

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

Remziye KATIRCI

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

**PATOLOJİK DESİDUAL SENESENSE BAĞLI GELİŞEN  
TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARININ  
DESİDUAL HÜCRELERİNDE PROGESTERON  
ANALOĞU UYGULAMASININ FOXM1  
EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Remziye KATIRCI

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

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

**PATOLOJİK DESİDUAL SENESENSE BAĞLI GELİŞEN**  
**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARININ**  
**DESİDUAL HÜCRELERİNDE PROGESTERON**  
**ANALOĞU UYGULAMASININ FOXM1**  
**EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Remziye KATIRCI

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
tarafından TDK-2023-6246 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından ..... Anabilim Dalı  
..... programında ..... tezi olarak kabul  
edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nuray ACAR-AYDEMİR  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üye. Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU  
Koç Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Enver Kerem DİRİCAN  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Özgür ÖKTEM  
Koç Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun  
görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve  
...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Remziye KATIRCI

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN

İmza

## TEŞEKKÜR

Doktora tezimi tamamlamanın heyecanını ve gururunu yaşamaktayım. Bu bölümde doktora tezimin tamamlanmasında yardımlarını esirgememiş kişilere teşekkürlerimi sunacağım.

Kendilerinin öğrencisi olmaktan her zaman gurur ve onur duyacağım, akademik hayatta bana ışık tutan ve beni yüreklendiren, bilimsel anlamda beni her zaman destekleyen sayın danışman hocalarım **Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ**'ye ve **Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN**'a

Dokularımın temininde bana her türlü kolaylığı sağlayan **Prof. Dr. Cem Yaşar SANHAL** ve **Uzm. Dr. Emine KİRTİŞ**'e

Anabilim Dalımızda bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarımıza,

Manevi desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Sevgili eşim **Ertan KATIRCI**'ya bu zorlu yolda beni her zaman desteklediği, iyiye teşvik ettiği, gösterdiği anlayışla sonsuz sabır ve tezime olan katkıları için,

Varlığıyla beni güçlü tutan ve onurlandıran canım kızım **İnci**'ye,

Sevgili ailemin tüm fertlerine canım annem, canım babam ve canım kardeşime bana her zaman maddi-manevi destek oldukları, sevgilerini ve emeklerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Desidualizasyondaki fizyolojik desidual senesens (desidual yaşlanma), patolojik desidual senesense dönüşerek, tekrarlayan gebelik kayıplarına (recurrent pregnancy loss-RPL) neden olmaktadır. FOXM1, desidualizasyonda proliferasyonla ilişkili transkripsiyon faktörüdür. Medroksiprogesteron asetat (MPA) ve didrogesteron (DYD) bir progesteron analogudur. Çalışmamızda, “patolojik desidual senesense bağlı gelişen tekrarlayan gebelik kayıplarının desidual hücrelerinde FOXM1 ekspresyonu azalır ve progesteron analogu uygulaması azalan FOXM1 ekspresyonunu tersine çevirir” hipotezi kurulmuştur. Bu amaçla, patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL’de desidual senesens ve FOXM1 ilişkisi ile progesteron analogları olan MPA ve DYD ile tedavisinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarından izole edilen primer desidual hücreler ile MPA ve DYD uygulanmış ve uygulanmamış gruplar oluşturularak, PRL ve IGFBP-1 düzeyleri ELISA yöntemiyle, FOXO1, DIO2,  $\beta$ -GAL, FOXM1 ve p-FOXM1’in ekspresyonları immünofloresan yöntemi ile, FOXM1 ve p-FOXM1’in protein düzeylerindeki değişiklikler ise western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Endometriyal fonksiyonun değerlendirilmesi amacıyla da desidual hücreler ile insan ekstrasvillöz trofoblast benzeri hücre hattı olan AC-1M88 hücreleri ko-kültüre edilmiş, sferoid genişleme ve migrasyon analizleri yapılmıştır.

**Bulgular:** RPL gruplarında MPA ve DYD uygulaması yetersiz desidualizasyona bağlı azalmış PRL, IGFBP-1, FOXO1, FOXM1 ve p-FOXM1 seviyelerini tersine çevirirken, desidual senesense bağlı artmış DIO2 ve  $\beta$ -GAL seviyelerini etkilemedi. Ayrıca MPA ve DYD uygulanmış RPL gruplarında artmış endometriyal proliferasyon ve migrasyon tespit edildi. Bununla birlikte, FOXM1 ve p-FOXM1 ekspresyonunu tersine çevirmede DYD tedavisi MPA tedavisinden daha etkili olmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamız, literatürdeki FOXM1 ve desidual senesens ile FOXM1 ve RPL ilişkisini, ayrıca iki farklı progesteron analogunun patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL hastalarında olası terapötik etkisinin temellerini ortaya koyan ilk çalışmadır. Patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL’de MPA ve DYD uygulaması desidualizasyon, endometriyal proliferasyon ve migrasyonu teşvik etmiş ancak desidual senesensi etkilememiştir. Bulgularımız doğrultusunda RPL teşhisi alan hastaların tedavisinde, progesteron analogu uygulamalarına ek olarak senesent hücrelerin de eliminasyonunu sağlayacak kombine tedavilerin geliştirilmesinin gelecekte umut vaat edici bir seçenek olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Patolojik Desidual Senesens, Tekrarlayan Gebelik Kaybı, FOXM1, Medroksiprogesteron Asetat, Didrogesteron

## ABSTRACT

**Aim:** Physiological decidual senescence in decidualization turns into pathological decidual senescence and causes recurrent pregnancy loss (RPL). FOXM1 is a proliferation-related transcription factor in decidualization. Medroxyprogesterone acetate (MPA) and dydrogesterone (DYD) are progesterone analogues. In our study, we hypothesised that "FOXM1 expression is decreased in decidual cells of recurrent pregnancy loss due to pathological decidual senescence and progesterone analogue administration reverses the decreased FOXM1 expression". For this purpose, we aimed to investigate the relationship between decidual senescence and FOXM1 in RPL due to pathological decidual senescence and the effect of treatment with progesterone analogues MPA and DYD.

**Method:** PRL and IGFBP-1 levels were analyzed by ELISA method, FOXO1, DIO2,  $\beta$ -GAL, FOXM1, and p-FOXM1 expressions were analyzed by immunofluorescence method, and changes in protein levels of FOXM1 and p-FOXM1 were analyzed by western blot method using primary decidual cells isolated from control pregnancy and RPL groups and MPA and DYD treated and untreated groups. In order to evaluate endometrial function, decidual cells, and human extravillous trophoblast-like cell line AC-1M88 cells were co-cultured and spheroid expansion and migration analyses were performed.

**Results:** In women with RPL, MPA and DYD administration reversed the decreased PRL, IGFBP-1, FOXO1, FOXM1, and p-FOXM1 levels due to inadequate decidualization, but did not affect the increased DIO2 and  $\beta$ -GAL levels due to decidual senescence. In addition, increased endometrial proliferation and migration were detected in MPA and DYD treated RPL groups. However, DYD treatment was more effective than MPA treatment in reversing FOXM1 and p-FOXM1 expression.

**Conclusion:** Our study is the first study in the literature to demonstrate the relationship between FOXM1 and decidual senescence, FOXM1 and RPL, and the therapeutic effect of two different progesterone analogs in RPL patients with pathological decidual senescence. In RPL developing due to pathological decidual senescence, MPA and DYD treatment promoted decidualization, endometrial proliferation and migration but did not affect decidual senescence. In light of our findings, we suggest that the development of combined therapies to eliminate senescent cells in addition to progesterone analog applications is a promising option in the treatment of patients diagnosed with RPL.

**Key words:** Pathological Decidual Senescence, Recurrent Pregnancy Loss, FOXM1, Medroxyprogesterone Acetate, Dydrogesterone

## İÇİNDEKİLER

|                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>ÖZET</b>                                                            | i    |
| <b>ABSTRACT</b>                                                        | ii   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                     | iii  |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                                 | v    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                                 | vi   |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>                                         | viii |
| <br>                                                                   |      |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                        | 1    |
| <br>                                                                   |      |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                               | 2    |
| 2.1. Dişi Üreme Sistemi                                                | 2    |
| 2.1.1. Uterus ve Endometriyum Histolojisi                              | 2    |
| 2.1.2. Dişi Genital Sistem Embriyolojisi                               | 4    |
| 2.1.3. Menstrual Siklus ve Desidualizasyonun Endokrin Kontrolü         | 5    |
| 2.2. Hücresel Senesens                                                 | 9    |
| 2.2.1. Replikatif Senesens                                             | 10   |
| 2.2.2. Stres İndüklü Prematür Senesens                                 | 10   |
| 2.2.3. Desidual Senesens                                               | 11   |
| 2.3. Tekrarlayan Gebelik Kaybının Etiyolojisi ve Risk Faktörleri       | 13   |
| 2.3.1. Maternal Yaş ve Anatomik Faktörler                              | 14   |
| 2.3.2. Endokrinolojik İmmünolojik ve Çevresel Faktörler                | 15   |
| 2.3.3. Desidual Senesense Bağlı Faktörler                              | 17   |
| 2.4. FOXM1: Forkhead Box (FOX) Ailesine Ait Bir Transkripsiyon Faktörü | 18   |
| 2.4.1. FOXM1 Fonksiyonu ve Düzenlenmesi                                | 20   |
| 2.4.2. FOXM1 ve Hücresel Senesens                                      | 21   |
| 2.4.3. FOXM1 ve Desidualizasyon                                        | 22   |
| 2.5. Progesteron Analogu (Progestin) Uygulamaları                      | 24   |
| 2.5.1. Medroksiprogesteron Asetat                                      | 25   |
| 2.5.2. Didrogesteron                                                   | 25   |



|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                                        | 27 |
| 3.1. Desidual Dokuların Eldesi                                                                                   | 27 |
| 3.2. Primer Desidual Hücre İzolasyonu ve Kültürü                                                                 | 28 |
| 3.3. Progesteron Analogu (Progestin) Uygulamaları                                                                | 30 |
| 3.4. ELISA Yöntemi ile PRL ve IGFBP-1 Seviyesinin Ölçümü                                                         | 31 |
| 3.5. İmmüno Floresan Analizi                                                                                     | 32 |
| 3.6. Western Blot Analizi                                                                                        | 34 |
| 3.7. Sferoid Genişleme ve Migrasyon Analizi                                                                      | 35 |
| 3.8. İstatistiksel Analizler                                                                                     | 37 |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                               | 38 |
| 4.1. Hücre Kültürü Bulguları                                                                                     | 39 |
| 4.2. Progesteron Analogu Uygulamaları Sonrasında PRL, IGFBP-1, FOXO1, DIO2 ve $\beta$ -GAL Ekspresyonu Bulguları | 39 |
| 4.3. Progesteron Analogu Uygulamaları Sonrasında FOXM1 ve p-FOXM1 Ekspresyonu Bulguları                          | 44 |
| 4.4. Sferoid Genişleme ve Migrasyon Bulguları                                                                    | 49 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                                               | 52 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                                      | 62 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                                                 | 65 |
| <b>EKLER</b>                                                                                                     |    |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                  |    |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                  |                                                            |    |
|------------------|------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 3.1</b> | PRL ve IGFBP-1'in katalog numaraları ve standart değerleri | 32 |
|------------------|------------------------------------------------------------|----|



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                   |                                                                                                                                  |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1</b>  | İç ve dış genital organlar                                                                                                       | 2  |
| <b>Şekil 2.2</b>  | Uterusun histolojik tabakaları                                                                                                   | 3  |
| <b>Şekil 2.3</b>  | Endometriyumun fonksiyonel ve bazal tabakası ile damarlanma yapısı                                                               | 4  |
| <b>Şekil 2.4</b>  | Paramezonefrik kanalın gelişimi                                                                                                  | 5  |
| <b>Şekil 2.5</b>  | Ovaryan ve uterinal siklus                                                                                                       | 6  |
| <b>Şekil 2.6</b>  | Mezenkimal-epitelyal dönüşüm ile oluşan desidual hücreler                                                                        | 8  |
| <b>Şekil 2.7</b>  | Normal ve senesent hücre karşılaştırılması                                                                                       | 9  |
| <b>Şekil 2.8</b>  | Desidual hücre alt popülasyonları: olgun desidual hücreler ve senesent desidual hücrelerin oluşumu ve uNK'ların ortamdaki etkisi | 12 |
| <b>Şekil 2.9</b>  | Hem gebelik sürecinde hem de senesent hücrelerin ortak salgıladığı SASP faktörleri                                               | 13 |
| <b>Şekil 2.10</b> | FOX ailesi üyelerinin filogenetik ağacı                                                                                          | 19 |
| <b>Şekil 2.11</b> | FOXm1 izoformları                                                                                                                | 20 |
| <b>Şekil 2.12</b> | Hücre döngüsü boyunca FOXm1 ve fosforilasyonu                                                                                    | 21 |
| <b>Şekil 3.1</b>  | Çalışmanın deneysel tasarımı                                                                                                     | 27 |
| <b>Şekil 3.2</b>  | Primer desidual hücre izolasyonu ve kültürü                                                                                      | 29 |

|                   |                                                                                                                                       |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.1</b>  | Hasta demografisi                                                                                                                     | 38 |
| <b>Şekil 4.2</b>  | Primer desidual hücre faz-kontrast mikroyrafları                                                                                      | 39 |
| <b>Şekil 4.3</b>  | Primer desidual hücrelerin süpernatantlarında ELISA analizi                                                                           | 41 |
| <b>Şekil 4.4</b>  | Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin FOXO1 primer antikoruyla immünofloresan analizi                      | 42 |
| <b>Şekil 4.5</b>  | Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin DIO2 primer antikoruyla immünofloresan analizi                       | 43 |
| <b>Şekil 4.6</b>  | Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin $\beta$ -GAL primer antikoruyla immünofloresan analizi               | 44 |
| <b>Şekil 4.7</b>  | Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin FOXM1 primer antikoruyla immünofloresan analizi                      | 45 |
| <b>Şekil 4.8</b>  | Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin p-FOXO1 primer antikoruyla immünofloresan analizi                    | 46 |
| <b>Şekil 4.9</b>  | Poliploid morfolojiye sahip hücrelerin yüzdesi                                                                                        | 47 |
| <b>Şekil 4.10</b> | Kontrol gebelik ve RPL gruplarının primer desidual hücrelerinde total ve fosforile FOXM1 protein düzeylerinin western blot analizi    | 48 |
| <b>Şekil 4.11</b> | AC-1M88 hücrelerinin kontrol gebelik ve RPL gruplarının primer desidual hücreleri ile ko-kültürü sonrasında sferoid genişleme analizi | 49 |
| <b>Şekil 4.12</b> | Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait farklı saatlerindeki migrasyon analizleri                                                       | 51 |
| <b>Şekil 6.1</b>  | Çalışmamızın sonuç ve öneri şekli                                                                                                     | 64 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                 |                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------|
| <b>RPL</b>      | : Tekrarlayan Gebelik Kaybı                        |
| <b>MPA</b>      | : Medroksiprogesteron Asetat                       |
| <b>DYD</b>      | : Didrogesteron                                    |
| <b>E2</b>       | : Östrojen                                         |
| <b>P4</b>       | : Progesteron                                      |
| <b>LH</b>       | : Luteinizan Hormon                                |
| <b>FSH</b>      | : Folikül Stimüle Edici Hormon                     |
| <b>PR</b>       | : Progesteron Reseptörü                            |
| <b>ÜYTE</b>     | : Üremeye Yardımcı Tedavi                          |
| <b>SA-β-gal</b> | : Senesens İlişkili β-galaktosidaz                 |
| <b>SASP</b>     | : Senesens İlişkili Sekretuar Fenotip              |
| <b>VEGF</b>     | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü               |
| <b>IL-15</b>    | : İnterlökin-15                                    |
| <b>uNK</b>      | : Uterus Doğal Öldürücü Hücreleri                  |
| <b>RM</b>       | : Tekrarlayan Düşükler                             |
| <b>ACOG</b>     | : Amerikan Jinekoloji ve Obstetrik Derneği         |
| <b>ASRM</b>     | : Amerikan Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği    |
| <b>ESHRE</b>    | : Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği              |
| <b>RCOG</b>     | : Birleşik Krallık Jinekoloji ve Obstetrik Derneği |
| <b>hCG</b>      | : İnsan Koryonik Gonadotropin                      |
| <b>DIO2</b>     | : İyodotironin deiyodinaz 2                        |
| <b>mTOR</b>     | : Rapamisinin Memeli Hedefi                        |

|                |                                                      |
|----------------|------------------------------------------------------|
| <b>IL-6</b>    | : İnterlökkin-6                                      |
| <b>IL-17A</b>  | : İnterlökkin-17A                                    |
| <b>DBD</b>     | : DNA Bağlanma Alanı                                 |
| <b>TAD</b>     | : Transaktivasyon Alanı                              |
| <b>NRD</b>     | : Negatif Düzenleyici Alan                           |
| <b>CDK</b>     | : Siklin Bağımlı Kinaz                               |
| <b>EVT</b>     | : Ekstravillöztrofoblast                             |
| <b>WMA</b>     | : Dünya Tıp Birliği                                  |
| <b>FBS</b>     | : Fetal Sığır Serumı                                 |
| <b>PRL</b>     | : Prolaktin                                          |
| <b>IGFBP-1</b> | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 1 |
| <b>AC-1M88</b> | : İnsan Ekstravillöz Trofoblast Benzeri Hücre Hattı  |
| <b>MFI</b>     | : Ortalama Floresan Yoğunluğu                        |

## 1. GİRİŞ

Desidualizasyon bir fizyolojik desidual senesens (fizyolojik desidual yaşlanma) sürecidir. Desidual senesens sürecinde ortaya çıkan senesent desidual hücreler (yaşlı desidual hücreler) implantasyonda, normal plasental ve fetal gelişimde önemli rol oynarak, gebelik homeostazını korurlar (Velarde ve Menon, 2016; Lucas ve ark., 2020). Fizyolojik desidual senesens endometriyal stromal hücrelerin olgun desidual hücrelere dönüşmemesi, immün hücrelerin ortamda sayıca az olması ve artan uterus yaşına bağlı olarak patolojik desidual senesense dönüşebilir. Böylece, ortamda senesent hücrelerin sayısı artarak, olgun desidual hücrelerin oluşumu engellenir ve bu durum endometriyal reseptivite kusurlarından, implantasyon kayıplarına, yetersiz plasental gelişime, preterm doğumlara ve önemli bir sağlık sorunu olan tekrarlayan gebelik kayıplarına (recurrent pregnancy loss-RPL) neden olur (Velarde ve Menon, 2016).

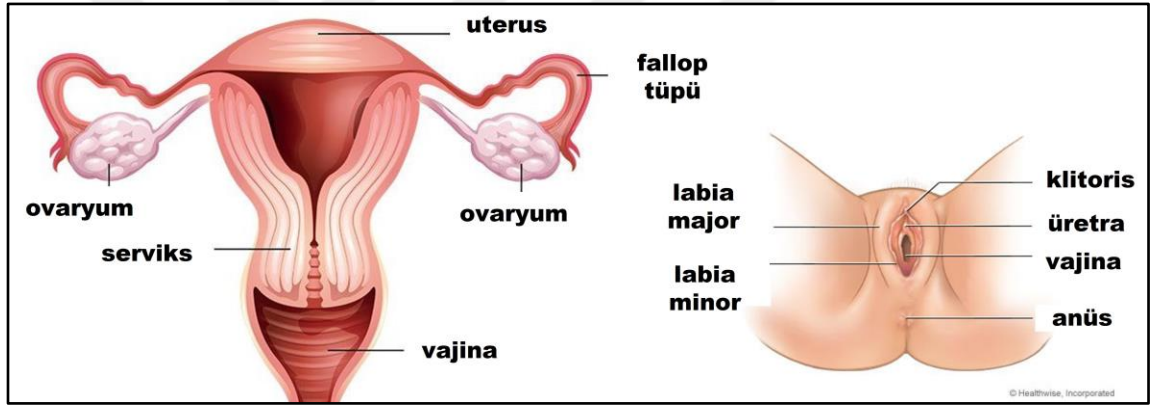
Progesteron reseptörü ile etkileşime giren, proliferasyonla ilişkili nüklear transkripsiyon faktörü olan FOXM1, erken-orta-geç sekretuvar fazda eksprese olarak endometriyumun gebeliğe hazırlanmasında ve gebeliğin devamlılığında önemli rol oynar (Xie, Li, ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2015). Progesteronun, desidualizasyonu desteklediği ve endometriyumu gebelik için hazırladığı bilinmektedir. Progesteron analogları (progestin) olan MPA ve DYD, yapay bir progesteron olup, çeşitli spontan gebelik kayıplarının tedavisinde ve endometriyal patolojilerin girişimsel olmayan tedavi yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yovich ve ark., 2020; Harmon ve ark., 2022).

Literatürde, FOXM1'in patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL ile ilişkisi hakkında bilgi bulunmamaktadır. MPA'nın FOXM1 ekspresyonunda artışa sebep olduğu ve DYD'nin de dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferlerinde implantasyon oranlarını artırdığı gösterilmiştir (Lv ve ark., 2021; L. Macedo ve ark., 2022). Tüm bu bilgiler ışığında, oldukça özgün olan çalışmamızda, "patolojik desidual senesense bağlı gelişen tekrarlayan gebelik kayıplarının desidual hücrelerinde FOXM1 ekspresyonu azalır ve progesteron analogu uygulaması azalan FOXM1 ekspresyonunu tersine çevirir" hipotezi kurulmuştur. Bu amaçla, çalışmamızda daha önce araştırılmamış tekrarlayan gebelik kayıplarında desidual senesens ve FOXM1 ilişkisi ile bu ilişki üzerine iki farklı progesteron analogu uygulamasıyla (MPA ve DYD) tedavi seçeneği araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dış Üreme Sistemi

Dış üreme sistemi iç ve dış genital organlar olarak ayrılır. Bir çift ovaryum, tuba uterina, uterus ve serviks periviste yerleşik iç genital organlardır. Vajina ise iç genital organların vücut dışına açıldığı yerdir. Labia major, labia minor ve klitoris ise dış genital organları oluşturur (Şekil 2.1). Plasenta ve meme bezleri fonksiyonel olarak dış genital sistemle ilişkilidir. Ovaryumlarda steroid hormonlar ve dışi germ hücreleri olan oositler üretilir. Uterus ise menstrual siklus sırasında düzenli aralıklarla tekrarlanan değişikliklere uğrar (William, 2013).



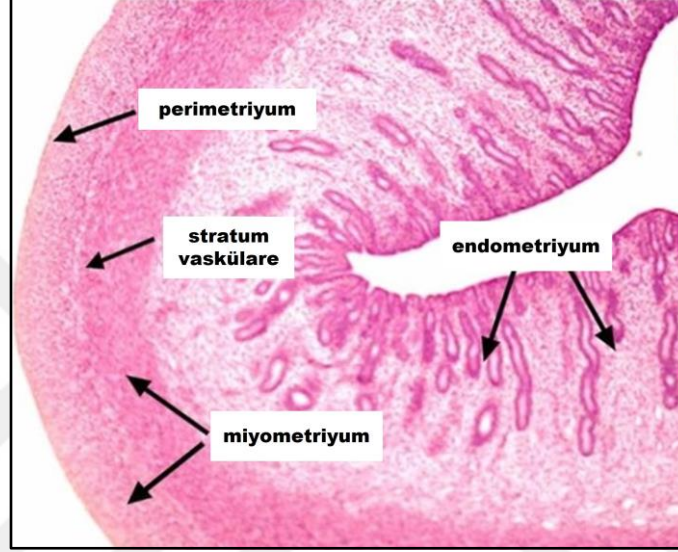
Şekil 2.1: İç ve dış genital organlar <https://www.everydayhealth.com/sexual-health/female-reproductive-organs.aspx>, kaynağından Türkçeleştirilmiştir, Erişim tarihi: 24 Ağustos 2023.

#### 2.1.1. Uterus ve Endometriyum Histolojisi

Uterus, pelviste mesane ile rektum arasında yerleşik bir organdır. Korpus, uterusun genişlemiş üst kısmı olup anterior yüzeyi düz, posterior yüzeyi konvektir. Korpusun tuba uterina bağlantısının üstündeki genişlemiş bölümü fundusu oluşturur. Tuba uterina, fundusun duvarından uterus içine doğru giriş yapar. Fundus ve korpus histolojik olarak hemen hemen aynıdır (Ross, 2006). Uterus histolojik olarak dıştan içe üç tabakadan oluşur; perimetrium, miyometrium ve endometriyum. Perimetrium, peritoneal mezotel ile örtülü en dıştaki bağ dokusudur. Miyometrium, içte ve dışta longitudinal, ortada ise sirküler seyirli düz kas demetlerinden oluşan en kalın tabakadır. Miyometriyumun orta kas tabakası kan damarı ve lenfatikleri içerir ve stratum vaskülare olarak adlandırılır. Gebeliğin oluşmadığı uterus, düz kas hücreleri 50 µm uzunluğunda yer alırken gebelik

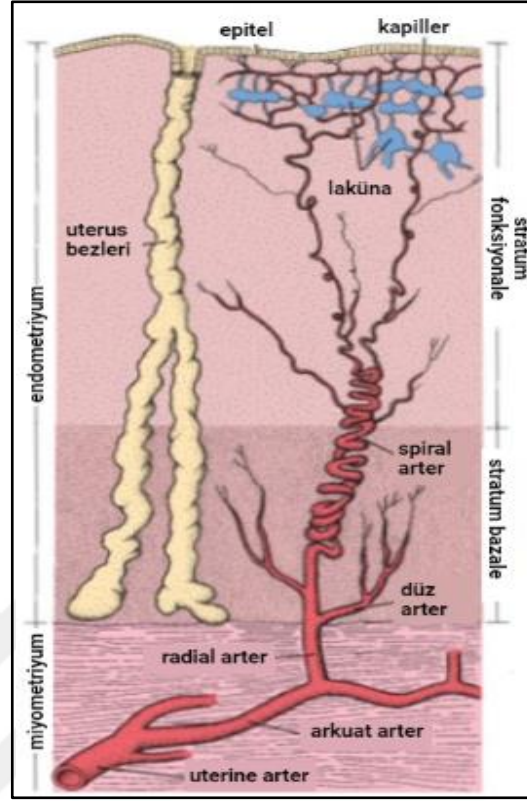


oluştduğunda bu hücrelerin uzunlukları 500  $\mu\text{m}$ 'yi bulur. Fetüsün büyüyüp gebeliğin ilerlemesi ile uterus duvarı incelir ve doğumdan sonra eski haline döner (Ross, 2006). Uterusun en iç tabakası olan endometriyum ise uterusun mukozası olup basit prizmatik epitel ile döşelidir (William, 2013) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2:** Uterusun histolojik tabakaları (Ross, 2006) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

Uterusun en iç tabakası olan endometriyum soluk kırmızı renkli ve 5 mm kalınlığındadır. Üreme çağında siklik değişimlere uğrayarak, embriyo implantasyonuna ve embriyonik fetal gelişime hazırlık yapar. Basit prizmatik epitel ile döşeli olup salgı hücreleri ve silyumlu hücreleri içerir. Basit tübüler yapıdaki uterus bezleri yüzey epitelinin lamina propiyaya invajine olmasıyla gelişir. Endometriyal stroma ise yüksek düzeyde selüler yapıda olup, bolca interselüler ara madde içerir. Endometriyum, fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonale) ve bazal tabakadan (stratum bazale) oluşur. Menstrual siklus sırasında stratum fonksiyonale prolifer ve dejenere olan kısımken, stratum bazale hormonal değişikliklerden etkilemeyip menstruasyon sırasında dökülmeyen kısımdır. Stratum fonksiyonale ve stratum bazalenin kanlanması farklıdır. Uterus arteri miyometriyumda 6-10 arkuat artere dallanır. Bunlardan ayrılan radial arterler, bazal arter ve spiral arterleri oluşturur. Stratum bazaleyi bazal arterler kanlandırırken, spiral arterler stratum bazaleyi geçip, stratum fonksiyoneleye ulaşır kapiler ağı drenaj olur (William, 2013) (Şekil 2.3).

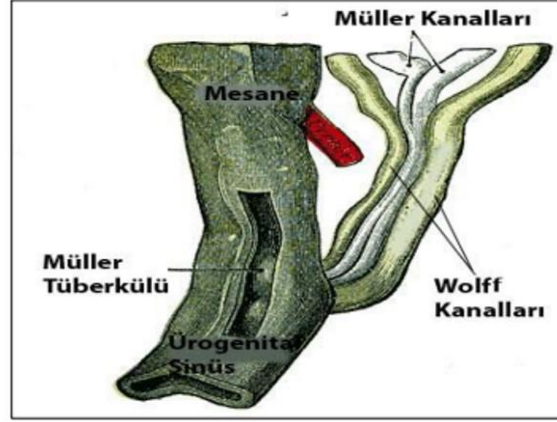


**Şekil 2.3:** Endometriyumun fonksiyonel ve bazal tabakası ile damarlanma yapısı (Weiss, 1988) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

### 2.1.2. Dişi Genital Sistem Embriyolojisi

Genital sistem mezoderm kaynaklıdır. Dişi ve erkek embriyolarda Wolff (mezonefrik) ve Müller (paramezonefrik) kanallar gelişir. Dişilerde gelişimin ilerleyen dönemlerinde testosteron hormonunun yokluğu ile mezonefrik kanal geriler ve Anti-Müllerian hormon ile paramezonefrik kanal gelişir. Paramezonefrik kanal, ürogenital kabartının ön ve yan yüzeyindeki sölom epiteline girinti yapar ve huni şeklinde açılarak ilerler. Bu ilerlemede, orta hatta her iki paramezonefrik kanal birbirine yaklaşır ve birleşerek uterus kanalını oluştururlar. Uterus kanalının kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarında paramezonefrik ya da Müller tüberkülünü oluşturur (Sadler, 1988) (**Şekil 2.4**). Tüberkülün, kranial, vertikal ve horizontal bölümlerinden tuba uterinalar gelişirken, kaudal bölümden uterus gelişir. Oluşan ilk bu uterovajinal taslaktan uterusun istmus, korpus, fundus ve endometriyum epiteli ile bezleri gelişir. Endometriyumun stroması ve miyometriyum kısımları ise splanik mezodermden gelişir. Gelişimsel olarak uterus 1.

