T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN SIÇAN UTERUS LEİOMYOMASI MODELİNDE KURKUMİNİN ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

AYŞEGÜL KİRAZ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970062

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN SIÇAN UTERUS LEİOMYOMASI MODELİNDE KURKUMİNİN ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞEGÜL KİRAZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Ülker CANKURT

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2016.KB.SAG.004 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970062

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Ayşegül KİRAZ'ın **"Deneysel Olarak Oluşturulan Sıçan Uterus Leiomyoması Modelinde Kurkuminin Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi"** konulu Yüksek Lisans tezini (28 /12 /2016) tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Ülker CANKURT
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Işıl TEKMEN
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Meltem KURUŞ
ÜYE
Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
ÜYE(YEDEK)
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Selen BAHÇECİ
ÜYE(YEDEK)
Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....i
ŞEKİL DİZİNİ.....iv
TABLO DİZİNİ.....vi
KISALTMALAR.....vii
TEŞEKKÜRLER.....x
ÖZET.....1
ABSTRACT.....3
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....5
2. GENEL BİLGİLER.....8
2.1. Uterus.....8
2.1.1.Uterus Embriyolojisi.....8
2.1.2. Uterus Anatomisi.....10
2.1.2.1. Yeri ve Yakın Komşuluğu.....10
2.1.2.2. Boyutları.....10
2.1.2.3. Şekli ve Konumu.....10
2.1.2.4. Hacmi.....11
2.1.2.5. Uterus Ligamentler.....11
2.1.2.5.1. Yuvarlak Ligamentler.....11
2.1.2.5.2. Uterosakral Ligamentler.....11
2.1.2.5.3. Tansvers Servikal Ligamentler.....11
2.1.2.5.4. Puboservikal Ligamentler.....12
2.1.2.6. Kan Desteği.....12
2.1.2.6.1. Arterler.....12
2.1.2.6.2. Venler.....12
2.1.2.7. Lenfatik Akım.....12
2.1.2.8. Uterusun Anatomik Bölümleri.....12
2.1.2.8.1. Corpus Uteri.....13
2.1.2.8.2. Cervix Uteri.....13
2.1.3.Uterus Histolojisi.....13
2.1.3.1.Endometriyum.....14
2.1.3.1.1.Endometriyumun Kanlanması.....16
2.1.3.2.Myometriyum.....16
2.1.3.2.1. Myometriyuma Hormonların Etkisi.....17
2.1.3.3. Perimetriyum.....17
2.1.4.Uterus Fizyolojisi.....18
2.2. Dişi Sıçan Genital Sistem.....21
2.2.1. Dişi Sıçanlarda Üreme Siklusu ve Uterus Histolojisi.....21
2.2.2 Sıçanlarda Östrus Siklusu.....22
2.3.Uterus Leiomyoması.....22
2.3.1.Tarihçe.....22
2.3.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji.....22
2.3.3.Seks Steroidleri (Östrojen ve Progesteron).....23
2.3.4. Histolojik Özellikler.....26
2.3.5. Leiomyoma Tipleri.....26
2.3.6. Özel Leiomyoma Tipleri.....26
2.3.6.1. Mitozdan Zengin Leiomyoma.....27

2.3.6.2. Hücreden Zengin Leiomyoma 27
2.3.6.3. Hemorajik Hücreden Zengin Leiomyoma 27
2.3.6.4. Atipik Leiomyoma 28
2.3.6.5. Epitelioid Leiomyoma 28
2.3.6.6. Dissekan Kotiledonoid Leiomyoma 29
2.3.6.7. Miksoid Leiomyoma 29
2.3.6.8. Vasküler Leiomyoma 29
2.3.6.9. Heterolog Elemanlı Leiomyoma 29
2.3.6.10. Hematopoetik Elemanlı Leiomyoma 30
2.3.7. Tedavi 30
2.4. Kurkumin 30
2.4.1. Kimyasal Özellikleri 30
2.4.2. Kurkuminin Antioksidan Etkileri 32
2.4.3. Kurkuminin Antienflamatuar Etkileri 33
2.4.4. Kurkuminin Antikarsinojenik Aktivitesi 33
2.4.5. Kurkuminin Klinik ve Medikal Kullanımı 35
3. GEREÇ VE YÖNTEM 36
3.1. Araştırmanın Tipi 36
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 36
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 36
3.4. Çalışmanın Materyali 37
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 37
3.6. Veri Toplama Araçları 38
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler 38
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler 38
3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi 38
3.6.2.2. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi 38
3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler 39
3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü 39
3.6.2.3.2. Masson Trikrom Boya Protokolü 40
3.6.2.3.3. PAS(Periodic Asid Schiff) Boya Protokolü 42
3.6.2.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler 43
3.6.2.4.1. α-SMA Boyama Prosedürü 43
3.6.2.4.2. PCNA Boyama Prosedürü 43
3.6.2.4.3. Ki67 Boyama Prosedürü 44
3.6.2.4.4. VEGF Boyama Protokolü 44
3.6.2.4.5. Semikantitatif İmmunohistokimyasal Analiz 45
3.6.2.5. Morfometrik Değerlendirmeler 46
3.6.2.5.1. Myometriyum Kalınlığı Değerlendirilmesi 46
3.6.2.6. Biyokimyasal Analizler 46
3.6.2.6.1. ELISA Yöntemi 46
3.6.2.6.1.1. Östradiol Ölçümü 46
3.6.2.6.1.2. Progesteron Ölçümü 47
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi 48
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi 49
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları 49
3.10. Etik Kurul Onayı 49
4. BULGULAR 50

4.1.Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi 50
4.2. Deneklerin Menstruel Sikluslarının Belirlenmesi 53
4.3. Histokimyasal Bulgular 53
4.3.1. Hematoksilen Eosin Boyama Değerlendirilmesi 53
4.3.3. PAS (Periyodik Asit-Schif) Boyama Değerlendirmesi 66
4.3.2. Masson Trikrom Boyama Değerlendirilmesi 69
4.4. Morfometrik Değerlendirme 74
4.4.1. Myometriyum Kalınlığının Değerlendirilmesi 74
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular 76
4.5.1. Ki-67 Boyama Değerlendirmesi 76
4.5.2. PCNA(Proliferasyon Hücre Nukleus Antijeni) Boyama Değerlendirme 82
4.5.3. VEGF(Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) Boyama Değerlendirme 88
4.5.4. α-SMA (alfa-Düz Kas Aktin) Boyama Değerlendirme 94
4.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler 100
4.6.1. Östradiol (E2) Değerlendirmesi 100
4.6.2. Progesteron (PROG) Değerlendirmesi 103
5. TARTIŞMA 106
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 114
7. KAYNAKLAR 115
8. EKLER 128

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Uterus ve vajina formasyonu.....9
Şekil 2: Uterusun sagittal kesitinin bir fotomikrografı 14
Şekil 3: Leiomyoma patogenezisinde östrojenin rolü 24
Şekil 4: Leiomyoma patogenezisinde progesteronun rolü 25
Şekil 5: Zerdeçaldan türetilen kurkumin ve benzerlerinin kimyasal yapısı 31
Şekil 6: Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi 50
Şekil 7: Kontrol grubuna ait uterus kesiti görüntüleri. 54
Şekil 8: Etanol grubuna ait uterus kesiti görüntüleri (H&E) 56
Şekil 9: Leiomyoma grubunda gözlenen yeni bir uterus benzeri yapılanmaya ait görüntüler(H&E). 58
Şekil 10: Leiomyoma grubunda genişlemiş myometriyuma ait görüntü(H&E). 59
Şekil 11: Leiomyoma grubunda atipik leiomyomanın görüntüleri (H&E). 60
Şekil 12: Uterus leiomyoması grubunda nodül yapısının görüntüsü (H&E) 60
Şekil 13: Leiomyoma+mısır yağı grubuna ait uterus görüntüleri (H&E). 62
Şekil 14: Leiomyoma+mısıryağı grubunda atipik leiomyomanın görüntüsü (H&E).....63
Şekil 15: Leiomyoma+mısıryağı grubunda epitel hiperplazisinin görüntüsü (H&E). 63
Şekil 16: Uterus leiomyoma+kurkumin grubuna ait kesit görüntüleri(H&E).....65
Şekil 17: Kontrol grubuna ait PAS boyama 66
Şekil 18: Etanol grubuna ait PAS boyama 67
Şekil 19: Leiomyoma grubuna ait PAS boyama 67
Şekil 20: Leiomyoma+mısıryağı gurbuna ait PAS boyama 68
Şekil 21: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait PAS boyama 68
Şekil 22: Kontrol grubuna ait Masson Trikrom boyama 70
Şekil 23: Etanol grubunua ait Masson Trikrom boyama 70
Şekil 24: Leiomyoma grubuna ait Masson Trikrom boyama 71
Şekil 25: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait Masson Trikrom boyama.....72
Şekil 26: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait Masson Trikrom boyama. 73
Şekil 27: Gruplar arası myometriyum kalınlık oranları 74
Şekil 28: Ki-67 pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması.....78
Şekil 29: Kontrol grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama 79
Şekil 30: Etanol grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama.....79

Şekil 31: Leiomyoma grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama 80
Şekil 32: Leiomyoma grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama 80
Şekil 33: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama 81
Şekil 34: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama.....81
Şekil 35: PCNA pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması 84
Şekil 36: Kontrol grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama.. 85
Şekil 37: Etanol grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama. 85
Şekil 38: Leiomyoma grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama 86
Şekil 39: Leiomyoma grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama 86
Şekil 40: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama. 87
Şekil 41: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama.....87
Şekil 42: VEGF pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması.....90
Şekil 43: Kontrol grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama.....91
Şekil 44: Etanol grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama.....91
Şekil 45: Leiomyoma grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama..92
Şekil 46: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama. 92
Şekil 47: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama.. 93
Şekil 48: α-SMA pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması.....96
Şekil 49: Kontrol grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama 97
Şekil 50: Etanol grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama. 97
Şekil 51: Leiomyoma grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama.. 98
Şekil 52: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama..98
Şekil 53: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama. 99
Şekil 54: E2 standart grafiği. 100
Şekil 55: E2 seviye değerlendirme grafiği 102
Şekil 56: Progesteron standart grafiği. 103
Şekil 57:Progesteron seviye değerlendirme grafiği.....105

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Deney grupları ve grup başına kullanılan denek sayısı 36
Tablo 2: Doku takip protokolü 39
Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boya protokolü 40
Tablo 4: Masson Trikrom boya protokolü 41
Tablo 5: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü 42
Tablo 6: İmmünohistokimyasal Bulgu Skorlama 45
Tablo 7: Gruplar arası ağırlık değerlendirilmesinin tarihlere göre karşılaştırılması. 51
Tablo 8: Tüm deney gruplarında ağırlık değişimlerinin kendi içerisinde değerlendirilmesi ... 52
Tablo 9:Myometriyum kalınlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi 75
Tablo 10: Ki-67 immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi 77
Tablo 11: Ki-67 Semikantitatif Değerlendirme 78
Tablo 12: PCNA immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi. 83
Tablo 13: PCNA Semikantitatif Değerlendirme 84
Tablo 14: VEGF immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi 89
Tablo 15:VEGF Semikantitatif Değerlendirme 90
Tablo 16: α-SMA immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi 95
Tablo 17: α-SMA Semikantitatif Değerlendirme 96
Tablo 18: Tüm deney gruplarında E2 değişimlerinin kendi içerisinde değerlendirilmesi. 102
Tablo 19: Tüm deney gruplarında Progesteron değişimlerinin kendi içerisinde değerlendirilmesi 105

KISALTMALAR

ELT-3 : Eritroid benzeri tranaskripsiyon faktörü-3

PCNA : Proliferasyon hücre nükleer antijeni

DNA : Deoksiribo nükleik asit

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

PDGF : Trombosit türevli büyüme faktörü

SMA : Düz kas aktin

SRY : Cinsiyet belirleyici bölge Y

AMH : Anti-müllerian hormon

Wnt : Wing-less type

Hox : Homeobox

GnRH : Gonadotropi serbestleştirici hormon

FSH : Folikül stimüle edici hormon

LH : Luteinizan hormon

gER : granüllü endoplazmik retikulum

AT-hook2(HMGA2) : Yüksek mobilite grubu A2

E2 : Östrojen

P : Progesteron

ÖR : Östrojen reseptörü

PR : Progesteron reseptörü

ÖRα : Östrojen reseptörü alfa

ÖR β : Östrojen reseptörü beta

UL : Uterus leiomyoması

IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

TGF : Transforme edici büyüme faktörü

PRα : Progesteron reseptörü alfa

PR β : Progesteron reseptörü beta

Bcl2 : B hücre lenfoma 2

HPF : Yüksek güç alanlar

GSH : Glutatyon

LPO : Lipit peroksidaz

MM : Çoklu miyeloma

COX-1,2 : Siklooksijenaz

Lx : Lipoksigenaz

TNF-α : Tümör nekroz faktör

AGP : Alfa 1-asit glikoprotein

MD-2 : Miyeloid farklılaşma proteini 2

HDAC : Histon asetiltransferazlar ve deasetilazlar

XO : Ksantin oksidaz

HIV 1 : İnsan bağışıklık eksikliği virüsü tip 1

GSK : Glikojen sentaz kinaz

PKC : Protein kinaz C

FAK : Fokal adhezyon kinaz

TrxR : Tioredoksin redüktaz

ALR : Aldoz redüktaz

Fe : Demir

Cu : Bakır

Mn : Mangan

Zn : Çinko

NF-κB : Nükleer faktör-kappa B

AP-1 : Aktivatör protein 1

STAT : Sinyal ileticisi ve aktivatörü

PPARγ : Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gamma

İNOS : İndüklenebilir nitrik oksid sentaz

AMPK : Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz

IL : Interlökin

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

MMP-2/9 : Matriks metalloproteinaz-2/9

mg/kg : miligram/kilogram

cc : Santilitre

PAS : Periyodik Asit-Schiff

PBS : Fosfat tamponlu tuz

ELİSA : Enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

PROG : Progesteron

μL : Mikrolitre

pg/ml : pikogram/mililitre

ng/ml : nanogram/mililitre

ECM : Ekstraselüler matriks

SPRM : Selektif progesteron reseptörü modülatörleri

RANKL : Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü

RANK : Nükleer Faktör Reseptör Aktivatörü κB

BSA : Bisfenol A

MED12 : Mediator Complex Subunit12 (Aracı Karmaşık Alt Birim12)

Tsc2 : Tuberöz Skleroz 2

NDEA : N-Nitrosodietilamin

CCl4 : Karbon tetraklorid

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim süresince daima yol gösterici olan, tecrübelerini ve bilgi birikimini paylaşmaktan çekinmeyen saygı ve sevgisi ile desteğini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Ülker CANKURT'a,

Yüksek lisans eğitimime katkılarını sağlayan değerli Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı öğretim üyesi hocalarıma ve biyolog Özcan ÜSTÜN'e,

Tez çalışmalarıma katkılarından dolayı Biyokimya Anabilimdalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR'a ve araştırma görevlisi Didem KELEŞ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı odayı paylaştığım, iyi ve kötü zamanlarımızda birbirimizden desteğimizi esirgemediğimiz sevgili arkadaşlarım Cansu BEKDEMİR ve Uygar SAÇIK'a,

Yüksek lisansın bana kazandırmış olduğu kıymetli arkadaşlarım Gökçen BİLİCİ, Pınar AKOKAY, Nevin ERSOY, Betül SARI, Şeyda DEMİR, Umut DEMİRDELEN, Hüseyin KISAOĞLU, Merve TÜTÜNCÜ, Feyyaz ÖZEL ve diğer yüksek lisans arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca iyi kalpleri ile ablalık ve abilik yapan Dilek BACIK ve Ahmet KIRBULUT'a

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatımda da desteklerini esirgemeyen her zaman sevgi ile tüm zorlukları aşmamı sağlayan sahip olduğum en kıymetliler babam Bekir KİRAZ, annem Fatma KİRAZ, kardeşlerim Hüseyin Cevahir KİRAZ ve Eylem Yağmur KİRAZ'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince her zora düştüğümde vazgeçmemem gerektiğine beni ikna eden, sevgisi ve saygısı ile her zaman yanımda olan ve kahrımı çeken sevgili yol arkadaşım Şahin KAYA'ya çok teşekkür ederim.

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN SIÇAN UTERUS LEİOMYOMASI MODELİNDE KURKUMİNİN ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

AYŞEGÜL KİRAZ

Dokuz Eylül Üniveristesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Narlıdere, İzmir, aysglkiraz@gmail.com

ÖZET

Amaç:

Uterus leiomyomaları, üreme çağındaki kadınlarda % 77 gibi yüksek sıklıkla meydana gelen, iyi huylu myometrial tümörlerdir. Leiomyomalar sıklıkla menoraji, dismenore, pelvik basınç ve ağrı, infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olmaktadır. Bu tümörler premenopozal kadınlarda histeroktemi için önemli bir göstergedir. Son birkaç yıl içerisinde bazı medikal ve minimal invazif cerrahi girişimler, uterusunun korunmasını isteyen kadınlarda histerektomiye alternatif olarak geliştirilmektedir. Sıklıkla görülen uterus leiomyomalarının kadın sağlığı ve yaşam kalitesi üzerine büyük bir etkisi vardır. Bu nedenle tedavi ve bu hastalıkları önlemek için yeni yollar tanımlamak oldukça önemlidir.

Bizde çalışmamızda uterus leiomyoması üzerine kurkuminin etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal analizler ile incelemeyi amaçladık.

Yöntem:

Çalışmada gruplar aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

1. Kontrol Grubu: Hiçbir işlem uygulanmadı, uterusları alındı. Bazal değerler için kullanıldı.

2. Etanol Grubu: Etanol grubuna 30 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal olarak 0,05 ml etanol enjekte edildi ve deney sonuna kadar başka bir işlem uygulanmadı.

3. Leiomyoma Grubu: 25 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal olarak 0,5 mg/kg estradiol benzoat enjekte edildi. Daha sonra 5 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal enjeksiyon ile 4 mg/kg progesteron enjekte edildi.Deney sonuna kadar başka bir işlem uygulanmadı.

4. Leiomyoma+mısıryağı (Çözgen) Grubu: Leiomyoma oluşturulduktan sonra 15 gün boyunca günde birer defa oral gavaj ile 2 cc mısır yağı verildi.

5. Leiomyoma+kurkumin (Antioksidan) Grubu: Leiomyoma oluşturulduktan sonra15 gün boyunca günde birer defa 200mg/kg kurkumin 2 cc mısır yağında çözdürülürek oral gavaj ile verildi.

Deney başlangıcı, leiomyoma oluşumu sonrası ve deney sonu deneklerin ağırlıkları ölçüldü ve kan örnekleri alındı. Deney sonunda tüm grupların eter anestezisi altında uterusları alındı.

Histokimyasal incelemeler için; Hematoksilen & Eozin, Periyodik Asit Schiff ve Masson Trikrom, immünohistokimyasal incelemeler için; Ki-67, PCNA, VEGF ve α-SMA boyamaları yapıldı. Biyokimyasal incelemeler için östradiol ve progesteron düzeyleri incelendi.

Bulgular:

Histokimyasal incelemeler sonucunda leiomyoma grubu ve leiomyoma oluşturulup mısıryağı verilen gruplarda atipik leiomyoma, hücresel leiomyoma ve epiteloid leiomyoma olgularına rastlandı. Kollajen artışına bağlı olarak myometriyal genişlemeler gözlendi. Bazal membran ondülasyonunda bozulma olduğu gösterildi. Leiomyoma+kurkumin grubunda bu bulgulara rastlanmadı ve bulguların kontrol grubuna yakın olduğu izlendi. Etanol grubunda kontrol grubuna göre vasküler yapılarda artış olduğu gözlendi.

İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda kontrol ve etanol gruplarına göre Ki-67, PCNA, VEGF ve α-SMA pozitif hücre sayısı leiomyoma ve leimyoma+mısıryağı grubunda anlamlı derecede artış gösterdi. Leiomyoma+kurkumin grubunda ise leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubuna göre immün pozitif hücre sayısında anlamlı azalma gözlendi.

Biyokimyasal olarak östradiol(E2) ve progesteron(P) seviyeleri değerlendirildi.Kontrol ve etanol gruplarına göre leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubunda E2 ve P seviyeleri anlamlı derecede artış gösterdi. Leiomyoma+kurkumin grubunda ise leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubuna göre E2 ve P seviyelerinde anlamlı azalma gözlendi.

Sonuç:

Elde ettiğimiz sonuçlar kurkuminin leiomyomalar üzerine etkilerini histokimyasal,immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak göstermiştir. Bu çalışmanın daha sonra yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

Anahtar Kelimeler: uterus leiomyoma, kurkumin, sıçan, infertilite

THE HISTOLOGIC OBSERVATION OF THE EFFECT OF CURCUMIN ON THE EXPERIMENTALLY GENERATED RAT UTERINE LEIOMYOMA MODEL

AYŞEGÜL KİRAZ

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology, Narlıdere, İzmir, aysglkiraz@gmail.com

ABSTRACT

Objective:

Uterus leiomyomas is a benign tumor which can highly be seen in women at fertility age up to 77%. Leiomyomas frequently cause menorrhagia, dismenore, pelvic pressure and pain, infertility and repeating loss of pregnancy. These tumors are important indicators of hystorectomy in premenopausal women. In the last few years, some medical and minimal surgical attempts were developed to protect the uteruses of women who desire to keep them. Uterus leiomyomas which can be seen frequently has a big effect on women health and life quality. For this reason cure and the preventative attempts are extremely important.

In our study, we aimed to investigate the effect of curcumin on uterine leiomyoma by histochemical, immunohistochemical and biochemical analyzes.

Method:

Groups are arranged within this study as the following.

1. Control Group: No procedure was performed, the uterus was removed. Used for the basal values.
2. Ethanol Group: Ethanol was injected intraperitoneally with 0.05 ml ethanol once a day for 30 days and no further treatment was applied until the end of the experiment.
3. Leiomyoma Group: 0.5 mg / kg estradiol benzoate was injected intraperitoneally once a day for 25 days. Then, 4 mg / kg progesterone was injected intraperitoneally once a day for 5 days. No further treatment was performed until the end of the experiment.
4. Leiomyoma+corn oil (Solvent) Group: After the formation of leiomyoma, 2 cc of corn oil was given by oral gavage once a day for 15 days.

5. Leiomyoma+curcumin (Antioxidant) Group: After leiomyoma formation, they were given oral gavage by dissolving 200 mg /kg curcumin in 2cc corn oil once a day for 15 days.

The weights of the test subjects, the end of the leiomyoma formation and the end of the experiment were measured and blood samples were taken. At the end of the experiment, uterus was taken under ether anesthesia in all groups.

For the histochemical studies; Hematoxylin and Eosin, Periodic Acid Schiff and Masson's trichrome, for the immunohistochemical studies; Ki-67, PCNA, VEGF and α-SMA staining methods were used.

Results:

Histochemical studies revealed atypical leiomyoma, cellular leiomyoma and epithelioid leiomyoma in the leiomyoma group and the leiomyoma group and the corn oil group. Myometrial enlargements were observed due to increased collagen. It was shown that basal membrane degeneration was deteriorated. Leiomyoma + curcumin group did not show these findings and it was observed that the findings were close to the control group. In the ethanol group, there was an increase in vascular structures compared to the control group.

As a result of immunohistochemical studies, Ki-67, PCNA, VEGF and α-SMA positive cell numbers increased significantly in the leiomyoma and leiomyoma + corn oil groups according to the control and ethanol groups. Leiomyoma + curcumin group showed a significant decrease in the number of immunocompetent cells compared to leiomyoma and leiomyoma + corn oil group.

Biochemically estradiol (E2) and progesterone (P) levels were evaluated. E2 and P levels in leiomyoma and leiomyoma + corn oil group increased significantly according to the control and ethanol groups. Leiomyoma + curcumin group showed a significant decrease in E2 and P levels compared to leiomyoma and leiomyoma + corn oil group.

Conclusion:

Our results showed histochemical, immunohistochemical and biochemical effects of curcumin leiomyomas. We believe that this study will shed light on future experimental and clinical studies.

Key Words: uterine leiomyoma, curcumin, rat, infertility

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Uterus leiomyomaları, üreme çağındaki kadınlarda % 77 gibi yüksek sıklıkla meydana gelen, iyi huylu myometrial tümörlerdir(1). Leiomyomalar sıklıkla menoraji, dismenore, pelvik basınç ve ağrı, infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olmaktadır(2). Bu tümörler premenopozal kadınlarda histeroktemi için önemli bir göstergedir. ABD'de en sık histerektomi endikasyonu myoma uteridir ve her yıl yapılan 200.000'in üstünde histerektominin yaklaşık %33'ünü oluşturmaktadır(1). Son birkaç yıl içerisinde bazı medikal ve minimal invazif cerrahi girişimler, uterusunun korunmasını isteyen kadınlarda histerektomiye alternatif olarak geliştirilmektedir(3). Sıklıkla görülen uterus leiomyomasının kadın sağlığı ve yaşam kalitesi üzerine büyük bir etkisi vardır(4). Bu nedenle tedavi ve bu hastalıkları önlemek için yeni yollar tanımlamak oldukça önemlidir.

Literatürde deneysel olarak oluşturulmuş uterus leiomyomasına kurkuminin etkisinin histolojik olarak incelenmesine ait çalışma bulunmamaktadır. Kurkumin daha önce literatürde Eker sıçandan türetilmiş uterus leiomyoma hücre hattı (ELT-3 hücreleri) çalışmasında kullanılmıştır, bu çalışmada hücre kültürüne belirli dozlarda kurkumin verilerek etkisine bakılmıştır(5). Ancak kurkuminin oral yolla verilerek deney hayvanlarında uterus leiomyoması üzerine etkisi bakılmamıştır.

Kurkumin; Zingiberaceae ailesi üyesi (1,7-bis[4-hidroksi-3-metoksifenil]-1,6-heptadien-3,5-dion) hidrofobik bir polifenol bileşiğidir. Genellikle zerdeçal olarak bilinen Curcuma longa bitkisinin rizomunda(kök gövde) bulunur(6). Zerdeçal (Curcuma longa)'dan elde edilen kurkumin kimyasal yoldan önleyici fitokimyasal bir maddedir ve çeşitli deney hayvan modellerinde birden fazla organ bölgesinde, kimyasal olarak indüklenmiş karsinojenezi inhibe ettiği bildirilmiştir(7). Kurkuminin, tümör hücre proliferasyonunda azalma, kan kolestrolünde düşüş, tromboz ve miyokard infarktüsü baskılaması gibi birçok etkisi olduğu geniş araştırmalar ile gösterilmiştir(5).

Ki67 proteini bir hücre proliferasyon belirtecidir. Ki67 proteini aynı zamanda MKI67 olarak da bilinir. Ki67 antijeni G2 ve M fazında daha çok olmakla birlikte geç faz S ve hücre döngüsünün tüm aktif bölgelerinde ifade edilen nükleer bir proteindir. Ancak G0 fazında(dinlenme fazı) görülmemektedir. Bu nedenle, Ki67 bir hücre proliferatif aktivite göstergesi olarak kabul edilmektedir(8). Ki67, belirli bir hücre popülasyonunun büyüme

oranını belirlemek için iyi bir işaretleyici olarak kullanılabilir. Ki67 pozitif tümör hücreleri (Ki67 indeksi etiketleme) fraksiyonu genellikle kanser klinik seyri ile ilişkilidir. Bu çalışmada da leiomyoma tümör hücrelerini işaretlemede kullanılacaktır.

Proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA), parafin bloklarda immünohistokimyasal yöntemle çalışma olanağı sağlayan, DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak fonksiyon gören nükleer nonhiston proteinidir(9). Klinik deneylerinde leiomyoma hücrelerinin çoğalması ve apoptozisi üzerine progesteronun etkisi gösterilmiştir. Bu durumda , ilk olarak, PCNA ve çoğalan bir monoklonal antikorun immünohistokimyasal analizi ile menstrual siklusta normal myometrial hücreler ile leiomyoma hücreleri karşılaştırıldığında leiomyoma hücrelerinin yüksek proliferatif etkisi tespit edilmiştir(2). Leiomyoma hücrelerinin proliferatif aktivitesini düzenleyen progesteronun rolünü anlamak için immünohistokimyasal olarak PCNA incelenecektir.

Memelilerde dokuda oluşan travmada çok sayıda molekül onarım ve rejenerasyonda rol alır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) süper familyasının bir alt familyasıdır. Özellikle endotel hücreleri için büyüme faktörleri birçok işleve sahip gruplar içerir. VEGF endotel hücre çoğalmasında, göçünde ve farklılaşmasında rol alır. VEGF uterine leiomyomalarında en çok ifade edilen faktörlerdendir. Leiomyomalarda normal myometrium ve endometriuma göre endotelyal çoğalma endeksi daha yüksek bir yoğunluğa sahiptir. Makrofajlar, arter duvarları, venüller ve düz kas hücreleri, leiomyoma varlığında artan ekspresyon ile VEGF için pozitif boyanırlar(10).

Düz kas aktin (SMA); miyofibroblast oluşumu ve fibrogenesis için gerekli olan 42kD'lık bir belirteçtir. Bu aktin protein ailesi içinde 6 izoformu vardır. Bu mikrofilamanlar kasılma proteinleridir. Bunlar iskelet kas alfa, düz kas alfa ve gama, kalp kası alfa, non-miyojenik beta ve gama olarak bilinir. Alfa formu iskelet kasında, düz kasta, kalp kasında ve ayrıca fibroblast ve miyoepitelial özellik taşıyan hücrelerde bulunur. Miyofibroblastlar düz kaslardan farklılaşan fibroblastların bir grubudur. Düz kas aktini (SMA) ve desmin düz kasın spesifik belirtecidir ve leiomyoma karakteristiği olarak güçlü bir şekilde pozitif boyanır(11).

Leiomyomaların tedavisi patolojilerine, büyüme özelliklerine ve klinik özelliklerine göre değişir. Leiomyomalar tek olabilecekleri gibi sıklıkla multipldır. Leiomyomalar çok çeşitli semptomlara neden olmasına karşılık, çoğunlukla asemptomiktir. Uterus leiomyomalı

olguların %50'sinden az bir kısmı semptomatiktir. Semptomlar tek olabileceği gibi, birden fazla da olabilir. Semptomlar tümörün lokalizasyonuna, büyüklüğüne ve leiomyomaların sayısına bağlıdır. Leiomyomada görülen semptomlar : anormal uterin kanama, dismenore , pelvik basınç hissi, kabızlık, dispanori, infertilite, tekraralayan gebelik kayıpları, erken doğum, abdominal distansiyondur(12). Myomektomi leiomyoma tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. Çoklu insizyon olmasına rağmen, myomektomi sonrası gebeliklerde uterus fonksiyonları korunmuştur. Gebelik sırasında rüptür oranı %1 olarak yayınlanmıştır(13). Yöntemin başarısı preoperatif uterus büyüklüğüne, leiomyomaların sayısına, leiomyomaların inkomplet çıkartılmasına ve submüköz leiomyomaların myometriuma uzanmasına bağlı olarak değişir(14,15). Histerektomi, leiomyomalarda kullanılan en iyi tedavi yöntemi olmasına rağmen, oluşan anksiyete ve depresyon kadınların hayat kalitesini azaltabilir. Bu nedenle seçilecek tedavi yönteminde hasta uyumu çok önemlidir(15). Uterus leiomyomalarında kalıcı kür ile sonuçlanan etkili medikal tedavi şu an için mevcut değildir. Cerrahi eksizyon, önemli semptomları olan olgularda yaygın kullanılan etkili bir metottur. Medikal tedavi cerrahiye yardımcı ya da geçici olarak cerrahi tedavi yerine kullanılabilir. Deneysel olarak oluşturmuş olduğumuz uterus leiomyomasında antioksidan olarak kurkumin kullanarak, oluşan bulgular üzerine etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle inceleyerek literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

2.1.1.Uterus Embriyolojisi

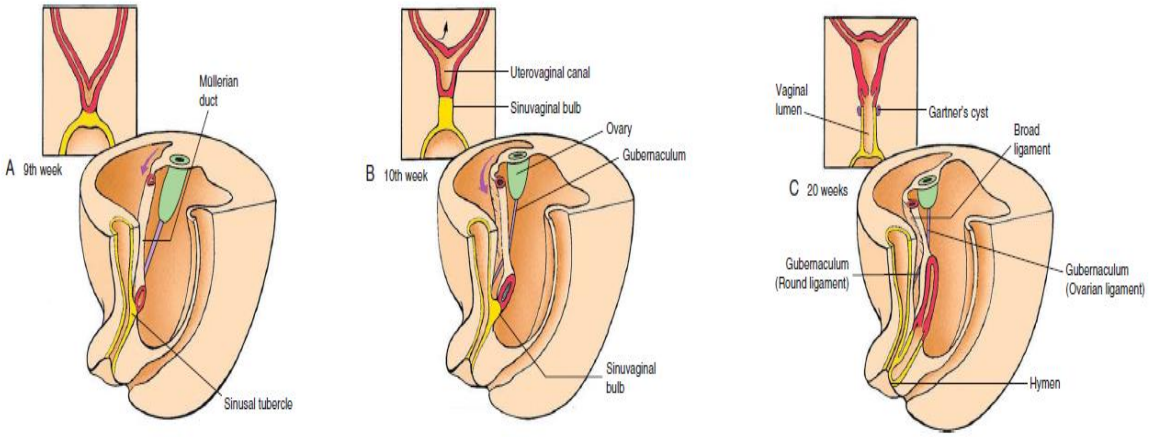
Kadınlarda genital organlar gonadlar, iç genital organlar ve dış genital organlardan oluşmaktadır. Gonadal farklılaşma embriyonik periyodun sonlanmasından önce meydana gelir. Reproduktif kanallar ve dış genital organlar ilk trimester sonlanmadan farklılaşırlar(16).

Fetal yaşamın ilk üç ayında seksüel gelişim bipotansiyaldir. Fenotip, hormonal ortam ve cinsiyet kromozomlarının bulunuşuna bağlıdır(16). Cinsiyet farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, SRY geninin kısa kolu üzerinde(Yp11) taşınan Y kromozomudur(17). Erkek gelişimi için SRY geni, androjenler ve bunlara ek olarak Anti-Müllerian Hormon(AMH) gereklidir. Bu üç faktörün yokluğunda immatür kadın gelişecektir. Varsayılan cinsiyet 2X kromozomu varlığında kadındır(16). Cinsiyet farklanmasında östrojenlerin de rolü vardır(17).

Kadınlarda, erkek androjen eksikliği nedeniyle mezonefrik kanal geriler. Buna karşılık bir kraniyal-kaudal ilerlemede paramezonefrik (müllerian) kanal proliferasyonları ve farklılaşmaları fallopian tüp, uterus ve üst vajinayı oluşturur(18). Paramezonefrik duktusların erken formasyonu Wnt sinyaline bağlıdır. Wnt-4'ün yokluğunda, paramezonefrik kanal şekillenmez(19). Wnt4 bir over belirleyici gendir(17). Gelişmekte olan ekstremitenin dorsoventral ekseni oluşturmak için gereken Wnt-7a tüm paramezonefrik kanallar boyunca epitelinde eksprese edilir ve normal gelişimi için gereklidir(19). Wnt-7a sentezlenmesi Hox ekspresyonu ve müllerian kanalların radyal eksen düzenlenmesi için çok önemlidir(18). Hoxa-9 uterus tüplerinde, Hoxa-10 uterusta, Hoxa-11 uterus ve servikste, Hoxa-12 üst vajinada eksprese edilir(19).

Primitif ürogenital sinüs posterior duvarına temasından hemen önce gelişen müllerian kanalların distal uçları birbirine bağlanır. Primitif ürogenital sinüs duvarı bu noktada sinüs tüberkülü denilen hafif bir kalınlaşma oluşturur(18). Uterovajinal primordiyum ile ürogenital sinüs birleşim yeri sinüs tüberkülünü oluşturur. Sinüs tüberkülü, çift halindeki endodermal çıkıntılar olan, sinovajinal şişkinliklerin oluşumunu indükler(20). En kısa sürede sinusal tüberkül ile müllerian duktusların kaynaşmış uçları bağlanır. Onların kaudal uçları kraniyalinden müllerian duktus kaynaşmaya başlar. Tek bir lümen ile kısa bir tüp oluşturur(18). Uterovajinal kanal yada genital kanal olarak adlandırılan bu tüp uterus olur ve vajinanın kraniyal kısmına katkıda bulunur(18). Paramezonefrik kanalların lateral füzyonu

yedi ve dokuzuncu hafta arasında paramezonefrik kanalların alt kesimleri kaynaşırken gerçekleşmektedir. Bu aşamada uterus boşluğunu oluşturacak bir orta hat septumu görülür ve genellikle 20 hafta boyunca ilerler(16).



