

RETİNOİK ASİT UYGULANAN SIÇANLARIN PLASENTALARINDA MMP-2 VE MMP-13 İMMÜNREAKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF MMP-2 AND MMP-13 IMMUNOREACTIVITY IN PLACENTA OF RATS TREATED WITH RETINOIC ACID

Tuğba KOTİL, Leyla TAPUL*

ÖZET

Amaç: Matriks metalloproteinazlar (MMP) hücrelerarası matriks yıkımında rol alarak implantasyonun gerçekleşmesine yardımcı olan enzimlerdir. Retinoik asit (RA); MMP üretimi üzerine etkisi olduğu düşünülen, trofoblast invazyonunda rolü olan bir moleküldür. Çalışmamızda retinoik asit uygulanan gebe siçanların plasentalarında MMP-2 ve MMP-13 immünreaktivitesinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kontrol (8 adet) ve deney (8 adet) gruplarında toplam 16 adet dişi Sprague Dawley türü siçan kullanıldı. Siçanlar gebe bırakılarak deney grubundakilere gastrulasyon döneminde 3 gün süre ile 40mg/kg/gün 13-cis retinoik asit oral yolla uygulandı. Gebeliğin orta döneminde (10-14 gün) plasentalardan alınan kesitler immünohistokimyasal olarak Streptavidin- Biotin yöntemi kullanılarak rabbit poliklonal MMP-13 antikoru ve mouse monoklonal MMP-2 antikoru ile işaretlendi.

Bulgular: Kontrol grubuna ait plasentalarda MMP-2 immünreaktivitesi trofoblastik dev hücrelerde kuvvetli pozitif (+++), koriyo-amniyotik zarda ise orta derecede pozitif (++) bulundu. RA uygulanan grupta trofoblastik dev hücrelerde MMP-2 immünreaktivitesi saptanmadı, buna karşın koriyo-amniyotik zarda kuvvetli pozitiflik mevcuttu. MMP-13 immünreaktivitesi ise kontrol grubu dev hücrelerinde ve korio-amniyotik zarda orta derecede (++) pozitifliği. RA grubunda dev hücrelerde değişiklik görülmezken koriyo-amniyotik zarda kuvvetli pozitif (+++) işaretlenme mevcuttu.

Sonuç: Eksojen olarak uygulanan retinoik asitin trofoblastik dev hücrelerde ve desiduada MMP-2 sentezini baskılayarak implantasyonu olumsuz etkileyebileceği ve koriyo-amniyotik zarda ise MMP-2 ve MMP-13'ü arttırmak suretiyle membran stabilizasyonunu bozabileceği, bunlara bağlı olarak hayatta kalımı engelleyebileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Placenta, retinoik asit, matriks metalloproteinaz-2, matriks metalloproteinaz-13

ABSTRACT

Objective: Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes and play important roles at implantation by degradation of extracellular matrix. Retinoic acid (RA) is an important molecule has effects on MMP synthesis, embryonic development and trophoblast invasion at placentation. In this study we investigated the MMP-2 and MMP-13 immunoreactivity on rat placenta treated by RA.

Materials and Methods: In this study 16 female Sprague Dawley rats were used, divided equally for control (8) and RA (8) treated groups. Rats were treated by 13-cis RA (40mg/kg/day) by gavaj for 3 days. For immunochemical study we used rabbit polyclonal MMP-13 and mouse monoclonal MMP-2 antibody.

Results: In the control group the trophoblast giant cells showed strong (+++) and chorioamniotic membrane moderate (++) positivity for MMP-2. There was no MMP-2 immunoreactivity detected at trophoblastic giant cells of RA treated group in contrast to the strong positivity were detected at chorion epithelium. Moderate MMP-13 immunoreactivity was detected at trophoblastic giant cells and chorioamniotic membrane of control group. In RA treated group trophoblastic giant cells showed moderate, chorioamniotic membrane showed strong reactivity for MMP-13.

Conclusion: It is convinced that exogenously applied retinoic acid affects implantation negatively by repressing MMP-2 synthesis in trophoblastic giant cells and decidua, impair membrane stabilization by increasing MMP-2 and MMP-13 synthesis in chorioamniotic membrane and therefore prevent survival.

