

# Mehanizam djelovanja progesterona u implantaciji embrija tijekom rane trudnoće u miševa

---

Šućurović, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:570565>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Sandra Šučurović

**MEHANIZAM DJELOVANJA  
PROGESTERONA U IMPLANTACIJI  
EMBRIJA TIJEKOM RANE TRUDNOĆE U  
MIŠEVA**

Doktorski rad

Rijeka, 2017.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Sandra Šučurović

**MEHANIZAM DJELOVANJA  
PROGESTERONA U IMPLANTACIJI  
EMBRIJA TIJEKOM RANE TRUDNOĆE U  
MIŠEVA**

Doktorski rad

Mentor: Prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević

Rijeka, 2017.



UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF MEDICINE

Sandra Šučurović

**MECHANISM OF PROGESTERONE  
ACTION IN EMBRYO IMPLANTATION  
DURING EARLY PREGNANCY IN MICE**

Doctoral thesis

Mentor: Prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević

Rijeka, 2017.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević

Doktorski rad obranjen je dana 25. rujna 2017. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac
2. Prof. dr. sc. Hrvoje Vrčić
3. Prof. dr. sc. Siniša Volarević
4. Prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević

Rad ima 148 listova.

UDK: 577.175.632:612.631.08(043.3)

## **PREDGOVOR**

Rad je izrađen na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su izvršena u sklopu projekata: “The role of progesterone in reproductive and non-reproductive tissues” (3432); pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost; “Uloga progesterona u reproduktivnim i nereproduktivnim organima” (808.10.1108) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević, financiranog od strane Sveučilišta u Rijeci i “Reprodukcijske i imunološke funkcije progesterona” (062-0620402-0381) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević, financiranog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

## ZAHVALE

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. Biserki Mulac-Jeričević na vodstvu, prenesenom znanju, korisnim savjetima, konstruktivnim kritikama, usmjeravanju ka znanstvenom razmišljanju i velikom strpljenju i pomoći koje je ugradila u izradu ovog rada.

Veliko hvala prof. Janu Brosensu na pruženoj prilici za rad u njegovoj grupi i nesebičnoj pomoći kojom je olakšao moj znanstveni put.

Hvala mojim „cimerima“, Tamari, Marinu i Tanji, na pomoći i potpori, kao i na veselom i vedrom radnom okruženju.

Zahvaljujem dragim prijateljima i kolegama sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju, čije su dosjetke i pošalice olakšale ponekad tmurne dane u laboratoriju, posebno Tatjani, Tihani, Ljerki, Hrvoju i Kristini.

Svim profesorima i novacima Zavoda za fiziologiju i imunologiju, kao i Tatjani Daki, Tihani Vujnović, Kseniji Tulić, Jeleni Đirlić, Mirjani Jotanović, Igoru Štimcu, Nini, Maji i kolegama s drugih zavoda Medicinskog fakulteta veliko hvala na pomoći tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojim prijateljima, posebno Ana-Mariji, Janji i mojim Molecoolicama.

Iskreno hvala mojoj obitelji i Filipu na strpljenju, bezgraničnoj podršci i razumijevanju.

Hvala Vam

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Implantacija razvojno kompetentnog embrija u receptivan uterus je ključan proces tijekom uspostavljanja trudnoće u sisavaca. Prema današnjim saznanjima smatra se da je nepravilna implantacija uzrok 75 % neuspjelih trudnoća. Aktivnost steroidnih hormona, estrogena (E) i progesterona (P), preko njihovih jezgrinih receptora je ključna za proces implantacije. Mehanizam djelovanja E-a, a pogotovo P-a tijekom rane trudnoće još nije dovoljno razjašnjen. Glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu progesteronskog receptora (PR) u mehanizmu implantacije blastociste *in vivo*. Ispitala sam: 1. vremenski i prostorni odnos između PR-a i njime reguliranih gena: Hand2 i Cox2 te ER i FGF9 u uterusu miša tijekom peri-implantacijskog razdoblja, 2. prostorne promjene izražaja PR-om reguliranih gena tijekom implantacije, 3. promjene izražaja Hand2, Cox2, FGF9 i PR gena u implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto i 4. regulaciju izražaja Hand2 i FGF9 s P-om i E-om u ovarijektomiziranim mišicama.

**Materijali i metode:** Kao model za istraživanje mehanizama uključenih u trudnoću koristila sam BALB/c miševе. Metodom imunofluorescencije na rezovima tkiva odredila sam prostorni i vremenski raspored PR-a, ER $\alpha$ , COX2, HAND2 i FGF9, kao i njihov međusobni odnos tijekom rane trudnoće. Metodu lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR) koristila sam za određivanje izražaja Hand2 i FGF9 gena tijekom rane trudnoće. Razliku izražaja P-om reguliranih gena na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto sam odredila RT-PCR metodom. Promjene izražaja bjelančevina Hand2 i FGF9 tijekom rane trudnoće odredila sam western blot metodom. Da bi odredila regulaciju izražaja Hand2 i FGF9 u uterusu koristila sam ovarijektomizirane WT mišice tretirane steroidnim hormonima. Ulogu PR izoformi u izražaju Hand2 u uterusu odredila sam koristeći ovarijektomizirane PRAKO i PRKO mišice tretirane egzogenim E-om i P-om.

**Rezultati:** Tijekom peri-implantacijskog razdoblja dinamika izražaja i odnos PR-a i njime reguliranih gena, Hand2, COX2, ER $\alpha$  i FGF9 mijenja se tijekom procesa rane trudnoće u miševa i strogo je stanično specifičan. Transkripcijska aktivnost PR-a je neophodna za izražaj Hand2 i Cox2 u specifičnoj populaciji stromalnih stanica na implantacijskom mjestu. Na implantacijskom mjestu izražaj Hand2 i COX2 je značajno povećan u usporedbi s ne-implantacijskim mjestom. Izražaj Hand2 u uterusu je ovisan o PR-A izoformi. Transkripcijska aktivnosti ER $\alpha$  na implantacijskom

mjestu je utišana. Ovim istraživanjem je po prvi puta pokazano da je FGF9 važan čimbenik u uspostavljanju komunikacije između kompetentne blastociste i receptivnog uterusa.

**Zaključak:** Precizno usklađeni mehanizmi koje reguliraju P i E, preko PR-a i ER $\alpha$  su ključni za stvaranje pogodnog okoliša za implantaciju embrija. Transkripcijski čimbenici, PR-a i Hand2 zajedno potiču diferencijaciju stromalnih stanica na mjestu implantacije. Ta populacija stanica je mjesto biosinteze prostaglandina. Prostaglandini su medijatori angiogeneze i decidualizacije u uterusu. Čimbenik rasta, FGF9 je važan za proces implantacije i uspostavljanje trudnoće u miša.

**Ključne riječi:** Implantacija; Progesteron; Progesteronski receptor; Trudnoća.

## SUMMARY

**Aim of the study:** Implantation of a developmentally competent embryo in a receptive uterus is an essential process during the establishment of pregnancy in mammals. Based on the current knowledge, it is assumed that improper implantation is the cause of 75% of failed pregnancies. Synchronized activity of steroid hormones estrogen (E) and progesterone (P) through their nuclear receptors is the key for successful pregnancy. Mechanisms of E and particularly P-regulated pathways during implantation still need to be clarified. The aim of this research was to determine progesterone receptor's (PR) role in the establishment of pregnancy *in vivo* using a mouse model organism. I investigated: 1. spatiotemporal relationship between PR and its targets: Hand2, COX2, ER and FGF9 during the peri-implantation period; 2. spatial changes in the expression of PR-regulated genes during implantation; 3. changes in expression of Hand2, COX2, FGF9 and PR genes at the implantation site in relation to the non-implantation site and 4. steroid hormone regulation of Hand2 and FGF9 expression.

**Material and methods:** For these studies BALB/c mice were used. Immunofluorescence analyses of uterus tissue obtained from pregnant mice were used to study the spatiotemporal relationship between PR and PR-regulated genes during peri-implantation. Changes in the expression of PR regulated genes at the implantation site in relation to the non-implantation site were analyzed by using immunofluorescence on uterus tissue, as well as using quantitative real time-PCR (RT-PCR). Differences in Hand2 and FGF9 gene and protein expression during peri-implantation were determined by using RT-PCR as well as by western blot. To study the regulation of Hand2 and FGF9 gene expression by steroid hormones in the uterus, ovariectomized WT mice were hormonally treated. The role of PR isoforms in Hand2 expression was studied by using E and P treated ovariectomized PRAKO and PRKO mice.

**Results:** During peri-implantation period the expression of PR and PR regulated genes Hand2, COX2, ER $\alpha$  and FGF9 dynamically changes in the uterus and is highly cell specific. Transcriptional activity of PR is necessary for the expression of Hand2 and COX2 in the specific population of the stromal cells at the implantation site. At the implantation site the expression of Hand2 and Cox2 was significantly higher in comparison to the non-implantation site. The expression of Hand2 is regulated by the

PR-A isoform in endometrium. Transcriptional activity of ER $\alpha$  is downregulated at the implantation site. For the first time, this study showed that FGF9 is an important factor for the establishment of communication between a competent blastocyst and a receptive uterus.

**Conclusion:** Balance in P and E regulated activity, throughout their cognate receptors is crucial to establish a suitable environment for embryo implantation in mice. The interaction of transcription factors PR and Hand2 is necessary for differentiation of specific stromal cells at the site of implantation. In these cells PR and Hand2 stimulate production of prostaglandins, which are the key mediators of angiogenesis and decidualization in the uterus. Growth factor FGF9 is an important factor for implantation and the establishment of pregnancy in the mice.

**Key words:** Implantation; Pregnancy; Progesterone; Progesterone receptor.



## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED ISTRAŽIVANOG PODRUČJA .....	1
1.1. Trudnoća .....	2
1.1.1. Reprodukcijski ciklus.....	5
1.2. Implantacija .....	7
1.2.1. Apozicija.....	8
1.2.2. Adhezija .....	8
1.2.3. Invazija.....	9
1.2.4. Uloga citokina u adheziji blastociste.....	10
1.2.5. Regulacija implantacije steroidnim hormonima .....	11
1.3. Decidualizacija .....	12
1.3.1. Imunološke stanice kao posrednici decidualizacije .....	13
1.3.2. Regulacija decidualizacije steroidnim hormonima.....	14
1.4. Receptori steroidnih hormona .....	16
1.4.1. Modularna struktura receptora .....	16
1.4.2. Regulacija genskog izražaja steroidnim hormonima .....	17
1.5. Estrogenski receptor .....	18
1.5.1. Proliferacija uterusa pod djelovanjem E-a.....	19
1.5.2. Čimbenici rasta fibroblasta.....	20
1.6. Progesteronski receptor .....	21
1.7. Geni regulirani P-om tijekom rane trudnoće .....	23
1.7.1. Morfogeni .....	23
1.7.1.1. Indian Hedgehog.....	23
1.7.1.2. Koštana morfogenetska bjelančevina 2 (BMP2).....	24
1.7.2. Transkripcijski čimbenici .....	24
1.7.2.1. Transkripcijski čimbenik Hoxa10.....	25
1.7.2.2. Transkripcijski čimbenik Hoxa11.....	25
1.7.2.3. Transkripcijski čimbenik Hand2 .....	25
1.7.3. Lipidni medijatori implantacije .....	26
1.8. Antiproliferacijski učinak progesterona .....	27
1.8.1. Obitelj transkripcijskih čimbenika Hand .....	27
1.8.2. Antiproliferacijski učinak P-a na LE posredovan s Hand2.....	27
1.9. Uloga P-a u krvožilnoj propusnosti .....	29
1.9.1. Prostaglandini .....	29
1.9.2. Uloga ciklooksigenaza u trudnoći.....	31

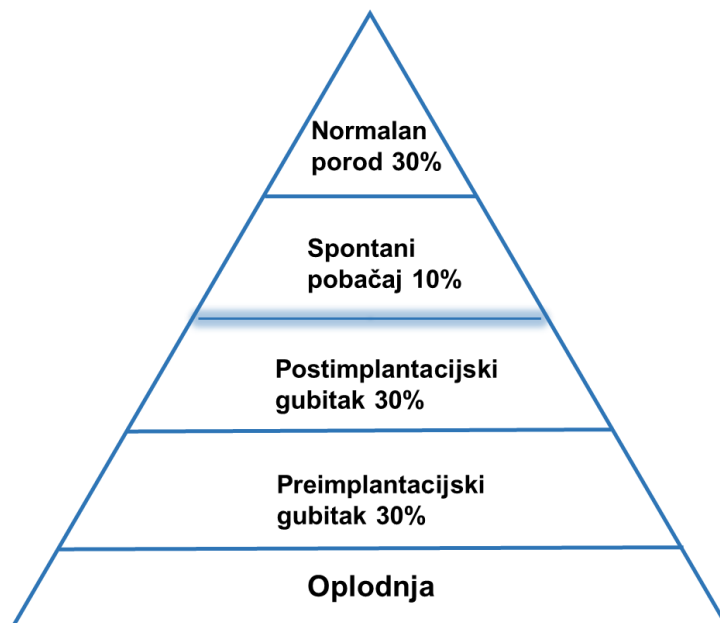
1.9.3. Uloga PG-a u povećanoj krvožilnoj propusnosti i angiogenezi tijekom implantacije .....	32
1.9.4. Uloga PG-a u decidualizaciji .....	33
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	34
3. MATERIJALI I METODE.....	35
3.1 Materijali .....	35
3.1.1. Kemikalije.....	35
3.1.2. Otopine i puferi.....	37
3.1.3. Laboratorijski uređaji, pribor i posuđe .....	39
3.1.4. Početnice za genotipizaciju miševa.....	41
3.1.5. Početnice za određivanje izražaja specifičnih molekula gRNA .....	41
3.1.6. Protutijela za imunofluorescentnu analizu tkiva.....	42
3.1.6.1. Primarna protutijela.....	42
3.1.6.2. Sekundarna protutijela .....	43
3.1.7. Protutijela za analizu izražaja bjelančevina western blot metodom.....	44
3.1.7.1. Primarna protutijela.....	44
3.1.7.2. Sekundarna protutijela .....	44
3.1.8. Laboratorijske životinje.....	44
3.1.8.1. PRKO – heterozigotni miševi (PR+/-) .....	45
3.1.8.2. PRAKO – heterozigotni miševi (PR-A <sup>+/-</sup> ).....	45
3.1.8.3. Pokusni miševi .....	45
3.1.8.4. Mišice za praćenje trudnoće .....	46
3.1.8.5. Mišice za istraživanje PR-om reguliranih gena .....	46
3.2. Metode .....	47
3.2.1. Izolacija genomske DNA i genotipizacija odraslih miševa.....	47
3.2.1.1 Izolacija genomske DNA.....	47
3.2.1.2. Genotipizacija odraslih miševa .....	47
3.2.2. Imunofluorescencija na parafinskim rezovima tkiva .....	49
3.2.3. Određivanje proliferacije stanica .....	50
3.2.4. Izolacija ukupne RNA i dokazivanje gRNA.....	50
3.2.5. Izolacija ukupnih bjelančevina.....	52
3.2.6. Western blot .....	52
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	53
4. REZULTATI .....	54
4.1. Histološke promjene uterusa tijekom rane trudnoće.....	54
4.2. Vremenski i prostorni izražaj PR-a tijekom rane trudnoće.....	55

4.2.1. Izražaj PR-a raste u stromalnim stanicama uterusa do i za vrijeme implantacije .....	55
4.2.2. Progesteronski receptor (PR) je aktivan u decidualnim stanicama .....	56
4.2.3. Prostorni raspored PR-a je različit na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	58
4.2.4. Razina izražaja PR-a se ne mijena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	59
4.3. Vremenski i prostorni izražaj ER $\alpha$ tijekom rane trudnoće .....	60
4.3.1. Izražaj ER $\alpha$ u stanicama LE-a opada za vrijeme implantacije.....	60
4.3.2. Procesom decidualizacije dolazi do smanjenja izražaja ER $\alpha$ u uterusu ...	61
4.3.4. Na mjestu implantacije blastociste ER $\alpha$ je prisutan u citoplazmi stanica LE-a .....	63
4.4. Vremenski i prostorni izražaj progesteronom reguliranih gena tijekom rane trudnoće .....	64
4.4.1. Izražaj Hand2 tijekom rane trudnoće.....	64
4.4.1.1. Tijekom rane trudnoće Hand2 je prisutan u jezgrama stromalnih stanica .....	64
4.4.1.2. Decidualne stanice izražavaju Hand2 .....	66
4.4.1.3. Progesteronski receptor (PR) i Hand2 kolokaliziraju tijekom peri-implantacije.....	67
4.4.1.4. Na mjestu implantacije ER $\alpha$ nije prisutan u stanicama koje izražavaju Hand2 .....	69
4.4.1.5. Izražaj Hand2 gena i bjelančevine raste tijekom implantacije i decidualizacije .....	70
4.4.1.6. Prostorni raspored Hand2 se ne mijenja na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.....	72
4.4.1.7. Razina izražaja Hand2 gena je značajno viša na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	72
4.4.1.8. Antiproliferacijski učinak Hand2 u diferenciranim stromalnim stanicama .....	74
4.4.1.9. Estrogen smanjuje izražaj Hand2 u mišicama tretiranim hormonima.	76
4.4.1.10. Izražaj Hand2 u uterusu je reguliran preko PR-A.....	79
4.4.1.11. Hand2 je supstrat za PKA tijekom rane trudnoće.....	80
4.4.1.12. Hand2 nije supstrat za Akt tijekom rane trudnoće.....	82
4.4.2. Izražaj COX2 tijekom rane trudnoće .....	84
4.4.2.1. Na mjestu implantacije COX2 je prisutan u maloj populaciji stromalnih stanica .....	84
4.4.2.2. Promjena raspodjele COX2 s antimezoetrijalnog pola uterusa na mezometrijalni pol uterusa .....	85

4.4.2.3. Na mjestu implantacije COX2 je prisutan u citoplazmi stromalnih stanica .....	87
4.4.2.4. Razina izražaja Cox2 gena je značajno viša na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	87
4.4.2.5. Na mjestu implantacije blastociste PR pozitivne stanice izražavaju i COX2 .....	88
4.4.2.6. Kolokalizacija Hand2 i COX2 tijekom peri-implantacije .....	89
4.5. Vremenski i prostorni izražaj estrogenom reguliranih gena tijekom rane trudnoće .....	91
4.5.1. Izražaj FGF9 tijekom rane trudnoće .....	91
4.5.1.1. Izražaj Fgf2 i Fgf9 je diferencijalno reguliran u uterusu tijekom peri-implantacije .....	91
4.5.1.2. Prostorni i vremenski izražaj FGF9 tijekom peri-implantacije .....	92
4.5.1.3. Izražaj FGF9 bjelančevine je povećan tijekom 4,5 dana trudnoće .....	94
4.5.1.4. Estrogen regulira izražaj 25 kDa izoforme FGF9 bjelančevine u uterusu miša .....	95
4.5.1.5. Regulacija izražaja FGF9 je različita na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	95
4.5.1.6. Prostorni raspored FGF9 se ne mijenja na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	97
4.5.1.7. Razina izražaja FGF9 se ne mijenja na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto .....	98
4.5.1.8. Izražaj FGF9 na mjestu implantacije je reguliran s prostaglandinima .....	99
4.5.1.9. Na mjestu implantacije FGF9 se nalazi u malim novostvorenim krvnim žilama .....	100
4.5.1.10. Međudjelovanje FGF9 i njegovog receptora FGFR2 je ključno za pravilno pričvršćivanje blastociste za LE tijekom implantacije u miša .....	101
5. RASPRAVA .....	102
6. ZAKLJUČCI .....	115
7. LITERATURA .....	116
ILUSTRACIJE .....	139
Popis slika .....	139
Popis tablica .....	142
ŽIVOTOPIS .....	143

## 1. UVOD I PREGLED ISTRAŽIVANOG PODRUČJA

Vjerojatnost začeća po menstrualnom ciklusu je manja od 30 %, dok je 75 % neuspjelih trudnoća posljedica neuspjele implantacije [161]. Pobačaj je najčešća poznata komplikacija trudnoće. Poznato je da 30 % embrija propadne prije same implantacije (pre-implantacijski gubitak), a ostalih 30 % prije šestog tjedna gestacije (pre-klinički/biokemijski gubitak trudnoće) (Slika 1) [137, 189]. Više od 10 % kliničkih trudnoća završi pobačajem, uglavnom prije 12. tjedna trudnoće. Također, 1-2 % parova ima problem s rekurentnim gubitkom trudnoće (RPL, prema engl. recurrent pregnancy loss), koji je definiran kao tri ili više uzastopnih neuspjelih trudnoća [179, 189]. Obzirom na sve veći broj neuspješnih pokušaja začeća kod parova kao i postotak neuspjelih trudnoća, neplodnost postaje sve veći sociološki i ekonomski problem u svijetu [28].



**Slika 1. Statistička analiza propalih embrija nakon oplodnje.**  
(prilagođeno prema [226]).

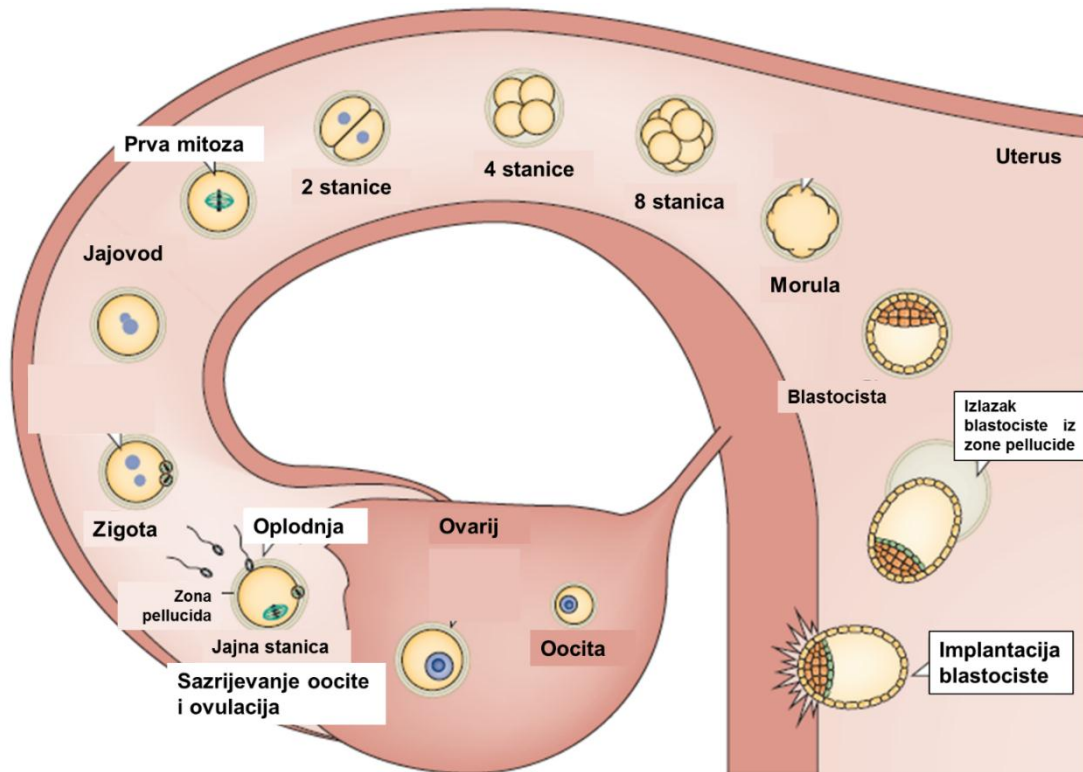
## 1.1.Trudnoća

Trudnoća je složen, visoko reguliran, ireverzibilan proces koji uključuje implantaciju, decidualizaciju, placentaciju i porođaj. Hijerarhijski pravilna uspostava svakog od ovih procesa je ključna za uspostavljanje i održavanje trudnoće [28]. Ti su događaji precizno regulirani majčnim hormonima estrogenom (E) i progesteronom (P), ali i lokalno stvorenim signalnim molekulama poput citokina, čimbenika rasta, lipidnih posrednika i gena važnih za morfogenezu [37, 230].

Trudnoća započinje procesom oplodnje jajne stanice spermijem, koji se odvija u proširenom dijelu jajovoda, 24 do 48 sati nakon ovulacije. Početni stadij razvoja, od oplođene zigote do stadija morule (nakupina od 12 do 16 stanica), odvija se prilikom prolaska zigote kroz jajovod unutar zone pellucide. Tri do četiri dana nakon oplodnje, morula ulazi u šupljinu maternice (uterusa), gdje diferencijacijom stanica prelazi u stadij blastociste [161]. Procijenjeno je da samo 20% ljudskih embrija dostigne ovaj stupanj razvoja. Za one embrije koji dođu do te faze počinje aktivacija genoma koja je neophodna za uspješnu implantaciju [25, 162]. Diferencijaciju stanica prati preobrazba površinskih stanica u stanice trofoblata i pretvorba unutarnje stanične mase (ICM, prema engl. inner cell mass) u embrij. Unutar 72 sata nakon ulaska morule u šupljinu maternice dolazi do iščezavanja zone pellucide uz izlaganje vanjskog sloja trofoblata, što omogućuje implantaciju blastociste [161] (Slika 2). Odgovor endometrija na implantaciju je transformacija endometrijskih stromalnih fibroblata u sekrecijske, decidualne stanice. U ljudi, ovaj proces započinje u srednjoj luteinskoj fazi svakog menstrualnog ciklusa, neovisno o trudnoći, dok u vrsta koje nemaju menstruaciju decidualizacija započinje tijekom trudnoće [20, 63].

Decidualizacija osigurava uvjete preživljavanja embrija prije uspostavljanja zrele posteljice, regulaciju invazije trofoblata, poticanje vaskularizacije te djeluje kao barijera protiv majčinog imunskog odgovora na semialogenični embrij [57]. Do 10. dana nakon oplodnje blastocista je potpuno uklopljena u stromalno tkivo, majčin epitel je prekrrio mjesto implantacije, a jednostanični citotroblast izlazi iz trofoblastnog sloja [161, 171]. Naposljetku, citotroblast prodire kroz cijeli endometrij i jednu trećinu miometrija (intersticijski prodor), što prati i prodor krvnih žila uterusa (krvožilni prodor) [170]. Taj proces, s uspostavljenom uteroplacentarnom cirkulacijom, dovodi trofoblast u direktni kontakt s majčinom krvlju [171]. Ljudska posteljica je hemokorionskog tipa i trofoblast resica posteljice u izravnom je dodiru s

majčinom krvlju. Razvoj posteljice u žena obuhvaća procese: stvaranje blastociste i njenu implantaciju, diferencijaciju trofoblasta, razvoj korionskih resica, prodor trofoblasta u krvne žile endometrija i angiogenezu posteljice [60].



**Slika 2. Shematski prikaz procesa oplodnje jajne stanice do implantacije blastociste u ženu.**

Nakon oplodnje u proširenom dijelu jajovoda, zigota prolazi kroz nekoliko mitoz te četvrtog dana nastaje morula, koja ulazi u šupljinu maternice. Morula diferencijacijom prelazi u blastocistu, koja se oslobađa iz zone pellucide 6-7 dana nakon oplodnje i implantira tijekom 7-10 nakon oplodnje (prilagođeno prema [34]).

Unatoč velikom napretku u poznavanju i razumijevanju molekulskih procesa i čimbenika koji u ljudi omogućuju normalnu plodnost, kao i napretku tehnika potpomognute oplodnje, uspješna implantacija, razvoj, održavanje i završetak normalne trudnoće i dalje su rijetki događaji. Nepravilan slijed molekulskih događaja tijekom implantacije prouzroči 75% izgubljenih trudnoća. Slaba kvaliteta embrija ili nemogućnost uspostavljanja pravilne receptivnosti uterusa samo su neki od čimbenika koji smanjuju uspjeh implantacije [22, 28]. Etička pitanja kao i nedostatak odgovarajućih metoda istraživanja su čimbenici koji ograničavaju istraživanja neplodnosti [28]. Molekularni mehanizmi koji dovode do uspostavljanja i održavanja trudnoće kod čovjeka su slični onima u miševa. Do sada poznati ključni regulatori implantacije su primarno otkriveni pomoću mišjih genetskih modela. [240].

Miševi su dobar model za praćenje uspostavljanja i održavanja trudnoće zbog svog brzog reprodukcijuskog ciklusa. U miševa je ciklus estrusa kratak, u prosjeku 4 dana, a gestacija traje približno 21 dan [132]. Miš se pokazao kao dobar model proučavanja implantacije zbog zajedničkih karakteristika sa čovjekom: mišji i ljudski embriji se mogu razvijati *in vitro* u jednostavnom mediju. U obje vrste implantacija blastociste dovodi do decidualizacije stromalnih stanica. Embrij se u pravilu usađuje na antimezometrijalnom polu uterusa. Također, u obje vrste placencija je hemokorijalna [240].

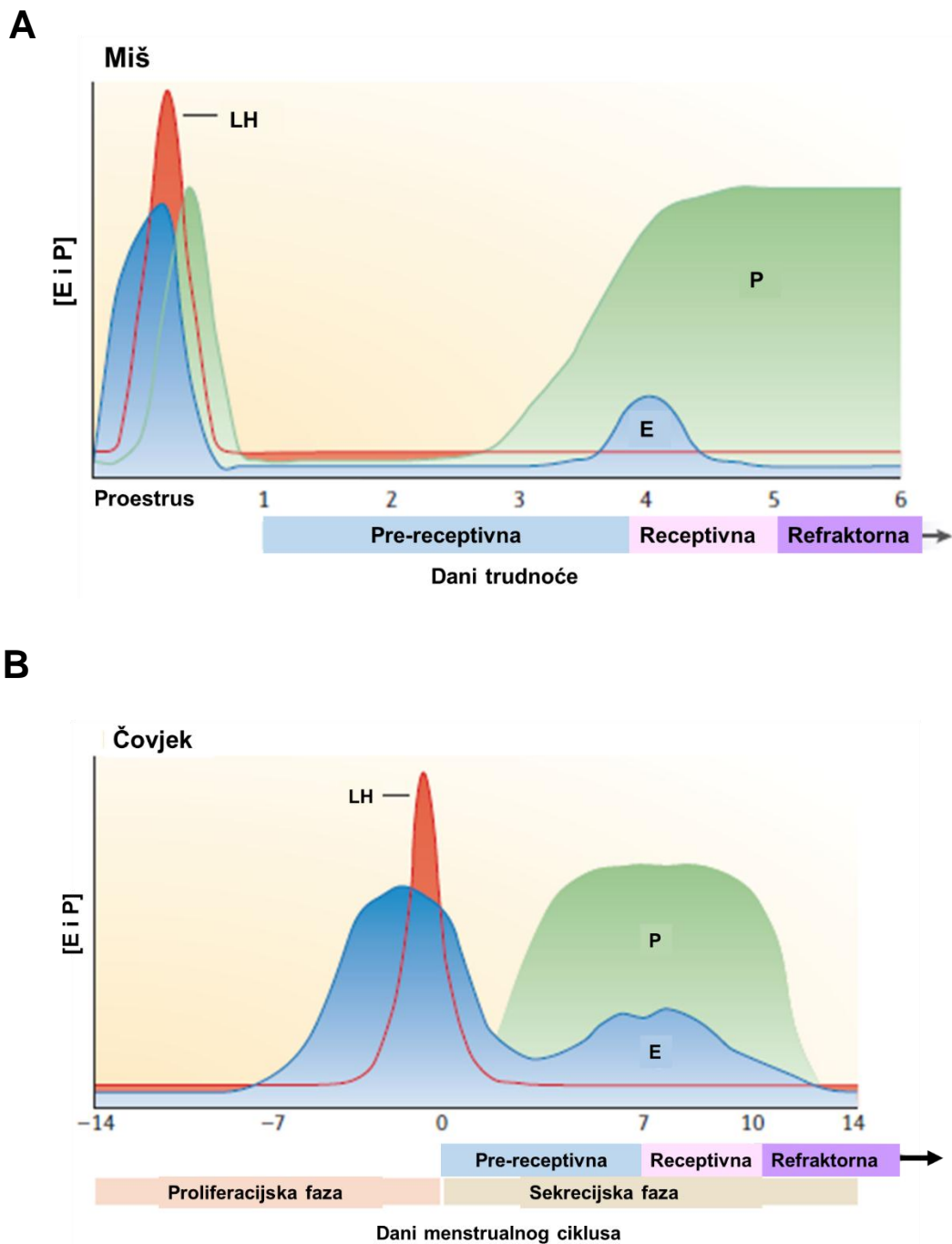
U miševa i ljudi, osim gore navedenih karakteristika, glavni regulatori uspostavljanja receptivnosti uterusa kao i održavanja trudnoće su steroidni hormoni E i P [28]. Ta dva hormona svoju fiziološku funkciju izvršavaju preko svojih jezgrinih receptora, estrogenskog receptora (ER) i progesteronskog receptora (PR), koji su ujedno i transkripcijski čimbenici. Receptori steroidnih hormona su evolucijski visoko očuvani kroz različite vrste [223]. Homologija između ljudskog i mišjeg gena za PR iznosi 99% [194], dok za ER iznosi 88% [244]. Također, zbog mogućnosti genetičkih modifikacija u miševima, potpunom ablacijom ovih receptora pokazano je da su oni regulatori svakog aspekta ženske reprodukcije [240].



### 1.1.1. Reprodukcijski ciklus

Menstrualni ciklus kod žene, odnosno estrus u miševa, uključuje sinkroniziranu proizvodnju ovarijskih steroidnih hormona, E-a i P-a, koji potiču morfološku i funkcionalnu pripremu endometrija za implantaciju embrija i uspostavu trudnoće [147] [240]. Tijekom ciklusa uterus je histološki i funkcijski podijeljen u proliferativnu (folikularnu) i sekrecijsku (luteinsku) fazu. Tijekom luteinske faze, prvenstveno pod utjecajem P-a, proliferacijski endometrij se mijenja u sekrecijski, što prati razvoj pojačanog krvožilnog spleta koji se sastoji od spiralnih arterija. Za uspješnu implantaciju kod sisavaca je neophodna pravilno uspostavljena dvosmjerna komunikacija između kompetentne blastociste i receptivnog uterusa. Ukoliko do nje ne dođe, na staničnoj i molekularnoj razini, embrij se neće usaditi [22, 240]. Ako ne dođe do implantacije, vremenska regresija i razaranje potpuno razvijenog endometrija kod žena dovodi do menstruacije. Međutim, ako do implantacije dođe, endometrij nastavlja rasti i prolazi kroz daljnje morfološke i molekularne promjene koje osiguravaju okoliš pogodan za razvoj embrija [213].

Tijekom sekrecijske faze, sposobnost uterusa za implantaciju kompetentne blastocite je podijeljena u tri faze: pre-receptivnu, receptivnu i refraktornu fazu (Slika 3). Tijekom pre-receptivne faze (kod žena prvih 7 dana nakon ovulacije – rana luteinska faza; kod mišica 1-3 dana nakon oplodnje), uterus osigurava fiziološki okoliš pogodan za razvoj blastociste spremne za implantaciju. Tijekom receptivne faze (kod žena 7-10 dana nakon ovulacije – srednja luteinska faza; kod mišica 4. dan nakon oplodnje) nastali endokrini uvjeti potiču u uterusu implantaciju kompetentne blastociste. Međutim, u slijedećoj fazi uterus postaje refraktoran okoliš za preživljavanje ne-implantirane blastociste (kod žena od završetka receptivne faze do kraja menstrualnog ciklusa - kasna luteinska faza; kod mišica od 5. dana trudnoće nadalje) [22, 28]. Prolazni porast razine E-a neposredno prije receptivne faze je neophodan za pravilnu implantaciju kod miševa [28, 145] dok, kod čovjeka i primata, uloga povećanja razine E-a tijekom srednje luteinske faze još nije razjašnjena [28, 79]. Razdoblje od oplodnje pa do završetka decidualizacije u miševa označava se kao peri-implantacijsko razdoblje (0,5 – 7,5 dana trudnoće) [240].



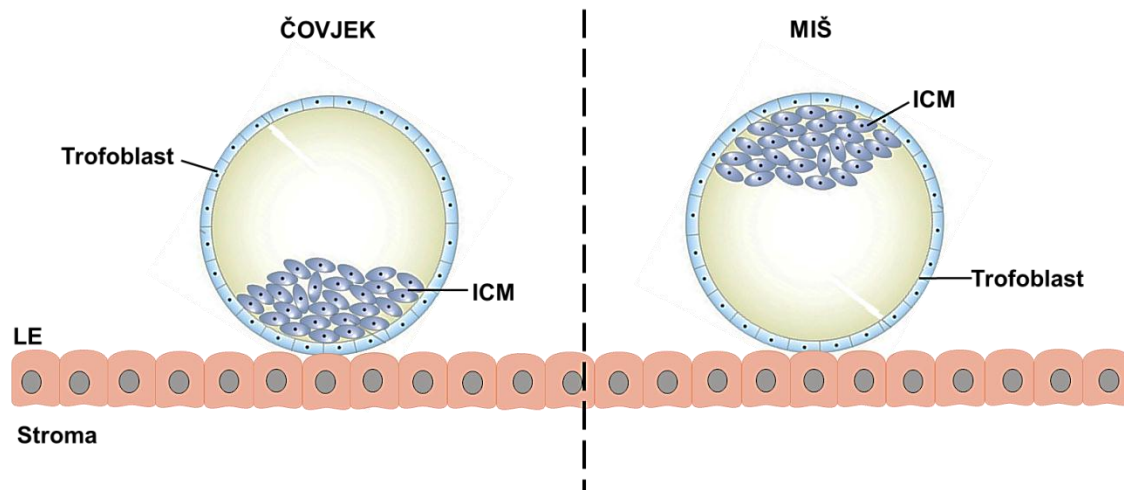
**Slika 3. Koncentracija steroidnih hormona E-a i P-a tijekom peri-implantacije.**

**(A)** U miša koncentracija oba hormona pada nakon oplodnje sve do trećeg dana trudnoće, kada dolazi do porasta P-a, a prolazni porast E-a događa se četvrtog dana trudnoće u receptivnoj fazi i neophodan je za pravilnu implantaciju. **(B)** U čovjeka nakon oplodnje pada razina E-a, dok razina P-a, čiji je izvor žuto tijelo ostaje visoka tijekom cijele sekrecijske faze, dok razina E-a poraste za vrijeme receptivne faze. E – estrogen, LH – luteinizacijski hormon, P – progesteron (prilagođeno prema [240]).

## 1.2. Implantacija

Receptivnost uterusa je fiziološko stanje kada endometrij omogućuje pričvršćenje blastociste, njeno čvrsto prianjanje, penetraciju i poticanje lokaliziranih promjena u stromi endometrija koje omogućavaju uspostavljanje trudnoće [213]. U mnogih sisavaca prva značajka implantacije blastociste je lokalno povećana krvožilna propusnost koja se očituje kao edem strome na mjestu implantacije. Upravo ta krvožilna promjena je važan čimbenik u uspostavljanju receptivnosti endometrija [195]. Prolazno razdoblje kad je uterus spreman za implantaciju označava se pojmom implantacijski prozor (prema engl. window of implantation) [57]. U miša se taj trenutak događa četvrtog dana trudnoće, a u žena od 6 do 10 dana nakon ovulacije [14].

Implantacija blastociste uključuje tri faze: apoziciju, adheziju (pričvršćivanje) i invaziju. Tijekom apozicije blastocista se s trofoblastom pričvršćuje za receptivni uterus [57]. Orijentacija blastociste za vrijeme implantacije je različita u miševa i ljudi. U ljudi, blastocista se implantira okrenuta s ICM-om prema luminalnom epitelu (LE) uterusa, dok je u miševa taj dio okrenut prema lumenu uterusa (Slika 4) [26].



**Slika 4. Orijentacija blastociste u odnosu na LE u čovjeka i miša.**

U čovjeka se blastocista implantira okrenuta sa ICM prema LE-u, dok u miša taj dio strši u lumen uterusa. LE – luminalni epitel, ICM – unutarnja stanična masa.

### 1.2.1. Apozicija

Apozicija je početna nestabilna adhezija blastociste za površinu endometrija [56]. Ova faza je histološki popraćena stvaranjem mikro izbočina (pinopoda) na apikalnoj površini epitela (Slika 5). Stvaranje pinopoda je ovisno o P-u, dok E uzrokuje njihovu regresiju [160, 181]. Pinopodi izražavaju kemokine i adhezijske molekule koje privlače plutajuću blastocistu unutar šupljine endometrija i omogućuju njeno pozicioniranje [147]. Važan marker ove faze implantacije je heparin vezujući epidermalni čimbenik rasta (HB-EGF, prema engl. heparin binding epidermal like growth factor), koji je kodiran *Hegf1* genom. Taj čimbenik rasta omogućava parakrino međudjelovanje između blastociste i LE-a uterusa. Nekoliko sati prije pričvršćenja blastociste, HB-EGF je izražen na stanicama LE-a koje okružuju blastocistu [49]. Ovaj čimbenik rasta je izražen u topljivom i transmembranskom obliku. Djeluje kao parakrini i/ili jukstakrini čimbenik na stanice blastociste koje na svojoj površini izražavaju receptore koji pripadaju obitelji receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGF, prema engl. epidermal growth factor) (ErbB1 i/ili ErbB4) [168, 176]. Također je poznato da kompetentna blastocista izražava HB-EGF koji djeluje parakrino na stanice LE-a i time dodatno potiče izražaj svog *Hegf1* gena [88, 167]. Ova pozitivna povratna sprega je prvi poznati primjer molekulskog međudjelovanja između blastociste i uterusa, kojim započinje reakcija pričvršćivanja blastociste za endometrij [104].

### 1.2.2. Adhezija

Adhezija blastociste za LE uterusa ovisi o adhezijskim molekulama. Veliki broj glikoproteina, ugljikohidratnih liganada i njihovih receptora je izraženo na stanicama LE-a uterusa i trofoblastnim stanicama blastociste tijekom implantacijskog prozora (Slika 5). Najvažnije adhezijske molekule koje su uključene u proces adhezije blastociste su integrini, seletini, galektini, kadherini i mucin 1 (Muc1) [26, 240]. Integrini su transmembranski receptori koji prepoznaju i vezuju arginin-glicin-aspartat (RGD) sekvence na izvanstaničnim ligandima kao što su osteopontin (OPN), fibronektin i vitronektin. Mehanizam vezivanja mora uključivati bifunkcionalni ligand koji povezuje integrinske receptore na stanicama trofoblasta i LE-a uterusa [196]. Zasadu najbolje proučen integrin u implantaciji je  $\alpha\beta3$ . Tijekom srednje sekretorne faze ciklusa izražavaju ga stanice LE-a i GE-a što upućuje na njegovu ulogu u

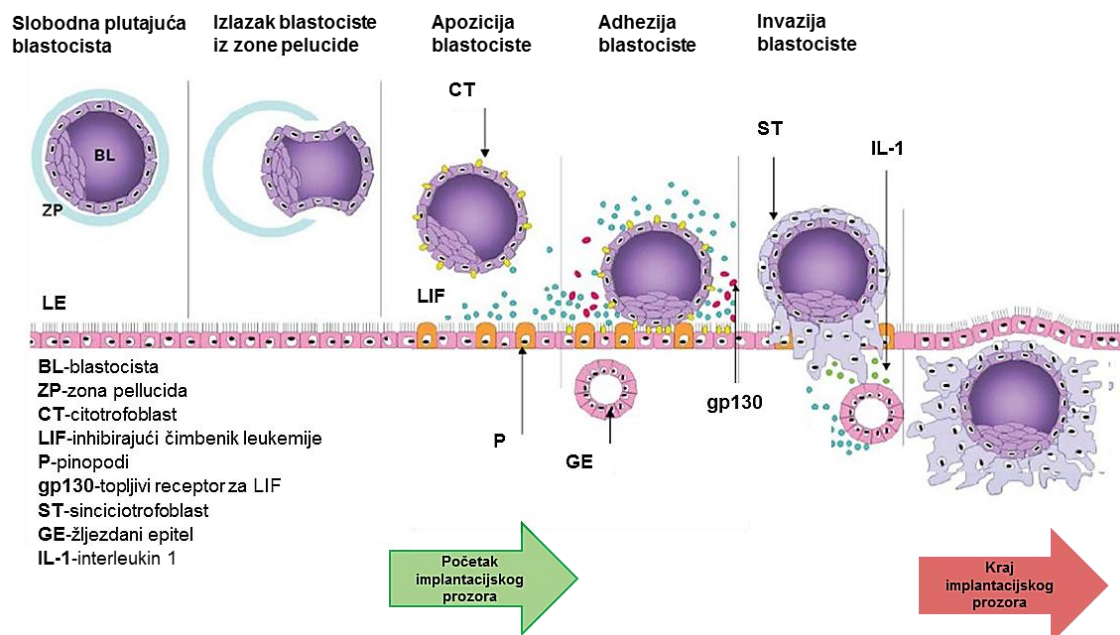
uspostavljanju receptivnosti endometrija [253]. Nadalje, promijenjeni izražaj  $\alpha\beta$  integrina se povezuje sa različitim stanjima koja dovode do neplodnosti u žena, što ukazuje na njihovu ulogu u određivanju mjesta i vremena implantacije [127, 126]. Integrin  $\alpha\beta 3$  prepoznaje RGD sekvencu OPN-a što se smatra važnom interakcijom u adheziji trofoblasta za endometriju tijekom implantacije [243].

Osim integrina, važnu ulogu u adheziji blastociste ima Muc1, glikoprotein koji oblaže epitel uterusa. On čini mukoznu barijeru koja ima zaštitnu ulogu od mikroorganizama i drugih štetnih tvari. Izražen je isključivo na stanicama LE-a, a njegov izražaj reguliran je steroidnim hormonima [26]. U miša, izražaj Muc1 je potaknut E-om, a inhibiran P-om [214]. Nakon oslobađanja jajne stanice i oplodnje, mukozni sloj mora biti uklonjen da bi se omogućila pravilna implantacija. U ranoj trudnoći, izražaj Muc1 je potaknut E-om, ali i rastom razine P-a i PR-a u LE-u uterusa tijekom trećeg dana trudnoće, njegov izražaj opada. Nestanak Muc1 s LE-a označava razdoblje implantacijskog prozora i omogućuje adheziju blastociste [58, 214, 242]. Nasuprot tome, u žena izražaj Muc1 na epitelu endometrija tijekom peri-implantacijskog razdoblja je povećan [95]. Smatra se da je potrebna aktivacija lokalnog mehanizma na mjestu implantacije da dođe do uklanjanja Muc1 s epitela endometrija [228]. Također, izražaj Muc1 gena u LE-u uterusa, i u ljudi i u miša, je različito reguliran ovisno o izoformi PR-a. U ljudi progesteronski receptor B (PR-B) potiče izražaj Muc1, dok ga progesteronski receptor A (PR-A) inhibira. U miševa PR-A je funkcionalni antagonist E-om potaknutog izražaja *Muc1* [18].

### **1.2.3. Invazija**

Karakteristika invazivne implantacije je vezivanje stanica trofoblasta na LE putem adhezijskih glikoproteina, razgradnja izvanstaničnog matriksa uterusa te invazija stanica trofoblasta u stromu uterusa. Razgradnja izvanstaničnog matriksa je posredovana preciznim međudjelovanjem proteaza i njihovih inhibitora [188]. Iako sam mehanizam djelovanja nije otkriven, najznačajnije proteaze u invaziji trofoblasta su metaloproteinaze matriksa (MMP, prema engl. matrix metalloproteinase) i tkivni inhibitori metaloproteinaze matriksa (TIMP, prema engl. tissue inhibitor of metalloproteinase) [254]. Nakon adhezije, trofoblast embrija prodire kroz LE uterusa u stromu da bi uspostavio odnos s majčinim krvožilnim sustavom (Slika 5). Kao odgovor na taj prodor i prisutnost P-a, endometrijske stromalne stanice podliježu

decidualizaciji koja je esencijalna za preživljavanje embrija i daljnjeg napretka trudnoće [83].



**Slika 5. Mehanizam implantacije blastociste.**

Nakon ulaska morule u šupljinu maternice ona diferencira u blastocistu koja se priprema na implantaciju. Prvi događaj je izlazak blastociste iz zone pellucide, zatim njena apozicija naspram luminalnog epitela, gdje je važan citokin LIF. Nakon toga slijedi njena adhezija za LE i invazija stanica trofoblasta kroz luminalni epitel i stromalne stanice. Apozicijom blastociste započinje razdoblje implantacijskog prozora, dok invazijom završava (prilagođeno prema [70]).

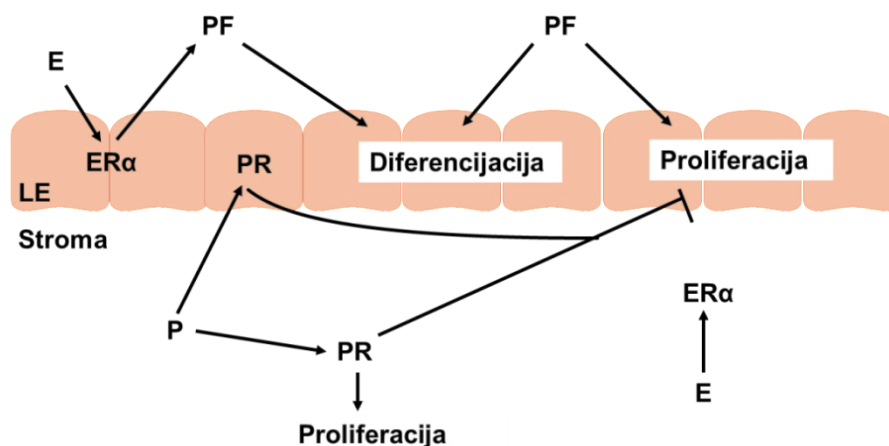
#### 1.2.4. Uloga citokina u adheziji blastociste

Osim adhezijskih molekula koje osiguravaju pričvršćenje blastociste za LE uterusa, citokini imaju važnu ulogu u privlačenju blastociste i njenom usmjeravanju prema mjestu implantacije. Jedan od najbolje proučenih citokina je inhibicijski čimbenik leukemije (LIF, prema engl. leukemia inhibitory factor), koji pripada obitelji citokina, interleukina 6 (IL-6). On regulira mnogobrojne procese prije i za vrijeme implantacije poput transformacije uterusa u receptivno stanje, decidualizaciju, rast i razvoj blastociste, međudjelovanje između embrija i blastociste, invaziju trofoblasta i imunološki odgovor na mjestu implantacije [191]. Svoju biološku funkciju ostvaruje preko svog membranskog receptora LIFR (prema engl. leukemia inhibitory factor receptor) i glikoproteina 130 (gp130) [140]. Implantacija blastociste je onemogućena kod mišica s genetičkom ablacijom *Lif-a* [211], što upućuje da je *Lif* važan čimbenik receptivnosti uterusa. U miševa ujutro, četvrtog dana trudnoće, *Lif* je izražen u stanicama GE-a, a zatim u stromalnim stanicama koje okružuju blastocistu tijekom

faze pričvršćenja [204, 212]. Paralelno s povećanjem izražaja Lif-a, u LE-u i stromi uterusa je povećan izražaj njegovih receptora, LIFR i gp130, tijekom peri-implantacijskog perioda [203]. Osim u miševa, izražaj Lif-a je povećan i kod drugih vrsta tijekom implantacije, uključujući i čovjeka [57].

