

Streptozotosin ile Deneysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Östrus Siklusunun Değişik Evrelerinde Ovaryum ve Uterus Dokularında Mast Hücrelerinin Dağılımının Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Streptozotocin-Induced Diabetic that Histochemical and Immunohistochemical Examination of Mast Cells Distribution in Ovary and Uterus During Different Stages of Estrous Cycle in Rats

Ali Eyüp Hayıroğlu, Turan Karaca, Selim Demirtaş

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, 22030, Edirne

ABSTRACT

AIM: The objective of this study was to evaluate in the ovary and uterus distribution of mast cells at histochemical and immunohistochemical in the diabetic rats.

METHODS: In the present study 64 adult female wistar albino rats were used. Subjects have been randomly separated into 8 different groups, four of which constituted the control group while the remaining four were the actual experimental group. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin; the control group received physiological saline (5 mL kg⁻¹). At the end of this period, both groups were processed for every cycle after detecting their menstrual cycles according to the vaginal smear findings.

RESULTS: Higher mast cell (MC) numbers were observed by toluidine blue staining in ovary of experimental groups, and the least dioestrous phase of the oestrous cycle compared with other diabetic groups. However, the highest mast cells were observed in metoestrous phase, and the least cells pre-oestrous phase of the oestrous cycle. Tryptase and chymase immune staining control and diabetic rats, tryptase and chymase-positive mast cells were the most intense phase of met-oestrous.

CONCLUSION: As a result, depending on the estrous cycle, it has changed and that the change in the distribution of mast cells in the ovary and the uterus was found to be a significant impact of diabetes.

Key words: oestrus cycles; mast cells; diabetes mellitus; ovary; uterus

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada, diyabetik sıçanların ovaryum ve uteruslarında mast hücrelerinin dağılımının histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlandı.

YÖNTEM: Çalışmada, 64 dişi Wistar Albino sıçan kullanıldı. Denekler, rastgele 4'ü kontrol, 4'ü ise deney grubu olmak üzere toplam 8 gruba ayrıldı (n=8). Deney grubunda diyabet oluşturmak için deneklere 60 mg/kg oranında streptozotosin (STZ) uygulandı. Deney sonunda vajinal smear bulgularına göre menstrual siklus evreleri saptanarak her evre için deney ve kontrol gruplarında 8 sıçan işleme alındı.

BULGULAR: Toluidine mavisi ile yapılan boyamada, deney grubu ovaryumlarında mast hücreleri en yoğun östrüs, en az ise diöstrüs evresinde tespit edildi. Bununla birlikte diyabetik endometriyumda mast hücresi en fazla metöstrüs, en az ise proöstrüs evresinde gözlemlendi. Triptaz ve kimaz immun boyamasında, kontrol ve diyabetik sıçanlarda, triptaz ve kimaz pozitif mast hücresi en yoğun metöstrüs evresinde tespit edildi.

SONUÇ: Sonuç olarak, östrüs siklusüne bağlı olarak ovaryum ve uterusda mast hücre dağılımının değiştiği ve bu değişimde diyabetin önemli etkisi olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: östrus siklusu; mast hücreleri; diabetes mellitus; over; uterus

Giriş

Diyabet, özellikle son yıllarda gelişmiş ülkelerde artmakta ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından "salgın" olarak nitelenmekte olup karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluğu ile seyreden kronik bir metabolizma hastalığıdır¹. Diyabet ve etkileri ülke ekonomilerine ciddi bir yük getirmektedir. Bu yükün Türkiye için yıllık maliyeti yaklaşık 3 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir².

Diyabet, hastalarda çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır. Kardiyovasküler rahatsızlık riskini arttırmakta³, retinopati ile körlük meydana getirebilmekte⁴,

Prof. Dr. Turan Karaca, Balkan Yerleşkesi 22030 Edirne - Türkiye,
Tel. 0284 235 76 53 Email. turankaraca74@hotmail.com
Geliş Tarihi: 28.08.2014 • Kabul Tarihi: 06.05.2015

hamileliği olumsuz etkileyebilmektedir⁵. Bu etkilerinden dolayı birçok deneysel hayvan modeli oluşturularak diyabet incelenmektedir³.

Memeli canlılarda, erişkin dönemde hayvan türüne göre değişen sürelerle sahip genital siklus (östrüs) izlenmektedir⁶. Bu siklus; insan, fare ve sıçan gibi canlılarda proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere birbirini takip eden dört evreden meydana gelmektedir⁷. Menstrüel siklusdaki hormonal değişikliklerden başta vajina olmak üzere tüm genital kanal organları etkilenmektedir.

Mast hücreleri sitoplazmik granüllerinde histamin, heparin, triptaz, kimaz, eozinofil kemotaktik faktör-A (ECF-A) gibi serin proteinler bulduran bağ dokusunun immünolojik hücrelerindedir. Mast hücreleri organizmada özellikle dış ortam ile bağlantılı doku ve organ kompartmanlarında ve özellikle kan damarları yakınlarında lokalize olma eğilimi gösteren hücrelerdir^{8,9}. Mast hücreleri, granüllerinde bulunan sülfatlanmış glikozaminoglikanların (heparin) varlığı nedeniyle bazik (TB, metilen mavisi, tiyonin vb.) boyalar ile boyandığında metakromazi gösterirler¹⁰. Yapılan çalışmalarda, genital siklusla bağlı olarak ovaryum ve uterusu mast hücresi dağılımının değiştiği rapor edilmiştir⁹.

Yapılan literatür taramalarında, ovaryum ve uterus dokularında deneysel diyabete bağlı olarak mast hücresi dağılımını immunohistokimyasal metotlarla gösterir çalışmaya rastlanılamadı. Mast hücreleri doku içi hemostazisin ayarlanmasında önemli roller oynayarak, ovaryumlarda folikülogenezis ve uterusu ise endometriyum yenilenmesinde önemli görevler almaktadır. Diyabette görülen folikül gelişim kusurları ve endometriyumundaki immun yanıtta mast hücrelerinin fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır. Planlanan bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların ovaryum ve uterus dokularında östrus siklusuna bağlı olarak mast hücrelerinin dağılımındaki değişimlerin histokimyasal ve immünohistokimyasal metotlarla ortaya konularak literatüre katkı sağlanması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmada, ağırlıkları 250–300 g arasında değişen, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Birimi'nde üretilmiş, 64 adet erişkin Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Denekler deney süresi boyunca, optimum laboratuvar koşulları altında (22±10C, 12 saat karanlık/aydınlık), günlük içme suyu ve %21

ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Çalışma için Trakya Üniversitesi deneysel hayvanları etik kurulundan TÜHDYK-2012/45 protokol no.lu izin alınarak çalışma başlatıldı.

