinde rol oynar (7). Progesteron hormonu, fertilizasyondan sonra uterus endometriyumunu implantasyona ve gebeliğe hazır duruma getirir. Gebeliğin daha ileri dönemlerinde de, meme bezlerinin laktasyon dönemi için gelişmesini sağlar. Fertilizasyon ve implantasyon olmaması halinde progesteron hormonunun eksikliği uterus endometriyumunun stratum fonksiyonalis kısmının dökülmesine ve tekrar yenilenmesine yardımcı olur. Bu iki hormonun etkisi ilk döngüsel değişikliklerinin düzensizleşip, zaman içinde tamamen kaybolduğu süreye (menapoz) kadar azalarak devam eder (7).

FSH ve LH ovaryumlarda, follikül gelişimi, ovulasyon, korpus luteum oluşması gibi siklik değişikliklere neden olur, buna ovaryum siklusu denir. Her siklusta FSH birkaç primordial follikülün primer folliküle dönüşmesine neden olur. Genellikle primer folliküllerin sadece bir tanesi olgun folliküle dönüşür (6). Her ay 4-11 follikül dejenere olur. Folliküllerin gelişiminde, primer follikülün boyutları arttıkça, komşu stromal yapı bir kapsüle dönüşür. Teka follikülü, içteki damardan zengin bez yapısındaki tabaka ve dıştaki kapsül benzeri tabaka olmak üzere iki tabakaya farklanır. Teka hücrelerinin, follikül gelişimi sırasında beslenmeyi sağlamak için teka internadaki anjiyogenezisi uyaran kan damarı büyütücü faktörü ürettikleri düşünülmektedir (28). Follikül hücreleri aktif olarak bölünür ve oosit etrafında çok katlı bir tabaka oluşturur. Daha sonra, hücreler etrafında sıvı dolu boşluklar oluşur, bunlar tek boşluk oluşturmak üzere birleşir,

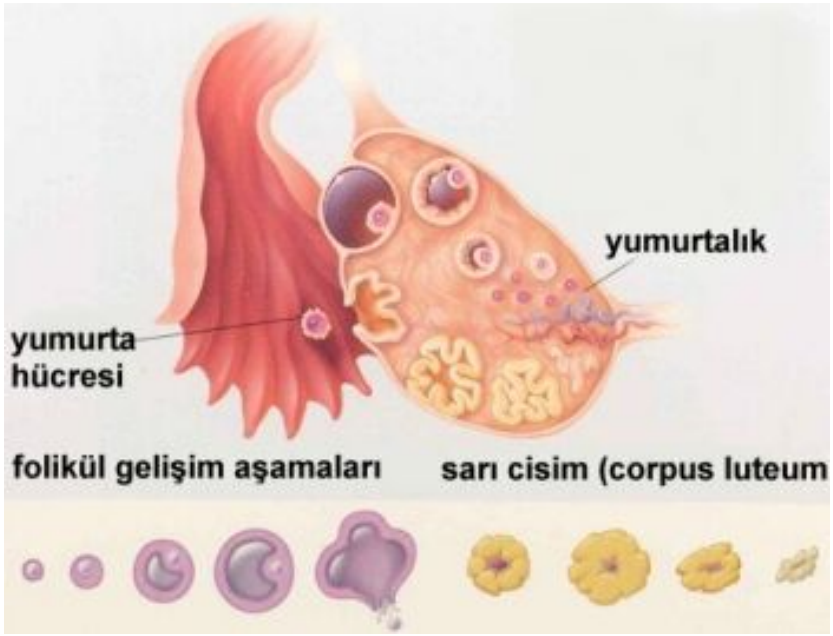
antrum adı verilen bu boşluk meydana gelir ve bu boşluk follikül sıvısı içerir. Ovaryum follikülü, antrum oluştuktan sonra sekonder follikül adını alır. Primer oosit follikülün bir tarafına itilerek, burada follikül hücre kitlesi tarafından çevrelenmiştir. Kumulus ooforus adı verilen bu hücre kitlesi genişlemiş antruma doğru uzanır. Follikül olgunlaşana kadar büyür ve ovaryum yüzeyinde bir kabartı oluşturur ve bu oluşan folliküle tersiyer veya graaf follikülü adı verilir. Ovaryum folliküllerinin erken gelişimi FSH uyarısıyla olur. Ancak olgunlaşmanın son aşamaları için aynı zamanda LH da gerekir. Büyüyen follikül üreme organlarının gelişimini ve fonksiyonunu düzenleyen bir hormon olan östrojen üretir. Üretilen östrojenin bir kısmı geniş bir dağılım gösteren stromal sekretuar hücrelerde üretilir, bunların tümü ovaryumun intertisiyel bezleri olarak bilinir (7, 28).

Ovulasyon, siklusun ortasına doğru (ortalama menstrual siklusun 14. Günü) ovaryum follikülü FSH ve LH etkisiyle ani bir büyüme gösterir ve ovaryum yüzeyinde kistik bir kabartı meydana gelir. Ovulasyon öncesi, sekonder oosit ve kumulus ooforusun bazı hücreleri olgun follikülün iç yüzeyinden ayrılır. Ovulasyon LH üretimindeki ani artış ile tetiklenir. Ovulasyon genellikle LH artışından 12-24 saat sonra olur. Kabartının oluşturduğu stigma kısmından sekonder oosit follikül sıvısıyla birlikte atılır. Atılan sekonder oosit; zona pellusida, bir ya da daha fazla tabakalı ışınsal tarzda dizilmiş follikül hücrelerinin oluşturduğu korona radiata ve kumulus tabakasıyla sarılmıştır. Böylece oosit-kumulus kompleksi oluşur (28).

1.1.2. Korpus luteum

Ovulasyondan kısa süre sonra ovaryum follikülünün ve teka follikülünün duvarları büzüşüp ve katlanarak, LH etkisiyle korpus luteum olarak bilinen glandüler bir yapıya dönüşür. Eğer oosit fertilize olursa, korpus luteum genişleyerek gebelik korpus luteumunu oluşturur ve hormon üretimini artırır. Bununla beraber koryonun sinsityotrofoblastları tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) korpus luteumun bozulmasını engeller (6). Sinsityotrofoblast LH bakımından zengindir. Gebelik korpus luteumu

hamileliğin ilk 20 haftası boyunca işlevsel olarak aktifdir. Daha sonra plasenta gebeliğin devamı için gerekli olan östrojen ve progesteronu salgılar. Eğer oosit fertilize olmaz ise, ovulasyondan 10-12 gün sonra korpus luteumda gerileme ve dejenerasyon gözlenir. O zaman da menstruasyon korpus luteumu adını alır (Şekil 1.3). Bu daha sonra korpus albikans adı verilen skar dokusuna dönüşür. Hamilelik dışında ovarian siklus, kadınların üreme yaşamı boyunca devam eder (29).



Şekil 1.3: Follikül gelişimi ve korpus luteum (30)

1.1.3. Tuba uterina

Tüpler, ovulasyonla atılan sekonder oositin fimbriyalar yardımıyla alınmasında, sekonder oositin döllenmesinde, zigotun başlangıç için uygun ortam sağlanmasında ve zigotun uterusa taşınmasında işlev görürler. Tüplerde infundibulum, ampulla, istmus, intramural kısım olmak üzere 4 bölge izlenir. Tüp duvarı ise mukoza tabakası, musküler tabaka ve seroza tabakası olarak 3 tabakadan oluşmaktadır (31).

Mukoza tabakasını, uzunlamasına seyreden katlantılar (plikalar, kıvrımlar) oluştururlar. Ampulladan uterusa doğru gidildikçe uzunlamasına olan mukoza katlantıları azalır. Epiteli silyalı ve sekratuvar tip olmak üzere iki farklı hücreden

oluşmuştur. Sekratuvar hücreler kapasitasyon ve besleme amaçlı salgılamadan sorumludur. Silyalı hücreler infundibulum yöresinde en fazla, istmusta en az sayıdadır. Silyaların hareketi, genelde zigotun uterusa taşınması amacıyla o yönde (uterusa doğru) olmakla birlikte bazı hücrelerde spermiyumların döllenme bölgesine taşınması amacı ile ovaryuma doğrudur. Epitel, ovaryum siklusuna bağlı olarak değişimler gösterir. Epitelin yüksekliği ovaryumda folliküler evrede en yüksektir, luteal evrenin (sekresyon evresi) sonlarında ise en alçaktır. Östrojen silyaların gelişmesi ve işlev görmesi için gereklidir. Progesteron ise silyaların hareketini arttırıcı özelliğe sahiptir (28).

Musküler tabaka içte sirküler, dışta longitudinal düz kas tabakasından oluşur.

Seroza tabakası, peritonun visseral yaprağından oluşmuştur (32).

1.1.4. Uterus

İnsanda uterus pelviste yerleşmiş idrar kesesi ile rektum arasında bulunan kalın duvarlı, armut şeklinde, boyutları çok değişken, kaslı bir organdır. Uterus boşluğu düz olup, uterus tüplerine ve vajinaya açılır (7). Boyu ortalama 7-8 cm, üst kısmında genişliği 5-7 cm ve kalınlığıda 2-3 cm dir. İki ana bölümden oluşur. Birincisi, geniş, üst 2/3 lük kısmı olan gövde, ikincisi, silindirik 1/3 lük kısmı olan serviksdir. Uterus gövdesi, fundustan (uterus tüplerinin açıldığı yerin üstteki kısımı) istmusa (gövde ile serviks arasındaki 1 cm uzunluğunda kısa parça) doğru dallanır. Serviks uterusun vajinaya doğru daralan son ucudur ve silindir şeklindedir. Servikal kanalın her iki ucunda birer açıklık vardır. İnternal açıklık uterus gövdesiyle, eksternal açıklık ise vajina ile devam eder (28). Uterus mukozası; endometriyumu, uterus kasları; miyometriyumu ve uterus seröz tabakası; perimetriymu oluşturur.

Siklus esnasında endometriyum siklik değişikliklere girer. Menstrual siklus esnasında fertilizasyon meydana gelip blastokist implante olur ve gebelik başlar ise siklus durur ve endometriyum ve miyometriyum tabakaları büyüme ve farklılaşma dönemine girer (7, 28).

1.1.4.1. Perimetriyum

İnce olan dış tabakadır. Miyometriyuma sıkıca tutunmuş bir periton tabakasıdır. En gelişmiş durumda kalınlığı 4-5 mm kadardır (28).

1.1.4.2. Miyometriyum

Uterus duvarının en kalın tabakasıdır. Stratum submukozum, stratum vasculare ve staratum subravasculare olmak üzere düz kas hücrelerinin farklı dizilimlerinden oluşur ve kas demetlerinin üçü uterus boyunca birlikte oryante olur. Normalde düz kas hücreleri 50 mm uzunluğunda iken gebelikte düz kas hücreleri hipertrofiye uğrar ve 500 mm uzunluğuna erişebilir. Fibriller ve bağ dokusu miktarı artar. Gebelik sonrası uterus genellikle orijinal ölçülerine döner (7).

1.1.4.3. Endometriyum

Menstrual siklus esnasında endometriyum siklik değişiklere girererek embriyo ve fetusun gelişimi için implantasyona hazırlanır. Ovaryum folliküllerinin olgunlaşmasına bağlı olarak uterus döngüsü esnasında endometriyum salgı aktivitesinde değişim olur. Her döngü sonunda mukozal damarlarda kanama ile birlikte 3-8 gün sürecek menstrüasyon boyunca endometriyumda dökülme ile birlikte menstruasyon akıntısı olur ve vajinaya ulaşır (7).

Menstrual siklusun sekresyon fazında, endometriyumun üç tabakası tanımlanabilir. İnce kompakt tabaka; sıkıca paketlenmiş bağ dokusu uterus bezlerinin boyun kısmını çevreler. Kalın spongioz tabaka; uterus bezlerinin genişlemiş gövdelerinin bulunduğu bağ dokusundan oluşur. İnce bazal tabaka; uterus bezlerinin kör uçlarını içerir (28).

Stratum fonksiyonalis veya endometriyum fonksiyonalis tabakası menstruasyonla birlikte dökülür. Burası endometriyumun kalın kısmıdır. Stratum bazale veya endometriyum bazale menstruasyon esnasında ve endometriyumun yeniden oluşmasında rol oynar (33).

Menstrual siklus esnasında, endometriyum kalınlığı 1 ila 6 mm arasında

değişir. Epiteli, salgı yapıcı ve silyalı hücrelerden oluşan prizmatik epitel yapısındadır. Lamina propria tabakasında basit tübüler tip bez yapıları endometriyal stroma hücreleri ve kan damarlarıdan oluşur ve intersellüler ara madde boldur.

Uterus arterleri miyometriyumda anastomoz yapan 6 ila 10 arkuat arterleri verir. Bu arterlerin kolları (radial arterler) endometriyumun bazal tabakasına girer ve küçük düz arterleri oluşturur. Endometriyumun fonksiyonalis tabakasındaki arterlere spiral arterler denir. Bu arterler anastomozlaşır ve zengin kapiller ağı oluşturur. Kapiller yatak laküna ismi verilen ince duvarlı şişmiş segmentleri içerir. Laküna venöz sistem içinde yerini alır. Menstrual siklus sırasında düz arterlerle spiral arterlerin proksimal kısmı değişikliğe uğramaz. Ancak spiral arterlerin distal kısmı östrojen ve progesteronun etkisi altındadır. Böylece dejenerasyona uğradığı gibi yeniden rejenere olabilir (7).

Menstrual siklus; hipofizden gonodotropin salgılatıcı hormonun, ovaryumun steroid salgısını etkilemesi ile bu döngü düzenlenir. Menstrual siklus normalde 28 günde bir tekrarlanır, morfolojik ve fonksiyonel değişikler oluşur.

Proliferasyon evresinde ovaryumda folliküler olgunlaşma sağlanırken östrojen salgılanması da artar. Menstrual siklusun proliferasyon safhası östrojenler tarafından düzenlenir. Sekresyon evresinde de korpus luteumun fonksiyonel aktiviteleri ile progesteron etkili olur. Menstrual safhada, korpus luteum dejenerasyonu ile birlikte hormon üretimi azalır. Menstrual evre sonunda endometriyum kalınlığı, yaklaşık 1mm'ye kadar iner. Uterus bezleri ve spiral arterlerin küçük bir bölümü stratum bazale içindedir. Kaybolan stratum fonksiyonalis östrojenlerin etkisiyle proliferasyon evresinde yenilenir. Proliferasyon safhası ovulasyona kadar devam eder. Bu ortalama 28 günlük siklusun 14 ila 15. günününe kadardır (Şekil 4). Bu safhanın sonunda endometriyumun kalınlığı 3 mm'e ulaşmış olur. Dar lümenli bezler gözlenirken epitel hücreleri içinde glikojen birikmeye başlar (7). Menstrual siklusun sekresyon safhası yine progesteron hormonu etkisindedir. Ovulasyon sonrası bir veya iki gün içinde endomerium kalınlığı 5-6 mm'e ulaşır. Bezler, genişlemiş, keseler oluşturmuş ve mukoid salgı üretmeye başlamış durumdadır ve zengin

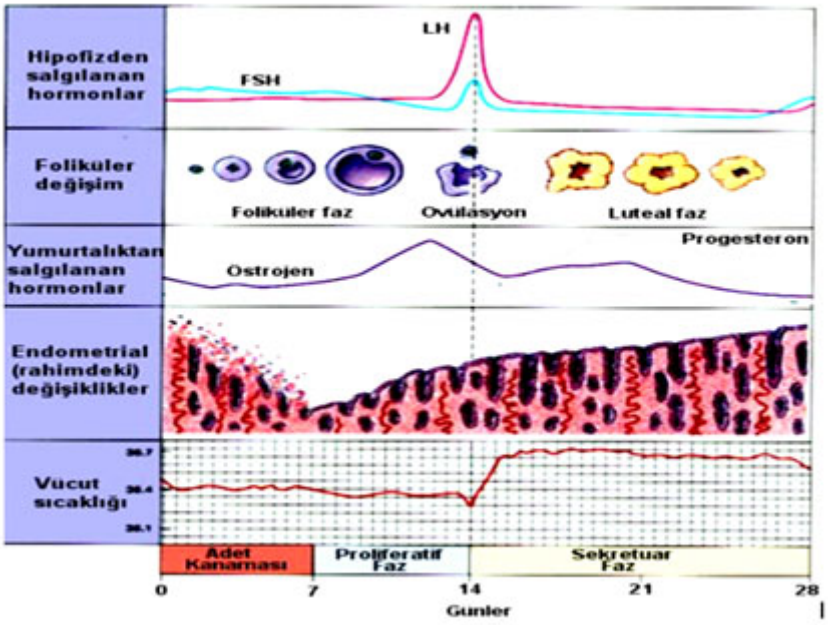
besin maddesini özellikle glikojeni depo eder. Uterus artık implantasyona hazırdır. Bu safhada epiteliyal hücrelerde hipertrofi gözlenirken damarlanmada da artış izlenir. Spiral arterler uzarken, daha kıvrımlanır ve bunlar endometriyum yüzeyine kadar ulaşırlar.

Östrojen ve progesteron etkisi stromal hücrelerin desidua hücrelerine dönüşmesini sağlar. Blastokistin implantasyonu da bu uyarıyı arttırır. Glikojenden zengin ve büyük hücreler fibroblasttan dönüşen desidua hücreleridir ve embriyonun beslenmesine, blastokistin endometriyumda nereye kadar yerleşeceğine, gebelik sonu endometriyumun yenilenmesine ve T lenfosit, antifötal antikorların yapımını durdurarak embriyo ve fetusun immün sistemin negatif etkisinden korunmasına yardımcı olurlar (7).

Fertilizasyon olmadığı taktirde korpus luteum progesteron ve östrojen hormonlarını aktif olarak 10 gün kadar üretir. Daha sonra hormon seviyesi süratle düşer. Stratum fonksiyonalis tabakasında kan akımında periodik azalma ile iskemi gelişir, bez sekreyonu durur, endometriyum yüksekliği ve stromal hücrelerin aktivitesi azalır. Kan akımının kesilmesi ile iki gün içinde yüzey epitelinde ve kan damarlarında farklılaşma olur. Stratum bazaledeki kan akışının devamı ile stratum fonksiyonalisdeki damarlardan kan endometriyuma yayılır. Böylece kan, uterus sıvısı, stromal ve epiteliyal hücreler ile birlikte vajinaya boşalmaya ve dökülme ise stratum bazaleye kadar devam eder (Şekil 1.4).

Menstruasyon periodu 5-8 gün kadardır. Ortalama 35-50 ml kan menstrüasyon boyunca vajinaya ulaşır. Bu kan içindeki enzimlerden dolayı pıhtılaşmaz.

Ovulasyon olmaz ise korpus luteum oluşmaz ve progesteron üretilemez. Progesteron yokluğunda, endometriyum sekresyon safhaya giremez ve menstruasyona kadar proliferasyon safhasında devam eder (Şekil 1.4) (7).



Şekil 1.4: Ovarian ve Endometriyal Siklus (34)

Endometriyal Siklusun Hormonal Kontrolü

Proliferatif Evre (Östrojenik, Folliküler Evre), menstruasyon bitiminden oositin overlerden atıldığı ovulasyon olayına kadar yaklaşık 9 gün süren ve endometriyum duvarı kalınlaşmaya başladığı evredir. Menstrual period sırasında ve hemen öncesinde, ön hipofiz bezinden salgılanan follikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) 'larına cevap olarak bir grup ikincil ovarian follikülü olgunlaşmaya ve 17-β-östradiol salgılamaya başlar. Tüm bu folliküller ovulasyon ile birlikte, bir tanesi hariç diğerleri atreziye uğrar (31). Proliferatif periodun sonuna doğru, gelişmekte olan ovarian follikülden salgılanan östrojenin seviyesindeki belirgin artış, hipotalamo-hipofiziyal sistemi etkiler. Bu da, hipotalamus tarafından gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salımında ani bir yükseliş yaratarak ön hipofizin GnRH salımına karşı cevabını artırmasına sebep olur. Bundan yaklaşık 24 saat sonra, kandaki 17-β-östradiol seviyesi en yüksek seviyesine ulaşır ve ovulasyon öncesi hipofizden bir LH ve FSH dalgası kana verilir (31, 35). LH hormonunun en yüksek seviyeye çıkması üzerine oosit, overlerden uterus tüplerine doğru atılır (Şekil 1.5). Endometriyumun proliferatif faz boyunca en belirgin özelliği, hücrelerin aktif

proliferasyonu, apopitotik faktörlerin baskılanması ve yeni oluşan dokunun beslenmesini sağlayacak olan anjiyojenez olayıdır. Siklusun bu fazındaki yeterli endometriyal gelişim, sekresyon fazda olgunlaşmış bir endometriyumun implantasyon sırasında eş zamanlı olarak salgılanabilmesi bakımından çok önemlidir (36).

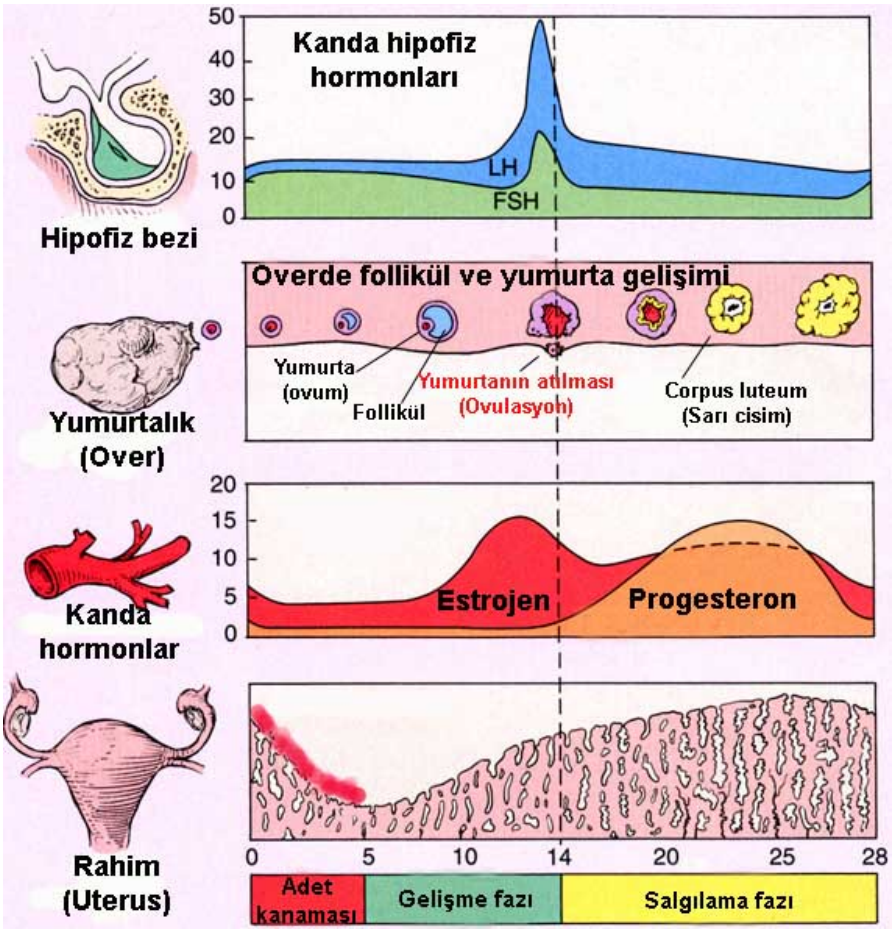
Sekresyon Evresi (Progestasyonel, Luteal Evre), ovulasyonun gerçekleştiği 14. günden sonra endometriyumun, yaklaşık 13 gün sürecek olan evredir (31). Ovulasyondan sonra, follikülden geriye kalan teka interna ve granüloza hücreleri, fiziksel ve kimyasal değişiklikler geçirerek “korpus luteum” adı verilen geçici bir endokrin organ haline dönüşürler (Şekil 5). Korpus luteumun başlıca görevi progesteron hormonu üretmektir. Uterusun sekresyon fazı sırasında salgılanan progesteron, endometriyum hücrelerinin daha da gelişimine katkıda bulunur. Progesteron ayrıca, uterustaki bezleri uyararak endometriyumun devamını sağlar ve dökülmesini engeller. Kandaki östojen ve progesteron seviyeleri, hipofiz bezinden FSH ve LH salımını baskılar (37, 38). Proliferatif faz boyunca östrojenin etkisi altında kalınlaşmış olan endometriyum, sekresyon evrede ileri değişikliğe uğrar. Uterin bezler daha da kıvrılmaya, epitel ise glikojen ve diğer salgı ürünlerini biriktirmeye başlar. Spiral arterler endometriyum yüzeyine doğru daha fazla büyürken endometriyal epitel hücrelerinde mitotik aktivite azalır. Bu evrede uterus endometriyumu, blastokisti kabul edecek kadar iyi hazırlanmış duruma gelmiştir (Şekil 1.5) (31,35). Yeniden şekillenen endometriyum, sadece kısa bir süre için olası bir blastokisti “kabul edici endometriyum” halini alır. “İmplantasyon Penceresi” adı verilen bu süre, ovulasyondan 6-8 gün sonra oluşur ve yaklaşık 4 gün daha (menstrual siklusun 20-24. günleri arası) aktif durumda kalır (39). Oositin bir sperm tarafından fertilize olmasını takiben gelişen blastokist, endometriyuma implante olmaya başlar. Koryondaki sinsityotrofoblastlardan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) salgılanmaya başlar. hCG, overdeki korpus luteumun dejenere olmasını engelleyerek progesteron üretiminin devam etmesini sağlar. Gebelik sırasında salgılanan hCG hormonu, kandaki progesteron seviyelerinin yüksek kalmasına neden olur ve endometriyumu plasentanın oluşumuna katılacak

şekilde kalınlaşmasına yardımcı olur. Endometriyum lamina propriasındaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipit ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişikliklere “desidual reaksiyon” denir. Desidual hücreler, gelişmekte olan embriyoya besin sağlarlar (31, 28).

Menstrual Evre (menstruasyon), seks hormonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak, spiral arterlerin kontraksiyonu sonucu gelişen, endometriyumun fonksiyonel tabakasının iskemik nekrozu şeklinde tanımlanan bir evredir (Şekil 1.5) (40).

Gebelik oluşmaz ise, bir sonraki siklusun başlamasından yaklaşık dört gün önce (24. gün) korpus luteum dejenere olmaya başlar ve geride kalan skar dokusu “korpus albikans” adını alır. Bu zamana kadar endometriyumu destekleyen progesteron hormonunun kandaki seviyesi ciddi ölçüde düşer. Korpus luteumun gerilemesinin yarattığı en belirgin sonuçlar; endometriyal stromaya lökositlerin infiltirasyonu, interstisyel sıvıda artma, spiral arterlerin lokal iskemidir. İskemi, hemorajiye ve endometriyum bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Tüm bu değişiklikler menstruasyonun başlamasına neden olur (1-5. günler) (Şekil 1.5). Menstrual periodun bitişiyle, geride sadece endometriyumun bazal tabakası kalmıştır. Bazal tabaka endometriyumun iyilesmeşini ve bir sonraki proliferasyon evresinde tekrar yapılanmasını sağlar (31, 35, 38).

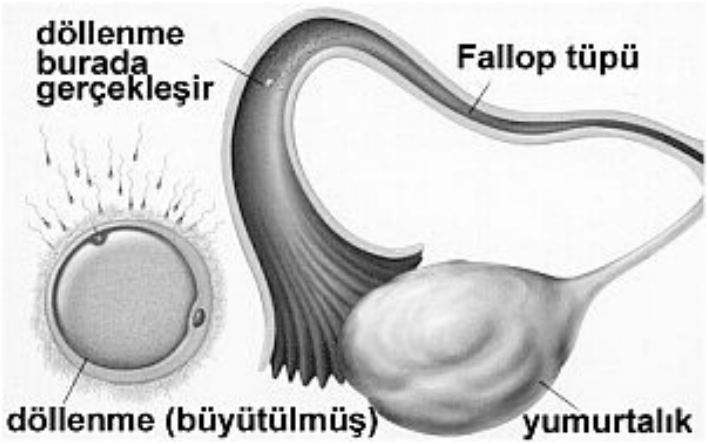
Endometriyal siklusun her fazı, endokrin, parakrin ve otokrin faktörler tarafından düzenlenen birçok bilinen ve bilinmeyen gen tarafından kontrol edilir. Ovarian steroid hormonların koordine ve düzenli bir şekilde üretimi endometriyumun siklik degişiklikleri için gerekirken, bu hormonların anormal, yanlış bir biçimde üretimi endometriyal kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına zemin hazırlar (36,41).



Şekil 1.5: Endometriyal Siklusun Hormonal Kontrolü (42)

1.1.5. Fertilizasyon

Fertilizasyon, ovaryumda ovulasyonla atılan oositun normalde tuba uterinanın 1/3 lük üst ampullar bölgesinde spermatazoonla karşılaşması ve onunla birleşmesine denir (Şekil 1.6). Ovulasyon esnasında, tuba uterinanın açık olan infindibulum bölgesinde fimbrialar ovulasyon yapılacak bölgeye kayarlar. Sertleşen fimbrialar geniş bir alanda oositi yakalayarak tuba uterinanın içine çekerler (Şekil 1.6) (7).



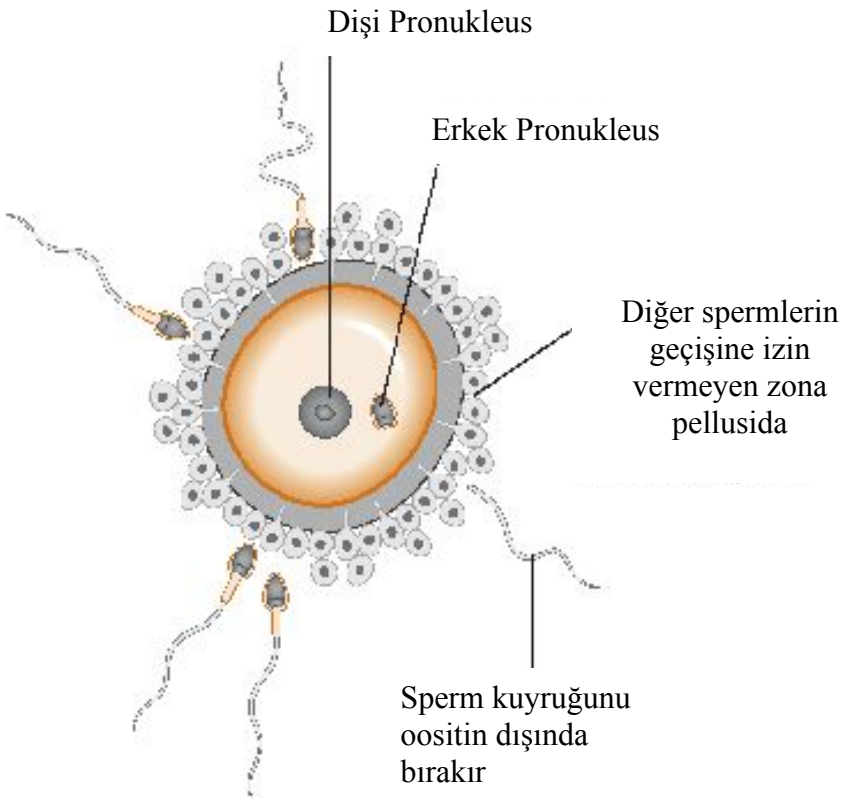
Şekil 1.6: Fertilizasyon ve Tuba Uterinanın Ampulla Bölgesi (43)

Ejakulat içinde bulunan 350-400 milyon kadar spermatozoon fertilizasyon yönüne doğru (vajina , serviks uteru, uterus ve tuba uterine) harekete geçerler. Vajinanın asidik ortamından kısa zamanda kurtulan spermatazoonlar uterusun bazik ortamına geçerler. Spermin oositi fertilize edebilme potansiyeli kazanması için, kadın genital sistemi içerisine girdikten sonra kapasitasyon denilen bir süreç geçirmesi gereklidir. Ejakulasyonun hemen arkasından spermatozoa ile oositin bir araya getirildiği in vitro şartlarda fertilizasyon görülmemesine rağmen, bir süre geçtikten sonra fertilizasyonun da gerçekleşmesi belirli bir kapasitasyon sürecinin bulunduğuna işaret eder (27). Bununla beraber, ejakulasyonu hemen takiben kadın genital sistemine giren spermatozoa motil olmasına rağmen fertilizasyon kapasitesine sahip değildir. Burada içinde bulunduğu ortamdan kaynaklanan bazı faktörlerin etkisiyle fertilizasyon potansiyeli kazanır. Kapasitasyon olarak bilinen bu süreç spermlerde yapısal bir değişikliğe neden olmayan ve genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için gerekli bir olgunlaşma süreci olarak bilinir. Bu süre içinde spermin akrozomal bölgesini örten plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıfı ve seminal plazma proteinleri ortadan kaldırılır. Ayrıca sperm plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir, intrasellüler kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir. Yapısal bir değişiklik gözlenmesede, kapasite olan spermlerde intrasellüler iyonların reorganizasyonu gerçekleşir ve metabolik değişiklikler olur (27).