Şekil 1: Uterus ve vajina formasyonu (18)

Uterusun histogenezisi fetusta başlamış olmasına rağmen insanlarda doğum, laboratuvar hayvanlarında doğum sonrasına kadar tamamlanmış değildir. Neonatal uterusta büyük bir gelişimsel olay adenogenezis vardır, endometriumda bezlerin gelişimi ve farklılaşması olarak tanımlanmaktadır. Epitel ve stroma arasındaki karmaşık Wnt ve Hox gen ağları uterus gelişimini düzenler. Knockout fare çalışmalarında forkhead transkripsiyon faktör ailesinin üyesi Wnt7a, Wnt5a ve Foxa2 eksikliği olduğu gösterilen farelerde, uterus bezleri eksikliği ve uterin adenogenezisin kesilmiş olduğu gösterilmiştir(21).

Uterus morfogenezisi önemlidir, çünkü endometriyal adenogenezis ve mezenkimal özellikler ve farklılaşmanın bozulması yetişkinlerde fertilite sorunlarına neden olabilir(21).

2.1.2. Uterus Anatomisi

Kadın genital organların merkezi sayılan uterus tek bir organdır. Çok değişik isimlendirmelere sahip olan uterus, klinikte daha çok hystera olarak bilinirken, organ için metra terimi de sıklıkla kullanılır(22).

Döllenen ovumu içinde barındıran, gelişimi esnasında embriyonun ihtiyaçlarını karşılayan ve doğumu gerçekleştiren organdır(22).

2.1.2.1. Yeri ve Yakın Komşuluğu

Uterus, pelvis boşluğunda mesane ile rektum arasında bulunan, kalın duvarlı, içi boş bir organdır(27). Paramezonefrik kanalların birleşmiş alt bölümlerinden köken alır(28). Uterus rektumun önünde, vesica urinarianın arkasında ve vajinanın üstünde yer alır. Üstten ise ince bağırsak kıvrımları ile de komşudur. Bununla birlikte uterusun durumu yakın komşuluğunda bulunan organların özellikle mesane ve rektumun dolu veya boş oluşuna göre değişir(22). Uterusun abdominal bölümü tuba uterinalarla, pelvik bölümü ise vagina ile birleşir(27).

2.1.2.2. Boyutları

Uterus üst kısmında genişliği dört-beş cm , kalınlığı iki-üç cm ve boyu yedi-sekiz cm olup içi boş kas yapısındadır(26). Hiç doğum yapmamış bir kadınla (nullipara) bir veya daha fazla doğum yapmış kadınlarda (primipara ve multipara) uterusun boyutları değişiklik gösterir(22). Uterusun herzamanki genişliği olan beş cm'lik genişlik bebek gelişimini karşılayabilmek için 30 cm'e kadar genişleme yeteneğine sahiptir(24). Gebe olmadığı durumlarda ağırlığı 30-80gr'dır(26). Gebelik esnasında uterusun hacmi, şekli ve pozisyonu değişir. Doğumdan sonra hemen hemen eski durumuna döner(27).

2.1.2.3. Şekli ve Konumu

Uterus tabanı yukarıda, tepesi aşağıda ters konumlu bir armuta benzer. Önden ve arkadan hafif basıkçadır. Organın uzun ekseni orta planda yerleşim göstermekle beraber, uterusun pelvis eksenine uyan ve öne aşağıya bakan bir konkavitesi vardır. Bununla birlikte uterusun durumu yakın komşuluğunda bulunan organların özellikle mesane ve rektumun dolu veya boş oluşuna göre değişir. Uterusun uzun ekseni, fundus uteri ile osteum uteri internum arasında uzanan hattır. (22)

Normal konumlu uterusta corpus uterinin uzun ekseni ve cervix uterinin uzun ekseni arasında açıklığı aşağı ve öne bakan yaklaşık 100-170 derecelik bir açı vardır. Uterusun açıklığının öne doğru bir eğim göstermesine anteflexio adı verilir(22).

Uterusun uzun ekseni ile vaginanın uzun ekseni arasında da açıklığı öne bakan yaklaşık 90-110 derecelik başka bir açı vardır. Anteversio denilen bu durum uterusun vaginaya göre öne doğru eğilmesidir. Uterusun normal konumu anteflexio ve anteversio durumudur. Kadın ayakta iken uterus yatay pozisyondadır(22).

2.1.2.4. Hacmi

Doğum yapmamış kadınların uterusları beş-altı cm^3 sıvı olacak şekilde iken, gebelikte fetüs ve eklerini alacak kadar genişler (22).

2.1.2.5. Uterus Ligamentler

Yuvarlak, uterosakral, transvers servikal ve puboservikal ligamentlerden oluşur(23).

2.1.2.5.1. Yuvarlak Ligamentler

Gubernakulumun alt yarısındaki kalıntıları temsil eden uterusun yuvarlak ligamenti, derin inguinal kanaldan labium majusun subkutan dokusuna, uterusun superolateral açısı arasında uzanır(25).

2.1.2.5.2. Uterosakral Ligamentler

Uterosakral ligamanlar rekto-katlantılardır ve fibröz doku ve düz kas içerirler. Onlar rektumun her iki yüzünde de serviks ve uterus gövdesinden geçer ve sakrum önüne bağlanırlar(23).

2.1.2.5.3. Tansvers Servikal Ligamentler

Transvers servikal ligament (kardinal ligament, mackenrodt ligaman) pelvik duvara geniş ölçüde bağlanmak için vajinanın lateral forniksi ve serviks yanından uzanmaktadır. Serviks seviyesinde, bazı lifler uterosakral ligamentlerin lifleri ile bağlanmaktadır. Onlar pelvik kan damarları ve üreterlerin alt kısımları etrafında fibröz doku ile süreklilerdir(23).

2.1.2.5.4. Puboservikal Ligamentler

Puboservikal ligamentler, pubisin arka yüzünden servikse geçen iki sağlam bantlardan oluşur. Bunlar destek vermek için mesane boynunun iki tarafında konumlanmıştır(25).

2.1.2.6. Kan Desteği

2.1.2.6.1. Arterler

Uterusun arteriyal beslenmesi esasen internal iliak arterin bir dalı olan uterin arter iledir. O geniş ligament tabanında medial olarak ilerleyerek uterusa ulaşır(25). Bu arterlerden endometriuma giden birçok kıvrımlı dal çıkar. Bu kıvrımlı dallara rami helicini denir(28). Dik açılarda üreter üzerinde çaprazlanır ve internal os seviyesinde servikse ulaşır. Arterin ovarian arter ile anastomozu sona erer ve sonra geniş ligament içinde uterus lateral kenarı boyunca yükselir. Aynı zamanda uterus beslenmesinde yardımcı olur. Uterin arter serviks ve vajinayı besleyen küçük bir inen dal verir(25).

2.1.2.6.2. Venler

Uterusun venöz drenajı, internal iliak venlere drene olmasıyla ve geniş ligamentte lateral uzanan uterin venler aracılığı iledir. Uterin venler üreterler üzerinden geçer ve geniş ligament içinde arterlere bitişik bir rotada ilerler. Vajinal ve ovarian venöz pleksus ile uterin venöz pleksuslar anastomozlaşır(23).

2.1.2.7. Lenfatik Akım

Lenf damarları ise ovarium ve fundus uteriden gelen lenfatik damarlarla birlikte nodi lymphatici lumbales ve daha sonra da nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralese açılır(22).

2.1.2.8. Uterusun Anatomik Bölümleri

Uterusun yapı ve fonksiyon bakımından birbirinden farklı corpus uteri ve cervix uteri olarak adlandırılan iki bölümü vardır. Bazı anatomistler bu iki bölüm arasında isthmus uteri adını alan bir bölümü de tanımlarlar. Organın dış yüzünden pek ayırt edilemeyen isthmus uteri, organın kendisinde kolaylıkla farkedilir. İsthmus uteri, iç yüzde canalis cervicalis ve cavitas uterinin yerleşim yerine uyar(22).

2.1.2.8.1. Corpus Uteri

Uterusun 2/3 üst kısmını oluşturan bu bölüm tabanı yukarıda tepesi aşağıda bir üçgene benzer. Önden arkaya basık olan corpus uterinin iki yüzü, üç kenarı ve üç köşesi bulunur. Corpus uterinin tuba uterinaların bağlandığı yerin üzerinde kalan künt, konveks kısmı fundus uteridir. Corpus uteri aşağıya doğru indikçe daralarak cervix uteri ile birleşir(22). Corpus uterinin içindeki boşluğa cavitas uteri denilir. Ön köşelerine tuba uterinalar açılır ve buradaki deliklere ostium uterinum tubae uterinae denilir. Cavitas uterinin, dip kısmından ostium uteriye kadar olan uzunluğu yaklaşık altı buçuk cm kadardır. Cavitas uteriyi vajinaya bağlayan kanala canalis cervicis uteri denilir. Bu kanalın iki ucu, orta bölümüne oranla daha dardır. Bu kanalın ön ve arka duvarında uzunlamasına seyreden birer çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılardan yan taraflara doğru uzanan plikalara, plicae palmatae denilir. Bu şekliyle bir hurma ağacına benzeyen plikaların tümüne arbor vitae uterinae da denilmektedir(27).

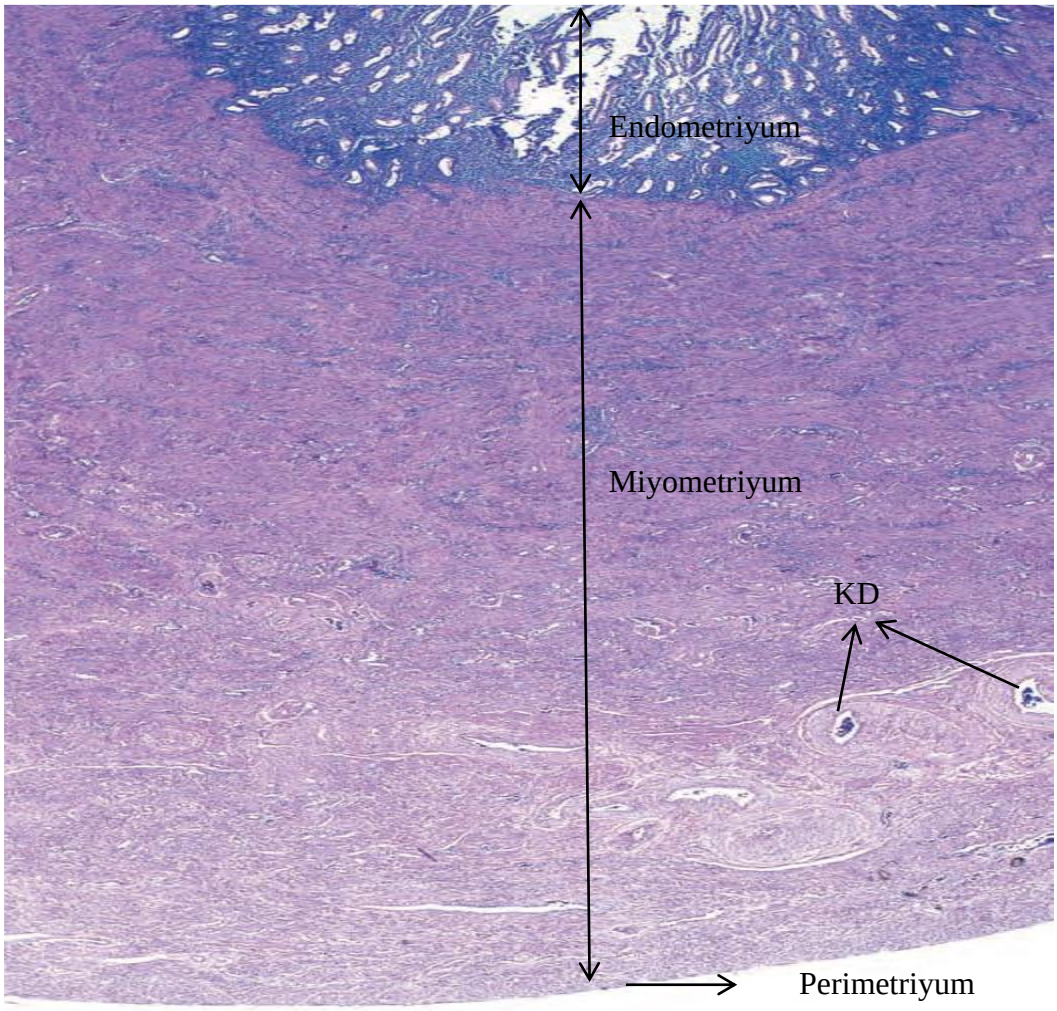
2.1.2.8.2. Cervix Uteri

Eskiden collum uteri olarak adlandırılan bu bölüm, isthmus uteri ile vajina arasındaki kısmıdır. Yaklaşık iki-iki buçuk cm uzunluğunda olup uterusun 1/3'ünü oluşturur. Cervix uterinin alt kısmı vajinanın içine doğru uzanmıştır. Bu yüzden cervix uterinin portio supravaginalis cervicis ve portio vaginalis cervicis olmak üzere iki bölümü vardır. Portio supravaginalis cervicis cervix uterinin 2/3'lük üst bölümünü, portio vaginalis cervicis ise cervix uterinin vajinanın içinde kalan 1/3'lük kısmını oluşturur(22).

2.1.3.Uterus Histolojisi

İnsan uterusu, içi boş, armut şeklinde bir organdır ve pelviste mesane ile rektum arasında bulunur. Nullipar (doğum yapmamış) kadında yaklaşık 30-40gr ağırlığında, 7,5cm uzunluğunda, üst tarafında 5cm genişliğinde ve 2,5cm kalınlığındadır. Lümeni de yassıdır ve tuba uterinalar ve vajina ile devam eder(29). Uterus histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır:

- Endometriyum (Tunika Mukoza): İç müköz membran
- Myometriyum (Tunika Muskularis): Orta kas tabakası
- Perimetriyum (Tunika Seroza) : Dış seröz membran (30)



Şekil 2: Uterusun sagittal kesitinin bir fotomikrografı (29)

2.1.3.1.Endometriyum

Fertilize ovumun implantasyonu için elverişli yatak oluşturmak, implantasyona katılmak ve maternal plasentayı yapmak başlıca görevidir(30).

Endometriyum epitel ve derin kısımlarında basit tübüler bezlerin bir çok dalını içeren lamina propriadan oluşmaktadır(31). Epitel salgılayıcı ve silli olmak üzere iki tip silindirik hücreden oluşur. Sillerin vurumu vajinaya doğrudur. Ancak sinematografik incelemelerde bazı sillerin ovaryuma doğru vurum yaptığı da gözlenmiştir. Bu durumun spermin tubaya doğru hareketini kolaylaştırdığına inanılmaktadır(30). Yüzey epiteli uterus bezlerini oluşturmak üzere alttaki lamina propria tabakasının yani endometriyal stromanın içine doğru invajine olur. Böylece oluşan basit tübüler bezler az sayıda silyumlu hücre içerirler ve endometriyumun derin kısmına doğru dallanırlar. Mezenkime benzeyen endometriyal stroma

yüksek düzeyde selülerdir ve bol miktarda intersellüler madde içermektedir(29). Lamina propria, retiküler lifler ve mezenşim hücrelerine benzeyen uzantılı hücrelerden zengindir. Ayrıca lenfositler, granüler lökositler ve makrofajlar da gözlenir(32).

Puberteden menopoza kadar endometriyum her ay implantasyon için uygun yapısal değişikliğe hazırlanır. Kalınlaşır, bezleri ve bezlerin salgısı artar, stromal hücreler glikojenle yüklenir. Bu hazırlık sonunda kalınlaşan endometriyum gebelik olmazsa eski durumuna dönemez. Dökülerek(deskuamasyon) bir miktar kanla birlikte vajinal yolla dışarı atılır. Bu olaya menstruasyon denir(30).

Üreme dönemi boyunca, endometriyum yapı ve işlev bakımından farklı iki tabakadan oluşur:

a) Stratum fonksiyonalis: Yüzeyel bölüm. Endometriyumun 2/3'ini oluşturur(32). Fonksiyonel tabaka bezlerinde epitel kökenli dört tip hücre bulunur. Bunlar; proliferatif hücreler, salgı oluşturan hücreler, silyalı hücreler ve bazal hücrelerdir(33). Silyalı hücreler proliferasyon evresinde daha belirgindir. Genç silyalı hücreler bazal laminaya yakın piramit şekillidir. Sitoplazmaları şeffaf açık renktedir. Salgılama evresinde ince yapı düzeyinde dev mitokondriyonlar ve nukleuslarında kanal sistemi tanımlanmıştır(34). Proliferatif ve bazal hücrelerin nukleus kromatinleri yoğundur ve belirsiz bir nukleolus içerirler. Sitoplazmaları bazofiliktir. Proliferasyon evresinde hücre sayısı artar ve nukleusların çokluğu nedeniyle bez epitelinde yalancı çok katlı epitel görünümü oluşur(34). Salgı hücre sitoplazmaları müsinöz olmayan salgı içerir. Salgı önce nukleus altı sitoplazmada birikir. Bu hücreler vakuollü, vakuolsüz ve tuba uterina hücrelerine benzer hücreler olarak üç farklı yapıdadır. Vakuolsüz hücrelerin nukleusları yuvarlaktır. Kromatin kapsamları homojen dağılmıştır. Nukleolusları belirgin, sitoplazmaları eozinofiliktir. Vakuollü hücrelerin nukleusları ise proliferatif hücrelerinkine benzer(34,35). Östrojen ve progesteronun kan düzeyindeki değişikliklerden ve spiral arterlerin kanlanmasından etkilenir. Bu tabaka menstruasyondan sonra kısmen ya da tümüyle dökülür(36).

b) Stratum bazale: Derinde yer alan bölüm. Endometriyumun 1/3'ini oluşturur(32). Bazal tabaka, östrojen ve progesteronun kan düzeylerindeki değişiminden etkilenmez. Spiral arterlerden değil, bazal arterlerden kanlanır. Bu tabaka menstruasyondan sonra dökülmez(36). Bazal tabaka, menstruasyonda dökülen fonksiyonel tabakanın yerine yenisinin oluşmasında işlev görür(32).

Endometriyum myometriyum ile ilişkilidir, aralarında kesin bir anatomik hat yoktur. Bazal bölgede gözlenen hücre çeşitliliği, gebelik esnasında bazı özellikler gösterirler. Gebelik dinamizmi gereği hücrelerde bir seri değişim meydana gelir. Genişleyen hücreler arası alanlarda uterinal sıvı birikerek ödemsi bir durum oluşturur ve embriyonun beslenmesi için iyi bir ortam hazırlar(37).

2.1.3.1.1.Endometriyumun Kanlanması

Endometriyum eşsiz bir kan damarları sistemine sahiptir(29). Endometriyumun damarlanması, menstruasyon ve plasentasyonun anlaşılması açısından önem taşımaktadır(32). Uterin arterlerden, myometriyumda anastomoz yapan 6-10 arkuat arter çıkar(29). Arteria uterina myometriyumda arteria arkuata adını alır(30). Bu arterlerin dalları olan radial arterler endometriyumun bazal tabakasına girerler ve burada endometriyumun bu bölgesini besleyen küçük düz arterleri oluştururlar. Radial arterlerin ana kolu yukarı doğru devam eder ve yüksek düzeyde sarmal hale gelir. Bu nedenle bu artere spiral arter denmektedir. Spiral arterlerden çok sayıda arteriyol çıkar ve bunlar kapiller ağı desteklerken sıklıkla anastomozlaşırlar(29). Arteriyoller de endometriyum fonksiyonalisteki kapiller ağını ve ince duvarlı geniş lakünaları beslerler. Ayrıca endometriyumda, venüller ağ ve sinusoidal genişlemeler yapan venöz sistem de bulunur(32).

Endometriyumun damar yapısının bilinmesi menstruasyon ve plasenta gelişiminin anlaşılması için gereklidir. Menstrual siklus sırasında damarlarda değişiklikler olur. Siklusun çoğu dönemlerinde spiral arterler ritmik olarak daralıp genişlerler, bu nedenle endometriyum yüzeyi bir beyazlaşır, bir kırmızılaşır(30). Menstrual siklus sırasında düz arterler ve spiral arterlerin proksimal parçaları değişime uğramaz. Östrojenlerin ve progesteronun etkisi altında spiral arterlerin distal parçaları her menstrual siklusta dejenerasyona ve rejenerasyona uğrar(29).

2.1.3.2.Myometriyum

Myometriyum, kalın kas tabakasıdır. Tuba uterinanın ve vajinanın kas tabakası ile devam etmektedir. Düz kas lifleri uterusa bağlı ligamentlere de uzanmaktadır(29).

Myometriyum düz kas tabakasından oluşmuştur. 12-15 mm kalınlıktadır(32). Gebe olmayan uterusta düz kas hücreleri yaklaşık 50 μm uzunluğundadırlar. Gebelik sırasında uterus büyük ölçüde genişler. Bu büyüme primer olarak varolan düz kas hücrelerinin hipertrofisi ile sağlanır ve düz kas hücreleri yaklaşık 500 μm uzunluğuna ulaşırlar. Sekonder

olarak da differansiye olmamış mezenkimal hücrelerin farklılaşması ve varolan kas hücrelerinin bölünmesi ile yeni lifler oluşur. Bağ dokunun miktarı da artar(29).

Spiral , longitudinal ve sirküler düz kas fibrilleri, birbirinden keskin sınırlarla ayrılmayan dört tabaka oluşturur:

a) Stratum Submukozum: Mukozaya komşu kas tabakası, kas fibrilleri longitudinaldir.
b) Stratum Vaskulare: Bir çok büyük kan damarı bulunan, kas fibrillerinin sirküler yönlü olduğu tabakadır.
c) Stratum Supra vaskulare: Hem sirküler, hem longitudinal kas fibrillerinin bulunduğu ince bir tabakadır.
d) Stratum Subserozum: Serozaya komşu, longitudinal düz kas fibrilleri tabakasıdır (30).

Birinci ve dördüncü tabaka organın uzun eksenine paralel longitudinal yerleşimli fibrillerin oluşturduğu tabakadır. Orta tabakalar büyük kan damarlarını içerir. Arkuat arterler myometriyumun orta kısımlarında dairesel olarak oryante olmuşlardır(31).

2.1.3.2.1. Myometriyuma Hormonların Etkisi

Myometriyum genellikle düzenli ve farkına varılmayan aralıklı kontraksiyonlar yapar. Kontraksiyonlar, cinsel stimulasyonda ya da kramp benzeri şeklinde menstruasyon sırasında artabilir(32). Gebelik sırasında myometriyal kontraksiyonların baskılanması, ovaryum ve plasentadan salgılanan bir peptit hormon olan relaksinin kontrolü altındadır. Doğum sırasındaki myometriyal kasılmalar ise nörohipofizden salgılanan bir peptit hormon olan oksitosinin kontrolü altındadır(36). Bu hormon kadın doğumcular tarafından bazen doğumun başlatılması ya da zayıf kontraksiyonların kuvvetlendirilmesi amacıyla kullanılır. Prostaglandinler genel olarak düz kası uyaran bileşiklerdir. Östrojen; myometriyumun normal hacmini ve sitolojisini sürdürmesi için gerekli hormondur (ovaryumda yapılıp, kan yoluyla uterusa taşınır). Östrojen yokluğunda myometriyum atrofi olur(30).

2.1.3.3. Perimetriyum

Perimetriyum, dış seröz tabakadır ya da uterusu kaplayan visseral periton tabakasıdır. Pelvik ve abdominal periton ile devam eder. Mezotelden ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelmektedir. Mezotelin altında bir elastik doku tabakası belirgindir. Perimetriyum anterior yüzeyin bir kısmını kaplarken pesterior yüzeyin tamamını kaplar. Anterior yüzeyin kalan kısmı bağ dokusu ya da adventisya ile kaplıdır(29).

2.1.4.Uterus Fizyolojisi

Dişi hormonal sistemi üç hormon grubunun etkisindedir. Bunlar;

a) Hipotalamustan sentezlenen hipotalamik serbestleştirci hormon ya da gonadotropik serbestleştirici hormon (GnRH).

b) Hipofiz ön lobundan salgılanan folliküller uyaran hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH). Bu hormonlar gonodotropik serbestleştirici hormona yanıt olarak salgılanırlar.

c) Ovaryumdan salgılanan östrojen ve progestrondur. Bunlar hipofiz ön lobundan salgılanan FSH ve LH' ya yanıt olarak salgılanırlar (38).

Bu hormonların salgılanma miktarları genital döngü süresince değişmektedir. Döngünün farklı evrelerinde salınım hızları değişkendir (39).

Hipotalamustan GnRH salgılanması ortalama 2 saatte bir gerçekleşir ve birkaç dakika sürer. GnRH'nın pulsatil salınımı LH'nın salınımına neden olurken FSH salgısı süreklidir. GnRH yükselmesi döngüyü başlatır. GnRH hipofiz ön lobundan LH ve FSH salınımını arttırır.

LH, androjenleri oluşturan teka hücrelerini uyarır. Androjenler FSH'nın etkisi ile granüloza hücrelerinde östrojene dönüştürülür. Östrojenler folliküler sıvıya girer. Östrojen düzeyi yükselince ilk olarak GnRH, daha sonra da FSH ve LH salınımı baskılanır. Döngünün yaklasık 12- 13. günü çok yükselen östrojen düzeyi pozitif geri bildirim etki yaratarak LH salınımını arttırır. Ovulasyondan yaklasık 18 saat önce ani LH ve FSH artışı önce ovulasyona, daha sonra da korpus luteum'un oluşumuna yol açar. LH' nın ovulasyon öncesi ani artışı olmazsa ovulasyon gerçekleşmez. Ovulasyondan sonra korpus luteumda çok yüksek yoğunlukta progestron salgılanır (38,40).

Progestron ve östrojen, GnRH, LH ve FSH' yı baskılar. Östrojen ve progestron'un geri bildirim etkisine ek olarak korpus luteum granüloza hücrelerinden salgılanan inhibin hormonu hipofizden FSH salınımını baskılamaktadır. Menstrüasyondan birkaç gün önce korpus luteum dejenere olur. Plazmada progestron ve östrojen düzeyi düşer. GnRH, LH ve FSH baskılanmaktan kurtularak yeni döngü başlar (41).

Uterusta her ay yinelenen ve menstruasyonla sonlanan (gebelik olmamışsa ya da süt verme dönemi dışında) siklik değişikliklere menstrual siklus denir. Ovarian siklus ile menstrual siklus sıkıca ilişkilidir. Menstrual siklus bireysel farklılıklar göstermekle birlikte ortalama 28 gündür.

Endometrium siklusu dört evre gösterir:

- Proliferasyon evresi (foliküler faz)
- Sekresyon evresi (luteal faz)
- İskemi evresi (premenstrual faz)
- Menstruasyon evresi (menstrual faz)

Proliferasyon evresi: her ay siklusun başlangıcında, endometriyumun büyük kısmı menstruasyon ile deskuamasyona uğrar. Menstruasyon sonrası orijinal endometriyumdan geriye kalan sadece ince bir endometriyal stroma tabakasıdır. Stromada endometriyumun kriptaları ve bezlerin dip kısımlarındaki epitel hücreleri yer alır(39). Proliferasyon evresinde, ovaryumda ise folikül stimülen hormon(FSH) stimulasyonu ile foliküller gelişmekte ve östrojen hormonlarını salgılamaktadırlar. İşte foliküllerin salgıladıkları bu östrojen hormonlarının etkisi altında, dökülen endometriyum fonksiyonalis yeniden oluşur(32). Proliferatif isminden de anlaşılacağı gibi çoğalmanın(mitoz) belirgin olduğu süreçtir. Bezlerin bazal kısımlarındaki hücrelerin mitozu ile bezler yenilenir ve yüzeyel epitel hücreleri oluşur. Epitel dışında bağ dokusunda da mitoz çoktur(30). Stratum bazaledeki stromal, endotelyal ve epitelyal hücreler hızla prolifere olurlar ve aşağıdaki değişiklikler görülebilir:

- Bezlerin bazal bölgelerindeki epitelyal hücreler bezleri yeniden yapılandırırlar ve soyulmuş olan endometriyal yüzeye göç ederek orayı kaplarlar.
- Stromal hücreler prolifere olurlar ve kollajen ile ara madde salgılarlar.
- Endometriyum yeniden oluşurken spiral arterler uzar. Bu arterler hafifçe sarmallaşırlar ve endometriyumun üst üçte birlik kısmına uzanmazlar(29).

Bezlerin lümenleri genişler, dalgalı bir görünüm alır ve hücreleri glikojenleri depolamaya başlar. Genişleyen ve kanla dolan kapillerden endometriyuma eritrositler yayılır. Bazen, bezlerin lümenine kan akabilir ve vajinaya ulaşabilir. Bu tür ara menstruasyon kanaması insanlarda sık görülmez. Bu evrenin sonunda endometriyum fonksiyonalis üç mm kalınlığa ulaşır(32).

Sekresyon evresi: ovaryumda, ovulasyon olaylanmış ve lüteinizan hormon(LH) stimulasyonu ile korpus luteum oluşmuştur(32). Bu evre, ovulasyondan sonra korpus luteumun oluşması, progesteron hormonu sentezlenmesi ve progesteron hormonunun bezlerde salgılamayı uyarması ile başlar(30). Ovulasyondan kısa bir süre sonra, plazma progesteron seviyesinin yükselmesi endometriumda belirgin değişiklikler üretir. Uterus bezleri daha çok kıvrıntılı hale gelir ve her hücrenin dibinde büyük vakuol içinde glikojen birikmeye başlar.

Siklusun luteal fazı ilerledikçe, vakuoller bezlerin lümenine doğru hareket eder ve bu bezlerin mukus salgısı büyük ölçüde artar(42). Bu aşamada görülen büyüme, epitelyal hücrelerin hipertrofisi, vaskülaritenin artması ve endometriyumun ödeminin sonucudur. Bununla birlikte, spiral arterler uzarlar ve daha fazla sarmal hale gelirler. Hemen hemen endometriyumun yüzeyine kadar uzanırlar(29). Stroma ödemlidir. Stromal hücreler sitoplazmalarında glikojen birikimi sonucu büyür ve hücre sınırları belirgin olarak seçilir. Serbest ribozom ve granüllü endoplazmik retikulum(gER)dan zengin bu hücrelere desidual hücre adı verilir. Yüzey epitelinin altında spiral arterlerin çevresinde birikim gösterirler(30).

Sekresyon evresi sonunda, meydana gelen yapısal değişimelerle ilgili olarak endometriyumda üç kısım dikkat çeker:

a. Yüzeyel kompakt tabaka; bu kısım bezlerin boyun kısımlarını içermekte olup çok az ödemli görünümlüdür.
b. Kalın spongiyöz tabaka; çok ödemlidir ve bezlerin kıvrıntılı kısımlarını içermektedir.
c. Derin bazal tabaka; bezlerin kök kısımlarını ve spiral arterlerin alt parçalarını içermektedir. Menstruasyon ve doğum sırasında doku kaybına uğramaz(32).

Sekresyon evresinde, hiperemi, ödem, yedek besin depolama ve aktif salgılamadan dolayı endometriyum desiduaya dönüşür. Döllenme gerçekleşmiş ise bu yapı blastokistin gömülmesi ve gelişmesi için en uygun ortam olur ve endometriyumun gebelik safhasına geçer(32).

İskemik evre:

- Progesteron düzeyinin düşmesinin tetiklediği spiral arterlerdeki periyodik kasılmalar, fonksiyonel tabakanın oksijenlenmesini keser(hipoksi).
- Spiral arterlerin parçalanması, lamina propriyanın kanla dolmasına neden olur.
- Bezler ve desidua benzeri hücrelerden oluşmuş fonksiyonel tabaka ayrılır ve uterus boşluğuna dökülür.
- Bazal tabakayı, bazal düz arterler doğrudan kanlandırdığı için, bu tabakada yukarıda anlatılan olaylar gözlenmez(36).

Menstruasyon evresi: korpus luteumun yıkılması sonucu plazma progesteron ve östrojen seviyelerinin azalması, oldukça kalınlaşmış olan endometriyumu hormonal destekten yoksun bırakır ve mestruasyona neden olur(43). Siklusun birinci gününden başlar ve beşinci gününe kadar devam eder(32). İlk olarak uterus kan damarları güçlü bir şekilde vazokonstruksiyon

yapar ve böylece endometriyal hücrelere oksijen ve besin maddesi taşınması azalır(43). Kan, yeniden damarlara akınca, iskemik evrede yıpranmış arterler, kısa sürede teker teker yırtılırlar. Kan, endometriyuma yayılır ve oradan da bezlerin lümenine akar. Nihayet nekrotik endometriyum fonksiyonalis, bez salgısı enzimlerinin de etkisiyle parçalanır ve kanla karışmış olarak uterus lümenine dökülmeye başlar(32).

Menstruel kan daha çok arter kaynaklı olup sadece %25'i venlerden gelir. Doku yıkım ürünleri, prostaglandinler ve göreceli olarak büyük miktarlarda endometriyum kaynaklı fibrinolizin içerir. Fibrinolizin pıhtıları yıktığı için aşırı miktarda kanama olmadıkça menstruel kan normalde pıhtı içermez(44).

Menstral kanama periyodu normalde yaklaşık beş gün sürer. Menstruel fazda ortalama 35-50 ml kan kaybedilir. Düz arterlerden kan akımı stratum bazaleyi korur(29).

2.2. Dişi Sıçan Genital Sistem

2.2.1. Dişi Sıçanlarda Üreme Siklusu ve Uterus Histolojisi

Diöstrus: Diöstrus başlangıcında uterus küçüktür ve aktif değildir. Uterus boynuzlarında belirgin bir damarlanma yoktur ve lümen bir yarık gibi görülür. Endometriyum zaman zaman dejenere hücrelerin görüldüğü, alçak kübik ya da silindirik epitele sahiptir. Diöstrusun başlangıcında mitotik aktivite vardır, ancak özellikle bezler inaktifdir. Safhanın ilerlemesiyle bezler aktiflik kazanır. Ayrıca aşamanın sonunda, endometriyumla bitişik stromada hafif ödem görülür (45).

Proöstrus: Bu aşamada endometriyumda geniş hücreler görülmeye başlar. Hücreler kübikten silindirik hale geçer. Bu aşamada sınırlı bir mitotik aktivite vardır. Endometriyum epiteli ile bez epitelinde dejenerasyon görülmez. Ayrıca inflamatuvar hücre infiltrasyonu da görülmektedir. Proöstrusun sonuna doğru mitotik aktivite azalır. Endometriyum damarlanması artar, stromada ödem görülür (45).

Östrus: Endometriyal epiteldeki değişimler ile birlikte, bezlerde görülen dejenerasyon ve nekrozis ile östrus başlangıcı tanımlanır. Buna mitotik aktivite ve lökosit infiltrasyonunda azalma eşlik eder. Östrusun sonuna doğru lümende dilatasyon görülür ve mitotik aktivite endomtriyum epitelinin bazı yerlerinde tekrar görülmeye başlar (45).

Metöstrus: Metöstrus boyunca uterus endometriyumu hem devamlı bir damarlanma hem de mitotik aktivite gösterir. Ayrıca lökosit infiltrasyonu da görülmektedir (45).

2.2.2 Sıçanlarda Östrus Siklusu

Laboratuar hayvanlarından olan sıçanlar puberteye 50 ile 70. günlerde ulaşırlar. Sıçanlarda ovulasyonlu östrus yaklaşık 77. günde görülmeye başlar. Sıçanlar genellikle ilk olarak 60 ile 120. günlerde çiftleşirler ve 300. güne ulaşıldığında fertilite en yüksek düzeye çıkar. Sıçanların en uygun üreme zamanı 9-10 aydır. Sıçanlar yıl boyu poliöstrus gösteren hayvanlardır. Östrus siklusu dört, beş gün sürer. Siklus proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere dört dönemden oluşmaktadır. Proöstrus ve östrusun yaklaşık 12 saat, diöstrusun ise 57 saat sürdüğü bilinmektedir (46,47).

