



MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

FARKLI KOH TEDAVİ PROTOKOLLERİNE ENDOMETRİAL  
SEMAFORİNLERİN CEVABI: İN VİTRO ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ  
Ulviye Cansu ÖZTÜRK

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Yıldız UYAR

Manisa, 2017

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bizlere her konuda destek veren Anabilim Dalı Başkanı hocamız sayın Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU'ya

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Yıldız UYAR'a,

Asistanlık süresi boyunca tıbbi birikim, beceri ve tecrübelerini paylaştan MCBÜ Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri sayın hocalarım Prof. Dr. Semra ORUÇ KOLTAN, Prof. Dr. Naci Kemal KUŞÇU, Prof. Dr. Tefvik GÜVENAL, Prof. Dr. Yeşim BÜLBÜL, Doç. Dr. Aslı GÖKER, Doç. Dr. Burcu ARTUNÇ ÜLKÜMEN'e, ayrıca Uzm. Dr. Pınar Solmaz HASDEMİR'e ve tezime ışık tutup tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e,

Tezimin deney aşamasında bilimsel destek veren ve gülen yüzü ile beni hep motive eden Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Melike ÖZGÜL'e, gece gündüz beraber çalıştığım, benden desteklerini esirgemeyen kliniğimizde azim, sabır ve özveri ile çalışan mezun olmuş ve halen asistan olan tüm arkadaşlarıma, tüm hemşire arkadaşlarıma, polikliniklerimiz ve kliniklerimizdeki tüm tıbbi sekreter ve personellerimize,

Beni yetiştiren aileme ve beni her daim gökyüzünden izlediğine inandığım canım anneanneme ve son olarak dünyamı güzelleştiren, elimi bir an olsun bırakmayan, vazgeçişlerimi mücadelelem yapan, aşkın insana huzur veren her anını yaşatan ve o kocaman kalbiyle biz olmanın gücünü gösteren hayatımın en güzel hediyesi sevgili eşim Kpt. Orkun Burak ÖZTÜRK'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ulviye Cansu ÖZTÜRK

Ekim, 2017

## KISALTMA LİSTESİ

- Aİ:** Aromataz inhibitörleri  
**ark:** Arkadaşları  
**BH:** Büyüme hormonu  
**BHR:** Büyüme hormonu reseptörü  
**ESM:** Ekstrasellüler matriks  
**FSH:** Folikül stimulan hormon  
**Gn:** Gonadotropin  
**hCG:** İnsan koryonik gonadotropini  
**IGF:** İnsulin-like growth faktör  
**İÜİ:** İntra uterin inseminasyon  
**İVF:** İn vitro fertilizasyon  
**KOH:** Kontrollü overyan hiperstimulasyon  
**L:** Letrozol  
**LH:** Luteinizan hormon  
**MMP:** Matriks metalloproteinaz  
**NRP:** Nöropilin  
**OİA:** Ovulasyon indüksiyon ajanları  
**PKOS:** Polikistik over sendromu  
**RKÇ:** Randomize kontrollü çalışma  
**SEMA:** Semaforin  
**TIMP:** Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri  
**VEGF:** Vasküler endotelyal growth faktör  
**VEGFR:** Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü  
**YÜT:** Yardımcı üreme teknikleri  
**ZOY:** Zayıf overyan yanıt

## ŞEKİL TABLOSU

## SAYFA

|                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1:</b> Uterusun yapısı .....                                                                                                                                                      | 5  |
| <b>Şekil 2:</b> Endometriyumun tabakaları.....                                                                                                                                             | 6  |
| <b>Şekil 3:</b> Menstrual siklus süresince endometriyumda oluşan değişiklikler.....                                                                                                        | 8  |
| <b>Şekil 4:</b> Endometrial siklus ve hormonal kontrolü .....                                                                                                                              | 10 |
| <b>Şekil 5:</b> Menstrual siklus fazlarında uterus yapısı .....                                                                                                                            | 12 |
| <b>Şekil 6:</b> Blastosistin endometriyuma implantasyonu .....                                                                                                                             | 15 |
| <b>Şekil 7:</b> İmplantasyon mekanizması .....                                                                                                                                             | 17 |
| <b>Şekil 8:</b> İmplantasyon sürecinde rol oynayan adezyon moleküllerinin şematik gösterimi .....                                                                                          | 19 |
| <b>Şekil 9:</b> Semaforinler ve reseptörleri nöropilinler ve pleksinler.....                                                                                                               | 35 |
| <b>Şekil 10:</b> SEMA-Pleksin etkileşimi ve hücre içi sinyal yolları .....                                                                                                                 | 37 |
| <b>Şekil 11:</b> 25 cm <sup>2</sup> kültür flaskında çoğaltılan CRL-1671 hücreleri.....                                                                                                    | 45 |
| <b>Şekil 12:</b> MTT analizi için hazırlanan 96 gözlü kültür kabının şematik gösterimi .....                                                                                               | 47 |
| <b>Şekil 13:</b> Steril hava akış kabini içerisinde immunositokimya için hazırlanmış CRL-1671 hücreleri ve DMEM F-12 hücre besiyeri .....                                                  | 48 |
| <b>Şekil 14:</b> İmmunositokimya analizi için hazırlanan 24 gözlü kültür kabının şematik gösterimi.....                                                                                    | 48 |
| <b>Şekil 15:</b> CRL-1671 hücrelerinin 1.gün inverted mikroskop görüntüleri .....                                                                                                          | 52 |
| <b>Şekil 16:</b> CRL-1671 hücrelerinin 8.gün inverted mikroskop görüntüleri .....                                                                                                          | 53 |
| <b>Şekil 17:</b> CRL-1671 hücrelerinin 2,5 mg letrozol/10 mL DMSO çözeltisinden 1:20 dilüsyon oranı ile hazırlanmış uygulamaları sonrasında 8.gündeki inverted mikroskop görüntüleri ..... | 53 |
| <b>Şekil 18:</b> CRL-1671 hücrelerinin ilaç uygulamaları sonrasında 8.gündeki inverted mikroskop görüntüleri .....                                                                         | 54 |
| <b>Şekil 19:</b> 1.25 mg/mL Letrozol MTT analizi bulguları .....                                                                                                                           | 55 |
| <b>Şekil 20:</b> 0.25 mg/mL Letrozol MTT analizi bulguları .....                                                                                                                           | 55 |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 21:</b> Semaforin 3A immunositokimyasal HSCORE değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması. .... | 57 |
| <b>Şekil 22:</b> Semaforin 3A immunositokimya fotoğrafları .....                                           | 57 |
| <b>Şekil 23:</b> Semaforin 3F immunositokimyasal HSCORE değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması. .... | 58 |
| <b>Şekil 24:</b> Semaforin 3F immunositokimya fotoğrafları.....                                            | 59 |
| <b>Şekil 25:</b> Semaforin 3E immunositokimyasal HSCORE değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması. .... | 60 |
| <b>Şekil 26:</b> Semaforin 3E immunfloresan fotoğrafları.....                                              | 61 |



## TABLO LİSTESİ

## SAYFA

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1:</b> Çalışmada kullanılan ilaçların dozları ve uygulama süreleri.....           | 46 |
| <b>Tablo 2:</b> İndirekt immunositokimya yönteminde kullanılan antikorlar .....            | 49 |
| <b>Tablo 3:</b> İndirekt immunositokimya yöntemi .....                                     | 50 |
| <b>Tablo 4:</b> İmmun dağılımların boyanma yoğunluğuna (i) göre<br>değerlendirilmesi ..... | 62 |
| <b>Tablo 5:</b> İmmun dağılımların HSCORE değerleri.....                                   | 62 |

## **İÇİNDEKİLER**

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>I. GİRİŞ</b> .....                                                          | 1  |
| <b>II. GENEL BİLGİLER</b> .....                                                | 5  |
| 2.1. Endometriyum .....                                                        | 5  |
| 2.2. Endometrial Siklus ve Hormonal Kontrolü .....                             | 7  |
| 2.3. İmplantasyon .....                                                        | 14 |
| 2.3.1. İmplantasyonu Etkileyen Faktörler .....                                 | 16 |
| 2.4. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon (KOH) .....                            | 22 |
| 2.4.1. Aromataz İnhibitörleri ile Overyan Stimulasyon.....                     | 23 |
| 2.4.2. Gonadotropinler ile Overyan Stimulasyon.....                            | 26 |
| 2.4.3. Büyüme Hormonu ile Overyan Stimulasyon .....                            | 29 |
| 2.5. Semaforinler .....                                                        | 34 |
| 2.5.1. Reprodüktif Sistemde Semaforinler .....                                 | 39 |
| <b>III. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....                                              | 44 |
| 3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi, Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması ..... | 44 |
| 3.2. İlaç Uygulamaları .....                                                   | 45 |
| 3.3. MTT Yöntemi .....                                                         | 46 |
| 3.4. İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi .....                                   | 47 |
| 3.5. İmmünohistokimya Yöntemi .....                                            | 50 |
| 3.6. İmmün Boyanmaların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler .....     | 51 |
| <b>IV. BULGULAR</b> .....                                                      | 52 |
| 4.1. Hücre Kültürü Bulguları .....                                             | 52 |
| 4.2. MTT Bulguları .....                                                       | 54 |
| 4.3. İmmün Boyama Bulguları .....                                              | 55 |
| 4.3.1. İmmünohistokimya Bulguları .....                                        | 56 |
| 4.3.2. İmmünohistokimya Bulguları .....                                        | 59 |
| <b>V. TARTIŞMA</b> .....                                                       | 63 |
| <b>VI. SONUÇ</b> .....                                                         | 75 |
| <b>VII. ÖZET</b> .....                                                         | 76 |
| <b>VIII. İNGİLİZCE ÖZET</b> .....                                              | 78 |
| <b>X. KAYNAKLAR</b> .....                                                      | 80 |

## I. GİRİŞ

İnsan yaşamı fertilizasyonla başlar. Tek hücreli zigottan çok hücreli organizmanın gelişimi, mükemmel bir şekilde programlanmış bir dizi olayın sonucudur. Bu süreçte oluşabilecek herhangi bir aksama, bu ahengin bozulmasına ve infertiliteye yol açabilir.

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle hiçbir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamaması durumudur. Sağlıklı çiftlerin yaklaşık %85-90'ında ilk bir yıl içerisinde gebelik gerçekleşmektedir. Dolayısıyla infertilite çiftlerin %10-15'ini ilgilendiren bir sorundur. İnfertilite tedavisindeki bilimsel ve teknolojik gelişmeler başarı oranlarının giderek artmasını sağlamıştır. Gelişen bu teknolojiler çiftlerin çocuk sahibi olabilme rüyalarını gerçekleştirmede önemli rol oynamaktadır. Doğal yollardan gebe kalamayan çiftlerde uygulanan tıbbi yöntem ve tedaviler kısaca yardımla üreme teknikleri (YÜT) olarak adlandırılır.

Her yıl dünyada infertilite tedavisi için çok sayıda kadın YÜT kullanmak üzere tüp bebek merkezlerine başvurmaktadır. 1988 yılında Türkiye'nin ilk tüp bebek merkezinin açılması ve 1989 yılında aynı merkezde Türkiye'nin ilk tüp bebeğinin dünyaya gelmesinin ardından ülkemizde de bu teknoloji hızla ilerlemiştir. Günümüzde yapılan çalışmalar, YÜT ile oluşturulan gebeliklerin ve canlı doğumların oranlarını yükseltmeye yöneliktir. YÜT'ün gelişmesiyle beraber infertilite tedavilerinde başarı oranları artmış ve daha çok infertil çiftin sağlıklı bebeklere sahip olması sağlanmıştır. Ancak tüm basamaklarda tekniğe uygun işlem yapılmasına rağmen gebelik elde edilemeyen ve nedeni açıklanamayan vakalar vardır. Gelişen teknoloji bize bu noktada az da olsa bazı şans kapıları açmıştır. Hala karanlık birçok yüzü bulunan infertilite sistemini anlamamız için bizlere ışık tutan her yeni çalışma implantasyon ve



gebelik oranlarını arttırmayı amaçlar. Çünkü implantasyon sürecinde açıklanamayan infertiliteye ışık tutabilecek ve araştırılması gereken birçok bilinmeyen durum bulunmaktadır.

YÜT tedavi yöntemleri arasında ovulasyon indüksiyonu tedavinin temelini oluşturmaktadır. Ovulasyon indüksiyonu kapsamında kontrollü overyan hiperstimulasyon (KOH) tedavi protokolleri sıklıkla kullanılan bir protokoldür. KOH konsepti in vitro fertilizasyon (İVF) pratiğinden doğmuştur. Uterusa birden fazla embriyo yerleştirildiğinde gebelik şansının arttığının anlaşılmasıyla iyi kalitede yumurtaların seçilebilmesine imkan verecek ve mümkün olduğunca çok folikülün elde edilebileceği KOH rejimleri önem kazanmıştır. KOH ile multiple folliküllerin, bunun sonucunda çok sayıda oosit ve embriyoların elde edilebilmesi ile YÜT başarısını arttırmak amaçlanmıştır. Her ne kadar günümüzde sıradan bir uygulama olsa da anovulatuvar kadınlarda ovulasyonu indüklemek ve onların gebe kalmasını sağlamak reproduktif endokrinolojinin sağladığı en büyük başarılarından biridir. İVF sikluslarında yapılan KOH'un amacı multifoliküler gelişim sağlamaktır. Bunun aksine intrauterin inseminasyon (İÜİ) sikluslarında yapılan KOH'un amacı monofoliküler gelişimi sağlamaktır.

Overyan stimulasyon; anovulatuvar döngüleri olan kadınlarda follikül gelişiminin çeşitli ajanlar yardımı ile uyarılması ve ovulasyonun sağlanması anlamına gelmektedir. Ancak günümüzde sadece amenore ve anovulasyon durumlarında değil, tubal, erkek ya da nedeni bilinmeyen infertilite olguları gibi ovulasyonu olan kadınlarda da follikül gelişiminin yönlendirilmesi, ovulasyonun zamanlanması ya da gamet hücrelerinin buluşma olasılığının artırılabilmesi, bir yerine birkaç follikül gelişiminin sağlanması için de kullanılmaktadır. Ovulasyon indüksiyon ajanları (OİA) tek başlarına ya da, kombine olarak değişik protokoller ile kullanılabilirler. OİA ve tedavi protokolü seçimi hastanın birincil patolojisi, tedavi tutarı, tedavi süresi göz önüne alınarak belirlenir. Gonadotropinlerin kullanıma girdiğinden bu yana geçen 4 dekatta ovulasyon indüksiyonu alanında çok hızlı gelişmeler olmuştur. İlaç araştırmalarındaki buluşlar, yeni protokoller ve daha iyi izlem teknikleri, daha etkin ve başarılı infertilite yaklaşımları ile sonuçlanmıştır. İleri reproduktif teknikler günümüzde

infertil çiftlerin problemleri için sunabilceğimiz çözümleri büyük oranda artırmıştır. Overyan stimülasyon amaçlı kullanılan ilaç yelpazesi oldukça geniş olmakla birlikte bu amaçla gonadotropinler, aromataz inhibitörleri, büyüme hormonu ve bunların kombinasyonları kullanılabilir. Bu ilaçlara verilen over yanıtı ile geliştirilen foliküller sonucu oluşan embriyolar için bir sonraki aşama gebeliğin devamı için gerekli olan implantasyon olmaktadır.

Ovulasyon indüksiyonunda kullanılan farklı preparatların, yardımcı üreme tekniklerinin başarısını ne yönde etkilediği konusunda hala çok fazla tartışma vardır. Ovulasyon indüksiyonunda kullanılan farklı farmakolojik ajanların üstün olduğu noktaları belirlemek tedavi sonuçlarının iyileştirilmesi açısından önemlidir. Overyan foliküler gelişimi ve direkt olarak ovulasyonu indüklemek için kullanılan ilaçlar oosit sayısını arttırmakla beraber, bu ilaçların endometrium üzerindeki etkileri de kadın sağlığı, implantasyon ve gebeliğin devamı için önemli olmaktadır.

Teknoloji ve bilimdeki ilerlemelere paralel olarak insan ve hayvan vücudundaki bilinen proteinlerin sayısı ve işlevlerine yönelik bilgi her geçen gün artmaktadır. Yeni belirlenen proteinlerin, vücudun işleyişine dair mekanizmaların daha iyi anlaşılması, şu ana kadar çözülememiş metabolik yolların açıklığa kavuşturulması, hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanımı gibi durumlar konunun cazipliğini artırmaktadır. Bu anlamda semaforinlerin keşfi 1992 yılında çekirgelerin ekstremitelerinde tomurcuğu akson rehberliği alanında olmuştur, ancak o zamandan beri, semaforinin birçok süreçte rolü olduğu bulunmuştur. Semaforinler (SEMA), nöronal hücre göçü, akson rehberliği, anjiyogenez, vaskülogenez, tümörögenez, hücre adezyonu ve motiliteyi içeren farklı gelişim süreçlerine aracılık eden ve çevresel ipuçları sağlayan membran bağlı proteinler ailesidir. Semaforinler, hücre içi sinyalleri dönüştürmek için plexin ve/veya nörofilin reseptörlerini kullanırlar. Bununla birlikte, rolleri oldukça çeşitlidir. Semaforin sinyalleri doğrudan hücre göçünü ya da hücre apoptozunu düzenleyerek hücre büyümesini teşvik edebilir ya da inhibe edebilirler. Böylece tümör invaziv büyümesini kontrol edebildikleri bulunmuştur. SEMA'ların hücre adezyonu ve invazyonundaki anahtar

düzenleyici rollerinin saptanması, implantasyonda rol alabileceklerini düşündürmüş ve güncel çalışmalarda gösterilmiştir.

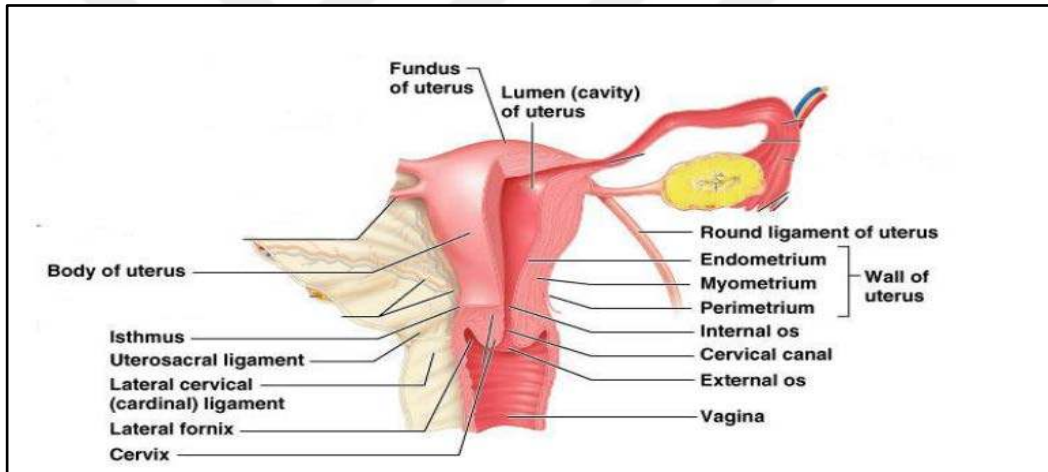
Yapılan çeşitli çalışmalar ile sağlıklı uterusda çeşitli semaforinlerin ifade edildiğini ve çeşitli hastalıklarda ise bu ifade seviyelerinde değişimler olduğu gösterilmiştir. Fakat literatürde gonadotropinler, aromataz inhibitörleri ve büyüme hormonuna cevap olarak endometrial semaforinlerin ifade seviyelerinin değişip değişmediği, bu değişimin implantasyonu etkileyip etkilemeyeceği gibi sorular henüz cevaplanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı; KOH için kullanılan protokollerde yer alan gonadotropinler, aromataz inhibitörleri ve büyüme hormonunun endometriyumda ifade edilen semaforinler üzerine etkilerinin in vitro kültür koşullarında araştırarak bize bu ilaçların kullanımı sonrası gerekli olan implantasyona etkisi hakkında veri sağlamasıdır. Elde edilen sonuçların literatürdeki endometrial semaforinlerin ifade seviyelerinin değişip değişmediği bilgilerindeki eksikliklerin tamamlanması ve bu konuda yapılacak in vivo, hayvan ve klinik çalışmaların önünü açarak, bu ilaçlara cevaben endometrial semaforinlerde meydana gelen değişikliklerin yardımcı üreme tekniklerinde çok önemli bir basamak olan implantasyon üzerindeki etkilerinin çalışılabileceği tahmin edilmektedir.

## II.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Endometriyum

Uterus, üç farklı histolojik tabakadan oluşur: perimetrium, miyometriyum, endometriyum. Perimetrium en dışta yer alan seroza katmanıdır, miyometriyum ortada yer alan en kalın tabaka olup, düz kas dokusundan oluşur, endometriyum iselümene bakan en iç tabakadır (şekil 1).



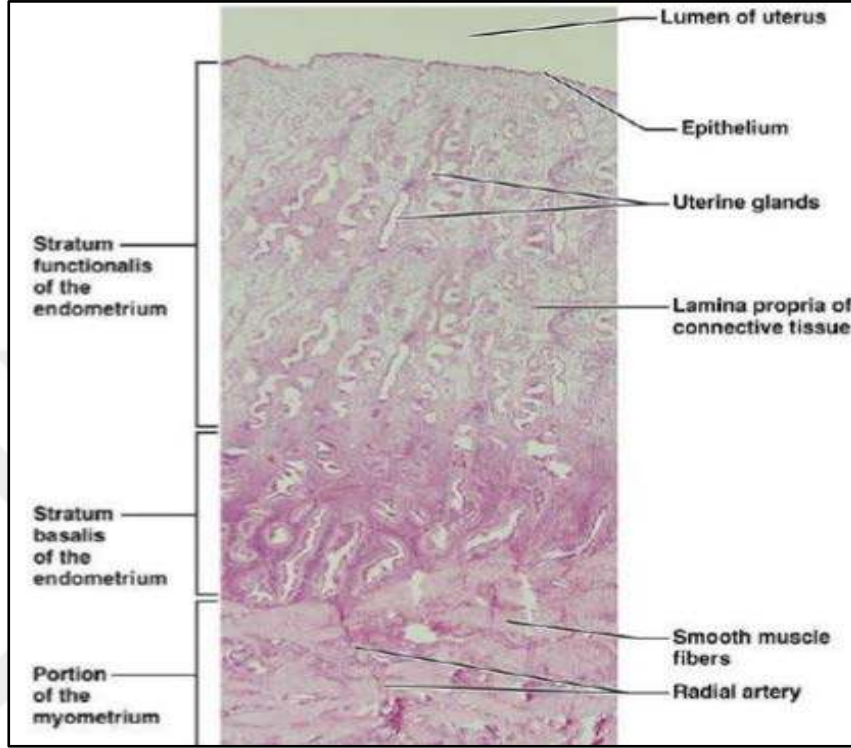
Şekil 1: Uterusun yapısı (1)

Endometriyum tabakasını, tek katlı silli prizmatik epitelden oluşan lamina epitalialis ve bu tabakanın altında seyreden basit tübüler uterus bezlerini içeren lamina propriya oluşturur (2).

Endometriyum yapı ve işlevlerine göre iki alt tabaka içerir (şekil 2).

**I. Fonksiyonel tabaka (Stratum fonksiyonale):** Menstrual siklus sürecinde overyan steroidlere yanıt olarak değişikliğe uğrar ve menstrual kanama ile birlikte dökülen üst 2/3'lük yüzey kısmı oluşturur. Menstrual siklus ile döküldükten sonra her siklуста yenilenir.

**II. Bazal tabaka (Stratum bazale):** Miyometriyumun üzerinde ince bir şerit halinde yer alan 1/3'lük taban kısmı oluşturur, bazal arterleri ve endometrial bezlerin taban kısımlarını içerir ve menstruasyonla dökülen fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlar (3). Menstrual siklusa etkilenebilir.



**Şekil 2:** Endometriyumun tabakaları (4)

Üreme çağında endometriyum her ay kendisini embriyo implantasyonuna ve sonrasında gelen embriyonik ve fetal gelişim olaylarına hazırlayan siklik değişimlere uğrar. Siklus sırasında endometriyumun salgı aktivitesindeki değişimler ovaryum folikülerinin olgunlaşmalarıyla korelasyon göstermektedir. Her siklusun sonu, endometriyumun bölgesel yıkımına ve dökülmesine eşlik eden mukozal damarlardan kanama ile karakterizedir. Menstrual siklusun fazları gerçekleşirken endometriyumun kalınlığı 1-6 mm arasında değişir. Endometriyumu döşeyen salgı hücrelerini ve silyumlu hücreleri içeren tek katlı prizmatik yüzey epiteli, uterus bezlerini oluşturmak üzere alttaki lamina propriya tabakasının yani endometrial stromanın içine doğru invajine olur. Böylece oluşan basit tübüler bezler az sayıda silyumlu hücre içerirler ve endometriyumun derin kısmına doğru dallanırlar. Mezenkime benzeyen endometrial stroma yüksek düzeyde selülerdir ve bol miktarda interselüler

aramadde içermektedir. Tuba uterinada olduğu gibi, endometriyumunu miyometriyumdan ayıran bir submukoza yoktur (5).

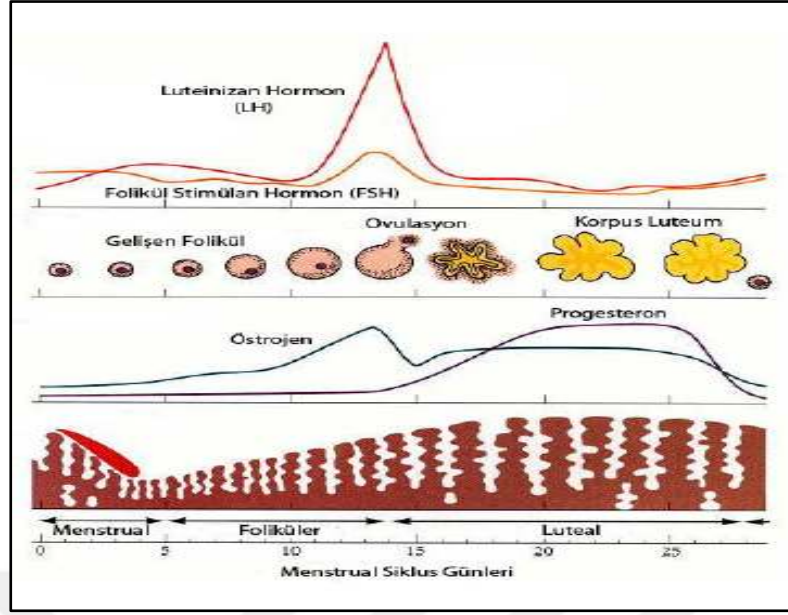
Endometriyum embriyonun invazyonuna izin veren, menstrual siklus ve gebelik süresince değişime uğrayan dört farklı hücre grubu içerir; luminal ve glandular epiteliyal hücreler, çoğu fibroblast olan stromal hücreler, endotelyal hücreler ve endometriyuma göç eden immün hücreler (6). Epitelyal hücrelerde gerçekleşen morfolojik değişimler embriyonun adezyon sürecine katılırken, stromal hücreler proliferasyon evresindeki östrojen kaynaklı ilk gelişiminin ardından geç-sekresyon evresinde progesteronun etkisi altında desidual hücrelere farklılaşır (7).

## **2.2.Endometrial Siklus ve Hormonal Kontrolü**

Gebe olmayan kadınlarda puberteden itibaren başlayıp menapoz dönemine kadar devam eden menstrual siklus, uterus endometriyumunda stratum fonksiyonale tabakasındaki gelişimsel evrelerin arka arkaya devam etmesiyle meydana gelen sürece denir. Pitüiter bezin pars distalisinden salgılanan ve ovaryumun steroid salgılarını düzenleyen gonadotropinler tarafından kontrol edilmektedir (5). Östrojen ve progesteron kontrolü altında her ay endometriyumda siklik değişiklikler gerçekleşir.

Endometriyum, her siklus boyunca, olası embriyonik implantasyon için hazırlık yapan; histolojik, morfolojik ve biyokimyasal açıdan değişik görünüm ve fonksiyon gösteren dinamik bir dokudur (8). Endometrial siklus yaklaşık 28 gün sürer (9) fakat kadınlar arasında bu süre 20 günden kısa veya 45 günden uzun dönemlerde de olabilir. Doğurganlıkla menstrual döngü sıklığı arasında ilişki bulunur ve döngü bozukluğu olanlarda üreme yeteneği azalır.

Menstrual döngü boyunca endometriyuma ait birbirini takip eden üç evre tarif edilir: Proliferasyon evresi (östrojenik veya foliküler evre), sekretuar evre (luteal evre) ve menstrual evre (Şekil 3).



**Şekil 3:** Menstrual siklus süresince endometriyumda oluşan değişiklikler (10)

**I. Proliferasyon Evresi (Östrojenik veya Foliküler evre):** Menstrual kanamanın 5.gününden itibaren başlar, 15. veya 16.güne kadar devam eder ve foliküler maturasyon ile aynı anda gerçekleşir. Uterus mukozası folikül stimule eden hormon (FSH) etkisiyle kalınlaşır (5). Uterus bezleri büyür. Fakat salgı yapmaz. Mukozayı besleyen kan damarları genişler. FSH seviyesindeki yükselme daha sonra içlerinden birisi dominans kazanacak olan foliküllerin gelişmesini sağlar. Teka internaları geliştiğinde bu foliküller aktif olarak östrojen salgısına neden olur, bu da endometriyumun proliferasyonunu sağlar (11).

Menstrual fazın sonunda endometriyum ince olup yaklaşık 1 mm kalınlığında ince bağ dokusundan meydana gelir ve bu bağ dokusu düz ve dar lümenli uterus bezlerinin bazal kısımları ile spiral arterlerin alt kısımlarını içerir. Bu tabaka stratum bazeledir. Dökülmüş olan tabaka ise stratum fonksiyonaledir (5). Stratum bazeledeki stromal, endotelial ve epitelyal hücrelerde östrojenin uyarıcı etkisiyle mitoz görülür ve bu hücreler hızla proliferasyon olurlar. Tübüler bezlerin bazal bölgelerindeki epitelyal hücreler bezleri yeniden yapılandırılır ve soyulmuş olan endometrial yüzeye göç ederek orayı kaplarlar. Bezler kıvrımlı bir şekil alır.

Stromal hücreler prolifer olurlar ve kollajen ile ara madde salgılarlar. Spiral arterler uzar ve endometriyumun kalınlığı 3-5 kat artar bu evreye 'proliferasyon evresi' denir (11).