Key words: Placenta, retinoic acid, matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-13

Date received/Dergiye geldiği tarih: 11.06.2009 - Dergiye kabul edildiği tarih: 07.12.2010

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul
(İletişim kurulacak yazar: tkotil@istanbul.edu.tr)

GİRİŞ

Matriks metalloproteinaz (MMP) süper ailesi, hücrelerarası matriks yıkımında rol alan enzimler olarak bilinir ve kollagenazlar, jelatinazlar, stromelisinler ve membran tipi metalloproteinazlar olmak üzere 4 ana gruba ayrılan 24 üyeden oluşur. Hücreden dışarı salındıklarında latent formda olan bu enzimler, gerektiği zaman aktif hale gelirler. Fonksiyonel aktiviteleri ayrıca yine ortamdaki hücrelerce üretilip salgılanan matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri ile baskılanarak düzenlenir. MMP enzimleri birçok yapısal ve fonksiyonel benzerliğe sahip olsalar da farklı substratlarla özgülürler (5,13).

Memeli uterusu gebelik sırasında büyüme ve yeniden düzenlenme özelliğine sahip bir organdır. Hücrelerarası matriks elemanları embriyonun endometriyum içine gömülmesi, barınması ve fetus ile anne arasındaki vaskular bağın kurulmasında (plasantasyon) önemli role sahiptir (1,3,23). İnsanda plasenta gelişiminde jelatinazlardan özellikle MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin etkinlik gösterdiği ve birinci trimestrin erken dönemlerinde trofoblastlarca esas olarak MMP-2'nin üretilip salgılandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (19,21,31). Rong Niu ve arkadaşlarının (16) insan plasentası üzerine yaptıkları çalışmada ise birinci trimestirda trofoblast hücrelerinde MMP-9, villöz dokuda ise MMP-2'nin üretildiği belirtilmektedir. Aynı çalışmada MMP doku inhibitörü 1'in seviyesinin birinci trimestirdan term dönemine gidildikçe azaldığı gösterilmiştir. Teesalu ve arkadaşları (23) fare plasentasında Gelatinaz B olarak bilinen MMP-9'un trofoblastik dev hücrelerce üretildiğini ve bu yolla trofoblast invazyonu ve embriyo implantasyonunda rol oynadığını, MMP-2 işaretlenmesinin ise yalnızca desidua hücrelerinde olduğunu gözlemlemişlerdir. Kedi plasantasının erken, orta ve geç gestasyon dönemleri üzerinde yapılan çalışmada sinsisyotrofoblast tabakasında MMP-1 ve MMP-13 gözlenmiş, MMP-2 işaretlenmesinin ise erken gestasyonel dönemde desidua hücreleri ve labirentteki dev hücrelerde olduğu bildirilmiştir (27).

MMP'ler plasenta gelişimi ve gelişen plasentanın uterusu gömülmesi sırasında etkinlik gösterdiği gibi doğum sırasında fetal membranların (amniyon ve koriyon) yıkımında, desidua ve uterustan plasentanın ayrılmasında da rol alır (6). Fetal membranlarda hücreler arası matriksinin ana elemanı tip IV kollajendir ve bilindiği gibi MMP-2 tip IV kollajeni yıkan bir proteazdır (17). Fetal membranlarda hem term hem de pretermde vaktinden önce meydana gelen yırtılmaların sebebi kollajen yıkımının artmasıdır (28). Literatürde terminal dönemde plasental membranlarda kollajen liflerce yaratılan gerilim dayanıklılığının preterm membranlara göre düşük olduğu ve membranlardaki MMP-9 aktivitesinin ise yüksek olduğu belirtilmektedir (25).

Retinol (vitamin A) ve aktif türevi olan retinoik asit, memeli gelişiminde mutlak gerekli olan, eksikliğinin ve fazlalığının çeşitli fetal anormalliklere sebep olduğu bilinen maddelerdir (18). Farelerde gestasyonun 7. ve 8. günlerinde uygulanan 12mg/kg RA'nın nöral tüp ve arka beyin gelişiminde anormalliklere sebep olduğu, RA yokluğunda ise ekstremitelerde gelişiminde bozulmalar görüldüğü bildirilmiştir (12,11). Retinoik asitin embryo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin plasenta aracılığıyla olabileceği tartışmalı bir konudur. Retinoik asitin plasenta gelişiminin erken evrelerinde etkili olduğu ileri sürülmektedir. Eksojen RA'nın morula evresindeki fare embriyolarında 50mg/kg dozda kullanılması sonucunda desidua gelişiminin baskılandığı bildirilmiştir (9).

