

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ۴: از ۱-۷
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

تغییرات بیان اینتگرین‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، αv ، $\beta 3$ و لیگاند آن‌ها استئوپوننتین در مراحل مختلف چرخه استروس موش

فاطمه پیغمبری^۱، مژده صالح‌نیا^{۲*}، مجتبی رضازاده‌ولوجردی^۳، مهدی فروزنده^۴

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۲

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵

چکیده

هدف: با توجه به اهمیت مولکول‌های اینتگرین در لانه‌گزینی و عدم اطلاعات کافی در الگوی بیان این مولکول‌ها در مراحل مختلف چرخه استروس بررسی این مولکول‌ها در اندومتر موش طی مراحل مختلف چرخه استروس ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: حیوانات مورد مطالعه در این تحقیق موش‌های بالغ نژاد NMRI تعداد ۱۵ سر با سن ۶-۸ هفته بودند. ابتدا مراحل مختلف چرخه استروس پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس از طریق بررسی سلول‌شناسی اسمیر واژینال تعیین شد. موش‌ها به تعداد حداقل سه رأس در هر مرحله با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و نمونه بافتی از $\frac{1}{3}$ میانی هر یک از شاخ‌های رحمی در هر مرحله تهیه شد، سپس نمونه‌ها به دستگاه کرایواستات منتقل شده و برش‌هایی به ضخامت ۸-۱۰ میکرون از آن‌ها تهیه شد. این لام‌ها برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی و ارزیابی بروز اینتگرین‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، αv ، $\beta 3$ و لیگاند آن‌ها استئوپوننتین به کار گرفته شدند.

نتایج: مطابق یافته‌ها بیان مولکول‌های اینتگرین در اندومتر موش تنها در مرحله متاستروس مثبت بود و در مکان‌های متفاوتی از اندومتر بیان شد. اینتگرین αv تنها در پوشش غددی و اینتگرین $\beta 3$ فقط در غشای قاعده‌ای هر دو نوع پوشش خود را نشان داد در حالی که بیان $\alpha 4$ برای هر دو نوع پوشش و هر دو غشاء مثبت بود. $\beta 1$ تنها اینتگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی و هم در استروما ملاحظه شد. استئوپوننتین فقط در غشای رأسی هر دو پوشش دیده شد و در نقاط دیگر اندومتر دیده نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ظهور اینتگرین‌ها در اندومتر براساس اهمیت و اولویت نقش آن در پدیده لانه‌گزینی باشد، بنابراین مولکول‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ و استئوپوننتین که در پوشش سطحی بیان می‌شوند، می‌توانند در اتصال و چسبندگی سلول به سلول و اینتگرین‌های αv ، $\beta 3$ و $\beta 1$ که در پوشش غددی و استروما بیان می‌شوند، می‌توانند در گسترش و نفوذ جنین مداخله کنند.

کلیدواژگان: اندومتر، اینتگرین، چرخه استروس، ایمونوهیستوشیمی

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

۱- مقدمه

لقاح، لانه‌گزینی و تشکیل جفت رویدادهای دینامیکی هستند که در آن‌ها ارتباطات پیچیده سلول‌ها با یکدیگر و سلول با ماتریکس (Matrix) خارج سلولی مطرح می‌شوند [۱]. اتصال ماتریکس خارج سلولی به سلول نیاز به پروتئین‌های اتصال عرض غشاء دارد که به‌عنوان گیرنده عمل می‌کنند. مولکول‌های اینترگرین (Integrin) گیرنده‌های گلیکوپروتئینی عرض غشاء هستند و ساختمان هتروداایمریک (زنجیره α و زنجیره β) با اتصال غیرکووالانسی دارند و در تمام مراحل باروری، لقاح، لانه‌گزینی و تکوین جفت مداخله می‌کنند [۲]. اینترگرین‌ها عملکردهای متفاوتی در انواع سلول‌ها دارند. در سلول‌هایی از جمله پوششی، اندوتلیالی یا عضلانی بقای سلولی بسته به ارسال علامت (Signal) از طریق اینترگرین‌ها است، بنابراین در یک جمله می‌توان گفت اینترگرین‌ها به‌عنوان مبدل‌های علامتی عمل می‌کنند و مسیر پیام‌های درون سلولی متفاوتی را هنگام فعال شدن به‌دنبال اتصال به ماتریکس خارج سلولی، تحریک می‌کنند [۱].

