

SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
1. KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ

Klinik Şefi: Doç. Dr. Bülent GÖKMEN



**NORMAL ENDOMETRİUM DOKUSUNDA NÜKLEER
FAKTÖR-KAPPA B' NİN MENSTRÜEL SIKLUS
FAZLARINA GÖRE EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. TUĞBA ALTUN

ANKARA
2008

SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
1. KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ

Klinik Şefi: Doç. Dr. Bülent GÖKMEN

**NORMAL ENDOMETRİUM DOKUSUNDA NÜKLEER
FAKTÖR-KAPPA B' NİN MENSTRÜEL SIKLUS
FAZLARINA GÖRE EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Op. Dr. HÜSEYİN AYDOĞMUŞ

Dr. TUĞBA ALTUN

ANKARA
2008

Asistanlığımın başından bu yana her konuda desteğini aldığım, kariyerimin en önemli adımlarında her zaman candan ve yol gösterici kimliğiyle yanımda olduğunu hissettiren, hem kişiliği hem de klinisyenliği ile hep hayran olduğum, öğrencisi olmaktan daima gurur duyacağım klinik şefimiz Sayın Doçent Dr. Bülent GÖKMEN'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca kendime düstur edindiğim birçok şeyi öğrendiğim, kendisi ile çalışabilmiş olmayı büyük onur ve şans saydığım, hem hekimlik hem insanlığıyla her zaman örnek alacağım Sayın Op. Dr. Yusuf ERGÜN'e,

Bu tezin hazırlık aşamalarının gerçekleştirilmesini, gerekli teknik ve bilimsel imkânlarla ulaşılmasını sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu(TÜBİTAK)'na

Yale Üniversitesi'ndeki laboratuvarının kapılarını açarak kariyerimin ilk büyük adımını atmamı sağlayan, aynı zamanda bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Aydın ARICI'ya,

Yale Üniversitesi'nde geçirdiğim her günde büyük emeği, desteği, yardımseverliği, içtenliği ile yanımda olan, bıkmadan öğreten, usanmadan ağabeylik yapan, örnek bilim adamı, essiz insan sevgili Doçent Dr. Ümit Ali KAYIŞLI'ya,

Arıcı Laboratuvarındaki bir yıl süresince zamanımın büyük kısmını birlikte geçirdiğim, sonsuz çalışkanlığıyla, benzersiz insanlığı ile tanışmış olmaktan onur duyduğum, kendisinden çok şey öğrendiğim sevgili Dr. William MURK'e,

Hacettepe Üniversitesi'ndeki eğitimimin ilk yılından itibaren örnek aldığım, bilgisini, kılavuzluğunu hiçbir zaman esirgemeyen, bilim adamlığının Türkiye'de de yapılıp bir şey olduğunu asla unutmamısağlayan, kendisine çok şey borçlu olduğum Sayın Prof. Dr. Oğuz GÜÇ'e,

İhtisasım sırasında eğitimime katkılarından dolayı uzman doktorlarımız Sayın Op. Dr. Levent KORKMAZ, Op. Dr. Hüseyin AYDOĞMUŞ, Op. Gülay AŞUT, Op. Dr. Deniz Yazar KESKİN, Op. Dr. Funda DOĞULU, Op. Dr. Derya KORKMAZ, Op. Dr. Şule ÖZEL'e

Asistanlık hayatımın bana armağanı, uzmanlık hayatımın vazgeçilmez dostları olan sevgili Op. Dr. Harun ŞİMŞEK, Op. Dr. Derya KARAÇAY, Dr. Remzi EREN ve Dr. Emre EKMEKÇİ'ye

Asistanlık gibi zor bir dönemin sorumluluklarını birlikte paylaştığım sevgili asistan doktor arkadaşlarıma ve birlikte çalıştığım sevgili klinik ve poliklinik hemşirelerimize,

Beni bugünlere getiren, iyi ve kötü her günümde benimle olan, canımdan çok sevdiğim sevgili aileme,

Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanmamdan başlayarak, emeği, sevgisi, dostluğu ile hem örnek hem de yanımda olan Dr. Serdar ENSARİ'ye,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMLE....

Dr. Tuğba ALTUN

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇLAR	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
Menstrüel Siklusun Hormonal Kontrolü.....	5
Nöroendokrin Kontrol.....	10
Hipotalamo-hipofizer Fonksiyon	10
İmplantasyon.....	12
3. MENSTRÜEL SIKLUS SIRASINDA ENDOMETRİUMDAKİ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER.....	14
Proliferatif Faz	14
Sekretuar Faz	15
4. NÜKLEER FAKTÖR- KAPPA B	16
5. MATERYAL VE METOD	21
Dokuların Toplanması	21
İmmünohistokimya	22
6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	24
7. SONUÇLAR	25
FOSFO-NF-κB (P-NF-κB).....	33
TOTAL NF-κB (T-NF-κB)	34
8. TARTIŞMA	37
9. ÖZET	41
10. KAYNAKLAR.....	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Fosforile NF- κ B menstrüel siklus fazlarına dağılımı	27
Tablo 2. Fosforile NF- κ B'nin stromal hücrelerde fazlara göre dağılımı	29
Tablo 3. Total NF- κ B glandular hücrelerde fazlara göre dağılımı.....	31

FIGÜR LİSTESİ

Figür 1. Menstrüel siklus hormonal değişimler.....	10
Figür 2. Fosforile NF- κ B'nin endometrial glandular hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı	26
Figür 3. Fosforile NF- κ B'nin endometrial stromal hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı	28
Figür 4. Total NF- κ B'nin endometrial glandular hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı	30
Figür 5. Total NF- κ B'nin endometrial stromal hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı	32
Figür 6. Endometrial dokuda NF-Kappa B	36

1. GİRİŞ VE AMAÇLAR

İnsan endometriumu her menstrual siklusta ve aynı zamanda erken dönem gebelikte temelinde endokrin-immün interaksiyonların olduğu özel moleküler yolların kontrolü altında siklik dönüşümler geçirir. Bu olaylar menstrual kanama, doku onarımı ve rejenerasyonu, inflamasyon, anjiyogenez, blastokist implantasyonu ve gebeliğin ilerlemesi gibi bir dizifarklı değişikliği içerir. Menstruel siklus süresince glandular epitel ve stromal dokunun relatif oranları, spiral arteriollerin uzunluk ve kıvrımları, çeşitli proteinlerin ekspresyonu, doku içerisindeki lökositlerin sayısı ve tipleri öngörülebilir bir şekilde dalgalanmalar ve değişimler gösterir. Bu dokuya spesifik değişimlerin modülasyonunda endokrin (östrojen ve progesteron) ve parakrin faktörlerin rolü olduğu açıktır. Endometrial diferensiasyon, proliferasyon, hücre sağkalımı, lökositlerin dokuda sekestrasyonu, apoptoz ve anjiogenez farklı seks steroidlerinin kontrolünde meydana gelir. [1]

Sitokinler hormonlar ve nörotransmitterler gibi, selüler komunikasyonda önemli roller olan sinyal protein ve glikoproteinleri olarak tanımlanırlar. Sitokinler hematopoietik ve non-hematopoietik çok çeşitli hücre gruplarını tarafından sentezlenirler ve otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterebilirler.[2,3] Sitokin ailesi genel olarak küçük moleküllü daha çok 8 ve 30 kDa moleküler ağırlıkta suda çözünebilir protein ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Sitokinler lenfokinler, interlökinler ve kemokinler olarak fonksiyonlarına, salgılandıkları hücreye ve fonksiyon gösterdikleri hedefe göre sınıflandırılabilirler. Kemokinler esas olarak kemotaksisi indüklemeye yetenekleri ile ön planda

olmalarına rağmen hücre proliferasyonu, differansiyasyonu ve apoptoziste de etkinlikleri vardır.[4] Bütün bunlara ek olarak sitokinler anjiyogenez, hematopoez ve temel olarak da inflamasyonda etkilidirler.

İnsan endometriumunda meydana gelen kritik reproduktif olaylar olan menstruasyon ve implantasyonun inflamatuvar karakterde mekanizmalar ile ilişkilidir.[5] Her iki olayda da prostoglandinlerin ve sitokinlerin aynı zamanda lökositlerin de katılımıyla rol oynaması söz konusudur. Bu mekanizmalarla ilişkili endometrial fizyoloji halen tam olarak açıklanabilmiş değildir ve bunun sağlanabilmesi birçok menstrual patolojiler, dismenore, implantasyon başarısızlığı gibi durumların tedavisinde yeni yaklaşımlar ortaya konulması için önemli olabilir.

Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) çok sayıda immün ve inflamatuvar genlerin ekspresyonunu regüle eden bir transkripsiyon faktörüdür. [6,7] Bir çok sitokin için gerekli DNA promotör bölgelerde NF- κ B reseptörü bulunduğu çeşitli yayınlarda bildirilmiştir.[8] Hücreler arası sinyalizasyonda görevli olan interlökin-1 ve tümör nekroz faktör- α , interlökin-6 ve lösemi inhibe edici faktör gibi önemli sitokinlerin regülasyonunda rol aldığı çalışmalarla ortaya konmuştur.[9-11]

Bu çalışmamızda gros metabolik olayların altında yatan moleküler mekanizmalar, inflamasyon ve immün sistemle ilişkili kaskadlardan yola çıkarak endometriumun fizyolojik döngüsü olan menstruel siklus boyunca NF- κ B ekspresyonun değişimini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Dişi reproduktif sisteminde menstruasyon ve implantasyon iki pivotal olay olarak gerçekleşir ve inflamatuvar prosesler olarak düşünülürler. Her ikisi de lökosit infiltrasyonu, doku yeniden modellenmesi ve inflamatuvar sitokinlerin artmış ekspresyonunu barındırır.[5,12] Bu olaylara dayanan endometrial fizyoloji halen tam olarak anlaşılmış değildir bu göz ardı edilme menoraji,dismenore implantasyon başarısızlığı gibi majör patolojilere daha özgün ve başarılı yaklaşımlar geliştirilmesini engellemektedir.

Menstruasyonun mekanizması üzerine en açıklayıcı çalışmalardan biri 1940 yılında Markee tarafından gerçekleştirilmiştir. Markee maymun gözünün ön odacığına endomerium transplante etmiş ve menstruasyonu oluşturan olayları mikroskobik olarak incelemiştir.

İnsan endometriumunun başlıca fonksiyonları, hormonlarla belirlenen bir implantasyon aralığı sağlanması[13], gebelik oluşmaması durumunda kendi ölümüne giden olayları başlatmak ve diğer bütün mukozal yüzeylerle paylaşılan bir fonksiyon olarak invazif patojenlere karşı korunma sağlamak olarak belirlenmiştir. Bu farklı fonksiyonlar farklı hücre bileşenleri arasında interaksiyonlar gerektirir, ovaryan steroid hormonların etkisindedir ve parakrin olarak da mikroçevre içerisinde kontrol edilmektedir. İnsan endometriumu yüzey ve glandular epitelyumdan oluşan mukozal epitelyal yüzey, heterolog bir stroma ve sadece menstruasyonu gerçekleştiren türlerde bulunan karakteristik vasküler sisteme sahiptir.[14]Bu komponentler sitokin

sentezinin kontrolü altında interaksiyona girerler ve hormonal kontrol altında sonlanırlar.

Steroid hormonlar nükleer hormon reseptörü süperaillesinin spesifik üyelerine bağlanarak transaktivasyon prosesi yoluyla belirli hedef genlerin transkripsiyonunu arttıırırlar. [15,16]

Son yıllarda ortaya çıkarıldı ki bu reseptörlerin çoğu transaktivasyonun yanı sıra hedef genleri majör büyüme faktörü ve sitokin aracılı sinyal moleküllerini inhibe etmek yoluyla etkili bir şekilde baskılayabilmektedirler. [17]

İmmünomodülasyonda rol oynamasının yanında bu interaksiyon, sitokinlerin ve steroid reseptörlerinin bir arada bulunduğu kemik, overler, endometrium, meme bezleri gibi non lenfoid dokularda ve inflamatuvar proseslere benzeyen menstruasyon, doğum ve ovulasyon gibi olaylarla yakından ilişkilidir.