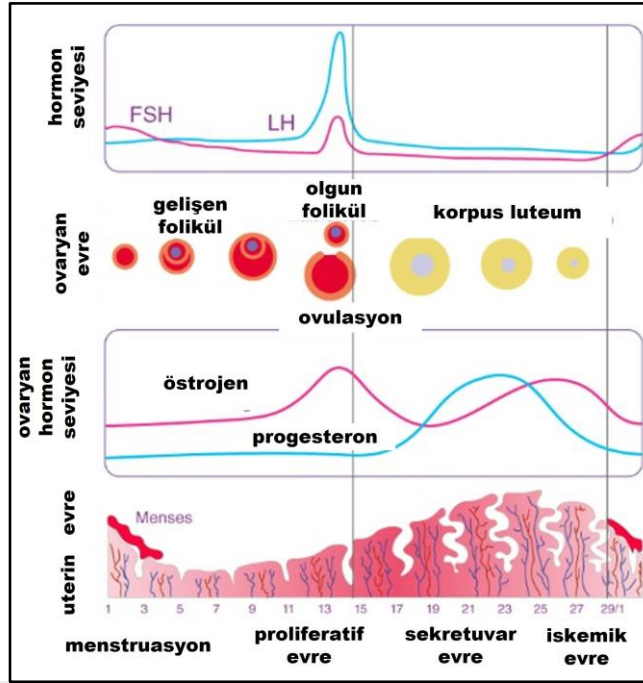
trimesterin sonunda oluşur, 2. trimesterde uterus bezleri ve kas tabakası gelişirken, bu gelişim 3. trimesterde tamamlanır (Moore ve ark., 2002).



**Şekil 2.4:** Paramezonefrik kanalın gelişimi (Gray, 1918) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

### 2.1.3. Menstrual Siklus ve Desidualizasyonun Endokrin Kontrolü

Embriyonun gelişimi ve büyümesi için özelleşmiş bir organ olan uterusun fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için endometriyum her ay düzenli bir değişime uğrar. Östrojen (E2) ve progesteron (P4) hormonları bu siklik değişimleri kontrol eder. Östrojen, uterus rejenerasyonunu uyararak, endometriyum kalınlığını artırır. Progesteron, endometriyum salgı bezlerinin genişlemesini sağlar. Hormonların yanı sıra lokal parakrin ve otokrin faktörlerde endometriyumun siklik değişiminde rol oynarlar. Örneğin, lokal faktörlerden en önemlisi olan lökositler, implantasyon süreci ve doğumun başlatılmasında rol oynar (Kayisli ve ark., 2002). Reprodüktif dönemde gebeliğin olmadığı durumda menstrual siklus, 28-30 günde bir tekrarlanan, 5-7 gün süren ve her siklusta yaklaşık 35-50 mL kan kaybının yaşandığı bir süreçtir. Menstrual siklus bozukluğu yaşayan kadınların üreme yeteneklerinde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Koeppen ve Stanton, 2009). Menstrual siklus, pitüer bezin pars distalisinden salgılanan gonadotropinler tarafından kontrol edilir ve menstrual faz (1-7.gün), proliferatif faz (7-13.gün), sekretuar faz (15-25.gün) ve iskemik faz (25-28.gün) olmak üzere dört evreyi içerir (William, 2013) (**Şekil 2.5**).



Şekil 2.5: Ovaryan ve uterinal siklus <https://byjus.com/biology/menstrual-cycle/> kaynağından Türkçeleştirilmiştir. Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023.

**Menstrual faz:** Gebeliğin oluşmadığı durumda, korpus luteum aktif hormon üretimine 10 gün devam eder. Ani ovaryan P4 ve E2 hormonlarının azalması ile stratum fonksiyonelenin kan desteğinde azalma ve spiral arterlerin duvarında kasılmalar meydana gelir. Endometrial bezlerin salgılarının durması ile endometriyum büzüşür. Stratum fonksiyoneledeki iskemiden iki gün sonra kan damarları rüptüre olur. Stratum fonksiyonaleden dökülen stromal ve epitelyal hücreler ile kan, vajinal akıntıyı oluşturur. Kan pıhtılaşma mekanizması menstrual siklus sırasında inhibe edilir (Ross, 2006).

**Proliferatif faz:** Bu faz E2 bağımlıdır ve Graff folikül gelişimi görülür. Graff folikül gelişimi ile  $17\beta$ -estradiol artışı dramatik olarak artar ve bu artış hipotalamus ve hipofizde, yüksek frekanslı dalgalar halinde luteinizan hormon (LH) salgılanmasını tetiklerken, folikül stimüle edici hormon (FSH) salınımının azalmasına neden olur. Proliferatif faz menstrual fazdan hemen sonra başlayıp, ovulasyondan hemen önce biter. Proliferatif faz sırasında, bezlerin prizmatik hücrelerinde yüksek mitoz aktivitesi görülerek, endometriyum kalınlığı 2-3 kat artar (William, 2013).

**Sekretuvar faz:** Bu faz ovulasyondan hemen sonra, korpus luteumu oluşumu ile başlar. Korpus luteum P4 salgılayarak, endometriyum implantasyona hazırlar. Bu fazda, hücrelerin bazal bölümlerinde glikojen birimi görülür ve 21-25. günlerde glikojen epitel hücrelerinin apikalinde birikir. Endometrial kalınlıkta artış olarak yaklaşık 4-6 mm'ye ulaşır ve uterus bezleri tırtıklı testere görünümünü alır. Bu bezlerde görülen, yoğun glikojen içerikli sekresyonlar lümenine verilir. Gebeliğin gerçekleşmesi durumunda, endometrial stromal hücreler, lipid ve glikojen depolama kapasitesine sahip epiteloit karakterli desidual hücrelere dönüşür (Ross, 2006).

Her ay gerçekleşen menstrual siklus, endometriyum dokusunun dinamik yapısını koruyarak olası bir embriyo implantasyonuna hazırlar. Menstrual siklusun sekretuvar fazında, endometrial stromal hücrelerin, epiteloit karakterli olgun desidual hücrelere dönüşüm süreçlerine desidualizasyon ve bu süreçte oluşan hücrelere de desidual hücreler adı verilir (McLENNAN ve RYDELL, 1965). Desidualizasyon sürecinde baskın olan hormon progesterondur ve etkisini progesteron reseptörü (PR) üzerinden gerçekleştirir. İnsanda nüklear progesteron reseptörü A (PR-A) ve progesteron reseptörü B (PR-B) ile mitokondri membranında yerleşik, mitokondriyal progesteron reseptörü (mPR) bulunmaktadır. PR-A'nın desidualizasyonda daha etkili olduğu gösterilmiştir (Kastner ve ark., 1990). Desidualizasyon süreci başarılı bir implantasyon için temel adımdır. Desidual hücreler bir yandan embriyonun gelişimi için ona besin kaynağı sağlarken, bir yandan da trofoblast hücrelerinin invazyonundan maternal dokuyu korur. Tüm bunlara ek olarak, desidual hücreler maternal-fetal yüzeyde mikroçevrenin korunmasında ve devamlılığının sağlanmasında, endometriyumda ekstrasellüler matriksin yeniden modellenmesinde, implantasyonda lokal immün yanıtın düzenlenmesinde, plasenta oluşumunda ve anjiyogenez süreçlerinde önemli rol oynar (Fabi ve ark., 2017). Desidual hücreler, mezenkimal-epitelyal dönüşüm ile oluşur. Bu dönüşüm esnasında, desidual hücrelerdeki sitoplazma ve organel miktarında, glikojen ve lipid depolanmasında ve hücre-hücre etkileşiminde artış görülür (Zhao ve ark., 2022) (**Şekil 2.6**).



**Şekil 2.6:** Mezenkimal-epitelyal dönüşüm ile oluşan desidual hücreler (Pan-Castillo ve ark., 2018) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

Moleküler düzeyde, endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşümü, kromatin yapısında değişimi, genom çapında yeniden düzenlenmeyi, çoklu sinyal yollarının yeniden programlanmasını ve desidual genlerin aktivasyonunu kapsayan çok aşamalı bir süreç içerir (Lucas ve ark., 2020). Bu dönüşüm sürecinde, G0/G1'deki hücre döngüsü çıkışından sonra, endometriyal stromal hücrelerde serbest radikal üretiminin artması ile çeşitli kemokinler salgılanarak desiduada geçici bir pro-enflamatuvar faz oluşur. Pro-enflamatuvar faz, endometriyal stromal hücrelerin dönüşümü ile ilişkilidir ve bu süreçte pre-desidual hücreler görülmektedir. Bu faz aynı zamanda embriyo implantasyonu için gerekli olan reseptif endometriyum oluşumuna aracılık eder. Geçici olan pro-enflamatuvar fazdan sonra, embriyo gelişimini destekleyecek, embriyoyu çevredeki sitotoksik T lenfositlerinden koruyacak olan anti-enflamatuvar faz görülür (Deryabin ve ark., 2020). Ayrıca hem kemirgenler de hem de insanlarda desidualizasyonda, olgun desidual hücrelerin ortaya çıkmasını sağlayan endoreduplikasyon kaynaklı poliploidizasyon görülmektedir (SACHS ve Shelesnyak, 1955; Moulton, 1979). Terminal farklılaşmış desidual poliploid hücreler, başarılı embriyo implantasyonu ve erken gebelik sırasında embriyo büyümesi ve desteklenmesi için çok önemlidir (Mori ve ark., 2011; Sroga ve ark., 2012).

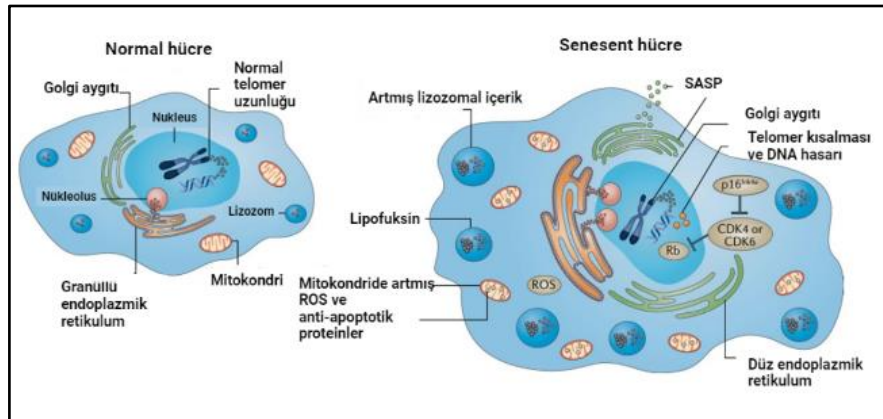
Yetersiz desidualizasyon veya desidualizasyon sürecinde meydana gelen anormaller, tekrarlayan düşükler, implantasyon kusurları, endometriozis ve preeklampsi gibi birçok patolojiye sebep olmaktadır (Cha ve ark., 2012). Literatürde, embriyo sağlıklı olsa dahi gebeliklerin yaklaşık %30'unda desidualizasyon kusurlarına bağlı gelişen implantasyon sonrası düşükler olduğu bildirilmiştir (Salker ve ark., 2010). Bu durum, üremeye yardımcı



tedavilerde (ÜYTE) implantasyon ve gebelik başarısını artırmak için, sağlıklı embriyo transferinin tek başına yeterli olmadığını ortaya koymaktadır (Lai ve ark., 2013). Bu sebeple, sağlıklı gebelik ve canlı doğum oranlarını artırmak için desidualizasyon sürecine odaklanarak, araştırmaların artırılması gerekmektedir.

## 2.2. Hücresel Senesens

Terminolojik olarak “senesens” kelimesi Latince “*lat-senex*” kelimesinden türev alıp, Türkçe karşılığı “yaşlanmak” tır. İlk olarak, hücre kültüründe büyümesi ve bölünmesi durmuş hücreleri ifade etmek için kullanılmıştır (Campisi ve d'Adda di Fagagna, 2007). Hücresel senesens üzerine öne sürülmüş başlıca hipotezler bulunmaktadır. Bunlardan ilki, hücrenin fizyolojik süreçleri boyunca kanserden korunması üzerine gelişmiş evrimsel bir mekanizma olduğu yönündedir. Diğer ise, hücrenin yaşlanma süreçlerinde karşılaştığı rejeneratif kapasitenin azalması ve hücrenin fonksiyon kaybına neden olduğu yönündedir (Campisi, 2013). Senesens sürecine giren hücreler, “senesent hücreler-yaşlanan hücreler” olarak adlandırılır. Senesent hücreler, normal hücrelerden farklı olarak, mitokondrilerindeki reaktif oksijen türleri miktarları yüksek olup anti-apoptotik protein içeriğine sahiptirler ve nükleusları daha büyüktür. Ayrıca bu hücrelerde hücre döngüsü inhibitör genlerinin, lizozomal içeriğin ve asidik lizozomal  $\beta$ -galaktosidazdan köken alan senesens ilişkili  $\beta$ -galaktosidaz (SA- $\beta$ -gal) aktivitesinin artışı görülür (Lozano-Torres ve ark., 2019; Lin ve ark., 2020) (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7:** Normal ve senesent hücre karşılaştırılması (Lozano-Torres ve ark., 2019) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

Senesent hücreler ortama senesens ilişkili sekretuar fenotip (SASP) salgırlar ve bu ortamı doğrudan veya dolaylı olarak enflamasyona teşvik eder (Campisi ve ark., 2011). SASP bulunduğu dokuya özgü pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteazlar salgılar; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) etkisi ile damar oluşumunu teşvik ederek dokuda hasar sonrası rejenerasyon teşvik edilir (Coppé ve ark., 2010; Campisi, 2013).

Hücreler iki farklı senesens sürecine girebilir. Bunlardan ilki, fizyolojik (akut-kısa süreli) süreçlerde embriyonik gelişimde, yara iyileşmesinde ve doku yenilenmesinde görülür. Fizyolojik koşullarda senesent hücreler geçici düzenleyicidir ve ortama çağrılan immün hücreler aracılığıyla ortamdan kaldırılırlar. Diğeri ise, immün sistem bozuklukları, kanser gelişimi, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, renal fonksiyon bozuklukları, sarkopeni ve yaşa bağı gelişen hastalıklar (parkinson, alzheimer, katarakt vb.) gibi patolojik (kronik-uzun süreli) süreçlerde görülür (Ovadya ve Krizhanovsky, 2014; Sturmlechner ve ark., 2017). Patolojik koşullarda senesent hücreler, stres faktörlerine bağı olarak ilerler. Bu koşullarda doku homeostazı bozulur, immün hücreler yetersiz kalır ve kademeli organ fonksiyon kaybı görülür (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

### **2.2.1. Replikatif Senesens**

Replikasyon stresine bağı görülen replikatif senesens (replikatif yaşlanma), hücrelerin yaşam döngüleri boyunca edindikleri sınırlı çoğalma yeteneklerini tanımlar ve bu sınırlı çoğalma kapasitesi Hayflick limiti olarak adlandırılır (Kamal ve ark., 2020). Bununla birlikte ister primer hücreler olsun ister ticari olarak satın alınmış hücre hatları olsun her bir hücre ortam şartlarına bağı olarak erken yaşlanabilmektedirler (Maier ve Westendorp, 2009).

### **2.2.2. Stres İndüklü Prematür Senesens**

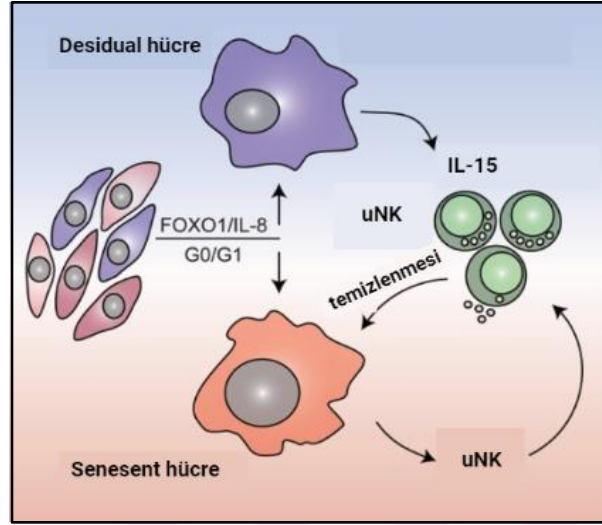
Hücrelerdeki telomeraz aktivitesinden bağımsız olarak hücrelere uygulanan stres ile hücrelerin yaşlanma eğrisi arasında doğrudan bir ilişki vardır. Hücrelerdeki stres fiziksel veya kimyasal olabileceği gibi iç veya dış kaynaklı da olabilir. Sonuçta hücrelerde stres etkisi birikerek hücreler prematür senesense (erken yaşlanmaya) gidebilir (Kamal ve ark., 2020).



### 2.2.3. Desidual Senesens

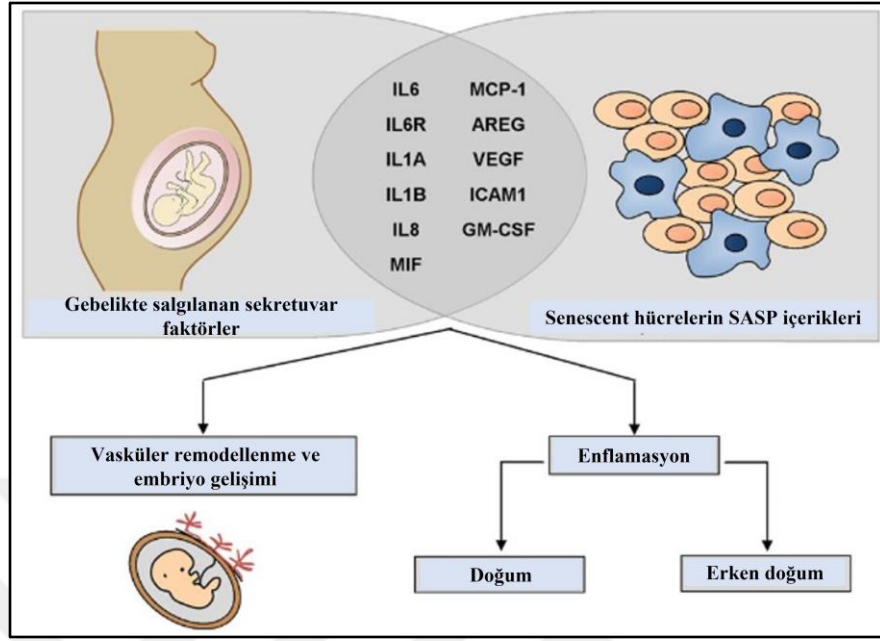
Desidual yaşlanma olarak adlandırılan desidual senesens, uterinal siklusun sekretuvar fazında desidualizasyon süreciyle birlikte başlayan bir fizyolojik senesens (fizyolojik akut-kısa süreli yaşlanma) durumudur (Deryabin ve ark., 2020). Fizyolojik süreçte, desidual hücrelerin alt popülasyonu olarak senesent desidual hücreler (yaşlı desidual hücreler) görülmektedir. Bu hücreler daha sonra, ortama çağrılan immün hücreler aracılığıyla temizlenirler. İmmün hücreler senesent hücreleri ortadan kaldırarak, ortamın enflamatuvar dengesinde korunmasına aracılık ederler. Senesent hücrelerin kısa süreli varlığı ve ardından temizlenmeleri pro-enflamatuvar fazın, anti-enflamatuvar faza dönüşümüne aracılık eder (Lucas ve ark., 2020).

Uterinal siklusun proliferatif evresindeki hızlı endometriyal proliferasyon, endometriyal stromal hücrelerin alt popülasyonunda replikatif stresin oluşumuna neden olur. Ortaya stres ile indüklenmiş endometriyal stromal hücreler çıkar ki bu hücreler uterinal siklusun sekretuvar evresinde olgun desidual hücrelere değil senesent desidual hücrelere farklılaşır. Senesent desidual hücreler fizyolojik koşullarda replikasyon stresine bağlı ortaya çıkmış kısa süreli ortamda bulunan (akut) hücrelerdir. Strese dirençli olan endometriyal stromal hücreler ise olgun desidual hücrelere dönüşerek ve özellikle ortama interlekin-15 (IL-15) salgılayarak, uterus doğal öldürücü (uNK) hücreleri çağırır. Uterus doğal öldürücü hücreleri, senesent desidual hücreleri granül ekzositozu yoluyla ortamdaki kaldırır. Böylece uNK hücreleri tarafından senesent desidual hücrelerin sistematik olarak temizlenmesi sağlanır (Brighton ve ark., 2017) (**Şekil 2.8**).



**Şekil 2.8:** Desidual hücre alt popülasyonları: olgun desidual hücreler ve senesent desidual hücrelerin oluşumu ve uNK'ların ortamdaki etkisi (Brighton ve ark., 2017) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

Senesent hücrelerin salgıladığı SASP faktörleri ile gebelik sırasında salgılanan sekretuvar faktörler ortaktır (Marquez ve ark., 2017) (**Şekil 2.9**). Erken dönem gebelikte senesent hücrelerin varlığı, plasenta gelişimi ve vasküler yeniden şekillenmeye katkıda bulunur. Gebeliğin geç evresinde ise uterus ve fetal membranlarda senesent hücrelerin sayısı artarak, fizyolojik süreç olan doğuma neden olur. Senesent hücre sayısındaki artış ve ortamdan temizlenmemeleri durumunda patolojik bir olay olan erken doğumlara da neden olmaktadır. Bu nedenle senesent hücrelerin bu ikili etkisinden dolayı literatürde desidual senesens sürecine “iki ucu keskin kılıç” denilmektedir (Marquez ve ark., 2017).



**Şekil 2.9:** Hem gebelik sürecinde hem de senesent hücrelerin ortak salgıladığı SASP faktörleri (Marquez ve ark., 2017) kaynağından Türkçeleştirilmiştir.

### 2.3. Tekrarlayan Gebelik Kaybının Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Tekrarlayan gebelik kaybı (recurrent pregnancy loss-RPL) veya sinonim adıyla tekrarlayan düşükler (recurrent miscarriage- RM), gebeliğin 20. haftasından önce görülen spontan gebelik kaybı (spontan düşük) olarak tanımlanır (Homer, 2019). RPL'nin tanımı farklı uluslararası topluluklar tarafından tartışılmaktadır. Amerikan Jinekoloji ve Obstetrik Derneği (ACOG), Amerikan Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği (ASRM) ve Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) RPL'yi iki veya daha fazla spontan gebelik kaybı olarak tanımlarken, Birleşik Krallık Jinekoloji ve Obstetrik Derneği (RCOG) ardışık üç veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlamaktadır (Jauniaux ve ark., 2006; Medicine, 2012). Spontan gebelik kaybı, 10. gebelik haftasından önce meydana geldiğinde embriyonik kayıp veya erken düşük, 10. gebelik haftasından sonra meydana geldiğinde fetal kayıp veya fetal düşük olarak sınıflandırılır. Primer RPL, daha önce hiç canlı doğum yapmamış bir kadında görülen spontan gebelik kaybını, sekonder RPL 20. gebelik haftasından önce yaşanmış spontan gebelik kaybını, tersiyer RPL ise normal gebelikleri arasında spontan gebelik kaybı yaşayan kadınları ifade etmektedir (Silver ve ark., 2011).

Spontan gebelik kaybı klinikte son derecede yaygın bir durumdur. Tüm gebeliklerin yaklaşık %15'i spontan kayıpla sonuçlanırken, sadece %30'u canlı doğumla sonuçlanır (Macklon ve ark., 2002). 20-24 yaşındaki kadınların spontan gebelik kayıp oranı %11, 25-29 yaşındaki kadınların %12, 30-34 yaşındaki kadınların ise %15 olduğu bildirilmiştir (Andersen ve ark., 2000). Tüm bu veriler, yaşla birlikte spontan gebelik kayıp oranı artsa da üreme yaşamın erken dönemlerinde dahi spontan gebelik kayıp riskinin bulunduğunu göstermektedir. RPL, spontan gebelik kayıpları arasında çiftlerin %2-5'ini etkileyen önemli bir üreme sağlığı sorunudur (El Hachem ve ark., 2017). 35 yaş altı kadınlarda RPL riski %9-12 iken 40 yaş üstü kadınlarda bu oran %50'ye çıkmaktadır (Wilcox ve ark., 1988).

RPL vakalarının %50'sinden fazlasında ayrıntılı incelemelerden sonra dahi belirli bir neden belirlenememiştir (Branch ve Heuser, 2010). Ancak günümüzde bilinen risk faktörleri olarak maternal yaş, daha önce yaşanan gebelik kayıpları öyküsü, anatomik, endokrinolojik, hematolojik, immünolojik faktörler, enfeksiyon, çevresel nedenler ve desidual senesens bulunmaktadır (van Dijk ve ark., 2020). RPL'nin sebepleri arasında "süper reseptif endometriyum" olabileceği ve bu vakalara "süper fertil" vakalar olarak adlandırılabilceği ileri sürülmektedir (Agenor ve Bhattacharya, 2015). Süper reseptif endometriyum kalitesiz embriyoların dahi implantasyonuna olanak tanımaktadır (Teklenburg ve ark., 2010). Dolayısıyla RPL kadınlarda ortaya çıkan sık sık gebe kalma (3-6 ay periyodu) ancak 20. gebelik haftasından önce spontan gebelik kaybıyla sonuçlanan kısır bir döngü ortaya çıkmaktadır.

### **2.3.1. Maternal Yaş ve Anatomik Faktörler**

Maternal yaş ve anatomik faktörlere bağlı RPL görülme sıklığı %8-10'dur. Yapılan araştırmalar maternal yaş ve daha önce görülen spontan gebelik kaybı sayısı arttıkça, RPL riskinde de artış olduğunu ortaya koymuştur. 40-44 yaş arası kadınlarda spontan gebelik kaybı görülme oranının %51'e ulaştığı bildirilmiştir (Larsen ve ark., 2013). Bununla birlikte daha önce yaşanan spontan gebelik kaybı sayısı arttıkça bunun tekrarlama olasılığı da artmaktadır. Örneğin, ilk gebelikte spontan gebelik kaybı yaşama oranı %15 iken, yaşanan bir gebelik kaybı sonrası bu oran %25'e, iki gebelik kaybı sonrası %33'e, üç gebelik kaybı sonrası ise %49'a çıktığı görülmüştür (Hatasaka, 1994).

Uterusa bağı anatomik faktörler de RPL'ye sebep olmaktadır. Konjenital uterus anomalisine (uterin septum, bikornuat uterus, uterin didelfis) sahip kadınlarda RPL görölme sıklığı %10-15'tir. Bunlar arasında en sık karşılaşılan konjenital uterus anomali, uterin septum olup görölme sıklığı %6-16'dır. Edinsel uterus anomalileri arasında RPL ile ilişkili olanları, endometriyal kavite patolojileri, uterin adezyonları (endometriyal polipler, uterin leiomyomları, Asherman sendromu) ve servikal yetmezliktir. ESHRE ve ASRM'ye göre endometriyal poliplerin varlığında histeroskopik polipektomiye gerek yoktur ancak vaka raporu çalışmaları, histeroskopik polipektominin RPL riskini azalttığı yönündedir (Carbonnel ve ark., 2021). Bu nedenle klinikte gebelik planlamasında gerekirse polipektomi önerilmektedir. Servikal yetmezlik ise daha çok ikinci trimester gebelik kayıplarına sebep olmakla birlikte öyküsü olan kadınlarda serklaj önerilmekte olup bunun literatürde RPL riskini azalttığına dair henüz kesin bir kanıt yoktur (Jorgensen ve ark., 2008).

### **2.3.2. Endokrinolojik İmmünolojik ve Çevresel Faktörler**

Endokrinolojik ve hematolojik faktörlere bağı RPL görölme sıklığı %5-10'dur. Endokrinolojik faktörler arasında, diyabet, tiroid disfonksiyonu, luteal faz defekti ve hiperprolaktinemi yer almaktadır (Pluchino ve ark., 2014). Tip 1 ve Tip 2 diyabet gebeliklerin yaklaşık %0,5-1' ini etkileyerek RPL'ye yol açmaktadır. Pregestasyonel diyabet erken doğum, spontan gebelik kaybı, preeklampsi riskinde artışa sebep olmakla birlikte glikozun yüksek düzeylerde teratonejik etkisinden dolayı ölümcül embriyonik malformasyonlara da neden olmaktadır (Pluchino ve ark., 2014). Tiroid hormonu fetal gelişim ve normal plasantasyon için vazgeçilmezdir. Gebelikte insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu etkisi ile tiroid hormon sentezi de artar. Tiroid disfonksiyonu RPL gelişimi ile ilişkilidir (Leung ve ark., 1993). Luteal faz defekti, gebeliğin başlangıcında korpus luteumdan, gebeliğin devamında ise plasentadan salgılanan P4'un yetersizliğine bağı gelişir. RPL vakalarının %35'inde luteal faz defekti görölmektedir. Ancak literatürde, luteal faz defektinin RPL etiyolojisi içinde olup olmadığı konusu tartışmalıdır. Klinikte teşhisi için kanıtlanmış standart bir test (idrarda LH seviyesi, bazal vücut ısı ölçümü, serum P4 düzeyi) bulunmadığından ayırıcı tanı yöntemleri arasından çıkarılması önerilmektedir. Luteal faz defektinin tedavisi için

progesteron analogu (progestin) tedavileriyle P4 hormon seviyesi yükseltilmektedir (Medicine, 2015). Hiperprolaktineminin (prolaktin yükselmesi) P4 salınımını baskılayarak luteal faz defektine yol açtığı ve RPL etiyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir (McNatty ve Sawers, 1975). Hematolojik faktörler arasında, hiperkoagülabilite ve trombofili yer almaktadır. Hiperkoagülabilite gebelikte fizyolojik olarak artmakla birlikte, pıhtılaşma bozukluğu olan kadınlarda, pulmoner emboli, derin ven trombozu, preeklampsi, plasental vasküler komplikasyonlar, intrauterin gelişme geriliği ve RPL gibi patolojilere sebep olmaktadır (Brenner, 2004). Kalıtsal trombofili sebepleri arasında, Faktör V Leiden mutasyonu, protein C ve protein S eksikliği ve protrombin gen mutasyonu yer almaktadır. Bunlar arasında en çok RPL ile ilişkisi olan Protein S eksikliğidir (Rey ve ark., 2003).