Kapasitasyon neticesinde spermde, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gelişir, akrozom reaksiyonu kapasitasyonun axine spermlerde yapısal değişikliğe sebep olan bu olay, spermin zona pellusidaya bağlanmasının ardından zona proteinleri tarafından başlatılır. Bu reaksiyon, zona pellusidanın penetrasyonu için gerekli olup, aralarında tripsin-benzeri maddelerin ve akrozinin de bulunduğu bazı enzimlerin salgılanmasıyla gerçekleşir. Akrozomal reaksiyon spermlerin oositle karşılaştıkları dönemde geçirdikleri bir süreçtir, öncesinde akrozom reaksiyonunu tamamlayan spermler kumulus-korona hücreleri arasında ilerleyemez veya ilerleseler bile zona pellusidaya tutunarak penetre olamazlar (28). Bu olayların hepsi, protein kinazlar tarafından belirli proteinlerin fosforilizasyonu sayesinde meydana gelir. Tuba uterinaların epiteline tutunmuş olan spermatozoaların serbestleşerek oosite doğru hareket edebilmeleri de ancak kapasitasyon olduktan sonra hiperaktif motilite özelliği kazanmaları sayesinde gerçekleşebilir.

Uterus ile tuba uterinayı daha hareketli geçen spermatozoonlar kapasitesini arttırmış ve özel yeteneklerle donanmıştır. Spermatazoonlar, korona radiata ile sarılı sekonder oosit ile karşılaştığında korona radiata hücrelerini geçmek için, akrozomundan salgılanan hiyaluronidaz enzimi ile bu hücrelerin bağlayıcı biyokimyasal yapısını bozarlar ve sonrasında, zona pellusidayı da geçerek sekonder oosite ulaşır. Spermatazoonlar zona pellusida reseptörlerine bağlanabilir, böylece akrozom membranı füzyonu ile akrozomal enzimler (hiyaluronidaz, nörominidaz, aril sülfataz, akrozin, asit fosfotaz, fibrolizin, fibrojenaz, fruktoz, proteaz) zona pellusidaya nüfuz eder (28). Zona pellusidanın geçirgenliği, sperm başının oositin yüzeyine temas etmesiyle değişikliğe uğrar. Buradaki ekstrasellüler glikoprotein örtünün içeriği fertilizasyondan sonra değişir. Bu temas ile, oositin plazma membranını döşeyen kortikal granüllerden lizozomal enzimlerin salgılanır. Bu enzimler de, sperm penetrasyonunu engellemek ve zona yüzeyinde sperm için türe özgü reseptör bölgelerinin inaktivasyonunu sağlamak için, zona pellusidanın özelliklerinde bazı değişiklikler yaratırlar (zona reaksiyonu) (Şekil 1.7). Zona pellusida içinde gömülü başka spermlere da rastlanmasına rağmen, bunlardan ancak bir tanesi

oositin içine girebilir (28). Tuba uterinanın salgı aktivitesinin spermatozoon ve oositi beslediği, enzimatik faaliyetlerinde bu iki hücrenin kaynaşmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Böylece, fertilizasyon sonrası teması sağlayan moleküller değişikliğe uğrayarak çoklu döllenmeye de engel olurlar. Ayrıca oosit II den salgılanan sıvı, oolemma ile zona pellusida arasında bir engel oluşturarak ikinci spermatozoonun bu engeli aşması önlenir (Şekil 1.7) (7).

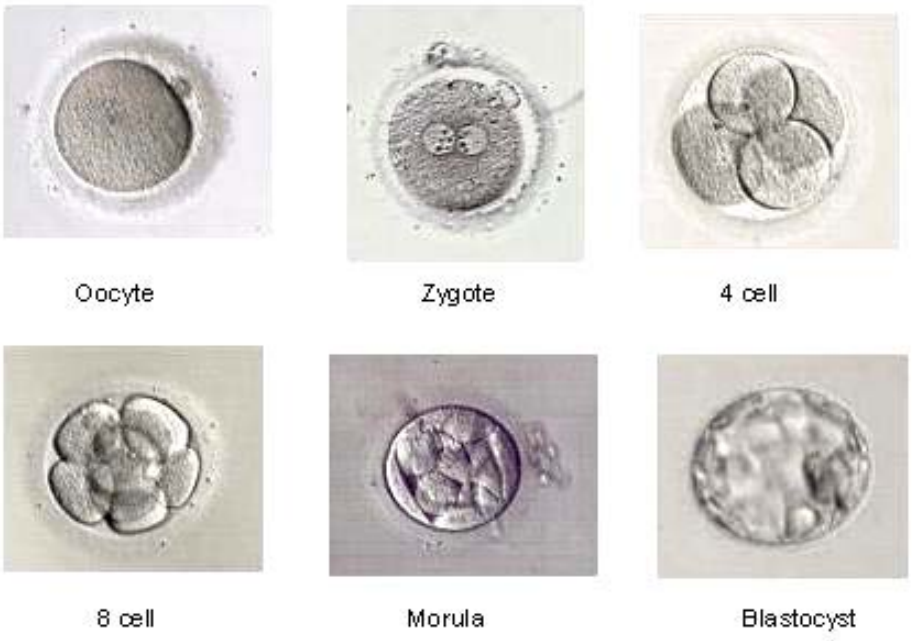


Şekil 1.7: Fertilizasyon (45)

Fertilizasyonun sonuçları; sekonder oositi uyararak, ikinci mayotik bölünmenin tamamlanmasının sağlanması, zigotun normal diploid kromozom sayısını koruması, anne ve babadan gelen kromozomların birbirine karışmasıyla insan türünde değişikliklere neden olunması, embriyonun kromozomal cinsiyetinin belirlenmesi ve oositte metabolik aktivitenin arttırılarak yarıklanmayı başlatması olarak sayılabilmektedir (28).

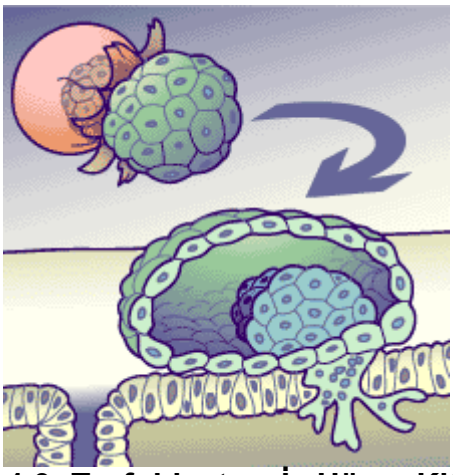
1.1.6. Zigotun yarıklanması

Zigotun tekrarlayan mitoz bölünmeleri ile yarıklanma meydana gelir, buna bağlı olarak hücre sayısında hızlı bir artış olur. Blastomer adı verilen bu hücreler her yarıklanma bölünmesiyle daha da küçülür. Başlangıçta zigot iki blastomere ayrılır, daha sonra bölünerek dört, sekiz, şeklinde artan blastomerler oluşur (Şekil 1.8). Yarıklanma normalde, zigotun uterus tüplerinden (tuba uterina) uterusa yolculuğu sırasında gerçekleşir. Zigot yarıklanma sırasında oldukça kalın ve jöle kıvamındaki zona pellusida içerisindedir. Zigotun blastomerlere bölünmesi fertilizasyondan 30 saat sonra başlar. Ardarda bölünmeler birbirini takip eder ve gittikçe küçülen blastomerler oluşur. Dokuz hücre aşamasından sonra blastomer şeklini değiştirir, birbirine sıkıca bağlı, hacimce küçülmüş bir tür paketlenmiş hücre topu oluşur. Blastomer sayısı 12-15 olduğunda gelişen zigot artık morula adını alır (Şekil 1.8). Morulanın internal hücreleri, dış hücre tabakasını oluşturan bir hücre tabakası ile çevrelenmiştir. Morula, fertilizasyondan üç gün sonra oluşur ve uterusa gelir (28).



Şekil 1.8: Zigotun Yarıklanması (46)

Morulanın içinde kısa sürede bir boşluk oluşur ve böylece blastokiste dönüşür. Blastokisti oluşturan yapılar; iç hücre kitlesi veya embriyoblast, blastokist boşluğu ve trofoblast (28). Trofoblastlar ileride plasentayı yaparlar. Blastokist, uterus boşluğunda bir veya iki gün kalırken daha ileri değişimlerin hazırlığını yapar ve bu esnada zona pellusidayı kaybeder. Yaklaşık 107 hücreli blastokistin iç hücre kitlesi embriyoyu, trofoblast hücreleride dış hücre kitlesini oluşturur (Şekil 1.9). Blastokistin endometriyum epiteline teması iki yapının mesaj alışverişiyle birbirini tanıma, seçici reseptörleriyle uygunluk sağlama, karar verme, ve onaylama süreçlerinde biyokimyasal ve fizyolojik etkileşimleri yanısıra morfolojik farklılaşmaya da hazır olmasıyla başlar. Bu durum hücresel, hormonal ve diğer faktörlerin etkisiyle olur (7).



Şekil 1.9: Trofoblast ve İç Hücre Kitlesi (47)

1.1.7. İmplantasyon

İmplantasyon, embriyo ve endometriyumun aktif bir şekilde aynı anda katıldığı bir hazırlık süreci sonucunda, embriyonun uterus duvarına tutunup içeriye doğru gömülmesi ile gerçekleşen süreci ifade eder. Blastokist implantasyonu ilk haftanın başında başlayıp ikinci haftanın sonunda tamamlanır (28). Gebeliğin 4. gününde blastokist evresindeki embriyo uterus boşluğu içindedir. Östrojen ve progesteronun salgısı sonucu, implantasyon bölgesinde endometriyal damar geçirgenliği artışının sağlanmasıyla endometriyum

implantasyon için hazırlanır. Blastokist zona pellusidadan ayrılır ve trofoektodermin epiteliyal uzantıları uterus lümeni epiteli ile karşı karşıya gelir (Apozisyon). Zona pellusidanın ayrılması başarısızlıkla sonuçlanırsa embriyo implante olamaz (7, 28).

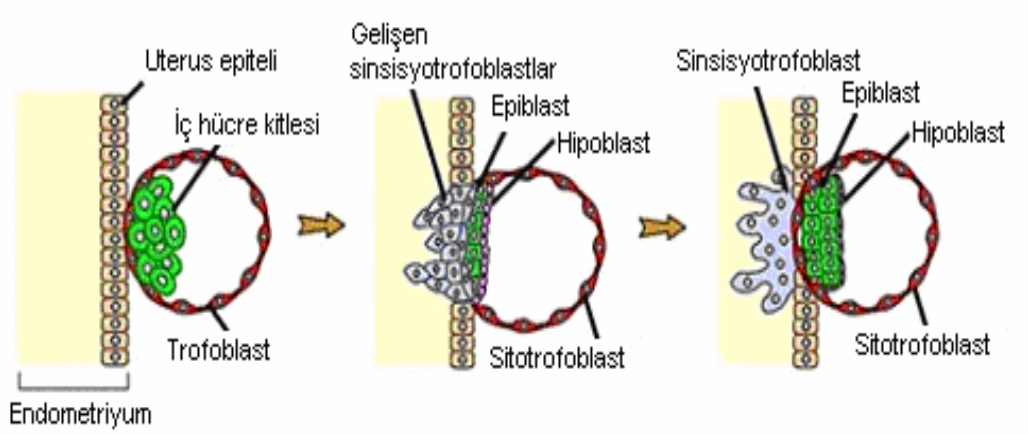
İmplantasyon, blastokistin embriyonik kutbundan (iç hücre kitlesinin olduğu taraf) başlar ve implantasyon alanı etrafında stromal bağ doku hücrelerinin sitoplazmasında glikojen ve lipit birikimi ile polihedral bir görünüm alır. Bu hücrelere desidual hücreler adı verilir. Bu yeni hücrelerin bazıları trofoblastlardan farklılanan sitotrofoblastların mitozu sonucunda oluşan sinsityotrofoblast hücre tabakası penaturasyonu ile dejenere olurlar. Blastokistin implantasyonu sırasında trofoblast hücreleride farklılanır ve iki farklı hücre tabakası oluşur. Tek çekirdekli hücre tabakası olan sitotrofoblast mitotik aktiviteye sahip olup sinsityotrofoblast hücrelerini oluşturur (Şekil 1.10). Sinsityotrofoblast hücreleri hızla çoğalarak hücre sınırlarının farkedilmediği çok çekirdekli bir hücre kitlesi halinde sinsisyumu oluşturur. İmplantasyonla birlikte sinsityotrofoblast hücreleri Human Koriyonik Gonodotropin (hCG) hormonu üretmeye başlar ve gebelik döneminde ovaryum içerisindeki korpus luteum aktivitesini devam ettirilmesini sağlar. Böylelikle menstrual siklus başlamaz ve gebelik devamlılığı sağlanmış olur (7, 28, 29).

İmplantasyonun gerçekleşebilmesi için trofoblast ile endometriyum epiteli arasındaki tutunma ve sonrasında gerçekleşen invazyonu kontrol eden temel faktörler;

- Dönüştürücü büyüme faktörü-α (TGF-α)
- Heparin bağlı epiteliyal büyüme faktörü (HB-EGF)
- Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGF-R)
- Heparin sülfat proteoglikan (perlekan) sayılabilir.

İmplantasyonda trofoblast hücrelerinin sitoplazmik çıkıntıları, uterusun epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki pinopod adını alan küçük çıkıntılarla bağlanırlar ve endometriyum lümenini döşeyen hücrelerin intersellüler alanlarına girerler. Penetrasyon, endometriyum hücrelerini bağlayan desmozomların sayıca giderek azalmasıyla kolaylaştırılır. Primer desidual zon proteazların etkisi

sonucunda yeniden şekillenir ve sekonder desidual zon içerisine embriyo yerleşir.



Şekil 1.10: İmplantasyon Sırasında Blastokistin Pozisyonu Ve Endometriyuma İnvazyonu (32)

1.1.7.1 İmplantasyon mekanizması

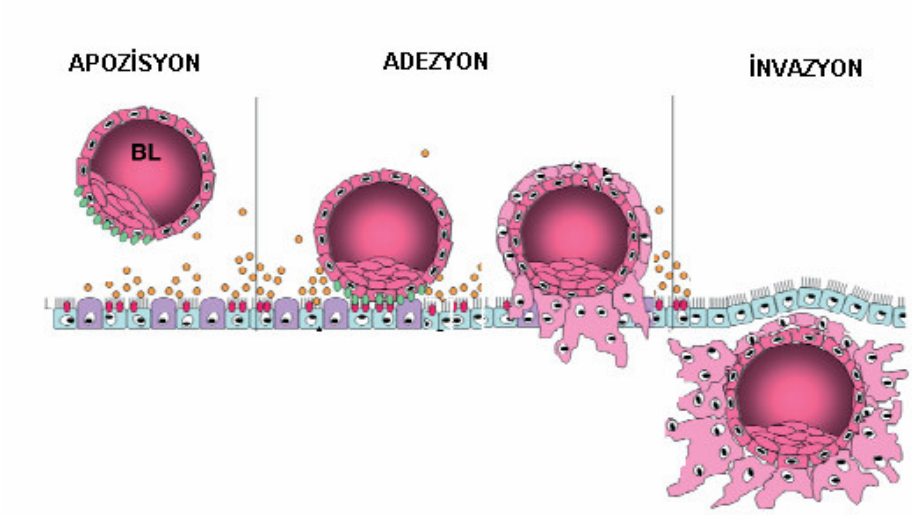
İmplantasyon belirgin, bağlantılı ve ardışık üç evre sonucunda gerçekleşir

Apozisyon; fertilizasyondan sonra blastokist haline gelmiş olan embriyonun uterusa ulaşması ve implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçmesini tanımlar. Blastokistin uterus kavitesine yerleşmesi, implantasyonun ve gebeliğin ilk adımıdır. Bu ana işlem, gamet matürasyonunu, fertilizasyon, embriyo yarıklanması ve uterusa giriş aşamaları sonucunda gerçekleşir (Şekil 1.11).

Adezyon; blastokist uterus lümeninde 2-3 gün kalır ve bu arada enzimatik olarak gevşeyen zona pellüsidadan ayrılır (zona hatching). Gelişimin 6-7. günü epitel yüzeyine yerleşen blastokistin tutunması endometriyum sekresyon fazında gerçekleşir. Temas noktasında trofoblast hücreleri dışta sinsityotrofoblast içte sitotrofoblast tabakalarına farklılaşarak endometriyum epiteline penetre olurlar. İç hücre kitlesi trofoblast boşluğunun iç duvarı boyunca tutunma bölgesine göç eder, bu şekilde blastokist embriyonel kutuptan endometriyuma girmiş olur (Şekil 1.11). İmplantasyonda adezyonun, gebeliğin gerçekleşebilmesi için en önemli aşama olduğu düşünülmektedir. Ovulasyon sonrasında salgılanan progesteron ile prereseptif dönem başlatılır. Ancak

progesteron implantasyon hazırlığı için tek başına yeterli değildir. Östrojen seviyelerinin de belli düzeyde salgılanması ile reseptif dönem gerçekleşir (48, 49). Adezyon molekülleri; implantasyonun gerçekleşmesinde, sinsityotrofoblastların endometriyuma invazyonunda ve invazyonun sınırlandırılmasında önemli bir role sahiptir (50, 51). Ayrıca adezyon moleküllerinin, hücresel oluşum ve farklılaşmada, fonksiyonel bağlantıların kurulmasında, hücre içi ya da hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesinde, hücre hareketlerinin organizasyonunda, immün ve inflamatuar yanıtın ortaya çıkmasında kritik rolleri olduğu görülmüştür (52, 53).

İnvazyon; başarılı bir implantasyon için adezyona takiben invazyon işlemi gerçekleşmelidir. İnvazyon blastokistin endometriyumda ilerlemesi sonucunda bazal membranı yıkarak stromaya geçmesi olayıdır (54, 55). İnvazyon için ekstrasellüler matrikste enzimatik sindirim gerçekleşirken, eş zamanlı olarak desidual dokularda neoanjiogenez ve kontrollü hemostazis gerçekleşmektedir. Gelişimin 8. gününde blastokist endometriyum stromasına tamamen gömülmüş durumdadır. Bu sırada trofoblastın farklılaşmasıda gözlenir.



Şekil 1.11: İmplantasyonun apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarından oluşan ardışık üç evresi (56)

1.1.7.2. İmplantasyonu kontrol eden endometriyal ve embriyonal faktörler

Endometriyumda embriyonun uterusa ulaşmasından sonra implantasyon penceresi döneminde, çeşitli yapısal, hücresel ve moleküler olaylar meydana gelir. Bu dönemde endometriyal reseptiviteyi sağlayan gerekli faktörlerin salgılanması ile implantasyon olayı başlar. İlk olarak endometriyumda gözlenen değişiklikler; pinopodların oluşumu ve blastokisti saran endometriyumdaki subepiteliyal kapillerlerin geçirgenliğinin belirgin olarak artmasıdır (57). Bu dönem sırasında geçirgenlik artışı sadece blastokiste karşı değil, diğer özel olmayan sinyallere örneğin travmatik uyartılara karşı da olmaktadır. Yine bu dönemde adhezyon molekülleri (58, 59), sitokinler (60) ve diğer endometriyal proteinlerin (61) salgılanmalarında değişikliklerin olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber, gebeliğin 5. günü sonunda, endometriyumun reseptivitesi sona erer ve bu dönemden sonra uterus boşluğuna transfer edilen blastokistler yaşayamazlar ve birkaç saat içinde dışarı atılırlar. Endometriyumda gözlenen histolojik değişiklikler implantasyon olayının başlaması ile salgılanan çeşitli faktörler tarafından kontrol edilir.

Endometriyumdan salınan faktörler

İmplantasyon sırasında endometriyumdan salınan faktörler, epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) ailesi üyelerinden EGF ekspresyonunun, insanlarda normal menstrual siklusta bulunmadığı halde, gebelikte desiduada arttığı bildirilmiştir (59, 61). Heparin Bağlayıcı-Epidermal Büyüme Faktörü (Heparin Binding-EGF, HB-EGF) ise, implante olan blastokistten ve erken implantasyon fazında lümen epitelinden eksprese edilmektedir (61). HB-EGF implantasyon sırasında embriyo-uterus arasında 2 yönlü olarak sinyallizasyon oluşturup işlev göstermektedir (62). Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (Transforming Growth Factor- α, TGF- α), insan uterusunda EGF ve TGF-α ile birlikte desidualizayon boyunca hücresel ve stromal proliferasyonu arttırır. TGF-α implantasyonda, parakrin ve otokrin salgı yolağı ile rol alır (63). Bununla beraber, TGF-β ailesi üyeleri, menstruasyon, proliferasyon,

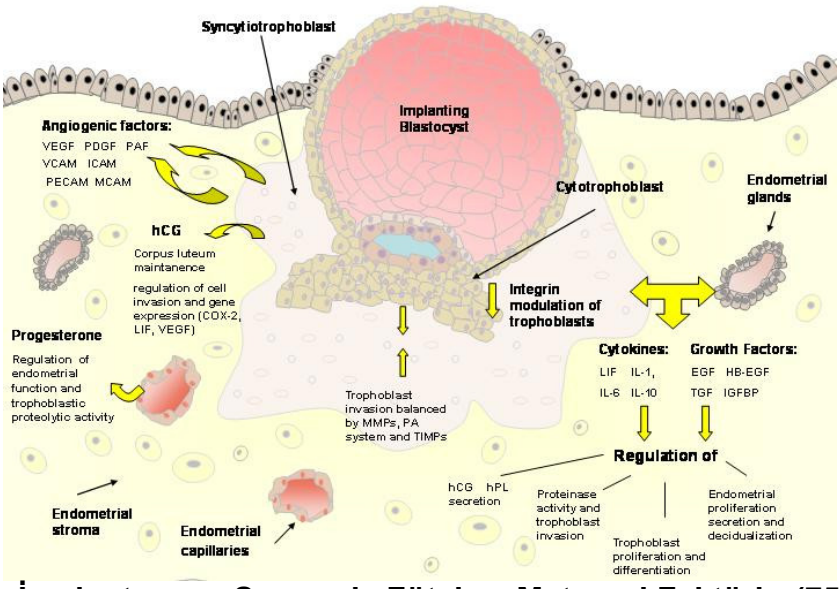
gebeliğin oluşumu ve desidualizasyon sırasındaki hücresel olayların düzenlenmesinde rol oynarlar (64). İnsulin-Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor Binding Protein, IGF), insan endometriyal hücreler tarafından IGFBP 'nin üretimini stimule eder (65). İmmun sistemde önemli rol oynayan sitokinler, implantasyon sırasında da aktiftirler (66). Bu ailenin üyelerinden İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6), Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor, LIF), Koloni Stimüle Edici Faktör-1 (Colony stimulating factor-1, CSF-1), Tümör Nekroz Faktörü-α (Tumour necrosis factor-α, TNF-α) hem embriyonik hem de maternal dokudan salgılandıkları bilinmektedir (67). Gamma İnterferon (IFN-γ), bir seri invitro çalışmada 2-hücreli embriyonun gelişimini ve tutunmuş blastokistin trofoblastik büyümesini önemli derecede inhibe etmiştir. İlave olarak IFN-γ gen delesyonu homozigot dişilerde fertilite bozukluğuna veya homozigot farelerde gebeliğin tamamlanmasında bozukluğa yol açmamıştır (68). Bu çalışmalar bu sitokinin varlığının implantasyon ve embriyogenesisde esansiyel olmadığını göstermiştir (69). Granulosit-makrofaj koloni-stimulan faktör (Granulocyte macrophage stimulating factor GM-CSF), insan decidual hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Yapılan araştırmalarda, endometriyal hücrelere blastokistin tutunmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (70). Fakat implantasyon üzerindeki etkilerini açıklayabilmek için daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Musin-1 (MUC-1), insan endometriyumda hem proliferatif fazda hem de sekresyon fazda eksprese edilir ve MUC1 embriyonunun tutunduğu yerde ve altındaki epitel hücrelerinde bulunmaz iken, ekspresyonun implantasyonun başlangıç sürecinde olduğunu destekleyici veriler bulunmaktadır (71). Epitelde MUC1'in azalması musin molekülünün antiadhezif etkisinin azalmasından dolayı uterus epiteli ile blastokistin başarılı bir şekilde tutunmasını sağladığı düşünülmektedir. MUC1 ekspresyonu hamileliğin bütün evrelerinde insan plasental sinsityotrofoblast hücrelerinde ve hamileliğin 1. ve 2. trimester'de desidual hücrelerde salgılandığı gösterilmiştir (71).

Prostoglandin (PG), implantasyonun başlangıcıyla ilgili olarak endometriyal vasküler permeabilitenin artış gösterdiği alanlarda artmış olduğu gösterilmiştir.

(65). IFN-γ ve hCG**,** normal insan uterin endometriyumunda immun yanıtın oluşması, büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde rol oynamaktadır (72).

Embriyodan salınan faktörler

İmmün sistem baskılayıcı bir protein olan erken gebelik faktörü (EPF), trofoblastik hücrelerden salgılanır ve fertilizasyondan 24-48 saat sonra anne serumunda ortaya çıkar. Preimplantasyon Faktörü (Preimplantation Factor, PIF), preimplantasyon evresindeki embriyolarda üretildiği gösterilmiş ve uterin kavitede canlı bir embriyonun bulunmasıyla birlikte maternal serumda belirli bir miktarda olduğu bulunmuştur (73). İnsanda in vitro fertilizasyon tedavisi sırasında embriyo transferinden sonraki 2. Günde de ekprese edildiği gösterilmiştir (73). Trombosit Aktive Edici Faktör (Platelet Activating Factor, PAF), preimplantasyon embriyosu tarafından salgılanan ilk mediyatördür olup embriyo metabolizması, hücre siklusunun devamlılığı ve embriyo canlılığının stimule edilmesinde sorumludur (74). Büyüme faktörleri, overde somatik hücreler tarafından, embriyonun değişik bölünme aşamalarında embriyo tarafından ve dişi üreme kanallarına ait hücreler tarafından sentezlenebilmektedirler (70).



Şekil 1.12: İmplantasyon Sırasında Fötal ve Maternal Faktörler(75)

1.2. Doğurganlığı Etkileyen Faktörler Ve İnfertilite

Fertilizasyon ve sonrasında spontan gebeliğin gerçekleşmesi için bir takım faktörlerin bir arada ve kusursuz çalışması gerekir. Öncelikle kadında, hipotalamus-hipofiz-ovarian siklus, uterus tüplerinin fonksiyonları, servikal ve endometriyal koşulların, erkekte ise hipotalamus-hipofizer-testiküler siklus, sperm üretimi ve hareketliliğinin normal olması gerekmektedir (76-87). Diğer koşullar ise **erkek için,** en az bir testis bir oositi dölleyebilecek kadar normal sperm üretebilmelidir. Duktal sistemin (epididimis ve vas deferens), penise spermi taşıyabilmesi için en az bir tarafın açık olması gerekmektedir. Ereksiyon gerçekleşebilmeli, ejekülasyon yapabilmelidir. Servikse ya da yakınına bırakılan sperm uterus içine girebilmeli, tüplere ilerleyebilmeli ve oositi fertilize edebilecek kapasitede olmalıdır. Uygun cinsel istek ve davranış biçimi olmalıdır. **Kadın için,** en az bir ovaryum güvenilir bir düzende (4-6 haftada) ovulasyon yeteneğine sahip olmalıdır (ovarian faktör). Serviks spermi tutabilmeli, besleyebilmeli ve uterus içine ve tubalara iletebilmelidir (servikal faktör). Fallop tüpleri ovule olmuş yumurtayı yakalayabilmeli, sperm ve döllenmiş olan yumurta hücresini efektif olarak taşıyabilmelidir (tubal faktör). Uterus embriyo implantasyonuna, bebeğin gelişim ve büyümesine uygun olmalıdır (uterin faktör) (77- 89).

1.2.1. İnfertilite

Kısırlık (infertilite) her geçen gün daha fazla çifti etkileyen bir sorun olarak gündemde olup insanlık tarihi boyunca çeşitli çözüm önerileriyle güncelliğini koruyan en önemli sorunlardan biri olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Bugün dünyanın çeşitli bölgelerinde değişen oranlarda olmakla birlikte, ortalama %15 oranında karşılaşılan infertlite sorunu, geliştirilen tıbbi yöntemlerle büyük ölçüde çözülebilmektedir. Üreme endokrinolojisi ve infertilite modern tıbbın en önemli gelişmelerinin yaşandığı bir dal olarak güncellliğini korumaktadır (90).

İnfertilite, en az bir yıl süre ile herhangi bir aile planlaması yöntemi kullanmadan ve düzenli (haftada en az iki) cinsel ilişki olmasına rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanır. Dünya Sağlık Örgütü'nün

infertilite tanımında ise, bu süre 2 yıla kadar uzatılmaktadır. Daha önce hiç gebelik oluşmamışsa **primer infertilite;** canlı doğumla sonuçlansın ya da sonuçlanmasın en az bir gebelik oluşmuş ise **sekonder infertilite** olarak tanımlanır (91, 83). Bir menstrual siklusta gebe kalabilme olasılığına **fekundabilite,** bir siklusta canlı doğum olma olasılığına ise **fekundite** adı verilir. Genç sağlıklı çiftlerde her ovarian siklus başına gebe kalabilme şansı, yani fekundabilite %20-25 iken, kadın yaşı arttıkça fekundabilite de düşer. Birinci yılın sonunda çiftlerin %85-90'ında gebelik gerçekleşir. Yani infertilite, üreme çağındaki çiftlerin %10-15'inde görülür. Ancak 30'lu yaşların sonlarında olan kadınlarda infertilite görülme oranı %25'e ulaşırken 40 yaşından sonra fertilite azalması daha hızlı olur (86, 87).

İnfertilite, 80'li yıllardan itibaren ciddi bir üreme sağlığı sorunu olarak kabul edilmeye başlanmıştır. WHO tarafından yapılan çalışmalarda, dünyada 60-80 milyon infertil çift olduğu tahmin edilmektedir (92). Kadınların çalışma hayatında daha fazla yer almaya başlamaları, aile planlaması yöntemlerinin gelişmesi ve toplum genelinde yaygın kullanımı sonucu çocuk doğurma yaşı giderek artmaktadır. Doğal ya da üremeye yardımcı yöntemlerin kullanıldığı sikluslarda başarının en önemli belirteci kadın yaşıdır. Yapılan çalışmalarda fertilitenin 25 yaşında en yüksek değere ulaştığı, 35 yaşından sonra giderek azaldığı ve 40 yaşına doğru ise her 3 kadından birinin infertil olduğu gözlenmiştir. İleri yaş kadınlarda over rezervinde azalmayla birlikte, cinsel ilişki sıklığının azalması ve fertiliteyi etkileyen pelvik enfeksiyon, miyoma uteri, endometriozis gibi hastalıkların görülme olasılığının yaşla birlikte artması da kadın fertilitesinde azalmaya yol açmaktadır (79, 82, 93, 94, 95, 96).

