

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Turan KARACA

**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA GEBELİĞİN FARKLI
GÜNLERİNDE OVARYUM VE UTERUS
DOKULARINDA ATRİAL NATRİÜRETİK PEPTİD
RESEPTÖR DAĞILIMININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Selim DEMİRTAŞ

Referans no:10025514

EDİRNE – 2014

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Turan KARACA

**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA GEBELİĞİN FARKLI
GÜNLERİNDE OVARYUM VE UTERUS
DOKULARINDA ATRİAL NATRİÜRETİK PEPTİD
RESEPTÖR DAĞILIMININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Selim DEMİRTAŞ

Destekleyen Kurum: TÜBAP

Tez No :

EDİRNE – 2014

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Turan KARACA danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Selim DEMİRTAŞ tarafından tez başlığı “Streptozotosin ile Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Gebeliğin Farklı Günlerinde Ovaryum ve Uterus Dokularında Atrial Natriüretik Peptid Dağılımının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 22/01/2014 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Yüksek Lisans Tezi” olarak kabul edilmiştir.

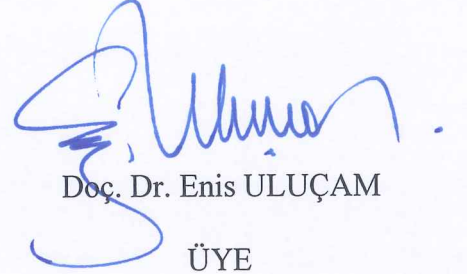


Doç. Dr. Turan KARACA

JÜRİ BAŞKANI

Doç Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

ÜYE



Doç. Dr. Enis ULUÇAM

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana yardımcı olan, tezimin hazırlanmasında büyük desteğini gördüğüm ve öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanımız ve çok değerli Danışmanım Sayın Doç. Dr. Turan KARACA'ya, yetişmemde büyük katkıları olan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'a, Sayın Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a, Yrd. Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR'a, yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e, Uzman Biyolog Ali Eyüp HAYIROĞLU'na, İhsan KARABOĞA'ya, Soner UYSAL'a, TÜBAP'a ve aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| DIABETES MELLİTUS | 3 |
| OVARYUM HİSTOLOJİSİ | 6 |
| UTERUS HİSTOLOJİSİ | 10 |
| SIÇANLARDA MENSTURAL SIKLUS VE GEBELİK | 12 |
| PANKREAS HİSTOLOJİSİ | 13 |
| ATRİAL NATRİÜRETİK PEPTİD | 14 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 20 |
| BULGULAR | 25 |
| TARTIŞMA | 40 |
| SONUÇLAR | 44 |
| ÖZET | 46 |
| SUMMARY | 48 |
| KAYNAKLAR | 50 |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | 56 |
| ÖZGEÇMİŞ | 58 |
| EKLER | 59 |

SİMGE VE KISALTMALAR

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| ACTH | : Adrenokortikotropik Hormon |
| ANP | : Atrial Natriüretik Peptid |
| BNP | : Beyin Natriüretik Peptid |
| CNP | : C-tipi natriüretik peptid |
| cGMP | : Cyclic Guanosine Monophosphate |
| D hücreleri | : Delta Hücreleri |
| DER | : Düz Endoplazmik Retikulum |
| DKA | : Diyabetik Ketoasidoz |
| dl | : Desilitre |
| DM | : Diabetes Mellitus |
| DNP | : Dendroaspis Natriüretik Peptid |
| DSÖ | : Dünya Sağlık Örgütü |
| FSH | : Folikül Stimulan Hormon |
| GDM | : Gestasyonel Diabetes Mellitus |
| GLUT-2 | : Glucose Transporter-2 |
| H+E | : Hematoksilen + Eozin |
| HCG | : Human Chorionic Gonadotropin |
| IGF-1 | : Insulin-Like Growth Factor-1 |
| kg | : Kilogram |
| LH | : Lüteinizan Hormon |

| | |
|---------------------------------|---|
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mm² | : Milimetre Kare |
| NAD | : Nikotinamid Adenin Dinukleotit |
| NO | : Nitrik Oksit |
| NEP | : Nötral Endopeptidaz |
| NPR-A | : Natriüretik Peptid Reseptör A |
| NPR-B | : Natriüretik Peptid Reseptör B |
| NPR-C | : Natriüretik Peptid Reseptör C |
| OMI | : Oosit Maturasyon İnhibitör |
| PAB | : Primary Antibody |
| PBS | : Phosphate Buffer Saline |
| PP Hücreleri | : Pankreatik Polipeptid Hücreleri |
| RAAS | : Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi |
| STZ | : Streptozotocin |
| ZP | : Zona Pellucida |
| α | : Alfa |
| β | : Beta |
| μm | : Micrometre |
| % | : Yüzde |
| ⁰C | : Santigrat |

GİRİŞ VE AMAÇ

Vücutta kan şekeri düzeyinin düzenlenmesi çok sayıda kimyasal madde ve hormonun karmaşık etkileşimi sonucunda sağlanır (1). Şeker metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan hormonlardan en önemlisi, pankreasın endokrin adacık beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonudur. Diabetes mellitus (DM), pankreas beta hücrelerinden insülin salınmasının durması veya yetersizliği ya da hedef hücrelerde insülin reseptör duyarlılığının azalması sonucu oluşan bir hastalıktır. İnsülin salınmadığı diyabet şekli Tip I diyabet olarak ifade edilirken, insülin azlığı ve/veya reseptör duyarlılığının azlığı sonucu oluşan diyabet, Tip II diyabet olarak adlandırılmaktadır (1,2). İnsülin yokluğunun veya insülin reseptör duyarlılığının azaltılmasının glukoz metabolizmasına başlıca etkisi, glukozun birçok hücre tarafından alınımının ve kullanımının engellenmesidir. Bu durumda, kan glukoz konsantrasyonu artar, glukozun kullanımı giderek azalır ve hücreler enerji kaynağı olarak yağları ve proteinleri kullanmaya başlar (3). Hastalığa dair nöropati, retinopati, nefropati ve vasküler patolojilerin hızlanması gibi birçok yan etki bildirilmiştir (4,5).

DM, yukarıda belirtilen tipler dışında başka çeşitlerde de bulunmaktadır. Bunlar gebelikte karşılaşılan gestasyonel diyabet, yenidoğan sonrası oluşan neonatal diyabet ve başka hastalıklarla diyabetin birlikte seyreden diğer tipler'dir (3).

Deneysel hayvan çalışmalarında insandakine benzer diyabet oluşturmak için belli ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlara örnek olarak alloksan ve streptozotosin (STZ) gibi kimyasal maddeler, çeşitli DNA ve RNA virüsleri verilebilir. Bunun dışında transgenik hayvan modelleri yolu ile de çalışmalar yapılmaktadır. Diyabet oluşturmada kullanılanlardan, N nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki STZ, oksidan maddeler meydana getirerek

pankreas Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmekte ve uygun olmayan nitrik oksit (NO) cevapları vererek diyabeti başlattığı düşünülmektedir (3).

Diyabetik hastalarda, vücutta salgılanan hormon düzeylerinin değiştiği bilinmekte hatta bazı diyabet tiplerinde insülin antogonisti hormonların söz konusu hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir (6). Kalp atriyumuna ait miyokardiyal hücrelerin yanısıra birçok organ ve dokudan sentezlendiği bilinen Atrial Natriüretik Peptid (ANP), diyabet sonucu plazma seviyelerinde değişim görülen hormonlardan biridir (7).

ANP de dahil olmak üzere, şu anda bilinen 4 üyesi bulunan natriüretik peptid ailesinin etkilerini gerçekleştirmelerine olanak sağlayan reseptörleri birçok sistem ve bağlı organlarda bulunmaktadır. İlave olarak ANP'nin genital sistem organlarında otokrin ve parakrin etkileri olduğu bildirilmektedir. Gerek gebelik öncesinde, gerekse gebelik boyunca genital sistem dokularında sürekli değişim gösteren ANP konsantrasyonu ve reseptör dağılımı, söz konusu doku ve organların fizyolojisinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir (8,9).

Planlanan bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların ovarium ve uterus dokularında gebeliğin 5. ve 10. günlerinde ANP reseptör dağılımındaki değişimlerin immünohistokimyasal olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

DM, insülin salgısının mutlak veya göreceli eksikliği ya da insülin rezistansı ile oluşan, hiperglisemi ile kendini belli eden, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. DM'un etiyopatogenezi ile ilgili araştırmalar, hastalığın heterojen, hiperglisemi ile karakterize pek çok durumu içine alan bir sendrom olduğunu göstermektedir (3).

DM; Tip 1, Tip 2, diğer türler ve gestasyonel diyabet olarak dört sınıfa ayrılmaktadır (4).

I- Tip-1 Diabetes Mellitus

İnsüline bağımlı diyabet ya da juvenil diyabet olarak da adlandırılmaktadır ve tüm diyabet olgularının %5-10'unu oluşturur (4). Pankreas β hücrelerinin otoimmün aracılıklı yıkımıyla oluşan insülin yetmezliği ile karakterizedir. Bu yüzden hastaların hayatlarını devam ettirmek veya diyabetik ketoasidozdan (DKA) korunmak için insüline ihtiyacı vardır (6).

II- Tip-2 Diabetes Mellitus

İnsüline bağımlı olmayan diyabet ya da yetişkin yaşta başlayan diyabet olarak adlandırılır ve vakaların %90-95'ini oluşturur. İnsülin direnci ve rölatif (tamamen eksikliği olmaksızın) insülin yetmezliği ile karakterizedir. Tedavisinde, insülin direncinin azalması ve endojen insülin sekresyonunun artırılması amaçlanır. Patogenez, insülin reseptörü ve onun

intraseküller sinyal yolunu içeren progresif insülin direnci ile β hücre yetmezliği arasındaki etkileşimi içerir. Tip-2 DM, genellikle obez bireylerde görülür, hipertansiyon ve dislipidemi ile ilişkilidir. Bu hastaların %85'i obez, kalan %15'i obez değildir. DM'ten etkilenen bireylerden %50'sinden fazlasının tanısının konmadığı tahmin edilmektedir. Çünkü, hiperglisemi yavaş yavaş meydana gelir ve hipergliseminin klasik semptomlarına yol açacak kadar şiddetli değildir. Hastalık her yaşta görülebilmekle birlikte, erişkin yaşlarda ortaya çıkar. Tip-2 DM'ta adacık hücre antikoru serumda tespit edilmez (2,3,6).

III-Diger Spesifik Tipler

Değişik hastalıklarla diyabetin birleştiği durumlardır. Bu hastalıkların bazıları klinik olarak Tip-1, bazıları da, Tip-2 karakterinde seyir gösterir (3).

IV-Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

İlk olarak gebelikte tanısı konan, yani; gebelik sırasında ortaya çıkan bir tablodur. Birçok kadında postpartum dönemde glukoz toleransı normale döner (10).

Deneysel Diyabet Oluşturma Yöntemleri

Günümüzde deneysel diyabet oluşturmak amacıyla belli başlı mekanizmalar geliştirilmiştir. İnsanlarda oluşan diyabeti her ne kadar tam yansıtmasa da kullanılan yöntemler hastalığa dair araştırmalar için oldukça önemlidir.

Oksidan bir madde olan, intraseküller redükthanlar olan askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek, onların antioksidan etkilerini engelleyen ve böylece oksidan üretimine sebebiyet veren **alloksan**, antioksidan enzimleri olmayan pankreas β hücrelerini tahrip eder ve diyabet gelişimini başlatır (3,11). Bunun dışında, tercih edilmeyen bir yöntem **çinko şelatörleridir**. Hayvanlarda başka patolojik durumlara sebebiyet vermektedir. 8-hidroksikinolin gibi bazı çinko şelatörleri sıçan ve farelerde diyabet modeli oluşturmak için kullanılmışlardır (3).

Günümüzde ençok kullanılan madde *Streptomyces griseus* adlı mantarın küfünden elde edilen **STZ**'dir. Kimyasal formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ şeklindedir. Alloksana benzer olarak, β -hücrelerini oksidan etkisi ile tahrip ederek, bu hücrelerden insülin salgı ve salınımını azaltır. Sitotoksik etkisini, Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) seviyelerinin azaltılması ve intraseküller serbest radikallerin oluşturulması aracılığıyla gösterir. Yapısında glukozamin-nitrozüre içeren STZ, pankreas β -hücrelerinde insülin üretiminin yüksek seviyelerinde meydana gelen Glucose Transporter-2 (GLUT-2) reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınır. GLUT-2 reseptörlerinin kan beyin bariyerinde olmaması nedeniyle, sistemik uygulama

sonrasında beyinde STZ'nin direkt etkileri oluşmaz. Bunların dışında, STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirerek diyabete sebep olduğu fikri de bulunmaktadır. STZ-diyabetik sıçanlar hipoinsülinemiktirler, buna karşın sağ kalım için insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar. STZ ile oluşturulmuş diyabet sonrası sıçanlarda da gözler, böbrekler, kan damarları ve sinir sisteminde hasarlar gelişir. Bu modelin avantajı, her yaşta verilebilmesi nedeni ile DM ile yaşlanmanın etkileşim çalışmalarına uygun oluşudur. Tekrarlayan küçük dozlarda ya da 50-100 mg/kg arası tek doz olarak verilebilir. Tekrarlayan küçük dozlarda verilirse etkisini daha çok otoimmün bir mekanizma sonucu gösterir (3).

Bu modeller dışında otoimmün mekanizma ile diyabet oluşturulan transgenik hayvan modelleri ve virüsler kullanılmaktadır. Virüslere örnek olarak hem sıçan hem de farelerde kullanılan bir DNA virüsü olan Kilham's sıçan virüsü ve Cocksackie B4, Mengovirüs ve Retrovirüs gibi RNA virüsleri gösterilebilir (3,11).

Tedavi Yöntemleri

1921 yılında insülinin kullanıma girmesinden bu yana diyabetin tüm türlerine yönelik tedavi edici protokoller uygulanmaktadır, ancak kesin bir tedavisi yoktur. İnsülinin şırınga, insülin pompası ya da insülin kalemleri ile enjekte edilmesi Tip-1 diyabetin en temel tedavi yöntemidir. Bunun dışında pankreasın bütün olarak ya da sadece beta hücrelerinin değiştirilmesi şeklinde pek çok kez denenen metotlar bulunmaktadır. Diyabete böbrek ile ilgili problemler de eşlik ettiğinden hem pankreas hem de böbreğin aynı anda değiştirilmesi kesin tedavi gibi görülebilir, ancak sonrasında hastalar bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlar kullanmak zorunda kalmaktadırlar (12, 13).

Diyabetin tedavisinde kök hücre çalışmalarında kaydedilen gelişmeler umut vericidir. Bu yolla yeniden gelişen pankreas β hücreleri, genetik olarak tedavi edilen kişinin bir parçası olduğu için bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlara gereksinim duyulmaz (14,15). Tip-2 diyabet ise, antihiperglisemik (şeker düşürücü) ilaçlar ve insülin takviyesi ya da bunları bir arada kullanarak kontrol altında tutulur (16). Aşırı obez diyabet hastalarına uygulanan gastrik bypass ameliyatı ile kan şekeri seviyeleri %80 - %100 oranında normale döndürülebileceği gösterilmiştir. Bu işlemin mekanizması ayrıntılı bir biçimde incelenmiş ve sağlanan yararın basitçe işlem sonrasındaki kilo kaybına bağlı olmadığı gösterilmiştir. Bu tedavi yöntemi yakın bir gelecekte bazı Tip-2 diyabet hastaları için standart bir tedavi olabilir. Bu ameliyat ayrıca aşırı obez insanların ölüm oranlarını %40 kadar azaltmaktadır (17,18).

OVARYUM HİSTOLOJİSİ

Ovaryum, pelvis boşluğunun yan duvarlarında bademe benzer görünümde, dişi cinsiyet hücresi olan oositin ve birçok hormonun salgılanmasında sorumlu bir çift organdır. Kadında uzunlukları 3 cm, genişlikleri 1,5-2 cm, kalınlığı ise 1 cm kadardır. Ovaryum hilumunun bulunduğu yerde periton kıvrımı, mezovaryum aracılığıyla ligamentuma bağlanır (19). Ovaryumun yüzeyini örten tek katlı kübik epitel, mezovaryumun periton epiteli olup, embriyonik dönemde birkaç defa çoğalarak primer ve sekonder seks kordonlarını yaptığından dolayı germinal epitel adını alır. Hücrelerin apikal kısımları mikrovillüslüdür. Epitelin altında tunika albuginea bulunur ki bu kısım organın açık renkte görülmesini sağlar. Ovaryum kesitlerde içte medulla ve dışta medullayı hiluma kadar saran korteks olmak üzere iki tabaka halinde olduğu görülür. Bu iki katman arasında kesin bir sınır çizilemezken belirli farklılıklarla ayrılırlar (19,20).

Ovaryum yüzeyi puberteden önce düzgün görümlü iken, dişinin üreme hayatı boyunca düzensiz hale gelir. Hem ovulasyon hem de foliküler gelişim yüzey yapısında değişikliklere neden olur. Menapoz sonrası ise ovaryum boyutlarında belirli bir azalma olur (19).

Medulla, kollojen ve elastik liflerden yapılmış oldukça sıkı bir bağ dokusu yapısındadır. Bunun yanında kan ve lenf damarları, kalın sinir demetleri ve hilum yakınında birkaç düz kas hücresi içerir (19).

Korteks, içinde yerleşik farklı gelişim evrelerindeki ovaryum foliküllerinin bulunduğu stroma kısmıdır. Stromada, kollogen ve elastik lifler, iğ biçimli bağ dokusu hücreleri ve retiküler lif ağları bulunur ki germinal epitel altında sıkılaştıran bu intersitisyel bağ dokusu tunika albugineanın yapısını oluşturur (19).

Ovaryum Folikülleri

Ovaryum korteksinde bulunan foliküller, tek bir oosit ile oositi çevreleyen foliküler hücrelerden meydana gelir. Yeni doğan kız çocuğunun ovaryumunda 400.000 - 2.000.000 arasında oosit bulunurken ileri yaşlarda bu sayı düşer. Doğumda oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasındadırlar. Puberte ile birlikte her genital siklusa küçük bir grup olgunlaşmaya başlar. Menstruasyon kanamasını takip eden ilk bir yıl veya kısa bir süre içinde ovulasyon olmayabilir. Ancak, menstrual siklusun düzene girmesiyle folikül gelişimi ve ovulasyon süreklilik kazanır ve genelde bir oosit olgunluğa erişir ve atılır. Dişinin seksüel

hayatı boyunca yaklaşık 400 kez ovulasyon meydana gelir. Ovaryumda farklı gelişim evrelerinde üç tip folikül bulunur (20).

Primordial foliküller: Fetal gelişimin ilk üç ayı içinde baskın olarak bulunurlar. Gonadotropin stimülasyonu foliküllerin büyümesini uyarır. Tunika albuginea altında yerleşen oositi yassı ve tek bir sıra halinde foliküler hücreler çevreler. Oositin çapı 30 mikrometre kadar olup nukleusu, yaygın bir kromatine, bir ya da daha fazla geniş nukleolusa sahiptir. Bu folikül 1. mayoz bölünmenin diploten evresindedir (19,20).

Primer foliküller: Tunika albuginea'ya yakın konumlu olup folikül hücreleri kübik şekil alırlar. Oosit çapı 50-80 mikrometre kadardır ve büyüdükçe nukleusu hücrenin geniş bir alanını kapsar. Hem folikül hücreleri hem de oosit glukozaminoglikanlar ve glikoproteinlerden zengin amorf bir madde olan zona pellucidayı oluşturma özelliğindedir. Oosit sitoplazması; mitokondriler, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, granüler endoplazmik retikulum, ribozom, küçük veziküller, mikroveziküler cisimler, lipid damlaları ve lipokrom pigmenti içerir. Memeliler de dahil bir çok türde oosit membranı (oolemma) altında kortikal granüller olarak isimlendirilen salgı vezikülleri bulunur. Proteaz içeren bu granüller ve ovum spermle aktive edildiğinde ekzositozla boşalırlar. Bazen birden fazla oosit olduğu gibi, aynı oositte birden fazla nukleus da görülebilir. Primer folikülün etrafını çevreleyen teka tabakası, kan kapillerleri ile oosit arasında belirli madde alışverişini sağlar. İnsanlarda oosit sitoplazması içinde endoplazmik retikulumun halka şeklinde sarımları ileannulate lamellae yapısı bulunur. Primer foliküle preantral folikül de denilmektedir (20).