Çalışma başlangıcında, hayvanların tartımları yapılarak tamamı bir gece aç bırakıldı. Ertesi sabah bütün hayvanların açlık kan şekeri (IME-DC, Almanya) ölçüldü. Ölçüm sonunda elde edilen kan değerleri ile (en düşük 52 mg/dl; en yüksek 136 mg/dl) hayvanların sağlıklı oldukları tespit edildi. Çalışmamızda hayvanlar rastgele Kontrol grupları ve Diyabetik gruplar olarak ikiye ayrıldı. Otuz iki sıçan kontrol gruplarını oluşturmak için ayrıldı ve herhangi bir uygulama yapılmadı. Diyabet gruplarının oluşturulması için 32 sıçana 60 mg/kg tek doz intraperitoneal streptozotosin (STZ) uygulanarak 48 saat bekletildi. İkinci günün gecesinde STZ uygulanan hayvanlar aç bırakılıp sabah tekrar kan değerleri ölçüldü. Ölçümde elde edilen değerler ile (en düşük 320 mg/dl, en yüksek 541 mg/dl) hayvanların diyabet olduklarına karar verildi. Ölçüm sonunda 18 gün (ilk STZ uygulamasının ardından 21 gün) bekletildi. Yirmibir (21) gün sonra vajinal smear yöntemiyle deneklerin östrus siklusu tayini yapıldı.

Deneysel Grupları;

- 1- Kontrol Proöstrus,
- 2- Kontrol Östrus,
- 3- Kontrol Metöstrus,
- 4- Kontrol Diöstrus,
- 5- Diyabet Proöstrus,
- 6- Diyabet Östrus,
- 7- Diyabet Metöstrus ve
- 8- Diyabet Diöstrus, şeklinde oluşturuldu.

Vajinal Smear Yöntemi

Deneysel sonunda 21. günden başlanarak 24 saatte bir defa deneklerin vulva bölgesi 70'lik 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 kurumaları bekletildi. Kuruyan yaymalar %70'lik metanole (Merk, Almanya) daldırılıp bekletilmeden çıkarıldı ve oda sıcaklığında kurutulularak yaymanın fiksasyonu sağlandı. %1'lik toluidine blue (TB, Fluka, 89640) ile 5 dakika boyanan preparatlar distile su ile yıkanıp kurutuldu ve kapatma uygulamaksızın incelendi. Fazların fotoğraflanması (Olympus CX31-Japan) ile sağlandı.

Işık Mikroskopik İnceleme

Işık mikroskopik incelemeler için ovaryumlardan biri ve uterusdan alınan uygun büyüklükteki örneklerin, Carnoy fiksatorü (60 ml absolt alkol, 30 ml kloroform, 10 ml glasiyal asetik asit) ile 12 saat fiksasyonu sağlandı. Rutin histolojik takiplerin ardından doku örnekleri parafinde bloklandılar. Parafin bloklardan elde edilen 5µm kalınlığındaki kesitlere, mast hücrelerinin dağılımlarını göstermek için %1'lik TB boyaması uygulandı.

Mast Hücre Sayımları ve İstatistiksel Analizler

TB ile boyanan preparatlarda mast hücrelerinin dağılımını belirlemek için yapılan hücre sayımlarında 100 kare oküler mikrometre (eyepiece graticule) kullanıldı. Kırklık objektif büyütmesinde oküler mikrometrenin 100 kare birim alanındaki mast hücreleri sayıldı ve milimetre kare (mm²)'deki hücre sayısı hesaplandı¹¹.

Her uterus kesitinin endometriyum ve miyometriyum katmalarından rastgele seçilen her bir bölgeden 6'şar (toplam 12) büyütülmüş alanda hücre sayımı yapıldı. Ovaryum kesitlerinde (korteks + medulla) rastgele seçilen her bir bölgeden 12 büyütülmüş alanda mast hücre sayımları yapıldı. Seri kesitlerin sayılması ile elde edilen mast hücre sayılarının aritmetik ortalaması alındı.

Her iki organda da mast hücre sayılarının SAS v.12.0 paket programı kullanılarak varyans analizleri yapıldı. Gruplar arası ve içindeki farklılıklar Duncan testi ile belirlendi.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Bu amaçla ovaryumlardan biri (sağ veya sol rastlantısal biçimde) ve uterus doku örneğinin %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu (100 ml %37'lik formaldehit solüsyonu 900 ml distile su, 6,5 gram Na₂HPO₄, 4 gram NaH₂PO₄·H₂O) ile 48 saat fiksasyonu sağlandı. Rutin histolojik takiplerden sonra parafin bloklardan alınan kesitler anti-triptaz (Abcam, ab2378) ve anti-kimaz (Biorbyt, orb4912) ile 2 saat süreyle inkübe edildi (1:250). Kromojen olarak anti-triptaz boyamasında 3-Amino-9-Ethylcarbazole AEC (Abcam, ab64257) ve anti-kimaz için ise 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 10 dk. süre ile uygulandı ve Weigert'in demirli hematoksilin'de 5 dakika zemin boyaması yapıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme ve Hücre Sayımları

İmmünohistokimyasal boyama yapılan preparatlarda kimaz pozitif ve triptaz pozitif mast hücre dağılımı semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif değerlendirme; taranan alanda pozitif hücre yok (-), 1-2 hücre (±), 3-4 hücre (+), 5-6 hücre (++), 7 ve daha fazla sayıda hücrede (+++), şeklinde yapıldı.