1.2.2. İnfertilite nedenleri

Kadına ait nedenler;

Çiftlerin %40-50'sinde infertilite nedeni kadına aittir. ***Yumurtlamaya ait nedenler,*** olgun yumurta hücresinin gelişememesi, yumurtlama olmaması, yeterli kalitede yumurta üretilememesi, polikistik over sendromudur. ***Endokrin nedenler,*** gonodotropin (FSH ve LH), adrenal bez, troid ve prolaxin

hormonlarında salınım bozukluklarının olmasıdır. Dişi üreme sistemine ait nedenler, s***ervikse ait nedenler,*** enfeksiyon, tümör, salgı yetersizliği olmasıdır. ***genetik ve immünolojik nedenler,*** antisperm antikorların olması, ***uterusa ait nedenler,*** rahmin yokluğu, rahim şekil bozukluğu (rahim içinde perde olması), polip, miyom varlığı, ***tuba uterinaya ait nedenler;*** tuba uterinaların yokluğu, doğuştan tıkanıklığı, geçirilmiş enfeksiyon, ameliyat, endometriozis sırasında ve sonrasında gelişen yapışıklıklar olarak sayılabilir. ***Psikolojik nedenler;*** korku ve endişe, ***diğer nedenler:*** tümörler, endometriozis, bağışıklık problemleri, üreme organı bozuklukları olarak sayılabilir (7).

İnfertil bireylerde, ovulasyonun olup olmadığı mutlaka tespit edilmelidir. Ovulasyonun tespitinde idrar LH ölçümü, bazal vücut Isısı ölçümü, midluteal serum progesteron ölçümü, endometriyal biyopsi, ultrasonografik monitorizasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. Endometriyal biyopsi, geç luteal dönemde genellikle beklenen mensturasyondan 2-3 gün önce alınır. Proliferatif endometriyumun tespit edilmesi anovulasyonu gösterir. Luteal fazı değerlendirmek için ise histolojik olarak tanımlanan gün kronolojik gün ile karşılaştırılır. Siklus gününe göre 2 gün veya daha fazla gecikme luteal faz yetmezliğini düşündürür. İnvaziv olması ve patologlar arasında yorum farklılıklarının bulunması yöntemin değerini azaltmaktadır. Luteal faz yetmezliği, ovulasyonun varlığını ancak luteinizasyonun yetersiz olması nedeni ile ovulasyon sonrası oluşan korpus luteum fonksiyonlarının yetersizliğini ifade eder. Korpus luteumun progesteron yapımının yetersizliği nedeniyle ya da endometriyumun yetersiz cevabında oluşur (77, 82, 84, 97).

1.2.3. Sebebi açıklanamayan infertilite

İnfertil çiftlerin yaklaşık %10-15'inde infertilite nedenini açıklayacak herhangi bir neden bulunmamaktadır. Kadın ve erkek araştırıldığında, gebeliğin oluşmasına engel olabilecek herhangi bir problemin saptanamadığı olgulardır. Dolayısıyla bu tanımlama yapılan tetkiklere göre göreceli bir terim olmakla birlikte pratikte, kullanılan testlerin tamamen normal olduğu çiftler için kullanılmaktadır. Suni döllenme, GIFT (direk olarak sperm ve yumurtaların tüpe

konulması), IVF (in vitro fetilizasyon), ICSI (In vitro sperm injeksiyonu) yöntemleri bu tip hastalarda uygulanılan tedavi yöntemleridir (7).

Apoptozis, mensturial siklus ve implantasyon sırasında endometriyal fonksiyonun bir düzenleyicisi olarak gösterilmiştir. Son zamanlarda açıklanamyan infertilite olgularında bazı olası implantasyon kusurları tespit edilmiştir. Spontan apoptozis, açıklanamayan infertilite teşhisi konulan kadınların endometriyumunu kısıtlamakta olduğu ve bununda Bcl:Bax oanındaki değişim ile alakalı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu kusurlu implantasyona sebep olan bu grup infertilite hastaları için önemli olduğu düşünülmektedir (94).

1.3. Wnt Proteini

Wnt ailesi sinyal proteinleri embriyogenez sürecinde ve yetişkin doku hemostazisini de içine alan bir çok gelişimsel olaya katılmaktadır (98). Salgılanabilen ve sisteinden zengin glikoproteinlerden oluşan Wnt protein ailesi üyeleri, reseptör aracılıklı sinyal yolaklarının aktivasyonunda kullanılan ligandlar olarak görev yaparlar. Wnt'lerin başlattığı sinyal yolaklarının, omurgalı ve omurgasızların embriyolojik gelişimi sırasında hücre proliferasyonu ve göçü, hücre kaderinin belirlenmesi ve hücrenin farklılaşması gibi çeşitli olaylarda önemli role sahip oldukları bilinmektedir (99, 100).

Wnt bir glikoprotein olup, günümüze kadar 19 adet farklı tipi saptanmıştır. Wnt1, esas olarak mesensefelon ve beyincik gelişiminin indüklenmesinde görevlidir (5). Wnt2, Wnt3a, Wnt5a, Wnt5b ise embriyogenez boyunca farklılanma ve hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlarken, onkogenezde de rol oynarlar (2). Wnt2b, İnsanda hem embriyonik hayatta hem de karsinogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Wnt4, fötal erkek genital gelişiminde rol oynar. Wnt6, servikal ve kolorektal karsinogenezde rol oynar (101-103). Wnt7a ise erkek üreme sistemindeki anterior ve posterior axin belirlenmesi yanı sıra uterus düz kasının gelişiminde ve erişkin uterus fonksiyonunda kritik bir role sahiptir (101). Aynı zamanda erkek üreme sisteminde seks steroid hormon seviyelerinin değişiminden de sorumludur. Wnt8b' de epilepsi için sorumlu bir gen olduğu düşünülmektedir (5). Wnt9a ise

gastrik kanserde eksprese edilmektedir (5). Wnt10b'nin adipogenezis gelişimi ve meme kanserinde rol oynar (101). Wnt11, iskelet, böbrek ve akciğer gelişiminde rol oynar iken, Wnt16 erişkin hayatta normal dokularda, pankreas, böbrek, plasenta, beyin, kalp ve dalakta eksprese edilmektedir (18).

1.4. β-Katenin

β-katenin 781 aminoasitden oluşan 92kDa'luk bir proteindir. Temel yapısı 100 aminoasitlik bir karboksi-terminal uç ve 16 aminoasitlik bir amino uç ile 42 aminoasitten oluşan arm benzeri tekrar bölgesi (drosofila segment polarite geni armadilloda tespit edilen tekrar bölgeleri) içerir. Amino ucu β-katenin stabilitesinin sağlanmasında, karboksil ucuda transkripsiyon aktivitesinde önemli rol oynar (104,105). Arm tekrar bölgesinin süper helikal tarzda bükülmesi, β-kateninin kaderin molekülü, adenomatöz polipozis koli (APC), axin ve TCF/LEF ailesine bağlanmasını düzenler (106, 107). β-kateninin amino terminal ucu serin/treonin içeren ve fosforilizasyon işlevinin olduğu yerdir. Karboksi-terminal ucu ise DNA ile aktivasyona girdiği fonksiyonel bölgesidir (105). β-katenin, epiteliyal hücrelerin sitoplazmasında ve plazma hücre membranında yer alır. β-katenin, katenin ailesinin bir üyesidir (β-katenin, α-katenin, γ-katenin). Kateninler arasında α-kateninin görevi, β-katenin ve γ-katenin'in kaderinle birleşimidir (108). Katenin-kaderin kompleksi hücre-hücre adezyonun düzenlemesinde görev alır (109). Molekül ağırlıkları 17.000-23.000 kDa arasında değişen kaderinler, kalsiyum bağımlı transmembranik yerleşimli homofilik adezyon reseptörleri olup yapıları N ve C terminali içeren iki bölgeden oluşur. Kateninlerle ilişkisini sağlayan özellesmiş bölge, C terminalinin bulunduğu bölgedir.(110)

Doku farklılaşmasında, özellikle de embriyonun preimplantasyonunda önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir. Embriyo henüz morula safhasındayken, blastomerler arasında bağlantının kurulması ve hücresel bütünlük, kaderinler sayesinde gerçekleşir. Bu olayda özellikle E-kaderin etkin rol oynar (111). β-katenin; hücre-hücre adezyonu, embriyonik gelişim, hücre diferansiyasyonu ve malign tümör transformasyonuna dahil olan multifonksiyonel bir proteindir. β-

katenin hücre tomurcuklanmasını etkiler, dorsovertebral asimetride ve dolayısıyla da vücut ekseninin embriyolojik oluşumunda direk rol oynar. Zonula adherens bağlantı kompleksindeki fonksiyonu ile yara iyileşmesinde etkilidir ve oluşacak defektler kanser gelişimine yol açabilir (112).

1.5. Fzd Reseptörü

Wnt sinyali hücre membranına spesifik 7 adet transmembran bölgesi bulunan ve hücre yüzeyinde yer alan 10 Frizzled (Fzd) reseptöründen birine bağlanarak fonksiyon görür (113). Fzd1, yetişkin kalp, akciğer, böbrek pankreas ve ovaryum gibi dokulardan aynı zamanda fötal akciğer ve böbrekten eksprese edilir. Fzd2, fötal böbrek ve akciğerinde, erişkin kolon ve ovaryumunda yüksek seviyede ekspresyonu ile gelişimi düzenlemede görevli iken Fzd3'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte kıl follikülünün gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Fzd4, Wnt'nin pozitif düzenleyicisi olarak rol oynar. Fzd5, Wnt5a'nın reseptörü olduğu düşünülmektedir. Fzd6 kanonikal Wnt/β-katenin sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olarak görev yapar ve onkogenik transformosyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozisin inhibisyonunu tetikleyen süreçlerin inhibisyonunda rol oynar. Fzd7, APC (adenomatosis poliposis coli) fonksiyonunu downregüle eder ve β-katenin bağımlı sinyalleri arttırarak insan özefagial karsinomunun gelişiminde rol oynar. Fzd8, kolon kanseri ve bir çok kanser türünde rol oynar. Fzd9, Williams sendromunda rol oynar ve ayrıca beyin, testis, göz, iskelet, kas ve böbrekte eksprese edildiği bildirilmiştir (113, 114, 115).

1.6. Dkk İnhibitörütörü

Bazı inhibitör proteinler, Wnt'ye bağlanır ve Wnt/Fzd kompleksinin formasyonunu bloke eder. Gastrulasyon süresince, embriyonun anterior kısmının formasyonunu şekillendirmek için, Cerberus, WIF, Dickkopf 'u içeren birkaç Wnt inhibitörü eksprese edilir ve kafa gelişimini destekler. Bu inhibitör proteinler, fiziksel olarak Wnt ye bağlanabilirler ve Wnt/Fzd kompleksinin

oluşumunu baskılarlar ve bunun sonucunda, gastrula safhasındaki embriyonun posterior bölgesindeki nüklear β-katenin seviyesi yükselirken, anterior bölgesinde düşük seviyelere iner. Anteroposterior aksis boyunca Wnt sinyalinin gradiyenti anterior kafa yapısının ve nöroektodermal oluşum için önemlidir (116).

Bundan başka, Dkk'nın pregesterona bağlı indüksiyonunda Wnt sinyali inhibe olmakta ve bu da desidualizasyonda yolağın baskılanmasında rol oynamaktadır (5, 18, 116). Bununla beraber Dkk1 'in implantasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (116). Dkk1 ekspresyonu endometriyumda ise sekresyon fazının ortalarında artış göstermektedir, ve endometriyal stromal hücrelerde progesteron ile arttığı gösterilmiştir (18, 116).

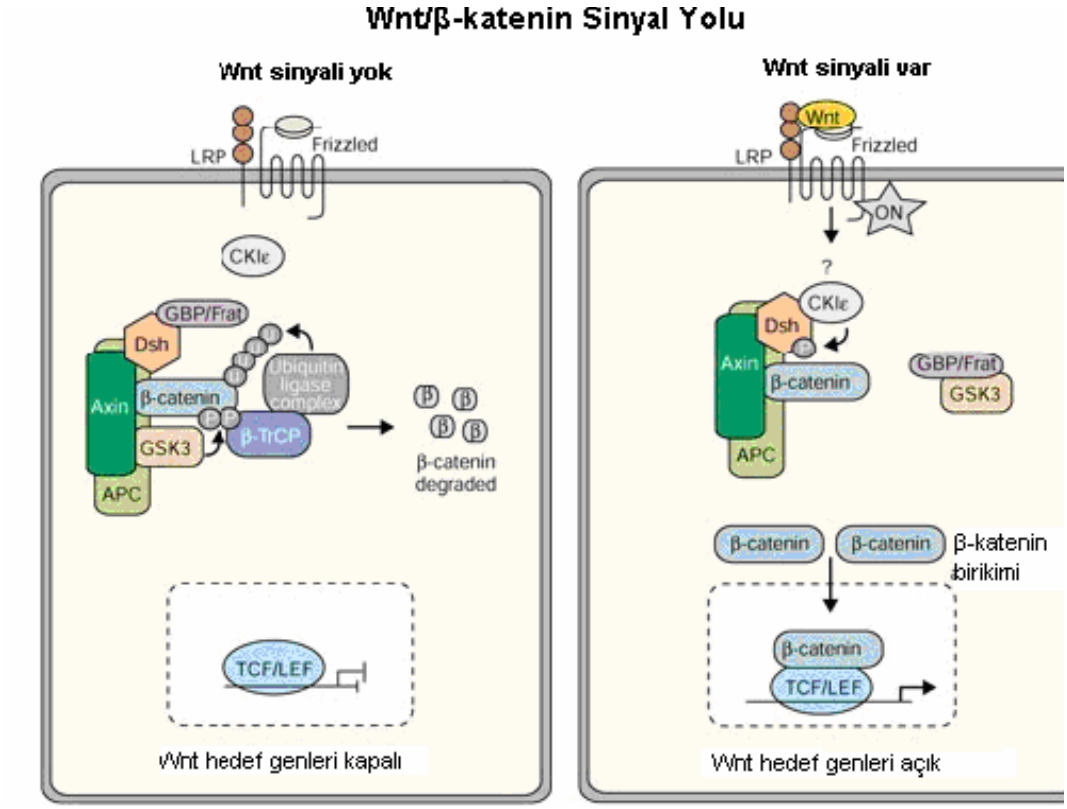
1.7. Wnt Sinyal Mekanizması

β-katenin, hücre-hücre adezyonunda ve Wnt sinyal yolağında önemli rol oynar (93). β-katenin etkilerinin ortaya çıkması için ilk olarak Wnt proteinlerinin Fzd ailesine ait reseptörlere bağlanması ve Wnt sinyalizasyon yolağının aktifleşmesi gerekir (105).

Wnt sinyal yolağı aktif olduğunda, Wnt'nin Fzd reseptörüne bağlanması, sitoplazmada DSH (Dishevelled) aktivasyonuna ve axin'in yıkımına neden olur. DSH'in aktivasyonu sonucunda Glikojen Sentetaz Kinaz 3β (GSK-3β) inhibe olur ve β-katenin fosforilasyonu gerçekleşemez. β-katenin sitoplazmada birikir ve sitoplazmadaki bu birikim neticesinde çekirdeğe transloke olur (Şekil 1.13).

Wnt sinyal yolağı aktif değil ise DSH'de aktif değildir ve kazein kinaz 1, β-serin 35 ve serin 33'ü sırasıyla fosforilize eder. Fosforilize β-katenin, E3 ubikuitin ligaz komponenti olan β transdusin tekrarları içeren protein (β-TrCP) tarafından bağlanır. β-TrCP, β-kateninin proteozom tarafından tanınmasını ve yıkılmasını sağlar. Özetle GSK3β, APC ve axinden oluşan kompleks β-kateninin proteozom tarafından tanınmasını sağlayarak, yıkımına yol açar (112). 76 aminoasitten oluşan bir polipeptid olan ubikuitin, bir proteinin lizis yan zincirlerinin amino grubuna bağlanarak o proteini işaretler. Daha sonra bu yapıya yeni ubikuitinler eklenerek bir multiubikuitin zincir oluşturulur. Böylece

çok sayıda ubikuitin ile işaretlenmiş olan protein oldukça iri ve çok sayıda alt birimden olusmuş bir proteaz kompleksi olan proteozom tarafından yıkılır (117). Bu durumda β-katenin miktarı sitoplazma ve çekirdekte yok denecek kadar azdır. Wnt/β-kateninin sinyal ileti yolağının sorumlu olduğu proliferasyon ve farklılaşma ile ilgili hedef genler, yardımcı reseptör proteini ile bağlı olan TCF/LEF transkripsiyon faktörleri tarafından baskılanmaktadır (Şekil 1.13).

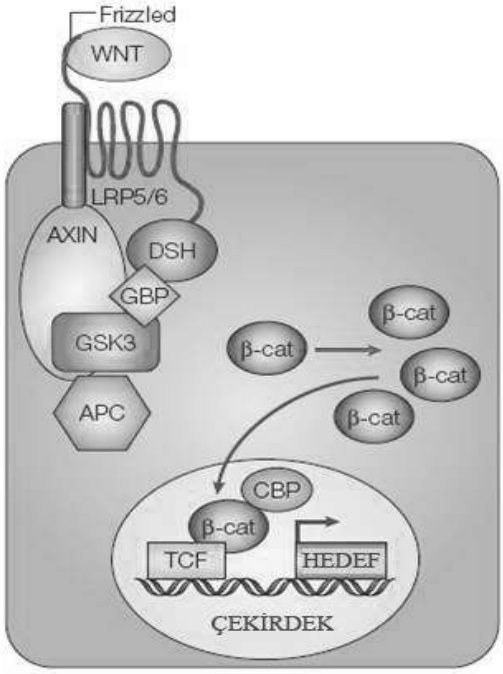


Resim 1.13: Wnt varlığında ve yokluğundaki sinyalizasyon mekanizmaları (5)

1.7.1. β-katenin bağımlı wnt sinyal yolağı (Kanonikal yolak)

Hücrede β-katenin plazma membranındaki kadherinler'le ya da başlıca Axin, APC, CK1 ve GSK3b içeren ve yıkıcı kompleks adı verilen bir yapı ile bağlı olarak bulunur. Salgılanabilen Fzd proteini hücre dışındaki Wnt ligandlarına ve yardımcı reseptör görevi yapan LRP5/6'ya bağlanırlar (118, 119). Wnt'in Fzd kompleksi DSH'nin aktivasyonu GSK3b'nin inhibisyonunu, dolayısı ile β-

katenin'nin fosforillenememesini ve sitoplazmada birikmesini sağlar. Sitoplazmada biriken β-katenin çekirdeğe giderek Groucho ile bağlanır. Bu da TCF/LEF'in serbest kalmasını ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmasını sağlar (120). Sonuç olarak, yolağın açık olduğu bu durumda Wnt bağımlı axin yıkımı ve GSK3b inhibisyonu ile çekirdekte β-katenin birikerek bu yolağın sorumlu olduğu genlerin transkripsiyonunu başlatmış olur (Şekil 1.14) (119, 121).



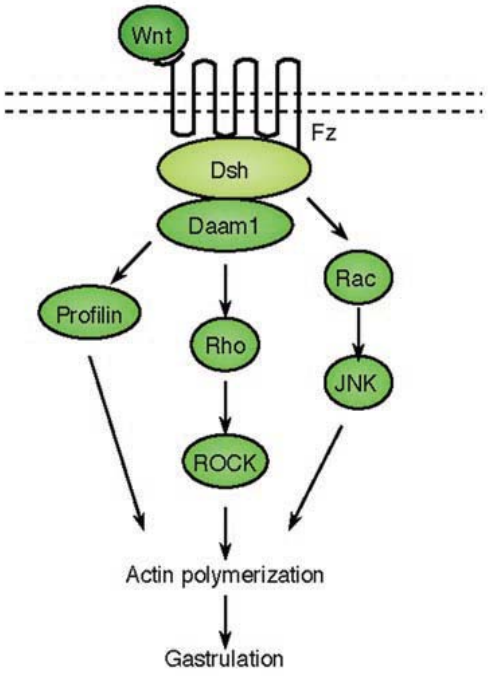
Şekil 1.14: Kanonikal Yolak (98)

1.7.2. β-katenin Bağımsız Wnt Sinyal Yolağı (Non-kanonikal yolak)

Non-kanonikal yolak veya β-katenin bağımsız yolak olarak tanımlanmaktadır ve iki farklı sınıfa ayrılır. Bunlar, Planar cell polarity (PCP) yolağı veya Wnt/Ca yolağıdır.

Planar cell polarity (PCP) yolağın, Dsh, Fzd, Daam1, Rho, Rac, Prickle ve Strabismus'u içeren birçok bileşeni gösterilmiştir (5). Protein Kinaz A (PKA) gibi diğer faktörler, non-kanonikal sinyal yolağının negatif düzenleyicileri gibi rolü olduğu gösterilmiştir. PKA, RhoA ile etkileşebilir ve Rho aktivitesini inhibe edebilir. Bu yolakta, Wnt sinyalinin LRP5/6 ko-reseptöründen bağımsız, Fzd'ın

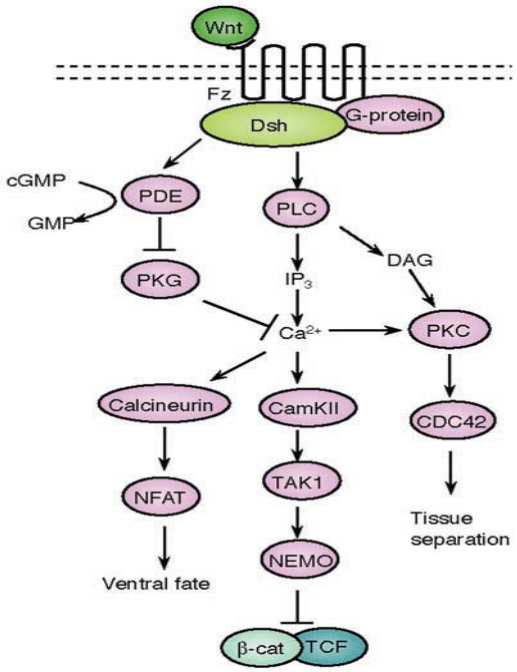
aracı olduğu düşünülmektedir (122, 118). Wnt sinyali ile, LRP5/6 dan bağımsız olan Fzd aracılığıyla Dsh aktivasyonu uyarılır. Dsh'e bağlanan Daam1, Rho kinaz (ROCK) aktivasyonuna dönüşen Rho aktivasyonuna aracılık eder. Daam1 bundan başka axin polimerizasyonu için axin bağlayıcı bir protein olan profiline aracılık eder. Dsh ise JNK aktivasyonu için Rac ın aktivasyonuna katılır. Hücre iskeletinin düzenlenmesi ve polarizasyou ile birlikte gastrulasyon için, Rock, Jnk ve Profilin bir araya gelmektedir (Şekil 1.15) (5, 122).



Şekil 1.15: Non-kanonikal veya β-kateninden bağımsız yolağın birincisi Planar cell polarity (PCP) yolağı (98)

Sirke sineği D. Melanogaster'in Planar-Cell-Polarity yolağı ile çok benzerlik gösteren **Wnt/Ca yolağı,** mekanizmasını çok iyi bilinmemekle birlikte, özellikle omurgalı erken fötal dönemde hücre göçü ile ilgili genlerin ekspresyonundan sorumludur. Wnt/Ca yolağı aracılığı ile gastrulasyondaki hücre polaritesi ve dorsal kemik gelişimini düzenler (124, 125, 126). Fzd bağlı Wnt sinyali, G-proteinin aktivasyonu için DSH'in aktivasyonunu sağlar. DSH kalsiyum salınımını ve PKG'yi inhibe eden fosfodiesteraz (PDE)'ın aktivasyonunu

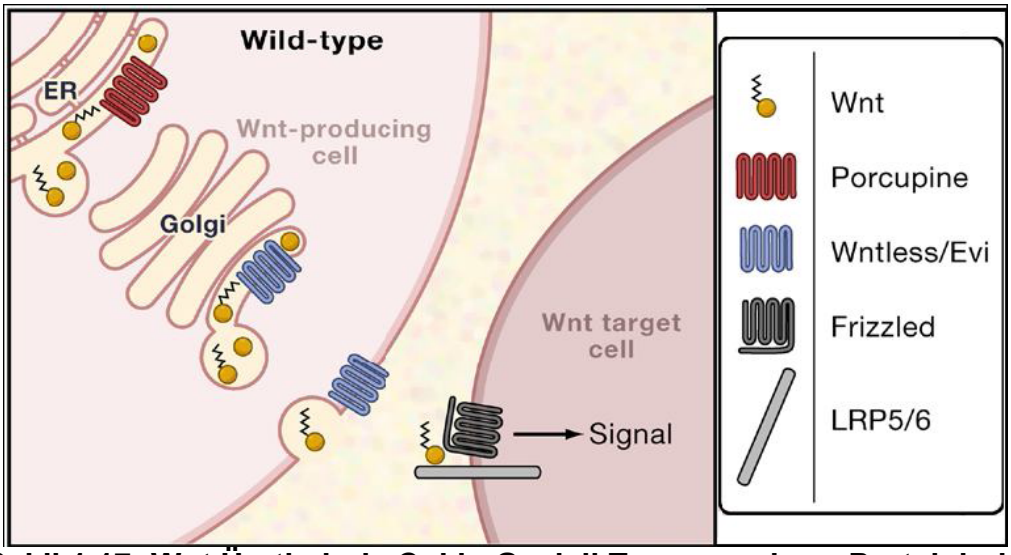
gerçekleştirir. DSH'ın aktive ettiği PLC (phospholipase C), hücreler arası kalsiyumun salınımına neden olan CamKII ve kalsineurin'i aktive eden IP3 ü aktive eder. Kalsinörin de, ventral hücre ölümünü düzenleyen NF-AT'ı aktive eder. CamKII, dorsal kemik gelişiminde negatif düzenleyici olarak rol alan β-katenin/TCF fonksiyonunu durduran TAK (TCF activated kinase) ve NLK (nemo-like kinase)'yı aktive eder. PKC ye dönüşen DAG, gastrulasyon süresince doku ayrımı ve hücre hareketini gerçekleştiren CDC42 yi aktive eder. (5, 127). Özetle, Wnt'in Fzd'a bağlanması ile aktifleşen DSH, kalsiyum salınımına ve buna bağlı kalsiyum-duyarlı PKC enzimi ile kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II'nin ekspresyonunu sağlar. Yine bu yolla, β-katenin yolağından farklı başka sitoplazmik proteinlerin de aktivasyonunu sağlar (Şekil 1.16) (121).



Şekil 1.16: Wnt/ Kalsiyum Sinyali (98)

1.8. Wnt Proteinin Salgılaması

Hücre hücre haberleşmesi moleküllerin salınması, taşınması ve bağlaması işlemlerini kapsar. Wnt üretimli hücrelerde, Wnt proteinleri porsupin transferi ile ER'da palmotil hale gelirler. Sekresyon vezikülleri içindeki Wnt proteinlerinin taşınması ve salgılanması, golgi veya plazma zarlarının üzerinde bulunan çoklu geçişli transmembran proteinleri olan Wnt/evi tarafından kontrol edilir (128) (Şekil 1.17). Retromer yapısı Wnt üretimli hücrelerin içerisinde hareket ederek çevre hücrelere taşınabilen, lipoprotein partükülü formunda Wnt formlarını yaparlar. Wnt proteinleri yüksek sayıda korunmuş sistein parçaları ile karakterize edilmektedir. Wnt proteinleri N terminal sinyal peptitleri ve salgıları taşımasına rağmen nispeten parçalanmazlar. Bu çözünmezlik, bölgesel bir protein modifikasyonu olup, Wnt fonksiyonu için gereklidir. Bu, Wnt sekresyon hücrelerinde gerekli olan bir drosophila geninde bulunmuş, porsupin olarak adlandırılmış, endoplazmik retikulum içerisindeki supstaratların bir çeşidi olan asil transferazlara, enzimlere benzerlik göstermiş, asilattır. Bu sebeple, porsupin ve onun homoloğu mom-1 in Wnt palmitilasyonundan sorumlu olan enzimi kodladığına inanılmaktadır (129). Drosofilanın dışında Wnt salgılaması için gerekli olan bir gen daha olduğu bulunmuş bunada Wntless(wls) denmiştir. Bu genin kodu 7 geçişli bir zar proteinlerden oluşmaktadır. Wls/Evi'nin yokluğunda Wnt'ler bunları üreten hücrelere tutunurlar. Wintless proteinleri ilk olarak Wnt ler ile fiziksel etkileşimde olduğu hücrenin içindeki golgi aparatında yer almaktadır. Bir hipotezde de retromer yapısının geri dönüşümlü bir Wnt reseptörü içermesi ve bununda temel salgılama yolları ve Wnt salgılamasındaki ayrılmış bölümün arasında olduğu gösterilmiştir (130). Sonuç olarak kompleksin, golgi döngüsüde proteinlerin geri hareketinde bir role sahip olduğu gösterilmiştir (131).



Şekil 1.17: Wnt Üretiminde Çoklu Geçişli Transmembran Proteinleri (128)

1.8.1. Wnt proteinlerinin hücreler arası taşınması

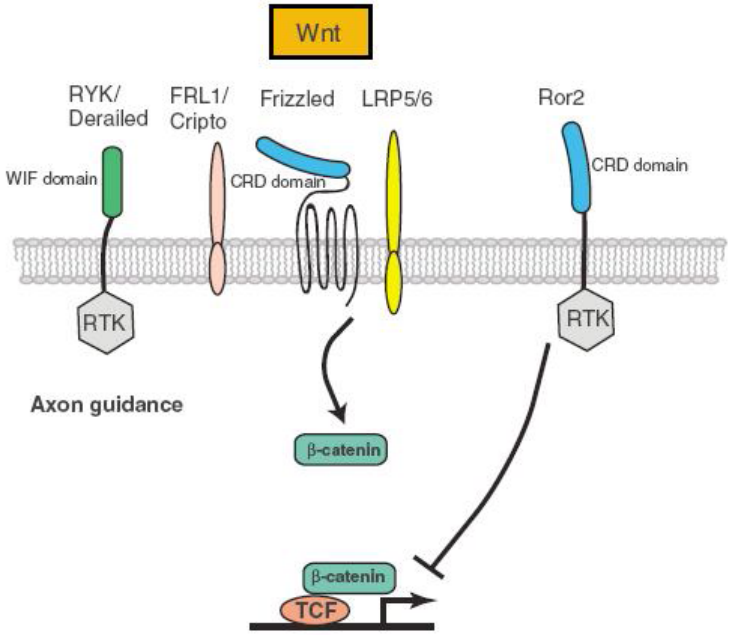
Wnt morfojen gibi davranır, konsantrasyona dayalı uzun sinyal mesafesi olan bir aktivitesi vardır. Bu sinyallerin nasıl üretildiği konusunda bir fikir yoktur. Palmitol parçaları zarın veya lipit partiküllerinin hareketlerini kısıtladığı akla yatkın gelmektedir. Böylelikle, Wntl'er intersellüler taşıyıcı veziküllere veya lipoprotein partiküllerine bağlanabilirler. Alternatif olarak, Wnt'ler uzun ve ince olan filopodial partiküller olan sitonimlerle taşınmaktadırlar. Buna ek olarak, drosophila üzerindeki çalışmalar onun ekstraselüler heparan sülfat proteoglikan üzerinde Wnt proteinlerının taşınmasına veya stabilizasyonuna yönelik bir rolü olduğunu göstermektedir (131).

