

Deneyisel toksik siroz ve omentektomili siroz modellerinin sıçan ovaryum, fallop tüpleri ve uterusu etkilerinin histolojik olarak incelenmesi

Histological evaluation of experimental toxic cirrhosis and omentectomised toxic cirrhosis over rat ovary, fallopian tubes and uteri

Yılmaz Dilsiz Ö¹ Akay H S² Ateş U¹ Özütemiz Ö³ Baka M¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²T.C. Sağlık Bakanlığı-İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Gastroenteroloji Servisi, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Dimetilnitrozamin (DMN) hepatik fibrozis ve toksik hepatit yapmaktadır. Asitin giderilmesi için omentektomi yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı DMN'nin ve omentektominin ovaryum, fallop tüpleri ve uterusu etkilerinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlar, *omentektomize toksik siroz* (Grup 1), *omentektomisiz toksik siroz* (Grup 2), serum fizyolojik (SF) enjekte edilmiş *omentektomize sham* (Grup 3) ve *omentektomisiz kontrol* (Grup 4) olarak gruplandırıldılar. İlgili gruplara omentektomizasyon ve/veya 3 hafta boyunca haftada 3 gün ardışık 1µl/100mg/gün ip DMN uygulaması yapıldı. Tüm deneklerin ovaryum, tuba ve uteruslarına fiksasyon ve histolojik takip yapıldı. Parafin kesitler Hematoksilen-Eosin, Alcian Blue-PAS ve Anti-Fibronektin ile incelendi.

Bulgular: Karaciğer siroz bulguları histoloji ile kanıtlandıktan sonra ovaryum, tuba ve uterus histolojisi değerlendirildi. Uterusta özellikle Grup 1 ve 2'de belirgin olan siroza bağlı sekretuar epitelin siklus değişikliklerinin yanı sıra Tuba uterinada DMN alan grup 1 ve 2'de adenokarsinom lehinde epitel kalınlaşma alanları izlendi. Over bulguları açısından özellikle Grup 1'de belirgin siklus baskılanması; Grup 1 ve 2'de primer ve sekonder foliküllerde azalma, oosit kalitesi değişiklikleri, ovoid karakterde oositler izlenmiştir. Ayrıca visceral peritonda yer yer dejenerasyon izlenmektedir. Grup 3'te kontrol grubundan farklı olarak granüloza hücreleri arasında konjesyone kapiller yapılar saptandı. Grup 3 ve 4 normal tuba ve uterus histolojisindeydi. Bu gruplarda omentektomiye bağlı özel bir değişiklik saptanamadı.

Sonuç: Sıçanlara DMN uygulandığında toksik karaciğer hasarlanması için model oluşturmaktadır. Sıvı transüdayonu ve asit önlenemediğinde cerrahi olarak omentektomi önerilmektedir. Büyüyen folikülde fibronektin gösterilmiştir. Sirozda foliküler arrest ve siklus baskılanmasının yanı sıra hücresel yaşamsal değişiklikleri düşündüren bulgular vardır. Sonuç olarak; bu çalışma modeli ve bulguları kısırlık açısından yapılacak gelecek araştırmalarda ve sirotik karaciğer hasarlanması olgularında, bulguların geriye döndürülmesine yönelik ilaç, vs. araştırmaları için anahtar çalışma niteliğindedir.

Anahtar Sözcükler: Omentum, dimetilnitrozamin, karaciğer sirozu, kısırlık, sıçan, histoloji.

Summary

Aim: The *in vitro* model of dimethylnitrosamine toxicity-induced early liver fibrogenesis provides a physiologic milieu to study mechanisms underlying infertility.

Materials and Methods: Effects on fertility after injections of dimethylnitrosamine were assessed by light microscopy and fibronectin immunohistochemistry. Rats were randomly allocated to: Group 1, omentectomised and dimethylnitrosamine-induced toxic cirrhosis; Group 2, non-omentectomised and dimethylnitrosamine-induced toxic cirrhosis; Group 3, omentectomised and saline injected sham controls ; and Group 4, controls.

Yazışma Adresi: Özlem YILMAZ DİLSİZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 23.05.2012 Kabul Tarihi: 05.06.2012

Results: Fibrotic alterations of the cirrhotic liver disease were demonstrated with histology. The ovaries for groups 1 and 2 showed cycle arrest and oocyte quality revealed ovoid morphology. Groups 3 and 4 showed unapparent changes. Inspection for fibronectin in the ovarian stroma and follicles revealed decreased immunoexpression for groups 1 and 2. Tuba uterina displayed epithelial thickening for groups 1 and 2. Normal fallopian and uterine histology with no significant alterations for omentectomy were described for groups 3 and 4.

