

# Kuersetin, streptozotosin uyarımlı diyabetik sıçanlarda metabolik devreleri ve plasenta morfolojisini iyileştirmektedir

Aynur Erşahin<sup>1</sup>, Meryem Hocoğlu<sup>2</sup>, Selin Demirer<sup>3</sup>, Ferhat Cengiz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>2</sup>İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul

<sup>3</sup>İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>4</sup>Göztepe Medical Park Hastanesi, In Vitro Fertilizasyon Laboratuvarı, İstanbul

## Özet

**Amaç:** Kuersetin (KE), doğada yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir. Bu deneysel çalışmada, KE'nin streptozotosin uyarımlı diyabetik sıçanların plasentası üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık.

**Yöntem:** Otuz virjin dişi Wistar sıçanı (200–250 g), en az 12 saat boyunca 15 erkek sıçanla çiftleştirildi. Gebeliğin başlangıcından itibaren sıçanlar, kontrol, streptozotosin (STZ) ve STZ+KE şeklinde eşit olarak üç deneysel gruba ayrıldı. Gebe sıçanlar, gebeliğin 21. gününde sakrifiye edildi ve plasenta dokuları alındı. Tüm grupların plasenta dokuları ve kan örnekleri, biyokimyasal ve histolojik analiz için işlendi.

**Bulgular:** KE tedavisi, STZ uyarımlı diyabetik sıçanlardaki yükselmiş serum glikoz seviyelerinde keskin bir düşüşe ve azalmış serum insülin konsantrasyonlarında artışa yol açtı ( $p<0.05$ ). Plasental malondialdehit (MDA) seviyesi, tedavi edilmeyen gruba kıyasla KE ile tedavi edilen sıçanlarda önemli oranda azaldı ( $p<0.05$ ). Tedavi görmeyen diyabetik gruba kıyaslandığında, KE tedavisi süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini anlamlı derecede artırdı ( $p<0.05$ ). Diyabetik grupta ise çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) immün etiketleme yoğunlukları azalmış ve sıçan plasentalarındaki TUNEL pozitif hücreler artmıştı.

**Sonuç:** KE, oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak ve plasenta morfolojisini muhafaza ederek diyabet üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir. KE, gebelikteki diabetes mellitus tedavisini güçlendirme umudu vermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Apoptoz, plasental diabetes mellitus, oksidatif stres.

## Abstract: Quercetin improves metabolic sequels and placental morphology in streptozotocin-induced diabetic rats

**Objective:** Quercetin (QE) is a flavonoid widely distributed in nature. This experimental study was designed to evaluate the effect of QE on the placenta in streptozotocin-induced diabetic rats.

**Methods:** Thirty virgin female Wistar rats (200–250 g) were mated with 15 males for at least 12 h. From the onset of pregnancy, the rats were divided equally into three experimental groups including control, streptozotocin (STZ)-treated, and STZ+QE-treated. Pregnant rats were sacrificed on day 21 of pregnancy and the placental tissue was harvested. Placental tissues and blood samples in all groups were processed for biochemical and histological analysis.

**Results:** QE treatment gave rise a sharp decrease in the elevated serum glucose levels and an increased in the lowered serum insulin concentrations in STZ-induced diabetic rats ( $p<0.05$ ). Placental malondialdehyde (MDA) level was considerably reduced in rats treated with QE when compared to untreated group ( $p<0.05$ ). QE treatment produced a significant increase superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities compared with the diabetic untreated group ( $p<0.05$ ). On the diabetic group, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling intensities decreased and TUNEL positive cells in the placenta of rats was found to increased.

**Conclusion:** Quercetin has a protective effect in diabetes by decreasing oxidative stress and apoptosis, and by preservation of placental morphology. QE gives hope to improve treatment diabetes mellitus in pregnancy.

**Keywords:** Apoptosis, placental diabetes mellitus, oxidative stress.

**Yazışma adresi:** Dr. Aynur Erşahin, Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul. e-posta: aynur.ersahin@hotmail.com

**Geliş tarihi:** 22 Kasım 2016; **Kabul tarihi:** 14 Aralık 2016

**Bu yazının atfı künyesi:** Erşahin A, Hocoğlu M, Demirer S, Cengiz F. Quercetin improves metabolic sequels and placental morphology in streptozotocin-induced diabetic rats. Perinatal Journal 2016;24(3):147-155.

©2016 Perinatal Tıp Vakfı

Bu yazının çevrimiçi İngilizce sürümü:

[www.perinataljournal.com/20160243007](http://www.perinataljournal.com/20160243007)

doi:10.2399/prn.16.0243007

Karekod (Quick Response) Code:



## Giriş

Gebelikteki diyabet, anormal fetal büyüme ve yenidoğan komplikasyonları gibi çeşitli rahatsızlıklarla ilişkilidir.<sup>[1]</sup> Gebelik döneminde diyabet, plasentanın ağırlık ve boyutunun artması<sup>[2-4]</sup> ve anormal plasenta ağırlığı / fetal ağırlık oranı<sup>[5]</sup> gibi bazı plasental bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Plasenta ağırlığı ve fetal ağırlık arasındaki güçlü korelasyon,<sup>[6,7]</sup> bu korelasyonun maternal hipertansiyon ve diyabet ile fetal intrauterin büyüme kısıtlılığı gibi patolojik koşullardan etkilenmesi nedeniyle, intrauterin yaşam boyunca fetal sağlığın bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Streptozotosin (STZ) uyarımlı diyabetik sıçanın gebeliği, plasentomegali ve çeşitli derecelerde fetal büyüme geriliğiyle de karakterizedir.<sup>[8]</sup> Makrozomi genellikle diyabetli gebelerin bebeklerinde görüldüğünden, büyüme geriliğinin de hayvanlardaki spontan ve deneysel diyabetlerde görülmesi neredeyse bir kuraldır. Maternal diyabet varlığında plasentomegalinin fonksiyonel anlamı sıçanlarda ve diğer türlerde belirsizdir<sup>[9]</sup> ve büyüme inhibisyonunun ne zaman başladığı veya maternal diyabette plasental patolojinin fetal büyümeyi nasıl etkilediği bilinmemektedir.<sup>[10]</sup> Bazı araştırmacılar, sürekli büyüme stimülasyonu ve hücre bölünmesinde gecikmeli matürasyon sağlayarak hipergliseminin sıçan plasentalarında göreceli bir immatüriteye yol açtığını ileri sürmüştür.<sup>[11]</sup> Yeni bir çalışma, kadın plasentasının insülin veya gıda kısıtlamasıyla farklı anormallikler gösterdiğini ortaya koymuştur.<sup>[11]</sup> Bununla birlikte, dolaşımdaki glikozun normal seviyeleri, plasenta ve fetüslerin normal olduğu anlamına gelmez. Hiperglisemiye sekonder olarak fetüs ve plasentada ortaya çıkan defektler, normal glikoz seviyelerine rağmen devam edebilmektedir.

