

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Sıçanlarda Östrus Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusların Histolojik Değerlendirmesi*

Gülçin EKİZCELİ^{1,2}, Sevinç İNAN¹, Gülperi ÖKTEM³, Ece ONUR⁴,
Kemal ÖZBİLGİN¹

- ¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa.
² Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
⁴ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa.

ÖZET

İnsanlarda 28 günde izlenen menstrüel döngünün, sıçanlarda 4-5 günde gerçekleşmesinden dolayı, kadın üreme sisteminin incelendiği çalışmalarda model organizma olarak kullanılan sıçanlar ile yapılan birçok çalışma kısa sürede tamamlanabilmektedir. Bu da sıçan modelinin bir avantajı olarak görülmektedir. Bu çalışmada sıçan östrus döngüsü ile ilgili sitolojik ve histolojik değerlendirmeler ve elde edilen son literatür bilgilerinin derlenmesi ile yeni çalışmalar için kaynak oluşturulması amaçlanmıştır. Vajinal yayma ile dişi sıçanlar proöstrus, östrus, metöstrus, diöstrus dönemlerinde olmak üzere 4 gruba ayrıldı ve grupları belirlenen dişi sıçanlardan (n=28) ovaryum ve uterus örnekleri elde edildi. Dokular formalinde tespit edilerek, rutin parafin doku takibi ile parafine gömüldü. Parafine gömülmüş dokulardan 5 µm.'lik kesitler alınarak Hematoksilin-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyandı. Boyanmış kesitlerde ovaryum ve uterustaki temel yapılar değerlendirildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kesitlerde görülen temel yapıların sayıları gruplar ile uyumlu olarak bulunmuş olup, proöstrus ve östrus gruplarında artmış primer ve sekonder folliküller izlenirken, metöstrus grubunda korpus luteum yapılarının istatistiksel anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Çalışmada sıçan östrus döngüsü evrelerinde elde edilen ovaryum ve uteruslara ait histokimyasal ve sayısal veriler geçmiş literatür ile uyumlu bulundu. Buradaki değerlendirmelerin bundan sonraki çalışmalar için kaynak niteliği taşıyacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ovulasyon. Sıçan östrus döngüsü. Ovaryum. Uterus.

Histologic Evaluation of Ovary and Uterus via Rat Estrous Cycle

ABSTRACT

Studies examining the female reproductive system in the rat model can be completed in a short time due to the 4-5-day-long estrous cycle, which is an advantage when compared to 28 days of menstrual cycle in humans. The present study aimed to create new insights for cytological and histological studies evaluating the rat estrous cycle with the compilation of the recent literature. Female rats were divided into 4 groups according to the vaginal smear examinations, as proestrous, estrous, metestrous and diestrous groups and ovaries as well as uterus samples were obtained. The samples were fixed in 10% formaline solution and prepared according the routine paraffin tissue processing protocol and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick paraffin-embedded sections were stained with H-E and PAS. By microscopical analyzing the stained sections, primary structures in the ovary and uterus were assessed and the results were statistically compared between groups. Numbers of primary structures observed in the sections were compatible with the respective groups. While increased numbers of primary and secondary follicles in the groups of proestrous and estrous were detected, in metestrous group increased number of corpus luteum was obtained. The data obtained from different stages of rat estrous cycle were in agreement with the reports in the literature. It is suggested that the results of this study can be used as a source to plan advanced histological studies.

Key Words: Ovulation. Rat estrous cycle. Ovary. Uteri.

* II. Sağlık Bilimleri Enstitüleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Sempozyumu'nda (Kuşadası 2014) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi: 28 Nisan 2015
Kabul Tarihi: 19 Haziran 2015

Doktora Öğrencisi Gülçin EKİZCELİ
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Bursa.
Tel: 0224 295 40 72
e-Posta: ekizceli.g@gmail.com

Ovulasyon; Graaf folikülünde oosit mayozunun yeniden aktifleştiği, folikül duvarının apikalinde stigmanın gelişimi ve yırtılması ile sekonder oositin atıldığı ve korpus luteumun şekillenmesi ile uterin dokunun yeniden yapılanmasının görüldüğü kompleks bir olaydır.¹ Normal ovaryum gelişimi ve ovulasyon, yaşamın devamındaki fertilité ve üreme başarısında kritik rol oynamaktadır.²

Ovaryumun temel ünitesi olan folliküller, oositlere mikroçevre yaratmanın yanı sıra gelişim ve sağ kalım

için de gereklidir.² **Follikülogenez, oosit** gelişimi ve gerekli steroid hormonların sağlanmasında rol oynadığından, normal fertilité ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi için esastır. Follikülogenezin normal sürecinin başarısızlığı, kadınlardaki ovaryum disfonksiyonu ve fertilité kaybının başlıca nedeni olabilmektedir.³

İnsanlarda 28 günde izlenen menstrüel döngünün, sıçanlarda 4-5 günde gerçekleşmesinden dolayı, sıçanlar ile yapılan birçok çalışma kısa sürede tamamlanabilmektedir. Bu da sıçan modelinin bir avantajı olarak görülmektedir.⁴

Sıçanlarda, östrus döngüsü birbirini takip eden toplam 4-5 günlük bir süreçten oluşmaktadır. Östrus döngüsü; proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olarak dört evreden oluşur.

