

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**KÖPEK UTERUSUNDA ÖSTRUS SIKLUSU SIRASINDA HÜCRE
ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN LOKALİZASYONU**

Proje No: VA-07-06

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Güner Küçük BAYRAM
Veteriner Fakültesi/Temel Birimler

Narin LİMAN
Veteriner Fakültesi/Temel Bilimler
Feyzullah BEYAZ
Veteriner Fakültesi/Temel Bilimler
Emel ALAN
Veteriner Fakültesi/Temel Bilimler

Mayıs 2010
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın parasal kaynağını sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	6
1. GİRİŞ.....	7
2. GENEL BİLGİLER.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
6. KAYNAKLAR.....	64

KÖPEK UTERUSUNDA ÖSTRUS SIKLUSU SIRASINDA HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN LOKALİZASYONU

ÖZET: Bu çalışma, östrus siklusunda köpek uterusunda hücre adezyon moleküllerinin varlığını ve lokalizasyonunu belirlemek amacıyla planlanmıştır. Araştırmada 15 adet sağlıklı dişi köpek uterus ve ovaryumları kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyamalar için strept-ABC boyama metodu uygulandı. Köpek endometriyumunda kaderin proteinler östrus siklusunun tüm dönemlerinde endometriyum yüzey, kript ve bez epitel hücrelerinin sitoplazma ve membranlarında, myometriyumun düz kasları sitoplazması ile perimetriyumda yoğun olarak görüldü. Lamininin bazal membranlardaki lokalizasyonu geç luteal dönemde yoğun, erken anöstral dönemde ise zayıf bir reaksiyonla belirlendi. Folliküler dönemde bazal membranlarda laminin reaksiyonu görülemedi. Fibronektin, yüzey, kript ve bez epitel hücreleri ile kas hücrenin sitoplazması, bağdoku hücreleri ve ipliklerinde lokalize olmuştu. Luteal dönemde şiddetli olarak görülen reaksiyon folliküler ve anöstral dönemde yüzey epitelinde yer yer negatif ve pozitif olarak görüldü. Osteopontin siklusun tüm evrelerinde epitel ve kas hücrelerinin sitoplazmaları ile bezlerin salgısında yoğun olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Köpek uterus, östrus siklus, kaderin, laminin, fibronektin, osteopontin

THE LOCALIZATION OF THE CELL ADHESION MOLECULES DURING OESTROUS CYCLE IN CANINE UTERUS

ABSTRACT: This study was planned to determine the localization and presence of cell adhesion molecules in canine uterus during oestrus cycle. In our study was used fifteen healthy bitches uterus and ovaries. For the immunohistochemical stainings, a strept-ABC immunohistochemical stainings procedure was applied. The cadherins in canine endometrium was intensively seen in the cytoplasm and membranes of surface, crypt and gland epithelial cells of endometrium, in the cytoplasm of myometrium smooth muscle and in the perimetrium. The localization of laminin in basement membranes was determined as intensive in the late luteal phase but as weak in the anoestrous phase. The laminin reaction in the basement membranes during follicular phase was not seen. The fibronectin localised in the cytoplasm of surface, crypt and gland epithelial and smooth muscle cells and in the cells and fibrils of connective tissue. Reaction strongly seen in luteal phase was seen here and there in the surface epithelium during follicular and anoestrous phase as negatively and positively. Osteopontin was determined in the all oestrous phase, in the cytoplasm of epithelial and muscle cells and in the secret of glands.

Key Words: Bitch uterus, oestrous cycle, cadherin, laminin, fibronectin, osteopontin

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Memelilerde üreme, dişi üreme organlarında eşey hücrelerinin oluşumu, döllenme, implantasyon ve gebelik ile karakterizedir. Eşey hücrelerinin oluşumu sırasında şekillenen olaylar dizisi seksüel siklus ya da östrus siklusu olarak adlandırılır. Bu siklusun amacı başarılı bir implantasyon ve sonuçta gebeliktir. Döllenmeyi takiben gelişen implantasyon, genetik olarak farklı olan embriyonik ve maternal dokular arasındaki bir kaynaşma olduğundan özellikle uterusun implantasyon ve gebelik periyoduna hazırlanması gereklidir. Bu hazırlık uterusun proliferasyon ve sekresyon evreleri olarak adlandırılan proliferasyon, diferensiyasyon ve hücre ölümünü içine alan bir dizi olaylar geçirmesi sonucu tamamlanır. İmplantasyonun endometrial hücre adezyon molekülleri yardımıyla başladığı belirlenmiştir. Endometriyumun kompleks yapısı, hücre dağılımına, hücre trafiğine ve hücreler arası iletişime katkıda bulunan farklı hücrelerin düzenlenişini sağlayan fibronektin, laminin vb. molekülleri gerektirir. Siklik endometriyal yenilenme, implantasyon, gebelik ve doğum, spesifik hücre-hücre veya hücre-ekstrasellüler matriks arası etkileşime gerek duyabilir. Biyolojik yapılarda hücre birlikteliğini sağlayan moleküler yapıştırıcılar olan hücre adezyon molekülleri, hücre yüzeyinde yapısal olarak varolan, bazı uyarılarla hücre yüzeyinde beliren, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde rol alan membran bağımlı proteinlerdir. Adezyon molekülleri, prenatal ve postnatal dönemlerde hücrede meydana gelen gelişim aşamaları; hücresel proliferasyon, göç, farklılaşma ve olgunlaşmada görev alırlar. Hücre hareketlerinin organizasyonu, immun ve inflamatuvar yanıtın ortaya çıkması, yara iyileşmesi, kanser metastasisi gibi olguların düzenlenmesinde de fonksiyonları vardır. Hücre adezyon moleküllerinin üremedeki rolleri çoğunlukla insan başta olmak üzere fare, rat, tavşan, sığır, koyun, domuz ve maymunlarda çalışılmış ancak bu çalışmalar implantasyon ve gebelik ile sınırlı kalmıştır. Konu ile ilgili yapılan literatür taramalarında uterus endometriyumunda implantasyona hazırlık aşaması olan seksüel siklus sırasında hücre adezyon moleküllerinin

tipleri ve lokalizasyonu ile ilgili olarak insanlarda yapılmış çalışmalar dışında az sayıda araştırmanın bulunduğu saptanmıştır. Hayvan türleri arasında da köpeklerde konu ile hiçbir araştırmaya rastlanılamamıştır. Köpekler monoöstrik hayvanlardır, yılda bir veya iki östrus siklusu gösterirler, oldukça uzun bir östrus siklusuna sahip olan köpeklerde östrusda, kandaki progesteron düzeyi hızla artarken, östrojen düzeyi düşer ve östrus belirtileri progesteron etkisi altında gelişir. Bu nedenlerle köpekler seksüel siklus açısından diğer hayvan türlerine göre oldukça ilginçlerdir. İnsanla ilişkisini eski çağlardan beri sıkı bir şekilde devam ettiren ve günümüzde gerek pet hayvanı, gerekse alan ve sürü koruma, güvenlik, sivil savunma ve emniyet teşkilatında kullanılan kaliteli cins köpeklerin yetiştiriciliği her geçen gün önem kazanmaktadır. Dişi köpeklerde östrus siklusunun folliküler, luteal ve anöstral dönemlerinde uterusda adezyon moleküllerinin tipleri ile bu moleküllerin siklusa bağlı değişimlerinin belirlenmesi amacıyla planlanan bu projenin sonuçları, üreme biyolojisinde çok kapsamlı rolleri olan adezyon moleküllerinin, köpeklerde ovulasyon, implantasyon ve embriyonal gelişim ile ilgili olası problemlerin nedenleri ve infertiliteye neden olan hastalıkların patolojilerinde adezyon moleküllerinin olası rolleri için kaynak oluşturacaktır.

GENEL BİLGİLER

Dişi köpeklerde üreme sistemi ovaryumlar, ovidukt, uterus, serviks, vagina, vulva ve meme bezlerinden oluşur. Köpeklerde oldukça uzun bir süreyi kapsayan, hayvanın cinsi, yaşı, genetik özellikleri, bakım, beslenme ve iklim gibi çevresel koşullara göre de süresi değişebilen östrus siklusu ile ilgili çok farklı görüşler bildirilmiştir. Dişi köpeklerde östrus siklusu, pro-östrus, östrus, metöstrus dönemlerinden oluşur. Her östrus siklusundan sonra süresi değişebilen yaklaşık olarak 3 aylık bir uzunluğa sahip olan anöstrus dönemi vardır. Bir östrus siklusunun süresi 4 - 12 ay arasında değişebilir yaklaşık olarak da 7 aylık bir zaman dilimidir (Concannon ve ark.1989). Östrus siklusunu takip eden anöstrus mevsimsel değildir 2- 10 ay arasında değişebilen oldukça değişken bir süredir (Bouchard ve ark.1991; Concannon 1993). Köpeğin genetik faktörleri ile bireysel farklılıklarının da oldukça etken olduğu siklus süresinin yaklaşık olarak İskoç çoban köpeğinde 36 hafta, Alman çoban köpeğinde 20-22 hafta arasında olduğu ifade edilmiştir (Okkens ve Kooistra, 2006; Christie ve Bell, 1972; Christiansen 1984). Schaefers-Okkens köpek davranışlarına yönelik bir sınıflandırma ile östrus siklusunu pro-östrus, östrus, metöstrus (diöstrus) ve anöstrus olarak tanımlamışlardır. Pro-östrus vaginal kanlı akıntı vulvada şişkinlik, çiftleşmeyi kabul etme gibi bulgularla en belirgin dönemdir 2-17 gün arasında değişebilen proöstrus ortalama olarak 9 gün sürer. Proöstrusu takip eden östrus 3-21 gün arasında değişir ortalama olarakda 9 gün devam eder bu sürede dişi köpek çiftleşmeyi kabul eder. Östrus boyunca vulva büzülmeye ve gevşemeye başlar. Metöstrus, aktif korpus luteumun mevcudiyetinden dolayı erkek köpeği kabul etmeye istekli olmadığı yaklaşık olarak 70 gün civarında uzunca bir dönemdir. Anöstrus, metöstrusun sonu ile gelecek proöstrusun başlangıcı arasındaki dönemdir. Dişi köpeklerde davranış orjinli olarak yapılan bu sınıflandırmaya ovaryum fonksiyonlarını da ilave etmek mümkündür. Buna göre, ovaryum folliküllerinin gelişimi ve ovulasyonu içeren folliküler dönem, luteal dönem ve anöstrusdur. Pro-östrus ve östrusun ilk 1/3'lük dönemi

folliküler faz, Östrusun kalan 2/3'lük dönemi ve metöstrus luteal faz olarak adlandırılmıştır (Schaefers-Okkens 1996, Butinar ve ark. 2004, Schaefers-Okkens 2005). Ovulasyon ve fertilizasyon folliküler fazda gerçekleşir (Hiemstra ve ark. 2001). Ovulasyondan sonra luteal faz başlar. Korpus luteumdan orjin alan progesteron seviyesi plazmada östrusun folliküler fazdan kalan bölümü ve metöstrusun başlangıcında artar. Östrus davranışları yükselen progesteronun etkisi altında gerçekleşir. Luteal fazın başlangıcında ovulasyondan yaklaşık olarak 4-8 gün sonra siklus, östrusdan metöstrusa doğru değişmeye başlar. Endometriyumdan salgılanan prostoglandin $F_{2\alpha}$ inek, koyun ve kısıraklarda korpus luteumu geriletilici faktör olarak belirlendiği halde köpeklerde korpus luteumun gerilemesini başlatmaktan sorumlu faktörler tam olarak açıklanamamıştır. Bu türlerde uterus çıkarıldığında, korpus luteumun yaşam süresinin uzadığı ve luteal aktivitenin devam ettiği bildirilmiştir (McCracken 1972; Beijerink 2001, Cruchten ve ark. 2002). Köpeklerde ise histerektomi luteal fazın uzunluğunu etkilemektedir (Okkens ve ark.1985; Hoffmann ve ark. 1992; Beijerink 2001). Köpeklerde östrus siklusu davranışlar, kliniksel, fizyolojik, sitolojik ve endokrinolojik bulgular bir arada değerlendirilerek proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrus olarak belirlenmiştir (Shirley ve ark. 2001). Sundeep ve ark. köpeklerdeki siklus evrelerini pro-östrus, östrus, erken ve geç diöstrus, erken ve geç anöstrus olarak tanımlamışlardır. Proöstrusda uterus endometriyumu belirgin şekilde ödematözdür. Derin ve yüzlek endometriyal bezlerde proliferasyon vardır. Anöstrus dönemi ile karşılaştırıldığında miyometriyumun daha kalın olduğu gözlenmiştir. Östrusda, stromal kollajenin artmasından dolayı stroma kalınlaşmıştır. Uterus bezleri ve miyometriyumun yapısı proöstrusa benzerdir. Araştırmacılar diöstrus döneminde endometriyumun ve hipertrofik düz kas hücrelerinden meydana gelen miyometriyumun oldukça kalın görüldüğünü ifade etmişlerdir. Dönemin başlangıcında yüzlek epiteliyal hücrelerin prizmatik ve eozinofilik yapıda olduğu, dönemin sonuna doğru ise bu hücrelerin ince vakuollü bir görüntü sergilediği bildirilmiştir. Anöstrus döneminde, küçük çapraz şekilli

bir lumene sahip olan atrofik uterus, bazofilik endometriyal stroma ve kompakt miyometrium ile karakterize olarak tanımlanmıştır (Sundee ve ark. 2008). Sikluskaki dişi köpeklerde endometrium büyüme ve farklılaşma olarak iki safha geçirir. İlk büyüme safhası anöstrusun son dönemlerinde başlar (Barrau ve ark. 1975). Endometrium önemli derecede kalınlaşmış, kan damarları genişlemiş, epitel örtüde mitotik aktivite artmıştır (Andersen ve Simpson, 1973). Bu dönemde endometrium tek katlı küboidal epitel ile örtülüdür ve glandulalardan sekresyon artar. İkinci büyüme periyodu östrusun ortası civarında başlar, folliküllerin büyüme ve gelişme dönemidir, östrusun sonuna doğru zayıflar ve metöstrusun ilk haftasında hızla geriler. Köpek uterus endometriyumu, östrojen seviyesindeki artış ve takiben ovulatory foliküller tarafından üretilen progesteron seviyesindeki yükselişin etkisi altında ovulasyondan önce kısmi olarak luteinize olur. Yüzey epiteli tek katlı kübikden tek katlı mukus salgılayan prizmatik epitele dönüşerek endometriyumun kriptlerini şekillendirir. Geç metöstrus ve erken anöstrus endometriumun involusyonu ile karakterizedir. Progesteron seviyesindeki azalma ile mukozal tabakanın yüksekliği ve kriptlerin derinliği azalır ve mukoza epitelinde iri köpüksü hücreler görülür (Barrau ve ark.1975). Metoestrus döneminde ovaryumda korpus luteum daima mevcuttur. Erken ve orta metöstrusta miyometrium ve endometriyum hiperplastik, ödamatöz şişkin, stroma, hiperemik kan damarları ve lumenleri kabarmış kıvrımlı bezler görülmüştür. Erken ve orta metöstrusta endometriumun yüzlek tabakası kriptleri şekillendirmiştir. Kriptler lumene çıkıntı yapan farklı büyüklükteki stromal tepelerdir. Tepeler mukus salgılayan yüksek prizmatik epitle örtülmüştür. Epiteliyal hücreler bazal membrana bağlanmıştır, oval ökromatik çekirdek içerirler. Uterus bezleri bu tepelerin arasında oluklara açılır buralar kript olarak kabul edilir. Geç metöstrusta, erken metöstrusta mevcut olan endometriyal kriptler daha da belirginleşmiş ve endometriyumun büyük bölümünü işgal etmiştir. Kriptlerin epitel hücreleri genişlemiş ve sitoplazmaları çok miktarda vakuol içermiştir. Stromal tepeler incelmış ve stroma neredeyse gözden kaybolmuştur. Anöstrus'un

erken dönemlerinde endometriumda kriptler sadece epiteliyal hücreler tarafından şekillendirilmiştir. Kriptler arasındaki stromal alan oldukça azalmıştır. Prizmatik epiteliyal hücreler hipertrofik bir görüntü sergilemektedir. Köpüksü epiteliyal hücreler dökülme sürecindedir ancak bu hücrelerin bazal membrana bağlı olduğu laminin boyanması ile gösterilmiştir. Orta anöstrus’da endometriyum tekkatlı küboidal epitelle örtülüdür. Köpüksü hücreler erken anöstrus döneminde yüzey epitelinde görülmesine rağmen geç anöstrusda görülememişlerdir. Geç anöstrusda yüzey epitelinin rejenerasyonunu takiben dökülme ve involüsyon belirlenmiştir (Galabova ve ark. 2003).

Organizmada hücreler arası uyum, yaşamın devamlılığının temel kuralını oluşturur. Bu uyum, çeşitli hücre içi ve hücre dışı faktörler yardımıyla sağlanmaktadır. Organizmayı oluşturan hücrelerin çevresinde çözülebilir moleküllerden oluşan kompleks bir karışım, diğer hücreler ve çözünebilir olmayan doku matriksi yer alır. Hücrenin bulunduğu bu çevreyi oluşturan ekstrasellüler sıvının bileşimi, diğer hücrelerin davranışları, şekilleri, kimyasal yapıları sürekli değişir. Doku ve hücrelerin bütünlüğünün ve fonksiyonunun korunabilmesi için hücrenin çevresindeki değişimleri algılaması ve uygun cevaplar vermesi gerekir. Hücre bunu, yüzeyinde eksprese edilen adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleştirir. Hücre adezyon molekülleri (CAM) hücre yüzeyinde bulunan, hücrelerin birbirine ve ekstrasellüler matrikse bağlanmasını sağlayan protein molekülleridir (Freemont 1998; Atabekoğlu ve ark. 2002). Adezyon molekülleri hücre yüzeyinde yapısal olarak var olan, bazı uyarılarla hücre yüzeyinde beliren, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşmesinde rol alan membran bağımlı proteinlerdir (Barlow ve ark. 2000). Hücre adezyon moleküllerinin en önemli fonksiyonları; hücre-hücre bağlantısı (embriyonal gelişim ve morfogenez), hücre hareketi (lökosit göçü ve immun cevap) ve hücreler arası haberleşme (sinaptik bağlantı kurulması) şeklinde sıralanabilir. Bu fonksiyonların yanı sıra; alerjik inflamasyon, astım, tromboz, angiogenez, yara iyileşmesi, iskemi, reperfüzyon hasarı, şok, arteroskleroz, kollajen doku hastalıkları, karaciğer ve böbrek

hastalıkları, tümör büyümesi, metastaz, transplantasyon, diyabetes mellitus ve rejeksiyon gibi birçok olayda da rol oynarlar (Rahman ve Meilsp, 1997; Frenette ve ark. 1996; Şensoy ve öznurlu, 2009). Ayrıca hücrelerin çoğalması ve göçü gibi önemli hareketlerin başlatılması, akciğerlerde doku bütünlüğünün sağlanması, endotel ve epitel hücrelerinin seçici bir bariyer oluşturması da adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilir (Mackay ve Imhof, 1993). Adezyon molekülleri transmembranal glikoproteinlerdir. Hücre içini dış ortama bağlarlar. En büyük olan ekstrasellüler kısım ve hücre içine doğru ilerleyen sitoplazmik fonksiyonel kısımdan oluşurlar. Dışarıdan gelen bir uyarının (bu bir hücre veya matrikse bağlı bir molekül olabilir) ekstrasellüler kısımda konformasyonel değişime yol açması ile aktive olurlar. Hücre adezyon molekülüne bağlanan molekül adezyon molekülünün ligandı olarak isimlendirilir, özgül olması şarttır. Hücre içinde bulundukları diğer moleküller sayesinde hücre fonksiyonunu etkileyebilirler. Bazıları hücre iskeleti ile bazıları da hücresel enzimlerle bağlantılıdır. Reseptör ligand birleşmesi hücrede morfolojik veya kimyasal bir değişime yol açar. Yapısal benzerliklerine dayanılarak hücre adezyon molekülleri farklı aileler halinde gruplandırılır; 1. Selektinler, 2. İntegrinler, 3. İmmünglobulin- Süper Ailesi, 4. Kaderinler Adezyon moleküllerinin çoğu hücre-hücre adezyonunda, integrinler ise aynı zamanda hücre matriks etkileşiminde yer alır. Ligand hücre adezyon molekülü ile aynı gruptan ise homofilik ligand (kaderinlerin ligandı gene kaderinler) farklı adezyon molekülü grubundan ise heterofilik ligand olarak isimlendirilir; selektinler immünglobülin süperailisi ile bağlantı kurarlar dolayısı ile birbirlerinin heterofilik ligandıdır. Bazen hücre adezyon molekülü olmayan bir molekül ligand olabilir; integrinlerin bir kısmı matriksteki kısa peptid zincirlerine bağlanırlar (Freemont 1998; Kasper ve Rasmussen, 2000; Atabekoğlu ve ark. 2002). Selektinler, endotel hücresi ve lökositlerin yüzeyinde bulunan transmembran yapısında yüzey glikoproteinleridir. Ligandları genellikle glikoprotein yapısındadır. Diğer adezyon moleküllerinde protein-protein bağlanması gibi bir gereklilik olmasına karşın, selektinler

karbonhidratlara bağlanabilirler. Selektinler, lökosit ve endotel hücreleri üzerindeki karbonhidrat ligandlarına bağlanarak lökosit trafiğinin düzenlenmesine katılırlar. Selektinler lökositlerin erken dönemde inflamasyon alanına lokalizasyonunda, lökositlerin damar endoteline yapışma ve geçiş öncesinde yavaşlayıp yuvarlanma hareketi yapmalarında görevli moleküllerdir. Yuvarlanmadan sonra ortamda sitokin ve lipid moleküllerinin artması sonucu, aktive olan inflamatuvar hücrenin üzerindeki L-selektinler, bu aktivasyonu takiben dökülür ve bunların yerine daha kuvvetli bağlanmayı sağlayan integrin grubu adezyon molekülleri ortaya çıkar. Selektinler bulundukları hücre çeşidine göre, lökosit, L-selektin, endoteliyal, E-selektin, trombosit, P-selektin olarak isimlendirilirler. L-selektin (CD62L), bu ailenin ilk tanımlanmış üyesidir. Lökositlerde yapısal bulunur ve endotel hücresindeki ligandı ile etkileşirler. En küçük selektin molekülüdür. Nötrofillerin inflamasyon bölgesine toplanması için gerekli yuvarlanma safhasından sorumludur. Hücre aktive olduktan sonra diğer selektinlerden daha hızlı bir şekilde hücre membranında yer alırlar. E-selektinler (CD62E) endotel hücre yüzeyinde endotoksin ya da interlökin-1 uyarısı sonucu eksprese edilirler. Lökositlerin gevşek olarak endotele tutunmasını sağlarlar. E-selektin sadece endotel hücrelerinden salınıp monosit ve granülositlerin adezyonunu kolaylaştırır. P-selektinler (CD62P), en büyük selektin molekülüdür. Trombositler ve endotel hücreleri üzerinde bulunurlar ve E-selektinlerle birlikte lökositlerin endotel üzerine gevşek olarak tutunmalarını sağlarlar. Selektinler CD (Cluster of Differentiation) sınıflandırmasına göre de CD62-L, CD62-E, CD62-P isimlerini alırlar. Selektin ailesinde ayrıca fonksiyonel olarak CAM olarak belirlenen bir tip adezyon molekülü de CD44'tür. İntegral membran glikoproteini olan CD44 hiyaluronik asit reseptörü olarak fonksiyon görür, diğer ligandları ekstrasellüler matriks (ECM) komponentlerinden kollajen, fibronektin, laminin ve kondroidin sülfattır. Selektinlerin en temel fonksiyonu lökositlerin, özellikle de nötrofillerin inflamasyon bölgesine hareketini sağlamaktır. Selektinlerin bağışıklık sistemindeki bu önemli rolleri bilim adamlarının sürekli dikkatini çekmiş ve

bunlardan anti-enflamatuar ajan olarak yararlanabilme çalışmaları yapılmıştır (Berg ve ark. 1989; Mackay ve Imhof, 1993; Kasper C. Rasmussen, 2000; Freemont 1998; Juliano 2002; Ergüler ve ark. 2002; Ross ve Pawlina. 2006; Şensoy ve Öznurlu 2009). İntegrinler hücre matriksine dıştan bağlanan transmembran hücre yüzey proteinleridir (Sims ve Dustin 2002). İntegrinler ekstrasellüler matriks bileşenlerinin diğer hücrelerle etkileşimini düzenleyen bir hücre yüzey reseptör ailesidir. İntegrin reseptörler, ekstrasellüler adezyon proteinlerinin hücre iskeletine sıkıca tutunmasını sağlayan integral membran glikoproteinleridir. İntegrinler hücre matriksine dıştan bağlanan heterofilik transmembran yüzey glikoproteinleridir ve ekstrasellüler matriks ile intrasellüler matriks arasında entegrasyonu sağlar. Ayrıca hücrelerin ekstrasellüler matrikse tutunmasını ve ekstrasellüler matriksden hücreye bilgi akışında da görev alırlar. İntegrinlerin birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlı α ve β alt üniteleri vardır (Shimizu ve ark.1999). İntegrin ailesi en az 14 α alt birim, 8 veya daha fazla β alt birimden oluşur. β -1 ve β -3 altbirimleri, fibronektin, kollajen ve laminini kapsayan ekstrasellüler matriks komponentleri ile gerçekleşen adhezyondan sorumlu bulunurken, β -2 alt grubu çoğunlukla hücre-hücre adhezyonu ile ilişkili bulunmuştur. İntegrinlerin yapıları ve fonksiyonları iki değerli katyonlara bağımlıdır (Ca^{2+} , Mg^{2+}). İntegrinler arginin-glisin-asparagin(RDG) aminoasit dizilerine sahip moleküllere bağlanma özelliği gösterir. İntegrinler dolaşımdaki lökositlerin damar endoteline tutunup yapıştıktan sonra inflammatuar reaksiyonun bulunduğu alana göç etmelerinde rol alırlar (Malik ve Lo.1996; Demir 2006). Hücre dışı sinyaller aracılığı ile haberleşmeyi sağlarlar (Etzioni 1996). İntegrinler embriyolojik gelişim, hemostazis, tromboz, yara iyileşmesi, immün ve immün olmayan savunma mekanizmaları gibi birçok fizyolojik olayda hücre-hücre ve hücre matriks adezyonuna katılırlar (Luscinskas ve Lawyer. 1994; Ross ve Pawlina 2006; Demir 2006). İmmünglobulin süper ailesi yapısal olarak immünglobulinlere benzediği için bu isim verilmiştir, transmembran kısım ile sitoplazmik kuyruktan meydana gelir. Molekül çeşitliliği bakımından oldukça zengindir.

