

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEKLERİN ERKEN GEBELİK DÖNEMİNDE
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN
ve
DOKU UYUŞUM ANTİJENLERİNİN
UTERUS ve PLASENTADA BELİRLENMESİ**

Hakkı Bülent BECERİKLİSOY

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Selim ASLAN

2007 - ANKARA

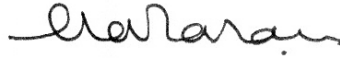
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Doğum ve Jinekoloji Doktora Programı

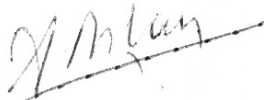
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma . aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 09.02.2007



Prof. Dr. Erol ALAÇAM
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Selim ASLAN
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Belma ALABAY
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Murat FINDIK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	ii
İçindekiler.....	iii
Önsöz.....	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Köpeklerde Gebeliğin Oluşum ve Gelişim Süreci.....	1
1.2. Köpek Uterus ve Plasentasında Gebelik Dönemlerindeki Histomorfolojik Değişiklikler.....	6
1.3. Köpeklerde Gebelik Döneminde Hormonal Etki.....	11
1.4. Köpeklerde Gebelik Döneminde Rol Oynayan Faktörler.....	15
1.5. Köpek Embriyolarının Toplanması.....	20
1.6. Doku Uyuşum Antijenleri'nin (MHC) Yapısı, Etki Mekanizması, Yapımını Etkileyen Faktörler.....	22
1.7. Doku Uyuşum Antijenlerinin Reprodüktif Sistem Üzerindeki Etkisi.....	24
1.8. Matriks Metalloproteinazların (MMP) Yapısı, Etki Mekanizması ve Yapımını Etkileyen Faktörler.....	26
1.9. Matriks Metalloproteinazların Reprodüktif Sistem Üzerindeki Etkisi.....	30
2. GEREÇ ve YÖNTEM	33
2.1. Gereç.....	33
2. 1. 1. Hayvan Materyali.....	33
2. 1. 2. Hayvan Materyalinin Gruplandırılması.....	33
2.1.3. Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	34
2. 2. Yöntem.....	37
2.2.1. Çalışmanın Yürütülme Düzeni.....	37
2. 2. 2. Kan Örneklerinin Toplanması.....	37
2. 2. 3. Ovariohisterektominin Uygulanışı.....	37
2. 2. 4. Preimplantasyon Dönemdeki Köpeklerde Uterus Yıkama Tekniği.....	38
2. 2. 5. Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	38
2.2.6. İmmunohistokimya Deneyleri İçin Parafin Blokların Hazırlanması.....	39
2.2.7. İmmunohistokimya Deneylerinin Uygulanışı.....	40
2.2.7.1. Histogreen Substrat Kit'inin Uygulanışı.....	42
2.2.8. Jelatin Zimografi Deneylerinin Uygulanışı	43

2.2.8.1. Dondurulmuş Dokuların Ekstraksiyonu.....	43
2.2.8.2. Zimografi Jellerinin Hazırlanması.....	44
2.2.8.3. Örneklerin Jele Aktarılması ve Elektroforezis.....	45
2.2.9. MMP-2, MMP-9 ve MHC-I, MHC-II'nin Değerlendirilme Yöntemi.....	46
2.2.10. Kan Serumu Örneklerinde Progesteron Analizi.....	47
2.3. Elde Edilen Bulguların İstatistik Değerlendirmesi.....	47
3. BULGULAR	48
3.1. Alınan Dokularda MMP-2 ve MMP-9 İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları.....	49
3.2. Jelatin Zimografi Yöntemiyle Gebe ve Gebe Olmayan Köpeklerde Elde Edilen Aktif MMP-2 ve MMP-9 Miktarlarının Tüm MMP-2 ve MMP-9 Miktarına oranının Belirlenmesi ve Elde Edilen Progesteron (P4) Verilerinin Değerlendirilmesi.....	51
3.3. Zimografik Yöntemle Elde Edilmiş Olan MMP-2 ve MMP-9 (Aktif ve Latent) Değerlerinin Gebelik Dönemleri Arasında ve Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması.	54
3.4. MMP-2 ve MMP-9 Jelatin Zimografi Değerleri ile Progesteron (P4) Değerleri Arasındaki Korelasyon.....	55
3.5. MHC-II Pozitif Hücre Sayılarının Uterusun Değişik Bölümlerinden Alınan Dokularda Değişik Gebelik Dönemlerinde Karşılaştırılması.....	56
3.6. MHC-II Pozitif Hücre Sayılarının Uterusun Değişik Bölümlerinden Alınan Dokuların Değişik Gebelik Dönemleri Göz Önünde Bulundurularak Karşılaştırılması.....	60
3.7. MHC-II Pozitif Hücre Sayılarının Plasental Bölümlere Ait Değişik Uterus Katmanlarında Karşılaştırılması.....	62
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
ÖZET	76
SUMMARY	77
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	92

ÖNSÖZ

Gebeliğin oluşumu ve devamlılığı hormonlar, immun sistem hücreleri, parakrin ve otokrin faktörlerin dengeli ilişkisi, maternal ve fetal bölümlerin uyumu ile ilgili bir gelişim sürecidir. Fötus genomunun yarısı anneden, diğer yarısı babadan oluştuğu için annenin immun sistemi tarafından bir reaksiyon gelişebilmesi mümkündür. Fetal yapının anne tarafından kabulü, en azından gebeliğin başlangıcında immun yanıtta azalma sonucunda geliştiği veya fötusun immun yanıtı baskıladığı daha da önemlisi uterusun immun sistem bakımından ayrıcalıklı bir bölge oluşturabileceği gibi konular halen tartışılmakta ve araştırılmaktadır.

Köpeklerde endoteliokorial tip plasentanın gelişim sürecinde büyük ölçüde yıkım ve yapılanma aşamaları gerçekleşir. İmplantasyon sürecinde fetal trofoblast invazyonuna bağlı olarak, maternal endometriyumda yıkımlanmalar meydana gelirken, diğer taraftan da fetal ve maternal kökenli stromal, epitel ve vasküler hücreler gelişim gösterirler.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) çinkoya bağlı proteolitik enzimlerdir, matriksin yıkımlanmasında, yapılanmasında ve hücre göçü sürecinde önemli rol oynamaktadır. Bu enzimlerin plasantasyon sürecinde önemli fonksiyonları olduğu düşünülmekte ve köpeklerde MMP-2 ve MMP-9'un jelatinolitik aktivitesinin doku yıkımında önemli bir indikatör olduğu düşünülmektedir.

Doku uyşum antijenleri (MHC), immun yanıtta önemli olduğu gibi, çeşitli otoimmun bozukluklarla ilgili bir gen grubudur. Memelilere fötus ile anne arasındaki ilişkide yavruya karşı gösterilen immun yanıt, MHC-I ve MHC-II moleküllerinde oluşan değişimle ilgilidir ve T lenfositlerine bağlı oluşan immun yanıtta kritik öneme sahiptir.

Köpeklerde MHC-I, MHC-II, MMP-2 ve MMP-9 molekülleri üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır ve gebeliğin devamı üzerindeki etkileri tam olarak belirlenememiştir.

Bu çalışmanın amacı, köpekte bu moleküllerin gebelik sürecindeki değişimini izleyerek pre implantasyon, implantasyon ve plasentasyon dönemlerindeki düzeylerini araştırmak ve gebe olmayan köpeklerle karşılaştırılarak elde edilen değerler arasındaki farklılıkları ortaya koymaktır.

Doktora çalışmam süresince her konuda yardım ve ilgisini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Selim ASLAN'a, Viyana'daki tez çalışmam sürecinde bilimsel yönde bana yardımlarını esirgemeyen Viyana Veteriner Üniversitesi'ne bağlı hocalarım Prof. Dr. Sabine SCHÄFER-SOMI'ye Prof. Dr. Ingrid WALTER'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve elemanları ile Viyana Veteriner Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Enstitüsü çalışanlarından Sayın Magdalena Helmreich, Waltraud Tschulenk ve Doris Rosenfellner'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu süreç içerisinde beni destekleyen değerli aileme ve beni bu günlere getiren rahmetli babaanneme teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
>	Büyüktür
<	Küçüktür
ark.	Arkadaşları
APC	Antigen presenting cells: antijen sunan hücreler
AVP	Arjinin vazopresinin
CD	İmmun hücre reseptörleri
cm	Santimetre
COX	Siklooksijenaz
DLA	Köpek lökosit antijen
E ₂	Östrojen
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FSH	Folikül uyarıcı hormon
G	Gauge
g	Santrifüj devir sabiti
GH	Büyüme hormonu
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
hCG	İnsan koriyonik gonadotropini
HCl	Hidroklorik asit
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
IGF-1	İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
IL	İnterleukin
kDa	Kilodalton
LIF	Leukemi inhibe edici faktör
LH	Luteinleştirici hormon
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MHC	Doku uyuşum antijeni
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Haberci (mesenger) ribonükleik asit
NK	Doğal öldürücü hücre
OT	Oksitosin
PBS	Fosfatlı tampon solüsyonu
p.c.	Post koitus
PGHS	Prostaglandin-Ednoperoksidaz H-sentez Mediyatörleri
pH	Asitlik sabiti
PR	Progesteron reseptörü
PRL	Prolaktin
TGF	Transforme edici büyüme faktörleri

TIMP	Metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri
TNF	Tümör nekrozis faktör
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Grup 1 ve kontrol grubu için alınan doku örnekleri	39
Şekil 2.2.	Grup 2 ve 3 için alınan doku örnekleri	39
Şekil 3.1.	Pre implantasyon döneme ait köpek embriyoları (10x30).....	48
Şekil 3.2.	Gebe ve gebe olmayan değişik uterus katmanlarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi.....	50
Şekil 3.3.	Jelatin zimografi ile belirlenmiş MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi.....	51
Şekil 3.4.	Gebelik dönemleri ve kontrol grubunda aktif ve latent MMP-9 değişiklikleri.....	55
Şekil 3.5.	Değişik uterus katmanlarında MHC-I ve MHC-II aktivitesi.....	57

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Köpek embriyoların gelişme dönemleri	3
Çizelge 1.2.	Köpekte gebelik ve LH piki arasındaki ilişki (Concannon ve ark., 2001).....	5
Çizelge 1.3.	İmplantasyon öncesi dönemde gebeliğin oluşmasında rol oynayan faktörler (Schäfer-Somi ve ark., 2007).....	16
Çizelge 2.1.	İmmonohistokimya deneylerinde kullanılan antikorlar ve sulandırma yüzdeleri.....	41
Çizelge 3.1.	Aktif MMP-2 ve MMP-9 miktarının total MMP-2 ve MMP-9 miktarına oranı (%).....	53
Çizelge 3.2.	Çalışma hayvanlarına ait gebelik dönemlerine göre ortalama progesteron değerleri.....	53
Çizelge 3.3.	Değişik gebelik dönemlerinde jelatin zimografi ile elde edilmiş aktif ve latent MMP-2 ve MMP-9 değerleri.....	54
Çizelge 3.4.	Aktif ve latent MMP-2 ve MMP-9'un erken gebelik döneminde progesteron (P4) ile korelasyonları (r^2).....	56
Çizelge 3.5.	MHC-II pozitif hücre sayılarının gebeliğin dönemlerine göre uterusun değişik bölümlerindeki ve kontrol grubundaki ortalama değerleri arasındaki ilişki.....	58
Çizelge 3.6.	MHC-II pozitif hücre sayılarının uterusun değişik bölümlerinde gebelik günlerine göre artışı.....	59
Çizelge 3.7.	MHC-II pozitif hücre sayılarının uterustan alınan dokular arasında karşılaştırılması.....	60
Çizelge 3.8.	Uterusun değişik bölümlerindeki MHC-II pozitif hücre sayılarının progesteron değerleri ile korelasyonu	61
Çizelge 3.9.	Plasentanın değişik katmanları arasında MHC-II pozitif hücre sayıları.....	62

1. GİRİŞ

1.1. Köpeklerde Gebeliğin Oluşum ve Gelişim Süreci

Korpus luteum formasyonu köpekte ovulasyondan önce başlar. Preovulatorik follikül gelişiminde ve luteinizasyon sürecinde üç dönem bulunmaktadır. Luteal dönemde yani ovulasyondan 2-3 gün önce folliküller ince, hafif kıvrımlı bir şekilde ve bir bölümü luteinize olan granüloza hücreleri bulundurlar. Oosit kompakt bir kumulus oophorus ile çevrelenmiş olup, follikül duvarına yapışmıştır. İkinci dönem olan intermedier dönemde, luteinize olmuş granüloza hücrelerinin daha fazla kıvrımlarının olduğu seçilir. Oosit bu dönemde follikül antrumunda serbest halde bulunur. Bu yapıdaki folliküller yapıda ovulasyona 1-2 günlük süre kalmıştır (Phemister ve ark., 1973; Olson ve ark., 1989). Ovulasyona hazır follikül graaf follikülü olarak tanımlanır. Ovaryum yüzeyinde doğrudan tunika albugineanın altında bulunur. Ovaryum yüzeyinin üzerinde bulunan folliküller ovulasyondan 24 saat önce 1 mm, 12 saat önce ise 2 mm büyüklüğündedirler (Tsutsui, 1989).

Son gelişim döneminde ovule follikülün bazı bölgelerinde incelmeler oluşur. Granüloza hücrelerinin belirgin ölçüde luteinize olmuş ve serbest kıvrımlar meydana getirdiği ve kumulus ooforus hücrelerinin oositin çevresinde dağıldığı durumda ovulasyon zamanının oldukça yakın olduğu saptanmıştır (Phemister ve ark., 1973; Olson ve ark., 1989). Follikül duvarı stigmada daha ince ve daha şeffaf bir görünüme kavuşur. Birçok follikül ovule olur ve bu ovule olan folliküllerin sayısı 2 ile 8 arasında değişmektedir (Andersen ve Simpson, 1973; England ve Allen, 1989, Preidkalns ve Leiser, 1998). Dişi köpek oositlerinin kumulus ooforusu ovulasyondan sonra ekspande olmaz ve birkaç gün kompakt bir şekilde kalır (Andersen ve Simpson, 1973).

Gebelik genel olarak konsepsiyon ve doğum arasındaki süre olarak ele alınmaktadır. Konsepsiyon zamanı klinik tanı bakımından güçlükler oluşturduğundan, çiftleşme günü veya ovulasyon günü gebeliğin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Günzel-Apel ve ark., 2001). Köpeğin fizyolojik durumundan dolayı, çiftleşme zamanı gebelik günü başlangıcı olarak kabul edildiğinde, gebelik sürecinde büyük oranda farklılıklar oluşmaktadır. Çünkü ovulasyondan yedi gün önce oluşan çiftleşme de gebeliğe neden olabilmektedir (Concannon ve ark., 1983, 1989). Preovulatorik luteinleştirici hormon (LH) piki ve doğum arasındaki süre 64-66 gün iken (Concannon ve ark., 1989) ovulasyon ve doğum arasındaki süre ise 62-64 gün olabilmektedir (Wildt ve ark., 1979).

Metafaz-I oositi olarak ovule olan oositler ilerleyen 2-3 gün içinde ikinci mayotik aşamayı geçirirler ve yaklaşık üç gün fertil kalma yeteneklerini korurlar (Holst ve Phemister, 1971; Concannon ve ark., 1989; Tsutsui, 1989).

Oositlerin fertilizasyonu köpekte salpinkste meydana gelmektedir. Post koitus (p.c.) 3. güne kadar henüz bölünmemiş ve zona pellusidalarında spermiler bulunan iki hücreli döneme 4. günde, sekiz hücreli döneme 6. günde, morula dönemine (16-32 hücreli) p.c. 7. günde ulaşılmaktadır. Yaklaşık p.c. 8. günde blastosel formasyonu oluşmaktadır, blastosist dönemine ulaşılmaktadır. Embriolar köpekte değişik gelişim dönemi içinde olabilmektedirler, ovulasyondan sonra köpek embriolarının hangi gelişme döneminde saptanabildikleri Çizelge 1.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Köpek embriyolarının gelişme dönemleri

Post ovulasyon (gün)	Embriyoların gelişme dönemi	Kaynak
4	Bir-iki hücreli	Tsutsi, 1989
5-6	Üç hücreden, sekiz hücreye kadar	
8	Morula (16 hücre)	
4	İki, dört, sekiz hücreli	Noden ve De Lahunta, 1985
5-8	Bir hücreden, sekiz hücreli döneme kadar	Renton ve ark., 1991
10	Morula	
12	Erken blastosist	

Blastosist salpinksin istmusu üzerinden uterusun apeksine taşınır. Çiftleşmenin bitiminden sonraki 10. günde kornu uterilerde ödemli, kabarık alanlar (ampullar) gelişmeye başlar. Bu alanlar implantasyon odacıklarının yapılanma döneminin başlangıcında önemlidirler. Bu dönemde uterus kripleri kısa, uterus bezleri ise uzamış bir durumdadır. Ampulla içerisindeki blastosist limon formundadır. Embriyolar salpinkste 32-64 hücreli blastosist olarak gelişir ve ovulasyondan 6-8 gün sonra uterotubal birleşmenin olduğu yerden uterusu ulaşırlar (Concannon ve ark., 1989; Michel, 1995). Yaklaşık üç gün boyunca kornunun ipsilateral bölümünde hareket ederler, diğer üç günde de uterus kornusundan diğerine göç gerçekleştirirler (Concannon ve ark., 1989) ve her iki kornuya genellikle eşit şekilde dağılırlar (Michel, 1995).

Onikinci günde yüzeysel bezsel yapılarda (kript) artışlar meydana gelir. Bu yapılar derine doğru genişlerler ve oval yapıda çukurluklar (lakuna) oluştururlar. Endometriyum epitellerinde fazla sayıda mitotik figür gözlenir (Michel, 1995).

İmplantasyon ile başlayan erken gebelik klinik yöntemlerle belirlenemez. Trofoblastların uterus epiteline invazyonu yani implantasyon

Holst ve Phemister 'e göre (1971) metaöstrusun 11. ve 12. gününde gerçekleşmektedir. Bu da ovulasyondan sonraki 17. ve 18. güne karşılık gelmektedir (Thatcher ve ark., 1994). Concannon ve ark. (1989), köpekte implantasyonun LH pikinden sonraki 18. günde olduğunu belirtmişlerdir. Thatcher ve ark., (1994) ise endometriumdaki histolojik değişikliklere bakarak elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda, implantasyonun LH pikinden sonraki 20. günde gerçekleştiğini (ovulasyondan sonraki 18. gün) ortaya koymuşlardır.

Gebelik zamanı ve LH piki arasında köpekte önemli derecede ilişki bulunmaktadır (Bysted ve ark., 2001; Concannon ve ark., 2001). LH piki artışı ve embriyo gelişimi arasındaki ilişki Çizelge 1.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Köpekte gebelik ve LH piki arasındaki ilişki (Concannon ve ark., 2001).

Gebelik günü/LH piki	LH değerleri ve embryonun gelişimi
0	LH serum değerlerinde artış, LH yükselmesi: 0-1. günler Progesteron artışı 0,3-0,8 ng/ml 'den 0,9-3,0 ng/ml, çiftleşme dönemi
+2	Ovulasyon: LH artışından sonra 38-58. saatler
+3	Ovidukta primer oosit: sperma penetrasyonu
+4	Oositlerde polar cisim yok, dişi proneükleus yok
+5	Oositlerin distal ovidukta gelişmesi, fertilizasyon (çiftleşme olmuşsa)
+6	Çiftleşme yok: gelişmiş oosit halen fertil
+7	Çiftleşme yok: oositin fertil olma yeteneği çok azalmış veya yok
+8	Fertil çiftleşme mümkün olabilir: Daha az yavru veya yavru alınamaz
+7, +8	Embriyolar ovidukta 2-4 hücreli aşamada
+9	Embriyolar ovidukta 4-8 hücreli aşamada
+10	Embriyolar ovidukta 8-10 hücreli aşamada
+12	Morula (16-32 hücreli aşama) zona pellusidanın içinde, kornu uteride
+13	Blastosistlerin uterus kornuları arasında migrasyonu
+16	Embriyonun uzaması, zona pellusida incelik
+18	Blastosist zona pellusidanın içinde, uterus veziküllerinde (≥ 1 mm)
+20	Embriyoda büyüme (≥ 2 mm'den 3-6 mm'ye) uterus veziküllerinde, zona pellusida yok
+22	Uterusta ödem, implantasyon, invazyon başlangıcı
+23	Plasental trofoektodermin endometriyuma invazyonu biter
+24	Embriyoların ultrasonografi ile saptanması mümkün (serum relaksin, ELISA)
+26	Embriyoda kalp atımı USG ile saptanabilir (serum relaksin artışı RIA ile saptanabilir)

Çiftleşmenin bitiminden sonraki 13. günde blastosistlerin zona pellusidadan dışarı çıkmalarından sonra, trofoblastların uterus epiteline invazyonu başlar. Trofoblast hücrelerindeki lipoid damlalar (yoğun cisimcik ve heterofagozom) bu hücrelerin fagositoz aktivitesini desteklerler. Köpekte implantasyon zamanı olan 17. ve 18. günler embriyoda nörolojik sistemin gelişmeye başladığı aşamadır. İmplantasyondan plasentasyona geçiş köpekte düzenli aşamaları kapsayan bir olgudur (Michel, 1995). Gebeliğin

ortasına kadar plasentadan, plasenta endoteliokorialis gelişene kadar çeşitli yıkımlanmalar gerçekleşir (Schnorr, 1996).

Ultrasonografi ile gebeliğin ilk defa saptandığı dönem olan implantasyon başlangıcı ve plasentasyonun bitişinde yuvarlak, sıvı dolu, anekojen yapılar, vesica urinerianın dorsalinde seçilirler (Schafer ve Poulsen Nautrup, 2001; Salmanoğlu ve ark., 2006). Erken gebelik yaklaşık olarak gebelik döneminin ilk yarısı olarak kabul edilmektedir (Noden, 1986). Organ bölümlerinin oluşmaya başladığı embriyonal dönem ise 5. gebelik haftasının ortalarına karşılık gelmektedir (Schnorr, 1996). Hemen ardından gelen fetal dönem süresince organlar başkalaşır ve hızlı bir büyüme gerçekleşir (Sinowatz, 1991; Schnorr, 1996). Dişi köpeğin oval olan yavru bölümleri embriyonal gelişimin bitiminden sonra uzunlamasına gelişim gösterirler (Schafer ve Poulsen Nautrup, 2001). Kemiklerdeki mineralizasyon çiftleşmeden sonraki 42 ve 45. günlerde başlar (Schafer ve Poulsen Nautrup, 2001) ve LH pikinden sonraki 46. günde fetal kemikler röntgen muayenesi ile saptanabilir (Concannon ve ark., 1989).

1.2. Köpek Uterus ve Plasentasında Gebelik Dönemlerindeki Histomorfolojik Değişiklikler

İmplantasyon ve nidasyon konseptus ile anne arasında ilişkinin başladığı dönem olarak kabul edilir (Rüsse, 1991).

Köpek plasenta tipi; plasenta vera olarak tanımlanmaktadır (Zietzschman ve Krölling, 1955). Bu plasenta tipinde korion ve endometrium arasında bir bağlantı vardır. Doğum sonrasında endometriumun değişikliğe uğrayan bölümleri olan desidua atılmaktadır (Rüsse, 1991; Michel, 1995; Schnorr, 1996). Plasentasyon döneminde trofoblast, endometriumda maternal endotele kadar uterus damarlarını yıkımlar ve histolojik yönden

köpek plasentası, plasenta endotelio korialis olarak tanımlanır (Zietzschmann ve Krölling 1955; Rüsse, 1991; Michel, 1995; Schnorr, 1996).

Korionun kuşak tarzında oluşmuş bölümü yavruyu sarar ve köpeğin bu durumda plasentası plasenta villosa zonaria olarak tanımlanır. Zonar plasenta köpek ve kedide yavruyu tam anlamıyla kuşatmaktadır. Amniyon tam anlamıyla allantois tarafından sarılmıştır ve fötüs iki yavru kesesinin içinde bulunmaktadır (Rüsse, 1991).

Zonar plasentanın olduğu bölümde, plasenta labirentleri gelişmektedir. Föto-maternal sınır endotelio-korialdir ve kapillarlara kadar tüm maternal plasentanın katmanları yıkılmamıştır. İmplantasyondan sonra trofoblast üç değişik alanda farklılaşır:

1. Tek katlı epitel doku olan sitotrofoblastlarda,
2. Sitotrofoblastlara dayanmış olan sinsitiyal trofoblastlarda,
3. Trofoblast bölümünün fagositik yeteneğini sürdüren kenar hematom bölümünde.

Sitotrofoblastlardan oluşan sinsitiotrofoblastlar uterusun yüzeysel epitel hücrelerinin arasına girerler, epitelin altında bulunan bazal membranı yıkmaları ve maternal kapillarlara ulaşırlar ve böylelikle orada bulunan tüm bağ doku hücrelerini yıkmaları (nekroz alanı). Maternal kapillarlarda bu duruma endotelin ve bazal membranın kalınlaşması ile yanıt verirler. Bazal bezsel bölüm ise varlığını sürdürerek, sekretorik görevine devam eder (Rüsse, 1991).

İç korionik kese bu durumda içeriye doğru uzamıştır (Zietzschmann ve Krölling, 1955). Zonar plasenta bölümünde gerçekleşen implantasyon ve plasentasyon uzun bir süreci kapsamaktadır. Korionik kuşak ve plasental labirent, yüzeysel ve bezsel epitel hipertrofisi, uterus bezlerinin artan proliferasyon ve sekresyonu ile oluşurlar. Daha sonra uterus epitelinin çözülmesi gerçekleşir ve uterus bezleri yüzeysel ve derin bez katmanında farklılaşarak, uterus bezlerini örten dokuyu oluştururlar. Lamel tarzındaki

plasenta labirentlerinin kendi içinde dallanarak yapılanması ile plasentanın embriyonal, fetal ve maternal bölümleri arasında kaynaşma meydana gelir. Böylelikle besinlerin ve metabolizma için gerekli metabolitlerin alınabilmesi amacıyla, bu kaynaşma bölgesindeki yüzey alanı genişler (Michel, 1995).

İmplantasyon alanları 16. günde interplasental bölümlere göre daha belirgin ölçüde seçilirler. Bu alanların 18. günde oldukça büyüdüğü gözlenir. Trofoblast bezsel bölümde büyümesini sürdürür. Sekonder korion villilerinin oluşumu sırasında mukozal yıkımlanma başlar. Gebeliğin 20. gününde villiler vaskularize olurlar. Trofoblast 25-26. günlerde endometriyumun içine tam anlamıyla girmiştir. Kriptler uzun, dallanmış ve sarmal bir şekilde birbirlerine çok yakın durmaktadırlar. Lakunalar genişlemiştir. Plasental bölümde sinsitiyum oluşmuş ve maternal damarları çevrelemiştir. Nekrotik alan, uterusun periferine doğru yönelmiş, labirent ve lakunalar arasında yer almaktadır (Rüsse, 1991).

Köpekte villilerden sadece 17. ve 24. günler arasında söz edilebilir. Daha sonra yaprak tarzında korion tomurcuklanmaları gelişir ve ana yapraklardan yan yaprakların geliştiği gözlenir (Rüsse, 1991).

Gebeliğin 3. haftasından başlayarak yavru kesesinin plasenta olmayan kutup bölgesi ile plasenta kuşağının (zonar plasentanın) kenarları arasında maternal endotelin yersel yıkımlanması sonucunda hematoma benzeri kanama alanları meydana gelir (Barrau ve ark., 1975; Michel, 1995; Dantzer, 1999). Daha sonra anne dokusunda aşırı erozyonlar oluşur. Bu erozyonlar maternal damar endotelilerine kadar ulaşırlar. Trofoblastın buradaki görevi yalnızca fagositozistir. Köpek plasentası bu dönemde primatlara ait plasenta tipi olan plasenta hemokorialis ile benzerlik gösterir (Michel, 1995). Bu kanama alanlarının parçalanma ve yıkımlanması hemoglobin kristallerinin ve amorf yapılarının oluşmasını sağlar. Bu yapılar yeşil olan hemoklorin içerirler. Hemoklorin hemoglobinin parçalanması sonucu oluşmaktadır. Kenar hematomlarının koyu yeşil renk almalarını sağlarlar ve bu yüzden de "yeşil

kenar” olarak tanımlanmaktadır (Zietzschmann ve Krölling, 1955; Michel, 1995). Korion bölümlerinin epitelleri kenar hematomunda çoğalırlar ve parçalanan eritrositler fagosite edilirler. Böylelikle kenar hematomunun kanı doğrudan trofoblast tarafından yıkımlanır. Zonar plasentanın orta bölümünde yersel kanamalar meydana gelir ve labirent kanamaları oluştururlar (Rüsse, 1991). Detritus yapılar dökülen maternal epitel, bağ doku ve kandan meydana gelirler (Zietzschmann ve Krölling, 1955).

Gebeliğin orta döneminde plasenta tam anlamıyla gelişmiştir ve bu formunu doğuma kadar korur. Köpek plasentasının labirent bölümü kediye göre daha dallanmış, iç içe girmiştir. Kedi plasenta labirent bölümü ile histolojik olarak karşılaştırıldığında dev hücreler içermemektedir. Bazal membranda maternal damarların olduğu yerde daha kalındır (Rüsse, 1991).