Menstrüel döngüde proöstrus başlangıcında, vajinal sitolojide, en baskın hücre tipi ara hücredir. Bazal, parabazal ve yüzeyel hücreler az sayıdadır. Bu evrenin sonuna doğru yüzeyel hücrelerde artış olur. Östrus evresinde kornifiye olmuş hücrelerde (yüzeyel hücreler) ve lökositlerde artış olur. Başlangıçta az sayıda görülen parabazal ve bazal hücreler evrenin ortalarına doğru kaybolur(48).

2.3.Uterus Leiomyoması

2.3.1.Tarihçe

Londra'daki St George Hastanesi'nde bir İskoç doktor ve patolog olan Matthew Baillie, ilk olarak 1793 yılında myomları tanımlamıştır. Ünlü Alman patolog Virchow, bu tümörlerin uterus düz kas kaynaklı olduğunu göstermişken; Rokitansky (1860) ve Kolb (1863), "myom" terimini tanıtmıştır. Böylece "myom" klinik kullanımda geçerli olmuştur(49).

İlk myoma operasyonu Danville, ABD'de, 1809 yılında yapılmıştır. Bu vesileyle, cerrah Ephraim McDowell, Başkan Abraham Lincoln'ün kuzeni Bayan Jane Todd Crawford'u ameliyat etmiştir(49).

2.3.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Leiomyomalar, üreme çağındaki kadınlarda % 77 gibi yüksek bir insidans ile ortaya çıkan, en sık görülen jinekolojik iyi huylu myometrial tümörlerdir(1). Otuz yaşın altında oldukça nadir olmakla birlikte, adölesan çağda ortaya çıkmış olgular da bildirilmiştir(50). Bildirilen en genç hasta 13 yaşındadır. Semptomatik olabildikleri gibi büyük oranda asemptomatiktirler(51). Uterus leiomyomaları beyaz kadınlara göre Afrika-Amerikan kadınlarda üç ila dört kat daha yaygındır(52). Uterus leiomyomaları menopoz öncesi kadınlarda histerektominin baskın göstergesidir ve ABD'de yıllık tüm (200.000) histerektomilerin % 33'ünü oluşturmaktadır(5).

Kesin etiyoloji bilinmemektedir. Olasılıkla normal myometriumda somatik mutasyon varlığında steroid hormonların ve lokal büyüme faktörlerinin etkilediği kompleks bir süreçtir(53). Patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Her tümörün klonal kökeni, muhtemelen onların patogenezi ile ilişkili tipik mutasyonlar ile kanıtlanır. Bunlar kromozom bölgesi 12q1415'in yeniden düzenlenmesi ve kromozom 7'nin uzun kolunun delesyonu gibi tekrarlayan kromozom anormalliklerinin çeşitli tipleridir. Leiomyomaların bir diğer grubu highmobility-group protein AT-hook 2 (HMGA2) kodlayan genin yüksek ekspresyonuyla karakterizedir(54). Bir diğer teori ise artmış östrojen ve progesteron düzeyi ve büyüme faktörlerinin, fibrotik süreç ve anjiyogenezisi uyararak, mitotik aktivitede artışa neden olmasıdır (55). Epidemiyolojik kanıtlar; östrojen, progesteron ve leiomyomada büyüme arasındaki ilişkiyi desteklemektedir(56).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, myomlar ile ilgili olarak ırk, menstrüel öykü, fertilite öyküsü, hormon kullanımı, kilo alımı, sigara içimi, diyet, fiziksel aktivite ve aile öyküsü olmak üzere çeşitli risk faktörleri ortaya koymaktadır(57).

2.3.3.Seks Steroidleri (Östrojen ve Progesteron)

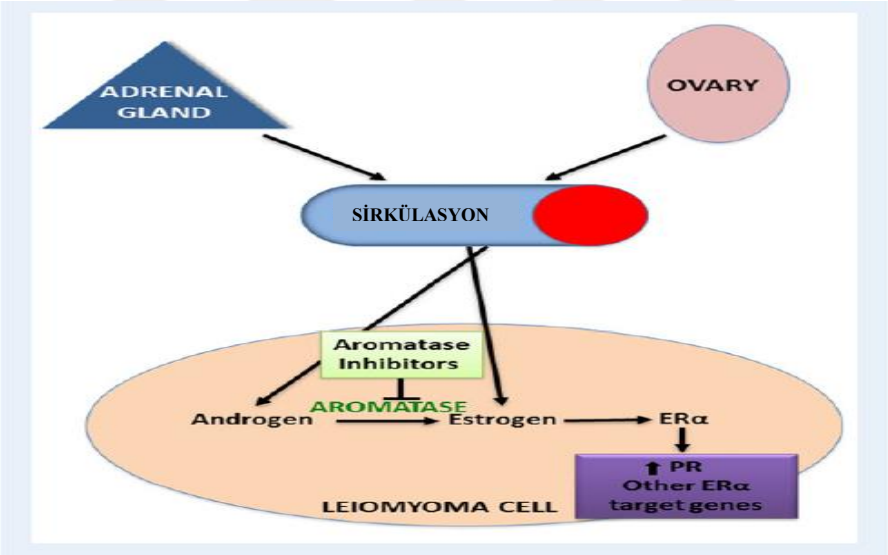
Leiomyomalar, hormona duyarlı tümörlerdir. Östrojen ve progesteron düzeyinin artması, somatik mutasyon yoluyla, leiomyomada mitotik aktivitenin artmasına yol açar(58).

Ovaryum kaynaklı steroid hormonlar olan östrojen (E2) ve progesteron (P) yeni döllenmiş bir embriyo implantasyonu için uterusun döngüsel hazırlanmasından sorumlulardır. Bu süreç uterus endometriumunu oluşturan epitel ve stromal hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını içerir. Düz kas veya myometrium tabakası endometriyal dokuyu destekler, kuşatır ve uterus hacminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Endometrium gibi, myometrium hücreleri E2 ve P ve her ikisi için reseptörlere sahiptir. Bu hormonların dolaşımdaki düzeylerindeki değişiklikler myometriumun fizyolojisini düzenlemektedir(59).

Uterus leiomyoma patogenezinde ovaryum hormonlarının rolü iyi bilinmektedir. E2 ve metabolitleri leiomyoma büyümesinin başlatılması ve teşvikinde önemli bir rol oynamaktadır(60). Östrojen reseptör(ÖR)'ü nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. ÖR'nin, alfa östrojen reseptörü (ÖR- α) ve beta östrojen reseptörü (ÖR- β) olmak üzere iki subtipi vardır. Leiomyoma hücrelerinde östrojen etkisi östrojen reseptör alfa (ÖRα) ağırlıklı olarak aracılık eder(61). Leiomyomalar komşu myometrium ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir düzeyde ÖRα ifade ettikleri bildirilmiştir(52).

Östrojen metabolizmasında etkin olan 17 β-hidroksi steroid dehidrogenaz ve 4-hidroksilaz enzimleri myom etyopatogenezinde önemlidir. Myom dokusunda myometriyuma, oranla 17 β-hidroksi steroid dehidrogenaz enziminde eksiklik veya aktivitesinde azalma görülürken (62); 4-hidroksilaz enzim düzeyinde ise artış gözlenir(63).

Uterus leiomyoma(UL) çoğalması üzerine in vitro çevresel östrojen etkileri üzerinde durulan önceki araştırmalarla desteklenen bazı çalışmalar, UL gelişimi üzerinde çevresel östrojenlerin bir etkisi olduğunu ileri sürmektedir. Bu çoğalma, muhtemelen IGF-1, VEGF ve ÖRα sinyal yolunun aracılık ettiği diğer tümör arttırıcı büyüme faktörlerinin artan ekspresyonu ile bağlantılıdır. Buna ek olarak, transforme edici büyüme faktörü (TGF) -β ailesi UL patojenezinde önemli bir rol oynar ve UL'nin TGF-β izoformu fizyolojik olarak en uygunu TGF-β3 olarak görünmektedir. TGF-β3 kaynaklı UL hücrelerinde profibrotik yanıtı Smad-bağımlı ve Smad bağımsız PI3K / Akt / mTOR yolları aracılığıyladır(64).



Şekil 3: Leiomyoma patogenezisinde östrojenin rolü (102). Leiomyomalar ovaryum kaynaklı östrojenlerin dolaşımına maruz kalmasına rağmen, östrojenin önemli miktarda adrenal bez ve ovaryumdan androjenlerin aromatizasyonu ile in situ üretildiği gösterilmiştir. Biyolojik olarak aktif olan östrojen, östradiol , ECM formasyonu ve proliferasyonunda rol oynayan genlerin transkripsiyonunu indüklemek için öncelikle ÖRα ile hareket eder, ancak temel görevi PR ekspresyonunun upregülasyonudur, böylece progesterona leiomyoma yanıtı artmaktadır. Aromataz inhibitleri östradiolün in situ üretimini etkin biçimde bloke eder, böylece östrojen ve progesteron sinyalleşmesine leiomyoma yanıtlanabilirliği azalır.

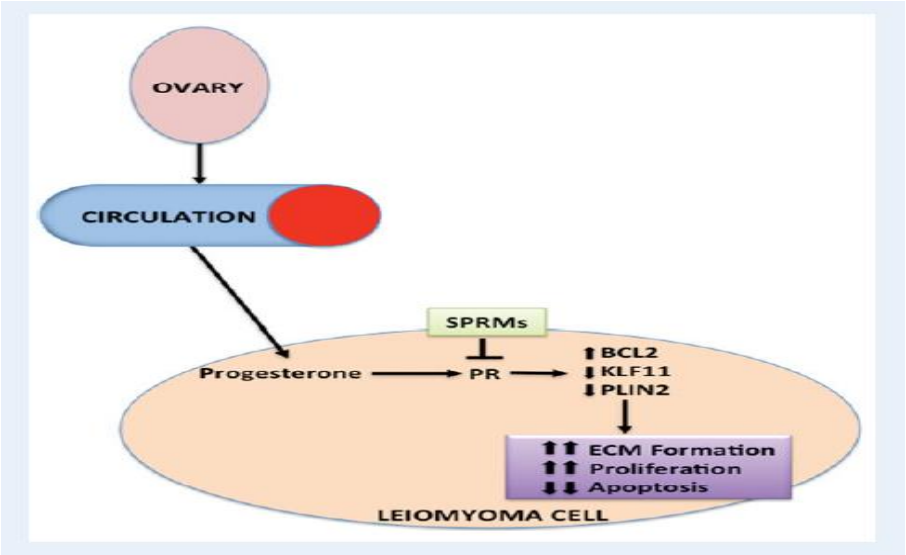
Tümörlerin net büyüme homeostatik kontrolünün hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında dinamik bir denge sonucu olduğu düşünülmektedir; çok fazla büyüme çok az ölüm

olması durumunda çok fazla çoğalma meydana gelebilir. Klinik deneyimler ile leiomyoma hücrelerinin çoğalması ve apoptozisi üzerine progesteronun etkisi karakterize edilmiştir(2).

Progesteron reseptörü(PR) , ÖR gibi nükleer reseptörlerdendir. Leiomyomada myometriuma oranla PRα baskın olup, PRα / PRβ oranının daha fazla olduğu gösterilmiştir (65,66).

Leiomyoma hücresinde, apoptozis inhibitörü bcl-2 ekspresyonu artmıştır(67). Bcl-2 proto-onkogen proliferasyonunu değiştirmeden tropik faktör yoksunluğu ya da diğer uyaranlar tarafından indüklenen çeşitli hücrelerde apoptotik hücre ölümünün normal seyrini engelleyen 26-kDa 'lık proteini kodladığı bilinmektedir. Bu nedenle, Bcl-2 protein tümör büyümesinde önemli bir rol oynayabilir(2).

Her iki sinerjistik ve antagonistik P ve E2 fonksiyonu endometriyal hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde uterus epitelyal-stromal iletişimi koordine etmek için kendi aynı kökenli nükleer reseptörleri üzerinden etki eden uygun uterus fonksiyonunu düzenlemektedir(68). Ovarian steroidlerin spesifik biyolojik etkileri polipeptid büyüme faktörlerinin işlemleri üzerinden aracılık ettiği bazılarının da anjiyojenik olduğu bilinmektedir. Leiomyomaların büyümesinin hormonu düzenlenmiş bir dizi polipeptid tarafından kontrol edildiği de bilinmektedir(10).



Şekil 4: Leiomyoma patogenezisinde progesteronun rolü (102). Ovarian progesteron ECM formasyonu, proliferasyon ve apoptozis için anahtar genlerin transkripsiyonunu regüle eden PR ile hareket eder. PR progesteron antagonistleri ve bu genlerin blok trankripsiyonu efektif SPRM(Selektif progesteron reseptörü modülatörleri)'ler gibi hareket eder.

2.3.4. Histolojik Özellikler

Bir leiomyoma, düz kas hücrelerinin birbirleri üzerine paketlenmesinden oluşur. Leiomyomanın çevre myometriumdan keskin sınırla ayrıldığının makroskopik ve mikroskobik olarak belirgin şekilde görülebileceği not edilmiştir. Düz kas hücreleri belirgin uzamış, eozinofilik sitoplazmalı, konik ve iğ biçimli nukleusa sahiptir(69). Nükleer pleomorfizm en azdır ve mitoz nadirdir(70). Bol retikülin mevcuttur(69).

Leiomyomanın histolojik fenotipi komşu myometriumdan daima farklıdır. Çoğu leiomyomada hücre dışı matriks myometriuma göre daha fazla birikmektedir ve düz kas hücreleri kapsüllenmiş kollajence zengin kitleler halinde mevcudiyet göstermektedir. Leiomyomada tip I kollajen oranında artış ve normal myometriumdan % 50 daha fazla kollajen vardır. Bazı kaynaklar leiomyoma dokusunda tip III kollajenin daha çok olduğunu saptamıştır. Leiomyomalar genellikle iyi sınırlı tümörlerdir(49).

2.3.5. Leiomyoma Tipleri

Leiomyomaların geleneksel sınıflandırması uterus içinde büyümesi ve konumuna dayanır. Öncelikle uterus içindeki konumuna göre sınıflandırılan leiomyomanın dört temel tipi vardır:

- Subserozal (sadece serozal yüzeyin altında yer alır)
- İntramural (başlıca kalın myometrium içinde bulunan)
- Submukozal (endometrium altında yer alır)

-Pedinkulat (myomlar uterus iç veya dış duvara onları birbirine bağlayan küçük bir sap üzerinde büyür) (49).

2.3.6. Özel Leiomyoma Tipleri

Bazı leiomyoma tipleri bir veya daha fazla özelliği ile maligniteyi taklit edebilir. Bunlar;

- mitozdan zengin leiomyoma,
- hücreden zengin leiomyoma,
- hemorajik hücreden zengin leiomyoma,
- atipik leiomyoma,
- epitelioid leiomyoma,
- dissekan kotiledonoid leiomyoma,

- miksoid leiomyoma,
- vasküler leiomyoma,
- heterolog elemanlı leiomyoma,
- hematopoetik elemanlı leiomyomalardır(71,72).

2.3.6.1. Mitozdan Zengin Leiomyoma

Benign düz kas tümörü, genellikle artan bir mitotik oran ile sekiz cm'in altında bir boyuttadır. Yüksek proliferasyon oranları salgılama fazında görülen artmış progestin seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir(69). Myomlar her yüksek büyütme başına on en aktif alanda sayıldığında 5-14 mitoz hesaplanmıştır ve bunlara mitozdan zengin leiomyoma denir(69,73).

2.3.6.2. Hücreden Zengin Leiomyoma

Bir benign düz kas tümörü, çevre myometrium ve diğer leiomyomaların büyük çoğunluğu ile karşılaştırıldığında birim alan başına düşen hücre sayısında belirgin artış vardır. Olağan leiomyomanın aksine, hücresel leiomyomaların sık sık komşu myometrium ile birleştiği ve içine fokal uzantılar gönderdiği görülmektedir. Mitoz sayısı değişken, ancak genellikle düşüktür. Nükleer atipi yoktur(69).

Hücreden zengin leiomyomada hücreler ve nukleusları iğsi özelliktedir. Retikulin paterni ve pleksiform vaskularitenin olmayışı da tanıya yardımcıdır. Büyük kalın duvarlı kan damarlarının daha çok hücreden zengin leiomyomalarda görüldüğü bildirilmiştir(74).

2.3.6.3. Hemorajik Hücreden Zengin Leiomyoma

Bazen 'apoplektik leiomyoma' olarak da anılmaktadır. Bu varyant, gebelikte ve oral kontraseptif tedavisi sırasında oluşur. Kanama ve kistik değişiklik gösterir(69).

Mikroskopik hücresel özellik olarak, yamalı kanama alanları ve ödem görülür. Nekroz genellikle yoktur. Mitotik figürler kanama alanı etrafındaki granülasyon dokusunda görülebilir. Hücresel atipi ve atipik mitotik figürler yoktur(72).

2.3.6.4. Atipik Leiomyoma

Atipik leiomyomalar koagüle olmayan tümör hücre nekrozu, düşük mitoz sayısı ve pleomorfik atipik tümör hücreleriyle karakterizedir(75).

Atipik nukleus ile karakterize biçimsiz plemorfik tümör hücreleridir. Biçimsiz hücrelerin çoğu multinuklear ya da çok loplu nukleusludur ama büyük ölçüde büyütülmüş hiperkromatik mononuklear hücreler de yaygındır. Nukleer özelliklerin bazıları , lekeli kromatin, vakuolizasyon, karyoreksis piknoz ile dejeneratiftir(69). Leiomyomanın çoğunun histolojisi iyi vaskülarize bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinin bir fasikül modelini sergilemiştir. Düz kas hücreleri eozinofilik ya da zaman zaman fibriler sitoplazma ve farklı hücre zarları ile elongedir(75).

Tanımı gereği atipik leiomyomalar düz kas tümörleri gibi hücresel atipi göstermektedir ve bazen mitotik oranları artmış olabilir. Bunların leiomiyosarkomadan doğru biçimde ayırt edilebilir olması önemlidir. Bening olarak sınıflandırılan atipik düz kas tümörleri proliferatif aktivitesi genellikle düşük olmakla birlikte, en yüksek sayım yöntemi kullanılarak her on yüksek güç alanlar (HPF)'ın başına yedi kadar mitoz bildirilmiştir. Bu tümörler görünüşte dejenere alanlarının kenarı ile ilişkili simplastik hücreler ile dejenerasyon, ödem ve hiyalin değişimi gösterebilirler (69).

2.3.6.5. Epitelioid Leiomyoma

Epiteloid leiomyomalar yuvarlak veya epitel benzeri görünen köşeli hücrelerdir. Tümörün en az yüzde 50'sini oluşturan iyi huylu tümörlerdir(76). Ağırlıklı olarak yuvarlak hücrelerden oluşsa da ortak leiomyoma daha normal iğsi hücrelerden de oluşan düz kas tümörüdür. Genellikle üç alt tipi kabul edilmektedir:

- Leiomyoblastoma
- Şeffaf hücre leiomyoma
- Pleksiform tümör(69).

Leiomyoblastoma geniş eozinofilik sitoplazmalı yuvarlak hücrelerden, berrak hücreli leiomyom berrak sitoplazmalı, belirgin hücre membranı olan poligonal hücrelerden oluşmuştur. Hücreler az miktarda lipid ve glikojen içerebilir ancak musin içermemektedir. Pleksiform leiomyoma, dar veya orta genişlikte sitoplazmalı yuvarlak hücrelerin kümeler ve kordonlar yapmasıyla oluşmuştur. Nukleus kenara çekilmiş şekilde gözlenebilmektedir(77,78).

2.3.6.6. Dissekan Kotiledonoid Leiomyoma

Bir dissekan leiomyoma (kotiledonoid leiomyoma) bitişik myometriuma penetre görünen hidropik bir matriksle çevrelenmiş nodüler düz kas tümörlerinin bir deseni ile karakterizedir(76). Dissekan leiomyoma, benign bir düz kas proliferasyonu olup, lezyonun dissekan bir paternle çevre myometriuma, ligamentum latuma, pelvise doğru uzanım göstermesi tipiktir(79).

2.3.6.7. Miksoid Leiomyoma

Kapsamlı miksoid değişikliği ile iyi huylu bir düz kas tümörüdür(69). Miksoid leiomyoma bol ekstrasellüler stroma içerir(76). Yuvarlak şekilli olup, hücresel atipi ve mitoz içermezler. Tümör sınırları genellikle infiltratiftir. İnfiltratif sınırlı, hücresel atipisi olan, mitoz açısından aktif büyük miksoid düz kas tümörleri şüpheli kabul edilmelidir(71,72). Miksoid bağ dokusu içinde düz kas adaları büyük damarlar içermektedir, ancak infiltratif değildir. Küçük ve ince nukleusludur ve mitotik aktiviteleri yoktur(80).

2.3.6.8. Vasküler Leiomyoma

Vasküler leiomyomalar çok sayıda geniş çaplı damar içerirler. Belirgin ve yuvarlak sınırlı olup, tipik iğsi düz kas hücrelerini en azından odaksal olarak içermektedirler. Hemanjiyom veya arteriovenöz malformasyondan ayırmak zor olabilir(71,72).

2.3.6.9. Heterolog Elemanlı Leiomyoma

Bazı benign uterus leiomyomalarında düz kas hücreleri ve düz kas dışı dokular beraber bulunabilir. Bazı mikst leiomyomalarda endometrial stromal hücreler belirgindir. İnfiltratif sınırlar ve/veya vasküler invazyon varlığı malign, bunların yokluğu benign lezyona (stromomyom) işaret etmektedir(81).

Belirgin yağ içeren leiomyomalar lipoleiomyoma, vasküler komponent de içerdiğinde anjiyolipoleiomyoma adı verilir(82). Tüm leiomyomalarının% 2'si; leiomyoma ve iyi huylu davranışlı olgun adipositlerin kombinasyonudur. Ayrıca tamamen olgun adipositlerin oluşturduğu neoplazmları içermektedir (83).

2.3.6.10. Hematopoetik Elemanlı Leiomyoma

Leiomyomalarda yoğun hematopoetik hücre infiltrasyonu görülebilir. Bakteriyel enfeksiyon varlığında abse gelişebilmektedir(84).

2.3.7. Tedavi

Asemptomatik myomlara tedavi gerekmez. Olgular gözlem altına alınır. Tedavi planlaması ancak spesifik semptom ve endikasyonlarda yapılır(85).

Cerrahi ve medikal olmak üzere 2 ana tedavi seçenegi vardır:

1. Cerrahi Tedavi:

Semptomatik leiyomyomalar premenopozal kadınlarda en sık major cerrahi nedeni ve Amerika Birleşik Devletleri'nde önde gelen histerektomi endikasyonları arasındadır(86).

2. Medikal Tedavi:

Seks steroidlerinin myom etiyopatogenezindeki rolüne ilişkin veriler arttıkça cerrahi yerine, medikal tedavi seçenekleri geliştirilmektedir. Bu amaçla seçilmiş olgularda nonsteroid antiinflamatuar ajanlar, oral kontraseptifler, antiprogestinler, selektif östrojen reseptör modülatörleri, androjenler, α-interferon, pirfenidon ve gonadotropin releasing hormon analogları gibi seçenekler önerilmektedir(55).

2.4. Kurkumin

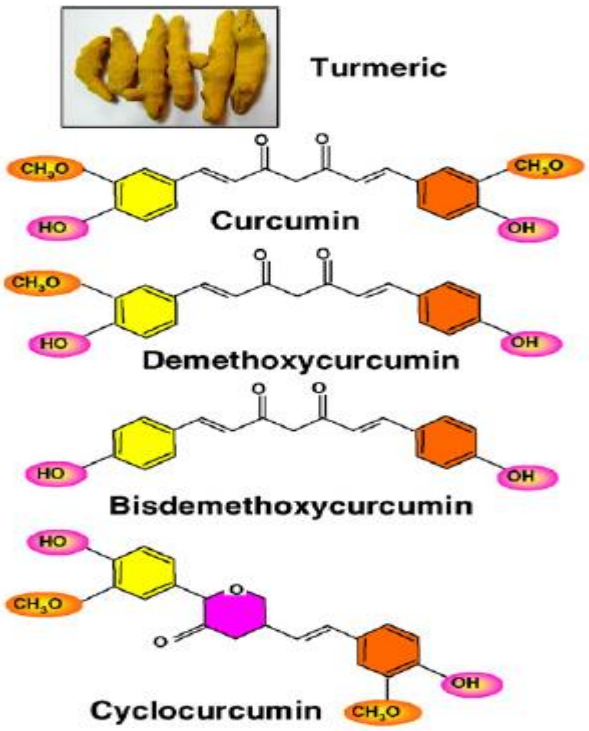
2.4.1. Kimyasal Özellikleri

İlk olarak 1815'de izole edilmiştir. 1870'de kristalin formda elde edilmiş ve 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis(4-hidroksi-3metoksifenil) veya diferulamylmethane olarak tanımlanmıştır. Kurkuminin feruloylmethane iskeleti daha sonra Lampe tarafından yapılan çalışma ve sentezlerle 1910 yılında teyit edilmiştir(87). Meyve, sebze veya baharatlardan türetilen bazı nutrasötiklerin sağlık için ekstra yararları olduğu ortaya konmuştur. Antikanser tedavisi için yeni bir ilaç olarak geleceği olabilecek ajanlardan biri de kurkumindir. Bu doğal ajan yaygın hint mutfağında ve güney-doğu asya ülkelerinde ayuverdik tıbbında bir baharat olarak kullanılmış olsa da kapsamlı araştırmalar son yıllarda yapılmıştır. İnvitro hayvan modellerinde, kurkumin ve türetilmiş moleküllerinin anti-anjiyojenik, anti-kanser ve anti-metastatik etkisi olduğu bildirilmiştir(88).

Kurkumin; zencefil Zingibeaceae ailesinin bir üyesi;(1,7-bis[4-hidroksi-3metoksifenil]-1,6-heptadien-3,5-dion) bir hidrofobik polifenol bileşiğidir. Yaygın olarak zerdeçal olarak bilinen bitki Curcuma Longa'nın rizomunda bulunur(6). Zerdeçal rizomundan elde edilen sarı aktif bir bileşendir(89). Kurkumin suda çözünmeyen çeşitli organik çözücüler (Etanol, Dimetilsülfoksit, Kloroform, Aseton) ve yağda iyi çözünen; asitli bileşiklerle temas ettiğinde koyu kırımızı renge dönüşen fenolik yapıda bir bileşiktir(90).

Kurkumin C12H20O6 moleküler formül, 183 derece erime noktası ve 368,37 g/mol moleküler ağırlığına sahiptir(87). pH 3-7 aralığında kurkumin güçlü bir H atom donörüdür. Buna karşın pH 8'in üzerinde enol form hakimdir. Kurkumin bir elektron donörü gibi hareket etmektedir ki bu fenolik antioksidanların bağlanma aktivitesi için tipik bir mekanizmadır(91). Kurkumin pH 2.5'da sarı renk alırken pH 7'den büyükse kırmızı bir renk tonu alır(87).

Zerdeçal içinde bulunan kurkuminoidler; kurkumin (kurkuminI), demethoxycurcumin (kurkuminII), bisdemetemethoxycurcumin (kurkuminIII) ve son zamanlarda belirlenen cyclocurcumindir. Ticari kurkumin curcuminI (yaklaşık %77), kurkuminII (yaklaşık %17) ve kurkuminIII (yaklaşık %3) ana bileşenleri içerir. Kurkuminoidler zerdeçalın %3-5'ini oluşturur(87).



Şekil 5: Zerdeçaldan türetilen kurkumin ve benzerlerinin kimyasal yapısı(9)

2.4.2. Kurkuminin Antioksidan Etkileri

Kurkuminin antioksidan mekanizması son yıllarda serbest radikal kimyacılar ve biyologların ilgi odağı olmuştur(92).

Kurkuminin peroksidatif hasara karşı biyomembranları koruması bilinmektedir. Antioksidanların çoğu bir fenolik işlevsel grup ya da bir diketon grubuna sahiptir. Kurkumin, hidroksil ve metoksi ikame edicilerin değişen miktarlarını içeren fenil halkaları, karbon-karbon ikili bağları ve β-diketo grubu da dahil olmak üzere fonksiyonel gruplar içeren eşsiz bir antioksidandır(92). Kurkuminin yapısındaki fenolik ve metoksi gruplarının serbest radikallerle reaksiyona girmesiyle fenoksil radikali oluşmaktadır(93). Kurkuminin mükemmel bir H+ iyonu vericisi olduğu ve verilen H+ iyonunun daha çok metil grubundan koptuğu belirlenmiştir(94). Benzer olarak yapılan diğer bir çalışmada, verilen iyonun kaynağı fenol grubu olarak tespit edilmiş, böylece kurkuminin çift yönlü çalışan, güçlü antioksidan bir bileşik olduğu ortaya konulmuştur (95). Kurkuminin antioksidan aktivitesi, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler aracılığı ile olabilir. Kurkuminin glutatyon ve tiyoredoksin ile reaksiyona sokulduğunda, bir Michael akseptörü olarak işlev gösterdiği gösterilmiştir. Bu maddelerle kurkumin reaksiyonu hücre içinde interselüller glutatyonu (GSH) azaltmaktadır. Kurkumin ile lipit peroksidaz(LPO) bastırılması inflamasyon baskılanmasına yol açabilir (96).

Kurkumin, birçok terapötik avantajı da beraberinde getirmektedir. Süperoksit radikalleri, hidroksi radikaller ve nitrojen radikalleri gibi birçok reaktif oksijen ürünleri açısından güçlü bir temizleyici olduğu gösterilmiştir. Çeşitli hayvan modellerinde lipid peroksidasyonu üzerindeki inhibitör etkisi de gösterilmiştir. Vasküler endotel hücrelerinde hem-oksijenaz üretimini arttırmak yoluyla oksidatif hücre hasarını azaltmıştır(97). Kurkumin hücre çoğalması ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eder, sitokinler ve çeşitli kinaz proteinleri yanı sıra büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri ve enzimlerinin modulasyonuna aracılık eder. Bu nedenle, kurkumin sindirim sistemi kanserleri (özofagus, mide, bağırsak, karaciğer, pankreas ve kolorektal), ürolojik kanserler (mesane, böbrek, prostat), üreme sistemi kanserleri (servikal, yumurtalık, uterus,), hematolojik kanserler [lösemi, lenfoma, çoklu miyeloma (MM)], pulmoner, timus, beyin, göğüs, kemik tümörleri için potansiyel terapötik değere sahiptir(98).

2.4.3. Kurkuminin Antienflamatuar Etkileri

Kurkumin doğrudan enflamatuar moleküllerin siklooksijenaz (COX-1,2), lipoksigenaz (lx), tümör nekroz faktörü (TNF- α), insan a1-asit glikoprotein (AGP), miyeloid farklılaşma proteini 2 (MD-2), enzimler [histon asetiltransferazlar ve deasetilazlar (HDAC), ksantin oksidaz (XO), insan bağışıklık eksikliği virüsü tip 1 (HIV1) integraz ve -protease DNA metiltransferaz ve - polimeraz, protein kinazlar ve redüktazların (glikojen sintaz kinaz (GSK-3b), fosforilaz kinaz-3, proteinkinaz C (PKC), fokal adhezyon kinaz (FAK), ErbB2 (HER2 / neu), tioredoksin redüktaz (TrxR), aldoz redüktaz (ALR)] gibi, Bcl2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinler ile de etkileşir. Kurkuminin, taşıyıcı proteinler (kazein albumin ve immünoglobulin), DNA, RNA ve iki değerli metal iyonlarını (Fe, Cu, Mn ve Zn) doğrudan bağladığı gösterilmiştir. Kurkumin nükleer faktör-kappa B (NF-κB), aktivatör protein 1 (AP-1), B-katenin, sinyal ileticisi ve aktivatörü (STAT) proteinleri ve peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gamma (PPARγ) dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri ile dolaylı etkileşimdedir. Kurkuminin enzimin aktif bölgesi artıkları ile yakın temas kurduğu gösterilmiş ve güçlü önleyiciliği gösterilmiştir. Enflamasyon hemen hemen tüm kanser türlerinin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili önemli bir bileşendir. Kurkuminin anti-enflamatuar bir mekanizma ile proenflamatuar enzimler olan indüklenebilir nitrik oksid sentazın (İNOS) ve COX-2 gen ifadesinin önlenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Pek çok çalışma, hücre çoğalması, dönüşümü ve tümör promosyonuyla NF-κB, sitokinler ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) rolünü ortaya koymuştur. Kurkuminin TNF α, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), İnterlökin-1, 2, 6, 8 ve 12 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 ve IL-12) gibi enflamatuar sitokinlerin engellenmesine yol açtığı ve NF-κB aktivasyonunu baskıladığı bulunmuştur (98).

Kurkuminin sistematik olarak hastaya verilmesini içeren çalışmalar; IL-6 ve IL-1b, NF-κB , TNF α, AP-1 dahil olmak üzere çeşitli sinyal molekülleri tarafından enflamatuvar koşullara çeşitli yararlı etkilerini göstermiştir(99).

2.4.4. Kurkuminin Antikarsinojenik Aktivitesi

Birçok araştırmacı kurkuminin tümör inhibisyon etkisini destekleyen veriler sunmuşlardır. Tümörlerin başlangıcının ve ilerlemesinin bu bileşik tarafından engellendiği veya azaltıldığı görülmüştür. Ayrıca kurkumin iyi bir antianjiogenetik ajan olarak da

tanımlanmıştır ki bu özelliği tümör oluşum mekanizmasındaki inhibitör özelliğini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Kurkuminin sağlıklı hücrelere toksik etkisi olmaksızın kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemesi antikarsinojenik potansiyelinin anlaşılmasına katkıda bulunur(100). Kurkumin çeşitli mekanizmalar yoluyla in vitro ve in vivo olarak anti-kanser aktivitelerini sergiler. Bu mesane, meme, akciğer, pankreas, prostat, uterus, baş ve boyun, yumurtalık, böbrek, beyin, kemik iliği ve deri kanseri hücreleri de dahil olmak üzere, in vitro olarak kanser hücresi türlerinde geniş bir dizi apoptoza neden olmakta ve proliferasyonunu inhibe etmektedir(87).

Tümör baskılayıcı genler kanser oluşumu ve inhibisyonunda önemli bir rol oynar. Bir gende mutasyon ya da bir değişiklik ortaya çıktığında tümör baskılayıcı gen normal işlevini yerine getirmeyi kaybeder(101). p53 tümör bastırıcı ve transkripsiyon faktörüdür ve hücre sinyal iletimi, DNA hasarı, genomik stabilite, hücre döngüsü kontrolü ve apoptoza karşı hücresel yanıt dahil olmak üzere birçok hücresel süreçlerde önemli bir düzenleyicidir(87). İn vivo ve in vitro raporlarında zerdeçal ve onun bileşenlerinin kanser önlenmesi veya inhibisyonunda önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir(101).

Östrojen ve reseptörleri alfa ve beta (ÖR- α ve ÖR- β) tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, ÖR mevcut ve gelişmekte olan tedaviler için önemli bir hedeftir. Verma tarafından yapılan çalışmalar kurkuminin ÖR-pozitif ve ÖR-negatif hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. ÖR-bağımlı veya-bağımsız bir yol üzerinden kurkuminin kimyasal yoldan önleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir(87).

Anjiyogenez hücreler, çözünebilir faktörler ve ECM bileşenleri arasında yaygın bir etkileşimi içeren karmaşık bir süreçtir. Aynı zamanda, tümör büyümesinde önemli bir etki gösterir ve hızlı bir büyüme aşamasında tümör hücrelerinden kimyasal sinyaller ile tetiklenir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiyojenin, transforme edici büyüme faktörü (TGF-α, TGF-β), ve epidermal büyüme faktörü gibi birçok anjiyojenik faktörler vardır. Bu faktörlerin serbest moleküller ve normal konak dokusu çevresine sinyaller göndererek kanserli tümör hücreleri ile tümör anjiyojenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. VEGF endotelyal hücrelerde antiapoptotik süreçlerin ekspresyonunu indükler ve fizyolojik tümör anjiyogenezisi sürecindeki endotel hücreleri için önemli bir sağkalım faktörüdür. Daha önceki çalışmalar kurkuminin ortotopikal implante pankreas tümörleri de dahil olmak üzere kanserin farklı tiplerinde VEGF'in inhibitörü olduğunu göstermiştir. Adenoid kistik karsinom hücrelerinin bir çalışmasında kurkuminin

mTOR ve NF-κB yolaklarını inhibe ettiği veya VEGF ve MMP-2/9 downregulasyonu ve büyüme, yaşama ve migrasyon inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir(101).