### 1.2.5. Regulacija implantacije steroidnim hormonima

Receptivnosti endometrija je dinamički, precizno kontroliran molekularni i stanični događaj koji uključuje usklađene efekte autokrinih, parakinih i endokrinih čimbenika. Za implantaciju i održavanje trudnoće je neophodan P, dok potreba za E-om ovisi o vrsti sisavaca [240]. Na modelu miša je otkriveno da je proliferacija LE-a uterusa tijekom pre-receptivne faze pod utjecajem preovulacijskog ovarijskog E-a. Prijelaz uterusa u receptivnu fazu prati pad E-a i porast P-a čiji je izvor žuto tijelo. Porast P-a uzrokuje u LE-u pad razine PR-a i inhibiciju proliferacije stanica, a u stromi porast izražaja PR-a i proliferaciju stromalnih stanica (Slika 6) [235, 252].



**Slika 6. Međudjelovanje E-a i P-a u uspostavljanju receptivnosti uterusa.**

Porast P-a nakon ovulacije uzrokuje porast progesteronskog receptora (PR) u stromi i proliferaciju stromalnih stanica, dok u luminalnom epitelu (LE) dovodi do smanjenog izražaja PR-a i prestanak E-om regulirane proliferacije stanica LE-a u uterusu. To je regulirano parakrinim mehanizmom preko parakrinih faktora čiji je izražaj reguliran PR-om i ERα. E- estrogen; LE – luminalni epitel; ERα – estrogenski receptor α; P – progesteron; PF – parakrini faktor; PR – progesteronski receptor.

Za vrijeme implantacije u miša izražaj ER $\alpha$  je značajno smanjen u LE-u i stromi oko implantacijskog mjesta [219]. Preduvjet za uspješnu implantaciju je P-om izazvana inhibicija proliferacije stanica LE-a uterusa, kao i kratkotrajno povećanje E-a četvrtog dana trudnoće u miša [235, 252]. U ovom peri-implantacijskom razdoblju daljnji tijek trudnoće ovisi o precizno reguliranoj ravnoteži između aktivnosti PR-a i ER-a te pravilnoj orijentaciji embrija [30]. Usklađeno djelovanje ovih receptora uzrokuje prestanak proliferacije i gubitka polarnosti stanica LE-a uterusa koje se počinju diferencirati u funkcionalno zrele površine koja može odgovarati na signale embrija. Uterus postaje spreman za implantaciju te se taj trenutak označava pojmom implantacijski prozor [57].

### **1.3. Decidualizacija**

Decidualizacija endometrija odvija se u svih vrsta čija implantacija uključuje grananje LE-a (adenogeneza) i invaziju trofoblasta u majčino tkivo [77, 180]. Decidualne stanice omogućuju uvjete preživljavanja embrija prije uspostavljanja zrele posteljice, regulaciju invazije trofoblasta, poticanje angiogenze i djeluju kao barijera protiv majčinog imunskog odgovora na semialogenični embrij [57]. U miševa ovaj proces započinje implantacijom embrija, dok u čovjeka decidualizacija započinje odmah nakon ovulacije, a svoj vrhunac doseže u srednjoj luteinskoj fazi menstrualnog ciklusa [75].

Proces decidualizacije je reguliran P-om, ali je neovisan o signalima blastociste [239]. Poticaj za decidualizaciju u glodavaca je sama prisutnost blastociste ili se može postići na umjetan način. Nekoliko vanjskih poticaja poput injiciranja ulja, trauma iglom ili injiciranje kuglica veličine blastociste mogu potaknuti proces decidualizacije u pseudotrudnoj ženki miša ili u hormonski, E-om i P-om, pripremljenom uterusu [56]. Transformacija stromalnih fibroblasta u decidualne stanice prvo se pojavljuje oko zrelih spiralnih arterija površinskog sloja endometrija i nastavlja se tijekom trudnoće i na kraju obuhvaća cijeli endometrij [75]. Decidualne stromalne stanice odmah okružuju blastocistu koja se implantirala i prestaju s proliferacijom te čine primarnu decidualnu zonu (PDZ, prema engl. primary decidual zone) [168, 47]. Stanice oko PDZ-a nastavljaju proliferirati i diferencirati se u poliploidne decidualne stanice koje tvore sekundarnu decidualnu zonu (SDZ, prema engl. secondary decidual zone) [57]. U miša se PDZ formira oko petog dana trudnoće, a do potpunog stvaranja SDZ-a



dolazi sedmog dana trudnoće. Sekundarnu decidualnu zonu karakteriziraju terminalno diferencirane poliploidne decidualne stanice na antimezometrijalnom polu uterusa. Nastanak stanične poliploidije je jedinstveni proces koji zahtijeva prelazak sa mitotičkog staničnog ciklusa na ciklus endoreplikacije pri čemu stanice podliježu DNA replikaciji bez naredne stanične diobe [210]. Fiziološka važnost poliploidnih decidualnih stanica još nije do kraja razjašnjena te se smatra da ona ograničava životni vijek decidualnih stanica kako bi se omogućio rast embrija i osigurali povećani metabolički zahtjevi potrebni za razvoj embrija [47].

Diferencijacija stromalnih stanica u decidualni fenotip, u *in vivo* i u *in vitro* uvjetima, popraćena je specifičnim morfološkim promjenama: zaokruživanjem jezgre, povećanjem broja jezgrića, proširenjem hrapavog endoplazmatskog retikuluma (rER, prema engl. rough endoplasmatic reticulum) i Golgijevog aparata, nakupljanjem glikogena i kapljica lipida u proširenoj citoplazmi [108]. Glavni sekrecijski produkti decidualnih stanica su prolaktin (PRL) i bjelančevina koja veže inzulinu slične čimbenike rasta (IGFB1, prema engl. insulin-like growth factor-binding protein-1). Te dvije bjelančevine se koriste i kao biljezi decidualizacije stromalnih stanica uterusa kod žena [76]. Međutim, diferencirane stromalne stanice endometrija proizvode citokine (npr. interleukin-11, IL-11), kao i čimbenike rasta npr. EGF, HB-EGF, Lefty-A i neuropeptide (npr. somatostatin i grelin). Te novostvorene molekule, autokrinim ili parakrinim mehanizmom, služe za pojačavanje i širenje procesa decidualizacije endometrijem [59, 81, 220].

### **1.3.1. Imunološke stanice kao posrednici decidualizacije**

Za uspostavljanje trudnoće osim autokrinih i parakrinih čimbenika potrebno je međudjelovanje između stromalnih stanica i imunskih stanica uterusa. Leukociti čine veliku staničnu populaciju u decidui tijekom rane trudnoće i u ljudi i u miševa. Većinu populacije leukocita koja se nalazi u uterusu čine uterine prirodno-bilačke (uNK, prema engl. uterine natural killer) stanice [43]. To je specijalizirana subpopulacija stanica NK koje se intenzivno boje na CD56 antigen, ali ne i na CD16 antigen. Smatra se da imaju glavnu ulogu u majčinoj imunološkoj toleranciji. Nakon ovulacije, broj stanica uNK se naglo povećava i čine 30-40 % stanica u stromi uterusa. Populacija stanica uNK ostaje postojana u ranoj decidui, ali u nedostatku začeca, nestaju menstruacijom [44]. Za razliku od ljudskog endometrija, gdje su

stanice uNK prisutne nakon ovulacije, u miša se zrele stanice uNK ne pojavljuju u uterusu prije implantacije [114]. Najčešće se nalaze oko spiralnih arterija blizu žlijezda endometrija i oko ekstraviloznog trofoblasta tijekom rane trudnoće. Citokini koji su kemokini, CXCL10, CXCL14 i trofoblastni CXCL12, ih privlače na mjesto djelovanja [148, 236]. Također, citokini koje proizvode stromalne stanice uterusa, IL-11, IL-15 i IL-33 djeluju na proliferaciju i sazrijevanje stanica uNK [4, 77, 190].

Stanice uNK se u velikoj mjeri razlikuju od perifernih stanica NK zbog svoje smanjene litičke sposobnosti i različitog izražaja receptora. Također, izražavaju drugačije angiogene čimbenike i kemoatraktante koji potencijalno mogu djelovati na preuređenje decidualnog krvožilnog sustava i invaziju trofoblasta [90, 117]. Nedostatak stanica uNK u miša povezan je s nedostatkom decidualnog rasta koji uključuju hipocelularnost, nekrozu i edem [5]. Međutim, glavni nedostaci povezani sa smanjenim brojem stanica uNK primijećeni su u krvožilnom sustavu decidue što upućuje na njihov doprinos u pokretanju krvožilnih promjena koje osiguravaju odgovarajući protok krvi za održavanje decidualizacije [5].

Nedavno istraživanje pokazalo je da gustoća stanica uNK u stromi uterusa je obrnuto proporcionalna s lokalnim izražajem enzima 11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 1 (11 $\beta$ -HSD1), koji katalizira konverziju neaktivnog kortizona u aktivni kortizol [121]. Stanice uNK nemaju PR, ali izražavaju glukokortikoidni receptor (GR), čija aktivnost može biti posredovana i P-om u stanicama uNK [85]. Poznato je da P ima afinitet vezanja za GR, s bržim vremenom vezanja za GR u odnosu na glukokortikoide. Također, P se na GR veže za drugo vezno mjesto nego glukokortikoidi [125, 215]. Može djelovati agonistički odnosno antagonistički, ovisno o vrsti stanica koje izražavaju GR [116].

U žena povećan broj uNK stanica u endometriju tijekom srednje luteinske faze dovodi se u korelaciju s RPL-om. Jedna od terapija u slučaju RPL-a je oralna primjena glukokortikoida koja značajno smanjuju broj uNK stanica tijekom srednje luteinske faze u endometriju [175].

### **1.3.2. Regulacija decidualizacije steroidnim hormonima**

U žena, u *in vivo* uvjetima, decidualizacija površinskog sloja endometrija je vidljiva 10 dana nakon ovulacije i povećanja koncentracije ovarijskog P-a, što upućuje da su potrebni dodatni signali za započinjanje procesa decidualizacije [51]. Sve više

podataka pokazuje da lokalni čimbenici koji povećavaju unutarstanični porast cikličkog adenozin monofosfata (cAMP, prema engl. cyclic adenosine monophosphate) potiču decidualizaciju ljudskih stromalnih stanica [77]. Ljudske stromalne stanice je moguće decidualizirati u staničnoj kulturi i ova istraživanja su značajno doprinjela razumjevanju procesa decidualizacije na molekularnoj razini [50, 77]. Decidualizacija može biti inducirana različitim kombinacijama: 1) E-a i P-a, odnosno progestina (agonističkih sintetskih molekula P-a), 2) čimbenicima koji induciraju stvaranje cAMP-a uz P ili progistine i 3) kombinacijom analoga cAMP-a i P-a ili progestina [17, 21].

Aktivacija signalnog puta cAMP-a je početni i neophodan događaj koji potiče decidualizaciju [76, 227]. Sveprisutni sekundarni glasnik cAMP nastaje iz adenozin trifosfata preko adenilil ciklaze [54]. Glavni nishodno regulirani enzim s cAMP-om je protein kinaza ovisna o c-AMP-u (PKA, prema engl. cAMP dependent protein kinase), koja se sastoji od dvije regulatorne i dvije katalitičke podjedinice [197]. Vezanjem dvije molekule cAMP-a za svaku regulatornu podjedinicu dolazi do konformacijske promjene PKA, što prati oslobađanje i aktivaciju katalitičke domene. Aktivirana PKA fosforilira ciljne bjelančevine u citoplazmi ili difundira u jezgru te mijenja aktivnost transkripcijskih čimbenika fosforilacijom. Glavne ciljne bjelančevine za fosforilaciju u jezgri su elementi koji odgovaraju na vezanja cAMP-a (CREB, prema engl. cAMP response element binding protein) i modulatori povezani s elementima koji odgovaraju na cAMP-a (CREM, prema engl. related cAMP response element modulator) [144].

U uterusu nakon ovulacije endometrij je povećano izložen endokrinim i lokalnim čimbenicima poput: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), relaksina, hormona koji oslobađa kortikotropin (CRH, prema engl. corticotropin-releasing hormone), luteinizacijskog hormona (LH) i folikulostimulacijskog hormona (FSH). Svi ti čimbenici potiču stvaranje cAMP-a u stromalnim stanicama [76]. Nadalje, tijekom menstrualnog ciklusa povećana je aktivnost adenilat ciklaze u endometriju, a time i prisutnost cAMP-a. U biopsijskim uzorcima endometrija tijekom sekrecijske faze prisutnost cAMP-a je veća u odnosu na proliferacijsku fazu [13, 221]. Daljnjim tijekom trudnoće, decidua je izložena velikim koncentracijama ljudskog korionskog gonadotropina (hCG, prema engl. human chorionic gonadotrophin), koji prvenstveno aktivira signalni put cAMP-a [222]. Pokazano je da primarne stanične linije nakon tretmana s cAMP-om izražavaju markere decidualizacije *PRL* i *IGFBP1* unutar nekoliko sati. Tretman stanica samo s

cAMP-om je pokazao da se kod tih stanica decidualni fenotip ne zadržava dulje od 8 do 10 dana. Dodatak progestina, uz cAMP, značajno pojačava decidualni odgovor što omogućava zadržavanje decidualnog fenotipa u primarnim staničnim linijama [76].

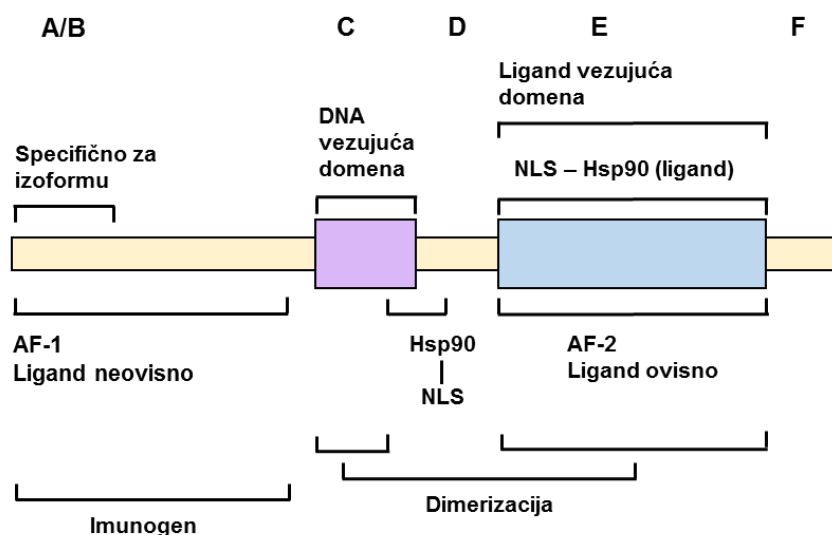
Prema tome, signalizacija cAMP-om, preko aktivacije staničnog puta PKA, čini ljudske stromalne stanice endometrija osjetljivije na P [76]. Osim *in vitro* decidualizacije ljudskih stromalnih stanica, u istraživanjima se koristi i *in vitro* decidualizacija mišjih stromalnih stanica. Pogotovo se koriste miševi s genetskim ablacijama gena koji su ključni za uspostavljanje i održavanje trudnoće [50].

#### **1.4. Receptori steroidnih hormona**

Steroidni hormoni izvršavaju svoju biološku funkciju preko jezgrinih receptora. Obitelj jezgrinih receptora sastoji se od 48 unutarstaničnih bjelančevina koje su ujedno i transkripcijski čimbenici [232].

##### **1.4.1. Modularna struktura receptora**

Jezgrini receptori imaju modularnu strukturu sastavljenu od pet različitih funkcionalnih i strukturnih domena koje se mogu izmjenjivati između srodnih receptora bez gubitka njihove funkcije. Domene čine: varijabilna regija na amino (NH<sub>2</sub>) kraju bjelančevine (A/B), visoko očuvana DNA-vezujuća domena (DBD ili C), regija savijanja bjelančevine (D), visoko očuvana ligand vezujuća domena (LBD, prema engl. ligand-binding domain) (E) i regija na karboski (COOH) kraju bjelančevine (F) (Slika 7) [223].



**Slika 7. Modularna struktura jezgrinih receptora.**

AF-1 – aktivacijski čimbenik 1; AF-2 - aktivacijski čimbenik 2; NLS – signal za lokalizaciju u jezgru, Hsp90 – bjelančevina staničnog stresa 90 kDa (prilagođeno prema [223]).

Evolucijski najviše očuvana je DBD koja se nalazi na sredini produkta bjelančevine. Ona sadrži dvije *zinc finger* domene tipa II koje olakšavaju vezivanje receptora za specifične DNA sljedove što je karakteristično za obitelji jezgrinih receptora. Regija A/B, koja se nalazi na amino kraju bjelančevine, najvarijabilnija je regija obzirom na dužinu i slijed genetske sekvence, što je posljedica alternativnog prekrajanja i korištenja različitih promotora [23]. Na karboksi terminalnom kraju jezgrinih receptora nalazi se očuvana LBD. Ta domena omogućava vezivanje hormonskog produkta. Ligand-vezujuća domena sadrži: dodatnu transaktivacijsku domenu, sekvencu važnu za međudjelovanje s bjelančevinama toplinskog šoka (Hsp, prema engl. heat shock protein) i za dimerizaciju receptora [64, 173]. U nedostatku liganda steroidni receptori nalaze se u kompleksu s bjelančevinama toplinskog šoka, kao što su Hsp90, Hsp56, Hsp70 i p23 koji održavaju receptor u aktivnoj konformaciji sposobnoj za vezivanje liganda [23]. Prema tome, jezgrini receptori su podijeljeni u podgrupe, obzirom da li stvaraju komplekse s Hsp bjelančevinama u citoplazmi i da li su aktivni kao monomeri, homodimeri ili heterodimeri [223].

#### 1.4.2. Regulacija genskog izražaja steroidnim hormonima

Regulacija genskog izražaja putem steroidnih hormona uključuje: steroidni receptor aktiviran ligandom i vezan s DNA-vezujućom domenom za specifična mjesta na DNA molekuli (HRE, prema engl. hormone response elements). Uz receptor, aktiviraju se i

bjelančevine potrebne za prepisivanje gena, što je djelomično posredovano s ko-regulatorima (ko-aktivatori i ko-represori). Steroidni receptori posreduju u aktivaciji prepisivanja gena privlačeći RNA polimerazu II na promotorsko mjesto gena, a nju prati kompleks od više podjedinica pre-inicijacijskog kompleksa koji se sastoji od općih transkripcijskih čimbenika. Pokazano je da steroidni receptori direktno djeluju s dijelovima pre-inicijacijskog kompleksa poput TATA vezujuće bjelančevine (TBP, prema engl. TATA binding protein), podjedinicom transkripcijskog čimbenika II D (TFIID), zatim transkripcijskim čimbenicima TFIIH, TFIIIF i brojnim čimbenicima povezanim s TBP-om (TAF, prema engl. TATA associated factor) [23, 24]. Također, steroidni receptori posreduju u transkripcijskoj aktivnosti pojedinih gena pomoću ko-regulatora (ko-aktivatora i ko-represora) koji sudjeluju u pregradnji kromatina i pospješuju međudjelovanje između steroidnih receptora i bjelančevina koji sudjeluju u prepisivanju gena [146]. Neki od ko-aktivatora su: bjelančevina koja veže CREB (CBP, prema engl. CREB-binding protein), čimbenici vezani za CBP, p300 i p/CAF, zatim obitelj p160 ko-aktivatora jezgrinih receptora (NCoA, prema engl. nuclear receptor coactivator) koja uključuje NCoA-1, NCoA-2 i NCoA-3 [24]. Steroidni receptori koji se nalaze u jezgri, vezani za DNA (npr. receptor za tiroidni hormon) inhibirani su djelovanjem ko-represora jezgrinih receptora (NCoR, prema engl. nuclear receptor corepressor) i SMRT-a [183, 184]. Ko-represorske bjelančevine NCoR i SMRT su povezane s kompleksom bjelančevina koji sudjeluje u deacetilaciji histona, čime se suprimira izražaj gena održavajući formu heterokromatina [99]. Naposljetku, jezgrini receptori posreduju stanični odgovor na hormone i ligande regulirajući različite stanične procese koji uključuju preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju stanica [232].

Za uspostavljanje i održavanje trudnoće su neophodni E i P koji svoju biološku funkciju ostvaraju preko svojih receptora ER-a i PR-a, koji pripadaju grupi jezgrinih receptora [30].

### **1.5. Estrogenski receptor**

Steroidni hormon E ostvaruje svoju fiziološku ulogu putem svoja dva receptora estrogenskog receptora  $\alpha$ , ER $\alpha$  (*Esr1*) i estrogenskog receptora  $\beta$ , ER $\beta$  (*Esr2*), koji se prepisuju s različitog gena [94, 150]. Ta dva receptora djeluju u različitim tkivima. U žlijezdama dojke, hipofizi, hipotalamusu, teka stanicama ovarija i uterusu je

pretežito izražen ER $\alpha$ , dok je ER $\beta$  primarno izražen u granulosa stanicama ovarija, plućima i prostati [40]. U endometriju čovjeka, kao i kod makaki majmuna, ER $\alpha$  i ER $\beta$  su izraženi u jezgrama stanica žljezdanog epitela (GE, prema engl. glandular epithelium) i stromalnih stanica. Izražaj ER $\alpha$  je visok u žlijezdama i stromi tijekom E-om dominirane proliferacijske faze, ali opada tijekom sekrecijske faze menstrualnog ciklusa [19, 198, 218]. Izražaj ER $\alpha$  je prostorno i vremenski reguliran tijekom implantacija u miševa. Tijekom 3,5 dana trudnoće u uterusu je ER $\alpha$  značajno izražen u stanicama GE-a, dok je u stanicama LE-a i strome njegov izražaj manji u odnosu na GE. Za vrijeme implantacije u miša izražaj ER $\alpha$  je i dalje visok u stanicama GE-a uterusa, ali je značajno smanjen u LE-u i stromi oko implantacijskog mjesta. Decidualne stanice koje okružuju blastocistu ne izražavaju ER $\alpha$  dok nediferencirane stromalne stanice zadržavaju visok izražaj ER $\alpha$  [94, 182, 219].

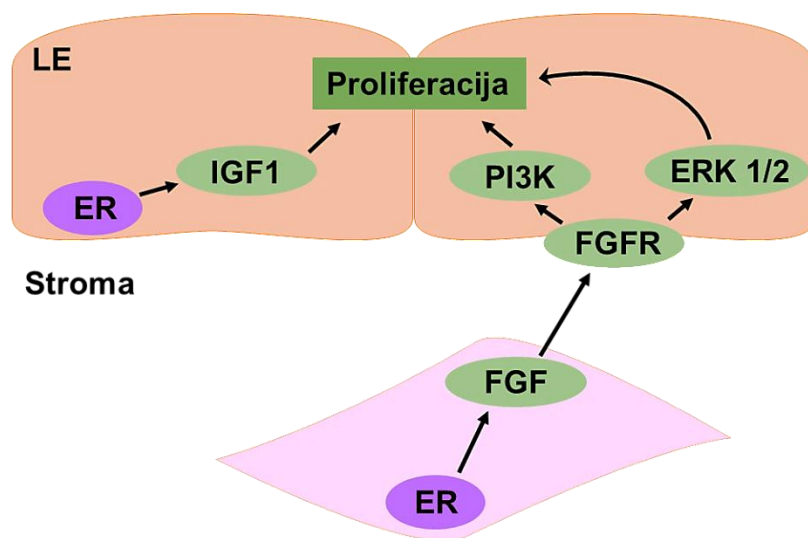
Genetičkom ablacijom ER $\alpha$  i ER $\beta$  pokazano je da je ER $\alpha$  pleotropni regulator funkcije uterusa tijekom reprodukcije [41]. Mišice ER $\alpha$ KO (prema engl. estrogen receptor  $\alpha$  knockout) imaju specifičan fenotip uterusa: hipoplaziju uterusa i neplodne su uslijed izostanka implantacije [134]. Nasuprot tome, ER $\beta$ KO (prema engl. estrogen receptor  $\beta$  knockout) mišice zadržavaju mogućnost normalne implantacije, što upućuje da E ovisna signalizacija za uspostavljanje i održavanje trudnoće ide primarno preko ER $\alpha$  [42, 237].

Poznato je da je E neophodan za izražaj PR-a [110, 234], jer *Pr* gen sadrži elemente koji odgovaraju na E (ERE, prema engl. estrogen response elements). Istraživanja su pokazala da PR ostaje izražen u uterusu ER $\alpha$ KO mišica, unatoč nedostatku ER $\alpha$ , ali je razina njegova izražaja smanjena što znači da postoje dva mehanizma izražaja PR-a: jedan ovisan, a drugi neovisan o ER $\alpha$ . Također, pokazano je kako je u ER $\alpha$ KO mišicama prisutan decidualni odgovor ovisan o P-u, dok je u divljem tipu mišica decidualizacija i dalje ovisna o E-u. [45].

### **1.5.1. Proliferacija uterusa pod djelovanjem E-a**

Regulacija proliferacije epitela endometrija je pod nadzorom E-a [1]. Signalizacija E-om potiče brojne promjene u proliferirajućem endometriju, uključujući prepisivanje gena staničnog ciklusa, DNA sintezu, mitozu epitelnih stanica, edem strome i infiltraciju imunskih stanica. Proliferacija vođena E-om je posredovana parakrinim signalnim putevima koji uključuju čimbenike rasta fibroblasta (FGF, prema engl.

fibroblast growth factors). Signalni put ER-a potiče izražaj FGF-ova u stromalnim stanicama uterusa [74, 233]. Stromalni FGF-ovi aktiviraju epitelne receptore FGF-ova (FGFR), koji pokreću proliferativni odgovor preko aktiviranja nishodne izvanstaničnim signalom regulirane kinaze 1/2 (ERK1/2, prema engl. extracellular signal-regulated kinase) ili fosfoinozitol – 3 kinaznog (PI3K) signalnog puta. Osim FGF-ova, E potaknuta proliferacija može biti regulirana i preko inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF1, prema engl. insulin like growth factor 1) (Slika 8) [255]. Proliferativni učinak E-a je očuvan u ljudi, obzirom da se proliferacija endometrija drastično pospješuje povećanjem koncentracije E-a tijekom proliferativne faze menstrualnog ciklusa [66]. Proliferacija LE-a endometrija posredovana E-om usklađena je parakrinim signalima između epitela i strome. Korištenjem mišjih modela pokazano je da je stromalni ER $\alpha$  neophodan za poticanje proliferacije epitela endometrija [16, 120].



**Slika 8. Mehanizam proliferacije LE-a posredovan E-om.**

ER -estrogenski receptor, FGF – čimbenik rasta fibroblasta, FGFR – receptor čimbenika rasta fibroblasta, PI3K – fosfoinozitol-3-kinaza, ERK1/2- izvanstaničnim signalom regulirana kinaza, IGF1 - inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (prilagođeno prema [1]).

### 1.5.2. Čimbenici rasta fibroblasta

Obitelj FGF-ova čini 22 heparin vezujuća polipeptidna čimbenika rasta. Većina FGF-ova su mitogeni koji potiču različite stanične funkcije, uključujući migraciju, proliferaciju i diferencijaciju [103, 250]. Te funkcije su važne za različite fiziološke i patofiziološke procese, uključujući embriogenezu, angiogenezu i tumorogenezu [10]. Svoju biološku funkciju FGF-ovi postižu vezanjem za svoje transmembranske tirozin kinazne receptore, FGFR. Receptori su kodirani s 4 različita gena (*Fgfr1–Fgfr4*) [62].



Uz membransku lokalizaciju FGFR-ova, stanična diferencijacija potaknuta FGF-ovima popraćena je s premještanjem FGFR-ova, koji sadrže jezgrin lokalizacijski signal, u jezgru [65]. U uterusu, dijelovi FGF signalnog puta mogu djelovati kao parakrini i/ili autokrini posrednici međudjelovanja između strome i epitela. Parakrini put aktivacije FGFR-ova uključuje proliferaciju LE-a u uterusu [67, 74]. Miševi sa specifičnom genetskom ablacijom transkripta 2 izraženog u srcu i tkivima porijeklom iz neuralnog grebena (*Hand2*, prema engl. heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2) ne pokazuju inhibiciju izražaja *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf9*, i *Fgf18* tijekom 3,5 dana trudnoće [128].

Prethodna istraživanja su pokazala dinamičku promjenu u izražaju FGF2 tijekom peri-implantacije u uterusu [167]. Također, FGF9 je mitogen i čimbenik preživljenja, čiji je izražaj potaknut E-om i prostaglandinima (PG) [247, 233]. U mišjim embrijima FGF9 je široko izražen [35]. Ablacija *Fgf9* alela vodi k letalnosti miša u neonatalnom stadiju, najčešće zbog malformacije pluća. Osim malformacije pluća, nedostatak FGF9 uzrokuje promjenu u muško ženskom spolu [133].

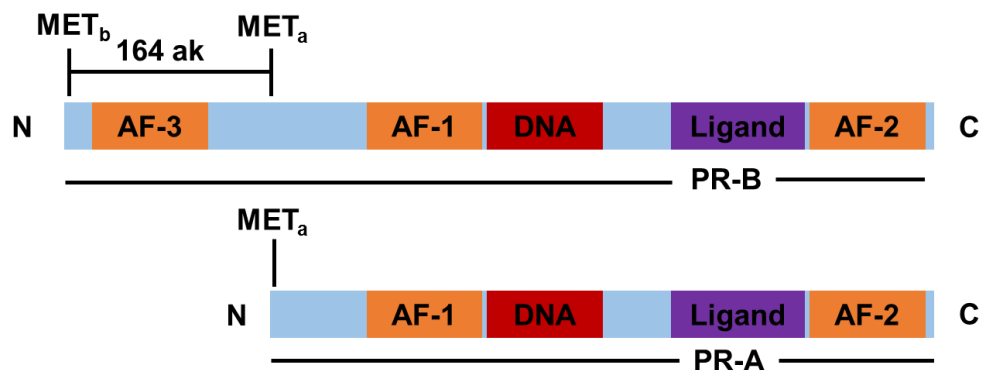
## 1.6. Progesteronski receptor

U ljudi i miševa, P izvršava svoju biološku funkciju preko svog unutarstaničnog receptora PR-a, koji pripada obitelji jezgrinih receptora s funkcijom transkripcijskog čimbenika. Zajedničko s drugim jezgrinim receptorima je modularna struktura koja sadrži različite domene, koje omogućuju odgovor na ligand, vezanje za DNA i regulaciju transkripcije [96]. Postoje dvije glavne izoforme PR-a, progesteronski receptor A (PR-A) i progesteronski receptor B (PR-B), koje nastaju prepisivanjem s istog gena, ali s dva alternativna promotora [36, 109]. Obje izoforme su strukturno identične: sadrže DBD i LBD, osim što PR-B sadrži dodatnu transaktivacijsku domenu (AF-3) od 164 aminokiseline na N-terminalnom kraju (Slika 9) [193]. Ova strukturna različitost između izoformi uzrokuje znatnu razliku u funkciji PR-A i PR-B u ljudi. Izoforma PR-A kod čovjeka inhibira transkripciju vežući ko-represor, NCoR2, na mjesto ciljnih gena [80]. Nasuprot tome, PR-B prvenstveno djeluje kao transkripcijski aktivator [238]. Domena AF-3 koja se nalazi na PR-B izoformi je odgovorna za ovu značajnu razliku u funkciji PR-A i PR-B u ljudi. Nedostatkom AF-3 domene, funkcija PR-A izoforme ovisi o njegovoj AF-1 domeni, koja je konstitutivno represivna što

upućuje na to da sama AF-3 domena u PR-B izoformi inhibira represivnu aktivnost AF-1 domene [33].

U literaturi su opisane izoforme, PR-C, PR-M i PR-S koje su rezultat alternativnog prepisivanja i prevođenja ili prekrajanja gena. Međutim, ne postoji dokaz da su te skraćene izoforme izražene u fiziološkim uvjetima u dovoljnoj količini da bi obavljale svoju biološka funkciju *in vivo* [192].

Iako je PR-B izoforma duža, selektivnom ablacijom PR-A (PRAKO, prema engl. progesterone receptor A knockout) i PR-B (PRBKO, prema engl. progesterone receptor B knockout) izoforme pokazano je da je PR-A, ali ne i PR-B, neophodan za uspostavljanje trudnoće kod mišica [38, 154]. Mišice s nedostatkom PR-A pokazuju fenotipska svojstva kao i PRKO (prema engl. progesterone receptor knockout) mišice, potpunu neplodnost s poremećajima funkcije jajnika i uterusa [135, 154]. Gubitak PR-B ne utječe na plodnost već dovodi do poremećenog razvoja mliječnih žlijezda tijekom laktacije [153]. Prema tome PR-A i PR-B se ponašaju kao dva različita transkripcijska čimbenika čija aktivnost ovisi o tkivu u kome su biološki aktivni [135, 38, 154, 152].



**Slika 9. Izoforme progesteronskog receptora.**

Izoforme su prepisane s istog gena ali različitog promotora. Izoforma PR-B je duža za 164 aminokiseline koje su dio AF-3 aktivacijske domene. Kao jezgriini receptor PR sadrži i DNA vezujuću domenu, kao i ligand vezujuću domenu. Prisustvo tih domena kao i tri različite aktivacijske domene omogućuje različitu funkciju pojedine PR izoforme. ak – aminokiselina, MET- metionin (prilagođeno prema [242]).

U citoplazmi PR receptor se nalazi u kompleksu vezan za bjelančevine staničnog stresa npr. Hsp90, Hsp40, Hsp70 i p23 ili imunofiline npr. FKBP4 i FKBP5 [106, 174, 231]. Ove šaperonske bjelančevine održavaju receptor u konformaciji koja omogućuje vezanje liganda. Također, važne su u održavanju dinamike prijelaza receptora između jezgre i citoplazme. Progesteron je lipofilna molekula koja prolazi

staničnu membranu i veže se na svoj receptor [21]. Poznato je da signalni put jezgrinih receptora uključuje vezivanje liganda, dimerizaciju receptora i vezanje na elemente koji odgovaraju na P (PRE, prema engl. progesterone response elements) unutar promotora uz omogućavanje ili inhibiciju vezanja faktora i enzima potrebnih za prijepis ciljnih gena [53]. U prisutnosti P, u citoplazmi PR disocira sa šaperonskih bjelančevina, dolazi do dimerizacije, koja dovodi do stvaranja: homodimera PR-A ili PR-B, i heterodimera PR-A/B, njihovog premještanja u jezgru i vezanje za DNA na točno određenim mjestima. Nakon aktivacije PR se sa svojom DNA vezujućom domenom veže na palindromsku sekvencu AGAACAnnnTGTTCT [87]. Zanimljivo je da se PR može vezati za promotorske sekvence i mijenjati transkripciju gena koji sadrže samo pola PRE ili uopće ne sadrže PRE [186].

Na promotorima ciljnih gena PR aktivira ko-aktivatore (npr NCoA-1, NCoA-2, itd.) pomoću kojih regulira prijepis ciljnih gena ili ko-represore (npr. NCoR2), pomoću kojih inhibira izražaj određenih gena [96]. Istraživanja su pokazala da razina, kao i omjer izražaja PR-A i PR-B u ljudi i miševa ovisi o endokrinološkom statusu organizma i mijenja se tijekom kancerogeneze [82].

## **1.7. Geni regulirani P-om tijekom rane trudnoće**

Progesteronom regulirani geni su ključni za implantaciju i decidualizaciju. Njihove bjelančevine određuju receptivnosti uterusa, a ubrajaju se u skupinu citokina, čimbenika rasta, homeobox transkripcijskih čimbenika, lipidnih medijatora te morfogena [240].

### **1.7.1. Morfogeni**

#### **1.7.1.1. Indian Hedgehog**

Indian Hedgehog (IHH), član Hedgehog signalnog puta, pripada skupini morfogena važnih u regulaciji stanične proliferacije, diferencijacije i komunikacije između stanica u procesima koji uključuju razvoj organa, održavanje matičnih stanica kao i onkogenezu [102, 187]. Njegov izražaj je reguliran P-om i doseže najvišu razinu četvrtog dana trudnoće kada u miša dolazi do implantacije [143]. Iako je izražaj IHH u uterusu ograničen na LE, nishodne molekule njegovog signalnog puta su izražene u stromi tijekom implantacije. To su Ptch1 (prema engl. patched-1) i COUP

transkripcijski čimbenik 2 (COUP-TFII, prema engl. COUP transcription factor 2) [217]. Istovremeni izražaj izražaja IHH u LE-u i Ptch1 i COUP-TFII u stromi upućuje na potencijalnu ulogu IHH u posredovanju parakrinog signalnog puta P-a između strome i LE-a uterusa [122]. Kondicionalna delecija *Ihh-a* u uterusu miša uzrokuje nemogućnost implantacije zbog nedostatka P-om potaknute proliferacije stromalnih stanica, angiogeneze i decidualizacije, fenotipski slično kao i kod PRKO mišica [71, 123]. To upućuje da je IHH neophodan medijator signalnog puta PR-a u uterusu, koji sudjeluje u komunikaciji između LE-a i strome uterusa koja je potrebna za implantaciju embrija [217]. Mikroanaliza gena je pokazala da je *IHH* glasnička RNA (gRNA) regulirana PR-om tijekom menstrualnog ciklusa žene [218]. Također, izražaj IHH u endometriju je smanjen kod endometrioze, što upućuje na rezistenciju stanica na P [199].

#### **1.7.1.2. Koštana morfogenetska bjelančevina 2 (BMP2)**

Koštana morfogenetska bjelančevina 2 (BMP2, prema engl. bone morphogenetic protein 2) je član najveće obitelji morfogena koja pripada super obitelji modulatora rasta, transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) [251]. Nekoliko gena koji pripadaju BMP obitelji izraženi su u uterusu miša, ali samo je izražaj BMP2 reguliran P-om. Njegov izražaj je pojačan u stromalnim stanicama koje okružuju mjesto implantacije embrija [167]. Također, BMP2 je nishodno regulirana molekula u signalnom putu IHH-COUP-TFII [119]. Mišice s kondicionalnom delecijom *Bmp2* su neplodne, unatoč pričvršćivanju blastociste za LE. Prekid trudnoće nastao je kao posljedica nemogućnosti potpune implantacije i decidualizacije [124]. *In vitro* istraživanja su pokazala da dodatak BMP2 u staničnu kulturu nediferenciranih stromalnih stanica značajno potakne decidualizaciju preko Smad signalnog puta, dok utišavanje izražaja BMP2 blokira decidualizaciju i u miša i u ljudi [124, 129].

#### **1.7.2. Transkripcijski čimbenici**

Homebox transkripcijski čimbenici (Hox) su evolucijski očuvani transkripcijski regulatori tijekom razvoja tkiva i organa, kao i u ranoj trudnoći. U miša, homebox A (Hoxa) geni, *Hoxa10* i *Hoxa11*, su izraženi u uterusu tijekom receptivne faze i povećan im je izražaj tijekom decidualizacije kao odgovor na steroidne hormone.

### 1.7.2.1. Transkripcijski čimbenik Hoxa10

Poznato je da je Hoxa10 izražen u uterusu miša za vrijeme implantacije te se njegov izražaj izrazito povećava u stromalnim stanicama koje podliježu procesu decidualizacije [12, 46]. U žena, izražaj Hoxa10 povećava se u endometrijskim epitelnim i stromalnim stanicama tijekom srednje sekrecijske faze ciklusa u kojoj se nalazi period implantacijskog prozora [224]. Također, pokazano je da je P primarni regulator izražaja Hoxa10 u miševa i u ljudi [46, 130, 224]. Miševi s potpunom ablacijom Hoxa10 djelomično mogu započeti sam proces implantacije, ali im je poremećen decidualni odgovor zbog smanjene stromalne proliferacije [48]. Točnije, kod tih je miševa smanjena proliferacija stromalnih stanica pod djelovanjem P-a i E-a, dok epitelne stanice pod djelovanjem E-a normalno proliferiraju [130]. Također je pokazano da nedostatak Hoxa10 uzrokuje deregulaciju diferencijacije stanica uNK [178]. Uspješna diferencijacija stanica uNK važna je za prehranu embrija, normalnu placentaciju i pravilno preuređenje uterusa tijekom trudnoće. U miševa s nedostatkom Hoxa10 preteče stanica uNK prisutne su u uterusu, međutim te stanice nemaju dovoljan diferencijacijski potencijal [178].

### 1.7.2.2. Transkripcijski čimbenik Hoxa11

Uz Hoxa10, Hoxa11 je također visoko izražen u stromalnim stanicama uterusa i kod čovjeka i miša tijekom implantacije [78, 225]. Nedostatak Hoxa11 u mišicama vodi ka neplodnosti [98]. Mišice s potpunom ablacijom *Hoxa11* imaju nepravilno diferencirane žlijezde uz nedostatak izražaja LIF-a, kao i nepravilan odgovor na steroidne hormone, posljedično s nedostatnom proliferacijom stromalnih stanica [78]. Stoga, Hoxa11 je ključni čimbenik normalne funkcije uterusa tijekom implantacije [235].

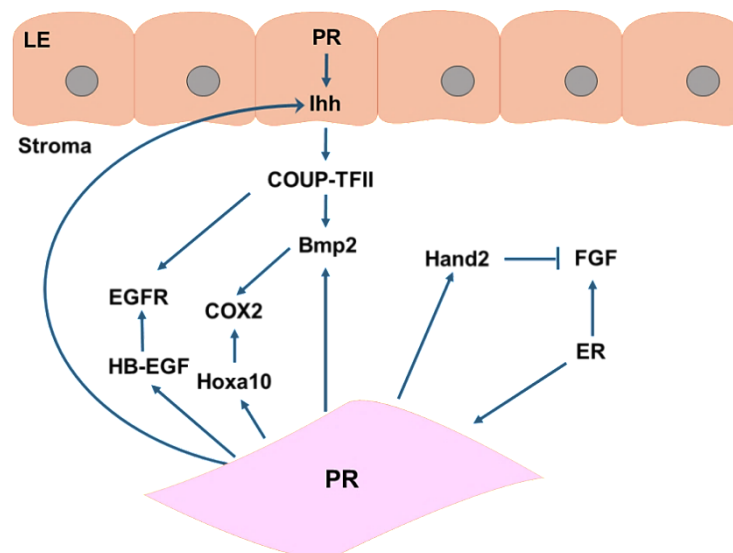
### 1.7.2.3. Transkripcijski čimbenik Hand2

Usporedbom tkiva uterusa mišica s genetskom ablacijom PR-a i divljeg tipa mišica, pokazano je da PR koji se nalazi u stromalnim stanicama inhibira proliferativni efekt E-a na epitel endometrija [128]. Mikroanalizom gena mišjeg uterusa tretiranog s RU-486 (antagonist P-a) u periimplantacijskom razdoblju otkriven je *Hand2*, kao jedan od gena čiji je izražaj u uterusu pod regulacijom P-a [6]. To je također potvrđeno istraživanjima na ovarijektomiziranim mišicama kojima je dodan P i gdje se uočio

pojačan izražaj *Hand2* u stromi uterusa. To je potvrdilo da je *Hand2* jedan od P-om reguliranih gena. Selektivnom ablacijom *Hand2* u stanicama uterusa pokazano je da izostanak P-om inhibirane E-om potaknute proliferacije LE-a u miša dovodi do implantacijskog neuspjeha [128].

### 1.7.3. Lipidni medijatori implantacije

Usporedno s pričvršćivanjem blastociste i implantacijom dolazi do povećane krvožilne propusnosti endometrija na mjestu implantacije. Taj proces u uterusu je posredovan djelovanjem lipidnih medijatora, PG-ova [29]. Ciklooksigenaza 1 i 2 (*Ptgs-1*, COX1; *Ptgs-2*, COX2) su dva enzima ključna u sintezi PG-a [202]. Svoju biološku funkciju PG-ovi ostvaraju preko svojih receptora, čiji je izražaj u uterusu reguliran P-om [130]. Izražaj gena *Cox1* je konstitutivan i ima ulogu kućepaziteljskog gena, dok je izražaj *Cox2* ovisan o podražaju i nalazi se u LE-u i stromalnim stanicama na samom mjestu implantacije blastociste [131]. Pokazano je da su mišice s nedostatkom *Cox2* neplodne zbog nepravilne ovulacije, oplodnje, implantacije i decidualizacije [131].



**Slika 10. Mehanizam djelovanja P-om reguliranih gena za vrijeme uspostavljanja receptivnosti uterusa.**

Bmp2 - koštano morfogenetska bjelančevina 2, COUP-TFII – COUP transkripcijski čimbenik 2, COX2 - ciklooksigenaza 2, EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta, ER – estrogenski receptor, FGF – čimbenik rasta fibroblasta, Hand2 – transkripta 2 izraženog u srcu i tkivima porijeklom iz neuralnog grebena, HB-EGF - heparin vezujući epidermalni čimbenik rasta, Ihh - Indian Hedgehog i LE-luminalni epitel (prilagođeno prema [122]).

## **1.8. Antiproliferacijski učinak progesterona**

Ključan događaj za pravilnu implantaciju je P-om regulirana inhibicija E-om potaknute proliferacije LE-a. Jedan od glavnih regulatora tog procesa je Hand2 [128].

### **1.8.1. Obitelj transkripcijskih čimbenika Hand**

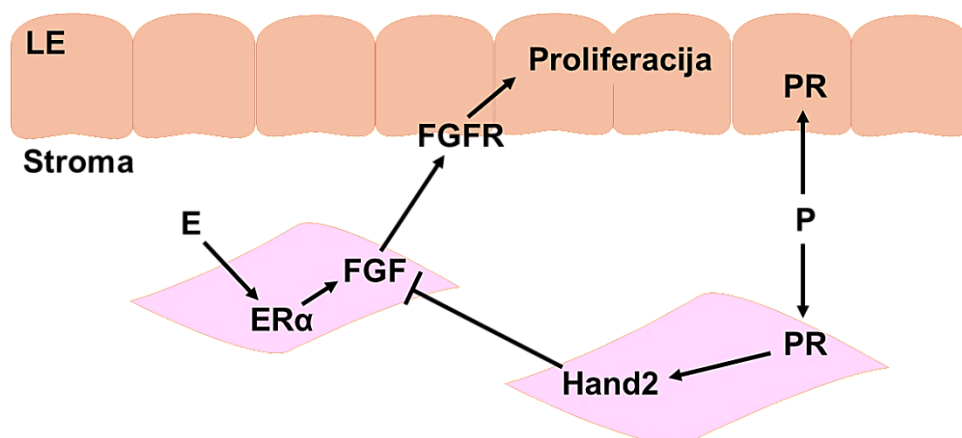
Obitelji Hand gena koja kodira za visoko očuvane bazične helix-loop-helix (bHLH) transkripcijske čimbenike ima ključnu ulogu u razvoju neuralnog grebena i srca u kralježnjaka [89]. Članovi bHLH obitelji transkripcijskih čimbenika sadrže zajednički sekvencijski motiv bazičnih aminokiselina u susjedstvu HLH domene, koje se vežu na odgovarajuće sljedove DNA. Ti transkripcijski čimbenici reguliraju genski izražaj stvarajući homodimere i heterodimere koji se vezuju na odsječke DNA s konsenzus sekvencom CANNTG [97]. Obitelj Hand bjelančevina čine dva člana: Hand1 i Hand2. Njihova glavna uloga je u formiranju lijevog i desnog ventrikula, epikarda i endokarda, što upućuje na njihovo sudjelovanje u razvoju urođenih srčanih bolesti [8, 68]. Životinje s nedostatkom Hand bjelančevina umiru tijekom ranog embrionalnog razvoja. Nedostatak Hand1 uzrokuje nepravilnu završnu doradu krvnih žila, dok je kod životinja s nedostatkom Hand2 diferencijacija endotela normalna uz izostanak odgovarajuće diferencijacija glatkih mišićnih stanica. To uzrokuje nepravilan razvoj krvnih žila tijekom embrionalnog života [209, 248].

### **1.8.2. Antiproliferacijski učinak P-a na LE posredovan s Hand2**

Nedavno je otkriveno da P preko PR-a kontrolira izražaj Hand2 u uterusu miša tijekom rane trudnoće [128]. Izražaj Hand2 glasničke RNA i bjelančevina značajno je snižen u uterusu miša tretiranog s mifepristonom (antagonist progesterona) [6, 128]. Također, tretman ovarijektomiziranih PRKO i mišica divljeg tipa (WT) s P-om, pokazao je da P preko PR-a inducira izražaj Hand2 u jezgri stromalnih stanica uterusa [128]. Selektivna ablacija Hand2 u stanicama uterusa koje izražavaju PR ukazala je da su takve mišice neplodne. Selektivna ablacija Hand2 u stanicama uterusa postignuta je progesteron receptor Cre-knockin metodom (PR-Cre) [128]. Miševi s PR-Cre generirani su tako da je u gen za PR u egzonu 1 umetnuta Cre rekombinaza. Mjesto umetanja Cre-rekombinaze je nishodno od PR promotora. Heterozigotne mišice s dodatkom Cre-rekombinaze se fenotipski ne razlikuju od

divljev tipa mišica. Aktivnost CRE-rekombinaze je ograničena na stanice koje izražavaju PR u tkivima koji su pod utjecajem P-a poput uterusa, jajnika, jajovoda i mliječnih žlijezda. Što znači da u tim stanicama može doći do selektivne delecije gena od interesa [208]. Nepolodnost u tim mišicima je posljedica nemogućnosti pričvršćivanja embrija za LE uterusa tijekom implantacije, dok su ovulacija i oplodnja normalne kao i morfologija embrija [128].