Siklik dejenerasyon gösteren dokularda inflamasyon ve immün cevaplar için sitokin ailelerinin bulunması şaşırtıcı olmamalıdır. İnterlökinler prostoglandinlerin ve diğeri sitokinlerin yapımını artırır. Koloni uyarıcı faktör-1 selüler proliferasyonu ve o bölgede makrofajların çoğalmasını artırır. İnterferon- γ aktive lökositler tarafından salgılanır ve endometrial epitelyal proliferasyonu artırır. Lösemi inhibe edici faktör birçok sitokin ve büyüme faktörlerine cevap olarak oluşur. İnterlökinler gibi LIF progesteronun etkili olduğu geç sekretuar dönemde ve erken desiduada gözlenir ve embryo implantasyonunda rolü olabilir.[10] Tümör nekroze edici faktör- α (TNF- α) gen ekspresyonu endometriumda gözlenir ve aktivitesi proliferatif fazda artar, erken sekretuar fazda azalır

ve tekrar sekretuar fazın ortalarında artar. $\text{TNF-}\alpha$ 'nin hücre sel büyüme ye birçok etkisi vardır. [18]

Büyü me faktörleri spesifik hücre membran reseptörlerine bağlanır ve hücre sel iletişimi başlatırlar. Büyü me faktörleri güçlü mitojenler olduklarından siklusun folliküler fazında endometriumun proliferatif aktivitesi ile beraber bulunmaları ve önemli oranda artmaları şaşırtıcı olmamalıdır. Östrojen epidermal büyü me faktörünün (EGF) ve reseptörünün ve insulin benzeri büyü me faktörünün (IGF) üretimini gen düzeyinde ortaya koyar. EGF östrojen reseptör mekanizması ile etkileşimi sonucu östrojen benzeri etkiler gösterir. Transforme edici büyü me faktörü ($\text{TGF-}\alpha$) ve EGF aynı reseptör üzerinden çalışırlar. Ve endomeriumun östrojen bağımlı büyümesinde önemli mediatörlerdir. $\text{TGF-}\alpha$ düzeyleri hemen hemen sabit olan ve siklik olmayan EGF düzeylerinin aksine siklusun ortasında en yüksek düzeye ulaşır. Trombosit kaynaklı büyü me faktörü(PDGF) ise stromal hücrelerde sentezlenen kuvvetli bir mitojendir.

İnsülin benzeri büyü me faktörleri(IGF) selüler mitozu ve farklılaşmayı sağlarlar,aynı zamanda östrojen ve progesteron tarafından kontrol edilen bir düzen içinde eksprese edilirler. IGF-I proliferatif ve erken sekretuar endometriumda predominant iken IGF-II orta ile geç sekretuar fazda ve erken gebelik desiduada görülür. IGF-I ekspresyonu menstruel siklus boyunca dolaşımda bulunan östrojen düzeyleri tarafından kontrol edilir.

Menstrüel Siklusun Hormonal Kontrolü

İnsanda menstrüel siklus 4 fonksiyonel faza ayrılarak incelenmektedir.

1. Foliküler faz; yeni foliküllerin gelişimi, büyümesi, matür graaf folikülü oluşumu
2. Ovulatuvar faz; oositin matürasyonu; oositin matürasyonu ve salınımı
3. Luteal faz; implantasyon için hazırlayıcı hormonları salgılayan yeni bir yapının (korpus luteum) oluşumu
4. Menstrüel faz; luteal-foliküler geçiş

İnsanlarda menstrüel siklus ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu periodlar arası ortalama sürenin reproduktif çağda 28 gün olduğu ve reproduktif hayatın iki ucunda(adolesan ve menopozal geçiş dönemleri) anovulatuvar sikluslar sonucu bu sürenin uzayabildiği gösterilmiştir.[19] Yirmi sekiz günlük tipik bir siklusta foliküler ve luteal fazlar eşit uzunluktadır. Aslında luteal faz süre olarak sabittir ve kısa veya uzun sikluslarda değişken olan foliküler faz süresidir.

1. Foliküler Faz

Siklusun ilk yarısı foliküler faz olarak adlandırılmakta ise de folikülogenez önceki siklusun geçluteal fazında başlar ve menstrüel faz boyunca da devam eder. Overdeki foliküllerin çoğunluğu primordial foliküllerdir ve bunların da sadece bir kısmı büyümeye devam edecektir. Erken antral döneme kadar olan foliküler büyüme pituiter kontrol altında değildir ve henüz netlesmemiş intraovarian , non-steroidal mekanizmaların etkisinde olduğu düşünülmektedir. Büyümekte olan foliküller erken antral döneme geldiklerinde büyümenin devamlılığı gonadotropinlerin uyarıcı etkisine bağlıdır. [20] Menstrüel siklusun başında kısa bir dönem (erken foliküler dönem) gonadotropin oranı FSH lehine artar ve bu daha sonra büyümeye devam edecek genellikle 3-7

folikülün seçilmesine (recruitment) yol açar. Bu foliküllerden sadece birisi matürasyona ulaşacaktır. Dominant folikül seçimi tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen en çok aromataz ve dolayısıyla östrojenik aktivite kazanan folikülün dominant folikül olduğu ileri sürülmektedir. Bu seçim erken foliküler fazda olmakta ve siklusun 5-6. günlerinde tamamlanmaktadır. Östrojenin negatif feedback etki ile periferik FSH sekresyonunu baskılaması sonucu diğer foliküller atreziye gitmektedir. Foliküler faz geliştirmekte olan graaf folikülü tarafından salınan inhibin B ve östradiol düzeylerindeki progresif artış ile karakterizedir. Önceki siklusun geç luteal ve menstrüel fazlarında korpus luteumun gerilemesi ve inhibin A ile östradiol ve progesteron düzeylerindeki ani düşüşmenstruasyondan yaklaşık 2 gün önce FSH salınımında artışa sebep olur. Kısaca tekrarlırsak FSH düzeylerindeki artış LH pulse frekansının düşükten yükseğe dönüşüyle foliküler fazın ilk 4-5 günü foliküler seçilmeyi başlatır. Bunu tek bir folikülün seçimi (5-7. günler), dominant folikülün matürasyonu (8-12. günler) ve sonunda ovulasyon (13-15. günler) izler. [21] Bu olaylar siklusun foliküler fazını oluşturur (yaklaşık 13 gün) ve diğerleri atreziye giderken bir preovulatuvar folikülün oluşumu ile sonlanır. Ovulasyon için seçilen bu dominant folikül yüksek androjen, östrojen, progesteron ve inhibin B biyosentez ve sekresyon kapasitesine sahiptir.[22-25] Östradiol ve inhibin FSH sekresyonuna potent supresör olduklarından FSH foliküler fazın sonuna doğru azalan bir trend izler.[24] LH düzeylerinin ise tersine, progresif olarak arttığı görülmektedir.

2. Ovulatuvar Faz (Foliküler-luteal Geçiş)

Midsiklus LH salınımının tepe noktası tam olarak belirlenemeyeceğinden LH salınımının başlangıcı midsiklustaki hormonal dinamiklerin referans noktası olarak değerlendirilmektedir.[26] Midsiklus salınımının başlangıcından önceki 2-3 gün içinde östradiol düzeylerindeki artışa paralel inhibin, progesteron ve 17-alfa hidroksoprogesteron düzeylerinde artış görölmektedir.

Graaf folikölünün matürasyonuile yüksek östradiol konsantrasyonlarına ulaşılır. Eşik değere ulaşıldığında ise östradiol pozitif feedback etki ile hipotalamus ve hipofize folikölün ovulasyon için hazır olduğı sinyali verir ve GnRH ile gonadotropin salınımı meydana gelir.

Ovulatuvar gonadotropin salınımı graaf folikölünde önemli yapısal değışiklikler oluşturur ve overin steroid sekresyon paterni değışir. LH salınımı granüloza hücre proliferasyonunu durdurur ve sonuç olarak da östradiol yapımı durur. Granüloza hücrelerinin luteinizasyonu olayı başlar ve bunun sonucu olarak preovulatuvar progesteron artışı oluşur. Gonadotropin salınımı için gerekli uyarı şüphesiz östradiolün eşik değerin üzerine yükselmesi ise de progesteron, midsiklus gonadotropin salınımının başlangıcını ve boyutunu etkilemektedir. LH salınımının 17-alfa-hidroksilaz-C-17,20-liyaz enzimini selektif olarak inhibe etmesi ile androjen yapımı da azalır. Ovulasyon, yani oositin atılması, LH salınımının başlangıcından yaklaşık 35-44 saat sonra gerçekleşir.[24,26] Ortalama LH salınımı süresi 48 saattir; hızla çıkan kolu 14 saat kadar sürer ve östradiol, 17-alfa hidroksiprogesteron, inhibin B

konsantrasyonlarında azalma ve inhibin A düzeylerinde artma ile birlikte; daha uzun olan inen kolu 20 saat kadar sürer ve inhibin A ile progesteron düzeylerinde artış ve 17-alfa hidrokspirogesteron,östradiol ve inhibin B düzeylerinde daha fazla bir azalma ile birlikte.

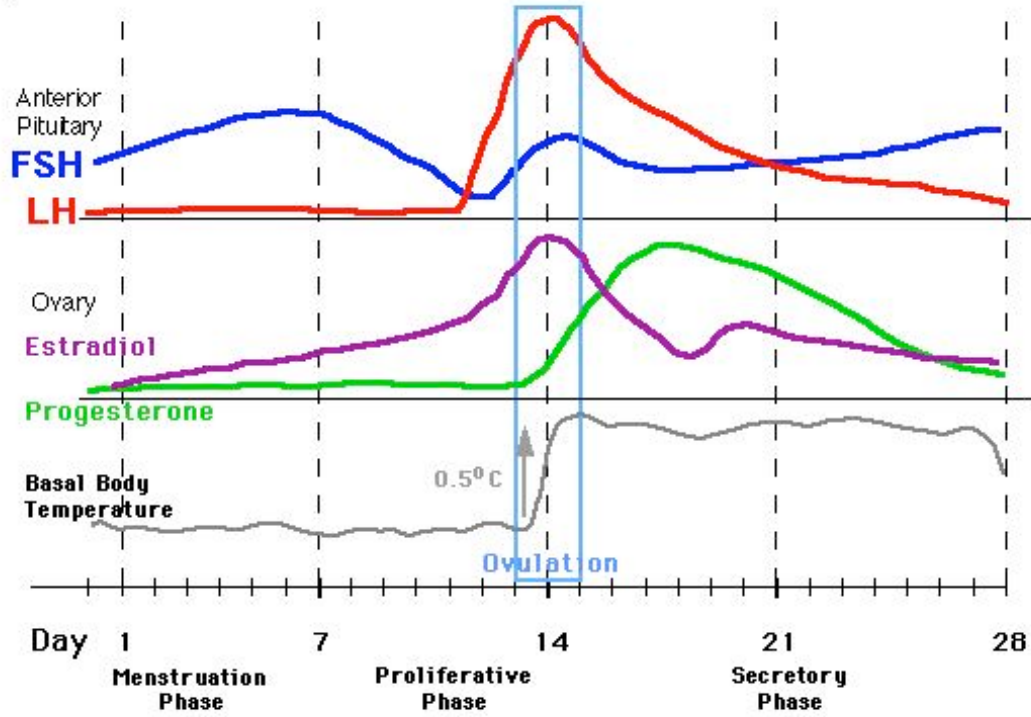
3. Luteal Faz

Luteal fazda, östrojen dominant foliküler fazdan progesteron dominansına geçilmektedir. Teka-granuloza hücrelerinin ovulasyon sonrası luteinizasyonu ile büyük miktarda progesteron ve daha az oranda östradiol sentezlenir. Progesteron ve östradiolün midluteal fazda maksimum konsantrasyonlara ulaştığı 4 günlük dönem (20-24. günler) sekretuar endometriumun implantasyona uygun olduğu zamandır. İnhibin A da bu dönemde maksimum düzeye ulaşır fakat implantasyonda rol oynamamaktadır. İmplantasyon gerçekleşmez ise progesteron, östradiol ve inhibin A düzeylerinde ani düşüş ile birlikte luteoliz oluşur. [24,27] Korpus luteumun sekretuar aktivitesi LH desteğine bağımlıdır. [28-30] Luteal fazda FSH düzeyleri tüm siklustaki en düşük seviyelere iner; korpus luteum devamlılığı için FSH gerekli değildir. İnhibinin östrojen ve progesteron ile sinerjistik etkisi sonucu FSH salınımı baskılanır ve böylelikle luteal fazda folikülogenezin başlaması engellenir.

