

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**



**İNVOLÜSYON DÖNEMİNDEKİ SIÇAN UTERUSUNDA EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ RESEPTÖRLERİ VE LİGANDLARI**

Proje No: TSA-12-3865

Proje Türü

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

**Yrd. Doç. Dr. EMEL ALAN
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Araştırmacının Adı Soyadı

Prof. Dr. NARİN LİMAN

Eylül 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu projede çalışmalarımın her aşamasında her türlü bilgi birikimiyle bana her zaman yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Narin LİMAN'a, laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Hakan SAĞSÖZ'e ve bu projeyi maddi yönden destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK.....	2
TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER.....	4
ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
2. GENEL BİLGİLER.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI.....	21
3.1.1 Doku Temini.....	21
3.1.2. İmmunohistokimya için doku hazırlanması.....	21
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	21
4. BULGULAR.....	24
4.1. Histolojik Bulgular.....	24
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
6. KAYNAKLAR.....	61

İNVOLÜSYON DÖNEMİNDEKİ SIÇAN UTERUSUNDA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRLERİ VE LİGANDLARI ÖZET

Memeli hayvanlarda bulunan epidermal büyüme faktörü sistemi, embriyogenezis, çoğalma ve farklılaşmada temel rol oynar. Epidermal büyüme faktörü sistemi ErbB1, ErbB2, ErbB3 ve ErbB4 olmak üzere dört reseptörden ve 11 ligand ya da üç gruba ayrılan proteinden oluşmaktadır. Bu gruplardan biri amfiregulin, neuregulin ve EGF’i kapsar. Bu çalışmanın amacı doğum sonrası involüsyon sürecinin 1., 3., 5., 10., ve 15. günlerinde sıçan uterusunda immunohistokimyasal teknikler kullanılarak dört EGF reseptör ve üç ligandın (amfiregulin, neuregulin ve EGF) lokalizasyon ve oranlarındaki olası değişiklikleri belirlemektir. Çünkü biz EGF-sisteminin endometriyum involüsyonunda rol oynadığı hipotezini savunuyoruz. Postpartum bütün involüsyon sürecinde endometriyal bezin apikal sitoplazmasında, postpartum 10. ve 15. günlerde ise luminal epitelin apikal sitoplazmasında kuvvetli ErbB1 immunreaksiyonu saptandı. Bazı stromal hücrelerin sitoplazması içinde çekirdeğin hemen yanında nokta şeklinde ErbB1 ve ErbB3 immunreaksiyonu görüldü. İnvolüsyonun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde luminal ve glandüler epitelin apikal membranında, postpartum 5. günden itibaren ise luminal epitelin lateral membranlarında ErbB2 ve ErbB4 immün boyanması pozitif. ErbB4 reaksiyonu luminal ve bez epitel hücrelerinin sitoplazmasında oldukça yoğun. Postpartum involüsyon süresince bazı stromal hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli ErbB4, EGF, AR ve NRG reaktivitesi tespit edildi. Luminal epitel, bez epitel, endotel hücreleri ve miyositlerin çekirdeğinde diğer reseptör ve ligandlardan farklı olarak AR immunreaksiyonu gözlendi. Postpartum involüsyon günler arasında ErbB reseptör ve ligandları açısından hiçbir farklılık saptanmadı. Sonuçlar, bu moleküllerin postpartum involüsyon sırasında uterus hücrelerinin farklılaşması ve çoğalmasında rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epidermal büyüme faktörü, postpartum, sıçan, uterus.

**EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS AND LIGANDS
IN RAT UTERUS IN INVOLUTION PERIOD
ABSTRACT**

The Epidermal Growth Factor (EGF)-system is ubiquitous in mammalian organs and plays fundamental roles in embryogenesis, proliferation and differentiation. It comprises four receptors, ErbB1, ErbB2, ErbB3 and ErbB4, and 11 ligands or binding-proteins divided into three groups. One of these groups includes amphiregulin, neuregulin and EGF. The aim of the study is to determine the possible changes in proportions and localization of the four EGF receptors and three ligands (amphiregulin, neuregulin and EGF) in the rat uterus at the 1st, 3th, 5th, 10th and 15th days of postpartum involution period using immunohistochemical techniques as we hypothesized that the EGF-system play a role for involution of the endometrium. Apical cytoplasm of endometrial gland involution process of all postpartum, apical cytoplasm of the luminal epithelium in the postpartum 10 and 15 days showed strong ErbB1 immunoreaction. Point form next to the nucleus in the cytoplasm of some of the stromal cells, ErbB1 and ErbB3 immunoreaction was observed. At apical membrane of the luminal and glandular epithelium in the involution of the 1st, 3rd, 5th, 10th, and 15 days, lateral membrane of the luminal epithelium at the from the day of postpartum 5, ErbB2 and ErbB4 immunostaining was positive. ErbB4 reaction in the cytoplasm of the luminal and glandular epithelial cells is quite intense. ErbB4, EGF, AR, and NRG strong reactivity was detected in the cytoplasm of some of the stromal cells during the postpartum involution. AR immunoreaction was observed different from other receptor and ligands in the nucleus of the luminal epithelium, gland epithelial, endothelial cells and myocytes. Between postpartum involution of the days there was no difference in terms of ErbB receptors and their ligands. The results, these molecules is play a role in differentiation and proliferation of uterus cells during postpartum involution.

Key words: Epidermal Growth Factor, postpartum, rat, uterus.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Büyüme faktörlerinden epidermal büyüme faktör ailesi (epidermal growth factor, EGF) epiteliyal hücreler ve sinir hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından üretilirler ve çeşitli dokuların gelişme, farklılaşma ve onarımında rol oynarlar. EGF ailesi içinde yapısal ve fonksiyonel özellikleri birbirine benzeyen Epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü –alfa (Transforming growth factor- α , TGF- α), amfiregulin (AR), heparin bağlayan EGF (HB-EGF), beta-selulin (BTC), epiregulin (EPR) ve neuregulinler (NRG) gibi ligandlar bulunur. EGF ailesinin tüm üyeleri bir dizi hücrenin hücre membranında bulunan özel reseptörlere (epidermal büyüme faktörü reseptörleri-EGFR/ErbB) bağlanırlar. Bu bağlanma hedef hücrede amino asit transpotunun artışı, glikoz alımının ve büyümenin artışı içine alan biyolojik yanıtı başlatır (Herbst, 2004). Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi (ErbB protein ailesi) 4 üyeden oluşur. Bunlar; ErbB-1 (epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR/HER1) olarak da adlandırılır), ErbB-2 (insanda HER2, kemiricilerde neu olarak adlandırılır), ErbB-3 (HER3 olarak da adlandırılır), ErbB-4 (HER4 olarak da adlandırılır)'tür. EGF, TGF- α ve AR sadece EGFR'e bağlanarak, HB-EGF, BTC ve EPR ayrıca doğrudan ErbB4'e bağlanarak bu reseptörleri aktive ederler.

Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin ektoderm, mezoderm ve endodermden köken alan bir çok hücrenin membranında lokalize olduğu bilinmekte olup, gerek epidermal büyüme faktörü ailesinin ve gerekse EGF reseptör ailesinin insan ve çeşitli hayvanlarda proliferasyon, büyüme, farklılaşma ve apoptosis gibi olaylarda otokrin ve/veya parakrin mediatörler olarak rol oynadıkları ve böylece üreme fonksiyonunu düzenledikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Ejskjaer et al. 2005; Srinivasan et al. 1999; Maggi et al. 1994; Bany and Kennedy 1995; Mukku and Stancel 1985; Chegini et al. 1986; Nelson et al. 1991; DiAugustine et al. 1988; Das et al. 1997; Kim et al. 1995; Nelson et al. 1992; Reese et al. 1998; Tsark et al. 1997; Karunagaran et al. 1996; Das et al. 1994; Zhang et al. 1992). İnsan, fare, tavşan, sığır ve sığanda özellikle seksüel siklus (Niikura et al. 1996; Ejskjaer et al. 2005; Sağsöz et al. 2010; Mukku and Stancel 1985) ve implantasyon dönemine (Wollenhaupt et al. 2004; Klonisch et al. 2001; Brown et al. 2004) odaklandığı gözlenen bu çalışmalar uterusda epidermal büyüme faktör reseptörleri ile ligandlarının ekspresyonlarının steroid hormonlar (östrojen ve progesteron) tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Das et al. 1995; Brown et al. 2004; Huet-Hudson et al. 1990; Dai and Ogle, 1999; McBean et al. 1997). Östrojen özellikle EGF ailesi ve reseptörlerine ait ligandların mitojenik etkilerini düzenler. Kemirgenlerde ve

insanlarda steroid hormonlarının uyarılmasını takiben EGF uterusu hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu stimüle eder. Östrojenin fare uterusunda EGF ve reseptörlerinin ekspresyonunu artırdığı bildirilmektedir (Shiraga et al. 2000; Nelson et al. 1991).

Steroid hormonlar ve EGF reproduktif dokularda benzer etkilere sahiptirler ve birbirleriyle de karşılıklı olarak etkileşirler (Smith, 1998). Örneğin gebe olmayan uterusda östrojen endometriyumda EGFR'lerin ekspresyonu için gereklidir (Mukku and Stancel, 1985; Lingham et al. 1988; Imai et al. 1995) ve EGF östrojenin çoğu etkisine aracılık eder (Nelson et al. 1991; Ignar-Trowbridge et al. 1992; Johnson and Chatterjee, 1993; Galand and Rooryck, 1996; Zhang et al. 1998). Deneysel olarak progesteron (P4) uygulanması EGF ve EGF ile ilişkili ligandların ekspresyonlarını düzenler ve böylece östrojenin uterusdaki etkilerini antagonize edebilir (Zhang et al. 1998; Kirkland et al. 1992; Das et al. 1994). Sonuç olarak EGF ekspresyonunun erişkin uterusu östrus siklusuyla değiştiği ve erişkin uterusunda EGF sentezi için östrojene ihtiyaç duyulduğu uterus EGF ekspresyonundaki değişikliklerin de kan östrojen seviyelerindeki siklik değişikliklerden kaynaklandığı bildirilmektedir (Shiraga et al. 2000).

Steroid ovaryum hormonları ile postpartum uterus involüsyonu arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte farelerde postpartum rejenerasyonun ovaryum ve ovaryum hormonlarından bağımsız olarak şekillendiği (Stewart et al. 2011), atlarda da doğum, laktasyon ve uterus involüsyonunun ovaryum hormonlarından bağımsız olduğu gösterilmiştir (Sertich et al. 1988). Memeli hayvanlar içerisinde sıçanlar doğumdan sonraki ilk 10-24 saat içinde östrus (postpartum östrus) gösterirler (Gilbert et al. 1985). Ancak yine de sıçanlarda doğumdan hemen sonra östrojen ve progesteron düzeylerinin oldukça düşük olduğu ve bunun postpartum stromal regresyon için gerekli olduğu ileri sürülmektedir (Tansey and Padykula, 1978).

Steroid hormonlar ile EGF ailesi ve reseptörlerinin reproduktif dokularda benzer etkilere sahip oldukları ve birbirleriyle de karşılıklı olarak etkileştikleri dikkate alındığında, dişilerde fertilitenin sürekliliği yönünden oldukça önemli bir dönem olan ve doğumun tamamlanmasından sonra genital organların anatomik, histolojik ve fonksiyonel bakımdan gebelik öncesi durumuna dönmesi olarak tanımlanan postpartum dönemde (postparturient veya puerperal dönem), EGFR ile ligandlarının uterusdaki ekspresyonlarının da değişikliğe uğrayabileceği akla gelmektedir. Buradan yola çıkılarak hazırlanan çalışmanın amacı hem endometriyumdaki doku kaybı ve takiben doku rejenerasyonunu, hem de miyometriyumdaki miyositlerin yapısal transformasyonunu içine alan involüsyon sürecinde, sıçan uterusunda postpartum 1. günden başlayarak EGFR ile ligandlarının (AR, NRG ve EGF)

lokalizasyonlarını ve involüsyon sürecinde uğradığı değişiklikleri immunohistokimyasal yöntemle belirleyerek postpartum involüsyon sürecindeki olası fonksiyonlarını ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Doğumdan sonra genital organlar gebelik öncesi durumlarına dönerken birtakım fizyolojik olaylar meydana gelir. Bunlar; genital organların involüsyonu, endometriyum'un rejenerasyonu, uterustaki bakteriyel kontaminasyonun eliminasyonu ve ovaryumların siklik aktivitelerinin yeniden başlaması aşamalarından oluşur. Bu dönem postpartum period veya puerperium olarak tanımlanır. Doğumdan sonra uterus'un gebelik öncesi hacmine ve fonksiyonuna dönmesine uterus involüsyonu adı verilir (Kiracofe, 1980). İnvolüsyon, gebeliğin olduğu kornunun gebeliğin olmadığı kornuya çok yakın ölçülere dönmesi, pelvik çatıdaki normal yerine gelmesi, normal tonusunu ve içeriğini tekrar kazanması olarak düşünülür (Casida et al. 1968). Uterusdaki hücrelerin apoptozisi, nötrofil granülosit girişi, lipaz, karbonhidraz, proteaz, nükleaz gibi yıkıcı enzimlerin salgılanması ve hücre döküntülerinin fagositozu olaylarını içine alan involüsyon, doku kaybı ve doku rejenerasyonu olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Doğum sonrası 1-6. günler arasında uterusun yaş doku ağırlığı 8 kat azalır. Bu azalma uterusun hücresel içeriğindeki azalıştan (Nilsen-Hamilton et al. 2003) ve ekstrasellüler matriksin özellikle de kollajenin parçalanmasından (Harkness and Moralee, 1956) kaynaklanır.

Memeli hayvanlarda uterus involüsyonu bir sonraki gebeliğin oluşması için gereklidir. Hayvanlar arasında uterus involüsyon süresi türlere göre farklılık göstermektedir (Okano and Tomizuka, 1996). Uterusun involüsyon hızı plasentasyon tipine bağlıdır. Tavşanlar hemokoriyal plasentaya sahip olduğu için uterus involüsyonu iki günde tamamlanır (Lebas, 1994). Epiteliyokoriyal plasentaya sahip hayvanlarda (kısırak ve domuz) uterus involüsyonu 2 ila 3 haftada tamamlanırken, sindesmokoriyal plasentaya sahip hayvanlarda (koyun, keçi ve inek) uterus involüsyonu 4 ila 5 hafta sürer. Endoteliyokoriyal plasentaya sahip hayvanlarda ise (köpek ve kedi) uterus involüsyonu 10 ila 12 hafta sürer (Slama et al. 1999). Sıçanlarda postpartum dönemde uterusun re-epitelizasyonu 36 saatte gerçekleşir ve bu hızlı rejenerasyon muhtemelen erken postpartum östrüstan kaynaklanır. İlk postpartum ovulasyon ise yavru lamadan sonraki yaklaşık 18 saat içinde oluşur (Warbrick, 1955). İnsanlarda postpartum periyod, doğumdan sonra uterusun gebe olmayan formuna dönmesi ve fizyolojik involüsyonu ile karakterize 6-8 haftalık bir periyod olarak tanımlanmıştır. Bu süreç içinde endometriyumun onarımı ile restorasyonu, mikroorganizmaların eliminasyonu ve miyometriyumun küçülmesi, gibi olaylar dizisi hem apoptozis hem de proliferasyonla ilişkilidir (Kim et al. 2000; Salamonsen, 2003).

Hücrel proliferasyon endometrial fizyolojide anahtar bir role sahiptir. Uterusta proliferasyon ve farklılaşma gibi hücrel olayların östrojen ve progesteron gibi cinsiyet hormonları tarafından düzenlendiği ve bu hormonların hedef dokulardaki etkilerinin de parakrin ve/veya otokrin mekanizmalarla etki eden büyüme faktörlerinin (growth factors) lokal üretimiyle gerçekleştiği kabul edilmektedir. Büyüme faktörleri (Growth factors), 4000-60.000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteleri etkileyebilen proteinlerdir. Bu faktörler, hücreleri endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin mekanizmalar yoluyla etkilerler (Ciğer, 2008).

Büyüme faktörleri,

- epidermal büyüme faktörü (EGF)
- trombositlerce salınan büyüme faktörü (PDGF)
- asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGFs)
- dönüştürücü büyüme faktörü -alfa ve -beta (transforming growth factors, TGF- α , - β)
- interlökin-1 (IL-1)
- interlökin-2 (IL-2)
- tümör nekroz faktör alfa (TNF α)
- vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)
- insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1, 2) vs. olarak sıralabilir (Ciğer, 2008; Kırıçoğlu ve ark. 2003; Bazley and Gullick, 2005).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi o hücrenin o faktör için reseptöre sahip olup olmasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde cevaba neden olan bir dizi sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinaz'ın uyarılmasıyla sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayılarda reseptörleri bulunur (Ciğer, 2008). Büyüme faktör reseptörlerinin hepsi hücre dışında yer alan bir amino ucuna, membran içi bölge ve sitoplazmik bölgeye sahiptir. Hücre dışındaki bölüm, ikisi ligand bağlayan ve ikisi ise yön tayin eden dört kısımdan oluşur. Membran içi bölge ise eskiden sanıldığı gibi aradaki bağlantıyı sağlayan pasif bir uzantı değil, reseptörlerin birbiriyle temasından ve dimerleşmesinden sorumludur. Sitoplazmik bölge ise üçe ayrılır: ligand bağlama özelliklerini değiştiren fosforilasyon bölgesi, ikinci haberci "*second messenger*" sistemi ile etkileşerek bu sistemi harekete geçiren fosforilasyon bölgesi ve tirozin kinaz bölgesidir.

Büyüme faktör reseptörlerinde aktivite artışı üç şekilde gerçekleşebilir:

- a. Reseptörlerin yapısında ve sayısında bir değişiklik olmadığı halde ligand sayısında çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkan artış nedeniyle reseptör aktivitesi artar.

- b. Reseptör molekülü normal yapısını koruduğu halde transkripsiyon artışı ve/veya gen amplifikasyonu sonucunda fazla sayıda eksprese olur.
- c. Reseptör molekülü üzerinde gerçekleşen mutasyonlar nedeniyle molekül sürekli aktif durumunu korur (Canbay, 2006).

Bir hücre hem büyüme faktörü, hem de onun reseptörünü taşıyorsa, kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna otokrin büyüme halkası denir. Bu halka normal hücrelerde bulunur ve fizyolojik uyarımlara cevap verir (Kırıçoğlu ve ark. 2003). Büyüme faktörlerinin uyarım yollarındaki sapmalar anormal büyüme ve gelişmelerle sonuçlanır. Bu faktörlerin reseptörlerindeki fonksiyon kayıpları diyabet ve cücelik gibi kalıtsal hastalıklara, fazla salgılanması ise psoriasis gibi tümoral olmayan hastalıkların gelişmesine neden olur. Tümoral bozukluklar karışık bir sürecin sonucu olarak ortaya çıkar. Büyüme faktörleri ya da onların uyarım yollarındaki bileşenlerin düzensiz salınması malign tümörlerin şekillenmesinde rol oynar (Rajkumar, 2001).

Büyüme faktörlerinden epidermal büyüme faktör ailesi (epidermal growth factor, EGF) epiteliyal hücreler ve sinir hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından üretilirler ve çeşitli dokuların gelişme, farklılaşma ve onarımında rol oynarlar. EGF ailesi içinde yapısal ve fonksiyonel özellikleri birbirine benzeyen epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü –alfa (Transforming growth factor- α , TGF- α), amfıregulin (AR), heparin bağlayan EGF (HB-EGF), beta-selulin (BTC), epiregulin (EPR) ve neuregulinler (NRG) gibi ligandlar bulunur. EGF ailesinin tüm üyeleri bir dizi hücrenin hücre membranında bulunan özel reseptörlere (epidermal büyüme faktörü reseptörleri-EGFR/ErbB) bağlanırlar. Bu bağlanma hedef hücrede amino asit transpotunun artışı, glikoz alımının ve büyümenin artışı içine alan biyolojik yanıtı başlatır (Herbst, 2004). Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi (ErbB protein ailesi) 4 üyeden oluşur. Bunlar; ErbB-1 (epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) olarak da adlandırılır), ErbB-2 (insanda HER2, kemiricilerde neu olarak adlandırılır), ErbB-3 (HER3 olarak da adlandırılır), ErbB-4 (HER4 olarak da adlandırılır)'tür (Eccles, 2001).

ErbB molekülleri ya homodimerizasyon ya da heterodimerizasyon yoluyla uyarılır. Homo- ya da heterodimerize bağlı erbB reseptörleri intraselüler uzantılarındaki spesifik tirozin kalıntılarının oto- ya da trans-fosforilasyonuna maruz kalır. Epidermal büyüme faktörü ailesinin üyeleri olan EGF, AR, TGF- α , HB-EGF, BTC, EPR ve NRG gibi ligandların hepsi

EGFR'e (HER1) bağlanırken, HB-EGF, EPR ve BTC direk olarak erbB-4 (HER4)'e de bağlanır (Earp et al. 1995; Cowing and Saker, 2001; Xian, 2007; Carpenter and Cohen, 1990). Ligand ve o ligandın spesifik reseptörleri arasındaki etkileşim jukstakrin, otokrin veya parakrin yollarla oluşabilir. Bu ligand/büyüme faktörleri her bir reseptörün tanınmasındaki farklılığa bağlı olarak üç gruba ayrılır: 1) öncelikle EGFR ile etkileşen; 2) öncelikle erbB-3 veya erbB-4 ile etkileşen ve heregulin olarak da adlandırılan Neuregulinler; 3) hem EGFR hem de erbB-4 ile eşit bir şekilde etkileşen ligandlar (Srinivasan et al. 1999). Kemirgenlerde bu ligandlar erbB gen ailesinin reseptör alt tipleri ile etkileşim halindedir. Bu reseptörlerin ligand spesifitesi ve kinaz aktiviteleri farklıdır (Heldin, 1995).

Diğer büyüme faktör reseptörlerinde olduğu gibi ErbB/HER ailesinin molekülleri de ligand tarafından uyarıldıklarında dimerler oluşturarak başka molekülleri fosforile eder ve böylece belirli sinyal yollarının harekete geçmesini sağlarlar. Bütün erbB molekülleri ya homo- ya da heterodimer meydana getirirler (Hunter, 2000). Bu sinyal yolları, hücrede eksprese olan reseptörlerin tipi ve sayısı ile ligandın türüne ve sayısına da bağlıdır. Tüm HER molekülleri birbirleriyle kompleks kurabildiklerinden oluşması mümkün olan kompleks sayısı on tanedir. EGFR ile HER4 homodimerler oluşturabilmelerine karşın, heterodimer oluşumu daha çok görülür. Heterodimer oluşumu yoluyla aktifleşme özellikle sinyal yolunun harekete geçmesi için üç bileşenin (kompleks kuran iki reseptör ve bunlardan birini uyaran ligand) gerekli olması açısından önem taşır (Canbay, 2006).

Bu ailedeki reseptörlerin aktivasyonu hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre göçü ve farklı dokuların yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenmesinde, yani homeostasisin sağlanmasında, ayrıca meme, sinir sistemi ile sindirim sistemi dokularında oluşan yaralanma durumlarında çeşitli cevapların şekillenmesinde rol oynar (Xian, 2007).

Epidermal growth faktör (EGF) urogastron ile identik olup, 53 amino asitli bir polipeptittir. Birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sonrasında salınır (Ciğer, 2008). İlk olarak 1962 yılında hücre kültürlerinde fibroblastlar üzerinde kuvvetli mitojenik etki gösterdiği bulunmuştur. 1980'li yıllarda ise EGF'nin tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörü olan EGFR'ne bağlandığı gösterilmiş ve ardından güçlü mitojenik aktiviteye sahip pek çok büyüme faktörü ve reseptörü tanımlanmıştır (Kırıçoğlu ve ark. 2003). Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) sinyal yollarının memeli hücrelerinde büyüme, yaşam, proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde en önemli yollardan biri olduğu tespit edilmiştir (Oda et al. 2005).

ErbB reseptör tirozin kinaz ailesinin üyesi olan EGFR, 170 kilo dalton ağırlığında tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteini olup, hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR üç bölgeden oluşur: hücre dışı ligandların (EGF, TGF- α , AR) bağlandığı N terminali, hidrofobik transmembran bölgesi ve hücre içi yerleşimli tirozin kinaz aktivitesine sahip C terminalidir. Büyüme faktörlerinin EGFR ile etkileşimine bağlı olarak, EGFR’de dimerizasyon ve ardından otofosforilasyonu sonucu, mitojenik sinyalizasyonda rol alan sitoplazmik proteinler aktifleşir (Kırıçoğlu ve ark. 2003; Carpenter and Cohen, 1990). EGFR en çok epitel hücrelerinde bulunur. Ayrıca endotel, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler görülür. Epitel ve endotel hücreleri ile fibroblastlar için EGFR’nin kemotaktik özelliği vardır. Bunun dışında anjiogenesis ve kollagenaz aktivitesini de uyarıcı özelliğe sahiptir (Ciğer, 2008).

EGFR, EGF, TGF, AR, HB-EGF, BTC ve EPR’i içine alan ligandlar tarafından aktive edilir. Bu ligandlar proteolitik parçalanmalar ve hücre yüzey değişiklikleri yoluyla transmembran prokürsörleri olarak üretilmektedir (Carpenter and Cohen, 1990).