U miša, receptivna faza uterusa nastaje kada P inhibira proliferaciju LE-a potaknutu E-om [57]. Smanjenje aktivnosti ER-a dovodi do sniženja izražaja gena koji su pod kontrolom E-a, uključujući Muc1. Glavno obilježje receptivnog uterusa je utišavanje izražaja Muc1 u LE-u. Nasuprot tome, održavanje Muc1 izražaja blokira uspostavljanje receptivnosti i implantaciju embrija [214]. Smatra se da selektivna ablacija Hand2 u uterusu mišica, ne dovodi do utišavanja izražaja Muc1 zbog pojačane aktivnosti ER-a u LE-u. Rezultati ukazuju da Hand2 djeluje nishodno od PR-a u provođenju antiproliferativnog djelovanja P-a na E-ovisnu epitelnu proliferaciju [128]. Dosadašnja istraživanja upućuju da je antiproliferacijsko djelovanje Hand2 posljedica njegove inhibicije FGF-ova u stromalnim stanicama uterusa koji parakrinim mehanizmom utječu na aktivaciju FGFR na LE-u [128]. Vezanjem FGF-ova na FGFR na LE-u, dovodi do aktivacije ERK1/2 čija aktivacija potiče staničnu proliferaciju [62]. Istraživanja su pokazala da Hand2 u uterusu smanjuje izražaj *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf9* i *Fgf18* [128].



**Slika 11. Mehanizam P-om regulirane inhibicije LE-a uterusa tijekom 3,5 dana trudnoće u miša.** Progesteron (P) preko svog receptora (PR) u stromi uterusa, potiče izražaj transkripcijskog čimbenika HADN2 koji potiskuje izražaj FGF-ova koji su posrednici u proliferaciji stanica luminalnog epitela uterusa u signalnom putu E-ER $\alpha$ . E – estrogen, ER $\alpha$  – estrogenski receptor  $\alpha$ , FGF – čimbenici rasta fibroblasta, FGFR – receptori čimbenika rasta fibroblasta, LE - luminalni epitel, P – progesteron, PR- progesteronski receptor (prilagođeno prema [128]).



Nemogućnost antiproliferacijskog djelovanja P-a povezano je s razvojem raka endometrija ovisnog o E-u, stoga se Hand2 nameće kao dobar kandidat u liječenju hormonskom terapijom, kao inhibitor E-om regulirane proliferacije endometrija [112].

*In vitro* istraživanja na ljudskim endometrijskim stromalnim stanicama pokazala su da tretman progestinima, pojačava izražaj Hand2 gRNA i da ovisi o dozi i vremenskom intervalu tretmana. Tretman s E-om nema utjecaj na izražaj Hand2 [31].

Tijekom rane trudnoće Hand2 gRNA i bjelančevinu izražavaju stromalne stanice oko mjesta implantacije te se njegov izražaj drastično povećava za vrijeme decidualizacije [100]. Modelom povećane hormonske osjetljivosti mišjeg uterusa pokazano je da se izražaj Hand2 povećava u odgovoru na P iako se još uvijek ne zna da li je transkripcija *Hand2* direktno regulirana P-om ili preko nishodnih efektoru [100], ali poznato je da promotor *Hand2* gena sadrži PR vezna mjesta [186].

## **1.9. Uloga P-a u krvožilnoj propusnosti**

Za uspješnu implantaciju od iznimne je važnosti stvaranje povećane krvožilne propusnosti i nastajanje edema na mjestu pričvršćivanja blastociste [11, 29].

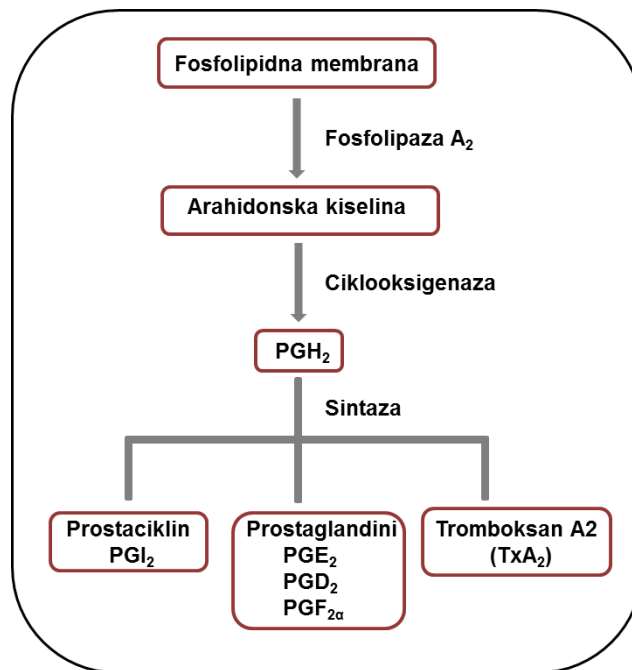
### **1.9.1. Prostaglandini**

Prostaglandini su lipidni medijatori važni u različitim aspektima ženske reprodukcije. Istraživanjima je otkriveno da sudjeluju u menstrualnom ciklusu i menstruaciji, ovulaciji, implantaciji, dilataciji grlića maternice, tonusu maternice i koordiniranim kontrakcijama miometrija te krvožilnoj funkciji posteljice [115]. Njihova sinteza (Slika 12) započinje iz arahidonske kiseline koja se oslobađa razgradnjom stanične membrane pomoću enzima fosfolipaza A<sub>2</sub>. Arahidonska kiselina se zatim prevodi u prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) preko COX koja djeluje i kao dioksidgenaza i peroksidaza [202]. Poznata su dva izoenzima: konstitutivni COX1 i inducibilni COX2, koji se razlikuju po izražaju i rasprostranjenosti u organizmu [107]. Homodimeri COX mogu biti smješteni u endoplazmatskom retikulumu ili membrani jezgre [202].

Nestabilni međuprodukt PGH<sub>2</sub> prolazi kroz brzu konverziju u ostale prostanoide sa specifičnom krajnjom PG sintazom, čime nastaju prostanoidi, prostaciklini i tromboksan A<sub>2</sub> [200]. Svoju biološku funkciju PG ostvaruju preko nekoliko G-protein vezujućih receptora (GPCR, prema engl. G-protein coupled receptor): četiri EP receptora za prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (EP1-EP4), IP receptor za prostaciklin, DP

receptor za prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), FP receptor za prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). Kada se sintetizirani PG izluči iz stanice on može djelovati autokrino, vezanjem na GPCR na stanici koja ga je proizvela ili parakrino, vezanjem za GPCR na susjednoj stanici, pritom aktivirajući različite unutarstanične signalne putove [91, 201]. Otkriven je i unutarstanični receptor za PG, peroksisomski proliferacijski aktivirajući receptor (PPAR, prema engl. peroxisome proliferator-activated receptor) [118].

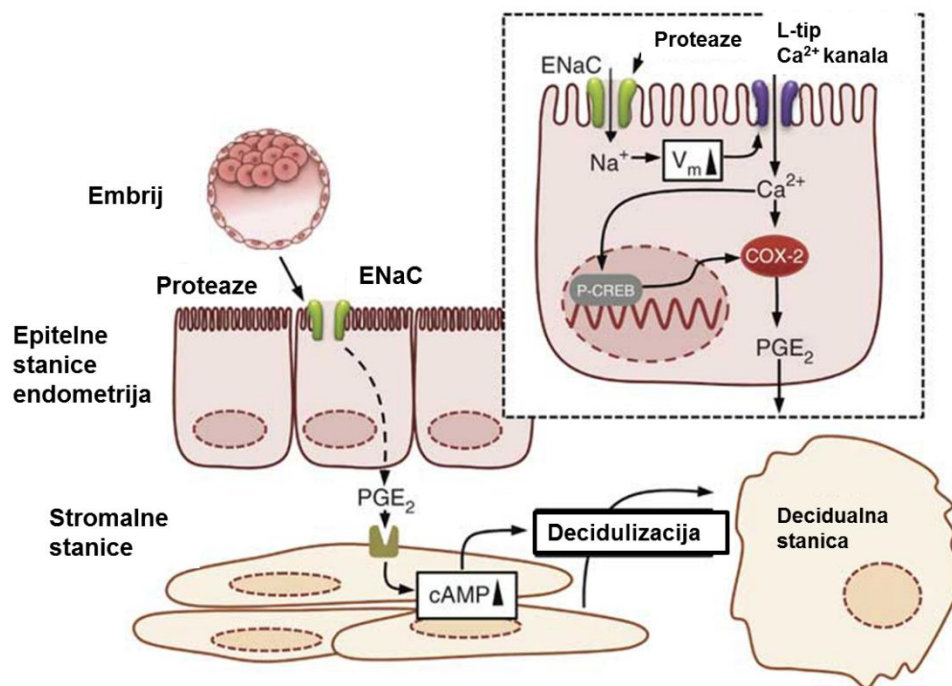
Miševi kojima nedostaju PG receptori, osobito E<sub>2</sub>, pokazuju nepravilnosti u reproduktivnoj funkciji [229]. U glodavaca je primijećeno da prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) i prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) imaju važnu ulogu u procesu implantacije i decidualizaciji, dok je prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) uključen u procese implantacije i decidualizacije preko PPAR-δ [141]. Također, u glodavaca je uočeno da PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> sudjeluju u kontrakcijama kružnog miometrijskog mišićnog sloja koji pospješuje transport embrija i pravilni prostorni razmještaj blastocista [249].



Slika 12. Shematski prikaz sinteze prostaglandina.

### 1.9.2. Uloga ciklooksigenaza u trudnoći

Jedinstven izražaj COX1 i COX2 enzima, ključnih za sintezu PG-ova tijekom peri-implantacije u uterusu miša, ukazuju da ova dva enzima imaju važnu ulogu u procesima rane trudnoće [131]. Premda se COX1 i COX2 izoforme prepisuju s različitih gena, *Ptgs1* i *Ptgs2*, one dijele sličnu strukturu bjelančevina i kinetička svojstva [200]. Sinteza PG-a i COX u ženskom reproduktivnom traktu može biti regulirana hormonima i parakrinim čimbenicima. U ljudi nakon tretmana s mifepristonom, antagonistom PR-a, izražaj COX1 u GE-u i COX2 u LE-u je značajno snižen, što upućuje da P utječe na izražaj ovih enzima [139]. Dosadašnja istraživanja upućuju na zaključak da tijekom rane trudnoće u miševa, izražaj COX1 gena u uterusu je pod kontrolom ovarijskih steroidnih hormona, dok izražaj COX2 može biti reguliran i s prisutnošću blastociste [29]. Četvrtog dana trudnoće, kada dolazi do implantacije u miševa, COX1 je izražen u epitelnim stanicama uterusa, ali njegov izražaj je smanjen za vrijeme pričvršćivanja blastociste. Fenotip mišica nakon genetske ablacije COX1 je ukazao na njegovu važnost na proces okota, ali ne i za implantaciju. Izražaj COX2 je ograničen na područje LE-a i prolazno je prisutan u neposrednom okolišu implantacijskog mjesta u stromi endometrija. Potpuna ablacija COX2 u C57BL/6J/129 mišica uzrokuje nepravilnu ovulaciju, oplodnju, implantaciju i decidualizaciju što dovodi do neplodnosti mišica i ukazuje na važnost COX2 u reproduktivnoj funkciji [131]. Osim spolnih hormona, na sintezu PG-ova i izražaj COX mogu utjecati i drugi hormoni i citokini. Primjerice, korionski gonadotropin (CG, prema engl. chorionic gonadotrophin) regulira izražaj PGE<sub>2</sub> u epitelu endometrija u ljudi i miševa [7]. Zatim, u *in vitro* uvjetima IL-1 $\alpha$  potiče izlučivanje PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  u mišjim stromalnim stanicama endometrija [105]. U uterusu štakora pokazano da i lizofosfatna kiselina (LPA, engl. lysophosphatidic acid), bioaktivni lipidni derivat, potiče izražaj COX2, a time i sintezu PGE<sub>2</sub> [206]. Za inicijaciju implantacije u miševa, potrebno je izlučivanje serinskih proteaza od strane embrija, koje zatim aktiviraju epitelne Na<sup>+</sup> kanale (ENaC, prema engl. epithelial Na<sup>+</sup> channel) u epitelnim stanicama endometrija, što uzrokuje naglo povišenje koncentracije Ca<sup>2+</sup> i potakne djelovanje COX2, a time sintezu i izlučivanje PGE<sub>2</sub> u stanicama LE-a uterusa (Slika 13) [22, 185]. U organizmu, ENaC je glavni regulator absorpcije soli i vode u epitelu [207].



**Slika 13. Utjecaj serinskih proteaza na sintezu prostaglandina i poticanje decidualizacije.** ENaC - epitelni Na<sup>+</sup> kanali, cAMP – ciklički adenzin monofosfat, COX2 – ciklooksigenaza, PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub> (prilagođeno prema [185]).

### 1.9.3. Uloga PG-a u povećanoj krvožilnoj propusnosti i angiogenezi tijekom implantacije

Medijatori povećane krvožilne propusnosti u endometriju tijekom implantacije i decidualizacije su PG [2]. Utjecaj spolnih hormona na izražaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, prema engl. vascular endothelial growth factor) i angiopoetina (Ang) je reguliran s PGE<sub>2</sub> [57], čime dolazi do povećane krvožilne propusnosti i angiogeneze tijekom implantacije, a kasnije i decidualizacije [142].

Spolni hormoni E i P imaju različiti utjecaj na te promjene. Povećanu krvožilnu propusnost potiče E, a inhibira angiogenezu *in vivo*. Angiogenezu potiče P, ali ima mali utjecaj na krvožilnu propusnost [136]. Promjene u krvožilnoj propusnosti i angiogenezi tijekom implantacije embrija su uzrokovane različitim izražajem pro-angiogenetskih čimbenika u uterusu VEGF-om i njegovim receptorima [177]. Angiopoetin-1 (Ang-1) i -2 (Ang-2) zajedno s VEGF-om reguliraju angiogenezu tijekom decidualizacije. Sazrijevanje krvnih žila i održavanje njihove propusnosti potiču VEGF i Ang-1, dok VEGF i Ang-2 potiču destabilizaciju krvnih žila koja je neophodna za neoangiogenezu [113].

Aktivnost dušik monoksid sintetaze (NOS) je smanjena na mjestu implantacije što se pridodaje inhibicijskom učinku PGE<sub>2</sub> na taj enzim [27, 205]. To upućuje da bi PGE<sub>2</sub>

mogao biti uključen u kontrolu krvožilne propusnosti potaknute dušikovim monoksidom (NO). Također, inducibilno stvoren NO ima utjecaj na aktivnost COX2, a time i na sintezu PG [149].

Nepravilna angiogeneza uterusa jedna je od karakteristika mišica s potpunom ablacijom COX2. Ti miševi imaju poremećen izražaja VEGF, ali ne i Ang. Egzogenim unosom PG u COX2<sup>-/-</sup> mišice uspostavlja se normalan izražaj VEGF i pravilna angiogeneza. To ukazuje da su PG-ovi sintetizirani s COX2 neophodni za proces angiogeneze tijekom decidualizacije [142, 240].

Prostaciklin, PGI<sub>2</sub>, je snažan vazodilatator i ima važnu ulogu u povećanju krvožilne propusnosti na mjestu implantacije. Razina PGI<sub>2</sub> se poveća tijekom rane trudnoće te je on glavni eikosanoid kojeg proizvode endotelne stanice arterija paralelno s povećanim izražajem prostaglandin-I sintaze (PGIS, prema engl. prostaglandin-I synthase) [138].

#### **1.9.4. Uloga PG-a u decidualizaciji**

Decidualizacija osigurava uvjete preživljavanja embrija prije uspostavljanja zrele posteljice [57]. Putem svojih transportera (PGT) PG se prenesu u stanice što im omogućava parakirni način djelovanja. Glavni PG-ovi uključeni u proces decidualizacije su PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>. Za PGI<sub>2</sub> se smatra da je također uključen u proces implantacije, jer u miševa je povećan izražaj PGIS tijekom petog dana trudnoće, a nakon toga počinje brzo opadati [111]. Osim povećanog izražaja COX, povećan je i izražaj receptora za PGE<sub>2</sub>: EP2 i PPAR-δ, u decidualnim stanicama miševa, što dodatno potvrđuje na važnost PG-ova u procesu decidualizacije [164]. Poznato je da P povećava izražaj receptora EP2 [17]. Također, P reguliran Hoxa10 potiče izražaj receptora EP3 i EP4 u stromi uterusa [130]. Pokazano je da PGE<sub>2</sub> regulira izražaj *Hand2* u stanicama koje podliježu *in vitro* decidualizaciji [100].

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Uspostavljanje trudnoće zahtjeva međudjelovanje pravilno razvijenog embrija i hormonski stimuliranog endometrija spremnog za njegovu implantaciju. Steroidni hormon P, zajedno s E-om, je ključan za implantaciju embrija i održavanje trudnoće kod gotovo svih životinjskih vrsta. Zna se da je razlog za gubitak trudnoće u 75% slučajeva nepravilna implantacija [28]. Molekulska i genetska istraživanja ukazuju da P zajedno s lokalno stvorenim signalnim molekulama osigurava uvjete u uterusu za prihvata embrija [1]. Ovu funkciju P izvršava preko PR-a, PR-A i PR-B, koji su transkripcijski čimbenici [38].

Istraživanje se temelji na pretpostavci da je pravilna vremenska i prostorna dinamika transkripcijske aktivnosti PR-a neophodna za implantaciju i diferencijaciju stanica u decidualni fenotip koji osigurava uspostavljanje i održavanje trudnoće. Hormonski uvjeti tijekom implantacije uzrokuju promjene na razini cijelog uterusa [28].

Polazim od hipoteze da P preko PR-a uzrokuje promjene u vrlo maloj populaciji stanica, specifičnih karakteristika, koje osiguravaju implantaciju na pravom mjestu i u pravo vrijeme. Do sada pravilna uspostava molekulskih signalnih putova pod kontrolom P-a tijekom rane trudnoće nije dovoljno dobro istražena.

Glavni cilj predloženog istraživanja je uloga PR-a u mehanizmu uspostavljanja trudnoće *in vivo*, stoga kako bi ispitala ulogu P-a u uspostavljanju trudnoće postavila sam sljedeće specifične ciljeve:

1. Analizirati vremenski i prostorni odnos između PR-a i njime reguliranih gena: Hand2 i Cox2 te ER i FGF9 u uterusu tijekom peri-implantacijskog razdoblja.
2. Analizirati prostorne promjene izražaja PR reguliranih gena tijekom implantacije (4,5 dpc) u miša.
3. Utvrditi promjene u izražaju Hand2, Cox2, FGF9 i PR gena u implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.
4. Utvrditi regulaciju izražaja Hand2 hormonima P-om i E-om u ovarijektomiziranim mišicama divljeg tipa (WT, prema engl. wild type) i genetski modificiranim PRKO i PRAKO mišicama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

2-merkaptoetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

2-propanol (izopropanol), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

30% Akrilamid/bisakrilamid otopina (29:1), *Alfa Aesar*, Karlsruhe, Njemačka

Agaroz, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Amonijev persulfat, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Biorad protein assay, *BioRad*, Hercule, SAD

Bjelančevinski markeri, obojeni, *Thermo Scientific*, Rockford, SAD

Brdu (5-Bromo-2'-deoksiuridin), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Bromfenol modriilo (prema engl. bromphenol blue), *Merck*, Darmstadt, Njemačka

Buprenorfin, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Chicago blue, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Complete tablete (Tablete proteaznih inhibitora), *Roche*, Basel, Švicarska

Dabco, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), *Thermo Scientific*, Rockford, SAD

Destilirana voda, Direct Q3, *Merck Milipore*, Darmstadt, Njemačka

di-Natrijev-dihidrogenfosfat-12-hidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

Dithiothreitol (DTT), *Panreac*, Barcelona, Španjolska

DNA markeri (100 bp, 1kb), *Metabion*, Martinsried, Njemačka

ECL plus Western Blotting Detection System, *GE Healthcare Life Sciences*, Pittsburgh, SAD

EDTA, *Fluka*, Buchs, Švicarska

Estrogen, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Etanol (CH<sub>3</sub>OH), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Etidij-bromid, *Invitrogen*, Carlsbad, SAD

Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF; C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>FO<sub>2</sub>S), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Formaldehid (36%), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

Formamid, deionizirani (CH<sub>3</sub>NO), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Glicerol, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD

Glicin ( $C_2H_5NO_2$ ), Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka

Goveđi serumski albumin (BSA, prema engl. bovine serum albumin), Affymetrix, Santa Clara, SAD

HEPES, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka

Hrana za miševе - Teklad, Envigo, Madison, SAD

Kalcijev klorid ( $CaCl_2$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijev dihidrogenfosfat ( $KH_2PO_4$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijev hidrogenkarbonat ( $KHCO_3$ ), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Kalijev klorid (KCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Ketamin hidroklorid ( $C_{13}H_{16}ClNO \times HCl$ ), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Kit za odstranjenje DNA onečišćenja; DNase I, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Kit za reverzni prijepis High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, SAD

Kloridna kiselina (HCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kloroform ( $CHCl_3$ ), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Ksilazin ( $C_{12}H_{16}N_2S$ ), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Magnezijev klorid heksahidrat ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Master mix za lančanu reakciju polimerazom (PCR prema engl. polymerase chain reaction), Promega, Madison, SAD

Metanol ( $CH_3OH$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Mowiol, Hoechst medij za uklapanje fluorescentno obilježenih preparata, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Natrijev acetat trihidrat, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Natrijev azid ( $NaN_3$ ), Difco, San Diego, SAD

Natrijev citrat ( $Na_3C_6H_5O_7$ ), Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka

Natrijev hidroksid (NaOH), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev klorid (NaCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrijev-dihidrogenfosfat-2-hidrat ( $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina (ledena) ( $CH_3COOH$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Paraformaldehid, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Ponceau S, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Power Sybr Green, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD

Progesteron, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

Proteinaza K, Roche, Basel, Švicarska



RIPA (prema engl. radiation immunoprecipitation assay), *Thermo Scientific*, Rockford, SAD  
RNA Later, *Applied Biosystems*, Carlsbad SAD  
RNase inhibitor, *Ambion*, Grand Island, SAD  
SDS (Natrij dodekasulfat), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD  
Sefarozne kuglice za imunoprecipitaciju, Protein A/G PLUS-Agarose, *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD  
Sezamovo ulje, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD  
Stelja, *Allspan*, Karlsruhe, Njemačka  
TEMED (C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD  
Tissue Clear, *Sakura Finetek Europe*, Zoeterwoude, Nizozemska  
Tris Baza, *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD  
Trizol Reagent, *Invitrogen*, Carlsbad, SAD  
Tween 20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat), *Sigma Aldrich*, St. Louis, SAD  
Voda bez nukleaza (prema engl. nuclease free water), *Ambion*, Grand Island, SAD

### **3.1.2. Otopine i puferi**

#### **Agarozni gel za određivanje kvalitete RNA**

Agarozni gel 0,9% (w/v): 0,9 g agaroze, 100 ml TAE pufera

#### **Agarozni gel za genotipizaciju miševa**

Agarozni gel 1,5% (w/v): 1,5 g agaroze, 100 ml TAE pufera

#### **Denaturirajući pufer za pripremu uzoraka RNA za elektroforezu (10x)**

200 mM Hepes, 50mM NaAcetat, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,0

#### **Denaturirajući pufer za nanošenje uzoraka RNA na gel (1x)**

1X denaturirajući pufer za pripremu uzoraka RNA za elektroforezu, 58,8% formamid (v/v), 7,2% formaldehid (v/v), 0,04 mg/ml Etidij bromid (EtBr)

#### **Fiziološka otopina**

Natrijev klorid 0,9% (w/v); 0,9g NaCl, 100 ml H<sub>2</sub>O

#### **Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, prema engl. phosphate buffered saline), pH 7,4**

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgCl<sub>2</sub>x 6H<sub>2</sub>O

**Fiziološka otopina puferirana s tris-bazom (TBS, prema engl. Tris buffered saline) pH 7,6**

20 mM Tris baza, 150 mM NaCl

**Otopina 4% paraformaldehida za fiksiranje tkiva pH 7,4**

40 g/L paraformaldehida, 16.83 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.85 g/L, 5.4 g/L glukoze u PBS-u

**Otopina amonijevog persulfat**

Amonijev persulfat 10% (w/v) u  $\text{H}_2\text{O}$

**Otopine etanola**

Etanol 96% (v/v) u  $\text{H}_2\text{O}$

Etanol 75% (v/v) u  $\text{H}_2\text{O}$

Etanol 70% (v/v) u  $\text{H}_2\text{O}$

**Otopina za demaskiranje epitopa za analizu bjelančevina na tkivnim rezovima**

10mM Natrijev Citrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), pH 6,0 u  $\text{H}_2\text{O}$

**Otopina ketamina/ksilazina (anestetik)**

1,75 ml Ketamin (100 mg/ml); 0,25 ml Ksilazin (100 mg/ml) u 8 ml fiziološke otopine

**Otopina SDS-a**

Natrij dodekasulfat (SDS) 10% (w/v) u  $\text{H}_2\text{O}$

**Otopina za blokiranje membrana tkivnih rezova**

Goveđi serumski albumin (BSA 1% (w/v); 1g BSA, 100 ml PBS + 0,001%  $\text{NaN}_3$  (v/v)

**Otopina za blokiranje membrana (western blot analiza)**

Goveđi serumski albumin (BSA 5% (w/v); 5g BSA, 100 ml TBS-T

**Otopina za ispiranje membrane**

Tween-20 0,05% (v/v) u TBS-u (TBS-T)

**Otopina za vizualizaciju bjelančevina na membrani**

Ponceau S 0,5% (w/v) u 1% (v/v) octenoj kiselini

**Otopina za detekciju implantacijskih mjesta**

Chicago blue 1% (w/v); 1g Chicago blue, 100ml fiziološke otopine

**Otopina za razdvajajući gel (12%) za elektroforezu bjelančevina**

12% BisAkrilamid (v/v), 380 mM Tris-Cl (pH 8,8), 0,1% SDS (v/v), 0,1% APS (v/v), 0,04% TEMED (v/v)

### **Otopina za sabijajući gel za elektroforezu bjelančevina**

5% BisAkrilamid (v/v), 130 mM Tris (pH 6,8) 0,1% SDS (v/v), 0,1% APS (v/v), 0,1% TEMED (v/v)

### **Pufer za elektroforezu DNA (TAE, od Tris-acetate-EDTA), pH 8,0**

40 mM Tris baza, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA

### **Pufer za elektroforezu bjelančevina**

25 mM Tris baza, 192 mM glicin, 0,1% SDS (w/v)

### **Pufer za imunotaloženje bjelančevina**

50mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM DTT

### **Pufer za izloaciju DNA (Sali pufer)**

10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10mM EDTA (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,2%SDS (w/v)

### **Pufer za nanošenje uzoraka DNA na gel**

Bromfenol modriilo 0,1% (w/v), 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 50% glicerol (v/v)

### **Pufer za nanošenje uzoraka bjelančevina na gel (5x)**

1M Tris-Cl (pH 6,8), 50% glicerol (v/v), 10%SDS (w/v), 0.05% bromfenol modrila (w/v)

### **Pufer za transfer bjelančevina s gela na membranu**

25 mM Tris baza, 192mM glicin, 20% metanol (v/v)

### **3.1.3. Laboratorijski uređaji, pribor i posuđe**

Analitička vaga, *Kern ALS 120-4*, Balingen, Njemačka

Anatomska pinceta, *2biological instruments*, Besozzo, Italija

Aplikator klipsi za rane, *2biological instruments*, Besozzo, Italija

Brijači aparat, *Phillips*, Amsterdam, Nizozemska

Centrifuga Eppendorf, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka

DAKO Pen, *Dako*, Glostrup, Danska

Epruvete sa zaobljenim dnom, sterilne 10 mL, *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Njemačka

Epruvete sa zaobljenim dnom, sterilne 50 mL, *Falcon BD Bioscience*, San Jose, SAD  
Filter 25 µm, *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Njemačka

Filter papir, *Munktell*, Bärenstein, Njemačka  
Fluorescentni mikroskop DP50, *Olympus*, Tokio, Japan  
Hladnjak +4° / -20° C, *Gorenje*, Velenje, Slovenija  
Hladnjak -80° C, *Hera Freeze*, Heraeus Instruments, Dusseldorf, Njemačka  
Homogenizator, *Biospec*, Bartlesville, SAD  
Homogenizator, *IKA*, Staufen, Njemačka  
Horizontalna kružna tresilica, *IKA*, Staufen, Njemačka  
Igle za iniciranje, *BD Microlance*, Madrid, Španjolska  
Injekcije, *BD Plastipak*, Madrid, Španjolska  
Kemiluminiscencijski čitač Alliance 4.0, *Uvitec*, Cambridge, UK  
Kirurška pinceta, *2biological instruments*, Besozzo, Italija  
Klipse, 9mm, *2biological instruments*, Besozzo, Italija  
Ledomat, *Ice International*, Milano, Italija  
Magnetska mješalica *Heidolph*, Schwabach, Njemačka  
Mikrovalna, *Whirlpool*, Benton-Harbor, SAD  
Mikroskop, *Olympus*, Tokyo, Japan  
Nastavci za pipete 10-100 µl, *Greiner*, Frickenhausen, Njemačka  
Naušnice s brojevima za miševе, *2biological instruments*, Besozzo, Italija  
Nitrocelulozna membrana za prijenos bjelančevina, *BioRad*, Hercules, SAD  
Odmjerne menzure, tikvice i čaše, *Neolab*, Heidelberg, Njemačka  
Pasteurove pipete, sterilne, *Kartell*, Noviglio, Italija  
Petrijeve posudice, 6cm , *TPP*, Trasadingen, Švicarska  
pH metar Lab 850, *Schott*, Jena, Njemačka  
Pipete 1- 1000 µL, *Gilson*, Middleton, SAD  
Pipetman, *Mettler Toledo*, Columbus, SAD  
Plastični lijevci, *Neolab*, Heidelberg, Njemačka  
Posudice za imunohistokemiju, *Tlos*, Zagreb, Hrvatska  
Silanizirana stakalca, *VitroGnost Plus*, Hannover, Njemačka  
Skalpeli, *Diagnostica skalpeli*, Zagreb, Hrvatska  
Spektrofotometar DU730, *Beckman Coulter*, Brea, SAD  
Spektrofotometar NanoVue, *GE Healthcare*, Buckinghamshire, UK  
Stakalca, pokrovna, *Carl Roth*, Karlsruhe, Njemačka  
Staklene boce (100 – 1000 ml), *Schott*, Mainz, Njemačka  
Staničevina, *Copan*, Zagreb, Hrvatska

Sterilne pipete 10ml, *Greiner Bio-one*, Frickenhausen, Njemačka  
 Sustav za agaroznu elektroforezu, Wide Mini-Sub Cell GT System, *Biorad*, München, Njemačka  
 Škarice, Moria 4877, *2biological instruments*, Besozzo, Italija  
 Škarice, Wagner, *2biological instruments*, Besozzo, Italija  
 Transiluminator, *Biostep*, Burkhardtsdorf, Njemačka  
 Tubice za centrifugiranje, 1,5 ml i 2 ml, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka  
 Tubice za smrzavanje, *Greiner*, Frickenhausen, Njemačka  
 Uređaj za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom ABI Prism 7300 SDS Fast Real Time PCR, *Applied Biosystems*, Foster City, SAD  
 Uređaj za lančanu reakciju polimerazom, *Applied Biosystems*, Foster City, SAD  
 Vorteks tresilica, Biosan V1 Plus, *Biosan*, Riga, Latvija  
 Western Blotting sustav Mini Protean Tetra Cell, *Biorad*, München, Njemačka  
 Whatman papir, *GE Healthcare Life Sciences*, Pittsburgh, SAD

### 3.1.4. Početnice za genotipizaciju miševa

#### 1. Početnice za genotipizaciju PRKO miševa

Normalni alel (WT):

PR WT F                    5' TAG ACA GTG TCT TAG ACT CGT T 3'

PR WT R                    5' GAT GGG CAC ATG GAT GAA ATC 3'

Mutirani alel (PRKO)

N1                            5' GCA TGC TCC AGA CTG CCT TGG 3'

#### 2. Početnice za genotipizaciju PRAKO miševa

Normalni alel (WT)

A1-WT R                    5' CTT GAT CTC TGG CCG ACT CAT 3'

A3-WT F                    5' TCA TAG GGA AGG AGG CAG AA 3'

Mutirani alel (PRAKO)

A2-Mut R                    5' CTT GAT CTC TGG CCG GCT AGC 3'

### 3.1.5. Početnice za određivanje izražaja specifičnih molekula gRNA

#### 1. Početnice za utvrđivanje izražaja ciklooksigenaze 2, *Cox2*

*Cox2* F                        5' GGGCCATGGAGTGGACTTAAA 3'

*Cox2* R                        5' TGCAGGTTCTCAGGGATGTG 3'

2. Početnice za utvrđivanje izražaja fibroblastnog čimbenika rasta 1, *Fgf1*

*Fgf1* F                    5'-TTTATACGGCTCGCAGACAC-3'  
*Fgf1* R                    5'-CGCTTACAGCTCCCGTTCTT-3'

3. Početnice za utvrđivanje izražaja fibroblastnog čimbenika rasta 2, *Fgf2*

*Fgf2* F                    5' GGC TGC TGG CTT CTA AGT GT 3'  
*Fgf2* R                    5' GTC CCG TTT TGG ATC CGA GT 3'

4. Početnice za utvrđivanje izražaja fibroblastnog čimbenika rasta 9, *Fgf9*

*Fgf9* F                    5' GCA GTC ACG GAC TTG GAT CA 3'  
*Fgf9* R                    5' AAT TCC AGA ATG CCG AAG CG 3'

5. Početnice za utvrđivanje izražaja fibroblastnog čimbenika rasta 18, *Fgf18*

*Fgf18* F                    5'- CCTGCACTTGCCTGTGTTTA-3'  
*Fgf18* R                    5'- GCTGCTTCCGACTCACATCA -3'

6. Početnice za utvrđivanje izražaja *Gapdh* (prema engl. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (preuzeto iz [172])

*Gapdh* F                    5' CCA ATG TGT CCG TCG TGG ATC T 3'  
*Gapdh* R                    5' GTT GAA GTC GCA GGA GAC AAC C 3'

7. Početnice za utvrđivanje izražaja *Hand2*

*Hand2* F                    5' CAC CAG CTA CAT CGC CTA CC 3'  
*Hand2* R                    5' TCT CAT TCA GCT CTT TCT TCC TCT 3'

8. Početnice za utvrđivanje izražaja *Pr-a* (preuzeto iz [151])

*Pr* F                    5' CTA ATC CTA AAT GAG CAG AG 3'  
*Pr* R                    5' AAT TGT GTT AAG AAG TAG TAA GAC 3'

### 3.1.6. Protutijela za imunofluorescentnu analizu tkiva

#### 3.1.6.1. Primarna protutijela

- DAPI (5mg/ml), *Thermo Scientific*, Rockford, SAD – u razrjeđenju 1:1000
- Kozje poliklonsko protutijelo protiv mišjeg *Hand2* (M-19), *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD – u razrjeđenju 1:100
- Kozje poliklonsko protutijelo protiv mišje ciklooksigenaze 2 (COX2), *Abcam*, Cambridge, UK – u razrjeđenju 1:100
- Mišje monoklonsko IgG<sub>3</sub> protutijelo protiv ljudskog FGF9, *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD – u razrjeđenju 1:100

- Štakorsko monoklonsko protutijelo protiv 5-Bromo-2'-deoksiuridina (BrdU) [klon ICR1], *Abcam*, Cambridge, UK – u razrjeđenju 1:500
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog FGF2R (Bek, C-17), *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD – u razrjeđenju 1:50
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog FGF3R (C-15), *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD – u razrjeđenju 1:200
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog Progesteronskog receptora (PR), *DakoCytomation*, Glostrup, Danska – u razrjeđenju 1:100
- Zečje monoklonsko protutijelo protiv ljudskog Estrogenskog receptora alfa (ER $\alpha$ ) [klon E115], *Abcam*, Cambridge, UK – u razrjeđenju 1:200
- Zečje monoklonsko protutijelo protiv ciklooksigenaze 2 (COX2), *Thermo Scientific*, Rockford, SAD – u razrjeđenju 1:200
- Zečje monoklonsko protutijelo protiv mišjeg CD31 (PECAM-1) [klon D8V9E], *Cell Signaling*, Danvers, SAD – u razrjeđenju 1:100
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv Fosfo – (Ser/Thr) PKA substrata, *Cell Signaling*, Danvers, SAD – u razrjeđenju 1:200
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv Fosfo – (Ser/Thr) Akt substrata, *Cell Signaling*, Danvers, SAD – u razrjeđenju 1:300

### 3.1.6.2. Sekundarna protutijela

- Konjsko protu-kozje protutijelo obilježeno biotinom, *Vector Laboratories*, Burlingame, SAD u razrjeđenju 1:400
- Kozje protu-mišje IgG<sub>3</sub> protutijelo obilježeno s AlexaFluor 488, *Molecular Probes*, Life Technologies, Carlsbad, SAD – u razrjeđenju 1:300
- Magareće protu-zečje IgG (H+L) poliklonsko protutijelo obilježeno s AlexaFluor 594, *Molecular Probes*, Life Technologies, Carlsbad, SAD – u razrjeđenju 1:500
- Magareće protu-štakorsko IgG (H+L) poliklonsko protutijelo obilježeno s AlexaFluor 594, *Molecular Probes*, Life Technologies, Carlsbad, SAD – u razrjeđenju 1:500
- Streptavidin AlexaFluor 488, *Molecular Probes*, Life Technologies, Carlsbad, SAD – u razrjeđenju 1:1000

### **3.1.7. Protutijela za analizu izražaja bjelančevina western blot metodom**

#### **3.1.7.1. Primarna protutijela**

- Kozje poliklonsko protutijelo protiv mišjeg Hand2, *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD – u razrjeđenju 1:200
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog FGF9, *Abcam*, Cambridge, UK – u razrješenju 1:2000
- Mišje monoklonsko protutijelo protiv Aktina [klon C4], *Milipore*, Darmstadt, Njemačka – u razrjeđenju 1:160 000

#### **3.1.7.2. Sekundarna protutijela**

- Zečje protu-kozje protutijelo obilježeno s peroksidazom, *Jackson ImmunoResearch*, West Grove, SAD – u razrjeđenju 1:50 000
- Kozje protu-mišje protutijelo obilježeno s peroksidazom, *Jackson ImmunoResearch*, West Grove, SAD – u razrjeđenju 1:100 000
- Kozje protu-zečje protutijelo obilježeno s peroksidazom, *Jackson ImmunoResearch*, West Grove, SAD – u razrjeđenju 1:50 000

### **3.1.8. Laboratorijske životinje**

Laboratorijski miševi soja BALB/c divljeg tipa, miševi soja BALB/c sa genetskom ablacijom PR-A izoforme (PRAKO miševi) i obje izoforme PR-a (PRKO miševi) uzgajani su u vivariju Zavoda za fiziologiju i imunologiju u kontroliranim uvjetima temperature, vlažnosti i uz prirodni ciklus izmjene svjetla i tame te uz slobodan pristup vodi i standardiziranoj hrani za laboratorijske životinje (HR-POK-024). Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe u sklopu projekta „Uloga progesterona u reprodukcijским i nereprodukcijским tkivima“ koji ima odobrenje Ministarstva poljoprivrede za korištenje eksperimentalnih životinja (EP 60-2/2016). Poseban naglasak je stavljen na 3R pristup koji podrazumijeva: a) zamjenu korištenja životinja u pokusima drugim metodama gdje god je to moguće (prema engl. Replacement), b) smanjenje broja životinja (prema engl. Reduction) i c)



oplemenjivanje postupaka rada sa životinjama (prema engl. Refinement) u skladu sa Europskom direktivom 2010/63/EU.

#### **3.1.8.1. PRKO – heterozigotni miševi (PR+/-)**

Jedan alel gena za PR mutiran je unosom neomicinske kazete u prvi egzon nizvodno od inicijacijskih kodona ATG<sub>A</sub> i ATG<sub>B</sub> koji kodiraju za PR-A i PR-B izoformu PR-a. Na taj način je onemogućena sinteza obje izoforme PR-a. Miševe s genetskom ablacijom je generirao J.P.Lydon [135]. Miševi su dobiveni kao dar prof. Mulac-Jeričević iz Baylor College of Medicine, Huston, SAD.

#### **3.1.8.2. PRAKO – heterozigotni miševi (PR-A<sup>+/-</sup>)**

Korištenjem CRE-loxP rekombinacijskog sustava u mišjim embrijskim matičnim stanicama uvedena je točkasta mutacija u PR genu na mjestu kodona ATG koji kodira Met 166 te je došlo do promjene Met 166 u Ala. Miševe s genetskom ablacijom je generirala B. Mulac-Jeričević [154]. Miševi su dobiveni kao dar prof. Mulac-Jeričević iz Baylor College of Medicine, Huston, SAD.

#### **3.1.8.3. Pokusni miševi**

U svrhu istraživanja uloge PR-a i njegovih ciljnih gena i procesa koje oni reguliraju korišteni su sljedeći pokusni miševi:

1. PR<sup>-/-</sup> (PRKO) miševe dobila sam križanjem heterozigotnih PRKO ženki i mužjaka. Homozigotne ženke sam koristila u daljnjim istraživanjima, a divlji tip mišica sam koristila kao unutarnju kontrolu.
2. PR-A<sup>+/-</sup> (PRAKO) miševe dobila sam križanjem heterozigotnih PRAKO ženki i mužjaka. Homozigotne ženke sam koristila u daljnjim istraživanjima, a divlji tip mišica sam koristila kao unutarnja kontrola.

Genotip pokusnih miševa potvrdila sam lančanom reakcijom polimeraze, PCR, korištenjem specifičnih početnica.

#### **3.1.8.4. Mišice za praćenje trudnoće**

Divlji tip mišica soja BALB/c stavila sam na rasplod sa istim sojem mužjaka. Jutro kad sam uočila vaginalni čep, brojala sam kao 0,5 dan gestacije. Mišice sam žrtvovala na 2., 3., 4., 5., 6., i 7. dan nakon pojave vaginalnog čepa (2,5 – 7,5 dpc, prema engl. days post coitum). Jedan rog uterusa sam koristila za dobivanje tkivnih rezova, a drugi rog sam stavila u u otopinu RNA Later i zatim pospremila na -80 °C za izolaciju RNA i bjelančevina. Iz uterusa sam nakon žrtvovanja na 5,5, 6,5 i 7,5 dpc iz tkiva uklonila embrije, tako da sam za izolaciju RNA i bjelančevina koristila samo tkivo uterusa. Za detaljnu analizu mjesta implantacije, na 4,5 dpc mišici sam 5 minuta prije žrtvovanja intravenozno ubrizgala 0,1% otopine Chicago blue boje, koja obilježava povećanu krvožilnu propusnost na mjestu implantacije [52]. Time sam prepoznala i razdvojila implantacijska mjesta (plavo obojen dio uterusa) i ne-implantacijska mjesta (neobojen dio uterusa) za detaljnu analizu izražaja gena i bjelančevina uključenih u proces implantacije. Tkiva sam pospremila na -80 °C za izolaciju RNA i bjelančevina.

#### **3.1.8.5. Mišice za istraživanje PR-om reguliranih gena**

Homozigotne PRAKO i PRKO mišice te BALB/c mišice divljeg tipa sam ovarijektomizirala. Neposredno prije zahvata intraperitonealno sam im injicirala anesteziju, koja sadrži kombinaciju ketamina 0,1 mg/g težine miša i ksilazina 0,02 mg/g težine miša. Mišicama sam dala i analgeziju (Buprenorfin 3.25mg/kg), za otklanjanje boli, patnje ili tjeskobe prije operativnog zahvata. Ovarijektomizirane mišice sam nakon 2 tjedna oporavka hormonski tretirala. Mišicama sam 4 dana potkožno ubrizgavala hormone E i P (Sigma, St.Luis, SAD), pripremljene u sezamovom ulju. Jedna skupina mišica primala je dnevno 250 ng E-a, druga skupina kombinaciju 250 ng E-a i 2,5 mg P-a, a kontrolna skupina samo sezamovo ulje. Petog dana sam žrtvovala mišice i prikupila tkivo uterusa za daljnju analizu. Za provjeru direktnog učinka P-a mišicama sam potkožno ubrizgala 1 mg P-a u sezamovom ulju i žrtvovala 6 i 8 sati nakon tretmana. Izvađene uteruse koristila sam za izolaciju RNA (6 sati nakon tretmana) i za izolaciju bjelančevina i tkivne rezove (8 sati nakon tretmana).

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Izolacija genomske DNA i genotipizacija odraslih miševa**

#### **3.2.1.1 Izolacija genomske DNA**

Vršak repa miša stavila sam u puferu za izolaciju DNA (Sali pufer) i inkubirala 2h na 55°C i 550 okretaja u minuti (rpm, prema engl. round per minutes) u prisutnosti proteinaze K. Nakon digestije uzorke sam stavila centrifugirati na sobnoj temperaturi (RT, prema engl. room temperature) na 12 000 rpm-a. Na supernatant uzoraka nanela sam izopropanol da bi se istaložila DNA te ih ponovno stavila centrifugirati na RT, 12 000 rpm-a. Dobiveni talog (DNA) sam dva puta isrpala sa 70%-om otopinom etanola. Nakon svakog ispiranja uzroke sam stavila centrifugirati prema uvjetima navedenim u prethodnim koracima. Talog sam ostavila da se osuši na zraku, nakon čega sam ga otopila u vodi bez prisustva nukleaza (prema engl. Nuclease free water).

#### **3.2.1.2. Genotipizacija odraslih miševa**

Genomsku DNA dobivenu iz vrška repa odraslih miševa analizirala sam PCR metodom. Analizu rezultata napravila sam na 1,5 % agaroznom gelu. Slijed nukleotida u početnicama naveden je u potpoglavlju 3.1.4, a koristila sam sljedeće uvjete reakcija.

**Tablica 1. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju PRKO miševa**

Dokazivanje PRKO miševa		
Sastojci reakcijske smjese	Količina sastojaka	Program reakcije:
2X Promega Master kita	12,5 µl	1. 95 °C 2,15 min 2. 94 °C 1 min 56 °C 2 min 72 °C 3 min 30X 3. 72 °C 10 min
PR WT F početnica	0,25 µl	
PR WT R početnica	0,25 µl	
N1 početnica	0,25 µl	
DNA	5 µl	
Vode bez nukleaza	6,75 µl	
Ukupni volumen reakcijske smjese 20 µl		
Veličina očekivanog produkta 500bp		

F-forward, N1-neomicinska kazeta; PR-progesteronski receptor, WT – divlji tip; R – reverse.

**Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju PRAKO miševa**

Dokazivanje PRAKO miševa			
Sastojci reakcijske smjese	Količina sastojaka za A <sub>1</sub> A <sub>3</sub> smjesu	Količina sastojaka za A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> smjesu	Program reakcije:
2X Promega Master kita	12,5 µl	12,5 µl	1. 95 °C 2,15 min 2. 95 °C 30 s 56 °C 1 min 72 °C 1 min 35 X 3. 72 °C 10 min
A1-WT R početnica	0,25 µl	-	
A3-WT F početnica	0,25 µl	0,25 µl	
A2-Mut R početnica	-	0,25 µl	
DNA	5 µl	5 µl	
Vode bez nukleaza	7 µl	7 µl	
Ukupni volumen reakcijske smjese 25 µl			
Veličina očekivanog produkta 250bp			

F-forward, Mut-mutiran alel; A-gen za progesteronski receptor, WT – divlji tip; R – reverse.

### 3.2.2. Imunofluorescencija na parafinskim rezovima tkiva

Tkiva uterusa sam fiksirala 24 sata u 4% otopini paraformaldehida. Nakon fiksacije tkiva sam isprala u nizu razrjeđenja etanola (75%-100%) i uklopila u parafin. Za daljnju analizu izražaja bjelančevina u tkivu koristila sam parafinske tkivne rezove debljine 5  $\mu\text{m}$ . Tkiva sam rehidrirala postupkom prolaska uzoraka tri puta po 5 minuta (min) kroz otopinu Tissue Clear, zatim jednom po 5 min kroz različite otopine etanola (100%-75%). Citratni pufer pH 6,0 koristila sam za postupak razotkrivanja staničnih antigena (prema engl. antigen retrieval). Uzorke sam zagrijala u puferu tri puta po 5 min na 350 W. Nakon hlađenja, uzorke sam isprala dva puta u vodi i jednom u PBS puferu. Rubove preparata obilježila sam s Dako olovkom. Tkiva sam inkubirala 1h na RT s otopinom 1% BSA u PBS puferu s dodatkom  $\text{NaN}_3$  da bi se postigla blokiranje nespecifičnog vezanja. Za analizu izražaja bjelančevina koristila sam specifična primarna protutijela (potpoglavlje 3.1.6.1.) koja sam otopila u puferu za blokiranje. Inkubacija s primarnim protutijelima provela sam preko noći na 4 °C. Sljedeći dan uzorke sam isprala tri puta po 5 min u PBS puferu. Detekciju imunokompleksa provela sam fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima (potpoglavlje 3.1.6.2.), inkubacijom 1h na RT u mraku. Za detekciju Hand2 bjelančevine i COX2 bjelančevine (kozje COX2 protutijelo) koristila sam metodu amplifikacije biotinom nakon inkubacije primarnim protutijelom tijekom cijele noći na 4 °C. Za detekciju biotinom vezanog kompleksa koristila sam Alexa streptavidin 488nm protutijelo. Uzorke sam nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelima, otopljenima u puferu za blokiranje, isprala tri puta po 5 min u PBS puferu. Za vizualizaciju jezgri uzorke sam inkubirala s otopinom DAPI-ja u PBS puferu 5 min. Uzorke sam isprala tri puta po 5 min u PBS puferu i uklopila otopinom Mowiol-a. Preparate sam analizirala fluorescentnom mikroskopijom, Olympus BX51 mikroskopom i integriranom digitalnom kamerom DP71CCD i računalnim softwarom CellF (Olympus, Tokyo, Japan). Za analizu i uređivanje slika koristila sam računalni program Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, SAD). Za svaki dan trudnoće i za svaki tretman kroz različite genotipove koristila sam uzorke tkiva iz šest različitih životinja.

Specifičnost imunofluorescentnog obilježavanja potvrdila sam inkubacijom tkivnih rezova s otopinom 1% BSA u PBS puferu s dodatkom  $\text{NaN}_3$  umjesto primarnih protutijela, preko noći na 4 °C. Drugi dan sam nastavila prema gore navedenom protokolu.