4. Menstruel Faz (Luteal-foliküler geçiş)

İzleyen siklusun foliküler gelişiminin başlaması korpus luteumun regresyonuna bağlıdır. Burada önemli olan inhibin A düzeyindeki düşüş ile FSH düzeyindeki yükselme arasındaki ters ilişkidir ve bu olay menstruasyonun başlangıcından 2 gün önce oluşarak izleyen siklus için foliküler gelişimi başlatır.[27,31] Bu faz luteal fonksiyonun bitimini ve

düşük frekanslı, yüksek amplitüdlü LH pulselerından yüksek frekanslı, düşük amplitüdlü LH pulselerına geçişi temsil etmektedir. Birlikte FSH'da artış olur, dolayısıyla da gelişmekte olan foliküller tarafından inhibin B yapımı uyarılır.[27,31,32] Bu dinamik değışiklikler korpus luteum steroidleri, inhibin ve hipotalamik opioid peptidlerinin inhibitör etkilerinin ortadan kalkmasının bir sonucudur. [24,27-29,33]



Figür1.Menstruel siklus hormonal değışimler

Nöroendokrin Kontrol

Hipotalamo-hipofizer Fonksiyon

Hipotalamopituiter-ovarian aksın çeşitli kademelerindeki hormonal salınım ve morfolojik değışiklikler arasında fevkalade bir koordinasyon mevcuttur. Bu döngüde başı çeken hipotalamustur.

Hipotalamik GnRH pulse jeneratörü aktif olarak çalışmadığında pituiter-ovarian aks uyarılmayacak ve siklus başlatılamayacaktır. GnRH salınımı pulsatiftir. Fizyolojik salınım frekansı 60-90 dakikada birdir. Bu salınım paterni pituiter gonadotropların uyarılmasında gereklidir. Over fonksiyonunun gonadotropik kontrolünde de pituiter FSH ve LH salınımının pulsatil olması önemlidir. Pulsatil pituiter gonadotropin salınımı GnRH'nin arkuat nucleus-median eminens bölgesindeki nöronal terminallerden epizodik salınımı ve hipotalamohipofizyal portal damarlar ile gonadotrop hücrelere taşınmasının direkt sonucudur. Pulsatil GnRH aktivitesi komşu nöron ve astrositlerden etkilenmektedir ve bu nöronal yapılarda östrojen ve progesteron reseptörleri gösterilmiştir.[34-37] Gonadotropin salınımının pulse frekans ve amplitüdü ovaryan steroidlerin de etkisindedir. Postmenopozal kadınlarda olduğu gibi bu gonadal feedback ortadan kalktığında yüksek amplitüd ve frekanslı pulsatil salınım ile gonadotropin seviyeleri artar.[38, 39] Reprodüktif çağıdaki normal kadınlarda foliküler fazda yüksek frekanslı düşük amplitüdlü, luteal fazda ise düşük frekanslı, yüksek amplitüdlü pulsalar görülür.[38,40-43] LH pulse amplitüdünü etkileyen en önemli faktör ovarian östradioldür, progesteron ise LH pulse frekansını azaltıcı etki göstermektedir.[44,45] Menstrüel siklusun hipotalamik kontrolünde temel olay GnRH'nin arkuat nükleustaki nöronal sistem ile portal sirkülasyona ritmik salınımıdır. GnRH/LH pulsatil aktivitesi santral ve periferik nöroendokrin sinyallerden etkilenmektedir. Norepinefrinin hipotalamik GnRH nöronları üzerinde uyarıcı etkisinin olduğu ileri sürülmektedir fakat bu nörotransmitterin insanlarda gonadotropin sekresyonunun kontrolündeki rolü tam olarak

ortaya konmamıştır. Dopaminin de GnRH sekresyonunun kontrolündeki rolü araştırılmış fakat etkisi net olarak belirlenememiştir. Deneysel çalışmalarda hem uyarıcı hem de inhibe edici etkisi görülmüştür. Endojen opioidler de hipotalamik GnRH salınımına inhibitör etki göstermektedir. [33] FSH ve LH'nin tonik sekresyonu ovarian negatif feedback etki altındadır. Graaf folikülü ve korpus luteum ovarian elementlerdir ve menstrüel siklus zamanlamasında önemlidir. Menstrüel siklusun en dramatik olayı ovulasyonu sağlayan midsiklus gonadotropin salınımıdır. Over siklusunun ilk yarısı pulsatil gonadotropin salınımı ile yönetilir ve gelişmekte olan graaf folikülünce üretilen östradiol eşik düzeyi geçtiğinde preovulatuvar gonadotropin salınımı meydana gelir. Siklusun ikinci yarısında korpus luteum formasyonu ile dominant olan progesteron östradiol ile sinerjistik etki göstererek yüksek frekanslı LH pulselerini düşük frekanslıyüksek amplitüdlü LH pulselerına çevirir. Aynı sinerjistik etki ile FSH salınımı inhibe olur ve böylelikle foliküler gelişim engellenir. Luteal fazın sonunda(menstruasyonun başlangıcından yaklaşık 2 gün önce) ovarian steroidler (graaf folikülüve korpus luteum tarafından salınan) sinerjistik etki gösterir.

İmplantasyon

Embriyolar uterin kaviteye fertilizasyondan yaklaşık 2-3 gün sonra, morula evresinde girmektedir. İmplantasyon birkaç gün sonra, fertilizasyondan sonraki 6-7. günlerde olmaktadır. Hayvan çalışmaları normal implantasyon ve gelişim için embryo ve endometrium gelişiminin senkron olması gerektiğini göstermiştir. [46]

Histolojik alışmalar ovulasyondan sonraki 12. günde embriyonun tamamiyle endometrium ile kaplandığını göstermektedir. Noyes ve arkadaşlarının histolojik kriterlerine göre implantasyon alanındaki endometrium gebe olmayan mid-sekretuar endometrium ile aynıdır. [47] Trofoblastların agresif, migratuar ve invazif özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynayan endometrial faktörler olduğu gösterilmiştir. TGF- β , makrofaj koloni stimule edici faktör(M-CSF), Lösemi inhibe edici faktör(LIF) bu endometrial faktörlerdendir ve bunlarla ilgili çalışmalar sürmektedir.

3. MENSTRÜEL SIKLUS SIRASINDA ENDOMETRİUMDAKİ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Ovulatuvar menstrüel siklus sırasındaki endometrial değişiklikler Noyes tarafından insanlarda, Bartalamez ve Markee tarafından da insandan daha ilkel primatlarda çalışılmıştır. Bu bilgilerden hareketle menstrual fizyolojinin tanımlanması endometriumdaki bezler, damarsal ve stromal yapıdaki spesifik anatomik ve fonksiyonel değişikliklere dayanılarak yapılmıştır.

Proliferatif Faz

Proliferatif faz ovaryan folikül gelişimi ve östrojen salınımının artışı ile birliktedir. Steroidal etki sonucu endometrium gelişmesi ve rekonstruksiyonu gerçekleşir. İlk olarak endometrial bezler ince ve tübülerdir ve alçak kolumnar(prizmatik) epitel hücrelerle döşelidir. Mitoz belirgin hale gelir ve psodostratifikasyon izlenir. Sonuç olarak, bez epiteli periferik ilerler ve bir bez segmentini hemen yanındaki beze bağlar. Stromal komponent selüler menstrual durumdan kısa bir ödem periyodu geçirerek, gevşek, sinsityal benzeri bir duruma geçer. Spiral damarlar stroma içinden seyrederek ve dallanma göstermeden hemen epitel bağlayıcı membranın altına kadar ilerler. Burada gevşek kapiller bir ağ oluştururlar. Tüm doku bileşenleri (bezler, stroma hücreleri ve endotel hücreleri) proliferasyon gösterir ve bu durum siklusun 8-10. günlerinde tepe noktasına erişir ve endometriumdaki maksimum östrojen reseptör konsantrasyonuna ulaşılır.[48] İntranükleer östrojen ve progesteron reseptör konsantrasyonları ovulasyondan hemen önce siklus ortasında tepe noktasına ulaşır.

Sekretuar Faz

Ovulasyondan hemen sonra endometrium hem östrojene hem de progesterona karşı reaksiyon gösterir. Devamlı östrojen etkisi olmasına rağmen endometrium preovulatar dönemdeki yüksekliğinde sabit kalır (5-6 mm.) Ovulasyondan 3 gün sonra epitel proliferasyonu durur.[49] Bu kontrolün ve inhibisyonun progesteron ile sağlandığına inanılmaktadır. Bu büyümedeki sınırlanma mitoz ve DNA sentezindeki düşmeye belirgin şekilde progesteronun östrojen reseptör ekspresyonuna etkisi ve östradiolu östrojen sülfat'a (hızla hücreden atılır) dönüştüren 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz ve sülfotransferazın progesteron tarafından uyarılmasına bağlıdır.[50,51] Ek olarak östrojen, östrojen aracılı hücre çoğalmasını düzenleyen pek çok onkogeni uyarır. Progesteron da östrojenin yaptığı onkogen mRNA transkripsiyonunu bloke ederek bu etkiyi antagonize eder. [52]

Stromal elemanların herbiri büyümeye devam ederken yüksekliğin sabit kalması bezlerde ve spiral damarlarda kıvrılmaya neden olur. Ovulasyon olduğunda ilk histolojik bulgu, siklusun 17-18. gününde, subnüklear intrastoplazmik glikojen vakuollerinin bez epitelde görülmesidir. Dev mitokondriler ve 'nükleolar kanal sistemi' bez hücrelerinde görülür. 'Nükleolar kanal sistemi' progesterona özgün bir oluşumdur. Yapısal değişiklikleri takiben glikoprotein ve peptidlerin endometrial kaviteye aktif sekresyonu başlar. Plazmanın transudasyonu da sekresyona katkıda bulunur. Sekresyonda tepe noktaya siklus ortası gonadotropin zirvesinden 7 gün sonra ulaşılır, bu da blastokistin implantasyonu ile aynı zamana denk düşmektedir.

Endometriumda ovulasyon sonrası 7-13. günler arasında (siklusun 21-27. günleri arası) önemli değişiklikler olur. Bu periyodun başlangıcında, genişlemiş kıvrımlı sekretuar bezler aradaki çok az stroma ile en belirgin haldedir. İmplantasyon zamanında, siklusun 21.-22. günlerinde, en belirgin morfolojik özellik stromanın ödemidir. Bu değişiklik endometrium tarafından östrojen ve progesteron aracılığı ile oluşturulmuş olan prostaglandin üretimine sekonder olabilir. Kapiller geçişteki artış bu prostoglandinlerin yerel artışının bir sonucudur. Endotelial hücrelerde mitoz ilk defa siklusun 22. gününde gözlenir. Spiral damarların kıvrımlaşmasına neden olan vasküler proliferasyon seks steroidleri, prostoglandinler, östrojen ve progesterona cevap olarak oluşan otokrin veya parakrin faktörlere bir cevaptır.

