



DOI:10.33188/vetheder.774408

Araştırma Makalesi / Research Article

İmplantasyon ve desidualizasyon esnasında fare uterus dokusunda PROK1 ve PROKR1'in ekspresyonu

Duygu Mutluay^{1, a*}, Özlem Özbey^{2, b}, Leyla Kılınç^{2, c}, Jale Öner^{1, d}, Hakan Öner^{1, e}, İsmail Üstünel^{2, f}

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

² Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

ORCID: 0000-0003-3286-130X^a; 0000-0002-7239-8762^b; 0000-0002-0946-2565^c; 0000-0002-1197-2468^d; 0000-0003-3310-8803^e; 0000-0002-3865-6457^f

MAKALE BİLGİSİ /

ARTICLE
INFORMATION:

Geliş / Received:

28 Temmuz 2020

28 July 2020

Kabul / Accepted:

12 Aralık 2020

12 December 2020

Anahtar Sözcükler:

Desidualizasyon,
İmplantasyon,
Preimplantasyon
Prokinetisin 1
Prokinetisin reseptör 1

Keywords:

Desidualization
Implantation
Preimplantation
Prokineticin
Prokineticin receptor 1

ÖZET:

İmplantasyon, embriyonun özel hücreleri olan trofoektoderm ve trophoblast vasıtasıyla uterus dokusuyla bağlantı kurulması ile son bulan bir süreçtir. Başarılı bir implantasyon, plasentasyon ve sonrasında gebeliğin gerçekleşebilmesi için damardan zengin bir endometriyum, koordine olmuş bir damar gelişimi ve plasental villöz damarların genişlemesine gereksinim vardır. Bu bilgiler anjiyogenezin gebeliğin erken dönemleri için önemli fizyolojik bir süreç olduğunu göstermiştir. Prokinetisin ailesinin bir üyesi olan vasküler endotelial büyüme faktörü (EG-VEGF) diğer bir adıyla prokinetisin 1 (PROK1) plasentayı da içine alan spesifik endokrin dokular için anjiyogenik bir faktör olarak rapor edilmiştir. Biyolojik aktivitesini iki G protein bağlı reseptör, prokinetisin reseptör 1 (PROKR1) ve prokinetisin reseptör 2 (PROKR2) aracılığı ile gerçekleştirir. Trofoblast invazyonunu kontrol eden PROK1 ve PROKR1 plasentada eksprese edilmektedir. Ayrıca, PROK1 plasental anjiyogenezi kontrol eder ve yüksek oranda birinci trimester boyunca eksprese edilmektedir. Çalışmamızda kullanılan dişi fareler, östrus siklusu tayini yapıldıktan sonra, 1 gece erkek fareler ile birlikte bırakılarak gebe kalmaları sağlandı. Vajinal plak (tıkaç) görülen dişiler gebe olarak değerlendirildi. Gebeliğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. günlerinde alınan uterus doku örneklerinde Western Blot yöntemi kullanılarak PROK1, PROKR1 proteinlerinin ekspresyon analizi yapıldı ve günler arasında bir farklılığın olup olmadığını belirlemek için varyans analizi yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda PROK1 ve PROKR1 proteinlerinin gebeliğin ilk 8 günü boyunca eksprese edildiği görüldü. Bu bulgular bize PROK1 ve PROKR1 proteinlerinin erken embriyo gelişimi ve implantasyon sırasında eksprese edildiğini ve bu proteinlerin embriyo gelişiminde önemli roller oynuyor olabileceğini önermiştir.

Expression of PROK-1 and PROKR-1 in mouse uterine tissue during implantation and decidualization

ABSTRACT:

Implantation is a process culminating whereby specialized cells of the embryo, the trophoblast and trophoblast, establish contact with a specialized tissue of the mother, the uterus. During this process trophoblast invades the maternal endometrium and makes contact with the maternal blood supply, which is critical for establishment of pregnancy. Successful implantation, placentation and subsequent gestation require coordinated vascular development to provide a richly vascularized endometrium for implantation and the development and expansion of the placental villous vasculature to facilitate transport of nutrients and oxygen to the embryo. This knowledge supports that angiogenesis is an essential physiological component of implantation, and placental and embryonic development in early stages of pregnancy. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), also named prokineticin 1 (PROK1), is the member of the prokineticin family which is an angiogenic factor reported to be specific for endocrine tissues, including the placenta. Its biological activity is mediated via two G protein coupled receptors, prokineticin receptor 1 (PROKR1) and prokineticin receptor 2 (PROKR2). PROK1 and PROKR1 are expressed in placenta and control trophoblast invasion. Additionally, PROKR1 controls placental angiogenesis and is highly expressed throughout the first trimester. Mice were mated overnight after determining of estrus. Pregnant mice were determined by vaginal plug control. Expressions of PROK-1 and PROKR1 proteins were determined by Western Blot analysis in uterine tissue samples taken at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 days of gestation and the results were compared statistically by using the variance analysis to determine whether there was a significant difference between days. In our study, we showed that PROK1 and PROKR1 proteins were expressed during the first 8 days of gestation. These findings suggested that PROK1 and PROKR1 proteins were expressed during early embryo development and implantation and these proteins may play important roles in embryo development.

How to cite this article: Mutluay D, Özbey Ö, Kılınç L, Öner J, Öner H, Üstünel İ: İmplantasyon ve desidualizasyon esnasında fare uterus dokusunda PROK1 ve PROKR1'in ekspresyonu. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 92(1): 49-59, 2021 DOI: 10.33188/vetheder.774408

* Sorumlu Yazar e-posta adresi / Corresponding Author e-mail address: duygumutluay@gmail.com