### **3.2.3. Određivanje proliferacije stanica**

Za određivanje proliferacije stanica koristila sam BrdU, sintetski nukleotid koji je analog timidinu. Tijekom S faze staničnog ciklusa BrdU se ugrađuje u molekulu DNA umjesto timidina. Mišicama sam dva sata prije žrtvovanja intraperitonealno ubrizgala otopinu BrdU-a (3mg/mišu). Metodom imunofluorescencije na tkivu sa specifičnim protutijelom za BrdU obilježila sam stanice koje proliferiraju i analizirala njihovu distribuciju u uterusu.

### **3.2.4. Izolacija ukupne RNA i dokazivanje gRNA**

Ukupnu RNA iz tkiva uterusa mišica izolirala sam korištenjem Trizol Reagenta, prema uputama proizvođača. Za svaku predviđenu točku istraživanja ujedinih sam tri roga uterusa različitih životinja i taj postupak odvojeno ponovila tri puta, sveukupno sam za svaku točku istraživanja koristila ukupno 9 životinja. Tkivo uterusa (100 mg) homogenizirala sam u 1 ml Trizola te na homogenat dodala 200 µl kloroforma. Uzorke sam promiješala i stavila centrifugirati na 12 000 g, 15 min na 4 °C. Vodenu fazu s otopljenom ukupnom RNA premjestila sam u čistu tubicu i istaložila dodavanjem 0,5 ml izopropanola. Nakon inkubacije od 10 min na RT, uzorke sam stavila centrifugirati na 12 000 g, 10 min na 4 °C. Nadtalog sam odstranila, a talog s ukupnom RNA 2 puta isprala sa 75% etanola. Nakon toga uzorke sam stavila centrifugirati na 7 200 g, 5 min na 4 °C. Talog s ukupnom RNA sam osušila na zraku i otopila u 50-100 µl vode bez nukleaza. Spektrofotometrijsku provjeru koncentracije i čistoće RNA provela sam na uređaju NanoVue. Kakvoća izolirane RNA provjerila sam i metodom elektroforeze na 0,9 % agaroznom gelu i vizualizirala UV transiluminatorom.

Izoliranu RNA zadovoljavajuće kvalitete pročistila sam od genomske DNA korištenjem Dnase I kita prema uputama proizvođača. Za reakcijsku smjesu koristila sam 2 µg RNA po uzorku. Uz RNA u reakcijsku smjesu dodala sam 2 µl 10X reakcijskog pufera i 2 µl enzima Dnaze te vode do 20 µl ukupne reakcijske smjese. Uzorke sam promiješala i ostavila 15 min na RT. Zatim sam dodala 2 µl Stop solution (otopina koja zaustavlja djelovanje enzima). Uzorke sam stavila grijati na 70 °C, 10 min i zatim ih prebacila na led da se ohlade.

Nakon što sam uzorke pročistila podijelila sam ih u dvije čiste tubice, po 10 µl u svaku (1 µg RNA po uzorku). Pripremila sam reakcijske smjese High Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit s enzimom reverzne transkriptaze i bez tog enzima, prema uputama proizvođača. Set uzoraka s enzimom je obrnuto prepisan u cDNA, a drugi set uzoraka sam koristila kao kontrolu.

**Tablica 3. Uvjeti reakcije obrnutog prijepisa RNA u cDNA**

<b>Reakcija obrnutog prijepisa RNA u cDNA</b>			
Sastojci reakcijske smjese	Reakcijska smjesa s enzimom	Reakcijska smjesa bez enzima	Program reakcije:
10X RT pufera	2 µl	2 µl	1. 25 °C 10min 2. 37 °C 120 min 3. 85 °C 5 min
25x dNTP Mix (100nM)	0,8 µl	0,8 µl	
10X nasumičnih početnica	2 µl	2 µl	
Enzim reverzna transkriptaza	1 µl	-	
Rnase inhibitor	1 µl	1 µl	
Vode bez nukleaza	3,2 µl	4,2 µl	
Ukupni volumen reakcijske smjese 20 µl			

dNTP – deoksinukleotid.

Sintetiziranu cDNA koristila sam kao kalup za vezivanje specifičnih početnica u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (prema engl. RT-PCR, real time polymerase chain reaction). Početnice za detekciju istraživanih gena (potpoglavlje 3.1.5.) sintetizirala sam u Primer Blast programu. Količinu produkta u RT-PCR reakciji odredila sam SYBR Green PCR Master Mix-om na uređaju ABI Prism 7300 prema uputama proizvođača.

**Tablica 4. Program reakcije za RT-PCR**

<b>Program reakcije</b>	
1. 94 °C 10 min	
2. 94 °C 15s	40X
60 °C 1min	

Prvi ciklus na kojem je moguće odrediti nastajanje PCR fragmenta je prag, Ct (prema engl. cycle treshold). Analizu podataka napravila sam usporedbom Ct vrijednosti istraživanog gena uz normalizaciju prema Ct vrijednosti za kućepaziteljskog (prema engl. housekeeping) gen *Gapdh*. Rezultate sam prikazala kao omjer između vrijednosti pokusnih u odnosu na kontrolne skupine za pojedini gen (n, prema engl. fold change).

### **3.2.5. Izolacija ukupnih bjelančevina**

Uzorke tkiva uterusa homogenizirala sam u RIPA puferu uz dodatak proteaznih inhibitora (Complete tableta). Za svaku predviđenu točku istraživanja ujedinih sam tri roga uterusa različitih životinja i taj postupak odvojeno ponovila tri puta, sveukupno sam za svaku točku istraživanja koristila ukupno 9 životinja. Homogenizirane uzroke ostavila sam na ledu 1h, i promiješala svakih 15 min na vorteks tresilici. Nakon toga sam uzorke stavila centrifugirati na 4°C, 13 200 rpm-a, 20 min. Supernatant sam prebacila u čiste, prethodno ohlađene, tubice od 1,5 ml i odredila koncentraciju bjelančevina pomoću Bradford Reagent-a i spektrofotometra prema uputama proizvođača. Uzorke sam nakon određivanja koncentracije pripremila za nanos na gel u denaturirajućim uvjetima. Pripremila sam otopine 1 µg/µl bjelančevina s puferom za nanošenje bjelančevina na gel i dodatkom 2-merkaptetanola. Uzorke sam stavila grijati na 95°C 10 min i pospremila ih na -20°C za analizu western blot metodom.

### **3.2.6. Western blot**

Lizate ukupnih bjelančevina pripremila sam u denaturirajućim uvjetima i razdvojila ih na 12% SDS-poliakrilamidnom gelu. U jažice sam nanosila 15 µg ukupnog lizata. Elektroforeza sam vodila pri 110 V kroz sabijajući i razdvajajući gel. Elektroforeza je trajala dok nisu iscurili bjelančevinski markeri od 15 kDa i dostatno se razdvojili bjelančevinski markeri od 25 i 30 kDa. Nakon elektroforeze uzorke sam prenijela na nitroceluloznu membranu u vlažnim uvjetima pri konstantnom naponu od 60V u trajanju od 1 h i 15 min. Membranu sam inkubirala s 5% otopinom BSA u 0,05% TBST puferu 1h na RT uz neprestano kružno miješanje na tresilici. Nakon blokiranja nespecifičnih veznih mjesta membrane sam inkubirala s otopinom specifičnih primarnih protutijela (potpoglavlje 3.1.7.1.) u 5% BSA/0,05% TBST-u preko noći na



4°C uz neprestano kružno miješanje na tresilici. Sljedeći dan uzorke sam isprala pet puta po 5 min u 0,05% TBST-u. Za detekciju specifičnih signala membrane sam inkubirala sekundarnim protutijelima obilježenima peroksidazom (potpoglavlje 3.1.7.2.) u otopini 1% BSA/0,05% TBST-a 1h na RT. Nakon inkubacije membrane sam isprala pet puta po 5 min u 0,05% TBST-u. Za vizualizaciju imunokompleksa koristila sam kemiluminescentni kit za detekciju ECL i instrument Alliance 4.7.

Specifičnost vezanja protutijela na bjelančevine prenesene na membranu potvrdila sam koristeći serum životinje u kojoj je proizvedeno protutijelo. Da bi potvrdila specifičnost vezanja Hand2 proteina koristila sam kozji serum, a za FGF9 zečji serum. Umjesto inkubacije membrane s primarnim protutijelom preko noći, membrane sam izložila istoj koncentraciji (kao i primarnih protutijela) ukupnih imunoglobulina u serumu. Sljedeći dan sam nastavila s prethodno navedenim protokolom. Da bi potvrdila specifičnost vezana Hand2 protutijela koristila sam Hand2 blokirajući peptid.

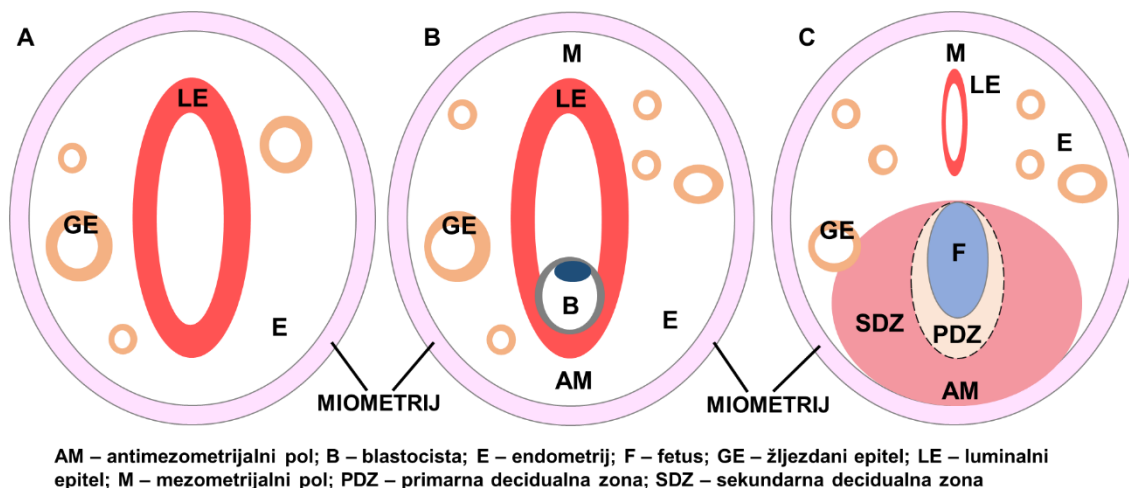
### **3.2.7. Statistička obrada podataka**

Dobivene podatke sam statistički obradila koristeći računalni program STATISTICA 10 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, SAD). Prema analizi raspodjele podataka koristila sam parametrijske testove da bi izračunala statističku značajnost. Za dva nezavisna uzorka Student-ov t-test, a za usporedbu više nezavisnih grupa ANOVA test. Vrijednost  $p \leq 0,05$  sam koristila kao statistički značajnu promjenu. Za prikaz rezultata koristila sam Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation. Podatke sam grafički prikazala i izrazila kao srednju vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Histološke promjene uterusa tijekom rane trudnoće

Za vrijeme trudnoće uterus miša prolazi kroz histološke promjene uvjetovane ulaskom blastociste u lumen uterusa, njenom implantacijom i poticanjem diferencijacije stromalnih stanica u decidualni fenotip. Peri-implantacijsko razdoblje označava period od oplodnje do 7,5 dana trudnoće. Tijekom 2,5 dana trudnoće uterus je histološki podijeljen na endometrij koji se sastoji od LE-a, strome, GE-a i miometrija kojeg čini kružnomišićni sloj (Slika 14A). Tijekom implantacije blastociste (4,5 dan trudnoće) dolazi do histoloških promjena u uterusu. Na samom mjestu implantacije blastociste za LE, stromalne stanice podliježu decidualizaciji te na tom području dolazi do hipocelularnosti endometrija. To dovodi do povećane krvožilne propusnosti na samom mjestu implantacije i započinje proces zatvaranja LE-a oko blastociste (Slika 14B). Za vrijeme implantacije blastocista se pričvršćuje za LE na antimezometrijalnom dijelu uterusa, na kojem dolazi do razvoja PDZ-a. Napretkom trudnoće decidualizacija se nastavlja, te tijekom 7,5 dana trudnoće nastaje jasno vidljiva razlika između PDZ-a i SDZ-a (Slika 14C). Za lakše razumijevanje rezultata koji će biti prikazani, shematski sam prikazala histološke promjene uterusa tijekom peri-implantacijskog razdoblja [55, 61, 165].



**Slika 14. Shematski prikaz histoloških promjena uterusa.**

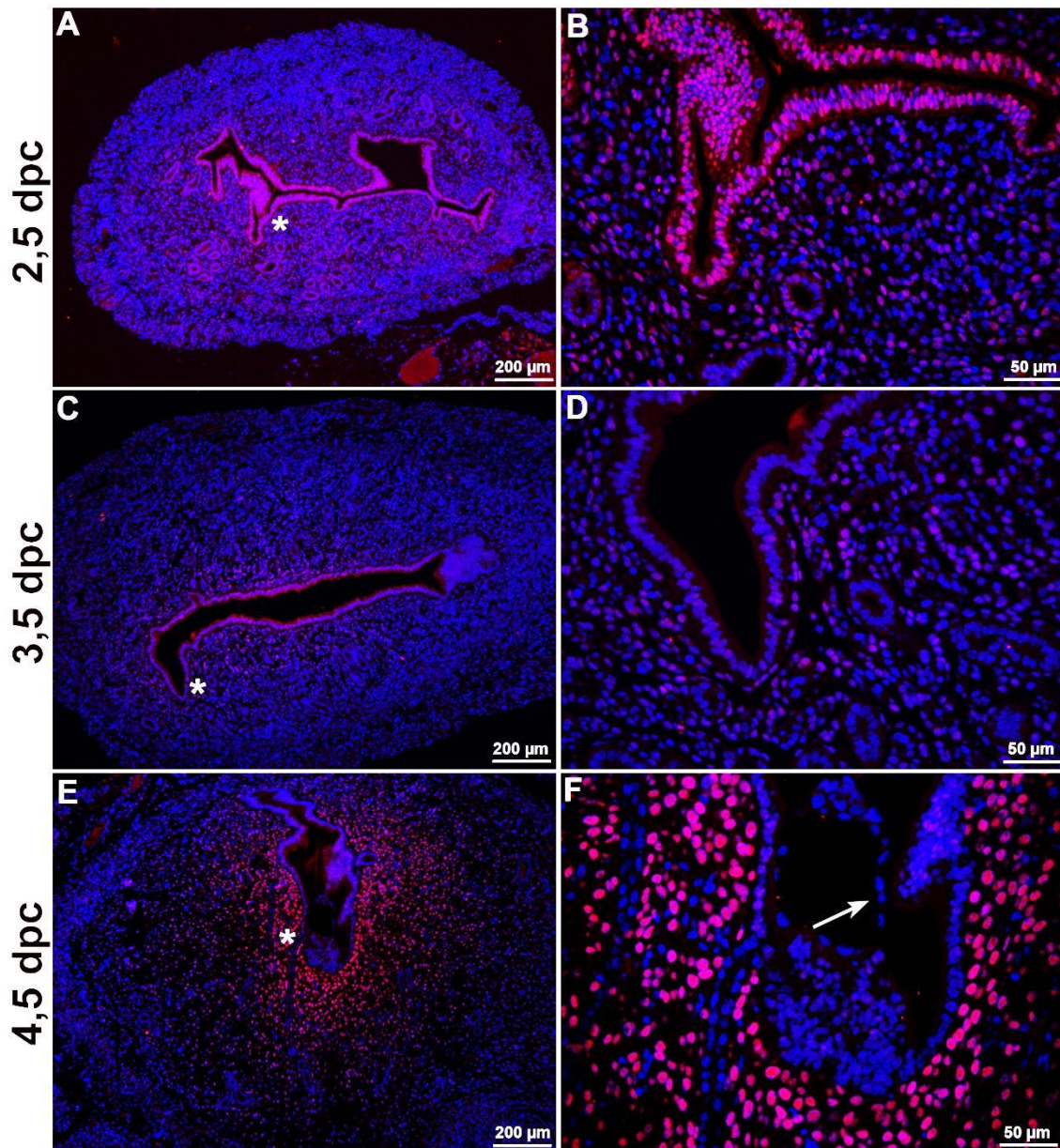
**A)** tijekom 2,5 dana trudnoće, **B)** u procesu implantacije, tijekom 4,5 dana trudnoće i **C)** tijekom 7,5 dana trudnoće.

## **4.2. Vremenski i prostorni izražaj PR-a tijekom rane trudnoće**

Za uspostavljanje i održavanje trudnoće je neophodan P, koji svoju funkciju ostvaruje putem svog receptora, PR-a [240]. Da bi utvrdila vremenski i prostorni izražaj PR-a tijekom rane trudnoće u miševa, koristila sam metodu imunofluorescencije na tkivu uterusa prikupljenog nakon 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, i 7,5 dana trudnoće.

### **4.2.1. Izražaj PR-a raste u stromalnim stanicama uterusa do i za vrijeme implantacije**

Za vrijeme 2,5 dana trudnoće PR (crvena fluorescencija) je prvenstveno izražen u jezgrama LE-a, dok je dijelom prisutan i u jezgrama stromalnih stanica, kao i u jezgrama GE-a (Slika 15A i B). Daljnjim napretkom trudnoće izražaj PR-a opada u LE-u, ali se povećava u jezgrama stromalnih stanica (Slika 15C i D). Za vrijeme implantacije, tijekom 4,5 dana trudnoće izražaj PR-a opada u LE-u, iako je još uvijek prisutan u jezgrama LE-a, dok njegov izražaj raste u stromalnim stanicama na samom mjestu implantacije (Slika 15F).



**Slika 15. Vremenski i prostorni raspored izražaja PR-a tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće.**

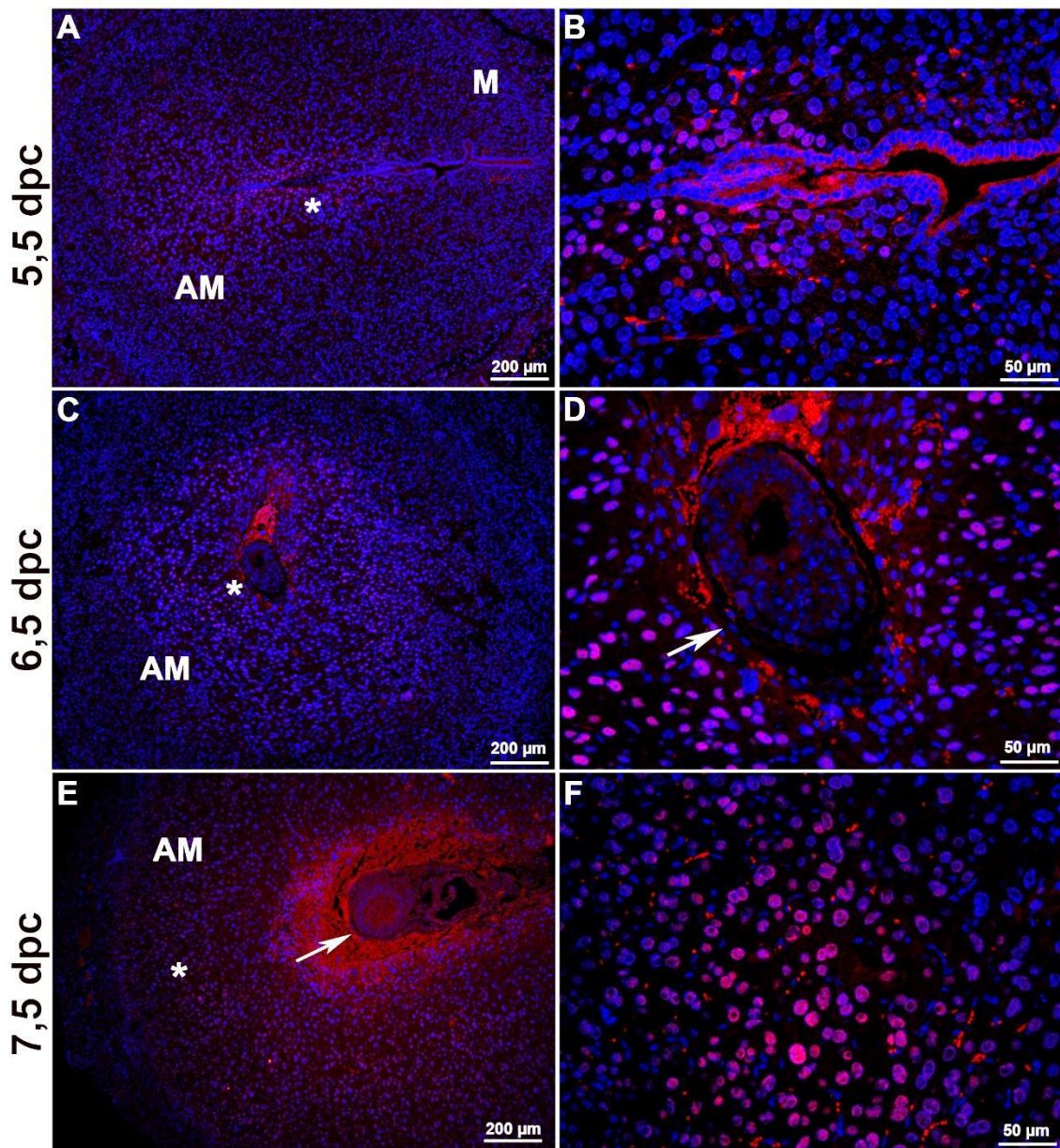
Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim poliklonskim protutijelom za PR (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici F prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### **4.2.2. Progesteronski receptor (PR) je aktivan u decidualnim stanicama**

Nakon implantacije stromalne stanice podliježu procesu decidualizacije, za koju je neophodna prisutnost P-a [239]. Tijekom 5,5, dana trudnoće PR (crvena fluorescencija) je izražen prvenstveno u jezgri stromalnih stanica kao i decidualnim stanicama (Slika 16A i B), dok je njegov izražaj u LE-u značajno smanjen obzirom na prva 4 dana trudnoće (Slika 15). Daljnjim procesom diferencijacije stromalnih stanica



u decidualni fenotip PR je izražen u jezgri velikih decidualnih stanica na području PDZ-a i SDZ-a (Slika 16D i F).

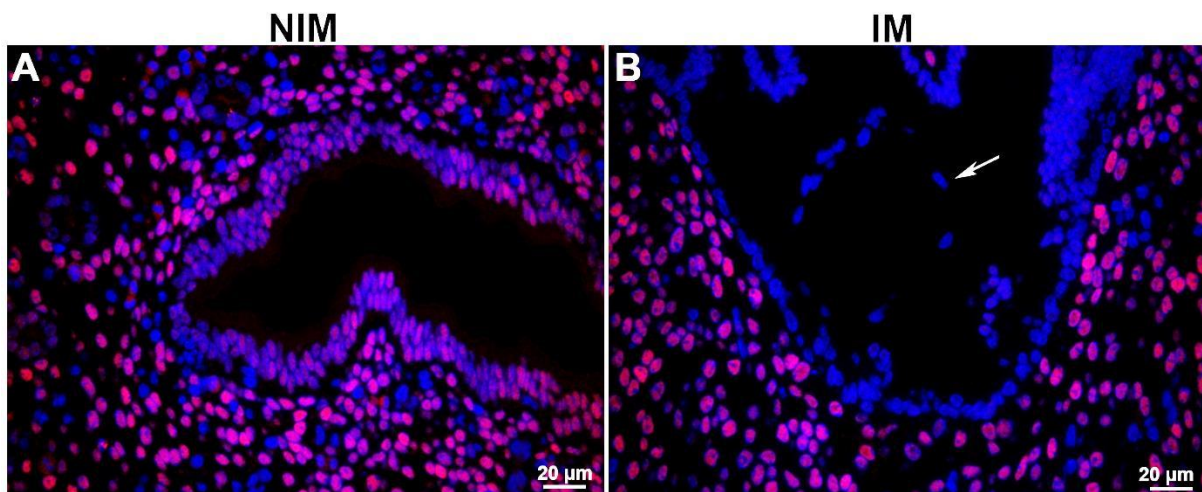


**Slika 16. Vremenski i prostorni raspored izražaja PR-a tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.**

Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim poliklonskim protutijelom za PR (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelice na slikama D i E prikazuju embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa AM - antimezometrijalni pol; dpc: days post coitum; M - mezometrijalni pol (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

### 4.2.3. Prostorni raspored PR-a je različit na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Prethodna istraživanja su pokazala da je PR pleiotropni regulator svakog aspekta ženske reprodukcije [135]. Zanimalo me da li postoji razlika u prostornom rasporedu PR-a na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto tijekom 4,5 dana trudnoće. Poznato je da na mjestu implantacije blastociste dolazi do povećane krvožilne propusnosti. Da bi mogla odrediti implantacijska mjesta koristila sam test krvožilne propusnosti koristeći 0,1% otopinu Chicago blue boje [52]. Implantacijska mjesta se oboje plavo te sam ih odvojila od ne-implantacijskih mjesta (bezbojna). Tijekom implantacije, prostorni raspored PR-a se mijenja na ne-implantacijskom mjestu u odnosu na implantacijsko mjesto. Na ne-implantacijskom mjestu PR je izražen u jezgrama stanica LE-a kao i stromalnim stanicama (Slika 17A). Stanice LE-a na mjestu implantacije imaju smanjen izražaj PR-a u odnosu na stromalne stanice koje okružuju mjesto implantacije (Slika 17B).

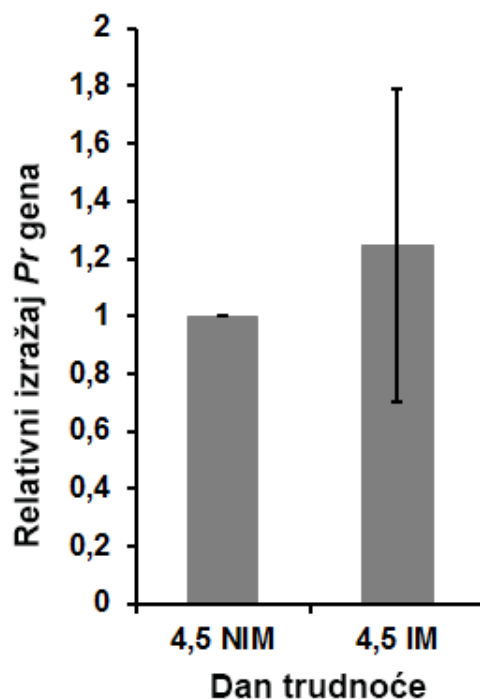


**Slika 17. Izražaj PR-a tijekom implantacije.**

**A)** Izražaj PR-a na ne-implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. **B)** Izražaj PR-a na implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim poliklonskim protutijelom za PR (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici B prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. NIM – ne implanatcijsko mjesto, IM-implantacijsko mjesto.

#### 4.2.4. Razina izražaja PR-a se ne mijena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Analiza indirektna fluorescencije prostornog rasporeda PR-a tijekom implantacije pokazala je razliku u njegovoj prostornoj raspodjeli na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 17), zanimalo me da li postoji razlika i u aktivaciji *Pr* gena na ta dva mjesta. Analiza aktivacije *Pr* gena RT-PCR metodom na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto pokazala je da ne postoji značajna razlika u izražaju *Pr*-a na ta dva mjesta (Slika 18).



**Slika 18. Razlika u aktivaciji *Pr* gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.**

Relativna razina izražaja *Pr* gena u ne-implantacijskom mjestu i implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške u tri odvojeno provedena pokusa. NIM – ne-implantacijsko mjesto, IM – implantacijsko mjesto.

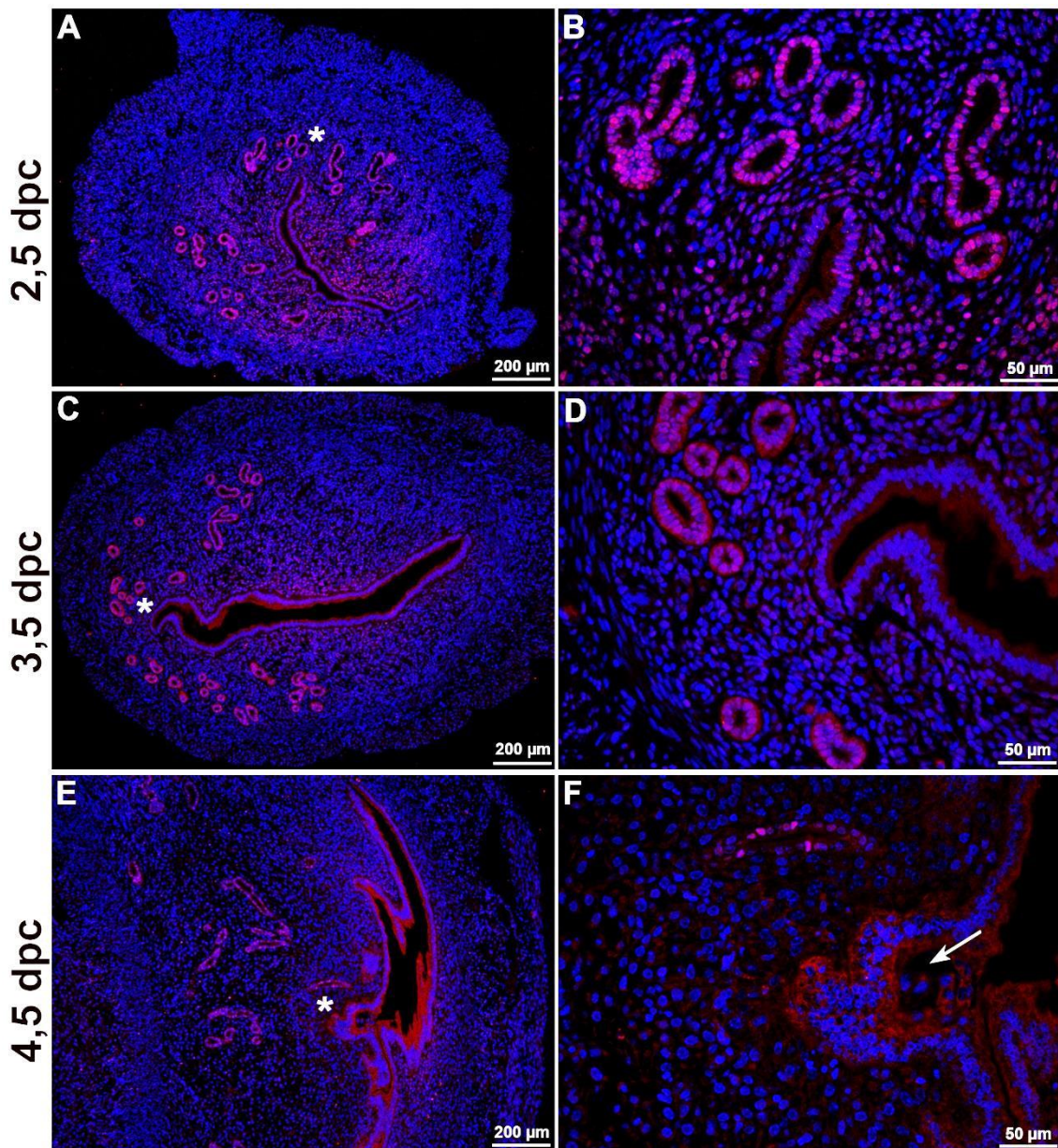
### **4.3. Vremenski i prostorni izražaj ER $\alpha$ tijekom rane trudnoće**

Za pravilno uspostavljanje trudnoće osim P-a, potreban je i E, koju svoju biološku funkciju ostvaruje preko svoja dva receptora ER $\alpha$  i Er $\beta$ . Potpunom ablacijom ER $\alpha$ , pokazano je da je i on uz PR važan regulator uspostavljanja i održavanja trudnoće [182]. Također, u miševima je otkriveno da je kratkotrajna prisutnost E-a četvrtog dana trudnoće neophodna za implantaciju [145]. Obzirom da je ER $\alpha$  važan za reprodukciju, jedan od mojih ciljeva istraživanja je bio i odrediti vremenski i prostorni izražaj ER $\alpha$  tijekom rane trudnoće u miševa. Koristila sam metodu imunofluorescencije na tkivu uterusa prikupljenog nakon 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, i 7,5 dana trudnoće.

#### **4.3.1. Izražaj ER $\alpha$ u stanicama LE-a opada za vrijeme implantacije**

Za vrijeme 2,5 dana trudnoće ER $\alpha$  (crvena fluorescencija) je prvenstveno izražen u jezgrama GE-a, stromalnih stanica, kao i u jezgrama stanica LE-a. (Slika 19A i B). Napretkom trudnoće izražaj ER $\alpha$  opada u LE-u ali se povećava u jezgrama GE-a (Slika 19C i D). Za vrijeme implantacije, tijekom 4,5 dana trudnoće ER $\alpha$  je prisutan u citoplazmi stanica LE-a na mjestu adhezije blastociste za LE. Kroz stromu endometrija, ER $\alpha$  je prisutan u jezgrama stanica GE-a (Slika 19F).





**Slika 19. Vremenski i prostorni raspored izražaja ER $\alpha$  tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće.**

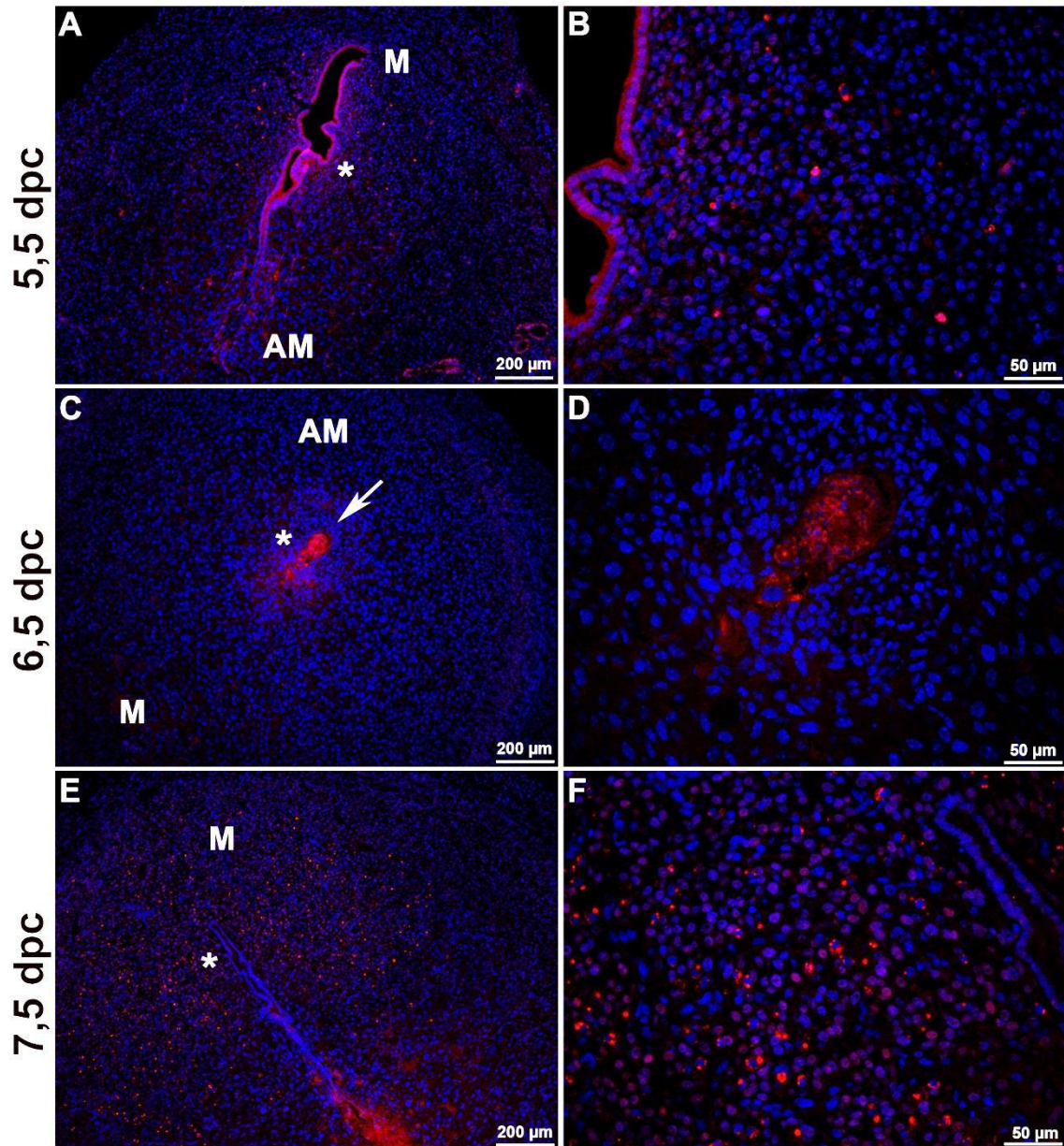
Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim monoklonskim protutijelom za ER $\alpha$  (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici F prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### **4.3.2. Procesom decidualizacije dolazi do smanjenja izražaja ER $\alpha$ u uterusu**

Decidualizacija započinje procesom implantacije. Tijekom 5,5, dana trudnoće ER $\alpha$  (crvena fluorescencija) je prisutan u jezgrama LE-a, kao i u jezgrama nediferenciranih stromalnih stanica na mezometrijalnom polu uterusa (Slika 20A i B). Pojačanom diferencijacijom stromalnih stanica u decidualni fenotip izražaj ER $\alpha$  se smanjuje u odnosu na razdoblje od 2,5 - 4,5 dana trudnoće (Slika 19). Njegov



prostorni raspored izražaja ER $\alpha$  unutar stanice se mijenja. Ovisno o populaciji stanica u kojima je izražen prisutan je u jezgri ili u citoplazmi nediferenciranih stromalnih stanica na mezometrijalnom polu uterusa (Slika 20F).

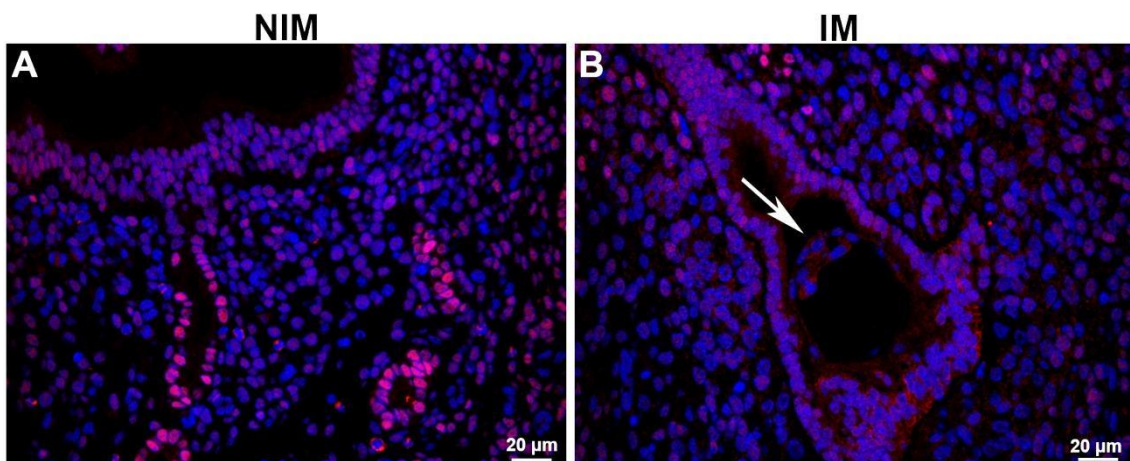


**Slika 20. Vremenski i prostorni raspored izražaja ER $\alpha$  tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.**

Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim monoklonskim protutijelom za ER $\alpha$  (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici C prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. AM - antimezometrijalni pol; dpc: days post coitum; M - mezometrijalni pol (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### 4.3.4. Na mjestu implantacije blastociste ER $\alpha$ je prisutan u citoplazmi stanica LE-a

Tijekom implantacije, prostorni raspored ER $\alpha$  se mijenja na ne-implantacijskom mjestu u odnosu na implantacijsko mjesto. Na ne-implantacijskom mjestu jak intenzitet bojanja za ER $\alpha$  je prisutan u jezgrama stanica GE-a, dok je slabijim intenzitetom bojanja prisutan u jezgrama stanica LE-a i okolnoj populaciji stromalnih stanica (Slika 21A). Na samom mjestu pričvršćivanja trofoblasta za LE, ER $\alpha$  se nalazi u citoplazmi stanica LE-a na neposrednom kontaktu trofoblasta s epitelom endometrija (Slika 21B). Nadalje, distalno od mjesta implantacije blastociste, ER $\alpha$  je i dalje prisutan u jezgrama stanica LE-a, GE-a i nediferenciranim stromalnim stanicama (Slika 21B). Promjena raspodjele ER $\alpha$  iz jezgre u citoplazmu stanica LE-a na neposrednom kontaktu blastociste za LE, ukazuje da je ER $\alpha$  u tim stanicama transkripcijski inaktivan.



**Slika 21. Izražaj ER $\alpha$  tijekom implantacije.**

**A)** Izražaj ER $\alpha$  na ne-implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. **B)** Izražaj ER $\alpha$  na implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim monoklonskim protutijelom za ER $\alpha$  (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici B prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. NIM – ne implanatcijsko mjesto, IM-implantacijsko mjesto.

#### **4.4. Vremenski i prostorni izražaj progesteronom reguliranih gena tijekom rane trudnoće**

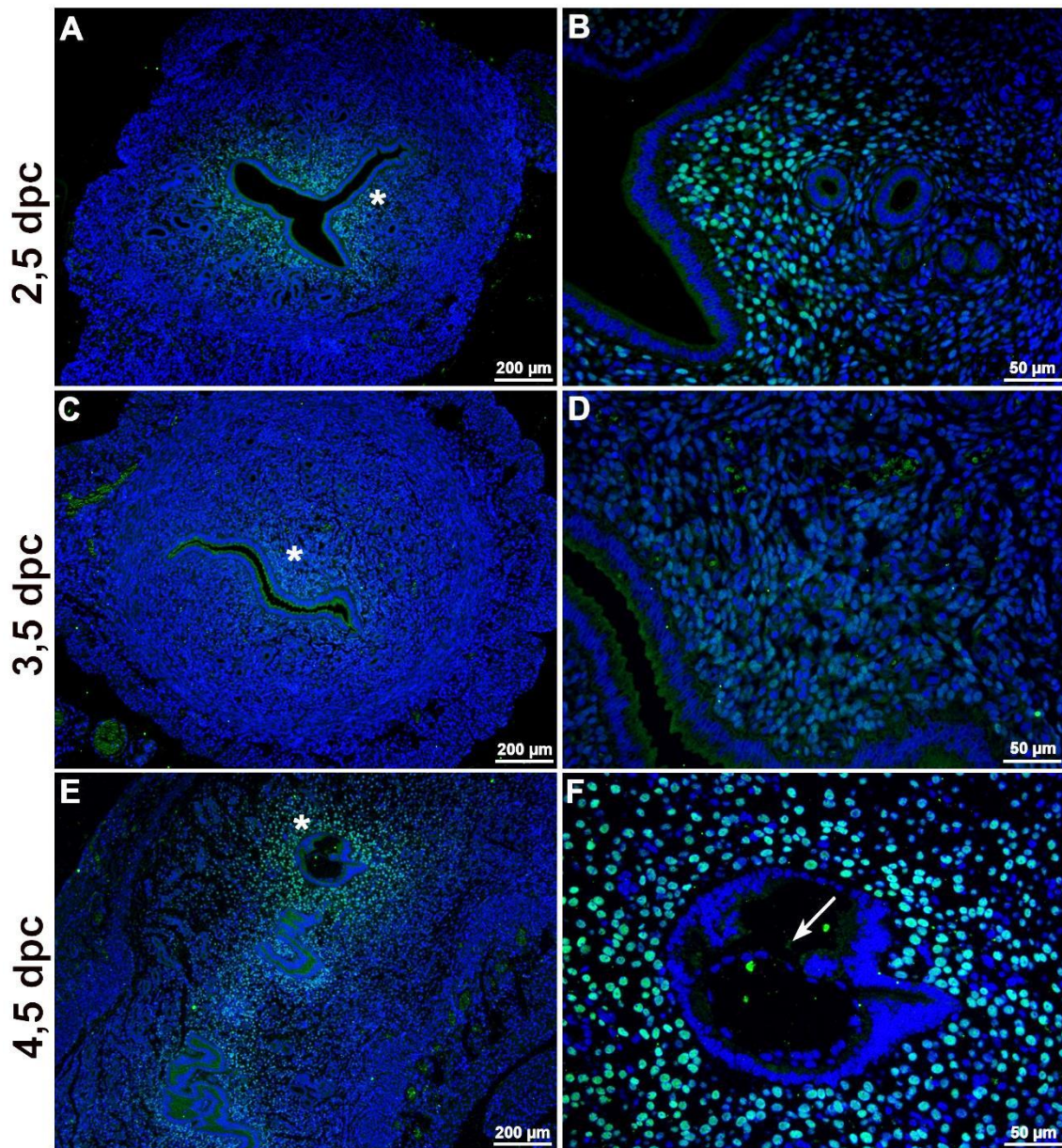
##### **4.4.1. Izražaj Hand2 tijekom rane trudnoće**

Jedan od P-om reguliranih gena je transkripcijski čimbenik Hand2 koji inhibira proliferaciju LE-a tijekom peri-implantacijskog razdoblja, a taj je događaj neophodan za pravilnu implantaciju [128]. Da bi utvrdila njegov prostorni i vremenski izražaj koristila sam metodu imunofluorescencije na tkivu uterusa prikupljenog nakon 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, i 7,5 dana trudnoće.

##### **4.4.1.1. Tijekom rane trudnoće Hand2 je prisutan u jezgrama stromalnih stanica**

Za vrijeme 2,5 dana trudnoće Hand2 (zelena fluorescencija) se nalazi u jezgrama stromalnih stanica, ali nije prisutan u stanicama LE-a ni GE-a (Slika 22A i B). Nadalje, Hand2 ostaje izražen u jezgrama stromalnih stanica tijekom 3,5 i 4,5 dana trudnoće (Slika 22C i E), ali se njegov izražaj znatno poveća tijekom 4,5 dana trudnoće na mjestu implantacije blastociste (Slika 22F).





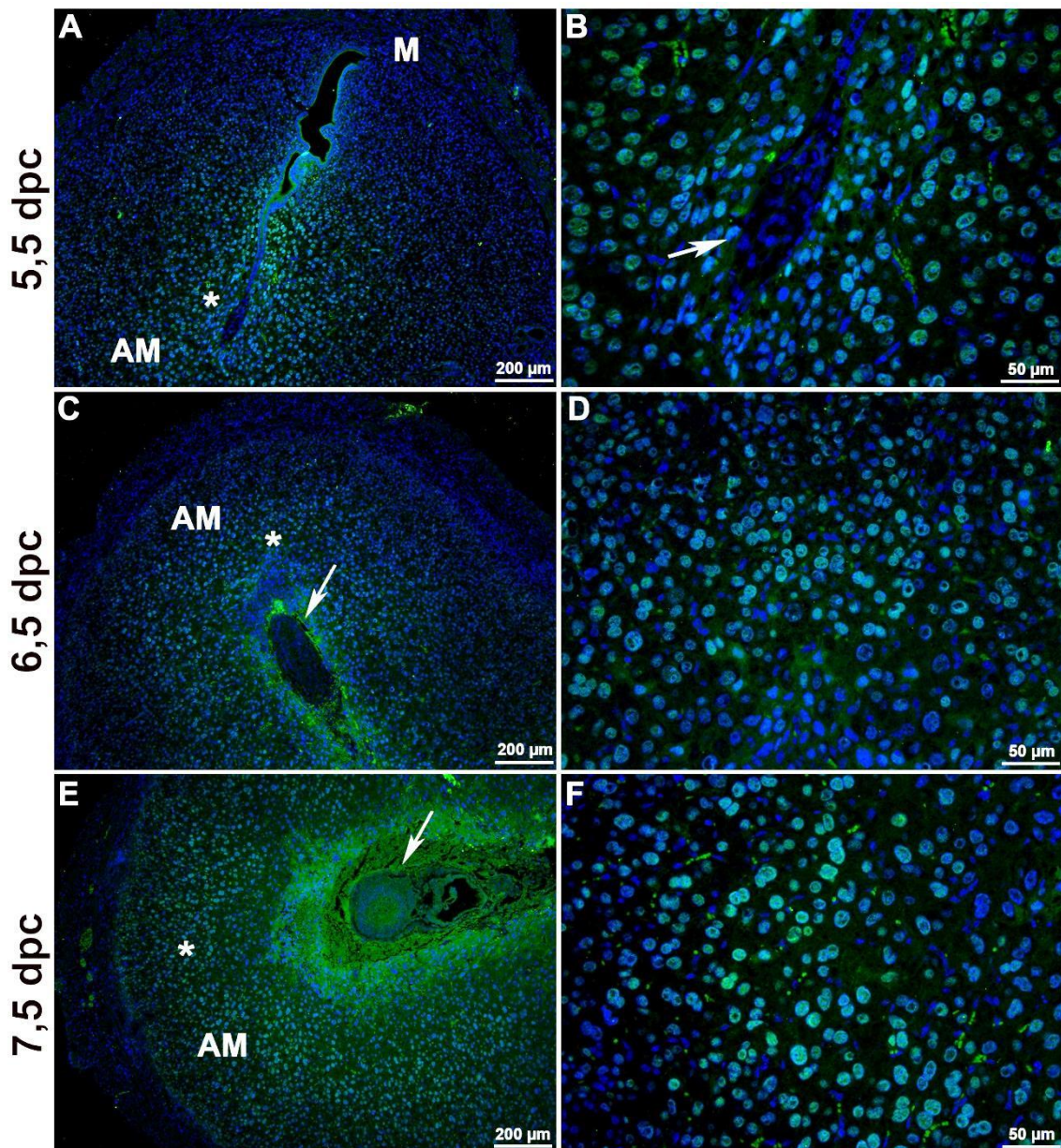
**Slika 22. Vremenski i prostorni raspored izražaja Hand2 tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće.**

Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici F prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.



#### 4.4.1.2. Decidualne stanice izražavaju Hand2

Tijekom 5,5, 6,5 i 7,5 dana trudnoće Hand2 je prisutan na antimezometrijalnom polu uterusa u području PDZ-a (Slika 23A, C i E). Decidualne stanice na mjestu implantacije blastociste izražavaju Hand2 (zeleno fluorescencija) koji se nalazi u njihovim jezgrama (Slika 23B, D i F).