بروز کلاس‌های متفاوت اینترگرین در مراحل مختلف واکنش‌های سلولی به عوامل متعددی بستگی دارد. گونه جانوری، نحوه لانه‌گزینی و ماهیت هورمون‌های جنسی از جمله عوامل تأثیرگذار روی بیان اینترگرین‌ها است [۱]. بیان اینترگرین اندومتری (Endometrial integrin) در گونه‌های مختلف متفاوت بوده و در خود یک گونه نیز در زمان‌های مختلف یک چرخه مشابه نیست. بروز این هتروداایمرهای گلیکوپروتئینی ارتباط نزدیکی با بلوغ بافتی اندومتر دارد [۳]. تحقیقات نشان داد که بروز اینترگرین‌ها در زمان لانه‌گزینی گونه‌های مختلف تابع الگوی متفاوتی است [۴] به‌عنوان مثال در انسان و پریمات‌ها نشان داده شده که بیان سه مولکول اینترگرینی $\alpha 1\beta 1$ و $\alpha 4\beta 1$ ، $\alpha v\beta 3$ طی چرخه تولیدمثلی تحت تأثیر هورمون‌های تخمدانی است و در بیماران نازا در دریچه لانه‌گزینی کاهش بیان $\beta 3$ و $\alpha 1$ ملاحظه شد [۴، ۵]؛ اما کیمینس (Kimmins) نشان داد در مدل نشخوارکنندگان

برخلاف سایر موجودات بیان این مولکول‌ها در پنجره لانه‌گزینی تفاوتی با سایر زمان‌ها ندارد [۶]. برای اتصال اینترگرین به ماتریکس خارج سلولی نیاز به لیگاندهای ویژه‌ای از جمله کلاژن IV (Collagen IV)، فیبرونکتین (Fibronectin)، لامینین (Laminin) و استئوپونتین (Osteopontin: OPN) است [۲] و از میان آن‌ها OPN به‌عنوان یکی از مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی است که در بیشتر موجودات دیده شد [۷]. OPN در سلول‌های پوششی، ترشحات لوله گوارش، کلیه، تیروئید، پستان، بیضه‌ها، لکوسیت‌ها، سلول‌های عضله صاف و برخی از سلول‌های توموری نیز دیده می‌شود [۸] در سیستم تناسلی، OPN به‌وسیله سلول‌های مرحله ترشحي اندومتر، تروفوبلاست (Trophoblast) مهاجم و جفت ترشح می‌شود [۷، ۸]. در تحقیقات مشخص شده که OPN تحت تأثیر پروژسترون از پوشش غده‌ای رحم ترشح شده و لیگاند آن $\alpha v\beta 3$ در پوشش سطحی است [۹، ۱۰].

با توجه به اهمیت لانه‌گزینی جنین و نیاز به اطلاعات بیشتر برای پراکندگی و نقش اینترگرین‌ها در آماده کردن رحم به‌خصوص در پنجره لانه‌گزینی ضرورت بررسی بیان اینترگرین‌ها و لیگاند OPN در مراحل مختلف چرخه استروس (Estrous cycle) مدل موشی احساس می‌شد تا بتوان از اطلاعات حاصل از این تحقیق در مطالعات بعدی به‌منظور بررسی مداخلات هورمون‌های تخمدانی در تغییر الگوی بروز این پروتئین‌های اتصال استفاده نمود.

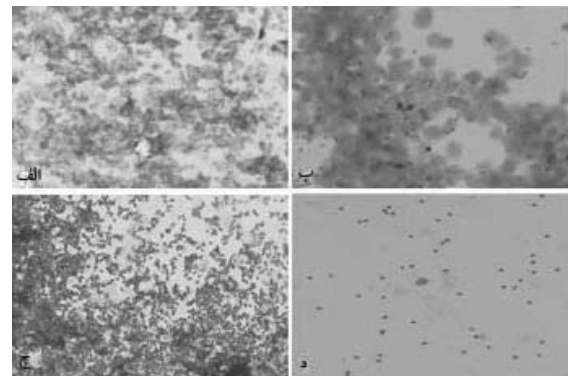
۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌های مورد مطالعه

در این تحقیق از موش‌های سوری ماده بالغ نژاد NMRI با سن ۶-۸ هفته در چهار گروه مربوط به مراحل مختلف چرخه استروس شامل پرو استروس (Proestrous)، استروس، مت استروس (Metestrous) و دی استروس (Diestrous) استفاده شد و در هر گروه حداقل سه رأس موش در نظر گرفته شد.

