

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

**KEDİLERİN UTERUSUNDA ÖSTRUS SİKLUSUNA BAĞLI
DEĞİŞİMLERDE APOPTOZİSİN ROLÜ VE APOPTOTİK
MEDİYATÖRLER**

Proje No: VA-O7-O5

Proje Türü: Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Prof. Dr. Narin Liman
Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacılar

Doç.Dr. Güner Küçük Bayram
Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr. Kutlay Gürbulak
Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

Araş.Gör. Emel Alan
Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Ocak 2011
KAYSERİ**

TEŞEKKÜR

Apoptozis, embriyogenez, normal doku ve organların involüsyonunda, sitotoksik immunolojik reaksiyonlar sırasında ve farklılaşmış hücrelerin yaşam süresinin tamamlanmasını takiben doğal olarak şekillenir. Apoptozis hematopoietik, lenfoid ve gastrointestinal dokuların yanı sıra ovaryum, uterus, testis ve prostat gibi genital sistem organlarında da gerçekleşmektedir. Dişilerde embriyonun implantasyonu için uterus endometriyumu ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında proliferasyon ve differensiyasyondan oluşan siklik değişikliklere uğrar. Bu siklik değişikliklerin düzenlemesinde apoptozisin önemli rol oynadığı insan, domuz, köpek, sıçan ve fareyi de içine alan birçok memelide incelenmiştir. Sunulan çalışmada östrus siklusu sırasında kedi endometriyumunda Survivin, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarının siklusun fazlarına göre değişim gösterdiği saptanmış olup, apoptozis ile ilişkili olan bu proteinlerin endometriyumdaki hücre apoptozu ve hücre çoğalmasını ortaklaşa düzenledikleri kanısına varılmıştır. Evcil kedilerde yapılmış olan bu çalışmanın sonuçları yabani kedi türlerinin üreme fizyoloji ve patolojilerinin anlaşılmasında bir model olarak hizmet edebilir. Bu çalışmanın yapılmasında maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İç kapak	2
Teşekkür	3
İçindekiler	4
Türkçe Özet	5
İngilizce Özet	6
1. Giriş/ Amaç ve Kapsam	7-8
2. Genel Bilgiler	9-19
3. Gereç ve Yöntem	20-22
3.1. Doku alımı ve işlenmesi	20
3.2. Enzim histokimyal analiz	20-21
3.3. İmmunohistokimyasal analiz	21-22
4. Bulgular	23-35
4.1. Tunel reaktivitesi	23
4.2. Survivin immunoreaktivitesi ve lokalizasyonu	24-27
4.3. Bcl-2 immunoreaktivitesi ve lokalizasyonu	28-30
4.4. Bax immunoreaktivitesi ve lokalizasyonu	31-34
4.4. Makrofaj lokalizasyonu	35
5. Tartışma ve Sonuç	36-44
6. Kaynaklar	45-61

ÖZET

Apopitozun endometriyal fonksiyonun önemli bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada normal östrus siklusu sırasında kedi uterusunda apopitozun düzenlenmesini belirlemek için apopitoz ile ilişkili proteinler (Bcl-2 ve Bax) ve apoptozis inhibitör proteini olan survivinin lokalizasyonu ile bunlar arasındaki korelasyon immünohistokimyasal olarak incelendi. Survivinin östrus siklusunun her fazında endometriumun luminal ve glandüler epitel hücrelerinde bulunduğu gözlemlendi. Siklusun folliküler ve anöstrus fazlarında sitoplazmik boyanma görüldüğü halde, luteal fazda endometriyumun yüzlek ve derin bölümlerindeki bezleri oluşturan hücrelerin hem sitoplazma ve hem de çekirdeklerinin survivin immunoreaktivitesi gösterdikleri tespit edildi. Anöstrus fazında luminal ve glandular epitel hücreleri ve miyometriyumun düz kas hücrelerinin sitoplazmalarında orta yoğunlukta bir Bcl-2 immunoreaktivitesi görüldü. Erken folliküler Bcl-2 için sitoplazmik boyanma yoğunlukla glandular epitel hücrelerinde saptandı. Orta folliküler fazda glandular epitelde Bcl-2 proteininin endometriyumun yüzlek katmanından derin katmanına doğru arttığı belirlendi. Luteal fazın ortalarına doğru derin bölümdeki bezlerdeki Bcl-2 immunoreaktivitesinin kaybolduğu izlendi. Bax proteini östrus siklusunun bütün fazlarında öncelikli olarak luminal ve glandular epitel hücrelerinde yerleşikti. Anöstrusta, Bax immunoreaktivitesi luminal ve glandular epitel hücrelerinin, miyometriyal ve vasküler düz kas hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf olarak izlendi. Bax immunoreaktivitesinin glandular epitelde folliküler fazda orta derecede olduğu ve luteal fazdan orta luteal faza doğru giderek arttığı belirlendi. Sonuç olarak bulgularımız, östrus siklusu sırasında kedi endometriyumunda Survivin, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin hücre apopitozu ve hücre çoğalmasını ortaklaşa düzenlediklerini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Kedi, uterus, surviving, bax, bcl-2, apopitoz

ABSTRACT

Apoptosis has been shown to be an important regulator of endometrium function. To clarify the regulation of apoptosis in the uterus of cat during the normal estrous cycle, the expressions of the apoptosis related proteins (Bcl-2 and Bax) and their correlation to inhibitor of apoptosis protein Survivin were analyzed by immunohistochemistry. Immunostaining of Survivin was detected in the luminal and glandular epithelial cells of cat endometrium at all phases of estrous cycle. Survivin expression was determined in both the cytoplasm and the nucleus of the superficial and deep uterine gland cells at the luteal phase, while only cytoplasmic staining was observed at the follicular and anestrus phases. The Bcl-2 immunostaining in the cytoplasm of luminal and glandular epithelial cells, smooth muscle cells of myometrium exhibited a moderate staining, at anestrus phase. During the early follicular phase, cytoplasmic immunostaining of Bcl-2 was detected mostly in glandular epithelial cells. At the middle follicular phase, in glands, Bcl-2 protein increased from the superficial to the deep layer. In contrast, the expression of Bcl-2 decreased in the secretory phase, being very low or absent in the mid- and late luteal phase. The levels of Bax protein in the cytoplasm luminal and glandular epithelial cells, smooth muscle cells of myometrium and blood vessels were lowest in the anestrus phase. Compared with anestrus, levels of Bax protein were modest in follicular endometrium and increased dramatically in the luteal phase. Our findings suggest that Survivin, Bax and Bcl-2 proteins may cooperatively contribute to cell apoptosis and cell proliferation in the cat uterus during the estrous cycle.

Key words: Cat, uterus, surviving, bcl-2, bax, apoptosis

1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM

Doku homeostazisi hücre proliferasyonu, differensiyasyonu ve hücre ölümü arasındaki hassas dengenin bir sonucudur. Hücre ölümü nekroz ve apoptozis olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Nekroz hücre yaralanmalarını takiben meydana gelir ve yangısal cevabı başlatır. Apoptozis programlanmış hücre ölümünü ifade eden bir terim olup hücre siklusunda özgün morfolojik değişiklikleri başlatan belirgin bir olaydır. Apoptoziste nükleazların aktivasyonu DNA'nın kromatin yapısı bozularak parçacıklara ayrıldığı halde, nekrozda rasgele DNA bozulması söz konusudur. Apoptozis, embriyogenez, normal doku ve organların involüsyonu, sitotoksik immunolojik reaksiyonlar sırasında ve farklılaşmış hücrelerin yaşam süresinin tamamlanmasını takiben doğal olarak şekillenir. Apoptozis ayrıca, çeşitli fizyolojik aktivatörler, ısı şoku, bakteriyal toksinler, onkogenler, kemoterapötik ilaçlar, ultraviyole ve gama radyasyonunu içine alan birçok farklı ajanın uygulanmasıyla da hücrelerde indüklenebilir. Apoptozis hematopoietik, lenfoid ve gastrointestinal dokuların yanı sıra ovaryum, uterus, testis ve prostat gibi genital sistem organlarında da gerçekleşmektedir. Dişilerde embriyonun implantasyonu için uterus endometriyumu ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında proliferasyon ve differensiyasyondan oluşan siklik değişikliklere uğrar. Bu siklik değişikliklerin düzenlemesinde apoptozisin önemli rol oynadığı insan, domuz, köpek, sıçan ve fareyi de içine alan birçok memelide incelenmiştir. Ancak kedilerde uterusun luminal ve glandular epiteli ile stromasında oluşan proliferatif, rejeneratif ve dejeneratif değişikliklerde apoptozisin rolü ve bu apoptozisin hangi apoptotik regülatörler kullanılarak şekillendiği ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Ayrıca insan endometriyumunun normal menstürel siklus ve gebelik için stromal, glandular ve vasküler hücrelerden ve lökositlerden köken alan parakrin faktörlere gereksinimi olduğu

bilinmektedir. Menstüral siklus sırasında lökosit tipleri ve sayılarında değişiklikler meydana gelmektedir. Bu lökositler uterusun gebeliğe hazırlanmasında, gebelik şekillenmediği zaman da endometriyumun yıkılmasında rol oynarlar. Ayrıca anjiyogeneze ve endometrial doku onarımında, implantasyon ve gebelikte de rol oynarlar. Apoptozisin insan endometriumunda lökositlerin sayı ve tiplerini kontrol eden önemli mekanizmalardan birisi olduğu da gösterilmiştir.

Bu çalışma, kedilerde seksüel siklusun farklı dönemlerinde uterus endometriumunda oluşan proliferasyon, diferensiyasyon, dejenerasyon ve involusyon gibi değişikliklerin düzenlenmesinde Apoptozisin rolünün ve bu değişikliklere aracılık eden apoptotik mediyatörlerin belirlenmesi, uterusdaki apoptozis ile ovarial hormonlar arasındaki ilişkinin ortaya konması ve ayrıca uterus endometriumunda bulunan immun sistem hücrelerinden makrofajların yoğunluklarında şekillenen siklusa bağlı değişimlerin saptanarak bu hücrelerin uterus endometriumundaki olası fonksiyonlarının tanımlanması amaçlarıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Doku yaşamı, hücresel çoğalma ve Apoptozis arasındaki dengeye bağlı olarak sürdürülür. Apoptozis terimi ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından çeşitli hücre ve doku tiplerinde gözlenen ortak hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır. Yunanca'dan köken alan bu terim bir ağacın yapraklarını veya bir çiçeğin taç yapraklarını dökmesi gibi bir anlam taşımaktadır (Hiramine 1997). Apoptozis doku homeostazisinin sürdürülmesinde kritik bir rol oynayan, fonksiyon bozukluğu olan hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlayan ve normal hücre döngüsünden sorumlu olan fizyolojik bir mekanizmadır. Apoptozis veya daha genel anlamda hücre ölümü uzun süre araştırmacıların ilgilenmedikleri bir alan olarak kalmıştır. Fakat gelişim biyolojisinde (Galan et al. 2000), normal doku dönüşümünde ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları (Los et al. 2001) gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerde Apoptozisin rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır. Her saniye yaklaşık bir milyon hücre Apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmakta, bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (Apoptozis) arasında kontrollü bir denge (homeostazis) vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda bulunur. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptozis veya hızlanmış ya da tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir (Kukhta et al. 2003, Ulukaya 2003).

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozisde çekirdek kromatini hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir; ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanase olur. Nekrotik hücrenin plazma membranı

bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepcikler oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar, fakat apoptotik hücre membranla çevrili olan ve değişen miktarlarda çekirdek veya diğer hücre içi yapıları içeren küçük cisimciklere (apoptotik cisimcik) parçalanır (Huppertz 2000). Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması sonucu dış ortama salınan hücre içeriği inflamasyona neden olur. Apoptozisde ise apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosit edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Falcieri et al. 1994). Apoptozisin en önemli yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezi ile DNA analiz edildiğinde merdiven görüntüsü ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. DNA Ca^{++} bağımlı endonükleaz ile parçalanır. Ayrıca, DNase I ve II de DNA parçalanmasından sorumludurlar. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir (Saraste and Pulkki 2000). Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediyatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli **kalsiyum** girişi olur. Kalsiyum iyonları fosfolipazlar, proteazlar ve nükleazlar gibi Ca^{++} bağımlı enzimler aracılığıyla gerçekleşen birçok fizyolojik olay ile hücre yaralanması ve apoptozis gibi olayların regülasyonunda görev alır (Smaili et al. 2000; Smaili et al. 2003). **Seramid**, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plazma membran hasarına

karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. **Mitokondriyonlar** apoptotik mekanizmada çok önemli rol oynayan bir organel olup çeşitli apoptotik mediyatörleri bünyesinde barındırır (Granville and Gottlieb 2002). Apoptozis efektör moleküller (Kaspazlar), adaptör moleküller (Apaf-1) ve düzenleyici moleküllerin [pro- and antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, Apoptozis inhibitörleri (IAPs), ve Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI] katılımıyla gerçekleşir (Hengartner 2000). İntrasellüler membranla ilişkili proteinler olan **Bcl-2** ailesi apoptozisi indükleyen –pro-apoptotik– (Bax, Bim, Bak, Bok Bad, Bid, Bcl-X_S) ve apoptozisi inhibe eden–anti-apoptotik– (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) üyelerden oluşur (Antonsson et al. 1997; Boise et al. 1993; Gross et al. 1999). Hücrenin canlılığı bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin nispi oranına bağlıdır. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar. Pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro- ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı, oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir.

Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dışı membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir (Antonsson et al. 1997). Bax sitosolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada pH ve voltaj bağımlı kanallar şekillendirir, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur (Antonsson et al. 1997).

Apopitozis Bax'ın sitosolden mitokondriyal membrana eklenmesiyle başlar (Suzuki et al. 2000). Sonuçda sitokrom c ve Apopitozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitosole çıkmasını sağlar.

Bcl-2 ailesinin mitokondri üzerindeki etkileri:

1. Bid'in kırılması: Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz “latent” halde bulunurlar. Bu pro-apoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine yol açan etken, kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal fragmanı oluşur. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir. Bid diğer pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerle etkileşime girerek onların normalde bulundukları sitoplazmadan mitokondriye göç etmelerine (aktivasyonlarına) neden olur. Bu aktivasyon sonucu, sitokrom c salıverilir. Bid karboksi terminal fragmanı ayrıca, bak-düzenlemeli sitokrom c salıverilmesini de aktifleştirir (Wei et al. 2000).

2. Bad'ın defosforilasyonu: Bad birçok normal hücrede bulunur. Bad'ın diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal koşullarda bad yaşam faktörlerinin etkisiyle fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştiremez. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edemez. Eğer defosforile olursa anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturarak anti-apoptotik (sitokrom c tutucu) etkilerini ortadan kaldırır. Böylece sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi kaspazların aktivasyonuna yol açar. İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin

mitokondriden saliverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir (Ulukaya 2003).

3. Bim'in mikrotübüllerden saliverilmesi: Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir. Mitokondriden ayrıca AIF (apoptosis indükleyici faktör)'ler saliverilir. Bunlar henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar (Ulukaya 2003).

p53, radyasyon ya da kemoterapi etkisiyle DNA hasarı (nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 Apoptozisi indükler. p53'ün Apoptozisi indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. **Sitokrom c**, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi Apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c'nin mitokondriyon dış membranını nasıl geçtiği bilinmemekle birlikte, Bcl-2 ailesinin üyelerinin bu olayın düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir. İnternal hasar Bcl-2' nin Bax'ı aktive etmesine neden olur. Bax dış mitokondriyal membrandaki kanalları açar ve sitokrom c'nin dışarı çıkmasına neden olur (Brady and Gil-Gomez 1998; Hengartner 2000). Sitokrom c mitokondriden Apoptozis-indükleyici faktör ("AIF, apoptosis-inducing factor") ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1")'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder (Zou et al. 1999).

Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (“ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease”) inaktifleştirir, böylece ICAD’ünün bağıladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (“CAD, caspase-activated deoxyribonuclease”) serbestleşir ve bu da Apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı Apoptozisi gösterir (Enari et al. 1998). Oysa kaspaz-bağımsız Apoptozisin varlığı da bilinmektedir. AIF, kaspaz-bağımsız Apoptozisi başlatan mitokondriyal bir flavoproteindir (Wu et al. 2002).

Kaspaz (“caspase”)’lar, inaktif prekürsörler olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein içeren aspartat spesifik proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Kaspazlar normal fizyolojik koşullarda, zimojen veya prokaspas olarak adlandırılan inaktif proteinlerdir (Fussenegger et al. 2000; Slee and Martin 1998). Şu ana kadar çoğu Apoptoziste rol alan 15 adet kaspaz (Kaspaz-1 (ICE), Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2), Kaspaz-3 (CPP32, apopain, Yama), Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICE_{rel}II), Kaspaz-5 (ICE_{rel}III, ICHIII, TY), Kaspaz-6 (Mch2), Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1), Kaspaz-8 (FLICE 1, Mch5, MACH 1), Kaspaz 9 (Mch 6, ICE-LAP6), (Kaspaz-10 (Mch4, FLICE 2), Kaspaz-11 (ICH-3), Kaspaz-12, Kaspaz-13 (ERICE), Kaspaz-14 (MICE), Kaspaz-15 tanımlanmıştır (Alnemri 1997; Eckhart et al. 2005; Schwartz 1998). Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)’a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz-2, -8, -9, -10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (Kaspaz-3, -6, -7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Kaspaz kaskadı, sitokrom c’nin

sitoplazmaya saliverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin saliverilmesine neden olabilirler (Fuentes-Prior and Salvesen 2004; Schwartz 1998). **Granzim B** sitotoksik T lenfositlerin (CTL) ve "doğal katil hücrelerin (NK cell) sitoplazmik granüllerinde perforin ile birlikte bulunan serin proteaz ailesine ait olan granül proteinleridir. CTL'lerinin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitosolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan granzimin bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz 8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) Apoptozise götürür (Pinkoski 2000).

Organ ve dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlükleri koruyabilmesi, hücrelerin proliferatif ve apoptotik aktiviteleri arasında homeostatik dengenin kurulmasına bağlıdır. Apoptosis farklı evrelerde indüklenebilir, stimule edilir veya inhibe edilir.

1. Apoptosis spesifik ligand–reseptör etkileşimiyle indüklenebilir. Memeli hücrelerinde apoptozis iki büyük apoptotik yolla gerçekleşir. Bunlar; ölüm reseptör yolu ve mitokondriyal yoldur (Hengartner 2000). Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen TNF-reseptör ailesine ait Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNF-R1, p55 veya CD120a)'ın ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılımları) sonucu indüklenir. Membranda bulunan bu hücre yüzey reseptörlerinden Fas, timusda, lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokardta bulunur (Nagata 1997; Mizuno et al. 2004). Fas'ın ilgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve doğal katil hücrelerde bulunur. TNFR-1'in ligandı ise TNF α dır. Fas Fas ligandına bağlanması reseptör kümelenmesine ve ölüm indükleyici sinyal oluşturan kompleks (DISC) şekillenmesine neden olur. Bu kompleksin adaptör bir molekül olan Fas ile ilişkili ölüm içeriği içeren protein (FADD) aracılığıyla FADD-benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzimi

(FLICE, prokaspaz-8) toplanması kaspaz-8'in aktivasyonu ile sonuçlanır. (Hengartner 2000; Krammer 1999). Aktive olan kaspaz-8'in düzeyine göre iki farklı intrasellüler apoptotik yol yürütülür. Birinci tip hücrelerde yüksek düzeydeki kaspaz-8 otoproteolitik olarak parçalanıp kaspaz-3 gibi efektör kaspazlara ayrılır ve böylece Apoptozisin infaz fazı başlar. İkinci tip hücrelerde Apoptozisi indüklemek üzere küçük bir kaspaz-8 sinyali oluşturulur. Aktif kaspaz-8, proapoptotik bir protein olan bid'i kırar. Kırılan Bid, Bax, Bak gibi proapoptotik Bcl-2 proteinlerinin mitokondriye bağlanmasını stimule eder, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-x_L) bağlanmasını ise inhibe eder. Bu sitokrom c'nin mitokondriden sitosole geçmesine ve apoptozomun şekillenmesine ve kaspaz 3'ün tetiklenmesine neden olur. Kaspaz 3'ün aktivasyonu DNA onarıcı enzimler, hücre iskeleti ve nükleer iskelet proteinleri gibi anahtar substratların yıkılmasından sorumlu olup Apoptozisde idam evresinin sonu olarak düşünülür (Scaffidi 1998).

2. Sitotoksik T lenfositlerden salınan perforin ve granzim B gibi sitolitikler de Apoptozisi başlatır.

3. Hücre-hücre ve hücre matrix bağlantısını sağlayan cadherin veya integrinler ile onların ligandlarının bağlantısının bozulması Apoptozisi başlatır.

4. Özgün büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğu, örneğin TGF β (Transforming growth factor beta)'nin varlığı veya CSF (Colony Stimulating Factor)'nin yokluğu Apoptozisi başlatır.

5. Steroid hormonlar gibi spesifik hormonların azalması veya artması Apoptozisi başlatır.

6. İrradyasyon gibi fizyolojik olmayan uyaranlar da Apoptozisi başlatır. Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak Apoptozisi başlatır (Hengartner 2000). p53 bax'ın

indüksiyonu haricinde ayrıca Fas gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da Apoptozisi başlatabilir.

7. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir.

Apoptozis inhibitor proteinleri (Inhibitor of Apoptosis Proteins, IAP) kaspaz-3, -7 ve -9'a bağlanarak onları inhibe eden antiapoptotik proteinlerdir. Bunlar kaspaz aktivasyonunu ya mitokondriyal yolda ya da ölüm reseptör yolunda inhibe ederler. Ayrıca kaspaz-3'ü direkt olarak aktive eden granzim B'yi de etkileyerek de Apoptozisi inhibe ederler (Zapata 1998). Apoptozis inhibitor proteinleri kaspaz aktivasyonunun inhibisyonu dışında hücre bölünmesini ve hücre siklusunu da düzenlerler. Ayrıca Nüklear Faktör B'yi aktive ederek hücre haberleşmesinde önemli rol oynarlar (Schimmer 2004). Apoptozis inhibitor proteinler ailesinin bir üyesi olan Survivin hücre bölünmesi ve Apoptozisi içine alan hücresel olaylarda kritik bir rol oynar. Survivin insan kanserlerinin çoğunda eksprese edilirken normal dokularda minimum düzeyde bulunur (Altieri 2003a, Caldas et al. 2005). Kanser hücrelerinde overeksprese olan survivin immun sistem hücreleri tarafından indüklenmiş olan Fas-aracılı apoptozisi inhibe eder. Survivin Fas-aracılı apoptotik sinyalleri inhibe ederek kanser hücrelerine sadece immun sistem hücrelerinin saldırılarını baskılama olanağı sağlamaz, aynı zamanda kanser hücrelerinde eksprese olan Fas Ligandı indükleyerek immun hücrelere saldırılarını da sağlar (Asanuma et al. 2004). Apoptotik uyarımlara yanıtta mitokondride bulunan survivin hızla sitosole salınır ve kaspazın aktivasyonunu önleyerek apoptozisi inhibe eder. Bu nedenle mitokondriyal survivin apoptozis inhibisyonunun yeni bir yolu olarak tümör progresyonuna katılır (Dohi et al. 2004).

Dişi kediler 7-12 aylıkken seksüel olgunluğa (puberte) ulaşırlar ve mevsime bağlı poliöstrik sıklusa sahiptirler. Kış sonunda, yaz başında ve sonbahar başlarken periyodik olarak yılda 2-3

defa siklusa gelirler, ancak bu siklusların uzunlukları değişkendir. Dişi kediler ırk, çevre koşulları ve sağlık durumlarına bağlı olarak bireysel siklus gösterirler. Artan gün ışığı kedilerde siklusu stimüle edici etki yapar. Özellikle evde tutulan hayvanlarda gün uzunluğunun suni yolla artırılması ile anöstrus süresinde kısalma olduğu görülmüştür. Hatta hayvanların yıl boyunca siklus gösterdikleri saptanmıştır. Artan gün ışığı GnRH üzerindeki epifiz bezinin inhibisyonunu kaldırır ve östrus siklusunun, proöstrus devresi 20-60 gün sonra başlar. Kedilerde proöstrus 2-3 gün kadar sürer. Bu esnada vulva dudaklarında ödemleşme, vaginal mukozada hiperemi, nemlilik artışı ve giderek kızgınlık semptomlarında da artış oluşur. Proöstrus dönemindeki kedilerin ovaryumlarında çapları 1 mm'e kadar varan çok sayıda folliküller bulunur. Östrus süresi değişkendir. Eğer ortamda erkek kedi bulunmuyorsa 10-14 gün boyunca kızgınlık semptomları gösterirler. Daha sonra 2-3 haftalık dinlenme periyodu oluşur ve sonra tekrar östrus şekillenir. Östrojenin artmasıyla vajina epiteli keratinize olur. Erkek kedi ile birlikte tutulan ve onlarla çiftleşen kedilerde östrus semptomları sadece 4-6 gün kadar sürer. Kedilerde çiftleşme isteği ilk günlerde azdır, sonra giderek artar ve 3-4. günlerde en yoğun çiftleşme isteği oluşur. Kediler bu esnada kısa aralıklarla erkek kedilerle defalarca çiftleşir. Çiftleşme isteği daha sonra 24 saat içerisinde kaybolur. Yaşlı olan kedilerde östruslar arasındaki geçen aralık uzun olup, kızgınlık semptomları da zayıftır.

Ovulasyon kedilerde çiftleşmeye bağlı olarak oluşan nörohormonal refleks sayesinde gerçekleşir. Ovulasyon, LH yükselmesinden sonraki 24-48 saat içerisinde olur. Gelişmiş folliküllerin ovulasyonu çiftleşmeden 22-24 saat sonra oluşur (Provake ovulasyon). Açığa çıkan ovumlar fimbria ovarica tarafında yakalanıp ovidukt'a sevk edilirler. Ovidukt'un ilk üçte birine ulaşan ovumlar burada spermatozoonlar ile karşılaşırlarsa fertilizasyon şekillenir ve oluşan zigotlar 4-5 gün kadar burada kalır, daha sonra uterusu geçerler. Zigotların uterustaki implantasyonu ovulasyondan sonraki 13.-14. günlerde oluşur. Çiftleşme olmazsa, LH salınımı olmaz ve gelişmiş olan folliküllerin regresyonu başlar. Çiftleşmenin dışında,

vajina ve serviks masaj yapılması, perineal bölge ve kuyruk köküne ellenmesi, erkeğin çiftleşme olmaksızın dişi üzerine atlaması, swapla vaginal smear alınması, GnRH ve HCG uygulaması da kedide ovulasyona sebep olur (Chtdarong K, 2003).

Kedilerde her östrus döneminde ortalama 4 follikül (ortalama çapları 1,5-2 mm) gelişir ve ovulasyon olur, böylece açığa çıkan ovumlar 24 saat boyunca fertilitelerini koruyabilirler. Ovulasyondan sonra şekillenen corpus luteumlar 10-17 gün içerisinde maksimal büyüklüğe ulaşırlar (ortalama çapları 2-3 mm kadar). Gebelik esnasında corpus luteumlar bu büyüklüklerini gebeliğin 30. güne kadar korurlar ve sonra yavaş yavaş gerilerler. Kedilerde gebeliğin 50. gününden sonra ovaryumların operasyonla çıkarılmasıyla abortus oluşmadığı görülmüştür. Burada anlaşılmaktadır ki gebeliğin 50. gününden itibaren doğuma kadar uterusun relaksasyonu progesteron ile sağlanmaz, bilakis plasenta tarafından salgılanan relaksin'e bağlı olarak uterusun sakinliği oluşturulmaktadır.

Steril bir çiftleşmeden sonra veya mekanik yada ilaçla ovulasyon oluşturulmasından sonra corpus luteumlar sadece 20 gün süreyle fonksiyonel kalır ve sonra giderek gerilerler (regresyon). Bunu takiben 36-45 gün kadar süren hayali gebelik semptomları ortaya çıkar.

Laktasyondaki kedilerde ender olarak doğumdan 7 gün sonra fertil bir östrus oluşabilir. Ancak normal olarak doğumdan sonra ilk siklus yavruların anneden ayrılmasından 3-4 hafta sonra ortaya çıkar. Eğer yeni doğmuş yavrular doğumdan sonra 24 saat içerisinde anneden ayrılmışlarsa, bu durumda anne kedilerde doğum sonrası ilk siklus 3-4 hafta sonra oluşur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Doku alımı ve işlenmesi: Bu çalışmada fakültemiz kliniğine ovario-hysterectomie operasyonları için gelen 37 adet sağlıklı dişi kediler kullanıldı. Kediler ovario-hysterectomie operasyonundan 8 saat öncesinden aç bırakıldı. Preanestezik olarak Atropine sulfate (0.045 mg/kg) subcutan olarak enjekte edildi. Takiben hayvanlar Xylazine (1mg/kg)-ketamin hydrochloride (10 mg/kg)'in intramusular enjeksiyonları ile anestezi edilerek opere edildi. Operasyondan hemen sonra ovaryum ve uteruslar histolojik ve immunohistokimyasal analizler için küçük parçalara ayrıldı. Alınan parçalar %10 formaldehit solüsyonunda tespit edildi ve yıkamayı takiben dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek paraflostta bloklandı. Östrus siklusunun fazlarını histolojik olarak belirlemek için bloklardan 6 µm kalınlığında bir seri kesit alındı ve Crossman'ın üçlü boyaması ile boyandı. Hazırlanan preparatlar incelenmesi sonucu uterus örnekleri foliküler (n=18), luteal (n=7) ve anöstrus (n=12 fazları olmak üzere) gruplandırıldı.

3.2. Enzim histokimyasal analiz (TUNEL-terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling-metodu)

TUNEL işaretleme tekniği için, parafine gömülen dokulardan 3-Aminopropyl-ethoxy-silane (APES) (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA) ile kaplanmış lamalar üzerine 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon işleminden sonra kesitler Proteinaz – K çalışma solüsyonu (10–20 mg/ml, 10mM Tris/HCL içinde pH =7,4-8) ile 15 dakika oda ısısında bekletildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra örnekler üzerine tunel reaksiyon karışımı eklenerek nemli karanlık ortamda (nem kamarası) 37 derecede 60 dk. inkübe edildi. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra kesitler converter – POD ile 37 derecede 30 dakika nemli ortamda inkübe edildi. Tekrar üç kez PBS ile yıkandıktan sonra DAB substrat ile 15–25 derecede 10

dakika muamele edilen kesitler, Gill'in hematoksileni ile 1 dakika zıt boyanıp alkoller ve ksilen'den geçirilip kapatılarak ışık mikroskopta incelenmeye hazır hale getirildi.

3.3. Immunohistokimyasal analiz

Uterus örneklerinde apoptosis ile ilişkili mediyatörleri (Bcl-2, Bax ve Survivin) ve makrofajları belirlemek için bloklardan 3-Aminopropyl-ethoxy-silane (APES) (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA) ile kaplanmış lamalar üzerine 5 mikron kalınlığında 4 seri kesit alındı. Alınan kesitlere Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) e çalkalanan kesitler metanolde hazırlanmış %3' lük H₂O₂ ile muamele edilerek tekrar PBS'de yıkandı. Doku antijeninin yeniden kazanımını yeniden sağlamak için kesitler sitrat buffer 'da (pH 6) 95°C'de 20 dak süreyle kaynatıldı. Takiben 20 dak aynı solüsyon içerisinde oda ısısında bekletildi. Tekrar PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika bloking solüsyonu (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB) ile bir nem odası (humidity chamber) içinde inkube edildi. Uygun dilasyonlarda hazırlanmış primer antikolar kesitler üzerine eklendi ve nem odasında oda ısısında 1 saat inkube edildi.