Proliferasyon döneminin son iki gününde mitozlar azalır, bezler daha fazla kıvrımlı olur, epitel hücrelerinin çekirdekleri altında glikojen boşlukları (subnükleer vakuol) oluşmaya başlar. Rutin histolojik preparatlarda glikojenin uzaklaştırılması bazal sitoplazmaya boşluklu bir görünüm verir (5).

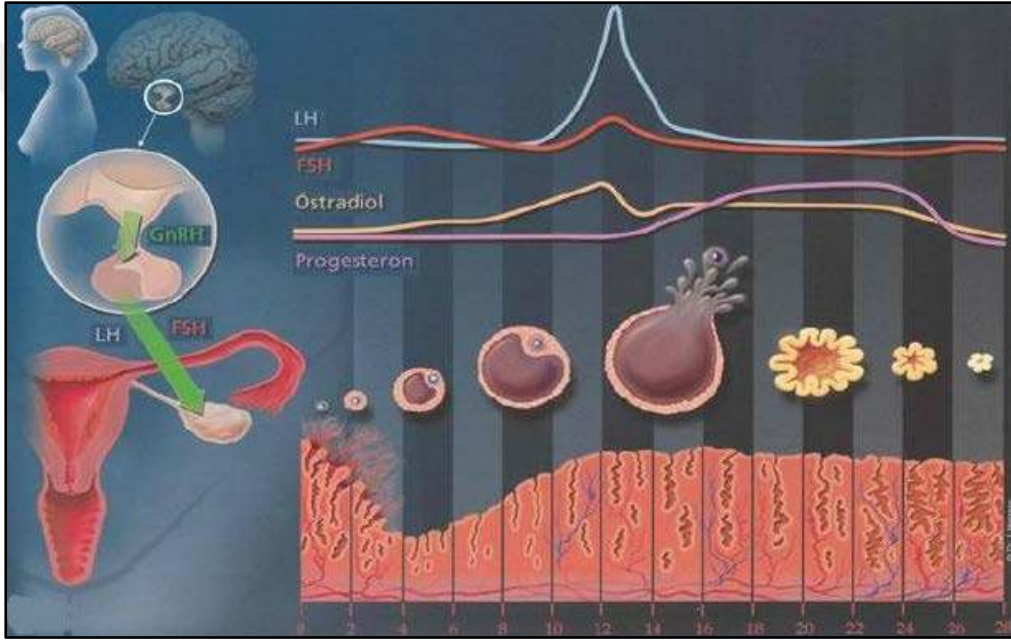
Artan östrojen; FSH salgısını baskılar, ancak östrojen salgısı belli bir düzeye gelince lüteinizan hormon (LH) salgısını uyarır ve LH'nin ani artışıyla ovulasyon meydana gelir (12). 28 günlük bir siklusda LH tepe noktasına 14.günde ulaşır ve ovulasyon ile 14 gün sürecek olan luteal dönem başlar (Şekil 4).

Ovulasyonu takip eden ilk 24 ila 36 saat düzensiz subranükleer vakuollerin görüldüğü geç proliferasyon dönemi ara dönemdir. Östrojene bağlı değişikliklerin ardından ovulasyonunun olduğunun en önemli kanıtı ovulasyonu takip eden 2.günde epitelde yaygın olarak subranükleer vakuollere sahip hücrelerin ortaya çıkmasıdır. Bu subranükleer vakuollerin endometriyum bezlerinin en az yarısında görülmesi ovulasyonun olduğunu kanıtlar. Daha sonraki günlerde bu vakuoller daha yukarıya hareket ederler ve ovulasyonun 5.gününde lümende salgı olarak görülürler. Ovulasyon sonrası 5 ila 9.gün arasında lümende salgı bulunan ileri derecede kıvrımlı bezler ve ödemli stroma bulunur. Ovulasyon sonrası 10 ila 14.günde ise stromada belirgin spiral arteriyoller ve önce bunların çevrelerinde daha sonra gittikçe artarak yaygın hale gelen geniş sitoplazmalı desidua öncesi (predesidua) hücreleri ortaya çıkar. Bu dönemde bezlerde ileri derecede testere dişlerini andıran yuvarlak soluk içerikli epitel hücreleriyle döşelidir (5).

Proliferasyon evresine hakim olan östrojen; premenopozal dönemde overlerde ve postmenopozal kadınlarda periferik dokuda kolesterolden sentezlenen 18 karbonlu steroidlerdir. Çeşitli doku tiplerinde  $\alpha$  ve  $\beta$  adlı iki reseptörü klonlanmış ve saptanmıştır. Doğal östrojenlerin başlıcaları; östradiol (E2), östron (E1) ve östriol (E3)'dür. Bunlardan potent etkisi en fazla olan östradiol iken en az potent etkiye sahip olan östrioldur (13).



Over, premenopozal yıllarda östrojen üretiminin başlıca kaynağıdır. Granüloza hücreleri teka hücrelerinde kolesterolden köken alan androstenedionu aromataz enzimini kullanarak östradiole dönüştürür (13). Granüloza hücrelerinde teka kaynaklı ve LH bağımlı androjenlerden öncelikle östron ve takiben yine bu hücrelerde bulunan 17- $\beta$ -OH steroid-dehidrogenaz enzimi ile östradiol yapılır. Östradiol foliküler sıvının ağırlıklı östrojenidir (8). Östrojen ve progesteron uterus mukozasının siklik yenilenmesini beraber düzenlerler. Östrojen uterin epitelde hücre artışını indüklerken progesteron bu hücre artışını engeller ve farklılaşmayı tetikler.



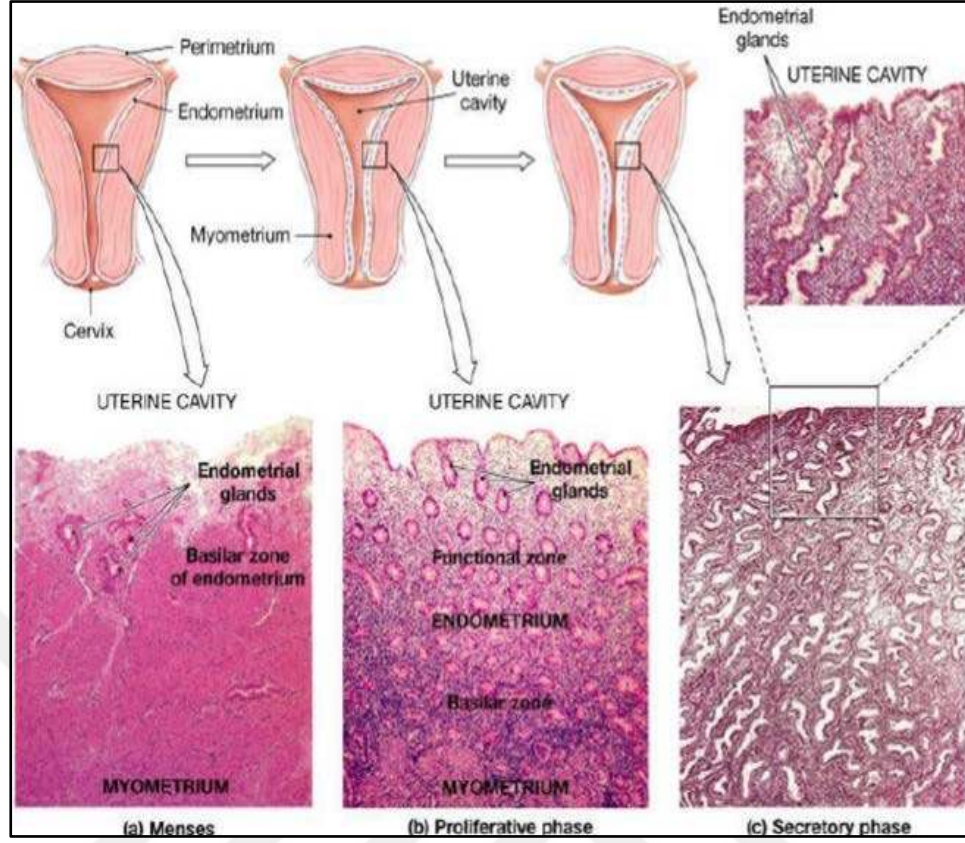
**Şekil 4:** Endometrial siklus ve Hormonal kontrolü (14)

**II. Sekretuar Evre (Luteal evre):** Menstrual siklusun 15-16.günlerinde (ovulasyondan sonra) sekretuar evre başlar (15) ve bir sonraki menstrual sıklusa kadar devam eder. Ovulasyondan sonra folikül yerinde oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanır. Östrojenlerin ve progesteronun ardışık etkileri ile stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşümü mümkün hale gelir. Progesteronun etkisiyle uterus bezlerinde salgılama ortaya çıkar. Uterus mukozası süngerimsi bir görünüm alır ve implantasyon için uygun bir ortam hazırlanmış olur. Dönüşüm için gereken stimülasyon, blastokistin implantasyonudur. Eğer fertilizasyon gerçekleşmiş ise uterusun bu durumu bir

müddet daha devam eder. Bu dönüşümün sonucunda büyük, soluk ve glikojen bakımından zengin hücreler ortaya çıkar. Bu hücrelerin kesin fonksiyonları bilinmemekle birlikte, embriyonun beslenmesi için gerekli ortamı sağladıkları ve gebeliğin sonlanması sırasında plasantanın uterusun duvarından ayrılmasını kolaylaştıran özelleşmiş bir tabaka oluşturdıkları açıktır (5).

Endometriyum ödemli hale gelir ve sonunda yaklaşık 5-6 mm kalınlığına ulaşır. Bezler büyür ve kıvrıntılı hale gelir, salgılarını artırır. Luteal evrenin ilerlemesiyle depolanan glikojen vakuolleri hücrenin tabanından lümene hareket eder. Bez epiteli tarafından üretilen mukoid sıvı implantasyonun gerçekleşmesi halinde gelişimi desteklemek üzere besin bakımından, özellikle de glikojen bakımından zengindir. Mitoz artık nadirdir. Bu aşamada görülen büyüme, epitelyal hücrelerin hipertrofisi, vaskülaritenin artması, salgıların birikmesi ve stromadaki ödeminin sonucudur. Bununla birlikte, spiral arterler uzarlar ve daha fazla sarmal hale gelirler. Hemen hemen endometriyumun yüzeyine kadar uzanırlar (5). Bu fazda endometriyum, maksimum kalınlığa ulaşır (Şekil 5). Sekresyon evresinde fertilizasyon gerçekleşmez ise menstrual evre başlar (11).

Sekretuar dönem sırasında, embriyonun implantasyonu için uterusun kısa bir kabul dönemi (implantasyon penceresi) vardır ve bu dönemde interlökin-8 (IL-8) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) sentezinde azalma olur. Sekretuar dönemin sonuna doğru yükselen progesteron seviyesinin baskılayıcı etkisinin belirtisi olarak östrojen reseptörünün glandular ekspresyonu belirgin olarak azalır. Luteal dönemin son zamanlarında, endometriyum, ön hipofiz gibi prolaktin yapar, fakat endometrial prolaktinin fonksiyonu bilinmemektedir. Progesteron, implantasyon sırasında lokal inflamatuvar cevabı azaltır. Eğer hamilelik gerçekleşirse IL-8 ve MCP-1 sentezinde azalma olurken interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), platelet aktive edici faktör (PAF) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) sentezinde artış olur (5).



**Şekil 5: Menstrual siklus fazlarında uterus yapısı (16)**

**III. Menstrual Evre:** Menstrual dönem, endometriyum fonksiyonel tabakasının iskemisi ve proteolizisi sonucu endometriyumun dökülmesi ile karakterizedir. Proteolitik enzimler postovulatuvar periyodun ilk yarısında membrana bağlı lizozomlarda depo edilir. Menstrual döngünün 24-25.günlerinde, östrojen ve progesteron azalması ile bu lizozomların membran bütünlüğünün kaybolması sonucu, glandular, stromal hücreler ve vasküler endotelial hücrelerinin lizisi gerçekleşir. Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum yaklaşık 10 gün aktif olarak hormon üretir.

Ardından korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki progesteron ve östrojenin ani düşüşü ile stratum fonksiyonaleye kan desteğinde değişimler olur. Endometriyumda normal kanlanmanın azalmasını ve aralıklı iskemiyi başlatır. Bunu izleyen hipoksi, endometriyumun fonksiyonel tabakasında nekroza neden olur. Nekroze doku 3-4 gün içerisinde menstruasyonla birlikte dökülür. Bu evreye 'menstrual evre' denir (15).

Endometriyumunu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir. Arkuat arterler endometriyumun alt kısmında bulunan miyometriyumun orta tabakalarında dairesel olarak yerleşmiştir. Bu damarlardan endometriyumunu besleyen iki grup damar çıkar: bazal tabakayı besleyen düz arterler ve fonksiyonel tabakaya kan taşıyan kıvrımlı (spiral) arterler. İlk olarak spiral arterlerin duvarlarının birkaç saat süren periyodik kasılmaları stratum fonksiyonelenin iskemik hale gelmesine neden olur. Bezlerin salgılanması durur ve stromadaki ödemin azalması ayrıca beslenme azalmasına bağlı olarak ekstrasellüler sıvının azalması ve spiral arterlerin vazokonstrüksiyonu ile endometriyum yükseklik olarak büzülür. Yaklaşık iki gün sonra, uzun süreli arteriyal kontraksiyon ve kısa süreli kan akımı nedeniyle yüzey epitelinde bozulma ve kan damarlarında rüptür meydana gelir. Spiral arterler kapandığında kan stratum fonksiyoneliye değil stratum bazaleye akar. Kan, uterin sıvı ve stratum fonksiyonaleden dökülen stromal ve epitelyal hücreler vajinal akıntıyı oluşturur. Endometriyumdan doku yamalar halinde ayrıldıkça venlerin, arterlerin ve bezlerin kopmuş uçları ortaya çıkar. Bu deskuamasyon, sadece stratum bazale kalana kadar devam eder (5). Endometrial siklus sonunda endometriyumun sadece bazal tabakası kalır ve yeni bir siklus başlar. Menstruasyon yeni bir menstrual döngü başlangıcının ilk bulgusudur (15).

Fertilizasyon gerçekleşmemiş ise, kanamanın durması, yeni ovaryum folikülerinin büyümesine ve olgunlaşmasına eşlik eder. Epitelyal hücreler, bir sonraki siklusun proliferasyon fazı başlarken yüzey epitelini eski haline getirmek için hızlıca prolifer olurlar ve göç ederler.

Fertilizasyon gerçekleşirse; sekretuar evreden sonra, zigot yarıklanmalarını takiben gelişen blastosistin endometriyuma implantasyon süreci başlar. İmplantasyon meydana gelmişse ovulasyonun 14.gününden itibaren predesidua geniş sitoplazmalı epitel andıran desidua hücrelerine dönüşür. Bu hücrelerde özellikle implantasyon yerinde belirgin olmak üzere çekirdek şekil ve büyüklük farkı meydana gelebilir. Desidua oluşumu sadece uterus içi değil ektopik gebelikte de ortaya çıkabilir.

Endometriyuma blastosist implantasyonu; başarılı bir gebelik için gerekli olan hücre farklılaşması, apoptoz, invazyon ve ekstrasellüler matriksinde model değişikliği gibi olaylar zincirinin ilk basamağıdır. Apoptoz hem implantasyon hem de desidualizasyonda rol oynar. İnsanda implantasyon sırasında, embriyonun epitele tutunmasını, endometrial stromal hücreler tarafından gerçekleştirilen desidualizasyon takip eder (17).

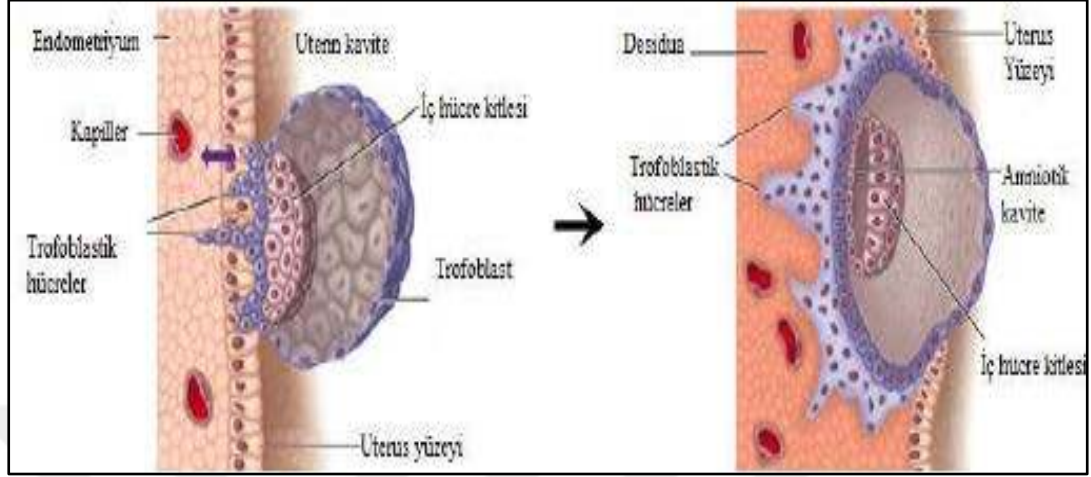
Endometriyumun bağ dokusu büyük değişiklikler geçirerek lamina proprianın fibroblastları genişler ve poligonal bir hal alarak protein sentezleyen hücrelerin özelliklerini gösterir. Bu hücreler artık desidua hücreleri olarak adlandırılır, endometriyumun bütünü de desidua adını alır. Stromal hücreler büyüyerek artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometrial değişikliklere desidual reaksiyon denir. Çünkü endometriyumun fonksiyonel tabakası doğum sırasında desidua olarak dökülür (18).

### **2.3.İmplantasyon**

Tubal fimbria tarafından tutularak tubal kanal içinde yolculuğuna başlayan ovum tubal silier hücreler sayesinde yolculuğunu tamamlayıp ampullaya yerleşir. O sırada vajene ulaşan milyonlarca spermden zona pellucidayı delerek döllenmeyi yapacak spermi bekler. Matür bir oositin sperm tarafından döllenmesi oluşturan zigot seri mitotik bölünme geçirerek uterus kavitesine doğru ilerler. Bu arada zigot 2, 4, 8 ve 16 hücreye bölünür. Morula(dut) adını alan onaltı hücreli kitle fertilizasyonu takip eden 4.günde uterus kavitesine ulaşır. Uterusta yer alan sıvı embriyoya ait hücreler arası boşluklarda birikmeye başlar ve morula içinde blastosöl denilen bir kavite oluşur (19). Bu evreden itibaren blastokist olarak adlandırılan bu yapıda iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi oluşur; iç hücre kitlesi embriyoya ait olan dokuları oluşturur, dış hücre kitlesi ise uterus duvarına invazyon gösterecek ve plasentayı oluşturacak olan trofoblastları oluşturur (15).

Ovulasyon sonrası 6.günde blastokist haline geldikten sonra implantasyon sürecine girer (20). Fetus ve anne arasındaki ilk etkileşim, östrojen ve progesteronun etkisi altında bulunan adezyon molekülleri, sitokinler, büyüme faktörleri, metalloproteinazlar ve homeobox genler gibi birçok faktörün

zincirleme bir şekilde birbirini indüklemesiyle gerçekleşen kompleks bir olaydır (21) (şekil 6).



**Şekil 6:** Blastosistin endometriyuma implantasyonu (22)

İmplantasyon üç aşamada incelenir: Apozisyon (yanaşma veya polarite), Adezyon (tutunma veya nidasyon), İnvazyon

**I. Apozisyon:** Blastokist ile endometriyumunun karşı karşıya gelmesidir. Schlafke ve Enders tarafından tanımlanmıştır (23). Gelişmekte olan embriyonun ovulasyonu takiben 4. günde uterus boşluğuna ulaşarak, zona pellusidasını kaybetmesinin ardından implantasyon için uygun yeri seçtiği evredir (21). Embriyo ovulasyondan sonra 5-6. gününde genişlemiş blastokist olarak zona pellusidadan kurtulup dışarı çıkar. İmplantasyon bölgesinde trofoektoderm hücreleri blastokistin zona pellusidası boyunca çıkarken, bu bölgeyi sindiren proteolitik enzimleri üreterek zonadan serbestleşirler. Zonadan kurtulmada (hatching) uterus çevresindeki proteolitik enzimler de etkilidir ancak hatchingin moleküler temeli tam olarak açıklanamamıştır. Zonadan kurtulmuş blastokistin kalan hücre tabakaları sıkı bir fiziksel temas yaparlar ve implantasyon başlar (20).

Zona pellusidanın erimesinden hemen sonra blastosistin trofoblast hücreleri L-selektin ekspresyonuna başlar. L-selektin, endometriyumun luminal epiteli üzerinde yer alan oligosakkarid ligandları ile etkileşime geçerek blastosisti yavaşlatır. Böylece integrinler aracılığıyla embriyo ve anne arasında



kurulacak olan adezyonun gerçekleşmesine olanak sağlar (24). Apozisyon epitel hücre membranı çıkıntılarıyla (pinopod) kolaylaştırılır.

**II. Adezyon:** Ovulasyon sonrasındaki 6. ve 7.günlerde apozisyon başarıyla tamamlandığı zaman endometrialadezyon molekülleri aracılığıyla embriyonik trofoblast hücreleri endometriyumun luminal epiteline tutunur (25). İntegrin/tastin/trofin kompleksleri, heparin sülfat proteoglikanları, kadherinler, lektin, glikan ve glikan-glikan etkileşimlerini kapsayan çok sayıda adezyon molekül ailesinin insanda embriyo tutunmasında az çok rol oynadığı düşünülmektedir.

**III. İnvazyon:** Embriyo, trofoblastlar ile epiteli geçtikten sonra desidualize olmuş endometriyumun bazal laminasına yapışır, alttaki bağ dokusuna penetre olur. İnvaziv trofoblast hücreleri endometriyum ve miyometriyumun üst tabakalarını işgal eder ve endometriyumun stromal matriksinde yayılım ve gelişimini sürdürür (23). Bu üç faz, uterus endometriyumun maksimum düzeyde alıcı (reseptif) olduğu periyotta olaylanır ki implantasyonun gerçekleşeceği ve endometriyumda hazırlıkların yapıldığı bu döneme implantasyon penceresi ya da reseptivite penceresi denmektedir. Endometriyum, kendisi için yabancı olan blastosistin doku içerisine kabulü için kısa süreliğine reseptif hale gelir. İmplantasyon penceresi her menstrüel siklusun midluteal dönemi denen siklusun 20-24.günlerini ya da LH hormonun pik yapmasının ardından 6-10.günler arasına denk gelen ve 48 saatten daha az süren bir zamanı kapsar (26).

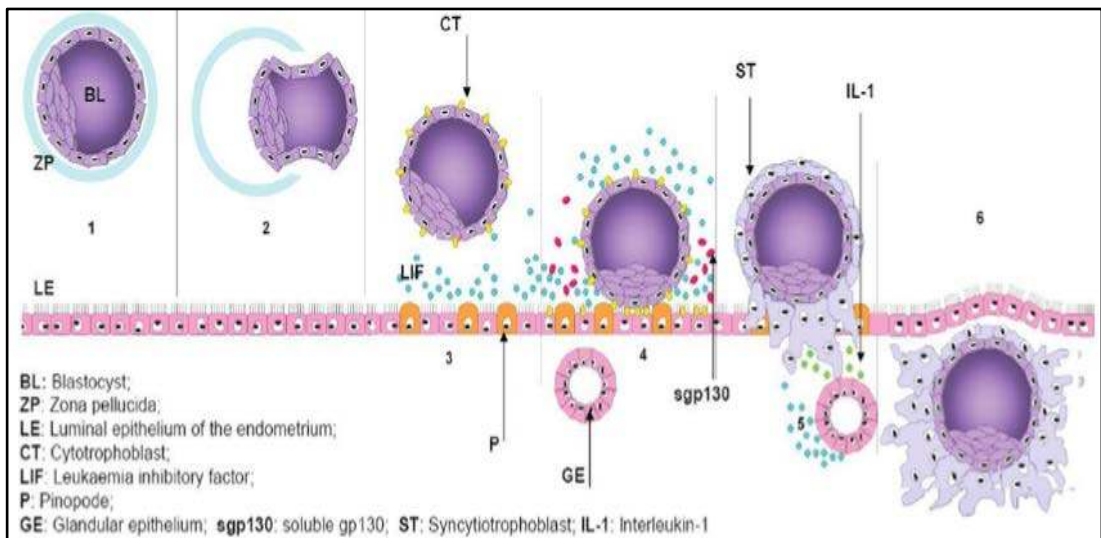
### 2.3.1. İmplantasyonu Etkileyen Faktörler

Başarılı bir implantasyon, aktive olmuş blastosistin endometriyumun reseptif fazındaki luminal epitel ile etkileşime geçmesi ile gerçekleşmektedir (27). İmplantasyon embriyonal kutup ile endometriyuma yaklaşan embriyo ve endometriyum arasında endokrin, parakrin, otokrin, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile olan bir iletişim söz konusudur ve bu etkileşim sonucu ortaya çıkan çok sayıda molekülün fonksiyon gösterdiği karmaşık bir süreçtir. Endometriyuma reseptif özellik kazandıran morfolojik ve biyokimyasal değişimler, implantasyon penceresi dönemine spesifik olan belirteçleri ortaya

koyar. Morfolojik farklılaşmaya örnek fibroblast benzeri endometrial stromal hücreler daha büyük ve yuvarlak desidua hücrelerine dönüşür, luminal epitelde sekretuar bez yapıları büyür, pinopodlar oluşur ve mikrovilluslar görülür (28).

Pinopodlar endometrial reseptivitenin değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Pinopodlar, endometriyuma ait olan epitelyal hücrelerin apikal membranında yer alan mikrovilluslarda ve membran altı yapılar olan sitoskeletonlarda, progesterona bağlı olarak gerçekleşen yapısal değişimler sonucu ortaya çıkan geniş ve düz membran uzantılarından oluşur (29). Endometrial bezlerin etrafını çevreleyen sıvıyı absorbe eder. Sadece 2 veya 3 gün varlıklarını sürdürürler (ovulasyondan sonraki 5-7.günler) ve implantasyon penceresinin açıldığının morfolojik bir göstergesidirler (30). Pinopodlar steroid hormonlarının etkisi ile endositoz ve pinositoz yaparlar ve böylece blastosist yüzeyi ile yakın temas ve adezyonu kolaylaştırıcı düzlemlerin oluşmasını sağlayarak adezyon sürecine katılırlar (8).

İmplantasyonu etkileyen birçok faktör vardır. Luminal glikokaliks yapımı ve negatif yüklü bir ortam sağlanması, endometriyumdaki müsin ve integrin yoğunluğu, trofinin ve tastin, kalsitonin, prostoglandin sentezinde hızlandırıcı olan siklooksijenaz-2 enzimi, hoxa geni, steroid hormonlar, sitokinler, vasküler endometrial büyüme faktörü implantasyonda ayrı ayrı önemi olan faktörlerdir (8) (şekil 7).



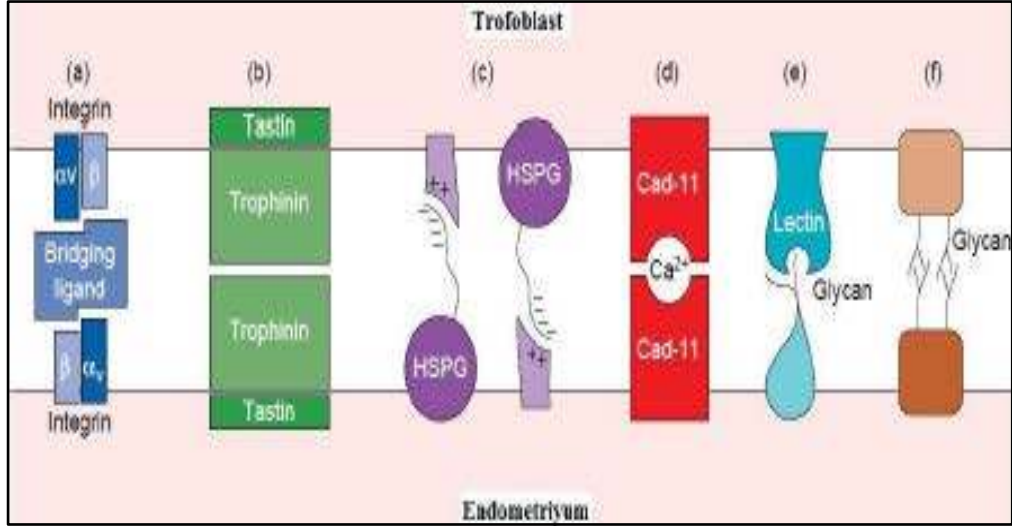
**Şekil 7:** İmplantasyon mekanizması (25)



Anti-adeziv özelliği ile bilinen musin ailesinin bir üyesi olan MUC-1, blastosistin luminal epitel üzerinde tutunacağı bölgeyi seçmesi konusunda etkin rol oynar. Endometriyumun reseptif fazında luminal epiteldeki ekspresyon düzeylerinde artış görülen MUC-1'in, blastosistin parakrin etkisinin ardından implantasyon alanında lokal olarak kaybı gözlenir ve böylece adezyonu engelleyen etken ortadan kaldırılarak embriyonun implantasyonuna izin verilir. Bir bariyer görevi gören MUC-1, embriyonun implantasyon için en uygun yere tutunmasını sağlamasının yanında embriyoyu annenin immün sistemine karşı korur (31).

Bir sitokin olan lösemi inhibitor faktörün (LİF) implantasyon için şart olduğu ve insan endometriyumunda orta ve geç luteal fazda LİF'in kuvvetli bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Apozisyon aşamasında luminal epitel hücreleri tarafından maksimum düzeylerde eksprese edilen LİF, trofoblast hücrelerinin yüzeyinde lokalize olan reseptörleri ile etkileşimleri vasıtasıyla implantasyon sürecine yardımcı olan faktörler arasındadır (32). Bu faktörün tuba uterina epiteli tarafından salgılanması ise oldukça ilginçtir ve reseptivite için gerekli yapılanmada tuba uterina- endometriyum ilişkisini işaret eder (33). İmplantasyon penceresi süresince luminal epitel hücreleri tarafından eksprese edilen LIF, sitotrofoblast hücreleri üzerinde eksprese olmuş reseptörlerine bağlanmasının ardından sitotrofoblast hücrelerinin sinsityotrofoblast hücrelerine farklılaşma sürecini indükleyerek invazyon aşamasında rol oynar. Endometrial bezler tarafından da eksprese edilen LIF'in düşük ya da yüksek düzeydeki ekspresyonları açıklanamayan infertilitenin nedenleri arasındadır (32).