- I. Proöstrus evresi; 12 saat,
- II. Östrus evresi; 12-14 saat,
- III. Metöstrus evresi; 21 saat,
- IV. Diöstrus evresi de; 57 saat sürer.

I) Proöstrus evresinde; LH ve östradiol en üst düzeye ulaşır. Östradiol seviyesi, evrenin başlangıcında en düşük düzeydeyken, evrenin sonlarına doğru yükselir. Proöstrus evresinde endometriyum yüzey epitelinin proliferasyon hızı azalmaya başlar ancak yine de maksimum proliferasyon olmaktadır. Tek katlı prizmatik epitel hücrelerinin boyutları artarak yüksek prizmatik hücrelere dönüşmüştür.⁵ Folliküllerin son maturasyonu esnasında gözlenen az bir miktar progesteron üretimi ovulasyonu kolaylaştırır. Proöstrus ve östrus arasında gerçekleşen ovulasyonu LH kendiliğinden stimüle eder.⁶ Yüksek oranda damarlanmış ovaryum follikülünden yükselerek dışa doğru bir çıkıntı oluşur ve oositin salınımı gerçekleşir. Östrus evresine geçerken östradiol düzeylerinde hafif bir azalma olur. FSH'da da yavaş bir artış görülür.⁵

II) Östrus evresinde; proöstrus ile östrus evresi arasında ovulasyon gerçekleşir ve LH'nin en yüksek düzeyine ulaşmasıyla ovulasyon gerçekleşir. Uterus yüzey epitelinde proliferasyon yoktur ancak hücre boyutu maksimum uzunlukta olduğundan epitelde kalınlaşma görülmektedir. Epitelin bazı yerlerinde yalancı çok katlı epitel de izlenir. Bu evrede apoptotik indeks artmış, epitelde apoptotik hücreler görülmektedir.⁵ Uterus boşluğu iyice genişlemiş ve sıvı birikimi de artmıştır. Yüzey epitelindeki bu değişiklikler uterus blastosist implantasyonun gerçekleşmesini sağlar.⁷

III) Metöstrus evresi; yaklaşık 21 saat sürer ve artık dişi erkeği kabul etmez.⁸ Metöstrus ve diöstrus evresinde östradiol ve progesteron serum düzeyleri düşüktür. Uterustaki kan damarları küçülmüş ve azalmıştır.⁵

IV) Diöstrus evresinde; tekrar endometriyal rejenerasyon başlar. Erken diöstrusda estradiol salınımı düşüktür, fakat geç diöstrus süresince kademeli olarak artar. FSH artışı ile follikül maturasyonuna eşlik eden estro-

diolün bu salınımı, proöstrus evresinin devamı olan günün öğleden sonrasında adenohipofizden ovulasyon öncesi LH salınımı için başlangıç stimulusu olduğu düşünülmektedir.⁹

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, sağlıklı gebelik elde etmek için önemli süreçlerden biri olan ovulasyon mekanizması; kadın üreme sistemi ile benzer olduğu için model organizma olarak kullanılan sıçan östrus siklusu ele alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada erişkin, daha önce çiftleşmemiş ve deneye girmemiş, 230-280 gr. ağırlığında, 28 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 25°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda, *ad libitum* olarak beslenerek; stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındılar.

Ovulasyon döneminin incelenmesi amacıyla ovaryum ve uterus değerlendirmesi için vaginal yayma yöntemi ile siklusu belirlenen deney hayvanları 4 gruba ayrıldı:

- 1. Grup:** Kontrol 1: Proöstrus grubu (n=7)
- 2. Grup:** Kontrol 2: Östrus grubu (n=7)
- 3. Grup:** Kontrol 3: Metöstrus grubu (n=7)
- 4. Grup:** Kontrol 4: Diöstrus grubu (n=7)

Deney sonunda, Ketamin/Xylasin anestezisi ile genel anestezi yapılan deney hayvanına servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Ardından deney hayvanlarının uterus ve ovaryum doku örnekleri histokimyasal inceleme için hazırlandı.

Uygulamalar sonunda, ışık mikroskop ile değerlendirilmek için % 10'luk formalin solüsyonu ile tespit edilmek üzere ovaryum ve uterus dokuları alındı. Dokuların fiksasyonunun ardından rutin ışık mikroskop parafin doku takibi yöntemi ile takip edildi. Takip sonunda dokular ışık mikroskopik inceleme için kesit alınmak üzere parafine gömüldü. 5 µm.'lik alınan kesitler Hematoksilin-Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması ile değerlendirildi.

Vaginal Yayma Preperatları Hazırlanması ve Grupların Oluşturulması

Sıçanlardan vaginal yayma preperatı, yayma fırçaları ile vaginal sürüntü yapılarak alındı. Alınan sürüntü lama düzgün bir şekilde yayılarak metanol ile 5 dk. süreyle tespit edildi. Ardından Giemsa boyası ile 10 dakika boyandı. Musluk suyu ile yıkanan örnekler kurumaya bırakıldı. Daha sonra, lamel ile kapatılarak, mikroskop altında incelenerek aşağıda belirtilen grupların ayrılması sağlandı.

