

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**NORMAL GENİTAL SİKLUSTA VE GONADOTROPİN
RELEASİNG HORMON BLOKAJINDA VİSFATİN
LOKALİZASYONU**

Ramazan Yavuz ARICAN

Doktora Tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**NORMAL GENİTAL SİKLUSTA VE GONADOTROPİN
RELEASİNG HORMON BLOKAJINDA VİSFATİN
LOKALİZASYONU**

**Ramazan Yavuz ARICAN
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Lutfiye Bikem SÜZEN**

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2010.01.0103.005)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2012

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 20 / Şubat / 2012

Tez danışmanı : Prof. Dr. Lütfiye Bikem SÜZEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Gülay YEGİNOĞLU
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2012 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği " ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşığıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur)

1. Arıcan RY, Sahin Z, Ustunel I, Sarikcioglu L, Ozdem S, Oguz N. "Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats." Exp Toxicol Pathol. 61, 297-305 (2009)
2. Coskun N, Arıcan RY, Utuk A, Ozcanli H, Sindel T "The incidence of accessory navicular bone types in Turkish subjects" Surg Radiol Anat. 31:675-679 (2009)

ÖZET

Yağ dokusunun enerji depolama fonksiyonunun yanısıra otokrin, endokrin ve parakrin etki gösteren adipokinleri salgılama görevinde bulunmaktadır. Obezite, insülin direnci, diabet ve kardiovasküler hastalıklardaki varlıkları bilinen adipokinlerin adipoz doku, ovaryum fonksiyonu ve döllenme arasındaki potansiyel mekanizmalarda da rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu çalışmada adipokin ailesinin en yeni üyelerinden biri olan Visfatin'in genital siklus fazlarında ovaryumdaki lokalizasyonunu ortaya koymak amaçlandı. Ayrıca folikülogenez GnRH antagonisti olan Cetrotorelix ile bloke edilerek, Visfatin ve hipotalamus-hipofiz-ovaryum eksenindeki ilişki araştırıldı.

Bu çalışmada yetişkin, *Rattus norvegicus* türü 40 adet dişi sıçan kullanıldı. Her bir grupta 8 denek olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. Proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus grupları vaginal smear metodu ile tayin edildi. Vaginal smear takipleri yapılan ratlardan preöstrus fazındaki 8 deneğe, GnRH antagonisti olan Cetrotorelix her bir rat için 100 µg/µl olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edildi. Deneklerin ovaryum, karaciğer ve kas örnekleri alınıp immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

Işık mikroskopik düzeyde immünohistokimyasal yöntemlerle pozitif boyanan Visfatin proteinin boyanma yoğunluğu yarı-kantitatif olarak değerlendirildiğinde, en şiddetli boyanma proöstrus grubu ovaryum foliküllerinde gözlemlendi. İmmünboyanmalar oosit sitoplazmaları, granüloza hücreleri, teka hücreleri, yüzey epiteli, luteal hücrelerde tespit edildi. H-Score analizi sonuçlarına göre yoğun immünboyanmadan zayıf immünboyanmaya doğru bir sıralama yapıldığında proöstrus, östrus, metöstrus, diöstrus ve Cetrotorelix sıralaması ortaya çıktı. Çalışmada ayrıca ovaryum arterlerinin tunica media tabakasındaki düz kas liflerinde Visfatinin pozitif reaksiyon gösterdiği gözlemlendi. Çizgili kas ve karaciğer dokularında yoğun Visfatin immünreaksiyonu belirlendi.

Sonuç olarak, Visfatin ekspresyonu rat ovaryum dokusunda siklusa bağlı değişim göstermektedir. GnRH bloke foliküllerde visfatin ekspresyonun düştüğü görülmektedir. Çizgili kas, düz kas ve karaciğer dokularında Visfatin immünreaksiyonu pozitifdir. Visfatin'in ovaryum fonksiyonlarında rol aldığını ve hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninin blokajı sonucu hormonal azalmaya bağlı olarak azaldığını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Visfatin, Cetrotorelix, Ovaryum, Rat, İmmünohistokimya

ABSTRACT

Except the energy storage function of the lipid tissue, it has a function like secreting the adipokines that has autocrine, paracrine and endocrine effects. The role of adipokines in obesity, insulin resistance, diabetes and cardiovascular diseases are known. It is thought that the adipokines has a potential role between ovary function and fertilization. in the present study to investigate the localization of a novel adipokine, in the genital cycle phases of the ovary. Additionally, after the blockage of folliculogenesis by GnRH antagonist, Cetrorelix, the relationship between hypothalamus-hypophysis-ovary axis and visfatin is also aimed.

In the present study, 40 adult female Wistar rats were used. 5 groups that consisted of 8 rats were generated. The Prooestrus, oestrus, metoestrus and dioestrus groups were determined after vaginal smear method. 8 rats in the prooestrus stage included in the cetrorelix group. The GnRH antagonist Cetrotide was given 100 µg/µl per rat intraperitoneally. The ovary, liver and the muscle tissues were dissected and evaluated by immunohistochemical methods.

The semiquantitative evaluation of the Visfatin protein by light microscobic immunohistochemical methods indicates that the most strong staining was identified in the ovary follicles of prooestrus group. The immunostainings were around the cytoplasm of oocytes, the granulosa cells, theca cells, surface epithelium and the luteal cells. According to the H Score analyses the immunoreaction density decreases as Prooestrus, oestrus, metoestrus, dioestrus. Additionally, Visfatin immunoreaction was shown in smooth muscle fibers of ovarian artery. An intense Visfatin immunoreaction was identified in both skeleton and liver tissues.

As a result, visfatin expression changes according to the ovarian cycle in rat. Visfatin expression decreases in folliculogenesis blocked by GnRH antagonist. In the skeletal muscle, smooth muscle and liver tissues the positive Visfatin immunreaction identified. We believe that Visfatin has a potential role in ovarian functions and decreases due to the hormonal decrease after the blockage of hypothalamus-hypophysis- ovary axis.

Key Words: Visfatin, Cetrorelix, Ovary, Rat, Immunohistochemistry

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli zamanını ve yardımlarını esirgemeyen projenin yürütücüsü ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. L. Bikem SÜZEN başta olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Bu araştırmanın planlanması ve değerlendirilmesine katkıda bulunan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Necdet DEMİR ve Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU' ya

Projenin deney aşamalarında her türlü yardımlarından dolayı Dr. Arzu ÇETİN, Dr. Zeliha ŞAHİN, Araş Gör.Fatih UZUNER, Araş Gör. Nuray ACAR, Teknisyen Sibel ÖZER'e,

Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Vermiş oldukları sonsuz destek ve sevgileri için eşime ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ramazan Yavuz ARICAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	Sayfa v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2. 1. Ovaryum Anatomisi	2
2. 2. Ovaryum Gelişimi	4
2. 3. Ovaryum Histolojisi	6
2. 3. 1. Ovaryum Folikülleri	6
2. 3. 1. 1. Primordiyal Foliküller	6
2. 3. 1. 2. Büyümekte Olan Foliküller	7
2. 3. 1. 3. Olgun Foliküller	8
2. 4. Sıçanlarda Östrus Siklusu	9
2. 4. 1. Sıçanlarda Östrus Siklus Döneminin Belirlenmesi	10
2. 5. Ovaryum Fizyolojisi	10
2. 5. 1. Gonadotropik Hormonların Ovaryum Üzerine Etkisi	11
2. 5. 2. Folikül Gelişim Fizyolojisi	12
2. 5. 3. Gonadotropin Serbestletici Hormon (GnRH)	13
2. 5. 3. 1. GnRH Agonistleri	14
2. 5. 3. 2. GnRH Antagonistleri	14
2. 5. 3. 3. Cetroreliks	16
2. 6. Yağ Dokusu	17
2. 6. 1. Adipokinler	18
2. 6. 1. 1. Sitokin ve Sitokin Özelliği Gösteren Adipokinler	18
2. 6. 1. 2. Kemokin Özelliği Gösteren Adipokinler	19
2. 6. 1. 3. Akut Faz Proteini Özelliği Gösteren Adipokinler	19
2. 6. 1. 4. Pro-inflamatuvar Özellikte Olan Adipokinler	19
2. 6. 2. Visfatin	19

GEREÇ VE YÖNTEM	21
3. 1. Denekler	21
3. 2. Grupların Oluşturulması	21
3. 2.1. Cetroreliks Uygulaması	21
3. 3. Dokuların Elde Edilmesi	21
3. 4. İmmünohistokimyasal Gözlemler	22
3. 4. 1. İmmünohistokimyasal Protokol	22
3. 4. 2. SDS-PAGE ve Western Blot Metodu	22
3. 5. İstatistiksel Analiz	23
3. 5. 1. Semikantitatif Değerlendirme	23
3. 5. 2. H Score Analizi	23
BULGULAR	24
4. 1. İmmunohistokimyasal Bulgular	24
4. 1. 1. Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi	24
4. 1. 2. Bulguların H Score Analizi	25
4. 1. 3. Karaciğer Dokusu Visfatin İmmunboyanmalarının Sonuçları	26
4. 1. 4. Çizgili Kas ve Düz Kas Visfatin İmmunboyanmalarının Sonuçları	27
4. 1. 5. Proöstrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmun boyanmalarının Sonuçları	28
4. 1. 6. Östrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmun boyanmalarının Sonuçları	30
4. 1. 7. Metöstrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmun boyanmalarının Sonuçları	32
4. 1. 8. Diöstrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmun boyanmalarının Sonuçları	34
4. 1. 9. Proöstrus ve Cetrorelix Gruplarının Visfatin İmmun boyanmalarının Karşılaştırılması	36
4. 1. 10. SDS-PAGE Western Blot Sonuçları	38
TARTIŞMA	39
SONUÇLAR	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	53
EKLER	54

Ek.1 Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa

Ek.2. The incidence of accessory navicular bone types in Turkish subjects

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

	Sayfa
IR : İnsülin reseptörü	1
FSH : Folikül Stimulan Hormon	8
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormon	8
LH : Lutein Hormon	8
AMP : Adenozin mono fosfat	11
cAMP : Siklik Adenozin monofosfat	11
KOH : Kontrollü ovaryen Hiperstimülasyonu	16
IVF : İn vitro fertilizasyon	16
TNF : Tümör nekroz faktör	18
kDa : kilodalton	18
IL : İnterlökin	18
PBEF : Pre B cell colony enhancing factor	19
NAMPT : Nicotinamide phosphoribosyl transferase	19
RT-PCR : Gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi	20
BMI : Kütle vücut indeksi	20
IG : İmmünglobülin	22
SDS : Sodyum dodesil sülfat	22
PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi	22
PBS : Phosphate buffered saline	22
DAB : Diamino benzidin	22

BCA	: Bicinchoninic acid	22
PVDF	: Polyvinylidene fluoride	23
TBS	: Tris buffered saline	23
TBSt	: Tris buffered saline ve tween 20	23
HRP	: Horse radish peroksidaz	23
CL	: Chemiluminisans	23
mRNA	: Messenger ribonükleik asit	40
PCOS	: Polikistik over sendromu	41
PRL	: Prolaktin	41
T	: Testesteron	41
DHEA-S	: Dehidroepiandrosterone sülfat	41
SHBG	: Sex hormone binding globulin	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.a	Ovaryum anatomisi	3
2.1.b	Sıçan ovaryum anatomisi	4
2.2.	Primordiyal folikül oluşumu	5
2.3.	Ovaryum histolojisi genel görünüm	6
2.3.1.1.	Primordiyal folikül	7
2.3.1.2.a	Tek tabakalı ve çok tabakalı primer folikül	8
2.3.1.2.b	Sekonder folikül	8
2.3.1.3.	Olgun folikül	9
2.4.1.	Sıçanlarda östrus siklusları sitolojisi	10
2.5.1.	GnRH ile FSH ilişkisi	11
2.5.3.3.	Cetrorelix'in kimyasal yapısı	16
4.1.2.	Genital siklusa ve cetrorelix grubuna ait Visfatin ekspresyonunun H Score analizi.	25
4.1.3.	Proöstrus grubuna ait karaciğer dokusundaki Visfatin ekspresyonu X40	26
4.1.4.	Proöstrus grubuna ait deneklerin M.soleus kasındaki ve ovaryum kesitlerindeki damarların tunica media tabakasına ait düz kas liflerindeki Visfatin ekspresyonu	27
4.1.5.	Proöstrus grubuna ait ovaryumlarda Visfatin immün boyanmaları.	29
4.1.6.	Östrus grubuna ait ovaryumlarda Visfatin immün boyanmaları	31
4.1.7.	Metöstrus grubuna ait ovaryumlarda Visfatin immün boyanmaları.	33

4.1.8.	Diöstrus grubuna ait ovaryumlarda Visfatin immün boyanmaları.	35
4.1.9.	Cetrorelix ve proöstrus grubuna ait ovaryumlarda Visfatin immün boyanmalarının karşılaştırılması	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1.1	Sikluslar arası ve Cetorelix grubuna ait Visfatin ekspresyonunun semikantitatif değeriendirme	24

GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda özellikle beslenme alışkanlığındaki bozulmalardan dolayı obezite ve obeziteye bağlı hastalıkların insidansında hızlı bir artış gözlenmektedir. Obezitenin en karakteristik özelliği yağ dokusundaki aşırı artıştır. Yağ dokusunun en önemli görevi enerji depolamadır. Buna ek olarak salgıladığı adipokin adlı ürünler aracılığıyla parakrin, otokrin ve endokrin etkilere de sahip olduğunun tespit edilmesiyle beraber bu dokunun önemi de gün geçtikçe artmaktadır [1].

Adipokinlerin en yeni üyelerinden biri olan visfatin insülin reseptörüne (IR) tutunarak fosforilasyonda rol oynayan ve glukoz transportunu indükleyen 52 kD luk insülinomimetrik bir peptittir. Genellikle visseral ve omental yağ dokusundan ekspresse olmaktadır [2]. Adipoz dokudan salgılanan adipokinlerin, ovaryum ve döllenme üzerine etkileri özellikle son yıllarda ilgi çeken konulardan biridir [3]. Adipokin ailesinin üyelerinden biri olan adiponektin ve ovaryum folikülleri arasındaki ilişki, adiponektinin ovaryum hücreleri üzerine etkileri detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur. Adiponektin prostanooid sentezini indüklemektedir. Adipoz dokunun ovaryum fonksiyonu ve döllenme arasındaki potansiyel mekanizmaları birbirine bağladığı düşünülmektedir [4] .

Visfatinin ovaryumdaki lokalizasyonu, ve genital siklus evrelerindeki rolü bilinmemektedir. İnsülinomimetrik olduğu düşünülmesine rağmen insülin duyarlılığı ile ilgili olarak negatif bulguların da ortaya çıkması visfatinin hipotalamus- hipofiz-ovaryum ekseninde rolü olabileceğini düşündürmektedir [5]. Visfatin ile ilgili çalışmaların sonuçlarındaki tutarsızlıkların nedeni, bu proteinin sistemik kanda çalışması ve buna bağlı olarak bulguların değişkenlik göstermesi olarak açıklanabilir. Bu durum visfatin ile ilgili spesifik çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın amacı ovaryal siklus evrelerindeki visfatin ekspresyonunun değişkenliğini, kas ve karaciğer dokularındaki visfatin immünreaktivitesini ve hipotalamo-hipofiziyer ark ile gonadal eksen arasındaki bağlantının visfatin ekspresyonu üzerine etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Anatomisi

İnsanda ovaryum uterusun her iki tarafında genellikle pelvis lateral duvarında fossa ovarica adı verilen çukura yerleşmiştir. Erkekteki testisin özdeşi olan bir çift organdır. Fossa ovarica'nın sınırlarını önde oblitere a.umbilicalis, arkada ise ureter ve a. iliaca interna yapar. Her bir ovaryum badem şeklinde olup boyu 3 cm, genişliği 1.5 cm, kalınlığı ise 1 cm'dir.

Ovaryumun facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüzü, margo liber ve margo mesovaricus olmak üzere iki kenarı, extremitas tubaria ve extremitas uterina olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. Extremitas tubaria da lig. suspensorium ovari bulunur ve içerisinden ovaryumun damarları ve sinirleri geçer. V.iliaca externa'ya komşu olan bu uçta tuba uterina'nın fimbria ovarica'sı extremitas tubaria'ya tutunur. Extremitas uterina ise Broad ligamentinin üzerindeki ligamentum ovari proprium ile uterus yan kenarına tutunan uca verilen isimdir.

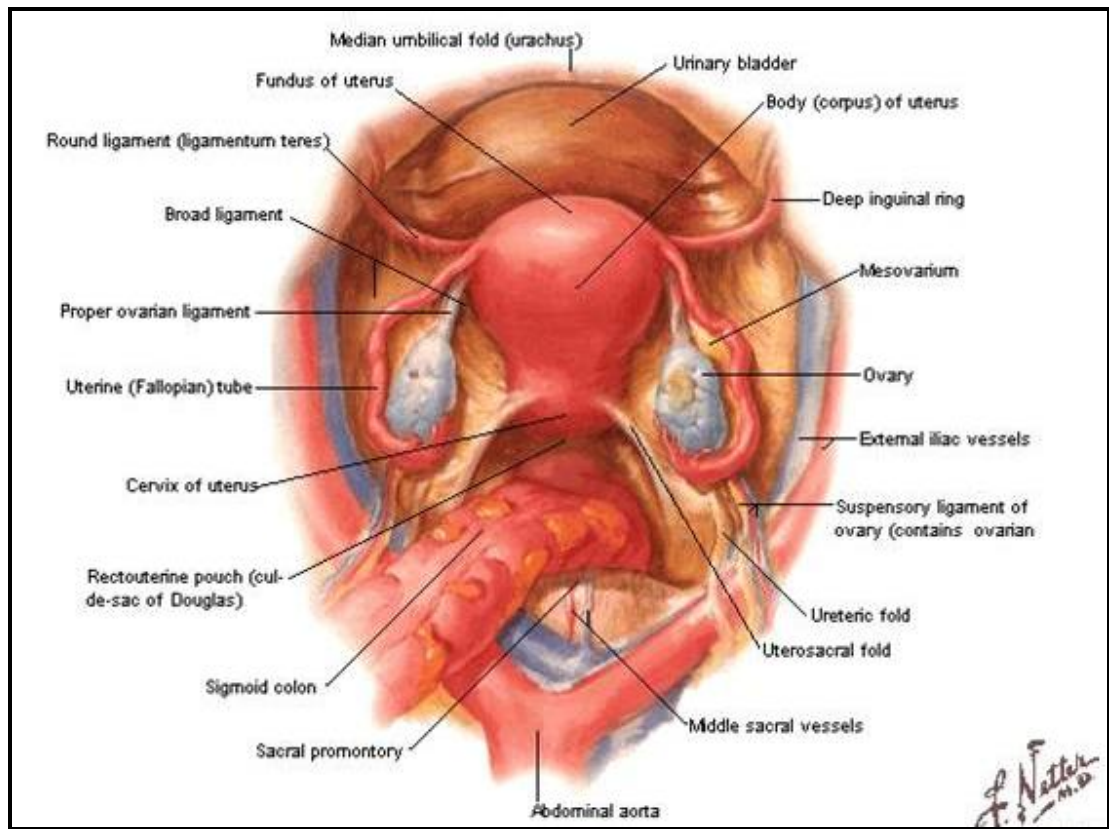
Lateral yüz fossa ovarica üzerinde uzanan parietal periton ile temas halindedir, ovaryumu extraperitoneal dokudan ve obturator arter, ven ve sinirden ayırır. Medial yüz büyük oranda tuba uterina ile komşudur. Margo mesovaricus oblitere umbilical arter boyunca düz seyreder ve mesovarium adı verilen periton bölümü ile Broad ligamentinin arkasına tutunur. Mesovariumun iki yaprağının arasından geçen damarlar ve sinirler hilum ovarii'ye uzanırlar. Serbest kenar ise konvektir ve üretere doğru uzanır [6].

Ovaryumu besleyen arterler Aorta abdominalis'ten çıkan a. ovarica'lardır. 1. Lumbar vertebra seviyesinde aorta abdominalis'ten ayrılan arter, lig. ovarii suspensorium içerisinde ilerler ve mesovarium'a gelir. Burada a. uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus ile anastomoz yapar. Hilum ovarii'den organa giren arter, medulla-korteks sınırında oluşturduğu pleksustan dağılan dallarıyla, foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağırları oluşturur. Damarların çapı döngü evrelerine göre değişir. Damarlar foliküllerin gelişimi sırasında geniştir. Ovulasyondan sonra ise daralırlar.

Ovaryumun venleri arterlere eşlik ederek hilum ovarii'den çıkarlar. Venler ilk önce plexus ovaricus denen venöz bir ağ yaparlar. Buradan ayrılan venler birleşerek bir bölümü plexus utero vaginalis'e, diğer bölümü ise v. ovarica'ya açılırlar. Sol v. ovarica v. renalis'e, sağ v. ovarica ise v. cava inferior'a dökülür.

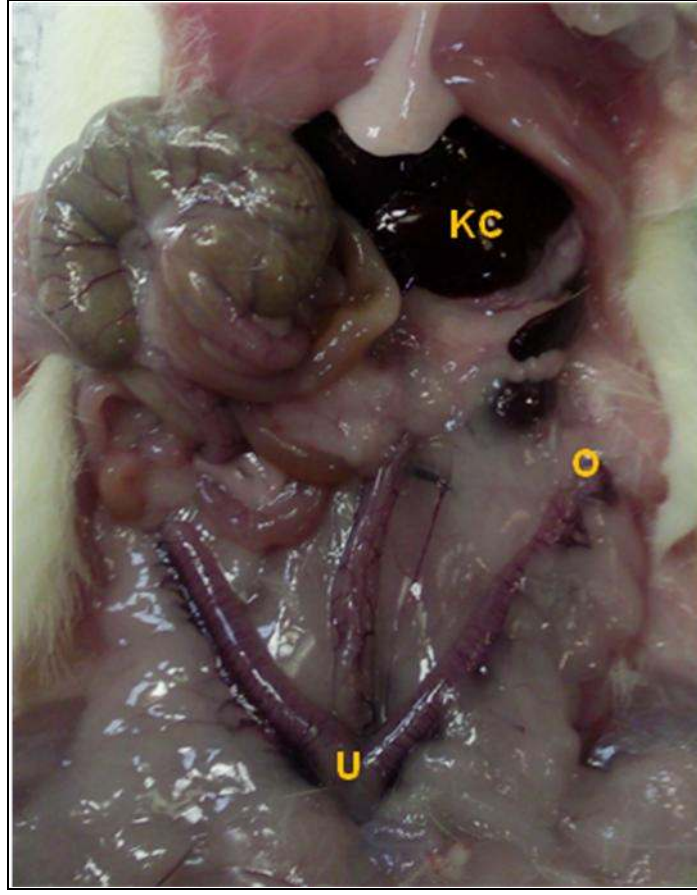
Ovaryumun sinirleri a. ovarica etrafında yer alan plexus ovaricus aracılığı ile gelir. Plexus ovaricus'u meydana getiren sempatik lifler torakal segmentlerden çıkan nervus splachnicus minor aracılığı ile gelirken parasempatik lifler ise nervus vagus ile taşınırlar [7].

Ovaryum lenfatikleri esas olarak folliküllerin teka tabakalarından köken alır. Olgun follikülün granuloza tabakası lenfatiklerden yoksunken korpus luteumda zengin bir lenfatik ağ mevcuttur. Ovaryum lenfatikleri damarlardan bağımsız olarak stromada ilerleyip hilum ovarii'de plexus yaparak kan damarlarına yakın seyrederek mesovaryuma girer ve burada tuba uterina ve uterustan gelen dallarla plexus subovaricus'u oluştururlar. Lenf sıvısı daha sonra nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralise drene olurlar. [8].



Şekil 2.1.a Ovaryum Anatomisi [9]

Sıçan uterusu Y şekliyle “uterus dupleks” olarak tanımlanır. Düzensiz yüzeyleri ve nodüler yapıları ile küçük bir üzüm salkımına benzeyen kırmızımsı ovaryumlar uterus boynuzlarına oviduktlerle bağlıdır. Erişkin bir sıçanda tek bir ovaryumun ağırlığı yaklaşık olarak 60 mg’dır ve 5x4x3 mm boyutlarındadır. Sağ ovaryum L4-L5 seviyesindedir ve L5-L6 seviyesindeki sol ovaryuma göre biraz daha yukarıda ve orta hattan uzaktadır [10].



Şekil 2.1.b Sıçan ovaryum anatomisi. Ovaryum (O), Uterus (U), Karaciğer (KC)

2.2. Ovaryum Gelişimi

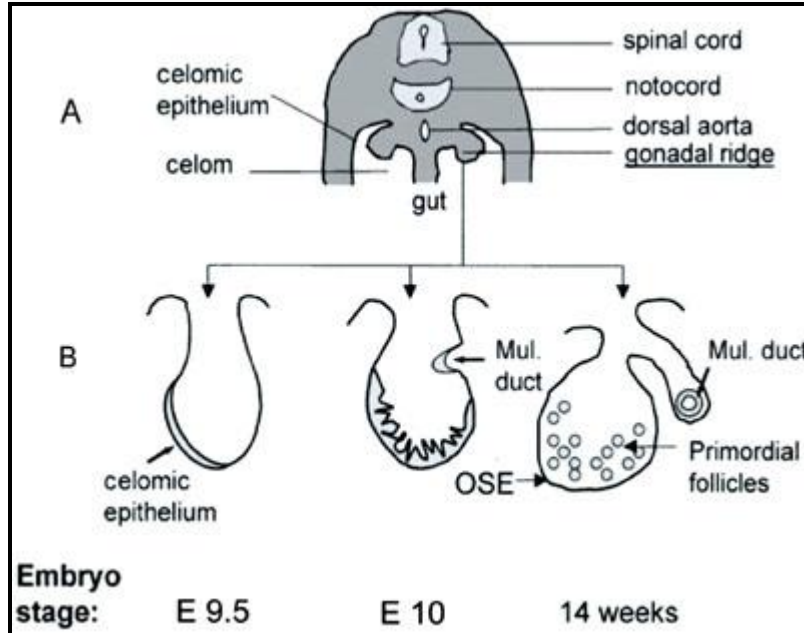
İnsanda embriyonik hayatın 7. haftasına kadar dişi ve erkek embriyodaki gonadlar morfolojik olarak aynıdır. Gonadlar başlangıçta sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift uzunlamasına düzenlenmiş genital ya da gonadal kabartılar halinde belirirler [11].