İmmünolojik ve genetik faktörlere bağlı RPL görülme sıklığı %10-15'tir. Gebeliğin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için immünolojik sistem hayatidir. Maternal immün toleransta rol alan hücrelerin (uNK, düzenleyici T hücreleri vb.) düzenlenmesi ve yönetilmesinde P4 görevlidir. Progesteron immün sistemin ara bulucusu olarak görev alır. Tekrarlayan gebelik kayıplarında pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokin dengesinde düzensizlik, yetersiz immün yanıt, immün toleranstan sorumlu hücrelerin azlığı ve uNK hücrelerinin dengesizliği yer almaktadır (Piccinni ve ark., 2021). Erken dönem spontan gebelik kayıplarının en sık rastlanan nedenleri arasında kromozomal bozukluklar yer almaktadır. Spontan gebelik kayıplarının %90'ından fazlasında sayısal kromozom anomalileri (anöploidi, poliploidi), yapısal anomaliler (inversiyon, translokasyon) ve mosaizm görülmektedir (Hyde ve Schust, 2015). Sayısal kromozom anomalilerinin büyük bir çoğunluğu ileri maternal yaş kaynaklıdır. İnversiyon, ve translokasyon gibi yapısal kromozom anomalisi olan çiftlerde RPL görülme olasılığı, sayısal kromozom anomalilerine göre daha düşüktür (Barber ve ark., 2010).

Çevresel faktörlere ve enfeksiyona bağlı RPL görülme sıklığı %5-10'dur. Enfeksiyonların spontan gebelik kayıplarına sebep olduğu bilinmesine rağmen RPL ile ilişkisi tartışmalıdır. Enfeksiyon kaynakları, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, sitomegalovirus ve primer genital herpes olmakla birlikte tek başlarına bu enfeksiyon

kaynaklarının RPL ye neden olduğu kanıtlanmamıştır. Ancak *Mycoplasma hominis* ve *Ureaplasma urealiticum* RPL ile en çok ilişkilendirilen mikroorganizmalardır (Obstetricians ve Gynecologists, 2002). Çevresel faktörlerin RPL etiolojisine dair kesin kanıtlar bulunmasa da sigara ve alkol kullanımı, yüksek kafein tüketimi (günde >300 mg), anestezi gazlarının solunması, çeşitli ilaçlar, ağır metaller gibi çevresel faktörlerin spontan gebelik kaybı için risk oluşturduğu bilinmektedir (Obstetricians ve Gynecologists, 2002).

### 2.3.3. Desidual Senesense Bağlı Faktörler

Desidualizasyon sürecinde endometriyumun oksidatif strese karşı dirençli oluşu, lokal enflamatuvar reaksiyonun modülasyonu ve immüntoleransın gelişimi sağlıklı bir gebelik için kritik önem taşır. Desidualizasyonun fizyolojik bir senesens süreci olduğu göz önüne alındığında, fizyolojik desidual senesensin (fizyolojik desidual yaşlanma) sağlıklı gebelik için gerekli olan tüm koşulları desteklediği de bilinmelidir. Ancak, fizyolojinin patolojiye dönüşümü ve patolojik desidual senesens (patolojik desidual yaşlanma) sürecine bağlı gelişen desidual kusurlar sonucunda, implantasyon başarısızlığı, RPL, spontan gebelik kayıpları ve uteroplazental disfonksiyon gibi çeşitli gebelik öncesi ve sonrası bozukluklar meydana gelmektedir (Weimar ve ark., 2012; Kuroda, 2019).

RPL tanısı almış kadınlarda, patolojik desidual senesense bağlı olarak uzun süreli pro-enflamatuvar yanıt, anti-enflamatuvar fazın desteklenememesi, anormal desidualizasyon, oksidatif strese karşı artan hassasiyet ve hCG'ye anormal tepkiler görülmüştür (Gellersen ve Brosens, 2014; Murakami ve ark., 2018). RPL tanısı almış kadınlarda, endometriyum doku örneklerinde uNK hücre eksikliği (yetersiz immün yanıt) ve desidual senesens belirteçlerinde iyodotironin deiyodinaz 2'nin (DIO2) yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmüştür (Lucas ve ark., 2020). Bu sonuçlar, endometrial stromal hücrelerin desidualizasyonu sırasında, ortamda immün hücre yetersizliğine bağlı artış gösteren senesent hücrelerin sebep olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla ortamda, embriyoyu destekleyecek olgun desidual hücrelerin yetersizliğine bağlı gelişen spontan gebelik kayıpları görülmektedir. Ayrıca RPL tanısı almış kadınlarda görülen süper reseptif endometriyum bir yandan kötü kalitedeki embriyoların dahi implantasyonuna olanak sağlarken, iyi kaliteli embriyolar için ise uygun olmayan bir mikroçevre sağlayarak yine spontan gebelik kayıplarına sebep olabilmektedir (Deryabin ve ark., 2020).

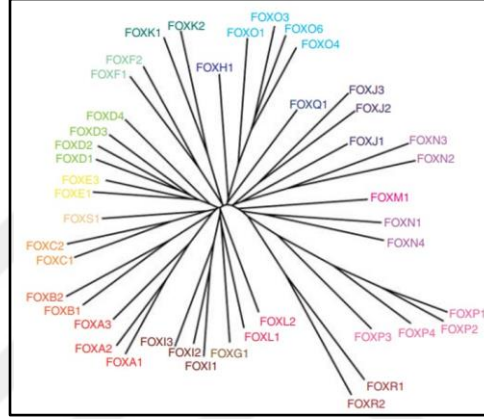
Erken doğum yapan kadınların desidual doku örneklerinde SA- $\beta$ -Gal, rapamisininin memeli hedefi (mTOR) aktivitesi ve gama-H2AX belirteçlerinde artış saptanmıştır (Gomez-Lopez ve ark., 2017). Benzer olarak gebeliğin 37. haftasından önce desidual dokuda artmış senesent desidual hücrelerin varlığının desidualizasyon yanıtını azalttığını ve erken doğumun başlamasına neden olabileceği gösterilmiştir (Velarde ve Menon, 2016). Ortamda sayıca artmış senesent hücreler, prostaglandin aracılı sinyal yolunu aktive eden SASP aracılığıyla erken doğumu teşvik eder (Deryabin ve ark., 2020). Ayrıca prenatal dönemde, ölü doğumların artmış maternal yaşla bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Flenady ve ark., 2011). Reseptif ve reseptif olmayan endometriyumda, senesent hücrelerin popülasyonu ve mezenkimal kök hücre benzeri hücreler ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, reseptif olmayan endometriyumdan izole edilen insan endometriyal stromal hücrelerinde artmış SA- $\beta$ -gal aktivitesi, interlökin-6 (IL6) ve interlökin-17A (IL17A) gibi senesens ilişkili sitokin belirteçlerinin artış gösterdiği ve kök hücre biyo-belirteçlerinin azaldığı ortaya konulmuştur (Tomari ve ark., 2020). Özetle, fizyolojik desidual senesensin patolojiye dönüşmesi, uterus fonksiyonlarında azalmadan, yetersiz desidualizasyona, plasental ve çeşitli gebelik patolojilerine, kusurlu embriyo gelişimine, ölü doğumlara, reseptivite kusurlarına ve erken doğumlara sebep olmaktadır. Dolayısıyla, uterustaki fizyolojik ve patolojik süreçlerde görülen senesent hücrelerin kadın fertilitesi üzerindeki olumlu ve olumsuz etkisi oldukça karmaşıktır (Velarde ve Menon, 2016).

#### **2.4. FOXM1: Forkhead Box (FOX) Ailesine Ait Bir Transkripsiyon Faktörü**

Forkhead ailesi ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmış transkripsiyonel düzenleyici bir ailedir. *Drosophiladaki* mutasyonuyla çatal şeklindeki ektopik baş morfolojileri gösteren bu aile Forkhead olarak adlandırılmıştır (Carter ve Brunet, 2007). Sekans benzerliği temel alınarak FOXA'dan FOXR'ye kadar sınıflandırılmış insanda tanımlanmış 100'den fazla üyesi vardır (Kaestner ve ark., 2000). FOX ailesinin korunmuş DNA bağlanma bölgeleri mevcuttur ki bu bölgeler FKH/FH domeni olarak adlandırılır (Huang ve Tindall, 2007). FOX ailesi üyeleri kritik hücrel süreçlerde rol alırlar. FOXA ve FOXB alt ailesi, endodermal kökenli organ gelişiminde hücrel metabolizma olaylarında (Friedman ve Kaestner, 2006); FOXC alt ailesi, kan ve lenfatik damarların oluşumu ve olgunlaşmasında (Seo ve ark., 2006); FOXD ve FOXE alt ailesi,

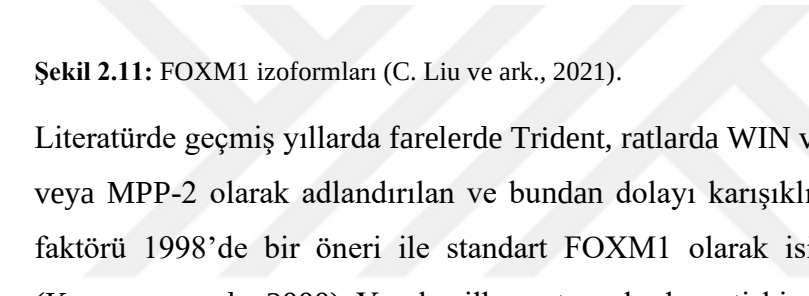


embriyogenez sürecinde polarizasyonda (Fleskens ve van Boxtel, 2014); FOXJ alt ailesi, spermatogenezde (Ni ve ark., 2016); FOXO alt ailesi, apoptoz, oksidatif ve hücrel strese karşı direncin düzenlenmesinde (Huang ve Tindall, 2007); FOXP alt ailesi, immün sistem gelişim ve işlevinin düzenlenmesinde (Kim, 2010); FOXQ, FOXR ve FOXS alt ailesi, hücrel farklılaşmanın kontrolünde ve koordinasyonunda rol alır (Fleskens ve van Boxtel, 2014), (**Şekil 2.10**).



**Şekil 2.10:** FOX ailesi üyelerinin filogenetik ağacı (Fleskens ve van Boxtel, 2014).

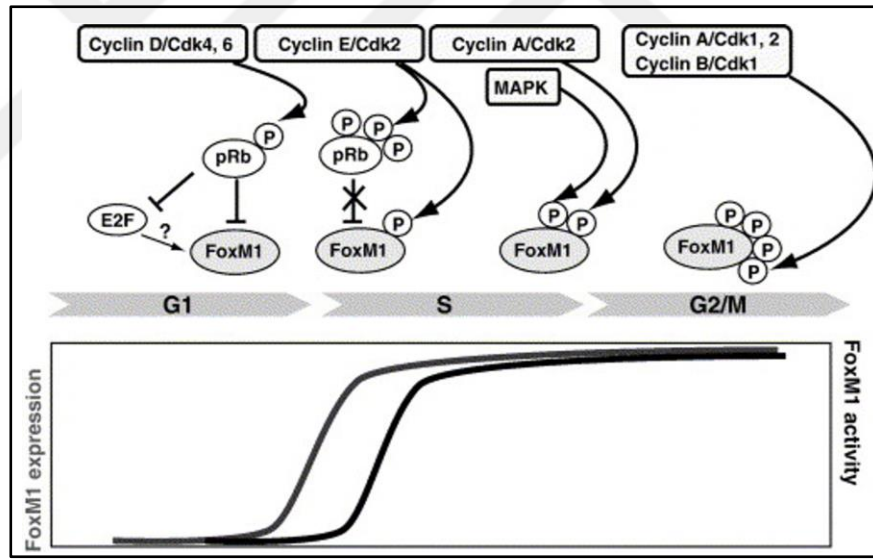
Forkhead box M ailesinin bilinen tek üyesi olan 12. kromozomun kısa kolunun 13.33 bandında yer alan ve 10 ekzon içeren FOXM1 bir transkripsiyon faktörüdür (Laoukili ve ark., 2007). FOXM1 geni aslında I-VIII ekzonları ve alternatif ekzonlar olan Va ve VIIa'ya sahip toplam 10 ekzondan oluşur. Ekzon Va diğer FOX ailelelerinde olmayan bir özellik ile DNA bağlanma alanına (DBD) 15 amino asitlik bir ekleme kodlar. Ekzon VIIa ise transaktivasyon alanına (TAD) 38 amino asitlik bir ekleme kodlar (Ye ve ark., 1997). Ekzon Va ve Ekzon VIIa'nın bu özelliklerinden dolayı FOXM1'in FOXM1a, FOXM1b ve FOXM1c olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. FOXM1a on ekzonun hepsini içerir, FOXM1b Va ve VIIa'yı içermez, FOXM1c ise sadece Va'yı içerirken, FoxM1b ve FoxM1c izoformları transkripsiyonal aktivatörlerdir. FoxM1a transkripsiyonal represör görevi görmektedir (Koo ve ark., 2012). FOXM1'in üç fonksiyonel protein alanı bulunmaktadır. N-terminalinde negatif düzenleyici alan (NRD), merkezi yerleşimli DBD ve C-terminalinde asidik bir TAD içerir (**Şekil 2.11**).



Literatürde geçmiş yıllarda farelerde Trident, ratlarda WIN veya INS-1, insanda HFH-11 veya MPP-2 olarak adlandırılan ve bundan dolayı karışıklık yaratan bu transkripsiyon faktörü 1998’de bir öneri ile standart FOXM1 olarak isimlendirilmeye başlanmıştır (Kaestner ve ark., 2000). Yapılan ilk araştırmalarda, yetişkin dokularında FOXM1'in aktif çoğalan hücrelerde sınırlı olduğunu gösterilirken, embriyonik dokularda ise yaygın ekspresyonu tanımlanmıştır (Korver ve ark., 1997; Ye ve ark., 1997).

FOXM1 hücrel senesens, DNA hasar yanıtı, hücrel farklılaşma, kök hücre yenilenmesi, epitelyal-mezenkimal geçiş, oksidatif stresin azaltılması, anjiogenez ve pre-metastatik niş oluşumu gibi çok sayıda hücrel fonksiyonda rol oynar (Jaiswal ve ark., 2014). FOXM1 embriyonik dokularda yaygın olarak özellikle epitelyum ve mezankimal kökenli hızla çoğalan hücrelerde ifade edilirken, yetişkin dokularında ise sadece yüksek çoğalma kapasitesine sahip dokularda (timus, testis, endometriyum) ifade edilmektedir. Çoğalma kapasitesi düşük olan dokularda, akciğer, böbrek, dalak ve ovaryumlarda FOXM1 ekspresyonu düşüktür. Bununla birlikte birçok kanser türünde FOXM1 ekspresyonu yüksek oranda ifade edilmektedir (M. Liu ve ark., 2006). FOXM1 ekspresyonunun hücrenin çoğalma kapasitesi ve durumuyla ilgili doğrudan ilişkili olduğu ve hücre çoğalmasına özgü bir protein olduğu gösterilmiştir (Laoukili ve ark., 2007).

*FOXM1* geni hücre döngüsünde özel bir ekspresyon sergiler. S-fazının başlangıcında *FOXM1* ifadesi artar ki bu artış G2-fazı ve M-fazı boyunca devam eder. Hücre döngüsü boyunca *FOXM1*'in protein fosforilasyonu ve transkripsiyonel aktivitesi eş zamanlı olarak devam eder. *FOXM1*'in ifadesi G2-fazında maksimuma çıkar. C-terminal bölgesine siklin bağımlı kinaz (CDK) bağlanması ile fosforilasyonu gerçekleşip aktivasyonu tamamlanır. *FOXM1*, CDK kompleksleri aracılığıyla en erken G1-fazında başlayıp, G2-M-fazları boyunca devam eder. G1-S-fazlarında siklinE-CDK1 kompleksi, G2-fazında siklinB-CDK1 kompleksi bağlanır. Tüm bunların yanında *FOXM1* aktivasyonu sadece fosforilasyon yoluyla değil Ras-MAPK yolu gibi uygun mitojenik sinyallerle de gerçekleşebilir (Ma ve ark., 2005) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Hücre döngüsü boyunca *FOXM1* ve fosforilasyonu (Laoukili ve ark., 2007).

#### 2.4.2. *FOXM1* ve Hücrel Senesens

Çoğalma kapasitesi yüksek olan hücrelerde ifade edilen *FOXM1*, G0-fazındaki sessiz durumdaki hücrelerde ve senesent hücrelerde ifade edilmez (Koo ve ark., 2012). Ancak bu hücreler çeşitli uyarılara bağlı olarak aktive olup proliferasyon yeteneklerini kazandıklarında *FOXM1*'i eksprese etmeye başlayabilirler. Keratinosit büyüme faktörü, fetal sıgır serumu, büyüme hormonları ve E2 hormonu hücrelerin proliferasyon yeteneklerini kazanmasını sağlayan uyarılardır (Down ve ark., 2012; Koo ve ark., 2012).

Hücre dışı veya hücre içi proliferatif uyaranlar ve sessiz durumdaki hücrelerin hücre döngüsüne girmesine yol açabilen transmembran reseptörleri tarafından FOXM1 ekspresyonu artarak, gelen sinyallere yanıt olarak PI3K-Akt, Ras-ERK, JNK/p38MAPK gibi sinyal yollarında işlev görür (Yao ve ark., 2018).

Yaşın artması ile birlikte senesent hücre sayısının arttığı ve çoğalan hücre popülasyonlarının sayısının azaldığı bilinmektedir. Genç, orta yaşlı ve yaşlı insan donörlerinden alınan aktif olarak bölünen insan deri fibroblastlarındaki *FOXM1* mRNA ifadesinin yaşın artması ile azaldığı bildirilmiştir. Yaşlı donörlerden alınan fibroblastların *FOXM1* mRNA ifadeleri orta yaşlılara oranla 3 kat, gençlere oranla 9 kat düşüş sergilemiştir (Ly ve ark., 2000). Benzer olarak, yaşlı insan fibroblast hücrelerinde mitotik anomali sıklığının ve buna bağlı olarak anöploidi artışının gösterildiği çalışmada, FOXM1 ekspresyonun yaşlı insan fibroblast hücrelerinde azaldığı bildirilmiştir. Bunun muhtemel nedeni olarak, yaşın artışı ile hücrelerin proliferasyon yeteneklerinin azalması ancak stres seviyesinin, genomik kararsızlığın ve proteostaz kaybının artması olduğu düşünülmüştür (J. C. Macedo ve ark., 2018).

#### **2.4.3. FOXM1 ve Desidualizasyon**

Embriyo implantasyonu ve kanser ilerlemesinin benzer özellikleri göz önüne alındığında, kanser sürecinde ekspresyonu artan *Foxm1*'in embriyo implantasyonunda da rol alabileceğinin düşünüldüğü bir çalışmada, farelerde normal gebeliğin 1. ve 5. günlerinde *Foxm1* protein ekspresyonunun embriyo implantasyonu sırasında zamana bağlı değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Buna göre farelerde gebeliğin 1-3. günlerinde *Foxm1*'in stromal hücrelerde eksprese olmaya başladığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak, farelerde desidualizasyonun embriyo varlığı ile tetiklenmesi ve desidualizasyon öncesinde hücrelerin proliferasyon kapasitesinin artmasıyla *Foxm1* ekspresyonunda stromal hücrelerde artış olabileceği değerlendirilmiştir. Öte yandan, gebeliğin ilerlemesi ile *Foxm1*'in glandüler ve lümen epitelinde eksprese olduğu görülmüştür (Xie, Cui, ve ark., 2014). Farelerde yapılan başka bir çalışmada ise, fare stromal hücrelerinde *Foxm1* yokluğunun, maternal kısımda desidual hücrelerde bozulmuş poliploidi ve desidual hasar, fetal kısımda ise embriyonik gelişimsel hatalar nedeniyle embriyonik ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Krupczak-Hollis ve ark., 2004). *Foxm1*'in farelerde koşullu silinmesinin,

hücre döngüsü ilerlemesini ve desidual hücrelerin oluşumunu engellediği ve desidualizasyon kusurlarına ek olarak implantasyon başarısızlığına sebep olduğu gösterilmiştir (Gao ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışma da ise farelerde *Foxm1* kaybının sentrozom hatalarına sebep olduğu bildirilmiştir (Schuüller ve ark., 2007). Sentrozom hatalarının, ortamda senesent hücrelerin artışına da sebep olarak, hücre yaşlanmayı, genomik kararsızlığı ve immün sistemi etkilediği bilinmektedir (Wu ve ark., 2020). Özetle, farelerde *Foxm1*, desidualizasyon, implantasyon ve endometrial reseptivitenin kazanılmasında önemli bir rol oynamaktadır.

İnsanlarda, FOXM1 menstrual siklus sırasında proliferatif ve geç sekretuvar fazda insan endometriyumunda dinamik olarak yüksek oranda eksprese edilir. Hem proliferatif hem de geç sekretuvar fazda FOXM1'in bu yüksek ekspresyonu, insan endometriyumunun yenilenmesinde, gebeliğe hazırlanmasında ve gebelik devamlılığının korunmasında potansiyel bir rolü olduğunu düşündürür. Ek olarak, orta-sekretuvar fazda (ki bu faz embriyo implantasyonunun gerçekleştiği “implantasyon penceresi” dönemine denk gelir) FOXM1'in endometrial stromal hücrelerde yüksek oranda nükleusta eksprese olduğu görülmüştür (Xie, Li, ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2015). Bu durum desidual genleri düzenleyen nüklear transkripsiyon faktörü olan FOXM1'in sekretuvar fazın her üç döneminde de önemini göstermektedir. Tümörögenез ile implantasyon süreçlerinin benzerliğine dikkat çeken insan hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada, araştırmacılar *in vitro* koşullarda FOXM1'in ekstrasvillöz trofoblast (EVT) hücrelerindeki potansiyel rolünü araştırmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, insanlarda FOXM1'in EVT'ların invazyon süreçlerini yönlendirdiği bildirilmiştir (Xie ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, insan endometrial stromal hücre hattında, FOXM1 inhibisyonunun, endometrial stromal hücrelerin proliferasyonu sırasında G2/M-faz geçişini geciktirdiğini, endometrial stromal hücrelerin proliferasyonlarını ve desidual hücrelere farklılaşmalarını engellediği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2015). İnsanlarda, VEGF ekspresyonunun reseptif endometriyum için bir biyobelirteç olabileceğinin tartışıldığı bir çalışmada ise FOXM1'in VEGF ekspresyonunu up-regüle ettiği gösterilmiştir (Paul ve ark., 2013; X. Liu ve ark., 2018). Dolayısıyla insanlarda FOXM1'in desidualizasyon ve implantasyona ek olarak, endometrial reseptivitenin kurulması için de gerekli olduğu raporlanmıştır.

## 2.5. Progesteron Analogu (Progestin) Uygulamaları

Her menstrual siklusta LH pikinin ardından ovulasyon tetiklenir ve böylece luteal faz evresi başlamış olur. Luteal faz evresi, gebeliğin oluşumu ve devamlılığı için hayati önem taşımaktadır. Luteal faz evresinin kontrolü ve düzenleniminden P4 hormonu sorumludur. Menstrual siklusun orta luteal faz evresinde, serum P4 seviyesi 3-30 ng/mL düzeyinde olup 90 dakika içerisinde toplam sekiz kez dalgalanma gösterir. Erken gebelikte 8-10.haftalarda P4 üretimini korpus luteum sağlarken, gebeliğin ilerlemesi ve plasentanın gelişimi ile P4 üretimini plasenta devir alır ki buna “luteo-plasental geçiş” adı verilir. Sağlıklı bir erken gebelikte serum P4 seviyesi 10-50 ng/mL iken, spontan kayıpların görüldüğü patolojik gebeliklerde serum P4 seviyesi 3-10 ng/mL seviyesinde kalmaktadır (Fanchin ve ark., 2003).

Korpus luteumun fonksiyon bozukluğuna bağlı gelişen P4 hormon üretiminin azalması ile luteal faz defekti görülmektedir (Usadi ve ark., 2008; Boutzios ve ark., 2013). P4 hormon seviyesindeki azalma ile spontan gebelik kaybı yaşandığı bildirilmiştir (Felberbaum ve ark., 2000). Progestinler, P4 hormonuna benzer etkiye sahiptirler. Bu nedenle üremeye yardımcı tedavi protokollerinde sağlıklı gebeliğin devamlılığını desteklemek adına gebeliğin 10-12. haftasına kadar progestin tedavilerinin uygulanması tavsiye edilir. Progestin tedavileri, P4 hormonu agonisti olup doğrudan hormonal etki göstermeye yardımcıdırlar. Progestinler doğal ve sentetik olmak üzere iki formda olup vajinal, oral, intramusküler rektal ve subkutan olarak uygulanmaktadır. Vajinal kullanımda, karaciğerde enzimatik yıkıma uğramayıp hızla absorbe edilmesi, biyoyarlanımının yüksek olması ve yan etkisinin az olması sebebiyle en sık tercih edilen yöntemdir (Fatemi ve ark., 2007). Yapılan meta-analiz sonucuna göre, intramusküler progestin uygulaması vajinal uygulamaya göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (Propst ve ark., 2001).

Gebelik patolojilerinin tedavilerinde 10.karbon atomlarında metil grubu içermeyen nomegestrol asetat, nesterone, demegeston, promegeston ve trimegeston gibi progestinler kullanılsa da sıklıkla medroksiprogesteron asetat ve didrogesteron gibi 10.karbon atomlarında metil grubu içeren progestinler kullanılmaktadır (Micks ve ark., 2015).

### 2.5.1. Medroksiprogesteron Asetat

Medroksiprogesteron asetat,  $C_{24}H_{34}O_4$  kimyasal formülüne sahip progestin tipi bir hormonal ilaçtır. Yapay bir P4 olup, progesteronun biyolojik hedefi olan progesteron reseptörüne bağlanır. Progesteronun, endometriyumun korunmasında önemli rol oynadığı, endometriyumu gebelik için hazırladığı ve desidualizasyonu desteklediği bilinmektedir. Öte yandan, endometriyal patoloji durumlarında P4'un fonksiyonu sıklıkla değişkenlik göstermektedir (I. I. Lee ve Kim, 2014). Endometriyal patolojilerde, sıklıkla üretilen P4 seviyesi düşmekte veya tam tersi P4 üretimi artmakta ancak hücreler progesteron reseptörüne yetersiz yanıt vermektedir (Thieffry ve ark., 2022).

MPA, genomik olmayan yolak üzerinden hızlı bir sinyalleşme mekanizmasına bağlı olarak progesteron reseptörünü aktive ederek gen transkripsiyonunu indükler (Moussatche ve Lyons, 2012). MPA, Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar listesinde yer almakta ve günümüzde endometriyozis, endometriyal hiperplazi, anormal uterin kanama ve menopozal hormon tedavisinin bir parçası olarak kullanılmaktadır (Kuhl, 2005). MPA'nın düşük dereceli endometrial tümörleri olan hastalarda genel sağkalımı uzattığı da gösterilmiştir (Thigpen ve ark., 1999). Endometrial tümörlere ek olarak, uterin leiomyom tedavisinde de MPA kullanımının, leiomyom gelişiminde azalmaya yol açtığı ve hasta genel durumunu iyi yönde etkilediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, üreme çağındaki genç kadınlarda sıklıkla ortaya çıkan uterin leiomyomların tedavisinde MPA'nın güvenilir ve girişimsel olmayan bir tedavi yöntemi olabileceğini belirtmişlerdir (Harmon ve ark., 2022). MPA gebelikte de güvenle kullanılmaktadır. 2020 yılında tamamlanan, 14 yıllık gözlemsel çalışma raporuna göre, 4057 klinik gebelikten 1343'ü düşük tehdidi nedeniyle MPA kullandığı ve bunların 934'ü (%69,6) canlı doğum ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Yovich ve ark., 2020).

### 2.5.2. Didrogesteron

Didrogesteron, ilk olarak 1950'lerde geliştirilmiş olup 1960'larda klinik kullanıma geçmiş bir progestindir. DYD yaygın olarak, menometroraji, adet düzensizlikleri, dismenore, RPL tedavisi, endometriyozis ve premenstrüel sendrom tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. DYD, yapısal açıdan doğal P4 ile yakından ilişkilidir ve emiliminden sonra büyük ölçüde kararlı 20- $\alpha$ -dihidrohidrogesteronu dönüştürülür (Van Amsterdam ve

ark., 1980). Progesteron molekülünden tek farkı 6. ve 7. karbon moleküllerinde ek çift bağ içermesidir. DYD, 10. karbonundaki metil grubunun betadan alfa pozisyonuna geçmesi ve 9. karbonundaki hidrojen atomunun alfadan beta pozisyonuna geçmesi sebebiyle P4 hormonuna kıyasla kolaylıkla bükülebilir bir moleküldür. DYD, yüksek seçiciliğe sahip sentetik bir progestin olup %85 bağlanma afinitesi ile ortamda sadece progesteron reseptörüne bağlanır. MPA ise DYD'ye kıyasla progesteron reseptörüne bağlanma afinitesi daha yüksekken (%196) androjenik/östrojenik etkiye sahip olup diğer hormon reseptörlerine de düşükte olsa bağlanma afinitesi (%10) vardır (Kontula ve ark., 1975).