Conclusion: For complete understanding the mechanisms by which environmental chemicals affect intrafollicular processes, further investigation is needed. When no other medication is available for increasing ascites, omentectomy is offered as a valuable surgical tool. Yet this Dimethylnitrosamine-induced cirrhotic model and its relevant findings are keys for following experimental research studies in reversing the effects and for developing drugs or new therapeutic approaches.

Key Words: Omentum, dimethylnitrosamine, liver cirrhosis, infertility, rat, histology.

Giriş

Tütün dumanı ve çeşitli yiyecek herbisitlerde yer alan karsinojen bir nitrozamin ($C_2H_6N_2O$) olan dimetilnitrozamin (DMN) laboratuvar koşullarında intraperitoneal olarak önceden belirlenmiş dozlarda ardışık günlerde uygulandığında hepatik fibrozise yol açmakta ve toksik hepatit yapmaktadır. Sonuçta, asit gelişimi ve siroz izlenmektedir. Asit gelişiminde hangi mekanizma söz konusu olursa olsun, patogenezisinde peritondan karın boşluğuna sıvı transüstasyonu önemlidir (1-3).

Gelişen asitin reabsorpsiyonunu hemodinamik çeşitli faktörler şekillendirmekte ve omentektomi başka klinik seçenek kalmadığında uygulanan invaziv ancak palyasyon sağlayan bir çözüm olarak sunulmaktadır. Ancak omentektominin morfolojik etkileri literatürde yeterince çalışılmamıştır (4,5).

Morfogenez, hücre proliferasyonları, epitelyal tabakaların kıvrılma ve katlanması, epitelyal tüplerin oluşması ve dallanması, epitelyal ve mezenşimal formların karşılıklı olarak birbirlerine dönüşümü, hücrelerin göçü ve fizyolojik olarak ölmeleri gibi çok sayıda mekanik süreci içerisinde barındırır. Hücrelerin çevrelerindeki ekstrasellüler matrikse fiziksel adezyonu üç boyutlu doku organizasyonunun sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Ekstrasellüler matriks hücre göçü, çoğalması, büyümesi ve gelişimi ile ilgili işlevlerde aldığı önemli roller ile overlerin fonksiyonlarda belirleyicidir (6). Ekstrasellüler matriks içinde yer alan en önemli ana bileşenlerden biri olan Fibronektin, embriyonik gelişim sırasında hücre göçü ve organ morfogenezini açısından önemli bir role sahiptir (7).

Bu çalışmanın amacı DMN'nin sıçan ovaryum, Fallop tüpleri ve uterus dokusu üzerindeki olası etkilerinin omentektomize ve/veya omentektomize olmamış sıçanlarda ışık mikroskobu ve immunohistokimyasal yöntem ile incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik kurulu'ndan alınan onayla gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada

(Protokol no: 2006/7); ortalama 3 aylık yaklaşık 180-200 gr ağırlığında Wistar türü dişi albino sıçanlar ($n=50$) Deneyel Cerrahi Araştırma Laboratuvarında $22\pm3^\circ C$ oda ısısında, 12 saat aydınlık-karanlık ışık koşullarındaki optimum şartlarda, standart yem ve su verilmek suretiyle uygun kafeslerde tutulmuştur (ad libitum). Deney başlangıcından itibaren periyodik olarak 4 günde bir 3 hafta süreyle vajinal yaymaları alınarak; havada kurutulup, 10 dk. süreyle metanol tesbiti sonrası Giemsa boyamalı preparatlarda deneklerin vaginal siklus durumları belirlenmiştir.

Dimetilnitrozamin (DMN) ile oluşturulan siroz modeli

Aynı beslenme koşullarını paylaşan olgular çalışmaya alındıktan iki hafta sonra deneye alındı. İntraperitoneal ksilazin (6 mg/kg) ve ketamin (75 mg/kg) ile genel anestezi altında kornea refleksi ve ekstremiteler çekme yanıtı kaybolduktan sonra karın bölgesi tüyleri elektrikli traş makinesi ile traş edilerek temizlendi. İnsizyon yapılacak saha povidon iyot ile silinip 2 dk. beklendikten sonra steril gazlı bez ile kurulandı ve daha sonra çalışma grupları rastgele oluşturuldu (Tablo-1).

Tablo-1. Deneyel çalışma gruplarının dağılımı.

Grup 1 (n=10)	Omentektomize Toksik Siroz	Omentektomi uygulanmış ve DMN enjeksiyonları yapılmış olan grup.
Grup 2 (n=20)	Omentektomisz Toksik Siroz	Omentektomi yapılmaksızın DMN uygulanmış olan grup.
Grup 3 (n=10)	Omentektomize Sham	Omentektomi geçirmiş ancak DMN almayan; yerine SF enjeksiyonu uygulanan grup.
Grup 4 (n=10)	Omentektomisz Kontrol	SF enjeksiyonu yapılmış ve operasyon geçirmeyen kontrol grubu.