Gebeliğin orta döneminde plasenta labirentlerinin asıl yapısını korion oluşturmaktadır. Korionun stromasının bağ dokusu daha gevşek bir yapıdadır. İnce cidarlı fetal damarlar ve çok fazla eritrosit içeren damar laminaları içermektedirler (Grether ve Friess, 1993). Yüzeysel endometriyumun yıkımlanmasına bağlı olarak, labirent bölümünde bağ dokunun maternal kısmından herhangi bir yapıya rastlanmaz ve plasenta labirenti sadece fetal bölüm ve maternal kapillarlardan oluşmaktadır. Bunlar spiral tarzda birbirlerinin içine girmişlerdir (Zietzschmann ve Krölling, 1955). Maternal kapillarların endoteli yaprak tarzında fetal korionda açılarak ortak lamellere bağlanır (Michel, 1995).

Plasenta labirent bölümünde maternal endotelde hipertrofi vardır. Fetal labirent damarlarının endotellerinden daha büyük sitoplazma volümü meydana gelir (Anderson, 1969; Stoffel ve ark., 1998). Karnivorların plasentasında maternal endotelin hipertrofisi türe özgüdür. Buna karşın fetal endotel hücreleri çok ince ve poligonaldır (Stoffel ve ark., 1998). Sitotrofoblast hücreleri koriovillilerin stromasının üzerinde bulunurlar. Bu hücreler büyük, yuvarlaktan ovale kadar değişen ve kromatini homojen

dağılmış ve çok belirgin olan nukleoli bulundururlar (Anderson, 1969). Bazı sitotrofoblast hücreleri mitotik aktivite göstermektedirler (Rüsse, 1991).

Sitotrofoblast hücrelerinin bazıları ışık mikroskopuyla incelendiğinde, sinsitiotrofoblast hücrelerinden daha açık renkte oldukları görülür. Sinsitiotrofoblast hücreleri mitotik aktivite göstermez (Anderson, 1969). Kenarda bulunan hematom köpek plasentasında gebeliğin orta döneminde plasenta labirentlerini kuşatarak, serbest endotelle kaplanmamış olan ve korionla uterus yüzeyi arasında kalan bir boşluk oluşturur (Zeitzschmann ve Krölling, 1955). Korionik villilerin ucunu kaplayan trofoblast hücreleri, plasenta labirentlerinde bulunan trofoblast hücrelerinden farklıdır ve bir kat tarzında iki değişik epitel hücre tipi bulundururlar. Bazal kat nispeten daha az sitoplazma içeren kübik yapıdaki hücreler ve büyük, oval, kromatinden zengin hücre çekirdeği içerir. Apikalde bulunan bezsel alanların trofoblast hücreleri poligonaldır ve soluk renktedirler (Grether ve ark., 1998).

Bu epitellerde gebeliğin 30. gününde apikal çıkıntılar görülmemekle birlikte gebeliğin 44. gününde yüksek çıkıntıların (protrüzyon) olduğu saptanmıştır (Grether ve ark., 1998). Trofoblast hiçbir alanda uterus bezlerinin yüzey epiteliyle bir ilişki içerisinde değildir. Bezel odacıkların epitel kıvrımlarının temelini sıkı bağ dokuları oluşturmaktadır. Bu bağ dokuları arasından maternal damarlar geçmektedir. Bu damarlar miyometriyumun stratum vaskulare bölümünden çıkarak, bezsel odacıklardan plasenta labirentlerine geçerler (Grether ve Friess, 1993). Bezel odacıkların epitel kıvrımları tek katlı ve düzenli kübik epitellerden oluşmaktadır. Bu epitelin yuvarlaktan ovale kadar değişen çekirdeği hücrenin merkezinde bulunmaktadır ve sitoplazmasında birçok küçük vezikül bulunmaktadır (Grether ve ark., 1998).

Köpeklerde tüm gebelik sürecinde sitotrofoblast farklılaşmayan dönemde kalır. Hücreler çok fazla ribozom ve az granüler endoplazmik retikulum içerirler. Sinsityum buna karşılık çok fazla gelişmemiş endoplazmik

retikulum içerir. Maternal desidial hücrelerde gelişmelerini sürdürürler. Maternal endotel aşırı düzeyde hipertrofiye olur ve birçok membranla sınırlanmış organeller içerir. Doğuma yakın 50. ve 60. günlerde de endotelde incelmeler gözlenir (Grether ve ark., 1998).

1.3. Köpeklerde Gebelik Döneminde Hormonal Etki

Memeli hayvanlarda gebeliğin şekillenmesi ve devamı sürecinde hem maternal hem de fetal faktörler etki gösterirler. Bu faktörler ve biyolojik reaksiyonların aydınlatılması, düşük fertilité durumlarında, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan embriyo kayıplarında ve ayrıca istenmeyen gebeliklerin sonlandırılması amacıyla çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak tanirlar.

Embriyo ve özellikle fetal membranlar luteal dönemin devamlılığını endometrial PGF2 α sentezini inhibe ederek ve luteolizisi engelleyerek sağlamaktadırlar (Sharp ve McDowell, 1985).

Gebeliğin anne tarafından tanınması üzerinde pek çok araştırma yapılmış ve hipotezler geliştirilmiştir. Köpekte gebelik döneminde progesteronun immun sistemi baskılayıcı etkisi olduğu bilinmektedir (Harvey ve ark., 1993). Gebeliğin devamı bakımından korpus luteumlar gerekli olmakla birlikte (Sokolowsky, 1974; Feldman ve Nelson, 1987) gebe köpeğin plasentasının da (de novo) az miktarda progesteron sentezlediği ortaya konmuştur (Kiso ve Yamauchi, 1984).

Köpekte follikül, kan serum progesteron değerleri 5-8 ng/ml düzeyine çıktığında ovule olur, daha sonra postovulasyon 10-30. güne kadar progesteron değeri genellikle 25 ng/ml'nin (15-25 ng/ml) üzerine çıkar. Gebeliğin son üçte birlik döneminde progesteron değerleri, korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak, 4-16 ng/ml'ye düşer ve bu düzeyde bir veya iki

hafta kalır (Smith ve McDonald, 1974; Concannon, 1984, 1986). Gebe ve gebe olmayan köpeklerde LH pikinden sonra progesteron değerleri birbirine çok yakındır. Gebe olanlarda doğumdan kısa bir süre önce değerler 2 ng/ml'nin altına düşerken, gebe olmayanlarda düşüş metaöstrus ve anöstrus süresinin bitimine göre 90. ve 150. günler arasında başlamaktadır (Jeffcoate ve Lindsay, 1989; Concannon, 1986).

Köpekte 2 ng/ml'nin altındaki serum progesteron düzeylerinin gebeliğin devamı için yeterli olmadığı ortaya konulmuş ve bu düzeylerin doğum zamanından önce 2 ng/ml'nin altına düşmesinin embriyonal ve fetal ölüm veya resorpsiyonlara neden olacağı saptanmıştır (Concannon ve Hansel, 1977). Fonksiyon yeteneği olan korpora lutea 55. güne kadar gebeliğin devamı bakımından gereklidir (Sokolowsky, 1974).

Korpora lutea fonksiyonel yaşam süresi hormonal yönden hem prolaktin hem de LH tafarından desteklenmektedir (Concannon, 1980; Concannon ve ark., 1987; Okkens ve ark., 1985)

Yalancı gebelik diöstrüsün sonunda serum progesteron konsantrasyonunun aniden düştüğü durumda görülmektedir. Serum progesteron düzeyinde sitolojik diöstrusun başlangıcından 13-16 gün sonra düşüş gözlenir, daha sonra diöstrusun ikinci yarısında bir yükselme meydana gelir ve diöstrusun son yedi günü içinde hızlı bir düşme gerçekleşir (Johnston ve ark., 2001).

Yalancı gebe köpeklerde prolaktin salınım yüksekliği klinik yönden belirtileri dışarıdan gözlenebilen (overt) veya dışarıdan gözlenemeyen (covert) duruma göre değişebilmektedir. Klinik yönden belirtileri dışardan gözlenebilen köpeklerin %90'nın da siklusun 81. ve 130. günleri arasında, dışarıdan klinik belirti gözlenmeyenlere göre daha yüksek prolaktin düzeyleri elde edilmiştir (Olschewski, 1987; Grünau, 1994).

Hipofizden köken alan prolaktin, gebe köpeklerde yaklaşık olarak 30. günden başlayarak 40-50 ng/ml plazma değerine ulaşır (Onclin ve Verstegen, 1997). Buna karşılık gebe olmayan köpeklerin luteal döneminde plazma değerleri 5 ng/ml düzeyindedir (Onclin ve Verstegen, 1997; Kooistra ve Okkens, 2001).

LH ve prolaktin (PRL) eksikliği gebe ve gebe olmayan köpeklerde luteal regresyon için tek başına sorumlu değildir. Çünkü her iki hormon da geç luteal dönemde yüksek düzeyde bulunur (Hoffmann ve Schneider, 1993) ve luteal LH- ve PRL-reseptörlerinde bu dönemde bir azalma gözlenmemektedir (Fernandes ve ark., 1987). Luteal dönemin en geç ikinci yarısından başlayarak LH ve özellikle prolaktin luteotrop faktör olarak etkili olmaktadır. Onclin ve Verstegen (1997), prolaktini köpekte en önemli luteotrop faktör olarak tanımlamışlardır. Prolaktin salınımını durdurucu dopamin agonistleri progesteron salınımında düşümlere neden olmaktadır (Okkens ve ark., 1990).

Geviş getiren hayvanlar ve kedinin aksine köpekte plasental östrojen salınımının gebelikte önemi yoktur. Diğer türler için östrojen salınımına bağlı olarak uterus ve plasentadaki gelişim, miyometriyumda prostaglandin ve oksitosin reseptörleri oluşumunun sağlanması, mammogenez ve laktogenezin desteklenmesi ve genital kanalın doğum için hazırlanması gibi geçerli olan fonksiyonların köpek için geçerli olmadığı ortaya konmuştur (Döcke, 1994). Proöstrus ve östrusun bir döneminde yüksek olan östradiol 17β ve östron sülfat değerleri yaklaşık 5-10 gün sonra 10 pg/ml değerinin altına düşer (Olson ve ark., 1982; Concannon, 1986). Gebe ve gebe olmayan köpekler arasında perifer östradiol düzeyleri bakımından bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Nett ve ark., 1975; Reimers ve ark., 1978; Döcke, 1994; Anadol, 2006).

Relaksinin erken invazyon dönemindeki önemi tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Bu hormon köpekte fetal plasenta tarafından yapılmakta

(Klonisch ve ark., 1999) ve köpekte gebeliğin 26-30. günlerinden başlayarak serumda saptanabilmektedir (Steinetz ve ark., 1990, 1996; Alaçam ve ark., 2005). Relaksinin matriksi yumuşatıcı etkisi olduğu sanılmaktaysa da bu etkinin nasıl oluştuğu tam anlamıyla bilinmemektedir. Relaksin endometrial stroma hücrelerinin desidualizasyonunda rol oynamakta ve doku gelişimini gerçekleştirerek implantasyon için uygun ortamı oluşturmaktadır (Chen ve ark., 1988; Zhu ve ark., 1990). Relaksin nidasyon için gerekli doku hazırlığını sağlayarak anjiyogenezisi geliştirir (Einspanier ve ark., 2002) ve doku gelişimini sağlayan enzimleri aktive eder (Hwang ve ark., 1996). Relaksinin bu fonksiyonu ovaryumda da bulunur. Korpus luteum oluşurken sürekli gelişim, yapım ve anjiogenezis aşamaları açısından önem taşımaktadır (Dickson ve ark., 2001). Einspanier ve ark. (2002), beagle ırkı köpeklerde, gebeliğin 20-25. günlerinde relaksin düzeylerini 8,6 ve 33,7 ng/ml arasında saptamışlardır.

İmplantasyon öncesi köpeğin vitellus kesesi sıvısında oksitosin (OT) ve arjinin vazopresinin (AVP) varlığı, bu peptitlerin endometriyal oksitosin reseptörlerinin downregülasyonunda ve fetal gelişimde katkıları olduğunu düşündürmektedir. İnsan ve tek tırnaklı türlerde embriyonal yavru keselerindeki OT ve AVP peptitlerinin embriyo tarafından üretilip üretilmediği ortaya konamamıştır. Fakat embriyo oksitosinaz üreterek OT ve AVP peptitlerinin aşırı üretimini dengelemektedir (Waelchi ve ark., 2000).

Fetal sitotrofoblastlardan ve uterus endometriyum hücrelerinden salınan relaksin benzeri faktör de aynı etkiye sahiptir (Klonisch ve ark., 1999). Harvey (1991) blastosist hatching aşamasında ve trofoblastın maternal dokuya girişi sırasında yangı reaksiyonlarının oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu yangı reaksiyonuna bağlı olarak akut-faz proteinlerinin serumda, gebeliğin 28. günden başlayarak arttığı gözlenmiştir (Evans ve Anderton, 1992). Yangı reaksiyonlarındaki bu artışın serumdaki ölçülebilir interleukin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör (TNF) artışından önce gerçekleştiği saptanmıştır (Yamashita ve ark., 1994).

1.4. Köpeklerde Gebelik Döneminde Rol Oynayan Faktörler

Memeli canlı türlerinin çoğunda gebeliğin oluşması ve devamında hem embriyonik hem de maternal faktörler etki gösterirler. Köpeklerde trofoblastlar tarafından üretilen proteinler ve mekanizmaları tam anlamıyla ortaya konamamıştır. Ayrıca diğer pekçok memelide olduğu gibi fertilizasyon sonrası erken gebelik faktörü de belirlenememiştir (Koch ve Ellendorff, 1986; Knotek, 1990; Bose, 1997; Cavanagh, 1997; Lash ve Legge, 1997).

Ovulasyondan sonra ruptur oluşmuş follikül bölgesinde kalan granüloza ve teka hücrelerinde LH ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (ILGF-1) gibi asıl luteinizasyon stimülatörleri aracılığı ile bu luteal hücrelerde değişim gerçekleşir (Reynolds ve Redmer, 1992). Anjiogenezis vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), LH ve IGF-1 tarafından uyarılarak, ovulasyondan sonraki luteinizasyon ve erken gebelik sürecinde luteal dokunun damarlaşmasında önemli rol üstlenir (Goede ve ark., 1998).

Çok sayıda memeli türünde gebeliğin anne tarafından tanınması ve devamlılığının birçok faktöre bağlı olduğu bir gerçektir. Bu süreç, anne ve fötüs arasında sitokinlerce düzenlenmekte ve mekanizmaların çoğu pre implantasyon dönemindeki embriyo tarafından başlatılmaktadır (Schäfer-Somi ve ark., 2006).

Köpeklerde pre implantasyon döneme ait uterusda IFN- γ ve CD-8+ yüzey molekülleri tespit edilmiştir. Progesteron reseptörü, siklo-oksijenaz 1 (COX-1), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), leukemia inhibitör faktör (LIF), MHC-I ve -II ayrıca MMP-2 ve -9 tüm uterus dokularında tespit edilmiştir. Uterusta gebeliğin erken döneminde interleukin-6 ve -8 (IL-6, IL-8) belirlenememiş buna karşın diöstrus döneme ait uterus dokusunda IL-6, pre

implantal embriyoda ise IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-9, HGF ve LIF belirlenmiştir. On günlük embriyolarda sadece COX-2, IGF-2 ve IL-8 saptanabilmiştir (Schäfer-Somi ve ark., 2006).

İmplantasyon öncesi gebelik döneminde uterus ve embriyolarda belirlenmiş önemli faktörler Çizelge 1.3.'de sunulmuştur (Schäfer-Somi ve ark., 2007).

Çizelge 1.3. İmplantasyon öncesi dönemde gebeliğin oluşmasında rol oynayan faktörler (Schäfer-Somi ve ark., 2007).

Faktörler	Reseptörler	Preimplantal dönem uterus 10. gün	Preimplantal dönem embriyo 10. gün	Erken diöstrus dönem uterus 10. gün
Reseptörler	P4-reseptör	+	-	+
PG sentez molekülleri	COX-1	+	-	+
	COX-2	-	+	-
Büyüme faktörleri	TGF- β	+	+	+
	TNF- α	-	+	+
	GM-CSF	-	-	-
	IGF-1	+	+	+
	IGF-2	-	+	-
	HGF	+	+	+
İnterleukinler	IL-6	-	+	+
	IL-8	-	+	-
	LIF	+	+	+
	IFN- γ	+	-	-
İmmun hücre reseptörleri	CD-4	-	+	+
	CD-8	+	-	-
MHC	MHC-I, -II	+	-	+
MMP	MMP-2, -9	+	+	+

(COX: Siklo-oksijenaz, TGF: Transforming büyüme faktörü, TNF: Tümör nekrozis faktör, GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör, IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü, HGF: Hepatosit büyüme faktörü, IL: İnterleukin, LIF: Leukemi inhibitör faktör, IFN: İnterferon, MHC: Doku uyuşum antijeni, MMP: Matriks-metalloproteinaz)

Makrofaj olarak embriyonun korunmasında rol oynayan lökositler erken gebelik döneminde uterusunda bulunan bir hücre tipidir (Watts ve ark., 1998). İlginç bir bulgu da sitoplazmik ve antinükleer antikörlerin hem gebe hem de gebe olmayan her köpekte post kopulasyon 25. ve 35. günlerde ortaya konması olmuştur (Pollak ve ark., 2001).

Köpek embriyosunun dört aşamalı bölünmeden başlayarak, bir başka deyişle salpinks pasajı sırasında protein sentezi yeteneği olduğu ortaya konmuştur. İnsanlarda gebeliğin ilk trimester aşamasında yükselen fetoprotein ve 2- α glikoproteinlerin gebe köpeklerde de arttığı saptanmıştır (Yamada ve ark., 1993; Von Schoultz ve ark., 1976). Antijen ve mitojen olarak lenfosit reaksiyonları aracılığı ile aktive edilen progesteron, fetoprotein ve 2- α glikoproteinlerin in-vitro yapılan deneyler sonucunda immunosupresif etkili olduğu gözlenmiştir (Murgita ve Tomasi, 1975). Maternal ve fetal kökenli T-baskılayıcı hücreler humoral ve selüler bağışıklığı aktive etme ve hücreler arası iletim fonksiyonlarını düzenlemede etkilidirler. Köpekte T-baskılayıcı hücrelerden salınan faktörler, gebelik döneminde immunitiyi baskılamakta sorumludurlar (Lloyd, 1983). Buhi ve ark. (1992, 1993, 1995) tarafından köpeklerde bu konular üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, köpek endometriyumu ve fetal membranlar üzerinde çeşitli proteinlerin (cP5, cP6, RBP, CUPD) immunolokalizasyonları araştırılmış, gebe ve gebe olmayan köpekler arasında herhangi bir farklılık olmadığı ortaya konmuştur.

Pek çok canlı türünde, trofoblastik kökenli interferonların (IFN) preimplantasyon dönem için önemi ortaya konmuştur. İnterferonların çeşitli fonksiyonlarından olan; antiluteolizis veya antimikrobiyel, antiviral, immunmodulatör etkileri halen tartışılan konulardandır (Schafer-Somi, 2003).

Pre implantasyon dönem uterusda IFN- γ varlığı kanıtlanmıştır. Bu faktörün domuzlarda (Tayade ve ark., 2006) ve farelerde (Ashkar ve ark., 2000) gebelik sürecindeki anjiogenezisi düzenlediği kanıtlanmıştır. IFN- γ oluşumu farelerde olduğu gibi embriyonun kendisi tarafından veya intrauterin doğal öldürücü hücreler (NK) tarafından ya da diğer mekanizmalar tarafından başlatılmaktadır. Erken gebe köpeklerde IFN- γ oluşumu T-lenfositleri tarafından artırılabilir (Raziuddin ve ark., 1995).

İnterferonlar, embriyonun sitokin üretimi, gebeliğin anne tarafından tanınması ve gebeliğin devamı hakkındaki bilgiler köpeklerde oldukça azdır. Harvey ve arkadaşları (1993), üç ve dört hücre aşamasındaki köpek embriyosunun protein üretiminde bir azalma olduğunu ortaya koymuşlar ve bu durumun embriyonun protein üretimindeki bir artıştan önce olabileceğini savunmuşlardır. Dolayısıyla maternal protein üretiminden kontrollü embriyonik protein üretimine dönüşümün bu dört hücreli embriyonik dönemde gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Köpek embriyosu tarafından üretilen peptitler ve proteinlerle ilgili bilgiler oldukça sınırlı kalmıştır (Schafer-Somi, 2003).

T-yardımcı-1 ve T-yardımcı-2 (Th1, Th2) sitokinleri uterus dokusunda bulunmaktadır ancak dağılımları gebe ve gebe olmayan köpekler arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılık progesteron reseptörlerinin (PR) oluşum farklılığı ile açıklanabilir, embriyonik faktörler maternal uterus dokusunda PR oluşumunun düzenlenmesini sağlamaktadırlar (Tabibzadeh ve ark., 1999).

Siklooksijenazlar (COX) veya Prostoglandin-Ednoperoksidaz H-sentez Mediyatörleri (PGHS) prostoglandinlerin araşidonik asitten sentezlerinde önemli rol oynayan enzimlerdir. COX-1 neredeyse tüm doku ve hücrelerde saptanabilirken, COX-2 ise birçok dokuda bulunmamakla birlikte büyük bir hızla gelişme faktörleri, tümör promotörleri, hormonlar, bakteriyel endotoksinler veya sitokinler tarafından uyarılırlar (Smith ve ark., 1996). Siklooksijenazlar yangı oluşumunda, ateşli durumlarda, ağrı durumunda veya tümör oluşumu sırasında rol oynarlar. COX-2 özel olarak reproduksiyon süreci ile ilgilidir ve fonksiyonları basit olarak ovulasyon, fertilizasyon, implantasyon ve desidualizasyondur (Dinchuk ve ark., 1995; Lim ve ark., 1997; Davis ve ark., 1999). COX-2, prostaglandin sentez aktivasyonunun yanında embriyonik ve endometriyal sitokinlerin düzenlenmesinde de önemli role sahiptir.

Hoffmann ve ark. (1996) siklooksijenaz salınımını durdurucu indometazin uyguladıktan sonra, gebelik süresinin uzadığını saptamışlardır.

İmplantasyon sürecinde COX-2 trofoblast hücrelerinde ve endometriyumda blastosistin temas alanlarında saptanmıştır (Das ve ark., 1999; Kim ve ark., 1999). COX-2 knockout farelerde anovulasyon, implantasyon ve desidualizasyon bozukluğu gözlenmiştir (Lim ve ark., 1997).

Köpeklerde ve pek çok memeli türünde progesteron (P_4), gebeliğin oluşması ve devamında gereklidir (Siiteri ve Stites, 1982; Concannon ve ark., 1989). Progesteron lösemi inhibitör faktörün endometriyal sentezini uyarır (Ace ve Okulicz, 1995). Tavşan uterusunda implantasyondan hemen önce maksimum düzeyde leukemia inhibe edici faktör (LIF) ve reseptörleri, tavşan blastosistinde ise LIF mRNA varlığı saptanmıştır. Bu nedenle köpeklerde LIF'nin fötomaternal ilişkide ve implantasyonda rol aldığı düşünülmektedir (Lei ve ark., 2004).

Gerber ve ark. (1979), geç gebelik dönemindeki köpeklerin uterus venalarından aldıkları kanda, PGE_2 ve PGI_2 'nin yüksek düzeylerini ölçmüşler buna karşılık $PGF2\alpha$ 'nın düzeyinin düşük olduğunu saptamışlardır.

IL-6, 26kD ağırlığında değişik fonksiyonları olan bir sitokindir. Makrofajlar ve aktif T-hücreleri dışında fibroblast, mast hücreleri, endotel hücreleri ve epitel hücrelerden salınır (Akira ve ark., 1990; Kishimoto, 2005). IL-6 başlangıçta B-lenfositleri plazma hücrelerine dönüştürücü faktör olarak tanınmış (Hirano ve ark., 1986) ve devam eden çalışmalar sonucunda IL-6'nın T-hücrelerini aktive eden ve hepatositlerin hücre yüzeylerinden akut-faz proteinlerinin salınımını sağlayan fonksiyonları olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca hematopoetik öncül hücrelerin hücre gelişimini stimüle etmektedir. IL-1 α/β , TNF- α ve lipopolisakkaritler (LPS), IL-6 salınımının aktif indükleyicileridir (Van Snick, 1990).

Pre implantasyon döneminde uterusda tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) olmamasının erken gebelik döneminde yarar sağladığı düşünülmektedir (Agarwal ve ark., 2000). İnsanlarda menstural siklusun sekretorik aşamasında endometriyal epitel hücrelerindeki TNF- α 'nın yeniden yapılması endometriyal kanama ve doku dökülmesi mekanizmasında önemli bir faktördür (Tabibzadeh ve ark., 1994, 1995, 1999).

Pre implantasyon döneminde insan embriyolarında belirlenmiş genler, aynı dönemde köpek embriyosunda da belirlenmiştir. Maternal dokulardaki jelatinolitik aktivite artışı, TNF- α , IL-6, TGF- β ve LIF'lerin jelatinolizisi azaltıcı etki göstermesi sonucu bazal membranlarda oluşan denge embriyonik invazyon düzenine katkıda bulunur. Koyun, domuz ve ineklerden elde edilmiş pre implantasyon dönem embriyolarda IL-6 varlığı belirlenmiştir. IL-6'nın embriyo gelişimine destek olduğu ve plasentasyonda rol aldığı düşünülmektedir. TGF- β 'nin lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği ve LIF'nin endometriyal oluşumunu düzenlediği bilinmektedir (Meisser ve ark., 1999). TNF- α çok yönlü etkiye sahiptir; gebelik zamanına, hücre katmanı durumuna, hormonal çeşitli özel faktörlerin oluşumuna bağlı olarak etkisini gösterir. Düşük miktarlarının endotelial hücrelerin gelişimine destek oldukları düşünülmektedir (Fajardo ve ark., 1992).

Luteinizasyon, daha ovulasyon döneminde neovaskularizasyonun organizasyonu ile başladığından ve bu dönemde IL-6 saptandığından dolayı IL-6'nın erken luteal dönemde anjiogenezisi desteklediği ortaya konmuştur (Motro ve ark., 1990; Vinatier ve ark., 1992).

1.5. Köpek Embriyolarının Toplanması

Köpek embriyolarının toplanması ya ovariohisterektomi ya da laparotomi sonrası kornularının yıkanması yöntemiyle yapılabilir. Endoskopik yöntem ile kornuların yıkanması ve embriyo elde edilmesi, çiftleşme sonrası

yedinci ve on birinci günlerde başarısız olmaktadır. Çünkü eksternal servikal bölümün aşağı yönde olması nedeniyle kateter kanala geçirilememektedir (Tsutsui ve ark., 2001).

Archbald ve ark. (1980), çiftleşmeden sekiz ve on iki gün sonra midventral laparotomi uygulayarak yaptıkları yıkama ile embriyo elde etmişler ve bu amaçla vaginal kanala balon manşetli Foley kateteri yerleştirilerek kateterin ucunu eksternal servikal bölüme yönlendirmişlerdir. Kornu uterusun uterotubal bölümünden 3 cm uzağına 18G'luk iğne yerleştirilmiş, vaginada bulunan manşet şişirilerek ipsilateral kornu uteriye ait olan uterotubal bölüm kapatılmıştır, sonra uterotubal bölüme fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) enjekte edilmiş ve yıkama sıvısı petri kabında toplanmıştır. Bu yöntemle her bir kornudaki embriyolar birbirinden ayrı ve güvenli bir şekilde toplanabilmiştir. Çiftleşme sonrası 5-15. günler arasında olan on beş köpeğin altısında (%40) 4-28 adet embriyo elde edilmiştir. Köpeklerde çiftleşme günü ile fertilizasyon günü uyuşmadığı için toplanan embriyoların 2-3 gün daha genç oldukları saptanmıştır.

Diğer bir çalışmada (Tsutsui ve ark., 2001) köpek embriyolarının toplanmasında histerektomi sonrası yöntem ve laparoskopik yöntemin etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada dişi köpeklerin kan progesteron düzeylerine bakılarak ovulasyondan 2-5 gün sonra köpekler çiftleştirilmiştir. Histerektomi yöntemiyle ovulasyon sonrası 8-11. günlerde kornular alınmış hem ovidukt hem de kornular yıkanmıştır. Embriyo toplama başarısı 16 köpekte toplam olarak %97.1; 13 köpekte ise %100 olarak bulunmuştur. Laparoskopik cerrahi yöntemde ise 3 adet köpekte çiftleşmeden sonra 8-11. günlerde laparotomi yapılmış ve 21G'luk iğne uterus kornusunun apeks bölümüne yerleştirilerek kaudale doğru yıkama yapılmıştır. Bu yöntemle embriyo toplama başarısı %42.5 olarak bulunmuştur.