1. Giriş

Memeli gelişimi fertilizasyonu adı verilen sperm ve oositin birleşmesi ile başlar. Fertilizasyonu çeşitli hücre ve yarıklanma bölünmeleri takip eder. Preimplantasyon olarak isimlendirdiğimiz bu dönem farelerde embriyonik gün 3.5 (E 3.5)'de iç hücre kütle (ICM) ve trofoektoderm (TE) olarak adlandırılan iki farklı hücre kökeninden oluşan blastosist adı verilen yapının oluşumu ile devam eder. Bu dönem blastositin yaklaşık E 4.5 döneminde zona pellusida'dan kurtularak endometriyuma tutunması ve implantasyonun başlaması ile son bulur (40). E 7.5 güne kadar implantasyon alanı kurulur, ICM ve polar TE hücreleri çoğalmaya devam ederler ve ektoplasental kon'u (EPC) oluşturur. E 6.5'nci günde EPC'nin dış hücreleri invaziv ikincil trophoblast dev hücreleri içine farkanmaya başlar. Plasantasyon ise uterus stromasının 7.5-10.5 günler arasında bu hücreler tarafından işgal edilmesine bağlıdır (1). Bu sırada doku farklılaşması gerçekleşerek uterus stroması desidual dokuya dönüşür. Desidualizasyon esnasında, foliküler fazda bulunan endometriumun fibronektin, tip I, III, V ve VI kollojen içeren intersitisyel tip ekstraselüler matriksi, laminin, heparan sülfat, perlekan ve tip IV kollojen içeren desidua dokusuna dönüşür. Desidualizasyon esnasında uterus ekstraselüler matriksi (ECM) yıkımı meydana gelir (3, 20). Bu nedenle ECM'in implantasyon sırasında önemli bir rolü bulunmaktadır (12, 35). Gebeliğin erken dönemlerinde meydana gelen önemli olaylardan bir tanesi de trofoblast invazyonudur. Ekstravillöz trofoblast hücreleri (EVT), desidualize olmuş uterus endometriyumuna doğru istilaya geçerler ve miyometriyuma kadar ulaşırlar. Bu sırada EVT, uterus spiral arterlerinin lumenine göç eder. Erken gebelik esnasında uterus spiral arterleri de yeniden yapılırlar, muskulo-elastik duvarları kaybolur ve yerini, içinde EVT hücrelerinin gömüldüğü, amorf, fibrinoid bir materyal alır (27, 46, 53). Plasentanın sağlıklı bir şekilde gelişebilmesinin trofoblast hücrelerinin kontrollü büyümesine, invazyonuna, farklılaşmasına ve yeterli bir vasküler gelişime bağlı olduğu belirtilmiştir (4). Oldukça vaskülarize bir organ olan plasenta, gebeliğin sonunda verimli materno-fetal değişim için esas olan ve plasental villöz dallanmanın hazırlanmasında anahtar bir rol oynayan kapiller ağın kurulması için gereklidir (6). Organ spesifik anjiogenik faktörlerin varlığı yıllardır bilinmektedir (45, 49), ancak son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli anjiogenik süreçleri uyardığı belirlenen ve plasental gelişimde anahtar endokrin faktör olarak rol oynadığı düşünülen prokinetisinler üzerine yoğunlaşmıştır.

Prokinetisinler, Prokineticin 1 (PROK1); endokrin bez-vasküler endotelial büyüme faktörü (EG-VEGF) ve Prokineticin 2 (PROK2); memeli Bombina variegata 8 (Bv8) olarak bilinen iki salgı proteininden oluşurlar (26, 31, 34, 36). Ancak prokinetisin ailesinin üyeleri farklı ekspresyon örnekleri gösterir. Bv8/PROK2, sinir sistemi ile ilişkili iken, EG-VEGF/PROK1 üreme sistemi ve endokrin organlar ile ilişkilidir (7, 8). Bu aile iki G protein bağlı reseptörlerin, sırasıyla PROKR1 ve PROKR2, aktivasyonu yolu ile biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirir (26). Reseptör aktivasyonunun çeşitli sistemlerde hedef hücrelerin çoğalmasını, anti-apoptozisi, farklılaşma ve göç/hareketini düzenlediği gösterilmiştir (26, 37, 43).

Prokinetisinler orijinal olarak sindirim sisteminde bağırsak motilitesini düzenleyen potent ajanlar olarak tanımlanmıştır, ancak daha sonra steroidojenik bezlerde, kalpte ve üreme organlarda anjiogenezisi teşvik ettiği gösterilmiştir (43). Prokinetisinler nörojenesis, sirkadyan ritim, nosisepsiyon (ağrı hissi), endotel hücre çoğalması, hematopoez (15, 33, 36), inflamasyon ve aynı zamanda immün cevapları düzenler (36, 39). Bunların çeşitli biyolojik fonksiyonları ve fonksiyonel karmaşıklığı reseptör ve ligandlarının farklı ekspresyon modelleri ve birden fazla G-protein bağlamaları ile düzenlenir (43).

Plasentada PROK1'in ekspresyonu Ferrara ve ark (18) tarafından rapor edilmiştir. Sonraki çalışmalar insanda gebelik döneminde desidual ve plasental dokularda ve gebeliğin erken dönemlerinde peptid ekspresyonu üzerine yoğunlaşmıştır (11, 37). PROK1 ve onun G proteinine bağlı reseptörü PROKR1'in yüksek oranda insan plasentasında eksprese edildiği, sinsityotrofoblastlarda (ST), sitotrofoblastlarda (CT), fetal endoteliumda ve Hofbauer hücrelerinde (Ho) immunolokale olduğu bildirilmiştir (13, 16, 37). İndirekt olarak da PROK-1'in, VEGF ekspresyonunu uyararak anjiogenezisi indüklediği bilinmektedir (37). Ayrıca gebeliğin erken dönemlerinde desiduada PROK-1 ve reseptörü PROKR1 seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (16). Plasenta da, endokrin bir unsur olan ST tarafından PROK1'in güçlü bir ekspresyonu, trofoblast farklılaşması için yeni bir plasental büyüme faktörü olarak önerilmesine sebep olmuştur (37).

Yapılan çalışmalarda prokinetisinlerin spesifik anjiogenik bir mitojen olduğu ovaryum (31) ve testiste (32) anjiogenezi teşvik ettiği ve adrenal bezden köken alan endotelial hücrelerin çoğalmasını, göçünü ve fenestrasyonunu indüklediği bildirilmiştir (31). Prokinetisinler, ovaryumda (18, 19), tuba uterinada (48), plasentada (14, 22) ve uterus (5, 16, 17, 42) tanımlanmış rollerinden dolayı dişi üreme fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir.