Kaderin ve selektinlerin tersine Ig süper ailesinin üyeleri kalsiyumdan bağımsız hücre yapışma molekülleri olup tek bir gen tarafından kodlanırlar. Ig süper ailesinin tüm üyelerinde bulunan ortak özellik ise immünglobülünler için tipik olan bir veya daha çok kez katlanmış hücre dışı seğmentinin varlığıdır. İmmünglobulin süper ailesinin üyeleri; morfojeniz, inflamasyon, hemostaz ve immunité sırasında hücrelerin tanınması olaylarında önemli rol oynarlar. Ig üyeleri paraziter veya viral proteinler için bir reseptör olarak da hizmet eder (Ross ve Pawlina, 2006; Demir 2006). Kaderinler organizmanın tüm katı dokularında Ca^{2+} bağılı hücre adezyon moleküllerin büyük bir ailesidir (hem adezyon hem de Ca^{2+} bağlayıcı bölge içerirler. Kaderin yapısı N ve C terminali içeren iki bölgeden oluşur. Ancak C terminalinin bulunduğu bölgesi diğer adezyon moleküllerinden farklı olarak kateninlerle ilişkisini sağlayacak şekilde özelleşmiştir. Sitoplazmik kısım üç sitoplazmik protein; α , β , γ katenin ile ilişkilidir. E-kaderin sitoplazmik uzantılarına direk olarak bağlanırken α katenin bu moleküllerle hücre iskeletindeki aktin mikrofilamentleri arasındaki bağlantıyı sağlar. Kaderinler homofiliktir hem reseptör hem de ligand görevini yaparlar. Hücrelerin birbirlerine bağlandıkları noktalarda yoğun şekilde bulunan kaderinler görevlerini yerine getirebilmek için sitoplazmik proteinlerle ilişki halinde olmalıdır. Bir hücre tipi birden fazla kaderini sentezleyebilir. Kaderinler üzerinde bulundukları dokulara göre isimlendirilirler. E-kaderinler (epiteliyal) epitel bütünlüğünü sağlayan intersellüler bir yapıştırıcı olarak işlev yapar. Uvomorilin de denilen E-kaderin; embriyonun preimplantasyon döneminde morula ve blastosist, hücre-hücre bağlanma bölgelerinde yoğun olarak izlenir. Epitel bütünlüğünü sağlayan intersellüler bir yapıştırıcı olarak işlev görür. Zonula adherenslerde yoğun olarak bulunur ve kateninlerin bağlandığı sitoplazmik bölgeleriyle aktin filamentlerine yapışmayı sağlarlar. E-kaderin eksikliğinde tümör hücrelerinin invazif olarak yayılma eğiliminde oldukları ileri sürüldüğünden E-kaderinin metastazı baskılayıcı bir görev yaptığı düşünülmektedir. P-kaderinler (plasental) embriyogenezde görev alırlar. Embriyonik

dokulardan, plasenta ve epitelden, belirli dönemlerde trofoblast, kalp, akciğer ve sindirim kanalı hücrelerinden salınmaktadır. N-kaderinler (Nöral), nöral dokulardan, akciğerden, kas hücrelerinden, merkezi sinir sistemi, lens, iskelet ve kalp kasından eksprese olurlar. R-kaderin (Retinal), retinal nöronlarda ve gliya hücrelerinde bulunur. M-kaderin (Kas), miyoblast ve iskelet kası hücrelerinde bulunur. H-kaderin, E-kaderine benzerlik gösterir ve meme kanserinin gelişiminde rolü olduğuna inanılmaktadır. Kaderinler yan yana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar. Yapışma kavşaklarında fermuara benzer yapılar oluştururlar. Kaderinler birbiri ile genelde homofilik karakterde ilişkiye girerler. Karşılıklı hücrelerde bulunan aynı kaderinler birbirine bağlanarak hücre-hücre adezyonunu sağlarlar. Kaderinler, embriyoda morfogenezden, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Kaderinler bir hücrenin diğeri ile bağlantı kurduğu, hücre-hücre bağlantı bölgelerinde yoğunlaşmışlardır. Kaderinlerin ekstrasellüler domain'leri kendilerine özeldir. Kaderinler ekstrasellüler domain'lerin hem hücre yüzeyine hem de sitoplazmik unsurlara bağlanmasını gerçekleştirir. Belirlenmiş 3 sitoplazmik proteinden en iyi bilineni katenindir. Kaderin/katenin kompleksi, kaderinin hücre-hücre bağlantısı ile doku ve hücrelerin yapısal ve fonksiyonel organizasyonunu şekillendirir. Kateninler, kaderinlerin aktin filamanlarına ve submembranöz ağlara bağlanmasına aracılık eder. Molekül ağırlıkları yaklaşık 102-105kDa (α -katein), 92-97kDa (β -katein) ve 82-86kDa (γ -katein) olmak üzere 3 tür katenin belirlenmiştir (Filiz ve ark. 2002; Grosskinsky ve ark.1995; Kimber 1993; Lyall 1998; Nose ve Takeichi 1986; Tabibzadeh 1992; Edelman ve Crossin 1991; Takeichi M.1990; Takeichi 1991; Ivanov ve ark. 2001; Wijnhoven ve ark. 2000). Embriyoda özgün adhezyon moleküllerinin ekspresyonu hücre göçü ve doku diferensiyasyonu için gereklidir. Hücre adhezyon molekülleri ilk embriyonal hücrelerde ve onlara köken veren üç germ yaprağında eksprese edilmiştir. En iyi belirlenebilen hücre adezyon molekülü N-CAM (neural) ve L-CAM (LiverCAM)dır (Vesweber and Kemler

1985). İnsanlarda menstrual siklus ve gebelik döneminde endometriyal integrinlerin implantasyon ve desidualizasyonda önemli rolleri olduğu açıklanmıştır (Lessey ve ark.1994; Lyall 1998) İntegrinler, endometriyal, desidual ve ekstrasvillöz sitotrophoblast (EVCT) hücrelerinde bulunan adhezyon molekülleridir. Bunlar, hücre-hücre dışı matriks (bazal lamina) bileşenleri arasındaki adezyonda olduğu kadar, hücre-hücre arası adezyonda da yer alırlar (Merviel ve ark. 2001). Hücre-hücre bağlantılarında yerleşen Afadin, vinculin bağlayan protein olup, tight junction proteini olan ZO-1 ve GTPRas gibi birçok sitoplazmik proteinleri bağlar. Afadin, zonula aderens ve tight junction gibi bağlantılarda büyük bir rol oynar (Ikeda 1999). Swiss-Webster sıçanlarda gebeliğin 6. ve 8. günlerinde uteroplasental kısımlarda 10., 12., 14., 16. ve 18. günlerinde ise plasenta da integrinlerden α_4 , α_v , β_1 , β_3 ve VCAM-1 eksprese edildiği, integrinler ve vasküler hücre adhezyon molekül-1 (VCAM)'in normal plasental gelişim için gerekli olduğu bildirilmiştir (Jeffery 1999). Farelerde spesifik integrinlerin, ovaryum hücre fenotipleri ile ilgili olduğu, integrin fonksiyonları arasında folliküler gelişim, luteinizasyon ve granulosa hücre gelişiminin yer aldığı ifade edilmiştir (Kathleen 2002). İnsan ve fare embriyoları arasında integrin molekülleri expression'undaki farklılıklar ve insan embriyolarında implantasyonda $\alpha_6\beta_1$ integrin dimerleri ve $\beta_v \beta_5$ 'in rolü belirlenmiştir (Bloor ve ark. 2002). Sığır uterusunda implantasyon döneminde trofoblast ve endometriumda α_1 , α_3 , α_6 integrin alt birimleri ile collagen IV ve laminin gibi ekstrasellüler matriks unsurları tespit edilmiştir. Uterus epitelinde α_3 , α_6 , luminal epitelde ise α_1 'in eksprese edildiği, gebelikte bazal lamina ve subepitelyal stromada collagen IV ve lamininin nisbeten arttığı açıklanmıştır (Doris ve ark. 2002). Osteopontin, hücre adezyonu, migrasyon, diferensiyasyon, anjiyogenesis ve doku şekillenmesi gibi birçok biyolojik olayda önemli rol oynayan glikolize olmuş bir fosfoproteindir. Bir ekstrasellüler matriks proteini olarak salgılanan ve integrin bağlayan bir ligand olan osteopontin çeşitli epitel hücrelerinde ve biyolojik sıvılarda bulunur. İnsan ve koyunlarda uterusun glandular epitelinin bir salgı ürünü

olarak osteopontin, uterus luminal epiteli ve trophoektoderme bağlanır ve periimplantasyon periyodu boyunca gebeliğin korunmasını sağlar. Tüm memeli uterus endometriyal bezleri histotroph salgılar. Histotroph, enzimler, büyüme faktörleri, sitokinler, lenfokinler, hormonlar, transport proteinleri ve diğer maddelerin kompleks bir karışımıdır. Histotrop, beslenme, bağlantı, implantasyon, plasenta şekillenmesi ve immun korumada rol oynar. Koyun osteopontinin uterus glandular epitelinden salgılanan histotroph'un bir unsuru olduğu ifade edilmiştir (Johnson ve ark. 2003). Koyunlarda osteopontinin integrin bağlayan ekstrasellüler matriks proteini olduğu implantasyon ve embriyo gelişimine katkıda bulunduğu açıklanmıştır. Osteopontin mRNA hem gebe hem de gebe olmayan kornuların glanduler epitelinde, immunoreaktif osteopontin proteini ise her iki kornuda luminal epitelde belirlenmiştir (Burghardt ve ark. 2005). Koyun uterusunda gebeliğin 25. ve 120. günleri arasında osteopontin mRNA ve proteini ekspresse edilmiştir. Gebeliğin 120. günündeki koyunlarda osteopontin 45-kDa formu luminal epitelin apikal yüzünde embriyonun trofoektoderminde hem plasentomda bölgeler hem de plasentomlar arasında uterus-plasenta iç yüzünde tespit edilmiştir (Johnson ve ark. 2003a). Gebe farelerde plasenta, desidua, uterus ve özellikle de granüllü endometriyal bez epitel hücrelerinde osteopontin mRNA ekspresse edilmiştir (Waterhouse ve ark. 1992). Domuz ovaryumlarında, gelişmiş ya da atretik folliküllerde klasik kaderinler ve β katenin immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Sağlıklı follikülerde granuloza hücrelerinde kaderin-8 ve β katenin ile güçlü, bazal membran ve granuloza hücre tabakasının iç yüzünde ise orta derecede boyanma görülmüştür. Güçlü VE- kaderin ekspresyonu sağlıklı folliküllerin teka interna tabakasında bazal membrana bağlı tek katlı hücre sırasında belirlenmiştir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre kaderin 8, N kaderin ve VE- kaderinin folliküler büyüme ve dejenerasyonda rol oynadığı bu kaderinlerin ekspresyonundaki azalmanın domuz ovaryum folliküllerindeki folliküler atrezi ile ilgili olduğu ifade edilmiştir (Nishihara ve ark. 2000). Fare embriyolarında P- kaderin'in plasenta ve uterus desiduasında

bol miktarda eksprese edildiği ve kaderinlerin fare embriyolarında morfogenez ve implantasyonda rol oynadığı bildirilmiştir (Nose ve Takeichi 1986). Fare embriyoları ile yapılan bir çalışmada, implantasyonun embriyo trophoblast hücreleri ile bol miktarda lamininin depo edildiği ekstrasellüler matriksten oluşan uterus duvarının birbirine tesirine bağlı olduğundan söz edilmektedir. Farelerde 32/67kDa laminin bağlayan protein antikorumun, yüksek oranda laminin içeren ekstraselüler matriks benzeri uterus desidual bazal membrana doğru olan embriyo trophoblast hücre invazyon ve göçünü önleyerek fare embriyosunun implantasyonuna engel olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2000). Sıçan uterusunda desidual reaksiyonun ilk olarak gebeliğin 4. gününde görüldüğü laminin ve fibronektin ile bu proteinlerin reseptör alt birimleri β_4 ve α_5 integrinlerin desidual doku yapınmasına ve implantasyon olaylarına aktif olarak katıldıkları, özellikle fibronektinin desidual reaksiyon ve implantasyon olaylarının başlatılmasında önemli anahtar moleküllerden biri olabileceği kanısına varılmıştır (Kayışlı ve ark. 2000). İnsan oositlerinde erken embriyo ve blastokist dönemlerinde indirekt immunofloresans kullanılarak bazı antikorlarla ilk trimesterde villöz plasentada hücre adezyon molekülleri belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, preimplantasyon gelişim süresinde 6 integrin alt grubu (α_3 , α_v , β_1 , β_3 , β_4 , β_5), çok az sayıdaki oositte ise α_2 , α_4 , α_L , β_2 ve β_7 integrin alt grupları tespit edilmiştir. E-kaderin, ICAM-1, NCAM ve VCAM-1'in oositlerde ve embriyonun ilk dönemlerinde mevcut olduğu, L- selektinin oositlerde görülürken 8 hücreli embriyolarda görülemmediği açıklanmıştır (Campbell ve ark. 1995).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın materyalini, özel veteriner kliniklerine ovario-hysterectomy operasyonları için gelen köpeklerden östrus siklusunun foliküler, luteal ve anöstral fazlardaki her dönem için 5 olmak üzere 15 adet köpeğin uterus ve ovaryumları oluşturmuştur. Hayvanlar xylazine (2mg/kg) - ketamin hydrochloride (15 mg/kg) ile anestezi edilerek operasyona alınmışlardır. İmmunositokimyasal incelemeler için alınan uterus örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi, dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek paraplastta bloklandı. Parafin bloklardan poly-lysinli lamlara alınan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra PBS'de çalkalandı, PBS'de hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile muamele edildi ve tekrar PBS'de yıkandı. Sitrat buffer kullanılarak doku antijeninin yeniden kazanımı sağlandı. Tekrar PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika bloking solüsyonu ile bir nem odası (humidity chamber) içinde inkube edildi. İmmunohistokimyasal boyamalar için strept-ABC metodu uygulandı. Kesitler üzerine rabbit poliklonal Cadherin Pan Ab- 4 RB-1524 (1/200 oranında, Thermo- Labvision), rabbit poliklonal Osteopontin RB-9097 (1/50 oranında, Thermo- Labvision), rabbit poliklonal Laminin AB-11575P (1/200 oranında, Abcam) ve mouse monoclonal anti-human Integrin-1, Fibronectin receptor (1/10,000 oranında, Takara) primer antikörleri uygulandı ve nem odasında oda ısısında 1 saat inkube edildi. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi. İnkubasyonu takiben PBS'te 3 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikör (Thermo-Shandon) ile 30 dakika oda ısısında inkube edildi ve 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepavidinde 30 dakika muamele edildi. Tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra 10-20 dakika DAB kromojen solüsyonunda (Thermo-Shandon) bekletildi. Gill'in Hematoksileninde 3 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı alkol ve ksilol serisinden geçirilip üzerine yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı. Işık

mikroskobunda incelenen preparatlar fotoğraflandı. Ayrıca köpeklere ait ovaryum örnekleri de %10 formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik işlemleri takiben bloklandı ve 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınarak üçlü boyama metodu ile boyandı. Ovaryumlar ve uterusdaki histolojik yapı birlikte değerlendirilerek köpeklerin siklusun hangi periyodunda olduğu belirlendi. İmmunohistokimyasal incelemelerin bir bölümü için frozen kesitlerde kullanmak amacıyla alınan uterus örnekleri sıvı azotta donduruldu ve materyal alımı tamamlanıncaya kadar -80 derecede saklandı. Ancak fakültemizde jeneratör bulunmadığından sık sık gerçekleşen elektrik kesintileri nedeniyle tüm dokuların kullanılamayacak şekilde bozulduğu tespit edildi. Bu nedenle frozen kesitlerde kullanılmak amacıyla alınan Afadin, Catenin γ , Catenin β , E- cadherin ve P- selektin antikorları bu araştırmada kullanılamamıştır. Antikorlar Anabilim dalımıza ait Histoloji laboratuvarındaki buzdolabında -18 C° de muhafaza edilmektedir. Bu antikorların uyumlu olduğu başka dokular araştırılmakta ve an kısa sürede kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır.

BULGULAR

Alınan doku örneklerinden ovaryum ve uterus histolojisindeki değişikliklere göre köpeklerin siklus evreleri folliküler, luteal ve anöstral dönem olarak belirlenmiştir (Schaefers - Okkens 1996; Schaefers-Okkens 2005).

Histolojik Bulgular:

Köpeklerde uterusun morfolojisi östrus siklusu evrelerine göre değişmektedir. Uterus, endometriyum, myometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç katmandır. Endometriyum, yüzey epiteli ve kriptler, orta bölge ve bazal bölgeden oluşmuştur. Kriptler girintili tek katlı kısa epitel ile örtülüdür, orta bölge bağdokudan oluşmuştur, bazal bölge ise siklusa bağlı olarak bezlerle doludur. Myometriyum, içte kalın sirküler dışta, ince longitudinal düz kaslardan oluşmuştur. İki kas katmanı arasında vasküler tabaka yer alır. Dış katman perimetriyum ya da tunika serozadır.

Foliküler dönemde, endometriyum epiteli, stromaya doğru çöküntü yaparak kriptleri şekillendirmeye başlamıştır. Başlangıçta derinliği az olan kriptler uterusdaki gelişime bağlı olarak gittikçe derinleşmektedirler. Endometriyum epiteli kript alanları dışında tek katlı kübik, çekirdek oval ve ortada, kriptlere yaklaştıkça tek katlı alçak prizmatik şekillidir. Kript epitel hücreleri yüksek prizmatik şekilli bazale itilmiş uzun, oval çekirdekli, bez epitel hücreleri ise prizmatik şekilli olarak gözlenmiştir. Foliküler dönemin başlangıcında endometriyumun büyük kısmını stromanın oluşturduğu, az sayıdaki küçük ve dar lumenli bezlerin sayısı ve genişliğinin uterus gelişimine bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Preparatlarda endometriyum ve myometriyum hemen hemen aynı kalınlıkta görülürken, içte longitudinal dışta sirküler kaslardan oluşan myometriyum uterusun bazı alanlarında çok incelmış ve yerini damar katmanına bırakmıştır.

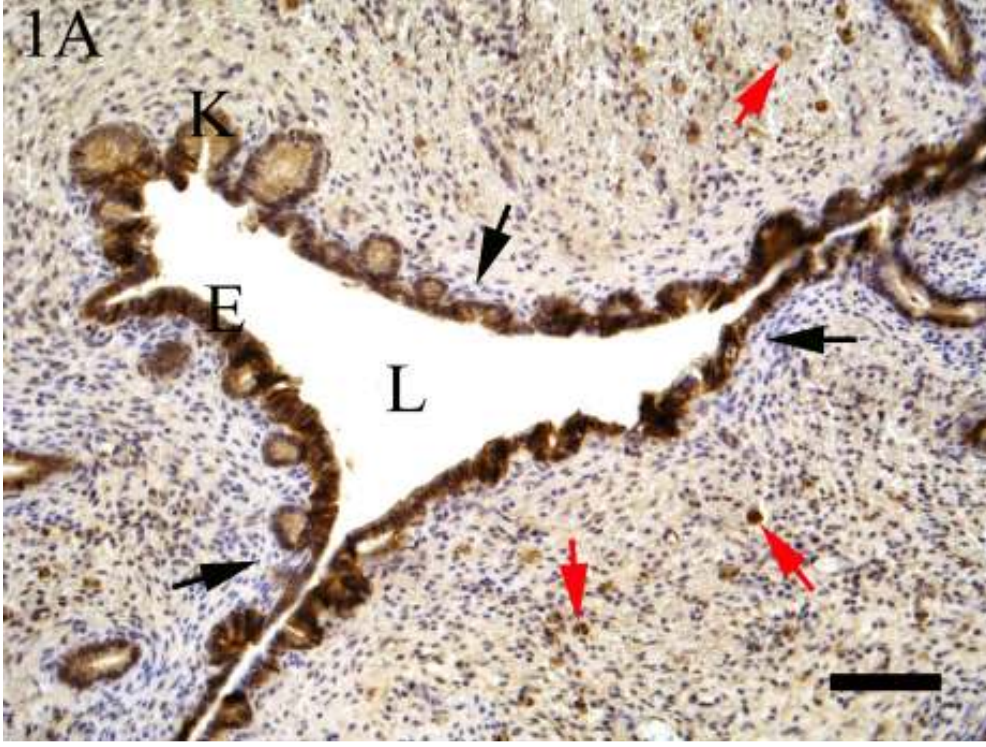
Luteal Dönemde, endometriyum ve myometriyum en yüksek kalınlık ve hücresel yoğunluktadır. Foliküler döneme göre derinliği artmış olan kriptlerin ve uterus bezlerinin sayısının artışı ve bezlerinin bazalde toplandığı gözlenmiştir. Alçak prizmatik şekilli endometriyum epiteli, uzun oval ve hücrenin büyük kısmını işgal etmiş çekirdeklere sahiptir. Erken luteal dönemde yüksek prizmatik şekilli kript epitel hücrelerinin yuvarlak, oval çekirdekleri bazalde yerleşmiştir. Prizmatik şekilli uterus bez epitel hücreleri, yuvarlak ve bazale yerleşmiş çekirdekli olarak gözlenmiştir. Erken luteal dönemde geniş ve açık lumenli bezlerin luteal dönemin sonuna doğru küçüldüğü, dar olan lumenlerinde salgı bulunduğu gözlenmiştir.

Anöstral dönemde, uterus diğer dönemlere göre oldukça gerilemiştir, endometriyum ve myometriyum oldukça incelmış ve genelde stromadan zengin olan endometriyumdaki bezlerin sayısındaki azalma dikkati çekmiştir. Anöstrusun erken dönemlerinde yüzey epitelini oluşturan yer yer alçak prizmatik ve kübik hücrelerin uzun, oval ve hücrenin hemen hemen tamamını doldurmuş çekirdeklere sahip olduğu görülmüştür. Luminal kriptler alçak prizmatik

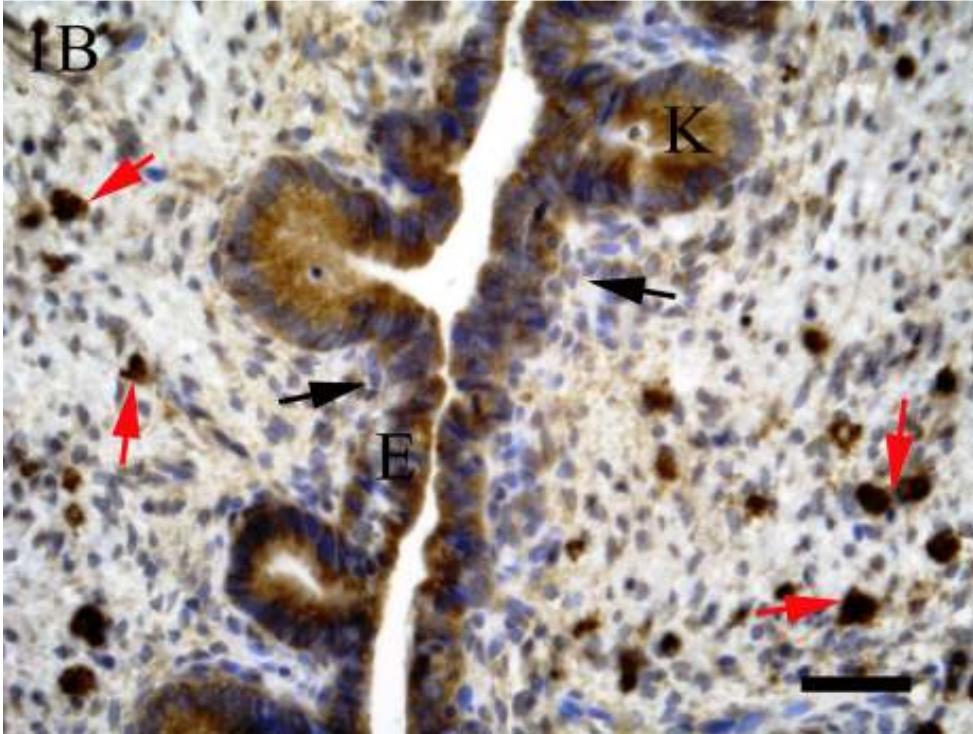
hücrelerden oluşmuşlardır, iri oval çekirdeklerinin ise hücrenin bazaline kaymış olarak yerleştiği belirlenmiştir. Anöstrusun geç dönemlerinde endometriyuma bağ doku unsurları hakimdir, tek katlı kübik epitelle örtülü olan endometriyumun, derinliği olmayan az sayıda kript bazalde ise kübik epitelde örtülü lumenleri dar salgı periyodunda olmayan az sayıda bez içerdiği gözlenmiştir. Anöstrus döneminde önce yüzey epitelinde daha sonra bez epitelinde de belirgin olmak üzere hipertrofik hücreler görülmüştür.

İmmunohistokimyasal Bulgular

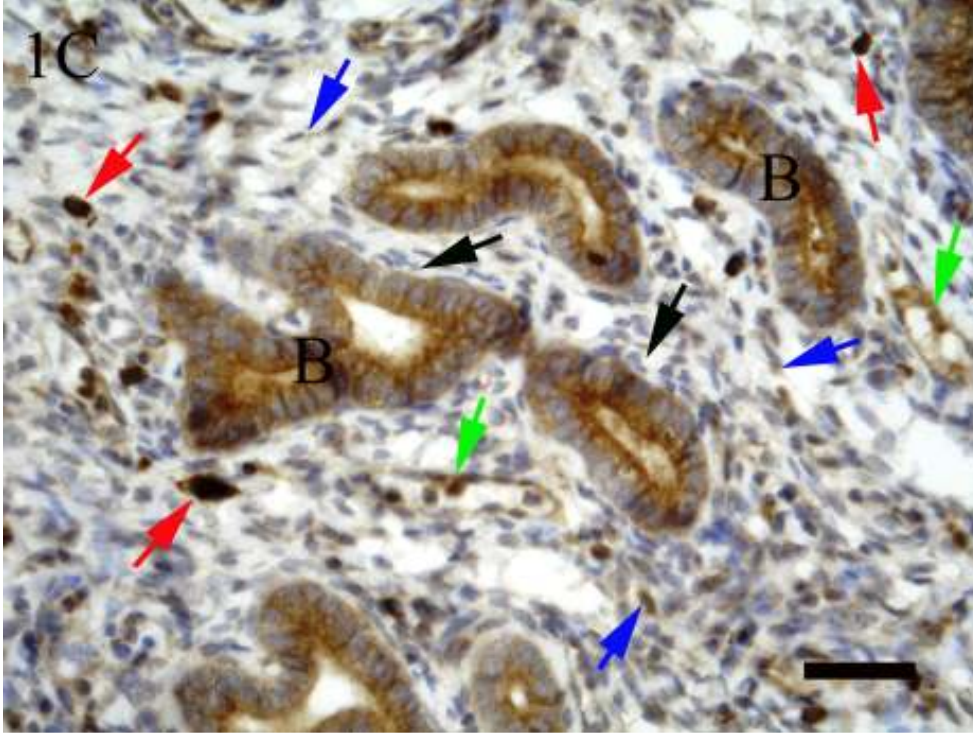
Pan-kaderin lokalizasyonu; Folliküler dönemde kaderin, endometrium yüzey epitelinde kriptlerde ve bezlerde güçlü reaksiyon gösterdi. Reaksiyon yüzey ve kript epitelinin apikalinde ve bez epitelinde oldukça şiddetliydi. Yüzey epitelinin hemen altındaki bağdokuda, endometriyumun bazal bölgesinde ve bezlerin etrafında negatif reaksiyonlu belirgin tabaka oluşturmuş stroma alanları görüldü (Şekil1A, B, C). Reaksiyonun şiddeti, myometriyumda orta derecede, perimetriyumda özellikle de mezotel hücrelerinde oldukça güçlüydü (Şekil 1D). Stratum vaskulare katmanındaki damarların endoteli ve tunika adventisyası orta derecede bir reaksiyon gösterirken, damar düz kasları negatif reaksiyon verdi. Endometriyal damarların endotel katmanı orta derece bir reaksiyon gösterdi (Şekil 1C). Eozinofilik granüllü stromal hücreler şiddetli pozitif reaksiyon verdiler (Şekil1A, B, C). Kaderin reaksiyonu epitel hücrelerinde membran ve sitoplazmada, kaslarda sitoplazmik, mezotel ve stromal hücrelerde sitoplazmada görüldü.