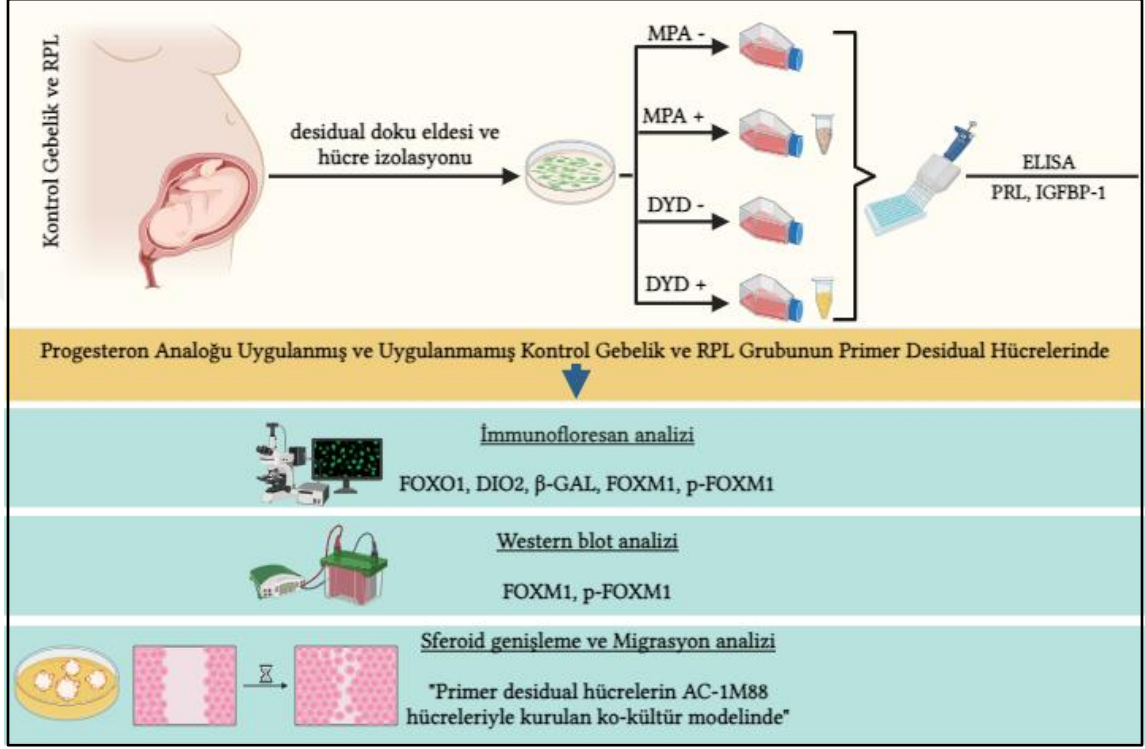
DYD'nin en fazla oral kullanımında biyoyararlanımı yüksektir. Vajinal yolla uygulanan diğer progestinler kadar etkili olup olmadığının araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. 2018 yılında, oral DYD ve vajinal P4 kullanan 3386 kadının dahil edildiği 8 randomize kontrollü çalışmanın meta-analizinde oral DYD kullanımının en az vajinal P4 kullanımı kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Barbosa ve ark., 2018).

Çeşitli endometrial patolojilerin ve özellikle erken gebelik kayıplarının önlenmesinde güvenle kullanılan MPA ve DYD'nin gerek progesteron reseptörüne bağlanma afinitelerinin farklılıklarından dolayı, gerekse MPA'nın diğer hormon reseptörlerine bağlanabilme potansiyellerinden dolayı literatürde iki progesteron analogunun karşılaştırmalı analizleri bulunmaktadır (Schindler, 2009). Ayrıca, MPA ve DYD'nin insan umbilikal ven endotel hücrelerinin moleküler sinyalleşmeleri üzerinde farklı etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (Simoncini ve ark., 2006). Bu sebeple progesteron reseptörünü aktive eden MPA ve DYD'nin farklı farmakolojik özelliklere sahip oldukları göz önüne alındığında, klinik açıdan karşılaştırmalı değerlendirilmeleri önerilmektedir.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızın deneysel tasarımı Şekil 3.1’de özetlendi.



Şekil 3.1: Çalışmanın deneysel tasarımı. Şekil, Biorender yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

#### 3.1. Desidual Dokuların Eldesi

Örnekler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD., Perinatoloji bölümüne başvuran hastalardan toplandı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi insan etik kurulu (protokol no: KAEK-726) ve Dünya Tıp Birliği (WMA) Helsinki Bildirgesi kurallarına uyuldu ve hastalardan gönüllü onam formları alındı. Hastaların desidual doku örnekleri, gebelik desiduasından maternal küretaj yoluyla elde edildi (Shao ve ark., 2020). Çalışma gruplarının istatistiksel analizi için gruplarda gereken örneklem sayısı %80 güç, 0.05 istatistiksel anlamlılık ve 0.56 etki büyüklüğünde ANOVA güç analizi kullanılarak hesaplandı ve her bir grup için 10 adet desidual doku örneği gerektiği saptandı. Bu nedenle, çalışmada iki grup oluşturuldu ve her gruptan n=10 desidual doku örneği toplandı.

**Grup 1:** Kontrol gebelik grubu; fizyolojik gebelik grubu-istemli sonlandırılmış ve klinik olarak sağlıklı gebelikleri olan hastalardan (n=10) desidual doku örnekleri gebelik desiduasından maternal küretaj yoluyla toplandı.

**Grup 2:** RPL grubu; patolojik gebelik grubu-tekrarlayan gebelik kaybı (RPL-20. gebelik haftasından önce iki veya daha fazla sayıda yaşanan spontan gebelik kaybı) yaşayan kadınların (n=10) desidual doku örnekleri gebelik desiduasından maternal küretaj yoluyla toplandı. Çalışmada ACOG, ASRM ve ESHRE gibi uluslararası kuruluşların RPL tanımı (iki veya daha fazla sayıda yaşanan spontan gebelik kaybı) baz alındı (Jauniaux ve ark., 2006; Medicine, 2012).

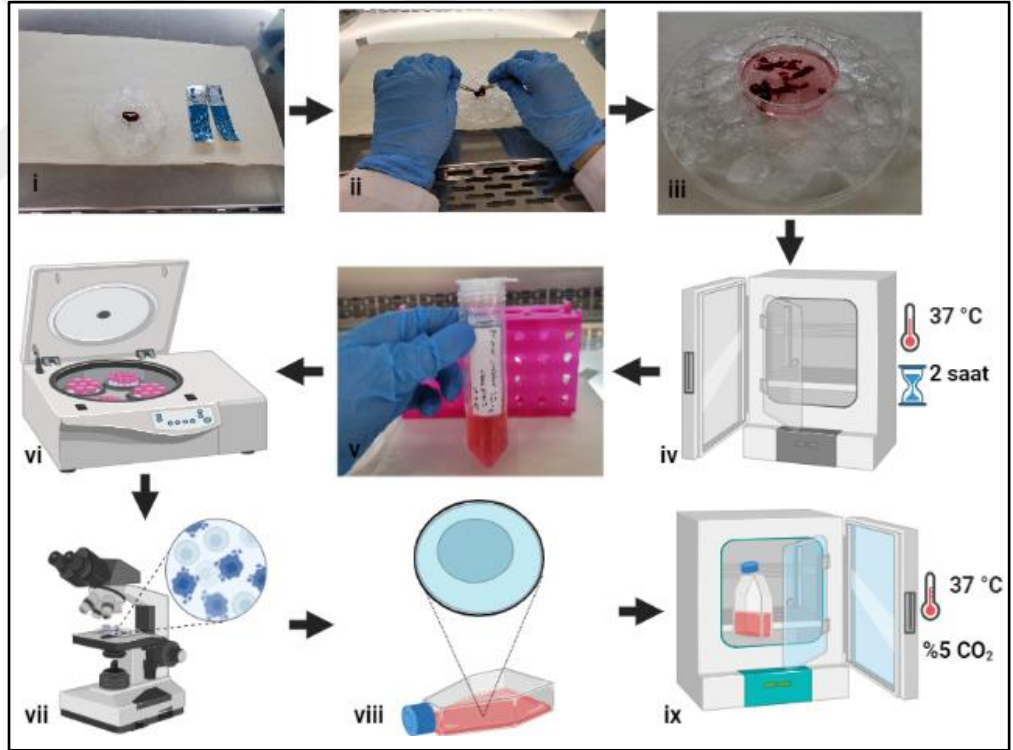
Her iki grupta hastaların dışlanma kriterleri belirlendi: **(1)** pelvik muayene ve ultrasona göre uterus için anatomik malformasyon taşıyanlar, **(2)** genetik anomalisi bulunanlar, **(3)** endokrin veya metabolik hastalıklar içerenler, **(4)** enfeksiyon taşıyanlar, **(5)** 40 yaşın üzerinde olanlar, **(6)** gebelik sürecinde progesteron analogu (progestin) tedavisi alanlar, **(7)** birden fazla partnerden gebelik kaybı yaşayanlar. Bu kriterlerden herhangi birini dahi taşıyan hastalar her iki grup için de çalışmaya dahil edilmedi (Dimitriadis ve ark., 2020; Lv ve ark., 2021).

### **3.2. Primer Desidual Hücre İzolasyonu ve Kültürü**

Kontrol gebelik ve RPL gruplarından alınan desidual doku örneklerinin izolasyonunda aşağıdaki protokol sırası ile uygulandı (Farine ve ark., 2018; Shao ve ark., 2020).

- 1)** Desidual doku örnekleri 50 ml’lik steril falkonda (Corning #430291) buz üzerinde hızlıca laboratuvara getirildi.
- 2)** Desidual doku örnekleri buz üzerinde bistüri (Brooche #12008) yardımı ile parçalandı ve ardından %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco #26140079), %1 penisilin-streptomisin (Gibco #15070063) ve %1 L-glutamin (Gibco #25030081) ilaveli DMEM:F12 (Gibco #11320033) kültür besiyerine, 500 µg/ml kollajenaz tip I-a (Sigma #C0130) ve 100 µg/ml DNase I (Thermo #89836) ilavesi yapılarak 37°C de 2 saat inkübe edilerek enzimatik sindirim yapıldı.
- 3)** Enzimatik sindirimin ardından, doku örnekleri 40 µM’lık hücre süzücünden (Corning #431751) geçirildi ve 1000 rpm’da 5 dakika 3’er kez santrifüj (Sigma #2-16K) edildi.

- 4) Santrifüj sonunda, süpernatant atılıp, pellet üzerine 3 mL besiyeri ilave edildi ve süspanse hale getirildi.
- 5) Elde edilen desidual hücreler, 1:1 oranında %0.4'lük tripan mavisini boyası (Invitrogen #T10282) ile Thoma lamına (Isolab #SH-204-001) eklenerek, mikroskop altında canlı ve ölü hücreler ayrıştırıldı. Canlı hücre oranı (%) = boya almamış hücrelerin sayısı/toplam hücre sayısı x 100 formülü ile hesaplandı ve deneye canlı hücreler ile devam edildi.
- 6) Primer desidual hücre izolasyonu sonrasında elde edilen süspanse haldeki primer desidual hücreler, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ilaveli DMEM:F12 besiyerinde 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskta (Corning #CLS430639) 37°C de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Panasonic #MCO-18AC-PE) kültüre edildi (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2:** Primer desidual hücre izolasyonu ve kültürü. **i)** Kontrol gebelik (n=10) ve RPL (n=10) gruplarına ait desidual doku örnekleri buz üzerinde hızlıca laboratuvara getirildi. **ii)** Doku buz üzerinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. **iii)** Kollajenaz Tip I-a ve DNase I ilavesi yapılan DMEM:F12 besiyeri eklendi. **iv)** Dokular 37°C de 2 saat inkübe edilerek enzimatik sindirim yapıldı. **v)** Ardından, doku örnekleri 40 µM'lık hücre süzücünden geçirildi. **vi)** 1000 rpm'da 5 dakika 3'er kez santrifüj edildi. **vii)** Elde edilen süspanse haldeki primer desidual hücrelerin tripan mavisiniyle thoma lamında canlı ve ölü hücre ayrımı yapıldı. **viii)** 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskta canlı primer desidual hücrelerle kültüre devam edildi. **ix)** Primer desidual hücreler 37°C de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültüre edildi. Şekil, Biorender yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

### 3.3. Progesteron Analogu (Progestin) Uygulamaları

Progesteron analogu olan progestin (MPA ve DYD) uygulamalarının kontrol gebelik ve RPL gruplarındaki desidual hücrelere etkisini gözlemlemek amacıyla, aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

- i. Kontrol gebelik + MPA grubu
- ii. Kontrol gebelik + DYD grubu
- iii. RPL + MPA grubu
- iv. RPL + DYD grubu

Desidual hücrelerin kültüre edildiği %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ilaveli DMEM:F12 besiyeri içeriğine MPA ve DYD uygulaması için aşağıdaki protokol sırası ile uygulandı.

- 1) 1 mL etil alkolde (Chemlab #L00.0505.5000), 5 mg MPA (Sigma #1378001) çözüldü ve elde edilen total konsantrasyon (12.900  $\mu$ M), 20  $\mu$ M final konsantrasyonu olacak şekilde medium ile seyreltildi ve 48 saat boyunca 37°C de %5 CO<sup>2</sup>'li inkübatörde kültüre edildi (Xu ve ark., 2023).
- 2) 1 mL etil alkolde, 63 mg DYD (Selleckchem #S4097) çözüldü ve elde edilen total konsantrasyon (201.000  $\mu$ M), 20  $\mu$ M final konsantrasyonu olacak şekilde medium ile seyreltildi ve 48 saat boyunca 37°C de %5 CO<sup>2</sup>'li inkübatörde kültüre edildi (Simoncini ve ark., 2006).
- 3) Kontrol gebelik ve RPL gruplarına MPA ve DYD uygulamalarından sonra PRL ve IGFBP-1 seviyeleri ELISA yöntemiyle, FOXO1, DIO2,  $\beta$ -GAL, FOXM1 ve p-FOXM1 (Thr 600) ekspresyonları immünofloresan yöntemiyle analiz edildi. FOXM1 ve p-FOXM1 (Thr 600)'in protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemiyle analiz edildi.

### 3.4. ELISA Yöntemi ile PRL ve IGFBP-1 Seviyesinin Ölçümü

Primer desidual hücreler elde edildikten yaklaşık 48 saat sonra, hormon ilavesiz besiyerinde, desidual hücrelerin karakterizasyonlarını yansıtan prolaktin (PRL) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1 (IGFBP-1) ekspresyonunun devam etmesi hücrelerin uygun *in vitro* koşullarda devamlılıklarını sağladıklarının bir göstergesidir (Lv ve ark., 2021). ELISA yöntemi için, 48 saat kültüre edilen desidual hücrelerden toplanan

süpernatantta desidual hücrelerin ortama salgıladığı PRL ve IGFBP-1 seviyesi ölçüldü ve aşağıdaki protokol sırası ile uygulandı.

- 1) 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda kültüre edilen desidual hücrelerin mediumları, 15 ml'lik steril falkona (Corning #430766) toplandı ve +4°C de 1000 g de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar deneyler yapılana kadar -20°C de saklandı.
- 2) Çalışılacak süpernatantlar oda ısısına getirildikten sonra, hazırlanan standartlar (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8) ve örnekler 100 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 3) Ardından, üzeri parafilm ile kaplanıp, 37°C de 90 dakika inkübe edildi.
- 4) Süre sonunda, her bir kuyucuğa 1:99 oranında hazırlanan, 100 µL biyotinli tespit antikor solusyonu kuyucuklara eklenerek, 37°C de 1 saat inkübe edildi.
- 5) Devamında, inkübasyon karışımı uzaklaştırıldı ve 3'er kez 2'ser dakika yıkama solusyonu ile yıkandı.
- 6) Yıkamanın ardından, 1:99 oranında hazırlanan, 100 µL HRP solusyonu kuyucuklara eklenerek, 37°C de 30 dakika inkübe edildi.
- 7) Ardından, 3'er kez 5'ser dakika yıkama solusyonu ile yıkandı.
- 8) Yıkama sonrasında, 90 µL substrat solusyonu eklenerek 37°C de 25 dakika inkübe edildi ve rengin maviye dönüştüğü görüldü.
- 9) İnkübasyonun ardından, tüm kuyucuklara 50 µL sonlandırıcı solüsyon eklenerek rengin sarıya dönüştüğü görüldü ve hemen 450 nm dalga boyunda EPOCH mikropate okuyucu (BioTek Vermont #254775) kullanarak, PRL ve IGFBP-1 seviyeleri ölçüldü.
- 10) Ölçüm sonucunda elde edilen optik dansite (OD) değerleri kaydedildi ve standart çalışma çözeltilerinin absorbans değerleri ile standart eğri oluşturuldu ve PRL ile IGFBP-1 seviyeleri ng/mL cinsinden ifade edildi.
- 11) Deneyler altı bağımsız biyolojik örnekte (n=6) bağımsız olarak iki kez tekrarlandı (2 teknik tekrar).
- 12) İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

ELISA yönteminde kullanılan PRL ve IGFBP-1 kitinin katalog numaraları ve standart değerleri **Tablo 3.1**'de gösterildi.

**Tablo 3.1:** PRL ve IGFBP-1'in katalog numaraları ve standart değerleri.

|                           | <b>PRL</b>              | <b>IGFBP-1</b>          |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Katalog numarası</b>   | Elabscience #E-EL-H0141 | Elabscience #E-EL-H0442 |
| <b>Standart değerleri</b> | <b>S1:</b> 100 ng/mL    | <b>S1:</b> 10 ng/mL     |
|                           | <b>S2:</b> 50 ng/mL     | <b>S2:</b> 5 ng/mL      |
|                           | <b>S3:</b> 25 ng/mL     | <b>S3:</b> 2,5 ng/mL    |
|                           | <b>S4:</b> 12,5 ng/mL   | <b>S4:</b> 1,25 ng/mL   |
|                           | <b>S5:</b> 6,25 ng/mL   | <b>S5:</b> 0,63 ng/mL   |
|                           | <b>S6:</b> 3,13 ng/mL   | <b>S6:</b> 0,32 ng/mL   |
|                           | <b>S7:</b> 1,56 ng/mL   | <b>S7:</b> 0,16 ng/mL   |
|                           | <b>S8:</b> 0,78 ng/mL   | <b>S8:</b> 0,08 ng/mL   |

### 3.5. İmmünofloresan Analizi

MPA ve DYD uygulanmış ve uygulanmamış primer desidual hücrelerin immünofloresan analizi için aşağıdaki protokol sırası ile uygulandı.

- 1) Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait desidual hücreler %4 paraformaldehit (Merck #1.04005.1000) ile oda ısısında 10 dakika fikse edildi.
- 2) Fiksasyonun ardından, hücreler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 3) Ardından %0,1 Triton X-100 (Sigma #X100) ile oda ısısında 15 dakika permeabilizasyon işlemi gerçekleştirildi.
- 4) Devamında hücreler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı ve bloklama aşamasına geçildi.
- 5) Bloklama solüsyonu FOXO1 (desidual hücre belirteci),  $\beta$ -GAL (senesent hücre belirteci), FOXM1 (desidual hücrelerdeki proliferasyon belirteci) ve p-FOXM1 primer antikoru için %5 oranında hazırlanan normal keçi serumu (Vector #S1000) ve DIO2 (senesent desidual hücre belirteci) primer antikoru içinse %5 oranında hazırlanan normal tavşan serumu (Sigma #R9133) kullanıldı ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi.

- 6) Bloklama aşamasından sonra, 1:100 dilüsyonda FOXO1 primer antikoru (tavşan mAb, Cell Signaling #2880), 1:100 dilüsyonda DIO2 primer antikoru (keçi pAb, Invitrogen #PA5-18659), 1:400 dilüsyonda  $\beta$ -GAL primer antikoru (tavşan mAb, Cell Signaling #27198), 1:250 dilüsyonda FOXM1 primer antikoru (tavşan mAb, Abcam #ab207298) ve 1:100 dilüsyonda p-FOXM1 (Thr 600) primer antikoru (tavşan pAb, Invitrogen #PA5-105625) hazırlandı ve hücrelere uygulanarak +4°C de gece boyu inkübe edildi.
- 7) Uygun primer antikolar için tavşan IgG (Vector #I-1000-5) ve keçi IgG (Vector #I-5000-5) izotip kontrol olarak kullanıldı. Sekonder antikoları test etmek için ise primer antikor yerine PBS kullanıldı.
- 8) Ertesi gün PBS solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkamanın ardından sekonder antikor aşamasına geçildi. Bunun için FOXO1,  $\beta$ -GAL, FOXM1 ve p-FOXM1 (Thr 600) primer antikoları için 1:1000 dilüsyonunda hazırlanan keçi anti-tavşan Alexa Fluor-488 bağlı sekonder antikor (Abcam #ab150077) ve DIO2 içinse 1:1000 dilüsyonunda hazırlanan tavşan anti-keçi Alexa Fluor-488 bağlı sekonder antikor (Abcam #ab150141) hücrelere uygulandı ve 1 saat oda ısısında karanlıkta bekletildi.
- 9) Süre sonunda PBS solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkama yapıldı.
- 10) Hücre nükleuslarının boyanması için gerekli olan Hoescht boyası (Invitrogen #H3570) 1:2000 dilüsyonunda hazırlanarak oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- 11) Ardından hücreler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı ve kapatma solüsyonu ile kapatıldı.
- 12) Boyanmalar Olympus BX61 floresan mikroskobu ile değerlendirildi ve fotoğraflar KC Junior yazılımı kullanılarak kaydedildi.
- 13) Kontrol gebelik ve RPL gruplarındaki FOXO1, DIO2,  $\beta$ -GAL, FOXM1 ve p-FOXM1 antikolarının ortalama floresan yoğunluğu ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak ölçüldü.
- 14) Deneyler on bağımsız biyolojik örnekte (n=10) bağımsız olarak üç kez tekrarlandı (3 teknik tekrar).
- 15) İstatistiksel analiz GraphPad Prism yazılımı 9 kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.6. Western Blot Analizi

MPA ve DYD uygulanmış ve uygulanmamış primer desidual hücrelerdeki total ve fosforile FOXM1'in protein düzeyindeki değişiklikler western blot yöntemiyle analiz edildi ve aşağıdaki protokol sırası ile uygulandı.

- 1) Monolayer hücrelere 2,5 mL %0.25 Trypsin-EDTA (Gibco #25200056) eklendi ve 37°C de 5 dakika beklenerek hücreler süspanse hale getirildi.
- 2) Süspanse hale gelen hücrelerde, Trypsin-EDTA'nın inhibisyonu için 2,5 mL besiyeri eklendi ve 1000 rpm'da 3 dakika santrifüj edildi.
- 3) Sonrasında protein lizat eldesi için içerisinde 10 µL Fenilmetilsülfonil florür (PMSF), 10 µL Sodyum ortovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) olan 1 mL Ripa Tampon solüsyonu (Elabscience #E-BC-R327) hazırlandı.
- 4) Ardından süpernatant atılıp,  $2.5 \times 10^6$  hücre için pellet üzerine 50 µL Ripa Tampon solüsyonu eklenerek buz üzerinde yarım saat inkübe edildi.
- 5) Süre sonunda 12.000 rpm'da +4°C de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6) Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak -20°C de saklandı.
- 7) Protein miktar tayini için -20°C de bulunan örnekler çözündürülerek hücrelerin içerdiği protein miktarları bicinchoninic asit (BCA) kiti (Sigma #BCA1) kullanılarak tespit edildi.
- 8) Protein miktar tayininin ardından örnekler 95°C deki suda 5 dakika kaynatıldı.
- 9) Biorad %10 TGX FastCast Acrylamide Kit (Biorad #1610173) ile jel hazırlanıp, her bir kuyucuğa 30 µg örnek protein miktarları eşit olacak şekilde yüklendi ve Biorad Mini Protean Sistem III tankının içine yerleştirildi.
- 10) Mini Protean Sistem III tankına elektroforez solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı ve proteinler 100 voltta 10 dakika, 200 voltta 60 dakika yürütüldükten sonra, blotlama aşamasına geçildi.
- 11) Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, içeriğinde %0,1 Tween-20 (Amresco #0994C037), %5'lik yağsız kuru süt tozu (Biorad #70-6404) bulunan tris tuz solüsyonu (TBS-T) ile hazırlanan bloklama solüsyonuna alındı.
- 12) Membran oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı ve ardından primer antikorlar FOXM1 (1:1000), p-FOXM1 (Thr 600) (1:1000) ve  $\beta$ -Actin (Cell



Signaling #4970, 1:3000) hazırlanarak, membran üzerine eklendi ve soğuk odada gece boyu çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

- 13) İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 er kez 10 dakika yıkama yapıldı.
- 14) Ardından membran, 1:5000 dilüsyonunda hazırlanan horseradish peroksidaz (HRP) bağlı keçi anti-rabbit konjuge sekonder antikorla (Vector #PI-1000-1) oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- 15) İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 er kez 10 dakika yıkama yapıldı ve membran SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (Thermo #34580) ile oda ısısında karanlıkta 5 dakika inkübe edildi. Ardından Azure C280 cihazında okutuldu.
- 16) p-FOXM1/FOXM1 bant yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi.
- 17) Deneyler altı bağımsız biyolojik örnekte (n=6) bağımsız olarak iki kez tekrarlandı (2 teknik tekrar).
- 18) İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı 9 kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.7. Sferoid Genişleme ve Migrasyon Analizi

MPA ve DYD uygulamasının endometriyumdaki fonksiyonel etkisini değerlendirmek amacıyla kontrol gebelik ve RPL gruplarındaki primer desidual hücrelerin insan ekstrasvillöz trofoblast benzeri hücre hattı olan AC-1M88 hücreleriyle ko-kültürü yapıldı ve ardından sferoid genişleme ve migrasyon analizleri gerçekleştirildi (C.-C. Liang ve ark., 2007; Weimar ve ark., 2012; Gellersen ve ark., 2013). Bunun için aşağıdaki protokol sırası ile uygulandı.

- 1) Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerle kültüre edilecek olan insan ekstrasvillöz trofoblast benzeri hücre hattı AC-1M88 (DSMZ #457) ticari olarak satın alındı.
- 2) AC-1M88 hücreleri için %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin, %10 FBS içeren DMEM:F12 besiyeri hazırlandı.
- 3) Soğuk zincir ile getirilen hücre hattı, 37°C de su banyosunda hızlıca çözüldü ve 5 mL besiyeri ilavesi ile 1500 rpm da 5 dk santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj sonunda, süpernatant atılıp, pellet üzerine 3 mL besiyeri ilave edilerek süspanse hale getirildi.

- 5) Önceden 2 mL besiyeri ile şartlandırılmış 25 cm<sup>2</sup>'lik flaska aktarılıp, 37°C de, %5 CO<sup>2</sup>'li inkübatörde kültüre edildi.
- 6) Sferoidlerin oluşumu için %3 oranında orta viskoziteli metil selüloz (Merck #0512) destek materyali hazırlandı (Gonzalez ve ark., 2011).
- 7) Bunun için; manyetik karıştırıcıda 48°C ye ayarlanmış ısıda, 100 mL steril distile su içine 3 gr metil selüloz eklendi ve çözelti berraklaşınca kadar karıştırıldı.
- 8) Hazırlanan çözelti 40-50 dakika boyunca oda ısısında bekletilerek ısı düşüşü sağlandı ve sferoidlerin oluşturulacağı 96 kuyucuklu plakaya (Corning #3599) 25 µL eklenerek, 37°C de, %5 CO<sup>2</sup>'li inkübatörde gece boyu inkübe edildi.
- 9) 96 kuyucuklu tabakaların metil selüloz ile kaplanmasının ardından kuyucuk başına 3x10<sup>3</sup> AC-1M88 hücresi olacak şekilde ekildi (kültürün 0. günü "D0" olarak isimlendirildi) ve 37°C de, %5 CO<sup>2</sup>'li inkübatörde 48 saat boyunca (kültürün 2. günü "D2" olarak isimlendirildi) sferoid oluşumu sağlandı.
- 10) Sferoidlerin oluşumunun ardından, sferoidler ince uçlu cam mikropipet (Drummond #1-000-9000) kullanılarak toplandı.
- 11) 24 kuyucuklu plakada (SPL #SPL30024) her bir kuyucukta 1-3 sferoid olacak şekilde progesteron analogu olan progestin (MPA ve DYD) uygulanmış ve uygulanmamış kontrol gebelik ve RPL gruplarının desidual hücreleri ile 48 saat ko-kültüre edildi.
- 12) Ko-kültür süresinin ardından, sferoidlerin Olympus BX61 mikroskopunda fotoğrafları çekildi ve ImageJ yazılımında sferoid çapı eklentisi kullanılarak her bir sferoidin çapı ölçüldü. İkinci gündeki sferoid genişlemesinin (D2) oranının, sıfırıncı gündeki (D0) sferoid genişlemesine oranı bölünerek, her bir grubun birbirinden bağımsız olarak sferoid genişlemeleri hesaplandı.
- 13) Migrasyon analizleri içinse, 6 kuyucuklu tabakada (SPL #SPL30006) kültüre edilen, progesteron analogu olan progestin (MPA ve DYD) uygulanmış ve uygulanmamış kontrol gebelik ve RPL gruplarının desidual hücrelerinin monolayer hücre katmanında bir göç bölgesi oluşturuldu.
- 14) Bunun için, 200 µL'lik pipet ucu kullanılarak kontrollü bir göç bölgesi oluşturuldu (Berkhout ve ark., 2020).

