

TAVŞANDA SERİN PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİNİN FOLİKÜLER GELİŞMEYE ETKİLERİ

Gürer Y. DELLALOĞLU*, Ramazan KAYAPINAR**, A. Kemal KUTLU***

ÖZET

Plazminojen aktivatörlerinin ovulasyonda folikül rüptürüne yardımcı olduğuna inanılmaktadır. Bunların etkisini ortadan kaldıran serin proteaz inhibitörlerinin erken folikül gelişmesi döneminde verilmesi ile folikül gelişmesinin nasıl etkileneceği araştırıldı. Bu amaçla 10 juvenil ada tavşanına insan korionik gonadotropini (HCG) verildikten 2 saat sonra direkt görüş altında bir taraftaki ovarial bursaya serin proteaz inhibitörü, kontrol amacıyla diğer tarafa ise serum fizyolojik enjekte edildi. 48 saat sonra overler çıkarılarak sitolojik olarak değerlendirildiler. Sonuçlara göre folikül gelişmesinde anlamlı gerileme olmuş, ayrıca ovulasyon da engellenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Serin proteazlar, inhibitörler, plazminojen aktivatörleri, folikülogenez.

SUMMARY

EFFECTS OF SERIN PROTEASE INHIBITORS ON FOLLICULOGENESIS IN THE RABBIT

It is believed that plasminogen activators enhance follicular rupture during ovulation. Effects of serin protease inhibitors, which cancel plasminogen activator activity, on folliculogenesis when given at an early stage of development is searched. That is, 10 juvenile rabbits were injected with HCG and after two hours undergone a laparotomy. During operation one ovaring bursa was injected under direct vision, with serin protease inhibitor and the other with physiologic saline, for control purposes. After 48 hours ovaries were extirpated and cytologically evaluated. Results indicate significant impairment of folliculogenesis as well as ovulation.

Key Words: Serine proteases, inhibitors, plasminogen activators, folliculogenesis.

GİRİŞ

On yıl kadar önce gelişmekte olan folikül sıvısında bulunan plazminojen aktivatörlerinin yıkıcı enzimatik aktiviteleri nedeni ile ovulasyon-

* T.Ü. Tıp Fak. Kadın Hast. ve Doğum Anabilim D. (Yrd. Doç. Dr.),

** T.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu (Yrd. Doç. Dr.),

*** T.Ü. Tıp Fak. Patolojik Anatomi Anabilim D. (Doç. Dr.).

da oynadıkları rol üzerinde durulmuştur (1, 2). Bazı çalışmalarda plazminojen aktivatör aktivitesinin folikül cidarının eritilmesinde rolü olduğu yolunda kuvvetli bulgular ortaya çıkmıştır. Örneğin, bir saat içerisinde çatlaması beklenen domuz over folikül sıvısında 5-20 saat önceden alınan folikül sıvısına göre daha fazla plazminojen aktivatör aktivitesi vardır (1).

Aynı overin preovulatuver foliküllerinde granuloza hücreleri, daha küçük antral foliküllerdekilere göre daha fazla plazminojen aktivatörü salgılar (2).

Sıçanlarda insan korionik gonadotropinleri (HCG) ile uyarılmış ovulasyon, periovaryal bursaya verilen serin proteaz inhibitörleri ile bloke edilebilir (3).

Gonadotropinlerin verilmesi granuloza hücrelerinde plazminojen aktivatör yapımını uyarır (3, 4, 5). Bulgulara göre de bu etki başlıca Folikül Stimulan Hormon (FSH)'a aittir (4, 6). Granuloza hücre kültürlerinde FSH verilmesini takiben 2 saat içerisinde plazminojen aktivatör yapımının başladığı gösterilmiştir (7, 8).