Sekonder foliküller: Oosit çapı artmışken, buna paralel folikül (granüloza) hücre sayısı mitozla artış göstermiştir. Foliküllerin büyümesi hipofizden salgılanan Folikül Stimulan Hormon (FSH), büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü, Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) ile kalsiyum iyonlarının (Ca^{+2}) etkisine bağlıdır. Granulosa hücreleri arasındaki iletişimi gap junctionlar sağlar. Oositte uzanan mikrovilluslar ve folikülden zona pellucida aracılığıyla oosite uzanan düzensiz uzantılar, madde alışverişinde görev alırlar. Folikül büyüdükçe granulosa hücreleri arasındaki boşluklara hyaluronik asitten zengin bir sıvı (likör folikülü) birikir. Bu boşluklar birleşerek daha büyük boşlukları oluşturur. Granulosa hücre katı 6 - 12 hücre sırası oluşturduğunda ve bu boşluklarda sıvı biriktiğinde bu foliküle sekonder folikül adı verilir. Bu aşamada oosit çapı yaklaşık 125 mikrometredir. Granüloza hücrelerinin aktiviteleri arasında Oosit Maturasyon İnhibitör (OMI) peptidi salgılanması da

vardır ve bu salgı antral boşluğa bırakılır. Erken sekonder safhada bu salgılama fazla miktarda iken olgun folikül büyüklüğüne erişildiğinde daha düşük konsantrasyondadır. Folikülün büyüklüğü 10 mm çapa ve daha üstüne ulaştığında oosit etrafında corona radiata oluşmaya başlar. Corona radiata, cumulus oophorus ile folikül duvarına bağlantılıdır. Bu durum, corona radiata uzantılarının zona pellucida içinden oosite ulaşması sonucu, folikül dışındaki kan damarlarından gelen bazı maddelerin oosite aktarımını sağlar. Oositten uzanan küçük mikrovilluslar da zona pellucidaya uzanarak bu işlevde görev alırlar. (19,21).

Foliküler olgunlaşma süresince Luteinizan Hormon (LH) reseptörlerinin sayısı ve yüzey boşluklarının artışına da bağlı olarak granulosa hücrelerinin yüzeyindeki mikrovillus sayısında artma gözlenir. Granulosa hücreleri arasında hücre dışı materyal olup, koyu boyanan PAS (-) yapıya Call-Exner cismi denir. Granuloza hücrelerinin yer yer erimesiyle oluşan bu yapı, hyaluronik asit ve proteoglikanlar içerir. Folikül büyümesi esnasında folikülü çevreleyen, fonksiyon ve özellik bakımından birbirinden ayrılan bağ dokusuna ait hücreler bulunur. Teka folikülü olarak adlandırılan bu yapının folikülü çevreleyen hücre sırası daha incedir ve vaskularizasyonu yoğun olan steroid salgı yapan hücrelerden oluşur ve teka interna olarak adlandırılır. Bu hücreler bol miktarda LH reseptörleri içerirler. Dolayısıyla LH stimülasyonu sorumluluğunda androjenleri sentezler ve salgırlar. Aynı zamanda östrojen prekürsörleri içerirler. Endokrin organ özelliğinde olan bu hücreler, yoğun kapiller ağına sahip olup yapılarında fibroblast ve kollajen demetler de bulunur. Teka eksterna ise düz kas hücreleri ve kollajen fibrillerden oluşan bir dış tabakayı oluşturur. İki teka tabakası arasında kesin ayrıcı bir hat yoktur. Oysa folikülün granuloza hücrelerini teka internadan ayıran membrana vitrea isimli belirgin bir sınır bulunmaktadır. Teka'nın zengin kapiller ağı folikül için gerekli besin maddelerinin kaynağını da oluşturur. Foliküller arasında ise lipitten zengin stromal hücreler yer alır (20).

10 mm veya daha büyük çapa ulaşmış foliküle **Graaf folikülü** denir. Granulosa hücrelerinde mitotik aktivite azalır, hücre tabakası incelir ve antral boşluk büyür. Bunun yanı sıra cumulus hücreleri arasında gevşeme olur. Corona radiatalı oositin daha da belirginleştiği tüm bu durumlar, folikülün ovulasyon yapabileceğinin bir işaretidir. Teka tabakalarındaki sıkışmanın yanı sıra, teka internadaki hücre sitoplazmasında lipid birikimi, düz endoplazmik retikulum (DER) ve tubüler tip mitokondrion görülür, böylece hücreler steroid sentezi ile ilgili özelliklere sahip olduklarını gösterir. İnsanlarda, gonadotropin salgılatıcı hormon artışının LH ve FSH seviyesini düzenleyerek folikülü ovulasyona götürdüğü bilinmektedir. Folikül olgunlaşması tamamlanırken oosit 1. mayoz bölünmeyi bitirir ve 1. polar cismi oosit-I

membranı ile zona pellucida arasına bırakır. Sonrasında ovulasyona gitmekte olan folikülde oosit, II. mayoz bölünmenin metafazına girer. Büyüme faktörleri ve bağlanma bölgeleri teka ve granuloza hücreleri tarafından sentezlenir. İnsanlarda spesifik yüksek affiniteye sahip IGF-1 reseptörleri Graaf folikülündeki granuloza hücrelerinde ve folikül sıvısında oldukça fazla miktarda bulunur ve östradiol stimüle edilmesinde aktif rol alırlar. Ovaryum fonksiyonlarında gonadotropinler haricinde başka metabolik faktörler de rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında insülin, glukagon, tiroid hormonları hepatik IGF ve leptin bulunmaktadır (20,21).

Ovulasyon

Graaf folikülünde stigmanın yırtılması ve folikül iç basıncının sıfırlanması ile etrafını saran hücre katmanı ile oositin ovaryumdan atılmasıdır. Fimbrialarının hareketi ile oosit tuba uterina içine alınır. Ovulasyon, pubertaden menapozda kadar yaklaşık olarak ayda bir kez gerçekleşir, menstrual siklusun ortasına rastlar ve genelde bir oosit atılır, ancak çoklu gebeliklere sebep olan aynı anda iki ya da daha fazla oosit atılması durumları da görülebilir. Ovulasyonla atılan hücre oosit-II'dir. Tuba uterina içinde oosit-II uterusu doğru ilerlerken spermiumla karşılaşarak döllenirse, II. mayoz bölünme tamamlanır ve döllenmiş ovum zigot adını alır. Bir müddet sonra zigot yarıklanmaya başlar ve yaklaşık 5. günde uterusu gelir. Döllenme gerçekleşmezse, oosit II 24-48 saat içinde dejenere olur. Ovulasyondan sonra granuloza ve teka interna hücreleri bölünmeden büyürler ve hormon salgılayan lutein hücrelerine dönüşürler. Böylece geçici bir endokrin bez olan korpus luteum oluşur. Korpus luteum, progesteron ve östrojen hormonları salgılar. Graaf folikülünde ovulasyon sonrası tekadaki kan sızması ile kısa bir süre içinde folikül içine kan dolar. Buna kırmızı cisim (corpus haemorrhagicum, corpus rubrum) denir. Döllenme olmazsa korpus luteum işlevini 14 gün kadar sürdürür. Bir sonraki menstruasyonun başlamasıyla birlikte, lutein hormonu salgısı durduğundan dejenere olur. Buna menstruasyon korpus luteumu denir. Döllenme olduğunda, korpus luteum, gelişmesinin 4. ayının sonuna kadar kalır. Daha sonra etkisini yitirir ve işlevini plasenta üstlenir. Gebelik dönemindeki korpus luteuma gebelik korpus luteumu denir. Menstruasyon ve gebelik korpus luteumları işlevleri sona erince dejenere olurlar ve yerlerinde kollogen iplikleri bol, bağ dokusundan oluşan beyaz renkli bir yapı (corpus albicans) kalır. Bu yapı ovaryum içinde zamanla absorbe edilerek gitgide küçülür ve nedbe dokusu benzeri yapı olarak kalır (19).

Foliküllerin çoğu fetal gelişim sırasında başlayıp pubertede, erişkinlikte ve menapozda devam edecek şekilde herhangi bir foliküler gelişim evresinde dejenere olurlar ve kalıntıları ise ovaryumlarda **atretik foliküller** haline gelir. Foliküllerin atreziye uğradığı bu işlev

sırasında granuloza hücrelerinde mitotik aktivite durur ve hücreler bazal membrandan ayrılır (19,22).

UTERUS HİSTOLOJİSİ

Uterus pelvik boşlukta idrar kesesi ile rektum arasında yerleşmiş, yukarı doğru genişleyen üst kısım ve aşağı doğru inen silindirik bir boyun kısmından oluşan armut şekilli, içi boş bir organdır. İki anatomik kısımdan oluşmuştur; korpus veya gövde ve serviks kısmı. (19,21). İnsanlarda basit yapıda iken (**uterus simpleks**), hayvanlarda ikiye çatallıdır. Bu yapıya iki boynuzlu uterus (**uterus bikornis**) denir (22). Sıçan uterus kornularının uzunluğu 4-6 cm kadardır. Bu iki kornu distalde birleşmektedirler. Ancak içte iki canalis cervicis gösterirler (23). Kalın uterus duvarında üç tabaka ayırt edilir. Bunlar dıştan içe seröz bir zar olan perimetriyum, ortada kas tabakası miyometriyum ve endometriyumdur (21).

Perimetriyum

Peritonun visseral yaprağından oluşmuş bir tabakadır. Epiteli tek katlı yassı olup mezotel ile bunun altında ince gevşek bir bağ dokudan oluşur. Peritonsuz bölgede dış kat tunika adventisya olarak seyreder (19).

Miyometriyum

Düz kas hücrelerinden meydana gelen miyometriyum katmanı belirgin olmayan üç kas tabakasından oluşmuştur: Orta tabaka kalındır ve sirküler yerleşimli kas lifleri ile çok miktarda kan damarı içerir. Bu nedenle vasküler (damarlı) tabaka denir. İç ve dış tabakada uzunlamasına ya da oblik seyirli kas lifleri bulunur. Gebelikle beraber, buradaki düz kaslar büyür ve lif sayısı artar. Gebelik sırasında, ovaryum ve plasentadan salgılanan bir peptid hormon olan relaksin, miyometriyal kontraksiyonların baskılanmasını kontrol eder. Nörohipofizden salgılanan bir peptid hormon olan oksitosin ise doğum sırasındaki miyometriyal kasılmaları düzenler (21).

Endometriyum

Tek katlı silindirik epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri, basit tubuler endometriyal bezlerin epiteli ile devam eder. Epitel hücrelerinin altında endometriyumun stromasını oluşturan lamina propriya bulunur. Endometriyum, işlevsel ve histolojik olarak farklı özelliklere sahip ve her birisinin kendine ait kanlanması olan iki tabakadan oluşur:

Menstruasyon sırasında dökülen yüzeysel **fonksiyonel tabaka** (stratum fonksiyonalis) ve menstruasyon sırasında dökülmeyip menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel

tabakaya kaynak oluşturan **bazal tabaka** (stratum bazalis). Fonksiyonel tabaka, menstrual siklusun evrelerine göre değişiklik gösterir. Kadınlarda menstrual siklus yaklaşık 28 gün sürer ve birbirini izleyen üç evreden oluşur (21,24).

Siklusun başlangıcı olan **menstrual evre** 4-5 gün sürer. Sonrasında, FSH kontrolünde yaklaşık 9 gün süren **proliferasyon evresi** (östrojenik ya da foliküler evre de denir) başlar. Bu evrede, östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumda kalınlaşma görülür. Hem epitelde ve hem de lamina propriyadaki hücrelerde mitoz görülür. Tubuler bezlerin epitel hücreleri yukarıya doğru göç eder, bezler giderek daralır ve kıvrımlı bir şekil alır (21,24).

Ovulasyondan hemen sonra başlayıp 28. güne kadar süren evre **sekresyon** ya da **luteal** evredir. Bu evre sırasında endometriyal bezler salgılama yapmaya başlar. Tubuler bezlerin dış sınırları kıvrılmaya ve düzensiz bir hal almaya, döşeyici epitelde glikojen birikmeye başlar ve bez lümenini glikojen ve glikoproteinden zengin bir salgı doldurur. Endometriyal bezlere paralel seyreden spiral damarların boyu uzar ve stromadaki fibroblastlarda çok miktarda glikojen ve yağ depolanır. Sekresyon evresi, progesteron ve östrojen tarafından kontrol edilir (19,24).

Menstrual siklusun sonunda, korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki steroid hormonların azalması, yaklaşık 1 gün süren **iskemik evreyi** başlatır. Normal kanlanmanın azalması iskemiye başlatır ve bunu izleyen hipoksi, endometriyumun fonksiyonel tabakasında nekroza neden olur ve bu doku, menstrual evrede uterus lümenine dökülür. Endometriyum dökülmesinde, spiral arterlerin kasılması ve gevşemesi, bölgede salgılanan matriks metalloproteinazlarının aktivasyonu ve yerel olarak salgılanan prostaglandinler, sitokinler ve nitrik oksit gibi birçok etmen görev almaktadır. Bu etmenler kan damarlarının duvar ve bazal membran yapılarının yırtılmasına ve endometriyum stromasındaki kollajenin parçalanmasına neden olur. Kasılmaların yukarısında kalan kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Fonksiyonel tabakanın bir kısmı ayrılır. Gebelik durumunda, embriyonun trofoblast hücreleri korpus luteumu progesteron salgılaması için uyaran Human Chorionic Gonadotropin (HCG) üretir. Menstruasyon oluşmaz ve gebelik boyunca ertelenir. Salgılanan progesteron ile endometriyumdaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişiklikler desidual reaksiyon olarak isimlendirilir (21,25).

Uterusun kanlanması arteria uterina ile gerçekleşir. Uterus arteri, serozanın hemen altında uterusu çepeçevre kuşatan 6-10 arkuat artere dallanarak kan verir ve bir dalda tuba uterinaya gönderir. Arkuat arterlerden ayrılan radyal arterler, miyometriyumun iç kas

tabakasının içine penetre olarak bazal arterler ve spiral arterler olarak bilinen iki ayrı arter grubunu oluşturur. Kısa ve düz olan bazal arterler, startum bazalisi kanlandırır ve dolaşımın kesintisiz olmasını sağlarlar. Tersine; spiral arterler, bazal tabakayı geçerek uterus bezlerine paralel olacak şekilde uzanırlar ve endometriyal yüzeye ulaşır çevrede bulunan yoğun kapiller ağa drene olurlar. Kapiller ağ ince duvarlı venöz göllenmelere dallanır, bunlar da efferent venlere drene olur. Spiral arterlerin distal segmentleri her menstrual siklusta dejenere ve rejenere olur. Menstrasyondan yaklaşık bir gün önce bu arterlerde ortaya çıkan güçlü vazokonstriksiyonlar, bu damarlardan kanlanan kapillerlerde iskemi ve rüptürlere neden olur. Uterus bezleri nekroze olur; kan, uterus salgıları ve doku debrisleri endometriyumdan dökülerek vajinadan dışarı atılır. Lenf damarları tunika mukozada başlar diğer tabakalara kadar yayılır (20,22).

Uterus sinirlerini pleksus uterovajinalisten alır. Bu pleksus 1. ve 4. sakral sinirlerle ve pleksus hypogastricus ile bağlantılıdır. Miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri damarları izleyerek uterusu girer ve uterusu sinir ağları oluşturur (20).

SİÇANLARDA MENSTURAL SIKLUS VE GEBELİK

Sıçanlar, puberte başlangıcından yaşlılığa kadar döngüsel aktivite gösteren ve mevsime bağlı olmayan poliöstrik, yani üreme dönemi boyunca birden fazla kızgınlık evresi görülen hayvanlardır. Puberte ile başlayan ilk menstrual siklus dört gün kadar sürer ve yaşlandıkça bu süre giderek uzayarak hayatın son dönemlerinde altı günü bulur (26).

Sıçanlarda östrus siklusu ortalama 4-5 gün sürmektedir. Östrus siklusu laboratuvar kolonilerinde mevsimden bağımsız olarak yıl boyu sürmektedir (27). Siklus proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere 4 dönemden oluşur. Proöstrus evresi yaklaşık 12 saat, östrus evresi 9-15 saat, metöstrus evresi 21 saat ve diöstrus evresi de ortalama 57 saat sürer (28).

Proöstrus evresinde; lüteinleştirici hormon ve östradiol en üst düzeye ulaşır. Östradiol, evrenin başlangıcında en düşük düzeydeyken, evrenin ortalarına doğru en yüksektir. Progesteron değeri metöstrus ve diöstrustan sonraki pik seviyesine proöstrus fazının sonunda ulaşır (29).

Östrus evresine geçerken, östradiol düzeylerinde hafif bir azalma olur. Folikül uyarıcı hormonda da yavaş bir artış görülür (26). Östrus evresinde; lüteinleştirici hormon en düşük düzeyde iken FSH en yüksek değerine ulaşır. Östradiol düzeyi düşmeyi sürdürür ve bu evrenin ortalarına doğru en alt düzeydedir. Progesteron düzeyinde de artma olur ve östrusun sonuna doğru ovülasyon gerçekleşir (28).

Metöstrus evresinde; östradiol seviyesi artmaya başlar. Progesteron sekresyonu metöstrus evresi süresince yüksektir. Bu fazda korpus luteum oluşumu gerçekleşir (30).

Diöstrus evresi dinlenme fazıdır, LH ve FSH düzeyleri düşüktür(30). Progesteron sekresyonu, diöstrus faz süresince yüksektir. Bu evrede östradiol düzeyinde de azalma sürer, proöstrus dönemine doğru en düşük düzeye ulaşır (26).

Sıçanlarda gebelik kopulasyondan doğuma kadar ortalama 21-23 gün sürmektedir. Ancak anne önceki doğumdan var olan yavrularını emziriyor ise bu süre uzayabilir. Gebeliğin 13. gününden itibaren abdominal genişleme görülürken, 14. günde meme bezi gelişimi ve meme başlarında büyüme gözlenir. Gebeliğin 7 - 13. günleri arasında progesteron değerleri en yüksek düzeye ulaşırlar. Yırtılmış (hatched) blastosistin implantasyonu gebeliğin 5. gününde meydana gelir. Diğer hayvan türlerinden farklı olarak sıçan embriyosu östrojen üretmez ve maternal östrojen implantasyonu düzenler (28).

PANKREAS HİSTOLOJİSİ

Pankreas, karın boşluğunda dalak ile duodenum arasında yatay şekilde uzanmış olarak bulunur. Ekzokrin ve endokrin salgı yapan bir bezdir. Seröz bez yapısında olan ekzokrin bölümü yapısal olarak parotise benzerken endokrin Langerhans adacıkları bulunması ve çizgili kanala sahip olmamasıyla parotisten ayırım gösterir. Yine son kısmında sentroasiner hücreler görülür (19). Pankreasın ekzokrin kısmı bileşik tubulo-alveolar bez yapısındadır. Lipaz, amilaz, tripsin, şimotripsin, karboksipeptidazlar, elastazlar, proteazlar, nukleazlar pankreasın ekzokrin kısmından salgılanmaktadır (31).