Diyabette oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmış üretimi yüzünden artabilir. ROS'un artmış üretimi, protein glikasyonu<sup>[12,13]</sup> ve hiperglisemik bir ortamda glikoz oto-oksidasyonu<sup>[14]</sup> ile ilişkilendirilmiştir. İnsan vücudunun diğer organlarında olduğu gibi plasentadaki hücre gelişimi ve fonksiyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Çoğalan hücre nükleer antijeninin (PCNA), erken gebelikte en çok, gebeliğin orta dönemlerinde daha az ve miyatta en az ekspresye olduğu bildirilmiştir.<sup>[15]</sup> Gebeliğin 11 ila 13. günlerinde plasentadaki yoğun PCNA pozitifitesinin, gebeliğin 17 ila 21. günleri arasında azaldığı belirtilmiştir.<sup>[16]</sup>

Apoptoz, gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerde istendiği şekilde ihtiyaç duyulmayan ve fonksi-

yonları ortam zarar görmeden bozulmaya yatkın, programlı hücre ölümüdür. İnsanlardaki normal gebeliğin ilk ve son trimesterinde alınan plasenta örneklerindeki apoptoz tüm hücre türlerinde görülmüştür ve apoptotik hücrelerin büyük bir kısmının (>%50) trofoblast olduğu saptanmıştır. Gebelik ilerledikçe, yaşlanmanın doğal bir sonucu olarak artmış apoptozun gözlemlendiği yönünde genel bir görüş bulunmaktadır.<sup>[17,18]</sup>

Flavonoidler, bitkiler aleminde ikincil metabolit olarak yaygın şekilde bulunan, doğal şekilde oluşan bir bileşen grubudur. Anti-enflamatuar, anti-alerjik, antiviral, antibakteriyel ve antitümöral faaliyetler gibi ilginç klinik özellikleriyle bilinmektedirler.<sup>[19]</sup> Bu flavonoidlerden biri olan kuersetin (KE), oksijen radikallerini temizleme,<sup>[20,21]</sup> lipid peroksidasyonuna karşı koruma<sup>[22]</sup> gibi çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasarı ve hücre ölümünü engeller. STZ ile uzun süreli tedavi olan diyabetik hayvanlarda oksidatif stresin azaldığı gösterilmiştir.<sup>[23]</sup> Bu çalışmanın amacı, KE'nin plasenta fonksiyonunu ve morfolojisini iyileştirip iyileştirmediğini ve diyabetik sıçanlarda trofoblast proliferasyonu ve oksidatif stresle birlikte apoptotik aktiviteyi etkileyip etkilemediğini belirlemektir.

## Yöntem

### Hayvanlar

Bu çalışma, etik komite onayıyla Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda, deney hayvanlarının bakımı ve kullanımı kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmada 30 dişi ve 15 erkek yetişkin Wistar sıçanı (200–250 g) kullanıldı ve hiçbirisi daha önce çiftleştirilmemişti. İki dişi ve bir erkek gece boyunca aynı kafeste tutuldu. Sıçanlar, standart laboratuvar koşulları altında (07:00–19:00 arası ışıklandırma, 21±1 °C sıcaklık ve serbest şekilde kullanabildikleri sıçan besini ve çeşme suyu) makrolon kafeslerde ayrı ayrı tutuldu. Ertesi sabah kontrol edilen sperm-pozitif vajinal smearın, başarılı çiftleşmeye işaret ettiği düşünüldü. Sperm-pozitif gün, gebeliğin ilk günü olarak kabul edildi. Gebe hayvanlar, her biri 10 sıçan içerecek şekilde rastgele olarak kontrol, STZ ve KE+STZ gruplarına ayrıldı. Kontrol grubuna çalışma boyunca sadece izotonik NaCl (2 ml/kg/gün) enjekte edildi. Diyabet, STZ grubunda (50 mg/kg vücut ağırlığı, 5 mmol/L sitrat tamponunda ve pH 4.5'te taze çözünmüş) tek bir intraperitoneal STZ enjeksiyonuyla gebeliğin başında indüklendi. KE, Sigma Chemical'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edildi ve intrape-

ritoneal enjeksiyondan hemen önce 0.5 ml'lik %60 etanolde çözüldü. KE grubundaki sıçanlara, STZ enjeksiyonundan 3 gün önce başlayarak 24 gün boyunca intraperitoneal olarak günde bir kez KE (15 mg/kg) verildi. Her iki gruptaki deney hayvanlarında, STZ verilmesinden sonraki 24 saat içinde diyabet gelişti. Diabetes mellitus, Ames One Touch Glucometer (LifeScan; Johnson and Johnson, ABD) ile teyit edildi ve yalnızca glikoz seviyesi  $\geq 300$  mg/dL olan hayvanlar diyabetik kabul edildi.<sup>[24]</sup> Tüm diyabetik sıçanlar kloral hidrat ile uyuşturulduktan sonra servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edildi ve fetüs ile plasentalar, gebeliğin 21. gününde alındı.