Predesidual transformasyon ile siklusun 25. gününde fonksiyonel tabakanın üst kısmında kompakt tabaka oluşur. Fertilizasyon ve implantasyon olmadığında trofoblastlardan insan koryonik gonadotropin desteğinin bulunmaması sonucu, korpus luteumun yaşam süresi tamamlanır ve östrojen ve progesteron seviyeleri azalır.

Östrojen ve progesteron çekilmesi vasomotor reaksiyonlar, apoptoz, doku kaybı ve sonrasında menstruasyon oluşmasına neden olur.

4. NÜKLEER FAKTÖR- KAPPA B

Nükleer faktor-kappa B(NF- κ B) hücrel olaylarda etkili yaklaşık olarak 150'den fazla genin ekspresyonunda görevli olan, yapısal olarak birbiri ile ilişkili bir dimerik transkripsiyon faktörleri ailesidir.[53] NF- κ B ailesinin bilinen mevcut beş üyesi;p50 (NF- κ B1),p52 (NF- κ B2),p65 (relA), c-Rel ve RelB olmak üzere çeşitli homo ve heterodimerler oluşturarak işlev görürler.[54]p50 ve p52 daha büyük prekürsör proteinler olan p100 ve p105'ten kaynaklanırlar. Beş proteinin herbirinin Rel homoloji domaini bulunmaktadır ve bu bölüm onların dimerizasyon, DNA-bağlanma ve başlıca düzenleyici domaini olarak görev yapar.[55] Birçok hücre tipinde inaktif NF- κ B kompleksleri stoplazma içerisinde I κ B'ler olarak bilinen inhibitor proteinlerle non kovalen bağlarla bağlı olarak bulunurlar. Sitokinler (TNF- α ,IL-1,IL-11,IL-17) ve lipopolisakkarit,bakteriyel,viral proteinler, ultraviyole,iyonizan radyasyon, proteinkinaz C aktivatörleri (forbol esterleri, platelet aktive edici faktör), oksidanlar (özellikle hidrojen peroksit) gibi diğer stimuluslara yanıt olarak latent stoplazmik NF- κ B/ I κ B α kompleksi I κ B'nin N-terminal kısmındaki serin rezidüleri üzerinden fosforilasyonla aktive olur. [55] Fosforilasyon I κ B α 'yı SCF-ubiquitin ligaz kompleks ile ubiquitinasyonun hedefi haline getirir ve 26S proteozom ile inhibitor alt ünitesinin degradasyonuna neden olur. Fosforilasyon NF- κ B'nin nükleusa translokasyonu ve gen transkripsiyonunun başlatılması ile ilişkilidir. I κ B'lerin fosforilasyonu I κ B kinaz kompleksi (IKK) olarak adlandırılan multimerik bir kompleks aracılığı ile gerçekleştirilir. IKK

kompleksi iki katalitik alt ünitelerden oluşur; IKK- α ve IKK- γ . NF kappa B IKK- γ 'nın esansiyel modülatörüdür.

İmmün, inflammatuar cevap, hücre adhezyonu, hücre proliferasyonu, anti-apoptotik cevapta görev alan birçok geni de içeren çok sayıda hedef genlerin ekspresyonu NF- κ B tarafından regüle edilir. NF- κ B ile regüle edilen genler IL-1 β , TNF- α , granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), IL-2, IL-11, IL-17 gibi proinflammatuar sitokinler, IL-8, RANTES, MIP-1 α , MCP-2 gibi kemokinler, indüklenabilir nitrik oksit sentaz, indüklenabilir siklooksijenaz gibi enzimler, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin gibi adhezyon molekülleri ve IL-2 reseptörü gibi reseptörler olarak sıralanabilir. NF- κ B tek başına hareket etmesinin yanında AP-1, ATF ve C/EBP (NF- κ B-bZip interaksyonu) gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile de birlikte işlev görebilir.

NF- κ B komponentlerinin hedeflenerek işlevsiz bırakılması ile yapılan çalışmalar bu transkripsiyon faktörünün önemini gözler önüne serer. Rel-A delesyonu farelerde yaşamla bağdaşmaz, p50 geninden yoksun bırakılanlarda enfeksiyonlara aşırı duyarlılık meydana gelir.[56] IKK α hasarlanması uzamış NF- κ B aktivasyonu ve inflammatuar stimulus ile sonuçlanmış ve yaygın inflamasyon sonucu ölüme neden olmuştur.[57]

Menstruasyonda interlökin-8 (IL-8), monosit kemotaksik protein-1 (MCP-1), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve prostoglandinler gibi inflammatuar medyatörlerin artmış ekspresyonu söz konusudur.[58-62] Ayrıca menstruasyon öncesinde geç sekretuar fazda reaktif oksijen radikalleri düzeyinde artış meydana gelir. Reaktif oksijen radikalleri siklooksijenaz (COX) üzerinden prostoglandin F2 α (PGF2 α) üretimini

stimüle ederler. İnterlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve lökosit inhibitör faktör (LIF) da implantasyonda önemli rolleri olduğu düşünülen moleküllerdir.[58,63,64] Bu sözü edilen moleküllerin kodlandığı genlerin çoğu NF Kappa B için hedef genlerdir. İn vitro çalışmalarda TNF- α ve IL-1 α stimülasyonunun endometrial epitelyal hücrelerde IL-6 ve LIF üretimini indüklediği gösterilmiştir.[65,66] Ancak NF- κ B inhibitörü olan SN50 veya proteozom inhibitörü MG-132 kullanıldığında TNF- ve IL-1 aracılı IL-6 ve LIF artışının suprese olduğu görülmüştür.

Glukokortikoid, progesteron ve östrojen reseptörleri NF- κ B aktivitesini baskırlarlar.[67-70] İmmünolojik ve inflamatuvar yanıtta santral rolü göz önüne alındığında, NF- κ B aktivitesinin inhibisyonu steroid hormonların anti-inflamatuvar ve immünsupresif aktivitelerini açıklayıcı olabilir.

NF- κ B çoğu tümör dokusu hücre dizilerinde aktif olarak saptanmış olsa da normal dokulardaki hücrelerde de bulunabilir. İnsan endometriumu da bunlardan biridir.

Normal insan endometrimundaki NF- κ B aktivitesi bir çok araştırmacının ilgisini çekmiştir. İlk olarak Laird ve arkadaşları endometrial biyopsi materyallerinde ve endometrial epitelyal hücre kültürlerinde yaptıkları immünohistokimyasal analizlerin sonuçlarını yayınlamışlardır. Erken,geç proliferatif ve erken,mid ve geç sekretuar fazlardan alınan 14 endometrial doku örneğinde NF- κ B p65 alt ünitesinin boyanma intensitesini proliferatif faz boyunca düşük, sekretuar faz boyunca artmış olarak buldular. Boyanma implantasyon sırasında maksimum olarak elde edildi. Fazları sadece proliferatif ve

sekretuar faz olarak indirgediklerinde p65 ve p50 alt nitelerinin endometrial epitelyal hücrelerde sekretuar faz sırasında arttığı, inhibitör protein I B'nin ise aynı şekilde azaldığı görüldü. Stromal hücrelerde bu türden kayda değer bir değişiklik g zlemlemediler.[71] NF- B'nin sekretuar fazda artı ı ve proliferatif fazda azalı ına karşılık progesteron reseptör B (PRB) ekspresyonu tersine sekretuar fazda düşük ve proliferatif fazda yüksek olarak gerçekleşir.[69] Ovaryan steroidlerin çekilmesi PGF2  üretimini NF Kappa B üzerinden stimüle eder.

5. MATERYAL VE METOD

Dokuların Toplanması

Endometrium patolojileri dışındaki benign jinekolojik nedenlerle Yale Üniversitesi New Haven Hastanesi'nde laparoskopik veya laparotomik olarak opere edilen hastalardan küretaj yolu ile elde edilen endometrial dokulardan yapılan paraffin seri kesitler kullanıldı. Son üç ay içerisinde steroid hormon içeren herhangi bir medikasyon almamış olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların hiç birinde patolojik inceleme sonucu endometrial patoloji bulunmadığı iki farklı patolog tarafından konfirme edildi. Menstruasyon fazları hastadan alınan menstrual siklus öyküsüne göre belirlendi ve endometrial histolojik inceleme sonuçları ile Noyes ve arkadaşları'nın yayınladıkları kriterler doğrultusunda konfirme edildi.[47]Endometrial dokular menstrual siklus fazlarına göre proliferatif dönem için erken, mid ve geç proliferatif, sekretuar dönem için de erken, mid ve geçsekretuar fazlar olarak altı fazda incelenek üzere gruplandırıldı.

Hastaların herbirinden bilgilendirilme sonrası yazılı onam formları ile onay alındı, araştırma protokolleri Yale Üniversitesi İnsan Araştırmaları Komitesi (Yale Human Investigation Committee) tarafından onaylandı.

İmmünohistokimya

Parafin kesitler defarafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirildi ve antijen geri dönüşümü için 10 milimolar (mM) pH'sı 6.0 olan tamponize sitrik asit solüsyonunda 15 dakika süre içinde 5'er dakika aralıklarla kaynatıldı. Kesitler daha sonra metanol içerisinde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonuna konularak 15 dakika süreyle bekletildi ve endojen peroksidaz aktivitesinin baskılanması sağlandı. Tris-Buffered saline(TBS) ile yıkanma işlemi sonrasında kesitler 30 dakika süre ile TBS içerisinde hazırlanan %5 keçi serumu [5% goat serum (Vector, Burlingame, CA)] ile bloklanma işlemine tabi tutuldular. Bloklama sonrası kesitler total NF-KappaB için 1:50 konsantrasyonda tavşan monoklonal anti-NF-κB p65 antikoru (Cell Signaling Technology Inc.,Beverly,MA), fosforile Nf Kappa B için 1:50 konsantrasyonda tavşan monoklonal anti-fosfo-Nf Kappa B p65(Ser536) antikoru (Cell Signaling Technology Inc.,Beverly,MA) ile bir gece süre ile (12-18 saat) +4 santigrad derecede(°C) inkübe edildiler. Kesitler üzerinde total ve fosforile NF-κB için birer adet negatif kontrol kesiti ayrıldı ve negatif kontroller non-spesifik olarak hazırlanmış tavşan immünglobülini ile aynı konsantrasyon ve aynı süre ile inkübe edildi. Inkübasyon bitiminde kesitler TBS içinde 15 dakika süre ile yıkandı. Yıkanma sonrası, 1:400 konsantrasyonda hazırlanan, keçide üretilmiş biotinli anti-tavşan sekonder antikoru ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Antijen-antikor kompleksinin saptanması için streptavidin-biotin-peroksidaz kiti (Vector Laboratories) kullanıldı. 3,3-diamonibenzidin tetrahidroklorid dihidrat (Vector) pozitif boyanmayı saptamak

amaçlıkromojen olarak kullanıldı ve kesitlere kontrast boyanma için 15 saniye süreyle hematoksilen uygulandı.