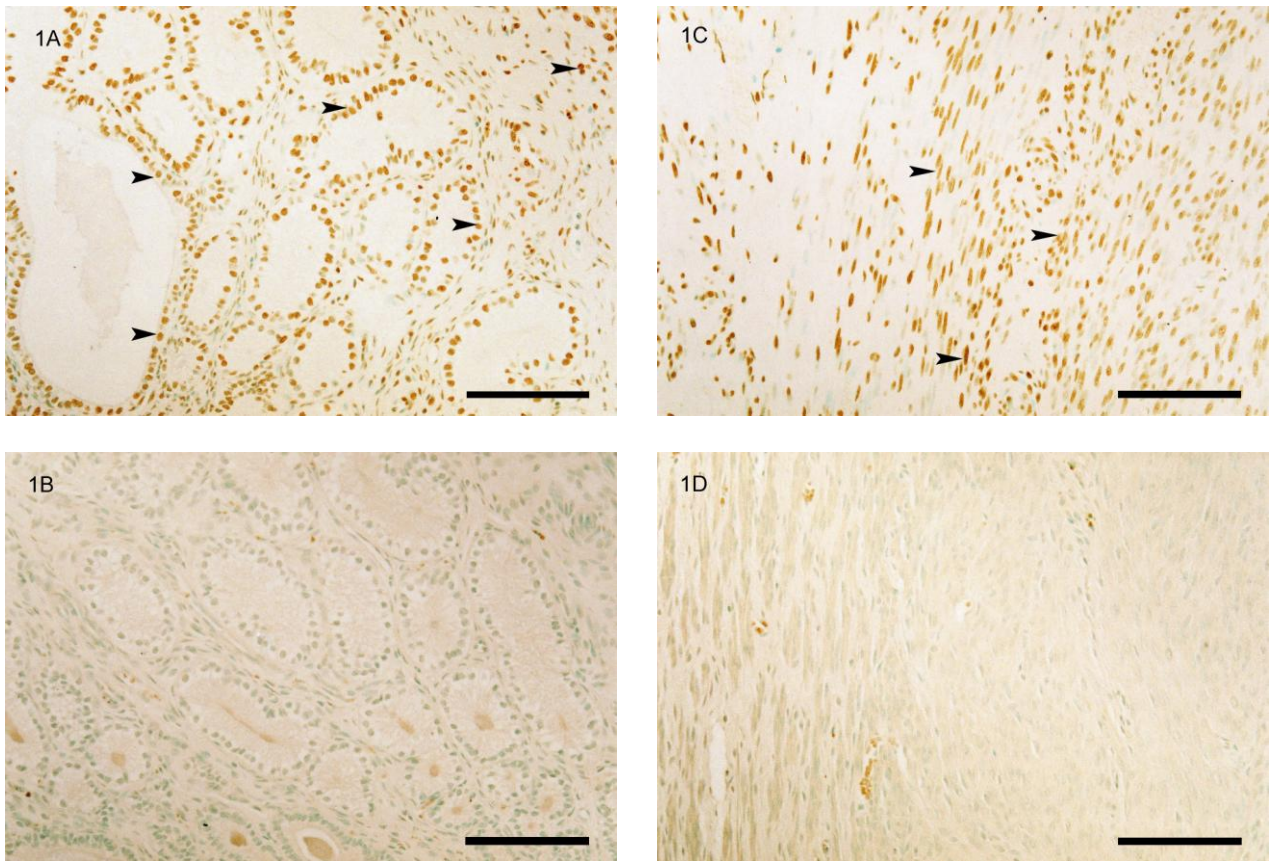
Hazırlanan birinci seri kesitler survivin (rabbit polyclonal antibody, abcam, dilüsyon oranı 1:400), ikinci seri kesitler Bax (rabbit monoclonal antibody, Santa cruz, dilüsyon oranı 1:200), üçüncü seri kesitler Bcl-2 (mouse monoclonal antibody, Novocastro dilüsyon oranı 1:50), dördüncü seri kesitler ise makrofaj markerı olan CD68 (mouse monoclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, dilüsyon oranı 1:50) antikoru ile muamele edildi. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi. Inkubasyonu takiben PBS'te 3 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor (Thermo Fisher

Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) ile 20 dakika oda ısısında inkube edilip, tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepavidinde 20 dakika bekletildi. Tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra 10-20 dakika kromojen solusyonunda (DAB ya da AEC) bekletildi. Gill'in Hematoksileninde 3 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkanan kesitler kullanılan kromojene göre (DAB ya da AEC) ya alkol ve ksilol serisinden geçirilip ya da direkt olarak üzerine yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı. Kırmızı veya kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirilip ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1. Tunel reaktivitesi

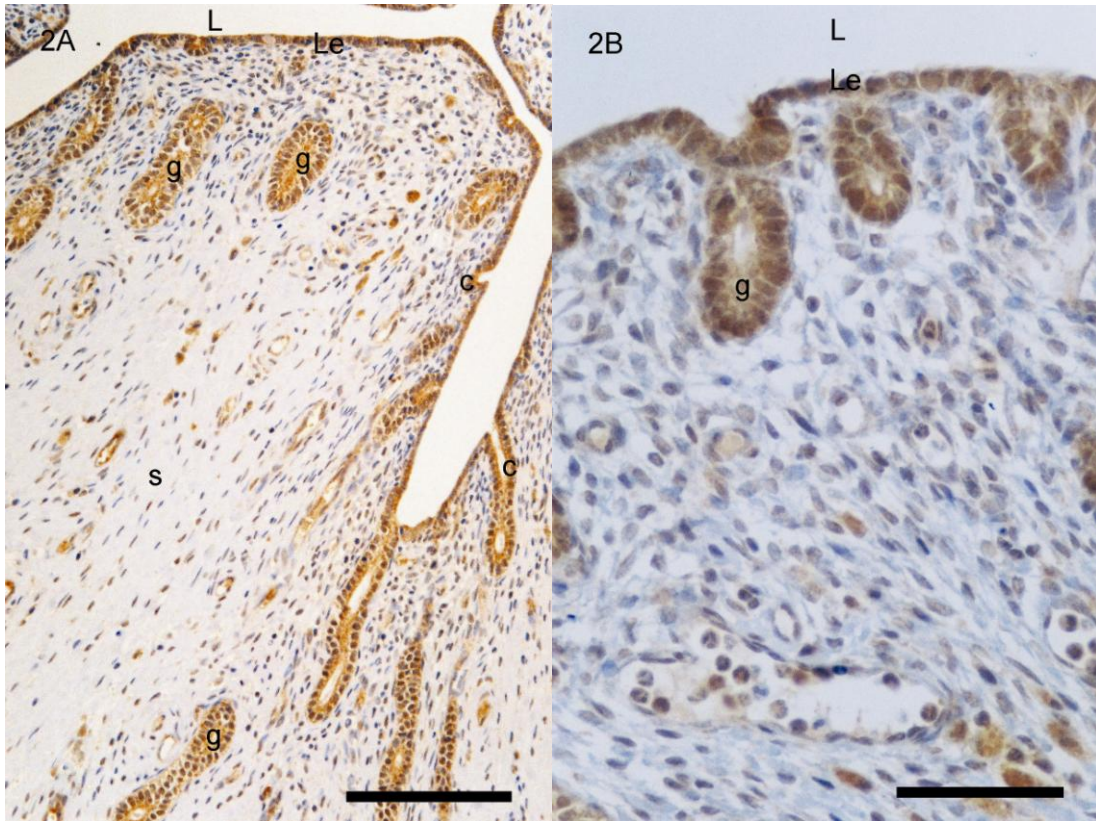
Tunel metodunun çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla DNAase ile muamele edilmiş kontrol kesitlerinde hem yüzey epiteli ile bez epitel hücrelerinde ve hem de miyometriyal kas hücrelerinde Tunel pozitif reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 1A ve C). Bununla birlikte seksüel siklusun bütün fazları incelendiğinde sadece luteal fazda endometriyumdaki bezlerde TUNEL pozitif reaksiyon veren bir iki adet hücreye rastlanmış olup apoptotik hücre sayımları yapılamamıştır (Şekil 1B ve D).



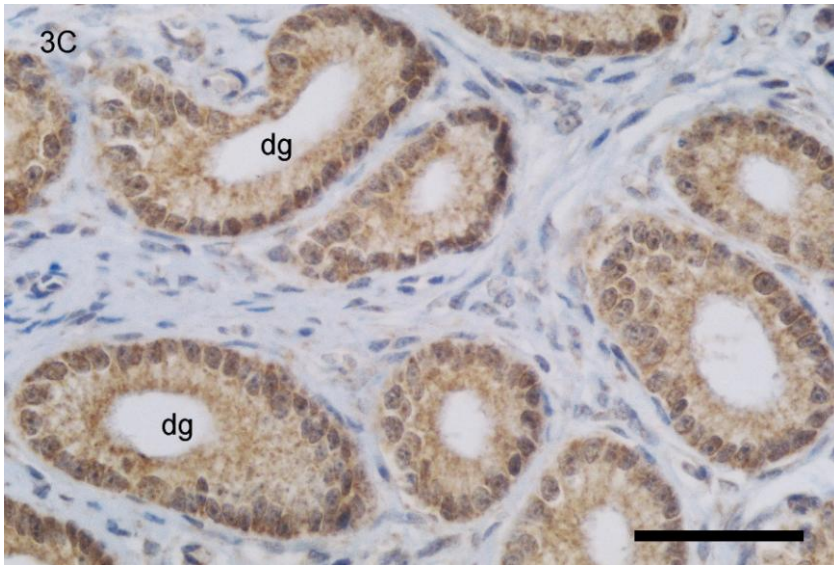
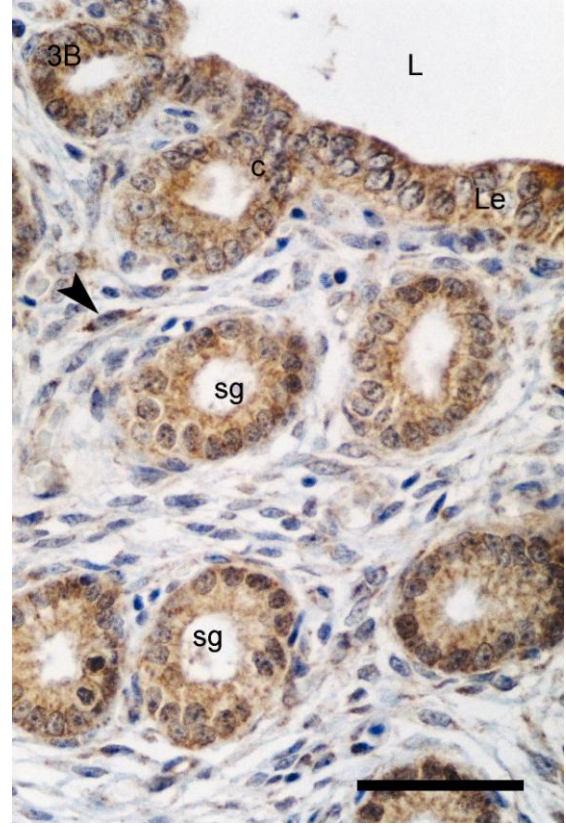
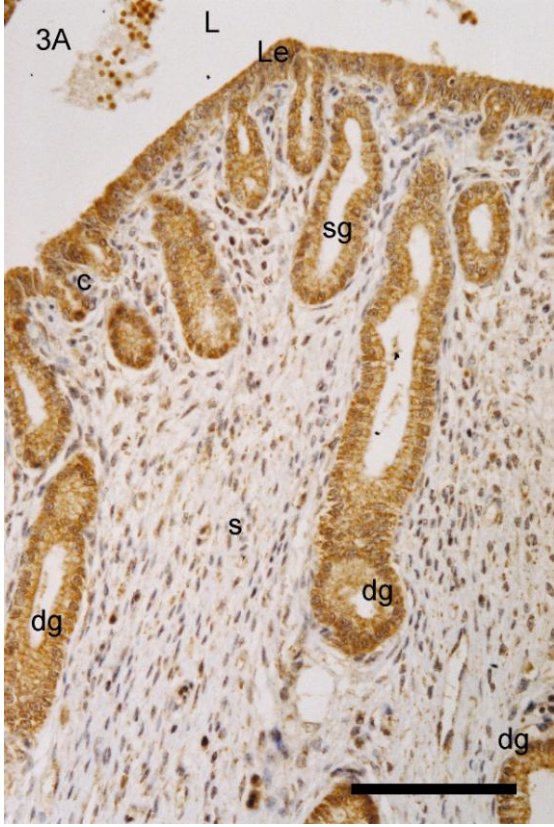
Şekil 1. Tunel reaktivitesi. DNAase uygulanan uterus dokusunda endometriyum (1A) ve miyometriyumdaki (1C) Tunel pozitif hücreler (ok başları), normal tunel metodu uygulanan uterus dokusunda endometriyum (1B) ve miyometriyumda(1D) Tunel pozitif hücre çok nadir gözlenmektedir. Bar: 100µm.

4.2. Survivin immunoreaktivitesi ve lokalizasyonu:

Östrus siklusunun bütün fazlarında luminal ve glandular epitelin survivin için pozitif reaksiyon verdiği, ancak glandular epiteldeki boyanmanın fazlara bağlı olarak değiştiği gözlemlendi (2A-B, 3A- 3C, 4A-B). Siklusun folliküler ve anöstrus fazlarında sitoplazmik boyanma görüldüğü halde (2A-B, 3A- 3C), luteal fazda endometriyumun yüzlek ve derin bölümlerindeki bezleri oluşturan hücrelerin hem sitoplazma ve hem de çekirdeklerinin survivin immunoreaktivitesi gösterdikleri (4A-B) tespit edildi.

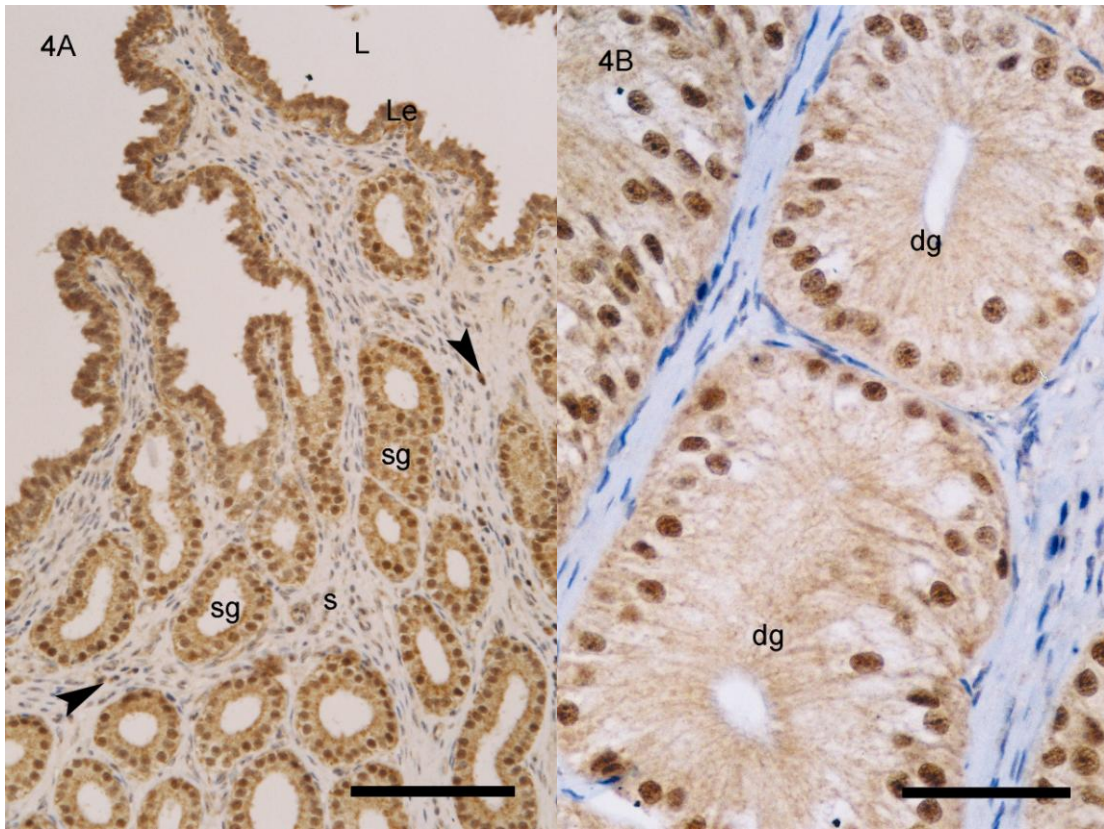


Şekil 2A ve 2B. İnaktif fazda endometriyumda survivin immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometrial bez, c: kript, s: stroma. Bar: 100µm.