Pankreasın endokrin bölümüne Langerhans adacıkları adı verilmektedir ve seröz asinüslerden izole bir şekilde konumlanmışlardır (19). Endokrin adacıklar salgıları ve boyanma özellikleri ile birbirinden ayrılan 4 farklı hücreyi içermektedir. Langerhans adacıklarının genellikle periferinde konumlanmış hücrelere **alfa (α) hücreleri** denmektedir (24,32). Asidofil özelliğe sahip bu hücreler kan glukoz seviyesini yükselten **glukagon** hormonunu salgılamaktadır (31). Bazofilik özellik gösteren hücreler **β hücreleri**dir ve salgıları ise kan glukoz seviyesini düşüren **insülin** hormonudur (22). Anilin mavisi boyamaları ile boyandığında ince granüllerinin boyanması ile ayırt edilen **delta (D) hücreleri** α ve β hücrelerinin salgılarını yavaşlatmakta görev alan **somatostatin**'i salgılamaktadır (31). Endokrin pankreasta az sayıda bulunan endokrin karakterli bir diğer hücre tipi de **F hücreleri** ki bunlar pankreatik polipeptitler salgıladığı için **pankreatik polipeptid (PP)** hücreleri olarak da adlandırılmaktadır (22). Bunlara ilaveten endokrin adacıklarda bulunan bir diğer hücre türü de gastrin salgılayan G hücreleri ki çok az sayıdadır.

ATRIAL NATRIÜRETİK PEPTİD

ANP, natriüretik, diüretik ve vazodilatör etkiler gösteren peptid yapılı bir hormondur (33). Tarihsel gelişimine bakıldığında zaman Palade ve Jamcison isimli araştırmacılar kalp atriumu kas hücrelerinin sekretuar granüller ihtiva ettiklerini ortaya çıkarmışlardır (34). Daha sonra De Bold tarafından sıçanlarda yapılan deneylerde, atriumlarda natriüretik etki gösteren granüller bulunmuştur. Sonrasında izolasyon çalışmaları gerçekleştirilen hormonun aminoasit zincirleri Kangavva tarafından gösterilmiştir (34,35).

ANP genel olarak sağ atriumda üretilmekle beraber, sol ventrikülde disfonksiyon ya da ventriküler hipertrofi durumunda ventrikül dokusundan da köken alabilmektedir (36). Salgılanan partiküller atrium kas hücreleri içerisinde granüllerde depolanmaktadır. ANP kalp dışında, hipotalamus, hipofiz, adrenal medulla, gastrointestinal sistem, timus, korpus luteum, ovaryum, testis gibi organlarda da sentezlenebilmektedir (8,37). ANP reseptörleri, protein A gold, Sternberger'in işaretli antikoru tekniği gibi ultrasantrifüj yöntemlerle beraber immunofloresan olarak da gösterilmektedir. ANP granülleri sola göre sağ atriyumda, subperikardiyal yüzeyde ve atrial apendiksde daha fazladır (34).

ANP üretildiği anda 126 aminoasit içeren bir prohormon olarak bulunurken, kana 28 aminoasitli olarak verilir (33,34). Bu durum atriyopeptidaz isimli enzimin 126 aminoasitli öncül ANP'yi 98 ve 28 aminoasitten müteşekkil iki parçaya ayırmasıyla sağlanır. Büyük parça amino-terminal uç, küçük parça karboksi-terminal uçtur (38).

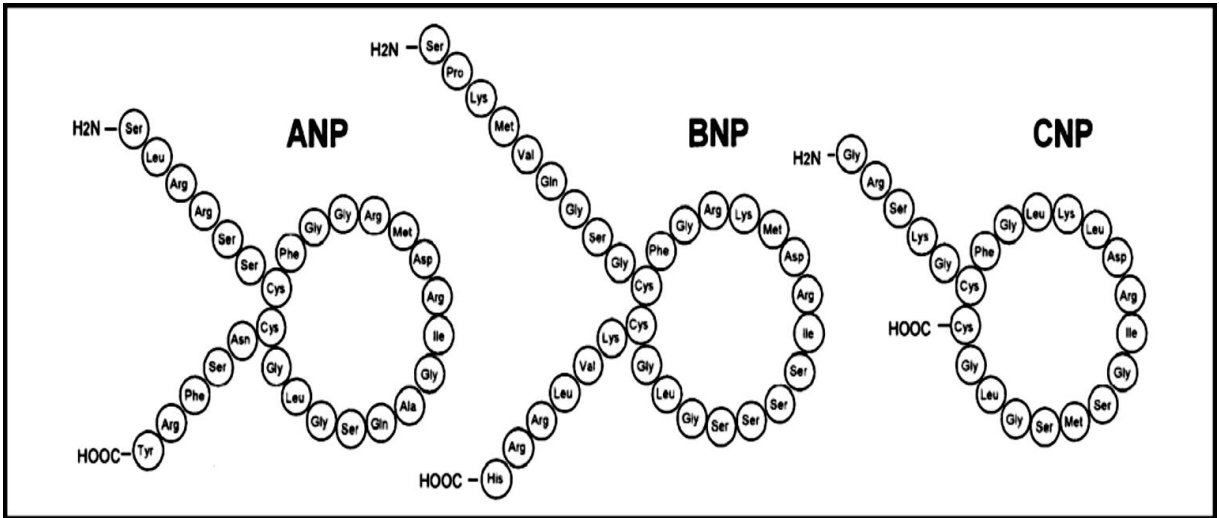
Plazmada moleküler ağırlığı 3085,5 Dalton olmakla birlikte, normal insanda ki ANP konsantrasyonu ortalama 0,65 ng/l'dir (34).

İnsan ve sıçan ANP'leri yapısal olarak farklıdır. İnsan ANP'si iki sistein aminoasidi arasında yer alan bir disülfid bağı ile oluşturulmuş karakteristik 17 aminoasitli halka yapısında olup karboksil ucundan itibaren 17. pozisyonda metiyonin bulundurulurken, sıçanda izolösin aminoasidi yer almaktadır. ProANP aminoasit zincirinde 124. aminoasitfenilalanin ve 123. aminoasit serin, ANP'nin biyolojik aktivitesi için oldukça önemlidir keza bu aminoasitlerin zincirden çıkarılması durumunda ANP'nin natriüretik, diüretik, damar genişletici etkisi ve aldosteron sekresyonunu inhibe edici özelliği önemli ölçüde azalır (39). ANP plazmada kronik böbrek yetersizliği, kalp yetersizliği, hipertansiyon, siroz, atrial fibrilasyon ve taşikardi gibi durumlarda yüksek seviyelere çıkmaktadır (34).

Diğer Natriüretik Peptidler

Domuz beyin özütlerinden ANP'ye benzer natriüretik ve diüretik özellikleri olan başka bir peptid elde edilmiştir (40). Bu 32 aminoasitlik (aa) polipeptid Beyin Natriüretik Peptid (BNP) olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra BNP'nin esas sentez yerinin ventriküler miyokard olduğu tespit edilmiştir (41,42).

Yakın geçmişte, natriüretik peptid ailesinin kalp dışı kaynaklı üyeleri tanımlanmıştır. C-tipi Natriüretik Peptid (CNP), 22 aa'ten oluşan bir peptiddir; esasen santral sinir sisteminde, vasküler endotel hücrelerinde ve çok düşük konsantrasyonlarda plazmada bulunur (43). Natriüretik peptid ailesinin dördüncü üyesi Dendroapsis Natriüretik Peptid (DNP) olup, yeşil mamba yılanının zehrinden izole edilmiştir ve diğer natriüretik peptidlere yapısal olarak benzerdir (Şekil 1;44).



Şekil 1. Natriüretik peptidlerin yapısı. 17 aa'ten oluşan halka yapısı olan sistein-sistein disülfid çapraz bağı hepsinde ortaktır.

Natriüretik Peptidlerin Reseptörleri

Natriüretik peptidlerin 3 tip reseptörü bulunmaktadır. Spesifik olarak ANP ve BNP'ye bağlayan Natriüretik Peptid Reseptör A (NPR-A) ve aynı şekilde CNP'yi bağlayan Natriüretik Peptid Reseptör B (NPR-B)'dir. Natriüretik peptidlerin reseptör ilgileri Tablo 1'de görülmektedir. Peptidler reseptörlerine bağlanarak, hücre içi ikinci haberci olan Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP)'nin üretilmesini sağlamaktadır. Hem NPR-A, hem de NPR-B guanil siklaza bağlıdır. Üçüncü reseptör Natriüretik Peptid Reseptör C (NPR-C) guanil siklaza bağlı değildir ve temizleyici rolündedir. Bu reseptör, nötral endopeptidaz (NEP) enzimatik sindirimi eşliğinde natriüretik peptidleri dolaşımdan çıkarmaktadır (45).

Tablo 1. Natriüretik peptidlerin reseptör afiniteleri (45)

| NPRs | ANP | BNP | CNP |
|-------------|------------|------------|------------|
| NPRA | +++++++ | +++++ | |
| NPRB | | | +++++++ |
| NPRC | +++++++ | ++++ | ++++ |

+ : Afinite derecesi.

NPR-C'nin BNP'ye affinitesi daha düşüktür, bu durum BNP'nin daha uzun ömürlü olup plazma seviyesinin daha yüksek olmasını sağlıyor olabilir. Natriüretik peptitlerin bir kısmı böbrek ve boşaltım sistemiyle de atılmaktadır. İnsanlarda, NPR-C ve NEP'den hangisinin natriüretik peptitlerin dolaşımından temizlenmesinde daha büyük rol aldığı bilinmemektedir. Ancak, koyunlarda yapılan ve NPR-C reseptörlerinin engellenmesini ve NEP inhibitörlerinin kullanılmasını içeren deneyler, NPR-C ve NEP'in natriüretik peptitlerin temizlenmesine benzer miktarda katkıda bulunduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, obez insanlar daha yüksek kan basıncına, ventrikül kitlesine ve atrial boyutlara sahip olmalarına rağmen daha düşük natriüretik peptit seviyesine sahiptirler, çünkü adipoz hücreleri yüksek seviyede NPR-C bulundurur. Bu çalışmalar, natriüretik peptitlerin anormal şekilde hızlı temizlenmesinin şişman insanlarda görülen hipertansiyon ve kalp yetmezliğine bağlı olabileceğine dair spekülasyonlara yol açabilir (9).

NPR-A'nın yapısı ve fonksiyonu iyi bilinmektedir ve NPR-B'ye benzerlik göstermektedir. NPR-A reseptörünün hücre dışı ligand bağlanma zinciri, membran içi zinciri, protein kinaz zinciri, hidge zinciri ve katalitik zinciri bulunmaktadır. Reseptör, yalnız homodimer olarak guanil siklaz fonksiyonunu göstermektedir. Katalitik aktivitesi için ATP bağlanması da gerekir. NPR-A ve NPR-B reseptörleri damarlarda, adrenal bezlerde, böbreklerde ve çok daha düşük oranda ventriküler miyositlerinde de bulunmaktadır. Reseptörlerin miyositlerde de bulunması, bu hücrelerin hem kaynak hem de hedef olmalarına olanak sağlar. NPR-B aynı zamanda beyinde de bulunmaktadır (9).

ANP'nin Etkileri

Natriüretik peptidler, kardiyovasküler sistemin birçok bölgesinde geniş biyolojik etki gösterirler. Fizyolojik etkileri benzer olan ANP ve BNP'nin artmış venöz kapasite, azalmış vasküler tonus ile Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS), endotelinler, sitokinler ve vazopressini içeren birçok hormon sisteminin aktivitelerinin inhibisyonu ile ilişkili oldukları düşünülür. Sol ventrikül disfonksiyonunda hem ANP hem de BNP'nin değerlerinin artmasına

rağmen, ANP'ye göre BNP'nin on kat daha fazla artan değeri farklı etkilerinin olduğu fikrini akla getirmektedir. ANP ve BNP refleks taşikardiye yol açmadan kardiyak ön yükü azaltabilmektedirler. Vagal afferentlerin uyarılmasına, santral sinir sisteminden çıkan sempatik uyarının baskılanmasına ve otonom sinir uçlarından katekolamin salınımının azalmasına bağlı olarak böyle bir düşüşün yaşandığı olasılık dâhilindedir. Böbrek tubullerinde su ve Na⁺ emilimi üzerine doğrudan etki ederek natriürez ve diürez yaparlar. Arteriyel ve venöz yataklarda dengeli vazodilatasyon ve böbrekten su ve tuz kaybı görülür. Natriüretik peptidler ayrıca kalpte ve diğer organlarda antimitojenik etki gösteriyor gibi görünmektedir, bu da hücre büyümesinin düzenlenmesinde potansiyel rollerini düşündürmektedir (34,42,46).

Bunlara nazaran CNP'nin fizyolojik etkileri diğerlerine göre daha farklıdır. Sınırlı diüretik ve natriüretik etkisi olup, dolaşımda bulunmaz. Damarlarda otokrin ve parakrin etki ile vazodilatör ve vasküler hücre büyümesini inhibe edici etkisi vardır (42).

Araştırmalar göstermektedirki ANP glomeruler filtrasyon hızını, idrar atım hızını, sodyum, fosfat, magnezyum, kalsiyum ve potasyum atılımını artırmakta; idrar osmolaritesini ise azaltmaktadır (42).

ANP, glomerullerde afferent arterioler direnci azaltırken, efferent arterioler direnci ise artırır. Böylece glomeruler kapiller hidrostatik basınç artar. Dolayısıyla filtrasyon fraksiyonu ve glomeruler filtrasyon hızı artar (34).

Son dönemde böbrek yetmezliği olan çocuklarda plazma ANP konsantrasyonları yüksek olduğu görülmüştür (46). Aynı sonuç yetişkinlerdeki böbrek yetmezliğinde de tespit edilmiştir. Hemodiyalizle ultrafiltrasyon yapıp basınç azalması oluşturulduğunda plazma ANP seviyesinin düştüğü bildirilmiştir (34).

ANP, büyük arterlerin düz kaslarını ve bağırsak düz kaslarını gevşetir. Femoral, karotid veya koroner arterlere göre renal arterler üzerinde daha çok damar genişletici etkiye sahiptir. Damar düz kasındaki bu gevşeme c-GMP ve özellikle guanil siklaz aktivitesinde artışla sağlanır (39,40).

Çalışmalarda, ANP'nin aldosteron sekresyonu, plazma renin aktivitesi ve plazma renin sekresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Plazma aldosteronunun iki sebeple düştüğü kabul edilmektedir: Birincisi, plazma renin ve anjiyotensin II'de azalma ve ikinci olarak da ANP'nin adrenal zona glomerulozadaki reseptörleri yoluyla aldosteron sekresyonunu direkt inhibe etmesidir (47,48).

Yapılan çalışmalarda, esansiyel hipertansiyon ve renovasküler hipertansiyonda plazma ANP düzeyleri incelenmiş ve yaş arttıkça esansiyel hipertansiyonlularda ANP düzeyinin kan

basıncı normal olanlara göre anlamlı oranda arttığı gösterilmiştir. Renovasküler hipertansiyonlular da normallere göre daha yüksek plazma ANP'sine sahiptir. ANP'nin uzun süre düşük dozda infüzyonu, esansiyel hipertansiyonlu hastalarda semptomatik hipotansiyon meydana getirebilir (34,48,49).

Merkezi sinir sistemi üzerinde, ANP'ye ait bağlanma yerleri nukleus traktus solitarius, area postrema, 3. ventrikülün ön bölümü olmakla birlikte, bunlar aynı zamanda renine bağlı hipertansiyonun gelişmesinden ve kontrolünden sorumludur (34).

ANP'nin sentez ve salgılanması glukokortikoidler, androjenler ve tiroid hormonları (T₃, T₄) gibi hormonların kontrolü altında olduğu bilinmektedir. Ayrıca, kardiyovasküler sistem içinde bu hormonların biyolojik etkilerinin pek çoğunun düzenleyicisidir (42).

ANP'nin sodyum, volüm veya kan basıncı üzerinde etkili olan hormonlarla ilişkisi araştırılmış, plazma arginin vazopressin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Aldosteronunadrenal zona glomerulozadan salınımını inhibe ettiği tespit edilmiştir (34,48). Stres sırasında salınan ANP, intrahipotalamik olarak vazopressin sekresyonunu inhibe eder. Vazopressin, stres durumunda adrenokortikotropik hormon (ACTH) sekresyonunu artırdığından, ANP vazopressin üzerinden de streste artan ACTH sekresyonunu azaltır (39). ANP, stres sırasında azalan immün yanıtı doğrudan ve dolaylı olarak artırır. Stres anında ANP salınımının ACTH ile oluşan immünsüpresyonu azalttığı belirtilmektedir (50). Obezite ve hiperinsülinemide ANP düzeylerinin düştüğü ve ANP etkisine natriüretik yanıtın azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, sodyum ve sıvı retansiyonuna yol açarak hipertansiyona katkıda bulunur (50).

Luteal hücrelerde, cGMP'deki artışla ANP sentezi artmakta, bu durum da progesteron sentezinin artmasına yol açmaktadır. ANP'nin ovaryumlardasalgınması ve bu sentez miktarının sıçanlarda siklus boyunca farklılık göstermesi hormonun ovaryumlarda fizyolojik etkileri olduğu anlamına gelmektedir. Yine oviduktun mukoza katmanında ANP mRNA'sı bulunmuş olup, ANP'nin bu mukoza katmanından sentezlenmekte olduğu kuvvetle muhtemeldir. Dolayısıyla lokal bir düzenleyici olarak burada görev yapar (37).

Buna göre steroidogenesi arttırmakta, oosit maturasyonunu inhibe etmekte, silier harekete, ovumun taşınmasına, mukus sekresyonuna etki etmektedir. Bu durum, yukarıda değinildiği gibi siklus boyunca değişen reseptör seviyesinden anlaşılmaktadır (37,51).

Gebelikte bakıldığında ANP reseptörlerinin plasenta, uterus, vitellüs kesesi, desidual bez ve plasentanın maternal damarlarında yoğunlaştığı görülmektedir (52). Gebelik boyunca kalp atım hızı %40 oranında artmakta, vasokontraktör ajanlara cevap azalmakta ve çevresel

damar direnci düşmektedir. Bu düzenlemenin ne şekilde ve nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemekle birlikte, süreç boyunca plazmada artış gösteren ANP konsantrasyonunun önemli bir etken olduğu öngörülmektedir (52,53).

Erkek genital sisteme bakıldığında, ANP seminifer tubullerde; Leydig hücrelerinde, germ hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde sitoplazmada yerleşik olarak bulunmaktadır. Leydig hücrelerine etki ederek testosteron seviyesini arttırmakta, bu yolla hücre gelişimine ve spermatogenezise etki etmektedir (54).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilmiş, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen Sprague-Dawley 32 adet erişkin dişi sıçan ve 12 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 saat karanlık/aydınlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Düzenli olarak kafes bakımları yapıldı.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30.05.2012 tarih ve 2012.04.03 karar nolu (Ek 1) onay alındı.

Çalışma başlangıcında, hayvanların tartımları yapılarak tamamı bir gece aç bırakıldı. Ertesi sabah bütün hayvanların açlık kan şekerleri (IME-DC, Almanya) ölçüldü. Ölçüm sonunda elde edilen kan değerleri ile (en düşük 71 miligram /desilitre (mg/dL), (en yüksek 125 mg/dL) hayvanların sağlıklı oldukları tespit edildi. Çalışmada hayvanlar rastgele **Kontrol grupları** ve **Diyabet grupları** olarak ikiye ayrıldı.

Kontrol grubunda herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Kafeslerine uygun sayıda erkek bırakılan sıçanların vajinal smearlerinde mikroskopik olarak spermatozoon görülen hayvanlar gebeliğin sıfıncı günü (0. gün) kabul edilerek deney başlatıldı. Gebeliğin 5. günü 8 ve 10. günü 8 denek derin anestezi altında sakrifiye edildi.

Diyabet grubunda ise yanlarına uygun sayıda erkek hayvan bırakılmasından sonra vajinal smear ile yapılan kontrollerde, mikroskop altında smear örneklerinde spermatozoon görülen hayvanlar gebeliğin 0. gününde kabul edildi. Aynı gün tek doz olarak 60 mg/kg STZ'nin intraperitoneal (i.p.) (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda

çözülerek) uygulamasını takiben 48 saat sonra kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde kan glukoz seviyesi 280 mg/dL ve üstü olanlar diyabet kabul edilip gruplar oluşturuldu. Gebeliğin 5. günü 8 ve 10. günü 8 denek derin anestezi altında sakrifiye edildi.