- 1. Proöstrus:** Yaymanın parlak renkte olduğu, intermedier hücrelerin yoğun, parabazal hücrelerin ve mukusun nadir olduğu, lökositlerin gözlenmediği preperatlar **Proöstrus grubu** olarak belirlendi.

Sıçanlarda Östrus Döngüsü Ovaryum ve Uterusları

- 2. Östrus:** Yaymanın ayrı ayrı bulunan keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerden oluştuğu, gruplar halinde şekillendikleri preperatlar **Östrus grubu** olarak belirlendi.
- 3. Metöstrus:** Metöstrus fazında, bir kısmında sitoplazmik vakuollerin yer aldığı sıkıca paketlenmiş çok sayıda nükleuslu epitel hücresi ve çok sayıda artmış nötrofil gözlenen grup **Metöstrus grubu** olarak belirlendi.
- 4. Diöstrus:** Yaygın olarak lökositlerin ve aralarında parabazal ve intermedier hücrelerin izlendiği preperatlar **Diöstrus grubu** olarak belirlendi.

Histokimyasal Değerlendirme: Hematoksilin Eozin Boyama

5 µm. kalınlıkta alınan kesitler bir gece 60°C etüvde deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek suya getirilen kesitler önce Hematoksilin solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Akar su altında yıkanan kesitler asit-alkol solüsyonu ile diferansiye edildikten sonra Eozin boyası ile 3 dakika boyandı. Kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilen içine alındı. Ksilen içinde 30 dakika bekletilen kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskop altında (Olympus BX-40) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Histokimyasal Değerlendirme: Periyodik Asit Schiff Boyama

5 µm. kalınlıkta alınan kesitler bir gece 60°C etüvde deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek suya getirilen kesitler önce Periyodik Asit solüsyonu ile 10 dakika boyandı. Akar su altında yıkanan kesitler Feulgen (Shiff) solüsyonu ile 15 dakika muamelenin ardından akar su altında yıkandı. Son olarak Mayer's Hematoksilin solüsyonunda 10 dakika tutularak nükleusların boyanması sağlandı. Akar suda 5 dakika yıkanan ke-

sitler asit-alkol solüsyonuna batırılıp çıkartılarak diferansiye edildikten sonra tekrar akar suda 5 dakika yıkandı. Kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilen içine alındı. Ksilen içinde 30 dakika bekletilen kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskop altında (Olympus BX-40) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Gruplardan elde edilen ovaryum örneklerinin H-E boyalı kesitlerinde, kortekste bulunan gelişen follikül yapıları olan, primer, sekonder, Graaf follikülü ve korpus luteum sayımları yapılarak, gruplardan elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analizi ve çöku karşılaştırma testlerinden Tukey testi ile karşılaştırılmıştır. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

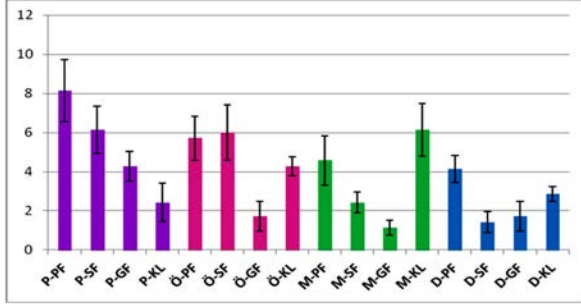
Çalışmamız, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 29/07/2011 tarih, 2011-118 protokol numaralı onayı ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan histokimyasal inceleme ve değerlendirme için gerekli kimyasal malzemeler Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/038 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bulgular

Sıçanlar vaginal yayma yöntemi ile proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus dönemlerinde belirlenerek ovaryum ve uterus örnekleri histokimyasal olarak H&E ve PAS boyamaları ile ışık mikroskop altında değerlendirildi. Gruplara ait sıçan ovaryumlarından alınan seri kesitlerden seçilen 10 farklı kesitte sayılan primer, sekonder, Graaf follikülü ve korpus luteum sayıları **Şekil 1**'de verilmiştir. Elde edilen sayılar gruplar ile uyumlu olarak bulunmuş olup, proöstrus ve östrus gruplarında artmış primer ve sekonder folliküller izlenirken, metöstrus grubunda korpus luteum yapılarının istatistiksel anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Tablo I).

Tablo I. Proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) dönemlerindeki sıçanlardan (n=7) elde edilen ovaryumlardan alınan seri kesitlerde görülen primer (PF), sekonder (SF), Graaf follikülü (GF) ve korpus luteum (KL) dağılımının karşılaştırması ve P değerleri. PF: Primer follikül, SF: Sekonder follikül, GF: Graaf follikülü, KL: Korpus luteum.