Sıçanların 20 tanesine eter anestezisi altında vertikal insizyon ile batına girilerek omentektomi yapılmış ve batin kapatılmıştır (8). DMN anestezisi olmadan her hafta üç gün ardışık olarak periton içine $1\mu l/100g/gün$ ($0.15 M$

steril NaCl içinde 1:100 oranında seyreltilerek verilmiştir. 20 tane sıçana omentektomi yapılmadan DMN uygulanmıştır.

Ortaya çıkabilecek değişiklikleri karşılaştırabilmek amacıyla 10 sıçana 3 hafta boyunca haftada 3 gün ardışık periton için 2 cc 0.15 M NaCl verilmiştir. İşlemin herhangi bir aşamasında ve işlem sonrasında deneklere antibiyotik verilmedi. Sıçanlar optimum yaşam şartlarında, aynı ortamda, aynı tür yiyecek ve su ihtiyaçları karşılanarak 3 hafta süre ile tutuldu.

Üçüncü hafta sonunda deneklerin sirotik değişimleri karaciğerde fibrojenesis ve asit oluşumu şeklinde histolojik olarak gösterilerek (yayınlanmak üzere olan bir başka çalışmanın bulguları) ve deneklerin hepsinin siroz olduğu görülerek servikal dislokasyon ile hayatlarına son verilmiş ve tümünün diseksiyonları yapılmış ve periton boşlukları açılarak deneklerin ovaryum, tuba ve uterus dokuları çıkarılmış ve immersiyon fiksasyonu uygulanmıştır.

Histolojik takip yöntemi

Çıkarılan dokular 0,2M Kakodilat (Sodium cacodylate trihydrate, MW: 214.03, Sigma-Aldrich, C4945-10G; Sigma Chemical Co.,U.S.A.) tamponu içeren % 4'lük paraformaldehit (PFA; Sigma-Aldrich, 441244-1KG; Sigma Chemical Co.,U.S.A.) (pH= 7,2) içinde +4°C de 24 saatlik fiksasyon süresinin sonunda 0,2M kakodilat tamponu içine alınarak diseksi edildi. Yükselen alkol serilerinde dehidratasyon ve ksilolde şeffaflama ile rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan polilizinli lamlara (Menzel-Glaser; 25x 75mm) alınan 3µm'luk kesitler (Leica MR 2145), hücresel morfoloji ve rutin histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eosin ve Alcian Blue-PAS ile boyandı. Ayrıca immunohistokimyasal (polyclonal rabbit anti human Fibronectin, A0245, Dako Corporation, USA; 1/100) değerlendirme için işaretlendi.

Histolojik değerlendirme yöntemi

Denek başına seçilen birbiri ile ardışık olmayan rastgele seçilmiş ortalama üç histolojik kesitten çekilen mikrofotograflarda birbiri ile örtüşmeyen en az 3 alan değerlendirildi. Alan seçiminin rastgele olmasına özen gösterilerek fotoğraflar iki araştırmacı tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX-51 ve Olympus C-5050 Dijital Kamera ile) çekildi ve over, tuba ve uterus dokusu stromal ve parankimal değişiklikleri histolojik olarak değerlendirildi.

Immunohistokimyasal değerlendirme yöntemi

Doku immunoreaktivitesi açısından her gruptan, denek başına seçilen birbiri ile ardışık olmayan rastgele seçilmiş ortalama üç histolojik kesitten çekilen mikrofotograflarda birbiri ile örtüşmeyen en az 3 alan değer-

lendirildi. Kontrol örnekleri için primer antikorların uygulanmadığı kesitler kullanıldı. Alan seçiminin rastgele olmasına özen gösterilerek fotoğraflar iki araştırmacı tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX-51 ve Olympus C-5050 Dijital Kamera ile) çekildi ve değerlendirilme semi-kantitatif olarak immunreaktif bir skora göre immunoekspresyon dağılımı ve yoğunluğu araştırıldı (9, 10) Özetle her bir slayt için ilk önce pozitif boyalı hücrelerin tahmini oranını içeren bir dağılım skoru belirlendi. Buna göre, hiç pozitif hücre olmadığında 0; pozitif boyalı hücrelerin oranı < 1/100 ise 1; 1/100 ile 1/10 arasında ise 2; 1/10 ile 1/3 arasında ise 3; 1/3 ile 2/3 arasında ise 4; ve > 2/3'den fazla ise 5 verildi. Daha sonra pozitif hücrelerin ortalama yoğunluğunu ifade eden bir skor hesaplandı. Buna göre hiç boyanma olmadığında 0 değeri alırken, zayıf immunreaktivitede 1+, orta derecede immun reaktivite varlığında 2+ ve güçlü (artmış) boyanma varlığında 3+ olarak değerlendirildi. Daha sonra dağılım ve yoğunluk skorları eklenerek 0 ile 8 arasında bir toplam skor elde edildi. Buna göre 0-2 arası negatif ekspresyon ve 3-8 arası değerler pozitif olarak değerlendirildi. Morfolojisi kötü olan kenarda kalan ya da belirgin nekrotik değişikliklerin izlendiği alanlar değerlendirme dışı tutuldu.