- Gruplar: 1- kontrol gebe 5. gün
2- kontrol gebe 10. gün
3- diyabet gebe 5. gün
4- diyabet gebe 10. gün

Gebelik Tespitinde Vajinal Smear Yöntemi

Yanlarına uygun sayıda erkek bırakılan dişi sıçanlardan günde 1 kez olmak üzere her sabah deneklerin vulva bölgesi yüzde (%) 70 etil alkolle (Merck, Almanya) silindikten sonra, steril tahta çubukların pamukla kaplanmış uç kısımları nemlendirildi ve vajina içerisinden, nazıkçe sürüntü alınıp, lam üzerine yayıldı. Yayma lamaların oda sıcaklığında kuruması beklendi. Sonrasında lamalar ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Japan) incelenerek vajinal smearlerinde mikroskopik olarak spermatozoon görülen denekler gebeliğin 0. günü kabul edildi.

Işık Mikroskopik İnceleme

Işık mikroskopik incelemeler için pankreas, ovaryum ve uterus dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında işleme tabi tutuldu. Bu amaçla ovaryumlarından biri (sağ veya sol rastlantısal biçimde) ile uterus ve pankreas doku parçası %10'luk tamponlu formol solüsyonu (100 ml % 37'lik formalin solüsyonu, 900 ml distile su, 6,5 gram Na₂HPO₄, 4 gram NaH₂PO₄H₂O içerisine alınarak 48 saat fikse edildi. Sonrasında dokular bir gece akar suda yıkandı. Ardından sırasıyla %70, %80, %90, %96'luk alkollerden, 1'er saat; 2 tekrar ve 1,5 saat olmak kaydı ile mutlak alkolden geçirilerek dehidretasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 45 dakika toluol ile muamele edildi, sürenin sonunda doku örnekleri 42-44 °C sıcaklıktaki yumuşak parafine alındı ve en az 45 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda dokular yumuşak parafinden, sıvı sert parafine alındı. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirik mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığındaki kesitler alındı. Genel histolojik durumun incelenmesi amacıyla hematoksilin ve eozin (H+E) boyası uygulandı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal incelemeler için ovaryum ve uterus dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında işlemlendirildi. Bu amaçla, ovaryumlarından biri (sağ veya sol rastlantısal biçimde) ile uterus doku parçası %10'luk tamponlu formol solüsyonu (100 ml %37'lik formalin solüsyonu, 900 ml distile su, 6,5 gram Na₂HPO₄, 4 gram NaH₂PO₄H₂O) ile 48 saat fiksasyonu tabii tutuldu. Sonrasında dokuları bir gece akarsuda yıkandı. Ardından sırasıyla %70, %80, %90, %96'lık alkollerden, 1'er saat; 2 tekrar ve 1,5 saat olmak kaydı ile mutlak alkolden geçirilerek dehidretasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 45 dakika toluol ile muamele edildi, sürenin sonunda doku örnekleri 42-44 °C sıcaklıktaki yumuşak parafine alındı ve en az 45 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda dokular yumuşak parafinden sıvı sert parafine alındı ve bloklandı. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirli mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığındaki kesitler alındı.

NPR-A İmmün Boyası

Poli-L-lysin lamlara alınan 5µm kalınlığındaki kesitler, deparafinize edilerek suya indirildi. Antijen retrieval işlemi için kesitler özel şalelere alınıp pH 6.0 sitrat buffer solüsyonu ile mikrodalga fırında (Vestel, 1550) maksimum konumunda 3 kez 5'er dakika inkübe edildi. Kesitler 20-25°C oda ısısında soğutulduktan sonra pH 7,2-7,4 0,01M phosphate buffer saline (PBS)'de 3 kez 5'er dakika yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için su ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksid) solüsyonu içinde 10 dakika bekletildi ve PBS ile yıkandı. Özgül olmayan antikör bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra block serum yıkamadan uzaklaştırıldı ve 1/50 oranında sulandırılan primary antibody (PAB) damlatılarak (Santa Cruz, sc-137041) 2 saat süreyle 25 °C ısıdaki etüvde inkübe edildi. PBS ile yıkama sonrası sekonder antibody (biotinli) damlatılarak 10 dakika oda ısısında inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkandı. HRP-streptavidin damlatılarak 10 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra PBS ile yıkanan dokular üzerine AEC kromojeni damlatıldı ve 5 dk. sonra mikroskop altında boyanma olup olmadığı kontrol edilerek dokular distile suya alındı. Weigert'in demirli hematoksilin'de 5 dakika zemin boyaması yapılan dokulara musluk suyunda 3-5 dakika morartma yapıldı. Sonrasında distile suya alınan kesitler su bazlı kapatma medyumu ile kapatıldı.

ANP İmmün Boyası

Poli-L-lysin lamlara alınan 5µm kalınlığındaki kesitler deparafinize edilerek suya indirildi. Kesitler antijen retrieval aşaması yapılmadan PBS'de 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için su ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ solüsyonu içinde 10 dakika bekletildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra block serum yıkamadan uzaklaştırıldı ve 1/50 oranında sulandırılan primary antibody (PAB) damlatılarak (Santa Cruz, sc-80686) 2 saat süreyle 25 °C ısıdaki etüvde inkübe edildi. PBS ile yıkama sonrası sekonder antibody (biotinli) damlatılarak 10 dakika oda ısısında inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkandı. HRP-streptavidin damlatılarak 10 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra PBS ile yıkanan dokular üzerine AEC kromojeni damlatıldı ve 5 dk. sonra mikroskop altında boyanma olup olmadığı kontrol edilerek dokular distile suya alındı. Weigert'in demirli hematoksilen'de 5 dakika zemin boyaması yapılan dokulara musluk suyunda 3–5 dakika morartma yapıldı. Sonrasında distile suya alınan kesitler su bazlı kapatma medyumu ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme, Hücre Sayımları ve İstatistiksel Analizler

İmmünohistokimyasal boyama yapılan preparatlarda ANP'nin boyanması, boyanmanın şiddetine göre derecelendirilerek semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif değerlendirme, 0 (sıfır); boyanma yok, (+); zayıf boyanma, (++); orta, (+++); şiddetli olmak üzere değerlendirildi.

NPR-A ile immünohistokimyasal boyama yapılan preparatlarda NPR-A pozitif hücrelerinin dağılımını belirlemek için yapılan hücre sayımlarında 100 kare oküler mikrometre (eyepiece graticule) kullanıldı. 20'lik objektif büyütmesinde oküler mikrometrenin 100 kare birim alanındaki pozitif hücreler sayıldı ve milimetre kare (mm²)'deki hücre sayısı hesaplandı (55).

Her uterus kesitinin endometriyum ve miyometriyum katmalarından rastgele seçilen her bir bölgeden 3-4 (toplam 25) büyütülmüş alanda hücre sayımı yapıldı. Ovaryum kesitlerinde rastgele seçilen her bir medullar bölgeden 3-4 (toplam 25) büyütülmüş alanda pozitif hücre sayımı yapıldı. Seri kesitlerin sayılması sonucu bu rakamların aritmetik ortalaması alındı.

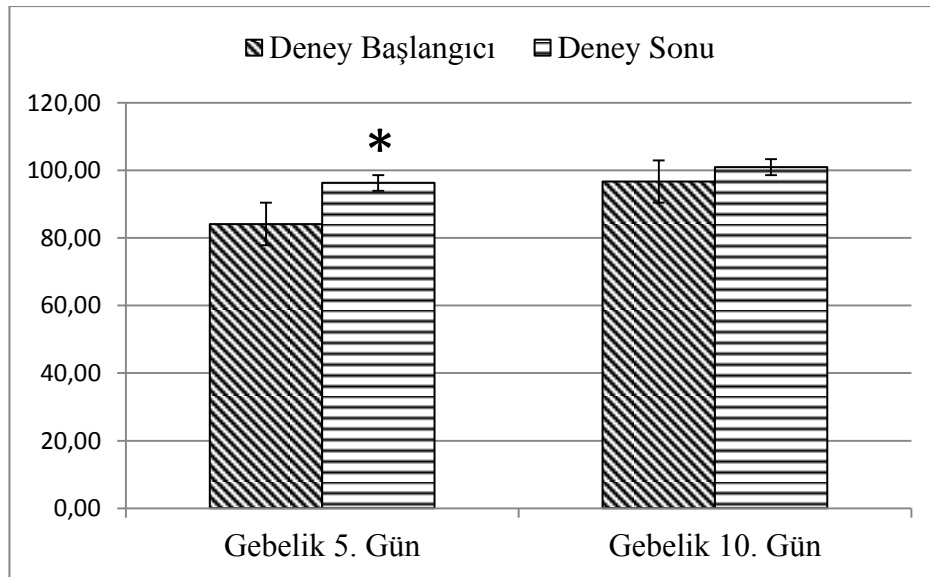
NRP-A pozitif hücre sayımlarının SAS v.13.0 paket programı kullanılarak varyans analizleri yapıldı. Gruplar arası ve içindeki farklılıklar Duncan testi ile belirlendi.

BULGULAR

MORFOMETRİK BULGULAR

Kan Glukoz Düzeyleri

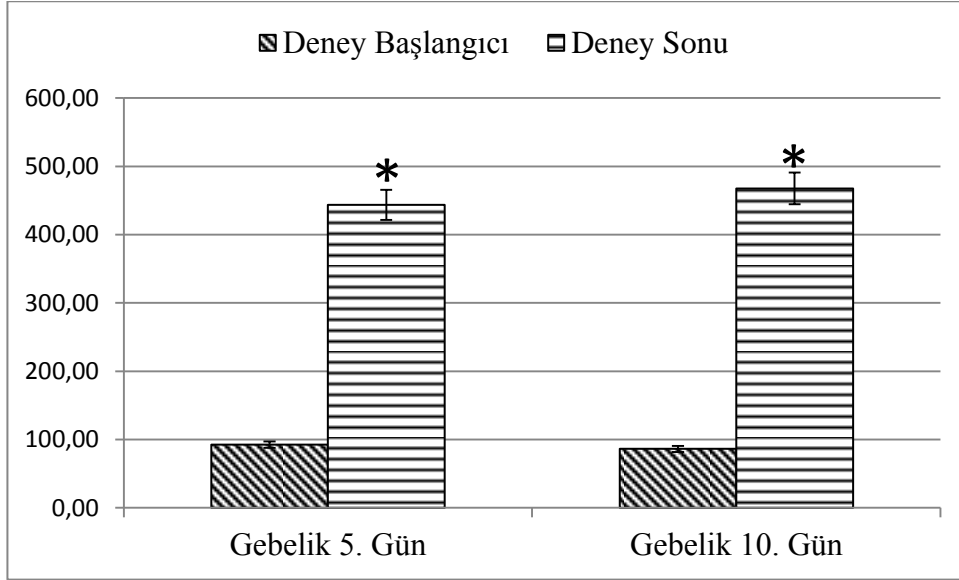
Tüm gruplarda kan glukoz değerleri deney başlangıcı ve sonunda glukometre (IME-DC, Almanya) kullanılarak ölçüldü. Bu ölçümler sonunda kontrol grubu hayvanların kan glukoz düzeylerinin başlangıç değerleri 76-125 mg/dl arasında olduğu saptandı. Kontrol grupları hayvanlarından gebelik 10. günlerde, kan glukoz düzeylerinde deneyin başından sonuna kadar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 2).



* $P < 0,05$ başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 2. Kontrol gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu kan şeker düzeyleri (mg/dl).

Diyabet gruplarında, STZ uygulamasından 3 gün sonraki ölçümde kan glukoz düzeylerinin 369-540 mg/dl arasında olduğu tespit edildi. Diyabet gruplarında gebeliğin 5. ve 10. günlerinde deney başlangıç değerlerine göre anlamlı bir artış olduğu görüldü ($P<0.05$;Şekil 3) .

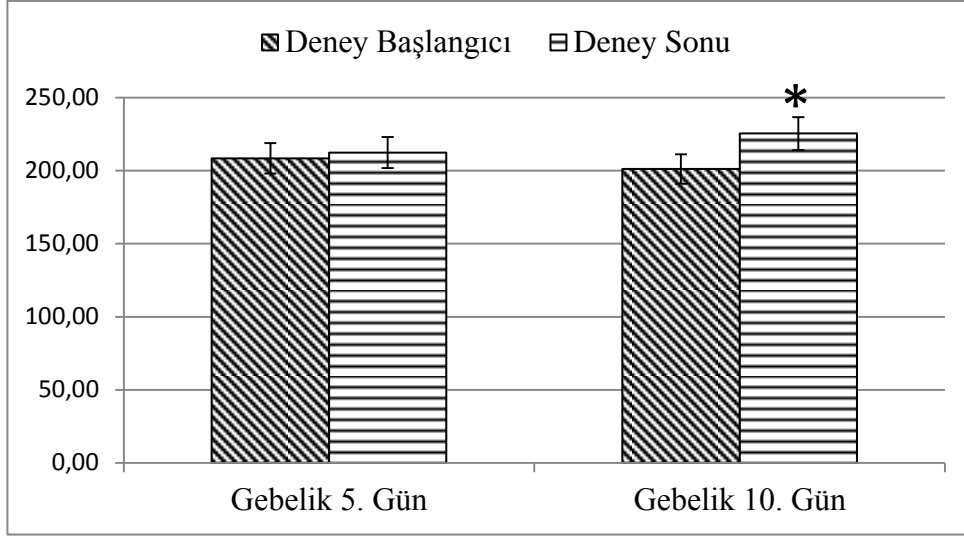


* $P<0.05$ başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 3. Diyabet gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu kan şeker düzeyleri (mg/dl).

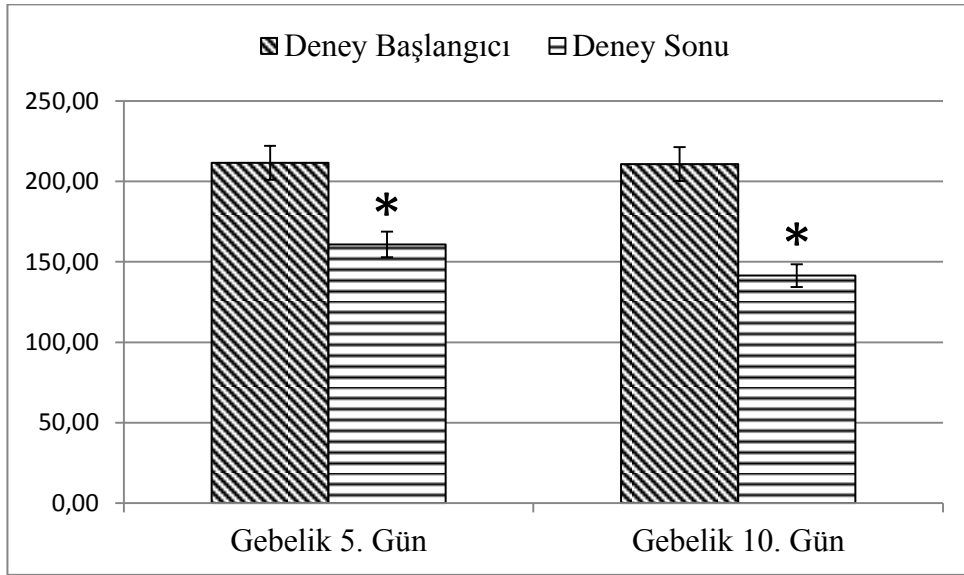
Ağırlık Bulguları

Tüm gruplardaki deneklerin ağırlık ölçümleri deneyin başında ve sonunda yapılmıştır. Kontrol gruplarında, deneylerin sonunda gebeliğin 10. günlerindeki canlı ağırlıkta artış başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$; Şekil 4). Deney sonunda yapılan ağırlık ölçümlerinde, diyabet gruplarında deney başlangıcına göre hem gebeliğin 5. günü hem de 10. günlerinde vücut ağırlıkları anlamlı olarak düşmüştür ($P<0.05$;Şekil 5).



* P<0.05 başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 4. Kontrol gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu ağırlık değerleri (gr).



* P<0.05 başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 5. Diyabet gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu ağırlık değerleri (gr).

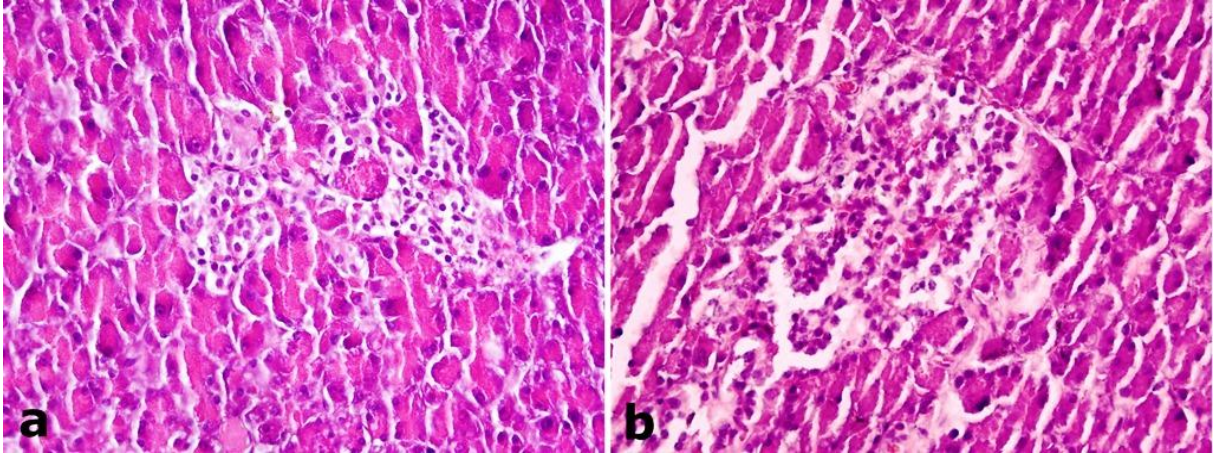
HİSTOLOJİK BULGULAR

Işık Mikroskopik Bulgular

Işık mikroskopik incelemelerde diyabet ve kontrol grubu hayvanlarından alınan pankreas, ovaryum ve uterus dokuları incelenmiştir. Pankreas dokusunda endokrin adacıklardaki değişimin gösterilmesi için H+E boyası yapıldı.

Pankreas Histopatolojik Bulgular

H+E boyaması ile boyanan pankreas dokuları incelendiğinde, kontrol grubu hayvanların Langerhans adacıklarında normal yapıda oldukları izlenirken, diyabet grubu hayvanların endokrin adacıklarında β hücrelerinde nekrozun, vakuolleşmenin ve dejenerasyonların varlığı dikkat çekiciydi (Şekil 6).



Şekil 6. a: Kontrol grubu sıçandan alınmış pankreas dokusu; b: Diyabet grubu sıçandan alınmış pankreas dokusunda endokrin adacıkların görünümü H+E, X400.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

ANP boyaması

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlarda, gebeliğin 5. ve 10. günlerinde alınan ovaryum ve uterus dokularının immunohistokimyasal ANP boyamasının skorlaması Tablo 2’de verilmiştir.