Retinoik asitin trofoblastik kök hücrelerin, trofoblastik dev hücrelere farklılaşmasını uyardığı da gösterilmiştir (20,32). Retinoik asit uygulaması ile trofoblastik dev hücre farklılaşması artarken, spongiotrofoblast oluşumunda ise azalma olduğu bildirilmektedir (32). Retinoik asit plasenta gelişimi sırasında yalnızca hücre farklılaşması üzerine etkili olmamakta ayrıca trofoblast hücreleri tarafından çeşitli hormonların üretimi üzerine de etki etmektedir. Retinoik asitin sinsisyotrofoblast hücrelerinde insan plasental laktojen hormon sentezi ve salınımı artırdığı in vitro çalışma ile gösterilmiştir (22). Braunhut ve arkadaşlarının (2) yaptıkları bir in vitro çalışmada retinoik asitin endotel hücrelerince MMP ve MMP inhibitörleri üzerine etki gösterdiği ve retinoik asit uygulanan grupta MMP-9 ve MMP-2 miktarının azaldığı, TIMP-2 miktarının ise artırdığı belirtilmiştir.

Bu çalışmanın amacı gastrulasyon sürecinde retinoik asit uygulanan gebe sıçanların plasentalarında morfolojik değişiklikleri MMP-2 ve MMP-13 immünreaktivitesi açısından değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kontrol grubunda 8 adet ve RA uygulanan grupta 8 adet olacak şekilde Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nden (DETAM) alınan toplam 16 adet dişi Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar gebe bırakıldı ve deney grubundakilere oral yolla gebeliğin 7,5. - 8,5. ve 9,5. günlerinde 3 gün süre ile 40mg/kg/gün 13-cis retinoik asit (Isotretinoin, Roaccutane) uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. Gebeliğin orta döneminde (10-14 gün) her iki gruptaki sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Uterus dokuları alınarak % 10 tamponlu formaldehitte fikse edildi. Işık mikroskopunda incelenmek üzere takip edilerek parafine gömüldü. Hematoksilin-eozin boyası ile genel değerlendirme yapıldı. Plasentalardan 2-3µm kalınlığında alınan kesitler 56 derecelik etüvde bir gece bekletildi. Deparafinizasyon için alçalan alkol serilerinden geçirildi ve 15 dakika 0,5 H₂O₂ (metanolde) karanlıkta bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi maskelendi. Kesitler 5 dakika 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra mikrodalga fırında 3 defa 5 dakika sitrat tamponuyla muamele edildi. Isısının oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra bloke edici solüsyon ile 30 dakika muamele edilip, kesitlere rabbit poliklonal MMP-13 antikoru (1:50) ve mouse monoklonal MMP-2 antikoru (1:10) uygulandı. Daha sonra sekonder antikor uygulanarak AEC kromojen ile renklendirildi. Mayer hematoksilin ile boyanıp, kapatıcı medyum ile kapatıldı. Dokulardaki immünreaktivite ışık mikroskopunda incelendi ve boyanma yoğunluğu göz önüne alınarak zayıf, orta ve kuvvetli olarak skorlandı.

BULGULAR

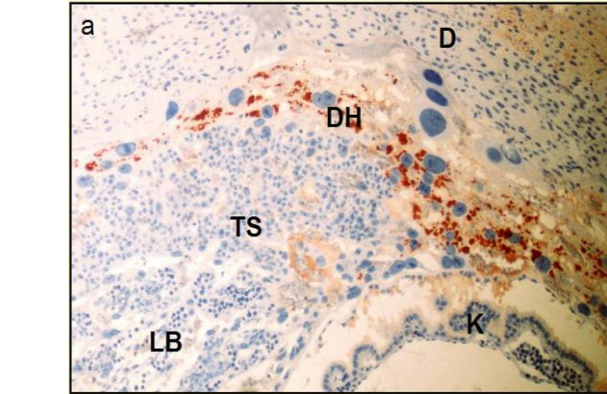
MMP-2 ve MMP-13'e ait tüm immünreaktivite skorları Tablo 1'de özetlendi.

Kontrol grubuna ait plasentalarda MMP-2 immünreaktivitesi (Resim 1aX10) desidua hücrelerinde orta derecede pozitif (++) (Resim 1bX25). Trofoblastik dev hücreler kuvvetli pozitif (+++) reaksiyon gösterdi (Resim 1cX10). Trofospongiyumda ve labirent tabakasında immünreaktivite görülmezken, koriyo-amniyotik zarda orta derecede pozitif (++) reaksiyon izlendi (Resim 1dX40). Retinoik asit uygulanan grupta desidua hücrelerinde, trofoblastik dev hücrelerde ve trofospongiyumda MMP-2 immünreaktivitesi saptanmadı (Resim 1eX25 ve 1fX25). Buna karşın labirent