Bulgular

Siklus değişiklikleri takip edilen gruplarda sadece Grup 1 ve 2' de deney için kurban edilene kadar geçen sürede alınan vajinal yaymaların Giemsa boyaması ile değerlendirilmesinde 1 günlük siklus gecikmesi (luteal faz uzaması) saptanmıştır. Bunun dışında sıçanlarda değişiklik izlenmedi.

Over, tuba ve uterus dokusu stromal ve parankimal değişiklikleri skorlaması Tablo-2'de belirtilmiştir.

Histolojik değerlendirme bulguları

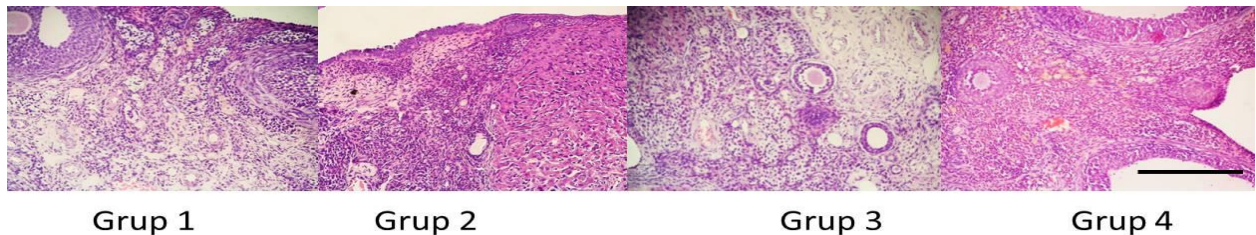
Over bulguları açısından özellikle Grup 1' de daha çarpıcı olmak üzere siklus baskılanmasını düşündürecek şekilde Grup 1 ve 2' de primer ve sekonder foliküller oldukça azalmış, oosit kalitesi değişmiş, oositler ovoid karakterde izlenmiştir. Ayrıca visceral peritonda yer yer dejeneratif alanlar izlenmektedir. 3. ve 4. gruplarda belirgin morfolojik değişiklik olmadığı gibi herhangi bir bağ dokusu artışı, stromal kalınlaşma, fibrozis lehinde bulguya rastlanmadı. Teka internada özellikle hormon salgılayan hücrelerin de burada iyi gelişmiş oldukları, morfolojik bir anormalliğin olmadığı izlenmektedir. Grup-3' te kontrol grubundan farklı olarak saptanan tek bulgu granüloza hücreleri arasına dek uzanan, genişlemiş, içi eritrositlerle dolu konjesyone kapiller yapıların teka internadaki varlığı ile birlikte stromadaki damar yapılarında venöz dilatasyonların daha fazla izlenmesi ve belirgin şekil değişiklikleri oluşturması şeklindeydi (Şekil-1).

Tablo-2. Over, tuba ve uterus dokusu stromal ve parankimal değişiklikleri histolojik skorlaması.

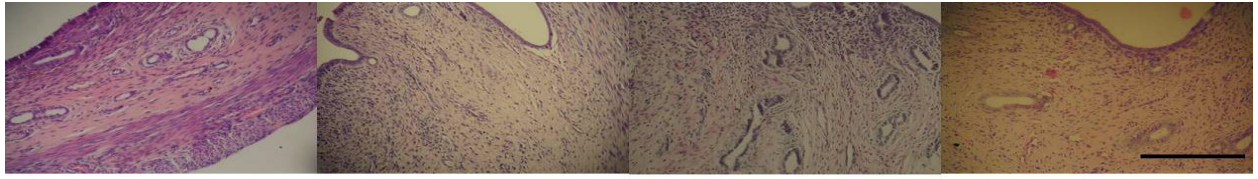
BÖLGELER/ GRUPLAR		Histolojik Skorlama				Ek Özellik
		Grup 1*	Grup 2**	Grup 3***	Grup 4****	
Over Bulguları	Germinatif Epitelde Değişiklik	0	0	0	0	
	Stromal Bağ Dokusunda Artma (Hücreleri-İskeleti)	2	1	0	0	
	Medulla (Damarsal Yapılarda Artma-Media Kalınlıklarında Artma)	1	1	0	0	Özellikle grup 2 overlerde daha belirgin olan lenfatik dilatasyon, stromal alanlarda venöz genişlemeler
	Primordial Follikül Şekil Değişikliği (Ovoid/Elipsoid)	0	0	0	0	
	Primer Follikül Şekil Değişikliği (Ovoid/Elipsoid)	2	2	0	0	Grup 2 primer folikülde saptanan oositlerde yer yer vakuolizasyon, dejenerasyon
	Sekonder Follikül Şekil Değişikliği (Ovoid/Elipsoid)	2	2	0	0	
	Tersier Follikül Şekil Değişikliği (Ovoid/Elipsoid)	2	1	0	0	3. ve 4. gruplarda sağlıklı siklus göstergesi normal folikül gelişim evreleri
	Granüloza Hücreleri Arasında Ayırıklaşma -İntertisiyel Aralıkta Artma	3	2	0	0	
	Oositlerde Vakualizasyon	1	2	0	0	
	Tekal Hücre Dizilişi-Damarlanmada Artış	0	0	2	2	
	Zona Pellucidada Kalınlaşma	2	3	0	0	
Tuba Uterina Bulguları	Epitelyal Yapılar	1	3	0	0	Grup1 ve 2 de tubal epitelde Adenokarsinom lehinde kalınlaşma bulguları
	Stromal Yapılar	2	1	0	0	
Uterus Bulguları	Epitelyal Yapılar	0	2	1	0	Grup1 ve 2 de sekretuar fazda siklus arresti
	Stromal Yapılar	0	0	0	0	