EGF reseptör ailesinin bir diğer üyesi olan ErbB2 (HER2/neu) proteini 185 kilo dalton ağırlığında bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür ve HER2, kromozom 17q21 üzerinde yerleşmiş bir gen tarafından kodlanır. Topoizomeraaz IIa genine komşu olan HER2 geni kanatlı eritroblastozis virusunun onkojen v-erbB’si ile benzerdir ve tümör olgularında, bir onkojen gibi davranır. Bu reseptör de, ekstraselüler ligand bağlayan bölge, kısa transmembran bölgesi ve tirozin kinaz ile bağlantılı intrasellüler bölge olmak üzere HER1 ile benzer moleküler yapıları içerir. Uyarımların başlangıcında ekstraselüler bölgeye farklı ligandların bağlanması hücre proliferasyonu, apoptoz, adezyon, migrasyon ve farklılaşmayı da içine alan hücre biyolojilerini etkiler. HER2 bilinen ligandların hiç birine bağlanmaz, ancak HER ailesinin diğer üyeleriyle heterodimer oluşturur (Gravalos and Jimeno, 2008; Worthylake et al. 1999; Garcia et al. 2003).

HER1 ve HER2 arasında sekans homolojisi bulunmasına rağmen EGF hiçbir zaman HER2’ye bağlanmaz. HER2’nin salgılanma miktarındaki artış meme, ovaryum, tiroid, akciğer, tükrük bezleri ve midede malign tümörlerin oluşmasına neden olur. Fazla miktarlarda salgılanan HER2, tümör hücrelerinin makrofajlara karşı direncini artırır. Bu nedenle HER2, tümörlerin gelişiminde ve devamlılığında önemli rol oynar (Kumar et al. 1991; Alroy and Yarden, 1997; Millanta et al. 2005).

ErbB3 (HER3) reseptörü, reseptör tirozin kinaz tip I ailesine aittir. Karakteristik ekstrasellüler bölge yapısına sahip reseptör L₁, S₁, L₂ ve S₂ olarak isimlendirilen dört alt bölgeden oluşur ve

bu bölgeler ailedeki tüm reseptörler tarafından paylaşılır. L_1 ve L_2 bölgelerinin direkt ligand bağlanmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. S_2 reseptör aktivitesinde ligand stimülasyonunda önemlidir. Yüksek disülfid bağları ve zorunlu bölgeler, L_1/L_2 tarafından tanımlanan ligandlar için gereklidirler (Srinivasana et al. 2001).

ErbB3 için en önemli ligand NRG ya da heregulin olarak da bilinen neu'dan farklılaşan faktördür. Başlangıçta erbB2'nin ligandı olduğu düşünülen NRG'nin, erbB3 ve erbB4 reseptörlerine bağlandığı gösterilmiştir. Ailedeki diğer üyelerin aksine tirozin kinaz ilişkili bir sekansla kodlanan erbB3'ün sitoplazmik bölgesi çok düşük bir katalitik aktiviteye sahiptir. Bu reseptör, hücre uyarımları ve diğer etkili uyarım mekanizmaları için önemlidir (Srinivasan et al. 2001; Stern, 2008).

ErbB3 reseptörü daha çok normal dokularda eksprese edilir. Diğer erbB reseptörleri ve erbB3 arasındaki en önemli farklılık çok az ya da hiç tirozin kinaz aktivitesine sahip olmamasıdır. Bu yüzden de, erbB3'ün homodimerleri inaktiftir. EGFR ya da erbB4 heterodimerleri ve özellikle erbB2 ile önemli etkinliklere sahip çiftler meydana getirdikleri görülmüştür (Gullick, 1996). İnsanlarda meydana gelen tümöral hastalıklarda da erbB3'ün miktarının arttığı saptanmıştır (Srinivasan et al. 1999). ErbB3 hücre farklılaşmasını sağladığı ve aynı zamanda proliferasyon, apoptozis, migrasyon ve adhezyonu inhibe ettiği bilinmektedir.

ErbB4 proteini 180 kilo dalton ağırlığında reseptör tirozin kinaz ailesinin bir diğer üyesidir. Bu reseptör kalp, akciğer ve sinir sisteminin embriyonik gelişiminde önemlidir. Metastatik hastalıkların progresinde de önemli roller oynamaktadır. Örneğin erbB1, meme, ovaryum, prostat ve akciğer kanserlerini de içeren insanlardaki malign tümörlerin çoğunda fazla miktarlarda sentezlenirken, ErbB2 meme kanserli hastalarda tümör agresifitesi ve kötü bir prognozla ilişkilidir. ErbB3 ise insanlarda meme ve mide kanserlerinden elde edilmektedir. Birçok araştırma erbB4 ekspresyonundaki ya da uyarımındaki artışın tümör gelişimiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. ErbB4'ün aşırı salgılanması meme, tiroid ve sindirim sisteminde tümöral gelişime neden olmaktadır. Ancak, bu tümörlerde erbB4 ekspresyonunun prognostik önemi erbB ailesindeki üyelerle erbB4'ün koekspresyonuna bağlıdır (Penington et al. 2002; Muraoka-Cook et al. 2008).

ErbB4 (HER4) fonksiyonlarını açıklamadaki çabalar birçok faktör tarafından engellenmektedir. ErbB4 reseptörü için spesifik agonist ve antagonistler bilinmemektedir. EGF ailesindeki peptid hormonlarının tamamı, erbB ailesinin diğer üyelerinden en az biri ve erbB4 ile bağlanma yeteneğindedirler. Örneğin; EPR ve BTC hem erbB1, hem de erbB4'ü aktive eder ve onlara bağlanırlar. Ayrıca, erbB ailesindeki reseptörlere bağlanmayan ligandlar,

ligand uyaran reseptör heterodimerizasyonu yoluyla değişime uğratılarak uyarımları aktive ederler. Sonuç olarak, erbB4'ü doğrudan aktive (NRG, BTC ve EPR) eden ve bağlayan ligandlar erbB1, erbB2 ve erbB3 sinyallerini de uyarırlar (Penington et al. 2002; Long et al. 2003).

Amfiregulin (AR) otokrin bir büyüme faktörü olup epidermal büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir. Astrositler, Schwann hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasında rol oynar (Falk and Frisen 2002; Kato et al. 2003). AR, EGF ve TGF- α reseptörleri ile etkileşerek normal epitel hücrelerinin büyümesini sağlar belirli karsinom hücrelerinin büyümesini inhibe eder (Shoyab et al.1989).

Neuregulinler (NRG), erbB reseptörlerinin aktivasyonuna ve bağlanmasına dayalı, growth faktörlerin EGF benzeri ailesinin üyeleri olduğu düşünülen sinyal proteinleridir. Sinir sistemi, kalp, meme ve diğer organ sistemlerinde hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eden dört ayrı gen tarafından kodlanmaktadır: NRG-1, NRG-2, NRG-3 ve NRG-4 (Falls, 2003). Şimdiye kadar en çok çalışılan NRG-1, yapılarına, fonksiyonlarına ve hibridizasyon özelliklerine göre üç alt tipe sahip olup 15 den fazla izoforma sahiptir (Peles and Yarden 1993). Tip I, neu farklılaşma faktörü (NDF), heregulin ve asetil kolin reseptör indükleyici aktiviteyi kapsar. Gliyal growth faktör (GGF) prototipik tip II izoformudur. Sensor ve motor nöron türevli faktör (SMDF) tip III NRG-1 izoformudur. Bazı önemli farklılıklara rağmen, erbB dimerizasyonun uyarılması ve korunmuş EGF domainleri içermesi nedeniyle aynı yapısal ve fonksiyonel özellikler paylaşırlar (Chang et al. 1997).

Uterusda epidermal büyüme faktör reseptörleri ve ligandları

Dişi genital sistemdeki gelişme, büyüme ve farklılaşma gibi periodik değişiklikler, ovaryumdan salgılanan steroid hormonlar (östrojen, progesteron) ve uterus epiteli ile stromadan salgılanan endojen büyüme (uterus epitelinde EGF, TGF- α , stromal hücrelerde hepatosit growth faktör, fibrosit growth faktör-2) faktörleri tarafından düzenlenir. Uterusda epiteliyal ile stromal hücrelerde eksprese edilen ve reseptörler tarafından aktive edilen bu büyüme faktörleri uterusun gelişmesini stimüle etmede önemli bir role sahiptirler (Boomsma et al. 1997). Büyüme faktörleri endokrin, otokrin, intrakin ve parakrin mekanizmalarla hücrelere etki eder ve bu etki tirozin kinazın stimülasyonu ile gerçekleşir (Ejskjaer et al. 2005; Srinivasan et al. 1999).

Epidermal büyüme faktör ve reseptörleri EGF sistemi olarak tanımlanır. Bu sistem uterus hücrelerinin gelişimi, çoğalması, farklılaşması ve embriyogenezis gibi çeşitli olaylarda temel bir role sahiptir (Harris et al. 2003; Alroy and Yarden, 1997).

Uterusta büyüme faktörleri ve reseptörlerinin ekspresyonu östrojen ve progesteron tarafından belirlenir. Östrojen özellikle EGF ailesi ve reseptörlerine ait ligandların mitojenik etkilerini düzenler. Kemirgenlerde ve insanlarda steroid hormonlarının uyarılmasını takiben EGF uterus hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu stimüle eder. Östrojenin fare uterusunda EGF ve reseptörlerinin ekspresyonunu artırdığı bildirilmektedir (Shiraga et al. 2000; Nelson et al. 1991).

EGF, uterus epitel hücrelerine bağlanır ve hem in vivo, hem de in vitro ortamda bu hücrelerin proliferasyonunu indükler. Bu nedenle EGF benzeri büyüme faktörleri direkt olarak epitelial hücre fonksiyonunu etkilerler (Nelson et al. 1991).

Erişkin farelerde EGF mRNA geç proöstrus, östrus ve gebeliğin 1. gününde tespit edilmesine rağmen (Huet-Hudson et al. 1990), östrojenle muamele ovariektomize farelerde EGF immunreaktivitesi luminal epitelde saptanmamaktadır (Falck and Forsberg, 1996). Bu nedenle endometriyumda EGF salgılayan hücrelerin lokalizasyonu hala açık değildir. EGF reseptörleri ve EGF reseptör mRNA rat ve fare uterusunda bulunmaktadır ve EGF'nin yüksek affinite duyduğu bağlanma alanlarını uterus hücreleri oluşturmaktadır (Mukku and Stancel, 1985).

Seksüel siklusun hem östrüs hem de diöstrüs dönemlerinde keçi uterusunda da uterusun luminal ve glandular epitelinde farklı EGF pozitif reaksiyon gözlenmesine rağmen, stromal ve miyometrial hücrelerde zayıftan negatifliğe değişen ölçüde bir reaksiyon tespit edilmektedir (Tamada et al. 2000).

Sıçanlarda uterus düz kasları EGF reseptörleri içerdiğinden EGF'nin, uterus kontraksiyonunu stimüle ettiği bilinmektedir. EGF'nin uterus düz kas kontraksiyonu üzerindeki bu etkisi dokuya özgü seçicilik göstermektedir. Çünkü bu büyüme faktörü izole edilen bağırsak düz kas kontraksiyonunu stimüle etmemektedir. Dolayısıyla EGF'nin uterotonik bir substans olarak klinikte kullanılmasının yanısıra uterus aktivitesini düzenlemede fizyolojik rolünün olduğu ileri sürülmektedir (Gardner et al. 1987).

EGF, memeli embriyolarının gelişiminin güçlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Onların temel fonksiyonları gebeliğin ilk zamanlarında yavrunun yerleşmesini ve çevre ile uyumunun sağlanmasını kolaylaştırmak, yumurta ve spermatozoanın taşınması ve embriyo bölünmelerinin ilk safhalarının desteklenmesinin sağlanmasıdır (Wollenhaupt et al. 2004). EGF aynı zamanda birçok mezodermal ve ektodermal kökenli hücre için mitojenik özelliktedir. Etkili olduğu hücrelerde iyon alınımları, glikolizisi, DNA ve RNA ile protein yapımını artırıcı özellik gösterir (Pratt, 1987).

Çeşitli memelilerde seksüel siklus süresince erbB/HER ailesinin bütün üyelerinin uterusun luminal ve glandular epitelinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Tamada et al. 2000; Ejksjaer et al. 2005; Sağsöz and Ketani, 2010). Uterusun epitelial, stromal ve miyometriyal hücreleri EGF reseptörleri içerir ve EGF epitelial hücrelerin gelişmesini stimüle eder. Bu durum aynı ligandın (mesela EGF) bir ya da daha fazla uterus hücre tipinin gelişmesini ve aynı organın bir diğer hücre tipinde farklılaşmış bir cevabı (örn: kontraksiyon) stimüle edebileceği olasılığını artırmaktadır (Tomooka et al. 1986). İnsan uterusu hem endometriyumda, hem de miyometriyumda EGF reseptörleri içerir (Chegini et al. 1986). EGFR, endometriyumun glandular epitelinin hücre yüzeyinde bulunur. İnsanlarda seksüel siklusun folliküler ve luteal fazı arasında immunohistokimyasal olarak boyanma farklılığı gözlenmemektedir. EGFR, miyometriyumdan ziyade endometriyumda daha çok bulunmaktadır (Smith et al. 1991). Sıçan uterusunda da EGF reseptörlerinin benzer dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir (Gardner et al. 1987; Stancel et al. 1987).

Fare uterusunda EGF reseptörlerinin iki ayrı formu bulunmaktadır: Fonksiyonel bir reseptör olan tam-uzun form (170 kDa) ve salgılanan bir protein olan kesilmiş (truncated) form (95 kDa) dur. Kesilmiş EGF reseptörlerinin, EGF veya EGF ile ilişkili büyüme faktörlerine bağlandığı ya da hücre membranına yerleşmiş olan tam-uzun EGF reseptörleri ile etkileşimde olduğu düşünülmektedir (Das et al. 1994).

Sığırlarda seksüel siklusun hem luteal, hem de folliküler fazında uterusun luminal epitel, glandular epitel, stroma, miyometriyum ve damar endotelinde membran ve sitoplazmik olarak değişen yoğunlukta pozitif reaksiyon gösteren erbB/HER reseptörleri bulunduğu belirtilmektedir. ErbB1 ve erbB2 reseptörleri, luminal epitel hücrelerinin hem apikal hem de bazal membranında, glandular epitelial hücrelerin ise sadece apikal membranında saptanmaktadır. ErbB3 ve ErbB4 reseptörleri ise luminal ve glandular epitelial hücrelerin sitoplazmasında daha yüksek seviyelerdedir. Hem luteal, hemde folliküler fazda erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4 reseptörlerinin luminal ve süperfisiyal glandular epitelial hücrelerdeki boyanma yoğunluğu, derin glandular epitelial ve bağ doku hücrelerindeki boyanma yoğunluğundan daha fazladır (Sağsöz et al. 2010).

ErbB1'in ligandları ile birlikte uterus hücre proliferasyonunu ve özellikle seksüel siklusun proliferatif fazında hücrelerin migrasyonunu stimüle ettiği bildirilmektedir. Kemirgenlerde ve insanlarda EGF ve EGFR/erbB1, hücre proliferasyonu ve farklılaşması yanında steroid hormon ilişkili uterus büyümesini uyarır (Ejksjaer et al. 2005; Srinivasan et al. 1999).

İnsan uterusunda erbB1'in seviyesi folliküler fazın başlangıcında düşük, luteal faz ve folliküler fazın sonunda ise yüksektir. ErbB1, domuz (Wollenhaupt et al. 2004), keçi (Tamada et al. 2000), köpek (Kida et al. 2010), rhesus maymununun (Yue et al. 2000) uterusunda luminal ve glandular epitelin yanı sıra bağ doku ve düz kas hücrelerinde değişen yoğunlukta lokalize olmaktadır. Sıçan ve farelerin uterusunda da erbB1'in varlığı bilinmektedir (Mukku and Stancel, 1985; DiAugustine et al. 1988).

ErbB2 fare uterusunda EGF-ilişkili büyüme faktörlerin stimülasyonunda potansiyel bir mediatör olarak faaliyet gösterir (Lim et al. 1997). ErbB2 geni uterusda epitel hücrelerinde eksprese edilmesine karşın, ErbB1 bu hücrelerde saptanmamaktadır (Das et al. 1994). ErbB1'in yokluğunda epitel hücrelerinin fonksiyonunu etkileyen ErbB4 ile ErbB2'nin heterodimerizasyonu bu hücrelerde ErbB4'ün varlığını göstermektedir. Bu nedenle epiteliyal, stromal ve embriyonik orijinli EGF benzeri ligandlar, epiteliyal hücre ErbB2 ve diğer reseptör alt tipleri üzerinden epiteliyal hücre fonksiyonunu düzenler (Lim et al. 1997). ErbB2, erbB1 ile birlikte dimer oluşturarak hücre proliferasyonunu stimüle eder (Ejskjaer et al. 2005; Srinivasan et al. 1999). ErbB2 gen ekspresyonu fare uterusunun epitelinde lokalize olmaktadır ve gebelik süresince miktarında değişiklik gözlenir. Bu bulgular gebelik süresince erbB2'nin endometrial fonksiyonlara katkıda bulunduğunu ifade eder (Idris et al. 2001).

ErbB4 reseptörü ile neuregulin- α , neuregulin- β ve betacellulin gibi ligandlar incelendiğinde menstrual siklusun proliferatif fazından ziyade sekretorik fazında daha yüksek seviyelerde bulunduğu ve böylelikle bu proteinlerin endometrial olgunlaşmada anahtar bir role sahip olduğu tespit edilmektedir. erbB4 immunreaktivitesi hem endometrial bezlerde hem de stromada zayıftan orta dereceliye değişen ölçüde reaksiyon göstermektedir. Glandular ve stromal ekspresyonları karşılaştırıldığında erbB4 ve NRG1- α 'nın stromada daha yüksek seviyede olduğu bildirilmektedir. Seksüel siklusun her iki fazında da endometrial bezlerde ve stromada erbB3 düşük seviyelerde eksprese edilmektedir. Buna karşın erbB2'nin sadece bezlerde eksprese edildiği, stromada ise eksprese edilmediği rapor edilmektedir (Srinivasan et al. 1999). Özellikle insanlarda erbB4 seksüel siklus süresince erbB1 ile birlikte güçlü proliferatif stimülasyonları düzenlemede rol oynadığı belirtilmektedir (Ejskjaer et al. 2005; Srinivasan et al. 1999).

Dişı genital sistemde amphiregulinin fizyolojik öneminin tam olarak anlaşılamamasına rağmen, implantasyon sürecinde hücrel infiltrasyona katılabileceğı düşünölmektedir. Amphiregulin, EGFR aracılığıyla erbB2, erbB3 ve erbB4'ün tirozin fosforilasyonunu stimöle eder (Lee et al. 2006). İnsanlarda seksüel siklus dönemi incelendiğinde amphiregulin en çok proliferatif fazda eksprese edilmektedir ve özellikle lökositler ile stromal hücrelerde rastlanmaktadır (Ejskjaer et al. 2005). Fare uterusunda amfiregulin ekspresyonunun implantasyon spesifik olduğı ve progesteron ile düzenlendiğı bilinmektedir (Das et al. 1995; Lee et al. 2006). Son çalışmalar farelerde amfiregulin mRNA ekspresyonunun ovidukta zigotun varlığıyla düzenlendiğini göstermektedir (Lee et al. 2006). Domuzların endometriyumunda amfiregulin mRNA ekspresyonunun gebeliğın 15. gününden 20. gününe kadar arttığı, 20. gününden 30. gününe kadar azaldığı ve 30-40. günler arasında değişmediğı belirlenmiştir (Kim et al. 2003).

Neuregulinlerden NRG-1 izoformları (Neu differentiation factor-NDF-, ve sensory and motor neuron-derived factor-SMDF) embriyonun uterus bağlanması sırasında ortaya çıkan implantasyon spesifik genlerdir ve blastosistin implantasyonu için gereklidirler. Tersine, NRG-4 preimplantasyon döneminde eksprese edilir ve ovaryum steroid hormonları tarafından düzenlenir (Brown et al. 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi deney hayvanları merkezinde yetiştirilen 6-8 haftalık, daha önce bir deneysel çalışmada kullanılmamış ve ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan *Rattus norvegicus* (Wistar) ırkı 25 dişi ve 4 adet erkek ergin sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar standart laboratuvar koşullarında standart diyet ve musluk suyu ile beslendi. Vaginal smearla östrusta olduğu belirlenen sıçanlar iki dişiye bir erkek olacak şekilde çiftleştirildi ve ertesi sabah alınan vaginal smearda spermiyumların görüldüğü gün gebeliğin birinci günü olarak kabul edildi.

3.1. DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

3.1.1. Doku Temini

Doğumların başlamasını takiben postpartum 1., 3., 5., 10., 15. günler için 5'er adet olmak üzere sıçanlardan rompun ve ketalar anestezisi (Rompun 13 mg/kg, Ketalar 87 mg/kg) altında uterus dokuları alındı ve kalbin sağ atriyumu kesilerek hayvanlar ötenazi edildi. Alınan uterus örnekleri formol-alkol solüsyonunda (10 ml %40'lık formaldehit + 90 ml %96'lık etanol) 12 saat tespit edildi. Erkek sıçanlar ve doğan yavrular deney sonrasında deney hayvanları ünitesine geri iade edildi.

3.1.2. İmmunohistokimya tekniği için doku hazırlanması

Formol-alkol solüsyonunda tespit edilen dokular sırası ile %96, %100 I, %100 II, %100 III alkol serilerinde 1'er saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Daha sonra metil benzoat ve benzol solüsyonlarında şeffaflaştırma işlemi yapılarak parafinde bloklandı. Bu parafin bloklardan Leica RM 2125 rotary miktomu ile alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitlere yapısal değişiklikleri belirlemek için Crossman'ın üçlü boyaması (Crossman, 1937), hemosiderin yüklü makrofajları (siderofajlar) belirlemek için Perl'in Prussian Blue metodu (Bancroft and Cook, 1984), epidermal büyüme faktörü reseptörleri ve ligandların lokalizasyonlarını belirlemek için ise Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz yöntemi uygulandı.

3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

1. Bu tekniğe göre parafin bloklardan APES [(3-Aminopropyl) triethoxysilane, minimum % 98, Sigma, A3648, 100 ml) ile kaplı lamlara kesitler alındı ve 1 gece boyunca 50 °C'de etüvde tutuldu.

2. Bir gün sonra deparafinizasyon için parafin kesitler 2 defa 5'er dakika ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 3'er dakika (%100, %96, %80, %70) bekletildi.
3. Distile su ile çalkalanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için methanolde (Merck, Katalog No: 106009.2511) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (%30 Hidrojen peroksit, Merck, Katalog No: 108597, 2.5 lt) içinde 15 dakika bekletildi.
4. Takiben kesitler 0,01 M PBS'de 2 kez 5'er dakika yıkandı.
5. Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler sitrat tamponu [2300 ml distile su içerisinde 4.8 gr sitrik asit (Anhidroz, Sigma, C0759, 500 gr) eritildi ve 12N NaOH ile pH 6.0'e ayarlanarak son hacim distile su ile 2500 ml'ye tamamlandı] içinde 95⁰C'de 20 dakika kaynatıldı ve takiben aynı tampon içinde oda ısısında 30 dakika bekletildi.
6. PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları yani dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek için kesitler 5 dakika bloklama solüsyonu (Ultra UV Block, LabVision Corporation TA-125UB) ile bir nem kamarası içinde inkübe edildi.
7. Hemen sonrasında, serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldı ve erbB-1 (1:50), erbB-2 (1:200), erbB-3 (1:50), erbB-4 (1:100), EGF (1:50), AR (1:50), NRG (1:50) primer antikorlarıyla 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikoru Adı	Antikoru Türü	Katalog Numarası
ErbB-1/EGFR	rabbit	Santa cruz, sc- 03
ErbB-2/NEU	mouse	Santa cruz, sc- 7301
ErbB-3	rabbit	Santa cruz, sc- 285
ErbB-4	rabbit	Santa cruz, sc- 283
EGF	rabbit	Santa cruz, sc- 275
AR	rabbit	Santa cruz, sc- 25436
NRG	rabbit	Santa cruz, sc- 28916

8. Kesitler primer antikorlar ile inkübasyondan sonra, 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.

9. Daha sonra kesitler, biyotinle işaretlenmiş keçi anti-tavşan (Labvision Corporation TR-125-BN) ve keçi anti-polivalent sekonder antikoru (Labvision Corporation TP-125-BN) ile 20 dakika oda ısısında muamele edildi.
10. PBS de 4 defa 5'er dakika ile yıkandı.
11. Horseradish peroksidaz konjugatlı streptavidinle (Labvision Corporation TS-125-HR) 20 dakika muamele edildi.
12. Tekrar 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
13. Diamino benzidin (DAB) kromojeni (Zymed) ile dokular 3-5 dakika muamele edildi. Enzim substrat etkileşimi sonucunda oluşan ürün kahverengi olarak mikroskopta görüldü.
14. Kesitler 2-3 kez distile suda çalkalandı.
15. Gill'in Hematoksilen solüsyonu ile 4 dakika zıt boyama yapıldı ve kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı.
16. Daha sonra sırasıyla %96, %100'lük alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitlerin üzerine yapıştırıcı (entellan) damlatılıp lamelle kapatıldı.

Pozitif Kontrol olarak meme karsinomu (erbB1) kullanıldı. Negatif kontrol olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi.