۲-۲- تعیین مراحل چرخه استروس

مراحل چرخه استروس برای هر موش با بررسی اسمیر واژینال تعیین شد. مراحل چرخه استروس با توجه به نسبت سلول‌های موجود در اسمیر پس از رنگ آمیزی با متیلن بلو (Methylene blue) تعیین شد. هر حیوان براساس سلول‌شناسی اسمیر واژینال در یکی از چهار مرحله پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس طبقه‌بندی شد (شکل ۱).



شکل ۱ سلول‌شناسی اسمیر واژن در مراحل مختلف از چرخه استروس؛ الف: پرواستروس (بزرگنمایی $\times 400$)، ب: استروس (بزرگنمایی $\times 400$)، ج: متاستروس (بزرگنمایی $\times 400$)، د: دی‌استروس (بزرگنمایی $\times 400$)

۲-۳- تهیه نمونه

پس از تعیین مراحل چرخه استروس در هر مرحله تعداد حداقل سه رأس موش در نظر گرفته شد، سپس موش‌ها به طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و یک نمونه بافتی حدود ۲ میلی‌متر از $\frac{1}{3}$ میانی شاخ رحمی به‌منظور مطالعه ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) تهیه شد.

۲-۴- ایمونوهیستوشیمی

برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی لام‌ها بعد از تثبیت شدن با پارافرمالدهید با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شده و سپس به‌ترتیب ۳۰ دقیقه در محلول اسید کلریدریک دو نرمال، ۵ دقیقه در محلول بافر بورات و به‌مدت ۰/۵ ساعت تحت تأثیر محلول تریتون X_{100} (۱۰۰۰ لاندا بافر فسفات، ۳ لاندا تریتون، ۱۰۰ لاندا سرم بز) قرار داده شدند. سپس لام‌ها داخل یک

پتری‌دیش مرطوب قرار گرفته و روی هر لام ابتدا چند قطره از آنتی‌بادی‌های اولیه رقیق شده به‌طور جداگانه قرار داده شد (رقت‌های مورد استفاده برای آنتی‌بادی‌های مختلف عبارت بود از αv ۱:۵۰، $\beta 3$ ۱:۴۰، $\alpha 4$ ۱:۱۰۰، $\beta 1$ ۱:۵۰، OPN ۱:۱۰۰، سپس به‌مدت یک شب کلیه ظروف در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و آنتی‌بادی‌های اضافی با PBS شسته شد. ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با فلوروسین ایزوتیوسیانید (Fluorescein isothiocyanate: FITC) (Anti-Rabbit ۱:۵۰۰)، αv ۱:۵۰ (Anti-Rat) روی هر لام ریخته شد و به‌مدت ۲ ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. بعد از طی ۲ ساعت نمونه‌ها دو بار با PBS شسته و با چسب بافر گلیسرول لام‌ها روی لام قرار داده شد سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی و کنترل داخلی نیز استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- تعیین چرخه استروس

ابتدا اسمیر واژن تهیه شد و مراحل مختلف چرخه استروس براساس نسبت سلول‌های موجود در اسمیر تعیین شد (شکل ۱). در مرحله پرواستروس اکثر سلول‌ها، سلول‌های پوشش گرد و بزرگ هستند و گاهی اوقات آثاری از شاخی شدن در سلول‌ها دیده می‌شود. گاهی اوقات در این مرحله تعداد کمی لکوسیت نیز مشاهده می‌شود. در مرحله استروس اکثر سلول‌ها از نوع سلول‌های پوشش شاخی هستند، سلول‌های مذکور به‌همدیگر وصل شده و ورقه‌های بزرگ سلولی را تشکیل می‌دهند. در مرحله متاستروس سلول‌های شاخی دچار پیکنوز (Pyknosis) شده و تعداد زیادی لکوسیت در اسمیر واژینال دیده می‌شود. در مرحله دی‌استروس تعداد سلول‌های واژینال کم و غالباً لکوسیت هستند.