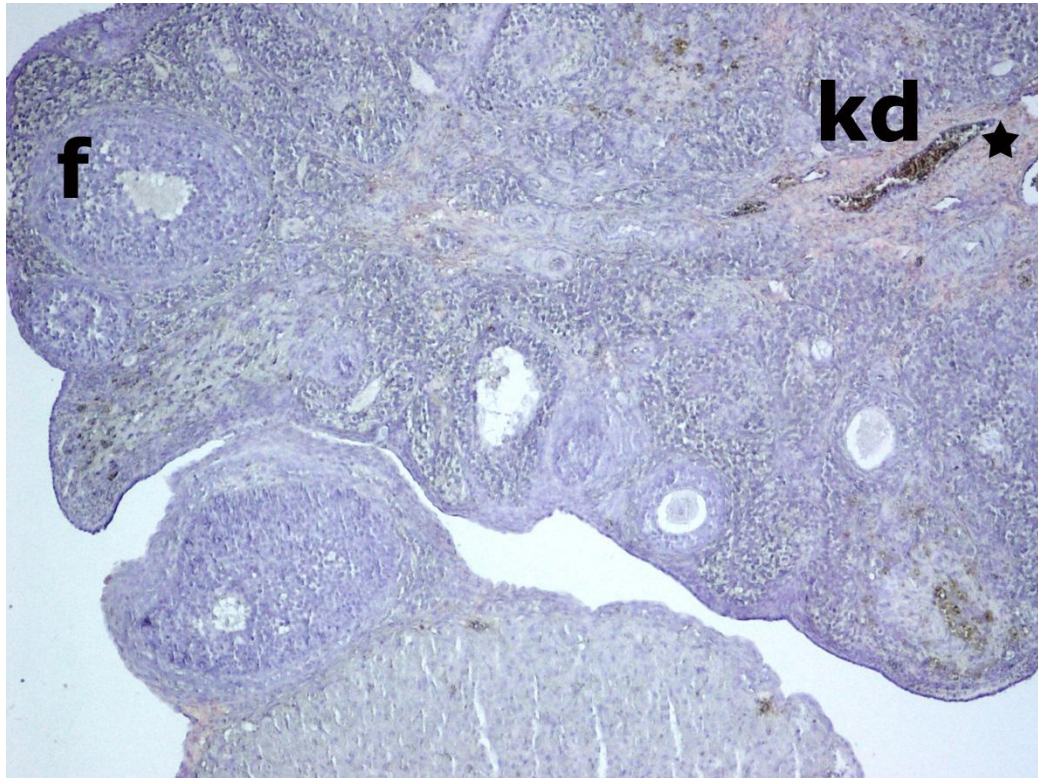
Tablo 2. Kontrol ve diyabet gruplarında gebeliğin 5 ve 10. günlerindeki ANP immunohistokimyasal boyamasının yoğunluğunun semikantitatif değerlendirilmesi

| | Kontrol | | Diyabet | |
|---------|---------|--------|---------|--------|
| | Ovaryum | Uterus | Ovaryum | Uterus |
| 5. gün | + | + | ++ | ++ |
| 10. gün | ++ | ++ | +++ | +++ |

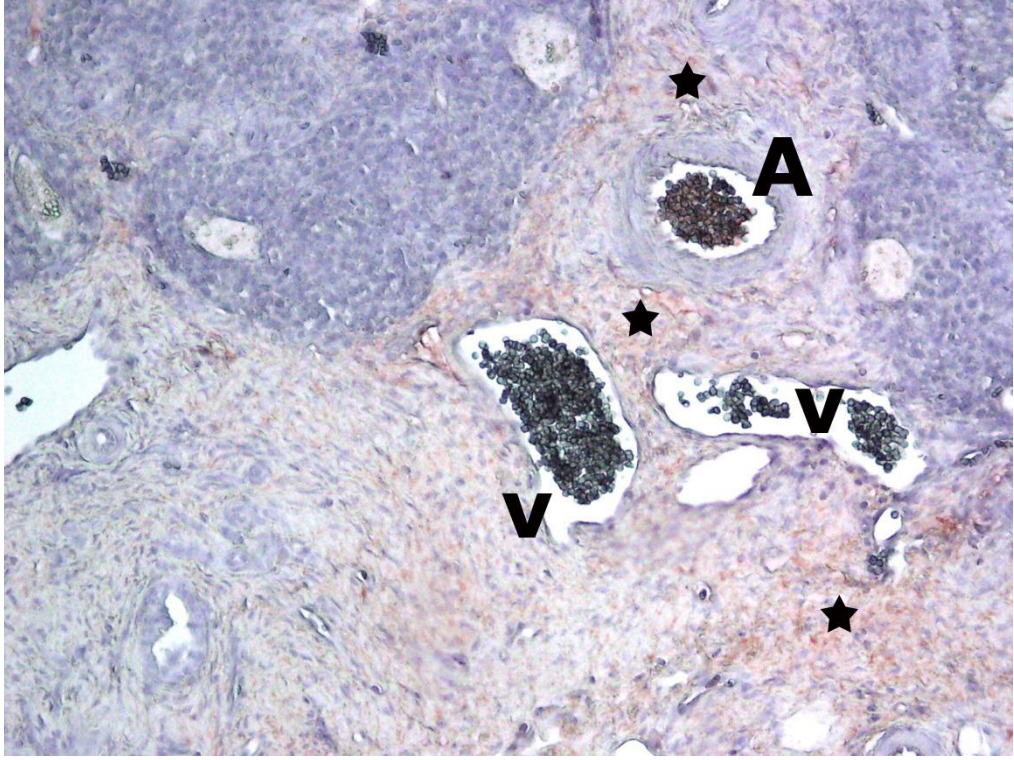
0 (sıfır); boyanma yok, (+); zayıf boyanma, (++); orta, (+++); şiddetli

ANP immunohistokimaya boyaması yapılan ovaryum dokuları incelendiğinde, ovaryumlarda medulla kısmında özellikle damarlar etrafında boyanma olduğu görüldü. Kontrol grubu ovaryum dokularında gebelik 5. günlerde (+) derecesinde olan boyama yaygınlığı gebelik 10. günlerde (++) olarak değerlendirildi (Şekil 7-8). Foliküllerde ve korpus luteumda boyanma görülmedi. Kontrol grubu uterus dokuların incelendiğinde 5. Günlerde miyometriyum tabakasında (+) yoğunlukta bir boyanma gözlenirken 10. günlerde artan boyanma (++) olarak belirlendi (Şekil 9-10).

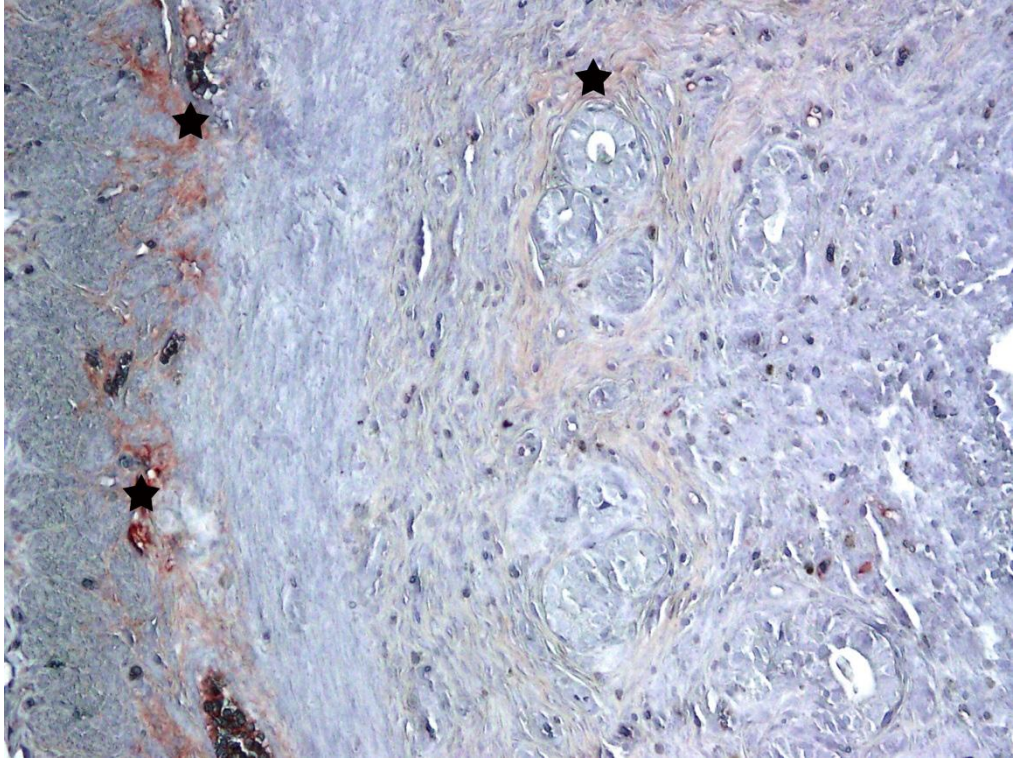
Diyabet guplarında gebelik 5. günlerde, ANP immün boyanması ovaryum medullasında özellikle damarlar etrafında gözlenirken yoğunluk (++) olarak değerlendirildi ve gebelik 10. günlerde boyanmanın (+++) derecesinde olduğu görüldü (Şekil 11-12). Diyabet grubu uterusları incelendiğinde ise gebelik 5. günlerde miyometriyum tabakasında (++) şiddetinde bir boyanma gözlenirken, gebelik 10. günlerde özellikle sadece miyometriyumda değil, endometriyumda bezlerin bazal kısmında (+++) şiddetinde boyanma gözlendi (Şekil13-14).



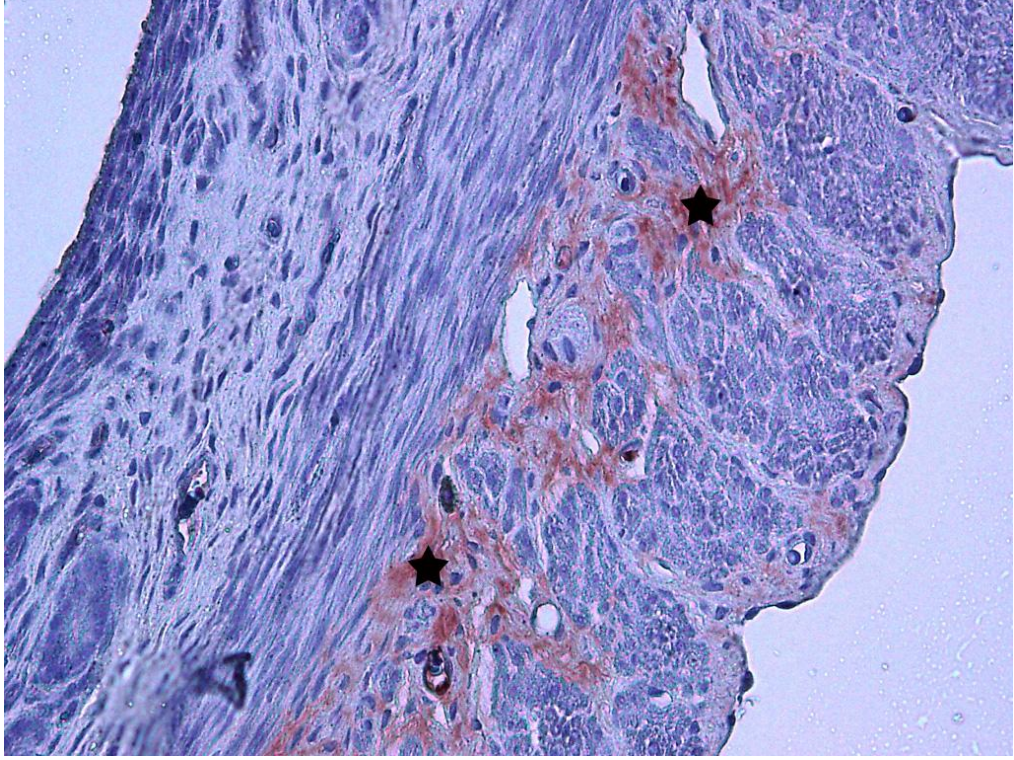
Şekil 7. Kontrol grubu gebelik 5. gün ovaryum medullası kan damarı etrafında zayıf ANP boyanması, X100 (*: ANP pozitif boyanma, f: folikül, kd: kan damarı).



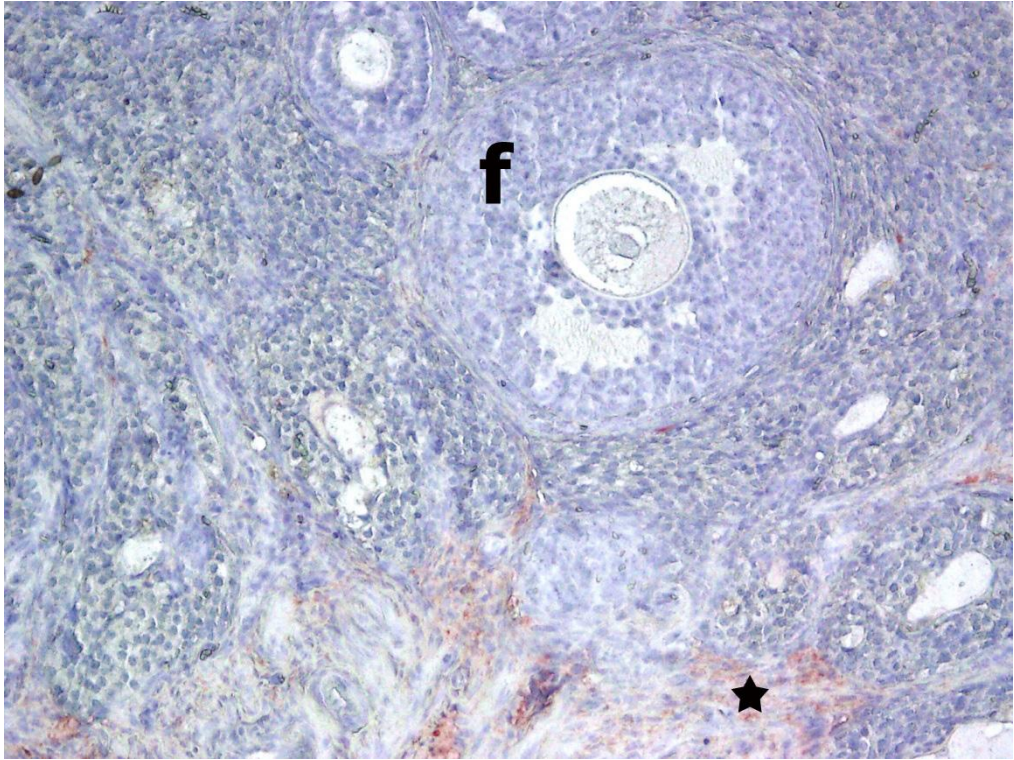
Şekil 8. Kontrol grubu gebelik 10. gün ovaryum medullası kan damarı etrafında ANP boyanması, X200 (*: ANP pozitif boyanma A:arter, V: ven).



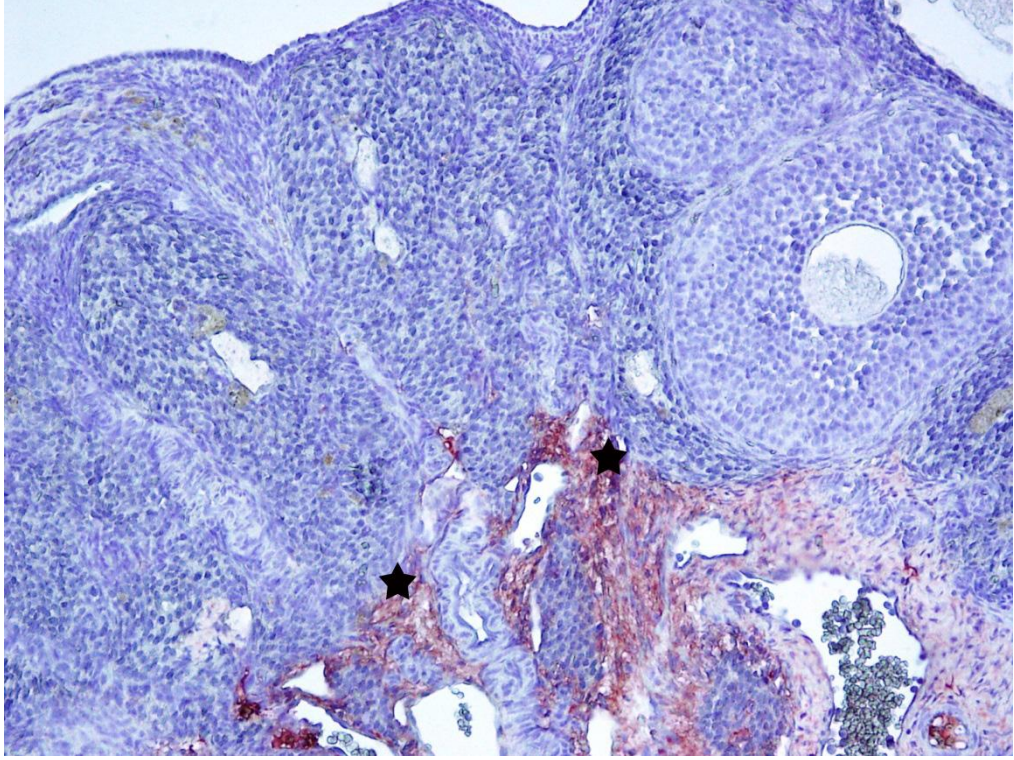
Şekil 9. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus dokusunda ANP boyanması, X200 (*: ANP pozitif boyanma).



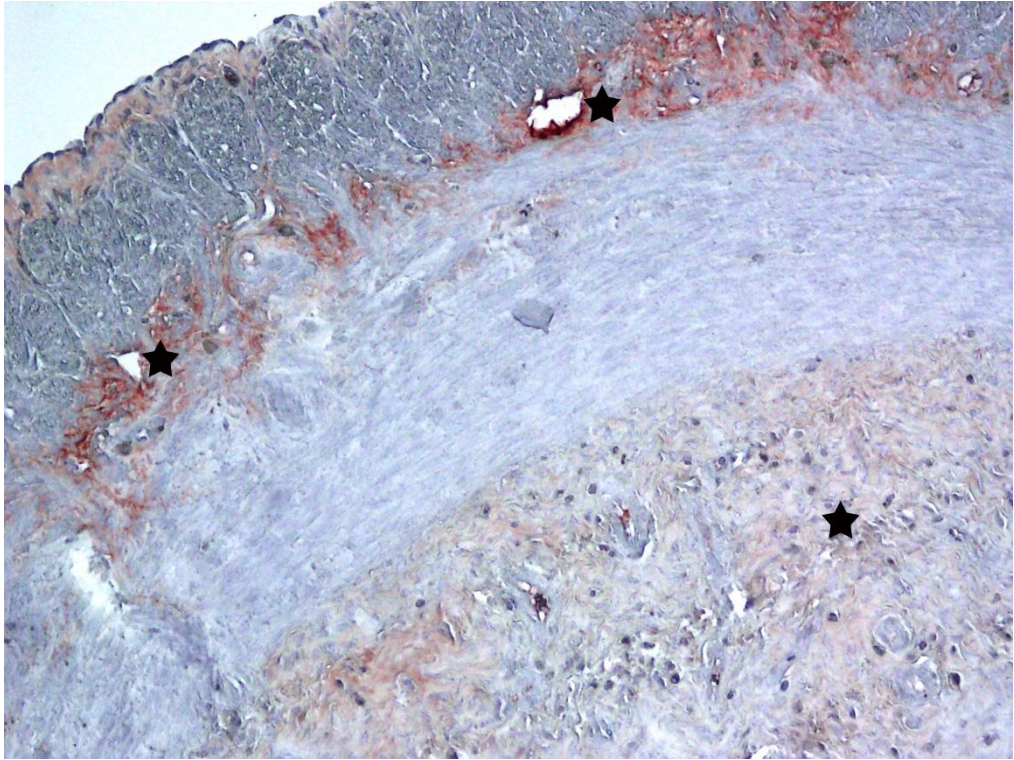
Şekil 10. Kontrol grubu gebelik 10. gün uterus dokusunda ANP boyanması, X200 (*: ANP pozitif boyanma).