Embriyo toplama başarısındaki bu farklılığın histerektomi grubuna ait kornuların tam olarak yıkanabilmesi ve toplanabilmesi olduğu sonucuna

varılmıştır. İki çalışma grubu da farklı yıkama solüsyonları (PBS, Ringer solüsyonu ve köpek serumu) kullanmalarına rağmen sonuçlar üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Tsutsui ve ark. (2001), çiftleşme sonrası toplanan embriyoların yaşına göre gelişim aşamalarını; çiftleşme sonrası 8. günde 8-16 hücreli embriyolar ve az miktarda morula aşamasında embriyolar, çiftleşme sonrası 11. günde ise genellikle kompakt embriyolar olarak gruplandırılmıştır. Embriyoların %5,9 oranında dejenere olduklarını saptamışlardır.

1.6. Doku Uyuşum Antijenleri'nin (MHC) Yapısı, Etki Mekanizması, Yapımını Etkileyen Faktörler

Doku uyumu antijenleri (major histokompatibilite kompleksi, MHC) membran spesifik glikoproteinleri tanımlayan ardışık bir gen grubudur. MHC moleküllerinin iki özelliği bulunmaktadır: bir taraftan her gen için birçok allel gen içerdiklerinden yüksek düzeyde polimorfizm gösterirler, diğer taraftan ise poligendirler. Bir başka deyişle değişik yapılarda aynı görevi üstlenen birçok izotipleri bulunmaktadır. MHC-I ve MHC-II moleküllerinin birbirinden ayrımı yapısal ve işlevsel özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Gromme ve Neefjes, 2002). MHC-I molekülü heterodimerdir (Dimer: iki alt yapıdan oluşan molekül, heterodimer: iki alt yapının birbirinden farklı olması). Bu moleküller membrana bağlı glikolize moleküller ağırlığı 45kDa olan ağır polipeptid zincirden (ağır zincir) ayrıca 12 kDa büyüklüğünde olan β -mikroglobulin-protein (hafif zincir) yapıdan oluşur. MHC-II molekülü de heterodimer yapıdadır. Bu molekül α (34kDa) ve β (29kDa) transmembran glikoprotein zincirden oluşmaktadır. Bu zincirler kendilerine ait iki domain (proteinin kendine ait parçası) tarafından bağlanırlar. Peptid oluşturan polimorf bölüm bu molekülde α_1 ve β_1 domainlerinden oluşurken, α_2 ve β_2 domainleri polimorf olmayan bölümü oluşturmaktadırlar. Bir transmembran alan ve bir stoplazma alanı MHC-II molekülünün üçüncü ve dördüncü bölümünü

oluşturmaktadırlar. MHC-II molekülleri profesyonel antijen oluşturan hücreler olan dendritik hücreler, monositler, makrofajlar ve B-lenfositler tarafından salınırlar (Chicz ve ark., 1992; Janeway, 2001).

MHC-I molekülleri sitozolik proteinlerden kaynaklanan peptidleri oluştururlar. Bu peptidlerin kökeni selüler proteinlerin yanında, viral ve bakteriyel proteinlerde olabilmektedir (Howard, 1995). MHC-II moleküllerinden ise çoğunlukla ekzojen kökenli peptid ve proteinler oluşmaktadır (Nagata ve ark., 2001).

Doku uyumu antijenleri (MHC) enfeksiyonlara karşı immun yanıtta önemli olan ve çeşitli otoimmün bozukluklarla ilgili bir gen kümesidir. MHC genleri peptidler ve T-hücreleri reseptörleri ile etkileşim kurarak bu antijenleri T- hücrelerine sunarlar. Genel olarak CD-4 molekülleri MHC-II reseptörüne, CD-8 ise MHC-I molekülüne bağlanır. T- hücrelerinin aktivasyonu için, T-hücreyi yüzeyindeki ön uyarıcı bir sinyalin antijen sunan hücrelerde yeterli miktarda bağlantısının olması gerekmektedir (Wagner, 2003). MHC genlerinin bazı bölümleri hücre içi işlemlerde ve peptidlerin transferinde veya Tümör Nekrozis Faktör (TNF) gibi sitokinlerin kodlanmasında gereklidir. Köpekte MHC'nin bir segmentinde TNF için iki gen uyumaktadır (Wagner ve ark., 2005).

Köpeklerde MHC, köpek lökosit antijen (DLA) bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Vriesendorp ve ark., 1971). Bunun nedeni MHC genlerinin alojenik doku reaksiyonları ve tümör oluşumunda önemli rol oynamasıdır (Barth ve ark., 1956). Köpek MHC bölgesi kromozom 12 üzerinde bulunur ve bu bölge üzerinde bazı dizilimler insan kromozomu dizilimine oldukça benzemektedir. Bu genlerin bazıları protein üretimi ile de yakından ilgilidirler (Wagner ve ark., 2002). Son çalışmalar ışığında köpeklerde MHC sınıf II genlerinin önemi ortaya konmuş ve bu bölge üzerinde 23 adet mikro satelit markers saptanmıştır (Debenham ve ark., 2005). Fakat köpeklerde sınıf I ve II gen fonksiyonları üzerine yapılan

çalışmalar sınırlı sayıdadır. Ayrıca maternal ve fetal MHC genlerinin gebeliğin devamı üzerindeki etkileri tam olarak ortaya konamamıştır. Sınıf I MHC genlerinin sitotoksik T-lenfositleri için reseptör gibi görev yaptıkları düşünülmektedir (Felsburg ve ark., 1998). MHC-II molekülleri APC (antigen presenting cells: antijen sunan hücreler), B-lenfositleri ve bazı türlerde aktif T-lenfositleri ve endotelinler tarafından salınırlar. Tüm köpek lenfositleri (stimüle olmamışlar dahil) ve APC'ler MHC-II oluşturmaktadır (Cobbold ve Metcalfe, 1994).

1.7. Doku Uyuşum Antjenlerinin Reprodüktif Sistem Üzerindeki Etkisi

İnekte yapılan bir çalışmada MHC-II molekülünün ekspresyonu (genlerin ait oldukları proteine dönüşümü) luteolizis döneminde luteal hücrelerde artış gösterirken, gebelik döneminde azalma görüldüğü ortaya konmuştur. MHC-II molekülünün ekspresyonu yönünden gebelik korpus luteumu, 18. gündeki siklik korpus luteumla karşılaştırıldığında tüm hücre tiplerinde istatistiksel yönden gebelik korpus luteumunda daha düşük olduğu ($p < 0,05$) ortaya konmuştur (Fairchild ve Pate, 1991). Buna karşılık MHC-II antijeni domuzda yapılan bir çalışmada siklusta uterusu belirlenemezken, gebeliğin 15. gününde uterusu ve özellikle endotel hücrelerde yüksek düzeyde saptanabilmiştir (Cencic ve ark., 2003).

Koyunlarda MHC-I moleküllerinin gebelikte endometriyal stroma ve glanduler epitelyumda ekprese edildiği buna karşılık implantasyon döneminde trofoektoderimde belirlenmediği ortaya konmuştur. Çalışmada implantasyon sırasında endometriyal luminal epitel, süperfisial glanduler epitel ve trofoektoderimde MHC-I moleküllerinin bulunmayışının konseptusun immun yetersizlikten korunması için gerektiği sonucuna varılmıştır (Choi ve ark., 2003).

Kısırlıklarda MHC üzerine geniş çaplı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar ışığında önemli bir bulgu olarak equin trofoblastın endometrial kuplara invazyonu döneminde maternal ve paternal MHC varlığı ortaya konmuştur. MHC-I sadece korionik kıvrımlarda saptanmıştır (Crump ve ark., 1987; Donaldson ve ark., 1990). Bunun yanında endometrial kuplarda hangi mekanizma tarafından MHC-I sisteminin başladığı, düzenlendiği ve down regüle edildiği henüz açıklanamamıştır. Klein (1986) tarafından erken embriyonik gelişim sürecinde MHC bağlanma bölgesinin varlığının gerekliliği savunulmuştur. İn-vitro yapılan çalışmalar sonucunda equin MHC sınıf I antijenlerinin lenfosit sitotoksitesini kontrol ettiği ve baskıladığı ortaya konmuştur. Bu mekanizmanın diğer memeli türlerinde de (O'Brien ve Yuhki, 1999) embriyonik yaşamın devamı için gerekliliği ortaya konmuştur. Bununla beraber equide türlerinde aşırı MHC polimorfizmi sayesinde enfeksiyonların önlenmesi ve saf kan yetiştiricilik için bireysel direnç gelişimi sağlanabilmektedir (Antczak, 1992).

Normal olarak "immün olmayan hücreler" MHC antijenini açığa çıkarmazlar. IFN- γ , tüm aktive olmuş T-hücreleri ve makrofajlar (Alm, 1987) TNF- α aktive makrofajlar veya korpus luteumun bağ dokuları (Terranova ve ark., 1995) ve epitel hücreleri MHC-II antijeninin ortaya çıkmasını sağlarlar ve immün hastalıkların patogenezi ve oluşumunda rol alırlar (Roitt ve Cooke., 1987). Granüloza hücreleri ovaryum fonksiyon yetersizliği olan durumlarda aşırı ölçüde MHC-II antijeni salarlar (Hill ve ark., 1990).

MHC-II ile siklik korpus luteumun dönüşümü sırasında immün hücrelerinin azalması arasında önemli bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Pate, 1995). Luteal dönemin sonuna doğru MHC-II pozitif hücrelerde artış meydana gelmektedir (Hehnke ve ark., 1994; Bukovsky ve ark., 1995).

MHC-II pozitif hücrelerin immunohistolojik olarak boyanmalarından sonra yapılan sayımda, domuzda tohumlamanın yapılmış olduğu kornu uteride, diğer kornuya göre önemli derecede fazla MHC-II pozitif hücre

bulunduğu ortaya konmuştur. Tohumlamadan sonra tohumlamanın yapıldığı taraftaki uterotubal bağlantıda diğer tarafa göre sayı bakımından önemli bir farklılık olduğu ortaya konmuştur. Yüzey epitelinde tohumlamanın olmadığı uterotubal bağlantı bölümünde MHC-II pozitif hücre ortalaması 2,5 olarak bulunurken, tohumlamanın yapıldığı kornu tarafında ortalamanın 4,0 olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Domuzlarda tohumlamadan 2-4 gün sonra uterus bezlerinin çevresinde MHC-II pozitif hücrelerde önemli bir artış olduğu saptanmıştır (Bischof ve ark., 1994).

1.8. Matriks Metalloproteinazların (MMP) Yapısı, Etki Mekanizması ve Yapımını Etkileyen Faktörler

Matriks metalloproteinazlar (MMPIler) çinkoya bağlı proteolitik enzim grubudur, matriksin yıkılmasında, yapılanmasında ve hücre göçü aşamalarında önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Woessner, 1991). Dolayısıyla bu enzimlerin plasantasyon sürecinde önemli fonksiyonları olduğu düşünülmektedir.

MMP ailesinden MMP-2 (Jelatinaz A, 72kD) ve MMP-9 (Jelatinaz B, 92kD) bazal membran yapılarının (kollojen IV, laminin, fibronektin) ve diğer hücre dışı matriks proteinlerinin yıkılmasından sorumludurlar (Woessner, 1991; Marbaix ve ark., 1992; Zhang ve ark., 2000). Köpeklerde MMP-2 ve MMP-9'un jelatinolitik aktivitesinin doku yıkılmasında bir indikatör olduğu düşünülmektedir. Bu enzimler hücrelerde latent formda salınırlar ve hücre dışı ortamda diğer MMP'ler veya diğer enzimler ile aktive edilirler. MMP-2 ve MMP-9'un latent formları çeşitli dokularda bulunurlar ve özellikle MMP-2 dokuların her yerinde saptanabilmektedir (Coughlan ve ark. 1998).

İmmunohistokimyasal yöntem ile MMP'lerin doku bölümlerindeki dağılımı ortaya konabilmektedir. Ancak, mevcut antikolar ile MMP'lerin latent ve aktif formlarını birbirinden ayırt etmek mümkün olmamaktadır. Jelatin

Zimografi tekniği aracılığı ile yarı kantitatif MMP miktarlarının değerlendirilmesi olanaklıdır. Fakat bu teknik MMP'nin hücre içi kaynağının belirlenmesinde kullanılamamaktadır ve bu nedenlerden dolayı her iki tekniğin bir arada kullanılması önerilmektedir (Walter ve Boss, 2001).

MMP'ler dokuların yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal doku gelişimi gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynarlar. Ayrıca tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (Walter ve Boss, 2001).

MMP'leri inhibe eden bazı faktörler bulunmaktadır ve en önemli faktörlerinden biri olan metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP'ler) *invivo* koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlere göre değişmekte ve bunlar arasındaki oran değişik patolojik durumların patogenezisinde önemli bir rol oynayabilmektedir (Clausen, 2005).

Ekstrasellüler matriks (ECM), proteinleri ve proteoglikanları içeren, organizmalara yapısal destek sağlayan ve aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ile kaynaşma ve doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede etkisi olan bir yapıdır. ECM; sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre aktivitesi ve yenilenmesini metalloproteinazlar aracılığı ile ortaya koyar (Clausen, 2005).

MMP, ekstrasellüler matriksi parçalayan, nötral pH'sı olan aktif bir endopeptidaz ailesidir. MMP'lerin tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ doku hücrelerinden salgılanırlar. MMP'ler yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusunun fizyolojik fonksiyonları, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldıkları gibi aynı zamanda artrit, tümör hücresinin invazyonu

ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar. Kanserde ECM tümör dokusunun büyümesini ve tümör hücrelerinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (Ennis ve Matrisian, 1994; Sethi ve ark., 2000).

MMP'ler implantasyon ve desidua oluşumunun asıl mediatörleridir (Alexander ve ark., 1996). İmplantasyonun oluşabilmesi uterus stromasının ekstra selüler matriks tarafından degrade edilmesine (degrado: ayrışma, yıkılma) bağlıdır (Librach ve ark., 1994). Matriks metalloproteinazlar çinkoya bağlı nötral endopeptidaz ailesi olarak bilinirler ve ekstraselüler matriksin tüm elemanlarını yıkılma özelliğine sahiptirler (Hidalgo ve Eckhardt, 2001).

MMP'ler yapıları ve kimyasal özelliklerine göre beş kategoriye ayrılmaktadırlar (Evans ve ark., 1997).

1-Kollajenazlar: MMP-1, MMP-8, MMP-13

2-Jelatinazlar: MMP-2, MMP-9

3-Stromelisinler: MMP-3, MMP-10, MMP-11

4-Membran tip metalloproteinazlar

5-Gruplandırılmayan MMP'ler ve MMP'lerin endojen inhibitörleri (TIMP'ler).

Son zamanlarda membran tip metalloproteinazlara metalloproteinaz-1 ve 5 (MT-MMP) ve MMP ailesinin proteolitik üyesi olan interstisyel kollajenazlar eklenmiştir. Nötrofil kollajenaz (MMP-8), kollajenaz-3 (MMP-13), jelatinaz A (MMP-2), jelatinaz B (MMP-9), stromelisin 1 (MMP-3, Transin), stromelisin-2 (MMP-10), stromelisin-3 (MMP-11), matrilizin (MMP-7), metalloelastaz (MMP-12) gibi metalloproteinazlar kollajenaz, jelatinaz ve stromelisinlere bağlı önemli üyeler olarak tanımlanırlar Matriks metalloproteinaz ailesinin önceden tanımlanmış 7 üyesine birçok yeni metalloproteinaz eklenmesi ile bugün 25'den fazla enzim olduğu bildirilmektedir (Evans ve ark., 1997; Sethi ve ark., 2000).

İnvivo koşullarda, MMP aktivasyonunun düzenlenmesinde TIMP'ler önemli rol oynar. TIMP'lerin aktivitesi için bütünlüğü bozulmamış yapı gereklidir, yapısının bozulması ile aktivitesi ortadan kalkar (Nagase ve ark., 1996; Brew ve ark., 2000).

TIMP, MMP aktivitesini hem proenzim aktivasyonu aşamasında hem de substrat parçalanması sırasında düzenler. Diğer proteinaz inhibitörlerinde olduğu gibi bu aktivasyonu sadece spesifik lokalizasyonlarda ortaya çıkar. Özellikle makrofajlar olmak üzere pekçok hücrede üretilir ve salgılanır trombositlerde rezidüel olarak bulunur ve çeşitli dokular ile amnion sıvısı, sinoviyal sıvı gibi vücut sıvılarında yer alır. TIMP-1 spesifik olarak metalloproteinazlara karşı aktivite gösterir (Thorgeirsson ve ark., 1994; Tanaka ve ark., 2000).

TIMP-1'in eritrosit üretimini artırıcı etkisi vardır. Ayrıca hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile ortaya çıkan sellüler etkisi ile çeşitli hücre tiplerinde replikasyonu uyarır (Evans ve ark., 1997; Sethi ve ark., 2000). TIMP-3 ise ekstrasellüler matriksten transforme olmuş hücrelerin ayrılmasını kolaylaştırır ve morfolojik değişiklikleri başlatır (Thorgeirsson ve ark., 1994).

TIMP'lerin kemiklerin yeniden yapılanması, meme bezlerinin küçülmesi, korpus luteum yıkımının önlenerek hamileliğin devamının sağlanması gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. TIMP'ler, doku hasarı ve angiogenezi içeren çeşitli malign olmayan hastalıklarda da yer alırlar (Apakkan-Aksun ve ark., 2001).

Matriks metalloproteinazların transkripsiyon (RNA'dan DNA'ya sentez) ve ekspresyonu (genler tarafından proteine dönüşümün aktive edilmesi) gelişme hormonları, sitokinler ve steroid hormonları tarafından düzenlenmektedir (Salamonsen, 1999). MMP'lerin genlerinin yapısı tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte mRNA larının büyüme faktörü,

sitokinler, tümör promoterleri, onkojen ürünleri gibi çeşitli ajanlarla aktive edildiği bilinmektedir (Matrisian, 1990). Diğer indikatörler arasında Transforming growth faktör (TGF) α , tümör nekrozis faktör (TNF) α , epidermal büyüme faktörü (EGF), interleukin-1 (IL-1) ve östradiol bulunmaktadır. Retinoidler, TGF β , IFN- γ ve progesteron ise ekspresyonu durdurmaktadırlar (Benaud ve ark., 1998; Kim ve ark., 2002).

MMP'nin mRNA'sı kodlandıktan sonra translasyon (canlı hücredeki mRNA'dan protein oluşumu) gerçekleşir ve enzim proenzim formunda salınır. MMP aktivatörleri molekülde çinko ile etkileşimi bozarak ve proteolitik reaksiyona eşlik edecek olan çinkoyu serbestleştirerek, MMP latent molekülünde yapısal değişikliğe yol açarlar (Matrisian, 1990).

1.9. Matriks Metalloproteinaz'ların Reprodüktif Sistem Üzerindeki Etkisi

TGF-b insan trofoblast hücre kültürüne eklendiğinde TIMP-1 mRNA artışı ile birlikte trofoblastların yayılma özelliklerinde azalma olur. TIMP'ler ve MMP'ler deki artış, yavru gelişimi ayrıca yavru ve anne arasındaki bütünlüğün devamı için şarttır. Maternal TIMP-1'in fetal trofoblastların yayılmasına set çekmesi, onun metastaz sırasındaki organ gelişimine de engel olabileceğini düşündürmektedir (Khokha ve Waterhouse, 1994; Murray ve Lessey, 1999).

MMP-2'ler gebe farelerin uterusunda, subepitel stromada, blastosistlerin implantasyonundan hemen önce ve sonra salınmaktadır (Alexander ve ark., 1996; Das ve ark., 1999). MMP-2 ekspresyonu insan embriyolarında ender olarak trofoblastlarda (Huppertz ve ark., 1998) primatlarda ise trofoblast hücrelerinin tümünde saptanmıştır (Fernandez ve ark., 1992). Koyun ve domuzlarda, implantasyon derinlere alt tabakalara kadar ulaşmadığından (invaziv olmadığından) MMP'ler bu türlerde immunohistokimyasal yöntemle tam anlamıyla saptanamamaktadır (Menino ve ark., 1997).

Fizyolojik olarak pre menapozal dönemlerde bulunan kadınlarda MMP-2 aktivitesi sekresyon döneminde, proliferasyon ve menapoz döneminden daha yüksektir (Laird ve ark., 1999). Kendini matriks metalloproteinazların yetersiz ekspresyonu ile gösteren birçok patolojik reproduktif süreç konseptusun yetersiz implantasyonu ile sonuçlanmaktadır. Gebeliğin 13. gününde ölen rat embriyolarında belirgin ölçüde daha az düzeyde MMP-2 aktivitesi saptanmıştır (Dai ve ark., 2003). Yetersiz intrauterin gelişim gösteren gebeliklerde villi korialislerde de düşük MMP-2 düzeyi elde edilmiştir (Choi ve ark., 2003).

Normal endometriyuma göre, matriks metalloproteinaz değerlerinin endometriozis olgularında çok yükseldiği ortaya konmuştur (Osteen ve ark., 1996).

MMP'ler biyolojik süreçlerin yanında embriyogenezis, desidua oluşumu, plasentasyon gibi reproduktif gelişim aşamalarında katılmaktadırlar (Nelson ve ark., 2000). Normal dokularda çok az görülen MMP ekspresyonunun birçok malign tümörde yüksek olduğu saptanmıştır. Özellikle MMP-2 ve MMP-9, tümör yayılımı, metastaz oluşma potansiyeline ilişkin bulgu vermektedir (Rao ve ark., 1999; Curran ve Murray, 2000).

Üremede yer alan; ovulasyon, implantasyon, gebelik, doğum, laktasyon ve involusyonu içeren pekçok süreç TIMP ve MMP aktivitesine gereksinim gösterir. Fonksiyonel MMP-9 ve TIMP-1 mRNA fertilize olmamış oositlerde bulunmaktadır. Döllenmeden sonra, her ikisi de blastosit implantasyonu sırasında artmaktadır. Blastositin uterus epiteli ve stromayı invaze edebilme yeteneği MMP'ler ile ilişkilidir. Bu durum embriyo ve desidua tarafından üretilen TIMP'ler ile oluşan lokal değişikliklerle ortadan kaldırılabilir. Fare embriyosu gelişimi sırasında kollajenaz, jelatinaz ve stromelisin düzeyleri embriyonun implante olduğu zamanla uyumlu olarak artar (Clausen, 2005).

Eksojen olarak ortama TIMP-1 eklendiğinde blastosistin aşırı büyümesi ile ilgili olarak oluşan matriks yapısındaki parçalanma inhibe edilir. Ekstra plasental bölgede desidua bazalisi 7,5 günde invaze eden, hızla bölünen trofoblastlar yer almaktadır. TIMP-1 mRNA miktarında 6-8. günlerde gözlenen pik, embriyo gelişiminde en fazla invazyonun gözleendiği bu dönemle uyumludur (Clausen, 2005).

Yeni yapılan bir çalışmada (Schäfer-Somi ve ark., 2006) MMP-2 ve MMP-9 serum aktivitesinin köpekte gebeliğin pre implantasyon ve implantasyon döneminde, gebe olmayanlara oranla istatistiksel yönden önemli ölçüde yüksek olduğu ($p<0,01$) ortaya konulmuş ve bu yöntemle söz konusu dönemlerde uygulanan analizler ile köpeklerde gebeliğin tanınabileceği sonucuna varılmıştır.

Yukarıda belirtilen bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı, değişik gebelik dönemlerinde bulunan ve gebe olmayan köpeklerde, MMP-2, MMP-9, MHC-I ve MHC-II moleküllerinin uterusun katmanlarında saptanabildikleri bölgeleri, düzeylerini ve düzeylerindeki değişiklikleri araştırmaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. Hayvan Materyali

Çalışmanın hayvan materyalini, 2003-2004 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne istenmeyen çiftleşme anamnezi ile, ovariohisterektomi istemiyle getirilen ve gebeliğin çeşitli dönemlerinde bulunan, sağlıklı toplam otuz altı adet dişi köpek oluşturdu.

Çalışma materyalini oluşturan değişik ırklardaki (Alman çoban köpeği, Sibirya kurdu, terrier, melez ırk) köpeklerin yaş ortalamaları 1 ile 4 arasındaydı ($2,28 \pm 0,73$).

2. 1. 2. Hayvan Materyalinin Gruplandırılması

Otuz altı adet dişi köpek alınan anamneze göre en son çiftleşme tarihleri esas alınarak gebelik dönemlerine göre dört gruba ayrıldı. Sadece MMP-2 ve MMP-9 plasental labirent analizleri için ek bir grup (Grup 5; n=3) oluşturuldu. Köpeklerin preimplantasyon döneminde, implantasyon veya plasantasyon döneminde oldukları çiftleşme zamanı esas alınarak ve post operatif makroskopik değişikliklere bakılarak ortaya konuldu. Hem uterusu hem de yavruda oluşan değişikliklerin gebeliğin çeşitli dönemlerinde makroskopik değerlendirilmesinde Rüsse (1991)'nin bulguları göz önünde bulunduruldu.

Gruplar aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

Grup 1 (n=11): Bu gruptaki köpeklere son çiftleşme tarihinden 5-12 gün sonra ovariohisterektomi yapıldı. Operasyon sonrası uterus lumeni 25°C ısıdaki fosfatlı tampon solüsyonu ile yıkandı ve toplanan sıvı stereo

mikroskop altında değişik dönemdeki köpek embriyolarının varlığı tespit edilen hayvanlar gebe olarak kabul edildi.

Grup 2 (n=9): Bu gruptaki köpekler son çiftleşme tarihinden sonraki 15-19. günler arasında ovariohisterektomiye alınan köpeklerden oluşturuldu. Operasyon ile alınan uterus dokusu üzerinde implantasyon bölgeleri makroskopik olarak tespit edilerek köpeklerin gebelikleri son çiftleşme tarihleri göz önünde bulundurularak doğrulandı.

Grup 3 (n=9): Bu grubu gebeliklerinin 20-30. günleri arasında olduğu alınan son çiftleşme tarihi anamnezi ve ultrasonografi ile tespit edildikten sonra, ovariohisterektomiye alınan köpekler oluşturdu.

Grup 4 (n=4): Kontrol grubunu gebe olmayan, proöstrus kanama tarihi temel alınan köpekler oluşturdu. Proöstrus kanama tarihinin üzerinden 25-35 gün geçmiş ve çiftleşmemiş köpekler bu gruba dahil edildi.

Jelatin zimografi yöntemi ile gebe ve gebe olmayan köpeklerde MMP-2 ve MMP-9 miktarlarının tüm MMP değerlerine oranlanarak yapılan analizlerde, yukarıda anılan gruplara ek olarak 30-45. günlerde gelişen plasental labirent dokuları da değerlendirilerek yeni bir grup (Grup 5, n=3) eklendi.

2.1.3. Kullanılan Alet ve Malzemeler

2.1.3.1. Ultrasonografi Cihazı

Gebelik muayenesi ve gebelik günlerinin tespiti amacıyla PieMedikal® marka (6 - 8 Mhz linear prob, Hollanda) ultrasonografi kullanıldı.

2.1.3.2. Doku Örnekleri Saklama Malzemeleri

Ovariohisterektomi sonrası skalpel ile dokuların en az 1x1x1 cm büyüklüğünde olacak şekilde kesitleri alındı. Her doku materyali için çift örnekleme yapıldı. Kesitlerin bir örneği %4'lük formalin solüsyonu ile tespit edilerek immunohistokimyasal analizleri yapılana kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

Diğer doku kesitleri ise Tissue Tek® (Sanova Pharma GmbH, Viyana, Avusturya) kriyoprotektan medyum ile kaplandı ve hemen sonrasında alüminyum folyo ile sarılarak zimografi deneyleri yapılana kadar -86°C'de derin dondurucuda saklandı.

2.1.3.3. İmmunohistokimya Deney Malzemeleri

Formalin ile tespit edilen doku örnekleri Histo-Comp (Vogel®, Giessen, Almanya) kasetleri içinde otomatik parafin doku bloklama hazırlık cihazında (Tissue Tek® V.I.P. 2000, Miles Scientific, Mishawaka; IN) bloklanmak için hazırlandı. Aynı cihazda bulunan parafin distiler bölümü kullanılarak parafin bloklar elde edildi.

Hazırlanmış olan parafin blokların mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitleri alınarak poli-L-lizin kaplanmış (Sigma®, Viyana, Avusturya) lamalar üzerine yerleştirildi. Bu lamalar üzerinde parafin kesitlerin tespit edilebilmesi amacıyla etüv kullanıldı.

İmmunohistokimyasal boyama işlemleri için absolut etanol, etanol, metanol, ksilol, distile su, hidrojen peroksit (H₂O₂), sitrat solüsyonu, fosfatlı tampon solüsyonu, tris solüsyonu, keçi serumu, birinci ve ikinci antikolar, diaminobenzidin (DAB), hemalumn boya, kaplama medyumunu DPX (Fluka®, Buchs, İsviçre), lamel ve boyama küvetleri kullanıldı (yöntem bölümünde ayrıntılar verilecektir).

İmmunohistokimyasal deneyler sırasında coverplates adı verilen plastik parçalar lamlar ile karşı karşıya getirilerek doku kesitini içine alacağı bir odacık oluşturuldu. Bu işlem sayesinde; doku kesitleri mekanik etkilerden korundu, kurumasını önledi ve solüsyonların az miktarda kullanılması sağlanarak sarfiyat önledi. Daha sonra coverplate ile birleştirilmiş lamlar immun boyama merkez düzeneğine (Sequenza[®], Shandon, Pittsburgh, ABD) yerleştirildi.

