

Hipertermide Tuba Uterina Yapısı

The Structure of Tuba Uterina in Hyperthermia

Gülşen Gülüzade Mehrabova, Celal Ilgaz, Deniz Erdoğan, Güleser Göktaş

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Vücut sıcaklığı 41°C ya da daha üst bir değere yükseldiğinde hipertermi oluşur ve bu ısı denetim düzeneklerinin bozulmasına yol açabilir. Tuba uterinada sıcaklığın artması silli hücrelerin apoptozisine, epitel hücrelerinde oksidatif stres gelişimine ve erken embriyonik ölümlere neden olur. Süperoksit dismutaz (SOD) serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak oksidatif stresi engelleyebilir ve apoptotik süreci geri döndürebileceği düşünülen bir antioksidandır. Bu çalışmada; hipertermi ile oluşturulan ısı stresinin ve stres öncesinde kullanılan SOD' un, tuba uterina üzerindeki koruyucu etkilerinin apoptotik ve oksidatif stres belirteçleri kullanılarak immünohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada kullanılan 18 adet Wistar-albino cinsi dişi sıçanlar, her grupta 6 denek olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubundaki denekler, sıcaklığı 22° C'ye ayarlanmış havuzda 20 dakika süre ile tutulmuş ve 24 saat sonra kesilmiş, ikinci ve üçüncü gruptaki denekler ise; sıcaklığı 42° C'ye ayarlanmış havuzda 20 dakika bekletilerek sırasıyla 30. dakika ve 24. saatte kesilerek tuba uterina dokuları alınmıştır. Hipertermi uygulaması yapılan gruplara, uygulamadan 1 saat önce NaCl+Catalaz+SOD enjeksiyonu yapılmıştır. Alınan dokulara, hiperterminin neden olduğu apoptozisi belirlemek için Kaspaz-3, Kaspaz-8 ile Kaspaz-9 protein yapılarına etkisinin belirlenebilmesi amacıyla HSP-70 primer antikolarıyla indirekt immünohistokimyasal yöntem uygulanmıştır.

Bulgular: Yapılan değerlendirmelerde; Kaspaz-9 tutulumunun daha belirgin olduğu saptanmıştır. İmmünoaktivitenin özellikle epitelde, hücre sitoplazmasında ve silyalarda, hipertermi uygulamasına koşut arttığı izlenmiştir. Kaspaz-3 tutulumunun hipertermi ile çok belirgin artmadığı saptanmıştır. Tüm kaspazlar için SOD uygulamasının süreye koşut tutulumu azalttığı gözlenmiştir. HSP-70 tutulumunun genelde epitel hücrelerinde sitoplazmik düzeyde ve orta dereceli olduğu, SOD uygulaması ile tutulumun süreye koşut arttığı belirlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak apoptotik programın merkezi bileşenleri olan kaspazların aktivasyonu, hiperterminin özellikle epitel hücrelerinde dış yoldan apoptozisi başlattığı yargısına varılmıştır. Ancak SOD uygulamasının süreye koşut apoptozisi baskıladığı, bunun da artan HSP-70'in koruyucu etkisi aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hipertermi, tuba uterina, apoptozis, HSP-70, immünohistokimya.

Geliş Tarihi: 25.02.2013

Kabul Tarihi: 12.07.2013

ABSTRACT

Objective: When the body temperature reaches the value of 41°C or higher hyperthermia occurs and this may lead to the destruction of heat regulation mechanisms. The rise of temperature within the fallopian tubes (tuba uterina) leads to apoptosis of ciliated cells, development of oxidative stress and early embryonic death. Superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant believed to be able to prevent oxidative stress and reverse apoptotic process by removing free oxygen radicals. This study aims to immunohistochemically detect protective effects of heat stress caused by hyperthermia, SOD used before the stress on tuba uterina by using apoptotic and oxidative stress markers.

Methods: 18 Wistar-albino female rats used within the study were separated into 3 groups, with 6 rats in each group. Test subjects within the control group were held for 20 minutes in the pool of 22°C and dissected 24 hours later. Subjects of second and third groups were held for 20 minutes in the pool of 42°C, and respectively dissected 30 minutes and 24 hours later, and their tuba uterina tissues removed. Groups where hyperthermia was applied were injected with NaCl+Catalase+SOD one hour before. In order to determine apoptosis caused by hyperthermia, removed tissues were subjected to indirect immunohistochemical method with HSP-70 primary antibodies to detect impact on Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 protein structures.

Results: Through conducted assessments it was determined that Caspase 3 retention was more evident. It was tracked that parallel to hyperthermia application immunoreactivity increased especially in epithelia, cell cytoplasm and cilia. It was detected that Caspase 3 retention does not increase significantly with hyperthermia. It was observed that for all caspases SOD application reduces retention parallel to time. It was identified that HSP-70 retention occurs generally in epithelia cells on cytoplasm level moderately, and with SOD application retention increases parallel to time.