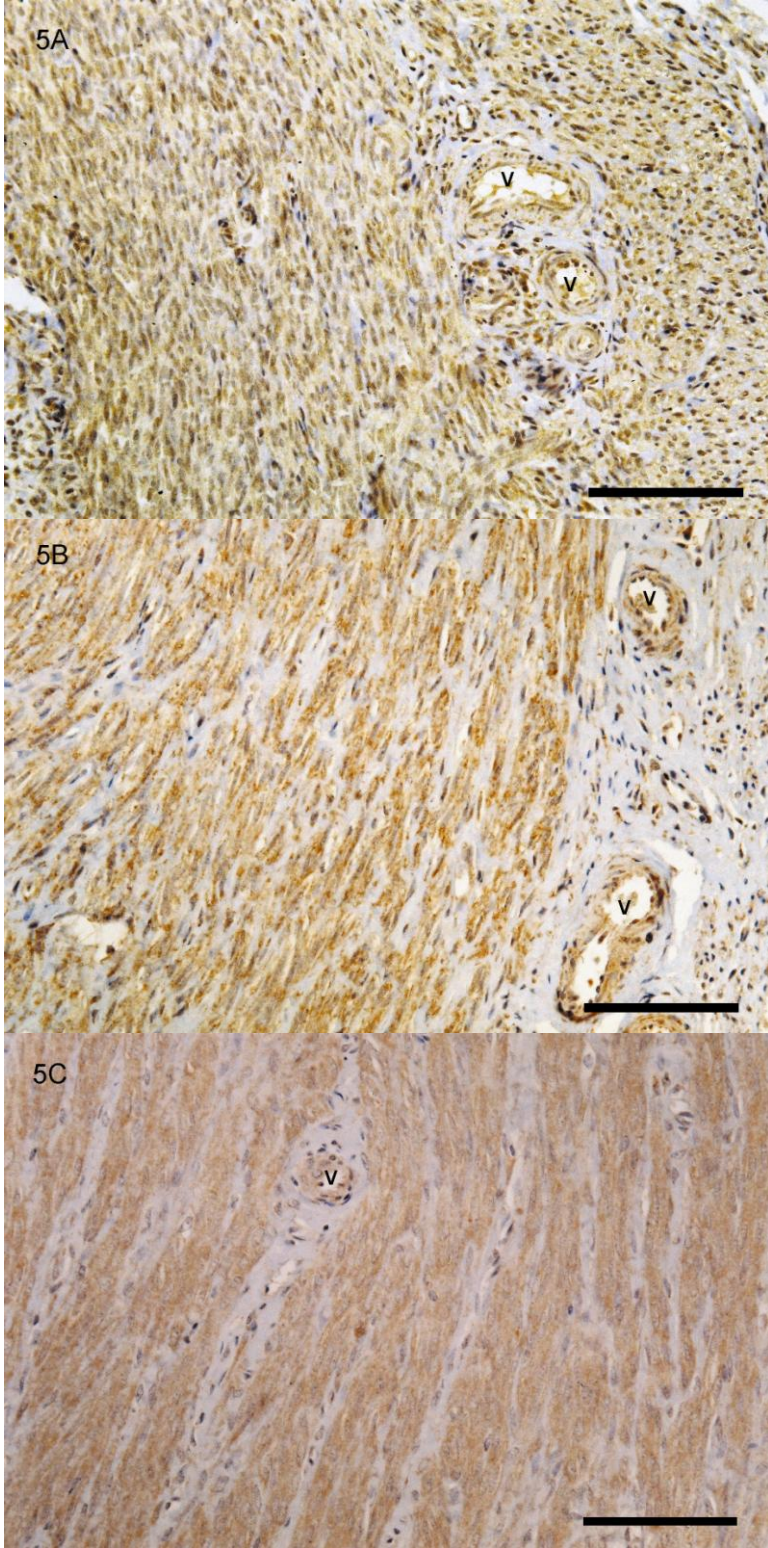


Şekil 3A, 3B ve 3C. Follicular fazda endometriyumda survivin immunoreaktivitesi (3A). Luminal epitel ve endometriyumun yüzlek bölgesindeki bezlerde (sg) survivin immunoreaktivitesi (3B), endometriyumun derin bölgesindeki bezlerde (dg) survivin immunoreaktivitesi (3C). L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometrial bez, c: kript, s: stroma. Barlar: 100µm (3A), 50µm (3B ve 3C).

Luteal fazda, luminal epitel ve endometriyumun yüzlek bölümündeki bezleri oluşturan hücrelerde ise sitoplazmadaki boyanma yoğunluğunun daha kuvvetli olduğu gözlemlendi (4A). Endometriyumun derin bölümündeki bezleri oluşturan hücrelerde çekirdekteki boyanma yoğunluğunun sitoplazmadakinden daha kuvvetli olduğu; bu boyanmanın luteal faz süresince giderek arttığı belirlendi (4B). Endometriyum stromasındaki hücrelerin, miyometriyal düz kas hücreleri ile damarların endotel ve düz kas hücrelerinin survivin pozitif oldukları tespit edildi (5A, 5B, 5C).



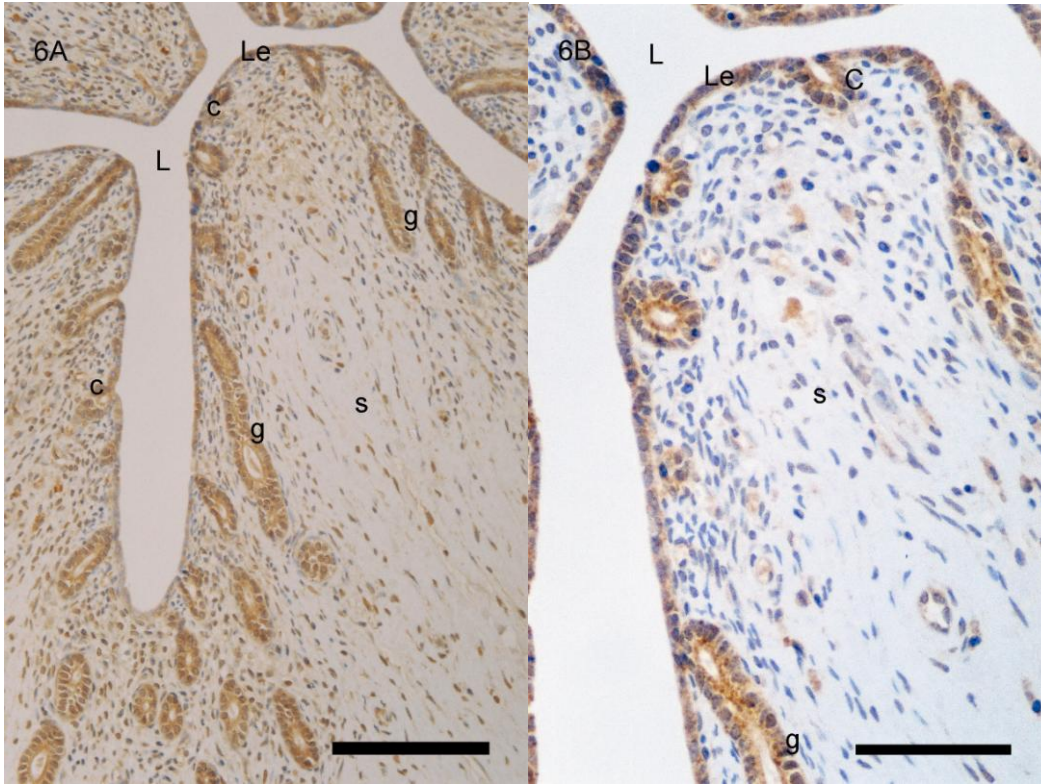
Şekil 4A ve 4B. Luteal fazda endometriyumda survivin immunoreaktivitesi. Luminal epitel ve endometriyumun yüzlek bölgesindeki bezlerde (sg) hem çekirdek hem de sitoplazmada survivin immunoreaktivitesi (4A), endometriyumun derin bölgesindeki bezlerde (dg) hem çekirdek hem de sitoplazmada survivin immunoreaktivitesi (4B). L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometriyal bez, c: kript, s: stroma, ok başı: survivin pozitif stromal hücreler Barlar: 100µm (4A), 50µm (4B).



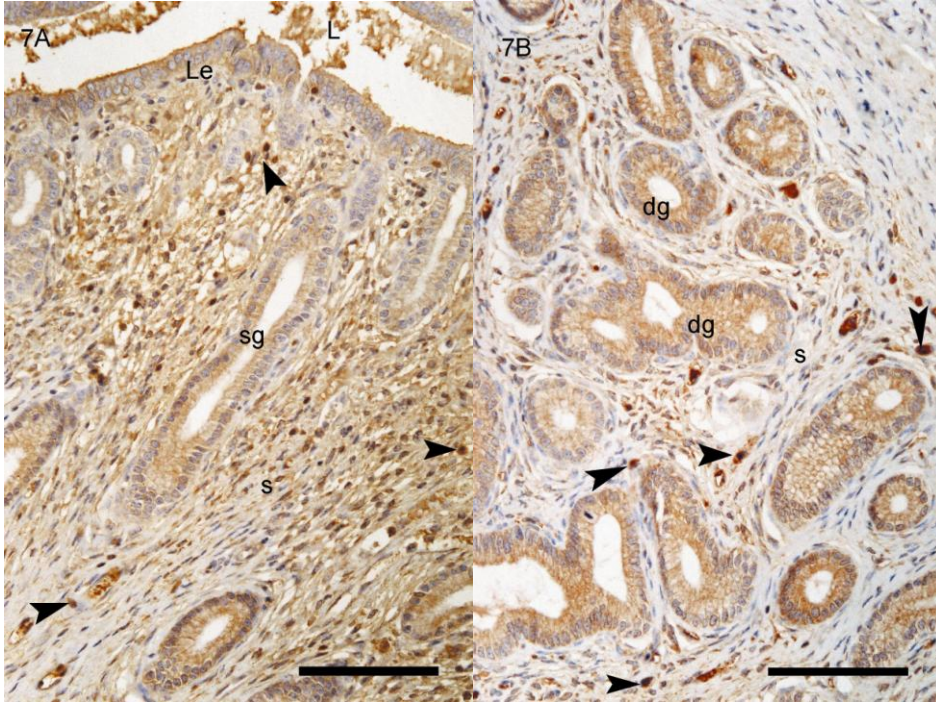
Şekil 5A, 5B, 5C. İnaktif (5A), folliküler (5B) ve luteal (5C) fazlarda miyometriyal düz kas hücreleri ile damarların endotel ve düz kas hücrelerinde survivin immunoreaktivitesi. Bar: 100µm

4. 3. Bcl-2 immunoreaktivitesi ve lokalizasyonu:

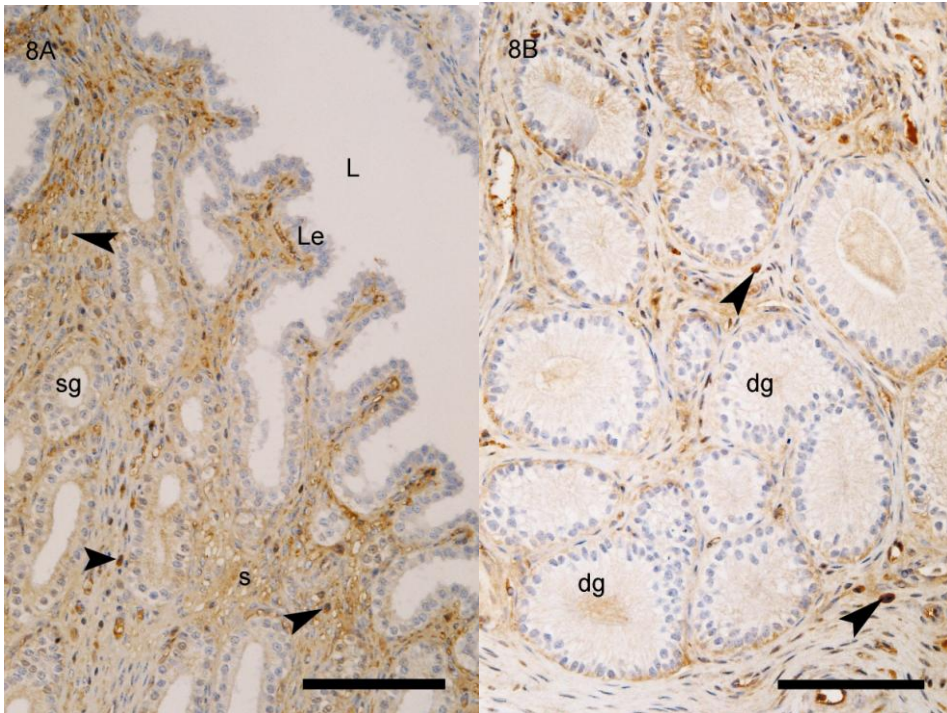
İnaktif (anöstrus) fazda, luminal ve glandular epitel hücrelerinin sitoplazmalarında orta yoğunlukta bir Bcl-2 immunoreaktivitesi görüldü (Şekil 6A ve 6B). Folliküler fazda luminal epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinin kuvvetli bir Bcl-2 immunoreaktivitesi sergiledikleri görüldü (Şekil 7A). Erken luteal fazda endometriyumun derin bölümündeki bezleri oluşturan hücrelerdeki Bcl-2 immunoreaktivitesinin folliküler fazdakine benzer olduğu gözlemlendi. Ancak luteal fazın ortalarına doğru derin bölümdeki bezlerdeki Bcl-2 immunoreaktivitesinin kaybolduğu izlendi (Şekil 7B). Luminal epitelde Bcl-2 immunoreaktivitesi heterojen nitelikte ve oldukça zayıftı. Luteal fazda Bcl-2 immunopozitif stromal hücrelerde belirgin bir artış göze çarptı (Şekil 8A ve 8B). Siklusun tüm evrelerinde miyometriyumun düz kas hücrelerinin orta derecede pozitif boyanırken, damarların medya katmanındaki düz kas hücrelerinin Bcl-2 için negatif oldukları belirlendi (Şekil 9A ve 9B).