Boyama intensitesi semikantitatif olarak şu kategorilerde değerlendirildi; 0, boyanma yok; 1+, zayıf boyanma; 2+, orta derecede boyanma; 3+, yoğun boyanma. Her doku için $HSKOR = \sum P_i (i + 1)$ formülü kullanılarak histolojik skarlama değeri elde edildi. Formülde i intensite skorunu, P_i ise söz konusu intensite skoruna sahip hücre grubunun yüzdesini temsil etmekteydi. Sonuçlar sayısal değeri olarak 0-300 aralığında bir değeri olarak tespit edildi. Doku tipi ve kaynağı açısından kör iki farklı araştırmacı tarafından her kesit için rasgele seçilen beş alan ışık mikroskobu altında X100 büyütme ile değerlendirildikten sonra farklı zamanlarda histolojik skarlama bu şekilde yapıldı. Histolojik skarlama değerlendirmesi için kişisel ve kişiler arası varyasyon katsayısı sırasıyla %11 ve %12 idi. İki araştırmacının değerlendirme sonuçlarının aritmetik ortalaması kullanıldı.

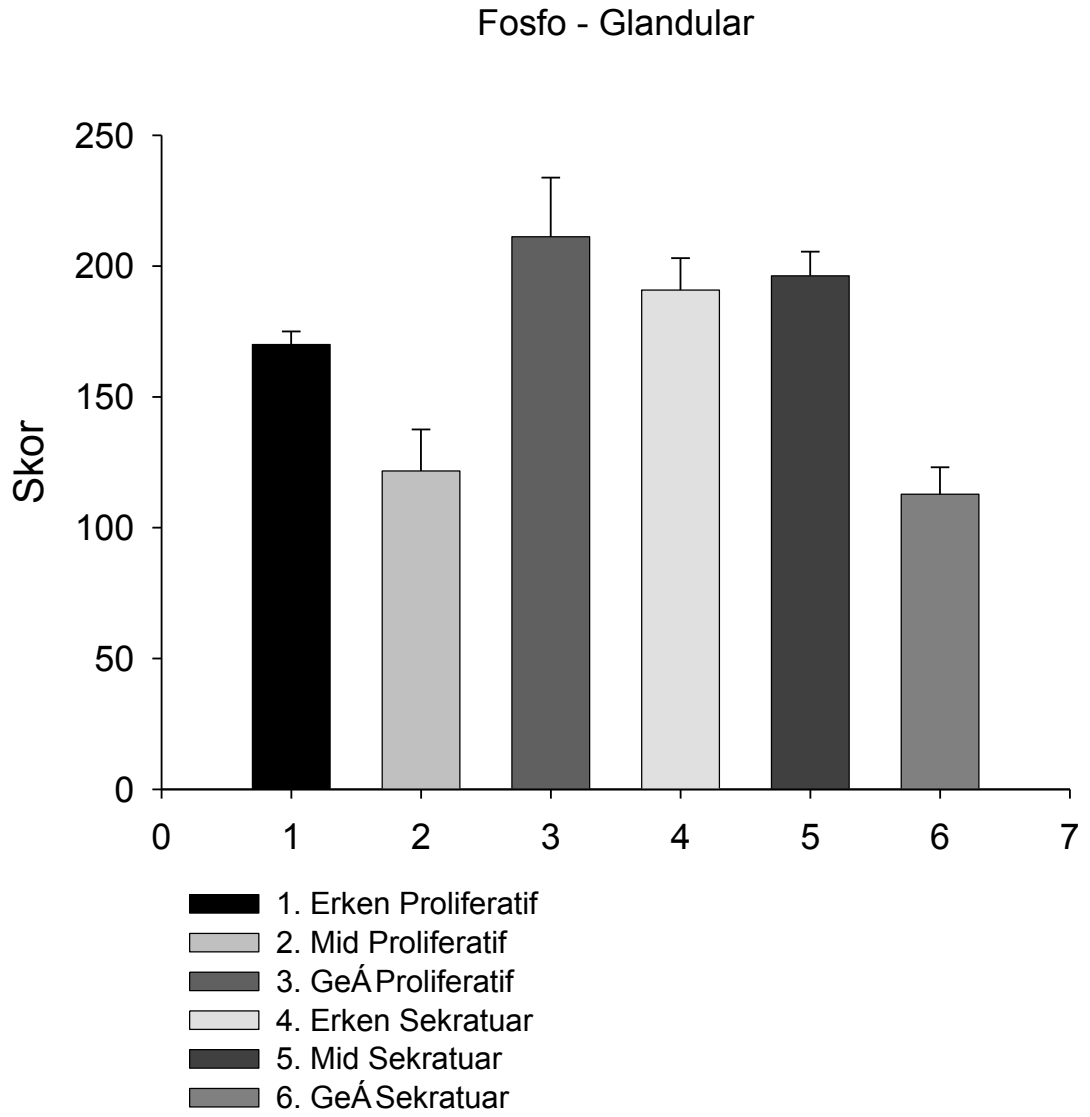
6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm in vivo datamız endometrial stromal hücrelerde total NF- κ B boyanma kesitleri dışında normal dağılım göstermekteydi ve *post hoc* Holm-Sidak testi ile birlikte One-Way ANOVA kullanılarak analiz edildi. Total NF- κ B'nin stromal hücrelerde değerlendirilmesi 'Kruskal-Wallis One Way Analysis of variance on Ranks' kullanılarak yapıldı. İstatistiksel hesaplamalar Windows için hazırlanmış Sigmatatversion 3.00 (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak tanımlandı.

7. SONUÇLAR

Menstrüel siklus toplam altı fazda incelenerek her faz için en az üç adet, en fazla ise 9 adet parafin kesit kullanıldı(Erken proliferatif endometrium n=3, mid proliferatif endometrium n=3, geç proliferatif endometrium n=4, erken sekretuar endometrium n=6, mid sekretuar endometrium n=8, geç sekretuar endometrium n=9).

Fosforile NF Kappa B için elde edilen boyanma intensitesi daha çok nükleer, total Nf Kappa B için elde edilen boyanma hem stoplazmik hem de nükleer olarak izlendi. Fosfo NF-Kappa B'nin immünohistokimyasal çalışma sonrası histolojik skorlaması sonucu endometrial glandular hücrelerde en yüksek boyanma intensitesinin geç proliferatif dönemde, en düşük boyanma intensitesinin ise geçsekretuar dönemde olduğu görüldü(Figür 2).



Figür2. Fosforile NF- κ B'nin endometrial glandular hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı

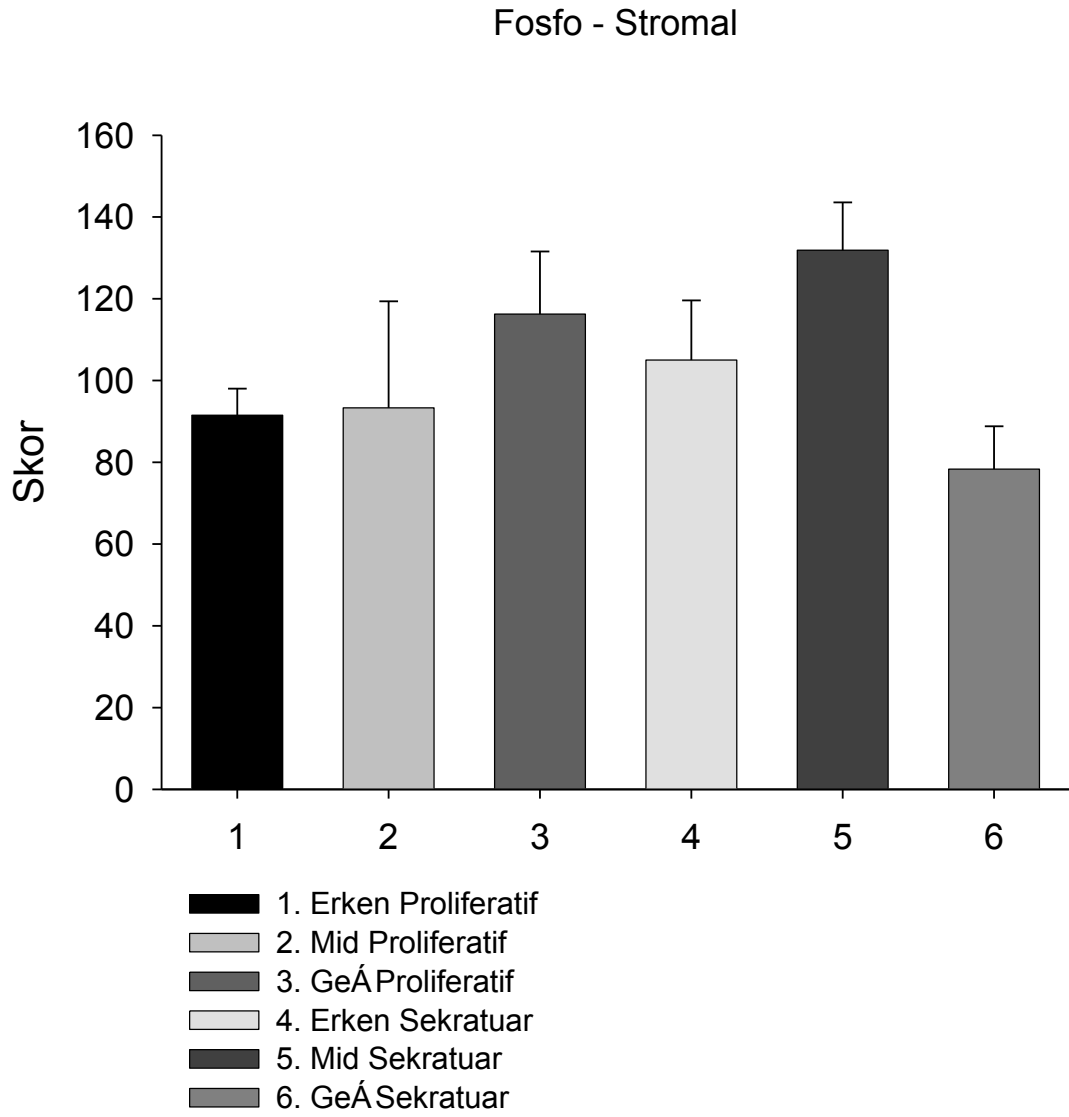
Tablo1. Fosforile NF-κB menstrüel siklus fazlarına dağılımı

Siklus Fazları	N	Ortalama skor	Std Dev	SEM
EP	3	174.000	1.732	7.636
MP	3	121.667	27.538	15.899
GP	4	211.250	45.162	22.581
ES	6	190.833	29.903	12.208
MS	8	196.250	26.152	9.246
GS	9	112.778	30.935	10.312

EP:erken proliferatif,MP:mid proliferatif, GP:geç proliferatif, ES:erken sekretuar,MS:mid sekretuar, GS:geç sekretuar

Std Dev: Standard sapma, SEM: Ortalama farklarının standard hatası

Stromal hücrelerde ise en yüksek boyanma intensitesinin mid sekretuar dönemde, en düşük boyanma intensitesinin ise geç sekretuar dönemde gerçekleştiği gözlemlendi (Figür 3).