### Biyokimyasal prosedür

Sıçanlar, gebeliğin 21. gününde intraperitoneal kloral hidrat (6 ml %7 kloral hidrat/kg vücut ağırlığı) ile uyuşturuldu.<sup>[24]</sup> Bu operasyon sonrasında embriyo ve plasenta ağırlığı ayrı ayrı ölçüldü. Her bir gebe sıçan sakrifiye edildi ve plasenta dokusu, lipid peroksidasyon ürünleri, antioksidan enzimler ve morfolojik görünüm açısından değerlendirildi. Kan örnekleri, heparinli şırıngayla yapılan kardiyak ponksiyonla alındı. Serum glikoz, Boehringer, Mannheim, Almanya üretilmiş reaktiflerle gerçekleştirilen heksokinaz yöntemiyle,<sup>[25]</sup> insülin ise çift-antikör radyoimmünassay kiti (Amersham Radiochemical Centre, Bucks, Birleşik Krallık) kullanılarak belirlendi.<sup>[26]</sup>

### Doku örneklerinin hazırlanması

Tüm plasenta dokuları tartıldı ve 0.15 M KCl solüsyonuyla homojenize edildi, bu dokuların %10 homojenatları (ağırlık/hacim) hazırlandı. Doku homojenatları, 10 dakika boyunca 4 °C'de soğuk santrifüj ile  $600 \times g$ 'de santrifüjlendi. Üst faz, 20 dakika boyunca  $10.000 \times g$ 'de santrifüjlendi, böylece postmitokondriyal fraksiyon elde edildi. Doku homojenatlarında dokuların malondialdehit (MDA) seviyesi belirlendi; süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri, bu homojenatların postmitokondriyal fraksiyonunda incelendi. Örneklerdeki protein miktarını belirlemek için biskoninik asit yöntemi kullanıldı.<sup>[27]</sup>

### Lipid peroksidasyon tespiti

Lipid peroksidasyon (LPO) için bir son ürün olan MDA, 532 nm'de tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin absorbanası tespit edilerek hesaplandı.<sup>[28]</sup> MDA seviyeleri, MDA nmol/mg protein olarak ifade edildi.

### Süperoksit dismutaz tespiti

Süperoksit dismutaz aktivitesi, riboflavin ile hassaslaştırılmış o-dianisidinde fotooksidasyon oranı kapasitesinin artırılması prensibiyle ölçüldü.<sup>[29]</sup> Renkli ürün, spektrofotometrik olarak 460 nm'de ölçüldü ve sonuçlar IU/mg protein olarak belirtildi.

### Glutatyon peroksidaz tespiti

Glutatyon peroksidaz aktivitesi, Lawrence ve ark.'nın protokolüne göre ölçüldü.<sup>[30]</sup> Sonuçlar, sönümleme (yokoluş) katsayısında NADPH kullanılarak hesaplandı ve nmol NADPH/mg protein/dk olarak ifade edildi.

### Histokimyasal prosedürler

Tüm gruplarda plasenta dokuları, gebeliğin 21. gününde toplanarak sabitlendi. Ardından, küçük parçalara ayrıldı ve cinsiyet sıvısında (%90 etanol, %40 formaldehit ve %96 asetik asitte pikrik asitle satüre solüsyon; 80:10:5) 4 °C sıcaklıkta 8 saat boyunca bekletildi. Materyaller daha sonra gece boyunca %40 formaldehit ve %90 etanol (1:9) solüsyonunda sabitlendi. Daha sonra rutin dehidrasyon ve temizleme teknikleri kullanılarak parafin içerisine gömüldü. 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve degrade edici alkol serisi ve saf suda kısa süre kaldıktan sonra periyodik asit-Schiff (PAS) reaksiyonuyla boyandı.<sup>[31]</sup>

### İmmünohistokimyasal prosedürler

Plasenta dokuları, ayrı ayrı Bouin fiksatifine daldırılıp, alkolde dehidrate edildikten sonra parafine gömüldü. 5 µm'lik kesitler alınıp deparafinize edildi ve PCNA immünohistokimya ile boyandı. İmmünohistokimyasal reaksiyonlar, Hsu ve ark.'nın açıkladığı ABC tekniğine göre gerçekleştirildi.<sup>[32]</sup> Prosedür şu adımları içerdi: (1) endojen peroksidaz aktivitesi 30 dakika boyunca saf suda %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inhibe edildi; (2) kesitler, 10 dakika boyunca saf suda yıkandı; (3) nonspesifik bağlanmış antikörler, PBS ile 1:4 oranında dilüe edilen normal keçi serumuyla (DAKO X 0907, Carpinteria, CA, ABD) inkübasyon yoluyla bloklandı; (4) kesitler, spesifik monoklonal anti-PCNA antikoruyla (Katalog No MS-106-B, Thermo LabVision; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) inkübe edildi, 1:50 oranında 1 saat dilüe edildi ve ardından oda sıcaklığına alındı; (5) ardından kesitler 3×3 dakika boyunca PBS'de yıkandı; (6) sonrasında biyotinlenmiş anti-fare IgG (DAKO LSAB 2 Kiti) ile inkübe edildi; (7) kesitler 3×3 dakika boyunca PBS'de yıkandı;

(8) daha sonra ABC kompleksiyle (DAKO LSAB 2 Kiti) inkübasyona alındılar; (9) inkübasyonu takiben kesitler bir kez daha 3x3 dakika boyunca PBS'de yıkandı; (10) peroksidaz, aminoetilkarbazol substrat kitiyle (AEC kiti; Zymed Laboratories, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA ABD) saptandı; (11) bu işlemten sonra kesitler çeşme suyunda 10 dakika boyunca yıkanarak dehidrate edildi; (12) çekirdekler hematoksilin ile boyandı ve (13) kesitler, DAKO Faramount'a yerleştirildi.

Tüm gruplara ait kesitlerde PCNA immün boyanması pozitif olan hücre sayılarının değerlendirilmesi HSCORE (histolojik skorlama) ile yapıldı. İmmünohistokimyasal tekniklerle boyanan kesitler özel bir oküler skala kullanılarak ışık mikroskopunda (Olympus CX31, Tokyo, Japonya) değerlendirildi. Her bir kesitte sekiz bölge, x400 büyütmede immünohistokimyasal boyanmanın analizi için değerlendirildi. Boyanmalar, kesitteki özel boyanmanın yoğunluğu temel alınarak yarı kantitatif olarak skorlandı. Değerlendirme yüzde olarak yapıldı ve alandaki tüm hücreler aşağıda verilen yoğunluk kategorilerinden birisine dahil edildi: Zayıf ( $\pm$ ), hafif (+), orta (++) , güçlü (+++) ve çok güçlü (++++) olarak kaydedildi.