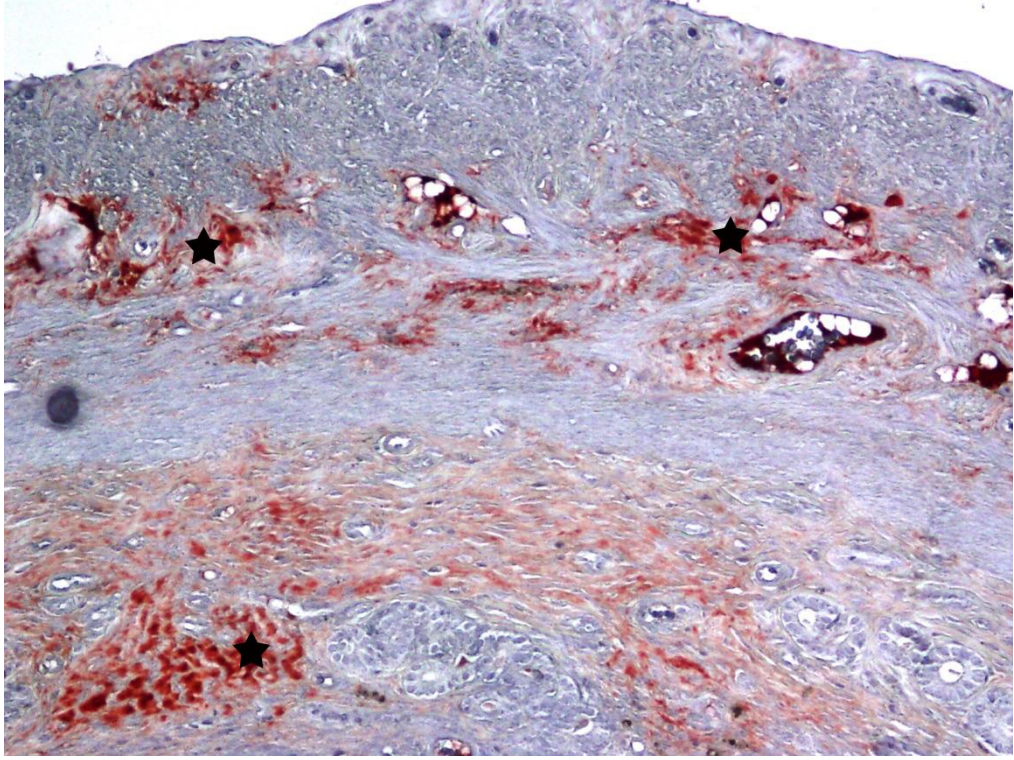
Şekil 11. Diyabet grubu gebelik 5. gün ovaryum ANP boyanması, X200 (*: ANP pozitif boyanma f: folikül).



Şekil 12. Diyabet grubu gebelik 10. gün ovarium ANP boyanması, X200 (*: ANP pozitif boyanma).



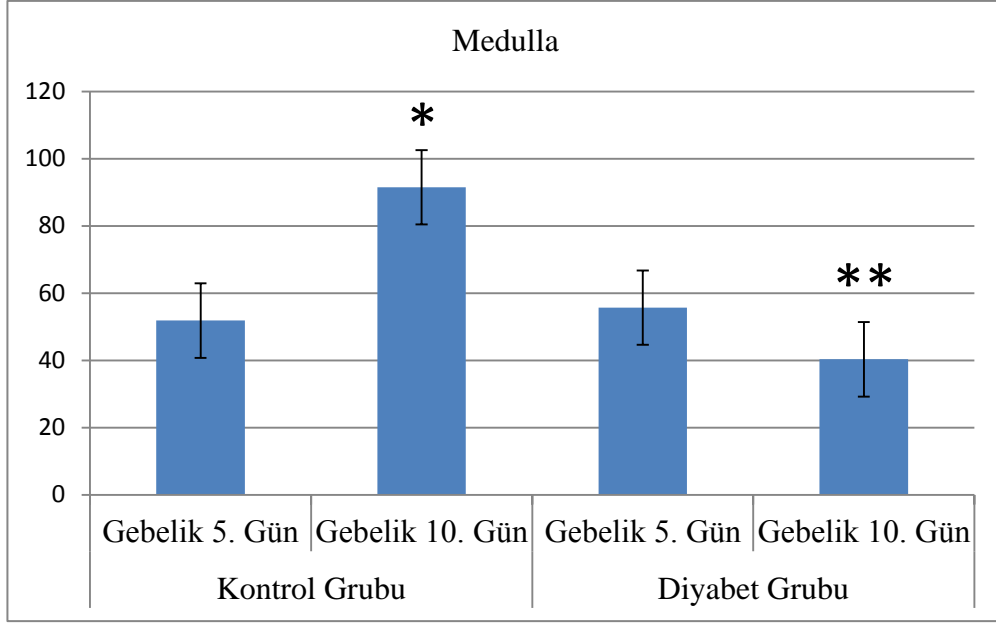
Şekil 13. Diyabet grubu gebelik 5. gün uterus ANP boyanması, X200 (*: ANP pozitif boyanma).



**Şekil 14. Diyabet grubu gebelik 10. gün uterus ANP boyanması, X200
(*: ANP pozitif boyanma).**

NPR-A boyaması

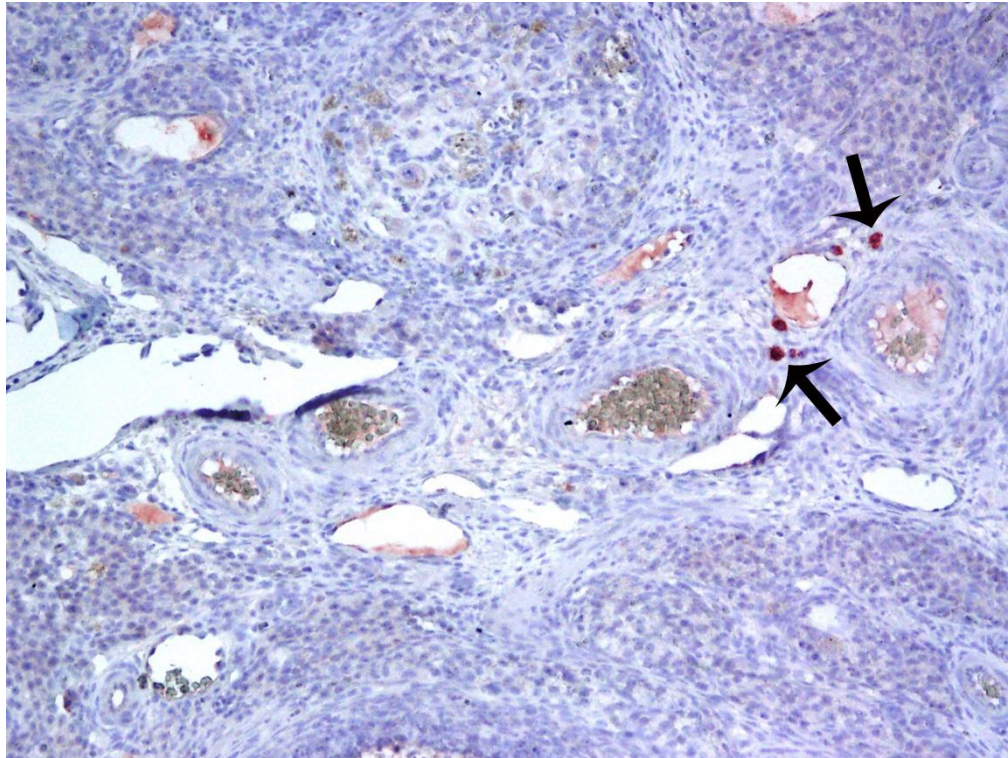
NPR-A boyaması yapılan ovaryum dokusunda medullada kontrol grubu gebelik 10. günde, kontrol gebelik 5. gün ve diyabet gebelik 5. ve 10. günlere göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Diyabet grubunda ise gebelik 10. günlerde 5. günlere göre bir anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 15). Kontrol ve diyabet grupların tümünde NPR-A pozitif hücre boyanması yalnızca medullar alanda tespit edilmiştir. Kortekste herhangi bir spesifik boyanma gözlenmemiştir. Hem diyabet hem de kontrol gruplarında primer ve sekonder foliküllerde NPR-A pozitif boyanma gözlenmemiştir (Şekil 16-19).



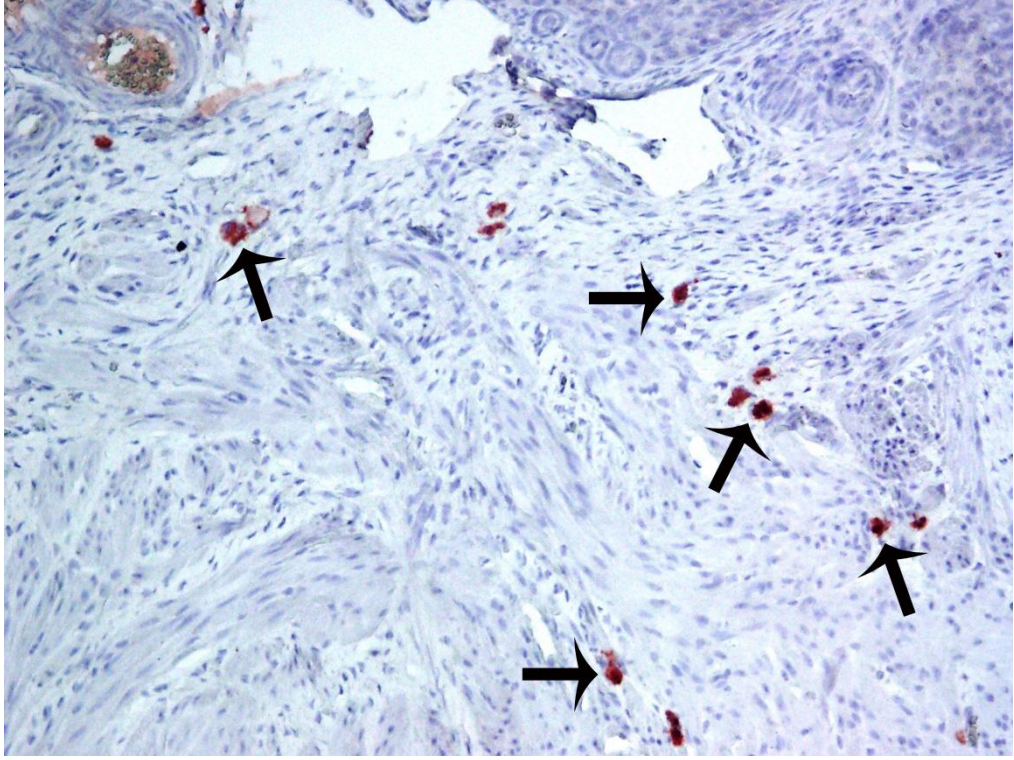
* $P < 0.05$ kontrol gebelik 5. ve diyabet gebelik 5. ve 10. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı

** $P < 0.05$ diyabet gebelik 5. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı

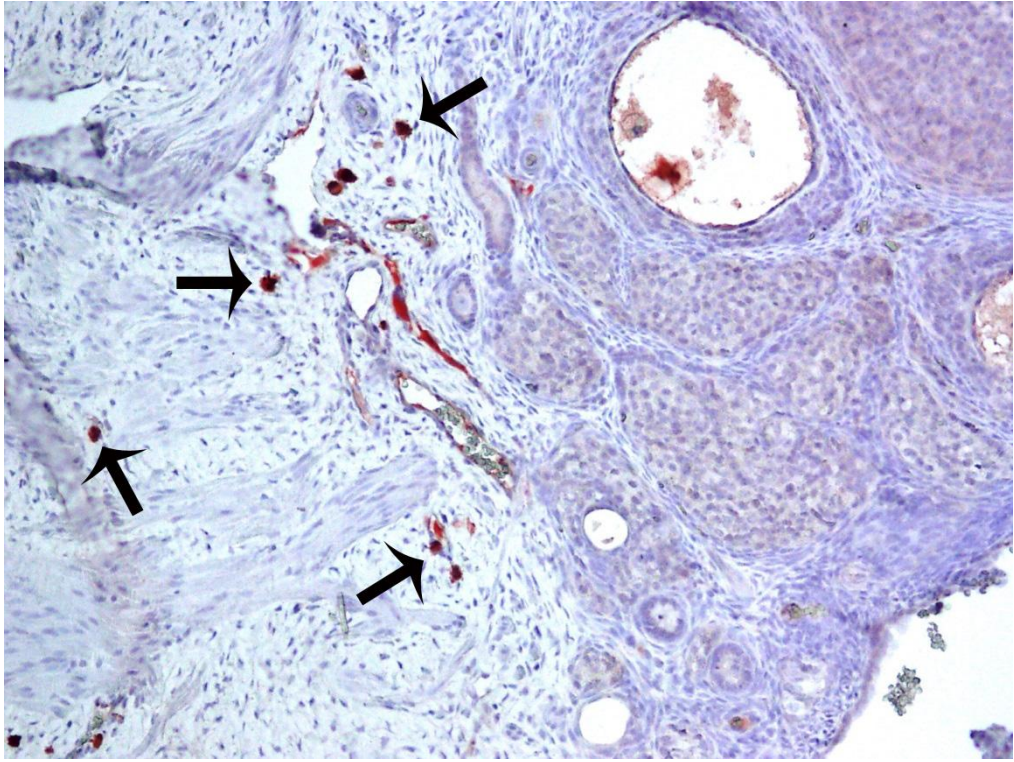
Şekil 15. Kontrol ve diyabet grubu ovaryum medullasında NPR-A pozitif hücre dağılımı (mm^2).



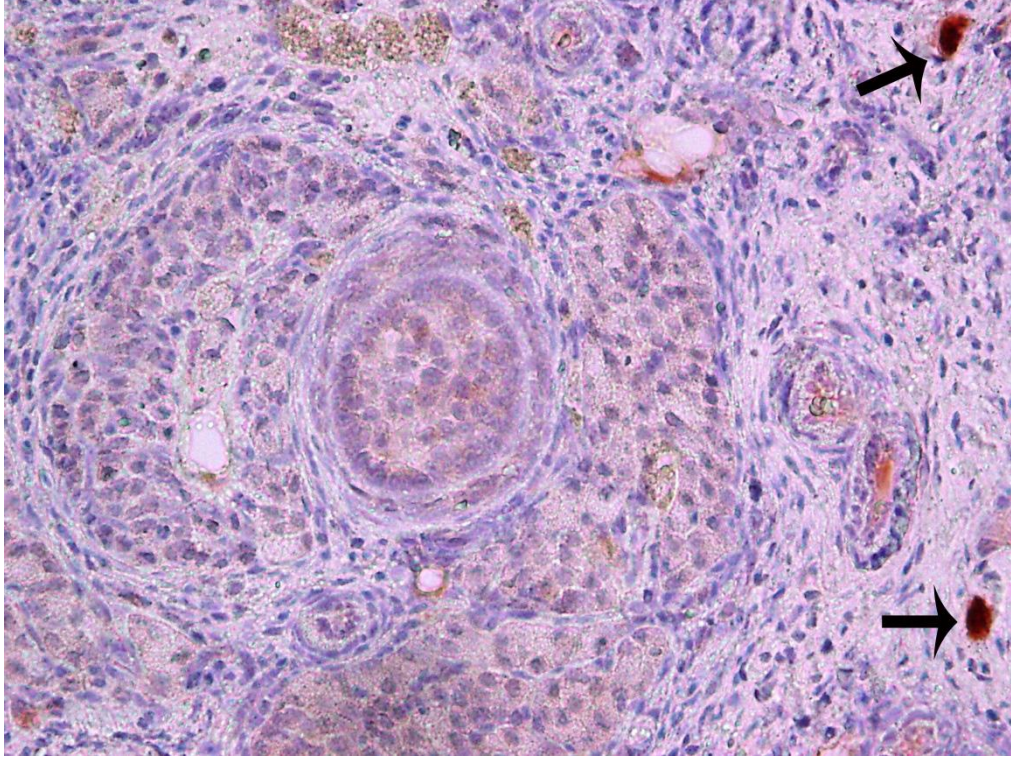
Şekil 16. Kontrol grubu gebelik 5. gün ovaryum medullasında NPR-A boyanması, X100 (ok: NPR-A pozitif hücreler).



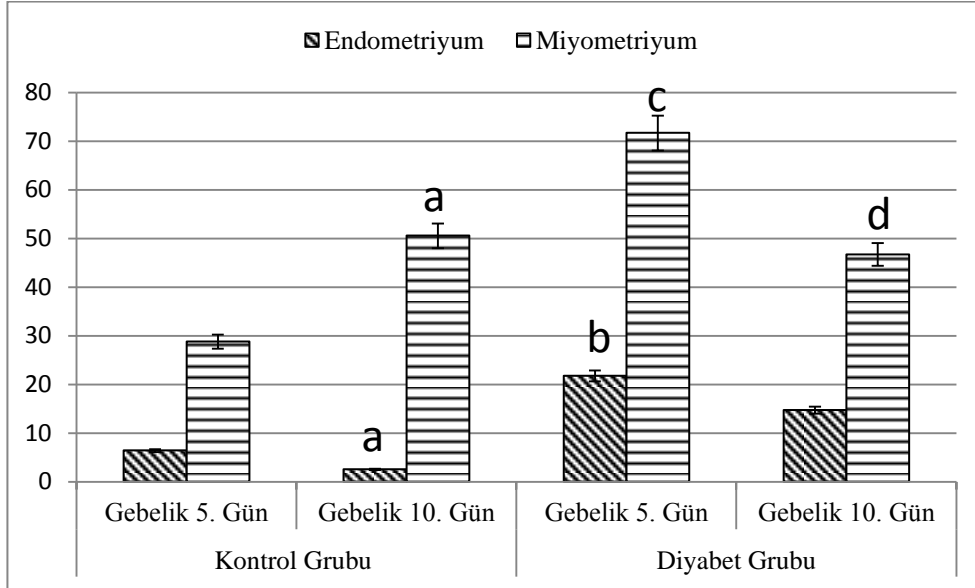
Şekil 17. Kontrol grubu gebelik 10. gün ovaryum medulladasında NPR-A boyanması, X200 (ok: NPR-A pozitif hücreler).



Şekil 18. Diyabet grubu gebelik 5. gün ovaryum medulladasında NPR-A boyanması, X200 (ok: NPR-A pozitif hücreler).



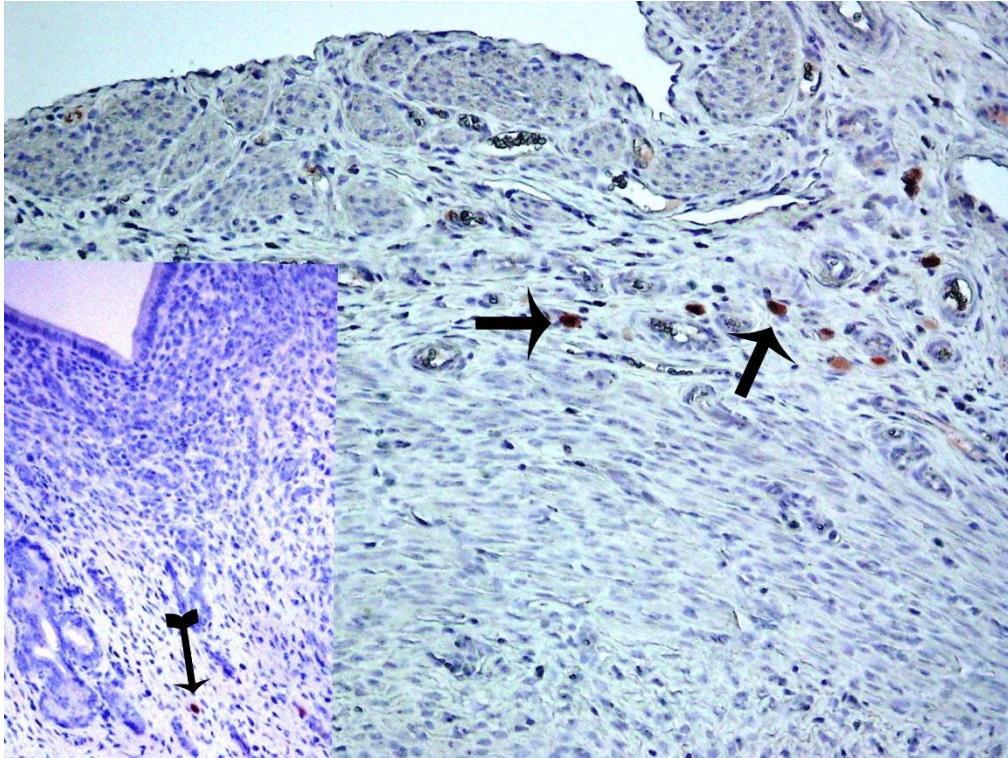
Şekil 19. Diyabet grubu gebelik 10. gün ovaryum medullasında NPR-A boyanması, X400 (ok: NPR-A pozitif hücreler).