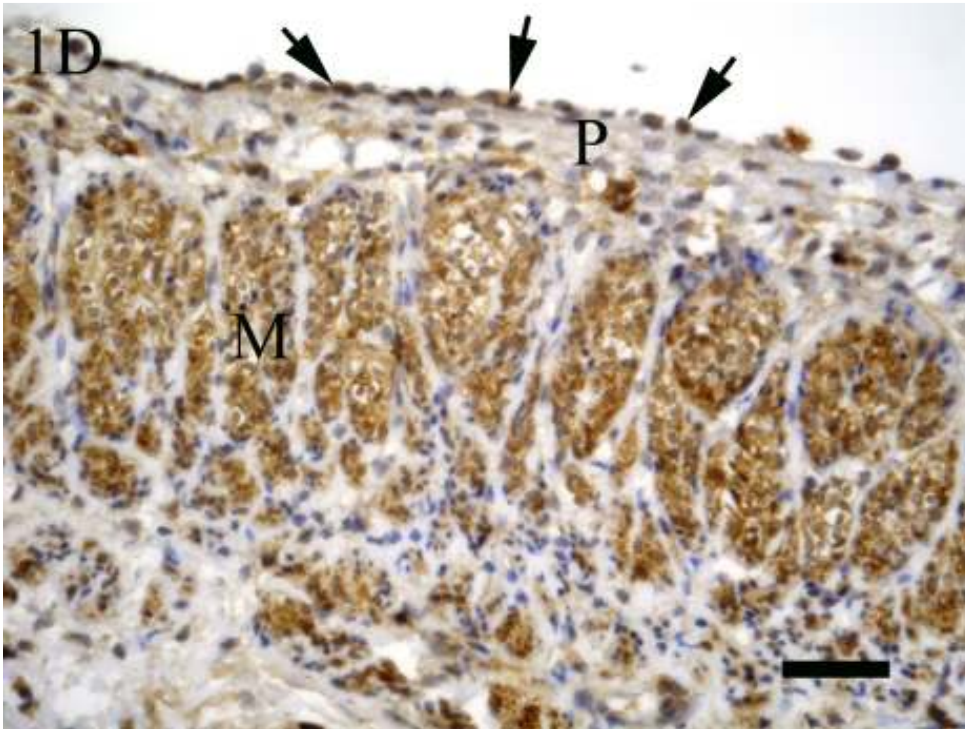
Şekil1A. Folliküler dönemde, endometriyumda pan-kaderin reaksiyonu, Lumen (L), Yüzey epiteli (E), Kript (K), negatif reaksiyon gösteren stroma alanları (Siyah oklar), Eozinofilik granüllü hücreler (Kırmızı oklar), bar 50 μ m, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 1B. Folliküler dönemde endometriyumda pan- kaderin reaksiyonu, Yüzey epiteli (E), Kript (K), negatif reaksiyon gösteren stroma alanları (siyah oklar), eozinofilik granüllü stromal hücreler (kırmızı oklar), bar 25 μ m, immunperoksidaz, DAB.

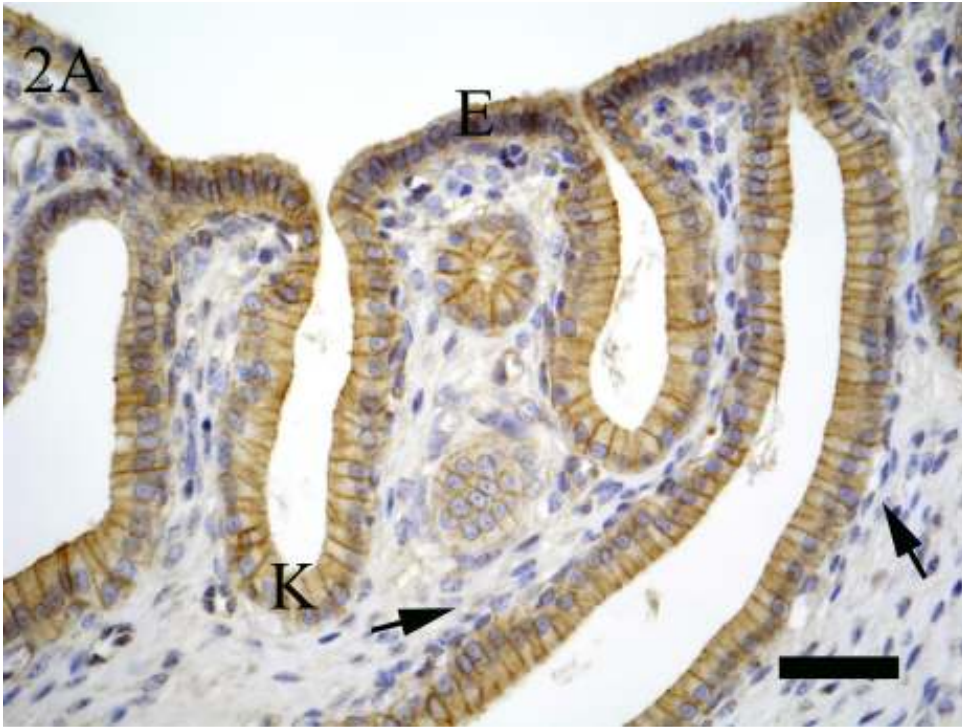


Şekil 1C. Folliküler dönemde, uterus bezlerinde pan- kaderin reaksiyonu, Bez (B), Endometriyal damarlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar), eozinofilik granüllü stromal hücreler (kırmızı oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

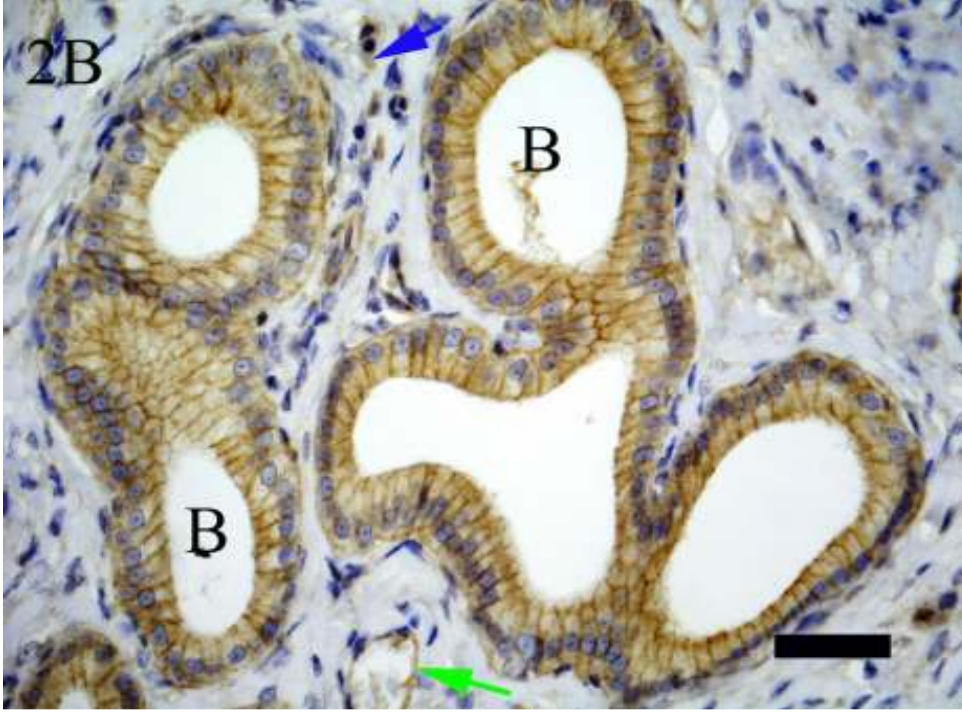


Şekil 1D. Folliküler dönemde myometriyum (M) ve perimetriyumda (P) pan- kaderin reaksiyonu, mezotel hücreleri (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

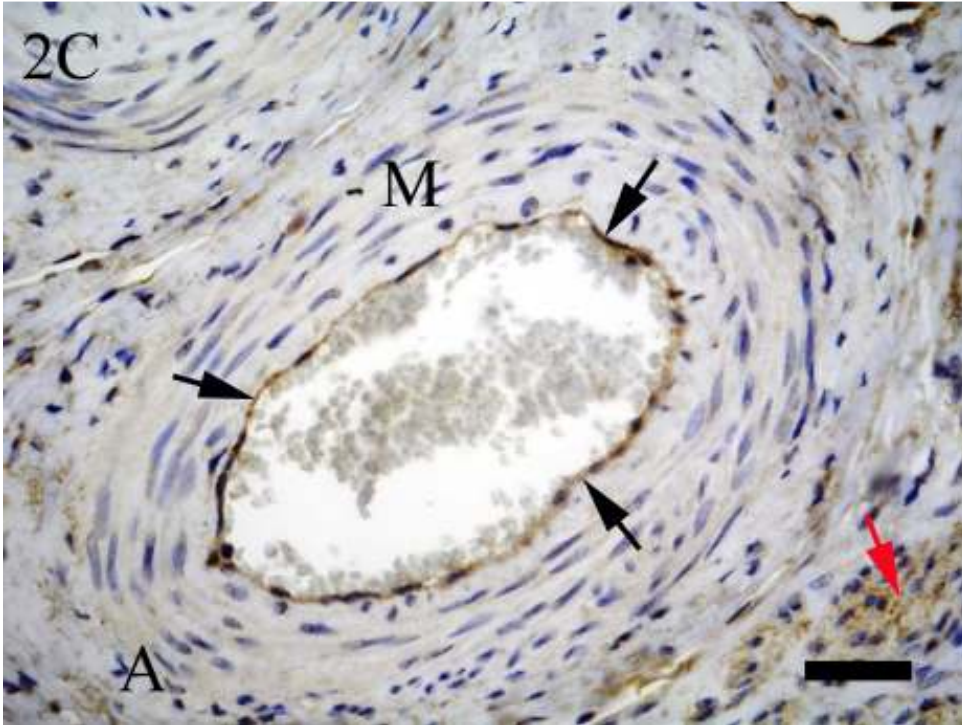
Luteal dönemde kaderin reaksiyonu, yüzey, kript (Şekil 2A, D) ve bez epitelinde (Şekil 2B, E) yoğun olarak gözlendi. Folliküler dönemde görülen yüzey epitelinin hemen altındaki bağdokuda, endometriyumun bazal bölgesinde ve bezlerin etrafında negatif reaksiyonlu belirgin tabaka oluşturmuş stroma alanları erken luteal dönemde folliküler dönemdeki gibi, geç luteal dönemde ise tek tük hücreli olarak görüldü (Şekil 2A, B, D, E). Uterus kript ve bez epiteli en yüksek salgı kapasitesine luteal dönemin ortalarında ulaşmıştı. Yüksek prizmatik şekilli kript epitel hücreleri, yassı ve bazale yerleşmiş çekirdeklere sahipti. Genelde bazalde toplanmış olan uterus bezleri kriptlere göre daha alçak prizmatik hücrelerden oluşmuştu ve çekirdekleri de daha iri ve yuvarlaklı. Geç luteal dönemde bezler iyice daralmıştı (Şekil 2E). Stratum vaskulare katmanındaki damarların endoteli ve tunika adventisyası folliküler dönemde olduğu gibi orta derecede bir reaksiyon, damar düz kasları negatif sayılabilecek soluklukta bir reaksiyon gösterdi (Şekil 2C). Geç luteal dönemde sitoplazmik kaderin yoğunluğunun erken luteal döneme göre arttığı belirlendi (Şekil 2D, E).



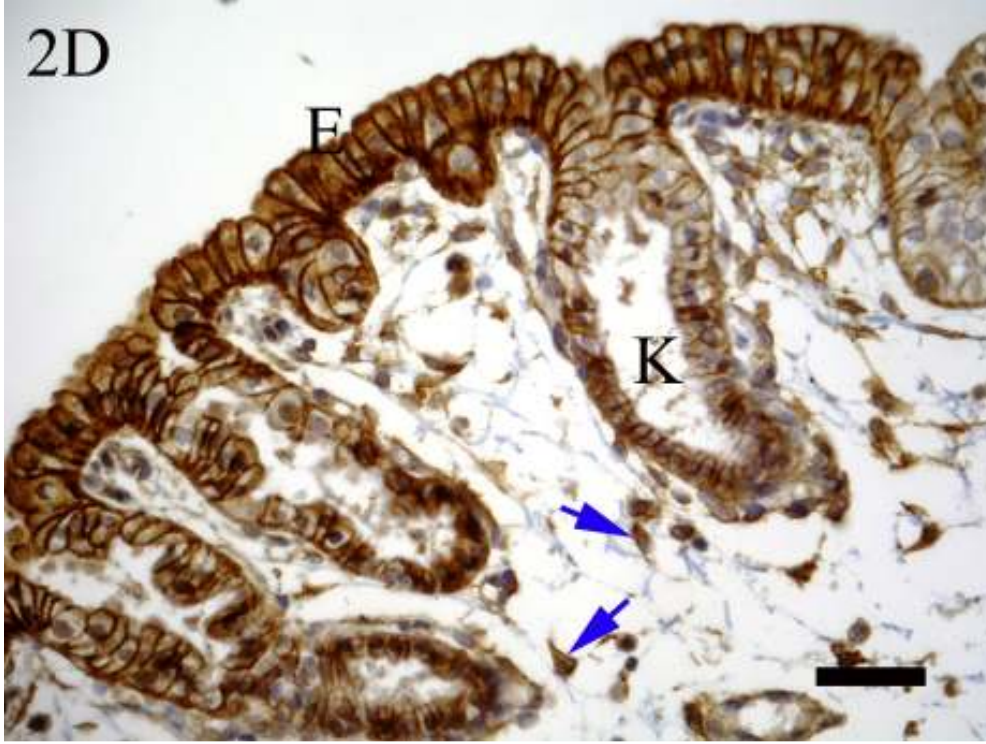
Şekil 2A. Erken luteal dönemde, endometriyumda pan-kaderin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), Kript (K), negatif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



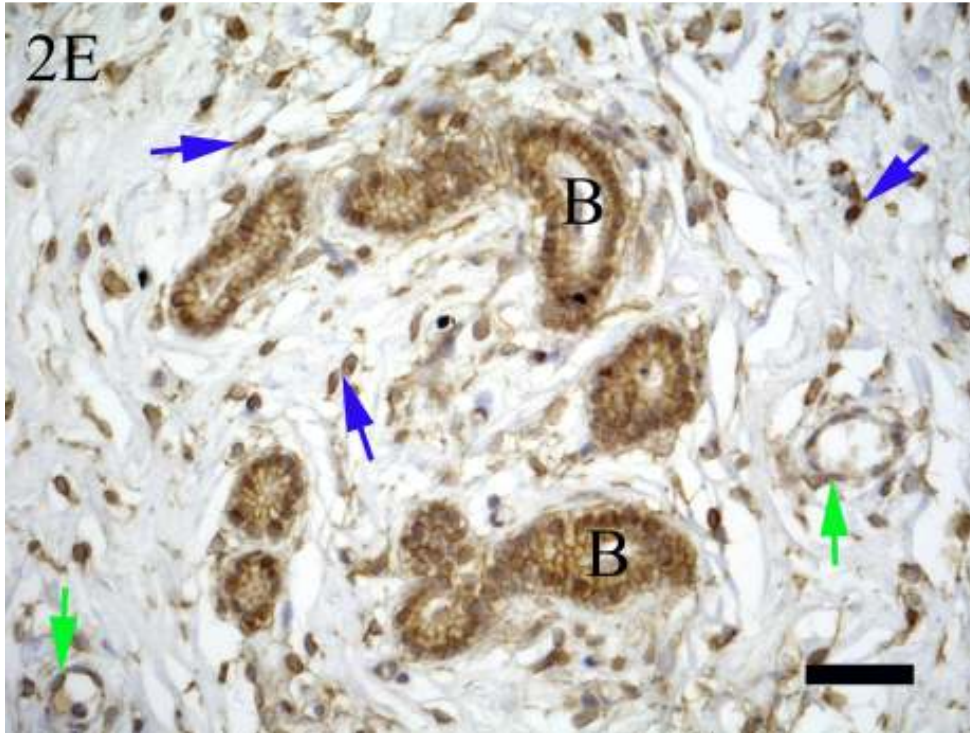
Şekil 2B. Erken luteal dönemde uterus bezlerinde (B) pan- kaderin reaksiyonu, pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar), endometriyal damarlar (yeşil oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 2C. Erken luteal dönemde stratum vasculare tabakasında damarlarda pan- kaderin reaksiyonu, damar endoteli (siyah oklar), mediya (M), adventisya(A), Myometriyum (kırmızı ok) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

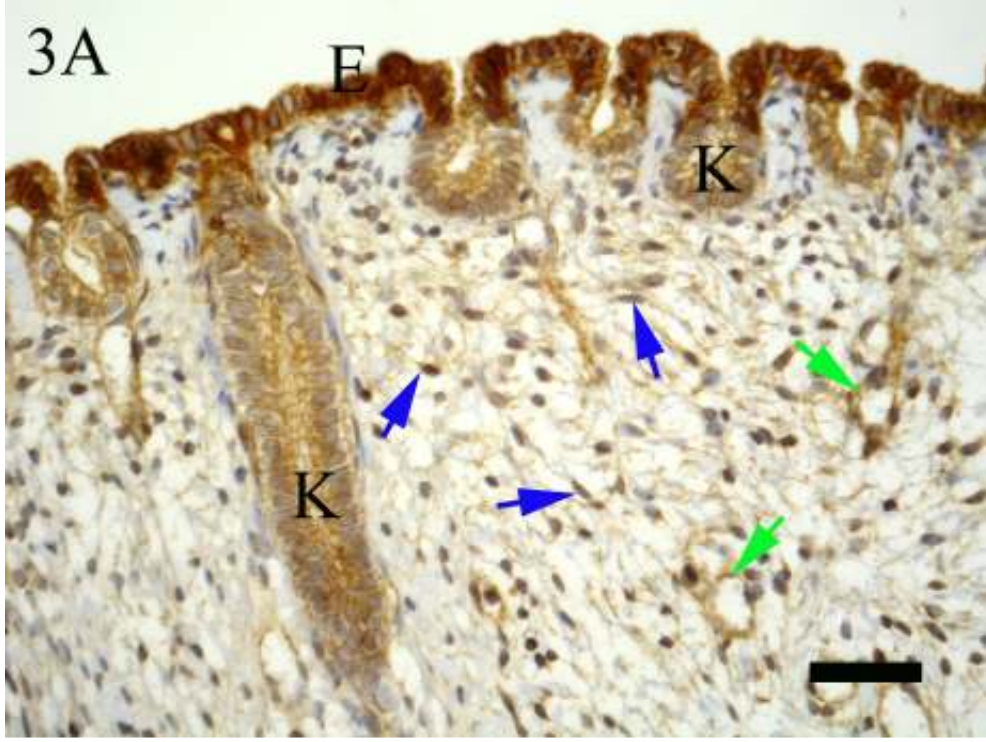


Şekil 2D. Geç luteal dönemde endometriyumda pan- kaderin reaksiyonu, yüzey epiteli (E) ve kript (K), pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

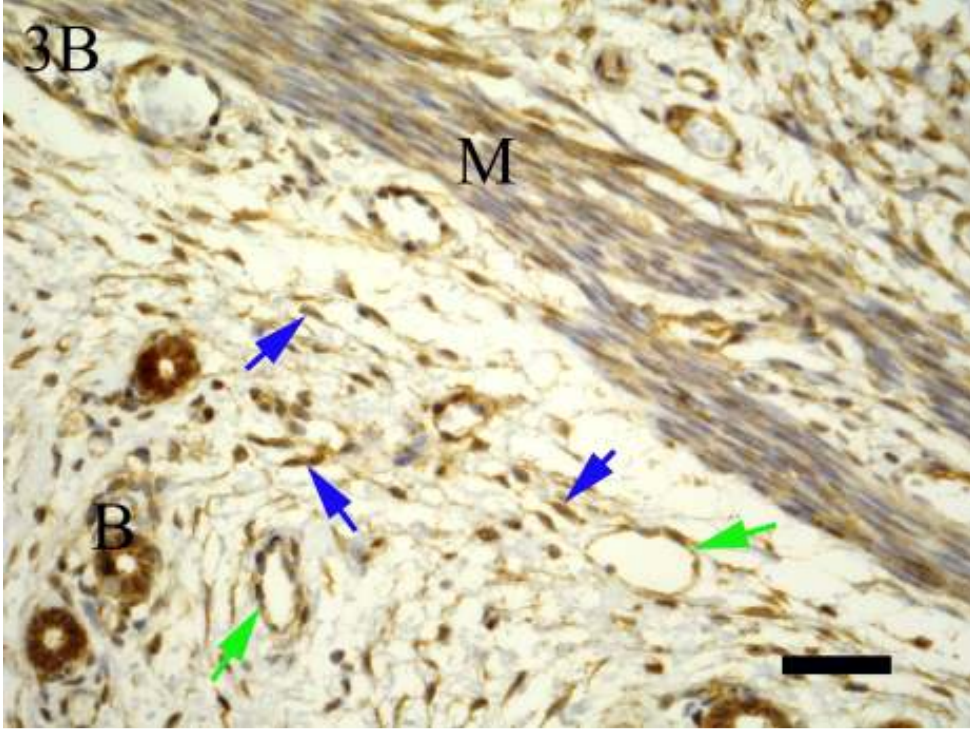


Şekil 2E. Geç luteal dönemde pan- kaderin reaksiyonu, Bezler (B), endometriyal damarlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

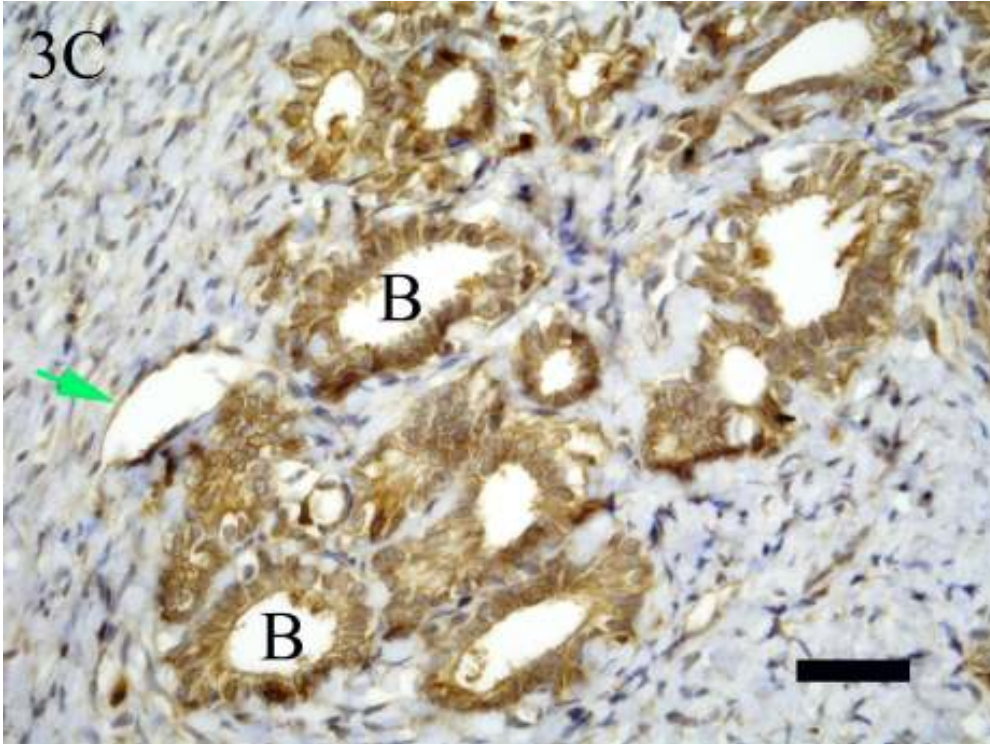
Anöstral dönemde, yüzey epitelinde kriptlere oranla reaksiyon daha şiddetliydi ve kriptlerin etrafını negatif reaksiyonlu hücreler sarmıştı (Şekil 3A). Anöstrusun geç dönemlerinde yüzey ve bez epiteli bozulmuş, hipertrofik hücrelerin sayısı artmıştır.



Şekil 3A. Erken anöstrus döneminde endometriyumda pan- kaderin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K) endometriyal damarlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 3B. Erken anöstrus döneminde, endometriyum ve myometriyumda (M) pan - kaderin reaksiyonu. Bezler(B), endometriyal damarlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

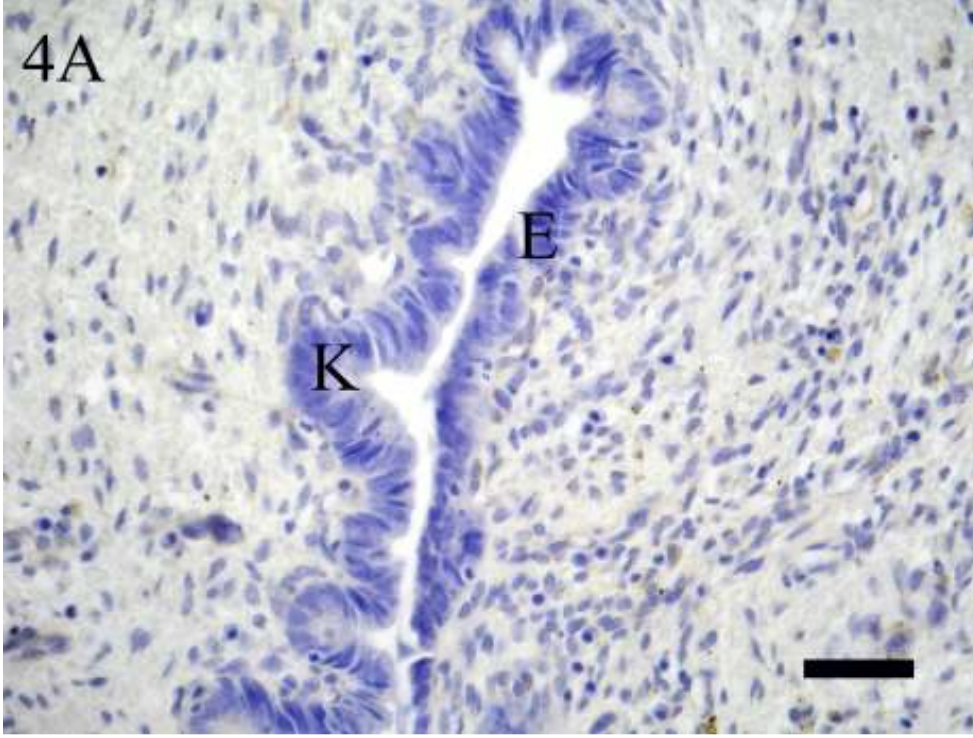


Şekil 3C. Geç Anöstral dönemde uterus bezlerinde (B) pan- kaderin reaksiyonu, endometriyal damarlar (yeşil ok) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

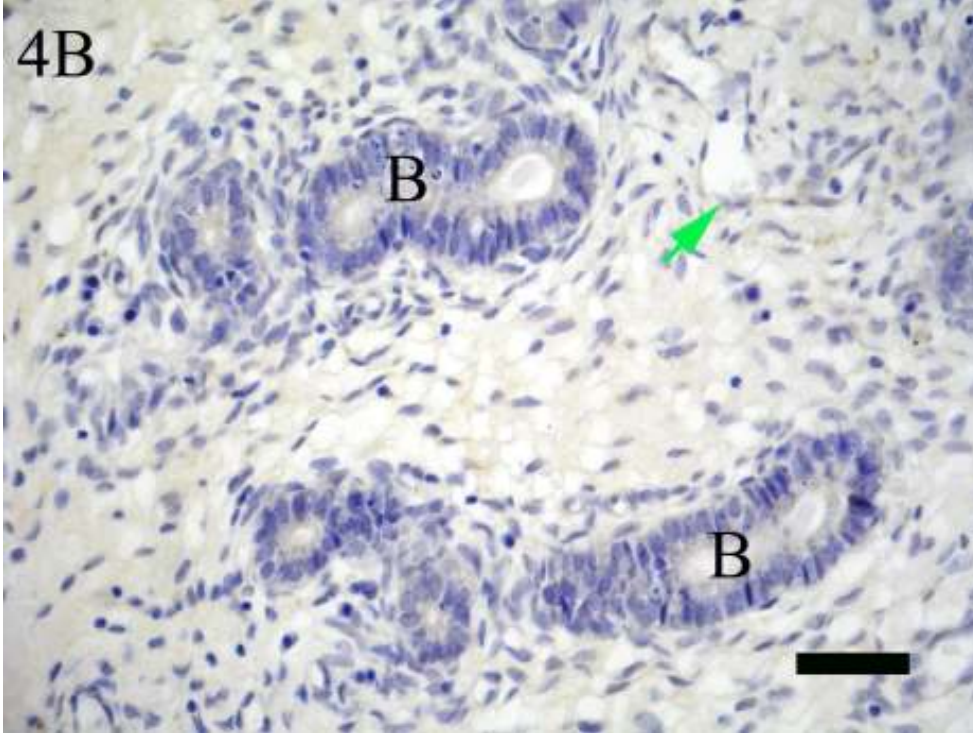
Uterusda pan- kaderin reaksiyonun görüldüğü alanlar		Foliküler Dönem	Luteal Dönem		Anöstral Dönem	
			<i>Erken D.</i>	<i>Geç D.</i>	<i>Erken D.</i>	<i>Geç D.</i>
Yüzey Epiteli		+++	+++	+++	+++	+++
Kript Epiteli		+++	+++	+++	++	++
Bez Epiteli		+++	+++	+++	+++	++
Myometriyum		++	++	++	++	++
Perimetriyum		+++	+++	+++	+++	+++
Damarlar	Endotel	++	+++	+++	+++	+++
	Mediya	—	+	+	+	+
	Adventisya	++	++	++	+++	+++

Tablo1. Östrus siklusunun farklı dönemlerinde köpek uterusunda P-kaderinin lokalizasyonu. İmmunoreaksiyonun derecelendirilmesi: negatif; (-), soluk boyanma; (+), orta derecede boyanma; (++) , güçlü boyanma; (+++) olarak gösterildi.