2.4.5. Kurkuminin Klinik ve Medikal Kullanımı

Kurkuminin çoklu hücresel sinyal yollarını modüle eden ve transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri, sitokinler de dahil olmak üzere, pek çok moleküler hedefler ve enzimler ile hücre çoğalmasını ve apoptozunu düzenleyen genler ile etkileştiği gösterilmiştir. Bu bilgiler çeşitli kanser tedavisindeki kurkumin kullanımının etkinliğini doğrular. İn vitro, in vivo hayvan ve insan klinik çalışmaları etkinliğini doğrulamıştır. Kanserlerin tedavisinde kurkuminin klinik tedavide umut vericiliği ortaya konmuştur(98).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma 09/2014 - 02/2015 tarihleri arasında literatür araştırılması ve tez konusunun belirlenmesi ile başlayıp 01/2016 – 11/2016 tarihleri arasında tez yazımı ile sonlanmıştır. Deneysel işlemler; Deney Hayvanları A.D, Histoloji ve Embriyoloji A.D, Biyokimya A.D ve ARLAB'da gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Deney grupları aşağıdaki gibi planlanmıştır.

Tablo 1: Deney grupları ve grup başına kullanılan denek sayısı

Deney Grupları	Grup Başına Denek Adedi
Grup 1: (Kontrol grubu, n=7) Hiçbir şey uygulanmayan grup uterusları alındı. Bazal değerler için kullanıldı.	7
Grup 2: (Etanol grubu, n=7) Uterus leiomyoması oluşturmak için kullanılan estradiol ve progesteronun çözgeni olan etanolün leiomyoma üzerine etkisi olup olmadığına bakmak için etanol verildi. Deney sonrası sakrifiyasyon ile uterusları alındı.	7
Grup 3: (Uterus leiomyoma modeli grubu, n=7) Uterus leiomyoma modeli oluşturuldu. Sakrifikasyon sonrası uterusları alındı.	7
Grup 4: (Leiomyoma+mısıryağı (çözgen) grubu, n=7) Uterus leiomyoma modeli oluşturulmuş sıçanlara mısır yağı verildi. Sakrifikasyon sonrası uterusları alındı.	7
Grup 5: (Leiomyom+kurkumin (antioksidan) grubu, n=7) Uterus leiomyoma modeli oluşturulmuş sıçanlara, kurkumin mısır yağında çözdürülerek verildi. Sakrifikasyon sonrası uterusları alındı.	7
Kullanılan toplam hayvan sayısı	**35**

Leiomyoma modeli oluşturulması: Uterus leiomyoması oluşturulmadan önce denekler rastgele gruplara ayrıldı. Deneklerin başlangıç ağırlıkları ölçüldü ve başlangıç kan örnekleri alındı. Uterus leiomyoması oluştulacak gruplara; 25 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal olarak 0,5 mg/kg estradiol benzoat enjekte edildi. Daha sonra 5 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal enjeksiyon ile 4 mg/kg progesteron enjekte edildi(4). Leiomyoma oluşturulduktan sonra tüm gruplardan kan örnekleri alındı. Leiomyoma oluşturulan bir gruba deney hayvanları etik ilkelerine uygun olarak 2 cc mısır yağında çözdürülen 200mg/kg kurkumin 15 gün boyunca günde birer defa oral gavaj yolu ile verildi(6,99). Leiomyoma oluşturulan diğer bir gruba 15 gün boyunca günde birer defa oral gavaj yolu ile deney hayvanları etik ilkelerine uygun olarak 2 cc mısır yağı verildi. Etanol grubuna 30 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal olarak etanol enjekte edildi. 15. gün sonunda tüm gruplardan eter anestezisi altında deney sonu kan örnekleri alındı, sakrifiye edildi ve leiomyoma üzerine kurkuminin etkisine bakıldı.

Sıçanların kuyruk veninden %10-%10 kuralına uygun olarak deney başlangıcı, leiomyoma oluşturulduktan sonra ve deney sonu alınan kan örneklerinden biyokimyasal analiz ile östrojen ve progesteron seviyelerine bakıldı.

3.4. Çalışmanın Materyali

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden temin edilen, Wistar suşu toplam 35 dişi sıçan (200-250gr) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmamıştır. Etanol grubuna ise estradiol ve progesteronun çözgeni olan etanol 30 gün boyunca enjekte edilmiştir. Leiomyoma gruplarına modeli oluşturmak için 25 gün östradiol ve 5 gün boyunca progesteron enjekte edilmiştir. Leiomyoma oluşturan bir gruba hiçbir işlem yapılmamıştır. Leiomyoma oluşturan diğer bir

gruba ise 15 gün boyunca kurkuminin çözgeni olan mısır yağı oral gavaj ile verilmiştir. Leiomyoma oluşturulan bir gruba 15 gün boyunca oral gavaj ile kurkumin verilmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada; deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv; kesitlerin alınmasında mikrotom; boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler kullanılmıştır. İlaçların hazırlanması için hassas terazi, vorteks kullanılmıştır. Biyokimyasal incelemeler için 37 dercelik inkübatör, soğutmalı santrifüj, santrifüj, terazi, pH metre, vorteks, manyetik karıştırıcı, derin dondurucu, plak okuyucu (Abs/Flu/Lum) kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen & Eozin, PAS ve Masson Trikrom; immünohistokimyasal olarak Ki-67, PCNA, α-SMA ve VEGF antikorları ile boyamalar yapılmıştır.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında, belirli aralıklarla ve deney sonunda (sakrifikasyon öncesi) deneklerin ağırlıkları ölçüldü. Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında değerlendirildi. Deneklerin ağırlıklarının başlangıç ve deney sonundaki verilerinin, grup içi ve gruplar arası karşılaştırılmasında $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.2. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi

Deneklere deney sonunda vaginal smear uygulandı. Vaginal smear'la alınan örnekler lama yayıldı. Hazırlanan preparatlar %96'lık, %80'lik, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirilip, akarsuda 5 dakika bekletildi. Daha sonra 30 saniye eozinde bekletildi. Eozinden çıkarılan preparatlar %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirilip havada

kurutlup preparatlar incelendi. Vaginal sitolojik veriler Schaberg (1992)' nin döngüsel değişimlerine bağlı olarak elde ettiği bulgular doğrultusunda değerlendirildi.

3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler

Uteruslar histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 2).

Tablo 2: Doku takip protokolü

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 20'şer dakika etüv dışında üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması ve mordantlama için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 30 saniye eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma

amacıyla 20’şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boya protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100’lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100’lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96’lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80’lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70’lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	30 saniye
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100’lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.2. Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için bir gece 60˚C’lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçiridi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (0406 TEK-PATH, İzmir, Türkiye) içerisinden Reaktif A (Weigert Iron Hematoksilin A Solution) ve Reaktif B (Weigert Iron Hematoksilin B Solution)’den 6’şar damla lamlara damlatılarak 10 dakika bekletildi. Lamlara direkt Reaktif C (Picric Asid Alcoholic Solution)’den 10 damla damlatılarak dört dakika bekletildi. Lamlar üç-dört dakika distile suda yıkandı ve Reaktif D (Ponceau Acid Fuchsin Solution)’den 10 damla lamların üzerine damlatılarak dört dakika bekletildi. Lamlar distile sudan geçirildi ve Reaktif

E (Phosphomolybdic Acid Solution)'den lamların üzerine 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Lamları yıkamadan direkt olarak Reaktif F (Aniline Blue Solution)'den 10 damla lamların üzerine damlatılarak beş dakika bekletilir. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Masson Trikrom boya protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda Isısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda Isısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif A + Reaktif B solüsyonu	10 dakika
Boyama	Reaktif C	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif D	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reaktif E	10 dakika
Boyama	Rekatif F	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.3. PAS(Periodic Asid Schiff) Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 30 dakika etüvde diğer ikisi 30'ar dakika oda ısısında üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika peryodik asit ile muamele edildi. Ardından 10 dakika akarsuda bekletilen kesitler etüvde 20 dakika kurutulduktan sonra, 20 dakika schiff reagent ile muamele edilip karanlıkta bekletildi. Sonrasında 20 dk akarsuda yıkandı. Mayer's Hematoksilen ile 3 dakika bekletildikten sonra 10 dakika akarsuda bekletildi. Daha sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacı ile 20'şer dakika üç ksilende bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı(Tablo 5).

Tablo 5: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Peryodik asit	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Kurutma	Etüvde	20 dakika
Boyama	Schiff	20 dakika
Yıkama	Akarsu	20 dakika
Boyama	Mayer's Hematoksilen	3 dakika
Yıkama	Akarasu	10 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler

3.6.2.4.1. α-SMA Boyama Prosedürü

Alınan kesitler öncelikle 60 ^{0}C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30' ar dakika üç değişim ksilene tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile distile su koyuldu. Ardından dokular 15 dakika 37 ^{0}C'de Tripsin ile muamele edildi. 3 kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dk Hidrojen Peroksit ile oda ısısında bekletilerek dokuda endojen peroksizdaz aktivitesi inhibe edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi.Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik α-SMA antikoru (1:50) (eBioscience LOT 4280517) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor(B) solusyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile 30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solusyonunda(İnvitrogen, LOT 1155338A) 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.4.2. PCNA Boyama Prosedürü

Alınan kesitler öncelikle 60 ^{0}C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30' ar dakika üç değişim ksilene tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile distile su koyuldu. Ardından dokular 15 dakika 37 ^{0}C'de Tripsin ile muamele edildi. 3 kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dk oda ısısında Hidrojen Peroksit ile bekletilerek dokuda endojen peroksizdaz aktivitesi inhibe edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi.Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik PCNA antikoru (1:100) (Bioss bs-0491R) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor(B) solusyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile 30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama

yapıldıktan sonra C solusyonunda(İnvitrogen, LOT 1155338A) 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.4.3. Ki67 Boyama Prosedürü

Alınan kesitler öncelikle 60 ^{0}C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30' ar dakika üç değişim ksilene tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Daha sonra dokular %10'luk sitrat tamponunda 5 dakika mikrodalgada kaynatıldaktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokuların etrafı pappen ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından 3 kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dk oda ısısında Hidrojen Peroksit ile bekletilerek dokuda endojen peroksizdaz aktivitesi inhibe edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi.Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik Ki67 antikoru (1:200) (Bioss bs-2130R) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor(B) solusyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile 30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solusyonunda(İnvitrogen, LOT 1155338A) 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.4.4. VEGF Boyama Protokolü

Alınan kesitler öncelikle 60 ^{0}C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30' ar dakika üç değişim ksilene tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Daha sonra dokular %10'luk sitrat tamponunda 5 dakika mikrodalgada kaynatıldaktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokuların etrafı pappen ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından 3 kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dk oda ısısında Hidrojen Peroksit ile

bekletilerek dokuda endojen peroksizdaz aktivitesi inhibe edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi.Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik VEGF antikoru (1:100) (Bioss bs-1665R) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor(B) solusyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile 30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solusyonunda(İnvitrogen, LOT 1155338A) 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.4.5. Semikantitatif İmmunohistokimyasal Analiz

Hücrelerdeki α-SMA, PCNA, VEGF ve Ki67 dağılımını belirlemek için α-SMA Antikor, VEGF Antikor, PCNA Antikor ve Ki67 Antikor boyaması yapıldı. Gruplar arası α-SMA, VEGF, PCNA ve Ki67 moleküllerinin dağılımını belirlemek için, myometriyumda beş farklı bölgede semikantitatif ölçümler yapıldı. Semikantitatif skorlama aşağıdaki gibi tanımlandı(103).

Semikantitatif değerlendirmede çift kör randomize çalışma yapıldı.

Tablo 6: İmmünohistokimyasal Bulgu Skorlama

Skor	**İmmunohistokimyasal Bulgular**
3	Görüntünün genelinde güçlü pozitif boyanma
2	1 ve 3 arasında pozitif boyama
1	Çok az pozitif boyanma
0	Pozitif boyanma yok

3.6.2.5. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.5.1. Myometriyum Kalınlığı Değerlendirilmesi

İmage Tool kullanılarak deney gruplarındaki her bir denek için ayrı ayrı beş bölgeden myometrium kalınlık ölçümleri yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.6. Biyokimyasal Analizler

3.6.2.6.1. ELISA Yöntemi

3.6.2.6.1.1. Östradiol Ölçümü

ELISA yöntemi Cusabio Rat Estradiol (E2) ELISA kiti (CUSABİO Lot:C9983672294) kullanılarak, plazmadan östradiol ölçümü yapıldı. Bu test yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunoassay prensibine dayanmaktadır. ELISA kiti üreticisinin tavsiyesi doğrultusunda tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirildi. Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konulacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi.

Standartlar, örnekler, diluent ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. 50 µl Standart ve örnek alınarak uygun kuyucuklara koyuldu (kör kuyucuk hariç).
2. 50 µl HRP- konjuge solüsyonundan daha sonra da 50 µl antikor eklenerek karışmaları sağlandıktan sonra 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyonu sağlanan örnekler 3 kez yıkama solüsyonu (200 µl) ile yıkanarak tüm kuyucukların içerisi boşaltıldı.
4. Daha sonra kuyucukların içerisine 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B eklenerek 15 dakika 37°C'de ışıktan korunarak inkübe edildi.
5. Ardından karanlıkta 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.
6. 10 dakika sonra kuyucuklar 450nm dalga boyunda plate okuyucusunda okundu.

Çizilen standart eğrisinden, plazmadaki östradiol konsantrasyonları tespit edildi. Sonuçlar pg/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan ticari kitin sensitivitesi 25 pg/ml idi. 40 pg/ml-1400 pg/ml aralığındaki değerler ölçüldü.

3.6.2.6.1.2. Progesteron Ölçümü

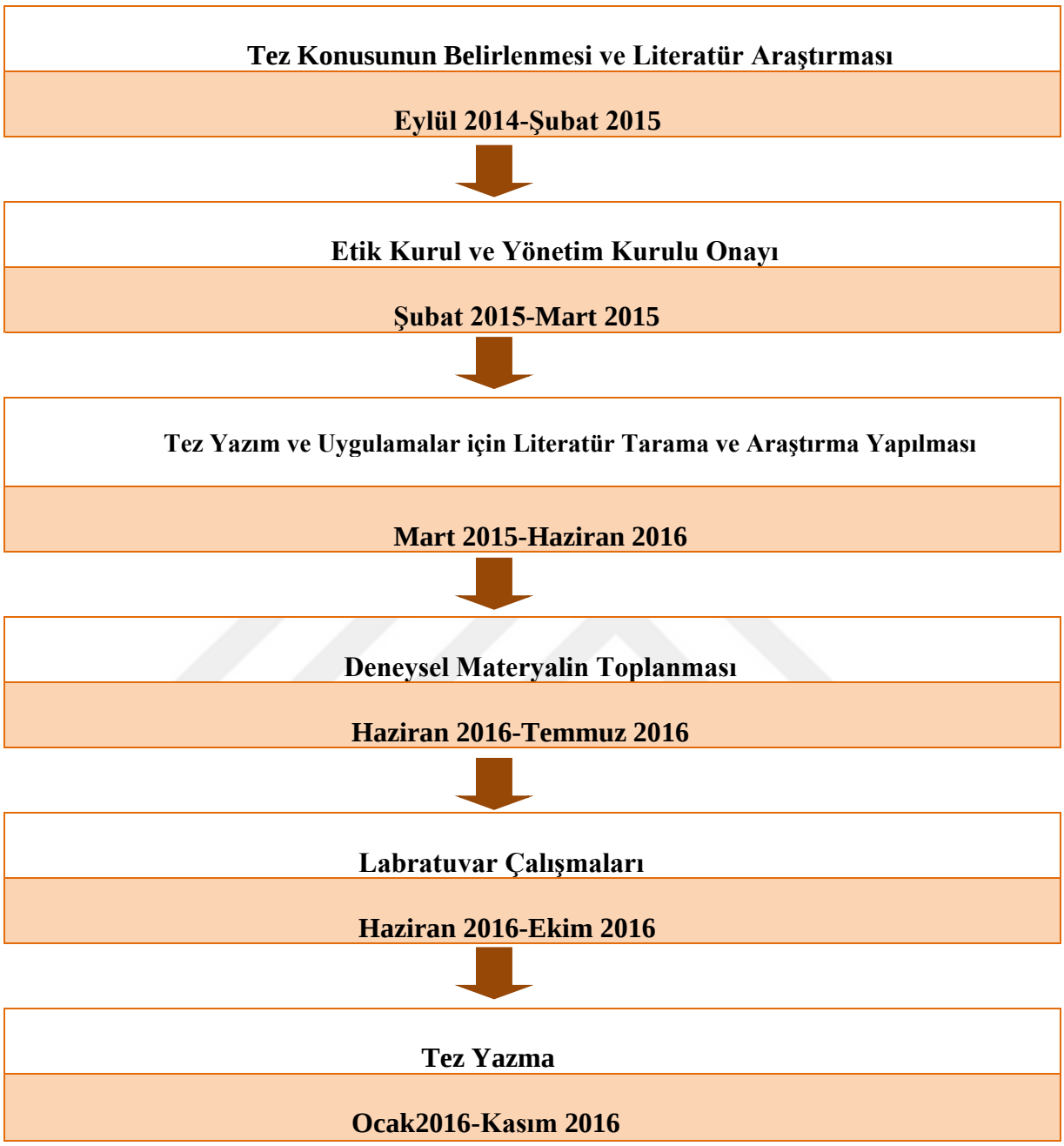
ELISA yöntemi Cusabio Rat Progesterone (PROG) ELISA kiti (CUSABİO Lot:C7744672299) kullanılarak, plazmadan progesteron ölçümü yapıldı. Bu test yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunoassay prensibine dayanmaktadır. ELISA kiti üreticisinin tavsiyesi doğrultusunda tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirildi. Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konulacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi.

Standartlar, örnekler, diluent ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. 50 µl Standart ve örnek alınarak uygun kuyucuklara koyuldu (kör kuyucuk hariç).
2. 50 µl HRP- konjuge solüsyonundan daha sonra da 50 µl antikor eklenerek karışmaları sağlandıktan sonra 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyonu sağlanan örnekler 3 kez yıkama solüsyonu (200 µl) ile yıkanarak tüm kuyucukların içerisi boşaltıldı.
4. Daha sonra kuyucukların içerisine 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B eklenerek 15 dakika 37°C'de ışıktan korunarak inkübe edildi.
5. Ardından karanlıkta 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.
6. 10 dakika sonra kuyucuklar 450nm dalga boyunda plate okuyucusunda okundu.

Çizilen standart eğrisinden, plazmadaki progesteron konsantrasyonları tespit edildi. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan ticari kitin sensitivitesi 0.2 ng/ml idi. 0.2 ng/ml-80 ng/ml aralığındaki değerler ölçüldü.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Deney sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15,0 paket programı kullanıldı. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş ve herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

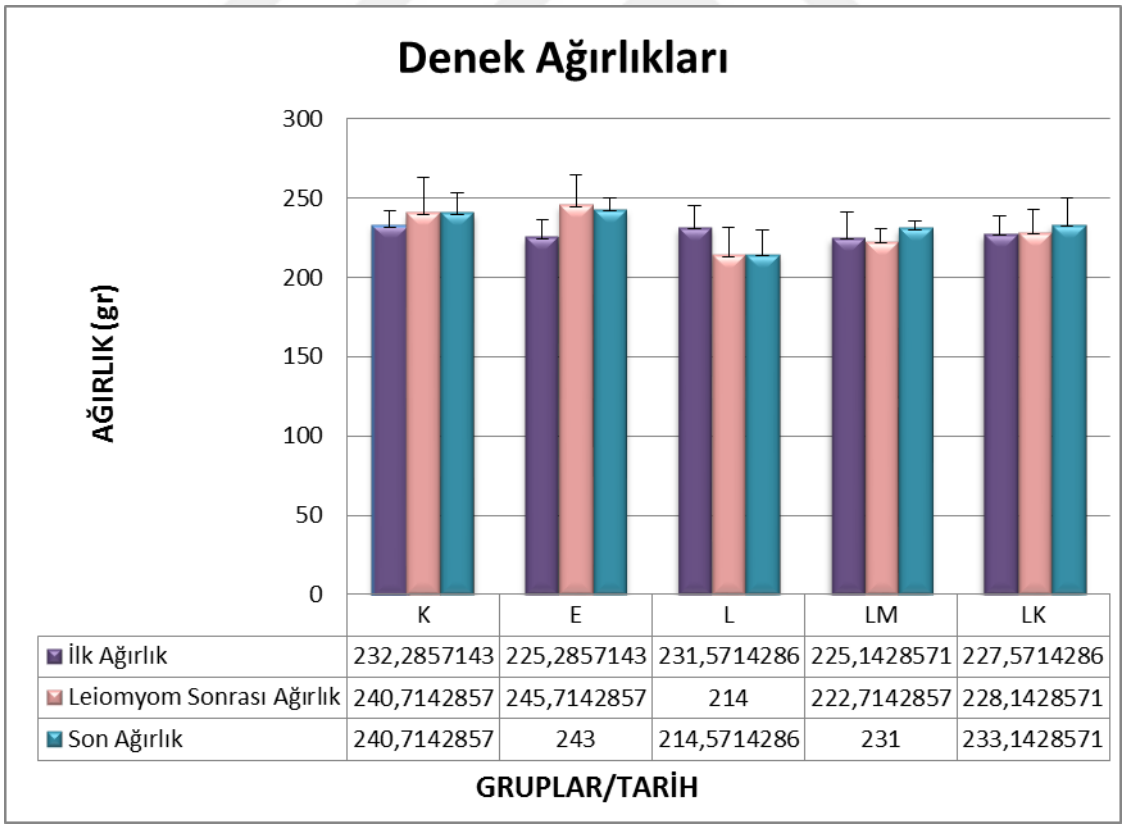
Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 12/2015 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1.Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Denekler deneye başlamadan önce rastgele gruplara ayrıldı ve ilk ağırlıkları ölçüldü. Deneklerin ilk ağırlıkları kontrol grubunda 232,28571±9,80, etanol grubunda 225,28571±11,09, leiomyoma grubunda 231,57143±13,32, leiomyoma+mısıryağı grubunda 225,14286±16,26, leiomyoma+kurkumin grubunda 227,57143±11,06 olarak ölçüldü. Östradiol ve progesteron verilerek leiomyoma oluşturma süreci sonunda denekler tekrar tartıldı; kontrol grubunda 240,71429±22,27, etanol grubunda 245,71429±19,18, leiomyoma grubunda 214±17,30, leiomyoma+mısıryağı grubunda 222,71429±7,55, leiomyoma+kurkumin grubunda 228,14286±14,91 olarak ölçüldü. Denekler son olarak deney bitiminde tartıldı. Deney sonu ağırlık değerleri kontrol grubunda 240,71429±12,92, etanol grubunda 243±7,17, leiomyoma grubunda 214,57143±14,93, leiomyoma+mısıryağı grubunda 231±4,40, leiomyoma+kurkumin grubunda 233,14286±16,94 olarak ölçüldü.



Şekil 6: Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi (n=7)

Deneklerin ağırlık ölçüm sonuçları spss ile değerlendirildi. Spss de p<0,05 çıkan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Tüm gruplar arası ağırlık değişimleri Kruskal-Wallis analizi ile p=0,008 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grupların ilk ağırlıklarının karşılaştırılmasında p=0,738 değeri anlamsız olarak değerlendirildi. Gruplar arası leiomyoma oluşturulduktan sonraki ağırlık değişimleri değerlendirildiğinde p=0,77 değeri anlamsız kabul edildi. Deneklerin deney bitimindeki son ağırlıkları değerlendirildiğinde p=0,005 değeri anlamlı bulundu. Gruplar arası ikili değerlendirmeler Mann Whitney U Testi ile değerlendirilmiştir. Mann Whitney U Testi ile bulunan değerler aşağıda tabloda gösterildi p<0,05 değerleri anlamlı kabul edildi.

Tablo7: Gruplar arası ağırlık değerlendirilmesinin tarihlere göre karşılaştırılması. İstatistiksel olarak p<0,05 olan değerler anlamlı kabul edildi, koyu renk ve * ile vurgulandı.(Grup1=Kontrol, Grup2=Etanol, Grup3=Leiomyoma, Grup4=Leiomyoma+Mısıryağı, Grup5=Leiomyoma+Kurkumin)

GRUPLAR	İlk Ağırlık Karşılaştırması	Leiomyoma Sonrası Ağırlık Karşılaştırması	Son Ağırlık Karşılaştırması
Grup1-Grup2	0,224	0,798	0,522
Grup1-Grup3	0,949	**0,040* Grup3'te azalma**	0,11
Grup1-Grup4	0,443	0,084	0,177
Grup1-Grup5	0,371	0,481	0,564
Grup2-Grup3	0,370	**0,018* Grup3'te azalma**	**0,002* Grup3'te azalma**
Grup2-Grup4	0,654	0,073	**0,006* Grup4'te azalma**
Grup2-Grup5	0,701	0,405	0,158
Grup3-Grup4	0,522	0,336	**0,046* Grup4'te artış**
Grup3-Grup5	0,522	0,224	0,063
Grup4-Grup5	0,798	0,370	0,404

Her grubun ilk ağırlıkları, leiomyoma sonrası ağırlıkları ve son ağırlıkları kendi içerisinde değerlendirildi. Mann-Whitney U Testi ile istatistikleri yapılan değerlendirmelerde $p<0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi. İlk ağırlık ile leiomyoma oluşumu sonrası ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda p=0,898, etanol grubunda p=0,110, leimyoma grubunda p=0,073, leiomyoma+mısıryağı grubunda p=0,654, leiomyoma+kurkumin grubunda p=0,609 değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Leiomyoma oluşumu sonrası ağırlık ve son ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda p=0,522, etanol grubunda p=0,898, leiomyoma grubunda p=0,898, leiomyoma+mısıryağı p= 0,096, leiomyoma+kurkumin p=0,276 değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulundu. İlk ağırlık ile son ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda p=0,277 değeri anlamsız, etanol grubunda p=0,010 değeri anlamlı, leiomyoma grubunda p=0,041 değeri anlamlı, leiomyoma+mısıryağı grubunda p=0,701 değeri anlamsız,leiomyoma+kurkumin p=0,306 değeri anlamsız olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 8: Tüm deney gruplarında ağırlık değişimlerinin kendi içerisinde değerlendirilmesi. İstatistiksel olarak p<0,05 anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

AĞIRLIK	İlk Ağırlık ile Leiomyoma oluşumu sonrası Ağırlık Değişimi	Leiomyoma Oluşumu Sonrası Ağırlık ile Son Ağırlık Değişimi	İlk Ağırlık ile Son Ağırlık Değişimi
Kontrol	0,898	0,522	0,277
Etanol	0,110	0,898	**0,010* Anlamlı artış**
Leiomyoma	0,070	0,898	**0,041* Anlamlı azalma**
Leiomyoma+Mısır yağı	0,654	0,096	0,701
Leiomyoma+Kurkumin	0,609	0,276	0,306

4.2. Deneklerin Menstruel Sikluslarının Belirlenmesi

Deneklerin menstrual siklusları belirlenerek deneyin standardizasyonu için tüm gruplar östrus evresinde iken sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir.

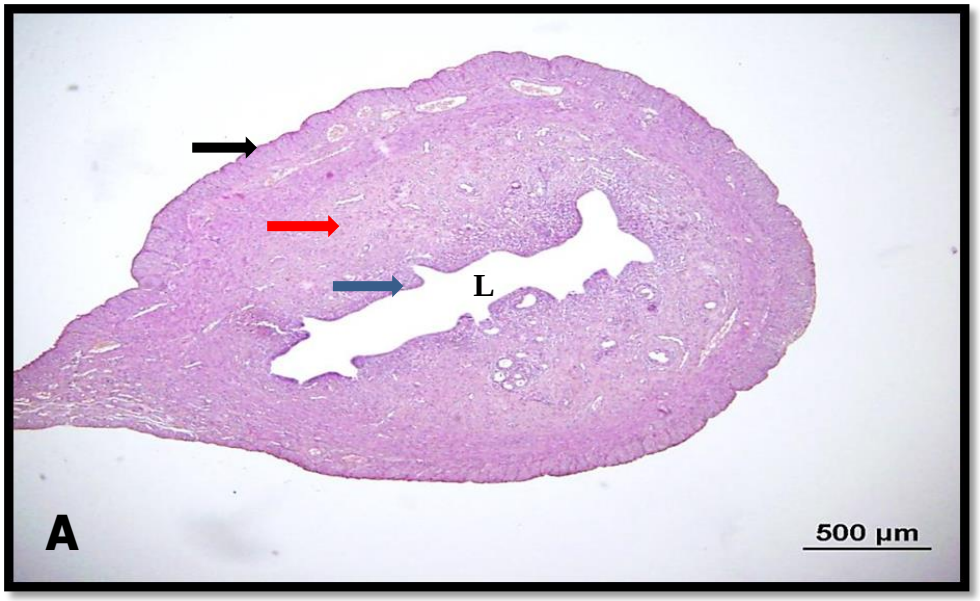
4.3. Histokimyasal Bulgular

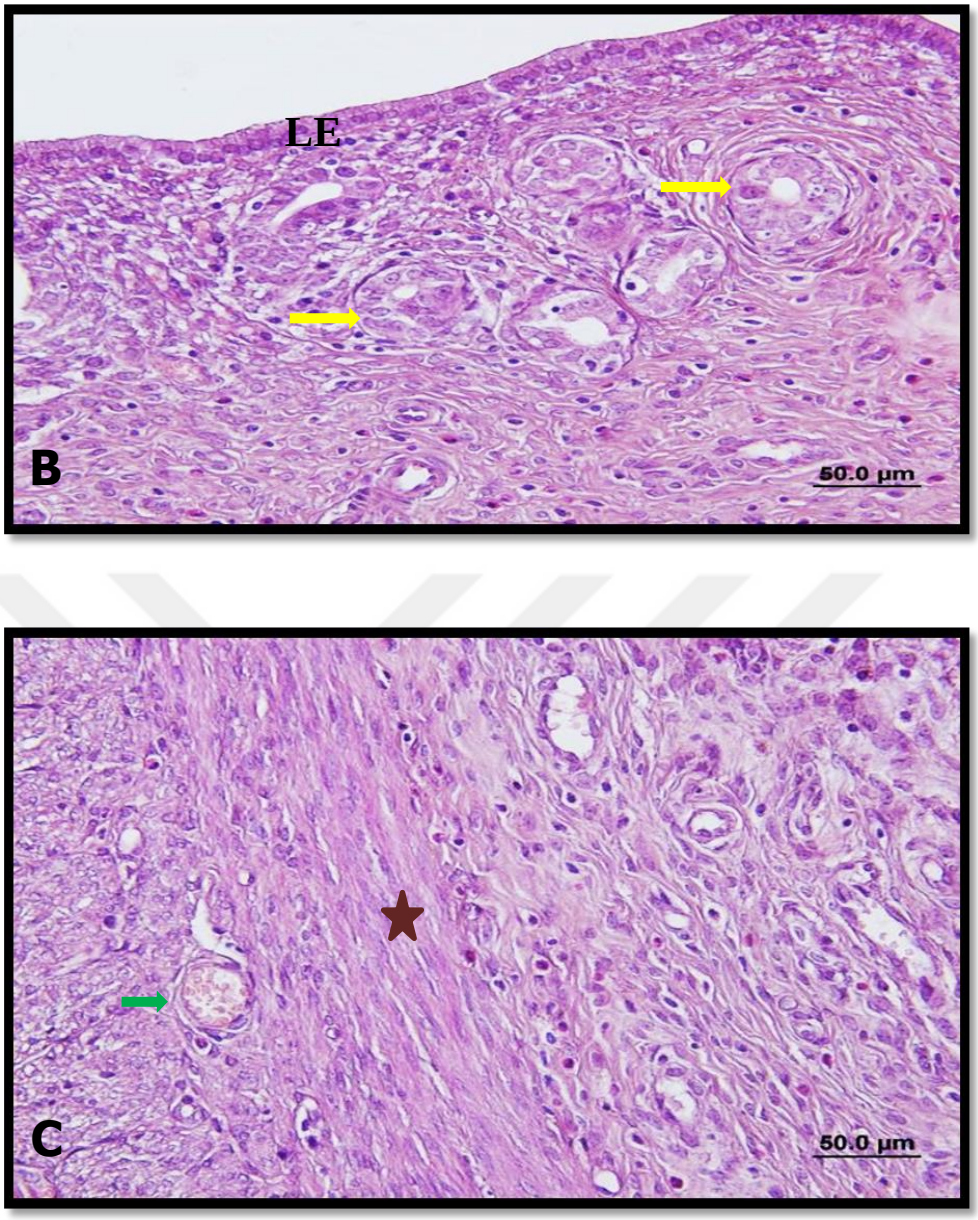
4.3.1. Hematoksilen Eosin Boyama Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ait uterus kesitleri incelendiğinde endometriyum tabakasında östrus evresine özgü belirgin katlantıların mevcut olduğu gözlendi. Epitel hücrelerinde nukleus genellikle bazalde ve oval şekilli idi. Fonksiyonalis tabakasında endometriyal bezler gözlemlendi.

Myometrium tabakasında fusiform şekilli kas liflerinin demetler oluşturduğu, bu kas lifi demetleri arasındaki interfasiküler alanda gevşek bağ dokusunun bulunduğu bunların normal görünümünde ve düzgün seyirli olduğu gözlemlendi.

Vasküler yapılar gevşek bağ doku içerisinde normal görünüme sahipti.





Şekil 7: Kontrol grubuna ait uterus kesiti görüntüleri.

A.Normal uterus görünümünde endometriyum ( ), myometriyum ( ), perimetriyum ( ) ve lümen (**L**) görüntüsü (X4).

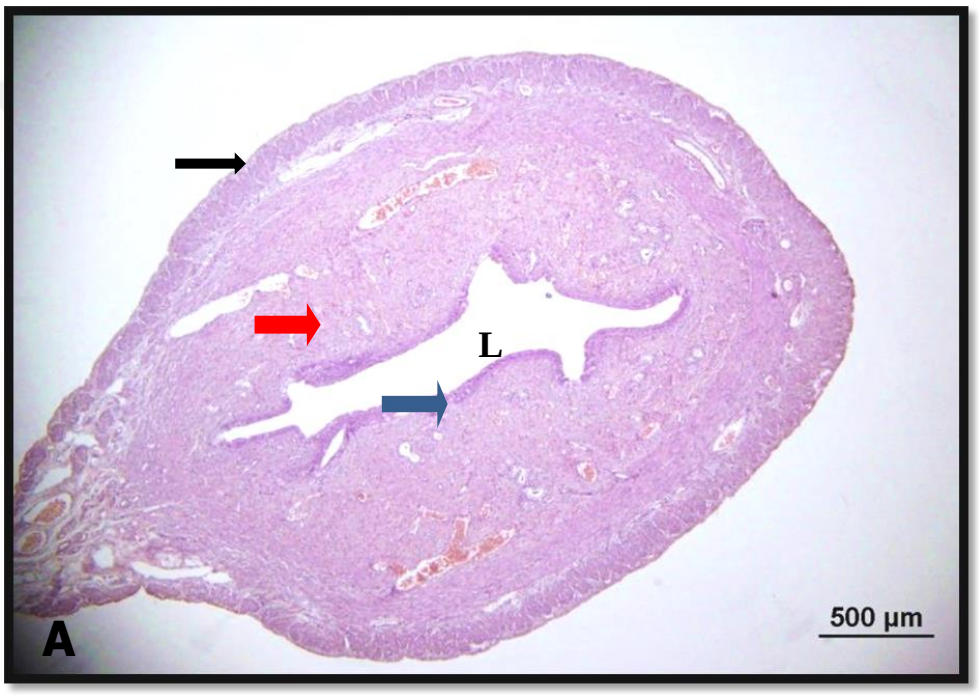
B. Düzgün seyreden lümen epiteli (**LE**) ve endometriyal bezlere ( ) ait bir görüntü (X40).