۳-۲- مشاهدات ایمونوهیستوشیمی

با استفاده از این روش بیان مولکول‌های ایتگرینی $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، αv ، $\beta 3$ و لیگاند OPN در کلیه مراحل چرخه استروس ارزیابی شد. در سه مرحله پرواستروس، استروس و

دی‌استروس این پاسخ منفی بود و تنها در مرحله مت‌استروس مثبت بود. مکان‌های بروز این پروتئین در پوشش سطحی (غشای رأسی و قاعده‌ای)، پوشش غده‌ای (غشای رأسی و قاعده‌ای) و استروما (Stroma) ارزیابی شد که نتایج ایمونوهیستوشیمی آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ بیان اینترگرین‌های αv , $\beta 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$ و OPN در مرحله مت‌استروس موش

استروما	پوشش قاعده‌ای		پوشش سطحی		
	غشای رأسی	غشای قاعده‌ای	غشای رأسی	غشای قاعده‌ای	
	مثبت	مثبت	منفی	منفی	αv
	منفی	مثبت	منفی	مثبت	$\beta 3$
	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	$\alpha 4$
	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	$\beta 1$
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	OPN

مطابق یافته‌های این تحقیق اینترگرین αv تنها در پوشش غددی (غشای رأسی و قاعده‌ای) بیان شد و در پوشش سطحی و استروما بیانی نداشت. اینترگرین $\beta 3$ فقط در غشای قاعده‌ای هر دو نوع پوشش خود را نشان داد و در استروما بیان نشد. بیان $\alpha 4$ برای هر دو نوع پوشش و هر دو غشاء مثبت بود اما در استروما دیده نشد. $\beta 1$ تنها اینترگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی (هر دو نوع غشاء) و هم در استروما ملاحظه شد. بیان OPN فقط در غشای رأسی هر دو پوشش بود و در استروما بیانی نداشت (شکل ۲).

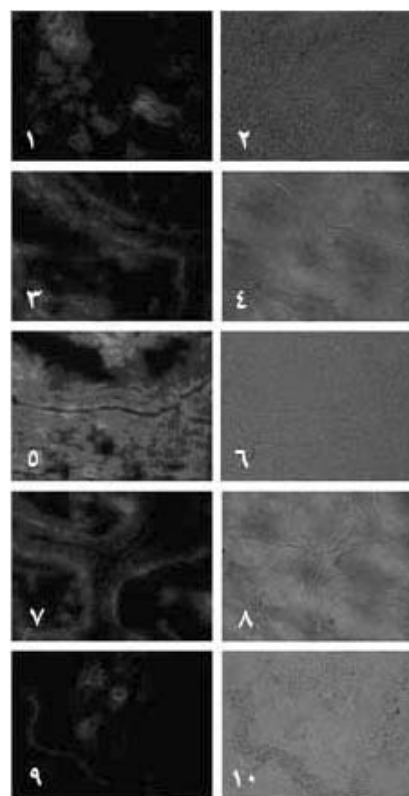
۴- بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که اینترگرین‌ها تنها در مرحله مت‌استروس چرخه استروس بیان شده و در دیگر مراحل دیده نشده است. به نظر می‌آید که با توجه به این‌که فولیکول‌های گراف (Graafian follicle) در اوایل مرحله استروس به بلوغ می‌رسند و تشکیل جسم زرد در مرحله مت‌استروس است این مرحله را می‌توان معادل مرحله ترشچی در سایر موجودات دانست بنابراین بالا بودن میزان هورمون پروژسترون در این مرحله می‌تواند یکی از دلایل القای بیان اینترگرین‌ها در این مرحله باشد.

در تأیید این موضوع فضل‌عباس (Fazleabas) و همکارانش نشان دادند که بیان اینترگرین در رحم میمون تحت کنترل هورمون پروژسترون است [۵].

کروس (Creus) و همکارانش عنوان کردند که بیان اینترگرین $\alpha v\beta 3$ در اندومتر انسان به بلوغ اندومتر بستگی دارد و هورمون‌های جنسی قادرند بر این بیان اثر بگذارند [۱۱].