*Grup 1: Omentektomize toksik siroz
 **Grup 2: Omentektomisiz toksik siroz
 ***Grup 3: Omentektomize sham
 ****Grup 4: Omentektomisiz kontrol

Over, tuba ve uterus dokusu stromal ve parankimal değişiklikleri histolojik skorlaması değişikliklerin şiddetine göre 0'dan 3+'ya kadar bir skala üzerinde değerlendirildi. Buna göre hiç değişiklik olmadığında 0 değeri alınırken, hafif değişiklikler varlığında 1+, orta derecede değişiklik varlığında 2+ ve ağır(şiddetli) değişiklik varlığında 3+ olarak değerlendirildi.



Şekil-1. Ovaryum kesitleri, H.E boyama. Grup 1: Omentektomize toksik siroz, Grup 2: Omentektomisiz toksik siroz, Grup 3: Omentektomize sham, Grup 4: Omentektomisiz kontrol (X10). Bar 250 µm.



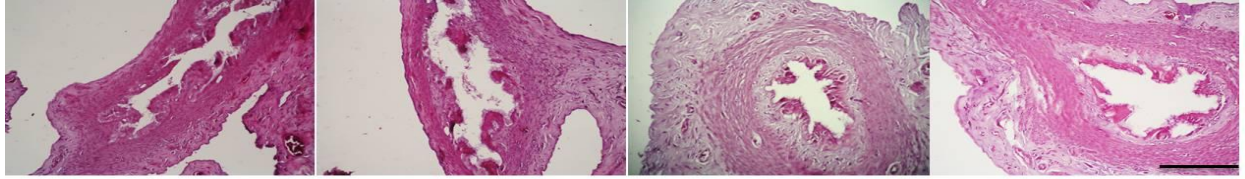
Grup 1

Grup 2

Grup 3

Grup 4

Şekil-2. Uterus kesitleri, H.E boyama. Grup 1: Omentektomize toksik siroz, Grup 2: Omentektomiz toksik siroz, Grup 3: Omentektomize sham, Grup 4: Omentektomiz kontrol (X10). Bar 250 µm



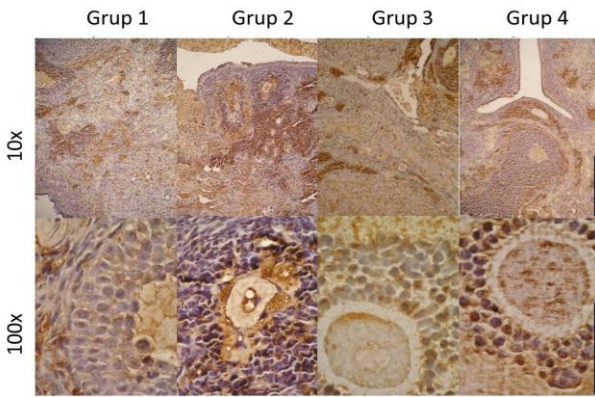
Grup 1

Grup 2

Grup 3

Grup 4

Şekil-3. Tuba uterina kesitleri, Alcian Blue- PAS boyama. Grup 1: Omentektomize toksik siroz, grup 2 : Omentektomiz toksik siroz, Grup 3: Omentektomize sham, Grup 4: Omentektomiz kontrol (X20). Bar 100 µm.