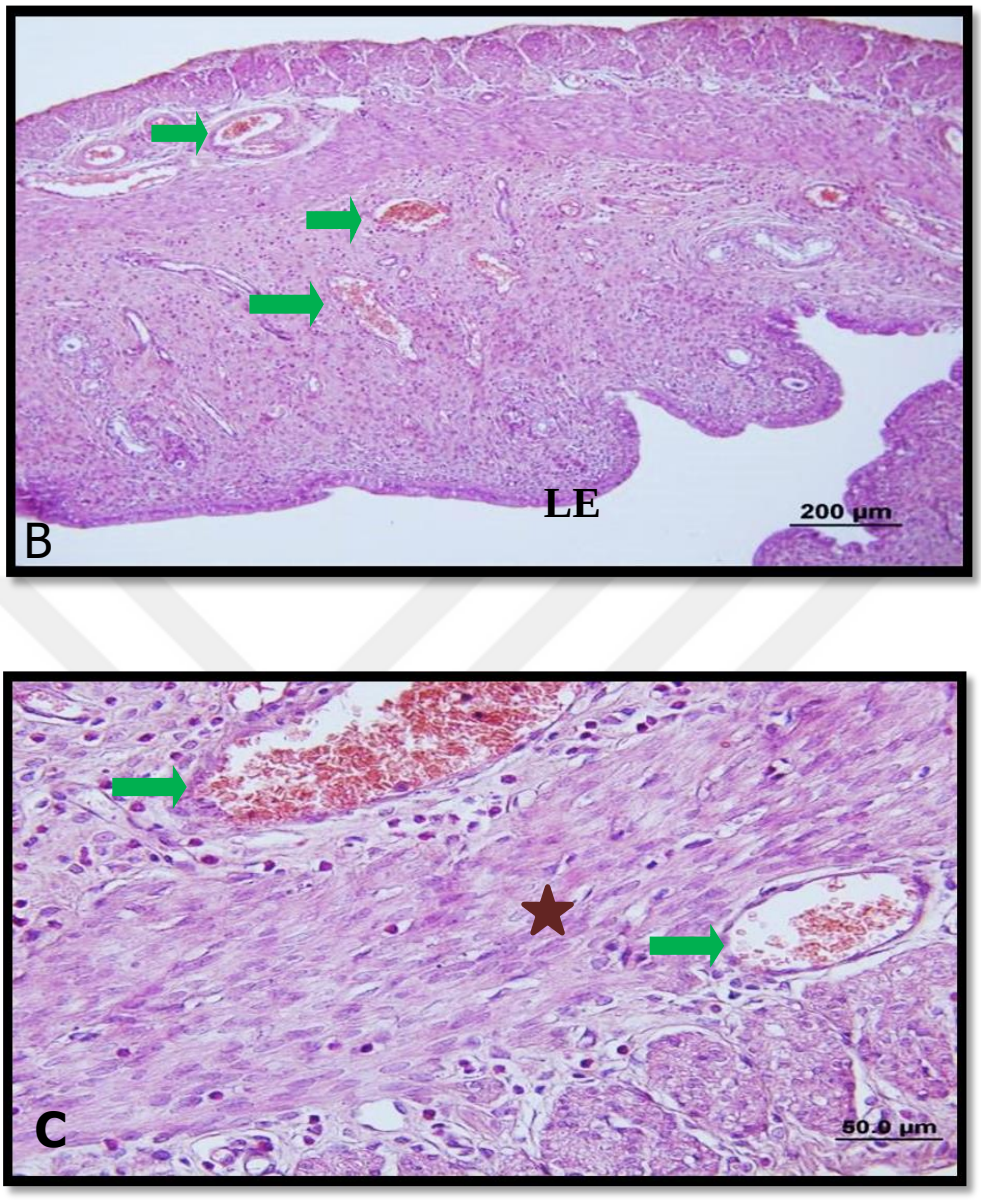
C. Normal görünümde bir damar ( ) ve düzgün seyreden kas lifi demetlerine ( ) ait bir görüntü (X40).

Etanol grubuna ait uterus kesitleri incelendiğinde endometriyum tabakasında epitel normal görünümünde ve normal seyrinde gözlemlendi.

Myometriyum tabakasında düz kas hücreleri düzgün seyirli ve normal görünümde idi.

Vasküler yapılarda kontrol grubuna nazaran artış olduğu gözlemlendi.





Şekil 8: Etanol grubuna ait uterus kesiti görüntüleri (H&E). A. Genel görünümde endometriyum ( ),myometriyum ( ),perimetriyum ( ) ve lümen(L) görüntüsü (X4).

B. Venöz konjesyon ( ) gösterilmiştir (X10).

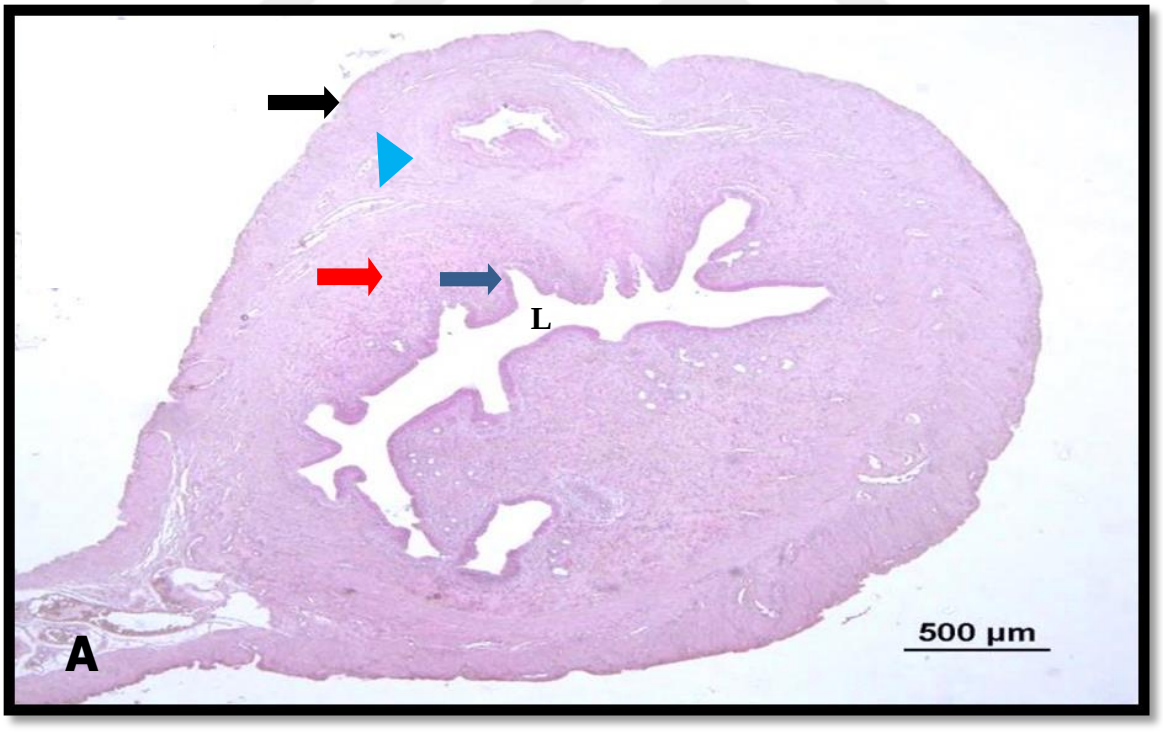
C. Venöz konjesyon ( ) ve düzgün seyreden düz kas lifleri ( ) gösterilmiştir (X40).

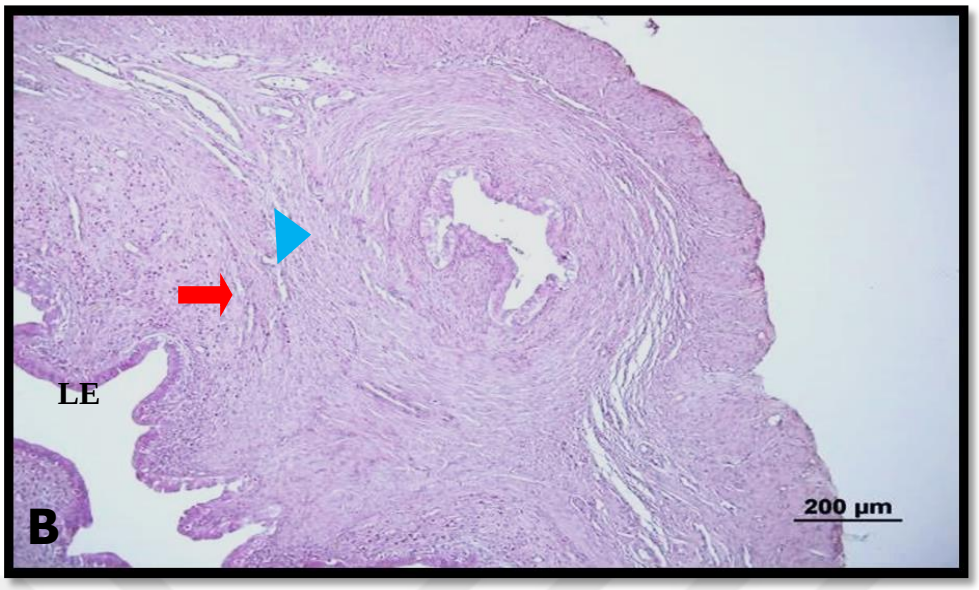
Leiomyoma grubuna ait uterus kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında myometriyumda kollajen artışına bağlı olarak dikkat çekici genişleme gözlendi. Myometriyal hipertrofi olduğu belirlendi (Şekil 10).

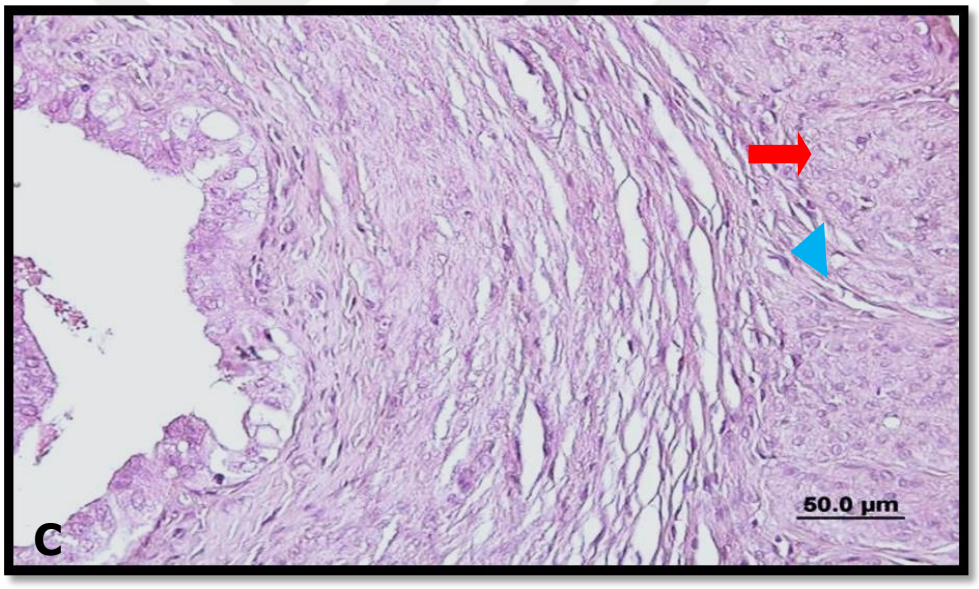
Leiomyoma grubuna ait bir örnekte myometriyal genişlemenin olduğu bölgede yeni bir uterus benzeri bir yapılanma olduğu gözlemlendi. Bu yapılanmanın kendine ait epiteli olduğu ve myometriyumunun genişlemiş myometriyum ile içiçe geçmiş olduğu gösterildi (Şekil 9).

Fokal ve multifokal atipi olduğu gösterildi. Miyositlerin vakualizasyonu leiomyomlu olgularda belirgin şekilde gösterildi (Şekil 11).

Vaskülarize bağ doku ile ayrılmış düz kas demetlerinin fasikül modeli sergilediği, eosinofilik ya da nadiren fibriler sitoplazmalı ve belirgin hücre zarları ile elonge olduğu gözlemlenmiştir. Perivasküler alanlarda da kollajenin arttığı gözlendi. Artan proliferasyon kaynaklı daha az nukleuslu nodül yapısı gözlendi (Şekil 12).





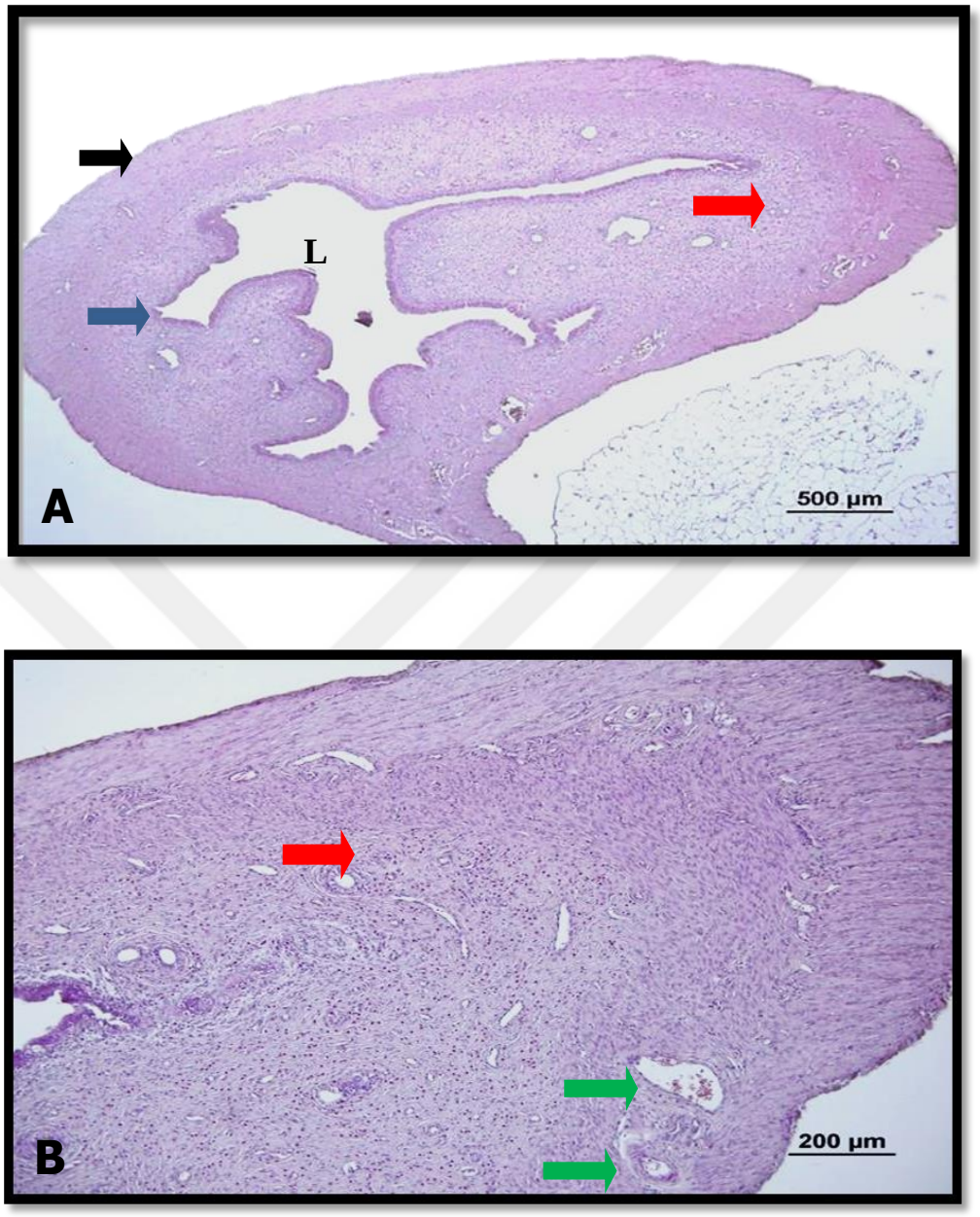


Şekil 9: Leiomyoma grubunda gözlenen yeni bir uterus benzeri yapılanmaya ait görüntüler(H&E).

A. Genel görünümde endometriyum ( ), myometriyum ( ), perimetriyum ( ),lümen (**L**) ve uterus benzeri yapılanma ( ) (X4).

B. Lümen epiteli(**LE**), uterus benzeri yapılanma ( ) ve myometriyum ( ) (X10).

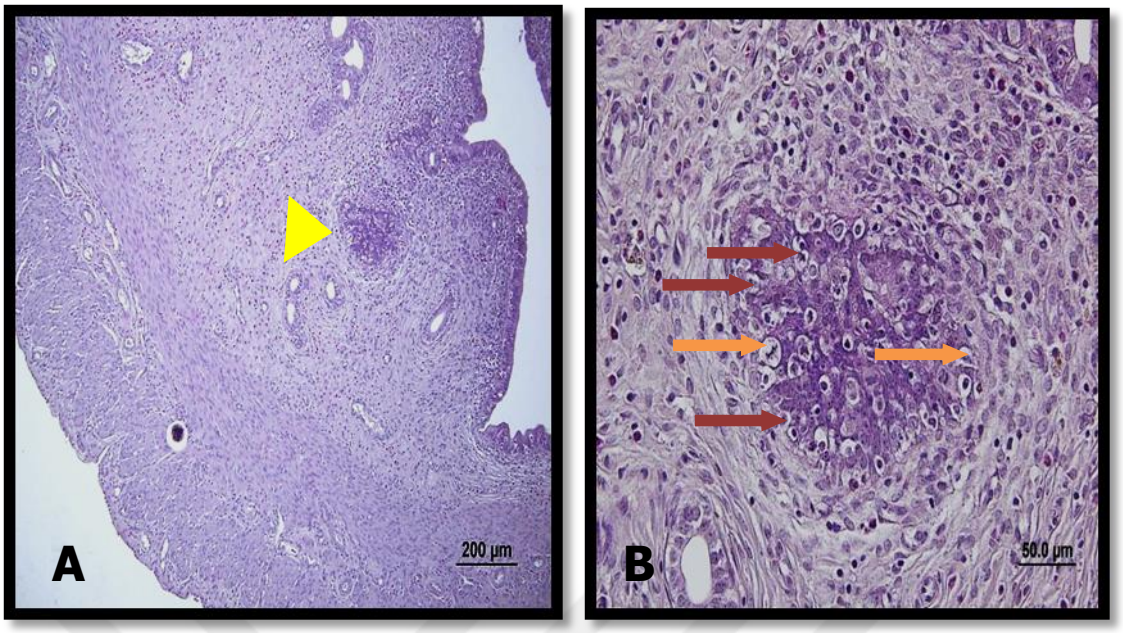
C. Uterus benzeri yapılanma ( ) ve ortak kullanılan myometriyum ( ) (X40).



Şekil 10: Leiomyoma grubunda genişlemiş myometriyuma ait görüntü(H&E).

A. Genişlemiş myometriyuma sahip leiomyomalı uterusun genel görünümünde endometriyum ( ), genişlemiş myometriyum ( ), perimetriyum ( ) ve lümen (**L**) (X4).

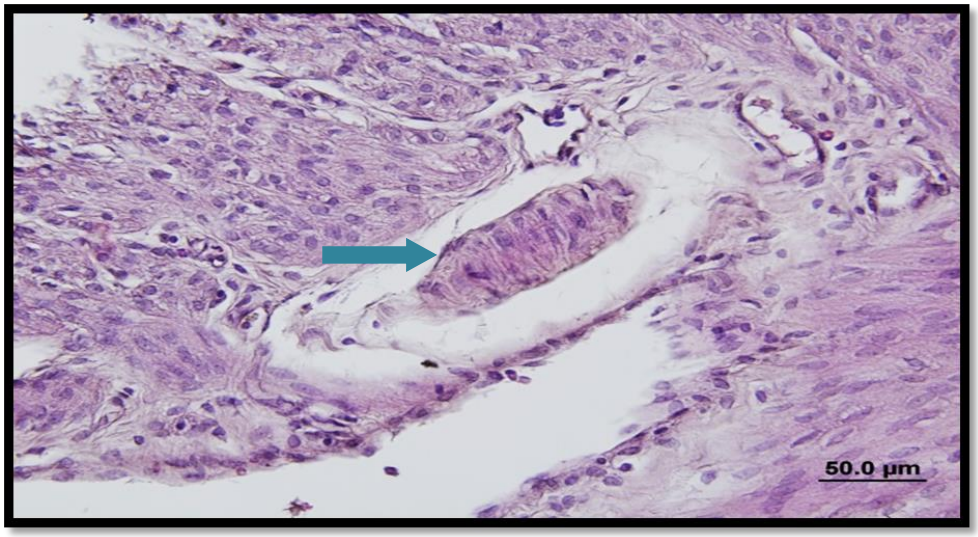
B. Genişlemiş myometriyumda myometriyal hipertrofi ( ) ve kan damarları ( ) (X10).



Şekil 11: Leiomyoma grubunda atipik leiomyomanın görüntüleri (H&E).

A. Atipik leiomyoma hücrelerinin oluşturduğu fibroid yapı ( ) (X10).

B. Atipik leiomyoma hücreleri ( ) ve vakuoller ( ) (X40).



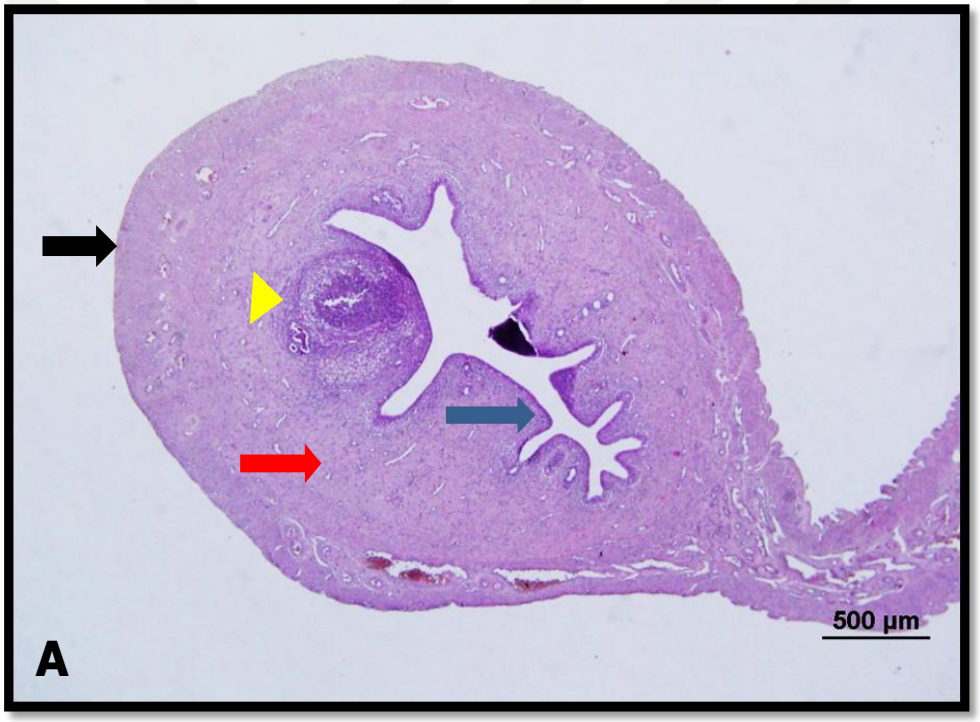
Şekil 12: Uterus leiomyoması grubunda nodül yapısının görüntüsü (H&E). Artan proliferasyon kaynaklı oluşan nodül yapısı ( ) (X40)

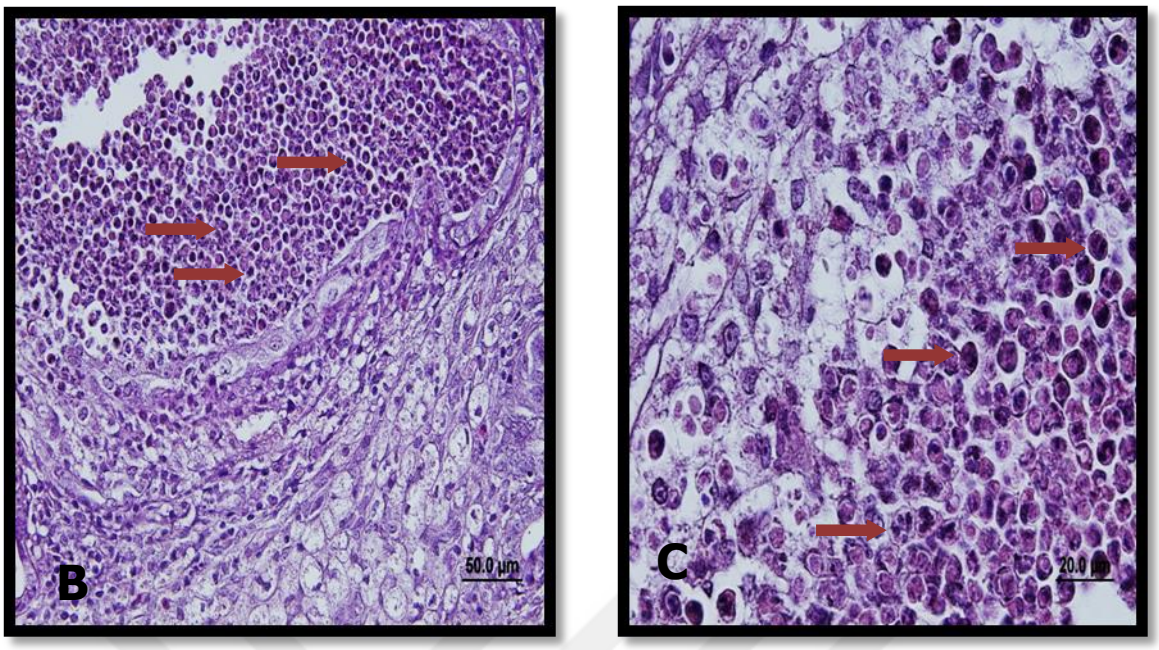
Leiomyoma oluşturulup mısıryağı verilen gruba ait uterus kesitleri leiomyoma ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında leiomyoma grubuna benzer bulgular gözlendi.

Leiomyoma+mısıryağı grubunda myometriyal hipertrofi olduğu, buna bağlı olarak myometriumda kontrol grubuna nazaran genişleme olduğu görüldü.

Leiomyoma grubuna benzer şekilde fokal ve multifokal atipi olduğu gösterildi.Miyositlerin vakualizasyonu leiomyoma grubunda gösterildiği şekilde mısıryağı verilen grupta da gözlendi (Şekil 14).

Büyük yuvarlak ya da poligonal şekilli eosinofilik hücrelerin görüldüğü epiteloid leiomyoma bulguları belirlendi (Şekil 13). Ayrıca endometriyum tabakasında epitel hiperplazisi de gözlenmiştir (Şekil 15).



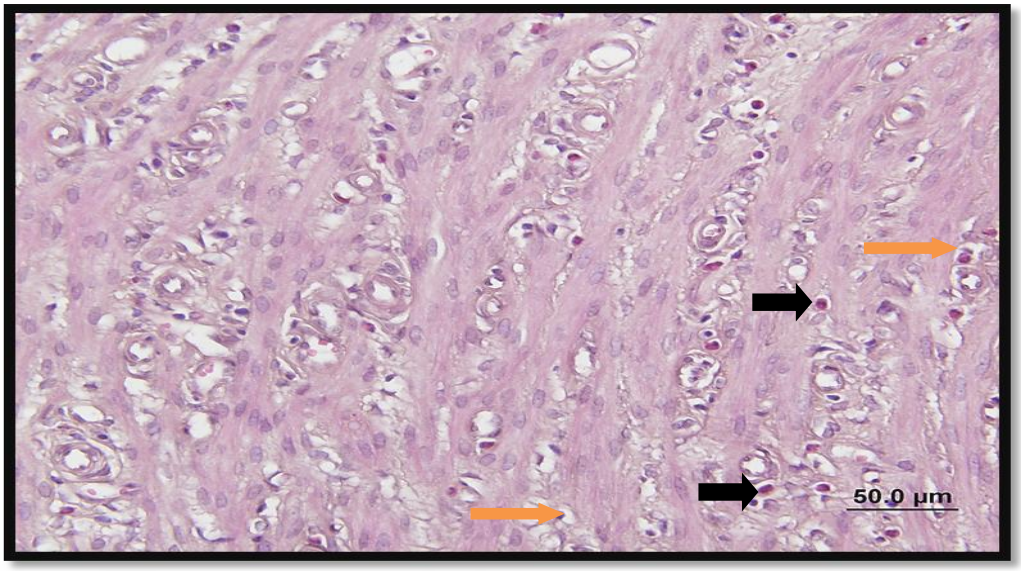


Şekil 13: Leiomyoma+mısır yağı grubuna ait uterus görüntüleri (H&E).

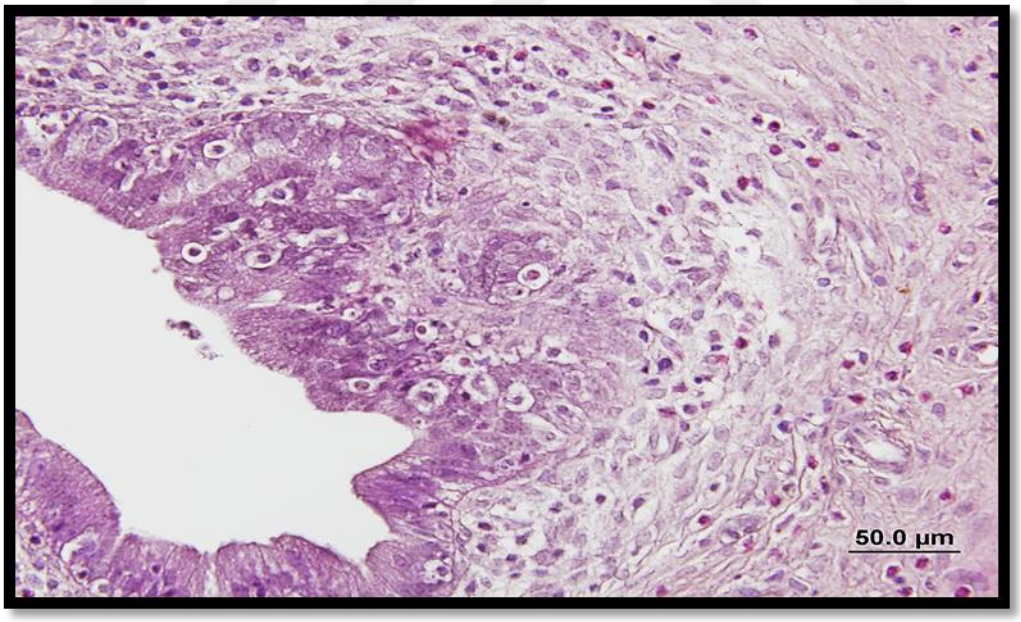
A. Genel görünümde endometriyum ( ), myometriyum ( ), perimetriyum ( ),lümen (**L**) ve epiteloid leiomyoma hücrelerinin oluşturduğu fibroid yapı ( ) (X4).

B. Epiteloid leiomyoma hücreleri ( ) (X40).

C. Epiteloid leiomyoma hücreleri ( ) (X100).



Şekil 14: Leiomyoma+mısıryağı grubunda atipik leiomyomanın görüntüsü (H&E). Düz kas hücreleri arasında artmış atipik leiomyoma hücreleri (➡) ve vakuoller (➡) (X40).

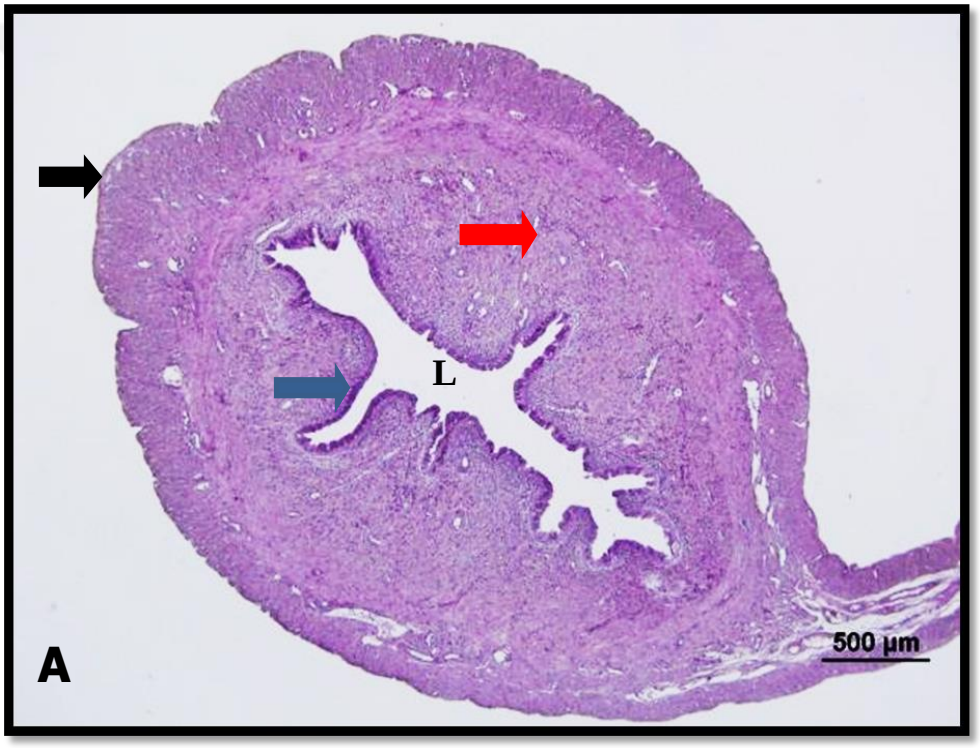


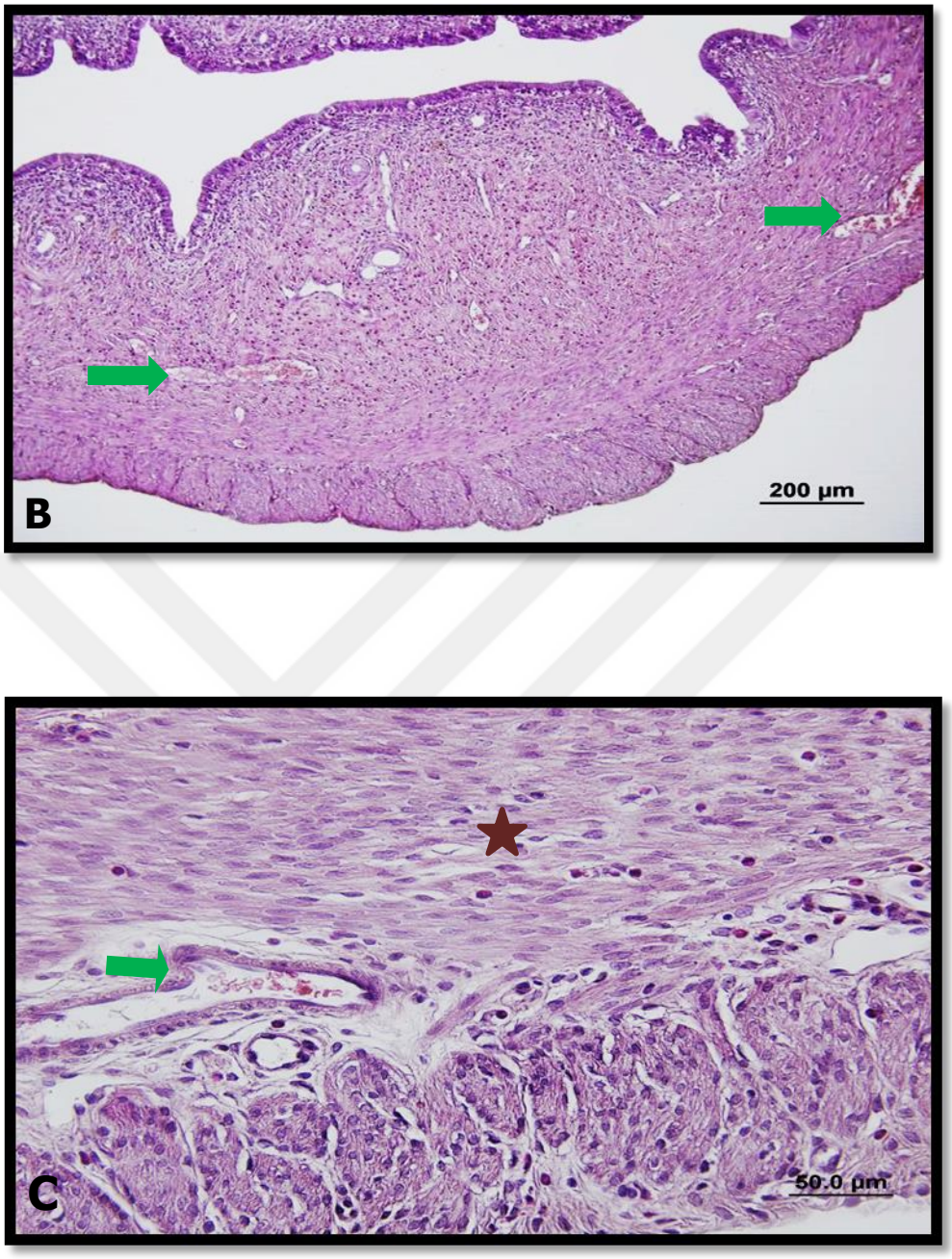
Şekil 15: Leiomyoma+mısıryağı grubunda epitel hiperplazisinin görüntüsü (H&E) (X40).