Homeobox gen ailesinin bir üyesi olan HOXA-10'nun ekspresyon düzeyleri implantasyon penceresi döneminde belirgin bir artış gösterir. Blastosistler için önemli tutunma alanları olan pinopodların gelişimi için esas olan HOXA-10'nun endometriyozis, polikistik over sendromu (PKOS) gibi kadın infertilitesi olgularında ekspresyon düzeylerinin azaldığı, buna bağlı olarakta implantasyon başarı oranlarında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (34).



**Şekil 8:** İmplantasyon sürecinde rol oynayan adezyon moleküllerinin şematik gösterimi (35)

Her iki yüzeyde de ekspresyon düzeylerinde artış gözlenen adezyon molekülleri ve ligandları fetal-maternal etkileşimi gerçekleştirir (Şekil 8). Bu süreçte en önemli rolü üstlenen adezyon molekülü grubunu integrinler oluşturur. Hem luminal epitel hücrelerinin hem de trofoblastik hücrelerin yüzeyinde ekspresyonu gözlenen  $\alpha 5\beta 3$  integrini ve ligandı osteopontin implantasyon aşamasındaki ilk hücre-hücre etkileşiminde görev alır (24).  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  ve  $\alpha 5\beta 5$  integrinleride adezyon sürecine katılan diğer adezyon molekülleridir (36). Endometriyumun reseptif fazındaki luminal epitelde, implantasyon sürecinde rol alan  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  ve  $\alpha 5\beta 3$  integrinlerinin ekspresyonları saptanmıştır. İmplantasyon penceresinin açılması ile reseptif fazın en önemli biyokimyasal belirteci olan  $\alpha 5\beta 3$  integrinin ekspresyon seviyeleri, luminal epitelin apikal yüzeyinde eksprese olmaya başlayan heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve epidermal büyüme faktörünün (EGF) indüklemesi ile artış gösterir.  $\alpha 5\beta 3$  integrini, progesteron tarafından ekspresyonu düzenlenen ligandı osteopontine bağlanarak trofoblast hücreleri ve luminal epitel hücreleri arasındaki ilk hücre-hücre etkileşimini başlatır (37). Açıklanamayan infertilitenin nedenleri arasında gösterilen  $\alpha 5\beta 3$  integrin ekspresyon düzeylerine bakılarak uygun

implantasyon zamanı belirlenip, İVF programının başarı oranlarının artırılabilirliği düşünülmektedir.

Blastosistin gelişimi için esas faktör olan E-kaderin, adezyonsüresince trofoektoderm tarafından yüksek düzeylerde eksprese edilirken, adherens bağlantı komplekslerinin diğer elemanları ise luminal epitelin yüzeyinde eksprese olur. E-kaderinler bağlantı kompleksleri aracılığıyla gerçekleştirdiği homofilik hücre-hücre etkileşimi ile adezyon sürecine katılır (38). Kaderin ailesi üyelerinden olan Cad-11, adezyon sürecinde luminal epitel ile direkt etkileşime geçen sinsityotrofoblast ve ekstrasellüler yapıdaki sitotrofoblast hücrelerin yüzeyinde lokalize olur. Luminal ve glandüler epitel hücrelerinin yüzeyinde de eksprese olan Cad-11, blastosistin endometriyuma olan adezyonunda rol oynar (39).

Transmembranik bir protein olan trofinin, farklı hücreler arası homofilik bağlantılarda görev alır. Trofinin adezyon işlevini sitoplazmik proteinler olan tastin ve bystine bağlanarak oluşturduğu kompleks aracılığıyla gerçekleştirir. İmplantasyon süresince ve plasental gelişimin ilk dönemlerinde trofoblast hücreleri ve desidual hücrelerin yüzeyinde gözlenen trofinin kompleksi, implantasyon sürecinde rol oynar (40).

Desidualize olan stromal hücreler perisellüler fibronektin yaparlar. Fibronektin, hücreler ile hücre dışı matriks arasındaki tutunmada rol oynar. Hücreler üzerindeki reseptörlere kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin yapışmasına yardım eder. Ayrıca, fibronektin hücre göçünü düzenler, hücre farklılaşmasını sağlar (5)

Embriyonun endometriyumun bazal membranını yok ederek stromaya geçtiği invazyon aşamasında ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yıkımı matriks metalloproteinazlarca (MMP) gerçekleştirilir (41). Ekspresyon düzeylerinde artış gözlenen MMP-2 ve MMP-9 invazyon aşamasında görev alır. MMP'lerin aktivitesi matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) tarafından kontrol edilir (42).

Yüksek metastatik potansiyele sahip kanser hücreleri ile ilişkili sitokinlere dahil olan interlökin-6 (IL-6), hamileliğin ilk dönemlerinde amniyotik sıvıda gözlenmiştir(43). İnvaziv özellik gösteren sitotrofoblast hücreleri tarafından

eksprese edilen IL-6; MMP-2 ve MMP-9'un ekstrasellüler matriks bileşenleri üzerindeki etkilerini arttırabilme özelliğine sahiptir (44).

Endometriyum stromasına penetre olan blastosistin trofoblastı mitotik aktiviteye sahip tek çekirdekli hücrelerden oluşan sitotrofoblast hücre tabakasına ve endometriyum tarafında, embriyonik kutupta çok çekirdekli hücrelerden oluşmuş sinsiyotrofoblast hücre tabakasına ayrılır (15). Sitotrofoblastlar, gelişim sürecinde mitoz geçirerek hücre zarlarının kaynaşması ve hücre zarlarının kaybolması sonucunda sinsiyotrofoblastlara dönüşürler. Sinsiyotrofoblastlar ise, maternal lakünalar içinde insan koryonik gonadotropini (hCG) salgılamaya başlarlar. Korpus luteum tarafından östrojen ve progesteron salgılanması bundan sonra hCG'nin kontrolü altında gerçekleşir (45). hCG ve üretilen LH sadece gebeliği teyit eden bir hormon olmayıp, bir sitokin veya büyüme hormonu gibi de etki göstermektedir. hCG intervillöz aralıkta triptofan katabolizmasını uyararak immünosupresyon yaratmaktadır. Zigotun uterin kaviteye ulaşımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca salgılanan hCG implantasyonda önemli rol üstlenmekte olup, intervillöz aralığa olan kan akımını artırmaktadır (8).

İmplantasyon penceresinde blastosistin tutunma ve invazyonu ile ilgili olarak gözlenen bu farklılıklar implantasyon gerçekleşmediği takdirde kısa süre sonunda ortadan kalkar (46).

Blastosistin stromaya olan invazyonu birçok faktör tarafından sınırlandırılır. Desidua da maksimum seviyede eksprese edilen transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ekspresyonunda artış sağladığı TIMP-1 aracılığıyla metalloproteinazlarca gerçekleştirilen invazyonu inhibe eder (47). Sitotrofoblast hücreleri tarafından eksprese edilen insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2) blastosistin stromaya olan invazyonunu stimüle eder. Desidual hücreler tarafından eksprese edilen IGFBP-1 ise, yüksek affinite gösterdiği IGF peptidleri ile gerçekleştirdiği etkileşimler sonucu IGF'nin etkisini inhibe eder ve invazyonu durdurur (48). Sitotrofoblast hücrelerinin yüzeyinde eksprese olan  $\alpha 5\beta 1$  integrini için RGD tanıma dizisi içeren IGFBP-1,  $\alpha 5\beta 1$  integrini ile gerçekleştirdiği etkileşim sonucunda sitotrofoblastların invaziv etkisini ortadan kaldırır (41). Menstrual siklusun sekretuar fazında, IL-6 sitokin

ailesinin üyelerinden biri olan IL-11, tüm endometrial hücrelerde ve daha yüksek düzeylerde desidual hücrelerde eksprese edilmektedir. Etkilerini IL-11 reseptör  $\alpha$  zinciri (IL-11R $\alpha$ ) ve sinyalizasyon bileşeni transmembranik glikoprotein olan gp130'dan oluşan heterodimerik yapıdaki reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir (49). Desidual reaksiyonun ilerlemesi, desidual hücre sınırlarının kaybı ile karakterizedir. Yapılan bir deneyde ortama IL-11'in eklenmesinin ardından desidual hücrelerin sınırlarının kaybolduğunun gözlenmesi, IL-11'in desidualizasyon sürecinin ilerlemesinde rol aldığını göstermiştir. IL-11 reseptörünü kodlayan gende meydana gelen bir mutasyon sonucu desidual dokunun gelişiminde aksama gözlenmiştir. Trofoblastın stromaya olan invazyonunu kontrol eden desidual dokuda gerçekleşen defekt infertiliteye neden olmaktadır (50).

#### **2.4. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon (KOH)**

Doğal siklusta YÜT uygulaması dışındaki YÜT sikluslarında, follikül ve oosit gelişimi kadına uygulanan bir dizi ilacın yardımı ile düzenlenmektedir. Yardımla üreme siklusları için tasarlanmış olan bu ilaç uygulamalarının hepsi Kontrollü overyan hiperstimulasyon protokolleri olarak adlandırılmaktadır. Burada amaçlanan, spontan oosit gelişimi ile spontan ovulasyonun baskılanması ve dışarıdan verilen ilaçlar ile mümkün olduğunca çok sayıda ve iyi kalitede oositin elde edilmesidir. İÜİ sikluslarında yapılan KOH'un amacı monofoliküler gelişimi sağlamaktır. Bunun aksine İVF sikluslarında yapılan KOH'un amacı ise multifoliküler gelişim sağlamaktır.

YÜT siklusunun başarısı, elde edilen oosit sayısı ve kalitesi ile direkt ilişkilidir ve gerekli olan KOH protokolü, her hasta için kendi özellikleri doğrultusunda planlanmalıdır. Bireysel olarak seçilen uygun bir KOH protokolü tedavide başarı şansını arttırdığı gibi, iptale giden siklus sayısı da azalmaktadır. Hastanın over kapasitesi, yaşı, antral follikül sayısı, daha önce geçirilmiş over cerrahisi öyküsü, çiftin önceki sikluslarından elde edilen cevap deneyimi, endometriozis ve/veya PKOS varlığı uygun protokolün kişiselleştirilebilmesi için önemli değişkenlerdir.

Overyan stimulasyon ile follikül gelişiminin çeşitli ajanlar yardımı ile uyarılması ve ovulasyonun sağlanması, günümüzde sadece amenore ve anovulasyon durumlarında değil, tubal, erkek ya da nedeni bilinmeyen infertilite olguları gibi ovulasyonu olan kadınlarda da follikül gelişiminin yönlendirilmesi, ovulasyonun zamanlanması ya da gamet hücrelerinin buluşma olasılığının artırılabilmesi ve bir yerine birkaç follikül gelişiminin sağlanması için de kullanılmaktadır (51). Ovulasyon indüksiyon ajanları (OİA) tek başlarına ya da, kombine olarak değişik protokoller ile kullanılabilirler. OİA ve tedavi protokolü seçimi hastanın birincil patolojisi, tedavi tutarı, tedavi süresi göz önüne alınarak belirlenir (52). Bu amaca uygun farklı ajanlar bulunmaktadır. Aromataz inhibitörleri, gonadotropinler ve büyüme hormonu OİA'dan bazılarıdır.

#### **2.4.1. Aromataz İnhibitörleri ile Overyan Stimulasyon**

Aromataz; androstenodion ve testosteronun sırasıyla östrona (E1) ve östradiole (E2) dönüştürerek östrojen üretimindeki hız kısıtlayıcı basamağı katalize eden, sit P450 hemoprotein içeren mikrozomal bir enzimdir (53). Östrojen üretimindeki son basamak olmasından dolayı selektif inhibisyon için iyi bir hedeftir.

Aromataz inhibitör (AI)'leri, aromataz enzimini bloke ederek östrojen sentezini baskılar. Antiöstrojenler sınıfına giren bu maddeler ilk olarak meme kanserinin iyileştirilmesinde kullanılmışlardır. Günümüzde letrozolün geçerli tek kullanım alanı postmenapozal östrojen reseptörü pozitif meme kanseri tedavisidir. Buna rağmen tüm dünyada etkin şekilde ovulasyon indüksiyonu için endikasyon dışı olarak reçete edilmektedir. Bu ilaçlardan 3.kuşak aromataz inhibitörü grubunda Anastrozol (Arimidex; Astra Zeneca, Switzerland) ve Letrozol (Femara; Novartis, Switzerland) mevcuttur (54). En sık kullanılan letrozol (L)'dür (55) ve potent, selektif, reverzibl, kompetitif aromataz inhibitörüdür (53).

AI'ler östrojen düzeyini azaltarak, negatif feed back yolu ile hipotalamusu uyarırlar ve hipofizden daha fazla gonadotropin salgılanmasına neden olurlar,

sonuç olarak folikül gelişimi uyarılır. Kısa yarı ömürlü olmalarından dolayı aromataz enzimi inhibisyonundaki geri dönüşebilirlik östrojen reseptörlerinde down regülasyon yaratmaz ve geç foliküler fazda östrojen üretiminin daha fizyolojik konsantrasyonda olmasını sağlar. Östrojendeki bu normal artış periferik östrojene duyarlı genital dokularla beraber, foliküllerin de sağlıklı bir şekilde gelişimine izin verir ve klomifen sitrat (KS) tedavisinde görülen endometriyum ve servikal mukus üzerinde istenmeyen antiöstrojenik etkileri engeller.

Yarılanma ömrü oldukça kısadır, yaklaşık olarak 45 saattir (56). Oral olarak alınması kullanım kolaylığı sağlar ve oral kullanımdan sonra tamamen absorbe olur (57). Rölatif olarak ucuzdur. 1-5 mg/gün kullanımında östrojen düzeylerini %97-99'dan daha fazla azaltarak birçok sensitif yöntemle ölçülemeyecek düzeye düşürür(54). Sistemik dolaşımdan esas olarak karaciğer yoluyla temizlenir, vücuttan hızla atılır (57). İlaç ve metabolitleri vücutta birikmez. Belirgin aktif bir metaboliti yoktur. Minör yan etkilere sahiptir (58). Bulantı gibi ılımlı gastrointestinal bozukluklar yan etkilerinin çoğunluğunu oluşturur. Ancak bunlar nadiren tedaviyi etkiler. Diğer yan etkiler asteni, sıcak basması, baş ağrısı ve bel ağrısıdır (54). Yalnız başına ya da diğer ilaçlarla beraber adjuvan olarak kullanılabilirler. Aİ'lerin yalnız kullanılmasındaki büyük bir avantaj ve KS'ye üstünlüğü sağlam bir östrojen negatif feedback etkisinin sonucu olarak PKOS gibi anovulatuvar infertilitede (multipl folliküler gelişimden kaçınmak önemli olduğu için) monofoliküler ovulasyon elde edilebilmesidir (59). Bu yüzden çok sıkı folikül takibi gerektirmeyebilir. % 5-10 ikiz gebelik olasılığı vardır. Üçüz ve üzeri gebelik gelişmesi olasılığı enderdir (60).

Aİ'ler gelişen preovulatuvar folikül sayısını arttırmak ve tedavinin sonuçlarını iyileştirmek amacıyla FSH enjeksiyonları ile beraber kullanılabilir. Ayrıca FSH'ya overyan cevabı arttırdığı için FSH enjeksiyonları ile beraber kullanımında gerekli FSH miktarında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu gibi (61), FSH'ya zayıf cevabı olanlarda stimülasyona anlamlı derecede daha iyi cevap alınmasını sağlamaktadır (62). FSH enjeksiyonlarının maliyeti infertilite tedavisinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Optimum overyan stimülasyon için gerekli FSH dozu, Aİ ile beraber kullanımında azaldığından

dolayı infertilite tedavisinin maliyeti de azalmaktadır (59). Böylece YÜT daha geniş bir grup infertil çift için ulaşılabilir olmaktadır.

Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında ovulasyon indüksiyonu için kullanılan AI, L'dir. Kullanım şekli genellikle siklusun 3-7.günlerinde 2,5 mg/gün şeklindedir. 2,5 mg'lık doz meme kanserinin hormonal tedavisinde L' nin günlük dozundan, 5 günlük tedavi ise KS tedavisinden uyarlanmıştır. 3-7.günlerde kullanılması L'nin vücuttan atılması ve ovulasyon zamanında kalan miktarın ihmal edilebilir düzeyde olmasını sağlar.

AI'lerin ovulasyon uyarılması amaçlı kullanımı konusunda tartışmalı noktalardan birisi potansiyel teratojenik etkileridir. Üretici firma letrozolün premenopozal kadınlarda kontrendike olduğunu belirtmektedir. İnsanlarda kullanılan dozların çok altındaki dozlarla sıçanlarda ve tavşanlarda embriyotoksik etkiler gözlemlendiği bildirilmiştir. Deney hayvan verilerinin insanlardaki geçerliliği tartışılabilir. Letrozol'ün kısa yarı ömrü ve erken folliküler evrede sınırlı süreyle kullanılıyor olması olası bir gebelikte embriyogenezisin kritik döneminden önce bu ilaçların hızla ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlar (56).

Dolaşımda ve periferik hedef dokulardaki östrojen konsantrasyonunun supresyonuna yol açan aromataz inhibisyonu, endometriyumda östrojen sekresyonunun düzelmesiyle hızlı bir endometrial büyümeye yol açan östrojen reseptörü up regülasyonuna neden olur. Ayrıca östrojen kendi reseptörlerinin sayısını, ubikuitinasyonunu stimüle ederek azaltır.Böylece reseptörlerde hızlı bir azalma meydana gelir. Östrojenin olmadığı durumlarda ubikuitinasyon azalarak östrojen reseptörleri artar ve ardından yapılacak östrojen uygulamasına sensitivite artar (63). Her iki mekanizma da endometriyumun östrojene sensitivitesini arttırabilir. Buna bağlı olarak östrojene endometrial sensitivite artabilir ve endometrial epitelyum ve stromada hızlı bir çoğalma ve uterus ve endometriyumun kan akımında bir artış meydana gelir (58). Sonuç olarak normal endometrial büyüme ve kalınlık foliküler matürasyonla eş zamanlı olur.



#### 2.4.2. Gonadotropinler ile Overyan Stimulasyon

1927 yılında, Ascheim ve Zondek gebe kadın idrarında ön hipofizden salınan gonadotropinler ile aynı fonksiyonu gösteren bir madde bulmuşlardır. 1949 yılında menopozal kadınların idrarından ilk insan menopozal gonadotropin (hMG) elde edilmesine rağmen Gemzell ve arkadaşları 1958 yılında ilk kez ovulasyon indüksiyonunda insan gonadotropini kullanıp 1960 yılında ilk gebeliği bildirmişlerdir (64). 1978'de ilk İVF gebelik bildirilmiştir. Daha sonra gonadotrop hormonlar postmenopozal kadın idrarından saflaştırılarak (65) veya rekombinant teknoloji ile elde edilen ovulasyon indüksiyon ajanları olmuştur.

Gonadotropinlerin fizyolojik işlevleri düzenli, monofoliküler ovulasyonu sağlamak ve erken gebeliğe hormonal destek vermektir. Bu amaçla gonadotropinler; klomifen sitrat ve letrozol gibi oral ajanlarla gebe kalamayan anovulatuvar ya da düzenli ovulasyon olmayan kadınlarda ovulasyon indüksiyonu amacıyla (monofoliküler gelişim) ya da gebelik şansını arttırmak için ovulatuvar hastalarda süperovulasyon (multifoliküler gelişim) sağlamak için kullanılmaktadır (66).

Yardımla üreme tekniklerinde (YÜT) kullanılması ile birlikte başarılı kontrollü overyan hiperstümülasyon (KOH) protokolleri oluşturulmuştur. Spontan sikluslarda %10-30 siklus iptali, %60-80 fertilizasyon oranı, transfer başına %20-30 implantasyon oranı ve uygun indüksiyonlar ile %35'lere varan devam eden gebelik oranları bildirilmiştir (65).

Gonadotropin preparatları, elde edilme yöntemleri, FSH ve LH sentezi, preparattaki her hormonun oranı ve uygulama yöntemlerine göre farklılıklar göstermektedir (56). Buna göre 4 farklı gonadotropin preparatı üretilmektedir;

- I. İnsan menopozal gonadotropini (Menotropinler, hMG)
- II. Üriner saf (purifiye) FSH (Ürofollitropin, u-p-FSH)
- III. Yüksek saflıkta (highly purifiye) üriner FSH (u-HP-FSH)
- IV. Rekombinant FSH (r-FSH)

**I. İnsan menopozal gonadotropini (hMG):** 30 yılı aşkın bir süredir infertilite tedavisinde kullanılan eksojen gonadotropindir. Postmenopozal

kadın idrarının, sefaroze içeren ortamdan süzülmesiyle elde edilir. hMG'nin içerisinde çeşitli üriner proteinler (UP) vardır ve oransal olarak bir ampul hMG içerisinde >% 95 UP mevcuttur, bu yüzden hMG'nin özgünlüğü düşüktür ve %4 kadar bir saflığa sahiptir yani protein içeriğinin sadece %3-4'ü gonadotropindir. FSH ve LH hormonlarını 1:1 oranında içerir, bir hMG ampulünde 75Ü FSH, 75Ü LH vardır. İlacın içerisindeki FSH, primer folliküllerin seçilmesi ve gelişmesini, LH ise ovulasyon öncesi folliküllerin gelişmesini ve luteal evrenin sağlıklı olmasını sağlar. hMG ile ovulasyon uyarımı için hastaların işlev gören ovaryum dokularının olması gerekir (56). İntramusküler (İM) olarak uygulanır (65).

**II. Üriner saf (purifiye) FSH (u-p-FSH):** 1980'lerin sonlarında yüksek LH seviyesinin fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi üzerine olumsuz etkilerinin gösterilmesi ayrıca follikülogeneziste esas rolü FSH'nin oynadığının anlaşılmasından sonra saf FSH preparatlarının hMG'ye üstün olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Bu amaçla FSH'yı daha saf olarak içeren u-p-FSH üretilmiştir. Postmenopozal kadın idrarının monoklonal antikorlar kullanılarak yabancı proteinler, LH ve hCG'den ayrıştırılmasıyla elde edilir. UP'ler açısından, hMG'ye göre daha saf olup, %90 oranında UP içerir. Bir ampul u-p-FSH, 75IU FSH aktivitesi, <%1 LH aktivitesi içerir. İM uygulanır (65).

**III. Yüksek saflıkta (highly purifiye) üriner FSH (u-HP-FSH):** Üriner preparatların son aşaması olan yüksek oranda saflaştırılmış preparatlar kullanıma girmiştir. Yaklaşık %96 oranında saflık içeren protein yapısına sahiptir (51). 75IU FSH aktivitesi, LH aktivitesi <0.001 ve üriner protein oranı <%1 FSH aktivitesi 100-150 IU/mg'dan, 10.000 IU/mg'a kadar çıkılmıştır. Yüksek oranda saflaştırılmış ve protein içeriği çok azaltılmış olmasından dolayı cilt altına da uygulanabilir (67).

**IV. Rekombinant FSH (r-FSH):** Ovulasyon uyarılmasında son gelişme, 1988'de başlayan çalışmalar sonucunda rekombinant DNA teknolojisi ile r-FSH'nin üretilmesidir. Bu teknolojiye kaynak olarak insan idrarı kullanılmamaktadır. Çünkü menopozdaki kadınların idrarlarından elde edilen ilaçların saflık derecesinin istenen düzeyde olmamasının yanı sıra, içerdikleri FSH ve LH üniteleri kutudankutuya farklılık gösterir (68).

r-FSH, insan FSH alfa ve beta sub nit geninin,  in hamster over hücresine transferi sayesinde rekombinant teknoloji ile üretilmektedir (69). Bu yöntemle hormon sentezlenerek, glikolize olmus biyoaktif dimerik FSH salgılanımını sağlanır. Ardından imm nkromotografi ile Anti-FSH monoklonal antikorlar kullanılarak saflaştırılır. Follitropin alfa ve beta olarak iki farklı r-FSHpreparatı elde edilmiştir. İlk r-FSH preparatı 1995'te ruhsatlandırılan Follitropin alfa (Gonal-F;Serono, Switzerland)'dır. 1996'da diğer r-FSH preparatı Follitropin beta, (Puregon; Organon, USA) piyasaya sürülmüştür. Farklı olarak pazarlanıyor olsalar da bu preparatlarda 1-alfa ve 1-beta glikoprotein zincir kombinasyonu vardır. Daha çok saflaştırma işlemi ve sonrasındaki modifikasyonlarda farklılıklar gösterirler.

Gonal-F, non kovalent bağlı  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birim olarak düzenlenmiş non-identikal glikoproteinlerden oluşmaktadır. $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri, 92 ve 111 amino asite sahiptir. Çok yüksek oranda sağlığa sahiptir. LH komponenti yoktur. Yüksek spesifik biyoaktiviteye sahiptir.  retiminde idrar toplanması gerekmemektedir.75  nite FSH içeren preparatları vardır (70).

r-FSH, hMG ve u-p-FSH'ya göre çok yüksek spesifik aktiviteye sahip olup, LH aktivitesi ve UP içermez. Rekombinant gonadotropinlerin en önemli yararlanımları deri içine uygulanabilmeleridir. Kas içine uygulanan üriner gonadotropinlerde, enjeksiyon yerinde görülen ağrı ve kızarıklık deri içi uygulamalarda görülmemektedir (68). Öte yandan günümüzde yüksek teknoloji ile elde edildiklerinden dolayı pahalı preparatlardır, r-FSH idrardan elde edilen FSH preparatlarına karşın yaklaşık %50 daha pahalıdır (56).

Gonadotropin hormonlar moleküler ağırlıkları yaklaşık 30 kilo dalton (kDa) olan glikoprotein hormonlardır ve oldukça heterojen bir yapıdadırlar. Fruktoz, mannoz, galaktoz, asetilglukozamin, N-asetiln ramik asit içerirler. Sialik asit içeriği, glikoprotein hormonlar arasında değişmektedir. Farklı sialik asit içeriğine göre, yirmi civarında değişik izoformu vardır. Bu içeriğin derecesi biyoaktivitelerini ve yarı ömürlerini etkiler. Sialik asit miktarı arttıkça FSH reseptörüne afinite azalırken plazma yarı ömrü artar (71). Bu da depo etkisi ile ovulasyon indüksiyonunda görülen multifoliküler gelişime ve OHSS'ye neden olabilir. r-FSH'da sialik asit içeriği azaltılarak yarılanma ömrü kısaltılmış,

reseptör afinitesi artarak östrojen sekresyonunu daha güçlü şekilde uyarmaları sağlanmış (72) ve depo etkisinden kaçınılmıştır (73). Subkütan enjeksiyonu takiben uygulanan dozun 2/3'ü sistemik dolaşıma geçmekte, yüksek vücut kitle indeksi Emilimi azaltmaktadır. Metabolik yıkımın 1/3'ü böbreklerde, büyük bir kısmı ise karaciğerde gerçekleşir.

PKOS hastalarında ovülasyon indüksiyonunda kullanıldığında ürener FSH ile rekombinat FSH arasında ovülasyon oranları, gebelik oranları, düşük oranları ve çoğul gebelik oranları açısından fark yoktur (74). Öte yandan r-FSH'nin ürener FSH'ya klinik gebelik oranı olarak üstünlüğü standart İVF sikluslarında gösterilmiştir (75).

YÜT'te gonadotropinlerin endometriyum üzerine olumsuz etki ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, endometrial hücre büyümesi üzerinde gonadotropin etkisi belirsizdir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada gonadotropinlerin (Gonal-F ve Puregon) insan endometrial hücre proliferasyonuna etkisi in vitro olarak incelenmiştir. İlk 48 saat içerisinde hem Gonal-F hem de Puregon endometrial hücre proliferasyonunu inhibe etmekle birlikte, 72 saat sonrasında Gonal-F'in inhibisyon etkisi devam etmiş, Puregon ise ters etki göstermiştir. Bu durumun  $\alpha$  ve  $\beta$  follitropinler arasındaki farklı moleküler yapı nedeni ile olduğu düşünülmektedir (76).

#### **2.4.3. Büyüme Hormonu ile Overyan Stimulasyon**

Büyüme hormonu (BH), ön hipofiz bezindeki somatotrof hücrelerce sentezlenen, depolanan ve salgılanan 191 aminoasitten oluşan, molekül içi iki disülfid bağı bulunan 22kDa molekül ağırlıklı tek zincirli polipeptit bir hormondur. BH sekresyonu, büyüme hormonu releasing hormon ve somatostatin tarafından kontrol edilir.

BH, karaciğerden insülin-like growth faktör (IGF) salgılanmasını ve hedef organlardaki IGF-1 üretimini uyarır. Bu hedef organlardan biri olan overde, BH'nin etkisi ile artan IGF-1, over fonksiyonlarını etkiler (77). IGF-1 overyan steroidogenezde düzenleyici rol oynar (78), granüloza hücrelerindeki FSH etkisini module eder (79), hem granüloza hem de teka hücrelerinde gonadotropin etkinliğini arttırarak; folliküler gelişimi, östrojen üretimini ve oosit

matürasyonunu uyarır (80). Granüloza hücre kültüründe gonadotropinlere IGF-1 ilavesinin, overde 17- $\beta$  östradiol ve progesteron seviyelerinde artış, LH reseptör oluşumunda artış ve aromataz aktivitesinde artış sağlayarak; gonadotropin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (81). Ayrıca BH hücre proliferasyonunu artırarak ve atreziyi inhibe ederek; gonadotropin-bağımsız erken folikülogenezi ve gonadotropin-bağımlı geç folikülogenezi modüle eder. Böylece canlı gamet üretimini destekler. BH, nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmayı artırarak ve ovulasyonu kolaylaştırarak oosit fertilitasını de artırır (82). İnsan oositlerinin morfolojik olarak normal ve implantasyon yapabilen embriyolar oluşturabilmelerinin, foliküler sıvıda farklı hormon konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Bu hormonlar arasında en tutarlı ilişkiye sahip olan hormon BH'dir (83).

