

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİŞKİN KEDİ OVARYUMUNDA OVARIYAL SIKLUS  
SIRASINDA CLAUDİN-1 VE CLAUDİN-5'İN  
İMMUNEKSPRESYONLARI**

**Hazırlayan  
Nermin ATEŞ**

**Danışman  
Prof. Dr. Narin LİMAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2017  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİŞKİN KEDİ OVARYUMUNDA OVARIYAL SIKLUS  
SIRASINDA CLAUDİN-1 VE CLAUDİN-5'İN  
İMMUNEKSPRESYONLARI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan  
Nermin ATEŞ**

**Danışman  
Prof. Dr. Narin LİMAN**

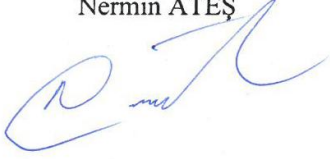
**Bu tez; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TYL-2014-5545 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**OCAK 2017  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Nermin ATEŞ



## YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Erişkin Kedi Ovaryumunda Ovariyal Siklus Sırasında Claudin-1 ve Claudin-5’in immunekspresyonları” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**

Nermin ATEŞ

**Danışman**

Prof. Dr. Narin LİMAN

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Prof. Dr. Narin LİMAN



## KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Narin LİMAN'ın danışmanlığında Veteriner Hekim Nermin ATEŞ tarafından hazırlanan “Erişkin Kedi Ovaryumunda Ovariyal Siklus Sırasında Claudin-1 ve Claudin-5'in immunekspresyonları” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

05 / 01 / 2017

### JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Narin LİMAN .....  
Erciyes Üniv. Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji Abd

Üye : Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM .....  
Erciyes Üniv. Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji Abd

Üye : Doç. Dr. Hakan SAĞSÖZ .....  
Dicle Üniv. Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji Abd

### ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / ..... / 2017

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ  
Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÖR

Veteriner Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, öncelikle Anabilim Dalı'na adaptasyonumda ve araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar insani ilişkilerde de sonsuz destekleriyle gelişmeme katkıda bulunan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Narin LİMAN'a, Yüksek Lisans öğrenimim süresince verdikleri derslerle yetişmemi sağlayan hocalarım Sayın Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM, Doç. Dr. Feyzullah BEYAZ ve Yrd. Doç. Dr. Emel ALAN'a, Yüksek Lisans öğrenimim boyunca her zaman destek olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Nermin ATEŞ

Kayseri, Ocak 2017

## ERİŞKİN KEDİ OVARYUMUNDA OVARIYAL SIKLUS SIRASINDA CLAUDİN-1 VE CLAUDİN-5'İN İMMUNEKSPRESYONLARI

Nermin ATEŞ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim

Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2017

Danışman: Prof. Dr. Narin LİMAN

### KISA ÖZET

Ovaryumda ovariyal siklus sırasında foliküllerin ve korpus luteumun (CL) büyümesi ve gerilemesi, bu yapıları oluşturan hücrelerdeki çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve göç gibi çeşitli fonksiyonlarla karakterizedir. Hücrelerarası bağlantılar komşu hücreler arasındaki iletişimin önemli bir bileşeni olarak bu fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Hücrelerarası bağlantıların başlıca bileşeni olan sıkı bağlantılar (TJs) claudin'ler, occludin ve bağlantı yapışma molekülleri (JAMs) gibi farklı transmembran adezyon proteinlerinden oluşurlar. Claudin'ler TJs'in en önemli bileşenleri olup iyonların ve küçük moleküllerin paraselüler yollarda taşınmasını kontrol ederler. Bu çalışmanın amacı, östrus siklusunun farklı dönemlerindeki kedi ovariumunda claudin-1 ve claudin-5'in doku ekspresyonunu ve lokalizasyonunu immunohistokimya yöntemi kullanarak belirlemek ve foliküller ile korpus luteumun (CL) büyümesi ve gerilemesi gibi ovarium dinamiklerinde claudin-1 ve claudin-5'in olası rolünü araştırmaktır. Kedi ovariumunun tüm hücre tiplerinde, claudin-1 ve claudin-5 immunreaksiyonlarının genel olarak çekirdek ve sitoplazmada bulunduğu, ancak germinatif epitel, stromal ve tekal tip interstisyel hücreler ile CL'un luteal hücrelerinde membransel yerleşim de gösterdikleri belirlendi. Tüm sağlıklı foliküllerde claudin-1 ve claudin-5 immunreaksiyonları oosit, pregranüloza/ granüloza ve teka hücre katmanlarında bulundu. Erken, orta ve geç luteal fazlardaki CL'da claudin-1 ve claudin-5'in immunlokalizasyonları benzerdi; bununla birlikte, immunboyanma yoğunluklarının erken dönemde en yüksek olduğu ve geç luteal fazda ise azaldığı görüldü. İnterstisyel stromada, stromal fibroblast-benzeri hücrelerin her iki claudin tipi için pozitif reaksiyon gösterdikleri belirlendi. Bu hücrelerdeki boyanma yoğunluklarının sabit kaldığı ve östrüs siklusu evrelerinden etkilenmediği tespit edildi. Ayrıca stromal interstisyel hücreler, düz kas hücreleri ve arteriyollerin endotel ve düz kas hücrelerinde de claudin-1 ve claudin-5 için pozitif immunreaksiyon görüldü. Sonuç olarak claudin-1 ve claudin-

5'in kedi ovaryumlarındaki tüm hücrelerde çekirdek ve sitoplazmada yerleşmeleri bu adezyon moleküllerinin ovaryum hücrelerinde çoğalma, farklılaşma, göç etme ve apoptoz gibi olayların düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca claudin-1 ve claudin-5'in germinatif epitel, stromal ve tekal interstisyel hücreler ile CL'un luteal hücrelerinde membransel yerleşimli olmaları claudin-1 ve claudin-5'in bu hücrelerin adezyonunda görevli olabileceğini, ancak granüloza ve teka hücrelerinde membransel yerleşim göstermemeleri ise folikül gelişiminde adezyon molekülü olarak işlev görmediklerini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kedi, ovaryum, claudin-1, claudin-5, immunohistokimya



**THE IMMUNEXPRESSION OF CLAUDIN-1 AND CLAUDIN-5 DURING THE  
OVARIAN CYCLE IN THE ADULT CAT OVARY**

**Nermin ATEŞ**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences Department  
of Histology and Embryology**

**MSc Thesis, January**

**Supervisor: Prof. Dr. Narin LİMAN**

**ABSTRACT**

The growth and regression of ovarian follicles and corpus luteum (CL) during the ovarian cycle are characterized by various cellular functions of ovarian cells, including proliferation, differentiation, apoptosis and migration. Cell-cell junctions play important role in regulating these processes as an essential component for communication between the neighboring cells. Major components of intercellular junctions are tight junctions (TJs) which are composed of different transmembrane proteins claudins, occludin, and junctional adhesion molecules (JAMs). Claudins are one the major components of TJs that control the transport of ions and small molecules in paracellular pathways. The purpose of this study was to identify tissue expression and localization of claudin-1 and claudin-5 in the cat ovary during different stages of the ovarian cycle using immunohistochemistry and was to investigate the potential role of claudin-1 and claudin-5 in ovarian dynamics such as the growth and regression of follicles and CL. In all cell types of cat ovary, the immunostainings for claudin-1 and claudin-5 are mainly localized in the nucleus and cytoplasm. However, the membranous localizations of claudin-1 and claudin-5 were observed in the surface epithelium, stromal and thecal type interstitial cells, and luteal cells. In the all healthy ovarian follicles, the immunostainings for claudin-1 and claudin-5 were present in oocytes, pregranulosa/granulosa and theca cell layers. In atretic follicles, the immunostainings were also found granulosa cells, thecal type interstitial cells and thecal fibroblast like cells. In CL, both small and large luteal cells were stained positively for both claudins. The patterns of immunostaining were similar in early, mid, and late luteal phases; however, the intensity was highest at early and decreased at late luteal phase. In the interstitial compartment, the some stromal fibroblast-like cells exhibited positive

immunostaining for claudin-1 and claudin-5, and the pattern of immunostaining for claudins remained constant and was not affected by the stage of oestrus cycle. Furthermore, ovarian stromal interstitial cells, smooth muscle cells and endothelial and smooth muscle cells in arterioles were also immunostained for both claudins.

In conclusion, the nuclear and cytoplasmic localizations of claudin-1 and claudin-5 suggest that these adhesion molecules may play a role in the regulation of events such as proliferation, differentiation, migration and apoptosis in ovarian cells. Furthermore, the membranous localizations of claudin-1 and claudin-5 in the surface epithelium, stromal and thecal type interstitial cells and luteal cells of CL indicate that claudin-1 and claudin-5 may be involved in the adhesion of these cells, whereas the absence of claudin-1 and claudin-5 immunoreactivities on the plasma membranes of both granulosa and theca cells suggest that they do not function as adhesion molecules in the development of follicles.

**Key words:** Cat, ovary, claudin-1, claudin-5, immunohistochemistry

## İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET .....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. EVCİL KEDİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	4
2.2.DİŞİ KEDİLERDE GENİTAL SİSTEM .....	5
2.3.KEDİ VE DİĞER MEMELİLERDE OVARYUMUN YAPISAL ÖZELLİKLERİ .....	6
2.3.1.Korteks .....	6
2.3.2.Ovaryum folikülleri .....	7
2.3.2.1.Primordial ve primer foliküller.....	8
2.3.2.2.Sekonder foliküller .....	9
2.3.2.3.Antral foliküller .....	10
2.3.2.4.Atretik foliküller .....	11
2.3.3.Ovülasyon.....	12
2.3.4.Korpus hemorajikum, korpus luteum ve korpus albicans .....	12
2.3.5.Medulla.....	14
2.4.KEDİLERDE ÜREME FİZYOLOJİSİ .....	14

2.5.CLAUDİN'LER .....	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM .....	21
3.1. Histolojik ve İmmunohistokimyasal analiz.....	21
4.BULGULAR .....	24
5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....	64
6.KAYNAKLAR .....	75
ÖZGEÇMİŞ	





## KISALTMALAR ve SİMGELER

AJ:	Yapıştırıcı bağlantı, adhesion junction
AJs:	Yapıştırıcı bağlantılar, adhesion junctions
CFA:	The Cat Fanciers' Association
CH:	korpus hemorajikum
CL:	korpus luteum
DAB:	Diaminobenzidine
E <sub>2</sub> :	östradiol
FIFE:	Federation International Feline
FSH:	Folikül stimuli edici hormon
GJ:	Oluklu bağlantı, gap junction
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen peroksit
IPCBA:	International Progressive Cat Breeders Alliance
JAM:	bağlantı yapışma molekülleri, junctional adhesion molecules
LH:	Luteinize edici hormon
LTH:	Luteotropik hormon
mm:	milimetre
µm :	mikrometre
P:	progesteron
PAS:	Periodic Acid Schiff
PGF <sub>2</sub> α:	Prostaglandin F2 alfa
PP:	Yalancı gebelik
PP1:	Yalancı gebelikte korpus luteumun şekillendiği birinci evre
PP2:	Yalancı gebelikte korpus luteumun gelişerek büyüdüğü ikinci evre
PP3:	Yalancı gebelikte korpus luteumun erken regresyon evresi
PP4:	Yalancı gebelikte korpus luteumun geç regresyon evresi

Strept-ABC: Streptavidin Biotin Kompleks immunoperoksidaz tekniği

TICA: The International Cat Association

TJ: Sıkı bağlantı, Tight junction

TJs: Sıkı bağlantılar

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

ZO: Sıkı bağlantı, Zonula okludens

ZO-1: Zonula okludens-1

ZO-2: Zonula okludens-2

ZO-3: Zonula okludens-3

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4.1.** Kedi ovaryumunda korteks ve medullanın genel görünümü. d, damar; F, folikül. Crossmon'un üçlü boyaması. ....25
- Şekil 4.2.** Kedi ovaryumunda korteksin genel görünümü. GE, germinatif epitel; PrF, primordial folikül; PF, primer folikül; S, stroma; SF, sekonder folikül; TF, tersiyer folikül. Crossmon'un üçlü boyaması.....25
- Şekil 4.3.** Primordial foliküller (PrF). GE, germinatif epitel; PF, primer folikül; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler Ta, tunika albuginea. Crossmon'un üçlü boyaması.....27
- Şekil 4.4.** Primer foliküller (PF). PrF, primordial foliküller; S, stroma; SF, sekonder folikül; SIC, stromal interstisyel hücreler. Crossmon'un üçlü boyaması. ....28
- Şekil 4.5.** Sekonder folikül. G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma, SIC, stromal interstisyel hücreler; TF, teka folikülü; Zp, zona pellusida. Crossmon'un üçlü boyaması.....28
- Şekil 4.6.** Erken tersiyer folikül. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; d, damar; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna. Crossmon'un üçlü boyaması. ....29
- Şekil 4.7.** Graaf folikülü. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; kd, kapılar dammar; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellusida. Crossmon'un üçlü boyaması.....30
- Şekil 4.8.** Atretik preantral folikül (APF). dO, dejenere olmuş oosit; G, granüloza hücreleri; S, stroma. Crossmon'un üçlü boyaması. ....31
- Şekil 4.9.** Atrezinin I. aşamasındaki folikül. d, damar; Jx, jukstaluminal hücreler; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; Te, teka eksterna; oklar apopitotik cisimcikler. Crossmon'un üçlü boyaması. ....32
- Şekil 4.10.** Atrezinin II. aşamasındaki folikül. dO, dejenere oosit; Te, teka eksterna; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; yıldız, dejenere granüloza hücreleri. Crossmon'un üçlü boyaması. ....33
- Şekil 4.11.** Atrezinin III. aşamasındaki folikül. A, antrum; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler. Crossmon'un üçlü boyaması. ....34

- Şekil 4.12.** Atrezinin IV. aşamasındaki folikül. TIC, tekal tip interstisyel hücreler; ZP, dejenere oosite ait büzüşmüş zona pellusida. Crossmon'un üçlü boyaması. ....34
- Şekil 4.13.** Korpus hemorajikum (CH). S, stroma; ok, folikül boşluğunu dolduran kan hücreleri. Crossmon'un üçlü boyaması.....35
- Şekil 4.14.** Korpus hemorajikum. kd, damar; Lh, lutein hücreleri. Crossmon'un üçlü boyaması. ....36
- Şekil 4.15.** Erken luteal dönemdeki (PP1) korpus luteum. kd, kapilar damar; Lh, lutein hücreleri; v1, tip 1 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması. ....36
- Şekil 4.16.** Orta luteal dönemdeki (PP2) korpus luteum. kd, kapilar damar; Lh, lutein hücreleri; v1, tip 1 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması. ....37
- Şekil 4.17.** Geç luteal dönemdeki (PP3) regrese olan korpus luteum. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması. ....37
- Şekil 4.18.** Geç luteal dönemdeki (PP4) regrese olan korpus luteum. d, damar; kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması.....38
- Şekil 4.19.** Ovidukt epitelinde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....39
- Şekil 4.20.** Germinatif epitelde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....40
- Şekil 4.21.** Damarlarda (d) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. S, stroma. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....40
- Şekil 4.22.** Primordial foliküllerde (PrF) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. O, oosit; S, stroma; oklar, pregranüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....41
- Şekil 4.23.** Primer folikülde (PF) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. G, granüloza hücreleri; O, oosit; PrF, primordial folikül; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....42

- Şekil 4.24.** Sekonder folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler; TF, teka folikülü; ZP, zona pellucida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....42
- Şekil 4.25.** Erken tersiyer folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellucida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....43
- Şekil 4.26.** Graaf folikülünde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; kd, kapılar dammar; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Ti, teka interna; ZP, zona pellucida; ok, kapılar dammar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....43
- Şekil 4.27.** Atretik preantral folikülde (APF) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. d, damar; dO, dejenere olmuş oosit; G, granüloza hücreleri; S, stroma; ZP, zona pellucida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....45
- Şekil 4.28.** I. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. d, damar; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; oklar apoptotik cisimcikler; yıldız, dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....45
- Şekil 4.29.** II. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; dO, dejenere oosit; TIC, tekal tip interstisyel hücreler yıldız, lumendeki dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....46
- Şekil 4.30.** II. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; d, damar; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler yıldız, lumendeki dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....46
- Şekil 4.31.** III. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, atretik folikülde küçülmüş antrum; TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....47

- Şekil 4.32.** IV. aşamadaki atretik folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. TIC, tekal tip interstisyel hücreler; ZP, dejenere oosite ait büzüşmüş zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....47
- Şekil 4.33.** Stromal interstisyel hücrelerde (SIC) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....48
- Şekil 4.34.** Korpus luteumun oluşmaya başladığı birinci evredeki (PP1) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; ok başı, membran boyanması. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği....49
- Şekil 4.35.** Korpus luteumun gelişip büyümesiyle karakterize olan ikinci evredeki (PP2) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; ok başı, membran boyanması. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....50
- Şekil 4.36.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) başladığı üçüncü evrede (PP3) luteal hücrelerde (LH) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....50
- Şekil 4.37.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) geç dönemi olan dördüncü evredeki (PP4) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....51
- Şekil 4.38.** Ovidukt epitelinde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....52
- Şekil 4.39.** Germinatif epitelde (GE) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. PrF, atretik primordial folikül; SIC, stromal interstisyel hücreler; Ta, tunika albuginea. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....52
- Şekil 4.40.** Damarlarda (d) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. S, stroma. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....53
- Şekil 4.41.** Primordial foliküllerde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. O, oosit; S, stroma; oklar, pregranuloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....54

- Şekil 4.42.** Primer folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, damar; G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....54
- Şekil 4.43.** Sekonder folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma; TF, teka folikülü; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....55
- Şekil 4.44.** Erken tersiyer folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellusida; kd, teka interna katmanındaki bazal membrana komşu kapilar damarlar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....55
- Şekil 4.45.** Graaf folikülünde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....56
- Şekil 4.46.** Atretik preantral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, damar; dO, dejenere olmuş oosit; G, granüloza hücreleri; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....57
- Şekil 4.47.** I. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, Jx, jukstaluminal granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; Te, teka eksterna; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; oklar apoptotik cisimcikler. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....57
- Şekil 4.48.** I. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d; dammar; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; yıldız, lumendeki dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....58
- Şekil 4.49.** III. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler; TIC, tekal tip interstisyel hücreler. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....59
- Şekil 4.50.** III. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....59

- Şekil 4.51.** IV. aşamadaki atretik folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. TIC, tekal tip interstisyel hücreler; ZP, dejenere oosite ait büzüşmüş zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....60
- Şekil 4.52.** Stromal interstisyel hücrelerde (SIC) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, damar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....60
- Şekil 4.53.** Korpus luteumun oluşmaya başladığı birinci evredeki (PP1) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği..... 61
- Şekil 4.54.** Korpus luteumun gelişip büyümesiyle karakterize olan ikinci evredeki (PP2) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; ok başı, luteal hücrelerde membrane boyanması. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....62
- Şekil 4.55.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) başladığı üçüncü evrede (PP3) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği. ....62
- Şekil 4.56.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) geç dönemi olan dördüncü evredeki (PP4) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.....63



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hücrelerarası bağlantı komplekslerinin apikal bileşeni sıkı bağlantılar [zonula okludens (ZO) ya da tight junctions (TJs)] olup hücreler arasındaki iletişimde görevli olmalarının yanısıra, membranda bir bariyer ya da çit oluşturarak parasellüler geçirgenliğin düzenlenmesinde ve doku ile hücre bütünlüğünün korunmasında rol oynarlar (1, 2). TJs aksesuar proteinlerle aktin hücre iskeletine bağlanan claudinler, occludinler ve bağlantı yapışma molekülleri [junctional adhesion molecules, JAMs] gibi transmembran proteinlerden oluşurlar (3). Bunlardan claudinler bütün epitel ve endotel hücrelerinde TJs'da bulunan 20-24 kDa ağırlığındaki integral membran proteinleridir (4) ve fonksiyonel olarak bariyer (claudin-1,-3,-4,-5) ve por oluşturan (claudin-2,-7,-10 and -16) claudinler olarak iki gruba ayrılırlar (5). Bariyer oluşturan claudinler farklı iyonlar ve proteinlere karşı parasellüler permeabiliteyi azalttıkları halde, por oluşturan claudinler iyonlara karşı parasellüler permeabiliteyi artırır. Bunun bir sonucu olarak, farklı claudin izoformlarının dokuya özgü ekspresyonları bu dokudaki TJs'm permeabilite özelliklerini belirleyen en önemli faktördür (6). Membrandaki claudin ekspresyonundaki azalmaların TJs'm bütünlüğünün bozularak geçirgenliğin artmasına, böylece büyüme faktörleri için erişilebilir bir mikroçevre oluşmasına ve kontrolsüz hücre çoğalması ile tümör oluşması ve yayılmasına neden olduğu ileri sürülmektedir (7, 8, 9). Ayrıca claudinlerin lokalizasyonlarındaki değişikliklerin, tümör hücrelerinin çoğalması ve canlılıklarını etkilediği (10, 11), Claudin-1'in sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin hücre tipine bağlı olarak değiştiği ve claudin-1'in apoptosisi indüklediği (10) veya antiapoptotik etkisinin bulunduğu (12) çeşitli çalışmalarla saptanmıştır. Claudin'lerin hücre bağlantısı ile ilişkili olmayan aktivitelerinden biri de anjiyogenez ile ilgili olaylara katılmasıdır (13). Claudin'ler

hücre ve doku spesifik olarak eksprese edilirler ve bunların ekspresyonları aynı organın farklı dokularında değişiklik gösterebilir (14).

Dişi cinsiyet hücresi oosit ile steroid hormonlardan östrojen ve progesteronun üretim yeri olan ovaryum hipofizden salgılanan gonadotropik hormonların [Folikül stimuli edici hormon (FSH), Luteinize edici hormone (LH)] etkisiyle bir takım morfolojik değişikliklere uğrar. Ovariyal siklus olarak adlandırılan bu değişiklikler sırasında ovaryumun fonksiyonel ünitesi olan ve olgunlaşmamış oosit ile bunu kuşatan somatik hücrelerden oluşan foliküller şekillenir ve olgunlaşır. Bu olay folikülogenez olarak adlandırılır. Folikül gelişimine paralel olarak oosit olgunlaşır (oogenez) ve Graaf folikülü patlar (ovülasyon). Patlayan folikül korpus luteuma farklılaşır. Folikül gelişimi ve büyümesi ile korpus luteumun oluşması hücre çoğalması (granüloza hücrelerinin proliferasyonu), farklılaşması (teka gelişimi, lutein hücrelerinin oluşması) ve apoptosis (antrum oluşumu) olayları ile ovülasyondan önce folikül gelişimi ve ovülasyondan sonra korpus luteumun gelişimi sırasında meydana gelen anjiyogenezi içine alan oldukça kompleks ve dinamik süreçler olup hücreler arası bağlantıların bu süreçlerin regülasyonunda önemli rol oynadıkları çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (15-19). TJs'in ana kurucu proteini olan claudin-1'in ovaryum yüzey epitelinde (20) ve korpus luteumdaki granüloza lutein hücrelerinin membranlarında lokalize olduğu (15), bariyer oluşturan claudinlerden claudin-5'in endotel hücrelerine spesifik olduğu ve korpus luteumun anjiyogenezinde önemli rol oynadığı (15, 17) çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte ovaryumda normal foliküler ve korpus luteum gelişimi ile foliküler ve luteal anjiyogenezde claudin'lerin lokalizasyonları ve fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar az sayıda olup bunlar da insan ve primatlarda yapılmıştır. Kediyi de içine alan evcil memelilerde yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı kedi ovaryumunda TJ proteinlerinden claudin-1 ve claudin-5'in lokalizasyonunu belirlemek ve bu bağlamda TJ proteinlerinin foliküler büyüme, farklılaşma ve atrezi ile korpus luteumun gelişimi ve regresyonu olaylarında, ovariyal siklus boyunca epiteliyal-mezenşimal değişimde, ayrıca foliküler ve luteal anjiyogenezdeki olası fonksiyonlarını ortaya koymaktır.

Mevsimsel poliöstrus gösteren evcil kediler, günümüzde pet hayvanı olarak yetiştirilen ve aynı zamanda vahşi kedilerin fizyolojilerinin belirlenmesi için de model olarak kullanılan hayvanlardır. Ayrıca kedi ovaryumu bütün folikül evrelerinin (primordial,

primer, sekonder, pre-antral ve antral foliküller) her zaman görülebilir olması nedeniyle foliküler gelişimin incelenmesi için de ideal bir modeldir (21). Bu çalışma ile kedi ovaryumunda claudin'lerin folikülogenez ve luteal gelişim sürecindeki lokalizasyonlarının ve ekspresyonlarının ortaya konacak olması, bu moleküllerin genital sistemdeki olası fonksiyonlarına ilişkin bilgilere katkı sağlayacaktır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. EVCİL KEDİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Kedi ailesi (Felidae) 37 tür içerir. Evcil kedi hariç olmak üzere, hepsi yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Diğer nesli tükenmekte olan hayvanlarda olduğu gibi, kedi popülasyonlarındaki azalma öncelikle hızlanan bir habitat yok etme ve kaçak avlanma kaynaklıdır (22)

Evcil kediler anatomik olarak güçlü, esnek bedenleriyle, hızlı refleksleriyle, keskin, geri çekilebilen pençeleriyle ve küçük avları öldürmeye uyarlanmış dişleriyle diğer kedigillere benzerler. Kediler insan kulakları için çok zayıf ya da çok yüksek frekanstaki sesleri duyabilir ve karanlığa yakın ortamlarda görebilirler. Ancak çoğu memeli hayvanlar gibi, kediler insanlara göre daha zayıf renkli görüşe ve daha güçlü koku alma duyusuna sahiptirler. Dünyada 70'den fazla kedi ırkı olduğu tahmin edilmekle birlikte, çeşitli uluslararası organizasyonlar tarafından tanınan ırkların sayısı tescil eden kurumun standartlarına göre farklılık gösterebilmektedir. Bu sayı, IPCBA (International Progressive Cat Breeders Alliance) tarafından 73, ABD merkezli en büyük ikinci organizasyon olan TICA (The International Cat Association) tarafından 58, CFA (The Cat Fanciers' Association) tarafından 44, Lüksemburg merkezli FIFE (Federation International Feline) tarafından 43 olarak açıklanmıştır (22).

Kediler, tek başlarına avlanmalarına rağmen sosyal bir türdür. Kedilerde iletişim, kedi feromeni ve kedilere özgü vücut dilinin yanı sıra seslenme çeşitliliğini (miyavlama, mırıltı, sesini titretme, tıslama, hırıltı ve gırtlaksı ses) de içine alır. Kediler etçil hayvanlardır. Sindirim sistemleri eti etkin biçimde işleyecek şekilde evrildiğinden, bitkisel ürünleri zor sindirirler. Sindirim kanalının diğer memelilere göre daha kısa olması, karbonhidratları sindirmek için gereken enzimlerin az miktarda bulunması, kedilerin bitki kaynaklı besinleri ve bazı yağ asitlerini sindirmedeki becerilerini sınırlar.

Bununla birlikte kediler arada sırada mevcut besinlerine ilaveten çim yemeyi tercih edebilirler. Çim, kediler için folik asit kaynağı ve sindirim sistemindeki tüyleri kolay atmak için bir lif kaynağıdır. Kediler yüksek bir üreme oranına sahiptir. Kontrollü üreme halinde çoğalabilirler ve tescilli cins hayvanlar olarak gösterilebilirler (23).

Kedilerin Antik Mısır'da tapılan hayvanlar olduğu ve orada evcilleştirildikleri düşünülmektedir. Bir genetik çalışma, evcil kedilerin milattan önce 8000'de, Orta Doğu'da Afrika yaban kedisi (*Felis silvestris lybica*) soyundan türediğini ortaya çıkarmıştır (24). Evcil kediler ve onun yabani atası 38 kromozom ve 20000 gene sahip olan diploid organizmalardır. İnsanlardaki diyabet, akromegali, kas distrofisi, hemofili vb. gibi hastalıkların analogu olan 250 kalıtsal hastalık tespit edilmiştir (25). Son yıllardaki biyomedikal araştırmalar evcil kedinin özellikle sinir bilimi, davranışsal biyoloji, üreme fizyolojisi ve endokrinolojisi, insan kalıtımı, kanser ve infeksiyöz hastalıklarının anlaşılması için değerli model organizma olduğunu göstermiştir. Evcil kedi köpeklerden farklı olarak tam karnivor (etçil) olduğundan memeli genomlarını karşılaştırmak için de model organizma olarak önemli bir değere sahiptir. Ayrıca evcil kedi hem yakın filogenetik akrabalığı olan yabani kedi (*Felis silvestris*), kum kedisi (*Felis margarita*), kara ayaklı kedi (*Felis nigripes*) ve orman kedisi (*Felis Chause*)'nin, hem de çita, puma, aslan ve kaplan gibi nesli tükenmekte olan vahşi türlerin genel biyolojilerini anlamak için önemli bir model hayvandır. Bunların yanısıra birçok ülkede vahşi kedi popülasyonlarının korunması amacıyla östrus siklusunun, ovülasyonun ve gebeliğin ardındaki mekanizmaları anlamaya yönelik çalışmalarda yaygın şekilde evcil kedi model hayvan olarak kullanılmaktadır (26).

## **2.2.DİŞİ KEDİLERDE GENİTAL SİSTEM**

Diğer dişi memeli hayvanlarda olduğu gibi kedilerde de genital sistemin organları eşey hücrelerini yapan ovaryumlar, genital kanallar olarak tuba uterina'lar (ovidukt, salpinks), uterus, serviks, vagina ve dış genital organ olarak da vulva'dan oluşur. Erişkin dişi kedilerde ovaryum oval biçimli olup yaklaşık 1.0 x 0.3 x 0.5 cm büyüklüğünde ve 220 mg ağırlığındadır. Tuba uterina'lar 5-6 cm uzunluğunda iken, uterus 2 cm uzunluğunda bir korpus ile her biri 10 cm uzunluğunda olan iki kornudan oluşur. Uterusun büyüklüğü kedinin büyüklüğüne, yaşına yaşa, östrus siklusunun veya gebeliğin dönemine göre değişiklik gösterir. Kedilerde serviks vulvanın 40 mm

kraniyalinde yerleşmiş abdominal bir organdır. Vagina yaklaşık 2 cm uzunluğunda olup vulvadan üretral deliğe kadar uzanır (27, 28).

Bu çalışmada materyal olarak ovaryumlar kullanıldığından sadece ovaryumun yapısı hakkında bilgi verilmiştir.

### **2.3.KEDİ VE DİĞER MEMELİLERDE OVARYUMUN YAPISAL ÖZELLİKLERİ**

Ovaryumlar eşey hücrelerini (oosit) üreten, salgıladığı steroid hormonlarla genital sistemin diğer organları üzerinde etkili olan ve böylece seksüel siklusu düzenleyen bir çift organdır. Genellikle oval biçimli olan ovaryumlarda damar ve sinirlerin girip çıktığı bölge hilus olarak adlandırılır ve tüm memelilerde ovaryum, uterusun kenarlarında uzanan ligamentum lata uteri'nin bir bölümü olan bağdokusu özelliğindeki mezovaryum ile uterusu ve pelvis duvarına tutunur. Mezovaryum peritonun viseral yaprağı, ovaryumlar ise bir bazal membran üzerine oturmuş olan germinatif epitel ile örtülüdürler. Germinatif epitel hormonal değişime bağlı olarak tek katlı yassı, kübik veya prizmatik özellik gösterir. Germinatif epitel altında sıkı bağdokudan oluşan tunika albuginea bulunur. Her bir ovaryum tunika albugineanın hemen altında yerleşen bir dış katman olan korteks (kortikal bölge) ve içte yerleşen medulla (medullar bölge) 'dan oluşur (29) .

#### **2.3.1.Korteks**

Bu kısım ovaryumun fonksiyonel üniteleri olan çeşitli gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri, korpus albicans ve korpus luteum ile bunlar arasındaki kortikal stromadan oluştuğundan zona parenşimatoza olarak da adlandırılır. Kortikal stroma, mekik biçimindeki stromal hücreler, ince kollagen ve retikulum iplik demetleri ve şekilsiz temel maddeden oluşan gevşek bağdoku özelliğindedir. Stromal hücreler fibroblast benzeri hücrelerdir, ancak lipid damlacıkları içerirler. Bunlar ovaryumun siklik yapısal değişimlerinde önemli rol oynarlar ve stromada retiküler bir ağ içine gömülmüş epiteloid karakterdeki interstisyel hücrelere dönüşerek östrojen hormonunu salgırlar. Stromada ayrıca düz kas hücreleri de bulunur. Diğer memeli türlerinden farklı olarak kemiriciler, köpek ve kedi ovaryumlarında ayrıca interstisyel bez hücreleri olarak adlandırılan epiteloid hücre kordonları mevcuttur. Bu hücreler atretik, antral foliküllerin teka internasından veya atretik, preantral foliküllerin granuloza

hücrelerinden kaynaklanır. Bunlar da lipid inklüzyonları içeren çok yüzeyle epiteloid hücreler olup, ovaryumun mekik şeklindeki stromal hücrelerinden farklı tiptedirler. Tavşanlarda steroid hormonların büyük bir bölümünü sentezlerler (29).

### **2.3.2.Ovaryum folikülleri**

Foliküller üreme sürecinde sağlıklı bir oositin gelişiminde temel bir rol oynamalarının yanı sıra beyin, kardiyovasküler ve iskelet sisteminin normal fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli olan steroidlerin üretiminden de sorumlu yapılardır. Bir folikül merkezde bir veya birden fazla oosit ile bunu saran folikül epitel hücrelerinden (granüloza hücreleri) oluşur. Ovaryum folikülerinin gelişimi folikülogenez olarak adlandırılır ve folikülogenez sırasında, oositin büyümesi ve oositi kuşatan folikül epitel hücrelerinin farklılaşmasına bağlı olarak folikül morfolojisi değişim gösterir. İnsan ve memeli hayvanlarda ovaryum folikülerinin gelişim aşamalarına göre sınıflandırılmasında farklı tanımlamalar yapılmıştır. İnsanlarda genel olarak ovaryum folikülleri primordiyal, primer, sekonder ve olgun veya Graaf folikülü olarak sınıflandırılır (29). Köpeklerde morfolojilerine büyüklüklerine, folikül epitel hücrelerinin tip ve sayısına ve foliküler sıvının varlığına göre 5 sınıfa ayrılır: Bunlar; primordiyal, primer, sekonder (preantral), erken antral ve geç antral foliküllerdir (30). Kedilerde ovaryum folikülerinin yapısı genel olarak diğer memelilerinkine benzer. Ancak kedilerde ovaryum folikülleri değişik araştırmacı grupları tarafından farklı şekilde sınıflandırılmıştır. Bristol-Gould and Woodruff (21), folikülleri primordiyal, sekonder ve antral foliküler olarak sınıflandırırken, Reynaud et al. (31) primordiyal, primer, sekonder, preantral ve antral folikül tanımlamaları yapmıştır.