Şekil-4. Ovaryum kesitleri, anti fibronektin immunoekspresyonu. Grup 1: Omentektomize toksik siroz, grup 2: Omentektomiz toksik siroz, Grup 3: Omentektomize sham, Grup 4: Omentektomiz kontrol (X10, Bar 250 µm; x100, Bar 25 µm).

Tablo-3. Overlerde Anti-Fibronektin Immunoekspresyon Dağılımı ve Yoğunluğu.

BÖLGELER	GRUP 1*	GRUP 2**	GRUP 3***	GRUP 4****
	Dağılım/ yoğunluk	Dağılım/ yoğunluk	Dağılım/ yoğunluk	Dağılım/ yoğunluk
Germinatif Epitel	+++++/+++	+++++/+++	+++//+	++//+
Stroma	+++//+	+++//+	++//+	++//+
Medulla	+++//+	+++//+	++//+	++//+
Foliküller Yapılar (Teka-Granuloza)	+++//+	+++//+	++//+	++//+
Oosit	++//+	++//+	++//+	++//+

*Grup 1: Omentektomize toksik siroz

**Grup 2 : Omentektomiz toksik siroz

***Grup 3: Omentektomize sham

****Grup 4: Omentektomiz kontrol

Özellikle Grup 1 ve 2'de uterusda belirgin olan siroza bağlı sekretuar epitelin siklus gecikmesi bulgusundan başka anormal bir bulguya rastlanmadı (Şekil-2). Grup 3 ve 4'ün normal uterus histolojik yapısını gösterdiği belirlendi. Omentektomiye bağlı özel bir değişiklik belirlenemedi.

Tuba uterinada DMN alan grup 1 ve 2'de adenokarsinom lehinde epitel kalınlaşma alanları izlendi (Şekil-3). Grup 3 ve 4'ün normal tuba histolojik yapısını gösterdiği belirlendi. Omentektomiye bağlı özel bir değişiklik belirlenemedi.

İmmunohistokimyasal değerlendirme bulguları

Poliklonal anti-fibronektin antikoru ile yapılan immunohistokimya çalışmasında kontrol ve diğer tüm uygulama gruplarında, incelenen tüm kesitlerde over dokusu içinde germinal epitelde, stromada, medullada ve değişik gelişim aşamalarında izlenen tüm folliküllerde granuloza ve teka hücrelerinde ve oositin kendisinde değişik düzeylerde fibronektin reaktivitesine rastlanmıştır (Şekil-4). Kontrol gruplarında izlenen folikül gelişim aşamaları boyunca stroma ve teka hücre kompartmanlarında izlenen artmış tutulumun göreceli olarak Grup 1 ve 2'de azaldığı saptandı. Buna karşılık granuloza hücre kompartmanındaki immunohistokimyasal tutulum özellikle toksik siroz ve omentektomize toksik siroz gruplarında azalmıştı. Ayrıca tüm gruplarda antral foliküler sıvıda artmış tutulum izlendi. Grup 3 ve 4 arasında özellikle foliküler yapılar ve oosit için ile gerek germinatif epitelde gerekse stromada izlenen azalmış immunoekspresyon yoğunluğu bulgusu dışında belirgin başka bir fark izlenmedi (Tablo-3).