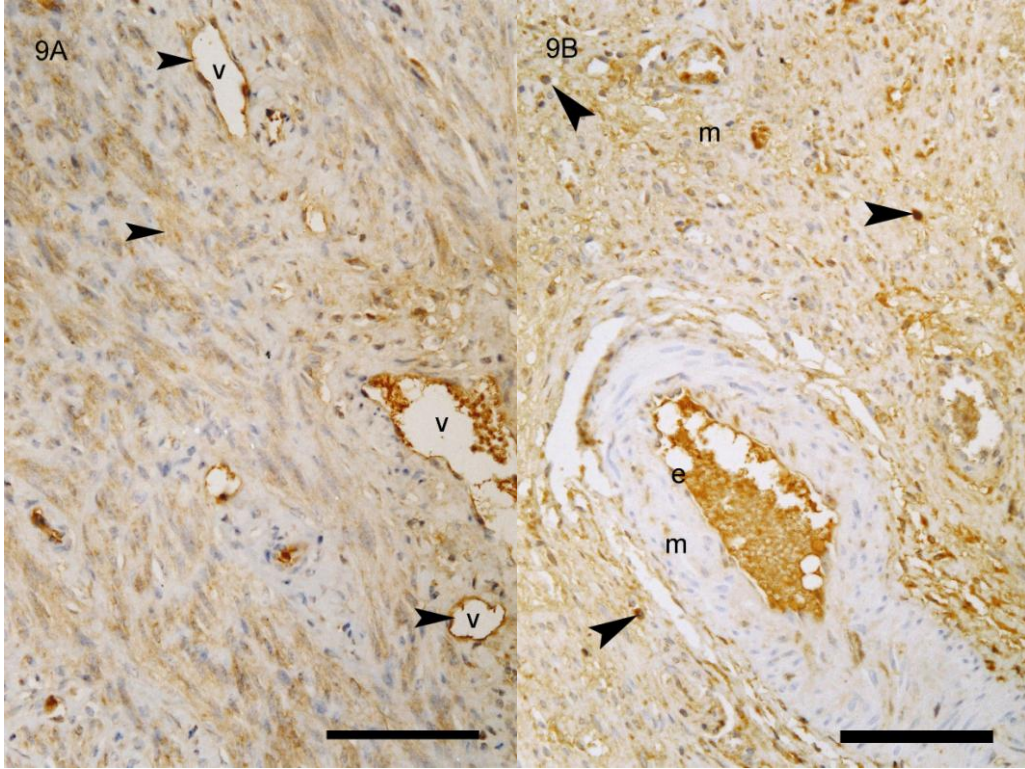
Şekil 6A ve 6B. İnaktif fazda luminal ve glandular epitel hücrelerinde Bcl-2 immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometriyal bez, c: kript, s: stroma. Barlar: 100µm (6A), 50µm (6B).



Şekil 7A ve 7B. Folliküler fazda luminal ve glandular epitel hücrelerinde Bcl-2 immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometriyal bez, c: kript, s: stroma, ok başları: Bcl-2 pozitif stromal hücreler. Barlar: 100µm.



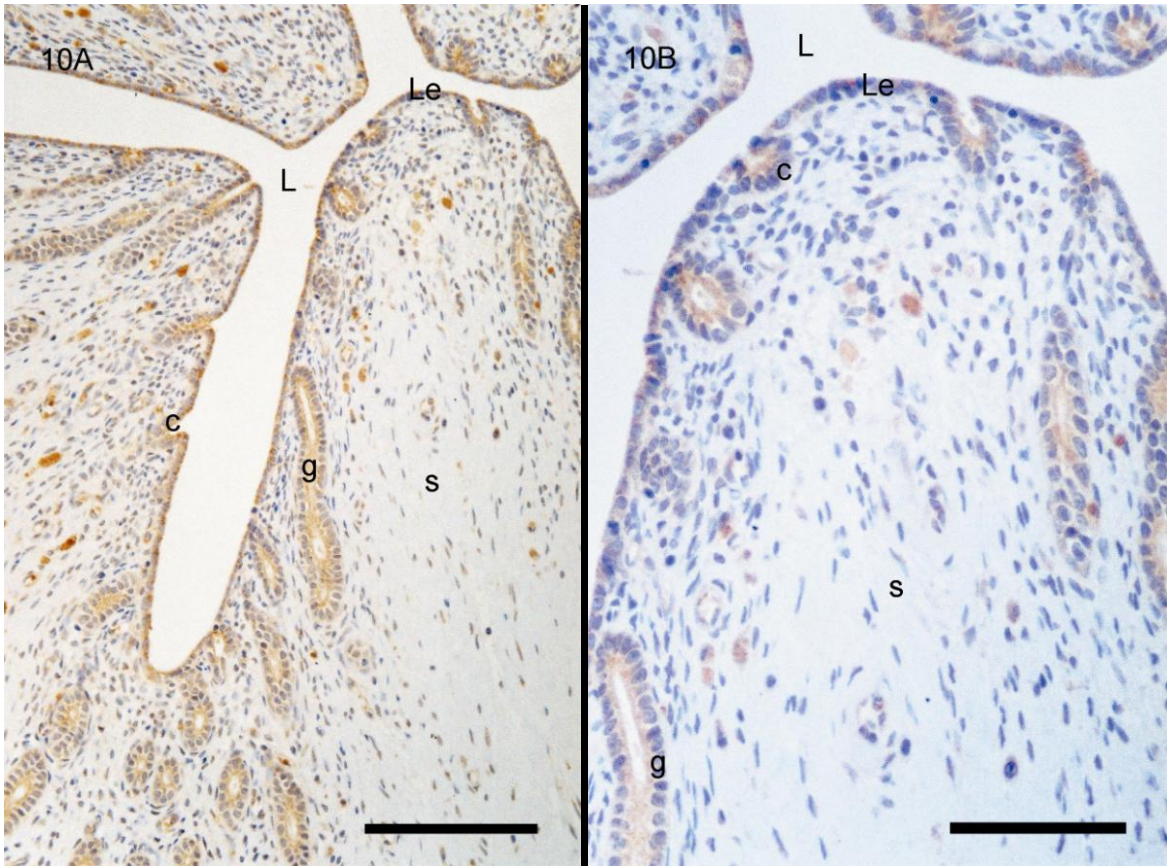
Şekil 8A ve 8B. Luteal fazda luminal epitelde zayıf Bcl-2 immunoreaktivitesi (8A), glandular epitel hücrelerinde negative Bcl-2 immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometriyal bez, c: kript, s: stroma, ok başları: Bcl-2 pozitif stromal hücreler. Barlar: 100µm.



Şekil 9A. Folliküler fazda miyometriyum düz kas hücrelerinde ve damar endotelinde pozitif Bcl-2 immunoreaktivitesi (ok başları) (9A) v: kan damarları. 9B. Luteal fazda miyometriyum düz kas hücrelerinde ve damar endotelinde pozitif Bcl-2 immunoreaktivitesi, m: düz kas hücreleri, ok başları: Bcl-2 pozitif stromal hücreler. Barlar: 100µm.

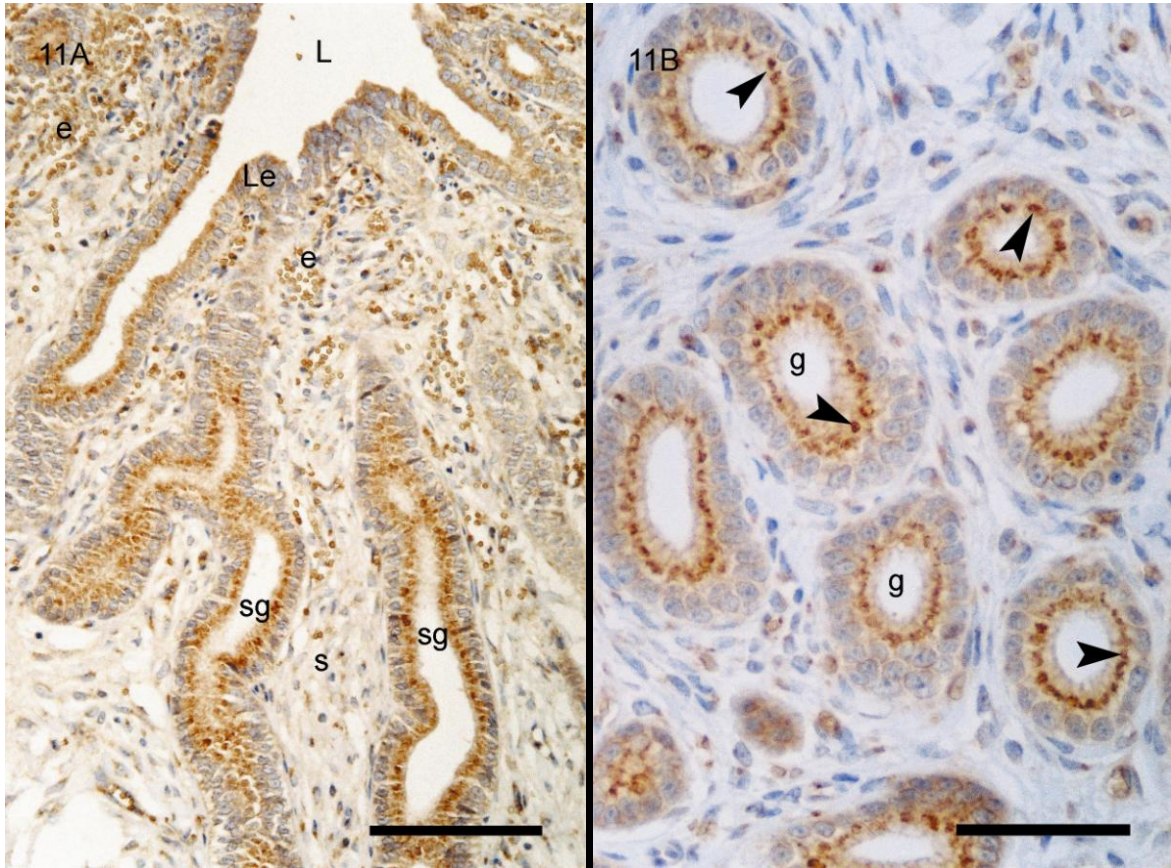
4.4. Bax immunoreaktivitesi ve lokalizasyonu:

Bax proteinini östrus siklusunun bütün fazlarında öncelikli olarak luminal ve glandular epitel hücrelerinde yerleşti. Anöstrusda, Bax immunoreaktivitesi luminal ve glandular epitel hücrelerinin, miyometriyal ve vasküler düz kas hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf olarak izlendi (Şekil 10A-B).



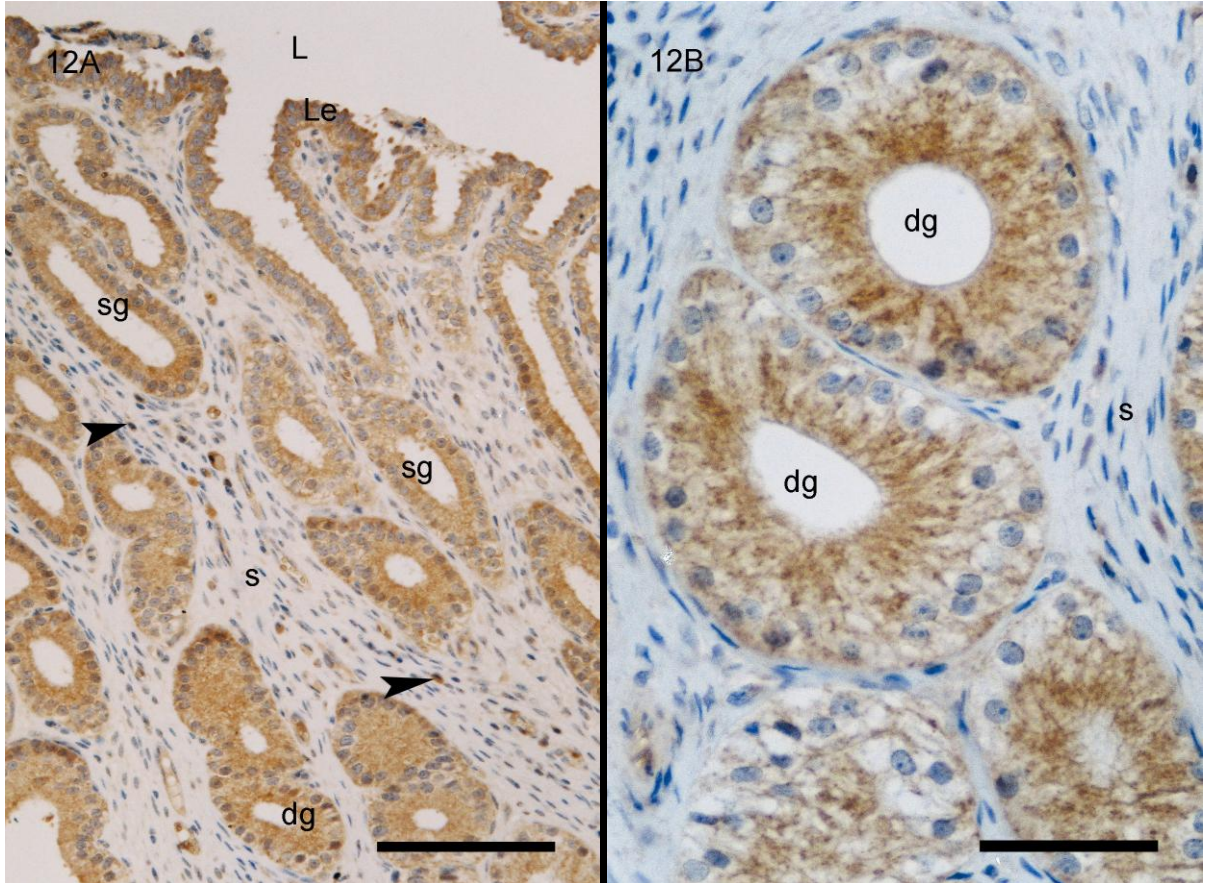
Şekil 10A ve 10B. İnaktif fazda luminal ve glandular epitel hücrelerinde Bax immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, g: endometriyal bez, c: kript, s: stroma. Barlar: 100µm (10A), 50µm (10B).

Anöstrusa kıyasla folliküler fazda Bax immunoreaksiyonunda bir artış görüldü. Damar dışına çıkan eritrositlerin sitoplazmalarında da Bax pozitif reaksiyon saptandı (Şekil 11A). Yüksek objektif büyötmeleri ile inceleme yapıldığında (objektif: $\times 40$ veya $\times 100$, oküler: $\times 10$) Bax proteinin luminal ve glanduler epitel hücrelerinde hücrenin supranükleer sitoplazmasında bir veya birkaç iri nokta şeklinde lokalize olduğu dikkati çekti ((Şekil 11B). Bax proteininin miyometriyal ve vasküler düz kas hücrelerinde de paranuklear konumda yerleştikleri görüldü (Şekil 13A-B). Bax protein stromal hücrelerde de bulundu.

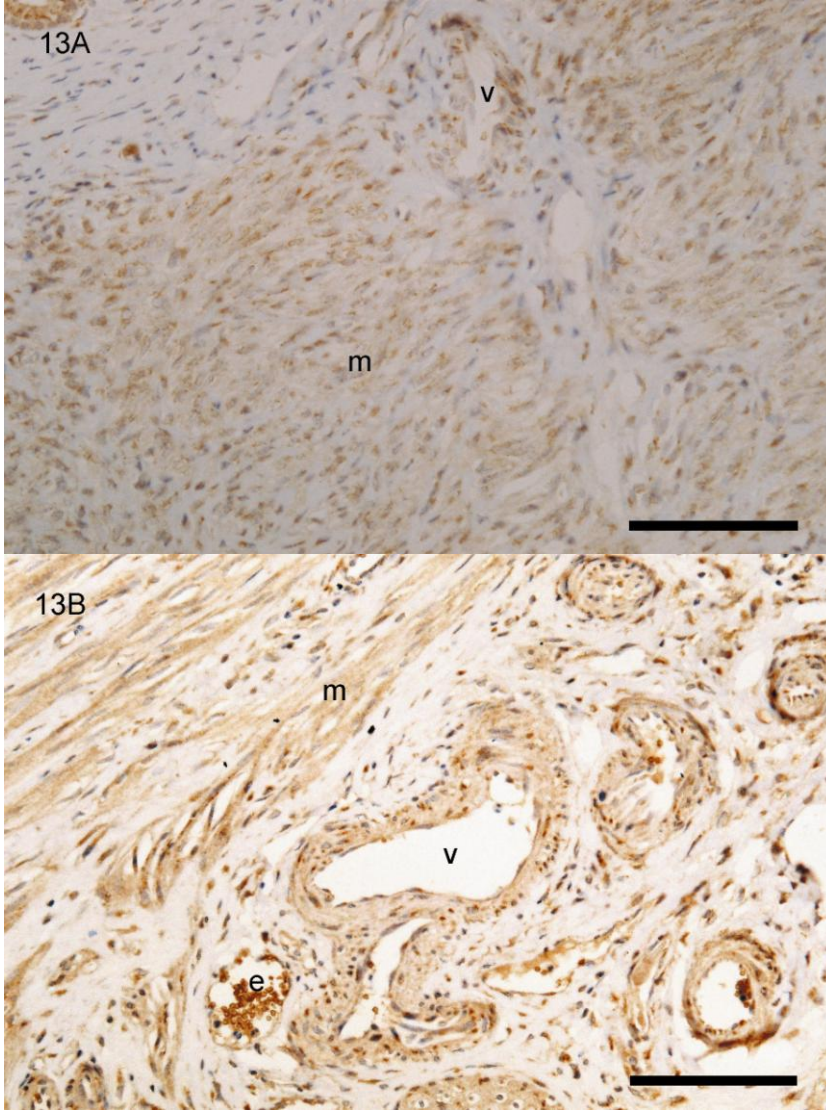


Şekil 11A ve 11B. Folliküler fazda luminal ve glandular epitel hücrelerinde Bax immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, sg: yüzlek endometriyal bez, c: kript, s: stroma, ok başları: Bax pozitif supranükleer sitoplazma. Barlar: 100 μ m (11A), 50 μ m (11B).