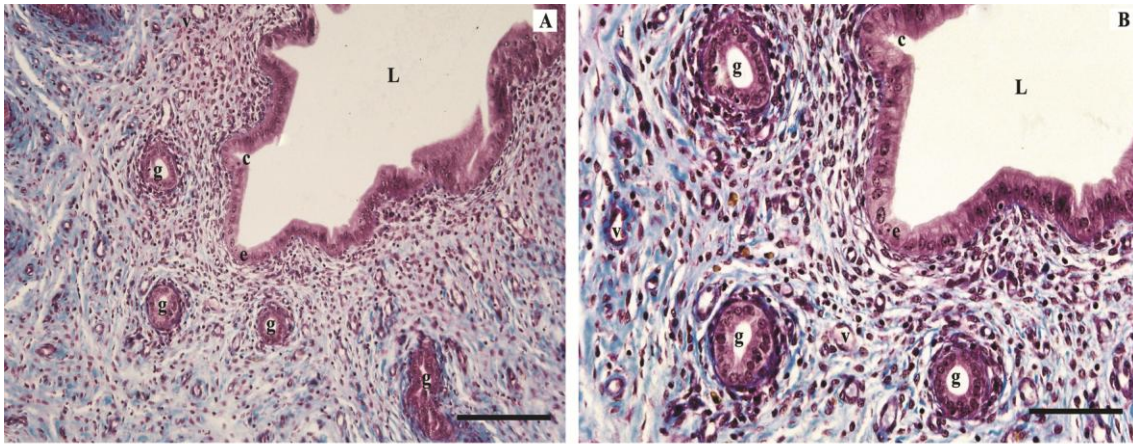
Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Japan) incelenerek fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

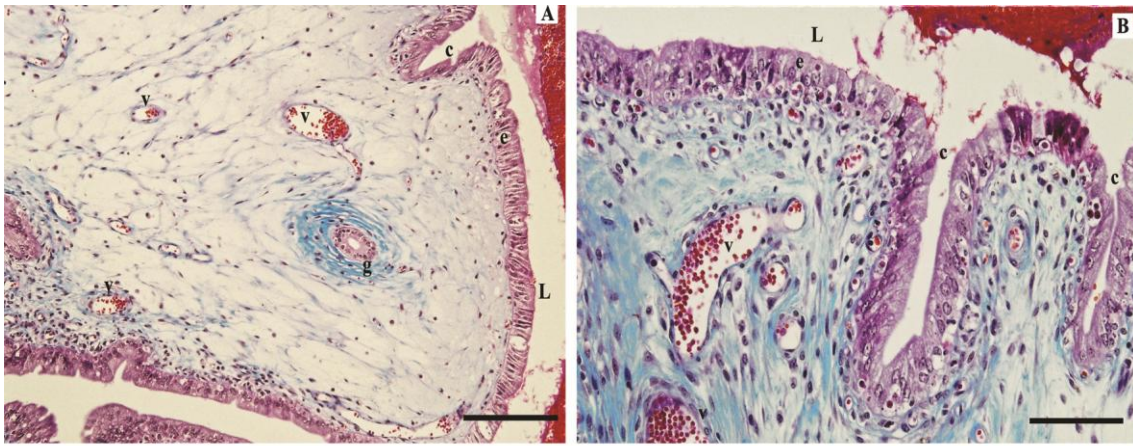
Anatomik olarak iki kornulu uterusu sahip olan sıçanlarda uterus duvarı endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç tabakadan oluşmaktaydı.

Endometriyumun yüzey epiteli tek katlı prizmatik ya da kübik özellikte olup lumene doğru kıvrımlar yapmaktaydı ve aynı zamanda epitel lamina propriyaya doğru kriptler oluşturmıştı (Şekil 4.1 A-B). Çok kısa silyumlara sahip olan epitel hücrelerinin sitoplazmasında özellikle supranükleer bölgede çok sayıda salgı granülü dikkat çekti. Çekirdek ise hücrelerin bazaline doğru yerleşmiş durumda oval şekilli ve ökromatik özellikte olup bir ya da iki adet çekirdekçik içermekteydi. Uterus epitelinde prizmatik hücreler arasında ikinci bir hücre tipi bulunmaktaydı ve bu hücrelerin sitoplazması yoğun boyanmış olup mekik şeklinde bir çekirdeğe sahipti. Lamina propriya tabakası geniş olup bol miktarda kan damarlarına ve stromal hücrelere sahipti. Epitelin hemen altındaki bağ dokuda hücre yoğunluğu fazla iken, kas katmanına doğru azalmakta olduğu dikkati çekti. Aynı zamanda bu gevşek bağ doku içerisinde basit alveolar karakterde bezler yer almakta olup, bu bezlerin lumenleri dar ve epiteli tek katlı kübik idi (Şekil 4.1 A-B). Lamina propriya içinde hemosiderin yüklü makrofajlara (siderofajlar) rastlandı. Uterusun miyometriyum tabakası içte sirküler dışta longitudinal olmak üzere iki kas katmanı içermekteydi. Bu iki kas katmanı arasında arter, ven ve lenf damarlarından zengin stratum vaskulare tabakası bulunmaktaydı. Perimetriyum ya da tunika seroza tabakası ise peritoneal mezotel hücreleri ile sarılı gevşek bağ dokusundan ibaretti. Bu tabakada oldukça az sayıda düz kas hücreleri yanında çok sayıda lenf, kan damarı ve sinir tellerine rastlandı.



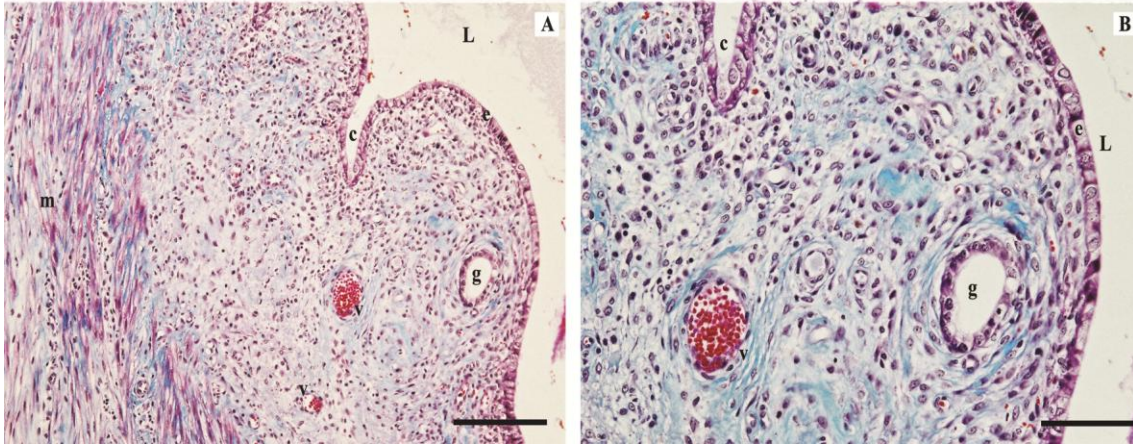
Şekil 4.1. Sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 µm (A), 100 µm (B).

Postpartum 1. günde uterus lumeninin oldukça genişlediği ve mukozanın lumene doğru değişik büyüklük ve biçimlerde kıvrımlar yaptığı ve bu nedenle epitel altındaki lamina propriyanın (stroma) yer yer kalın, yer yer ince olduğu görüldü. Lamina epiteliyalis içerisinde koyu ve açık boyanan asidofilik sitoplazmalı hücreler, piknotik çekirdekli hücreler gibi değişik hücre tiplerinin bulunduğu bu nedenle epitelin yalancı çok katlı prizmatik özellik belirlendi. Epitel hücrelerinin çoğunun vakuollü olduğu ve epitelin bazalinde intraepiteliyal kapilar damarların bulunduğu tespit edildi. Vakuolleşmenin ve intraepiteliyal damarların yoğun olduğu bölgelerde ise epitel ile endometriyal stroma arasındaki sınır belirgin değildi. Yüzey epitel kriptleri ise oldukça derin ve düzensizdi. Mukozal kıvrımların içindeki stromanın ödemli olduğu ve bunları örten epitelin yüksekliğinin azalmış olduğu dikkati çekti. Stromanın hücre yoğunluğunun az olduğu, ayrıca hiperemik ve değişik büyüklüklerde olan kan damarları ile çok az sayıda uterus bezleri ve bu bezler etrafında konsantrik dizilmiş kollagen ipliklerin bulunduğu tespit edildi. Miyometriyumun stratum vaskülar tabakasındaki damarların da geniş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2 A-B).



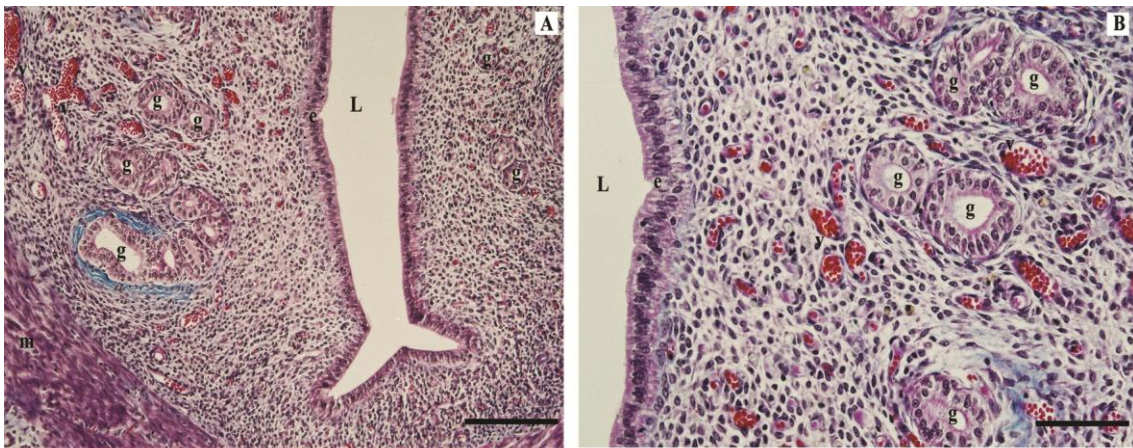
Şekil 4.2. Postpartum 1. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 µm (A), 100 µm (B).

Postpartum 3. günde mukozal kıvrımların azalmasıyla birlikte lumenin daraldığı, intraepiteliyal damarların kaybolduğu, uterusunda bulunan kriptlerin derinlikleri ile sayılarının da azaldığı gözlemlendi. Ayrıca stromadaki ödemin azaldığı buna karşılık stromal hücre yoğunluğunun arttığı (Şekil 4.3A-B) ve çok az sayıda siderofajın (hemosiderin yüklü makrofajların) ortaya çıktığı belirlendi (Şekil 4.7).



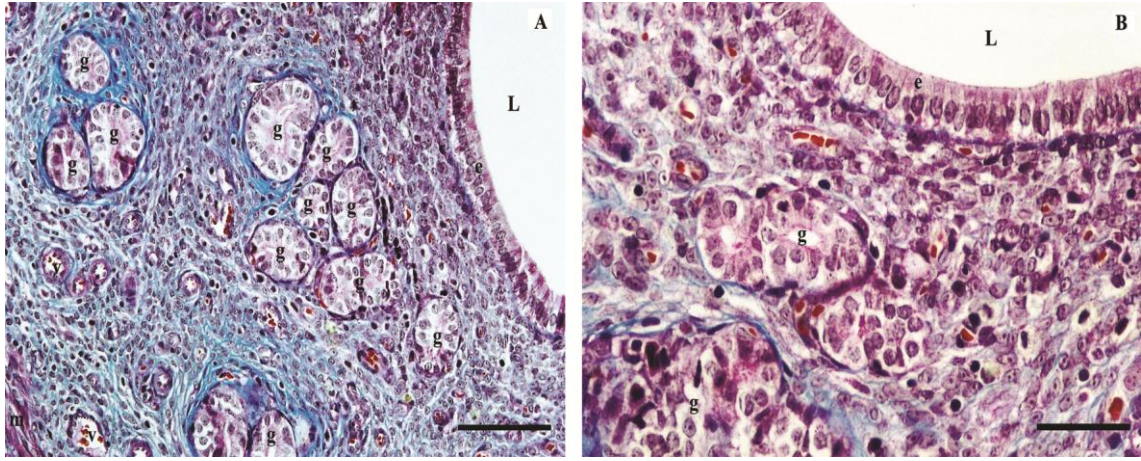
Şekil 4.3. Postpartum 3. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 μ m (A), 100 μ m (B).

Postpartum 5. günde uterus lumeninin iyice küçülerek T şeklini aldığı, epitelin aynı tipteki prizmatik hücrelerden oluştuğu, birkaç tane olduğu gözlenen kriptlerin derinliklerinin iyice azaldığı görüldü. Luminal epitel hücrelerinde görülen vakuollerin ve stromal ödemin de kaybolduğu, stromada küçük çaplı kapillar damarların bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.4 A-B). Stromal hücre yoğunluğunun artmasına paralel olarak özellikle bez grupları etrafında olmak üzere hemosiderin yüklü makrofajların sayısında da artış saptandı (Şekil 4.7). Ayrıca gruplar halindeki uterus bezlerinin etrafındaki kollagen ipliklerin kalınlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.4 A-B).

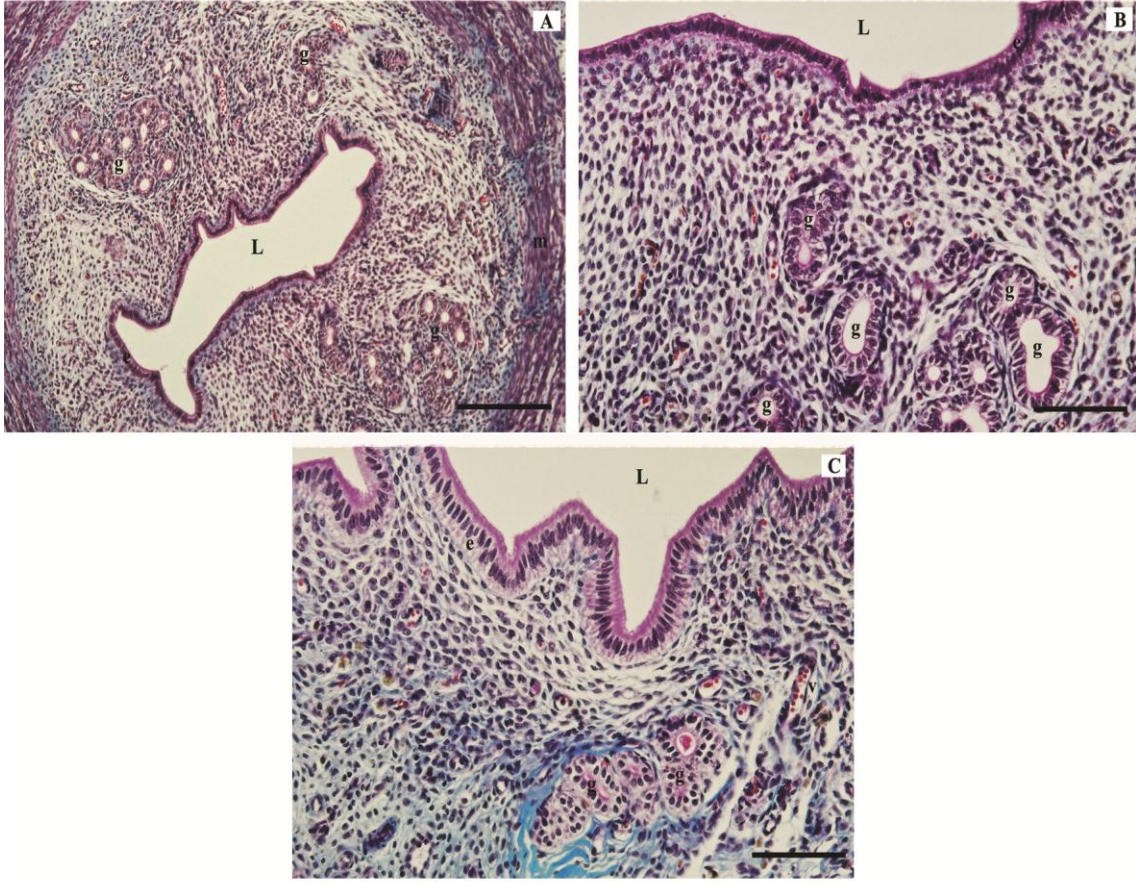


Şekil 4.4. Postpartum 5. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 μ m (A), 100 μ m (B).

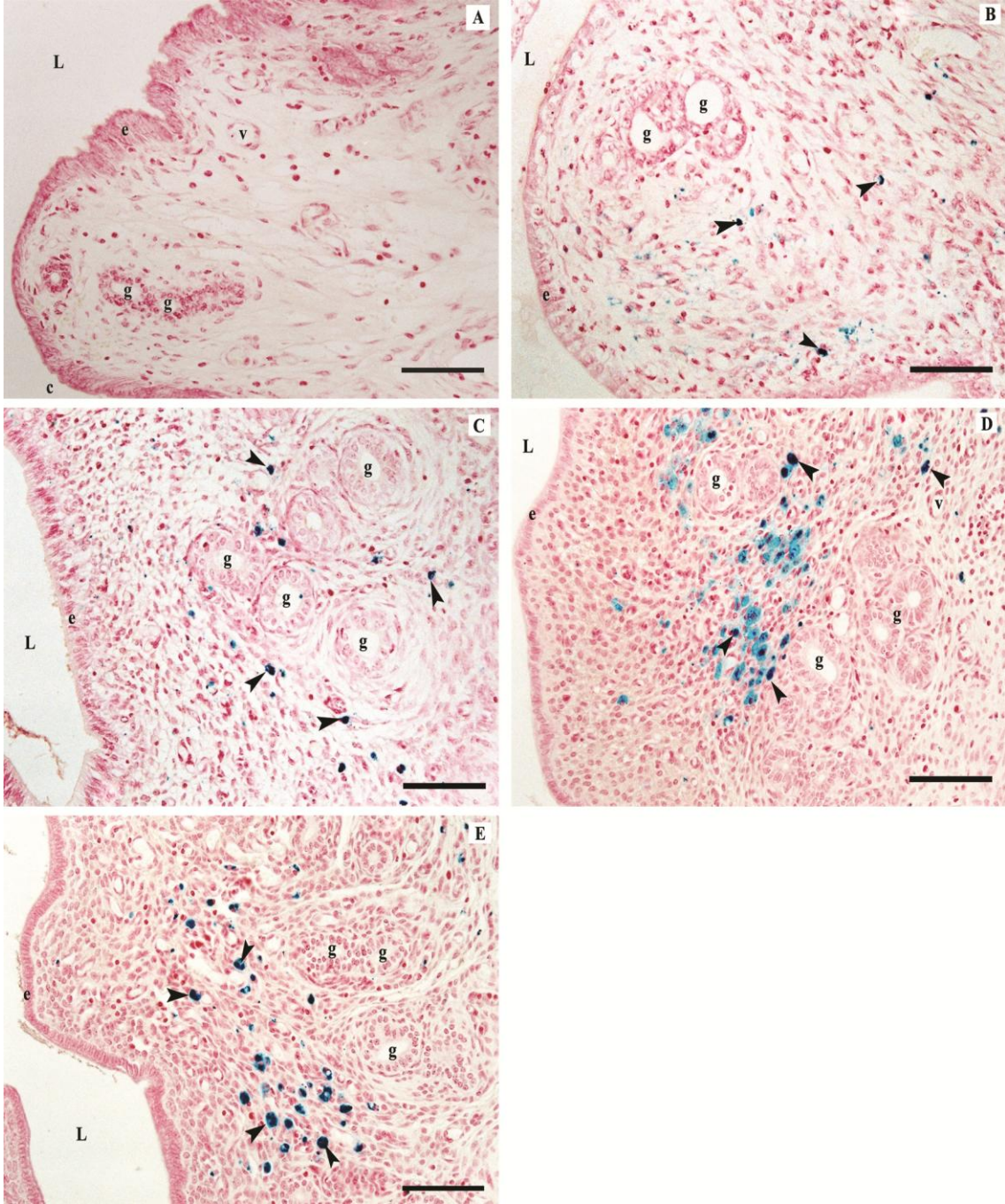
Postpartum 10. ve 15. günde uterus mukozasında kriptlerin kaybolduğu, lumenin daraldığı ve yüzey epitelinin ise yüksek prizmatik özellik kazandığı tespit edildi. Postpartum 10. günde çok sayıda hemosiderin yüklü makrofajlara rastlandı (Şekil 4.7). Bu hücreler özellikle miyometriyuma bitişik endometriyal stroma bölgesine yayılmıştı (Şekil 4.5 A-B). Postpartum 15. günde hemosiderin yüklü makrofaj miktarının biraz azaldığı görüldü (Şekil 4.7). Epitelin hemen altındaki bağ dokuda stromal hücre yoğunluğu fazla iken kas katmanına doğru azalmakta olduğu dikkati çekti. Uterus bezlerin sayısının arttığı ve aynı zamanda hücre yoğunluğu artmasıyla birlikte lamina propriya tabakası kalınlığının arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6 A-C).



Şekil 4.5. Postpartum 10. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 100 µm (A), 50 µm (B).



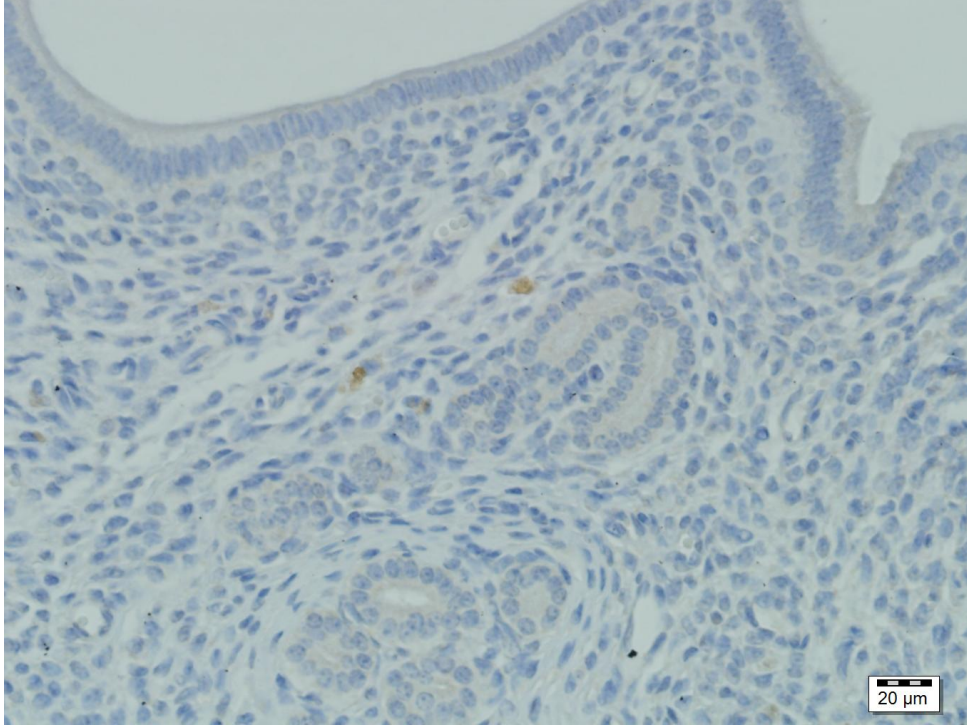
Şekil 4.6. Postpartum 15. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, g: endometriyal bez, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 μ m (A), 100 μ m (B,C).



Şekil 4.7. Postpartum 1. (A), postpartum 3. (B), postpartum 5. (C), postpartum 10. (D) ve postpartum 15. (E) günde sıçan uterusundaki hemosiderin yüklü makrofajlar. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, ok başı: hemosiderin yüklü makrofajlar, Perl'in Prussian Blue Boyaması, Barlar: 100 μ m.

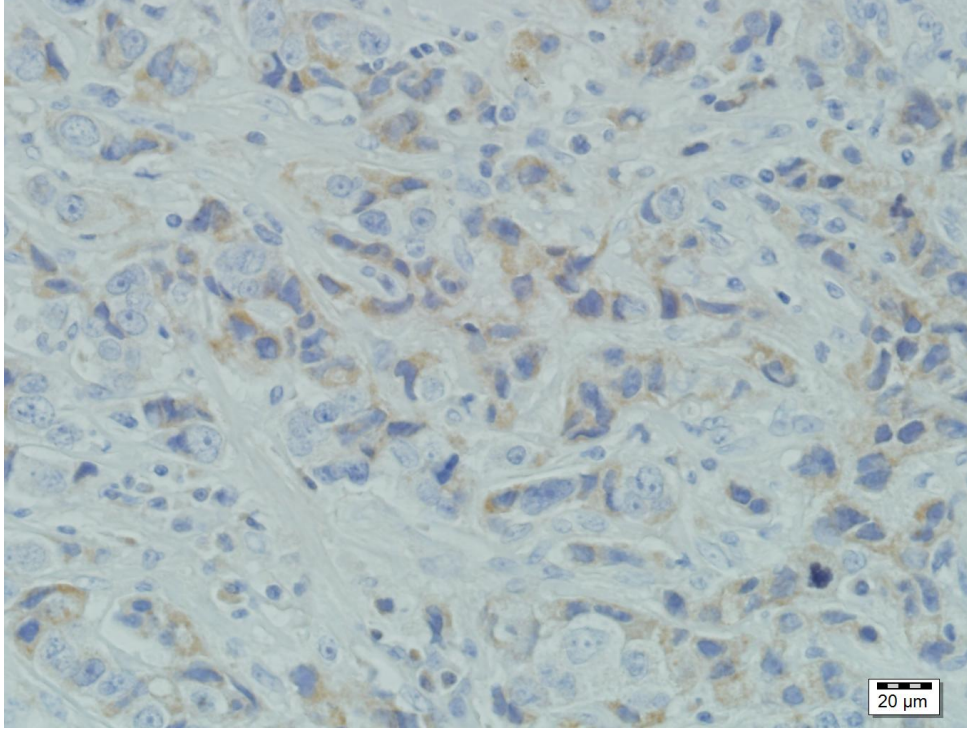
4.2. UTERUSDA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRLERİ VE LİGANDLARININ (EGF, AR ve NRG) LOKALİZASYONU

Bu çalışmada primer antikorlar yerine PBS ile muamele edilen negatif kontrollerde boyanmanın olmadığı gözlenmiş olup bu immunreaksiyonun spesifik olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda primer antikorlar yerine PBS ile muamele edilen negatif kontrol. Bar: 20 µm.