Memelilerde en erken ovaryum gelişimi primordiyal germ hücrelerinin embriyonik gonad taslaklarına göç etmesi ve yayılması ile başlar. Gonad taslaklarında kolonize olan primordiyal germ hücreleri göç etme yeteneklerini (motilite) kaybederler ve gametogenez başlar. Kısa bir süre sonra gonadların cinsiyet spesifik farklılaşması başlar ve primordiyal germ hücreleri mayotik olarak aktif oogonyumlara, bunlar da primer oositlere (oosit I) dönüşürler. Primer oositler mayoz bölünme sürecine girerler ve pubertiye kadar I. mayoz bölünmenin profazında tutuklu kalırlar (32). Kedilerde primer oosit oluşumu fetal gelişimin yaklaşık 40-50. günlerinde başlamakla birlikte, doğumdan sonra 8. günde tamamlanır. Folikülogenez sığır, koyun ve buffalo'da (33) doğumdan önce, sıçan, fare ve hamsterde (33-35) ise doğumdan kısa bir süre sonra

başlar. Pubertiye kadar olan dönemde ovaryumdaki germ hücrelerin hepsi primer oosit olup ovülasyon oluncaya kadar da bu aşamada kalır (36). Memeli ovaryumları binlerce folikül içerir, bunların yaklaşık %99.9'u atrezi, apoptosis ve hücrel nekroz ile elimine edilir (37).

### **2.3.2.1. Primordial ve primer foliküller**

Kedi ovaryumunu kemirici ovaryumundan ayıran en önemli yapısal özellik tunika albugineanın hemen altında korteksde yerleşmiş olan primordial foliküllerin bolluğudur. Bu özelliği ile kedi ovaryumu daha çok koyun, maymun ve insan ovaryumuna benzer. Primordial foliküller tek katlı yassı granüloza hücreleri tarafından sarılmış olan ve mayoz bölünmenin 1. profazında tutuklu kalan inaktif bir oosit içerirler. Primordial foliküller ovaryumlardaki rezerv foliküllerdir. Bristol-Gould and Woodruff (21) 'a göre primordial foliküller 20-30 µm çapında oosit içeren en küçük foliküllerdir ve üç tipe ayrılırlar. Primordial foliküllerin birinci tipini oluşturan B sınıfı foliküllerde oositi, sayısı 1-8 arasında değişen tek katlı basık veya yassı pregranüloza hücreleri sarmıştır. Geçici primordial foliküler olarak tanımlanan B/C sınıfı foliküllerde ise oosit tek katlı yassı veya kübik granüloza hücreleri ile sarılmıştır. Üçüncü primordial folikül tipi C sınıfı primordial foliküller olup bunlar primer foliküller olarak da tanımlanırlar. Primer foliküllerde oosit çapı 30-50 µm'dir ve tek katlı kübik veya prizmatik granüloza hücreleri ile sarılmışlardır. Bazı araştırmacılar (21, 38) primer foliküllerde zona pellusida ve granüloza hücre katmanını ovaryum stromasından ayıran bazal membranın belirgin olarak görülebildiğini bildirdiği halde, Reynaud et al. (31) primordial ve primer foliküllerde bulunmadığını ancak 110 µm'den büyük sekonder foliküllerde ölçülebilir olduğunu rapor etmişlerdir.

İnsanda primer folikülün yapısal özellikleriyle ilgili bilgiler kedilerdekinden farklıdır. Puberti ile birlikte hipofiz ön lobundan salgılanan FSH'nın etkisiyle her siklusta belli sayıda (5-15) primordial folikülün hem oosit hem de folikül epitel hücrelerinde bir takım yapısal değişiklikler meydana gelir. Primordial folikül aşamasında tek katlı yassı olan folikül hücreleri önce kübik, daha sonra prizmatik şekil alır. Bu durumdaki foliküle tek katlı primer folikül (unilaminar primer folikül) adı verilir. Folikül epitelleri mitozla çoğalıp çok katlı olunca folikül, çok katlı primer folikül (multilaminar primer folikül) veya henüz antrum (folikül boşluğu) şekillenmemiş olduğundan preantral folikül olarak adlandırılır. Bu foliküllerde çoğalan epitel hücreleri granüloza hücreleri olarak, bunların



oluşturduğu katman da zona granuloza olarak tanımlanır. Bu gelişme evresinde, oosit I gelişip 60-80 µm'lik bir çapa ulaştığında primer oosit ile ilk sıra granuloza hücreleri arasında her iki hücre grubu tarafından üretilen homojen görünüşte, asidofilik özellikte glikoproteinden zengin olan ve bu nedenle Periodic Acid Schiff (PAS) (+) boyanan zona pellusida (membrana pellucida) şekillenir. Zona pellusida'nın oositi koruyucu ve besleyici görevleri vardır ve varlığını geç blastokist evresine kadar sürdürür. Çok katlı primer folikül içinde bu gelişmeler olurken, folikülü kuşatan ovaryum stroması da folikül etrafında teka folikülü adı verilen bir kılıf yapar (29).

### 2.3.2.2.Sekonder foliküller

Sekonder folikül için insan ve hayvanlarda farklı morfolojik özellikler tanımlanmaktadır. İnsanda sekonder folikül, antral folikül veya veziküler folikül olarak da adlandırılmaktadır. Primer foliküllerde gelişme ilerleyip folikülün çapı 200 µm civarına, granuloza hücreleri kalınlığı ise 6-12 sıraya ulaştığında, granuloza hücreleri arasında yer yer erimeler başlar ve antrum adı verilen boşluklar belirir. Bu boşluklarda granuloza hücrelerinden salgılanan bir folikül sıvısı (likör folikülü; başlıca östrojen olmak üzere progesteron, androgenler gibi steroid hormonlar, FSH, LH, inhibin, aktivin, folikülostatin, OMI gibi steroid yapıda olmayan hormonlar ve çeşitli glikozaminoglikanlar içerir) birikir. İlk antrum şekillendikten sonra folikülün adı artık sekonder folikül'dür (29). Kedilerde ise sekonder foliküllerin yapısal özellikleri çeşitli araştırmacı grupları tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. Bristol-Gould and Woodruff (21) iki veya daha fazla granuloza hücre katmanı tarafından kuşatılmış 40-70 µm çapında oosit içeren ve 100-400 µm arasında değişen bir çapa sahip olan ve etrafında ayrıca teka folikülü adı verilen bir hücre katmanı bulunan folikülleri sekonder foliküller olarak nitelendirmiştir. Carrijo et al. (38) sekonder folikül çapını 43-110 µm, oosit çapını ise 22-77 µm olarak saptamışlardır. Reynaud et al. (31) ise sekonder foliküllerin çaplarının 86.3-158.8 µm, oosit çapının ise 58.8-107.5 µm arasında değiştiğini ve zona pellucidanın ilk kez sekonder folikül aşamasında görüldüğünü ve kalınlığının da 1.3-4.4 µm arasında olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar (31) ortalama  $126 \pm 2$  µm çapındaki sekonder folikül duvarında granuloza hücrelerinin iki katlı olduğunu ve preantral folikül duvarınının ise çok katlı granuloza hücrelerinden oluştuğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte insan (39), kedi (38) ve diğer memeli hayvanlarda (40-47) preantral folikül tanımı primordial, primer ve sekonder foliküller

için kullanılmaktadır. Her bir ovaryum başına preantral folikül popülasyonu türler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Evcil kedide 37853 (38), insanda 402000 (39), köpekte 47,900 (40), sığırdada 89577 (41), bufaloda 19819 (42), zebuda 70576 (43), maymunda 106071 (44), keçide 37646 (45), koyunda 75642 (46) ve domuzda 21000 (47)'dir.

### **2.3.2.3.Antral foliküller**

Kedilerde antral foliküller gelişim evrelerine ve folikül büyüklüklerine göre erken (küçük) ve geç (büyük) antral foliküller olarak iki gruba ayrılırlar. Erken antral foliküller sekonder foliküllere benzer çapa sahiptirler ve granüloza hücrelerinin yer yer erimesi sonucu oluşan antrum adı verilen boşluklar içerirler. Bu boşluklar folikül sıvısı içerirler ve folikül sıvısının artması sonucu folikül çapı 300-1000 µm'ye ulaşır. Bu foliküllerde oosit çapı 75-90 µm arasında değişir. Folikül etrafında iki veya üç sıralı teka hücre katmanı bulunur. Geç (büyük) antral foliküller çok sayıdaki antrumun birleşmesi ve yarımay veya C harfi şeklinde tek bir boşluğa dönüşmesiyle karakterizedirler. Bu foliküller olgun foliküller veya Graaf folikülü olarak da adlandırılırlar. Bu foliküllerde primer oosit 80-100 mikronluk çapa ulaşınca büyümesi artık durur (21). Primer oosit kendisini saran zona pellusida ve birkaç sıra granüloza hücresi ile folikül boşluğuna doğru sarkmıştır. Buraya "yumurta tepciği" (cumulus oophorus) adı verilir. Oositi kuşatan ilk sıradaki granüloza hücreleri prizmatiktir ve oositi taç gibi sardığından bu hücreler katmanı korona radyata olarak adlandırılır. Geç antral foliküllerde granüloza hücreleri fonksiyonel olarak farklı olan iki gruba ayrılırlar. Korona radyata'nın hemen dışında birkaç sıra halinde yerleşmiş olan granüloza hücreleri ise kumulus hücreleri olarak adlandırılır. Folikül duvarını oluşturan ve aynı zamanda antrumu çevreleyen granüloza hücreleri ise mural granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Kumulus hücreleri oositin beslenmesini sağlarlar ve aynı zamanda oositin gelişimini de parakrin tarzda etkilerler. Oosit de aynı zamanda kumulus hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eden ve etkileyen farklı sinyalizasyon faktörleri salgılar. Oosit ve kumulus hücreleri kumulus-oosit kompleksini oluştururlar (21, 29) Mural granüloza hücreleri ise olgunlaşan folikülün steroidojenik aktivitesinden sorumludur. İnsan, sığır ve farede granüloza hücrelerinin primer fonksiyonu östradiol (E<sub>2</sub>) ve progesteron (P) gibi steroid hormonları sentezlemektir. Folikül gelişimi devam ederken granüloza hücreleri farklılaşır ve E<sub>2</sub> sentezi artar. Bu hücreler folikül olgunlaşmasının başlaması ve takiben

ovülasyonu için gerekli olan LH reseptörlerini eksprese ederler (48). Antral foliküller en dıştan kalın bir bazal membranla (membrana vitrea) ve onun dışında da belirgin iki katman halinde gözlenen teka folikülü katmanı ile sarılmıştır. Folikülde bazal membrane bitişik olan teka interna iç biçimli hücrelerden ve kapillar damarlardan zengindir. Teka interna hücrelerinin hücre membranlarında FSH ve LH reseptörleri bulunur. LH salınımıyla faaliyete geçen bu hücrelerden salgılanan androstenedion hormonu granüloza hücrelerine geçer ve orada östradiole dönüştürülür. Teka eksterna ise fibröz bağ dokusu yapısındadır, kollagen iplik demetleri, düz kas hücreleri, fibroblast benzeri stromal hücreler ve kan damarları içerir, belirgin bir sınır göstermeden ovaryum stromasına karışır (29). Ovülasyon sırasında LH'daki artış progesteron ve prostaglandin F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) sentezini artıran siklik adenosin monofosfatı artırır. PGF2 $\alpha$ 'nın teka eksternadaki düz kas hücrelerinin kontraksiyonu indükleyerek folikül iç basıncını artırması follikülün patlamasına ve olgun oositin atılmasına, yani ovülasyona yardımcı olur (49).

Geç antral foliküllerde insan ve evcil hayvanların çoğunda ovülasyondan hemen önce (24-36 saat önce) teka interna hücreleri gibi granüloza hücrelerinde de LH reseptörleri belirir, LH artışına bağlı olarak lokal bir faktör olan mayoz bölünmeyi uyarıcı maddenin salınımını takiben primer oosit, I. mayoz bölünmesini tamamlar ve sekonder oosit ile I. kutup hücresi (polosit I) oluşur; dişi köpek ve kısırakte ise ovülasyonla atılan primer oositte ovülasyondan kısa bir süre sonra I. mayoz bölünme tamamlanır. Oluşan sekonder oosit hemen ikinci mayoz bölünmesine başlar ve metafaz evresinde kalır. Fertilizasyon olmadıkça bölünme tamamlanmaz, ancak fertilizasyon olduğunda sekonder oositten ovum ve II. kutup hücresi oluşur. Fertilizasyon sonrası ovum'un pronükleusu spermiyumun pronükleusuyla kaynaşır ve zigot meydana gelir (50).

#### **2.3.2.4. Atretik foliküller**

Ovaryumda prenatal dönemde şekillenmiş olan oositlerin çoğu olgunlaşarak ovülasyon aşamasına kadar ulaşamaz. Her gelişme evresindeki folikülde ve çoğunlukla da primer folikül evresinde büyümenin durması, oosit ve takiben granüloza hücrelerinin dejenerasyonu sonucu ovaryumda bir nedbe dokusu şekillenir. Buna atretik folikül adı verilir. Gerileme sürecine giren folikül ne kadar gelişmişse nedbe dokusu da o kadar büyük olur. Folikül atrezisi özellikle gebelik, doğum sonrası, puberte dönemlerinde belirgindir (29).

### 2.3.3.Ovülasyon

Ovülasyondan hemen önceki olgun folikülde (Graaf folikülü), sekonder oosit etrafındaki korona radyata ve birkaç sıra folikül epiteli ile sarılı olarak folikül duvarından ayrılır ve folikül boşluğu içinde serbest kalır. Graaf folikülü ovaryum yüzeyine dayanarak onu dışa doğru kubbelendirir ve germinatif epitele baskı yapar. Ayrıca tunika albugineadaki damarları sıkıştırarak germinatif epitelin en zayıf noktası olan ve stigma adı verilen bölgenin beslenmesine engel olur. Olgun folikülün baskısı sonucu stigma bölgesi iskemiye uğrar, buradaki dokunun zayıflaması sonucu yırtılma olur. Folikül sıvısının artışıdan dolayı bu noktaya yapılan iç basınç da, zayıflamış olan bu noktanın yırtılmasına sebep olur. Bazı tür hayvanlarda folikülün teka eksternasında bulunan düz kas hücrelerinin kontraksiyonunun folikül duvarının yırtılmasında etkili olduğu bilinmektedir. Bu sırada hipofizden salgılanan LH hormonu da ovülasyonu hazırlayan etkenlerdendir. Artan LH mural granüloza hücrelerini birbirine bağlayan hücrelerarası maddeyi eriterek bu hücrelerin birbirinden ayrılmasında etkili olur. Ayrıca LH bazal membranı (membrane vitrea) polimerize eder. Ayrıca granüloza hücreleri tarafından salgılanan kollagenaz ve plazmin gibi proteazların artması da folikül etrafındaki bağdokunun yıkımını sağlayarak ovülasyonda etkili olan faktörlerdendir. Ovülasyon sonucu folikül yırtılır, oosit II kendisini saran korona radiata hücreleriyle birlikte tuba uterinaya atılır (29).

### 2.3.4.Korpus hemorajikum, korpus luteum ve korpus albicans

Ovülasyondan sonra folikülün yırtılmasıyla birlikte folikül sıvısı boşalır ve folikül duvarı büzülür. Kandaki östrojen düzeyi düşer ve takiben LH ve luteotropik hormonun (LTH) etkisiyle patlayan folikülde bir takım yapısal değişiklikler oluşmaya başlar. Teka eksternadaki düz kas tellerinin kontraksiyonu ile büzüşen folikül boşluğu içine yırtılan kan damarlarından kan dolar. Bu yapıya korpus hemorajikum adı verilir. İç kısımdaki kan kısa sürede rezorbe olur ve aynı zamanda büzüşen kıvrımlanan mural granüloza hücreleri arasına septumlar halinde bağdoku ve kan damarları yayılır. Bunu takiben granüloza ve teka hücreleri çoğalırlar ve lipid ile lipokrom pigmenti (lutein) içeren endokrin fonksiyonlu lutein hücrelerine (granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri) farklılaşırlar. Böylece iri granüloza lutein hücreleri ile onlardan biraz daha küçük olan teka lutein hücrelerinden oluşan korpus luteum'u meydana getirirler. Bu endokrin yapı progesteron hormonu ile az miktarda östrojen ve oksitosin hormonlarını

salgılayarak hipofizden FSH ve LH salgılanmasını önler. Progesteron ovaryumda yeni foliküllerin gelişimini ve ovülasyonu engeller. Çiftleşme olur ve gebelik şekillenirse korpus luteum büyüyerek gebelik süresince varlığını sürdürür. Bu durumda ovaryumda oluşan korpus luteum, korpus luteum graviditatis (korpus luteum verum, korpus luteum pregnansi) adını alır. Gebelik olmadığı takdirde fazla büyüyemeyen korpus luteum korpus luteum periyodikum (korpus luteum spurium) olarak tanımlanır. Korpus luteum gebelik sona erdiğinde veya gebelik olmadığında yeni bir siklusun başlamasıyla dejenere olur ve dejenerasyon alanının bağdokuyuyla dolması sonucu beyaz bir nedbe dokusu şekillenir. Bu dokuya korpus albicans adı verilir (29). Kedilerde korpus luteumun gerilemesinin en önemli belirteci lutein hücreleri içinde iri yağ vakuollerin oluşması ve nonsteroid hücrelerin miktarındaki artıştır (51). Amelkina et al. (52) yalancı gebelik periyodundaki CL'ü luteal hücrelerin içerdiği lipid vakuollerin tipi ve miktarına göre histomorfolojik olarak 4 dört evreye ayırmışlardır. Yalancı gebeliğin birinci evresi (PP1), CL'un oluşum aşamasını temsil eder. Hücreler luteinizasyon sürecindedir ve genel olarak küçüktür. Hücre şekilleri, mekik biçiminden yuvarlağa kadar değişirken, sitoplazma/çekirdek oranları benzerdir. Sitoplazmada küçük lipid vakuolleri (tip 1 vakuolizasyon) orta derecededir. PP1'in geç döneminde, hücrelerin biçimleri yuvarlaktan polihedrala dönüşür ve boyutları artar. Aşama ilerledikçe neovaskülarizasyon süreçleri daha belirgin hale gelir. PP2 aşaması hem luteal gelişmenin hem de devamlılığın olduğu aşamadır. Luteal hücrelerin büyüklüğü artar, polihedral şekilli, yuvarlak veziküler çekirdekli ve bol miktarda tip 1 vakuoller içeren hücrelere dönüşürler. Nonsteroidojenik hücreler luteal hücreler arasındaki boşlukları kaplar, bazen de kümeler oluştururlar. Yalancı gebeliğin bu evresi boyunca CL'nin ortalama ağırlığı en yüksektir ( $24.9 \pm 9.3$  mg). PP2 evresinin ilerlemesi ile birlikte, tip 1 vakuolizasyon derecesi azalmıştır. PP3 evresi erken luteal regresyonu temsil eder ve iri bir ya da bir kaç vakuolün (tip 2 vakuolizasyon) sitoplazmayı işgal ettiği görülür. PP3'ün ilerlemesi ile tek tek vakuollerin büyüklüğü artmıştır. Tüm çekirdekler veziküler değildir. Nonsteroidojenik hücrelerin miktarı daha da artar. PP4 evresi geç luteal regresyonu temsil eder ve iki tip hücre modifikasyonu içerdiğinden PP4.1 ve PP4.2 olmak üzere iki alt evreye ayrılır. PP4.1'in luteal hücreleri, özellikle yoğun olarak II tipi vakuolizasyon gösterir. Hücre boyutları, PP3'e kıyasla daha küçüktür ve çekirdekler çoğunlukla kondansedir. PP4.2'nin luteal hücreleri, ise neredeyse tüm hücre

sitoplazmasını kaplayan büyük bir vakuolden dolayı halka formu kazanmıştır. Çekirdek hücrenin bir kenarına itilmiştir (52).

### **2.3.5. Medulla**

Medullar bölge ovaryum iç bölgesinde elastik ipliklerin çoğunlukta olduğu gevşek bağ dokudan oluşan kan damarlarından zengin bölümdür, bu nedenle zona vaskuloza da denir. Medullada tek tük düz kas telleri ile lenf damarları ve sinir telleri de bulunur. Medullada ayrıca bazı embriyolojik artıklara (mezonefroz kalıntıları) rastlanabilir. Bunlar epoooforon ve paraooforondur. Bunlar kübik epitelle döşeli bir uçları kapalı tübüler yapılardır. İnsan ve domuzda rete ovaryumun yakınındaki hilus bölgesinde interstisyel bez hücrelerine benzer yapısal özellik gösteren epitelooid hücre grupları bulunur. “Hilus hücreleri” olarak adlandırılan bu hücreler sitokimyasal özellikler bakımından testiste Leydig hücrelerine benzerler ve steroidleri özellikle de androstenedionu üretirler. Fötal ovaryumda görülürler, bebeklik ve çocuklukta bulunmazlar, ancak pubertide tekrar ortaya çıkarlar. Bu hücrelerin hiperplazisi ya da tümörlerinde erkeklik karakterleri ortaya çıkar (29).

### **2.4. KEDİLERDE ÜREME FİZYOLOJİSİ**

Evcil dişi kediler 7-10 aylık olduklarında pubetiye ulaşan, mevsimsel poliöstrus gösteren ve tüm yaşamı boyunca 50-100 yavru doğurabilen hayvanlardır. Bunların seksüel sikluslarının belirli özellikleri diğer türlerden farklıdır, ancak yine de üreme fizyolojilerinin tam olarak anlaşılmasını ve araştırmaların yapılmasını gerekli kılan birçok yönü vardır. Evcil kedilerde östrus siklusu beş evreye ayrılır: Proöstrus, östrus, interöstrus, diöstrus ve anöstrus (53). Bazı araştırmacılar interöstrus ve anöstrusu aynı periyot olarak tanımlarlar (54). Proöstrus hipofiz ön lobundan salgılanan FSH'nin etkisiyle başlar. Ovaryumda foliküler gelişmeyle ve serum östradiol düzeyindeki artışla karakterize olan bu evrenin süresi 12 saat ile 3 gün arasında değişir (21, 55, 56). Östradiol vajinal kornifikasyonu ve östrus davranışlarını uyarır. Bu dönemde dişiler giderek aktifleşirler, ancak erkek kediler ile çiftleşmeyi kabul etmezler (56, 57). Proöstrusu izleyen östrus dişinin erkeği kabul ettiği evredir, yaklaşık 4-7 gün sürer, fakat bu süre 1-21 gün arasında da değişebilir. Maksimum düzeyde foliküler gelişim (çapları 2 mm'den büyüktür) ile vajinal kornifikasyon ve östradiol seviyesinin 20 ng/ml'ye ulaşmasıyla karakterizedir (55, 56, 58). Bu dönemde çiftleşme olursa, östrus, ovülasyon olduktan sonraki 4-5. günde sonlanır. Dişi kediler 36 saatlik bir süre içinde

30 çiftleşmeye izin verirler (59). Başarılı bir çiftleşmeden sonra uterotubal birleşme yeri ve uterus kripleri spermiyum rezervuarları olarak işlev görürler (60). Çiftleşme veya spontan ovülasyon olmadığında ise östrus üreme mevsimi boyunca her 10-14 günde bir gözlenir (59).

Östrusu takiben çiftleşme olmadığında ovülasyon şekillenmez ve kediler anöstrus periyoduna girerler. Bu periyot 7-21 gün sürer ve “interöstrus” olarak adlandırılır. İnteröstrus üreme mevsiminde gerçekleşir ve iki östrus arasındaki ovülasyonun olmadığı, ovaryumda foliküler aktivite dalgalanmaları arasındaki dönemdir. Bu dönemde östrojen ve progesteron düzeyleri bazal seviyelere iner ve ovaryumlar hormonal olarak aktif olmadıklarından çiftleşme davranışları kaybolur. Dişi kediler 1-3 hafta içinde tekrar proöstrus dönemine geçerler, fakat bu süre 3 gün ile 7 hafta arasında da değişebilir (21, 55, 61).

Kedilerde östrus sonrasında anovülasyon evresi, yalancı gebelik ve gebelik olmak üzere olası üç farklı sonuç görülür. İnteröstrus, çiftleşmenin olmadığı anovülasyon evresinin karşılığı olarak kabul edilir (55, 61). Östrusu takiben çiftleşme olduğunda ise vagina duvarının gerilmesi suretiyle oluşan bir nöroendokrin refleks aracılığıyla orta-ventral hipotalamusdan GnRH salınma neden olur. Dakikalar içinde GnRH ön hipofiz lobundan LH salınımını başlatır. LH iki saat içinde pik yapar ve 8 saat içinde bazal seviyelere iner. Eğer LH seviyesi yeterli ise ovülasyon meydana gelir (57). Çiftleşme sonrası ovülasyon LH pikinden 24-52 saat sonra şekillenir. Vajina ve serviksin swab çubuğu ile uyarılması, koku vb gibi çeşitli uyaranların etkisiyle çiftleşme olmaksızın da ovülasyon şekillenebilir. Bu nedenle evcil dişi kedilerde indüklenmiş veya spontan ovülasyon gözlenebilir. Ovülasyonu takip eden 1-2 gün içinde patlayan folikül yerinde önce korpus hemorajikum (CH) oluşur. Takiben CH korpus luteuma (CL) dönüşür ve 24-48 saat içinde CL progesteron salgılamaya başlar (55). Genel olarak CL'un şekillendiği ve serum progesteron düzeyinin yüksek olduğu bu dönem diöstrus veya luteal faz olarak adlandırılır. Çiftleşme sonrası döllenmenin başarılı olup olmamasına bağlı olarak, iki tip luteal faz mevcuttur: biri gebelik ile ilişkilidir (62), diğeri ise steril bir luteal faz olup, genellikle yalancı gebelik olarak adlandırılır (63).

Dişi köpeklerde görülen ovülasyon öncesi progesteron hormonu düzeyindeki yükselme kedilerde şekillenmez. Ovülasyondan sonraki 15-25. günlerde progesteron düzeyi 100-200 nmol/L'ye ulaşır. Gebe ve yalancı gebe olan kedilerde progesteron düzeyleri benzer

değerlerde veya gebelerde biraz daha yüksek olabilir. Progesteronun yüksek konsantrasyonları GnRH salınımının merkezi olarak durdurulması ile sağlanır, böylece kedilerin östrus evresine girmesi engellenir (63).

Gebe olmayan (yalancı gebe) kedilerde CL luteoliziz oluncaya kadar yaklaşık 35-44 gün kadar varlığını sürdürür (63). Buna bağlı olarak serum progesteron düzeyi ovülasyonu takiben gebe kalmayan kedilerde 36-38 gün yüksek kalır (55, 64). Gebe kedilerde ise plasentanın geç gebelik sırasında progesteron üretiminde rol oynadığı bilindiği halde, gebelik boyunca progesteronun primer kaynağı olarak CL görülmektedir (65). Bu nedenle gebe kedilerde serum progesteron düzeyi gebelik süresince (63-67 gün) yüksek kalır (55, 64).

Normal gebelik ve yalancı gebelik sırasında progesteron seviyelerinin yüksek kalma süresi değişiklik gösterir. Eğer ovülasyondan sonra oosit döllenmez ise yaklaşık 30-50 gün kadar süren bir yalancı gebelik oluşur. Yalancı gebelikte progesteron konsantrasyonu yaklaşık 25-30. günlerde azalmaya başlar ve 30-40. günlerde 3.2 nmol/L'nin altına veya bazal seviyelere iner (64). Yalancı gebelik anöstrus ve interöstrusdan farklı olarak çiftleşme davranışlarının bulunmadığı dönemdir. Yalancı gebelik sonrası ovaryumda foliküler aktivite CL'un regresyonunu takiben 10. günde yeniden başlar ve dişi kediler fertile duruma geri dönerler (62). Bir poliöstrus sezonunda kedilerde 4-5 kez yalancı gebelik şekillenebilir (64). Eğer ovülasyon sonrası oosit döllenirse çiftleşmeden (kopulasyon) 5 gün sonra embriyo uterusu gelir ve implantasyon çiftleşmeden sonraki 12-13. günde gerçekleşir (62). Gebelik süresi ortalama 66 gün olmakla birlikte 62-74 gün kadar da sürebilir. Gebelikte progesteron konsantrasyonu 25-35. günlerde azalır, fakat daha sonra yaklaşık 15-30 nmol/L düzeylerinde stabil kalır ve gebeliğin sonuna yakın 60. günde 3-5 nmol/L'nin altına düşmez. Gebeliğin devam etmesi için progesteron konsantrasyonunun 3 nmol/L'nin altına inmemesi gereklidir (62, 63). Son yıllardaki çalışmalar (66) yalancı gebe ve gebe kedilerin korpus luteumlarının benzer steroidojenik kapasiteye sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca Amelkina et al. (52) kedide progesteron ve östrojen hormonlarının intraluteal düzeylerinin yalancı gebelik boyunca önemli farklılıklar gösterdiğini bildirmiştir. Bu araştırmacılar (52) PP2'deki progesteron seviyesinin, PP3 ve PP4'e göre daha yüksek olduğunu ( $P < 0.05$ ) ve PP1'deki östrojen seviyesinin de PP2'de olduğu gibi



PP3 ve PP4 ile karşılaştırıldığında PP2'ye ( $P < 0.05$ ), PP3 ve PP4'e ( $P < 0.005$ ) göre daha yüksek bulunduğunu saptamışlardır ( $P < 0.005$ ).

Gebelik sırasında salgılanan diğer hormonlar relaksin, prostaglandin ve prolaktin'dir. Relaksin hormonu gebeliğin 20. gününden itibaren fetoplasental unite tarafından salgılanır ve salgılanma süreci doğuma kadar devam eder. Relaksin ve prolaktin hormonları çiftleşmeden sonraki 35. günde normal ve yalancı gebeliğin ayırt edilmesinde önemli bir kriterdir. Prostaglandin 30. günde hem endometriyum hem de fetoplasental unite tarafından üretilmeye başlar, 45. günde belirli bir düzeye ulaşır, doğumdan hemen önce bir dalgalanma gösterir ve doğumdan birkaç gün sonra aniden düşer. Prolaktin memenin gelişimi, laktasyonun başlaması ve devamlılığı için gereklidir. Gebeliğin 25-35. günlerinde artmaya başlar, 50. günde belirli bir düzeye ulaşır ve doğumdan hemen önce aniden artar. Kedilerde prolaktin implantasyonun şekillenmesini takip eden 20-25. günlerin sonrasında en önemli luteotropik faktör olarak rol oynar. Prolaktin CL'un regresyonunu önler ve gebeliğin devam etmesini sağlayacak miktarda progesteron salgılanmasını sağlar. Relaksin de önemli bir luteotropik faktördür (54).

Anöstrus gün ışığının kısa olduğu ocak şubat ayları arasında meydana gelir. Bu dönem dişilerin seksüel dinlenme dönemidir, çiftleşme davranışları göstermezler ve erkeği kabul etmezler. Bu dönemde östrojen ve progesteron hormon düzeyleri bazal seviyelerdedir (61).

## **2.5.CLAUDİN'LER**

Normal epitel hücreleri zonula okludens, yapıştırıcı bağlantı (adherens junction, AJ) ve oluklu bağlantı (Gap junction, GJ) ile birarada tutulurlar. TJs mide, bağırsak, karaciğer, safra kesesi, prostat, testis, ovaryum, plasenta, beyin, retina, iç kulak veya akciğer gibi bütün epiteliyal organlardaki epitel hücrelerine ve vasküler endotel hücrelerine hücreler polarite kazandıran ve plazma membranının apikal ve bazolateral yüzeyler arasında protein ve lipidin serbest yayılmasını engelleyerek paraselüler geçirgenliği düzenleyen apikal hücre bağlantılarıdır (67, 68). TJs aksesuar proteinlerle aktin hücre iskeletine bağlanan transmembran proteinlerden oluşurlar. Bu transmembran proteinleri claudinler, occludinler, JAMs'dir (69). TJs'ın bel kemiği olarak nitelendirilen claudinler bütün epitel ve endotel hücrelerinde TJs'da bulunan 20-24 kDa ağırlığındaki integral membran proteinleridir ve TJs'ın bütünlüğünü desteklerler (70). İlk defa 1998 yılında

tavuk karaciğerinde identifiye edilmişlerdir (68). Bugüne değin fare ve insanda claudinlerin hücre ve doku spesifik olarak eksprese edilen 27 üyesi tanımlanmıştır. Ancak bunların hepsi bütün memeli türlerinde bulunmaz. Örneğin; claudin-13 insanda bulunmaz (71).

Claudin'ler komşu hücreler üzerindeki claudinler arasındaki etkileşime aracılık eden 2 ekstrasellüler loop, 4 transmembran domain ve intrasellüler amino ve karboksi terminallerinden oluşan tetraspan membran proteinleri olarak bilinirler (67, 72, 73). Claudin'lerin karboksi terminali Zonula okludens-1 (ZO-1), -2 (ZO-2), ve -3 (ZO-3) sitoplazmik proteinlerine bağlanır (74). Aminoasit dizilerine göre claudinler klasik ve klasik olmayan claudin'ler olarak iki alt gruba ayrılırlar. Klasik claudinler claudin-1,10, -14, -15, -17, -19 ve klasik olmayan claudinler ise claudin-11, -12, -13, -16, -18, -20-24 (5). Claudin'ler fonksiyonel olarak bariyer oluşturan (claudin-1,-3,-4,-5) ve por oluşturan (claudin-2,-7,-10 and -16) claudin'ler olarak iki gruba ayrılırlar (5). Bariyer oluşturan claudinler farklı iyonlar ve proteinlere karşı parasellüler permeabilityyi azalttıkları halde, por oluşturan claudinler iyonlara karşı parasellüler permeabilityyi artırır. Bunun bir sonucu olarak, farklı claudin izoformlarının dokuya özgü ekspresyonları bu dokudaki TJs'in permeabilite özelliklerini belirleyen en önemli faktördür (6). Çoğu hücreler farklı claudin izoformlarını eksprese ederler ve bu izoformlar homofilik ve heterofilik etkileşimlerle heteropolimerler içine ko-polimerize olma yeteneğine sahiptirler. Claudin polimerlerinin çeşitli tipleri TJs'a dayanıklılık ve seçicilik vermek ve junksiyonal permeabilityyi düzenlemek için birlikte çalışırlar (75). Bu çalışmada epitelial spesifik claudin-1 ve endotelial spesifik olan claudin-5'in ekspresyonları çalışılacağından bunlar hakkında bilgi verilmiştir.