Gebeliğin erken döneminde, insanlarda plasental PROK1 ekspresyonu ilk trimester boyunca güçlüdür (22). Gebeliğin 7-8. haftalarında (7-8 h), PROK1 ekspresyonu ST, plasental villinin endokrin birimi ve Ho ile sınırlıdır. İleri gebelik haftalarında (9 ile 12 h), PROK1 ekspresyonu ST ve Ho'de daha güçlü, CT de hafiftir (22). PROK1 ekspresyonu ekstrasvillöz trofoblastlarda bulunmaz. Plasental EG-VEGF ekspresyonu gebeliğin 8-11. haftalarında en yoğundur ve sonra insanlarda gebeliğin ilk trimesterin sonuna doğru tedricen azalır. Bölgesel PROK1'in güçlü ekspresyonu gebeliğin farklı trimesterlerinde gebe kadınlardan alınan serumda da bulunur. Gebe olmayan kadınlarda, plazma PROK-1 düzeyleri 40 pg/ml civarındadır ve ilk trimesterde beş kat artar (yaklaşık 200 pg/ml); bu düzeyler gebeliğin sonuna doğru gebe olmayan kadınlarda gözlemlenen değerlere ulaşarak tedricen azalır (24). Gebelik esnasında yüksek PROK-1 düzeyleri, plasentanın PROK-1'in asıl kaynağı olduğunu göstermektedir; bu daha sonra plasental eksplant kültür ortamlarında PROK-1'in ölçülmesi ile ispatlanmıştır (6, 23). Bununla birlikte, özellikle erken gebelik esnasında dolaşımdaki PROK-1'in tek kaynağının plasenta olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte PROK-1'in aynı zamanda östrus siklusunun sekresyon (luteal) fazı esnasında korpus luteumun (CL) granuloza kökenli hücreleri tarafından aşırı derecede eksprese edildiği gösterilmiştir (19). Bu durum CL'un şekillenmesinde bir rolü olan PROK-1'in gonadotropin ile uyarılmış bir gen olarak tanımlanmasına sebep olmuştur (28, 29, 30).

Geçtiğimiz son on yılda yapılan çalışmalar PROK1 ve reseptörleri olan PROKR1 ve PROKR2 nin implantasyon sonrası özellikle plasentadaki rolleri ve moleküler mekanizmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan literatür taramalarında, plasental gelişimde önemli ve esansiyel roller üstlenen bu faktörün preimplantasyon sürecinde uterus dokusunda etki mekanizması, ekspresyonu ve rolleri üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmanın amacı fare uterus dokusunda preimplantasyon, implantasyon sırasında ve sonrasında, PROK-1 ve PROKR-1'nin ekspresyonu belirlenerek bu dönemlerdeki rolleri hakkında literatüre yeni bilgiler kazandırmaktır.

2. Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali:

Bu çalışmada, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarından temin edilen her grupta 6 adet olmak üzere toplam 48 adet (yaklaşık 20-24 gr ağırlığında, 8-10 haftalık) yetişkin dişi Swiss albino cinsi fareler kullanılmıştır. Çalışma boyunca farelere ayrı kabinlerde standart yem ve su verilerek, ortamlarının sıcaklık ve nem oranları sabit olacak şekilde, 12 saat karanlık/aydınlık ortamlarda tutuldu. Vajinal smear ile östrus siklusunda oldukları tespit edilen dişi fareler, 1 gece erkek fareler ile (2 dişi/1 erkek) birlikte bırakıldı. Ertesi sabah, vajinal plug (tıkaç) tespit edilen dişi fareler gebeliğin 1. gününde olarak kabul edildi. Gebeliği takip eden günler için; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. günlerinde, bulunan farelere xylazine (7.5 mg/kg)/ketamin (80 mg/kg) kombinasyonu ile sağlanan genel anestezi altında, servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanarak anterior abdominal duvar açılıp uterus dokuları alındı (41). Western blot analizleri için alınan uterus dokuları tüplere konularak -80 °C'lik dolaplara kaldırıldı. Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2016- 173).

Western blot methodu:

Gebeliğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. günlerinde, elde edilen doku örnekleri 0.2 gr dokuya 600 µl lysis buffer ve 10µl proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde inkübe edilerek sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Tüm örnekler, 15000 g'de +4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları alındı ve dokuların içerdiği protein miktarlarını ölçmek için BCA kiti kullanıldı. Elektroforezden önce örnekler 100 °C'deki 5 dakika kaynatıldı ve jel elektroforezi için (PROK1 için %18'lik, PROKR1 için %10'luk) poliakrilamid jel hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µl (10'luk tarak için) ve

10 µl (15'lik tarak için) örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde konularak Mini Protean Sistem III tankının içine yerleştirildi. Mini Protean Sistem III tankına elektroforez solüsyonu eklenerek güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika elektroforez edildi.

Proteinler jelde yürürken, PVDF membran üstte ve altta 3'er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. PVDF membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alındı. Mini protean III tankına transfer solüsyonu eklendi ve +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra Tris tampon solüsyonu (Tris buffered-saline, TBS) ile hazırlanan % 5'lik yağsız kuru süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde blokladı. Bloklama solüsyonuna ayrıca % 0.1 Tween-20 ilave edildi. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde sulandırılmış olan primer antikor [PROK 1 (1:250; ab72807; abcam) ve PROKR1 (1:200; NBP2-15201; Novus) kullanılarak +4°C 'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile sulandırılmış horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla [(PROK 1 için; 1/1500; PI-2000; Vector Laboratories ve PROKR1 için; 1/2000; PI-1000 Vector Laboratories)] oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı. Film geliştirici ve tespitten geçirilerek, distile su ile yıkanıp kurutuldu. Böylece, belirlenen günlerde Prokineticin 1 (PROK 1) ve PROKR1 protein ekspresyon miktarları belirlendi ve semikantitatif olarak protein seviyeleri karşılaştırıldı (25). Western blot bantlarının değerlendirilmesi ImageJ analiz sistemi ile gerçekleştirildi. Standart olarak kullanılan beta-aktin ve analizi gerçekleştirilen antikorların bant yoğunlukları karşılaştırılarak protein düzeyleri arasındaki farklar tespit edildi.