Luteal fazda Bax immunoreaktivitesi luminal ve glanduler epitelde homojen ve sitoplamik bir boyanma olarak izlendi. Glanduler epitelde Bax proteininin ekspresyonu erken luteal fazdan orta luteal faza doğru giderek artış gösterdi (şekil 12A-B). Bu dönemde Bax positive immunoreaksiyon gösteren stromal hücrelerin sayısında da belirgin bir artış tespit edildi.



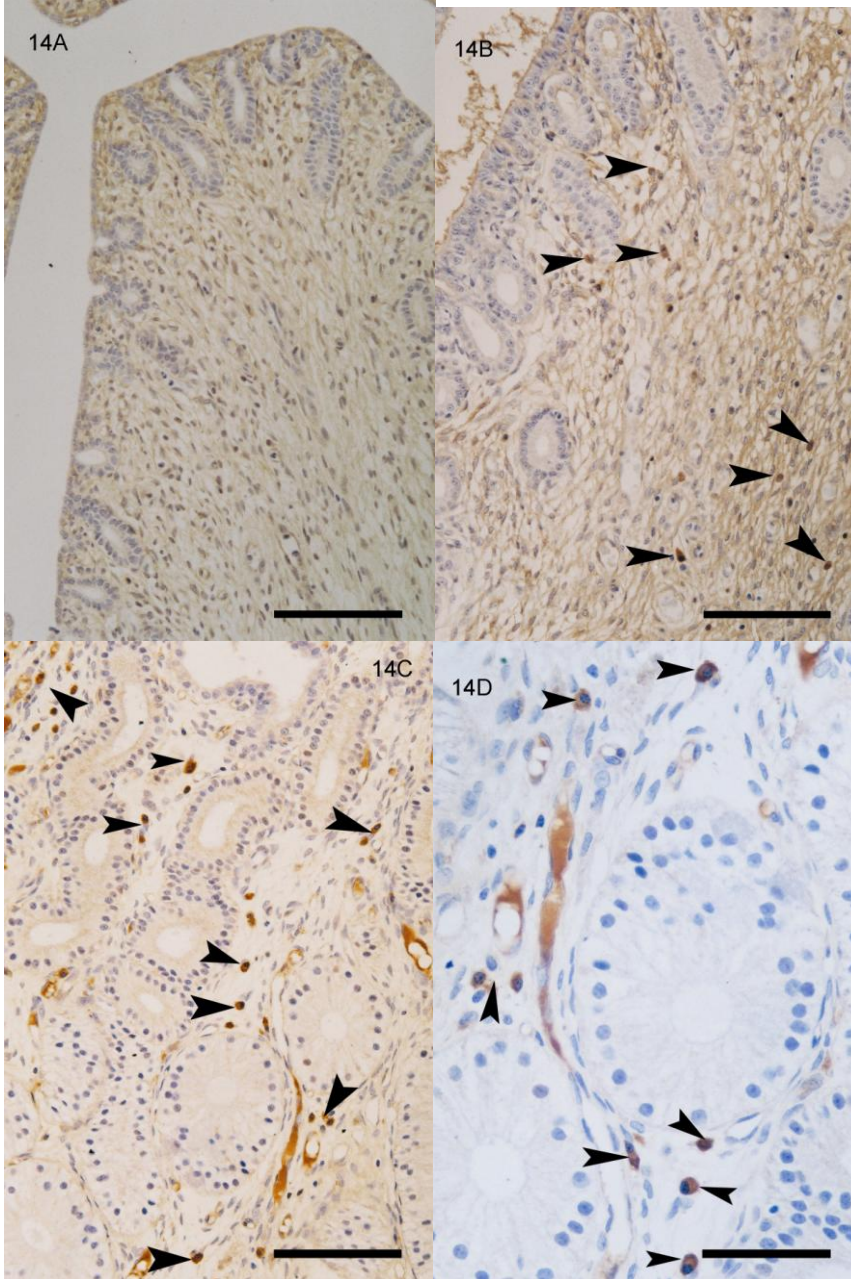
Şekil 12A ve 12B. Luteal fazda luminal ve glandular epitel hücrelerinde Bax immunoreaktivitesi. L: lumen, Le: Luminal epitel, sg: yüzlek endometriyal bez, dg: endometriyal bez, s: stroma, ok başları: Bax pozitif tromal hücreler. Barlar: 100µm (12A), 50µm (12B).



Şekil 13A ve 13B. Folliküler (13A) ve luteal (13B) fazlarda miyometriyum düz kas hücrelerinde (m) ve damar duvarında (v) pozitif Bax immunoreaktivitesi. Barlar: 100µm.

4.5. Makrofaj lokalizasyonu

Östrus siklusunun inaktif fazında endometriyum stromasında CD68pozitif reaksiyon veren makrofajların çok çok nadir olarak bulunduğu görüldü (Şekil 14A). Folliküler fazın başlamasıyla birlikte CD68 pozitif makrofajların sayıca arttığı (Şekil 14B) ve luteal fazda maksimum düzeye ulaştığı (Şekil 14C ve 14D) tespit edildi.



Şeki14. İnaktif (14A),folliküler (14B) ve luteal (14C,14D) fazlarda CD68 poiztif makrofajlar (ok başları). Barlar: 100µm (14A, 14B ve 14C), 50µm (14D).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uterus ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında endometriyal hücre büyümesi (proliferasyon ve differensiyasyon) ve apoptozisden oluşan oluşan siklik değişikliklerle karakterize olan bir dişi genital sistem organıdır. Memeli hayvanlarda bu siklik değişiklikler östrus siklusu olarak adlandırılır. Uterus, ovaryumdaki siklik değişikliklere paralel olarak proliferasyon, sekresyon ve involüsyondan oluşan üç evre geçirir. Proliferasyon ovaryumda folliküllerin olgunlaştığı (foliküler faz) ve FSH'nın etkisiyle endometriumun kalınlaştığı evredir. Bu evrede uterus endometriumu luminal epitel hücrelerinin yalancı çok katlılığı ile karakterizedir. Sekresyon evresi, ovaryumda ovulasyonu takiben LH'nın etkisiyle uterus bezlerinin salgı yaptığı evre olup luteal evre olarak da adlandırılır. Bu evrede luminal ve glandular epitelin her ikisi de yalancı çok katlıdır. Luminal epitel hücreleri foliküler, glandular epitel hücreleri ise luteal evrede en yüksektirler. İnvolüsyon evresi ise endometriumun inaktif duruma geçtiği evredir. Uterus kedilerde östrus siklusunun inaktif olduğu bu evrede ve doğum sonrasında tek katlı bir luminal ve glandular epitel ile karakterizedir (Chatdarong, 2003). Bu çalışmada kedilerin seksüel siklusu uterus ve ovaryumdaki daha önceki çalışmalarda (Chatdarong et al.2005; Reynaud et al. 2009; Bristol-Gould and Woodruff, 2006) belirtilen özellikler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve östrus siklusu inaktif (anöstrus), foliküler ve luteal faz olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

Apoptozisin insanda menstüral siklusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda normal menstüral siklusda endometriyumda apoptozisin regülasyonu incelendiğinde apoptotik hücrelerin çoğunlukla geç sekretorik ve menstüral fazdaki endometriumun glandular epitelinde bulunduğu rapor edilmektedir (Kokawa et al. 1996, Shikone et al. 1997).

Dokularda şekillenen apoptosisi tespit etmek için çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bunlardan bir TUNEL((TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) metodudur. The TUNEL

tekniki apoptotik sürecin son basamağında meydana gelen parçalanmış DNA'yı enzim histokimyasal olarak belirleyen bir methodur. Sunulan çalışmada östrus siklusu sırasında endometriyumdaki apoptotik hücrelerin varlığını belirlemek için TUNEL tekniği uygulanmıştır. Pozitif kontrol için hazırlanan preparatlar Proteinaz K solüsyonu ile muameleden sonra deiyonize ile yıkandı ve takiben DNA nükleaz ile inkube edildi. Permeabilizasyon ve işaretleme işleminin çalışıp çalışmadığını gösteren bu işlem sonuunda dokudaki hücrelerin büyük çoğunluğu DAB kromojeni kahverengi boyanmaktadır. Ancak normal TUNEL boyama prosedüründe ancak bir ya da iki hücrede pozitif boyanma izlenmiştir Krajewska ve ark. (1997) endometriyumda kuvvetli kaspaz-3 immunoreaktivitesi veren hücrelerin TUNEL negatif olduğunu bildirmektedir. Aynı şekilde Sohn ve ark. (2000) prostat hiperplazileri ile prostatik karsinomlarda kaspaz-3 ve apoptotik indeks arasında önemli bir korelasyon bulunmadığını rapor etmektedirler. Köpeklerde östrus siklusunun farklı evrelerindeki uterus endometriyumunda apoptotik hücre ölümü, TUNEL metodu ve kaspaz-3 aktivitesi immunohistokimyasal olarak incelendiğinde östrus siklusu boyunca yüzey epiteli ve stromada TUNEL ve kaspaz pozitif hücrelerin ender olduğu (apoptotik indeks<1), bununla birlikte anöstrusda stromada ve geç metöstrusda stroma ve yüzey epitelinin her ikisinde sadece kaspaz aktivitesinde önemli bir artış gözlemlendiği bildirilmektedir. Apoptotik endeksin geç metöstrus ve anöstrus sırasında kriplerde ve bazaldeki bezlerde arttığından, kriplerdeki artışın sadece kaspaz yöntemi kullanıldığında önemli olduğundan, oysa bazaldeki bezlerde her iki teknikte önemli farklılıkların bulunduğu söz edilmektedir. Östrus siklusu sırasında köpeğin endometriyal hücrelerinde Apoptozisin bulunduğu ve kaspaz-3'ün belirlenmesinin TUNEL yöntemine göre daha etkin olduğu belirtilmektedir (Van Cruchten et al. 2003). Bu literatür bilgileri bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Apoptozis efektör moleküller (Kaspazlar), adaptör moleküller (Apaf-1) ve düzenleyici moleküllerin [pro- and antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, Apoptozis inhibitörleri (IAPs), ve

Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI) katılımıyla gerçekleşir (Hengartner 2000). Bu çalışmada apoptoz inhibitor protein ailesinin bir üyesi olan survivin ile düzenleyici moleküllerden Bcl-2 ailesine ait olan anti-apoptotik protein Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax proteinlerinin kedilerin uterusundaki lokalizasyonunda östrus siklusuna bağlı değişimler olup olmadığı incelenmiştir.

Survivin (BIRC5), apoptoz inhibitor protein (IAP) ailesinin en küçük üyesi olup fonksiyonu apoptozu inhibe etmektir. Son 12 yılda Survivin fonksiyonu üzerinde yapılmış çalışmalar çok çeşitli olup, sonuçları tartışmalıdır. Çeşitli memeli hücrelerinde survivinin aşırı ekspresyonu apoptozun inhibisyonu ile hücre canlılığının artmasını sağlar, oysa survivin yoksunluğu sınırsız ve spontan apoptozu neden olur (Altieri 2003a, b). Survivin ekspresyon örnekleri IAP ailesinin diğer üyelerininkinden farklıdır. Survivin embriyonik ve fetal gelişim sırasında ve bütün tümör tiplerinde aşırı eksprese olur (Ambrosini et al. 1997; Li and Altieri, 1999; O'Driscoll et al. 2003). Oysa farklılaşmasını tamamlamış erişkin dokularında transkripsiyonel olarak sessizdir. Bununla birlikte, beyinde, ovaryumda ve siklik insan endometriyumunda menstrüal siklusun proliferatif fazında eksprese olur (Konno et al. 2000; Fukuda and Pelus, 2006). Nabilis ve ark. (2010) survivinin endometrial fizyolojide önemli rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler. Bununla birlikte survivinin insanda normal endometriyumda eksprese olduğu ve bu ekspresyonun menstrüal siklus süresince şekillenen hormonal dalgalanma ile ilişkili olduğunu belirten bir çalışma bulunmaktadır (Konno et al (2000). Yapılan literature tarama sonuçlarına göre; östrus siklusu sırasında hayvanların uterusunda survivinin varlığını gösteren herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle bizim çalışmamız, kedide normal endometriyumda survivinin lokalizasyonunu gösteren ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Çalışmamız sonuçları kedilerde östrus siklusunun tüm fazlarında luminal ve glandular epitelin surviving pozitif olduğunu göstermiştir. Konno ve ark. (2000) survivinin insan endometriyumunda sekretorik fazda eksprese olduğunu

proliferative fazda hiç veya nadir bulunduğunu bildirdiği halde, biz survivin immunoreaktivitesinin östrus siklunun tüm evrelerinde luminal ve glandular epitel hücrelerinde ekspre olduğunu gözlemledik.

Normal hücrelerde survivin ekspresyonu hücre siklusunun G₂-M geçişi sırasında pik yapar, oysa survivinin hücre siklusu bağımlı transkripsiyonel kontrolü kanser hücrelerinde çeşitli onkojenik yollarla bozulur (Altieri 2006). Survivin interfazdaki tümör hücrelerinin çoğunluğunda bulunur (Li et al. 2005; Engels et al. 2007). Hatta, survivin endotelial ve CD34 pozitif köken hücreler ile tümör hücrelerinin hem sitoplazma ve hem de çekirdeklerinde bulunabilir (Fukuda and Pelus 2006). Bu nedenle survivinin sitoplazmik ve nüklear olmak üzere iki havuzu vardır. Nüklear survivin metafaz kromozomlarının kinetokorlarına ve anafazda mitoz mekiğinin orta bölgesine yerleşiktir. Bununla birlikte sitoplazmik survivin interfaz mikrotubullerinde sentrozomlarda, mitoz mekiği kutuplarında ve metafaz ile anafazda mitoz mekiği mikrotubullerinde yerleşiktir. Nüklear survivinin hücre bölünmesini kontrol ettiği, oysa sitoplazmik survivinin ağırlıklı olarak Survivin sitoprotektif faaliyetinden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Fortugno et al. 2002).

Bu literatür bilgiye dayanarak, çalışmamızda nüklear survivinin kedilerde folliküler fazda eksprese olabileceğini tahmin ettik. Ancak survivin immunoreaktivitesinin kedilerde luteal fazda endometriyumun yüzlek ve derin katmanlarındaki bezleri oluşturan epitel hücrelerinin hem çekirdek hem de sitoplazmalarında bulunduğunu, östrus siklusunun folliküler ve anöstrus fazlarında ise endometriyal bez epitel hücrelerinin sadece sitoplazmalarında lokalize olduğunu tespit ettik. Konno ve ark. (2000) da benzer olarak survivin immunoreaktivitesinin insan endometriyumunda sekretorik faz sırasında fonksiyonel katmandaki bez epitel hücrelerinin çekirdeğinde eksprese olduğunu belirtmektedirler. Bu araştırmacılar sekretorik faz sırasında endometriyumun bazal bölümündeki hücrelerdekine benzer olarak, proliferatif fazda

survivin immunoreaktivitesinin sitoplazmik olduğunu da rapor etmektedirler. Ayrıca, araştırmacılar survivin immunolokalizasyonundaki farklılığın survivin-mikrotubul etkileşiminden kaynaklandığını ileri sürmektedirler (Konno et al. 2000).