Bulgular

Kontrol ve diyabet gruplarına ait deney başlangıç ve deney sonu kan glikoz ve vücut ağırlık değişim değerleri Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

Table 1. Kontrol ve diyabet gruplarına ait kan glikoz değişimleri

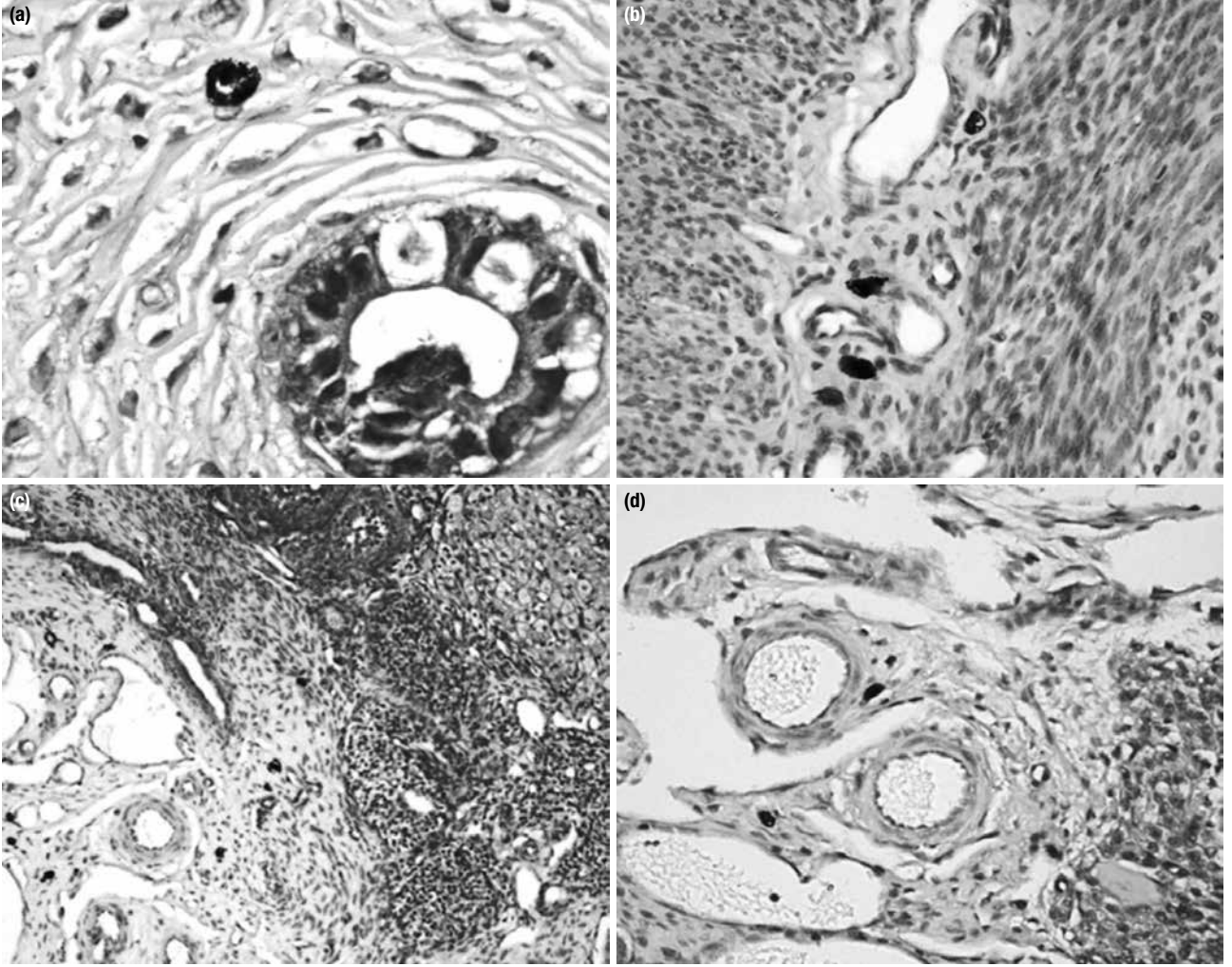
Siklus Fazı	Kontrol		Diyabet	
	Deney başlangıç kan glikoz seviyesi (mg/dl)	Deney son kan glikoz seviyesi (mg/dl)	Deney başlangıç kan glikoz seviyesi (mg/dl)	Deney son kan glikoz seviyesi (mg/dl)
Proöstrus	89,63	88,00	80,40	443,40*
Östrus	76,25	75,50	78,20	411,60*
Metöstrus	75,86	77,43	81,83	401,83*
Diöstrus	90,38	88,38	74,67	452,33*

*: Başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı; P<0.05

Table 2. Kontrol ve diyabet gruplarına ait vücut ağırlık değişimleri

Siklus Fazı	Kontrol		Diyabet	
	Deney başlangıç vücut ağırlığı (gr)	Deney son vücut ağırlığı (gr)	Deney başlangıç vücut ağırlığı (gr)	Deney son vücut ağırlığı (gr)
Proöstrus	176,25	191,75*	189,40	147,60*
Östrus	169,88	180,75	185,80	141,60*
Metöstrus	167,86	185,86*	179,50	139,17*
Diöstrus	170,38	188,25*	174,00	143,67*

*: Başlangıç değerine göre istatistiksel olarak anlamlı; P<0.05



Şekil 1. a–d. Toluidine blue boyaması ile mast hücrelerinin görünümü. Kontrol grubu östrus evresi endometriyum dokusu (1000×) (a); diyabetik grup metöstrüs evresi miyometriyum dokusu (400×) (b); diyabetik grup östrüs evresi ovaryum dokusu (200×) (c); kontrol grubu metöstrüs evresi ovaryum (400×) (d).