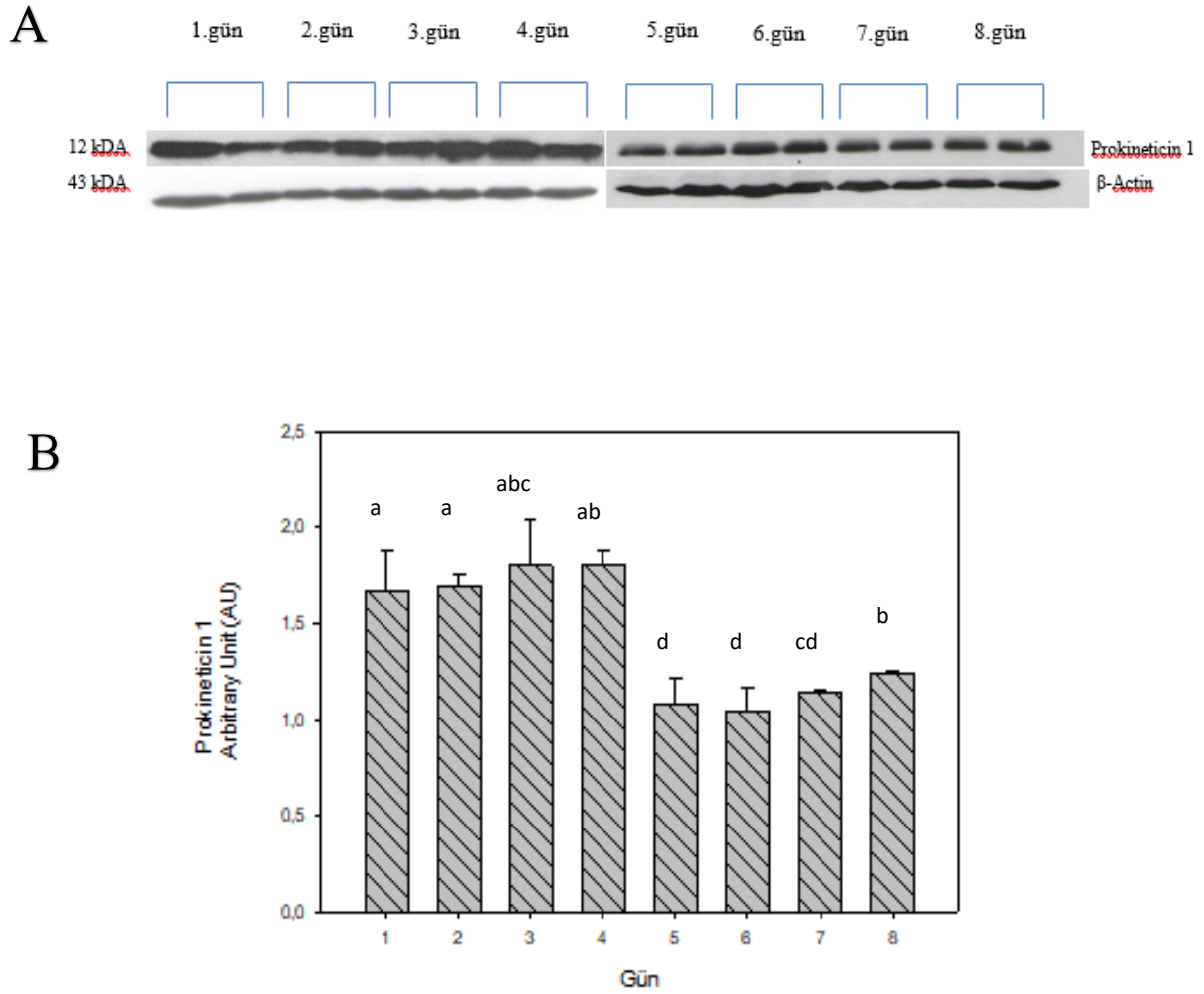
İstatistik analiz:

Deneyler sonucunda elde edilen veriler SPSS (IBM SPSS Statistics version 23) programı ile öncelikle normal dağılım testi için Shapiro-Wilk testi ve varyansların homojenliği için Levene testi uygulanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda verilerin normal dağılıma uygun ve varyansların homojen olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra gruplar arası istatistiksel analizler tek yönlü varyans analiz yöntemi ve Tukey post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir (P <0,05). Alınan değerler ortalama ± standart hata (SEM) şeklinde belirtilmiştir.