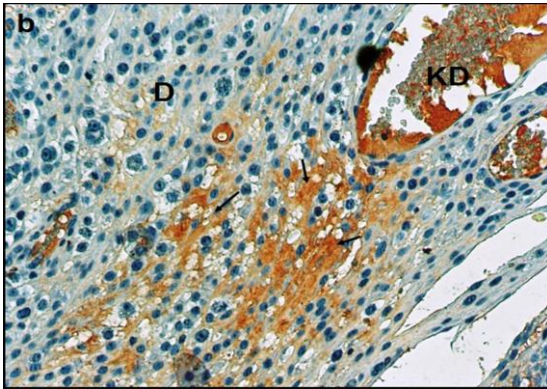
MMP-2 and MMP-13 immunoreactivity of placenta

tabakasında ise zayıf pozitif (+) reaksiyon görüldü. Koriyo-amniyotik zarda kuvvetli pozitiflik (+++) mevcuttu (Resim 1gX25).

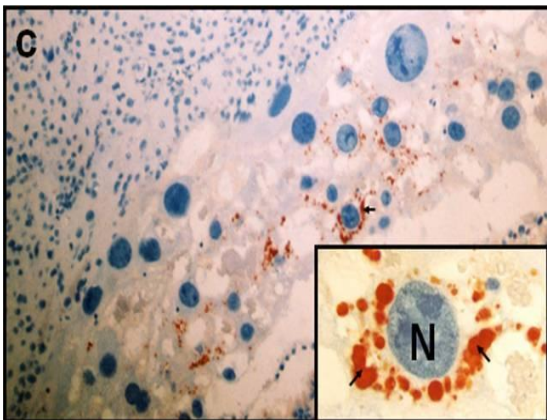
Kontrol grubunda MMP-13 immünreaktivitesi incelendiğinde desidua, trofoblastik dev hücrelerde, trofospongiyumda, labirent tabakasında ve koriyonda orta derecede pozitif (++) işaretlenme saptandı (Resim 2aX4, 2bX10, 2cX25 ve 2dX25). Retinoik asit uygulanan grupta MMP-13 immün reaktivitesi yönünden desidual hücrelerde zayıf (+) reaksiyon gözlemlendi (Resim 2eX25). Trofoblastik dev hücrelerde orta derecede pozitif (++) işaretlenme saptandı (Resim 2fX100). Trofospongiyumda ve labirent tabakasında zayıf pozitif (+) immün reaksiyon izlenirken, koriyo-amniyotik zarda kuvvetli pozitif (++) reaksiyon saptandı (Resim 2gX25).