Conclusion: It was concluded that with the activation of caspases, the central components of apoptotic program, especially in epithelia cells hyperthermia starts apoptosis from the external pathway. It was deduced that SOD+Catalase application represses apoptosis parallel to time, which probably happens due to the increased HSP-70's protective effect.

Key Words: Hyperthermia, fallopian tube, apoptosis, HSP-70, immunohistochemistry.

Received: 25.12.2013

Accepted: 07.12.2013

GİRİŞ

İnsan organizması tüm yaşamsal işlevlerini, ancak belirli vücut ısısında sürdürebilir. Vücutta yer alan derin dokuların ısıları, cinsiyet, kişinin hareket etme durumu, yeme-içme tüketimi, günün saati, kadınlarda menstruasyon evresi ve ateşli bir hastalık olmadıkça 37°C' de sabit tutulmaya çalışılır. Bu değer sıçanlar için de 37,5-38,5 °C' dir. Normal değer gün içinde $\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ' lik sapmalar gösterebilir. Vücut ısısı 41°C ya da daha üst bir değere yükseldiğinde ise hipertermi oluşarak ve ısı denetim düzeneklerinin bozulmasına yol açabilir. Vücut ısısının yükselmesiyle organizmada doku hasarları oluşur. Üreme organları yüksek ısıya karşı çok duyarlı oldukları için hipertermi bu organları ve doğum öncesi evrede embriyon kalitesini etkilemektedir (1).

Tuba uterinaller üreme işlevinde birçok önemli role sahiptirler. Bunlardan en önemlisi ise üremenin ilk aşaması olan döllenmenin burada gerçekleşmesidir. Döllenmeden sonra tuba uterinaller oluşan zigot ve erken dönem embriyonun uterusu iletilmesinde ve bu iletilme sırasında embriyonun beslenmesinde de önemli işlevler üstlenirler. Maternal hipertermi tuba uterinallerde oksidatif stres oluşumuna neden olur. Hipertermi uygulanan sıçanların embriyonlarında iki hücreli evrede Cdc-2 aktivitesinde olan bozuklukla ilgili olarak gelişimsel yetilerde kayıp izlenilmektedir (2). Maternal hiperterminin zigot, morula ve blastosistte toplam hücre sayılarını önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Aynı zamanda hipertermiye maruz kalmış farelerin iki hücreli evrede olan embriyonlarında DNA hasarı çok yüksek bulunmuştur (3). Bu nedenle hiperterminin maternal vücuttaki redoks durumunda sistemik değişikliklere neden olduğu ve tuba uterinada oksidatif stresin artmasını tetiklediği, bunun da erken embriyonik ölümlerle ilgili olduğu düşünülmektedir.

Hipertermi gametogenezis üzerinde gösterdiği olumsuz etkisini apoptozisi indükleyerek gerçekleştirir. Bu durum moleküler düzeyde oositlerde ve Leydig hücrelerindeki membran bütünlüğünü bozarak sfingomyelinazları aktive eder. Sonuçta Bcl-2 yolağı üzerinden sitoplazmadaki APAF-1 aktivitesi artar ve apoptozis olaylanır (4). Yüksek sıcaklıkta tüm organizmada yaygın olarak bulunan ısı şok proteinleri (HSP) ise koruyucu bir mekanizma oluştururlar. Isıyla organizmadaki birçok protein yapıların denatüre olması ve hücrelerde lipid peroksidasyonun artması sonucunda, çoğu organda geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz hasarlar ortaya çıkar. Sıcaklık artması sonucu organlardaki ribozomlarda HSP sentezi de artarak, denatüre proteinlerin renatüre olmasına aracılık eder (5). SOD ise serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak oksidatif stresi engelleyebilen ve apoptotik süreci geri döndürebileceği düşünülen antioksidan bir maddedir (6). Tüm bu nedenlerle, oksidatif metabolizma sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin enzimlerle, vücuttaki antioksidan mekanizmalar ya da dışarıdan verilen antioksidan maddeler ile yok edilebileceği düşünülebilir. Buna koşut olarak çalışmamızda hipertermi ile oluşturulan ısı stresinin ve stres öncesinde kullanılan SOD'un, tuba uterina üzerindeki koruyucu etkilerinin apoptotik ve oksidatif stres belirteçleri kullanılarak immünohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Gruplandırma:

Çalışmada Wistar albino cinsi dişi sıçanlardan oluşan ve her birinde 6 denek bulunan 3 grup oluşturuldu. Hiperterminin oluşturulması amacıyla sıçanlar 42°C sıcak su banyosunda 20 dakika süreyle bekletildi. SOD'un antioksidan etkisinin incelenmesi amacıyla 1ml % 0.9' luk NaCl içerisinde 50.000 U/kg SOD ve 90 U/kg katalaz çözülerek hazırlanan sıvı, ısı stresi oluşumundan bir saat önce deneklere subkutan olarak uygulandı. 1. Grup: 22° C sıcak su banyosu uygulanan ve 24 saat sonra dokuların alınacağı kontrol grubu, 2. Grup: Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl+Katalaz+SOD uygulaması yapılan ve hipertermi sonrası 30. dakikada dokuların alınacağı grup, 3. Grup: Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl+Katalaz+SOD uygulaması yapılan ve hipertermi sonrası 24. saatte dokuların alınacağı grup olarak belirlendi. Süre sonunda her denekten alınan sağ tuba uterina örnekleri %10'luk nötral formaldehite alınarak dokuların tespit edilmesi sağlandı. Alışılmış ışık mikroskopik izleme yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar oluşturuldu.

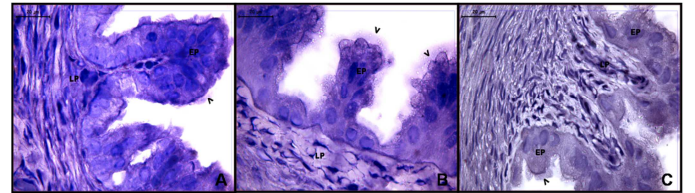
İmmünohistokimyasal Yöntem

Dokulara immünohistokimyasal yöntem olarak peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) indirekt immünohistokimyasal yöntem uygulanarak Kaspaz-3 (Cat: RB-1197, Lot: 1197P08A, NeoMarkers, USA), Kaspaz-8 (Cat: RB-1200-P, Lot: 1200P708C, Neomarkers, USA), Kaspaz-9 (Cat: RB-1205-P, Lot:1205P306, Neomarkers, USA) ve HSP-70 (Cat: Sc-66048, Lot: J1408, Santa Cruz, USA) primer antikoları uygulandı.

Sekonder kit olarak Kaspaz-3, 8, 9 için Ultravision Detection System (Cat: TA-125-UB, Lot: AUB70803, Lab Vision, Fremont, USA) ve HSP-70 için HRP kit (Cat: 85-9043, Lot: 1396691, Zymed, Frederick, USA) kullanıldı. Elde edilen bloklardan polilizinli camlara 4 μm ' luk kesitler alınarak deparafin ve dehidrate edildiler. Sonrasında %3' lük hidrojen peroksit etkin bırakılarak doku içerisindeki endojen peroksidaz aktiviteleri bloke edildi. Formaldehitin kapattığı epitel bölgelerini açığa çıkartmak amacıyla Kaspaz-3, 8 ve 9 uygulanacak kesitlere "retriver" uygulaması yapıldı. HSP-70 için bu işlem uygulanmadı. Daha sonra, camlar PBS (Phosphate Buffer Saline, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Kaspaz-3, 8 ve 9 için 5 dakika ve HSP-70 için 10 dakika Ultra V Blok uygulandı. Blok aşamasının ardından kesitler Kaspaz-3, 8, 9 için 1 saat ve HSP-70 için +4°C' de bir gece primer antikolarla etkin bırakıldı. Bu sürelerin sonunda camlar PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika biyotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Yeniden PBS ile yıkanan camlar, enzimin biyotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı. Kromojen olarak Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 antikoları için AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Cat:TA-007-HAC, Lot: 007HAC13565, Lab Vision, Fremont, USA) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. HSP-70 primer antikoru için kromojen olarak DAB (3,3'-aminobenzidine Tetrahydrochloride-Plus kit, Cat No; 00-2020, Lot; 421138A, Zymed, Frederick, USA) kullanıldı. Zemin boyamasında Kaspaz-3, 8 ve 9 için Mayer' in hematoksileni (Cat:TA-125-MH, Lot: AMH70809, Lab Vision, Fremont, USA) ve HSP-70 için Harris' in hematoksileni uygulandı. AEC ile boyanan camlar Ultramont (Cat: TA-125-UG, Lot: VM13518, Lab Vision, Fremont, USA), DAB ile boyanan camlar entellan ile kapatıldılar. Tüm preparatlar Leica DM 4000 (Leica, Weetlar, Germany) mikroskobunda kamera ataçmanlı (DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirilerek fotoğraflandırdılar.