ون‌ولف (von Wolff) و همکارانش به این نتیجه رسیدند که در اواسط و اواخر دوره ترشح، میزان mRNA مربوط به بیان $\beta 3$ حدود ۵-۱۰ برابر می‌شود در حالی‌که افزایش بیان این زیرواحد اینترگرینی در مرحله تکثیر به این اندازه نبود. این خود می‌تواند بیانگر وابستگی بیان زیرگروه‌های اینترگرینی به هورمون‌های جنسی و اثر این



شکل ۲ ایمونوهیستوشیمی اینترگرین‌های αv (۱، ۳)، $\beta 3$ (۲، ۴)، $\alpha 4$ (۵، ۷)، $\beta 1$ (۶، ۸) و لیگاند آن‌ها OPN (۹، ۱۰)، در مقاطع عرضی بافت اندومتر موش و در مرحله مت‌استروس از چرخه استروس (بزرگنمایی $\times 400$)، لازم به ذکر است که ستون اول مشاهدات با میکروسکوپ فلوروسنت و ستون دوم تصاویر مرحله کنتراست همان برش‌ها در ستون مقابل است.

هورمون‌ها بر اندومتر رحم باشد [۱۲].
 توموس (Thomus) و همکارانش دریافتند که بیان اینتگرین‌ها در اندومتر طی چرخه جنسی در حال تغییر است و در افراد نابارور الگوهای غیرعادی از بروز اینتگرین در رحم دیده می‌شود [۴].

همچنین بخش دیگری از نتایج این تحقیق نشان داد که از نظر مکان بروز، اینتگرین‌های مختلف در مرحله متاستروس تفاوت دارند. اینتگرین αv تنها در پوشش غددی، اینتگرین $\beta 3$ فقط در غشای قاعده‌ای هر دو نوع پوشش و بیان $\alpha 4$ برای هر دو نوع پوشش و هر دو غشاء دیده شد. $\beta 1$ تنها اینتگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی و هم در استروما دیده شد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که مکان‌های متفاوتی از بیان اینتگرین‌ها در اندومتر قابل ملاحظه است که اختلاف در این مکان‌ها نشانه اهمیت و اولویت مولکول در پدیده لانه‌گزینی است.

به نظر می‌رسد مولکول‌هایی که در پوشش سطحی این مرحله بیان شدند از جمله $\alpha 4$ ، $\beta 1$ و OPN، اغلب در اتصال و چسبندگی جنین به اندومتر و اینتگرین‌هایی که در پوشش غددی و استروما بیان شدند (αv ، $\beta 3$ و $\beta 1$) در گسترش و نفوذ جنین به این بافت مداخله می‌کنند.

بنابراین لازمه انجام پدیده لانه‌گزینی تغییرات فنوتیپی اینتگرین‌ها در سطح اندومتر و سلول‌های جنینی است. بدین ترتیب که در زمان نزدیک به لانه‌گزینی اغلب اینتگرین‌های مداخله کننده در اتصال سلول به سلول (برای چسبندگی بیشتر) و در مرحله نفوذپذیری جنین اینتگرین‌های مداخله کننده در اتصالات سلول به ماتریکس خارج سلولی (برای نفوذپذیری بیشتر) مطرح می‌شود.

با توجه به بیان زیرواحدهای اینتگرینی متفاوت در سطح بلاستوسیست‌ها (Blastocysts) و تروفوبلاست‌های جنینی یا به عبارت دیگر تغییرات فنوتیپی اینتگرین‌ها، حضور لیگانندی در سطح مادری که قادر به شناخت طیف وسیعی از این گیرنده‌ها باشد کاملاً ضروری است.

بلور (Bloor) و همکارانش بیان $\alpha 2$ ، $\alpha 3$ ، αv را در

رویان‌های بعد از بلاستوسیست انسانی نشان داده و $\alpha v \beta 3$ را به‌عنوان یک گیرنده در سطح تروفوبلاست‌های ابتدایی معرفی کردند [۱۳].

باساک (Basak) و کین (Qin) نیز مشخص کردند که زیرواحدهای αv ، $\alpha 6$ ، $\alpha 5$ ، $\alpha 4$ ، $\alpha 2$ ، $\beta 1$ و $\alpha 1$ در سلول‌های تروفوبلاست جنینی قبل از جایگزینی بروز می‌کنند [۱۴، ۱۵].