Claudin-1 ilk identifiye edilen claudin olup epitelial spesifik bir proteindir (68). Claudin-1 'in epidermal bariyer fonksiyonunda kritik rol oynadığı (76, 77), farede normal meme gelişimi (78) ve erken involüsyon periyodu (79) sırasında claudin-1 ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir. İnsanda kornea ve konjunktiva epitelinde de claudin-1'in eksprese olduğu rapor edilmektedir (80). Claudin-1 ekspresyonu insanda gliyoblastoma, kolon, meme, prostat, ovaryum (81) kanserleri gibi çoğu kanser türünde çalışılmıştır. Claudin-1 ekspresyonundaki artış veya azalış tümör büyümesi ve ilerlemesinin potansiyel nedeni olarak gösterilmektedir. Claudin-1'in  $\beta$ -catenin ile E-cadherin'in ekspresyon ve lokalizasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülür. Claudin-1'in sitoplazmik ve nüklear lokalizasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin

hücre tipine bağlı olarak değiştiği ve claudin-1'in ya apoptosisi indüklediği (10) veya antiapoptotik etkisinin bulunduğu (12) çeşitli çalışmalarla saptanmıştır. TJs'in ana kurucu proteini olan claudin-1'in normal ovaryum yüzey epitelinde (20) ve korpus luteumdaki granüloza lutein hücrelerinin membranlarında lokalize olduğu (15) bildirilmektedir. Erken luteal faz sırasında granüloza lutein hücrelerinde claudin-1'in dağılımının orta ve geç luteal fazlara göre daha az organize olduğu, luteal gerilemeden sonra claudin-1'in az sayıdaki granüloza hücrelerinin sitoplazmasında bulunduğu saptanmıştır (15). Claudin-1'in hücre sel büyüme ve epiteliyal-mezenşimal değişimde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (82, 83). Epiteliyal mezenşimal değişim epitel hücrelerinin kutuplaşma ve hücre-hücre adezyonu özelliğini kaybederek tekrar göç etme ve yayılma özelliği kazanması ve giderek mezenşimal köken hücreye dönüşmesidir. Embriyonal gelişim sırasında mezodermin ve nöral tübün oluşması gibi gelişimsel süreçler için esensiyeldir. Epiteliyal mezenşimal değişim ayrıca yara iyileşmesi, organ fibrozisi, kanserin ilerlemesi için metastazın başlamasında da meydana gelir. Ovaryum yüzey epiteli ovülasyona uğramamış ovaryumda epiteliyal ve mezenşimal özellikler gösteren durağan bir mezotelden oluşur (84). Bununla birlikte menstrüel veya ovarial siklus sırasında ovülasyon sonrası ovaryum yüzey epiteli de epiteliyal-mezenşimal değişime uğrar (85). Claudin-1'in ovaryumda ovülasyon sonrası şekillenen epiteliyal-mezenşimal değişimde rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir.

Bariyer oluşturan claudinlerden claudin-5 endotel hücrelerindeki TJs'da predominant olarak eksprese edilir (86). Kan beyin bariyerinde vasküler endotelde bulunan claudin-5 diğer dokulardaki endotel hücrelerindeki göre daha sıklıdır ve makromoleküllere karşı impermeabl özellik gösterir (87). Claudin-5 akciğer alveol epiteli gibi bazı epiteliyal dokularda da bulunur (88, 89). Ancak bu dokulardaki fonksiyonları bilinmemektedir. Claudin-5'in endotel hücrelerine spesifik olduğu, endotel hücrelerinde bariyer fonksiyonunun yanısıra endotel hücrelerinin motilitesinin düzenlenmesine katıldığı (90) ve ayrıca, ovaryumda korpus luteumun anjiyogenezinde önemli rol oynadığı (15, 17) gösterilmiştir. İnsan ovaryumunda erken, orta ve geç luteal fazlarda claudin-5'in teka'nın büyük damarlarının endotelinde ve granüloza kapıllarında bulunduğu saptanmıştır (15). Ayrıca claudin-5 lenf düğümlerinde sinuzoidal endotelde, lenfoid dokularda yüksek endotelli venüllerde, deride kılın serbest gövdesinde ve ter bezlerinin lumeninde, glomerular podositlerde, mide, ince bağırsak, kolon, safra kesesi ile pankreasın asinus ve kanllarındaki epitel hücrelerinin lateral yüzeylerinde bulunur (91,

92). Prostat bez epitelinde, tiroid folikül epitelinde, tonsiller kript epitelinde, çok katlı yassı epitelin yüzey katmanında, memede kanal epitelinde bulunur (91). Claudin-5 kardiyovasküler gelişim için de gereklidir (93).



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 2008-2013 yılları arasında değişik zamanlarda yapılan ovaryohisterektomi operasyonları sonrasında toplanmış ve rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklar halinde Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı doku arşivinde saklanmış olan ovaryum doku örnekleri kullanıldı. Bu örnekler Veteriner Fakültesi kliniklerine hayvan sahipleri tarafından kısırlaştırılmak üzere getirilmiş ve ovaryohisterektomi operasyonu uygulanmış olan toplam 45 adet sağlıklı erişkin dişi kediye ait dokulardır. Kedilerde ovaryohisterektomi operasyonları kedilerin kısırlaştırılması amacıyla rutin olarak yapılan bir operasyon olup, operasyon sonrası ovaryum, ovidukt ve uterus dokuları tıbbi atık olarak atılmaktadır. Bu dokular Anabilim dalı'mız tarafından uygun tespit işlemini takiben parafin içine gömülmekte bu haliyle Anabilim dalı arşivinde çok uzun süreler saklanabilmektedir.

#### 3.1. Histolojik ve İmmunohistokimyasal analiz

Operasyon sonrası ovaryum örnekleri 18 saat süreyle formol alkol solüsyonunda tespit edilmiş, takiben %96'lık alkolden başlayarak dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafin blokta bloklanmıştır.

Çalışmada claudin-1 ve -5'in kedi ovaryumundaki lokalizasyonunu incelemek için her bir hayvanın ovaryumlarına ait bloklardan 5 mikron kalınlığında seri kesitler alınıp, toplam 3 seri preparat hazırlandı. Her bir seri preparat için bir hayvanın her iki ovaryumuna ait en az 6 kesit alındı. Preparatların birinci serisi genel yapıyı belirlemek amacıyla Crossmon'un üçlü boyaması (94) ile boyandı. Bu preparatlarda ovaryumda foliküllerin gelişim aşamaları ve korpus luteumun bulunup bulunmaması ve korpus luteumda gözlenen histolojik değişikliklere göre siklus dönemleri inaktif, foliküler ve luteal evre olarak üç gruba ayrıldı. Diğer serilere ise immunohistokimyasal incelemeler için Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı.

İmmunohistokimyasal incelemeler için hazırlanan kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS: Phosphate buffer saline) ile 5 dak. yıkandı ve takiben endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için metanolde hazırlanmış %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 15 dak. muamele edildi. Takiben PBS'de iki kez 5'er dak. yıkanan kesitlerde doku antijeninin yeniden kazanımını sağlamak için sitrat bufferda (pH.6) 80 °C'de 30 dakika süreyle kaynatıldı ve aynı solüsyon içinde 20 dak. soğutuldu. Tekrar PBS ile dört kez 5'er dak. yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika bloklama solüsyonu (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB ile bir nem odası içinde inkübe edildi. Uygun dilusyonlarda hazırlanmış primer antikorlar (Claudin-1 ve -5) (Tablo 1) kesitler üzerine damlatılarak 4 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonu takiben PBS'te dört kez 5'er dak. yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor (Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) ile 15 dakika oda ısısında inkübe edilip, tekrar dört kez PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepavidin (Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) ile 15 dak. muamele edildi. Tekrar dört kez PBS ile yıkanan kesitler 5-10 dakika 3-3'-diaminobenzidine (DAB; Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, A, USA) kromojen solüsyonunda bekletildi. Distile su ile yıkamayı takiben kesitler Gill'in Hematoksilen'inde 5 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı. Takiben alkoller ve ksilollerden geçirilen kesitler üzerine yapıştırıcı (entellan) damlatılıp lamelle kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (BX51 Olympus, JAPAN) incelenerek fotoğraflandı. İmmunreaksiyonun spesifikliğini belirlemek amacıyla negatif ve pozitif kontrol preparatları hazırlandı. Pozitif kontrol dokuları olarak kedi oviduktundan alınan kesitlere aynı immunohistokimya prosedürü uygulandı. Negatif kontroller olarak alınan ovaryum kesitleri ise primer antikor yerine non-immun tavşan serumu (Santa Cruz Biotechnology, sc-2027) veya PBS ile muamele edildiler. Oviduktta pozitif boyanmanın görülmesi ve negatif kontrol kesitlerinde ise immunboyanmanın olmaması, claudin-1 ve claudin-5 antikorlarının kedi dokusu için spesifik olduğunu gösterdi.

Çalışmada germinatif epitel, kortikal ve medullar stromadaki fibroblast benzeri hücreler ile stromal interstisyel hücreler, primordiyal, primer, sekonder, erken ve geç antral (Graaf) foliküller, atretik foliküller ve korpus luteumda her bir antikor için

immunboyanmalar yoğunluklarına göre negatif, zayıf, orta şiddette ve kuvvetli olarak derecelendirilerek semikantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme her bir hayvanın sağ ve sol ovaryumundan alınan 6 seri kesitte yapıldı.

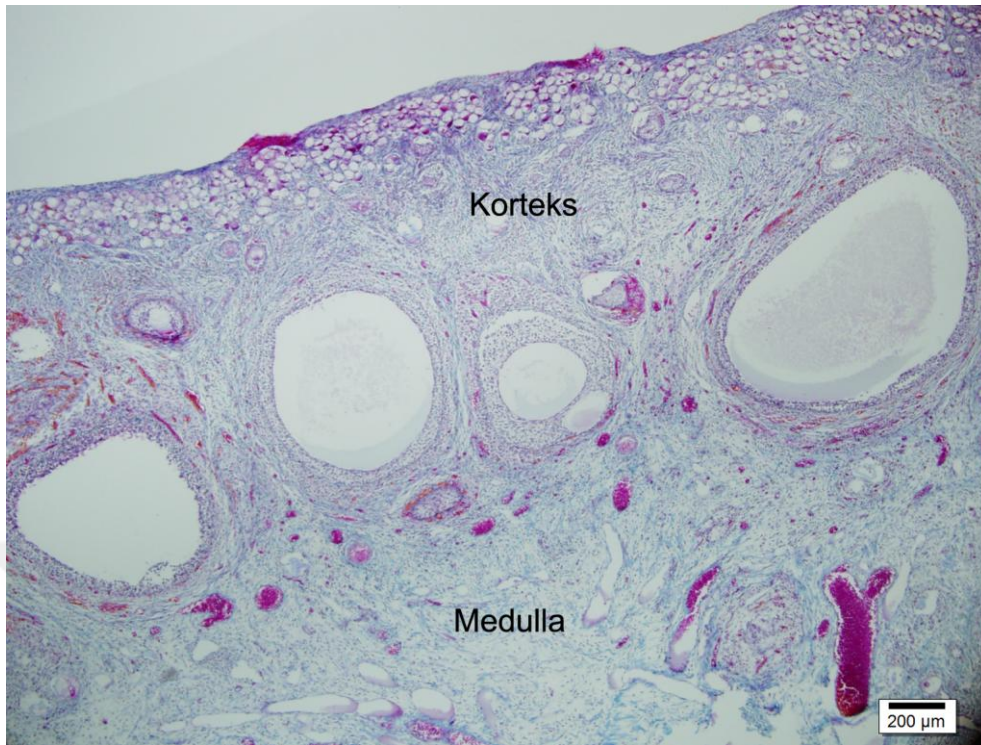
**Tablo 3.1.** İmmunohistokimyasal analizde kullanılan primer antikolar

<b>Antikor</b>	<b>Konakçı</b>	<b>Tür reaktivitesi</b>	<b>Dilüsyon oranı</b>	<b>Üretici firma/ Katalog No</b>
Claudin-1	Tavşan	İnsan, fare, sıçan	1/100	Thermo Scientific/ RB-
Claudin-5	Tavşan	İnsan, fare, sıçan	1/800	Millipore/ABT45

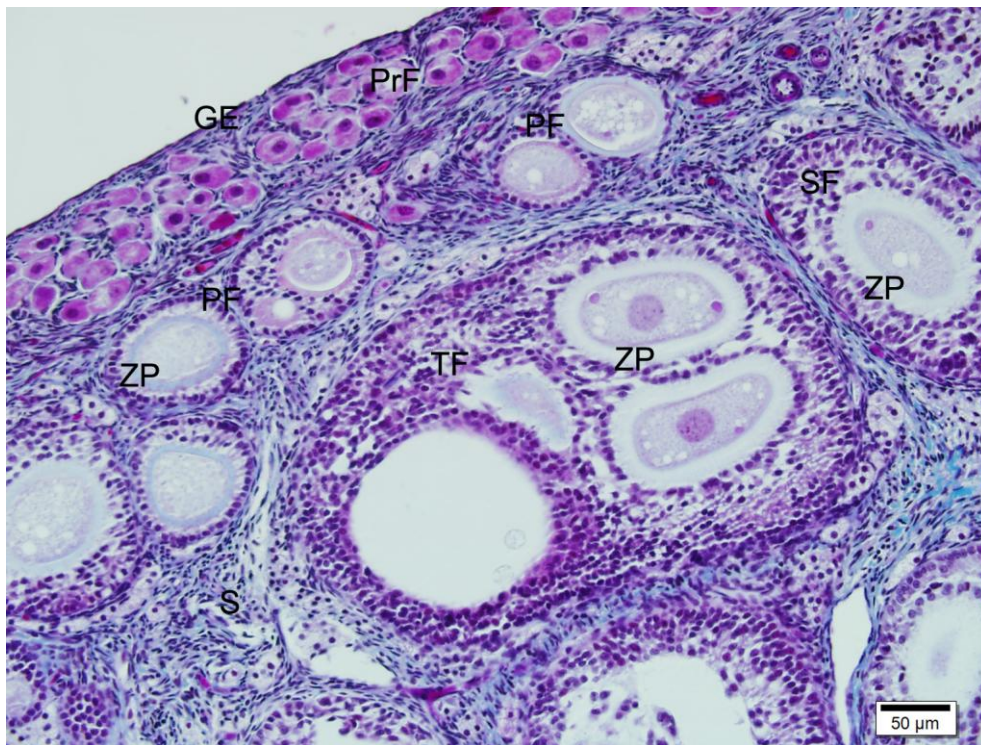
## 4.BULGULAR

Çalışmada kedilerin sağ ve sol ovaryumlarından alınan ve Crossmon'un üçlü boyaması ile boyanan kesitler ışık mikroskobunda incelendi. Ovaryumların dıştan tek katlı yassı veya kübik germinatif epitelle örtülü olduğu, epitelin altında sıkı bağdokudan oluşan tunika albuginea'nın bulunduğu gözlemlendi. Diğer memeli hayvanlardakine benzer olarak ovaryumda korteks ve medulla olmak üzere iki kısım ayırt edildi (Şekil 4.1). Korteks stromasında çeşitli gelişim aşamalarındaki sağlıklı ve atretik foliküller ve ovariyal sıklusa bağlı olarak korpus luteum, foliküller etrafında ve tunika albuginea'nın altında yerleşmiş olan düz kas hücreleri, fibroblast benzeri hücreler ve interstisyel hücre grupları görüldü (Şekil 4.2). Endokrin fonksiyonlu oldukları bilinen interstisyel hücre grupları ovaryumdaki yerleşimleri dikkate alınarak stromal ve tekal tip interstisyel hücreler olarak ikiye ayrıldı. Her iki gruptaki hücre tipinin yuvarlak çekirdekli ve poligonal biçimli olduğu, stromal interstisyel hücre gruplarının ovaryumun kortikal stromasında, tekal tip interstisyel hücre gruplarının ise atretik folikül duvarlarında yerleştiği tespit edildi (Şekil 4.2 ve 4.3). Gevşek bağdokudan oluşan medullada ise bol miktarda kan ve lenf damarları ile düz kas hücre demetlerinin ve ayrıca bazı ovaryum örneklerinde tek katlı prizmatik epitelle örtülü olan rete ovarii'nin bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.1).





**Şekil 4.1.** Kedi ovaryumunda korteks ve medullanın genel görünümü. d, damar; F, folikül. Crossmon'un üçlü boyaması.



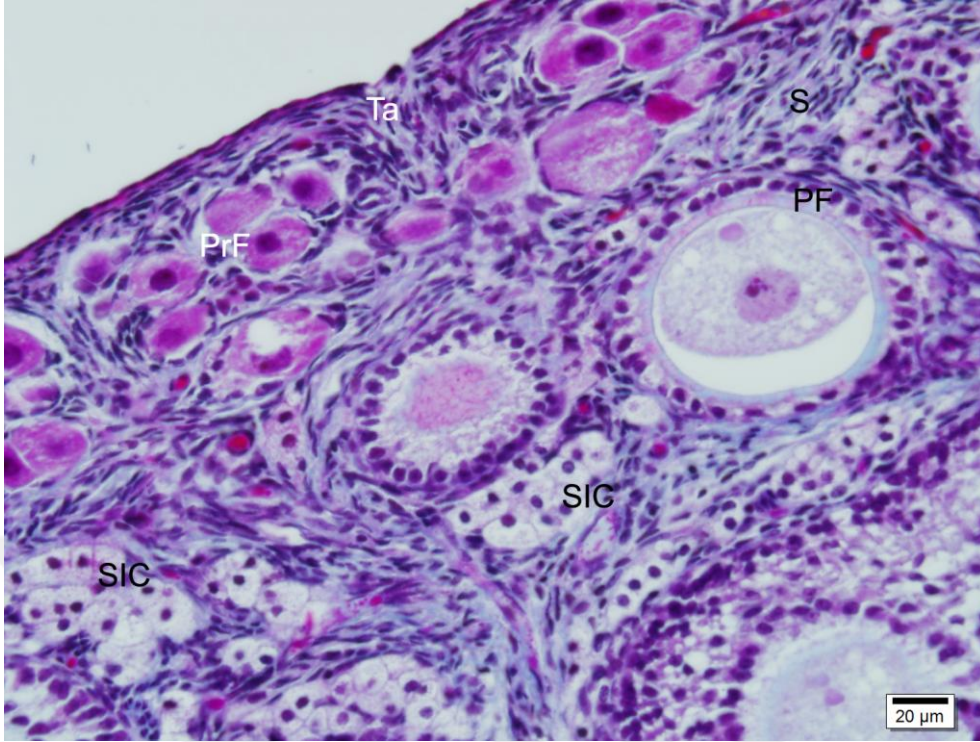
**Şekil 4.2.** Kedi ovaryumunda korteksin genel görünümü. GE, germinatif epitel; PrF, primordial folikül; PF, primer folikül; S, stroma; SF, sekonder folikül; TF, tersiyer folikül. Crossmon'un üçlü boyaması.

Kedilerde ovariohisterektomi operasyonları sırasında her bir hayvana ait ovaryum dokusuyla birlikte uterus dokuları da alınmış olduğundan çalışmamızda östrus siklusunun belirlenmesi amacıyla her bir hayvanın sağ ve sol ovaryumlarıyla birlikte sağ ve sol uterus kornularından da kesitler alınarak Crossmon'un üçlü boyaması ile boyandı. Uterusun yapısal özellikleri ile ovaryumların yapısal özellikleri karşılaştırılarak kediler inaktif, foliküler ve luteal faz olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Çalışmamızda her bir ovaryumdaki foliküller yapısal özellikleri dikkate alınarak Bristol-Gould and Woodru (21) tarafından bildirildiği gibi sağlıklı primordiyal, primer, sekonder, erken antral ve geç antral foliküller olarak tiplendirildi. Ovaryumların genel yapısal özellikleri incelendikten sonra çalışmada sadece primordiyal, primer, sekonder ile az sayıda erken antral folikülleri içeren örnekler inaktif fazda, primordiyal, primer, sekonder ve özellikle çok sayıda antral folikül tiplerini içeren ovaryum örnekleri foliküler fazda, primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküller ile korpus hemorajikum veya korpus luteumun bulunduğu ovaryum örnekleri ise uterusda herhangi bir gebelik bulgusu olmadığında yalancı gebeliğe (PP) ait luteal fazda kabul edildi. Korpus luteum lutein hücrelerinin yapısal özellikleri dikkate alınarak, Amelkina et al. (52)'nin tanımlamalarına uygun olarak luteal faz da ayrıca 4 evreye ayrıldı.

### **Foliküllerin yapısal özellikleri**

#### **Primordiyal foliküller**

Merkezde oosit ve bunu saran bir kaç adet tek katlı yassı epitel hücrelerinden (pregranüloza hücreleri) oluşan foliküller "primordiyal foliküller" olarak tanımlandı. Bu foliküllerin tunika albuginea'nın altında gruplar halinde yerleştiği ve anöstrus ile foliküler fazda çok sayıda oldukları görüldü (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Primordial foliküller (PrF). GE, germinatif epitel; PF, primer folikül; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler Ta, tunika albuginea. Crossmon'un üçlü boyaması.

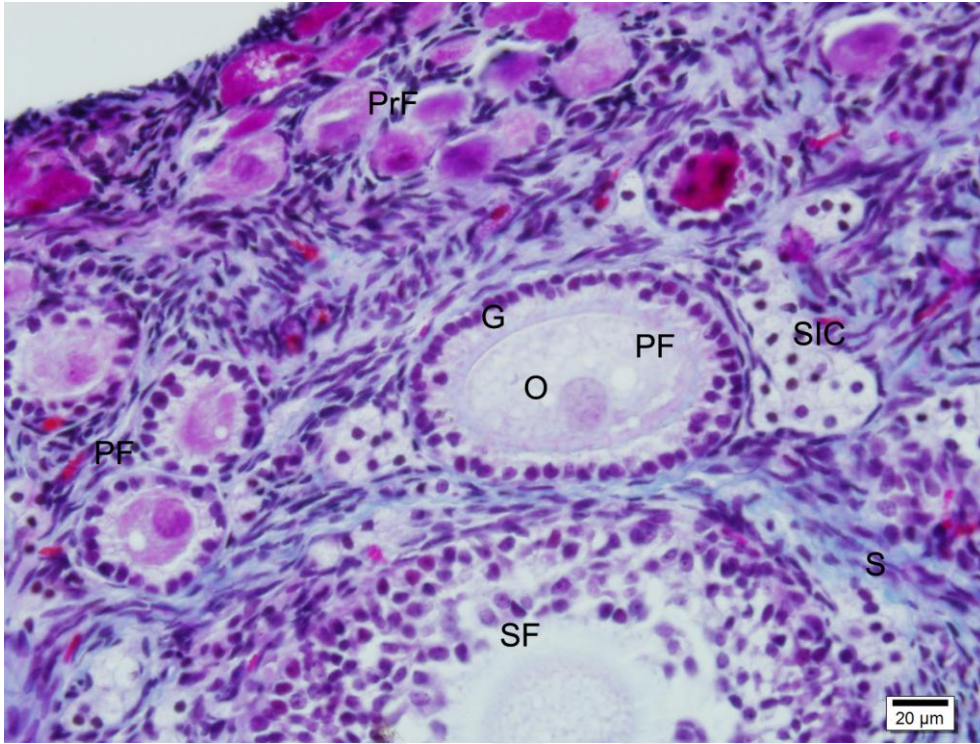
### **Primer foliküller**

Bu foliküllerde oositi saran epitel hücrelerinin tek katlı kübik veya prizmatik epitele (granüloza hücreleri) dönüştüğü ve homojen mavi boyanmış olan zona pellusidanın oldukça belirginleştiği tespit edildi (Şekil 4.4).

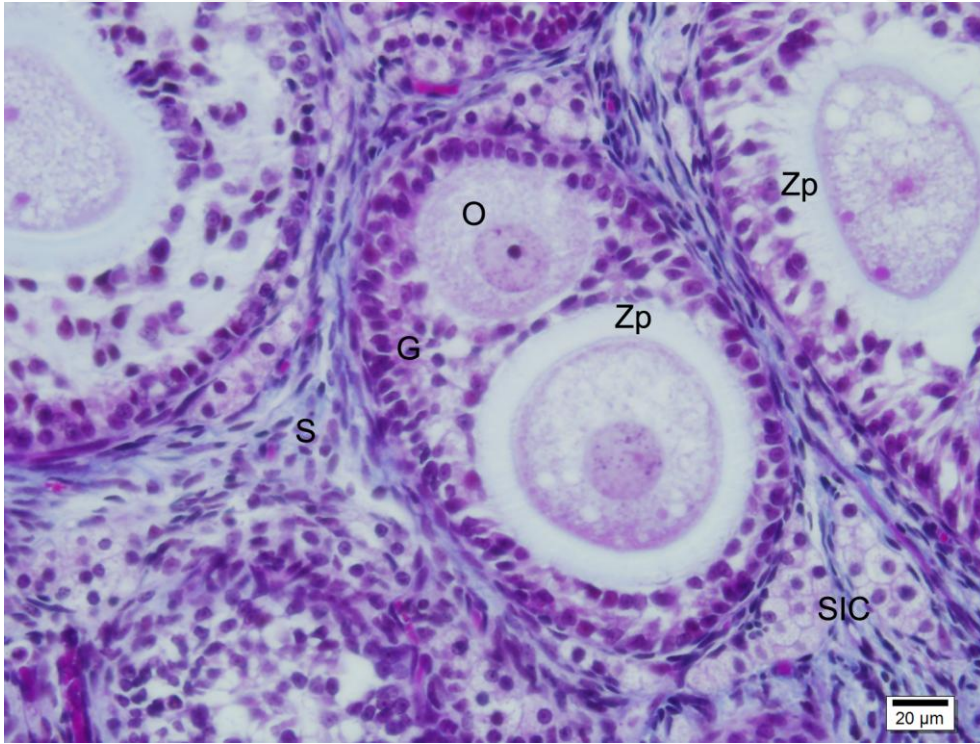
### **Sekonder foliküller**

Oositi saran granüloza hücrelerinin iki veya daha çok katlı olduğu, zona pellusidanın bulunduğu, ayrıca folikülün dışında teka folikülünün şekillendiği gözlemlendi. Teka folikülü içinde kapilar damarlara da rastlandı (Şekil 4.5).





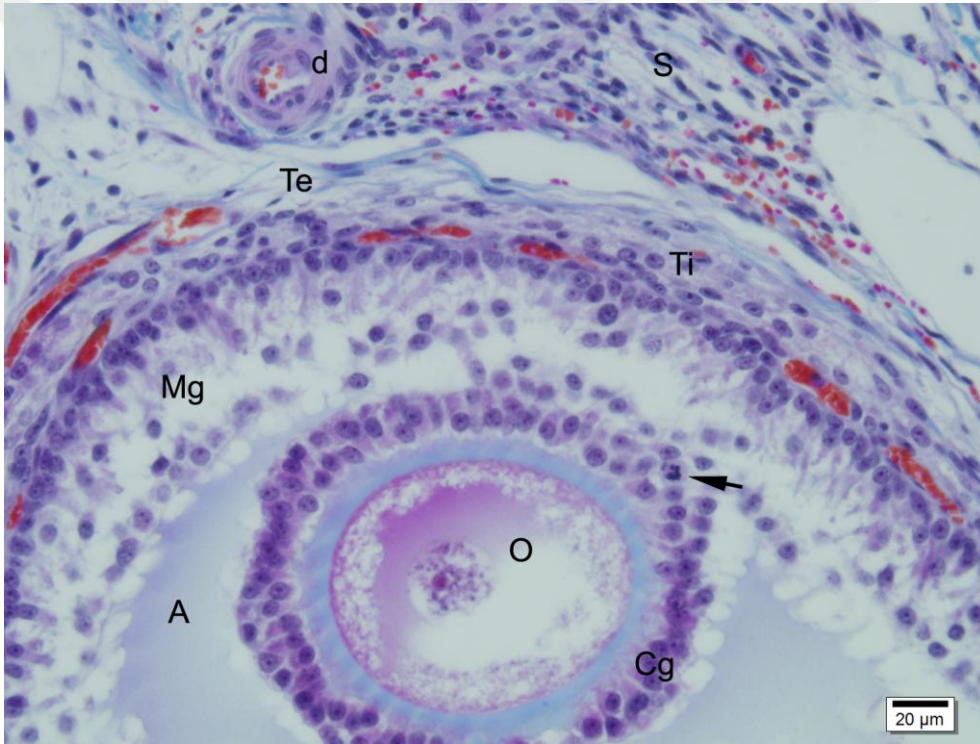
**Şekil 4.4.** Primer foliküller (PF). PrF, primordial foliküller; S, stroma; SF, sekonder folikül; SIC, stromal interstisyel hücreler. Crossmon'un üçlü boyaması.



**Şekil 4.5.** Sekonder folikül. G, granuloza hücreleri; O, oosit; S, stroma, SIC, stromal interstisyel hücreler; TF, teka folikülü; Zp, zona pellusida. Crossmon'un üçlü boyaması.

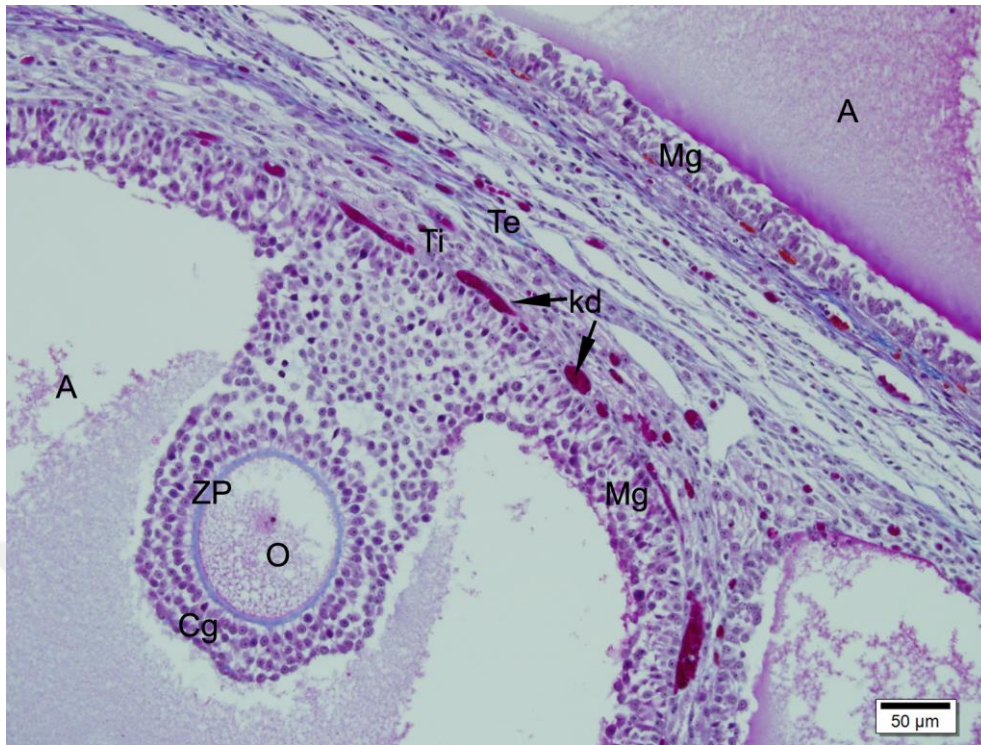
### Antral foliküller

Erken antral foliküllerde bir veya birden fazla folikül boşluğunun (antrumun) bulunduğu, hem folikül çapının hem de antrumun küçük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6). Geç antral foliküllerde ise folikül çapının ve antrumun oldukça büyüdüğü ve kumulus ooforusun şekillendiği belirlendi. Folikülde antrumu kuşatan hücreler mural granüloza hücreleri, oositi kuşatan hücreler ise kumulus granüloza hücreleri olarak tanımlandı (Şekil 4.7). Her iki folikül tipinin dıştan teka eksterna ve teka interna katmanlarıyla sarılmış olduğu görüldü (Şekil 4.6 ve 4.7).



**Şekil 4.6.** Erken tersiyer folikül. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; d, damar; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna. Crossmon'un üçlü boyaması.

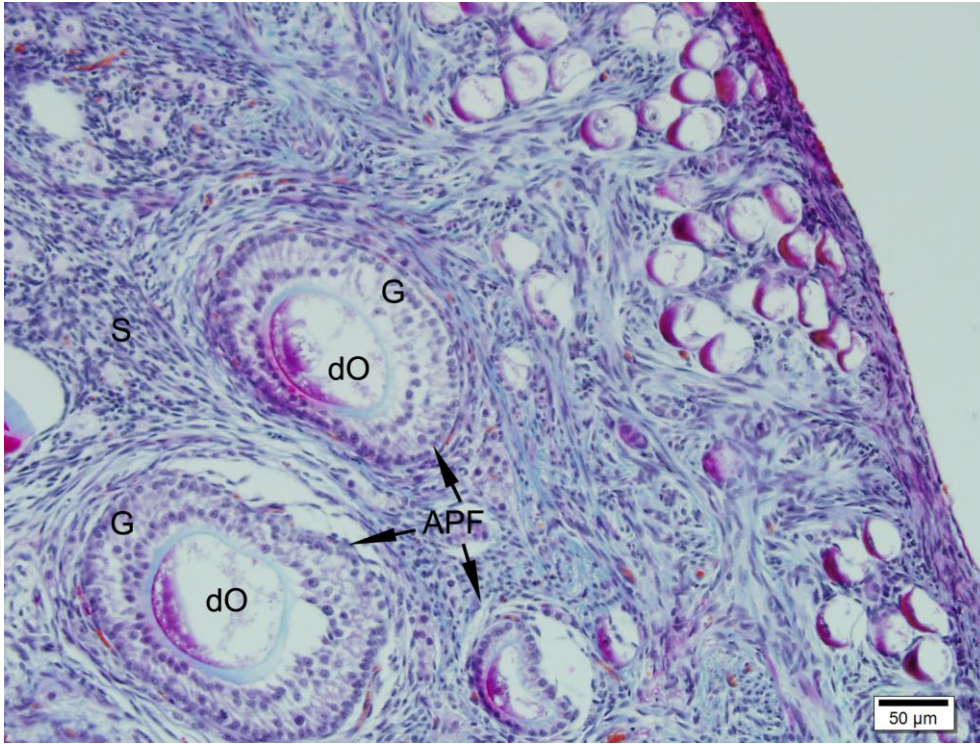




**Şekil 4.7.** Graaf folikülü. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; kd, kapilar dammar; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellusida. Crossmon'un üçlü boyaması.

### Atretik foliküler

Kedide atretik foliküllerin tiplendirilmesine ilişkin herhangi bir bilgi olmadığından çalışmamızda Wang et al. (95)'in kobay ovaryumu için bildirdiği kriterler dikkate alınarak atretik foliküller şekillendiği folikül tipine bağlı olarak öncelikle atretik preantral foliküller ve atretik antral foliküller olarak ikiye ayrıldı. Primer ve sekonder foliküller atreziye olmuşsa atretik preantral, tersiyer ve graaf foliküllerinde atrezi şekillenmişse bu foliküller de atretik antral foliküller olarak sınıflandırıldı. Kedi ovaryumlarında az sayıda oldukları belirlenen atretik preantral foliküllerde oosit çekirdeğinin ekzantrik yerleşimli olduğu, sitoplazmada vakuollerin bulunduğu veya sitoplazmanın boşalmasıyla zona pellusidanın büzüldüğü, ancak granüloza hücrelerinin normal yapıda oldukları görüldü. Bazı atretik preantral foliküllerde granüloza hücre katmanının stromadan ayrılmış olduğu belirlendi. Atretik antral foliküler granüloza hücreleri ve teka interna katmanında şekillenen morfolojik değişikliklere göre 4 aşamaya ayrıldı.