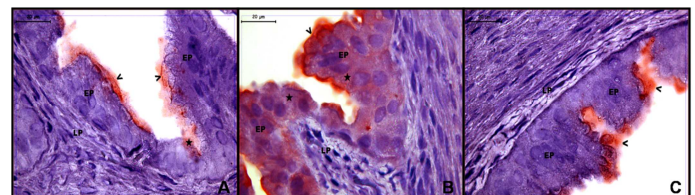
BULGULAR

Kaspaz-8 immünboyamalarında 1. grupta; immün tutulumunun özgün olmadığı gözlemlendi. Silyalı hücrelerde silyalar üzerinde ve yer yer apikal sitoplazmada nadiren belirlenen tutulum zayıftı (Resim 1A). 2. grupta; Kaspaz-8 tutulumu epitel hücrelerinde, apikal sitoplazmada ve silyalarda orta-zayıf düzeydeydi (Resim 1B). 3. grupta; Kaspaz-8 tutulumunun epitel hücrelerinde apikal sitoplazmada ve silyalarda orta-zayıf düzeyde olduğu görüldü. Lamina propria ve kas dokusunda da immünreaktivite zayıftı (Resim 1C) (Tablo 1).



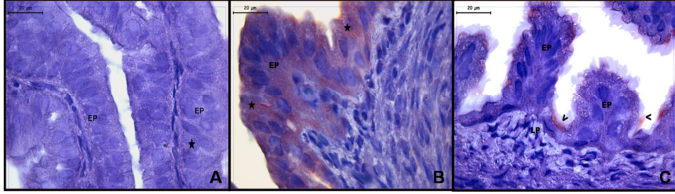
Resim 1A,B,C: A: 1. grup, B: 2. grup, C: 3. grupta Kaspaz-8 boyaması yapılan tuba uterina dokusunda; immünreaktivitenin epitelde (EP), silyalarda (<) ve lamina propriada (LP) son derece zayıf olduğu görülüyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B,CX1000).

Kaspaz-9 immünreaktivitesinin ise 1. grupta; silli hücrelerde apikal hücre zarı, apikal sitoplazma ve silyalarda olduğu izlendi. Bağ dokusu hücrelerinde ve kas dokusunda tepkime zayıftı (Resim 2A). 2. grupta; tutulum tüm epitel hücre sitoplazmasında yaygındı. Apikal sitoplazmada, hücre zarı ve silyalarda ise yoğun reaktivite ilgiyi çekti. Lamina propria ve kas dokusunda yer yer orta dereceli tutulum izlendi (Resim 2B). 3. grupta tutulum kontrole eşdeşti ve epitelde, apikal hücre zarı ile silyalarda belirgindi. Lamina propria ve kas dokusu tutulumu kontrole benzerdi (Resim 2C) (Tablo 1).



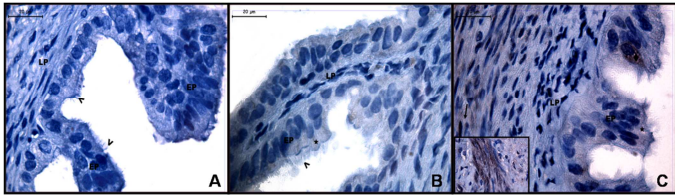
Resim 2A,B,C: A: 1. grup, B: 2. grup, C: 3. grupta Kaspaz-9 boyaması yapılan tuba uterina dokusunda; epitelde (EP), siller (<) üzerinde ve lamina propriada (LP) immünreaktivite (\star) izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B,CX1000).

Birinci grupta Kaspaz-3 immünreaktivitesi genelde belirsizdi. Epitelde özellikle silli hücrelerin apikal sitoplazmalarında, hücre zarlarında ve silyalarda yer yer zayıf tutulum vardı. Bazı salgı hücrelerinde de tutulum orta dereceliydi. Lamina propria ve kas dokusunda genelde immünreaktivite ayırt edilmezken, bazı bölgelerde zayıf sitoplazmik tutulum izlendi (Resim 3A). 2. grupta; tüm epitel hücrelerinde ortadan kuvvetliye değişen yaygın tutulum vardı. Apikal hücre zarında ve silyalarda kuvvetli immünreaktivite görüldü. Lamina propria ve kas hücrelerinde reaktivite orta dereceliydi (Resim 3B). 3. grupta ise; doku genelinde Kaspaz-3 tutulumunun kontrole benzer görünümü dikkati çekti. Tutulum hücrelerin apikalinde ve silyalarda zayıftan ortaya değişiyordu. Kas ve bağ doku hücrelerinde ise Kaspaz-3 tutulumu son derece zayıftı (Resim 3C)(Tablo 1).



Resim 3A,B,C: A: 1. grup, B: 2. grup, C:3. grupta Kaspaz-3 boyaması yapılan tuba uterina dokusunda; epitelde (EP), siller (<) üzerinde ve lamina propriada (LP) immünreaktivite (★) izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B,CX1000).