از آنجایی که در بین لیگاندهای اینتگرینی، OPN قادر به برقراری ارتباط با اکثر اینتگرین‌ها است، نسبت به سایر پروتئین‌ها از اهمیت بیشتری در لانه‌گزینی برخوردار است و نتایج نشان داد که OPN تنها در مرحله متاستروس چرخه استروس و آن هم فقط در غشای رأسی هر دو پوشش سطحی و غده‌ای بیان شد. با توجه به تعریفی که قبلاً از این مرحله شد، می‌توان گفت که بیان این لیگاند می‌تواند تحت تأثیر هورمون‌های جنسی به‌خصوص پروژسترون باشد؛ از طرفی با توجه به این‌که جنین در دریچه لانه‌گزینی طیف وسیعی از اینتگرین‌ها را در سطح خود بیان می‌کند که فنوتیپ آن‌ها دائماً در حال تغییر است. حضور OPN آن هم در غشای رأسی هر دو پوشش سطحی و غده‌ای بیانگر واکنش اینتگرین‌های متعدد توسط این لیگاند و نقش این ماتریکس خارج سلولی در مراحل اولیه لانه‌گزینی جنین است.

نفوذپذیری بیشتر مؤثر است [۱۶].

بنابراین براساس یافته‌های این تحقیق به نظر می‌رسد که بیان اینTEGRین‌ها و لیگاندها OPN فقط در مرحله متاستروس از چرخه استروس مدل موشی است. این بیان در سطح رحمی می‌تواند تحت تأثیر هورمون پروژسترون و علائم جنینی در پنجره لانه‌گزینی باشد و به نظر می‌رسد تفاوت در مکان بیان اینTEGRین‌ها و لیگاندها نشان‌دهنده اهمیت‌شان در پدیده لانه‌گزینی است.

۵- تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است؛ بنابراین نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از زحمات کارشناسان آزمایشگاه این گروه جناب آقای پوربیراوند و سرکار خانم ابراهیمی که در تهیه نمونه‌ها و عکس‌برداری ما را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی شود.

۶- منابع

- [1] Jeffery AB, Joan SH. The role of integrins in reproduction. *Biol Med* 2000; 223(4): 331-43.
- [2] Tabibzadeh S. Patterns of expression integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1992; 7(6): 876-82.
- [3] Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle. *J Reprod* 1996; 35(3): 195-204.
- [4] Thomas K, Thomson AJ, Sephton V, Cowan C, Wood S, Vince G, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. The effect of gonadotrophic stimulation on integrin expression in the endometrium. *Hum Reprod* 2002; 17(1): 63-8.
- [5] Fazleabas AT, Bell SC, Flemming A, Sun J, Lessey BA. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 56(2): 348-56.
- [6] Kimmins S, Lim HC, Maclaren LA. Immunohistochemical localization of integrin alpha v beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 19-33.
- [7] Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression and distribution of osteopontin in human tissue: wide spread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1992; 3(10): 1169-80.
- [8] Kreiss T, Vale R. *Gvidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*. Oxford, England, Oxford Univ Press, 1993; p: 76-9.
- [9] Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW. Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol Reprod* 1999; 61(4): 892-9.
- [10] Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Bazer FW. Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. *Biol Reprod* 1999; 61(4): 884-91.
- [11] Creus M, Balasch J, Ordí J, Fábregues F,

- Casamitjana R, Quinto L, Coutifaris C, Vanrell JA. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. *Hum Reprod* 1998; 13(12): 3460-8.
- [12] von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C, Tabibzadeh S, Thaler CJ. Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril* 2001; 76(4): 775-81.
- [13] Bloor DJ, Metcalfe AD, Rutherford A, Brison DR, Kimber SJ. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(3): 237-45.
- [14] Basak S, Dhar R, Das C. Steroids modulate the expression of $\alpha 4$ integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biol Reprod* 2002; 66(6): 1784-9.
- [15] Qin L, Wang YL, Bai SX, Xiao ZJ, Herva R, Piao YS. Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface during tubal implantation. *Reprod* 2003; 126(3): 383-91.
- [16] Hierck BP, Thorsteinsdóttir S, Niessen CM, Freund E, Iperen LV, Feyen A, Hogervorst F, Poelmann RE, Mummery CL, Sonnenberg A. Variants of the alpha 6 beta 1 laminin receptor in early murine development: distribution, molecular cloning and chromosomal localization of the mouse integrin alpha 6 subunit. *Cell Adhesion Commun* 1993; 1(1): 33-53.