Figür3. Fosforile NF-κB'nin endometrial stromal hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı

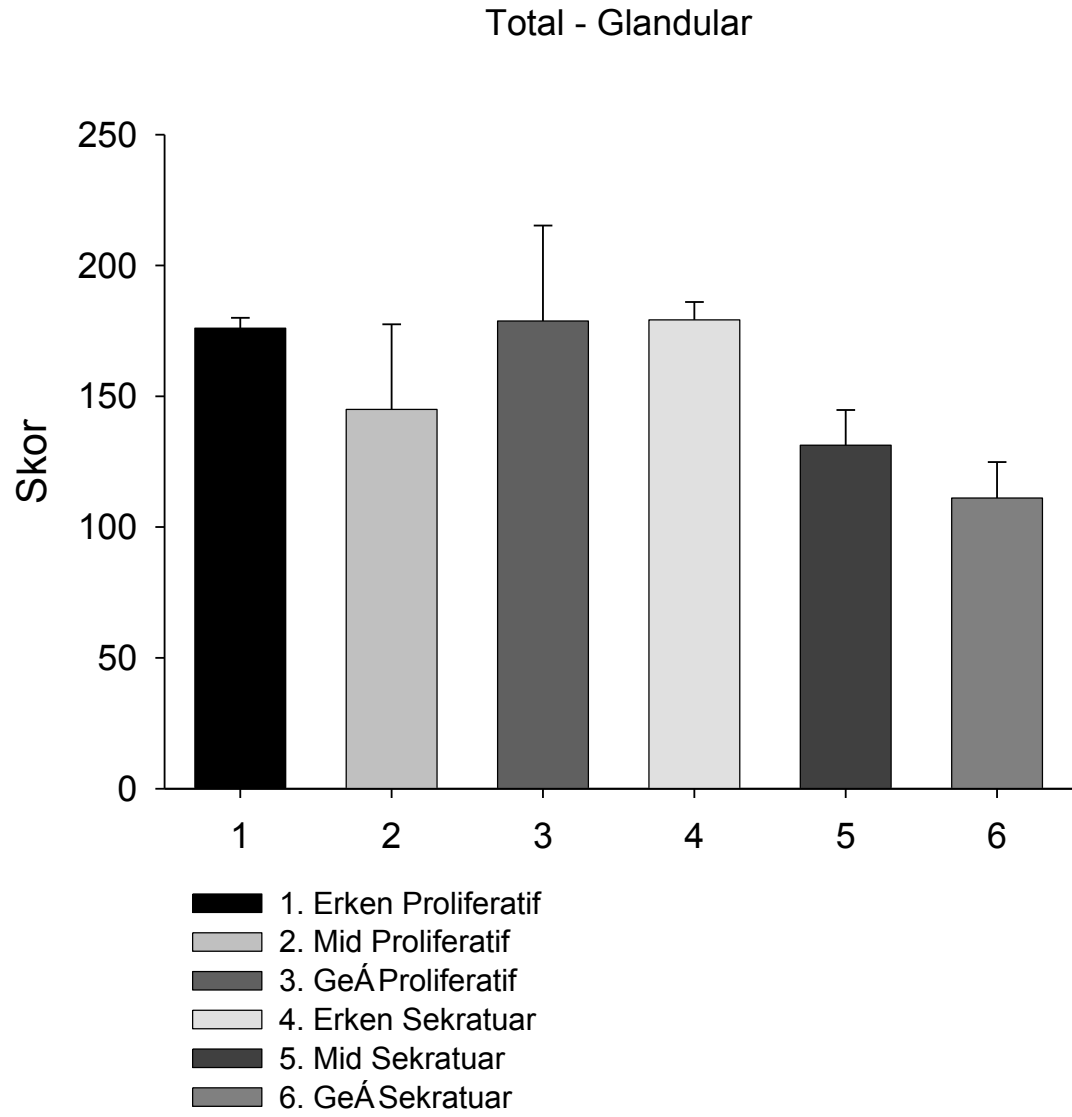
Tablo2. Fosforile NF- κ B'nin stromal hücrelerde fazlara göre dağılımı

Siklus Fazları	N	Ortalama skor	Std Dev	SEM
EP	3	84.000	1.734	9.667
MP	3	93.333	45.092	26.034
GP	4	116.250	30.653	15.326
ES	6	105.000	35.777	14.606
MS	8	131.875	33.160	11.724
GS	9	78.333	31.425	10.475

EP:erken proliferatif,MP:mid proliferatif, GP:geç proliferatif, ES:erken sekretuar,MS:mid sekretuar, GS:geç sekretuar

Std Dev: Standard sapma, SEM: Ortalama farklarının standard hatası

Total NFKappa B için elde edilen boyanma intensitesi glandular hücrelerde geç proliferatif ve erken sekretuar dönemde en yoğun, geç sekretuar dönemde ise en az yoğun olarak izlendi(Figür4).



Figür4. Total NF- κ B'nin endometrial glandular hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı

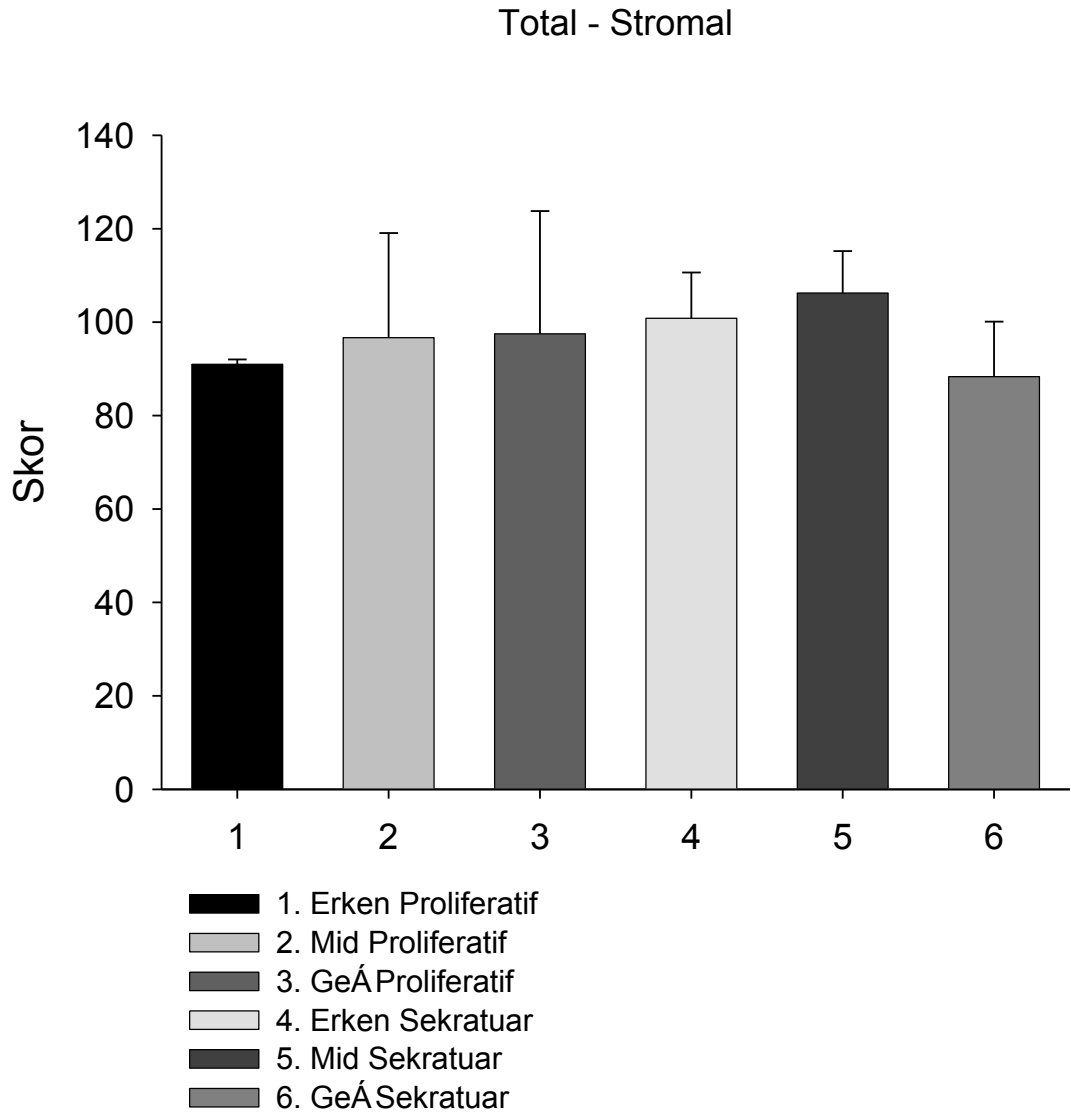
Tablo3. Total NF- κ B glandular hücrelerde fazlara göre dağılımı

Siklus Fazları	N	Ortalama skor	Std Dev	SEM
EP	3	177.976	4.566	9.632
MP	3	145.000	56.347	32.532
GP	4	178.750	72.958	36.479
ES	6	179.167	16.857	6.882
MS	8	131.250	38.243	113.521
GS	9	111.111	41.138	13.713

EP:erken proliferatif,MP:mid proliferatif, GP:geç proliferatif, ES:erken sekretuar,MS:mid sekretuar, GS:geç sekretuar

Std Dev: Standard sapma, SEM: Ortalama farklarının standard hatası

Stromal hücrelerde ise total NF kappa B için en yoğun boyanma mid sekretuar fazda, en düşük yoğunlukta boyanma ise geç sekretuar fazda elde edildi (Figür 5).



Figür5. Total NF- κ B'nin endometrial stromal hücrelerde siklus fazlarına göre dağılımı

FOSFO-NF-κB (P-NF-κB)

Endometrial glandular hücrelerde fosforile-NFκB içinyapılan immünohistokimyasal çalışmalar sonucunda elde edilen boyanma intensitesinin menstrüel siklus fazlarına göre değerlendirilen histolojik skorlanması ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi endometrial glandular hücrelerde geç proliferatif dönemde artan boyanma intensitesinin mid proliferatif dönem ve geç sekretuar dönemdeki intensiteler ile olan farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya çıkardı (Sırasıyla $p=0.008$ ve $p<0.001$). Aynı zamanda mid sekretuar dönemde erken ve geç sekretuar dönemlere göre yüksek bulunan boyanma yoğunluğu özellikle geç sekretuar dönemle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p<0.001$). Erken sekretuar fazda mid sekretuar faza göre düşük ancak geç sekretuar faza göre yüksek bulunan histolojik skor değeri mid sekretuar fazla istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemekle birlikte geç sekretuar fazdaki değere göre anlamlı olarak farklıydı (Sırasıyla $p=0.752$, $p<0.001$). Mid sekretuar faz ile mid proliferatif fazdaki boyanma yoğunluğu farkı karşılaştırıldığında da mid sekretuar fazda daha yüksek bulunan yoğunluğun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p=0.009$). Erken sekretuar fazdaki fosforile NF-κB boyanma intensitesi mid proliferatif fazdaki histolojik skora değeri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.012$) (Tablo 1).

Stromal hücrelerde fosforile NF-κB için elde edilen boyanma intensitesinin histolojik skorlaması sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi sonucu mid sekretuar fazda en yüksek olarak bulunan

boyanma yoğunluğunun geç sekretuar faz ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü($p=0.035$). Proliferatif fazlar arasında en yoğun boyanma geç proliferatif fazda elde edilmekle beraber erken proliferatif ve mid proliferatif fazlarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Sırasıyla $p=0.843$, $p=0.656$). Aynı şekilde mid sekretuar dönemde erken sekretuar döneme göre artmış olan boyanma yoğunluğunu gösteren histolojik skorum değeri de istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemekteydi ($p=0.325$)(Tablo 2).