HSP-70 immünreaktivitesi 1. grupta; epitel hücrelerinde sitoplazmik düzeyde ve zayıftı. Lamina propria ve kas dokusunda belirgin bir tutulum izlenmedi (Resim 4A) 2. grupta; epitel hücrelerinde orta dereceli sitoplazmik tutulum belirlendi. Tutulum epitel hücrelerinde bazı bölgelerde apikal hücre zarında kuvvetliyen lamina propriada zayıf, kas hücrelerinde ise kuvvetliden ortaya değişiyordu (Resim 4B). 3. grupta; HSP 70 tutulumu epitel düzeyinde 2. gruba benzerdi ve tutulum sitoplazmik orta dereceliydi. Lamina propriada da zayıf tutulum izlenmesine karşın bazı kas hücrelerinde kuvvetli bazılarında orta dereceli tutulum ilgilgi çekti (Resim 4C) (Tablo 1).



Resim 4A,B,C,inset: A: 1. grup, B: 2. grup, C, inset:3. grupta HSP-70 boyaması yapılan tuba uterina dokusunda; epitelde (EP), siller (<) üzerinde ve lamina propriada (LP), kas tabakasında (inset) immünreaktivite (★) izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B,CX1000).

Tablo 1: Tuba uterina kesitlerinde gruplara göre, Kaspaz-8,9 ve 3 ile HSP-70 antikollarının skor tablosu.

	Kaspaz-8	Kaspaz-9	Kaspaz-3	HSP-70
1.GRUP	-/+	++	-/+	-
2. GRUP	+	++/+++	++/+++	++
3. GRUP	+	++	+	+++

(-): tutulum yok, (+): zayıf immünreaktivite, (++): orta düzeyde immünreaktivite,

(+++): kuvvetli düzeyde immünreaktivite olarak belirlenmiştir.

(/) önündeki ve arkasındaki değerler iki değer arasında değişen tutulumu ifade etmektedir.

TARTIŞMA

Hipertermi, vücut ısısı 41°C ya da daha yüksek bir değere yükseldiğinde ortaya çıkan ve ısı düzenleme mekanizmalarının bozulmasına yol açabilen bir olgudur. Hiperterminin genital sistem üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte diz üstü bilgisayar, uzun süreli araba ve çocuklarda plastik içerikli bezlerin kullanılmasıyla oluşan hipertermi sonucu infertilitenin de arttığı vurgulanmaktadır (7). Döllenmenin gerçekleştiği organlar olan tuba uterinalar da ısıya karşı oldukça duyarlıdır.

Kaynaklarda hiperterminin genital sistem üzerine olan etkileri ve bunun sonuçları ile ilgili çalışmalar bulunmasına karşın, hiperterminin doğrudan tuba uterinalar üzerine olan etkileri ve bu etkilerin önlenmesine yönelik araştırmalar bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda hiperterminin apoptozisi artırdığı ve hipertermi süresince bu olayın artarak sürdüğü belirlenmiştir. Tedaviye başlama zamanının ve hipertermide kalış süresinin de bu durumu etkilediği bildirilmiştir. Son çalışmalar iskemiye izleyerek görülen hücre ölümünün ısıya bağımlı olarak artış ya da azalış gösterebileceğini ortaya koymaktadır (8). Üreme işlevinde önemli bir role sahip olan tuba uterinalarda da sıcaklığın artması, silli hücrelerin apoptozisine, epitel hücrelerinde oksidatif stres gelişimine ve erken embriyonik ölümlere neden olur. Ozawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, maternal ısı stresine etkin kalan embriyonlarda hücre içi oksidatif stresin, hidrojen-peroksit düzeyinin arttığı, GSH düzeyini azalttığı ve ısı stresinde tuba uterina ROS üretiminin arttığı belirlenmiştir. (1, 2, 9).

SOD serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak oksidatif stresi engelleyebilen ve apoptotik süreci geri döndürebileceği düşünülen bir antioksidandır. Tüm bilgiler ışığında bu çalışmada; hipertermi ile oluşturulan ısı stresinin ve stres öncesinde kullanılan SOD' un, tuba uterina üzerindeki etkilerinin apoptotik ve oksidatif stres belirteçleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Apoptozisin genel özelliği oksidatif stresin oluşmasıdır. Sitosolik bir antioksidan olan SOD, lipid peroksidasyonunu engelleme ve serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırabilme özelliklerine sahiptir. Oksidatif stresi engelleme özelliği, bu enzimin apoptotik süreci geri döndürebileceğini düşündürmektedir. SOD süperoksit radikaline karşı devreye giren ilk savunma sistemidir ve süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ile moleküler oksijene dönüşümünü sağlayarak hücre içindeki süperoksit radikali düzeylerini azaltır. Süperoksit radikali birçok yükseltgenme tepkimesinde yan ürün olarak üretilir, ancak olasılıkla büyük bir kısmı mitokondriyonlardaki elektron taşıma zincirinin bir hatası sonucunda ortaya çıkar. Aerobik hücreler dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek süperoksiti temizleyen ve detoksifiye eden süperoksit dismutazları içerir (6, 10, 11). Yoshikawa tavşanlarda antitümör olarak uygulanan hipertermide reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hipertermi sonrası ROS' un yarattığı lipid peroksidasyonunun arttığını saptamışlardır. ROS üretimini baskılamak amacıyla ROS temizleyicileri olan SOD ve CAT kullanılmışlardır. Sonuç olarak bir antioksidanların ROS üretimini önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir (12).