1.9.Wnt Alımı

7 geçişli zar proteininden olan Fzd proteini Wnt sinyalini dönüştüren ilk alıcı olarak bilinir. Kültüre edilen hücreler Wg'ye kayıtsız kalır, Fzd2 nin fazla ekspresyonu sonucu ise hücre yüzeyinde Wg tutucusu ve üretilmiş kanonikal Wnt sinyali meydana gelir. Wnt'ler bir çok reseptör ile iletişimde olabilir, bunlar RYK tipi reseptörleri içerir ve bu reseptörler drosophila da akson yönlendirmesi boyunca üretilen sinyale yön verirler. Wnt/β-katenin sinyali boyunca, CRD etki

alanı boyunca Wnt'ler Fzd ile birlikte hareket ederler (Şekil 1.18) (5,131). LRP5/6 sınıfı zar proteinleri Xenopus ekseni formasyonundaki yardımcı alıcılar gibi davranırlar. FRL1/kripto aynı şekilde yarımcı alıcı görevi görebilirler. Sonuç olarak, Wnt'ler çekirdekteki β-katenin TCF aktivesini engelleyen sinyali üretmek için Ror tirosin kinazla birlikte çalışabilirler. Tüm Fzd proteinler, 10 sisteinden oluşan büyük bir ekstrasellüler alanı içerirler. Çeşitli Fzd reseptörlerinden oluşan bazı alanlar yüksek afinite ile çoklu Wnt'leri bağlamak için görev alırlar. Ancak, son kanıtlar, bu alanların Wnt sinyalleri için vazgeçilebilir olabilir olduğunu göstermektedir. Aslında ortaya çıkan genetik ve biyokimyasal analizler G-proteinlerinin Fzd sinyalleşmesi ile aktif hale geldiğini gösterir (131).

Ancak bu heterotrimerik g-proteinlerinin nasıl Wnt sinyalleri karşısında devreye girdikleri ve geriye kalan Wnt yolları ile nasıl temas kurdukları, bu sorular hala açıklanamamıştır (131).

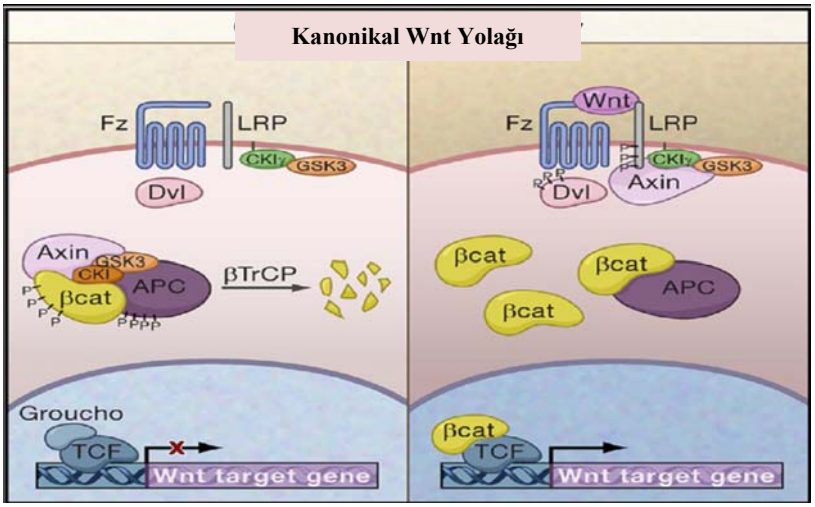


Şekil 1.18: Wnt'nin Çeşitli Moleküller ile Etkileşimi (129)

1.10. Sitoplazmadaki Kanonikal Wnt Sinyalizasyonu

Daha önce vurgulandığı gibi kanonikal Wnt sinyalizasyonu en çok çalışılan Wnt sinyalizasyon yolağıdır. Fzd/LRP koreseptörleri kanonikal sinyalizasyon

yolağını aktive ederler. Wnt sinyalizasyonu Dsh'nin fosforilizasyonunu kontrol eder, ancak Wnt'nin Fzd-Dsh etkileşiminde direk bir bağlayıcı olup olamadığı, ya da Dsh fosforilizasyonunun nasıl kontrol edildiği ve Wnt sinyalizasyonu içinde nasıl Dsh fosforilazyonu olduğu tam olarak bilinmemektedir (131). Son yapılan çalışmalar, koreseptörler olan LRP5/6'nın axin ile birlikte çalışmakta olduğunu ve LRP'nin sitoplazmik kuyruğunda 5 tane fosforlanmış PPP(S/T) olarak kendini tekrarladığını göstermektedir. Wnt'ler direk olarak LRP'nın sitoplazmik kuyruklarında fosforilizasyonu arttırır. Böylelikle axinlerin iskelelerini düzene sokar. GSK3'un PPP(s/t) motifini fosforlar, Ck1y, Ck1 zardan C terminal palmitolasyonuna bağlanır. Her iki kinazda sinyalin başlaması için gereklidir. DSH ve axin, kendi zar alıcılarını kısıtladığı zaman, kendi alanları heterodimerizasyon yapar ve bu moleküller, olayları ortak olarak yönetirler. Wnt reseptörler kompleksi ligandlarla sınırlandırılmadılarında, serin/tireonin kinazlar β-kateninleri fosforlar. Fosforlanan β-katenin bir E3 ubikutin ligaz olan F box/WD proteinleri tarafından tanınırlar. Takip eden ubikutinasyonlar β-kateninin protozom tarafından hızlı bir sekilde yıkılmasını hedefler (131).

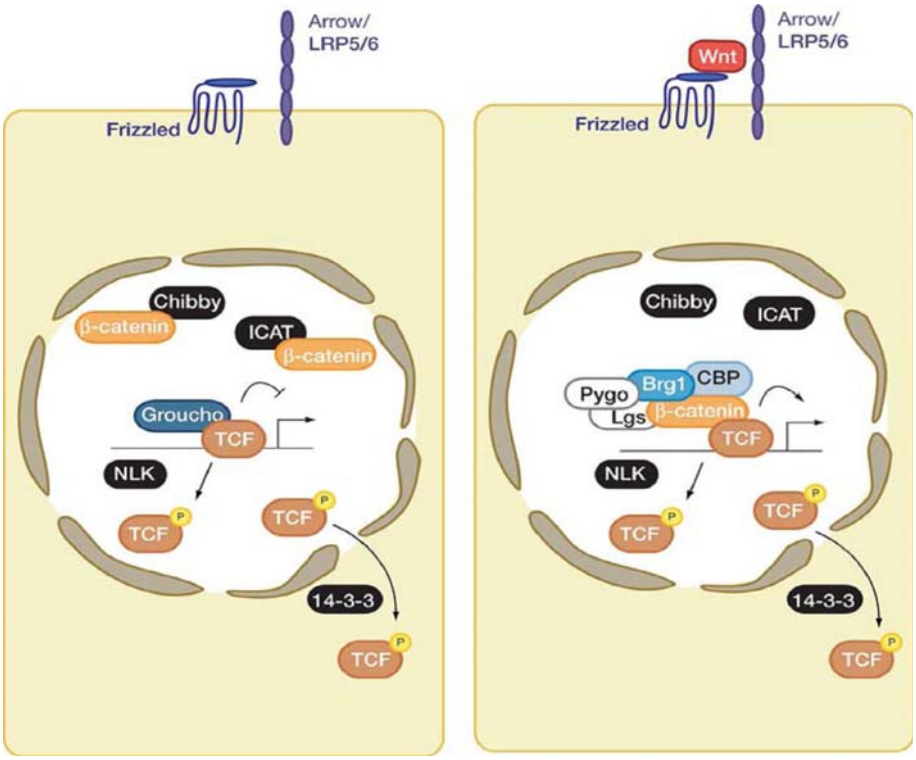


Şekil 1.19: Sitoplazmadaki Kanonikal Wnt yolağı (130)

1.11. Çekirdekte Oluşan Kanonikal Wnt Sinyalizasyonu

β-katenin kararlılığının artmasından sonra, TCF/LEF DNA-bağlayıcı proteinlerin aracılığıyla, Wnt sinyalizasyonu hedef hücrelerin transkripsiyon

aktivasyonunu başlatır. Wnt sinyali olmadığında, TCF Wnt / Wg hedef genlerin bir baskılayıcısı olup Groucho ile kompleks oluşturarak hareket eder. Çekirdekte, β-kateninin, TCF represör yapıyı transkripsiyonu sağlayan aktivatör bir yapıya dönüştürdüğü düşünülmektedir. Sitoplazmadaki kanonikal Wnt sinyalizasyonun, Groucho ve TCF arasında etkileşimi ile transkripsiyon aktivasyonunu baskılanabileceği düşünülmektedir. β-katenin chibby proteinine ve β-katenin inhibitörüne ve TCF'ye bağlandığı zaman negatif olarak düzenlenmiş olur. Hücredeki TCF aktivitesi nemo benzeri kinazlar ile değiştirilebilir. β-katenin, TCF ve Groucho arasındaki etkileşime engel olur, TCF ile birlikte ise, gen ekspreyonunu aktive eder. β-katenin aynı zamanda Legless (Lgs), Pygopus (Pygo), CREB-binding protein (CBP), and Brg1 gibi diğer bileşenlerle bağlanabilir (131).



Şekil 1.20: Wnt Sinyalimde Nüklear Faktörler (5)

1.12. Wnt-β-katenin Yolağının İmplantasyon ve Embriyonik Gelişimde Yeri ve Önemi

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda başarılı bir implantasyonun, invaziv blastokist ve reseptif endometriyum etkileşimine bağlı olduğu, implantasyon süreci boyunca Wnt/β-katenin yolağının önemli rolü olduğu gösterilmiştir (20). Wnt/β-katenin sinyali, ilk olarak fare uterusunda , sirküler düz kas formasyonu sırasında olduğu, daha sonra olası implantasyon bölgesinde lümen epitelinde aktivasyonunun kısıtlandığı gösterilmiştir. İmplantasyon bölgesinde Wnt/β-katenin aktivasyonu maternal ve fötal bölgede blastokist varlığını gerektirmektedir. Ayrıca Wnt/β-katenin sinyalinin inhibisyonu implantasyon süreci boyunca engellenmektedir (132).

Gen eksikliği yapılan çalışmalarda β-katenin yokluğu ile oluşturulan mutant embriyoların, blastokist evresine kadar geliştikleri gösterilmiştir. β-katenin'in preimplantasyon döneminde zigotik protein eksikliğinde, yerine konabilir bir molekül olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda TCF/β-katenin inhibisyonu (küçük moleküler inhibitörleri veya Dkk1'in fazla eksperesyonun sağlanması yolağıyla) blastokist oluşumu negatif olarak etkilememektedir (5, 18, 115).

Bu sonuçlar, β-katenin'in preimplantasyon evresi boyunca gerekli olmadığını göstermektedir. Preimplantasyon döneminde; Ca bağımlı sinyal yolağı gibi nonkanonikal yolakların zigotik Wnt ve Fzd ekspresyonların düzenlenmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Oositlerinde β-katenin'in kısmi delesyonu yapılan dişi fareler, wild tip erkek fareler ile çiftleştirilmiş ve normal fare ile kıyaslandığında daha az embriyo gelişimi gözlenmiştir (134). Bununla beraber, kanonikal Wnt sinyali sadece blastokist aktivasyonunu için değil, aynı zamanda başarılı bir implantasyon için de gereklidir. Blastokistin endometriyum epiteline tutunması, miyometriyumdaki düz kas hücrelerinde ve ardından implantasyon alanındaki uterus epitelinde TCF/β-katenin bağımlı sinyali indüklediği gösterilmiştir. Dkk1, endometruyuma implantasyon ve trofoblast adezyonunda negatif etkili olmaktadır. Dkk1 ile tedavide endometriyum benzeri Ishikawa hücrelerinin endometriyuma adezyonda bozukluk olduğu gösterilmiştir. Trofoblast supernatantların, primer desidualize endometriyal

stromal hücreler ile inkübasyonu sonucunda Wnt4 ve Fzd2 ekspresyonlarının azalması, Wnt sinyalinin trofoblast bağımlı olduğunu ve desidualizasyonu düzenlediğini göstermektedir (5, 18, 115).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırmaları Koordinasyon Birimi tarafından 2009-083 proje no ile desteklenmiş, Celal Bayar Üniversitesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komitesi tarafından 04.09.2010 tarih ve 2009-10 sayılı kararı ile etik kurul onayı alınmıştır.

2.1. Örneklerin Eldesi

Endometriyal biyopsi örnekleri, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran sebebi açıklanamayan infertil olgu olarak sınıflandırılan (ovulasyon-fertilizasyon problemi olmayan) 20 - 38 yaşları arasında 10 hastadan proliferasyon ve erken sekresyon fazında alındı. Kontrol grubu olarak da daha önce en az bir gebelik öyküsü bulunan, kanser veya enfeksiyon öyküsü olmayan 20 – 38 yaşları arasında 5 hastadan endometriyal siklusun proliferasyon ve erken sekresyon dönemlerinde biopsi örnekleri alındı. Hem kontrol hem de infertil örneklerin alındığı hastalar, örnek alımından önce çalışma hakkında bilgilendirilip onayları alınmış ve onam formları ilgili klinisyen tarafından imzalatılılmıştır.

Tablo 2.1.1: Kontrol Grubu Hastalara Ait Bilgileri

ADI SOYADI	YAŞI	SİKLUS FAZI		SİKLUS SÜRESİ	KAÇ YILLIK EVLİ	KAÇ ÇOCUK	HASTALIK	HORMON DEĞERLERİ
1. Hasta	**33**	**Proliferasyon**	**Sekresyon**	**Düzensiz**	**10 yıl**	**2**	**Myom**	**TSH=1.02 FSH=5.49 LH=2.79 E2=262.84 PRL=13.37**
2. Hasta	**26**	**Proliferasyon**	**Sekresyon**	**22 gün**	**10 yıl**	**3**	**-**	**TSH=3.68 FSH=4.47 LH=6.83 E2=69.20**
3. Hasta	**38**	**Proliferasyon**	**Sekresyon**	**Düzensiz**	**14 yıl**	**-**	**-**	**TSH=1.82 FSH=4.55 LH=3.90 E2=165**
4. Hasta	**36**	**Proliferasyon**	**Sekresyon**	**25 gün**	**6 yıl**	**2**	**1 yıldır adet görmeme**	**TSH=1.74 FSH=6.38 LH=5.08 E2=22.72**
5. Hasta	**38**	**Proliferasyon**	**Sekresyon**	**20 gün**		**2**	**Myom, sık aralıklarla kanama**	**TSH=3.35 FSH=5.16 LH=3.50 E2=138**

Tablo 2.1.2: İnfertil Grubu Hastalara Ait Bilgiler

ADI SOYADI	YAŞI	SİKLUS SÜRESİ	SİKLUS FAZI		KAÇ YILLIK EVLİ	İNFERTİL ÖYKÜSÜ (Düşük,Kürtaj)	ERKEK FAKTÖRÜ	HASTALIK	HORMON DEĞERLERİ
1. Hasta	22	28	Proliferasyon	Sekresyon	5 Yıl	-	-	Astım	FSH=4.9 LH=13.1 TSH=0.91 E2=247
2. Hasta	33	27	Prolifersyon	Sekresyon	8 yıl		-	-	FSH=6.34 LH=15.1 E2=35.7 PRL=7.5
3. Hasta	20	Düzensiz	Prolifersyon	Sekresyon	2yıl	-	-	Sol overde 15.5 mm follikül	TSH=1.8 E2=22
4. Hasta	27	30	Proliferasyon	Sekresyon	5 yıl	-	-	-	-
5. Hasta	35	30	Proliferasyon	Sekresyon	11 yıl	-	Sayı= 26.10x6	Obezite	FSH=5.96 LH=8.09 TSH=1.33 PRL=7.67
6. Hasta	36	28	Prolifersyon	Sekresyon	12 yıl	-	-	-	-
7. Hasta	25	30	Prolifersyon	Sekresyon	4 yıl	-	-	-	-
8. Hasta	38	30	Prolifersyon	Sekresyon	17 yıl	-	Sayı=25.10x6 Hareket=%20	-	FSH=14,68 LH=14.68 TSH=1.35 PRL=6.45
9. Hasta	21	27	Proliferasyon	Sekresyon	3 yıl	-	-	Uterus didelfis	TSH=1.95 LH=2.98 E2=39.31 PRL=7.8
10. Hasta	21	30	Proliferasyon	Sekresyon	4 yıl	-	-	-	FSH=5.42 LH=2 TSH=9.72 PRL=1113

2.2. Örneklerin Hazırlanması

Alınan dokular %10 formalin solüsyonu içerisinde tespit işlemi yapıldıktan sonra fiksatifin zararlı etkilerinden uzaklaştırmak amaçlı bir gece akarsuya bırakıldı. Ertesi gün sırasıyla %60, %70, %80, %100'lük alkol serilerinden geçirildi. Ardından alkol-ksilen karışından ve iki değişim ksilen solusyonundan geçirildikten sonra etüv içine alınarak ksilen-parafin karışımından sonra, iki değişim parafin solusyonundan geçirildi. Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek blok haline getirildi. (Tablo 2.2). Işık mikroskobunda incelenmek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 μm'lik seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümü Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immunohistokimya ve in situ hibridizasyon boyaması yapıldı.

Tablo 2.2: Parafin Takibi Protokolü

İşlem	Süre
Fiksasyon: % 10 Formalin	24-48 saat
Akarsuda yıkama	16-18 saat
% 60 Etil Alkol	30 dk
% 70 Etil Alkol	30 dk
% 80 Etil Alkol	30 dk
% 100 Etil Alkol	60 dk
% 100 Etil Alkol	60 dk
Ksilen-Alkol	30 dk
KsilenI	60 dk
Ksilen II	60 dk
Ksilen-Parafin	30 dk
Parafin I	60 dk
Parafin II	60 dk

2.3. Histokimyasal İnceleme

Kesitler histokimya boyama için bir gece 60 C°' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95' ten %60' a doğru azalan alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Doku morfolojisinin belirlenmesi için yapılacak olan histokimyasal analizinde, kesitler Hematoksilen ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. akar suda yıkandı. Sonrasında hematoksilenin fazlasını uzaklaştırmak amaçlı asit-alkol karışımına batırıp çıkarıldı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin boyası ile boyandı ve 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Süre
Deparafinizasyon (60^0C etüvde)	1 saat veya 1 gece
Ksilen I	30 dk
Ksilen II	30 dk
%95 Alkol	2 dk
%80 Alkol	2 dk
%70 Alkol	2 dk
%60 Alkol	2 dk
Musluk suyu ile yıkama	5 dk
Hematoksilen	3 dk
Musluk suyu ile yıkama	5 dk
Asit-alkol	1sn
Musluk suyu ile yıkama	5 dk
Eozin	1dk
Musluk suyu ile yıkama	5 dk
%95 Alkol	1dk
%80 Alkol	1dk
Ksilen	30-60 dk
Entellan ile kapama	

2.4. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal analiz için kesitler histokimya boyama için bir gece 60 C°' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95' ten %60' a doğru azalan alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. İmmunohistokimya kalemi (Dako, S2002, Glostrup, Denmark) ile sınırlandırıldıktan sonra ve % 0,5'lik tripsin (İnvitrogen, 00-3008, Camarillo, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3' lük H_2O_2 (Merck, K31 355100, CA, USA) uygulanan kesitler 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution- (İnvitrogen, 00-3000, Camarillo, USA) ile yıkanarak ve 10 dakika bloklama solusyonu (İnvitrogen, 85-9043 Camarillo, USA) ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar 1/50 dilüsyonda anti-Wnt7a (Sigma, HPA015719, Taufkirchen, Germany), 1/50 dilüsyonda anti-Dkk1 (sc-25516, California, USA), 1/50 dilüsyonda anti-Fzd6 (Sigma, HPA017991, Taufkirchen, Germany), 1/50 dilüsyonda anti-β katenin (sc-59737, California, USA) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse-rabbit biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz (İnvitrogen, 85-9043 Camarillo, USA) ikincil antikoru ile 30'ar dakika boyandıktan sonra üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Diaminobenzidin kromojen (İnvitrogen, 00-2014, Camarillo, USA) ile 5 dk boyandıktan sonra Mayer's hematoksilen (Scytek, HMM999, Utah, USA.) ile artalan boyaması sağlandı. Kesitler distile su ile 10 dk yıkandıktan sonra kapatma vasatı (DDK Italia, 04-102, Milano, Italia) ile kapatıldı (Tablo 2.4). İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirildi, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirilerek ve boyama yoğunlukları HSCORE analiz yöntemi ile değerlendirildi.

Tablo 2.4.1: İndirek İmmunohistokimya Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Fiziksel Deparafinizasyon	60˚C etüvde	1 gece
Kimyasal Deparafinizasyon	Ksilen (1)	30 dakika
	Ksilen (2)	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi	%3'lük Hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Wnt7a, β-katenin, Fzd6, Dkk1	1 gece, +4˚de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
Sekonder antikor ile inkübasyon	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's Hematoksilen	5 dakika
İşlem	Madde	Süre
Dehidratasyon	%80-%90'lık alkol serileri	2 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 2.4.2: İmmunohistokimya Analizinde Kullanılan Antikorlar

Primer Antikor	Katalog No	Türü	Firma	Dilusyon
anti-Wnt7a	HPA015719	Rabbit	Sigma	1/50
anti-β-katenin	59737	Mouse	Scytek	1/50
anti-Fzd6	HPA017991	Rabbit	Sigma	1/50
anti-Dkk1	25516	Rabbit	Scytek	1/50

2.5. İn Situ Hibridizasyon Tekniği ile İnceleme

Kesitler 1 gece 60^0C lik etüvde deparafinizasyonu sağlandıktan sonra 30 ar dakika iki değişim ksilen solusyonunda bekletildi ve sırasıyla %100, %95, %90, %80 ve %70 lik azalan alkol serilerinden geçirildi. DEPC water (İnvitrogen, 750023, Camarillo, USA) ile yıkama yapıldıktan sonra %4 paraformaldehit ile postfiksasyon işlemi gerçekleştirildi, 5 dk %1'lik DEPC-PBS ile yıkandı. Proteinaz K (Travigen, 4800-30-01, Gaithersburg, USA) ile 10 dk 37^0C de inkübe edilen kesitler 5 dk DEPC-PBS ile yıkandı sonra tekrar postfiksasyon yapıldı. Pre-hibridizasyon solüsyonu (Biochain, K2191050, CA, USA) ile 3-4 saat 50^0C de tutulan kesitler üzerine Wnt7a (Exiqon, 300500-01, MA, USA), Dkk1 (Exiqon, 300500-01, MA, USA), Fzd6 (Exiqon, 300500-01, MA, USA) ve β-katenin (Exiqon, 300500-01, MA, USA) probları konarak 18 saat 45^0C inkübasyonu sağlandı. Uygun tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, 1 saat oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Daha sonra kesitler anti-digoxingenin ikincil antikoru (Biochain, K2191050, CA, USA) uygulanarak 4 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkanan kesitler hibridizasyonun görünürlüğünü saptamak amacı ile NBT/BCIP (Biochain, K2191050, CA, USA) karışımı ile 18 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkandı ve su bazlı kapatma mediumu ile kapatılıldı. Örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda incelendi ve boyanma yoğunluğu negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 2.5.1: İn Situ Hibridizasyon Protokolü

İşlem	**Madde**	**Süre / Sıcaklık**
Fiziksel Deparafinizasyon	60˚C etüvde	1 gece
Kimyasal Deparafinizasyon	Ksilen 5	30 dakika
	Ksilen (2)	30 dakika
Rehidratasyon	% 100 alkol	5 dakika
	% 100 alkol	5 dakika
	% 95 alkol	5 dakika
	% 90 alkol	5 dakika
	% 80 alkol	5 dakika
	% 70 alkol	5 dakika
Yıkama	DEPC water	5 dakika
Fiksasyon	%4'lük paraformaldehit	20 dk
Yıkama	DEPC/PBS	2x5 dakika
Permablizasyon	10makrogram/ml Proteinaz K	8-15 dakika, 37 Cº
Yıkama	DEPC/PBS	3x5 dakika
Postfiksasyon	%4'lük paraformaldehit	20 dakika
Yıkama	DEPC/PBS	3x5 dakika
Prehibridizasyon	Prehibridizasyon solüsyonu	3-4 sa, 50 Cº
Hibridizasyon	Hibridizasyon solüsyonu	1 gece, 45 Cº
Yıkama	2xSSC (1/10 dilue)i	10 dk, 45 Cº
Yıkama	1.5xSSC (1/15 dilue)	10 dk, 45 Cº
Yıkama	0.2xSSC (1/100 dilue)	2X20 dk, 37 Cº
	Bloking solüsyonu	1 sa, oda sıcaklığı
	AP-conjugated anti-dioksigenin antibody	1-4 sa, oda sıcaklığında
Yıkama	Steril PBS	3x10 dakika
Yıkama	1x Alkalen fosfotaz	2X5 dakika

Boyama	1 ml Alkalen fosfotaz buffer içerisinde 6.6 makrolitre NBT, 3.3 makrolitre BCIP	gece, karanlık, +4C°
Yıkama	Bidistile	3x5 dakika
Kapatma	Su bazlı kapatma mediumu	

Tablo 2.5.2: İn Situ Hibridizasyon Analizinde Kullanılan Problar

Prob	Katalog No	Firma	Dilusyon
Wnt7a	300500-01	Exiqon	1/1000
β-katenin	300500-01	Exiqon	1/1000
Fzd6	300500-01	Exiqon	1/1000
Dkk1	300500-01	Exiqon	1/1000

2.6. İstatistiksel Değerlendirme

HSCORE analizi sırasında HSCORE = Σ Pi (i+1) formülü kullanıldı. ‘’Pi’’ değeri boyanan hücre sayısını, ‘’i’’ değeri boyanma derecesine karşılık gelmektedir. Boyanma derecesi ise zayıf (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirilmiştir. Her bir yoğunluk derecesi için 5 farklı alanda toplam 100’er hücre sayılarak değerler elde edilmiştir.

Elde edilen veriler GraphPad İstatistiksel analiz programında ANOVA testi kullalarak değerlendirildi. İstatistiksel değerler mean±SEM olarak verilmiş olup, $P<0.05$ küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.7. Kullanılan Kimyasallar

1) Formaldehit
2) Etil alkol
3) Ksilen
4) Parafin
5) Hemotoksilen

6) Eozin

7) PBS (Fosfat Buffer solüsyonu)

8) Tripsin (İnvitrogen, 00-3008, CA/USA)

9) Dakopen (Dako, S2002, Glostrup, Denmark)

10) % 3 Hidrojen Peroksidaz

11) Bloking solüsyonu(İnvitrogen, 85-9043 Camarillo, USA)

12) Sekonder Antikor Kit (Invitrogen anti-mouse, anti-rabbit, Camarillo, CA, 93012)

13) DAB (İnvitrogen, 00-2014, Camarillo, USA)

14) Mayers Hematoksilen (Richord-Allan Scientific, CA/USA)

15) DEPC water (İnvitrogen, 750023, Camarillo, USA)

16) %4 Paraformaldehit

17) In situ Hibridizasyon Kit (Biochain, K2191050, CA, USA)

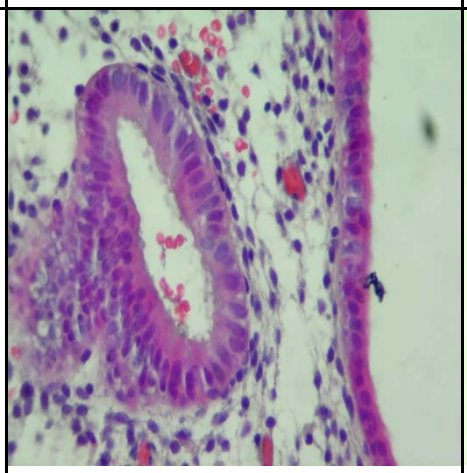
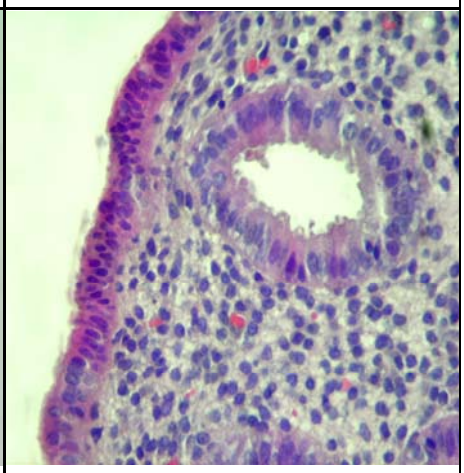
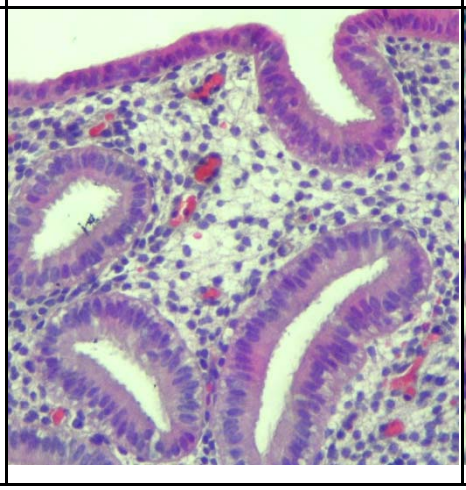
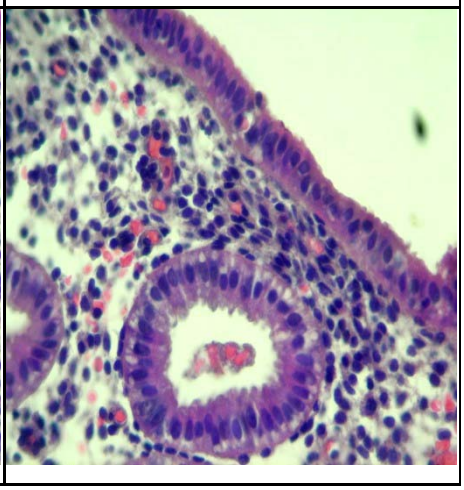
18) Su Bazlı Kapatma Mediumu (Scytek, AMLO30, California, USA)

19) Entellan (DDK Italia, 04-102, Milano, Italia)

3. BULGULAR

3.1. Histokimyasal Sonuçlar

Hematoksilen ve eozin ile boyalı preperatlar incelendiğinde, tüm gruplarda endometriyuma ait epitel ve lamina propria dokuları gözlendi (Resim 3.1). Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon döneminde alınan kesitlerde, epitelin tek katlı prizmatik epitel olduğu ve lamina propriada bağ dokusu arasında bulunan bezlerin yuvarlak şekilli oldukları, tek katlı prizmatik hücreler ile döşendiği izlendi (Resim 3.1). Kontrol ve infertil olgularda erken sekresyon dönemine ait kesitlerde ise, epitelin tek katlı prizmatik epitel olduğu, lamina propriada bağ dokusu arasındaki bez yapılarının kıvrıntılı olduğu, tek katlı alçak kübik hücreler ile döşeli olan bez epitelinin bazal kısımlarında vakuollerin olduğu gözlendi (Resim 3.1). Bu vakuoller bez epitellerin erken sekresyon dönemine ait olduklarını desteklemektedir.

H – E	KONTROL	İNFERTİL
Proliferasyon		
Sekresyon		

Resim 3.1: Kontrol ve infertil gruplara ait proliferasyon ve sekresyon dönemlerindeki endometriyumun histokimyasal görünümü. X400.