#### TUNEL analizi

İn situ apoptotik hücre ölümü sırasında çekirdekte meydan gelen DNA kırılmasını saptayabilen terminal deoksinnükleotidil transferaz aracılı dUTP *nick end labeling* (TUNEL) yöntemi, bir apoptoz tespit kitiyle (TdT-Fragel™ DNA Kırılması Tespit Kiti, Katalog No. QIA33; Calbiochem, MilliporeSigma Merck, Darmstadt, Almanya) birlikte kullanıldı. Üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılan test kiti dahilindeki tüm kimyasalların listesi aşağıda verilmiştir. Beş µm kalınlığındaki renal kesitler, ksilende deparafinize edildi ve daha önce açıklandığı şekilde kademeli bir etanol serisinde rehidre edildi. Ardından, 20 mg/ml proteinaz K ile 20 dakika boyunca inkübe edildiler ve TBS'de yıkandılar. Endojen peroksidaz aktivitesi, %3 hidrojen peroksit inkübasyonu ile inhibe edildi. Kesitler daha sonra 10–30 dakika boyunca tampon çözeltide, ardından 90 dakika boyunca 37°C'lik nemli ortamda TdT enzimiyle inhibe edildi. Kesitler, önceden ısıtılmış çalışma gücü durdurma/yıkama tamponunda, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletildi, ardından 30 dakika bloklayıcı tamponda inkübe edildi. Her bir aşama arasında TBS ile yıkama yapıldı. İşaretleme DAB kullanılarak gerçekleştirildi, karşıt boya olarak metil yeşili kullanıldı. Kesitler kurutulup temizlenerek gömüldü.

TUNEL hücre sayısı kontrol ve deney gruplarından elde edilen plasenta dokuları arasındaki yarı kantitatif farklar gözlemlenerek belirlendi. Değerlendirme yüzde olarak yapıldı ve alandaki tüm hücreler aşağıda verilen yoğunluk kategorilerinden birisine dahil edildi: Yok (–), zayıf ( $\pm$ ), hafif (+), orta (++) , güçlü (+++) ve çok güçlü (++++) olarak kaydedildi. Bu analiz, plasenta kesidi başına en az beş alanda x400 büyütmede, her hayvandan iki kesit üzerinde gerçekleştirildi.

#### İstatistiksel analiz

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak ifade edildi ve tekrarlanan varyans ölçümleriyle analiz edildi. Ortalamalar arasındaki farkları test etmek için Tukey testi kullanıldı, varyans analizi (ANOVA), anlamlı bir F oranı ( $p<0.05$ ) gösterdi. İmmünohistokimyasal verilerin analizi için parametrik olmayan bir test (Kruskal-Wallis) kullanıldı. P değerinin  $<0.05$  olduğu durumlarda farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### Bulgular

##### Biyokimyasal bulgular

Çalışmanın başlangıcında sıçanların başlangıç ağırlıkları tüm gruplarda benzerdi. Tedavi sonunda diyabetik hayvanlarda kilo kaybı görüldü. Başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları, kontrol sıçanları ve KE tedavili diyabetik sıçanlar arasında farklı değildi. Diyabetik hayvanlar, sürekli olarak hiperglisemi sergiledi. KE tedavisi (24 gün boyunca), STZ uyarımlı diyabetik sıçanlardaki yükselmiş serum glikoz seviyelerinde keskin bir düşüş ve azalmış serum insülin konsantrasyonlarında ise artışa yol açtı (Tablo 1).

**Tablo 1.** A (kontrol), B (tedavi görmemiş diyabetik) ve C (KE tedavisi görmüş diyabetik) gruplarındaki vücut ağırlığı ve serum glikoz ve insülin seviyeleri.

Parametreler	A	B	C
Başlangıç vücut ağırlığı (g)	233 $\pm$ 12	232 $\pm$ 9	231 $\pm$ 8
Bitiş vücut ağırlığı (g)	236 $\pm$ 13	179 $\pm$ 6*	235 $\pm$ 11
Başlangıç serum glikozu (mg/dl)	104 $\pm$ 7	102 $\pm$ 6	100 $\pm$ 5
Bitiş serum glikozu (mg/dl)	100 $\pm$ 5	290 $\pm$ 15 <sup>†</sup>	185 $\pm$ 8 <sup>‡</sup>
Başlangıç serum insülini (mU/l)	57 $\pm$ 3	59 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4
Bitiş serum insülini (mU/l)	59 $\pm$ 4	12 $\pm$ 1 <sup>§</sup>	20 $\pm$ 2 <sup>  </sup>

İstatistiksel analizde, Tukey testiyle birlikte tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir; her grup için n=10; \*A grubuna kıyasla  $p<0.05$ ; †A grubuna kıyasla  $p<0.01$ ; ‡B grubuna kıyasla  $p<0.05$ ; §A grubuna kıyasla  $p<0.001$ ; ||B grubuna kıyasla  $p<0.05$ .



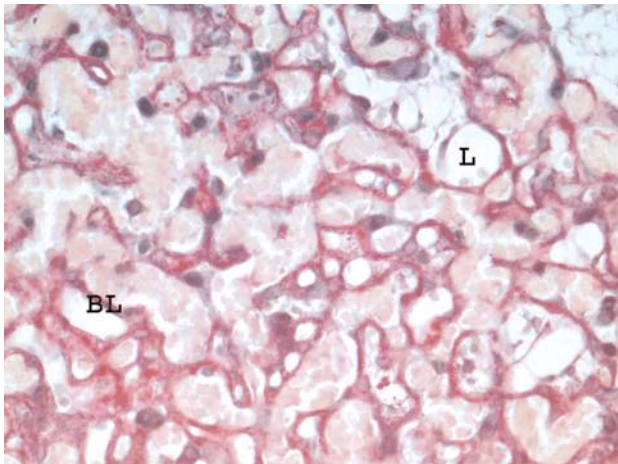
Diyabet uyarımlı oksidatif stres, kontrol grubuna kıyasla, plasenta dokusunda (bir LPO markeri olan) MDA seviyesinin anlamlı düzeyde artışa neden oldu. Ancak plasental MDA seviyesi, tedavi edilmeyen diyabetik gruba kıyasla KE ile tedavi edilen sıçanlarda önemli oranda azaldı. Diyabet ayrıca, SOD ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinde kontrol grubuna nazaran anlamlı düzeyde düşüşe yol açtı. KE tedavisi, tedavi görmeyen diyabetli gruba kıyasla SOD ve GPx aktivitelerinde anlamlı bir artışa neden oldu (**Tablo 2**).