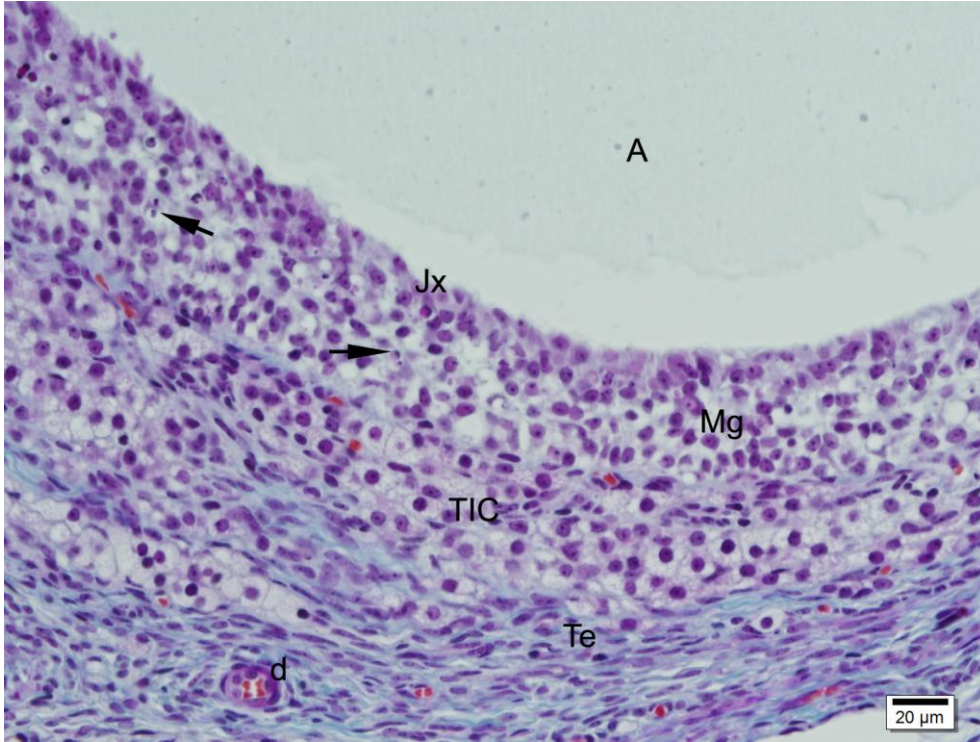


**Şekil 4.8.** Atretik preantral folikül (APF). dO, dejenere olmuş oosit; G, granüloza hücreleri; S, stroma. Crossmon'un üçlü boyaması.

I. aşamadaki atretik antral foliküllerde granüloza hücrelerinin birbirlerinden yavaş yavaş uzaklaşmaya başladığı, özellikle antruma bakan yüzdeki (jokstaluminal) granüloza hücrelerinin yoğun asidofilik sitoplazmalı ve bazılarının piknotik çekirdekli oldukları ve mural granüloza katmanında apopitotik cisimciklerin bulunduğu tespit edilirken, oositin yapısında, follikül büyüklüğünde ve teka katmanında belirgin bir morfolojik değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.9).

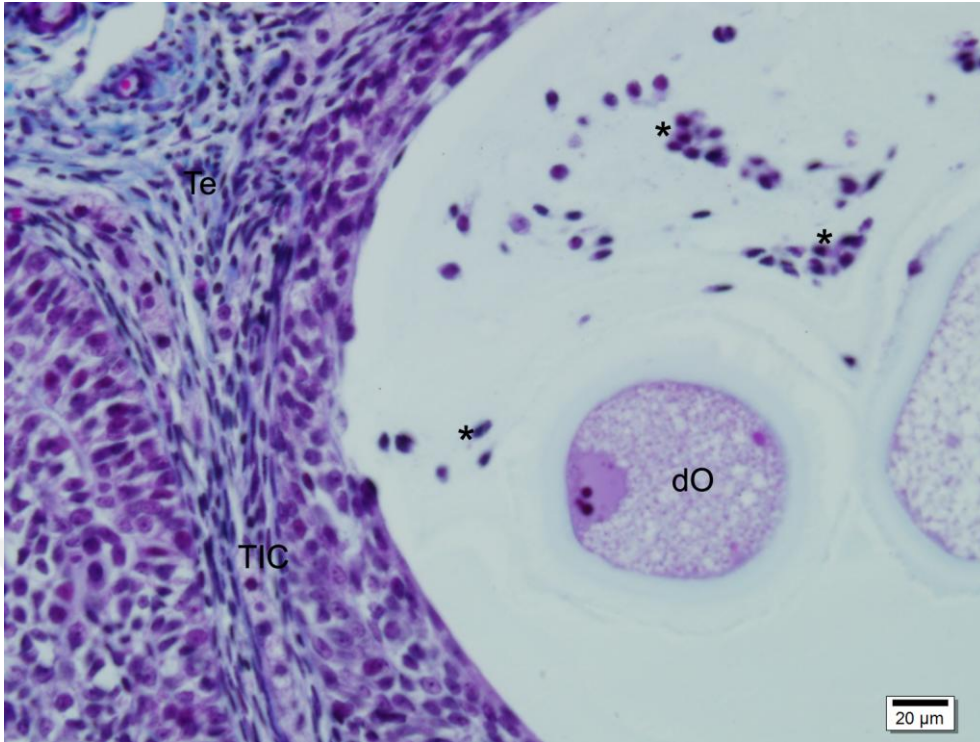
II. aşamadaki foliküllerde sağlıklı granüloza hücrelerinin sayısının azaldığı, jokstaluminal granüloza hücrelerinin yassılaşılarak yoğun asidofilik sitoplazmalı mekik biçimindeki hücelere dönüştüğü, ayrıca antrum içinde ve antrumun granüloza katmanına bitişik olarak yerleşmiş ölü granüloza hücreleri ve apopitotik cisimciklerin bulunduğu görüldü. Bazı foliküllerde folikülün bazal membranına bitişik olan prizmatik granüloza hücrelerinin bazal membrandan ayrıldığı ve böylece folikül duvarında ve granüloza hücreleri arasında büyük boşluklar oluştuğu ve granüloza hücrelerinin lumene atılması sonucu folikül duvarının inceldiği tespit edildi. Bu aşamadaki bazı foliküllerde dejenere oosit ve bunu saran az sayıda piknotik çekirdekli kumulus granüloza hücrelerinden oluşan kumulus ooforusun folikül lumeninde yüzer durumda bulunduğu

da gözlemlendi. Aynı anda teka katmanında bazı morfolojik değişiklikler göze çarptı. Sağlıklı foliküllerde ince sitoplazmalı olduğu gözlenen teka interna hücrelerinin atrezinin başlamasıyla mekik veya yuvarlağımsı şekil kazanarak folikül etrafında gruplaştıkları belirlendi. Bu hücreler tekal tip interstisyel hücreler olarak adlandırıldı (Şekil 4.10).



**Şekil 4.9.** Atrezinin I. aşamasındaki folikül. d, damar; Jx, jukstaluminal hücreler; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; Te, teka eksterna; oklar apoptotik cisimcikler. Crossmon'un üçlü boyaması.

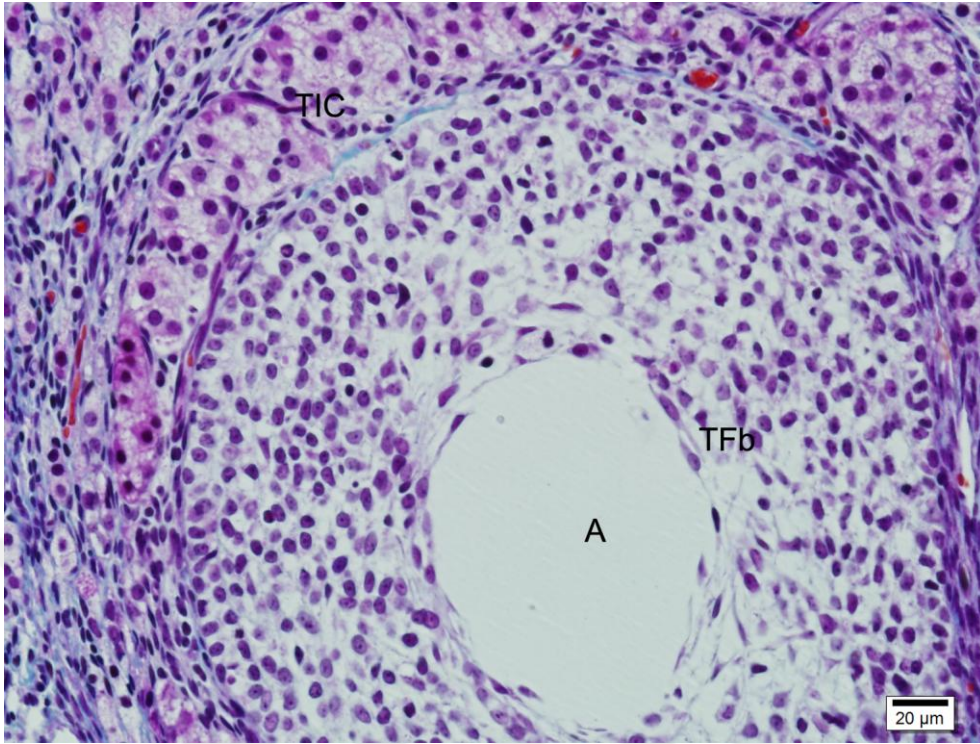




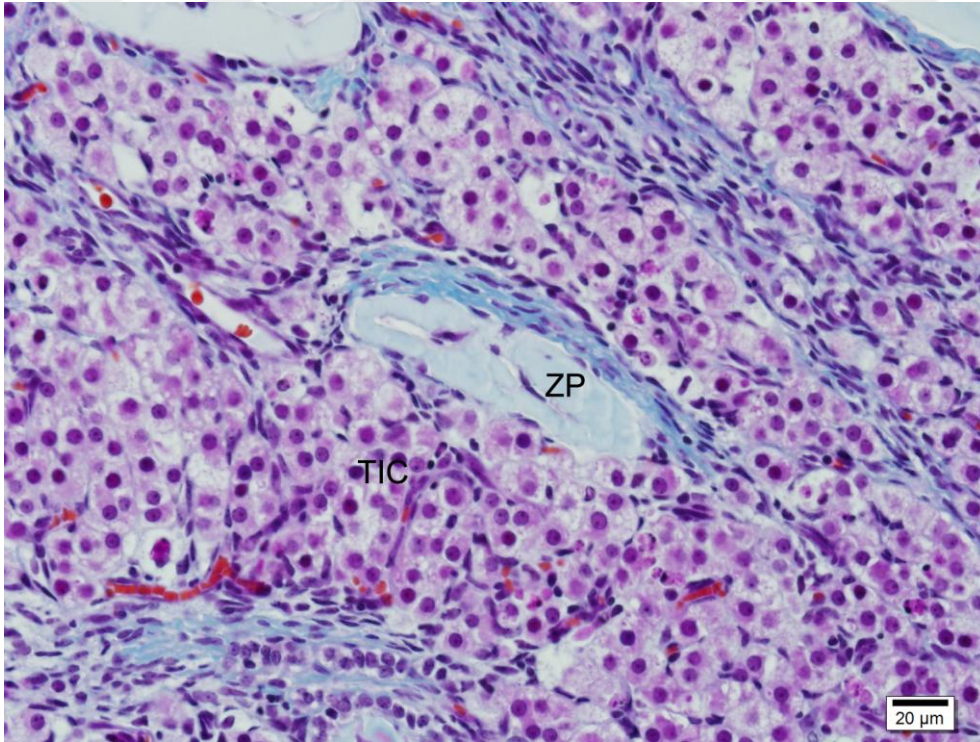
**Şekil 4.10.** Atrezinin II. aşamasındaki folikül. dO, dejenere oosit; Te, teka eksterna; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; yıldız, dejenere granüloza hücreleri. Crossmon'un üçlü boyaması.

III. aşamadaki atretik foliküllerde mural granüloza hücrelerinin kaybolduğu, foliküler boşluğun küçülerek atrofik bir görünüm aldığı ve bu atrofik foliküler boşluğu poligonal ve ameboid bir görünüme sahip olan ve gevşek bir ağ oluşturan fibroblast benzeri hücrelerin doldurmaya başladığı ve ayrıca tekal tip interstisyel hücre gruplarındaki hücre sayısının artmasıyla hipertrofik bir katmanın şekillendiği görüldü. Ayrıca bu aşamada oosit çekirdeğinin kaybolduğu, sitoplazmanın büzüştüğü ve korona radyata hücrelerinin kaybolduğu, ancak zona pellusidanın bütünlüğünü koruduğu belirlendi (Şekil 4.11).

IV. aşamadaki foliküllerin ortada büzüşmüş bir zona pellusida ile bunun etrafında hipertrofiye olmuş tekal tip interstisyel hücrelerden oluştuğu tespit edildi (Şekil 4.12).



**Şekil 4.11.** Atrezinin III. aşamasındaki folikül. A, antrum; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler. Crossmon'un üçlü boyaması.

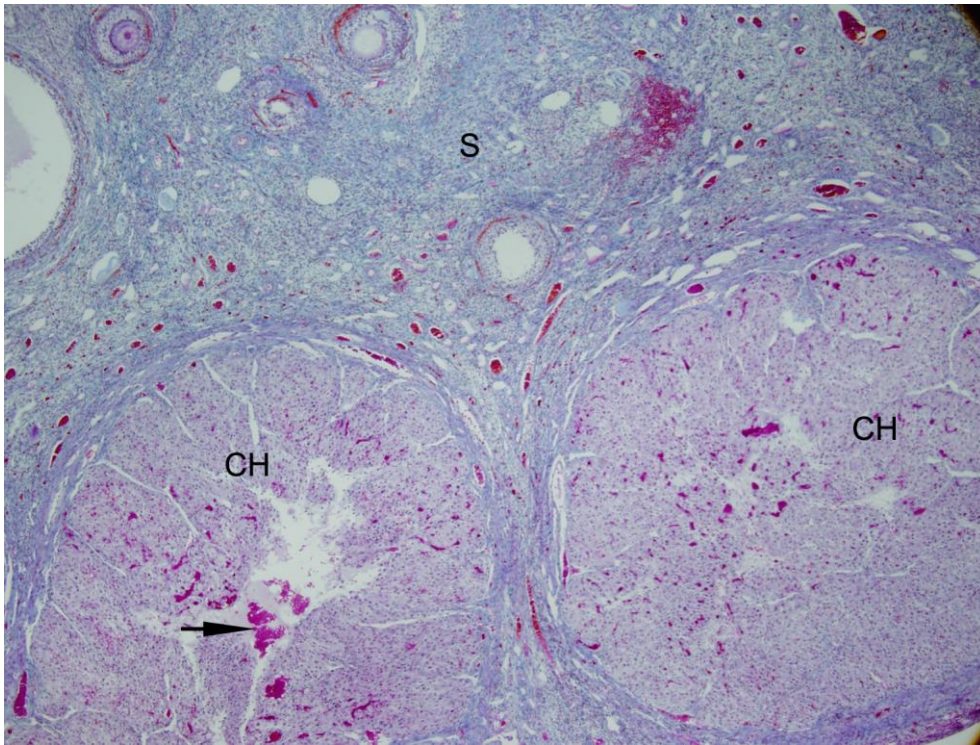


**Şekil 4.12.** Atrezinin IV. aşamasındaki folikül. TIC, tekal tip interstisyel hücreler; ZP, dejenerasyonla büzüşmüş zona pellucida. Crossmon'un üçlü boyaması.

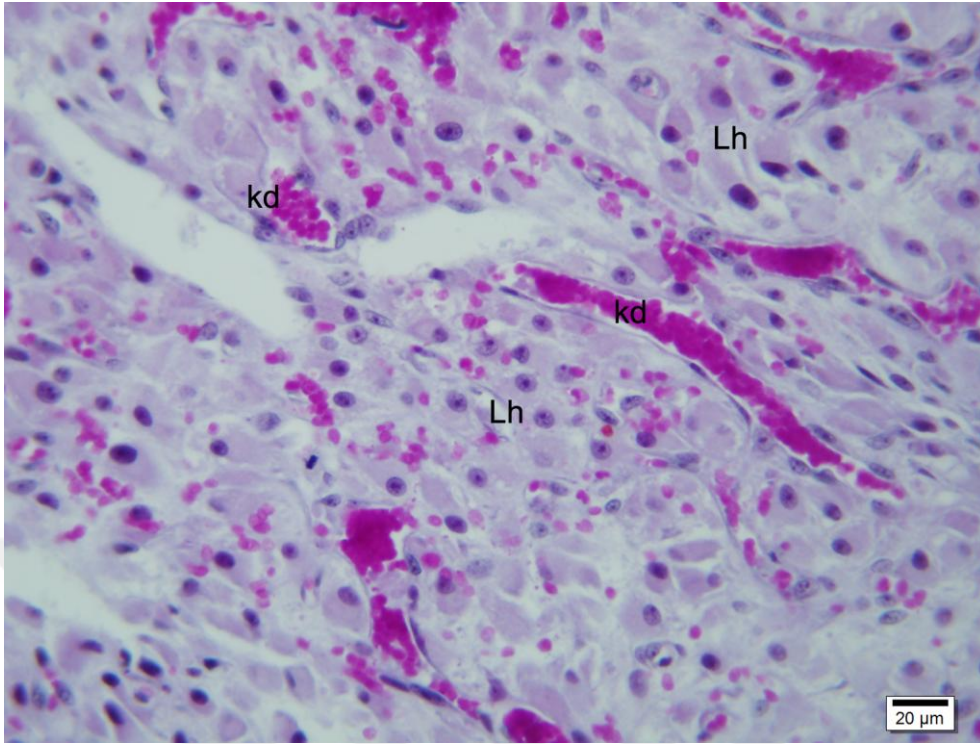


### Korpus hemorajikum ve korpus luteum

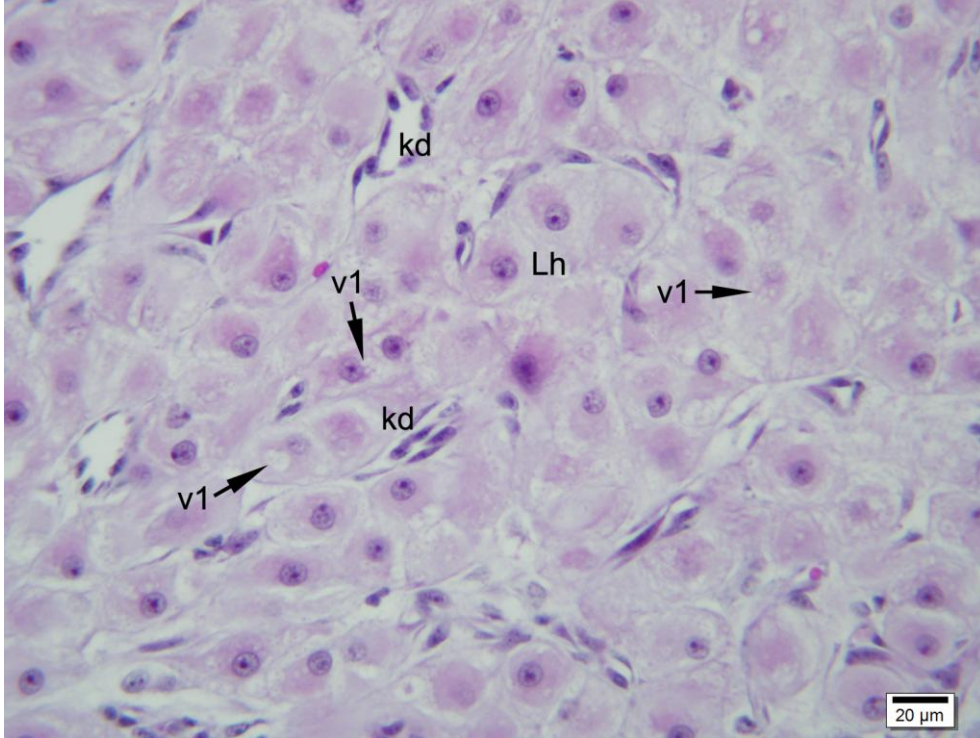
Korpus hemorajikum ovülasyonu takiben patlayan folikül boşluğuna kan hücrelerinin dolması ile karakterize idi (Şekil 4.13 ve 4.14). Amelkina et al. (52)'nin tanımlamalarına uygun olarak çalışmamızda da korpus luteumu oluşturan hücrelerin histolojik özelliklerine göre 4 evre tanımlandı. Korpus luteumun oluşmaya başladığı birinci evrede (PP1) lutein hücreleri asidofilik ve homojen boyanan bir sitoplazmaya ve birkaç küçük vakuole (tip 1 vakuol) sahip iken (Şekil 4.15), korpus luteumun gelişip büyümesiyle karakterize olan ikinci evrede (PP2) luteal hücrelerin poligonal şekil alıp irileştiği ve içerdikleri vakuol sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 4.16). Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) başladığı üçüncü evrede (PP3) luteal hücre sitoplazmalarında lipid vakullerin birleşerek büyük vakuoller (tip 2 vakuol) oluşturduğu, aynı zamanda tip 1 vakuollerin de bulunduğu (Şekil 4.17), regresyonun geç dönemi olarak tanımlanan dördüncü evrede (PP4) ise luteal hücre sitoplazmasını büyük bir tip 2 vakuolün doldurmuş olduğu, çok az miktardaki sitoplazmanın ince bir halka şeklinde bu vakuolü çevrelediği, çekirdeğin de kenara itilmiş olduğu, bu haliyle luteal hücrelerin tek taşlı yüzüğü andırdığı belirlendi (Şekil 4.18).



**Şekil 4.13.** Korpus hemorajikum (CH). S, stroma; ok, folikül boşluğunu dolduran kan hücreleri. Crossmon'un üçlü boyaması.

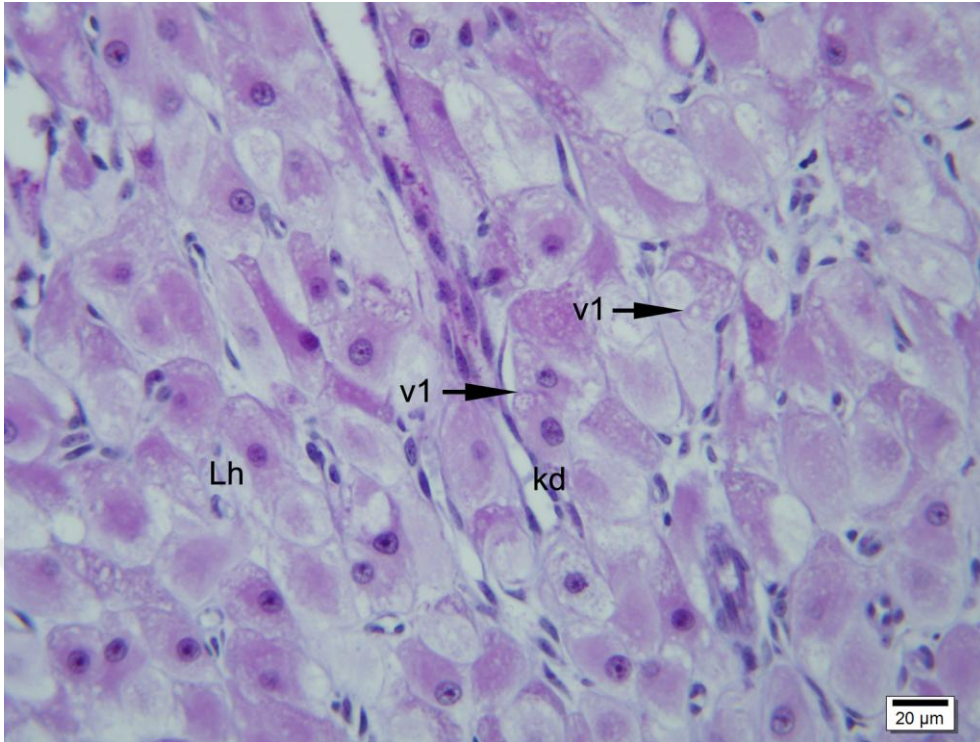


**Şekil 4.14.** Korpus hemorajikum. kd, damar; Lh, lutein hücreleri. Crossmon'un üçlü boyaması.

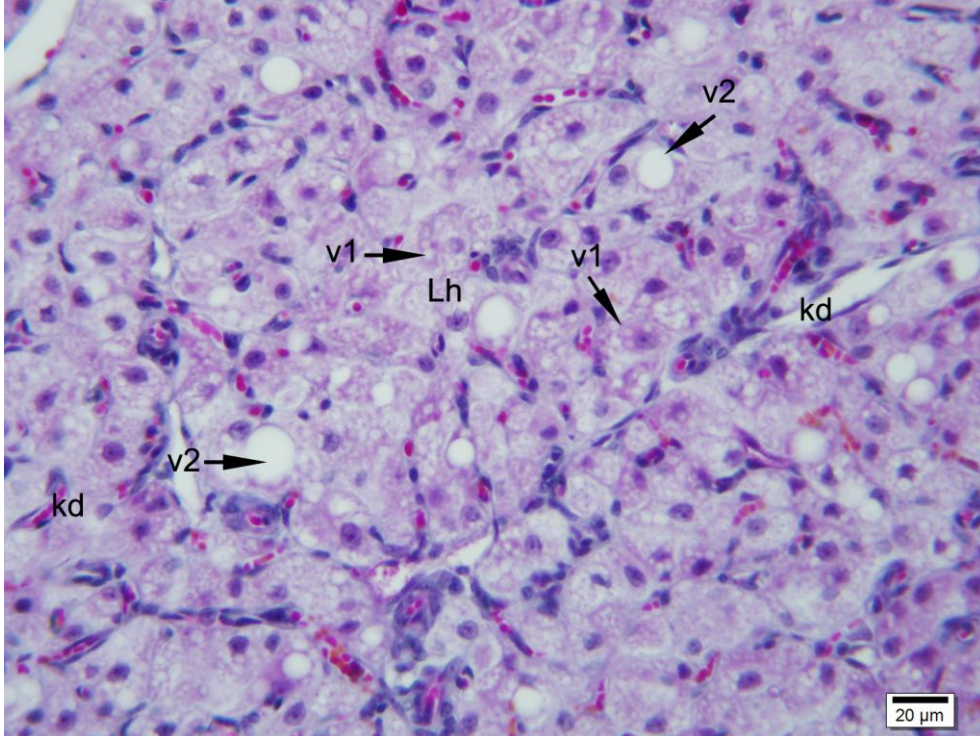


**Şekil 4.15.** Erken luteal dönemdeki (PP1) korpus luteum. kd, kapilar damar; Lh, lutein hücreleri; v1, tip 1 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması.

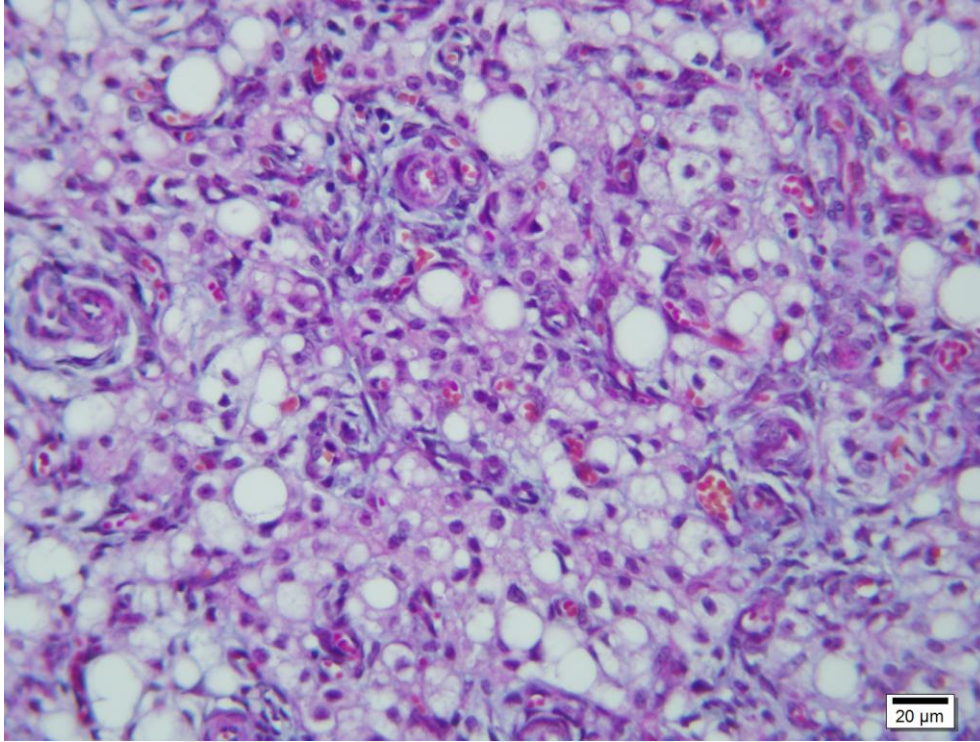




**Şekil 4.16.** Orta luteal dönemdeki (PP2) korpus luteum. kd, kapilar damar; Lh, lutein hücreleri; v1, tip 1 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması.



**Şekil 4.17.** Geç luteal dönemdeki (PP3) regrese olan korpus luteum. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması.



**Şekil 4.18.** Geç luteal dönemdeki (PP4) regrese olan korpus luteum. d, damar; kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Crossmon'un üçlü boyaması.

#### **Kedi ovaryumunda claudin-1 ve -5'in immunlokalizasyonları**

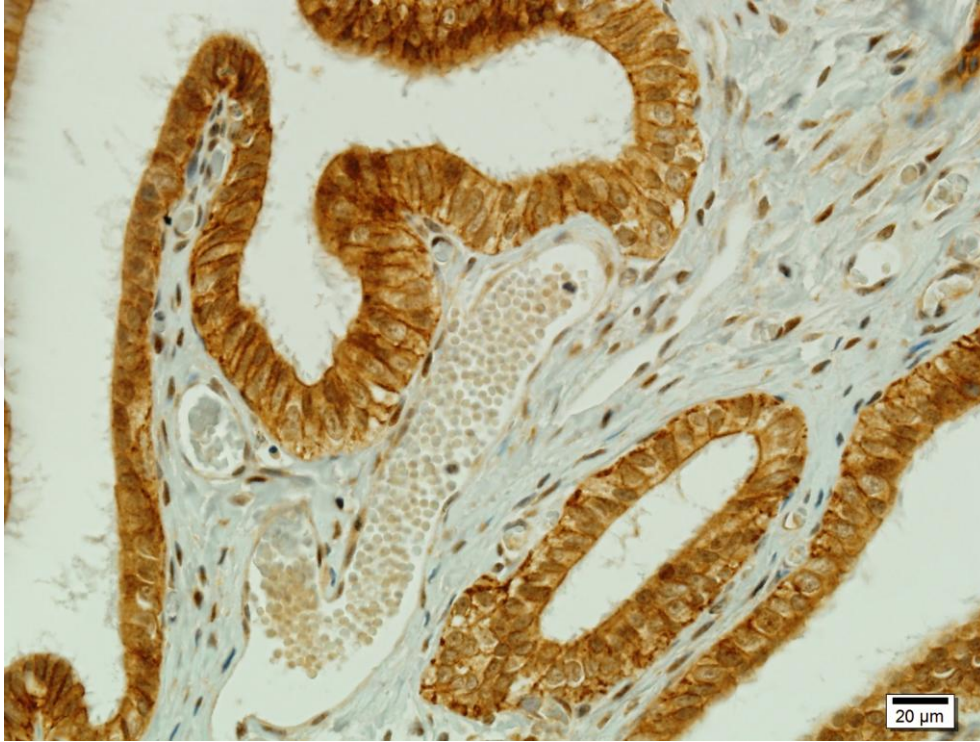
Claudin-1 ve Claudin-5 antikorlarıyla boyanan örnekler incelendiğinde östrus siklusunun her üç döneminde foliküllerdeki hücrelerin boyanma yoğunluklarında sıklusa bağlı herhangi bir değişim olmadığı saptandı.

#### **Claudin-1'in immunlokalizasyonu**

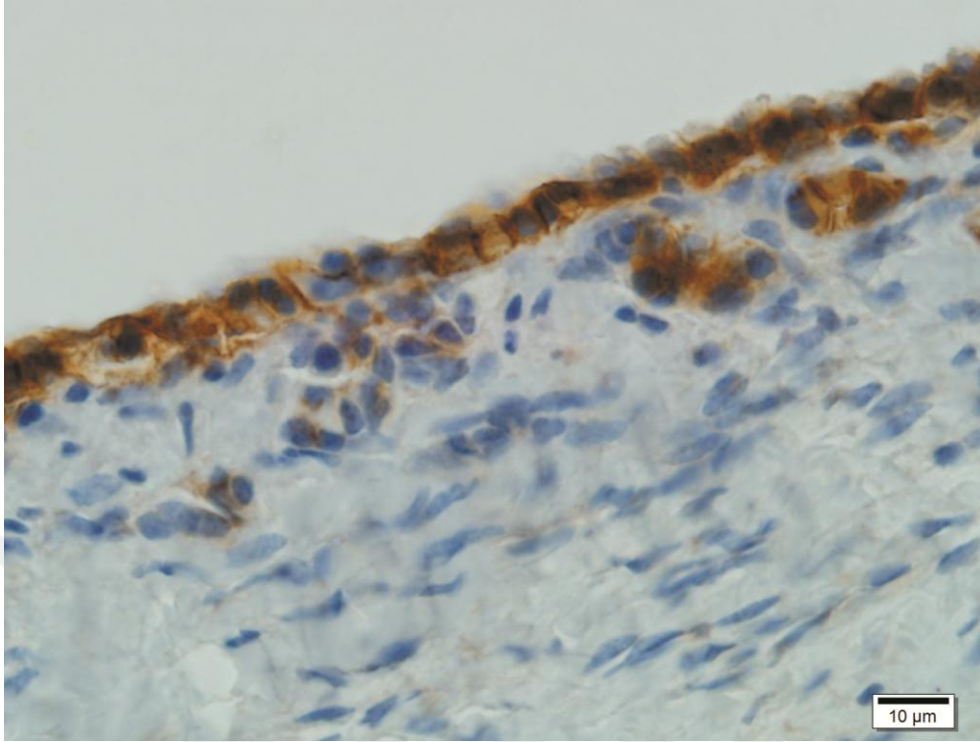
Pozitif kontrol dokusu olarak kullanılan kedi oviduktuna ait örneklerde claudin-1'in ovidukt epitelinin özellikle lateral hücre membranında kuvvetli olmak üzere, çekirdek ve sitoplazmasında yerleştiği belirlendi (Şekil 4.19). Ovidukt epitelinin aksine claudin-1'in ovaryum hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında reaksiyon verdiği, çekirdek boyanmasının kuvvetli, sitoplazmik boyanmanın ise orta derecede olduğu gözlemlendi (Şekil 4.22–4.37). Germinatif epitelde lateral membran ve sitoplazmada yerleşen kuvvetli bir claudin-1 immunreaksiyonu izlendi (Şekil 4.20). Tunika albuginea ile kortikal ve stromal medulladaki kollajen ipliklerde boyanma görülmezken, bazı fibroblast benzeri hücrelerin sadece çekirdeklerinde ve düz kas hücrelerinin ise hem çekirdek hem de sitoplazmalarında pozitif immunreaksiyon belirlendi. Gerek korteks ve



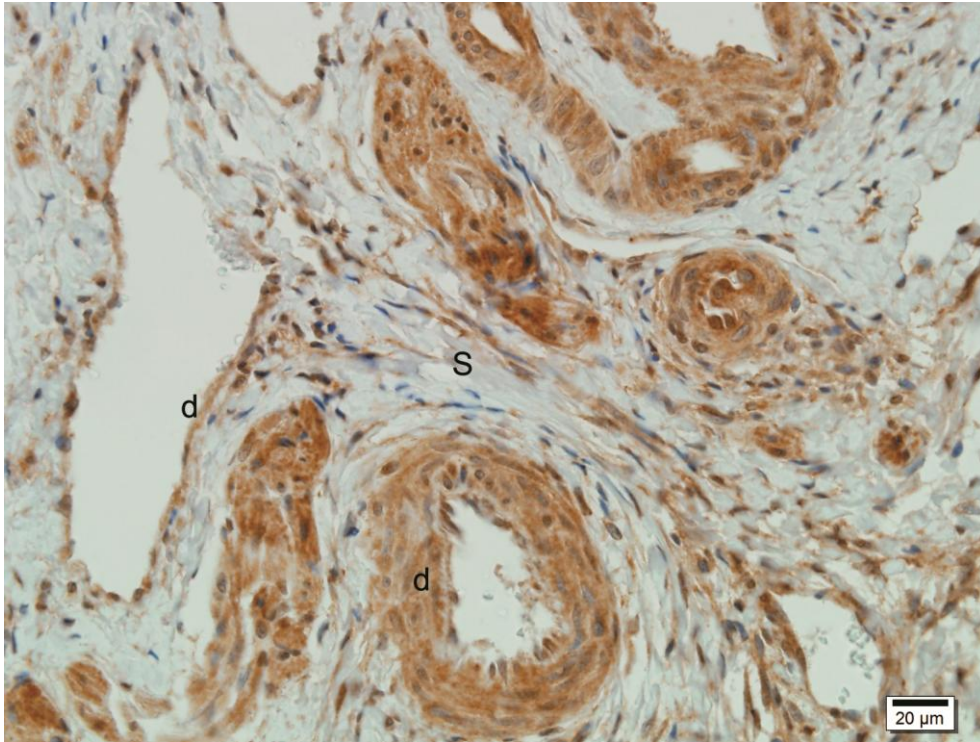
gerekse medulladaki kan damarlarının endotel ile düz kas hücrelerinde de claudin-1'in eksprese olduğu gözlemlendi (Şekil 4. 21).



**Şekil 4.19.** Ovidukt epitelinde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



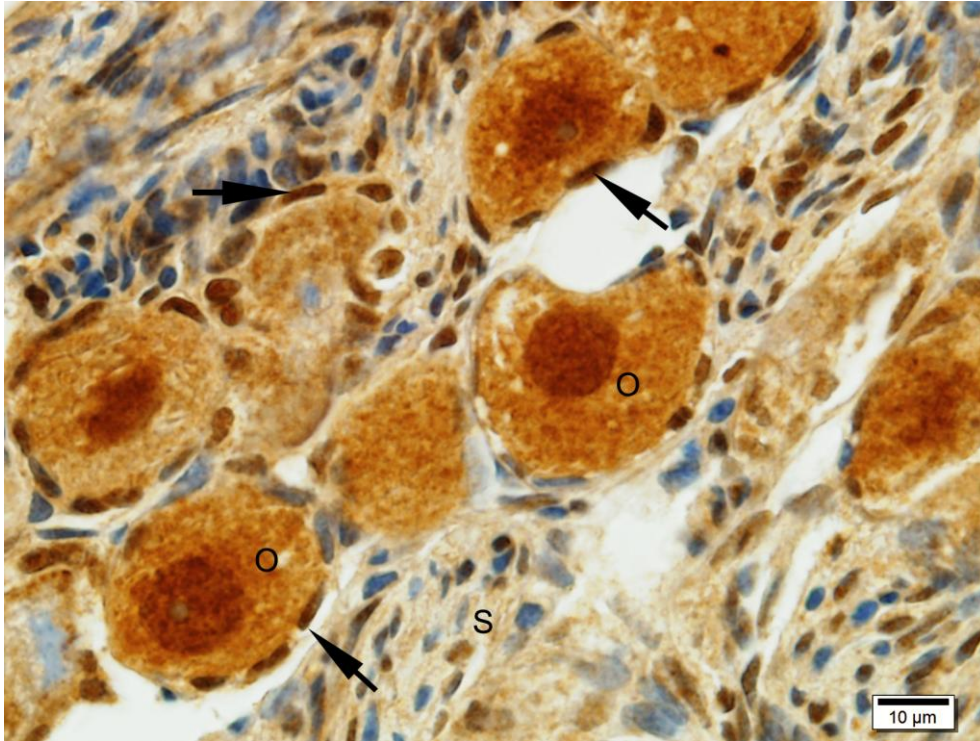
**Şekil 4.20.** Germinatif epitelde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



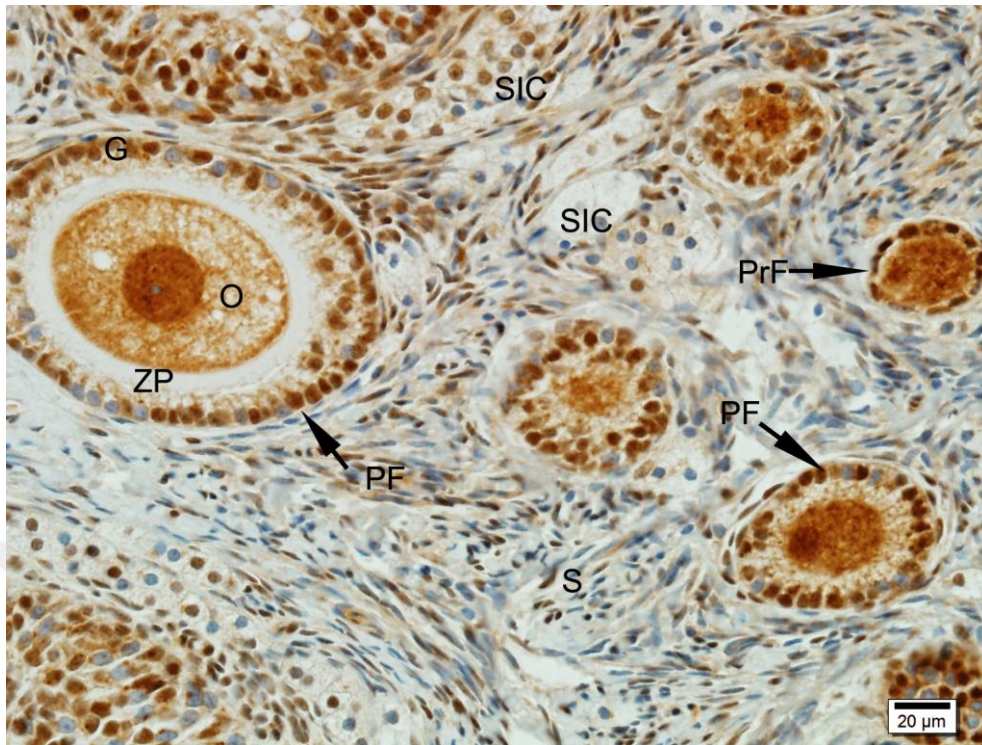
**Şekil 4.21.** Damarlarda (d) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. S, stroma. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



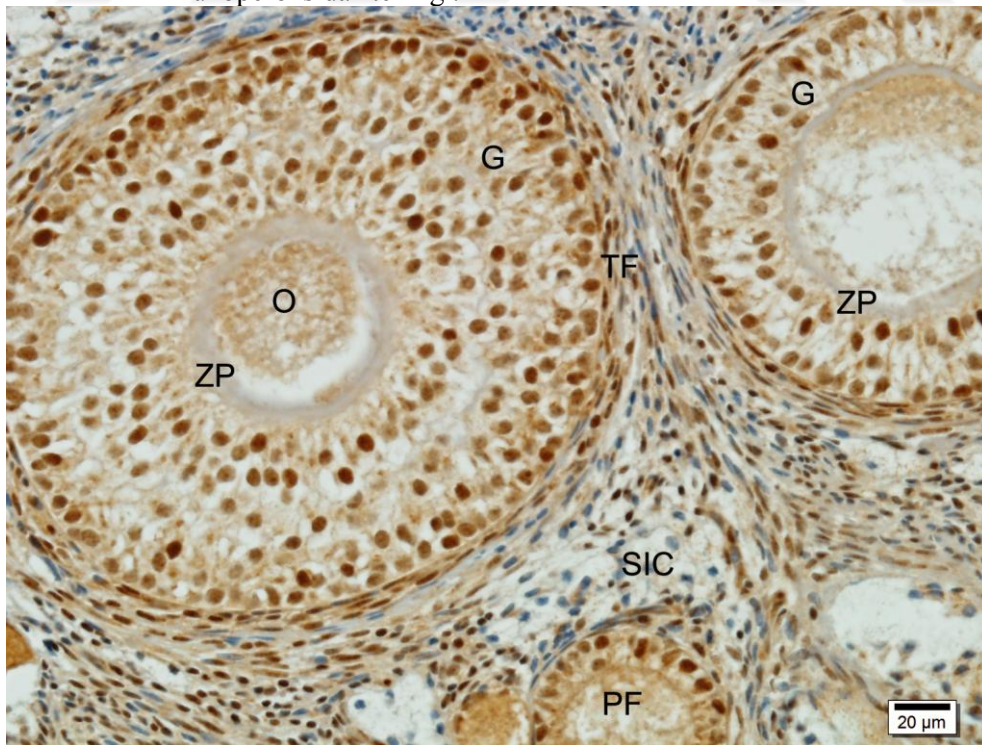
Ovaryumda folikül gelişimi süresince granüloza ve teka hücrelerinde claudin-1'in boyanma yoğunluğunun değişmediği tespit edildi. Primordiyal foliküllerde yassı folikül epitel hücreleri (pregranüloza hücreleri) ve primer oositin immunpozitif olduğu ve oosit çekirdeğinin sitoplazmasından daha yoğun boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.22). Primer foliküllerde de tek katlı kübik veya prizmatik granüloza hücreleri ile oositlerde çekirdek ve sitoplazmada boyanma görülürken, zona pellusida'nın boyanmadığı tespit edildi (Şekil 4.23). Sekonder foliküllerde claudin-1 immunreaksiyonu primer oosit, teka ve granüloza hücrelerinde bulunurken, zona pellusida ve bazal membranda gözlenmedi (Şekil 4.24). Erken (Şekil 4.25) ve geç antral (Şekil 4.26) foliküllerde oosit ve oositi saran kumulus hücrelerinin, antrumu kuşatan mural granüloza hücrelerinin çoğunda ve teka interna hücrelerinde, ayrıca, teka katmanında bulunan kapilar damarların damar endotellerinde kuvvetli nükleer claudin-1 immureaksiyonu tespit edildi. Ayrıca sözü edilen hücrelerde orta şiddette sitoplazmik claudin-1 immunreaksiyonu görülürken, zona pellusida, antrum ve bazal membranda reaksiyon negatif (Şekil 4.25, 4.26).



**Şekil 4.22.** Primordial foliküllerde (PrF) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. O, oosit; S, stroma; oklar, pregranüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

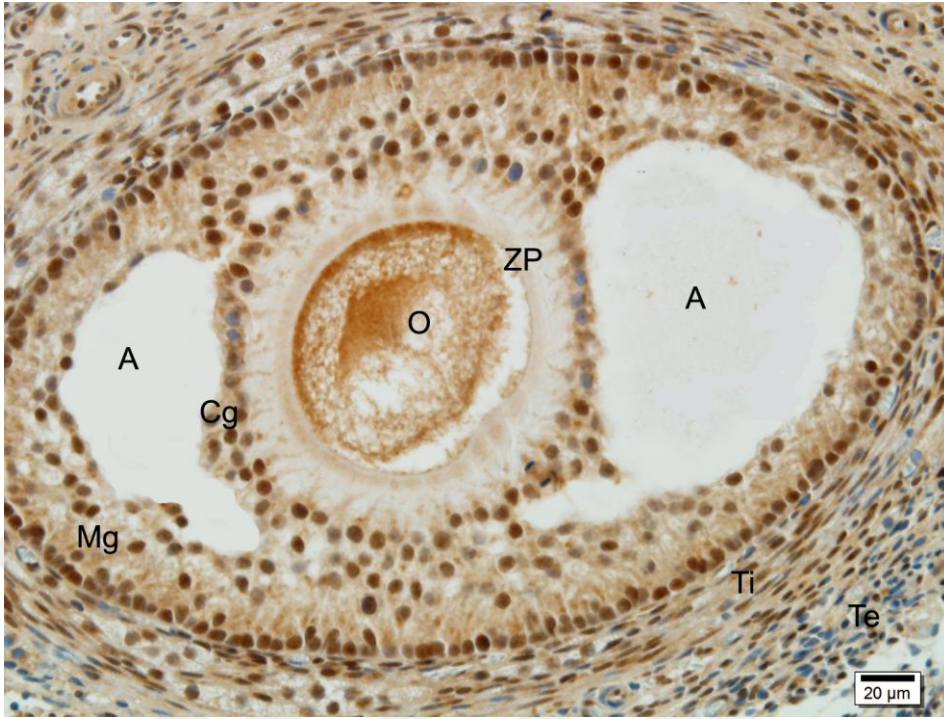


**Şekil 4.23.** Primer folikülde (PF) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. G, granüloza hücreleri; O, oosit; PrF, primordial folikül; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



**Şekil 4.24.** Sekonder folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler; TF, teka folikülü; ZP, zona pellucida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.





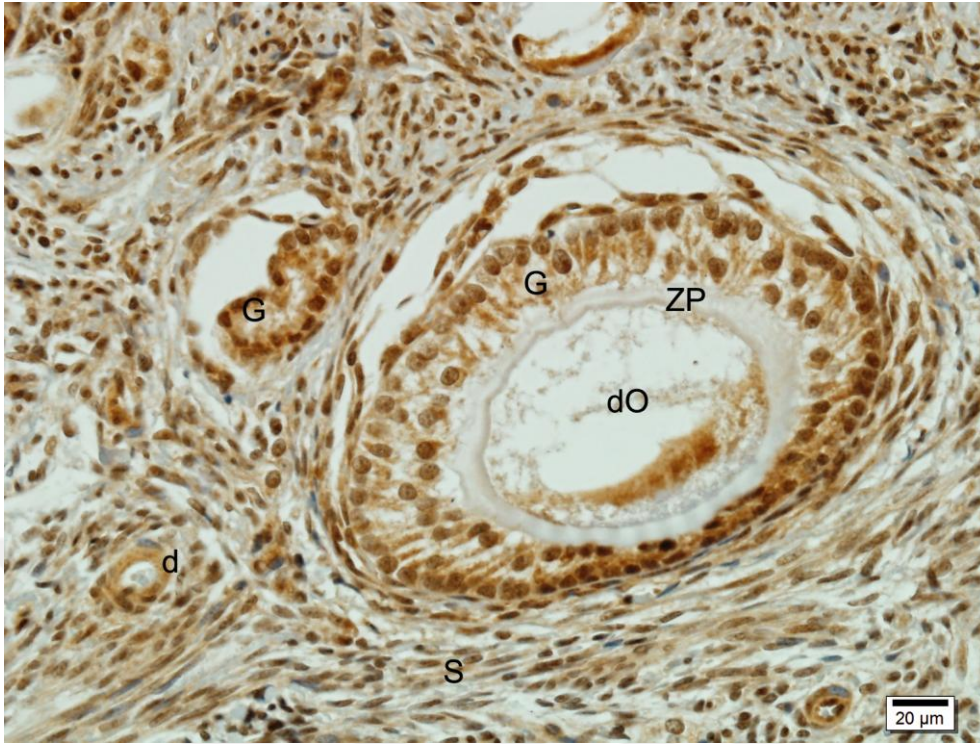
**Şekil 4.25.** Erken tersiyer folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellucida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



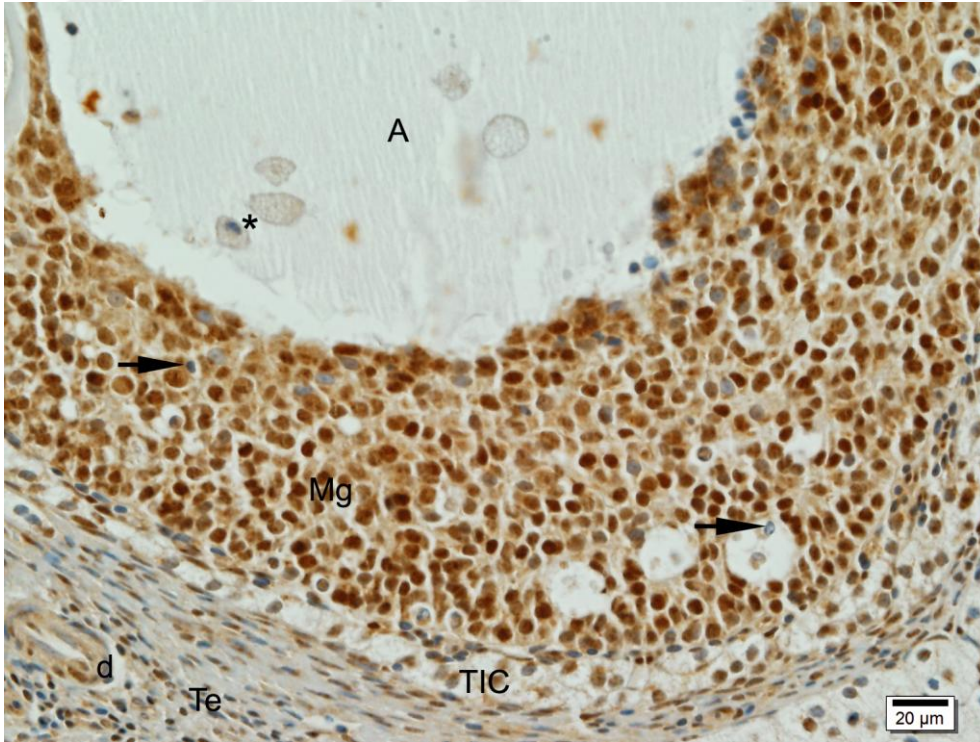
**Şekil 4.26.** Graaf folikülünde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; kd, kapilar dammar; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Ti, teka interna; ZP, zona pellucida; ok, kapilar dammar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

Atretik foliküllerde claudin-1 immunreaksiyonunun boyanma yoğunluğunda önemli bir farklılığın bulunmadığı, ancak atrezi sürecinde oluşan morfolojik değişikliklere paralel olarak claudin-1'i eksprese eden hücrelerin değiştiği belirlendi. Genel olarak atretik preantral foliküllerin granüloza hücrelerindeki (Şekil 4.27) ve I. ve II. aşamalarındaki atretik antral foliküllerin granüloza ve teka hücrelerindeki claudin-1 immunreaksiyonunun sağlıklı foliküllerdekine benzer olarak çekirdekte kuvvetli, sitoplazmada ise orta derecede pozitif olduğu görüldü (Şekil 4.28-4.30). I. aşamadaki antral foliküllerde oositteki reaksiyon sağlıklı foliküllerdekine benzerken, II. aşamada oosit dejenerasyonuna bağlı olarak azaldığı tespit edildi. II. aşamada dejenere granüloza hücrelerinde hala nüklear ve sitoplazmik boyanmanın bulunduğu görüldü (Şekil 4.30). III. aşamadaki atretik antral foliküllerde ise claudin-1 immunreaksiyonunun atretik foliküler boşluktaki fibroblast-benzeri hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde ve tekal tip interstisyel hücrelerin özellikle çekirdeklerinde bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.31). IV. aşamada tekal tip interstisyel hücrelerde kuvvetli nüklear, kollabe olmuş zona pellusida da ise negatif reaksiyonun varlığı dikkati çekti (Şekil 4.32). Gerek atretik foliküller etrafındaki ve gerekse ovaryum stromasındaki tekal tip interstisyel hücrelerin lipid damlacıklarının sitoplazmayı işgal etmesinden ötürü farklı yapısal özellikler sergiledikleri ve bu hücrelerin bazılarının çekirdeklerinde claudin-1 için kuvvetli pozitif immunreaksiyon gözlenirken, bazılarının çekirdeklerinde reaksiyonun negatif olduğu tespit edildi (Şekil 4.32, 4.33).



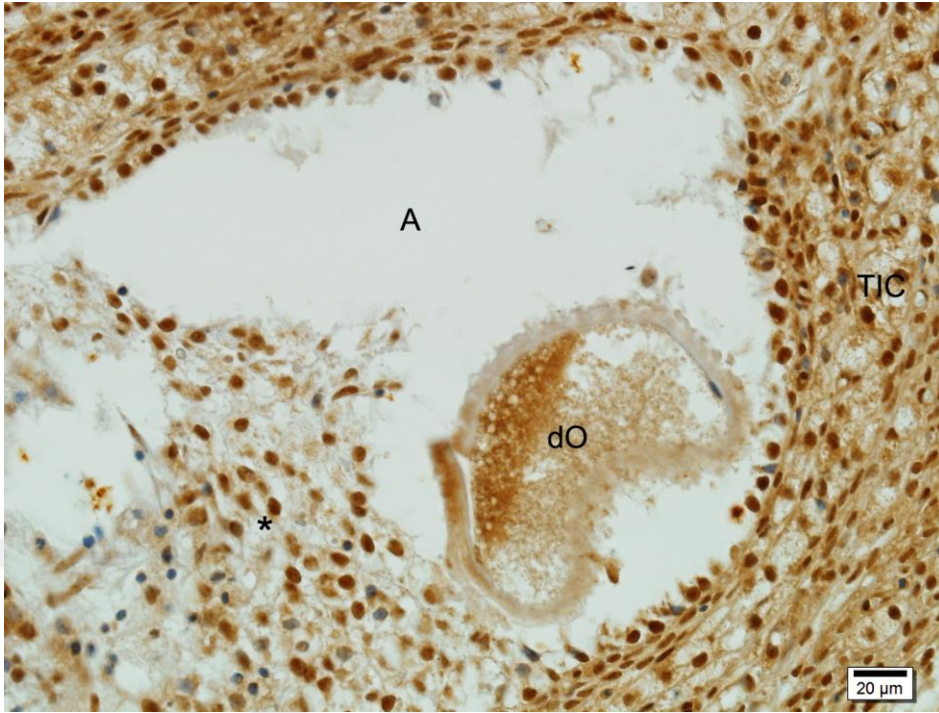


**Şekil 4.27.** Atretik preantral folikülde (APF) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. d, damar; dO, dejenere olmuş oosit; G, granüloza hücreleri; S, stroma; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

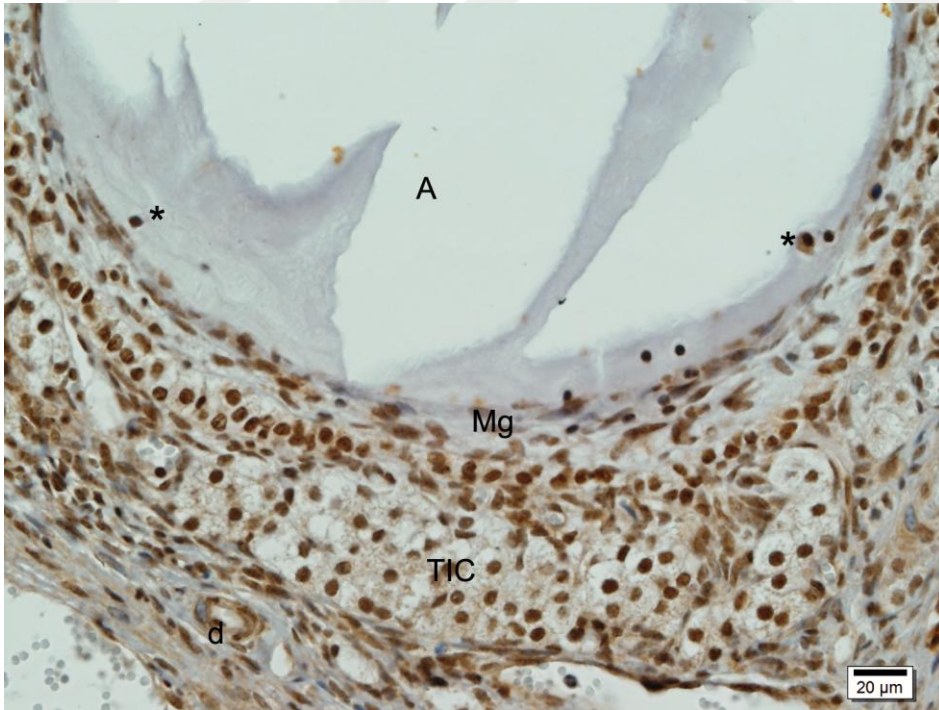


**Şekil 4.28.** I. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. d, damar; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; oklar apoptotik cisimcikler; yıldız, dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



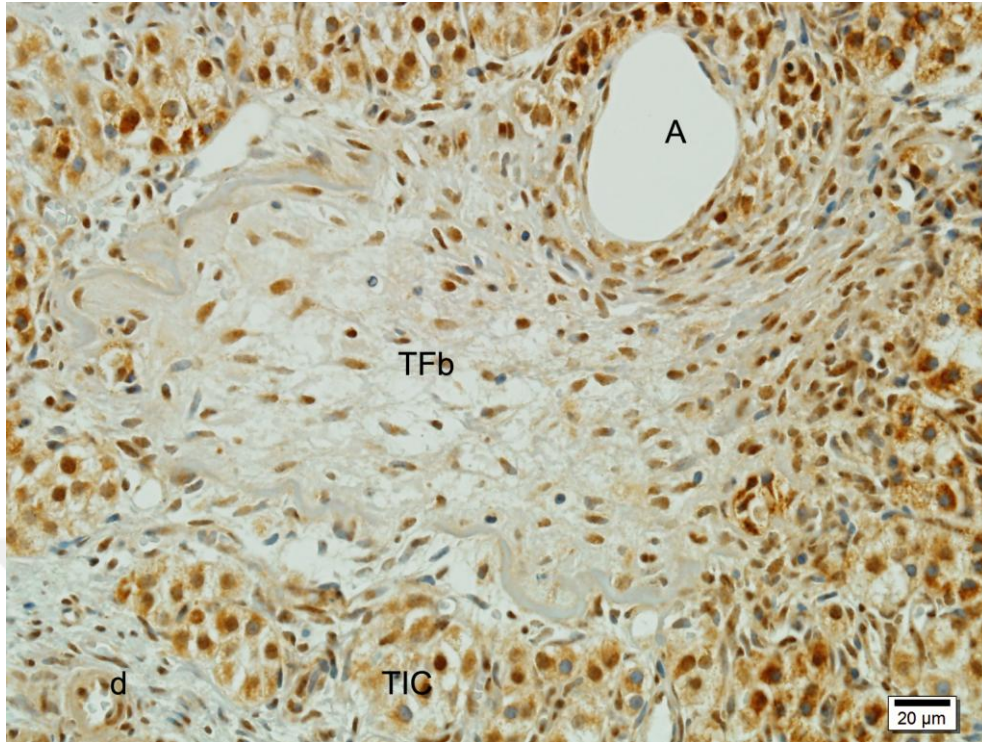


**Şekil 4.29.** II. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; dO, dejenere oosit; TIC, tekal tip interstisyel hücreler yıldız, lumendeki dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

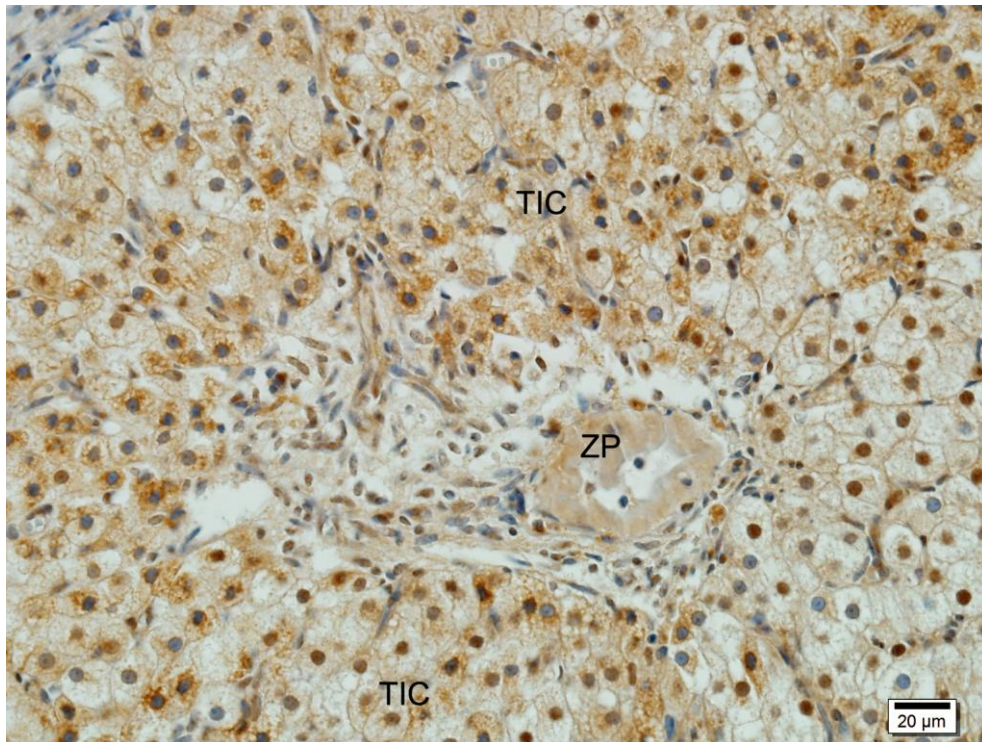


**Şekil 4.30.** II. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, antrum; d, damar; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler yıldız, lumendeki dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

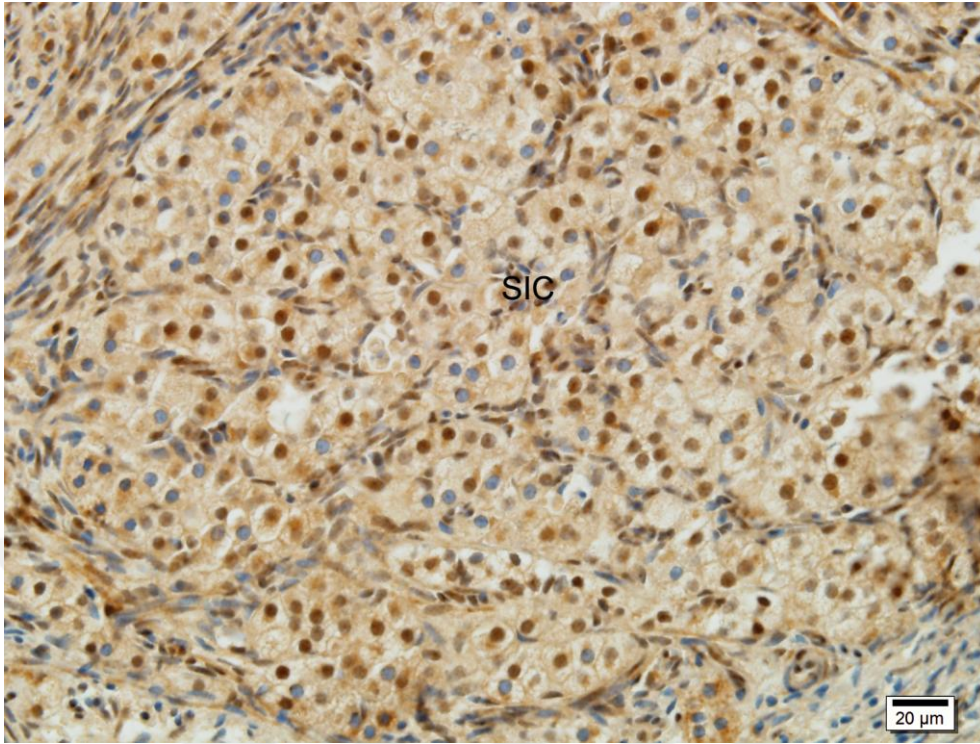




**Şekil 4.31.** III. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. A, atretik folikülde küçülmüş antrum; TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



**Şekil 4.32.** IV. aşamadaki atretik folikülde Claudin-1'in immunlokalizasyonu. TIC, tekal tip interstisyel hücreler; ZP, dejenere oosite ait büzülmüş zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