Leiomyoma oluştulduktan sonra kurkumin verilen gruptan alınan uterus kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna yakın veriler gözlemlendi.

Myometriyum tabakasında hücrelerin leiomyoma grubuna nazaran daha düzgün seyirli olduğu gözlemlendi. Normal morfolojisine yakın görünümde olan myometriyal hücrelerin fusiform şekilli kas lifi demetlerini oluşturduğu görüldü.

Vasküler yapılarda leiomyoma grubuna göre artış olduğu gözlemlendi.





Şekil 16: Uterus leiomyoma+kurkumin grubuna ait kesit görüntüleri(H&E).

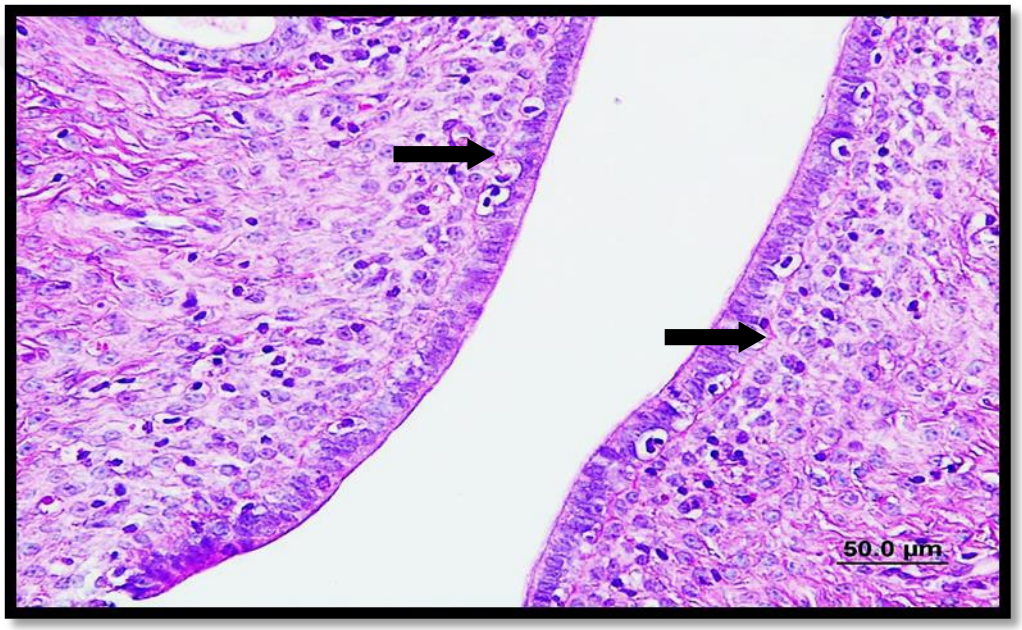
A. Genel görünümde endometriyum ( ), myometriyum ( ), perimetriyum ( ) ve lümen (**L**) görüntüsü (X4).

B. Vasküler yapılar (**)** gösterilmiştir (X10).

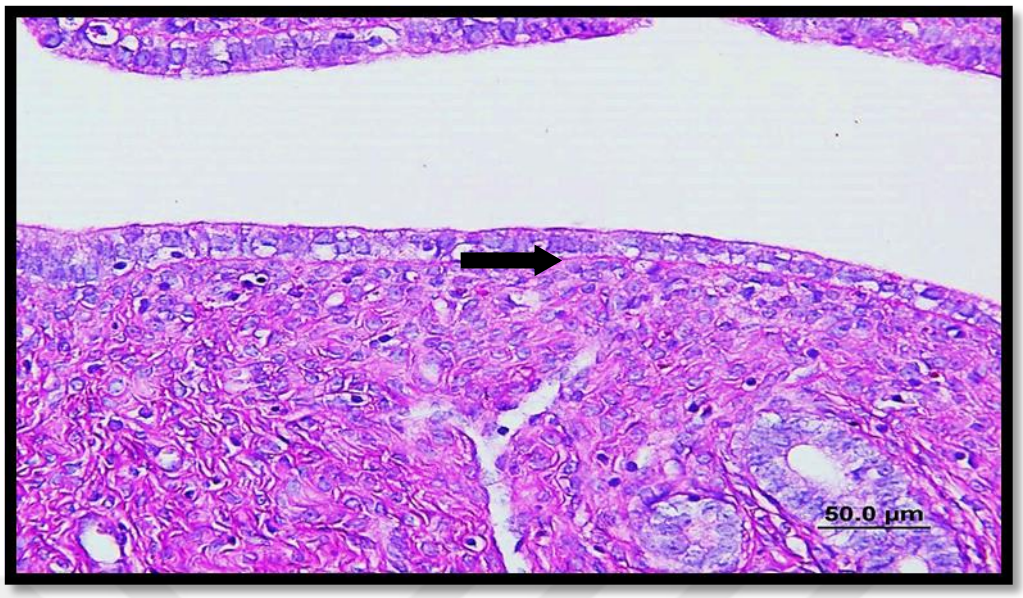
C. Vasküler yapılar ( ) ve düzgün seyreden düz kas lifleri ( ) gösterilmiştir (X40).

4.3.3. PAS (Periyodik Asit-Schif) Boyama Değerlendirmesi

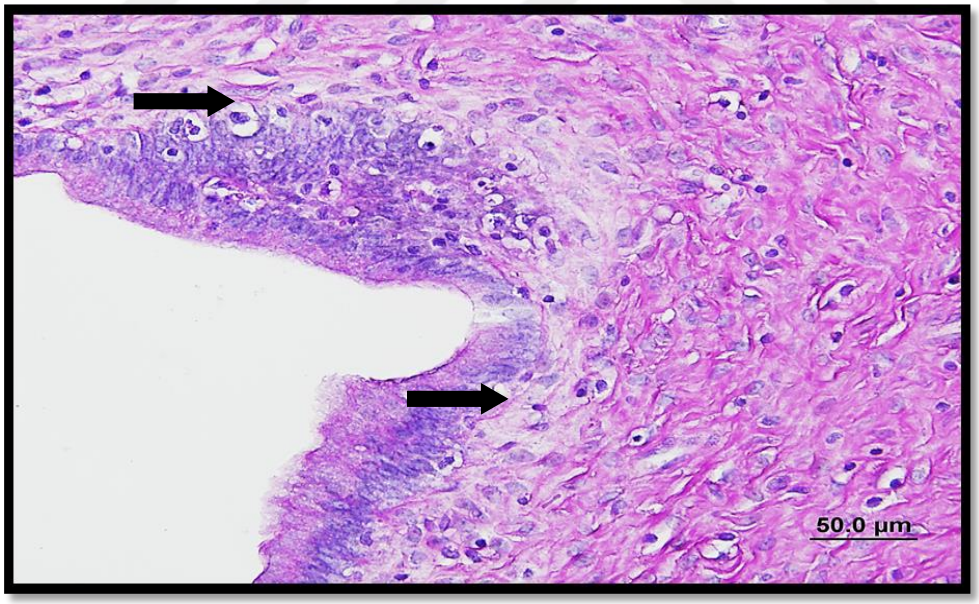
Çalışmamızda bazal membran ondülasyonunu belirlemek amacıyla PAS boyama yapılmıştır. Kontrol, etanol ve leiomyoma+kurkumin grubunda epitel düzgün görünümde, bazal membran ondülasyonu düzgün ve normal seyrinde ilerlediği izlendi. Ancak leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı verilen gruplarda epitelde hiperplazi gözlendi ve buna bağlı olarak da bazal membran ondülasyonunun bozulduğu ve düzgün seyirli ilerlemediği gözlendi.



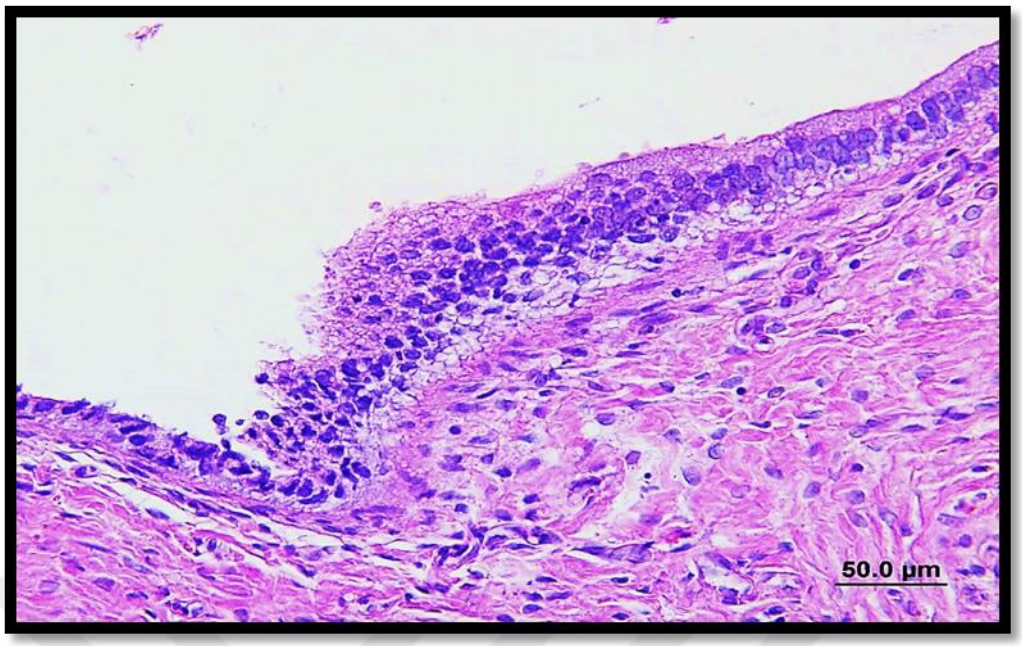
Şekil 17: Kontrol grubuna ait PAS boyama (X40). Bazal membran (➡) gösterildi.



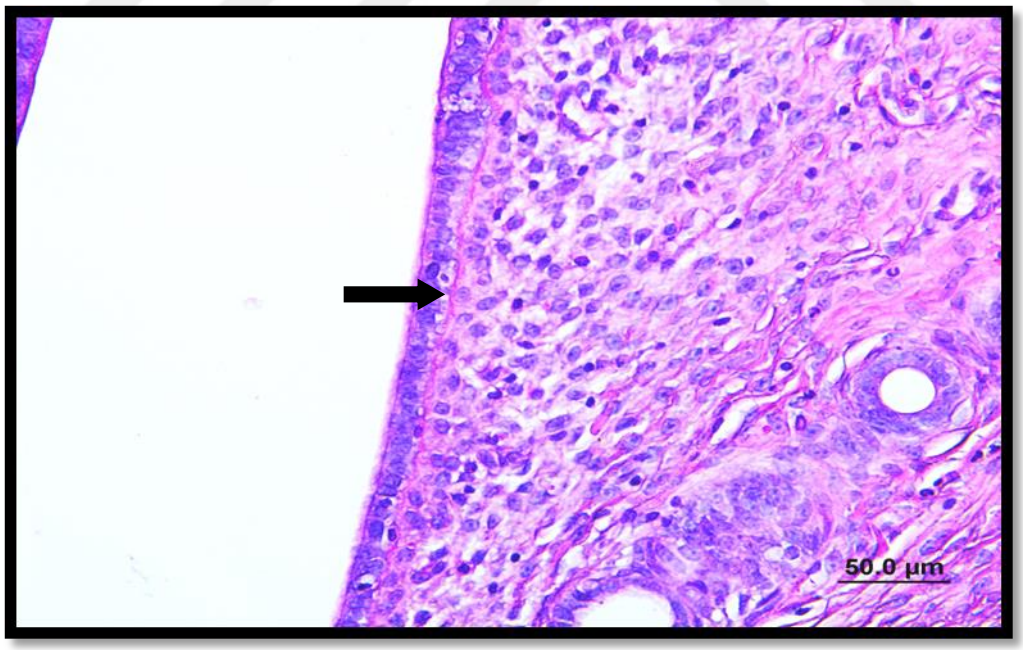
Şekil 18: Etanol grubuna ait PAS boyama (X40). Bazal membran (➡) gösterildi.



Şekil 19: Leiomyoma grubuna ait PAS boyama (X40). Bazal membran (➡) gösterildi.



Şekil 20: Leiomyoma+mısıryağı gurbuna ait PAS boyama (X40).



Şekil 21: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait PAS boyama (X40). Bazal membran (➡) gösterildi.

4.3.2. Masson Trikrom Boyama Değerlendirilmesi

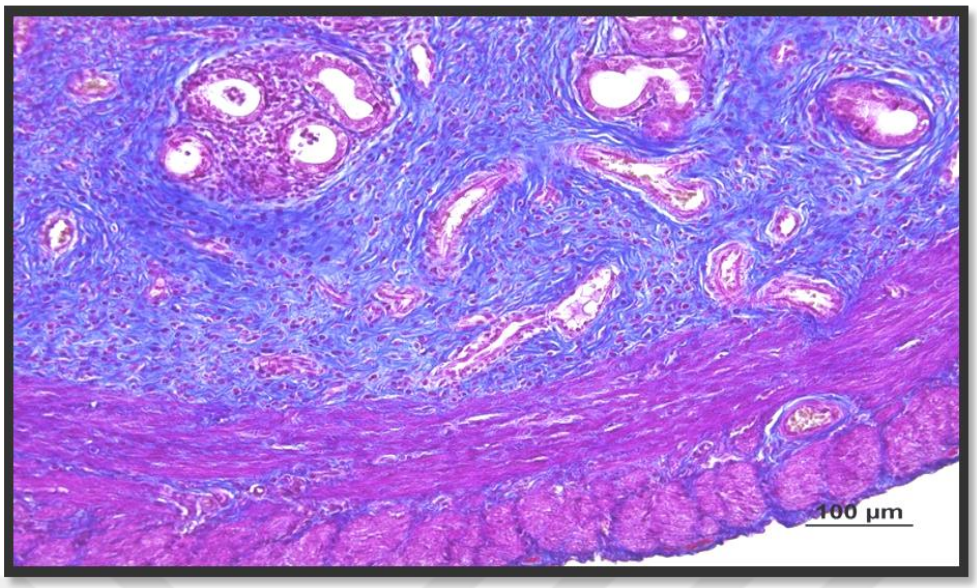
Kontrol grubuna ait uterus kesitleri Masson Trikrom boyama yöntemi ile boyanarak incelendiğinde kollajen liflerin mavi renkte, kas liflerinin ise kırmızı renkte boyandığı görüldü. İnterfasiküler alanlarda kollajen liflerin ve bağ dokusuna ait hücre nukleuslarının olduğu gözlemlendi. Ayrıca interfasiküler alanlarda vasküler yapıların normal morfolojide olduğu gözlendi. Miyositlerin düzgün seyirli olduğu ve normal morfolojik özelliklerine uygun olarak iğsi şekilli ve oval merkezi konumlu nukleusa sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 22).

Etanol grubuna ait uterus kesitleri incelendiğinde düz kas liflerinin düzgün seyirli ve düz kas hücrelerinin normal morfolojide oldukları gözlendi. Kollajen liflerinin perivasküler alanlarda artış gösterdiği myometriumun genelinde ise kontrol grubu ile benzer görünümde olduğu gözlendi (Şekil 23).

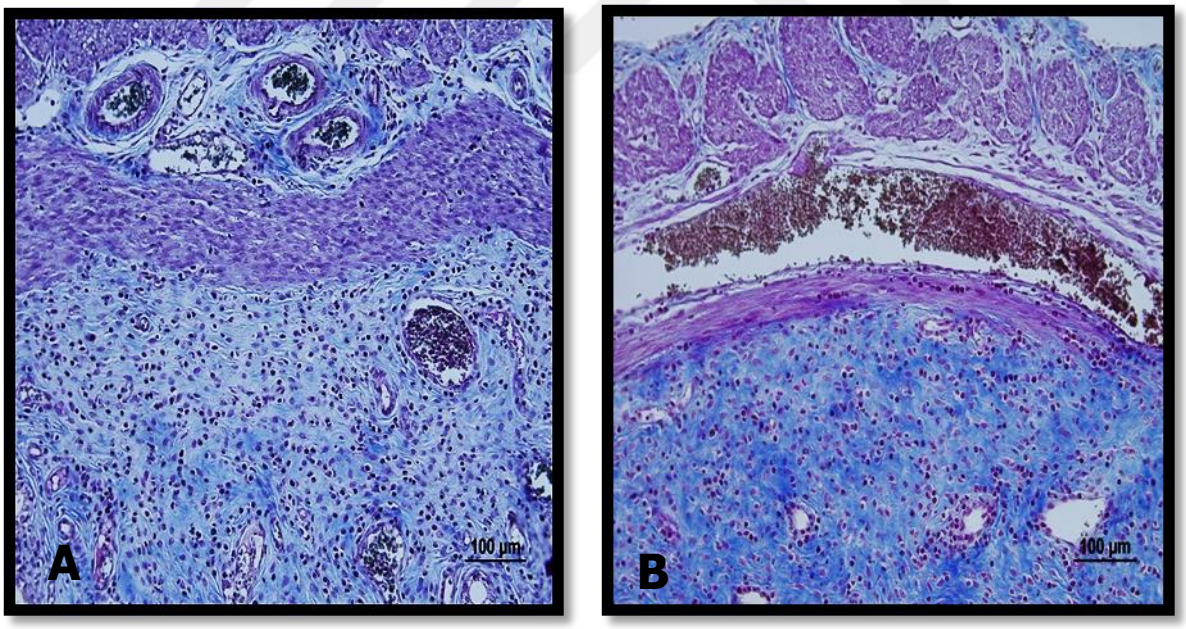
Leiomyoma grubuna ait uterus kesitleri incelendiğinde miyositlerin normal myometriyum dokusundakine göre değişim göstererek fibroblast benzeri bir yapılanma kazandığı gözlendi. Miyositlerde atrofi nedeniyle deformasyon ve vakuolizasyon olduğu gözlendi. Leiomyomlu dokularda kollajen birikiminin değişken biçimde interfasiküler, intrafasiküler ya da bu ikisinin bir arada görüldüğü gözlendi. İnterfasiküler alanlar mavi renkte boyandı. İnterfasiküler alanlarda ve perivasküler alanlar etrafındaki kollajen birikiminin kontrol grubuna nazaran artış gösterdiği gözlendi (Şekil 24).

Leiomyoma oluşturulduktan sonra mısır yağı verilen gruba ait uterus kesitleri incelendiğinde leiomyoma grubuna ait bulgular ile benzerlik gösterdiği gözlendi (Şekil 25).

Leiomyoma oluşturulduktan sonra kurkumin verilen grupta leiomyom grubuna göre kollajen miktarında azalma olduğu, düz kas liflerinin düzgün seyirli olduğu, vasküler yapıların kontrol grubu ile benzer görünümde olduğu gözlendi (Şekil 26).



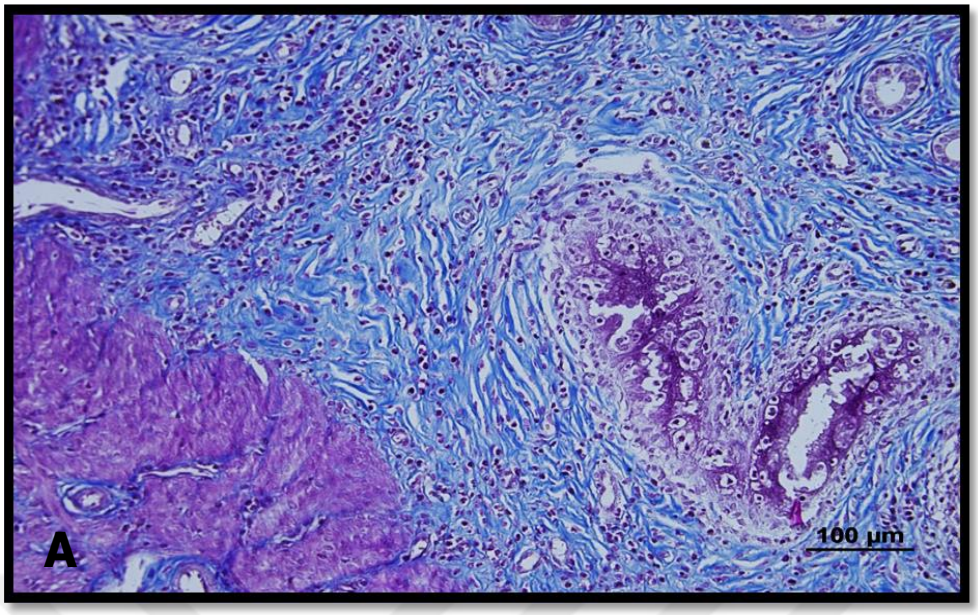
Şekil 22: Kontrol grubuna ait Masson Trikrom boyama (X20).

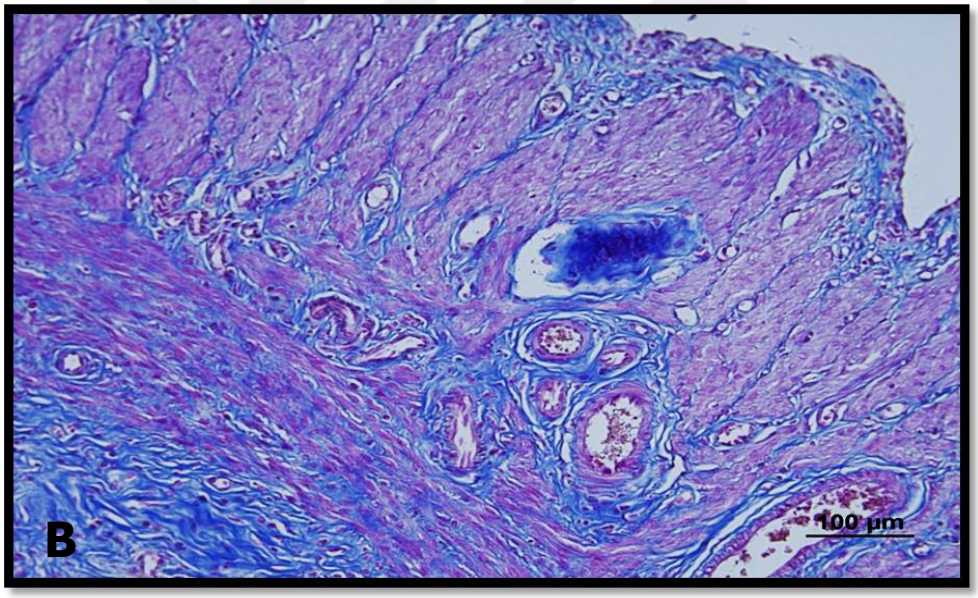


Şekil 23: Etanol grubunua ait Masson Trikrom boyama (X20).

A. Perivasküler alanlarda kollajen liflerinin artış gösterdiği gösterilmiştir.

B. Normal görünümde myometriyum ve vasküler yapı gösterilmiştir.

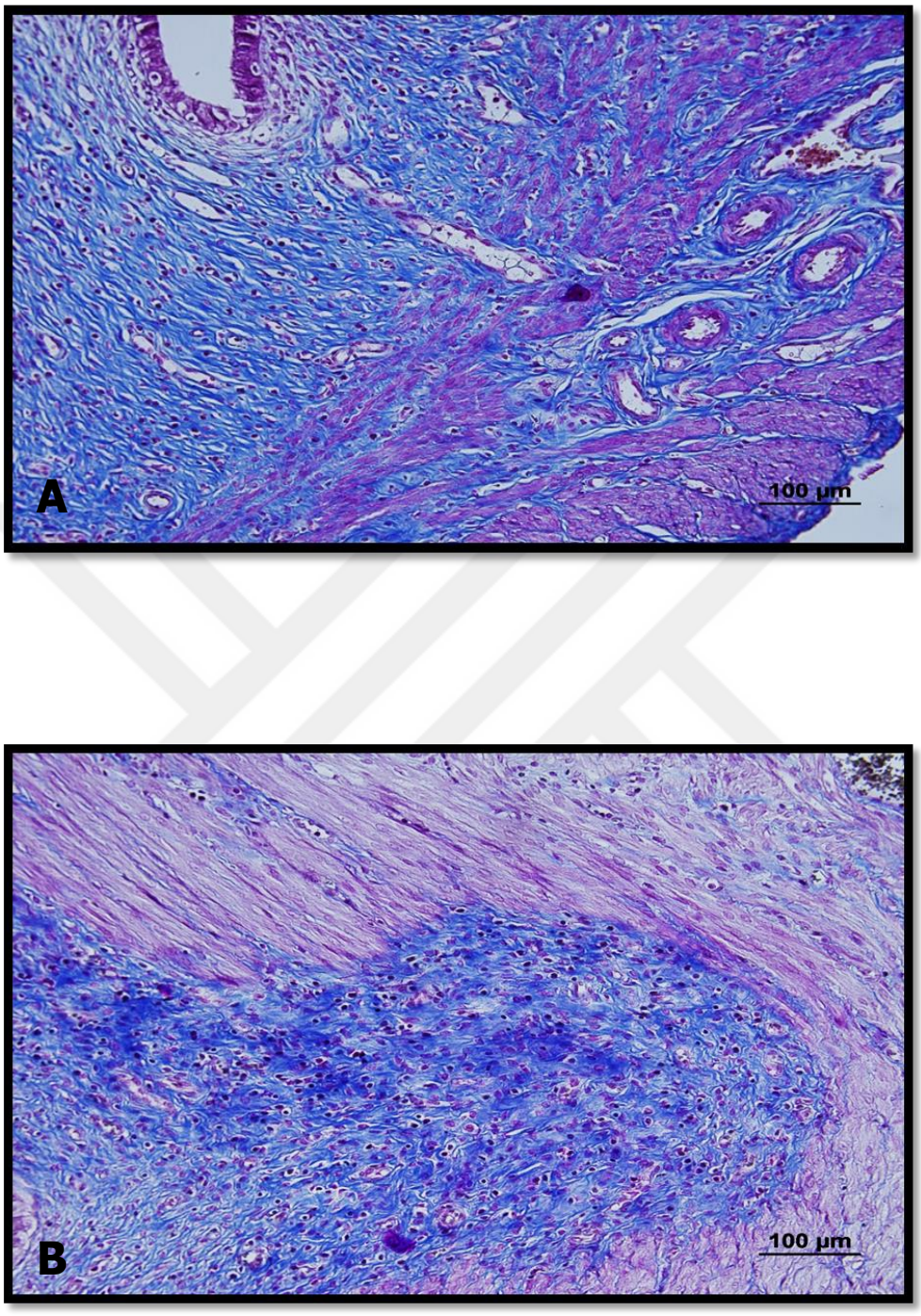




Şekil 24: Leiomyoma grubuna ait Masson Trikrom boyama (X20).

A. Miyositlerde atrofi nedeniyle görülen deformasyon ve vakuolizsayon gösterimiştir.

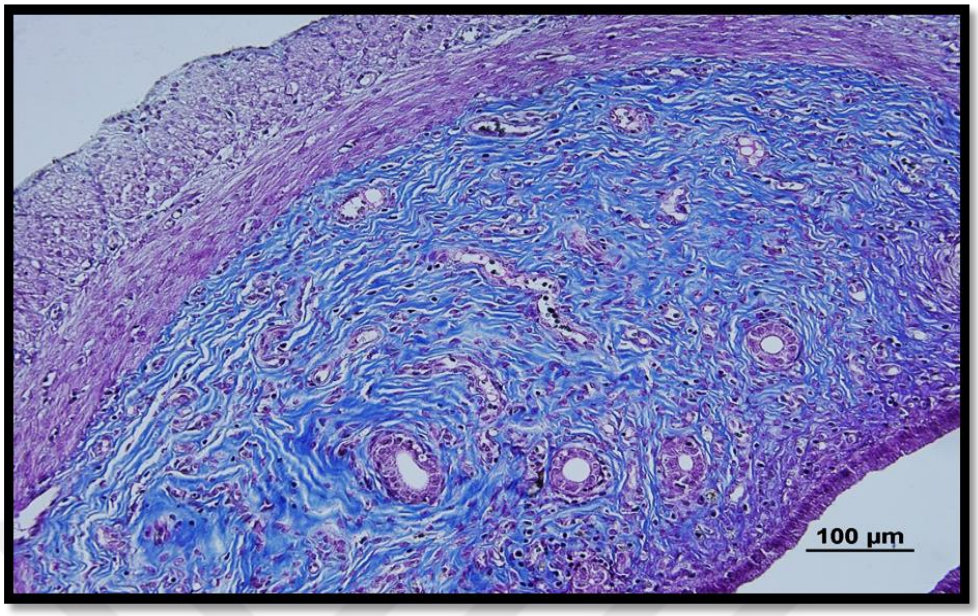
B. İnterfasiküler ve intrafasiküller arası kollajen birikimi gösterilmiştir.



Şekil 25: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait Masson Trikrom boyama (X20).

A. İnterfasiküler ve intrafasiküler kollajen birikimi gösterilmiştir.

B. Kollajen artışı gösterilmiştir.



Şekil 26: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait Masson Trikrom boyama (X20).

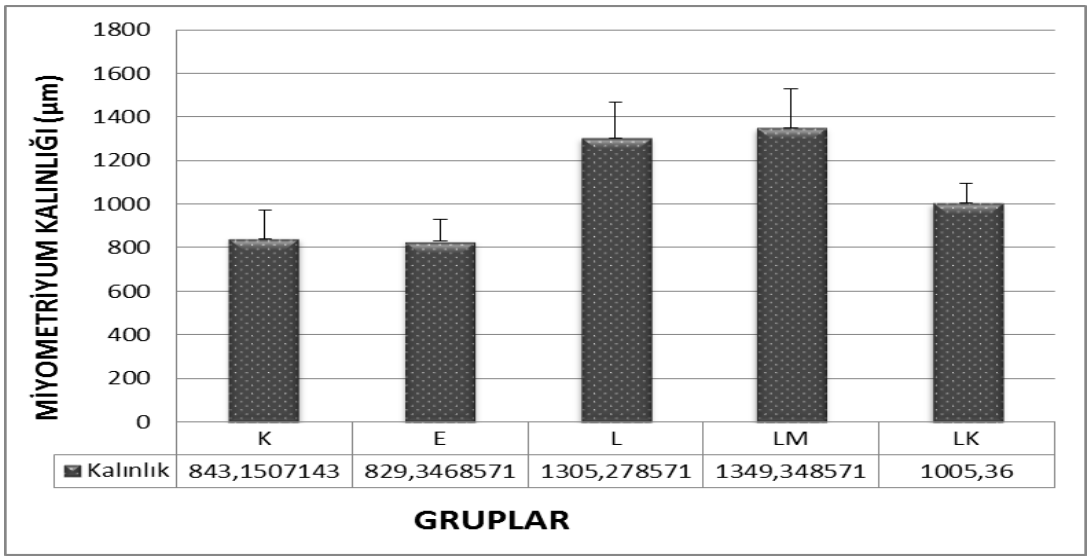
4.4. Morfometrik Değerlendirme

4.4.1. Myometriyum Kalınlığının Değerlendirilmesi

Uterus parafin bloklarından 5µm'lik kesitler alındı. Mikroskopta en küçük büyütmede (X4) UTHSCSA ImageTool Version 3.0 programı kullanılarak beş farklı myometriyum bölgesinden kalınlık ortalamaları hesaplandı. Gruplar arasındaki myometriyal kalınlığın belirlenmesi amacı ile tüm gruplardan her deneğe ait uterus kesitleri değerlendirildi.

Hesaplamalara göre gruplara ait myometriyum kalınlıkları; kontrol grubunda(Grup1) 843,15±130,34, etanol grubunda(Grup2) 829,34±99,81, leiomyoma grubunda(Grup3) 1305,27±161,81, leiomyoma+mısıryağı gubunda(Grup4) 1349,34±181,35, leiomyoma+kurkumin grubunda(Grup5) 1005,36±94,50 olarak hesaplanmıştır.(Şekil 25)

İstatistiksel olarak tüm gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis Testi kullanılarak değerlendirildiğinde p=0,000 değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkişerli gruplar arasındaki myometriyum kalınlıkları Mann-Whitney U Testi kullanılarak elde edilen değerler karşılaştırıldığında Grup1 ve Grup2 arasında (p=0,749), Grup1 ve Grup5 arasında(p=0,064) ve Grup3 ve Grup4 arasında (p=0,565) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı; ancak Grup1 ve Grup 3arasında(p=0,002), Grup1 ve Grup4 arasında(p=0,003), Grup2 ve Grup3 arasında(p=0,002), Grup2 ve Grup4 arasında(p=0,002), Grup2 ve Grup5 arasında(p=0,035), Grup3 ve Grup5 arasında(p=0,002) ve Grup4 ve Grup5 arasında(p=0,002) istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olduğu bulundu.(Tablo 9)



Şekil 27: Gruplar arası myometriyum kalınlık oranları

Tablo 9: Myometriyum kalınlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

Gruplar	Değerler (p-*value*)	Sonuçlar
Grup1-Grup2	0,749	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup1-Grup3	**0,002***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup4	**0,003***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup5	0,064	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup2-Grup3	**0,002***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup4	**0,002***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup5	**0,035***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup3-Grup4	0,565	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup5	**0,002***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup4-Grup5	**0,002***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1. Ki-67 Boyama Değerlendirmesi

Ki-67 insanlarda Mki67 gen (monoklonal antikor tarafından tanımlanan antijen) ile kodlanan bir proteindir. Ki-67 bir hücre proliferasyon belirtecidir. Ki-67 , belirli bir hücre popülasyonunun büyüme oranını belirlemek için iyi bir işaretleyici olarak kullanılabilir.

Histokimyasal bulgulara ek olarak gruplar arasındaki proliferasyon değişikliklerini belirlemek amacı ile Ki-67 boyama yöntemi kullanıldı. Parafin bloklardan 5 μm kalınlıkta alınan uterus kesitleri Ki-67 antikoru ile avidin-biotin complex(ABC) yöntemi ile boyanarak değerlendirildi.

İstatistiksel ve semikantitatif değerlendirmeler için preparatlardan hücre yoğunluğu fazla her beş alanda X100'lük büyütmede immün pozitif hücre sayımı yapıldı.