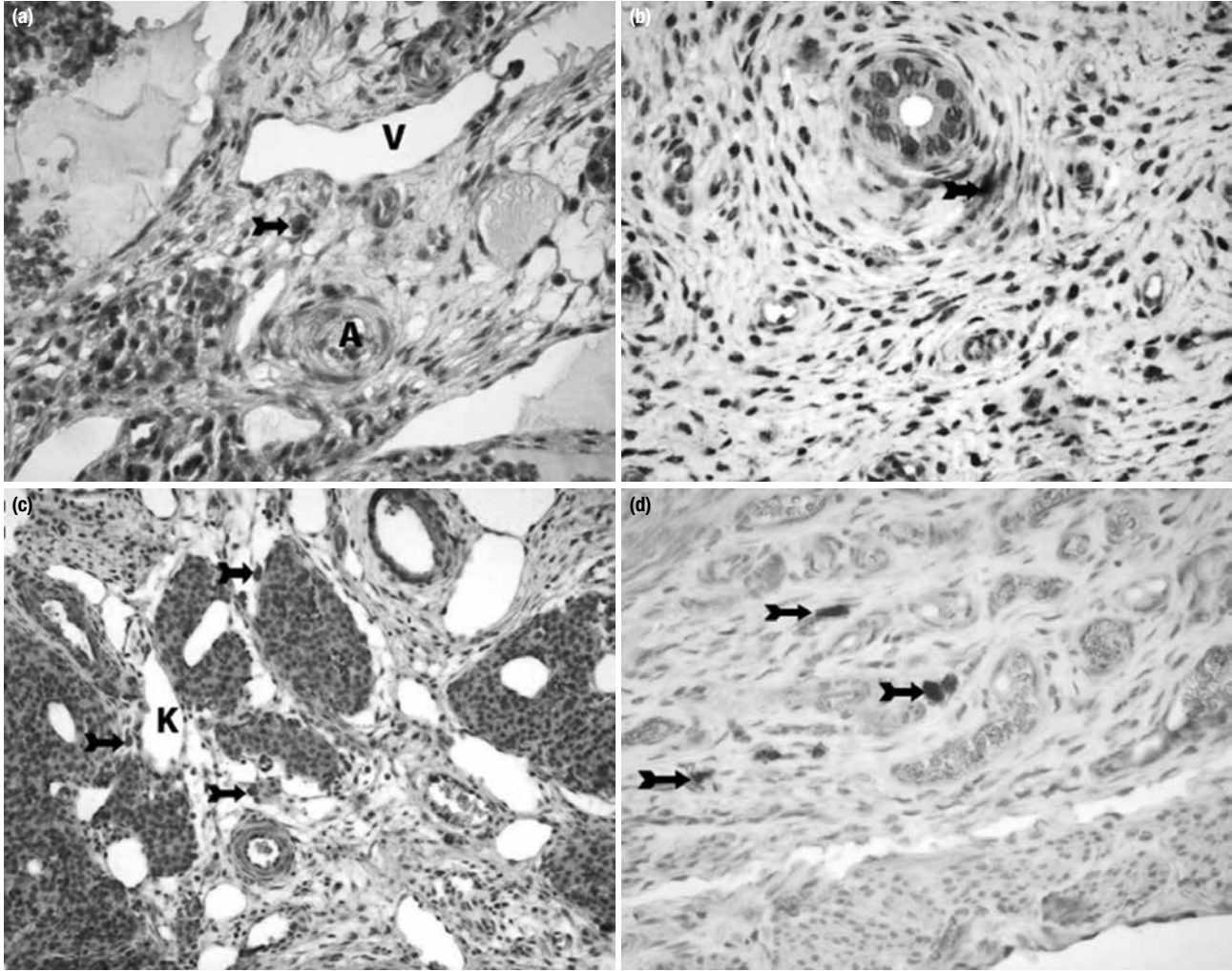
Uterus ve Ovaryumda Toluidine Blue Pozitif Mast Hücre Dağılımı

Uterus endometriyum katmanı incelendiğinde, mast hücrelerinin lamina propria tabakasında bulunduğu gözlemlendi (Şekil 1a). Uterusun endometriyum katmanında diyabet ve kontrol gruplarından elde edilen mast hücreleri sayıları incelendiğinde diyabetik sıçanlarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$).

Uterus miyometriyum katmanı incelendiğinde mast hücrelerinin stratum vasculare bölgesinde damarlara yakın konumda yerleştikleri gözlemlendi. Yine bu katman değerlendirildiğinde, kontrol ile diyabet gruplarını karşılaştırılmasında östrus ve diöstrus evrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmezken ($P > 0.05$), proöstrus ve metöstrus evrelerinde diyabet

grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlendi ($P < 0.05$; Şekil 1b).

Ovaryum dokusunda TB ile boyamada, metakromatik boyanan mast hücrelerinin genellikle ovaryumun medulla kısmında ve bu alanda da genellikle kan damarı yakınlarında yerleşik oldukları saptandı (Şekil 1c). Kortikal alanlarda TB (+) mast hücreleri daha azınlıktaydı ve germinal epitel katmanında, follikül içinde ve korpus luteumda bu hücrelere rastlanmadı. Proöstrus, östrus, diöstrus sikluslarının kontrol ve diyabet grupları karşılaştırıldığında, diyabet gruplarında mast hücreleri sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken ($P < 0.05$), metöstrus evresindeki kontrol ve diyabetik sıçanların ovaryumlarındaki mast hücreleri sayısındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($P > 0.05$; Şekil 1d).



Şekil 2. a-d. Anti-triptaz immunreaktivitesi. Kontrol grubu proöstrüs evresi ovaryum dokusu, (400×) (a); kontrol grubu diöstrüs evresi uterus dokusu (400×) (b); kontrol grubu östrüs evresi ovaryum dokusu (200×) (c); diyabetik grup östrüs evresi myometriyum dokusu (400×) (d) (ok, triptaz pozitif mast hücresi; A, arter; V, ven).

İmmünohistokimyasal Bulguları

Triptaz Pozitif Mast Hücresi Dağılımı

Ovaryum ve uterusun dokularında yapılan immünohistokimyasal triptaz boyamasından elde edilen triptaz pozitif mast hücre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir.