Değerlendirmelerin yapılabilmesi ve görüntülerin alınabilmesi amacıyla dijital kamera ve mikroskop düzeneği (DN100; Nikon[®], Viyana, Avusturya) kullanıldı.

2.1.3.3. Jelatin Zimografi Deney Malzemeleri

Elektroforezis yapılacak jellerin hazırlanması için, toz jelatin (Sigma[®]), akril bisakrilamid, akrilamid, distile su, hidroklorik asit, tris tamponu, sodyum dodesil sülfat (SDS, Gerbu[®], Gaiberg), amonyum persülfat, etanol, propanol, temed (tetrametiletilediamin, Serva[®], Heidelberg) gibi kimyasallar ve plak jellerin hazırlanması için sandviç dik model jel kamera düzeneği kullanıldı (SE245 Hoefer[®], San Francisco, ABD).

Donmuş dokuların ekstraksiyonu için fenil metil sülfonflorid (PMSF) ve homojenizatör, jellere ekstrakte edilmiş doku ekstraksiyonlarının örneklenmesi için merkaptto etanol (Sigma[®]) ve pipetleme malzemeleri kullanıldı.

Elektroforezis aleti (SE250-10A-75 Hoefer[®], San Francisco, ABD) ve elektroforezis sırasında kullanılan solüsyonların soğutulması amacıyla (+4°C) soğutucu bir düzenek (Fryka[®], Esslingen, Almanya) kullanıldı.

2. 2. Yöntem

2.2.1. Çalışmanın Yürütülme Düzeni

Aşağıda anlatılacak yöntemler arasında olan işlemlerden kan örneklerinin toplanması, ovariohisterektomi uygulamaları, pre implantasyon dönem köpeklerde uterusun yıkanması ve embriyoların elde edilmesi, doku örneklerinin immunohistolojik ve zimografik yöntemlerle bakılması için hazırlanması gibi işlemler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Kliniğinde yapılmıştır. Hazırlanan dokular kuru buz ile beraber (-20°, -25°C) Viyana Veteriner Üniversitesi Doğum, Jinekoloji, Reprodüksiyon Hastalıkları ve Androloji Kliniğine gönderildikten sonra diğer işlemler Viyana Veteriner Üniversitesi Histoloji Bölümünde yapılan ortak çalışma doğrultusunda tamamlandı.

2. 2. 2. Kan Örneklerinin Toplanması

Köpekler operasyona alınmadan hemen önce kan serum progesteron ölçümleri amacıyla vena cephalica antibrachii'den alınan 5 ml kan örneği santrifüje edilerek (1000 x g, 15 dakika) serumu çıkarıldı ve serum örnekleri progesteron ölçümleri yapılabildiği kadar derin dondurucuda -18°C'de (Beko®, Türkiye) saklandı.

2. 2. 3. Ovariohisterektominin Uygulanışı

Dişi köpeklere preanestezik olarak ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer, 2.33 mg/kg, i.m.) verildikten sonra ketamin hidroklorür (Alfamine®, Ege Vet, 10 mg/kg, i.m.) uygulanarak genel anestezi sağlandı. Abdomen bölgesi traş edildikten sonra gerekli asepti-antisepti kurallarına uyularak operasyon linea alba'dan yapıldı. Böylelikle ovaryumlar ve uterus operasyonla dışarı alındı.

Operasyon sırasında her köpekte 15 ml/kg olacak şekilde serum fizyolojik (i.v.) infüzyonu yapıldı.

2. 2. 4. Preimplantasyon Dönemdeki Köpeklerde Uterus Yıkama Tekniği

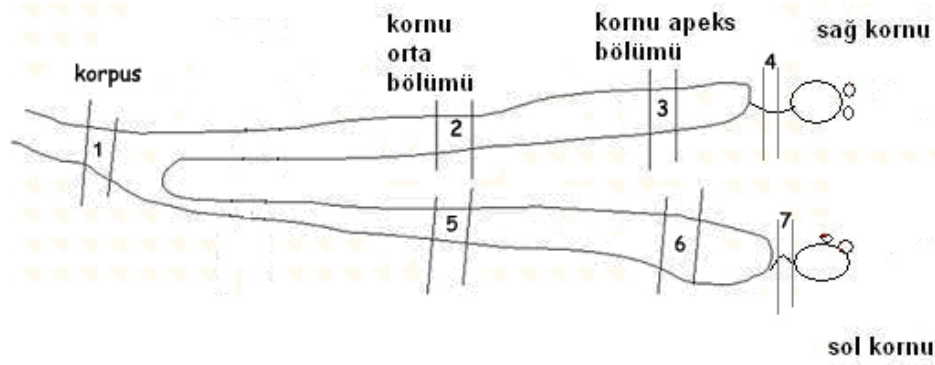
Son çiftleşme tarihi baz alınarak, gebeliğin 5-12. günleri arasında pre implantasyon dönemde olan köpeklerde fertilizasyonun doğrulanması amacıyla uterus kornuları yıkanarak embriyoların varlığı araştırıldı. Operasyon sonrası çıkarılan doku materyali üzerindeki kan, fosfatlı tampon solüsyonu (PBS, Sigma® P4244) ile temizlendikten sonra uterus kornularının apeks bölümünden 21 G iğne ile her bir kornu için 20'şer mililitre oda ısısında olan PBS enjekte edildi (Tsutsui ve ark., 2001) ve korpus bölgesinden steril bir kap içine toplandı. Elde edilen sıvı 15 ml'lik konik tabanlı steril tüplerde hareketsiz olacak şekilde 10 dakika bekletilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan çökelti ve PBS karışımı 60x15 mm şeffaf petrilere (CC430589) aktararak stereomikroskop (Nikon® SMZ 10, Japonya) altında (10x20; 10x30 büyüklükte) embriyolar araştırıldı. Embriyo varlığı belirlenen uterus dokuları Grup 1 doku materyalini oluşturdu.

2. 2. 5. Doku Örneklerinin Hazırlanması

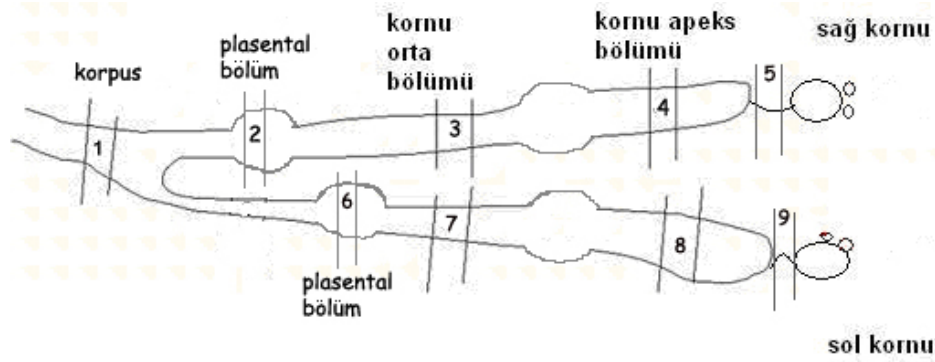
Ovariohisterektomi sonrası dokular hemen laboratuvara alınarak ovidukt, uterusun apeks, uterus kornularının orta bölümü, maternal ve fetal bölümleri de birlikte içeren plasental bölgeler (plasantasyonun şekillendiği Grup II ve Grup III) ve korpus bölgesi en az 1x1x1 cm büyüklüğünde olacak şekilde kesilerek çift örnek olacak şekilde hazırlandı (Şekil 2.1. ve 2.2.). Kesitlerin bir örneği %4'lük formalin solüsyonu ile tespit edilerek immunohistokimyasal analizleri yapılana kadar +4°C'de buzdolabında (Beko®, Türkiye) saklandı.

İkinci doku örnekleri ise Tissue Tek® (Sanova Pharma GmbH, Viyana, Avusturya) kriyoprotektan ile kaplanarak zimografi deneyleri yapılana kadar

-86°C'de derin dondurucuda (Sanyo®, MDF-U5186S, Tokyo, Japonya) saklandı.



Şekil 2.1. Grup 1 ve kontrol grubu için alınan doku örnekleri



Şekil 2.2. Grup 2 ve 3 için alınan doku örnekleri

2.2.6. İmmunohistokimya Deneyleri İçin Parafin Blokların Hazırlanması

Dokuların parafin bloklama için hazırlanmasında otomatik parafin bloklama hazırlık cihazı (Tissue Tek® V.I.P. 2000, Miles Scientific, Mishawaka; IN) kullanıldı ve bu amaçla dokular aşağıdaki aşamalardan geçirildi:

-Doku parçaları formolden çıkarılıp küçük parçalara ayrılarak plastik doku kasetlerine yerleştirildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- Su banyosu, 24 saat
- %70'lik alkol, 1 saat

- %80'lik alkol, 1 saat
- %96'lik alkol, 1 saat
- Absolut alkol, 1 saat (3 kez)
- Ksilol, 12 saat (3 kez)

Yine aynı cihazın parafin distiller bölümü kullanılarak bloklama için hazır hale getirilmiş doku kesitleri çelik bloklama kapları içinde yaklaşık 60°C sıcaklığında eritilmiş likit haldeki parafine gömüldü ve soğutuldu.

2.2.7. İmmunohistokimya Deneilerinin Uygulanışı

Elde edilen parafin bloklardan 4 µm kalınlığında mikrotom ile kesitler alındı. Poli-L-lizin kaplanmış lamlara (Sigma®, Viyana, Avusturya) yerleştirildi. Bu lamlar üzerinde parafin kesitlerin tespit edilebilmesi için 90 dakika süreyle 65°C'lik etüvde (Mermert® Schwabach, Almanya) bekletildi.

İmmunohistokimya deneyi için hazırlanmış olan bu slaytlar aşağıdaki şekilde boyandı:

- Küvette bulunan ksilen içinde 5 dakika süreyle kesitlerdeki fazla parafin uzaklaştırıldı (deparafinizasyon).
- Sırasıyla %100, %100, %96, %70 etanol içinde küvette ikişer dakika tutularak rehidrasyon sağlandı.
- Endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %0,6'lık metanol/perhidrol (40 ml metanol + 1ml %30'luk H₂O₂ ve 9 ml distile su) içinde 15 dakika bekletildi.
- Akar su altında bir küvet içinde 10 kez yıkandı.
- Antikor bağlanma bölgelerinin ortaya çıkarılması için (ön işlem) 0,1 M EDTA içinde (pH 8.0) mikrodalga fırında 5 dakika süre ile 3 kez kaynatıldı.

- Lamlar, coverplate adı verilen plastiklere geçirilerek, immunolojik boyama düzeneğine yerleştirildi (Sequenza[®], Shandon, Pittsburgh, ABD)
- Fosfatlı tampon solüsyonu ile 5 dakika süreyle yıkandı.
- Kesitler fosfatlı tampon solüsyonu ile sulandırılmış %1,5'lük keçi serumu (75 µl keçi serumu+ 5 ml PBS) kullanılarak 30 dakika süreyle oda ısısında yıkandı. Böylelikle spesifik olmayan bağlanma bölgeleri ortadan kaldırıldı.
- Lamlara aranan moleküle göre aşağıdaki birinci antikorlardan slayt başına 100 µl olacak şekilde ilave edildi (Çizelge 2.1).

anti-MMP-2 (Klon A-gel VC2, Neomarkers[®], Freemont, CA, ABD)

anti-MMP-9 (Ab9, Lab Vision[®], Kanada)

anti-MHC I (Klon H58A, VMRD, Inc.; Pullman, WA, ABD)

anti-MHC II (dog 26-1, Rat monoclonal, GSF, Almanya)

Çizelge 2.1. İmmonohistokimya deneylerinde kullanılan antikorlar ve sulandırma yüzdeleri

Birinci antikor	Sulandırma (%)	Antikor tipi	İkinci antikor	Substrat
anti-MMP-2	1:100	Fare monoklonal	Power Vision [®] Poli-HRP anti mouse IgG	DAB
anti-MMP-9	1:200	Tavşan poliklonal	Power Vision [®] Poli-HRP anti rabbit IgG	DAB
anti-MHC I	1:100	Fare monoklonal	Power Vision [®] Poli-HRP anti mouse IgG	Histogreen
anti-MHC II	1:100	Rat monoklonal	Anti rat biyotinlenmiş ABC	Histogreen

- Birinci antikorların ilavesinden sonra +4°C'de gece boyunca lamlar bekletildi.
- Ertesi sabah 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı.
- Slayt başına 100 µl olacak şekilde ikinci antikorlar ilave edildi.
- PBS ile 5 dakika süreyle bir kez daha yıkandı.

- Slaytlar DAB (diaminobenzidin, Sigma[®], Viyana, Avusturya) substrat ile 10 dakika muamele edilerek, aranan molekülün mikroskop altındaki görünürlüğü ortaya kondu.
- Reaksiyonu durdurmak amacıyla distile su içinde 5 dakika bekletildi
- Hücre çekirdeklerinin boyanması amacıyla 2-3 dakika süreyle Mayer's hemalumn (VWR, International) boya kullanıldı.
- Fazla boyanın uzaklaştırılması için musluk suyu altında akar suda 10 dakika süreyle hazırlanan lamlar yıkandı.
- Kesitlerin uzun süreli saklanabilmesi için dehidrasyon amacıyla 2 dakika süreyle %96'lık etanolde tutuldu.
- Absolut alkolde en az iki farklı kuvvette olmak üzere ikişer dakika süreyle bekletildi.
- Ksilen ile ikişer dakika iki farklı kuvvette yıkandı.
- Kesitler üzerine kapatıcı (Depex[®], No: 1354, Houten, Hollanda) damlatılarak lamel ile kapatıldı ve değerlendirilmeleri yapılmak üzere kurumaya bırakıldı.

Yapılan pilot çalışmalar sonucunda MHC-I ve MHC-II için DAB substrat yerine histogreen kitin (HISTOPRIME[®], No: E109, Linaris-Biyolojik Ürünler, Wertheim-Bettingen, Almanya) kullanılmasıyla daha belirgin ve görünür reaksiyonlar ortaya konulduğundan, MHC-I ve MHC-II immunohistokimya deneylerinde substrat olarak bu kit kullanıldı.

2.2.7.1. Histogreen Substrat Kiti'nin Uygulanışı

- Histogreen kromojen solüsyonundan iki damla, 1 ml histogreen-tampon ve üzerine 2 damla hidrojen peroksit (H₂O₂) karıştırıldı.
- Doku preparatları PBS içinde yıkandıktan sonra kesitler üzerine hazırlanmış karışım damlatılarak 5 dakika süreyle bekletildi.
- Beş dakika süreyle PBS içinde ve ardından hemen distile su içinde yıkandı.

- İki dakika süreyle Nuclear Fast Red (LINARIS®, No: EGH3403, Wertheim-Bettingen, Almanya) boyama yapıldı.
- Distile su ile fazla boya uzaklaştırıldı.
- Sonrasında %100'lük etil alkol bulunan üçer adet küvete daldırılarak 1'er dakikalık süreyle dehidrasyon sağlandı.
- Histogreen suda çözünmediği için, sinyallerin kaybolmaması amacıyla preparatların lamelle kapatılmasında Entellan kullanıldı.
- Sonuçlar dijital mikroskop altında (10x10 ve 10x40 büyütmede) görüntülendi ve değerlendirildi.

2.2.8. Jelatin Zimografi DeneYlerinin Uygulanışı

2.2.8.1. Dondurulmuş Dokuların Ekstraksiyonu

Uterus, salpinks ve plasental bölgelere ait doku örnekleri saklanmış oldukları -86°C derin dondurucudan çıkarıldı. Dokular henüz erimeden kaplanmış oldukları alüminyum folyodan çıkarıldı ve skalpel yardımı ile daha küçük parçalara ayrıldı. Doku bütünlüğünü korumuş olan örneklerin endometriyum ve miyometriyum bölümleri birbirinden ayrılarak ekstraksiyon işlemine alındılar. Kıyılarak küçük parçalara ayrılmış doku kesitleri yine skalpel yardımı ile soğutulmuş manuel homojenizatör tüpünün (Milian®, İsviçre) içine en fazla 0,25 cm³ olacak şekilde dolduruldu. Üzerine aynı miktarda 10 µl PMSF/ml (fenil metil sülfonflorid) içeren ekstraksiyon tamponu eklenerek piston yardımıyla doku parçacıkları homojenize edildi. Homojenizasyon sırasında sürtünmeden oluşacak ısınma ve proteinlerdeki denatürasyonun engellenmesi amacıyla, pistonun her 3-4 rotasyonundan sonra, homeojenizatör tüp buz aküsünün içinde soğutularak homojenizasyon işlemine devam edildi. Doku parçaları ekstraksiyon tamponu içinde homojenize olduktan sonra ependorf tüplerin içine doldurulup -18°C'de dondurularak deneyler yapılana kadar saklandı.

2.2.8.2. Zimografi Jellerinin Hazırlanması

Sandviç dik model jel kamera düzeneği (SE245 Hoefer®, San Francisco, ABD) ve jel kalıpları %70'lik alkol ile temizlenip kurulandıktan sonra, cam jel kalıpları kamera düzeneğine yerleştirilerek mandalları sıkıştırıldı. İki cam kalıp levha arasında oluşan boşluğa jellerin dökülmesi için düz bir yüzeye yerleştirildi.

Zimografi jelleri, ayırıcı jel (trenjel) ve örnekleme jeli (sammelgel) adı verilen iki bölümden oluşmaktadır. Ayırıcı jel altta bulunan temel bölümü oluştururken, örnekleme jelinin üst kısımda ayrı bölümler oluşturmuş olan yuvalara doku ekstraksiyonları pipetle aktarıldı. Böylelikle örneklerin birbirine karışması engellendi. Jeller aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlandı:

Ayırıcı jel (Trenjel) hazırlanması: Akrilamid (3700 µl), 2M Tris solüsyonu (pH: 8,8; 2900 µl), bidistile su (3113 µl), jelatin solüsyonu (10 mg/ml distile suda ısı uygulaması ile çözündürülmüş; 1087 µl), %10'luk amonyumpersülfat (APS; 80 µl) karışımı balon joje içinde karıştırılarak üzerine 4 µl Temed (tetrametiletildiamin, Serva®, Heidelberg) ilave edilerek henüz soğumadan jel kalıbına döküldü. Üzerine 1 ml propanol ilave edilerek kalıp içinde soğuması ve kalıbın şeklini alması sağlandı.

Örnekleme jeli (Sammelgel) hazırlanması: Akrilamid (740 µl), 0,5 M Tris solüsyonu (ph: 6,8; 1000 µl), bidistile su (2600 µl), %10'luk amonyumpersülfat (APS; 40 µl) karışımı balon joje içinde karıştırılarak üzerine 4 µl Temed ilave edildi. Ayırıcı jelin bulunduğu kalıp üzerindeki propanol dökülerek, ayırıcı jelin üzerine balon joje içindeki örnekleme jeli kalıbın üst kısmına döküldü ve yapışmaları sağlandı. Henüz sıvı halde bulunan örnekleme jelinin üst sınırına ayırıcı tarak biçimindeki plastik parça

yerleştirildi ve soğumaya bırakıldı. Bu tarak aracılığıyla örnekleme jelinin en üst kısmı elektroforezis öncesi örneklerin yüklenmesi için odacıklara ayrıldı.

Bir saat bekleme sonucunda jeller elektroforezis için hazır hale geldi. Jeller cam kalıplarıyla beraber, kurumalarının önlenmesi amacıyla 1 ml bidistile su ile beraber su geçirmez poşetler içine yerleştirildi ve poşetlerin ağzı kapatıldı. Poşetler içindeki jeller elektroforezis işlemi yapılana kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

2.2.8.3. Örneklerin Jele Aktarılması ve Elektroforezis

Yeni hazırlanmış veya önceden hazırlanıp buzdolabında saklanmış olan jeller cam kalıplarıyla beraber elektroforezisin yapılacağı düzeneğe (SE250-10A-75 Hoefer®, San Francisco, ABD) yerleştirildi. Dik yerleştirilen jellerin üzerini yaklaşık 1 cm kaplayacak kadar tris glisin sodyum dodesil sülfat (Novex®, Hollanda) tamponu ile elektroforezis düzeneği dolduruldu. Kalıpların üzerinde bulunan ayırıcı tarak uzaklaştırılarak istenilen odacıklar elde edildi.

Ekstrakte edilmiş doku örneklerinde bir örnekliliğin sağlanması için protein konsantrasyonları ölçüldü (Kolorimetrik Biuret metodu, Prof.Dr. Franz Schwarzenberger, Viyana Veteriner Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı). Örnekler mililitresinde 480 µg protein olacak şekilde ekstraksiyon tamponu kullanılarak sulandırıldı. Bu karışımdan 15 µl alınarak 15 µl örnekleme tamponu (İnvitrogen®, Avusturya) ile 1:1 oranında karıştırıldı. Jellerin üst bölümündeki odacıklara, odacık başına 20 µl karışım olacak şekilde ince pipet uçları ile örnekler dolduruldu. İlk odacığa pozitif kontrol amaçlı 10 µl jelatinaz A ve B ve 10 µl örnekleme tamponu karıştırılarak (Chemicon®, Kanada) dolduruldu ve elektroforezis akım düzeneğinin kapağı kapatılarak, soğutucu çalıştırıldı. Örnekleme jeli (Sammelgel) için Program 1 (30 mA), ayırıcı jel (Tengel) için ise Program 2 (50 mA) jellerin üzerinde bantların göçü süresince çalıştırıldı.

Elektroforezis düzeneğindeki elektrik akımı kesildikten sonra zimografi jeli düzeneden çıkarıldı. Örnekleme jeli kesilerek uzaklaştırıldı, ayırıcı jel (trengel) büyük boy boyama küveti içinde 30 dakika renaturing tamponuna konuldu. Sonra yine 30 dakika süreyle geliştirme tamponunda bekletildi. Gece boyunca 37°C'de inkübatörde tutuldu. Ertesi gün 2 saat süreyle coomassie blue (Sigma®, Avusturya) ile jel boyandı, jel üzerindeki fazla boya 1 saat süreyle, %40 metanol, %10 asetik asit ve %50 distile su karışımı 10-15 dakika aralıklar ile tazelenerek jel üzerinden uzaklaştırıldı. Gliserin alkol (%20 alkol ve 2 ml gliserin) içinde 1 saat tutuldu. Jeller gliserin alkolden çıkarılarak şeffaf asetat ile kaplandı ve kurutulmaya bırakıldı.

Kurumuş jellerin görüntüsü tarayıcı (Sharp® JX-330) ve bağlı olduğu Sun SPARC station 4 bilgisayar ortamında (Sun® Mikrosistemleri, Mountain View, ABD) dijital ortama aktarıldı. MMP-2 ve MMP-9 aktif ve latent bantların yoğunluğu Quantity One version 2.7 yazılım programı (PDI®, Huntington Station, New York, ABD) ile rakamsal verilere dönüştürüldü.

2.2.9. MMP-2, MMP-9 ve MHC-I, MHC-II'nin Değerlendirilme Yöntemi

MMP-2 ve MMP-9'un latent ve aktif formlarının hesaplanması elde edilen jelatin zimografi bantlarının yoğunluğunun bilgisayar ortamında rakamsal verilere dönüştürülmesiyle olmuştur.

MHC-II pozitif hücrelerin değerlendirilmesinde utreusun değişik bölümlerden alınan her doku için dijital mikroskop kamera ile (DN100; Nikon, Vienna, Austria) her dokuda (salpinks, apeks, kornunun orta bölümü, korpus, implantasyon bölgesi ve plasentanın kompartımanları) rasgele beş adet kare alan ($1920,00 \mu\text{m}$, $240,00 \text{ px}$ X $2560,00 \mu\text{m}$, $320,00 \text{ px}$ = $4915200 \mu\text{m}^2$) seçildi. Bu karelerdeki MHC-II pozitif hücreler sayıldı ve her bir kesit için ortalama bir değer elde edildi. MHC-I'in ise sadece immunohistolojik yöntemle boyanan dokulardaki yoğunlukları alınan kesitler üzerinde gösterildi.

2.2.10. Kan Serumu Örneklerinde Progesteron Analizi

Soğuk zincir altında Viyana Veteriner Üniversitesi Doğum Kliniğine gönderilmiş olan kan serumu örneklerinde, otomatik kemiluminesans (chemiluminescence) sistem (ACS:180 Plus; Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA, ABD) ile progesteron ölçümleri gerçekleştirildi. Bu teknik para manyetik partiküllerin akridinyum esterlerinin okside olmasıyla elde edilen ışığın veriye dönüştürülmesi esasıyla çalışmaktadır.

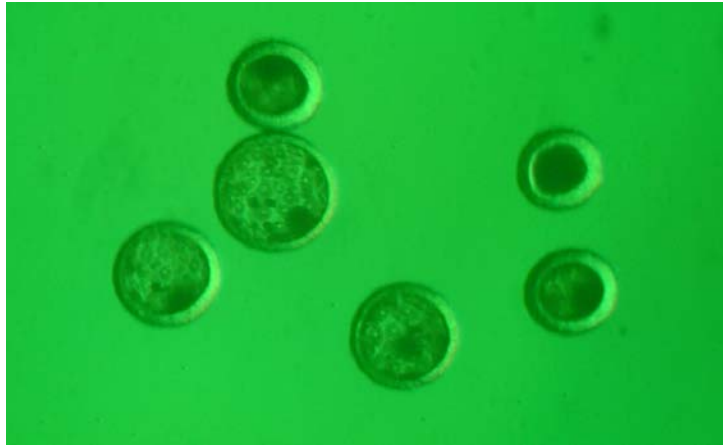
2.3. Elde Edilen Bulguların İstatistik Değerlendirmesi

Elde edilen verilerin hesaplanmasında SPSS® (SPSS, 11.0) programı kullanılmıştır. Verilerin ortalama değer ve standart sapmalarının hesaplanmasında “Descriptive Statistics” yöntemi uygulanmıştır.

Gebelik günleri arasındaki veya değişik dokularda elde edilen sayısal değerlerin karşılaştırılmasında “Non Parametrik” testler uygulanmıştır. Başlangıçta gruplar arasındaki dağılımın homojenizasyonu için “Kolmogorov-Smirnovz” test uygulanmış daha sonra bağımsız gruplar arasındaki farklılıkların ortaya konabilmesi amacıyla “Kruskal-Wallis H” testi kullanılmıştır. “Kruskal-Wallis H” testindeki farklı değerlerin kendi aralarındaki istatistiksel önemliliğin ortaya konması için “Mann-Whitney U” testi uygulanmıştır. Hücre sayılarının uterusun değişik bölümlerinde gebelik günlerine göre artışının hesaplanmasında ise Regresyon (r^2) istatistiksel analiz testine başvurulmuştur. Bu amaçla “Linear Regresyon” analizi uygulanmıştır. Progesteron değerlerinin gebelik günlerine göre değişimi ile dokularda ölçülen değerlerin günlere göre artışları arasındaki ilişki “Bivariate Correlation” ile ortaya konulmuş ve bu durumda Correlation Coefficient “Pearson” a göre hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

Grup 1'de yapılan salpinks ve uterus kornularının yıkanması sonucunda 11 köpekten 51 adet değişik dönemlerde embriyo elde edilmiştir (Şekil 3.1). Çalışmada sadece erken gebelik dönemi (Grup 1, 5-12. günler; embriyo pozitif) saptanmak istendiğinden, embriyoların hangi dönemde oldukları değerlendirilmemiştir.



Şekil 3.1. Pre implantasyon döneme ait köpek embriyoları (10x30).

Elde edilen doku örneklerinin hazırlanması, immunohistolojik boyama aşamaları sırasında oluşan kayıplar ayrıca jelatin zimografi deneyleri için dokuların fazla homojenizasyonuna bağlı olarak oluşan denatürasyonlar nedeniyle, operasyona alınan hayvan sayısı ve elde edilen doku adeti bakımından öngörülen sayının üzerine çıkılmasına karşın, yapılan çalışmalar sonucunda yorumlanabilecek olan örnek sayısında değişiklikler meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle gruplarda sayısal yönden tek örneklilik elde edilememiştir. Grup sayılarının bakılan parametreye ve bu parametrenin yorumlanabilmesi için dokuların hazırlanma yöntemine göre (immunohistolojik, zimografik) değişebileceği ortaya konmuştur.