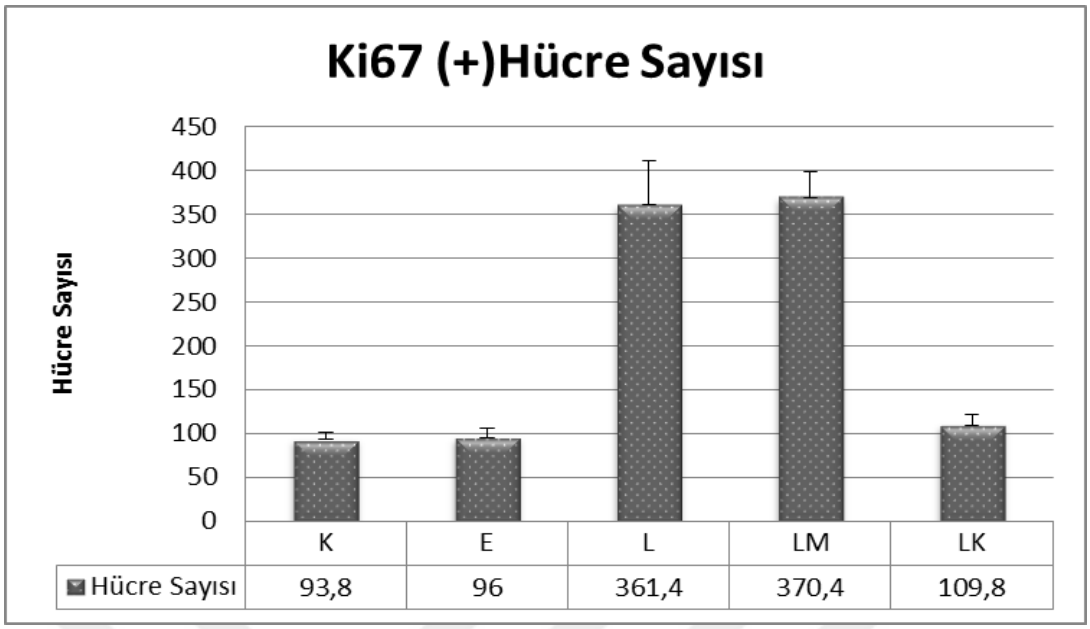
Etanol grubunda kontrol grubuna göre immün pozitif hücre sayısında artış gözlenmezken leiomyoma ve leiomyoma oluşturulduktan sonra mısır yağı verilen gruplarda artış olduğu gözlendi. Leiomyoma oluşturulduktan sonra kurkumin verilen grupta leiomyoma gubuna göre Ki-67 pozitif hücrelerde azalma olduğu gözlendi.

Hesaplamalara göre gruplara ait Ki-67 pozitif hücre sayısı; kontrol grubunda(Grup1) 93,8±6,82 , etanol grubunda(Grup2) 96±10,19, leiomyoma grubunda(Grup3) 361,4±49,83, leiomyoma+mısıryağı gubunda(Grup4) 370,4±27,63, leiomyoma+kurkumin grubunda(Grup5) 109,8±11,6 olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel olarak tüm gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis Testi kullanılarak değerlendirildiğinde p=0,001 değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkişerli gruplar arasındaki myometriyum kalınlıkları Mann-Whitney U Testi kullanılarak karşılaştırıldığında Grup1 ve Grup2 arasında (p=0,590), Grup1 ve Grup5 arasında(p=0,072) , Grup2 ve Grup5 arasında(p=0,138) ve Grup3 ve Grup4 arasında (p=0,754) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı; ancak Grup1 ve Grup 3arasında(p=0,009), Grup1 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup3 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup3 ve Grup5 arasında(p=0,009) ve Grup4 ve Grup5 arasında(p=0,009) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu.(Tablo 10)

Tablo 10: Ki-67 immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

Gruplar	Değerler (p-*value*)	Sonuçlar
Grup1-Grup2	0,590	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup1-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup5	0,072	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup2-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup5	0,138	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup4	0,754	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup4-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**

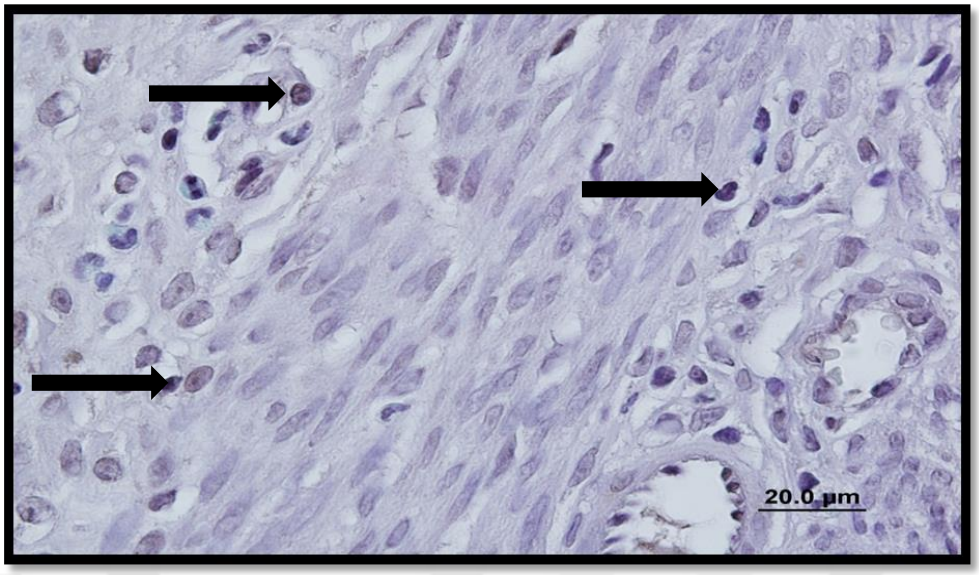


Şekil 28: Ki-67 pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması.

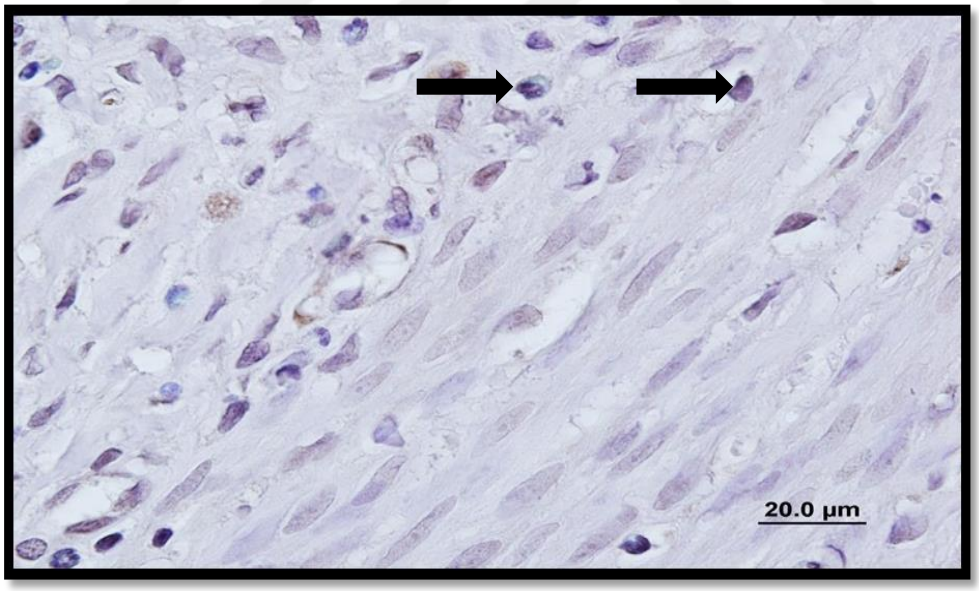
Çift kör olarak sayılan Ki-67 pozitif hücreler semikantitatif olarak değerlendirildi. Seminkantitatif değerlendirmede kontrol değeri 1 olarak kabul edildi ve buna bağlı olarak diğer grupların 1-3 arası değerleri hesaplandı.(Tablo 11)

Tablo 11: Ki-67 Semikantitatif Değerlendirme

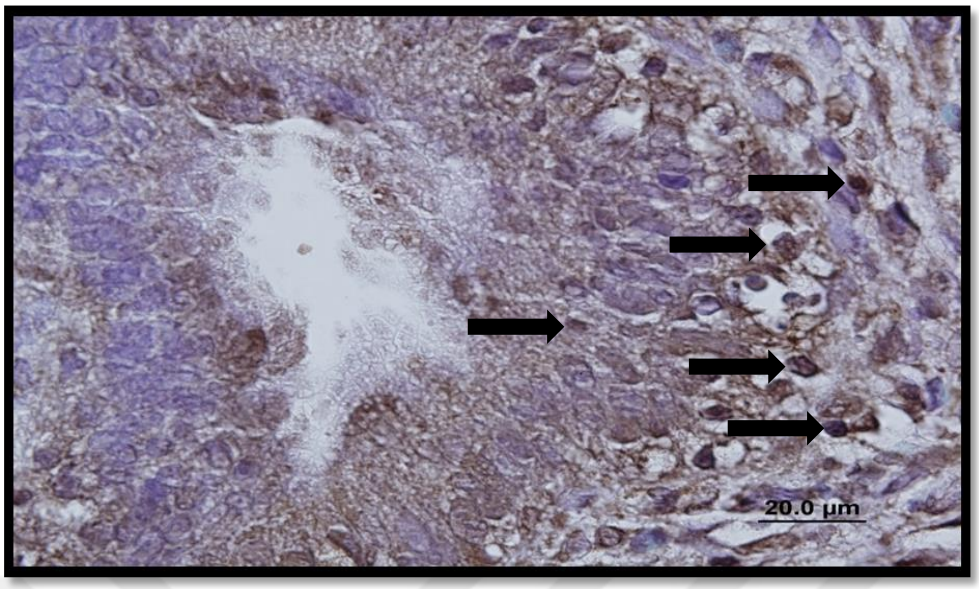
Gruplar	**Ki-67 Semikantitatif Değerlendirme Sonuçları**	**Skor**
Kontrol	1	1
Etanol	1,02	1
Leiomyoma	3,88	4
Leiomyoma+Mısıryağı	3,94	4
Leiomyoma+Kurkumin	1,17	1



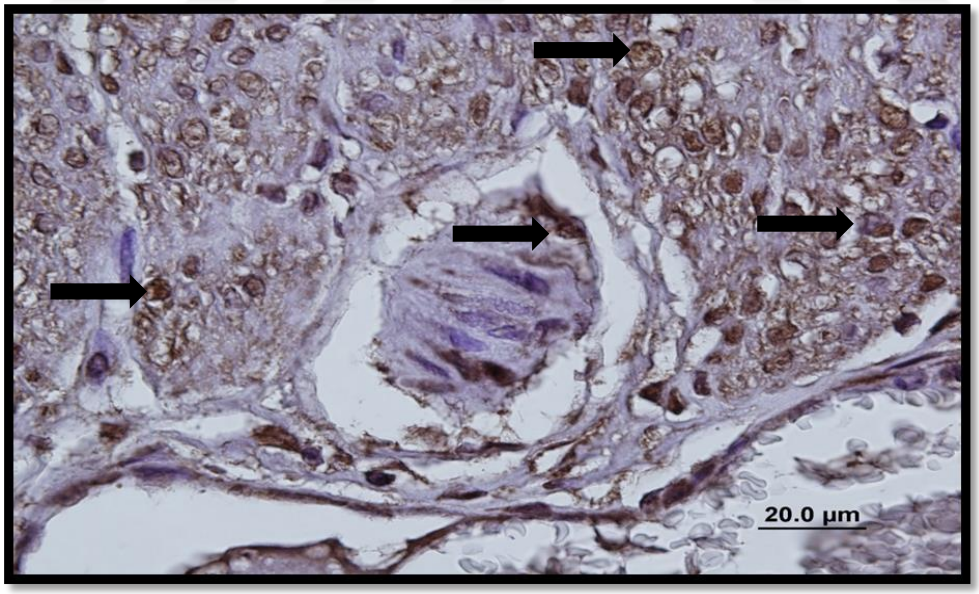
Şekil 29: Kontrol grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama (X100). Ki-67 pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.



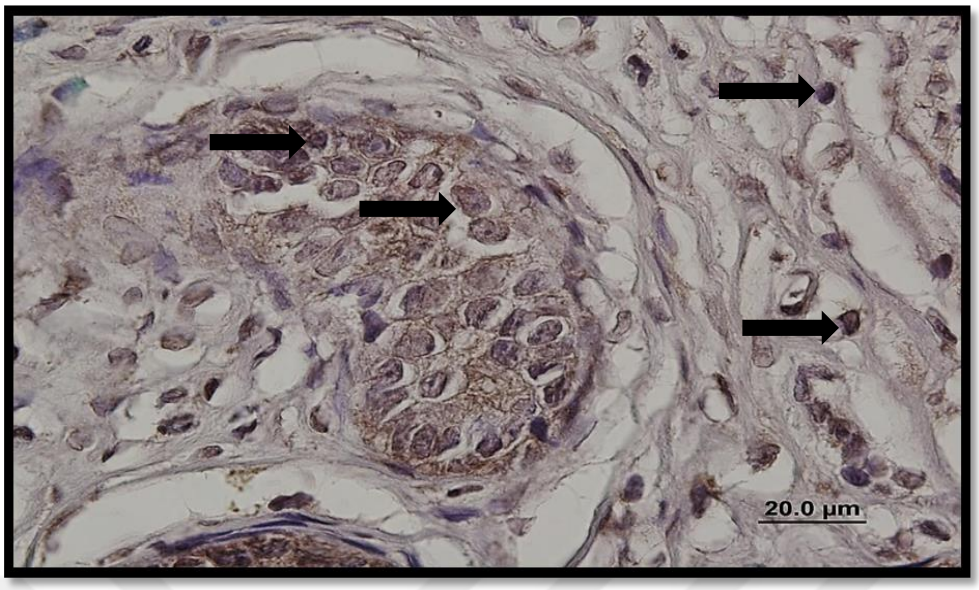
Şekil 30: Etanol grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama(X100). Ki-67 pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.



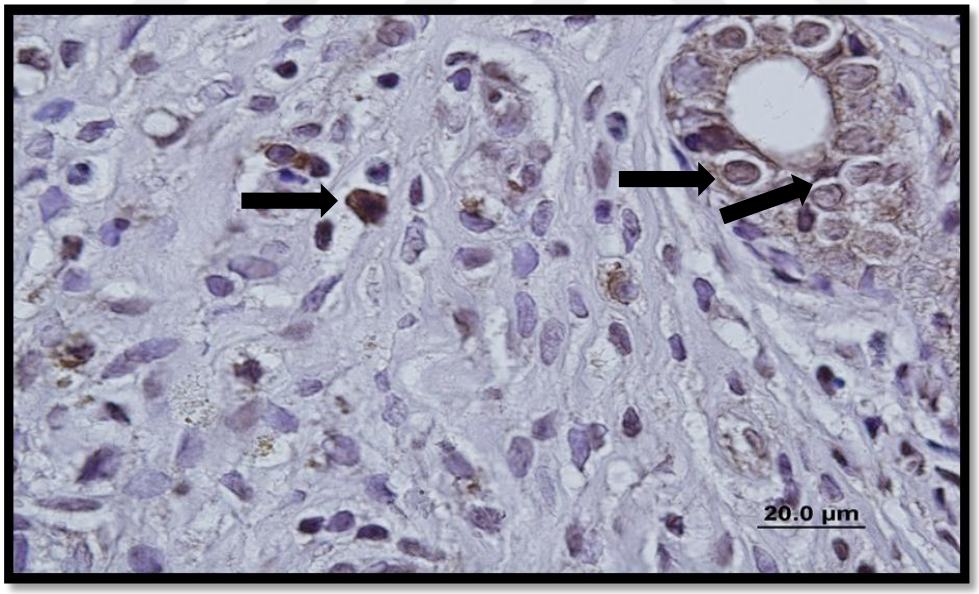
Şekil 31: Leiomyoma grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama (X100). Ki-67 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



Şekil 32: Leiomyoma grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama (X100). Ki-67 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



Şekil 33: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama(X100). Ki-67 pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.



Şekil 34: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait Ki-67 immünohistokimyasal boyama(X100). Ki-67 pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.

4.5.2. PCNA(Proliferasyon Hücre Nukleus Antijeni) Boyama Değerlendirme

Monoklonal bir antikor olan proliferasyon hücre nukleus antijeni (PCNA) parafin bloklarda immünohistokimyasal analiz için kullanılanılabilen bir nonhiston proteinidir. Progesteronun leiomyoma üzerine etkisini belirlemek ve proliferasyonun belirlenmesi amacı ile PCNA antikor boyaması yapıldı.

İstatistiksel ve semikantitatif değerlendirmeler için preparatlardan hücre yoğunluğu fazla her beş alanda X100'lük büyütmede immün pozitif hücre sayımı yapıldı.

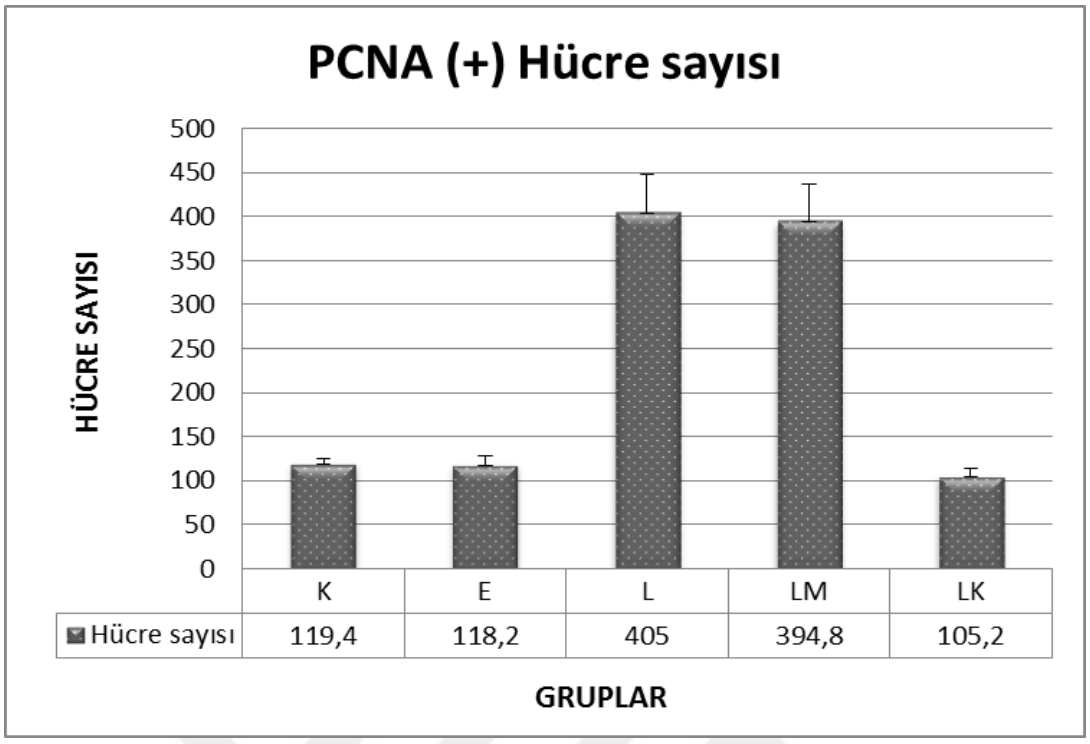
Leiomyoma ve kontrol grubu doku kesitleri karşılaştırıldığında PCNA pozitif nukleusların ortalama sayıları leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubunda artış gösterdiği; leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı verilen gruba göre kurkumin verilen grupta azalma olduğu belirlendi.

Hesaplamalara göre gruplara ait Ki-67 pozitif hücre sayısı; kontrol grubunda(Grup1) 119,4± 6,15, etanol grubunda(Grup2) 118,2± 10,47, leiomyoma grubunda(Grup3) 405± 43,37, leiomyoma+mısıryağı gubunda(Grup4) 394,8±42,77, leiomyoma+kurkumin grubunda(Grup5) 105,2± 8,70 olarak hesaplanmıştır.(Şekil 33)

İstatistiksel olarak tüm gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis Testi kullanılarak değerlendirildiğinde p=0,000 değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkişerli gruplar arasındaki myometriyum kalınlıkları Mann-Whitney U Testi kullanılarak elde edilen değerler karşılaştırıldığında Grup1 ve Grup2 arasında (p=0,528), Grup1 ve Grup5 arasında(p=0,059) , Grup2 ve Grup5 arasında(p=0,113) ve Grup3 ve Grup4 arasında (p=0,754) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı; ancak Grup1 ve Grup 3arasında(p=0,009), Grup1 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup3 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup3 ve Grup5 arasında(p=0,009) ve Grup4 ve Grup5 arasında(p=0,009) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu.(Tablo 12)

Tablo 12: PCNA immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

Gruplar	Değerler (p-*value*)	Sonuçlar
Grup1-Grup2	0,528	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup1-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup5	0,059	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup2-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup5	0,113	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup4	0,754	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup4-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**

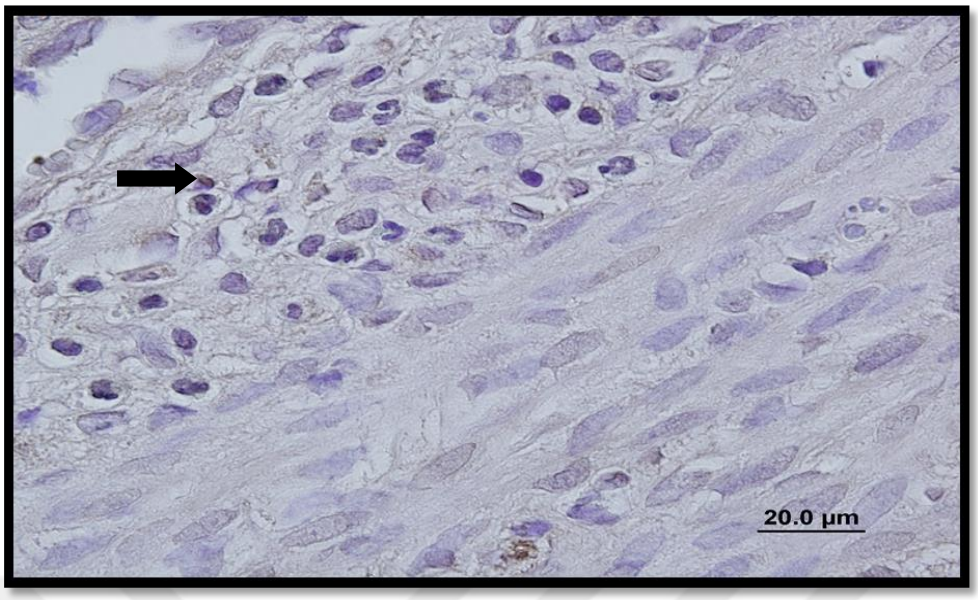


Şekil 35: PCNA pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması

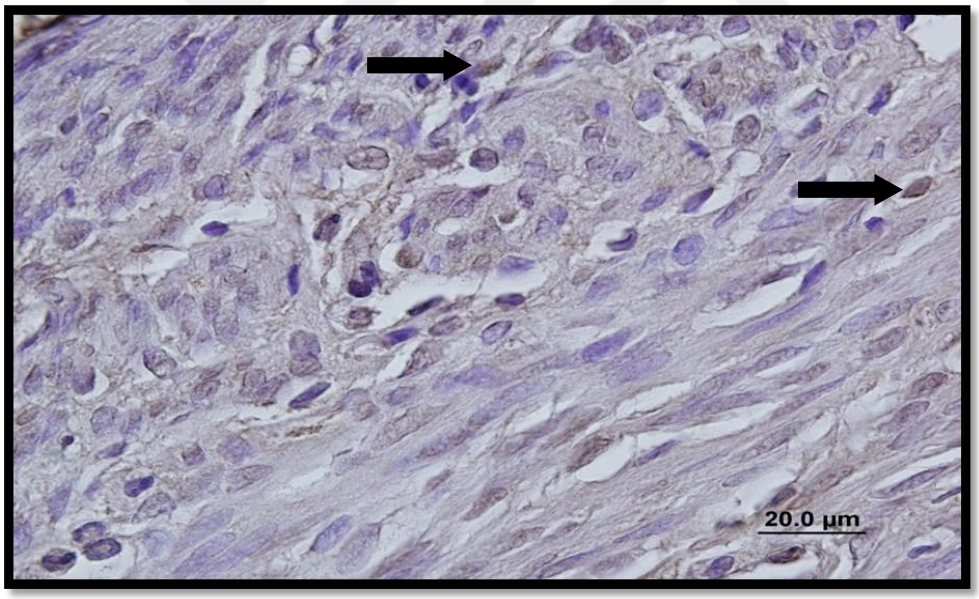
Çift kör olarak sayılan PCNA pozitif hücreler semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif değerlendirmede kontrol değeri bir olarak kabul edildi ve buna bağlı olarak diğer grupların 1-3 arası değerleri hesaplandı.(Tablo 13)

Tablo 13: PCNA Semikantitatif Değerlendirme

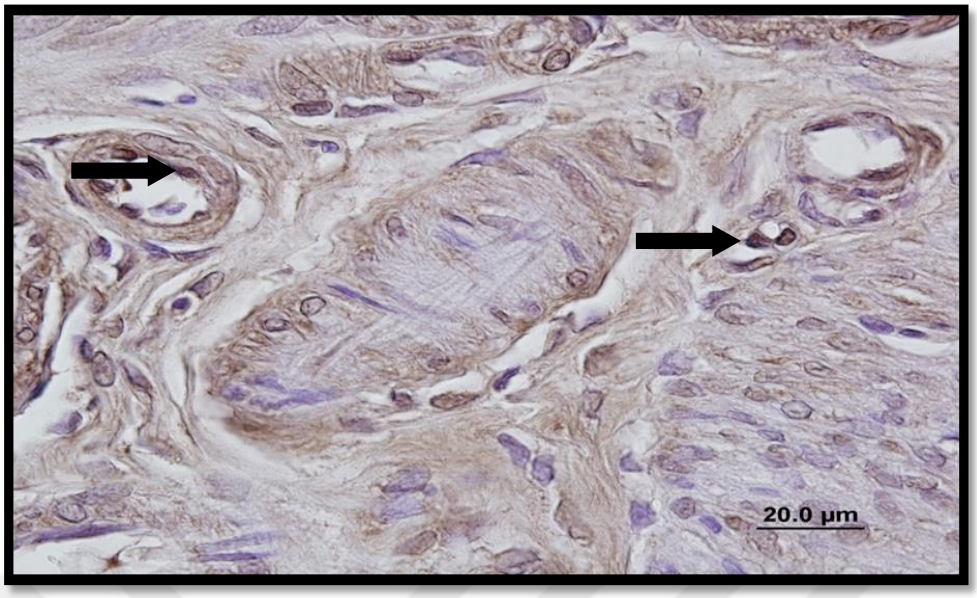
Gruplar	**PCNA Semikantitatif Değerlendirme Sonuçları**	**Skor**
Kontrol	1	1
Etanol	0,98	1
Leiomyoma	3,39	3
Leiomyoma+Mısıryağı	3,30	3
Leiomyoma+Kurkumin	0,88	1



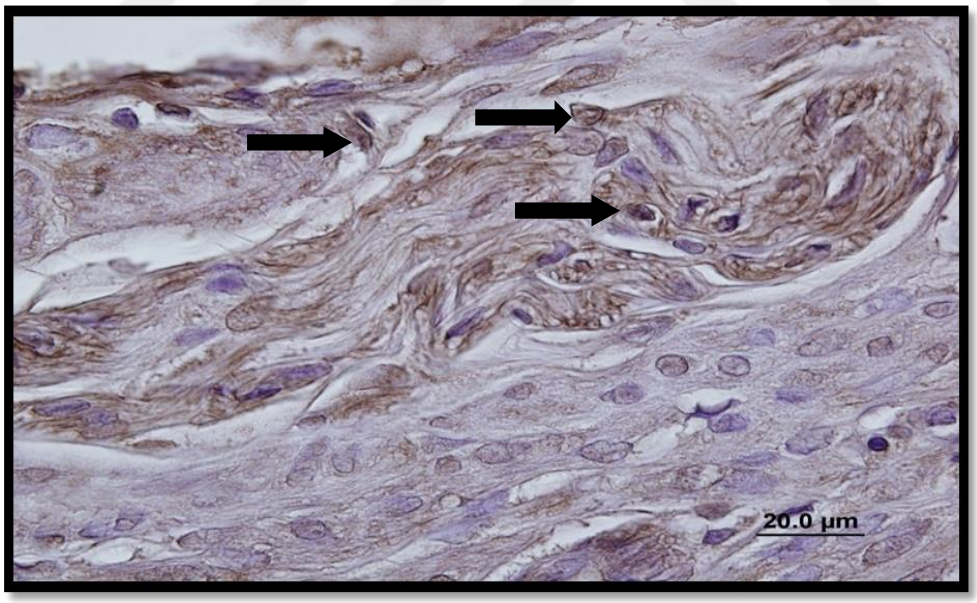
Şekil 36: Kontrol grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama(X100). PCNA pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



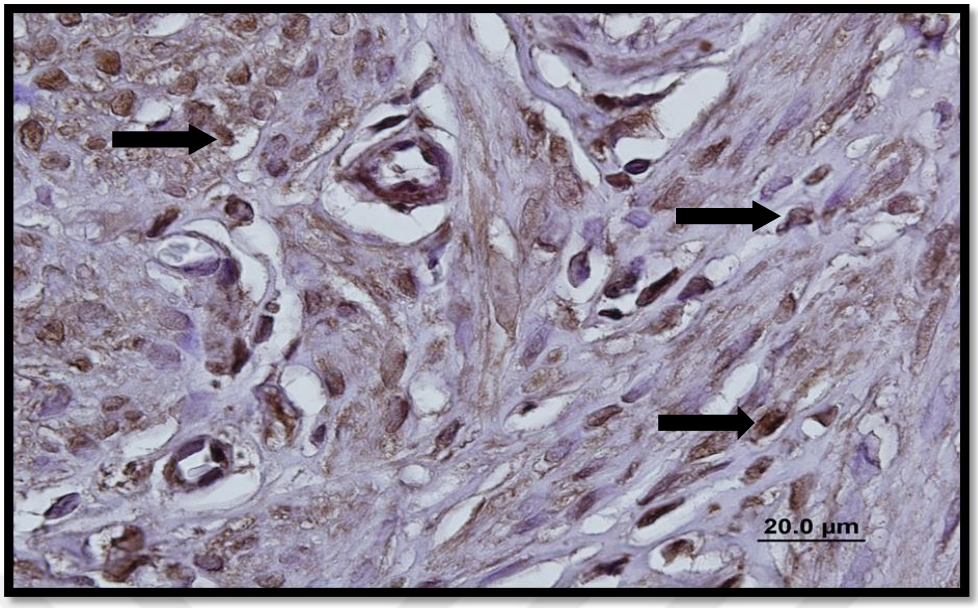
Şekil 37: Etanol grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama(X100). PCNA pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



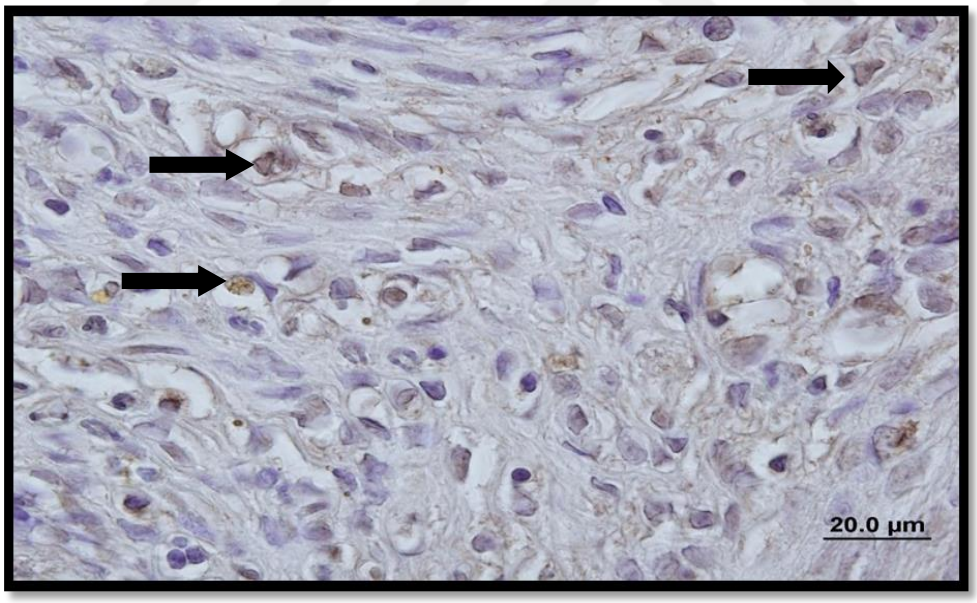
Şekil 38: Leiomyoma grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama(X100). PCNA pozitif hücreler ( ) ile gösterilmiştir.



Şekil 39: Leiomyoma grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama (X100). PCNA pozitif hücreler ( ) ile gösterilmiştir.



Şekil 40: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama(X100). PCNA pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.



Şekil 41: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait PCNA immünohistokimyasal boyama(X100). PCNA pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.

4.5.3. VEGF(Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) Boyama Değerlendirme

VEGF, anjiyogenezisin anahtar bir mediatörüdür. VEGF, yetişkinlerde yeni kan damarlarının oluşumunda major iş görmektedir. Anjiyogenik tepkinin başlaması ve idamesi için de anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca anjiyogenezin tümör büyümesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu kanıtlanmıştır. Bu bilgiler ışığında tüm gruplardan alınan uterus kesitleri incelendiğinde istatistiksel ve semikantitatif değerlendirmeler için preparatlardan hücre yoğunluğu fazla beşer alanda X100'lük büyütmede immün pozitif hücre sayımı yapıldı.

Kontrol grubunda ve leiomyoma oluşturuluduktan sonra kurkumin verilen grupta vasküler yapılar olağan görünümde iken etanol grubunda vasküler yapıların sayısında ve vasküler yapıların çaplarında artış görüldü. Bunlara ek olarak leiomyoma grubunda ve leiomyoma oluşturulduktan sonra mısır yağı verilen grupta vasküler yapıların sayısında ve çaplarında azalma olmasına rağmen VEGF pozitif hücre sayısında kontrol grubuna ve leiomyoma+kurkumin grubuna göre artış olduğu görüldü. Bunun sebebinin de anjiyogenez sürecindeki hücre sayısının artışı olduğu düşünüldü. Anjiyogenezin artışı ile leiomyoma arasında doğru orantı olduğu tespit edildi.

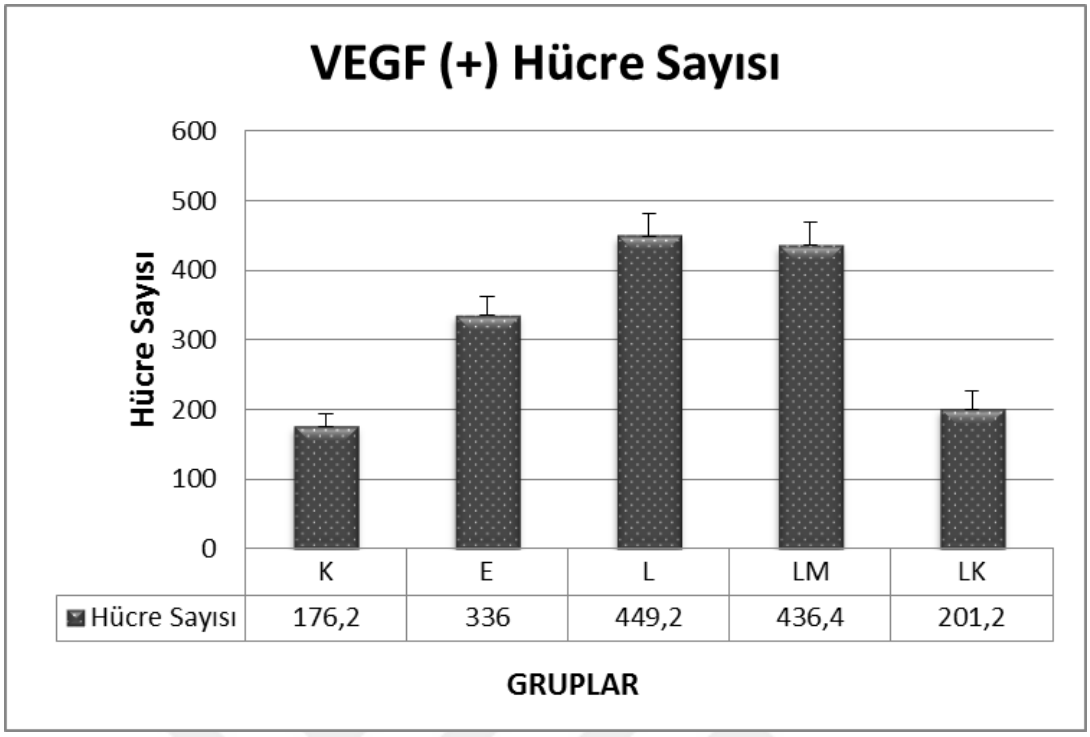
Tüm gruplara ait doku kesitleri incelendiğinde VEGF pozitif hücre sayısının leiomyoma, leiomyoma+mısıryağı ve etanol grubunda kontrol grubuna göre artış gösterdiği; fakat leiomyoma+kurkumin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olmadığı gözlendi.