**Slika 23. Vremenski i prostorni raspored izražaja Hand2 tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.**

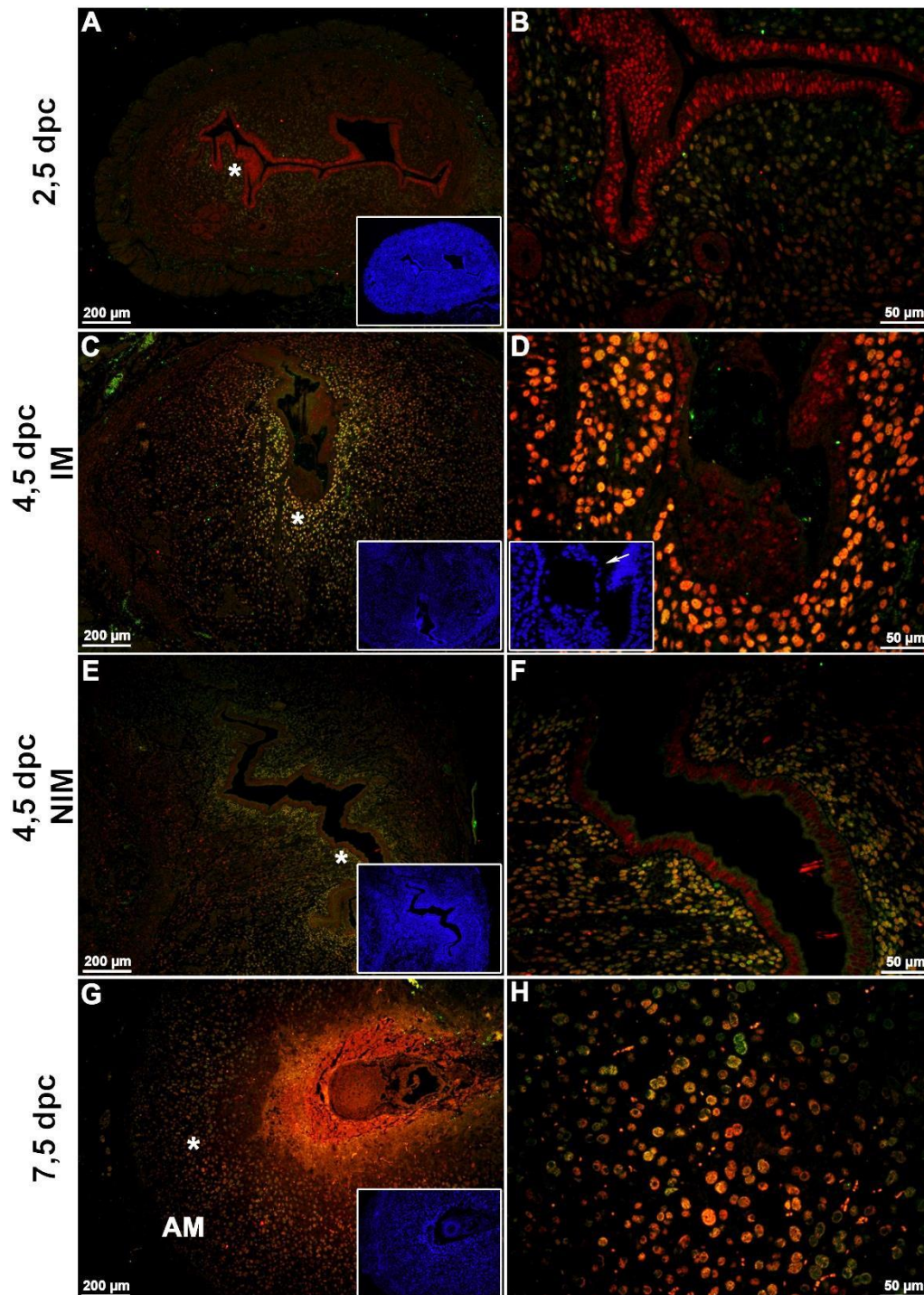
Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelice na slikama B, C i E prikazuju embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. AM – antimezometrijalni pol; M – mezometrijalni pol; dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### **4.4.1.3. Progesteronski receptor (PR) i Hand2 kolokaliziraju tijekom peri-implantacije**

Analiza prostornog i vremenskog izražaj PR-a i Hand2 tijekom rane trudnoće pokazala je da su jedna i druga bjelančevina prisutne u stromalnim stanicama endometrija uterusa tijekom peri-implantacije. Prema prijašnjim istraživanjima, pretpostavljalo se da kolokalizacija postoji, ali nije bila direktno dokazana. Prema tome, moj slijedeći cilj istraživanja je bio odrediti međusobni odnos Hand2 i PR-a na staničnoj razini. Metodom imunofluorescencije na tkivima prikupljenim na 2,5, 4,5 i 7,5, dana trudnoće istražila sam kolokalizaciju PR-a i Hand2 bjelančevine. Te dane sam odredila kao ključne točke razdoblja peri-implantacije jer predstavljaju reprezentativne histološke promjene uterusa i obuhvaćaju procese u uterusu koje sam proučavala: prije implantacije (2,5 dan trudnoće), za vrijeme implantacije (4,5 dan trudnoće) i za vrijeme decidualizacije (7,5 dan trudnoće).

Kod 2,5 dana trudnoće izražaj Hand2 i PR-a se preklapa. Mala populacija stromalnih stanica uterusa koja izražava PR, izražava i Hand2 (narančasta fluorescencija) (Slika 24A i B). Za razliku od stromalnih stanica, u stanicama LE-a i GE-a isključivo je prisutan samo PR (crvena fluorescencija) (Slika 24B). Procesom implantacije prisutnost i izražaj Hand2 raste u stromalnim stanicama oko implantacijskog mjesta kao i njegova kolokalizacija s PR-om (Slika 24C i D). Svaka Hand2 pozitivna stanica izražava i PR (Slika 24D). Na ne-implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće, prostorni raspored i kolokalizacija Hand2/PR je slična kao i tijekom 2,5 dana trudnoće (Slika 24F). Razvojem decidue, tijekom 7,5 dana trudnoće Hand2 je, kao i PR, prisutan u jezgrama velikih decidualnih stanica na antimezometrijalnom polu uterusa (Slika 24G i H). Kolokalizacija Hand2 i PR-a je prisutna isključivo u jezgrama stromalnih, odnosno decidulanih stanica (Slika 24). Ovaj dio mog istraživanja je pokazao da je svaka Hand2 pozitivna stanica istovremeno i PR pozitivna, ali ne i obrnuto.





**Slika 24. Kolokalizacija PR-a i Hand2 tijekom peri-implantacije.**

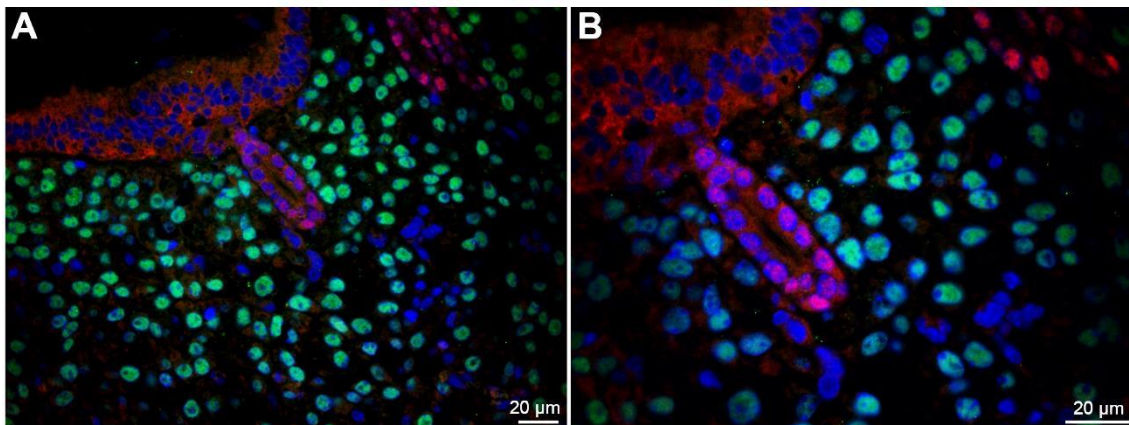
(A&B) izražaj PR-a i Hand2 tijekom 2,5 dana trudnoće. (C&D) izražaj PR-a i Hand2 na mjestu implantacije tijekom 4,5 dana trudnoće. (E&F) izražaj PR-a i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu tijekom 4,5 dana trudnoće. (G&H) izražaj PR-a i Hand2 tijekom 7,5 dana trudnoće. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno) i zečjim poliklonskim protutijelom za PR (crveno). Mjesto kolokalizacije označava narančasta fluorescencija. Umetnute slike na A, C, D i G prikazuju jezgre koje su obojane plavo (DAPI bojanje). Strelce na umetnutoj slici D prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. dpc: days post coitum; NIM – ne-implantacijsko mjesto; IM – implantacijsko mjesto; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.



#### 4.4.1.4. Na mjestu implantacije ER $\alpha$ nije prisutan u stanicama koje izražavaju Hand2

Jedan od ciljeva istraživanja ovog rada bio je i odrediti izražaj i odnos između PR-a i ER $\alpha$  na mjestu implantacije. Obzirom da su oba protutijela za receptore porijeklom iz zeca, nije bilo moguće istražiti odnos PR-a i ER $\alpha$  metodom imunofluorescentnog dvostrukog obilježavanja tkiva. Zbog toga sam iskoristila dobiveni rezultat, da je svaka Hand2 pozitivna stanica izražava PR i usporedila odnos izražaja ER $\alpha$  i Hand2 na mjestu implantacije.

Tijekom implantacije, ER $\alpha$  je prisutan u citoplazmi LE-a, ali i u jezgrama stanica GE-a. Njegov izražaj u jezgrama stanica GE-a upućuje da je u tim stanicama aktivan kao transkripcijski čimbenik (Slika 25). Na samom mjestu implantacije ne dolazi do preklapanja signala za ER $\alpha$  i Hand2 (Slika 25). Prema tome, mogu zaključiti da na mjestu implantacije Hand2, odnosno PR, pozitivne stanice ne izražavaju ER $\alpha$ , i da stvaranje PDZ-a direktno ne ovisi o aktivnosti ER $\alpha$ .



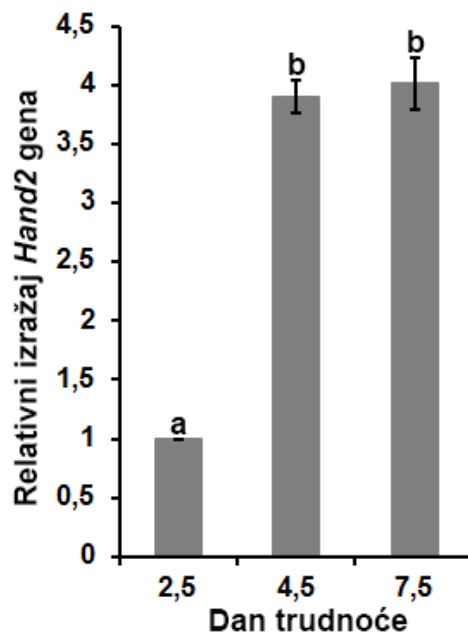
**Slika 25. Odnos izražaja Hand2 i ER $\alpha$  na mjestu implantacije.**

Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće sa zečjim monoklonskim protutijelom za ER $\alpha$  (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa.

#### 4.4.1.5. Izražaj *Hand2* gena i bjelančevine raste tijekom implantacije i decidualizacije

Imunofluorescentnom analizom izražaja *Hand2* vidjela sam da njegov izražaj raste odmicanjem trudnoće (Slika 22 i 23), htjela sam istražiti da li je to popraćeno i aktivacijom prijepisa i prevođenja *Hand2* gena tijekom 2,5, 4,5 i 7,5 dana trudnoće.

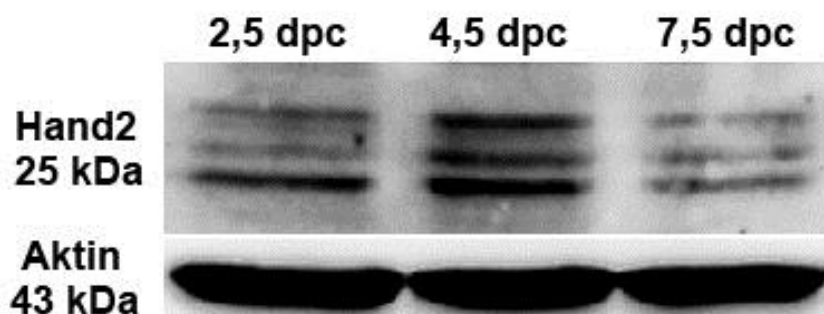
Metodom RT-PCR odredila sam izražaj *Hand2* gena tijekom rane trudnoće (Slika 26). Izražaj *Hand2* je statistički značajno veći tijekom 4,5 i 7,5 dana trudnoće u odnosu na 2,5 dan trudnoće (Slika 26).



**Slika 26. Razlika u aktivaciji *Hand2* gena tijekom peri-implantacije.**

Relativna razina izražaja *Hand2* gena tijekom 2,5, 4,5 i 7,5 dana trudnoće. Rezultati su dobiveni iz tri odvojeno provedena pokusa i prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške. Rezultati s različitim slovima su statistički značajni ( $p \leq 0,05$ ).

Western blot analizom koristeći Hand2 protutijelo potvrdila sam obrazac izražaja Hand2 od 2,5 do 7,5 dana trudnoće u odnosu na analizu izražaja *Hand2* gena RT-PCR metodom (Slika 26). Tijekom trudnoće Hand2 je prisutan u tri izoforme koje se protežu od 25 do 30 kDa. Izražaj Hand2 tijekom 4,5 dana trudnoće je povećan u odnosu na 2,5 i 7,5 dana trudnoće (Slika 27).



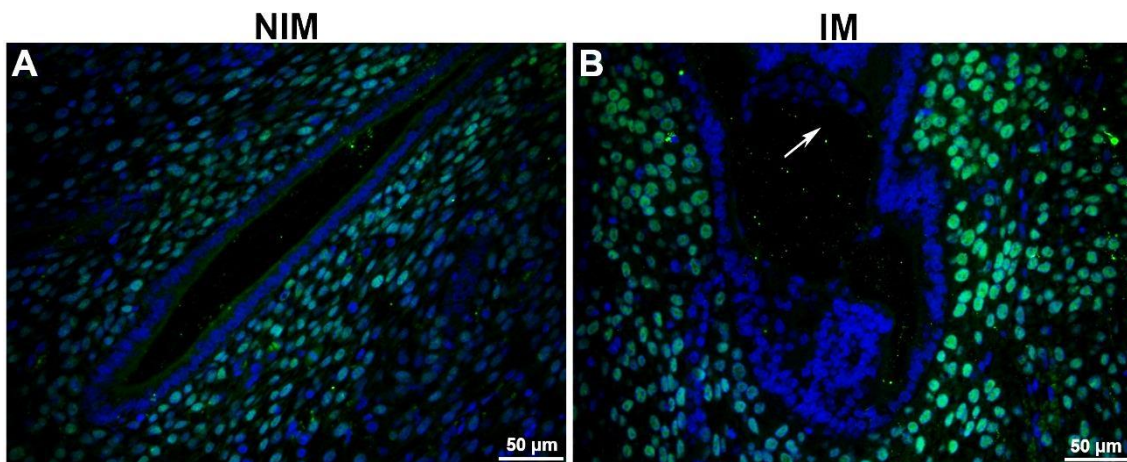
**Slika 27. Western blot analiza izražaja Hand2 bjelančevine tijekom rane trudnoće.**

Uzorci su obilježeni s kozjim poliklonskim Hand2 protutijelom. Za kontrolu nanosa bjelančevina je korišteno mišje monoklonsko protutijelo za aktin. Specifičnost vezanja Hand2 protutijela potvrđena je Hand2 blokirajućim peptidom. Rezultat je ogledni primjer jednog od tri odvojeno ponovljena pokusa.

#### 4.4.1.6. Prostorni raspored Hand2 se ne mijenja na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Testom krvožilne propusnosti na mjestu implantacije [52] odvojila sam implantacijska mjesta od ne-implantacijskih i koristila u daljnjim analizama izražaja Hand2.

Za vrijeme implantacije Hand2 je prisutan u jezgri stromalnih stanica na ne-implantacijskom mjestu (Slika 28A), kao i na implantacijskom mjestu (Slika 28B). Intenzitet fluorescentnog bojanja za Hand2 na implantacijskom mjestu je jači u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 28).

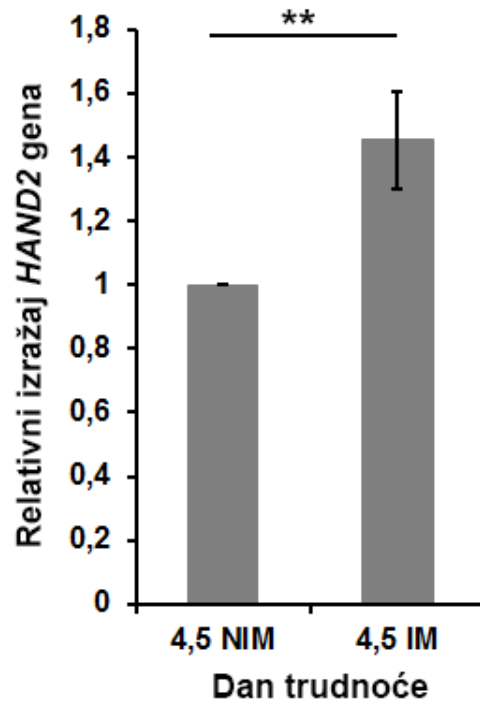


**Slika 28. Izražaj Hand2 tijekom implantacije.**

**A)** Izražaj Hand2 na ne-implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. **B)** Izražaj Hand2 na implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici B prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. NIM – ne implanatcijsko mjesto, IM-implantacijsko mjesto.

#### 4.4.1.7. Razina izražaja *Hand2* gena je značajno viša na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Imunofluorescentna analiza prostornog rasporeda Hand2 tijekom implantacije nije pokazala razliku u njegovoj prostornoj raspodjeli na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto, ali vidjela se razlika u intenzitetu bojanja za Hand2 na ta dva mjesta (Slika 28). Obzirom na razliku u intenzitetu bojanja za Hand2 na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto analizirala sam izražaj *Hand2* RT-PCR metodom na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto. Analiza dobivenih podataka pokazala je da je razina izražaja *Hand2* značajno viša na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 29).



**Slika 29. Razlika u aktivaciji Hand2 gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.**

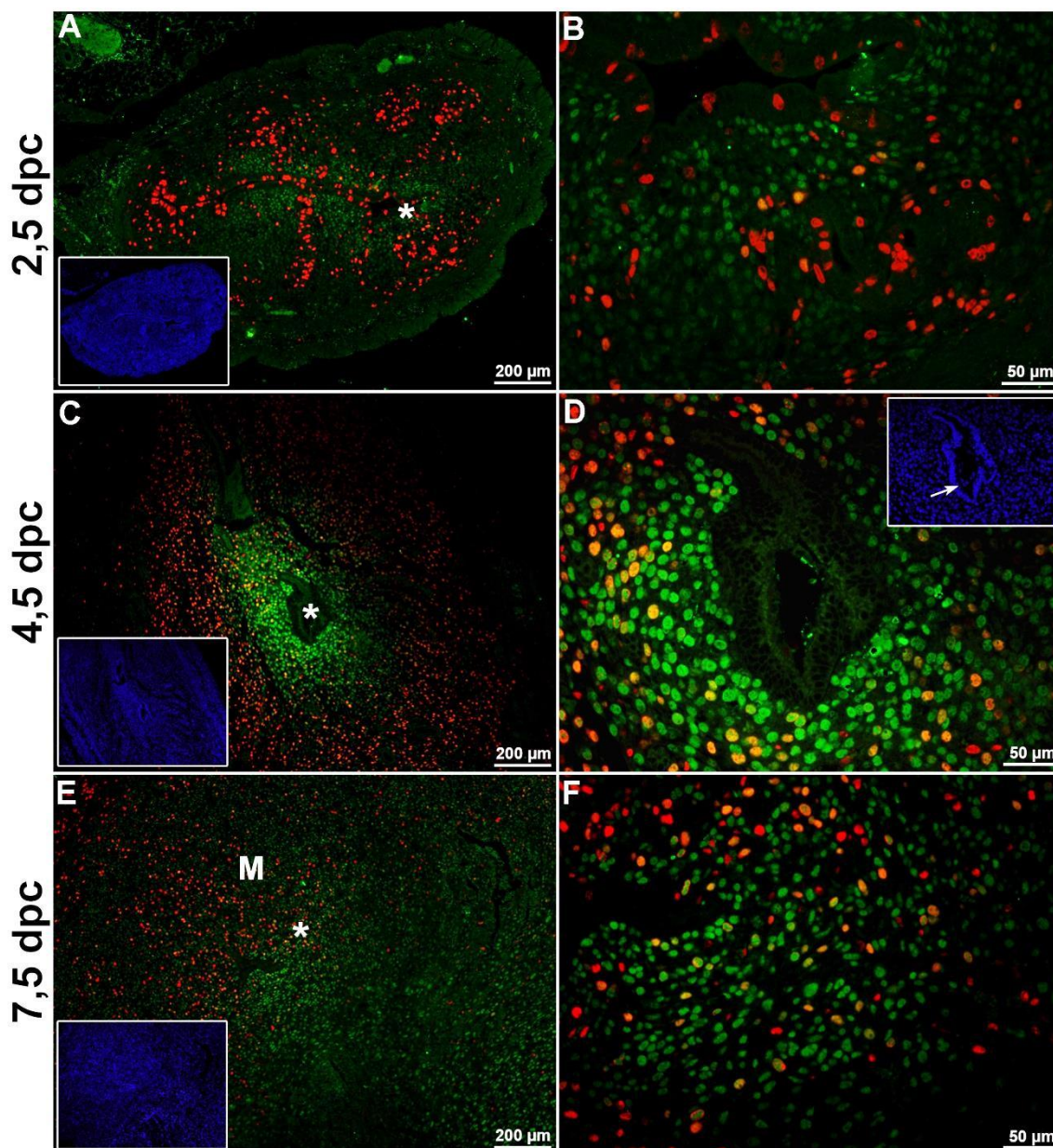
Relativna razina izražaja *Hand2* gena u ne-implantacijskom mjestu i implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške u tri odvojeno provedena pokusa. (\*\*) predstavlja statističku značajnost  $p \leq 0,01$ . NIM – ne-implantacijsko mjesto, IM – implantacijsko mjesto.

#### **4.4.1.8. Antiproliferacijski učinak Hand2 u diferenciranim stromalnim stanicama**

Prijašnja istraživanja su pokazala da Hand2 parakrinim mehanizmom inhibira proliferaciju LE-a tijekom peri-implantacije [128]. Obzirom da do sad nije pokazano da Hand2 pozitivne stanice ne proliferiraju tijekom tog razdoblja, analizirala sam izražaj Hand2 i BrdU pozitivnih stanica metodom imunofluorescencije. Cilj mi je bio odrediti odnos proliferirajućih stanica s Hand2 izražajem. Koristila sam metodu dvostrukog obilježavanja tkiva uterusa životinja kojima sam dva sata prije žrtvovanja ubrizgala otopinu BrdU-a (obilježava stanice u S fazi staničnog ciklusa).

Tijekom 2,5 dana trudnoće BrdU pozitivne stanice (crvena fluorescencija) se nalaze u LE-u, stromi kao i u GE-u (Slika 30A i B). U jezgri stromalnih stanica prisutan je Hand2 (zelena fluorescencija) (Slika 30B). Mala skupina stromalnih stanica koje izražavaju Hand2 ujedno su i BrdU pozitivne (narančasta fluorescencija) (Slika 30B). Implantacijom blastociste stvara se predio oko samog mjesta implantacije gdje prisutne stromalne stanice ne proliferiraju, ali izražavaju Hand2 (Slika 30C i D). Udaljavanjem od mjesta implantacije stromalne stanice izražavaju BrdU što upućuje na njihovu proliferacijsku aktivnost (Slika 30C). Također, kao i tijekom 2,5 dana trudnoće na mjestu implantacije postoji mala populacija stromalnih stanica koje su BrdU pozitivne i izražavaju Hand2 (Slika 30D). One čine granicu (prijelaz) između mjesta implantacije blastociste gdje stromalne stanice ne proliferiraju i mjesta udaljenog od implantacije gdje je prisutna proliferacija stromalnih stanica. Tijekom 7,5 dana trudnoće BrdU pozitivne stanice su prisutne na mezometrijalnom polu uterusa oko ostatnog dijela LE-a i isto kao kod 4,5 dana trudnoće mala populacija proliferirajućih stanica izražava Hand2 (Slika 30E i F).





**Slika 30. Analiza proliferacije Hand2 pozitivnih stanica.**

**(A&B)** izražaj Hand2 i BrdU tijekom 2,5 dana trudnoće. **(C&D)** izražaj Hand2 i BrdU na mjestu implantacije tijekom 4,5 dana trudnoće. **(E&F)** izražaj Hand2 i BrdU tijekom 7,5 dana trudnoće. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno) i štakorskim monoklonskim protutijelom za BrdU (crveno). Mjesto kolokalizacije označava narančasta fluorescencija. Umetnute slike na A, C, D i E prikazuju jezgre koje su obojane plavo (DAPI bojanje). Strelica na umetnutoj slici (D) prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. dpc: days post coitum; M – mezometrijalni pol; NIM – ne-implantacijsko mjesto; IM – implantacijsko mjesto; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### 4.4.1.9. Estrogen smanjuje izražaj Hand2 u mišicama tretiranim hormonima

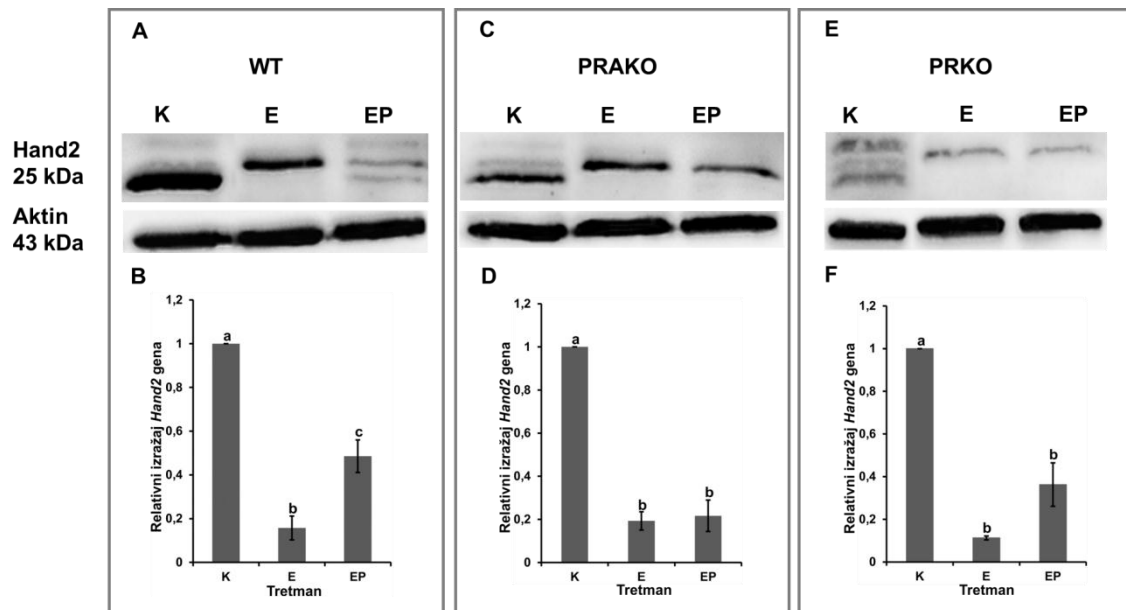
Prijašnja istraživanja su pokazala da je izražaj *Hand2* reguliran P-om [6]. Za uspješno uspostavljanje i održavanje trudnoće neophodno je usklađeno djelovanje steroidnih hormona E-a i P-a [28]. Da bi utvrdila regulaciju izražaja *Hand2* steroidnim hormonima, ovarijskomizirane homozigotne mišice PRKO i PRAKO sam tretirala s E-om, EP-om i sezamovim uljem kao kontrolom (K). Iz prikupljenih tkiva sam izolirala bjelančevine i ukupnu RNA i dobivene uzorke analizirala metodom western blot i RT-PCR-a.

U kontrolnoj skupini divljeg tipa (WT) mišica *Hand2* bjelančevina je dominantno prisutan u jednoj izoformi oko 25 kDa. Njen izražaj je smanjen nakon tretmana s E-om. Zanimljivo je da se nakon tretmana s E-om pojavljuje različita izoforma *Hand2* bjelančevine u odnosu na K. Nakon tretmana s EP-om vidljive su sve tri izoforme *Hand2* (Slika 31A), kao i u trudnoći (Slika 27). Analizom izražaja *Hand2* gena u WT mišicama prisutan je statistički značajan pad razine izražaja *Hand2* nakon tretmana s E-om u odnosu na K. Kombinacija E-a s P-om statistički značajno povisuje izražaj *Hand2* u odnosu na E tretman, ali je još uvijek statistički značajno manje nego u kontrolnoj skupini (Slika 31B).

Izražaj *Hand2* bjelančevine u PRAKO mišicama je također smanjen nakon tretmana s E-om i EP-om u odnosu na kontrolnu skupinu. U uzorcima nakon tretmana s E-om dominantno je prisutna srednja izoforma *Hand2* bjelančevine (Slika 31C). Također, i nakon tretmana s EP-om je prisutna samo jedna izoforma *Hand2* bjelančevine (Slika 31C). Analiza genetskog izražaja *Hand2* u uzorcima PRAKO mišica nakon tretmana hormonima potvrdila je da je izražaj *Hand2* statistički značajno snižen nakon tretmana E-om i EP-om u odnosu na kontrolu skupinu (Slika 31D).

Mišice s potpunom ablacijom *Pr-a* (PRKO) u kontrolnoj skupini sadrže *Hand2* bjelančevinu u sva tri oblika (od 25-30 kDa). Kao i u WT i PRAKO uzorcima, nakon tretmana s E-om i EP-om izražaj *Hand2* se smanjuje, ali je prisutna dominantno samo jedna (u sredini) izoforma *Hand2* (Slika 31E). Analiza genetskog izražaja *Hand2* u PRKO mišica potvrdila je rezultate dobivene western blot analizom, gdje se vidi da E i EP tretman statistički značajno smanjuju izražaj *Hand2* u odnosu na K (Slika 31F).



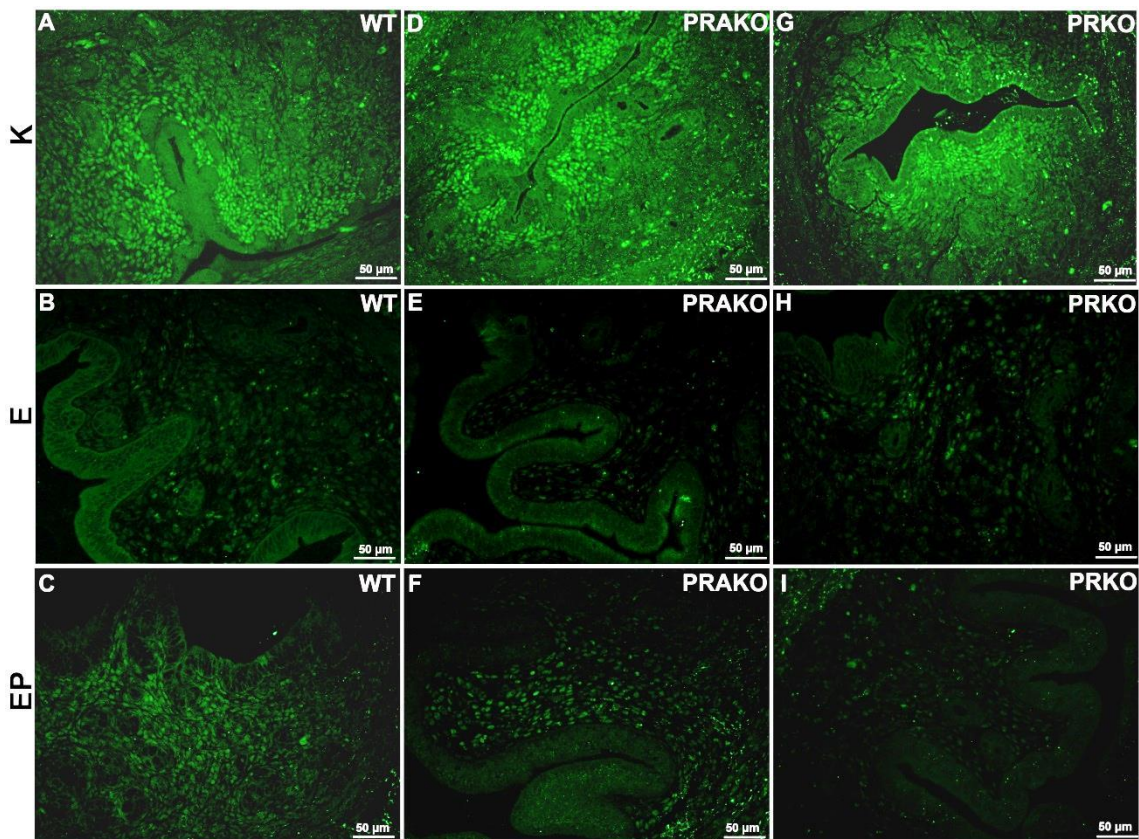


**Slika 31. Regulacija izražaja Hand2 steroidnim hormonima.**

Western blot analiza ukupnog lizata bjelančevina dobivenog iz tkiva uterusa ovarijskim ovarijskim **A)** WT, **C)** PRAKO i **E)** PRKO mišica nakon tretmana s estrogenom (E), estrogenom/progesteronom (EP) i sezamovim uljem kao kontrolom (K) u trajanju od četiri dana. Uzorci su obilježeni s kozjim poliklonskim Hand2 protutijelom. Za kontrolu nanosa bjelančevina je korišteno mišje monoklonsko protutijelo za aktin. Specifičnost vezanja Hand2 protutijela potvrđena je sa Hand2 blokirajućim peptidom. Rezultat je ogledni primjer jednog od tri odvojeno ponovljena pokusa.

Analiza ukupne RNA dobivene iz tkiva uterusa ovarijskim ovarijskim **B)** WT, **D)** PRAKO i **F)** PRKO mišica nakon tretmana s estrogenom (E), estrogenom/progesteronom (EP) i sezamovim uljem kao kontrolom (K) u trajanju od četiri dana. Relativnog izražaja *Hand2* gena određen je RT-PCR metodom. Rezultati su dobiveni iz tri odvojeno provedena pokusa i prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške. Rezultati s različitim slovima su statistički značajni ( $p \leq 0,05$ ).

Nadalje, imunofluorescentnom analizom tkiva uterusa ovarijskimiziranih WT, PRAKO i PRKO mišica s protutijelom za Hand2, potvrdila sam rezultate izražaja gena i bjelančevina dobivene RT-PCR i western blot analizom. U WT mišicama je izražaj Hand2 smanjen nakon tretmana E-om i EP-om što se očituje smanjenim intenzitetom bojanja za Hand2 (zelena fluorescencija) (Slika 32A-C). Nakon tretmana s EP dolazi do pojačanja intenziteta bojanja za Hand2 u odnosu na tkiva nakon E tretmana (Slika 32B i C). Obrazac izražaja Hand2 u uterusu PRAKO (Slika 32D-F) i PRKO (Slika 32G-I) mišica se ponavlja kao i u uterusu WT mišica, uz razliku da nakon EP tretmana u tkivu uterusa PRKO mišica intenzitet bojanja za Hand2 se ne pojačava u odnosu na E tretman (Slika 32H i I)

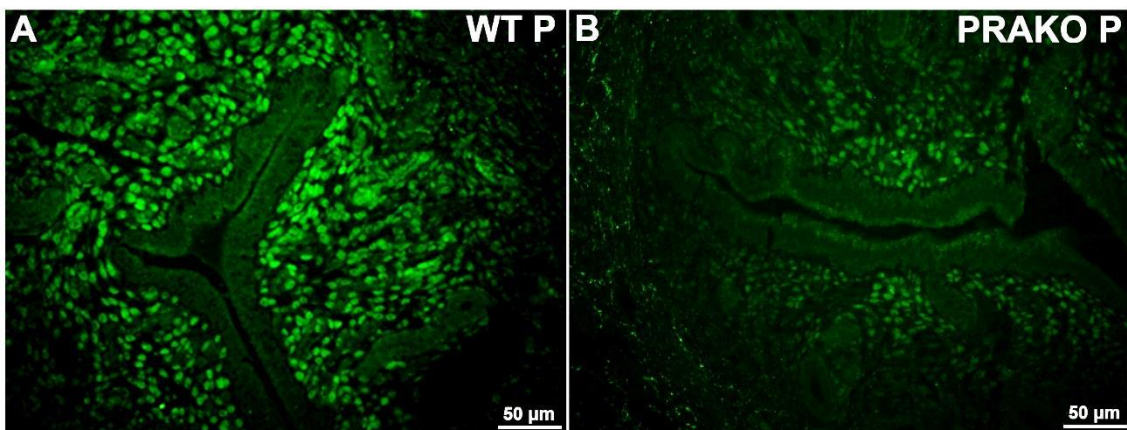


**Slika 32. Imunofluorescentna analiza izražaja Hand2 na tkivu uterusa nakon hormonskog tretmana.**

Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa ovarijskimiziranih **A-C)** WT, **D-F)** PRAKO i **G-I)** PRKO mišica s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno), nakon tretmana s E-om, EP i sezamovim uljem kao kontrolom (K) u trajanju od četiri dana. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. E – estrogen, EP – estrogen/progesteron; K – kontrola; PRAKO – progesterone receptor A *knockout*; PRKO – *progesterone receptor knockout*.

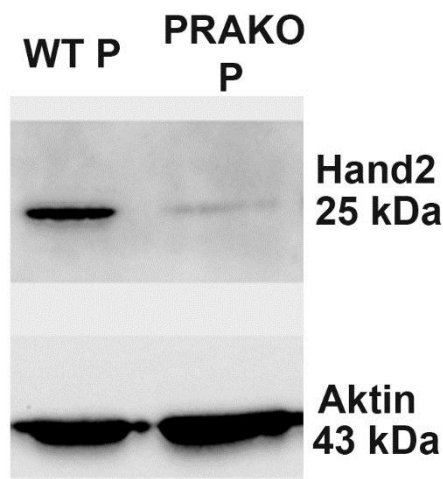
#### 4.4.1.10. Izražaj Hand2 u uterusu je reguliran preko PR-A

Mišice sa selektivnom ablacijom PR-A pokazuju iste fenotipske karakteristike kao i PRKO mišice, nepravilnu ovulaciju, implantaciju i neplodnost. Da bi utvrdila izražaj Hand2 u divljem tipu mišica u odnosu na PRAKO mišice ovarijektomizirane mišice sam tretirala s 1mg P-a i žrtvovala ih nakon 8 sati za analizu izražaja bjelančevina. Imunofluorescentna analiza izražaja Hand2 bjelančevina na tkivu uterusa pokazala je da je Hand2 prisutan u jezgrama stromalnih stanica uterusa WT mišica, kao i u stromalnim stanicama uterusa PRAKO mišica nakon tretmana s P-om (Slika 33). Intenzitet bojanja za Hand2 bjelančevinu (zelena fluorescencija) je jači u WT uzorku (Slika 33A) u odnosu na PRAKO uzorak (Slika 33B).



**Slika 33. Imunofluorescentna analiza izražaja Hand2 bjelančevine nakon tretmana s P-om.** **A)** u divljem tipu (WT) mišica i **B)** PRAKO mišicama. Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa ovarijektomiziranih WT i PRAKO mišica s kozjim poliklonalnim protutijelom za Hand2 (zeleno). Tkiva su prikupljena 8 sati nakon injiciranja P-a. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. PRAKO – progesterone receptor A *knockout*, WT - divlji tip.

Nadalje, western blot analizom izražaja Hand2 bjelančevine u WT i PRAKO mišicama potvrdila sam da je izražaj Hand2 snižen u PRAKO mišicama nakon tretmana P-om (Slika 34). To upućuje da je PR-A važan u regulaciji izražaja Hand2 u uterusu. U odnosu na trudnoće (Slika 27), nakon tretmana s P-om i u WT i u PRAKO uzorcima prisutna je samo jedna izoforma Hand2 bjelančevine.



**Slika 34. Izražaj Hand2 bjelančevine u WT i PRAKO mišicama nakon tretmana s P-om.**

Uzorci su obilježeni s kozjim poliklonskim Hand2 protutijelom. Tkiva su prikupljena 8 sati nakon injiciranja P-a. Za kontrolu nanosa bjelančevina je korišteno mišje monoklonsko protutijelo za aktin. Specifičnost vezanja Hand2 protutijela potvrđena je sa Hand2 blokirajućim peptidom. Rezultat je ogledni primjer jednog od tri odvojeno ponovljena pokusa.

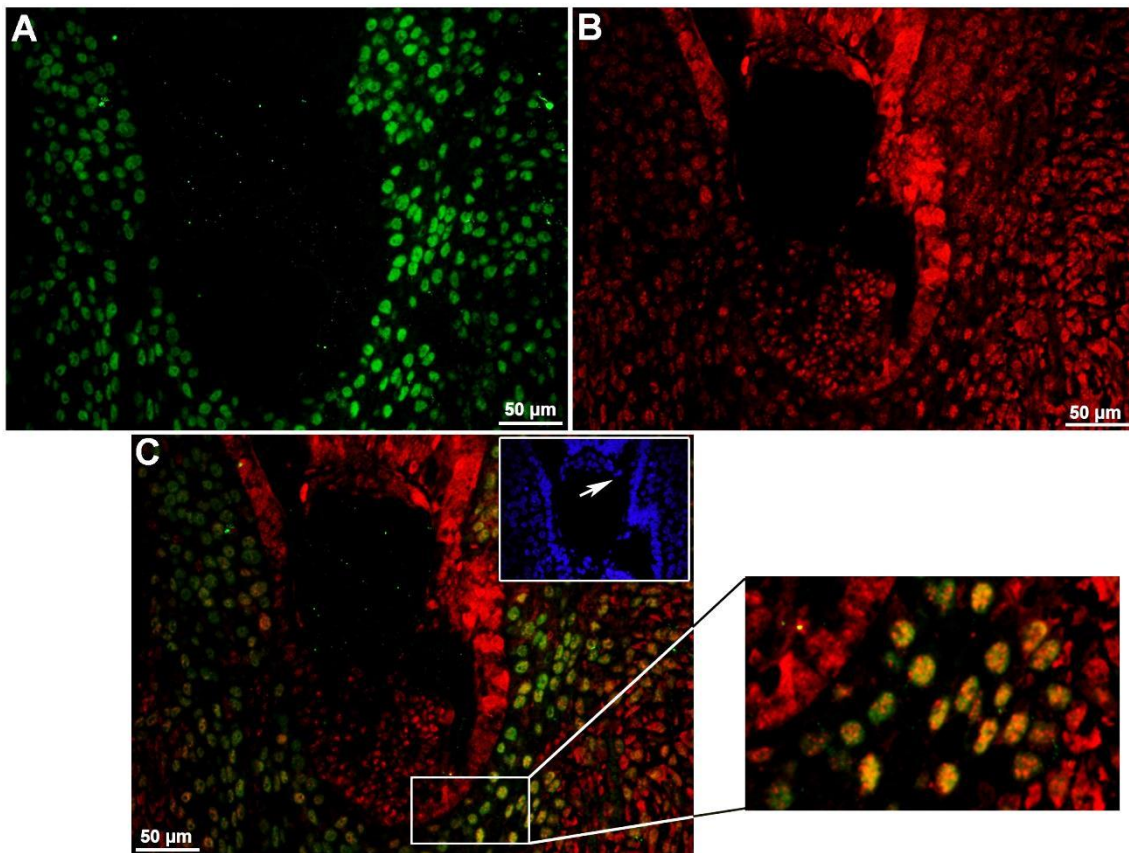
#### 4.4.1.11. Hand2 je supstrat za PKA tijekom rane trudnoće

Western blot analiza uzoraka prikupljenih tijekom 2,5, 4,5, i 7,5, dana trudnoće pokazala da je Hand2 prisutan u tri izoforme (Slika 27). Također, analiza izražaja Hand2 bjelančevine u WT mišicama nakon tretmana EP-om pokazala je prisutnost tri izoforme Hand2 bjelančevine (Slika 31). Obzirom na prisutnost tri izoforme Hand2 istražila sam da li je možda Hand2 posttranslacijski modificiran. Pregledom baza podataka otkrila sam da ima jedno moguće fosforilacijsko mjesto na serinu 114 (S114) koje se nalazi na konsenzus sekvencama koje prepoznaju i PKA i protein kinaza B (Akt) [69, 155]. Da bi utvrdila da li je Hand2 fosforiliran i da li je supstrat za neku od prethodno navedenih protein kinaza koristila sam protutijela koja prepoznaju bjelančevine fosforilirane PKA ili Akt. Metodim imunofluorescencije s dvostrukim obilježavanjem koristeći protutijela za Hand2 (zeleno) i protutijela za bjelančevine fosforilirane PKA-om (crveno) odnosno bjelančevine fosforilirane Akt-om (crveno), istražila sam da li dolazi do preklapanja fluorescentnog signala za Hand2 i bjelančevina fosforiliranih PKA-om, odnosno Akt-om, tijekom 4,5 i 7,5 dana trudnoće kada je izražaj Hand2 najveći tijekom peri-implantacijskog razdoblja.

Na mjestu implantacije Hand2 kolokalizira (narančasta fluorescencija) sa bjelančevinama fosforiliranim s PKA-om (Slika 35C). Također, preklapanje signala je prisutno i u decidualnim stanicama na antimezometrijalnom polu tijekom 7,5 dana

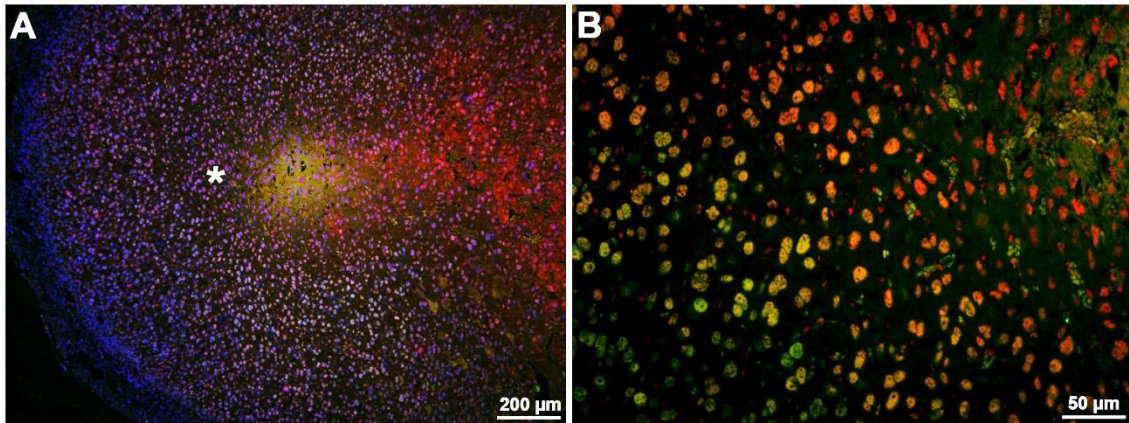


trudnoće (Slika 36B). Prema tome, mogu zaključiti da postoji mogućnost da je Hand2 supstrat za PKA.



**Slika 35. Analiza kolokalizacije Hand2 i bjelančevina foforiliranih PKA-om na mjestu implantacije.**

(A) izražaj Hand2 i (B) izražaj fosfo PKA supstrata, tijekom 4,5 dana trudnoće. (C) prikaz preklapljenе slike A i B. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno) i zečjim poliklonskim protutijelom za fosfo PKA supstrat (crveno). Mjesto kolokalizacije označava narančasta fluorescencija. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Strelica na umetnutoj slici (C) prikazuje embrij, plavo (DAPI bojanje); dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

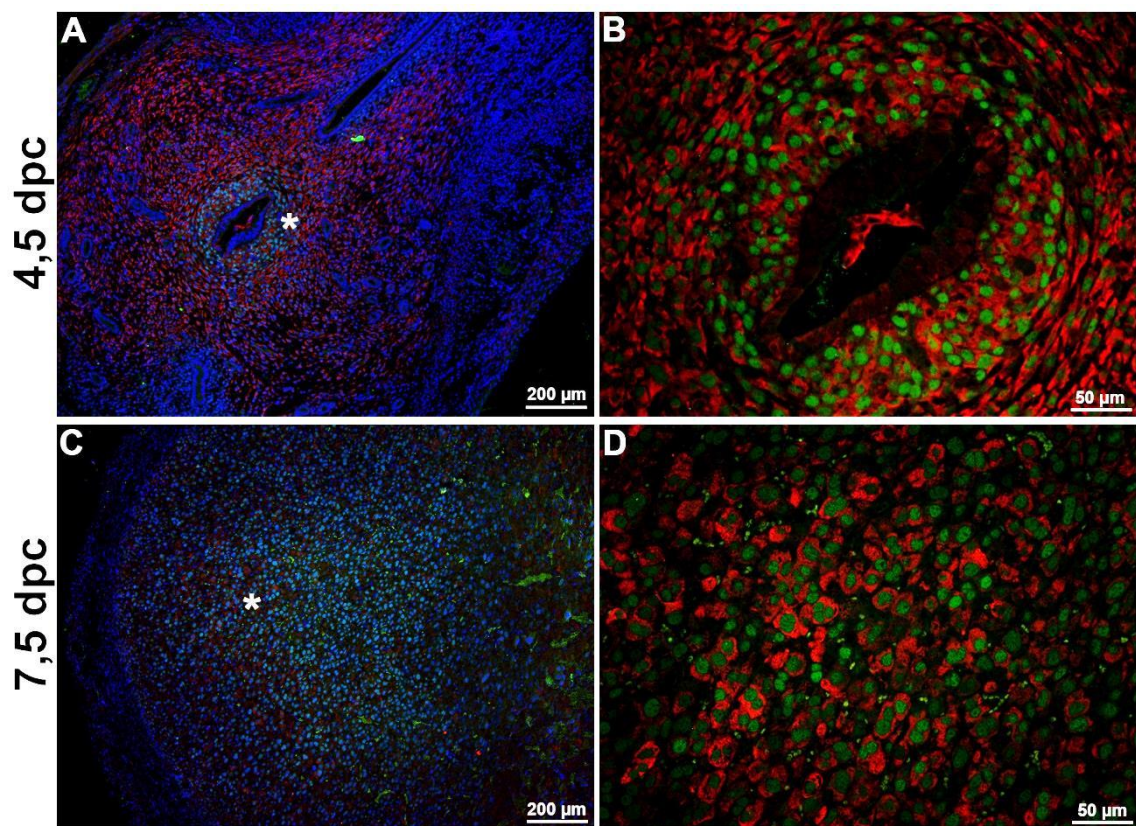


**Slika 36. Analiza kolokalizacije Hand2 i bjelančevina fosforiliranih PKA-om tijekom 7,5 dana trudnoće.**

Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno) i zečjim poliklonskim protutijelom za fosfo PKA supstrat (crveno). Mjesto kolokalizacije označava narančasta fluorescencija. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Strelica na umetnutoj slici (C) prikazuje embrij, plavo (DAPI bojanje); dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### **4.4.1.12. Hand2 nije supstrat za Akt tijekom rane trudnoće**

Nadalje, analizom imunofluorescentnog obilježavanja tkiva uterusa pokazala sam da se izražaj Hand2 na mjestu implantacije ne preklapa sa izražajem bjelančevina fosforiliranih Akt-om (Slika 37B). Hand2 je prisutan u jezgri, dok su bjelančevine fosforilirane Akt-om isključivo prisutne u citoplazmi stromalnih stanica (Slika 37B). U decidualnim stanicama tijekom 7,5 dana trudnoće Hand2 je prisutan u jezgri, a bjelančevine fosforilirane Akt-om u citoplazmi (Slika 37D).