3.1. Alınan Dokularda MMP-2 ve MMP-9 İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları

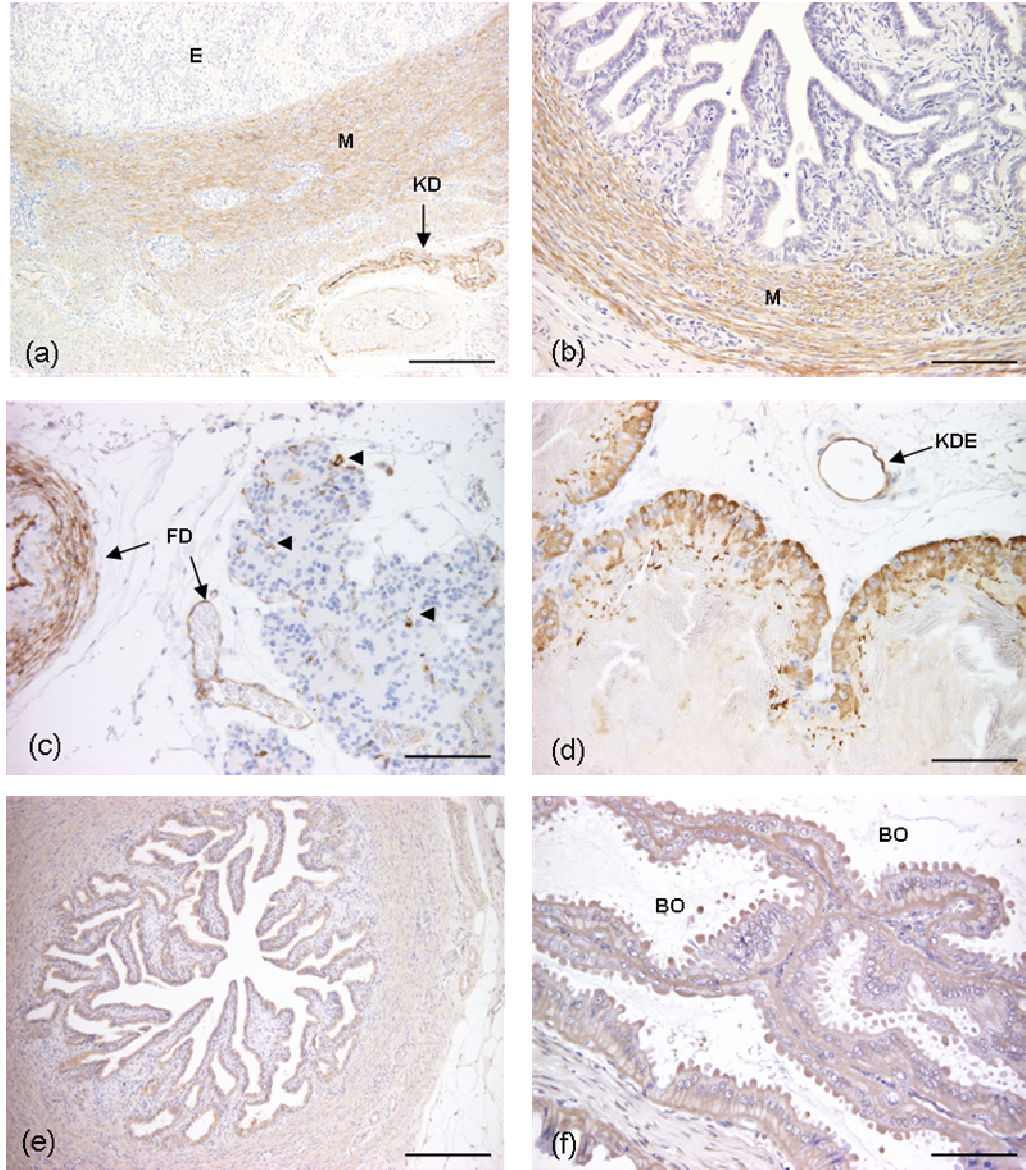
Gebe ve gebe olmayan köpeklerde uterusun tüm bölümlerinde ve oviduktta MMP-2 immunohistokimyasal olarak saptanmıştır.

Gebe olmayan uterusu kan damarları endotelinin ve miyometriyuma ait kan damarlarının düz kas hücrelerinde ayrıca uterusun miyometriyum bölümünde MMP-2 aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 3.2a).

Gebe olmayan uterus dokularında MMP-2 pozitif olan bu bölgeler gebe uterus interplasental alanlarında da gözlenmiştir. Ayrıca oviduktta yüzey epiteli ve miyometrum bölümlerinde post implantasyon döneminde MMP-2'nin pozitif immun yanıt verdiği saptanmıştır (Şekil 3.2b).

Plasental gelişim sonrasında fetal kan damarlarında da MMP-2 pozitif hücreler görülmüştür. Plasental labirent bölümünde pozitif reaksiyonlar genellikle fetal kapillar damarların endotel katmanında gözlenmişlerdir (Şekil 3.1c). Plasental birleşme bölümünde bulunan trofoblast hücrelerin MMP-2 pozitif boyandığı saptanmıştır. Marjinal hematoma bölgesinde trofoblast hücre katmanının tüm hücrelerinin MMP-2 pozitif reaksiyon verdikleri bulunmuştur (Şekil 3.2d).

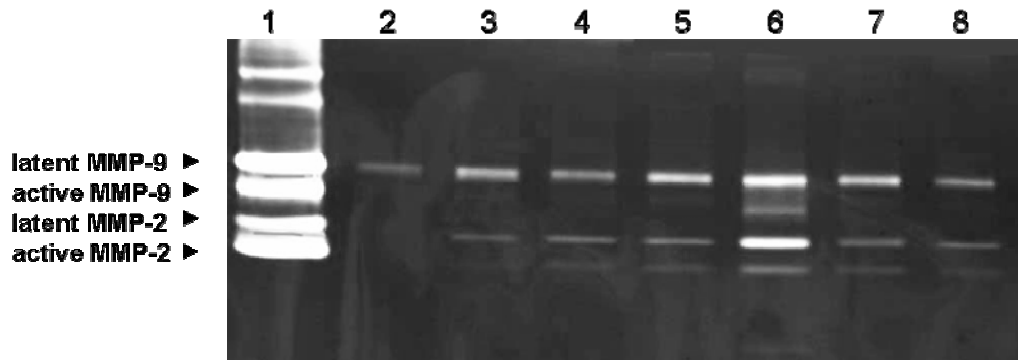
Hem gebe hem de gebe olmayan doku kesitlerinde kan damarlarının, düz kas hücrelerinin, maternal yüzey epitel hücrelerinin, uterus kıvrım ve bezlerinin MMP-9 immunohistokimyasal boyamalarda pozitif yanıt verdiği bulunmuştur. Salpinks yüzey epiteli de gebe ve gebe olmayan dokularda MMP-9 aktivitesi bakımından pozitif bulunmuştur (Şekil 3.2e). Placenta doku örneklerinde saptanan derin uterus bezlerinin ve bezsel odacıkların bulunduğu epiteliyumun MMP-9 antikoru ile reaksiyona girerek immun yanıt verdiği belirlenmiştir (Şekil 3.2f). Plasental birleşme bölgesinin, bezsel odacıkların alt katmanının az miktarda MMP-9 pozitif boyandığı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Gebe ve gebe olmayan değişik uterus katmanlarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi. (a) Gebe olmayan uterus: kan damarları (KD), kan damarı endotel (KDE) hücreleri, düz kas hücreleri ve uterusun miyometriyum (M) bölümünde MMP-2 için pozitif boyanmıştır (Bar, 150 μ m) (b) Ovidukta MMP-2'nin immunohistokimyasal lokalizasyonu (post implantasyon grup); (Bar, 50 μ m) (c) Plasenta: fetal damarlar (FD) ve maternal kapillarlar (ok başı) MMP-2 pozitif bulunmuştur (Bar, 75 μ m) (d) Plasentanın marjinal hematom bölgesindeki trofoblastik hücreler MMP-2 pozitif bulunmuştur (Bar, 75 μ m) (e) Ovidukta MMP-9'un immunohistokimyasal lokalizasyonu (Bar, 250 μ m) (f) Plasenta: derin uterus bezleri ve bezsel odacıkların (BO) epiteliyumu MMP-9 için immunoreaktivite göstermiştir (Bar, 150 μ m) E: endometriyum.

3.2. Jelatin Zimografi Yöntemiyle Gebe ve Gebe Olmayan Köpeklerde Elde Edilen Aktif MMP-2 ve MMP-9 Miktarlarının Tüm MMP-2 ve MMP-9 Miktarına Oranının Belirlenmesi ve Elde Edilen Progesteron (P4) Verilerinin Değerlendirilmesi

Zimografi deneyleri sonucunda gebe ve gebe olmayan köpeklerden alınan uterus ve ovidukt dokularının yoğun düzeyde MMP-2 ve MMP-9 içerdikleri ortaya konmuştur. Jelatin zimografi analizine göre aktif formdaki MMP-2 ve MMP-9 bantlarının latent MMP-2 ve MMP-9 bantlarına göre oldukça düşük miktarlarda oldukları bulunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Jelatin zimografi ile belirlenmiş MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi.

Bant 1: insan MMP-2 ve MMP-9, pozitif kontrol; bant 2: salpinks; bant 3: apeks uteriye ait endometriyum; bant 4: apeks uteriye ait miyometriyum; bant 5: uterus kornusu (interplasental) orta bölüm; bant 6: plasenta; bant 7: korpus uteriye ait endometriyum; bant 8: korpus uteriye ait miyometriyum.

Jelatin zimografi analizi sonucunda elde edilmiş bantların yoğunluğu bilgisayar ortamında rakamsal verilere dönüştürülmüştür. Gebe olan köpeklerde gebeliğin tüm dönemlerinde MMP-2 aktivitesinin endometriyum ve miyometriyumda gebe olmayan köpeklere göre istatistiksel yönden yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.1, $p < 0,05$). Buna göre gebeliğin 5-12. günlerinde olan embriyonun saptandığı pre implantasyon dönemde (Grup 1) endometriyumdaki MMP-2 aktivitesi %19,7, miyometriyumdaki MMP-2 aktivitesi %19,1 ve post implantasyon dönemde (gebeliğin 20-30. günleri) %21,9 ve %23,4 arasında iken, MMP-2 aktivitesinin gebe olmayan köpeklerin uterusunun endometriyumunda %3,9 ve miyometriyumunda da %5,3 ile daha

düşük oranlarda olduğu ortaya konmuştur ($p<0,05$). Gebe grupların kendi arasında ise gebelik dönemi bakımından istatistiksel yönden herhangi bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

MMP-9 aktivitesi bakımından, uterusun endometriyum katında pre implantasyon gebelik döneminden (5-12. günler, embriyo pozitif) sonra gelen implantasyon dönemdeki (Grup 2) MMP-9 aktivitesi (%8,1) gebe olmayan köpeklerle karşılaştırıldığında (%11,8) bu aktivitenin oransal olarak daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Post implantasyon dönemde de (Grup 3) MMP-9 aktivitesinin endometriyum katında (%13,2), gebe olmayan köpeklere göre (%11,8) daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Gebelik dönemleri göz önünde bulundurulduğunda endometriyum katında, pre implantasyon döneminde (%23,2) ve gebeliğin 30-45. gebelik günlerine denk düşen plasental labirent bölgesinde (%33,3) MMP-9 aktivitesinin diğer gebelik dönemlerine göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur ($p<0,05$). Miyometriyumda ise tüm gebelik dönemlerinde (%13,7 ile %17,5 arasında) MMP-9 aktivitesinin gebe olmayan kontrol grubuna göre istatistiksel yönden önemli olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Pre implantasyon grubu (%23,2) ve plasental (%33,3) bölümlere ait endometriyal MMP-9 değerleri yüksek bulunmuştur; bu gruplarda endometriyumdaki MMP aktivitesi implantasyon grubundan (%8,1, $p<0,05$), post implantasyon grubundan (%13,2, $p<0,05$) ve kontrol grubundan farklı düzeyde önemli bulunmuştur (%11,8, $p<0,05$, Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Aktif MMP-2 ve MMP-9 miktarının total MMP-2 ve MMP-9 miktarına oranı (%).

Ölçülen parametreler (zimografi)	Gebe olmayan (Kontrol) % (n)	Pre implantasyon (Embriyo pozitif) (5-12. günler) % (n)	İmplantasyon (15-19. günler) % (n)	Post implantasyon (20-30. günler) % (n)	Plasental Labirent (30-45. günler) % (n)
MMP-2					
Endometriyum	3,9±1,7 ^(a) (4)	19,7±15,0 ^(b) (4)	19,5±8,0 ^(b) (4)	21,9±10,0 ^(b) (5)	20,1±3,9 ^(b) (3)
Miyometriyum	5,3±4,8 ^(a) (4)	19,1±7,4 ^(b) (4)	26,3±21,4 ^(b) (4)	23,4±14,5 ^(b) (5)	-
MMP-9					
Endometriyum	11,8±4,4 ^(c) (3)	23,2±6,0 ^(a,c) (4)	8,1±4,1 ^(b) (4)	13,2±6,3 ^(b) (5)	33,3±7,8 ^(a) (3)
Miyometriyum	9,2 ± 1,0 ^(a) (3)	17,5±5,5 ^(b) (4)	13,7±9,3 ^(b) (4)	15,3±10,9 ^(b) (5)	-

Farklı harflerle gösterilen değerler (a, b, c) birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,05).

Pre implantasyon döneminde 58,96 nmol/l olan P4 değerinin, post implantasyon döneminde 23,91 nmol/l düzeyine düştüğü (p<0,01) saptanmıştır. Ayrıca pre implantasyon dönemdeki (5-12. günler) P4 değerleri ile gebe olmayan kontrol grubu değerleri arasında istatistiksel yönden (p<0,01) önemli bir farklılık olduğu saptanmıştır. Pre implantasyon döneminde elde edilen P4 değerlerinin 58,96 nmol/l ile kontrol grubundan (48,27 nmol/l) daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışma hayvanlarına ait gebelik dönemlerine göre ortalama progesteron değerleri.

Gebelik Dönemi	Hayvan sayısı (n)	Progesteron (nmol/l)
Pre implantasyon	11	58,96 ± 42,77 ^(a)
İmplantasyon	9	38,32 ± 41,82 ^(a, b)
Post implantasyon	8	23,91 ± 29,94 ^(b)
Plasental dönem	3	26,50 ± 8,17 ^(a, b)
Kontrol	4	48,27 ± 28,83 ^(b)

Farklı harflerle gösterilen değerler (a, b) birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,01).

3.3. Zimografik Yöntemle Elde Edilmiş Olan MMP-2 ve MMP-9 (Aktif ve Latent) Değerlerinin Gebelik Dönemleri Arasında ve Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

MMP-2 aktivitesi bakımından jelatin zimografi yöntemi ile elde edilmiş verilerin ortalama değerleri karşılaştırılmış, (Çizelge 3.3) ne latent ne de aktif formunda gebelik günlerinin kendi arasında veya gebelik günleri ve kontrol grubu arasında istatistiksel yönden önemli bir farklılık ($p>0,05$) gözlemlenmiştir.

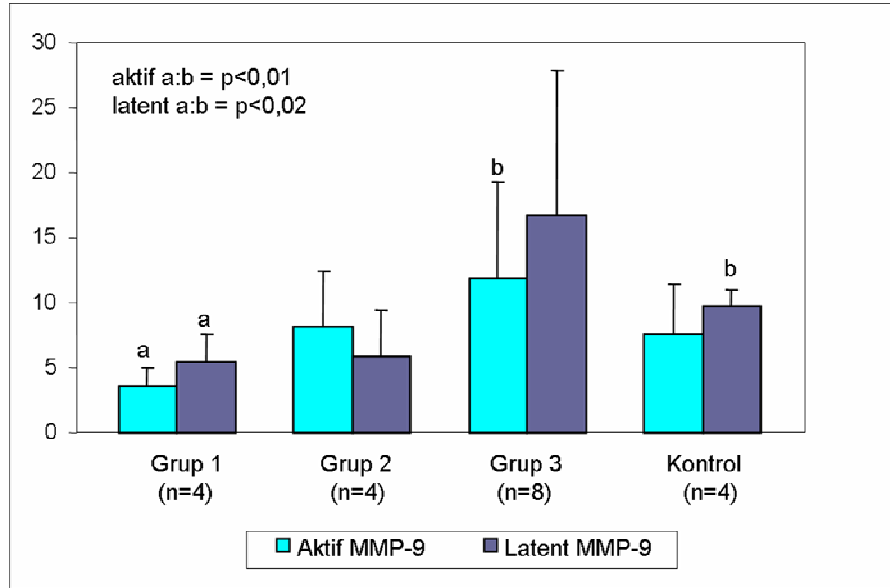
Zimografik yöntemle elde edilen aktif MMP-9 sonuçları Grup 1 (preimplantasyon) ve Grup 3 (plasentasyon) dönemleri arasında istatistiksel yönden önemli bir farklılık olduğunu göstermiştir. Buna göre pre implantasyon dönemde MMP-9 ortalama değeri 3,59 iken, plasentasyon döneminde bu değerlerin 11,91'e yükseldiği gözlenmiştir ($p<0,01$). Aktif MMP-9 ekspresyonu bakımından gebelik dönemi arasında bir farklılık olduğu ortaya konulmuştur.

Latent MMP-9 ekspresyonu göz önünde bulundurulduğunda pre implantasyon grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel yönden bir farklılık olduğu saptanmıştır. Latent MMP-9 düzeyi Grup 1'de 5,47 iken kontrol grubunda 9,67 olarak bulunmuştur ($p<0,02$). Bu sonuçlara ilişkin değerler Çizelge 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Değişik gebelik dönemlerinde jelatin zimografi ile elde edilmiş aktif ve latent MMP-2 ve MMP-9 değerleri.

		Grup 1 (n=4)	Grup 2 (n=4)	Grup 3 (n=8)	Kontrol (n=4)	p
MMP-2	Aktif	6,38±4,37 ^(a)	4,81±2,32 ^(a)	16,90±13,48 ^(a)	7,91±8,38 ^(a)	$p>0,05$
	Latent	5,03±2,55 ^(a)	5,89±2,11 ^(a)	14,88±12,03 ^(a)	8,90±5,54 ^(a)	$p>0,05$
MMP-9	Aktif	3,59±1,35 ^(a)	8,17±4,31 ^(a,b)	11,91±7,31 ^(b)	7,53±3,87 ^(a,b)	$p<0,01$
	Latent	5,47±2,04 ^(a)	5,84±3,54 ^(a,b)	16,73±11,18 ^(a,b)	9,67±1,27 ^(b)	$p<0,02$

Farklı harflerle gösterilen değerler (a, b) birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 3.4. Gebelik dönemleri ve kontrol grubunda aktif ve latent MMP-9 değişiklikleri

MMP-2 ve MMP-9 aktif ve latent ortalama değerleri Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve kontrol gruplarında her grubun kendi arasında karşılaştırıldığında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi bakımından aktif ve latent değerlerin istatistiksel yönden birbirinden farklı olmadığı ($p>0,05$) ortaya konmuştur.

3.4. MMP-2 ve MMP-9 Jelatin Zimografi Değerleri ile Progesteron (P4) Değerleri Arasındaki Korelasyon

Aktif ve latent MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin gebeliğin değişik dönemlerindeki ortalama değerlerindeki farklılık, gebelik dönemlerine karşılık gelen progesteron (P4) değerlerinin değişimi ile karşılaştırıldığında, aktif MMP-9 ile serum P4 değerleri arasında negatif bir korelasyon olduğu (-0,854) yani MMP-9 değerleri artarken P4 değerlerinde bir azalma gözlemlendiği buna karşın bu negatif ilişkinin yeterli düzeyde önemli olmadığı ($p<0,348$)

saptanmıştır. Aynı durumun aktif MMP-2 değerleri ve P4 arasında da olduğu (-0,988; $p<0,09$) ortaya konmuştur.

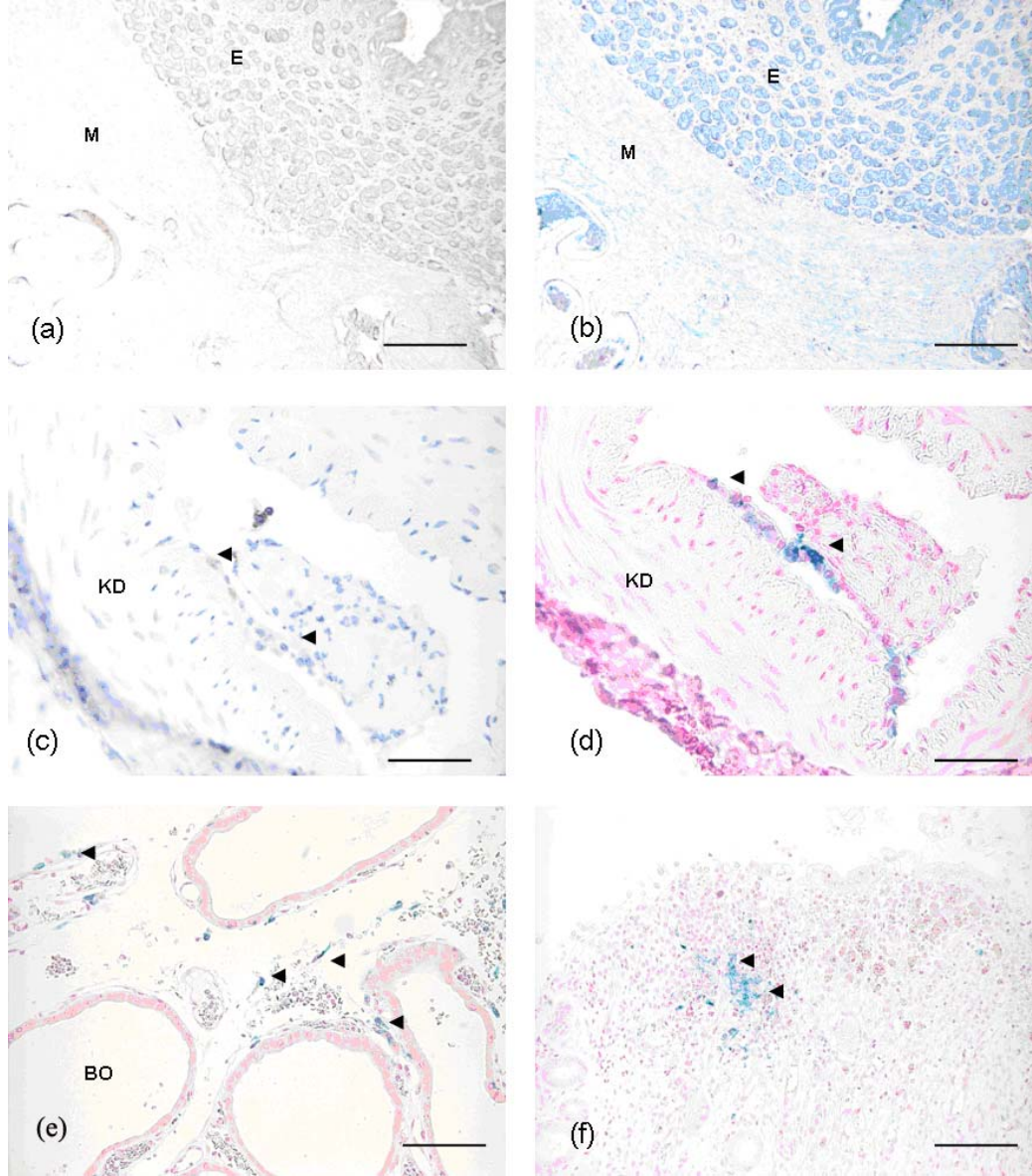
Buna karşılık latent MMP-9 ve P4 (-1,000; $p<0,05$) ayrıca latent MMP-2 ve P4 (-0,999; $p<0,03$) değerleri arasında yine MMP değerlerinin artışı buna karşılık serum P4 değerlerinin azalmasına bağlı olarak değerler arasında önemli düzeyde negatif korelasyonun varlığı saptanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Aktif ve latent MMP-2 ve MMP-9'un erken gebelik döneminde progesteron (P4) ile korelasyonları (r^2)

	MMP-2 Aktif	MMP-2 Latent	MMP-9 Aktif	MMP-9 Latent	P4
Grup 1 (n=4)	6,38±4,37	5,03±2,55	3,59±1,35	5,47±2,04	58,96±42,77
Grup 2 (n=4)	4,81±2,32	5,89±2,11	8,17±4,31	5,84±3,54	38,32±41,82
Grup 3 (n=8)	16,90±13,48	14,88±12,03	11,91±7,3	16,73±11,18	23,91±29,94
Korelasyon	-0,988	-0,999	-0,854	-1,000	–
İstatistiksel önemlilik	$p<0,09$	$p<0,03$	$p<0,348$	$p<0,05$	–

3.5. MHC-II Pozitif Hücre Sayılarının Uterusun Değişik Bölümlerinden Alınan Dokularda Değişik Gebelik Dönemlerinde Karşılaştırılması

MHC-I ve MHC-II arasında immunohistokimyasal boyamalarda bulunan farklılık, MHC-II'nin trofoblastlarda belirlenemediği buna karşılık B-lenfositlerinde, dentritik hücrelerde, endotel hücrelerinde ve bazı aktif T-lenfositlerinde belirlenebildiği, MHC-I'in ise trofoblastlarda ve dokuların bütün çekirdekli hücrelerin membranlarında saptanabildiği olmuştur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Değişik uterus katmanlarında MHC-I ve MHC-II aktivitesi.

(a) Post implantasyon grubu gebelerin uterus orta kornu bölümü: uterusun endometriyum (E) ve miyometriyum (M) bölümlerindeki tüm hücreler MHC-I için pozitif boyanmıştır (substrat, diaminobenzen, Bar, 150 μ m) (b) Aynı kesit daha belirgin mavi renkte MHC-I pozitif hücreler (substrat, Histogreen, Bar, 150 μ m) (c) Gebelerin uterus kan damarı (KD) MHC-II pozitif endotel hücreleri (ok başı) (Bar, 50 μ m) (d) Aynı kesit daha belirgin mavi renkte MHC-II pozitif endotel hücreleri (ok başı) (substrat, Histogreen, Bar, 50 μ m) (e) Post implantasyon grubuna ait plasenta bölgesi bezel odacıklarda (BO) MHC-II pozitif hücreleri (ok başı) (substrat, Histogreen, Bar, 75 μ m) (f) İmplantasyon grubu gebelerin uterus orta bölümü MHC-II pozitif hücreleri (ok başı) (substrat, Histogreen, Bar, 150 μ m).

Uterusun değişik bölümlerinden alınan (salpinks, apeks, kornunun orta bölümü ve korpus) dokularda bakılan MHC-II pozitif hücrelerde; ortalama değer bakımından bu dokuların alındığı hem gebeliğin değişik dönemleri arasında, hem de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farklılıklar gözleendiği saptanmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. MHC-II pozitif hücre sayılarının gebeliğin dönemlerine göre uterusun değişik bölümlerindeki ve kontrol grubundaki ortalama değerleri arasındaki ilişki

Uterus Bölümleri	Grup 1 (n)	Grup 2 (n)	Grup 3 (n)	Kontrol (n)	p
Salpinks	1,62±1,40 ^(a) (5)	2,36±2,48 ^(a) (6)	1,64±1,37 ^(a) (10)	0,55±0,68 ^(b) (4)	p<0,05
Apeks	1,54±1,21 ^(a) (5)	1,68±1,70 ^(a) (5)	3,82±2,93 ^(b) (6)	1,75±1,61 ^(a) (4)	p<0,01
Kornunun orta bölümü	3,63±3,06 ^(a) (7)	3,26±2,75 ^(a) (5)	4,59±3,77 ^(a) (10)	3,17±2,29 ^(a) (4)	p>0,05
Korpus	1,62±1,90 ^(a) (6)	4,77±4,70 ^(b) (7)	5,04±4,95 ^(b) (6)	3,6±2,16 ^(b) (4)	p<0,05

Farklı harflerle gösterilen değerler (a, b) birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (p<0,01; p<0,05).

Buna göre salpinkteki kesitlerde tüm değişik gebelik günlerinde hesaplanan MHC-II pozitif hücrelerin ortalama değerlerinin (Grup 1: 1,62, Grup 2: 2,36, Grup 3: 1,64) kontrol grubundan (geç metaöstrus; 0,55) istatistiksel yönden farklı olduğu (p<0,05) ortaya konmuştur. Salpinkte MHC-II pozitif hücre sayısı bakımından kontrol grubunun gebe gruplara göre belirgin ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir (p<0,05).

Apeks bölgesinden değişik gebelik dönemlerinde alınan kesitlerde gruplar arasındaki pozitif hücre sayısı Grup 3'te diğer gruplardan farklı bulunmuştur (p<0,01). Grup 3'te (plasentasyon dönemi) MHC-II pozitif hücre ortalamasının diğer gruplara göre (Grup 1: 1,54; Grup 2: 1,68; Kontrol: 0,55) daha yüksek olduğunu (3,82) elde edilen veriler göstermiştir (Çizelge 3.5).

Kornunun orta bölümünden elde edilen dokularda sayılan MHC-II pozitif hücre sayılarının ortalamasının hem gebelik dönemleri arasında hem de gebelik dönemleri ve kontrol grubu arasında istatistiksel yönden farklılıklar göstermediği sonucuna varılmıştır ($p>0,05$). Sayılan MHC-II pozitif hücre sayısı bakımından ortalama değerlerin ve bu ortalama değerlerin standart sapmalarının tüm gruplar arasında birbirine yakın olduğu gözlenmiştir.

Korpus bölümünden alınan ve MHC-II pozitif hücre sayılan dokularda ise istatistiksel farklılığın ($p<0,05$) 1,62 ile en düşük hücre sayısına sahip embriyo grubundan (Grup 1) kaynaklandığı saptanmıştır. Gebe gruplar arasında ve Grup 1'in dışındaki diğer gebe gruplarla, kontrol grubu arasında da farklılık olmadığı ortaya konmuştur.