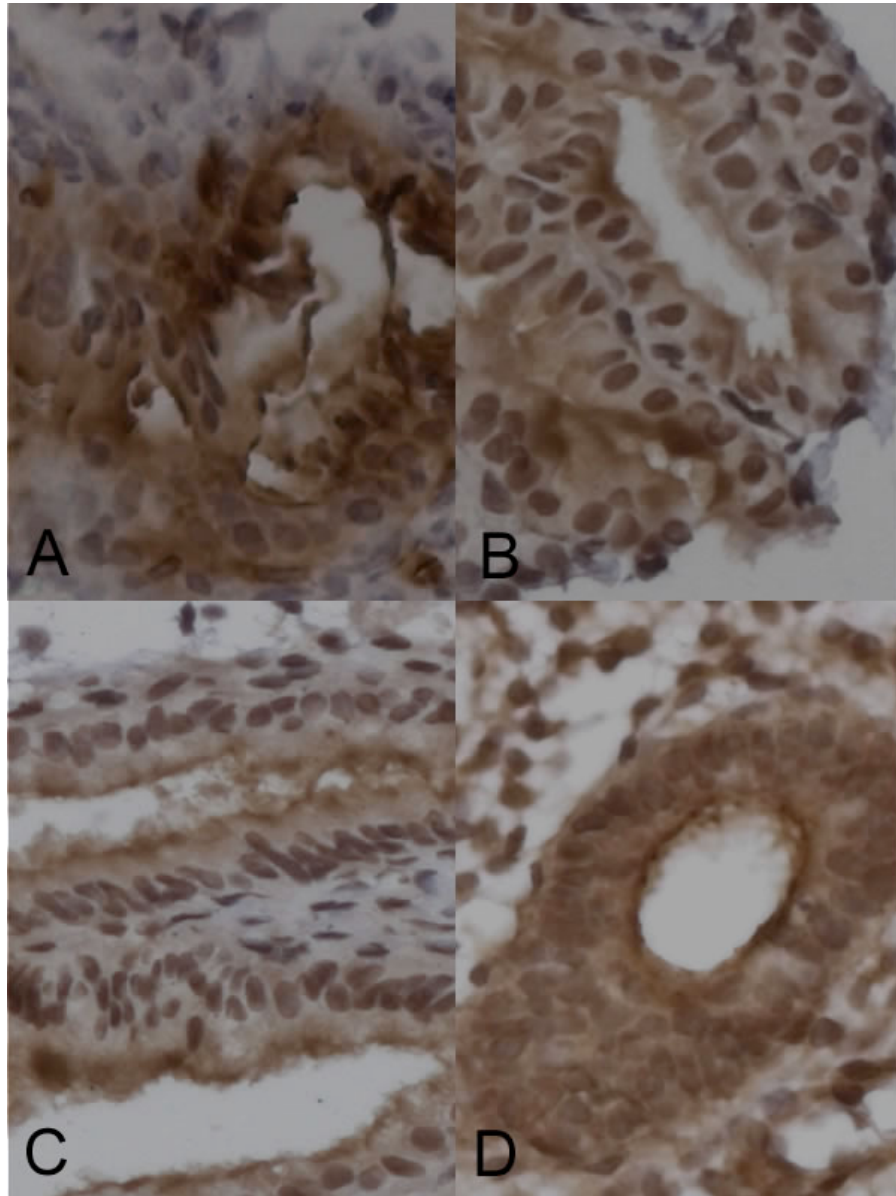
TOTAL NF- κ B (T-NF- κ B)

Endometrial glandular hücrelerde Total NF- κ B için yapılan immünohistokimyasal çalışmalar sonucunda elde edilen boyanma yoğunluğunu gösteren histolojik skorum değeri karşılaştırıldığında erken proliferatif, geç proliferatif ve erken sekretuar dönemlerde diğer fazlara yüksek ve birbirlerine çok yakın ortalama değerler elde edilmekle birlikte erken sekretuar dönemde diğerlerine göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu fazlardaki ortalama değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmedi(Sırasıyla $p=0.978$, $p=0.986$, $p=0.988$).

Proliferatif fazlar arasında mid proliferatif fazda histolojik skorum değeri ortalaması erken proliferatif ve geç proliferatif fazlara göre daha düşük bulunmasına rağmen erken ve geç proliferatif fazlarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Sırasıyla $p=0.898$, $p=0.321$) (Tablo 3).

Sekretuar fazlar incelendiğinde erken sekretuar faz ortalama değeri aralarında en yüksek olarak bulunurken mid sekretuar fazda da ortalama histolojik skor değerinin geç sekretuar faza göre daha yüksek olduğu görüldü. Bu ortalama değerlerden erken sekretuar fazdaki histolojik skor değerinin geç sekretuar faza ait değerden farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p=0.047$). Mid sekretuar faz ve geç sekretuar fazdaki ortalama değerler birbirlerinden istatistiksel anlamlıolarak farklı bulunmadı($p=0.351$)(Tablo 3).

Endometrial stromal hücrelerde Total NF- κ B için elde edilen boyanma intensitelerini gösteren histolojik değerlendirme skorları en yüksek olarak mid sekretuar fazda bulunurken fazlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmedi. Proliferatif fazlar arasında en yüksek ortalama değer geç proliferatif fazda elde edilirken bu fazın erken ve mid proliferatif fazlarla karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı($p=0.740$). Sekretuar fazlarda da mid sekretuar faz en yüksek olmakla birlikte, erken sekretuar fazda da boyanmanın geç sekretuar faza göre daha yoğun olduğu görüldü. Ancak sekretuar dönemde de fazlar arasında istatistiksel olarak anlamlıfarklılık bulunmadı($p=0.740$).



Figür6. Endometrial dokuda NF-Kappa B

A: Mid sekretuar endometrium fosfo-NF- κ B

B: Erken Sekretuar edometrium fosfo-NF- κ B

C: Erken sekretuar endometrium total-NF- κ B

D: Erken proliferatif endometrium total-NF-Kb

8. TARTIŞMA

Nükleer faktör Kappa B'nin endometriumda ve endometrial proseslerdeki rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. NF- κ B'nin çok sayıda biyolojik moleküler mekanizmada rol alıyor olması ve bu mekanizmalar içerisinde birbirinden çok sayıda molekül ile hem etkileşiyor hem de bu moleküllerin bizzat genetik kodlanması sırasında DNA bağlanma bölgelerindeki majör promotor alanlara etki ediyor olması bu molekülün majör fizyolojik kaskatlardaki nihai etkisinin anlaşılmasını oldukça karmaşık bir hale getirmektedir. Nükleer Faktör Kappa B'nin immün ve inflamatuvar proseslerde oynadığı önemli rol göz önüne alındığında araştırmacılar daha çok bu molekülün patolojik bir takım olaylardaki etkinliği üzerinde yoğunlaşmışlardır.

Biz bu çalışmamızda NF- κ B molekülünün p65 komponentinin fosforile ve non-fosforile durumdaki ekspresyonunu normal insan endometriumu dokusunda inceledik. İnceledigimiz proteinin insan endometrial epitelyal hücrelerindeki ekspresyonunun menstruel sıklusa bağımlı değişiklik gösterdiğini ortaya çıkardık. Page ve arkadaşları NF- κ B'nin p50 komponentini kullanarak yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar ortaya koydular.[71] p50 ilk önce daha büyük bir molekül olan p105 şeklinde sentezlenir ve daha sonra p105'ten p50'ye konversiyonunun ne şekilde gerçekleştiği tam olarak açıklığa kavuşturulmuş değildir. P105'in ayrıca zaman zaman inhibitör bir protein olarak da işlev gördüğü bilinmektedir. [10,72]

Bu çalışma aynı zamanda total ve fosforile NF- κ B komponentlerinin endometrial epitelyal hücrelerde stromal hücrelere

göre daha yoğun bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. IL-6 ve LIF gibi sitokinler ve ayrıca $\gamma\beta 3, \alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 4\beta 1$ gibi integrinlerinde gebelik gerçekleşmeyen siklusta endometrial hücrelerde stromal hücrelere göre daha fazla eksprese edildiğinin ortaya çıkarılmış olması da NF- κ B'nin bu faktörlerin üretimini kontrol etmedeki rolünü destekleyici olabilir.[64,73,74] Daha önce yapılmış olan çalışmalarda NF- κ B molekülünün p65 ve p50 komponentleri ile immünohistokimyasal analiz sonuçları yayınlanmıştı.[10] Biz bu çalışmamızda fosforile-NF- κ B antikorları kullanılarak fosforilasyon ile aktivasyon ve hücre nükleusuna translokasyon olan NF- κ B oranları incelendi.

Daha önceki çalışmalarda da bildirilmiş olduğu ve bizim çalışmamızda da konfirme edildiği üzere NF- κ B'nin siklusun mid sekretuar fazında artış gösteriyor olması endometriumun implantasyona hazırlanması açısından anlamlı olabilir. Bir grup sitokinin belirli reseptörler aracılığı ile implantasyonda önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu sitokinler başlıca IL-6, LIF, onkostatin M, IL-11 gibi molekülleri içerirler. Homozigot LIF knockout farelerin implantasyon başarısızlığı nedeniyle infertil olması[75], LIF reseptör ablasyonunun implantasyon başarısızlığı ile sonlanması bunun önemli göstergeleridir.[76] NF- κ B'nin bu faktörlerin ekspresyonunda doğrudan önemli olduğu daha önce ortaya çıkarılmıştı. [10] Endometrial stromal dokudaki lökositlerden de kaynaklandığı gösterilen LIF'in maternal desidual dokunun blastokisti kabulünde de önemli olduğu düşünülmektedir.[63,77] NF- κ B'nin endometriumda bizim çalışmamıza özgü olarak çalışılan fosforile ve aktif formunun implantasyona hazırlanan endometriumda hem glandular epitelyal dokuda hem de

endometrial stromal dokuda artıyor olduğunun gösterilmesi bu açıdan özellikle önem ta ımadır.

İnsan endometriumunun menstrüel siklus boyunca geçirdiği değişimlerde hormonal kontrolün de önemi büyüktür. Steroid hormonlar da endometrial fizyoloji üzerindeki etkilerini karmaşık moleküler mekanizmalar üzerinden göstermektedirler. Progesteron ve glukokortikoidlerin NF- B ile antagonistik etkileşimlerinin olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmişti. Özellikle geç sekretuar dönemde meydana gelen progesteron çekilmesi sonucunda menstruasyonun meydana gelmesi sürecinde azalan progesteron seviyesinin prostoglandin sentezini artırdığı ve bunu COX enzimi üzerinden muhtemelen NF- B'nin de bu enzimi stimule etmesi sayesinde menstruasyonun başladığı bildirilmişti.[69] Ancak progesteron ve NF- B'nin karşılıklı antagonistik etkilerinin nasıl gerçekleştiği henüz araştırma konusudur. İnsan menstruel fizyolojisinde steroid hormonların hakim rolü olması yanında steroid hormon reseptörleri ile NF- B'nin farklı yöndeki etkileşimlerini ortaya koyan yine az sayıda deneysel araştırma çalışması mevcuttur.Endometrial hücre kültür serilerinde progesteron reseptör ekspresyonunun sınırlı miktarda gösterilmiş olması çalışmaların başlıca kısıtlılığıdır. Bu nedenle progesteron reseptör çalışmaları bu reseptörün belirgin olarak eksprese edildiği meme kanseri hücrelerinden köken almaktadır.[78]Glukokortikoidler ve progesteron endometrial sitokin sentezi üzerindeki bir kısım etkilerini NF- B üzerinden gösterirler.[79]Progesteronun NF- B aktivitesi üzerindeki kontrol mekanizmalarından biri transkripsiyon faktör genleri üzerindeki bağlanma noktalarında progesteron reseptörü ve NF- B'nin

kompetisyonu olabilir. [69,80] Ya da steroid reseptörleri ve NF- κ B arasındaki kompetisyon üçüncü bir kofaktör için gerçekleşiyor olabilir. Diğer bir mekanizma da NF- κ B'nin inhibitör proteini olan I κ B üzerinden progesteron aracılı bir inhibisyon olabilir. Ancak bu mekanizmaların her biri için ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak in vivo ve in vitro çalışmalarda progesteronun temelde NF- κ B'nin kontrolünde olduğu bilinen sitokinleri baskıladığı gösterilmiştir.[62,81-83] Tüm bunların ışığında progesteron seviyesinin yüksek olduğu mid sekretuar fazda fosforile-NF- κ B'nin artmış olarak bulunması, devamında da progesteron çekilmesinin başladığı geç sekretuar fazda azalmaya başlaması kompetisyonla açıklanabilir olmakla birlikte daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğunu gösterir. Çünkü çalışmamızda aynı zamanda progesteron seviyesinin siklus boyunca en düşük düzeyde olduğu dönem olan geç proliferatif fazda hem fosforile hem de total NF- κ B'nin en yüksek düzeyde eksprese edildiğini gösterdik. Bu bulgumuz söz konusu antagonistik etkileşimi doğrular niteliktedir.