Normal koşullar altında, interfazda survivin ağırlıklı olarak sitoplazmada yerleşiktir. Hücre strese girdiği zaman aktive olan kaspazla etkileşir ve onu inhibe eder. Ancak, bu kaspaz aktivitesinin sadece sitoplazma ile sınırlı olduğu anlamına gelmez. Survivin chromosome passenger complex'inin bir bileşeni olarak önemli bir bifonksiyonel proteindir ve aynı zamanda apoptotik olayların negatif regülasyonuna da katılır. Survivin apoptotik uyarana maruz kaldığında ubiquitin-proteozom proteolitik yolu aktif olarak uzaklaştırılır. Apoptozun erken fazında RanGTP gradientinin çöküşünden dolayı sitoplazmadan çekirdeğe geçer, oysa pro-kaspaz-3 ve aktive edilmiş kaspaz-3 sitoplazmada kalır. Survivin çekirdekte olduğu zaman apoptozu önleyemez. Çünkü apoptozis sırasında sitoplazma içindeki hedef proteinlere (kaspazlar gibi) ulaşp onlarla etkileşemediğinden endojen survivinin etkisi sadece sitoprotektif etki ile sınırlı kalır (Chan et al. 2010). Bu çalışmada luteal fazda endometriyumun derin bölümlerindeki bezleri oluşturan hücrelerin çekirdeklerindeki survivin immunoreaktivitesinin kuvvetli olduğunu ve geç luteal fazda pik düzeye ulaştığını belirledik. Bununla birlikte luteal fazda endometriyumun luminal epitel ile yüzlek bölümündeki bezleri oluşturan hücrelerde sitoplazmik boyanmanın kuvvetli olduğunu gözlemledik. Bu bulguya ve Chan ve ark (2010)'nın raporlarına dayanarak biz survivinin luteal fazda sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirdiğini, bunun sonucu olarak da endometriyal epitel hücrelerinin apoptozunda fizyolojik bir anahtar rol oynayabileceğini ileri sürmekteyiz. Ayrıca luteal fazda survivinin nüklear ve sitoplazmik havuzlarının uterus bezlerinde hücre canlılığı ve hücre proliferasyonun kontrolünde görev alabileceği kanısındayız (Fortugno et al. 2002). Bir diğer tezimiz ise anoestrus ve folliküler fazlarda sitoplazmik survivinin hücre canlılığının kontrolüne katılıyor olmasıdır (Fortugno et al. 2002). Bununla birlikte, survivinin

endometriyal hücrelerdeki biyolojik rollerine ilişkin olan bu ve diğer hipotezleri kesinleştirmek için ek deneysel çalışmalar yapılmalıdır. Sunulan çalışmada surviving loklizasyonu sadece immunohistokimyasal yöntemle belirlendiğinden, kedi uterusunda seksüel siklus sırasında survivinin kesin rolü tam olarak belirlenememiştir. Bununla birlikte kedide östrus siklusu sırasında luminal ve glandular epitelde survivinin farklı lokalizasyon sergilediğinin saptanması, survivinin bu doku tiplerindeki fonksiyonunun farklı olabileceği ve Survivin'in birçok splicing varyanta sahip olduğu bilgisini desteklemektedir (Mahotka et al. 1999; Badran et al. 2004) and it is a bifunctional molecule (Li, 2003; Li et al. 2005).

Konno *et al.* (2000) insanda endometriyal stromal hücrelerin survivin negative olduğunu bildirmekte olup kedi endometriyal stromal hücrelerde de survivin immunoreaktivitesi negative olarak saptanmıştır.

Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal apoptozisin anahtar düzenleyicileridir. Bu aile anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerden oluşur. Bcl-2 proteini anti-apoptotik, Bax proteini ise pro-apoptotik üyelere örnek verilebilir (Adams and Cory, 1998; Chao and Korsmeyer, 1998). Memelilerden insan (Tao et al. 1997; Konno et al. 2000), sıçan (Mendoza-Rodríguez et al. 2003) ve maymunda (Wei et al. 2005) endometriyal büyüme ve regresyon gibi siklik değişikliklerin glandular epitel hücrelerinde Bcl-2 ve bununla ilişkili proteinler arasındaki denge veya oran ile düzenlendiği rapor edilmektedir (Tao et al. 1997). Bu çalışmanın sonuçları kedi uterusunda apoptoz ile ilişkili proteinler olan Bcl-2 ve Bax'ın ekspresyonlarının östrus siklusuna bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Önceki çalışmalarda bildirilenlere benzer olarak (Koh et al. 1995; Tao et al. 1997; Konno et al. 2000; Vaskivuo et al. 2000; Mendoza-Rodríguez et al. 2003) kedi uterusunda Bcl-2'nin folliküler faz sırasında çoğunlukla glandular epitel hücrelerinde bulunduğu, luteal fazda ise kaybolduğu tespit edilmiştir (Otsuki et al., 1994; Gompel 1994; Jones et al. 1998a; Yamashita et al. 1999; Konno et al. 2000; Vaskivuo et al. 2000). Çalışmanın bulguları Bax proteinin östrus siklusu

sırasında luminal ve glandular epitel hücreleri, miyometriyal ve damar düz kas hücrelerinde ekprese olduğunu ve bu ekspresyonun folliküler fazda luteal faza göre arttığını ve ayrıca glandular epiteldeki Bax immunoreaktivitesinin erken ve orta luteal fazlarda hafif kuvvetli olduğunu göstermiştir . Bu bulgular insane (Tao et al. 1997) ve maymunun (Wei et al. 2005) endometriyal hücrelerindeki Bax immunoreaktivitesine benzerdir. Sunulan çalışmada Bax ve Bcl-2'nin östrus siklusu sırasındaki karşıt ekspresyonları normal östrus siklusu sırasında apoptozun düzenlenmesinde Bax- Bcl-2 dengesinin kritik faktör olabileceği bilgisini (Tao et al. 1997; Wei et al. 2005) desteklemektedir. Luteal faz sırasında Bcl-2 ekspresyonundaki göreceli azalma Bax'ın yükselmesine izin verir ki, bu apoptozun son basamağında şekillenen hücre ölüm proteazlarından kaspaz ailesinin direkt veya indirekt aktivasyonuna karışır (Dragovich et al. 1998; Nunez et al. 1998; Reed 1998).

Bax, ilk olarak identifiye edilen ve Bcl-2 homoloğu olan pro-apoptotik bir proteindir (Oltvai et al., 1993). Çeşitli dokularda çok farklı varyantlarının ekprese olduğu bilinmektedir. (Oltvai et al., 1993, Apte et al. 1995; Zhou et al. 1998; Shi et al. 1999; Schmitt et al. 2000). Bax α en çok bilinen isoform olup BH1, 2 ve 3'ü içerir, membrane bağlıdır ve apoptoz stimülasyonu sonucu mitokondriyonlarda yerleşir (Wolter et al. 1997). Bax β transmembran region içermez, sitoplazmada yerleşir, ama yine de apoptozu indükler (Oltvai et al. 1993). Bax γ , BH domain veya membran bağlanma domain I içeren 4.5kDa ağırlığında bir proteindir; ancak fonksiyonel önemi bilinmemektedir (Oltvai et al., 1993). Bunlar ve diğer Bax varyantlarının yapısal özellikleri tanımlandığı halde, fonksiyonel özellikleri ve subsellüler lokalizasyonları hala açık değildir. Bu nedenle biz onların apoptozu düzenleme yollarını bilmemekteyiz (Apte et al. 1995; Zhou et al. 1998; Shi et al. 1999; Schmitt et al. 2000). Ayrıca, bugüne kadar Bax proteininin endometriyal bez epitel hücrelerindeki subsellüler lokalizasyonu hakkında herhangi bir bilgi rapor edilmemiştir. Bu çalışmada östrus siklusunun folliküler fazında Bax proteininin supranükleer sitoplazmada hücre başına bir veya birkaç adet nokta veya veziküler

nokta topluluğu olacak şekilde yerleştiğini saptandı. Ayrıca luteal faz sırasında, luminal ve glanduler epitelde Bax için homojen sitoplazmik bir boyanmanın varlığı gözlemlendi. Sunulan çalışma immunohistokimyasal bir çalışma olduğu için kedinin endometriyal bez epitel hücrelerinde Bax'ın farklı varyantlarını belirleyemedik. Ancak elde edilen bulgular ve literatür bilgileri ışığında, Bax proteininin farklı subsellüler lokalizasyonları göstermesinin nedeninin Bax geninin farklı varyantlarından kaynaklanabileceği kanısındayız. Bununla birlikte, kedinin endometriyal bez epitel hücrelerindeki biyolojik rolüne ilişkin olan bu ve diğer hipotezleri doğrulamak için ilave çalışmaların yapılması gerekmektedir.

İnsan endometriumunun normal menstrüal siklus ve gebelik için stromal, glandular ve vasküler hücrelerden ve lökositlerden köken alan parakrin faktörlere gereksinimi olduğu bilinmektedir. Menstrüal siklus sırasında lökosit tipleri ve sayılarında değişiklikler meydana gelmektedir. Bu lökositler uterusun gebeliğe hazırlanmasında, gebelik şekillenmediği zaman da endometriyumun yıkılmasında rol oynarlar. Ayrıca anjiyogenezde ve endometriyal doku onarımında, implantasyon ve gebelikte de rol oynarlar (Kayışlı et al. 2004). İnsan endometriumu spesifik antijenlere karşı lokal olarak antikor sentezleyebilen ve immunolojik olarak aktif bir dokudur (Ogra and Ogra 1973). Bu tip immun cevap endometriyal lumenin bakteriyolojik olarak steril kalmasının sağlanmasında ve özellikle artan bakteriyal enfeksiyonların eradikasyonu ve tanınmasında önemlidir. Apoptozisin insan endometriumunda lökositlerin sayı ve tiplerini kontrol eden önemli mekanizmalardan birisi olduğu gösterilmiştir (Kayışlı et al. 2004). Seksüel siklusda endometriyal lenfoid doku hücrelerinin B lenfosit, T lenfosit ve alt tipleri ve makrofajlar ile dentritik hücrelerin mikroskopik organizasyonlarına ilişkin insan, domuz ve bazı laboratuvar hayvanlarında olmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu hücrelerin siklusa bağlı değişimler gösterdikleri saptanmıştır (Butterworth et al. 2001; Chu et al. 2006; D'Hooghe et al. 2001; Jiwakanon et al. 2006; Kaeoket et al. 2002; Morris et al. 1985; Rbeiro et al. 2006). İmmun sistem

hücrelerinden sitotoksik T lenfositler hücre ölüm reseptörlerinden Fas'ın ligandı olan FasLigandı (ölüm aktivatörü) yüzeylerinde taşırlar. Sitotoksik T lenfositler apoptosise sürüklenen hedef hücreye bağlandıklarında çok miktarda FasL üretirler; bunun da hedef hücre membranındaki Fas'a bağlanmasıyla hedef hücrenin Apoptozisine neden olurlar (Hengartner 2000; Krammer 1999). Apoptozis sonucu oluşan apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosit ediliirler.

Bu çalışmada Bcl ve Bax immunoreaktivitelerinin siklus boyunca endometriyumdaki bazı stromal hücrelerde bulunduğu, bu pozitif hücrelerin miktarının siklusa bağımlı şekilde artarak luteal fazda maksimuma ulaştığı gözlenmiştir. İnsanda (Critchley et al. 1999) ve maymunda (Wei et al. 2005) bu hücreler büyük granüler lenfositler veya makrofajların alt popülasyonları olan immunositler olarak tanımlanmaktadır. İnsanda ayrıca bu immunositlerin CD68 makrofajlar olduğu bildirilmektedir (Critchley et al. 1999). Çalışmamızda da bu hücrelerin CD68 pozitif makrofajlar olduğu ve bunların sayısının luteal fazda maksimuma ulaştığı saptanmış olup kedilerde luteal faz sırasında veya sonrasında oluşacak olan apoptotik cisimciklerin fagositozunda rol oynayabilecekleri düşünülmektedir.

Tüm bulgular birlikte ele alındığında kedi endometriyumunda Bcl-2 Bax ve Bcl-2'nin östrus siklusu sırasındaki karşıt ekspresyonları normal östrus siklusu sırasında apoptozun düzenlenmesinde Bax- Bcl-2 dengesinin kritik faktör olabileceği ileri sürülebilir.

Ayrıca, anoestrus ve folliküler fazlarda sitoplazmik survivinin hücre canlılığının kontrolünde luteal fazda ise nüklear ve sitoplazmik survivinin ise uterus bezlerinde hücre canlılığı ve hücre proliferasyonun kontrolünde görev alabileceği söylenebilir. Sonuç olarak kedi uterusunda endometriyal büyüme ve regresyonu içine alan siklik değişiklikler pro-survival, anti-apoptotik ve proapoptotik faktörler arasındaki oran veya denge ile düzenleniyor olabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abe H, Shibata M-A, Otsuki Y. Caspase cascade of Fas-mediated apoptosis in human normal endometrium and endometrial carcinoma cells. *Molecular Human Reproduction* 2006; 12:535–541.
- Adams JM, Cory S The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322–1326.
- Adams J M, S. Cory. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci* 2001; 26: 61–66.
- Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene surviving in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43-49.
- Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, Feng Y Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. *Cancer* 2006; 107: 746-756.
- Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem.* 1997; 64: 33–42.
- Altieri DC. Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa. *J Biol Chem* 1994a; 269: 3139-3142.
- Altieri DC. Splicing of effector cell protease receptor-1 mRNA is modulated by an unusual retained intron. *Biochemistry* 1994b; 33: 13848-13855.
- Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Advances in Cancer Research* 2003a; 88: 31-52.
- Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Progress in Cell Cycle Research* 2003b; 5: 447–452.
- Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 478–482.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917–921.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2. *Science*. 1997; 277: 370–372.

Aouacheria A, Brunet F and Gouy M Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-only, and BNip families of apoptotic regulators, *Mol Biol Evol* 2005; 22: 2395–2416.

Apte SS, Mattei M G, Olsen BR. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 1995; 26: 592–594.

Asanuma K, Tsuji N, Endoh T, Yagihashi A, Watanabe N. Survivin Enhances Fas Ligand Expression via Up-Regulation of Specificity Protein 1-Mediated Gene Transcription in Colon Cancer Cells. *The Journal of Immunology*, 2004; 172: 3922–3929.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene Survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 902–907.

Boise, LH, Gonzales-Garcia M, Postema CE, Dinh L, Lindsten T, Turka LA., Mao X, Nunez G, Thompson CB. Bcl-x, a Bcl-2-related gene that function as adomainat regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597–608.

Boomsma RA, Mavrogianis PA, Verhage HG. Changes in endometrial and placental protein synthesis and morphology during pregnancy and pseudopregnancy in the cat. *Biol Reprod* 1991; 44: 345-356.

Brady HJM, Gil-Gomez G. Molecules in foxus Bax. The propoptotic Bcl-2 familiy member Bax. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 1998; 30: 647–650.

Brown JL, Graham LH, Wielebnowski N, Swanson WF, Wildt DE, Howard JG. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 71–82.

Butterworth JL, English RV, Jordan HL, Tompkins MB. Distribution of immune cells in the female reproductive tract in uninfected and FIV infected cats. *Veteriner Immunology and Immunopathology* 2001; 83: 37–51.

Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2 α : a novel Survivin splice variant expressed in human Malignancies *Molecular Cancer* 2005; 4:11.

Chan KS, Wong CH, Huang YF and Li HY Survivin withdrawal by nuclear export failure as a physiological switch to commit cells to apoptosis. *Cell Death and Disease* 2010; 1, e57; doi:10.1038/cddis.2010.34.

Chao D, Korsmeyer S. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419.

Chtdarong K. Reproductive physiology of female cat: with special reference to cervical patency, sperm distribution and hystero-graphy. Swedish University of Agricultural thesis, Uppsala, 2003. Doctoral thesis.