BH, insan hipofizinden ilk kez 1956 yılında izole edilmiştir. Biyokimyasal yapısı ise ancak 1972 yılında aydınlatılabilmektedir (84). İnsan hipofiz bezi ekstresinden elde edilen hormon preparatları, 1985 yılına kadar kullanılırken; hem tedavinin etkinliğinin daha az oluşu, hem de Creutzfeld-Jacob hastalığının gündeme gelmesi sentetik büyüme hormonu elde edilmesi ihtiyacını doğurmuştur (84). BH, günümüzde rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak sentetik olarak üretilmektedir ve insan popülasyonunda kullanılmak üzere lisanslıdır. Rekombinant büyüme hormonu, tedavisi ilk ortaya çıktığında, tedavi oral yoldan verilmekteydi; fakat etkinliğin az oluşu nedeniyle, zamanla subkutan enjeksiyon tedavisine geçilmiştir (84). BH yetersizliğinde kullanılan BH tedavisinde gözlenen potansiyel yan etkiler artmış sıvı retansiyonunun neden olduğu, ödem, baş ağrısı, eklem şişliği, eklem ağrısı, karpal tünel sendromu, uyku kaybı, serebrovasküler olay ve bozulmuş glikoz metabolizmasıdır (85). Ancak YÜT amaçlı BH tedavisinin kısa süreli olması bu yan etkilerin oldukça nadir görülmesini sağlamaktadır. İ VF amaçlı kullanılan BH, hafif ödem dışında herhangi bir yan etki ile ilişkilendirilmemiştir. Plazma yarı ömrü 20 ila 30 dk. arasında bildirmiştir. BH tedavisinin potansiyel bir dezavantajı maliyettir. Adjuvan BH, YÜT tedavi maliyetini yaklaşık olarak ikiye katlamaktadır.

Normal fertilite için normal bir BH aksı şart değildir ancak BH optimal kadın fertilitesi için gerekli bir faktördür (86). Bu, BH eksikliği olan kadınlarda fertilitenin azalması ve BH eksikliği olan infertil kadınlarda BH replasmanı ile başarılı doğal gebeliklerin sağlanabilmesi (87) ile kanıtlanmıştır. Öte yandan, BH dirençli ve BH eksikliği olan kadınların bir kısmının doğal yolla gebe kaldıkları bilinmektedir (88). Aslında BH eksikliği olan çoğu kadının gebe kalmak için YÜT'e gereksinim duyması asıl olarak ovülasyon indüksiyonu içindir.

20 yıl önce, Owen ve ark., BH'nin zayıf over yanıtı (ZOY) PKOS'lu kadınlarda hipofiz süpresyonu sonrası KOH rejimlerine over cevabında etkili olduğunu göstermişlerdir ve tedaviye eklenen BH, gonadotropin gereksiniminde önemli bir düşüş sağlamıştır (89). Bu sonuç Homburg ve ark.'nın gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonunda BH'nin overleri daha duyarlı hale getirdiğini gösteren çalışmalarına dayanmaktadır. Çok sayıda yeni çalışmaya rağmen, ZOY'li kadınların İVF tedavi rejimlerine BH eklenmesi halen tartışmalıdır (90). KOH sikluslarında BH kullanımının yeri ile ilgili literatürde randomize kontrollü çalışmalar (RKÇ) küçük örneklem sayısı içerirler. Kolibianakis ve ark. çok sayıda küçük ölçekli çalışmadan elde edilen sonuçları yeniden analiz etmiş ve BH'nin artmış klinik gebelik oranı sağlayarak YÜT başarısını artırdığı sonucuna varmıştır (91).

İVF protokollerinde adjuvan olarak BH'nin rutin kullanımını destekleyen veri azdır. İVF için ovülasyon indüksiyonu tedavisi alan 38 yaş ve altı normo-ovülatuar kadınlarda yapılan RKÇ'ye göre, hipofizer-overyan aksın baskılanması için midluteal fazda gonadotropin releasing hormon agonisti (GnRHa) başlanıp, ovulasyon indüksiyonu için, hMG kullanılan ve hMG tedavisinin 1., 3., 5. ve 7. günlerinde BH (12 IU / gün) veya plasebo eklenen iki grup karşılaştırılmış ve stimülasyon parametreleri benzer bulunmuştur. Her embriyo transferi ve implantasyon oranı başına, klinik gebelik oranı açısından iki grup arasında fark saptanmamıştır (92). Yakın zamanlı bir meta-analize göre BH'nin rutin kullanımı İVF sonuçlarını iyileştirmede etkin gözükmemektedir. Buna karşın ZOY'li hastalarda BH kullanımı canlı doğum

oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamıştır (93). Zayıf yanıtli hastaları tanımlamak zor olduğu için Bologna Kriterleri oluşturulmuştur.

- İleri anne yaşı (>40yıl) veya ZOY için diğer risk faktörü
- KOH protokolüne üç oositten daha az sayıda cevap veren önceki bir sonuç
- Anormal bir over rezerv testi

Buna göre; bu üç kriterin en az ikisi karşılanmalıdır (94).

Tesarik ve ark. yaptıkları RKÇ'de BH ve plasebo verilen İVF uygulanan 40 yaş ve üzeri ZOY'li kadınlarda BH tedavi grubunda plasebo grubuna kıyasla benzer sayıda oosit, embriyo ve gebelik elde edilmiş öte yandan BH ile tedavi edilen hastaların gebelik kaybı daha az olmuş, doğum ve canlı doğum oranları artmıştır (95).

Küçük ve ark., tekrarlayan YÜT yapılan zayıf yanıtli kadınlarda GnRHa uzun protokol ile birlikte BH kullanımının daha fazla oosit üreterek daha yüksek fertilizasyon oranına ulaştıklarını belirlemişlerdir fakat KOH maliyetini yaklaşık iki kat arttırdığını ortaya çıkmıştır (96).

Hazout ve ark. BH tedavisinin 2.gün embriyo sayısı ve gebelik oranlarını arttırdığını bildirmişlerdir (97). Prospektif başka bir çalışmaya göre de zayıf over yanıtli hastaların sikluslarına düşük doz BH eklenmesiyle güvenli bir şekilde daha yüksek klinik gebelik oranları elde edilmektedir (98).

Ardışık bir çok çalışma ile değerlendirilen zayıf yanıtli hastalarda adjuvan BH kullanımının dondurulmuş çözölmüş embriyo başına ve taze transfer başına klinik gebelik oranlarını önemli ölçüde geliştirdiği sonucuna varılmıştır. Etki, tüm yaş gruplarında olmak üzere özellikle genç yaştaki hastalarda anlamlı bulunmuştur (99).

Kyrou ve ark.'ının zayıf yanıt verenlerde en iyi tedavi biçimini değerlendirmek için yaptığı güncel bir meta-analiz; ZOY'li hastalar için önerilen protokol alternatifleri içinde sadece adjuvan BH tedavisi İVF başarı oranını belirgin şekilde arttırmıştır (100). BH ile iyileştirilen sonuçların genel olarak artmış oosit kalitesini yansıtan sonuçlar olduğugösterilmiştir (96).

Duffy ve ark.'nın toplam 10 çalışmadan 440 infertil çift olarak oluşturdukları analizde zayıf KOH cevaplı hastaların tedavisine BH eklenmesinin KOH

cevabını veya oosit sayısını arttırmasa da, gebelik ve canlı doğum oranlarını arttırdığını göstermişlerdir (101).

Günümüzde İVF uygulanan hastalarda adjuvan BH kullanımının daha yüksek doğum oranları ile sonuçlandığına dair yeteri kadar kanıt olmasına rağmen eldeki sonuçların toplamda çok az hastayı içermesinden ve çalışmaların gücünün yetersizliğinden YÜT'te BH kullanımı tartışma konusudur. BH'nin İVF tedavisi üzerindeki etkisini daha açıkça tespit edebilen daha büyük çapta RKÇ'ye ihtiyaç vardır.

Uterus, hem BH üretildiği hem de BH etki ettiği bir alandır. Hem BH hem de BH reseptörleri (BHR) gebe ve gebe olmayan uterusda eksprese edilir. BHR'ler, gebelikte ve menstrüel dönemde, farklı şekilde düzenlenir (102). Örneğin, BHR'ler orta ve geç luteal fazlarda insan endometriyumu ve desidua glandüler hücrelerinde (fakat stromal hücreler değil) eksprese edilir, ancak proliferatif veya erken luteal fazlar sırasında görülmez (103). Uterusta IGF-1, gebelik boyunca bol miktarda bulunurken, BH etkileri ile olan ilgisi tartışmalıdır.

BH, uterus büyümesini düzenler ve destekler. BH eksikliği olan kadınlar, BH replase edilen kadınlara göre (vücut yüzey alanına göre düzeltildiğinde), daha küçük uterusu sahiptirler (104). Aslında normal bir BH aksı, östrojenle indüklenen uterus hipertrofisi için gerekli olabilir, çünkü uterusda BHR mRNA fazlalığı, östrojenle indüklenen uterus büyümesi ile güçlü korelasyona sahiptir (105). BH, farelerde uterus büyümesini uyarak implantasyonu kolaylaştırmıştır (106). Bununla birlikte, BH eksikliği olan kadınlara BH uygulaması endometrial kalınlığı arttırmamıştır (107).

Başarılı embriyonik implantasyon için embriyonik ve maternal değişiklikler gereklidir, ve embriyoda BH varlığı, in vivo implantasyonun daha yüksek seviyelerini göstermektedir (108). Erken blastosist, glikoproteinler ve karbonhidratlardan oluşan koruyucu bir matriks olan zona pellucida ile çevrilidir. Maternal endometriyuma implante olmadan önce blastosistin bu matriksten çıkması gerekir (109). BH, sığır (110) ve fare (111) blastosistlerinde bu matriksten soyulma oranını arttırmıştır. Matriks metalloproteinazların (MMP) üretiminin potansiyel olarak artmasına neden olabilir, çünkü bu proteinler implantasyonda rol oynar ve BH'ye yanıt olarak üretilirler (112). BH



aynı zamanda trofoblast hücre proliferasyonunu selektif olarak stimüle ederek implantasyonu kolaylaştırabilir, çünkü bu hücreler blastokist kavitesi oluşumu ve maternal endometriyumun invazyonuna katılır (113). Dahası, plasental BH (ve daha az oranda hipofiz BH) bu trofoblastların invaziv aktivitesini uyarır ve BHR ekspresyonu, invazivlik derecesi ile koreledir (114).

## 2.5. Semaforinler

Teknoloji ve bilimdeki ilerlemelere paralel olarak insan ve hayvan vücudundaki bilinen proteinlerin sayısı ve işlevlerine yönelik bilgi her geçen gün artmaktadır. Yeni belirlenen proteinlerin, vücudun işleyişine dair mekanizmaların daha iyi anlaşılması, şu ana kadar çözölememiş metabolik yolların açıklığı kavuşturulması, hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanımı gibi durumlar konunun cazipliğini artırmaktadır. Yaklaşık son 20 yıldır belli bir protein sınıfına ait olmamakla birlikte, peptid yapısında, farklı amaçlarla kullanılan bazı endojen maddeler keşfedilmiştir. Semaforinler ve reseptörleri olan pleksinler ve nöropilinler bunlardan bazılarıdır.

Semaforinler ilk olarak 1992 yılında çekirgelerin ekstremitelerinde tomurcuğunda akson rehberlik molekülü olarak keşfedilmiştir. Semaforin ailesi, hücre membranına bağlı bulunan ya da hücreden salgılanılan zar proteinlerinin bir sınıfıdır. Bu hücreler arası sinyal proteini ailesi, başlangıçta aksonal büyüme rehberlik molekülleri olarak tanımlanmış olup (115), reseptör kompleksleri aracılığıyla kısa menzilli inhibisyon sinyalleri göndererek aksonlara, onları uygun bölgelerden saptırma ipuçları verdikleri bulunmuştur (116). Bu yüzden isimleri, işaret taşıyan anlamına gelen Yunanca kökenli İngilizce semafor kelimesinden köken almaktadır. Ancak o zamandan beri, semaforinin birçok süreçte rolü olduğu keşfedilmiştir.

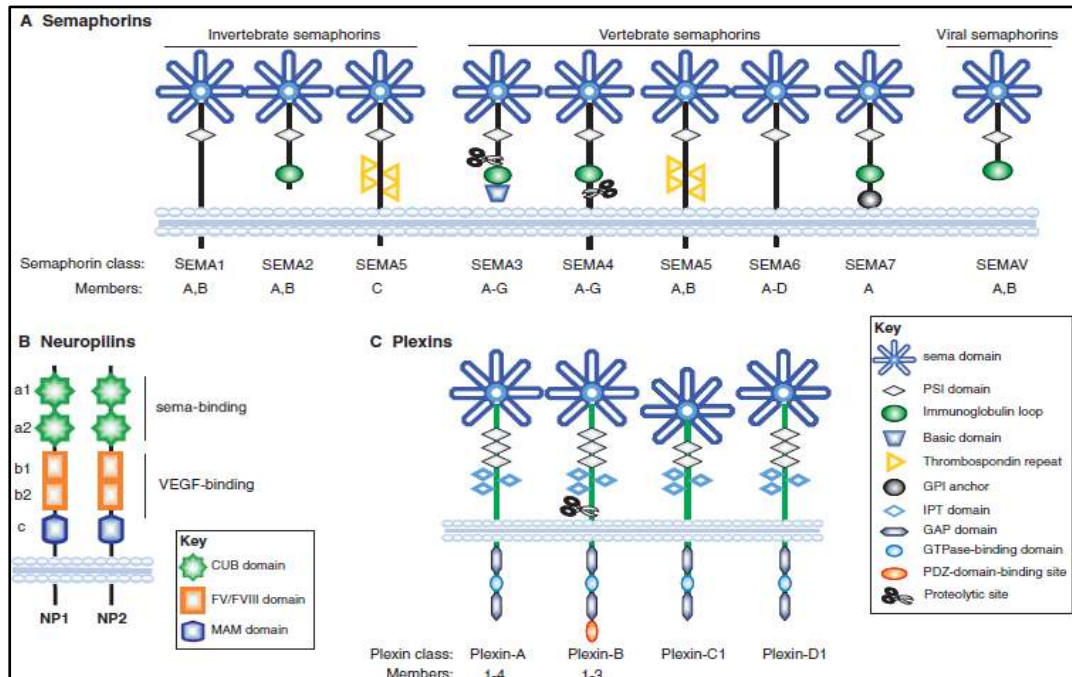
Semaforin aile üyelerinin hücresel etkileri hakkındaki bilgiler son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiş ve semaforin işlevinin gerçekleşmesini sağlayan reseptörler ve hücre içi sinyal mekanizmaları hızlı bir şekilde ortaya çıkmaya başlamıştır. Semaforinlerin çok yönlü olduğu, gelişme sırasında sadece aksonları yönlendirmekle kalmayıp, aynı zamanda immün yanıt, kemik gelişimi

(117), anjiyogenez ve tümörögenezde görev aldıkları keşfedilmiştir. Ayrıca hücre adezyonu ve hücre motilitesi için önemli anahtar düzenleyiciler oldukları bilinmektedir (118).

Semaforinler(SEMA) en az 20 üyeden oluşmaktadır ayrıca yapı ve filogenetik ağaç analizlerine dayalı olarak sekiz ana sınıfa ayrılırlar (119). İlk yedi sınıf 1'den sınıf 7'ye kadar sayı ile sıralanır. Sekizinci sınıf V harfi ile adlandırılır. Sınıf 1 ve 2 yalnızca omurgasızlarda bulunurken; 3., 4., 6.ve 7. sınıflar sadece omurgalılarda bulunur. Sınıf 5 hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda bulunur. V sınıfı viral semaforinlerdir ve virüslere özgüdür (120). Semaforinin her sınıfında, benzer özellikleri paylaşan farklı moleküllerden oluşan birçok alt grup bulunur. Örneğin, Sınıf 3 Semaforinler SEMA3A' dan SEMA3G' ye kadar uzanır. İnsanlarda semaforinler şunlardır:

- SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3E, SEMA3F, SEMA3G
- SEMA4A, SEMA4B, SEMA4C ("SEMAF"), SEMA4D, SEMA4F, SEMA4G
- SEMA5A, SEMA5B
- SEMA6A, SEMA6B, SEMA6C, SEMA6D
- SEMA7A

Semaforin reseptörleri pleksinler ve nöropilinlerdir (Şekil 9).



**Şekil 9:** Semaforinler ve reseptörleri nöropilinler ve pleksinler (121)

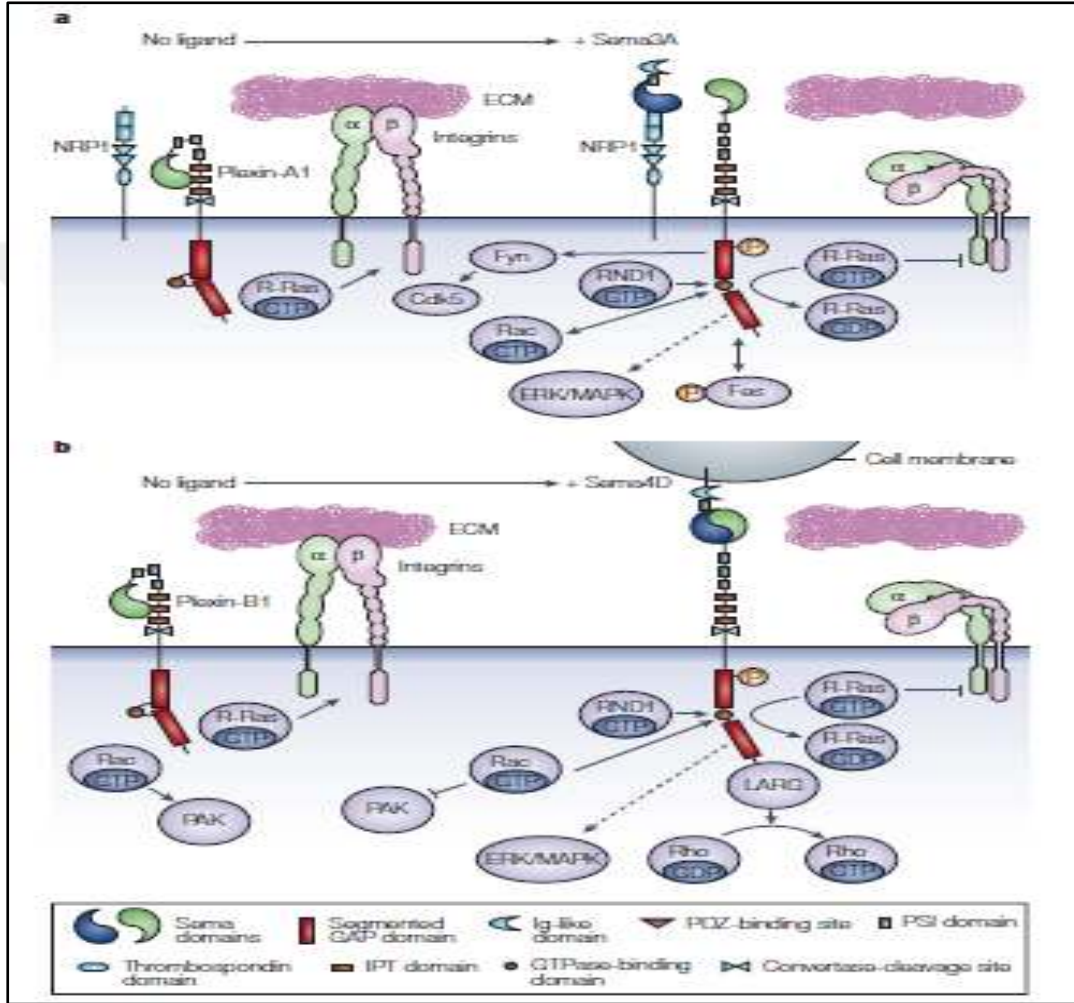
**PLEKSİNLER** semaforin reseptörlerinin ana protein sınıfıdır. Hücre içi semaforin sinyalizasyonlarından sorumludur ve çoğu durumda ko-reseptör olarak nöropilinlerle birlikte bulunur. Nöronlar, endotel hücreleri ve kanser hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. Plexinlerin, ilk olarak ekstrasellüler matrikse (ESM) hücre adezyonunu doğrudan etkilediği bulunmuştur (122), ayrıca anjiyogenezis (123), epitelyal morfogenezis (124), epitelyal hücrelerde invaziv büyüme (125) ve metastaz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (126).

Pleksinlerin alt tipleri vardır: genel homoloji temelinde dört kategori (A-D) olup, bireysel proteinler bir sayı koduna göre adlandırılır - örneğin, Plexin-A1 veya Plexin-B1'dir. Dört A-tipi, üç B-tipi, bir C-tipi ve bir adet D-tipi vardır (Şekil 9).

Birçok rapor, semaforinlerin; hücreleri ekstrasellüler matrikse (ESM) bağlayan heterodimerik hücre yüzeyi reseptörleri olan integrinlerin fonksiyonunu düzenlediğini göstermiştir (127) (Şekil 10). Integrinler, hücre büyümesi ve survisi, apoptoz ve motilite gibi olayları kontrol eden hücre içi sinyal yollarının tetiklenmesinde merkezi bir noktadır (128). Semaforin bağımlı sinyalizasyonun integrinleri düzenlediği moleküler mekanizmalar kısmen anlaşılmıştır. Bazı semaforinlerin integrinleri reseptörleri olarak kullandığı düşünülse de, semaforinlerin veya reseptörlerinin integrinlerle doğrudan etkileşim kurabileceğini gösteren kanıtlar halen eksiktir. Ancak semaforinlerin integrinleri pleksinler üzerinden düzenledikleri bilinmektedir.

Plexinlerin sitoplazmik alanı intrinsik GAP aktivitesine sahiptir ve bu aktivite, integrin aktivasyonunu sürdürebilen R-Ras üzerinde etkilidir (129). Ras ilişkili GTPazlar aktin sitoskeleton dinamikleri kontrolünde rol alır. R-Ras aktivasyonu fokal adezyon oluşumunu ve hücre adezyonunu artırır ve ayrıca hücre yayılımı, migrasyon ve invazyonu düzenleyebilir (130). Semaforin pleksinlere bağlanmasını takiben, pleksinlerin GAP aktivitesi R-Ras inaktivasyonuna sebep olur böylece R-Ras'ın integrinden ayrılmasına ve dolayısıyla integrin aracılığındaki adezyonun inhibe olmasını sağlar (129) (Şekil 10). Semaforinler ile plexin aktivasyonunu takiben, integrin kaynaklı fokal adezyonlar birkaç dakika içinde çözülür ve akabinde aktin depolimerizasyonu ve hücre iskelet

sisteminin remodelingi izlenir (122). Hücre hareketinde önemli olan integrin inaktivasyonunun semaforin ile indüklenen hücre çöküşünde erken bir olay olduğu gösterilmiştir (131). Bununla birlikte, semaforin bağlanmamış yani aktif pleksin, Ras aktivasyonunu artırır. Ras aktivasyonu ESM'ye integrin bağlanmasını ve hücre adezyonunu (132) artırır (Şekil 10).



**Şekil 10:** SEMA-Pleksin etkileşimi ve hücre içi sinyal yolları (133)

**NÖROPİLİNLER** semaforinlerin bir başka resptörleridir.1987 yılında Shin Takagi, Hajime Fujisawa ve çalışma arkadaşları *Xenopus laevis*' in (bir kurbağa çeşidi) optik taktumundan yeni bir membran proteini izole etmişler ve bu yeni proteini "Nöropilin (NRP)" olarak isimlendirmişlerdir (134). On yıl sonra NRP'nin, nöronal ve vasküler sistemlerin gelişmesi yönünde rolü olduğu kanıtlanmıştır (135). NRP'ler, yaklaşık üç farklı yapısal bölge içeren

ekstraselüler bir alan ve kısa bir sitoplazmik alana sahip yaklaşık 140 kDa'lık transmembran glikoproteinlerdir.

1997 yılında iki ayrı çalışma grubu, nöropilinleri normal nöronal gelişme için hayati öneme sahip olan semaforinlerin reseptörü olarak izole etmişlerdir (136). 1998'de NRP'nin, güçlü bir anjiyojenik faktör olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin yeni bir reseptörü olduğu açıklanmıştır (137).

NRP'ler 2 tiptir: NRP1, NRP2'ye % 47 homologdur ve NRP-2'den daha yüksek VEGF afinitesine sahiptir (138). VEGF hem NRP1 hem de NRP2'ye bağlanır. VEGF ailesinin diğer üyeleri aynı zamanda NRP'ler için ligandlardır; örneğin plasental büyüme faktörü (139). Bu reseptörler hem endotel hem de endotel olmayan hücrelerde VEGF reseptörleri gibi davranır (138). NRP'ler VEGF fonksiyonunun önemli modülatörleri olarak ilişkilendirilir.

Doğumdan sonra nöronal dokularda NRP ekspresyonu azalmaktadır. Fakat çoğu yetişkin dokusunda, özellikle de placentada ve kalpte NRP ekspresyonu devam etmektedir (140). Nöropilin nöronal rehberlik, kardiyovasküler gelişme, anjiyogenez ve tümör progresyonunda önemli roller oynamaktadır (141). NRP1'in aşırı ekspresyonu aşırı kapiller damar oluşumu ve yoğun kanama ile sonuçlanır (142). NRP1 veya NRP2'nin üretilmemesi embriyonik olarak nöronal ve kardiyovasküler defektlerden dolayı letaldir. Bununla birlikte, her ikisinin olmayışı anormal vasküler fenotip nedeniyle çok erken dönemde ölümle sonuçlanır (143).

Sınıf 3 semaforinler, çok yönlü semaforin sınıflarından biridir ve en iyi tanımlanmış olan sınıftır. Sınıf 3 semaforinler, nöropilin, plexin ve hücre adezyon molekülleri aracılığıyla sinyal verir. Bu komplekslerin oluşumu farklı Sınıf 3 Semaforinlerden gelen sinyalleri bağlama ve dönüştürme için spesifiktir (144). SEMA3A, bu ailenin vertebralılardaki prototip üyesidir ve ilk olarak 1993 yılında kanatlı beyin ekstraktlarından saflaştırılmıştır. En fazla çalışılan alt gruptur. SEMA3A ve SEMA3F gelişmekte olan sinir sisteminde spesifik merkezi sinir sistemi (MSS) yolları ve periferik sinirlerin rehberliğinde önemli roller oynamaktadır. Motor nöronların sınıflandırılmasına, afferent ve efferent aksonlar için yol bulma modülasyonuna dahil olmaktadır (145). Örneğin SEMA3A, aksların arka kök gangliyonları, fasial sinirler, vagal sinirler, koku

alma-duyu, kortikal sinirler, hipokampal sinirler ve beyincik sinirlerinden çekilmesini sağlar. Sempatik nöronların SEMA3A proteinine maruz kalması nöronal apoptozun indüksiyonu ile sonuçlanmıştır, NRP1'e karşı oluşturulan antikolar, hücre ölümünü zayıflatmıştır (121). Sınıf 3 semaforinler spinal kord yaralanması gibi travmatik MSS yaralanmalarından sonra önemli bir işleve sahiptir. Yaralı dokudaki varlığı ile travmadan hasar görmüş nöronal ve non-nöronal hücreleri düzenlerler. Sınıf 3 semaforinler, aksonal yeniden büyümeyi, revaskülarizasyonu, remiyelinasyonu ve MSS travmasından sonra immün cevabı modüle ederler (146). Ayrıca sınıf 3 SEMA'lar (SEMA3), hücre survisi, proliferasyonu, apoptozu ve göçü gibi hücresel süreçlerin kilit düzenleyicileri olarak görev yapmaktadırlar (147).

### **2.5.1. Reprodüktif Sistemde Semaforinler**

SEMA'ların ve reseptörlerinin reprodüktif sistemde fizyolojik önemi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte; anjiyogenezis, epitelyal-stromal iletişim ve embriyonik implantasyonda rehberlik mekanizmasını içeren birçok potansiyel fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (148).

Reprodüktif sistemde semaforin-pleksin ilişkisi çok az araştırılmıştır. Semaforin reseptörlerinden PlexinB1'in fare overinde eksprese edildiği (149) ve foliküler büyüme, gelişme ve steroidogeneizde rol aldığı bulunmuştur (150). Pleksin-Semaforin ve VEGF-VEGFR sistemlerinin fare overinde ovulasyon döngüsü sırasında düzenlendikleri bildirilmiştir. Semaforinlerin ve plexinlerin anjiyogeneze yakından bağlı oldukları ve foliküler gelişim sırasında VEGF'nin ve reseptörlerinin bilinen etkileri ile etkileşime girebilecekleri öne sürülmüştür (151).

Semaforin 3A ve PleksinA1 insan plasentasında ve uterusunda bulunmuştur. Östrojen etkisindeki uterusun ve gebeliğin sempatik denervasyonunun düzenlenmesinde semaforin ailesinin kemo-itici faktörler olarak da rol oynayabileceğine dikkat çekilmiştir (152). SEMA3A, gebeliğin 16. ve 17.haftasında miyometriyumun düz kas hücrelerinde gösterilmiştir. Birinci ve üçüncü trimester plasentalarında SEMA3A, sinsityotrofoblastların apikal

plazma membranı boyunca lokalize olduğu, buna karşın villöz sitotrofoblast veya stromada gözlenmediği bulunmuştur (152). Sağlıklı bireylere ait uterus dokusunun hem bez epitel hücrelerinde hem de stromal hücrelerinde yüksek oranda SEMA3A gözlenmiştir. Ayrıca gebelik sırasında uterusu ait artmış SEMA3A ifadesinin, sempatik innervasyonun azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (153).

Semaforin 3, reseptörleriyle etkileşime girerek, kimyasal itici ve çekici sonuçları olan mekanizmaları harekete geçirip gelişmekte olan aksonlara rehberlik yapar (154). Endometriyum içindeki embriyoyu yönlendiren mekanizmaları bulmak için, semaforinler ve reseptörlerinin kimyasal itici ve çekici sonuçları olan bu mekanizmalara ve benzer sistemlere bakmamız gerektiği düşünülmüş ve insan endometriyumunda semaforin 3 aile homologlarının ve semaforin E'nin, implantasyon penceresinde azaldığı (sırasıyla 6 ve 3 kat) bulunmuştur (155). Ancak semaforinE düzeyi, implantasyon penceresindeki endometriozisli hastaların endometriyumunda yükselmiştir (156).