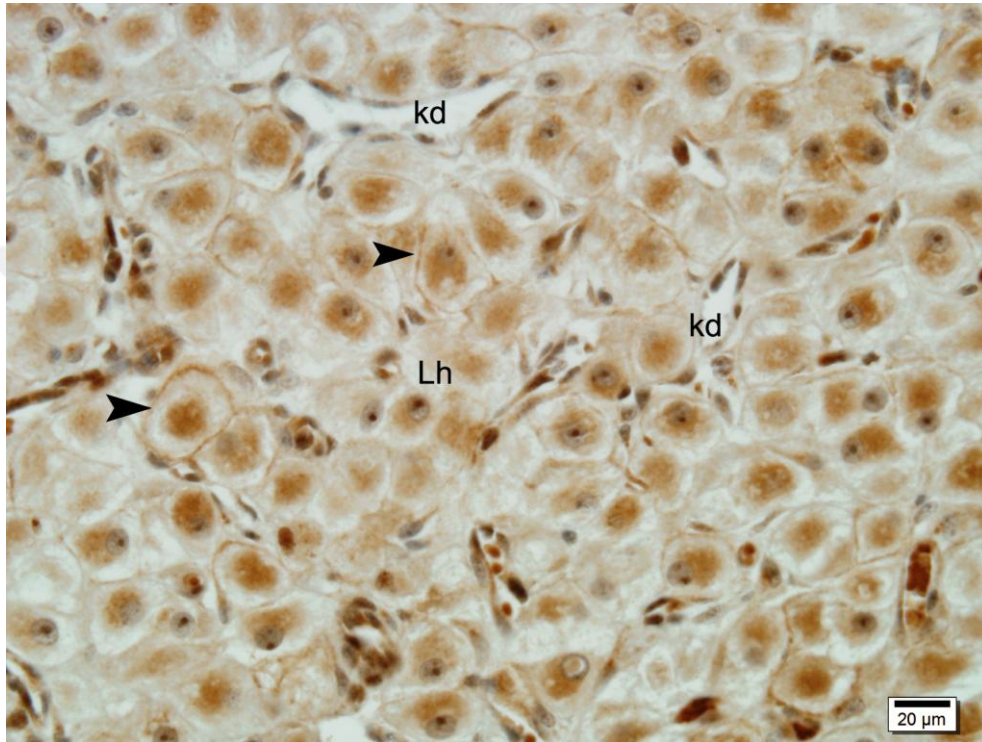


**Şekil 4.33.** Stromal interstisyel hücrelerde (SIC) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

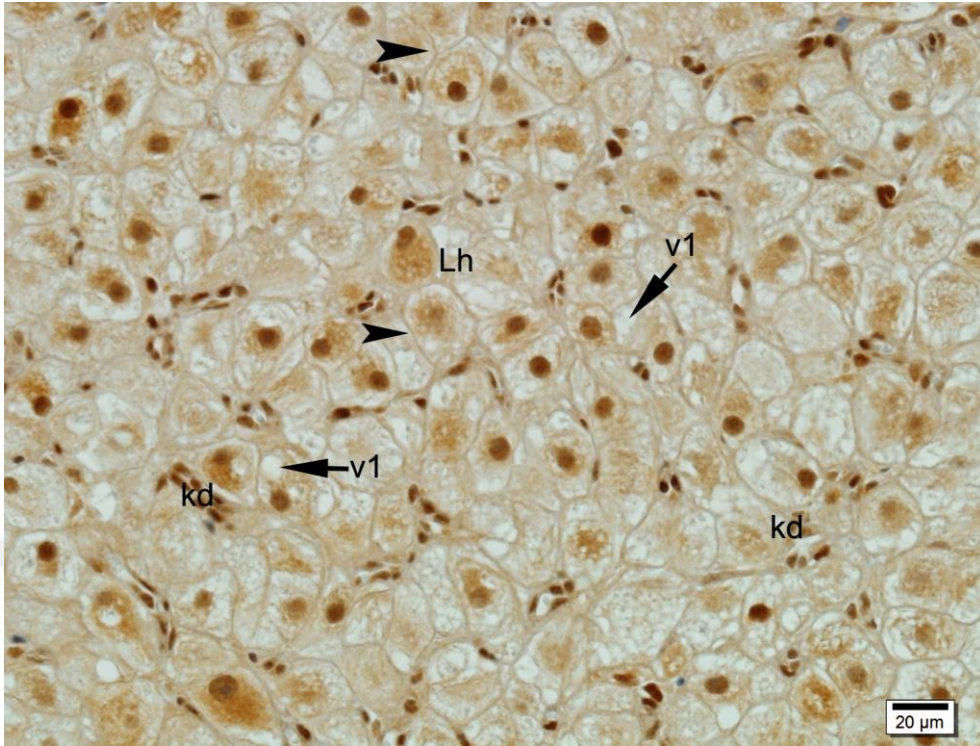
Luteal faz süresince korpus luteumda claudin-1'in küçük ve büyük luteal hücreler ile bunlar arasında bulunan kan damarlarının endotel hücrelerinde eksprese olduğu luteal hücrelerdeki ekspresyonun korpus luteumun oluşumu ve regresyonu süresince oluşan morfolojik değişikliklere paralel olarak değiştiği gözlemlendi. Korpus luteumun oluşmaya başladığı birinci evrede (PP1) claudin 1'in lutein hücrelerinin sitoplazmalarında, çekirdeklerinde ve ayrıca folikül hücrelerinden farklı olarak hücre membranlarında bulunduğu belirlendi (Şekil 4.34). Korpus luteumun gelişip büyümesiyle karakterize olan ikinci evrede (PP2) luteal hücrelerde çekirdekteki reaksiyonun arttığı ancak tip 1 vakuollerin artmasına bağlı olarak sitoplazmik reaksiyonun biraz azaldığı, ayrıca membransel reaksiyonun da az belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.35). Ayrıca bu dönemlerde lutein hücreleri arasındaki kapilar damarların endotel hücrelerinin çekirdeklerinde kuvvetli nükleer claudin-1 immunreaksiyonu gözlemlendi. Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) başladığı üçüncü evrede (PP3) luteal hücrelerde tip 1 ve tip 2 vakuollerin sitoplazmayı işgal etmesi sonucu claudin-1'in sınırlı sitoplazmik alanda bulunduğu, membransel reaksiyonun belirgin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.36). Regresyonun geç dönemi olan dördüncü evrede (PP4) ise luteal hücre



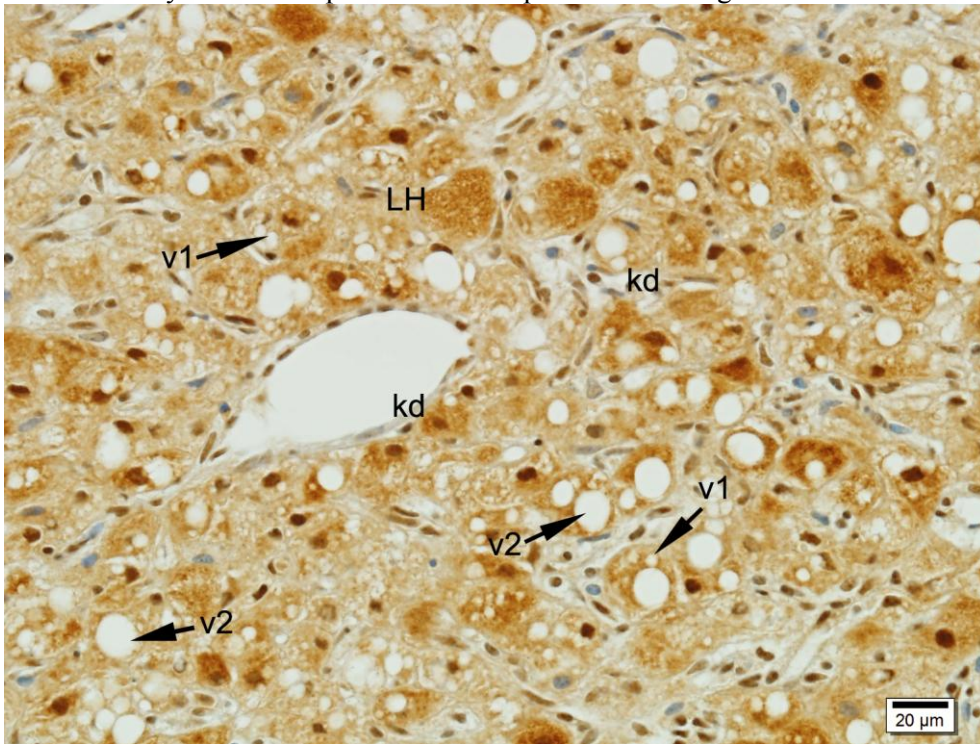
sitoplazmasını büyük bir tip 2 vakuolün doldurduğundan claudin-1 immunreaksiyonunun bu vakuol etrafında ince bir halka şeklindeki sitoplazma alanında ve çekirdekte lokalize olduğu gözlemlendi (Şekil 4.37). Regresyon sürecinde kapilar damarların endotel hücrelerinin çekirdeklerindeki claudin-1 immunreaksiyonunun da azaldığı tespit edildi.



**Şekil 4.34.** Korpus luteumun oluşmaya başladığı birinci evredeki (PP1) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; ok başı, membran boyanması. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

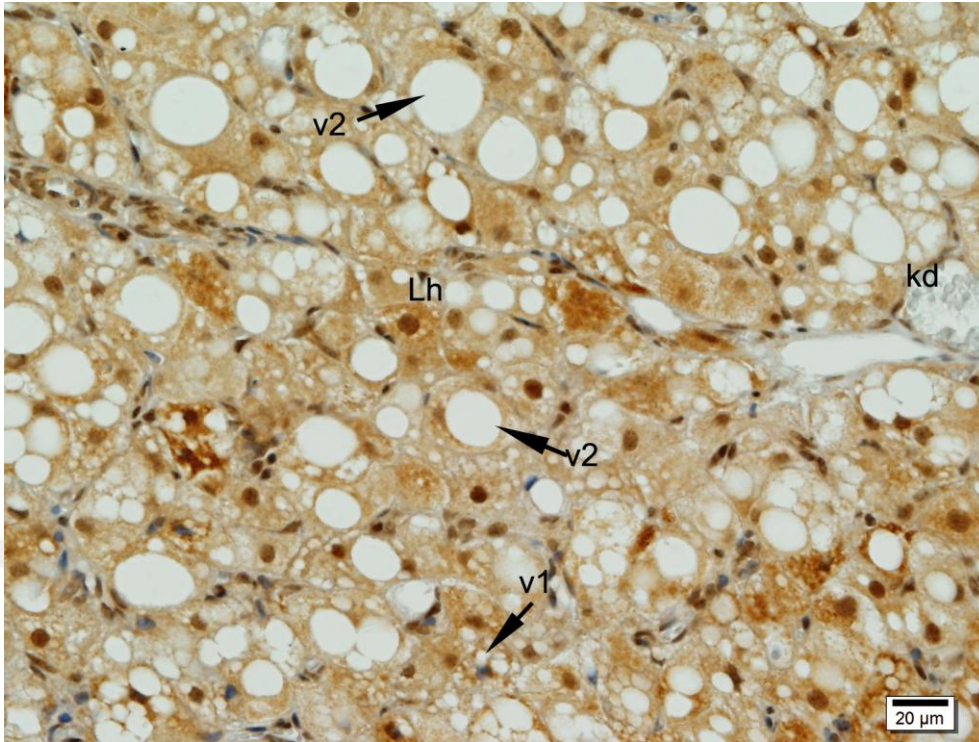


**Şekil 4.35.** Korpus luteumun gelişip büyümesiyle karakterize olan ikinci evredeki (PP2) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; ok başı, membran boyanması. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



**Şekil 4.36.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) başladığı üçüncü evrede (PP3) luteal hücrelerde (LH) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

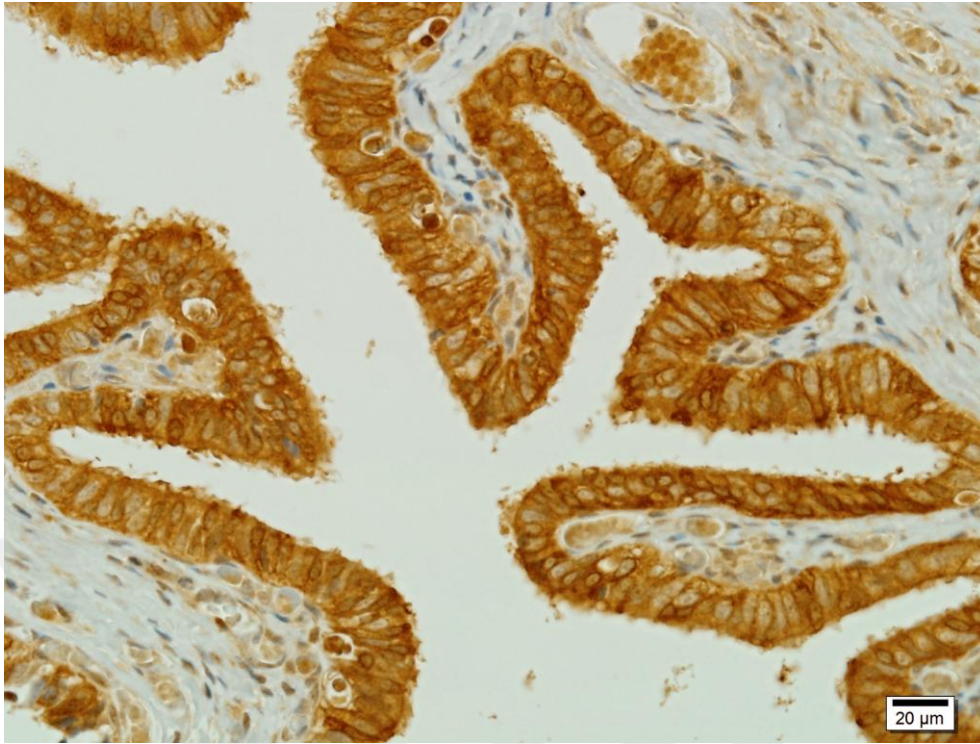




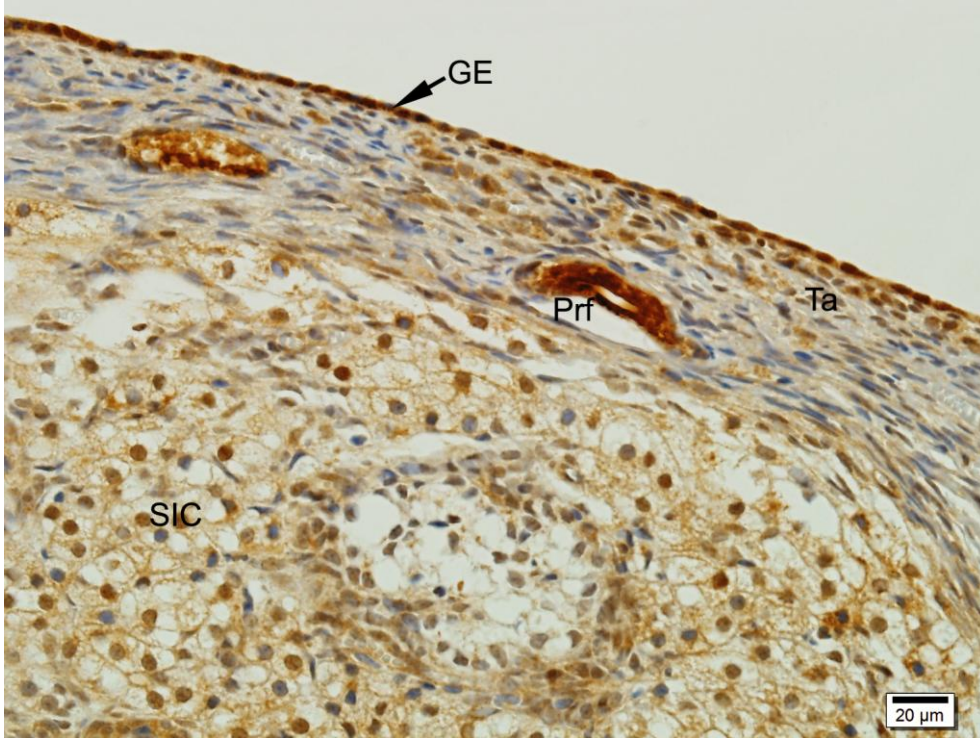
**Şekil 4.37.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) geç dönemi olan dördüncü evredeki (PP4) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-1'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

### **Claudin-5'in immunlokalizasyonu**

Kedi oviduktuna ait pozitif kontrol örneklerinde claudin-5'in oviduktta epitel hücrelerinin lateral membranları, çekirdek membranları ve sitoplazmalarında, ayrıca lamina propria katmanındaki damarların endotel hücrelerinin çekirdeklerinde bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.38). Claudin-5'in ovaryum hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında reaksiyon verdiği, çekirdek boyanmasının özellikle çekirdek membranında belirgin olduğu, sitoplazmik boyanmanın ise hücre tipine bağlı olarak orta derecede olduğu gözlemlendi (Şekil 4.39–4.56). Germinatif epitelde de çekirdek ve sitoplazmada yerleşen kuvvetli bir claudin-5 immunreaksiyonu izlendi (Şekil 4.39). Tunika albuginea ile kortikal ve stromal medulladaki bazı fibroblast benzeri hücrelerin çekirdeklerinin, makrofajların ve düz kas hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarının da claudin-5 pozitif immunreaksiyon sergiledikleri gözlemlendi. Korteks ve medulladaki kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde de claudin-5 immunreaksiyonunun bulunduğu saptandı (Şekil 4. 40).

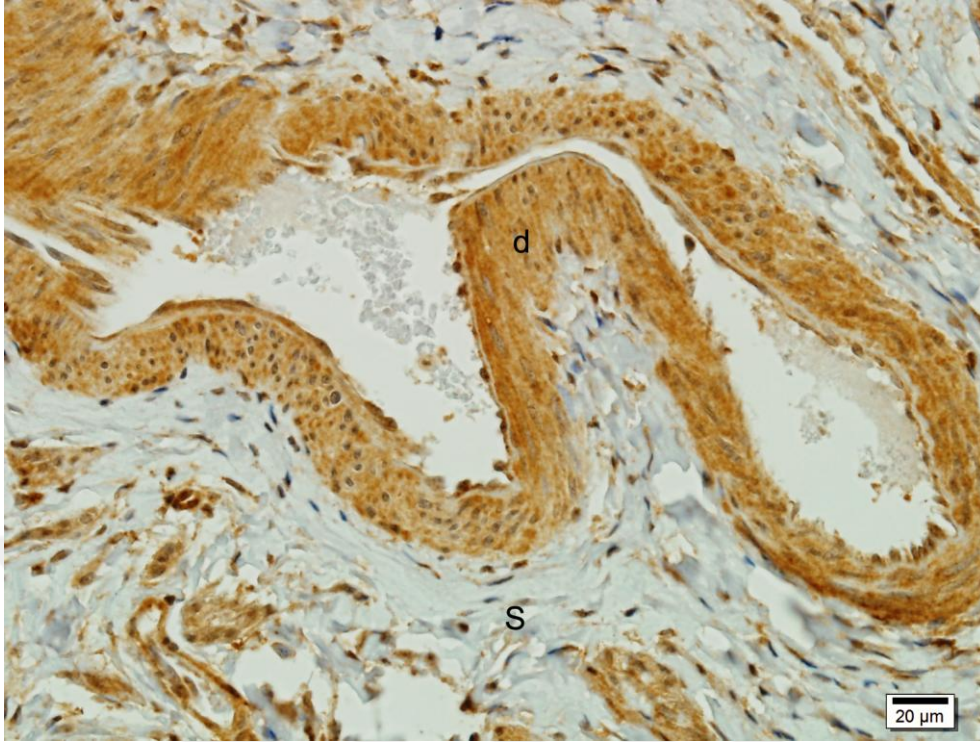


**Şekil 4.38.** Ovidukt epitelinde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



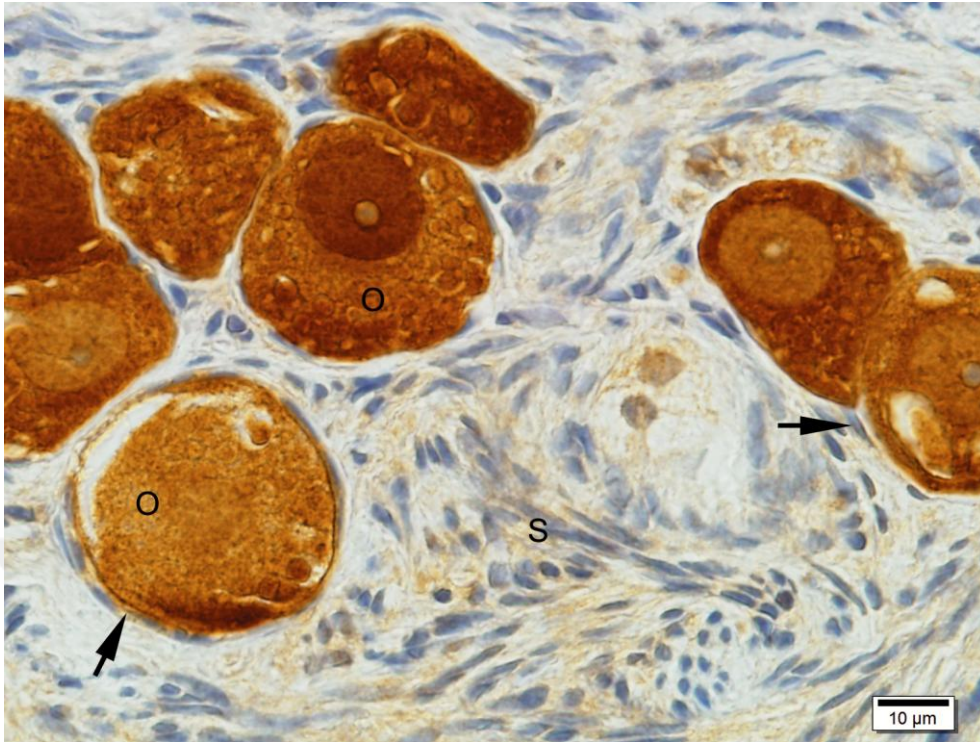
**Şekil 4.39.** Germinatif epitelde (GE) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. PrF, atretik primordial folikül; SIC, stromal interstisyel hücreler; Ta, tunika albuginea. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



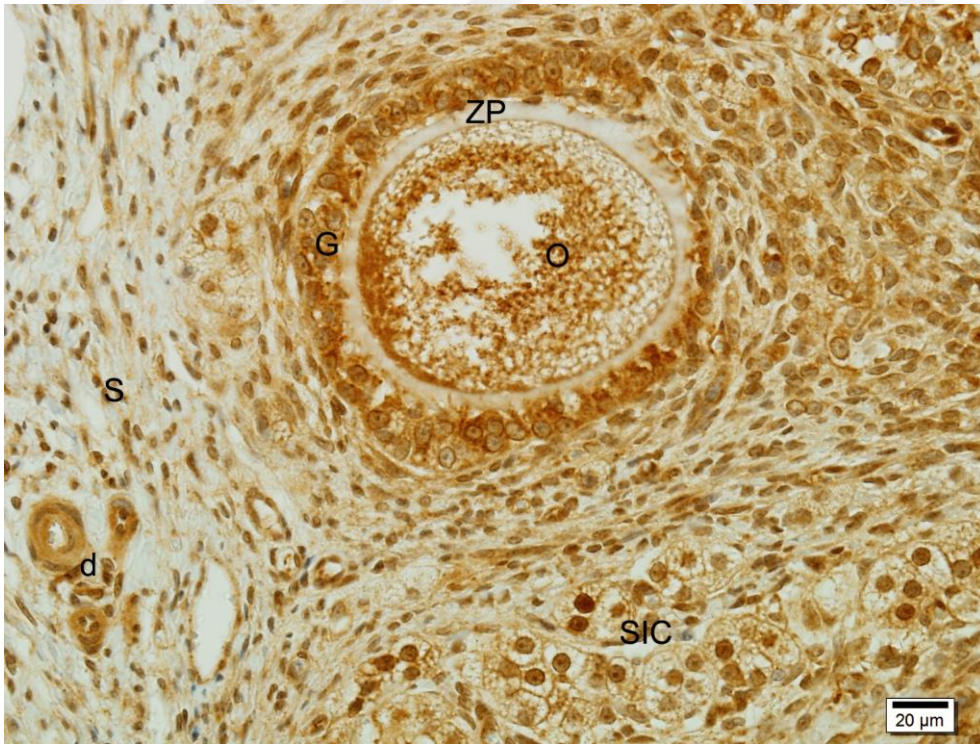


**Şekil 4.40.** Damarlarda (d) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. S, stroma. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

Ovaryumda sağlıklı tüm foliküllerde oosit sitoplazma ve çekirdekleri claudin-5 için pozitif reaksiyon sergilerken (Şekil 4.41–4.45), primer folikül aşamasından itibaren gözlenen zona pellusida'nın ise boyanmadığı (Şekil 4.42–4.45) tespit edildi. Claudin-5 immunreaksiyonunun primordial foliküllerde pregranüloza hücrelerinde bulunmadığı (Şekil 4.41), ancak primer (Şekil 4.42), sekonder (Şekil 4.43), erken antral (Şekil 4.44) ve geç antral (Şekil 4.45) foliküllerde granüloza ve teka hücrelerinin sitoplazmaları ve özellikle çekirdek membranlarında yerleştiği tespit edildi (Şekil 4.42–4.45). Sekonder ve antral foliküllerde teka katmanında bulunan kapıpların endotel hücrelerinde kuvvetli nükleer claudin-5 immunreaksiyonu gözlemlendi (Şekil 4.44 ve 4.45).

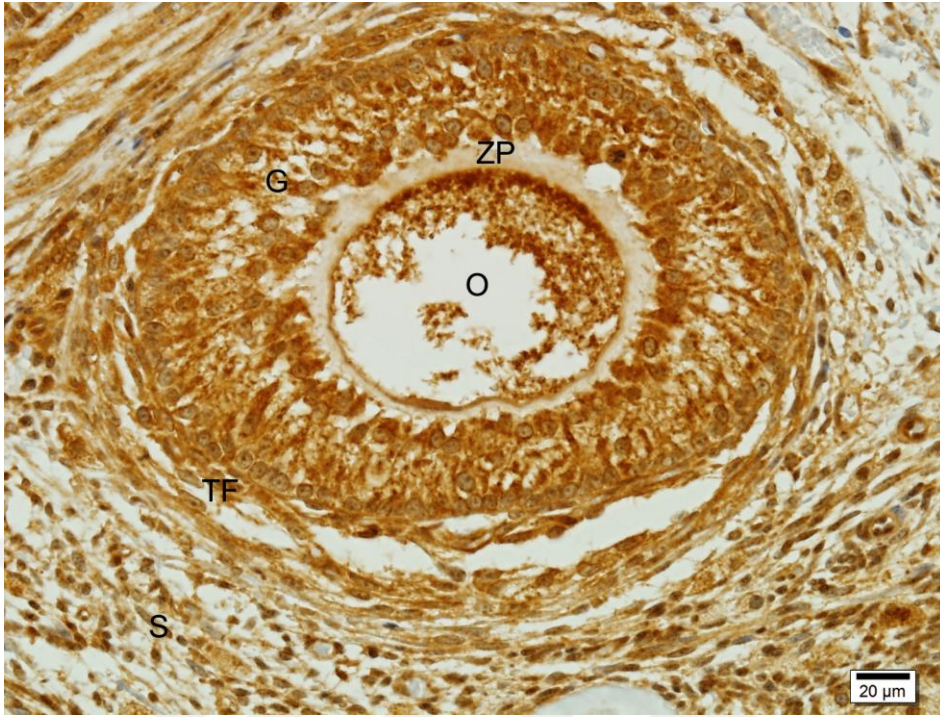


**Şekil 4.41.** Primordial foliküllerde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. O, oosit; S, stroma; oklar, pregranüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

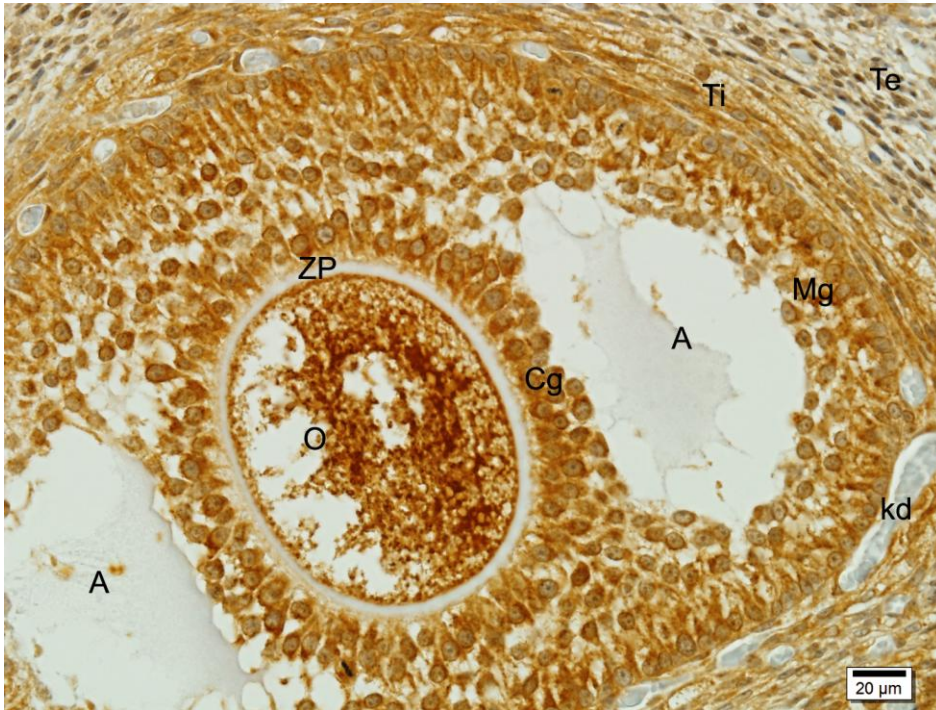


**Şekil 4.42.** Primer folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, damar; G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

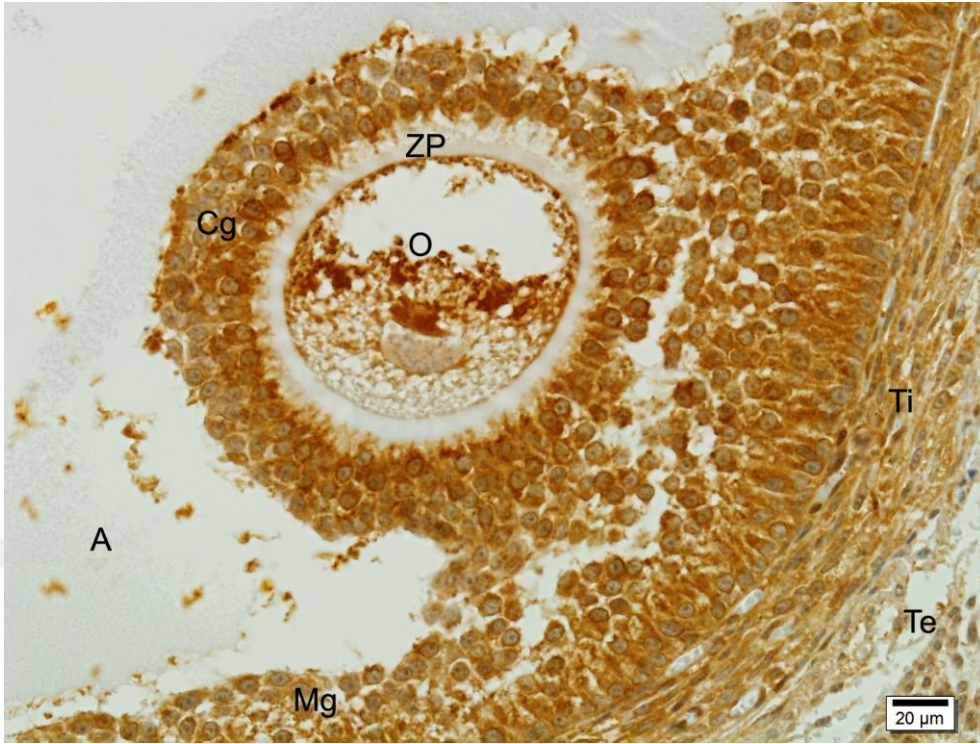




**Şekil 4.43.** Sekonder folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. G, granüloza hücreleri; O, oosit; S, stroma; TF, teka folikülü; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



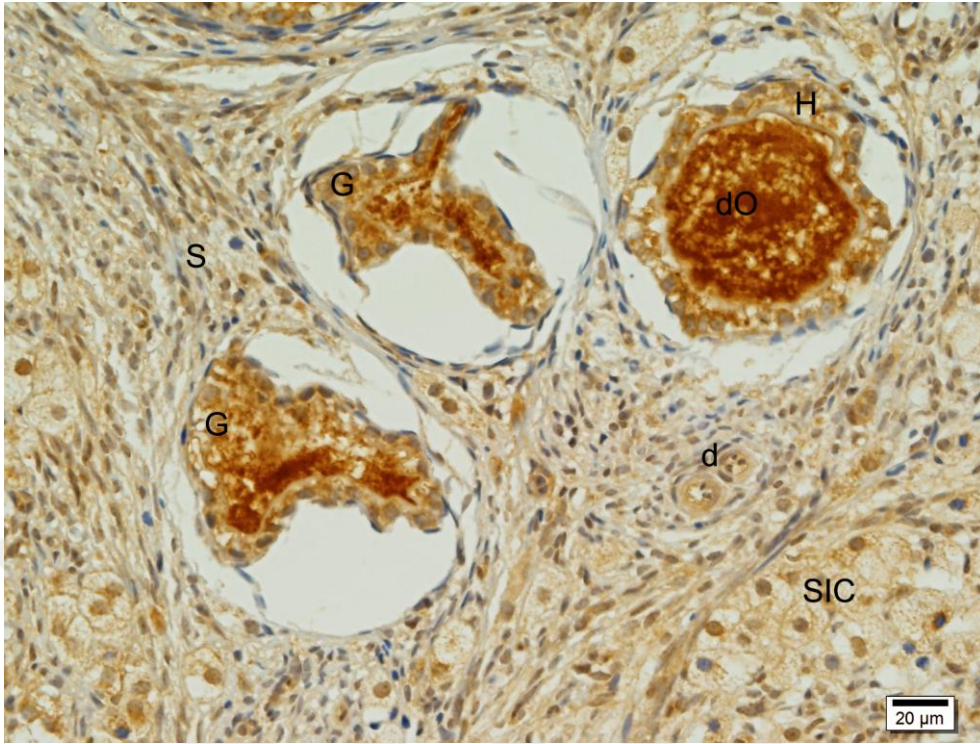
**Şekil 4.44.** Erken tersiyer folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellusida; kd, teka interna katmanındaki bazal membrana komşu kapilar damarlar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



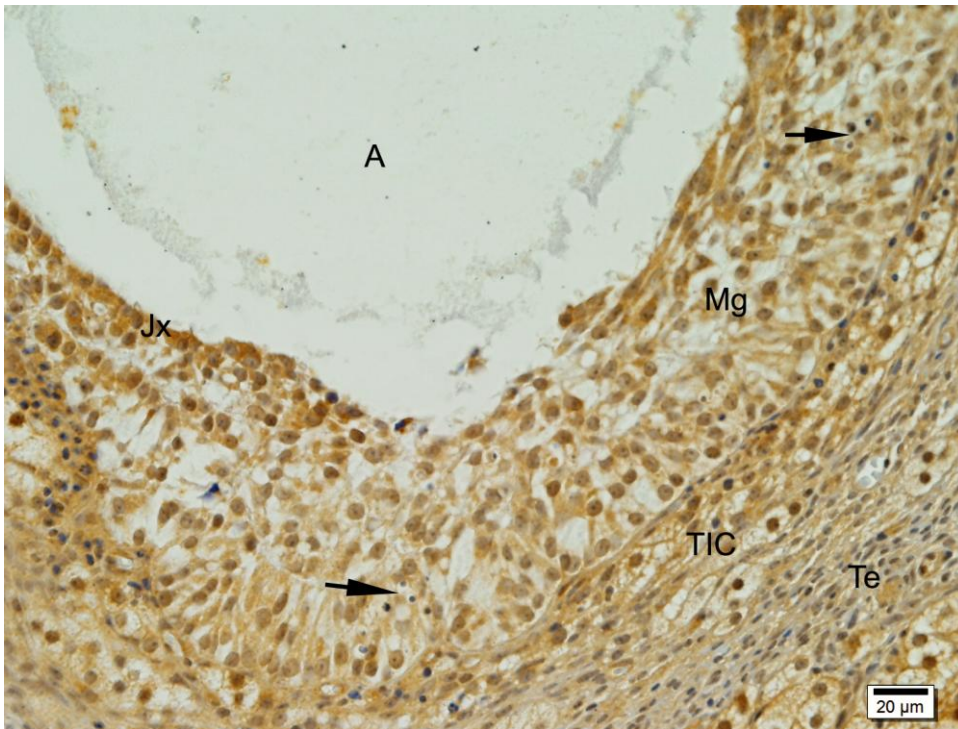
**Şekil 4.45.** Graaf folikülünde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. A, antrum; Cg, kumulus granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; O, oosit; Te, teka eksterna; Ti, teka interna; ZP, zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

Tüm atretik folikül tiplerinde claudin-5'in atrezinin farklı aşamalarında gözlenen hücre tiplerine özgü yerleşim gösterdikleri ve farklı boyanma yoğunluğu sergiledikleri tespit edildi. Genel olarak atretik preantral foliküllerdeki granüloza hücreleri (Şekil 4.46) ile I. ve II. aşamalarda atretik antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinin sağlıklı foliküllerdekine benzer claudin-5 immunreaksiyonu gösterdikleri belirlendi. (Şekil 4.47 ve 4.48). I. aşamadaki antral foliküllerde oositteki claudin-5 immunreaksiyonu sağlıklı foliküllerdekine benzerken, II. aşamada oosit dejenerasyonuna bağlı olarak reaksiyonda azalma gözlemlendi. Atrezinin II. aşamasında bazal membrandan ayrılarak lumene dökülmüş olan granüloza hücrelerinin çekirdek membranları ve sitoplazmalarında claudin-5 reaksiyonunun varlığını sürdürdüğü görüldü. II. aşamada şekillenmeye başlamış olan tekal tip interstisyel hücrelerin çekirdeklerinde kuvvetli ve membranları ile sitoplazmalarında ise orta derecede pozitif bir claudin-5 reaksiyonu dikkati çekti (Şekil 4.48).