Chu, PY, Wright PJ, Lee CS. Association of endometrial degeneration in bitches with insufficient plasma progesteron concentrations. *J Reprod fertil Suppl.* 2001; 57: 35–43.

Chu PY, Wright PJ and Lee CS. Apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Reprod. Fertil. Dev* 2002; 14: 297–305.

Chu PY, Lee CS and Wright PJ. Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Theriogenology* 2006; 66: 1545–1549.

Clarke CL, Sutherland RL. Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocrin Rev* 1990; 11: 266–301.

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B and Martinou J-C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis J Cell Biol 1999; 144: 891–901.

Dharma SJ, Kholkute SD and Nandedkar TD. Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle, Indian J Exp Biol 2000; **39**: 218–222.

Dharma SJ, Kholkute SD, Nandedkar TD. Apoptosis in the endometrium of mouse during estrouss cycle. Indian J Exp Biol. 2001; 39: 218–222.

D’Hooghe TM, Pudney J, Hill JA. Immunobiology of the reproductive tract in a female baboon. American Journal of Primatology 2001; 53: 47–54.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. J. Clin. Invest. 2004; 114: 1117–1127.

Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the cat. The Veterinary Record 1962; 74: 141-147.

Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. Oncogene 1998; 17: 3207–3213.

Eckhart L, Ballaun C, Uthman A, Kittel C, Stichenwirth M, Buchberger M, Fischer H, Sipos W, Tschachler, E. Identification and Characterization of a Novel Mammalian Caspase with Proapoptotic Activity. J Biol Chem 2005; 280: 35077–35080.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 1998; 391: 43–45.

Engels K, Knauer S, Metzler D, et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. J Pathol 2007; 211: 532–540

Falcieri E, Gobbi P, Zamai L, Vitale M. Ultrastructural features of apoptosis. *Scanning Microscopy*, 1994; 8: 653–666.

Farrow SN, White JHM, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ et al., Cloning of a Bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 1995; 374: 731–733.

Franca LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003; 68: 1554–1561.

Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002; 115: 575– 585.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004; 384: 201–232.

Fukuda S and Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5: 1087-1098.

Fussenegger M, Bailey J E, Varner J. A mathematical model of caspase function in apoptosis. *Nature Biotechnology* 2000; 18: 768–774.

Galan A, Herrer R, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation. *Hum Reprod*. 2000; 15: 74-80.

Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y and Poitout P Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1994; 144, 1195–1202.

Granville DJ, Gottlieb RA. Mitochondria: regulators of cell death and survival. *ScientificWorldJournal*. 2002; 11: 1569–78.

Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*. 1998; 17: 3878–3885.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer S J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 1999; 13: 1899–1911.

Grossman D, Kim P.J. and Blanc-Brude O.P. *et al.*, Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* 2001; 108: 991–999.

Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E and Terakawa N Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Human Reproduction Update* 2004; 10: 29-38.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770–776.

Hiramine C. Definition and morphological features of apoptosis. *Rinsho Byori* 1997; 45: 459–69.

Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A and Cory S The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J* 1997; 16: 4628–4638.

Huang Z The Chemical Biology of Apoptosis: Exploring Protein-Protein Interactions and the Life and Death of Cells with Small Molecules. *Chemistry and Biology* 2002; 9: 1059–1072.

Huppertz B, Frank H-G, Kaufman P. The apoptosis cascade-morphological immunohistochemical method for its visualization. *Anat Embryol* 2000; 200: 1–18.

Jiwakanon J, Persson E, Dalin, A-M. The endometrium of the anooestrous female pig: Studies on infiltration by cells of immun system. *Reprod Dom Anim.* 2006; 41: 191–195.

Johnson ME, Howerth EW Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol* 2004; 41: 599–607.

Jones RK, Searle RF and Bulmer JN Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998a; 13: 3496–3502.

Jones RK, Searle R F, Stewart J A, Turner S, Bulmer JN. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferative activity in human endometrial stroma and endometrial granulated lymphocytes. *Biol Reprod* 1998b; 58: 995–1002.

Joswig A, Gabriel H, Kibschull M, Winterhager E Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 44–52.

Kaeoket K, Persson E, Dalin A-M. Corrigendum to “The sow endometrium at different stages of the oestrus cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of immun system. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 89–107.

Kaeoket K, Dalin A-M, Magnusson U, Persson, E, Corrigendum to “The sow endometrium at different stages of the oestrus cycle: studies the distribution of CD2, CD4, CD8 ve MHC class II expressing cells”. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 109–119.

Kayıslı UA, Güzeloğlu-Kayıslı O, Arıcı A. Endocrine-Immune interactions in human endometrium. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1034: 50–63.

Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD et al. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 736–739

Klinger FG, Battista N, De Felici M and Maccarrone M Stage-variations of anandamide hydrolase activity in the Mouse uterus during the natural oestrus cycle. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 2006; 3: 3, doi:10.1186/1743-1050-3-3.

Kluck RM, Bossy-Wetze IE, Green DR and Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132–1136.

Koh ETA, Illingworth PJ, Duncan WC and Critchley HOD. Immunolocalization of Bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Hum. Reprod* 1995; 10: 1557–1562.

Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 4144–4147.

Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S and Yajima A Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 529–534.

Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879–886.

Korsmeyer S, Shutter J, Veis D et al. Bcl-2/Bax: A rheostat that regulates an antioxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 327–332.

Kraus MD, Shahsafaei A, Antin J and Odze RD. Relationship of Bcl-2 expression with apoptosis and proliferation in colonic graft versus host disease. *Hum Pathol* 1998; 29: 869–875.

Krajewska M, Wang H, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32, a cell death protease. *Cancer Res* 1997; 57: 1605–1613.

Krammer PH. CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis: live and let die. *Advances in Immunology* 1999, 71:163-210.

Kukhta VK, Marozkina NV, Sokolchik IG, Bogaturova EV. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr Biokhim Zh* 2003; 75 :5–9.

Lawler, DF, Evans RH, Reimers TJ, Colby ED, Monti KL. Histopathologic features, environmental factors, and serum estrogen, progesterone, and prolactin values associated with ovarian phase and inflammatory uterine disease in cats. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52: 1747–1753.

LeBrun D, Warnke R, Cleary M. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993; 142: 743–753.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 1998; 396: 580–584.

Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *The Biochemical Journal* 1999; 344 Pt 2: 305–311.

Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 2003; 197: 8–29.

Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer* 2005; 114: 509–512.

Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *TREND in Immunology* 2001; 22: 31–34.

Lu Q, Poulson R, Wong L et al. Bcl-2 expression in adult and embryonic nonhematopoietic tissues. *J Pathol* 1993; 169: 431–437.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin- deltaEx3 and Survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor Survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 1999; 59: 6097–6102.

Meikrantz W and Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* 1995; 58: 160–174.

Mendoza-Rodriguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-Lopez P, Camacho-Arroyo I, Dominguez R, Cerbon M. Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 61: 445–452.

Mendoza-Rodríguez CA, Monroy-Mendoza MG, Morimoto S, Cerbón MA. Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 208: 31–39.

Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M and Rumi LS Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 760–766.

Mizuno T, Baba K, Goto Y, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Alternatively spliced transcripts of Fas mRNAs in feline lymphoid cells. *European Journal of Immunogenetics*, 2004; 31: 159–166.

Morris H, Edwards J, Tiltman A, Emms M. Endometrial lymphoid tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol* 1985; 38: 644–652.

39.

Nabils NH, Broaddus RR, McCampbell AS, Lu KH, Lynch HT, Chen L and Loose DS Sex hormone regulation of survivin gene expression. *J Endocrinol* 2010; 207: 237–243.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, 88:355;

Narkar M, Kholkute S and Nandedkar T Hormonal regulation of apoptosis in the endometrium of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology* 2006; 66: 1194–1209.

Nayak NR, Critchley HO, Slayden OD, Menrad A, Chwalisz K, Baird DT, Brenner RM. Progesterone withdrawal up-regulates vascular endothelial growth factor receptor type 2 in the superficial zone stroma of the human and macaque endometrium: potential relevance to menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3442–3452.

Nomura M, Shimizu S, Ito T, Narita M, Matsuda H, Tsujimoto Y. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 1999; 59: 5542–5548.

Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237–3245.

O'Driscoll L, Linehan R, and Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Current Cancer Drug Targets* 2003; 3: 131–152.

Ogra PL, Ogra SS. Local antibody response to polio vaccine in human female genital tract. *J. Immunol* 1973;110:1307.

Okano A, Ogawa H, Takahashi H, Geshi M. Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum. *J Reprod Dev* 2007; 53: 923–930.

Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 hetero-dimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609–619.

Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis, *Trends in Cell Biology* 1994; 4: 394–398.

Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y and Akao Y. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344: 28–29.

Otsuki Y. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 2001; 34:166–173.

Pampfer S, Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in the mouse and rat. *Cell Death Differ* 1999; 6: 533–545.

Pinkoski MJ, Heibein JA, Barryl M, Bleackley RC. Nuclear translocation of granzymeB in target cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2000; 7: 17–24.

Potter K, Hancock DH, Gallina AM. Clinical and pathologic features of endometrial hyperplasia, pyometra, and endometritis in cats: 79 cases (1980-1985). *JAWMA* 1991; 198: 1427–1431.

Pukazhenthil BS, Wildt DE, Howard JG. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001; 57: 423–433.

Rbeiro APC, Vicente WRR, Apparicio M, Gadelha CRF, Alves AE, Covizzi GJ. Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches. *Theriogenology* 2006; 66: 1462–1464.

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1–6.

Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family, *Nature* 1997; 387: 773–776.

Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225–3236.

Reynolds JE, Yang T, Oian L, Jenkinson JD, Zhou P and Eastman A. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1994; 54: 6348–635.

Roberto da Costa RP, Serrão PM, Monteiro S, Pessa P, Robalo Silva J, Ferreira-Dias G. Caspase-3 mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 925–932.

Roth TL, Munson L, Swanson WF, Wildt DE. Histological characteristics of the uterine endometrium and corpus luteum during early embryogenesis and the relationship to embryonic mortality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1995; 53: 1012-1021.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 2000; 45: 528–537.

Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y. Apoptotic cell death during the estrous cycle in rat uterus and vagina. *The Anatomical Record* 1997; 248: 76–83.

Scaffidi C, Fulda S, Sirinivasan A. Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer, PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO Journal* 1998; 17: 1675–1687.

Schimmer AD. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Research* 2004; 64: 7183–7190.

Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J, Bertrand R. Characterization of Bax-sigma, a cell death inducing isoform of Bax. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000; 270: 868–879.

Schwartz SM. Cell Death and the Caspase Cascade. *Circulation* 1998; 97: 227–229.

Shi B, Triebe D, Kajiji S, Iwata KK, Bruskin A, Mahajna J. Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 779–785.

Shin S, Sung BJ, Cho YS. et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117–1123.

Shikone T, Kokawa K, Yamoto M, Nakano R. Apoptosis in human ovary and uterine endometrium during the menstrual cycle. *Horm Res* 1997; 48: 27–34.

Slayden OD, Rubin JS, Lacey DL, Brenner RM. Effects of keratinocyte growth factor in the endometrium of Rhesus macaques during the luteal–follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 275–285.

Slee ES, Martin SJ. Regulation of caspase activation in apoptosis: implications for transformation and drug resistance. *Cytotechnology* 1998; 27: 309–320.

Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca^{2+} signaling and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2000; 32: 35–46.

Smaili SS, Hsu Y-T, Carvalho ACP, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res*, 2003; 36: 183–190.

Sohn JH, Kim DH, Choi NG, Park JE, Ro JY. Caspase 3/CPP32 immunoreactivity and its correlation with frequency of apoptotic bodies in human prostatic carcinomas and benign nodular hyperplasias. *Histopathology* 2000; 37:555–560.

Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S, Mor, G. Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas Ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 447–455.

Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 1996; 51: 314–23.

Suzuki M, Youle R J, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; 103: 645–654.

Svaion S, Lepsky E, Orenstein H, Carp H, Shepshelovich J, Torchinsky A, Fein A, Toder, V. Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology* 2002; 47: 118–127.

Takagi-Morishita Y, Yamada N, Sugihara A, Iwasaki T, Tsujimura T and Terada N. Mouse Uterine Epithelial Apoptosis Is Associated with Expression of Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channels, Release of Cytochrome C from Mitochondria, and the Ratio of Bax to Bcl-2 or Bcl-X. *Biol Reprod* 2003; 68: 1178–1184.

Tang DG, Li L, Chopra DP and Porter AT. Extended survivability of prostate cancer cells in the absence of trophic factors: increased proliferation, evasion of apoptosis, and the role of apoptosis proteins. *Cancer Res* 1998; 58: 3466–3479.

Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JD, Tilly JL and Isaacson KB. Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol* 1997; 82: 2738–2746

Tao X-J, Sayegh RA, Tilly JL, Isaacson KB. Elevated expression of the proapoptotic BCL-2 family member, BAK, in the human endometrium coincident with apoptosis during the secretory phase of the cycle. *Fertility and Sterility* 1998; 70: 338–343.

Tarkowski R, Kotarski J, Polak G, Wojcierowski J. Expression of the survivin gene in the scar endometriosis and in normal human endometrium. *Ginekol Pol* 2001; 72: 1539–1542.

Toki T, Mori A, Shimizu M, Nikaido T, Fujii S Localization of apoptotic cells within the human endometrium and correlation between apoptosis and p21 expression. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1157–1164.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch, *FEBS Lett* 2000; 466: 6–10.

Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Hung YC, Ueki M. Survivin gene expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3452–3459.

Ulukaya E, Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı. www20.uludag.edu.tr/eulukaya, 2003.

Van Cruchten S, Van den Broek W, Duchateau L, Simoens P. Apoptosis in the canine endometrium during the estrus cycle. *Theriogenology* 2003; 60: 1595–1608.

Vaskivuo TE, Stenbäck F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L and Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 165: 75–83.

Vaux DL and Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245–254.

Wasowska B, Ludkiewicz B, Stefanczyk-Krzyszowska S, Grzegorzewski W, Skipor J. Apoptotic cell death in the porcine endometrium during the oestrus cycle. *Acta Vet Hung.* 2001; 49: 71–79.

Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y and Mori T. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:360–368.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes and Development* 2000; 14: 2060–2071.

Wei P, Jin X, Tao S-X, Han C-S, Liu Y-X. Fas, FasL, Bcl-2, and Bax in the endometrium of rhesus monkey during the menstrual cycle. *Molecular Reproduction and Development* 2005; 70: 478–484.

West NB, Verhage HG, Brenner RM. Changes in nuclear estradiol receptor and cell structure during estrus cycles and pregnancy in the oviduct and uterus of cats. *Biol Reprod* 1977; 17: 138–143.

Wildt DE, Schiewe MC, Schmidt PM, Goodrowe KL, Howard JG, Phillips LG, O'Brien SJ, Bush M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wild-life. *Theriogenology* 1986; 25: 33–51.

Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*. 1987; 329: 328–331.

Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechustan A, Xi X-G and Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1281–1292.

Wu M, Xu L-G, Zhai XL Z, Shu H-B. AMID, an Apoptosis-inducing Factor-homologous Mitochondrion-associated Protein, Induces Caspase-independent Apoptosis *J Biol Chem*, 2002; 277: 25617–25623.

Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis, *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 97–104.

Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Science* 2008; 99: 1709–1714.

Yamashita H, Otsuki Y, Matsumoto K, Ueki K and Ueki M. Fas ligand, Fas antigen and Bcl-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 358–364.

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL-2 family and cell death, *Blood* 1996; 88: 386–401.

Zhang Q, Paria BC. Importance of Uterine Cell Death, Renewal, and Their Hormonal Regulation in Hamsters that Show Progesterone-Dependent Implantation. *Endocrinol* 2006; 147: 2215–2227.

Zhou M, Demo SD, McClure TN, Crea R, Bitler CM. A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *J Biol Chem* 1998; 273: 11930–11936.

Zapata JM, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 6916–6920.

Zou H, Liu YLX, WangAn X. APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549–11556.