**Slika 37. Analiza kolokalizacije Hand2 i bjelančevina fosforiliranih Akt-om.**

**(A&B)** izražaj Hand2 i fosfo Akt supstrata na mjestu implantacije, tijekom 4,5 dana trudnoće. **(C&D)** izražaj Hand2 i fosfo Akt supstrata tijekom 7,5 dana trudnoće. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno) i zečjim poliklonskim protutijelom za fosfo Akt supstrat (crveno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo (A i C). Mjesto kolokalizacije označava narančasta fluorescencija. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### **4.4.2. Izražaj COX2 tijekom rane trudnoće**

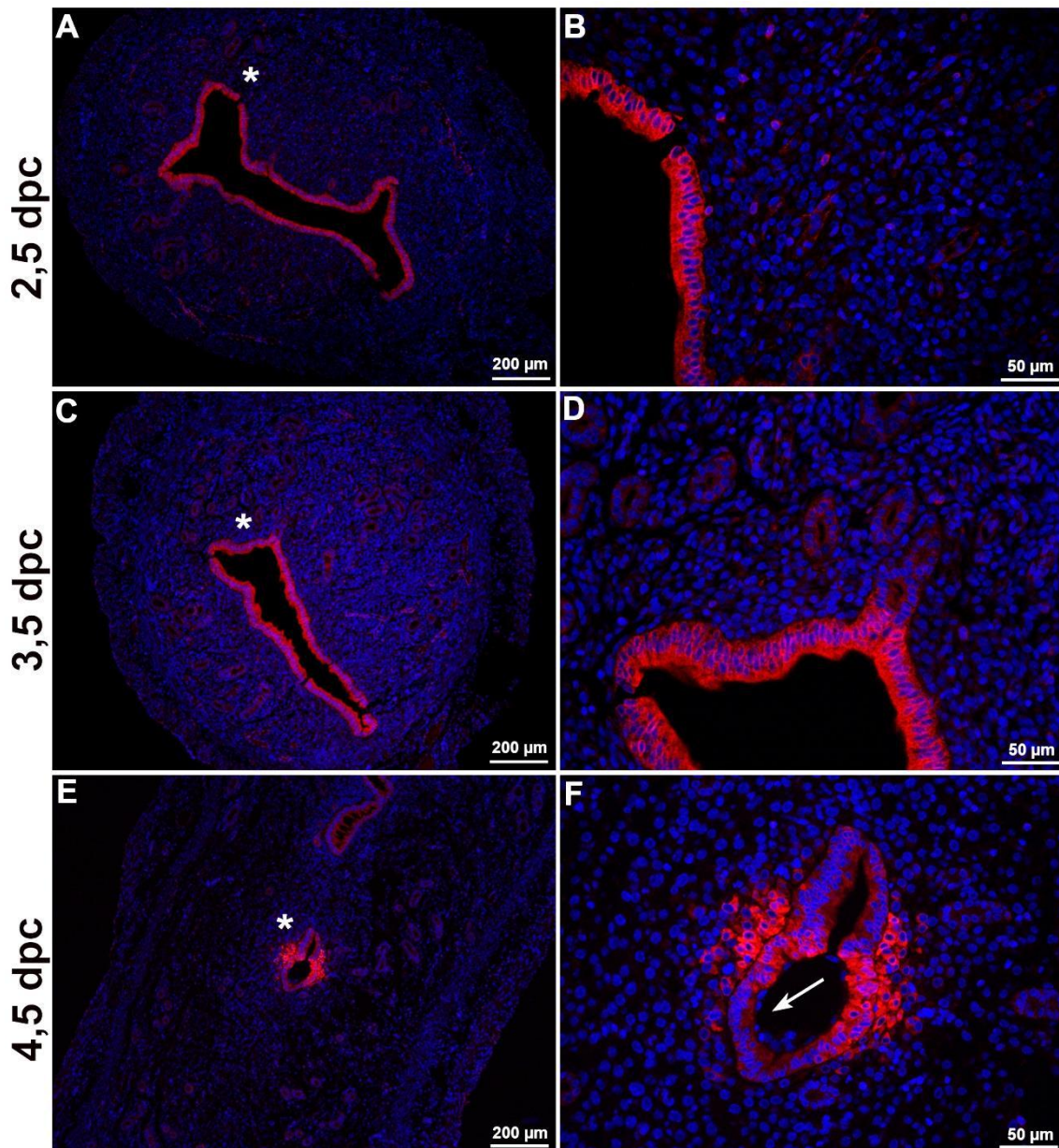
Nedavna istraživanja sekvenciranja imunoprecipitiranih kromatinskih dijelova iz uterusa miša su pokazala da *Cox2* gen u mišu ima elemente koji odgovaraju na P (PRE) [186]. Također je poznato da su mišice s potpunom ablacijom *Cox2* neplodne [131].

Da bi utvrdila prostorni i vremenski izražaj COX2 tijekom rane trudnoće koristila sam metodu imunofluorescencije na tkivu uterusa tijekom 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, i 7,5 dana trudnoće.

##### **4.4.2.1. Na mjestu implantacije COX2 je prisutan u maloj populaciji stromalnih stanica**

Na početku trudnoće, tijekom 2,5 i 3,5 dana trudnoće, COX2 (crvena fluorescencija) je prisutan u citoplazmi stanica LE-a, GE-a i maloj populaciji stromalnih stanica, kao i u endotelu krvnih žila (Slika 38A-D). Procesom implantacije dolazi do promjene raspodjele COX2 na mjestu implantacije, osim u LE-u, COX2 je prisutan i u stromalnim stanicama oko samog mjesta implantacije (Slika 38E i F). Ta tranzicija se očituje u snažnom intenzitetu bojanja za COX2 na samom mjestu implantacije (Slika 38F).





**Slika 38. Vremenski i prostorni raspored izražaja COX2 tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće.**

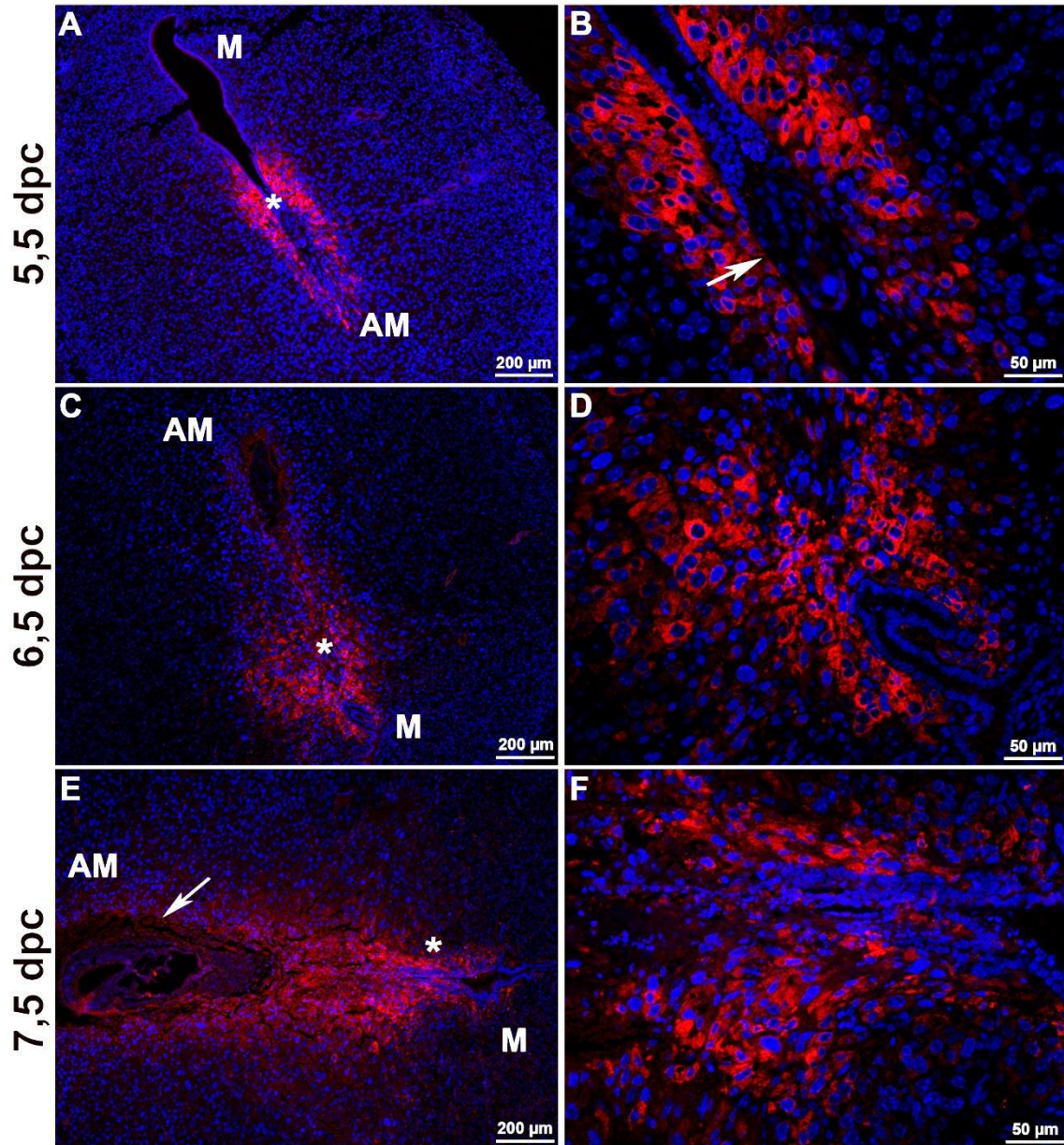
Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim monoklonskim protutijelom za COX2 (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici F prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Skala od 200  $\mu\text{m}$  (A, C, E) i 50  $\mu\text{m}$  (B, D, F); dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### **4.4.2.2. Promjena raspodjele COX2 s antimezoemtrijalnog pola uterusa na mezometrijelani pol uterusa**

Tijekom 5,5, dana trudnoće, COX2 (crvena fluorescencija) ostaje prisutan u citoplazmi stromalnih stanica, koje podliježu decidualizaciji, neposredno na mjestu implantacije (Slika 39A i B). Procesom zatvaranja LE-a oko blastociste, 6,5 i 7,5 dan trudnoće, COX2 je prisutan na mezometrijalnom polu uterusa oko ostatnog dijela LE-



a, dok ga na području PDZ-a na antimezoemtrijalnom polu uterusa nema. Dolazi do gubitka izražaja COX2 u stromalnim stanicama uterusa na mjestu implantacije (Slika 39C-F).



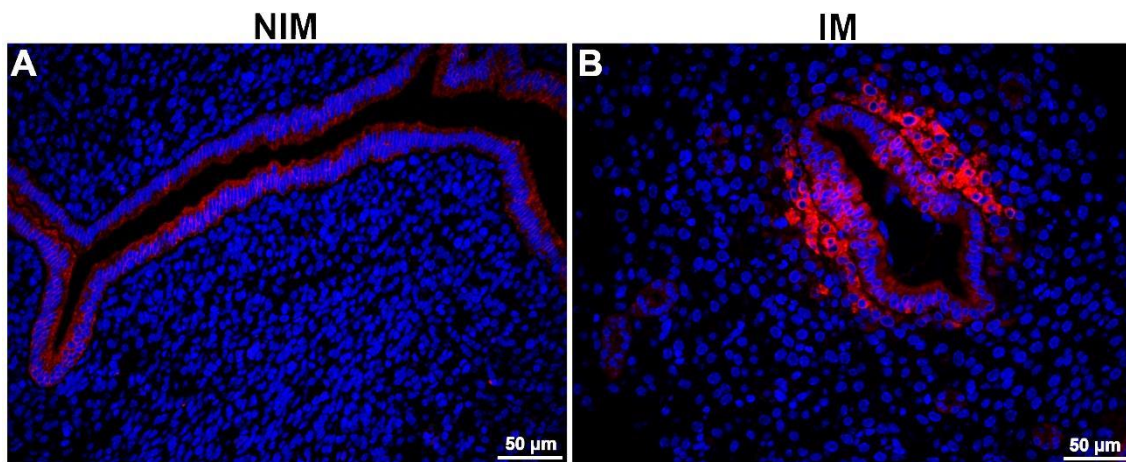
**Slika 39. Vremenski i prostorni raspored izražaja COX2 tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.**

Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim monoklonskim protutijelom za COX2 (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelice na slikama B i E prikazuju embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Skala od 200 µm (A, C, E) i 50 µm (B, D, F); dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### 4.4.2.3. Na mjestu implantacije COX2 je prisutan u citoplazmi stromalnih stanica

Testom krvožilne propusnosti na mjestu implantacije [52] odvojila sam implantacijska mjesta od ne-implantacijskih i koristila ih u daljnjim analizama izražaja *Cox2* gena i bjelančevine.

Na ne-implantacijskom mjestu COX2 je prisutan u citoplazmi LE-a (Slika 40A), dok je na mjestu implantacije blastociste prisutan u citoplazmi stromalnih stanica (Slika 40B). Intenzitet fluorescentnog bojanja za COX2 na implantacijskom mjestu je jači u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 40).

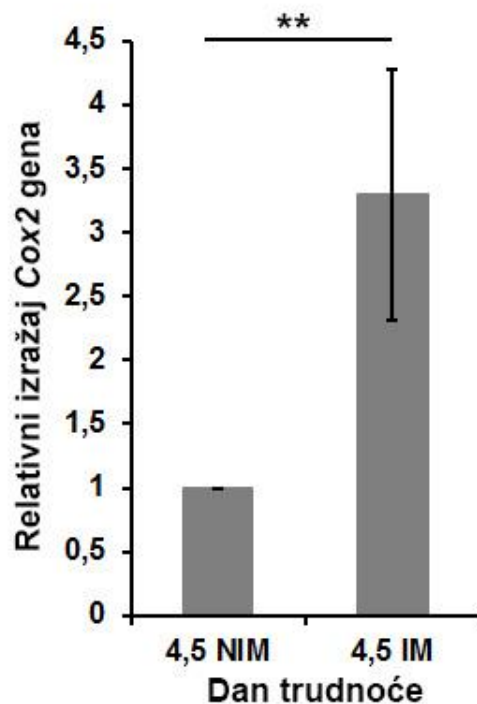


**Slika 40. Izražaj i raspodjela COX2 tijekom implantacije.**

**A)** Izražaj COX2 na ne-implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. **B)** Izražaj COX2 na implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa zečjim monoklonskim protutijelom za COX2 (crveno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici B prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Skala od 50  $\mu\text{m}$ ; NIM – ne implantacijsko mjesto, IM-implantacijsko mjesto.

#### 4.4.2.4. Razina izražaja *Cox2* gena je značajno viša na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Analiza metode imunofluorescencije na tkivu uterusa je pokazala da je intenzitet bojanja za COX2 (crvena fluorescencija) jači na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 40). Analizirala sam izražaj *Cox2* gena RT-PCR-om na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto. Analiza dobivenih podataka pokazala je da je razina izražaja *Cox2* značajno viša na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 41).



**Slika 41. Razlika u aktivaciji Cox2 gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.**

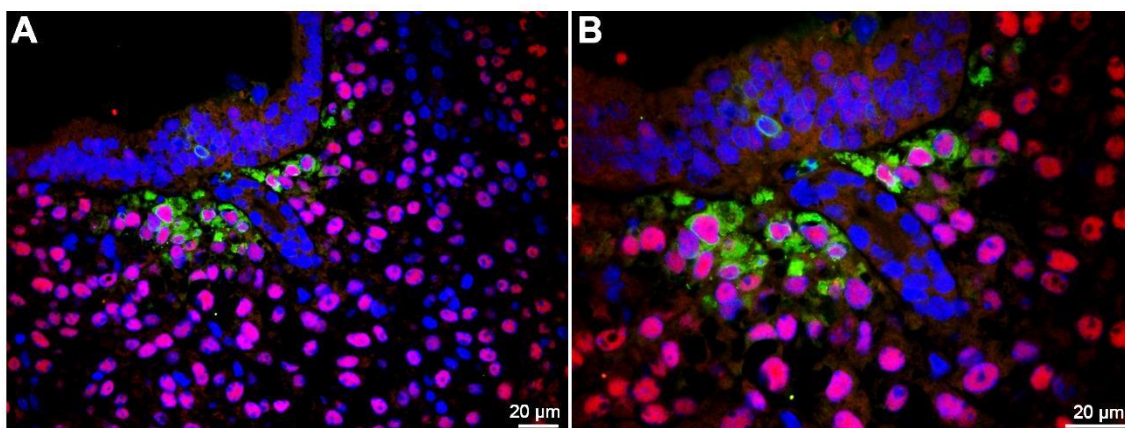
Relativna razina izražaja Cox2 gena u ne-implantacijskom mjestu i implantacijskom mjestu tijekom 4,5 dana trudnoće. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške u tri odvojeno provedena pokusa. \*\* predstavlja statističku značajnost  $p \leq 0,01$ . NIM – ne-implantacijsko mjesto, IM – implantacijsko mjesto.

#### **4.4.2.5. Na mjestu implantacije blastociste PR pozitivne stanice izražavaju i COX2**

Obzirom da gen za Cox2 sadrži PRE [186], istražila sam da li na mjestu implantacije dolazi do kolokalizacije COX2 s PR-om u stromalnim stanicama uterusa. Da bi to utvrdila koristila sam metodu imunofluorescencije dvostrukim obilježavanjem tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće s protutijelom za PR (crveno) i COX2 (zeleno).

Na mjestu implantacije blastociste stromalne stanice uz sam rub LE-a izražavaju PR, ali i COX2 (Slika 42). PR se nalazi u jezgri stromalnih stanica, dok je COX2 prisutan u citoplazmi istih (Slika 42B). To upućuje da je izražaj COX2 na mjestu implantacije reguliran PR-om. Na samom mjestu implantacije je vidljiva adenogeneza, ali stanice novonastale žlijezde nisu pozitivne na PR (Slika 42B).





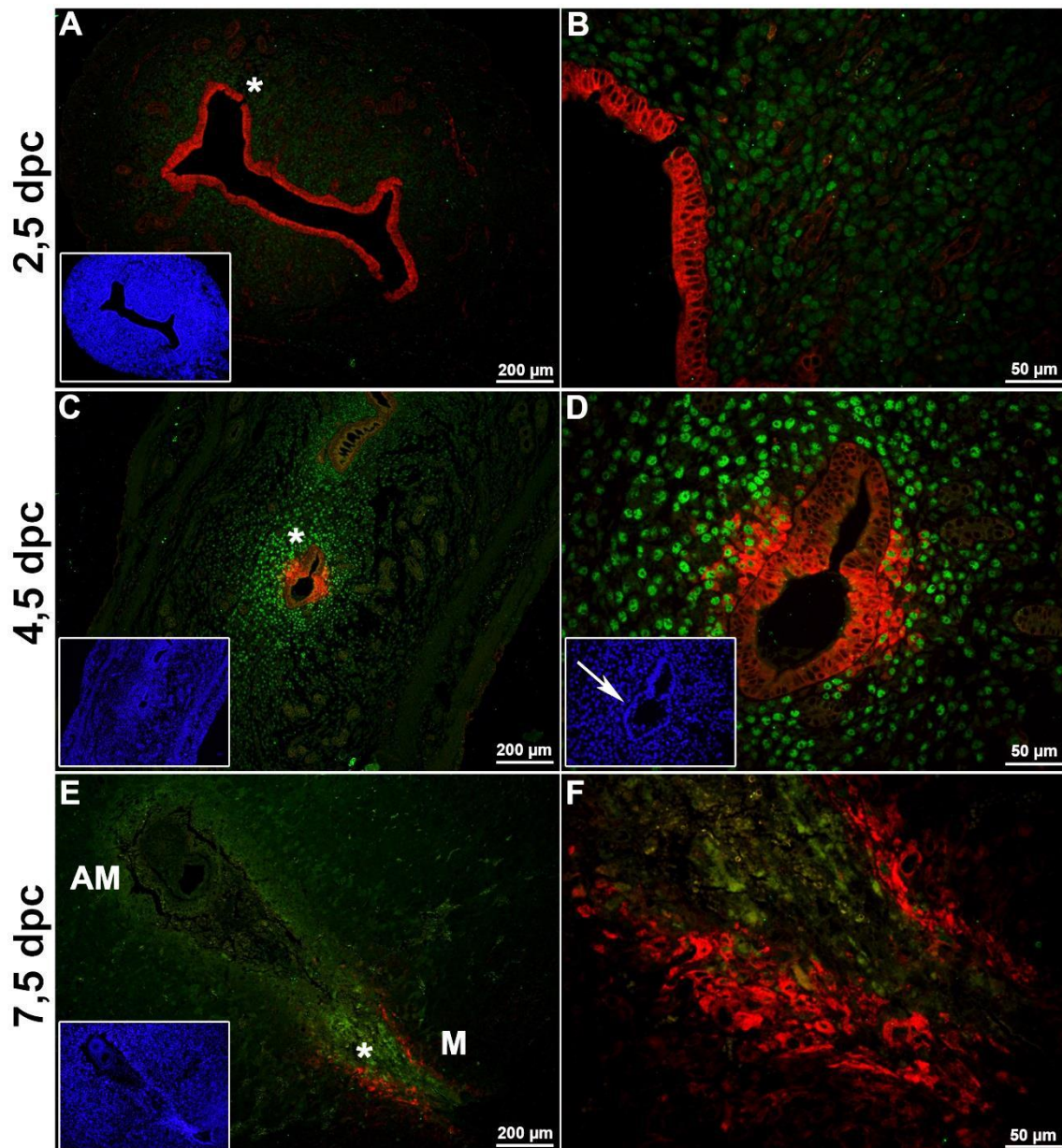
**Slika 42. Odnos izražaja PR-a i COX2 na mjestu implantacije.**

Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa, tijekom 4,5 dana trudnoće, sa zečjim poliklonskim protutijelom za PR (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za COX2 (zeleno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Skala od 20 µm.

#### 4.4.2.6. Kolokalizacija Hand2 i COX2 tijekom peri-implantacije

Obzirom da je izražaj i Hand2 i COX2 reguliran PR-om, jedan od ciljeva mog istraživanja bio je i ispitati da li se izražaj tih dviju bjelančevina preklapa tijekom peri-implantacijskog razdoblja u uterusu miša.

Imunofluorescentnim dvostrukim obilježavanjem Hand2 (zeleno) i COX2 (crveno) odredila sam njihov odnos tijekom peri-implantacije. Kod 2,5 dana trudnoće ne dolazi do preklapanja signala za COX2 i Hand2 (Slika 43A i B). U tom razdoblju COX2 je većim dijelom prisutan u citoplazmi stanica LE-a, dok je Hand2 prisutan u jezgrama stromalnih stanica (Slika 43B). Za vrijeme implantacije blastociste, osim u LE-u COX2 je prisutan i u citoplazmi male populacije stromalnih stanica na mjestu implantacije (Slika 43C i D). Stromalne stanice koje izražavaju COX2 pozitivne su i na izražaj Hand2, koji je prisutan u jezgri (Slika 43D). Nadalje, tijekom 7,5 dana trudnoće kolokalizacija Hand2 i COX2 nestaje (Slika 43E i F).



**Slika 43. Odnos izražaja i raspodjela Hand2 i COX2 tijekom peri-implantacije.**

(A&B) izražaj Hand2 i COX2 tijekom 2,5 dana trudnoće. (C&D) izražaj Hand2 i COX2 na mjestu implantacije tijekom 4,5 dana trudnoće. (E&F) izražaj Hand2 i COX2 tijekom 7,5 dana trudnoće. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa s kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno) i zečjim monoklonskim protutijelom za COX2 (crveno). Umetnute slike na A, C, D i E prikazuju jezgre koje su obojane plavo (DAPI bojanje). Strelica na umetnutoj slici D prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. AM – antimezometrijalni pol; M – mezometrijalni pol; dpc: days post coitum; NIM – ne-implantacijsko mjesto; IM – implantacijsko mjesto; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

## **4.5. Vremenski i prostorni izražaj estrogenom reguliranih gena tijekom rane trudnoće**

### **4.5.1. Izražaj FGF9 tijekom rane trudnoće**

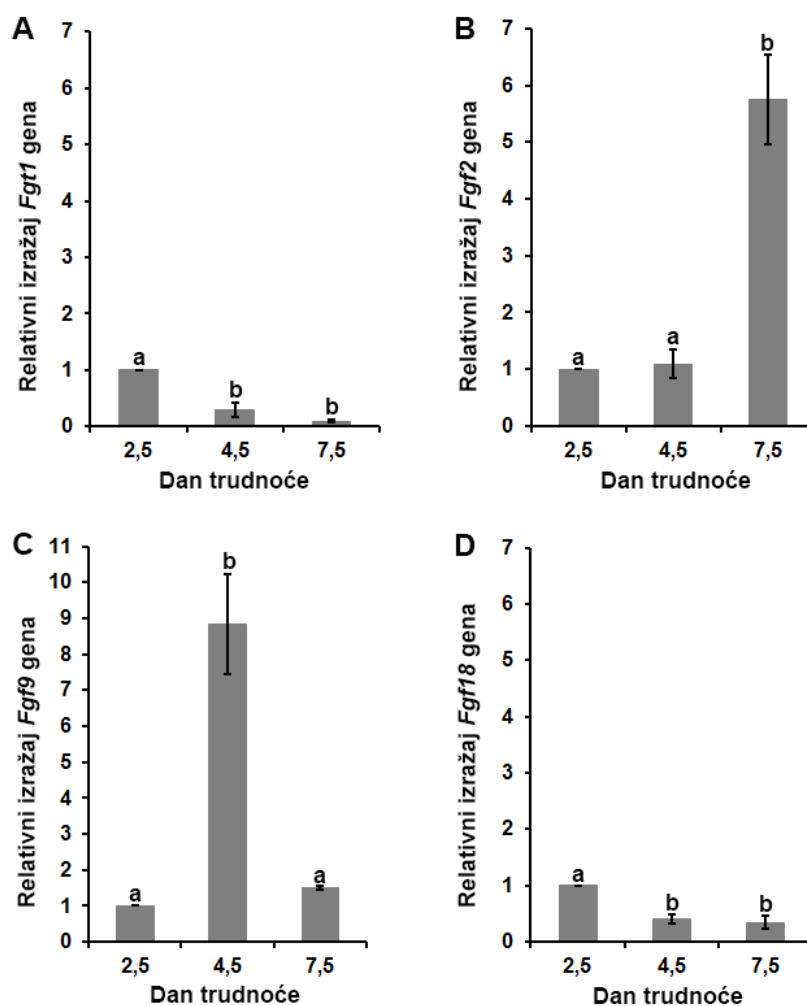
Prijašnja istraživanja su pokazala da je FGF9 u ljudskim stromalnim stanicama endometrija reguliran E-om [233]. Također, rezultati dobiveni istraživanjem sekvenciranih imunoprecipitiranih kromatinskih dijelova iz uterusa miša su pokazala da FGF9 ima ERE, ali ne i PRE [93, 186].

Obzirom da do sada izražaj i prisutnost FGF9 u uterus miša tijekom rane trudnoće nije istražen, jedan od ciljeva ovog rada je bio i utvrditi njegov prostorni i vremenski izražaj tijekom rane trudnoće, kao i odnos s drugim bjelančevinama ključnim za uspješnu implantaciju.

#### **4.5.1.1. Izražaj *Fgf2* i *Fgf9* je diferencijalno reguliran u uterusu tijekom peri-implantacije**

U miševa sa specifičnom Cre-posredovanom ablacijom *Hand2* u uterusu, analiza genskog izražaja tijekom četvrtog dana trudnoće pokazala je povećan izražaj *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf9* i *Fgf18* gRNA [128]. Da bi utvrdila ulogu FGF-ova u uterusu tijekom rane trudnoće, odredila sam razinu izražaja *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf9* i *Fgf18* tijekom 2,5, 4,5 i 7,5 dana trudnoće (Slika 44). Primijetila sam značajan porast izražaja *Fgf2* i *Fgf9* (Slika 44B i C) gena tijekom trudnoće u odnosu na izražaj gena *Fgf1* i *Fgf18* (Slika 44A i D). Izražaj *Fgf9* gena postiže svoj maksimum tijekom 4,5 dana trudnoće (Slika 44C), kada dolazi do pričvršćivanja embrija za LE uterusa i početak decidualizacije. Nasuprot tome, značajan porast izražaja *Fgf2* gena je tijekom 7,5 dana trudnoće (Slika 44B), a izražaj *Fgf9* gena je tada smanjen. Dobiveni rezultati ukazuju da FGF9 i FGF2 imaju različitu ulogu koja se preklapa tijekom razdoblja peri-implantacije. Specifično, FGF9 za proces implantacije i razvoj PDZ-a, a FGF2 za stvaranje SDZ-a.





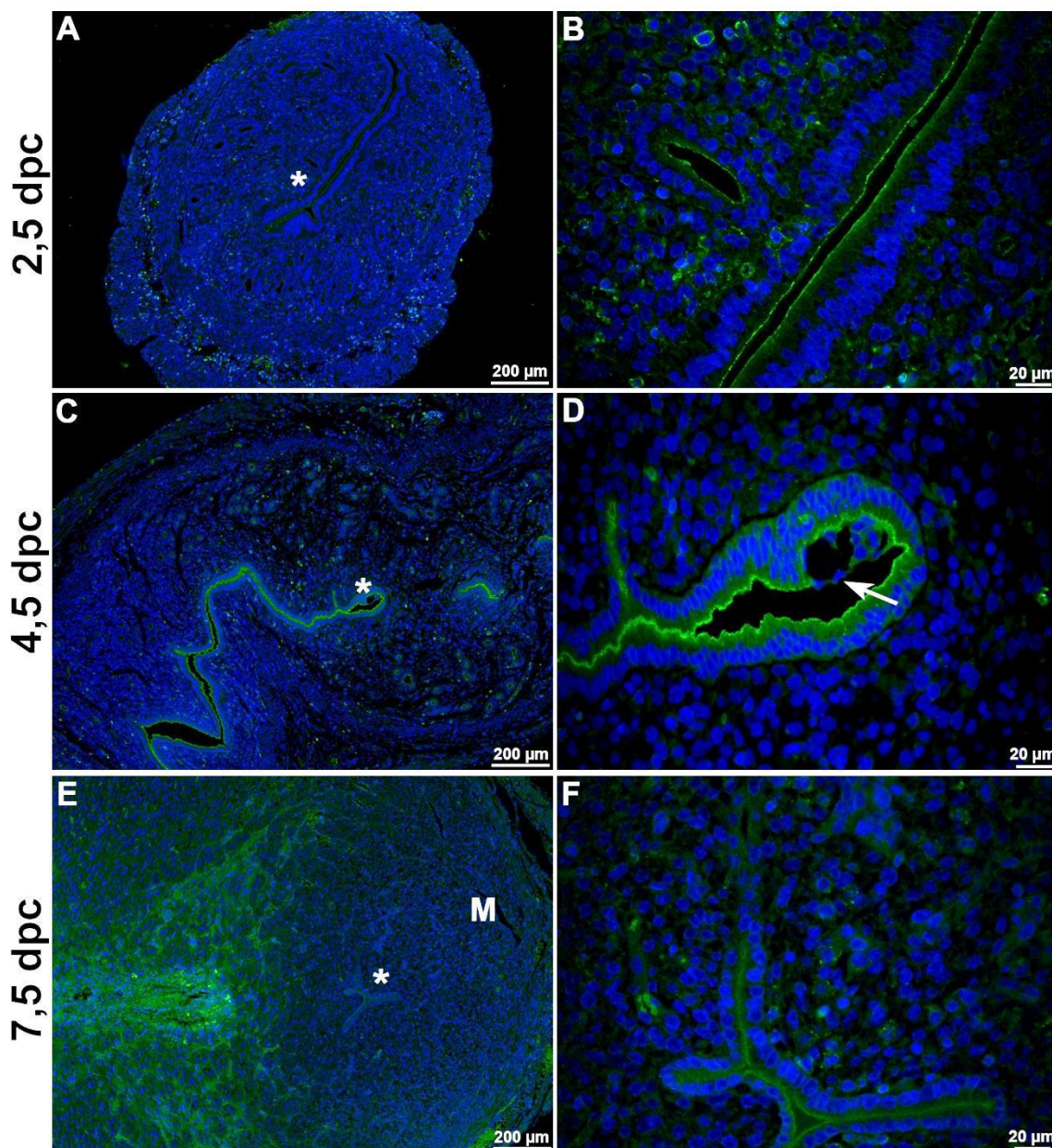
**Slika 44. Relativna razina izražaja Fgf1 (A), Fgf2 (B), Fgf9 (C) i Fgf18 (D) u uterusu tijekom peri-implantacije u miša.**

Rezultati su dobiveni iz tri odvojeno provedena pokusa i prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške. Rezultati s različitim slovima su statistički značajni ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5.1.2. Prostorni i vremenski izražaj FGF9 tijekom peri-implantacije

Prema dosadašnjim literaturnim podacima, vremenski i prostorni raspored FGF9 u uterusu do sada još nije istražen. Zbog toga je jedan od mojih ciljeva bio i imunofluorescentna analiza FGF9 u tkivu uterusa tijekom 2,5, 4,5 i 7,5 dana trudnoće. Kod 2,5 dana trudnoće, FGF9 (zelena fluorescencija) je prisutan na apikalnom dijelu epitelnih stanica LE-a i GE-u kao i u nekim stromalnim stanicama uterusa (Slika 45A i B). Za vrijeme implantacije, 4,5 dana trudnoće, intenzitet bojanja za FGF9 je značajno jači u odnosu na 2,5 dana trudnoće, i prisutan je na apikalnom dijelu stanica LE-a koje okružuju pričvršćenu blastocistu (Slika 45C i D). Osim u LE-u FGF9 je prisutan i u stanicama GE-a, kao i stromalnim stanicama endometrija (Slika

45C). Do 7,5 dana trudnoće izražaj FGF9 opada, ali ostaje prisutan, uz smanjen intenzitet bojanja, na apikalnom dijelu stanica ostatnog LE-a (Slika 45E i F).



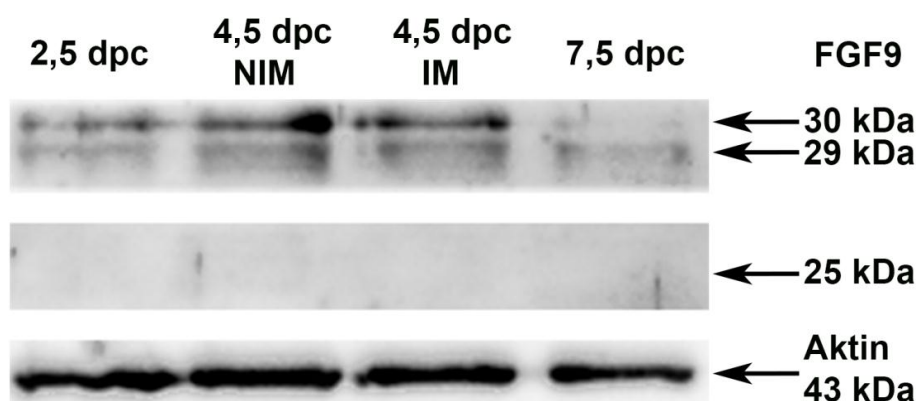
**Slika 45. Vremenski i prostorni raspored izražaja FGF9 tijekom 2,5 (A&B), 4,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.**

Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa s mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici D prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. M – mezometrijalni pol; dpc: days post coitum; (\*) predstavlja područje većeg povećanja.

#### 4.5.1.3. Izražaj FGF9 bjelančevine je povećan tijekom 4,5 dana trudnoće

Da bi potvrdila rezultate dobivene imunofluorescentnom analizom raspodijele FGF9 tijekom peri-implantacije pripremila sam ukupne lizate bjelančevina iz tkiva uterusa nakon 2,5, 4,5 i 7,5 dana trudnoće. Odvojeno sam pripremila ukupne lizate bjelančevina odvojivši mjesto implantacije od ne-implantacijskog mjesta (4,5 dan trudnoće) pomoću testa povećane krvožilne propusnosti [52]. Western blot metodom sam odredila promjene izražaja FGF9 bjelančevine tijekom peri-implantacije (Slika 46).

Prema podacima iz literature FGF9 je prisutan u tri izoforme, 25, 29 i 30 kDa [159]. Od tri očekivane FGF9 izoforme, izoforma od 25 kDa nije prisutna tijekom rane trudnoće u uterusu. Međutim, ostale dvije izoforme 29 i 30 kDa su prisutne tijekom svih istraživanih točaka trudnoće. Izražaj 30 kDa izoforme se dinamički mijenja, dok je izražaj 29 kDa izoforme konstantan. Intenzitet FGF9 signala je jači tijekom 4,5 dana trudnoće u odnosu na 2,5 i 7,5 dana trudnoće, ali bez razlike između implantacijskog i ne-implantacijskog mjesta (Slika 46).

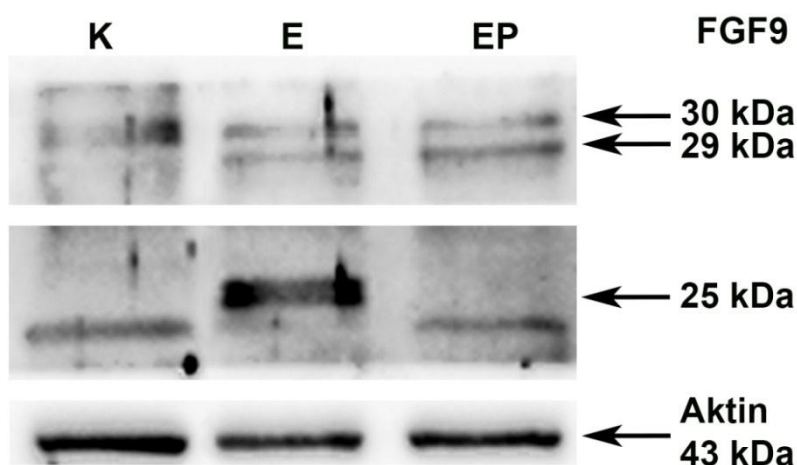


**Slika 46. Western blot analiza izražaja FGF9 bjelančevine tijekom rane trudnoće.**

Western blot metodom analizirani su ukupni lizati bjelančevina izoliranih iz tkiva uterusa nakon 2,5, 4,5 i 7,5 dana trudnoće. FGF9 je prisutan u dvije izoforme 29 i 30 kDa. Uzorci su obilježeni sa zečjim poliklonskim FGF9 protutijelom. Za kontrolu nanosa bjelančevina korišteno je mišje monoklonsko protutijelo za aktin. Specifičnost vezanja FGF9 protutijela potvrđena je kozjim serumom. Rezultat je ogledni primjer jednog od tri odvojeno ponovljena pokusa.

#### 4.5.1.4. Estrogen regulira izražaj 25 kDa izoforme FGF9 bjelančevine u uterusu miša

Za istraživanje regulacije izražaja FGF9 u uterus, koristila sam ovarijektomizirane mišice divljeg tipa koje sam tretirala s E-om, EP-om i sezamovim uljem kao kontrolom. Iz prikupljenih tkiva uterusa sam izolirala ukupne bjelančevine i analizirala ih metodom western blot. Dobiveni rezultati su pokazali da je nakon tretmana E-om osim 29 i 30 kDa izoforme prisutna i 25 kDa izoforma FGF9 bjelančevine (Slika 47).



**Slika 47. Western blot analiza regulacije izražaja FGF9 bjelančevine steroidnim hormonima.**

Western blot metodom analizirani su ukupni lizati bjelančevina izoliranih iz tkiva uterusa ovarijektomiziranih mišica divljeg tipa prikupljenih nakon tretmana estrogenom (E), estrogenom/progesteronom (EP) i sezamovim uljem kao kontrolom (K). FGF9 je prisutan u tri izoforme 25, 29 i 30 kDa. Uzorci su obilježeni sa zečjim poliklonskim FGF9 protutijelom. Za kontrolu nanosa bjelančevina korišteno je mišje monoklonsko protutijelo za aktin. Specifičnost vezanja FGF9 protutijela potvrđena je kozjim serumom. Rezultat je ogleđni primjer jednog od tri odvojeno ponovljena pokusa.

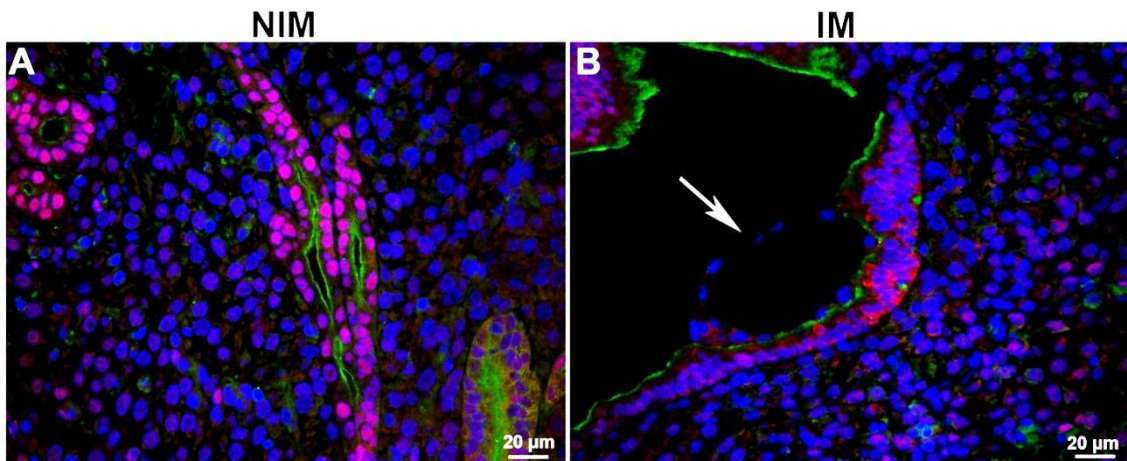
#### 4.5.1.5. Regulacija izražaja FGF9 je različita na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Za uspješnu implantaciju u miša, neophodna je prolazna prisutnost E-a četvrtog dana trudnoće [145]. Dobiveni rezultati su pokazali da je izražaj FGF9 u uterusu najviši tijekom 4,5 dana trudnoće i da je u ovarijektomiziranim WT mišicama reguliran E-om, kao sljedeći cilj postavila sam si odrediti odnos između ER $\alpha$  i FGF9 tijekom implantacije u miša.

Imunofluorescentnom metodom dvostrukog obilježavanja odredila sam odnos između FGF9 (zelena fluorescencija) i ER $\alpha$  (crvena fluorescencija) tijekom 4,5 dana trudnoće u miša. Na ne-implantacijskom mjestu FGF9 i ER $\alpha$  su prisutni u stanicama GE-a (Slika 48A). U stanicama GE-a, ER $\alpha$  je prisutan u jezgrama, dok je FGF9 prisutan na



apikalnom dijelu stanica. Prisutnost ER $\alpha$  u jezgri upućuje da on ima aktivnu ulogu kao transkripcijski čimbenik u tim stanicama i prema tome može regulirati izražaj FGF9. Nadalje, na samom mjestu pričvršćivanja blastociste za LE, FGF9 je prisutan u apikalnom dijelu stanica LE-a, dok je ER $\alpha$  prisutan u citoplazmi stanica LE-a (Slika 48B). Obzirom da ER $\alpha$  u stanicama LE-a nema transkripcijski aktivnu ulogu, izražaj FGF9 na samom mjestu implantacije je reguliran drugim čimbenicima.

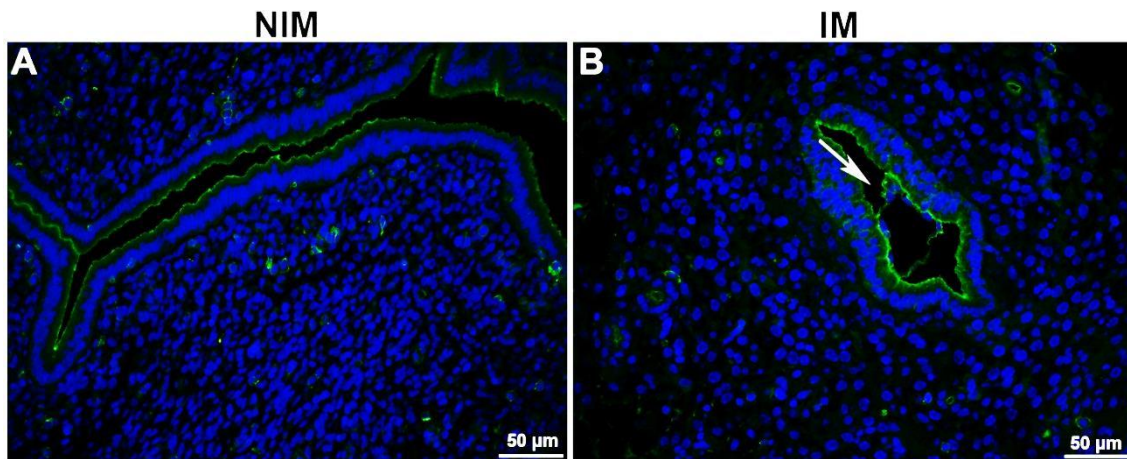


**Slika 48. Odnos izražaja FGF9 i ER $\alpha$  na mjestu implantacije.**

Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće sa mišjim monoklonskim protutijelom za ER $\alpha$  (crveno) i mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo. Strelica na slici B prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Skala od 20  $\mu$ m.

#### 4.5.1.6. Prostorni raspored FGF9 se ne mijenja na implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Za vrijeme implantacije FGF9 je prisutan na apikalnom dijelu stanica LE-a na ne-implantacijskom mjestu (Slika 49A), kao i na implantacijskom mjestu (Slika 49B). Intenzitet fluorescentnog bojanja za FGF9 na ne-implantacijskom mjestu se ne razlikuje u odnosu na implantacijsko mjesto (Slika 49).

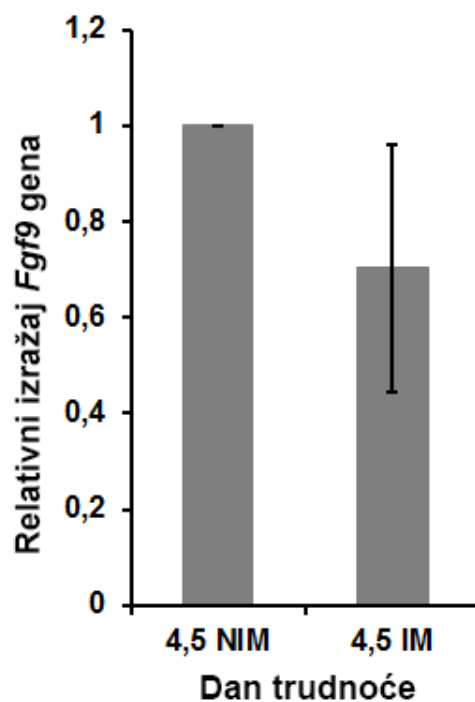


**Slika 49. Izražaj FGF9 tijekom implantacije.**

**A)** Izražaj FGF9 na ne-implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. **B)** Izražaj FGF9 na implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Imunofluorescentno bojanje tkiva uterusa sa mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno), jezgre su prikazane plavo (DAPI bojanje). Strelica na slici B prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa. Skala od 50 µm; NIM – ne implanatcijsko mjesto, IM-implantacijsko mjesto.

#### 4.5.1.7. Razina izražaja FGF9 se ne mijena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto

Analiza indirektna fluorescencije prostornog rasporeda FGF9 tijekom implantacije nije pokazala razliku u njegovoj prostornoj raspodjeli na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto (Slika 49). Unatoč tome zanimalo me da li možda postoji razlika u aktivaciji *Fgf9* gena na ta dva mjesta. Analiza aktivacije *Fgf9* gena RT-PCR metodom na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto pokazala je da ne postoji značajna razlika u izražaju *Fgf9* na ta dva mjesta (Slika 50).



**Slika 50. Razlika u aktivaciji *Fgf9* gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.**

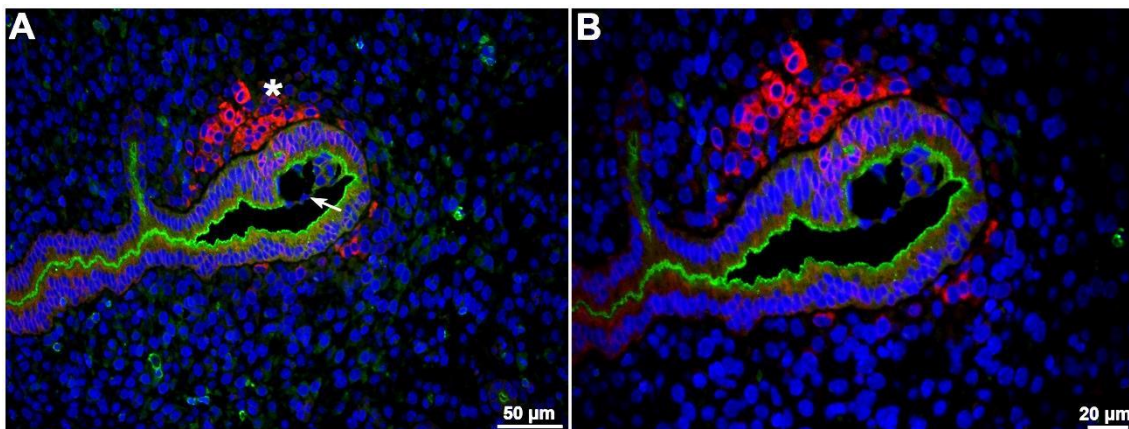
Relativna razina izražaja *Fgf9* gena u ne-implantacijskom mjestu i implantacijskom mjestu, tijekom 4,5 dana trudnoće. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne pogreške u tri odvojeno provedena pokusa. NIM – ne-implantacijsko mjesto, IM – implantacijsko mjesto.