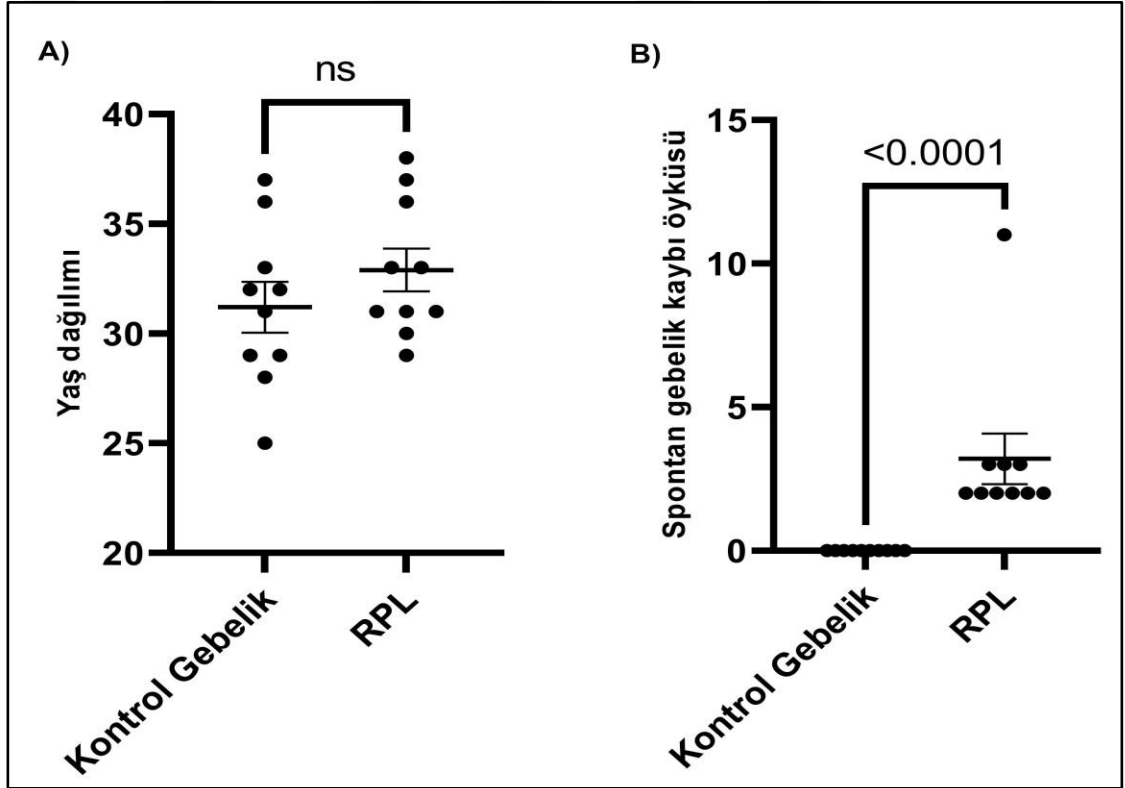
- 15) Göç bölgesi oluşturulduktan sonra, desidual hücrelerin 0., 12., 24., 36. ve 48. saatlerinde Olympus BX61 mikroskop yardımıyla fotoğrafları çekildi ve ImageJ yazılımı kullanılarak migrasyon ölçümleri gerçekleştirildi.
- 19) Sferoid genişleme ve migrasyon analizleri için deneyler üç bağımsız biyolojik örnekte (n=3) bağımsız olarak iki kez tekrarlandı (2 teknik tekrar).
- 20) İstatistiksel analizleri GraphPad Prism yazılımı 9 kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.8. İstatistiksel Analizler

DeneySEL veriler, ortalama ve ortalamanın standart hatasının hesaplanması da dahil olmak üzere tanımlayıcı istatistiksel testler kullanılarak analiz edildi. Normallik testleri Shapiro-Wilk testi kullanılarak yapıldı. Parametrik veriler One way-ANOVA ve ardından Sidak post hoc testi kullanılarak analiz edilirken, parametrik olmayan veriler Kruskal-Wallis testi ve ardından post hoc Dunn's testi kullanılarak analiz edildi. Hastaların demografik özelliklerinin sunulduğu istatistiksel analizlerde, Shapiro-Wilk testini geçen ve normal dağılan veriler için two tailed student's t-test, normal dağılmayan veriler içinse two tailed Mann Whitney testi yapıldı. Migrasyon analizlerinde gruplar arasındaki farklı saatlerin istatistiksel değerlendirilmelerinde, Two way-ANOVA ve ardından Sidak post hoc testi kullanılarak analiz edildi. Veriler mean  $\pm$  SEM olarak sunuldu. Tüm istatistiksel analizler için GraphPad Prism yazılımı sürüm 9 kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık  $P$ -değeri  $< 0.05$  olarak belirlendi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda, güç analizi kullanılarak hesaplanan 10 adet kontrol gebelik ve 10 adet RPL hastasının maternal desidual doku örnekleri gebelik desiduasından toplandı. Hastaların demografik ve klinik özellikleri **Şekil 4.1**'de gösterildi. Yaş dağılımları açısından, kontrol gebelik ve RPL grupları arasında anlamlı bir fark yok iken [(kontrol gebelik  $31.2 \pm 1.7$ \_RPL  $32.9 \pm 1.5$ ), ( $p > 0.05$ )] (**Şekil 4.1.A**), daha önceki spontan gebelik kaybı öyküsü açısından RPL grubu kontrol gebelik grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.0001$ ) (**Şekil 4.1.B**).

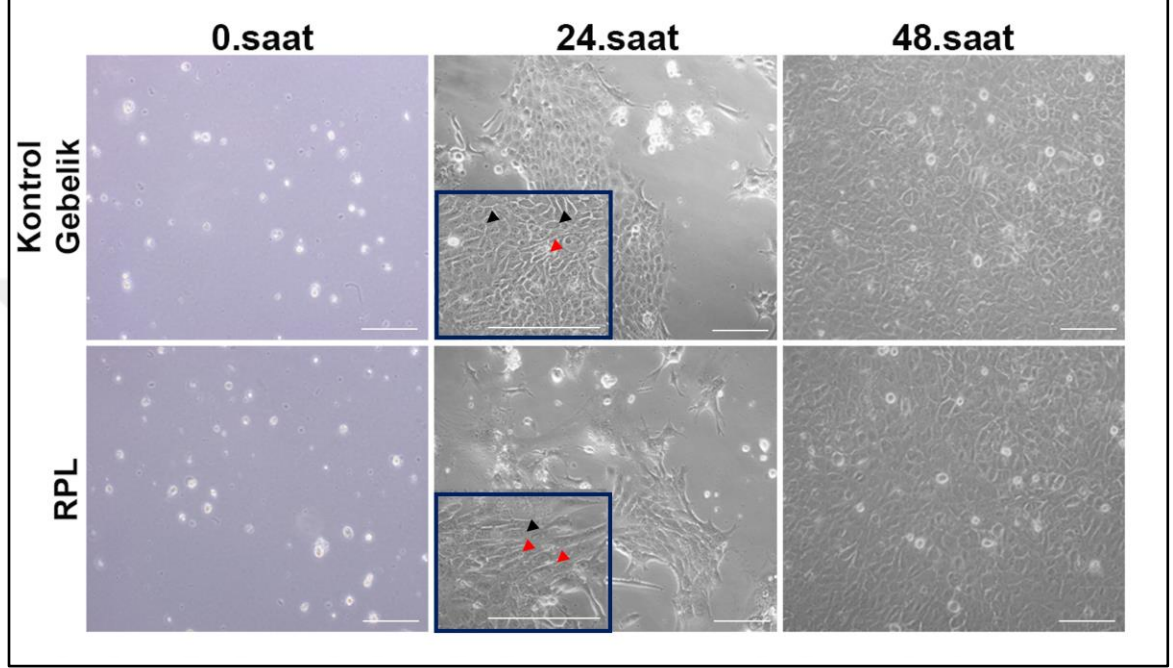


**Şekil 4.1:** Hasta demografisi. **A)** hastaların yaşı, **B)** spontan gebelik kaybı öyküsüne göre hasta demografisi.  $P$ -değerleri  $< 0.05$  grafiklere eklendi.

##### 4.1. Hücre Kültürü Bulguları

Primer desidual hücrelerin eldesinden hemen sonra (0.saat) her iki grupta da süspanse hücreler görüldü. Kültürün 24.saatinde kontrol gebelik gruplarına ait primer desidual hücrelerde olgun desidual hücrelerin morfolojisini yansıtan poliploid morfolojiye sahip hücrelerle, az sayıda fibroblastik karakterde hücreler görüldü. Poliploid morfolojiye sahip

hücreler RPL gruplarında da görülmekle birlikte popülasyonları ve dağılımları daha azdı. RPL gruplarında daha çok fibroblast karakterinde hücreler görüldü. Kültürün 48.saatinde her iki grupta da hücrelerin > %95 konfluensiye ulaştığı görüldü (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** Primer desidual hücre faz-kontrast mikrografları. Kontrol gebelik (n=10) ve RPL (n=10) gruplarına ait primer desidual hücrelerin izolasyonundan hemen sonra (0.saat), 24. ve 48. saatlerde Olympus BX61 mikroskobuyla çekilmiş faz-kontrast mikrografları. Mavi kutu 40X objektifle çekilmiş mikrografları göstermektedir. Siyah ok başı: olgun desidual hücrelerin morfolojisini yansıtan poliploidi hücreleri göstermektedir. Kırmızı ok başı: Fibroblastik karakterdeki endometriyal stromal hücreleri göstermektedir. Skala bar: 200 µm.

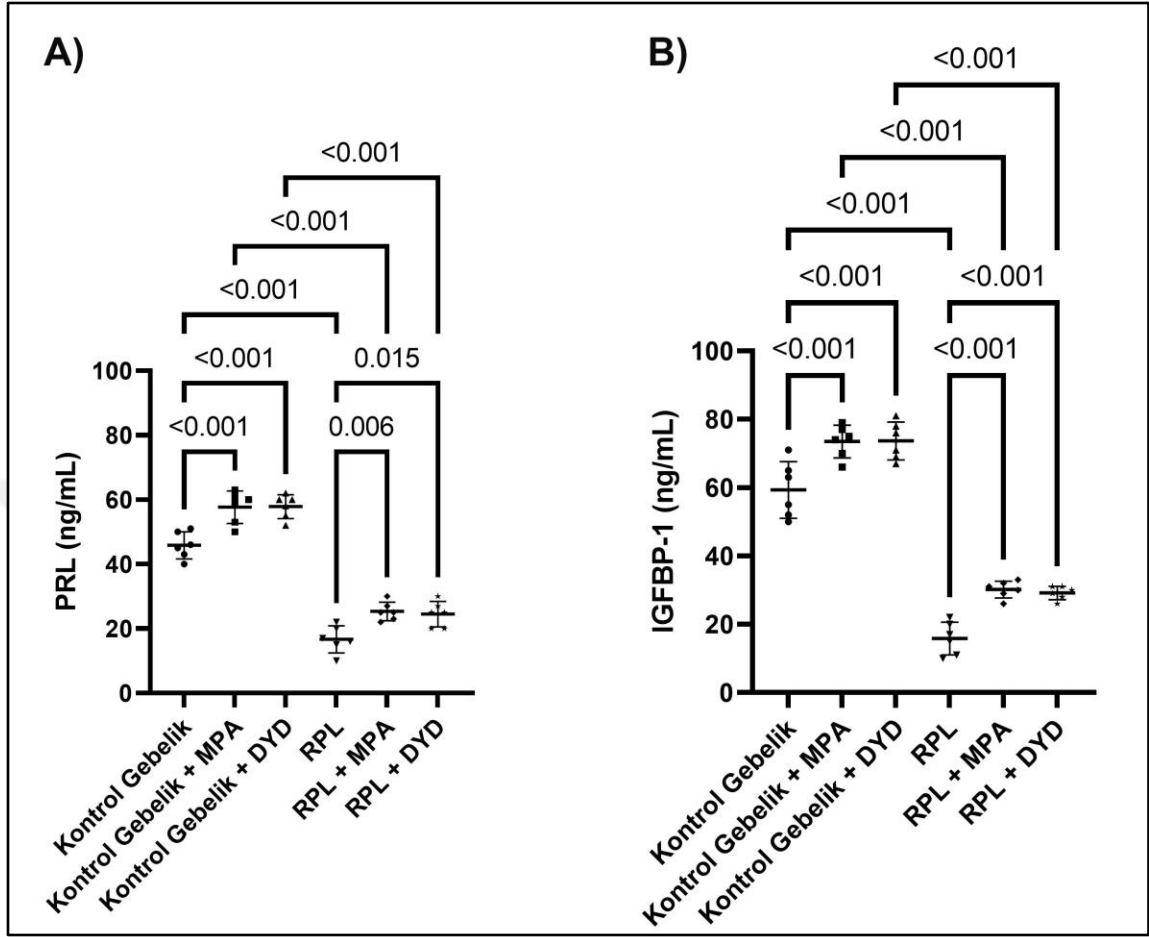
#### **4.2. Progesteron Analogu Uygulamaları Sonrasında PRL, IGFBP-1, FOXO1, DIO2 ve $\beta$ -GAL Ekspresyonu Bulguları**

##### ***Progesteron analoğu uygulaması tekrarlayan gebelik kayıplarına ait primer desidual hücrelerde yetersiz desidualizasyonu düzenlerken, hücre senesensi etkilemedi***

Primer desidual hücrelerin hormon ilavesiz bir ortamda 48 saat kültürü sonrasında PRL ve IGFBP-1 ekspresyonunun devam etmesi, hücrelerin uygun *in vitro* koşullarda devamlılıklarını sağlayabildiklerinin bir göstergesidir (Lv ve ark., 2021). Bu çalışmada, kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerden, MPA ve DYD uygulamaları sonrasında süpernatantlar toplanarak, hücrelerin ortama salgıladığı PRL ve IGFBP-1 seviyesi değerlendirildiğinde, PRL seviyesi kontrol gebelik + MPA ve kontrol

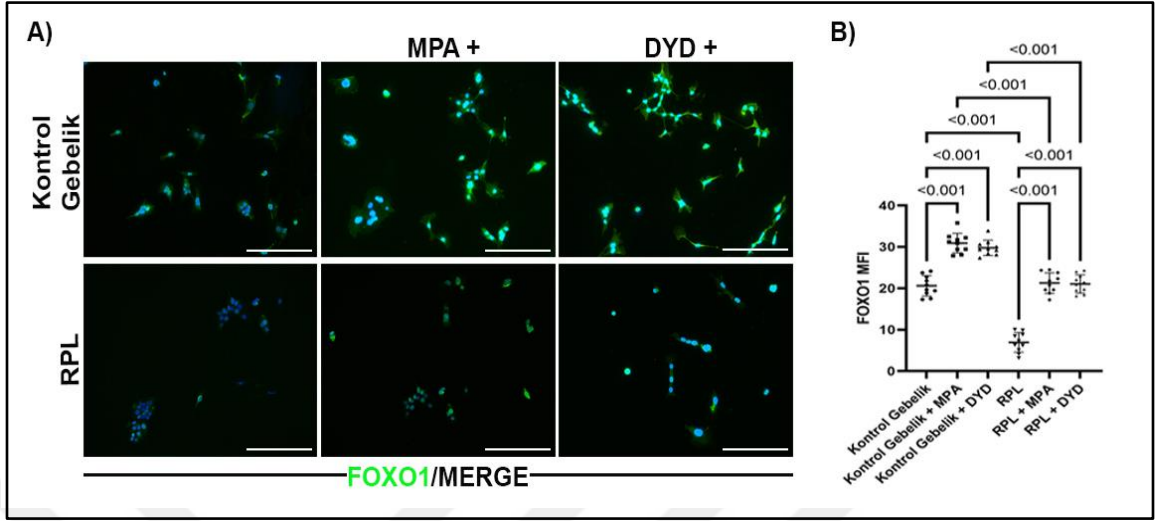
gebelik + DYD gruplarında, progestin tedavisi uygulanmamış kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ) (**Şekil 4.3**). Ancak kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ). PRL seviyesi RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarında, progestin ilavesi yapılmamış RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla  $p=0.006$ ,  $p=0.015$ ). Ancak RPL + MPA ve RPL + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ). Bununla birlikte, PRL seviyesi RPL gruplarında kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL + MPA gruplarında kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla ve RPL + DYD gruplarında kontrol gebelik + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.001$ ) (**Şekil 4.3.A**).

IGFBP-1 seviyesi kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarında, progestin tedavisi uygulanmamış kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). Ancak kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ). IGFBP-1 seviyesi RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarında, progestin ilavesi yapılmamış RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). Ancak RPL + MPA ve RPL + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ). Bununla birlikte, IGFBP-1 seviyesi RPL gruplarında kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL + MPA gruplarında kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla ve RPL + DYD gruplarında kontrol gebelik + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.001$ ) (**Şekil 4.3.B**).



**Şekil 4.3:** Primer desidual hücrelerin süpernatantlarında ELISA analizi. **A)** PRL, **B)** IGFBP-1 seviyeleri (ng/mL). *P*-değerleri < 0.05 grafiklere eklendi.

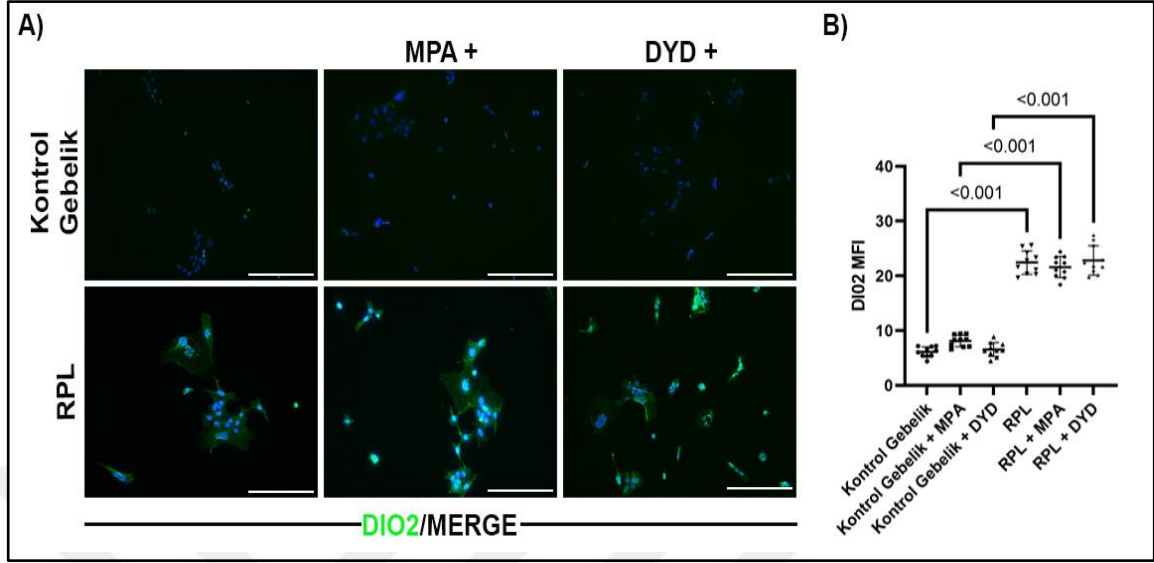
Desidual hücre belirteci olan FOXO1 ekspresyonu (**Şekil 4.4.A**) kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarında, kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Ancak kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (**Şekil 4.4.B**). FOXO1 ekspresyonu RPL + MPA gruplarında ve RPL + DYD gruplarında RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Ancak RPL + MPA ve RPL + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (**Şekil 4.4.B**). FOXO1 ekspresyonu, kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında, kontrol gebelik + MPA gruplarında RPL + MPA gruplarında ve kontrol gebelik + DYD gruplarında RPL + DYD gruplarına anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0.001$ ) (**Şekil 4.4.B**).



**Şekil 4.4:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin FOXO1 primer antikoruyla immüno Floresan analizi. **A)** Progesterin tedavisi uygulanmamış, MPA uygulanmış (MPA +), DYD uygulanmış (DYD +) primer desidual hücrelerin FOXO1 (yeşil, Alexa Fluor-488) ile immüno Floresan boyanmasını ve nükleusların Hoechst boyası (mavi) ile zıt boyanmasının birleştirilmiş halini göstermektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. **B)** FOXO1 antikorunun ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerlerini vermektedir. *P*-değerleri < 0.05 grafiklere eklendi.

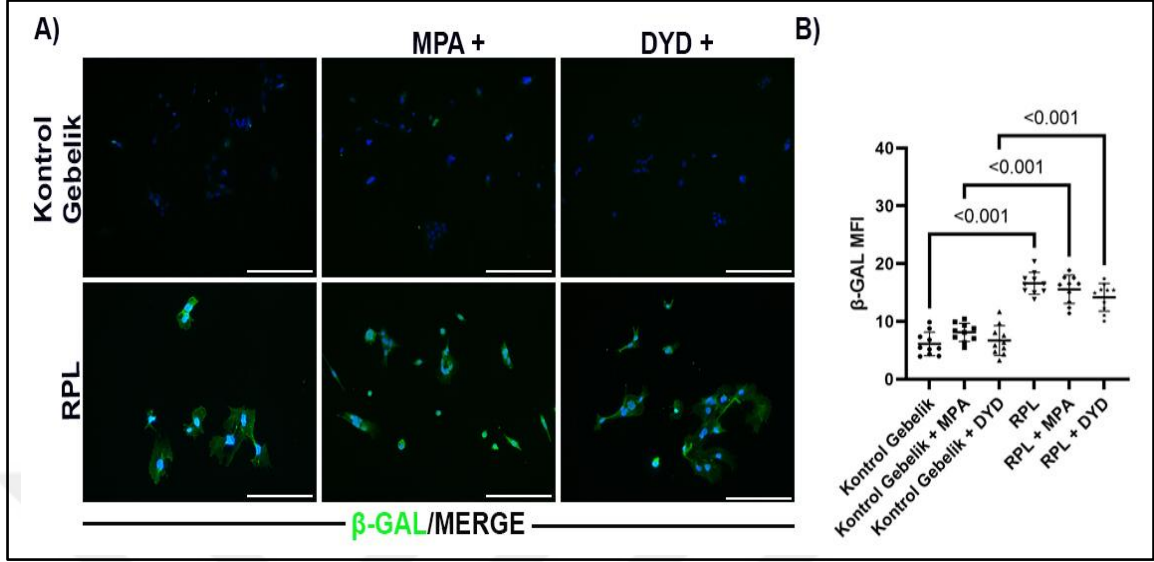
Senesent desidual hücre belirtici olan DIO2 ekspresyonunda (**Şekil 4.5.A**) kontrol gebelik, kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (**Şekil 4.5.B**). RPL gruplarında da benzer şekilde, RPL grupları ile RPL + MPA ve RPL + DYD grupları arasında anlamlı bir fark izlenmedi ( $p > 0.05$ ) (**Şekil 4.5.B**). Ancak DIO2 ekspresyonu kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla RPL + MPA gruplarında ve kontrol gebelik + DYD gruplarında kıyasla RPL + DYD gruplarında anlamlı olarak yükseldi ( $p < 0.001$ ) (**Şekil 4.5.B**).





**Şekil 4.5:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin DIO2 primer antikoruyla immüno Floresan analizi. **A)** Progestin tedavisi uygulanmamış, MPA uygulanmış (MPA +), DYD uygulanmış (DYD +) primer desidual hücrelerin DIO2 (yeşil, Alexa Fluor-488) ile immüno Floresan boyanmasını ve nükleusların Hoechst boyası (mavi) ile zıt boyanmasının birleştirilmiş halini göstermektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. **B)** DIO2 antikorunun ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerlerini vermektedir.  $P$ -değerleri  $< 0.05$  grafiklere eklendi.

Senesent hücre belirteci olan  $\beta$ -GAL ekspresyonunda (**Şekil 4.6.A**) kontrol gebelik, kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (**Şekil 4.6.B**). RPL gruplarında da benzer şekilde, RPL grupları ile RPL + MPA ve RPL + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (**Şekil 4.6.B**). Ancak  $\beta$ -GAL ekspresyonu kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla RPL + MPA gruplarında ve kontrol gebelik + DYD gruplarında kıyasla RPL + DYD gruplarında anlamlı olarak yükseldi ( $p < 0.001$ ) (**Şekil 4.6.B**).

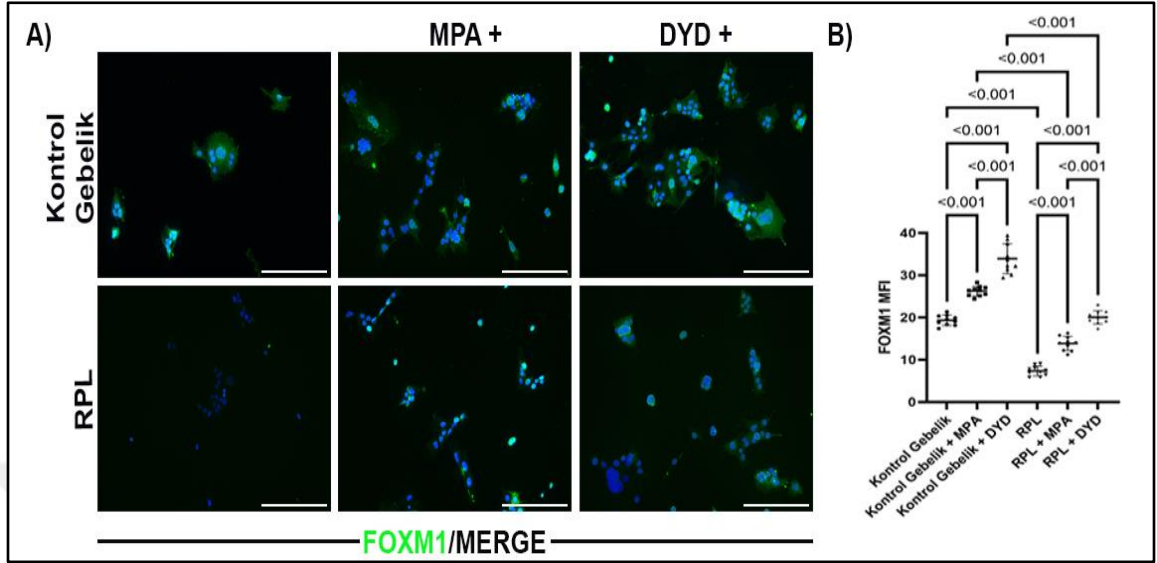


**Şekil 4.6:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin  $\beta$ -GAL primer antikoruyla immüno Floresan analizi. **A)** Progesterin tedavisi uygulanmamış, MPA uygulanmış (MPA +), DYD uygulanmış (DYD +) primer desidual hücrelerin  $\beta$ -GAL (yeşil, Alexa Fluor-488) ile immüno Floresan boyanmasını ve nükleusların Hoechst boyası (mavi) ile zıt boyanmasının birleştirilmiş halini göstermektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. **B)**  $\beta$ -GAL antikorunun ortalama Floresan yoğunluğu (MFI) değerlerini vermektedir.  $P$ -değerleri < 0.05 grafiklere eklendi.

#### 4.3. Progesteron Analöğü Uygulamaları Sonrasında FOXM1 ve p-FOXM1 Ekspresyonu Bulguları

*DYD uygulaması MPA uygulamasından daha etkili bir şekilde tekrarlayan gebelik kayıplarına ait primer desidual hücrelerdeki azalmış FOXM1 ve p-FOXM1 seviyelerini tersine çevirdi*

FOXM1 ekspresyonu (Şekil 4.7.A) kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarında, kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Ayrıca kontrol gebelik + DYD gruplarındaki FOXM1 ekspresyonu kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.7.B). Benzer şekilde, RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarındaki FOXM1 ekspresyonu, RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Ayrıca RPL + DYD gruplarındaki FOXM1 ekspresyonu, RPL + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.7.B). Bununla birlikte, FOXM1 ekspresyonu kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL gruplarında, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla RPL + MPA gruplarında ve kontrol gebelik + DYD gruplarında, RPL + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.7.B).

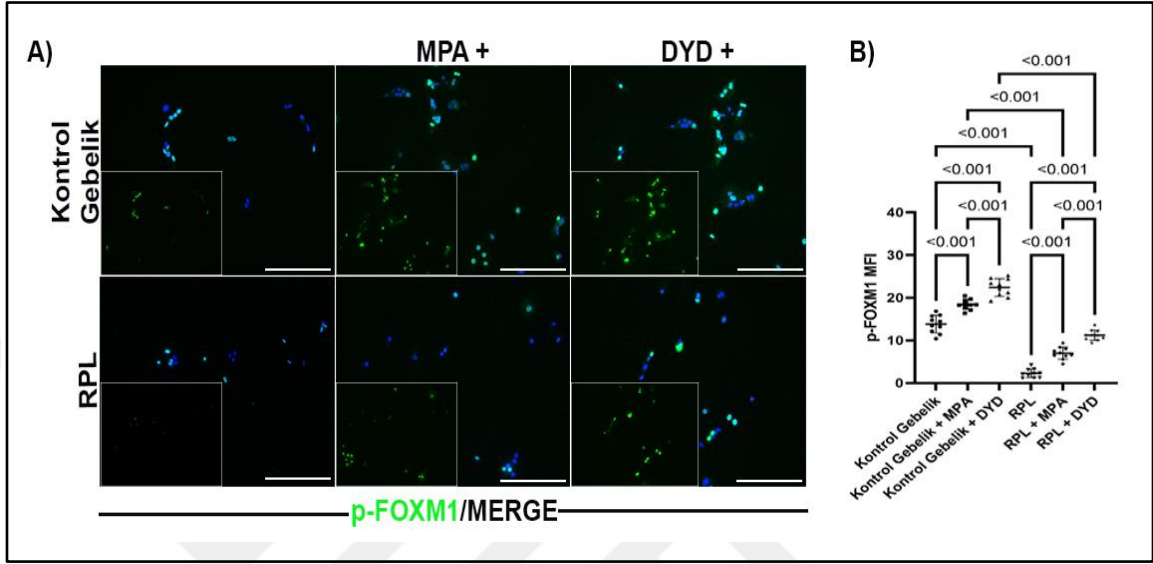


**Şekil 4.7:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin FOXM1 primer antikoruyla immüno Floresan analizi. **A)** Progesterin tedavisi uygulanmamış, MPA uygulanmış (MPA +), DYD uygulanmış (DYD +) primer desidual hücrelerin FOXM1 (yeşil., Alexa Fluor-488) ile immüno Floresan boyanmasını ve nükleusların Hoechst boyası (mavi) ile zıt boyanmasının birleştirilmiş halini göstermektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. **B)** FOXM1 antikorunun ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerlerini vermektedir. *P*-değerleri < 0.05 grafiklere eklendi.

Fosforilasyonu nükleusta gerçekleşen ve nüklear lokasyonda aktif formda bulunan p-FOXM1 (Thr 600)'in kontrol gebelik gruplarında protein lokalizasyonu nüklear iken, kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarında protein lokalizasyonu artmış şiddetli nükleardı hem de sitoplazmikti (**Şekil 4.8.A**). RPL gruplarındaki p-FOXM1 (Thr 600)'in protein lokalizasyonu çok zayıf şiddetli nüklear iken, RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarındaki protein lokalizasyonu artmış orta şiddetli nükleardı (**Şekil 4.8.A**).

p-FOXM1 (Thr 600) ekspresyonu kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarında, kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Ayrıca, kontrol gebelik + DYD gruplarındaki p-FOXM1 ekspresyonu, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ) (**Şekil 4.8.B**). Benzer şekilde, RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarındaki p-FOXM1 ekspresyonu RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Ayrıca, RPL + DYD gruplarındaki p-FOXM1 ekspresyonu RPL + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ) (**Şekil 4.8.B**). Bununla birlikte p-FOXM1 ekspresyonu, kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla RPL + MPA gruplarında ve kontrol

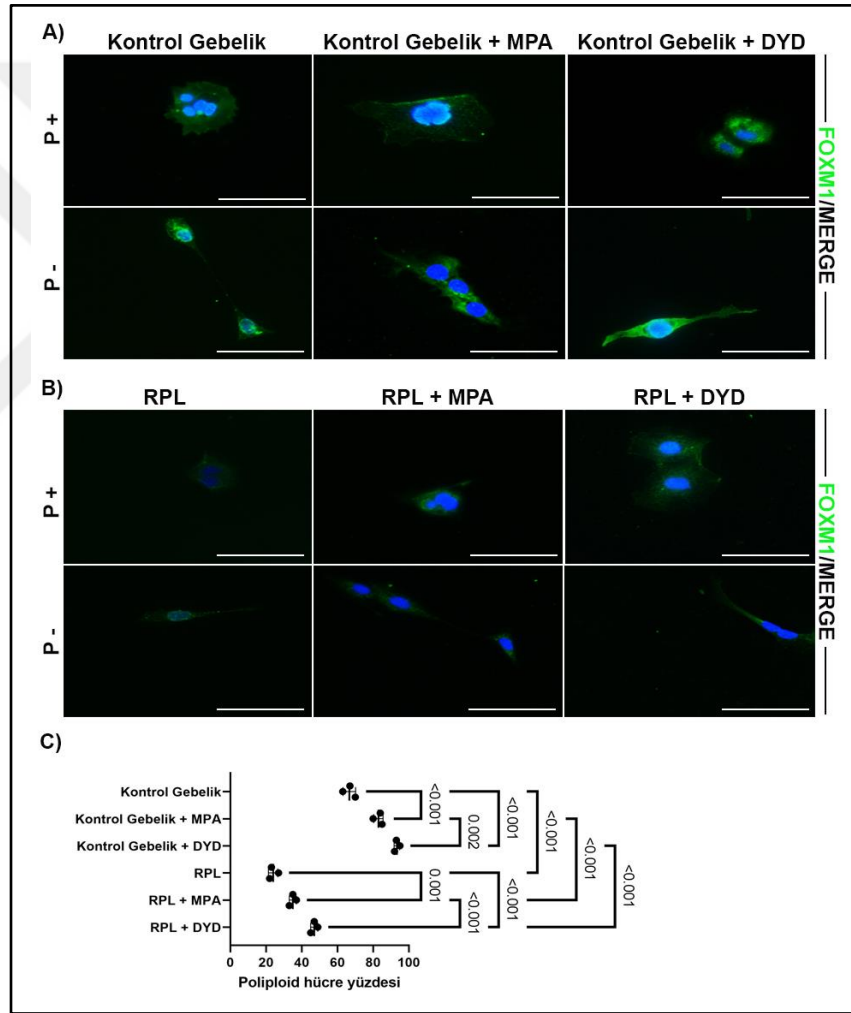
gebelik + DYD gruplarına kıyasla RPL + DYD gruplarında kıyasla anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.8.B).



**Şekil 4.8:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerin p-FOXM1 primer antikoruyla immüno Floresan analizi. **A)** Progesterin tedavisi uygulanmamış, MPA uygulanmış (MPA +), DYD uygulanmış (DYD +) primer desidual hücrelerin p-FOXM1 (yeşil., Alexa Fluor-488) ile immüno Floresan boyanmasını ve nükleusların Hoechst boyası (mavi) ile zıt boyanmasının birleştirilmiş halini göstermektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. Beyaz kutu her bir gruptaki p-FOXM1 (Thr 600)'in hücresel lokalizasyonunun ayrımının yapılabilmesi için sadece Alexa Fluor-488 (yeşil) boyanmasını göstermektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. **B)** p-FOXM1 antikorunun ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerlerini vermektedir. P-değerleri < 0.05 grafiklere eklendi.

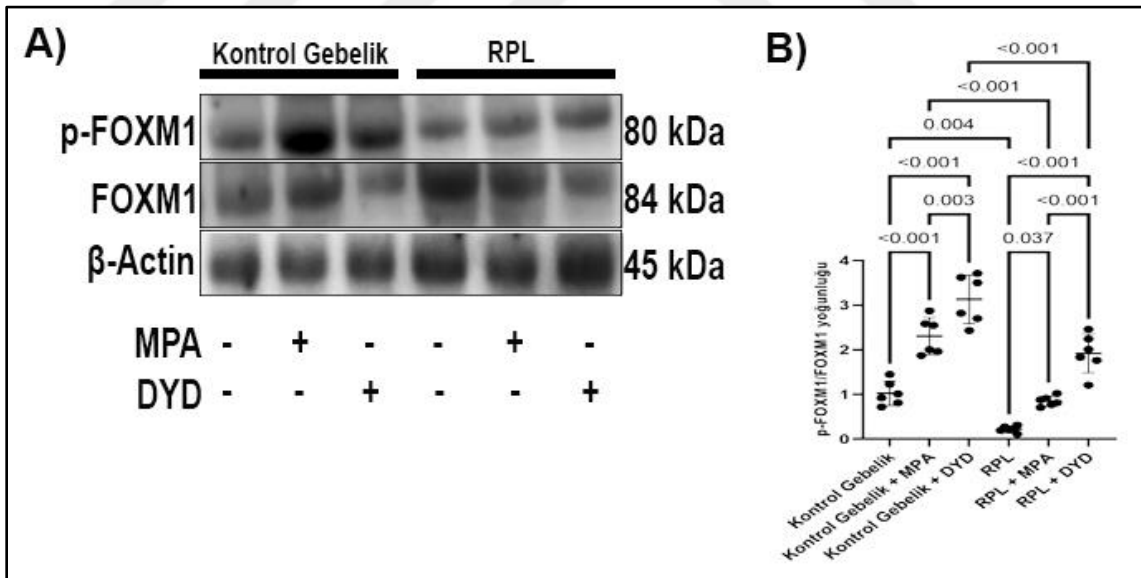
Progesteron analogu olan progesterin (MPA ve DYD) uygulanmış ve uygulanmamış gruplarda FOXO1, DIO2,  $\beta$ -GAL, FOXM1 ve p-FOXM1 (Thr 600)'in immüno Floresan analizlerinin ardından, MPA ve DYD uygulamasının senesent hücrelerin ekspresyonlarını değiştirmese de yetersiz desidualizasyonu düzenlediği göz önüne alınınca, progesteron analogu uygulamalarının olgun desidual hücrelerin morfolojisini yansıtan poliploidi hücreler üzerinde bir etkisi olup olmadığı değerlendirildi (Şekil 4.9.A.B). Terminal farklılaşmış desidual poliploid hücrelerin, başarılı embriyo implantasyonu ve erken gebelik sırasında embriyo büyümesi ve desteklenmesi için çok önemli olduğu bilinmektedir (Mori ve ark., 2011; Sroga ve ark., 2012). Kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarındaki poliploidi hücre sayısı, kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). Ayrıca, kontrol gebelik + DYD gruplarındaki poliploidi hücre sayısı, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.002$ ) (Şekil 4.9.C). RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarındaki poliploidi hücre

sayısı, RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla  $p=0.001$ ,  $p<0.001$ ). Ayrıca, RPL + DYD gruplarındaki poliploidi hücre sayısı, RPL + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.9.C). RPL gruplarındaki poliploidi hücre sayısı kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL + MPA gruplarındaki poliploidi hücre sayısı kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla ve RPL + DYD gruplarındaki poliploidi hücre sayısı kontrol gebelik + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.9.C).



**Şekil 4.9:** Poliploid morfolojiye sahip hücrelerin yüzdesi. **A)** Kontrol gebelik, **B)** RPL gruplarında desidual hücrelerdeki poliploid morfolojiyi daha iyi ayırt edebilmek için, desidual hücrelerdeki proliferasyon belirteci olan FOXM1'in (yeşil, Alexa Fluor-488) immüno Floresan boyanmasının ardından poliploid morfolojiye sahip olan (P +) ve olmayan (P -) hücrelerin sayımı yapıldı (Mori ve ark., 2011; Gao ve ark., 2015). Skala bar: 200  $\mu$ m. **C)** Poliploid hücre sayısının yüzdelik istatistiksel analizi. P-değerleri  $< 0.05$  grafiklere eklendi.

İmmüno Floresan analizlerin ardından, FOXM1 ve p-FOXM1'in gruplar arasındaki protein düzeylerinin değerlendirilmesi için western blot analizleri gerçekleştirildi (**Şekil 4.10.A**). p-FOXM1/FOXM1 yoğunluğu kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarında kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). Ayrıca, kontrol gebelik + DYD gruplarındaki p-FOXM1/FOXM1 yoğunluğu, kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.003$ ) (**Şekil 4.10.B**). p-FOXM1/FOXM1 yoğunluğu RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarında RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla  $p=0.037$ ,  $p<0.001$ ). Ayrıca, RPL + DYD gruplarındaki p-FOXM1/FOXM1 yoğunluğu RPL + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ) (**Şekil 4.10.B**). Bununla birlikte, p-FOXM1/FOXM1 yoğunluğu RPL gruplarında kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL + MPA gruplarında kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla ve RPL + DYD gruplarında da kontrol gebelik + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla  $p=0.004$  ve  $p<0.001$ ) (**Şekil 4.10.B**).

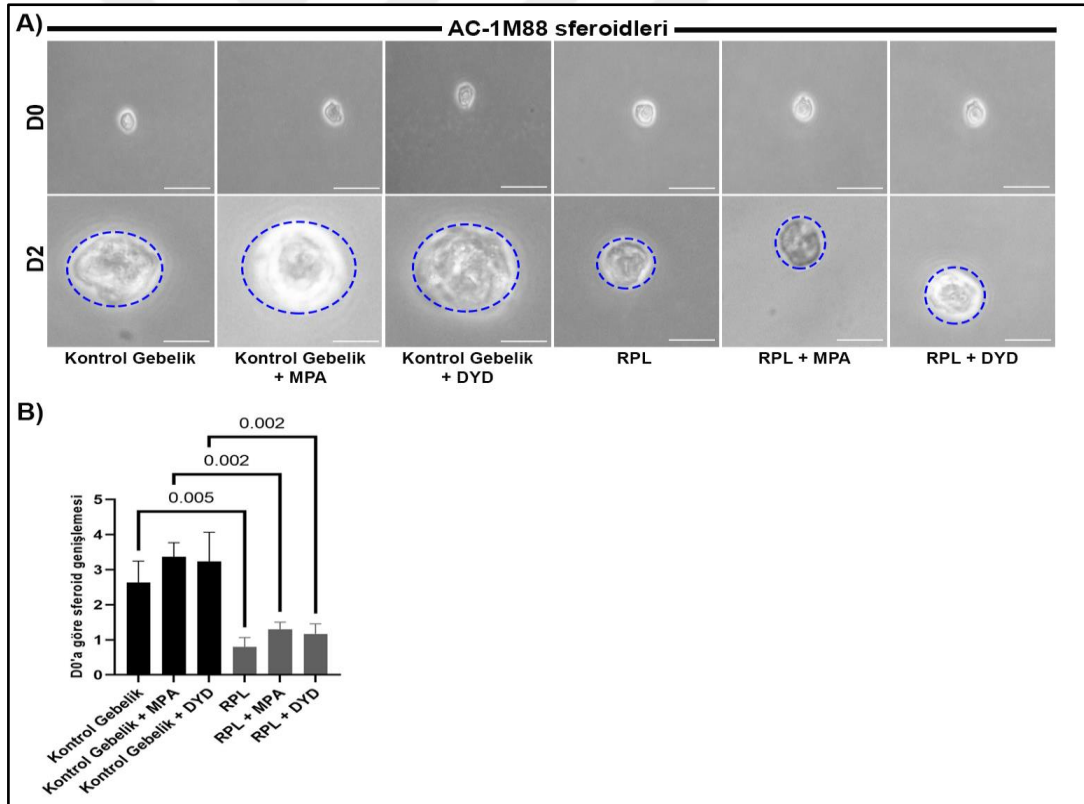


**Şekil 4.10:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarının primer desidual hücrelerinde total ve fosforile FOXM1 protein düzeylerinin western blot analizi. **A)** MPA uygulanmamış (MPA -), MPA uygulanmış (MPA +), DYD uygulanmamış (DYD -) ve DYD uygulanmış (DYD +) kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait primer desidual hücrelerde total FOXM1 ve p-FOXM1'in temsili western blot bantları. **B)** Gruplardaki p-FOXM1/FOXM1 yoğunluğu. P-değerleri < 0,05 grafiklere eklendi.

#### 4.4. Sferoid Genişleme ve Migrasyon Bulguları

##### *Progesteron analogu uygulaması endometriyal proliferasyon ve migrasyonu iyileştirdi*

Sferoid genişleme analizlerinde (Şekil 4.11.A) kontrol gebelik gruplarıyla, kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde RPL gruplarıyla, RPL + MPA ve RPL + DYD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ). Ancak, RPL gruplarındaki sferoid genişlemesi kontrol gruplarına kıyasla, RPL + MPA gruplarındaki sferoid genişlemesi kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla ve RPL + DYD gruplarındaki sferoid genişlemesi kontrol gebelik + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düştü (sırasıyla  $p=0.005$ ,  $p=0.002$ ,  $p=0.002$ ) (Şekil 4.11.B).

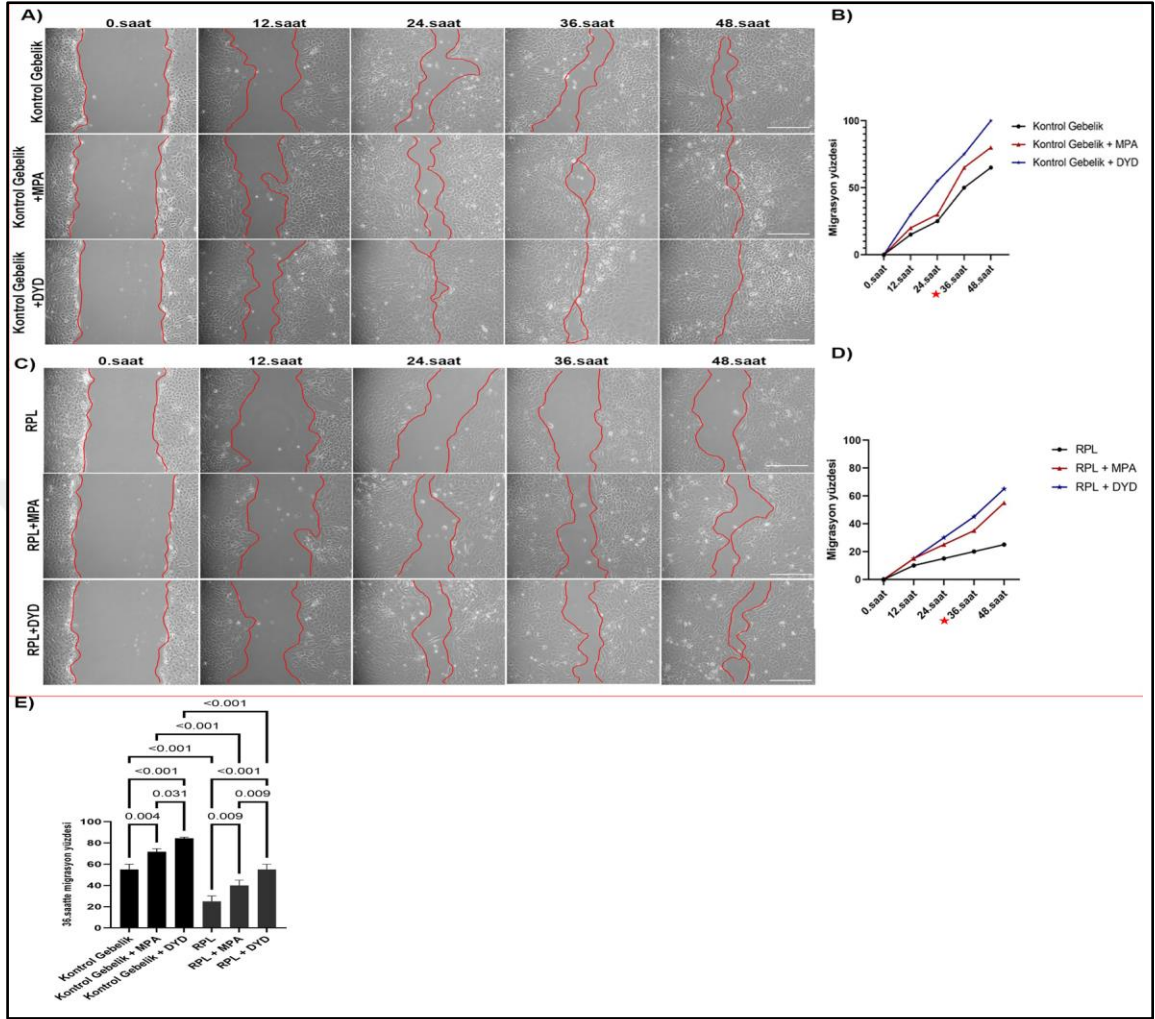


**Şekil 4.11:** AC-1M88 hücrelerinin kontrol gebelik ve RPL gruplarının primer desidual hücreleri ile ko-kültürü sonrasında sferoid genişleme analizi. **A)** MPA ve DYD uygulanmamış, MPA uygulanmış (MPA +) ve DYD uygulanmış (DYD +) kontrol gebelik ve RPL gruplarında AC-1M88 sferoidlerinin eklendiği an (0.gün, D0) ve 48 saat sonra (2.gün, D2) elde edilen faz kontrast mikrografları. Mavi kesikli çizgiler her bir sferoidin ölçülen genişlemesini temsil etmektedir. Skala bar: 200  $\mu$ m. **B)** Her bir sferoidin göreceli genişlemesi, D2'deki sferoid genişlemesinin D0'daki sferoid genişlemesine bölünmesiyle hesaplandı. P-değerleri  $< 0,05$  grafiklere eklendi.



Kontrollü göç bölgesi oluşturulan migrasyon analizlerinde (**Şekil 4.12.A,C**) tüm grupların 0., 12., 24., 36. ve 48. saatlerindeki migrasyon yüzdesi hesaplandı. Buna göre gruplardaki en fazla migrasyon bölgesindeki değişimin ( $\geq\%50$ ) 36.saatte gerçekleştiği tespit edildi (**Şekil 4.12.B,D**). Zaman noktasının tespitinden sonra, 36.saatte tüm gruplardaki migrasyon yüzdesi istatistiksel olarak karşılaştırıldı (**Şekil 4.12.E**). Buna göre kontrol gebelik + MPA ve kontrol gebelik + DYD gruplarındaki migrasyon yüzdesi kontrol gebelik gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla  $p=0.004$ ,  $p<0.001$ ). Bununla birlikte, kontrol gebelik + DYD gruplarındaki migrasyon yüzdesi kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.031$ ) (**Şekil 4.12.E**). Benzer şekilde, RPL + MPA ve RPL + DYD gruplarındaki migrasyon yüzdesi RPL gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla  $p=0.009$ ,  $p<0.001$ ). RPL + DYD gruplarındaki migrasyon yüzdesi de RPL + MPA gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.009$ ) (**Şekil 4.12.E**). Ayrıca, RPL gruplarındaki migrasyon yüzdesi kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL + MPA gruplarındaki migrasyon yüzdesi kontrol gebelik + MPA gruplarına kıyasla ve RPL + DYD gruplarındaki migrasyon yüzdesi de kontrol gebelik + DYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.001$ ) (**Şekil 4.12.E**).





**Şekil 4.12:** Kontrol gebelik ve RPL gruplarına ait farklı saatlerdeki migrasyon analizleri. **A, C)** Grupların monolayer hücre katmanında kontrollü bir göç bölgesi oluşturulduktan sonra, kültürün 0., 12., 24., 36. ve 48.saatlerinde faz kontrast mikrografları. Kırmızı çizgiler göç bölgesini temsil etmektedir. **B, D)** Grupların migrasyon yüzdesinde en etkili saatin (36.saat) istatistiksel analizi ( $\geq 50$ ). **E)** 36. saatte gruplar arasındaki migrasyon yüzdesinin istatistiksel analizi.  $P$ -değerleri  $< 0,05$  grafiklere eklendi.

## 5. TARTIŞMA

“Patolojik desidual senesense bağı gelişen tekrarlayan gebelik kayıplarının desidual hücrelerinde FOXM1 ekspresyonu azalır ve progesteron analogu uygulaması azalan FOXM1 ekspresyonunu tersine çevirir” hipotezini kurduğumuz çalışmamızda, hipotezimizle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamız, literatürdeki FOXM1 ve desidual senesens ile FOXM1 ve RPL ilişkisini, ayrıca iki farklı progesteron analogu (MPA ve DYD) uygulamasının patolojik desidual senesense bağı gelişen RPL hastalarındaki terapötik etkisini araştıran ve tartışan ilk çalışmadır.

Bireyin kronolojik yaşı ile endometriyumun biyolojik yaşı arasında tutarsızlık olabileceğinin gösterildiği bir çalışmada yapay zeka algoritmaları kullanılarak hücrel senesens ile ilişkili genleri özetleyen bir veri tabanından endometriyal senesens ilişkili genler araştırılmıştır. Çalışmada 35 yaşından küçük RPL tanısı almış kadınların endometriyum dokusunun biyolojik yaşı ile bireyin kronolojik yaşı arasında fark olduğu bildirilmiştir. Buna göre, 35 yaşından küçük RPL tanısı almış kadınların endometriyum dokusunda metabolik aktif sınıflandırma sonucuna göre, yaşlanmayla ilişkili genlerin ekspresyonunda artış olmasının yanı sıra daha düşük endometriyal reseptivite ve yetersiz desidualizasyon oranı gösterdikleri bildirilmiştir (Chen ve ark., 2022). Çalışmamızda RPL vakalarında desidual yaşlanma araştırıldığından, kronolojik yaşlanmayı elimine etmek için çeşitli hasta seçim kriterleri oluşturulmuştur (Lv ve ark., 2021). Buna göre hastalarda üst sınır olarak 40 yaş belirlenmiştir. ANOVA güç analizimize göre toplam 20 kadında gerçekleştirilen çalışmamızda, kontrol gebelik (fizyolojik gebelik-istemli küretaj) ve RPL grupları (patolojik gebelik) arasında yaş dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Öte yandan, kontrol gebelik ve RPL gruplarını oluşturan yaşları 25-38 arasında değişen toplam 20 kadında spontan gebelik kaybı öyküsü bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir. Dolayısıyla bulgularımız, kronolojik olarak genç yaşlarda dahi (<40) gebelik patolojilerinin görülebileceğini ve gebelik patolojilerinin doğrudan ve kesin olarak kronolojik yaş ile bağlantılı olmadığını göstermektedir. Öte yandan, üreme yaşamının ve kalitesinin yaşın artması ile azalma eğilimi gösterdiği de unutulmamalıdır. Bu nedenle kadınlarda infertilite açısından yapılacak çalışmalarda yaş faktörü dikkatlice ele alınmalıdır.

Çalışmamızda dikkate alınan diğer bir konu ise RPL tanımıydı. Literatürde gebeliğin 20.haftasından önce görülen spontan gebelik kaybı olarak tanımlanan RPL'nin öykü sayısı hakkında tartışmalar vardır. Buna göre ACOG, ASRM ve ESHRE yaşanan iki veya daha fazla sayıdaki spontan gebelik kaybını RPL olarak sınıflandırırken, RCOG yaşanan üç veya daha fazla sayıda ardışık spontan gebelik kaybını RPL olarak sınıflandırılmaktadır (Jauniaux ve ark., 2006; Medicine, 2012; Homer, 2019). Çalışmamızda RPL gruplarını ACOG, ASRM ve ESHRE'nin tanımladığı şekilde kabul ettik. Buna göre toplam 10 RPL kadının 6'sı iki spontan gebelik kaybı, 3'ü üç spontan gebelik kaybı ve 1'ide 11 spontan gebelik kaybı yaşayan kadınlardı. Spontan gebelik kaybı, 10. gebelik haftasından önce meydana geldiğinde embriyonik kayıp olarak sınıflandırılırken, 10. gebelik haftasından sonra meydana geldiğinde fetal kayıp olarak sınıflandırılmaktadır (Silver ve ark., 2011). Çalışmamızda 10 RPL kadının 4 tanesi embriyonik kayıp, 6 tanesi fetal kayıp yaşayan kadınlardı.

Çalışmamızda yaş ve RPL kriterini belirledikten sonra, patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL'yi araştırabilmek için hasta seçim kriterleri eklenmiştir. RPL'nin etiyolojisi ve risk faktörleri oldukça karmaşıktır. RPL maternal yaş ve anatomik faktörlere bağlı, endokrinolojik ve hematolojik faktörlere bağlı, immünolojik ve genetik faktörlere bağlı, enfeksiyon ve çevresel faktörlere bağlı ve desidual senesense bağlı gelişebilir. Bu nedenle RPL'nin desidual senesens haricindeki etiyolojik faktörlerini elimine edebilmek için, pelvik muayene ve ultrasona göre uterus anatomik malformasyonu taşıyanlar, genetik anomalileri bulunanlar, endokrin veya metabolik hastalıklar içerenler ve enfeksiyon taşıyanlar çalışmaya dahil edilmemiştir (Lv ve ark., 2021). Çalışmamıza literatürde sıklıkla kullanılan RPL hasta seçim kriterlerine ek olarak iki önemli kriter daha eklenmiştir. Bunlardan ilki, hastaların daha önce herhangi bir progesteron analogu olan progestin (MPA-DYD veya diğerleri) tedavisi almamasıydı. Diğer önemli bir kriter olarak paternal faktörü elimine etmek için tekrarlayan düşüklerin tek bir partnerden gerçekleşmesine dikkat edildi. RPL çalışmalarında paternal faktörün elimine edilmemesi çalışmaların bir kısıtlayıcı noktası olarak ele alınmıştır (Dimitriadis ve ark., 2020). Tüm bunlarla birlikte, RPL'nin bilinen bu etiyolojilerinin yanı sıra hastaların %50'sinden fazlasında ayrıntılı incelemelerden sonra dahi belirli bir neden belirlenememektedir (Branch ve Heuser, 2010). Bu nedenle, klinikte 35 yaş altı kadınlarda %9-12 oranında

görülen (Wilcox ve ark., 1988) RPL'nin hücrel biyolojisinin anlaşılmasına ve geliştirilebilecek tedavi seçeneklerine artan bir ilgi vardır.

Her ay menstruasyonla yenilenen ve şekillenen aktif bir doku olan endometriyum, gebelik oluştuğunda desidua adını alır. Desidual hücreler, başarılı bir implantasyon için hormonal faktörlerin salgılanmasından, maternal immün-toleransın sürdürülmesinden ve utero-plasental arayüzün gelişiminden sorumludurlar (Farine ve ark., 2018). Gebelik desiduasında, desidual hücrelerin yanı sıra gebeliğe özgü çok çeşitli immün hücrelerde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, gebelik desiduasının yaklaşık %55-60'ının desidual hücreler, %35'inin lökositler, %1'inin epitelyal hücreler ve %1-3'ünün de fetal hücreler olduğu bildirilmiştir (Croy ve ark., 2002; Farine ve ark., 2018). Bu nedenle, elde edilen gebelik desiduasından, çalışılacak hücre popülasyonunu doğru bir şekilde izole etmek kritik bir basamaktır. Çalışmamızda literatürde yaygın olarak kullanılan primer desidual hücre izolasyon protokolü uygulanmıştır (Chou ve ark., 2003; Farine ve ark., 2018; Lv ve ark., 2019). Gebelik döneminde desidual hücrelerin maruz kaldıkları gebelik hormonlarının aniden kesilmesi maksimum 2-3 gün sonra hücrelerin karakteristik yapılarında değişimle birlikte hücrelerde ölüme neden olduğu gösterilmiştir (Rytkönen ve ark., 2019; Lv ve ark., 2021). Bu nedenle çalışmamızda gebelik desiduasından izole edilen primer desidual hücrelerin hormon ilavesiz besiyerinde iki günlük kısa süreli kültürü yapılmıştır.

Her menstrual siklusta görülen fizyolojik desidual senesens, olgun desidual hücrelerin oluşumunda, desidualizasyonun desteklenmesinde, pro ve anti-enflamatuvar sürecin kontrolünde, endometriyal kaderde, implantasyonda ve embriyonik gelişimin desteklenmesinde kritik rol oynar (Brighton ve ark., 2017; Deryabin ve ark., 2020; Lucas ve ark., 2020; Kong ve ark., 2021). Ancak patolojik desidual senesens, yetersiz desidualizasyon veya desidualizasyon kusurlarına sebep olarak implantasyon başarısızlığı, RPL, plasental patolojiler gibi çeşitli gebelik öncesi ve sonrası gebelik patolojilerine neden olmaktadır (Cha ve ark., 2012; Weimar ve ark., 2012; Kuroda, 2019). İnsanlarda endometriyal stromal hücrelerin, her menstrual siklusun sekretuar fazında desidualizasyona girmeleriyle oluşan olgun desidual hücreler, PRL ve IGFBP-1 gibi çeşitli karakteristik büyüme faktörleri üretir ve bunlar literatürde yaygın olarak kullanılan

desidual hücrelerin klasik belirteçleridir (McLENNAN ve RYDELL, 1965; Salamonson ve ark., 2003; Yoshino ve ark., 2003). Literatürde, RPL yaşayan kadınların desidual hücrelerinde, yetersiz desidualizasyona bağlı gelişen azalmış PRL ve IGFBP-1 seviyesi bildirilmiştir (Salker ve ark., 2010; Lv ve ark., 2021). Çalışmamızda da kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında istatistiksel olarak azalmış PRL ve IGFBP-1 seviyeleri görülmüştür.