Plazminojen aktivatörlerinin hücrel farklılaşma ve dokunun yeniden şekillenmesiyle ilgili oldukları bilinmektedir (9, 10). Dolayısıyla FSH ile uyarılmış plazminojen aktivitesinin sırf ovulasyon (folikül rüptürü) olayının ortaya çıkması ile kalmayıp folikül gelişmesinin diğer yönleri ile de ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bunun için de gonadotropinlerle uyarılmış juvenil, dişi ada tavşanı overlerine foliküllerin erken gelişme döneminde plazminojen aktivatörleri ve plazmin gruplarını da içine alan serin proteazları inhibe eden maddelerin enjekte edilerek serin proteaz aktivitesinin durdurulması ile erken folikülojenez döneminde folikül gelişmesi ve ovulasyon üzerinde etkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

MATERYEL VE YÖNTEM

Deneyde 10 juvenil, dişi ada tavşanı (*Oryctolagus cuniculus*; Leporidae) kullanıldı. Hayvanlar gün ışığında tutuldular. İstedikleri kadar su ve yem verildi. Hayvanlara önce 10 IU/Kg insan korionik gonadotropini (Pregnyl-Organon) i.m. olarak enjekte edildi. İki saat sonra eter anestezi altında laparotomi yapılarak overler ortaya çıkarıldı. 100 µl (40 mg) ε-aminokaproik asit (Epsamin-İE) serin proteaz inhibitörü olarak bir taraf-

taki ovariyal bursaya enjekte edildi. Diğer taraftaki ovariyal bursaya ise 100 µl %0.9 serum fizyolojik verilerek kontrol olarak değerlendirildi. Ayrıca kontrol olarak 7 tavşana HCG verildi. Enjeksiyonlar direkt görüş altında ensülin enjektörü ile yapıldı. 48 saat sonra tekrar laparotomi yapılarak overler çıkartıldı ve % 10'luk formaldehit içerisinde tesbit edildikten sonra parafin blok haline getirildi. En geniş çapından alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin ve eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelendi.

Foliküllerin total antral alanları ile ovaryumun total kesit alanı mikrometrik planometre ile ölçülerek (μ^2) birbirleri ile oranları hesaplandı. Değerler 3 kesitte ölçüm yapıp ortalamaları alınarak hesaplandı ve Student's t-testi ile değerlendirildi. Ölçümlerde sadece normal foliküller dikkate alındı. Normal ve atretik foliküllerin belirlenmesi granuloza hücrelerinde piknotik nüvelerin bulunmasına, granuloza tabakasının yer yer bozulmasına veya atretik foliküllerde makrofaj infiltrasyonu bulunma esasına göre yapıldı. Çatlamış, hemorajik foliküller sayıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada folikülojenezin erken döneminde enjekte edilen serin proteaz inhibitörlerinin folikül gelişmesi üzerine olan etkileri araştırıldı. İntra müsküler HCG ile yapılan uyarıdan 2 saat sonra ovariyal bursaya serin proteaz inhibitörü enjekte edilen juvenil dişi tavşanlarda inhibitör enjeksiyonundan 46 saat sonra yapılan antral foliküler alan ölçümlerinde inhibitör verilmeyen overlere göre istatistiki olarak anlamlı ($p < .001$) bir azalma tesbit edilmiştir (Tablo I, Şekil 1). Bu bulgular çalışılan tüm hayvanlarda mevcuttur.

Serin proteaz inhibitörünün enjeksiyonu, foliküllerin sayı ve alanını azaltmakla kalmayıp aynı zamanda overlerin boyutlarının da genel olarak küçük kalmasına neden olmuştur.

Kontrol grubundaki 7 tavşan sadece i.m. HCG ile uyarıldı. 48 saat sonra yapılan laparotomide alınan overlerin deney grubundakilerle yapılan karşılaştırmalarında anlamlı farklılık bulunmadı. Korpus hemorajikum sayıları ortalama 4.3 bulundu.