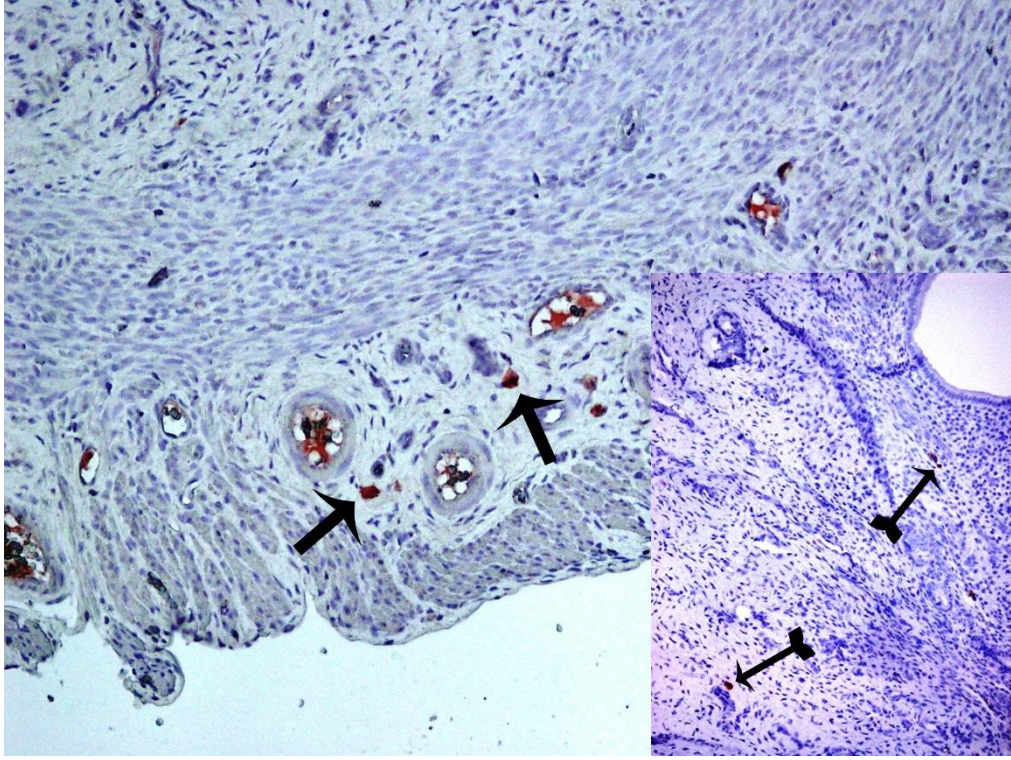
- a:** $P < 0.05$ kontrol gebelik 5. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı
b: $P < 0.05$ kontrol gebelik 5. ve 10. günler ile diyabet gebelik 10. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı
c: $P < 0.05$ kontrol gebelik 5. ve 10. günlere göre ve diyabet gebelik 10. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı
d: $P < 0.05$ diyabet gebelik 5. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 20. Kontrol ve diyabet grupları uterus dokusunda NPR-A pozitif hücre dağılımı (mm^2).

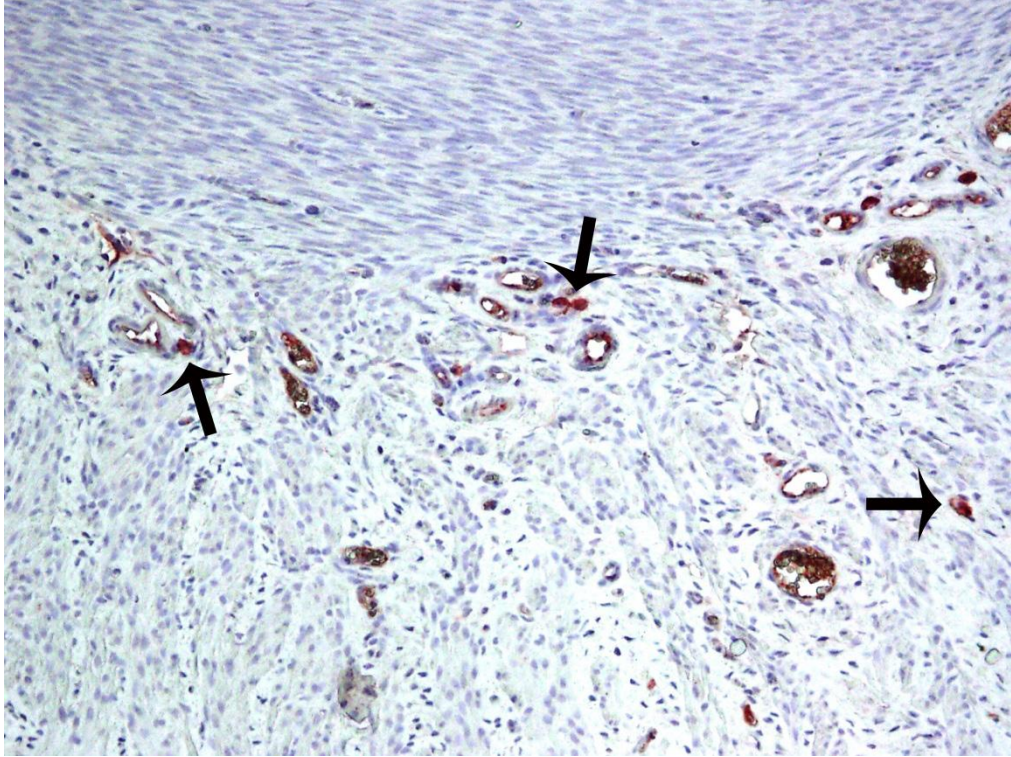
Uterus endometriyum tabakasındaki NPR-A pozitif hücre sayısında, kontrol gebelik 10. günlerde kontrol gebelik 5. günlere göre anlamlı bir azalma mevcuttur. Diyabet gebelik 5. günlerde kontrol gebelik 5. ve 10. günler ile diyabet gebelik 10. günlere göre anlamlı bir artış mevcuttur. Miyometriyum katmanına bakıldığında pozitif hücre sayısında, kontrol gebelik 10. günlerde kontrol gebelik 5. günlere göre anlamlı bir artış saptandı. Diyabet gebelik 5. gün grubunda, diyabet gebelik 10. gün ve kontrol gebelik 5. ve 10 günlere göre anlamlı olarak artış mevcuttur. Diyabet gebelik 10. gün grubunda ise, diyabet gebelik 5. güne göre anlamlı olarak azalma tespit edildi (Şekil 20). Pozitif boyanmaların özellikle miyometriyumun vasküler tabakasında ve endometriyumda damarlar etrafında olduğu görülmüştür (Şekil 21-24).



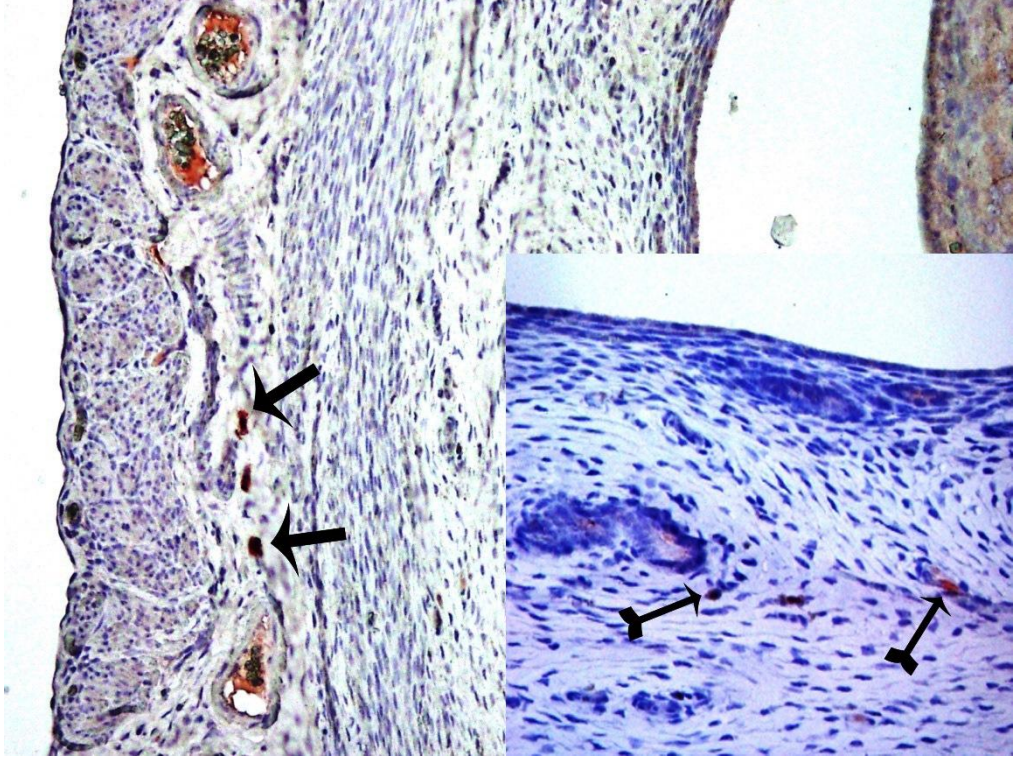
Şekil 21. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması, X200 (ok: NPR-A pozitif hücreler, küçük resim: Endometriyumda NPR-A pozitif hücreler).



Şekil 22. Kontrol grubu gebelik 10. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması, X200 (ok: NPR-A pozitif hücreler, küçük resim: Endometriyumda NPR-A pozitif hücreler).



Şekil 23. Diyabet grubu gebelik 5. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması, X200 (ok: NPR-A pozitif hücreler).



Şekil 24. Diyabet grubu gebelik 10. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması, X200 (ok: NPR-A pozitif hücreler, küçük resim: Endometriyumda NPR-A pozitif hücreler).

TARTIŞMA

DM, kompleks bir metabolik hastalık olup bireylerin kan glukoz konsantrasyonunda artışa ve kilo kayıplarına sebebiyet vermekte, ayrıca karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasını etkilemektedir. STZ ile yapılan deneysel diyabet modeli çalışmalarında, deneklerde kan-glukoz düzeyinde artış, kilo kayıpları, endokrin pankreasta hasar ve buna bağlı olarak insülin hormon seviyesinde azalma meydana gelmektedir (56). Sunulan bu çalışmada, deneysel diyabet oluşumu sonucu, sıçanların endokrin pankreaslarındaki hasarlar, kan-glukoz değerlerindeki yükselmeler ve kilo kayıpları önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Memelilerde atrial kardiyositlerin endokrin hücreler olduğu ve ANP salgıladığı bilinmektedir. ANP, diüretik, natriüretik ve vazodilatör etkileri olan; aldosteron, vazopressin, kortizol, arjinin ve renin salınımını inhibe edici özellikleri bulunan bir hormondur (57). Yapılan çalışmalar, ANP dahil 4 üyesi bulunan natriüretik peptidlerin benzer otokrin ve parakrin etkilere sahip olduğunu göstermiştir (9). ANP, etkisini iki membran proteinine bağlanarak göstermektedir. NPR-A ve NPR-B isimli reseptörlerin aktivasyonu ile cGMP biosentezi sağlanmaktadır. Plazmadan temizlenmesi ise NPR-C isimli reseptör ile gerçekleştirilmektedir (7).

Yapılan çalışmalarda, ANP'nin bir çok hücre, doku ve organ tarafından sentezlendiği bildirilmiştir. Bunlar arasında, sıçan merkezi sinir sistemi nöronları, timüs hücreleri, sıçır korneası, sıçanlarda damar düz kasları, fare makrofajları ve mast hücrelerinden ANP salınımı olduğu gösterilmiştir (58). Otokrin ve parakrin etki gösterdiği göz önüne alındığında sentezlendiği dokuların fizyolojilerinde etkileri olduğu görülmektedir (8).

Yapılan çalışmalarda, ANP'nin ovaryum ve uterus dokularında da sentezlendiği ve dokuların fizyolojik düzenlenmelerinde rol oynadığı görülmüştür (8,59). Önceki çalışmalara bakıldığında, ANP'nin sıçan ovaryumlarında intestinal alanlarda görüldüğü, granuloza hücrelerinde ve teka tabakasında ANP varlığına rastlanılmadığı bildirilmiştir. Diğer taraftan sığır korpus luteumunda, tavşan, domuz ve alabalık foliküllerinde ve foliküler sıvıda da bulunduğu bildirilmiştir (60).

Girsen ve ark. (61) yaptıkları çalışmada Tip 1 diyabetik gebeliklerde fetal kardiyak ANP sekresyonunun arttığını göstermişlerdir. Maternal hiperglisemi sonucu plazma ANP seviyesi akut olarak artmaktadır ve glisemik kontrolün zayıfladığı bu tür gebeliklerde, fütüste miyokardiyal hipertrofi görülmektedir. Bu fütüslerde total kalp debisinin normale göre arttığı bildirilmiştir (61).

Sunulan bu çalışmada, ANP'nin kontrol ve diyabet grubu ovaryum dokularında medullar kısımlarda immünoreaktivitesine rastlanılmıştır. Foliküller, teka tabakası ve granuloza hücrelerinde herhangi spesifik bir ANP immünoreaktivitesi gözlenmemiştir. Buna karşın, domuz ovaryum dokularında yapılan bir çalışmada granuloza hücrelerinde immünohistokimyasal olarak ANP belirlenmiştir. Adı geçen çalışmada, ANP'nin ovaryumlarda endokrin fonksiyonları düzenlediği, oosit maturasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (51).

Yapılan literatür taramalarında, sıçan uterus dokusunda ANP ve NPR-A'nın immünohistokimyasal olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple, ANP plazma konsantrasyonlarının incelendiği ve başka dokular üzerinde immunohistokimyasal boyamaların yapıldığı bazı çalışmalar ile tartışma yapılmıştır.

Yapılan araştırmalarda, ANP'nin uterus miyometrumlarında sentezlendiği, otkrin ve parakrin etki gösterdiği bildirilmiştir. Myometrial tabakadaki düz kasların gevşemesinde ve uteroplazental homeostasiste natriüretik peptidlerin rol oynadığı görülmektedir. Ayrıca, gestasyonel yaş artışıyla beraber ANP plazma seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu durumda ise myometrial kontraksiyonların kontrolünü sağlamakla beraber, gebelik yaşıyla birlikte artmasının tokolitik etki gösterdiği düşündürmektedir (52,59).

Carvajal ve ark. (60) hamsterlar üzerinde yaptıkları çalışmada, ANP'nin uterus düz kasları üzerine etkisini oksitoksinin etkilerini inhibe ederek gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna göre, ANP uterus miyometrial tabakada NPR-A reseptörlerini aktive ederek, cGMP sinyallerinin artmasını sağlamaktadır. BNP, ANP'ye göre kasların gevşemesinde daha iyi etki gösterirken, ANP daha fazla sinyal yolağını aktive etmektedir (60).

Sunulan bu çalışmada, gebe sıçanların uterus dokularına bakıldığında, ANP immünoreaktivitesinin özellikle miyometriyal tabakada kan damarları etrafında pozitif olduğu ve gebelik yaşı ile beraber doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda, Tip 1 DM'da akut hiperglisemi durumunda ANP plazma seviyesinin arttığı görülmüştür (7,62). Böbrekler üzerinde yapılan başka çalışmada ise, ANP sentezlediği ortaya konulmuş olan sıçan böbreklerinde, diyabetik durumda ANP sentezinin arttığı ifade edilmiştir (62). Böbreklerde ANP sentezinin diyabetik durumlarda güçlü bir şekilde artmasının ise diyabet sonucu değişen su ve sodyum dengesinin düzenlenmesine yönelik olduğu savunulmuştur (62). Qiu ve ark. (63) farelerde mide mukozası üzerinde yaptıkları araştırmada, mide mukozasından ANP sentezinin gerçekleştiğini ve bu sentezin STZ ile indüklenmiş diyabetik farelerde, kontrol farelere göre arttığını belirtmişlerdir. Diyabetik farelerde gastroparesis oluşumu sonucu mide kaslarında yavaşlayan kasılmalara bağlı olarak, ANP sentezinin arttığı ve bunun da kas hareketlerinin düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir (63).

Sunulan bu çalışmada gebe sıçanların ovaryum ve uterus dokularına bakıldığında ANP immünoreaktivitesinin diyabet grubunda kontrol grubuna göre arttığı ve önceki çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmüştür.

Vaillancourt ve ark. (64) yaptıkları çalışmada, sıçan akciğerlerinde ANP reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir. Akciğer dokusundaki NPR-A reseptör seviyesi NPR-B'den iki kat yüksek bulunmuştur. ANP ve CNP reseptörlerinin ise bu çalışmada gebe olmayan sıçanlarla karşılaştırıldıklarında, gebe sıçanların akciğerlerindeki seviyelerinde önemli bir değişiklik görülmediği bildirilmiştir (64). Aynı çalışmada, NPR-A ve NPR-B reseptörlerinin, uterusda gebelik yaşı arttıkça azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca CNP'nin ANP'ye göre uterusda, gebelikte salgılanmasının daha az olduğu ancak etkisinin oldukça yüksek olduğu, gösterilmiştir (64). Başka bir çalışmada, CNP'nin uterus miyometriyal tabakasında etkisi olmadığı görüşleri ileri sürülmüştür (60). Gebeliğin, ANP'nin tokolitik etkisini inhibe ettiği yönünde görüşler bulunmaktadır (64).

Sechi ve ark. (65) sıçan böbrekleri üzerinde yaptıkları çalışmada, STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların böbrek dokularında, ANP reseptörlerinin kontrol sıçanlara göre azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, ANP plazma seviyesinin ise önceki çalışmalara paralel şekilde arttığı görülmüştür (65). STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda, azalan ANP reseptörlerine paralel olarak nefron aktivitesinin ANP'ye karşı cevabını azaltmaktadır (65).

Sunulan bu çalışmada, uterus endometriyum tabakalarındaki NPR-A pozitif hücre dağılımının hem kontrol hem de diyabet gruplarında gebelik yaşı ile paralel olarak azaldığı belirlenmiştir. Miyometriyum katmanına bakıldığında ise NPR-A pozitif hücre sayısı kontrol gruplarında gebelik yaşı ile beraber artarken, diyabet gruplarında azaldığı belirlenmiştir. NPR-A pozitif hücre sayısı özellikle miyometriyumun vasküler tabakasında ve endometriyumda damarlar etrafında olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalar, CNP ve onun yüksek affinite gösterdiği reseptörü NPR-B'nin ovaryumlarda diğer natriüretik peptidlere ve reseptörlere göre daha fazla etkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla NPR-A'nın ovaryumlarda daha az fonksiyonel olduğu görüşleri mevcuttur (66,67).

Sunulan bu çalışmada, NPR-A reseptörleri ovaryum medullasında kontrol grubunda gebelik yaşının artması ile arttığı gözlenirken, diyabet grubunda gebelik yaşı ile beraber NPR-A pozitif hücre dağılımında azalma görülmüştür. Bunun yanında ovaryum korteksinde herhangi bir pozitif hücre gözlenmemiştir.