Bizim çalışmamızda da hipertermiye etkin bırakılan deneklerde, SOD' un olası koruyucu etkilerinin apoptotik sürece etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan Kaspaz boyamalarında, özellikle 2. grupta Kaspaz-3 immünreaktivitesinin diğer gruplara karşın daha çok olduğu görülmüştür. İmmünreaktivitenin apikal hücre zarında ve tüm sitoplazmada kuvvetli olduğu belirlenmiştir. Kas hücrelerinde orta dereceli Kaspaz-3 tutulumu izlenmekle birlikte seroza katmanında da bağ dokusu hücrelerinde ve mezotelde belirgin tepkime ayırt edilmiştir. 1. ve 3. gruptaki tutulumların ise birbirine benzer olduğu ilgilgi çekmiştir. Kaspaz-8 immünreaktivitesinin ise tüm gruplarda zayıf olmasına karşın, Kaspaz-9 tutulumunun tüm gruplarda daha belirgin olduğu görülmüştür. 2. Grupta özellikle Kaspaz- 9 tutulumunun tüm epitel hücre sitoplazmalarında yaygın olduğu, ancak apikal hücre zarı ve apikal sitoplazmada daha da yoğun olduğu ilgilgi çekmiştir. Düz kas ve bağ dokusu hücrelerinde ise orta dereceli Kaspaz-9 immün tutulumu ayırt edilmiştir.

Lapointe ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada inek tuba uterinasında östrus döngüsü süresince temel antioksidanlar olan glutatin-peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (Cu, ZnSOD) ve CAT' in mRNA ekspresyonu ve enzimatik aktiviteleri incelenmiştir. İstmusda yüksek düzeyde GPx-3, ampulla ve infundibulumda ise GPx-1 ve GPx-2 ekspresyonu olmuştur. Katalaz, Cu,ZnSOD mRNA' ları tuba uterina boyunca tutulmuştur. GPx ve CAT östrus döngüsünün ortasında ve sonunda yüksek düzeyde ekspresyonu olmuştur. SOD ekspresyonu ise tuba uterina tüm östrus döngüsü süresince sabit kalmıştır. Çalışmada başarılı bir döllenme ve implantasyonda bu antioksidanların fizyolojik rollerinin önemli olduğu vurgulanmıştır (13).

Bizim çalışmamızda ise yapılan değerlendirmelerde, başlatıcı kaspazlardan Kaspaz-8 ve 9 ile ilerletici kaspazlardan Kaspaz-3 proteinlerinin tutulumları incelendiğinde, Kaspaz-9 tutulumunun daha belirgin olduğu saptanmıştır. İmmünreaktivitenin özellikle epitelde, hücre sitoplazmasında ve silyalarda hipertermi uygulamasına koşut arttığı izlenmiştir. Kaspaz-3 tutulumunun hipertermi ile belirgin artmadığı gözlenmiştir. Tüm kaspazlar için SOD uygulamasının süreye koşut tutulumu azalttığı ilgilgi çekmiştir.

HSP' ler ise hipertermiyi de içeren çoğu stres koşulunda üretimi artan proteinlerdir.

Çoğu HSP aynı zamanda hasara uğramamış normal hücrelerden de salınır ve proteinlerin katlanması, açılması ve translokasyonu gibi hayati işlevler üstlenirler (5, 14, 15). Hipertermiyle birlikte ise organizmadaki birçok protein yapısı denatüre olur. Denatürasyona ek hücrelerde lipid peroksidasyonunun da artmasıyla çoğu organda geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz hasarlar ortaya çıkar. Yüksek sıcaklıkta tüm organizmada yaygın olarak bulunan HSP'ler aslında koruyucu bir mekanizma oluştururlar. Bunun temeli sıcaklık artışı sonucu organlardaki ribozomlarda HSP sentezinin artması ve denatüre proteinlerin renatüre olmasına aracılık etmesi esasına dayanır (5). Strese koşut olarak üretimi artan esas grup ise HSP-70'tir. Isı stresine koşut olarak hücrelerde yapımı artan HSP-70 genlerinin geleneksel aktivasyonu, çevresel sıcaklık artımına da tepki göstermektedir ve bu durum ısı şoku transkripsiyon faktörü tarafından sıkıca denetlenmektedir (16). Hücre hasarını onarımı ve hücre yenilenmesini sağlayan bu proteinler çekirdek, mitokondriyon ve sitoplazmada bulunur (17). Anti-kanser ilaçlarıyla tedavi gören hastaların tümör hücrelerinde yüksek düzeyde HSP-70 salgılanması bu proteinlerin kemoterapi, radioterapi ve hipertermi direnci için yararlı belirteçler olabileceğini düşündürmektedir (18).