Regresyon analizinde apeks bölgesinden alınan gebe dokulardaki MHC-II pozitif hücre sayısı artışı ve bu dokuların alındıkları günler arasında önemli ve pozitif bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Grup 1: $byx=5,94$; $y=0,362+0,698x$, $r^2=0,796$, Grup 2: $byx=10,83$; $y=0,362+0,698x$, $r^2=0,796$, Grup 3: $byx=14,32$; $y=0,362+0,698x$, $r^2=0,796$). Regresyon analizi ile yapılan istatistiksel hesaplamalarda aynı önemli ilişki korpus bölgesinden alınan dokulardaki hücre artışı ve bu dokuların alındığı gebelik günleri arasında da bulunmuştur (Grup 1: $byx=3,98$; $y=0,198+0,473x$, $r^2=0,809$, Grup 2: $byx=7,29$; $y=0,198+0,473x$, $r^2=0,809$, Grup 3: $byx=9,65$; $y=0,198+0,473x$, $r^2=0,809$, Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. MHC-II pozitif hücre sayılarının uterusun değişik bölümlerinde gebelik günlerine göre artışı.

Uterus Bölümleri	Grup 1 (n)	Grup 2 (n)	Grup 3 (n)
Apeks	1,54±1,21 (5)	1,68±1,70 (5)	3,82±2,93 (6)
$r^2=0,796/byx$ ($y=0,362+0,698x$)	5,94	10,83	14,32
Korpus	1,62±1,90 (6)	4,77±4,70 (7)	5,04±4,95 (6)
$r^2=0,809/byx$ ($y=0,198+0,473x$)	3,98	7,29	9,65

3.6. MHC-II Pozitif Hücre Sayılarının Uterusun Değişik Bölümlerinden Alınan Dokuların Değişik Gebelik Dönemleri Göz Önünde Bulundurulurak Karşılaştırılması

Gebelik dönemlerine göre karşılaştırılmaları yapılan MHC-II pozitif hücre sayısı ortalamaları, belirlendikleri gebelik dönem grupları göz önünde bulundurularak doku bölümleri arasında da istatistiksel yönden karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.7). Bu karşılaştırmada uterusu salpinksden başlayarak korpus bölümüne kadar kesiti alınan dokularda karşılaştırılan MHC-II pozitif sayılan hücrelere ilişkin elde edilen sonuçlar şu şekildedir: Grup 1'de salpinks bölümünde sayılan MHC-II pozitif hücre ortalaması 1,62 iken bu değer kornunun orta bölümünde 3,63 olarak bulunmuştur ($p<0.01$).

Çizelge 3.7. MHC-II pozitif hücre sayılarının uterusu alınan dokular arasında karşılaştırılması

Gruplar	Salpinks (n)	Apeks (n)	Kornunun orta bölümü (n)	Korpus (n)	İmplantasyon bölgesi (n)	p
Grup 1	1,62±1,40 ^(a) (5)	1,54±1,21 ^(a) (5)	3,63±3,06 ^(b) (7)	1,62±1,90 ^(a) (6)	-	p<0,01
Grup 2	2,36±2,48 ^(a,b) (6)	1,68±1,70 ^(a) (5)	3,26±2,75 ^(a,b) (5)	4,77±4,70 ^(b) (7)	6,64±5,90 (6)	p<0,05
Grup 3	1,64±1,37 ^(a) (10)	3,82±2,93 ^(b) (6)	4,59±3,77 ^(b) (10)	5,04±4,95 ^(b) (6)	-	p<0,001
Kontrol	0,55±0,68 ^(a) (4)	1,75±1,61 ^(c) (4)	3,17±2,29 ^(b) (4)	3,60±2,16 ^(b) (4)	-	p<0,001

Satırlardaki farklı harfler istatistiksel yönden önemli bulunmuştur ($p<0,01$; $p<0,05$)

İstatistiksel inceleme sonucunda gebeliğin 5-12. günlerinde alınan (Grup 1) kornu örneklerinin orta bölümüne ait ortalama değer (3,63) uterusu diğer doku bölümlerine göre istatistiksel yönden önemlilik göstermiştir ($p<0,01$). Grup 2'nin apeks ve korpus bölümlerinde sayılan hücrelerin ortalama değerleri 1,68 ve 4,77 olarak saptanmış ve istatistiksel olarak aralarında fark belirlenmiştir ($p<0,05$). Gebeliğin 20-30. günleri arasında alınan (Grup 3) salpinks kesitlerine ait ortalama değer (1,64) diğer tüm uterus

doku bölümlerine göre (Apeks: 3,82; Kornunun orta bölümü: 4,59; Korpus: 5,04) istatistiksel yönden farklılık göstermiştir ($p < 0,001$).

Benzer şekilde kontrol grubuna ait salpinks ortalama değeri (0,55) diğer doku bölümlerine oranla istatistiksel yönden önemli ölçüde düşük bulunmuştur ($p < 0,001$). Kontrol grubunda kornunun apeks bölümünde sayılan MHC-II pozitif hücreler hem salpinkste saptanan hücrelerin ortalama değerinden, hem de uterusun diğer bölümlerinden alınan dokulardaki hücrelerden istatistiksel yönden farklı bulunmuştur ($p < 0,001$). Apekte ortalama değer kontrol grubunda (1,75) diğer uterus doku bölümlerinden yani kornunun orta bölümü (3,17) ve korpus (3,60) değerine göre istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

Elde edilen sonuç MHC-II pozitif hücrelerin uterusun değişik bölümlerinden elde edilen dokular arasında da ortalama değerler ele alındığında farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Düşük hücre sayılarının özellikle salpinkste saptandığı ortaya konulmuştur.

Elde edilen serum progesteron değerleri ile apeks, kornunun orta bölümü ve korpus arasında MHC-II pozitif hücre sayıları bakımından değişik düzeyde negatif korelasyonlar saptanmıştır ($r^2 = -0,650$ ve $-0,947$ arasında). Bu korelasyon kat sayıları yüksek olmakla birlikte, önemli olmadığı ($p > 0,05$) istatistiksel hesaplamalar sonucu belirlenmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Uterusun değişik bölümlerindeki MHC-II pozitif hücre sayılarının progesteron değerleri ile korelasyonu

Uterus Bölümleri	Salpinks	Apeks	Kornunun orta bölümü	Korpus	P4
Grup 1	1,62	1,54	3,63	1,62	58,98
Grup 2	2,36	1,68	3,26	4,77	38,32
Grup 3	1,64	3,82	4,59	5,04	23,91
Korelasyon r^2 / p	-	-0,829 / 0,377	-0,605 / 0,586	-0,947 / 0,209	-

3.7. MHC-II Pozitif Hücre Sayılarının Plasental Bölümlere Ait Değişik Uterus Katmanlarında Karşılaştırılması

Uterusun plasental bölümlere ait kesitlerinde, MHC-II pozitif hücre sayılarının ortalama değerleri karşılaştırıldığında, katmanlardaki hücre sayısı ortalamalarının 1,90 ve 2,64 arasında değiştiği ve bu katmanlar (labirent, bezsel odacıklar, konnektif doku, derin bezler, miyometriyum) arasındaki MHC-II pozitif hücre sayıları bakımından hesaplanan farklılığın istatistiksel yönden önemli olmadığını ($p>0,05$) ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar uterusun plasental bölümlere ait kesitlerinde MHC-II pozitif hücre bakımından herhangi bir farklılık elde edilemediğini göstermiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Plasentanın değişik katmanları arasında MHC-II pozitif hücre sayıları

Grup	Labirent (n=5)	Bezsel odacıklar (n=13)	Konnektif doku (n=11)	Derin bezler (n=10)	Miyometriyum (n=9)
Grup 3	2,0±1,52 ^(a)	2,60±2,35 ^(a)	2,64±2,48 ^(a)	1,90±1,89 ^(a)	2,40±2,34 ^(a)

a: $p>0,05$

4. TARTIŞMA

Gebeliğin mekanizmasının düzenlenmesinde hormonlar, immun hücreler, parakrin ve otokrin faktörlerin dengeli ilişkisi maternal ve fetal bölümler arasındaki uyumu sağlarlar. MMP moleküllerinin insan embriyosunda pre implantasyon döneminde, maternal plasentada ve fetal dokuların gelişmelerinde önemli rolünün olduğu ortaya konulmuştur (Bischof ve Campana, 2000).

Matriks metalloproteinaz-2 ve -9 rat uterusunda erken gebelik döneminde (Zhao ve ark., 2002), koyun ve köpek plasentasında (Riley ve ark., 2000), gebe ve gebe olmayan köpek serumunda (Schäfer-Somi ve ark., 2005) incelenmiş, doku uyumu antijeni (major histocompatibility complex, MHC) ise kısarak, koyun ve inek uterusunda (Antczak, 1992; Fernandez ve ark., 1999; Choi ve ark., 2003) geniş ölçüde çalışılmıştır.

Matriks metalloproteinazların (MMP) ve doku uyumu antijenlerinin (MHC) embriyo ve maternal plasenta için önemleri bilinmekle birlikte (Fernandez ve ark., 1999; Huppertz ve ark., 1998) köpekte erken ve geç gebelik dönemlerindeki fonksiyonları tam anlamıyla ortaya konulamamıştır.

Bu çalışma MMP-2, -9 ve MHC-I, -II ile yapılan immunohistolojik ve jelatin zimografik analizler sonucunda, bu moleküllerin köpek uterusunda gebelik dönemleri olan pre implantasyon, implantasyon ve plasentasyon evrelerinde ne şekilde değişikliğe uğradığı ve gebeliğin tanınmasında hangi önemlerinin olduğunun ortaya konulması amacıyla yapılmıştır.

İmmunohistokimyasal boyama tekniği ile matriks metalloproteinazların varlıkları ortaya konulabilmektedir. Bu teknikte MMP-2 ve MMP-9 miktarının belirlenmesi mümkün olmamaktadır. Jelatin zimografi tekniği ile aktif ve latent MMP değerlerinin ölçümünün yapılabileceği ortaya konulmuştur (Riley ve ark., 2000; Goldman ve ark.,

2003). İmmunohistokimyasal boyama yöntemiyle endotel hücrelerinin kullanılan antikörlara karşı MHC-II pozitif boya aldıkları da saptanmıştır. MHC'nin immunohistokimyasal yöntemle yapılan boyamalar sonucu aktivitesi ortaya konulabilmiş, doku katmanları arasında boyamaya bağlı farklılıklar gözlenmiş ve geniş doku kesitlerinin de boyandığı saptanmıştır (Ramsosondar ve ark., 1999; Döhring, 2004).

Bu doktora çalışmasında immunohistokimyasal yöntemle yapılan boyamalar sonucu uterusun değişik bölümlerinde ve oviduktun katmanlarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi ortaya konabilmiştir. Aktif ve latent MMP-2 ve MMP-9 miktarının jelatin zimografi tekniği uygulanarak elde edilen bant görüntülerin bilgisayar ortamına aktarılmasıyla anlamlı matematiksel verilere dönüştürülebileceği saptanmıştır.

MHC-I ve MHC-II molekülleri de uterusun değişik katmanlarında immunohistokimyasal yöntemle belirlenmiş ve Döhring' in (2004) belirttiği şekilde ışık mikroskobu altında (40x10) sayılmıştır.

Bu çalışmada gebe ve gebe olmayan köpeklerde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerine bakılması amacıyla alınan uterus dokularında ve uterusun diğer bölümlerinde de MMP-2 ve MMP-9 aktivitesine rastlanmıştır. Hem gebe hem de gebe olmayan köpeklerden alınan doku kesitlerinde kan damarlarında, düz kas hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin varlığı yapılan immunohistolojik boyamalar sonucunda ortaya konulmuştur.

Chu ve ark. (2002), MMP-2'nin latent ve aktif formlarını ve MMP-2'nin latent formunu köpeklerin endometriyumunda ortaya koymuşlardır. İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile korionik epitel ve marjinal hematom bölgesinde MMP-1, -2, -7, -10 ve -14'ü ve plasental labirentin sinsityotrofoblastlarında MMP-2, -10 ve -23 aktivitelerinin varlığını saptanmış. MMP-2'nin uterusun subepitel stromasında implantasyondan

hemen önce salındığı ortaya konulmuştur (Alexander ve ark., 1996; Das ve ark., 1999).

Gebe uterusunda MMP-2 pozitif boya alan interplasental alanların saptanması, plasental labirent bölümünde pozitif MMP-2 reaksiyonunun fetal kapillar damarların endotel katmanında görülmesi söz konusu yayınları desteklemektedir. Ayrıca Riley ve ark. (2000)'in bulgularına paralel olarak MMP-2 ve MMP-9'un plasenta ve interkotiledonar bölgede saptandığı ortaya konulmuştur.

Yapılan çalışmada, immunohistokimyasal boyamalar, plasental birleşme bölümünde bulunan hücrelerin ve marjinal hematoma bölgesindeki trofoblast hücre katmanındaki tüm hücrelerin MMP-2 pozitif reaksiyon verdiklerini göstermiştir. İnsan embriyosunda MMP-2'nin inaktif ekstra villöz trofoblastlarda bulunması buna karşılık primatlarda trofoblastların tüm hücrelerinde saptanması elde edilen bulguları desteklemektedir (Fernandez ve ark., 1992; Huppertz ve ark., 1998).

Yapılan değişik çalışmalar sonucunda desidual hücrelerde jelatinolitik aktivitede MMP-2'nin hem aktif hem de latent formu zimografik yöntemle ortaya konmuş ayrıca MMP-2'nin latent ve aktif formları ve MMP-9'un da latent formu tüm köpeklerin endometriyumunda belirlenebilmiştir (Goldman ve ark., 2003; Chu ve ark., 2002). Söz konusu çalışmalara paralel olarak elde edilen sonuçlar gebe ve gebe olmayan köpeklerden alınan uterus ve ovidukt dokularında yoğun düzeyde MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi olduğunu göstermiştir.

Jelatin zimografi analizlerinin köpeklerden alınan uterus dokularında yapıldığı bu çalışmada aktif formdaki MMP-2 ve MMP-9 bantlarının, latent MMP-2 ve MMP-9 bantlarına göre oldukça düşük miktarda olduğu ortaya konulmuştur. Aynı doğrultuda kedilerin ileri gebelik döneminde (40-60. günler) MMP aktivitesi jelatin zimografi yöntemiyle sadece plasental

labirent bölgesinde araştırılmış ve düşük düzeyde aktif MMP-2 ve MMP-9 varlığı ortaya konulmuştur (Walter ve Schönkypl, 2006). Aktif MMP düzeyindeki artışın plasentolarda matriks yıkımında bir artışın sonucu olduğunun bulunmuş olması (Chu ve ark., 2002) aktif MMP düzeyindeki azalmanın da matriks yapımındaki artışla ilgili bir süreç olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen bulguların köpeklerin 30-40. gebelik günlerinde var olan plasental labirent bölgesinde önemli miktarda yüksek aktif MMP-2 (% 20,1) ve MMP-9 (% 33,9) varlığını göstermesi, bu dönemde önemli bir matriks yıkımının varlığına işaret etmektedir.

Gebelik döneminde yüzeysel endometriyumun yıkımlanmasına bağlı olarak, bağ dokunun maternal bölümüyle ilgili herhangi bir yapıya rastlanmaması ve maternal dönemde endotelde hipertrofilerin oluşmaya başlaması (Zietzschmann ve Krölling, 1955, Stoffel ve ark., 1998) köpeklerde MMP-2 ve MMP-9 jelatinolitik aktivitenin doku hasarında bir indikatör olduğunu düşündürmektedir (Coughlan ve ark., 1998). Gebeliğin 5-12. günlerinde ve post implantasyon döneminde uterus endometriyumundaki ve miyometriyumundaki MMP-2 aktivitesinin, gebe olmayan köpeklere göre daha yüksek bulunması, gebelik döneminde oluşan söz konusu doku yıkımlanmaları ve MMP-2 aktivitesinin artışı arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır.

Ekstravillöz trofoblast ve endotel hücreler tarafından gebeliğin ilk üçte birlik döneminde yüksek düzeyde MMP-2 eksprese edilmesi (Matrisian, 1990; Ennis ve Matrisian, 1994) ve MMP-2'nin trofoblastın desidual endometriyuma invazyonu ayrıca damar yenilenmesi ve anjiyogenezis durumlarında primer düzenleyici olduğunun belirlenmesi (Welgus, 1991; Ray ve Stetler-Stevenson, 1994) köpeklerdeki embriyo ve post implantasyon döneminde değişik uterus katmanlarındaki MMP-2 artışının gebe olmayanlara göre yüksek olmasını açıklamaktadır.

Zimografik yöntemle elde edilen MMP-2 verilerinin ortalama değerleri bakımından ise ne ilerleyen gebelik dönemleri arasında ne de gebelik dönemleri ve kontrol grubu arasında bu çalışmada istatistiksel yönden farklılık ($p>0,05$) gözlemlenmiştir.

Aktif MMP-9 sonuçları bakımından ise pre implantasyon (3,59) ve plasentasyon (11,91) dönemleri arasında önemli düzeyde ($p<0.01$) farklılık olduğu ortaya konmuştur. Aynı şekilde aktif MMP-9 miktarının tüm MMP-9 miktarına göre oranların belirlendiği durumda da, hem 30-45. gebelik günlerinde plasental labirent bölgede diğer gebelik günlerine göre, hem de miyometriyumda tüm gebelik dönemleri ile gebe olmayan gruba göre MMP-9 aktivitesinin istatistiksel yönden önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Pre implantasyon ve implantasyon periyodunda gebe köpeklerdeki serum MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin gebe olmayan köpeklere göre önemli ölçüde yüksek bulunduğu bir çalışmada, testin geliştirilmesiyle, söz konusu dönemlerde MMP-2 ve MMP-9 değerlerine bakarak gebelik teşhisine gidilebileceği sonucuna varılmıştır (Schafer-Somi ve ark., 2005). Rodentlerde de (Curry ve Osteen, 2003) MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ve gebelik günlerine göre farklılıkları MMP'lerin implantasyon açısından kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada aktif ve latent MMP-9 düzeylerinin embriyo döneminde (5-12. gün) düşük olduğu ve ilerleyen gebelik sürecinde önemli ölçüde artış gösterdiği gözlenmiştir.

Latent MMP-9 düzeyinin ise pre implantasyon grubunda 5,47 ile kontrol grubuna göre (9,67) daha düşük ($p<0,02$) düzeyde olduğu ortaya konulmuştur. Grup 1 (5,47) ve Grup 3 (16,73) arasındaki artış istatistiksel yönden önemli bulunmuştur ($p<0,02$). Aktif MMP-9'da Grup 1'de ortalama değer 3,59 iken Grup 3'te 11,91'e yükseldiği ($p<0,01$) saptanmıştır.

Maymunlarda (*Macca mulatta*) yapılan bir çalışmada (Wang ve ark., 2001) gebeliğin 12. gününde MMP-2 mRNA'sı endometriyumun luminal epitelyuma komşu desidual hücrelerinde saptanırken, gebeliğin 26. gününde plasental villilerde MMP-2 mRNA'sı için herhangi bir sinyal belirlenememiştir. MMP-2'nin ekspresyonu MMP-9'dan belirgin olarak farklıdır. MMP-2 mRNA'sı embriyonik ya da ekstra embriyonik dokularda bulunamamıştır ve pozitif reaksiyon desidualize olan bölgenin dışında uterus mukozasının stromal hücrelerinde gözlenmiştir. MMP-9 ise luminal ve glandüler epitelyumda ve hücrelerin apikal yüzeylerine doğru ilerleyen biçimde saptanmış ve uterus lumeninde salındığı ortaya konmuştur (Salamonsen, 1999). Benzer esansiyel proteaz inhibitörlerin tüm türlerde implantasyonla ilişkili olmasına karşın invazyonun yaygınlığı farklılık göstermektedir. Bu yayınlara dayanarak elde edilen bulgular doğrultusunda, tüm MMP-2 miktarının aktif MMP miktarına oranı göz önünde bulundurulduğunda gebeliğin değişik dönemlerinde ve gebe olmayan köpekler arasında önemli farklılıkların gözlenmesi, buna karşılık doğrudan yapılan zimografik ölçümlerde bu farklılıkların olmamasının söz konusu MMP-2 ve MMP-9 arasındaki ekspresyon farklılığına bağlı olduğu düşünülebilir.

MMP-9 aktivitesi bakımından ise aktif MMP-9 ve total MMP-9 oranlarının ve doğrudan elde edilen zimografik sonuçların hem gebeliğin değişik dönemleri hem de gebe ve gebe olmayanlar arasında önemli farklılıkları yansıtabilmesi, invazyonun yaygınlığındaki değişikliğe bağlı olarak gelişen MMP-2 ve MMP-9 arasındaki ekspresyon farklılığını ortaya koymaktadır.

Gebelik dönemleri göz önünde bulundurulduğunda, aktif ve latent MMP-2, MMP-9 ve progesteron arasındaki ilişki bakımından aktif ve latent form ile progesteron arasında negatif bir korelasyon olduğu ve özellikle latent formdaki MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi ve progesteron arasındaki

negatif korelasyonun ($r^2 = -0,999$; $-1,000$) önemli olduğu ($p < 0,05$; $p < 0,03$) ortaya konulmuştur.

Progesteron ve MMP-2, -9 arasındaki korelasyon bakımından farklı sonuçlar elde edilmiştir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada (Goldman ve Shalev, 2006), geç dönem trofoblastik hücrelerin progesteron ile işleminden geçirilmesi sonucu ters bir etki mekanizmasının varlığı ortaya konmuş, yani progesteronun MMP ekspresyonu ve hücre invazyonu üzerinde inhibe edici bir rolü olduğu ortaya konurken, yine Hashizume ve ark., (2003)'nin insanlarda yaptıkları çalışma hem yüksek östrojen hem de yüksek progesteron düzeylerinin MMP-2 üretimini stimüle ederken, düşük progesteronun MMP-2 üretimini inhibe ettiğini göstermiştir. İnsanlarda yapılan çalışmalar (Arthur, 1994; Duncan, 2000), progesteron eksikliğinde MMP-2 üretiminde artışın olacağı doğrultusundadır.

Köpek serumlarında MMP-2 ve MMP-9 değerlerinin gebeliğin değişik dönemlerinde saptanmasından sonra, aynı dönemde alınan serum progesteron değerleriyle yapılan karşılaştırmalar MMP-2, MMP-9 serum değerleriyle steroid hormonlar arasında pozitif bir korelasyon ($0,667$; $p < 0,05$) olduğunu göstermiştir (Schafer-Somi ve ark., 2005). Sunulan doktora çalışmasında ise MMP-2 ve MMP-9 değerlerinin zimografik yöntemle uterus dokularından elde edilmesi ve bu değerlerin serum progesteron değerleriyle karşılaştırılması sonucu hesaplanan yüksek negatif korelasyon sonuçları, Chu ve ark. (2002)'nin köpek endometriyumunda MMP-2 ve MMP-9'un aktif ve latent formlarını saptadıktan sonra, plazma progesteron düzeyindeki düşüş ile MMP aktivitesinde artış arasındaki ilişkiyi ortaya koyduğu çalışmayı desteklemektedir. Serum progesteron ve dokulardaki MMP üretimi arasındaki bu negatif ilişkinin mekanizması tam anlamıyla ortaya konulmamıştır (Arthur, 1994; Duncan, 2000).

İneklerde erken gebelik döneminde (34-63. günler) trofoblastlarda yaygın MHC-I ekspresyonu belirlenmiştir (Hill ve ark., 2002). MHC-II antijenlerinin ise insan trofoblast hücre popülasyonunda saptanamayacağı (Redman, 1983) ortaya konmuştur. Farelerde yapılan bir çalışmada ise (Mattsson ve ark., 1992) MHC-II ekspresyonunun çok az olduğu, trofoblast labirentlerinde ve dev trofoblast hücrelerinde MHC-I ve MHC-II ekspresyonunun yetersiz olduğu bildirilmiştir. Bu doktora çalışmasında da söz konusu yayınlarda bildirildiği gibi MHC-II'nin trofoblastlarda belirlenemediği buna karşılık MHC-I'in belirlendiği saptanmıştır.

Domuzlardan elde edilen uterus kornusu kesitlerinde yüzey epitel, glandüler epitel, subepitel katmanlarda MHC-II hücreleri saptanmıştır (Kaeoket ve ark., 2003). Ayrıca MHC-II'nin dendritik hücreler, makrofajlar, lenfosit ve endotel hücrelerinde üretildiğine ilişkin de bilgi verilmiştir (Döhring, 2004). Aynı şekilde bu çalışmada da MHC-II'nin trofoblastlarda saptanamadığı buna karşılık B-lenfositlerinde, dendritik hücrelerde, endotel hücrelerinde ve bazı aktif T-lenfositlerinde belirlenebildiği ortaya konmuştur.

Genel olarak MHC-II aktivitesinin saptandığı hücreler, dendritik hücreler, makrofajlar, lenfositler ve endotel hücreleri olarak tanımlanmıştır (Lunney ve Pescovitz, 1987). Dendritik hücreler ve makrofajlar arasında ışık mikroskobu altında, immunohistokimyasal boyama sonrası ayırım yapılmak mümkün olmadığından tüm bu hücreler MHC-II pozitif hücreler olarak sayılmışlardır. MHC-II pozitif hücreler arasında ayırma gidilmeden (Kaeoket ve ark., 2003; Döhring, 2004) yapılan hesaplamaların gebelik dönemleri arasındaki farklılığı ortaya koyabileceği belirtilmiştir.

Salpinkste sayılan MHC-II pozitif hücreler grup 1, grup 2 ve grup 3'te sırasıyla 1,62, 2,36 ve 1,64 ile kontrol grubundan (0,55) önemli ölçüde ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur. Apeks ve korpus bölümlerinde ise MHC-II pozitif hücre ortalamaları bakımından gebelik dönemleri arasında

farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Regresyon analizinde grup 1, grup 2, grup 3'te artan gebelik günleri ile apeks ($r^2=0,796/byx$) ve korpusta ($r^2=0,809/byx$) sayılan MHC-II pozitif hücreler arasında önemli ve pozitif bir ilişkinin olması da MHC-II pozitif hücre ortalama değerlerinin ilerleyen gebelik dönemlerinde artış gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Domuzda yapılan tohumlamadan sonra, tohumlamanın yapıldığı uterusun utero-tubal bölümü ile tohumlamanın yapılmadığı bölüm karşılaştırıldığında, MHC-II pozitif hücrelerinin tohumlamanın yapıldığı uterus bölümünde önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır (Döhring, 2004). Kaeoket ve ark. (2003)'nin yaptığı bir çalışmada özellikle uterusun subepitel katmanında, ovulasyon sonrası 70. saatte MHC-II pozitif hücre sayısı $4,9\pm 0,1$ olarak bulunurken, gebeliğin 19. gününde pozitif hücre sayısının $7,3\pm 1,3$ değerine yükseldiği saptanmıştır.

Erken gebelik döneminde MHC-II değerlerinin düşük olması, bu dönemde embriyonun immun yanıtın baskılanmasına neden olan faktörler içerdiği, buna karşılık ilerleyen gebelik dönemlerinde MHC-II pozitif hücrelerindeki artışın trofoblast hücrelerinin tutunabilmesi ve gebeliğin devamı açısından önemli olduğu belirtilmiştir (Croy ve ark., 1987; King, 1988). Bu doktora çalışmasında, embriyo döneminde (grup 1) salpinkste 1,62, apeks 1,54 ve korpusta 1,62 MHC-II pozitif hücre ortalama değerlerinin bulunması ilerleyen gebelik dönemlerinde ise bu değerlerin artış göstermesi, yazarların elde ettikleri sonuçları desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmada gebeliğin değişik aşamaları (pre implantasyon, implantasyon ve plasentasyon) karşılaştırıldığından, yapılan istatistiksel hesaplamalar bu dokulardaki gebelik zamanına göre oluşan MHC-II pozitif hücre artışını açık bir şekilde göstermektedir.

Siklik korpus luteumun, korpus luteum graviditatis dönüşümü sırasında LH hormonunun yükselmesiyle birlikte, immun sistemi düzenleyen hücrelerin sayısındaki azalmayla birlikte MHC-II pozitif

hücrelerinde de sayıca bir düşüşün meydana geldiği (Pate, 1995) ve bu dönüşüm tamamlandıktan sonra MHC-II pozitif hücrelerinde artışın görüldüğü saptanmıştır (Henhke ve ark., 1994; Bukovsky ve ark., 1995). Bu doktora çalışmasında embriyonik dönemde MHC-II pozitif hücreleri bakımından elde edilen düşük ortalama değerler ve ilerleyen gebelik günlerinde ortalama değerlerde oluşan istatistiksel yönden önemli artışlar, bu yazarların embriyodaki faktörlere bağlı olarak immunolojik defans sonucu pre implantasyon döneminde MHC-II pozitif hücrelerinde düşme ve ilerleyen gebelik dönemlerinde ise oluşan immunolojik dengeye bağlı olarak önemli yükselmelerin olduğunu ortaya koyan yayınlarını desteklemektedir.

En düşük MHC-II pozitif hücre sayısı tüm gruplarda salpinkste saptanmıştır ve değerler 0,55 ile 2,36 arasında bulunmuştur. Kornunun orta bölümü, korpus ve grup 2'de implantasyon bölgesinde, yani salpinks ve apekten ilerideki uterus bölümlerinde MHC-II pozitif hücre sayısında önemli ölçüde bir artış olduğu ortaya konulmuştur. Plasental bölüme ait değişik uterus katmanları arasında MHC-II pozitif hücre sayısı bakımından herhangi bir farklılık olmadığı bulunmuştur.