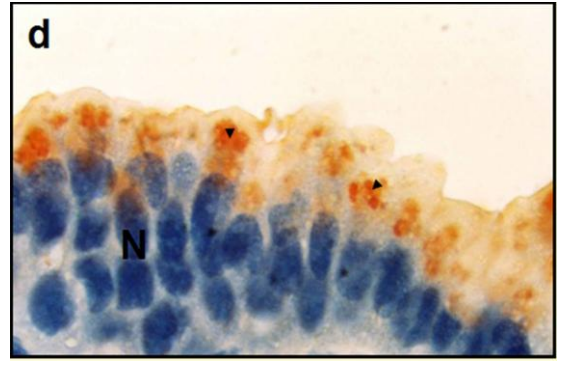
1-a



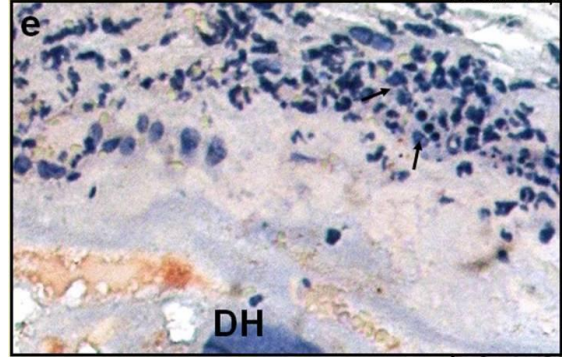
1-b



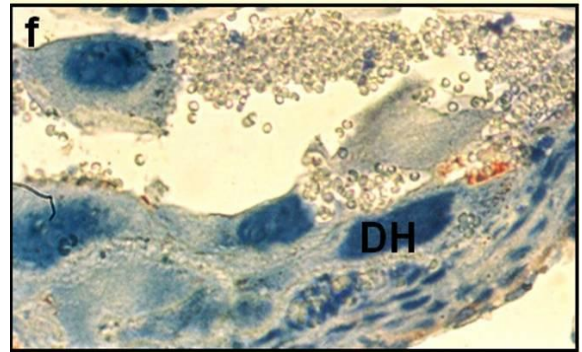
1-c



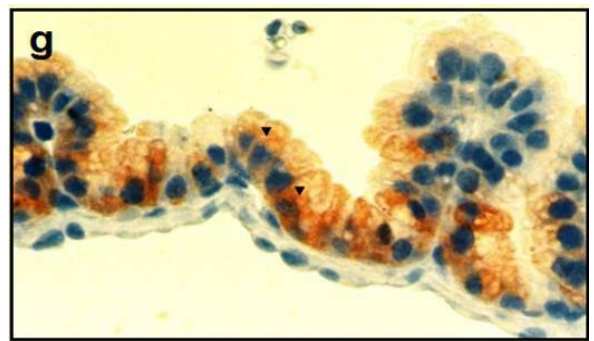
1-d



1-e

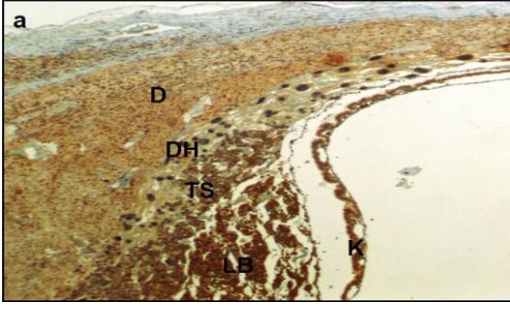


1-f

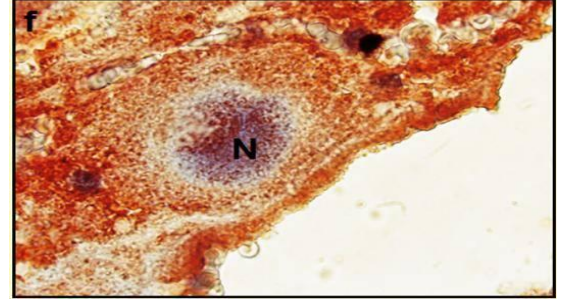


1-g

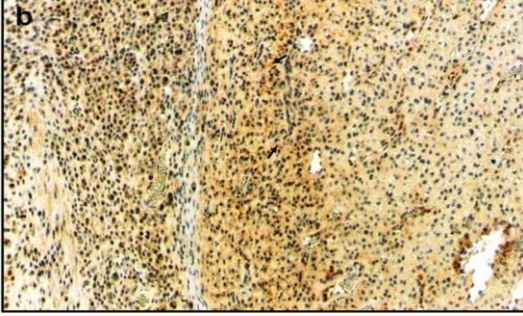
Resim 1. Kontrol grubunda MMP-2 immünreaktivitesi (a-d): a) Genel görünüm b) Desidual hücreler (oklar) c) Trofoblastik dev hücreler (ok), küçük resim: Bir trofoblastik dev hücre (büyük büyütme) d) Koriyo-amniyotik zar (ok başları) RA uygulanan grupta MMP-2 immünreaktivitesi (e-g): e) Desidual hücrelerde (oklar) ve f) trofoblastik dev hücrelerde immünreaktivite görülmedi. g) Koriyo-amniyotik zarda (ok başları) ise kontrol grubuna göre immünreaktivitenin arttığı görüldü. D: Desidua, DH: Dev Hücre, TS: Trofospongiyum, LB: Labirent tabakası, K: Koriyo-amniyotik zar, KD: Kan damarı, N: Nukleus