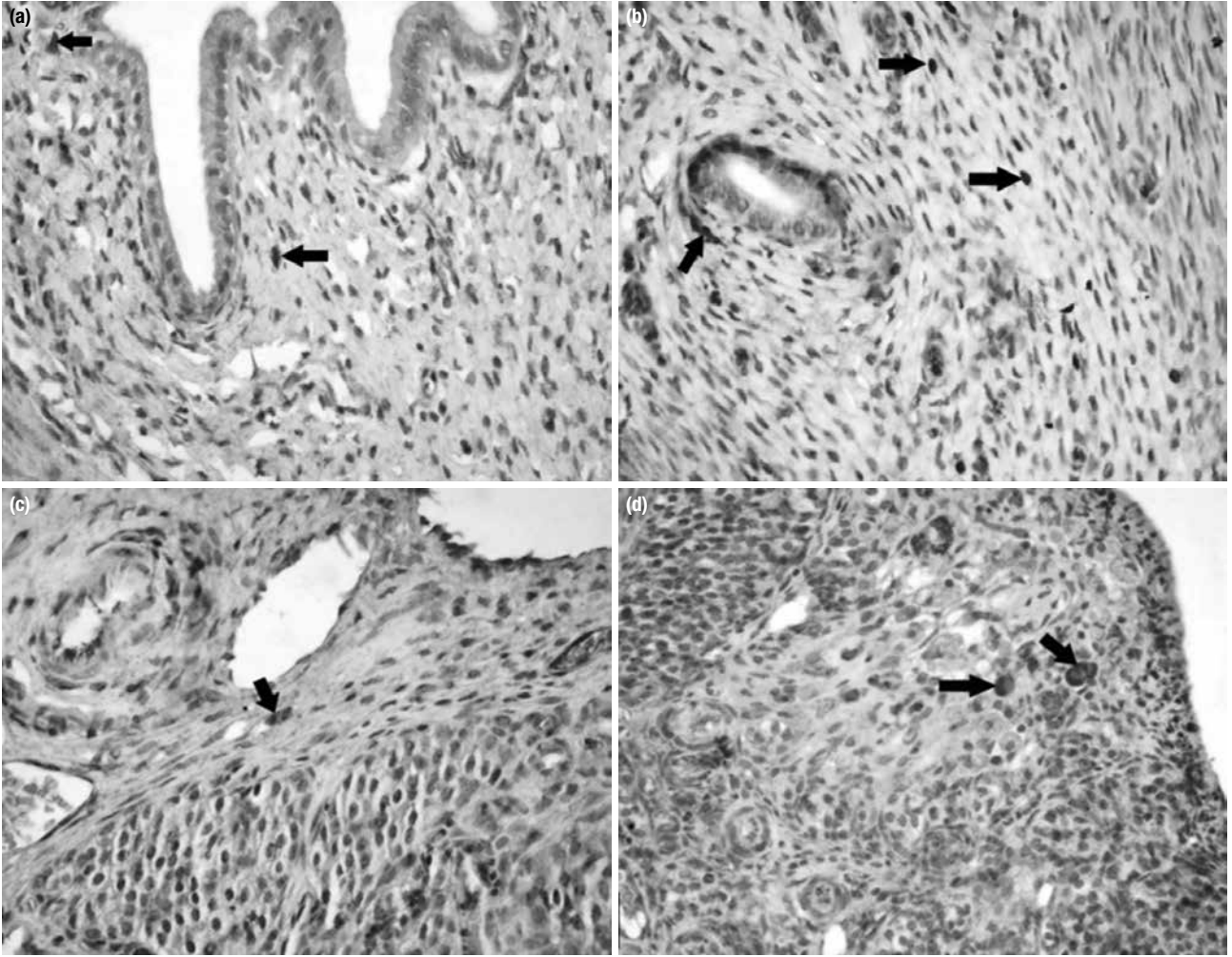
Triptaz boyaması sonucunda siklus fazlarına göre ovaryum dokusu incelendiğinde proöstrus ve metöstrus fazlarında deney grubu ile kontrol grupları arasında triptaz pozitif hücre sayısında bir değişim gözlenmemiştir. Östrus siklusu incelendiğinde deney grubu sıçanlarının ovaryumlarında, kontrol grubu sıçanların ovaryumlarına göre bir artış olduğu gözlemlendi. Diöstrus evresinde ise diyabet grubu sıçanların ovaryumlarında, kontrol grubu sıçanlarının ovaryumlarına göre bir azalmanın olduğu tespit edildi (Şekil 2a, c).

Tablo 3. Ovaryum ve uterus dokularında farklı siklus evrelerinde triptaz pozitif mast hücrelerinin semikantitatif dağılımı

Siklus Evresi	Kontrol		Diyabetik	
	Ovaryum	Uterus	Ovaryum	Uterus
Proöstrus	±	-	±	-
Östrus	±	±	+	+
Metöstrus	++	++	++	+
Diöstrus	+	+	±	±

Yok (-), 1-2 hücre (±), 3-4 hücre (+), 5-6 hücre (++) ve daha fazla sayıda hücrede (+++)

Yapılan triptaz boyamasında diyabet ve kontrol gruplarının uteruslarında, proöstrus evresinde triptaz pozitif mast hücresine rastlanılmadı. Östrus evresinde triptaz pozitif mast hücre sayısının diyabet grubu sıçanların uteruslarında,



Şekil 3. a–d. Anti-kimaz immunreaktivitesi. Kontrol proöstrüs endometriyum dokusu (400×) (a); diyabetik grubu metöstrüs evresi endometriyum dokusu (400×) (b); kontrol grubu metöstrüs evresi ovaryum dokusu (400×) (c); diyabetik grup diöstrüs evresi ovaryum dokusu (400×) (d) (ok, kimaz pozitif mast hücreleri).

kontrol grubu sıçanların uteruslarına göre bir artış gösterdiği tespit edildi. Metöstrus ve diöstrus evrelerinin kontrol ve diyabet grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında triptaz pozitif mast hücre sayısının diyabet grubu sıçanların uteruslarında, kontrol grubu sıçanların uteruslarına göre bir azalma gösterdiği saptandı (Şekil 2b, d).

Kimaz Pozitif Mast Hücreleri Dağılımı

Ovaryum ve uterus dokularında kimaz pozitif boyanan mast hücre dağılımı Tablo 4'te verilmiştir.