GRUPLAR	PROÖSTRUS (P)	ÖSTRUS (O)	METÖSTRUS (M)	DİÖSTRUS (D)	P	İKİLİ KARŞILAŞTIRMALAR					
						P-Ö	P-M	P-D	Ö-M	Ö-D	M-D
PRİMER FOLLİKÜL (PF)	8,142 ± 1,574	5,714 ± 1,113	4,571 ± 1,272	4,142 ± 0,690	P=0,001	0,006	0,001	0,001	0,099	0,008*	0,448
SEKONDER FOLLİKÜL (SF)	6,142 ± 1,215	6,000 ± 1,414	2,428 ± 0,534	1,428 ± 0,534	P=<0,001	0,844	0,001	0,001	0,001	0,001	0,004
GRAAF FOLLİKÜLÜ (GF)	4,285 ± 0,755	1,714 ± 1,272	1,142 ± 0,378	1,714 ± 0,755	P=0,001	0,001	0,001	0,001	0,276	1,000	0,098
KORPUS LUTEUM (KL)	2,428 ± 0,975	4,285 ± 0,488	6,142 ± 1,345	2,857 ± 0,378	P=0,001	0,001	0,001	0,299	0,005	0,001	0,001

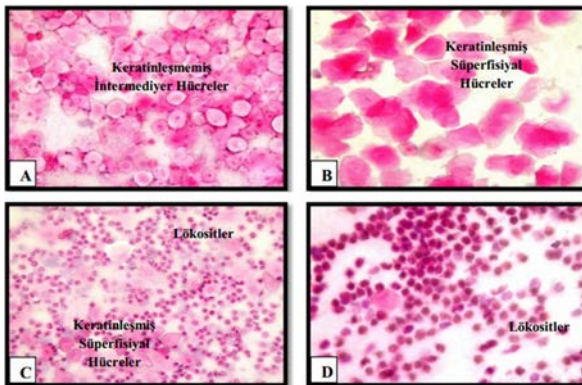


Şekil 1.

Proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) dönemlerindeki sıçanlardan (n=7) elde edilen ovaryumlardan alınan seri kesitlerde görülen primer, sekonder, Graaf follikülü ve korpus luteum sayılarının dağılımı. PF: Primer follikül, SF: Sekonder follikül, GF: Graaf follikülü, KL: Korpus luteum.

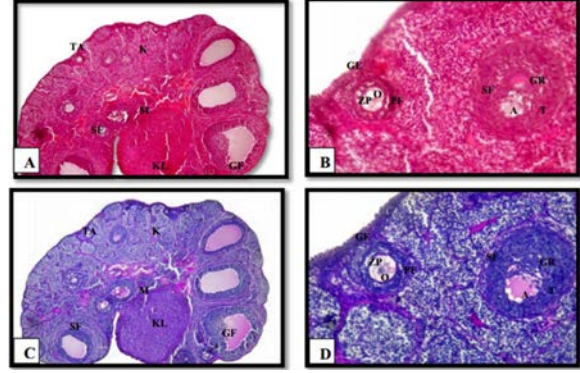
Vaginal yayma bulguları

Sıçanlardan elde edilen vaginal yayma preparatlarının Giemsa boyamasıyla incelenmesi sonucunda, parlak renkte ve mukusun nadiren izlendiği, keratinleşmemiş intermediyer hücrelerin predominant ve parabazal hücrelerin nadir olduğu, lökositlerin görülmediği preparatlar **Proöstrus grubu (Grup 1, Şekil 2.A)**; keratinleşmiş süperfişyal hücrelerden oluşan ve gruplar oluşturan hücrelerin görüldüğü preparatlar **Östrus grubu (Grup 2, Şekil 2.B)**; az sayıda keratinleşmiş süperfişyal hücreler ve bol miktarda lökositten oluşan hücrelerin görüldüğü preparatlar **Metöstrus grubu (Grup 3, Şekil 2.C)** ve bol miktarda lökositlerin gözlemlendiği, çok az miktarda parabazal ve intermediyer hücrelerin görüldüğü preparatlar **Diöstrus grubu (Grup 4, Şekil 2.D)** olarak tanımlandı.



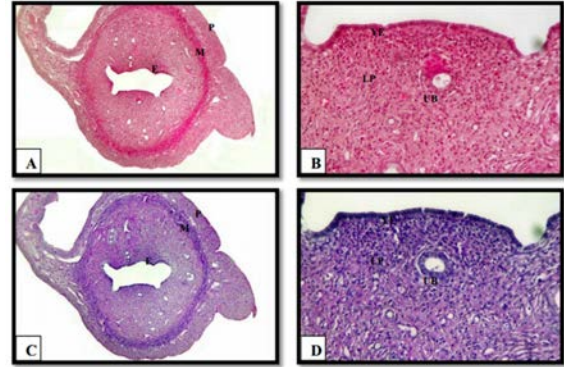
Şekil 2.

Proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus gruplarında bulunan sıçanlardan alınan vaginal yaymaların görüntüleri. (A) Proöstrus grubu (Grup 1), (B) Östrus grubu (Grup 2), (C) Metöstrus grubu (Grup 3), (D) Diöstrus grubu (Grup 4). Giemsa; X200.



Şekil 3.

Proöstrus grubuna ait sıçan ovaryum dokusundan alınan seri kesitlerin görüntüleri. Kortekste yer alan primer, sekonder ve Graaf follikülleri izlenmektedir. K: Korteks, M: Medulla, TA: Tunika Albuginea, GE: Germinal Epitel, PF: Primer follikül, SF: Sekonder follikül, GF: Graaf follikülü, A: Antrum, ZP: Zona pellusida, T: Teka hücreleri, KL: Korpus luteum, O: Oosit. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).



Şekil 4.

Proöstrus grubuna ait sıçan uterus dokusundan alınan seri kesitlerin görüntüleri. En içte endometrium (E), ortada miyometriyum (M) ve en dışta perimetriyum (P) tabakaları ayırt edilmektedir. YE: Yüzey epiteli, LP: Lamina propriya, UB: Uterus bezleri. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).