Desidual genleri düzenleyen nüklear transkripsiyon faktörü olan FOXO1 desidualizasyon, implantasyon ve endometriyal reseptivitenin kurulması için gereklidir (Vasquez ve ark., 2018). RPL yaşayan hastalarda yeni terapötik ilaçların tasarlanması ve biyobelirteçlerin belirlenmesi üzerine yürütülen bir çalışmada, RPL tanısı almış kadınlarda 14 farklı azalan gen içerisinde *FOXO1*'in de olduğu tanımlanmıştır (A. A. Ramírez-Coronel, Rostami, Younus, Arias Gonzáles, Lafta, Amin, Saadoon, Salman, Bahrami, Feilei, ve ark., 2023). Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada, RPL hastalarından alınan desidual doku örneklerinde azalmış *FOXO1* ekspresyonu tanımlanmıştır (Zhu ve ark., 2023). Çalışmamızda da kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında istatistiksel olarak azalmış FOXO1 ekspresyonu görülmüştür. Bu sonuçlar, ELISA analizlerimizde de gördüğümüz RPL gruplarındaki istatistiksel olarak azalmış PRL ve IGFBP-1 seviyesiyle birlikte ele alındığında, RPL hastalarındaki yetersiz desidualizasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Desidualizasyonda baskın hormon olan P4 sadece desidualizasyonu desteklemekle kalmayıp endometriyumu gebelik için hazırlar ve gebelik devamlılığında da önemini sürdürür. Orta sekretuvar fazdaki implantasyon penceresi sırasında P4 ve FOXO1 karşılıklı etkileşim içindedirler ve endometriyal reseptivitenin kurulmasından rol alırlar (Vasquez ve ark., 2018). P4 hormon yetersizliğine bağlı gelişen luteal faz defektinde spontan gebelik kayıpları görülmektedir. Günümüzde klinikte luteal faz defektlerinin tedavisinde progesteron analogu tedavileri uygulanmaktadır (Medicine, 2015). Progesteron analogu (progestin) olan MPA ve DYD, üremeye yardımcı tedavi protokollerinde sağlıklı gebeliği desteklemek için sıklıkla kullanılır. MPA endometriyal patolojilerin tedavisinde ve daha çok gebelikte düşük tehdidine karşı kullanılmaktadır (Kuhl, 2005; Omar ve ark., 2022). *In vitro* koşullarda endometriyal stromal hücrelerin

MPA ile tedavisi sonrasında FOXO1 protein seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Yilin Wang ve ark., 2018; Murata ve ark., 2021). Sonik strese maruz kalan farelerde yüksek implantasyon kayıpları görülmüş ve farelere deri altı DYD enjeksiyonunun implantasyon kayıplarını azalttığı bildirilmiştir (Joachim ve ark., 2003). RPL tanısı almış kadınlarda oral DYD kullanımının spontan gebelik kayıplarının sayısında istatistiksel olarak azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (El-Zibdeh, 2005). DYD'nin spontan gebelik kayıplarını önleyebilmesinin yanı sıra RPL vakalarında desidualizasyonu da desteklediği, desidual genlerin aktivasyonunu sağladığı, dondumuş-çözdürülmüş embriyo transferlerinde luteal faz desteğiyle embriyolarda implantasyon oranlarını artırdığı gösterilmiştir (X. Liang ve ark., 2022; Neumann ve ark., 2022; Di ve ark., 2023; Vidal ve ark., 2023). Tüm bunların yanında, spontan gebelik kayıplarının önlenmesinde sıklıkla kullanılan MPA ve DYD'nin progesteron reseptörüne farklı bağlanma afinitelerinden dolayı ve hücrelerde farklı moleküler etkilere sebep oldukları bildirildiğinden, klinik açıdan karşılaştırmalı değerlendirilmeleri önemlidir (Simoncini ve ark., 2006; Schindler, 2009). Çalışmamızda kontrol gebelik ve RPL gruplarına progesteron analogu olan progestin uygulamaları (MPA ve DYD) istatistiksel olarak PRL, IGFBP-1 ve FOXO1 seviyelerini artırarak desidualizasyonu düzenlemiş ancak MPA ve DYD arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar, MPA ve DYD farketmeksizin progesteron analogu uygulamalarının RPL hastalarında desidualizasyonu teşvik etmek için kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

*DIO2* geni tarafından kodlanan ve selenyum içeren *DIO2* proteini, tiroid hormonlarının dönüşümüne aracılık ederek prohormon tiroksini (T4) aktif triiyodotironine (T3) dönüştürür ve hücrelerdeki artan enerji metabolizmasının bir göstergesidir (Adu-Gyamfi ve ark., 2020). Bununla birlikte, *DIO2*'nin tiroid hormon metabolizmasında rol almasından dolayı, literatürdeki *DIO2* ve RPL'nin ilişkisinin araştırıldığı çoğu çalışma, RPL'nin etiyolojilerinden biri olan tiroid disfonksiyonuyla ilişkilidir (Gereben ve ark., 2008; Dentice ve ark., 2013; Adu-Gyamfi ve ark., 2020). Ancak *DIO2*'nin tiroid hormon metabolizmasından bağımsız olarak desidualizasyonda rol alan cAMP tarafından kontrol edilebildiğini ve desidualizasyonla plasentasyonda rol alabildiği de gösterilmiştir (de Jesus ve ark., 2001; Maia ve ark., 2005; Adu-Gyamfi ve ark., 2021). Bu nedenle çalışmamızda RPL tanısı almış kadınların desidual hücrelerindeki *DIO2* ekspresyonu

tiroid hormon metabolizmasından bağımsız olarak desidual senesens ile ilişkilendirilerek tartışılmıştır.

Literatürde önceki yıllarda, RPL tanısı almış kadınların endometriyal doku örneklerinde senesent desidual hücre belirteci olan DIO2'un artmış ekspresyonu görülmüştür (Lucas ve ark., 2020; Tewary ve ark., 2020). Sağlıklı gebelik yaşayan kadınlarla, RPL tanısı almış kadınların plasenta örneklerinde DIO2 ekspresyonunun araştırıldığı çalışmada, DIO2'nin sitotrofoblast hücrelerinde ve sinsityotrofoblast hücrelerinde fizyolojik olarak eksprese olduğu ve sağlıklı gebeliklerde gebeliğin ilerlemesiyle ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Oysaki RPL tanısı almış kadınların plasenta örneklerinde ise DIO2'nin aşırı eksprese olduğu ve trofoblast hücrelerindeki proliferasyonu durdurduğu bildirilmiştir (Adu-Gyamfi ve ark., 2021). Çalışmamızda kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL gruplarında istatistiksel olarak artmış DIO2 ekspresyonu görülmüştür.

Patolojik desidual senesens durumunda ortamdaki yaşlanan hücrelerin sayıca artmasından dolayı yetersiz desidualizasyon, embriyo gelişiminin desteklenememesi ve doğum eylemini teşvik eden prostaglandin aracılı sinyal yolunun erken aktivasyonu görülerek gebelik süreci spontan erken kayıpla sonuçlanır (Deryabin ve ark., 2020; Baboota ve ark., 2022). Senesent hücrelerin belirteci olan  $\beta$ -GAL, hücrel senesensi tespit etmek için kullanılan yaygın bir belirteçtir. Çalışmamızda  $\beta$ -GAL ekspresyonu kontrol gebelik gruplarına kıyasla, RPL gruplarında istatistiksel olarak daha yüksekti. Bu bulgu, immünofloresan analizlerimizde gördüğümüz RPL gruplarındaki artmış DIO2 ekspresyonuyla birlikte ele alındığında, RPL tanısı almış kadınlarda sayıca artmış senesent desidual hücre ve senesent hücrelerin varlığına; ortamın patolojiye dönüştüğüne işaretir. Progesteron analogu olan progestin uygulamaları ise (MPA ve DYD) kontrol gebelik ve RPL gruplarındaki DIO2 ve  $\beta$ -GAL ekspresyonlarını değiştirmemiştir. Bu sonuçlar, progesteron analogu uygulamalarının (MPA ve DYD) desidualizasyonu teşvik etmekle sınırlı kaldığını ve hücrel senesens üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığını göstermiştir.

Forkhead box M ailesinin bilinen tek üyesi olan FOXM1 hücrel çoğalma kapasitesine sahip, yüksek proliferasyon yapan hücrelere özgü bir protein olup senesent hücrelerde

ekspresyonu görülmemektir (Koo ve ark., 2012). Bununla birlikte birçok kanser türünde FOXM1'in aşırı oranda eksprese olduğu görülür (M. Liu ve ark., 2006; Li ve ark., 2020). FOXM1 desidualizasyon sürecinde PI3K-Akt, Ras-ERK ve JNK/p38MAPK sinyal yollarında rol alır (Yao ve ark., 2018). FOXM1 hem farelerde (Krupczak-Hollis ve ark., 2004; Schuüller ve ark., 2007; Xie, Cui, ve ark., 2014; Gao ve ark., 2015) hem de insanlarda (Paul ve ark., 2013; Xie, Li, ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2015; Xie ve ark., 2015; X. Liu ve ark., 2018) desidualizasyon, implantasyon ve endometrial reseptivitenin kazanılmasında önemli bir rol oynar. RPL tanısı almış kadınların desidual doku örneklerinde azalmış FOXM1 ekspresyonu bildirilmiştir (Lv ve ark., 2021). Çalışmamızda hem immünofloresan hem de western blot analizlerinde kontrol gebelik gruplarına kıyasla RPL gruplarında istatistiksel olarak azalmış FOXM1 ekspresyonu görülmüştür.

Hücrel proliferasyonla ilişkili olan FOXM1'in fosforilasyonu CDK'lar tarafından nükleusta gerçekleştirilir ve nüklear lokasyonda aktif formda bulunarak hücre döngüsü boyunca fosforilasyon durumu sürekli değişir (Yukun Wang ve ark., 2021). Desidual hücrelerde S ve G2 fazı ayrı bir önem taşımaktadır. Hem kemirgenler de hem de insanlarda desidualizasyon sürecinde, hücre döngüsü boyunca olgun desidual hücrelerin ortaya çıkmasını sağlayan poliploidizasyon görülmektedir (SACHS ve Shelesnyak, 1955; Moulton, 1979). Poliploidizasyon sürecinde desidual hücreler, M-fazına girmeden sadece S ve G2 fazlarında döngü gerçekleştirerek hücre yüzey alanlarını artırıp, bir sonraki hücre döngüsünde daha az enerji harcarlar (H. O. Lee ve ark., 2009). Hücreler poliploidizasyon sürecinde S ve G2 fazına girdiklerinde, siklinE/A-CDK2 kompleksi Thr 600 kalıntısından FOXM1'in nüklear fosforilasyonunu gerçekleştirir (Lüscher-Firzlaff ve ark., 2006). Çalışmamızda, hücrelerin S ve G2 fazlarında siklinE/A-CDK2 kompleksi tarafından Thr 600 kalıntısından fosforilasyonu gerçekleşen p-FOXM1 çalışılmış ve hem immünofloresan hem de western blot analizlerinde kontrol gebelik gruplarına (fizyolojik gebelik) kıyasla RPL gruplarında (patolojik gebelik) istatistiksel olarak azalmış p-FOXM1 (Thr 600) ekspresyonu görülmüştür. Bununla birlikte, fosforilasyonu nükleusta gerçekleşen ve nüklear lokasyonda aktif formda bulunan p-FOXM1 (Thr 600)'in kontrol gebelik gruplarında protein lokalizasyonu nüklear iken, MPA ve DYD uygulamalarından sonra protein lokalizasyonunun artmış şiddetli nüklear olduğu görülmüştür. p-FOXM1'in



RPL gruplarındaki protein lokalizasyonu çok zayıf şiddetli nüklear iken, MPA ve DYD uygulamalarından sonra protein lokalizasyonu artmış orta şiddetli nüklear olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, kontrol gebelik ve RPL gruplarına progestin uygulamalarının hücrelerdeki tipik gen ifadelerini düzenleyen sinyal yollarının aktivasyonlarına ve hücrelerdeki aktifleşen hücresel yanıt tepkilerine işaret etmektedir. Ancak, hücrelerdeki protein transportu, birden fazla faktör tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir (Sánchez-Vicente ve ark., 2019). Bu bakımdan RPL hastalarında MPA ve DYD uygulamalarından sonra p-FOXM1'in transportunun altında yatan hücresel mekanizmaları ve desidual senesensin düzenlenmesindeki rolünü tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bununla birlikte, FOXM1'in hücre döngüsü boyunca değişen fosforilasyon durumu hücresel senesensi baskılamaya yardımcı olur (Anders ve ark., 2011). Bu sonuçlar, RPL gruplarında immünofloresan ve western blot analizlerimizde gördüğümüz azalmış FOXM1 ve p-FOXM1 ekspresyonu ve azalmış poliploid hücrelerin sayısı ile birlikte ele alındığında, RPL hastalarında FOXM1'in Thr 600 kalıntısı üzerinden nüklear fosforilasyonunun gerçekleşemediğini ve böylece yetersiz desidualizasyon, desidual hücrelerdeki azalmış proliferasyonla birlikte görülen poliploidiyi göstermektedir. Progesteron analogu olan progestin uygulamaları (MPA ve DYD) immünofloresan ve western blot analizlerimizde hem kontrol gebelik hem de RPL gruplarındaki FOXM1 ve p-FOXM1 ekspresyonunu istatistiksel olarak artırmıştır. Ancak MPA'ya göre DYD uygulanan gruplardaki FOXM1 ve p-FOXM1 ekspresyonu istatistiksel olarak daha yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca, RPL hastalarına DYD uygulanan gruplardaki poliploid hücre sayısı, MPA uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak artmıştır. Tüm bu bulgular, DYD uygulamasının MPA'dan daha etkili bir şekilde desidualizasyonu teşvik ettiğini, desidual hücrelerdeki proliferasyonu desteklediğini ve poliploid hücre artışını sağladığını göstermiştir. DYD'nin MPA'dan daha etkili bir şekilde bu etkisini yapmasının sebebi olarak, progesteron reseptörüne bağlanma afinite ve duyarlılıklarından kaynaklanması olabilir. DYD'nin progesteron reseptörüne bağlanma afinitesi %85 iken, MPA'nın %196'dır. MPA DYD'ye göre daha yüksek bağlanma afinitesi sergilese de MPA'nın ortamdaki diğer hormon reseptörlerine de (androjenik/östrojenik) düşükte olsa bağlanma afinitesi (%10) vardır. Oysaki DYD progesteron reseptörüne yüksek seçiciliği

olan bir progestindir (Kontula ve ark., 1975; Schindler, 2009). DYD'nin MPA'dan daha etkili bir şekilde desidual hücrelere gösterdiği bu etki doğrudan progesteron reseptörüyle ilişkili olabilir. Ancak, DYD'nin bu etkiyi doğrudan nasıl yaptığı, uygulanan progestinin farmakodinamiği ve farmakokinetiğiyle ilişkili olup, çalışma konumuzun kapsamı dışındadır.

Tüm bunların yanında FOXM1 fosforilasyonu Ras-MAPK yolağı ve Plk-1 gibi kinazlar aracılığıyla da gerçekleşebilir (Ma ve ark., 2005; Laoukili ve ark., 2007). Literatürde, Ras-MAPK ve Plk-1'in RPL hastalarında ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Yinglan Wang ve ark., 2016; Andrés Alexis Ramírez-Coronel, Rostami, Younus, Arias Gonzáles, Lafta, Amin, Saadoon, Salman, Bahrami, & Feilei, 2023). Özetle, CDK aracılığıyla veya uygun mitojenik sinyallerle fosforilasyonu ve devamında aktivasyonu gerçekleşen FOXM1 ve p-FOXM1'in çalışmamızda kanıtladığımız gibi RPL hastalarında ekspresyonlarının azalması, PRL ve IGFBP-1 seviyesinin ve FOXO1'in ekspresyonlarının azalması ve desidual-hücre sel senesens belirteçlerinin (DIO2,  $\beta$ -GAL) ekspresyonlarının artması RPL hastalarındaki yetersiz ve patolojik desidualizasyonun bir göstergesidir. Ancak, tüm bunların yanı sıra literatürde RPL hastalarını "süper reseptif endometriyuma sahip süper fertil" vakalar olarak adlandıran çalışmalarda mevcuttur (Teklenburg ve ark., 2010; Agenor ve Bhattacharya, 2015; Deryabin ve ark., 2020). RPL tanısı almış kadınlar bir yandan kötü kalitedeki dahi embriyoların implantasyonuna olanak tanırken, bir yandan da iyi kalitedeki embriyolarda sağlıklı gebeliği ve canlı doğumu desteklememektedirler. Çalışmamızda, kontrol gebelik ve RPL hastalarında iki farklı progesteron analogu uygulamasıyla endometrial fonksiyon araştırılmıştır. RPL gruplarındaki sferoidlerin genişlemesi kontrol gebelik gruplarına kıyasla istatistiksel olarak düşük olmakla birlikte MPA ve DYD uygulamaları bu sonuçları değiştirmemiştir. RPL gruplarındaki azalmış sferoid genişlemesi ortamın patolojiye dönüştüğünü ve buna bağlı olarakta blastosistler için elverişli bir ortamın sürdürülemediğini göstermiştir. Kontrollü göç bölgesi oluşturulan migrasyon analizlerinde ise 36.saatte neredeyse tüm gruplarda 0.saate kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Elde edilen bu bulgulardan yola çıkarak 36. saatte tüm gruplardaki migrasyon yüzdesi karşılaştırılmıştır. Buna göre hem kontrol gebelik hem de RPL gruplarına progesteron analogu olan progestin (MPA ve DYD) uygulamalarının

primer desidual hücrelerdeki proliferasyon ve migrasyonu desteklediği görülmüştür. Ancak DYD bu etkisini MPA'dan daha etkili bir şekilde göstermiştir. MPA ve DYD'nin blastosistleri taklit eden AC-1M88 sferoidlerinin genişlemesinde bir etkisi olmadığı ancak primer desidual hücrelerdeki migrasyonu desteklediği bilgisi birlikte ele alındığında, sferoid genişlemesi üzerindeki etki eksikliğinin kültür süresiyle bağlantılı olabileceğini ve progesteron analogu tedavisinin endometriyum ve blastosistler arasındaki etkileşimleri teşvik etmeden önce başlangıçta endometrial işlevi düzenleyebileceği olasılığını akıllara getirebilir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünyada 35 yaş altı gebelik planlayan çiftlerin RPL yaşama yüzdeleri göz önünde alındığında, RPL etiyolojisi, tanısı ve tedavisinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Çalışmamız literatürdeki patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL hastalarında FOXM1 ve p-FOXM1 ekspresyonunun ilk olarak tanımlandığı ve iki farklı progesteron analogu uygulamasıyla (MPA ve DYD) olası tedavi yönteminin araştırıldığı ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz bilgiler, RPL hastalarının üreme sorunları için daha iyi ve stratejik tedavilere rehberlik edebilir niteliktedir.

### Çalışmamızın sonuçları:

- MPA ve DYD uygulamasının aralarında istatistiksel bir farklılık olmadan PRL, IGFBP-1 ve FOXO1 ekspresyon artışını sağlayarak RPL hastalarında yetersiz desidualizasyonu düzenlediği sonucuna varılmıştır.
- Bununla birlikte ne MPA ne de DYD'nin DIO2 ve  $\beta$ -GAL ekspresyonunu ve sferoid genişlemesini değiştirmediği göz önüne alındığında, progestin uygulamalarının hücresel senesens sürecine etkisi olmadığını ve sferoidlerde kültür süresine bağlı olarak blastosistlerden ziyade endometriyal işlevi düzenleyebileceğini göstermiştir.
- Ayrıca, DYD'nin MPA'dan daha etkili bir şekilde FOXM1 ve p-FOXM1 ekspresyon artışını, poliploidi hücre sayısı ve migrasyon yüzdeleri artırdığı göz önüne alındığında, DYD'nin belkide spesifik progesteron reseptörü seçiciliğinden dolayı desidual hücrelerdeki proliferasyonu ve desidualizasyonu desteklediğini göstermiştir.

### Çalışmamızın önerileri:

- RPL teşhisi konmuş ve gebe kalmayı planlayan hastaların tedavisinde, desidualizasyonu teşvik etmeye ve patolojik desidual senesensi baskılamaya yardımcı olacak progestin ve senomorfik ajanlarla geliştirilecek kombine

tedavilerin gelecekte üreme tıbbında geniş kapsamlı etkileri olabileceğine inanmaktayız. Bu kombine tedaviler sadece progesteron analoglarının kullanılmasıyla desidualizasyonu, endometriyal proliferasyon ve migrasyonu teşvik etmekle kalmayacak aynı zamanda senomorfik ajanlarla senesent hücrelerin de eliminasyonunu sağlayarak patolojik desidual senesensi baskılayabilecek ve böylece RPL hastalarının tedavisinde yeni umut vaad edici bir yaklaşım doğacaktır.

- Üremeye yardımcı tedavi protokollerinde hastalarda tüp bebek tedavisi uygulanmadıysa, luteal faz defekti yoksa ve gebelikte devam eden bir vajinal kanaması yoksa progesteron analogu tedavileri önerilmemektedir. Ancak çalışmamızda, progesteron analogu uygulamalarının desidualizasyonu, endometriyal proliferasyon ve migrasyonu, total ve fosforile FOXM1 artışını sağladığı göz önüne alındığında, klinikte gebe kalmak isteyen kadınlara takipli progesteron analogu tedavilerinin (özellikle DYD) fayda sağlayabileceğini ve böylece daha geniş bir hasta yelpazesine fayda sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

#### **Çalışmamızın yaygın etkisi:**

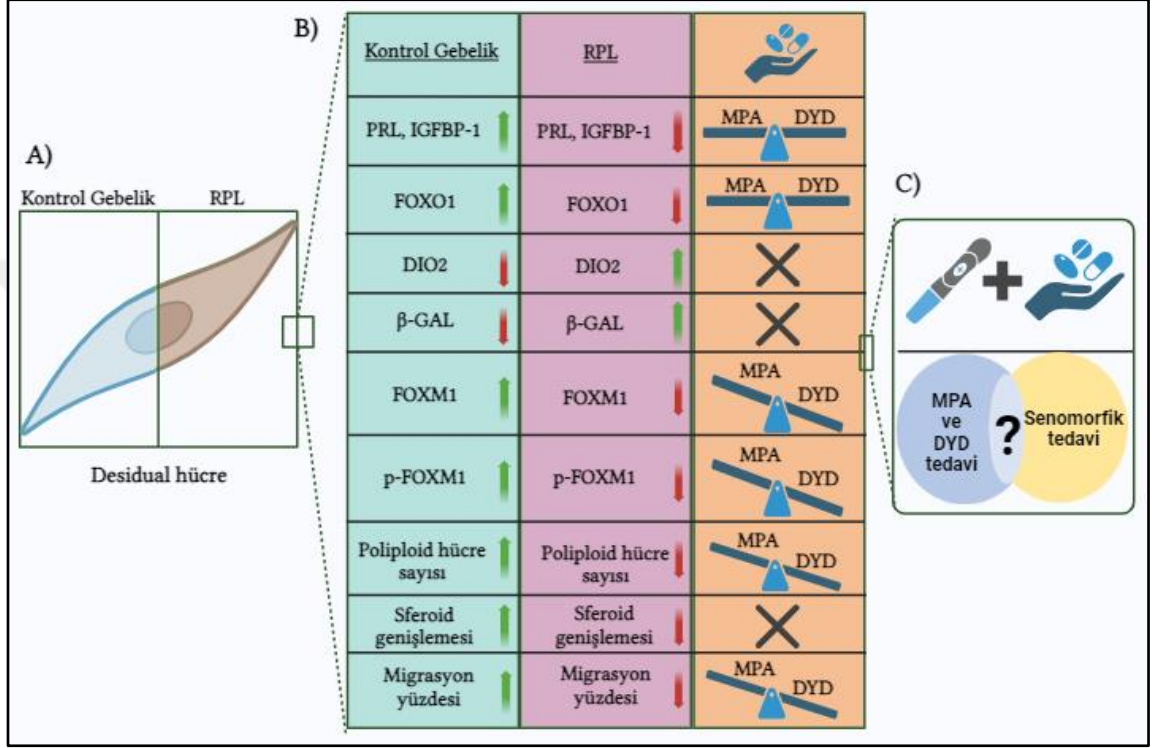
- Çalışmamız, patolojik desidual senesense bağlı gelişen RPL vakalarında, progestin uygulamalarının üreme tıbbı alanında potansiyel tedavi seçeneklerine ışık tutmakta ve üreme sağlığını optimize etmek için yenilikçi çözümleri düşündürmektedir.

#### **Çalışmamızın kısıtlayıcı noktası:**

- Çalışmamızın önemli bir kısıtlayıcı noktası, deneysel modellerimizde primer desidual hücreler için uygulanan kısa süreli kültür koşuluuydu. Hücrelerin MPA ve DYD tedavisine bağlılığı ve hücresel dirençleri değerlendiremememiz bu kısıtlayıcı noktadan kaynaklanmaktadır. Hücrelere MPA ve DYD uygulamasının ardından yapılacak hormon geri çekilmesi hücrelerin progestin tedavilerine karşı potansiyel hücresel tepkilerini ortaya koyacaktır. Elde edilen bilgiler, RPL yaşayan kadınlar için progesteron analogu tedavilerinin zamanlamasını ve etkisini

belirlemede önemli olabileceğinden, bu kısıtlayıcı noktanın ele alınması önemlidir.

Çalışmamızın sonuç ve önerileri **Şekil 6.1**'de özetlenmiştir.



**Şekil 6.1:** Çalışmamızın sonuç ve önerileri özetlenmiştir. **A)** Kontrol gebelik ve RPL gruplarından elde edilen primer desidual hücre. **B)** Kontrol gebelik ve RPL gruplarında MPA ve DYD öncesi ve sonrası değişimler. Yeşil oklar: ekspresyon artışını, kırmızı oklar: ekspresyon düşüşünü temsil etmektedir. *Dengedeki terazi:* MPA ve DYD'nin istatistiksel olarak farketmeksizin her iki grupta da ekspresyon artışı sağladığını temsil etmektedir. *Dengede olmayan terazi:* Her iki grupta da DYD'nin MPA'dan istatistiksel olarak daha yüksek bir şekilde ekspresyon artışı sağladığını temsil etmektedir. *X işareti:* MPA ve DYD'nin her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığını temsil etmektedir. **C)** Çalışmamızın iki temel önerisini temsil etmektedir. *Yukarıdaki dikdörtgen:* gebe kalmak isteyen kadınların takipli progesteron analogu tedavilerine başlanması önerisini temsil ederken, *aşağıdaki dikdörtgen:* progestin tedavilerinin yanında kombine halde uygulanacak senomorfik tedavilerin önerisini temsil etmektedir. Şekil, Biorender yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Adu-Gyamfi, E. A., Lamptey, J., Chen, X.-M., Li, F.-F., Li, C., Ruan, L.-L., . . . Ding, Y.-B. Iodothyronine deiodinase 2 (dio2) regulates trophoblast cell line cycle, invasion and apoptosis; and its downregulation is associated with early recurrent miscarriage. *Placenta*. 2021; 111: 54-68.
- Adu-Gyamfi, E. A., Wang, Y.-X., & Ding, Y.-B. The interplay between thyroid hormones and the placenta: A comprehensive review. *Biology of Reproduction*. 2020; 102 (1): 8-17.
- Agenor, A., & Bhattacharya, S. Infertility and miscarriage: Common pathways in manifestation and management. *Women's health*. 2015; 11 (4): 527-541.
- Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y. J., Widlund, H. R., Chick, J. M., . . . Braun, P. A systematic screen for cdk4/6 substrates links foxm1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer cell*. 2011; 20 (5): 620-634.
- Andersen, A.-M. N., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., & Melbye, M. Maternal age and fetal loss: Population based register linkage study. *Bmj*. 2000; 320 (7251): 1708-1712.
- Baboota, R. K., Rawshani, A., Bonnet, L., Li, X., Yang, H., Mardinoglu, A., . . . Dietrich, A. Bmp4 and gremlin 1 regulate hepatic cell senescence during clinical progression of nafld/nash. *Nature Metabolism*. 2022; 4 (8): 1007-1021.
- Barber, J., Cockwell, A., Grant, E., Williams, S., Dunn, R., & Ogilvie, C. Is karyotyping couples experiencing recurrent miscarriage worth the cost? *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2010; 117 (7): 885-888.
- Barbosa, M. W. P., Valadares, N. P. B., Barbosa, A. C. P., Amaral, A. S., Iglesias, J. R., Nastri, C. O., . . . Nakagawa, H. M. Oral dydrogesterone vs. Vaginal progesterone capsules for luteal-phase support in women undergoing embryo transfer: A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assisted Reproduction*. 2018; 22 (2): 148.
- Berkhout, R. P., Keijser, R., Repping, S., Lambalk, C. B., Afink, G. B., Mastenbroek, S., & Hamer, G. High-quality human preimplantation embryos stimulate endometrial stromal cell migration via secretion of microrna hsa-mir-320a. *Hum Reprod*. 2020; 35 (8): 1797-1807.
- Boutzios, G., Karalaki, M., & Zapanti, E. Common pathophysiological mechanisms involved in luteal phase deficiency and polycystic ovary syndrome. Impact on fertility. *Endocrine*. 2013; 43: 314-317.
- Branch, D., & Heuser, C. Recurrent miscarriage. *Reproductive endocrinology and infertility*. *Eur J Epidemiol*. 2010; 16 (2): 281-296.
- Brenner, B. Clinical management of thrombophilia-related placental vascular complications. *Blood*. 2004; 103 (11): 4003-4009.
- Brighton, P. J., Maruyama, Y., Fishwick, K., Vrljicak, P., Tewary, S., Fujihara, R., . . . Woods, L. Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *elife*. 2017; 6: e31274.
- Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*. 2013; 75: 685-705.
- Campisi, J., Andersen, J. K., Kapahi, P., & Melov, S. (2011). *Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease?* Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8 (9): 729-740.
- Carbonnel, M., Pirtea, P., de Ziegler, D., & Ayoubi, J. M. Uterine factors in recurrent pregnancy losses. *Fertility and Sterility*. 2021; 115 (3): 538-545.