Proöstrus evresi uterus örneklerinde, kimaz pozitif mast hücreleri yoğunluğunun diyabetik ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmasında bir değişiklik göstermediği tespit edildi (Tablo 4; Şekil 3a, b). Metöstrus grubu sıçan, uterus dokularında kimaz pozitif mast hücre yoğunluğunda diyabetik grupta kontrol

Tablo 4. Ovaryum ve uterus dokularında farklı siklus evrelerinde kimaz pozitif mast hücre semikantitatif dağılımı

Siklus Evresi	Kontrol		Diyabetik	
	Ovaryum	Uterus	Ovaryum	Uterus
Proöstrus	±	±	+	±
Östrus	+	++	+	±
Metöstrus	++	++	++	+++
Diöstrus	±	+	±	±

Yok (-), 1–2 hücre (±), 3–4 hücre (+), 5–6 hücre (++) ve daha fazla sayıda hücrede (+++)

grubuna göre bir artışın olduğu gözlenmiştir. Östrus ve diöstrus gruplarına ait uteruslarda ise diyabetik gruplarda, kimaz pozitif mast hücre yoğunluğunun kontrollere göre azalma gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4).

Kimaz boyamasında, genel olarak kimaz pozitif mast hücrelerinin ovaryum medullasında lokalize oldukları gözlemlenirken, çok seyrek olarak da korteks alanında görüldü. Kimaz pozitif mast hücre dağılımı incelendiğinde ovaryumda östrus, metöstrus ve diöstrus fazlarında kontrol ve deney grupları arasında bir farklılığın olmadığı tespit edildi. Proöstrus grubunda ise, diyabet grubu ovaryumlarında kontrol grubuna göre bir artış gösterdiği gözlemlendi (Tablo 4; Şekil 3c, d).

Tartışma

Diabetes mellitus (DM), kan glikoz düzeyinde artışa, bireylerin kilo kayıplarına sebebiyet veren, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasını etkileyen oldukça kompleks bir metabolik hastalıktır. STZ ile yapılan deneysel diyabet modeli çalışmalarında, deneklerde kilo kayıpları, kan glikoz düzeyinde artış, endokrin pankreasta hasar ve buna bağlı olarak insülin hormon seviyesinde azalma meydana gelmektedir^{12,13}.

Östrus siklusu sırasında dişi genital organlarda birçok fizyolojik ve histofizyolojik değişimler meydana gelir. Bu değişimler göz önünde bulundurularak, vajinal smear metodu ile tüm memeli canlılarda östrus siklusu belirlenebilmektedir⁷. Sunulan çalışmada da, bu bilgilere paralel smear görüntüleri elde edilmiş ve sıçanların östrus fazları belirlenmiştir.

Mast hücrelerinin fare, sıçan, inek, hamster gibi türlerin ovaryum ve uteruslarında östrus siklüsüne bağlı değişim gösterdiği bildirilmiştir⁹. Yapılan araştırmalarda, sıçan ovaryum ve uterus dokularında östrus siklusunun farklı evrelerinde mast hücreleri sayısal dağılımlarında farklılıklar olduğu görülmektedir^{9,14}. Aynı çalışmalarda ovaryum medulla ve korteksinde mast hücrelerinin var olduğu, ama medullanın kortekse göre daha fazla mast hücreleri içerdiği rapor edilmektedir⁹. Yapılan bu çalışmada da, buna paralel olarak mast hücreleri ovaryumda tespit edilmiş ve medullada kortekse göre daha fazla mast hücrelerinin yerleştiği gözlenmiştir.

Mast hücrelerinin, östrus siklusunun farklı evrelerinde uterustaki dağılımının değiştiği farklı hayvan türlerinde çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Eren ve ark. fare uterusunda yaptıkları çalışmada, östrus ve diöstrus dönemi uteruslar kıyaslanmış, hem endometriyum hem de miyometriyumda östrus dönemindeki dağılımın diöstrus dönemindeki farelere göre fazla olduğu tespit edilmiştir¹⁵. Aynı çalışmada, miyometriyumda endometriyuma göre daha fazla mast hücreleri yerleştiği tespit edilmiştir. Sıçan uterusu üzerinde yapılan çalışmada⁹, endometriyumda en

yüksek dağılımın gözlemlendiği genital siklus fazının östrus, miyometriyumda en fazla mast hücrelerinin bulunduğu fazın ise metöstrus olduğu gösterilmiştir. Sunulan bu çalışmada, endometriyum ve miyometriyumda TB ile boyanmış en yüksek sayıda mast hücrelerinin bulunduğu fazın metöstrus olduğu tespit edilmiştir.

Deneysel diyabet çalışmalarında, diyabete bağlı olarak farklı doku ve organlarda yerleşik olan mast hücre dağılımının değiştiği ve degranülasyonun olduğu bildirilmiştir. Kalp, karaciğer ve mesane gibi farklı organ ve organ katmanlarında diyabete bağlı olarak mast hücre dağılımının değiştiği gösterilmiştir. STZ ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlar üzerinde Çetin ve ark. tarafından yapılan çalışmada, diyabetik sıçanların kalp dokularında kontrol grubuna göre mast hücrelerinde bir artışın olduğu tespit edilmiştir¹⁶. Vardı ve ark. sıçanlar üzerine yaptıkları çalışmada, deneysel diyabetin karaciğer dokularında mast hücreleri sayısını azalttığını göstermiştir¹⁷. Deneysel diyabet oluşturulan sıçanların mesanelerinde yapılan incelemede, kontrol grubu hayvanların mesanelerinde intraepitelial mast hücrelerine rastlanmaz iken, diyabet oluşturulan gruplarda diyabete bağlı intraepitelial mast hücrelerine rastlanmıştır¹⁸.

Sunulan bu araştırmada, ovaryum dokusunda proöstrüs, östrüs ve diöstrüs grubu diyabetik sıçanlarda, kontrole göre mast hücre sayılarının anlamlı olarak yükseldiği tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Metöstrüs evresinde mast hücreleri diyabetik grupta artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı gösterilmiştir. Karaca ve ark. yaptıkları bir çalışmada, sıçan ovaryumunda mast hücreleri medulla östrüs evresinde; kortekste ise metöstrüs evresinde en yüksek sayıda olduğu bildirilmiştir⁹.