3.2. İmmunohistokimyasal sonuçlar

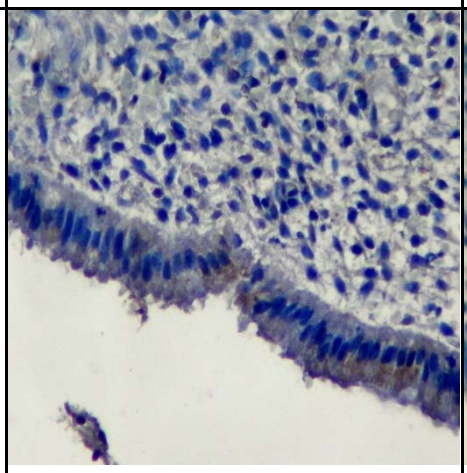
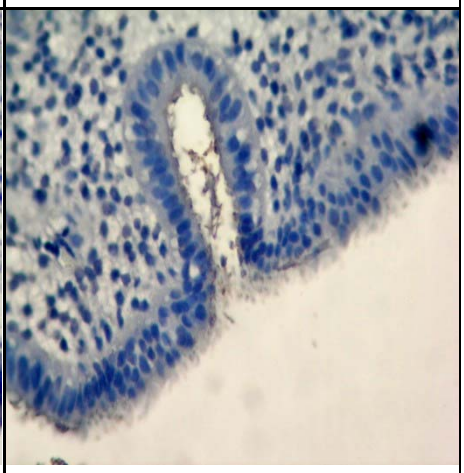
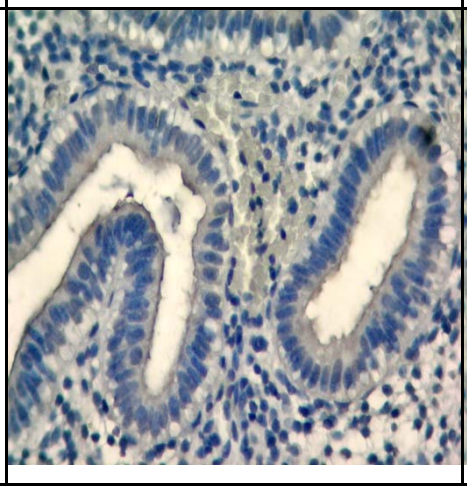
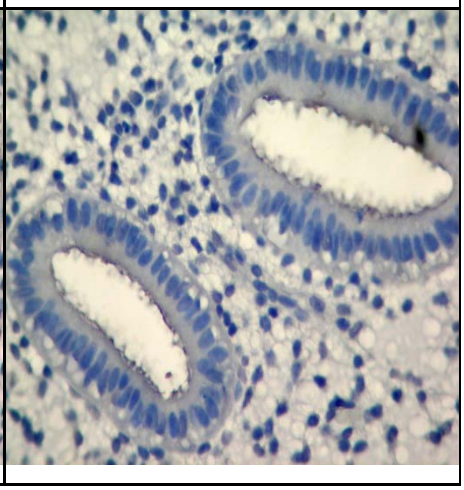
Kontrol grubuna ait 5, infertil gruba ait 10 vakada proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde alınan örneklerin immunohistokimyasal analizi sonucunda hem kontrol hem de infertil gruplardaki hasta örnekleri bireysel olarak hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerindeki HSCORE analizleri incelendiğinde, verilen grupların kendi içlerinde benzer olduğu ve istatistiksel olarakta farklılık olmadığı gözlenmesi üzerine, aşağıda verilen immunohistokimyasal bulgular ve HSCORE analizleri bireysel değil, grup içindeki tüm vakalardan alınan örneklerin analizleri yapılarak verilmiştir.

3.2.1. Wnt7a immunoreaktivitesi

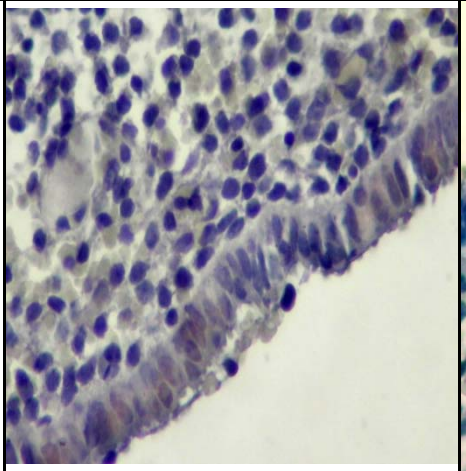
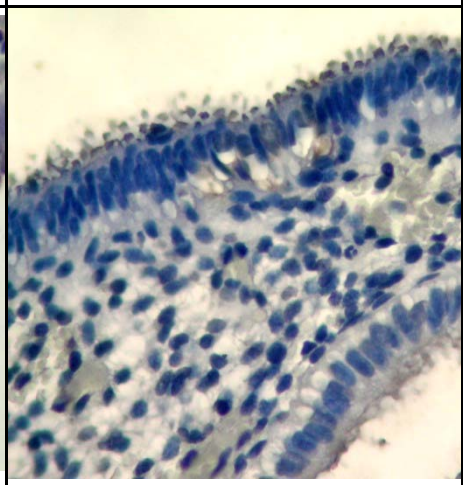
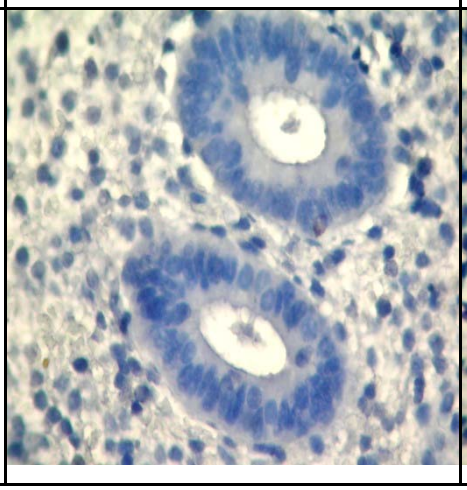
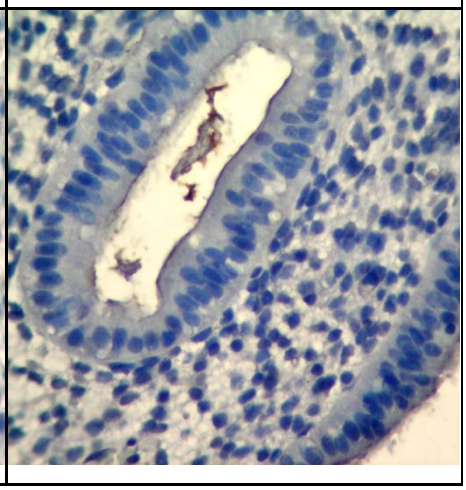
Kontrol grubundaki örneklerde, Wnt7a immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde, sadece luminal epitelinde zayıf şiddette iken, bez epitelinde ve stromada immunoreaktivitenin negatif olduğu gözlendi (Resim 3.2). İmmunoreaktivitenin dağılımı HSCORE analizi ile değerlendirildiğinde ise, Wnt7a immunoreaktivitesinin luminal epitelde kontrol grubunda 23.00±2.36 olarak hesaplandı (Tablo 3.2). Kontrol grubunda sekresyon döneminde alınan örneklerde ise, luminal ve bez epitelleri ile stromada immünorekativitenin negatif olduğu gözlendi (Resim 3.2). Kontrol grubunda proliferasyon döneminde gözlenen Wnt7a immunoreaktivitesinin hem aynı dönemde hem de sekresyon dönemindeki veriler ile karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı saptandı ($P>0.05$).

İnfertil grubundan alınan örneklerde Wnt7a immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde luminal epitelde zayıf şiddette olduğu ve HSCORE analizi sonucunda 97.50±34.16 olduğu hesaplandı (Tablo 3.2). Proliferasyon döneminde bez epiteli ve stromada immunoreaktiviteye rastlanmadı (Resim 3). Wnt7a immunoreaktivitesinin sekresyon döneminde luminal epitelde proliferasyon döneminde göre daha az olduğu ve zayıf şiddette yer yer negatif olduğu izlendi (Resim 3.3). Bu döneme ait HSCORE analizi ise 24.00±9.20 idi (Tablo 3.2). Sekresyon döneminde bez epiteli ve stromada Wnt7a immunoreaktivitesi gözlenmedi (Resim 3.3). Proliferasyon döneminde gözlenen luminal epiteldeki Wnt7a immunoreaktivitesinin hem aynı dönemdeki bez epiteli ve stroma ile hem de sekresyon döneminde luminal epitelindeki Wnt7a immunoreaktivitelerine göre daha fazla olduğu ve istatistiksel olarakta anlamlı olduğu görüldü ($P<0.001$).

Kontrol grubu ile infertil grubu karşılaştırıldığında, proliferasyon döneminde infertil olgularda luminal epiteldeki Wnt7a immunoreativitesinin kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu ve istatistiksel olarakta anlamlı olduğu saptandı ($P<0.001$). Bununla beraber sekresyon döneminde kontrol grubunda luminal epitelde Wnt7a immunoreaktivitesi olmamasına rağmen, infertil olgularda sekresyon döneminde luminal epitelde gözlenen immunoreaktivitenin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$).

KONTROL (Wnt7a)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

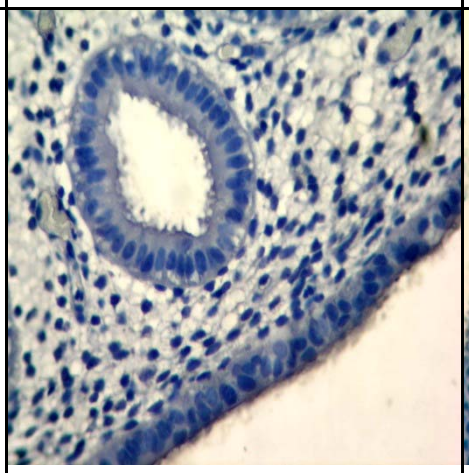
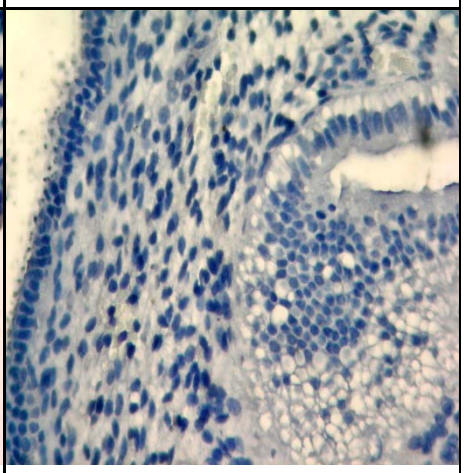
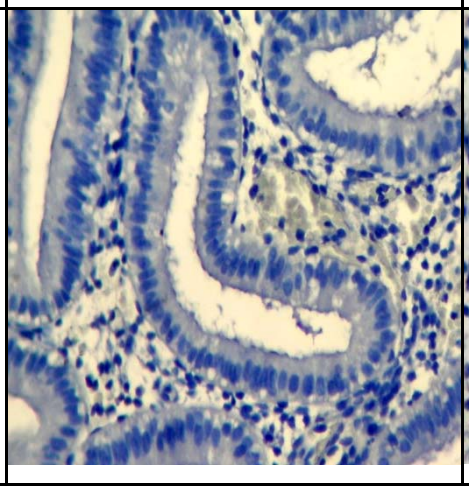
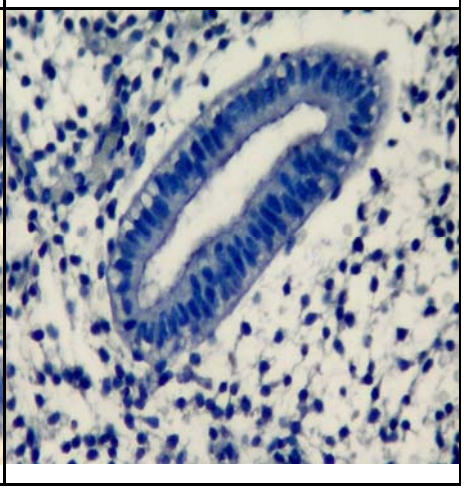
Resim 3.2: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Wnt7a immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

İNFERTİL (Wnt7a)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

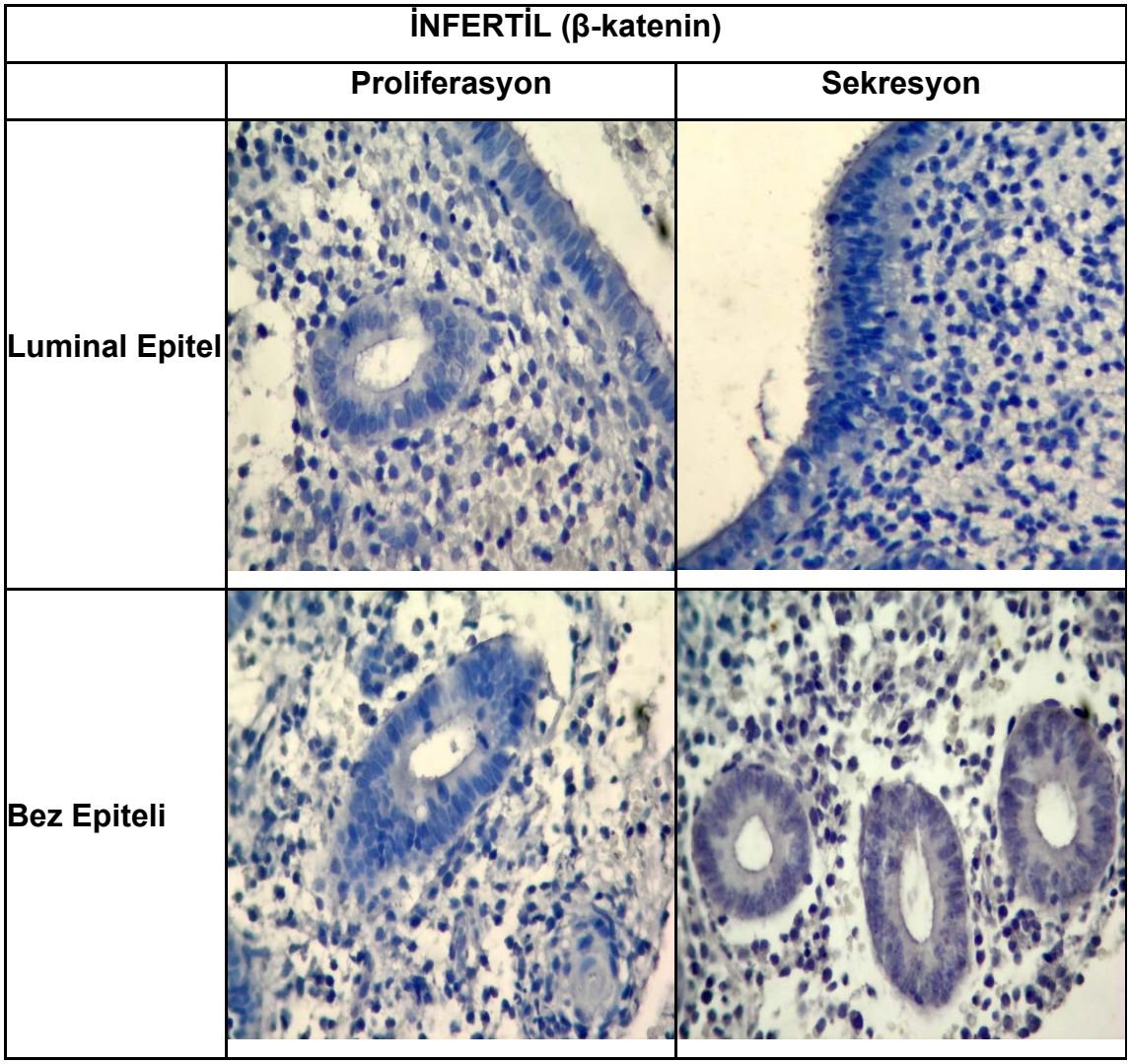
Resim 3.3: İnfertil grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Wnt7a immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

3.2.2. β-katenin immunoreaktivitesi

Kontrol ve infertil gruplara ait hastalardan alınan örneklerin immunoreaktivitelerinin incelenmesi sonucunda, β-katenin immunoreaktivitesinin hem kontrol (Resim 3.4) hem de infertil gruplara ait örneklerde proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde, luminal ve bez epiteli ile birlikte stromada da negatif olduğu saptandı (Resim 3.5). Bu sonuçların, istatistiksel olarakta anlamlı olmadığı görüldü. (P>0.05), (Tablo 3.2).

KONTROL (β-katenin)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.4: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki β-katenin immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400



Resim 3.5: İnfertil grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki β-katenin immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

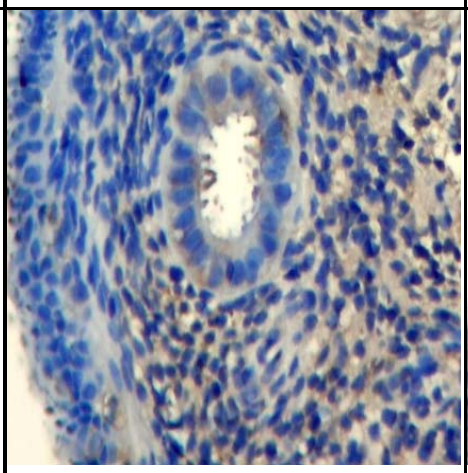
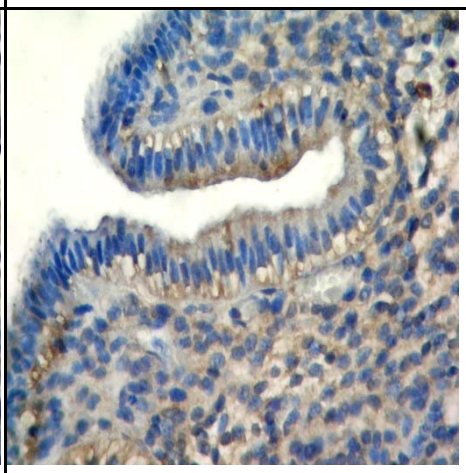
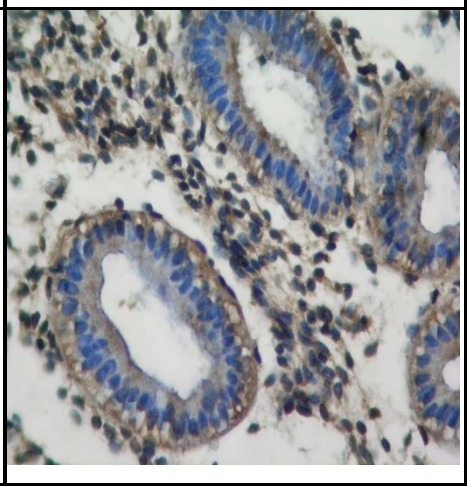
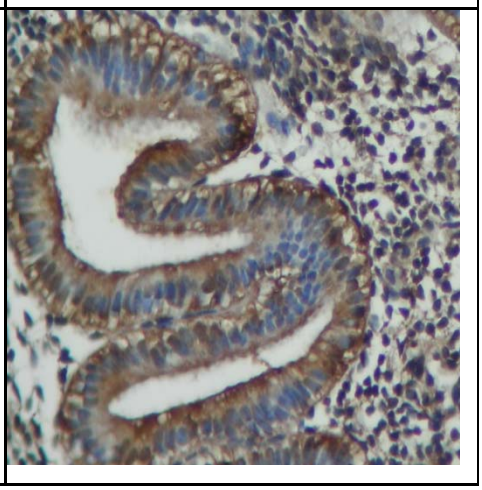
3.2.3. Fzd6 immunoreaktivitesi

Kontrol grubu hastaların proliferasyon dönemine ait örneklerinde Fzd6 immunoreaktivitesinin luminal epitelde zayıf şiddette pozitif, yer yer negatif iken (Resim 3.6), bu döneme ait yapılan HSCORE analizi sonucunda Fzd6 intensitesi 80.20±14.20 idi (Tablo 3.2). Bez epitelinde Fzd6 immunoreaktivitesi orta şiddette pozitif ve yer yer kuvvetli pozitif (Resim 3.6) ve HSCORE analiz sonucununda 96.21±12.77 olduğu gözlendi (Tablo 3.2). Stromada ise immunoreaktivitenin zayıf şiddette pozitif olduğu saptandı ve yapılan HSCORE

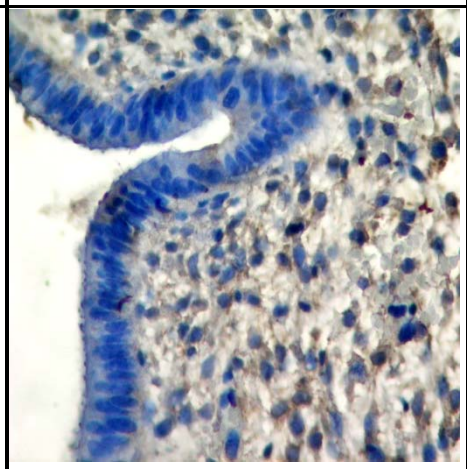
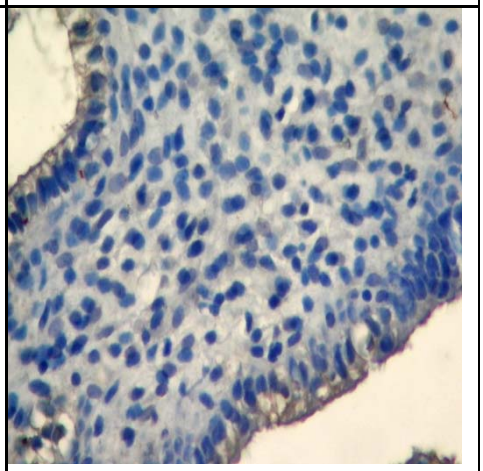
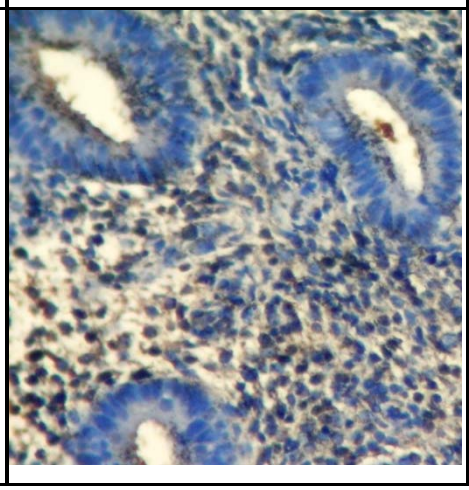
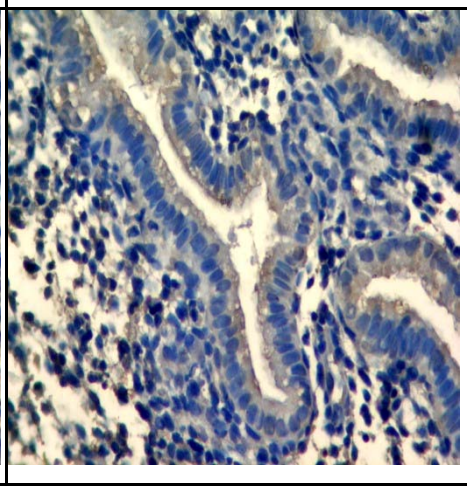
analizi sonucu 154.27±45.00 idi (Tablo 3.2). Kontrol grubunun proliferasyon döneminde luminal ve bez epitelleri ile stromadaki Fdz-6 immunoreaktviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı (P>0.05) gözlenmesi üzerine, Fzd6 immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde endometriyumda dokular arasında farklı olmadığı düşünüldü. Kontrol grubunun sekresyon dönemine ait örneklerinde ise, Fzd6 immunoreaktivitesinin luminal epitelde zayıf, yer yer orta şiddette pozitif olduğu ve HSORE analizinin ise 50.26±11.30 idi (Tablo 3.2). Bez epitelinde Fzd6 immunoreaktivitesi orta şiddette, yer yer kuvvetli pozitif olduğu saptandı (Resim 3.6). HSCORE analizi sonucu ise 110.93±14.71 idi (Tablo 3.2). Stromada ise Fzd6 immunoreaktivitesinin zayıf şiddette ve yer yer negatif olduğu görüldü (Resim 3.6). HSCORE analizi sonucu 43.10±14.05 olarak saptandı (Tablo 3.2). Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde, Fzd6 immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi (P>0.05) (Tablo 3.2).

İnfertil grubuna ait örneklerde Fzd6 immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde, luminal ve bez epitelinde negatif olduğu gözlenirken, immunoreaktivitenin stromada zayıf şiddette pozitif, yer yer negatif olduğu (Resim 7) ve HSCORE değerinin stroma için 62.60±9.29 olduğu saptandı (Tablo 3.2). Stromadaki Fzd6 immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak luminal ve bez epiteli ile anlamlı olmadığı gözlendi (P>0.05). Sekresyon döneminde ise, Fzd6 immunoreaktivitesinin artmış olduğu, luminal ve bez epitelinde orta şiddette pozitif iken, stromada zayıf şiddette pozitif olduğu saptandı (Resim 3.7). HSCORE analizleri sonucunda ise, sekresyon döneminde luminal epitelde 44.00±6.77, bez epitelinde 85.54±18.15 ve stromada ise 30.00±5.16 olduğu görüldü (Tablo 3.2). Tüm alanlarda görülen immunoreaktiviteler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı değildi (P>0.05).

Kontrol grubu ile infertil gruba ait örneklerde Fzd6 immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında, sadece kontrol grubu ile infertil gruplarda proliferasyon dönemindeki stromada bulunan Fzd6 immunoreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı iken (P<0.01), diğer bölgelerdeki immunoreaktivitelerin benzer olduğu ve istatistiksel olarakta anlamlı olmadığı izlendi (P>0.05).

KONTROL (Fzd6)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.6: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Fzd6 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

İNFERTİL (Fzd6)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.7: İnfertill grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Fzd6 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

3.2.4. Dkk1 immunoreaktivitesi:

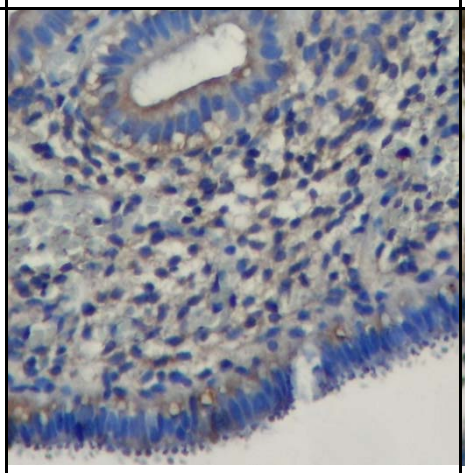
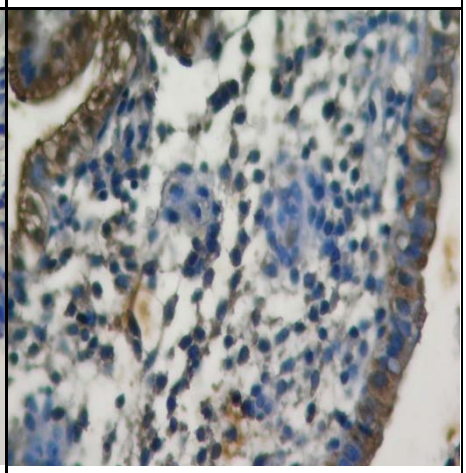
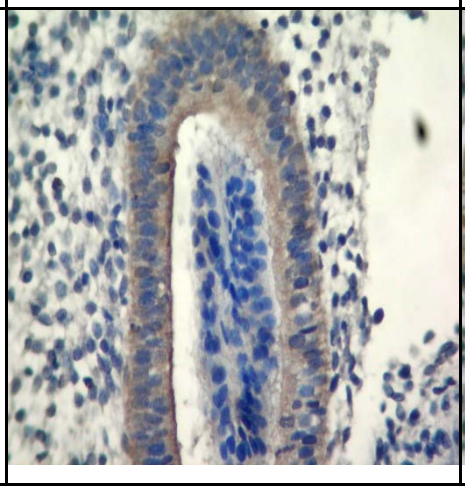
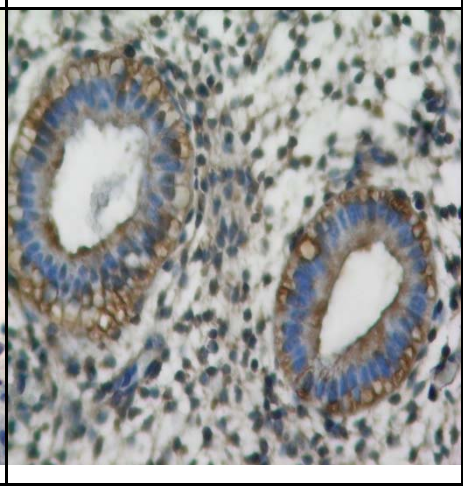
Kontrol grubu hastaların proliferasyon döneminde Dkk1 immunoreaktivitesinin, luminal epitelde zayıf şiddette pozitif ve yer yer negatif olduğu, bez epitelinde orta şiddette pozitif, stromada ise zayıf şiddette pozitif olduğu görüldü (Resim 3.8). Dkk1 immunoreaktivitesi proliferasyon dönemindeki luminal ve bez epiteli ile stromadaki HSCORE analizi sonuçları ise sırasıyla 68.44±13.51, 75.85±12.29 ve 69.46±7.21 olduğu saptandı (Tablo 3.2). Proliferasyon dönemine ait Dkk1 immunoreaktiviteleri karşılaştırıldığında ise

istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (P>0.05). Kontrol grubunun sekresyon döneminde Dkk1 immunoreaktivitesinin ise luminal epitelde orta şiddette pozitif ve yer yer kuvvetli, bez epitelinde kuvvetli pozitif ve stromada ise zayıf, yer yer orta şiddette pozitif olduğu izlendi (Resim 3.8). Sekresyon dönemindeki Dkk1 immunoreaktivitesinin HSCORE analizi sonrasında ise, luminal epitelde 69.50±7.18, bez epitelinde 86.00±9.01 ve stromada 25.68±2.57 olduğu görüldü (Tablo 3.2). Kontrol grubu sekresyon döneminde bez epiteli ile stroma arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark var iken (P<0.05), luminal epitel ile bez epiteli ve stroma arasındaki karşılaştırmada anlamlı fark gözlenmedi (P>0.05).

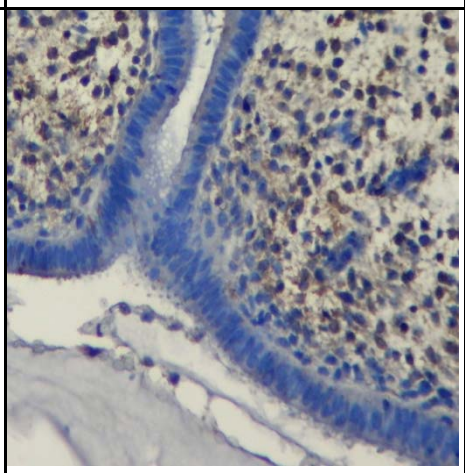
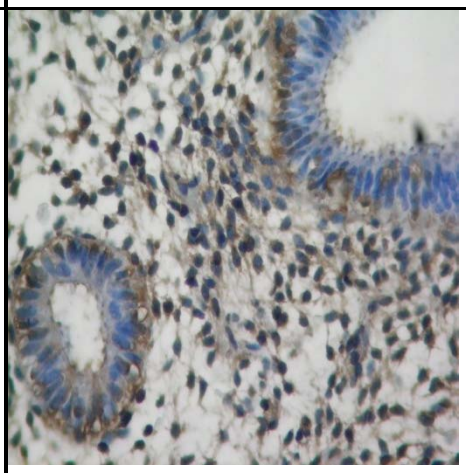
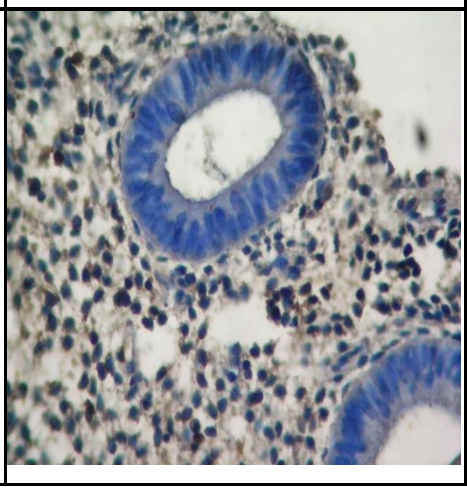
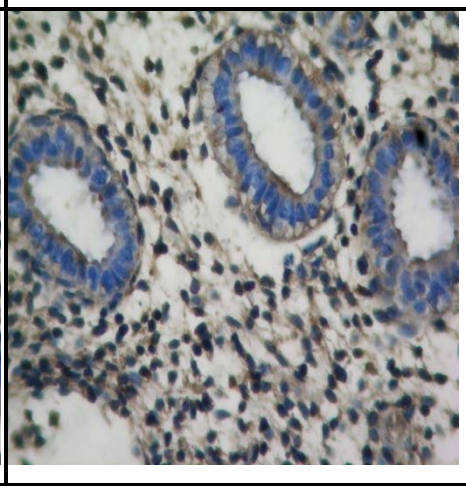
İnfertil gruba ait proliferasyon döneminde ise, Dkk1 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelinde negatif olduğu izlenir iken, stromada zayıf şiddette pozitif ve yer yer negatif olduğu görüldü (Resim 3.9). Proliferasyon dönemine ait örneklerin HSCORE analizi sonucunda ise luminal epitelde 86.78±13.04, bez epitelinde 92.38±21.79 ve stromada 71.46±10.54 olduğu hesaplandı (Tablo 3.2). Proliferasyon dönemine ait Dkk1 immunoreaktiviteleri HSCORE analizi sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise, dokuların immunoreaktivitesi arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlendi (P>0.05). Sekresyon döneminde Dkk1 immunoreaktivitesinin, luminal epitelde zayıf şiddette pozitif, bez epiteinde zayıf ve yer yer orta şiddette pozitif olduğu, stromada ise, yer yer negatif olduğu saptandı (Resim 3.9). Dkk1 immunoreaktivitesinin luminal epitelde 65.00±10.50, bez epitelinde 95.50±32.75 ve stromada 61.11±20.49 olduğu HSCORE analizi sonucunda görüldü (Tablo 3.2). Sekresyon dönemine ait Dkk1 immunoreaktiviteleri karşılaştırıldığında ise immunoreaktvitelerin benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi (P>0.05).