Gebelik sırasında diyabet tanısı konmuş hayvanlarda plasenta ve fetüs ağırlıkları, KE tedavisi uygulanmış sıçanlar ve kontrol sıçanlarına göre daha yüksek bulundu (**Tablo 3**).

### Histokimyasal bulgular

Diyabetik grupta sıçan plasentasının ana histolojik bulgularında, trofoblastlarda bazal membran hacminde artış, villöz ödem ve intervillöz mesafelerde sıvı birikimi oldu. Buna karşılık endometriyumun desidual bileşeni zayıf ve incelmış olarak bulundu (**Şekil 1-3**).

Gebeliğin 21. gününde kontrol grubunda, labirent trofoblastları, labirent alanındaki labirent fetal damar endotel hücreleri, kesişme bölgelerindeki spongiyotrofoblastlar ve trofoblast dev hücreleri, çok güçlü PCNA immün boyanma yoğunluğu gösterdi. Diyabetik grupta ise PCNA immün etiketleme yoğunlukları, kontrol grubuna ve KE tedavili diyabetik gruplara kıyasla azaldı. Gebeliğin 21. gününde kontrol grubundaki sıçanla-



**Şekil 1.** Kontrol grubunda plasental labirent, normal histolojik görünüme sahipti (PAS boyaması. Büyütme:  $\times 320$ ). BL: Bazal lamina, L: Labirent.

**Tablo 2.** A (kontrol), B (tedavi görmemiş diyabetik) ve C (KE tedavisi görmüş diyabetik) gruplarındaki MDA seviyeleri ve SOD ile GPx enzim aktiviteleri.

Parametreler	A	B	C
MDA (nm/mg doku)	4.95 $\pm$ 0.23	7.65 $\pm$ 0.46*	5.83 $\pm$ 0.33†
SOD (U/mg protein)	4.17 $\pm$ 0.22	2.95 $\pm$ 0.13*	3.72 $\pm$ 0.19†
GPx (nm/mg protein)	321.16 $\pm$ 18.01	163.12 $\pm$ 11.34*	279.17 $\pm$ 16.25†

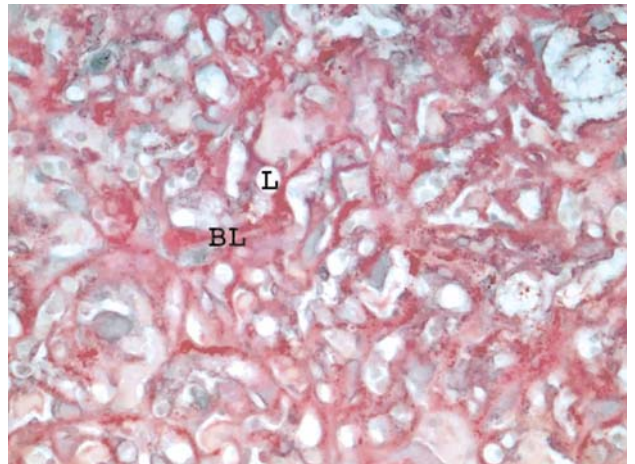
İstatistiksel analiz için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir; her grup için n=10. \*A grubuna kıyasla p<0.01; †B grubuna kıyasla p<0.05.

**Tablo 3.** A (kontrol), B (tedavi görmemiş diyabetik) ve C (KE tedavisi görmüş diyabetik) gruplarındaki fetal doğum ağırlığının ve plasenta ağırlığının ortalama değerleri.

Parametreler	A	B	C
Fetüsün doğum ağırlığı (g)	4.3 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.5*	4.9 $\pm$ 0.4†
Plasenta ağırlığı (g)	0.7 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.05*	0.9 $\pm$ 0.04†

İstatistiksel analiz için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir; her grup için n=10. \*A grubuna kıyasla p<0.01; †B grubuna kıyasla p<0.05.

rın plasentalarında nadir sayıdaki TUNEL pozitif hücre gözlemlendi. Gebeliğin 21. gününde diyabetik grupta, kontrol grubu ve KE uygulanmış diyabetik grup ile karşılaştırıldığında proliferen olan PCNA immün boyanma yoğunluğunun azaldığı ve sıçanların plasentasında TUNEL pozitif hücrelerin arttığı bulundu (**Tablo 4**).



**Şekil 2.** Diyabetik plasentada daha interhemal bariyerin daha büyük kalınlığı ve düzensizliği (PAS boyaması. Büyütme:  $\times 320$ ). BL: Bazal lamina, L: Labirent.

**Tablo 4.** Her grup için plasenta dokularında PCNA ve TUNEL yoğunluğunun yarı kantitatif karşılaştırılması (Kontrol, tedavi görmemiş diyabetik ve KE tedavili diyabetik grupları).

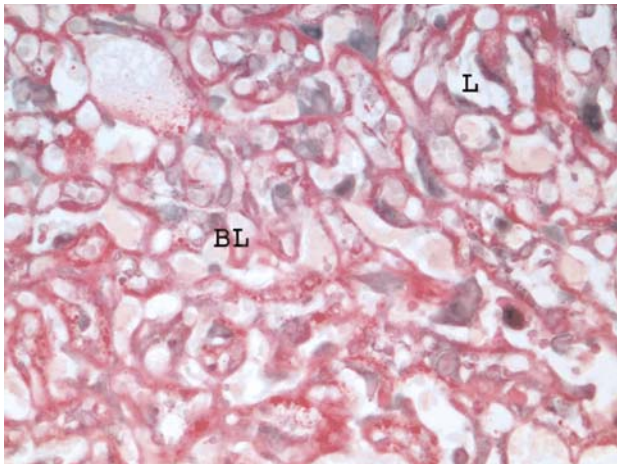
Parametreler	Kontrol	Tedavi görmemiş diyabetik	KE tedavili diyabetik
PCNA	+++	+	++
TUNEL	±	+++	++

PCNA ve TUNEL, yarı kantitatif olarak şöyle ifade edilmiştir: hafif (+), orta (++), güçlü (+++) ve çok güçlü (++++).