Tartışma

Dimetiltirozamin (DMN) sıçanlara uygulandığında toksik karaciğer hasarlanması için uygun bir model oluşturmaktadır (11,12). Gonadotropinlerin metabolizmasında karaciğerin sirotik değişikliklerinin etkileri yayınlarda sıklıkla değinilen, oldukça iyi bilinen bir olgudur (13). Karaciğerin kronik alkol kullanımına bağlı yetmezliği halinde hipotalamo-hipofizo-gonadal aksının baskılandığı bildirilmektedir (14). Çalışmamızda da overlerde follikülogenezisin değiştiği ve siklus baskılanmasının etkilerini gösteren çeşitli bulgular izlenmektedir. Bilindiği üzere, kronik hastalıklarda başlangıçta düzenli olan menstruel adet döngüsü çeşitli yollarla düzensizleşmektedir (15). Karaciğer sirozunda hipogonadizmin patogenezi tam anlaşılmamıştır (16). Kronik alkol kullanımına bağlı hipogonadizm vakalarında sıkça belirtilen bulgular sekonder seks karakteristiklerinde kayıp, amenore ve östrojenlerin ve gonadotropinlerin salınımındaki azalmanın sonucu ortaya çıkan erken menopozdur. Ovaryan yetmezlik, ovulasyonda bozulma, azalma yanı sıra kısırlıkla sonuçlanmaktadır (14,15). Erkek hastalarda seks hormonu bağlayıcı globulinlerdeki artışın testosteron sentezinde azalmaya ve androstendion sentezinde buna paralel artışa ikincil olarak androstendionların östrona dönüşümü ile sonuçlandığını göstermektedir (17). Gonadların düzgün çalışması düzgün karaciğer fonksiyonlarının sağlanması ile yakın ilişkide olup karaciğer sirozu bulunan hastalarda hipogonadizmin klinik bulguları ile birliktelik göstermektedir (18). Bu çalışmada sıçanların siklus değişikliklerinin vajinal yaymalarında izlenmiş olması yanı sıra follikül gelişiminde ve oosit kalitesinde saptadığımız histolojik değişiklikler DMN bağlı karaciğer yetmezliği ve asit gelişimi, çalışmada uygulanan deneysel modelin hipogonadizmik karaciğer yetmezliği açısından da geçerliliğini sağlar niteliktedir Ovaryumdaki follikülogenezis, atrezi, ovulasyon, korpus luteum oluşumu ve luteoliz gibi dinamik değişikliklerin değerlendirilmesinde immunohistokimyasal teknikler tartışmasız önemlidir. Büyüyen folikülde Fibronektin ekspresyonu teka eksterna, teka interna ve bazal membranda gösterilmiştir. Foliküler atrezi sırasında granüloza hücreleri apoptozis ile ölmeye başlarlarken; bu hücrelerin anti-fibronektin boyamalarında reaktiviteleri de giderek azalmaktadır (19, 20). Bu çalışmadaki over dokusu foliküler morfolojisindeki değişiklikler ile deneysel toksik siroz ve omentektomize toksik siroz grubunun granüloza hücrelerindeki azalmış tutulum uyumludur. Bu da sirozda foliküler gelişimde duraklama ve over döngüsü baskılanmasının yanı sıra hücresel yaşam anlamında da bazı değişikliklerin ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Follikülogenezisin değerlendirildiği gerek *in vivo*, gerekse *in vitro* pek çok çalışmada çeşitli büyüme faktörlerinin

yanı sıra; hormonların folikül gelişimi üzerine etkileri değerlendirilirken ekstrasellüler matriksin yapısı ve içeriği göz ardı edilmektedir. Tip 1 ve 4 kollagen, fibronektin, laminin, Matrigel ve diğer ekstrasellüler matriks proteinleri ve bunların kombinasyonları granüloza hücrelerinin, foliküllerin ve hatta "bütün ovaryum" organ kültürlerinin morfolojisini, yaşayabilirliğini, çoğalmasını ve steroidogenezisini etkilemektedir. Ekstrasellüler matriks folikül mikroçevresi için belirleyici önemli bir faktör olup, bunun üzerinde çeşitli büyüme faktörleri ve hormonların ve bunlarla ilişkili pek çok sinyal yolağının etkileşiminin tek tek düşünülmesi gereklidir (6, 20, 21). Bu bağlamda bu çalışma sadece fibronektin ile sınırlandırılmış bir ön çalışma niteliğindedir.

Yayınlara kimyasallara maruziyetin üreme kapasitesinde azalma yanı sıra kısırlık ve over yetmezliği ilişkisini ortaya koymaktadır. Sigara dumanındaki kadmiyum, nikotin, kotinin gibi çeşitli maddelerin organizma tarafından alındıktan sonra dişi üreme kapasitesi üzerine etkilerinin (22) gösterilmesi bakımından bu çalışma önemlidir. Modelin siroz açısından etkisi gruplar arasında farklı değildir. Bu noktaya açıklık getirecek olursak; süreç daha çok hastalığın patogenezi ile ilgili gibi görünmektedir. Şöyle ki, hepatik fibrozise eşlik eden asit gelişimi başlangıçta artan lenfatik drenaj ile kompanze edilmeye çalışılır; fakat hastalığın ilerleyen dönemlerinde lenf oluşumu lenfatik drenaj kapasitesini aştığında bu hastaların diyaframlarında ve eşlik eden periton uzantısı olan omentumda çeşitli değişiklikler meydana gelir (4,23-25). Tedavide yaygın olarak kullanılan diüretikler, parasentez, portosistemik şant gibi çeşitli uygulamaların yanıtsız kaldığı olgularda önerilen bir yöntem olan omentektominin komşu organlarda yarattığı morfolojik etkiler bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. Hemodinamik ve asite bağlı değişikliklerin de etkisiyle komşu organlarda izlenen morfolojik değişimler sirozun ya da daha doğru bir söylem ile karaciğerdeki fibrojenetik değişikliklerin ortaya çıkışı biçimi olarak ele alınacak olursa; overler, Fallop tüpleri ve uterus ortaya çıkan DMN'ye bağlı toksik hepatit tablosundan benzer şekilde etkilenmekte ve invazif bir yöntem olmakla birlikte omentektomi işleminin mekanik koruyucu etkisi, oosit kalitesi açısından bu ön çalışmanın sonuçlarına göre faydalı bulunmaktadır.