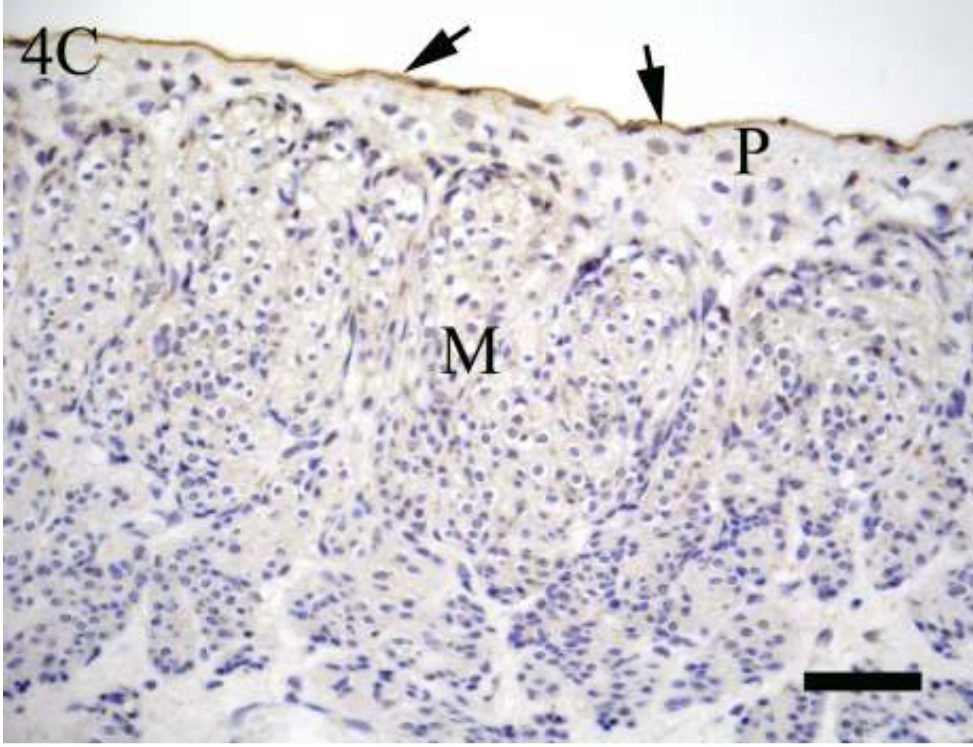
Laminin lokalizasyonu; Folliküler dönemde, laminin reaksiyonu yüzey, kript ve bez epitelinde görülemedi (Şekil 4A, B). Myometriyumun düz kasları ve perimetriyumda soluk bir reaksiyon görülürken mezotel hücrelerde reaksiyon şiddetliydi (Şekil 4C). Endometriyal damarlar lamininle negatif reaksiyon verirken, vasküler katmandaki damarların endotel ve subendoteli orta derecede pozitif damar düz kasları soluk reaksiyon gösterdi. Bağ doku hücrelerinin büyük çoğunda negatif reaksiyon, çok az sayıda hücre ve bağdoku ipliği ile eozinofilik granüllü hücrelerde hafif derecede immün reaksiyon görüldü.



Şekil 4A. Folliküler dönemde yüzey epitelinde (E) ve kriptlerde (K) laminin negatif reaksiyon bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

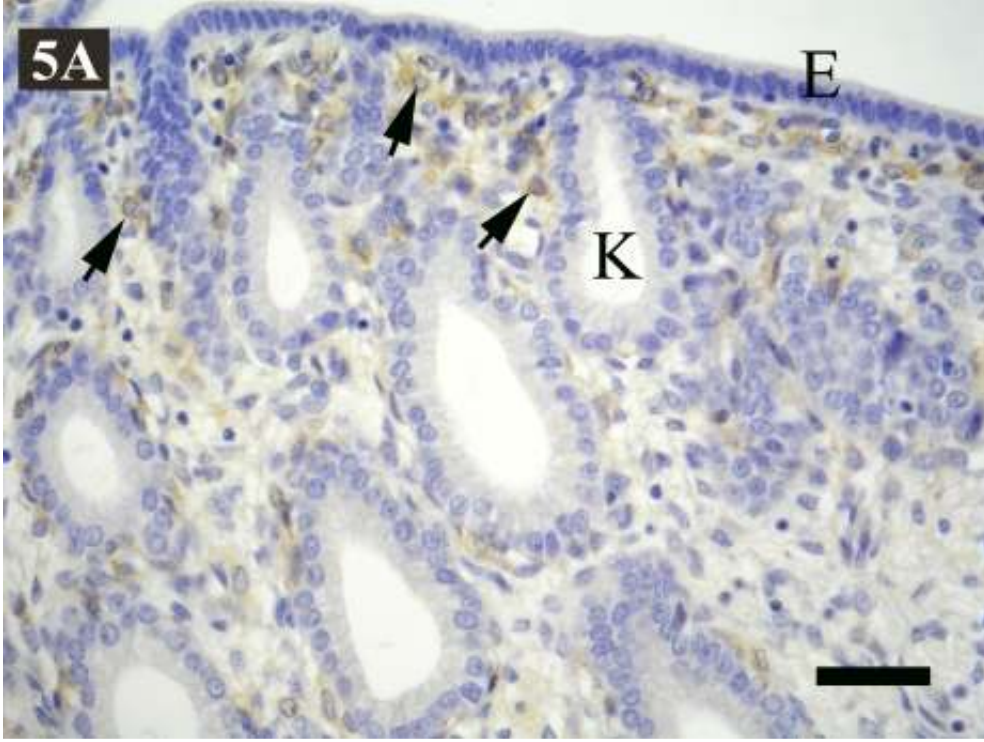


Şekil 4B. Folliküler dönemde bez epitelinde (B) laminin negatif reaksiyon, endometriyal damarlar (yeşil ok) bar 25 µm, immunperoksidaz, DAB.

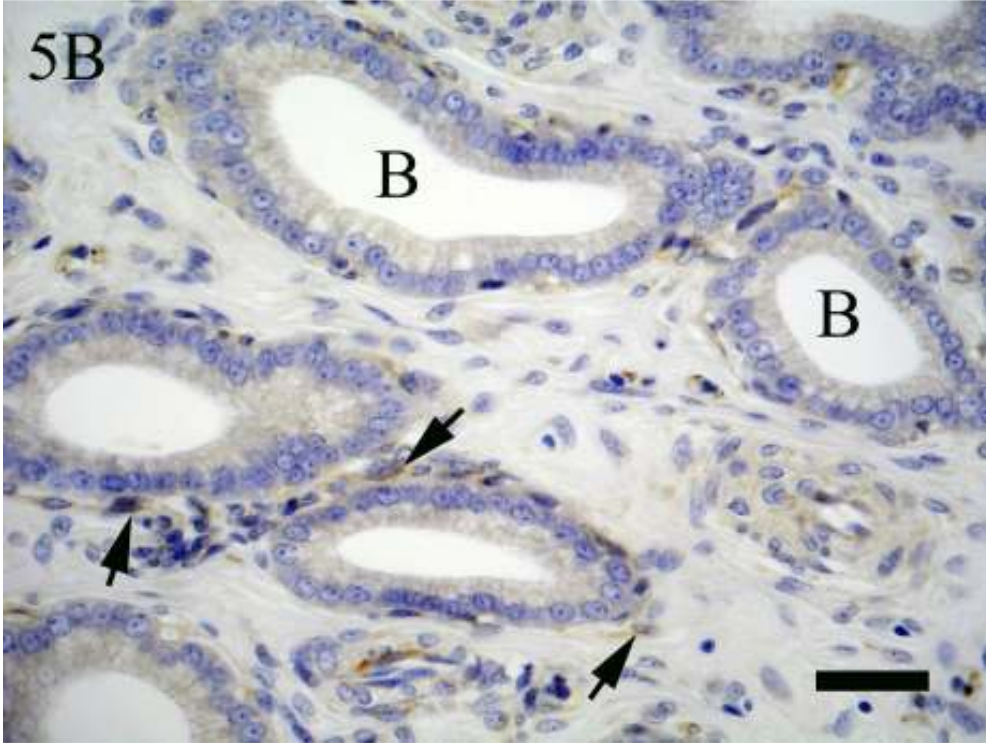


Şekil 4C. Folliküler dönemde Myometriyum (M), perimetriyum (P) ve mezotelde laminin reaksiyonu (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

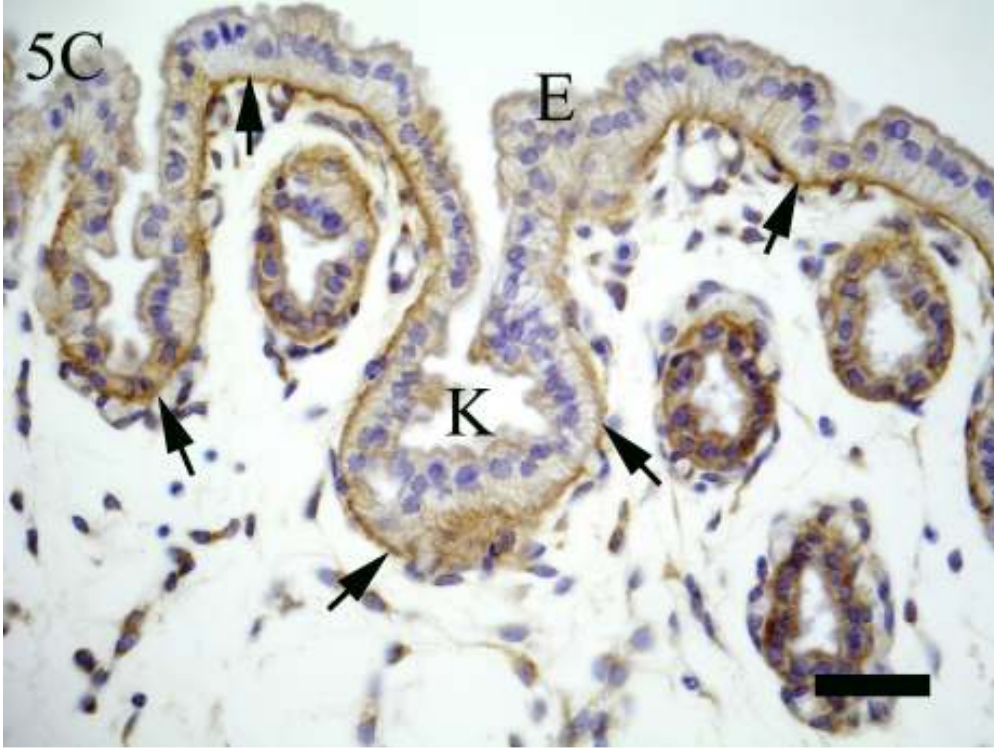
Erken luteal dönemde yüzey ve kript epitel hücrelerinde laminin reaksiyonu görülemedi. Pozitif reaksiyon epitelin hemen altındaki lamina propiia bölgesinde orta derecede yoğunlukta ve sıklıkla, kriptler ve bazal bezler civarında ise seyrek olarak belirlendi (Şekil 5A, B). Geç luteal dönemde yüzey ve kript epitel hücrelerinin bazal membranı yoğun, apikal membranı orta derecede pozitif reaksiyon gösterirken (Şekil 5C), bezlerin bazal ve apikal membranlarında reaksiyon şiddetliydi (Şekil 5D). Myometriyumdaki reaksiyon luteal dönemin başlangıcında orta derecede son döneminde ise özellikle perimetriyuma bitişik alanlarda şiddetliydi. Vasküler katmanın subendotelinde şiddetli reaksiyon görüldü (Şekil 5E).



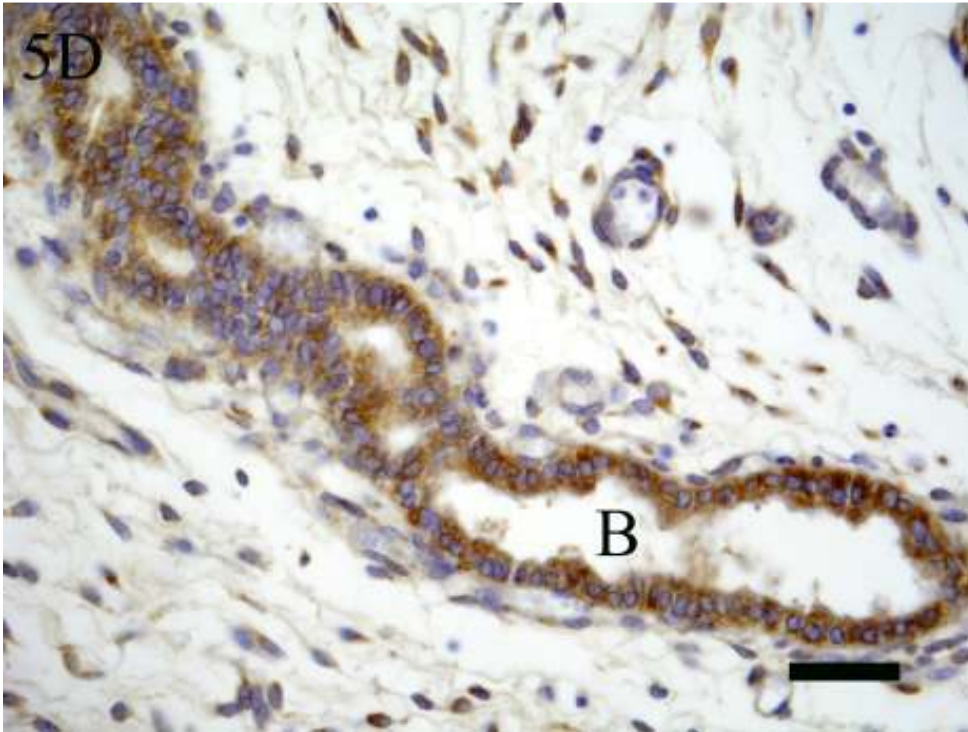
Şekil 5A. Erken luteal dönemde endometriyumdaki laminin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K), bağ dokudaki pozitif hücreler (siyah oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



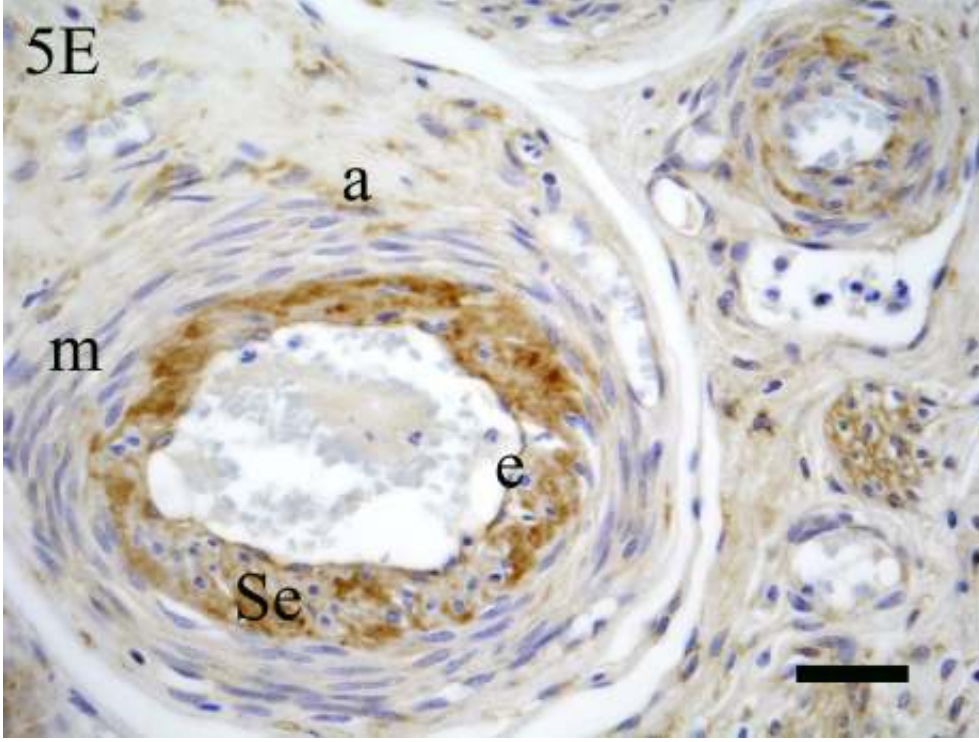
Şekil 5B. Erken luteal dönemde laminin reaksiyonu, bazal bezler (B), bağ dokudaki pozitif reaksiyonlu hücreler (siyah oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 5C. Geç luteal dönemde laminin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K), bezler (B), bazal membranda pozitif reaksiyon (siyah oklar), bar 25 μ m, immunperoksidaz, DAB.

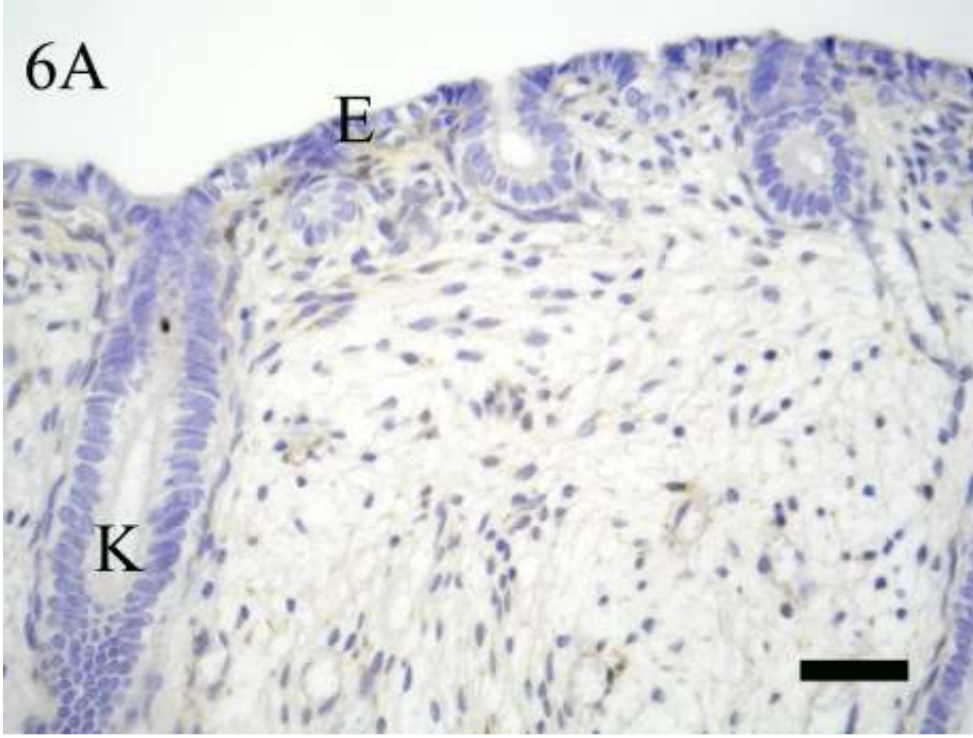


Şekil 5D. Geç luteal dönemde bezlerde (B) laminin reaksiyonu, bar 25 μ m, immunperoksidaz, DAB.

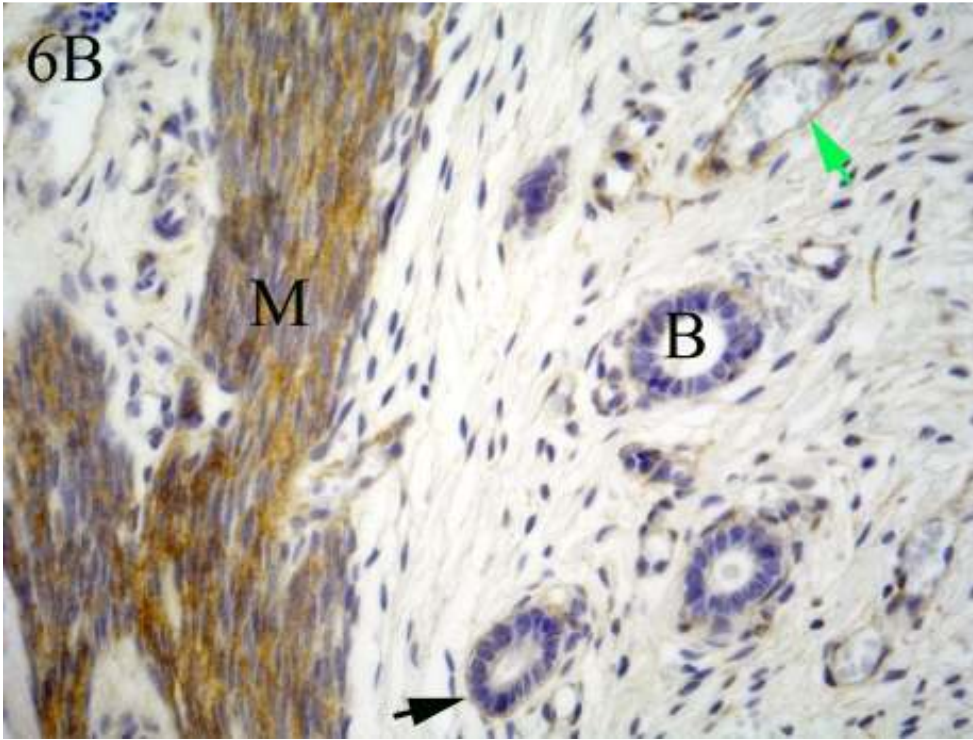


Şekil 5E. Geç luteal dönemde vasküler katmandaki damarlarda laminin reaksiyonu, endotel (e), subendotel (Se), mediya (m), adventisya (a), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

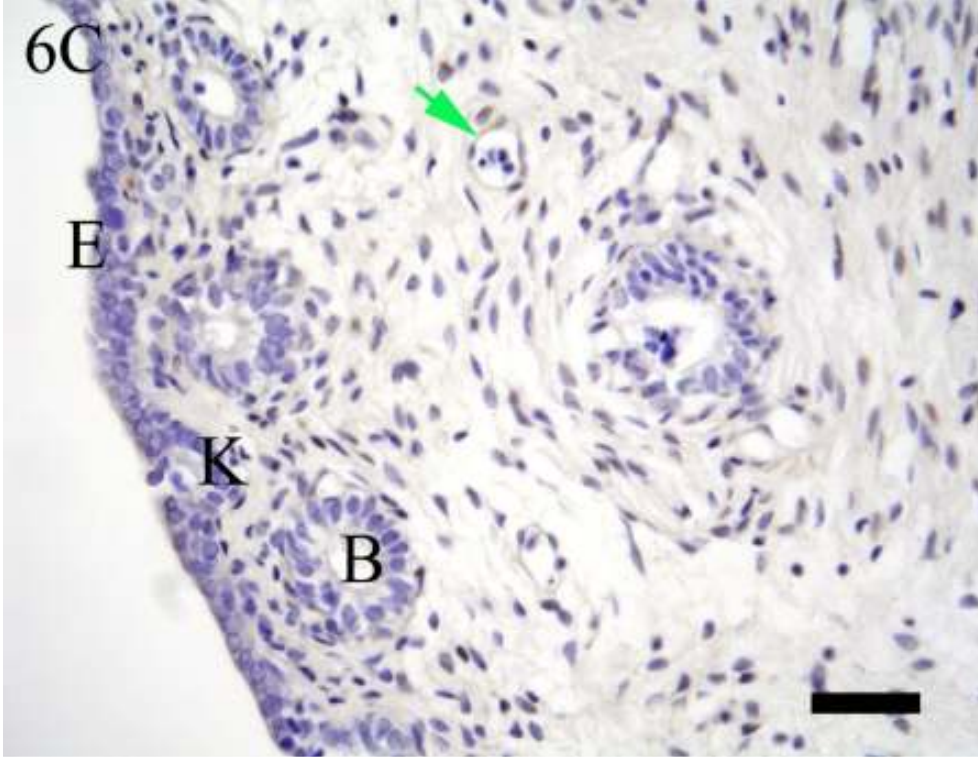
Erken anöstrus dönemi lamininin yüzey ve kript epitelinde lokalizasyonu açısından folliküler ve erken luteal dönem ile uyumlu olarak değerlendirildi (Şekil 5A, 6A). Erken luteal döneme göre lamina propria katmanında pozitif reaksiyon gösteren alan anöstral dönemde daha incelmıştır (Şekil 6A). Anöstrusun erken dönemlerinde bezlerin bazal membranında zayıf bir reaksiyon görülürken reaksiyonun şiddeti geç dönemlerde yer yer negatif bile sayılacak derecede oldukça zayıflamıştır (Şekil 6B, D). Anöstrus dönemi boyunca myometriyumda laminin reaksiyonu oldukça güçlü olarak görülmüştür (Şekil 6B).