Mariani ve arkadaşları farelerde depresif bozukluklar oluşturmak için kronik stres uygulayarak yeni doğan gelişimi, östrus döngüsü ve erken gebelik süresince, fare tuba uterinasında immünohistokimyasal yöntemlerle HSP-25, HSP-70 ve östrojen reseptörü α' nın (ER- α') ekspresyonunu araştırmışlardır. Kronik stres oluşturmak için farelere 10 dakika süreyle 45°C ısı uygulamışlardır. Çalışmada, erken gelişim sırasında her iki HSP de tuba uterina hücreleri farklılaştığı zaman ekspresse olmuştur ve yetişkin tuba uterinasında yaygın immünreaktivite dikkati çekmiştir. Yine erişkin tuba uterinasında HSP-70, HSP-25' ten daha fazla ifade olmuştur. Epitel hücrelerinde HSP-70 ekspresyonunun diöstrus (luteal evre) evresinde en yüksek düzeyde olduğu aynı zamanda infundibulum ve ampulla bölgesindeki hormonal değişikliklere daha çok yanıt verdiği belirlenmiştir. Ancak diöstrusta ampulla ve infundibulumda HSP-70 pozitif hücre oranında önemli artış saptanmamıştır. Mezotel hücrelerinde de güçlü HSP-70 immün boyanması görülmesine karşın stroma ve kas hücrelerinde HSP-70 için zayıf pozitiflik izlenmiştir. Gebelikte ise tüm işlevsel bölgelerde immünreaktivite gözlemlenmiştir. Gebe farenin tuba uterinasında HSP-70 pozitif hücre oranı gebe olmayanlara karşın çok bulunmuştur. Bu bulgulardan HSP-70' in tuba uterina östrus döngüsüyle düzenlenen bir protein olduğu, bu proteinin östrus döngüsünün özgün evreleri için protein belirteçi olduğu ve büyük olasılıkla gebelikte ilgili hormonlar tarafından düzenlendiği sonucuna varılmıştır (19).

Bizim çalışmamızda da 1. grupta yapılan HSP-70 immün boyamalarında, epitel hücrelerinde sitoplazmik düzeyde ve orta dereceli HSP-70 tutulumu görülmüştür. İkinci grupta ise immünreaktivitenin, epitel hücrelerinde bazı bölgelerde özellikle apikal hücre zarında oldukça kuvvetli olduğu belirlenmiştir. Bu gruptaki diğer önemli bir bulgu ise damar duvarında endotel hücre düzeyinde de HSP-70 immünoaktivitesinin belirlenmesidir. Üçüncü grupta ise HSP-70 immünreaktivitesinin doku genelinde 2. gruba benzer olduğu görülmüştür. Ancak bazı kas hücrelerinde zayıf immünreaktivite olmasına karşın bazılarında son derece kuvvetli HSP-70 immünreaktivitesi olması dikkati çekmiştir.

Araştırmalarda domuz ve tavşan tuba uterinalarında spermiumların biriktikleri bölgeler ile döllenmenin olduğu yerler arasında küçük ısı farklılıklarının bulunduğu bildirilmiştir. Malayer ve arkadaşları, Brahman ve Holstein ineklerinden alınıp kültüre edilmiş endometriyum ve tuba uterina örneklerinde protein sentezi ve salgılama farklılıkları ve bu dokuların in vitro ısı stresine olan tepkilerini incelemişler. Her iki cinste 43°C ısıyla inkübasyonda kontralateral bölgelerden alınmış tuba uterinalardan salgılanan makromoleküllerin çözülmesinde artım olmuştur. Brahman ineklerinde her iki tuba uterina sıcaklığın 43°C olması zardan geçemeyen 3H etiketli makromoleküllerin salgılanmasını artırmıştır. Holstein ineklerinde ise ovulasyon gerçekleşmesiyle tuba uterina ısı yükselmesi olmuş ve salgılama durmuştur. Melez ineklerden alınan dokularda zardan geçemeyen makromoleküllerin salgılanması bölge ve sıcaklık etkileşimi göstermiştir. Kontralateral bölgeden alınmış dokuda sıcaklığa tepki olarak salgılama artmıştır. Aynı taraftan alınmış dokularsa sıcaklık artımından etkilenmemişlerdir. Sıcaklık uygulandıktan 2,5 saat sonra her iki cins ve melez ineklerde HSP-70 ekspresse olmuştur. Kontrol grubunda ise bu protein ifade olmamıştır. Isıya etkin kalmış dokularda 3-3.5 saat sonra HSP-70 miktarı artmıştır. Ancak sıcaklık uygulamasından 24 saat sonra alınmış dokularda HSP-70 ekspresyonu azalmıştır. Araştırmacılar bunu dokuların süre geçtikçe sıcaklığa alışarak uyum göstermesiyle açıklamışlardır (20).