Fizyolojik olaylar oldukça karmaşık moleküler mekanizmalardan oluşmaktadır. Ortaya çıkarılan bulguların her biri önemli ipuçları vererek belirli aşamaları aydınlatmaktadır. Ancak tüm neden-sonuç ilişkilerini ortaya çıkarabilmek için daha kapsamlı multi moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

9. ÖZET

GİRİŞ ve AMAÇLAR

İnsan endometriumu her menstrual siklusta ve aynı zamanda erken dönem gebelikte temelinde endokrin-immün interaksiyonların olduğu, doku onarımı ve rejenerasyonu, inflamasyon, anjiyogenez, blastokist implantasyonunu içeren özel moleküler yolların kontrolü altında siklik dönüşümler geçirir.

Nükleer faktör-kappa B (NFκB) inflamasyon, immünite, hücresel adezyon, hücre çoğalması, apoptozis ve anjogenezis gibi olaylarda kilit rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Proinflamatuvar genleri regüle etmek yanında menstruasyon ve implantasyon gibi inflamasyon proseslerinin rol oynaması muhtemel olan reproduktif mekanizmalarla ilişkili olabilir.

YÖNTEM ve GEREÇLER

Sağlıklı, herhangi bir endometrial patoloji öyküsü olmayan kadınlardan elde edilmiş olan endometrial örnekler (n=31) üzerinde fosforile NFκB(p- NFκB ve total NFκB için immunohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak menstrüel siklusun değişik fazlarında bu moleküllerin hücresel ekspresyonu endometrial glanduler epitel ve stromal hücrelerde araştırıldı. Boyanma intensiteleri HSCORE yöntemi kullanılarak semikantitatif olarak analiz edildi. İstatistiksel analizler One-Way ANOVA kullanılarak yapıldı.

SONUÇLAR

İmmünolojik boyanma glanduler ve stromal hücrelerde fosfo-NFκB için daha çok nükleer olarak gerçekleşirken, total NFκB için boyanma yoğunluğu hem nükleer hem de stoplazmik olarak gerçekleşti.

Glanduler hücrelerde NFκB fosforilasyonu geç proliferatif fazda en yüksek, geç sekretuar fazda ise en düşük düzeyde saptandı ($p<0.05$). Geç proliferatif fazdaki boyanma yoğunluğu geç proliferatif fazda orta (mid) proliferatif faza göre ($p<0.05$), ve orta (mid) sekretuar fazda geç sekretuar faza göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0.05$). Endometrial stromal hücrelerde ise p-NFκB boyanma yoğunluğu orta (mid) sekretuar fazda geç sekretuar faza göre anlamlı olarak fazla saptandı ($p=0.035$).

TARTIŞMA

Menstrüal siklus boyunca östrojen ve progesteron erken proliferatif ve geç sekretuar fazlarda en düşük seviyelerinde izlenirler. Östrojen düzeyi en yüksek seviyesine geç proliferatif fazda ulaşır ve orta (mid) sekretuar fazda her iki steroid hormonun düzeyleri de yüksek seviyededir. Sonuçta NF-κB'nin endometrial epiteldeki ekspresyonunun steroid hormon düzeyleri ile bağlantılı olarak değiştiğini ortaya çıkardık. Ayrıca NF-κB'nin siklusun mid sekretuar fazında artışı endometriumun implantasyona hazırlanması açısından anlamlı olabilir. İmplantasyonda önemli sitokinlerin ekspresyonunda NF-κB'nin rolü olduğu daha önceden ortaya çıkarılmıştı. Çalışmamıza özgü olarak çalışılan fosforile ve aktif formunun implantasyona hazırlanan endometriumda hem glandular hem de stromal dokuda artıyor olduğunun gösterilmesi bu açıdan özellikle önemlidir.

10. KAYNAKLAR

1. Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 385-398.
2. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 213-221.
3. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 123.
4. Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A. Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 50-63.
5. Finn CA. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1986; 61: 313-328.
6. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455.
7. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
8. Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S. Endometriosis: a disease of oxidative stress? *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 263-273.
9. Schutze S, Wiegmann K, Machleidt T, Kronke M. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology* 1995; 193: 193-203.
10. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Li TC. Expression of nuclear factor kappa B in human endometrium; role in the control of

- interleukin 6 and leukaemia inhibitory factor production. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 34-40.
11. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997; 12: 569-574.
 12. Kelly RW. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr Rev* 1994; 15: 684-706.
 13. Tabibzadeh S, Lessey B, Satyaswaroop PG. Temporal and site-specific expression of transforming growth factor-beta4 in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 595-602.
 14. Rasweiler JJt. Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*. *Am J Anat* 1991; 191: 1-22.
 15. Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993; 14: 459-479.
 16. van der Burg B, van der Saag PT. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 433-438.
 17. Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* 1993; 14: 651-658.
 18. Kunkel SL, Chensue SW, Phan SH. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J Immunol* 1986; 136: 186-192.

19. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, Magrini O, Gammi L, Paradisi R, Flamigni C. Longitudinal evaluation of the different gonadotropin pulsatile patterns in anovulatory cycles of young girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 836-841.
20. Scherzer WJ, Ruutiainen-Altman KS, Putowski LT, Kol S, Adashi EY, Rohan RM. Detection and in vivo hormonal regulation of rat ovarian type I and type II interleukin-I receptor mRNAs: increased expression during the periovulatory period. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3: 131-139.
21. Goodman AL, Hodgen GD. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 1983; 39: 1-73.
22. Judd HL, Yen SS. Serum androstenedione and testosterone levels during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36: 475-481.
23. Hillier SG, Reichert LE, Jr., Van Hall EV. Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 847-856.
24. McLachlan RI, Cohen NL, Dahl KD, Bremner WJ, Soules MR. Serum inhibin levels during the periovulatory interval in normal women: relationships with sex steroid and gonadotrophin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 32: 39-48.
25. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1401-1405.

26. Hoff JD, Quigley ME, Yen SS. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 792-796.
27. Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG, Yen SS. Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 1033-1039.
28. McLachlan RI, Cohen NL, Vale WW, Rivier JE, Burger HG, Bremner WJ, Soules MR. The importance of luteinizing hormone in the control of inhibin and progesterone secretion by the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 1078-1085.
29. Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL, Yen SS. Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 1109-1114.
30. Filicori M, Butler JP, Crowley WF, Jr. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 1984; 73: 1638-1647.
31. Welt CK, Martin KA, Taylor AE, Lambert-Messerlian GM, Crowley WF, Jr., Smith JA, Schoenfeld DA, Hall JE. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2645-2652.
32. Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF, Jr. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 600-607.

33. Yen SS, Quigley ME, Reid RL, Ropert JF, Cetel NS. Neuroendocrinology of opioid peptides and their role in the control of gonadotropin and prolactin secretion. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152: 485-493.
34. Romano GJ, Krust A, Pfaff DW. Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1295-1300.
35. Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 1990; 51: 276-283.
36. Sar M. Estradiol is concentrated in tyrosine hydroxylase-containing neurons of the hypothalamus. *Science* 1984; 223: 938-940.
37. Hoffman GE, Lee WS, Attardi B, Yann V, Fitzsimmons MD. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express c-fos antigen after steroid activation. *Endocrinology* 1990; 126: 1736-1741.
38. Yen SS, Tsai CC, Naftolin F, Vandenberg G, Ajabor L. Pulsatile patterns of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34: 671-675.
39. Santen RJ, Bardin CW. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest* 1973; 52: 2617-2628.

40. Backstrom CT, McNeilly AS, Leask RM, Baird DT. Pulsatile secretion of LH, FSH, prolactin, oestradiol and progesterone during the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982; 17: 29-42.
41. Reame N, Sauder SE, Kelch RP, Marshall JC. Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 328-337.
42. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF, Jr. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 1136-1144.
43. Yen SS, Vandenberg G, Siler TM. Modulation of pituitary responsiveness to LRF by estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39: 170-177.
44. Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ. Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 378-383.
45. Ferin M, Van Vugt D, Wardlaw S. The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides. *Recent Prog Horm Res* 1984; 40: 441-485.
46. Wasmoen TL, Coulam CB, Benirschke K, Gleich GJ. Association of immunoreactive eosinophil major basic protein with placental septa and cysts. *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Aug;165(2):416-20.
47. Noyes RW, Hertig, A.T. and Rock, J. Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25

48. Bergeron C, Ferenczy A, Shyamala G. Distribution of estrogen receptors in various cell types of normal, hyperplastic, and neoplastic human endometrial tissues. *Lab Invest* 1988; 58: 338-345.
49. Tabibzadeh S. Proliferative activity of lymphoid cells in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 437-443.
50. Gurpide E, Gusberg SB, Tseng L. Estradiol binding and metabolism in human endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Steroid Biochem* 1976; 7: 891-896.
51. Falany JL, Falany CN. Regulation of estrogen sulfotransferase in human endometrial adenocarcinoma cells by progesterone. *Endocrinology* 1996; 137: 1395-1401.
52. Kirkland JL, Murthy L, Stancel GM. Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology* 1992; 130: 3223-3230.
53. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683.
54. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
55. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 867-870.
56. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995; 80: 321-330.

57. Klement JF, Rice NR, Car BD, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt PH, Chen CH, Rosen CA, Stewart CL. IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2341-2349.
58. Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994; 134: 521-528.
59. Tabibzadeh S, Zupi E, Babaknia A, Liu R, Marconi D, Romanini C. Site and menstrual cycle-dependent expression of proteins of the tumour necrosis factor (TNF) receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase-specific production of TNF alpha in human endometrium. *Hum Reprod* 1995; 10: 277-286.
60. Baird DT, Cameron ST, Critchley HO, Drudy TA, Howe A, Jones RL, Lea RG, Kelly RW. Prostaglandins and menstruation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 70: 15-17.
61. Jones RL, Kelly RW, Critchley HO. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 1997; 12: 1300-1306.
62. Critchley HO, Jones RL, Lea RG, Drudy TA, Kelly RW, Williams AR, Baird DT. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 240-248.
63. Stewart CL. The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734: 157-165.

64. Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod* 1995; 10: 2793-2799.
65. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1908-1915.
66. Laird SM, Tuckerman E, Li TC, Bolton AE. Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. *Hum Reprod* 1994; 9: 1339-1343.
67. Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4971-4979.
68. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994; 269: 13289-13295.
69. Kalkhoven E, Wissink S, van der Saag PT, van der Burg B. Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 6217-6224.
70. Ray A, Prefontaine KE, Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 12940-12946.

71. Page M, Tuckerman EM, Li TC, Laird SM. Expression of nuclear factor kappa B components in human endometrium. *J Reprod Immunol* 2002; 54: 1-13.
72. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; 19: 80-88.
73. Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1992; 7: 876-882.
74. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994; 62: 497-506.
75. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-79.
76. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 1995; 121: 1283-1299.
77. Sawai K, Matsuzaki N, Kameda T, Hashimoto K, Okada T, Shimoya K, Nobunaga T, Taga T, Kishimoto T, Saji F. Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1449-1456.

78. Horwitz KB, Mockus MB, Lessey BA. Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance. *Cell* 1982; 28: 633-642.
79. Bourke E, Moynagh PN. Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF-kappa B. *J Immunol* 1999; 163: 2113-2119.
80. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 401-412.
81. Kelly R. Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of neutrophil in menstruation and parturition. *Human Reproduction* 1994; 9: 253-258.
82. Critchley HO, Kelly RW, Lea RG, Drudy TA, Jones RL, Baird DT. Sex steroid regulation of leukocyte traffic in human decidua. *Hum Reprod* 1996; 11: 2257-2262.
83. Ito A, Imada K, Sato T, Kubo T, Matsushima K, Mori Y. Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix. *Biochem J* 1994; 301 (Pt 1): 183-186.