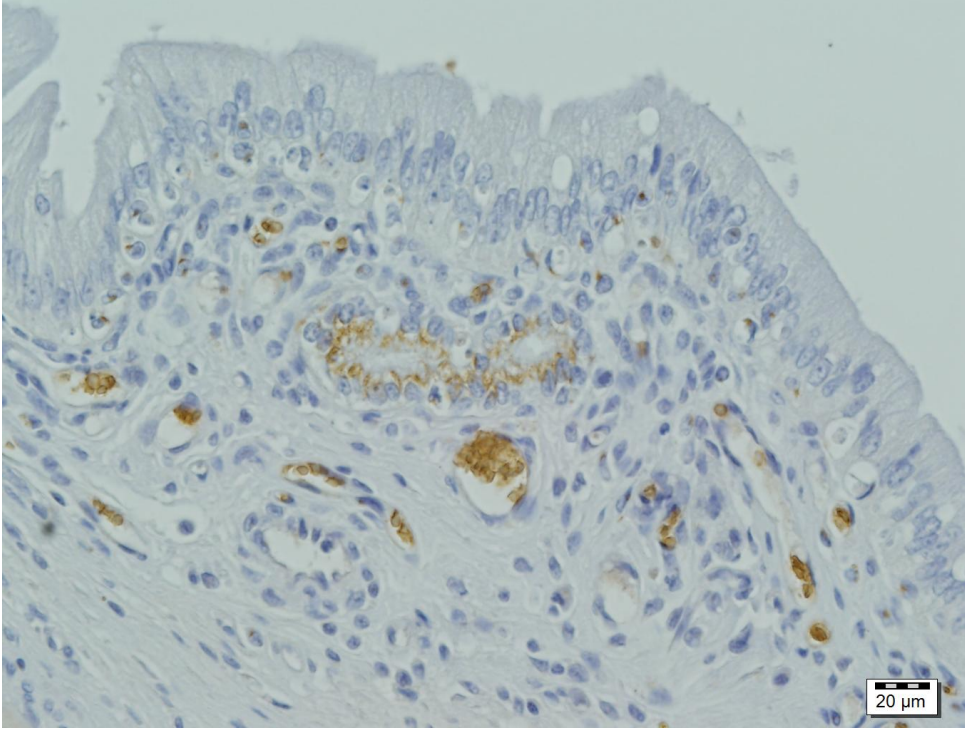
Ayrıca erbB1 için meme karsinomu pozitif kontrol olarak seçildi (Şekil 4.9).



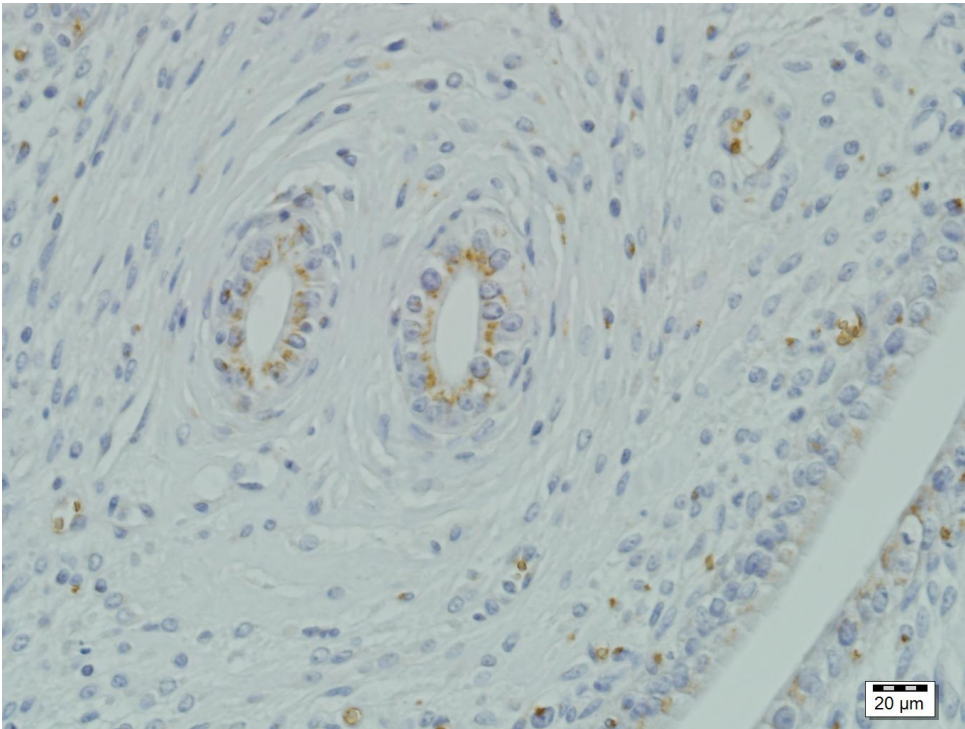
Şekil 4.9. İnsan meme karsinomundaki hücrelerin sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.1. ErbB1 lokalizasyonu

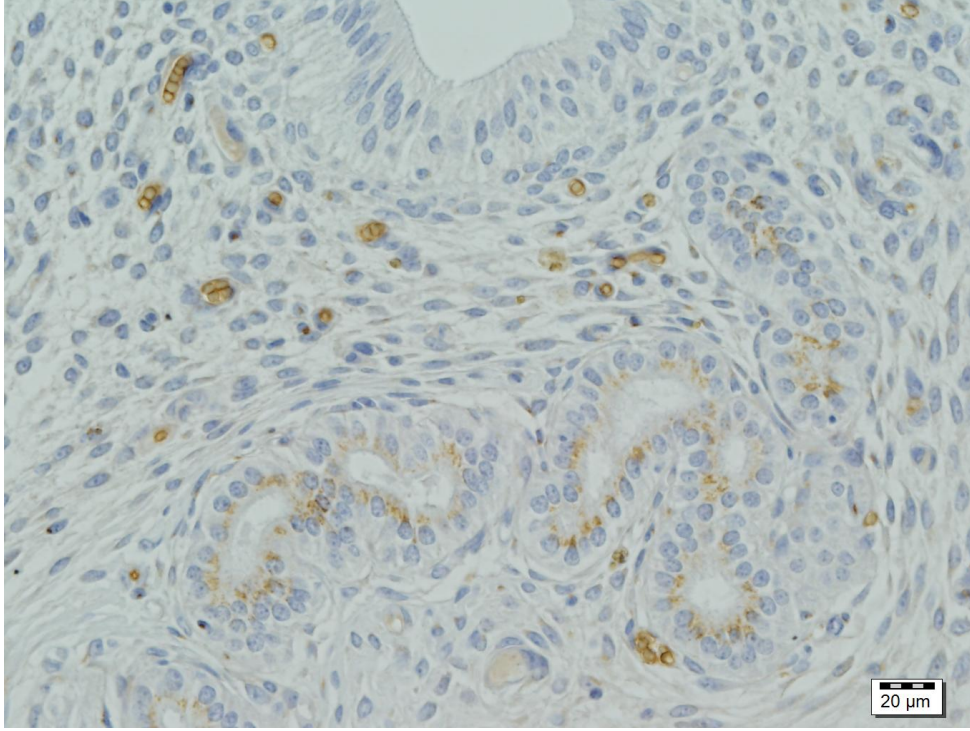
Postpartum bütün günlerde endometriyal bezin apikal sitoplazmasında kuvvetli erbB1 immunreaksiyonu gözlemlendi. Bazı stromal hücre, luminal epitel hücreleri ve miyositlerde sitoplazma içerisinde çekirdeğin hemen yanında nokta şeklinde pozitif reaksiyon saptandı. Postpartum 10. ve 15. günlerde diğer günlerden farklı olarak luminal epitelin apikal sitoplazmasında da kuvvetli pozitif immunreaksiyon saptandı. Postpartum günler arasında reaksiyon açısından hiçbir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.10-15).



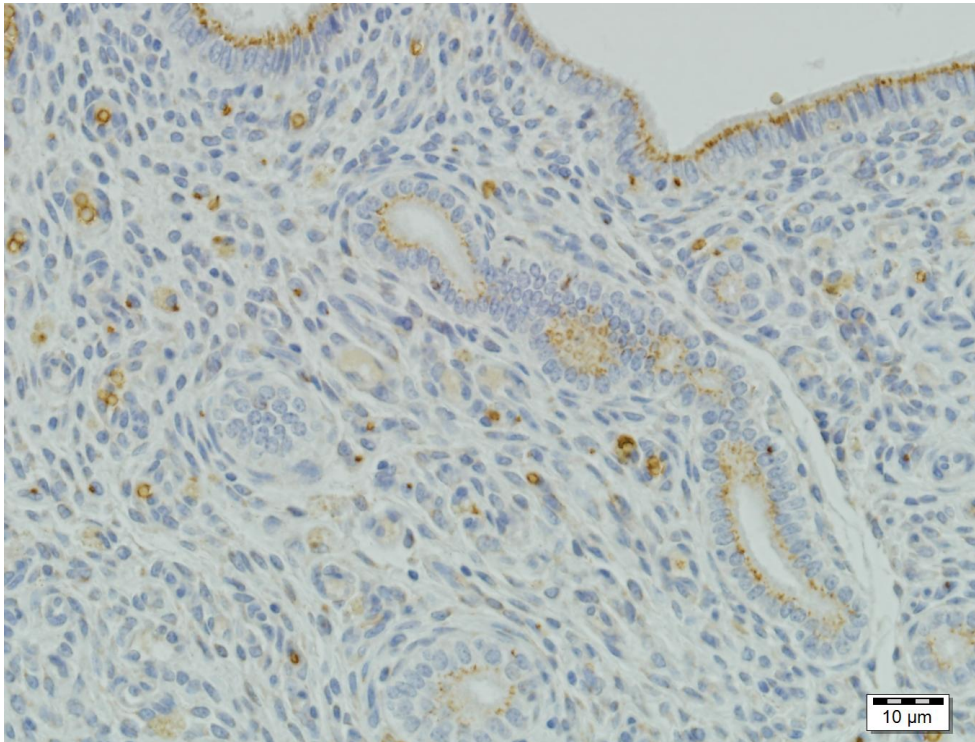
Şekil 4.10. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda bez epitelinin apikal sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



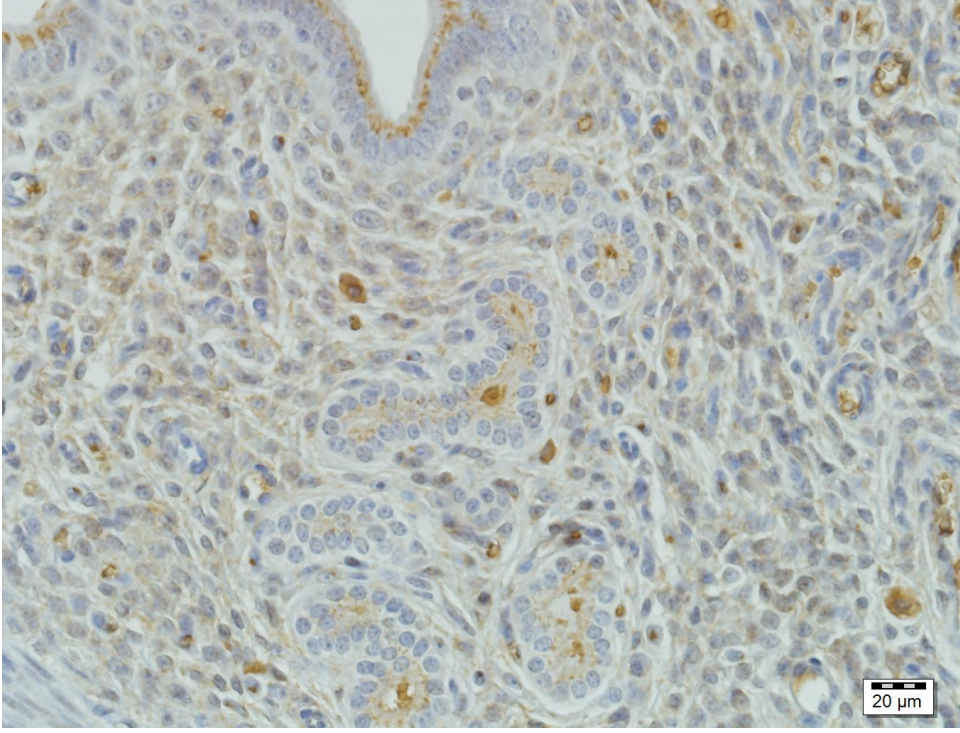
Şekil 4.11. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda bez epitelinin apikal sitoplazmasında ve bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



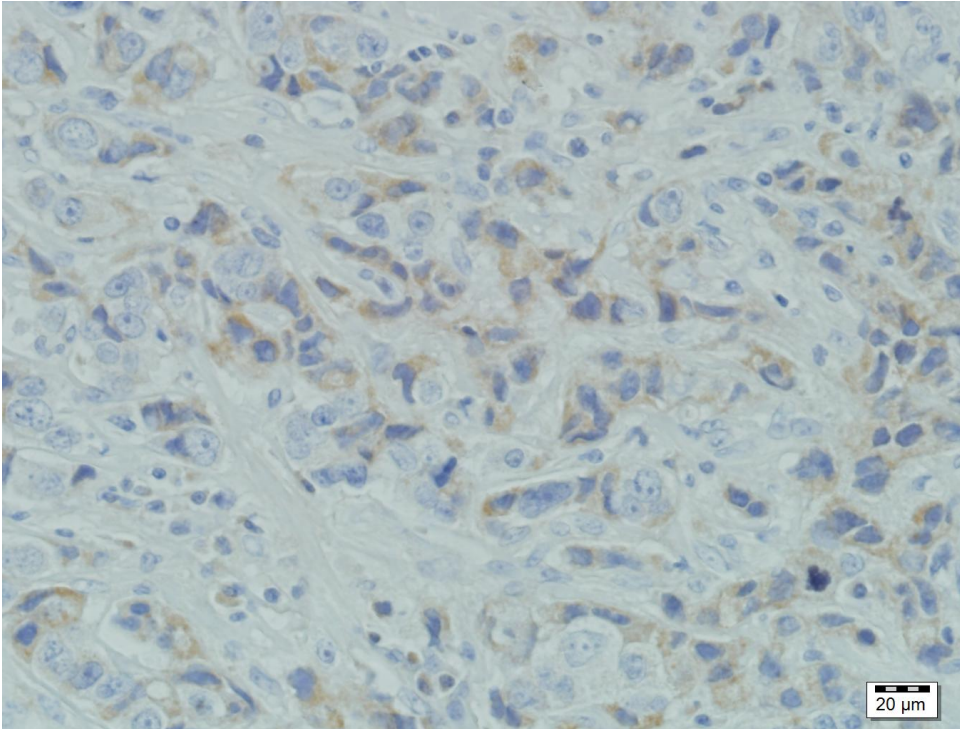
Şekil 4.12. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda bez epitelinin apikal sitoplazmasında ve bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



Şekil 4.13. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda luminal epitelin ve bez epitelinin apikal sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



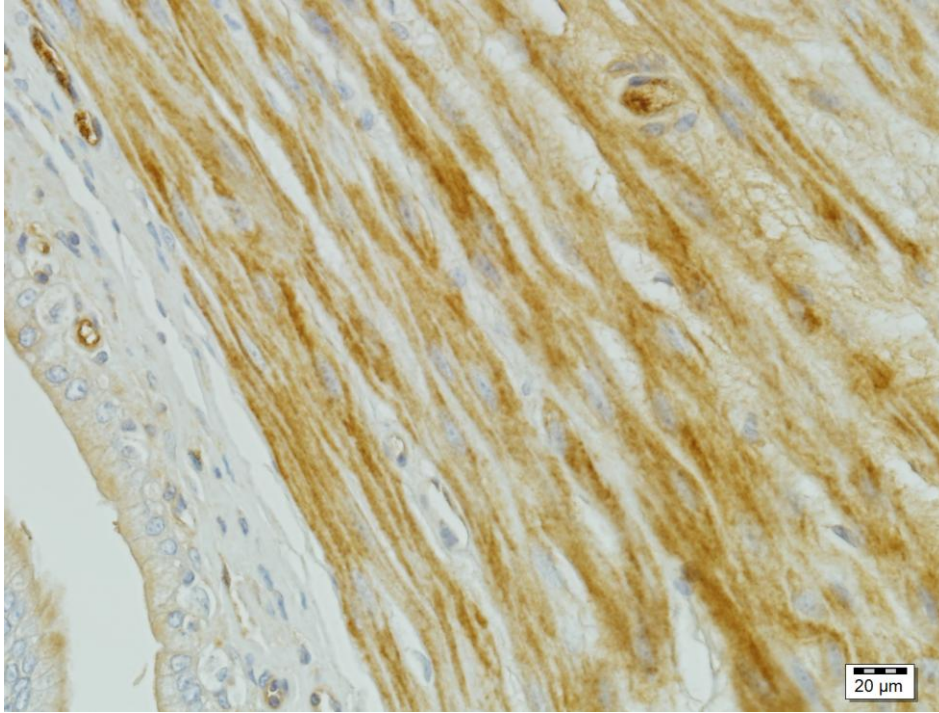
Şekil 4.14. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazması, luminal epitelin ve bez epitelinin apikal sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



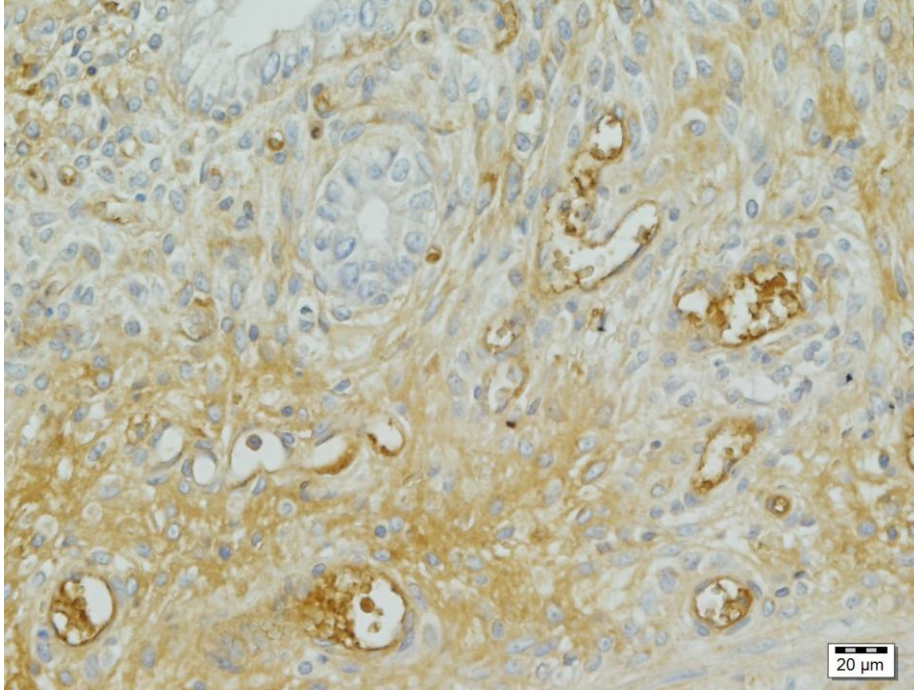
Şekil 4.15. İnsan meme karsinomundaki hücrelerin sitoplazmasında erbB1 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.2. ErbB2 lokalizasyonu

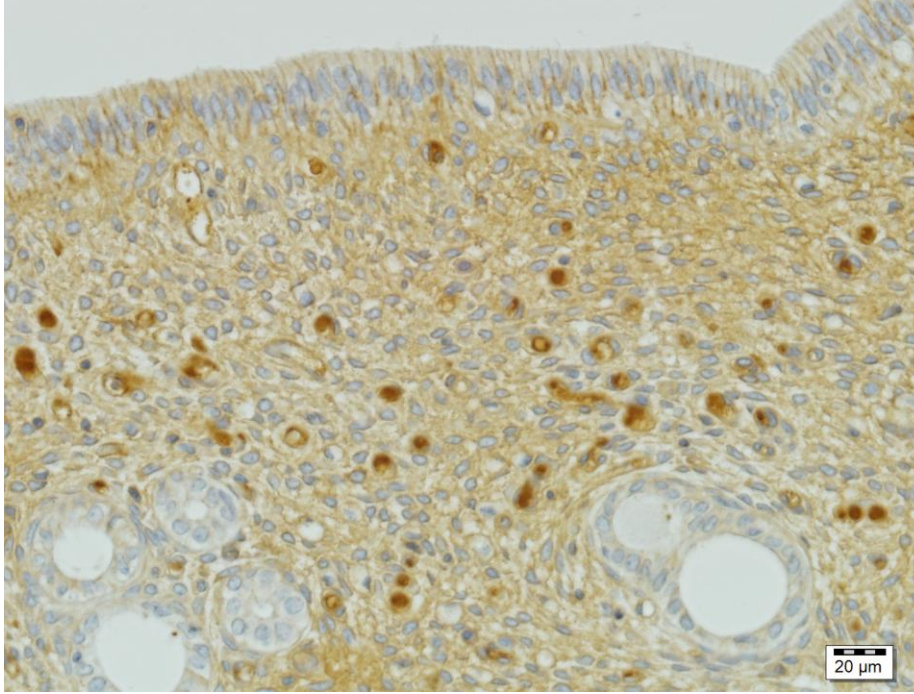
Postpartum bütün günlerde luminal epitelin ve glandular epitelin apikal membranında, 5., 10. ve 15. günlerde ise luminal epitelin lateral membranında erbB2 immunreaksiyonu gözlemlendi. Stromal hücre, miyosit ve endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki reaksiyon kuvvetli iken, luminal epitel ve glandular epitelin sitoplazmasında daha zayıf bir reaksiyon saptandı. Postpartum günler arasında reaksiyon açısından hiçbir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.16-20).