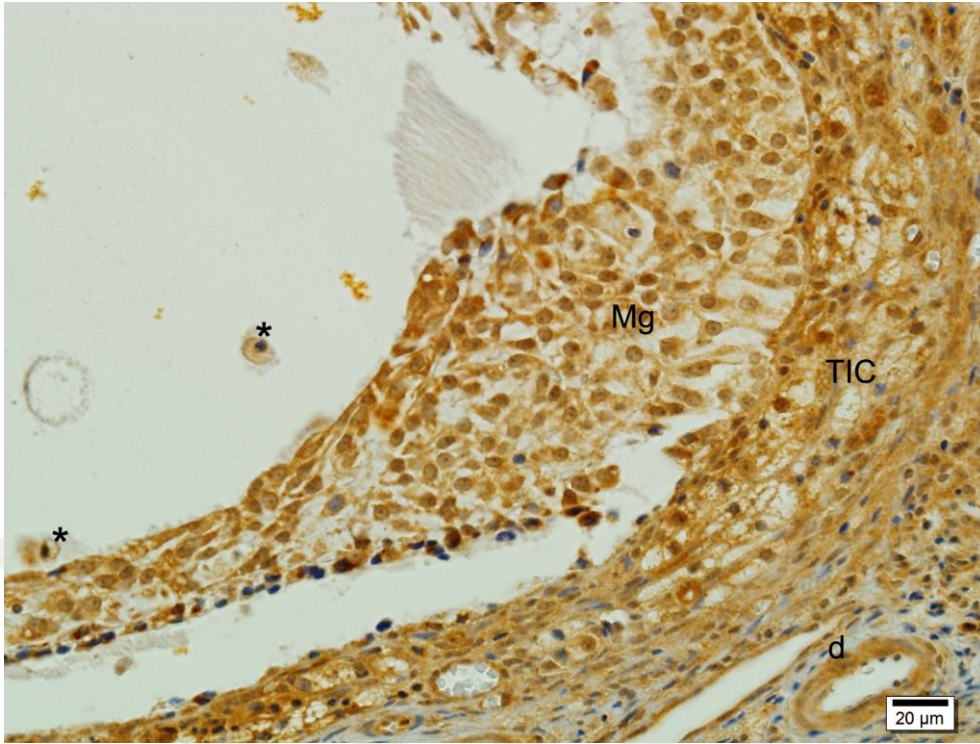




**Şekil 4.46.** Atretik preantral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, damar; dO, dejenere olmuş oosit; G, granüloza hücreleri; S, stroma; SIC, stromal interstisyel hücreler. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



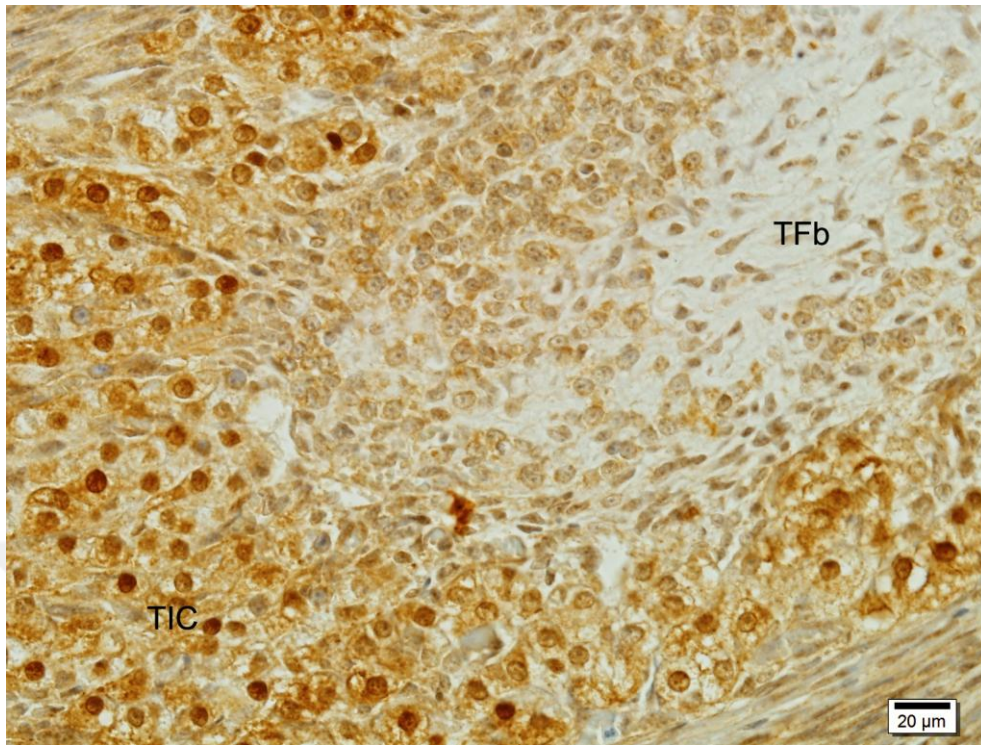
**Şekil 4.47.** I. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, Jx, juxtaluminal granüloza hücreleri; Mg, mural granüloza hücreleri; Te, teka eksterna; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; oklar apoptotik cisimcikler. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



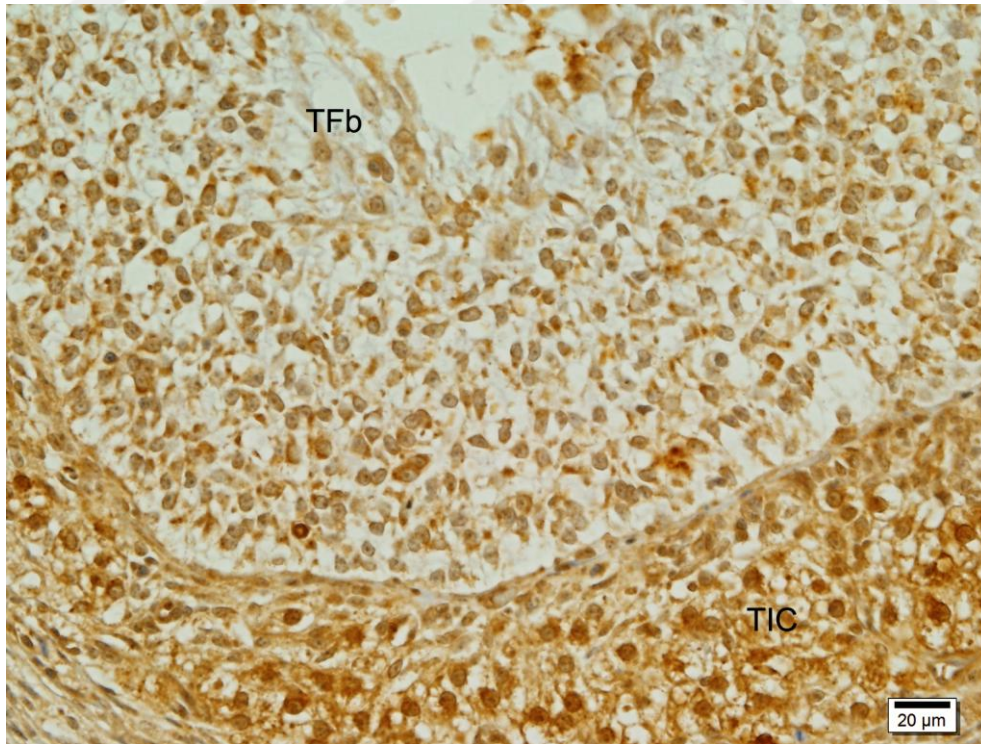
**Şekil 4.48.** II. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d; dammar; Mg, mural granüloza hücreleri; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; yıldız, lumendeki dejenere granüloza hücreleri. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

III. aşamadaki atretik antral foliküllerde ise claudin-5 immunreaksiyonunun atretik foliküler boşluktaki fibroblast-benzeri hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde orta derecede, tekal tip interstisyel hücrelerin çekirdeklerinde kuvvetli, sitoplazma ve membranlarında ise orta derecede pozitif olduğu görüldü (Şekil 4.49 ve 4.50). Atrezinin IV. aşamasındaki atretik antral foliküllerde tekal tip interstisyel hücrelerin bazılarının çekirdeklerinde kuvvetli, bazılarınıninkinde ise negatif reaksiyon izlenirken, membranlarında orta derecede ve sitoplazmalarında da zayıf veya orta derecede pozitif claudin-5 immunreaksiyonu tespit edildi. Kollabe olmuş zona pellusida da reaksiyon negatifti (Şekil 4.51). Stromal interstisyel hücrelerin de tekal tip interstisyel hücrelerinkine benzer bir claudin-5 immunreaksiyonu sergiledikleri görüldü (Şekil 4.52).



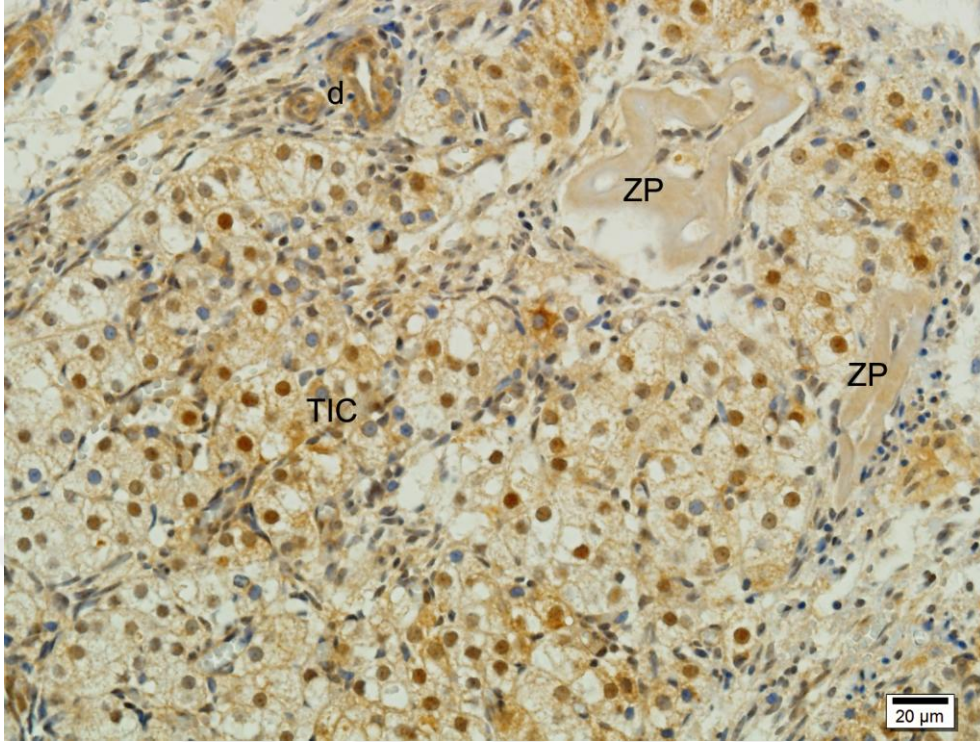


**Şekil 4.49.** III. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler; TIC, tekal tip interstisyel hücreler. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

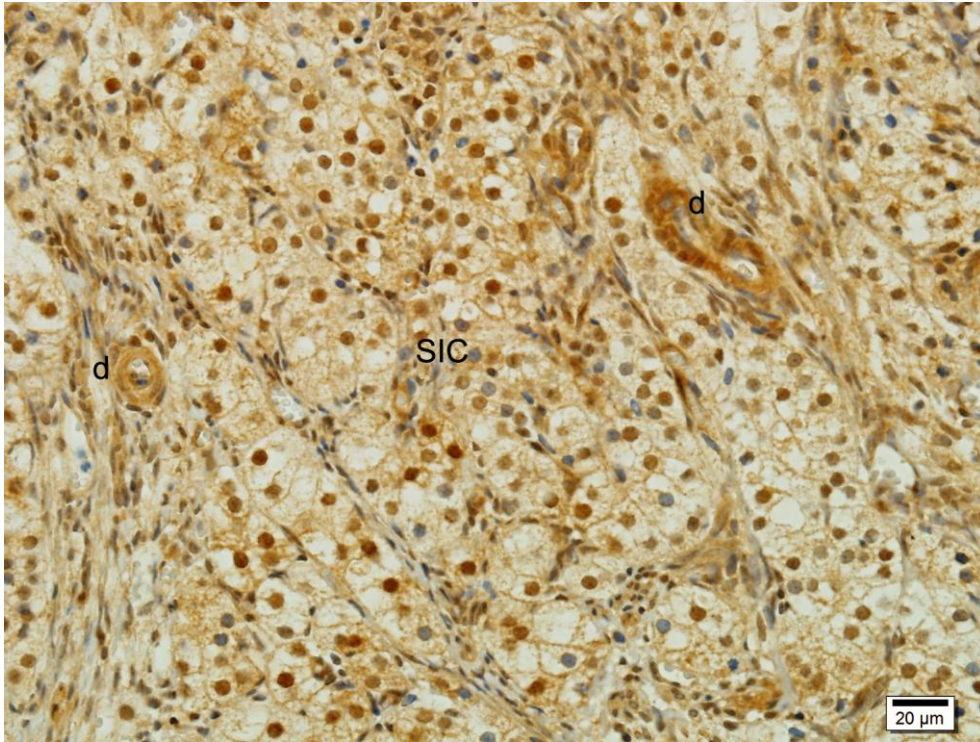


**Şekil 4.50.** III. aşamadaki atretik antral folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. TFb, fibroblast benzeri tekal hücreler; TIC, tekal tip interstisyel hücreler; Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.





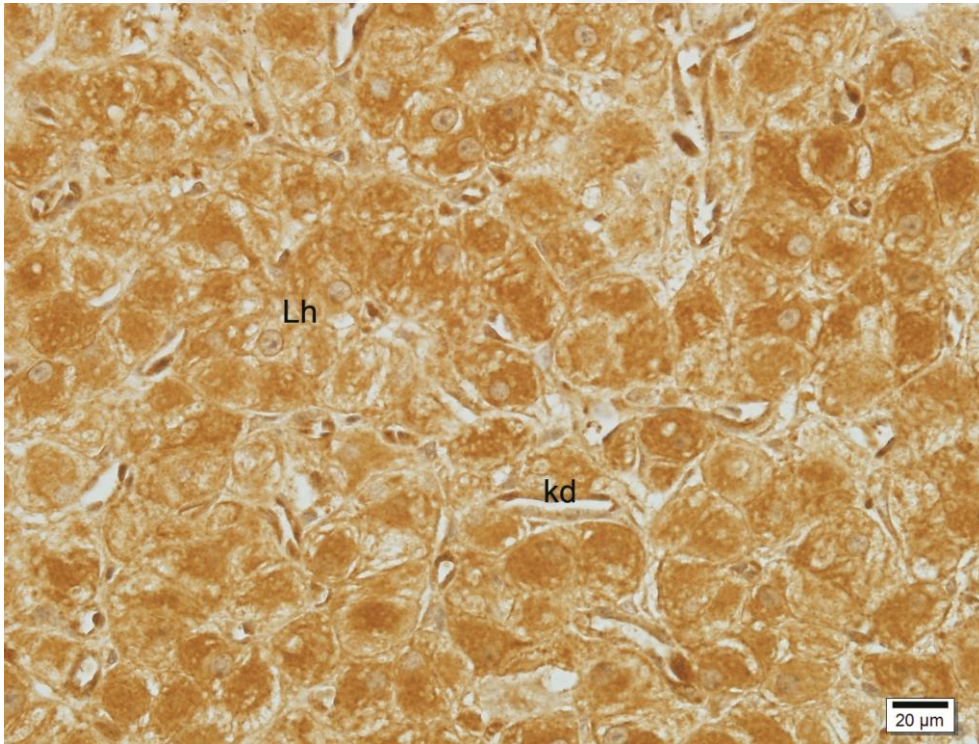
**Şekil 4.51.** IV. aşamadaki atretik folikülde Claudin-5'in immunlokalizasyonu. TIC, tekal tip interstisyel hücreler; ZP, dejenere oosite ait büzüşmüş zona pellusida. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



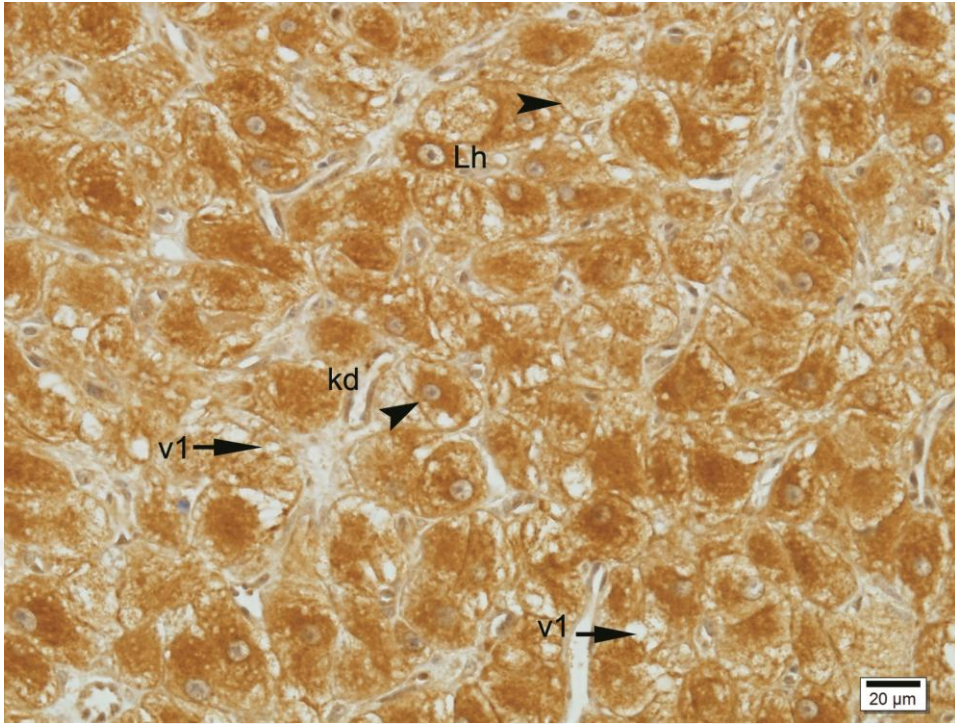
**Şekil 4.52.** Stromal interstisyel hücrelerde (SIC) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. d, damar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



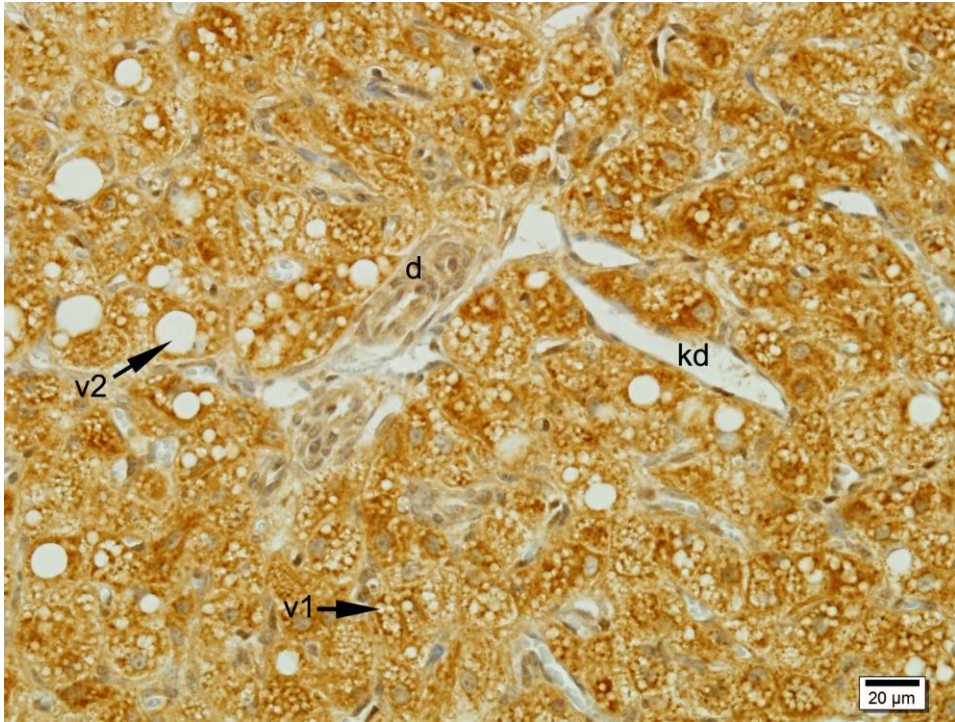
Luteal faz süresince korpus luteumda claudin-5'in luteal hücrelerde eksprese olduğu ve ekspresyonun korpus luteumun oluşumu ve regresyonu süresince oluşan morfolojik değişikliklere paralel olarak değiştiği gözlemlendi. Claudin 5'in PP1 ve PP2 evresinde luteal hücrelerinin sitoplazmalarında, çekirdek membranlarında ve hücre membranlarında yerleştiği belirlendi (Şekil 4.53 ve 4.54). PP3 evresinde luteal hücrelerde tip 1 ve tip 2 vakuollerin sitoplazmayı işgal etmesi sonucu claudin-1'in sınırlı sitoplazmik alanda bulunduğu ve membransel reaksiyonun belirgin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.55). PP4 evresinde ise luteal hücrelerde claudin-5 immunreaksiyonunun tip 2 vakuol etrafında ince bir halka şeklindeki sitoplazmada ve zayıf olarak çekirdek membranında bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.56). Ayrıca claudin-5'in luteal hücreler arasında bulunan kapilar damar endotellerinin çekirdeklerinde de eksprese olduğu, PP1 ve PP2 evrelerinde kuvvetli olduğu gözlenen bu ekspresyonun, PP3 evresinden itibaren azaldığı ve PP4 evresinde ise zayıf ya da negatif olduğu tespit edildi.



**Şekil 4.53.** Korpus luteumun oluşmaya başladığı birinci evredeki (PP1) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

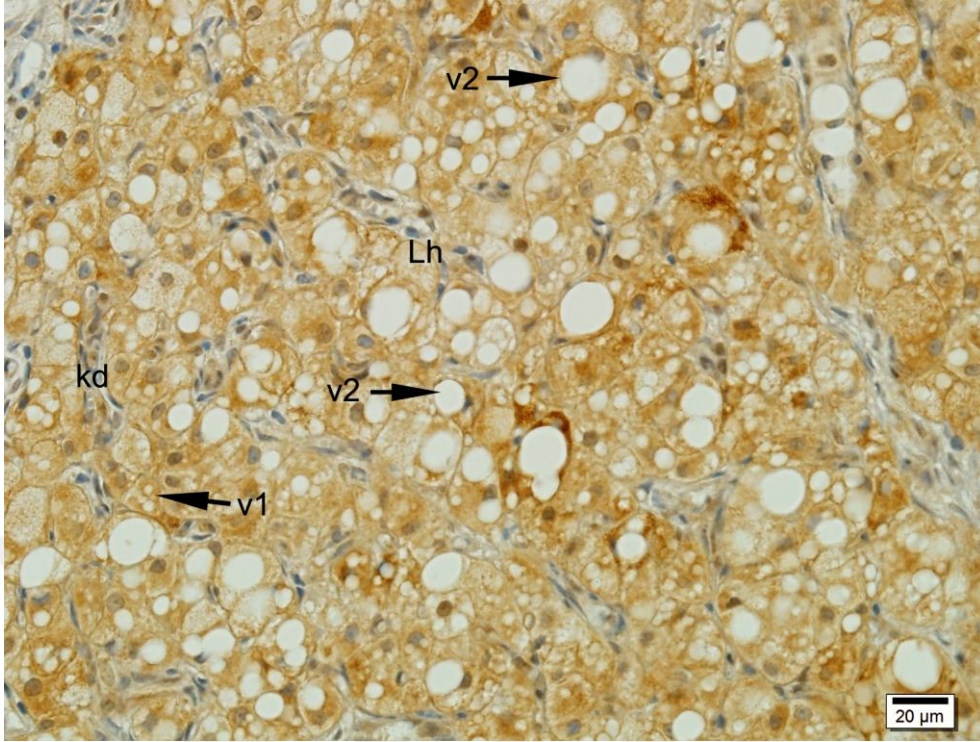


**Şekil 4.54.** Korpus luteumun gelişip büyümesiyle karakterize olan ikinci evredeki (PP2) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; ok başı, luteal hücrelerde membrane boyanması. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.



**Şekil 4.55.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) başladığı üçüncü evrede (PP3) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.





**Şekil 4.56.** Korpus luteumun gerilemesinin (regresyonun) geç dönemi olan dördüncü evredeki (PP4) luteal hücrelerde (Lh) Claudin-5'in immunlokalizasyonu. kd, kapilar damar; v1, lutein hücrelerinde tip 1 vakuol; v2, lutein hücrelerinde tip 2 vakuol. Strept-ABC immunoperoksidaz tekniği.

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Memeli ovaryumunda folikülogenezis hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve göçü ile apoptozu içine alan oldukça kompleks ve dinamik bir süreç olup folikül gelişimi oosit etrafında bulunan yassı pregranüloza hücrelerinin kübik veya prizmatik granüloza hücrelerine dönüşümüyle başlar. Belirli bir follikülün büyümeye başlamasını tetikleyen sinyallerin ne olduğu halihazırda tam olarak bilinmemektedir ve ayrıca foliküler gelişimin başlamasının en önemli kanıtı olan granüloza hücrelerinin şeklindeki değişimle ilgili hücresel olaylar hakkında çok az şey bilinmektedir. Hücre şeklinin farede granüloza hücrelerinin çoğalmasını (96) ve sıçan granüloza hücrelerinde steroidogenezi (97) düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca diğer dokulara ait hücrelerde hücre şeklinin hücre büyümesini, hücre farklılaşmasını ve apoptozu düzenlediği de bildirilmiştir (98-100). Genellikle, hücre şekli değişikliğinin de hücrelerarası bağlantılar ve hücre iskeletinin yapısındaki değişikliklerle kontrol edildiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (19, 101-104). Hücrelerarası bağlantı birimlerinden TJs epitel hücre polaritesi için önem taşıyan apikal hücre adezyon birimleridir ve plazma membranının apikal ve bazo-lateral yüzeyleri arasındaki proteinlerin ve lipidlerin serbest difüzyonunu bloke ederek parasellüler geçirgenliği düzenlerler (67, 68). TJs, occludin ve claudin protein ailesi gibi transmembran proteinler ile zonula occludens 1-3 (ZO-1, -2 ve -3) gibi periferel proteinlerden oluşurlar (19).

TJs'in ana kurucu proteini olan claudin-1, epitel spesifik bir proteindir (68). Genital sistemde claudin-1 ekspresyonu insanda meme, prostat ve ovaryum kanserlerinde gösterilmiş (81), ancak normal ovaryumda lokalizasyonu ve ekspresyonu ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır (15, 20, 105). Bariyer oluşturan claudinlerden claudin-



5'in de endotel hücrelerindeki TJs'da predominant olarak eksprese edildiği (86) ve ovaryumda korpus luteumun anjiyogenezinde önemli rol oynadığı (15, 17) gösterilmiştir. Ancak kedi ovaryumlarında foliküler ve luteal gelişim ile regresyon sırasında epiteliyal spesifik protein olan claudin-1'in ve endoteliyal spesifik protein olan claudin-5'in lokalizasyonları ve ekspresyonlarına ilişkin bilgi bulunmamaktadır. Ovaryumda gerek foliküler ve gerekse luteal gelişim sürecinde etkin hücre tipi olarak görev alan granüloza hücrelerinin epitel hücreleri olarak tanımlanmaları, bu hücrelerin epiteliyal claudin-1'i eksprese edebilecekleri fikrini ve ayrıca foliküler ve luteal anjiyogenezde damar endotellerinin claudin-5'i eksprese edebilecekleri fikrini akla getirmektedir. Buradan yola çıkılarak hazırlanan bu çalışmada kedi ovaryumlarında foliküler gelişimin farklı basamakları ile luteal gelişim ve regresyon sürecinde TJ proteinlerinden claudin-1 ve claudin-5'in varlıkları, lokalizasyonları ve ekspresyonlarındaki değişiklikler immunohistokimyasal yöntem kullanılarak ilk kez ortaya konmuştur. Bu çalışmadaki immunohistokimyasal bulgular, claudin-1 ve claudin-5'in değişik boyanma yoğunluklarında olmak üzere germinatif epitelde (yüzel epitel), değişik gelişme aşamalarındaki foliküllerdeki oositte, folikül epitel hücrelerinde (pregranüloza, granüloza ve kumulus hücreleri), teka interna ve eksterna hücreleri ile tekal tip ve stromal interstisyel hücrelerde, fibroblast-benzeri stromal hücrelerde, ayrıca korpus luteumu oluşturan luteal hücrelerde ve kan damarlarında bulduklarını göstermektedir ki bu bulgular, claudin-1 ve claudin-5'in kedi ovaryumundaki folikülogenezde, luteal gelişim ile regresyonda ve anjiyogenezde görevli olabileceği hipotezini destekler niteliktedir.

Claudin-1 hücrelerde genellikle TJ'nın dış tarafında lateral membranda bulunur. Bununla birlikte claudin-1'in özellikle ekspresyonunun ve hücreyel yerleşiminin tümör oluşumu sırasında değiştiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (105-107). Sunulan çalışmada pozitif kontrol dokusu olarak kullanılan kedi ovidukt epitelinde claudin-1'in epitel hücrelerinin özellikle lateral membranında, çekirdek ve sitoplazmasında yerleştiği gözlenmiş olup bu bulgu claudin-1'in TJ proteini olarak membransel yerleşimini doğrulamaktadır. Kedi ovaryumunun yüzeysel epitelinde (germinatif epitel) önceki çalışmalarda bildirilenlere (20) benzer olarak claudin-1'in sitoplazmik ve membransel bir boyanma sergilediği tespit edildi. Ovaryum yüzeysel epitelinin ovülasyona uğramamış ovaryumda epiteliyal ve mezenşimal özellikler gösteren durağan bir mezotelden oluştuğu (84), ancak menstrüel veya ovariyal siklus sırasında ovülasyon sonrası

ovaryum yüzey epitelinin epiteliyal-mezenşimal değişime uğradığı (85) bilinmektedir (85). Bu çalışmada claudin-1'in ovaryumda germinatif epitelde ovülasyon sonrası şekillenen epiteliyal-mezenşimal değişimde rol oynayıp oynamadığı saptanamadı. Bununla birlikte germinatif epitelin özellikle çeşitli materyallerin ovaryumdan periton boşluğuna, periton boşluğundan da ovaryuma taşınmasında ve ovülasyon sonrası şekillenen rüptür ile akabindeki onarım olaylarında işlev gördüğü (108) ve claudin-1'in çeşitli iyonların taşınmasına aracılık eden TJs'in önemli bir yapısal proteini olduğu (67, 68) bilgileri birlikte ele alındığında bu bulgu, claudin-1'in ovaryum yüzey epitel hücrelerinin fonksiyonlarına aracılık ettiğinin önemli kanıtı olabilir.

Claudin-1'in memelilerin ovaryum foliküllerindeki ekspresyonu ve lokalizasyonu sadece farede çalışılmış olup, TJ proteinlerinden claudin-1, 3 ve 11'in ovidukt epitel hücrelerinde bulunduğu, ancak ovaryum foliküllerinde bulunmadığı bildirilmiştir. Bu literatür bilginin (19) aksine kedide ovaryum örnekleri incelendiğinde östrus siklusunun her üç evresindeki ovaryum dokusunda claudin-1'in eksprese edildiği, sağlıklı ve atretik folikül tiplerinin tümünde gerek oositte, gerekse somatik hücrelerde (granüloza ve teka hücreleri), ayrıca stromadaki fibroblast benzeri hücreler ile medulladaki düz kas hücrelerinde, kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde claudin-1'in sitoplazmik ve nüklear lokalizasyon gösterdiği saptandı. Claudin-1'in sitoplazmik ve nüklear lokalizasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin hücre tipine bağlı olarak değiştiği ve claudin-1'in ya apoptosisi indüklediği (10) veya antiapoptotik etkisinin bulunduğu (12) çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Melanoma, kolon ve nazofarengeal karsinom gibi kanser türlerinde claudin-1'in çekirdek ve sitoplazmada yerleştiği gösterilmiştir (105-107). İlginç olarak nazofarengeal karsinomda hücrelerde claudin-1 ekspresyonundaki artışın hücre proliferasyonunu artırmaktan ziyade apoptozu azalttığı (107), benzer olarak kolon karsinomunda da claudin-1 ekspresyonunun inhibisyonunun anoikise (hücre-matriks etkileşiminin kaybindan kaynaklanan apoptoz) bağlı apoptozu önemli ölçüde arttırdığı, ancak hücre proliferasyonunu etkilemediği ve claudin-1'in tümör oluşumu ile kolon epitel hücrelerinin invaziv özellikleri için önemli olduğu bildirilmiştir (11). Memeli ovaryumlarında folikülogenezin hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve göçü ile apoptozu içine alan oldukça kompleks bir süreç olduğu dikkate alındığında kedi ovaryumunda claudin-1'in ovaryum hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde bulunduğunu gösteren bulgularımız folikül gelişimi ve atrezisi süresince claudin-1'in folikül hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozunda, teka hücrelerinin proliferasyonu ve

farklılaşmasında ve ayrıca stromal hücrelerin proliferasyonunda görevli olabileceği ileri sürülebilir.