İmplantasyon sürecindeki embriyo; endometriyum membranına tutunup, uterin stromayı invaze eder. Semaforin bağlanmamış aktif plexinlerin, ekstrasellüler matrikse (ESM) hücre adezyonunu doğrudan etkilemesi ve hücre invazyonunda rol alması araştırmacıları implantasyon sürecinde plexinin rolünü araştırmaya itmiştir. Bir çalışmada, in vitro koşullarda trofoblastlar ile daha çok adezyon yapan insan endometriyum hücre hattında plexinB1 ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (157), böylece plexinB1'in endometriyum epiteli adezyon özelliklerini artırarak trofoblast-endometriyum epiteli etkileşimine katıldığı tespit edilmiştir (158). İn vivo planlanan başka bir çalışma da benzer sonuçları bulmuştur. Endometriyumdaki 19-23 günler arasındaki plexinB1 ekspresyonu, 12-14. günlere kıyasla ( $1.166 \pm 0.42$ ,  $0.523 \pm 0.299$ ,  $p < 0.005$ ) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (159). PlexinB1'in insan endometrial dokusunda implantasyon penceresine karşılık gelen bu dönemde önemli ölçüde daha yüksek bulunması plexinB1'in endometrial reseptivitede rol aldığını ve hormonal düzenlemeye tabi tutulduğunu göstermiştir.

Semaforin 3 ve VEGF, aynı reseptör (nöropilin) için yarışır. NRP1 ile bu etkileşim endotel hücresi migrasyon inhibisyonu ile sonuçlanır (160). Anjiyojenik sistem ve nöronal rehberlik sistemi arasındaki etkileşimler, implantasyon penceresi boyunca endometriyumda hücre motilite regülasyonu için potansiyel yeni mekanizmalar öne sürmektedir.

Endometrial stromal hücrelerde, desidualizasyon sonrası SEMA E, NRP1 ve 2'nin arttığı bulunmuştur (148). Bu da bize semaforinlerin endometriyumda NRP1 aracılığı ile etki edebileceğini, stromal NRP1'in, parakrin veya otokrin yollar ile VEGF'nin non-endotelial etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir (161).

Dişi üreme siklusunda endometrial vaskülaritede dramatik değişiklikler olur, bu süreçteki endometrial vaskülarizasyon ve rejenerasyon için ve dahası embriyonik implantasyon için esas gerekli olan şey anjiyogenezdır. Anjiyogenezin insan endometriyumunda majör fizyolojik değişiklik olduğunun gösterilmesi ve insan endometriyumunda semaforinlerin menstürel siklusun farklı evrelerinde farklı ekspresyon düzeylerinin bildirilmesi ile endometriyumdaki Sınıf 3 semaforinlerin potansiyel bir sinyalizasyon rolü olduğu desteklenmiştir. Çünkü semaforin reseptörü olan nöropilinler vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) bağlanarak anjiyogenezise katılırlar (148). VEGF endometriyumdaki anjiyogenezis ve vasküler remodellingin potent bir modülatördür. Menstrüel siklus sırasında insan endometriyumunda VEGF'nin siklik değişikliklerde, hormonal düzenlenmede ve endometrial anjiyogeneizde rolü olduğu gösterilmiştir (162). Bu nedenle VEGF reseptörlerinin rollerini daha iyi anlamak ve reproduktif anormallikleri düzeltmek için endometriyumdaki semaforinler ve nöropilinler araştırılmıştır. Fare ve sıçan endometriyumunda hem endotel hem de endotel dışı hücrelerde NRP'lerin sentezlenmesi, uterustaki vasküler permeabilite ve anjiyogenezin indüksiyonunda bir VEGF-NRP rolü olduğunu düşündürmüştür (163). Daha sonra semaforin ve nöropilinlerin menstürel siklus sırasındaki insan endometriyumunda hormonal regülasyon gösterdiği bulunmuştur.

Endometriyum luminal epitelde, NRP1'in proliferatif fazda arttığı, sekresyon fazında azaldığı gösterilmiştir ve hormon yoksunluğu sırasında



saptanmamıştır (164). Lüminal epitelde NRP1 siklik ekspresyonunun; VEGF-NRP1 etkileşiminin, bu epitelin yüzey özelliklerindeki değişikliği etkilediğini (161), NRP1'in VEGF'ye bağlı lüminal epitelyal proliferasyona aracılık ettiğini göstermiştir (164). Özellikle foliküler fazda artan NRP-1'in; siklus boyunca meydana gelen anjiyogenezin hormonal olarak düzenlenen değişikliklere katıldığını ve NRP1'in artmış ekspresyonunun östrojen bağımlı olduğunu göstermektedir. Primat endometriyumda östrojen bağımlı olan VEGF (165), farelerde luminal epiteldeki östrojen bağımlı proliferasyona aracılık etmektedir (166). Folliküler fazda artmış NRP1'in, VEGF için bir kofaktör olarak hareket ettiği ve NRP1 ve VEGF ko-ekspresyonunun anjiyogenetik stimülasyonu artırıp, endometriyum proliferasyonunu, bu sıradaki anjiyogenezi ve endotelial büyümeyi sağladığı ortaya konmuştur (167).

Endometrial endotelde tüm fazlarda NRP1'in arttığı ancak sekretuar faz ile kıyaslandığında, proliferatif fazda anlamlı şekilde daha fazla arttığı bulunmuştur (167). NRP2, endotelde proliferatif faz sırasında çok düşük iken, sekresyon fazı sırasında önemli ölçüde yükselmiştir. Bu da vasküler endotelde VEGF-nöropilin etkileşimlerinin foliküler fazda sadece NRP1 mevcut olduğunda, sekretuar faz sırasında hem NRP1 hem de NRP2 mevcut olduğunda, proliferatif etkileri olduğunu göstermiştir (161). NRP2, sekretuar faz boyunca venöz endotelde artmıştır. VEGF, permeabilityi arttırmak için sekretuar faz boyunca endometriyuma etkir, venöz NRP-2 bu etkiye aracılık edebilir. VEGF güçlü bir permeabilite faktörüdür (162). Sekretuar faz boyunca VEGF endometriyuma etkiyerek permeabilityi arttırır. Endometriyumun lümen epitelinin hemen altına indüklediği ödem, uygun implantasyon için önemlidir (168). VEGF'nin fizyolojik ödem üzerindeki indüktif etkileri NRP2 aracılı olabilir. Sekretuar fazda venöz endotelde NRP-2 ekspresyonuna NRP1'in eklenmesi, bu endotelde VEGF etkisini daha da güçlendirmektedir (164).

SEMA3B ve SEMA3F' nin sağlıklı uterus dokusunun hem endometriyum hem de miyometriyum alanlarında çok yüksek ifade edildiği, endometrial kanser dokularında (ve kanser derecesi ilerledikçe) ifade seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Eksojen SEMA3B veya SEMA3F

eklenen endometrial kanser hücre hatlarında matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesi azalmıştır (169). MMP'ler, ESM'nin ve bazal membranların tutulmasında anahtar oyuncularlardır. MMP, kazein, fibronektin ve jelatin tip I, III, IV ve V'i parçalamaktadır (170). MMP'lerin artmış ekspresyonu, kanser hücresi invazyonu ve metastatik potansiyel ile ilişkilidir (171). SEMA3 ile restore edilmiş hücrelerde MMP-2 ve MMP-9'un azalması ve MMP inhibitörü TIMP3'ün artması, (172) invazyonun azalmasını sağlamıştır (169). Ayrıca SEMA3B ve SEMA3F aşırı ekspresyonu, hücre-matriks tutunması ve motilitesinin ana aracı olarak gösterilen  $\alpha 5\beta 3$  integrin'in (173) azalmasına neden olmaktadır. Proanjiyojenik genleri inhibe ederek ve antianjiyojenik genleri upregüle ederek angiogenezi azaltırlar (169). Bu bulgular tümörögenез, tümör invazyonu ve angiogeneз inhibisyonunda SEMA'ların rolünü ima eder. Öte yandan implantasyonda önemli olan endometrial epitel hücrelerinden adezyon olan yerde salgılanan MMP'nin (174) endometrial glandüler ve luminal epitelde reseptif faz sırasında eksprese edildiği ve infertil hastalarda düşük düzeylerde olduğu gösterilmiştir (170). Bu da implantasyon sırasında endometriyum hücrelerinde SEMA'lar azalırsa, implantasyon için çok önemli olan MMP-2, MMP-9,  $\alpha 5\beta 3$  integrin aktivitesinin artacağını ve bunun da infertilite için yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından stoklanmış CRL-1671 (ATCC-RL95-2-58027481) insan endometrial epitel hücre hattı kullanıldı. Deneyler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışma altı grup olarak planlandı. Bu gruplar aşağıdaki şekilde tanımlandı:

- 1.Grup: Kontrol Grubu
- 2.Grup: Büyüme Hormonu (BH) Grubu
- 3.Grup: Gonadotropin (Gn) Grubu
- 4.Grup: Büyüme Hormonu (BH) + Gonadotropin (Gn) Grubu
- 5.Grup: Letrozol (L) + Gonadotropin (Gn) Grubu
- 6.Grup: Letrozol (L) + Büyüme Hormonu (BH) + Gonadotropin (Gn) Grubu

#### 3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi, Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması

CRL-1671 insan endometrial epitel hücre hattı için %10 Fötal Sığır Serum (FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), 2 mM L-Glutamin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) içeren DMEM F-12 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) hücre kültür besiyeri kullanıldı. Çalışmada -80°C derin dondurucuda ya da -196°C azot tankında saklanan stok hücreler çıkarılarak hızlıca 37°C su banyosunda çözdürüldükten sonra 5 ml kültür vasatı içerisinde 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra altta kalan hücreler halihazırda hazırlanmış besiyeri içeren kültür kaplarına ekildi, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarına sahip nemli inkübatörde çoğaltıldı (Şekil 11), %70-80 konfluent olan hücreler pasajlandı ve

çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stok oluşturmak amacı ile %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (AppliChem, Darmstadt, Germany) ve %90 FBS kullanılarak hazırlanan hücre dondurma solüsyonu ile donduruldu.



**Şekil 11:** 25 cm<sup>2</sup> kültür flaskında çoğaltılan CRL-1671 hücreleri

### 3.2. İlaç Uygulamaları

Çalışmada, KOH amaçlı kullanılan ilaçlar olan aromataz inhibitörlerinden letrozol (Femara; Novartis, Switzerland), büyüme hormonu olarak somatotropin (Saizen; Merck Serono, Italy) ve gonadotropin olarak follitropin alfa (Gonal-F; Serono, Switzerland) kullanıldı. Uygulamalar için kullanılacak doz ve günler belirlenirken rutin tedavilerde kullanılan standartlara bağlı kalındı. Ortalama 60 kg ağırlığında ve 160 cm boyunda olduğu varsayılan bir kişinin vücut yüzey alanı hesaplandı ve 1.62 m<sup>2</sup> bulundu. Bu değer üzerinden her bir kültür kabının 2 cm<sup>2</sup> yüzey alanına göre birimler dönüştürüldü ve ilaç uygulamaları yapıldı. Gonadotropin günlük 225 IU/gün olmak üzere 8 gün boyunca uygulandı. Letrozol ile uygulanan grupta gonadotropin uygulaması 3.gün başlayıp 6 gün boyunca devam edildi ve doz 150 IU/gün olarak azaltıldı. Büyüme hormonu total 8 mgr olacak şekilde 1., 4., ve 8. günlerde uygulandı (günlük doz 2,7 mgr/gün). Letrozol uygulaması tüm letrozol kullanılan gruplarda (Grup 5 ve 6) 5 mgr/gün üzerinden 5 gün boyunca uygulandı.

Çalışmada in vitro olarak kullanılan ilaçların dozları ve uygulama süreleri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1:** Çalışmada kullanılan ilaçların dozları ve uygulama süreleri

| İlaç                                             | Doz (2 cm <sup>2</sup> için) | Uygulama Süresi  |
|--------------------------------------------------|------------------------------|------------------|
| Letrozol                                         | 0.61728 µg                   | İlk 5 gün        |
| Gonadotropin                                     | 0.00198 µg                   | 1.-8. günler     |
| Gonadotropin<br>(Letrozol ile<br>uygulandığında) | 0.00132 µg                   | 3.-8. Günlerde   |
| Büyüme Hormonu                                   | 0.32922 µg                   | 1., 4. ve 8. Gün |

### 3.3. MTT Yöntemi

CRL-1671 hücreleri her bir gözde  $5 \times 10^4$  hücre/ml olacak 96 gözlü kültür kabına ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra letrozol uygulaması sırasında kullanılan DMSO çözücüsünün toksisitesinin belirlenmesi için MTT (-3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-) analizi gerçekleştirildi. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki hücre besiyeri uzaklaştırılarak iki farklı hacimde DMSO kullanılarak hazırlanan letrozol uygulamaları yapıldı. Letrozol 1.25 mg/mL olacak şekilde hazırlandıktan sonra, 1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:400 dilüsyonlarında hazırlandı. Letrozol 0.25 mg/mL olarak hazırlanan örneği ise 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 ve 1:100 dilüsyonlarında uygulandı (Şekil 12). CRL-1671 hücrelerine yukarıda belirtilen oranda ve dilüsyonlarda ilaç uygulamaları 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamında 24 saat inkübasyonu sonucunda sitotoksite analizi yapıldı. Süre sonunda hücrelerin letrozol içeren besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra steril Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (Biochrome, Leonorenstraße 2, Berlin, Germany) içerisinde 5 mg/mL MTT (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) ile hazırlanan solüsyondan 1:10 dilüsyonda olacak şekilde her bir göze konuldu ve 37°C de 4 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu ortamdan

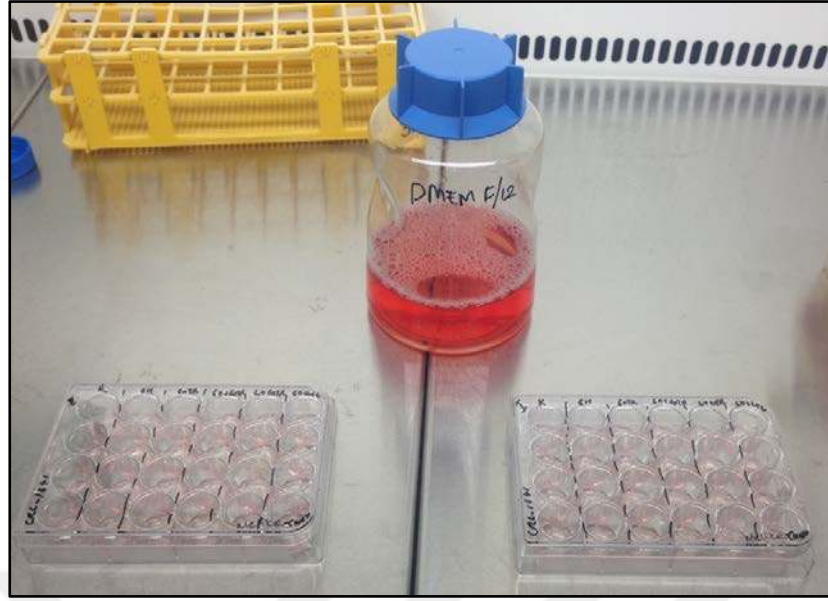
uzaklaştırıldı ve her bir göze 50 µL DMSO eklenerek oda ısısında 10 dakika süreyle bekletildi. MTT analizi absorbands 540 nm’de optik mikropilaka okuyucu (ELx800UV, BioTek) ile değerlendirildi. Deneyler üç kez tekrarlandı.

|                           |   | 1  | 2  | 3   | 4    | 5    | 6     | 7     | 8     | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------|---|----|----|-----|------|------|-------|-------|-------|---|----|----|----|
| 1.25<br>mg/mL<br>Letrazol | A | VK | HK | 1:5 | 1:25 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 |   |    |    |    |
|                           | B | VK | HK | 1:5 | 1:25 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 |   |    |    |    |
|                           | C | VK | HK | 1:5 | 1:25 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 |   |    |    |    |
|                           | D |    |    |     |      |      |       |       |       |   |    |    |    |
| 0.25<br>mg/mL<br>Letrazol | E |    |    |     |      |      |       |       |       |   |    |    |    |
|                           | F | VK | HK | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40  | 1:80  | 1:100 |   |    |    |    |
|                           | G | VK | HK | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40  | 1:80  | 1:100 |   |    |    |    |
|                           | H | VK | HK | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40  | 1:80  | 1:100 |   |    |    |    |

**Şekil 12:** MTT analizi için hazırlanan 96 gözlü kültür kabının şematik gösterimi

### 3.4. İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

İndirekt immünohistokimya yöntemi, 24 gözlü hücre kültür kaplarının her bir gözüne 12 mm çapında steril cam yuvarlak lameller konularak gerçekleştirildi. Her gözde  $5 \times 10^4$  hücre/ml hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi (Şekil 13, 14).



**Şekil 13:** Steril hava akış kabini içerisinde immunositokimya için hazırlanmış CRL-1671 hücreleri ve DMEM F-12 hücre besiyeri

|                 |          | 1       | 2  | 3  | 4     | 5    | 6        |
|-----------------|----------|---------|----|----|-------|------|----------|
| SEMAFORİN 3E    | <b>A</b> | KONTROL | BH | Gn | BH+Gn | L+Gn | L+Gn+ BH |
| SEMAFORİN 3A    | <b>B</b> | KONTROL | BH | Gn | BH+Gn | L+Gn | L+Gn+BH  |
| SEMAFORİN 3F    | <b>C</b> | KONTROL | BH | Gn | BH+Gn | L+Gn | L+Gn+BH  |
| NEGATİF KONTROL | <b>D</b> | KONTROL | BH | Gn | BH+Gn | L+Gn | L+Gn+BH  |

**Şekil 14:** İmmunositokimya analizi için hazırlanan 24 gözlü kültür kabının şematik gösterimi

Hücrelerin ekiminden sonra %50 konfluent oldukları gözlemlendikten sonra gruplara uygun olarak yapılan ilaç uygulamaları sonrasında, her bir göz steril PBS (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) ile yıkandı. Tüm hücreler %4'lük paraformaldehit ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyondan sonra 5'er dakikalık 3 kere PBS yıkaması ile fiksatif uzaklaştırıldı. Takiben %3'lük Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) (Merck, K31355100303, Darmstadt, Germany) uygulaması oda sıcaklığında

gerçekleştirildi. PBS işlemi ile yıkama yapıldıktan sonra permeabilizasyon için %0,1'lik Triton®-X-100 (Applichem, 4L003808) ile 15 dakika buz üzerinde muamele edildikten sonra tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Örnekler 1 saat bloklama solüsyonu (Histostain®-Plus Bulk Kit, Kat No:85-9043, Invitrogen, Carlsbad, California, United States) uygulamasından sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmeden anti-SEMA3A, anti-SEMA3E ve anti-SEMA3F primer antikorları (Tablo 2) ile 1 gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi sabah PBS ile yıkandıktan sonra anti-rabbit veya anti-mouse biotinlenmiş sekonder antikorlar (30 dakika) ve ardından streptavidin hidrojen peroksidad ile (30 dakika) uygulandı (Histostain®-Plus Bulk Kit, Kat No:85-9043, Invitrogen, Carlsbad, California, United States). İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra PBS ile yıkamalar yapıldı. DAB kromojeni (ScyTek Laboratories, SensiTek HRP Anti-Polyvalent, Kat No: AEM080, Logan, Utah, USA) oda sıcaklığında 1 dk uygulanarak antijen antikor komplekslerinin görünürlüğü sağlandı. Daha sonra Mayer'in Hematoksilen (Bio-Optica, Kat No: 05-06002/L, Milano, ITALY) boyası ile art alan boyaması gerçekleştirildi ve örnekler distile su ile yıkandı. Her bir gözdeki lameller lam üzerine alındı ve immunositokimyasal kapatma vasatı (Aqueous-Mount, ScyTek Laboratories, Kat No: AMT060, Logan, Utah, USA) ile kapatılarak ışık mikroskopunda (BX43, Olympus) incelendi (Tablo 3).

İndirekt immünositokimya yöntemi sırasında immunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile negatif kontrol boyamaları yapıldı. Her grup için deneyler üç kez tekrarlandı ve değerlendirmeler iki bağımsız araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

**Tablo 2:** İndirekt immunositokimya yönteminde kullanılan antikorlar

| Primer antikor                         | Katalog No | Üretici Firma          | Dilüsyon Oranı |
|----------------------------------------|------------|------------------------|----------------|
| Anti-SEMA3A<br>(rabbit polyclonal IgG) | orb11359   | Biorbyt.               | 1:50           |
| Anti-SEMA3E<br>(goat polyclonal IgG)   | PA5-18350  | ThermoFisherScientific | 1:50           |
| Anti-SEMA3F<br>(rabbit polyclonal IgG) | orb11360   | Biorbyt.               | 1:50           |



**Tablo 3:** İndirekt immunositokimya yöntemi

| Yapılan İşlem               | Kullanılan Madde                       | Uygulanan Süre                              |
|-----------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| Yıkama                      | PBS                                    | 2 x 5 dk                                    |
| Fiksasyon                   | %4'lük Paraformaldehit                 | 30 dk.                                      |
| Yıkama                      | PBS                                    | 2 x 5 dk.                                   |
| Bloklama                    | %3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | 5 dk.                                       |
| Yıkama                      | PBS                                    | 3 x 5 dk.                                   |
| Permeabilizasyon            | %0,1 lik Triton-X 100                  | 15 dk.                                      |
| Yıkama                      | PBS                                    | 3 x 5 dk.                                   |
| Bloklama                    | Bloklama Solüsyonu                     | 1 saat                                      |
| Primer Antikor Uygulaması   | anti-SEMA3A, anti-SEMA3E ve antiSEMA3F | Oda Sıcaklığında 2 Saat veya +4°C'de 1 Gece |
| Yıkama                      | PBS                                    | 3 x 5 dk.                                   |
| Sekonder Antikor Uygulaması | Biotin                                 | 30 dk.                                      |
| Yıkama                      | PBS                                    | 3 x 5 dk.                                   |
| Sekonder Antikor Uygulaması | Streptavidin HRP                       | 30 dk.                                      |
| Yıkama                      | PBS                                    | 3 x 5 dk.                                   |
| Boyama                      | DAB                                    | 1 dk.                                       |
| Yıkama                      | Distile su                             | 3 x 5 dk.                                   |
| Art Alan Boyaması           | Mayer'in Hematoksileni                 | 1 dk                                        |
| Yıkama                      | Distile su                             | 3 x 5 dk.                                   |
| Kapatma                     | Kapatma vasatı                         |                                             |

### 3.5. İmmünfloresan Yöntemi

Hücrelerin ekiminden sonra %50 konfluent oldukları gözlemlendikten sonra gruplara uygun olarak yapılan ilaç uygulamaları sonrasında, steril PBS ile yıkanan hücreler fikse edilmek için 30 dakika boyunca oda sıcaklığında %4'lük paraformaldehit ile muamele edildi. Fiksasyondan sonra 5'er dakikalık 3 kere PBS yıkaması ile fiksatif uzaklaştırıldı. Floresan boyama için 1/500 dilüsyonunda sheep serum (Santa Cruz, Kat No: sc-2488, Texas, USA) ile 1 saat bloklama yapıldı ve yıkama işlemi gerçekleştirilmeden uygun dilüsyonda

anti-SEMA3E primer antikoru ile 1 gece +4°C'de inkübe edildi. Örnekler ertesi sabah PBS ile yıkandıktan sonra Rhodamine ile işaretli 1/500 dilüsyonunda rabbit anti-goat sekonder antikor (GeneTex, Kat No: GTX26882, Irvine, California) ile 2 saat oda sıcaklığında muamele edildi. PBS ile yıkanan örnekler ait lameller kültür kaplarından çıkartılarak 1:1 DAPI (Cell Signaling Technology, Kat No: 4083S, Danvers, USA) : floresan kapatma solüsyonu (Calbiochem, Kat No: JA1750, Darmstadt, Germany) içeren lam üzerine alındı ve floresan mikroskob (IX71, Olympus) altında incelendi. Her grup için deneyler üç kez tekrarlandı ve değerlendirmeler iki bağımsız araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

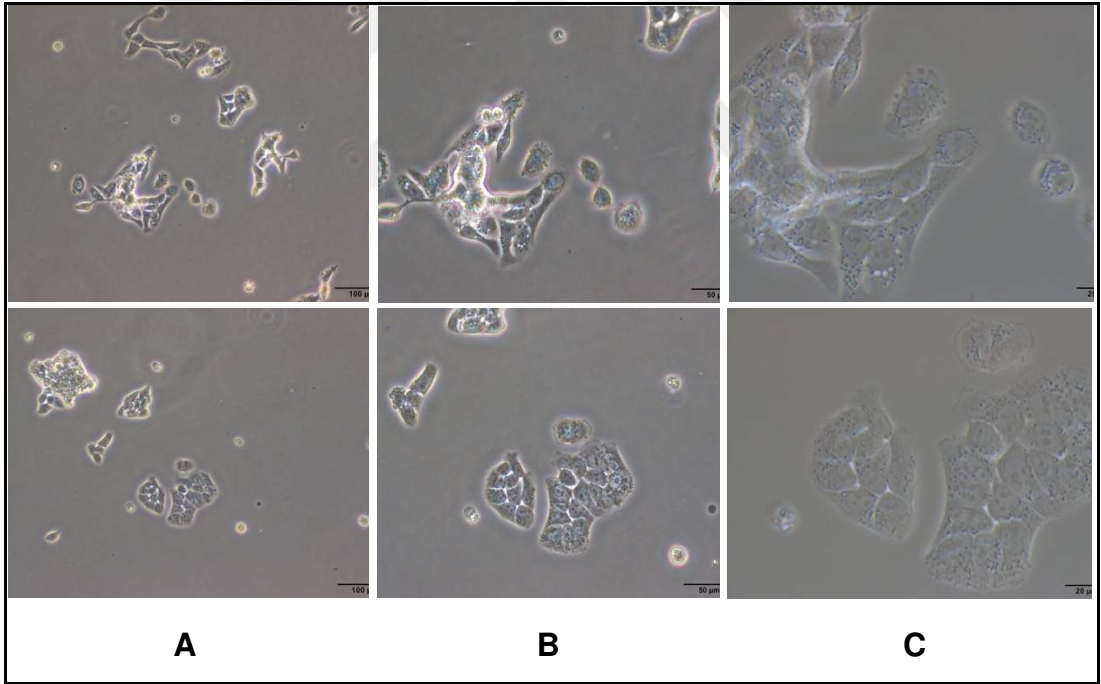
### **3.6. İmmün Boyanmaların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler**

İmmünohistokimya ve immunofloresan boyama sonucu örnekler 200x büyütmede değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Her bir preparat için rastgele seçilmiş 5 alanda her 100 hücre içinde pozitif boyanan hücreler sayılarak HSCORE değerleri belirlendi [HSCORE:  $\sum P_i (i+1)$  ( $P_i$ : % pozitif boyanmış hücre sayısı;  $i$ : boyanma şiddeti)]. Antikorların immunoreaktivite boyanma şiddetleri ( $i$ ); hafif (1)(+), orta (2)(++) ve şiddetli (3)(+++ ) olacak şekilde skorlandı. Sonuçlar One-way ANOVA istatistiksel testi ile değerlendirildi ve değerler  $\text{mean} \pm \text{SD}$  olarak verildi. İstatistiksel olarak  $p$  değeri 0.05'ten küçük elde edilen karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

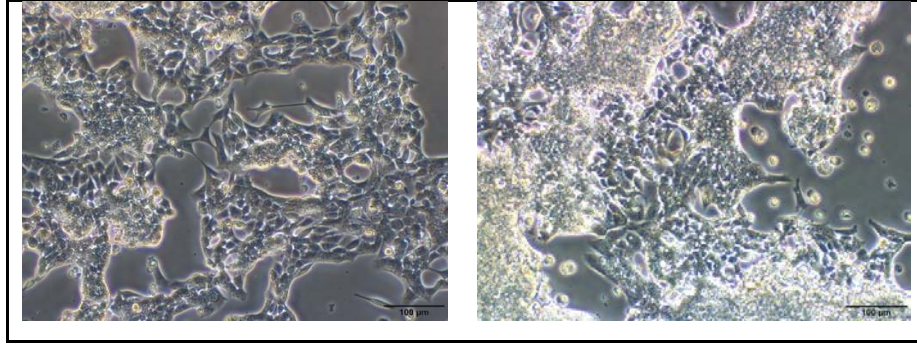
## IV. BULGULAR

### 4.1. Hücre Kültürü Bulguları

Hücre kültürü çalışmaları sırasında, CRL-1671 insan endometrial epitel hücre hattının açıldıktan sonra 1.gününde epitelyal karakterde ve adherent büyüme özelliğine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 15). Kültürün 8.gününe hücrelerin çoğalarak gruplar halinde ve çok tabakalı büyüme eğilimi gösterdikleri tespit edildi (Şekil 16).