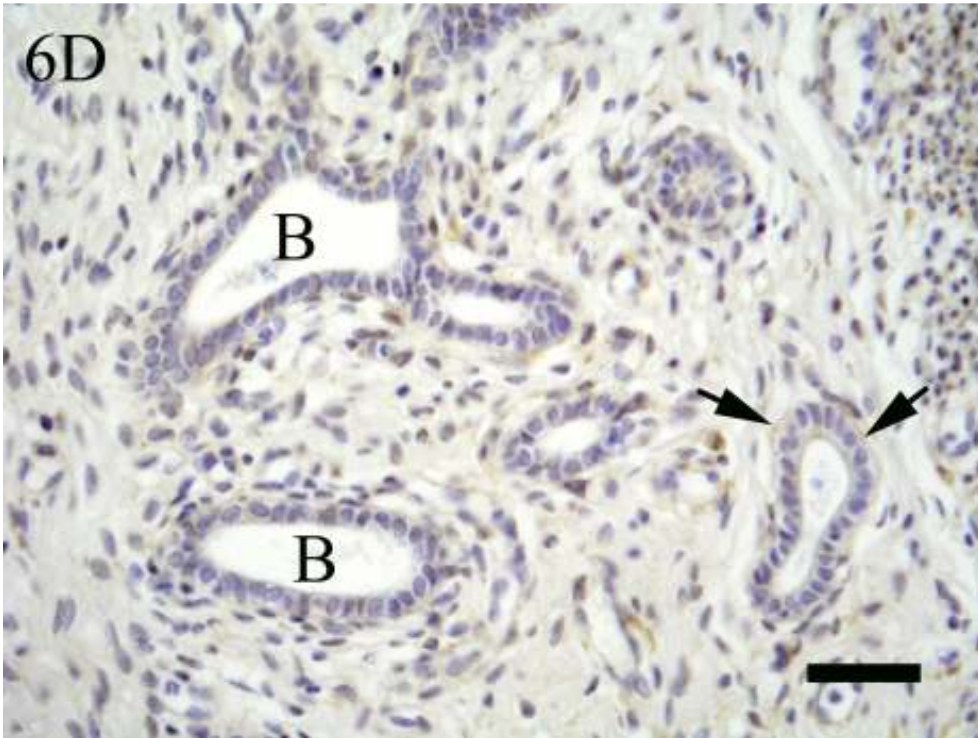
Şekil 6A. Erken anöstral dönemde endometriyumda laminin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), Kript (K) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 6B. Erken anöstral dönemde, bezler (B) etrafında laminin reaksiyonu (siyah oklar), myometriyum (M) endometriyal damarlar (yeşil oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 6C. Geç anöstral dönemde, yüzey epiteli (E), Kript (K), endometriyal damarlarda (yeşil oklar) laminin negatif reaksiyon, bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

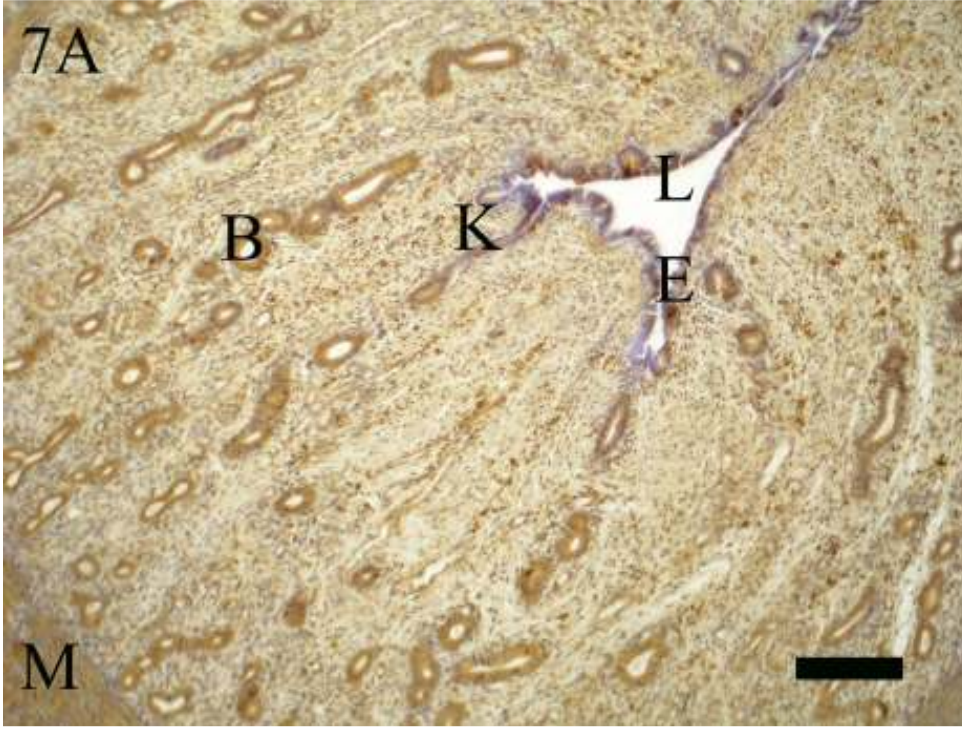


Şekil 6D. Geç anöstral dönemde bezler (B) etrafında laminin reaksiyonu (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

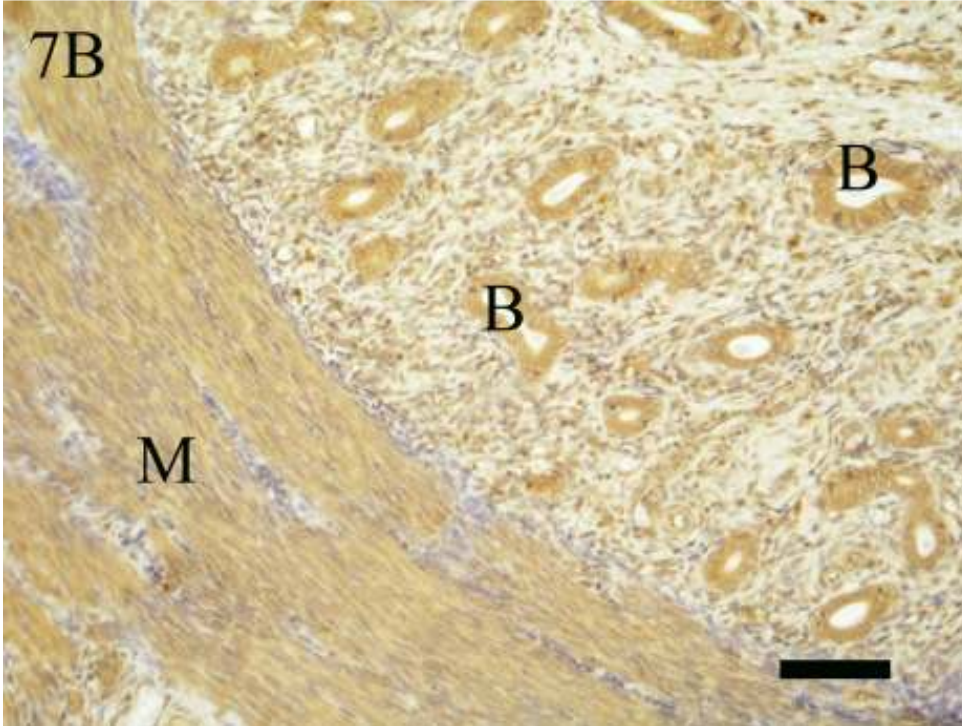
Uterusda Laminin reaksiyonun görüldüğü alanlar		Foliküler Dönem	Luteal Dönem		Anöstrus	
			Erken D.	Geç D.	Erken D.	Geç D.
Yüzey Epiteli	<i>Bazal Membran</i>	-	-	+++	-	-
		-	-	-	-	-
	<i>Apikal Membran</i>	-	-	++	-	-
Kript Epiteli	<i>Bazal Membran</i>	-	-	+++	-	-
		-	-	-	-	-
	<i>Apikal Membran</i>	-	-	++	-	-
Bez Epiteli	<i>Bazal Membran</i>	+	+	+++	+	+
		-	-	+++	-	-
	<i>Apikal Membran</i>	-	-	+++	-	+
Myometriyum		+	++	+++	+++	+++
Perimetriyum		+	+	+	+	+
<i>Mezotel</i>		+++	+++	+++	+++	+++
Damarlar	Endotel	++	++	+++	++	++
	Subendotel	++	++	+++	++	++
	Mediya	+	+	++	+	++
	Adventisya	+	+	++	+	+

Tablo 2. Östrus siklusunun farklı dönemlerinde köpek uterusunda laminin lokalizasyonu. İmmunoreaksiyonun derecelendirilmesi: negatif; (-), soluk boyanma; (+), orta derecede boyanma; (++) , güçlü boyanma; (+++) olarak gösterildi.

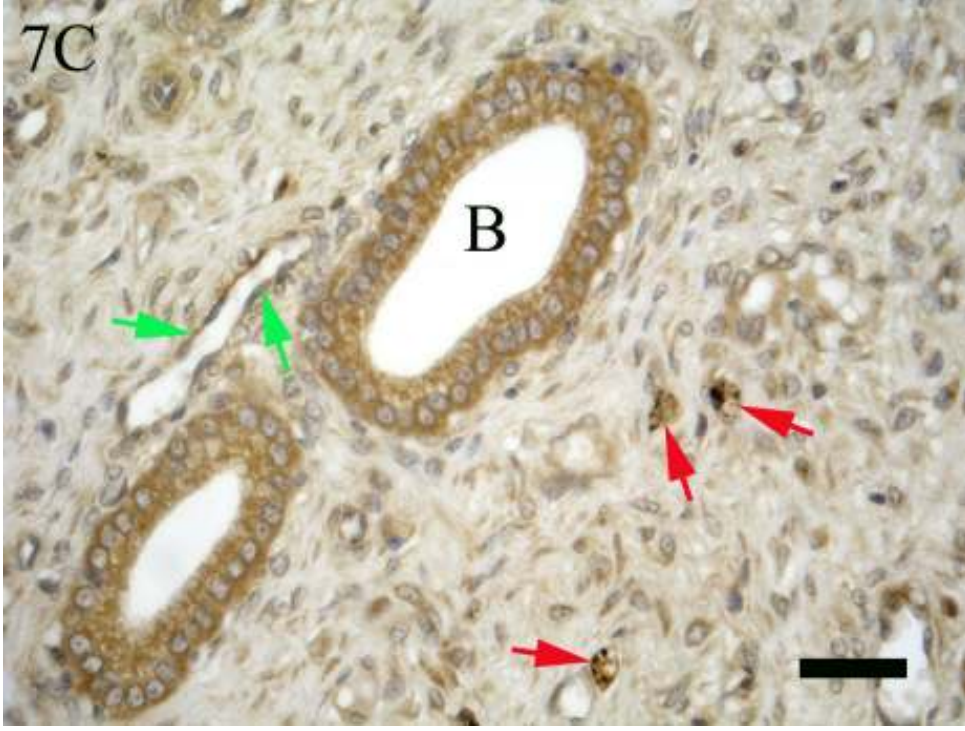
Fibronektin lokalizasyonu; Fibronektinin epitel, bağdoku ve myometriyum hücrelerinin sitoplazması ile bağdoku ipliklerini boyadığı belirlendi. Foliküler dönemde yüzey epitel hücrelerinin sitoplazması yer yer negatif ve pozitif reaksiyon gösterdi. Kript epitelinin apikal sitoplazmasında reaksiyonun şiddeti yoğun (Şekil 7A, B). Foliküler dönemde pozitif reaksiyonlu sitoplazma çekirdekleri örtemediği (Şekil 7C) halde luteal dönemde çekirdekleri tamamen örtmüş ancak seyrek olarak da negatif reaksiyonlu çekirdekler görülmüştür (Şekil 8A, B). Bez epitel hücreleri, bağ doku hücreleri ile ipliklerinde orta derecede (Şekil 7C) myometriyum, perimetriyum ve damarlarda yoğun reaksiyon görülmüştür (Şekil 7D, E). Luteal dönemde yüzey ve kript epitel, bağ doku iplikleri ve hücreleri yoğun pozitif reaksiyon göstermektedir. Erken luteal dönemde epitel hücrelerinin bazal ve apikal sitoplazmasında reaksiyonun oldukça şiddetli olduğu belirlenmiştir (Şekil 8A, B).



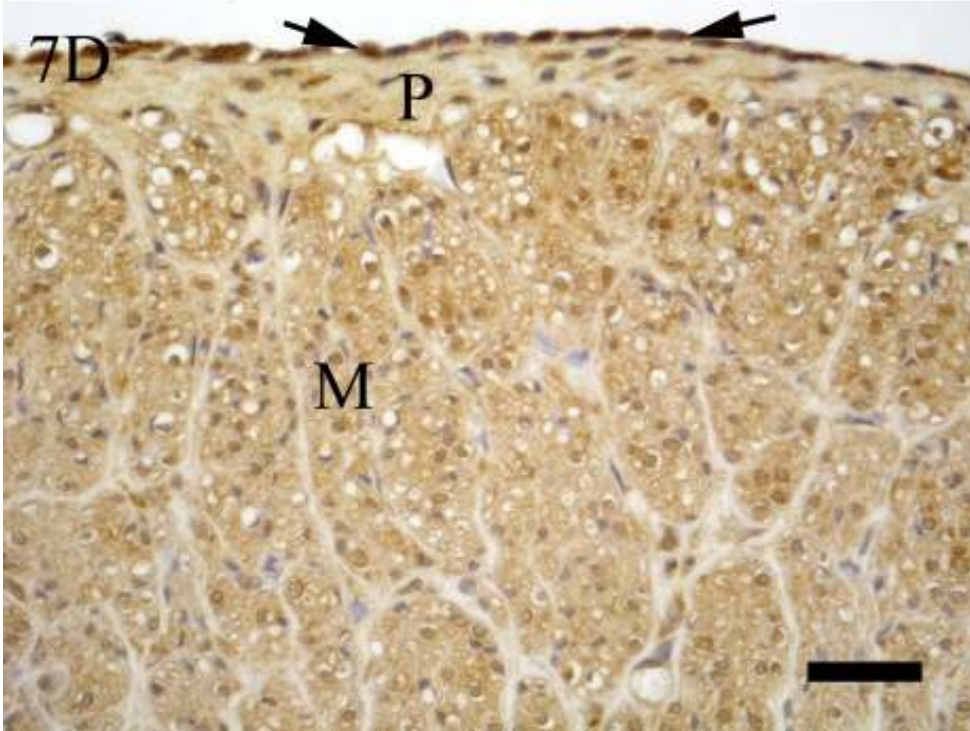
Şekil 7A. Folliküler dönemde endometriyumda fibronektin reaksiyonu, uterus lumeni (L), yüzey epiteli (E), kript (K), bezler (B), myometriyum (M), bar 50µm, immunperoksidaz, DAB.



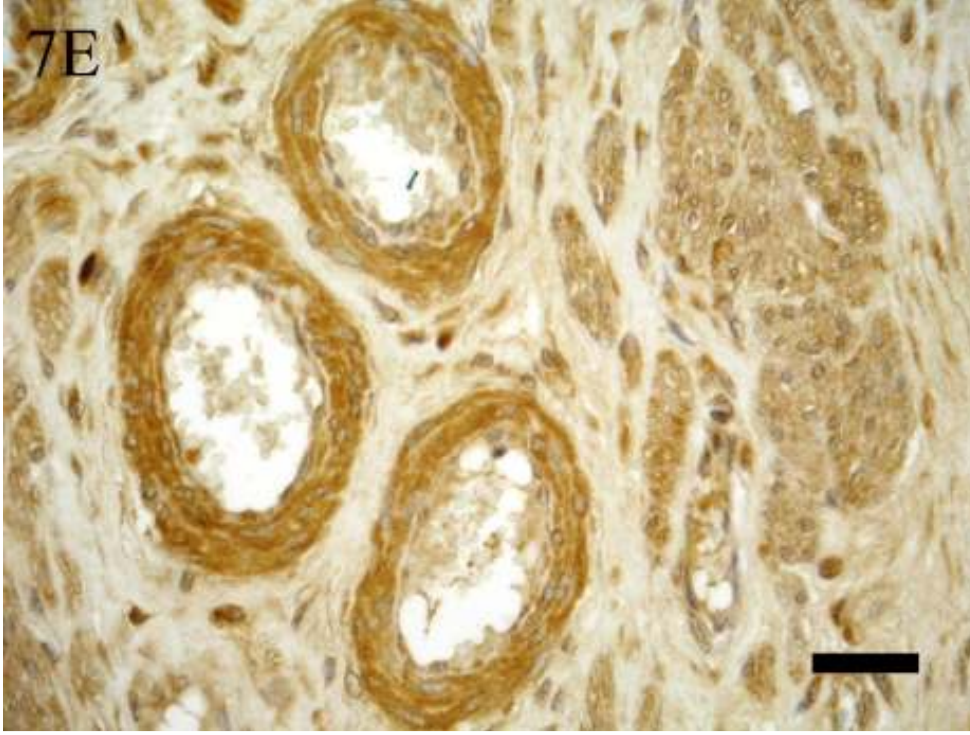
Şekil 7B. Folliküler dönemde bezler (B) ve myometriyumda (M) fibronektin reaksiyonu, bar 50 µm, immunperoksidaz, DAB.



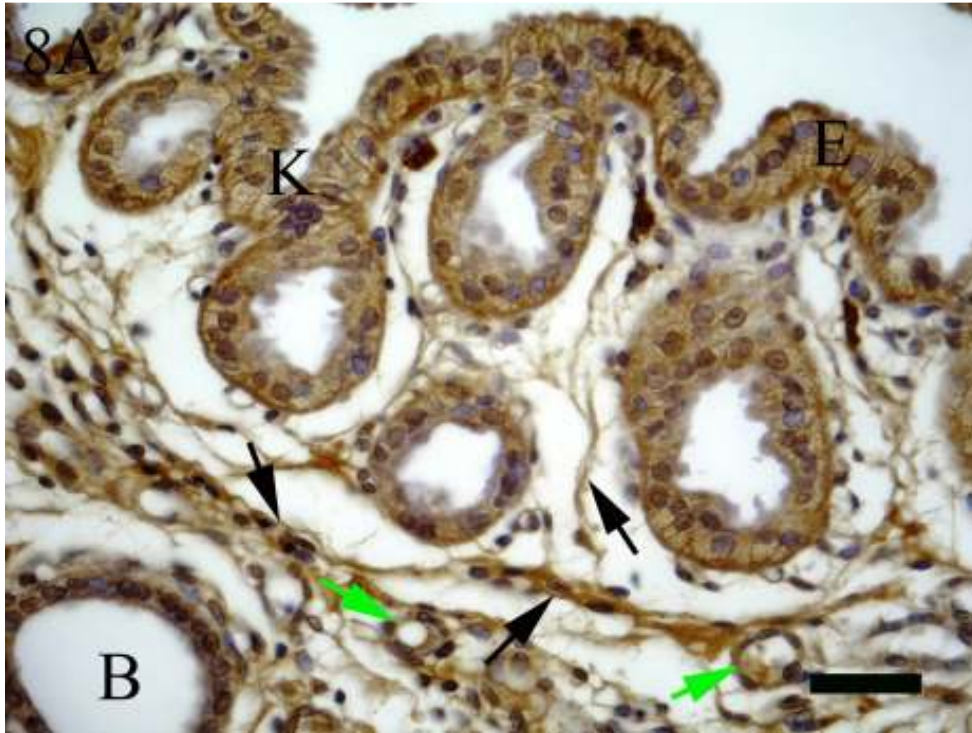
Şekil 7C. Folliküler dönemde endometriyumda fibronektin reaksiyonu, bezler (B), endometriyal damarlar (yeşil oklar), eozinofilik granüllü hücreler (kırmızı oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



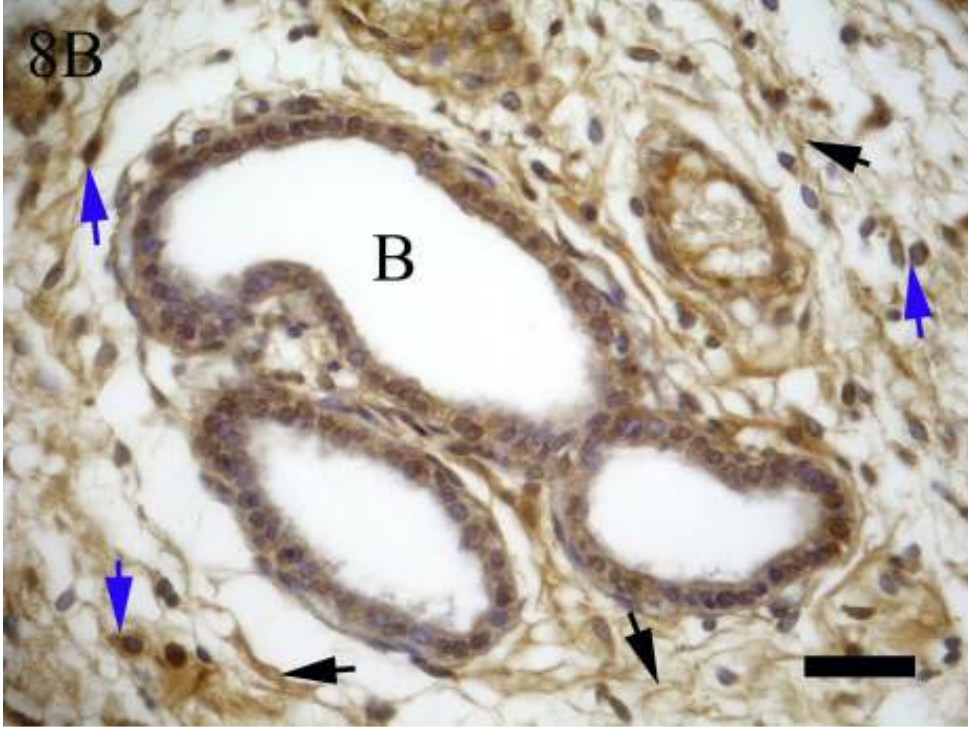
Şekil 7D. Folliküler Dönemde myometriyum (M), perimetriyum (P) ve mezotel hücrelerinde (siyah oklar) fibronektin reaksiyonu, bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



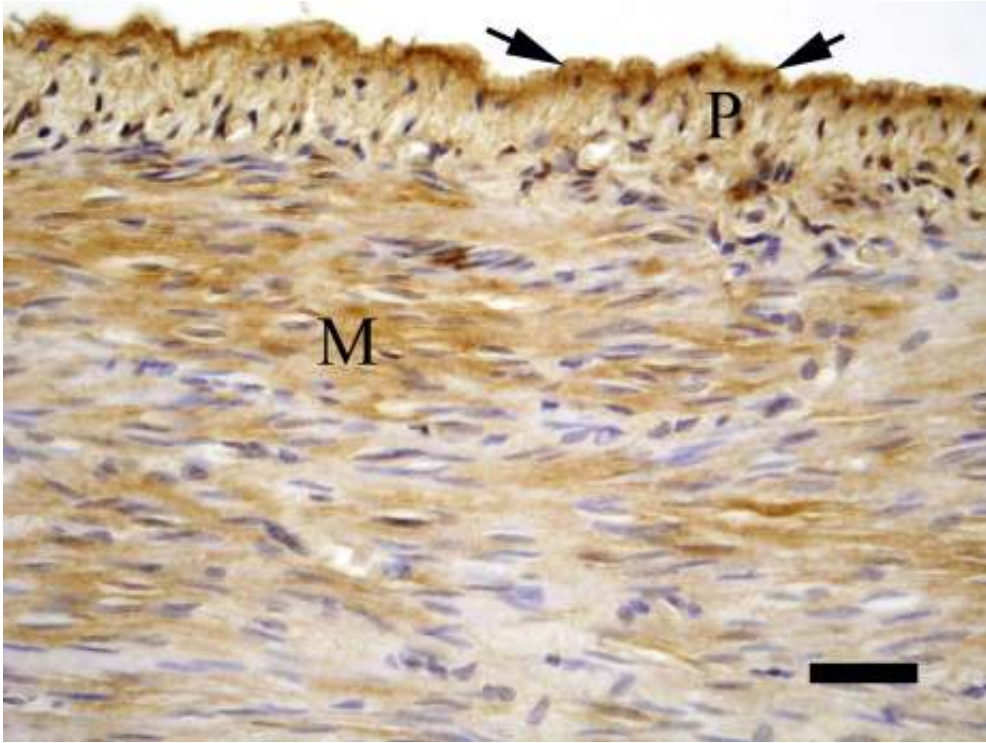
Şekil 7E. Folliküler dönemde vasküler katman damarlarında fibronektin reaksiyonu bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 8A. Erken luteal dönemde endometriyumda fibronektin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K), pozitif reaksiyon gösteren bağ doku hücre ve iplikleri (siyah oklar), endometriyal damarlar (yeşil oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

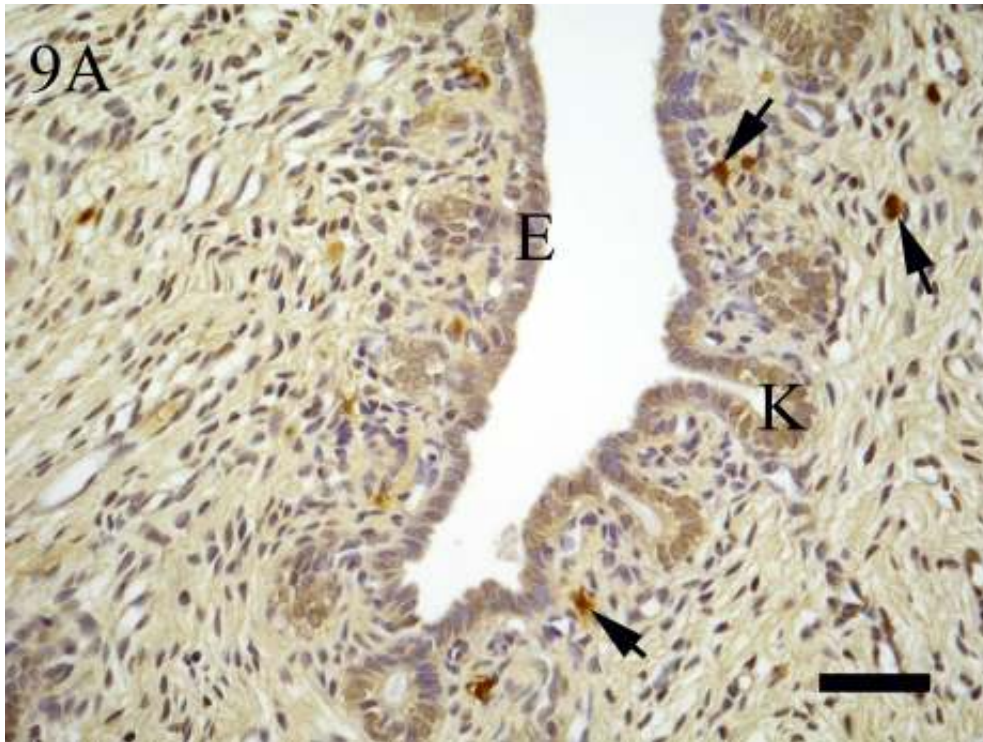


Şekil 8B. Geç luteal dönemde fibronektin reaksiyonu, bezler (B), pozitif reaksiyon gösteren bağdoku hücreleri (mavi oklar), pozitif reaksiyon gösteren bağ doku iplikleri (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

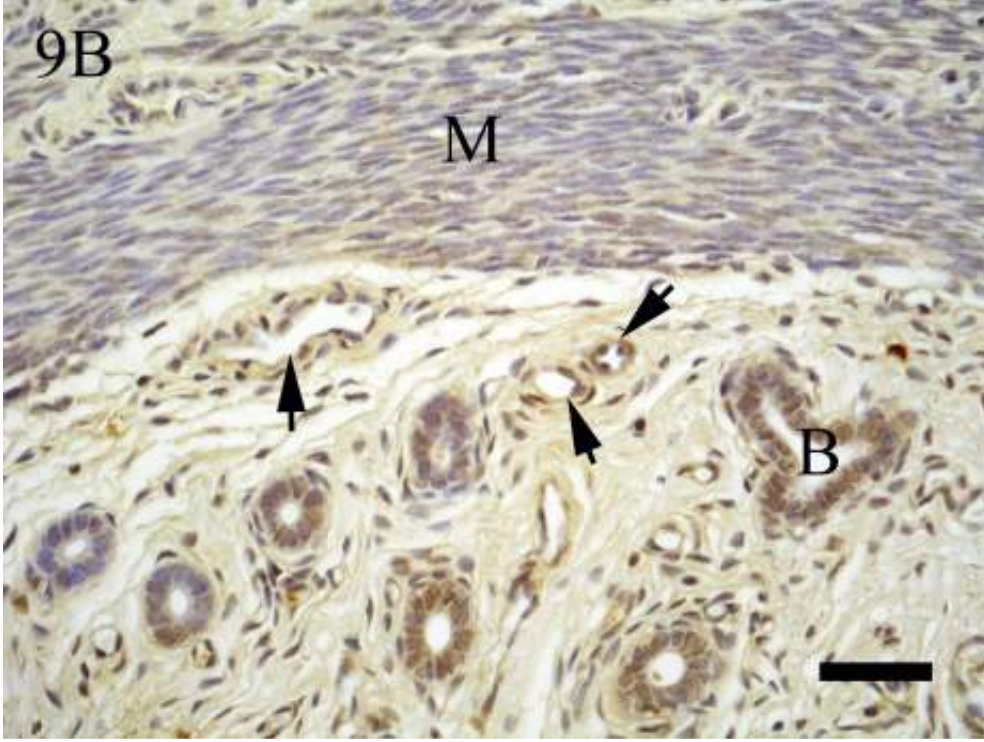


Şekil 8C. Geç luteal dönemde myometriyum (M), perimetriyum (P) ve mezotelyumda (siyah oklar) fibronektin reaksiyonu, bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

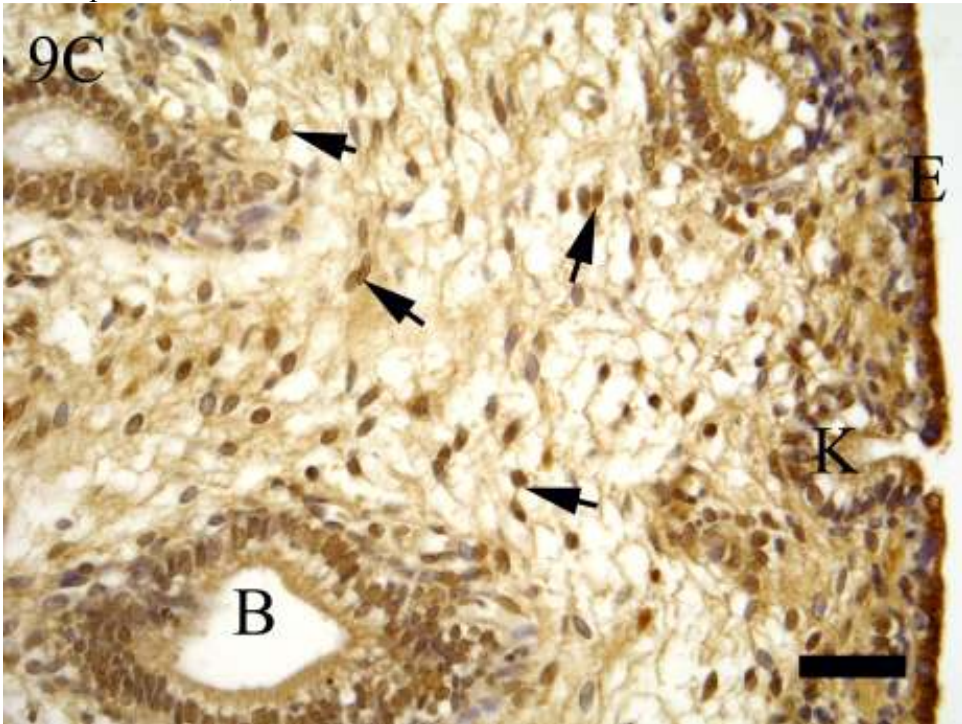
Anöstrusun erken dönemlerinde yüzey epitelindeki reaksiyon folliküler döneme benzerlik göstermekteydi. Reaksiyonun şiddeti, folliküler ve luteal dönemlere oranla daha zayıf olarak belirlendi. Yüzey epitelinde yer yer, kriptlerin boyun kısımlarında ise boyanmamış çekirdekli hücreler görüldü. Kriptlerin taban kısmındaki hücrelerde orta derecede bir reaksiyon belirlendi (Şekil 9A). Kript epitelinin apikal sitoplazması orta derecede pozitif reaksiyon göstermişti. Anöstrusta stromaya hakim olan bağdokuda, pozitif reaksiyonlu hücreler ve ipliklerin çoğunlukta olduğu görüldü. Erken anöstrusta bazal bezlerin bir kısmında ve kasların çekirdeklerinde negatif reaksiyon belirlendi. (Şekil 9B). Geç anöstrus döneminde epitelde görülen hipertrofik hücrelerde fibronektin reaksiyonu görülemedi. Kript epitelinde apikal sitoplazmada çok dar bir alanda orta derecede reaksiyon (Şekil 9C) stromada çok sayıda negatif reaksiyonlu hücre belirlendi (Şekil 9D).