İlk eşey hücreleri, gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allontois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameooid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testis'e farklılaşmasında ilkel germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır.

İlkel cins hücreleri ilkel gonadlara ulaşmadan önce, genital kabartıların epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kolonlar oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda ilkel cins kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye farklılaşmamış dönem denir. Bu gonada da farklılaşmamış gonad adı verilir [11].

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaştır. X kromozomları ovaryum'un gelişimi için genler içerir; ovaryum oluşmasında otozomal bir genin rol oynadığı bilinmektedir. 10. haftaya değin, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler. İlkel seks kordonları dişi embriyolarda erkekteki kadar belirgin değildir. Gonad taslağının medullasına kadar uzanırlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovarii ve ilkel seks kordonları dejenere olarak ortadan kalkarlar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar. Erken fötal dönemde kortikal kordonlar denilen ikinci cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey sölom epitelinden başlayarak, alttaki mezenşime doğru gelişmeye başlar. Kortikal kordonlar sölom epitelinin çoğalmasıyla kalınlaşırken, ilkel cins hücreleri kordonların içine karışırlar. 16. haftada bu kordonlar primordiyal folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her grup ortada ilkel cins hücrelerinden köken alan bir oogonyum ve onun çevresinde, kortikal kordon epitelyum kökenli tek sıra yassı folikül hücrelerinden oluşur. Fötal dönemde milyonlarca oogonyum aktif olarak mitozla çoğalır. Mitoz bölünmeler fetal hayatın beşinci ayına kadar devam eder. Fetal hayatın 3. ayından itibaren bazı oogonyumlar mayoz bölünmenin profazına girerek primer oosit haline dönüşürler [12].

Doğumdan sonra oogonium oluşmaz. Primer oositlerin çoğu doğumdan önce dejenere olur. Doğumdan sonra iki milyon kadar primer oosit kalır. Doğumdan sonra ovaryum yüzey epiteli düzleşir. Ovaryum hilusunda, periton mezoteli ile devam eder. Ovaryum folikülleri biçimlenirken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını yitirirler. Yüzey epiteli ile ovaryum korteks'i arasında tunica albuginea denilen ince fibröz bir kapsül gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezenteriyile vücut duvarına asılır [13].



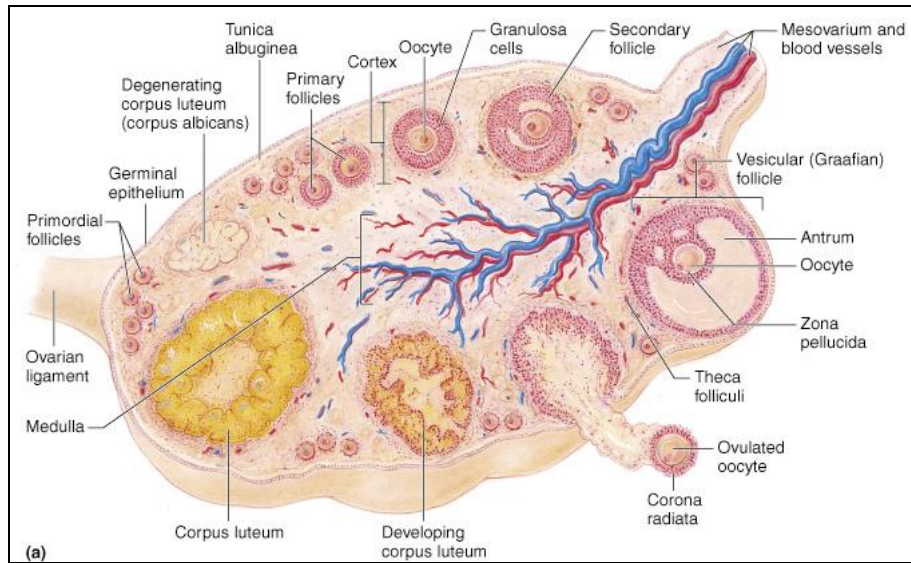
Şekil 2.2. Primordiyal Folikül oluşumu [14]

2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum gevşek bağ dokusu içerisinde damardan zengin bir yapı gösteren medullar bölge ile oosit içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu bir kortikal bölgeden meydana gelmektedir. Korteks ile medulla bölgesi arasında kesin bir sınır görülmemektedir. Korteks bölgesinin stroması karakteristik iğsi şekilli fibroblastlardan meydana gelir. Ovaryum yüzeyi germinal epitelyum ismini alan tek katlı yassı epitelyum ya da kübik epitelyum ile örtülüdür. Germinal epitel altında, stroma, tunika albuginea denen sınırları belirsiz bir bağ dokusu tabakası oluşturur. Tunika albuginea ovaryumun açık renkte görünmesini sağlar.

2.3.1. Ovaryum Folikülleri

Ovaryum folikülleri korteksin stroma tabakası içerisinde yer alır. Bir folikül bir yada daha fazla tabaka oluşturmuş folikül hücreleri ile (granüloza hücreleri) çevrili bir oositten meydana gelir. Foliküler gelişimin birkaç safhası vardır. Erişkin normal bir genç kadının iki ovaryumundaki toplam folikül sayısı tahminen 400.000 kadardır. Bu foliküllerin çoğu kadının doğurganlık süreci boyunca oositleri ile birlikte olgunlaşmadan atreziye uğrayarak yok olacaktır. Her menstrual siklusta (insanda ortalama 28 gün) genellikle bir ovum serbest kalır.

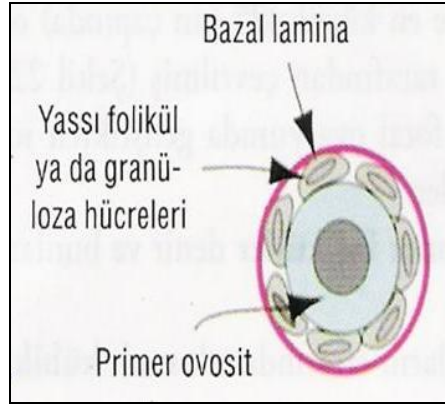


Şekil 2.3. Ovaryum Histolojisi Genel Görünüm [15]

2.3.1.1. Primordiyal Foliküller

Her bir primordiyal folikül tek sıra yassı folikül hücreleri ile çevrili bir primer oositten oluşur. Primordiyal foliküllerdeki oosit yaklaşık 25 µm çaplı küre şeklinde bir hücredir. Hafifçe eksantrik olarak yerleşmiş büyük bir nükleusu ve nükleolusu bulunur. Sitoplazmadaki organeller nükleusa yakın bir küme oluşturma eğilimindedir. Sitoplazmada çok sayıda mitokondri, birkaç golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum sisternası bulunur. Yassı folikül hücreleri birbirlerine desmozomlarla bağlanırlar. Folikül hücrelerinin altında bir bazal lamina bulunur ve damardan yoksun folikülleri stromadan ayıran sınırı oluşturur.

Primordiyal folikül gelişimi gonadotropinden bağımsız olup ilk olarak parakrin ve endokrin faktörlerle sağlanır. Bu faktörler oositin kendisi ve etrafındaki granuloza hücreleri tarafından üretilir ve koordinasyonu granuloza hücresi-oosit ilişkisi ile sağlanır.



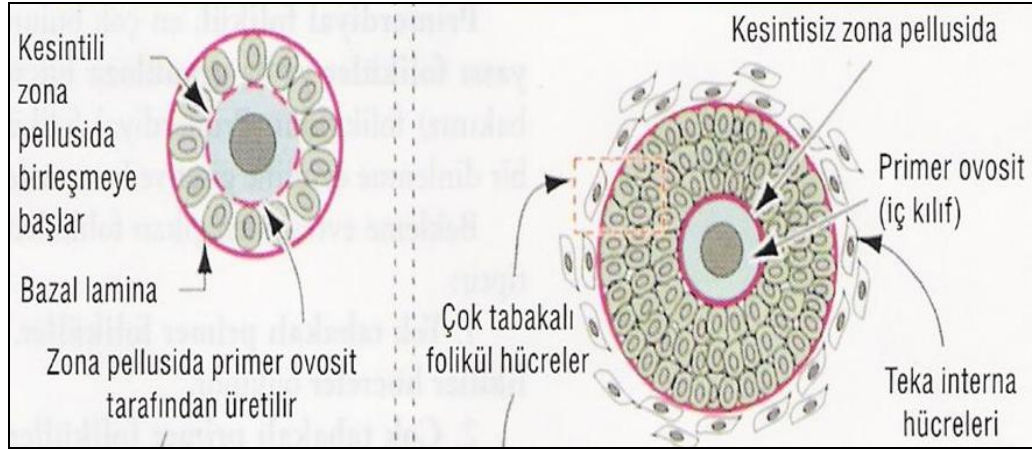
Şekil 2.3.1.1. Primordiyal folikül [16].

2.3.1.2. Büyümekte Olan Foliküller

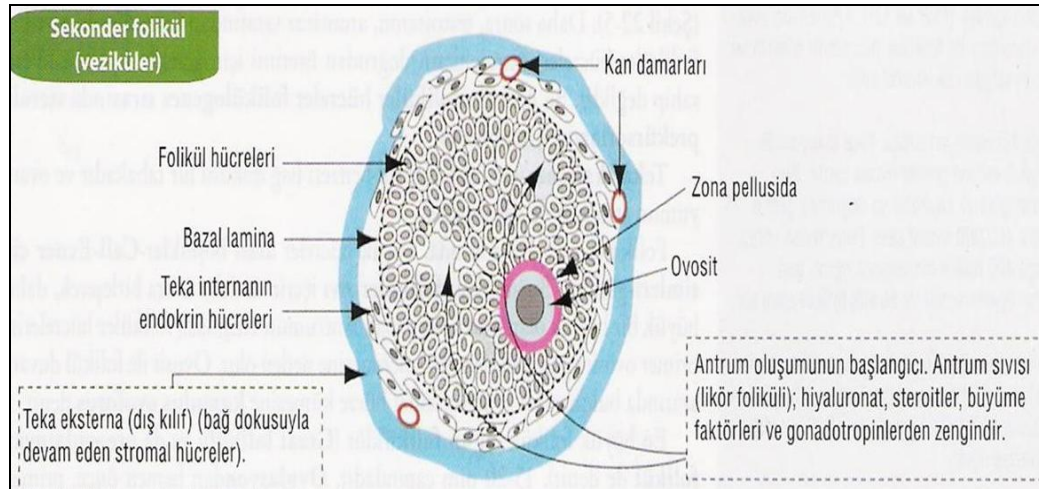
Foliküllerin büyümesi esas olarak folikül hücrelerinin ve bununla birlikte primer oositin ve folikülü çevreleyen stromanın büyümesi ile olur. Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem foliküler büyümenin birinci evresidir. Bu esnada oositin çapı max. 125-150 μm ye ulaşır. Nükleus büyür ve bu durumu ile germinal vezikül ismini alır. Folikül hücreleri tek tabakalı kübik hücreler haline geldiğinde foliküle unilaminer primer folikül ismi verilir. Folikül hücreleri mitozla çoğalırlar ve çok katlı foliküler epitelyumu ya da granuloza tabakasını oluştururlar. Folikülün bu haline multilaminer primer folikül ismi verilir ve folikül hücreleri arasında gap junctionlara rastlanır. Oositi çevreleyen kalın bir örtü olan zona pellusidanın sentezinin hem oositler hem de folikül hücreleri tarafından yapıldığı düşünülmektedir. Folikül hücrelerinin uzantıları ile oosit mikrovillusları zona pellusida içine uzanırlar ve gap junctionlar ile bağlantı kurarlar. Bu değişiklikler oluşmakta iken, folikülün bitişğinde etrafını saran stroma farklılaşma göstererek teka folikülünü oluşturur. Daha sonra bu tabaka, teka interna ve teka eksterna olarak farklılaşır.

Folikülün büyümesi esas olarak granuloza hücrelerinin büyüklüğünün ve sayısının artması ile olur. Bu esnada hücreler arasında folikül sıvısı toplanmaya başlar. Sıvıyı içeren boşluklar birleşerek antrum adı verilen tek bir boşluk haline gelirler. Bu özelliklerinden dolayı foliküle sekonder folikül ismi verilir. Folikül sıvısı plazma sızıntılarını (transüstasyon) ve folikül hücreleri tarafından salgılanan ürünleri içerir. Aynı zamanda glukozaminoglikanlar bazı proteinler (steroid bağlayıcı proteinlerde dahil olmak üzere) ve yüksek konsantrasyonda steroidler (progesteron, androjenler ve östrojenler) mevcuttur. Granuloza tabakasının hücreleri folikül duvarı üzerinde belli bir yerde daha fazla yoğunlaşır. Burada hücrelerden oluşan kumulus ooforus adı verilen küçük bir tepecik oluşur. Kumulus ooforus antrumun iç kısmına doğru uzantı yapar. Bundan böyle oosit daha fazla büyüyemez. Granuloza hücreleri

FSH (Folikül Stimulan Hormon) reseptörleri taşır ve FSH'a cevap verir, olgunlaşan oositi destekleme ve beslemeye yönelik hücelere farklılaşır. Hipotalamustan pulsatil olarak GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) salgılanması hipofizden FSH ve LH (lutein hormon) gonadotropinlerinin salgılanmasını uyarır.



Şekil 2.3.1.2.a Tek tabakalı ve çok tabakalı primer folikül [16]

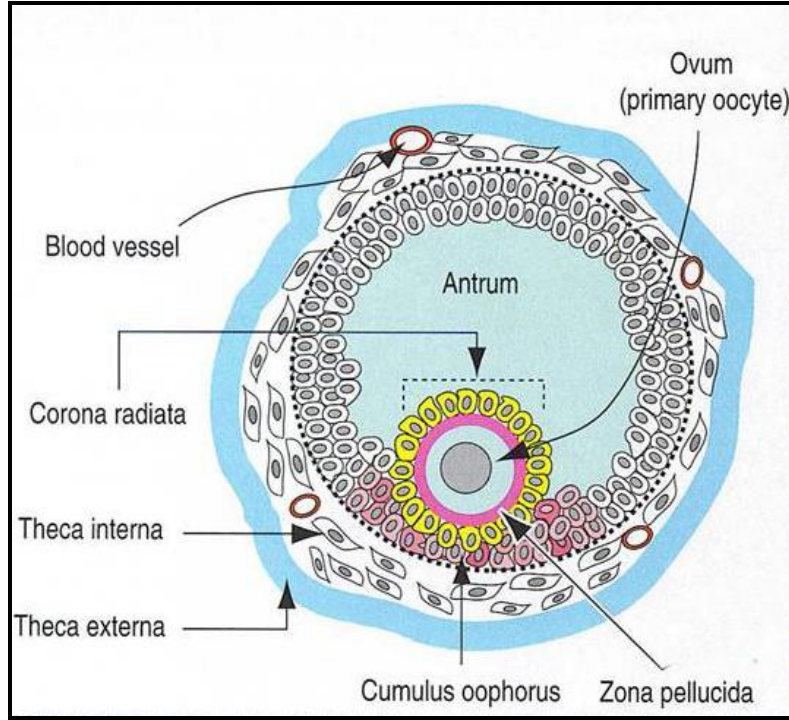


Şekil 2.3.1.2.b Sekonder folikül [16].

2.3.1.3. Olgun Foliküller

Graaf folikülleri yaklaşık 2.5 cm çapındadır ve ovaryum yüzeyinden dışarı doğru şişkinlik yapan saydam bir vezikül olarak görülebilir. Sıvı toplanmasının bir sonucu olarak, folikül boşluğunun genişliğinde artış olur ve oosit granüloza hücreleri tarafından oluşturulan bir sap ile folikül duvarına bağlanır. Granüloza hücreleri, sıvı toplanması ile orantılı bir biçimde çoğalma göstermedikleri için granüloza tabakası daha ince bir hale gelir.

Ovum etrafındaki ilk tabakayı oluşturan granüloza hücreleri zona pellusida ile yakın temastadır. Bu hücreler uzayarak korona radiatayı oluşturur. Korona radiata ovum ovaryumu terk ederken ona eşlik eder. Korona radiata spermatazoonun ovumu dölediği zamanda dahi mevcuttur ve ovumun ovuduktan geçişi esnasında da bir müddet kalır [17-19].



Şekil 2.3.1.3. Olgun folikül [16].

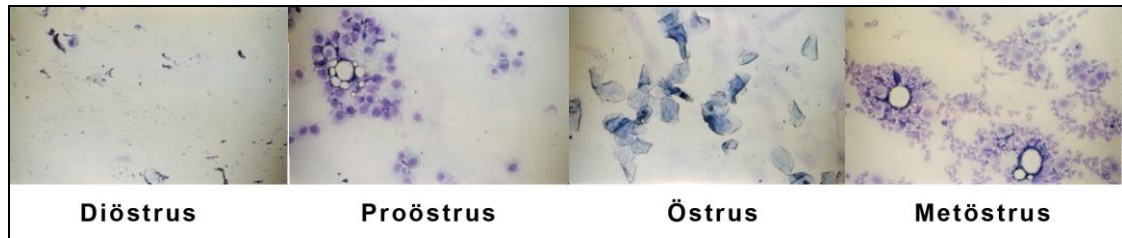
2.4. Sıçanlarda Östrus Siklusu

Sıçan östrus siklusu ortalama 4-5 gün sürmektedir. Östrus siklusu laboratuvar kolonilerinde mevsimden bağımsız olarak yıl boyu sürmektedir [20]. Siklus proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere dört dönemi kapsar. Korpus luteum en yüksek büyüklüğüne erken diöstrus döneminde ulaşır ve en yüksek progesteron değerlerine de östrus siklusunun 2. gününde ulaşılır. Hormonal salınımlar ön hipofizden salınan ve vaginal sitolojik değişimler şeklinde saptanabilen ovaryum ve folliküler değişimlere neden olan gonadotropinler tarafından düzenlenir. LH pulsatil olarak salınır. En yüksek frekansa proöstrusta en düşüğe de östrusta ulaşır. LH atımı GnRH salınımının yüksekliğine bağlıdır [21]. Proöstrus esnasında salınan LH dalgaları 0,9-1,0 mm çapında ki preovulatuvar folliküllerde ovulasyonun meydana gelmesine ve corpora lutea şekillenmesine neden olur. İki adet preovulatuvar FSH dalgası küçük folliküllerin gelişimini stimule eder [22]. Metaöstrus boyunca, corpora lutea'dan progesteron salınır. Progesteron seviyesi diöstrusta azalır ve artan östradiol-17 β 'ya bağlı olarak folliküler gelişim tekrar başlar. Siklus proöstrusta meydana gelen östrojen piklerinin ovulasyona neden olan gonadotropin salınımını indüklemesi ile tamamlanır. Ratlarda 5 gün devam eden

östrus siklusu, 4 günlük siklusa benzer fakat LH ve östrojen sekresyonu, luteolizis ve uterus değişiklikleri 24 saat gecikmeli olarak meydana gelir [23].

2.4.1. Sıçanlarda Östrus Siklus Döneminin Belirlenmesi

Sıçanlarda reproduktif performansı artırma amaçlı olarak östrus döneminin saptanması için bir çok yöntem kullanılmaktadır. Önemli yöntemler arasında davranışsal değişimlerin gözlenmesi, vaginal sitolojik bakı, vaginanın elektrik iletkenliğinin ölçülmesi sayılabilir. Östrus siklusunun östrus döneminin süresi 9-15 saat sürmekte ve dişinin erkeği kabul ettiği dönem olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanında östrustaki dişide hareket artışı, baş ve sırta vurulduğunda kulakların titretilmesi, pelvik stimülasyon sonrası lordozis hareketi (vertebral sütunda dorsifleksiyon hareketi) görülür. Östrus esnasında vaginal duvar kuru ve vulva ödemlidir. Vaginal sitolojik bakı östrus siklusu döneminin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Etkili bir saptama için vaginal sitolojik örneklerin gün boyunca aynı saatte alınması gerekmektedir. Çekirdekli süperfisiyal hücrelerle karakterize olan proöstrus dönemi yaklaşık olarak 12 saat sürmektedir. Proöstrus döneminde özellikle prepubertal ratlarda uterus sıvı ile doludur. Bu durum hidrometra ile karıştırılmamalıdır. Östrus döneminde vaginal sitolojik bakıda başlangıçta %75 çekirdekli süperfisiyal ve %25 keratinize süperfisiyal hücre saptanırken dönemin ortalarına doğru bu oran keratinize süperfisiyal hücreler lehinde değişir. Dönemin sonlarına doğru bu keratinize (kornifiye) hücreler dejenere olur ve epiteliyal bir yığıntı halini alır. Metaöstrus dönemi ovulasyondan sonra görülür ve yaklaşık 21 saat sürer. Dönemde alınan sitolojik örneklerde çekirdekli ve kornifiye hücreler etrafında çok miktarda lökosit saptanır (Şekil 2.4.1). Diöstrus en uzun dönemdir ve 57 saat kadar sürmektedir [24]. Sitolojik bakıda dominant hücre tipi lökositlerdir [25]. Vaginal mukustaki elektriksel direncin ölçülmesi yönteminde vaginaya prob yerleştirilir. Proöstrusta direnç pik yaparken, östrusta en düşük seviyeye geriler [26]



Şekil 2.4.1. Sıçanlarda östrus siklusları sitolojisi

2.5. Ovaryumun Fizyolojisi

Kadın hormonal sistemi, bir diğerini yöneten üç ayrı hormon grubundan oluşur:

- i. Hipotalamik-serbestleştirici hormon (Gonadotropin- Releasing Hormon - GnRH)
- ii. Hipofiz ön lobu hormonları olan Folikül Uyaran Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH)'dur. Bu hormonların her ikisi de hipotalamusta sentezlenen GnRH-serbestleştirici hormon etkisiyle salgılanırlar.

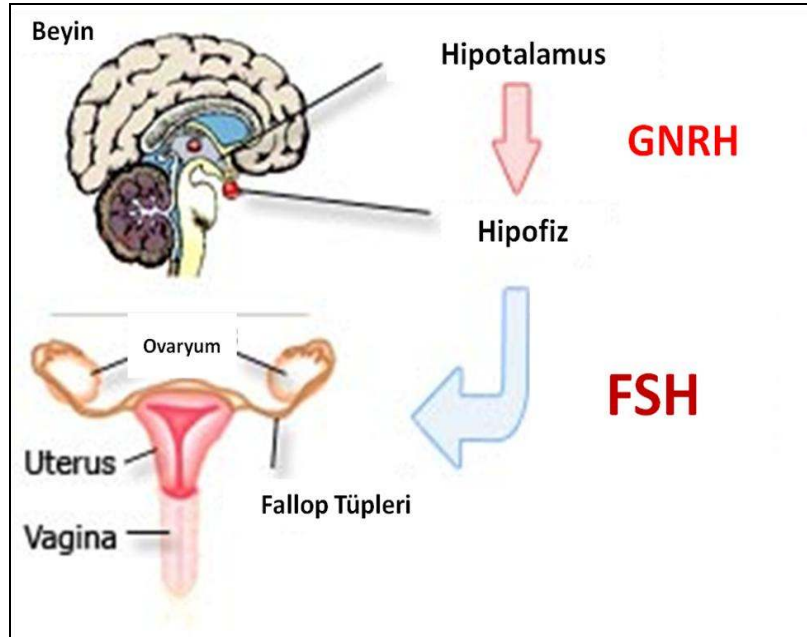
iii. Ovaryum hormonları: Östrojen ve progesteron. Bu hormonlar hipofiz ön lobundan salınan FSH ve LH' ye yanıt olarak ovaryumlarca salgılanırlar. Kadında aylık menstrüal döngü sürecinde, bu hormonların salınımları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde salgılanma hızları farklıdır.

Hipotalamustan GnRH salgısı artma ve azalma şeklinde büyük değişiklikler gösterirken bu artma ve azalmalar aylık döngü sürecinde daha azdır. Hormonlar ortalama olarak her 90 dakikada bir salgılanırlar.

2.5.1. Gonadotropik Hormonların Ovaryum Üzerine Etkisi

Cinsel döngü sürecinde ovaryumdaki değişiklikler tamamen, ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropik hormonlar, FSH ve LH' a bağlıdır. Gonadotropik hormonlarla uyarılmayan ovaryumlar inaktif durumdadırlar. 9-12 yaşlarında hipofiz giderek daha çok FSH ve LH salgılamaya başlar, 11-15 yaşlar arasında aylık cinsel döngünün başlaması ile en yüksek düzeye ulaşırlar. Bu değişim dönemine püberte ilk aybaşı döngüsüne ise menarş adı verilir. FSH ve LH molekül ağırlıkları yaklaşık 30.000 olan küçük glikoprotein yapısında hormonlardır.

FSH ve LH overlerdeki hedef hücrelerini, hücre zarlarında bulunan son derece özgül reseptörlere bağlanarak uyarırlar. Aktive olan reseptörler, bu hücrelerde hem salgı, hem de büyüme ve çoğalma hızını artırır. Bu uyarıcı etkilerin hemen hepsi hücre sitoplazmasındaki ikinci haberci siklik AMP (cAMP) sisteminin aktivasyonu sonucu, cAMP protein kinaz oluşumuna ve cinsiyet hormonlarının sentezini uyararak çeşitli anahtar enzimlerinin fosforilasyonunun sağlanmasına bağlıdır.



Şekil 2.5.1. GnRH ile FSH ilişkisi.

2.5.2. Folikül Gelişim Fizyolojisi

Çocukluk çağı boyunca granüloza hücreleri ovaryumun beslenmesini üstlenirler. Aynı zamanda, oositlerin olgunlaşmasını baskılayan bir faktör, oosit-matürasyonu inhibe edici faktörü salgılayarak ovumun mayozun profaz aşamasında, primordiyal halde kalmasına yardımcı olurlar. Puberte sonrasında, ön hipofiz bezinin büyük miktarda FSH ve LH salgılaması ile her iki ovaryum foliküllerle birlikte büyümeye başlar.

Aylık menstrüel siklusun her birinin ilk birkaç günü içinde FSH ve LH konsantrasyonları, hafif yada orta derecede artış gösterir. Bu dönem içerisinde FSH'nın artışı LH'a göre biraz daha fazladır. FSH her ay 6 ila 12 primer folikülün gelişimini hızlandırır. Hormonun ilk etkisi granüloza hücrelerinin bölünmesini hızlandırmak ve pek çok granüloza hücre tabakasının oluşumunu sağlamaktır.

Primer folikülün antral folikül haline dönüşümü sırasında erken fazda yalnız FSH uyarısı önemlidir. Daha sonra büyüme olayı çok hızlanır, antral folikülün oluşumu veziküler folikül adı verilen çok daha büyük foliküllerin oluşumuna neden olur. Hızlı büyümeye yol açan etkenler şunlardır:

1-Folikül içine serbestlenen östrojen, granüloza hücrelerinde FSH reseptör sayısının artmasına neden olur. Bu olay pozitif bir geri bildirim etkisi yaratır, çünkü granüloza hücrelerinin ön hipofiz bezinden salgılanan FSH'a karşı, şimdiye kadar hiç olmadığı derecede duyarlılık kazandırır.

2-Hipofiz FSH ve östrojenle birlikte, granüloza hücrelerinin yüzeyinde, aynı zamanda LH reseptörlerinin yapısını hızlandırır. Böylece bu hücrelerde FSH uyarısına ek olarak, LH uyarısında sağlanmış olur ve folikül sekresyonunun daha da hızlanmasına yol açılır.

3-Folikülde östrojen salgısının artması, ön hipofizden salgılanan LH'nin yükselmesi ile birlikte foliküler teka hücrelerinin proliferasyonuna neden olacak ve aynı zamanda salgılarının artmasına yol açacaktır [27].

Olgun folikülün granüloza ve teka interna hücrelerinden salgılanan steroid hormonlar hipotalamo-hipofiziyal sistemi etkileyerek gonadotrop hormon salgılanmasını düzenler. Döngünün ilk yarısında primer foliküllerin oluşumu gonadotrop hormonlardan bağımsızdır ancak daha sonraki gelişme için FSH gereklidir. Foliküler evrenin başında artan FSH salınımı primer foliküllerin büyümesini uyarır, granüloza hücrelerinde FSH reseptörlerinin sayısını artırır. Bu etkiyle granüloza hücreleri çoğalır ve bu hücrelerde aromataz enzimi yapılır. Yüksek östrojen düzeyi FSH'ı azaltırken, LH'ı artırır. LH reseptörleri teka interna hücrelerinde bulunur. Bu hücrelerde kolesterolden androjenler sentezlenerek salgılanır ve difüzyonla granüloza hücrelerine geçer, aromataz androjenleri östrojenlere dönüştürür.

Östrojen teka internaya geçer ve burada bulunan kılcal damarlarla genel dolaşıma katılır. Artan östrojenler doğrudan hipofizi etkiler ve dolaylı olarak da, GnRH sentezini baskılayarak FSH salgılanmasını kısıtlar. Östrojenler ovulasyon öncesi LH salgısının artmasını sağlar ve ovulasyon gerçekleşir. FSH ve östrojenlerin etkisiyle granüloza ve teka hücrelerinde LH reseptörleri artınca LH'un etkisi gözlenir. Bu da luteal evrede progesteron yapımını artırıp östrojen yapımını azaltır. Progesteron endometriyum'u olası gebeliğe hazırlar, LH'u baskılar ve folikül gelişmesine engel olur. FSH azalması folikülleri olumsuz etkiler. En büyük folikül gelişmeyi sürdürse de diğerleri gerileyip atrezi olurlar[27, 28].

2.5.3. Gonadotropin Serbestletici Hormon (GnRH)

GnRH 10 aminoasitli bir peptit olup, hipotalamusun nucleus arcuatus'unda bulunur. Bu nöronların sonlanmaları başlıca, hipotalamusun eminentia mediana bölgesinde gerçekleşir. Bu bölgedeki nöronlardan salgılanan GnRH, hipotalamo-hipofiziyal portal sistemi damarlarına serbestlenir. Daha sonra, GnRH portal kan yoluyla ön hipofize taşınır ve iki gonadotropin, LH ve FSH'ın salgılanmasını uyarır.

GnRH ağırlıklı olarak 1-3 saatte bir, birkaç dakika süreyle salgılanır. Hormonun uyarıcılık şiddeti, salgılama döngülerinin sıklığı ve her bir döngüde salgılanan GnRH düzeyi olmak üzere iki olaydan etkilenir.

Ön hipofizden salgılanan LH da GnRH gibi döngüler halinde, pulsatil olarak salgılanır. Oysa FSH salgısı, GnRH düzeyindeki küçük değişimlere bağlı olarak çok hafif artış yada azalma gösterir. GnRH daki uzun süreli değişimlere karşın, FSH birkaç saatten fazla bir dönem sonunda çok yavaş yanıt verir. GnRH salgısı ile LH salgısı arasındaki çok yakın ilişki nedeni ile, GnRH aynı zamanda serbestleştirici hormon olarak kabul edilir [27].

Klasik olarak bilinen bu fonksiyonlar aslında GnRH-I tarafından yürütülmektedir ve santral sinir sisteminin hipotalamus dışındaki alanlarında ve santral sinir sistemi dışında da bulunabilir [29].

GnRH-I'den 3 adet aminoasitle farklılık gösteren GnRH-II ise bütün omurgalılarda beyin seviyesinde bulunmuştur ve vücutta başka birçok yerde izlenmektedir[30].

Beyinde bulunan GnRH-II gonadotropin salınımını salgısını artırarak üreme davranışları üzerine değişikliklere sebep olabilir. Gerek GnRH-I gerekse de GnRH-II reseptörleri birkaç tümörde ve hücre dizisinde izlenmiş olup otokrin ve parakrin olarak büyüme üzerine olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir [31-33].

2.5.3.1. GnRH Agonistleri

İlk olarak Schally ve arkadaşları tarafından 1971 yılında bulunan [34] GnRH aminoasidlerinin önemli fonksiyonlarında görev alanlar 1, 2, 3, 6 ve 10 pozisyonunda olanlardır. Pozisyon 6'daki aminoasidler enzimatik klivajda, pozisyon 2 ve 3'dekiler gonadotropin salınımında, pozisyon 1,6 ve 10 da olanlar ise üç boyutlu yapının korunmasında görev alırlar. İki-dört dakika kadar kısa bir yarılanma ömrüne sahiptirler ve bu özellikleri 5-6, 6-7 ile 9-10 numaralı aminoasitler arasındaki bağların çabuk yıkılmasına bağlıdır. Altı numaralı aminoasitin pozisyonunun veya C terminaline glisin-amid yerleştirilmesi uzun yarılanma ömrüne sahip GnRH agonistlerinin üretilmesini sağlamaktadır.

GnRH agonistleri intramuskular, intranasal veya cilt altı şeklinde uygulanırken oral olarak kullanılamazlar. İlk uygulandığında alevlendirici bir etkisi mevcuttur ve bu dönemde dolaşımda artmış FSH ve LH seviyeleri tesbit edilmektedir. Bu etki özellikle bireyin kendi yüksek GnRH ve düşük östrodiol seviyelerinin artmış gonadotropin uyarımı yaptığı erken folliküler dönemde en yüksektir. İlaç uygulanmasından yaklaşık 1-3 hafta sonra ise hipogonadotropik hipogonad durum oluşmaktadır. Duyarsızlık sürecindeki ilk neden muhtemel reseptör sayısındaki azalma ve reseptörlerin efektör sistemden ayrılmalardır. İlginç olarak bu dönemde sadece çok duyarlı yöntemlerle test edilebilen biyolojik olarak inaktif gonadotropinler halen üretilmektedir; ancak seviyeleri oldukça düşüktür.

GnRH agonistleri ile tedavi sadece yardımcı üreme teknikleri kapsamında değil endometriosis, erken puberte ve özel tıbbi durumların varlığında (örneğin hemorajik diyatezler) artmış menstrual kanamayı önlemek amacıyla da uygulanabilmektedir. GnRH agonistlerine örnek olarak Leuprolide, Buserelin, Nafarelin, Histrelin, Goserelin, Deslorelin, Tryptorelin verilebilir [35].

2.5.3.2. GnRH Antagonistleri

Ovulasyon indüksiyonunda amaç, foliküler büyümeyi uyarmaktır. Çoğu klinisyen erken LH piklerini azaltmak için hipofiz down-regulasyonunu kullanmaktadır. 1971 yılında GnRH yapısının ortaya çıkmasından sonra GnRH analogları sentezlenmeye başlandı [36].

Fertiliteyi arttıracığı umuduyla binlerce molekül üretildi. 1978'de GnRH analoglarının tekrarlayan dozlarda uygulanması ile, seks steroidlerinde başlangıçta bir artışı takiben ileri derecede bir düşüş olduğu ve gonadal fonksiyonlarda önemli düzeyde bir azalma olduğu gözlenmiştir [37].

1980'lerin sonuna doğru özellikle yardımcı üreme tekniklerinde kontrollü ovaryen hiperstimulasyonunda (KOH) kullanılmak amacıyla GnRH agonistleri piyasaya sürülmüş, ve dünyada birçok merkezde rutin KOH rejimleri içinde yerini almıştır. Yardımcı üreme tekniklerinde ovaryum indüksiyon protokollerinde GnRH agonistlerinin kullanılmaya başlanmasıyla, klinik sonuçlarda önemli gelişmeler sağlanmıştır [38].

GnRH-a klinik kullanıma girmeden önce, in vitro fertilizasyon (IVF) programlarında erken LH pikine bağlı siklus iptal oranları %20'ler civarında iken, GnRH agonistlerinin kullanılmaya başlanmasıyla, bu oran %2 civarına inmiştir. Bunu, hipofizdeki gonadotrop hücrelerdeki GnRH reseptörlerini down-regüle ve desensitize edip, erken LH pikini önleyerek yapmaktadır[39].

Bir GnRH agonisti ile tedavide, analogun GnRH reseptörlerine bağlanması ve onları uyarması sonucu, gonadotropin salgılanmasında başlangıçta bir artış meydana gelir. Daha sonra reseptörlerin devamlı uyarılması sonucu, desensitizasyon nedeniyle, FSH seviyelerinde daha az olmak üzere LH düzeylerinde ileri derecede bir azalma meydana gelir. Agonistler birkaç ay gibi uzun bir süre uygulanırsa LH seviyeleri baskılanmış halde kalmaya devam ederken, FSH düzeyleri normale döner, ve suprafizyolojik bir seviyeye çıkar.

GnRH antagonistleri 1972'lerde keşfedilmiştir ve analoglardan farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. GnRH reseptörlerine yüksek bir afiniteyle bağlanırlar ve etkisini kompetitif inhibitörler gibi gösterir. GnRH antagonistlerinin reseptöre bağlanma yerlerinin analoglardan farklı olduğu düşünülmektedir [40, 41].

GnRH agonistlerinin klinik kullanımı, gonadotropin stimülasyon protokollerinde sıklıkla gözlenen, luteinizasyona ve normal folikül ve oosit gelişiminde bozulmaya neden olan erken LH pikini, hipofizden gonadotropin salınımını geri çevrilebilir bir şekilde inhibe etmesine dayanmaktadır .

GnRH kadınlarda, overian siklusunun kontrolünde hayati bir role sahiptir. Bu decapeptitin moleküler yapısını değiştirerek elde edilen analoglar, ön hipofiz bezindeki gonadotropik hücreler üzerinde agonistik veya antagonist etkiye sahiptir. GnRH antagonist ve agonistlerin etki mekanizmaları tamamen farklıdır.

Agonistler, başlangıçta stimulator etkilerinden sonra, gonadotropik hücre membranları üzerinde ki GnRH reseptör sayısında azalma ve desensitizasyona neden olarak FSH ve LH salınımında düşmeye yol açarlar. Böylece androjen ve östrojen yapımında azalma meydana gelir. Antagonistler ise GnRH reseptörleri üzerinde hızlı bir inhibisyona yol açarlar[42] .

Östrojen eksikliği yan etkilerinin olmaması ve güvenli ve uygun doz protokollerinin olması, antagonistlerle tedavi edilen kadınlar açısından en önemli avantajdır. Gonadotropin tedavisine başlamak için önceden bir tedavi gerekmez ki yapılan klinik çalışmalar sonucu, GnRH antagonistleriyle tedavi protokollerinin daha kısa olduğu, daha az enjeksiyon sayısı ve daha az gonadotropin ihtiyacı gerektirdiği ortaya konmuştur[43].

Fertilizasyon oranları %60 dan büyük ve transfer başına gebelik oranları %30 civarındadır. GnRH antagonist kullanımıyla estradiol salgılanmasında ciddi düşüşler

yoktur. Erken LH piki insidansı %2 seviyelerindedir. Hipofizin gonadotropine cevap verebilme yeteneği bozulmamaktadır [44] .

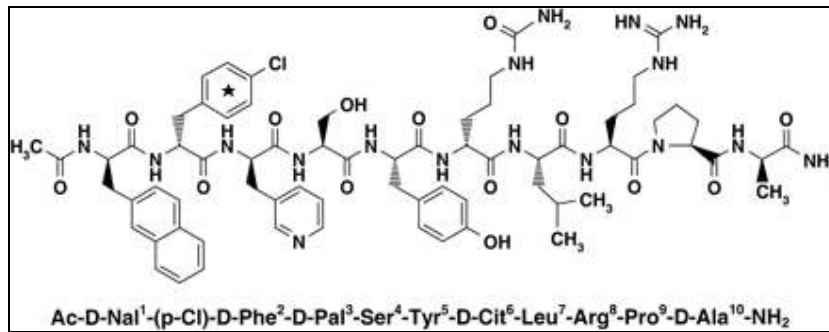
GnRH antagonisti kullanımında en sık rastlanılan yan etki, enjeksiyon yerinde eritem, kaşınma ve şişme gibi hafif geçici lokal reaksiyonlardır. Nadiren asteni, bulantı, kusma, baş ağrısı ve baş dönmesi görülmektedir. GnRH antagonist kullanımında ki artış ile beraber, elde edilen gebeliklerin bu ilaçlara maruz kalma daha da artmaktadır.

Jinekolojide GnRH antagonistleriyle ilgili ilk çalışma sonuçları, Reissmann ve arkadaşlarınca 1995 yılında yayınlanmıştır. Erken LH pikini önlemek amacıyla IVF için uygulanan KOH'ta cetroreliks kullanılmıştır ve istenen başarı sağlanmıştır[45].

GnRH antagonistleriyle androjenler kombine edildiğinde etkili bir şekilde spermatogenez baskılanmaktadır. Myoma uteri, endometriozis ve meme, ovaryum, endometrium ve prostat kanseri gibi hormon bağımlı kanserlerin tedavisinde faydalı olabilmektedir[46, 47]

2.5.3.3. Cetrorelix

Cetrorelix asidik komponent içermeyen temel bir peptittir. Moleküler ağırlığı 1431.06 g/mol olarak hesaplanmıştır [48]. GnRH membran reseptörünün antagonisti olan ovaryum steroidegenezinde içsel etkisi olmayan doğal GnRH'ın yapısal bir analogudur [49]. Bu sentetik dekapeptit tek bir peptit bileşenlerinden oluşmuştur ve aksine doğal GnRH'nın 1, 2, 3, 6 ve 10 pozisyonlarındaki aminoasitlerden meydana gelmiştir.



Şekil 2.5.3.3. Cetrorelix'in kimyasal yapısı [48].

Cetrorelix, steril enjeksiyon suyunda (pH 5-8) çözünen liyofilize tuz bileşeninden 0.25- veya 3.0- mg derialtı enjeksiyon ile uygulanır. Dilüsyon oranı 1 ml (0.25-mg flakon, 0.26 – 0.27 mg Cetrorelix asetat'a denktir) veya 3.0 ml (3-mg flakon, 3.12 – 3.24 mg Cetrorelix asetat'a denktir) olarak hesaplanır [48].

Cetrorelix doğal GnRH ile birlikte hipofiz hücreleri üzerindeki membran reseptörlerine bağlanmak için yarış içerisine girer. Cetrorelix reseptöre

bağlandığında, reseptör bloke edilir. Böylece LH ve FSH salınımı doza bağımlı hale gelir. 3 mglık doz verildiğinde 1 saat, 0.25 mglık dozda ise 2 saat sonra LH supresyonu oluşmaya başlar. Supresyon sürekli Cetorelix uygulaması ile devam ettirilir. LH supresyonu FSHa göre daha fazla telaffuz edilir. Cetorelix muamelesi kesildiği zaman LH ve FSH üzerine etkisi tamamen geri dönüşümlüdür [50, 51].

GnRH antagonistleri hipofiziyel GnRH reseptörleri üzerinde hızlı ve doza bağımlı bir baskılamaya neden olurlar. Cetorelix, endometriosis tedavisinde sancılı periodları azalttığı ve hastalığın nüksetmesini engellediği için iyi tolere edilebilinen ve etkili bir tıropatik seçenektir [52, 53].

GnRH analogları uzun süreli kullanımda kemik erimesi ateş basması gibi menopoz sonrası görülen yakınmalara neden olabileceğinden östrojen içeren ilaçlar ile birlikte verilebilir. Add-back tedavi adı verilen bu durum tezat gibi görülebilir. Ancak amaç kan östrojen düzeyini endometriozi baskılayacak kadar düşük ve kemik erimesine neden olmayacak kadar yüksek bir aralıkta tutmaktır. Cetorelix muamelesinde add-back tedaviye ihtiyaç duyulmaz ve hasta menopoz sonrası semptomlara maruz kalmaz [54].

2.6. Yağ Dokusu

Yağ dokusu yağ dokusunun özel bir tipidir ve adiposit adı verilen hücrelerden oluşur. Erkeklerde vücut ağırlığının % 15-20'sini, kadınlarda ise vücut ağırlığının % 20-25'ini yağ dokusu oluşturmaktadır. Farklı yerleşim, renk ve patoloji gösteren iki tip yağ dokusu vardır. Olgunlaşmış uniloküler yağ dokusu (beyaz yağ dokusu) hücreleri, sitoplazmalarının ortasında bir tek sarı yağ damlacığı içerirler. Çekirdek kenara itilmiştir. Multiloküler yağ dokusu (kahverengi yağ dokusu) hücrelerinin sitoplazmalarında ise çok sayıda lipid damlacığı ve kahverengi mitokondriumlar mevcuttur. Çok sayıda kan damarları ve mitokondrilerindeki renkli sitokromlardan dolayı kahverengi görünürler. Beyaz yağ dokusu vücutta homojen dağılım gösterirken, kahverengi yağ dokusu vücudun belli yerlerinde toplanmıştır.

Beyaz yağ dokusu, visseral yağ ve deri altı yağ dokusu olmak üzere iki kısımda incelenir. Visseral yağ, total vücut yağının %10-20 kısmını oluşturur. Deri altı ve visseral yağ arasında hücre hacmi, membran reseptörleri, kana yağ asidi salgılama ve yağ depolama fonksiyonları bakımından farklılıklar vardır. Visseral yağ dokusunun venöz drenajı portal sistemledir ve salgılanan yağ asitleri doğrudan karaciğere gider. Karaciğerde lipoproteinlere dönüştürülerek tekrar kana verilir [55-57].

Yağ hücreleri hamileliğin 15. haftasından sonra, fibroblastların mitozla çoğalıp preadipositlere dönüşümü ile olur. Yaşamın ilk iki yılında preadipositlerden yağ hücreleri oluşur, büyüklük ve sayı olarak en çok bu zamanlarda değişime uğrarlar [58, 59]. Puberteye kadar yağ hücre sayısı, çoğalarak artmaya devam eder. Ergenlikten itibaren yağ hücresinde mitoz görülmez. Hücreler sayısal olarak artış göstermez. Sadece büyüklükleri değişime uğrar [60].

Yağ hücrelerinin büyüklüğü 10-200 mikrometre kadar olabilmektedir. Böylece hücre çap olarak 20 kat büyüme gösterebilirken, hacim olarak büyüme bin kata kadar ulaşabilmektedir [58, 59].

2.6.1. Adipokinler

Adipokin veya adipositokin olarak isimlendirilen bir çok hormon yağ dokusunda salgılanmaktadır. Adipoz dokuyu oluşturan matür adipositler, pre-adipositler, fibroblastlar ve makrofajlar gibi pek çok hücre tipinden bazıları adipokin sekresyonunda aktif rol alırken bazıları pasiftir [1]. Adipokinlerin endokrin, parakrin ve endokrin etkileri bulunmaktadır [61]. Adipositokinler obezite, insülin direnci, diabetes ve kardiovasküler hastalıklarda rol oynamaktadırlar.

Adipokinleri, sitokin ve sitokin özelliği gösteren adipokinler, kemokin özellikte ki adipokinler, akut faz proteinleri olan adipokinler ve pro-inflamatuvar özellikte olan adipokinler olarak da sınıflandırmak mümkündür [62].

2.6.1.1. Sitokin ve Sitokin Özelliği Gösteren Adipokinler

TNF α çeşitli immünolojik fonksiyonları ile bilinen önemli bir sitokindir. Önceleri tümör nekrozuna neden olabileceği ve hatta kanser, enfeksiyon gibi durumlarla da ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Obez kişilerde adipositlerde ve vasküler bağ dokusu hücrelerinde TNF α reseptörlerinin sentezi artmaktadır [63]. TNF α bu etkileriyle obezite ve diyabette insülin direncinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır. TNF α , insülinin yağ ve kas dokusu üzerindeki etkisini inhibe eder [64].

16 kDa ağırlığında olan leptin yağ dokusundaki artışa bağlı olarak artar. Deri altı yağ dokusu başta olmak üzere pek çok dokudan sentezlenip salınır. Leptin, ayrıca vücut lipid metabolizması, hematopoez [65], ovarial hücre fonksiyonu [66] gibi farklı doku ve sistemler üzerine de etkilidir. Leptinin en önemli fonksiyonu vücuttaki yağ miktarını sabit tutmaktır [67]. Leptin ayrıca sempatik sinir sisteminin aktivitesini de artırır.

Yağ dokusu tarafından sentezlenen ve 30 kDa büyüklüğünde bir polipeptid olan adiponektin kollagen benzeri bir plazma proteindir. Adiponektin makrofajlardan TNF α salınımını ve makrofajların epitelyal makrofaj hücrelerine dönüşümünü baskılamaktadır. Ayrıca adiponektin vasküler düz kaslarda depolanır ve damar duvarını koroner arter hastalığı riskine karşı korur [68, 69].

İnterlökin (IL) 6, IL-1 β , IL-10, IL-18, Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör sitokin özelliği gösteren adipokinler grubunun diğer üyeleridir.

2.6.1.2. Kemokin Özelliği Gösteren Adipokinler

Kemokinler inflamasyon, infeksiyon, doku hasarı, alerji, kardiyovasküler hastalıklar, ayrıca malign tümör patofizyolojisinde rol alan ve farklı hücre tiplerini aktive eden bir polipeptid sınıfıdır. IL-8, Makrofaj Göçünü Baskılayıcı Faktör, Monosit Kemotaktik Protein-1 bu gruptaki adipokinlere dahildirler [70].

2.6.1.3. Akut Faz Proteinini Özelliği Gösteren Adipokinler

Yaşlanma ve obezite ile birlikte artan Orosomukoid, hiperglisemik durumlarda adipoz dokudan sentezlenen Serum Amiloid, C Reaktif Protein, Pentoksifilin, Haptoglobulin akut faz proteinini özelliği gösterirler.

2.6.1.4. Pro-inflamatuvar Özellikte Olan Adipokinler

Bu grupta yer alan adipokinler direkt olarak inflamasyonun bir parçası olmayıp inflamatuvar olayları başlatıcı veya sonlandırıcı etkiye sahiptirler [62].

Adiponektin, yağ dokusundan sentezlenen 30 KDa ağırlığında antiaterojenik ve anti-inflamatuvar bir adipokindir. Kollajen benzeri bir plazma proteini olan adiponektin GBP28, AdipoQ, ACRP 30 olarak da bilinir. Adiponektin vasküler düz kaslarda depolanır ve damar duvarını koroner arter hastalığı riskine karşı korur [71].

Rezistin, 12.5 kDa ağırlığında Fizz3 proteini olarak da adlandırılan bir adipokindir. Yaşlanma ile birlikte artan rezistin adiponektinin aksine özellikle kemirgenlerde insülin rezistansına ve tip 2 diyabete yol açabilmektedir. Rezistinin insanlardaki asıl kaynağı ise makrofajlardır [72].

Visfatin, Vasküler Endotel Büyüme Faktörü, Monobütirin, Sinir Büyüme Faktörü, Adipsin, Apelin, Omentin pro inflamatuvar özellikte olan adipokinlere örnek olarak gösterilir.

2.6.2. Visfatin

Visfatin 2004 yılında Fukuhara ve ark. tarafından bulunan en yeni adipokinlerden biridir. İsmi visceral yağ dokusundan almaktadır. 52 KDa ağırlığına olan visfatin, 491 aminoasitten oluşan bir gen dizilimine sahiptir [2]. Visfatin ilk olarak, 1994 yılında lenfositlerden türeyen bir sitokin olarak tanımlanmış ve Pre B cell colony enhancing factor (PBEF) olarak adlandırılmıştır. PBEF'nin lenfosit maturasyonu ve inflamatuvar regülasyondan sorumlu olduğu rapor edilmiştir [73, 74]. Daha sonra benzer bir yapı nikotinamid adenin dinükleotit biyosentezinde rol alan NAMPT (Nicotinamide phosphoribosyl transferase) olarak nitelendirilmiş ve bir enzim olarak kabul edilmiştir [75]. Visfatin genellikle visceral ve omental yağ dokusundan eksprese olmaktadır. Ayrıca deri altı yağ dokusundan da çok az miktarda visfatin salındığı görülmektedir [76]. Visfatinin lökosit ve adipoz dokudan ayrı olarak hepatositlerden [77], fetal zarlar ve kaslardan [78] eksprese olduğunu belirten çalışmalarda bulunmaktadır.

Fukuhara RT-PCR kullanarak tanımladığı Visfatinin subkutanöz yağdan ziyade visseral yağdan eksprese olduğunu belirtmiştir. İnsanda plazma visfatin konsantrasyonları visseral yağ ile pozitif olarak ilişkilendirilirken subkutanöz yağ ile negatif ilişkilendirilmektedir [2]. Visfatin insülinomimetrik bir adipokin olarak rapor edilmesine rağmen, visfatin seviyesi ve insülin duyarlılığı arasında herhangi bir korelasyonun olmadığını ortaya koyan çalışmalar da son dönemlerde bulunmaktadır [5, 79]. Fakat obez bireylerde kilo kaybına bağlı olarak visfatin seviyelerinin azaldığı da ortaya konulmuştur [80, 81].

İnsanlarda plazma visfatin oranı obez bireylerde daha yüksek seviyelerde görülmekte iken [82] buna bağlı olarak kütle vücut indeksi (BMI) ile de ilişkilidir [83]. Nitekim BMI ve visfatin düzeyleri arasındaki ilişkiyi desteklemeyen çalışmalar da bulunmaktadır [84, 85].

Son yıllarda adipoz dokudan salgılanan adipokinlerin, ovaryum ve döllenme üzerine etkileri çalışılmaktadır [3]. Adiponektin ve ovaryum folikülleri arasındaki ilişki, adiponektinin ovaryum hücreleri üzerine etkileri detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur. Adiponektin prostanoit sentezini indüktlemektedir. Adipoz doku, ovaryum fonksiyonu ve döllenme arasındaki potansiyel mekanizmaların birbirine bağlanmasını sağlamaktadır [4].

Yeni bulunan bir adipokin olan visfatinin ovaryumdaki lokalizasyonu, ve genital siklus evrelerindeki rolü bilinmemektedir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, insülin duyarlılığı ile ilgili negatif bulguların ortaya çıkması visfatinin hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın amacı visfatin ekspresyonu ve gonadal eksen arasındaki ilişkiyi ortaya koymak, visfatinin genital siklus fazlarında ovaryumdaki lokalizasyonunu ve Cetrorelix bloke folikulogeneze ki visfatin lokalizasyonunu ortaya koyabilmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Denekler

Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen toplam 40 adet *Rattus norvegicus* (Wistar) türü, dişi sıçanlar kullanıldı. Tüm denekler standart laboratuvar koşullarında standart diyet ve musluk suyu ile beslendi. Kafesleri içerisinde bulunan deneklere deney süresince özel bir diyet uygulanmadı.

3.2. Grupların Oluşturulması

Her bir grupta 8 denek olacak şekilde 5 grup oluşturuldu.

I.grup	II.grup	III.grup	IV.grup	V.grup
Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Diöstrus	Cetrorelix blokaj grubu

Tüm gruplar için, sıçanların vaginal smir takipleri yapılarak genital siklus fazları belirlendi. Smir alınırken rat, kuyruk ve kuyruk kökünden tespit edilip kaldırılarak kafası aşağıya gelecek şekilde tutuldu, vagina %0.2'lik serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra bagetle smir alındı. Vaginal sitolojik bulgular Schaberg 'in siklus değişimlerine bağlı olarak elde ettiği bulgular doğrultusunda ışık mikroskopunda değerlendirildi [86].

3.2.1. Cetrorelix Uygulaması

Vaginal smir takipleri yapılan ratlardan proöstrus fazındaki 8 rat deney grubuna dahil edildi. GnRH antagonisti olan Cetrorelix (Cetrotide 0.25/ Serono, İstanbul) her bir rat için 100 µg/µl olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edildi. 14:00 da enjeksiyon ve 19:00 da [87] dekapitasyon yapılarak deneklerden ovaryum, karaciğer ve kas dokusu örnekleri alındı.

3.3. Dokuların Elde Edilmesi

Tüm gruplarda sağ ovaryum immünohistokimya, sol ovaryum western blot analizleri için alındı. Karaciğerin sol lobu dissekte edildi. Kas dokusu içinde kolay erişim nedeni ile alt ekstremité bacak kaslarından soleus kası tercih edildi. Alınan dokular immunohistokimyasal işlemler için %10 luk formalin solüsyonuna, SDS-Page Western blot işlemi için ise sıvı nitrojene alınarak -80 °C deki derin dondurucuya yerleştirildi.

3.4. İmmünohistokimyasal Gözlemler:

Parafin bloklardan alınan 5µm kalınlığındaki kesitler üzerinde Visfatin proteininin ovaryum, karaciğer ve kas dokusundaki dağılımlarını incelemek amacıyla rutin immunohistokimyasal protokol (*aşağıda belirtildiği gibi*) uygulandı ve ışık mikroskobu ile incelendi. Ayrıca SDS-Page ve Western blot yöntemi ile protein bantları fotoğraflandırılarak visfatin ekspresyonunun ortaya konulması amaçlandı.

3.4.1. İmmünohistokimyasal Protokol:

5 µm kalınlığındaki parafin kesitler, superfrost lamalar üzerine alınarak bir gece 56 derecelik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildi ve her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra, distile suda çalkalandı ve fosfat tuzu tamponunda (PBS; pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalga fırında yedi dakika muamele edildi ve fırın dışında yirmi dakika soğumaya bırakıldı. Bunu takiben çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile sudan ve PBS'ten geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi. Distile suda çalkalanıp PBS'te yıkanan kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Large Volume Ultra V Blok, Labvision, UK) ile 20 dakika muamele edildi serumun fazlası alınarak kesitler, tavşan poliklonal Visfatin-1(C-term) (Abbiotec, Katolog No:250539) ile 1:100 dilüsyon oranında, tavşan poliklonal Rabbit Anti-visfatin (Phoenix, (H-003-084) ile 1:200 dilüsyon + 4°C'de gece boyu inkübe edildi.

Kontrol kesitlerine primer antikor yerine PBS uygulandı. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı. Daha sonra sırasıyla, 20 dakika biyotinli sekonder antikor (Dako, Glostrup, Denmark) ve 15 dakika streptavidin-peroksidaz kompleksi ile inkübasyon yapıldı. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa beşer dakika yıkama yapıldı. Ardından sinyali geliştirmek için dokular üç dakika Diamino benzidin (DAB) kromojeni (Ultravision Detection system, Labvision, UK) ile muamele edildi ve musluk suyunda yıkandı. Dokular Mayer'in Hematoksilen'inde (Dako, Glostrup, Denmark) 6-7 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Boyanmış kesitler Zeiss-Axioplan ışık mikroskobunda değerlendirilerek fotoğraflandırıldı.

3.4.2. SDS - Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Western Blot Metodu:

Tüm gruplara ait doku örnekleri, 0.2 gr dokuya 600ml lysis buffer ve 10 ml proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde inkübe edilerek sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Deneklerden alınan ovaryum, karaciğer ve kas dokuları 15000 g'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları -20°C'de saklanmak üzere, protein lizatlari hazırlandı. Dokuların içerdiği protein miktarları BCA kiti kullanılarak tespit edildi. Elektrofrezden önce, 100°C'deki suda örnekler 5 dakika kaynatıldı. Jel elektrofrez için %10'luk poliakrilamid jel hazırlandı. Her kuyucuğa 20 mikrolitre örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde konularak ve Mini protean

sistem IV tankının içine yerleştirildi. Mini protean sistem IV tankına elektroforez solusyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika elektroforez edildi.

Proteinler jelde yürürken, PVDF membran üstte ve altta 3'er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlanarak, PVDF membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean IV sistemindeki tank blot içerisine alındı. Mini protean IV tankına transfer solusyonu eklenerek +4 C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, Tris tuz solusyonu (TBS) ile hazırlanan % 5'lik yağsız kuru süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklama solusyonuna ayrıca % 0.1 Tween-20 ilave edildi. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solusyonu içinde dilue edilmiş olan visfatin primer antikor (Abbiotec, Katolog No:250539) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solusyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solusyonu ile dilue edilmiş horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solusyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı. Film developer ve fiksatif solusyondan geçirilerek, distile su ile yıkanıp kurutuldu.

3.5. İstatistiksel Analiz

3.5.1. Semikantitatif Değerlendirme

Tüm gruplarda pozitif immunoreaktif hücrelerin immunboyanma yoğunlukları semikantitatif olarak (0): Negatif; (+/-): zayıf pozitif; +: Pozitif, ++: Kuvvetli pozitif; +++: Çok kuvvetli pozitif; şeklinde değerlendirildi. Primordiyal ve primer foliküllerde oosit sitoplazması, Graff foliküllerinde oosit sitoplazmasına ek olarak granüloza hücrelerinin de immünboyanması dikkate alınmıştır. Corpus luteumda ise luteal hücrelerin visfatin immünreaksiyonu dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır.

3.5.2. H Score Analizi

Çalışma gruplarındaki visfatin immünreaksiyonun değerlendirmesi H score analizi ile yapıldı. Kısaca, visfatin ile immün boyanan corpus luteum kesitlerinde Zeiss-Axioplan mikroskop kullanılarak değerlendirme yapıldı. Beş farklı alan belirlenerek X40 büyütmede immünboyanma şiddetine bakıldı. Analiz iki araştırmacı tarafından gerçekleştirildi [88]. Aynı zamanda gruplar arasında yapılan Student t test sonuçlarına göre anlamlı farklar ortaya konuldu.

BULGULAR

4.1. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.1.1. Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi

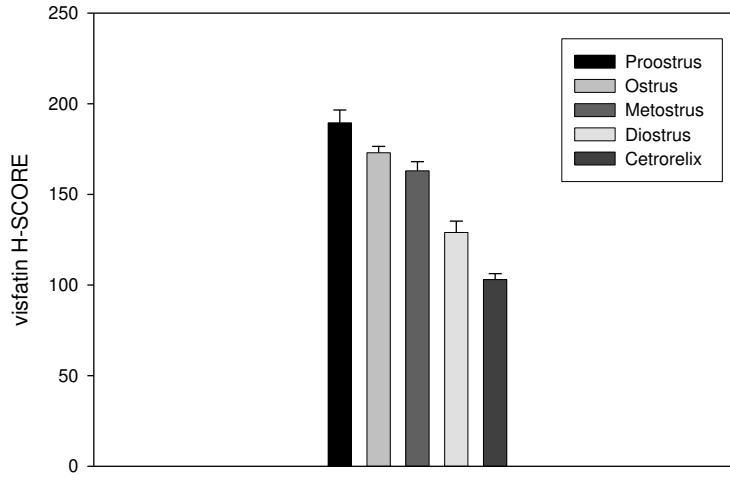
Yaptığımız immunohistokimyasal boyamalar sonucunda çalışılan visfatin proteininin immunboyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirilerek kontrol ve deney gruplarındaki immunboyanma yoğunlukları Tablo 1 de özetlenmiştir.

	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Diöstrus	Cetrorelix
Primordiyal	++	+	+	+	+/-
Primer	++	+	+	+	+
Graaf	++	+++	++	+	+
Corpus Luteum	+++	++	++	+	+/-

Tablo 4.1.1.: Sikluslar arası ve cetrorelix grubuna ait visfatin ekspresyonunun semikantitatif değerlendirmesi.(0: Negatif, +/-: Zayıf pozitif; +: Pozitif; ++: Kuvvetli pozitif; +++:Çok kuvvetli pozitif)

4.1.2. Bulguların H-SCORE Analizi

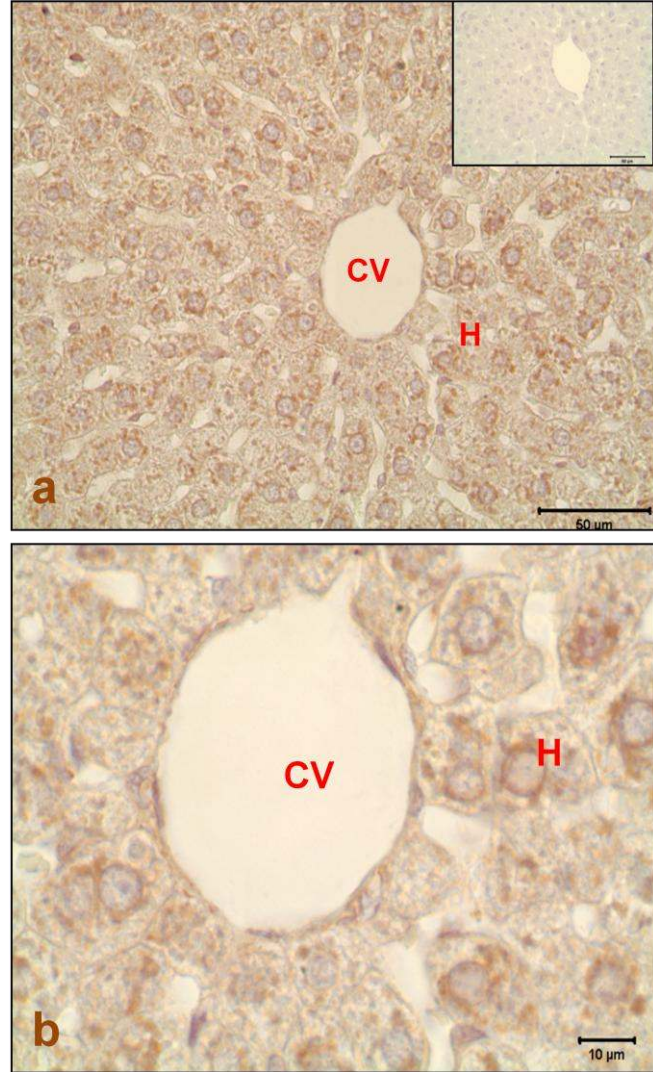
Visfatin immünboyanma pozitif hücre sıklığı H score analizine göre değerlendirildiğinde Proöstrus grubunda en yoğun boyanmanın olduğu ve boyanma yoğunluğunun sırasıyla östrus, metöstrus ve diöstrus olacak şekilde azaldığı ortaya konulmuştur. İstatiksel olarak östrus grubu ile metöstrus grubu arasında anlamlı bir fark olmamakla beraber diğer gruplar arasında anlamlı bir fark ortaya konulmuştur. Değerlendirme sonucunda özellikle cetorelix grubunda oldukça düşük immünreaksiyon gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1.2. Genital siklusa ve cetorelix grubuna ait visfatin ekspresyonunun H Score analizi.

4.1.3. Karaciğer Dokusu Visfatin İmmunboyanmalarının Sonuçları

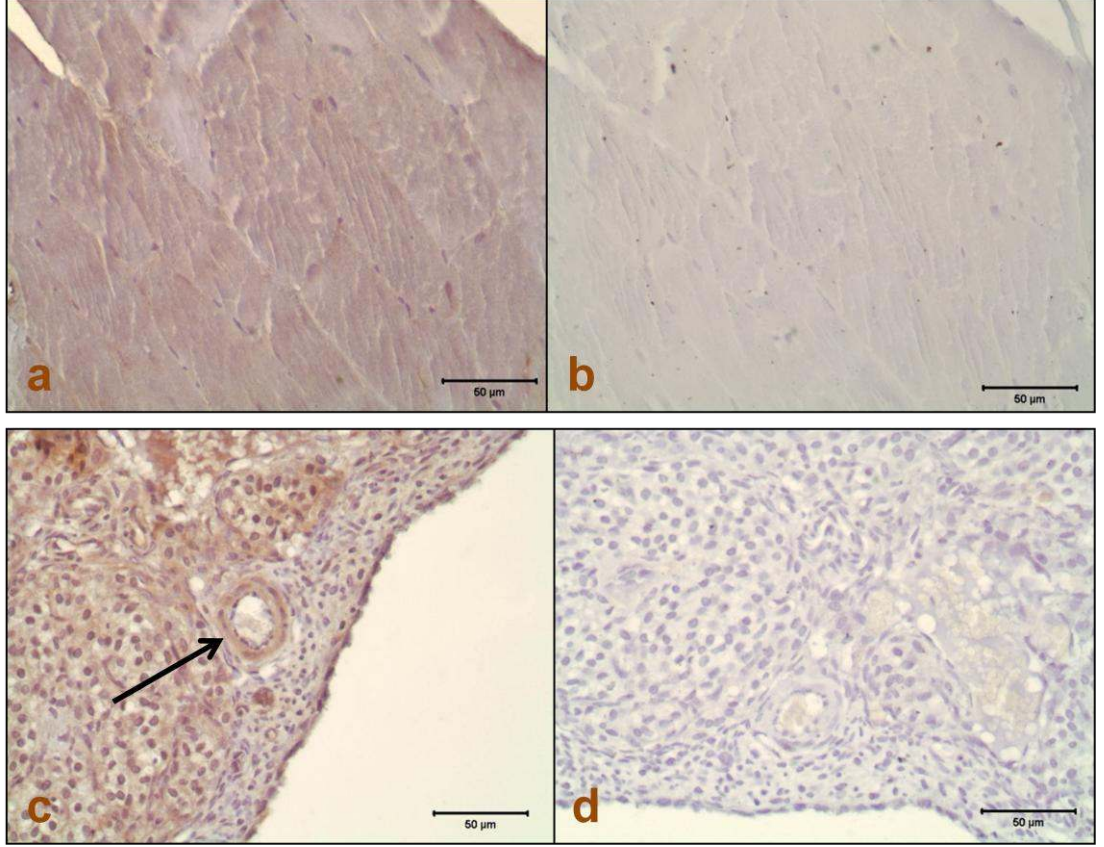
Proöstrus grubuna ait deneklerden alınan karaciğer dokusundaki yaygın visfatin immunreaksiyonu hepatosit sitoplazmalarında perinükleer yerleşimli olarak gözlemlendi. Karaciğer lobülleri vena centralise göre merkezden perifere doğru Z3-Z2-Z1 olarak bölgelere ayrılarak değerlendirilme yapıldığında anlamlı bir farkın olmadığı ve visfatin ekspresyonunun homojen dağılım gösterdiği ortaya konuldu (Şekil 4.1.3 a,b). Negatif kontrol kesitlerde visfatin immünreaksiyonu gözlenmedi (Şekil 4.1.3 a, küçük panel)



Şekil 4.1.3. (a) Proöstrus grubuna ait karaciğer dokusundaki visfatin ekspresyonu x40. **(b)** Proöstrus grubuna ait karaciğer dokusundaki visfatin ekspresyonu. X 100. Negatif kontrol kesiti (Küçük panel), Santral ven (CV), Hepatositler (H).

4.1.4. Çizgili Kas ve Düz Kas Visfatin İmmunboyanmalarının Sonuçları

Proöstrus grubuna ait deneklerin bacak bölgesinden alınan soleus kası ile ovaryum damarlarının tunica media tabakasına ait düz kas hücrelerinde visfatin immunreaksiyonu gözlemlendi.(Şekil 4.1.4.a,c). Her iki doku örneklerinin negatif kontrol kesitlerinde immünreaksiyon görülmedi.(Şekil 4.1.4.b,d).



Şekil 4.1.4. (a) Proöstrus grubuna ait deneklerin M.soleus kasındaki visfatin ekspresyonu X20. (b) Negatif kontrol kesiti. X20. (c) Proöstrus grubuna ait deneklerin ovaryum kesitlerindeki damarların tunica media tabakasına ait düz kas liflerindeki visfatin ekspresyonu (ok). X20 d: Negatif kontrol kesiti X20.

4. 1.5. Proöstrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmünboyanmalarının Sonuçları

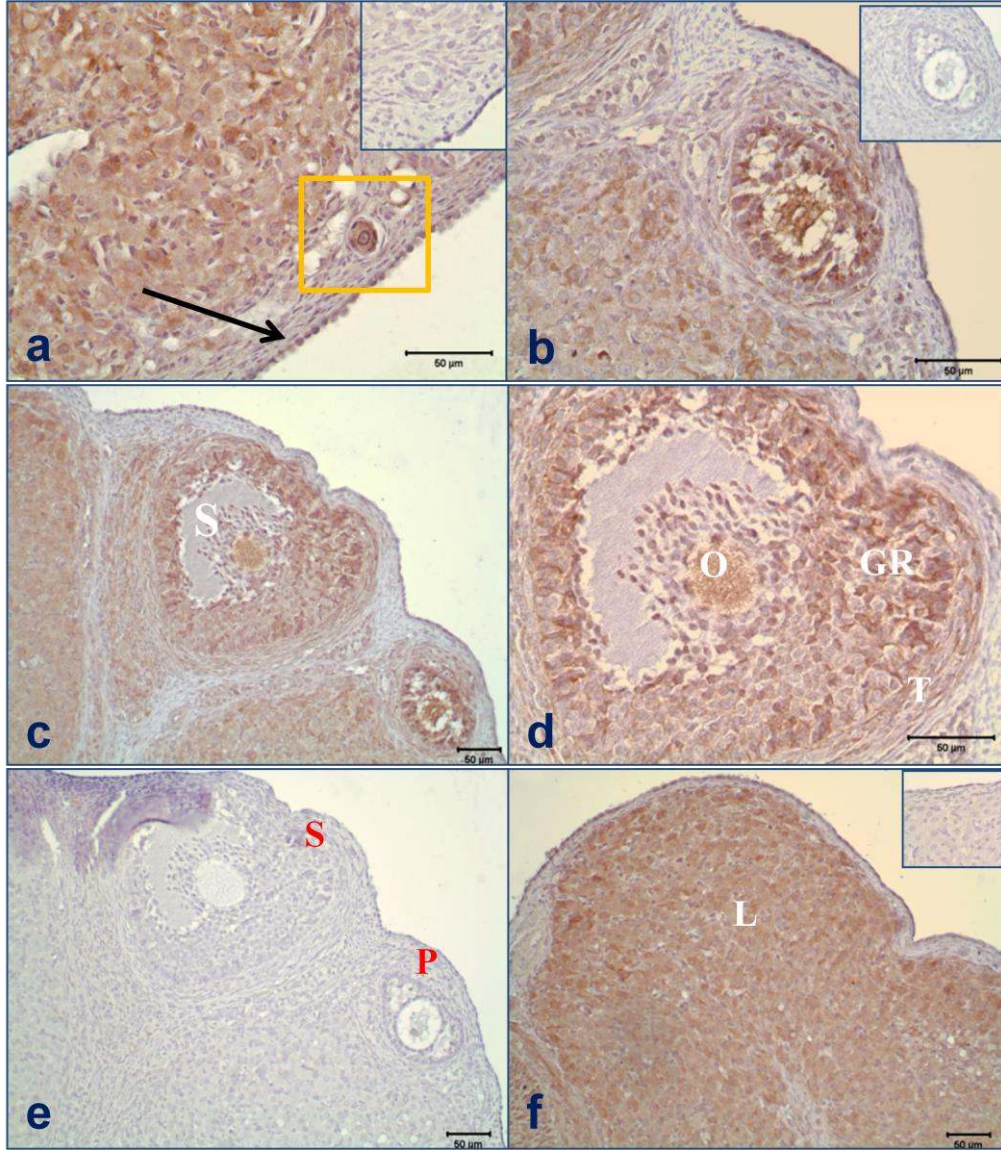
Proöstrus evresindeki bir primordiyal folikül incelendiğinde immünreaksiyonun yoğun olduğu gözlemlendi. Bu foliküllerin çevresini saran yassı granüloza hücre tabakası net izlenmekle beraber sitoplazmalarında immünreaksiyon belirgin değildi. Yüzey epiteline de pozitif immünreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.1.5.a).

Primer folikül incelendiğinde foliküllerin oosit sitoplazmalarında reaksiyon gözlemlenirken granüloza hücrelerinde daha yoğun reaksiyon görülmekteydi (Şekil 4.1.5.b-c).

Graaf foliküllerde oosit sitoplazmaları benzer immünreaksiyon gösterirken, granüloza hücrelerinin kumulus ooforus ve corona radiata tabakalarında heterojen bir boyanma gözlemlendi. Teka interna tabakasına baktığımızda oldukça yoğun bir visfatin immünreaksiyonu söz konusu idi (Şekil 4.1.5.c-d).

Proöstrus grubu kesitlerde tüm luteal hücrelerde şiddetli bir immünboyanma gözlemlendi. İmmünreaksiyonun yüzey epiteline yaklaştıkça daha da arttığı görüldü (Şekil 4.1.5.f).

Proöstrus grubu negatif kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmedi (Şekil 4.1.5.e ve küçük paneller) .



Şekil 4.1.5. Proöstrus grubuna ait ovaryumlarda visfatin immün boyanmaları. a: primordiyal folikül (turuncu panel), yüzey epiteli (ok) 40X. b: primer folikül c: sekonder folikül 20X, d: sekonder folikül 40 X. e: Primer ve sekonder folikül negatif kesiti 20X. f: Corpus luteum 20X. Negatif kontrol kesitleri (küçük panel). Oositler (O), Granüloza hücreleri (GR), Teka hücreleri (T), Luteal hücreler (L), Primer folikül (P), Sekonder folikül (S)

4. 1.6. Östrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmünboyanmalarının Sonuçları

Östrus evresindeki bir primordiyal folikül incelendiğinde immünreaksiyonun pozitif olduğu gözlenmektedir. (Şekil 4.1.6.a).

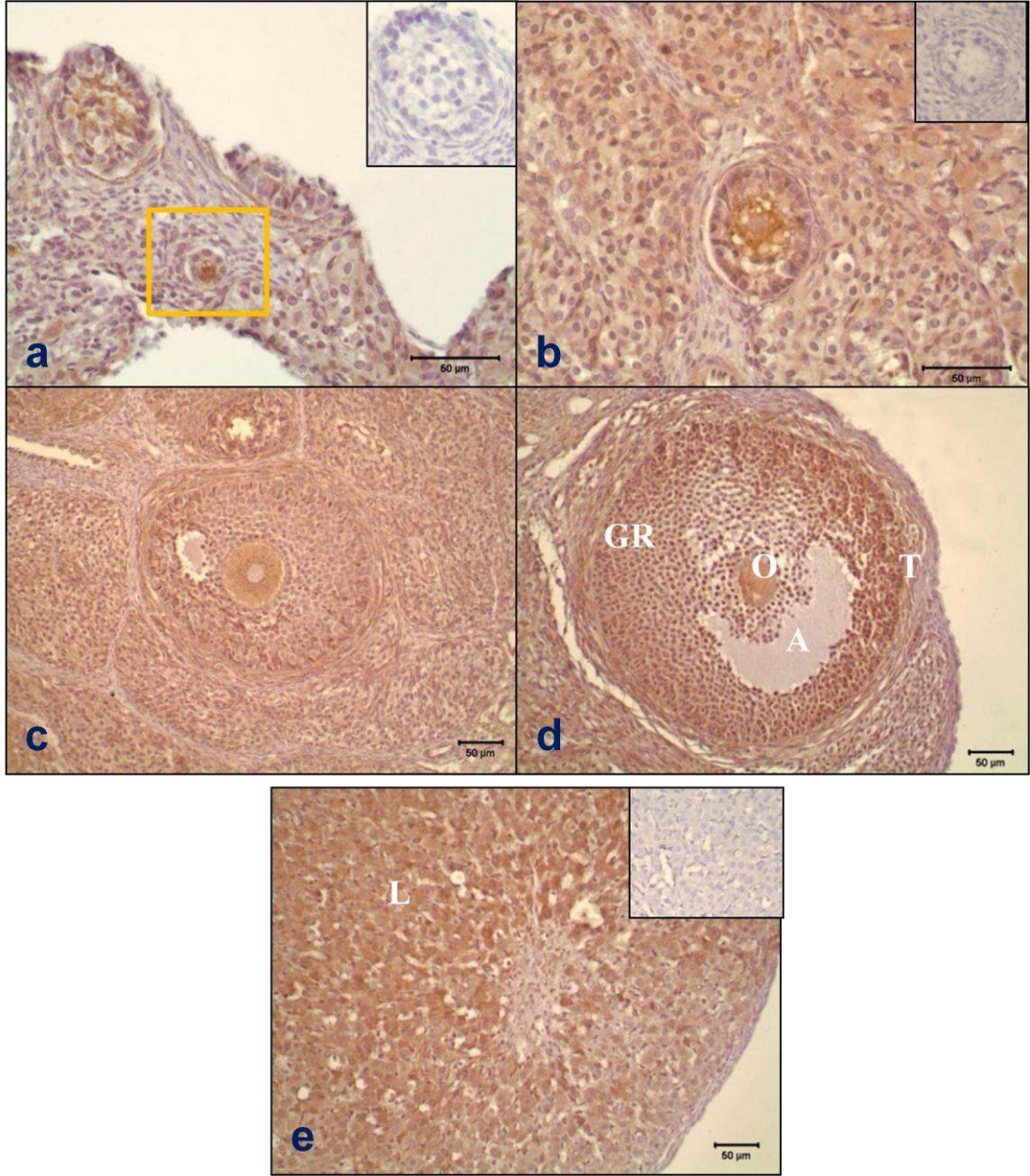
Östrus evresindeki primer bir folikül incelendiğinde foliküllerin oosit sitoplazmalarında reaksiyon gözlemlenirken granüloza hücrelerinde ise oldukça zayıf bir reaksiyon vardı. (Şekil 4.1.6.b).

Gelişmekte olan foliküllerde oosit sitoplazmaları , granüloza hücreleri ve teka interna tabakasına baktığımızda oldukça yoğun bir visfatin immünreaksiyonu söz konusu idi (Şekil 4.1.6.c).

Graaf aşamaya ulaşmış foliküllerde tek bir antral boşluğun folikül sıvısı ile dolu olduğu ama visfatine bağlı immünreaksiyon göstermediği görüldü. Oosit sitoplazmaları immünreaksiyon gösterirken oositin çevresini saran granüloza hücrelerinin kumulus ooforus ve corona radiata tabakalarında da homojen bir immünboyanma gözlemlendi.Teka interna tabakasında da oldukça yoğun bir immünboyanma görülmekteydi (Şekil 4.1.6.d).

Östrus grubu kesitlerde tüm luteal hücrelerde şiddetli bir immünboyanma görülürken immünreaksiyon yüzey epiteline yaklaştıkça daha da şiddetlendi (Şekil 4.1.6.e).

Östrus grubu negatif kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlemlenmedi (Şekil 4.1.6.a,b,e küçük paneller) .



Şekil 4.1.6. Östrus grubuna ait ovaryumlarda visfatin immün boyanmaları. a: primordiyal folikül (turuncu panel), yüzey epiteli (ok) 40X. b: primer folikül 40 X c: sekonder folikül 20X, d: graaf folikülü 20 X e: Corpus luteum 20X. Negatif kontrol kesitleri (küçük panel). Oositler (O), Granüloza hücreleri (GR), Teka hücreleri (T), Antrum (A), Luteal hücreler (L).

4. 1.7. Metöstrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmünboyanmalarının Sonuçları

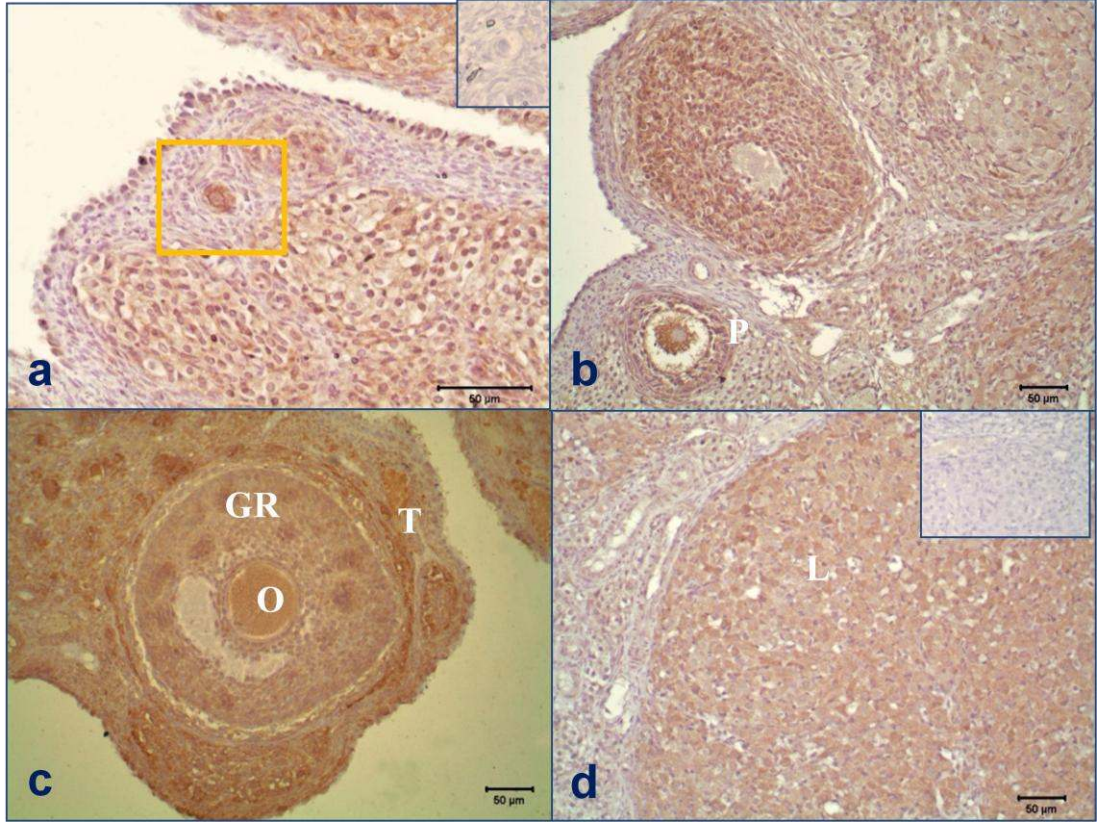
Metöstrus evresindeki bir primordiyal folikül incelendiğinde immün reaksiyonun pozitif olduğu gözlenmektedir. Bu foliküllerin çevresini saran yassı granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında immünreaksiyon belirgin değildi. (Şekil 4.1.7.a) .

Primer folikül incelendiğinde foliküllerin oosit sitoplazmalarında ve granüloza hücrelerinde zayıf bir immünreaksiyon reaksiyon vardı (Şekil 4.1.7.b) .

Graaf foliküllerde oosit sitoplazmaları, granüloza hücrelerinin kumulus ooforus, corona radiata ve teka interna tabakalarında preantral foliküllere nazaran daha yoğun bir visfatin immünreaksiyonu gözlemlendi. (Şekil 4.1.7.c) .

Metöstrus grubu kesitlerde tüm luteal hücrelerde yoğun bir immünboyanma gözlemlendi (Şekil 4.1.7.d).

Metöstrus grubu negatif kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmedi (Şekil 4.1.7.a,d- küçük paneller) .



Şekil 4.1.7. Metöstrus grubuna ait ovaryumlarda visfatin immün boyanmaları. a: primordiyal folikül (turuncu panel), 40X. b: primer folikül (P) c: Graaf folikül 20X, d: Corpus luteum 20X. Negatif kontrol kesitleri (küçük panel). Oositler (O), Granüloza hücreleri (GR), Teka hücreleri (T), Luteal hücreler (L).

4. 1.8. Diöstrus Grubu Ovaryumların Visfatin İmmünboyanmalarının Sonuçları

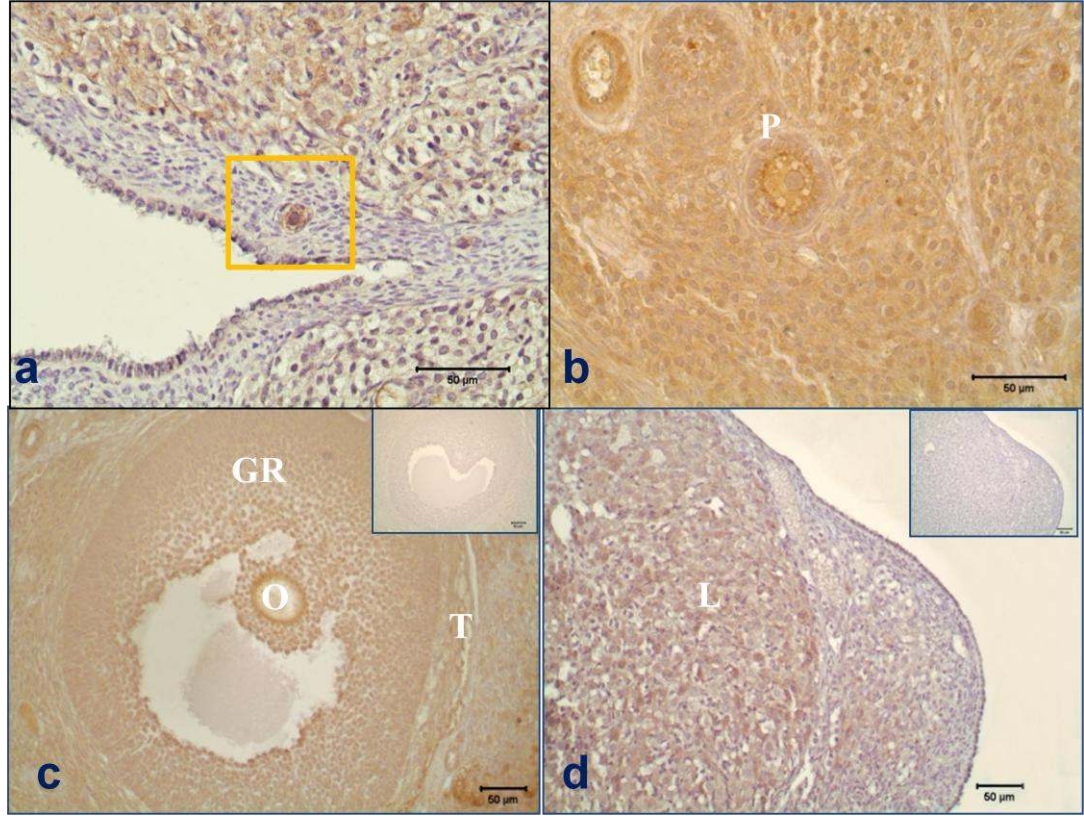
Diöstrus evresindeki bir primordiyal folikül incelendiğinde immün reaksiyonun pozitif olduğu gözlenmektedir. (Şekil 4.1.8. a) .

Primer folikül incelendiğinde foliküllerin oosit sitoplazmalarında reaksiyon gözlemlenirken granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında oldukça zayıf visfatin immünreaksiyonu vardı (Şekil 4.1.8.b) .

Graaf foliküllerde oosit sitoplazmaları, granüloza hücrelerinin kumulus ooforus ve corona radiata tabakaları ve teka interna tabakasında zayıf visfatin immünreaksiyonu söz konusu idi (Şekil 4.1.8.c) .

Diöstrus grubu kesitlerde tüm luteal hücrelerde zayıf bir immünboyanma gözlemlendi (Şekil 4.1.8. d).

Diöstrus grubu negatif kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmedi (Şekil 4.1.8. c, d- küçük paneller) .



Şekil 4.1.8. Diöstrus grubuna ait ovaryumlarda visfatin immün boyanmaları. a: primordiyal folikül (turuncu panel) 40X, b: primer folikül (P) 40X, c: Graaf folikül 20X, d: Corpus luteum 20X. Negatif kontrol kesitleri (küçük panel). Oositler (O), Granüloza hücreleri (GR), Teka hücreleri (T), Luteal hücreler (L).

4. 1.9. Proöstrus ve Cetrorelix Gruplarının Visfatin İmmünboyanmalarının Karşılaştırılması

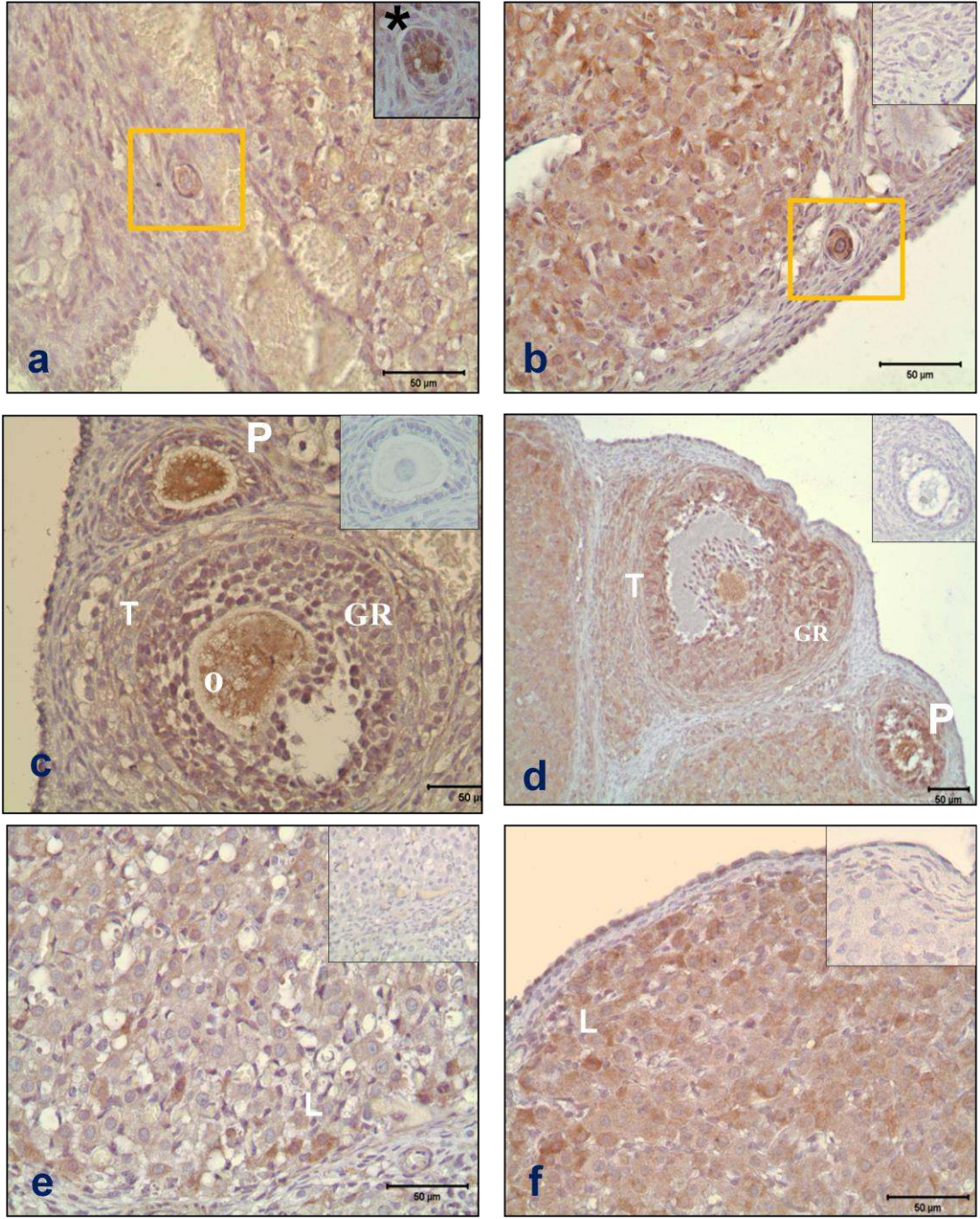
Proestrus evresindeki bir primordiyal folikül incelendiğinde immünreaksiyonu yoğun olarak gözlemledik. Cetrorelix grubunda, primordiyal folikül sitoplazmaları daha zayıf immünboyanma göstermektedir (Şekil 4.1.9.a-b) .Yassı granüloza hücreleri gelişimle beraber kübikleşmeye başladıkça stoplazmalarının visfatine karşı daha yoğun immünreaksiyon gösterdiğini gözlemledik (Şekil 4.1.9.a- küçük panel)

Primer folükül incelendiğinde her iki gruptaki foliküllerin oosit sitoplazmalarında benzer reaksiyon gözlemlenirken proöstrus grubuna ait kesitlerde granüloza hücrelerinde daha yoğun reaksiyon vardı (Şekil 4.1.9.c-d) .

Graaf aşamaya ulaşmış foliküllerde oosit sitoplazmaları benzer immünreaksiyon gösterirken proöstrus grubunda granüloza hücrelerinin kumulus ooforus ve corona radiata tabakalarında heterojen bir boyanma gözlemlendi. Cetrorelix grubunda ise zayıf bir boyanma vardı. Her iki grubun teka interna tabakasına baktığımızda cetrorelix grubunda immünreaksiyon çok zayıf iken proöstrus grubunda oldukça yoğun bir immünboyanma gözlenmekteydi (Şekil 4.1.9.c-d).

Cetrorelix grubuna ait corpus luteum alanlarında az sayıda hücre ve zayıf bir immünboyanma söz konusu iken proöstrus grubunda ise tüm luteal hücrelerde yoğun bir immünboyanma gözlemlendi. İmmünreaksiyon yüzey epiteline yaklaştıkça daha da şiddetlendi (Şekil 4.1.9.e-f)

Her iki grubun negatif kontrol kesitlerinde immünboyanma gözlenmedi (Şekil 4.1.9.b-e küçük paneller) .



Şekil 4.1.9. a, c, e Cetrorelix grubuna ait ovaryumlarda visfatin immün boyanmaları. a: primordiyal folikül (turuncu panel) 40X. Kübik primordiyal folikül (*). c: primer folikül (P) ve sekonder folikül, e: Corpus luteum . Negatif kontrol kesitleri (küçük panel). Oositler (O), Granüloza hücreleri (GR), Teka hücreleri (T), Luteal hücreler (L).

b, d, f Proöstrus grubuna ait ovaryumlarda visfatin immün boyanmaları. b: primordiyal folikül (turuncu panel) 40X. Kübik primordiyal folikül (*). d: primer folikül (P) ve sekonder folikül, f: Corpus luteum . Negatif kontrol kesitleri (küçük panel). Granüloza hücreleri (GR), Teka hücreleri (T), Luteal hücreler (L).

4. 1.10. SDS-PAGE Western Blot Sonuçları

İmmünohistokimyasal bulgularımızı desteklemesi amacıyla yapmayı düşündüğümüz Western Blot çalışmalarımızda deney prosedürü uygulanmasına rağmen antikor çalışmadı ve visfatin düzeyini göstermeyi amaçladığımız bantları ortaya koyamadık.

TARTIŞMA

Adipoz dokunun sadece enerji kaynağı değil aynı zamanda, birçok sitokin ve yağ dokusu kaynaklı peptidleri salgılama yeteneği olan aktif bir organ olması nedeniyle, yeni metabolik belirteçlerin varlığını araştırmak için çalışmalara kaynak oluşturmaktadır. Özellikle artan yağ kitlesi ile tip 2 diyabet, metabolik sendrom, hipertansiyon ve astım gibi pek çok hastalığın ortaya çıkması bu durumu ispatlamaktadır. Yağ dokusunun, salgıladığı adipokinlerin miktarındaki değişiklikler sonucunda bu hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir [89].

Visfatin, adipositokin ailesinin en yeni üyelerinden biridir. İlk olarak 1994 yılında lenfositler tarafından üretilen bir sitokin olarak tanımlanmış ve pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF) olarak rapor edilmiştir [90]. Daha sonraları NAD biyosentezinin sınırlandırıcı enzimlerinden biri olarak tanımlanmış ve NAMPT olarak isimlendirilmiştir [77, 78]. 2004 yılında Fukuhara ve ark. tarafından 52 kDa ağırlığında 491 aminoasitlik gen dizilimine sahip bir protein olduğu bulunmuş ve yağ dokusundan sentezlendiği düşünülerek (visseral fat) visfatin olarak isimlendirilmiştir [2]. Yayımlanan ilk çalışmaların verilerinde, insanlarda ve farelerde obezite gelişimi sırasında plazma visfatin düzeyinin arttığı, hücre kültürlerinde insulin-mimetik etki gösterdiği ve farelerde plazma glikoz düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir. Bu bulgular, insulin direnci ve beraberindeki metabolik hastalıkların patogeneğini açıklamada, alternatif tedavi seçeneklerini yaratmada visfatinin yeni bir umut olabileceği fikrini doğurmuştur [91].

Visfatin hormon gibi değil parakrin-otokrin ajan gibi rol oynamaktadır. Araştırmacılar immünblot analizi sonucunda Visfatini 52 kDa ve 17 kDa olmak üzere 2 bant halinde rapor etmişlerdir. 17 kDa olan yapının henüz isimlendirilmemiş bir visfatin metaboliti ya da daha küçük bir formu olabileceğini bildirmektedirler [92, 93].

İnsülin dirençliliğine bağlı tip 2 diyabet [79, 94], obezite [80, 84], gestasyonel diabetes mellitus [95, 96] gibi bir takım hastalıklarda dolaşımdaki visfatin seviyeleri incelenmiştir. Periferik visfatin konsantrasyonunun obez bireylerde yükseldiği görülürken farklı sonuçlar da söz konusudur. Tip 2 diyabetli hastalarda kandaki visfatin konsantrasyonunda artış [97], azalma [98] ve herhangi bir değişikliğin olmadığını [99, 100] gösteren farklı sonuçlar ortaya konulmuştur.

Obez ve diyabet hastalar ile hamile bireylerde visfatin serum seviyelerinin arttığını rapor eden çalışmalar tespit edilmiştir. Tartışmalı sonuçlar burada da karşımıza çıkmaktadır. Bazı araştırmacılar gruplar arasında önemli bir farkın

olmadığını rapor etmişlerdir [80, 101, 102]. Hamile bireylerde serum visfatin seviyeleri yüksek iken obez ve zayıf kontrol grubu arasında önemli bir farkın olmadığını belirtmişlerdir.[93].

Sağlıklı bir kadının normal hamileliğinde insülin duyarlılığına bağlı olarak adipoz dokuda artış görüldüğü bilinmektedir. Hamileliğin ilk dönemindeki serum visfatin oranları, 2. dönemdeki insülin duyarlılığını işaret ederken, 1.dönemdeki vücut yağ oranı, 2. dönemdeki insülin aktiviteleri ile negatif ilişkilendirilmektedir [92].

Sıçanlarda yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre mRNA gestasyonun 21.gününde visfatin seviyesi yükselirken, 7 ve 14. günlerde visfatin görülmemektedir. Eğer visfatinin glukoz metabolizmasına bir etkisi varsa hamileliğin son zamanlarında görülmesi gerekmektedir [103].

Adiponektin, visfatin/PBEF, omentin ve vaspin adı verilen dört adipokinin insülin duyarlılığını artırdığı için yararlı olarak nitelendirebiliriz. Adiponektinin ovaryum ve plasentada fonksiyonel rol oynadığı bilinmektedir. Folikülogenezin geç safhalarını ve ovaryum foliküllerinde insülin ve gonadotropinleri direkt olarak etkilediği dair güçlü deliller bulunmaktadır. Visfatin/PBEF, omentin ve vaspin'in üremedeki rolü henüz ortaya konulmamıştır. Bu sitokinlerinde ovaryum fonksiyonun üzerinde bir takım mekanizmalarda rol almaları muhtemeldir. [3].

Visfatin ile ilgili çalışmalar gözden geçirildiğinde elde edilen bulguların birbirleriyle çeliştiği görülmektedir. Çalışmaların neredeyse tamamı sistemik kandan serum seviyelerinde ölçüm yolu ile elde edilen bulgulardır. Eğer visfatin lokal etki gösteren bir protein ise dolaşımdaki kanın visfatin seviyesini ölçmek yeterli ve sağlıklı bir yöntem değildir. Bu nedenle visfatin ile ilgili olarak farklı bulgular ortaya çıkabilmektedir [104]. Bu farklı sonuçlar daha spesifik, doku odaklı histolojik çalışmalara gereksinim olduğunu açıkça ifade etmektedir. Bu çalışmanın sonuçları ovaryum Visfatin korelasyonunun ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilen ilk doku odaklı bilimsel verilerdir.

Bu çalışmanın amaçlarından birisi de östrus siklusuna bağlı olarak visfatin ekspresyonunu ortaya koymaktır. Primordiyal folikül gelişimi gonadotropinden bağımsızdır ve ilk olarak parakrin ve endokrin faktörlerle sağlanır. Bu faktörler oositin kendisi ve etrafındaki granuloza hücreleri tarafından üretilmektedir ve organizasyon granuloza hücresi-oosit ilişkisi ile sağlanır. Çalışmadaki bulgular visfatin ekspresyonunun bütün folikül evrelerinde gözlemlendiğini ortaya koymaktadır. Primordiyal foliküllerin oosit sitoplazmalarında, primer foliküllerin oosit sitoplazmaları ve kübik granuloza hücrelerinde, antral foliküllerin oosit sitoplazmaları ve granuloza hücrelerine ek olarak teka tabakasında da visfatin immünreaksiyonu gözlemlendi. Primordiyal foliküllerde visfatin varlığının tespiti bu adipokinin parakrin ve otokrin fonksiyonuna bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bilindiği üzere, foliküler evrenin başında FSH salınımının artışı primer foliküllerin büyümesini uyarır ve granüloza hücrelerinde ki FSH reseptörlerinin sayısını artırır. Böylece granüloza hücreleri çoğalmaya başlar. Ortamdaki yüksek östrojen düzeyi FSH'ı azaltırken, LH'ı artırır ki LH reseptörleri teka interna hücrelerinde bulunur [16]. Elde edilen bulgulara göre granüloza hücrelerinde gözlemlenen immünreaksiyon visfatin ile FSH arasındaki, teka tabakasında gözlemlenen immünreaksiyon ise visfatin ile LH arasındaki bağlantıyı ifade etmektedir. Çalışmamızda en yoğun visfatin immünboyanması proöstrus grubu deneklerden elde edilen kesitlerde görülmekteydi. Östrus, metöstrus ve diöstrus grubu deneklerden elde edilen kesitlerde de immünreaksiyon ortaya konuldu. Çalışma sonucu elde edilen semikantitatif değerlendirme göz önüne alındığında FSH ve LH'un pik yaptığı östrus siklusundaki Graaf foliküllerinde, hem oosit sitoplazmasında hemde granüloza hücreleri ile teka tabakasında en şiddetli visfatin immünreaksiyonunu gözlemledik. Bu bulgular ışığında, visfatinin de adiponektin gibi folikülogenezde fonksiyonel rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Polikistik over sendromlu hastalarda (PCOS) yapılan bir çalışmada lutein hormon (LH), folikül stimulan hormon (FSH), prolaktin (PRL), testosteron (T), $\Delta 4$ -androstenedion ($\Delta 4A$), dehidroepiandrosterone sülfat (DHEA-S), 17α -OH-progesteron, SHBG, glukoz, insülin ve visfatin seviyeleri ölçülerek, obezite hastaları ve normal kilolu kontrol gruplar karşılaştırılmıştır. LH seviyeleri PCOS' lu hastalarda daha yüksek çıkarken FSH ve PRL seviyeleri arasında bir fark gözlemlenmemiştir. T, $\Delta 4A$, DHEA-S, 17α -OH-progesteron seviyeleri PCOS' lu hastalarda daha yüksek çıkmaktadır. 3 grubun glukoz seviyeleri arasında bir fark gözlemlenemezken, plazma visfatin seviyeleri ve LH seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğu ortaya konulmuştur. SHBG ise diğerlerinden bağımsız olan tek değerdir. Sonuç olarak PCOS lu zayıf bayanlarda normal kontrol grubuna oranla daha yüksek visfatin seviyeleri gözlemlenmektedir. Yükselen visfatin değerleri PCOS ile ilişkilendirilen hiperinsülinemia ile direkt olarak ilgili değildir. Plazma visfatin ve LH değerleri arasında korelasyon PCOS'un nedenlerinden olan hipofiz-hipotalamus-ovaryum axisinin arasındaki ilişkiyi düşündürmektedir [105].

Bu düşünce doğrultusunda GnRH antagonisti olan Cetorelix kullanılarak dışarıdan folikülogenez kontrol altına alınarak Visfatin ve hipofiz-hipotalamus-ovaryum axisi arasındaki ilişki ortaya konuldu. Cetorelix muamelesi sonucu FSH ve LH seviyeleri azaldığında [87] visfatinin de immünreaksiyonun azalması beklenmekteydi. Sonuçlar hipotezimizi destekler nitelikteydi. Hem semikantitatif değerlendirme hem de H Score analizi sonucu Cetorelix grubunda visfatin immünreaksiyonunun en zayıf düzeyde olduğunu gözlemledik. Cetorelix uygulanmış deneklerde ki anlamlı ($p<0.05$) H-Score azalışı corpus luteum alanlarındaki androjen biyosentezinin de etkilendiğini göstermektedir. Deney modelimiz çerçevesinde bulgularımızın biyokimyasal parametreler ile desteklenmesinin yeni çalışma alanları yaratacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmanın karaciğer kesitlerinden elde edilen sonuçlar, bu proteinin karaciğerde de eksprese olduğunu, özellikle granüllü endoplazmik retikulum alanları olan perinükleer alanlardaki visfatin immünreaksiyonu, bu proteinin yoğun bir şekilde bu

bölgelerden salındığını düşünmemize yol açtı. Bulgularımız literatürü destekler nitelikte idi.

Visfatin, vasküler disfonksiyon ve bazı metabolik hastalıklar ile ilişkili olarak vasküler düz kaslarda inflamasyona yol açmaktadır [106]. Artan visfatin seviyeleri kolesterol, sigara kullanımı, hipertansiyon, diabet ve obeziteye bağlı olarak koroner arter hastalıkları ve akut koroner sendromlar ile ilişkilendirilmiştir [107]. Visfatinin bağımsız olarak karotis kalınlaşmasına yol açtığı ortaya konulmuştur [108]. Visfatin ekspresyonunun koroner aterosklerozis makrofajlarında arttığı bildirilmiştir. Plak destabilizasyonunda rol alabileceği düşünülmektedir [109]. Aynı zamanda atherosklerotik iskemi reperfüzyon hayvan deney modelinde visfatinin kalbi koruyan bir etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir [110]. Çalışma sonucu ortaya koyduğumuz ovaryum damarlarının tunika media tabakasındaki düz kasların visfatin ekspresyonu literatürü destekler niteliktedir.

Sporcularda, normal bireylerden daha yüksek iskelet kası NAMPT görülmesi ve 3 haftalık egzersiz sonucu normal bireylerin iskelet kası NAMPT seviyelerinin yükselmesi visfatin ve iskelet kası arasında doğru orantının olduğunu ortaya koymaktadır [78]. Çalışmamızda ki M.soleus kasından alınan örneklerin visfatin immünboyanmaları kas dokusundaki visfatin lokalizasyonun ortaya koymaktadır.

SONUÇLAR

1. Visfatin ekspresyonu genital siklus evrelerine bağılı olarak değışim göstermektedir. Foliküllerin oosit sitoplazmalarında, primer ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka interna tabakasında visfatin immünreaksiyonu pozitifdir. Corpus luteum, luteal hücrelerinde visfatin immünreaksiyonu oldukça yoğundur.
2. Primordiyal foliküllerdeki visfatin immünreaksiyonu visfatinin otokrin ve parakrin etkisini ortaya koymaktadır.
3. Özellikle Graaf foliküllerdeki visfatin ekspresyonu yoğunluğu FSH ve LH' ın pik yaptığı periyotda visfatinin ekspresyonunda arttığını ortaya koymaktadır.
4. GnRH blokajı sonrasında visfatin immünreaksiyonun azalması visfatinin hipotalama-hipofiz-ovaryum aksisinde potansiyel rol oynadığını düşündürmektedir
5. Karaciğer, çizgili kas ve damar düz kaslarında visfatin lokalizasyonu ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Wisse BE, Kim F, Schwartz MW (2007) Physiology. An integrative view of obesity. Science. 318:928-9.
2. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. Science. 307:426-30.
3. Campos DB, Palin MF, Bordignon V, Murphy BD (2008) The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. Int J Obes (Lond). 32:223-31.
4. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD (2006) Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. Endocrinology. 147:5178-86.
5. Berndt J, Kloting N, Kralisch S, et al. (2005) Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. Diabetes. 54:2911-6.
6. Warwick RW, P.L. Gray's Anatomy. 35th ed. Edinburgh, Longman, 1973, pp. 1351-3.
7. Arıncı K EA (2001) Anatomi. Ankara: Güneş Kitap Evi.
8. Clement PB Anatomy and Histology of the Ovary. In R K (ed.): Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 5 ed. New York, Springer-Verlag, 2002, pp. 649-50.
9. H.Netter F Atlas of Human anatomy. 5th ed, Elsevier, 2010, p. 369.
10. Bayramiçli M (2005) Deneysel Mikrocerrahi, Temel Araştırma Doku ve Organ Nakli Modelleri İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri A.Ş.
11. Sadler TW Medikal Embryoloji. In C B (ed.). 9 ed. Ankara, Palme yayıncılık 2005
12. Robboy SJ Embryology of the female genital tract. In R K (ed.): Bleustein's Pathology of the Female Genital Tract. 5 ed. New York, Springer- Verlag, 2002, pp. 3-31.
13. Moore KL Klinik yönleri ile İnsan Embryolojisi. In Yıldırım M (ed.). 6 ed. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, 2002

14. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 22:255-88.
15. <http://www.d.umn.edu/~lshannon/biology2761/ReproductiveSystems.htm>.
16. Demir R Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Patolojiye Giriş. In Kierszenbaum AL (ed.): *Histology and Cell Biology*. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
17. Junqueira LC, J. Kelley, R.O. Temel Histoloji. 8th ed, Barış Kitabevi, 1998, pp. 423-6.
18. Hebel RS, M.W. (1986) *Anatomy and Embryology of the laboratory Rat.*: Woerthsee: BioMed Verlag.
19. Hafez ESE Female reproductive organs. In: , editor. . In Hafez E (ed.): *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1970, pp. 74-107.
20. Bennett JP, Vickery, B.H., Rats and Mice. In Hafez ESE (ed.): *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia, Lea and Febiger, 1970, pp. 299-315.
21. Gallo RV (1981) Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biol Reprod.* 24:771-7.
22. Fortune JE (1994) Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50:225-32.
23. Gallo RV (1981) Pulsatile LH release during the ovulatory LH surge on proestrus in the rat. *Biol Reprod.* 24:100-4.
24. Oba G, Aslan, S., Kaymaz, M. (2001) Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vajinal sitolojinin kullanılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 48:51-7.
25. Maeda KL, Okhura, S., Tsukamura, H. Physiology of reproduction. In Krinke GJ (ed.): *The laboratory rat*. New York, Academy Press, 2000, pp. 145-76.
26. Ramos SD, Lee JM, Peuler JD (2001) An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *J Appl Physiol.* 91:667-70.
27. Guyton AC Tıbbi Fizyoloji. In H Ç (ed.). 10 ed. İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri, 2001, pp. 1011-3.

28. Tekelioğlu M (2002) Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp AŞ yayınları.
29. King JA, Millar RP (1995) Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol.* 15:5-23.
30. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998) Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:305-9.
31. Grundker C, Gunthert AR, Millar RP, Emons G (2002) Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:1427-30.
32. Tanriverdi F, Gonzalez-Martinez D, Silveira LF, et al. (2004) Expression of gonadotropin-releasing hormone type-I (GnRH-I) and type-II (GnRH-II) in human peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) and regulation of B-lymphoblastoid cell proliferation by GnRH-I and GnRH-II. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 112:587-94.
33. Millar RP (2003) GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 14:35-43.
34. Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A (1971) Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem.* 246:7230-6.
35. Demirel AB, G; Gürkan, T. (2006) GnRH Agonistleri Ve Antagonistleri Güncel Yönleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 13:135-40.
36. Al-Inany HG, Abou-Setta, A.M., Aboulghar, M. (2006) Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews.*
37. Cusan L, Auclair C, Belanger A, et al. (1979) Inhibitory effects of long term treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist on the pituitary-gonadal axis in male and female rats. *Endocrinology.* 104:1369-76.
38. Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA (1992) The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 58:888-96.
39. Barlow DH (1998) GnRH agonists and in vitro fertilization. *J Reprod Med.* 43:245-51.

40. Bouchard P, Garcia E (1987) Comparison of the mechanisms of action of LHRH analogs and steroids in the treatment of endometriosis. *Contrib Gynecol Obstet.* 16:260-5.
41. Karten MJ, Rivier JE (1986) Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev.* 7:44-66.
42. Kiesel L, Runnebaum B (1992) [Gonadotropin releasing hormone and analogs. Physiology and pharmacology]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch.* 32:22-30.
43. Olivennes F (2002) [LH and GnRH antagonists]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 31:1S25-1S7.
44. Diedrich K, Ludwig M, Felberbaum RE (2001) The role of gonadotropin-releasing hormone antagonists in in vitro fertilization. *Semin Reprod Med.* 19:213-20.
45. Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, Schally AV (1995) Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Hum Reprod.* 10:1974-81.
46. Reissmann KR, Udupa KB (1978) Effect of inflammation on erythroid precursors (BFU-E and CFU-E) in bone marrow and spleen of mice. *J Lab Clin Med.* 92:22-9.
47. Albano C, Platteau P, Devroey P (2001) Gonadotropin-releasing hormone antagonist: how good is the new hope? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 13:257-62.
48. Information on cetrorelix acetate injection. 2002.
49. Weiss JM, Oltmanns K, Gurke EM, et al. (2001) Actions of gonadotropin-releasing hormone antagonists on steroidogenesis in human granulosa lutein cells. *Eur J Endocrinol.* 144:677-85.
50. Bokser L, Srkalovic G, Szepeshazi K, Schally AV (1991) Recovery of pituitary-gonadal function in male and female rats after prolonged administration of a potent antagonist of luteinizing hormone-releasing hormone (SB-75). *Neuroendocrinology.* 54:136-45.
51. Saatli B, Kizildag S, Posaci C, et al. (2009) Long-term effects of GnRH agonist, GnRH antagonist, and estrogen plus progesterone treatment on apoptosis related genes in rat ovary. *Fertil Steril.* 91:2006-11.
52. Huirne JA, Lambalk CB (2001) Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet.* 358:1793-803.

53. Pouly JL, Drolet J, Canis M, et al. (1996) Laparoscopic treatment of symptomatic endometriosis. *Hum Reprod.* 11 Suppl 3:67-88.
54. Felberbaum RE, Ludwig M, Diedrich K (2000) Clinical application of GnRH-antagonists. *Mol Cell Endocrinol.* 166:9-14.
55. Montague CT, O'Rahilly S (2000) The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes.* 49:883-8.
56. Miller WH, Jr., Faust IM, Goldberger AC, Hirsch J (1983) Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat. *Am J Physiol.* 245:E74-80.
57. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:847-50.
58. Steppan CM, Lazar MA (2002) Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 13:18-23.
59. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280:E827-47.
60. Reynisdottir S, Dauzats M, Thorne A, Langin D (1997) Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:4162-6.
61. Gimble JM (2003) Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 3:705-13.
62. Nedvidkova J, Smitka K, Kopsky V, Hainer V (2005) Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res.* 54:133-40.
63. Das UN (1999) GLUT-4, tumour necrosis factor, essential fatty acids and daf-genes and their role in glucose homeostasis, insulin resistance, non-insulin dependent diabetes mellitus, and longevity. *J Assoc Physicians India.* 47:431-5.
64. Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P (2004) Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 318:168-75.
65. Gaja A, Chury Z, Pecan L, Fra kova H, Jandakova E, Hejlova N (2000) Bone marrow and peripheral blood leptin levels in lymphoproliferative diseases--relation to the bone marrow fat and infiltration. *Neoplasma.* 47:307-12.

66. Martinez-Carpio PA, Fiol C, Hurtado I, et al. (2003) Relation between leptin and body fat distribution in menopausal status. *J Physiol Biochem.* 59:301-7.
67. Klaus S (2004) Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets.* 5:241-50.
68. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, et al. (2004) Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* 40:177-84.
69. Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B (2004) Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 314:151-8.
70. de Carvalho MH, Colaco AL, Fortes ZB (2006) [Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 50:304-12.
71. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Casamitjana R, Ricart W (2003) Novel interactions of adiponectin with the endocrine system and inflammatory parameters. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:2714-8.
72. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S (2005) Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond).* 109:243-56.
73. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol.* 14:1431-7.
74. Kim MK, Lee JH, Kim H, et al. (2006) Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *J Mol Biol.* 362:66-77.
75. Sommer G, Garten A, Petzold S, et al. (2008) Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clin Sci (Lond).* 115:13-23.
76. Hug C, Lodish HF (2005) Medicine. Visfatin: a new adipokine. *Science.* 307:366-7.
77. Garten A, Petzold S, Barnikol-Oettler A, et al. (2010) Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:376-81.
78. Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, et al. (2010) Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298:E117-26.

79. Chen MP, Chung FM, Chang DM, et al. (2006) Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:295-9.
80. Haider DG, Schindler K, Schaller G, Prager G, Wolzt M, Ludvik B (2006) Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:1578-81.
81. Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F, et al. (2007) Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:483-90.
82. Malavazos AE, Ermetici F, Cereda E, et al. (2008) Epicardial fat thickness: relationship with plasma visfatin and plasminogen activator inhibitor-1 levels in visceral obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18:523-30.
83. Kovacikova M, Vitkova M, Klimcakova E, et al. (2008) Visfatin expression in subcutaneous adipose tissue of pre-menopausal women: relation to hormones and weight reduction. *Eur J Clin Invest.* 38:516-22.
84. Pagano C, Pilon C, Olivieri M, et al. (2006) Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:3165-70.
85. Chen CC, Li TC, Li CI, et al. (2007) The relationship between visfatin levels and anthropometric and metabolic parameters: association with cholesterol levels in women. *Metabolism.* 56:1216-20.
86. Schaberg ES, Jordan WH, Kuyatt BL (1992) Artificial intelligence in automated classification of rat vaginal smear cells. *Anal Quant Cytol Histol.* 14:446-50.
87. Silveyra P, Lux-Lantos V, Libertun C (2007) Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E977-85.
88. Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun ET, Savas B, Demir R (2004) Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev.* 67:414-23.
89. Haider DG, Schaller G, Kapiotis S, Maier C, Luger A, Wolzt M (2006) The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetologia.* 49:1909-14.

90. Saddi-Rosa P, Oliveira CS, Giuffrida FM, Reis AF (2010) Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetol Metab Syndr.* 2:21.
91. Gorar S. CC, Demir YS, Serter R, Aral Y (2010) Visfatin: Relationship of Obesity and Metabolic Syndrome. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism.* 14:35-8.
92. Mastorakos G, Valsamakis G, Papatheodorou DC, et al. (2007) The role of adipocytokines in insulin resistance in normal pregnancy: visfatin concentrations in early pregnancy predict insulin sensitivity. *Clin Chem.* 53:1477-83.
93. Morgan SA, Bringolf JB, Seidel ER (2008) Visfatin expression is elevated in normal human pregnancy. *Peptides.* 29:1382-9.
94. Lopez-Bermejo A, Chico-Julia B, Fernandez-Balsells M, et al. (2006) Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes.* 55:2871-5.
95. Krzyzanowska K, Krugluger W, Mittermayer F, et al. (2006) Increased visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond).* 110:605-9.
96. Chan TF, Chen YL, Lee CH, et al. (2006) Decreased plasma visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *J Soc Gynecol Investig.* 13:364-7.
97. Dogru T, Sonmez A, Tasci I, et al. (2007) Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 76:24-9.
98. Li L, Yang G, Li Q, et al. (2006) Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 114:544-8.
99. Jian WX, Luo TH, Gu YY, et al. (2006) The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabet Med.* 23:967-73.
100. Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S, Aso Y, Inukai T (2007) Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 56:451-8.
101. Sethi JK, Vidal-Puig A (2005) Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med.* 11:344-7.

102. Toruner F, Altinova AE, Bukan N, et al. (2009) Plasma visfatin concentrations in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res.* 72:33-7.
103. Josephs T, Waugh H, Kokay I, Grattan D, Thompson M (2007) Fasting-induced adipose factor identified as a key adipokine that is up-regulated in white adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *J Endocrinol.* 194:305-12.
104. Katwa LC, Seidel ER (2009) Visfatin in pregnancy: proposed mechanism of peptide delivery. *Amino Acids.* 37:555-8.
105. Panidis D, Farmakiotis D, Rousso D, et al. (2008) Plasma visfatin levels in normal weight women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Intern Med.* 19:406-12.
106. Romacho T, Azcutia V, Vazquez-Bella M, et al. (2009) Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia.* 52:2455-63.
107. Liu SW, Qiao SB, Yuan JS, Liu DQ (2009) Association of plasma visfatin levels with inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes (ACS) in humans. *Clin Endocrinol (Oxf).* 71:202-7.
108. Zhong M, Tan HW, Gong HP, Wang SF, Zhang Y, Zhang W (2008) Increased serum visfatin in patients with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 69:878-84.
109. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, et al. (2007) Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation.* 115:972-80.
110. Lim SY, Davidson SM, Paramanathan AJ, Smith CC, Yellon DM, Hausenloy DJ (2008) The novel adipocytokine visfatin exerts direct cardioprotective effects. *J Cell Mol Med.* 12:1395-403.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Zonguldak'ta doğdu. 1987 yılında Bartın İnönü İlkokulu'ndan, 1991 yılında TED Zonguldak Koleji Vakfı Özel Lisesi'nden ve 1994 yılında Bornova Mustafa Kemal Lisesinden mezun oldu. Lisans eğitimini, 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. Yüksek Lisans eğitimini, 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Yüksek Lisans programında tamamladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir kız çocuk sahibi olan Ramazan Yavuz ARICAN İngilizce bilmektedir.

EKLER



Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats

R. Yavuz Arican^a, Zeliha Sahin^b, Ismail Ustunel^b, Levent Sarikcioglu^a, Sadi Ozdem^c, Nurettin Oguz^{a,*}

^aDepartment of Anatomy, Faculty of Medicine, 07070 Antalya, Turkey

^bDepartment of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey

^cDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey

Abstract

Exposure to formaldehyde, which is an organic compound, disturbs the integrity of nasal mucosa. In this study, we aimed to clarify the protein changes in the junctional complex of nasal mucosa of Wistar rats exposed to formaldehyde inhalation.

The study was performed in 20 female Wistar rats. Rats were divided into two groups randomly. Control rats were allowed free access to standard rat chaw and tap water ($n:10$). Experimental group was exposed to formaldehyde vapor at 15 ppm, 6 h/day, 5 days/week for 12 weeks ($n:10$). Histological evaluation of the experimental model was determined by hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid Schiff (PAS) stainings of paraffin-embedded nasal mucosa tissues and by electron microscopy. The effects of formaldehyde inhalation on the distribution of occludin, E-cadherin, and γ -catenin were assessed by immunohistochemistry.

The nasal mucosa of the experimental group was correlated with hypertrophy in goblet cell, degeneration in basal lamina, stratification of epithelium, and proliferation. Thickness of basal lamina and also local degenerative regions, vacuole increase in cytoplasmic areas, irregular forms of kinocilium and loss of sharpness in the kinocilium membrane were the findings at the ultrastructural level. The expressions of E-cadherin, occludin, γ -catenin proteins in intercellular junctional complexes of rat nasal mucosa were also decreased in experimental group compared to control group.

The findings of the present study indicated that formaldehyde vapor inhalation in the concentrations and duration of exposure used in the present experiment significantly decreased the density of structural proteins of the junctional complex in the nasoepithelium. It was suggested that, the formaldehyde inhalation could cause complete impairment of intercellular junctional complexes and disturb the tissue integrity in nasal mucosa at higher concentrations.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Formaldehyde inhalation; Occludin; γ -catenin; E-cadherin; Rat

Introduction

Nasal mucosa cells connect with each other by intercellular junctions consisting of tight junctions, *adherens* junctions, desmosomes, and connects to the

basement membrane by hemidesmosomes (Janqueira and Carneiro, 1983).

The junctional complexes serve as sites of adhesion cell–cell and cell–basement membrane in the mucosa and also act as seals to prevent the flow of materials through the intercellular space. They also provide a mechanism for communication between adjacent cells. The coordinated establishment of specific cell–cell and cell–basement

*Corresponding author. Tel.: +90 242 2274485.

E-mail address: oguzn@akdeniz.edu.tr (N. Oguz).

membrane junctions is necessary for maintenance of tissue integrity in adult organisms.

Zonula occludens (tight junctions) are the most apical of the junctions and regulate the passage of ions and molecules through the paracellular pathway and maintain the polarized distribution of lipids and proteins at the plasma membrane (Contreras et al., 1992; Furuse et al., 1993).

Desmosomes together with *zonula adherens* represent the major adhesive cell-to-cell junctions in epithelial cells (Kemler, 1993; Potter et al., 1999). Desmosomes are especially abundant in tissues that experience mechanical stress. In *adherens* junctions and desmosomes, Ca^{++} -dependent transmembrane glycoproteins of the cadherin superfamily mediate specific cell-to-cell contacts. In *adherens* junctions, the actin microfilaments in the cell cytoplasm are linked to epithelial cadherin (E-cadherin) by the catenins (Aberle et al., 1994; Jou et al., 1995; Pokutta and Weis, 2000). The catenin complexes consist of α -catenin, β -catenin, γ -catenin and p120. This binding is essential for the formation of stable cell-to-cell adhesion and is partly regulated by α -catenin (Kemler, 1993; Potter et al., 1999). E-cadherin–catenin complex is found at sites of cell-to-cell contact, known as the *zonula adherens* and is the target of many growth factor-dependent and hormone-dependent signaling pathways that regulate its function and expression. In addition, the cadherin–catenin complex itself may modulate or initiate signaling events implicated in differentiation and growth control (Kemler, 1993; Potter et al., 1999).

Formaldehyde is a low molecular weight organic compound that is often found in materials used in occupational environments and domestic environments (Kim et al., 2002). Additionally, it is well known as a preservative in medical laboratories, as an embalming fluid, and as a sterilizer (Bartone et al., 1968; Restani and Galli, 1991). The industries or occupations of significant formaldehyde exposure are medical specialties (autopsies, hospital sterilizing staffs, and laboratory workers), embalmers, industrial workers (formaldehyde synthesis, resins, molding compounds, decorative laminates, plastic moldings, photographic films), textiles, garment workers, foundries, man-made mineral fibers, and wood workers (plywood, particle board, and furniture).

Levels of endogenous formaldehyde in blood of unexposed humans range from about 2 to 3 $\mu\text{g/g}$, and similar levels have been found in rats (2.24 $\mu\text{g/g}$) and monkeys (2.04 $\mu\text{g/g}$) (Heck et al., 1985; Casanova and Heck, 1987). Exogenous formaldehyde is rapidly and nearly completely absorbed by inhalation routes and metabolized. Formaldehyde that is not metabolized has the potential to produce toxicity (Collins et al., 2001). Formaldehyde is a well-known upper respiratory tract irritant. Accordingly, number of previous studies have found a relation between the inhalation of low-level formaldehyde and disorders of the respiratory organs in humans, rats and mice (Kane and Alarie, 1977).

Inhalation studies on rats have also shown that long-term repeated exposure to formaldehyde at concentrations of 6 ppm and above, induced rhinitis, degeneration, frank necrosis, hyperplasia, and squamous metaplasia of the ciliated and non-ciliated nasal respiratory epithelium (Cassee and Feron, 1994).

It was suggested that formaldehyde induces changes in nasoepithelial differentiation and cause disruption of nasoepithelial integrity. Therefore, it seems important to give insight into the level of proteins of intercellular junctional complexes at the nasoepithelium in formaldehyde inhalation. Thus, in the present study, we aimed to clarify the effects of formaldehyde on nasal mucosa epithelial cell junctional complexes proteins including: occludin, E-cadherin, γ -catenin by using immunohistochemical techniques combined with transmission electron microscopy.

Materials and methods

Animals

Female, adult, *Rattus norvegicus* (Wistar) rats weighting 230 ± 10 g were obtained from Akdeniz University Animal Care and Usage Unit. All rats were allowed free access to standard rat chaw and tap water. Animals were separated randomly into two group as control ($n = 10$) and experimental groups ($n = 10$). The experimental group was exposed to the formaldehyde vapor at a concentration of 15 ppm for 6 h (09.00–15.00) for five consecutive days per week for 12 weeks. Control rats were exposed to room air using the same protocol (Woutersen et al., 1987).

The experimental protocol was approved by the Animal Care and Usage Committee of Akdeniz University and was in accordance with the declaration of Helsinki and International Association for the study of pain guidelines.

Formaldehyde exposure

Rats were placed in a quadrangular chambers ($100 \times 65 \times 100 \text{ cm}^3$) containing two holes for inflow and outflow of air. The circulation of the air in the chamber is fixed by air pumps. The formaldehyde was generated by thermal depolymerization of paraformaldehyde (Merck AG, Darmstadt, Germany) according to a method described by Chang et al. (1983) and was pumped to the chamber.

Tissue processing

At the end of the experimental period the rats were weighted and anesthetized with a mixture of Xylazin HCl (Rompun, 15 mg/kg IM, Bayer AG, Leverkusen,

Germany) and Ketamin (Ketalar, 100 mg/kg IM, Parke Davis, Istanbul, Turkey) solution via intraperitoneal injection. For harvesting of the respiratory mucosa tip of the nose was cut gently. Then, nasal bone was separated and the nasal septum was approached. Subsequently, the respiratory mucosa was gently harvested by a blunt dissection made under a stereomicroscope with fiber optic illumination. Care was taken to harvest the real respiratory mucosa located in the medial and inferior walls of the nasal cavity. Additionally, the mucosa was avoided from mechanic damage during dissection and floated on a piece of paper. All specimens were divided into two pieces: one piece was processed for immunohistochemistry and the rest for electron microscopy.

Histological evaluation was performed by hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid Schiff (PAS) staining.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical assays, sections fixed by 10% formaldehyde were deparaffinized and blocked for endogenous peroxidase activity with methanol containing 3% H₂O₂ for 10 min and for nonspecific binding with universal blocking reagent (BioGenex, San Ramon, CA, USA) for 10 min at room temperature. Rabbit polyclonal anti-occludin (Zymed, 71-1500), mouse monoclonal anti-E-cadherin (Santa Cruz, (G-10): sc-8426) and rabbit polyclonal anti- α -catenin (Santa Cruz, (H-297): sc-7894) primary antibodies were applied as 1:100 (2 μ g IgG/ml), for overnight at +4 °C. Negative control staining was performed by replacing the primary antibodies with their non-immune isotypes at the same concentrations. The signals were developed by an avidin-biotin horseradish peroxidase complex using Universal LSAB kit (Dako, Glostrup, Denmark). Antibody complexes were visualized by incubation with diaminobenzidine (DAB) chromogen (BioGenex, San Ramon, CA, USA). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Dako), for 30 s, dehydrated, coverslipped and examined by light microscopy.

Electron microscopy

Nasal mucosa tissue specimens for TEM technique were prepared as described elsewhere. Briefly, samples of rat nasal tissues were fixed by immersion in 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) at room temperature for 4 h and post-fixed in 1% phosphate-buffered osmium tetroxide for 2 h. Specimens were dehydrated in ascending concentrations of ethanol and embedded in araldite-epoxy resin. Semi-thin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were contrast stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with the help of a Zeiss EM Leo 906E transmission electron microscope (Jena, Germany).

H-SCORE and semi-quantitative evaluations

The evaluations of the immunohistochemical staining of preparations from both control and experimental groups were done utilizing H-SCORE. Briefly, stained sections were evaluated using an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a special ocular scale. From randomly selected three slides, each five different fields at $\times 200$ magnification were evaluated for the analysis of immunohistochemical staining of the antibodies. The staining was scored in a semi-quantitative fashion that included the intensity of specific staining in sections. The evaluations were recorded as percentages of positive stained cells of all type in each of four intensity categories which were denoted as + (weak but detectable above control), ++ (distinct), +++ (intense). For each tissue, an H-SCORE value was derived by summing the percentages of cells that stained at each intensity multiplied by the weighted intensity of the staining ($H\text{-SCORE} = \sum_{i=1}^n S_i P_i$), where i is the intensity score and P_i is the corresponding percentage of the cells). The H-SCORE values were graphed.

The distributions of positively immunoreactive cells in control and experimental group were also determined semi-quantitatively (+:weak positive, ++:positive, +++:dense positive) and presented in Table 1.

Statistical analysis

Values are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses of immunohistochemical quantifications were performed by Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney U test. p -Value < 0.05 was considered significant.

Results

Clinical results

The initial body weights of the rats from both groups were similar (230 ± 10 and 230 ± 10 for control and

Table 1. Semi-quantitative immunolabeling density distribution patterns of γ -catenin, occludin, and E-cadherin in control and formaldehyde inhalation groups

Protein type	Control group	Experiment group
Occludin	+++	++
E-cadherin	+++	+
γ -catenin	++	+

+ (weak but detectable above control), ++ (distinct), +++ (intense).

experimental groups, respectively). However, at the end of the experimental period, the mean body weight of the experiment group was significantly lower (283 ± 20 g) than those of control rats (296 ± 10 g, $p < 0.05$). In addition, there was yellow coloration of the fur after the

10th day of the experiment in formaldehyde-exposed rats. Formaldehyde-exposed rats displayed behavioral changes such as excessive licking and blinking of eyes, sneezing, increase in nose cleaning, and a rest sleep motion.

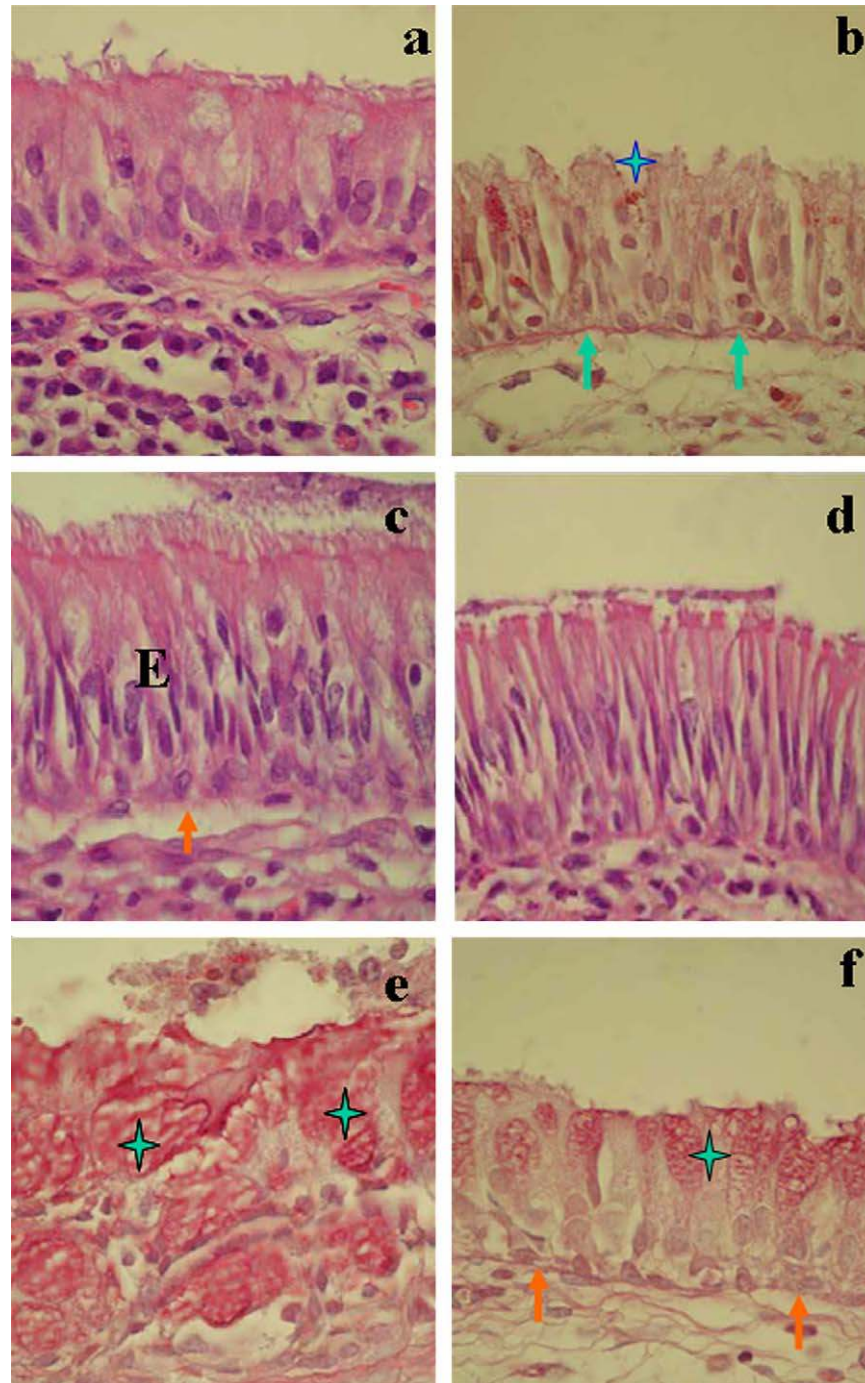


Fig. 1. (a) In control group, the respiratory epithelium is observed to be morphologically healthy in appearance. HE staining. X 40. (b) In control group, the appearance of goblet cells (star) and the structural integrity of basal lamina (arrows) was normal. PAS staining. X 40. (c, d) In experimental group, the stratification of the nasoepithelium (E) depending on the hyperplasia (Fig. c) and basal lamina degeneration (arrow) was seen (Fig. b). HE staining. X 40. (e, f) In experimental group, hypertrophy in goblet cells (stars in Fig. e) and basal lamina degeneration was seen (arrows in Fig. f). PAS staining. 1e: X100, 1f: X40.

Histological evaluation of the formaldehyde inhalation model by light microscopy

The nasal respiratory mucosal epithelium tissue sections were normal in the control group. (Fig. 1a and b). Specimens from experimental group displayed marked, the thickness of the epithelium depending on the hyperplasia (Fig. 1c), basal lamina degeneration

(Fig. 1d) and hypertrophy in the goblet cells of the nasoepithelium, (Fig. 1e and f).

Immunohistochemical results

Semi-quantitative immunolabeling density distribution patterns of occludin, E-cadherin and γ -catenin in control and formaldehyde inhalation groups of nasoepithelium

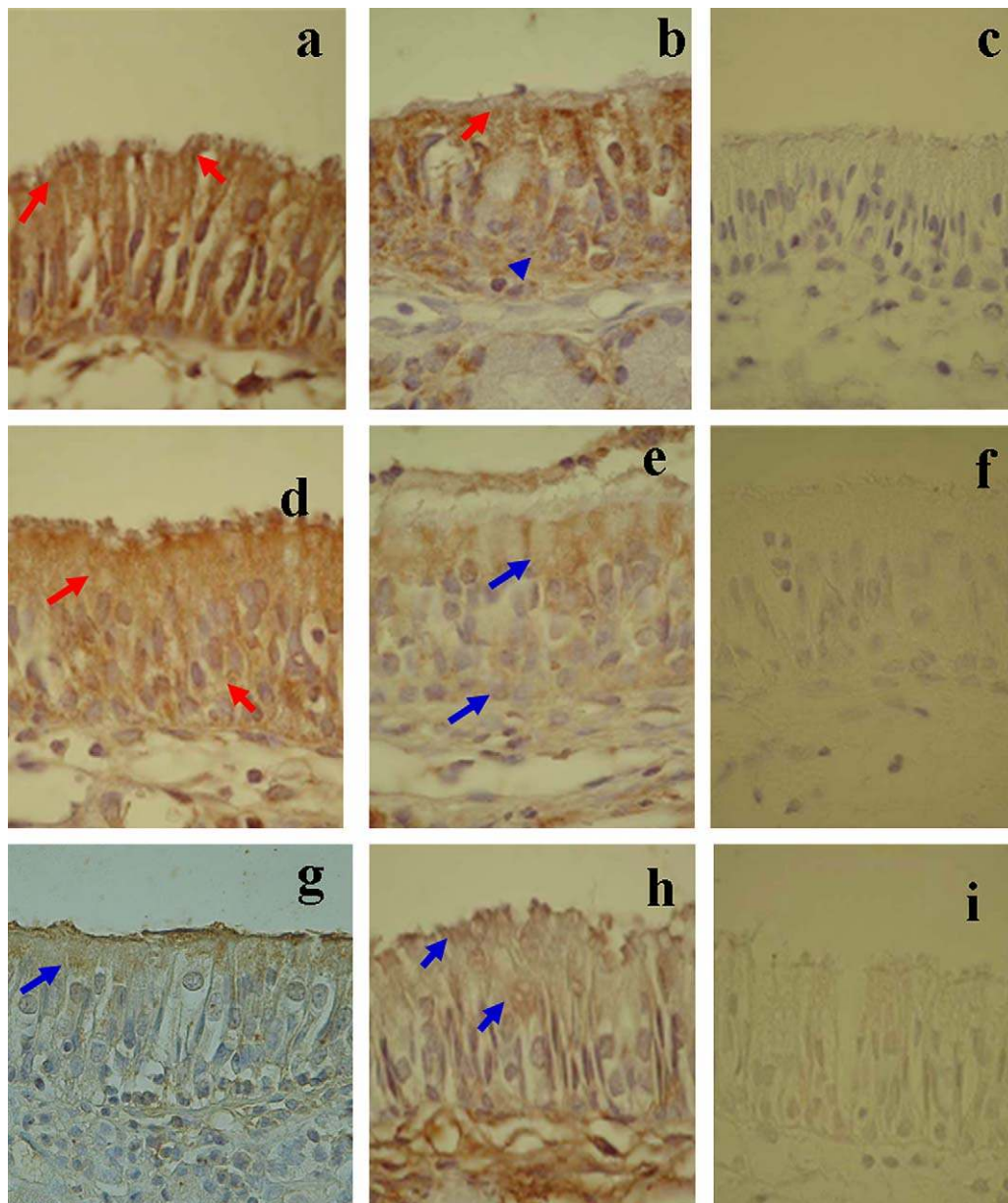


Fig. 2. (a–c) The immunostaining of occludin protein in control group (a) and in experimental group (b). Red arrows indicate the immunopositivity of occludin protein between apical region of prismatic cells. Blue arrow indicates the reduction of immunoreactivity between apical region of prismatic cells and arrow head indicates the reduction in basal compartment. Negative control staining (c). X 40 (d–f) The immunostaining of E-cadherin protein in control group (d) and in experimental group (e). Red arrows indicate the immunoreactivity in of E-cadherin which disperse whole region of nasoepithelium. Blue arrows indicate the reduction of immunoreactivity in nasoepithelium. Negative control staining (f). X40. (g–i) The immunostaining of γ -catenin protein in control group (g) and in experimental group (h). Orange arrows indicate the immunoreactivity in of γ -catenin which shows immunoreactivity in adherens junctions disperse. Blue arrows indicate the reduction of immunoreactivity in nasoepithelium. Negative control staining (i). X20 (g) and X40 (h, i).

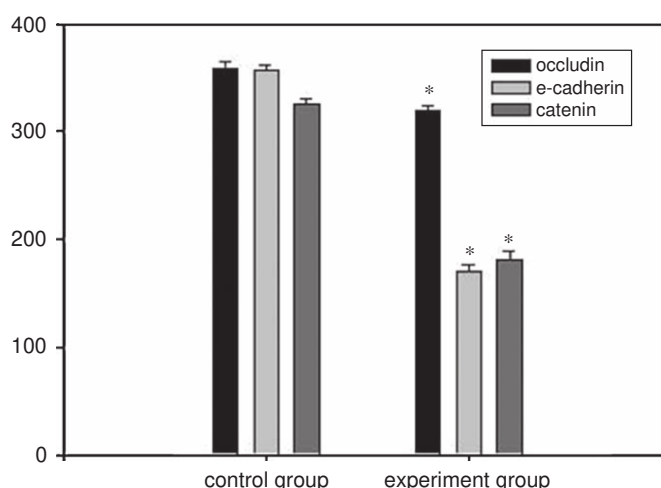


Fig. 3. H-SCORE analysis of immunostaining in control group and experimental group.

were shown in Table 1. Briefly, the densities of immunohistochemical staining of all three proteins were decreased in experimental group when compared to control group.

Occludin

In control group the occludin protein was immunopositive especially between apical region of prismatic cells (red arrows) (Fig. 2a). In experimental group the immunoreactivity of occludin protein was decreased both between apical region of prismatic cells (red arrow) and basal region of the cells (blue arrow head) when compared to control rats (Fig. 2b). There was no immunostaining in the negative control section of occludin (Fig. 2c).

E-Cadherin

In control group, E-cadherin protein was immunopositive in all region of the nasal mucosa of respiratory epithelium cells (red arrows) (Fig. 2d). Similar to the occludin protein, the immunostaining density of the E-cadherin was decreased in experimental group when compared to control (blue arrows) (Fig. 2e). There was no immunostaining in the negative control section (Fig. 2f).

γ -Catenin

In control group, the catenin immunoreactivity was positive especially in zonula adherens of respiratory epithelium (blue arrow) (Fig. 2g). Parallel to the other junctional proteins, the immunostaining intensity of γ -catenin was decreased in experiment group when compared to the control group (blue arrows) (Fig. 2h). There was no immunostaining in the negative control section (Fig. 2i).

H-SCORE analysis revealed that the immunostaining densities of occludin, E-cadherin and γ -catenin proteins

were significantly decreased in experimental group when compared to control group (*: $p < 0.05$) (Fig. 3).

Ultrastructural results

TEM results were undertaken to detail changes in the nasoepithelial cells resulting from the formaldehyde inhalation. The nasal respiratory mucosal cells of the control group were in normal structure (Fig. 4a and b). TEM results revealed stratification in the basal lamina and locally degeneration regions and the vacuol increase in cytoplasmic region (Fig. 4c and d), irregular forms of kinocilium and loose of sharpness in the experimental group (Fig. 4e and f). However, in experimental group, nasal mucosa cells preserved their normal structure and no separation was observed in the intercellular junctions compared with control group (Fig. 4g–l).

Discussion

The findings of the present study indicated that constant inhalation of formaldehyde vapor at 15 ppm, 6 h/day, 5 days/week for 12 weeks caused clinical effects in rats similar to those reported in other studies (Malek et al., 2003; Morgan et al., 1986; Casanova and Heck, 1987; Appelman et al., 1988; Wilmer et al., 1989) which are excessive licking and blinking of eyes, sneezing, increase in nose cleaning, and a rest sleep motion (Morgan et al., 1986; Casanova and Heck, 1987; Appelman et al., 1988; Wilmer et al., 1989; Ozen et al., 2005). Thus, the gross results obtained in presented model, agree well with existing experimental studies.

Formaldehyde stops the nucleic acid and protein synthesis and causes loss of weight (Ma and Harris,

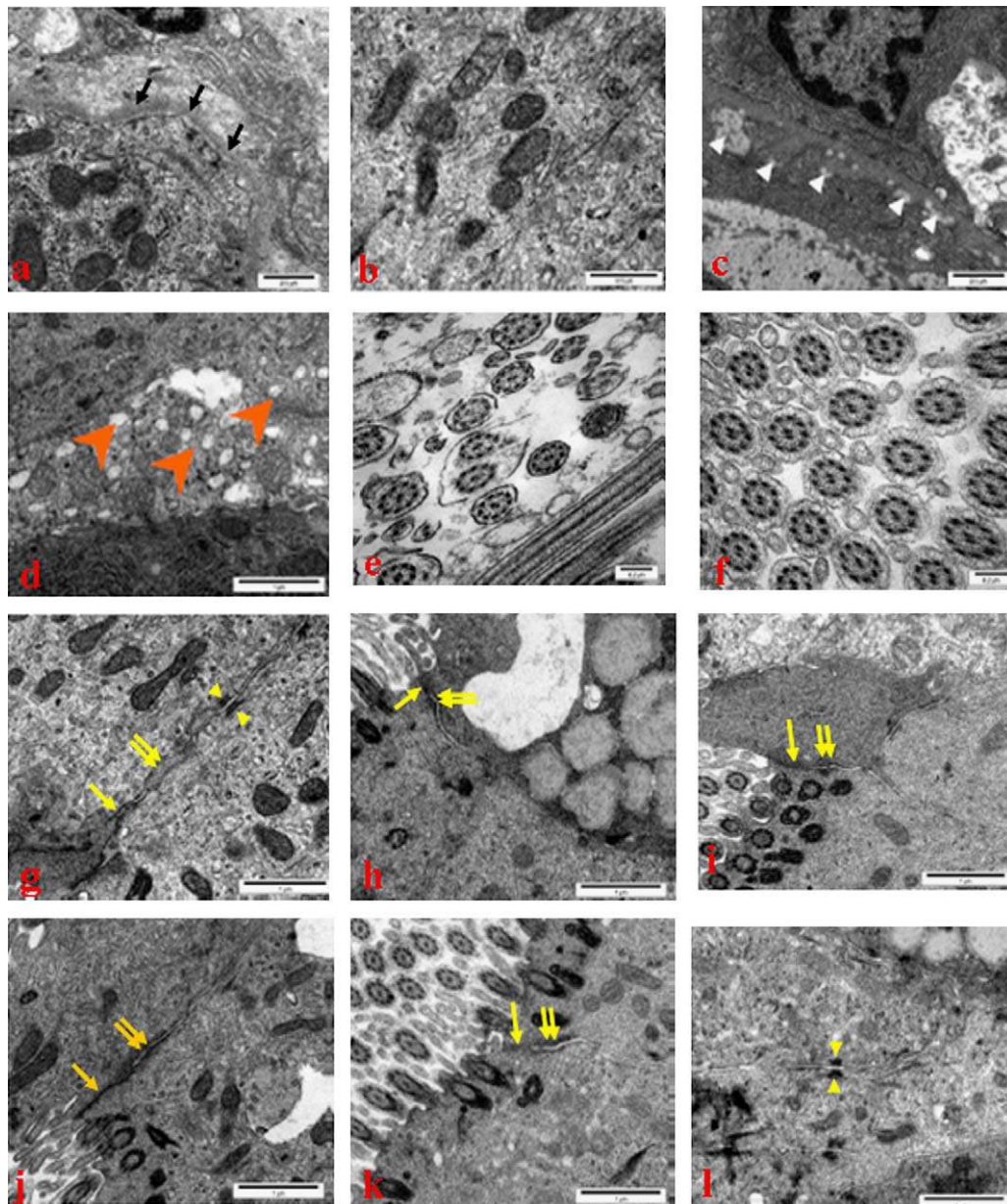


Fig. 4. (a, b) TEM micrographs of control group. The thickness of basal lamina (arrows, in Fig. 4a) is normal and no cytoplasmic vacuoles are observed (Fig. 4b). (c, d) TEM micrographs of experimental group. The stratification in the basal lamina and locally degeneration regions (arrows in 4c) and the vacuol increase in cytoplasmic region (arrows in 4d) are seen. (e, f) Irregular forms of kinocilium and loose of sharpness in the experimental group are seen. (g–l) The intercellular junctions are seen normally in the control and experimental groups. Zonula occludens (arrows), Zonula adherens (double arrows), Desmosomes (arrow heads).

1988). Accordingly, a reduction in body weights of formaldehyde-exposed rats has been reported in recent studies (Ma and Harris, 1988). In agreement, in the present study we found that formaldehyde-exposed rats gained significantly less weight than control rats.

Zwart et al. (1988) reported neutrophil infiltration, mitochondrial degeneration and autophagic vacuoles, hypertrophy in goblet and ciliary cells, loss of microvilli, nucleus separations and pycnotic changes in their study.

The present study was conducted to determine the immunohistochemical changes in junctional complexes between nasoepithelial cells and to relate these changes with staining intensity of E-cadherin, occludin, and γ -catenin after formaldehyde inhalation in rats. Therefore, this study gives insight that exposure of formaldehyde affected the junctional complexes proteins in rat nasal mucosa.

E-cadherin is localized on the surfaces of epithelial cells in regions of cell-to-cell contact known as *adherens*

junctions (Kemler, 1993; Potter et al., 1999). It is essential for formation and maintenance of epithelia and interacts with the actin cytoskeleton through linker molecules (Kemler, 1993; Okegawa et al., 2002). Structurally, the desmosome is similar to the *adherens* junction and is composed of a transmembrane cadherin and proteins that link the cadherin to the intermediate filaments of the cytoskeleton. *Adherens* and desmosomal junctions are known as cadherin-related junctional complexes. In our study, we observed marked reductions in immunostaining intensity of E-cadherin, occludin and α -catenin proteins in nasoepithelium of formaldehyde exposed rats, suggesting that formaldehyde may cause degeneration in adherens, desmosomal and tight junctions of nasoepithelium. These results indicate that formaldehyde, an irritant to the respiratory tract, induces the down-regulation of E-cadherin, occludin, and γ -catenin in nasoepithelial cells.

In our study, formaldehyde inhalation caused histopathological nasal changes in rats varying from epithelial disarrangement to epithelial hyperplasia and goblet cells hypertrophy restricted to a small area of the anterior part of the nose which is normally covered with respiratory epithelium.

Transmission electron microscopic examination did not reveal signs of degeneration or separation in junctional complexes. Epidemiological studies of occupational exposure have suggested possible links between concentration and duration of exposure and elevated risks of formaldehyde (Hauptmann et al., 2003). In our study it is obvious that the concentration of FA used in our study reduces the level of proteins in junctional complexes but not separate the junctional complex structure completely.

In conclusion, this study was conducted to investigate the effect of formaldehyde on nasoepithelial junctional complex proteins. Our immunohistochemical results are the first that indicated the altered immunostaining density of nasoepithelial junctional complex proteins after formaldehyde inhalation. The effects of formaldehyde inhalation on nasoepithelial cells seem to be important in junctional complexes. It is possible that altered E-cadherin, occludin, and γ -catenin expression due to upper-dose formaldehyde inhalation may be involved in disintegration of the cell–cell adhesion system of nasoepithelium moreover, may disturb the tissue integrity.

Acknowledgements

This project was supported by Akdeniz University Research Foundation Antalya, TURKIYE (Project number: 2004.02.0122.003). The authors thank Arife DEMIRTOP and Hakan ER (Transmission Electron Microscopy Imaging and Analysis [TEMGA] Unit) for

their technical assistance for transmission electron microscopy and Sibel OZER for her technical support for immunohistochemical stainings.

References

- Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin–catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 1994;107: 3655–63.
- Appelman LM, Woutersen RA, Zwart A, Falke HE, Feron VJ. One-year inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats with a damaged or undamaged nasal mucosa. *J Appl Toxicol* 1988;8:85–90.
- Bartone NF, Grieco RV, Herr BS. Corrosive gastritis due to ingestion of formaldehyde without esophageal impairment. *JAMA* 1968;203:50–1.
- Casanova M, Heck HD. Further studies on the metabolic incorporation and covalent binding of inhaled (2H)- and (14C) formaldehyde in Fisher-344 rats: effects of glutathione depletion. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;89:105–21.
- Cassee FR, Feron VJ. Biochemical and histopathological changes in nasal epithelium of rats after 3-day intermittent exposure to formaldehyde and ozone alone or in combination. *Toxicol Lett* 1994;72:257–68.
- Chang JC, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS. Nasal cavity deposition, histopathology, and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposures in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;68:161–76.
- Collins JJ, Ness R, Tyl RW, Krivanek N, Esmen NA, Hall TA. A review of adverse pregnancy outcomes and formaldehyde exposure in human and animal studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001;34:17–34.
- Contreras RG, Miller JH, Zamora M, Gonzalez-Mariscal L, Cerejido M. Interaction of calcium with plasma membrane of epithelial (MDCK) cells during junction formation. *Am J Physiol* 1992;263:C313–8.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123: 1777–88.
- Hauptmann M, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1615–23.
- Heck HD, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T. Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *Am Ind Hyg Assoc J* 1985;46:1–3.
- Janqueira LC, Carneiro J. Basic histology, 4th ed. Lange medical Publications; 1983.
- Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marrs JA. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin–catenin complex. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 92. 1995. p. 5067–5071.
- Kane LE, Alarie Y. Sensory irritation to formaldehyde and acrolein during single and repeated exposures in mice. *Am Ind Hyg Assoc J* 1977;38:509–22.

- Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993;9:317–21.
- Kim WJ, Terada N, Nomura T, Takahashi R, Lee SD, Park JH, et al. Effect of formaldehyde on the expression of adhesion molecules in nasal microvascular endothelial cells: the role of formaldehyde in the pathogenesis of sick building syndrome. *Clin Exp Allergy* 2002;32:287–95.
- Ma TH, Harris MM. Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat Res* 1988;196:37–59.
- Malek FA, Moritz KU, Fanghanel J. Formaldehyde inhalation & open field behaviour in rats. *Indian J Med Res* 2003;118:90–6.
- Morgan KT, Jiang XZ, Starr TB, Kerns WD. More precise localization of nasal tumors associated with chronic exposure of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;82:264–71.
- Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JT. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* 2002;167:1836–43.
- Ozen OA, Akpolat N, Songur A, Kus I, Zararsiz I, Ozacmak VH, et al. Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study. *Toxicol Ind Health* 2005;21:249–54.
- Pokutta S, Weis WI. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell* 2000;5: 533–43.
- Potter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev* 1999;20:207–39.
- Restani P, Galli CL. Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. *Toxicol* 1991;21:315–28.
- Wilmer JW, Woutersen RA, Appelman LM, Leeman WR, Feron VJ. Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-h intermittent versus 8-h continuous exposures. *Toxicol Lett* 1989;47:287–93.
- Woutersen RA, Appelman LM, Wilmer JW, Falke HE, Feron VJ. Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in rats. *J Appl Toxicol* 1987;7:43–9.
- Zwart A, Woutersen RA, Wilmer JW, Spit BJ, Feron VJ. Cytotoxic and adaptive effects in rat nasal epithelium after 3-day and 13-week exposure to low concentrations of formaldehyde vapour. *Toxicology* 1988;51:87–99.

The incidence of accessory navicular bone types in Turkish subjects

Nigar Keles Coskun · Ramazan Yavuz Arican ·
Arzu Utuk · Haluk Ozcanli · Timur Sindel

Received: 24 November 2008 / Accepted: 26 March 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Accessory ossicles are the skeletal variations of the ankle and foot that can cause painful syndromes. The accessory navicular bone is one of the most common accessory ossicle of the foot (4–21%) and is also known as os tibiale, os tibiale externum and os naviculare secundarium. This bone can be adjacent to the posteromedial tuberosity of the navicular bone or can be separated and may cause various diseases in the foot and mimic fractures of foot bones. The aim of this study was to document a detailed investigation of incidence and types of accessory navicular bones of Turkish subjects according to sex in both extremities. The accessory navicular bone was detected (11%) via the posterior–anterior radiographs of 650 subjects in the radiological examination. The incidences of accessory navicular bones were identified as 6.1–4.9% in female and male participants. Accessory navicular bones were classified into three groups as Type I, Type II and Type III and the incidences of these bones were determined as 3.3, 3.1, 4.6%, respectively. Each group was also divided into subgroups. The incidences of the subgroups are as Type Ia 0.6%, Type Ib 1.5%, Type Ic 1.2%, Type IIA/a 0.8%, Type IIA/b 0.4%, Type IIA/c 0%, Type IIB/a 1.1%, IIB/b 0.3%, IIB/c 0.5%, Type IIIa 1.5%, Type IIIb 1.4%, Type IIIc

1.7%. Finally, the types of accessory navicular bones were discussed and the imaging modalities for diagnosis were presented.

Keywords Accessory navicular bone · Normal variant · Incidence · Foot · Radiography

Introduction

Accessory ossicles are the developmental variations and appear from secondary ossification center which originate from the main bone. They might be found adjacent to the main bone or might be separated which is often confused with avulsion fractures. As a result of painful fractures, these bones might be infected or dislocated and the fracture of the bone can also cause connective tissue diseases [2, 10, 11, 14, 17].

The accessory navicular bone is one of the most common accessory ossicles of the foot and considered as a normal anatomic and radiographic variant [1]. Thereupon, numerous names have been indicated in the literature for this accessory bone including os scaphoidea accessoria, os naviculare accessorium, prehallux, os naviculare secundarium, and os tibiale externum. Three types of accessory navicular bone have been described (Fig. 1). Type I is a 2–3 mm sized sesamoid bone in the posterior tibial tendon and is known as “os tibiale externum”. Type II exists from the secondary ossification center of the navicular bone and this type also referred to “prehallux”. The ossicles in Type II is seen triangular or heart-shaped, approximately 9×12 mm in size, with its base situated 1–2 mm from the medial and posterior aspects of the navicular bone. It is connected to the navicular tuberosity by a fibrocartilage or a hyaline cartilage layer. This type frequently becomes symptomatic and is

N. Keles Coskun (✉) · R. Y. Arican · A. Utuk
Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey
e-mail: nigarc@akdeniz.edu.tr

H. Ozcanli
Department of Orthopedics, Faculty of Medicine,
Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

T. Sindel
Department of Radiology, Faculty of Medicine,
Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

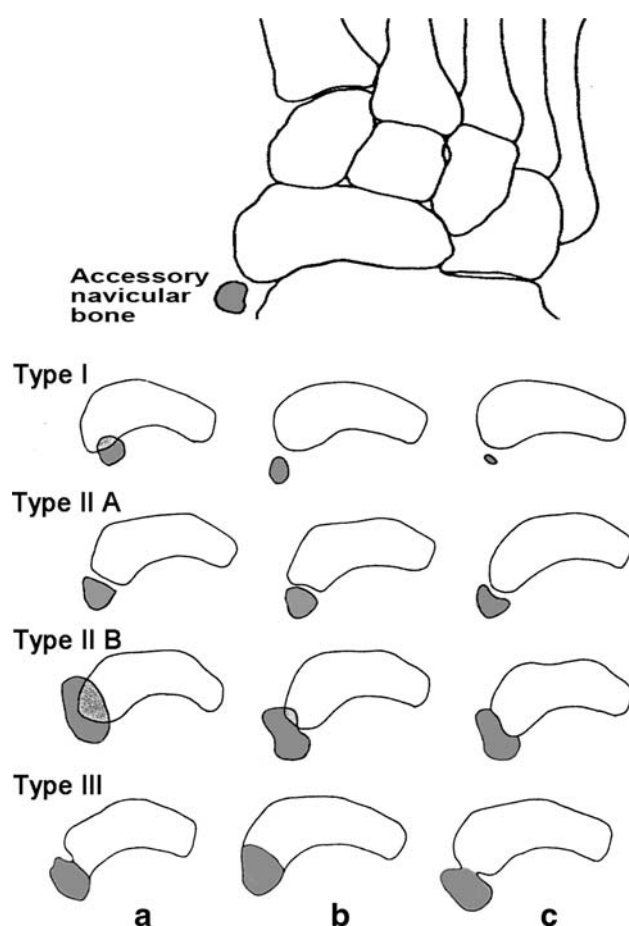


Fig. 1 Schematic illustration showing types of the accessory navicular bone: modified classification of Coughlin [2]

occasionally mistaken as a fracture of the tuberosity of the navicular bone [2, 4, 6]. Sella and Lawson [19] have separated Type II accessory navicular bones into two groups. Type II A is connected to the talar process by a less acute angle, whereas with Type II B is situated more inferiorly. Type III accessory navicular bones are united by a bony ridge producing a cornuate navicular [2].

Clinical presentation and several case reports of accessory navicular bones are available in the literature [4, 5, 7–9, 21]. However, the number of studies with large sample sizes reporting the incidence on the types of accessory navicular bones in the anatomic and orthopedic literature is insufficient. In the present study, we aimed to document a detailed investigation of the incidence and types of the accessory navicular bones in Turkish subjects symmetrically according to sex by radiography.

Materials and methods

In the present study, radiographs of 650 cases (334 women, 316 men, age range 18–94 years) obtained from the Radiol-

ogy and Orthopaedics Departments of Akdeniz University Faculty of Medicine, between the years 2005 and 2008 were studied. The radiographs of the feet with accessory navicular bone are selected incidentally. Dorsoplantar and oblique foot radiographs were examined with regard to presence, incidence and types of the accessory navicular bones in both extremities. All the types and subgroups are determined according to the Coughlin's classification [2]. The small accessory navicular bone (2–3 mm sized, round or oval shaped) without attachment to the navicular bone is determined as Type I. The triangular or heart-shaped bone, approximately 9×12 mm in size, with its base situated 1–2 mm from the medial and posterior aspects of the navicular bone is defined as Type II and additionally Type III accessory navicular bones are united by a bony ridge producing a cornuate navicular.

Results

Accessory navicular bone was determined in 72 cases (11%) of the 650 cases. These bones were seen in 40 female participants and 32 male participants. Accessory navicular bones were detected in 38% bilateral, in 31% unilateral right and in 31% unilateral left in 72 cases (Table 1).

The classification of the accessory navicular bones were as Type I, Type II and Type III and each group were also divided into the subgroups (Fig. 1). Type I was identified in 3.3% of 650 cases (Fig. 2). The incidence of the subgroups of the Type I determined as Type Ia 0.6%, Type Ib 1.5% and Type Ic 1.2%.

The rate of the Type II was detected as 3.1% (Type IIA 1.2% and Type IIB 1.9%) in 650 cases (Fig. 3). Type IIA and Type IIB were also divided into the subgroups. The incidence of Type IIA/a was 0.8%, Type IIA/b was 0.4% and Type IIA/c was 0%. The incidence of Type IIB were determined as Type IIB/a 1.1%, Type IIB/b 0.3% and Type IIB/c 0.5%.

Incidence of the Type III was determined as 4.6% in 650 cases (Fig. 4). Type III divided into three subgroups as Type IIIa, Type IIIb and Type IIIc. And the incidence of these subgroups were determined as 1.5, 1.4, 1.7%, respectively.

Table 1 Types of the accessory navicular bone

Accessory navicular bone	Sex		Side		
	Female	Male	Bilateral	Unilateral right	Unilateral left
Type I	9	13	9	6	7
Type IIA	6	2	–	4	4
Type IIB	10	2	12	–	–
Type III	15	15	6	12	12

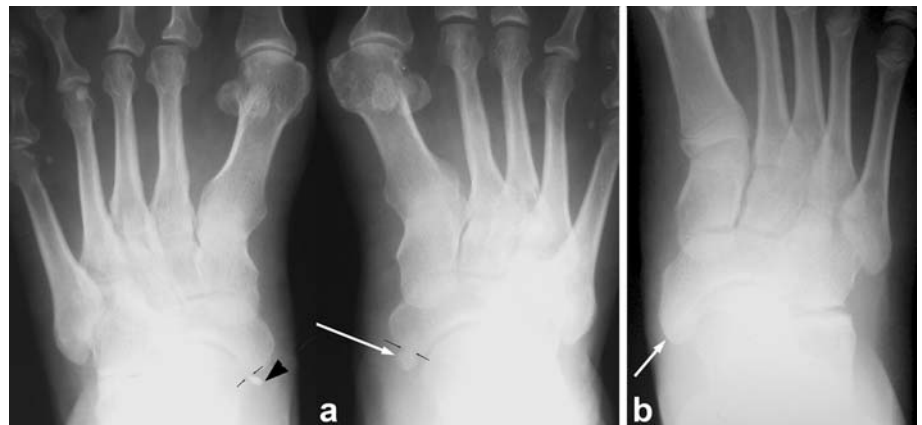
Fig. 2 Dorsoplantar radiographs of Type I accessory navicular bones in different subgroups (*arrows*). **a** 32-year-old woman and **b** 27-year-old woman



Fig. 3 Dorsoplantar radiograph shows Type II accessory navicular bones in different subgroups. **a** 25-year-old woman-bilaterally and **b** 37-year-old woman



Fig. 4 Subgroups of the Type III accessory navicular bone (36-year-old man, bilateral). **a** The black arrowhead and white arrow shows the accessory navicular bone. Small black arrows shows the bony ridge. **b** A cornuate navicular bone (24-year-old woman)



Discussion

An accessory navicular bone was first described in 1605 by Bauhin. Haglund noticed a bony structure adjoining the tuberosity of the navicular bone by looking at X-ray images

in 1906. He first interpreted it as a fracture but later identified it as an accessory navicular bone [6, 15, 20].

Most of the accessory navicular bones are asymptomatic and these bones do not cause any complaint. Generally they are determined in routine radiologic examinations after a

trauma or overuse leading to degenerative changes or pain [3, 6, 14, 21]. Symptomatic accessory navicular typically develops in young athletes. The symptoms are exaggerated during exercise or walking, affecting the sports performance of adolescent athletes [16]. An accessory navicular bone might be symptomatic in childhood or early adulthood. Symptoms are usually caused from pressure of the accessory bone against the shoe in children. Sometimes the condition is associated with progressive flattening of the longitudinal arch. In adults, symptoms particularly develop after trauma of the foot, often resulting from a twisting injury. Physical examination often reveals tenderness over the prominence on the medial aspect of the instep [2, 4, 12, 13].

The incidence of the accessory navicular is 4–21% in general populations [2, 13, 14, 17]. In the present study, the incidence of the accessory navicular bones was 11% parallel to the literature.

Mellado et al. [14] described three types of accessory navicular bone, based on radiographic appearance and also Coughlin [2] added the subgroups to the Mellado's classification. Type I is generally asymptomatic and this type's incidence is approximately 30% of all accessory navicular bones [2, 6, 14]. In our results, this rate is 31% of all accessory navicular bones. Additionally, 41% bilaterally, 27% unilaterally right and 32% unilaterally left accessory navicular bones were detected.

The most frequent symptoms are seen in Type II accessory navicular bone because of traumatic or arthritic changes of the synchondrosis [12, 16, 18, 19]. Occasionally, Type II accessory navicular might become painful, and cause the so-called symptomatic accessory navicular. This clinico-radiological entity is believed to be caused by osteonecrosis of the accessory navicular. Type II accessory navicular bones should be distinguished from Type I sesamoid bones within the distal segment of the posterior tibial tendon synchondrosis [1, 2, 6, 14]. Type II accessory navicular is usually larger and well-corticated, generally presents bilaterally, and the line of separation from the adjacent bone is commonly smoother than in a true avulsion fracture. It presents more commonly in middle-aged women and causes pain and tenderness in the medial aspect of the foot. Because of these properties, Type II accessory navicular bone should be remembered for radiographic distinction [1, 17]. Type II is identified approximately in 50–60% of accessory navicular bones. According to our results, Type II is 28% in all cases with accessory navicular bone. Sella and Lawson [19] divided the Type II accessory navicular bone into two subdivisions. Type IIA accessory navicular bone was connected with the talar process with a less acute angle, whereas Type IIB was situated more inferiorly. The two types can only be distinguished radiographically [19]. According to our results, Type IIA was unilateral in all

cases. Parallel to the literature Type IIB was bilateral in all cases and was most common in woman.

The accessory navicular may unite with the navicular tuberosity, thus forming the so-called Type III accessory navicular bone, also known as the cornuate navicular bone. The cornuate navicular bone may occasionally associate with painful conditions, adventitious bursa formation or flat-foot deformity [14]. Type II and Type III include 70% of accessory navicular bone deformities. The incidence of the Type III was determined as 4.6% in the present study.

In conclusion, the present study represents the first detailed report of the incidence types of accessory navicular bones in Turkish subjects. The incidence of the subdivisions are first reported by the present study. We think that types of accessory navicular bones should be kept in mind and could help clinicians in the radiological diagnosis.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Akdeniz University Scientific Research Projects Management Unit, Antalya, Turkey. The authors wish to express their appreciation to Prof. Dr. Muzafer Sindel for her contributions to this work.

References

1. Choi YS, Lee KT, Kang HS et al (2004) MR imaging findings of painful type II accessory navicular bone. Correlation with surgical and pathologic studies. *Korean J Radiol* 5:274–279
2. Coughlin MJ (2006) Sesamoid and accessory bones of the foot. In: Coughlin MJ (ed) *Surgery of the foot and ankle*, 8th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 438–494
3. Coskun N, Yuksel M, Cevener M et al (2009) Incidence of accessory ossicles and sesamoid bones in the feet: a radiographic study of the Turkish subjects. *Surg Radiol Anat* 31:19–24
4. Fredrick LA, Beall DP, Ly JQ et al (2005) The symptomatic accessory navicular bone: a report and discussion of the clinical presentation. *Curr Probl Diagn Radiol* 34:47–50
5. Grogan DP, Gasser SI, Ogden JA (1989) The painful accessory navicular: a clinical and histopathological study. *Foot Ankle* 10:164–169
6. Issever AS, Minden K, Eshed I et al (2007) Accessory navicular bone: when ankle pain does not originate from the ankle. *Clin Rheumatol* 26:2143–2144
7. Kiter E, Erdag N, Karatosun V et al (1999) Tibialis posterior tendon abnormalities in feet with accessory navicular bone and flat-foot. *Acta Orthop Scand* 70:618–621
8. Kiter E, Gunal I, Karatosun V et al (2000) The relationship between the tibialis posterior tendon and the accessory navicular. *Anat Anz* 182:65–68
9. Kiter E, Gunal I, Turgut A et al (2000) Evaluation of simple excision in the treatment of symptomatic accessory navicular associated with flat feet. *J Orthop Sci* 5:333–335
10. Kruse RW, Chen J (1995) Accessory ossicles of the foot: clinical significance. *Mil Med* 160:464–467
11. Lawson JP, Ogden JA, Sella E et al (1984) The painful accessory navicular. *Skeletal Radiol* 13:250–262
12. Lawson JP (1994) International skeletal society lecture in honor of Howard D. Dorfman. Clinically significant radiologic anatomic variants of the skeleton. *AJR Am J Roentgenol* 163:249–255
13. Miller TT (2002) Painful accessory bones of the foot. *Semin Musculoskelet Radiol* 6:153–161

14. Mellado JM, Ramos A, Salvadó E et al (2003) Accessory ossicles and sesamoid bones of the ankle and foot: imaging findings, clinical significance and differential diagnosis. *Eur Radiol* 13:L164–L177
15. Mygind HB (1953) The accessory tarsal scaphoid. *Acta Orthop* 23:142–151
16. Nakayama S, Sugimoto K, Takakura Y et al (2005) Percutaneous drilling of symptomatic accessory navicular in young athletes. *Am J Sports Med* 33:531–535
17. Sarrafian SK (1993) Osteology. In: Sarrafian SK (ed) *Anatomy of the foot and ankle*. Lippincott, Philadelphia, pp 89–112
18. Sella EJ, Lawson JP, Ogden JA (1986) The accessory navicular synchondrosis. *Clin Orthop* 209:280–285
19. Sella EJ, Lawson JP (1987) Biomechanics of the accessory navicular synchondrosis. *Foot Ankle* 8:156–163
20. Sullivan JA, Miller WA (1979) The relationship of the accessory navicular to the development of the flat foot. *Clin Orthop Relat Res* 144:233–237
21. Ugolini PA, Raikin SM (2004) The accessory navicular. *Foot Ankle Clin* 9:165–180