3. Bulgular

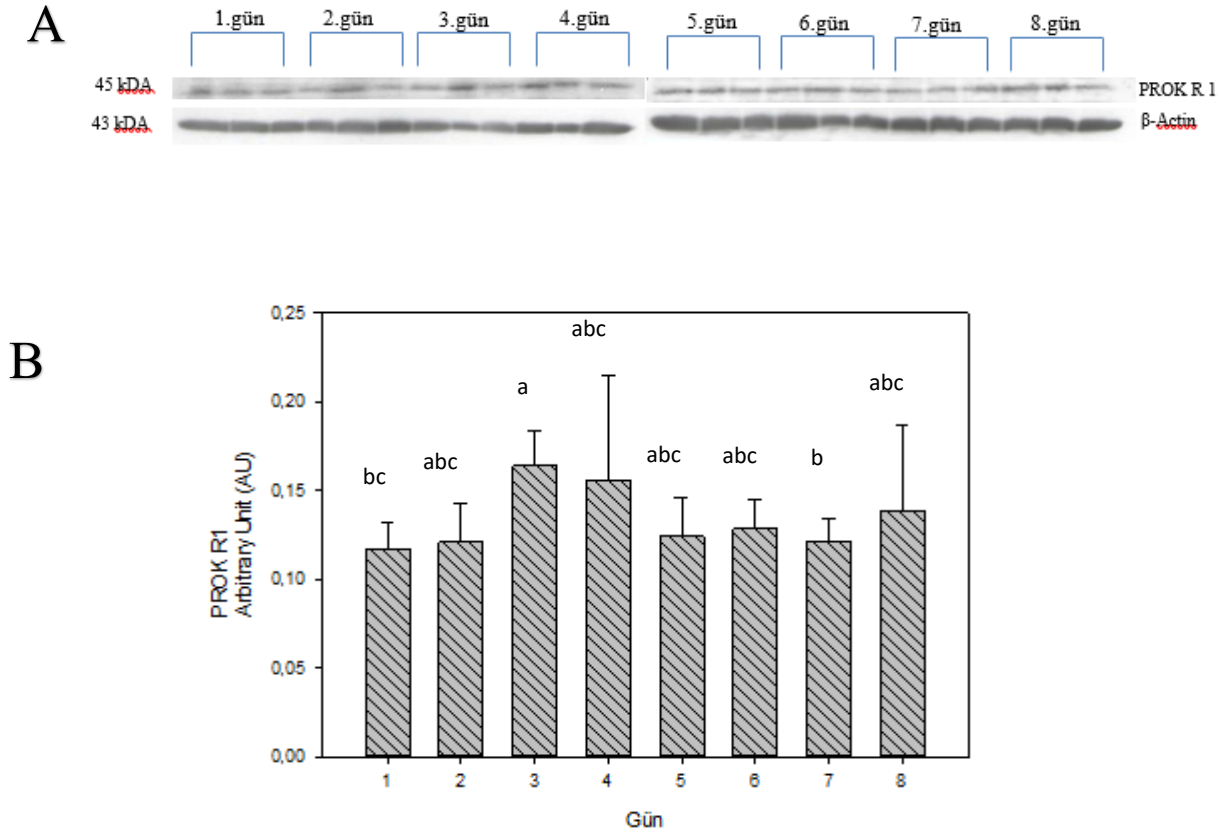
PROK1, PROKR1 protein ekspresyon paternleri 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. günlerde toplanan uterus dokuları üzerine Western Blot analizi uygulanarak belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda 12 kDa moleküler ağırlığında olan PROK1 proteinin gebeliğin 1. günü ile 8. günü arasında eksprese edildiği tespit edildi. PROK1 ekspresyonunun gebeliğin ilk dört gününde, ilerleyen günler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi (P<0,05). Blastosistin endometriyuma tutunmasının gerçekleştiği E 4.5 aşamasından sonra E 4.5-E 5.5 günleri arasından başlayarak 5.-6. ve 7. günlerde 4. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde PROK1 ekspresyonunun azaldığı saptandı (P<0,05). 8. günde PROK1 ekspresyon düzeyinin 5., 6. ve 7. günlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olduğu tespit edildi (P<0,05) (Şekil 1).

PROKR1 proteini ise 45 kDa karşılık gelen band üzerinde tespit edilmişti. PROK1 ile benzer şekilde gebeliğin 1. günü ile 8. günü arasında eksprese edildiği görüldü. PROKR1 proteinin ekspresyonunun gebeliğin 3. gününde en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda PROKR1 ekspresyonunun 3. günde 1. ve 2. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken 5., 6. ve 7. günde 3. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı (P<0,05). Analiz grafiğinde 4. günde PROKR1 seviyesinde bir artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık belirlenemedi (P>0,05). PROKR1 ekspresyonunun da 7. günden sonra bir artış görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (P>0,05) (Şekil 2).



Şekil 1: Western blot yöntemiyle gebeliğin ilk 8 günü boyunca PROK1 ekspresyonunun belirlenmesi. **A:** Western blot işlemi sonrası tüm gruplarda 12 kDa değerine karşılık gelen spesifik bandın görünümü. Kontrol amacıyla kullanılan β-aktinin ekspresyonunun görünümü. **B:** Çalışma grupları için Arbitrary Unit (a.u.) cinsinden verilen ekspresyon değişim sonuçlarını göstermektedir. Farklı harfler ile gösterilen indisler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0,05$)

Figure 1: Determination of Prokineticin 1, expression during the first 8 days of pregnancy with Western blot method. **A:** The presence of a specific band corresponding to 12 kDa level is observed in all groups after Western blot analysis. Expression of β-actin used for control purposes. **B:** It shows the expression level change results given in Arbitrary Unit (a.u.) for the research groups. The difference between the indices shown with different letters is statistically significant ($P < 0.05$).



Şekil 2: Western blot yöntemiyle gebeliğin ilk 8 günü boyunca PROKR1, ekspresyonunun belirlenmesi. **A:**Western blot işlemi sonrası tüm gruplarda 45 kDa değerine karşılık gelen spesifik bandın görünümü. Kontrol amacıyla kullanılan β -aktinin ekspresyonunun görünümü. **B:** Çalışma grupları için Arbitrary Unit (a.u.) cinsinden verilen ekspresyon değişim sonuçlarını göstermektedir. Farklı harfler ile gösterilen indisler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0,05$).

Figure 2: Determination of Prokineticin Receptor 1 expression during the first 8 days of pregnancy with Western blot method. **A:** The presence of a specific band corresponding to 45 kDa level is observed in all groups after Expression of β -actin used for control purposes. **B:** It shows the expression level change results given in Arbitrary Unit (a.u.) for the study groups. The difference between the indices shown with different letters is statistically significant ($P < 0.05$).

4. Tartışma ve Sonuç

Son on yıldır yapılan çalışmalar EG-VEGF'nin plasentasyondaki rollerini ve kompleks sinyal yollarının bilinmesini belirlemek üzerinedir. Bu çalışmalar, Prokinetisinler ve reseptörlerinin birçok gebelik patolojisini ortadan kaldırmak için umut verici tedavi hedefleri olduklarını göstermektedir. Bu amaçla gebeliğin farklı zamanlarında EGF-VEGF ekspresyon çalışmaları yapılmakla beraber, literatürde belirtilen proteinlerin fare uterus dokusunda preimplantasyon dönemi sırasında ve sonrasındaki ekspresyonları ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu projenin amacı ise fare uterus dokusunda pre ve peri-implantasyon sürecinde PROK1/PROKR ekspresyonunun tanımlanmasıdır.