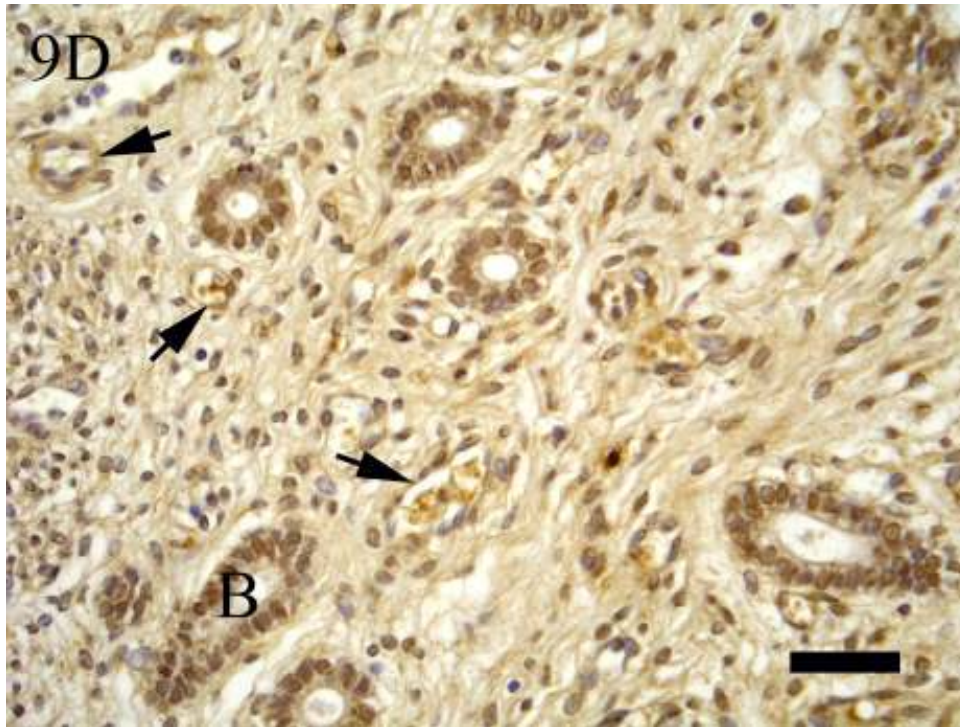
Şekil 9A. Erken Anöstrus döneminde endometriyumda fibronektin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K), pozitif reaksiyonlu hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 9B. Erken anöstrus döneminde endometriyum ve myometriyumda fibronektin reaksiyonu, bezler (B), myometriyum (M), endometriyal damarlar (siyah oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 9C. Geç anöstrus döneminde endometriyumda fibronektin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K), pozitif reaksiyonlu hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

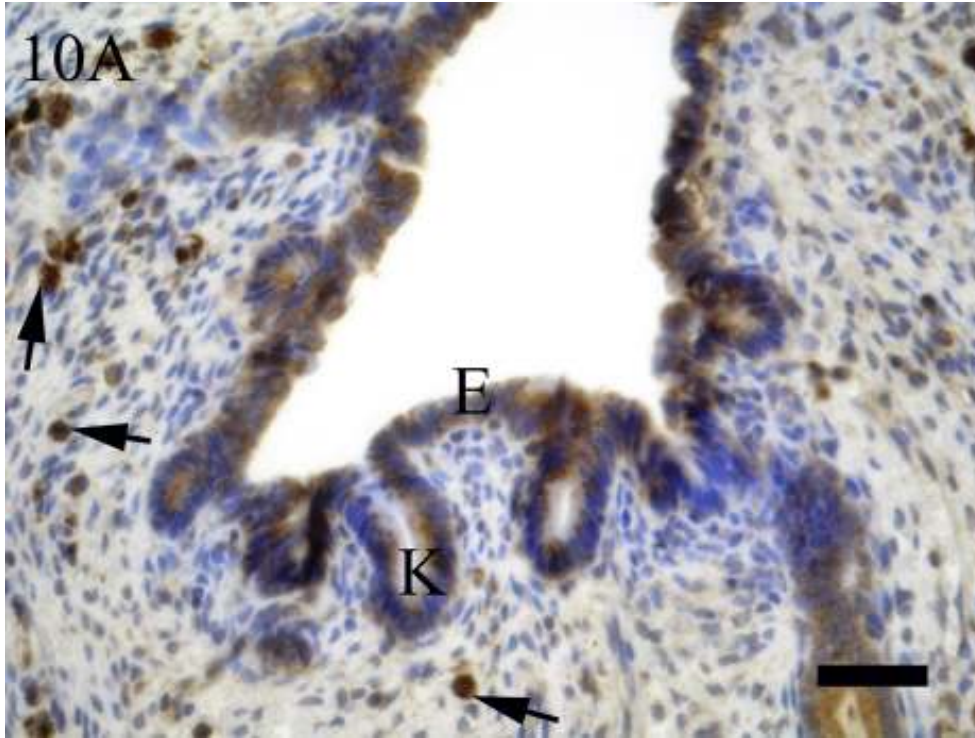


Şekil 9D. Geç anöstrus döneminde endometriyumda fibronektin reaksiyonu, bezler (B), endometriyal damarlar (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

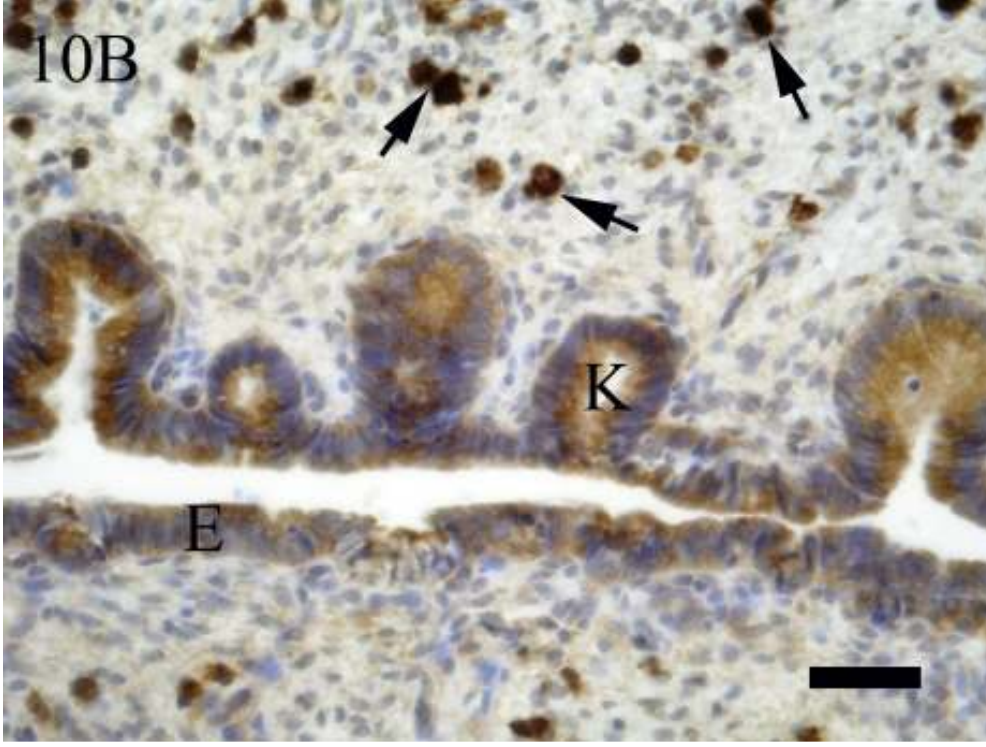
Uterusda Fibronektin reaksiyonun görüldüğü alanlar		Foliküler Dönem	Luteal Dönem		Anöstral Dönem	
			<i>Erken D.</i>	<i>Geç D.</i>	<i>Erken D.</i>	<i>Geç D.</i>
Yüzey Epiteli		- / ++	+++	+++	- / ++	- / ++
Kript Epiteli		++	+++	+++	++	++
Bez Epiteli		++	+++	+++	- / ++	++
Bağdoku hücreleri		++	+++	+++	++	++
Stroma						
Bağdoku iplikleri		++	+++	+++	++	++
Myometriyum		+++	+++	+++	++	++
Perimetriyum		+++	+++	+++	+++	+++
Damarlar	Endotel	+++	+++	+++	+++	+++
	subendotel	++	++	++	++	++
	Mediya	+++	+++	+++	+++	+++
	Adventisya	++	++	++	++	+++

Tablo 3. Östrus siklusunun farklı dönemlerinde köpek uterusunda fibronektin lokalizasyonu. İmmunoreaksiyonun derecelendirilmesi: negatif; -, soluk boyanma; +, orta derecede boyanma; ++, güçlü boyanma; +++ olarak gösterildi.

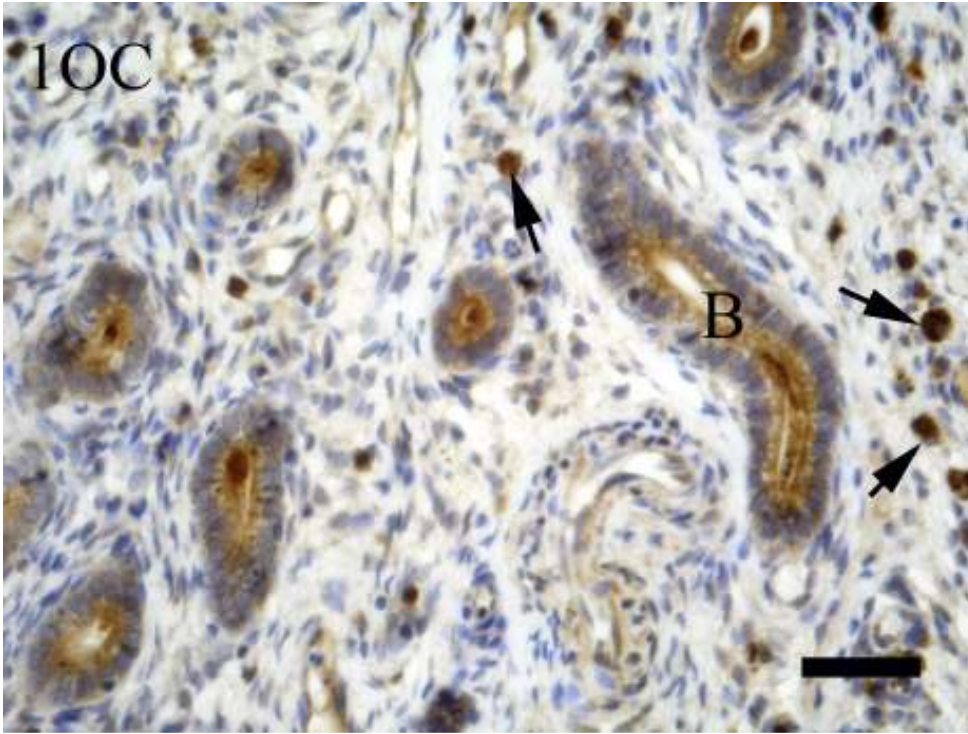
Osteopontin lokalizasyonu, Folliküler dönemde endometriyum yüzey epitelinde hücrelerin apikal sitoplazmasında orta derecede, çekirdeklerde ise negatif reaksiyon görüldü (Şekil 10A, B). Yüzey epitelinin hemen altındaki ve myometriyumun üzerindeki stroma alanında negatif reaksiyonlu bağdoku hücrelerinden oluşmuş bir tabaka gözlemlendi (Şekil10A, B, D). Endometriyumdaki eozinofilik granüllü stromal hücrelerde reaksiyon şiddetli olarak belirlendi (Şekil10A, B, C, D). Uterus bez epitelinde reaksiyon kript ve yüzey epiteline göre daha şiddetliydi (Şekil10 C, D). Kriptler ve bezler etrafları negatif reaksiyonlu stromal hücrelerle sarılmış olarak görüldü (Şekil10A, B, C). Uterus bezlerinden bir kısmında lumenindeki az miktarda salgıda osteopontin pozitif reaksiyon görüldü. Folliküler ve erken luteal dönemde epitel hücrelerinin çekirdekleri boyanmadığı halde (Şekil10A, B, C, Şekil11A, B) geç luteal dönemde çekirdeklerin boyandığı dikkati çekti (Şekil 11E, F). Geç luteal dönemde bezlerin salgısı da yoğun olarak boyanmıştı (Şekil 11F).



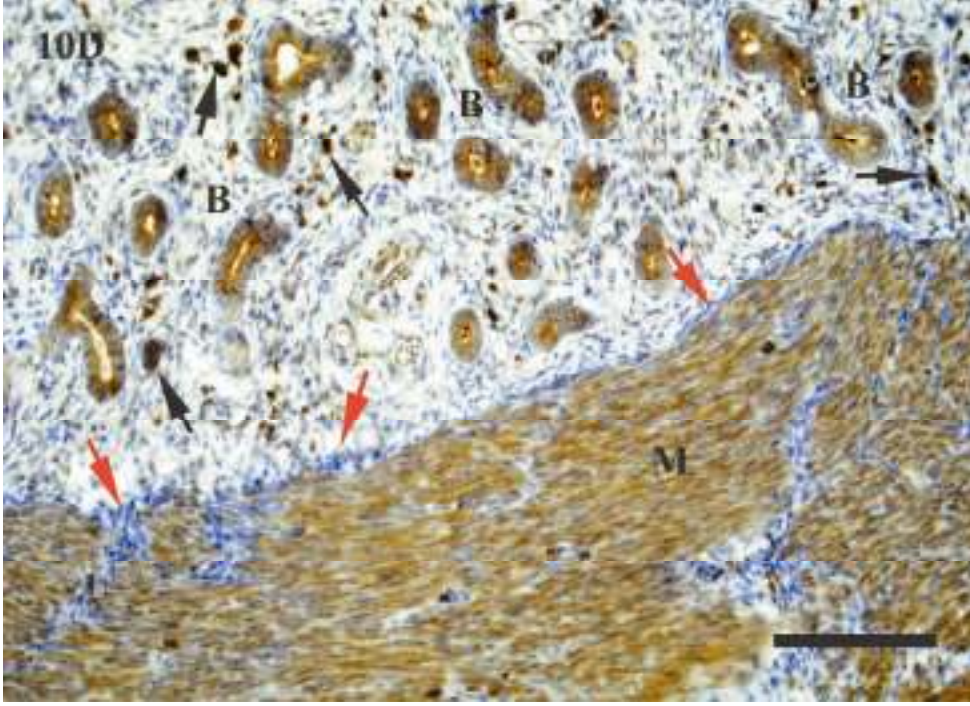
Şekil 10A. Folliküler dönemde endometriyumda osteopontin reaksiyonu, uterus lumeni (L), yüzey epiteli (E), kript (K), eozinofilik granüllü hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



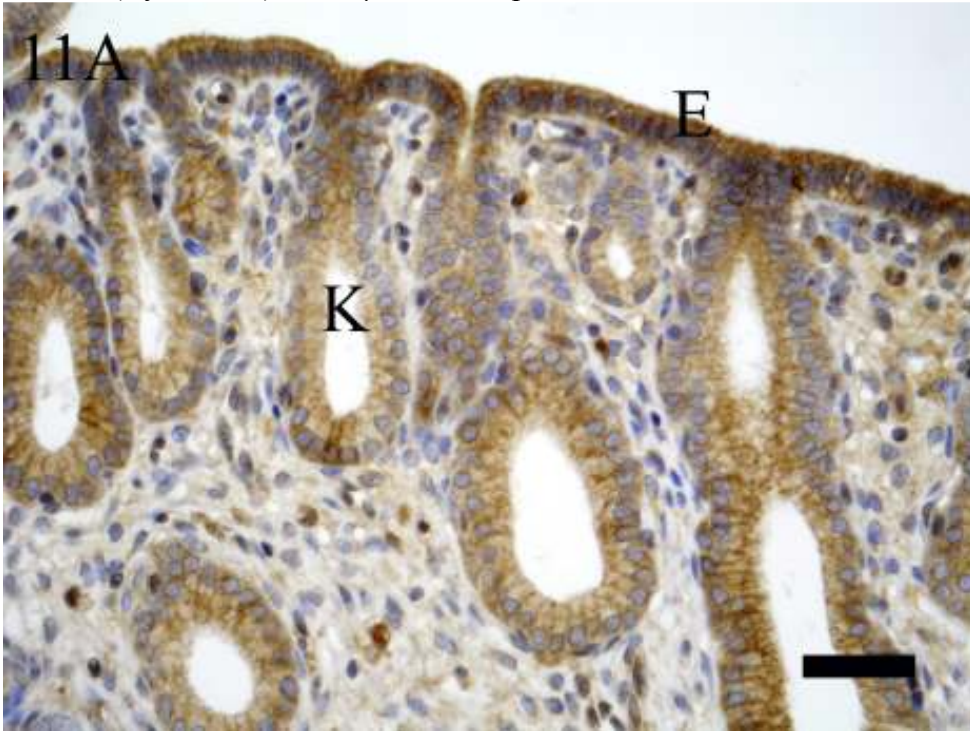
Şekil 10B. Folliküler Dönemde endometriyumda osteopontin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K), eozinofilik granüllü hücreler (siyah oklar), bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



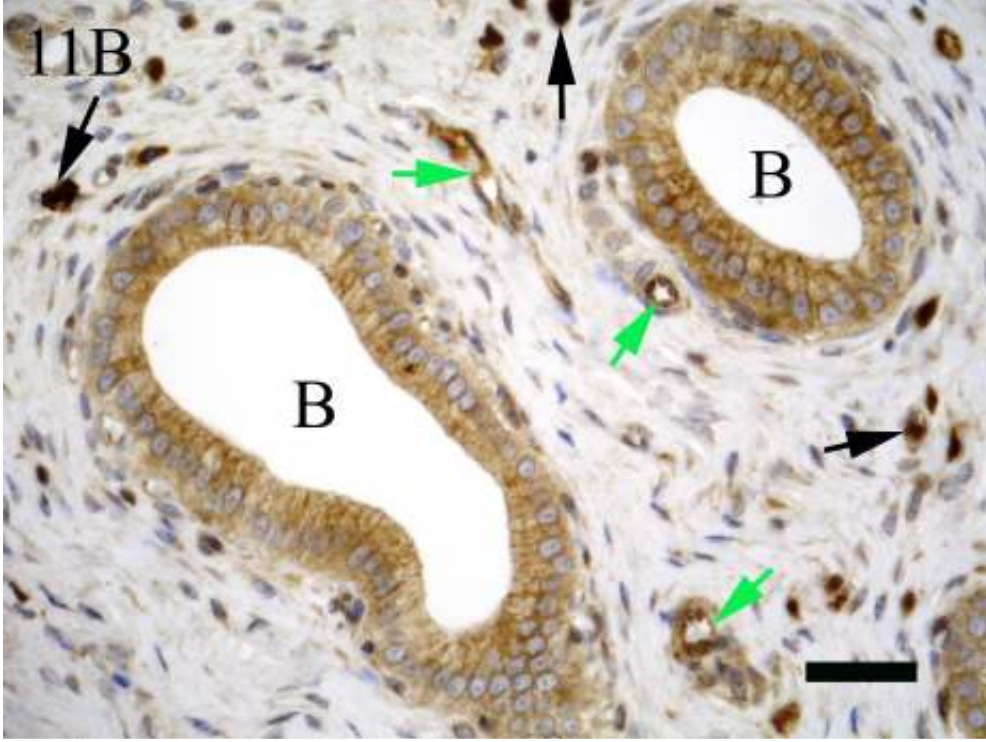
Şekil 10C. Folliküler dönemde endometriyumda osteopontin reaksiyonu, bezler (B), eozinofilik granüllü hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



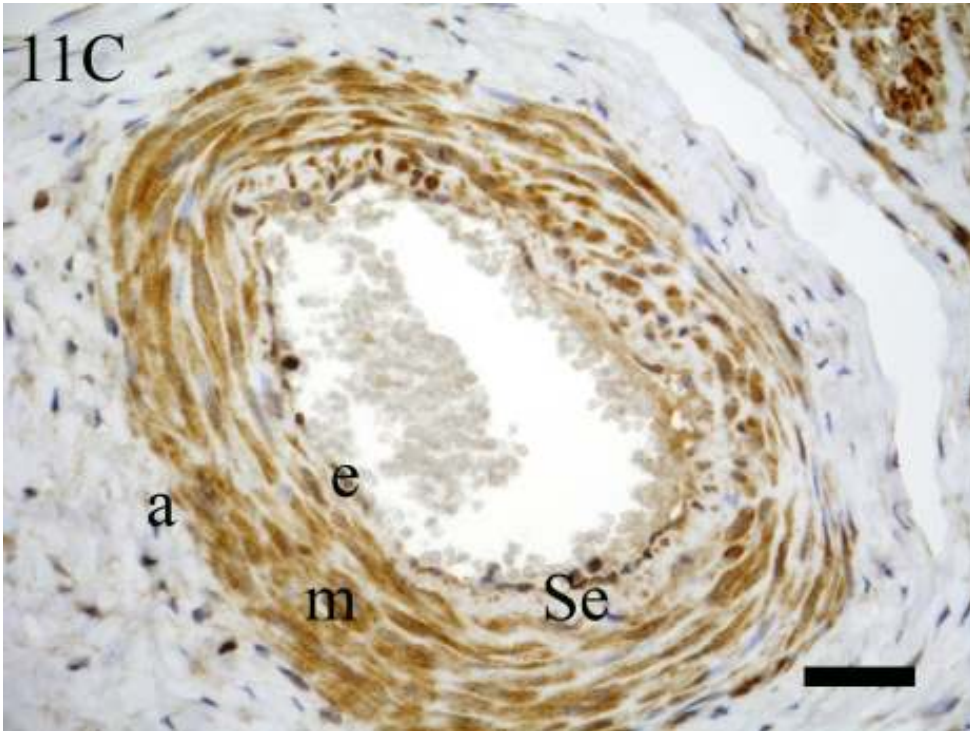
Şekil 10D. Folliküler dönemde endometriyum ve myometriyumda osteopontin reaksiyonu, bezler (B), myometriyum (M), negatif reaksiyonlu alan (kırmızı oklar), eozinofilik granüllü hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



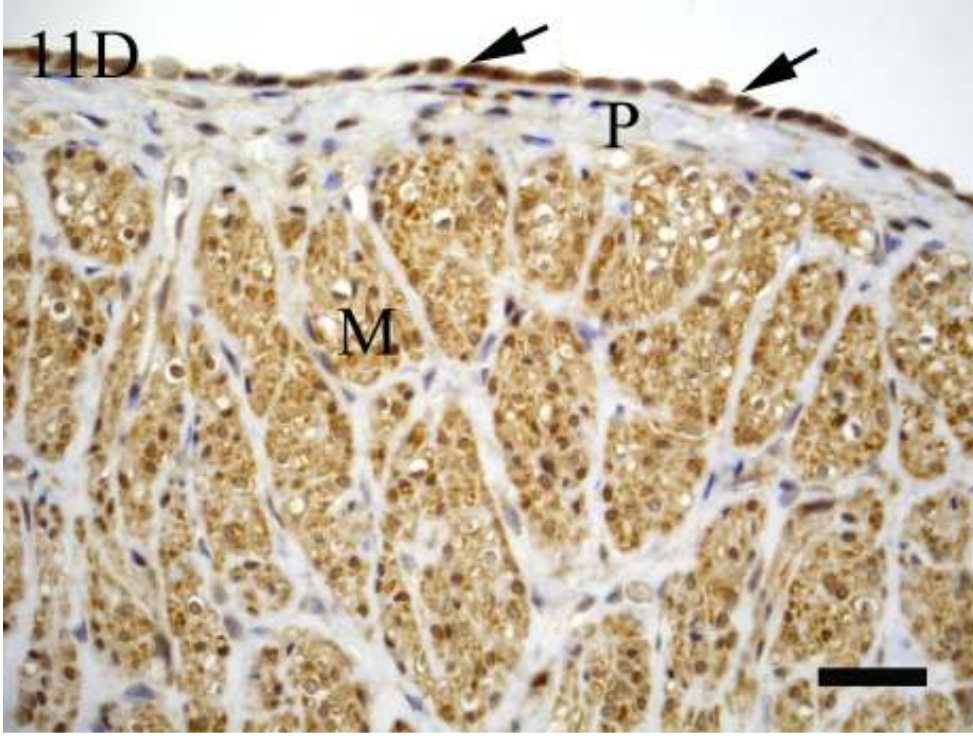
Şekil 11A. Erken Luteal dönemde osteopontin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