Plasentanın maternal kısmında ve plasental labirentte yer alan glikojen içeriği, kontrol sıçanlarına kıyasla STZ ile tedavi edilmiş sıçanlarda daha yüksekti. KE tedavisi, sıçanlarda STZ uyarımlı diyabet sonrası plasentanın morfolojisinin iyileşmesine ve glikojen içeriğinin azalmasına neden oldu (Şekil 4-6, Tablo 5).

### Tartışma

Mevcut literatüre baktığımızda diyabetin hem fetüs hem de plasenta gelişimi üzerinde olumsuz etkisi olduğu açıktır. Tip 1 ve 2 diyabet, erken ve geç dönem düşük ve ya doğum eylemlerine yol açar. Dahası, her iki diyabet türü de kardiyak defektler ve plasentomegali gibi konjenital ve plasental anormalliklere neden olabilir.<sup>[1,33]</sup> STZ uyarımlı diyabetik hayvan modeli, diyabet araştırmaları için iyi kabul gören bir yöntem olmuştur. Bu yöntemde sekonder hiperglisemi birçok kritik dokuda oksidatif strese neden olabilmektedir. İnsan gebeliklerinin aksine,



**Şekil 3.** KE tedavisi, STZ+KE tedavi grubunda plasenta morfolojisinin iyileşmesine sebep olmaktadır (PAS boyaması. Büyütme: x320). BL: Bazal lamina, L: Labirent.

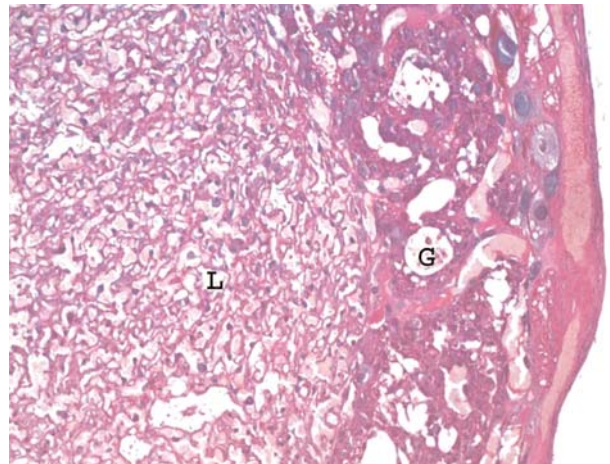
**Tablo 5.** Her grup için gebeliğin 21. gününde PAS boyalı bölümden yarı kantitatif olarak hesaplanan plasenta glikojen içeriği (Kontrol, tedavi görmemiş diyabetik ve KE tedavili diyabetik grupları).

Parametreler	Kontrol	Tedavi görmemiş diyabetik	KE tedavili diyabetik
Plasentanın maternal kısmı	+++	+	++
Plasenta labirenti	±	+++	++

±: Az miktarda glikojen; +, ++, +++: dokularda göreceli miktarda glikojen (+++: yüksek, ++: orta, +: düşük).

deney hayvanlarındaki hiperglisemi, kilo kaybıyla sonuçlanır.<sup>[34]</sup> Buna karşın, STZ etkisindeki yenidoğanların hem plasenta ağırlığı hem de boyu sağlıklı popülasyona göre daha fazladır.<sup>[1,34,35]</sup> Çalışmamızda, tedavinin sonunda, diyabetik hayvanlar kilo kaybı gösterdi. Başlangıç ve sonuç vücut ağırlıkları, kontrol sıçanlarında ve KE ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda farklı değildi. STZ sıçanlarında plasental veya fetal ağırlıklar, kontrol hayvanlarına kıyasla belirgin şekilde artmıştı. KE tedavisi, STZ uyarımlı diyabetik sıçanlarda plasenta ve fetüs ağırlıklarında düşüşe yol açmıştır.

O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dismutasyonunu katalize eden SOD aktivitesinin diyabetik sıçanların<sup>[36]</sup> ve diyabetik insanların<sup>[37,38]</sup> eritrositlerinde azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda ise plasental MDA seviyesi, tedavi edilmeyen diyabetik gruba kıyasla KE ile tedavi edilen sıçanlarda önemli oranda azaldı. Diyabet ayrıca, SOD ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinin kontrole nazaran anlamlı



**Şekil 4.** Kontrol grubundaki plasentanın maternal kısmında glikojen içeriği (PAS boyaması. Büyütme: x320). G: Glikojen, L: Labirent.



şekilde azalmasını indüklemiştir. KE tedavisi, tedavi görmeyen diyabetli gruba kıyasla SOD ve GPx aktivitelelerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur.