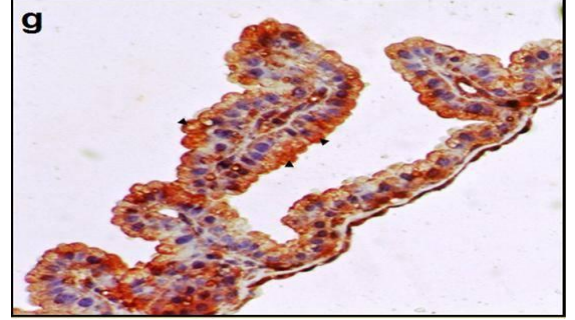
2-a



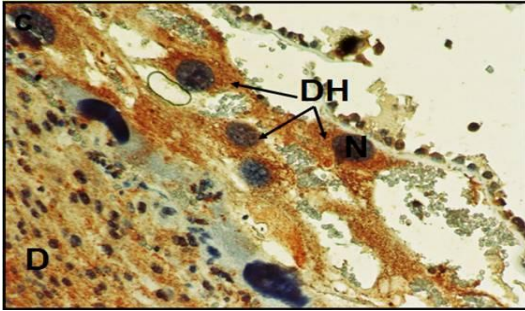
2-f



2-b

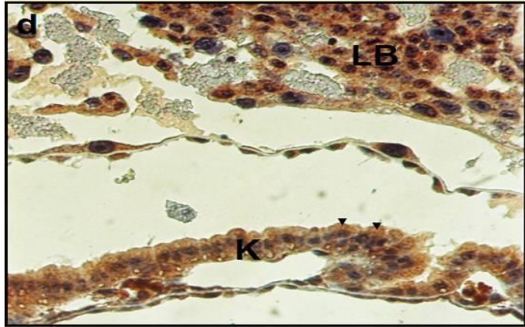


2-g



2-c

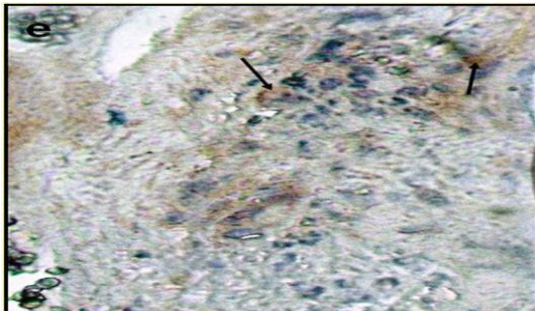
Resim 2. Kontrol grubunda MMP-13 immünreaktivitesi (a-d): a) Genel görünüm b) Desidual hücreler (oklar), c) Trofoblastik dev hücreler (oklar), d) Koriyo-amniyotik zarda (ok başları). RA uygulanan grupta MMP-13 immünreaktivitesi (e-g): e) Desidual hücrelerde kontrol grubuna göre immünreaktivitede azalma görüldü. f) Trofoblastik dev hücrelerde kontrole göre immünreaktivitede orta derecede (++) pozitiflik görüldü. g) Koriyo-amniyotik zarda (ok başları) kontrol grubuna göre immünreaktivitede artış görüldü. D: Desidua, DH: Dev hücre, LB: Labirent tabakası, K: Koriyo-amniyotik zar



2-d

Tablo 1. Plasentanın değişik bölgelerinde kontrol ve RA gruplarının MMP-2 ve MMP-13 immünreaktivitelemi

	Kontrol (MMP-2)	RA Grubu (MMP-2)	Kontrol (MMP-13)	RA Grubu (MMP-13)
DESİDUAL HÜCRELER	++	-	++	+
TROFOBLASTİK DEV HÜCRELER	+++	-	++	++
TROFOSPONGİYUM	-	-	++	+
LABİRENT TABAKASI	-	+	++	+
KORIYO-AMNİYOTİK ZAR	++	+++	++	+++



2-e

TARTIŞMA

Trofoblastik dev hücreler, blastokistin trofoektoderm hücrelerinin farklılaşması ile oluşan büyük çaplı ve poliploid şekilli hücrelerdir. Simmons ve arkadaşları (20) yaptıkları çalışmada trofoblastik dev hücrelerin homojen bir grup olmadığını, 4 ayrı tip içerdiğini, bunların farklı lokalizasyona, gen ekspresyonuna ve orijine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu hücreler başarılı bir gebeliğin gerçekleşmesi için gerekli olan birçok olayda etkinlik gösterirler ki, bu olaylar; blastokist implantasyonu, maternal desiduanın yeniden düzenlenmesi, proliferin, plasental laktojen gibi plasentanın fetal ve maternal elemanlarının gelişimini düzenleyen hormonların salınmasıdır. Hücreler aynı zamanda angiogenik faktörler, vazodilatörler, antikoagulanlar ve interferon gibi parakrin etkili faktörler de sentezlerler. (14,20). Retinoik asit, dietilstilbestrol, paratiroid hormon ilişkili protein (PTHrP), sinir büyüme faktörü (NGF)

gibi birçok eksojen faktör trofoblastik dev hücre oluşumunu teşvik edebilir (4,10, 24,32).