Kontrol ve infertil grupları örnekleri karşılılaştırıldığında her üç bölgedeki immunoreaktivitelerin hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde benzer olmasından dolayı istatistiksel anlamlılık bulunmadı (P>0.05).

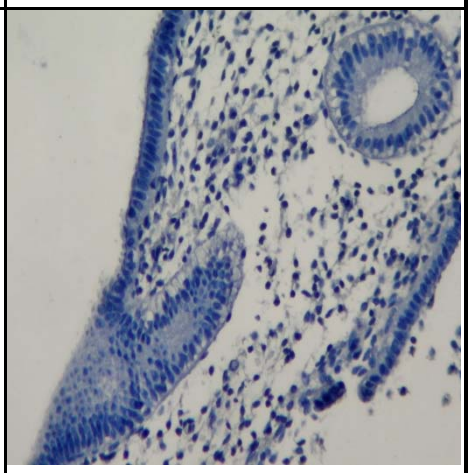
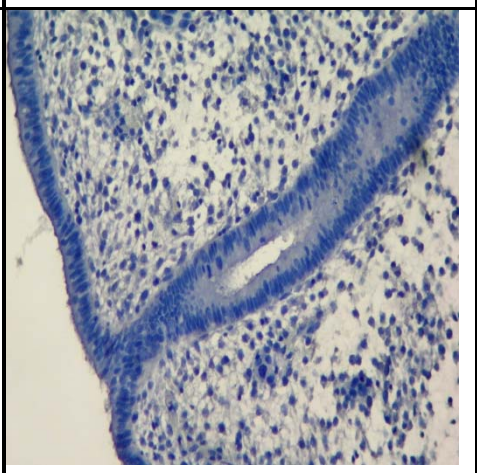
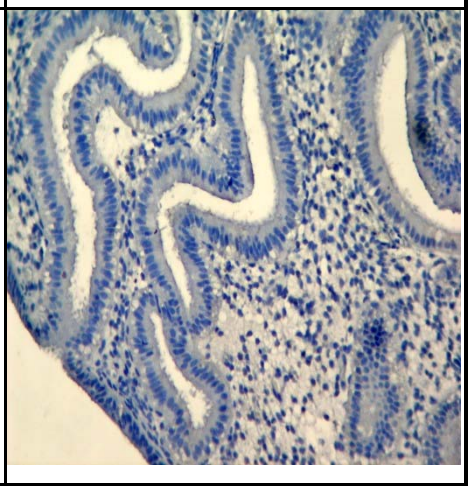
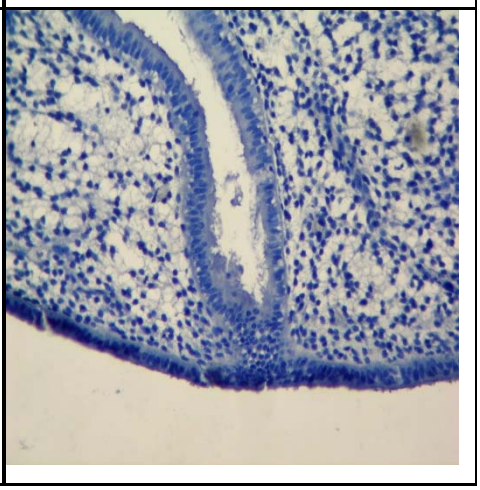
Gruplara ait tüm immunohistokimyasal yoğunlukları Tablo 3.1, HSCORE analiz sonuçları ise Tablo 3.2’ de verilmiştir.

KONTROL (Dkk1)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.8: Kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Dkk1 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

İNFERTİL (Dkk1)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.9: İnfertil grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki Dkk1 immunoreaktivitesinin luminal ve bez epitelindeki dağılımı. X400

Negatif Kontrol (İmmunohistokimya)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Kontrol		
İnfertil		

Resim 3.10: İnfertil ve kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki immunohistokimya boyamasının negatif kontrolleri. X200

Tablo 3.1: Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon ve sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 immunohistokimyasal yoğunluklarının dağılımları.

	KONTROL						**İNFERTİL**					
	Proliferasyon			**Sekresyon**			**Proliferasyon**			**Sekresyon**		
	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma
Wnt7a	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	-	-
β-katenin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fzd6	+/-	++/+++	+	+/++	++/+++	+,+/-	-	-	+/-	++	++	+
Dkk1	-,+/-	++	+	++/+++	+++	+ yer yer ++	-	-	+/-	+	+ yer yer ++	+/-

Tablo 3.2: Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon ve sekresyon dönemlerinden alınan örneklerde Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 immunohistokimyasal dağılımlarının HSCORE değerleri. * (P<0.001), ** (P<0.01), * (P<0.5)**

	KONTROL						**İNFERTİL**					
	Proliferasyon			**Sekresyon**			**Proliferasyon**			**Sekresyon**		
	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma
Wnt7a	23.00 ± 2.36***	0 ***	0 ****	0***	0	0	97.50 ± 34.16***	0	0	24.00 ± 9.20	0	0
β-katenin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fzd6	80.20 ± 14.20	96.2 ± 12.77	154.2 ± 45.00**	50.26 ± 11.30	110.93 ± 14.71	43.10 ± 14.05	0	0	62.60 ± 9.29**	44.00 ± 6.77	85.54 ± 18.15	30.00 ± 5.16
Dkk1	64.44 ± 13.51	75.85 ± 12.29	69.46 ± 7.21	69.50 ± 7.18	86.00 ± 9.01*	25.68 ± 2.57*	86.78 ± 13.04	92.38 ± 21.79	71.46 ± 10.54	65.00 ± 10.50	95.50 ± 32.75	61.11 ± 20.49

3.3. İn Situ Hibridizasyon Analiz Sonuçları

3.3.1. Wnt7a ekspresyonu

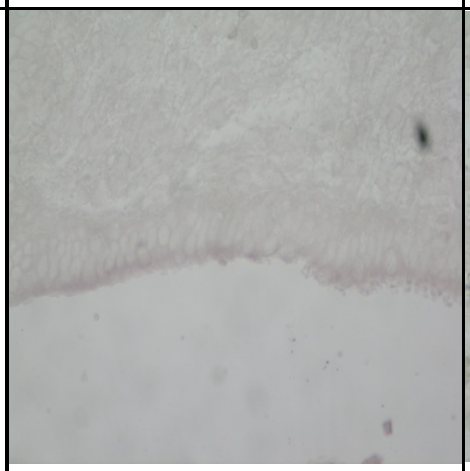
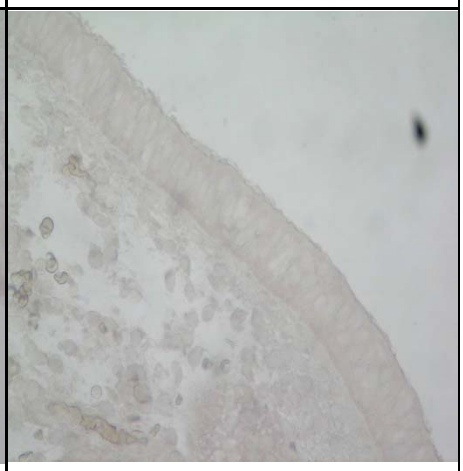
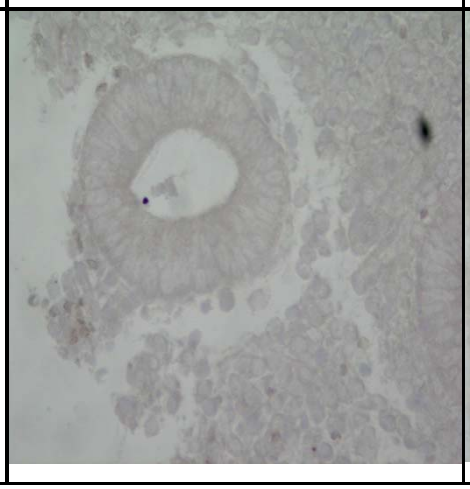
Wnt7a ekspresyonu kontrol grubunda hem proliferasyon hem de sekresyon döneminde luminal ve bez epitellerinde zayıf şiddette pozitif iken, stromada negatif olduğu saptandı (Resim 3.11). Bununla beraber Wnt7a ekspresyonu luminal epitelde her iki dönemde benzer iken, bez epitelinde sekresyon döneminde ekspresyonun orta şiddette olduğu ve proliferasyon dönemine oranla daha fazla olduğu izlendi (Resim 3.11). İn situ hibridizasyon tekniği sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kontrol grubunda proliferasyon döneminde luminal ve bez epitelinde Wnt7a ekspresyonunun stromaya göre anlamlı olduğu ($P<0.001$), luminal epitel ile bez epitelindeki ekspresyonlarının benzer olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi ($P>0.05$). Kontrol grubu sekresyon dönemi Wnt7a ekspresyonu karşılaştırıldığında ise, üç bölgeden alınan ekspresyonların birbirleri arasında anlamlı olduğu saptandı ($P<0.001$).

İnfertil olgularda ise proliferasyon döneminde Wnt7a ekspresyonu luminal epitelde negatif iken, bez epitelinde yer yer zayıf şiddette pozitif olduğu izlendi (Resim 3.12). Wnt7a ekspresyonu stromada infertil olgularda da negatif idi (Resim 3.12). İnfertil olgular ile kontrol grubuna ait proliferasyon dönemlerindeki Wnt7a ekspresyonu karşılaştırıldığında, infertil olgularda ekspresyonun daha az olduğu saptandı. İnfertil olgularda sekresyon dönemine ait Wnt7a ekspresyonu ise hem luminal hem de bez epitelinde orta şiddette pozitif, stromada ise negatif olduğu izlendi. (Resim 3.12). İnfertil olgularda sekresyon dönemindeki Wnt7a ekspresyonunun proliferasyon dönemine göre daha fazla olduğu saptandı (Resim 3.12). Wnt7a ekspresyonunun infertil olgularda saptanan sekresyon dönemindeki dağılımı, kontrol grubu sekresyon dönemi ile karşılaştırıldığında, bez epitelindeki ekspresyonlar benzer iken, luminal epitelde infertil olgularda ekspresyonda artış olduğu izlendi.

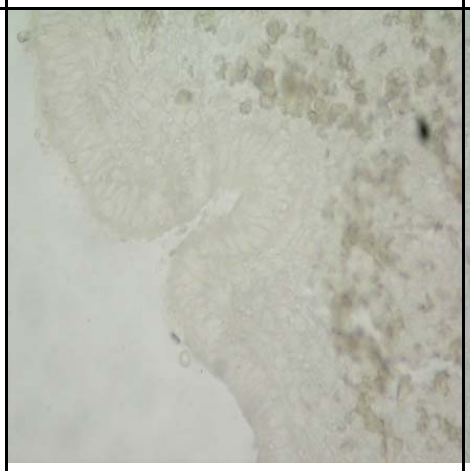
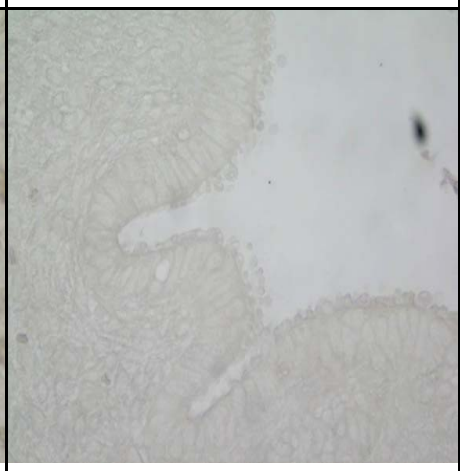
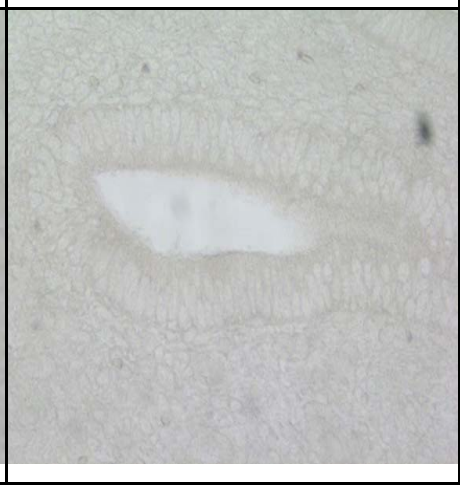
İnfertil grubunda Wnt7a ekspresyonları proliferasyon döneminde

karşılaştırıldığında ise, bez epitelindeki ekspresyonun luminal epitel ve stromaya oranla istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi (P<0.001). Sekresyon dönemindeki Wnt7a ekspresyonu ise, hem luminal hem de bez epitelindeki artışdan dolayı stromaya oranla her iki bölgedeki ekspresyonların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi (P<0.001).

Kontrol grubu ile infertil gruplardaki Wnt7a ekspresyonları karşılaştırıldığında, proliferasyon döneminde luminal ve bez epitellerindeki ekspresyonlar istatistiksel olarak anlamlı iken (P<0.001), stromada her iki grupta da ekspresyon gözlenmediğinden dolayı anlamsız idi (P>0.05). Sekresyon döneminde luminal epitelde Wnt7a ekspresyonu istatistiksel olarak infertil gruplarda daha fazla iken (P<0.001), bez epiteli ve stromadaki Wnt7a ekspresyonlarının kontrol grubu ile benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (P>0.05).

KONTROL (Wnt7a)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.11: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Wnt7a ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400.

İNFERTİL (Wnt7a)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.12: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Wnt7a ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400.

3.3.2. β-katenin ekspresyonu

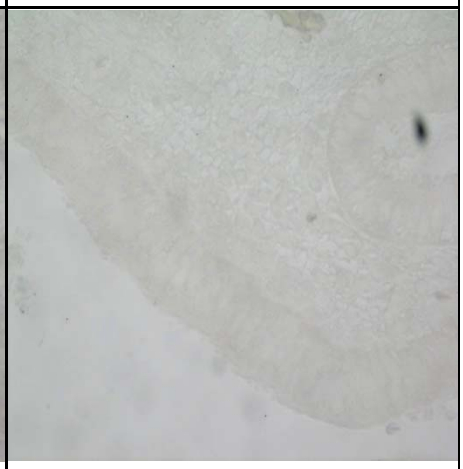
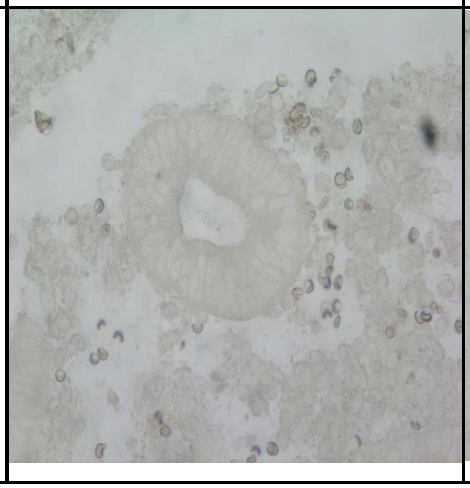
Kontrol grubu proliferasyon dönemine ait kesitlerde yapılan in situ hibridizasyon analizi sonucunda, β-katenin ekspresyonunun luminal epitelde zayıf şiddette, bez epitelinde ise zayıf şiddette ve yer yer negatif olduğu gözlendi (Resim 3.13). Stromada ise proliferasyon döneminde ekspresyona rastlanmadı (Resim 3.13). Ekspresyonlar istatistiksel olarak incelendiğinde ise, luminal epitel ile bez epiteli arasında benzer ekspresyon gözlenir iken (istatistiksel olarak anlamlı değil $P>0.05$), hem luminal hem de bez epiteline ait

ekpresyonların stromaya göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (sırasıyla, P<0.001, P<0.05). Sekresyon döneminde ise β-katenin ekspresyonunun hem luminal hem de bez epitelinde zayıf, yer yer negatif olduğu, stromada ise negatif olduğu gözlendi (Resim 3.13). Sekresyon dönemindeki β-katenin ekspresyonu istatistiksel olarak incelendiğinde ise, sadece luminal epitel ile stroma arasında anlamlı olduğu (P<0.05), luminal epitel ile bez epiteli ve stroma arasındaki ekspresyonların anlamlı olmadığı saptandı (P>0.05). Kontrol grubunda proliferasyon dönemi ile sekresyon dönemlerindeki β-katenin ekspresyonu karşılaştırıldığında ise, ekspresyonların benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (P>0.05).

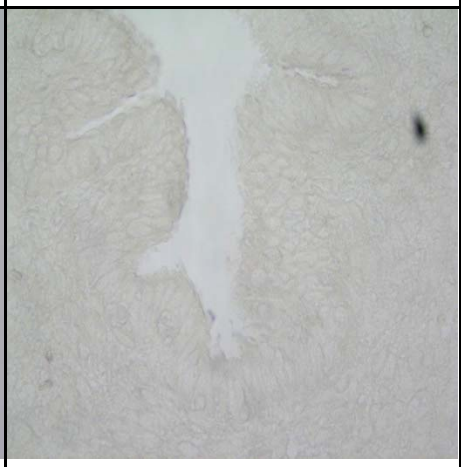
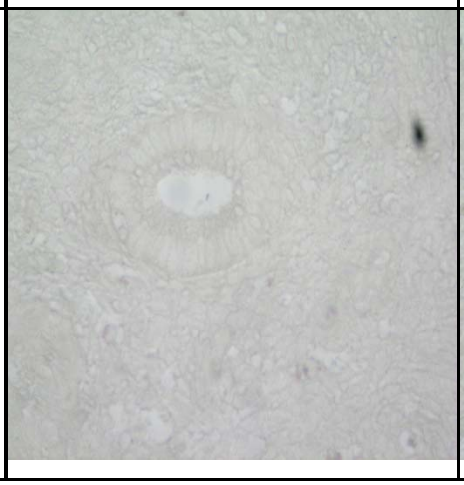
İnfertil olgularda β-katenin ekspresyonunun proliferasyon döneminde luminal epitelde negatif iken, bez epitelinde negatif, yer yer zayıf şiddette pozitif olduğu, stromada da ekspresyonun negatif olduğu (Resim 3.14) ve ekspresyonların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi (P>0.05). İnfertil olguların sekresyon döneminde hem luminal hem de bez epitelinde β-katenin ekspresyonunun zayıf şiddette iken, stromada ekspresyonun olmadığı görüldü (Resim 3.14). Sekresyon döneminde, β-katenin ekspresyonunun luminal ve bez epitelinde stromaya göre daha fazla olduğu ve istatistiksel olarakta anlamlı iken (P<0.001), luminal epitel ekspresyonu ile bez epitelindeki ekspresyonlar karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi (P>0.05). İnfertil olgularda proliferasyon ile sekresyon dönemindeki β-katenin ekspresyonu karşılaştırıldığında, sekresyon döneminde luminal ve bez epitelinde ekspresyonların daha fazla olduğu (Resim 3.14) ve istatistiksel olarakta anlamlı olduğu (P<0.001), stromadaki ekspresyonun ise her iki dönemde de negatif olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (P>0.05).

Kontrol grubu ile infertil gruplardaki β-katenin ekspresyonları karşılaştırıldığında, proliferasyon dönemine ait örneklerde luminal ve bez epitellerindeki ekspresyonlar istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenirken (P<0.001), stromada her iki grupta da ekspresyonun olmadığı saptandı. Sekresyon döneminde ise luminal ve bez epitelinde β-katenin ekspresyonu

infertil gruplarda kontrol grubuna göre daha fazla iken (P<0.001), stromadaki β-katenin ekspresyonlarının kontrol grubu ile benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (P>0.05).

KONTROL (β-katenin)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.13: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait β-katenin ekpresyonunun luminal be bez epitelindeki dağılımları. X400

İNFERTİL (β-katenin)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.14: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait β-katenin ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400

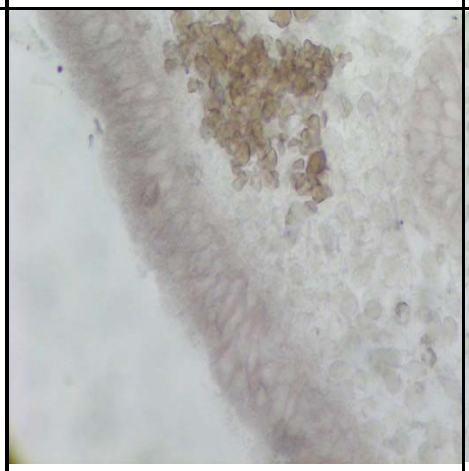
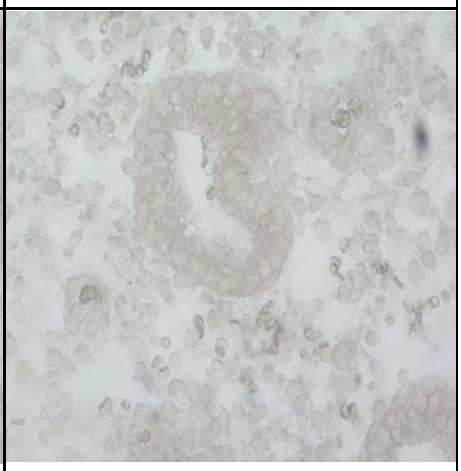
3.3.3. Fzd6 ekspresyonu:

Fzd6 ekspresyonu kontrol grubu proliferasyon döneminde luminal ve bez epitelinde orta şiddette pozitif olduğu saptanır iken, stromada ekspresyon gözlenmedi (Resim 3.15). Proliferasyon dönemindeki ekspresyonlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde luminal ve bez epitellerindeki ekpresyonlar anlamlı değil iken ($P>0.05$), luminal ve bez epitellerindeki ekspresyonların stromadaki ekspresyona göre anlamlı olduğu gözlendi ($P<0.001$). Kontrol grubunda, Fzd6,

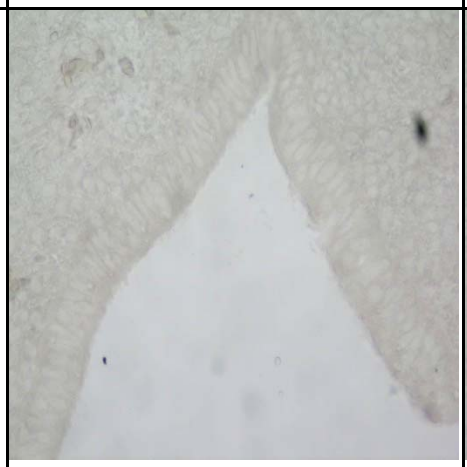
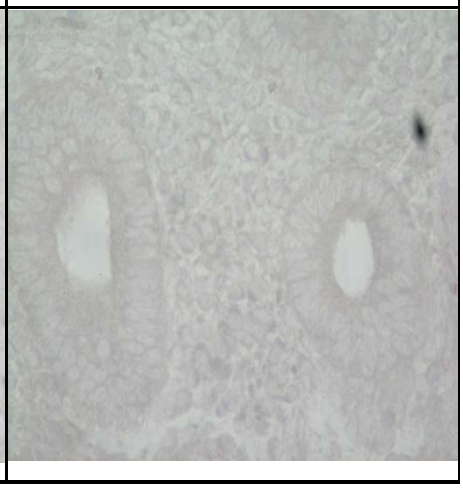
sekresyon döneminde, hem luminal hem de bez epitelin zayıf şiddette olduğu, stromada yine ekspresyonun olmadığı izlendi (Resim 3.15). İstatistiksel olarakta sekresyon dönemindeki ekspresyonların proliferasyon dönemi ile benzer olduğu, luminal epitel ile bez epitelindeki ekspresyonlar anlamlı değil iken (P>0.05), stroma ile her iki epitel ekspresyonlarının anlamlı olduğu saptandı (P<0.001). Kontrol grubundaki proliferasyon ve sekresyon dönemlerindeki Fzd6 ekspresyonları karşılaştırıldığında, Fzd6 ekspresyonunun sekresyon döneminde luminal ve bez epitellerinde azaldığı, stromada her iki dönemde ise negatif olduğu görüldü. Sekresyon dönemindeki Fzd6 ekspresyonundaki azalmanın istatistiksel olarakta anlamlı olduğu saptandı (P<0.001).

İnfertil olgulardan alınan proliferasyon dönemindeki endometriyum örneklerinde Fzd6 ekspresyonunun kontrol grubuna benzer olarak orta şiddette olduğu gözlenir iken, stromada ekspresyonun olmadığı izlendi (Resim 3.16). Fzd6 ekspresyonu luminal epitel ile bez epitelinde benzer iken, istatistiksel olarak da anlamlı değil idi (P>0.05). Buna karşın hem luminal hem de bez epitelindeki Fzd6 ekspresyonları stromaya göre anlamlı olduğu saptandı (P<0.001). Sekresyon döneminde Fzd6 ekspresyonunun hem luminal hem de bez epitelinde zayıf yer yer negatif olduğu, stromada ekspresyonun olmadığı gözlendi (Resim 3.16). Fzd6 ekspresyonu sekresyon döneminde luminal epitel ile bez epitelinde benzer iken, her iki epiteldeki ekspresyon stromaya göre anlamlı idi (P<0.001). İnfertil olgularda proliferasyon ile sekresyon dönemindeki Fzd6 ekspresyonu karşılaştırıldığında, her iki dönemde de stromada negatif olduğu, fakat sekresyon döneminde ekspresyonun istatistiksel olarakta anlamlı şekilde azaldığı gözlendi (P<0.001).

Kontrol grubu ile infertil gruplar karşılaştırıldığında ise, hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde Fzd6 ekspresyonunun benzer olduğu ve istatistiksel olarakta anlamlı olmadığı saptandı (P>0.05).

KONTROL (Fzd6)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.15: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Fzd6 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400.

İNFERTİL (Fzd6)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.16: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Fzd6 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400

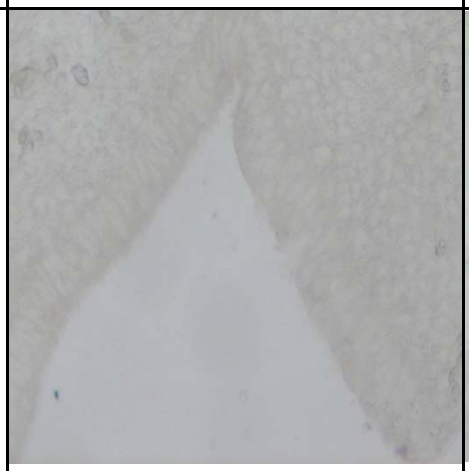
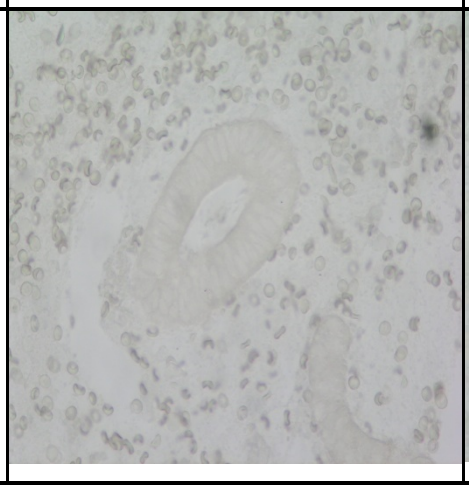
3.3.4. Dkk1 ekspresyonu

Kontrol grubu proliferasyon döneminde alınan endometriyum örneklerinde Dkk1 ekspresyonun hem luminal hem de bez epitelinde negatif olduğu, sekresyon döneminde ise luminal ve bez epitelinde negatif, yer yer zayıf şiddette ekspresyonun varlığı saptandı (Resim 3.17). Bununla beraber her iki dönemde de stromada Dkk1 ekspresyonu gözlenmedi (Resim 3.17).

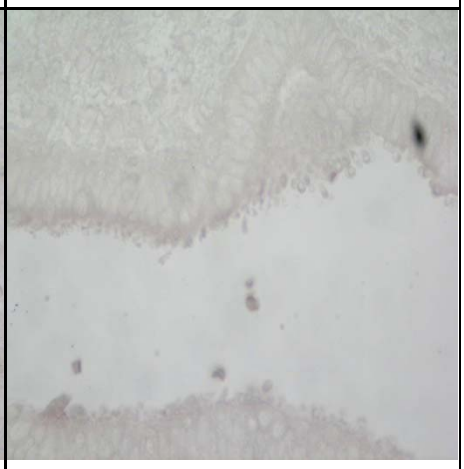
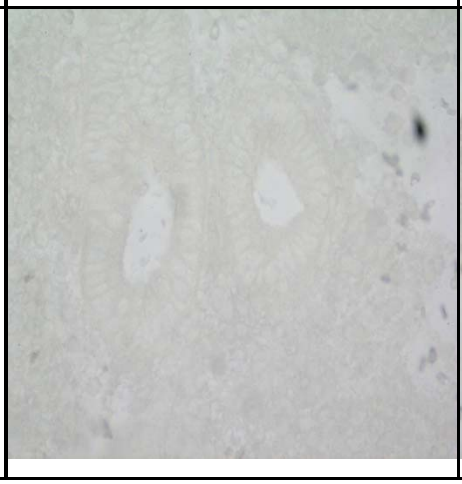
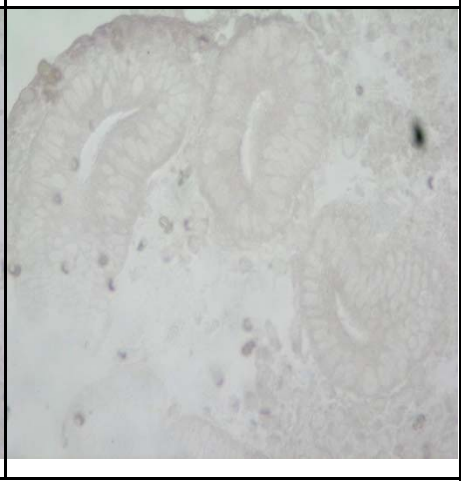
İnfertil gruplarda ise proliferasyon dönemine ait örneklerde luminal epitlede Dkk1 ekspresyonu negatif iken, bez epitelinde negatif yer yer zayıf şiddette

pozitif olduğu gözlendi (Resim 3.18). İnfertil olgularda sekresyon döneminde ise, Dkk1 ekspresyonun luminal ve bez epitelinde zayıf şiddette, yer yer negatif olduğu saptandı (Resim 3.18). İnfertil gruplarda her iki dönemde de Dkk1 ekspresyonu, luminal ve bez epiteinde ve stromada negatif idi. Kontrol ile sekresyon gruplarının proliferasyon ve sekresyon dönemleri karşılaştırıldığında ise, ekspresyonların benzer olduğu istatistiksel olarak gruplar kendi içlerinde ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında Dkk1 ekspresyonunun anlamlı olmadığı saptandı ($P>0.05$).