#### 4.5.1.8. Izražaj FGF9 na mjestu implantacije je reguliran s prostaglandinima

Prethodna istraživanja su pokazala da uz E, PGE<sub>2</sub> potiče izražaj FGF9 [32, 246]. Sinteza PGE<sub>2</sub> je regulirana s COX2 [200]. Analizom izražaja COX2 tijekom implantacije (Slika 39) potvrdila sam da je COX2 prisutan u stromalnim stanicama koje okružuju LE tijekom implantacije. Također, istraživanja na COX2<sup>-/-</sup> mišicima su pokazala da su PG-ovi sintetizirani s COX2 ključni za krvožilnu propusnost i angiogenezu tijekom implantacije i decidualizacije [142].

Zbog toga sam istražila vremenski i prostorni odnos između COX2 i FGF9 na mjestu implantacije (Slika 51A i B). Metoda imunofluorescencije je pokazala jaki intenzitet bojanja za FGF9 i COX2 u stanicama koje neposredno okružuju mjesto implantacije (Slika 51B). Na apikalnom dijelu stanica LE-a je izražen FGF9, a COX2 u stanicama strome koje okružuju mjesto implantacije, kao i u nekim stanicama LE-a. Stanice LE-a pozitivne na COX2 nalaze se u neposrednom kontaktu blastociste sa LE-om (Slika 51B). Dobiveni rezultati upućuju da lokalna enzimska aktivnost COX2 proizvede dovoljnu količinu PG-a koja će potaknuti aktivaciju FGF9 na mjestu implantacije.



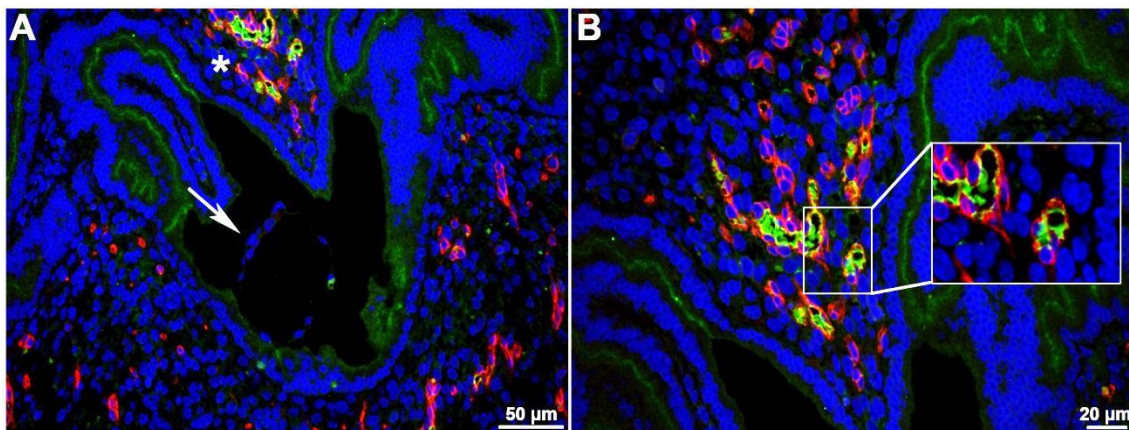
**Slika 51. Odnos izražaja i raspodjela FGF9 i COX2 na mjestu implantacije.**

Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće sa mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno) i zečjim monoklonskim protutijelom za COX2 (crveno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo. Strelica na slici A prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa.

#### 4.5.1.9. Na mjestu implantacije FGF9 se nalazi u malim novostvorenim krvnim žilama

Kao što sam već prije spomenula, jedan od prvih znakova implantacije je povećana krvožilna propusnost na samom mjestu pričvršćivanja blastociste za LE [166]. Također, poznato je da su FGF-ovi jaki pokretači angiogeneze [156]. Nadalje, prisutnost FGF9 tijekom angiogeneze potiče stvaranje izdržljivih malih krvnih žila koje su omotane glatkomišićnim stanicama [73].

Prema tome, jedna od postavljenih hipoteza ovog rada je bila da li je FGF9 uključen u angiogenezu tijekom rane trudnoće. Da bi to istražila, koristila sam metodu imunofluorescencije dvostrukog obilježavanja tkiva uterusa s FGF9 i CD31 (PECAM-1) protutijelom (biljeg za endotelne stanice). Dobiveni rezultati su pokazali da su FGF9 i CD31 pozitivne stanice dio mikrovaskulature, ali da pripadaju različitim populacijama stanica (Slika 52A i B). Prema tome, FGF9 bi mogao biti prisutan u muralnim stanicama. Muralne stanice, se sastoje od vaskularnih glatkih mišićnih stanica i pericita i pokrivaju endotelne stanice, a time reguliraju krvožilnu stabilnosti i homeostazu [216]. Dobiveni rezultati upućuju da bi FGF9 mogao imati važnu ulogu u sazrijevanju malih krvnih žila na mjestu implantacije.



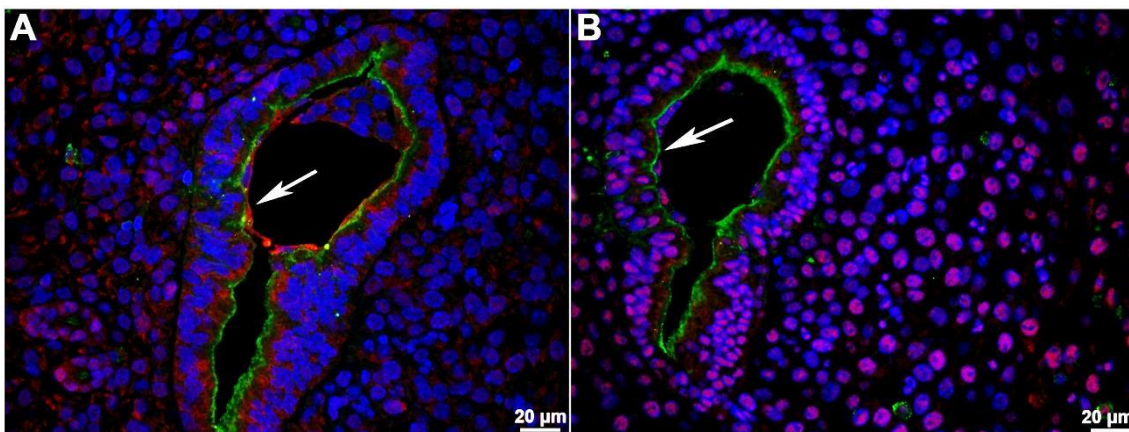
**Slika 52. Odnos izražaja i raspodjela FGF9 i CD31 na mjestu implantacije.**

Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće sa mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno) i zečjim monoklonskim protutijelom za CD31 (PECAM-1) (crveno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo. Strelica na slici A prikazuje embrij na implantacijskom mjestu. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa.

#### 4.5.1.10. Međudjelovanje FGF9 i njegovog receptora FGFR2 je ključno za pravilno pričvršćivanje blastociste za LE tijekom implantacije u miša

Biološka aktivnost FGF-ova je posredovana preko četiri različita protein kinazna receptora (FGFR1–4). Svoju biološku funkciju FGF9 ostvaruje vezanjem na tri od četiri FGFR-a, FGFR2, FGFR3 i FGFR4 [163]. Poznato je da FGFR2 i FGFR3 vežu FGF9 s velikim afinitetom [84, 92]. Zbog toga je moj sljedeći cilj bio ispitati vremenski i prostorni odnos između FGF9 i FGFR2 odnosno FGFR3, metodom imunofluorescencije.

Analiza raspodjele FGFR2 (crvena fluorescencija) pokazala je da je on prisutan u citoplazmi (Slika 53A), dok se FGFR3 (crvena fluorescencija) nalazi u jezgri (Slika 53B) stromalnih i epitelnih stanica uterusa. Jak intenzitet bojanja za FGF9 (zelena fluorescencija) prisutan je na apikalnom dijelu stanica LE-a. Za razliku od FGFR3, trofoblastne stanice blastociste pokazale su jak intenzitet bojanja za FGFR2. Dobiveni rezultati upućuju na sinkroniziranu prostornu i vremensku raspodjelu FGF9 i njegovog FGFR2. Zbog toga bi FGF9-FGFR2 signalni put mogao biti važan za komunikaciju između blastociste i LE-a koja je neophodna za apoziciju i implantaciju blastociste.



**Slika 53. Odnos izražaja i raspodjela FGF9 i njegovih receptora na mjestu implantacije**

**A)** Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće sa mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno) i zečjim poliklonskim protutijelom za FGFR2 (crveno).

**B)** Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva uterusa tijekom 4,5 dana trudnoće sa mišjim monoklonskim protutijelom za FGF9 (zeleno) i zečjim poliklonskim protutijelom za FGFR3 (crveno). Jezgre su obilježene DAPI-om, plavo. Strelica na slici A i B prikazuje trofoblast embrija koji se pričvrstio za LE. Rezultat je ogledni primjer jednog od šest odvojeno ponovljenih pokusa.

## 5. RASPRAVA

Reprodukcija je ključna za održavanje svake vrste [9]. U sisavaca, oplodnja jajne stanice spermijem dovodi do stvaranja zigote. Nakon oplodnje, zigota prolazi kroz nekoliko ciklusa mitoze i morfogeneze do stadija blastociste. Blastocista zatim stupa u prvi fizički i fiziološki kontakt sa majčinim endometrijem i time započinje implantacija [161]. Dvosmjerna komunikacija između blastociste i kompetentnog embrija je neophodna za uspostavljanje implantacije i uspjeh trudnoće [22]. Svaka perturbacija ovog složenog procesa, uspostavljanja trudnoće, stvara nepovoljne ishode za naknadni razvoj, uključujući decidualizaciju i placentaciju, s mogućim gubitkom trudnoće [28, 245]. Rani gubitak trudnoće, koji se događa tijekom peri-implantacijskog razdoblja prije nego je trudnoća prepoznata, klinički je relativno čest događaj u ljudi [161]. Vjerojatnost začeća tijekom jednog menstrualnog ciklusa u prosjeku iznosi oko 30 % [256]. U ljudi trudnoća nakon 20. tjedna je održana samo u 50 do 60 % slučajeva [161]. Od spontano prekinutih trudnoća, 75 % ih je posljedica neuspjele implantacije u fazi u kojoj trudnoća još klinički nije prepoznata [161]. Nepravilna implantacija je i kritička točka potpomognute oplodnje [226]. Bolje razumijevanje molekularnih mehanizama odgovornih za implantaciju i placentaciju doprinijelo bi liječenju poremećaja koji vode do tih procesa, uključujući neplodnost i rani gubitak trudnoće [161]. Tijekom implantacije embrij se pričvrsti za epitel endometrija i time potiče uspostavljanje trudnoće. Nakon adhezije, embrij nadire u stromu endometrija oko implantacijskog mjesta, a stromalne stanice podliježu diferencijaciji u decidualni fenotip. Novonastale decidualne sekrecijske stanice održavaju rast i preživljavanje embrija do uspostavljanja funkcionalne posteljice. U pre-implantacijskoj fazi usklađeno djelovanje steroidnih hormona P-a i E-a dovodi do funkcionalnih i morfoloških promjene u uterusa, čime on postaje kompetentan za implantaciju embrija [28].

Mnoga istraživanja, vezana za humanu reprodukciju, zbog etičkih razloga je nemoguće provesti na ljudima pa se kao zamjena koriste životinjski modeli. Istraživanja genetski modificiranih miševa značajno su doprinijela poznavanju molekularnih mehanizama tijekom kritičnih faza u uspostavljanju trudnoće [240]. U ljudi i miševa biološka aktivnost P-a je neophodna za svaki stupanj uspostavljanja i održavanja trudnoće: implantaciju, decidualizaciju, placentaciju i porođaj [28]. Poznato je da je P ligand za transkripcijske čimbenike: PR-A i PR-B, čija

transkripcijska aktivnost osigurava stvaranje mikrookoliša za implantaciju embrija [15]. Jedan od ciljeva ovog rada je bio odrediti vremenski i prostorni izražaj PR-a tijekom peri-implantacije u uterusu. Prisutnost PR-a u jezgrama stanica uterusa ukazuje na njegovu transkripcijsku aktivnost. Vremenski i prostorni izražaj PR-a se mijenja unutar određenih dijelova uterusa ovisno o stupnju trudnoće. Porast P-a tijekom rane trudnoće prati pad PR-a u stanicama LE-a i GE-a te njegov porast u stromi endometrija i decidualnim stanicama. Moji rezultati pokazali su da PR nije transkripcijski aktivan na mjestu pričvršćenja blastociste za LE tijekom 4,5 dana trudnoće u miša. Značajan porast izražaja PR-a u jezgri je prisutan u stromalnim stanicama agregiranih oko implantacijskog mjesta. Prema tome mogu zaključiti kako su promjene u specifičnoj populaciji stanica oko mjesta implantacije ovisne o čimbenicima čiji je izražaj reguliran P-om.

Sekvenciranjem imunoprecipitiranih dijelova kromatina analizirani su geni koji sadrže PRE u uterusu miša. Jedan od tih gena je i transkripcijski čimbenik *Hand2* [186]. Također, istraživanja na mišicama s antagonistom PR-a, RU-486, su pokazala da je on jedan od P-om reguliranih gena u uterusu [6]. Poznato je da je *Hand2* bitan za inhibiciju E-om potaknute proliferacije LE-a, događaja koji je ključan za uspostavljanje implantacije. Na temelju toga predložen je mehanizam djelovanja *Hand2* na inhibiciju proliferacije LE-a, koji uključuje inhibiciju izražaja pro-proliferacijskog djelovanja FGF-ova [103]. Transkripcijski čimbenik *Hand2*, koji pripada obitelji bHLH, je važan regulator morfogeneze srca i pluća [68]. Istraživanja trudnoće u mišica pokazala su da je *Hand2* također važan regulator morfogeneze uterusa tijekom rane trudnoće [100]. Dio istraživanja ovog rada uključuje i analizu do sada nepoznatog prostornog i vremenskog izražaja *Hand2* tijekom rane trudnoće u uterusu miša. Tijekom peri-implantacijskog razdoblja *Hand2* je prisutan u jezgrama stromalnih stanica uz povećani izražaj tijekom 4,5 i 7,5 dana trudnoće. Izražaj *Hand2* u jezgri upućuje da je tijekom peri-implantacijskog razdoblja transkripcijski aktivan, a njegov povećani izražaj tijekom 4,5 i 7,5 dana trudnoće upućuje na njegovu važnost u procesima implantacije i decidualizacije. Ovi rezultati su potvrđeni na razini izražaja *Hand2* gena i bjelančevine.

Nadalje, western blot analizom utvrdila sam da je *Hand2* uz očekivanu 25 kDa izoformu prisutan u još dvije izoforme u području molekularne mase od 25 kDa do 30 kDa. Primarna struktura *Hand2* bjelančevine sadrži konsenzus sekvencu za



fosofrilaciju [155]. Dobiveni rezultat upućuje na mogućnost da je Hand2 različito posttranslacijski reguliran tijekom trudnoće.

Imunofluorescentna analiza prostornog i vremenskog izražaja Hand2 tijekom 4,5 dana trudnoće pokazala je pojačan izražaj Hand2 na mjestu implantacije u odnosu na ostale dane trudnoće. Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi P-om regulirane mehanizme za vrijeme implantacije u miša. Stoga sam usporedila izražaj Hand2 na mjestu implantacije u odnosu na ne-implantacijsko mjesto. Moji rezultati su također pokazali da nastajanje implantacijskog mjesta prati jak porast izražaja PR-a. Prema tome, pretpostavila sam da nastajanje funkcionalnog implantacijskog mjesta vjerojatno prati i porast Hand2. Da bi odvojila mjesto implantacije od ne-implantacijskog mjesta koristila sam Chicago blue boju koja boji mjesta povećane krvožilne propusnosti, a jedan od prvih znakova implantacije je povećana krvožilna propusnost na mjestu implantacije [52]. Analizom izražaja *Hand2* gena, potvrdila sam ovu hipotezu. Izražaj Hand2 na razini gRNA i bjelančevine je značajno veći u implantacijskom u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.

*In silico* metodama dokazano je prisustvo PRE na Hand2 genu [186]. Zbog toga se može pretpostaviti da je Hand2 nishodno regulirana molekula P-PR signalnog puta. Ako je izražaj Hand2 rezultat direktne transkripcijske aktivnosti PR-a, onda ove dvije bjelančevine trebaju biti prisutne u istoj stanici, a to do sada nije bilo potvrđeno. Metodom imunofluorescencije na rezovima tkiva uterusa istražila sam da li postoji preklapanje u izražaju PR-a i Hand2 tijekom rane trudnoće. Moji rezultati su pokazali da je tijekom peri-implantacije Hand2 prisutan u jezgrama subpopulacije stromalnih stanica čije su jezgre i PR pozitivne. Svaka Hand2 stanica je ujedno i PR pozitivna, ali ne i obrnuto. Iz toga se može zaključiti da P preko PR-a regulira izražaj Hand2 u populaciji stromalnih stanica u endometriju uterusa odnosno da je Hand2 nishodno regulirana molekula PR signalnog puta.

Poznato je da Hand2 kao parakirni faktor PR signalnog puta inhibira proliferaciju LE-a [128]. Zbog toga moj sljedeći cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje utjecaja Hand2 na proliferaciju stromalnih stanica. Kao marker proliferacije koristila sam BrdU, koji obilježava stanice u S fazi staničnog ciklusa. Tijekom peri-implantacijskog razdoblja postoji mala populacija Hand2 pozitivnih stanica koje ujedno i proliferiraju. Pokazala sam kako Hand2 pozitivne stanice koje se nalaze u stromi oko implantacijskog mjesta u PDZ-u ne proliferiraju. Distalno od implantacijskog mjesta prisutna je jaka proliferacija nedecidualiziranih stromalnih stanica. Na mjestu implantacije dvostruko

pozitivne BrdU i Hand2 stanice prisutne su na granici između PDZ-a i nediferenciranih stromalnih stanica. Prema ovom rezultatu mogu pretpostaviti kako Hand2 pozitivne stanice koje proliferiraju imaju važnu ulogu u formiranju gradijenta signalnih čimbenika koji određuju kinetiku procesa decidualizacije te invaziju trofoblasta, čime potiču pripremu uterusa na implantaciju [77]. Proliferacija decidualnih stanica je bila odsutna na antimezometrijalnom polu uterusa tijekom 7,5 dana trudnoće. Stromalne stanice endometrija na mezometrijalnom polu uterusa nastavljaju proliferirati i populacija dvostruko pozitivnih BrdU i Hand2 stanica se nalazi uglavnom na granici između SDZ-a i mezometrijalnog pola uterusa. Ovaj rezultat dodatno podupire značajnosti Hand2/BrdU pozitivnih stanica u dinamici decidualizacije endometrija. Stoga, mogu pretpostaviti kako je stanična diferencijacija u decidualni fenotip pod kontrolom PR-om regulirane aktivnosti Hand2.

U ljudi i miševa, kao i u drugim vrstama, PR je prisutan u dvije izoforme PR-A i PR-B. Istraživanja na miševima s nedostatkom obje (PRKO) ili pojedinačne PR izoforme (PRAKO ili PRBKO) su pokazala da PR izoforme imaju različitu ulogu u endometriju uterusa [152]. Nedostatak PR-A i PR-B izoforme u PRKO mišića vodi do neplodnosti. Neplodnost je posljedica gubitka P-om inducirane inhibicije E-om potaknute hiperplazije uterusa i decidualizacije stromalnih stanica uterusa [135]. Zbog nedostatka PR-A izoforme u PRAKO mišićama, P nije u mogućnosti suprimirati mitogeni efekt E-a na LE i zbog toga izostane implantacija [154]. U PRBKO mišićama koje sadrže samo PR-A izoformu, P stvara uvjete potrebne za implantaciju, decidualizaciju i održavanje trudnoće [153]. Kao i u uterusu PRAKO mišića, tkivno specifična postnatalna ablacija Hand2 uzrokuje izostanak P-om regulirane inhibicije proliferacije LE-a [128]. Rezultat ovog istraživanja upućuje da u PRAKO uterusu, transkripcijska aktivnost PR-B izoforme nije dostatna za potpuni izražaj Hand2. Prema tome, u uterusu miša P ovisan Hand2 izražaj je najvjerojatnije reguliran PR-A izoformom.

Za uspješnu implantaciju i trudnoću neophodno je usklađeno djelovanje E-a i P-a koji stvaraju povoljne uvjete u endometriju uterusa za implantaciju blastociste [28]. Obzirom da je potrebno usklađeno djelovanje E-a i P-a tijekom trudnoće, jedan od ciljeva istraživanja je i bio odrediti regulaciju izražaja Hand2 pod utjecajem egzogenog E-a i kombinacije E-a i P-a u ovarijektomiziranim WT, PRKO i PRAKO mišićama. Analiza izražaja Hand2 bjelančevine pokazala je kako je u kontroli divljeg tipa prisutna dominantno jedna izoforma Hand2, dok je nakon E tretmana prisutna



druga izoforma Hand2, čiji je izražaj snižen u odnosu na kontrolu. Zanimljivo je da su u uterusu WT mišica nakon EP tretmana prisutne sve tri izoforme Hand2, kao i kod trudnoće, ali im je izražaj snižen u odnosu na kontrolu. Ove promjene dinamike izražaja Hand2 bjelančevine potvrđene su i analizom izražaja *Hand2* gena u tkivima WT mišica. Poznato je da potpuna ablacija PR-a u mišica uzrokuje neplodnost [135]. Prema tome, jedan od ciljeva koje sam ispitala bila je prisutnost Hand2 u tkivu ovarijektomiziranih PRKO mišica. Analiza izražaja Hand2 gRNA i bjelančevine pokazala je da je Hand2 prisutan u uterusu PRKO mišica i u kontrolnim skupinama, kao i nakon tretman s E-om i EP. Također je taj obrazac izražaja Hand2 postojan i u PRAKO mišicama, koje su fenotipski iste kao i PRKO [154]. Zanimljivo je da je i u PRKO i PRAKO mišicama izražaj Hand2 nakon tretmana s E-om snižen u odnosu na kontrolu, i da nakon EP tretmana nisu prisutne tri izoforme kao u WT uzorcima. Estrogen inhibira izražaj Hand2 u sva tri genotipa koje sam analizirala. Dodatak P-a zajedno sa E uzrokuje statistički značajan porast izražaja Hand2 samo u WT mišica. Zanimljivo je da je Hand2 prisutan u stromi uterusa kod ovarijektomiziranih WT, PRAKO i PRKO mišica bez prisustva hormona ovarija. Moji rezultati su u korelaciji s rezultatima dobivenim genomskom analizom sekvenciranja imunoprecipitiranih dijelova kromatina uterusa miša. Tom analizom je pokazano da je Hand2 prisutan u uterusu i bez prisustva P-a [186]. Daljnjom *in silico* analizom *Hand2* gena, pronašli smo dva predviđena P ovisna PRE mjesta, i treći koji je aktivan, ali neovisno o P-u. Sukladno tome, visok izražaj Hand2 je bio prisutan i u stromi uterusa 5 dana starog neonatalnog miša, kada je endogena koncentracija P-a jako niska [39]. Rezultati tih istraživanja zajedno s mojima navode na zaključak da u uterusu miša izražaj Hand2 može biti reguliran uz P ovisan i P neovisan mehanizam.

Prema tome, rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju da je izražaj Hand2 u uterusu WT mišica uz E i P, reguliran i drugim čimbenicima. Također, prema dobivenim rezultatima mogu zaključiti kako su za pravilnu uspostavu trudnoće neophodne sve tri izoforme Hand2, i da, osim P-a, i E regulira izražaj Hand2. Za pravilnu implantaciju je neophodna kratkotrajna prisutnost E-a ujutro četvrtog dana trudnoće u mišica [240]. Mogu pretpostaviti da je možda kratkotrajna inhibicija izražaja Hand2 na samom mjestu implantacije neophodna za pričvršćivanje blastociste i njenu implantaciju.

Tijekom trudnoće Hand2 je prisutan u tri izoforme, kao i u ovarijektomiziranim WT životinjama nakon EP tretmana. Različite izoforme Hand2 mogu biti rezultat njegove posttranslacijske dorade. Kao član bHLH obitelji transkripcijskih čimbenika Hand2 ima mogućnost dimerizacije. Poznato je kako je tijekom diferencijacije trofoblastnih stanica aktivnost Hand2 promijenjena fosforilacijom, kao što je i stvaranje transkripcijski kompetentnog dimera dijelom regulirano fosforilacijom [69]. Do sada je poznato kako Hand2 sadrži konzensus sekvence koje prepoznaju PKA i Akt kao mjesto fosforilacije [155]. Pregledom baza podataka pronašla sam da je predviđeno jedno fosforilacijsko mjesto na serinu 114 (S114), a ostala mjesta posttranslacijskih modifikacija predviđaju acetilaciju. Prema tome, moguće je da tijekom implantacije i decidualizacije PKA ili Akt regulira transkripcijsku aktivnost Hand2.

U nedostatku protutijela koja prepoznaju fosforilirani Hand2, indirektno sam pokušala odrediti da li je Hand2 fosforiliran s PKA odnosno Akt na mjestu implantacije i u decidualnim stanicama. Koristeći protutijela koja prepoznaju bjelančevine fosforilirane PKA, odnosno Akt-om, odredila sam dolazi li do preklapanja signala za PKA i Akt s Hand2 u endometriju tijekom peri-implantacije. Moji rezultati upućuju na mogućnost fosforilacije Hand2 s PKA, a ne s Akt tijekom implantacije i decidualizacije. Izražaj transkripcijski aktivnog Hand2, koji je prisutan u jezgri, preklapa se s izražajem bjelančevina fosforiliranih PKA-om. To indirektno upućuje da P-om reguliran Hand2 sudjeluje u procesu decidualizacije. Za proces decidualizacije potrebno je sinergističko djelovanje P-a i cAMP-a [76]. Prema tome, P regulira izražaj Hand2, a cAMP enzimsku aktivnost PKA. Dimerizacija Hand2 je preduvjet za njegovu transkripcijsku aktivnost, a dimerizacija je regulirana s fosforilacijom [69]. To navodi na zaključak kako je Hand2 mogući supstrat za PKA tijekom rane trudnoće u endometriju.

Jedan od prvih znakova implantacije je i povećana krvožilna propusnost na mjestu pričvršćivanja blastociste za LE. Taj događaj je posredovan PG-om za čiju je sintezu odgovoran COX2 [29]. Poznato je kako su mišice s potpunom ablacijom COX2 neplodne [131]. Na implantacijskom mjestu dolazi do promjene izražaja COX2 u uterusu [29]. Istraživanja sekvenciranja imunoprecipitiranih kromatinskih dijelova iz uterusa miša su pokazala da COX2 ima PRE, što znači da može direktno biti reguliran P-om [186]. Sam E nema direktan učinak na izražaj COX2, jer COX2 nema ERE [93]. Međutim, E regulira izražaj prostaglandin E sintaze-1 (PTGES, prema engl.

prostaglandin E synthase) [72]. To je enzim koji djeluje nishodno od COX1 i -2 i neophodan je za stvaranje PGE<sub>2</sub> [169]. U glodavaca je primijećeno kako PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> imaju važnu ulogu u procesu implantacije i decidualizacije [141].

Istraživanjem temeljenim na kvaliteti ljudskih embrija pokazali smo kako embrij koji, zbog loše kvalitete uzrokovane kromosomskim aberacijama, i nije kompetentan za implantaciju, šalje u decidualnim stanicama endometrija signale koji izazivaju stres endoplazmatskog retikuluma. Suprotno, embrij kompetentan za implantaciju (dobre kvalitete) šalje signale koji potpomažu proces implantacije. Za implantaciju kompetentan embrij šalje kao signal serinsku proteazu koja aktivira ENaC što uzrokuje ulazak Ca<sup>+2</sup> u stanicu i potakne izražaj COX2, a time i sintezu PG-a. Sinteza PG-a je ključna za uspostavljanje implantacije. Ovi rezultati ukazuju na prisustvo pozitivnih i negativnih mehanizama uključenih u selekciju humanog embrija kompetentnog za implantaciju i uspostavljanje trudnoće [22]. Prema tome, jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio dodatno istražiti izražaj COX2 tijekom peri-implantacije u miša.

Prva tri dana trudnoće COX2 je prisutan u citoplazmi stanica LE-a kao i endotelu. Implantacijom blastociste COX2 se pojavljuje u citoplazmi male populacije stromalnih stanica samo na mjestu implantacije. Važno je napomenuti kako je drastično smanjen izražaj COX2 u stanicama LE-a na mjestu adhezije blastociste. Nakon implantacije COX2 se još zadržava tijekom 5,5 dana trudnoće oko mjesta implantacije. Progresijom trudnoće dovodi do prestanka izražaja Cox2 na mjestu implantacije tijekom 6,5 i 7,5 dana trudnoće, dok je u istom razdoblju COX2 prisutan na mezometrijalnom polu uterusa. To ukazuje na stanično-specifičnu aktivnost COX2 na samom mjestu implantacije. Ta značajna promjena prostornog razmještaja COX2 na implantacijskom mjestu navela me na istraživanje izražaj gena Cox2 u implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto. Analiza izražaja Cox2 gena pokazala je kako je njegov izražaj na mjestu implantacije veći u odnosu na ne-implantacijsko mjesto. Nadalje, kako je poznato da Cox2 gen sadrži PRE, zanimalo me dolazi li do preklapanja izražaja COX2 i PR na mjestu implantacije. Do sada ta kolokalizacija nije istražena niti pokazana. Metodom dvostrukog obilježavanja rezova tkiva imunofluorescencijom istražila sam izražaj COX2 i PR na samom mjestu implantacije. Mala populacija stromalnih stanica koja je COX2 pozitivna oko mjesta adhezije blastociste je i PR pozitivna. U tim stanicama se PR nalazi u jezgri, što upućuje na njegovu transkripcijsku aktivnost. Stoga, mogu pretpostaviti kako u

stromalnim stanicama koje su COX2 pozitivne, izražaj COX2 ovisi o P-PR signalnom putu. Izražaj i *Cox2* i *Hand2* gena može biti reguliran PR-om, zbog prisustva PRE na njihovim regulacijskim sljedovima [186]. Istražila sam prostorni i vremenski raspored COX2 i Hand2 tijekom peri-implantacijskog razdoblja. Premda su i Hand2 i COX2 prisutni kod 2,5 i 7,5 dana trudnoće njihova kolokalizacija je odsutna. Za vrijeme implantacije Hand2 i COX2 su prisutni u istoj populaciji stromalnih stanica oko mjesta adhezije blastociste. Obzirom da svaka stanica koja izražava Hand2 izražava i PR, i da njihov izražaj kolokalizira u jezgri, mogu zaključiti da promjene izražaja gena u toj maloj populaciji stanica, koja je pozitivna na COX2, Hand2 i PR oko mjesta implantacije, imaju važnu ulogu u osiguravanju uvjeta pogodnih za implantaciju blastociste.

Kratkotrajna prolazna prisutnost E-a četvrtog dana trudnoće je neophodna za pravilnu implantaciju kod miša [145]. Svoju biološku funkciju E ostvaruje preko svoja dva receptora ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Poznato je kako su i mišice s potpunom ablacijom ER $\alpha$  neplodne [94]. Jedan od postavljenih ciljeva ovog rada bilo je istraživanje prostornog i vremenskog raspored ER $\alpha$  tijekom rane trudnoće. Tijekom 2,5 i 3,5 dana trudnoće ER $\alpha$  je prisutan u jezgrama stanica GE-a, LE-a i strome. Pričvršćivanjem blastociste za LE dolazi do promjene u prostornom izražaju ER $\alpha$ . Za razliku od PR-a, čiji je izražaj smanjen u LE-u, ali ostane prisutan u jezgri, ER $\alpha$  je na mjestu implantacije u LE-u prvenstveno prisutan u citoplazmi, što upućuje na njegovu transkripcijsku inaktivnost. Nadalje, na mjestu implantacije dolazi do adenogeneze i jezgre novonastalih žlijezda se intenzivno boje na ER $\alpha$ . To upućuje kako E preko ER $\alpha$  na parakrini način regulira uvijete pogodne za implantaciju embrija. Također, kao i PR, na ne-implantacijskom mjestu ER $\alpha$  ostaje izražen u jezgrama stanica LE-a, GE-a i populaciji stromalnih stanica. Odmicanjem trudnoće, izražaj ER $\alpha$  se smanjuje na mjestu implantacije i dolazi do prostorne promjene izražaja ER $\alpha$  s antimezometrijalnog dijela na mezometrijalni dio, kao i unutar samih stanica. U populaciji stanica na mezoemtrijskom dijelu ER $\alpha$  je prisutan u citoplazmi, što može upućivati na njegovu proteasomsku degradaciju i utišavanje funkcije u tim stanicama. Poznato je da *Pr* gen sadrži ERE, i da je izražaj PR-a u uterusu u prvom dijelu ciklusa reguliran preovulacijskim E-om [234]. Do sada nije istražen njihov odnos na mjestu implantacije, zato sam kao dio ovog istraživanja analizirala i njihov odnos na implantacijskom mjestu. Komercijalna protutijela visoke kvalitete za PR i ER $\alpha$  su

proizvedena u istoj životinji te ih nisam mogla koristiti za istovremeno dvostruko obilježavanje rezova tkiva. Iskoristila sam činjenicu kako je svaka Hand2 pozitivna stanica i PR pozitivna te sam koristila kombinaciju protutijela za Hand2 i ER $\alpha$ . Na mjestu implantacije nije došlo do preklapanja signala ER $\alpha$  s Hand2. Prema tome, mogu zaključiti kako se na mjestu implantacije izražaj ER $\alpha$  i Hand2 ne preklapa. Analogno tome, izražaj PR-a u tim stanicama nije reguliran ER $\alpha$  unatoč kratkotrajnoj prisutnosti E-a za vrijeme implantacije. Također, tijekom 4,5 dana izražaj Hand2 nije direktno inhibiran s ER $\alpha$ . Da bi se utvrdio precizan mehanizam kojim E inhibira izražaj Hand2 *in vivo* potrebna su dodatna istraživanja *in vivo* i *in vitro*.

Proliferacija uterusa potaknutom E-om je posredovana parakrinim signalima koji uključuju FGF-ove [74]. Za uspješnu implantaciju potrebna je inhibicija proliferacije LE-a posredovana P-om, što osigurava pogodan mikrookoliš za pričvršćivanje blastociste za LE [240]. Čimbenici za koje se smatra da su ključni za proliferaciju uterusa posredovanu FGF-ovima su FGF1, FGF2, FGF9 i FGF18 [128]. Do sada njihov izražaj u trudnoći tijekom peri-implantacijskog razdoblja nije bio istražen, stoga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio i odrediti izražaj *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf9* i *Fgf18* gena. Dobiveni rezultati pokazali su kako izražaj *Fgf2* i *Fgf9* doseže maksimum tijekom dvije različite točke trudnoće. *Fgf9* tijekom 4,5 dana trudnoće, kada dolazi do implantacije, a *Fgf2* tijekom 7,5 dana trudnoće, kada se stvara decidua. Cjelokupnom *in situ* hibridizacijom na tkivu uterusa pokazano je kako je *Fgf2* izražen u stromi oko implantacijskog mjesta i da njegov izražaj raste procesom decidualizacije [167].

Rezultati prikazani u ovom radu po prvi puta pokazuju kako je izražaj *Fgf9* povećan tijekom implantacije u uterusu miša. Prijašnja istraživanja pokazala su kako je izražaj *Fgf9* u ljudskim stromalnim stanicama reguliran s E-om [233].

Istraživanja sekvenciranja imunoprecipitiranih dijelova kromatina iz uterusa miša su pokazala kako *Fgf9* ima ERE, ali nema PRE. [93, 186]. Zbog toga sam istražila utjecaj E-a i EP-a na izražaj FGF9 bjelančevine u uterusu ovarijektomiziranih mišica. Rezultati koje sam dobila pokazuju kako je FGF9 prisutan u tri izoforme koje su vidljive kao signali od 25, 29 i 30 kDa. U uterusu ovarijektomiziranih životinja izražaj FGF9 izoforme molekularne mase 25 kDa je induciran isključivo sa E-om.

Postojanje tri izoforme FGF9, 25, 29 i 30 kDa potvrđene su u ljudskim glijalnim stanicama [159]. Prema tome, zbog 99% sličnosti proteinske sekvence između ljudskog i mišjeg FGF9, mogu zaključiti kako te dvije heparin vezujuće bjelančevine

moгу biti posttranslacijski dorađene na isti naćin u obje vrste. Poznato je kako je u miša potrebna kratkotrajna prisutnost E-a za uspješnu implantaciju embrija ćetvrtog dana trudnoće [28]. Iznenadujuće je da E-om potaknuta 25 kDa izoforma, koja je prisutna u uterusu ovarijektomiziranih mišica, nije prisutna u uterusu mišica tijekom trudnoće. Nedostatak 25 kDa izoforme tijekom trudnoće i maksimalni izražaj 29 i 30 kDa FGF9 tijekom 4,5 dana trudnoće upućuje na to da FGF9 izoforme imaju selektivnu ulogu za pravilnu funkciju endometrija.

Rezultati dobiveni imunofluorescentnom analizom tkiva uterusa za vrijeme implantacije, tijekom 4,5 dana trudnoće, pokazali su kako se na ne-implantacijskom mjestu FGF9 nalazi na apikalnom dijelu stanica GE-a i LE-a, u kojima je ER $\alpha$  prisutan u jezgri. Stoga mogu zaključiti kako je u tim stanicama izražaj FGF9 reguliran s ER $\alpha$ . Nasuprot tome, na implantacijskom mjestu u stanicama u kojima je prisutan FGF9, ER $\alpha$  je prisutan u citoplazmi, što znaći da on nije transkripcijski aktivan. Dakle, izražaj FGF9 na neposrednom kontaktu trofoblasta za LE, je reguliran nekim drugim ćimbenicima.

Istraživanja endometrioze su pokazala kako produkt enzima COX2, PGE<sub>2</sub>, potiće izražaj FGF9 koji uzrokuje proliferaciju endometrijskih stromalnih stanica [32]. Mišice sa genetskom ablacijom *Cox2* pokazuju pleiotropne nedostatke reprodukcije, uključujući implantaciju i decidualizaciju [241]. Prostorni razmještaj izražaja COX2 oko mjesta pričvršćivanja blastociste mođe biti posljedica signaliziranja embrija preko izlućivanja serinske proteaze. Proteaza zatim aktivira ENaC, što dovodi do povećanja unutarstanićne koncentracije Ca<sup>2+</sup> koji potiće izlućivanje PG-a, fosforilaciju CREB-a koji regulira prijepis i izražaj COX2 [185, 22].

Tijekom 4,5 dana trudnoće istražila sam odnos COX2 i FGF9 na mjestu implantacije. Rezultati upućuju da PG-ovi sintetizirani oko implantacijskog mjesta putem COX2 mogu potaknuti izražaj FGF9 u epitelnim stanicama uterusa. Prema tome, mogu zaključiti kako je povećanje izražaja FGF9 vjerojatno potrebno za omogućavanje visoko specifićnog, prijelaznog mikrokoliša u endometriju, koji je neophodan za pravilnu uspostavu razdoblja implantacijskog prozora. Od prije je poznato kako izražaj FGF9 mođe biti potaknut E-om i PGE<sub>2</sub> [247]. Signalni put PGE<sub>2</sub> je posredovan preko EP3 receptora [246]. U stromalnim stanicama uterusa, EP3 receptor je produkt transkripcijske aktivnosti *Hoxa10*. To je potvrđeno istraživanjem na *Hoxa10*<sup>-/-</sup> mišicama u kojima je izražaj EP3 snižen [130]. Nedavna istraživanja pokazala su da

je u endometriju miša i ljudi Hoxa10 reguliran P-om [122]. Stoga, u uterusu, aktivnost FGF9 može ovisiti o preciznoj ravnoteži između aktivnosti E-a i P-a.

Povećana krvožilna propusnost na mjestu implantacije je regulirana s PG-ovima [131]. Također je poznato da FGF-ovi imaju i ulogu u angiogenezi uterusa [101]. Istraživanja su pokazala kako prisutnost FGF9 tijekom angiogeneze potiče stvaranje otpornih, malih krvnih žila omotanih glatkomišićnim stanicama. Ugradnja *Matrigel* plaka u miša, koji sadrži kombinaciju FGF9 i FGF2, pokazala je kako ta dva čimbenika imaju jako sinergističko djelovanje na stvaranje mikrožilja [73]. Mikrožilje se sastoji od tubularnih endotelnih stanica okruženih s potpornim muralnim stanicama. Moji rezultati, koji se temelje na analizi dvostrukog imunofluorescentnog obilježavanja tkiva s FGF9 i CD31, pokazali su kako se FGF9 nalazi u stanicama koje su pridružene mikrožilju, ali njegov izražaj se ne preklapa s CD31 pozitivnim endotelnim stanicama. Pretpostavljam kako FGF9 pozitivne stanice čine malu populaciju muralnih stanica i da u tim stanicama FGF9 djeluje kao autokrini ili parakrini čimbenik za poticanje sazrijevanja mikrožilja u uterusu.

Svoju biološku ulogu FGF-ovi ostvaruju vezanjem za četiri protein kinazna receptora, FGFR(1-4) [103]. Poznato je da se FGF9 može vezati za FGFR2, FGFR3 i FGFR4, ali se s velikim afinitetom veže za FGFR2-IIIc i FGFR3-IIIc receptore [163]. Tijekom implantacije FGFR3 je prisutan u jezgri stromalnih stanica i LE-a oko implantacijskog mjesta. U nekim zloćudnim promjenama tkiva, raku dojke, mokraćnog mjehura i gušterače, FGFR3 je također prisutan u jezgri [157]. Smatra se da su stanični mehanizmi tijekom implantacije slični mehanizmima pomoću kojih tumorske stanice metastaziraju [157]. Kako bi se pojasnilo razumijevanje zahtjevnog mehanizma implantacije embrija, neophodno je dodatno istraživanje FGFR3. Ova istraživanja mogla bi dovesti do boljeg razumijevanja staničnih i molekularnih događaja koji dovode do procesa metastaziranja.

Poznato je kako postnatalna specifična ablacija FGFR2 u uterusu dovodi do stvaranja slojevitog LE-a i gubitka trudnoće tijekom peri-implantacije. To ukazuje da FGFR2 ima važnu ulogu u pravilnom postnatalnom razvoju uterusa kao i njegovoj normalnoj funkciji [67]. Također, pokazano je kako FGF9-FGFR2IIIc signalni put u epitelu uterusa sprječava stvaranje slojevitog epitela [158]. Istraživanja na mišjim blastocistama pokazala su da stanice blastociste izražavaju FGFR2 i da je on važan u razvoju embrija tijekom peri-implantacije [86]. Potpuna ablacija *Fgfr2* dovodi do peri-implantacijske smrti embrija i aresta trofoblasta. Mutanti *Fgfr2*<sup>-/-</sup> umiru prije



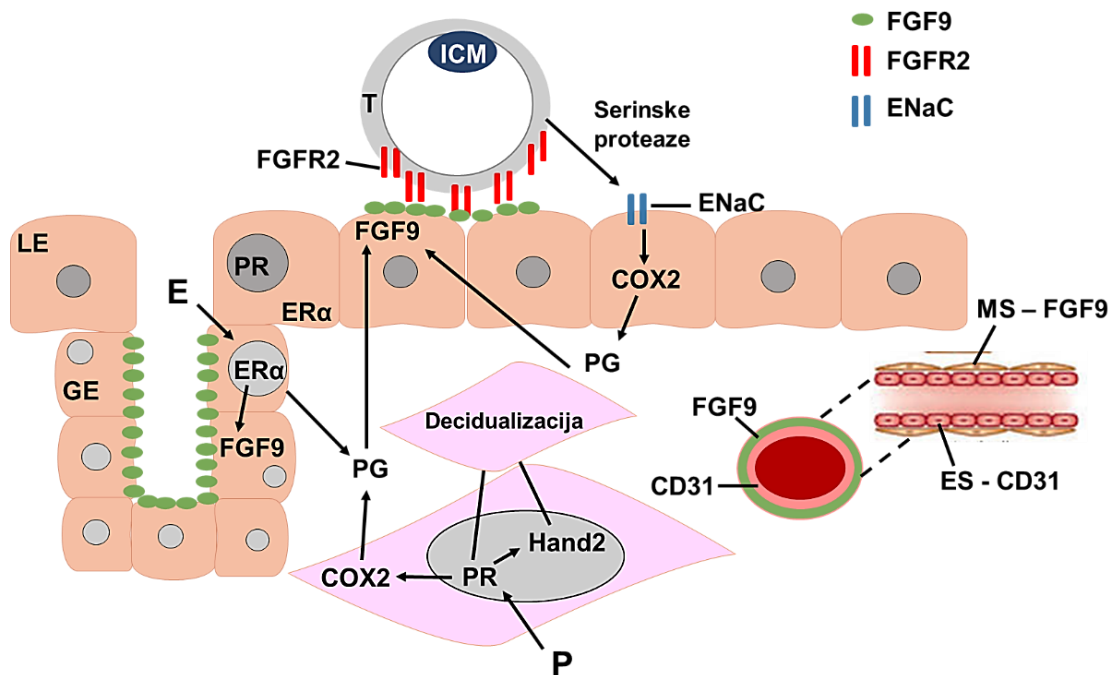
vidljivog decidualnog odgovora. Blastociste s nedostatkom FGFR2 potiču pojačanu kapilarnu propustljivost koja je indikator prvog koraka implantacije, ali bez prikladne decidualizacije stromalnih stanica. Stoga se može zaključiti da u nedostatku FGFR2, decidualizacija potaknuta pričvršćivanjem trofoblasta za LE izostane [3]. Implantacija je kompleksan proces koji zahtjeva pravilno pripremljen uterus i funkcionalni kompetentan embrij za implantaciju [22].

Tijekom 4,5, dana trudnoće pokazala sam prisutnost FGF9 u LE-u endometrija i prisutnost FGFR2 u trofoblastu. Ovaj rezultat upućuje na zaključak kako FGF9-FGFR2 interakcija može biti bitna za uspostavljanje komunikacije između kompetentnog embrija i uterusa pripremljenog za implantaciju.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazuju kako precizno usklađeni mehanizmi, koje reguliraju P i E, preko PR i ER $\alpha$ , su ključni za stvaranje pogodnog okoliša za implantaciju embrija u miša. Međudjelovanje transkripcijskih čimbenika PR i Hand2 je ključno za stvaranje specifične populacije stromalnih stanica na samom mjestu implantacije koja je odgovorna za proizvodnju PG-a, ključnih medijatora povećane krvožilne propusnosti i decidualizacije u uterusu.

Također, ovim istraživanjem sam pokazala kako je izražaj FGF9 u uterusu miša važan čimbenik za stvaranje prikladnog mikrookoliša za uspješnu implantaciju i održavanje trudnoće. Dodatna analiza signalnog puta preko kojeg FGF9 sudjeluje u angiogenezi endometrija tijekom trudnoće, i komunikaciji između endometrija i embrija, doprinijela bi boljem razumijevanju molekularnih mehanizama koji dovode do implantacije. Objedinjeni rezultati prikazani su u predloženom mehanizmu P-om reguliranih molekularnih procesa na mjestu implantacije (Slika 54).

Mnogi signalni putovi uključeni u funkciju endometrija tijekom implantacije visoko su očuvani u miša i čovjeka. Dodatna istraživanja, koja bi omogućila preciznu izolaciju i analizu izražaja gena u stromalnim stanicama oko mjesta implantacije, doprinijela bi boljem razumijevanju regulacije izražaja čimbenika potrebnih za uspješnu implantaciju. Time bi se dodatno pojasnili mehanizmi kojima P i E kontroliraju brze promjene na mjestu implantacije. Prema tome, bolje poznavanje molekularnih mehanizama uključenih u regulaciju implantacije embrija putem direktno ili indirektno P-om reguliranih gena, Hand2, Cox2 i FGF9, znatno bi doprinijelo razumijevanju uzroka patoloških promjena endometrija, neuspjelih implantacija, neplodnosti kao i odabiru prikladnog liječenja.



**Slika 54. Predloženi mehanizam djelovanja steroidnih hormona E-a i P-a na mjestu implantacije blastociste.**

Na mjestu implantacije je prisutan precizno reguliran odnos P-a i E-a. U stromalnim stanicama P preko PR-a potiče izražaj Hand2 i COX2. Sinergističkim djelovanjem PR i Hand2 potiču decidualizaciju stromalnih stanica oko mjesta implantacije i stvaranje PDZ-a. Aktivacijom COX2 u stromi nastaju PG-ovi, koji su važni za poticanje sinteze FGF9 u LE-u. U stanicama LE-a na kontaktu s blastocistom ERα je prisutan u citoplazmi, dok je u stanicama GE-a, prisutan u jezgri. Izražaj FGF9 u stanicama GE-a je pod regulacijom ERα, a u stanicama LE-a pod regulacijom PG-a. Kompetentna blastocista šalje signale putem serinske proteaze epitelu endometrija i time aktivira ENaC. Njihovom aktivacijom dolazi do povećanja izražaja COX2 i sinteze PG-a. Novonastali PG-ovi mogu dodatno potaknuti sintezu FGF9 u LE-u. Blastocista na trofoblastnim stanicama izražava FGFR2 koji je receptor za FGF9. Interakcija FGF9-FGFR2 je važna za pravilnu orijentaciju i implantaciju kompetentne blastociste. Jedan od prvih znakova implantacije je povećana krvožilna propusnost koja je posredovana PG-ovima. Mikrožilje oko implantacijskog mjesta uz endotelne stanice (CD31) sadrži i muralne stanice koje izražavaju FGF9. CD31 –endotelne stanice; COX2 – ciklooksigenaza 2; E – estrogen; ENaC - epitelni Na<sup>+</sup> kanal; ERα – estrogenski receptor α; ES – endotelne stanice; FGF9 – čimbenik rasta fibroblasta 9; FGFR2 – receptor 2 čimbenika rasta fibroblasta; GE – žljezdani epitel; Hand2 – transkript 2 izražen u srcu i tkivima porijeklom iz neuralnog grebena; ICM – unutastanična masa; LE – luminalni epitel; MS – muralne stanice; P – progesteron; PDZ – primarna decidualna zona; PG – prostaglandini; PR – progesteronski receptor i T – trofoblast.