Vagnoni ve ark. (1996), MHC ekspresyonlarının uterusun değişik bölümlerinde düzenlenebileceğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca yüzey epiteli ve subepitel tabakalarda MHC-II eksprese eden hücrelerin sayısındaki artışın, bu bölümlerde ovulasyondan 70 saat sonra tohumlamaya karşı immun yanıtı bağlı oluştuğunun saptanması sonucuna dayanarak (Kaeoket ve ark., 2002), MHC-II pozitif hücrelerinin kornunun orta bölümü, korpus ve implantasyon bölgesinde fazla olmasının uterusun belirli bölgelerinde yavrunun gelişimine karşı daha yüksek yersel immun yanıt alındığı bu doktora çalışmasında elde edilen sonuçlara bakılarak söylenebilir.

Aktive olmuş T-lenfositlerinin $IFN\gamma$ ve $TNF-\alpha$ üreterek luteal hücrelerde MHC-I ve MHC-II ekspresyonunu arttırdıkları, buna karşılık progesteron üretimini baskıladıkları bulunmuştur (Fairchild ve Pate, 1989; Benyo ve Pate, 1992). Elde edilen MHC-II pozitif hücre sayıları ile progesteron arasında negatif korelasyon bulguları bu yazarların sonuçlarını desteklemektedir.

MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin, MHC-I ve MHC-II pozitif hücre sayılarının köpekte embriyonik dönem ve diğer gebelik dönemleri arasında önemli düzeyde farklılıklar göstermeleri ve farklılıkların gebe ve gebe olmayan köpekler arasında da saptanması, bu faktörlerin pratik uygulama amacıyla geliştirilecek yeni laboratuvar teknikleri ile köpekte erken gebeliğin tanınmasında önemli rol oynayabilecekleri sonucunu doğurmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Aktif MMP-2 ve MMP-9'un tüm MMP-2 ve MMP-9 miktarına oranlandığı durumda gebeliğin embriyonik ve post implantasyon döneminde hem endometriyum hem de miyometriyumda bu moleküllerin miktarının, gebe olmayan köpeklere oranla önemli düzeyde ($p<0,05$) yüksek olduğu saptanmıştır.
2. Zimografik yöntemle elde edilen veriler, aktif MMP-9 aktivitesinin gebeliğin çeşitli dönemlerinde farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur ($p<0,01$). Özellikle embriyonik dönem (Grup 1) ile kontrol grubu arasında önemli düzeyde farklılık olduğu ($p<0,01$) sonucuna varılmıştır.
3. Elde edilen sonuçlar latent MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi ile serum progesteron değerleri arasında negatif korelasyonun varlığını (-1,000 ve -0,999) ve bu korelasyon değerinin önemli ($p<0,05$ ve $p<0,03$) olduğunu göstermiştir.
4. Uterusun değişik bölümlerinden alınan (salpinks, apeks, kornunun orta bölümü ve korpus) dokularda, MHC-II pozitif hücre sayısı bakımından, bu dokuların alındığı hem gebeliğin farklı dönemleri arasında hem de kontrol grubuyla gebelik dönemleri karşılaştırıldığında, önemli farklılıklar olduğu saptanmıştır.
5. MHC-II pozitif hücrelerin uterusun salpinks, apeks, kornunun orta bölümü, korpus gibi değişik bölümlerinden elde edilen dokular arasında da ortalama değerler açısından farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur.
6. Regresyon analizi gebe köpeklerin apeks ve korpus bölgesinden alınan dokulardaki MHC-II pozitif hücre sayısı artışı ile bu dokuların

alındıkları günler arasında önemli düzeyde ($r^2=0,796/byx$; $r^2=0,809/byx$) pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir.

7. Gebeliğin değişik dönemlerinde ve gebe olmayan köpeklerde doku düzeyinde aktivite ve sayısal değer olarak bu parametrelerin (MMP-2, MMP-9, MHC-I, MHC-II) incelenmesi sonucunda, elde edilen verilerden yola çıkılarak, değişik pratik uygulanabilecek testlerin geliştirilebileceği ve ileride köpekte erken gebelik döneminin bir dizi çalışma sonucu bu testlere dayanarak belirlenebileceği kanısına varılmıştır.

ÖZET

Köpeklerin Erken Gebelik Döneminde Matriks Metalloproteinazların ve Doku Uyuşum Antijenlerinin Uterus ve Plasentada Belirlenmesi

Bu çalışmada MMP-2, MMP-9 ve MHC-I, II moleküllerinin uterus dokusunun değişik bölümlerinde, gebeliğin değişik dönemlerindeki miktarları ve aktiviteleri araştırıldı.

Çalışma materyalini toplam 36 dişi köpek oluşturdu. Köpeklerin gebelik dönemlerine göre, pre implantasyon dönem (Grup 1, n=11), implantasyon dönem (Grup 2, n=9), plasantasyon dönemde (Grup 3, n=9) ovariohisterektomi operasyonları yapılarak uterus dokuları alındı. Metaöstrustaki 4 köpeğe ait uterus dokuları da kontrol grubunu (Grup 4) oluşturdu. MMP aktivitelerinin ortaya konulduğu analizlerde bu gruplara ek olarak plasental labirent grubu (Grup 5, n=3) oluşturuldu. MMP-2, MMP-9 ve MHC-I, MHC-II'nin dokularda belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal boyamalar, MMP aktivitelerinin belirlenmesi için de jelatin zimografi tekniği kullanıldı. Sayısal veriler zimografi jel görüntülerinin bilgisayara aktarılmasıyla elde edildi. MHC-II pozitif hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı.

MMP-2 aktivitesinin endometriyum ve miyometriyumda gebe olmayan köpeklere oranla istatistiksel yönden yüksek olduğu saptandı. Pre implantasyon (%23,2) ve plasental gruplara (%33,3) ait MMP-9 aktivitesi, implantasyon (%8,1) ve post implantasyon (%13,2) gruptan ve kontrol grubundan (%11,8) önemli düzeyde farklı bulundu ($p<0,05$). MHC-II pozitif hücrelerin ortalama değerlerinin, salpinksteki kesitlerde (grup1, 1,62; grup 2, 2,36; grup 3, 1,64) kontrol grubundan (0,55) istatistiksel yönden önemli ölçüde farklı olduğu ortaya kondu ($p<0,05$). Regresyon analizi ile yapılan istatistiksel hesaplamalar, apeks ve korpus bölgesinden alınan dokularda gebelik dönemleri ile (Grup 1, Grup 2, Grup 3) bu günlere göre MHC-II pozitif hücre artışı arasında önemli pozitif bir ilişki olduğunu ($r^2=0,796/byx$; $r^2=0,809/byx$) gösterdi. MMP-2, MMP-9 ve progesteron değerleri arasında yüksek düzeyde ($-0,988$; $-0,854$) ve önemli derecede ($p<0,03$; $p<0,05$) negatif bir korelasyon olduğu bulundu.

Sonuç olarak MMP-2, MMP-9 aktivitelerinin ve MHC-I, MHC-II pozitif hücre sayılarının köpekte embriyonik dönem ve diğer gebelik dönemleri arasında önemli düzeyde farklı olduğu ve bu farklılığın gebe ve gebe olmayan köpekler arasında da bulunduğu ortaya konuldu.

Anahtar Sözcükler: Dişi köpek, erken gebelik, immunohistokimya, MHC-I, II, MMP-2, 9

SUMMARY

The Uterine and Placental Expression of Matrix Metalloproteinases and Major Histocompatibility Complex During Early Canine Pregnancy

In the present study, the amounts and activities of MMP-2, MMP-9 and MHC-I, II molecules were investigated in different uterus sites at different pregnancy stages.

The material of the study included 36 bitches. Uterine tissues were removed according to pregnancy stages at preimplantation stage (Group 1, n=11), implantation stage (Group 2, n=9), placentation stage (Group 3, n=9). Moreover, uterus of 4 bitches in metoestrus stages constitute control group. Additionally placental labyrinth group (Group 5, n=3) was formed for MMP activity analysis. Immunohistochemical staining was used to determine MMP-2, MMP-9 and MHC-I, MHC-II in tissue samples, gelatine zymography technic was used to determine MMP activities. Numeric data was obtained from transferring zymography gel images to computer. MHC-II positive cells were counted under a stereo microscope.

MMP-2 activity in endometrium and myometrium in comparison with nonpregnant animals was found statistically important. MMP-9 activities of preimplantation (23.2%) and placental groups (33.3%) were found different than implantation (8.1%), postimplantation (13.2%) and control groups (11.8%) ($p<0.05$). Average numbers of MHC-II positive cells in salpax sites (group1, 1.62; group 2, 2.36; group 3, 1.64) were found different than control group (0.55) ($p<0.05$). Regression analyses showed a positive relation between pregnancy stages (Group 1, Group 2, Group 3) and enhancement of MHC-II positive cell number in apex and corpus sites of uterus ($r^2=0.796/$ byx; $r^2=0.809/$ byx). High significant ($p<0.03$; $p<0.05$) negative correlation (-0.988; -0.854) was found between MMP-2, MMP-9 and progesterone levels.

In conclusion, MMP-2, MMP-9 activities and MHC-I, MHC-II positive cell numbers in embryonic stages and other pregnancy stages were found different. Moreover these differences were found between pregnant and nonpregnant bitches.

Key Words: Bitch, early pregnancy, immunohistochemistry, MHC-I, II, MMP-2, 9

KAYNAKLAR

- ACE, C. I., OKULICZ, W. C. (1995). Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol.*, **115**(1):95-103.
- AGARWAL, R., LOGANATH, A., ROY, A. C., WONG, Y. C., NG, S. C. (2000). Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture. *Gynecol Endocrinol.*, **14**(5):305-10.
- AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* **9**:1897–906
- ALAÇAM, E., ORAL, H., MACUN, C., (2005). Evaluation of blood relaxin levels in bitches and queens for the diagnosis of pregnancy, false pregnancy and foetal deaths. *Indian Vet. J.*, **82**: 268-271.
- ALEXANDER, C. M., HANSELL, E. J., BEHRENDTSEN, O., FLANNERY, M. L., KISHNANI, N. S., HAWKES, S. P., WERB, Z. (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development.*, **122**(6):1723-36.
- ALM, G. V. (1987). Lymphokines in the regulation of immune responses. *Vet Immunol Immunopathol.*, **17**(1-4):173-82.
- ANADOL, E. (2006). Dişi köpeklerde uygulanan eksojen GnRH'nın serum östradiol 17 β düzeyi ve vagina epitelinde yaptığı sitolojik değişikliklerin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ANDERSON, J. W. (1969). Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. I. The placental labyrinth. *Anat. Rec.* **165**, 15-36
- ANDERSON, J. W., SIMPSON, M. E. (1973). The ovary and reproductive cycle of the dog. Peron-X Inc., Los Altos, Calif.
- ANTCZAK, D. F. (1992). The Major Histocompatibility Complex of the Horse. In: Equine Infectious Diseases VI. Proceedings of the Sixth International Congress on Equine infectious diseases. Ed.: W. Plowright, P.D. Rosedale, J.F. Wade. R&W. Publications (Newmarket) Ltd. p. 99-112.
- APAKKAN-AKSUN, S., ÖZMEN, D., BAYINDIR, O. (2001). Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Tıp Bilimleri Dergisi*, **21**:4
- ARCHBALD, L. F., BAKER, B., CLOONEY, L. L., GODKE, R. A. (1980). Collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin.*, **75**(2), 228-38.
- ARTHUR, M. J. P. (1994). Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Path Res Pract.*, **190**, 825-33.
- ASHKAR, A. A., DI SANTO, J. P., CROY, B. A. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.*, **192**:259–269.

- BARRAU, M. D., HABEL JR, J., TORBIT, C. A., TIETZ JR, W. J. (1975). Development of the implantation chamber in pregnant bitch. *Am. J. Anat.*, **143**, 115-130.
- BARTH, R, COUNCE, S, SMITH, P, SNELL, G. D. (1956). Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann Surg. Aug.*, **144**(2):198-204.
- BENAUD, C., DICKSON, R. B., THOMPSON, E. W. (1998). Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, **50**(2):97-116.
- BENYO, D. L., PATE, J.L. (1992). Tumor necrosis factor- α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology*, **130**: 854-860.
- BISCHOF, P., CAMPANA, A. (2000). Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, **14**(5):801-14.
- BISCHOF, R. J., LEE, C. S., BRANDON, M. R., MEEUSEN, E. (1994). Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *J Reprod Immunol.*, **26**(2):131-46.
- BOSE, R., (1997). An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.* **14**(9), 497-499.
- BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, **1477** (1-2): 267-83.
- BUHI, W. C., ALVAREZ, I. M., SHILLE, V. M., THATCHER, M. J, HARNEY, J. P., COTTON, M. (1995). Purification and characterization of a uterine retinol-binding protein in the bitch. *Biochem J.*, **311**:407-415.
- BUHI, W. C., SHILLE, VM, THATCHER, M. J., ALVAREZ, I. M., QIU, Y. X. (1993). Identification of proteins synthesized by dog endometrium and membranes, and immunolocalization of RBP and CUPED. *J Reprod Fertil Supplement*, **47**:141-157.
- BUHI, W. C., THATCHER, M. J., SHILLE, V. M., ALVAREZ, I. M., LANNON, A. P., JOHNSON, J. (1992). Synthesis of uterine endometrial proteins during early diestrus in the cyclic and pregnant dog, and after estrogen and progesterone treatment. *Biol Reprod.*, **47**:326-336.
- BUKOVSKY, A., CAUDLE, M. R., KEENAN, J. A., WIMALASENA, J., UPADHYAYA, N. B., VAN METER, S. E. (1995). Is corpus luteum regression an immune-mediated event? Localization of immune system components and luteinizing hormone receptor in human corpora lutea. *Biol Reprod.*, **53**(6):1373-84.
- BYSTED, B. V., DIELEMAN, S. J., HYTTTEL, P., GREVE, T. (2001). Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 181-186.
- CAVANAGH, A.C., (1997). An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.* **14**(9), 492-495.
- CENCIC, A., GUILLOMOT, M., KOREN, S., LA BONNARDIERE, C. (2003). Trophoblastic interferons: do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? *Placenta.*, **24**(8-9):862-9.
- CHEN, G.A., HUANG, J.R., TSANG. L. (1988). The effect of relaxin on cyclic AMP concentration in human endometrial glandular epithelial cells. *Biol. Reprod.*, **39**, 519-525.

- CHICZ, R. M., URBAN, R. G., LANE, W. S., GORGA, J. C., STERN, L. J., VIGNALI, D. A., STROMINGER, J. L. (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature.*, **358**(6389):764-8.
- CHOI, Y. H., LOVE, C. C., VARNER, D. D., LOVE, L. B., HINRICHS, K. (2003). Effects of gas conditions, time of medium change, and ratio of medium to embryo on in vitro development of horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, **59**(5-6), 1219-1229.
- CHU, P. Y., SALAMONSEN, L. A., LEE, C. S., WRIGHT, P. J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction*, **123**(3):467-77.
- CLAUSEN, I. (2005). Veränderungen der Transkription in Embryoblast und Trophoblast der Kaninchenblastozyste nach Exposition mit polychlorierten Biphenylen, Doktora Tezi, Der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Giesen.
- COBBOLD, S., METCALFE, S. (1994). Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens.*, **43**(3):137-54.
- CONCANNON, P. W. (1980). Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. *J. Reprod. Fertil.* **58**, 407-410.
- CONCANNON, P. W. (1984). Endocrinology of canine estrus cycle, pregnancy and parturition. Proc. Ann. Meeting Soc. *Theriogenology*, 1984, Denver, Colorado, USA, S. 1-24.
- CONCANNON, P. W. (1986). Canine pregnancy and parturition. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **16**, 453-475.
- CONCANNON, P. W., HANSEL, W. (1977). Prostaglandin F_{2α} induces luteolysis, hypothermia and abortion in beagle bitches. *Prostaglandins*, **13**, 533-542.
- CONCANNON, P. W., TSUTSUI, T., SHILLE, V. (2001). Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **57**, 169-179.
- CONCANNON, P. W., MCCANN, J. P., TEMPLE, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **39**, 3-25.
- CONCANNON, P. W., WEINSTEIN, P., WHALEY, S., FRANK, D. (1987). Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone anti-serum and by bromocriptine. *J. Reprod. Fertil.* **81**, 175-180.
- CONCANNON, P. W., WHALEY, S., LEIN, D., WISSLER, R. (1983). Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am. J. Vet. Res.* **44**, 1819-1821.
- COUGHLAN, A. R., ROBERTSON, D. H., BENNETT, D., MAY, C., BEYNON, R. J., CARTER, S. D. (1998). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec.*, **143**(8):219-23.
- CROY, B.A., WOOD, W., KING, G.J., (1987). Evaluation of intrauterine immune suppression during pregnancy in a species with epitheliochorial placentation. *J. Immunol.* **139**, 1088-1095.

- CRUMP, A., DONALDSON, W. L., MILLER, J., KYDD, J., ALLEN, W. R., ANTCAZAK, D. F. (1987). Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) antigens on equine trophoblast. *J Reprod Fert Suppl.*, **35**, 379-388.
- CURRAN, S., MURRAY, G.I. (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.*, **36**(13):1621-30.
- CURRY, JR T. E. , OSTEEEN, K. G. (2003). The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev.*, **24**(4):428-65.
- DAI B, CAO Y, ZHOU J, LI S, WANG X, CHEN D, DUAN E. (2003). Abnormal expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in interspecific pregnancy of rat embryos in mouse recipients. *Theriogenology.*, **15**;60(7):1279-91.
- DANTZER, V. (1999). Endotheliochorial Placentation. In: E. Knobil, J. D. Neill (Hrsg.): Encyclopedia of Reproduction. Verlag Academic Press, San Diego, USA, S. 1078-1084.
- DAS, S. K., WANG, J., DEY, S. K., MEAD, R. A. (1999). Spatiotemporal expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 during delayed implantation and the periimplantation period in the Western spotted skunk. *Biol Reprod*, **60**: 893-9.
- DAVIS, B. J., LENNARD, D. E., LEE, C. A., TIANO, H. F., MORHAM, S. G., WETSEL, W. C., LANGENBACH, R. (1999). Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology*, **140**: 2685-95.
- DEBENHAM, S. L., HART, E. A., ASHURST, J. L., HOWE, K. L., QUAIL, M. A., OLLIER, W. E., BINNS, M. M. (2005). Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species. *Genomics.*, **85**(1):48-59.
- DICKSON, S. E., BICKNELL, R., FRASER, H. M. (2001). Mid-luteal angiogenesis and function in the primate is dependent on VEGF. *Journal of Endocrinology*, 168.
- DINCHUK, J. E., CAR, B. D., FOCHT, R. J., JOHNSTON, J. J., JAFFEE, B. D., COVINGTON, M. B., CONTEL, N. R., ENG, V. M., COLLINS, R. J., CZERNIAK, P. M. (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, **378**: 406-9.
- DONALDSON, W. L., ZHANG, C. H., ORIOL, J. G., ANTCAZAK, D. F. (1990). Invasive equine trophoblast expresses conventional class I Major Histocompatibility Complex antigens. *Development*, **110**, 63-71.
- DÖCKE, F. (1994). Gravidität, Geburt und Puerperium. In: F. Döcke (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Auflage, Verlag Fischer, Jena, Stuttgart, S. 516-554.
- DÖHRING, A. (2004). Etablierung eines In-vivo-Modells zur Charakterisierung der Immunreaktion des Uterus von Jungsauen nach Insemination. Doktora Tezi, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- DUNCAN, W. C. (2000). The human corpus luteum: remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Rev Reprod.*, **5** (1): 12-7.
- EINSPANIER, A., BUNCK, C., SALPIGTIDOU, P., MARTEN, A., FUHRMANN, K., HOPPEN, H. O., GÜNZEL-APEL, A. R. (2002). Relaxin: ein wichtiger Graviditätsindikator bei der Hündin. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **109**, 8-12.

- ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E. (1989). Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **39**, 91-100.
- ENNIS, B. W., MATRISIAN, L. M. (1994). Matrix degrading metalloproteinases. *Journal of Neuro-Oncology*, **18**:105-9.
- EVANS, J. M., ANDERTON, D. J. (1992). Pregnancy diagnosis in the bitch: the development of a test based on the measurement of acute phase proteins in the blood. *Annls. Zootech.* **41**(3-4):397-405.
- EVANS, J. D., GHANEH, P., KAWESHA, A., NEOPTOLEMOS, J. P. (1997). Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion.*, **58**:520-8.
- FAIRCHILD, D.L., PATE, J. L. (1989). Interferon- γ induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod.*, **40**: 453-457.
- FAIRCHILD, D.L., PATE, J. L. (1991). Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma. *Biol Reprod.*, **44**(2):357-63.
- FAJARDO, L. F., KWAN, H. H., KOWALSKI, J., PRIONAS, S. D., ALLISON, A. C. (1992). Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol.*, **140**(3):539-44.
- FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. (1987). Canine female reproduction. In: E. C. Feldman, R. W. Nelson (Hrsg.): Canine and feline endocrinology and reproduction. 2. Aufl., Verlag W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, S. 399-475.
- FELSBURG, P. J., SOMBERG, R. L., HARTNETT, B. J., HENTHORN, P. S., CARDING, S. R. (1998). Canine X-linked severe combined immunodeficiency. A model for investigating the requirement for the common gamma chain (gamma c) in human lymphocyte development and function. *Immunol Res.*, **17**(1-2):63-73.
- FERNANDES, P. A., BOWEN, R. A., KOSTAS, A. C., SAWYER, H. R., NETT, T. M., OLSON, P. N. (1987). Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol Reprod.*, **37**(4):804-11.
- FERNANDEZ, H. A., KALLENBACH, K., SEGHEZZI, G., GROSSI, E., COLVIN, S., SCHNEIDER, R., MIGNATTI, P., GALLOWAY, A. (1999). Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Surg Res.*, **82**(2):156-62.
- FERNANDEZ, P. L., MERINO, M. J., NOGALES, F. F., CHARONIS, A. S., STETLER-STEVENSON, W., LIOTTA, L. (1992). Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kilodalton type IV collagenase in the implantation placental site. *An integrated view. Lab Invest.*, **66**(5):572-9.
- GERBER, J. G., HUBBARD, W. C., NIES, A. S. (1979). Uterine vein prostaglandin levels in late pregnant dogs. *Prostaglandins.*, **17**(4):623-7.
- GOEDE, V. SCHMIDT, T., KIMMINA, S. (1998). Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*, **78**, pp. 1385–1394.
- GOLDMAN, S., SHALEV, E. (2006). Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol Reprod.*, **74**(1):13-22.

- GOLDMAN, S., WEISS, A., EYALI, V., SHALEV, E. (2003). Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod.*, **9**(6):367-73.
- GRETHER, B. M., FRIESS, A. E. (1993). Die Drüsenkammern der Hundeplazenta - eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **135**, 272-278.
- GRETHER, B. M., FRIESS, A. E., STOFFEL, M. H. (1998). The glandular chambers of the placenta of the bitch in the second third of pregnancy (day 30-44): an ultrastructural, ultrahistochemical and lectin histochemical investigation. *Anat. Histol. Embryol.* **27**, 95-103.
- GROMME, M., NEEFJES, J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol.*, **39**(3-4):181-202.
- GRÜNAU, B. (1994). Zur Bedeutung von Prolaktin bei der Pseudogravidität der Hündin. Doktora Tezi. Hannover.
- GÜNZEL-APEL, A. R., HEINZE, B., SCHÄFER, D. (2001). Bestimmung des Gestationsalters. In: C. Poulsen Nautrup, R. Tobias (Hrsg.), Atlas und Lehrbuch der Ultraschall Diagnostik bei Hund und Katze. 3. Aufl., Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, S. 304-311.
- HARVEY, M. J. A. (1991). Changes in the ovum during the time of ovulation. BSAVA Congress Proceedings. **50**.
- HARVEY, M. J., NICKSON, D. A., RENTON, J. P., BOYD, J. S., ECKERSALL, P. D., FERGUSON, J. M., (1993). Studies of protein synthesis in dog oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **47**, 533-534.
- HASHIZUME, K., TAKAHASHI, T., SHIMIZU, M., TODOROKI, J., SHIMADA, A., HIRATA, M., SATO, T., ITO, A. (2003). Matrix-metalloproteinases-2 and -9 production in bovine endometrial cell culture. *J Reprod Dev.*, **49**(1):45-53.
- HEHNKE, K. E., CHRISTENSON, L. K., FORD, S. P., TAYLOR, M. (1994). Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis. *Biol Reprod.*, **50**(1):10-5.
- HIDALGO, M., ECKHARDT, S. G. (2001). Matrix metalloproteinase inhibitors: how can we optimize their development? *Ann Oncol.*, **12**(3):285-7.
- HILL, J. R., SCHLAFER, D. H., FISHER, P. J., DAVIES, C. J. (2002). Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol Reprod.*, **67**(1):55-63.
- HILL, J. A., WELCH, W. R., FARIS, H. M., ANDERSON, D. J. (1990). Induction of class II major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma: a potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.*, **162**(2):534-40.
- HIRANO, T., YASUKAWA, K., HARADA, H., TAGA, T., WATANABE, Y. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* **324**:73-76.

- HOFFMANN, B., RIESENBECK, A., KLEIN, R., (1996). Reproductive endocrinology of the bitch. *Anim Reprod Sci.*, **42**, 275–288.
- HOFFMANN B., SCHNEIDER, S. (1993). Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrous cycle in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **47**, 85-91.
- HOLST, P. A., PHEMISTER, R. D. (1971). The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol. Reprod.* **5**, 194-206.
- HOWARD, J. C. (1995). Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol.*, **7**(1):69-76.
- HUPPERTZ, B., KERTSCHANSKA, S., DEMIR, A. Y., FRANK, H. G., KAUFMANN, P. (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res.*, **291**(1):133-48.
- HWANG, J. J., MACINGA, D., RORKE, E. A. (1996). Relaxin modulates human cervical stromal cell activity. *J Clin Endocrinol Metab.*; **81**:3379–3384.
- JANEWAY, C. A. JR. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.*, **3**(13):1167-71.
- JEFFCOATE, I. A., LINDSAY, F. E. (1989). Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **39**, 277-287.
- JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. (2001). Disorders of the mammary glands of the bitch. In: *Canine and Feline Theriogenology*, Ed.: D. LeMelledo. W. B. Saunders company, p.: 243-256.
- KAEOKET, K., DALIN, A.-M., MAGNUSSON, U., PERSSON, E., (2002). The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on the distribution of CD2, CD4, CD8, and MHC class II expressing cells. *Anim. Reprod.Sci.*, **73**, 109–119.
- KAEOKET, K., PERSSON, E., DALIN, A. M. (2003). Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the distribution of CD2, CD4, CD8 and MHC class II expressing cells in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci.*, **15**;76(3-4):231-44.
- KHOKHA, R., WATERHOUSE, P. (1994). The role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in specific aspects of cancer progression and reproduction. *Journal of Neuro- Oncology*, **18**: 123-7.
- KIM, J. S., PARK, H. Y., KWON, J. H., IM, E. K., CHOI, D. H., JANG, Y. S., CHO, S. Y. (2002). The roles of stromelysin-1 and the gelatinase B gene polymorphism in stable angina. *Yonsei Med J.*, **43**(4):473-81.
- KIM, J. J., WANG, J., BAMBRA, C., DAS, S. K., DEY, S. K., FAZLEABAS, A. T. (1999). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the baboon endometrium during the menstrual cycle and pregnancy. *Endocrinology*, **140**: 2672-8.
- KING, G.J., (1988). Reduction in uterine intra-epithelial lymphocytes during early gestation in pigs. *J. Reprod. Immunol.*, **14**: 41–46.
- KISHIMOTO, T. (2005). INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**:1–21.

- KISO, Y., YAMAUCHI, S. (1984). Histochemical study on hydroxysteroid dehydrogenases in the trophoblast of the dog placenta. *Nippon Juigaku Zasshi*. **46**(2):219-23.
- KLEIN, J. (1986). Natural History of the Major Histocompatibility Complex, John Wiley & Sons, New York.
- KLONISCH, T., HOMBACH-KLONISCH, S., FRÖHLICH, C., KAUFFOLD, J., STEGER, K., STEINETZ, B. G., FISCHER, B. (1999). Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biol. Reprod.* **60**, 551-557.
- KNOTEK, Z., (1990). Demonstration of early pregnancy factor in gilts during the reproductive cycle. *Acta Vet. Brno.*, **59**, 35-40.
- KOCH, E., ELLENDORFF, F. (1986). Studies on early pregnancy factor (EPF) in the pig. In: Hau j (ed.): Pregnancy proteins in animals: Proceedings of the International Meeting on Pregnancy Proteins in Animals. Copenhagen, Denmark, W de Gruyter, 501-4.
- KOOISTRA, H. S., OKKENS, A. C. (2001). Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. *J Reprod Fertil Suppl.*; **57**:11-4.
- LAIRD, S. M., DALTON, C. F., OKON, M. A., BUNNING, R. A., MARSHALL, R., LI, T. C. (1999). Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in endometrial flushings from pre- and post-menopausal women and from women with endometrial adenocarcinoma. *J Reprod Fertil.*, **115**(2):225-32.
- LASH, G.E., LEGGE, M., (1997). Early pregnancy factor: an unresolved molecule. *J. Assist. Reprod. Genet.* **14**(9), 495-496.
- LEI, T., YANG, Z. Q., XIA, T., GAN, L., CHEN, X. D., YUAN, J. H., ZHU, Y. (2004). Stage-specific expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in rabbit pre-implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. *Reprod Domest Anim.*, **39**(1):13-8
- LIBRACH, C. L., FEIGENBAUM, S. L., BASS, K. E., CUI, T. Y., VERASTAS, N., SADOVSKY, Y., QUIGLEY, J. P., FRENCH, D. L., FISHER, S. J. (1994). Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem.*, **269**(25):17125-31.
- LIM, H., PARIA, B. C., DAS, S. K., DINCHUK, J. E., LANGENBACH, R., TRZASKOS, J. M., DEY, S. K. (1997): Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, **91**: 197-208.
- LLOYD S. (1983). Effect of pregnancy and lactation upon infection. *Vet Immunol Immunopathol.*, **4**(1-2):153-176.
- LUNNEY, J. K., PESCOVITZ, M. D. (1987). Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol.*, **17**(1-4):135-44.
- MARBAIX, E, DONNEZ, J, COURTOY, P. J., EECKHOUT, Y. (1992). Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci.*, **89**(24):11789-93.
- MATRISIAN, L. M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Tig*, **6**:4.