Aydın ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada, ovaryum dokusunda proöstrüs grubu sıçanlarda kortekste mast hücrelerine rastlanmadığı bildirilmiş, kortekste en yüksek mast hücre sayısının metöstrüs evresinde olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, ovaryum medullasında en yüksek mast hücre sayısı östrüs fazında, en düşük değer ise proöstrüs evresinde olduğu bildirilmiştir¹⁴.

Sunulan bu araştırmada, kontrol grubu sıçanlarda, ovaryum dokusunda mast hücre sayısı mm^2 'de en yüksek metöstrüs, en düşük ise diöstrüs evresinde tespit edilmiştir. Bu bulgular metöstrüs fazındaki mast hücre sayısı açısından Karaca ve ark. (2007) ve Aydın ve ark. (1998)'in çalışmaları ile benzerken, en düşük sayıdaki mast hücre sayısı açısından ise adı geçen çalışmalarda farklılıklar göstermektedir^{9,14}. Jones ve ark. (1980) ovaryum medullasında en yüksek sayıda mast hücre sayısının östrüs, en

az ise proöstrüs evresinde olduğunu bildirmişlerdir¹⁹ Krishna ve ark. (1989) yaptıkları çalışmada, hamster ovaryum medullasında en az mast hücrelerinin benzer olarak proöstrüs evresinde olduğunu göstermişlerdir²⁰. Bununla birlikte Jones ve ark. ovaryum korteksinde mast hücrelerine rastladıklarını iddia etmişlerdir¹⁹. Bu sonuçlarla, yapılan bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında korteksde mast hücrelerin az da olsa varlığının tespiti adı geçen çalışma ile farklılıklar göstermektedir.

Shinohara ve ark. (1987) yaptıkları araştırmada, ovaryan bursada östrüs siklusunun 4. gününde mast hücre sayısı 1, 2, ve 3. östrüs günlerine göre önemli derecede azalmaların olduğu tespit edilmiştir²¹. Gaytan ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada, siklusa bağlı olarak ovaryum medulla ve korteksinde önemli değişimler olmasına rağmen, ovaryan bursada ise önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir²².

Uterusta mast hücrelerinin östrüs fazına bağlı dağılımı üzerine yapılan çalışmalarda, endometriyum ve miyometriyum katmanlarında bu hücrelerin sayısının östrüs fazına bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir^{9,14,23}. Sunulan bu çalışmada, kontrol grubu sıçanlarda endometriyumda en fazla sayıda mast hücresi metöstrüsde; en az ise proöstrüs evresinde olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, diyabetik sıçanların endometriyumunda mast hücre sayısının tüm östrüs siklüs evrelerinde kontrole göre anlamlı olarak artmış olduğu tespit edilirken ($P < 0.05$); diyabetik sıçanların endometriyum dokusunda en yüksek sayıda mast hücresine metöstrüsde, en az ise östrüs evresinde olduğu tespit edilmiştir. Endometriyum katmanında, hem kontrol hem de diyabetik sıçanlarda bez epiteline ve lumen epitelde mast hücresi gözlenmemiştir.

Sunulan bu çalışmada, uterus miyometriyumunda mast hücre dağılımı incelendiğinde en yüksek sayıda hücre kontrol grubunda metöstrüs, en az proöstrüs; diyabetik sıçanlarda ise aksine en yüksek proöstrüs en azda östrüs evresinde tespit edilmiştir. Miyometriyumda mast hücrelerinin yoğun olarak kas katmanları arasında yer alan stratum vaskulare katmanında yerleşik oldukları gözlemlenirken, az sayıda da kas lifleri arası bağdokusu içine lokalize oldukları tespit edilmiştir. Miyometriyum mast hücreleri dağılımları Karaca ve ark.'nın çalışması ile paralellik göstermesine rağmen, Aydın ve ark. çalışması ile farklılık göstermektedir^{9,14}.

Yapılan literatür taramalarında sıçanların dişi genital organlarında mast hücrelerinin immünohistokimyasal olarak incelendiği (triptaz ve kimaz) bir çalışmaya

rastlanılmadı. Bu nedenle, triptaz ve kimaz pozitif mast hücrelerindeki dağılım az sayıda rastlanılan farklı doku ve organ sonuçları ile tartışılmıştır.

Kedilerde yapılan bir çalışmada, triptaz ve kimaz pozitif mast hücrelerinin deri, dil, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve gastrointestinal kanal organlarında değişik oranlarda bulunduğu rapor edilmiştir²⁴. İnsanlarda, mast hücrelerinin immünohistokimyasal metotlarla içerdikleri proteazların varlığına göre yalnızca triptaz içeren mast hücreleri (MC_T), yalnızca kimaz içeren mast hücreleri (MC_C) ve hem triptaz hem de kimaz içeren mast hücreler (MC_{TC}) olarak sınıflandırılmıştır^{25,26}.

Sunulan çalışmada yapılan immünohistokimyasal boyamada, triptaz pozitif mast hücrelerinin yapılan semikantitatif değerlendirilmesinde, kontrol ve diyabetik sıçan ovaryumlarında en yoğun mast hücresine metöstrüs evresinde rastlanılmıştır. Uterus incelendiğinde ise, kontrol ve diyabetik sıçanlarda, immun boyama sonucunda proöstrüs fazında triptaz pozitif mast hücresine rastlanılmazken, kontrol gruplarına benzer olarak en yoğun metöstrüs fazında olduğu tespit edilmiştir.

Triptaz proteazı, gastrointestinal ve bronşial mukoza gibi alanlarda yerleşik olan atipik mast hücrelerinde (mukozal mast hücreleri-MMC) lokalize oldukları tespit edilmiştir²⁷. Bunun yanında triptazın, insan akciğer mast hücrelerinde de varlığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur^{28,29}. Sunulan bu araştırmada, triptaz pozitif mast hücrelerin sıçan ovaryum ve uteruslarında varlığı tespit edilerek, östrüs siklusuna göre de değişim gösterdiği ilk kez ortaya konmuştur.