- Carter, M. E., & Brunet, A. Foxo transcription factors. *Current Biology*. 2007; 17 (4): R113-R114.
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*. 2012; 18 (12): 1754-1767.
- Chen, P., Yang, M., Wang, Y., Guo, Y., Liu, Y., Fang, C., & Li, T. Aging endometrium in young women: Molecular classification of endometrial aging-based markers in women younger than 35 years with recurrent implantation failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022: 1-9.
- Chou, C. S., MacCalman, C. D., & Leung, P. C. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone i and ii on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (8): 3806-3815.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology: mechanisms of disease*. 2010; 5: 99-118.
- Croy, B. A., Chantakru, S., Esadeg, S., Ashkar, A. A., & Wei, Q. Decidual natural killer cells: Key regulators of placental development (a review). *Journal of reproductive immunology*. 2002; 57 (1-2): 151-168.
- de Jesus, L. A., Carvalho, S. D., Ribeiro, M. O., Schneider, M., Kim, S.-W., Harney, J. W., . . . Bianco, A. C. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 108 (9): 1379-1385.
- Dentice, M., Marsili, A., Zavacki, A., Larsen, P. R., & Salvatore, D. The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013; 1830 (7): 3937-3945.
- Deryabin, P., Griukova, A., Nikolsky, N., & Borodkina, A. The link between endometrial stromal cell senescence and decidualization in female fertility: The art of balance. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020; 77: 1357-1370.
- Di, X., Hao, Y., Duan, Z., Ma, Y., Cao, Y., Tan, Z., . . . Lin, X. Activation of sgk1/enac signaling pathway improves the level of decidualization in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reproductive Sciences*. 2023: 1-12.
- Dimitriadis, E., Menkhorst, E., Saito, S., Kutteh, W. H., & Brosens, J. J. Recurrent pregnancy loss. *Nature reviews disease primers*. 2020; 6 (1): 98.
- Down, C. F., Millour, J., Lam, E. W.-F., & Watson, R. J. Binding of foxm1 to g2/m gene promoters is dependent upon b-myb. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2012; 1819 (8): 855-862.
- El-Zibdeh, M. Dydrogesterone in the reduction of recurrent spontaneous abortion. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005; 97 (5): 431-434.
- El Hachem, H., Crepaux, V., May-Panloup, P., Descamps, P., Legendre, G., & Bouet, P.-E. Recurrent pregnancy loss: Current perspectives. *International journal of women's health*. 2017: 331-345.
- Fabi, F., Grenier, K., Parent, S., Adam, P., Tardif, L., Leblanc, V., & Asselin, E. Regulation of the pi3k/akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. *PloS one*. 2017; 12 (5): e0177387.
- Fanchin, R., Schonäuer, L. M., Righini, C., Guibourdenche, J., Frydman, R., & Taieb, J. Serum anti-müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin b, estradiol, fsh and lh on day 3. *Human reproduction*. 2003; 18 (2): 323-327.
- Farine, T., Parsons, M., Lye, S., & Shynlova, O. Isolation of primary human decidual cells from the fetal membranes of term placentae. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2018; (134): e57443.



- Fatemi, H., Popovic-Todorovic, B., Papanikolaou, E., Donoso, P., & Devroey, P. An update of luteal phase support in stimulated ivf cycles. *Human Reproduction Update*. 2007; 13 (6): 581-590.
- Felberbaum, R., Albano, C., Ludwig, M., Riethmüller-Winzen, H., Grigat, M., Devroey, P., & Diedrich, K. Ovarian stimulation for assisted reproduction with hmg and concomitant midcycle administration of the gnRH antagonist cetrorelix according to the multiple dose protocol: A prospective uncontrolled phase iii study. *Human Reproduction*. 2000; 15 (5): 1015-1020.
- Flenady, V., Koopmans, L., Middleton, P., Frøen, J. F., Smith, G. C., Gibbons, K., . . . McIntyre, H. D. Major risk factors for stillbirth in high-income countries: A systematic review and meta-analysis. *The lancet*. 2011; 377 (9774): 1331-1340.
- Fleskens, V., & van Boxtel, R. Forkhead box p family members at the crossroad between tolerance and immunity: A balancing act. *International reviews of immunology*. 2014; 33 (2): 94-109.
- Friedman, J., & Kaestner, K. The foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2006; 63: 2317-2328.
- Gao, F., Bian, F., Ma, X., Kalinichenko, V. V., & Das, S. K. Control of regional decidualization in implantation: Role of foxm1 downstream of hoxa10 and cyclin d3. *Scientific reports*. 2015; 5 (1): 13863.
- Gellersen, B., & Brosens, J. J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine reviews*. 2014; 35 (6): 851-905.
- Gellersen, B., Wolf, A., Kruse, M., Schwenke, M., & Bamberger, A.-M. Human endometrial stromal cell-trophoblast interactions: Mutual stimulation of chemotactic migration and promigratory roles of cell surface molecules cd82 and ceacam1. *Biology of reproduction*. 2013; 88 (3): 80, 81-13.
- Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., . . . Bianco, A. C. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine reviews*. 2008; 29 (7): 898-938.
- Gomez-Lopez, N., Romero, R., Plazyo, O., Schwenkel, G., Garcia-Flores, V., Unkel, R., . . . Panaitescu, B. Preterm labor in the absence of acute histologic chorioamnionitis is characterized by cellular senescence of the chorioamniotic membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2017; 217 (5): 592. e591-592. e517.
- Gonzalez, M., Neufeld, J., Reimann, K., Wittmann, S., Samalecos, A., Wolf, A., . . . Gellersen, B. Expansion of human trophoblastic spheroids is promoted by decidualized endometrial stromal cells and enhanced by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interleukin-1  $\beta$ . *Mol Hum Reprod*. 2011; 17 (7): 421-433.
- Gray, H. Antomy of the human body. *Annals of surgery*. 1918; 68 (5): 564-566.
- Harmon, Q. E., Patchel, S. A., Zhao, S., Umbach, D. M., Cooper, T. E., & Baird, D. D. Depot medroxyprogesterone acetate use and the development and progression of uterine leiomyoma. *Obstetrics and gynecology*. 2022; 139 (5): 797.
- Hatasaka, H. H. Recurrent miscarriage: Epidemiologic factors, definitions, and incidence. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1994; 37 (3): 625-634.
- Homer, H. A. Modern management of recurrent miscarriage. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2019; 59 (1): 36-44.
- Huang, H., & Tindall, D. J. Dynamic foxo transcription factors. *Journal of cell science*. 2007; 120 (15): 2479-2487.
- Hyde, K. J., & Schust, D. J. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015; 5 (3): a023119.

- Jaiswal, N., Chakraborty, S., & Nag, A. Biology of foxm1 and its emerging role in cancer therapy. *Journal of Proteins & Proteomics*. 2014; 5 (1).
- Jauniaux, E., Farquharson, R. G., Christiansen, O. B., & Exalto, N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Human reproduction*. 2006; 21 (9): 2216-2222.
- Jiang, Y., Liao, Y., He, H., Xin, Q., Tu, Z., Kong, S., . . . Li, B. Foxm1 directs stat3 expression essential for human endometrial stromal decidualization. *Scientific reports*. 2015; 5 (1): 13735.
- Joachim, R., Zenclussen, A. C., Polgar, B., Douglas, A. J., Fest, S., Knackstedt, M., . . . Arck, P. C. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a th2 biased local immune response. *Steroids*. 2003; 68 (10-13): 931-940.
- Jorgensen, A., Alfirevic, Z., Smith, C. T., & Williamson, P. Cervical stitch (cerclage) for preventing pregnancy loss: Individual patient data meta-analysis. *Obstetric Anesthesia Digest*. 2008; 28 (3): 149-150.
- Kaestner, K. H., Knöchel, W., & Martínez, D. E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development*. 2000; 14 (2): 142-146.
- Kamal, N. S. M., Safuan, S., Shamsuddin, S., & Foroozandeh, P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection methods. *European journal of cell biology*. 2020; 99 (6): 151108.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., & Chambon, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms a and b. *The EMBO journal*. 1990; 9 (5): 1603-1614.
- Kayisli, U. A., Mahutte, N. G., & Arici, A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2002; 47 (4): 213-221.
- Kim, C. H. Foxp3 and its role in the immune system. *Forkhead Transcription Factors: Vital Elements in Biology and Medicine*. 2010: 17-29.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. *Berne y levy. Fisiología+ studentconsult: Elsevier Health Sciences*; 2009, p:
- Kong, C. S., Ordoñez, A. A., Turner, S., Tremaine, T., Muter, J., Lucas, E. S., . . . Brighton, P. J. Embryo biosensing by uterine natural killer cells determines endometrial fate decisions at implantation. *Faseb j*. 2021; 35 (4): e21336.
- Kontula, K., Jänne, O., Vihko, R., de Jager, E., de Visser, J., & Zeelen, F. Progesterone-binding proteins: In vitro binding and biological activity of different steroidal ligands. *European Journal of Endocrinology*. 1975; 78 (3): 574-592.
- Koo, C.-Y., Muir, K. W., & Lam, E. W.-F. Foxm1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2012; 1819 (1): 28-37.
- Korver, W., Roose, J., & Clevers, H. The winged-helix transcription factor trident is expressed in cycling cells. *Nucleic acids research*. 1997; 25 (9): 1715-1719.
- Krupczak-Hollis, K., Wang, X., Kalinichenko, V. V., Gusarova, G. A., Wang, I.-C., Dennewitz, M. B., . . . Costa, R. H. The mouse forkhead box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Developmental biology*. 2004; 276 (1): 74-88.
- Kuhl, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: Influence of different routes of administration. *Climacteric*. 2005; 8 (sup1): 3-63.
- Kuroda, K. Impaired endometrial function and unexplained recurrent pregnancy loss. *Hypertension Research in Pregnancy*. 2019; 7 (1): 16-21.

- Lai, Q., Zhang, H., Zhu, G., Li, Y., Jin, L., He, L., . . . Zhang, S. Comparison of the gnrh agonist and antagonist protocol on the same patients in assisted reproduction during controlled ovarian stimulation cycles. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013; 6 (9): 1903.
- Laoukili, J., Stahl, M., & Medema, R. H. Foxm1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2007; 1775 (1): 92-102.
- Larsen, E. C., Christiansen, O. B., Kolte, A. M., & Macklon, N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC medicine*. 2013; 11 (1): 1-10.
- Lee, H. O., Davidson, J. M., & Duronio, R. J. Endoreplication: Polyploidy with purpose. *Genes & development*. 2009; 23 (21): 2461-2477.
- Lee, I. I., & Kim, J. J. Influence of akt on progesterone action in endometrial diseases. *Biology of reproduction*. 2014; 91 (3): 63, 61-10.
- Leung, A. S., MILLAR, L. K., KOONINGS, P. P., MONTORO, M., & MESTMAN, J. H. Perinatal outcome in hypothyroid pregnancies. *Obstetrics & Gynecology*. 1993; 81 (3): 349-353.
- Li, Y., Lu, L., Tu, J., Zhang, J., Xiong, T., Fan, W., . . . Steggerda, J. Reciprocal regulation between forkhead box m1/nf-kb and methionine adenosyltransferase 1a drives liver cancer. *Hepatology*. 2020; 72 (5): 1682-1700.
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007; 2 (2): 329-333.
- Liang, X., Tang, S., Li, D., Song, Y., He, M., Duan, Y., & Du, H. Shoutai wan improves embryo survival by regulating aerobic glycolysis of trophoblast cells in a mouse model of recurrent spontaneous abortion. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022; 2022.
- Lin, C., Li, H., Liu, J., Hu, Q., Zhang, S., Zhang, N., . . . Li, X. Arginine hypomethylation-mediated proteasomal degradation of histone h4—an early biomarker of cellular senescence. *Cell Death & Differentiation*. 2020; 27 (9): 2697-2709.
- Liu, C., Barger, C. J., & Karpf, A. R. Foxm1: A multifunctional oncoprotein and emerging therapeutic target in ovarian cancer. *Cancers*. 2021; 13 (12): 3065.
- Liu, M., Dai, B., Kang, S.-H., Ban, K., Huang, F.-J., Lang, F. F., . . . Xie, K. Foxm1b is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer research*. 2006; 66 (7): 3593-3602.
- Liu, X., Zhang, L., Liu, Y., Cui, J., Che, S., An, X., . . . Cao, B. Circ-8073 regulates cep55 by sponging mir-449a to promote caprine endometrial epithelial cells proliferation via the pi3k/akt/mtor pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2018; 1865 (8): 1130-1147.
- Lozano-Torres, B., Estepa-Fernández, A., Rovira, M., Orzaez, M., Serrano, M., Martinez-Manez, R., & Sancenon, F. The chemistry of senescence. *Nature Reviews Chemistry*. 2019; 3 (7): 426-441.
- Lucas, E. S., Vrljicak, P., Muter, J., Diniz-da-Costa, M. M., Brighton, P. J., Kong, C.-S., . . . Ewington, L. J. Recurrent pregnancy loss is associated with a pro-senescent decidual response during the peri-implantation window. *Communications biology*. 2020; 3 (1): 37.
- Lüscher-Firzlaff, J. M., Lilischkis, R., & Lüscher, B. Regulation of the transcription factor foxm1c by cyclin e/cdk2. *FEBS letters*. 2006; 580 (7): 1716-1722.
- Lv, S., Liu, M., Xu, L., & Zhang, C. Downregulation of decidual skp2 is associated with human recurrent miscarriage. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021; 19 (1): 1-9.
- Lv, S., Wang, N., Ma, J., Li, W.-P., Chen, Z.-J., & Zhang, C. Impaired decidualization caused by downregulation of circadian clock gene bmal1 contributes to human recurrent miscarriage. *Biology of reproduction*. 2019; 101 (1): 138-147.

- Ly, D. H., Lockhart, D. J., Lerner, R. A., & Schultz, P. G. Mitotic misregulation and human aging. *Science*. 2000; 287 (5462): 2486-2492.
- Ma, R. Y., Tong, T. H., Cheung, A. M., Tsang, A. C., Leung, W. Y., & Yao, K.-M. Raf/mek/mapk signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of foxm1c. *Journal of cell science*. 2005; 118 (4): 795-806.
- Macedo, J. C., Vaz, S., Bakker, B., Ribeiro, R., Bakker, P. L., Escandell, J. M., . . . Logarinho, E. Foxm1 repression during human aging leads to mitotic decline and aneuploidy-driven full senescence. *Nature communications*. 2018; 9 (1): 2834.
- Macedo, L., Cavagna Neto, M., Dzik, A., Rocha, A. D. R., & Lima, S. Oral dydrogesterone in frozen-thawed embryo transfer cycles. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2022; 68 (1): 100-105.
- Macklon, N. S., Geraedts, J. P., & Fauser, B. C. Conception to ongoing pregnancy: The 'black box' of early pregnancy loss. *Human reproduction update*. 2002; 8 (4): 333-343.
- Maia, A. L., Kim, B. W., Huang, S. A., Harney, J. W., & Larsen, P. R. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma t<sub>3</sub> in euthyroid humans. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115 (9): 2524-2533.
- Maier, A. B., & Westendorp, R. G. Relation between replicative senescence of human fibroblasts and life history characteristics. *Ageing research reviews*. 2009; 8 (3): 237-243.
- Marquez, C. M. D., Ibana, J. A., & Velarde, M. C. The female reproduction and senescence nexus. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017; 77 (5): e12646.
- McLENNAN, C. E., & RYDELL, A. H. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstetrics & Gynecology*. 1965; 26 (5): 605-621.
- McNatty, K., & Sawers, R. Relationship between the endocrine environment within the graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cells in vitro. *Journal of Endocrinology*. 1975; 66 (3): 391-400.
- Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertility and sterility*. 2012; 98 (5): 1103-1111.
- Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: A committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2015; 103 (4): e27-e32.
- Micks, E., Raglan, G. B., & Schulkin, J. Bridging progestogens in pregnancy and pregnancy prevention. *Endocrine connections*. 2015; 4 (4): R81.
- Moore, K. L., Persaud, T., Yıldırım, M., Okar, İ., & Dalçık, H. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002, p:
- Mori, M., Kitazume, M., Ose, R., Kurokawa, J., Koga, K., Osuga, Y., . . . Miyazaki, T. Death effector domain-containing protein (dedd) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121 (1): 318-327.
- Moulton, B. C. Effect of progesterone on DNA, rna and protein synthesis of deciduoma cell fractions separated by velocity sedimentation. *Biology of Reproduction*. 1979; 21 (3): 667-672.
- Moussatche, P., & Lyons, T. J. (2012). Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. In: Portland Press Ltd.
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15 (7): 482-496.
- Murakami, K., Kuroda, K., & Brosens, J. J. Perturbation of endometrial decidualization. *Treatment Strategy for Unexplained Infertility and Recurrent Miscarriage*. 2018: 105-114.
- Murata, H., Tanaka, S., Hisamatsu, Y., Tsubokura, H., Hashimoto, Y., Kitada, M., & Okada, H. Transcriptional regulation of Igals9 by hand2 and foxo1 in human endometrial stromal cells in women with regular cycles. *Molecular Human Reproduction*. 2021; 27 (11): gaab063.

- Neumann, K., Masuch, A., Vonthein, R., Depenbusch, M., Schultze-Mosgau, A., Eggersmann, T. K., & Griesinger, G. Dihydroprogesterone and 20 $\alpha$ -dihydrodihydroprogesterone plasma levels on day of embryo transfer and clinical outcome in an anovulatory programmed frozen-thawed embryo transfer cycle: A prospective cohort study. *Human Reproduction*. 2022; 37 (6): 1183-1193.
- Ni, L., Xie, H., & Tan, L. Multiple roles of foxj3 in spermatogenesis: A lesson from foxj3 conditional knockout mouse models. *Molecular Reproduction and Development*. 2016; 83 (12): 1060-1069.
- Obstetricians, A. C. o., & Gynecologists. Acog practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, february 2001.(replaces technical bulletin number 212, september 1995). American college of obstetricians and gynecologists. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2002; 78 (2): 179-190.
- Omar, I. S., Adenan, N. A. M., Godoy, A., Teo, I. H., Gunasagran, Y., & Chung, I. Aberrant upregulation of cdk1 contributes to medroxyprogesterone acetate (mpa) resistance in cancer-associated fibroblasts of the endometrium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022; 628: 133-140.
- Ovadya, Y., & Krizhanovsky, V. Senescent cells: Suspected drivers of age-related pathologies. *Biogerontology*. 2014; 15: 627-642.
- Pan-Castillo, B., Gazze, S. A., Thomas, S., Lucas, C., Margarit, L., Gonzalez, D., . . . Conlan, R. S. Morphophysical dynamics of human endometrial cells during decidualization. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018; 14 (7): 2235-2245.
- Paul, S., Jain, P., Tuli, A., Gupta, U., & Jain, M. (2013). Serum vegf as a marker of endometrial receptivity in infertile women. In: *Wiley Online Library*.
- Piccinni, M.-P., Raghupathy, R., Saito, S., & Szekeres-Bartho, J. Cytokines, hormones and cellular regulatory mechanisms favoring successful reproduction. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 717808.
- Pluchino, N., Drakopoulos, P., Wenger, J. M., Petignat, P., Streuli, I., & Genazzani, A. R. Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (rpl). *Hormones*. 2014; 13: 314-322.
- Propst, A. M., Hill, J. A., Ginsburg, E. S., Hurwitz, S., Politch, J., & Yanushpolsky, E. H. A randomized study comparing crinone 8% and intramuscular progesterone supplementation in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and sterility*. 2001; 76 (6): 1144-1149.
- Ramírez-Coronel, A. A., Rostami, A., Younus, L. A., Arias Gonzáles, J. L., Lafta, M. H., Amin, A. H., . . . Feilei, R. Designing effective multi-target drugs and identifying biomarkers in recurrent pregnancy loss (rpl) using in vivo, in vitro, and in silico approaches. *Biomedicines*. 2023; 11 (3): 879.
- Ramírez-Coronel, A. A., Rostami, A., Younus, L. A., Arias Gonzáles, J. L., Lafta, M. H., Amin, A. H., . . . Akhavan-Sigari, R. Designing effective multi-target drugs and identifying biomarkers in recurrent pregnancy loss (rpl) using in vivo, in vitro, and in silico approaches. *Biomedicines*. 2023; 11 (3).
- Rey, E., Kahn, S. R., David, M., & Shrier, I. Thrombophilic disorders and fetal loss: A meta-analysis. *The Lancet*. 2003; 361 (9361): 901-908.
- Ross, M. (2006). H., pawlina w., histology. In: Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Rytönen, K. T., Erkenbrack, E. M., Poutanen, M., Elo, L. L., Pavlicev, M., & Wagner, G. P. Decidualization of human endometrial stromal fibroblasts is a multiphasic process involving distinct transcriptional programs. *Reprod Sci*. 2019; 26 (3): 323-336.
- SACHS, L., & Shelesnyak, M. The development and suppression of polyploidy in the developing and suppressed deciduoma in the rat. *Journal of Endocrinology*. 1955; 12 (2): 146-151.

- Sadler, T. Langman's medical embryology. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1988; 81 (1): 131.
- Salamonsen, L. A., Dimitriadis, E., Jones, R., & Nie, G. Complex regulation of decidualization: A role for cytokines and proteases—a review. *Placenta*. 2003; 24: S76-S85.
- Salker, M., Teklenburg, G., Molokhia, M., Lavery, S., Trew, G., Aojanepong, T., . . . Landles, C. Natural selection of human embryos: Impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PloS one*. 2010; 5 (4): e10287.
- Sánchez-Vicente, I., Albertos, P., & Lorenzo, O. Protein shuttle between nucleus and cytoplasm: New paradigms in the *abi5*-dependent *aba* responses. *Molecular Plant*. 2019; 12 (11): 1425-1427.
- Schindler, A. E. Progestational effects of dydrogesterone in vitro, in vivo and on the human endometrium. *Maturitas*. 2009; 65: S3-S11.
- Schuüller, U., Zhao, Q., Godinho, S. A., Heine, V. M., Medema, R. H., Pellman, D., & Rowitch, D. H. Forkhead transcription factor *foxm1* regulates mitotic entry and prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors. *Molecular and cellular biology*. 2007; 27 (23): 8259-8270.
- Seo, S., Fujita, H., Nakano, A., Kang, M., Duarte, A., & Kume, T. The forkhead transcription factors, *foxc1* and *foxc2*, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Developmental biology*. 2006; 294 (2): 458-470.
- Shao, Q., Liu, X., Huang, Y., Chen, X., & Wang, H. Human decidual stromal cells in early pregnancy induce functional re-programming of monocyte-derived dendritic cells via crosstalk between *g-csf* and *il-1 $\beta$* . *Frontiers in immunology*. 2020; 11: 574270.
- Silver, R. M., Branch, D. W., Goldenberg, R., Iams, J. D., & Klebanoff, M. A. Nomenclature for pregnancy outcomes: Time for a change. *Obstetrics & Gynecology*. 2011; 118 (6): 1402-1408.
- Simoncini, T., Caruso, A., Giretti, M. S., Scorticati, C., Fu, X.-D., Garibaldi, S., . . . Genazzani, A. R. Effects of dydrogesterone and of its stable metabolite, 20- $\alpha$ -dihydrodydrogesterone, on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Fertility and sterility*. 2006; 86 (4): 1235-1242.
- Sroga, J. M., Ma, X., & Das, S. K. Developmental regulation of decidual cell polyploidy at the site of implantation. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2012; 4: 1475.
- Sturmlechner, I., Durik, M., Sieben, C. J., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. Cellular senescence in renal ageing and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2017; 13 (2): 77-89.
- Teklenburg, G., Salker, M., Heijnen, C., Macklon, N. S., & Brosens, J. J. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: Impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction*. 2010; 16 (12): 886-895.
- Tewary, S., Lucas, E. S., Fujihara, R., Kimani, P. K., Polanco, A., Brighton, P. J., . . . Quenby, S. Impact of sitagliptin on endometrial mesenchymal stem-like progenitor cells: A randomised, double-blind placebo-controlled feasibility trial. *EBioMedicine*. 2020; 51: 102597.
- Thieffry, C., Van Wynendaele, M., Samain, L., Tyteca, D., Pierreux, C., Marbaix, E., & Henriët, P. Spatiotemporal expression pattern of progesterone receptor component (*pgrmc*) 1 in endometrium from patients with or without endometriosis or adenomyosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2022; 223: 106153.
- Thigpen, J. T., Brady, M. F., Alvarez, R. D., Adelson, M. D., Homesley, H. D., Manetta, A., . . . Given, F. T. Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: A dose-response study by the gynecologic oncology group. *Journal of Clinical Oncology*. 1999; 17 (6): 1736-1736.

- Tomari, H., Kawamura, T., Asanoma, K., Egashira, K., Kawamura, K., Honjo, K., . . . Kato, K. Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity. *Biology of reproduction*. 2020; 103 (1): 104-113.
- Usadi, R. S., Groll, J. M., Lessey, B. A., Lininger, R. A., Zaino, R. J., Fritz, M. A., & Young, S. L. Endometrial development and function in experimentally induced luteal phase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008; 93 (10): 4058-4064.
- Van Amsterdam, P., Overmars, H., Scherpenisse, P., & de Bree LC, H. Dydrogesterone: Metabolism in man. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1980; 5 (3): 173-184.
- van Dijk, M. M., Kolte, A. M., Limpens, J., Kirk, E., Quenby, S., van Wely, M., & Goddijn, M. Recurrent pregnancy loss: Diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Human reproduction update*. 2020; 26 (3): 356-367.
- Vasquez, Y. M., Wang, X., Wetendorf, M., Franco, H. L., Mo, Q., Wang, T., . . . Spencer, T. E. Foxo1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. *PLoS genetics*. 2018; 14 (11): e1007787.
- Velarde, M. C., & Menon, R. Positive and negative effects of cellular senescence during female reproductive aging and pregnancy. *Journal of Endocrinology*. 2016; 230 (2): R59-R76.
- Vidal, A., Dhakal, C., Werth, N., Weiss, J. M., Lehnick, D., & Kohl Schwartz, A. S. Supplementary dydrogesterone is beneficial as luteal phase support in artificial frozen-thawed embryo transfer cycles compared to micronized progesterone alone. *Frontiers in endocrinology*. 2023; 14: 1128564.
- Wang, Y., Gan, H., Su, F., Zhang, H., Wang, S., & Xian, J. Role of mapk/erk signal pathway in recurrent miscarriage patients by case-control analysis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2016; 9: 12773-12778.
- Wang, Y., Yuan, X., Li, J., Liu, Z., Li, X., Wang, Z., . . . Wang, X. The synergistic effects of shr6390 combined with pyrotinib on her2+/hr+ breast cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9: 785796.
- Wang, Y., Zhang, L., Che, X., Li, W., Liu, Z., & Jiang, J. Roles of sirt1/foxo1/srebp-1 in the development of progestin resistance in endometrial cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2018; 298: 961-969.
- Weimar, C. H., Kavelaars, A., Brosens, J. J., Gellersen, B., de Vreeden-Elbertse, J. M., Heijnen, C. J., & Macklon, N. S. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high-and low-quality human embryos. *PLoS One*. 2012; 7 (7): e41424.
- Weiss, L. *Cell and tissue biology. A textbook of histology*. 1988: 211-254.
- Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., O'Connor, J. F., Baird, D. D., Schlatterer, J. P., Canfield, R. E., . . . Nisula, B. C. Incidence of early loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 1988; 319 (4): 189-194.
- William, K. O. *Netter's essential histology 2e*: Saunders; 2013, p:
- Wu, Q., Li, B., Liu, L., Sun, S., & Sun, S. Centrosome dysfunction: A link between senescence and tumor immunity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020; 5 (1): 107.
- Xie, Y., Cui, D., & Kong, Y. Foxm1 influences embryo implantation and is regulated by 17 beta-estradiol and progesterone in mouse uteri and endometrium cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014; 7 (10): 6585.

- Xie, Y., Cui, D., Sui, L., Xu, Y., Zhang, N., Ma, Y., . . . Kong, Y. Induction of forkhead box m1 (foxm1) by egf through erk signaling pathway promotes trophoblast cell invasion. *Cell and tissue research*. 2015; 362 (2): 421-430.
- Xie, Y., Li, Y., & Kong, Y. Opn induces foxm1 expression and localization through erk 1/2, akt, and p38 signaling pathway in hec-1a cells. *International journal of molecular sciences*. 2014; 15 (12): 23345-23358.
- Xu, Y., Hu, J., Lv, Q., Shi, C., Qiu, M., Xie, L., . . . Chen, X. Endometrium-derived mesenchymal stem cells suppress progression of endometrial cancer via the dkk1-wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2023; 14 (1): 159.
- Yao, S., Fan, L. Y.-N., & Lam, E. W.-F. (2018). *The foxo3-foxm1 axis: A key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Ye, H., Kelly, T. F., Samadani, U., Lim, L., Rubio, S., Overdier, D. G., . . . Costa, R. H. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Molecular and cellular biology*. 1997; 17 (3): 1626-1641.
- Yoshino, O., Osuga, Y., Hirota, Y., Koga, K., Hirata, T., Yano, T., . . . Taketani, Y. Endometrial stromal cells undergoing decidualization down-regulate their properties to produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 $\beta$  via reduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003; 88 (5): 2236-2241.
- Yovich, J. L., Mariappen, U., Hinchliffe, P. M., Dhaliwal, S. S., & Keane, K. N. Mpa given orally during the first trimester for threatened miscarriage carries no specific risk for foetal abnormalities albeit the rate is higher than non-threatened pregnancies. *Reproductive Biology*. 2020; 20 (3): 424-432.
- Zhao, Q., Larios, K., Naaldijk, Y., Sherman, L., Chemerinski, A., Okereke, K., . . . Morelli, S. S. Bone marrow-and umbilical cord-derived mesenchymal stem cell secretome alters gene expression and upregulates motility of human endometrial stromal cells. *bioRxiv*. 2022: 2022.2011.2012.516251.
- Zhu, Y., Wu, F., Hu, J., Xu, Y., Zhang, J., Li, Y., . . . Liu, X. Ldha deficiency inhibits trophoblast proliferation via the pi3k/akt/foxo1/cyclind1 signaling pathway in unexplained recurrent spontaneous abortion. *The FASEB Journal*. 2023; 37 (2): e22744.