Çalışmamızda gebeliğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. günlerinde, elde edilen doku örneklerinde PROK1 ve PROKR1 protein ekspresyon miktarları belirlenmiştir ve her iki proteinin de belirtilen günler boyunca eksprese edildiği görülmüştür. Gebeliğin ilk dört gününde (1-4. gün), ilerleyen günler (5-8. gün) ile karşılaştırıldığında PROK1 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir ($P < 0,05$). Özellikle 5., 6. ve 7. güne kıyasla 4. günde gözlenen PROK1 ekspresyonu bize bu proteinin implantasyon sırasında görev yaptığını

göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olarak, yapılan çalışmalarda da PROK1'in endometriyumun mikrovasküler geçirgenliğini artırarak implantasyonu kolaylaştırabildiği öne sürülmüştür (42). Ayrıca yapılan çalışmalarda PROK1'in implantasyon başarısında etkili olduğu ve implantasyon penceresinin açıldığı dönemde endometriyum-konseptus ağına katıldığını göstermiştir (21). Daha da önemlisi, PROK1'in seksüel siklus döneminde insanlarda endometriyal kabulün (endometriyumun blastosisti başarılı bir şekilde bağlama yeteneği) yeni bir belirteci olarak tanımlanmıştır (16, 17, 36). PROK1'in COX-2 ve Dickkopf-1 (DKK1) gibi implantasyon anahtar faktörlerinin ekspresyonunu da düzenlediği bildirilmiştir (8). Dahası, insanlar da PROK1'in doğrudan endometriyal implantasyon genlerinin ekspresyonunu ve ekstraselüler matris proteinleri ile trofoblast hücrelerinin yapışmasını arttırdığı, aynı zamanda implantasyon penceresi sırasında embriyo trofektoderm ve endometrial hücreler arasındaki çapraz etkileşimde doğrudan bir rolü olduğu ileri sürülmektedir (2). Preimplantasyon dönemi implantasyon sırası ve sonrasında uterus bezlerinin sayıca arttığı düşünüldüğünde, hücrelerde proliferasyonu destekleyen PROK1 proteininin bu artıştan sorumlu olabileceği ve bezlerde eksprese olabileceği düşünülebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla prokinetisinlerin üreme süreçlerinde özellikle endometriyal kabul ve plasental gelişim sırasında anahtar rol oynadıkları gösterilmektedir (8, 10, 37). Hoffman ve ark (24), yaptıkları çalışma ile PROK1'in en yüksek düzeyde birinci trimester döneminde olduğunu, 11. haftadan sonra değerlerin düştüğünü sonrasında gebeliğin olmadığı zamandaki düzeylere geldiğini göstermişlerdir. Ayrıca PROK1'in EVT migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar da PROK1 proteininin plasentada esas olarak sinsityotrofoblastlarda lokalize olduğu ve buradan eksprese edildiği bildirilmiştir. Ayrıca PROK1 proteinin trofoblast hücreleri üzerine etki ederek plasenta da proliferasyonu ve büyümeyi tetiklediği (22), EVT, ECM ve başarılı bir gebeliğin gerçekleşmesini sağlayan olayların koordinasyonuna tümünden katkıda bulunan villöz trofoblastlar üzerinde de parakrin etkiler sergilediği gösterilmiştir. (8).

Farelerde bilindiği gibi gebeliğin E 4.5 (embriyonik gün 4.5) geç blastosist aşamasında olan embriyo uterusu doğru hareket etmeye başlar ve yaklaşık E 5.0 döneminde hatching olarak adlandırdığımız dönemde blastosist etrafındaki zona pellusida'dan kurtularak endometriyuma tutunur. Blastosist bu sırada uterus lumeninde uterus epiteli ile karşı karşıya gelir. Bu karşılaşma sırasında da blastosist farklılaşmaya devam eder (40). Gelişmenin yaklaşık 5.-6. gününde blastosist uterusun endometriyumuna yapışır. E 5.0 dönemi ile birlikte yapışma embriyoblastın bulunduğu kutuptaki, yapışkan trofoblastlar tarafından gerçekleştirilir. Endometriyum epiteline yapışan trofoblastlar, endometriyuma değer değmez hızla çoğalmaya başlarlar ve iki tabakaya ayrılırlar. İç tabaka belirgin sınırlı tek çekirdekli hücrelerden meydana gelir ve sitotrofoblast olarak adlandırılır. Dış tabaka ise hücre sınırları belirgin olmayan yalnızca çok çekirdekli sitoplazma kitlesinden oluşan sinsityotrofoblast tabakasıdır (44). Çalışmamız sırasında elde ettiğimiz veriler de 4. günden sonra PROK1 ekspresyonunda bir azalma meydana gelirken (5. ve 6. gün), 7. ve 8. günlerde ise istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiği görülmüştür. Daha önceden yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak elde ettiğimiz bulgular da implantasyon sonrası 5-8 günler arasında eksprese olduğunu tespit ettiğimiz PROK1 proteinin bu süre içinde sinsityotrofoblastlardan sentezlendiğini (22) ve implantasyon sonrası mekanizmalar ile plasenta oluşumunda bir takım roller üstleniyor olabileceğini düşündürmektedir.

PROK1 seviyesi, insan endometriyumunda menstrual siklusun sekresyon fazında artmaktadır (5, 16). PROK1 ve PROKR1 menstrual siklus boyunca uterusu bez epitel hücreleri ve stromada, erken gebelik döneminde de desidua lokalize olur (5, 16, 36). Çalışmalar PROK1 ekspresyonunun endometriyumda progesteron ve insan koryonik gonadotropin (hCG) tarafından düzenlendiğini göstermiştir (5, 17, 42). Ayrıca, endometriyumda PROK1 sinyalinin endometrial kabul ve implantasyona da dahil olan siklooksijenaz 2 (COX2) (16), lösemi inhibitör faktör (LIF) (17), interlökin 8 (IL 8) (38), interlökin 2 (IL 2) (13) ve bağ doku büyüme faktörlerini (CTGF) (52) içeren birkaç gen tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Bu bulgular PROK1'in erken gebeliğin önemli bir düzenleyicisi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Prokinetisinlerin, tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi ve fetal büyüme geriliği (FGR) gibi plasental gelişim patalojilerinde görülen belirgin fonksiyon bozukluklarında, ovaryum, uterus, plasenta ve testisin fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmelerinde ana düzenleyici olarak görev yaptıkları düşünülmektedir (9, 51). Gerçekten, PROK1 ve reseptörleri ile tekrarlayan gebelik kaybı ve polimorfizm arasında bir ilişki vardır (36, 50). PROK1 ekspresyonundaki anormal artışın bozulmuş desidua ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili olduğu görülmektedir (47).