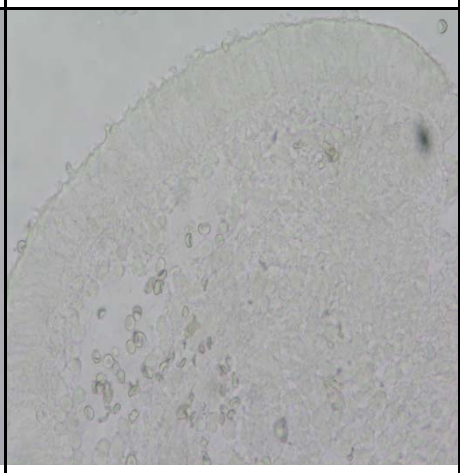
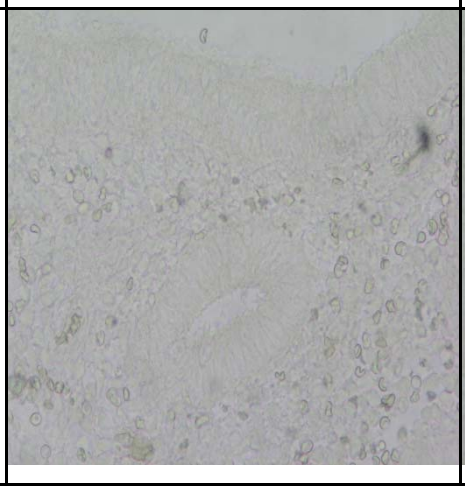
Kontrol ve infertil gruplara ait örneklerdeki in situ hibridizasyon yöntemi ile elde edilen Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 ekspresyonlarının dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

KONTROL (Dkk1)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.17: Kontrol grubuna ait olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Dkk1 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400

İNFERTİL (Dkk1)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Luminal Epitel		
Bez Epiteli		

Resim 3.18: İnfertil olgularda proliferasyon ve sekresyon dönemine ait Dkk1 ekpresyonunun luminal ve bez epitelindeki dağılımları. X400

Negatif Kontrol (İn Situ Hibridizasyon)		
	Proliferasyon	**Sekresyon**
Kontrol		
İnfertil		

Resim 3.19: İnfertil ve kontrol grubuna ait proliferasyon ve sekresyon dönemindeki, in situ hibridizasyon tekniği ile negatif kontrol boyamaları. X400

Tablo 3.3: Tablo 3.1: Kontrol ve infertil olgulardan proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde alınan örneklerde, in situ hibridizasyon tekniği sonucu Wnt7a, β-katenin, Fzd6 ve Dkk1 ekspresyonlarının dağılımları
***** (P<0.001), ** (P<0.01), * (P<0.5)**

	KONTROL						**İNFERTİL**					
	Proliferasyon			**Sekresyon**			**Proliferasyon**			**Sekresyon**		
	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma	Luminal Epitel	Bez Epiteli	Stroma
Wnt7a	+ ***	+ ***	-***	+***	++***	-***	-***	- yer yer +/-***	-***	++***	++***	-***
β-katenin	+***	+, +/-*	-*	+/-*	+/-	-*	-	- yer yer +/-	-	+***	+***	-***
Fzd6	++***	++***	-***	+***	+***	-***	++***	++***	-***	+ , +/-***	+ , +/-**	-***
Dkk1	- *	- *	- *	+/- ***	+/- ***	- *	- *	- yer yer +/-	- *	+/- ***	+/- ***	- *

2. TARTIŞMA

Wingless (Wnt) ligantları embriyonik gelişimde, kök hücre onarımında, farklılaşmada ve doku hemaostazisinde önemli rol oynar (5). Wnt ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve β-kateninin çekirdek üzerinden etkili kanonikal Wnt yolağı, çeşitli üreme dokularının farklılaşması ve gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir. İnsan ve fare endometriyumunda ve plasental gelişimde Wnt ligantlarının ve reseptörlerinin ekspresyonlarının olduğu da bildirilmiştir (2, 5). İnsanlarda östrojene bağlı hücre proliferasyonu, desidualizasyon, trofoblast farklılaşması ve invazyonunun, bölgesel sinyal yolakları ile kontrol edildiği gösterilmiştir (20). İmplantasyonda esas olarak blastokist aktivasyonu ve uterusun kabul edilebilirliği arasındaki senkronizasyon önemlidir (135). Ayrıca implantasyonla birlikte trofoblast ve uterus luminal epiteli arasında gerçekleşen biyolojik süreçte hem embriyonik hem de maternal olarak salgılanan birçok faktör rol alır (62, 63, 65, 70, 73, 74).

Sinyal moleküllerinden Wnt ailesi üyeleri, hücre özellikleri ve epiteliyal-mezenşimal etkileşimlerde rol oynar (5). Endokrine duyarlı bir doku olan insan endometriyumunda da implantasyon sırasında epiteliyal-mezenşimal etkileşimin olmasından dolayı Wnt ailesi üyelerinin önemi göz ardı edilemez (136). Özellikle menstrual siklusun proliferasyon ve sekresyon fazlarındaki Wnt ligantlarının (Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt8b) reseptörlerinin (Fzd6 ve LRP6), inhibitörlerinin (FrpHE ve Dkk1) ve efektörlerinin (Dvl1, GSK-3B ve β-katenin), bunların endometriyal ekspresyonları, normal dokuda daha önceki çalışmalar da da incelenmiştir (123). Bu aile üyelerinden Wnt3 ekspresyonunun proliferatif endometriyumda sekretuar endometriyuma kıyasla daha fazla olduğunun gösterilmesi ile birlikte Wnt7a ekspresyonunun da luminal epitelden eksprese olduğu saptanmıştır (123). Fzd6 reseptörü ve β-katenin efektörü ise aynı dönemde hem epitelden hem de stromadan eksprese edildiği bildirilmiştir (18). Buna karşın, Dkk1 ekspresyonunun ise proliferasyon ve sekresyon fazı boyunca stromada sınırlı olduğu vurgulanmıştır (123). Endometriyumun farklı hücre tiplerindeki Wnt ailesi ekspresyonu ile birlikte reseptör, inhibitör ve

efektörlerinin farklı regülasyonları, menstrual siklusun proliferasyon ve sekresyon fazları sırasında tespit edilmiş olması, implantasyona hazırlık döneminde endometriyumda, epiteliyal ve stromal yapıları arasındaki Wnt sinyal iletişiminin önemini desteklemektedir. Wnt ailesi üyelerinin embriyonik dönemde de salgılanması, endometriyal gelişim ve farklılaşmada önemli olması, embriyonik dönemden itibaren erişkinde de Wnt ailesi üyeleri ve regülatörlerinin salgılarının farklı dönemlerde farklı şekilde önemli olduğunu düşündürmektedir. Örneğin Wnt7a eksikliği olan farelerin uterus bezi gelişmemekte ve uterus düz kasları organize olamamaktadır (137).

İmplantasyon sırasında insan endometriyumunun ovaryum hormonlarına yanıt veren ve implantasyona hazırlık aşamasında menstural siklus boyunca dinamik yapılanmalar geçiren kompleks bir doku olduğu bilinmektedir (138). İmplantasyon sırasında embriyodan salgılanan faktörler EGF, TGF-α, IL-6, PDGF, IGF-II vb. iken, maternal olarak salgılanan faktörler MUC-1, LIF, EGF-TGF-α vb. olarak özetlenebilir (59, 63, 64, 65, 69). Bununla beraber embriyodan salgılanan bazı faktörlerin reseptör veya ligandları endometriyumda bulunur iken, maternal olarakta salgılanan bazı faktörlerin reseptör ve ligandları blastokistte bulunmaktadır. Örnek olarak EGF-R, PDGF-R, LIF-R, IL-6-R vb. verilebilir. Bunun yanında, steroid hormonları, LIF gibi sitokinler, Heghod morfojenler ve diğerlerinin farelerdeki uterus kabul edilebilirliğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İmplantasyon sırasında önemli olan yolaklardan biri de Wnt/β-katenin yolağıdır. Wnt ailesi genlerinin ve inhibitörlerinin, hem endometriyum hem de gelişen blastoksit ve embriyoda ekspresyonları gösterilmiştir (20). Normal menstrual siklus sırasında Wnt7a'nın insan endometriyumunda luminal epitelde salgılandığı, bez epiteli ve stromada da salgısının olduğu fakat luminal epitele oranla daha az olduğu gösterilmiştir (2, 5, 20). Bununla beraber normal menstrual siklusun proliferasyon ve sekresyon evrelerinde farklılık gözlenmemiştir.

Çalışmamızda **Wnt7a** immunoreaktivitesi kontrol grubunda proliferasyon döneminde, luminal epitelde gözlenir iken, bez epiteli ve stromada immunoreaktivitenin negatif olmasına rağmen, mRNA ekspresyonlarının

proliferasyon döneminde luminal ve bez epitelinde olduğu gösterilmiştir. Stromada hem immunoreaktiviteye rastlanmamış hem de mRNA ekspresyonu gözlenmemiştir. O nedenle kontrol gruplarındaki Wnt7a ekspresyonunun bez epitelinde mRNA düzeyinde daha fazla olduğu, fakat luminal epitelde hem mRNA hem de protein bazında salgılanması, implantasyona hazırlık aşaması açısından, implantasyonun gerçekleşeceği luminal epitel açısından önemli olduğunu düşündürdü. İnfertil gruplarda ise proliferasyon dönemindeki Wnt7a immunoreaktivitesinin luminal epitelde pozitif iken, mRNA sının eksprese edilmediği gözlendi. Kontrol grubu prolifreasyon evresinde Wnt7a immunoreaktivitesinin ve mRNA ekspresyonun luminal epitelde olduğu gözlenir iken, sekresyon döneminde sadece mRNA ekspresyonu olduğu gözlenmesi üzerine, kontrol grubunda Wnt7'nın proliferasyon döneminde başlayan ekspresyonun sekresyon dönemine kadar devam ettiği fakat, protein salgısının sekresyon döneminde daha az olduğu gözlendi. İnfertil gruplarda proliferasyon döneminde Wnt7a immunoreaktivitesi sadece luminal epitelde olduğu fakat bu dönemde mRNA ekspresyonunun olmadığı izlendi. Sekresyon döneminde Wnt7a hem immunoreaktivitesinin hem de mRNA ekspresyonun olduğu ve bez epitelindeki ekspresyonlarınında luminal epitel ekspresyonuna eşlik ettiği saptandı. Özellikle sekresyon döneminde Wnt7a ekspresyonun artmış olması proliferasyon döneminde olmasını beklediğimiz Wnt7a ekspresyonunun geç olduğunu göstermektedir. O nedenle infertil gruplarda Wnt7a ekspresyonun geç olması implantasyon aşamasında endometriyumun hazırlanmasında gecikmeye sebep olabilir. Çünkü normal endometriyumda proliferasyon döneminde başlayan ve sekresyon döneminde devam eden luminal epiteldeki Wnt7a varlığı implantasyon için önemlidir. Bununla beraber kontrol ve infertil gruplarda Wnt7a immunoreaktivitesinin hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde bez epitelinde görülmemesine rağmen, ekspresyonunun her iki grupta ve her iki dönemde var olduğu ve özellikle sekresyon dönemlerinde artmış olduğu saptandı. Fakat kontrol grup örnekleri ile infertil grup örnekleri arasında anlamlı fark olmaması, implantasyon aşamasında bez epitelinden ziyade luminal epitelden salgılanan Wnt7a ekspresyonun varlığının önemli olabileceğini

düşündürdü. Buna ilaveten, stromada Wnt7a immunoreaktivitesinin ve ekspresyonun proliferasyon ve sekresyon dönemlerinde gözlenmemesi, yapılan çalışmalarda fare uterus duvarında embriyonun varlığı ile birlikte Wnt7a nın stromadan da salgılandığı gösterilmesi üzerine (18) hem uterin lümende embriyonun olmaması, hem de implantasyon için gerekli luminal ve/veya embriyonal faktörlerin salgılanmamış olmasından dolayı olabileceği düşünüldü. Wnt7a immunoreaktivitesinin özellikle normal endometriyumda luminal epitelde salgılandığı, bezlerin oluşumunda ve stromal desidualizasyonun da rol oynayan önemli faktörlerin başında geldiği bilinmektedir (20). Bununla beraber endometriyumun sekresyon ve proliferasyon fazında Wnt2, Wnt4 ve Wnt5a mRNA ekspresyonularının daha az olmasına rağmen, Wnt3'ünde proliferasyon fazında düzenli bir regülasyona sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (139). Ayrıca Wnt7a, Wnt7b, Wnt11 ve Wnt16 ekspresyonlarınında fare uterusunda implantasyon boyunca yüksek olduğu, fakat desidualizasyon sırasında düşük olduğunun görülmesi üzerine bu faktörlerin özellikle implantasyon öncesinde ve sırasında daha önemli olduğu vurgulanmıştır (140). Wnt7a transjenik farelerde de endometriyal stromada HoxA10 ve HoxA11 ekspresyonlarının olmamasından dolayı desidualizasyonun başarısız olmasına ve infertiliteye sebep olduğuda gösterilmiştir (141). Bizim çalışmamız sonucunda da kontrol grubu ile infertil gruplar arasında fark olmasından dolayı Wnt7a ekspresyonundaki değişikliğin infertiliteye neden olabileceği düşünüldü.

β-katenin endometriyal siklusun hem proliferasyon hem de sekresyon fazı boyunca bez epitelinde ve stromada eksprese edildiği gösterilmiştir (19). Buna karşın gen knock-out çalışmaları ile β-katenin eksikliği yaşayan mutant embriyolar blastokist evresine kadar gelişebilmektedirler (142). Ancak β-katenin preimplantasyon döneminde zigotik protein eksikliğininin telafi edilebildiği, TCF/β-katenin inhibisyonunun, Dkk1 ekspresyonunudaki artış ile birlikte blastokist formasyonunu negatif olarak etkilemediği gösterilmiştir (143). Embriyonik dönemde β-katenin yerine konulabilir bir faktör olması üzerine, preimplantasyon evresi boyunca da olmasa da olabileceği fikri öngörülmüştür (144). Çalışmamızda β-katenin immunoreaktivitesinin her iki grupta ve her iki

dönemde de negatif olduğunu izledik. Bu sonuçla ilgili antikorun etkinliğini kontrol etmek amacı ile immunohistokimya için pozitif kontrol boyaması yapıldı. Boyama için kanser hücre hattı kullanılmış olup, pozitif boyanma gözlendiğinden, çalışmamızda β-katenin immunoreaktivitesi dokuta β-katenin olmadığından dolayı negatif olduğu saptandı. Kontrol grubunda proliferasyon döneminde luminal ve bez epitelinde β-katenin ekspresyonunun gözlendiği, infertil gruplarda proliferasyon döneminde sadece bez epitelinde ekspresyonun olduğu gözlenmiş olup ve istatistiksel olarakta anlamlı olduğu saptandı. Bu bağlamda, infertil olgularda β-katenin ekspresyonunun, proliferasyon döneminde endometriyumun sekresyon dönemine hazırlık açısından salgısının olmaması nedeni ile implantasyon için gerekli sinyal yolaklarının tetiklenebilmesi açısından yetersiz olabileceği düşünüldü. Bununla beraber hem kontrol hem de infertil gruplarda sekresyon döneminde β-katenin ekspresyonunun hem luminal hem de bez epitelinde var olduğu, buna karşın infertil gruplardaki ekspresyonlarının kontrol grubuna oranla artmış olması, proliferasyon döneminde olmayan ekspresyonun gecikmiş olabileceğini desteklemektedir. Bununla beraber stromada β-katenin ekspresyonlarının gözlenmemesi implantasyona hazırlık evresinde luminal ve bez epitellerinin daha önceden (belki menstuasyondan hemen sonra) uyarıldığını göstermektedir. Ayrıca blastokistin miyometriyumundaki düz kas hücrelerindeki TCF/β-katenin bağımlı sinyali azalttığı gösterilmiş (180) olması üzerine, çalışmamızda da bulunduğu gibi β-katenin salgısı implantasyon öncesi ekspresyonu yolağın diğer faktörlerine oranla daha azdır ve kontrol grubu ile infertil grubu arasında farkın anlamlı olmamasından dolayı, β-katenin salgısının infertil gruplarda değişik olmadığını göstermektedir.

Fzd alıcıları ve Wnt ligandların implantasyon öncesi ve boyunca stromal hücre farklılaşmasında olduğu gibi fare uteruslarında eksprese edildiği görülmüştür (18). Özellikle Wnt4 ve Wnt7a ile birlikte Fzd gen ekspresyonlarının farede fertilizasyondan sonraki 5. günde yani implantasyonun olması planlanan dönemde olduğu saptanmıştır (140). Wnt-Fzd etkileşimleri ve protein-reseptör ilişkisinin önemi bilinmektedir. Bununla beraber menstrual siklus sırasındaki

endometrial, implantasyon sırasında desidual ve embriyonik gelişimde plasental (özellikle trofoblast farklılaşması) non-kanonikal sinyal yolağının önemi tam olarak aydınlatılamamıştır (140). Çalışmamızda, Fzd6 immunoreaktivitesinin ve ekspresyonunun kontrol grubunda hem proliferasyon hem de sekresyon döneminde varlığı ve sekresyon döneminde özellikle luminal epitelde artmış olması, Wnt7a ekspresyonu ile uyumludur. Çünkü Wnt7a nın foksiyonel olarak aktif olabilmesi ve hücre içi sinyalizasyonu başlatabilmesi için Fzd6 nın varlığı ve Wnt-Fzd komplesinin aktif olması gerekmektedir (5). Normal menstrual siklusda da Fzd6 ekspresyonu Wnt7a ekspresyonu ile birlikte eş zamanlı artar (19). İnfertil gruplarda ise Fzd6 immunoreaktivitesinin proliferasyon döneminde negatif iken, ekspresyonun var olduğu gözlendi. Buna ilaveten sekresyon döneminde hem immunoreaktivitenin hem de ekspresyonun olduğu ve kontrol grubunun sekresyon dönemindeki immunoreaktivite ve ekspresyonlarına benzer olduğu saptandı. Bunun yanında infertil gruplarda proliferasyon dönemindeki negatif immunoreaktiviteye karşın pozitif ekspresyonun olması kontrol grubu ile arasında fark oluşturmakta idi. Normal örneklerde Fzd6 ekspresyonun proliferasyon döneminde başlaması ve Wnt sinyal yolağının aktivasyonu için gerekli olmasından dolayı, infertil vakalarda gecikmiş ekspresyon olabileceği ön görüldü. Bunun üzerine Fzd6'daki gecikmiş olan uyarılmanın, β-katenin gecikmesi ile uyumlu olmasından dolayı, infertil gruplarda proliferasyon döneminde, Wnt7a üzerinden olması beklenen hücre içi Wnt/β-katenin aktivasyonun gerçekleşemediği düşüncesini desteklemektedir. O nedenle Wnt/β-katenin yolağının aktivasyonu için reseptörlerinin varlığı ve aktivasyonu da önemlidir.

Dkk1, Wnt yolağında inhibitör olarak görev alır ve fare trofoblast hücre invazyonunda antogonist olarak davrandığı gösterilmiştir (123). Ayrıca proliferatif endometriyumda Wnt3 ekspresyonunda artış gözlenir iken, Dkk1 ekspresyonunun ise sekretuar fazın ortalarında artış olduğu belirtilmiştir (18). Ayrıca Dkk1 in endometriyal stromal hücrelerde progesteron ile upregüle olduğu da gösterilmiştir (19). Dkk1 in progesterona bağlı indüksiyonunda Wnt sinyalinin inhibe olduğu ve bununla bağlantılı olarak desidualizasyonun da bu yolak

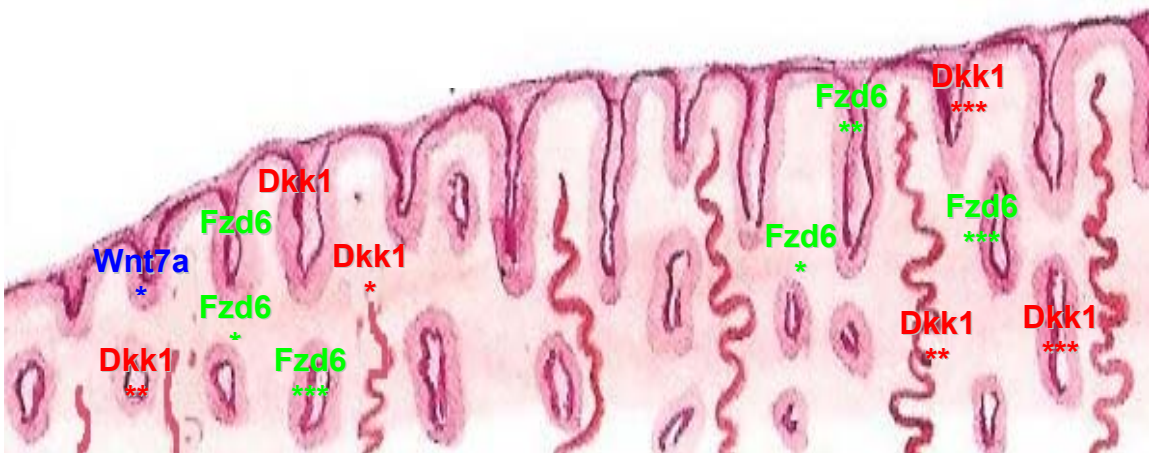
üzerinden baskılandığı gösterilmiştir (145). Kısaca Dkk1, endometriyumda trofoblastın adezyonu ve implatasyonunda negatif bir aktivite göstermektedir (146). Microarray analizi sonuçlarına göre, Dkk1 ve Wnt10 ekspresyonunun erken ve orta luteal faz arasında esas olarak arttığı ve regülasyonun da steroid hormonlar aracılı olduğu vurgulanmıştır (147). Çalışmamızda Dkk1 immunoreaktivitesi kontrol grubu proliferasyon döneminde gözlenir iken, ekspresyonun olmadığı saptandı. Buna karşın sekresyon döneminde hem immunoreaktivitenin hem de ekspresyonun varlığının saptanması literatür ile uyumlu olup, özellikle Dkk1'in sekresyon döneminin ortalarında arttığı gösterilmiştir (18). Bununla beraber ekspresyonun immunoreaktiviteye oranla daha az olması, Dkk1 in daha önceden eksprese edildiği ve dokuda depolandığı hipotezini desteklemektedir. İnfertil gruplarda ise, proliferasyon döneminde immunoreaktivitenin sadece stromada olduğu, fakat zayıf olarak ekspresyonun bezde de olduğu gözlenmiştir. Sekresyon döneminde ise hem immunoreaktivitenin hem de ekspresyonun luminal ve bez epitelinde stromadan daha fazla olduğu izlendi. Ayrıca infertil gruplarda sekresyon dönemindeki ekspresyonların proliferasyon dönemine göre daha fazla olması burada olası beklenen Wnt/β-katenin sinyal yolağının Dkk1 tarafından baskılandığı ve kontrol grubuna göre infertil gruplarda Wnt/β-katenin yolağının daha az aktif olmasından dolayı, Dkk1 ekspresyonun negatif etkisi olduğu düşünüldü. Kısaca Wnt/β-katenin yolağı Fzd6 ekspresyonu ile infertil olgularda desteklenmesine rağmen, Dkk1 ekspresyonunda aynı anda varlığı implantasyon için olumsuz bir ortam sağlayabileceğini düşündürdü. Ayrıca Dkk1 immunoreaktivitesinin ekspresyondan daha fazla olması, Dkk1 ekspresyonunun infertil olgularda proliferasyonda da önce (belkide menstrual kanamanın bitmesi ile birlikte) başlaması Wnt/ β-katenin yolağının aktivasyonuna da negatif etki etmiş olabilir. Bununla beraber çeşitli çalışmalarda Wnt proteinini baskılayarak Fzd6'ya bağlanmasını engelleyen sFRP1 ekspresyonunda normal endometriyumda farklı fazlarda salındığı gösterilmiştir (19). sFRP1 proteni sadece Wnt'yi bağladığı, fakat Dkk'1 in ise Wnt/β-katenin sinyalinin farklı basamaklarını inhibe ettiğinden dolayı implantasyon döneminde Dkk1 ekspresyonunun infertil

gruplaradaki dağılımına bakılması amaçlanmıştı. Bununla beraber sFRP1 üzerinde de sinyalizasyonun bakılması bu tür vakalarda önemli olabilir. Özellikle sekresyon fazında proliferasyon fazına oranla sRFP1 in azalmış olması Wnt ‘nin Fzd6‘ya bağlanmasını kolaylaştırmakta ve implantasyon için sekresyon fazında endometriyumu hazırlamaya yardımcı olabilmektedir. Dkk1 ekpresyonlarının fazlalığında implantasyonunda inhibe olduğu çalışmalara dayanarak (123) çalışmamızda Dkk1’inde infertil gruplarda yüksek olması implantasyon başarısızlığına katkı sağlamış olabilir.

Bununla beraber implantasyon aşamasında etkili olan Wnt/β-katenin yolağına ait inhibitör veya efektörlerin salgısı, uterus lümeninde blastokist varlığında değiştiği gösterilmiştir (18). İnsan endometriyumunda, Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt8b, Fzd6, Lrp6, Dkk1, Dvl1, Gsk-3B ve β-katenin ekspresyonları RT-PCR ile gösterilmiştir ve proliferatif ve sekretuar fazda da aynı şekilde ekspresyonlar tespit edilmiştir. Ancak Dkk1 ekspresyonunun esas olarak sekretuar faz boyunca fazla bir şekilde eksprese edildiğide vurgulanmıştır (18). Çalışmamızda da elde edilen sonuçlar doğrultusunda Dkk1 in ekspresyonunun kontrol ve infertil gruplarda sekresyon evresinde benzer olduğu, Dkk1 ekspresyonunda infertil grupları etkilemediği düşünüldü.

KONTROL

PROLİFERASYON **SEKRESYON**



Şekil 4.1: Kontrol grubuda proliferasyon ve sekresyon döneminde endometriyumdan salınan faktörlerin immunoreaktivitelerinin dağılımları.

İNFERTİL

PROLİFERASYON **SEKRESYON**



Şekil 4.2: İnfertil grubuda proliferasyon ve sekresyon döneminde endometriyumdan salınan faktörlerin immunoreaktivitelerinin dağılımları.

KONTROL

PROLİFERASYON SEKRESYON



Şekil 4.3: Kontrol grubuda proliferasyon ve sekresyon döneminde endometriyumdan salınan faktörlerin ekspresyonlarının dağılımları.

İNFERTİL

PROLİFERASYON SEKRESYON



Şekil 4.4: İnfertil grubuda proliferasyon ve sekresyon döneminde endometriyumdan salınan faktörlerin ekspresyonlarının dağılımları.

İmplantasyon sürecinde önemli olan diğer faktörler arasında ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron da yer alır. Stromal hücre farklılaşmasında östrojen ve progesteronun koordineli hareketi gerekirken, farelerde uterus luminal ve bez epitelindeki proliferasyon ve farklılaşma için östrojen gereklidir (148). Wnt/β-katenin yolağı ile östrojen ve progesteron arasında da direkt ilişki deneysel modeller üzerinde gösterilmiştir (123). Örneğin Wnt4, Wnt5a ve Fzd2 ekspresyonlarının fare uterusunda östrojen ile indüklendiği, ayrıca β-kateninde endometriyumda nüklear ekspresyonunuda rol oynadığı saptanmıştır (123). Bununla beraber kanonikal Wnt sinyalinin östrojen ile inhibisyonu sonucunda uterin epiteliyal hücre proliferasyonunda azalma olduğu gözlenmiş ve uterusdaki hücre büyümesinin Wnt sinyal yolağı ile ilişki olabileceği vurgulanmıştır (19). Ayrıca BMP2'nin düzenleyicisi olarakta çalışan Wnt4'ünde uterus stromal hücrelerin progesteron tedavisine etkin cevabın oluşmasında önemlidir (149).

Çalışmamızda infertil hastalar ile kontrol grubu hastalar arasındaki hormonal profillerinin karşılaştırılması sonucunda, ise infertil grup hastalarda östrojen değerlerlerinin daha az olduğu gözlenmesi üzerine, bu hasta gruplarında Wnt sinyal yolağının tetiklenmemesinin bir nedeni olarakta östrojen seviyelerindeki azlığa bağlı olabileceği düşünülmüştür. Fakat hormonal profilin Wnt/β-katenin yolağı ile ilgili bağlantısının açıklanabilmesi için daha fazla hasta sayısına ihtiyaç vardır. Bununla beraber çalışma planlanması aşamasında hormonal profil ile Wnt yolağının ilişkisi çalışılması planlanmadığından, çalışmada alınan hastaların anovulatuar siklusta olup olmadıkları sorgulanmadığından hastalardaki östrojen seviyesinin anovulatuar siklusta mı yoksa seçilen bu gruptaki hastalarda gerçekten bir östrojen azalması olduğu analiz edilememiştir. Cloke ve ark (2008), östrojen bağımlı proliferasyonun kısmen Wnt sinyaline bağımlı olduğunu ve östrojen tedavisi gören kadınların endometriyumunda Wnt komponentlerinin indüklendiğini göstermişlerdir (150). Bu çalışmaya ilaveten, diğer çalışmalarda da östrojene bağlı kanserlerin %30'unda nüklear β-katenin ekspresyonunun olduğunu ve kanonikal Wnt sinyal yolağının tetiklenebileceğini vurgulamışlardır (151, 152)

İnfertilite vakalarında, özellikle sebebi açıklanamayan yani baba veya anneye ait tanısı konabilmiş hastalıklar dışında, her iki ebeveyn sperm ve oosit kalitesi, hormonal profil, endometriyal kalite açısından normal olmasına rağmen fizyolojik olarak implantasyon ve/veya gebelik gelişememektedir (153). Sebebi açıklanamayan olgular üzerinde yapılan çalışmalarda endometriyal reseptörlerden αVβ3 integrin reseptörünün klomifen sitrat ile tedavi sonrasında kontrol grubuna benzer bulgu elde edilmiş olması, sebebi açıklanamayan infertil olgularda bazı moleküler mekanizmaların implantasyon sırasında tetiklenememesinden dolayı gebeliğin oluşamadığını desteklemektedir (94). Bununla beraber apoptotik yolaklarında değişikliğine bağlı sebebi açıklanamayan infertil olgularda implantasyon da gerçekleşememektedir (94).

Çalışmamız sonucunda kontrol grubu ile infertil grup arasında Wnt/β-katenin yolağında rol oynayan moleküllerde değişiklikler gözlenmiştir. Bu tür vakalardaki Wnt/β-katenin yolağında rol oynayan faktörlerin salgısı çeşitli infertilite tedavileri sonrasında da değişebilmektedir. O nedenle farklı infertilite tedavi protokollleri uygulanan hasta örneklerinden alınacak olan endometriyal örnekler üzerinde yapılacak olan incelemeler sonrasında tedaviye cevap olarak bu yolağın değişikliklerinin analizlerinin yapılması gerekmektedir. Tedavi sonrası değişikliklerin olup olmamasının belirlenmesi, endometriyumun moleküler salgısının tedaviler sonrasında değişmesi ve implantasyon için uygun hale gelmesi önemlidir. Fakat bu tedaviler sonrasında implantasyon gerçekleşemeyen olgularda da ise bu yolağın blastokist tarafından da aktive edilebildiği bilinmesi üzerine, hastalar infertilite kliniklerinde in vitro fertilizasyon yönteminden faydalanabilecekleri düşünülmektedir. Hayvan deneysel modellerinde embriyonun endometriyal Wnt/β-katenin yolağını pozitif yönde tetiklediği bilinmesine rağmen, IVF ile ilgili klinik çalışmalar sınırlıdır. Koler ve ark (2009) yaptığı çalışmada, IVF merkezine başvuran ve tekrarlayan implantasyon yetersizliği tespit edilen hasta örneklerinde fertil hasta örneklerine göre siklik östrojen, SFRP1 ve LEF1 ekspresyonlarında azalma gözlenir iken, Slug ve Dkk1 ekspresyonlarında artış görülmüştür. Koler ve ark. özellikle azalmış ekspresyonların östrojene bağımlı olduğuda vurgulanmıştır. O nedenle

IVF merkezlerinde başarısız implantasyon vakalarında Wnt/β-katenin yolağında rol oynayan faktörlerinde incelenmesi önemli olacağı düşünülmektedir. Kanonikal Wnt sinyalinin sFRP2'nin adenovirus uyumlu ekpresyonunun inhibisyonu ile β-katenin ve epiteliyal hücre proliferasyonunun östrojene bağımlı aktivasyonunu inhibe etmesi steroid hormon bağımlı uterus büyümesinin de Wnt sinyali ile ilişkisini desteklemektedir. Bununla beraber östrojen β-katenin bağımlı transkripsiyon faktörlerini TCF-3 ve LEF-1 upragulate etmektedir. İlginç olan; hormon aynı zamanda ERα ve aktif LFE1/TCF-1 arasındaki fiziksel iletişime neden olmaktadır. Wnt/östrojen bağımlı hedef genler östrojen ve Wnt'lerin karşılıklı iletişimlerinin endometriyal fonksiyonlar için kritik olduğunu desteklemektedir (154). Dahası, fare uterusunda progesteronun GSK-3β'yı downregüle ettiği ve bu da kanonikal Wnt yolunun östrojen bağımlı aktivasyonu için gerekli bir ön şart gibi görünmektedir (155). Bununla beraber non-kanonikal Wnt düzenleyicisi ROR-2'ninde endometriyal epitelde ve hamile olmayan farelerin stromal hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiş ve hamilelik boyunca ROR-2'nin stromal hücrelerde ekspresyondaki artışın, implantasyonun ve trofoblast invazyonunun gerçekleşmesinde gerekli olan Natural Killer hücrelerinin düzenlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (156).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Wnt sinyali, moleküller Wnt ligandları, frizzled alıcıları, membran alıcıları olan LRP, HSPGS ve Wnt sinyali inhibitör faktörlerini içerir. Mikroarray ve RNAse analizleri ile de Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b, 10b, DKK1, SFRP1 ve SFRP4'ün insan endometriyumunda bulunduğu desteklenmiştir (157, 158, 159). Yapılan çalışmalar sonucunda, hem protein hem de mRNA düzeyinde, hem proliferatif hem de sekretuar dönemlerde, Wnt/β-kateninin sinyal yolağında rol oynayan faktörlerin varlığı gösterilmesi üzerine, sebebi açıklanamayan infertil olgularda çalışmalar kısıtlıdır.