SONUÇLAR

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlarda dişi genital sistem organlarından uterus ve ovaryum dokularında, ANP immünoreaktivitesi ve NPR-A pozitif hücrelerin immunohistokimyasal olarak dağılımları belirlendi. Buna göre;

1. Diyabet grubu sıçanların canlı vücut ağırlıklarında deney başlangıcına göre, deney sonunda anlamlı olarak azalmanın olduğu belirlendi.
2. ANP immünoreaktivitesinin gerek kontrol gerekse diyabet gruplarının ovaryum dokularında sadece medullar kısımda olduğu tespit edildi. Uterus dokularında ise miyometriyal ve endometriyal tabakada boyanma olduğu belirlendi.
3. ANP immünoreaktivitesinin semikantitatif değerlendirilmesinde, diyabet gruplarında kontrol gruplara göre, hem ovaryum hem de uterus dokuları için boyanma yoğunluğunda artışın olduğu tespit edildi.
4. NPR-A immün boyanması incelendiğinde ovaryum dokularında sadece medullar alanlarda, uterus dokularında ise miyometriyum vaskular kısımda damarlar etrafında ve endometriyumda yine damarlar etrafında olduğu tespit edildi.
5. NPR-A immün boyanması istatistiksel değerlendirmesinde pozitif hücre sayısında, ovaryum medullar alanda, diyabet gruplarında gebelik 10. günde 5. güne göre anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise gebelik 10. günlerde, kontrol gebelik 5. günler ile diyabet gebelik 5. ve 10. günlere göre anlamlı olarak artış olduğu tespit edilmiştir.

6. NPR-A immun boyaması istatistiksel değerlendirmesinde, uterus dokularında hem endometriyum hem de miyometriyum tabakasında en yoğun pozitif hücre boyanmasının diğer tüm gruplara göre diyabet gebelik 5. günlerde olduğu belirlenmiştir.

ÖZET

Bu çalışmada, diyabetik sıçanların ovaryum ve uteruslarında ANP immunoreaktivitesinin ve NPR-A pozitif hücre dağılımının immunohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlandı. Çalışmada, Sprague-Dawley 32 adet erişkin dişi sıçan ve 12 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Kontrol gruplarını oluşturmak için kafeslerine uygun sayıda erkek bırakılan sıçanların vajinal smearlerinde mikroskopik olarak spermatozoon görülen hayvanlar gebeliğin sıfırncı günü (0. gün) kabul edildi. Gebeliğin 5. günü 8 ve 10. günü 8 denek derin anestezi altında sakrifiye edildi. Diyabet gruplarını oluşturmak için iseyanlarına uygun sayıda erkek hayvan bırakılmasından sonra vajinal smear ile yapılan kontrollerde, mikroskop altında smear örneklerinde spermatozoon görülen hayvanlar gebeliğin 0. gününde kabul edildi. Aynı gün tek doz olarak 60 mg/kg streptozotosinin i.p. uygulamasını takiben 48 saat sonra kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde kan glukoz seviyesi 280 mg/dL ve üstü olanlar diyabet kabul edilip gruplar oluşturuldu. Gebeliğin 5. günü 8 ve 10. günü 8 denek derin anestezi altında sakrifiye edildi. ANP immünoreaktivitesinin semikantitatif değerlendirilmesinde, diyabetik gruplarda kontrol gruplara göre, hem ovaryum hem de uterus dokuları için boyanma yoğunluğunda artışın olduğu tespit edildi. Kontrol grubu ovaryum dokularına bakıldığında NPR-A pozitif hücre dağılımının gebelik yaşının artması ile arttığı gözlenirken, diyabet grubunda gebelik yaşı artışı ile beraber azalma görülmüştür. Uterus endometriyum tabakalarındaki NPR-A pozitif hücre dağılımı gebelik yaşı ile paralel olarak azalmıştır. Miyometriyum katmanına bakıldığında ise diyabet gebelik 5. günlerde diğer tüm gruplara göre NPR-A pozitif hücre sayısında artma tespit edildi.

Sonuçta, gebelik yaşının artması ile beraber ovaryum ve uterusda ANP immunoreaktivitesinin ve NPR-A pozitif hücre dağılımının değiştiği ve bu değişimde diyabetin önemli etkisi olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: ANP, NPR-A, diabetes mellitus, over, uterus

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE DISTRIBUTION ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR IN OVARIAN AND UTERINE TISSUES IN DIFFERENT DAYS OF PREGNANCY OF THE EXPERIMENTAL DIABETES BY STREPTOZOTOCIN IN RATS

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate in the ovary and uterus immunoreaction of ANP and distribution of NPR-A positive cells at immunohistochemical in the diabetic rats. In the present study Sprague-Dawley 32 adult female and 12 adult male rats were used. For control group rats cage according to the number of male rats and it was considered zero day of pregnancy (Day 0) that animals who seen for microscopic sperm in vaginal smears. 8 rats in day 5 of gestation and 8 rats in day 10 of gestation were proceeding. For diabetic group rats cage according to the number of male rats and it was considered zero day of pregnancy (Day 0) that animals who seen for microscopic spermin vaginal smears. In the day 0 of pregnancy these rats were induced by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin. After 48 hours following the application of tail vein blood glucose levels in blood samples taken from 280 mg / dL and above are considered and diabetes groups were formed. Semiquantitative ANP in evaluating the immunoreactivity of the diabetic group compared to the control group, as well as ovarian for uterine tissues were found to increase in intensity of staining. NPR-positive cells distribution with increasing gestational age in the control groups were found to be increased. In the diabetic group decreased with increase in gestational age. Uterine endometrium NPR-A positive cells in the layers of distribution has decreased in parallel with

the gestational age. At 5 days of the diabetic groups were found increasing of NPR-A positive cells then all other groups in myometrium.

As a result, depending on the increasing gestational age, it has changed and that the change in the immunoreaction of ANP and distribution of NPR-A positive cells in the ovary and the uterus was found to be a significant impact of diabetes.

Keywords: ANP, NPR-A, diabetes mellitus, ovary, uterus

KAYNAKLAR

1. Rother IK. Diabetes treatment-bridging the divide. N Engl J Med 2007;356(15):1498-1501.
2. Quinn L. Mechanism in the development of type 2 diabetes mellitus. J Cardiovasc Nurs 2002;16(2):1-16.
3. Yeşilot Ş. Diyabetik Ratlarda Aspirin ve Nimesulid'in Diyabete Bağlı Doku Hasarı Üzerine Olan Etkileri (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2010;33(Suppl 1):S62-9.
5. Bağrıaçık N. Diabetes mellitus: Tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı. Diabetes Mellitus Sempozyumu s.9-18,İstanbul, 2007.
6. World Health Organization. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation 1999;1-49.
7. Laychock SG, You H. Long-term treatment with atrial natriuretic peptide inhibits ATP production and insulin secretion in rat pancreatic islets. Am J Physiol Endoc M 2011;300: E435-E44.
8. Ivanova MD, Gregoraszcuk EL, Augustowska K, Kolodziejzyk J, Mollova MV, Kehayov IR. Localization of atrial natriuretic peptide in pig granulosa cells isolated from ovarian follicles of various size. Reprod Biol 2003;3 Suppl 2: 173-81.
9. Karaman C. Serum İrrigasyonlu Radyofrekans Ablasyon Yönteminin Atriyal Natriüretik Peptit ve Hemodinami Üzerine Etkileri (tez). Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2006.

10. Karakurt F, Çarlıoğlu A, Kasapođlu B, Gümüř İN. Gestasyonel diabetes mellitus tanı ve tedavisi. *Yeni Tıp Dergisi* 2009;26:134-8
11. Andrade SI, Monsalve MCR, Pena JE, Polanco AC, Polamino MA, Valesco AF. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats. *Acta Histochem Cytoc* 2000;33(3):201-8.
12. Vinik AI, Fishwick DT, Pittenger G. Advances in diabetes for the millennium: Toward a cure for diabetes. *Med Gen Med* 2004;6 Suppl 3:1-10.
13. Naftanel MA, Harlan DM. Pancreatic islet transplantation. *Plos Med* 2004;1(3 e58):198-201.
14. Saphiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Rindblad R, Robetson P et al. International trial of the edmonton protocol for islet transplantation. *New Engl J Med* 2006;355:1318-30.
15. Voltarelli JC, Couri CEB, Stracieri ABPL, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2007;297:1568-76
16. Adler AI, Stratton IM, Neill HAW, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000;321:412-9.
17. Rubino F, Gagner M. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 2002;236(5):554-9.
18. Adams TD, Gress RE, Shermann MA, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *New Engl J Med* 2007; 357:753-61.
19. Erdođan D, Hatipođlu MT, Grgn M, Ilgaz C. zel histoloji. Ankara: Hatibođlu Yayınevi; 2007:175-85.
20. Gürsoy E, Ergin K. Dişi reme sistemi atlası. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007:4-15.
21. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Demir R. (eviri Editörü) Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. s.570-80.
22. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter temel histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (eviri Editörleri) Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2009. s.399-415.

23. Nacar E. Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda İmplantasyon Döneminde Endometriyumdaki İmmün Sistem Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi (tez). Hatay: Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012.
24. Hiatt JL, Gartner LP. Renkli histoloji atlası. Dağdeviren A, Müftüoğlu S, Karabay G. (Çeviri Editörleri) Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2009. s.344-5.
25. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel histoloji text&atlas. Solakoğlu S, Aytekin Y (Çeviri Editörü). Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009. s.448-50.
26. Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev* 2000;21:5–22.
27. Kohn DF, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: Anderson LC, Leow FM, Quimby FW, editors. *Laboratory Animal Medicine*, San Diego: Academic Press; 2002; p.121–65.
28. Mülazımoğlu SB, İde T, Aslan S. Ratlarda üreme. Yücel O (Editör). Küçük deney hayvanlarından rat. Ankara: *J Clin Anal Med* 2012; 39-44.
29. Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002; 40:237-44.
30. Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 2005; 80 (2):79-87.
31. Tanyolaç A. Özel histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi; 1993: s.96-151.
32. Eroschenko VP. DiFiore Histoloji Atlası. Demir R. (Çeviri Editörü) Ankara: Palme Yayıncılık; 2011. s. 284
33. Bakalska M, Mourdjeva M, Russinova A, Kyurkchiev S, Kehayov I. Localization of atrial natriuretic factor (anf) in rat testis after leydig cell destruction: Evidence for a potential role in regulating gonadal function. *Endocr Regul* 1999;33:183-91.
34. San A, Selçuk NY. Atrial natriüretik peptid. *Turk Neph Dial Transpl* 1993;1:1-6.
35. Woodman OL, Malakul W, Cao AH, Xu O, Ritche RH. Atrial natriuretic peptide prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Life Sci* 2008;82:847-54.
36. Forssmann WG, Richter R, Mayer M. The endocrine heart and natriuretic peptides: Histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol* 1998;110:335-57.
37. Kim HS, Cho KW, Kim SZ, Koh GY. Characterization of the atrial natriuretic peptide system in the oviduct. *Endocrinology* 1997;138(6):2410-6.

38. Yılmaz YT. Sepsisli Olgularda Atriyal ve Beyin Natriüretik Peptit, Troponin I, C-Reaktif Protein Düzeylerinin Prognostik Değeri (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2007.
39. Karakuşoğlu Ö. Sağlıklı Erkeklerde Anaerobik Egzersizin Plazma Atriyal Natriüretik Peptid Düzeyine Etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
40. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332(3):78-81.
41. Mukoyama M, Nakao K, Hasoda K, Suga SI, Seito Y, Ogawa Y et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *J Clin Invest* 1991;87:1402-12.
42. Bacaksız A. Akut Miyokard İnfarktüsünün Bi-Atriyal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi (tez). Konya: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi; 2009.
43. Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide 1996;17(7):1243-51.
44. Shweitz H, Wigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992;267(20):13928-32.
45. Uçar F, Turhan S. Natriüretik peptidler. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2005;62:49-54.
46. Saxenhofer H, Gnadinger MP, Weidmann P, Shaw S, Shonn D, Hess C et al. Plasma levels and dialysance of atrial natriuretic peptide in terminal renal failure. *Kidney Int* 1987;32:554-61.
47. Huang CL, Levicki J, Jhonson LK, Cogan MG. Renal mechanism of action of rat atrial natriuretic factor. *J Clin Invest* 1985;75:769-73.
48. Özer ÖF. İnsan Plazmasında Oksitosinin, Atriyal Natriüretik Peptit, B-Tip Natriüretik Peptit Ve C-Tip Natriüretik Peptit Düzeyleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi (tez). İstanbul: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2009.
49. Janssen WMT, Jong PE, Hem GK, Zeeuw D. Effect of human atrial natriuretic peptide on blood pressure after sodium depletion in essential hypertension. *BMJ* 1986;293:351-3.
50. Özgün F, Ertemir M, Ceylan E, Demir Ç. Stres ve polidipsi. *Klin Psikofarmakol B* s.86-8, İstanbul, 2002.
51. Kim HS, Cho WK, Lim SH, Hwang YH, Ryu H, Ohh SH et al. Presence and release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in granulosa cells of the pig ovarian follicle. *Regul Peptides* 1992;42:153-62.

52. Scott JN. Atrial natriuretic peptide binding in rat placenta, yolk sac, decidua and maternal placental vessels. *Cell Tissue Res* 1993;272:391-4.
53. Holcberg G, Kossenjans W, Brewer A, Miodownik M, Myatt L. The action of two natriuretic peptides (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) in the human placental vasculature. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:71-7.
54. Muller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter RL et al. Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* 2004;145(3):1392-401.
55. Böck P. *Romeis mikroskopische technik*. 17. aufl. München:Urban und Schwarzenberg, 1989:177-243.
56. Karaca T, Yörük M, Yörük İH, Uslu S. Effects of extract of green tea and ginseng on pancreatic beta cells and levels of serum glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in rats with experimentally streptozotocin-induced diabetes: A histochemical and immunohistochemical study. *J Anim Vet Advan* 2010; 9(1):102-7.
57. Mifune H, Suzuki S, Nokihara K, Noda Y. Distribution of immunoreactive atrial and brain natriuretic peptides in the heart of chicken, quail, snake and frog. *Exp Anim* 1996;45(2):125-33.
58. Martynova MG, Bystrova OA, Moiseeva OM, Evdonin AL, Kondratov KA, Medvedeva ND. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. 2005;15(10):811-6.
59. Cootauco AC, Murphy JD, Maleski J, Blakemore KJ, Slodzinski MK. Atrial natriuretic peptide production and natriuretic peptide receptors in the human uterus and their effect on myometrial relaxation. *Am J Obstet Gynecol* 2008;429:1-6.
60. Carvajal JA, Aguan K, Thompson LP, Buhimschi IA, Weiner CP. Natriuretic peptide induced relaxation of myometrium from the pregnant guinea pig is not mediated by guanylate cyclase activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:181-8.
61. Girsan A, Kopsala MA, Makikallio K, Vuollteenaho O, Rasanen J. Increased fetal cardiac natriuretic peptide secretion in type-1 diabetic pregnancies. *Acta Obstet Gynecol* 2008;87:307-12.
62. Shin SJ, Lee YJ, Tan MS, Hsieh TJ, Tsai JH. Increased atrial natriuretic peptide mRNA expression in the kidney of diabetic rats. *Kidney Int* 1997;51:1100-5.
63. Qui ZX, Mei B, Wu YS, Huang XU, Wang ZY, Han YF et al. Atrial natriuretic peptide signal pathway upregulated in stomach of streptozotocin-induced diabetic mice. *World J Gastroenterol* 2010;16(1):48-55.

64. Waillancourt P, Omar S, Deng FX, Mulay S, Varma DR. Differential effects of rat pregnancy on uterine and lung atrial natriuretic factor receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998;274:E52-E6.
65. Sechi LA, Valentin JP, Griffin CA, Lee E, Bartoli E, Humphreys MH et al. Receptors for atrial natriuretic peptide are decreased in the kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995;(95):2451-7.
66. Noubani A, Frookhi R, Gutkowska J. B-type natriuretic peptide receptor expression and activity are hormonally regulated in rat ovarian cells. *Endocrinology* 2000;141(2):551-9.
67. Gutkowska J, Tremblay J, Antakly T, Meyer R, Mukaddam-Daher S, Nemer M. The atrial natriuretic peptide system in rat ovaries. *Endocrinology* 1993;132(2):693-700.

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Natriüretik peptidlerin yapısı | 15 |
| Şekil 2. Kontrol gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu kan şeker düzeyleri | 25 |
| Şekil 3. Diyabet gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu kan şeker düzeyleri | 26 |
| Şekil 4. Kontrol gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu ağırlık değerleri | 27 |
| Şekil 5. Diyabet gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu ağırlık değerleri | 27 |
| Şekil 6. Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait pankreasın histopatolojik görünümü | 28 |
| Şekil 7. Kontrol grubu gebelik 5. gün ovaryum ANP boyanması | 29 |
| Şekil 8. Kontrol grubu gebelik 10. gün ovaryum ANP boyanması | 30 |
| Şekil 9. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus ANP boyanması | 30 |
| Şekil 10. Kontrol grubu gebelik 10. gün uterus ANP boyanması | 31 |
| Şekil 11. Diyabet grubu gebelik 5. gün ovaryum ANP boyanması | 31 |
| Şekil 12. Diyabet grubu gebelik 10. gün ovaryum ANP boyanması | 32 |
| Şekil 13. Diyabet grubu gebelik 5. gün uterus ANP boyanması | 32 |
| Şekil 14. Diyabet grubu gebelik 10. gün uterus ANP boyanması | 33 |
| Şekil 15. Kontrol ve diyabet grubu ovaryum medullasında NPR-A pozitif hücre dağılımı ... | 34 |
| Şekil 16. Kontrol grubu gebelik 5. gün ovaryum medullasında NPR-A boyanması | 34 |
| Şekil 17. Kontrol grubu gebelik 10. gün ovaryum medulladasında NPR-A boyanması | 35 |
| Şekil 18. Diyabet grubu gebelik 5. gün ovaryum medulladasında NPR-A boyanması | 35 |
| Şekil 19. Diyabet grubu gebelik 10. gün ovaryum medullasında NPR-A boyanması | 36 |
| Şekil 20. Kontrol ve diyabet grupları uterus dokusunda NPR-A pozitif hücre dağılımı | 36 |
| Şekil 21. Kontrol grubu gebelik 5. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması..... | 37 |

| | |
|---|----|
| Şekil 22. Kontrol grubu gebelik 10. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması..... | 38 |
| Şekil 23. Diyabet grubu gebelik 5. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması | 38 |
| Şekil 24. Diyabet grubu gebelik 10. gün uterus dokusunda NPR-A boyanması | 39 |

Tablolar

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Natriüretik peptidlerin reseptör afiniteleri | 16 |
| Tablo 2. Kontrol ve diyabet gruplarının gebeliğin 5 ve 10. günlerindeki ANP immunohistokimyasal boyamanın yoğunluğunun semikantitatif değerlendirilmesi | 28 |

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Edirne’de doğdu. Ortaöğrenimini İstanbul Kartal Lisesinde 2006 yılında tamamladıktan sonra, 2007-2011 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimini aldı. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında bulunduğu Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen eğitimine Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmektedir.

EKLER

Ek 1

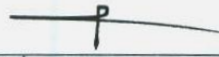
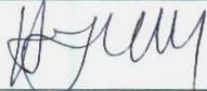

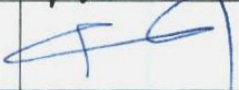

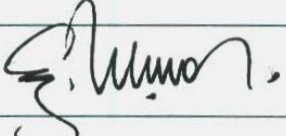
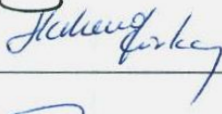

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 04
KARAR NO: 2012.04.03

Karar Tarihi: 30.05.2012

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Turan KARACA'nın yaptığı Yüksek Lisans Öğr. Selim DEMİRTAŞ'ın tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/44 protokol nolu "Streptozotocin ile Deneysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Gebeliğin Farklı Günlerinde Ovaryum ve Uterus Dokularında Atrial Natriüretik Peptid Reseptör Dağılımının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabilmesine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

| Ünvanı/Adı/Soyadı | Araştırma ile İlişki | Toplantı Katılımı | İmza |
|---|---|--|---|
| Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır | |
| Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Osman GÜLTEKİN Sivil Üye | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |