



Immunohistochemically Investigation of the Effect of Repeated Doses of GnRH on Oestrogen α and Progesterone B Receptors in Rats

Sema USLU¹  Mecit YÖRÜK² 

¹ Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Burdur, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Van, Turkey

Received: 16.10.2020

Accepted: 04.11.2020

ABSTRACT

The present study aimed to determine the effect of repeated doses of GnRH injection on the distribution of estrogen and progesterone receptors. In the study (n = 24) rats were used. Trial groups; control group with placebo injection (n = 6), Group 1 (n = 6) with single GnRH injection, Group 2 (n = 6) with 5 consecutive days of GnRH, Group 3 with repeated doses of GnRH for 10 days (n = 6) randomly divided into 4 groups. At the end of the application, the ovary and uterus were removed from the sacrificed rats and the histological tissue was blocked after the follow-up procedure. The cut tissues were examined immunohistochemically in terms of estrogen, progesterone receptor distribution, and staining intensity. When ovaries are evaluated in control and 1 group; Estrogen α receptors were seen as (+) in granulosa cells in follicles, primary, secondary and graaf in granulosa cells in follicle wall. (+) Reactions were detected in germinative epithelium, vascular wall endothelial cells, smooth muscle cells and interstitial cells. In the tissue samples taken from the corn and corpus uteri sections, (+) reactions were observed in the endometrial epithelium. In groups 2 and 3, reactions with different intensity in terms of staining intensity were detected in similar settlements in the ovary. Progesterone B receptors; It was observed that corpus luteum luteal cells, germinative epithelium, theca interna / externa cells showed positive reactions in groups 1, 2, 3 and 4, and the intensity of staining varied between groups. While (+) reactions were detected in the endometrium epithelium, stratum basalis region, myometrium, and perimetrium in the corn and corpus uterus, no (+) reaction was detected in the myometrium region in the control group samples.

Keywords: Immunohistochemical, Oestrogen receptor α , Ovary, Progesterone receptor B, Uterine

öz

Ratlarda Tekrarlayan Dozlarda GnRH uygulamasının, Östrojen α ve Progesteron B Reseptörlerine Etkisinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

Sunulan bu çalışma da, tekrarlayan dozlarda GnRH enjeksiyonunun östrojen ve progesteron reseptörlerinin dağılımına etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada (n=24) adet rat kullanıldı. Gruplar; hiçbir uygulama yapılmayıp placebo enjeksiyonu yapılan kontrol grubu (n=6), tek GnRH enjeksiyonu yapılan Grup 1 (n=6), 5 gün üst üste GnRH enjeksiyonu yapılan Grup 2 (n=6), 10 gün süreyle tekrarlayan dozlarda GnRH uygulanan Grup 3 (n=6) olarak rastgele 4 gruba ayrıldı. Uygulama sonunda sakrifiye edilen ratlardan ovaryum ve uteruslar alınarak histolojik doku takip prosedürü ardından bloklandı. Kesilen dokular immunohistokimyasal olarak östrojen, progesteron reseptörlerinin dağılımı ve boyanma şiddeti yönünden incelendi. Kontrol ve 1 grupta ovaryumlar değerlendirildiğinde; Östrojen α reseptörlerinin, foliküllerdeki granuloza hücrelerinde, primer, sekonder ve graaf folikül duvarında granuloza hücrelerinde (+) olarak görüldü. Germinatif epitelde, damar duvarı endotel hücreleri, düz kas hücrelerinde ve interstisyel hücrelerde (+) reaksiyonlar tespit edildi. Kornu ve korpus uteri bölümlerinden alınan doku örneklerinde ise endometriyum epitelinde (+) reaksiyonlar görüldü. Grup 2 ve 3'te, ovaryum da benzer yerleşim bölgelerinde fakat boyanma şiddeti yönünden farklı şiddette reaksiyonlar tespit edildi. Progesteron B reseptörlerinin; Grup 1,2,3 ve 4'te korpus luteum luteal hücreleri, germinatif epitel, teka interna / eksterna hücreleri pozitif reaksiyon gösterdiği, gruplar arasında boyanma şiddetinin değiştiği görüldü. Kornu ve korpus uteride endometriyum epiteli, stratum bazalis bölgesi, miyometriyum ve perimetriyumda (+) reaksiyonlar tespit edilirken kontrol grubu örneklerinde miyometriyum bölgesinde (+) reaksiyon tespit edilemedi.

Anahtar Kelimeler: İmmunohistokimya, Östrojen reseptör α , Ovaryum, Progesteron reseptör B, Uterus



GİRİŞ

Gonadotropin-salglatıcı hormon (GnRH) gonadotropinler diye bilinen, folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH)'ın ve sonrasında gonadal hormonların sentezini ve sekresyonunu kontrol eden dekaeptit yapılı bir hormondur (King ve Millar 1995). En iyi bilinen ovaryum salgıları steroid hormonlardır ve bu salgılar ovaryumdaki korpus luteumdan, çeşitli aşamalarda foliküllerden, interstisyel hücrelerden salgılanırlar (Schams ve Berisha 2002). Ovaryumdan salgılanan steroid hormonların başlıcaları östrojen ve progesterondur. Bu hormonlar dişilerde üreme organlarının morfolojik ve fonksiyonel değişimlerinin kontrolünde rol oynarlar (Srisuwatanaşagul ve ark. 2009).

Östrojen, steroidogenezi ve folikülogenezi iyi bilinen bir düzenleyicidir. Östrojen ovaryum granüloza hücre proliferasyonunu uyararak foliküler gelişimi düzenlemektedir. Granüloza hücrelerinden FSH salgısının artması ve granüloza hücreleri arasındaki etkileşim bilinmektedir (Drummond ve Findlay 1999; Merk ve ark. 1972). Ovaryum içi östrojenle ilgili hareketlerde ovaryum dokusu içerisinde dağılık olarak bulunan Östrojen reseptörü alfa (ER α) ve östrojen reseptörü beta (ER β) adlı iki spesifik östrojen reseptörü bulunmaktadır (Hulas-Stasiak ve Gawron 2007). Yapılan immuno-histokimyasal çalışmalar birçok hayvan türünde bu iki östrojen reseptörünün yerleşimini ve dağılımını ortaya koymuştur (Hild -Petito ve ark., 1988; Chiang ve ark. 2000; Rosenfeld ve ark. 1999; Slomczynska ve Wozniak 2001).

Progesteron hormonu memelilerde reproduktif faaliyetleri düzenleyen, korpus luteum tarafından sentezlenen bir hormondur (Dellman ve Eurell 1988). Progesteron hedef dokularda spesifik hücre içi progesteron reseptörlerine (PR) bağlandıktan sonra etkili olur. Progesteron reseptörlerinin iki izoformu bulunmaktadır, bunlar Progesteron reseptör A (PR-A), Progesteron reseptör B (PR-B) dir (Graham ve Clarke 1997). Progesteron reseptör C (PR-C) adı verilen fakat göğüs kanseri gibi patolojik durumlarda belirlenen progesteron reseptörü de vardır (Wei ve Miner 1994). Progesteron reseptörleri, östrüs siklusunun farklı aşamalarında ovaryumda sığırlar, köpekler gibi farklı hayvanlarda çalışmıştır (Van den Broeck ve ark. 2002; Vermeirsch ve ark. 2001).

MATERYAL ve METOT

Hayvanların Gruplandırılması ve Dokuların Alınması

Çalışmanın planlanması sürecinde, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 07.01.2016 tarihinde 65202830-050.04.04.06 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Çalışmanın için kullanılan hayvanlar, 250-300 gr ağırlığındaki (n=24) Wistar Albino dişi ratlar, Kontrol grubu (n=6) 0,3 ml placebo (fizyolojik tuzlu su) njeksiyonu yapılmıştır. Grup1 (n=6) tek doz (0,3 ml) GnRH (Lesirelin asetat, 25 μ g/ml), Grup 2 (n=6), 5 doz (0,3x5=1,5 ml) GnRH (Lesirelin asetat, 25 μ g/ml), Grup 3 (n=6) 10 doz (0,3 x 10=3,0 ml) GnRH (Lesirelin asetat, 25 μ g/ml) enjeksiyonu yapılan ratlar olarak rastgele gruplandırıldı. Her gruptaki hayvanlar son enjeksiyon yapılan günden 1 gün sonra sakrifiye edilerek ovaryum ve uterusları alındı.

Elde edilen ovaryumlar ve uteruslar, morfolojik görünimleri değerlendirilip % 10'luk tamponlu nötr formaldehit içerisinde 24 saat süreyle tespit edilip, rutin histolojik metotlarla işlenerek paraplast ile bloklandı (Bancroft ve Cook 1984). Her bir dokudan elde edilen 4 μ m

kalınlığındaki seri kesitler, PR- B reseptörü ve ER α belirleyebilmek amacıyla immuno-histokimyasal olarak boyandı.

İmmunohistokimyasal Prosedür

İmmuno-histokimyasal olarak dokular ABC metoduyla, Abcam tarafından belirlenen protokole göre boyandı. Doku kesitleri (4 μ m) polysine ile kaplı lamlara alındı (Thermo scientific, Menzel -Glaser, Germany). Deparafinize edilen kesitlere rehidrasyon sonrası, antijen retrieval (citrate buffer%10 pH: 6) 40dk kaynatılarak uygulandı. Oda ısısında soğutulduktan sonra (%3 metanolde) H2O2de 20 dk nonspesifik boyanmaları önlemek için peroksidaz blokajı yapıldı. PBS yıkamasından sonra 1/5 konsantrasyonda rabbit serum 10 dk inkübe edilerek protein blokaj yapıldı. 1/100 konsantrasyonda östrojen α (Santa Cruz Bioteknoloji- 53493), 1/50 konsantrasyonda PR B (Santa Cruz Bioteknoloji-2615) primer antikorları ile oda ısısında 2 saat inkübe edildi. PBS ile yıkama yapıldı. 20 dk biotin uygulandı, 20 dk PBS yıkamasından sonra 20 dk streptavidin peroksidaz uygulandı. PBS sonrası 10 dk AEC (zymed, 3- Amino-9-ethylcarbazole) takiben Mayer's hematoksileni ile zemin boyaması yapıldı, su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı.

Semikantitatif Analiz ve Skorum

Ovaryum, kornu uteri ve korpus uteri bölümleri ER α ve progesteron B reseptörlerinin İmmunohistokimyasal olarak (+) reaksiyon vermelerine göre farklı iki araştırmacı (Uslu S. ve Yörük M.) tarafından değerlendirildi ve ortalama değerler bulgular bölümüne eklendi. İmmunohistokimyasal olarak AEC kromojen ile kırmızı boyananlar (+) reaksiyon verenler olarak, kırmızı boyanma görülmeyenler ise (-) reaksiyon verenler olarak adlandırıldı. Araştırmadaki sonuçlar boyanma yoğunluğu ve boyanma şiddeti olarak iki şekilde semi-kantitatif biçimde oluşturuldu. Boyanma yoğunluğu skoru, stoplazma, çekirdek ve membranda bulunan pozitif alanları yansıtmaktadır. % 0: boyanma yok, 0. (-) %00 - %20 : zayıf yoğunluk, 1. (+) % 20 -50: orta yoğunluk, 2. (++) % 50- 80 : yoğun 3. (+++) Boyanma şiddeti; boyanma yok : 0, (-) zayıf reaksiyon: 1, (+) Orta reaksiyon: 2, (++) güçlü reaksiyon: 3 (+++) şeklinde değerlendirildi (Brown ve Lamartiner 2000).

BULGULAR

ER α Bulguları

Kontrol, Grup 1, 2, 3'e ait ovaryum örnekleri değerlendirildiğinde foliküllerdeki granüloza hücrelerinde primer, sekonder ve graf folikül duvarında granüloza hücrelerinde (+) reaksiyon olduğu görüldü. Germinatif epitelde ER α reseptörleri (+) olarak belirlendi. Damar duvarı endotel hücreleri, düz kas hücrelerinde ve İnterstisyel hücrelerde (+) reaksiyonlar tespit edildi (Tablo 1).

Kornu ve korpus uteri bölümlerinden alınan doku örneklerinde endometriyum epiteli, stratum bazalis yakınlarındaki stromal bölge, miyometriyum ve perimetriyum bölgesindeki (+) reaksiyonlar değerlendirildiğinde; Grup 1, 2, 3 te endometriyum epiteli, stratum bazalis, ve miyometriyumda (+) reaksiyonlar belirlendi.

PR B Bulguları

Ovaryum doku örnekleri PR B reseptörlerinin korpus luteum luteal hücreleri, korpus albicans hücreleri, germinatif epitel, teka interna/eksterna hücreleri ve stromal hücrelerde incelenerek kontrol grubu, Grup 1, 2, 3

te pozitif reaksiyon ve boyanma şiddetinin değiştiği görüldü (Tablo 1).

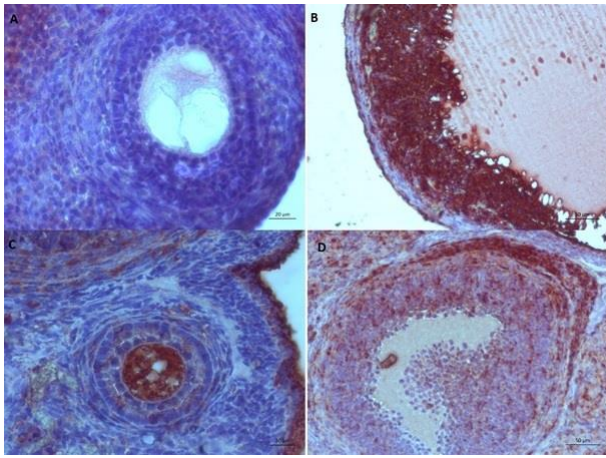
Kornu ve korpus uteri kontrol grubu, Grup 1, 2, 3'te endometriyum epitel, stratum bazalis bölgesi,

miyometriyum ve perimetriyumda (+) reaksiyonlar tespit edilirken kontrol grubu örneklerinde miyometriyum bölgesinde (+) PR B reaksiyonu tespit edilemedi.

Tablo 1. GnRH enjeksiyonu sonrası ovaryum, korpus ve kornu uterilerinde ER α ve PR B'nin immunohistokimyasal lokalizasyonlarının boyanma şiddeti ve yoğunluk ortalaması skoru.

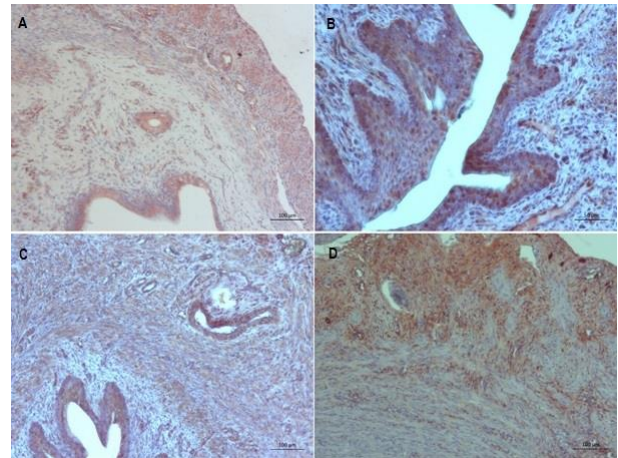
Table 1. The staining intensity and intensity mean score of the immunohistochemical localizations of ER α and PR B in the ovary, corpus and cornu uteri after GnRH injection.

Ovaryum	ER α				PR-B			
	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Germinatif epitel	+	+	+	+++	++	++	++	++
Granüloza hücreleri	++	++	+++	++	-	-	-	-
Teka eks/teka int	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Korpus luteum/Korpus albikans					-/+	-/+	-/+	-/+
Kornu ve Korpus uteri								
Yüzey epitel	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Str bazalis ve bağ doku	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+
Miyometriyum ve perimetriyum	++/++	++/++	++/++	++/++	-/-	++/++	++/++	++/++



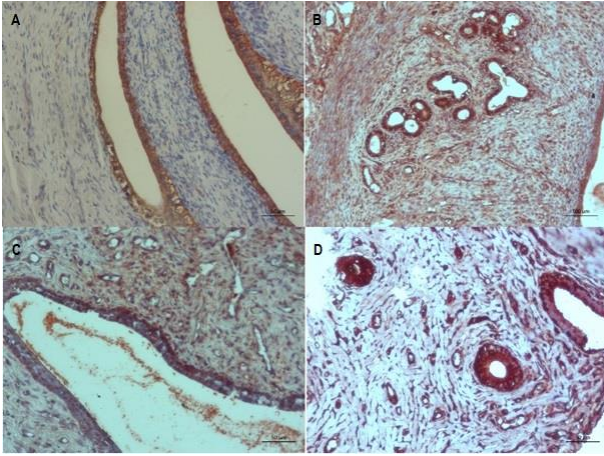
Şekil 1. Ovaryum östrojen α boyamalarının Grup 1, 2, 3 de gösterimi. **A-** Grup 1, ovaryum, primer folikül, östrojen α (+); **B-** Grup 2, ovaryum, granuloza hücreleri, östrojen α (+); **C-** Grup 3, ovaryum, primer folikül ve germinatif epitel, östrojen α (+); **D-** Grup 3, ovaryum, tersiyer follikül, teka interna ve externa, östrojen α (+).

Figure 1. Display of ovarian estrogen α staining in Groups 1, 2, 3. **A-** Group 1, ovary, primary follicle, estrogen α (+); **B-** Group 2, ovary, granulosa cells, estrogen α (+); **C-** Group 3, ovary, primary follicle and germinative epithelium, estrogen α (+); **D-** Group 3, ovary, tertiary follicle, theca interna and externa, estrogen α (+).



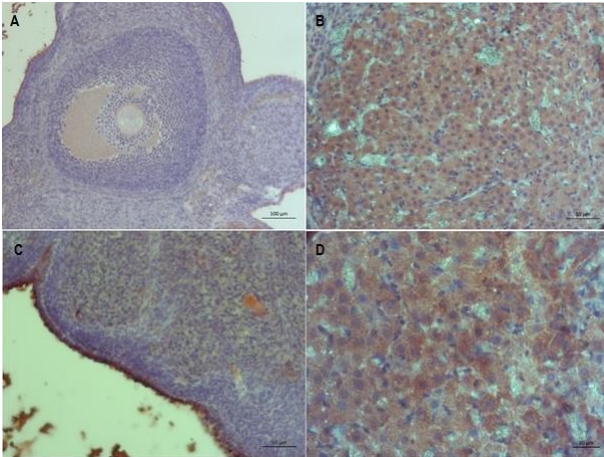
Şekil 2. Korpus uteri östrojen α boyamalarının Grup 1, 2, 3 de gösterimi. **A-** Grup 1, korpus uteri, östrojen α (+); **B-** Grup 2, korpus uteri, endometriyum, östrojen α (+); **C-** Grup 1, korpus uteri, endometriyum, epitel ve bezde östrojen α (+); **D-** Grup 3, korpus uteri, myometriyum, östrojen α (+).

Figure 2. Representation of corpus uteri estrogen α staining in Groups 1, 2, 3. **A-** Group 1, corpus uteri, estrogen α (+); **B-** Group 2, corpus uteri, endometrium, estrogen α (+); **C-** Group 1, corpus uteri, endometrium, epithelium and gland estrogen α (+); **D-** Group 3, corpus uteri, myometrium, estrogen α (+).



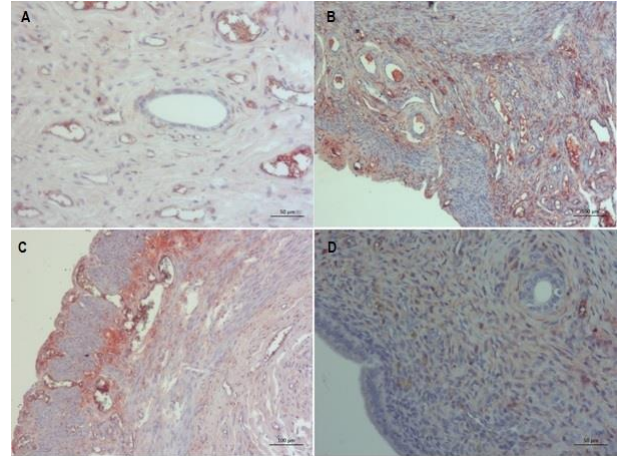
Şekil 3. Kornu uteri östrojen α boyamalarının Grup 1, 2, 3 de gösterimi. **A-** Kontrol kornu uteri, Östrojen α (+); **B-** Grup 1, kornu uteri, endometrium bez epiteli, östrojen α (+); **C-** Grup 2, kornu uteri, endometrium, östrojen α (+); **D-** Grup 2, kornu uteri, endometrium bezleri, östrojen α (+).

Figure 3. Display of Kornu uteri estrogen α staining in Groups 1, 2, 3. **A-** Control corn uteri, Estrogen α (+); **B-** Group 1, cornu uteri, endometrial gland epithelium, estrogen α (+); **C-** Group 2, cornu uteri, endometrium, estrogen α (+); **D-** Group 2, cornu uteri, endometrial glands, estrogen α (+).



Şekil 4. Ovaryum PR-B boyamalarının Grup 2, 3 de gösterimi. **A-** Grup 2, ovaryum, teka externa, PR-B (+); **B-** Grup 2, ovaryum, luteal hücreler, PR-B (+); **C-** Grup 3, ovaryum, germinatif epitel, PR-B (+); **D-** Grup 3, ovaryum, luteal hücreler, PR-B (+).

Figure 4. Display of ovary PR-B staining in Group 2, 3. **A-** Group 2, ovary, theca externa, PR-B (+); **B-** Group 2, ovary, luteal cells, PR-B (+); **C-** Group 3, ovary, germinative epithelium, PR-B (+); **D-** Group 3, ovary, luteal cells, PR-B (+).



Şekil 5. Kornu uteri PR-B boyamalarının Kontrol ve Grup 2, 3 de gösterimi. **A-** Kontrol grubu, kornu uteri, PR-B (+); **B-** Kontrol grubu, korpus uteri, PR-B (+); **C-** Grup 2, kornu uteri, PR-B (+); **D-** Grup 3, kornu uteri, PR-B (+).

Figure 5. Display of Kornu uteri PR-B staining in Control and Group 2, 3. **A-** Control group, cornu uteri, PR-B (+); **B-** Control group, corpus uteri, PR-B (+); **C-** Group 2, cornu uteri, PR-B (+); **D-** Group 3, cornu uteri, PR-B (+).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ratlarda östrüs siklusunun değişik dönemlerinde östrojen ve progesteron reseptörlerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmada da farklı doz ve sürelerde eksojen GnRH uygulamasının östrojen ve progesteron reseptörleri üzerine immünohistokimyasal etkileri incelenmiştir.

GnRH düşük dozda uygulanması ile ovulasyon üzerine etkili olarak görülmüştür. Ratlarda yapılan çalışmada uygulanan GnRH ovulasyonun baskılanması üzerinde etkili belirlenmiştir (Reissmann ve ark. 2000). Uzun süreli GnRH uygulamaları ise FSH ve LH konsantrasyonuna etki ederek folikül gelişimine, uterus ağırlığına, ovaryum makroskopi ve mikroskopisine, östrüs siklus bulguları üzerine etkili görülmüştür (Janssens ve ark. 2000).

Yapılan çalışmada ovaryum, uterusda makroskopik ve mikroskopik değişimler olduğu tanımlandı. Ovaryumda folikül gelişimini sayısal ve yapısal olarak arttırdığı belirlendi. Uterus da kornu, korpus bölümlerinde yapısal farklılaşmaların başladığı östrojen ve progesteron reseptörlerinin boyanma şiddeti ve boyanma yoğunlukları üzerine etkili olduğu görüldü. Bu sonuçlar uzun süreli GnRH uygulamasının ovaryum ve uterus üzerine etkili olduğunu ifade eden Soltysik ve ark. (2014)'nin çalışması ile uyum göstermektedir. Soltysik ve ark. (2014), GnRH uygulamasının iki hafta süreden sonra siklus üzerine, folikülogenezis üzerine, ovulasyon üzerine, androjen reseptörlerinin, östrojen reseptörlerinin ve progesteron reseptörlerinin stroma ve çekirdek yerleşimi üzerine etkili olduğu uterusda ise yapısal değişime sebep olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışma ise 10 gün ve 5 gün GnRH uygulamalarının reseptör yerleşiminde boyanma şiddet ve yoğunluk bakımından etkili görülmüştür. Progesteron reseptörlerinin 10 gün ve 5 gün GnRH uygulanan gruplarda ovaryum ve uterusun iki kısmında daha yoğun olması luteinizasyon üzerine GnRH etkisini düşündürmektedir. GnRH uygulamalarının bu iki grupta folikülogenezisin ve östrojen α 'nın immünohistokimyasal reaksiyon şiddetinin arttığı görülmüştür (Roth ve ark. 2000). GnRH uygulamalarının 10 gün süreden daha az uygulanmasında uterusda ağırlık kaybı şekillenmediği, yapısal olarak

preparatlarda da farklılık görülmediği söylenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Östrojen α ve Progesteron B reseptörlerinin yoğunluklarının tek doz uygulamada değişmediği 5 gün ve 10 gün uygulamalarında ise benzer olarak değişimin olduğu tespit edilmiştir. Soltysik ve ark. (2014) çalışmalarında ovaryum ve uterus uzun süreli uygulamalarla değişikliklerin olduğu ve hormonal geri dönüşümün olabildiği belirtilmiştir.

Östrojen α reseptörünün farelerde uterus duvar kalınlığı uterus hacmi ve infertilite üzerine etkili olduğunu araştırılmış ve etkili olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark. 2009). Farelerde desidua formasyonu ile östrojen progesteron reseptörlerinin bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Winuthayanon ve ark. 2010). Yapılan çalışmada da GnRH uygulamalarından uterus endometriyum bez hücreleri ve epitel hücrelerinin etkilenmiş olması östrojen ve progesteron reseptör yoğunluğunun hormonal değişimden etkilendiği uygulama süre ve dozu arttıkça etkinin değiştiği belirlenmiştir. Östrojen reseptörlerinin ve progesteron reseptörlerinin dağılımının, rolünün ovaryum ve uterus, benzer olmadığı bildirilmiştir (Winuthayanon ve ark. 2010). Yapılan çalışmada da östrojen α ve progesteron B nin yerleşim yerlerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada GnRH uygulamalarının östrojen α ve progesteron B ekspresyonu üzerine etkisi araştırılarak tek doz uygulama da kontrol grubuna benzer olan yoğunluk ve yerleşimde reseptörler belirlenmiştir. Beş ve on gün uygulamalarında ise östrojen α ekspresyonun ovaryum ve uterus yer yer boyanma şiddeti olarak arttığı görülmüştür. Progesteron B nin ise ovaryumda üç grupta da benzer yoğunluk ve yerleşimde olduğu uterus ise on gün GnRH uygulama yapılan grupta ise endometriyum ve miyometriyum bölgelerinde artış gösterdiği görülmüştür.

Teilman ve ark. (2006), PR-B reseptörlerinin sığırlarda sekonder ve tersiyer foliküller, granuloza hücreleri, teka interna ve teka eksterna hücrelerinde lokalize olduğu bildirilmiştir. Progesteron üretiminin sadece granuloza hücreleriyle değil, aynı zamanda teka interna ve teka eksterna tarafından da üretilebildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, progesteronun sığırlarda daha önce bildirildiği üzere PR'nün immünohistokimyasal olarak boyanması üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Haeseleer ve ark. 2006). Ratlarda yapılan çalışmada kontrol grubunda korpus luteum luteal hücrelerinin yoğun ve şiddetli pozitif olarak boyandığı görüldü. Korpus albicanslarda zayıf pozitiflik, germinatif epitelde ise orta şiddette pozitiflik ve yoğun olarak her alanın boyandığı görüldü. Grup 1 ovaryum örneklerinde progesteron B reseptörlerinin korpus luteuma ait luteal hücrelerde orta ve zayıf (+) immünohistokimyasal reaksiyon verdiği belirlendi. Grup 2 ye ait ovaryum örneklerinde irili ufaklı korpus luteum sayısının fazla olduğu görüldü. Luteal hücrelerde yoğun reaksiyon ve boyanma derecesi orta ve güçlü belirlendi. Germinatif epitel ve bazı stromal hücrelerde de (+) boyanmalar görüldü. Teka interna ve eksterna larda progesteron B (+) reaksiyon zayıf olarak tespit edildi. Grup 3 ovaryum kesitlerinde de korpus luteum sayısının fazla olduğu, luteal hücrelerde de yoğun boyanma reaksiyonları belirlendi. Germinatif epitelde progesteron B güçlü (+) olarak tespit edildi.

İneklerde yapılan bir başka çalışmada (Akbalık ve ark. 2011), luteal ve folliküler fazda ovaryumlarda ER ve PR'lerinin lokalizasyonu ve yoğunluğu karşılaştırılmış ve PR-B'nin immünohistokimyasal olarak germinal epitel, stroma hücreleri, korpus albicans ve CL'da pozitif reaksiyon (+) verildiği, ER- α 'nın granuloza, germinal epitelium hücrelerinden primer folikül hücrelerinde

immünohistokimyasal olarak (+) reaksiyon cevap verildiği bildirilmiştir. Lokalizasyonun olarak incelenen rat ovaryumunda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Teilman ve ark. (2006), farelerde yaptıkları bir çalışmada, uygulama yapılmayan grupta PR zayıf boyandığı fakat farelere hCG uygulaması ile yapılan boyamalar sonucu güçlü bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir. Granuloza hücreleri, preovulator folliküllerin boyandığı kumulus hücrelerinin boyanmadığı tespit edilmiştir (Teilman ve ark. 2006). Bu boyanma derecelerinin ve reaksiyon gücünün GnRH ile hCG uyarımı ile boyanma özelliklerinin artırılabilirliğini göstermektedir. Yapılan çalışma Teilman ve ark. (2006)'nın sonuçları ile uyumludur.

Mevcut sonuçlar değerlendirildiğinde; ratlara GnRH'nin tek enjeksiyonu ve tekrarlayan enjeksiyonları ile ovaryum ve uterus ER α ve PR-B reseptörlerinin (+) reaksiyonlar gösterdiği belirlenmiştir. Tekrarlayan dozlarda GnRH enjeksiyonunun ER α ve PR-B reseptörlerinin dağılımlarına, yoğunluğuna kısmen etkili olduğu, boyanma reaksiyonuna şiddetine ise etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan bu çalışmadaki GnRH hormon uygulamalarının, ileride yapılacak olan üreme hormonu uygulamalarının, immünohistokimyasal etkilerinin araştırıldığı çalışmalara kaynak teşkil edeceği ve bu konudaki literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızı, VF-049 nolu proje ile destekleyen, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Akbalık ME, Sağsöz H, Saruhan BG (2011).** Localization of estrogen receptor alpha and progesterone receptor B in the bovine ovary during the follicular and luteal phase of the sexual cycle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 795-802
- Bancroft JD, Cook HC (1984).** Manuel of Histological Techniques. Churchill Livingstone Inc. New York.
- Brown NM, Lamartiniere CA (2000).** Genistein regulation of transforming growth factor- α , epidermal growth factor (EGF) and EGF Receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ*, 11, 255-260.
- Chiang CH, Cheng KW, Igarashi S ve ark. (2000).** Hormonal regulation of estrogen receptor alpha and beta gene expression in human granulosa-luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 3828-3839.
- Chen M, Wolfe A, Wang X ve ark. (2009).** Generation and characterization of a complete null estrogen receptor alpha mouse using Cre/LoxP technology. *Mol Cell Biochem*, 1-2, 145-153.
- Delman HD, Eurell JA (1988).** Textbook of Veterinary Histology, 5th ed Williams-Wilkins London pp: 252-325.
- Drummond AE, Findlay JK (1999).** The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 151, 57-64.
- Graham JD, Clarke CL (1997).** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18, 502-519.
- Haeseleer MD, Simoens P, Van den Broeck W (2006).** Cell-specific localization of progesterone receptors in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 98, 271-281.
- Hild-Petito S, Stouffer RL, Brenner RM (1988).** Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology*, 123, 2896-2905.
- Hulas-Stasiak M, Gawron A (2007).** Immunohistochemical localization of estrogen receptors ER alpha and ER beta in the spiny mouse (*Acomys Cahirinus*) ovary during postnatal development. *J Mol Hist*, 38, 25-32.
- Janssens RM, Brus L, Cahill DJ ve ark. (2000).** Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum Reprod Update*, 6, 505-518.

- King JA, Millar RP (1995).** Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol*, 15, 5-23.
- Merk FB, Botticelli CHR, Albright JT (1972).** An intercellular response to estrogen by granulosa cells in rat ovary; an electron microscope study. *Endocrinology*, 90, 992-1007.
- Reissmann T, Schally AV, Bouchard P ve ark. (2000).** The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod Update*, 6, 322-331.
- Rosenfeld CS, Yuan X, Manikkam M ve ark. (1999).** Cloning, sequencing and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 60, 691-697.
- Roth Ch, Leonhardt S, Seidel CH ve ark. (2000).** Comparative analysis of different puberty inhibiting mechanisms of two GnRH agonists and the GnRH antagonist cetrorelix using a female model. *Pediatr Res*, 48, 468-474.
- Schams D, Berisha B (2002).** Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domestic Anim Endocrinol*, 23, 53-65.
- Slomczynska M, Wozniak J (2001).** Differential distribution of estrogen receptor beta and estrogen receptor alpha in the porcine ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109, 238-244.
- Soltysik K, Czekał P, Suszka-Switek A ve ark. (2014).** Changes in the subcellular and tissue location of estrogen and progesterone receptors in rat uterus after long-term treatment with analogs of gonadoliberin. *Ginekol Po*, 185, 254-263.
- Srisuwatanasagul S, Tummaruk P, Kunavongkrit A (2009).** Studies of oestrogen and progesterone receptors in reproductive organs of prepubertal gilts with reproductive disturbance. *Thai J Vet Med*, 40, 15-24.
- Teilmann SC, Clement CA, Thorup J ve ark. (2006).** Expression and localization of the progesterone receptor in Mouse and human reproductive organs. *J Endocrinol*, 191, 525-535.
- Van den Broeck W, D'Haeseleer M ve ark. (2002).** Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. *Reprod Domest Anim*, 37, 164-170.
- Vermeirsch H, Simoens P, Ccorijn M ve ark. (2001).** Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction*, 122, 73-83.
- Wei LL, Miner R (1994).** Evidence for the resistance of a third progesterone receptor protein in human breast cancer line T47D. *Cancer Research*, 54, 340-343.
- Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD ve ark. (2010).** Uterine epithelial estrogen receptor is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci*, 45, 19272-19277.