Bizim çalışmamızda HSP-70 tutulumunun genelde epitel hücrelerinde sitoplazmik düzeyde ve orta dereceli olduğu, SOD uygulaması ile tutulumun süreye koşut arttığı belirlenmiştir. King ve arkadaşları hipertermiye etkin kalmış farelerde HSP-70 ve antioksidan enzim aktivitesini incelemişlerdir.

Öldürücü olmayan sıcaklık uygulanmış farelerde HSP-70 sentezlenmiş ve kontrol grubuna karşın HSP-70 düzeyi oldukça artmıştır. 15 dakika sıcaklığa etkin bırakılmış deneklerde bu oran %72.2 olarak bulunmuştur. 30 dakikalık hipertermiden 48 saat sonra ise HSP-70 %88.2 gibi oldukça yüksek bir orana yükselmiştir. Sıcaklığa 45 dakika etkin kalan farelerde %63.5 gibi kontrol grubundan hiç bir farkı olmayan bir oran bulunmuştur. 48 saat sonra deneklerdeki hepatik antioksidan enzim aktiviteeri-SOD, CAT, GPx düzeylerinde önemli bir değişiklik belirlenmemiştir. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar deneklerin yüksek ısıya karşı dirençlerine HSP-70 düzeylerinde gerçekleşen artışın antioksidanlardan daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (21).

SONUÇ

Çalışmamızda sonuç olarak apoptotik programın merkezi bileşenleri olan kaspazların aktivasyonu, hiperterminin özellikle epitel hücrelerinde dış yolağın apoptozisi başlattığı yargısına varılmıştır. Yer yer salgı yapan hücrelerin de etkilenmesine koşut olarak ovarian siklusun da bozulmuş olabileceği düşünülmüştür. Doku genelinde oluşan apoptozisin dış yolağın gerçekleşmiş olabileceği yargısına varılmıştır. Ancak SOD uygulamasının süreye koşut apoptozisi baskıladığı, bunun da artan HSP-70' in koruyucu etkisi ile gerçekleşmiş olabileceği kanısına varılmıştır. Tüm bu bulgular ışığında SOD'un, hipertermi sonucu oluşabilecek hasarlardan tuba uterina yapısını koruyabilecek bir antioksidan olduğunu düşünülmele birlikte bu konuda daha ilerletilecek çalışmalar yapılmasını anlamlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction* 2002;124:683-9.
2. Ozawa M, Matsuzuka T, Hirabayashi M, Kanai Y. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol Reprod* 2004;71:291-6.
3. Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *J Reprod Dev* 2005;51:281-7.
4. Lue Y, Hikim AP, Wang C, Im M, Leung A, Swerdloff RS. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the "two-hit" approach to male contraceptive development. *Endocrinology* 2000;141:1414-24.
5. Eddy EM. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999;4:23-30.
6. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987-97.
7. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* 2005;20:452-5.
8. Gilbert ME, Cain DP. A single neonatal pentylenehtetrazol or hyperthermia convulsion increases kindling susceptibility in the adult rat. *Brain Res* 1985;354:169-80.
9. Ryan DP, Blakewood EG, Lynn JW, Munyakazi L, Godke RA. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J Anim Sci* 1992;70:3490-7.
10. Ranawat P, Bansal MP. Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: possible involvement of p38 and JNK MAPKs--in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 2008;309:21-32.
11. Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl* 2002;23:400-9.
12. Yoshikawa T, Kokura S, Tainaka K, Itani K, Oyama H, Kaneko T, Naito Y, Kondo M. The role of active oxygen species and lipid peroxidation in the antitumor effect of hyperthermia. *Cancer Res* 1993;53:2326-9.
13. Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003;68:1157-64.
14. Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 1991;60:321-47.
15. Wu B, Hunt C, Morimoto R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol* 1985;5:330-41.
16. Mariani ML, Ciocca DR, González Jatuff AS, Souto M. Effect of neonatal chronic stress on expression of Hsp70 and oestrogen receptor alpha in the rat oviduct during development and the oestrous cycle. *Reproduction* 2003;126:801-8.
17. Park J, Easton DP, Chen X, MacDonald IJ, Wang XY, Subjeck JR. The chaperoning properties of mouse grp170, a member of the third family of hsp70 related proteins. *Biochemistry* 2003;42:14893-902.
18. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006;31:164-72.
19. Mariani ML, Souto M, Fanelli MA, Ciocca DR. Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil*. 2000;120:217-23.
20. Malayer JR, Hansen PJ. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J Anim Sci* 1990;68:266-80.
21. King YT, Lin CS, Lin JH, Lee WC. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of heat shock protein 70 in mice. *J Exp Biol* 2002;205:273-8.