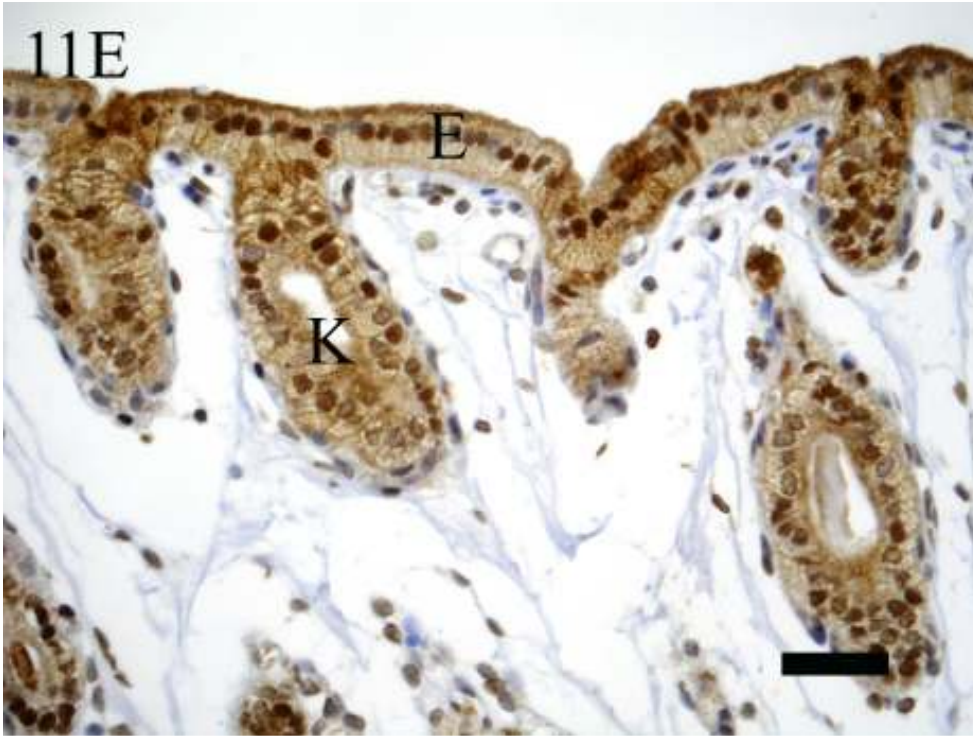
Şekil11B.Erken luteal dönemde osteopontin reaksiyonu, bezler (B), endometriyal damarlar (yeşil oklar), eozinofilik granüllü stromal hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



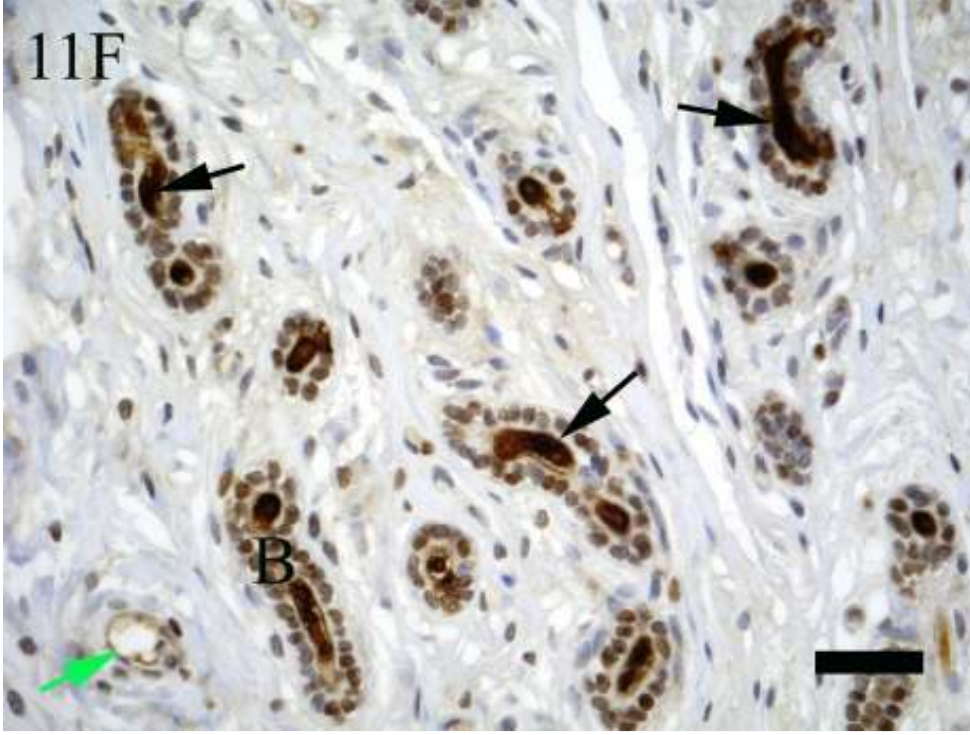
Şekil 11C. Erken luteal dönemde damarlarda osteopontin reaksiyonu, endotel (e), subendotel (se), mediya (m), adventisya (a) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



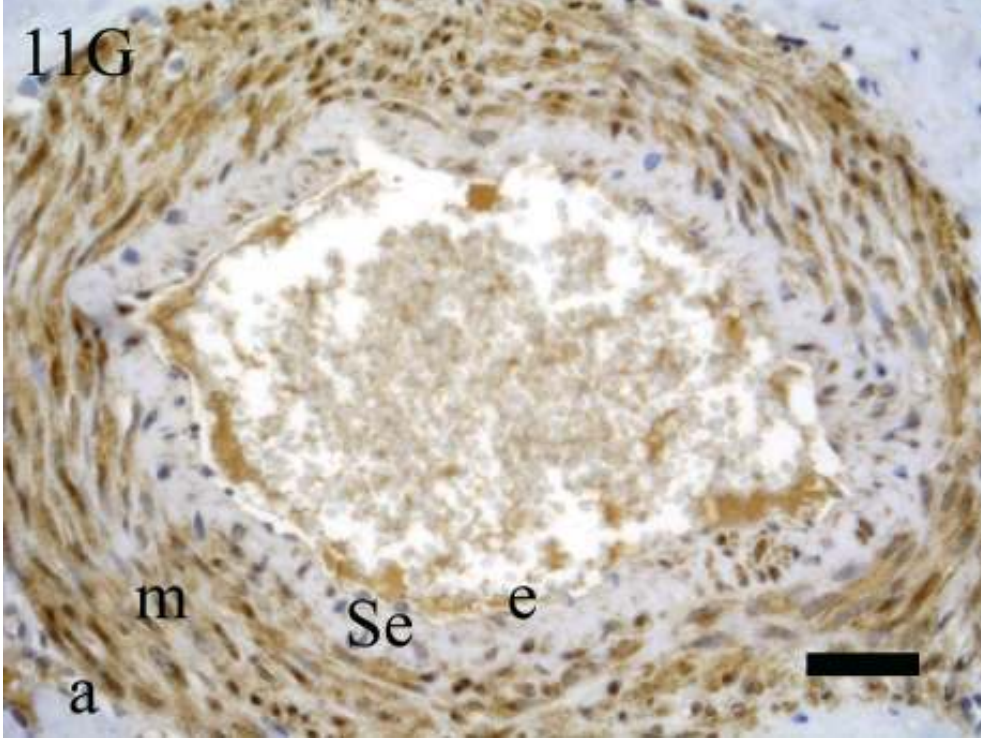
Şekil11D. Erken luteal dönemde, myometriyum (M), perimetriyum (P) ve mezotel hücrelerinde (siyah oklar), osteopontin reaksiyonu, bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 11E. Geç luteal dönemde endometriyumda osteopontin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), kript (K) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

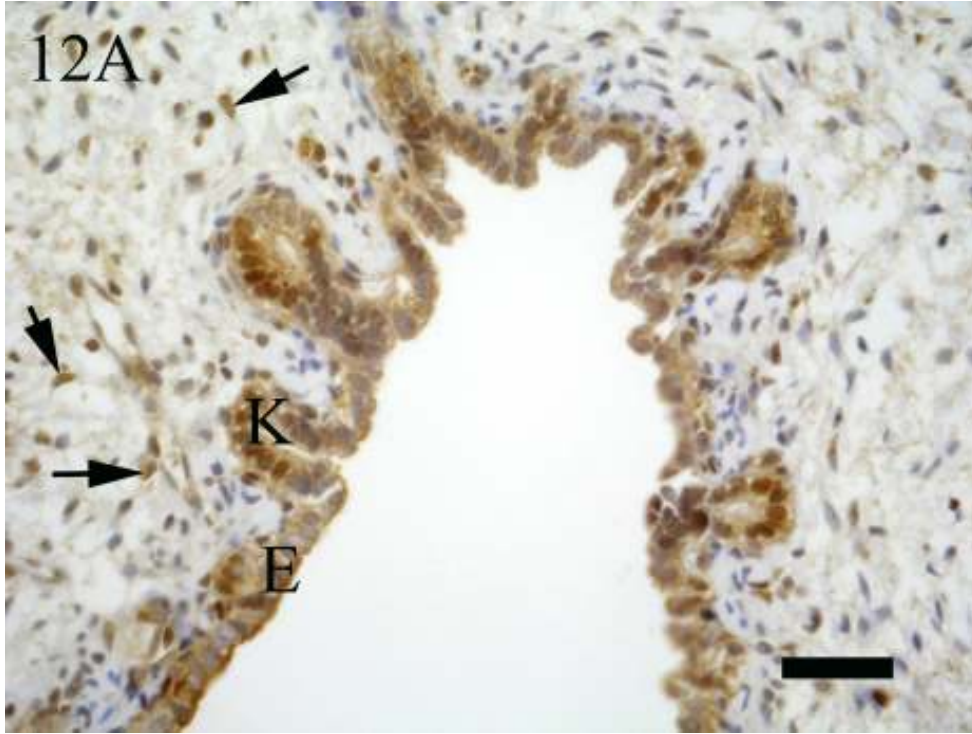


Şekil 11F. Geç luteal dönemde osteopontin reaksiyonu, bezler (B), bezlerin salgısı (siyah oklar), endometriyal damarlar (yeşil oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

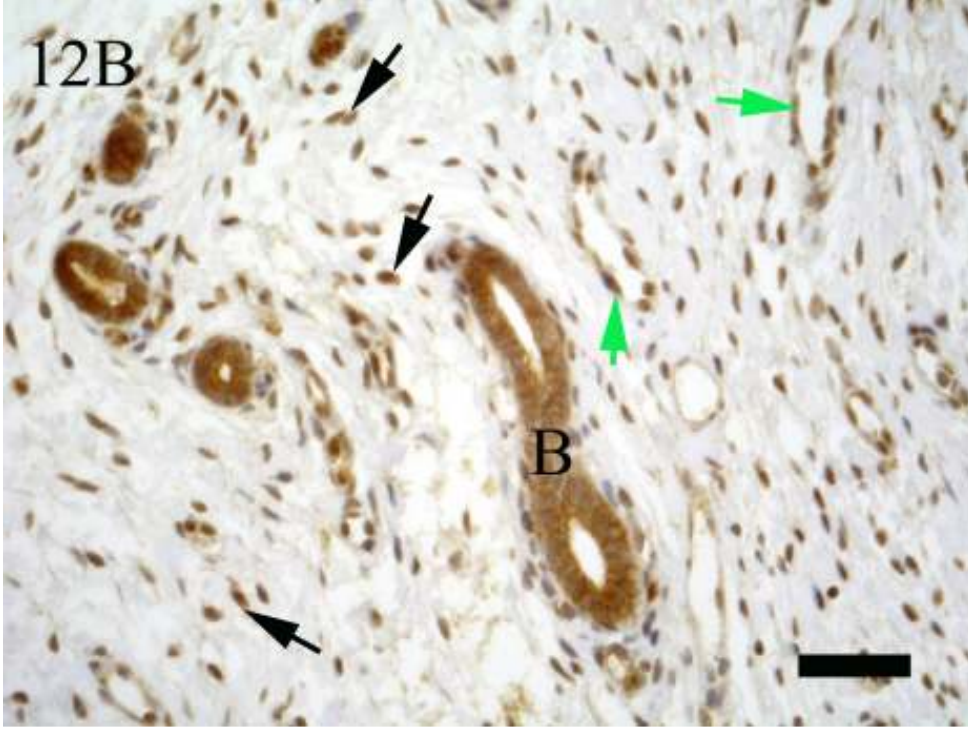


Şekil 11G. Geç luteal dönemde damarlardaki osteopontin reaksiyonu, endotel (e), subendotel (Se), mediya (m), adventisya (a) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

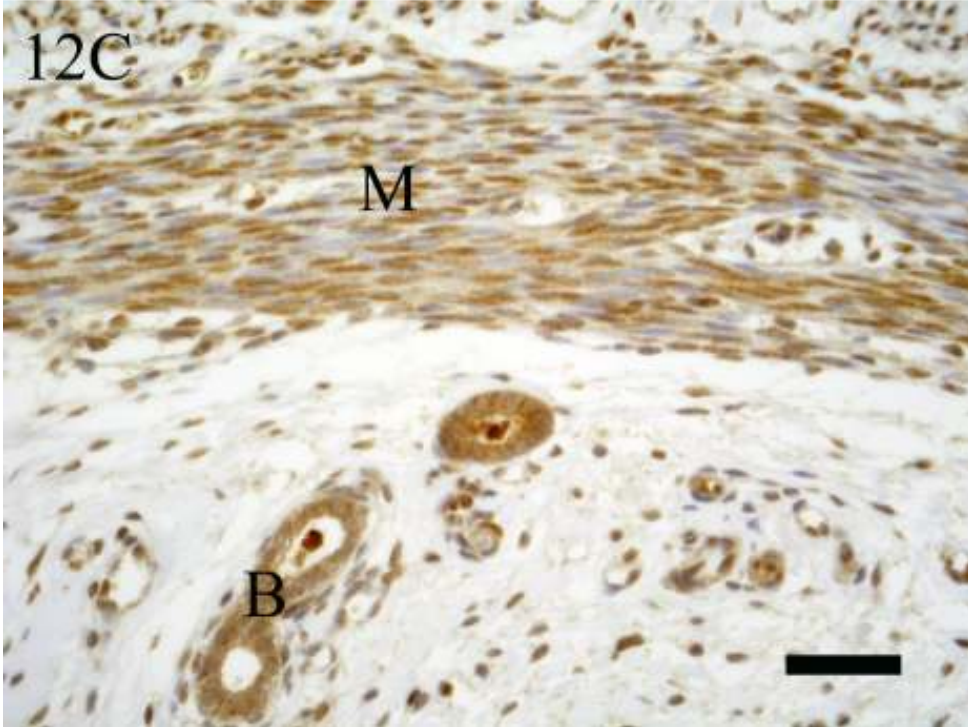
Erken Anöstrus döneminde yüzey epitelinde solgun, kript epitelinde şiddetli reaksiyon görüldü. Osteopontin pozitif sitoplazma kriptlerde çekirdekleri de örtmüştü (Şekil12A). Endometriyal bezler, damarlar ve bağ doku hücrelerinde yoğun osteopontin reaksiyonu gözlemlendi (Şekil 12B, C). Myometriyumdaki düz kas hücrelerinin çoğu osteopontin pozitif, az sayıdaki hücre ise negatif reaksiyon gösterdi (Şekil12C). Geç anöstrus döneminde osteopontin reaksiyonu yüzey epitelinde şiddetli, kriptlerde solgun olarak görüldü. Kriptlerdeki solgun reaksiyon epitelin apikalinde ince bir tabaka halinde şiddetli olarak belirlendi (Şekil 12D). Bu dönemde bez epiteli orta derecede bir reaksiyon gösterdi (Şekil 12E).



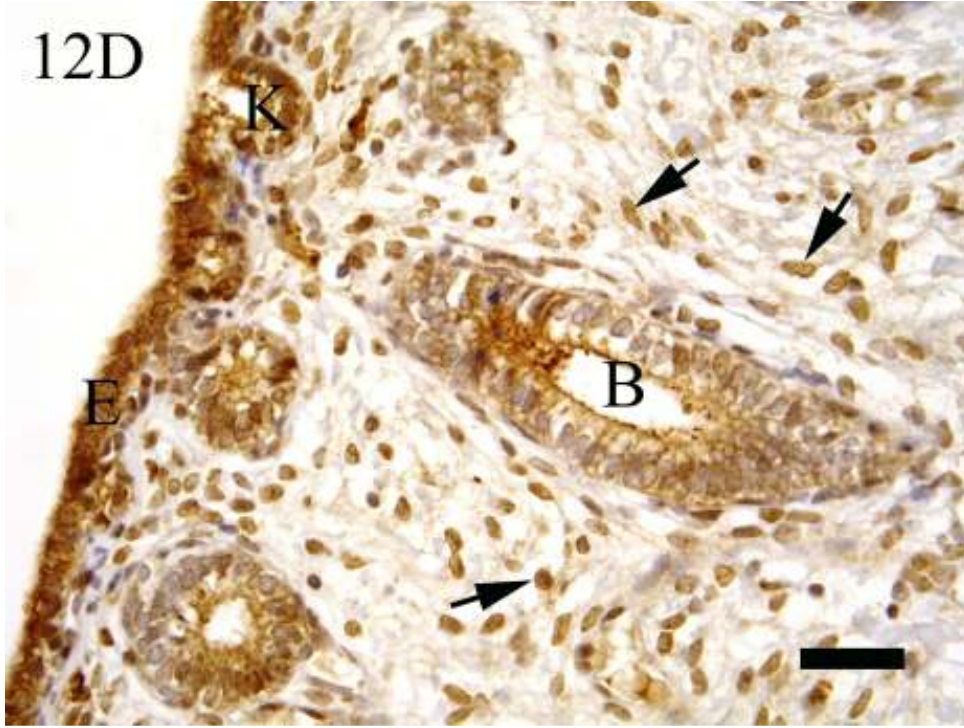
Şekil 12A. Erken Anöstrus döneminde yüzey epitelinde solgun reaksiyon (E), kriptlerde şiddetli reaksiyon (K), osteopontin pozitif hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



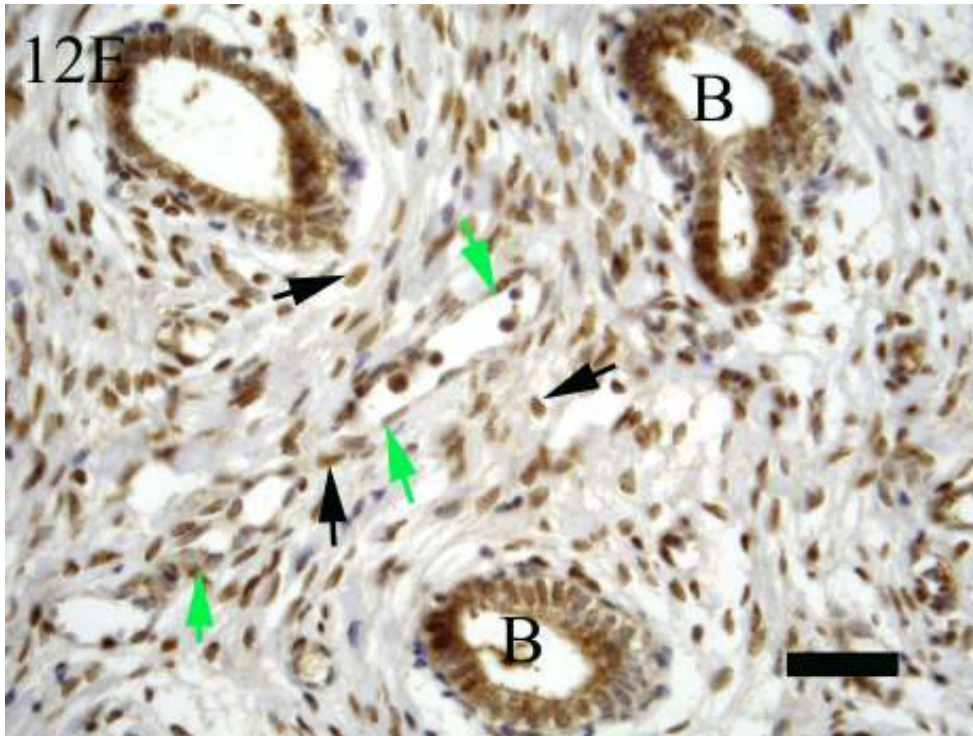
Şekil 12B. Erken Anöstrus döneminde endometriyumda osteopontin reaksiyonu, bezler (B), endometriyal damarlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyonlu hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 12C. Erken anöstrus döneminde bezler (B) ve myometriyumda (M) osteopontin reaksiyonu bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 12 D. Geç Anöstrus döneminde endometriyunda osteopontin reaksiyonu, yüzey epiteli (E), Kript (K), pozitif reaksiyonlu hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.



Şekil 12E. Geç Anöstrus döneminde endometriyumda osteopontin reaksiyonu, bezler (B), endometriyal damarlar (yeşil oklar), pozitif reaksiyonlu hücreler (siyah oklar) bar 25µm, immunperoksidaz, DAB.

Uterusda Osteopontin reaksiyonun görüldüğü alanlar		Foliküler Dönem	Luteal Dönem <i>Erken D. Geç D.</i>	Anöstral Dönem <i>Erken D. Geç D.</i>
Yüzey Epiteli		++	+++ ++	++ +++
Kript Epiteli		++	+++ ++	+++ ++
Bez Epiteli		+++	+++ ++	++ ++
<i>Bağdoku hücreleri</i>		+	++ ++	+++ +++
<i>Stroma</i>				
<i>Bağdoku iplikleri</i>		+	+ +	++ ++
Myometriyum		+++	+++ ++	+++ +++
Perimetriyum		++	++ ++	+++ +++
<i>Mezotel</i>		+++	+++ ++	+++ +++
Damarlar	Endotel	+++	+++ ++	+++ +++
	<i>subendotel</i>	++	++ ++	++ ++
	Mediya	+++	+++ ++	+++ +++
	Adventisya	+	+ +	++ +++

TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre adezyon moleküllerinin üremedeki rolleri ile ilgili yapılan çalışmalar, insan başta olmak üzere fare, tavşan, sığır, koyun, domuz ve maymunlarda implantasyon ve gebelik ile sınırlı kalmıştır. Östrus sikluslarının diğer hayvanlara göre ilginç olduğu ifade edilen köpeklerde konu ile hiçbir araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu araştırma ile östrus siklusunun folliküler, luteal ve anöstrus dönemlerinde köpek uterusunda hücre adezyon moleküllerinden kaderin, laminin, fibronektin ve osteopontin proteinlerinin lokalizasyonları ilk kez belirlenmiştir. Araştırmada materyal olarak kullanılan köpeklerin siklus evreleri Schaefers-Okkens,1996; Schaefers-Okkens, 2005’de açıklandığı gibi folliküler, luteal ve anöstral dönem olarak belirlenmiştir. Siklus evreleri ile ilgili histolojik bulgularımız, köpeklerde östrus siklusunu davranışlar, kliniksel, fizyolojik, sitolojik ve endokrinolojik bulgular bir arada değerlendirilerek proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrus olarak belirleyen, McCracken 1972, Okkens ve ark. 1985; Hoffmann ve ark. 1992; Beijerink 2001, Shirley ve ark. 2001, Butinar J

ve ark. 2004 görüşleri ile uyumludur. Folliküler dönemde, endometriyum epitelinin uterus gelişimine bağlı olarak derinliği gittikçe artan kriptleri şekillendirmeye başladığı, yüzey epitelinin kript alanları dışında tek katlı kübik, kriptlere yaklaştıkça tek katlı alçak prizmatik şekilli olduğu belirlenmiştir. Folliküler dönemin başlangıcı ile anöstral dönemde endometriyumun büyük kısmını stromanın oluşturduğu gözlenmiştir. Folliküler dönemin sonuna doğru gelişmeye başlayan uterus bezlerinin luteal dönemde en yüksek seviyeye ulaştığı, luteal dönemin sonundan itibaren lumenlerinin daralmaya başladığı belirlenmiştir. Barrau ve ark. 1975, bulgularımızla uyumlu olarak yüzey epitelinin tek katlı kübikden tek katlı mukus salgılayan prizmatik epitelli kriptleri şekillendirdiğini, geç metöstrus ve erken anöstrus dönemlerinin endometriumun involusyonu ile karakterize olduğunu açıklamışlardır. Barrau ve ark. 1975, Galabova ve ark. 2003 tarafından belirlenen anöstrus döneminde yüzey epitelindeki hipertrofik hücreler bizim araştırmamızda da hem yüzey epitelinde hem de bez epitelinde gözlenmiştir.

Köpek uterusunda folliküler, luteal ve anöstral dönemlerde kaderin, laminin, fibronektin ve osteopontin proteinlerinin lokalizasyonları tablo1, 2, 3 ve 4’de özetlenmiştir. İmmunoreaksiyonun derecelendirilmesi www.ganfyd.org Quick score göre, ışık mikroskopunda yüksek büyütme ile boyanmış hücre görülememesi negatif; (-), reaksiyonun sadece yüksek büyütme ile görülmesi soluk ; (+), düşük büyütme ile görülen orta derecedeki reaksiyon ; (++) , düşük büyütme ile görülebilen güçlü reaksiyon; (+++) olarak gösterilmiştir.