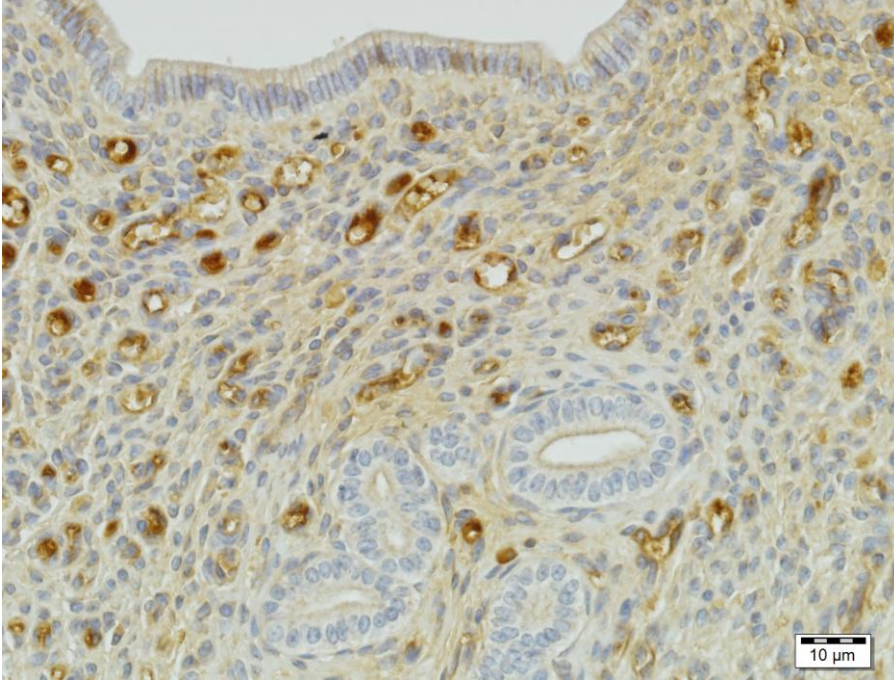
Şekil 4.16. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda miyosit ve damar endotelinin sitoplazmasında erbB2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



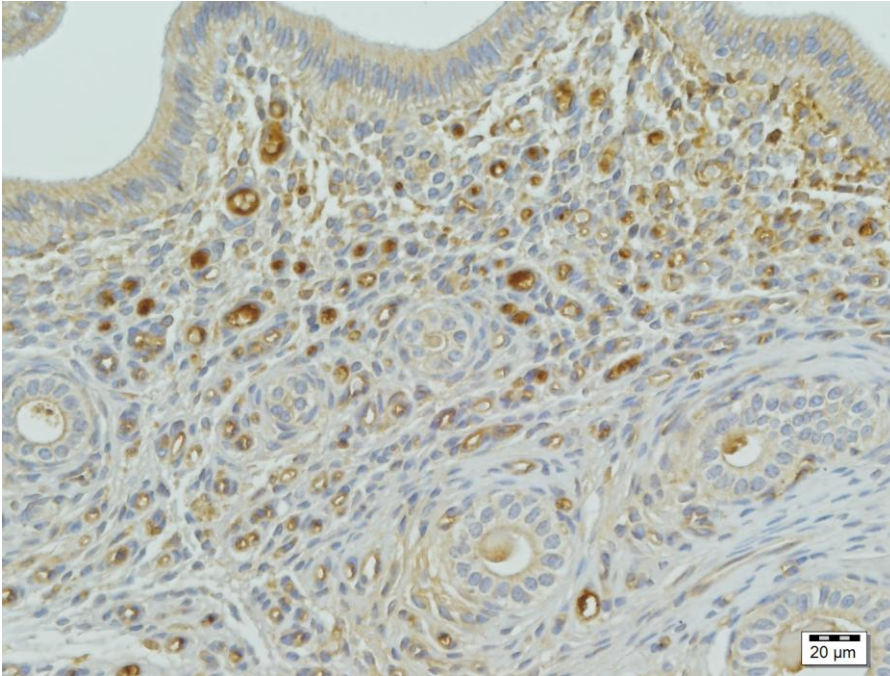
Şekil 4.17. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda damar endotelinin sitoplazmasında erbB2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



Şekil 4.18. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda luminal epitelin lateral membranında ve damar endotelinin sitoplazmasında erbB2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



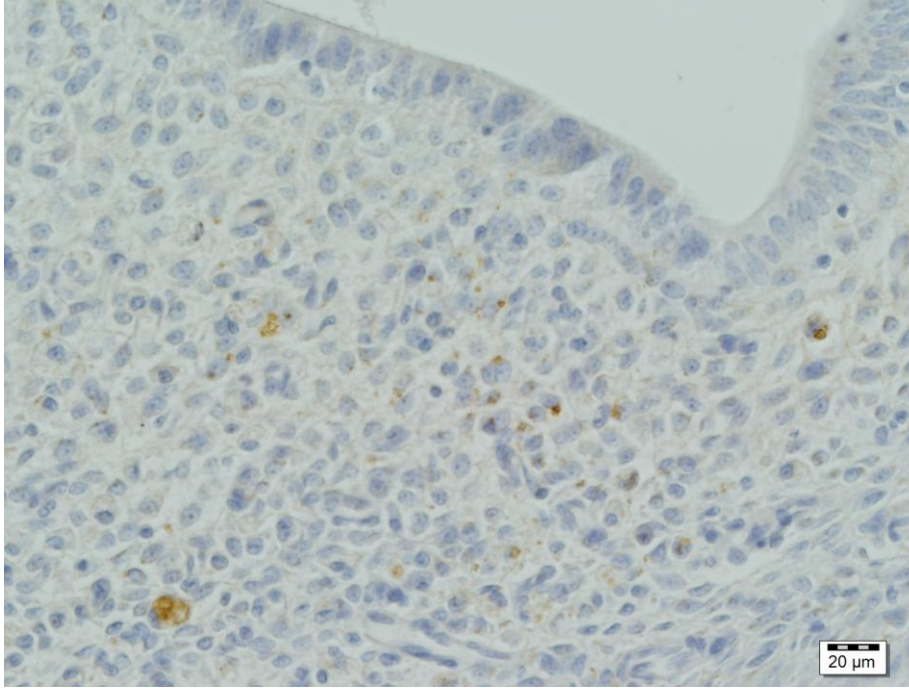
Şekil 4.19. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda luminal epitelin lateral membranında, bez epitelinin apikal membranında ve damar endotelinin sitoplazmasında erbB2 immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



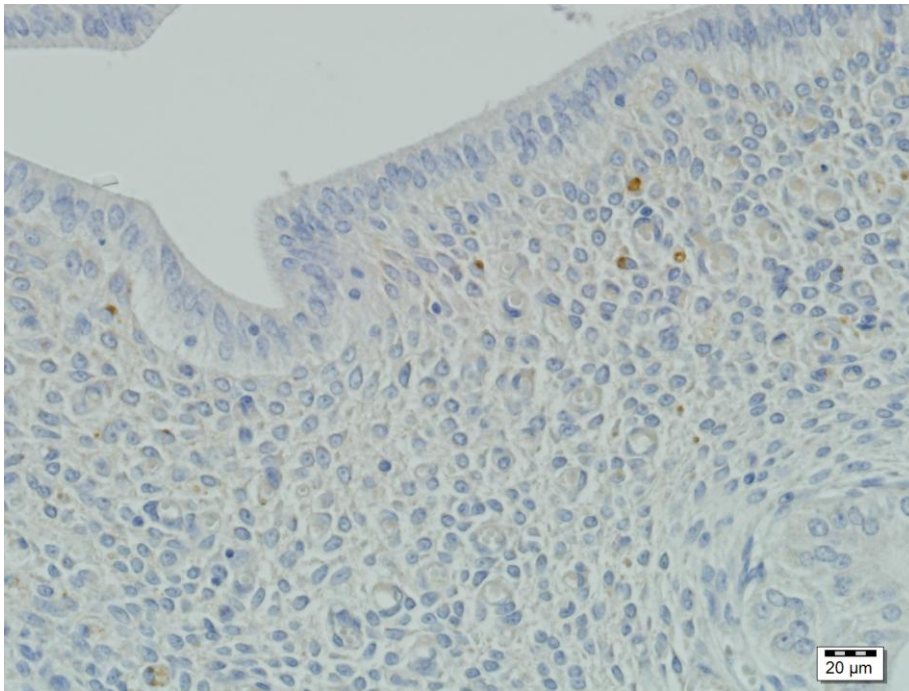
Şekil 4.20. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda luminal epitelin lateral membranında, bez epitelinin apikal membranında ve damar endotelinin sitoplazmasında erbB2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.3. ErbB3 lokalizasyonu

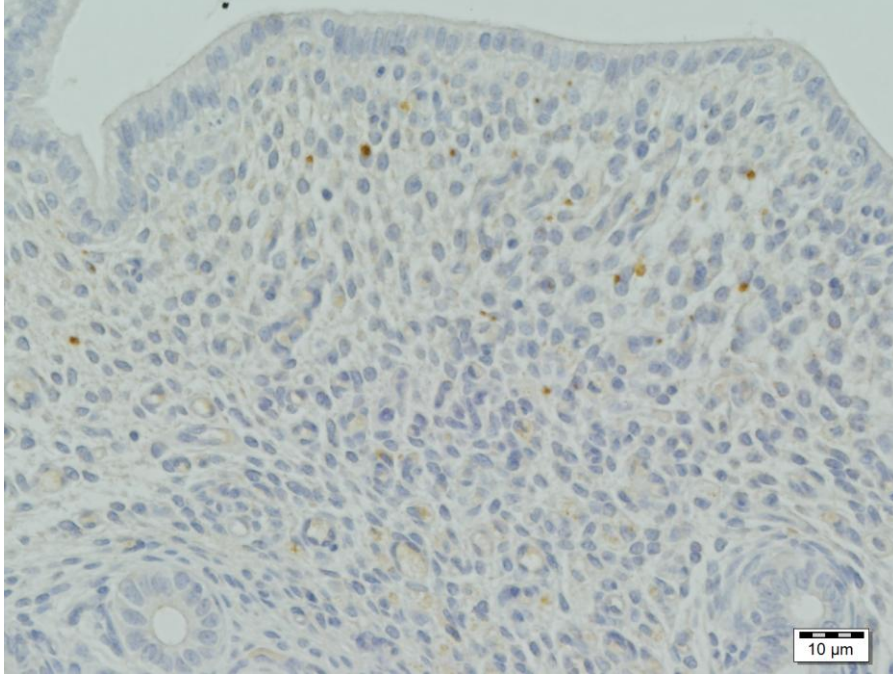
Postpartum involüsyonun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde bazı stromal hücre sitoplazması içerisinde çekirdeğin hemen yanında nokta şeklinde erbB3 pozitif reaksiyon saptandı. Diğer uterusun bütün yapısal komponentlerinde erbB3 reaksiyonu negatifti (Şekil 4.21-23).



Şekil 4.21. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB3 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



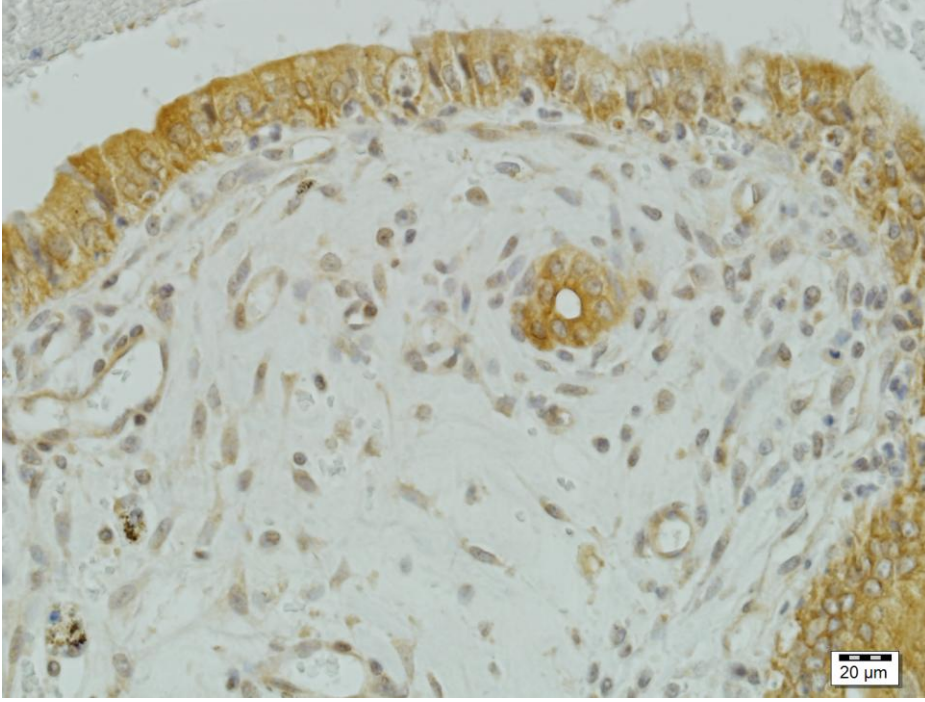
Şekil 4.22. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB3 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



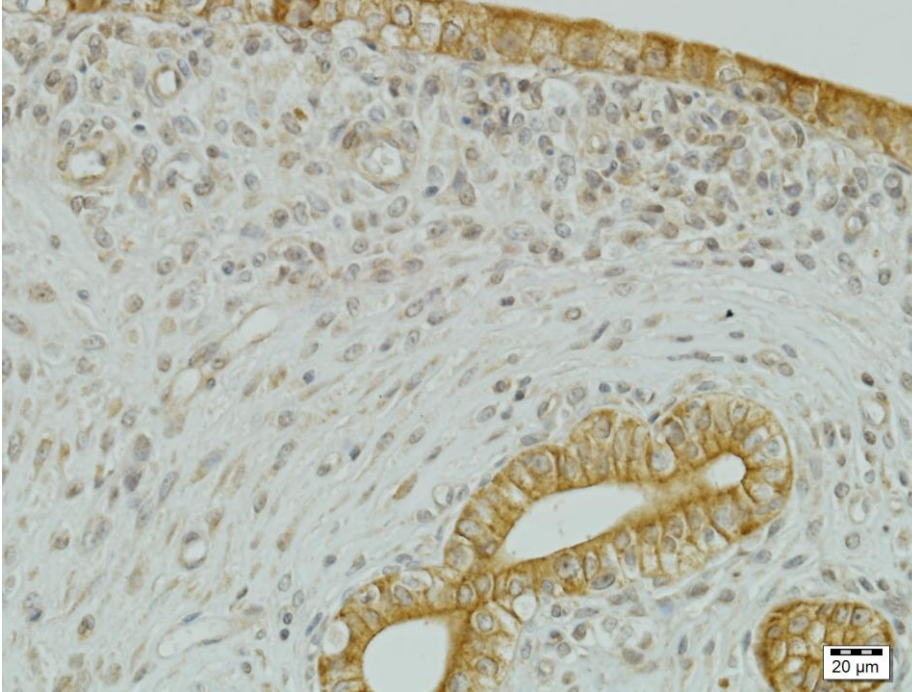
Şekil 4.23. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB3 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.4. ErbB4 lokalizasyonu

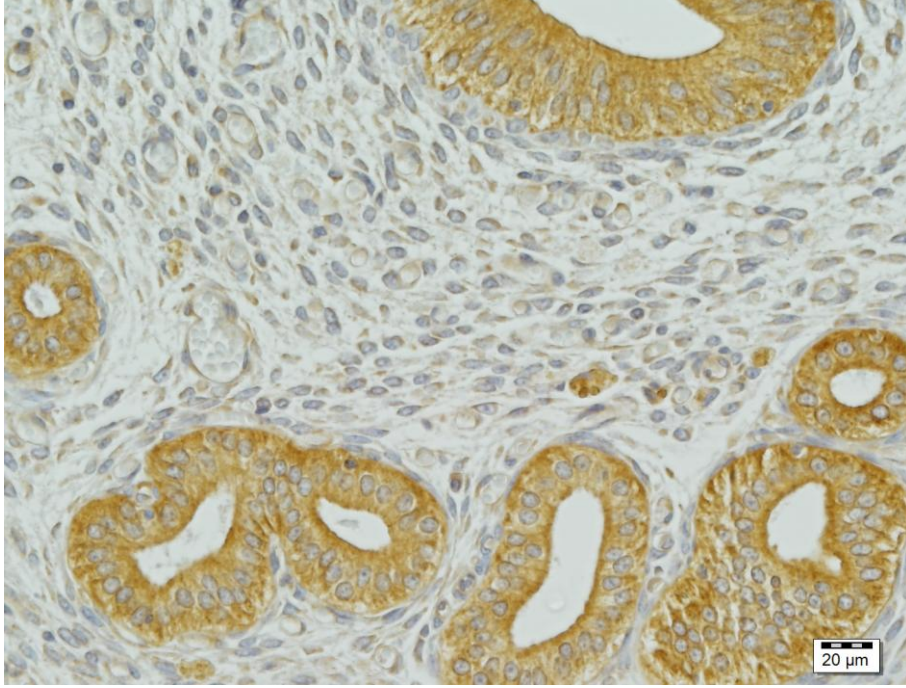
Postpartum involüsyonun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde luminal epitel ve bez epitel hücrelerinin sitoplazmasında ve apikal membranında kuvvetli erbB4 immunreaksiyonu gözlemlendi. Stromal hücre, endotel ve düz kas hücrelerinin ise sitoplazmasında orta dereceli bir reaksiyon saptandı. Postpartum 5. günden itibaren luminal epitelin lateral membranlarında pozitif reaksiyon saptandı ve aynı zamanda sitoplazması oldukça kuvvetli erbB4 pozitif reaksiyon veren stromal hücrelere rastlandı (Şekil 4.24-28).



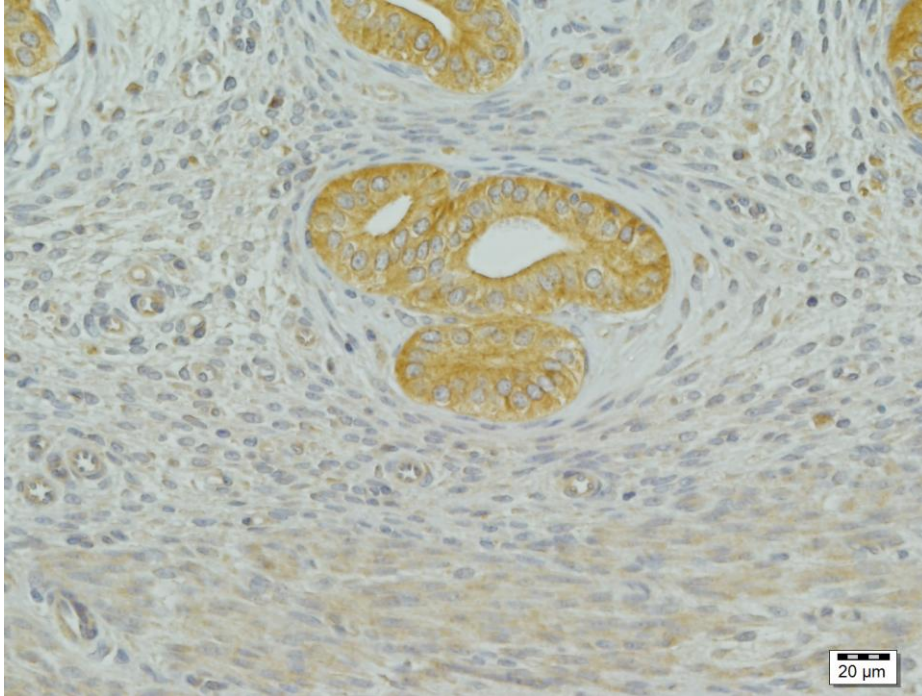
Şekil 4.24. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda luminal epitel, bez epitel, endotel ve stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



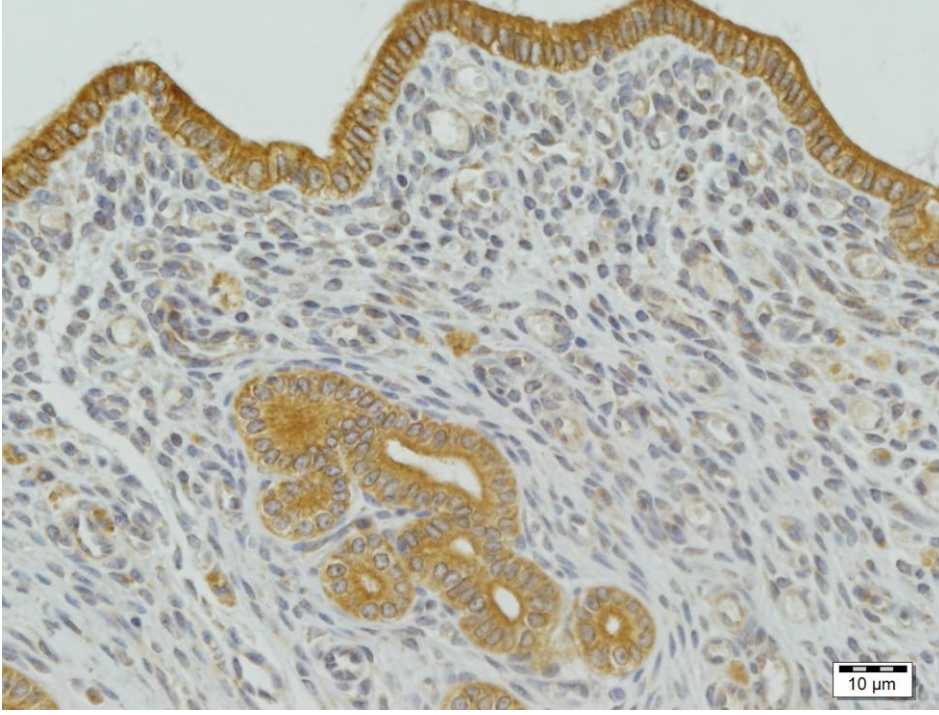
Şekil 4.25. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda luminal epitel, bez epitel, endotel ve stromal hücrelerin sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



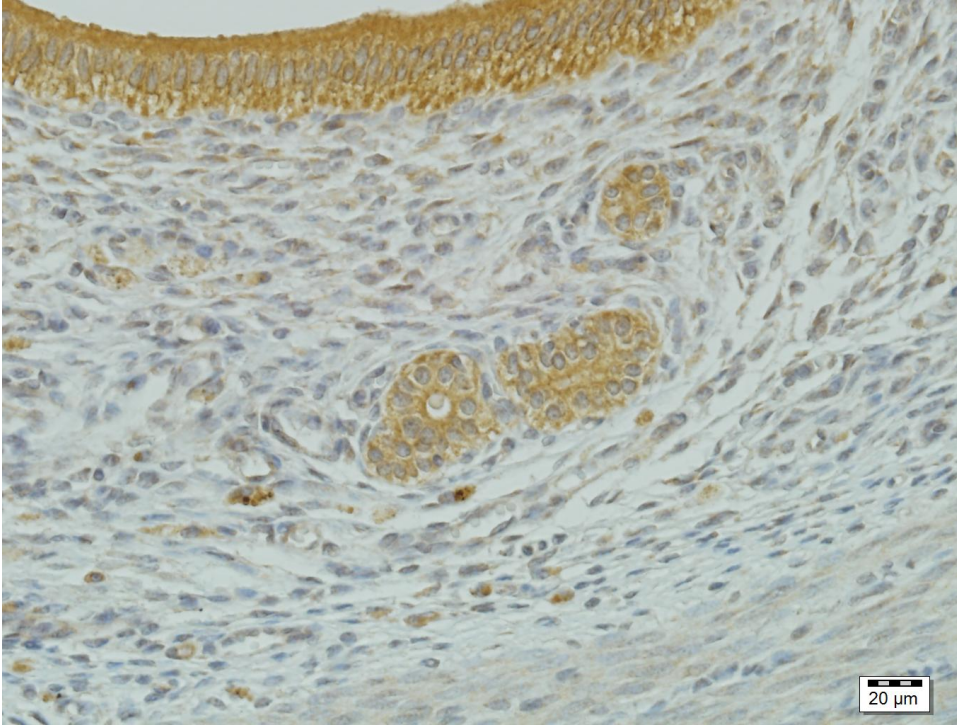
Şekil 4.26A. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda luminal epitel, bez epitel ve endotel sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



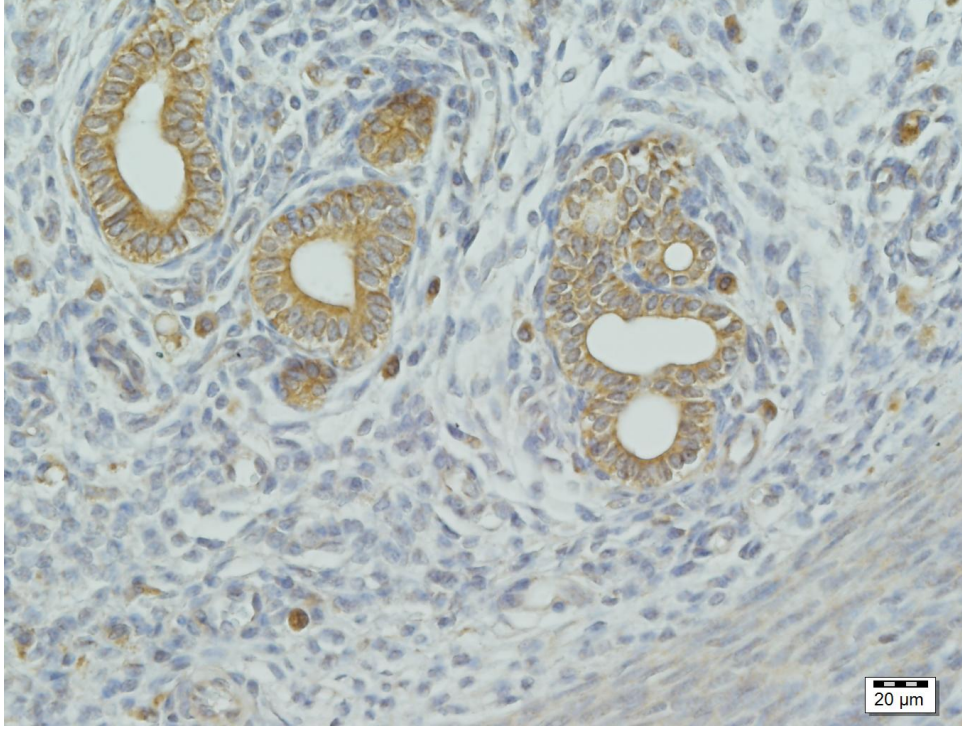
Şekil 4.26B. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda bez epitel, endotel ve miyosit sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



Şekil 4.27. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda luminal epitel, bez epitel ve endotel sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



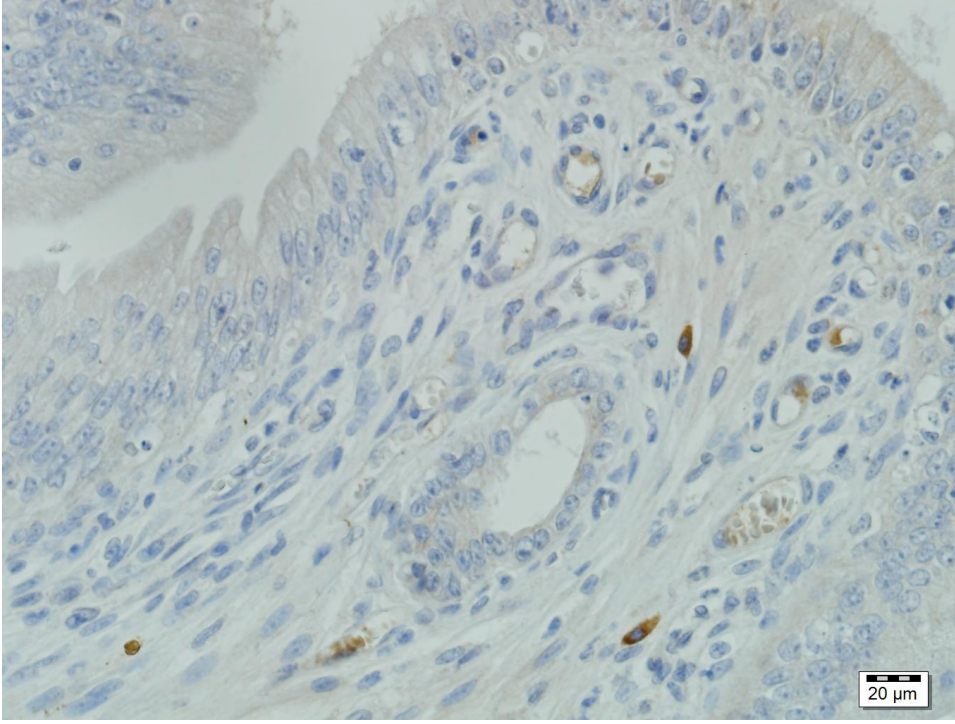
Şekil 4.28A. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda luminal epitel ve bez epitel sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