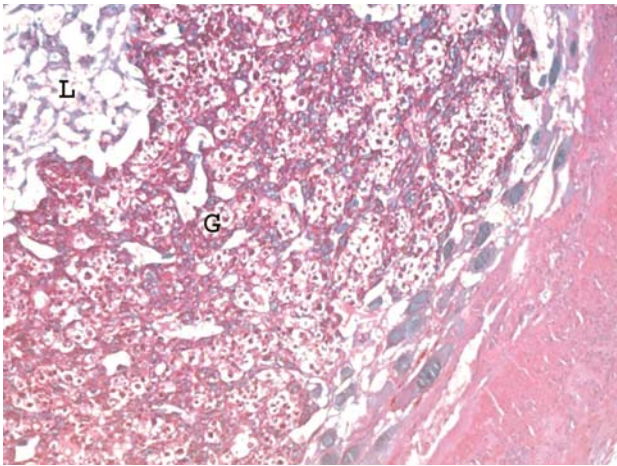
STZ sıçanların plasentasında histopatolojik özellikler önemli derecede farklıdır. Trofoblast hücrelerinin temel zarının boyutu ve hacmi önemli ölçüde artmıştır. Kontrol grubundaki sıçanlarda bu değişiklikler gözlenmemiştir. Plasenta hücrelerindeki proliferasyonun artması, plasentanın mikroortamında iskemiye gösterebilir.<sup>[39]</sup> Bu durumun diyabetli hayvanların membranlarındaki kalınlaşma ile uyumlu olduğu bildirilmiştir.<sup>[40]</sup> Aynı şekilde, kontrol edilemeyen diyabetik plasentada, plasenta morfolojisinde benzer değişiklikler bildirilmiştir.<sup>[41]</sup> Plasenta yapısındaki kalınlığın olası açıklaması mukopolisakkaridler olabilir.<sup>[42]</sup> Plasental membranların kalınlaşması, uteroplasental dolaşımın inhibisyonu ile sonuçlanır ve bu da fetüsün büyüme geriliğine neden olur.<sup>[1]</sup> Bununla birlikte, membran kalınlığındaki artış maternal ve fetal dolaşım arasındaki boşluğun artmasına yol açabilir. Bu da fetal beslenme sağlayan moleküllerin etkisiz şekilde yayılmasına neden olabilir.<sup>[39]</sup>

İnsanlardaki diyabetik gebelikte birçok farklı plasenta anomali bulunmaktadır.<sup>[43]</sup> Bunlardan plasentomegali ve fetal makrozominin artmış glikoz transferi nedeniyle olması ihtimali mevcuttur<sup>[44]</sup> ancak insülinin ve muhtemelen diğer hormonların büyümeyi destekleyen etkileri nedeniyle de olabilir.<sup>[45,46]</sup> Diyabette anılan diğer anomaliler arasında enfarktüsler, koryoanjiyomatöz, villöz fibroz ve dismatürite, *basement* membran

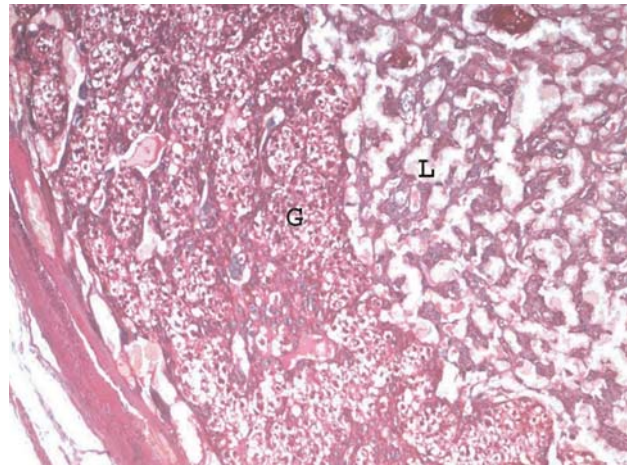
kompozisyonunda anomalileri ve artmış glikoz içeriği de yer almaktadır.<sup>[43]</sup> Çalışmamızda, gebeliğin 21. gününde diyabetik ve kontrol plasentaları arasındaki en dikkat çekici farklılık, tüm diyabetik plasentalarda bazal bölgede birçok glikojenle şişmiş hücrenin varlığıdır. Plasenta labirenti içinde, interhemal membrandaki trofoblast tabakaları kontrol grubuna kıyasla diyabetik hayvanlarda önemli derecede daha kalındı. KE ile tedavi, plasenta morfolojisinin iyileşmesine ve diyabetik plasentada glikojen içeriğinin azalmasına yol açmıştır.

Acar ve ark.<sup>[16]</sup> yaptıkları çalışmada, PCNA immüno-pozitif hücre frekansının kontrol grubunda ve diyabetik sıçan plasentasında azaldığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada ise, plasentadaki PCNA immüno-pozitif hücre sayısının gestasyonel yaşla paralel olarak azaldığı görülmüştür. Bu bulgular, plasentanın miyada yaklaştıkça proliferatif özelliğini yitirdiği bilgisini desteklemektedir.<sup>[15]</sup> STZ uygulandıktan sonra PCNA pozitifliğinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir. KE tedavisi, diyabetli sıçanların plasentasında PCNA pozitif hücreleri azaltmıştır.

Daha önceki bir çalışmada,<sup>[47]</sup> plasentanın fetal ve maternal kısmında bulunan TUNEL pozitif hücreler gebeliğin 20. gününde sayılmış ve maternal kısımdaki apoptotik hücrelerin sayısının, fetal kısımdakilerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada,<sup>[48]</sup> gebeliğin 18. gününde sıçan plasentadaki apoptotik hücrelerin nadiren bulunduğu bildirilmiştir. Plasentanın normal gelişimi için önemli olan apopto-



**Şekil 5.** STZ tedavili grupta plasentanın maternal kısmında glikojen içeriği (PAS boyaması. Büyütme: x320). G: Glikojen, L: Labirent.



**Şekil 6.** STZ+KE tedavili grupta plasentanın maternal kısmında glikojen içeriği (PAS boyaması. Büyütme: x320). G: Glikojen, L: Labirent.

zun, dışarıdan yapılan uygulamaların ya da sağlıklı plasenta ve embriyoyu etkileyen olguların sonucu olarak aşırı şekilde arttığı görülmüştür.<sup>[48-50]</sup> Bir başka çalışmada ise,<sup>[51]</sup> sıçan plasentasındaki etil nitrozüenin, labirent tabakasında apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, kontrol grubunda nadir miktarda apoptotik hücreye rastladık. STZ uygulamasının bir sonucu olarak, gebeliğin 21. gününde labirent tabakasındaki apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısının anlamlı şekilde arttığını bulduk. KE tedavisi, diyabetli sıçanların plasentasında TUNEL pozitif hücreleri azaltmıştır.

## Sonuç

Sonuç olarak çalışmamız, gebelik esnasında STZ uygulamasının, trofoblast hücrelerdeki oksidatif stres ve apoptoz/proliferasyon dengesini bozarak anormal plasenta gelişimine neden olduğunu göstermektedir. KE tedavisi, plasenta morfolojisinde iyileşmeye ve oksidatif stres, glikojen içeriği ve serum glikoz seviyelerinde azalmaya, serum insülin konsantrasyonlarında ise artışa neden olmaktadır.