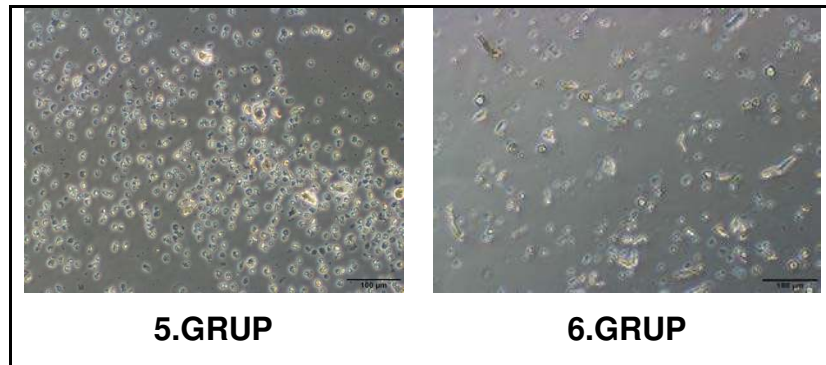


**Şekil 15:** CRL-1671 hücrelerinin 1.gün inverted mikroskop görüntüleri (KONTROL GRUBU). A: 100 µm. B: 50 µm. C: 20 µm.

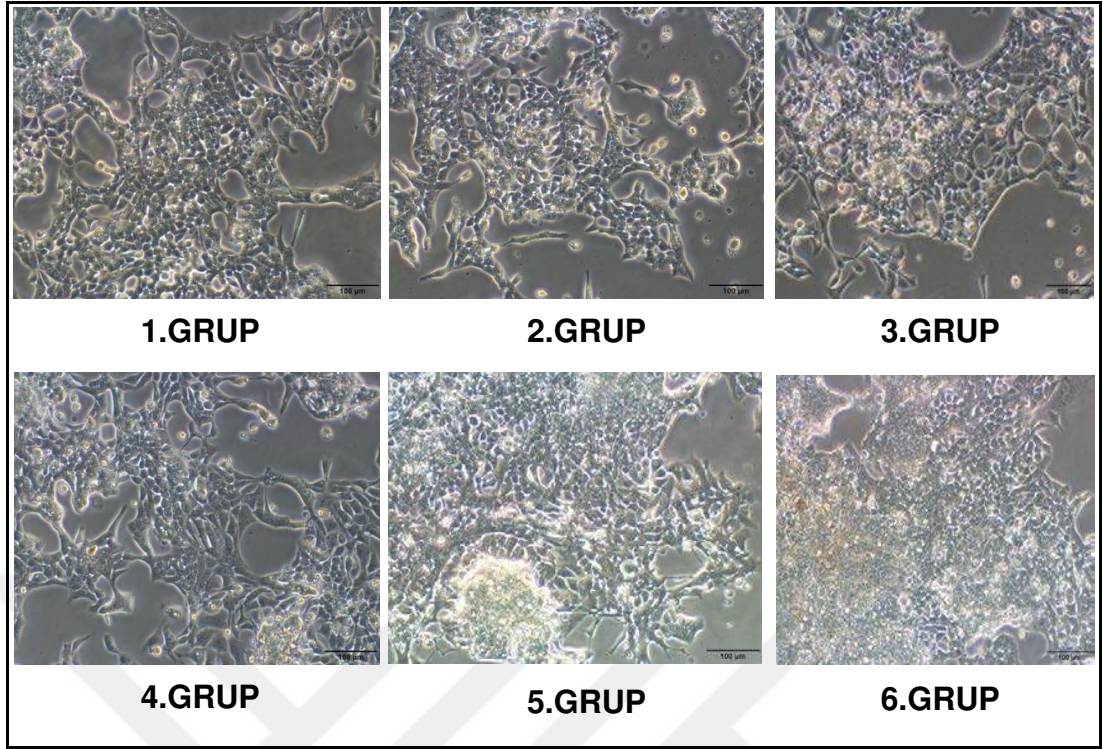


**Şekil 16:** CRL-1671 hücrelerinin 8.gün inverted mikroskop görüntüleri (KONTROL GRUBU). Bar: 100 µm.

Hücreler %80 konfluent olduklarında gruplara uygun olarak  $5 \times 10^4$  hücre/ml hücre olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Protokole uygun olarak ilaç uygulamaları sonrasında, Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'teki hücrelerin çoğalmaya devam ettikleri ve adherent özelliklerini korudukları saptandı. Letrozol'ün klinik kullanımdaki uygulanan dozuna göre hesaplanması ve uygulaması sonrasında letrozol içeren gruplardaki hücrelerin kültürün 2.günüнден itibaren yuvarlaklaşarak kültür kabından kalktıkları, süspanse hücrelerin sayısının arttığı ve hücre içi birikimlerden dolayı bazı hücrelerin daha koyu renk aldıkları gözlemlendi (Şekil 17, 18). Kültüre devam edildiğinde hücre sayısının giderek azalması ve yapışan hücrelerin olmamasından dolayı bu etkinin letrozol çözücü olarak kullanılan DMSO'dan kaynaklandığı düşünüldüğü sitotoksikite analizi yapıldı.



**Şekil 17:** CRL-1671 hücrelerinin 2,5 mg letrozol/10 mL DMSO çözeltisinden 1:20 dilüsyon oranı ile hazırlanmış uygulamaları sonrasında 8.gündeki inverted mikroskop görüntüleri. 5.GRUP: L+ Gn, 6.GRUP: L+ Gn + BH.



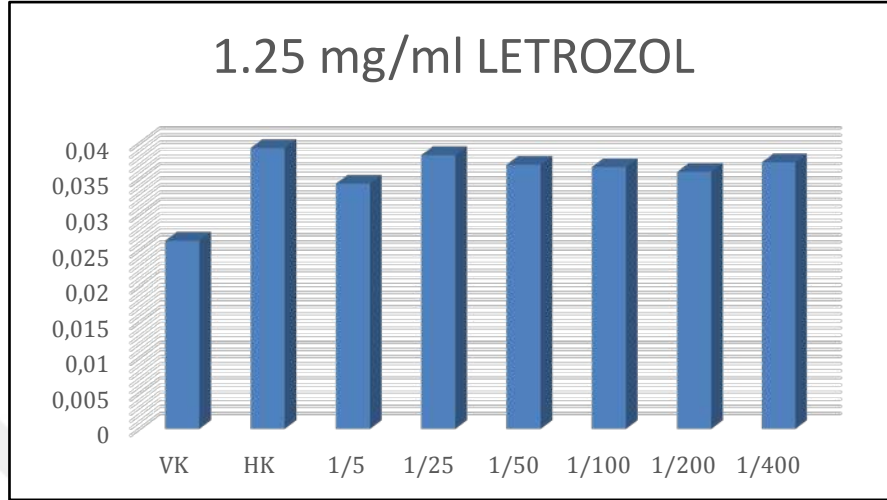
**Şekil 18:** CRL-1671 hücrelerinin ilaç uygulamaları sonrasında 8.gündeki inverted mikroskop görüntüleri. 1.GRUP: Kontrol Grubu, 2.GRUP: BH, 3.GRUP: Gn, 4.GRUP: BH+Gn, 5.GRUP: L+ Gn, 6.GRUP: L+ Gn + BH.

#### 4.2. MTT Bulguları

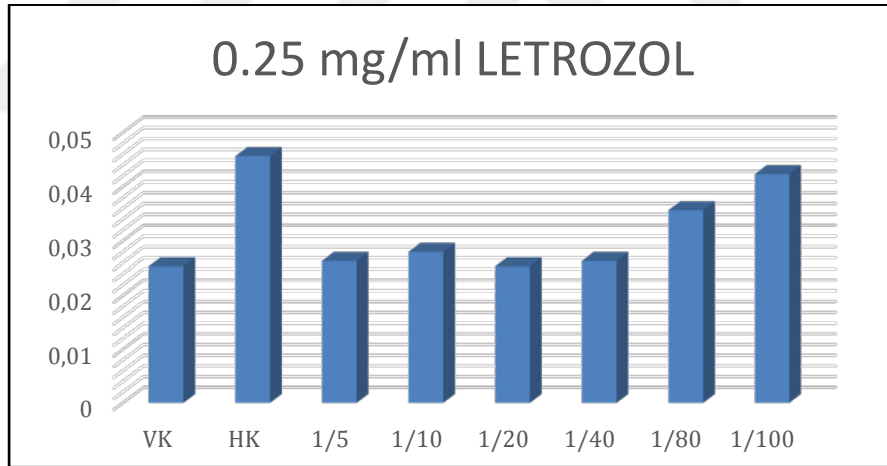
Sarı renkli olarak hazırlanan MTT solüsyonu, mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz tarafından indirgenir ve canlı hücrelerde koyu mavi/mor renkli formazan yapısına dönüşür, ölü hücrelerde ise bu reaksiyon gerçekleşmez. MTT analizi sonucunda hücre kontrol (HK) uygulamalarında hücrelerin değerlerinin sırası ile 0,039 ve 0,046 oldukları saptanırken 1.25 mg/mL letrozol çözeltisinden 1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:400 dilüsyonlarından 1:25 dilüe oranının (0,038) hücre kontrol grubu ile benzer olduğu izlendi (Şekil 19). İlk denemede kullanılan 0.25 mg/mL letrozol çözeltisinden ise 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 ve 1:100 dilüsyonlarından yapılan analiz sonrasında 1:100 dilüsyon oranının (0,042) hücre kontrol grubuna en yakın olduğu (Şekil 20), her iki dilüsyon sonucunda çözeltiler içerisindeki etken maddenin 0.124 µg olduğu gözlenmesi üzerine 0.25 mg/mL letrozol olacak



şeklinde hazırlanan solüsyondan 1:100 dilüsyonun kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varıldı. Çalışma gruplarından 5. gruba ve 6. gruba ait örneklerin bu dozda letrozol uygulaması ile yapılmasına karar verildi.



**Şekil 19:** 1.25 mg/ml Letrozol MTT analizi bulguları



**Şekil 20:** 0.25 mg/ml Letrozol MTT analizi bulguları

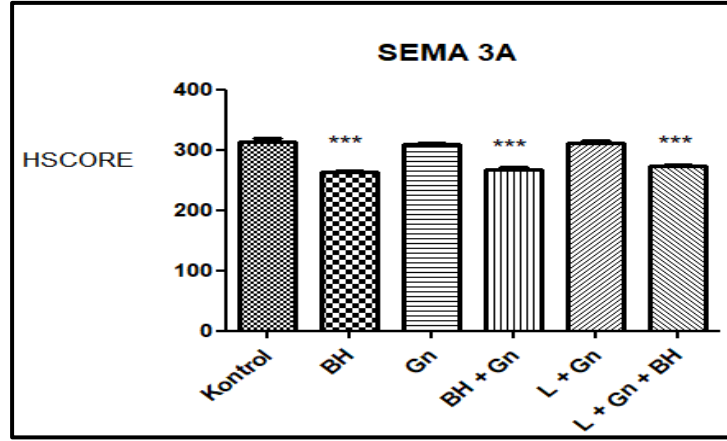
#### 4.3. İmmun Boyama Bulguları

Tüm gruplarda Semaforin 3A ve Semaforin 3F dağılımları immunositokimyasal olarak değerlendirilirken, Semaforin 3E dağılımının ikincil antikorun uygunluğu açısından immunofloresan analizler ile değerlendirilmesine karar verildi.

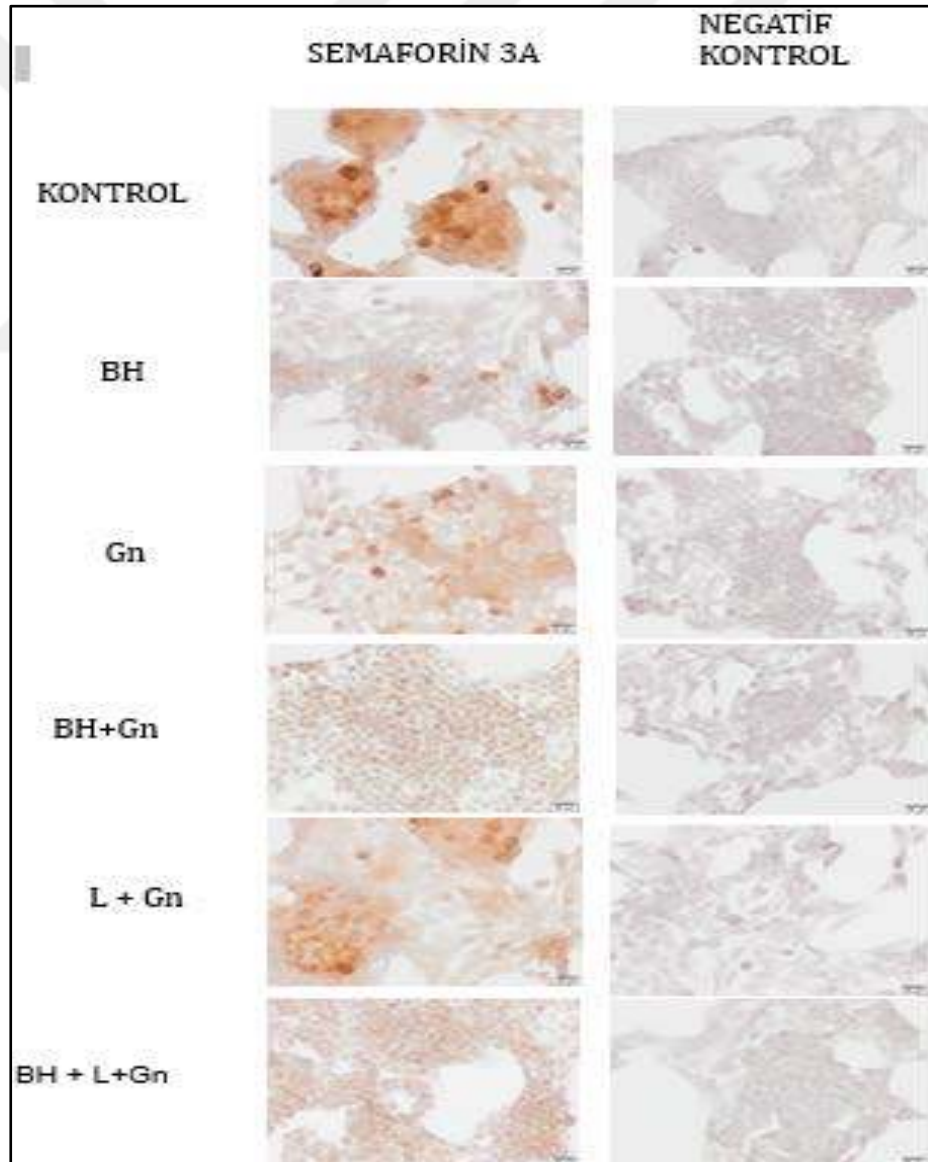
#### 4.3.1. İmmunositokimya Bulguları

Semaforin 3A ve 3F immün dağılımları ışık mikroskopunda değerlendirildiğinde, Semaforin 3A ve Semaforin 3F'nin sitoplazmik boyanma özelliği gösterdiği belirlendi (Şekil 22 ve Şekil 24).

Kontrol grubunda (1.Grup) Semaforin 3A'nın şiddetli pozitif (+++) boyandığı (Şekil 22, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $315,6 \pm 15,24$  olduğu saptandı (Tablo 5). BH uygulanan grupta (2.Grup) ise Semaforin 3A immün dağılımının zayıf pozitif (+) olarak izlendiği (Şekil 22, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $262,6 \pm 19,61$  olduğu (Tablo 5) ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu izlendi (Şekil 21). Gn (3.Grup) uygulanan grupta immunositokimyasal yoğunluğu orta/şiddetli (++) pozitif olduğu (Şekil 22, Tablo 4), HSCORE değerinin  $309 \pm 16,06$  olduğu (Tablo 5) ve Semaforin 3A dağılımı açısından Gn grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 21). BH ve Gn birlikte uygulandığı grupta (4.Grup) Semaforin 3A immün dağılımı ise zayıf pozitif (+) olarak gözlemlendi (Şekil 22, Tablo 4). Bu grupta HSCORE analizi sonucunda değer  $267,2 \pm 37,97$  (Tablo 5) olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 21). L ve Gn birlikte uygulandığı grupta (5.Grup) Semaforin 3A immün dağılımı şiddetli pozitif (+++) boyandığı (Şekil 22, Tablo 4), HSCORE değerinin  $313,2 \pm 13,6$  olduğu (Tablo 5) ve diğer gruplar ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 21). L, Gn ve BH uygulanan grupta (6.Grup) Semaforin 3A immün dağılımı zayıf pozitif (+) olduğu (Şekil 22, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $273 \pm 9,6$  olduğu (Tablo 5) ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 21).



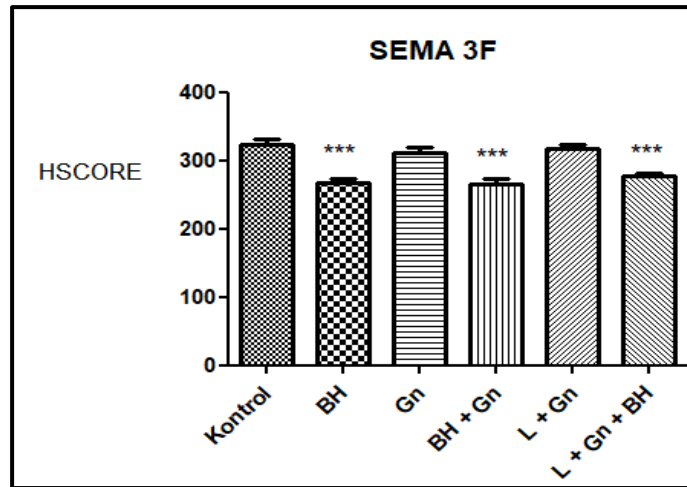
**Şekil 21:** Semaforin 3A immunositokimyasal HSCORE değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



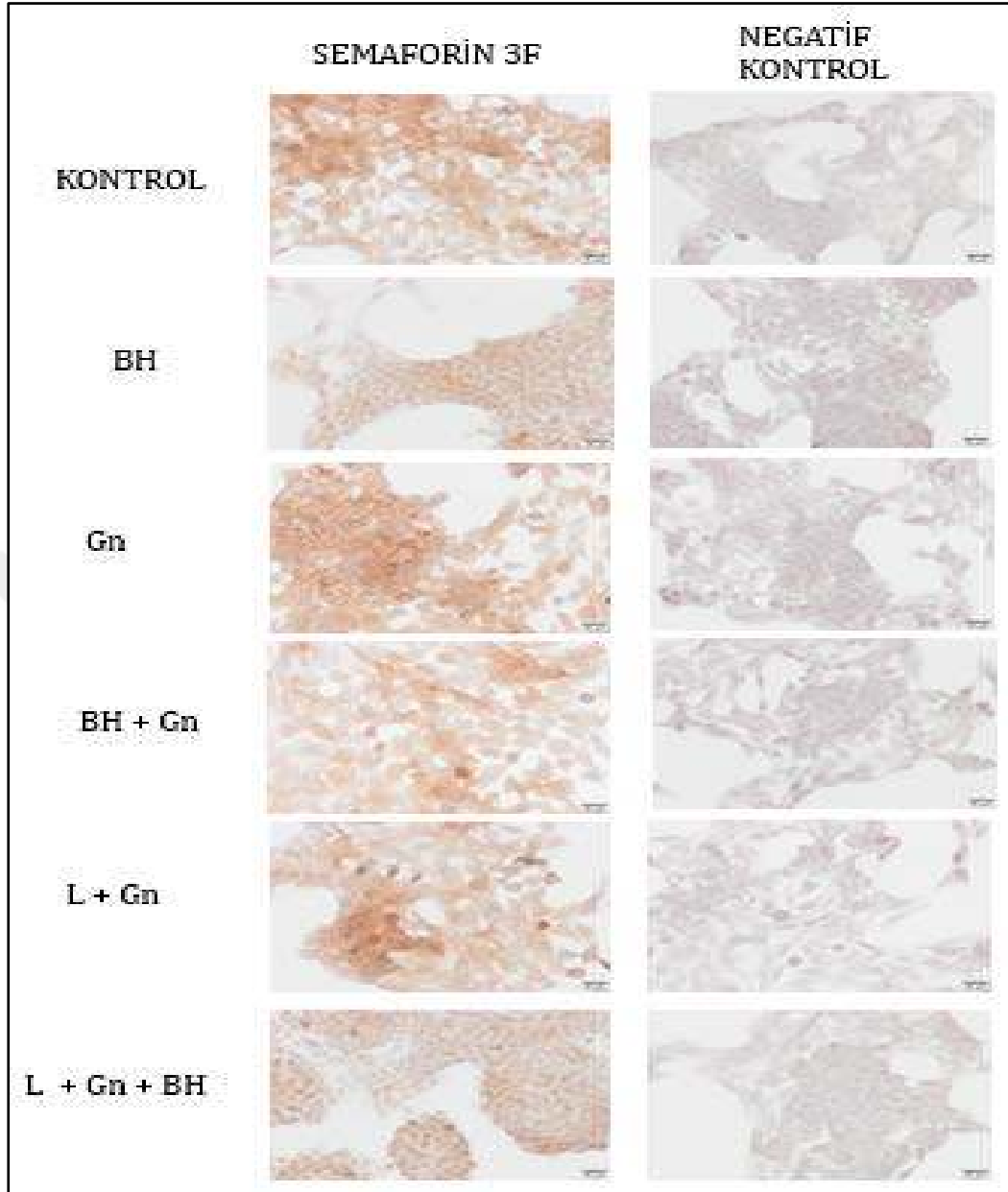
**Şekil 22:** Semaforin 3A immunositokimya fotoğrafları (Bar: 20  $\mu$ m).



Kontrol grubunda (1.Grup) Semaforin 3F'nin şiddetli (+++) pozitif boyandığı (Şekil 24,Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $321,4 \pm 26.4$  olduğu saptandı (Tablo 5). BH uygulanan grupta (2.Grup) ise Semaforin 3F immun dağılımı zayıf pozitif (+) olarak izlendiği (Şekil 24, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $265,4 \pm 26.86$  olduğu (Tablo 5) ve kontrol grubu, BH ve L+Gn gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi (Şekil 23). Gn (3.Grup) uygulanan grupta immunositokimyasal yoğunluğu orta (++) şiddette olduğu (Şekil 24, Tablo 4), HSCORE değerinin  $310 \pm 5.83$  olduğu (Tablo 5) ve Semaforin 3F dağılımının Gn grubu ile BH, BH+Gn ve BH+Gn+L grubu arasında anlamlı fark olduğu görüldü (Şekil 23). BH ve Gn birlikte uygulandığı grupta (4.Grup) Semaforin 3F immun dağılımı ise zayıf pozitif (+) olarak gözlemlendi (Şekil 24, Tablo 4). Bu grupta HSCORE analizi sonucunda değerin  $267,3 \pm 14.57$  (Tablo 5) olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 23). L ve Gn birlikte uygulandığı grupta (5.Grup) Semaforin 3F immun dağılımı şiddetli pozitif (+++) olduğu (Şekil 24, Tablo 4), HSCORE değerinin  $318 \pm 16$  olduğu (Tablo 5) ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı (Şekil 23). L, Gn ve BH uygulanan grupta (6.Grup) Semaforin 3F immun dağılımı zayıf pozitif (+) olduğu (Şekil 24, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $275 \pm 18,9$  olduğu belirlendi (Tablo 5). L, Gn ve BH uygulanan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 23).



**Şekil 23:** Semaforin 3F immunositokimyasal HSCORE değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

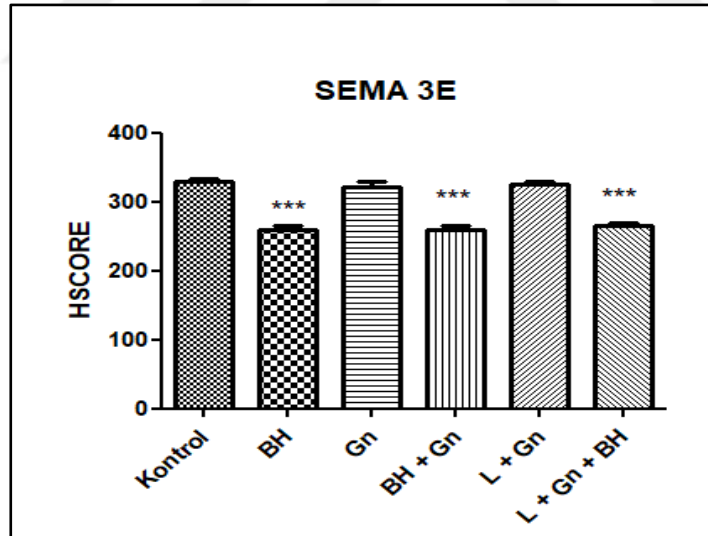


**Şekil 24:** Semaforin 3F immunositokimya fotoğrafları (Bar: 20 µm).

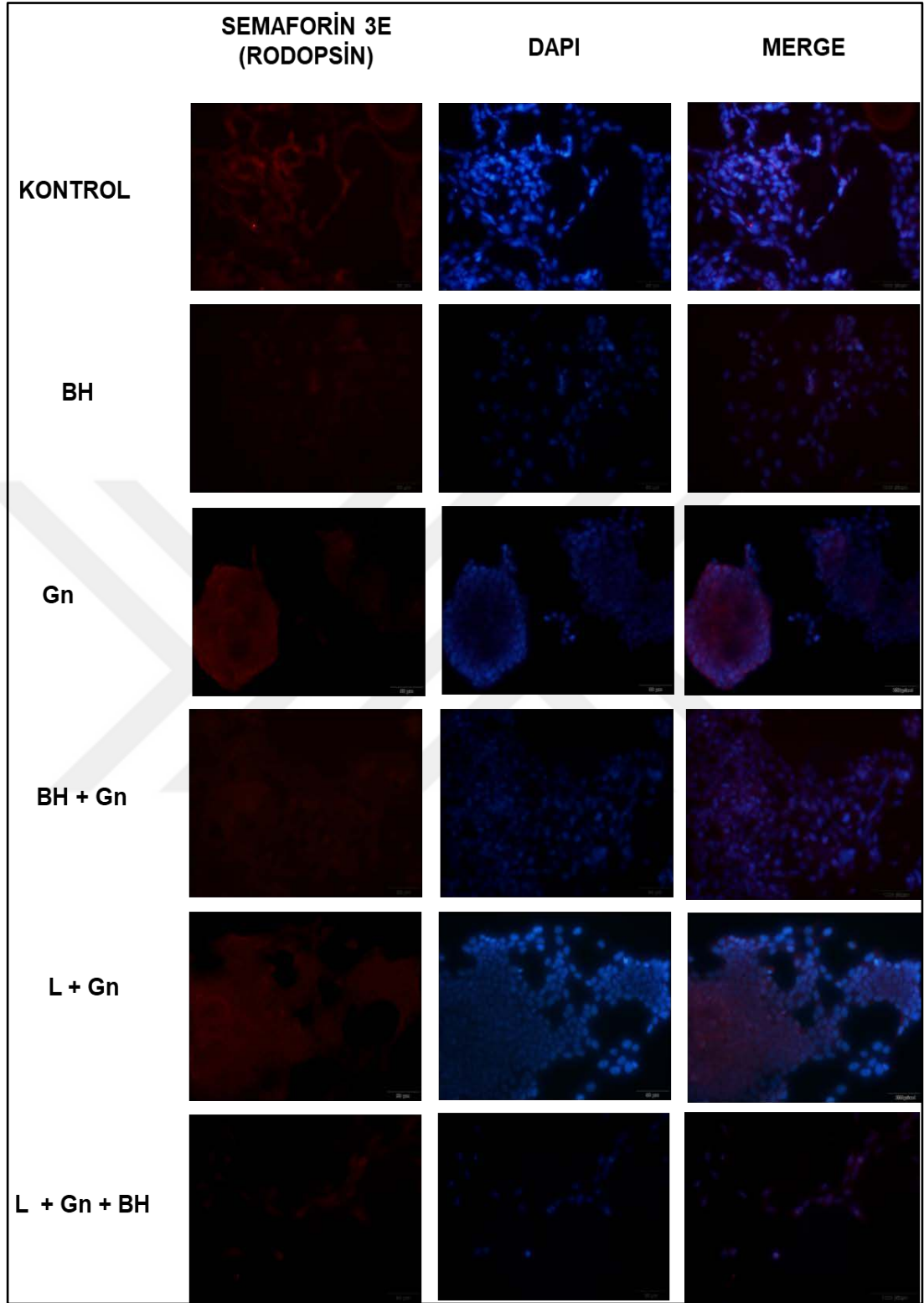
#### 4.3.2. İmmunfloresan Bulguları

Semaforin 3E immün dağılımları floresan mikroskopunda değerlendirildiğinde, sitoplazmik boyanma özelliği gösterdiği belirlendi (Şekil 26). Kontrol grubunda (1.Grup) Semaforin 3E'nin şiddetli (+++) pozitif boyandığı (Şekil 26, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $330,7 \pm 6,29$  olduğu saptandı (Tablo 5). BH uygulanan grupta (2.Grup) ise Semaforin 3E immün dağılımı hafif pozitif (+) olarak izlendiği (Şekil 26, Tablo 4) ve HSCORE

değerinin  $260,3 \pm 9,5$  olduğu (Tablo 5) ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi (Şekil 25). Gn (3.Grup) uygulanan grupta immunfloresan yoğunluğu orta (++) şiddette olduğu (Şekil 26, Tablo 4), HSCORE değerinin  $321,8 \pm 5$  olduğu (Tablo 5) ve Semaforin 3E dağılımının kontrol grubu ile arasında anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 25). BH ve Gn birlikte uygulandığı grupta (4.Grup) Semaforin 3E immün dağılımı ise hafif pozitif (+) olarak gözlemlendi (Şekil 26, Tablo 4). Bu grupta HSCORE analizi sonucunda değer  $260,2 \pm 5,29$  (Tablo 5) olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu saptandı (Şekil 25). L ve Gn birlikte uygulandığı grupta (5.Grup) Semaforin 3E immün dağılımı şiddetli (+++) olduğu (Şekil 26, Tablo 4), HSCORE değerinin  $325,6 \pm 7,1$  olduğu (Tablo 5), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı saptandı (Şekil 25). L, Gn ve BH uygulanan grupta (6.Grup) Semaforin 3E immün dağılımı zayıf şiddette (+) (Şekil 26, Tablo 4) ve HSCORE değerinin  $265,7 \pm 6,17$  (Tablo 5) olduğu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu saptandı (Şekil 25).



**Şekil 25:** Semaforin 3E immünfloresan HSCORE değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Şekil 26:** Semaforin 3E immunfloresan fotoğrafları (Bar: 50 µm).

**Tablo 4:** İmmun dağılımların boyanma yoğunluğuna (i) göre değerlendirilmesi

|                         | <b>SEMA 3A</b> | <b>SEMA 3F</b> | <b>SEMA 3E</b> |
|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Kontrol Grubu</b>    | +++            | +++            | +++            |
| <b>BH Grubu</b>         | +              | +              | +              |
| <b>Gn Grubu</b>         | ++/+++         | ++             | ++             |
| <b>BH + Gn Grubu</b>    | +              | +              | +              |
| <b>L + Gn Grubu</b>     | +++            | +++            | +++            |
| <b>L+ Gn + BH Grubu</b> | +              | +              | +              |

**Tablo 5:** İmmun dağılımların HSCORE değerleri

|                        | <b>SEMA 3A</b> | <b>SEMA 3F</b> | <b>SEMA 3E</b> |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Kontrol Grubu</b>   | 315.6±15.24    | 321.4±26.42    | 330.7±6.29     |
| <b>BH Grubu</b>        | 262.6±19.61    | 265.4±26.86    | 260.3±9.5      |
| <b>Gn Grubu</b>        | 309±16.06      | 310±5.83       | 321.8±5        |
| <b>BH+ Gn Grubu</b>    | 267.2±37.97    | 267.3±14.57    | 260.2±5.29     |
| <b>L+ Gn Grubu</b>     | 313.2±13.6     | 318±16         | 325.6±7.1      |
| <b>L+ Gn+ BH Grubu</b> | 273±9.6        | 275±18.9       | 265.7±6.17     |

## V.TARTIŞMA

Hücre kültürü tekniği kullanılarak uygulanan yöntemler ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle ilaç endüstrisi tarafından geliştirilen yeni ilaç adaylarının etkinliğinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmasının yanı sıra hücresel belirteçlerin ve metabolik yolların ortaya çıkmasında da etkin olarak kullanılmaktadır. CRL-1671 endometriyum epiteliyal hücreleri epiteliyal özellikte olup adherent kültür özelliğine sahip olan ticari bir hücre hattıdır. CRL-1671 endometriyum hücre hattının ikilenme zamanı  $47 \pm 1,7$  saat olarak bildirilmektedir ve bu hücrelerin karakterizasyonu yapıldığında keratin pozitif iken uvomorulin ve vimentin negatif oldukları belirlenmiştir (175). CRL-1671 hücrelerinin uterus epitel hücrelerinin fenotipik çalışmaları için kullanışlı bir model oldukları bilinmektedir (176).