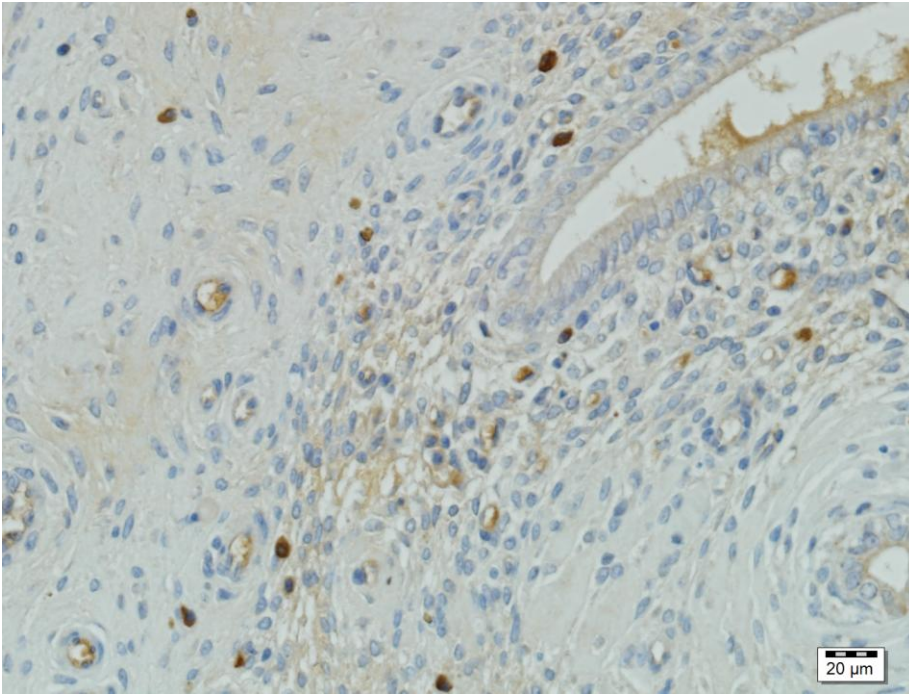
Şekil 4.28B. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda bez epitel, stromal hücre ve miyosit sitoplazmasında erbB4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.5. EGF lokalizasyonu

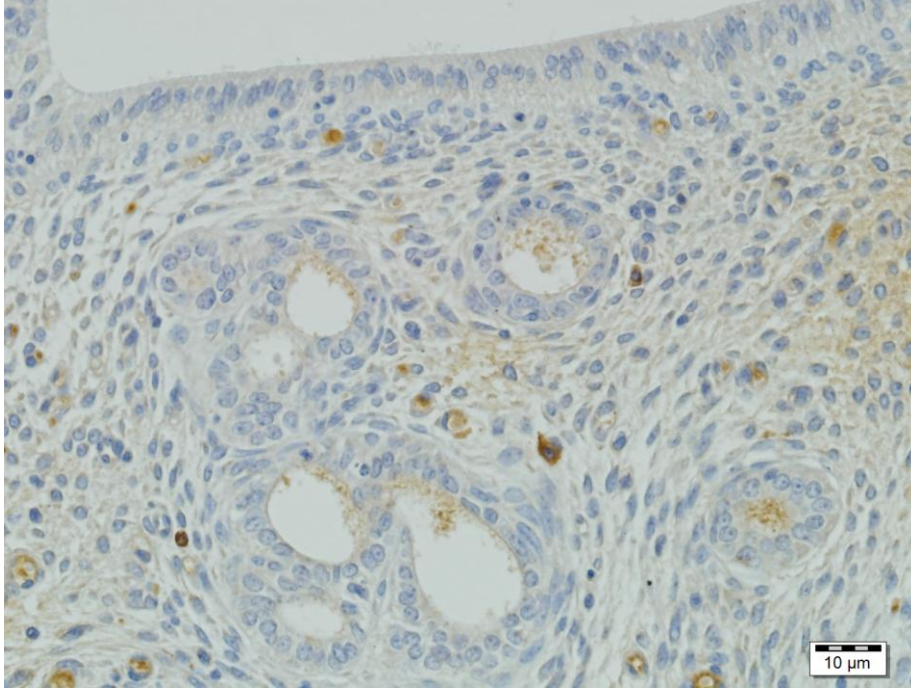
Postpartum bütün günlerde bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli EGF pozitif immunreaksiyon saptandı. Luminal epitel ve bez epitelinin apikal membranında da EGF pozitif reaksiyon görüldü. Endotel, miyosit, luminal epitel ve bez epitelinin sitoplazmasında ise zayıf bir reaksiyon tespit edildi. Postpartum 10. günde luminal epitelde sitoplazması kuvvetli EGF pozitif olan iç şeklinde hücrelere rastlandı. Postpartum günler arasında hiçbir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.29-33).



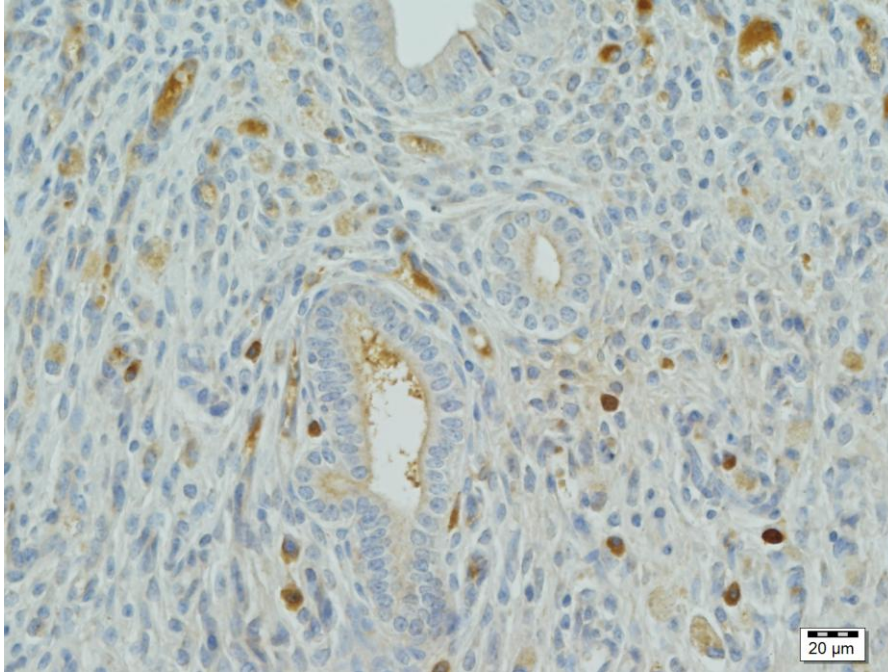
Şekil 4.29. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda stromal hücre sitoplazmasında EGF immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



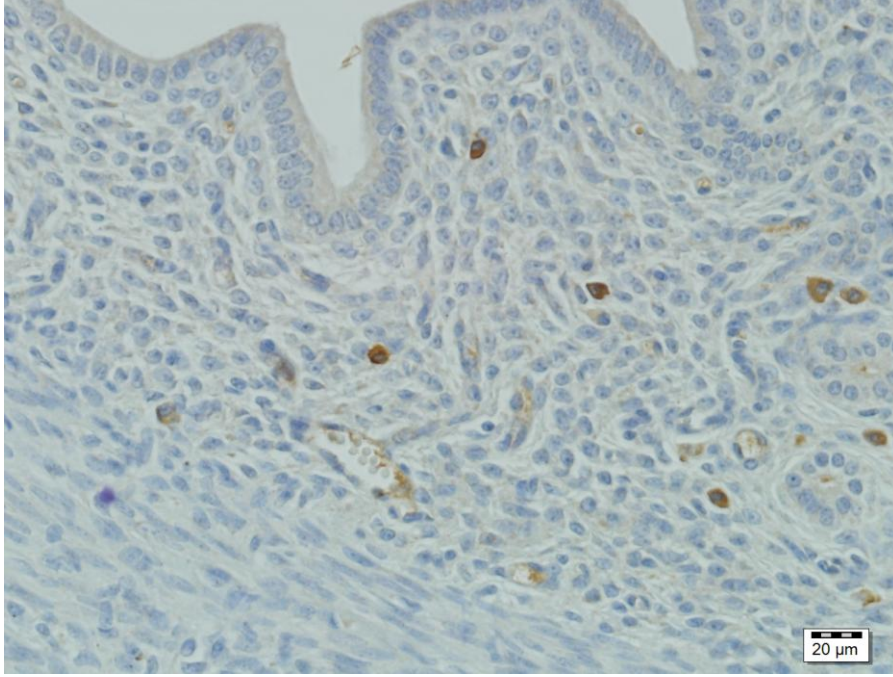
Şekil 4.30. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda stromal hücre sitoplazmasında EGF immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



Şekil 4.31. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda stromal hücre sitoplazmasında EGF immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



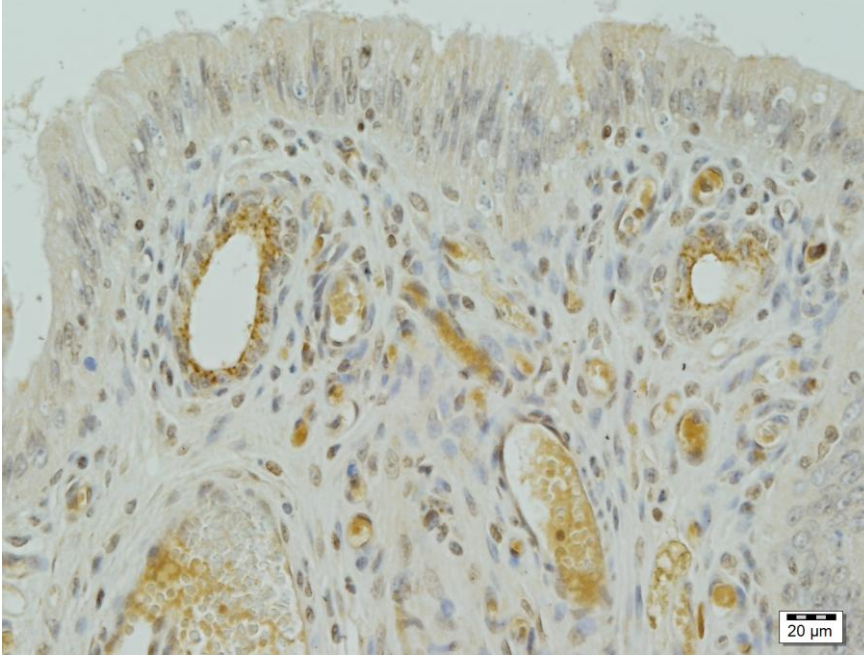
Şekil 4.32. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda stromal hücre sitoplazmasında EGF immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



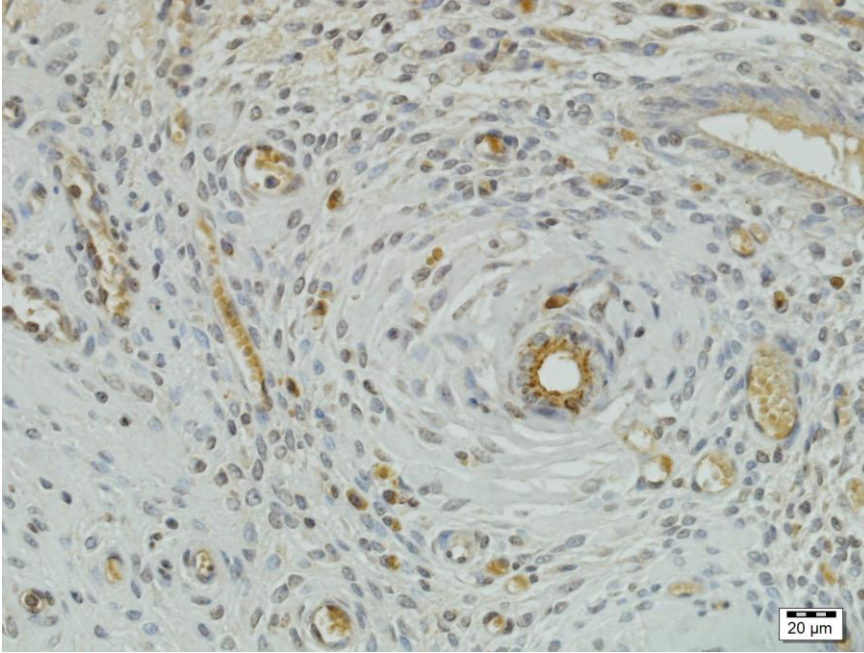
Şekil 4.33. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda stromal hücre sitoplazmasında EGF immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.6. AR lokalizasyonu

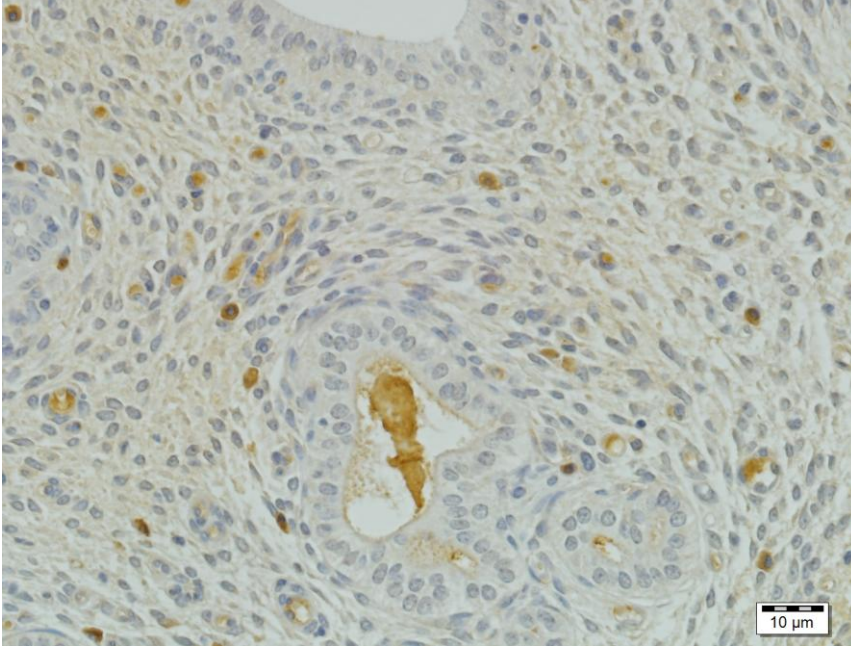
Postpartum bütün günlerde bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli AR pozitif immunreaksiyon saptandı. Aynı zamanda postpartum 1. ve 3. günde bez epitelinin apikal sitoplazmasında reaksiyon oldukça yoğunlu. Luminal epitel ve bez epitelinin apikal membranında da AR pozitif reaksiyon görüldü. Endotel, miyosit, luminal epitel ve bez epitelinin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında ise zayıftan orta dereceliye değişen bir reaksiyon tespit edildi. Postpartum günler arasında hiçbir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.34-38).



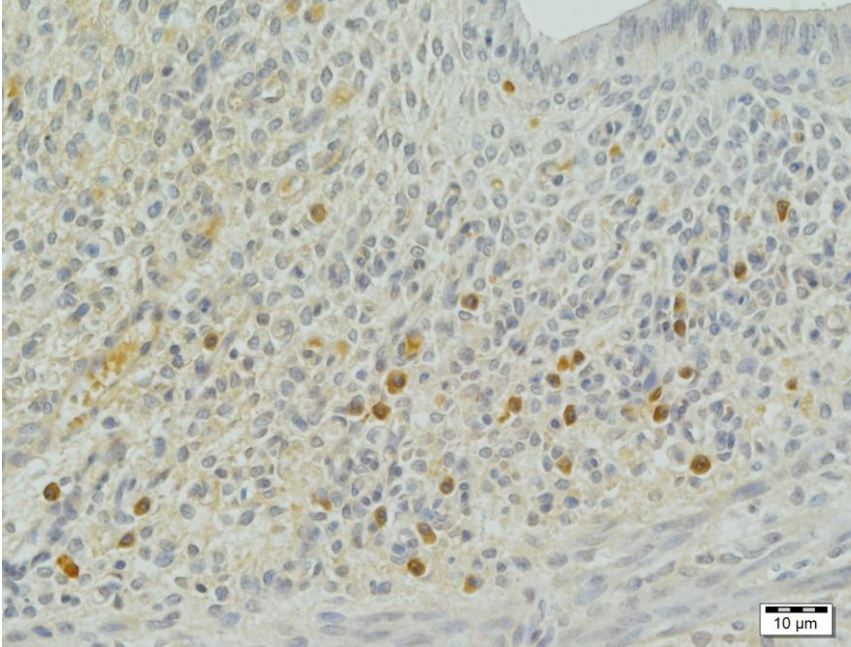
Şekil 4.34. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda luminal epitel, bez epitel, stromal hücre ve endotel hücrelerin çekirdeğinde ve bez epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasında AR immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



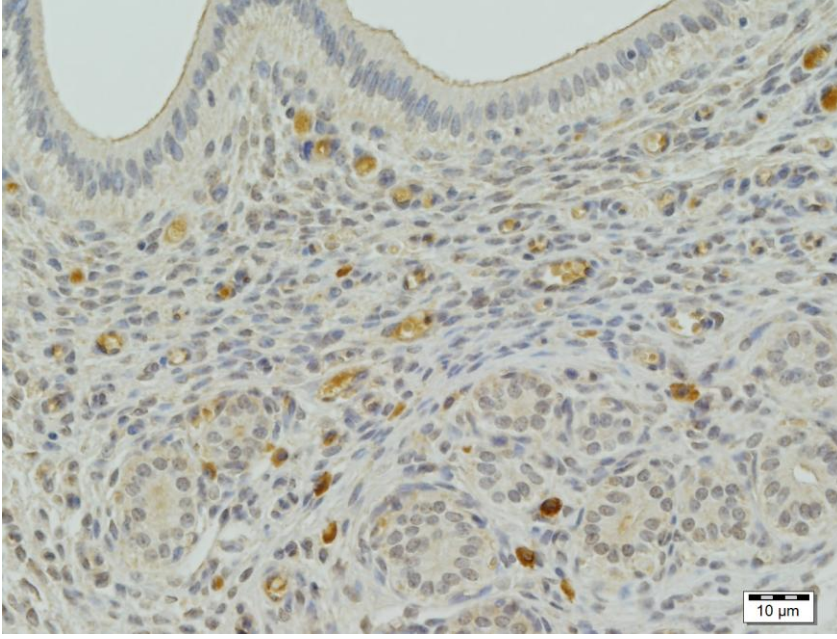
Şekil 4.35. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda bez epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasında ve stromal hücrelerin sitoplazmasında AR immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



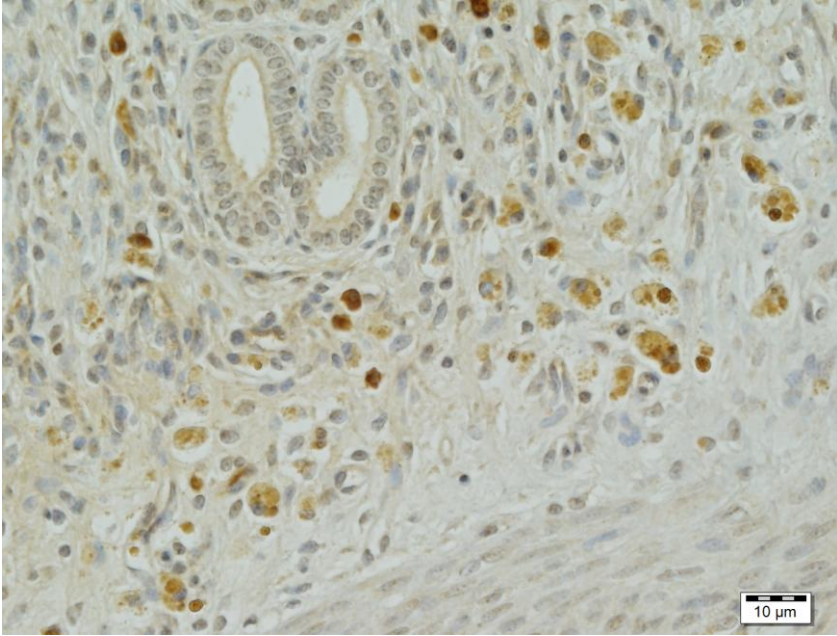
Şekil 4.36A. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında AR immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



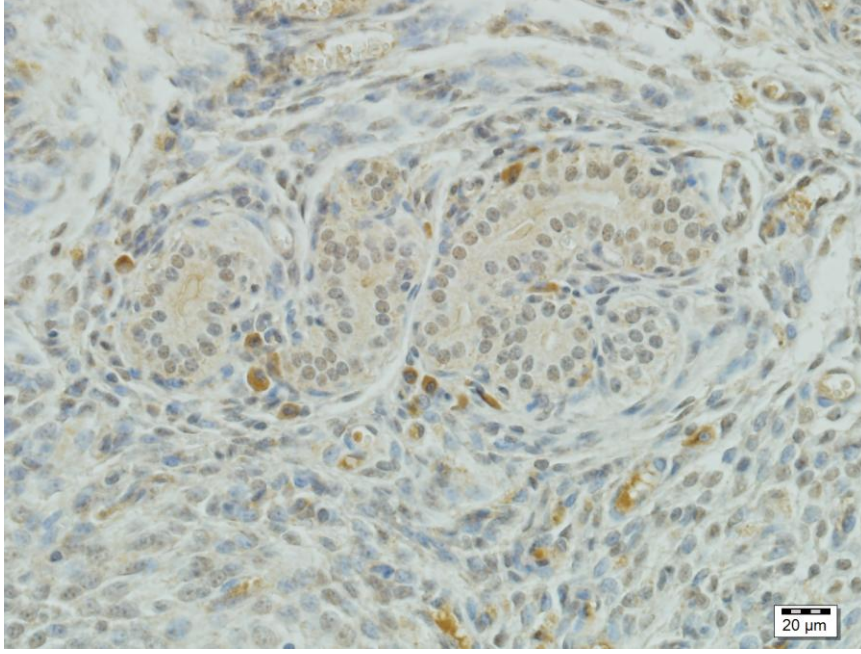
Şekil 4.36B. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında AR immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



Şekil 4.37A. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında AR immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



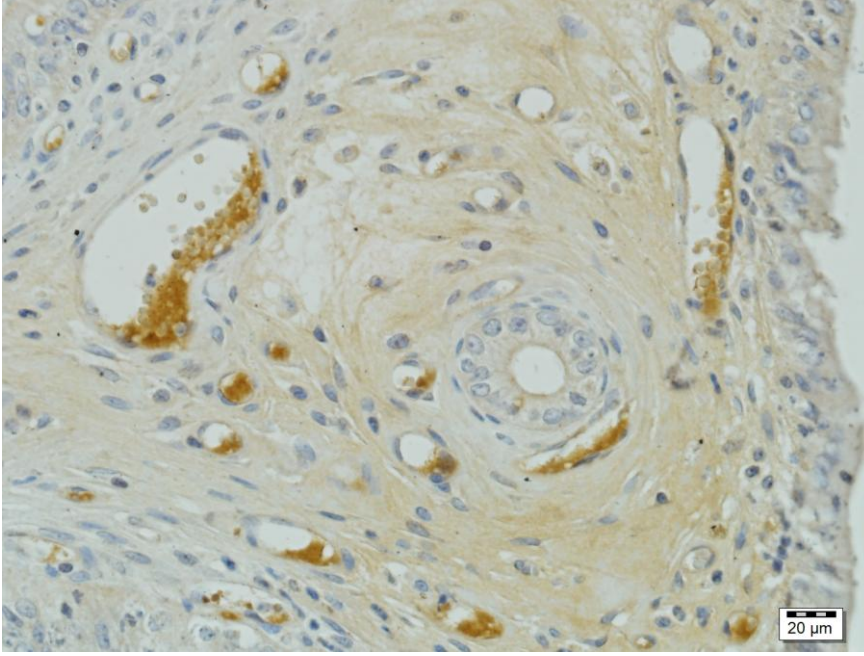
Şekil 4.37B. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında ve bez epitel hücrelerinin apikal membranında AR immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



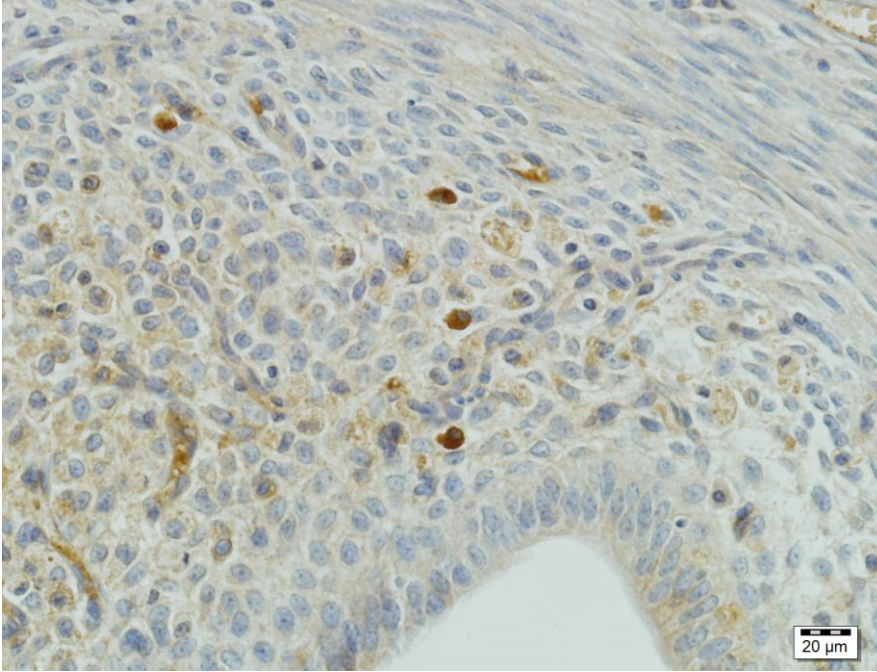
Şekil 4.38. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında AR immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

4.2.7. NRG lokalizasyonu

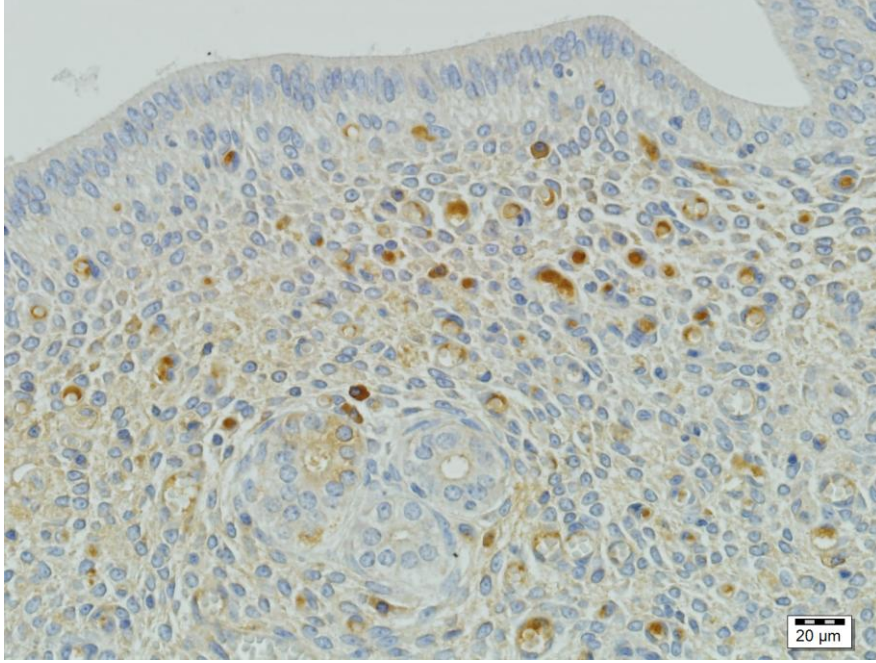
Postpartum 1. günden itibaren diğer bütün günlerde bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli NRG pozitif immunreaksiyon saptandı. Luminal epitel ve bez epitelinin apikal membranında da NRG pozitif reaksiyon görüldü. Endotel, miyosit, luminal epitel ve bez epitelinin sitoplazmasında daha zayıf bir reaksiyon tespit edilirken, çekirdekteki reaksiyon negatifti. Postpartum 10. günde luminal epitelde sitoplazması kuvvetli NRG pozitif olan iç şeklinde hücrelere rastlandı. Postpartum günler arasında hiçbir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.39-43).