İnsanlarda, menstrual siklus döneminde uterus endometriyumda E ve P-kaderin luminal ve glandular epiteliyal hücrelerden eksprese edilmiş ancak stromada bulunamamıştır (Tabibzadeh S. ve ark. 1995a, Van der Linden PJ. ve ark. 1995). E ve P-kaderin menstrual siklusun tüm fazlarında eksprese edilmiş (Van der Linden PJ. ve ark. 1995) ancak, E-kaderin lokalizasyonu siklusun gelişimine bağlı olarak değişmiştir. Menstruasyondan önce E-kaderin, α - ve β - katenin glanduler epitelin bazal bölgeleri ve intercellular membranlarda lokalize

olduğu bildirilmiştir. Hücre adezyon alanlarındaki bu spesifik ekspresyon menstruasyonda kayba uğramıştır (Tabibzadeh S ve ark.1995b.). İnsan uterusunda K-kaderinin folliküler dönemde hem glanduler epitel hem de stromadan yüksek seviyede eksprese edildiği açıklanmıştır. Ovulasyondan sonra, K- kaderin ekspresiyonunda azalma görülmüştür (Getsios S ve ark. 1998). Sunulan çalışmada köpek uterusunda kaderinler östrus siklusunun tüm dönemlerinde endometriyum yüzey, kript ve bez epitel hücrelerinin sitoplazma ve membranlarında, myometriyumun düz kasları sitoplazması ile perimetriyumda yoğun olarak görülmüşlerdir. Köpek endometriyumunda kaderinleri belirlemek için tercih edilen pan-kaderin AB- 4 antikoru, E, P, N, R, VE ve K-kaderin gibi çok sayıda kaderin türünü belirlemiştir. Farelerde P-kaderinin trophoblast - endometriyum etkileşimi ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Kadokawa Y ve ark. 1998). Shimoyama Y.ve ark.1989, insan trophoblastlarında P-kaderinin mevcut olmadığını bildirmişlerdir. Benio T ve ark. 2006, İnsan uterusunda menstrual siklus boyunca E-kaderin immunreaktivitesini yoğun olarak ancak N-kaderin immunreaktivitesini proliferatif ve salgı fazları arasında tamamen farklı olarak gözlemişlerdir. Araştırmacılara göre proliferatif fazda endometriyal bezlerin epiteli, endometriyal yüzey epiteli hariç N- kaderin ile güçlü reaksiyon vermiştir. N-kaderin immunreaktivitesi erken ve geç sekretor fazda endometriyal epitelde görülememiştir. Aynı araştırmacılar, menstruasyon sonrası dönemde endometriyumda E-kaderin reaksiyonunu pozitif, N-kaderin reaksiyonunu negatif olarak belirlemişlerdir. Steroid hormonlar doku yapısı ve hücre-hücre bağlantılarında önemli morfolojik değişiklikler yaparlar. Hormon duyarlı hücre adezyon molekülü olan kaderinler üreme sistemine ait olan dokularda bu morfolojik değişikliklerin koordinasyonu ve kontrolünde önemli görevler üstlenirler. Embriyonik implantasyon ve plasenta gelişiminde önemli rolleri olan kaderinlerin aracılık ettiği hücre adezyonunun bozulması ile ilgili yapılan çalışmalar, ilaçla yapılacak olan doğum kontrolünde yeni gelişmeler sağlayacaktır (Tracey M ve ark. 2000). Menstrual siklus döneminde insan

uterus glandular epitelinde E-kaderin belirlenmiş ancak E-kaderin stromal ya da endotelial hücrelerde belirlenememiştir (Beliard A ve ark. 1997). Filiz S ve ark. 2002, ergin ratlarda adenohipofiz, cornea, oesophagus, mide, barsaklar, akciğer, böbrek, pankreas, penis, karaciğer ve corpus ciliaris dokularında pan-kaderin reaktivitesini belirlemişlerdir. Araştırmacılar kaderinlerin hücre polaritesinin oluşumu ve normal doku yapısının onarımında rolleri olduğunu ifade etmişlerdir (Filiz S ve ark. 2002). Laminin ve fibronektin bazal membrana epitelial hücre bağlantısı ve interstitial matrikse stromal hücre adezyonunun sağlanmasında bir anahtar rolü oynayan iki önemli adezyon glikoproteinidir (Yamada KM. 1989). Epitelial hücreler laminin, fibronektin ve kollojen tipIV'den oluşan bir bazal membrana bağlanırlar (Benton G ve George JG. 2005). Epitelial polarizasyon ve farklılaşma bazal membran komponentleri kullanılarak oluşturulmaktadır (Stadler K ve ark. 2009). Laminin ve fibronektin endometriyosizli kadın uterusunda menstrual siklusun tüm safhalarında endometrial bezler ve damarların epitelial bazal membranlarında lokalize olmuştur. Araştırmacılar, stromal hücrelerin etrafındaki pericellular matriksin sadece salgı fazında laminin içerdiğini gözlemişlerdir. Proliferatif fazda stromada laminin lokalizasyonu görülemedi ancak erken ve geç secretory fazda laminin lokalizasyonu belirlenmiştir (Beliard A ve ark. 1997). Köpek uterusunda folliküler dönemde laminin reaksiyonunu belirleyemedik ancak geç luteal dönemde yüzey, kript ve bez epitel hücrelerinin bazal ve apikal membranlarında laminin lokalizasyonunu oldukça belirgin olarak anöstral dönemde ise çok soluk olarak gözledik. Normal insan uteruslarda, laminin endotelial hücreler ve glanduler epitel hücrelerin bazal membranında görülmüştür. Proliferatif fazın stromal hücreleri laminin reaksiyonu gösterememişlerdir. Sekretor fazda stromal hücrelerin etrafında laminin artan bir şekilde birikmiştir (Beliard A, 1997). Araştırmamızda stromal hücrelerde folliküler ve anöstral dönemde az sayıdaki hücrede soluk reaksiyon luteal dönemde ise daha fazla sayıdaki hücrede orta derecede bir laminin reaksiyonu görülmüştür. Beliard A, 1997, tarafından insan

uterusunda sekretor fazda stromal hücreler etrafında artan bir şekilde gözlenen laminin reaksiyonu, köpek uterus stromal hücrelerinde folliküler ve anöstral dönemde az sayıdaki hücrede soluk, luteal dönemde ise daha fazla sayıda hücrede orta derecede bir reaksiyonla belirlenmiştir. Laminin gebeliğin 4.- 5. günündeki rat uterusunda, uterus epiteli ve endometriyal bezlerin bazal membranı ile kan damarlarının çok sayıdaki düz kas hücrelerinde belirlenmiştir. Araştırmacılar laminin lokalizasyonunu myometriyal düz kas hücrelerinde güçlü olarak gözlemişlerdir. Folliküler dönemde zayıf olmak üzere köpeklerde östrus siklusunun tüm dönemlerinde myometriyal düz kaslarda laminin reaksiyonu güçlü olarak belirlenmiştir. Östrus siklusunun primer endometriyal desidual hücrelerinde soluk bir laminin reaksiyonu belirlenmiştir. Endometriyal bezlerin epitel hücreleri ile uterus epitel hücrelerinin laminin ile boyanamadığı açıklanmıştır. Gebeliğin 6. günündeki ratlarda laminin uterus epiteli ile uterus damar endotel hücrelerinde belirlenemediği halde gebeliğin 7. günündeki ratlarda laminin, primer ve sekonder decidual bölgede güçlü bir şekilde eksprese edilmiştir. Gebeliğin 8. günündeki ratlarda lamininin primer ve sekonder decidual bölgenin olgun decidual hücreleri ve myometriyumun düz kas hücrelerinde güçlü bir reaksiyon gösterdiği ifade edilmiştir. Uterus yüzey ve glanduler epitelinin bazal membranları orta derecede laminin reaksiyonu gösterirken, ayırt edilemeyen stromal hücreler bölgesinde lamininin soluk olarak boyandığı bildirilmiştir. Gebe rat uterusunda implantasyon süresince laminin ekspresyonundaki artış hücresel farklılaşma ile birlikte görülmüştür (Korgun ET ve ark. 2007). İnsan uterusunda tüm siklus dönemlerinde stromada fibronektin reaktivitesi gözlenmiştir. Glanduler epitel hücreler ve vasküler endotelial hücrelerin bazal membranında fibronektin lokalizasyonu görülemediği (Beliard A ve ark. 1997). Kayışlı ve ark. 2000, gebelik sürecine giren endometriyumda ekstrasellüler matriks proteinleri ile adezyon reseptörlerinin gebeliğin habercisi olan desidualizasyonun belirleyicisi olabildiği ve desidualizasyon sürecinde rol aldığını bildirilmişlerdir. Araştırmacılar gebe sıçan uterusunda lumen epiteli bazal membranının,

desidual reaksiyondan ve implantasyondan etkilenen yapılar olduğunu ve gebeliğin 5. gününden itibaren bu yapının giderek bozulmaya başladığını azalan laminin immunreaktivitesinden açıkça anlaşıldığını ifade etmişlerdir. İmplantasyonun başlangıcında lumen epiteli bazal laminasında ve desidual alanda görülen gebelik yaşına bağlı olarak laminin immunreaktivitesindeki bu azalmanın proteolitik enzimlerin etkisine ve laminin yapısındaki konformasyonel değişikliklere bağlanabileceği yönündeki görüşleri kuvvetlendirmektedir (Kayışlı Ü ve ark. 2000). Nishida ve ark. 1991, fibronektin ile reseptörünün etkileşmesinin, uterinal siklusu takiben epitelyal hücre tamirinde ve migrasyonunda rol aldığını bildirmişlerdir. Ayrıca endometriyal stroma ve blastosist yüzeyindeki integrinlerin adezyon reseptörleri olarak fertilizasyon, implantasyon ve embriyogeneizde önemli rollerinin olduğunu özellikle de $\beta 1$ integrinin desidual hücre farklılaşmasında rol aldığını ifade etmişlerdir (Nishida T ve ark.1991). Sıçan uterusunda desidual reaksiyonun ilk olarak gebeliğin 4. gününde görüldüğü ekstrasellüler matriks moleküllerinden laminin ve fibronektin ile bu proteinlerin reseptör alt birimleri $\beta 4$ ve $\alpha 5$ integrinlerin desidual doku yapılanmasına ve implantasyon olaylarına aktif olarak katıldıkları, özellikle fibronektinin desidual reaksiyon ve implantasyon olaylarının başlatılmasında önemli anahtar moleküllerden biri olabileceği açıklanmıştır (Kayışlı Ü ve ark. 2000). Östrus siklus dönemlerinde rat uterusunda fibronektin reseptörlerinin ekspresyonunun yapıldığı bir çalışmada, fibronektin reseptörleri endometriyumun epitel hücreleri ve vascular endothelial hücrelerde gözlenmiştir. Epiteliyal hücrelerin aktif göçünün olduğu proöstrusda bazal ve lateral epiteliyal hücre yüzeylerinde belirlenen fibronektin reseptörler östrus döneminde gözden kaybolmaya başladığı çok az fibronektin reseptörün metöstrus ya da diöstrus döneminde belirlenebildiğini Nishida ve ark. 1991’de açıklanmıştır. Aplin J.D ve ark.1989, insan endometriyumunda bazal lamina proteinlerinden laminin ve kollajen tip IV çalıştıkları bir araştırmada bu proteinlerin menstrual siklus boyunca epitelin ya da kan damarlarının bazal

laminasında değişmediğini ifade etmişlerdir. Aynı araştırmada stromal hücre matriksinde laminin ve kollajen tip IV sadece geç sekretor fazda desidual dokuda yoğun boyama ile gösterilmiştir. İnsan endometriyumunda ekstrasellüler matriks proteinlerinin belirlendiği bu araştırmada fibronektinin menstrual siklus boyunca matriksde mevcut olduğu ancak orta sekretör fazda immunreaktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir. Nishida ve ark. 1991, fibronektin-fibronektin reseptör koordinasyonunun östrus siklusu boyunca fizyolojik yenilenmede rolü olduğunu, Bissel MJ ve ark. 2002, ekstrasellüler matriksin doku fenotipi ve normal hemostasisin sağlanmasında düzenleyici bir anahtar görevi yaptığını bildirmişlerdir. Ogawa ve ark. 2001, ekstrasellüler matriks proteinlerinden olan laminin ve kollojen tipIV'ün involüsyon dönemindeki domuz uterusunda lokalizasyonu belirlemişlerdir. Laktasyondaki domuz uterusunda laminin ve kollojen tip IV epitel hücrelerin bazal laminasında sarmal yapıda lokalize olmuştur. Laktasyondan sonra luminal epiteliyal hücreler iyi gelişmiş ve ekstrasellüler matriks proteinleri bazal membranda görülmüştür. Bazal membran unsurlarının düzeni uterusun involüsyonu sürecinde luminal epiteliyal hücrelerin büyüme ve proliferasyonunu etkilediği bildirilmiştir (Ogawa H ve ark. 2001). Mansour GD ve ark. 2003 at uterusunda laminin lokalizasyonunu hem endometriyal bezlerin hem de kapillar damarların bazal membranlarında gözlemişlerdir. Fibronektin endometriyumun kan damarlarında ve bağdokuda belirlenmiştir. Araştırmacılar östrus siklusu periyodunda laminin, fibronektin ve kollajen tipIV reaksiyonunun farklı olmadığını ifade etmişlerdir. Tavşan uteruslarında yapılan bir çalışmada osteopontin'nin ekstrasellüler matriks unsuru olan bir glikoprotein olduğu implantasyon sırasında memeli uterusunun glandular epitelinden salgılandığı belirtilmiştir (Apparaove ark. 2003). Köpek uterusunda geç luteal dönemde bezlerin salgısında güçlü osteopontinin reaksiyonu görülmüştür. Apparaove ark. 2003, immunofloresans kullanılarak osteopontin proteinin gebeliğin 6.75. gününde glanduler epitelde görüldüğünü, blastosistte ise bulunmadığını açıklamışlardır. Uterus osteopontinlerinin plasental faktörler ile uterus

anormallikleri ile ilgili başarısız gebeliklerin önlenmesinde tedavi amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Johnson ve ark. 2003b). Maymunlarda menstrual siklus ve erken gebelik döneminde endometriumda, damarlar ve glandular epiteli örten bazal membranda kollagen ve laminin, mezenşimal bölgelerde fibronektin yada vitronektin tespit edilmiş ve endometrium integrinleri ve ECM açısından maymunların insanlara benzer olduğu görüşüne varılmıştır (Fazleabas ve ark.1997). Turhan F ve ark. 2008, menstrual siklusda rat uterusundaki değişiklikleri elektron mikroskopik olarak incelemişler ve sıçan menstrüel evrelerinin, insan menstrüel, proliferasyon, folliküler ve erken - geç sekresyon evreleri ile örtüştüğünü, menstrüel evrede uterus değişimlerinin inceleneceği araştırmalarda sıçanların deneysel model olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Dişi köpeklerde östrus siklusunun folliküler, luteal ve anöstral dönemlerinde uterusda kaderin, laminin, fibronektin ve osteopontinin lokalizasyonları ve siklusa bağlı değişimlerinin ilk kez belirlendiği bu araştırmanın sonuçları, köpeklerde ovulasyon, implantasyon ve embriyonal gelişim ile ilgili olası problemlerin nedenleri ve infertiliteye neden olan hastalıkların patolojilerinde adezyon moleküllerinin olası rolleri için önemli bir kaynak olacaktır.

KAYNAKLAR

Andersen AC, Simpson ME, 1973. The first estrous cycle in pregnant and non pregnant beagles.In: Andersen AC, Simpson ME(eds) The ovary and Reproductive Cycle of the Dog(Beagle), Los Altos, CA: Geron-X Inc.pp.181-186.

Apparao, K.B.C., Illera, M.J., Beyler, S.A., Olson, G.E., Osteen, K.G., Corjay, M.H., Boggess, K. and Lessey, B.A. 2003. Regulated Expression of Osteopontin in the Peri-Implantation Rabbit Uterus. *Biology of Reproduction.*, 68: 1484-1490.

Aplin JD, Clarlton AK,Ayad S.1989 .An immunohistochemical study of human endometriyal extracellular matrikx during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tiss. Res.* 253:231-240.

- Atabekoğlu Cem S, Engin Yaprak, Yusuf Üstün, Ruşen Aytaç, 2002. Üreme Fizyolojisi ve Adhezyon Molekülleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 55(1): 85- 92.
- Barlow JZ, Huntley GW, 2000. Developmentally regulated expression of Thy-1 in structures of Mouse sensory-motor system. *J.Comp. Neurol.* 421: 215- 233
- Barrau MD, Abel JH Jr, Verhage HG, Tietz WJ, 1975. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. *Am. J. Anat .* 142, 47– 66.
- Beijerink N.J. 2001. Endocrinology of physiology and progestin-induced canine anoestrus. PhD thesis, faculty of veterinary medicine, Utrecht University, The Netherlands, ISBN 978. 90. 393. 4564.1
- Beliard A, Donmez J, Nisolle M, Foidart JM. 1997. localization of laminin, fibronectin,E-cadherin,and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertility and Sterility.* 67, 2: 266 - 272.
- Benio T, Yuichi S, Toru K, Isao O, Kiyoshi M. 2006. Differential expression of N- cadherin and E-cadherin in normal human tissue. *Arch Histol Cytol*, 69 (2): 135-145.
- Berg EL, Goldstein LA, Jutila MA, Nakache M, Picker LJ, Streeter PR, Wu NW, Zhou D, Butcher EC, 1989. Homing receptors and vascular addressing. Cell adhesion molecules that direct lymphosite traffic. *Immunol Rev*, 108: 5-7.
- Benton G, George JG. 2005. Defining 3-d culture for investigating breast cancer progression. *Bio. Sci. Technol.*1:50 - 52.
- Bissel MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. 2002. The organizing principle: Microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation.*70: 537- 546.
- Bloor D.J, Metcalfe A.D, Rutherford A, Brison D. R and Kimber S.J. 2002. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction*, 8, 3: 237- 245.

- Burghardt, R.C., Frankie, W., Schylr, G., Spencer, T. and Johnson, G.A. (M586) 2005. The Induction of Osteopontin in Ovina Endometrial Stromal Cells Requires Conceptus Attachment. *The Society for the of Reproduction, 38th Annual Meeting*. July 24-27. Canada
- Butinar J, Mujagic E, Galac S, 2004. The oestrus cycle in the bitch : A review article. *Slov.Vet.Res.*41(1): 5-11.
- Bouchard G, Youngquist RS, Vaillancourt D, Krause GF, Guay P, Paradis M, 1991. Seasonality and variability of the interestrous interval in the bitch. *Theriogenology* 36: 41-50.
- Campbell, S., Swann, H.R., Seif M.W., Kimber, S.J. and Aplin J.D. 1995. Integrins and adhesion molecules: Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reproduction*.,10: 1571 - 1578.
- Christie DW and Bell ET, 1972. Studies on canine reproductive behavior during the normal oestrous cycle. *Anim. Behav.* 20: 621- 631.
- Christiansen IJ, 1984. Reproduction in the dog and cat. Balliere Tindall, london, 1984.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M, 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, 39 : 3- 25.
- Concannon PW, 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47: 3 - 27.
- Cruchten S Van, Broeck W Van den, Simoens P and Lauwers H, 2002. Scanning electron microscopic changes of the canine uterine luminal surface during oestrus and late metoestrus. *Reprod. Domest. Anim.* 37(3): 121-126.
- Demir R, 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Çeviri. Palme yayıncılık. S: 9 - 23.
- Doris M, MacIntyre, Hai Choo Lim, Kim Ryan, Sarah Kimmins, Julie A. 2002. Small Implantation - Associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biology of Reproduction*, 66: 1430- 1436

- Edelman G.M, Crossin K.L.1991 Cell adhesion molecules: Implication for a molecular histology. *Ann. Rev. Biochem.* , 60: 155 - 190.
- Engel J.1992. Laminins and other strange proteins. *Biochemistry.* 31:10643 – 10651.
- Ergüler G, Demir N, Demir R: 2002. Adezyon Moleküllerinin Yapısal Özellikleri ve Fonksiyonları. *T. Klin .J. Med. Sci.* 22: 313 - 327.
- Etzioni A. 1996. Adhesion molecules - Their role in health and disease. *Ped. Res.*39:191-198.
- Fazleabas, A.T., Bell, S.C., Fleming, S., Sun, J. and Lessey, B.A. 1997. Distruction of Integrins and the Extracellular Matrix Proteins in the Baboon Endometrium During the Menstrual Cycle and Early Pregnancy. *Biology of Reproduction.* 56: 348 - 356.
- Filiz, S., Dalcik, H., Yardimoğlu, M., Gonca, S. Ve Ceylan S. Localization of Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM). 2002. Immunoreactivity in Adult Rat Tissues. *Biotechnic& Histochemistry.* 77: 127- 135.
- Filiz S, Dalcık H, Yardımoğlu M, Gonca S, Ceylan S. 2002. localization of pan-cadheın immunoreactivity in adult rat tissues. *Cell Biol. Inter.* 26,11: 985 – 991.
- Freemont AJ, 1998. Adhesion molecules. *J. Mol. Pathol. Clin. Pathol.* 51:175-184.
- Frenette PS, Denisa D,Wagner DD, 1996. Adhesion molecules-Part I, *N. Engl. J. Med.* 335: 43 - 45.
- Galabova G, Egerbacher M, Aurich JE, Leitner M and Walter I. 2003. Morphological Changes of the Endometrial Epithelium in the Bitch During Metoestrus and Anoestrus. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 415 - 420.
- Getsios S, Chen GTC, Stephenson MD, Leclerc P, Blaschuk OW and MacCalman CD. 1998. Regulated expression of cadherin-6 and cadherin11 in the glandular epithelial and stromal cells of the human endometrium. *Developmental Dynamics.* 211: 238 - 247.

- Grosskinsky CM, Yowell CW, Sun J, Parise LV, Lessey BA. 1995. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2, 2, 198.
- Hoffmann B, Hoveler R, Hasan SH, Failing K. 1992. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J. Reprod. Fertil.* 96: 837 - 845.
- Hiemstra M, Schaefers-Okkens AC, Tekse E, Kooistra HS, 2001. The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. *Tijdschr Diergeneeskd.* 126: 658- 689.
- Ikeda W. Et al. 1999. Afadin: A key molecule essential for structural organisation of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J. Cell Biol.*, 146: 1117 – 1131.
- Ivanov D.B., Philippova M.P, Tkachuk.V.A. 2001. Structure and Functions. *Biochemistry(Moscow)*. 66:10. 1174 - 1186.
- Jeffery A, Bowen and Joan S. Hunt. 1999. Expression of Cell Adhesion Molecules in Murine Placentas and a Placental Cell Line. *Biology of Reproduction*, 60: 428 – 434.
- Johnson G.A., Burghardt R.C., Joyce M.M., Spencer T.E., Bazer F.W., Gray C.A. and Praffer C. 2003a. Osteopontin is Synthesized by Uterine Glands and a 45-kDa Cleavage Fragment is Localized at the Uterine-placental Interface Throughout Ovine Pregnancy. *Biology of Reproduction*, 69: 92 - 98.
- Johnson G.A., Burghardt R.C., Bazer F.W. and Spencer T.E. 2003b. Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. *Biology of Reproduction*, 69: 1458 - 1471.
- Juliano RL, 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 283 - 323.

- Kadokawa Y, Fuketa I, Nose A, Takeichi M and Nakatsuji N, 1989. Expression pattern of E- and P-cadherin in Mouse embryos and uteri during the preimplantation period. *Development Growth and Differentiation* .31: 23 – 30.
- Kasper C., Rasmussen H., 2000. Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat. Struct. Biol.*, 7: 389 - 393.
- Kathleen H. Burns, Gabe E. Owens, Julianna M. Fernandez, John H. Nilson. 2002. Characterization of integrin Expression in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*. 67: 743 - 751.
- Kayışlı Ü.A., Asar M. Demir R. 2000. Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matriksin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri İntegrin $\beta 4$ ve $\alpha 5$ 'in Dağılımları ve Muhtemel Roller. *Turk J Biol.* 24: 379 – 395.
- Kimber SJ, Brown DG, Pahlsson P, Nilsson B. 1993. Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stemcells and embryos. *Histochem J.*, 25: 628 – 641.
- Korgun ET, Çaylı S, Asar M, Demir R. 2007. Distribution of laminin, vimentin and demsin in the rat uterus during initial stages of implantation. *J. Mol. Hist.* 38: 253 - 260.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. 1994. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil. Steril.* 63:1353 - 1355.
- Luscinskas FW, Lawyer J, 1994. Integrins as dynamic regulators of vascular function, *FASEB J.* 8: 929 - 938.
- Lyall F. 1998. Cell Adhesion Molecules: Their Role in Pregnancy. *Fetal and Maternal Medicine Review*. 10: 21 - 44.
- Malik AB, Lo SK, 1996. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation, *Pharmacol. Rev.* 48: 213 – 229.

- Mackay CR, Imhof BA, 1993. Cell adhesion in the Immune System. *Immunol Today* 14(3): 99 - 102.
- Mansour GD, Henry M, Ferreira MR. 2003. Immunohistochemical study of equine endometrial extracellular matrix during the oestrous cycle. *J. Comp. Path.* 129: 316 - 319.
- McCracken JA, Carlson JC, Glew ME, Goding JR, Baint DT, Green K, Samuelsson B, 1972. Prostaglandin F₂ identified as a luteotropic hormone in sheep. *Nat. New.Biol.* 238: 129 - 134.
- Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S. 2001. The role of Integrins in Human Embryo Implantation. *Fetal Diagn Ther.* 16: 364 – 371.
- Nishida T, Murakami J, Otori T. 1991. Expression of fibronectin receptor (integrin) in the uterus of rats in relation to the estrous cycle. *Histochemistry.* 96: 279 - 283.
- Nishihara S, Manabe N, Nakayama M, Wada S, Inoue N. and Miyamoto H. 2000. Changes in Cell Adhesion Molecules During Follicular Atresia in Porcine Ovaries. *Journal of Reproduction and Development.* 46: 325 - 334.
- Nose A, Takeichi M. 1986. A Novel Cadherin Cell Adhesion Molecule: Its Expression Patterns Associated with Implantation and Organogenesis of Mouse Embryos. *The Journal of Cell Biology.* 103: 2649 - 2658.
- Ogawa H, Takahashi M, Takahashi H, Okano A. 2001. Histochemical Observations during Uterine Involution in Meishan Pigs. *J of Rep.and Dev.* 47: 83 - 89.
- Okkens AC, Dieleman SJ, Bevers MM, Willemse AH. 1985. Evidence for the noninvolvement of uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *Vet. Quard,* 7:196 - 173.
- Okkens AC and Kooistra HS. 2006. Anoestrus in the Dog: a Fascinating Story. *Reprod. Dom. Anim,* 41: 291 – 296.

- Rahman J, Meilsp J, 1997. Dynamic exercise leads an to increase in circulating ICAM-1 further evidence per adrenergic modulation of cell adhesion. *Brain Benav. Immun.* 11: 343-351.
- Ross Michael H, Pawlina Wojciech. 2006. Histology A text and Atlas with correlated cell and molecular biology. Fifth edition. Lippincott Williams Wilkins.
- Schaefers-Okkens AC, 1996. Ovaries. In: Rijnberk A (ed.), Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, s. 131–156.
- Schaefers-Okkens AC. 2005. Estrous cycle and breeding management of the healthy bitch. In: Ettinger SJ, Feldman Ec(eds). Textbook of Veterinary Internal medicine. Diseases of the dog and cat 6th edn. Saunders, Philadelphia, PA, s. 1640-1649.
- Shimizu Y, Rose DM, Ginsber MH, 1999. Integrins: in the immune system .*Advanc. Immunol* ,72: 325 - 381.
- Shirley Dianne Johnston, Shirley D. Johnston, Margaret V. Root Kustritz, Patricia Schultz Olson, 2001 Canine and feline theriogenology. The Curtis center Independence Square West Philadelphia, PA 19106, chapter 2: 16.
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M and Abe O, 1989. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Research.* 49: 2128 – 2133.
- Sims TN, Dustin ML. 2002. The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunological Reviews.* 186: 100 - 117.
- Stadler K, Handler J, Schoenkypf S, Walter I. 2009. A three-dimensional culture model of canine uterine glands. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 45: 35 - 43.
- Sundeeep A. Chandra and Rick R. Adler. 2008. Frequency of Different estrous stages in purpose - bred beagles: A retrospective study. *Toxicologic Pathology.* 36: 944 – 949.

- Şensoy E, Öznurlu Y. 2009. Hücre Adezyon Molekülleri. *Atatürk Üniv. Vet .Bil .Derg.* 4. 1:57- 68.
- Tabibzadeh S. 1992, Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle . *Hum Reprod.* 7: 876 – 882.
- Tabibzadeh S, Babaknia A, Kong QF, Zupi E, Marconi D, Romanini C and Satyaswaroop PG,1995a. Menstruation is associated with disordered expression of desmoplakin I/II and cadherin/catenins and conversion of F to G-actin in endometrial epithelium. *Human Reproduction* 10, 776 - 784.
- Takeichi M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann Rev Biochem.* 59: 237 - 252.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251: 1451 - 1455.
- Tracey M. Rowlands J, Matthew Symonds, Riaz Farookhi and Orest W. Blaschuk. 2000. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Reviews of Reproduction.* 5: 53 - 61.
- Turhan F, Erdoğan D, Take G, Bardakçı Y. 2008. Electron Microscopic Changes in the Rat Uterus During the Menstrual Cycle. *Gazi Tıp Dergisi.*19, 3; 102 - 112.
- Van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW and Evers JL. 1995. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility.* 63,1210 – 1216.
- Vesweber D, Kemler R R. 1985. Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO J.*,4: 3393.
- Waterhouse P, Parhar R.S, Guo X, Lala R. K and Denhardt D.T 1992. Regulated temporal and spatial expression of the calcium- binding proteins calcyclin and OPN(osteopontin) in mouse tissues during pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 315- 323.

Wijnhoven BPL, Dinjens WN, Pignatelli M. 2000. E- cadherin /catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.*, 87: 992 - 1005.

Yamada KM. 1989. Fibronectins: structure, functions and receptor. *Curr Opin cell Biol.* 1: 956 - 963.

Zhang C., Duan E., Cao Y, Jiang G. and Zeng G. 2000. Effect of 32/67 kDa Laminin-Binding Protein Antibody on Mouse Embryo Implantation. *Journal of Reproduction and Fertility.* 119: 137- 142.