**Çıkar Çakışması:** Çıkar çakışması bulunmadığı belirtilmiştir.

## Kaynaklar

- Gewolb IH, Merdian W, Warshaw JB, Enders AC. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes* 1986;35:1254-61.
- Winick M, Noble A. Cellular growth in human placenta. II. Diabetes mellitus. *J Pediatr* 1967;71:216-9.
- Naeye RL. Do placental weights have clinical significance? *Hum Pathol* 1987;18:387-91.
- Desoye G, Shafir E. The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes Rev* 1996;4:70-89.
- Lao TT, Lee CP, Wong WM. Placental weight to birth-weight ratio is increased in mild gestational glucose intolerance. *Placenta* 1997;18:227-30.
- Molteni RA, Stys SJ, Battaglia FC. Relationship of fetal and placental weight in human beings: fetal/placental weight ratio at various gestational ages and birth weight distribution. *J Reprod Med* 1978;21:327-34.
- Heinonen S, Taipale P, Saarikoski S. Weights of placenta from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta* 2001;22:399-404.
- Robinson J, Canavan JP, el Haj AJ, Goldspink DF. Maternal diabetes in rats. I. Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes* 1988;37:1665-70.
- Husain SM, Frost R, Mughal ZM. Effect of diabetes mellitus on rat placenta cellularity. *Early Hum Dev* 2001;60:207-14.
- Padmanabhan R, Shafiullah M. Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. *Arch Physiol Biochem* 2001;109:260-71.
- Mathiesen ER, Ringholm L, Damm P. Stillbirth in diabetic pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:105-11.
- Gillery P, Monboise JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes Metab* 1988;14:25-30.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
- Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autooxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990;39:1420-4.
- Maruo T, Ishihara N, Samoto T, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Matsuo H Regulation of human trophoblast proliferation and apoptosis during pregnancy. *Early Pregnancy* 2001;5:28-9.
- Acar N, Korgun ET, Cayli S, Sahin Z, Demir R, Ustunel I. Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy? *Acta Histochem* 2008;110:408-17.
- Migheli A, Attanasio A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. *J Pathol* 1995;176:27-35.
- Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;73:229-35.
- Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:175-82.
- Inal ME, Akgün A, Kahraman A. Radioprotective effects of exogenous glutathione against whole-body gamma-ray irradiation: age- and gender-related changes in malondialdehyde levels, superoxide dismutase and catalase activities in rat liver. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24:209-12.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990;186:343-55.
- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-81.
- Mahesh T, Menon, VP. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2004;18:123-7.
- Adegheta E. Distribution of calcitonin-gene-related peptide, neuropeptide-Y, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin-8, substance P and islet peptides in the pancreas of normal and diabetic rats. *Neuropeptides* 1999;33:227-35.
- Passey RB, Gillum RF, Fuller JB, Urry FM, Giles ML. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). *Clin Chem* 1977;23:131-9.



26. Hales CN, Randle PJ. Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem J* 1963;88:137–46.
27. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
28. Buage JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302–10.
29. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;82:512–20.
30. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952–8.
31. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of histological techniques*. Churchill Livingstone: New York; 1984.
32. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577–80.
33. Higgins M, Felle P, Mooney E, Bannigan J, McAuliffe F. Stereology of the placenta in type 1 and type 2 diabetes. *Placenta* 2011;32:564–9.
34. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999;375:217–23.
35. Vambergue A, Fajardy I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes* 2011;2:196–203.
36. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Diekus M, et al. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1986;35:503–7.
37. Peuchant E, Delmas-Beauvieux MC, Couchouron A, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, et al. Short-term insulin therapy and normoglycemia. Effects on erythrocyte lipid peroxidation in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997;20:202–7.
38. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanism in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987;36:1014–8.
39. Honda M, Toyoda C, Nakabayashi M, Omori Y. Quantitative investigations of placental terminal villi in maternal diabetes mellitus by scanning and transmission electron microscopy. *Tohoku J Exp Med* 1992;167:247–57.
40. Gül M, Bayat N, Çetin A, Kepekçi RA, Şimşek Y, Kayhan B, et al. Histopathological, ultrastructural and apoptotic changes in diabetic rat placenta. *Balkan Med J* 2015;32:296–302.
41. Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, et al. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:287–95.
42. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. *Pathology of the human placenta*. 6th ed. Berlin: Springer; 2012.
43. Singer DB. The placenta in pregnancies complicated by diabetes mellitus. *Perspect Pediatr Pathol* 1984;8:199–212.
44. Pedersen J, Bojsen-Moller B, Poulsen H. Blood sugar in newborn infants of diabetic mothers. *Acta Endocrinol* 1954;15:33–52.
45. Sosenko IR, Kitzmiller JL, Loo SW, Blix P, Rubenstein AH, Gabbay KH. The infant of the diabetic mother. Correlation in increased cord C-peptide levels with macrosomia and hypoglycemia. *N Engl J Med* 1979;301:859–62.
46. Susa JB, McCormick KL, Widness JA, Singer DB, Oh W, Adamsons K, et al. Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey: effects on fetal growth and composition. *Diabetes* 1979;28:1058–63.
47. Unek G, Ozmen A, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *Acta Histochem* 2012;114:31–40.
48. Chauhan M, Yallampalli U, Reed L, Yallampalli C. Adrenomedullin antagonist infusion to rats during midgestation causes fetoplacental growth restriction through apoptosis. *Biol Reprod* 2006;75:940–7.
49. Yamauchi H, Katayama K, Ueno M, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Involvement of p53 in 1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine-induced trophoblastic cell apoptosis and impaired proliferation in rat placenta. *Biol Reprod* 2004;70:1762–7.
50. Antipatis C, Ashworth CJ, Riley SC, Hannah L, Hoggard N, Lea RG. Vitamin A deficiency during rat pregnancy alters placental TNF-alpha signalling and apoptosis. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:151–8.
51. Katayama K, Ueno M, Takai H, Ejiri N, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Ethylnitrosourea induces apoptosis and growth arrest in the trophoblastic cells of rat placenta. *Biol Reprod* 2002;67:431–5.