Çalışmamızda folikül epitel hücreleri olarak tanımlanan granüloza hücrelerinde claudin-1'in membransel bir yerleşim göstermesi beklenirken, claudin-1'in granüloza hücre membranlarında bulunmadığı belirlendi. Memeli ovaryumunda foliküllerin küçük moleküller için geçirgen olduğu (109, 110) ve sıçan ovaryumunda preovulatör foliküllerde TJs'in bulunmadığı (111) gösterilmiştir. Kedi ovaryumunda da claudin-1'in foliküllerde granüloza hücrelerinin membranlarında bulunmaması, belirli çözeltilerin ve küçük proteinlerin damarsız granüloza katmanından büyüyen oosite erişmesine izin vermek için granüloza hücreleri arasının daha geçirgen olması gerektiğiyle açıklanabilir. Memeli ovaryumlarında granüloza hücrelerinin gelişimsel kökeni belirsizdir, ancak bu hücrelerin ağırlıklı olarak yüzey epitelinden türetildiği düşünülmektedir (112). Bununla birlikte, ovaryum yüzey epitel hücrelerinin lateral membranlarında claudin-1'in ekprese olduğu gözlenmesine rağmen, foliküllerde granüloza hücre membranlarında epiteliyal protein olan claudin-1'in bulunmaması pregranüloza ve granüloza hücrelerinin gerçekten epitel kökenli olmadığına önemli bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Ovaryumda preantral evrede sekonder foliküllerin gelişmeye başlamasıyla birlikte folikül duvarında teka hücre tabakasının ortaya çıkması erken foliküler gelişim için önemli bir fizyolojik olgudur. Çünkü, teka hücreleri foliküler gelişim sırasında çeşitli fonksiyonlar üstlenirler. Bu fonksiyonlar, foliküler gelişim sırasında granüloza hücreleri ve oositler arasındaki iletişimi sağlamak, olgun ve fertilize olabilen bir oosit üretmek için büyüyen foliküle yapısal destek sağlamak ve özellikle kolesterolden androjen substratlarını (androstenedion) üretmek şeklinde sıralanabilir (49). Sunulan çalışma bulguları gelişmekte olan folikül duvarındaki teka hücrelerinin çekirdeklerinde kuvvetli ve sitoplazmalarında ise orta şiddette bir claudin-1 immunreaksiyonunun bulunduğunu, foliküler atrezin II. aşamasından itibaren teka interna hücrelerinin tekal tip interstisyel hücrelere dönüşümünü takiben hücre sitoplazmalarının genişlemesi ve çekirdeğin de yuvarlaklaşması sonucu sitoplazmik boyanmanın zayıfladığı, ancak çekirdekteki reaksiyonun arttığını, ayrıca tekal tip interstisyel hücre membranlarında orta şiddette membransel bir boyanmanın bulunduğunu gösterdi. Bunların yanısıra atrezinin III. aşamasındaki antral folikül tiplerinde teka hücrelerinin farklılaşmasıyla şekillendiği düşünülen tekal tip fibroblast benzeri hücrelerin çekirdek ve

sitoplazmalarında da claudin-1 immunreaksiyonunun var olduğu tespit edildi. Teka hücrelerinin ovaryumda en son ölen hücreler olduğu bilindiğinden (49) çalışma bulgularımız claudin-1'in tekal hücrelerin çoğalma ve farklılaşma süreçlerine katıldığını gösterebilir, ancak bu hipotezi doğrulamak için daha detaylı çalışmaların yapılması gereklidir.

Ovaryumda folikül gelişimin en önemli amaçlarından biri olgun ve fertilize olabilen oositi üretmektir. Memeli oositleri büyümeleri sırasında, GJ'lar yoluyla çevresindeki follikül hücreleriyle sürekli olarak etkileşirler. Amino asitler, glikoz metabolitleri ve nükleotidler, büyüyen oosite GJ'lar aracılığıyla aktarılan moleküllerdir (113). Farelerde folikül gelişiminin başlamasıyla oosit etrafındaki granüloza hücrelerinin oosite AJs aracılığıyla bağlandığı, kalsiyum bağımsız adezyon molekülü nectin-2 oosit-granüloza hücre etkileşiminde önemli rol oynadığı, E-cadherin ve  $\beta$ -catenin ooplazmada ve oosit membranında birlikte bulunduğu, bununla birlikte TJ proteinlerinden claudin-1, claudin-3 ve claudin-11'in oositte bulunmadıkları bildirilmiştir (19). Farede bildirildiği (19) gibi kedi ovaryumunda da gerek primordiyal foliküllerde oosit ve pregranüloza hücreleri arasında ve gerekse primer, sekonder ve antral foliküllerde oosit ile kumulus granüloza hücreleri arasında claudin-1'in bulunmadığı yani primordiyal foliküllerdeki oolemmannın ve diğer foliküllerdeki zona pellusidanın negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi. Bununla birlikte primordiyal foliküllerde oldukça kuvvetli olmak üzere tüm foliküllerde claudin-1'in oositlerin çekirdek ve sitoplazmalarında eksprese olduğu gözlemlendi. Bu bulgular, kedi oositlerinde TJ proteini olan claudin-1'in oositi ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantılara katılmadığı fikrini ve ayrıca claudin-1'in çekirdek ve sitoplazmadaki yerleşimlerinin proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili olabileceği bilgisi (105-107) dikkate alındığında bu proteinin oositin gelişiminde rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir. Çalışmamız claudin-1'in oositlerdeki varlığını gösteren ilk araştırmadır.

Claudin-5 endotel hücreleri ile epitel hücrelerinde lokalize olan (90), aynı zamanda doku spesifik bir ekspresyon sergileyen ve özellikle kan-beyin bariyerinin oluşumuna katılan bir TJ proteindir (71). Claudin-5 damar tümörlerinde yüksek oranda eksprese edilir (105, 114) ve damar farklılaşmasının önemli bir belirteçidir (114). Çalışmalar claudin-5 ekspresyonunun seröz ovaryum adenokarsinomunda arttığını göstermiştir (115, 116). İnsan ovaryumunda claudin-5'in gerek foliküllerde ve gerekse korpus



luteumun luteal hücrelerinde bulunmadığı ancak, özellikle korpus luteumdaki kapilar damarların ve stromadaki kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (15, 117). İpek maymunu (marmoset)'nda da claudin-5'in endotel spesifik bir TF proteini olduğu ve ovaryumdaki damarlarda bulunduğu, ayrıca ovaryum foliküllerinde geç sekonder folikül aşamasında teka katmanında damar ağının oluşumuyla birlikte claudin-5'in endotel hücrelerinde eksprese edildiği, foliküler büyümeye paralel olarak claudin-5 immunboyanmasının belirginleştiği, ancak sağlıklı ve atretik foliküllerin teka katmanındaki damarlardaki boyanmanın değişmediği gösterilmiştir (17). Sunulan çalışmada pozitif kontrol dokusu olarak kullanılan kedi oviduktunda claudin-5'in epitel hücrelerinin lateral membranları, çekirdek membranları ve sitoplazmalarında, ayrıca lamina propriya katmanındaki damarların endotel hücrelerinin çekirdeklerinde bulunduğu gözlemlendi. İnsan ovaryumunda bildirildiği (105) gibi kedi ovaryum örneklerinde de claudin-5'in germinatif epitelde eksprese olduğu, ancak insanda bildirilen germinatif epiteldeki membransel yerleşiminin (105) aksine kedi ovaryumunun germinatif epitelinde çekirdek ve sitoplazmada yerleşen kuvvetli bir claudin-5 immunreaksiyonunun bulunduğu tespit edildi.

Memelilerde normal ovaryum dokusunda claudin-5'in oositlerdeki varlığına ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak immunhistokimyasal bulgularımız kedi ovaryumunda claudin-5'in sağlıklı foliküllerde özellikle primordial foliküllerde çok kuvvetli olmak üzere çekirdek ve sitoplazmada eksprese olduğunu, ancak primer folikül aşamasından itibaren gözlenen zona pellusida da bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca bulgularımız insan (15, 117) ve ipek maymununda (17) bildirilenin aksine, kedi ovaryumunda claudin-5'in primordial foliküllerdeki pregranüloza hücreleri hariç, diğer gelişim aşamalarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinin ve ayrıca sekonder folikül aşamasından itibaren şekillenen teka hücrelerinin sitoplazmaları ve özellikle çekirdek membranlarında yerleştiğini ortaya koymaktadır. Bunun yanısıra çalışmamızda sekonder ve antral foliküllerde teka katmanında bulunan kapilar damarların endotelinde kuvvetli nükleer claudin-5 immunreaksiyonu gözlenmiş olup bu bulgu, insan (15, 117) ve ipek maymununda da rapor edilmiştir (17). Sunulan çalışmada claudin-5'in ayrıca atretik folikül tiplerinde eksprese olduğu ve atrezinin farklı aşamalarında gözlenen hücre tiplerine özgü yerleşim gösterdiği ve farklı boyanma yoğunluğu sergilediği tespit edildi. Atreziye uğrayan granüloza hücrelerinde claudin-5 ekspresyonu çok değişmezken, atrezinin II. aşamasındaki oositlerde dejenerasyonuna

bağlı olarak azalma saptandı. Ayrıca atrezinin II. aşamasında şekillenen tekal tip interstisyel hücrelerin çekirdeklerinde kuvvetli, membranları ile bazen de sitoplazmalarında orta derecede pozitif bir claudin-5 immunreaksiyonu belirlendi. Atrezinin III. aşamasında şekillenen tekal tip fibroblast benzeri hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında da pozitif claudin-5 immunreaksiyonu bulundu. Çalışmamızda kedi ovaryumunun çeşitli hücrelerinde claudin-5'in nükleer ve sitoplazmik yerleşimlerinin saptanması, claudin-5'in sadece endotel spesifik bir TJ proteini olmadığını ve insanda bildirildiği gibi (86, 89) dokuya özgü ekspresyon örnekleri sergilediğini ifade edebilir.

Korpus luteum, memelilerde östrus siklusu boyunca dönüşümlü olarak üretilen ve dejenerasyona uğrayan, bu nedenle de gebeliğin devam etmesinde merkezi bir rol oynayan endokrin fonksiyonlu aktif bir bez olarak kabul edilir (118). Korpus luteum, fibroblastlar, immun hücreler ve perisitlerin yanı sıra esas olarak endotel hücreleri, granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerinden oluşur. Primatlar dışındaki memelilerde granüloza lutein hücreleri büyük steroidojenik luteal hücreler, teka lutein hücreleri ise küçük steroidojenik luteal hücreler olarak adlandırılır. Granüloza lutein hücreleri progesteronun büyük miktarlarda üretimi için gerekli olan besin maddelerini, oksijeni ve hormon ön maddelerini (prekürsör) sağlamak üzere proksimal kan damarlarının filizlenmesine neden olarak anjiyogenezi başlatabilme yeteneğindedirler (119). Progesteron sentezi için gerekli anjiyogenez ile birlikte, luteal damarların geçirgenliği de sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Bu düzenleme besin, oksijen ve hormon ön maddelerinin dokuya girmesini ve aynı zamanda progesteronun dokudan damarlara serbest bırakılmasını sağlar. Korpus luteumun gelişimi için vazgeçilmez bir ön şart olan vasküler geçirgenlik endotel hücreleri tarafından kontrol edilir. Geçirgenlik endotel hücreleri arasındaki AJs ve TJs ile sağlanır (1, 120, 121). Korpus luteumda farklı adezyon moleküllerinin bulunduğu bilinmektedir. Bunlar, TJ proteinlerinden occludin, claudin-1 ve claudin-5, AJ proteinlerinden ise VE-cadherin'dir (15, 117). Bu moleküllerin dağılımı doğal olarak korpus luteumun çeşitli bölmelerinde farklılık gösterir. İnsan korpus luteumunda occludin'in granüloza ve teka lutein hücrelerinin etrafındaki kapıların endotel hücrelerinin ve ayrıca granüloza lutein hücrelerinin membranlarında bulunduğu ancak, teka lutein hücrelerinde bulunmadığı bildirilmektedir (15). Claudin-1'in ise özellikle granüloza lutein hücrelerinin membranında bulunduğu, occludin'in aksine kemer tarzında olmayıp membranın bazı kısımlarında eksprese olduğu belirtilmektedir. Ayrıca erken luteal faz sırasında

granüloza lutein hücrelerinde claudin-1'in dağılımının orta ve geç luteal fazlara göre daha az organize olduğu, luteal gerilemeden sonra claudin-1'in az sayıdaki granüloza hücresinin sitoplazmasında bulunduğu bildirilmektedir (15). Bunların yanı sıra claudin-1'in korpus luteumda endotel hücrelerinde bulunmadığı da belirtilmektedir (15). İnsan korpus luteumundakine benzer olarak (15) kedi ovaryumundaki korpus luteumda da büyük lutein hücreler olarak da tanımlanan granüloza hücrelerinin bazılarının membranlarında claudin-1'in kesintili biçimde eksprese olduğu ve yine insanda bildirildiği gibi (15), kedi korpus luteumunda da bu ekspresyonun korpus luteum şekillenmeye başladığı luteal fazın PP1 evresinde ve korpus luteumun büyümesiyle karakterize olan PP2 evresinde belirgin olduğu, regresyonun gerçekleştiği dönemler olan PP3 ve PP4 evrelerinde ise kaybolduğu tespit edildi. Bu bulgular korpus luteumun tam işlevsel duruma ulaştığında TJs'ların dağılım ve organizasyonlarının tamamlandığının kanıtı olabilir. Ayrıca luteal gelişim ve regresyon sürecinde claudin-1'in ekspresyonundaki farklılık da, progesteron ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi kilit steroidojenik hücre moleküllerinin salınmasını kolaylaştırmada claudin-1'in fonksiyonel bir öneme sahip olduğunu gösterebilir. Luteal regresyon, farklı hücresel bölmelerin yeniden modellenmesi ile ilişkilidir. Bu gibi yeniden doku modellenmesini başlatmak için hücre bağlantılarının kaybı, granüloza lutein hücre bölmesindeki kılcal damarların işgalini ve genişlemesini sağlayan hücre içi boşluğu gevşetmek için ilk adım olarak gerekebilir (122).

Çalışmamızda kedinin korpus luteumunda hem küçük teka lutein hücrelerinin hem de granüloza hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarının claudin-1 için pozitif immunreaksiyon sergiledikleri de gözlemlendi. Korpus luteumda claudin-1'in ekspresyonuna ilişkin insanda yapılmış sadece bir çalışma bulunmakta olup (15), bu çalışmada da claudin-1'in çekirdekteki yerleşimi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız kedi ovaryumunda korpus luteumda claudin-1'in nüklear yerleşimini gösteren ilk çalışma olup luteal fazın tüm evrelerinde claudin-1'in nüklear ve sitoplazmik yerleşimi bu proteinin luteal gelişim sürecinde luteal hücrelerin proliferasyonunda ve luteal regresyon sürecinde ise luteal hücrelerin apoptozunda görevli olabileceğini düşündürmektedir. İnsan korpus luteumunda bildirilenin (15) aksine, bulgularımız claudin-1'in luteal fazın özellikle PP1 ve PP2 evrelerinde daha kuvvetli olmak üzere luteal hücreler arasında bulunan kapilar damarların endotel hücrelerinin çekirdeklerinde eksprese olduğunu göstermektedir.

Kısrak (123), ipek maymunu (124), domuz (125), koyun (126, 127), sığır (128, 129), insan (130), makak (131), tavşan (132) ve sıçan (133, 134) ovaryumlarında yapılan çalışmalar endotel hücre çoğalmasının korpus luteum oluşumunda en yüksek olduğunu, daha sonra orta luteal fazda ve korpus luteumun regresyonu sırasında azaldığını veya düşük kaldığını ortaya koymuştur. Bu bilgilerin ışığında, kedi ovaryumunda luteal gelişim sürecinde endotel hücrelerinin çekirdeklerinde özellikle PP1 ve PP2 evrelerinde görülen kuvvetli nükleer claudin-1 ekspresyonunun endotel hücrelerinin proliferasyonu ile ilişkili olabileceği fikrini ileri sürülebiliriz.

Claudin-5'in ovaryumun korpus luteumunda ekspresyonu sadece insan (15, 117) ve ipek maymununda (17) incelenmiştir. Claudin-5'in insanda (15, 117) granüloza ve lutein hücrelerinde bulunmadığı, ancak korpus luteumun teka ve granüloza kompartımanlarındaki damarların endotel katmanlarında bulunduğu ifade edilmiştir. İpek maymununda da erken luteal fazda granüloza kompartımanına penetre olmaya başlayan teka kompartımanına ait kapılarda bulunduğu, orta luteal fazda claudin-5'in tüm luteal damarlarda aynı boyanma örneğini sergilediği rapor edilmiştir (17). İnsan (15, 117) ve ipek maymununda (17) lutein hücreleri için bildirilenlerden farklı olarak kedi ovaryumundaki immunohistokimyasal bulgularımız claudin-5'in PP1 ve PP2 evresinde lutein hücrelerinin sitoplazmalarında, çekirdek membranlarında ve hücre membranlarında yerleştiğini, PP3 evresinde luteal hücrelerde tip 1 ve tip 2 vakuollerin sitoplazmayı işgal etmesi sonucu claudin-1'in sınırlı sitoplazmik alanda bulunduğunu ve membransel reaksiyonun belirgin olmadığını, PP4 evresinde ise luteal hücrelerde claudin-5 immunreaksiyonunun tip 2 vakuol etrafında ince bir halka şeklindeki sitoplazmada ve zayıf olarak çekirdek membranında bulunduğunu göstermektedir. Bu bulgular kedi ovaryumunda luteal faz süresince korpus luteumda claudin-5'in luteal hücrelerde eksprese olduğunu ve ekspresyonun korpus luteumun oluşumu ve regresyonu süresince oluşan morfolojik değişikliklere paralel olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Claudin-5'in luteal hücrelerde farklı subsellüler lokalizasyonlar göstermesinin nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte, bu TJ proteininin hem luteal hücrelerin birbirine bağlanmasından ve aynı zamanda luteal hücrelerinin proliferasyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülebilir.

İnsan (15, 117) ve ipek maymununda (17) rapor edildiği gibi kedi ovaryumunun luteal damarlarının endotel hücrelerinde claudin-5'in bulunduğu tespit edildi. Bu memelilerde



claudin-5'in damar endotellerinin membranlarında eksprese olduğu gösterildiği halde çalışmamızda, luteal fazın PP1 ve PP2 evrelerindeki luteal damarların endotel hücrelerinin çekirdeklerinde kuvvetli, PP3 evresinden itibaren azalan ve PP4 evresinde ise zayıf ya da negatif olan claudin-5 ekspresyonunun bulunduğu gözlemlendi. Claudin-5, endotel hücrelerinin temas-inhibisyonunda rol oynar; böylece endotel hücresi çoğalmasını ve damarların stabilize edilmesini azaltır. Endotel hücreleri komşu hücrelerle temasa geçtiği anda yapışma molekülleri birbirine bağlanır ve hücreler VEGF'ün proanjyogenik etkisinden daha az etkilenir hale gelir (17). VEGF endotel hücrelerinden claudin-5 salınmasını artırır böylece damar geçirgenliği de artar (117, 122). Claudin-5 ayrıca endotel hücrelerinin motilitelerinin düzenlenmesine de katılır (90). Bu bilgilerin ışığında kedi ovaryumunda luteal damar endotellerinde claudin-5'in damar geçirgenliğinin ve aynı zamanda damar endotellerinin proliferasyonu ve motilitelerine (90) katılarak luteal gelişim sürecinin önemli bir aşaması olan anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Ovaryum stromasının seksüel siklusa bağlı olarak değişimler gösterdiği ve fibroblast benzeri hücrelerin özellikle stromal interstisyel hücrelere farklılaşarak ovaryumlarda steroid hormonların sentezine katıldığı bilinmektedir (135). Memeli ovaryumlarında claudin-1 ve claudin-5'in ovaryumda stromal ve tekal tip interstisyel hücrelerde, fibroblastlarda ve düz kas hücrelerinde eksprese olduğuna ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamasıyla birlikte, kedi ovaryumunda her iki TJ proteininin stromal ve tekal tip interstisyel hücrelerin membranları, çekirdekleri ve sitoplazmalarında bulunduğu, ayrıca stromadaki bazı fibroblast benzeri hücrelerin çekirdeklerinde, makrofajların ve düz kas hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında, ayrıca korteks ve medulladaki kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde bulunduğu saptandı. Genel olarak bağdoku fibroblastlarında TJs'in bulunmadığı bildirilmesine karşılık (136), kalp kasındaki bazı fibroblastlarda (137) claudin-5'in eksprese olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca claudin-1'in de akciğerde hava yollarında düz kas hücrelerinin hücre membranında bulunmadıkları ancak çekirdek ve sitoplazmada yerleştikleri bildirilmiştir (138). Bu literatür bilgilere (136–138) ve kedide ovaryum stromasının çeşitli hücresel bileşenlerinde claudin-1 ve claudin-5'in eksprese edildiğini gösteren immunhistokimyasal bulgularımıza dayanarak her iki TJ proteininin sadece epitel ve endotel hücrelerine spesifik olmadıklarını diğer hücreler tarafından da ifadelendiklerini ileri süreriz.

Sonuç olarak, bu çalışma TJ proteinlerinden claudin-1 ve claudin-5'in kedi ovaryumunda östrus siklusunun inaktif, foliküler ve luteal dönemleri boyunca germinatif epitel, oositler, foliküler (granüloza ve teka hücreleri) ve luteal hücreler, stromal ve tekal tip interstisyel hücreler, fibroblast-benzeri stromal hücreler, düz kas hücreleri ve kan damarı endotel ile düz kas hücrelerinin sitoplazma veya çekirdeklerinde eksprese edildiğini ortaya koyan ilk çalışmadır. Claudin-1 ve claudin-5'in ekspresyonlarının ve özellikle hücreler ve subsellüler lokalizasyonlarının ovaryumdaki yapısal değişikliklere ve hücrelere göre değiştiğini gösteren bulgularımız, TJ proteinlerinin kedi ovaryumunda oogenez, folikülogenez, foliküler atrezi, korpus luteumun oluşumu ve gerilemesi ile steroid sentezini de içine alan fizyolojik süreçlerde işlevi olduğunu kanıtları olabilir.

## 6.KAYNAKLAR

1. Dejana E. Endothelial cell –cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 261–270
2. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1213–C1228
3. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 42: 221–242
4. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013; 93: 525–569
5. Krause G, Winkler L, Mueller SL, et al. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 631–645
6. Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE, et al. Differential gene expression in ovarian carcinoma: Identification of potential biomarkers. *Am J Pathol* 2004; 165: 397–414
7. Mullin JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool* 1997; 279: 484–489
8. Mullin JM. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci STKE* 2004; 2004: pe2.
9. Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 17–28.
10. Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer* 2004; 108: 374–383

11. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 1765–1776
12. Akasaka H, Sato F, Morohashi S, et al. Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer* 2010; 10: 548
13. Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, et al. Claudin promotes activation of promatrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 2001; 276: 28204–28211
14. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006; 6: 186
15. Groten T, Fraser HM, Duncan WC, et al. Cell junctional proteins in the human corpus luteum: changes during the normal cycle and after HCG treatment. *Hum Reprod* 2006; 21: 3096–3102
16. Kitajima Y, Endo T, Nagasawa K, et al. Hyperstimulation and a gonadotropin-releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. *Endocrinology* 2006; 147: 694–699
17. Rodewald M, Herr D, Fraser HM, et al. Regulation of tight junction proteins occludin and claudin 5 in the primate ovary during the ovulatory cycle and after inhibition of vascular endothelial growth factor. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 781–789
18. Mora J, Franks S, Hardy K. Leaky ovaries: Tight junction expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 2011; 8: 664
19. Mora JM, Fenwick MA, Castle L, et al. Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 2012; 86: 1–14.
20. Zhu Y, Maric J, Nilsson M, et al. Formation and barrier function of tight junctions in human ovarian surface epithelium. *Biol Reprod* 2004; 71: 53–59
21. Bristol-Gould S, Woodru TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006; 66: 5–13
22. WEB\_1 (2010) [<http://www.different-cat-breeds.com/popular-cat-breeds.html>], Erişim Tarihi: 11.05.2016



23. MacDonald ML, Rogers QR, Morris JG. Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore. *Annu Rev Nutr* 1984; 4: 521–562
24. Wade, N (29 June 2007). Study Traces Cat's Ancestry to Middle East. *New York Times* (New York: NYTC), Erişim Tarihi: 11.05.2016
25. O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, et al. State of cat genomics. *Trends Genet* 2008; 24: 268–279
26. Swanson W. Research in nondomestic species: Experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids. *İlar J* 2003; 44: 307–316
27. Root M. Early spay neuter in the cat: Effect on development of obesity and metabolic rate. *Vet Clin Nutr* 1995; 2: 132–134
28. Root MV, Johnston SD, Olson PNS. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 429–433
29. Priedkalns J. Female reproductive sytem. In: Dieter Dellman H, Brown EM (eds), *Textbook of Veterinary Histology*. 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia 1987: p 313–339
30. Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim Reprod Sci*. 2007; 91: 2–22
31. Reynaud K, Gicquel C, Thoumire S, et al. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. *Reprod Dom Anim* 2009; 44: 174–179
32. Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord* 2002; 3: 5–12
33. Peters H, McNatty KP. The ovary: A correlation of structure and function in mammals. In: *Morphology of the Ovary*. 1st ed. Granada Publishing, Great Britain; 1980: p 12–35
34. Peters H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol* 1969; 62: 98–116

35. Merchant-Larios H, Chimal-Monroy J. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Prog Clin Biol Res* 1989; 296: 55–63
36. Picton HM. Activation of follicle development: The primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 55: 1193–1210
37. Chun SY, Hsueh AJW. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 63–75
38. Carrijo Jr OA, Marinho AP, Campos AA, et al. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs* 2010; 191: 152–160
39. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994; 50: 653–663
40. Jivago JLPR. Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas. Master of Science Thesis. University of Brasilia: Graduation Program in Animal Biology, 2012: 59
41. Silva-Santos KC, Santos GM, Siloto LS, et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology* 2011; 76: 1051–1057
42. Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AA, Porfirio EP, Bao SN. Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 33–37
43. Lucci CM, Rumpf R, Figueiredo JR, Bao SN. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology* 2002; 57: 1467–1483
44. Domingues SFS, Diniz LV, Furtado SHC, et al. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amaz* 2004; 34: 495–501
45. Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues APR, et al. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci* 1999; 56: 223–236

46. Land RB. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and finnish landrace cross blackface and welsh sheep. *J Reprod Fertil* 1970; 21: 517–521
47. Erickson BH. Radioresponse of pre-puberal porcine ovary. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1967; 13: 57–67
48. Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, et al. Biology and biotechnology of follicle development. *Sci World J* 2012; 2012: 938138–938152
49. Young JM McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 2010; 140: 489–504
50. McGeady TA, Quinn PJ, Fitzpatric ES, Ryan MT, Cahalan S. *Veterinary Embryology* (1st ed), Blackwell Publishing, Oxford 2006: 10–16
51. Jewgenow K, Amelkina O, Painer J, Göritz F, Dehnhard M. Life cycle of feline Corpora lutea: histological and intraluteal hormone analysis. *Reprod Domest Anim* 2012; 47: 25–29
52. Amelkina O, Braun BC, Dehnhard M, Jewgenow K. The corpus luteum of the domestic cat: Histologic classification and intraluteal hormone profile. *Theriogenology* 2015; 83: 711–720
53. Feldman EC, Nelson RW. Feline reproduction. In: Kersey R, LeMelledo D (eds), *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd ed. Missouri: Saunders, 2004: p 1016–1043
54. Brown JL. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim Reprod Sci* 2011; 124:155–162
55. Wildt DE, Brown JL, Swanson WF. *Cats. Encyclopedia of Reproduction Volume 1*. New York, NY: Academic Press, 1999: 497–510
56. Shille VM, Lundstrom KE, Stabenfeldt GH. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol Reprod* 1979; 21:953–963
57. Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 39:73–90

58. Feldman EC, Nelson KW. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 1996: 741–768
59. Concannon PW, Verstegen J. Pregnancy in dogs and cats. In: Knobil E, Neill JD (eds), Encyclopedia of Reproduction Volume 3. New York, NY: Academic Press, 1999: p 970–979
60. Chatdarong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C. Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of the domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology* 2004; 62:1027–1041
61. Feldman EC, Nelson RW. Feline reproduction. In: Kersey R, LeMelledo D (eds), Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3rd ed. Missouri: Saunders, 2004: p 1016–1043
62. Tsutsui T, Stabenfeldt GH. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47: 29–35
63. Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* 1981; 25: 15–28
64. Paape SR, Shille VM, Seto H, Stabenfeldt GH. Luteal activity in the pseudopregnant cat. *Biol Reprod* 1975; 13:470–474
65. Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, et al. Regulation of progesterone during pregnancy in the cat: studies on the roles of corpora lutea, placenta and prolactin secretion. *Journal of Reprod Ferti Suppl* 1993; 47:165–173
66. Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, et al. Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 44: 373–381
67. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285–293
68. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539–1550



69. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 42: 221–242
70. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013; 93: 525–569
71. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004; 117: 2435–2447
72. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 403–429
73. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1–44
74. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999; 147: 891–903
75. Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem* 2007; 282: 30005–30013
76. Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156: 1099–1111
77. Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 531–536
78. Blanchard AAA, Watson PH, Shiu RPC, et al. Differential expression of claudin 1, 3, and 4 during normal mammary gland development in the mouse. *DNA Cell Biol* 2006; 25: 79–86
79. Blanchard A, Shiu R, Booth S, et al. Gene expression profiling of early involuting mammary gland reveals novel genes potentially relevant to human breast cancer. *Front Biosci* 2007; 12: 2221–2232
80. Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S. Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2103–2108

81. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005; 65: 9603–9606
82. Shu Y, Yoon CH, Kim RK, et al. Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene* 2013; 32: 4873–4882
83. Ohkubo T, Ozawa M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* 2004; 117: 1675–1685
84. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev* 2001; 22: 255–288
85. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, et al. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1532–C1542
86. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 1999; 147: 185–194
87. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967; 34: 207–217
88. Wang F, Daugherty B, Keise LL, et al. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 62–70
89. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 511–516
90. Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. Claudin-5 participates in the regulation of endothelial cell motility. *Mol Cell Biochem* 2012; 362: 71–85
91. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Wang ZF. Claudin-5 as an immunohistochemical marker for angiosarcoma and hemangioendotheliomas. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1848–1856

92. Jakab Cs, Halász J, Kiss A, et al. Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol Histopathol* 2009; 24: 801–813
93. Moll R, Sievers E, Hammerling B, et al. Endothelial and virgular cell formations in the mammalian lymph node sinus: endothelial differentiation morphotypes characterized by a special kind of junction (complexus adherens). *Cell Tissue Res* 2009; 335: 109–141
94. Crossmon GA. Modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937; 69: 33–38
95. Wang W, Liu HL, Tian W, et al. Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11: 307–314
96. Da Silva-Buttkus P, Jayasooriya GS, Mora JM, et al. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *J Cell Sci* 2008; 121: 3890–3900
97. Carnegie JA, Byard R, Dardick I, Tsang BK. Culture of granulosa cells in collagen gels: the influence of cell shape on steroidogenesis. *Biol Reprod* 1988; 38: 881–890
98. Huang S, Ingber DE. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* 2000; 261: 91–103
99. Ben-Ze'ev A. Animal cell shape changes and gene expression. *Bioessays* 1991; 13: 207–212
100. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276: 1425–1428
101. Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E101–E108
102. Cavey M, Lecuit T. Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a002998

103. Thery M, Bornens M. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 648–657
104. Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 1993; 123: 1777–178
105. Zhu Y, Brannstrom M, Janson PO, Sundfeldt K. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium compared with epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *Int J Cancer* 2006; 118: 1884–1891
106. French AD, Fiori JL, Camilli TC, et al. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* 2009; 6: 93–101.
107. Lee J-W, Hsiao W-T, Chen H-Y, et al. Upregulated claudin-1 expression confers resistance to cell death of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2010; 126: 1353–1366
108. Auersperg N, Wong AST, Choi K-Y, et al. Ovarian surface epithelium: Biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001; 22: 255–288
109. Albertini DF, Anderson E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J Cell Biol* 1974; 63: 234–250
110. Anderson E. The localization of acid phosphatase and the uptake of horseradish peroxidase in the oocyte and follicle cells of mammals. In: Biggers JD, Schuetz AW (eds), *Oogenesis*. Baltimore: University Park Press, 1972: p 87–117
111. Amsterdam A, Josephs R, Lieberman ME, Lindner HR. Organization of intramembrane particles in freeze-cleaved gap junctions of rat graafian follicles: optical-diffraction analysis. *J Cell Sci* 1976; 21: 93–105
112. Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, et al. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol Reprod* 2012; 86: 37

113. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 2002; 123: 613–620
114. Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumors. *Histopathol* 2005; 46: 551–560
115. Soini Y, Talvensaari-Mattila A. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 in ovarian tumors of diverse types. *Int J Gynecol Pathol* 2006; 25: 330–335
116. Turunen M, Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Santala M. Claudin-5 overexpression correlates with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2009; 29: 5185–5189
117. Herr D, Fraser HM, Konrad R, et al. Human chorionic gonadotropin controls luteal vascular permeability via vascular endothelial growth factor by down-regulation of a cascade of adhesion proteins. *Fertil Steril* 2013; 99: 1749–1758
118. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev.* 2007; 28: 117–149
119. Fraser HM, Lunn SF. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 2001; 121: 355–362
120. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004; 84: 869–901
121. Walz A, Keck C, Weber H, Kissel C, Pietrowski D. 2005 Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on corpus luteum cells in a spheroid cell culture system. *Mol Reprod Develop* 2005; 72: 98–104
122. Herr D, Bekes I, Wulff C. Regulation of endothelial permeability in the primate corpora lutea: implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *Reproduction* 2015; 149: R71–R79
123. Al-Zi'abi MO, Fraser HM, Watson ED. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction.* 2002; 23: 67–77
124. Young FM, Rodger FE, Illingworth PJ, Fraser HM. Cell proliferation and vascular morphology in the marmoset corpus luteum. *Hum Reprod.* 2000; 15: 557–566



125. Ricke WA, Redmer DA, Reynolds LP. Growth and cellular proliferation of pig corpora lutea throughout the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 369–377
126. Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 1993; 133: 1871–1879
127. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2001; 65: 879–889
128. Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am J Pathol* 1995; 147: 339–351
129. Amselgruber WM, Schafer M, Sinowatz F. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Anat Histol Embryol* 1999; 28: 157–166
130. Rodger FE, Young FM, Fraser HM, Illingworth PJ. Endothelial cell proliferation follows the mid-cycle luteinizing hormone surge, but not human chorionic gonadotrophin rescue, in the human corpus luteum. *Hum Reprod* 1997; 12: 1723–1729
131. Christenson LK, Stouffer RL. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Endocrinology* 1996; 137: 367–374
132. Nicosia SV, Diaz J, Nicosia RF, Saunders BO, Muro-Cacho C. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25: 143–157
133. Tamura H, Greenwald GS. Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. *Biol Reprod* 1987; 36: 1149–1154
134. Meyer GT, Bruce NW. Quantitative cell changes and vascularisation in the early corpus luteum of the pregnant rat. *Anat Rec* 1980; 197: 369–374
135. Quattropani SL. Morphogenesis of the ovarian interstitial tissue in the neonatal mouse. *Anat Rec* 177: 569–583

136. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 1998; 143: 391–401
137. Swager SA, Delfin DA, Rastogi N. Claudin-5 levels are reduced from multiple cell types in human failing hearts and are associated with mislocalization of ephrin-B1. *Cardiovasc Pathol* 2015; 24: 160–167
138. Fujita H, Chalubinski M, Rhyner C. et al. Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1612–1621



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nermin ATEŞ

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.01.1989, TOKAT/ MERKEZ

Medeni Durumu: Bekar

Tel: 05378599262

Fax: -

email: nermin\_ates60@hotmail.com

Yazışma

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	-
Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	19. 06. 2013
Lise	Mehmat Akif Ersoy Lisesi (YDA) Tokat	2008

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2103-2014	Kayseri Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü	Veteriner Hekim
2015	Hacıbey Et ve Gıda San	Veteriner Hekim
2016	Mutki İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müd.	Veteriner Hekim (4B)

### YABANCI DİL

İngilizce

### YAYINLAR

-