## 6. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima dobivenim ovim istraživanjem mogu zaključiti sljedeće:

1. Tijekom peri-implantacijskog razdoblja dinamika izražaja i odnos PR-a i njime reguliranih gena, Hand2, COX2, ER $\alpha$  i FGF9 mijenja se tijekom procesa rane trudnoće u miševa i strogo je stanično specifičan.
2. Transkripcijska aktivnost PR-a je neophodna za izražaj Hand2 i Cox2 u specifičnoj populaciji stromalnih stanica na implantacijskom mjestu.
3. Izražaj PR-a, ER $\alpha$ , Hand2, COX2 i FGF9 je prostorno i vremenski specifičan za implantacijsko mjesto. Na implantacijskom mjestu izražaj Hand2 i COX2 je značajno povećan u usporedbi s ne-implantacijskim mjestom.
4. Transkripcijska aktivnosti ER $\alpha$  na implantacijskom mjestu je utišana, na što ukazuje translokacija ER $\alpha$  iz jezgre u citoplazmu stanica LE-a.
5. Vremenski i prostorni izražaj FGF9 ovisi o promjenama hormonalnog statusa tijekom rane trudnoće u miševa.
6. Prisutnost FGF9 na apikalnom dijelu stanica LE-a, a njegovog receptora FGFR2 na stanicama trofoblasta kompetentne blastociste, upućuje na važnost ove interakcije za implantaciju embrija.
7. Smanjen izražaj Hand2 u uterusu PRAKO mišica ukazuje na mogućnost da je izražaj Hand2 ovisan o PR-A izoformi.
8. Estrogen je negativni regulator izražaja Hand2 u uterusu ovrijektomiziranih WT, PRAKO i PRKO životinja.

Ravnoteža između aktivnosti E-a i P-a je ključna za preciznu regulaciju molekularnih događaja koji omogućuju stvaranje mikrokoliša potrebnog za nastajanje implantacijskog mjesta.

## 7. LITERATURA

- [1] Adams NR and DeMayo FJ. The Role of Steroid Hormone Receptors in the Establishment of Pregnancy in Rodents. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015;216:27-49.
- [2] Ahmed A, Dearn S, Shams M, Li XF, Sangha RK, Rola-Pleszczynski M, and Jiang J. Localization, quantification, and activation of platelet-activating factor receptor in human endometrium during the menstrual cycle: PAF stimulates NO, VEGF, and FAKpp125. *FASEB J* 1998;12(10):831-43.
- [3] Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, and Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):5082-7.
- [4] Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, and Croy BA. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol* 2003;171(6):2937-44.
- [5] Ashkar AA, Di Santo JP, and Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000;192(2):259-70.
- [6] Bagchi IC, Li Q, Cheon YP, Mantena SR, Kannan A, and Bagchi MK. Use of the progesterone receptor antagonist RU 486 to identify novel progesterone receptor-regulated pathways in implantation. *Semin Reprod Med* 2005;23(1):38-45.
- [7] Banerjee P, Sapru K, Strakova Z, and Fazleabas AT. Chorionic gonadotropin regulates prostaglandin E synthase via a phosphatidylinositol 3-kinase-extracellular regulatory kinase pathway in a human endometrial epithelial cell line: implications for endometrial responses for embryo implantation. *Endocrinology* 2009;150(9):4326-37.
- [8] Barbosa AC, Funato N, Chapman S, McKee MD, Richardson JA, Olson EN, and Yanagisawa H. Hand transcription factors cooperatively regulate development of the distal midline mesenchyme. *Dev Biol* 2007;310(1):154-68.
- [9] Bazer FW. History of Maternal Recognition of Pregnancy. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015;216:5-25.
- [10] Beenken A and Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(3):235-53.

- [11] Beltrame JS, Sordelli MS, Cella M, Perez Martinez S, Franchi AM, and Ribeiro ML. Lysophosphatidic acid increases the production of pivotal mediators of decidualization and vascularization in the rat uterus. *Placenta* 2013;34(9):751-6.
- [12] Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, and Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996;122(9):2687-96.
- [13] Bergamini CM, Pansini F, Bettocchi S, Jr., Segala V, Dallochio F, Bagni B, and Mollica G. Hormonal sensitivity of adenylate cyclase from human endometrium: modulation by estradiol. *J Steroid Biochem* 1985;22(3):299-303.
- [14] Bergh PA and Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992;58(3):537-42.
- [15] Bhurke AS, Bagchi IC, and Bagchi MK. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016;75(3):237-45.
- [16] Bigsby RM and Cunha GR. Estrogen stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in uterine epithelial cells which lack estrogen receptors. *Endocrinology* 1986;119(1):390-6.
- [17] Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, and Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 1997;6(3):301-7.
- [18] Brayman MJ, Julian J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Edwards DP, and Carson DD. Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 2006;20(10):2278-91.
- [19] Brenner RM, West NB, and McClellan MC. Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* 1990;42(1):11-9.
- [20] Brosens JJ and Gellersen B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* 2006;36(3):389-98.
- [21] Brosens JJ, Hayashi N, and White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1999;140(10):4809-20.
- [22] Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, Steel JH, Christian M, Chan YW, Boomsma CM, Moore JD, Hartshorne GM, Sucurovic S, Mulac-Jericevic B, Heijnen CJ, Quenby S, Koerkamp MJ, Holstege FC, Shmygol A, and Macklon NS. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep* 2014;4:3894.

- [23] Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R, and Lam EW. Steroid receptor action. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18(2):265-83.
- [24] Bulyanko YA and O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. *Biochemistry* 2011;50(3):313-28.
- [25] Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, Cohen SW, Hamilton M, Simon JA, Thorneycroft IH, and Marshall JR. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153(2):211-7.
- [26] Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, and Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol* 2000;223(2):217-37.
- [27] Cella M, Aisemberg J, Sordelli MS, Billi S, Farina M, Franchi AM, and Ribeiro ML. Prostaglandins modulate nitric oxide synthase activity early in time in the uterus of estrogenized rat challenged with lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* 2006;534(1-3):218-26.
- [28] Cha J, Sun X, and Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 2012;18(12):1754-67.
- [29] Chakraborty I, Das SK, Wang J, and Dey SK. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 1996;16(2):107-22.
- [30] Chen Q, Zhang Y, Elad D, Jaffa AJ, Cao Y, Ye X, and Duan E. Navigating the site for embryo implantation: biomechanical and molecular regulation of intrauterine embryo distribution. *Mol Aspects Med* 2013;34(5):1024-42.
- [31] Cho H, Okada H, Tsuzuki T, Nishigaki A, Yasuda K, and Kanzaki H. Progesterin-induced heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 is associated with fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2013;99(1):248-55.
- [32] Chuang PC, Sun HS, Chen TM, and Tsai SJ. Prostaglandin E2 induces fibroblast growth factor 9 via EP3-dependent protein kinase Cdelta and Elk-1 signaling. *Mol Cell Biol* 2006;26(22):8281-92.
- [33] Clemm DL, Sherman L, Boonyaratanakornkit V, Schrader WT, Weigel NL, and Edwards DP. Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol Endocrinol* 2000;14(1):52-65.

- [34] Cliff D and Schuh M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(9):549-62.
- [35] Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, Goldfarb M, and Ornitz DM. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Dev Dyn* 1999;216(1):72-88.
- [36] Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai MJ, Schrader WT, and O'Malley BW. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem* 1989;264(24):14062-4.
- [37] Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, and O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:339-55.
- [38] Conneely OM, Mulac-Jericevic B, and Lydon JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 2003;68(10-13):771-8.
- [39] Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, Dziuk PJ, Hayashi K, and Bartol FF. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod* 2012;86(3):63.
- [40] Couse JF and Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999;20(3):358-417.
- [41] Couse JF and Korach KS. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)* 1999;60(2):143-8.
- [42] Critchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, Millar MR, and Saunders PT. Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):1370-8.
- [43] Croy BA, Chen Z, Hofmann AP, Lord EM, Sedlacek AL, and Gerber SA. Imaging of vascular development in early mouse decidua and its association with leukocytes and trophoblasts. *Biol Reprod* 2012;87(5):125.
- [44] Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, and Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* 2006;214:161-85.
- [45] Curtis SW, Clark J, Myers P, and Korach KS. Disruption of estrogen signaling does not prevent progesterone action in the estrogen receptor alpha knockout mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3646-51.



- [46] Daikoku T, Tranguch S, Friedman DB, Das SK, Smith DF, and Dey SK. Proteomic analysis identifies immunophilin FK506 binding protein 4 (FKBP52) as a downstream target of Hoxa10 in the periimplantation mouse uterus. *Mol Endocrinol* 2005;19(3):683-97.
- [47] Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction* 2009;137(6):889-99.
- [48] Das SK, Lim H, Paria BC, and Dey SK. Cyclin D3 in the mouse uterus is associated with the decidualization process during early pregnancy. *J Mol Endocrinol* 1999;22(1):91-101.
- [49] Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, and Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994;120(5):1071-83.
- [50] De Clercq K, Hennes A, and Vriens J. Isolation of Mouse Endometrial Epithelial and Stromal Cells for In Vitro Decidualization. *J Vis Exp* 2017(121).
- [51] de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, and Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* 1998;39(1-2):149-66.
- [52] Deb K, Reese J, and Paria BC. Methodologies to study implantation in mice. *Methods Mol Med* 2006;121:9-34.
- [53] DeMayo FJ, Zhao B, Takamoto N, and Tsai SY. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:48-59; discussion 86-8, 396-406.
- [54] Dessauer CW, Posner BA, and Gilman AG. Visualizing signal transduction: receptors, G-proteins, and adenylate cyclases. *Clin Sci (Lond)* 1996;91(5):527-37.
- [55] Dey SK. Implantation. U: Adashi EY, J.A. R, and Rosenwaks Z, ur. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. New York: Lippincott-Raven, 1996; str. 421–34.
- [56] Dey SK. Focus on implantation. *Reproduction* 2004;128(6):655-6.
- [57] Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, and Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004;25(3):341-73.

- [58] Dharmaraj N, Gendler SJ, and Carson DD. Expression of human MUC1 during early pregnancy in the human MUC1 transgenic mouse model. *Biol Reprod* 2009;81(6):1182-8.
- [59] Dimitriadis E, White CA, Jones RL, and Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005;11(6):613-30.
- [60] Đelmiš J and Orešković S (ur). *Fetalna medicina i opstetricija*, Zagreb: Medicinska naklada.2014.
- [61] Edwards KA, Janzen-Pang J, Peng A, Tayade C, Carniato A, Yamada AT, Lima PD, and Tse D. Microscopic Anatomy of the Pregnant Mouse Uterus Throughout Gestation. U: Anne Croy ATY, Francesco J. DeMayo and S. Lee Adamson ur. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. San Diego: Academic Press, 2013; str. 43-67.
- [62] Eswarakumar VP, Lax I, and Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):139-49.
- [63] Evans J, Salamonsen LA, Winship A, Menkhorst E, Nie G, Gargett CE, and Dimitriadis E. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12(11):654-67.
- [64] Fawell SE, Lees JA, White R, and Parker MG. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 1990;60(6):953-62.
- [65] Fearon AE, Gould CR, and Grose RP. FGFR signalling in women's cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(12):2832-42.
- [66] Ferenczy A, Bertrand G, and Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979;133(8):859-67.
- [67] Filant J, DeMayo FJ, Pru JK, Lydon JP, and Spencer TE. Fibroblast growth factor receptor two (FGFR2) regulates uterine epithelial integrity and fertility in mice. *Biol Reprod* 2014;90(1):1-11.
- [68] Firulli AB. A HANDful of questions: the molecular biology of the heart and neural crest derivatives (HAND)-subclass of basic helix-loop-helix transcription factors. *Gene* 2003;312:27-40.
- [69] Firulli BA, Howard MJ, McDaid JR, McIlreavey L, Dionne KM, Centonze VE, Cserjesi P, Virshup DM, and Firulli AB. PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A

influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol Cell* 2003;12(5):1225-37.

[70] Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, and Markert UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update* 2008;14(4):335-44.

[71] Franco HL, Lee KY, Broaddus RR, White LD, Lanske B, Lydon JP, Jeong JW, and DeMayo FJ. Ablation of Indian hedgehog in the murine uterus results in decreased cell cycle progression, aberrant epidermal growth factor signaling, and increased estrogen signaling. *Biol Reprod* 2010;82(4):783-90.

[72] Frasor J, Weaver AE, Pradhan M, and Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008;149(12):6272-9.

[73] Frontini MJ, Nong Z, Gros R, Drangova M, O'Neil C, Rahman MN, Akawi O, Yin H, Ellis CG, and Pickering JG. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells. *Nat Biotechnol* 2011;29(5):421-7.

[74] Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, and Tamaya T. Ovarian steroids regulate the expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in fibroblasts derived from uterine endometrium. *Ann Clin Biochem* 1997;34(Pt 1):91-6.

[75] Gellersen B, Brosens IA, and Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007;25(6):445-53.

[76] Gellersen B and Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 2003;178(3):357-72.

[77] Gellersen B and Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev* 2014;35(6):851-905.

[78] Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS, and Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in *Hoxa-11* null mice. *Biol Reprod* 1997;56(5):1097-105.

[79] Ghosh D, De P, and Sengupta J. Luteal phase ovarian oestrogen is not essential for implantation and maintenance of pregnancy from surrogate embryo transfer in the rhesus monkey. *Hum Reprod* 1994;9(4):629-37.

- [80] Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, and McDonnell DP. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* 2000;20(9):3102-15.
- [81] Giudice LC. Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4(5):299-312.
- [82] Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, and Clarke CL. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55(21):5063-8.
- [83] Groll J and Lessey B, Implantation, in *Glob. libr. women's med*2009.
- [84] Guillemot F and Zimmer C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron* 2011;71(4):574-88.
- [85] Guo W, Li P, Zhao G, Fan H, Hu Y, and Hou Y. Glucocorticoid receptor mediates the effect of progesterone on uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 2012;67(6):463-73.
- [86] Haffner-Krausz R, Gorivodsky M, Chen Y, and Lonai P. Expression of Fgfr2 in the early mouse embryo indicates its involvement in preimplantation development. *Mech Dev* 1999;85(1-2):167-72.
- [87] Ham J, Thomson A, Needham M, Webb P, and Parker M. Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* 1988;16(12):5263-76.
- [88] Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, and Dey SK. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(28):10326-31.
- [89] Hamik A, Wang B, and Jain MK. Transcriptional regulators of angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(9):1936-47.
- [90] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, and Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12(9):1065-74.
- [91] Hata AN and Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004;103(2):147-66.

- [92] Hecht D, Zimmerman N, Bedford M, Avivi A, and Yayon A. Identification of fibroblast growth factor 9 (FGF9) as a high affinity, heparin dependent ligand for FGF receptors 3 and 2 but not for FGF receptors 1 and 4. *Growth Factors* 1995;12(3):223-33.
- [93] Hewitt SC, Li L, Grimm SA, Chen Y, Liu L, Li Y, Bushel PR, Fargo D, and Korach KS. Research resource: whole-genome estrogen receptor alpha binding in mouse uterine tissue revealed by ChIP-seq. *Mol Endocrinol* 2012;26(5):887-98.
- [94] Hewitt SC, Winuthayanon W, and Korach KS. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol* 2016;56(2):R55-71.
- [95] Hey NA, Graham RA, Seif MW, and Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(2):337-42.
- [96] Hill KK, Roemer SC, Churchill ME, and Edwards DP. Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2012;348(2):418-29.
- [97] Hollenberg SM, Sternglanz R, Cheng PF, and Weintraub H. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol* 1995;15(7):3813-22.
- [98] Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Small K, and Potter SS. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 1995;121(5):1373-85.
- [99] Huang EY, Zhang J, Miska EA, Guenther MG, Kouzarides T, and Lazar MA. Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev* 2000;14(1):45-54.
- [100] Huyen DV and Bany BM. Evidence for a conserved function of heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 in mouse and human decidualization. *Reproduction* 2011;142(2):353-68.
- [101] Hyder SM and Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol* 1999;13(6):806-11.
- [102] Ingham PW and McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15(23):3059-87.
- [103] Itoh N and Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 2011;149(2):121-30.

- [104] Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, and Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3221-6.
- [105] Jacobs AL and Carson DD. Uterine epithelial cell secretion of interleukin-1 alpha induces prostaglandin E2 (PGE2) and PGF2 alpha secretion by uterine stromal cells in vitro. *Endocrinology* 1993;132(1):300-8.
- [106] Johnson J, Corbisier R, Stensgard B, and Toft D. The involvement of p23, hsp90, and immunophilins in the assembly of progesterone receptor complexes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;56(1-6 Spec No):31-7.
- [107] Joseph T, Zalenskaya IA, Sawyer LC, Chandra N, and Doncel GF. Seminal plasma induces prostaglandin-endoperoxide synthase (PTGS) 2 expression in immortalized human vaginal cells: involvement of semen prostaglandin E2 in PTGS2 upregulation. *Biol Reprod* 2013;88(1):13.
- [108] Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Sucurovic S, Murakami K, Brosens JJ, and Ishihara O. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci* 2014;21(3):372-80.
- [109] Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P, and Gronemeyer H. Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* 1990;265(21):12163-7.
- [110] Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, and Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9(5):1603-14.
- [111] Kengni JH, St-Louis I, Parent S, Leblanc V, Shooner C, and Asselin E. Regulation of prostaglandin D synthase and prostacyclin synthase in the endometrium of cyclic, pregnant, and pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *J Endocrinol* 2007;195(2):301-11.
- [112] Kim JJ and Chapman-Davis E. Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med* 2010;28(1):81-90.

- [113] Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, Choi Y, Lydon JP, Demayo FJ, Shibuya M, Ferrara N, Sung HK, Nagy A, Alitalo K, and Koh GY. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol Med* 2013;5(9):1415-30.
- [114] King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000;6(1):28-36.
- [115] Kniss DA. Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6(6):285-92.
- [116] Kontula K, Paavonen T, Luukkainen T, and Andersson LC. Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on in vitro functions of human mononuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 1983;32(9):1511-8.
- [117] Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, and Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003;198(8):1201-12.
- [118] Kota BP, Huang TH, and Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005;51(2):85-94.
- [119] Kurihara I, Lee DK, Petit FG, Jeong J, Lee K, Lydon JP, DeMayo FJ, Tsai MJ, and Tsai SY. COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity. *PLoS Genet* 2007;3(6):e102.
- [120] Kurita T, Cooke PS, and Cunha GR. Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation. *Dev Biol* 2001;240(1):194-211.
- [121] Kuroda K, Venkatakrishnan R, James S, Sucurovic S, Mulac-Jericevic B, Lucas ES, Takeda S, Shmygol A, Brosens JJ, and Quenby S. Elevated periimplantation uterine natural killer cell density in human endometrium is associated with impaired corticosteroid signaling in decidualizing stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(11):4429-37.
- [122] Large MJ and DeMayo FJ. The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358(2):155-65.
- [123] Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu CT, Lanske B, Soegiarto DW, Toftgard R, Tsai MJ, Tsai S, Lydon JP, and DeMayo FJ. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet* 2006;38(10):1204-9.



- [124] Lee KY, Jeong JW, Wang J, Ma L, Martin JF, Tsai SY, Lydon JP, and DeMayo FJ. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol Cell Biol* 2007;27(15):5468-78.
- [125] Lei K, Chen L, Georgiou EX, Sooranna SR, Khanjani S, Brosens JJ, Bennett PR, and Johnson MR. Progesterone acts via the nuclear glucocorticoid receptor to suppress IL-1beta-induced COX-2 expression in human term myometrial cells. *PLoS One* 2012;7(11):e50167.
- [126] Lessey BA. The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* 1994;61(5):812-4.
- [127] Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, and Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992;90(1):188-95.
- [128] Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK, and Bagchi IC. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science* 2011;331(6019):912-6.
- [129] Li Q, Kannan A, Wang W, Demayo FJ, Taylor RN, Bagchi MK, and Bagchi IC. Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. *J Biol Chem* 2007;282(43):31725-32.
- [130] Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL, and Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol* 1999;13(6):1005-17.
- [131] Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, and Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997;91(2):197-208.
- [132] Lim HJ and Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest* 2010;120(4):1004-15.
- [133] Lin Y, Liu G, and Wang F. Generation of an Fgf9 conditional null allele. *Genesis* 2006;44(3):150-4.
- [134] Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, and Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(23):11162-6.

- [135] Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, and O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995;9(18):2266-78.
- [136] Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK, and Dey SK. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol* 2001;15(11):1983-92.
- [137] Macklon NS, Geraedts JP, and Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8(4):333-43.
- [138] Magness RR, Shideman CR, Habermehl DA, Sullivan JA, and Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. V. Effects of ovariectomy, the ovarian cycle, and pregnancy on prostacyclin synthase expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;60(4-6):103-18.
- [139] Marions L and Danielsson KG. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 1999;5(10):961-5.
- [140] Mathieu ME, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Theze N, Praloran V, Thiebaud P, and Boeuf H. LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego. *Stem Cell Rev* 2012;8(1):1-15.
- [141] Matsumoto H, Ma W, Smalley W, Trzaskos J, Breyer RM, and Dey SK. Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. *Biol Reprod* 2001;64(5):1557-65.
- [142] Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM, and Dey SK. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem* 2002;277(32):29260-7.
- [143] Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Hogan BL, and Dey SK. Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus. *Dev Biol* 2002;245(2):280-90.
- [144] Mayr B and Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(8):599-609.
- [145] McCormack JT and Greenwald GS. Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17beta levels on day 4 of pregnancy in the mouse. *J Reprod Fertil* 1974;41(2):297-301.
- [146] McKenna NJ and O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002;108(4):465-74.

- [147] Mesino S (ur). The Endocrinology of Human Pregnancy and Fetoplacental Neuroendocrine Development.2009.
- [148] Mokhtar NM, Cheng CW, Cook E, Bielby H, Smith SK, and Charnock-Jones DS. Progesterin regulates chemokine (C-X-C motif) ligand 14 transcript level in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2010;16(3):170-7.
- [149] Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, and Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005;57(2):217-52.
- [150] Mosselman S, Polman J, and Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392(1):49-53.
- [151] Movaghar B and Askarian S. Expression of e-cadherin, leukemia inhibitory factor and progesterone receptor in mouse blastocysts after ovarian stimulation. *Cell J* 2012;14(3):225-30.
- [152] Mulac-Jericevic B and Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 2004;128(2):139-46.
- [153] Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, and Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(17):9744-9.
- [154] Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, and Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000;289(5485):1751-4.
- [155] Murakami M, Kataoka K, Fukuhara S, Nakagawa O, and Kurihara H. Akt-dependent phosphorylation negatively regulates the transcriptional activity of dHAND by inhibiting the DNA binding activity. *Eur J Biochem* 2004;271(16):3330-9.
- [156] Murakami M and Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol* 2008;15(3):215-20.
- [157] Murray MJ and Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17(3):275-90.
- [158] Nakajima T, Hayashi S, Iguchi T, and Sato T. The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. *Differentiation* 2011;82(1):28-37.
- [159] Naruo K, Seko C, Kuroshima K, Matsutani E, Sasada R, Kondo T, and Kurokawa T. Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (glia-

activating factors) involved in glial cell growth. Purification and biological properties. *J Biol Chem* 1993;268(4):2857-64.

[160] Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, and Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod* 1995;10(5):1208-13.

[161] Norwitz ER, Schust DJ, and Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;345(19):1400-8.

[162] O'Rahilly R and Muller F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs* 2010;192(2):73-84.

[163] Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, and Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271(25):15292-7.

[164] Pakrasi PL and Jain AK. Cyclooxygenase-2 derived PGE2 and PGI2 play an important role via EP2 and PPARdelta receptors in early steps of oil induced decidualization in mice. *Placenta* 2008;29(6):523-30.

[165] Pang ZJ, Janzen-Pang J, Tse MY, Croy BA, and Tse D. Implant Site Dissections. U: Croy BA, et al., ur. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. San Diego: Academic press, 2013; str. 21-42.

[166] Paria BC, Huet-Hudson YM, and Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(21):10159-62.

[167] Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, and Hogan BL. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(3):1047-52.

[168] Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, and Yoshinaga K. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol* 1999;208(2):488-501.

[169] Park JY, Pillinger MH, and Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006;119(3):229-40.

[170] Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, and Brosens I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 1981;2(4):303-16.

- [171] Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, and Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981;2(1):71-91.
- [172] Poleskaya A, Naguibneva I, Fritsch L, Duquet A, Ait-Si-Ali S, Robin P, Vervisch A, Pritchard LL, Cole P, and Harel-Bellan A. CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *EMBO J* 2001;20(23):6816-25.
- [173] Pratt WB, Jolly DJ, Pratt DV, Hollenberg SM, Giguere V, Cadepond FM, Schweizer-Groyer G, Catelli MG, Evans RM, and Baulieu EE. A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex. *J Biol Chem* 1988;263(1):267-73.
- [174] Pratt WB and Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997;18(3):306-60.
- [175] Quenby S, Kalumbi C, Bates M, Farquharson R, and Vince G. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2005;84(4):980-4.
- [176] Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, and Klagsbrun M. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 1996;122(2):637-45.
- [177] Rabbani ML and Rogers PA. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 2001;122(1):85-90.
- [178] Rahman MA, Li M, Li P, Wang H, Dey SK, and Das SK. Hoxa-10 deficiency alters region-specific gene expression and perturbs differentiation of natural killer cells during decidualization. *Dev Biol* 2006;290(1):105-17.
- [179] Rai R and Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006;368(9535):601-11.
- [180] Ramsey EM, Houston ML, and Harris JW. Interactions of the trophoblast and maternal tissues in three closely related primate species. *Am J Obstet Gynecol* 1976;124(6):647-52.
- [181] Rashidi B, Rad JS, Roshangar L, and Miran RA. Progesterone and ovarian stimulation control endometrial pinopode expression before implantation in mice. *Pathophysiology* 2012;19(2):131-5.
- [182] Robertshaw I, Bian F, and Das SK. Mechanisms of uterine estrogen signaling during early pregnancy in mice: an update. *J Mol Endocrinol* 2016;56(3):127-38.

- [183] Rosenfeld MG and Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 2001;276(40):36865-8.
- [184] Rosenfeld MG, Lunnyak VV, and Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 2006;20(11):1405-28.
- [185] Ruan YC, Guo JH, Liu X, Zhang R, Tsang LL, Dong JD, Chen H, Yu MK, Jiang X, Zhang XH, Fok KL, Chung YW, Huang H, Zhou WL, and Chan HC. Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel triggers prostaglandin E(2) release and production required for embryo implantation. *Nat Med* 2012;18(7):1112-7.
- [186] Rubel CA, Lanz RB, Kommagani R, Franco HL, Lydon JP, and DeMayo FJ. Research resource: Genome-wide profiling of progesterone receptor binding in the mouse uterus. *Mol Endocrinol* 2012;26(8):1428-42.
- [187] Ryan KE and Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J Biol Chem* 2012;287(22):17905-13.
- [188] Salamonsen LA. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 1999;4(1):11-22.
- [189] Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, Roelen BA, Quenby S, Kuijk EW, Kavelaars A, Heijnen CJ, Regan L, Macklon NS, and Brosens JJ. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One* 2010;5(4):e10287.
- [190] Salker MS, Nautiyal J, Steel JH, Webster Z, Sucurovic S, Nicou M, Singh Y, Lucas ES, Murakami K, Chan YW, James S, Abdallah Y, Christian M, Croy BA, Mulac-Jericevic B, Quenby S, and Brosens JJ. Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolongs uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss. *PLoS One* 2012;7(12):e52252.
- [191] Salleh N and Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:201514.
- [192] Samalecos A and Gellersen B. Systematic expression analysis and antibody screening do not support the existence of naturally occurring progesterone receptor (PR)-C, PR-M, or other truncated PR isoforms. *Endocrinology* 2008;149(11):5872-87.

- [193] Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, and Horwitz KB. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 1994;8(10):1347-60.
- [194] Schott DR, Shyamala G, Schneider W, and Parry G. Molecular cloning, sequence analyses, and expression of complementary DNA encoding murine progesterone receptor. *Biochemistry* 1991;30(28):7014-20.
- [195] Sharkey AM and Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17(2):289-307.
- [196] Singh H and Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat* 2009;215(1):3-13.
- [197] Skalhegg BS and Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 2000;5:D678-93.
- [198] Slayden OD and Brenner RM. Hormonal regulation and localization of estrogen, progestin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists. *Arch Histol Cytol* 2004;67(5):393-409.
- [199] Smith K, Alnifaidy R, Wei Q, and Nieman LK. Endometrial Indian hedgehog expression is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2011;95(8):2738-41 e1-3.
- [200] Smith WL, DeWitt DL, and Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.
- [201] Smith WL and Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1991;1083(1):1-17.
- [202] Smith WL, Urade Y, and Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* 2011;111(10):5821-65.
- [203] Song H and Lim H. Evidence for heterodimeric association of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and gp130 in the mouse uterus for LIF signaling during blastocyst implantation. *Reproduction* 2006;131(2):341-9.
- [204] Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, and Dey SK. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol* 2000;14(8):1147-61.



- [205] Sordelli MS, Beltrame JS, Burdet J, Zotta E, Pardo R, Cella M, Franchi AM, and Ribeiro ML. The effect of anandamide on uterine nitric oxide synthase activity depends on the presence of the blastocyst. *PLoS One* 2011;6(4):e18368.
- [206] Sordelli MS, Beltrame JS, Cella M, Gervasi MG, Perez Martinez S, Burdet J, Zotta E, Franchi AM, and Ribeiro ML. Interaction between lysophosphatidic acid, prostaglandins and the endocannabinoid system during the window of implantation in the rat uterus. *PLoS One* 2012;7(9):e46059.
- [207] Soundararajan R, Pearce D, Hughey RP, and Kleyman TR. Role of epithelial sodium channels and their regulators in hypertension. *J Biol Chem* 2010;285(40):30363-9.
- [208] Soyal SM, Mukherjee A, Lee KY, Li J, Li H, DeMayo FJ, and Lydon JP. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* 2005;41(2):58-66.
- [209] Srivastava D. HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9(1-2):11-8.
- [210] Sroga JM, Ma X, and Das SK. Developmental regulation of decidual cell ploidy at the site of implantation. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012;4:1475-86.
- [211] Stewart CL. The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:157-65.
- [212] Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, and Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359(6390):76-9.
- [213] Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, and von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006;12(5):617-30.
- [214] Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, and Carson DD. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 1995;136(8):3639-47.
- [215] Svec F. Differences in the interaction of RU 486 and ketoconazole with the second binding site of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 1988;123(4):1902-6.
- [216] Sweeney MD, Ayyadurai S, and Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci* 2016;19(6):771-83.

- [217] Takamoto N, Zhao B, Tsai SY, and DeMayo FJ. Identification of Indian hedgehog as a progesterone-responsive gene in the murine uterus. *Mol Endocrinol* 2002;16(10):2338-48.
- [218] Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, and Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;147(3):1097-121.
- [219] Tan J, Paria BC, Dey SK, and Das SK. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology* 1999;140(11):5310-21.
- [220] Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, and Toyoda N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2335-40.
- [221] Tanaka N, Miyazaki K, Tashiro H, Mizutani H, and Okamura H. Changes in adenylyl cyclase activity in human endometrium during the menstrual cycle and in human decidua during pregnancy. *J Reprod Fertil* 1993;98(1):33-9.
- [222] Tang B and Gurside E. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;47(1-6):115-21.
- [223] Tata JR. Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):702-10.
- [224] Taylor HS, Arici A, Olive D, and Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998;101(7):1379-84.
- [225] Taylor HS, Vanden Heuvel GB, and Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997;57(6):1338-45.
- [226] Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, and Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Mol Hum Reprod* 2010;16(12):886-95.
- [227] Telgmann R, Maronde E, Tasken K, and Gellersen B. Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1997;138(3):929-37.

- [228] Thathiah A, Brayman M, Dharmaraj N, Julian JJ, Lagow EL, and Carson DD. Tumor necrosis factor alpha stimulates MUC1 synthesis and ectodomain release in a human uterine epithelial cell line. *Endocrinology* 2004;145(9):4192-203.
- [229] Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, and Koller BH. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 1999;103(11):1539-45.
- [230] Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, Wang H, and Dey SK. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(17):1964-73.
- [231] Tranguch S, Smith DF, and Dey SK. Progesterone receptor requires a co-chaperone for signalling in uterine biology and implantation. *Reprod Biomed Online* 2007;14 Spec No 1:39-48.
- [232] Tsai MJ and O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;63:451-86.
- [233] Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, and Wing LY. Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology* 2002;143(7):2715-21.
- [234] Tseng L and Zhu HH. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1997;57(6):1360-6.
- [235] Tu Z, Ran H, Zhang S, Xia G, Wang B, and Wang H. Molecular determinants of uterine receptivity. *Int J Dev Biol* 2014;58(2-4):147-54.
- [236] van den Heuvel MJ, Chantakru S, Xuemei X, Evans SS, Tekpetey F, Mote PA, Clarke CL, and Croy BA. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 2005;34(3):273-93.
- [237] Vasquez YM and DeMayo FJ. Role of nuclear receptors in blastocyst implantation. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24(10-12):724-35.
- [238] Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, and McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7(10):1244-55.
- [239] Wang DF, Minoura H, Sugiyama T, Tanaka K, Kawato H, Toyoda N, and Sagawa N. Analysis on the promoter region of human decidual prolactin gene in the progesterone-induced decidualization and cAMP-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Cell Biochem* 2007;300(1-2):239-47.

- [240] Wang H and Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006;7(3):185-99.
- [241] Wang H, Ma WG, Tejada L, Zhang H, Morrow JD, Das SK, and Dey SK. Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic makeup. *J Biol Chem* 2004;279(11):10649-58.
- [242] Wetendorf M and DeMayo FJ. Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *Int J Dev Biol* 2014;58(2-4):95-106.
- [243] White FJ, Burghardt RC, Hu J, Joyce MM, Spencer TE, and Johnson GA. Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction* 2006;132(6):919-29.
- [244] White R, Lees JA, Needham M, Ham J, and Parker M. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1987;1(10):735-44.
- [245] Wilcox AJ, Baird DD, and Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(23):1796-9.
- [246] Wu MH, Lu CW, Chuang PC, and Tsai SJ. Prostaglandin E2: the master of endometriosis? *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235(6):668-77.
- [247] Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, and Tsai SJ. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med* 2007;9(2):1-20.
- [248] Yamagishi H, Olson EN, and Srivastava D. The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development. *J Clin Invest* 2000;105(3):261-70.
- [249] Yang ZM, Das SK, Wang J, Sugimoto Y, Ichikawa A, and Dey SK. Potential sites of prostaglandin actions in the periimplantation mouse uterus: differential expression and regulation of prostaglandin receptor genes. *Biol Reprod* 1997;56(2):368-79.
- [250] Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, and Kim HW. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* 2010;2010:218142.

- [251] Zamani N and Brown CW. Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev* 2011;32(3):387-403.
- [252] Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, and Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med* 2013;34(5):939-80.
- [253] Zhong Y, Li J, Wu H, Ying Y, Liu Y, Zhou C, Xu Y, Shen X, and Qi Q. Surgical treatment for hydrosalpinx increases the expression of integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  in the endometrium during the implantation window. *Exp Ther Med* 2012;4(3):415-8.
- [254] Zhu JY, Pang ZJ, and Yu YH. Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol* 2012;5(3-4):e137-43.
- [255] Zhu L and Pollard JW. Estradiol-17 $\beta$  regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(40):15847-51.
- [256] Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, and Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 1996;65(3):503-9.

## ILUSTRACIJE

### Popis slika

Slika 1. Statistička analiza propalih embrija nakon oplodnje.....	1
Slika 2. Shematski prikaz procesa oplodnje jajne stanice do implantacije blastociste u žena.....	3
Slika 3. Koncentracija steroidnih hormona E-a i P-a tijekom peri-implantacije. ....	6
Slika 4. Orijentacija blastociste u odnosu na LE u čovjeka i miša.....	7
Slika 5. Mehanizam implantacije blastociste.....	10
Slika 6. Međudjelovanje E-a i P-a u uspostavljanju receptivnosti uterusa. ....	11
Slika 7. Modularna struktura jezgrinih receptora.....	17
Slika 8. Mehanizam proliferacije LE-a posredovan E-om. ....	20
Slika 9. Izoforme progesteronskog receptora. ....	22
Slika 10. Mehanizam djelovanja P-om reguliranih gena za vrijeme uspostavljanja receptivnosti uterusa. ....	26
Slika 11. Mehanizam P-om regulirane inhibicije LE-a uterusa tijekom 3,5 dana trudnoće u miša. ....	28
Slika 12. Shematski prikaz sinteze prostaglandina.....	30
Slika 13. Utjecaj serinskih proteaza na sintezu prostaglandina i poticanje decidualizacije. ....	32
Slika 14. Shematski prikaz histoloških promjena uterusa. ....	54
Slika 15. Vremenski i prostorni raspored izražaja PR-a tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće. ....	56
Slika 16. Vremenski i prostorni raspored izražaja PR-a tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće. ....	57
Slika 17. Izražaj PR-a tijekom implantacije.....	58
Slika 18. Razlika u aktivaciji Pr gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.....	59
Slika 19. Vremenski i prostorni raspored izražaja ER $\alpha$ tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće. ....	61
Slika 20. Vremenski i prostorni raspored izražaja ER $\alpha$ tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće. ....	62
Slika 21. Izražaj ER $\alpha$ tijekom implantacije.....	63

Slika 22. Vremenski i prostorni raspored izražaja Hand2 tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće.....	65
Slika 23. Vremenski i prostorni raspored izražaja Hand2 tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.....	66
Slika 24. Kolokalizacija PR-a i Hand2 tijekom peri-implantacije. ....	68
Slika 25. Odnos izražaja Hand2 i ER $\alpha$ na mjestu implantacije. ....	69
Slika 26. Razlika u aktivaciji Hand2 gena tijekom peri-implantacije.....	70
Slika 27. Western blot analiza izražaja Hand2 bjelančevine tijekom rane trudnoće. ....	71
Slika 28. Izražaj Hand2 tijekom implantacije.....	72
Slika 29. Razlika u aktivaciji Hand2 gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.....	73
Slika 30. Analiza proliferacije Hand2 pozitivnih stanica. ....	75
Slika 31. Regulacija izražaja Hand2 steroidnim hormonima. ....	77
Slika 32. Imunofluorescentna analiza izražaja Hand2 na tkivu uterusa nakon hormonskog tretmana.....	78
Slika 33. Imunofluorescentna analiza izražaja Hand2 bjelančevine nakon tretmana s P-om.....	79
Slika 34. Izražaj Hand2 bjelančevine u WT i PRAKO mišicama nakon tretmana s P-om. ....	80
Slika 35. Analiza kolokalizacije Hand2 i bjelančevina fosforiliranih PKA-om na mjestu implantacije.....	81
Slika 36. Analiza kolokalizacije Hand2 i bjelančevina fosforiliranih PKA-om tijekom 7,5 dana trudnoće.....	82
Slika 37. Analiza kolokalizacije Hand2 i bjelančevina fosforiliranih Akt-om. ....	83
Slika 38. Vremenski i prostorni raspored izražaja COX2 tijekom 2,5 (A&B), 3,5 (C&D) i 4,5 (E&F) dana trudnoće.....	85
Slika 39. Vremenski i prostorni raspored izražaja COX2 tijekom 5,5 (A&B), 6,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.....	86
Slika 40. Izražaj i raspodjela COX2 tijekom implantacije. ....	87
Slika 41. Razlika u aktivaciji Cox2 gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.....	88
Slika 42. Odnos izražaja PR-a i COX2 na mjestu implantacije. ....	89
Slika 43. Odnos izražaja i raspodjela Hand2 i COX2 tijekom peri-implantacije. ....	90



Slika 44. Relativna razina izražaja Fgf1 (A), Fgf2 (B), Fgf9 (C) i Fgf18 (D) u uterusu tijekom peri-implantacije u miša.....	92
Slika 45. Vremenski i prostorni raspored izražaja FGF9 tijekom 2,5 (A&B), 4,5 (C&D) i 7,5 (E&F) dana trudnoće.....	93
Slika 46. Western blot analiza izražaja FGF9 bjelančevine tijekom rane trudnoće... 94	94
Slika 47. Western blot analiza regulacije izražaja FGF9 bjelančevine steroidnim hormonima.....	95
Slika 48. Odnos izražaja FGF9 i ER $\alpha$ na mjestu implantacije.....	96
Slika 49. Izražaj FGF9 tijekom implantacije. ....	97
Slika 50. Razlika u aktivaciji Fgf9 gena na implantacijskom mjestu u odnosu na ne-implantacijsko mjesto.....	98
Slika 51. Odnos izražaja i raspodjela FGF9 i COX2 na mjestu implantacije.....	99
Slika 52. Odnos izražaja i raspodjela FGF9 i CD31 na mjestu implantacije. ....	100
Slika 53. Odnos izražaja i raspodjela FGF9 i njegovih receptora na mjestu implantacije.....	101
Slika 54. Predloženi mehanizam djelovanja steroidnih hormona E-a i P-a na mjestu implantacije blastociste.....	114

## **Popis tablica**

Tablica 1. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju PRKO miševa .....	48
Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju PRAKO miševa .....	48
Tablica 3. Uvjeti reakcije obrnutog prijepisa RNA u cDNA.....	51
Tablica 4. Program reakcije za RT-PCR.....	51

## **ŽIVOTOPIS**

### **IME I PREZIME**

Sandra Šučurović

### **DATUM I MJESTO ROĐENJA**

15. veljače 1987., Maribor, Slovenija

### **ZAPOSLENJE**

1. srpnja 2011. - danas

Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

### **ŠKOLOVANJE**

1993. – 2001. Osnovna škola „Ivana Mažuranića“, Novi Vinodolski

2001. – 2005. Opća gimnazija „dr. Antuna Barca“, Crikvenica

2005. – 2011. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

### **AKADEMSKI NASLOVI**

2011. Magistra molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

### **ZNANSTVENI STUPNJEVI**

2011. - Znanstveni novak na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci

### **ČLANSTVA**

Hrvatsko društvo biokemičara i molekularnih biologa

Hrvatsko društvo fiziologa

Hrvatsko imunološko društvo

## STRUČNE AKTIVNOSTI I PUBLIKACIJE

### Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

1. "The role of progesterone in reproductive and non-reproductive tissues" (3432); pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.
2. "Uloga progesterona u reproduktivnim i nereproduktivnim organima" (808.10.1108) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević, financiranog od strane Sveučilišta u Rijeci.
3. "Reprodukcijske i imunološke funkcije progesterona" (062-0620402-0381) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević, financiranog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike.

### Znanstveno usavršavanje

1. veljača - lipanj 2012. – radila u grupi prof. dr. sc. Jana Brosensa na University of Warwick; University hospital Coventry and Warwickshare, Coventry, UK.  
Znanstveno usavršavanje je bilo u sklopu TransMedRi projekta Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci (Seventh Framework Programme, FP7-REGPOT-2010-5).

### Radovi u CC / SCI časopisima

1. **Šućurović S.**, Nikolić T., Brosens J.J., Mulac-Jeričević B. Spatial and temporal analyses of FGF9 expression during early pregnancy. Cell Physiol Biochem. 2017 Aug 17;42(6):2318-2329.
2. Jakovac H., Kezele T.G., **Šućurović S.**, Mulac-Jeričević B., Radošević-Stašić B. Osteopontin-metallothionein I/II interactions in experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience 2017 350, 133-145.
3. Brosens J.J., Salker M.S., Teklenburg G., Nautiyal J., Salter S., Lucas E.S., Steel J.H., Christian M., Chan Y.W., Boomsma C.M., Moore J.D., Hartshorne G.M., **Šućurović S.**, Mulac-Jericevic B., Heijnen C.J., Quenby S., Koerkamp M.J., Holstege F.C., Shmygol A., Macklon N.S. Uterine selection of human embryos at implantation. Sci. Rep. 2014 Feb 6;4:3894.

4. Repar J., **Šućurović S.**, Zahradka K., Zahradka D., Ćurković-Perica M Stress resistance of Escherichia coli and Bacillus subtilis is modulated by auxins. Can J Microbiol. 2013 Nov;59(11):766-70.
5. Kuroda K., Venkatakrisnan R., James S., **Šućurović S.**, Mulac-Jericevic B., Lucas E.S., Takeda S., Shmygol A., Brosens J.J., Quenby S. Elevated periimplantation uterine natural killer cell density in human endometrium is associated with impaired corticosteroid signaling in decidualizing stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Nov;98(11):4429-37.
6. Kajihara T., Tanaka K., Oguro T., Tochigi H., Prechapanich J., Uchino S., Itakura A., **Šućurović S.**, Murakami K., Brosens J.J., Ishihara O. Androgens Modulate the Morphological Characteristics of Human Endometrial Stromal Cells Decidualized In Vitro. Reprod Sci. 2014 Mar;21(3):372-80.

#### **OSTALI RADOVI**

1. Salker M.S., Nautiyal J., Steel J.H., Webster Z., **Šućurović S.**, Nicou M., Singh Y., Lucas E.S., Murakami K., Chan Y.W., James S., Abdallah Y., Christian M., Croy B.A., Mulac-Jericevic B., Quenby S., Brosens J.J. Disordered IL-33/ST2 Activation in Decidualizing Stromal Cells Prolongs Uterine Receptivity in Women with Recurrent Pregnancy Loss. PLoS One. 2012;7(12):e52252.

#### **Sažeci objavljeni u CC/SCI časopisima**

1. Venkatakrisnan R., **Šućurović S.**, Brosens J.J., Quenby S., Kuroda K. Increased Density of Uterine Natural Killer Cells in the Peri-Implantation Endometrium is Associated with Inadequate Decidualization, Local Cortisol Deficiency, and Impaired Induction of Metabolic Enzymes. Hum. Reprod. 2013; 28 (suppl 1): i4-i6. doi: 10.1093/humrep/det158.

#### **Sažeci objavljeni u časopisima SCOPUS baze podataka**

1. Mulac-Jeričević B, Nikolić T, **Šućurović S.** The Role of Osteopontin in Early Pregnancy. Endocr Rev. 2012; 33: MON-12.

## Sažeci objavljeni u knjigama sažetaka

1. **Šućurović S.**, Nikolić T., Mulac-Jeričević B. Colocalization of Galectin-1 and Osteopontin in Mouse Uterus During Early Pregnancy. Poster presentation. FEBS 3+Meeting, Molecules of life, Portorož, Slovenija, 16. -19. rujna 2015.
2. **Šućurović S.**, Nikolić T., Mulac-Jeričević B. Distribution of Galectin-1 in Mouse Uterus During Early Pregnancy. Oral presentation. 3. Congress of Croatian Physiological Society; Rijeka; rujna 2013.
3. Nikolić T., **Šućurović S.**, Mulac-Jeričević B. Analysis of Hand2 Expression in Uterus during Early Pregnancy. Poster presentation. FEBS 3+Meeting, Opatija Croatia, 13.-16. lipanj, 2012.

## Pohađanje tečajeva i školovanja

1. 10. veljače 2017. Radionica "Kako prijaviti pokus na laboratorijskim životinjama" u organizaciji Hrvatskog Društva za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA), Zagreb, Hrvatska.
2. Listopad 2014. Tečaj za rad na laboratorijskim životinjama. Završenim tečajem stekla potvrdu o osposobljenosti za provedbu pokusa na životinjama (kategorija C) Broj potvrde: TPŽ 35/4.
3. 23. - 25. svibnja 2013., Radionica „Live Cell Imaging Microscopy“, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.
4. 13. - 15. rujna 2012. Radionica „Cell proliferation in cancer“, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.
5. 10.-11. studeni 2011. Radionica „Translation Cancer Research“, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.

## Sudjelovanje na međunarodnim i domaćim skupovima

1. 6. listopada 2016., 16. Simpozij „Istraživanja na modelima laboratorijskih životinja; stanje i perspektive u Hrvatskoj i na Sveučilištu u Rijeci“, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti – Zavod za kliničku i transplantacijsku imunologiju i molekularnu medicinu u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.
2. 21. – 26. kolovoz 2016. Poster prezentacija: „The expression of heart and neural crest derivatives-expressed protein 2 (HAND2) is regulated by progesterone receptor A (PR-A)“. **Šućurović S.**, Nikolić T., Mulac-Jeričević B.

Gordon Research Conferences, Mammalian Reproduction, Waterville Valley, NH, SAD.

3. 4. srpanj 2016., 14. Simpozij „Translation of basic immunology and neuroscience tools to therapies, where are we now?“, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti – Zavod za kliničku i transplantacijsku imunologiju i molekularnu medicinu u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.
4. 29. lipanj 2015., 9. Simpozij „Progress towards individualized cancer therapeutics“, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti – Zavod za kliničku i transplantacijsku imunologiju i molekularnu medicinu u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.
5. 12. ožujak 2015., 6. Simpozij „Razvojna biologija trombocita, trombocitopenija i mijeloproliferativne neoplazme“, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti – Zavod za kliničku i transplantacijsku imunologiju i molekularnu medicinu u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.
6. 26. studeni 2014., 4. Znanstvena tribina „Mitohondrijska medicina/Mitochondrial medicine“, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti – Zavod za kliničku i transplantacijsku imunologiju i molekularnu medicinu u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.

### **Nastavna djelatnost**

Od 1. listopada 2011. - , aktivno sam sudjelovala u izvođenju vježbi i seminara na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci na kolegijima:

1. Fiziologija i patofiziologija I - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
2. Fiziologija i patofiziologija II - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
3. Fiziologija i patofiziologija III - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
4. Imunologija - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
5. Fiziologija i patofiziologija I - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

6. Fiziologija i patofiziologija II - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
7. Fiziologija i patofiziologija III - Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
8. Fiziologija s patofiziologijom - Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
9. Imunologija – Preddiplomski stručni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Fakultet za zdravstvene studije Sveučilišta u Rijeci
10. Imunologija – Preddiplomski stručni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika izvanredni studij, Fakultet za zdravstvene studije Sveučilišta u Rijeci
11. Fiziologija - redovni studij - Preddiplomski stručni studij Sestrinstvo, Fakultet za zdravstvene studije Sveučilišta u Rijeci