Trofoblastik dev hücreler implantasyon sürecinde sentezledikleri MMP'ler ile uterus duvarının ekstrasellüler matriks elemanlarını parçalayarak invazyonu kolaylaştırırlar (1,5,13). Biz çalışmamızda kontrol plasentalarına ait desidual hücrelerde MMP-2 aktivitesini orta derecede pozitif bulurken, özellikle trofoblastik dev hücrelerde kuvvetli pozitif olarak gözlemledik. Çalışmamızda RA uygulanan grupta retinoik asitin trofoblastik dev hücrelerde MMP-2 üretimini baskıladığı, MMP-13 üretimi üzerine etki etmediği görüldü. Winterhager ve arkadaşları (29) tarafından, retinoidlerin metalloproteinaz inhibitörlerinin üretimi üzerinden trofoblast invazyonunu etkileyerek plasenta gelişiminde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Ayrıca desidua hücrelerinde de retinoik asit uygulamasının hem MMP-2 hem de MMP-13 aktivitesini düşürdüğü gözlemlendi. Bu bulgumuz Huang'ın (9) çalışmasında retinoik asitin desidual gelişimi baskıladığı bilgisi ile paraleldir. Yapılan diğer bazı çalışmalarda retinoik asitin sıçan memeli adenokarsinoma, insan malignan melanoma hücrelerinde ve sığır endotel hücrelerinde de MMP-2 seviyesini düşürdüğü belirtilmektedir (2,8,15).

Fetus gebelik boyunca koryoamniyon isimli bir zar ile çevrili olarak bulunur. Bu zar gebelik boyunca fetusu koruyucu etkinlik gösterir ve doğum sırasında parçalanır. Bazı patolojik durumlarda prematür olarak yırtılabilir. Term döneminde fetal membranın yırtılması miyometriyumdaki kasılmalara bağlı olsa da membranın hücreler arası matriks elemanlarını yıkan enzimatik aktivite de bu duruma yardımcı olmaktadır (1,28,30). İnsan fetal membranı üzerinde yapılan çalışmalar kollagen içeriğinin azalmasının, kollagen yapısının bozulmasının, kollagenolitik aktivitenin yükselmesinin prematür membran yırtılması ile alakalı olduğunu göstermektedir. Fetal membranlar yani amniyon ve koryon birçok kollagen tipinin yanında esas olarak tip IV kollajenden oluşur. Bu proteinin yıkımı şiddetlendiğinde membranın yırtılma olasılığı artar. Tip IV kollajenin yıkımında esas olarak MMP-2 ve MMP-9 rol oynamaktadır (17,25,26). Goldman ve arkadaşları (6) yaptıkları çalışmada termdeki uterus kasılmaları sırasında amniyonda MMP-9 aktivitesinin arttığını, MMP-2 aktivitesinin ise esas olarak desiduada arttığını bildirmiştir. Prematür membran yırtılması sırasında etkinlik gösteren proteazların seviyesi normal doğum ve sezeryan ile karşılaştırıldığında ise MMP-2 aktivitesinin amniyokoryonda anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Çalışmada MMP-2 seviyesindeki artış bu bölgedeki tip IV kollajenin yıkımı ve dolayısıyla membranın zamanından önce yırtılması anlamına gelmektedir (16). Preterm dönemde prematür fetal membran yıkımı sırasında ve term döneminde spontan olarak koryonda MMP-2 üretiminin arttığı bildirilmiştir (19). Çalışmamızda RA uygulaması yapılan grupta koryon epitelinde MMP-2 ve MMP-13 immünreaksiyonunun kontrole göre arttığı görüldü. Bu bilgi RA'nın fetal membranlardaki yıkımı erken başlattığının ve düşük olma olasılığını arttırdığının göstergesi olabilir.

RA'nın MMP'lerin ekspresyonunu düzenlemedeki rolü yapılan çeşitli çalışmalarda tartışılmaktadır. Örneğin kemirgenlerde embriyonal kanser hücrelerinin farklılaşmasının RA tarafından uyarılması bu hücrelerce tip 4 kollagenaz üretiminin artışı ile birlikte görülür. MMP-2 üretiminin artışı üzerine yapılan bir çalışmada RA'nın cAMP

ile sinergistik etki göstererek MMP-2 geninin bazal promotörü üzerine etki ederek MMP protein seviyesini arttırdığı bildirilmiştir. Sıçan meme adenokarsinomu ve insan malign melanoma hücrelerinde ise MMP-2'nin hücrelerarası seviyesinin RA tarafından düşürüldüğü bildirilmiştir (7).