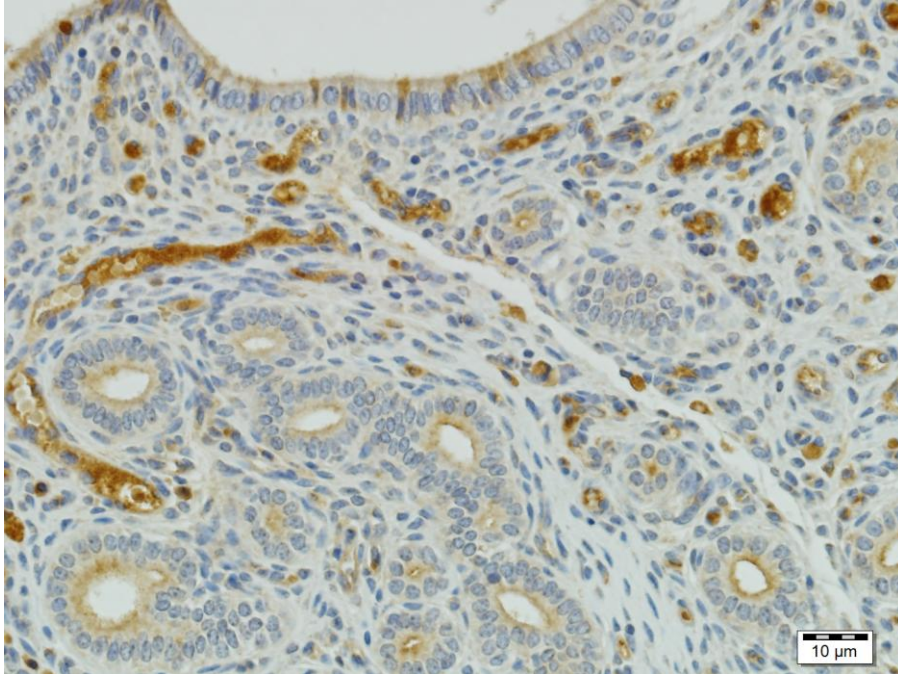
Şekil 4.39. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda bez epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasında NRG immunoreaktivitesi. Bar: 20 μ m.



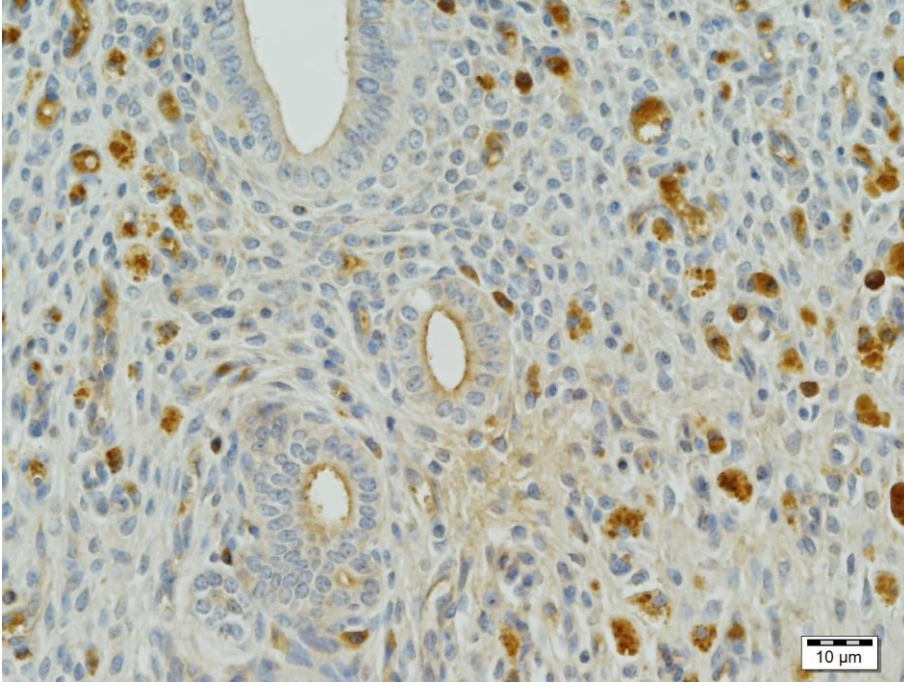
Şekil 4.40. Postpartum 3. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında NRG immunoreaktivitesi. Bar: 20 μ m.



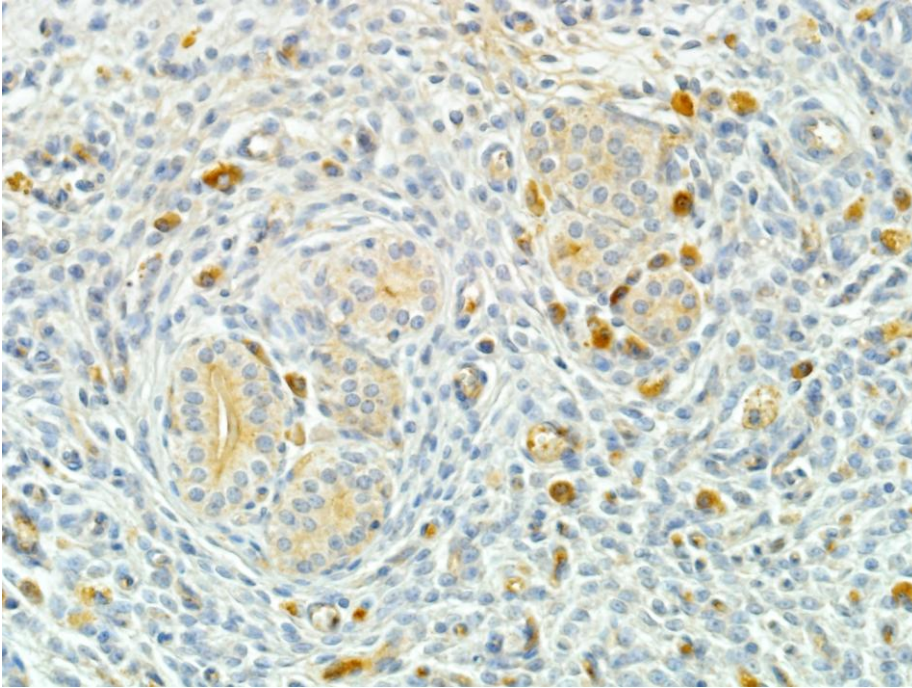
Şekil 4.41. Postpartum 5. günde sıçan uterusunda stromal hücrelerin sitoplazmasında NRG immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



Şekil 4.42A. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda luminal epitel hücrelerinin, stromal hücrelerin sitoplazmasında ve bez epitel hücrelerinin apikal membranında NRG immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



Şekil 4.42B. Postpartum 10. günde sıçan uterusunda luminal epitel hücrelerinin ve bez epitel hücrelerinin apikal membranında, stromal hücrelerin sitoplazmasında NRG immunoreaktivitesi. Bar: 10 µm.



Şekil 4.43. Postpartum 15. günde sıçan uterusunda bez epitel hücrelerinin ve stromal hücrelerin sitoplazmasında NRG immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uterus fonksiyonları steroid hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi ekstrasellüler uyaranların kompleks etkileşimleri tarafından düzenlenir. Hücrenin ya sitoplazmasında ya da membranında eksprese olan bu büyüme faktörlerinin ligandları erbB/HER reseptör ailesinin üyelerine bağlanma yoluyla aktive edilir. Böylece uterus hücrelerinin büyümesi, farklılaşması ve çoğalması stimüle edilir (Chobotava et al. 2005).

EGF reseptörleri ve ligandlarının (AR, EGF ve NRG), insan (Smith et al. 1991), domuz (Zhang et al. 1992; Wollenhaupt et al. 2004), at (Lennard et al. 1998), sıçan (Mukku and Stancel 1985), sığır (Sağsöz et al. 2010), fare (DiAugustine et al. 1988; Brown et al. 2004; Das et al. 1995), kedi (Boomsma et al. 1997), köpek (Kida et al. 2010), tavşan (Klonisch et al. 2001), rhesus maymunu (Yue Z-P et al. 2000) ve keçi (Tamada et al. 2000) gibi çeşitli türlerin gebe uterusunda, seksüel siklus döneminde ve implantasyon döneminde identifiye edilmesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat postpartum involüsyon sürecinde EGF reseptörleri ve ligandlarının lokalizasyonları ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamaktadır. Bu açıdan bizim çalışmamız doğum sonrası involüsyon sürecinin 1., 3., 5., 10., ve 15. günlerinde sıçan uterusunda immunohistokimyasal teknikler kullanılarak dört EGF reseptör ve üç ligandın (AR, NRG ve EGF) lokalizasyon ve oranlarındaki olası değişiklikleri belirleyen ilk çalışma niteliğini taşımaktadır.

Yapılan literatür çalışmalarında EGF reseptörleri ile ilgili çalışmaların genellikle EGFR üzerine odaklandığı tespit edilmiştir. Buna göre insanlarda seksüel siklus döneminde yapılan çalışmalarda EGFR'nin bez epitelinin hücre yüzeyinde bulunduğunu ve miyometriyumdan ziyade endometriyumda daha çok yer aldığını (Smith et al. 1991), bir diğer çalışmada ise EGFR'nin üç fazda da (proliferatif, erken ve geç sekretotik faz) luminal epitel hücrelerinin bazal kısmında lokalize olduğu ve EGFR ekspresyonunun proliferatif fazda en yüksek olduğu bildirilmektedir (Ejskjær et al. 2005). Wang ve ark. yapmış olduğu çalışmada bu çalışmalara zıt olarak EGFR'nin sekretorik fazda artan seviyelerde endometrial stromal hücrelerde bulunduğunu fakat bezlerde bulunmadığı tespit edilmektedir (Wang et al. 1992). İnsanlar üzerine yapılan başka bir çalışmada EGFR'nin sadece stromal hücrelerde bulunduğunu ya da hem epitel hem de stromal hücrelerde bulunduğu (Miturski et al. 1998) belirlenerek elde edilen bu bulgular Wang'ın yapmış olduğu çalışmaya paralellik göstermektedir.

Sığırlarda seksüel siklus döneminde yapılan çalışmada hem luteal hem de folliküler fazda EGFR'nin luminal epitel hücrelerinin apikal ve bazal membranlarında, bez epitel hücrelerinin ise sadece apikal membranlarında bulunduğu saptanmaktadır. Aynı zamanda hem luteal,

hemde folliküler fazda erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4 reseptörlerinin luminal ve süperfisiyal glandular epiteliyal hücrelerdeki boyanma yoğunluğu, derin glandular epitel ve bağ doku hücrelerindeki boyanma yoğunluğundan daha fazla olduğu bildirilmektedir (Sağsöz et al. 2011). Rhesus maymun uterusunda seksüel siklusun luteal ve geç folliküler fazında EGFR immunreaktivitesinin en yüksek seviyelerde olduğu rapor edilmektedir (Yue et al. 2000). Bu bilgiler EGFR'in ligandları ile birlikte uterus hücre proliferasyonunu ve özellikle seksüel siklusun hem proliferatif hem de luteal fazında hücrelerin migrasyonunu stimüle ettiğini ortaya çıkarmaktadır. Sunulan çalışmada ise involüsyon dönemindeki bütün günlerde endometriyal bezin apikal sitoplazmasında kuvvetli EGFR immunreaksiyonu gözlenmiştir. Bazı stromal hücre, luminal epitel hücreleri ve miyositlerde sitoplazma içerisinde çekirdeğin hemen yanında nokta şeklinde pozitif reaksiyon saptanmıştır. Postpartum 10. ve 15. günlerde diğer günlerden farklı olarak luminal epitelin apikal sitoplazmasında da kuvvetli pozitif immunreaksiyon tespit edilmiştir. Bu bulgular EGFR'nin postpartum dönemde de hücre migrasyonunu uyardığını göstermektedir.

Keçi uterusunda yapılan çalışmada EGFR immunreaksiyonu luminal ve glandular epitelde belirgin olmasına rağmen, stromal ve miyometrial hücrelerde daha zayıf ya da orta dereceli saptanmaktadır. Ayrıca bazı kesitlerde luminal epitelin yanındaki stromal hücrelerde daha kuvvetli bir EGFR immunreaksiyonu tespit edilmektedir (Tamada et al. 2000). Köpeklerde de keçilerde yapılan çalışmaya benzer şekilde EGF ve EGFR immunreaksiyonunun luminal ve glandular epitelinde gözlenmesiyle bu çalışmaya paralellik göstermektedir (Kida et al. 2010). Domuzlarda endometriyumun hem glandular hem de stromal hücrelerinde EGFR'nin yaygın bir şekilde dağıldığı belirtilmektedir (Wollenhaupt et al. 1997). Ratlarda yapılan çalışmada Mukku ve Stancel (1985a, 1985b) erişkin rat uterusunun membranlarının genç rat uterusununkine benzer şekilde EGF reseptörleri içerdiği saptanmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada da involüsyon dönemindeki bütün sıçanların membranlarında ErbB2, ErbB4, AR, EGF ve NRG gözlenmiştir. Bu bulgular kemirgenlerde ve insanlarda EGF reseptör ve ligandların hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını uyardığını göstermektedir.

İnsan uterusunda yapılan çalışmada EGFR en yüksek seksüel siklusun proliferatif fazında saptanmaktadır (Ejskjær et al. 2005). İnsanlarda yapılan bir diğer çalışmada EGFR erken folliküler fazda düşük seviyede iken, geç folliküler ve luteal fazda yüksek seviyelerde olduğu rapor edilmektedir (Imai et al. 2005). Smith ve ark. ise bu çalışmaya zıt olarak siklusun luteal ve folliküler fazları arasında EGFR immunreaksiyonu açısından hiçbir farklılık olmadığını bildirilmektedir (Smith et al. 1991). Aynı şekilde Chegini ve ark. da hem EGF hem de

EGFR'nin siklusun proliferatif ve luteal fazları arasında farklılık olmadığını rapor etmektedirler (Chegini et al. 1986). Köpek (Kida et. 2010) ve Habeş maymunu (Slowey et al. 1994) üzerinde yapılan çalışmalarda da EGFR mRNA seviyesinin östrus siklusuna göre değişmediği rapor edilmektedir. Bizim sıçan uterusunda yapmış olduğumuz çalışmada da postpartum involüsyon günleri arasında EGF reseptörleri ve ligandlarının immunreaksiyon yoğunluğu açısından hiçbir farklılık bulunmamıştır.

ErbB2 fare uterusunda EGF-ilişkili büyüme faktörlerin stimülasyonunda potansiyel bir mediatör olarak faaliyet gösterir. Epitel, stromal ve embriyonik orijinli EGF benzeri ligandlar, erbB2 ve diğer reseptör alt tipleri ile etkileşerek epitel hücre fonksiyonlarını modüle eder (Lim et al. 1997). Miturski ve ark. insanların proliferatif ve hiperplastik endometriyumunda yapmış olduğu çalışmada erbB2 immunreaksiyonunun hücre membranında ve sitoplazmada lokalize olduğunu saptamaktadır. İmmunboyanma proliferatif endometrial bezlerde ve epitelde pozitif, miyometriyuma bitişik endometrial bölgede ise negatiftir (Miturski et al. 1998). Bir diğer çalışmada erbB2 reseptörünün sadece endometrial bezlerde değil aynı zamanda stroma da tespit edildiği ve Ejkskjær ve ark'a paralel olarak siklusun sekretorik fazında artış gösterdiği bildirilmektedir (Wang et al. 1992). Srinivasan ve ark. ise tam tersine erbB2'nin sadece bezlerde eksprese edildiği, stromada ise eksprese edilmediğini rapor etmektedir (Srinivasan et al. 1999). Fare dişi genital sistem (ovidukt, vajina ve uterus) epitelinin erbB2'nin hem apikal hem de bazolateral formlarını gösterdiği bildirilmektedir (Idris et al. 2001). Bizim çalışmamızda postpartum bütün günlerde luminal epitelin ve glandular epitelin apikal membranında, 5., 10. ve 15. günlerde ise luminal epitelin lateral membranlarında erbB2 immunreaksiyonu gözlenmiştir. Stromal hücre, miyosit ve endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki reaksiyon kuvvetli iken, luminal epitel ve glandular epitelin sitoplazmasında daha zayıf bir reaksiyon saptanmıştır. Postpartum günler arasında ise reaksiyon açısından hiçbir farklılık gözlenmemiştir.

ErbB3 reseptörü daha çok normal dokularda eksprese edilir. Diğer erbB reseptörleri ve erbB3 arasındaki en önemli farklılık çok az ya da hiç tirozin kinaz aktivitesine sahip olmamasıdır. Bu yüzden de, erbB3'ün homodimerleri inaktiftir. ErbB3 hücre farklılaşmasını sağladığı ve aynı zamanda proliferasyon, apoptozis, migrasyon ve adhezyonu inhibe ettiği bilinmektedir. (Gullick, 1996). İnsanların seksuel siklusu üzerine yapılan çalışmalarda hem luteal hem de folliküler fazda erbB3 immunreaksiyonu endometrial bezler ve stromada düşük seviyelerde olduğu rapor edilmektedir (Srinivasan et al. 1999). Ejkskjær ve ark. erbB3'ün geç sekretorik fazda epitelde en yüksek seviyelerde olduğunu bildirmektedir. Sığırlarda ErbB3 ve ErbB4

reseptörleri ise luminal ve glandular epitel hücrelerinin sitoplazmasında daha yüksek seviyelerdedir (Sağsöz et al. 2011). Sunulan bu çalışmada postpartum involüsyonun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde bazı stromal hücre sitoplazması içerisinde çekirdeğin hemen yanında nokta şeklinde erbB3 pozitif reaksiyon saptanmıştır. Bunun dışında diğer uterusun bütün yapısal komponentlerinde erbB3 reaksiyonu negatif olarak tespit edilmiştir.

ErbB4 reseptörü ile neuregulin- α , neuregulin- β ve betacellulin gibi ligandlar incelendiğinde menstrual siklusun proliferatif fazından ziyade sekretorik fazında daha yüksek seviyelerde bulunduğu ve böylelikle bu proteinlerin endometriyal olgunlaşmada anahtar bir role sahip olduğu tespit edilmektedir. Glandular ve stromal ekspresyonları karşılaştırıldığında erbB4 ve NRG1- α 'nın stromada daha yüksek seviyede olduğu bildirilmektedir (Srinivasan et al. 1999). Özellikle insanlarda erbB4 seksüel siklus süresince erbB1 ile birlikte güçlü proliferatif stimülasyonları düzenlemede rol oynadığı belirtilmektedir (Ejskjær et al. 2005; Srinivasan et al. 1999). Ejskjær ve ark. bu çalışmaya paralel olarak erbB4'ün erken sekretorik fazda epitelde en yüksek seviyelerde olduğunu tespit etmiştir (Ejskjær et al. 2005). Chobotova ve ark. erbB4'ün sekretorik fazda epitel ve stromada, proliferatif fazda ise stromada lokalize olduğunu saptanmıştır (Chobotova et al. 2005). Sunulan çalışmada postpartum involüsyonun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde luminal epitel ve bez epitel hücrelerinin sitoplazmasında ve apikal membranında kuvvetli erbB4 immunreaksiyonu gözlenmiştir. Stromal hücre, endotel ve düz kas hücrelerinin ise sitoplazmasında orta dereceli bir reaksiyon saptanmıştır. Postpartum 5. günden itibaren luminal epitelin lateral membranlarında pozitif reaksiyon belirlenmiş ve aynı zamanda sitoplazması oldukça kuvvetli erbB4 pozitif reaksiyon veren stromal hücrelere rastlanmıştır. Bu bulgular postpartum dönemde de erbB4 reseptörünün endometriyal fonksiyonların tekrar eski haline dönmesinde rol aldığını göstermektedir.

Neuregulinlerden NRG-1 izoformları (Neu differentiation factor-NDF-, ve sensory and motor neuron-derived factor-SMDF) embriyonun uterus bağlanması sırasında ortaya çıkan implantasyon spesifik genlerdir ve blastosistin implantasyonu için gereklidirler (Brown et al. 2004). Bu çalışmada involüsyon döneminde de NRG'nin görülmesi implantasyon gibi postpartum dönemde de NRG'nin erbB reseptörlerinin aktivasyonuna ve bağlanmasına dayalı, uterus dokusunda hücre-hücre etkileşimlerine aracılık ettiği düşünülmektedir. Çalışmamızda NRG'ler incelendiğinde postpartum 1. günden itibaren diğer bütün günlerde bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli pozitif immunreaksiyon gözlenmiştir. Luminal epitel ve bez epitelinin apikal membranında da NRG pozitif reaksiyon belirlenmiştir. Endotel, miyosit, luminal epitel ve bez epitelinin sitoplazmasında daha zayıf bir reaksiyon tespit edilirken,

çekirdekdeki reaksiyon negatif tespit edilmiştir. Postpartum 10. günde luminal epitelde sitoplazması kuvvetli NRG pozitif olan iğ şeklinde hücelere rastlanmıştır. Postpartum günler arasında ise hiçbir farklılık gözlenmemiştir.

Peri-implantasyon döneminde fare uterusunda yapılan çalışmada dört erbB reseptörü eksprese edilmektedir. Bu çalışmaya göre erbB1 subepiteliyal stromada, erbB2 ve erbB3 luminal epitelde ve erbB4 implantasyon alanından uzakta yer alan stromada ve miyometriyumda eksprese edilmektedir (Lim et al. 1998).

EGF, genital sistemde potansiyel bir mitojendir. Fare uterus ve vajinasında östrojen tarafından stimüle edilen büyüme ve farklılaşmanın önemli bir otokrin ve/veya parakrin mediatörüdür (Nelson et al. 1991). EGF ile ilgili birçok çalışma hücre proliferasyonunun stimülasyonu üzerine odaklanmıştır. Ancak, EGF aynı zamanda asit sekresyonu (Gregory, 1985) ve damar düz kasının kontraksiyonunu da içeren (Muramatsu et al. 1985) birkaç diğer biyolojik aktivitede gösterir. Buna ek olarak EGF'nin, kalsiyum seviyeleri (Moolenaar et al. 1986), iyon akışı (Rozengurt and Mendoza, 1986), hücresel pH (Moolenaar, 1986) ve prostaglandinler (Chiba et al. 1982) gibi çeşitli hücresel parametreler üzerine etkileri de rapor edilmektedir (Cohen and Carpenter, 1979).