Çalışmamızda infertilitede kullanılan ovulasyon indüksiyon ajanlarından letrozol, gonadotropin ve büyüme hormonu ilaçlarının tek başına ve kombine olarak endometriyum hücrelerinde semaförin cevabını inceledik. Bu amaçla hücre kültür çalışması dizayn edildi. CRL-1671 endometriyum hücre hattı kullanılarak in vitro ilaç etkilerine bakıldı. İnfertilite tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalarda implantasyon ve kadın sağlığı göz önüne alındığında, çalışmamızda kullandığımız ovulasyon indüksiyonu ilaçlarından gonadotropin, büyüme hormone ve letrozol'ün endometriyum üzerine etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir.

YÜT' te gonadotropinlerin endometriyum üzerine olumsuz etki ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, endometrial hücre büyümesi üzerinde gonadotropin etkisi belirsizdir. 2011 yılında yapılan Chang ve ark.'ının yaptığı bir çalışmada gonadotropinlerin (Gonal-F ve Puregon) insan endometrial hücre proliferasyonuna etkisi in vitro olarak incelenmiştir. İlk 48 saat içerisinde hem Gonal-F (Follitropin  $\alpha$ ) hem de Puregon (Follitropin  $\beta$ ) endometrial hücre

proliferasyonunu inhibe etmekle birlikte, 72 saat sonrasında Gonal-F'in inhibisyon etkisi devam etmiş, Puregon ise ters etki göstermiştir. Bu durumun  $\alpha$  ve  $\beta$  follitropinler arasındaki farklı moleküler yapı nedeni ile olduğu düşünülmektedir (76). Bizim çalışmamızda gonadotropin olarak Gonal-F uyguladığımız insan endometrial epitel hücre hattında hücre proliferasyon inhibisyonu gözlenmemiştir.

Casper ve ark., aromataz inhibitörlerinin endometriyum üzerine etkisini araştırmış, dolaşımda ve periferik hedef dokulardaki östrojen konsantrasyonunun supresyonuna yol açan aromataz inhibitörlerinin endometriyumda östrojen sekresyonunun düzelmesiyle hızlı bir endometrial büyümeye yol açan östrojen reseptörü artışına neden olduğunu göstermişlerdir (63). Buna paralel olarak Mitwally ve ark.'ı aromataz inhibitörlerinin östrojene olan endometrial sensitiviteyi arttırdığını ve östrojen varlığında endometrial epitelyum ve stromada hızlı bir çoğalma, uterus ve endometriyumun kan akımında artış meydana getirdiğini göstermişlerdir (58). Bizim çalışmamızda ovulasyon indüksiyonunda en sık kullanılan aromataz inhibitörü letrozol tercih edilmiştir. Letrozol'ün rutin kullanım dozu esas alınarak yapılan hesaplamalarda elde edilen dozu olan 0,61728  $\mu\text{g}$ 'ın sağlanabilmesi için 2,5mg letrozol 10mL DMSO içerisinde çözdürülmüş ve bu çözelti 1:20 dilüsyon oranı ile hazırlanarak CRL-1671 insan endometrial epitel hücre hattı üzerine uygulanmıştır. Letrozol içeren gruplara ait hücrelerin 8. Günün sonunda (şekil 17) yuvarlak oldukları ve adeziv özelliklerini kayb ettikleri görülmüştür. Bu spesifik özellikler hücrelerin kültür kabından ayrıldıklarını, canlılık özelliklerinde ve çoğalma hızlarında azalma gösterdiklerini belirtmektedir. Toksisitenin çözücü sebebiyetiyle meydana geldiği düşünülerek, letrozol çözeltisinin toksik olmayan dilüsyon oranının belirlenmesi için MTT testi yapılmasına karar verilmiştir.

MTT testi, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kolorimetrik bir testtir. Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak

solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazı, tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondriyal fonksiyon azalır ve sonuç olarak bu ürünü çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır. Bizim çalışmamızda letrozol için elde edilen MTT sonuçlarına bağlı olarak, hücreler üzerinde toksik etki yaratmayacak değerin 10 mL DMSO ile hazırlanmış olan letrozol çözeltisinden 1:100 dilüsyon oranı (0,124 µg) ile elde edilebileceği hesaplanmış ve letrozol içeren gruplar belirlenen doz kapsamında çalışılmasına karar verilmiştir. Çalışmamızda yeni dozlarla letrozol uygulanan gruplarda insan endometrial epitel hücre hattında proliferasyon inhibisyonu gözlenmemiştir.

Hull ve ark.'ı büyüme hormonunun hem uterusu etki ettiği hem de uterusu üretilmesini göstermişlerdir. Ayrıca hem BH hem de BH reseptörleri (BHR)'nin gebe ve gebe olmayan uterusu eksprese edildiği ve BHR'lerin, gebelikte ve menstrual dönemde, farklı şekilde düzenlendiğini bulmuşlardır (102). Sbracia ve ark.'ı, BHR'lerin orta ve geç luteal fazlarda insan endometriyum ve desidua glandüler hücrelerinde (stromal hücrelerde değil) eksprese edildiğini, ancak proliferatif veya erken luteal fazlar sırasında görülmediğini bulmuşlardır (103). Oliveria ve ark.'ının yaptığı çalışmada BH eksikliği olan kadınlar, BH replase edilen kadınlara göre (vücut yüzey alanına göre düzeltilindiğinde), daha küçük uterusu sahip oldukları bulunmuştur (104). Stygar ve ark.'ı uterusu BHR mRNA fazlalığının, östrojenle indüklenen uterus büyümesi ile güçlü korelasyona sahip olduğunu göstermişlerdir (105). Öte yandan Rajesh ve ark.'ının yaptığı çalışmada BH eksikliği olan kadınlara BH uygulaması endometrial kalınlığı arttırmamıştır (107). Bizim çalışmamızda insan endometrial epitel hücre hattına uyguladığımız büyüme hormonu sonrası hücre proliferasyon inhibisyonu gözlenmemiştir.



Semaforinler ilk olarak 1992 yılında Kolodkin ve ark.'ı tarafından tanımlanmıştır (117). Semaforin ailesi, hücre membranına bağlı bulunan ya da hücreden salgılanılan zar proteinlerinin bir sınıfıdır. Rapel ve ark.'ı tarafından bu hücreler arası sinyal proteini ailesinin, aksonal büyüme rehberlik molekülleri olduğu, reseptör kompleksleri aracılığıyla kısa menzilli inhibisyon sinyalleri göndererek aksonlara, onları uygunsuz bölgelerden saptırma ipuçları verdikleri bulunmuş ve semaforinlerin farklı tiplerinin birçok hücresel mekanizmada rol oynadıkları saptanmıştır (116). Pasterkamp ve ark.'ı SEMA'ların aynı zamanda immün yanıt, kemik gelişimi, anjiyogenez ve tümörögenizde görev aldıklarını göstermişlerdir (118). Ayrıca hücre adezyonu ve hücre motilitesi için önemli anahtar düzenleyiciler oldukları bulunmuştur (177). Ancak reproduktif sistemde semaforin fonksiyonu çok az araştırılmış ve rolleri tam olarak belirlenememiştir.

Liang ve ark.'ı sağlıklı bireylere ait uterus dokusunun hem bez epitel hücrelerinde hem de stromal hücrelerinde yüksek oranda SEMA3A pozitif boyanma olduğunu gözlemiştir. Ayrıca gebelik sırasında uterusu ait SEMA3A ifadesinin arttığını göstermişler, bunun da sempatik innervasyonun azalması ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (153).

Marzioni ve ark.'ı semaforin 3A ve PleksinA1'in insan plasentasında ve uterusu bulunduğunu, gebe uterusunda SEMA3A'nın, gebeliğin 16. ve 17. haftasında miyometriyumun düz kas hücreleri tarafından ifade edildiği, birinci ve üçüncü trimester plasentalarında, SEMA3A'nın, sinsityotrofoblastların apikal plazma membranı boyunca lokalize olduğunu, villöz sitotrofoblast veya stromada olmadığını göstermişlerdir (152).

Richeri ve ark.'ları östrojenle hazırlanmış sıçan uterusunda (özellikle kas demetiyle sınırlanan ve intrauterin kan damarlarını çevreleyen bağ dokuda) SEMA3F'nin doku spesifik 5 katlı indüksiyonunu tanımlamışlar (178), Nguyen ve ark.'ı SEMA3B ve SEMA3F'nin sağlıklı uterus dokusunun hem endometriyum hem de miyometriyum alanlarında çok yüksek ifade edildiği ve endometriyum kanserinde ifade seviyesinin azaldığını göstermişlerdir. SEMA3B ve SEMA3F'nin, tümör büyümesinin ve anjiyogenezin güçlü inhibitörleri olarak işlev gördüğünü kanıtlamışlardır (169).

1997 yılında iki ayrı çalışma grubu, normal nöronal gelişme için hayati öneme sahip olan SEMA3A reseptörü olarak NRP1 ve 2'yi tanımlamışlardır (135). 1998'de Soker ve ark.'ı NRP1 ve 2'nin, güçlü bir anjiyojenik faktör olan VEGF'nin yeni bir reseptörü olduğunu açıklamışlardır (137). Semaforin 3 ve VEGF'nin aynı reseptör (NRP) için yarışması, semaforinlerin anjiogenezis ile olan ilişkisini açıklar.

2002 yılında Germeyer ve ark.'ı endometrial biyopsi örneklerinde ve endometrial stromal hücrelerde in vitro olarak SEMAE, NRP1 ve 2'nin proliferatif faz ile karşılaştırıldığında, sekretuar fazda azaldığını tespit etmişlerdir. Bunun aksine, in vitro endometrial stromal hücrelerde, desidualizasyon yapıldıktan sonra üç proteinin de arttığı gösterilmiştir (148). Hess ve ark.'ı inceledikleri toplam 32 endometrial numunede (22 foliküler faz, 10 sekretuar faz) NRP1'in foliküler faz ile kıyaslandığında, sekretuar fazda anlamlı derecede azaldığını göstermiştir ( $p<0.05$ ) (167).

2003 yılında Germeyer ve ark.'ı tarafından 20 adet maymundan farklı menstural fazlarda alınan endometrial örneklerde, NRP1'in endometriyum luminal epitelinde orta-geç proliferatif evrede artmış ekspresyon ve sekretuar faz sırasında azalmış ekspresyon olduğu ayrıca hem arter hem de ven endotelinde tüm siklus sırasında yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (161).

2002 yılında Kao ve ark.'ı insan endometriyumundaki SEMAE ve SEMA3 aile homologlarının ayrıca anjiyojenik faktör olan VEGF'nin implantasyon penceresinde (midsekretuar dönemde) azaldığını (sırasıyla 6 ve 3 kat) bulmuştur (155).

Miao ve ark.'ı NRP1 ve SEMA etkileşiminin endotel hücresi migrasyon inhibisyonuyla sonuçlandığını gösterdiler (160). Bir çalışmada tavuk embriyo endotel hücrelerinde de SEMA3 reseptörlerinin yanlış sentezlenmesi ile, integrinlerin aktif olarak baskılandığı ve anjiogenezin şiddetle bozulduğu bulunmuştur. Serini ve ark.'ı vasküler gelişim ve deneysel anjiyogenez sırasında, endotel hücrelerindeki endojen SEMA3 fonksiyonunun bozulmasının, integrin aracılı adezyonu ve hücre dışı matrilere göçü

uyardığını, eksojen SEMA3 proteinlerinin ise integrin aktivasyonunu antagone ettiğini gösterdiler (179).

Reprodüktif sistemde semaforin ilişkisi çok az araştırılmış olup farklı semaforinlerin etkileri tam olarak açıklanamamıştır. SEMA'ların ve reseptörlerinin reprodüktif sistemde fizyolojik önemi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte; anjiyogenez, epitelyal-stromal iletişim ve embriyonik implantasyonda öncü mekanizmalarını içeren birçok potansiyel fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. Semaforin reseptörleri olan NRP'lerin, VEGF'e bağlanması, anjiyogenezde semaforinin potansiyel bir sinyal rolü olduğunu ima etmektedir. Fizyolojik reprodüktif siklus için ve dahası embriyonik implantasyon için anjiyogenezin gerekli olduğu göz önüne alındığında menstrüel siklus farklı evrelerinde insan endometriumunda semaforin ve reseptörlerinin foliküler ve sekretuar fazda farklı ekspresyonu bu reseptörün; siklus boyunca meydana gelen anjiyogenezin hormonal olarak düzenlenen değişikliklerine katıldığını göstermektedir. Foliküler fazda artmış SEMA ve NRP1 ekspresyonu, VEGF'nin ko-faktörü olarak anjiyogenetik stimülasyonu artırıp, endometriumun düzenlenmesinde rolünü ortaya koymaktadır. Sekretuar fazda azalan SEMA, NRP ve VEGF'nin insan endometriumundaki, implantasyona karşılık gelen midsektuar fazda vazokonstriksiyonun en aza indirgenmesi, embriyoya artmış kan akışı gerektiren bir süreçte anlamlı olabilir, ama VEGF'nin neden azaldığı tam olarak belli değildir. VEGF-NRP etkileşimlerinin, insan endometrium epitel yüzey özelliklerindeki değişikliği ve implantasyonu etkileyebileceğini göstermektedir. Reprodüktif siklusda bu reseptörlerin rollerini daha iyi anlamak; reprodüktif anormallikleri düzeltmek için yeni stratejilere rehberlik edebilir.

Taft ve ark.'ı tarafından SEMA reseptörlerinden pleksinB1 ekspresyonu fare oositinde bulunmuştur (149). Regav ve ark.'ı, pleksinB1'in fare overinde foliküler büyüme ve steroidogenezde rol aldığını saptamıştır (150). Ben-Shlomo ve ark.'ı Pleksin-Semaforin ve VEGF sistem üyelerini fare ovaryumlarında göstererek, ovulasyon döngüsü sırasında düzenlendiklerini bildirmiştir (151).

Serini ve ark.'ı, semaforinlerin; hücreleri ekstraselüler matrikse (ESM) bağlayan hücre yüzeyi reseptörleri olan integrinlerin fonksiyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (179). Barberis ve ark.'ı pleksinlerin, ESM'ye hücre adezyonunu doğrudan etkilediğini ve semaforinler ile plexin aktivasyonunun, integrin kaynaklı fokal adezyonları birkaç dakika içinde çözdüğünü göstermişlerdir (122). Ounima ve ark.'ı semaforinin pleksine bağlanması ile ESM'ye bağlanmaya aracılık eden integrinde bir azalma meydana geldiğini ve integrin aracılığındaki adezyonun inhibe olduğunu göstermişlerdir (129). Kruger ve ark.'ının yaptığı çalışmada semaforin ile bağlanmamış yani aktif pleksinB1'in ESM'ye integrin bağlanmasını ve hücre adezyonunu yönettiği gösterilmiştir (132). Aurandt ve ark.'ı pleksin aktivasyonundan sonra edinilen morfolojik değişikliklerin, aynı mekanizmalarla hücre invazyonu ve metastazda rol oynadığını gösterdiler (126). Dalpe ve ark.'ı semaforinlerin reseptörlüğünü yapan pleksinB1'in anjiogenezis, epitelyal morfogenezis ve epitelyal hücrelerde invaziv büyüme ile ilişkili olduğunu gösterdiler (124).

Amir ve ark.'larının planladıkları in vivo çalışmada endometriyumdaki menstrual siklusun 19-23.günler arasındaki pleksinB1 ekspresyonunun, 12-14.günlere kıyasla ( $1.166 \pm 0.42$ ,  $0.523 \pm 0.299$ ,  $p < 0.005$ ) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Fallop tüpünde PleksinB1 seviyesi menstrüel siklus boyunca belirgin bir şekilde değişmemiştir. Endometrium PleksinB1 ekspresyon seviyesi, implantasyon penceresine karşılık gelen midsekretuar dönemde önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (180).

Endometrial epitelyal hücrelere reseptif özellik kazandıran morfolojik değişikliklere yol açan insan endometrial epitelyal hücre yüzeyindeki moleküler mekanizmalar halen belirsizdir ve reseptif endometriumun moleküler karakteristikleri tam olarak anlaşılamamıştır. Harduf ve ark.'ı 2007 yılında reseptif ve nonreseptif hücre modelleri olarak kullanılan RL95-2 (katalog no: CRL 1671) ve HEC-1A endometrial hücre hatlarındaki pleksinB1'in rolünü keşfetmek üzere tasarladıkları in vitro çalışmada adezyon için iyi bilinen bir model olan insan trofoblast JAR hücre hattının sferoidleri ile insan endometrial epitel hücre hatlarına adezyon deneyi yapmıştır. İnsan endometrial epitel

hücre hattı RL95-2 (%71 sferoid tutunma), diğer tamamen polarize insan endometrial epitel hücre hattı olan HEC-1A (%23 sferoid bağlanma) ile karşılaştırıldığında, JAR sferoidleri için artmış adezyon göstermiştir ve semaforin reseptörü olan PlexinB1 ekspresyonu, HEC-1A ile karşılaştırıldığında, adezyon gücü fazla olan RL95-2 hücre hattında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş, PlexinB1'e karşı inhibisyon antikollarının varlığında RL95-2 hücrelerinin adezyon oranlarının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (158). Bu sonuç PlexinB1'in büyük olasılıkla adezyon özelliklerini artırarak trofoblast-endometriyum epiteli etkileşimine katıldığını göstermektedir.

2002 yılında Kao ve ark.'ı insan endometriyumundaki SEMAE ve SEMA3 aile homologlarının ve anjiyojenik faktör olan VEGF'nin implantasyon penceresinde (midsekretuar dönemde) azaldığını (sırasıyla 6- ve 3 kat) bulmuştur (155).

Semaforinlerin ve plexinlerin anjiyogeneze yakından bağlı oldukları ve foliküler gelişim sırasında VEGF'in ve reseptörlerinin bilinen etkileri ile etkileşime girebilecekleri önerilmiştir. Anjiyojenik sistem ve nöronal rehberlik sistemi olarak tanımlanan semaforinlerin arasındaki etkileşimler, implantasyon penceresi boyunca endometriyumda hücre motilite regülasyonu için potansiyel yeni mekanizmalar önermektedir. SEMA'ların steroid hormonlarla düzenlendiği, anjiyogeneze rolleri olduğu, epitelyal-stromal iletişime katıldığı ve implantasyonda nidasyon sırasında bir rehberlik mekanizmasını içeren birçok potansiyel fonksiyonu olduğu tanımlanmıştır. Nguyen ve ark.'ının yaptıkları invitro bir çalışmada SEMA3B ve SEMA3F ekspresyonunun endometriyum hücre hattı ile kıyaslandığında, endometrial kanser hücre hattında (endometrial kanser HEC-1B ve Ishikawa hücre hatlarında) azaldığını gösterdiler (169). Ayrıca endometriyum kanser hücre hattına eksojen eklenen SEMA3B veya SEMA3F'nin,  $\alpha 5\beta 3$  integrini inhibe ederek SEMA3 sınıfının invazyonunu azalttığı gösterildi. İmplantasyon sırasında en önemli rolü üstlenen adezyon molekül grubu integrinlerden, integrin  $\alpha 5\beta 3$  hücre-matriks tutunması ve motilitesinin ana aracı olarak gösterilmektedir. Dominguez ve ark.'ı hem endometriyum luminal epitel hücrelerin hem de trofoblastik

hücrelerin yüzeyinde  $\alpha 5\beta 3$  integrin ekspresyonu gözleyip, implantasyon aşamasındaki ilk hücre-hücre etkileşiminde görev aldığını gösterdiler (24). Apparao ve ark.'ının yaptığı çalışmada implantasyon penceresinin açılması ile reseptif fazın en önemli biyokimyasal belirteci olan  $\alpha 5\beta 3$  integrin ekspresyon seviyeleri, luminal epitelin apikal yüzeyinde artış göstermiştir (37). Açıklanamayan infertilitenin nedenleri arasında gösterilen  $\alpha 5\beta 3$  integrin ekspresyon düzeylerine bakılarak uygun implantasyon zamanı belirlenip, İVF programının başarı oranlarının artırılabilceği düşünülmektedir. Joohnson ve ark.'larının yaptığı çalışmada  $\alpha 5\beta 3$  integrini, progesteron tarafından ekspresyonu düzenlenen osteopontin adlı ligandına bağlanarak trofoblast hücreleri ve luminal epitel hücreleri arasındaki ilk hücre-hücre etkileşimini başlatır (181). Nguyen ve ark.'ı yaptıkları in vitro çalışmada progesteron veya D vitamini ile endometriyum kanseri hücre hattında SEMA3 ekspresyonunun, hücre proliferasyonunun ve invazyonunun azaldığını ve  $\alpha 5\beta 3$  integrinin arttığını gösterdiler (169).

İn vitro bir çalışmada endometriyum kanser hücre hattına eksojen eklenen SEMA3B veya SEMA3F'nin, matrix metalloproteinazları (MMP-2, MMP-9) inhibe ettiğini, matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP3)'ni arttırdığını böylece SEMA3 sınıfının invazyonu inhibe ettiği gösterildi (169). Yanaihara ve ark.'ı MMP'lerin ESM'nin ve bazal membranların tutulmasında anahtar oyuncu olduğunu göstermiş (170), Giavazzi ve ark.'ı MMP'lerin artmış ekspresyonunu, hücre invazyonu ve metastatik potansiyel ile ilişkili bulmuştur (182). Öte yandan tümör invazyonu ile implantasyon benzer mekanizma ile oluşmaktadır. Staun-Ram ve ark.'ı implantasyonda MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunun artarak MMP'lerin invazyonda görev aldığını (42), Zhang ve ark.'ı implantasyon adezyon bölgesinde endometrial epitel hücrelerin MMP salgıladığını (174), Strowwitzki ve ark.'ı embriyonun endometriyumun bazal membranını yok ederek stromaya geçtiği invazyon aşamasında ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yıkımının MMP'ler tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir (41). Yanaihara ve ark.'ı tarafından endometrial glandüler ve luminal epitelde reseptif faz sırasında MMP eksprese edildiği ve infertil hastalarda MMP'lerin düşük düzeylerde olduğu gösterilmiştir (170). Bruner-

Tran ve ark.'ı endometriozis patogenezinde endometrial hücrelerin pelvik peritona invazyonu MMP'ler tarafından gerçekleştiğini göstermiştir (183). Endometriyozisli kadınlarda implantasyon başarısızlığının moleküler temelini araştıran Kao ve ark.'ı SEMA3 aile homologlarının ve SEMAE düzeyinin, implantasyon penceresindeki insan endometriyumunda azalırken, endometriozisli hastaların endometriyumunda yükseldiğini göstermiştir (156). Endometrial hücrelerin peritoneal invazyonu ve peritoneal lezyonlarda belirgin neovaskülarizasyon görülen endometriyoziste, SEMA'ların artışı bu patogeneizde rolü olduğunu düşündürmektedir.

İmplantasyon süreci, embriyonun; endometriyum epiteline adezyonu ve uterin stromayı invazyon kabiliyetine bağlıdır. Semaforinlerin insan endometriyumunda implantasyon penceresi boyunca azalması, adezyon ve invazyon inhibisyonunun ortadan kaldırılması, endometrial glandüler dallanma ve/veya maksimum vasküler gelişimin durdurulmasını ve daha ileri vaskülogenezin durdurulmasını yansıtabilir.

Sonuç olarak; implantasyon için gerekli olan anjiyogenez, adezyon ve invazyon mekanizmaları düşünüldüğünde SEMA'ların infertilite patogenezinde rol aldığını gösteren pek çok araştırma bulunmaktadır. Endometriyum hücrelerinde SEMA azalmasını sağlayan ilaçların, implantasyona dayalı infertilitede yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla bizim çalışmamızda ovulasyon indüksiyonunda kullanılan letrozol (L), gonadotropin (Gn) ve büyüme hormone (BH) ilaçlarının endometriyumda salgılanan sınıf 3 semaforinleri değiştirip değiştirmediği in vitro koşullarda araştırılmıştır. Pek çok çalışmada ilaçlar ardışık olarak kullanılmasına rağmen bizim çalışmamızda ilaçlar hem tekli etki hem de kombine etki görülecek şekilde hücre kültürüne uygulanmıştır. İlaç kombinasyonları klinik uygulamalara uygun protokoller doğrultusunda belirlenmiştir. İlaçlar belirtilen sıklıkta ve dozda 8 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışmamızda CRL-1671 endometriyum hücre hattında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BH ve BH'nin bulunduğu gruplar olan BH+Gn ve BH+Gn+L gruplarında SEMA3A, 3F ve 3E'deki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.001$ ). BH ile BH+Gn grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

BH+Gn grubu BH+Gn+L grubu ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu da letrozol ve gonadotropinlerin incelenen semaforinlerin ekspresyonlarına katkı sağlamadığını göstermektedir. Ayrıca büyüme hormonuna letrozol eklemenin bu noktada bir üstünlüğü olmadığı da gösterilmiştir. Gonadotropinlerle letrozol yerine büyüme hormonu tercih etmenin bu noktada daha üstün olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak endometriyum hücre hattında BH'nin SEMA3A, SEMA3E ve SEMA3F üzerindeki azaltıcı etkisi net olarak gösterilmiştir. İmplantasyonda azaldığı gösterilen semaforinlerin BH ile azalması, in vitro olarak BH'nin endometrial epitel hücrelerinde reseptif özelliğini destekleyici ve implantasyonu arttırabileceğini desteklemektedir. Literatürde BH'nin implantasyonu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcut olup mekanizması içerisinde semaforinlerdeki artışında etkisinin olduğu vurgulanması gerekmektedir.

Kyrou ve ark.'ının ovulasyon indüksiyonunda zayıf over yanıt verenlerde en iyi tedavi biçimini değerlendirmek için yaptığı güncel bir meta-analizde; ZOY'li hastalar için önerilen protokol alternatifleri içinde sadece adjuvan BH tedavisi İVF başarı oranını belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir (100). Duffy ve ark.'nın toplam 10 çalışmadan 440 infertil çift olarak oluşturdukları analizde zayıf KOH cevablı hastaların tedavisine BH eklenmesinin KOH cevabını veya oosit sayısını arttırmasa da, gebelik ve canlı doğum oranlarını arttırdığını göstermişlerdir (101). Fukaya ve ark.'ı embriyoda BH varlığında, in vivo implantasyonun daha yüksek olduğunu göstermiştir (108). Zaczek ve ark.'ı BH'nin, farelerde uterus büyümesini uyararak implantasyonu kolaylaştırdığını kanıtlamışlardır (106). Pozzobon ve ark.'ı sığırdaki (110) ve Drakakis ve ark.'ı farede (111) BH'nin blastokistlerin implantasyon öncesi çıkması gereken zona pellucidanın matriksten MMP üretimini arttırarak soyulma oranını arttırdığını göstermişlerdir. Thompson ve ark.'ı MMP'lerin BH'ye yanıt olarak üretildiğini göstermişlerdir (112). Lacroix ve ark.'ı plasental BH'nin (ve daha az oranda hipofiz BH'nin) trofoblastların invaziv aktivitesini uyardığını ve BHR ekspresyonunun, invazivlik derecesi ile korele olduğunu göstermişlerdir (114). Günümüzde İVF uygulanan hastalarda adjuvan BH kullanımının daha yüksek doğum oranları ile sonuçlandığına dair yeteri kadar kanıt olmasına rağmen



eldeki sonuçların toplamda çok az hastayı içermesinden ve çalışmaların gücünün yetersizliğinden YÜT'te BH kullanımı tartışma konusudur. BH'nin İVF tedavisi üzerindeki etkisini daha açıkça tespit edebilen daha büyük çapta RKÇ'ye ihtiyaç vardır. Literatürde semaforinlerin anjiyogenezi etkileyerek endometriyumun neovaskülarizasyonuna katıldığı, integrin inaktivasyonu ile adezyonu inhibe ettiği, MMP'lere etki ederek invazyonu inhibe ettiği ve implantasyon penceresinde azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamızdaki sonuç olan BH'nin SEMA3'ler üzerine negatif etkisi; BH'nin implantasyonu arttırdığını gösteren literatür bilgisi göz önüne alınarak literatürde etkileşimleri gösterilen integrinler, MMP'ler ve anjiyojenik faktörler üzerinden oluşabileceği düşüncesindeyiz.

Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, insan endometrial hücre hattında büyüme hormonu, letrozol ve gonadotropin ilaçlarının semaforin cevabını gösteren ilk rapordur. Burada tanımlanan bilgiler implantasyona dayalı infertilitesi olan kadınlarda kullanılacak ovulasyon indüksiyonu ilaç kombinasyonları seçiminde tercih üstünlüğü sağlayabilir. Ancak literatürde bu konuyla ilgili yapılmış çalışma sayısı yeteri kadar olmadığı için daha fazla in vivo, hayvan ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Yeni çalışmalarla desteklendiği takdirde böyle bir yaklaşım, endometriyum bozukluklarında, değişikliklerin daha fazla araştırılması için bir aşama oluşturabilir; örneğin implantasyona dayalı infertilite, hiperandrojenik bozuklukları olan kadınlarda endometriyumun değerlendirilmesi, normovulatuar kadınlarda endometriyumun hedeflendiği (veya diğer terapilerin bir yan etkisi olarak) terapötiklere yanıtın değerlendirilmesi, endometrial hiperplazi ve endometrial kanserler gibi. Son olarak, bu çalışma infertilitesi olan kadınlarda reproduktif anormallikleri düzeltmek için yeni stratejilere rehberlik edebilir ve infertilite tedavisi (veya kontrasepsiyon) için implantasyonun artırılması (veya inhibe edilmesi) hedefli ilaç keşfi ve mevcut ilaçların geliştirilmesine ışık tutabilir.