Proöstrus grubu (Grup 1) ovaryum örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, dışta tek sıralı kübik germinal epitel, altında sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea izlendi. Ovaryumun korteksinde gelişmekte olan primer, sekonder, Graaf follikülleri ve içte gevşek bağ dokusu yapısında medulla normal histolojik yapıda gözlemlendi. Oosit etrafında zona pellusida, granuloza hücrelerinin aralarında antrumun gelişmesi ile sekonder ve Graaf folliküllerinin olduğu, folliküllerin bağ dokusuna komşu kısmında sıkı bağ dokusu yapısında teka eksterna ve iç kısmında kan damarlarından zengin teka interna yapısı gözlemlendi (Şekil 3.A,B). PAS boyalı örneklerde bazal membran ve zona pellusida yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 3.C,D).

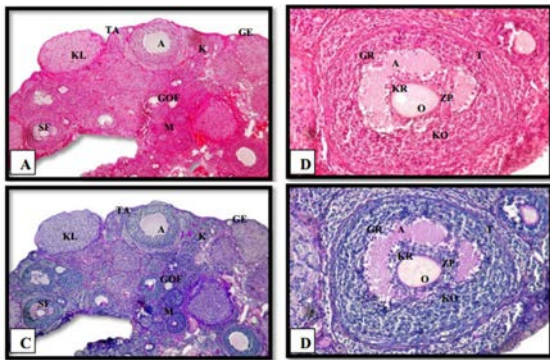
Sıçanlarda Östrus Döngüsü Ovaryum ve Uterusları

Proöstrus grubu (Grup 1) uterus örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen uterus kesitlerinin H&E ile boyanarak incelenmesinde, uterusun 3 tabakası ayırt edildi. En içte yer alan endometriyum tabakasının lümeni döşeyen kinosilyalı ve salgı yapıcı hücrelerden oluşan tek sıralı prizmatik yüzey epiteli, lamina propriyaya doğru uzanan basit tübüler uterus bezleri ve gevşek bağ dokusu yapısındaki lamina propriyasında fibroblast, makrofaj, lenfosit, lökosit ve bağ dokusu lifleri içerdiği gözlemlendi. Bu grupta, uterus bezlerinin boyutlarının küçük olduğu ve salgı içeriklerinin az olduğu izlendi. Ortada yer alan miyometriyum tabakasının içte dairesel, dışta uzunlamasına düzenlenmiş fusiform şekilli, merkezde tek çekirdek içeren düz kas hücreleri ve aralarında bağ dokusu tabakasından oluştuğu izlendi. En dışta yer alan perimetriyum tabakasının ise, mezotel hücreleri ile çevrili, kan damarları ve sinir bakımından zengin gevşek bağ dokusu yapısında olduğu izlendi (Şekil 4.A,B). PAS boyalı örneklerde bazal membran ve uterus bez yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 4.C,D).

Östrus grubu (Grup 2) ovaryum örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, proöstrus döneminde tanımlanan bulgulara ek olarak, ovulasyonun gerçekleşmesine bağlı olarak Graaf follikülleri ve korpus luteum yapılarında artış izlendi. Büyüyen oositin etrafında zona pellusida yapısı, granuloza hücrelerinin oositi çevrelemesiyle oluşan korona radyata hücreleri, granuloza hücreleri ile devam eden kumulus ooforus yapısı ve gelişmekte olan büyük bir antrum izlendi. Teka internanın geniş kan damarları içerdiği ve teka eksternanın sıkı, fibröz bağ dokusu yapısında olduğu izlendi (Şekil 5.A,B). PAS boyalı örneklerde bazal membran ve zona pellusida yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 5.C,D).



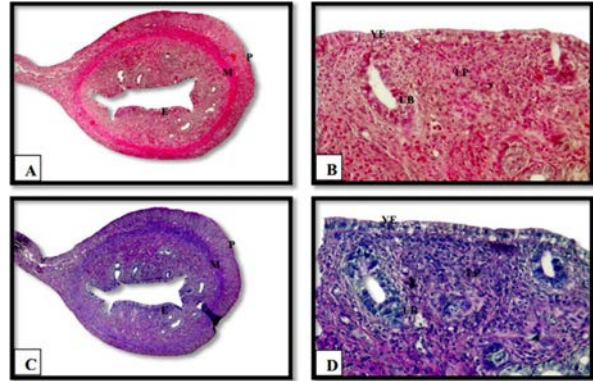
Şekil 5.

Östrus grubuna ait sıçan ovaryum dokusundan alınan kesitlerin görüntüleri. Kortekste yer alan gelişen folliküller ve antral follikül izlenmektedir. K: Korteks, M: Medulla, TA: Tunika Albuginea, GE: Germinal Epitel, GOF: Gelişmekte olan folliküller, A: Antrum, KL: Korpus luteum, O: Oosit, KR: Korona Radyata, KO: Kumulus ooforus, ZP: Zona pellusida GR: Granuloza hücreleri, T: Teka hücreleri. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).

H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).