Yapılan araştırmalarda kimazın; sıçan deri³⁰, kas³¹, akciğer parenşimi³¹, serozal kavite^{31,32} ve karaciğer³³ mast hücrelerinde varlığı tespit edilmiştir³⁴. Mitani ve ark. (2002), kimaz pozitif mast hücrelerine normal gebelik miyometriyumunda ve plasenta dokularında değişik oranlarda rastladıklarını bildirmişlerdir³⁵ Bu hücrelerin preeklampsi durumunda miyometriyumunda artarken, plasentada ise anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir araştırmada, endometriyumda rat mast hücresi proteaz II (RMCP-II)'nin bulunmadığı, oysa miyometriyumda az da olsa bu enzimi içeren mast hücrelerine rastlandığı bildirilmiştir. Buna karşın uterus dokusunda RMCP-I içeren mast hücrelerinin bulunduğu bildirilmiştir³⁶.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile diyabetik sıçanlarda östrüs siklusunun farklı günlerinde meydana gelen hormonal değişime paralel olarak, triptaz ve kimaz immun reaktif mast hücre dağılımlarının değiştiği ortaya konmuştur.

Bununla birlikte, bu hücrelerin dağılımlarındaki değişikliklerin biyokimyasal ve ileri tekniklerle desteklenerek araştırılmasına gereksinim bulunduğu kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> (01.05.13 tarihinde erişildi)
2. <http://www.diyabetidurduralim.org/sayfa.aspx?m=1> (20.04.13 tarihinde erişildi)
3. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şekeri seviyesinin ölçülmesi. *Gen Tıp Derg* 2007;17(4):231-6.
4. <http://www.idf.org/complications-diabetes> (01.05.13 tarihinde erişildi)
5. Küçük F, Gürer F, Bayçu C, Hassa H. Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetin blastosist, embriyonik kök hücreleri gelişimi ve in vitro spontan histogenezise etkileri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2009;10(1):169-78.
6. Yalçın A. Sıçanlarda östrus siklusunda endometriyum dokusunun hücrel ve humoral savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 1999.
7. Sapmaz Metin M. Normal ve süperovule farelerde iyonizan radyasyonun ovaryum morfolojisi, östrus siklusu ve ovulasyon oranı üzerine etkilerinin incelenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
8. Koçak Harem M. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. *Sag Bil Derg (J Health Sci)* 2005;14(1):61-7.
9. Karaca T, Yörük M, Uslu S. Distribution and quantitative patterns of mast cell in ovary an uterus of rat. *Arc Med Vet* 2007;39(2):135-9.
10. Özcan O, İrmak MK, Dalcık H. Metakromazi. *T Klin J Med Sci* 1995;15;316-8.
11. Karaca T. Tavuk ve bıldırcın sindirim kanalında mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerine morfolojik ve histometrik araştırmalar (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2003.
12. Vardı N, Uçar M, Iraz M, ve ark. Deneysel diyabetin sıçan endokrin pankreasında oluşturduğu morfolojik değişiklikler. *T Klin J Med Sci* 2003;23:27-32.
13. 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.
14. Aydın Y, Tunçel N, Gürer F, et al. Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: Cyclic changes and contribution to tissue histamine. *Comp Biochem Physiol Part A* 1998;120:255-62.
15. Eren Ü, Sandıkçı M, Sur E, ve ark. Seksüel siklusun farklı dönemlerinde fare uterusunda bulunan mast hücreleri üzerinde histolojik ve histokimyasal çalışmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1997;44:117-26.
16. Çetin A, Vardı N, Orman D. Deneysel diyabetin sıçan kalp dokusunda meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine aminoguanidinin iyileştirici etkileri. *Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi* 2013;4(1):1-11.
17. Vardı N, Iraz M, Öztürk F, ve ark. Deneysel diyabetin sıçan karaciğerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:641-8.
18. Gökalp Özkormaz E. Streptozotosin diyabetik ve Benfluoreks - C vitamini tedavili sıçanların mesane dokusunda histolojik incelemeler (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2008.
19. Jones RE, Duvall D, Guilette LJ. Rat ovarian mast cells; distribution and cyclic changes. *Anat Rec* 1980;197:489-93.
20. Krishna A, Beesley K, Terranova PF. Histamine, mast cell and ovarian function. *J Endocrinol* 1989;120:363-71.
21. Shinohara H, Nakatani T, Morisawa S, et al. Mast cells in the ovarian bursa of the golden hamster. *Biol Reprod* 1987;36:445-50.
22. Gaytan F, Aceitero J, Bellido C, et al. Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biol Reprod* 1991;45:27-33.
23. Brandon JM, Evans JE. Observations on uterine mast cells during early pregnancy in the vole *Microtus agrestis*. *Anat Rec* 1984;208:515-20.
24. Noviana D, Kono F, Nagakui Y, et al. Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochem J* 2001;33:597-603.
25. Irani AA, Schecter NM, Craig SS, et al. Two types of human mast cells have distinct neural protease compositions. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:4464-8.
26. Weidner N, Austen KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 1993;189:156-62.
27. Woodbury RG, Gruzenski GM, Lagunoff D. Immunofluorescent localization of a serine protease in rat small intestine. *Proc Natl Acad Sci* 1978;75:2785-9.
28. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells: Purification and characterization. *J Biol Chem* 1981;256:11939-43.
29. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, et al. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol* 1981;126:1290-4.
30. Seppa HEJ, Jarvinen M. Rat skin main neutral protease: purification and properties. *J Invest Derm* 1978;70:84-9.
31. Woodbury RG, Gruzenski GM, Lagunoff D. Immunofluorescent localization of a serine protease in rat small intestine. *Proc Natl Acad Sci* 1978;75:2785-9.
32. Yurt RW, Austen KF. Preparative purification of rat mast cell chymase. Characterization and interaction with granule components. *J Exp Med* 1977;146:1405-19.
33. Katunuma N, Kominami E, Kobayashi K, et al. Studies on new intracellular proteases in various organs of rat I. Purification and comparison of their properties. *Eur J Biochem* 1975;52:37-50.
34. Schwartz LB, Austen KF. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. *Prog Allergy* 1984;34:271-321.
35. Mitani R, Maeda K, Fukui R, et al. Production of human mast cell chymase in human myometrium and placenta in cases of normal pregnancy and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;101:155-60.
36. Salamonsen LA, Jeziorska M, Newlands GFJ, et al. Evidence against a significant role for mast cells in blastocyst implantation in the rat and mouse. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:1157-64.