Çalışmamızda PROKR1 proteinin ekspresyonunun gebeliğin 3. gününde en yüksek düzeyde olduğu ekspresyonun 3. günde 1. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken, 7. günde 3. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu veriler bize PROKR1 ekspresyonunun 3. günde istatistiksel olarak anlamlı 4. günde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde bir artış göstererek implantasyon öncesi dönemdeki mekanizmalarda görev aldığını göstermiştir. İmplantasyon sonrasında ise PROK1 ile de uyumlu olarak anlamlı şekilde 7. günde anlamlı 8. günde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarla, PROK1/PROKR sistemin lokal düzenlenmesi hakkında çok az bilgi elde edilebilmiştir. İnsan gebeliği süresince bu faktörün ve reseptörlerinin güçlü ekspresyon profili, plasentada bu proteinlerin farklı mekanizmalar tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Gebeliğin ilk trimesteri esnasında plasental gelişimin önemli bir parametresi olan hipoksi tarafından PROK1 ve PROKR'in ekspresyon seviyesi artar. (22). Her iki gen, hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 (HIF-1) bağlayan düzenleyici bölgelerinde fonksiyonel bir hipoksi yanıt elementi içerir ve düşük oksijen basıncı bu proteinlerin ekspresyonlarının indüksiyonunu düzenler. İnsan gebeliği esnasında, hipoksik çevre ilk trimester boyunca devam eder. Bu yüzden, 8-11. haftada gözlemlenen PROK1 ve PROKR1 ekspresyonundaki yükseliş sadece oksijen basınç düzenlenmesi ile açıklanamamaktadır. Plasentada başka düzenleyicilerin de olduğu ve lokal PROK-1/reseptör ekspresyonunu kontrol ettiği düşünülmektedir (7). Ayrıca gebeliğin 8-10. haftalarında yükselerek pik yapan PROKR1 ekspresyonu PROK1'in ekspresyonu ile paralellik gösterirken, PROKR2 mRNA seviyeleri ilk trimesterin sonuna kadar çok fazla değişiklik göstermez, fakat gebeliğin sonuna doğru giderek azaldığı bildirilmiştir (22, 24).

Sonuç olarak PROKR1 ekspresyonunun özellikle implantasyon öncesi 4. günde artması, implantasyonun meydana geldiği 5. günde azalması ve implantasyon sonrasında 7. günden itibaren tekrar artmaya başlaması bu proteinin gebeliğin sağlıklı şekilde sürdürülebilmesi için gerekli süreçlerde görev aldığını göstermektedir. Ayrıca PROK1 ve PROKR1 proteinlerinin preimplantasyon, implantasyon sırasında ve sonrasında eksprese ediliyor olması bizlere bu proteinlerin bu dönemlerde önemli roller oynadığını akla getirmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Çalışma kapsamında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması yoktur.

Finansal Kaynak Beyanı

Bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0136-NAP-16 no'lu proje numarası ile desteklenmiştir.

Yazar Katkıları Beyanı

Fikir/kavram: Hakan Öner, Duygu Mutluay
 Deney tasarımı: Duygu Mutluay, Hakan Öner
 Denetleme/Danışmanlık: İsmail Üstünel, Hakan Öner, Jale Öner
 Veri toplama: Duygu Mutluay, Özlem Özbey, Leyla Kılınc
 Veri analizi ve yorum: Duygu Mutluay, Özlem Özbey
 Kaynak taraması: Duygu Mutluay
 Makalenin yazımı: Duygu Mutluay
 Eleştirel inceleme: Duygu Mutluay, Özlem Özbey

Etik Onay

Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2016- 173).

Kaynaklar

1. Afonso S, Romagnano L, Babiarz B (1997): *The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation*. Development, **124**, 3415-3425.
2. Alfaidy N, Hoffmann P, Gillois P, Gueniffey A, Lebayle C, Garçin H, Thomas-Cadi C, Bessonnat J, Coutton C, Villaret L, Quenard N, Bergues U, Feige JJ, Hennebicq S, Brouillet S (2015): *PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation*. J Clin Endocrinol Metab, **101(2)**, 435-444.
3. Aplin JD (1988): *Cellular biology of the endometrium*. 187-202. In: Wynn RM, Jolie WP, (Ed), Biology of the Uterus. Ed.3 Plenum Press, New York.
4. Baschat AA (2004): *Fetal responses to placental insufficiency: an update*. BJOG, **111(10)**, 1031-1041.
5. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN (2004): *Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, **89**, 2463-2469.
6. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N (2010): *Molecular characterization of EG-VEGF mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells*. Mol Biol Cell, **21**, 2832-2843.
7. Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, Salomon A, Chamboredon S, Sergent F, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N (2012): *Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors*. Cell Mol Life Sci, **69(9)**, 1537-1550.
8. Brouillet S, Hoffmann P, Feige J.J, Alfaidy N (2012): *EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development*. Trends Endocrinol Metab, **23(10)**, 501-508.
9. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent f, De Mazancourt P, Dakouane-Giudicelli M, Dieudonne' M. N, Rozenberg P, Vaiman D, Barboux S, Benharouga M, Feige J, Alfaidy N (2013): *EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR)*. Cell Mol Life Sci, **70**, 511-525.
10. Brouillet S, Hoffmann P, Alfaidy N, Feige JJ (2014): *Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction*. Med Sci (Paris), **30**, 274-279.
11. Catalano RD, Lannagan TR, Gorowiec M, Denison FC, Norman JE, Jabbour HN (2010): *Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition?* Mol Hum Reprod, **16**, 311-319.
12. Church HJ, Vicovac LM, Williams JDL, Hey NA, Aplin JD (1996): *Laminins 2 and 4 are expressed by human decidual cells*. Lab Invest, **74**, 21-32.
13. Cook IH, Evans J, Maldonado-Perez D, Critchley HO, Sales KJ, Jabbour HN (2010): *Prokineticin-1 (PROK1) modulates interleukin (IL)-11 expression via prokineticin receptor 1 (PROKR1) and the calcineurin/NFAT signalling pathway*. Mol Hum Reprod, **16**, 158-169.
14. Denison FC, Battersby S, King AE, Szuber M, Jabbour HN (2008): *Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta*. Endocrinology, **149**, 3470-3477.
15. Dorsch M, Qiu Y, Soler D, Frank N, Duong T, Goodearl A, O'Neil S, Lora J, Fraser CC (2005): *PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation*. J Leukoc Biol, **78**, 426-434.
16. Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN (2008): *Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy*. Endocrinology, **149**, 2877-2887.
17. Evans J, Catalano RD, Brown P, Sherwin R, Critchley HO, Fazleabas AT, Jabbour HN (2009): *Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor*. FASEBJ, **23**, 2165-2175.
18. Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F (2003): *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am J Pathol, **162**, 1881-1893.
19. Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, Duncan WC (2005): *Localization and*

- quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum.* J Clin Endocrinol Metab, **90**, 427–434.
20. **Graham CH, Lala PK** (1992): *Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control.* Biochem Cell Biol, **70**, 867-74.
 21. **Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Rème T, Dewailly D, Hamamah S** (2009): *Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle.* Hum Reprod, **24**, 198–205.
 22. **Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N** (2006): *Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy.* Endocrinology, **147**(4), 1675–1684.
 23. **Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N** (2007): *Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation.* Placenta, **28**(10), 1049–1058.
 24. **Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N** (2009): *Role of EG-VEGF in human placentation: physiological and pathological implications.* J Cell Mol Med, **13**(8B), 2224–2235.
 25. **Izgun-Uysal VN, Acar N, Birsen I, Ozcan F, Ozbey O, Soylu H, Avci S, Tepekoy F, Akkoyunlu G, Yucel G, Ustunel I** (2018): *Apelin-APJ system is responsible for stress-induced increase in atrial natriuretic peptide expression in rat heart.* Tissue Cell. **51**, 91-96.
 26. **Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G** (2003): *The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions.* EMBO Reports, **4**, 469–73.
 27. **Kelly BA, Bond BC, Poston L** (2003): *Gestational profile of matrix metalloproteinases in rat uterine artery.* Mol Hum Reprod, **9**, 351-358.
 28. **Kisliouk T, Levy N, Hurwitz A, Meidan R** (2003): *Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells.* J Clin. Endocrinol Metab, **88**, 3700–3707.
 29. **Kisliouk T, Podlovni H, Meidan R** (2005): *Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum.* Ann Anat, **187**, 529–537.
 30. **Kisliouk T, Podlovni H, Spanel-Borowski K, Ovadia O, Zhou QY, Meidan R** (2005): *Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells.* Endocrinology, **146**, 3950–3958.
 31. **LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang ZM, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N** (2001): *Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium.* Nature, **412**, 877–84.
 32. **LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, Ferrara N** (2003): *The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: localization of Bv8 receptors to endothelial cells.* PNAS, **100**, 2685–90.
 33. **LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N** (2004): *Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization.* PNAS, **101**, 16813–16818.
 34. **Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY** (2001): *Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle.* Mol Pharmacol, **59**, 692–698.
 35. **Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht VA, Papp C. and Schatz F** (1998): *Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal.* Endocrinology, **139**(11), 4607-4613.
 36. **Macdonald LJ, Sales KJ, Grant V, Brown P, Jabbour HN, Catalano RD** (2011): *Prokineticin 1 induces Dickkopf 1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium.* Mol Hum Reprod, **17**, 626–636.
 37. **Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN** (2007): *Potential roles of the prokineticins*

in reproduction. Trends Endocrin Met, **18**, 66–72.

38. **Maldonado-Perez D, Brown P, Morgan K, Millar RP, Thompson EA, Jabbour HN** (2009): *Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway*. Biochim Biophys Acta, **1793**, 1315–1324.
39. **Monnier J, Samson M** (2008): *Cytokine properties of prokineticins*. FEBSJ, **275**, 4014–4021.
40. **Mutluay D, Oner H** (2015): *Farelerde preimplantasyon döneminde trofoektoderm ve iç hücre kütlelerinin oluşumu*. MAKU J Health Sci Inst, **3**, 1-9.
41. **Mutluay D, Oner H** (2017): *The Abelson tyrosine kinase (c-Abl) localization in preimplantation mouse development*. Rom J Morphol Embryol, **58(4)**, 1385-1391.
42. **Ngan ESW, Lee KY, Yeung WSB, Ngan HYS, Ng EHY, Ho PC** (2006): *Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma*. Endocrinology, **147**, 88–95.
43. **Ngan ESW, Tam PKH** (2008): *Prokineticin-signaling pathway*. Int J Biochem Cell B, **40**, 1679–1684.
44. **Piliszek A, Grabarek JB, Frankenberg SR, Plusa B** (2016): *Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability*. Mol Hum Reprod, **22(10)**, 681-690.
45. **Roberts WG, Delaat J, Nagane M, Huang S, Cavenee WK, Palade GE** (1998): *Host microvasculature influence on tumor vascular morphology and endothelial gene expression*. Am J Pathol, **153**, 1239–1248.
46. **Salamonsen LA, Woolley DE** (1999): *The role of proteinases in implanation*. Rev Reprod, **4**, 11-22.
47. **Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C** (2010): *Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss*. PLoS One, **5**:e10287.
48. **Shaw JL, Denison FC, Evans J, Durno K, Williams AR, Entrican G, Critchley HO, Jabbour HN, Horne AW** (2010): *Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy*. Fertil Steril, **94**, 1601–1608.
49. **Stewart PA, Wiley M J** (1981): *Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras*. Dev Biol, **84**, 183–192.
50. **Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Hsu CC, Pan HA, Kuo PL** (2010): *Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss*. Hum Reprod, **25**, 2923–2930.
51. **Traboulsi W, Brouillet S, Sergent F, Boufettal H, Samouh N, Aboussaouira T, Hoffmann P, Feige JJ, Benharouga M, Alfaidy N** (2015): *Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction*. Horm Mol Biol Clin Investig, **24(2)**, 73-81.
52. **Waddell JM, Evans J, Jabbour HN, Denison FC** (2011): *CTGF expression is up-regulated by PROK1 in early pregnancy and influences HTR-8/Svneo cell adhesion and network formation*. Hum Reprod, **26(1)**, 67-75.
53. **Wang H, Li Q, Shao L, Zhu C** (2001): *Expression of matrix metalloproteinase -2, -9, -14, and Tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (Macaca mulatta) during early pregnancy*. Biol Reprod, **65**, 31-40.