Östrus grubu (Grup 2) uterus örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen uterus kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, uterusun 3 tabakası ayırt edildi (Şekil 6.A,B). Endometriyumu oluşturan epitel hücrelerinin yüksek prizmatik olduğu, uterus bezlerinde hipertrofi ve proliferasyonun, stromada ise vaskularizasyonun artışıyla beraber bezlerin daha çok kıvrıntılı ve lamina propriya derinlerine doğru uzamış olduğu gözlemlendi. PAS boyalı örneklerde bazal membran ve uterus bez yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 6.C,D).



Şekil 6.

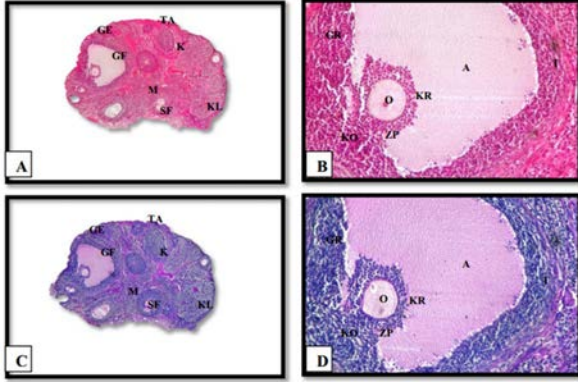
Östrus grubuna ait sıçan uterus dokusundan alınan kesitlerin görüntüleri. En içte endometriyum (E), ortada miyometriyum (M) ve en dışta perimetriyum (P) tabakaları ayırt edilmektedir. Yüzey epitelinin yüksek prizmatik olduğu ve uterus bezlerinin çoğalışı kıvrınlaşarak lamina propriyanın derinliklerine doğru uzandığı izlenmektedir. UB: Uterus bezleri. LP: Lamina propriya. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).

Metöstrus grubu (Grup 3) ovaryum örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, ovaryum örneklerinde korpus luteum yapılarında belirgin artış ile birlikte gelişmekte olan primer ve sekonder follikül yapıları ve az sayıda Graaf follikülü izlendi (Şekil 7.A,B). PAS boyalı örneklerde bazal membran ve zona pellusida yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 7.C,D).

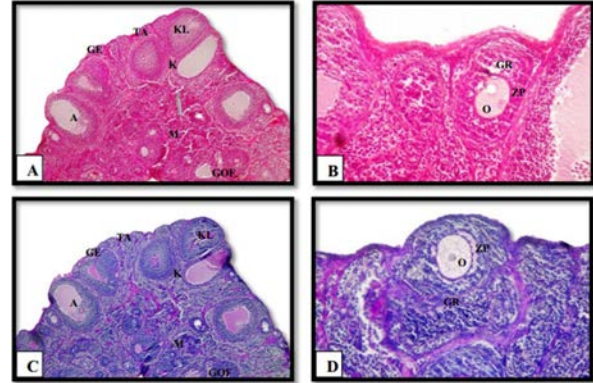
Metöstrus grubu (Grup 3) uterus örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen uterus kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, uterus yapısında yüzey epitelinin yenilenmeye başladığı, düzgün tek katlı prizmatik yapıda olduğu, uterus bezlerinde ve kan damarlarında belirgin azalma gözlemlendi (Şekil 8.A,B). PAS boyalı örneklerde bazal membran ve uterus bez yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 8.C,D).



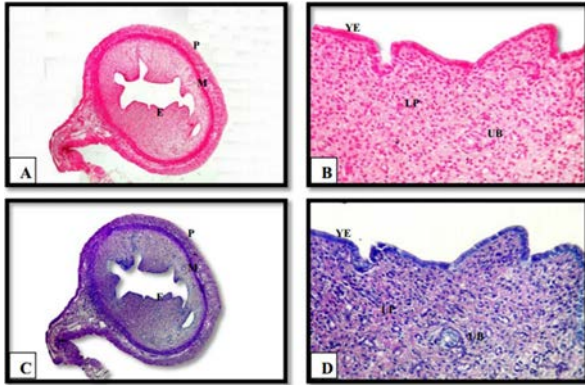
Şekil 7.

Metöstrus grubuna ait sıçan ovaryum dokusundan alınan kesitlerin görüntüleri. Kortekste yer alan gelişen follüküller ve antral follükül izlenmektedir. K: Korteks, M: Medulla, TA: Tunika Albuginea, GE: Germinal Epitel, A: Antrum, KL: Korpus luteum, GF: Graaf Follükülü, O: Oosit, KR: Korona Radiyata, KO: Kumulus ooforus, ZP: Zona pellusida GR: Granüloza hücreleri, T: Teka hücreleri. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).



Şekil 9.

Diöstrus grubuna ait sıçan ovaryum dokusundan alınan kesitlerin görüntüleri. Kortekste yer alan gelişen follüküller ve antral follükül izlenmektedir. K: Korteks, M: Medulla, TA: Tunika Albuginea, GE: Germinal Epitel, GOF: Gelişmekte olan follüküller, A: Antrum, KL: Korpus luteum, O: Oosit, ZP: Zona pellusida GR: Granüloza hücreleri. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).



Şekil 8.