## VI. SONUÇ

Büyüme hormonunun insan endometriyum epitelyal hücre hattındaki semaforin 3A, 3E ve 3F'yi azalttığı gösterilmiştir. Letrozol ve gonadotropinlerin bu etkiye katkı sağlamadığı gösterilmiştir. Ayrıca büyüme hormona letrozol eklemenin bu noktada bir üstünlüğü olmadığı ve gonadotropinlerle letrozol yerine büyüme hormonu tercih etmenin bu noktada daha üstün olduğu gösterilmiştir. İmplantasyonda azaldığı gösterilen semaforinlerin BH ile azalması, BH'nin implantasyonu arttırdığını desteklemektedir. Öte yandan bu sonuç yeni çalışmalarla desteklendiği takdirde, implantasyona dayalı infertilitesi olan kadınlarda ovulasyon indüksiyonu amaçlı kullanılan ilaç kombinasyonu seçiminde tercih üstünlüğü sağlayabilir, ilaç geliştirme ve ilaç keşfi amaçlı araştırmalara ışık tutabilir.

## VII. ÖZET

### FARKLI KOH TEDAVİ PROTOKOLLERİNE ENDOMETRİAL SEMAFORİNLERİN CEVABI: İN VİTRO ÇALIŞMA

**AMAÇ:** Semaforinler aksonal rehberlik molekülü olarak tanımlanmış daha sonra nöronal olmayan dokularda da bulunmuştur. Semaforin ailesinin anjiyogenez, adezyon ve invazyondaki rolleri ile epitelyal-stromal iletişim ve implantasyon sırasında bir rehberlik mekanizmasını içeren birçok potansiyel fonksiyonları mevcuttur. İmplantasyon sırasında adezyon, invazyon ve anjiyogenez major fizyolojik değişiklik olup, implantasyon penceresinde semaforin 3 aile homologlarının azaldığı gösterilmiştir. Endometriyum hücrelerinde SEMA azalmasının, implantasyona dayalı infertilitede yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla çalışmamızda ovulasyon indüksiyonunda kullanılan letrozol (L), gonadotropin (Gn) ve büyüme hormonu (BH) ilaçlarının endometriyumda salgılanan sınıf 3 semaforinleri değiştirip değiştirmedeği in vitro koşullarda araştırılmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** CRL-1671 insan endometrial epitel hücre hattı kullanarak *in vitro* ilaç etkilerine bakılmıştır. Kontrol grubu 1.Grup olmak üzere toplam 6 grup oluşturulmuştur. 2.Grup BH, 3.Grup Gn, 4.Grup BH+Gn, 5.Grup L+Gn, 6.Grup L+Gn+BH'dir. İlaç kombinasyonları klinik uygulamalara uygun protokoller doğrultusunda BH 1., 4. ve 8. günlerde, L ilk 5 gün, Gn 8 gün boyunca (L ile uygulandığında doz 1/3 azaltılıp 3. günden itibaren) uygulanmıştır. İlaç uygulama sonrası immunohistokimya ve immunofloresan boyama yapılmış ve örnekler 200x büyütmede değerlendirilmiştir. Her bir preparat için rastgele seçilmiş 5 alanda her 100 hücre içinde pozitif boyanan hücreler boyanma şiddetleri (i); hafif (1)(+), orta (2)(++) ve şiddetli (3)(+++). Olacak şekilde sayılarak HSCORE değerleri belirlenmiştir [HSCORE:  $\sum P_i (i+1)$  (Pi: % pozitif boyanmış hücre sayısı; i: boyanma şiddeti)]. Sonuçlar One-way

ANOVA istatistiksel testi ile değerlendirilmiş, istatistiksel olarak p değeri 0.05'ten küçük elde edilen karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

**BULGULAR:** Çalışmamızda CRL-1671 insan endometrial epitel hücre hattında, hiç ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BH ve BH'nin bulunduğu gruplar olan BH+Gn ve BH+Gn+L gruplarında SEMA 3A, 3F ve 3E'deki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001$ ). BH ile BH+Gn grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). BH+Gn grubu BH+Gn+L grubu ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

**SONUÇ:** Büyüme hormonunun insan endometrial epitel hücre hattındaki semaforin 3A, 3E ve 3F'yi azalttığı gösterilmiştir. Letrozol ve gonadotropinlerin bu etkiye katkı sağlamadığı gösterilmiştir. Ayrıca büyüme hormona letrozol eklemenin bu noktada bir üstünlüğü olmadığı ve gonadotropinlerle letrozol yerine büyüme hormonu tercih etmenin bu noktada daha üstün olduğu gösterilmiştir. İmplantasyonda azaldığı gösterilen semaforinlerin BH ile azalması, BH'nin implantasyonu arttırdığını desteklemektedir. Öte yandan bu sonuç yeni çalışmalarla desteklendiği takdirde, implantasyona dayalı infertilitesi olan kadınlarda ovulasyon indüksiyonu amaçlı kullanılan ilaç kombinasyonu seçiminde tercih üstünlüğü sağlayabilir, ilaç geliştirme ve ilaç keşfi amaçlı araştırmalara ışık tutabilir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** letrozol, büyüme hormonu, gonadotropin, endometriyum, semaforin.

## VIII. ABSTRACT

### RESPONSE OF ENDOMETRIAL SEMAPHORINS IN DIFFERENT COH TREATMENT PROTOCOLS: IN VITRO STUDY

**OBJECTIVE:** Semaphorins have been identified as axonal guidance molecules and later found in non-neuronal tissues. The semaphorin family has many potential functions including angiogenesis, adhesion and invasive roles, and a guidance mechanism during epithelial-stromal communication and implantation. Adhesion, invasion and angiogenesis during implantation are major physiological changes, and semaphorin 3 family homologs have been shown to decrease in the implantation window. It is thought that SEMA reduction in endometrial cells may be beneficial in implantation-based infertility. For this purpose, we investigated in vitro conditions that letrozole (L), gonadotropin (Gn) and growth hormone (GH) drugs used in ovulation induction in our study altered class 3 semaphorins secreted in the endometrium.

**MATERIALS AND METHODS:** In vitro drug efficacy was determined using the CRL-1671 human endometrial epithel cell line. A total of 6 groups were formed, the control group being the first group. Group 2 GH, Group 3 Gn, Group 4 GH + Gn, Group 5 L + Gn, Group 6 L + Gn + GH. Drug combinations were applied to the clinical applications in accordance with appropriate protocols on days 1, 4 and 8 on GH, 5 days on L, 8 days on Gn (reduced by 1/3 when applied with L and on day 3). Immunohistochemistry and immunofluorescence staining were performed and the samples were evaluated at 200x magnification. Staining intensity (i) of positive stained cells in every 100 cells in 5 randomly selected 5 sites for each preparation; HSCORE values were determined as being mild (1) (+), moderate (2) (++) , and severe (3) (+++), [HSCORE:  $\sum P_i (i + 1)$  ( $P_i$ :% of cells stained positive; i: staining intensity)]. The results were

evaluated by One-way ANOVA statistical test. Statistically, p values less than 0.05 were considered statistically significant (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**RESULTS:** The decrease in SEMA 3A, 3F and 3E in the GH and GH groups (GH + Gn and GH + Gn + L groups), in the CRL-1671 human endometrial epithel cell line was statistically significant when compared to the control group ( $p < 0.001$ ). When the group GH is compared with the group GH + Gn groups, no statistically significant difference was found ( $p > 0.05$ ). When the group GH + Gn is compared with the group GH + Gn + L; there was no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Growth hormone has been shown to reduce semaphorin 3A, 3E and 3F in the human endometrial epithel cell line. Letrozole and gonadotropins have been shown to not contribute to this effect. It has also been shown that the growth hormone letrozole joint has no superiority at this point and that it is better to choose growth hormone instead of letrozole with gonadotropins. Reduction of the indicated semaphorins by implantation supports GH's implantation. On the other hand, if this result is supported by new studies, women with implantation-based infertility can provide preference in the selection of drug combinations used for ovulation induction, and can shed light on research for drug development and drug discovery.

**KEYWORDS:** letrozole, growth hormone, gonadotropin, endometrium, semaphorin.

## X. KAYNAKLAR

1. [http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020\\_Exam\\_Reviews/Exam\\_5/27-14a\\_Uterus\\_1.jpg](http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/27-14a_Uterus_1.jpg), Erişim Tarihi:11.04.2017.
2. Barberini F, Makabe S, Franchitto G, et al. Ultrastructural dynamics of the human endometrium from 14 to 22 weeks of gestation. *Arch Histol Cytol.* 2007; 70:21-28.
3. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, et al. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 2006; 27:17-46.
4. <http://classes.midlandstech.edu>, Erişim Tarihi: 13.04.2017.
5. Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text And Atlas.* 6 .Basım. Çeviri Editörü: Barış Baykal Ankara: Palme Yayıncılık, 2014:848-849.
6. Horne FM, Blithe DL. Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Hum Reprod Update.* 2007; 13:567-580.
7. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update.*2000; 6:28-36.
8. Hassa H. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Basım Evi, 2003.
9. Horne AW, White JO, Lalani EN. The endometrium and embryo implantation. *Br Med J.* 2000; 321:1301-1302.
10. [https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/images/Menstrual%20 &%20ovarian%20cycles.jpg](https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/images/Menstrual%20&%20ovarian%20cycles.jpg), Erişim Tarihi: 17.04.2017.
11. Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, ve ark. Kadın hastalıkları ve doğum bilgisi üreme fizyolojisi. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004.
12. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve hücre biyolojisi.* Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
13. Hall G, Phillips TJ. Östrojen ve deri: Östrojen, menopoz ve hormon replasman tedavisinin deri üzerine etkileri. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 3(1):1-14
14. Reinhard H, Stoll CF. *Kinderwunschzentrum Berlin.* <http://www.kinderwunschzentrum.de/tr/ursachen.shtml>, Erişim Tarihi: 25.04.2017.
15. Sadler TW. *Langman medikal embriyoloji.* Başaklar AC. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005.
16. <http://www.austincc.edu.tr>,Erişim Tarihi: 15.04.2017.
17. Selam B, Kayışlı ÜA, Mülayim N, ve ark. Regulation of fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol of Reprod.* 2001; 65: 979-985.
18. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji.* Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006.
19. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesionsorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 2006; 20: 3199-3214

20. Elder K, Dale B. *İn-vitro Fertilizasyon Çeviri Editörü: Prof. Dr. Tülay İrez*. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2014.
21. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, et al. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Upd.* 2007; 13:365-377.
22. Reproduction and development. Lecture Outline Chapter (26). <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430200/024reproduction.htm>, Erişim Tarihi: 28.04.2017
23. Chavez DJ. Cellular aspects of implantation. in van Blerkam. The Hague: Motta PJ *Ultrastructure of Reproduction*, 1984;247–259.
24. Dominguez F, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, et al. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players?. *FASEB J.* 2005; 19:1056-1060.
25. <http://humupd.oxfordjournals.org>, Erişim Tarihi: 15.04.2017.
26. Van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol.* 2009; 85:4-19.
27. Makrigiannakis A. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 102-109.
28. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:151–161.
29. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update.* 2009; 15:229-236.
30. Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. et al. Synchronous expression of pinopodes and alpha 5 beta 3 and alpha 4 beta1 integrins in the endometrium surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *J Rep Med.* 2003; 48(5):355-361.
31. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, et al. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod.* 2001; 64:590–601.
32. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, et al. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update.* 2008; 14:335-344.
33. Bayçu C, Özatik O, Gürer F, et al. Endometriyum reseptivitesi tuba epitelinin oosit ve embriyo ile otokrin ve parakrin ilişkisine mi bağlıdır?. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi.* 2009; 10(1):133-139.
34. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1999; 14:1328-1331.
35. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* 1997;2:84-93.
36. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25:341-373.
37. Apparao KBC, Murray MJ, Fritz MA, et al. Osteopontin and its receptor  $\alpha\beta 3$  integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:4991-5000.



38. Paria BC, Zhao X, Das SK, et al. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol.* 1999; 208:488-501.
39. Maccalman CD, Furth EE, Omigbodun A, et al. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: A role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions?. *Dev Dyn.* 1996; 206:201-211.
40. Nadano D, Nakayama J, Matsuzawa S, et al. Human tasin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. *Biochem J.* 2002; 364:669-677
41. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, et al. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:617-630.
42. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, et al. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2:59.
43. Meisser A, Cameo P, Islami D, et al. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5:1055-1058.
44. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14:2123-2133.
45. Moore LK, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
46. Dey SK Implantation. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive endocrinology, surgery and technology.* New York: Lippincott-Raven; 1996:421-434.
47. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, et al. Localization of transforming growth factor- $\beta$  at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod.* 1992; 46:561-572.
48. Fowler DJ, Nicolaides KH, Miell JP. Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 2000; 6:495-504.
49. Dimitriadis E, Salamonsen LA, Robb L. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:907-914.
50. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, et al. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 2005; 11:613-630.
51. Akyürek N, Çelik C, Haberal A. Ovulasyon Fizyolojisi ve Ovulasyon indüksiyonu, 2. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2006.
52. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Yöntemleri. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2008.
53. Bayar U, Tanriverdi HA, Barut A ve ark. Letrozole vs. clomiphene citrate in patients with ovulatory infertility. *Fertil Steril.* 2006; 85:1045-8.
54. Holzer H, Casper R, Tulandi T. A new era in ovulation induction. *Fertil Steril.* 2006; 85:277-284.
55. Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2001; 75: 305-309.

56. Pabuçcu R. IVF Embriyoloji Rehberi. Üreme Endokronoloji, İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri Derneği. 2005.
57. Cortinez A, De Carvalho I, Vantman D, et al. Hormonal profile and morphology in letrozole-controlled ovarian hyperstimulation in ovulatory infertile patients. *Fertil Steril* 2005; 83:110-115.
58. Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibitors in ovulation induction. *Semin in Reprod Med*. 2004; 22:61-78.
59. Casper RF, Mitwally MF. Use of the Aromatase Inhibitor Letrozole for Ovulation Induction in Women With Polycystic Ovarian Syndrome. *Clinical Obstetrics And Gynecology* 2011; 54/4 685–695.
60. Bayer SR, Alper MM, Penzias AS. İnfertilite El Kitabı. Işık AZ, Vicdan K (Çev). 2. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008.
61. Mitwally MF, Biljan MM, Casper RF. Pregnancy outcome after the use of an aromatase inhibitor for ovarian stimulation. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:381-6.
62. Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fertil Steril* 2002; 77:776-80.
63. Casper RF, Mitwally MF. Aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 760-71.
64. Gemzell CA, Human pituitary follicle stimulating hormone. *Ciba Foundation Collaquir on Endocrinology* 1960; 13:191.
65. Macklon NS, Fauser BCJM. Progress in ovarian stimulation. *Ann. d'Endocrinol* 1999; 60:137-142.
66. Lewis V. Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. Gürsoy RH, Delilbaşı L (Çev). 1. Baskı. İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık, 2009.
67. Loumaye E, Campbell R, Salat-Boroux J. Human follicle-stimulating hormone produced by recombinant DNA technology: a review for clinicians. *Hum reprod* 1995; 188-199.
68. Çolgar U. Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. 1. Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006.
69. Van Santbrink EJP, Fauser BCJM. Urinary Follicle Stimulating Hormone for Normogonadotropic Clomiphene-Resistant Anovulatory Infertility: Prospective, Randomized Comparison between Low Dose Step-Up and Step-Down Dose Regimens. *Clin Endocrinol Metab* 1997; 8.2:3597-3601.
70. Fauser BCJM, Mannaerts BMJL, Devroey P, et al. Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Human Reproduction Update* 2009; 15:3,309-321.
71. Ben-Rafael Z, Levy T, Schoemaker J. Pharmacokinetics of follicle-stimulating hormone: clinical significance. *Fertil Steril* 1998; 69:40-49.
72. Ventura SJ, Hamilton BE, Sutton PD. Revised birth and fertility rates for the United States, 2000 and 2001. *Natl. Vital Stat. Rep.* 2003; 51:1-18.
73. Boime I, Ben-Menahem D, and Olijve W. Studies of recombinant gonadotropins: intersection of basic science and therapeutics. In : Fauser P.CJM, Rutherford AJ, Strauss IÜ JF et all. *Molecular Biology in Reproductive medicine*. London: Parthenon Publis., 1999: 147-164.

74. Van Wely M, Bayram N, van der Veen F. Recombinant FSH in alternative doses or versus urinary gonadotrophins for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome: a systematic review based on a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2003; 1143-1149.
75. Daya S, Gunby J. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2003:4.
76. Chang CC, Hsieh YY, Hsu KH. Effects of gonadotropins (Gonal-F and Puregon) on human endometrial cell proliferation in vitro. *Obstet Gynecol.* 2011;50(1): 42-7.
77. Hsu CJ, Hammond JM. Concomitant effects of growth hormone on secretion of insulin-like growth factor I and progesterone by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1987; 121(4):1343-8.
78. Giudice LC. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev.* 1992; 13(4):641-69
79. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 1985; 6: 400-420.
80. Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biology of Reproduction* 1996; 55:152-160.
81. Mason HD, Martikainen H, Beard RW, et al. Direct gonadotrophic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cell in vitro. *Journal of Endocrinology* 1990; 126: R1-R2.
82. Hull KL, Harvey S. Growth hormone: roles in female reproduction. *J Endocrinol.* 2001; 168(1):1-23.
83. Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, et al. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod.* 1999; 14(3):628-35.
84. Krysiak R, Gdula-Dymek A, Bednarska-Czerwińska A, et al. Growth hormone therapy in children and adults. *Pharmacol Rep* 2007; 59:500-16.
85. N. E. Kokshoorn, N. R. Biermasz, F. Roelfsema, et al. GH replacement therapy in elderly GH-deficient patients: a systematic review. *European Journal of Endocrinology* 2011; 164(5): 657- 665.
86. De Boer JAM, Schoemaker J, and Van Der Veen E. A.. "Impaired reproductive function in women treated for growth hormone deficiency during childhood. *Clinical Endocrinology* 1997; 46(6): 681-689.
87. Giampietro A, Milardi D, Bianchi A, et al. The effect of treatment with growth hormone on fertility outcome in eugonadal women with growth hormone deficiency: report of four cases and review of the literature. *Fertility and Sterility* 2009; 91(3):,930.e7-930.II.
88. De Boer JA, Schoemaker J, van der Veen EA. Impaired reproductive function in women treated for growth hormone deficiency during childhood. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997; 46(6):681-9.

89. Owen EJ, Shoham Z, Mason BA, et al. Cotreatment with growth hormone, after pituitary suppression, for ovarian stimulation in in vitro fertilization: a randomized, double-blind, placebo-control trial. *Fertil Steril* 1991; 56(6):1104-10.
90. De Ziegler D, Streuli I, Meldrum DR, and Chapron C. The value of growth hormone supplements in ART for poor ovarian responders. *Fertility and Sterility* 2011; 96(5): 1069-1076.
91. E. M. Kolibianakis, C. A. Venetis, K. Diedrich, et al. Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: a systematic review and metaanalysis. *Human Reproduction Update* 2009; 15(6): 613-622.
92. Younis JS, Simon A, Koren R, et al. The effect of growth hormone supplementation on in vitro fertilization outcome: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Fertil Steril* 1992; 58(3):575-80.
93. Harper K, Proctor M, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 3:CD000099.
94. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, et al. "ESHRE consensus on the definition of "poor response" to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction* 2011; 26( 7): 1616-1624.
95. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Hum Reprod.* 2005; 20(9):2536-41.
96. Kucuk T, Kozinoglu H, Kaba A. Growth hormone co-treatment within a GnRH agonist long protocol in patients with poor ovarian response: a prospective, randomized, clinical trial. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25(4):123-7.
97. Hazout A, Junca A, Ménéz Y, et al. Effect of growth hormone on oocyte competence in patients with multiple IVF failures. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 664-670.
98. Lattes K, Brassesco M, Gomez M, et al. Low-dose growth hormone supplementation increases clinical pregnancy rate in poor responders undergoing in vitro fertilisation. *Gynecol Endocrinol* 2015; 21: 1-4.
99. Yovich JL, Stanger JD. Growth hormone supplementation improves implantation and pregnancy productivity rates for poor-prognosis patients undertaking IVF. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(1):37-49.
100. Kyrrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, et al. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility* 2009; 91(3):749-766.
101. Duffy JM, Ahmad G, Mohiyiddeen L, et al. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 20;(1):CD000099.
102. K. L. Hull, S. Harvey. "Growth hormone: roles in female reproduction. *Journal of Endocrinology* 2001; 168(1): 1-23.
103. Sbracia M, Scarpellini T., Poverini F, et al. Immunohistochemical localization of the growth hormone in human endometrium and decidua. *American Journal of Reproductive Immunology* 2004; 51(2):112-116.

104. Oliveira CRP., Salvatori R, Nbreaga LMA, et al. Sizes of abdominal organs in adults with severe short stature due to severe, untreated, congenital GH deficiency caused by a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *Clinical Endocrinology* 2008; 69(1):153-158.
105. Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, et al. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1(40).
106. Zaczek D., Hammond J., Suen L, et al. "Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Bio. of Rep.* 2002; 67(4):1115-1124.
107. Rajesh H, Yong YY, Zhu M, Chia D, et al. Growth hormone deficiency and supplementation at in-vitro fertilization. *Singapore Medical Journal* 2007; 48(6):514-518.
108. Fukaya T, Yamanaka T, Terada Y, et al. Growth hormone improves mouse embryo development in vitro, and the effect is neutralized by growth hormone receptor antibody.' *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1998; 184(2): 113-122.
109. Montag M, Koli B, Holmes P, et al. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biology of Reproduction* 2000; 62(6):1738-1744.
110. Pozzobon SE, Lagares MA, Brum DS, et al. Addition of recombinant human growth hormone to in vitro maturation medium of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 2005; 40(1):19-22.
111. Drakakis P, Loutradis D, Milingos S et al. A preliminary study of the effect of growth hormone on mouse preimplantation embryo development in vitro. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 1995; 40(4):222-226.
112. Thompson BJL, Shang CA, Waters MJ. Identification of genes induced by growth hormone in rat liver using cDNA arrays. *Endocrinology* 2000; 141(11):4321-4324.
113. Markham KE, Kaye PL. Growth hormone, insulin-like growth factor I and cell proliferation in the mouse blastocyst. *Reproduction* 2003; 125(3):327-336.
114. Lacroix MC, Guibourdenche J, Fournier T, et al. Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* 2005; 146(5):2434-2444.
115. Kong Y, Janssen BJ, Malinauskas T, et al. Structural Basis for Plexin Activation and Regulation. *Neuron* 2016; 91(8):1-13.
116. Raper JA. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* 2000; 10: 88-94.
117. Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, et al. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 1992; 9: 831-845.
118. Pasterkamp RJ, Anderson PN, Verhaagen J. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci* 2001; 13(3):457-71.

119. Semaphorin Nomenclature Committee. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. 1999; 97(5):5512.
120. De Wit J, Verhaagen J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol* 2003; 71 (2-3):249-267.
121. Artigiani S, Barberis D, Fazzari P, et al. Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:10094-10101
122. Barberis D, Artigiani S, Casazza S, et al. Plexin signaling hampers integrin-based adhesion, leading to Rho-kinase independent cell rounding, and inhibiting lamellipodia extension and cell motility. *FASEB J* 2004;18:592-4.
123. Conrotto P, Valdembrì D, Corso S, et al. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment. *Blood* 2005;105:4321-9.
124. Dalpe G, Zhang LW, Zheng H, et al. Conversion of cell movement responses to semaphorin-1 and plexin-1 from attraction to repulsion by lowered levels of specific RAC GTPases in *C.elegans*. *Development* 2004;131:2073-88.
125. Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4):289-300.
126. Aurandt J, Li W, Guan KL. Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of plexin-B1. *Biochem J* 2006; 394:459-64.
127. Halloran MC, Wolman MA. Repulsion or adhesion: receptors make the call. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006; 18:533-540.
128. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer 2000;100; 57-70.
129. Oinuma I, Ishikawa Y, Katoh H, et al. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 2004; 305:862-865.
130. Negishi M, Oinuma I, Katoh H. R-ras as a key player for signaling pathway of plexins. *Mol. Neurobiol* 2005; 32:217-222.
131. Barberis D, Casazza A, Sordella R, et al. Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling. *J Cell Sci* 2005; 118:4689-700.
132. Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:789-800.
133. Ito Y, Oinuma I, Katoh H, et al. Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3 $\beta$  through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep* 2006; 7:704-9.
134. Takagi S, Tsuji T, Amagai T, et al. Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol.* 1987; 122: 90-100.
135. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. 1997; 90: 739-751.
136. Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. 1997; 90: 753–762.
137. Soker S. Neuropilin in the midst of cell migration and retraction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2001; 33:433-437.

138. Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. 1998; 92:735–745.
139. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, et al. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* 2000; 275:18040-18045.
140. Rossignol M, Gagnon ML, Klagsbrun M. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 2000; 70: 211-222.
141. Cackowski FC, Xu L, Hu B, et al. Identification of two novel alternatively spliced neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 2004; 84:82-94.
142. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, et al. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995; 121:4309-4318.
143. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad* 2002; 99:3657-3662.
144. Sharma A, Verhaagen J, Harvey AR. Receptor complexes for each of the Class3Semaphorins. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2012; 6:28.
145. Cohen S, Funkelstein L, Livet J, et al. A semaphorin code defines subpopulations of spinal motor neurons during mouse development. *The European Journal of Neuroscience* 2005; 21(7):1767-76.
146. Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2014; 8:328.
147. Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, et al. Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2009; 15:6763-70.
148. Ariane G, Suzana T, Nihar R et al. Semaphorin E and its receptors neuropilin 1 & 2 in human endometrium. *Stanford Univ Medical Ctr* 2002; 78 (3):1.
149. Taft R, Denegre JM, Pendola FL, et al. Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap. *Biol Reprod* 2002; 67:953-60.
150. Regev A, Goldman S, Shalev E. Expression of plexin-B1 in the Mouse ovary and its possible role in follicular development. *Fertil Steril* 2005; 84:1210-19.
151. Ben-Shlomo I. Sharing of unrelated receptors and ligands by cognate partners: possible implications for ovarian and endometrial physiology. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(2):259-69.
152. Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, et al. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn* 2004; 23.

153. Liang Y, Wang W, Huang J, et al. Potential Role of Semaphorin 3A and Its Receptors in Regulating Aberrant Sympathetic Innervation in Peritoneal and Deep Infiltrating Endometriosis. *Plosone* 2015; 10(12):e0146027
154. Spriggs MK. Shared resources between the neural and immune systems: semaphorins join the ranks. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:387-391.
155. Kao LC, Tulac S, Lobo S, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002; 143:2119-2138.
156. Kao LC, Germeyer A, Tulac S et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 143:2119-2138.
157. Heneweer C, Holger G, Lars A, et al. Human uterine epithelial RL95-2 cells reorganize their cytoplasmic architecture with respect to Rho protein and F-actin in response to trophoblast binding. *Cells Tissues Organs* 2003; 175:1-8.
158. Harduf H, Goldman S, Shalev E. Human uterine epithelial RL95- 2 and HEC-1A cell-line adhesiveness: the role of plexin B1. *Fertil Steril* 2007; 87: 1419-1427.
159. Michal A, Shabtai R, Shlomit G, et al. Plexin-B1, glycodelin and MMP7 expression in the human fallopian tube and in the endometrium.
160. Miao HQ, Soker S, Feiner L, et al. Neuropilin-1 mediates collapsing-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol* 1999; 146:233-241.
161. Ariane G, Robert MB, Lee C, et al. Cell type-specific expression and regulation of neuropilin-1 and -2 in the rhesus macaque endometrium suggests roles for VEGF-Neuropilin in endometrial remodeling during the menstrual cycle in primates. *Fertility & Sterility* 2003; 80(3): 20-53.
162. Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update* 1998; 4:509-519.
163. Pavelock K, Braas K, Ouafik L, et al. Differential expression and regulation of the vascular endothelial growth factor receptors neuropilin 1 and neuropilin-2 in rat uterus. *Endocrinology* 2001;142:613-622.
164. Ariane G, Amy EH, Lisa SL, et al. Cellular Expression and Hormonal Regulation of Neuropilin-1 and -2 Messenger Ribonucleic Acid in the Human and Rhesus Macaque Endometrium.
165. Albrecht ED, Pepe GJ. Steroid hormone regulation of angiogenesis in the primate endometrium. *Front Biosci* 2003;8:416-429.
166. Hastings JM, Licence DR, Burton GJ, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology* 2003;144:326-334.
167. Alexandra PH, Isabelle H, Jens H, et al. Differential expression of neuropilin-1, a novel receptor for vascular endothelial growth factor, in cycling human endometrium. *Fertility and Sterility* 2002;78(1): 221-321.



168. Lessey BA. Uterine factors in implantation. In: Glasser SR, et al. eds. *The endometrium*, 1st ed. New York: T&F Group, 2002:208-228.
169. Nguyen H, Ivanova VS, Kavandi L, et al. Progesterone and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibit endometrial cancer cell growth by upregulating semaphorin 3B and semaphorin 3F. *Mol Cancer Res*. 2011;9(11):1479-92.
170. Yanaihara A, Otsuka Y, Iwasaki S, et al. Comparison in gene expression of secretory human endometrium using laser microdissection. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:66
171. Ahmed N, Pansino F, Clyde R, et al. Overexpression of alpha(v)beta6 integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade. *Carcinogenesis* 2002;23:237-44.
172. Tunuguntla R, Ripley D, Sang QX, et al. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer. *Gyn. Onco.* 2003;89:453-9
173. Neufeld G, Shraga-Heled N, Lange T, et al. Semaphorins in cancer. *Front Biosci* 2005;10:751-60.
174. Zhang X, Nothnick WB. The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and nonmenstruating species. *Front Biosci* 2005;10:353-366.
175. John NJ, Linke M, Denker HW. Quantitation of human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; 29(6):461-8.
176. Thie M, Röspel R, Dettmann W, et al. Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod* 1998;13(11):3211-9.
177. Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19(3):263-74.
178. Richeri A, Chalar C, Martínez G, et al. Semaphorin 3F expression pattern coincides with the sympathetic nerve degeneration induced by oestrogen in the rat uterus. *Autonomic Neuro Science: Basic and Clinical* 2011; 163 (1-2): 132
179. Serini G, Valdembri D, Zanivan S et al. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 2003;424:391–397.
180. Michal A, Shabtai R, Shlomit G, et al. Plexin-B1, glycodelin and MMP7 expression in the human fallopian tube and in the endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:152.
181. Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, et al. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 2003;69:1458-1471.
182. Giavazzi R, Garofalo A, Ferri C, et al. Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts. *Clin Cancer Res* 1998;4:985-92.
183. Bruner-Traun KL, et al. Steroid and cytokine regulation of MMP expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endoc. Metab* 2002;87:4782-4791