Sonuç

Bu çalışma modeli ve elde edilen bulgular, kısırlık açısından yapılacak hayvan deneyi çalışmalarında ve siroza bağlı karaciğer hasarlanması olgularında, bulguların kısırlık açısından geriye döndürülmesine yönelik ilaç vs. araştırmaları için anahtar çalışma niteliğindedir. Ancak uygulamanın etkilerinin, insanlarda uygulanmadan önce, farklı doku belirteçleri ile tekrarlanacak hayvan modelinde yeniden detaylandırılarak tanımlanması daha uygun olacaktır.

Teşekkür

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Deneysel Cerrahi Bilim Dalı personeline bu çalışmadaki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Khoroshaev VA, Vorozheikin VM, Baibekov IM. Routes of resorption of peritoneal fluid in the diaphragm in liver cirrhosis (morphologic study). *Arkh Patol* 1991;53(3):40-44.
2. George J, Rao RK, Stern R. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: The early deposition of collagen. *Toxicol* 2001;156:129-138.
3. Henrich W. Principles and practice of dialysis. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2001:185-209.
4. Akay S, Ozutemiz O, Kilic M, et al. Reabsorption of ascites and the factors that affect this process in cirrhosis. *Transl Res* 2008;152(4):157-164.
5. Khoroshaev VA, Vorozheikin VM, Baibekov IM. Routes of resorption of peritoneal fluid in the diaphragm in liver cirrhosis (morphologic study). *Arkh Patol* 1991;53(3):40-44.
6. Berkholtz CB, Lai BE, Woodruff TK, Shea LD. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. *Histochem Cell Biol* 2006;126(5):583-592.
7. Morris-Kay GM, Sokolova N. Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* 1996;10(9):961-968.
8. Abe T, Kajiyama K, Harimoto N, Gion T, Nagaie T. Laparoscopic omentectomy for preoperative diagnosis of torsion of the greater omentum. *Int J Surg Case Rep* 2012;3(3):100-102.
9. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11(2):155-168.
10. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, et al. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;26(3):225-235.
11. Joseph G, Robert S. Serum hyaluronan and hyaluronidase: Very early markers of toxic liver injury. *Clinica Chimica Acta* 2004;348:189-197.
12. Joseph G. Ascorbic acid concentrations in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Clinica Chimica Acta* 2003;335:39-47.
13. Van Steenberg W. Alcohol, liver cirrhosis and disorders in sex hormone metabolism *Acta Clin Belg* 1993;48(4):269-283.
14. Van Thiel DH, Kumar S, Gavalier JS, Tarter RE. Effect of liver transplantation on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of chronic alcoholic men with advanced liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14(3):478-481.
15. Karagiannis A ve Harsoulis F. Gonadal dysfunction in systemic diseases. *Eur J Endocrinol* 2005;152:501-513.
16. Castilla-Cortazar I, Diez N, Garcia-Fernandez M, et al. Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: Effect of insulin-like growth factor. *World J Gastroenterol* 2004;10(17):2529-2534.
17. Baker HW, Burger HG, de Kretser DM, et al. A study of the endocrine manifestations of hepatic cirrhosis. *Q J Med* 1976;45(177):145-178.
18. Foresta C, Schipilliti M, Ciarleglio FA, Lenzi A, D'Amico D. Male hypogonadism in cirrhosis and after liver transplantation. *J Endocrinol Invest* 2008;31(5):470-478.
19. Yasuda K, Hagiwara E, Takeuchi A, et al. Changes in the distribution of tenascin and fibronectin in the mouse ovary during folliculogenesis, atresia, corpus luteum formation and luteolysis. *Zoolog Sci* 2005 Feb;22(2):237-45.
20. Akkoyunlu G, Demir R, Ustunel I. Distribution patterns of TGF-alpha, laminin and fibronectin and their relationship with folliculogenesis in rat ovary. *Acta Histochem* 2003;105(4):295-301.
21. Berkholtz CB, Shea LD, Woodruff TK. Extracellular matrix functions in follicle maturation. *Semin Reprod Med* 2006 Sep;24(4):262-9.
22. Mlynarcikova A, Fickova M, Scsukova S. Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocr Regul* 2005;39(1):21-32.
23. Yilmaz FM, Akay H, Duranay M, et al. Carotid atherosclerosis and cardiovascular risk factors in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Clin Biochem* 2007;40(18):1361-1366.
24. Kuiper JJ, van Buuren HR, de Man RA. Ascites in cirrhosis: A review of management and complications. *Neth J Med* 2007;65(8):283-288.
25. Giannini E, Romagnoli P, Tenconi GL, et al. High ascitic fluid leptin levels in patients with decompensated liver cirrhosis and sterile ascites: Relationship with TNF-alpha levels. *Dig Dis Sci* 2004;49(2):275-280.