Sonuç olarak, embriyo gelişiminde esansiyel bir role sahip olduğunu bildiğimiz RA'nın fazlalığının, sıçanlarda embriyonun hayatta kalmasını sağlayan plasentanın oluşumunda trofoblastik dev hücreler ve desidual hücrelerde MMP-2 sentezini baskılayarak, koryo-amniyotik zarda MMP-2 ve MMP-13'ü arttırmak suretiyle membran stabilizasyonunu bozarak implantasyonu ve hayatta kalımı olumsuz etkileyebileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- 1- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani N, Hawkes SP, Werb Z. Expression and function of matriks metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 1996; 122: 1723-1736.
- 2- Braunhut SJ, Moses MA. Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269 : 13472-13479.
- 3- Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Mouse Uterus During the Peri-Implantation Period. *Developmental Genetics* 1997; 21:44-54.
- 4- El-Hashash AH, Esbrit P, Kimber SJ. PTHrP promotes murine secondary trophoblast giant cell differentiation through induction of endocycle, upregulation of giant-cell-promoting transcription factors and suppression of other trophoblast cell types. *Differentiation* 2005; 73: 154-174.
- 5- Fortunato SJ, Menon R. Screening of Novel Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Fetal Membranes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2002; 19:483-486.
- 6- Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Molecular Human Reproduction* 2003; 9: 367-373.
- 7- Hasan S, Nakajima M. Retinoic acid synergizes with cyclic AMP to enhance MMP-2 basal promoter activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 258: 663-667.
- 8- Hendrix MJC, Wood WR, Seftor EA, Lotan D, Nakajima M, Misiorowski RL, SeftorREB, Stetler-Stevenson WG, Bevacqua SJ, Liotta LA, Sobel ME, Lotan R. Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor. *Cancer Res* 1990; 50:4121-4130.
- 9- Huang F. Effects of retinoic acid on morula-stage embryo development in mice. *Chang Gung Med J* 2008;31:44-51.
- 10- Kanai-Azuma M, Kanai Y, Matsuda H, Kurohmaru M, Tachi C, Yazaki K, Hayashi Y. Nerve growth factor

- promotes giant-cell transformation of mouse trophoblast cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 231: 309–315.
- 11- Maden M. Retinoic acid in development and rejeeneration. *J. Biosci.* 1996; 21: 299-312.
 - 12- Morriss-Kay GM, Murphy P, Hill RE, Davidson DR. Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. *EMBO J* 1991;10:2985-95.
 - 13- Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology* 2004; 16:558-564.
 - 14- Nadra K, Anghel S, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator – activated receptor β/δ . *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26: 3266-3281.
 - 15- Nakajima M, Lotan D, Baig M, Carralero LM, Wood WR, Hendrix MJC, Lotan R. Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1989;49: 1698-1706.
 - 16- Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases -2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sciences* 2000; 66: 1127-1137.
 - 17- Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I. Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorions during premature rupture of membranes. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2006; 13:592-597.
 - 18- Sapin V, Begue R, Dastugue B, Chambon P, Dolle P. Retinoids and Mouse placentation. *Trophoblast Research* 1998; 12:57-76.
 - 19- Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochemica* 2004; 106: 353-362.
 - 20- Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the Mouse placenta. *Developmental Biology* 2007; 304:567-578.
 - 21- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004; 2:59.
 - 22- Stephanou A, Handwerker S. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology* 1995; 136:933-938.
 - 23- Teesalu T, Masson R, Basset P, Blasi F, Talarico D. Expression of matriks metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Developmental Dynamics* 1999; 214: 248-258.
 - 24- Tremblay GB, Kunath T, Bergeron D, Lapointe L, Champigny C, Bader JA, Rossant J, Giguere V. Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev* 2001; 15: 833–838.
 - 25- Uchide K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 851-855.
 - 26- Ulug U, Goldman S, Ben-Shlomo I, Shalev E. Matrix metalloproteinase (MMP)- 2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F2 α and indomethacin. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 1187-1193.
 - 27- Walter I, Schönkypl S. Extracellular matrix components and matrix degrading enzymes in the feline placenta during gestation. *Placenta* 2006; 27: 291-306.
 - 28- Weiss A, Goldman S, Shlomo IB, Eyali V, Leibovitz S, Shalev E. Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 inhibition by N-acetylcysteine in the human term decidua and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1758-1763.
 - 29- Winterhager E, Reuss B, Hellmann P, Spray DC, Gruemmer R. Gap junctionand tissue invasion: A comparison of tumorigenesis and pregnancy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 1996; 23: 1058-1061.
 - 30- Xu P, Alfaidy N, Challis JRG. Expression of matriks metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87: 1353-1361.
 - 31- Xu P, Wang Y, Zhu S, Luo S, Piao Y, Zhuang K. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, Tissue Inhibitors of metalloproteinase-1, and Matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 988-994.
 - 32- Yan J, Tanaka S, Oda M, Makino T, Ohgane J, Shiota K. Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. *Developmental Biology* 2001; 235: 422-432.