EGF ve reseptörü insan plasental dokularında, maymun uterus dokusunda, domuz ovaryumunda ve folliküler sıvıda, domuz ovidukt epitel hücre kültüründe ve insan ovidukt dokularında bulunmaktadır (Swanchara et al. 1995). Diğer memeli hayvanlarda da EGF ligandı üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Buna göre keçilerde seksüel siklusun hem östrüs hem de diöstrüs dönemlerinde uterusun luminal ve glandular epitelinde farklı EGF pozitif reaksiyon gözlenmesine rağmen, stromal ve miyometrial hücrelerde zayıftan negatifliğe değişen ölçüde bir reaksiyon tespit edilmektedir (Tamada et al. 2000). Köpeklerde yapılan çalışmada siklusun hem proöstrüs hem de östrusta döneminde endometriyumun glandular epitel hücrelerinde belirgin bir EGF immunreaktivitesi saptanırken, luminal epitelde daha zayıf bir pozitiflik belirlenmiştir (Kida et al. 2010). DiAugustine ve ark. genç ve erişkin farelerde uterus luminal ve glandular epitel hücrelerinin sınırlarında immunohistokimyasal olarak EGF saptamıştır ve östrojen tedavisinin fare uterusunda prepro-EGF mRNA miktarını artırdığını bulmuştur (DiAugustine et al. 1988). Bizim yaptığımız çalışmada da postpartum dönemde rat uterusunun luminal epitel ve bez epitelinin apikal membranında EGF pozitif reaksiyon tespit edilmesi bu çalışmaya paralellik göstermektedir. Seksüel siklus süresince insan uterusunda yapılan çalışmada EGF saptanmamaktadır (Ejskjaer et al. 2005). Hofmann ve ark. ise bu çalışmaya zıt olarak insanlarda sadece glandular epitelde değil aynı zamanda

stromal hücrelerde de EGF’i eksprese etmişlerdir. Bu veri EGF/EGFR mekanizmalarının otokrinden ziyade parakrin tarzda faaliyet gösterdiğini vurgulamaktadır (Hofmann et al. 1991). Rhesus maymunlarında gebeliğin 9. ve 11. günlerinde EGF ve EGFR immunreaktivitesi en yüksek seviyelerdedir (Yue et al. 2000). Bizim sıçanlar üzerine yaptığımız bu çalışmada ise postpartum involüsyonun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli EGF pozitif immunreaksiyon saptanmıştır. Endotel, miyosit, luminal epitel ve bez epitelinin sitoplazmasında ise zayıf bir reaksiyon tespit edilmiştir. Postpartum 10. günde luminal epitelde sitoplazması kuvvetli EGF pozitif olan iç şeklinde hücrelere rastlanmıştır. Postpartum günler arasında hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Bu bulgular EGF’nin involüsyon döneminde de yoğun olarak bulunduğu stromal hücrelerde iyon alınımı, glikolizis, DNA ve RNA ile protein yapımını artırıcı özellik gösterdiği düşünülebilir.

Dişi genital sistemde AR fizyolojik öneminin tam olarak anlaşılamamasına rağmen, implantasyon sürecinde hücrel infiltrasyona katılabileceği düşünülmektedir. AR, EGFR aracılığıyla erbB2, erbB3 ve erbB4’ün tirozin fosforilasyonunu stimüle eder (Lee et al. 2006). Fare, maymun, domuz ve insan uterusunda AR ekspresyonu rapor edilmektedir (Ejskjaer et al. 2005; Das et al. 2005; Kim et al. 2003; Yue et al. 2000). Buna göre insanlarda seksüel siklus dönemi incelendiğinde AR en çok proliferatif fazda ve özellikle lökositler ile stromal hücrelerde saptanmaktadır (Ejskjaer et al. 2005). Bir diğer çalışmada ise AR, monositlerde eksprese edilmektedir (Mograbı et al. 1997). Rhesus maymunlarında yapılan çalışmada EGF, EGFR ve AR temel olarak glandular ve luminal epitelde lokalize olmaktadır. AR immunreaksiyonu miyometriyuma yakın olan glandular epitelde daha yoğundur ve en çok luteal fazda eksprese olmaktadır (Yue et al. 2000). Gebeliğin 4. gününde fare endometriyal epitelde AR mRNA en yüksek seviyelerde bulunmaktadır (Das et al. 2005). Sunulan bu çalışmada ise postpartum involüsyon döneminde bazı stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli AR pozitif immunreaksiyon saptanmıştır. Fakat bu stromal hücrelerin hangisi olduğu identifiye edilememiştir. Domuzların endometriyumunda AR mRNA ekspresyonunun gebeliğin 15. gününden 20. gününe kadar arttığı, 20. gününden 30. gününe kadar azaldığı ve 30-40. günler arasında değişmediği belirlenmiştir (Kim et al. 2003). Bizim sıçanlarda yaptığımız çalışmada postpartum dönemde de AR’in görülmesi bu ligandın sadece implantasyon spesifik olmadığı ve involüsyon döneminde de görevi olduğunu akla getirmektedir. Bu çalışmada AR, stromal hücrelerin sitoplazması haricinde postpartum 1. ve 3. günde bez epitelinin apikal sitoplazmasında da reaksiyon göstermiştir. Luminal epitel ve

bez epitelinin apikal membranında da AR pozitif reaksiyon saptanmıştır. Endotel, miyosit, luminal epitel ve bez epitelinin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında ise zayıftan orta dereceliye değişen bir reaksiyon tespit edilmiştir. Postpartum günler arasında hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Diğer erbB reseptör ve ligandlardan farklı olarak (sitoplazmik, membransel) bu ligandın immunreaksiyonu çekirdekte de tespit edilmiştir.

Östrojen özellikle EGF ailesi ve reseptörlerine ait ligandların mitojenik etkilerini düzenler.

Östrojenin fare uterusunda EGF ve reseptörlerinin ekspresyonunu artırdığı bildirilmektedir (Shiraga et al. 2000; Nelson et al. 1991). Bizim çalışmamızda kandaki östrojen seviyeleri belirlenmediği için postpartum dönemde östrojenin bu EGF reseptör ve ligandları üzerine nasıl bir etki yarattığı belirlenememiştir.

Sonuç olarak steroid hormonlar ile EGF ailesinin reproduktif dokularda benzer etkilere sahip oldukları ve birbirleriyle de karşılıklı olarak etkileştikleri dikkate alındığında, seksüel siklus, gebelik ve implantasyon dönemlerinde olduğu gibi dişilerde fertilitenin sürekliliği yönünden oldukça önemli bir dönem olan ve doğumun tamamlanmasından sonra genital organların anatomik, histolojik ve fonksiyonel bakımdan gebelik öncesi durumuna dönmesi olarak tanımlanan postpartum dönemde de (postparturient veya puerperal dönem) bu EGF reseptör ve ligandlar eksprese edilmektedir. Hem endometriyumdaki doku kaybı ve takiben doku rejenerasyonunu, hem de miyometriyumdaki miyositlerin yapısal transformasyonunu içine alan involüsyon sürecinde, sıçan uterusunda postpartum 1. günden başlayarak tespit edilen erbB reseptör ile ligandlarının (AR, NRG ve EGF) uterus hücrelerinin gelişimi, çoğalması ve farklılaşması gibi çeşitli olaylarda görev alarak endometriyal fizyolojide anahtar bir role sahip oldukları düşünülebilir.

6. KAYNAKLAR

- Alroy I, Yarden Y. 1997. The ErbB signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410: 83-86.
- Bancroft JD, Cook HC. 1984. *Manual of histological techniques*. (1 th ed), Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York pp 151-152.
- Bany BM, Kennedy TG. 1995. Regulation by epidermal growth factor of prostglandin production and cyclooxygenase activity in sensitized rat endometrial stromal cells in vitro. *J Reprod Fertil* 104: 57-62
- Bazley LA, Gullick WJ. 2005. The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-Related Cancer* 12: 17-27.
- Boomsma RA, Mavrogianis PA, Verhage HG. 1997. Immunohistochemical localization of TGF- α , EGF and EGFR in the cat endometrium and placenta. *Histochem J* 29: 495-504.
- Brown N, Deb K, Paria BC, Das SK, Reese J. 2004. Embryo-uterine interactions via the neuregulin family of growth factors during implantation in the mouse. *Biol Reprod* 71: 2003-2011.
- Canbay E. 2006. Meme kanseri hücrelerinde HER2 reseptör antikoru pertuzumab (2C4 omnitarg)'ın fokal adezyon kinaz üzerine etkisi. Uzmanlık tezi, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Carpenter G, Cohen S. 1979. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48:193-216.
- Carpenter G, Cohen S. 1990. Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 265: 7709-7712
- Casida LE, Graves WE, Lauderdale JW, et al. 1968. Studies on the postpartum cow Research Bulletin 270 University of Wisconsin, , Madison.
- Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ. 1997. Ligands for erbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387: 509-512.
- Chegini N, Rao CV, Wakim N, Sanfilippo J. 1986. Binding of 125 I-epidermal growth factor in human uterus. *Cell Tissue Res* 246: 543-548.
- Chiba T, Hirata T, Taminato T, Kadowaki S, Matsukura S, Fujita T. 1982. Epidermal growth factor stimulates prostaglandin E release from isolated perfused rat stomach. *Biochem Biophysics Res Commun* 105: 370-374.
- Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, Mardon HJ. 2005. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and poteintiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocr Metab* 90: 913-919.
- Ciğer S. “Yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri”. <http://www.dermaneturk.com>. 27.03.2008.

- Cohen S, Carpenter G. 1979. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48: 193-216.
- Cowing BE, Saker KE. 2001. Polyunsaturated fatty acids and epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling in mammary cancer. *J Nutr* 131: 1125–1128.
- Crossman G. 1937. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 69: 33-38.
- Dai D, Ogle TF. 1999. Progesterone Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor in Rat Decidua Basalis during Pregnancy. *Biol Reprod* 61: 326-332.
- Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey SK. 1994. Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. *Endocrinology* 134: 971-981.
- Das SK, Chakraborty I, Paria BC, Wang XN, Plowman G, Dey SK. 1995. Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol* 9: 691-705.
- Das SK, Das N, Wang J, Lim H, Schryver B, Plowman GD, Dey SK. 1997. Expression of betacellulin and epiregulin genes in the Mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the “window” of implantation. *Dev Biol* 190: 178-190.
- DiAugustine RP, Petrusz P, Bell GL, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA, Teng CT. 1988. Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and Messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 122: 2355-2363.
- Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H. 1995. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer res Treat* 35: 115-132.
- Eccles SA. 2001. The Role of c-erbB-2/HER2/neu in Breast Cancer Progression and Metastasis. *J Mammary Gland Biol* 6: 393-405.
- Ejskjaer K, Sorensen BS, Poulsen SS, Mogensen O, Forman A, Nexø E. 2005. Expression of the epidermal growth factor system in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 11: 543-551.
- Falck L, Forsberg J-G. 1996. Immunohistochemical studies on the expression and estrogen dependency of EGF and its receptor and c-fos proto-oncogene in the uterus and vagina of normal and neonatally estrogen-treated mice. *Anat Rec* 245: 459-471.
- Falk A, Frisen J. 2002. Amphiregulin is a mitogen for adult neural stem cells. *J Neurosci Res* 69: 757–762.
- Falls DL. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284: 14-30.

- Galand P, Rooryck J. 1996. Mediation by epidermal growth factor of the estradiol-induced increase in cyclic guanosine 3',5'-monophosphate content in the rat uterus. *Endocrinology* 137: 1932–1937.
- Garcia I, Vizoso F, Martin A et al. 2003. Clinical Significance of the Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Receptor in Resectable Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 10: 234–241.
- Gardner RM, Lingham RB, Stancel GM. 1987. Contractions of the isolated uterus stimulated by epidermal growth factor. *FASEB J* 1: 224-228.
- Gilbert AN, Rosenwasser AM, Adler NT. 1985. Timing of parturition and postpartum mating in Norway rats: interaction of an interval timer and a circadian gate. *Physiology and Behavior* 34: 61-63.
- Gravalos C, Jimeno A. 2008. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 19: 1523–1529.
- Gregory H. 1985. In vivo aspects of urogastrone–epidermal growth factor. *J Cell Sci Suppl* 3: 11-17.
- Gullick WJ. 1996. The c-erbB3/HER3 receptor in human cancer. *Cancer Surv* 27: 339-349.
- Harkness RD, Moralee BE. 1956. Time course and route of loss of collagen from the rat's uterus collagen during post-partum involution. *J Physiol* 132: 502-508.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ. 2003. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284: 2-13.
- Heldin CH. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223.
- Herbst RS. 2004. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol* 59: 21-26.
- Hofmann GE, Scott RT Jr, Bergh PA, Deligdisch L. 1991. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol&Metab.* 73: 882-887.
- Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Anderws GK, Dey SK. 1990. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in Mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 4: 510-523.
- Hunter T. 2000. Signaling. *Cell* 100:113-127.
- Idris N, Carothers Carraway CA, Carraway KL. 2001. Differential localization of erbB2 in different tissues of the rat female reproductive tract: implications for the use of specific antibodies for erbB2 analysis. *J Cell Physiol* 189: 162-170.

Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS. 1992. Coupling of dual signalling pathways: epidermal growth factor action involves estrogen receptor. PNAS USA 89: 4658–4662.

Imai T, Kurachi H, Adachi K, Adachi H, Yoshimoto Y, Homma H, Takokoro C, Takeda S, Yamaguchi M, Sakata M, Sakoyama Y, Miyake A. 1995. Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. Biol Reprod 52: 928–938.

Johnson DC, Chatterjee S. 1993. Epidermal growth factor (EGF) replaces estradiol for the initiation of embryo implantation in the hypophysectomized rat. Placenta 14: 429–438.

Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. 1996. ErbB2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. EMBO J 15: 254-264.

Kato M, Inazu T, Kawai Y, Masamura K, Yoshida M, Tanaka N, Miyamoto K, Miyamori I. 2003. Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. Biochem Biophys Res Commun 301: 1109–1115.

Kırıçoğlu CE, Öztürk C, Köktürk N. 2003. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri. Solunum 5: 146-152.

Kida K, Maezono Y, Kawate N, Inaba T, Hatoya S, Tamada H. 2010. Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. Theriogenology 73: 36-47.

Kim GY, Besner GE, Steffen CL, McCarthy DW, Downing MT, Luquette MH, Abad MS, Brigstock DR. 1995. Purification of heparin-binding EGF-like growth factor from pig uterine luminal flushings, and its production by endometrial tissues. Biol Reprod 52: 561-571.

Kim M, Kitson R, Albertson P, et al. 2000. Secreted and membrane-associated matrix metalloproteinases of IL-2-activated NK cells and their inhibitors. J Immunol 164: 5883-5889.

Kim JG, Vallet JL, Christenson RK. 2003. Molecular cloning and endometrial expression of porcine amphiregulin. Molecular Reproduction and Development, 65: 366-372.

Kiracofe GH. 1980. Uterine involution: its role in regulating postpartum intervals. J Anim Sci 51: 16-28.

Kirkland JL, Murthy L, Stancel GM. 1992. Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. Endocrinology 130: 3223–3230.

Klonisch T, Wolf P, Hombach-Klonisch S, Vogt S, Kuechenhoff A, Tetens F, Fischer B. 2001. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. Biol Reprod 64: 1835-1844.

- Kumar R, Shepard HM, Mendelsohn J. 1991. Regulation of Phosphorylation of the c-erbB-2/HER2 Gene Product by a Monoclonal Antibody and Serum Growth Factor(s) in Human Mammary Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol* 11: 979-986.
- Lebas F. 1994. Physiologie de la reproduction chez le lapin. Journée AERA-ASFC “La reproduction chez le lapin”, 20 Janvier.
- Lee D-S, Yanagimoto Ueta Y, Suzuki H. 2006. Expression of amphiregulin during the pre- and post-implantation period in the Mouse reproduction tract. *J Reprod Dev* 52: 781-787.
- Lennard SN, Gerstenberg C, Allen WR, Stewart E. 1998. Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. *J Reprod Fertil* 112: 49-57.
- Lim H, Dey SK, Das SK. 1997. Differential expression of the erbB2 gene in the periimplantation Mouse uterus: potential mediator of signaling by epidermal growth factor-like growth factors. *Endocrinology*. 138: 1328-1337.
- Lim H, Das N, Dey SK. 1998. erbB genes in the Mouse uterus: cell-specific signaling by epidermal growth factor (EGF) family of growth factors during implantation. *Dev Biol*. 204: 97-110.
- Lingham RB, Stancel GM, Loose-Mitchell DM. 1988. Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2: 230–235.
- Long W, Wagner KU, Kent Lloyd KC et al. 2003. Impaired differentiation and lactational failure of Erbb4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development* 130: 5257-5268.
- Lund LR, Romer J, Thomasset N, et al. 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase independent and dependent pathways. *Development* 122: 181-193.
- Maggi M, Baldi E, Susuni T. 1994. Hormonal and local regulation of uterine activity during parturition: Part I-The oxytocin system. *J Endocrinol Invest*; 17: 739-756.
- McBean JH, Brumsted JR, Stirewalt WS. 1997. In Vivo Estrogen Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1467–1471.
- Millanta F, Calandrella M, Citi S et al. 2005. Overexpression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An Immunohistochemical Survey and Evaluation of Its Prognostic Potential. *Vet Pathol* 42: 30–34.
- Miturski R, Semczuk A, Jacowicki JA. 1998. C-erbB-2 expression in human proliferative and hyperplastic endometrium. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 61: 73-74).
- Mograb B, Rochet N, Imbert V, Bourget I, Bocciardi R, Emiliozzi C, Rossi B. 1997. Human monocytes Express amphiregulin and heregulin growth factors upon activation. *Eur Cytokine Netw*. 8: 73-81.

- Moolenaar WH. 1986. Effects of growth factors on intra-cellular pH regulation. *Annu Rev Physiol* 48: 363-376.
- Moolenaar WH, Aerts RJ, Tertoolen LG, De Laat SW. 1986. The epidermal growth factor-induced calcium signal in A431 cells. *J Biol Chem* 261: 279-284.
- Mukku VR, Stancel GM. 1985. Receptors for epidermal growth factor in the rat uterus. *Endocrinology* 117: 149-154.
- Mukku VR, Stancel GL. 1985. Regulation of epidermal growth factor receptors by estrogen. *J Biol Chem* 260: 9820-9824.
- Muramatsu I, Hollenberg MD, Lederis K. 1985. Vascular actions of epidermal growth factor-urogastrone: possible relationship to prostaglandin production. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 994-999.
- Muraoka-Cook RS, Feng SM, Strunk KE et al. 2008. ErbB4/HER4: Role in Mammary Gland Development, Differentiation and Growth Inhibition. *J Mammary Gland Biol* 13: 235-246.
- Nawaz S, Lynch MP, Galand P, Gerschenson LE. 1987. Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 127: 51-59.
- Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA. 1991. Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 88: 21-25.
- Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetkeke NC, Bossert NL, Ross K, Eitzman BE, McLachlan JA. 1992. Transforming growth factor- α is a potential mediator of estrogen action in the Mouse uterus. *Endocrinology* 131: 1657-1664.
- Niikura H, Sasano H, Kaga K, Sato S, Yajima A. 1996. Expression of epidermal growth factor family proteins and epidermal growth factor receptor in human endometrium. *Hum Pathol* 27: 282-289.
- Nilsen-Hamilton M, Liu Q, Ryon J, et al. 2003. Tissue involution and the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 995: 94-108.
- Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* doi:10.1038/msb.4100014.
- Okano A, Tomizuka T. 1996. Postpartum uterine involution in the cow. *JARQ* 30: 113-121.
- Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. 1998. ErbB-1 and ErbB2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18: 5042-5051.
- Peles E, Yarden Y. 1993. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* 15: 815-824.
- Rajkumar T. 2001. Growth factors and growth factor receptors in cancer. *Current science* 81: 535-541.

- Reese J, Brown N, Das SK, Dey SK. 1998. Expression of neu differentiation factor during the periimplantation period in the Mouse uterus. *Biol Reprod* 58: 719-727.
- Rozengurt E, Mendoza SA. 1986. Early stimulation of Na^+ - H^+ antiport, Na^+ - K^+ pump activity, and Ca^{2+} fluxes in fibroblast mitogenesis. *Current Top Membr Transp* 28: 163-193.
- Penington DJ, Bryant I, Riese DJ. 2002. Constitutively Active ErbB4 and ErbB2 Mutants Exhibit Distinct Biological Activities. *Cell Growth & Differentiation*; 13: 247–256.
- Pratt RM. 1987. Role of EGF in embryonic development. *Curr Top Dev Biol* 22: 175-193.
- Sağsöz H, Ketani MA. 2010. The role of estrogen receptors, erbB receptors, vascular endothelial growth factor and its receptors, and vascular endothelial growth inhibitor in the development of the rat mammary gland. *Growth Factors* 28: 379-393.
- Sağsöz H, Ketani MA, Saruhan BG. 2011. Expression of the erbB/HER receptor family in the bovine uterus during the sexual cycle and the relation of this family to serum sex steroids. *Biotech Histochem* doi:10.3109/10520295.2011.556666.
- Salamonsen LA. 2003. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 125: 301-311.
- Schwochau GB, Nath KA, Rosenberg ME. 1998. Colusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and non-aggregative properties. *Kidney Int* 53: 1647-1653.
- Sertich PL, Hinrichs K, Schiereck DE, Kenney RM. 1988. Periparturient events in ovariectomized embryo transfer recipient mares. *Theriogenology* 30: 401-409.
- Shiraga M, Komatsu N, Teshigawara K, Okada A, Takeuchi S, Fukamachi H, Takahashi S. 2000. Epidermal growth factor stimulates proliferation of mouse uterine epithelial cells in primary culture. *Zool Sci* 17: 661-666.
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. 1989. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family". *Science* 243: 1074–1076.
- Slama H, Tainturier D, Chemli J, Zaiem I, Bencharif J. 1999. Involution utérine chez les femelles domestiques: étude comparée. *Revue Med Vet* 150: 779-790.
- Slowey MJ, Verhage HG, Fazleabas AT. 1994. Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Soc Gynecol Invest* 1: 277-284.
- Smith CL. 1998. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58: 627–632.
- Smith K, Lejeune S, Harris AH, Rees MCP. 1991. Epidermal growth factor receptor in human uterine tissues. *Hum Reprod* 6: 619-622.

Srinivasan R, Benton E, McCormick F, Thomas H, Gullick WJ. 1999. Expression of the c-erbB3/HER-3 and c-erbB4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 α , neuregulin-1 β , and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 5: 2877-2883.

Srinivasana R, Levertonb KE, Sheldonc H et al. 2001. Intracellular expression of the truncated extracellular domain of c-erbB-3/HER3. *Cell Signall* 13: 321-330.

Stancel GM, Gardner RM, Kirkland JL, Lin TH, Lingham RB, Loose-Mitchell DS, Mukku VR, Orengo CA, Verner G. 1987. Interactions between estrogen and EGF in uterine growth and function. *Adv Exp Med Biol* 230: 99-118.

Stern DF. 2008. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 215–223.

Stewart CA, Fisher SJ, Wang Y, Stewart MD, Hewitt SC, Rodriguez KF, Korach KS, Behringer RR. 2011. Uterine gland formation in mice is a continuous process, requiring the ovary after puberty, but not after parturition. *Biology of Reproduction Papers in Press*. Published on July 6, 2011 as DOI:10.1095/biolreprod.111.091470

Swanchara KW, Henricks DM, Birrenkott GP, Bodine AB, Richardson ME. 1995. Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in the porcine oviduct. *Biol Reprod*. 53: 911-922

Takamoto N, Leppert PC, Yu SY. 1998. Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. *Connect Tissue Res* 37: 163-175.

Tamada H, Yoh C, Inaba T, Takano H, Kawate N, Sawada T. 2000. Epidermal growth factor (EGF) in the goat uterus: immunohistochemical localization of EGF and EGF receptor and effect of EGF on uterine activity in vivo. *Therigenology* 54: 159-169.

Tansey TR, Padykula HA. 1978. Cellular responses to experimental inhibition of collagen degradation in the postpartum rat uterus. *Anat Rec* 191: 287-309.

Tomooka Y, DiAugustine RP, McLachlan JA. 1986. Proliferation of mouse uterine epithelial cells in vitro. *Endocrinology* 118: 1011-1018.

Tsark EC, Adamson ED, Withers GE, Wiley LM. 1997. Expression and function of amphiregulin during murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 47: 271-283.

Wang D, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Iwai T, Nonogaki H. 1992. Expression of c-erbB2 protein and epidermal growth factor receptor in normal tissues of the female genital tract and in the placenta. *Virchows Archiv. A Pathol Anat* 420: 385-393.

Warbrick JG. 1955. Postpartum changes in the uterus of rat. *J Embryol Exp Morph* 3: 256-264.

Watson H, Franks S, Bonney RC. 1994. Characterization of epidermal growth factor receptor in human endometrial cells in culture. *J Reprod Fertil* 101: 415-420.

Wollenhaupt K, Welter H, Einspanier R, Manabe N, Brüssow K-P. 2004. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R), vascular endothelial growth factor receptor

(VEGF-R) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) systems in porcine oviduct and endometrium during the time of implantation. *J Reprod Develop* 50: 269-278.

Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. 1999. ErbB-2 Amplification Inhibits Down-regulation and Induces Constitutive Activation of Both ErbB-2 and Epidermal Growth Factor Receptors. *J Biol Chem* 274: 8865–8874.

Xian CJ. 2007. Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev* 28: 284-296.

Yue Z-P, Yang Z-M, Li S-J, Wang H-B, Haroer MJK. 2000. Epidermal growth factor family in rhesus monkey uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 55: 164-174.

Zhang Z, Krause M, Davis DL. 1992. Epidermal growth factor receptors in porcine endometrium: binding characteristics and the regulation of prostaglandin E and F₂ alpha production. *Biol Reprod* 46: 932-936.

Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J. 1998. Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* 139: 961–966.