- MATTSSON, R., MATTSSON, A., HOLMDAHL, R., SCHEYNIUS, A., VAN DER MEIDE, P. H. (1992). In vivo treatment with interferon-gamma during early pregnancy in mice induces strong expression of major histocompatibility complex class I and II molecules in uterus and decidua but not in extra-embryonic tissues. *Biol Reprod.*, **46**(6):1176-86.
- MEISSER, A., CHARDONNENS, D., CAMPANA, A., BISCHOF, P. (1999). Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod.*, **5**(3):252-60.
- MENINO, JR. A. R., HOGAN, A., SCHULTZ, G. A., NOVAK, S., DIXON, W., FOXCROFT, G. H. (1997). Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig. *Dev Genet.*, **21**(1):68-74.
- MICHEL, G. (1995). Die Plazentation. In: G. MICHEL (Hrsg.): Vergleichende Embryologie der Haustiere: ein Lehrbuch auf funktioneller Grundlage. Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 106-141.
- MOTRO, B., ITIN, A., SACHS, L., KESHET, E. (1990). Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci.*, **87**(8):3092-6.
- MURGITA, R. A., TOMASI, JR. T. B., (1975). Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *J Exp Med.* Feb 1;**141**(2):269-286.
- MURRAY, M. J., LESSEY, B. A. (1999). Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, **17** (3): 275-90.
- NAGASE, H., SUZUKI, K., ITOH, Y., KAN, C-C., GEHRING, M. R., HUANG, W., BREW, K. (1996). Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. *Intracellular Protein Catabolism*, New York,; 23-31.
- NAGATA, T., HIGASHI, T., AOSHI, T., SUZUKI, M., UCHIJIMA, M., KOIDE, Y. (2001). Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells in vivo: the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine.*, **20**(1-2):105-14.
- NELSON, A. R., FINGLETON, B., ROTHENBERG, M. L., MATRISIAN, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.*, **18**(5):1135-49.
- NETT, T. M., AKBAR, A. M., PHEMISTER, R. D., HOLST, P. A., REICHERT, JR. L. E., NISWENDER, G. D. (1975). Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during estrous cycle and pregnancy in the Beagle bitch. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**, 134-139.
- NODEN, D. M. (1986). Current veterinary therapy IX. Small animal practice. In: R. W. Kirk (Hrsg.): Verlag Saunders, Philadelphia, ABD, S. 1248-1257.
- NODEN, D., DE LAHUNTA, A., (1985). The Embryology of Domestic Animals. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 196-210.
- O'BRIEN, S. J., YUHKI, N. (1999). Comparative genome organization of the major histocompatibility complex: lessons from the Felidae. *Immunol Rev.*, **167**:133-44.

- OKKENS, A. C., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J., WILLEMSE, A. H. (1985). Shortening of the interestrous interval and lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Vet. Quart.* **7**, 173-176.
- OKKENS, A. C., BEVERS, M. M., DIELEMAN S. J., WILLEMSE, A. H. (1990). Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *Vet Q.*, **12**(4):193-201.
- OLSCHEWSKI, C. (1987). Die Lactatio falsa der Hündin: Klinische und hormonanalytische Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung einiger Therapieverfahren. Doktora Tezi. Gießen.
- OLSON, P. N., BOWEN, R. A., BEHRENDT, M. D., OLSON J. D., NETT, T. M. (1982). Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol. Reprod.* **27**, 1196-1206.
- OLSON, P. N., NETT, T. M., BOWEN, R. A., SAWYER H. R., NISWENDER, G. D (1989). Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **39**, 27-40.
- ONCLIN, K., VERSTEGEN, J. P. (1997). In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and -diestrus. *Dom. Anim. Endocrinol.* **14**, 25-38.
- OSTEEN, K. G., BRUNER, K. L., SHARPE-TIMMS, K. L. (1996). Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol.*, **14**(3):247-55.
- PATE, J. L. (1995). Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. *J Reprod Fertil Suppl.*, **49**:365-77.
- PHEMISTER, R. D., HOLST, P. A., SPANO, J. S., HOPWOOD, M. L. (1973). Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol. Reprod.* **8**(1):74-82.
- POLLAK, S., SCHÄFER-SOMI, S., HERKNER, K. R. (2001). Zytoplasmatische Autoantikörper bei der trächtigen Hündin. Autoimmundiagnostik in Human- und Veterinärmedizin, Labor und Klinik. AKH, Wien. 24. Okt. 2000. *Berichte der Österreichischen Gesellschaft für klinische Chemie*, **24**, (2), 42-44.
- PREIDKALNS, J., LEISER, R. (1998): Female reproductive system. In: *Textbook of Veterinary Histology*, Ed.: H. Dellman, S. Eurell. Williams & Wilkins, Baltimore.
- RAMSOONDAR, J. J., CHRISTOPHERSON, R. J., GUILBERT, L. J., DIXON, W. T., GHAHARY, A., ELLIS, S., WEGMANN, T. G., PIEDRAHITA, J. A. (1999). Lack of class I major histocompatibility antigens on trophoblast of periimplantation blastocysts and term placenta in the pig. *Biol Reprod.*, **60**(2):387-97.
- RAO, V. H., SINGH, R. K., DELIMONT, D. C., FINNELL, R. H., BRIDGE, J. A., NEFF, J. R., GARVIN, B. P., PICKERING, D. L., SANGER, W. G., BUEHLER, B. A., SCHAEFER, G. B. (1999). Transcriptional regulation of MMP-9 expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone by tumor necrosis factor-alpha. *Int J Oncol.*, **14**(2):291-300.
- RAY, J. M., STETLER-STEVENSON, W. G. (1994). The role of Matrix Metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J.*, **7**: 2062-72.
- RAZIIDDIN, S., EL-AWAD, M. E., TELMESANI, A. W., BILAL, N. E., AL-JANADI, M. (1995). CD4+ Th2 cell response cytokine production in bacterial meningitis. *J Clin Immunol.* **15**(6):338-48.

- REDMAN, C. W. (1983). HLA-DR antigen on human trophoblast: a review. *Am J Reprod Immunol.*, **3**(4):175-7.
- REIMERS, T. J., PHEMISTER, R. D., NISWENDER, G. D. (1978). Radioimmunological measurement of follicle stimulation hormone and prolactin in the dog. *Biol. Reprod.* **19**, 673-679.
- RENTON, J. P., BOYD, J. S., ECKERSALL, P. D., FERGUSON, J. M., HARVEY, M. J., MULLANEY, J., PERRY, B. (1991). Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* **93** (1), 221-231.
- REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A. (1992). Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol Reprod*, **47**,698–708.
- RILEY, S. C., WEB, C. J., LEASK, R., MCCAIG, F. M., HOWE, D. C. (2000). Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodelling in the sheep placenta. *J Reprod Fertil.*, **118**(1):19-27.
- ROITT, I. M., COOKE, A. (1987). The role of autoantigen in autoimmunity. *Immunol Lett.*, **16**(3-4):259-63.
- RUSSE, I. (1991). Frühgravidität, Implantation und Plazentation. In: I. Rüsse, F. Sinowatz (Hrsg.): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Verlag Paul Parey, Berlin, Hannover, S. 153-198.
- SALAMONSEN, L. A. (1999). Role of proteases in implantation. *Rev Reprod.*, **4**(1):11-22.
- SALMANOĞLU, R., ŞENTÜRK, C., EKER, K. (2006). Ovulasyon günü ultrasonografi ile belirlenen köpeklerde gebeliğin erken dönemde saptanması. *II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006*, Antalya: 210-211.
- SCHÄFER, D., POULSEN NAUTRUP, C. (2001). Frühträchtigkeit. In: C. Poulsen Nautrup, R. Tobias (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. 3. Aufl., Verlag Schlütersche Verlagsanstalt Hannover, S. 293-297.
- SCHÄFER-SOMI, S. (2003). Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Anim. Reprod. Sci.* **75**: (1-2), 73-94.
- SCHÄFER-SOMI, S., AKSOY, O. A., PATZL, M., FINDİK, M., ERÜNAL-MARAL, N, BECERİKLISOY, H. B., POLAT, B, ASLAN, S. (2005). The Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Serum of Pregnant and Non-Pregnant Bitches. *Reprod Dom Anim.*, **40**, 46–50.
- SCHÄFER-SOMI, S., BECERİKLISOY, H. B., BUDİK, S., KANCA, H., AKSOY, O. A., POLAT, B., ÇETİN, Y. AY, S. S., ASLAN, S. (2007). Expression of genes in the canine preimplantation uterus and embryo – implications for an active role of the embryos during invasion. *Basımda*.
- SCHÄFER-SOMI, S., HERKNER, K. R., NEUBAUER, S., EGERBACHER, M., PATZL, M., POLLAK, S., AKSOY, O. A., BECERİKLISOY, H. B., KANCA, H., FINDİK, M., KALENDER, H., ASLAN, S. (2006). A Screening for the Occurrence of Autoreactive Antibodies in Sera of Pregnant and Non-pregnant Bitches. *Reprod Dom Anim*, **41**, 48–54.
- SCHNORR, B. (1996). Plazentation beim Säuger und Embryonalhüllen beim Vogel. In: B. Schnorr (Hrsg.): Embryologie der Haustiere. 3. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 66-96.
- SETHI, C. S., BAILEY, T. A., LUTHERT, P. J., CHONG, N. H. V. (2000). Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol*, **84**:654-64.

- SHARP, D. C., McDOWELL, K. J., (1985). Critical events surrounding the maternal recognition of pregnancy in mares. *Equine Vet J Suppl* **3**: 19-22.
- SIITERI, P. K., STITES, D. P. (1982). Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol Reprod.*, **26**(1):1-14.
- SINOWATZ, F. (1991). Allgemeine Prinzipien der Entwicklung und Morphogenese. In: I. Rüsse, F. Sinowatz (Hrsg.): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 29-41.
- SMITH, M. S., MCDONALD, L. E. (1974). Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. *Endocrinology*, **94**, 404-412.
- SMITH, W. L., GARAVITO, R. M., DEWITT, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.*, **271**: 33157-60.
- SOKOLOWSKY, J. (1974). The effects of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch. *Lab Anim Sci*, **21**, 696 - 699.
- STEINETZ, B. G., BÜLLESBACH, E. E., GOLDSMITH, L. T., SCHWABE, C., LUST, G. (1996). Use of synthetic canine relaxin to develop a rapid homologous radioimmunoassay. *Biol. Reprod.* **54**, 1252-1260.
- STEINETZ, B. G., GOLDSMITH, L. T., HASAN, S. H, LUST, G. (1990). Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin or estradiol-17 β in the pregnant bitch. *Endocrinology*, **127**, 1057-1063.
- STOFFEL, M. H., GILLE, U., FRIESS, A. E. (1998). Scanning electron microscopy of the canine placenta. *Ital. J. Anat. Embryol.* **103**, 291-300.
- TABIBZADEH S, KONG Q. F, BABAKNIA A. (1994). Expression of adhesion molecules in human endometrial vasculature throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.*, **79**(4):1024-32.
- TABIBZADEH, S., KONG, Q. F., BABAKNIA, A., MAY, L. T. (1995). Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod.*, **10**(10):2793-9.
- TABIBZADEH, S., SHEA, W., LESSEY, B. A., BROOME, J. (1999). From endometrial receptivity to infertility. *Semin Reprod Endocrinol.*, **17**(3):197-203.
- TANAKA, H., MIYAZAKI, N., OASHI, K., TANAKA, S., OCMICHI, M., ABE, S. (2000). Sputum Matrix Metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of Metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J.Allergy Clin Immunol.*, **105**: 5.
- TAYADE, C., BLACK, G. P., FANG, Y., CROY, B. A. (2006). Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J. Immunol.*, **176**:148–156.
- TERRANOVA, P. F., HUNTER, V. J., ROBY, K. F., HUNT, J. S. (1995). Tumor necrosis factor-alpha in the female reproductive tract. *Proc Soc Exp Biol Med.*, **209**(4):325-42.
- THATCHER, M. J. D., SHILLE, V. M., BUHI, W. C., ALVAREZ, I. M., CONCANNON P. W., THIBEAULT, D. (1994). Canine conceptus appearance and de novo protein synthesis in relation to the time of implantation. *Theriogenology*, **41**, 1679-1692.

- THORGEIRSSON, U. P., LINDSAY, C. K., COTTAM, D. W., GOMEZ, D. E. (1994). Tumor invasion, proteolysis and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology*, **18**:89-103.
- TSUTSUI, T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in the dog. *J. Reprod Fertil., Suppl.*, **39**, 169-175.
- TSUTSUI, T., HORI, T., OKAZAKI, H., TANAKA, A., SHIONO, M., YOKOSUKA, M., KAWAKAMI, E. (2001). Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci.*, **63**(4), 401-405.
- VAGNONI, K. E., GINTHER, O. J., LUNN, D. P. (1996). Expression of major histocompatibility complex antigen and timing of invasion by equine chorionic girdle cells cultured on Matrigel. *Biol Reprod.*, **54**(1):219-23.
- VAN SNICK, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* **8**:253-78.
- VINATIER, D., TIFFET, O., DUFOUR, P., TIBERGHIE, B., MAUNOURY-LEFEBVRE, C., MONNIER, J. C. (1992). Cytokines and pregnancy: physiology. *Gynecol Obstet Biol Reprod.*, **21**(5):535-43.
- VON SCHOULTZ, B., STIGBRAND, T., MARTINSSON, K., HOLMGREN, N. (1976). Demonstration of analogues to the human pregnancy zone protein in animals. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **81**(2):379-84.
- VRIESENDORP, H. M., ROTHENGATTER, C., BOS, E., WESTBROEK, D. L., VAN ROOD, J. J. (1971). The production and evaluation of dog allolymphocytotoxins for donor selection in transplantation experiments. *Transplantation*, **11**: 440-445.
- WALCHI, R. O., SHAND, N. A., ROUD, H. K., ALEXANDER, S. L., BETTERIDGE, K. J. (2000). Oxytocin and arginine vasopressin accumulation in the equine conceptus during the second to fifth week of gestation. *Theriogenology*, **53**(1-2), 287.
- WAGNER, J. L. (2003). Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. *J Hered.*, **94**(1):23-6.
- WAGNER, J. L., PALT, Y., DiDARIO, D., FARACO, J. (2005). Sequence of the canine major histocompatibility complex region containing non-classical class I genes. *Tissue Antigens.*, **65**(6):549-55.
- WAGNER, J. L., SARMIENTO, U. M., STORB, R. (2002). Cellular, serological, and molecular polymorphism of the class I and class II loci of the canine Major Histocompatibility Complex. *Tissue Antigens.*, **59**(3):205-10.
- WALTER, I., BOSS, A. (2001). Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta*, **22**: 473-483.
- WALTER, I., SCHONKYPL, S. (2006). Extracellular matrix components and matrix degrading enzymes in the feline placenta during gestation. *Placenta.*, **27**(2-3):291-306.
- WANG, H., LI, Q., SHAO, L., ZHU, C. (2001). Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) during early pregnancy. *Biol Reprod.*, **65**(1):31-40.
- WATTS, J. R., WRIGHT, P. J., LEE, C. S. (1998). Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J Small Anim Pract.*, **39**(1):2-9.

- WELGUS, H. G. (1991). Stromelysin: Structure and function. *Progress in Inflammation. Research and Therapy.*, 61-5.
- WILDT, D. E., PANKO, B., CHAKRABORTY, K. P., SEAGER, S. W. J. (1979). Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behaviour and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.*, **20**, 648-658.
- WOESSNER, JR J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, **5**(8):2145-54.
- YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWANO, Y., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y. (1993). In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl*, **47**, 227-229.
- YAMASHITA, K., FUJINAGA, T., MIYAMOTO, T., HAGIO, T., IZUMISAWA, Y., KOTANI, T. (1994). Canine acute phase response:relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **56**(3):487-492.
- ZHANG, J., HAMPTON, A. L, NIE, G., SALAMONSEN, L. A. (2000). Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium. *Biol Reprod.*, **62**(1):85-94.
- ZHAO, Y. G., XIAO, A. Z., CAO, X. M., ZHU, C. (2002). Expression of matrix metalloproteinase - 2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy. *Mol Reprod Dev.*, **62**(2):149-58.
- ZHU, H. H., HUANG, J. R., MAZELLA, J., ROSENBERG, M., TSENG, L. (1990). Differential effects of progestin and relaxin on the synthesis and secretion of immunoreactive prolactin in long term culture of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.*, **71**(4):889-99.
- ZIETZSCHMANN, O., KRÖLLING, O. (1955). Die Plazentation der Fleischfresser, 2. Die Vollplazenta. In: O. Zietschmann, O. Krölling (Hrsg.): Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere. 2. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 163-173.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Hakkı Bülent

Soyadı: BECERİKLİSOY

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 09/03/1976

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

Askerlik Durumu: Tecilli

İletişim adresi ve telefonu: Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın

Tlf: 0 256 247 07 20

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi/Ankara, 1995-2001

Ankara Lisesi/Ankara, 1990-1993

Mehmetçik Ortaokulu/Ankara, 1987-1990

Şeker İlkokulu/Ankara, 1982-1987

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

VI- Mesleki Deneyimleri

-2002 yılından itibaren Araştırma Görevlisi

-Mart 2004 - Haziran 2005; Viyana Veteriner Üniversitesi, Doğum, Jinekoloji ve Androloji Kliniği ve Histoloji Enstitüsünde tez çalışması (Direktör: Prof. Dr. I. Walter ve Prof. Dr. S. Schäfer-Somi).

-Mayıs 2006 - Temmuz 2006. Justus-Liebig Üniversitesi, Doğum, Jinekoloji ve Androloji Kliniği, Almanya, (Direktör: Prof. Dr. Dr. Bernd HOFFMANN), "Normal ve doğum için antiprogesterin uygulanmış köpek utero/plasental dokularında, siklooksijenaz 2 (cox2), prostaglandin f2 α –sentetaz (pgfs) ve reseptör (pgfr) ekspresyonu" isimli projede immunohistolojik ve moleküler teknikler (IHC, RT-PCR, In-situ hibridizasyon) üzerine çalışma.

V- Üye Olduğu Kuruluşlar

Türk Veteriner Jinekoloji Derneği (TVJD), European Society of Domestic Animal Reproduction (ESDAR)

VI- Bilimsel İlgili Alanları

Yayınları:

1. BAŞTAN, A., ÖZENÇ, E., PİR YAĞCI, İ., BECERİKLİSOY, H.B. (2004). Bir kedide meme hipertrofisi olgusu. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 51, 79-82,
2. SCHÄFER-SOMI, S., AKSOY, O.A., PLATZL, M., FINDIK, M., ERÜNAL-MARAL, N., BECERİKLİSOY, H.B. , POLAT, B., ASLAN, S. (2005). The activity of matrix metalloproteinase-2 and in serum of pregnant bitches. *Reprod Dom Anim.* **40**, 46-50.
3. BECERİKLİSOY H.B., KANCA, H., AKSOY, O.A., ERÜNAL-MARAL, N., FINDIK, M., KAYMAZ, M., ASLAN, S. (2005). Effectiveness of different pharmacological approaches on post-ovariohysterectomy urinary incontinence in the bitch. *Ankara Üni. Vet Fak Derg*, **52**, 157-160
4. SCHÄFER-SOMI, S., HERKNER, K.R., NEUBAUER, S., POLLAK, S., EGERBACHER, M., PATZL, M., AKSOY, O.A., BECERİKLİSOY, H.B., KANCA, H., FINDIK, M., ERÜNAL-MARAL, N., ASLAN, S. (2006). A screening for antibodies in sera from pregnant and pseudopregnant bitches. *Reprod Dom Anim.* **41**, 48–54.
5. SCHÄFER-SOMI, S., BUDIK, S., BECERİKLİSOY, H.B., AKSOY, O.A., POLAT, B., KANCA, H., ASLAN, S., AURICH, J.E. (2006). The expression of cytokines, enzymes and receptors in uterine tissue from pregnant and non-pregnant bitches, and the canine embryo. *Reprod. Dom. Anim.*, **41**(4):359.

6. BECERİKLİSOY, H.B., AY, S.S., ZONTURLU, A.K., ÇETİN, Y., KAÇAR, C., HANDLER, J., ASLAN, S. (2006). Reprodüktif Açıdan Sorunlu Kısıraklarda Aşım Sezonu Başlangıcında Uterus Yıkamaları ve Hormon Kullanımının Siklus Aktivitesi ve Fertilité Parametreleri Üzerindeki Etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **53**, 169-173.
7. KALENDER, H., BECERİKLİSOY, H.B., KANCA, H., FINDIK, M., ERUNAL-MARAL, N., HANDLER, J., ASLAN, S. (2006). Plasmakonzentrationen von Folsäure, Vitamin B12 und Progesteron während des Sexualzyklus, Gravidität, Abortinduktion und Pyometra bei der Hündin. Dtsche. Tierarztl. Wschr. 113, 321-360.
8. BECERİKLİSOY, H.B., WALTER, I., SCHÄFER-SOMI, S., MILLER, I., ASLAN, S., KANCA, H., İZGÜR, H. (2007). Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the canine uterus before and during placentation. *Reprod in Dom Anim.* (Basımda)
9. BECERİKLİSOY, H.B., ASLAN S. (2005). Veteriner Hekimliğinde Akupunktur Temelleri: Doğum ve Jinekolojideki Bazı Uygulama Alanları. *Veteriner Dünyası*, **5**, 26-31
10. BECERİKLİSOY H.B., ASLAN S. (2005). Homeopatinin Genel Kuralları ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı, *Bilim ve Teknik Der.*, 28, (EYLÜL-2005).

Dergilerde Yayınlanan Kongre ve Poster Özetleri

1. AKSOY, O.A, BECERİKLİSOY, H.B., KANCA, H., KAYA, D. ASLAN, S., İZGÜR, H. (2003). Dişi Köpekte Siklus Dönemi ve Optimum Çiftleşme Zamanının Saptanmasında Hızlı Progesteron Testi (Ovulasyon® Test) ve RIA-Testinin (Immunotech®) Karşılaştırılması; 1. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi, 4-5-6 Eylül, Konya.

2. BECERİKLİSOY, H.B., AY, S.S., ZONTURLU, A.K., ÇETİN, Y., KAÇAR, C. HANDLER, J., ASLAN, S. (2004). Reprodüktif açıdan sorunlu kısıraklarda aşım sezonu başlangıcında hormon kullanımının siklus aktivitesi üzerindeki etkisi; II. Ulusal atçılık sempozyumu (Uluslararası katılımlı) 3-6 Haziran, Nevşehir.
3. ASLAN, S., BECERİKLİSOY, H.B., ÖZYURTLU, N., KANCA, H., HANDLER, J. (2004). Effect of treatment with Thuja Occidentalis D30 and Urtica Urens D6 on Pseudopregnancy in bitch. (abstract).; Wien.Tierärztl. Mschr. 91, Suppl2.
4. SCHÄFER-SOMI, S., BUDIK, S., BECERİKLİSOY, H.B., WALTER, I., KANCA, H., AKSOY, O.A., POLAR, B., ASLAN, S., AURICH, J.E. (2005). The Expression of TGF- β , CD-8, COX-1, MMP and MHC in Uterine Tissue from Pregnant Bitches. 9th Annual Conference of European Society for Domestic Animal Reproduction. Murcia, Spain. 01.-03.Sept.2005. Reproduction in Domestic Animals, Abstract, **40**, 410.
5. BECERİKLİSOY, H.B., WALTER, I., SCHÄFER-SOMI, S., ASLAN, S., AKSOY, O., POLAT, B., KANCA, H., BUDIK, S., AURICH, J.E. (2005). Histomorphological aspects of the oviduct and uterus and the expression of MMP-2 and MMP-9 in early pregnant bitches.; 38.Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung 10-11. Februar, (30. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung.) Schweizer Archiv für Tierheilkunde 48 Abstract., Zurich.
6. SCHÄFER-SOMI, S., HERKNER, K.H., NEUBAUER, S., EGERBACHER, M., ALI AKSOY, O., FINDIK, M., ERÜNAL-MARAL, N., BECERİKLİSOY, H.B., POLAT, B., ASLAN, S. (2005). Pregnant Bitches Produce Antibodies Against Contractile Proteins Of The Cytoplasm. (Abstract) Schweizer Archiv Für Tierheilkunde, 73-74.

7. BECERİKLİSOY, H.B., KAYA, M., BUMİN, A., ÖZENÇ, E., KANCA, H., YILDIRIM, M.Z., KUTSAL, O., KIOSSIS, E., BOLLWEIN, H., ASLAN, S. (2006). Echostrukturanalyse und Farbdopplersonographie beim Mammatumor der Hündin, Hannover. 39. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung (31. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung.) 16-17. February. *Reprod Dom Anim*, 41 (Suppl,1), S:4 Hannover.
8. BECERİKLİSOY, H.B., WALTER, I., SCHÄFER-SOMI, S., KANCA, H., ASLAN, S., AURICH, J.E. (2006). The expression of MHC I-II and MMP 2 and 9 in uterine tissue of early pregnant bitches. 10th Annual Conference of European Society for Domestic Animal Reproduction. Murcia, Spain.07.09.Sept. 2006. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 4, 359.
9. SCHÄFER-SOMI, S., BUDIK, S., BECERİKLİSOY, H.B., AKSOY, O.A., POLAT, B., KANCA, H., ASLAN, S., AURICH, J.E. (2006). The expression of cytokines, enzymes and receptors in uterine tissue from pregnant and non-pregnant bitches, and canine embryo. 10th Annual Conference of European Society for Domestic Animal Reproduction. Murcia, Spain.07.09.Sept. 2006. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 4, 359.
10. BECERİKLİSOY, H.B., WALTER, I., SCHÄFFER-SOMI, S., KANCA, H., ASLAN, S., İZGÜR, H., AURICH, J. (2006). Erken gebe köpeklerin uterus dokularında doku uyuşum antijenleri I-II ve matriksmetalloproteinaz 2 ve 9 ekspresyonu. II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya.
11. KAYA, D., AY, S.S., BECERİKLİSOY, H.B., AĞAOĞLU, A.R., KÜÇÜKASLAN, İ., ÇELİK, O., ÖZYURTLU, N., ASLAN, S. (2006) Sütçü ineklerde postpartum dönemde profilaktik amaçlı ceftiofur ve oksitosin

- uygulamalarının fertilité parametreleri úzerine etkisi. II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya.
12. KALENDER, H., BECERİKLİSOY, H.B., KANCA, H., FINDIK, M., MARAL, N.E., HANDLER, J, ASLAN, S., (2006). Siklus gösteren, gebe, abort uyarılan veya pyometralı dişi köpeklerdeki plazma folik asit, vitamin B12 ve progesteron konsantrasyonları. II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya.
13. AY, S.S., BECERİKLİSOY, H.B., KAYA, D., AĞAOĞLU, A.R., KÜÇÜKASLAN, İ., MÜLAZIMOĞLU, S.B., ASLAN, S. (2006) Köpeklerde uterus patolojilerinde parenteral PGF2 α ve intrauterin antibiyotik sağaltım yöntemlerinin kombinasyonu. II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya.
14. AKSOY, O.A., PANCARCI, Ő.M., ZONTURLU, A.G., BECERİKLİSOY, H.B., ASLAN, S. (2006) Köpeklerde aglepristone ve aglepristone-cabergoline kombinasyonu uygulamaları ile gebeliğin sonlandırılması ve fertilitéye etkisi. II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya.
15. MACUN, H.C., ÇETİN, Y., BECERİKLİSOY, H.B., ASLAN, S. (2006) Köpeklerde istenmeyen gebeliklerin alfaprostol, cabergolin ve misoprostol ile sonlandırılması. II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya.
16. H. BECERİKLİSOY., I. WALTER., S. SCHAEFER-SOMI., H. KANCA., S. ASLAN., H. İZGÜR., J. AURICH (2006). Erken Gebe Köpeklerin Uterus Dokularında Doku Uyuşum Antijenleri I-II ve Matrixmetalloproteinaz 2 ve 9'un değerlendirilmesi, Hannover Veteriner Yüksekokulu İle Ortak Bilimsel İşbirliği Toplantısı (09-11-2006).