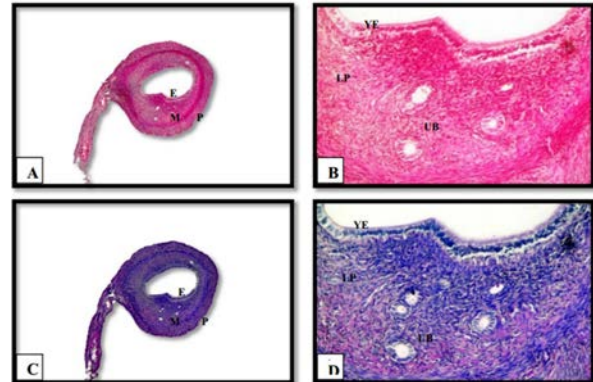
Metöstrus grubuna ait sıçan uterus dokusundan alınan kesitlerin görüntüleri. En dışta perimetriyum (P), orta miyometriyum (M) ve en içte endometriyum (E) tabakaları ayırt edilmektedir. Yüzey epitelinin düzgün tek katlı prizmatik yapıda olduğu, uterus bezlerinde ve kan damarlarında belirgin azalma dikkat çekmektedir. UB: Uterus bezleri. LP: Lamina propriya. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).

Diöstrus grubu (Grup 4) ovaryum örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen ovaryum kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, ovaryum örneklerinde korpus luteumların gerilediği ve primer ve sekonder follükül yapılarında artış izlendi (Şekil 9.A,B). Gelişmekte olan primer ve sekonder follüküller ve Graaf follükülleri izlendi. PAS boyalı örneklerde bazal membran ve zona pellusida yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 9.C,D).

Diöstrus grubu (Grup 4) uterus örneklerinin histokimyasal değerlendirilmesi

Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen uterus kesitlerinin, H&E ile boyanarak değerlendirilmesinde, uterusun yapısında genel olarak küçülme izlenirken, epitelde çoğalmaya başlayan tek katlı prizmatik görünüm, uterus bezlerinde de az miktarda artış gözlemlendi (Şekil 10.A,B). PAS boyalı örneklerde bazal membran ve uterus bez yapıları belirgin olarak izlendi (Şekil 10.C,D).



Şekil 10.

Diöstrus grubuna ait sıçan uterus dokusundan alınan kesitlerin görüntüleri. En dışta perimetriyum (P), orta miyometriyum (M) ve en içte endometriyum (E) tabakaları ayırt edilmektedir. Uterusun yapısında genel olarak küçülme izlenirken, epitelde tek katlı prizmatik görünüm, uterus bezlerinde az miktarda artış gözlenmektedir. UB: Uterus bezleri, LP: Lamina propriya. H&E; X40 (A), X200 (B), PAS; X40 (C), X200 (D).

Tartışma

Çalışmamızda ovulasyon süreçlerinin insana benzer olarak gözlenmesi ve kısa östrus döngüsüyle karakterize olduğu için, sıçan ovaryum ve uterus örnekleri kullanılmıştır ve bu süreçler net olarak izlenmiştir. Sıçan östrus döngüsünde evrelerin belirlenmesinde vaginal yayma örnekleri Giemsa boyaması ile ışık mikroskop altında değerlendirilmiştir. Deney hayvanlarının birbiri ardına devam eden ve herbiri 4-5 gün süren sıçan östrus döngüsünün değerlendirilmesi amacıyla proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evrelerinde belirlenerek ovaryum ve uterus örnekleri alınmıştır.

Vaginal yayma değerlendirmesine göre; proöstrus evresinde intermedier hücrelerin yoğun, parabazal hücrelerin nadir olduğu ve lökositlerin gözlenmediği; östrus evresinde keratinleşmiş süperfisiyal hücrelerin varlığı; metöstrus evresinde az sayıda keratinleşmiş süperfisiyal hücreler; diöstrus evresinde ise yaygın olarak lökositler, nadiren parabazal ve intermedier hücreler izlendi. Ovaryumların değerlendirilmesi ile belirlenen follikül sayıları ve uterus örneklerinin ışık mikroskop altında histokimyasal olarak değerlendirilmesinde, vaginal yayma bulgularının sıçan östrus döngüsü ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Sıçanlarda proöstrus ve östrus evreleri arasında ovulasyonun gerçekleştiği ve bu süreçte LH ve östradiolün en üst düzeye ulaştığı, östrus evresine geçerken östradiolde azalma ile beraber FSH'da hafif bir artış olduğu bildirilmiştir.⁵ Çalışmada elde edilen histokimyasal veriler literatüre uyumlu olarak ovaryumun ve uterusun proöstrus evresinde ovulasyon ve implantasyona hazırlandığını düşündürdü.

Proöstrus evresinde; ovaryum dokusunda primer, sekonder ve Graaf follikülü yapılarında artış ile birlikte ovaryum ve uterus dokularının normal histolojik yapısında olduğu görüldü. Östrus evresinde; ovaryumda Graaf follikülleri ve korpus luteum yapılarında artış, uterusu ise; endometriyumu oluşturan epitel hücrelerinin yüksek prizmatik olduğu, uterus bezlerinde hipertrofi, proliferasyon ve vaskülarizasyonun artışıyla beraber bezlerin daha çok kıvrıntılı ve lamina propriya derinlerine doğru uzamış olduğu gözlemlendi. Bu evrede apoptotik indeks artışına bağlı epitelde apoptotik hücrelerin olabileceği bildirilmiştir.⁵ Bu evrede uterus boşluğunun genişlediği ve uterusun blastosist implantasyonuna hazırlandığı bildirilmiştir.⁷ Çalışmada elde edilen verilerde östrus evresinde, sıçanlarda ovulasyonun gerçekleşmesine bağlı olarak implantasyona hazırlık aşamasının gerçekleşmesine yönelik olarak ovaryum ve uterusu histolojik değişiklikler ile uyumlu olduğunu düşündürdü.