Wnt sinyalinin gelişim ve hücre ölümünün belirlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. İnsan endometriyumundaki Wnt sinyal yollarının hem pozitif hem de negatif düzenleyici mRNA bulunması, Wnt sinyali bu hücre ve dokularda koordineli bir şekilde kontrol edilmektedir. Dahası hem kanonikal hem de non-kanonikal yolaklar için gerekli mRNA ekspresyonlarının varlığı, kanonikal ve non-kanonikal yolaklar arasında bir dengenin olduğunu da göstermektedir. Özellikle, SFRP1 ekspresyonunun insan endometriyum tüm safhalarında bulunduğu, fakat stromal bölgelerde ekpresyonun epitel ve beze oranla daha güçlü olduğu ve proliferatif dönemde ekspresyonun arttığı gözlenir iken, sekretuar dönemde azaldığı bilinmektedir. Çünkü implantasyonun gerçekleşeceği bu dönemde Wnt/β-katenin sinyal yolağının tetiklenebilmesi için SFRP1 aktivasyonu inhibe olmalıdır. (158, 160)

İmplantasyon öncesi embriyoda Wnt5, Wnt11 ve FZD gibi Wnt sinyalinde rol oynayan faktörlere rastlansa da, bu yolakların blastokist formasyonu için gerekliliği tartışmalıdır. Yukarıda da bahsedildiği gibi gen knock-out çalışmalar ile elde edilen β-katenin eksikliği yaşayan mutant embriyolar blastokist evresine kadar gelişebilmektedirler (161). O nedenle farklı Wnt sinyal yolağında rol oynayan reseptör, inhibitör ve aktivatörlerden özellikle Ca2+ bağımlı yolağın preimplantasyon dönemindeki embriyo gelişimi için gerekli olduğu düşünülebilir. (162). Embriyonun bulunduğu alanda sınırlanan luminal epiteldeki Wnt/β-katenin sinyal aktivitesi, endometriyal bezlerde tespit edilmiştir. Buna karşın

endometriyal bezlerdeki Wnt/β-katenin sinyal aktivasyonu direk olarak blastokist ile ilişkili olmadığı, fakat embriyo varlığında uterusun geniş çaplı bir cevap oluşturduğu fikrini desteklemektedir (19). Kanonikal Wnt sinyal aktivasyonunun, blastokist gelişimi için gerekli olmadığı diğer çalışmalar ilede desteklenmiş, non-kanonikal yolağında trofoblast farklılaşmasında önemli rol oynayabileceği vurgulanmıştır (58, 59, 60).

Wnt sinyal yolağının embriyolojik gelişim sırasındaki rolü yanısıra, organların farklılaşmasında da (ovaryumların gelişimi ve fonksiyonlarında) rolleri vardır (163, 164)

İnsan endometriyumundaki Wnt ailesi üyelerinin yerleşimi ve dağılımı ile birlikte, sinyal yolağını kontrol eden faktörlerin varlığının tespit edilebilmesi, endometrial fonksiyon açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Epiteliyal fonksiyon, hücre-hücre ilişkisi ile hücre-matriks arasındaki ilişkide önemli rol oynayan (165), Wnt7a'nın endometriyal dağılımı incelenmiştir. Wnt7a proliferasyon döneminde salgılanmakta ve endometriyumu implantasyon için hazırlamakta iken, infertil olgularda da Wnt7a nın salgılandığı fakat kontrol grubuna oranla daha fazla olduğu, o nedenle salgılanan Wnt7a nın, sekresyon döneminde de salgısının azalarak devam etmesinden dolayı, kontrol grubunda Wnt7a immunoreaktivitesi olmamasına rağmen, infertil olgularda devam eden immunoreaktivitenin proliferasyon döneminde fazla salgılanmasından dolayı olduğunu düşündürmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda Wnt5a'nın uterus sadece stromasında eksprese edildiği, stromadaki Wnt5a ekspresyonunda, luminal epiteldeki Wnt7a ekspresyonu ile korunduğu bilinmesi üzerine çalışmamızda Wnt7a tercih edilmiştir. (166)

İnsan endometriyumunda proliferatif ve sekretuar fazda Wnt reseptörleri (Fzd6 ve LRP6) ve aktivatörleri (Dvl1, GSK3B ve β-katenin) ekspresyonlarında Wnt7a gibi hormonal düzenleme gerektirmez. Wnt sinyalinin anahtar bir aracısı olan, sitoplazma ve çekirdek membranında bulunan β-katenin, gap junction proteinleri ve kaderinlerin ilişkisine izin verir ve hücre-hücre adezyon moleküllerinde önemli bir role sahiptir (166).

β-katenin ekspresyonu siklusun proliferasyon ve sekresyon fazı arasında

önemli bir farklılık göstermez iken, Wnt sinyali aktivasyonu endometriyumda değişkendir (167). Çalışmamızda da kontrol ile infertil gruplar arasında fark gözlenmemesi, β-katenin ekspresyonun infertil olgularda değişmediğini göstermektedir.

Wnt sinyal yolağının reseptörlerinden Fzd6 nın Wnt ekspresyonundan önce veya birlikte eksprese edilmeleri Wnt fonksiyonu için önemlidir. Çalışmamızda infertil olgularda stromadaki Fzd6 immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak azalmış olması, Wnt ekspresyonu yeterli olsa dahi, sinyal yolağının yetersiz Fzd6 ekspresyonu nedeni ile tetiklenmemiş olabilir. Wnt7a'nın epiteliyal ekspresyonu embriyonun maternal doku tarafından reseptivitesi için gerekli iken, Fzd6 ekspresyonun esas olarak implantasyon aşamasında adezyonunu tamamlamış embriyonun stromal dokuda ilerleyebilmesi için gerekli olduğu düşündürdü. O nedenle infertil olgularda hem epiteliyal Wnt7a ekspresyonundaki azlık, hem de stromal Fzd6 ekspresyonundaki azlıktan dolayı implantasyon başarısız olmuş olabilir.

Wnt yolağının inhibitörlerinden Dkk1 ekspresyonunun insan endometriyumunda progesteronla uyarıldığı, Wnt sinyalini inhibe ettiği ve desidualizasyonda önemli olduğu bilinmektedir (123). Çalışmamızda infertil gruplarda hem proliferasyon hem de sekresyon dönemlerinde Dkk1 ekspresyonunun negatif olması, Wnt7a ekspresyonununda az olmasına bağlı olarak inhibitör salgısının tetiklenemediğini düşündürdü.

Başarılı bir implantasyon için blastoksitten gelen uyarıların olması yanısıra, endometriyumdan salgılanan faktörlerden Wnt ve ailesi üyelerinin doğru zamanda ve doğru yerde bulunması önemlidir. Kanonikal Wnt sinyali sadece blastokist aktivasyonunu için gerekli olmayıp, aynı zamanda başarılı implantasyon içinde gereklidir. Bununla beraber Wnt/β-katenin sinyal yolağını kontrol eden faktörlerin Wnt ile eş zamanlı olarak salgılanmaları veya inhibe olmaları implantasyonun gerçekleşmesinde kritik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar, infertil olgularda kanonikal yolağın aktive olamadığı gözlenmiş, bununla beraber kanonikal yolağa alternatif olan non-kanonikal yolağında aktive olamamasından dolayı Wnt/β-katenin yolağının

implantasyon için yeterli miktarda tetiklenemediği gözlenmiştir. Bunun tespiti için ise non-kanonikal yolakta rol oynayan faktörlerin dağılımlarının incelenmesi önerilebilir. Bununla beraber, implantasyon başarısızlığı olan vakalarda tedavi sonrası gebelik oluşması üzerine, hem kanonikal (Wnt7a) hem de non-kanonikal yolakların (Wnt5a gibi) tedavi sonrasındaki dağılımlarınında analizleri bu yolağın infertil vakalardaki önemini destekleyecektir. Blastokist varlığında Wnt/β-katenin yolağının farklı faktörlerinin aktivasyonu nedeni ile embriyo transferi edilmiş fakat implantasyon gerçekleşmemiş olgularda bu yolağın analizide bilime katkı sağlayabilir. Ayrıca bu yolakta rol oynayan faktörleri kontrol eden genetik mekanizmaların analizi (özellikle Hoxa10, Hoxa11 gibi), ayrıca ebeveynlerin genetik profillerinin incelenmesi, bu tür vakalarda genetiğe bağlı infertilite sebebini açıklamada yardımcı olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Nusse R, Varmus HE, Miller C, Sassoon DA. Wnt7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. Development, 1998;125: 3201–3211.

2. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. Cell Res, 2005; 15(1): 28-32.

3. Miller JR. The Wnts. Genome, Biol 2002; 3(1): 232-260.

4. Tanır H, Demirezen Ş. Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomolekuller. Turkiye Klinikleri J Med Sci, 2009; 29(5): 1292-7.

5. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis, 2008; 4:2, 68-75.

6. Li H, Pamukçu R, Thompson W. β-katenin Signaling. Cancer Biology and Tharapy, 2002; 1:6.

7. Gürsoy E, Koptagel E, Ergin K. Hücre dokuları, genel embriyoloji, dişi üreme sistemi, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, 2009; 196-201.

8. www.zlp.charite.de

9. Sondereggera S, Pollheimerb J, Knöflerb M. Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation. Placenta, 2010; 31(10): 839–847.

10. Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R. Functional in teraction of an axin homolog, conductin, with β-catenin, APC and GSK3-β. Science, 1998; 280(5363): 596-9.

11. Miller JR, The Wnts. Genome Bio, 2002; 3(1): 49-88.

12. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cad herinbinding prevents β-catenin nuclear localization and β-catenin/LEF1-mediated transactivation. J Cell Sci, 1999; 112 (8): 1237-45.

13. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogenez, 2006; 25(57): 7461-8.

14. Wil lert K, Nusse R. β-catenin: a key me dia tor of Wnt signaling. Curr Opin Genet Dev, 1998; 8(1): 95-102.

15. Sönmez Ü, Ergür BU. Wnt signal mechanism and its effect on spine

development. J. Turk Spinal Surg, 2002; 13(3-4): 17-21.

16. www.themedicalbiochemistrypage.org

17. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier. J Biol, 2005; 4: 2.

18. Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, Germeyer A, Lessey BA, Taylor RN, Suchanek E, Giudice LC, Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88(8): 3860-6.

19. Smith CA, Shoemaker CM, Roeszler KN, Queen J, Crews D, Sinclair AH. Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. BMC Developmental Biology, 2008; 8:72.

20. Mohamed OA, Jonnaert M, Labelle DC, Kuroda K, Clarke HJ, Dufort D. Uterine wnt β-catenin signaling is required for implantation. Pnas, 2005; 102(24): 8579–8584.

21. Gaetje R, Holtrich U, Karn T, Cikrit E, Engels K, Rody A. Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. Fertil Steril, 2007; 88: 1534–40.

22. Smith K, Cheng S, Charnock DS. Transcript profile and localization of Wnt signaling–related molecules in human endometrium. Fertil Steril, 2007; 73-223

23. Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, Das SK. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. Mol Endocrinol, 2004; 18: 3035–49.

24. Ray S, Xu F, Wang H, Das SK. Cooperative control via lymphoid enhancer factor 1/T cell factor 3 and estrogen receptor-alpha for uterine gene regulation by estrogen. Mol Endocrinol, 2008; 22: 1125.

25. Rider V, Isuzugawa K, Twarog M, Jones S, Cameron B, Imakawa K. Progesterone initiates Wnt/β-catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronousproliferation of rat uterine stromal cells. J Endocrinol, 2006; 191: 537–48.

26. Kuş C. İnfertilite Durumunda Kadınların Yaşam Kalitesi Ve Algıladıkları Sosyal Desteğin Belirlenmesi. İstanbul, 2008; 28-45.

27. Delilbaşı L. İnvitro Fertilizasyon Labaratuvar Yöntemleri. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008.

28. Moore LK. Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.

29. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Ankara. Palme Yayıncılık, 2005.

30. http://biyolojiegitim.yyu.edu.tr/

31. Kierszenbaum AL(Ed). Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual döngü (Çev Ed.R Demir), Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 565-600.

32. Karaöz E. Özel Histoloji, Genital Sistem Histolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta, 2002; 228.

33. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO(Ed). Temel Histoloji, Dişi üreme sistemi. (Çev Ed. Y Aytekin), Barış Kitabevi, İstanbul, 1998; 356-370.

34. www.jinokoloji.gen.tr

35. Carlson BM. Human Embryology And Developmental Biology. China, Mosby Elsevier, 2009; 216-415.

36. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M. The human endometrium as a fertility determining factor. Hum Reprod Update, 2006; 12(5): 617–30.

37. Mitchell MK. Nutrition Across The Life Span. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 2002; 265-347.

38. Johnson RW. The future trends of induction of ovulation. Minerva Endocrinol, 2010; (4): 227-46.

39. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. Hum Reprod Update, 2007; 3(4): 365–77.

40. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. Hum. Reprod. Update, 2004; 10(1): 29-38.

41. Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada A, Yoshimura Y. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. Endocrinology, 2005;

146(12): 5365-73.

42. www.boniefamilyplanning.com

43. www.tupbebekgebelik.net

44. Mastroianni L, Coutifaris C. Manual of Human Reproduction. Reproductive Physiology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. London: Butler & Tanner Ltd, 1990; 41-52.

45. www.britannica.com

46. www.embriyo.org

47. www.embryology.ch

48. Gelety TJ, Buyalos RP. The influence of supraphysiologic estradiol levels on human nidation. J Assist Reprod Genet, 1995; 12: 406-412.

49. Paria BC, Lim H, Das SK. Molecular signaling in uterin receptivity for implantation. Semin Cell Dev Biol, 2000; 11: 67-76.

50. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. Rev Reproductive, 1997; 2: 84-93.

51. Sugihara K, Sugiyama D, Byrne J, Wolf DP, Lowitz KP, Kobayashi Y, Kabir Salmani M, Nadano D, Aoki D, Nozawa S, Nakayama J, Mustelin T, Ruoslahti E, Yamaguchi N, Fukuda MN. Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. Proc Natl Acad Sci, 2007; 104: 3799–3804.

52. Howe LR. Brown A.M, Wnt signaling and breast cancer. Cancer Biol Ther, 2004; 36: 41.

53. Ergüler G, Demir N, Demir R. Adhezyon moleküllerinin yapısal özellikleri ve fonksiyonları. T Klin J Med Sci, 2002; 22: 313-327.

54. Paria BC. Huet-Hudsont YM, Deyt SK, Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. Proc Natl Acad Sci, 1993; 90: 10159- 10162.

55. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update, 2006; 12: 731–746.

56. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Suman P, Gupta SK, Schleussner E, Markert UR. Signal ransducer and activator of transcription 3 (stat3) and trophoblast

invasion. J Reproduktionsmed Endocrinolgy, 2007; 4: 322–330.

57. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Human Reproduction Update, 2006; 12: 731-746.

58. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. Reproduction, 2004; 128: 679-695.

59. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. Reproduction, 2004; 128: 657-668.

60. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: Their putative role in atherogenesis. Atherosclerosis, 2006; 186: 38-53.

61. Sakakibara H, Taga M, Saji M. Gene expression of epidermal growth factor in human endometrium during decidualization. J. Clin. Endoc. Metab, 1994; 79: 223-226.

62. Lim HJ, Dey SK, HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. Experimental Cell Research, 2009; 315: 619-626.

63. Slater M, Murphy CR. Transforming growth factors α and β–1 are co-expressed in the uterine epithelium during early pregnancy. Cell Tissue Research, 2000; 300: 315-320.

64. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. Society for Reproduction and Fertility, 2006; 132: 217–232.

65. Ghosh D, Sengupta J. Endocrine and paracrine correlates of endometrial receptivity to blastocyst implantation in the human. Indian J Physiol Pharmacol, 2004; 48: 6–30.

66. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. Human Reproduction Update, 2005; 11: 613-630.

67. Wolff MV, Linke IC, Heid D, Krusche CA, Hellwig KB, Karl C,Beier HM. Tumour necrosis factor-α (TNF-α) in human endometrium and uterine secretion:

an evaluation by immunohistochemistry. Molecular Human Reproduction, 1999; 5: 146-152.

68. Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Guyre PM, Wira CR, Fanger MW. IFN-{gamma} is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. The Journal of Immunology, 1998; 160; 5145-5153.

69. Salmani MK, Hosseini A, Valojerdi MR. Endometrial receptivity to implantation in humans biochemical and molecular aspects. yakhteh medical journal, 2008; 10: 1-24.

70. Bulgurcuoğlu S, Özsait B, Attar E. Büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisi. Artemis, 2003; 4: 18-26.

71. Kennedy TG, Carolina GM, Phang SM. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. Society for Reproduction and Fertility, 2007; 134: 635-643.

72. Gizinger OA, Ishpakhtina KG. The study of expression of apoptosis receptors (CD95+) on the surface of neutrophils from cervical secretion of women with chlamydial infection and the possibility of its correction by magnetic laser radiation. Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. 2010 May-Jun;(3):29-31.

73. Rosario GX, Modi DN, Sachdeva G, Manjramkar DD, Puri CP. Morphological events in the primate endometrium in the presence of a preimplantation embryo, detected by the serum preimplantation factor bioassay. Human Reproduction, 2005; 20: 61-71.

74. Neill CO. The role of paf in embryo physiology. Human Reproduction Update, 2005; 11: 215-228.

75. www.embryology.med.unsw.edu.au

76. Eichenauer RH, Vanherpe H. Klinik Muayene Tanı Tedavi Acil Klavuzu Klinik ve Pratik Üroloji. 1. Basım. Çeviren: Diren M. Yüce Yayınları A.Ş. İstanbul, 1995; 25: 374-391.

77. Aksu T, Demirtaş E. Yardımcı Üreme Teknikleri, Kadın Hastalıkları ve Doğum Tanı ve Tedavi. Ed: Günalp GS. Tuncer ZS. Pelikan Yayınları, İstanbul, 2004; 567-583.

78. Akyüz A. İnfertilite Hemşireliği, Eğitimi, Rolü. 1. Uluslararası Üreme Endokrinolojisi. İnfertilite ve Yardımcı Üreme Kongresi, İnfertilite Hemşireliği Kurs Kitabı, İstanbul, 2004; 15-40.

79. Garcia JE, Nelson LM, Wallach E. Reproductive Endocrinology and İnfertility. Obstetrics and Gynecology, 2006; 95: 102-105.

80. Gordon JD. Speroff L. Klinik Jinekoloji ve İnfertilite El Kitabı. Çeviren: Işık AZ. Vicdan K., Nobel Kitabevi, Nobel Matbaacılık, Ankara, 2003.

81. Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ. Usta MF. Kendirci M. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. Türk Androloji Derneği Yayını, İstanbul, 2004.

82. Özcan J. Invitro fertilizasyon planlanan zayıf yanıtlı hastalarda uygulanan mikrodoz protokolü ile mikrodoz stop protokolünün karşılaştırılması. S.B. Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2005.

83. Tekin Y. Kadın Hastalıkları ve Doğum. Klinisyen Tıp, Ankara, 2005; 67-100

84. Chen ZJ, Shi Y. Polycystic ovary syndrome. Front Med China, 2010; 4(3): 280-4.

85. Aile Planlaması ve Üreme Sağlığı. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü. Ulusal Aile Planlaması Hizmet Rehberi, , Cilt 1. Ankara, 2000; 203-235.

86. Yaralı H, Esinler İ. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi içinde: Kadın Hastalıkları ve Doğum Tanı ve Tedavi. Ed: Günalp GS, Tuncer ZS, Pelikan Yayınları, İstanbul, 2004; 559-566.

87. Yıldırım M. Klinik Jinekoloji. 2. Baskı, Eryılmaz Ofset, Ankara, 2002; 38-88.

88. Petrozza J, Styer AK, Cowan BD, Talavera F, Gaupp FB. Assisted Reproduction Technology. Obstetrics and Gynecology, 2006; 8: 103-115.

89. Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. Campbell Üroloji. 8. Baskı, Çeviren: Anafarta MK. Yaman MÖ. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2. Cilt, İstanbul, 2005; 1437-1587.

90. Üstünsöz A. İnfertiliteyi etkileyen faktörler. 5. Uluslar arası Üreme Sağlığı ve Aile Planlaması Kongresi, Kongre Kitabı, Ankara, 2007; 40-43.

91. Ragni G, Mosconi P, Pia Baldini M, Somigliana E, Vegetti W, Caliari I, Elisa Nicolosi A. Health-related quality of life and need for IVF in 1000 Italian infertile couples, Human Reproduction, 2005; 20(5): 1286-1291.

92. Oğuz H. İnfertilite tedavisi gören kadınlarda infertilitenin ruh sağlığına, evlilik ilişkileri ve cinsel yaşama etkileri. Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2004; 33-85.

93. Schohl A, Fagotto F. β-catenin, MAPK and smad signaling during early xenopus development. 2002; 129: 37-52.

94. Lacin S, Vatansever S, Kuscu NK, Koyuncu F, Ozbilgin K, Ceylan E. Clomiphene citrate does not affect the secretion of alpha3, alphaV and beta1 integrin molecules during the implantation window in patients with unexplained infertility. Hum Reprod, 2001;16(11): 2305-9.

95. Karabiber N. İnfertil kadınlarda depresyon ve anksiyete. İstanbul Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1987; 46-51.

96. Polat M. IVF'de gerçek başarı nedir? Art'ye hasta seçim kriterleri, tedavi kararında etik yaklaşımlar. 5. Uluslar arası Üreme Sağlığı ve Aile Planlaması Kongresi, Kongre Kitabı, Ankara, 2007; 44-46.

97. Eroschenko VP. di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, 9. Baskıdan Çeviri, Çev. Ed. Demir R. "Palme Yayıncılık Ankara 2001; 301.

98. Berk. S. Reconstructıon of proteın-proteın and domaın-domaın ınteractıon networks of Wnt signaling in C. elegans. İzmir Institute of Technology, Chemical Engineering, 2006; 36-86.

99. Huelsken J, Behrens J. The Wnt signaling pathways. J Cell Sci, 2002; 115: 3977-78.

100. Olson EN. Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. Genes Dev, 2003; 15: 1937-56.

101. Carmon KS, Loose DS. Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. Mol Cancer Res, 2008;6:1017–28.

102. Walsh J, Andrews PW. Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonal carcinoma cell line and embryonic stem cell. APMIS, 2003; 111: 197–210.

103. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998; 14: 59–88.

104. Willert K, Nusse R. β-catenin: a key mediator of Wnt signaling, Oncogenes and cell proliferation. Gene Develop, 1998; 8: 95–102.

105. 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.

106. Luu HH, Ruiwen Z, Haydon RC, Rayburn El, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, He TC. Wnt/β-catenin signaling pathway as novel cancer drug targets. Curr Cancer Drug Targets, 2004; 4: 653-671.

107. Willert, K, S. Shibamoto, Nusse R, "Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex", Genes and Development, 1999; 13: 1768-1773.

108. Kemler R. Classical cadherins. Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003; 88(8): 3860–3866.

109. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phosphoregulation of β-catenin adhesion and signaling functions. Physiology, 2007; 22: 303-9.

110. Erdem F, Alper D. Adhezyon Molekülleri. T Klin J Med Sci, 1997, 17: 75-77.

111. Sert E. Meme kanserinde β-catenin'in prognostik rolü. Atatürk Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 2007; 22-62.

112. 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-B in colorectal cancer. J Natl Cancer Inst, 2004; 96: 1161-1170.

113. Hendrickx M, Leyns L. Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. Dev Growth Differ, 2008; 50: 229–43.

114. Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Development, 2009; 136: 3205–14.

115. Noort M, Meeldijk J, Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls

the phosphorylation status of β-catenin. Biological Chemistry, 2002; 277(20): 17901–17905.

116. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. Oncogene, 2006; 25: 7469–81.

117. Tao Q, Yokota C, Puck H, Kofron M, Birsoy B, Yan D, Asashima M, Wylie CC, Lin X, Heasman J. Maternal Wnt11 activates the canonical Wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos. Cell, 2005; 120: 857-71.

118. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. Mol Cell, 2001; 7: 801–9.

119. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. Cell Calcium, 2005; 38: 439–46. 174.

120. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3β and β-catenin and promotes GSK-3β-dependent phosphorylation of β-catenin. EMBO J, 1998; 17: 1371–84.

121. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and β-catenin signalling: Diseases and Therapies. Nature Reviews Genetics, 2004; 5: 689-98.

122. Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. Science, 2007; 316: 1619–22.

123. Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. Development, 2008;135:367–75.

124. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. Mol Cell Biol, 2003; 23: 131–9.

125. Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. Mol Cancer, 2009; 8: 2103–9.

126. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits β-catenin-TCF signaling depending on receptor context. PLoS Biol, 2006; 4: 115.

127. Katoh M, Katoh M. Wnt signaling pathway and stem cell signaling network. Clin Cancer Res, 2007; 13(14): 88-112.

128. Ching W, Nusse R. A dedicated Wnt secretion factor. Cell, 2006; 125(3): 432-3.

129. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene, 2006; 25(57): 7461-8.

130. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell, 2006; 127(3): 469-80.

131. Oruç ME, Berk S. Reconstructıon of protein-protein and domain-domain ınteractıon networks of Wnt signaling in C. elegans. Chemical Engineering, İzmir Institute of Technology, 2006; 91-104.

132. Korswagen, HC. Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in Caenorhabditis elegans: variations on a common signaling theme. Bio Essays, 2002; 24: 801-810.

133. www.hormonlar.com

134. Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R. Lack of β-catenin affects mouse development at gastrulation. Development, 1995; 121: 3529–37.

135. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T. Molecular cues to implantation. Endocr Rev, 2004; 25: 341–73.

136. Liu Y, Kodithuwakku SP, Ng PY, Chai J, Ng EH, Yeung WS, Ho PC, Lee KF. Excessive ovarian stimulation up-regulates the Wnt-signaling molecule DKK1 in human endometrium and may affect implantation: an in vitro co-culture study. Hum Reprod, 2010; 25(2): 479-90.

137. Miller C, Sassoon DA, Wnt7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. Development, 1998; 125: 3201–8.

138. Cunha GR. Epithelial-stromal interactions in development of the urogenitaltract. Int Rev, 1976; 47: 137–194.
139. Bui TD, Zhang L, Rees MC, Bicknell R, Harris AL. Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. Br J Cancer, 1997; 75: 1131–1136.
140. Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA, Bany BM, Maclean JA, Rucker EB. Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. Biol Reprod, 2009; 80: 989–1000.
141. Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt7a. Nature, 1998; 395: 707–10.
142. Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. Development, 1995; 121: 3529–37.
143. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R. Maternal betacatenin and E-cadherin in mouse development. Development, 2004; 131: 4435–45.
144. Chen Q, Zhang Y, Lu J, Wang Q, Wang S, Cao Y. Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. Mol Hum Reprod, 2009; 15: 215–21.
145. 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: 1453–61.
146. Liu Y, Kodithuwakku SP, Ng PY, Chai J, Ng EH, Yeung WS. Excessive ovarian stimulation up-regulates the Wnt-signaling molecule DKK1 in human endometrium and may affect implantation: an in vitro co-culture study. Hum Reprod, 2010; 25: 479–90.
147. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M. Changes in gene expression during the early to mid-luteal transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. Mol Hum Reprod, 2002; 8: 871–9.

148. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. Nat Rev Genet, 2006; 7: 185–99.
149. Li Q, Kannan A, Wang W, Demayo FJ, Taylor RN, Bagchi MK. Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. J Biol Chem, 2007; 282: 31725–32.
150. Cloke B, Huhtinen K, Fusi L, Kajihara T, Yliheikkila M, Ho KK. The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium. Endocrinology, 2008; 149: 4462–74.
151. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. Oncogene, 2002; 21: 7981– 90.
152. Wang Y, Hanifi-Moghaddam P, Hanekamp EE, Kloosterboer HJ, Franken P, Veldscholte J. Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. Clin Cancer Res, 2009; 15: 5784–93.
153. Amar-Hoffet A, Hédon B, Belaisch-Allart J. Assisted reproductive technologies place. J Gynecol Obstet Biol Reprod, 2010; 39(8S2): 88-S99.
154. Ray S, Xu F, Wang H, Das SK. Cooperative control via lymphoid enhancer factor 1/T cell factor 3 and estrogen receptor-alpha for uterine gene regulation by estrogen. Mol Endocrinol, 2008; 22: 1125–40.
155. Rider V, Isuzugawa K, Twarog M, Jones S, Cameron B, Imakawa K. Progesterone initiates Wnt–beta-catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. J Endocrinol, 2006;191: 537–48.
156. Chen K, Carter Z, Leno-Duran AL, Zhang E, Ruiz-Ruiz C. Orphan receptor kinase ROR2 is expressed in the mouse uterus. Placenta, 2010; 31: 327–33.
157. Abu-Jawdeh G, Comella N, Tomita Y, Brown LF, Tognazzi K, Sokol SY. Differential expression of frpHE, a novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. Lab Invest,

1999; 79: 439–47.

158. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. Endocrinology, 2002; 143: 2119–38.

159. Borthwick JM, Bui TD, Lako M, Lejeune S, Curtis AR, Strachan T, Lindsay S. Isolation of a full-length human Wnt7A gene implicated in limb development and cell transformation, and mapping to chromosome 3p25. Gene, 1997; 189: 25–9.

160. Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC. Determination of the transcript profile of human endometrium. Mol Hum Reprod, 2003; 9: 19–33.

161. Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R. Lack of β-catenin affects mouse development at gastrulation. Development, 1995; 121: 3529–37.

162. Xie H, Tranguch S, Jia X, Zhang H, Das SK, Dey SK. Inactivation of nuclear Wnt–beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. Development, 2008; 135: 717–27.

163. Boyer A, Goff AK, Boerboom D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. Trends Endocrinol Metab, 2010; 21(1): 25-32.

164. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. Recent Prog Horm Res, 2002; 57: 195–220.

165. Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA, Bany BM, Maclean JA 2nd, Rucker EB 3rd, Johnson GA, Spencer TE. Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. Biol Reprod. 2009 May;80(5):989-1000.

166. Potter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implicationsfor growth and differentiation of endocrine tissues. Endocr Rev, 1999; 20: 207–239.

167. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev, 1997; 11: 3286–3305.