Tablo I: Serin proteaz inhibitörü ve serum fizyolojik enjeksiyonundan sonra folikül antral alanlarının toplam over kesiti alanına oranları:

Tavşan No	Toplam folikül antral alanı/over kesit alanı		SPI/SF	P
	SPI Ort ± SH	SF Ort ± SH		
1	0.10 ±0.013	0.22 ±0.012	0.45	0.28
2	0.10 ± 0.014	0.32 ± 0.014	0.31	0.17
3	0.14 ± 0.012	0.25 ± 0.013	0.56	0.28
4	0.07 ± 0.014	0.34 ± 0.013	0.21	0.25
5	0.07 ± 0.014	0.41 ± 0.010	0.17	0.20
6	0.11 ± 0.014	0.27 ± 0.013	0.41	0.19
7	0.09 ± 0.014	0.31 ± 0.011	0.29	0.19
8	0.09 ± 0.013	0.33 ± 0.013	0.27	0.32
9	0.08 ± 0.009	0.28 ± 0.010	0.29	0.41
10	0.13 ± 0.013	0.38 ± 0.015	0.34	0.30
Tüm hayvanlar	0.10 ±0.013	0.31 ± 0.012	0.33	0.001

SPI : Serin proteaz inhibitörü

SF : Serum fizyolojik

SH : Ortalamanın standart hatası

SONUÇ

Çalışmamızda ovariyal bursa içerisine enjekte edilen ve serin proteaz aktivitesini durduran ajanların folikül gelişmesini engelledikleri gösterilmiştir. Serin proteaz inhibitörü verilen overlerin karşı taraftaki serum fizyolojik verilen overlere göre antral folikül alanı %67 küçülmüştür. Burada dikkat edilmesi gereken nokta serin proteaz inhibitörleri verildiği zaman over boyutlarının da küçüldüğü, fakat antral folikül alanları karşılaştırmalarının toplam over kesit alanına göre yapıldığıdır. Böylece antral folikül alanında görülen azalmanın overdeki boyut küçülmesine değil serin proteaz inhibitörü etkisine bağlı olduğu anlaşılır.



Şekil 1a. Serin proteaz inhibitörü verilmiş over kesiti. 64X. **b.** Serum fizyolojik verilmiş over kesiti. 64 X.

Deneyimizde serin proteaz inhibitörü verilen overlerde hiç bir korpus hemorajikum bulunmaması ovulasyonun da etkilendiğini göster-

mektedir. Bu şekilde serin proteaz inhibitörü ile hem folikül gelişmesi hem de ovulasyonun olumsuz yönde etkilendiği ortaya çıkmaktadır.

Enzimatik inhibisyon temeli üzerine kurulan çalışmalarda sonuçlar dikkatle değerlendirilmelidir. Çünkü, bilinmeyen enzimatik etkiler söz konusu olabilir. Burada yer verilen intrabursal serin proteaz inhibitörü enjeksiyonu daha önce başkaları tarafından da serin proteazların ovulasyondaki yerini göstermek için başarılı olarak kullanılmıştır (3). Buna rağmen inhibitörlerin yeralmadığı teknikler kullanılarak folikojenez üzerindeki serin proteaz etkisi araştırıldıktan sonra bunların rolü hakkında kesin olarak yargıya varılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Beers W.H.: *Follicular plasminogen activator and effect of plasmin on ovarian follicle wall.* Cell 6: 379-386, 1975.
2. Beers W.H., Strickland S., Reich E.: *Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation.* Cell 6: 387-394, 1975.
3. Ny T., Bjersing L., Hsueh A.J.W., Loskutoff D.J.: *Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and antiactivator, each regulated differently by gonadotropins.* Endocrinology 116: 1666-8, 1985.
4. Ossowski L., Biegel D., Reich E.: *Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue.* Cell 16: 929-940, 1979.
5. Reich R., Miskin R., Tsafiri A.: *Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation.* Endocrinology 116: 516-521, 1985.
6. Canipari R., Strickland S.: *Studies on the hormonal regulation of plasminogen activator production in the rat ovary.* Endocrinology 118: 1652-1659, 1986.
7. Strickland S., Reich E., Sherman M.I.: *Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm.* Cell 9: 231-240, 1976.
8. Canipari R., Strickland S.: *Plasminogen activator in the rat ovary: production and gonadotropin regulation of the enzyme in granulosa and thecal cells.* J Biol Chem 260: 5121-5125, 1985.
9. Wang C., Leung A.: *Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells.* Endocrinology 112: 1201-1207, 1983.
10. Knecht M.: *Production of cell-associated and secreted plasminogen activator by cultured rat granulosa cells.* Endocrinology 118: 348-353, 1986.