Metöstrus evresinde; ovulasyonun gerçekleşmesini takiben, follikül hücrelerinin luteal hücrelere dönüşmesi yoluyla ovaryumda korpus luteum yapılarında

artış, uterusu kan damarları ve bezlerde de belirgin azalma saptandı. Daha önce yapılan çalışmalarda da, metöstrus evresinde uterusu kan damarlarının belirgin azaldığı bildirilmiştir.⁵ Bu evrede elde edilen verilerin literatüre uyumlu olması, ovulasyon sürecinin ovaryum ve uterusu doğru bir şekilde izlendiğini kanıtlar niteliktedir.

Diöstrus evresinde, ovaryumlarda korpus luteum yapılarının gerilediği ve primer, sekonder follikül yapılarında artış; uterus yapısında genel olarak küçülme izlenirken, epitelde çoğalmaya başlayan tek katlı prizmatik görünüm, uterus bezlerinde az miktarda artış izlendi. Yapılan çalışmalarda erken diöstrusda estradiol salınımının düşük olduğu, fakat geç diöstrus sürecince kademeli olarak arttığı, FSH artışı ile follikül matürasyonuna eşlik eden estradiolün bu salınımın adenohipofizden ovulasyon öncesi LH salınımı için başlangıç uyarısı olduğu öne sürülmüştür.⁹ Çalışmamızda bu evrede elde edilen ovaryum ve uterusu ait histokimyasal ve follikül sayımı verileri literatür ile uyumlu olup, bu evrede sıçan östrus döngüsünün yeniden şekillendiğini, ovaryum ve uterusu değerlendirmeleri ile desteklendi.

Sonuç olarak bu çalışmada, sıçan östrus döngüsü evrelerinde elde edilen ovaryum ve uterusu ait histokimyasal ve sayısal veriler geçmiş literatür ile uyumlu bulundu. Prosöstrus ve östrus evreleri arasında ovulasyonun gerçekleşmesine bağlı olarak ovaryumlarda Graaf folliküllerinde artış, uterusu da bez yapılarında artış; metöstrus evresinde ovaryumlarda korpus luteum yapılarında artış, uterusu da ise genel olarak bir küçülme ve bez yapılarında azalma ve son olarak diöstrus evresinde östrus siklusunun yeniden şekillenmesi için ovaryumlarda primer ve sekonder folliküllerde artış, uterusu da bezlerin yeniden oluşmaya başladığı izlendi. Bu çalışmadaki değerlendirmelerin bundan sonraki çalışmalar için kaynak niteliği taşıyacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Russel D. L., Robker R. L. Molecular Mechanism of Ovulation: Coordination Through The Cumulus Complex. Human Reproduction Update, 2007; 13/ 3: 289-312.
2. Sarraj M. A., Drummond A. E. Mammalian Foetal Ovarian Development: Consequences for Health and Disease. Reproduction 2012; 143: 151-163.
3. Chowdhury I, Garcia-Barrio M, Harp D, Thomas K, Matthews R, Thompson W. E. The Emerging Roles of Prohibitins in Folliculogenesis. Front Biosci. (Elite Ed.) 2012; 4: 690-699.
4. Stille J. A. W, Birt J. A, Sharpe-Timms K. L. Cellular and Molecular Basis For Endometriosis-Associated Infertility. Cell Tissue Res. 2012 Sep; 349/ 3: 849-862.
5. Mendoza-Rodriguez C. A, Merchant-Larios H, Segura-Valdez Md. M. L., Moreno-Mendoza N, Cruz M. E, Arteaga-Lopez P, et al.. Expression Of p53 In Luminal And Glandular Epithelium During The Growth And Regression Of Rat Uterus During The Estrous Cycle, Mol. Reprod. Dev. 2002; 61: 445-452.

6. Smith, M. S., Freeman, M. E., and Neill, J. D. The Control Of Progesterone Secretion During The Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in The Rat: Prolactin, Gonadotropin And Steroid Levels Associated With Rescue Of The Corpus Luteum Of Pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96: 219–226.
7. Orchard M. D, Murphy C. R. Alterations In Tight Junction Molecules Of Uterine Epithelial Cells During Early Pregnancy In Molecules Of Uterine Epithelial Cells During Early Pregnancy In The Rat. *Acta Histochem.* 2002; 104: 149-155.
8. Lohmiller J. L, Swing S. P. Reproduction And Breeding. In: Suckow M. A, Weisbroth S. H, Franklin C.L, Editors. *The Laboratory Rat.* Academic Press; 2006; 148-153.
9. Levine J. E, Norman R. J, Gliesman P. M, Oyama T. T, Bansberg D.R, Spies H. G. In Vivo Gonadotropin-Releasing Hormone Release And Serum Luteinizing Hormone Measurements In Ovariectomized, Estrogen Treated Rhesus Macaques. *Endocrinology* 1985; 117: 711-721.