Hesaplamalara göre gruplara ait Ki-67 pozitif hücre sayısı; kontrol grubunda(Grup1) 176,2±16,72, etanol grubunda(Grup2) 336±26,02, leiomyoma grubunda(Grup3) 449,2±31,85, leiomyoma+mısıryağı gubunda(Grup4) 436,4±31,62, leiomyoma+kurkumin grubunda(Grup5) 201,2± 26,15 olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel olarak tüm gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis Testi kullanılarak değerlendirildiğinde p=0,000 değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkişerli gruplar arasındaki myometriyum kalınlıkları Mann-Whitney U Testi kullanılarak elde edilen değerler karşılaştırıldığında Grup1 ve Grup5 arasında (p=0,209) ve Grup3 ve Grup4 arasında (p=0,602) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı; ancak Grup1 ve Grup2 arasında(p=0,009), Grup1 ve Grup 3arasında(p=0,009), Grup1 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup3 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup5 arasında(p=0,009), Grup3 ve Grup5 arasında(p=0,009) ve Grup4 ve Grup5 arasında(p=0,009) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu.(Tablo 14)

Tablo 14: VEGF immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

Gruplar	Değerler (p-*value*)	Sonuçlar
Grup1-Grup2	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup5	0,209	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup2-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup3-Grup4	0,602	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup4-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**

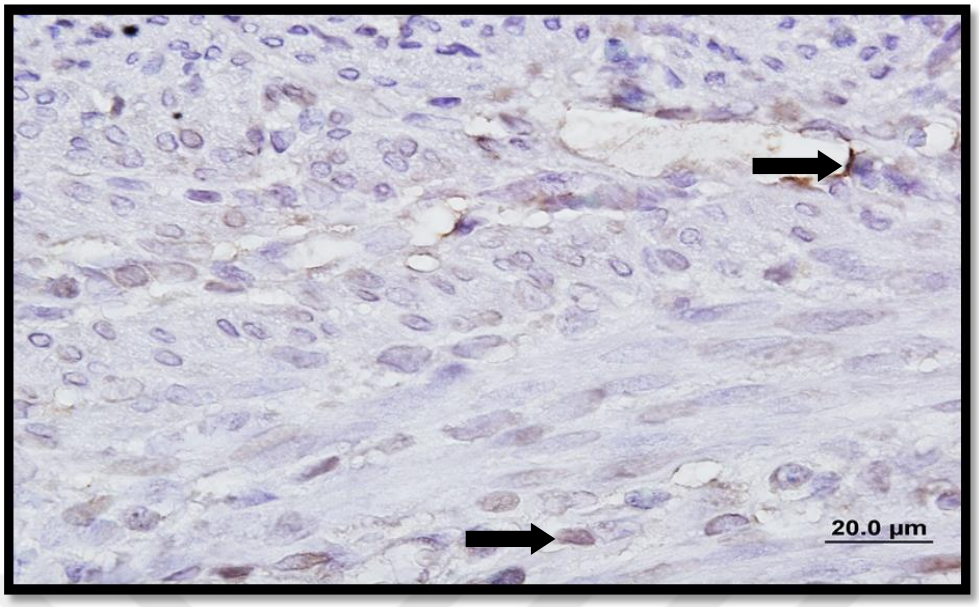


Şekil 42: VEGF pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması

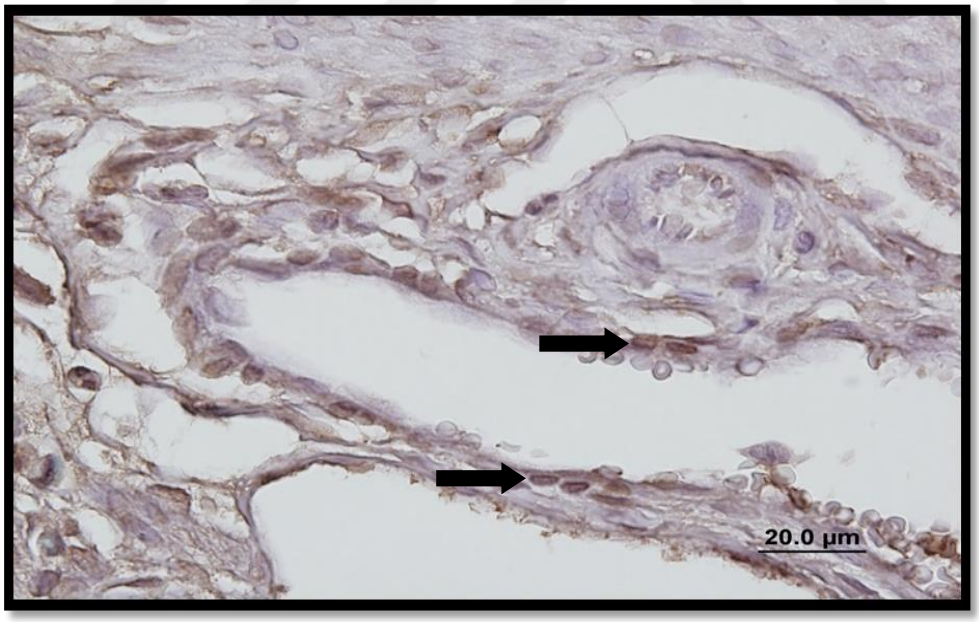
Çift kör olarak sayılan VEGF pozitif hücreler semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikatitatif değerlendirmede kontrol değeri bir olarak kabul edildi ve buna bağlı olarak diğer grupların 1-4 arası değerleri hesaplandı.(Tablo 15)

Tablo 15:VEGF Semikantitatif Değerlendirme

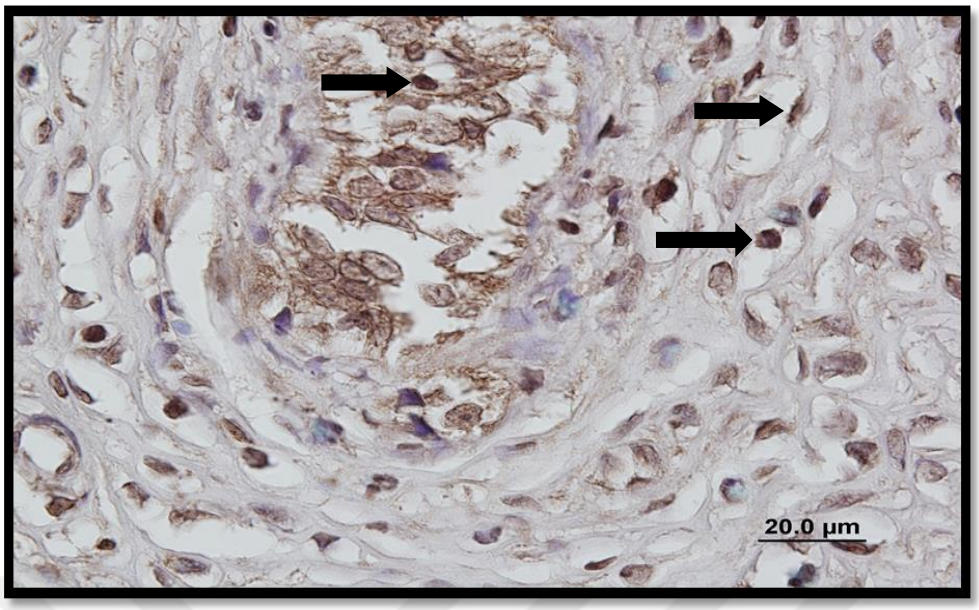
Gruplar	**VEGF Semikantitatif Değerlendirme Sonuçları**	**Skor**
Kontrol	1	1
Etanol	1,90	2
Leiomyoma	2,54	3
Leiomyoma+Mısıryağı	2,47	2
Leiomyoma+Kurkumin	1,41	1



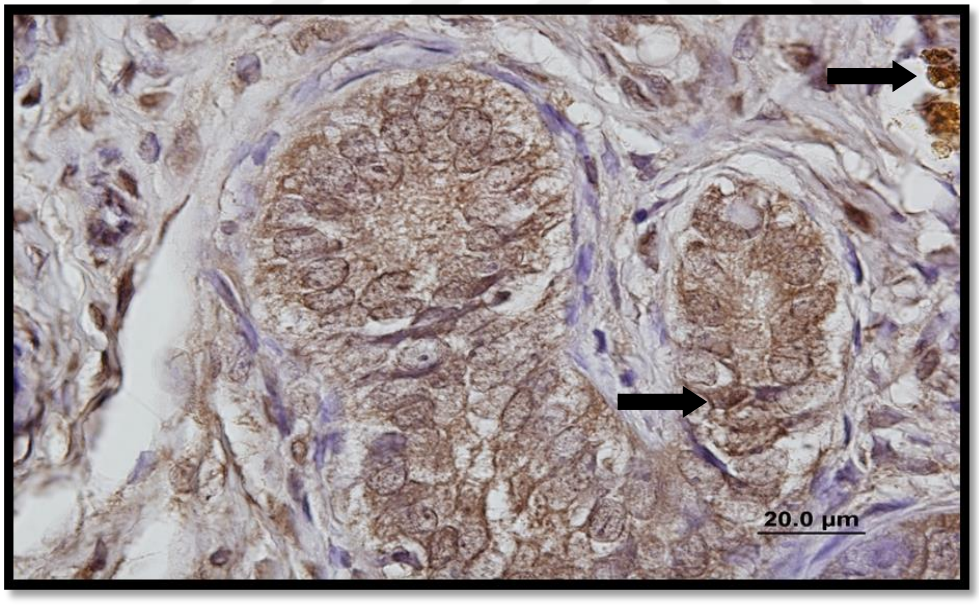
Şekil 43: Kontrol grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama (X100). VEGF pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



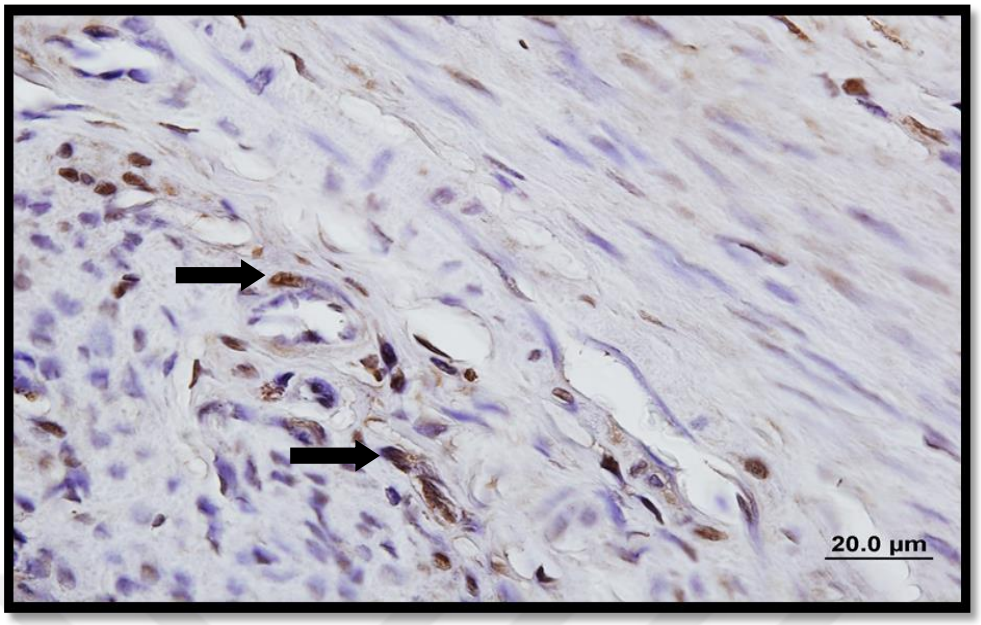
Şekil 44: Etanol grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama(X100). VEGF pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



Şekil 45: Leiomyoma grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama(X100). VEGF pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



Şekil 46: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama(X100). VEGF pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



Şekil 47: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait VEGF immünohistokimyasal boyama(X100). VEGF pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.

4.5.4. α-SMA (alfa-Düz Kas Aktin) Boyama Değerlendirme

Düz kas aktini (SMA) ve desmin düz kasın spesifik belirtecidir. Östrojen reseptörü (ÖR) ve progesteron reseptörü (PR) leiomyoma karakteristiği olarak güçlü bir şekilde pozitif boyanır. Gruplar arasındaki α-SMA değişimlerini immunohistokimyasal olarak değerlendirdik.

Leiomyoma ve kontrol grubu karşılaştırıldığında α-SMA pozitif nukleusların ortalama sayılarının leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubunda artış gösterdiği, kurkumin verilen grupta azalma olduğu belirlendi.

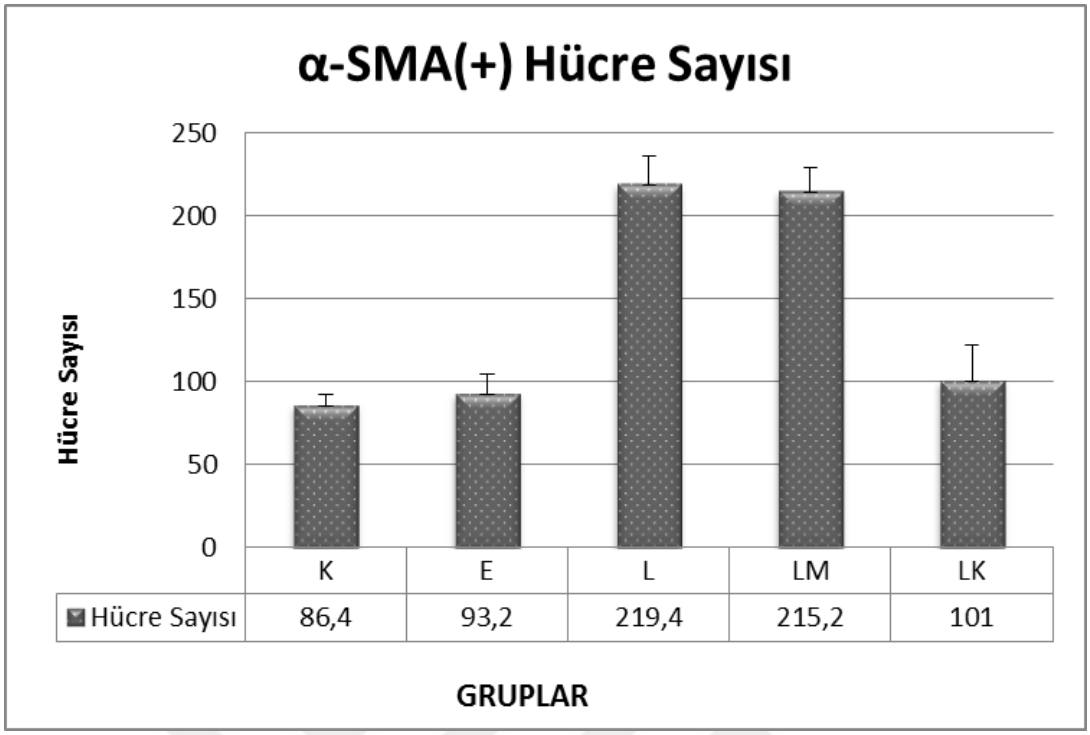
İstatistiksel ve semikantitatif değerlendirmeler için preparatlardan X100'lük büyütmede hücre yoğunluğu fazla beşer alanda immün pozitif hücre sayımı yapıldı.

Hesaplamalara göre gruplara ait α-SMA pozitif hücre sayısı; kontrol grubunda(Grup1) 86,4± 5,81, etanol grubunda(Grup2) 93,2± 11,51, leiomyoma grubunda(Grup3) 219,4±16,95, leiomyoma+mısıryağı gubunda(Grup4) 215,2±14,20, leiomyoma+kurkumin grubunda(Grup5) 101± 20,8 olarak hesaplanmıştır.(Şekil 33)

İstatistiksel olarak tüm gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis Testi kullanılarak değerlendirildiğinde p=0,000 değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkişerli gruplar arasındaki myometriyum kalınlıkları Mann-Whitney U Testi kullanılarak elde edilen değerler karşılaştırıldığında Grup1 ve Grup2 arasında (p=0,402), Grup1 ve Grup5 arasında(p=0,251) , Grup2 ve Grup5 arasında(p=0,754) ve Grup3 ve Grup4 arasında (p=0,675) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı; ancak Grup1 ve Grup 3arasında(p=0,009), Grup1 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup3 arasında(p=0,009), Grup2 ve Grup4 arasında(p=0,009), Grup3 ve Grup5 arasında(p=0,009) ve Grup4 ve Grup5 arasında(p=0,009) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu.(Tablo 16)

Tablo 16: α-SMA immünohistokimyasal boyama istatistiksel değerlendirmesi. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

Gruplar	Değerler (p-*value*)	Sonuçlar
Grup1-Grup2	0,402	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup1-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup1-Grup5	0,251	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup2-Grup3	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup4	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup2-Grup5	0,754	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup4	0,675	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık yoktur**
Grup3-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**
Grup4-Grup5	**0,009***	<0,05 olduğundan **Ortalamalar arası anlamlı bir farklılık vardır**

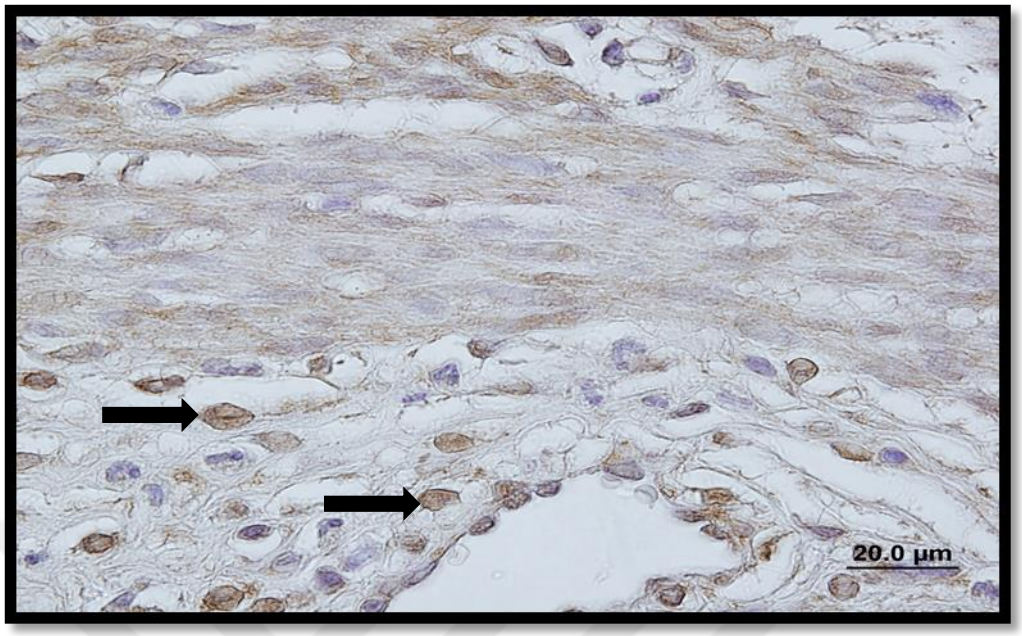


Şekil 48: α-SMA pozitif boyanan hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması

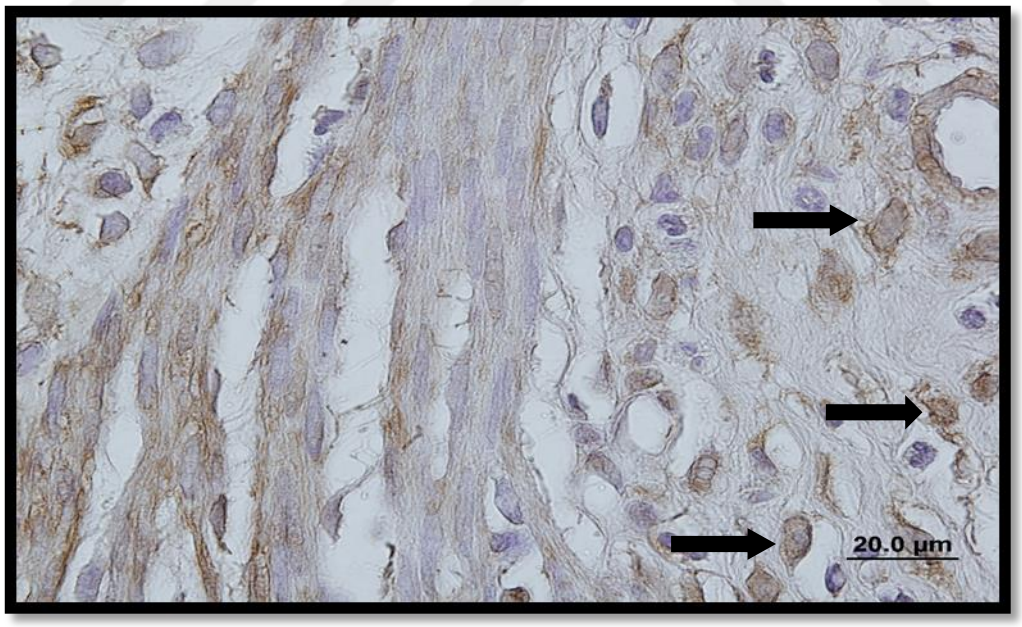
Çift kör olarak sayılan α-SMA pozitif hücreler semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif değerlendirmede kontrol değeri bir olarak kabul edildi ve buna bağlı olarak diğer grupların 1-4 arası değerleri hesaplandı.(Tablo 17)

Tablo 17: α-SMA Semikantitatif Değerlendirme

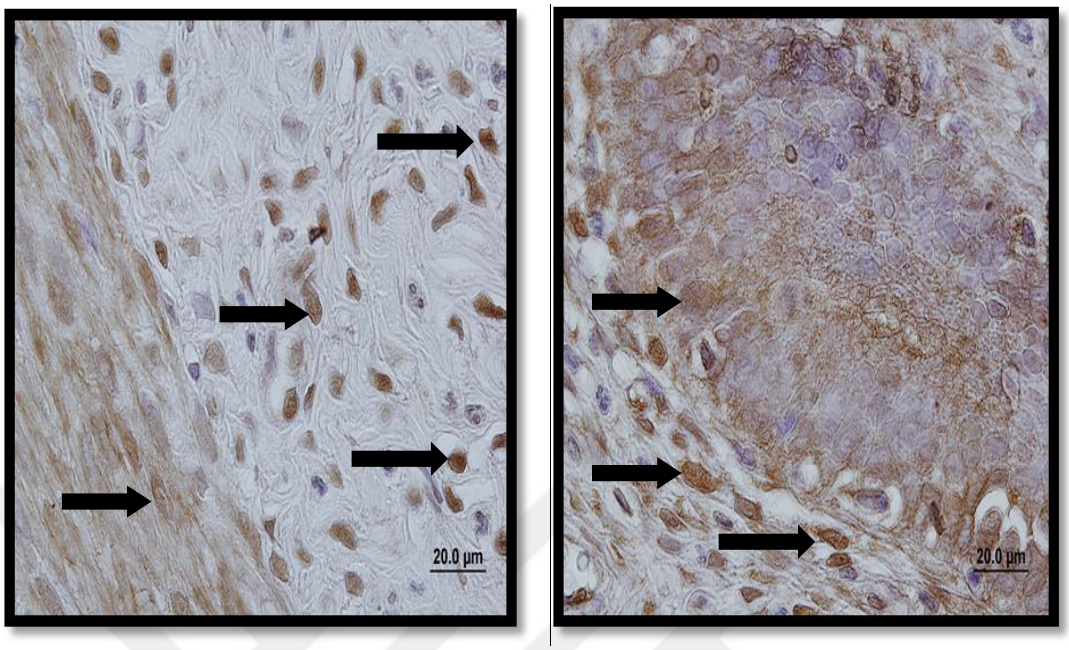
Gruplar	**α-SMA Semikantitatif Değerlendirme Sonuçları**	**Skor**
Kontrol	1	1
Etanol	1,07	1
Leiomyoma	2,53	3
Leiomyoma+Mısıryağı	2,49	2
Leiomyoma+Kurkumin	1,16	1



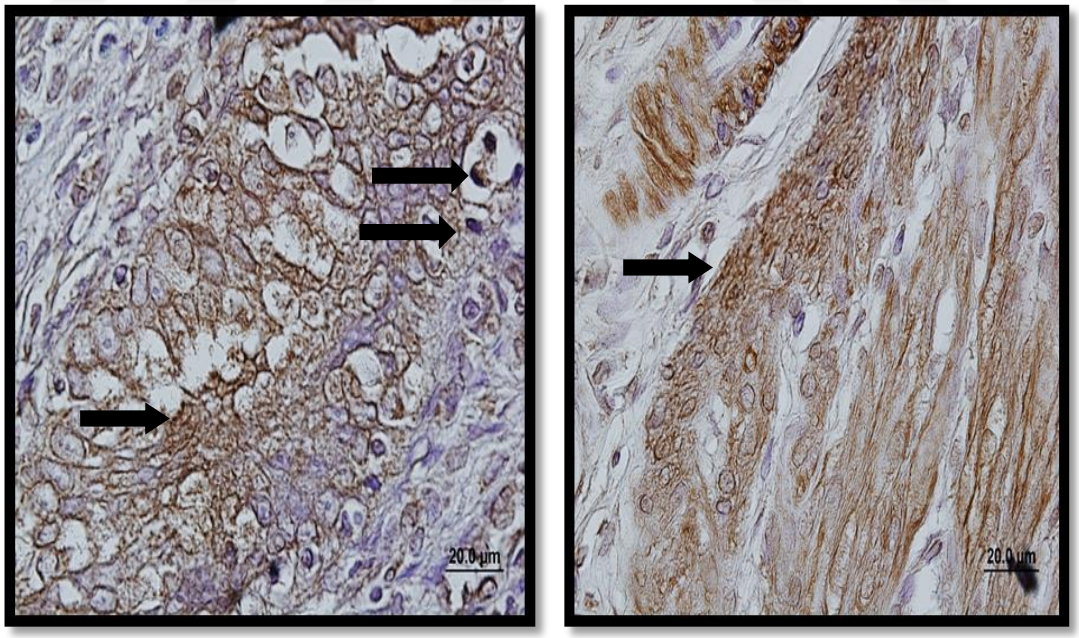
Şekil 49: Kontrol grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama (X100). α-SMA pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.



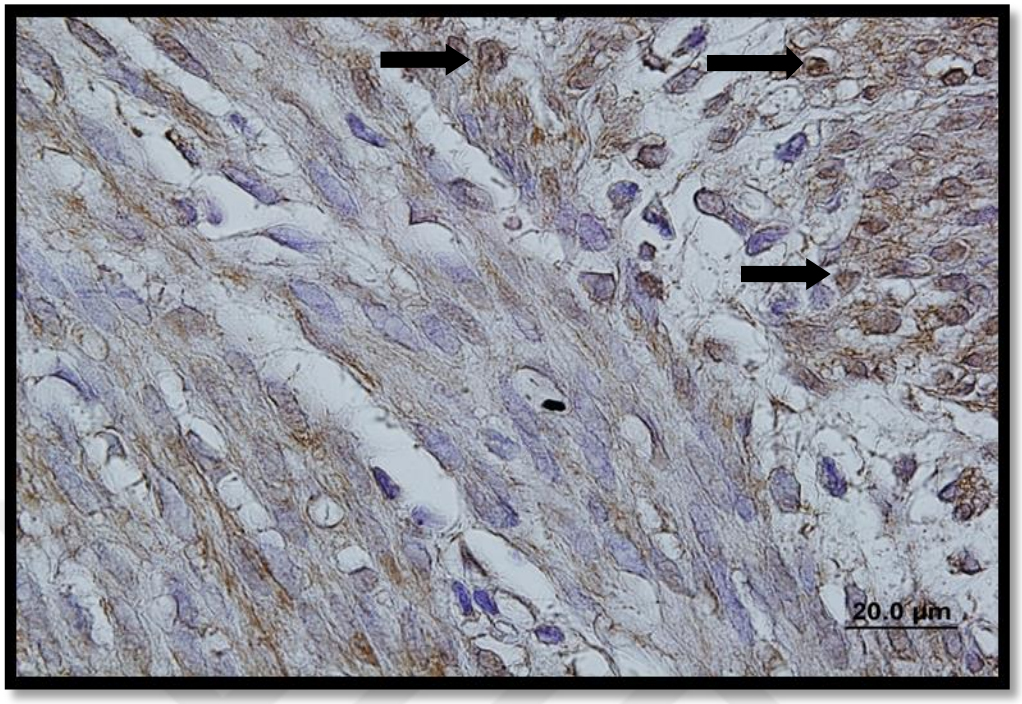
Şekil 50: Etanol grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama(X100). α-SMA pozitif hücreler (⟶) ile gösterilmiştir.



Şekil 51: Leiomyoma grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama(X100). α-SMA pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



Şekil 52: Leiomyoma+mısıryağı grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama(X100). α-SMA pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.



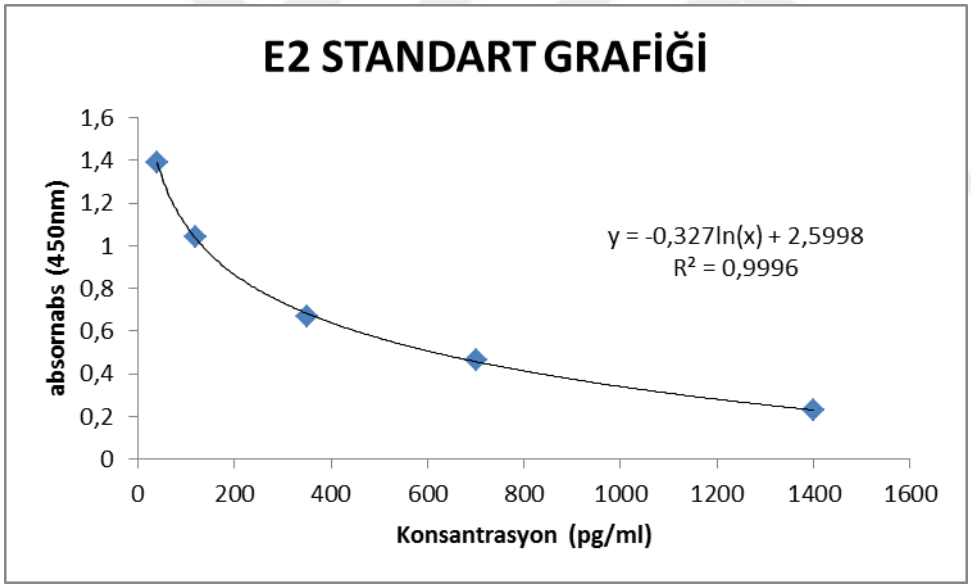
Şekil 53: Leiomyoma+kurkumin grubuna ait α-SMA immünohistokimyasal boyama(X100). α-SMA pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir.

4.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler

4.6.1. Östradiol (E2) Değerlendirmesi

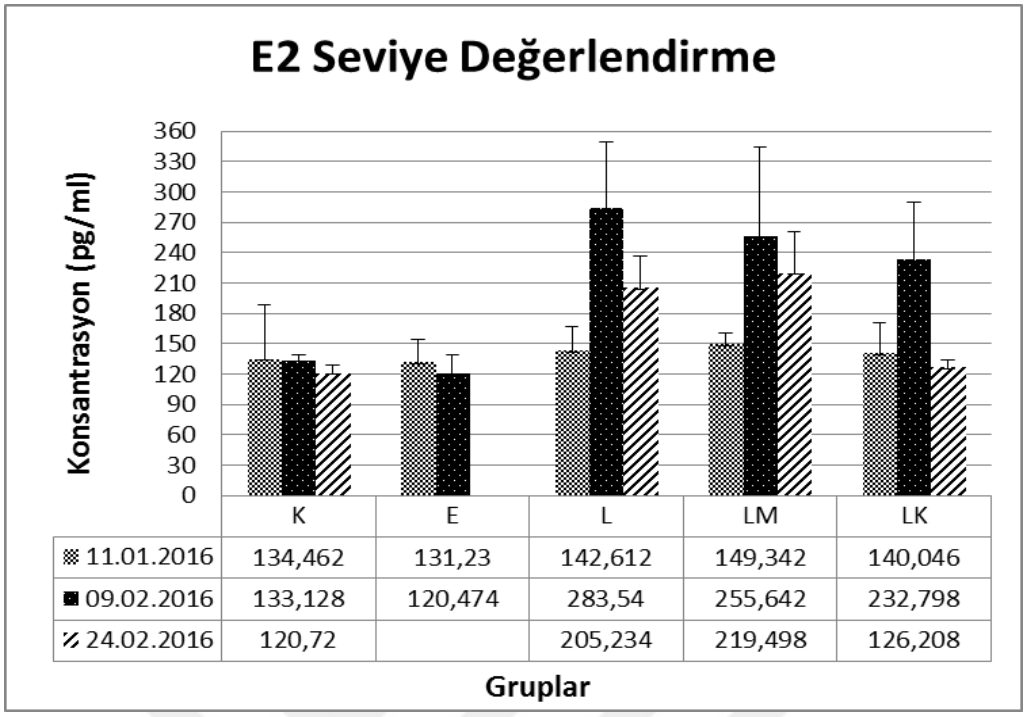
Uterus leiomyoma patogenezinde ovaryum hormonlarının rolü iyi bilinmektedir. Bu çalışmada da leiomyoma gelişimi ve büyümesinde etkili bir hormon olduğu düşünülen östradiolün etkisine bakıldı.

Östradiol analizi için E2 ELİSA yöntemi kullanıldı. Bunun için her bir denekten deney başı, leiomyoma oluşumu sonrası ve deney sonu kan örnekleri alınarak santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kan serumları alındı ve analiz için kullanıldı. ELİSA analizi yapıldıktan sonra standartların absorbanslarından blank absorbansı çıkartıldıktan sonra ortalamaları alındı ve kitteki aralığa uygun olarak standart eğri grafikleri çıkarıldı. Bu eğri grafiğinde çıkan formüle uygun olarak her bir örneğe ait değerler belirlendi.



Şekil 54: E2 standart grafiği

Örneklere ait değerler belirlendikten sonra elden edilen verilere göre 11.01.2016 tarihinde ilk alınan örneklere ait sonuçlar ; kontrol grubunda(134,462±54,51), etanol grubunda(131,23±22,91), leiomyoma grubunda(142,612±24,73), leiomyoma+mısıryağı grubunda(149,342±11,41) ve leiomyoma+kurkumin grubunda(140,046±31,26) olarak hesaplandı. 09.02.2016 tarihinde leiomyoma oluşumu sonrası alınan örneklere ait veriler ; kontrol grubunda(133,128±6,15), etanol grubunda(131,23±18,36), leiomyoma grubunda(283,54±65,63), leiomyoma+mısıryağı grubunda(255,642±89,37), leiomyoma+kurkumin grubunda(232,798±56,59) olarak hesaplandı. 24.02.2016 tarihinde deney sonu alınan örneklere ait sonuçlar; kontrol grubunda(120,72±8,12), etanol grubunda(son alınan örnekler hemolizden dolayı çalışılamamıştır), leiomyoma grubunda(205,234±31,84), leiomyoma+mısıryağı grubunda(219,498±41,69) ve leiomyoma+kurkumin grubunda(126,208±8,19) olarak hesaplandı. Bu veriler ışığında Mann Whitney-U Testi kullanılarak istatistikleri yapıldı ve istatistiksel olarak $p<0,05$'den küçük değerler anlamlı kabul edildi. Tüm grupların kendi içerisinde ilk, ikinci ve son E2 ölçümleri değerlendiridiğinde; kontrol grubunun ilk ve ikinci değerleri karşılaşırıldığında $p=0,173$ ve ikinci ve son değerler karşılaştırıldığında $p=0,74$ değerleri ile anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Etanol grubunda ilk ve ikinci değerler karşılaştırıldığında $p=0,344$ değeri anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Etanol grubunda son örnekler aşırı hemolizden dolayı çalışılmadı ve istatiksel analize dahil edilmedi. Leiomyoma grubunda ilk ve ikinci değerler karşılaştırıldığında $p=0,016$ değeri ile ilk E2 seviyesine göre leiomyoma oluşumu sonrasında anlamlı bir artış olduğu gözlendi, ikinci ve son değerler karşılaştırldığında $p=0,115$ değeri istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi ve leiomyoma sonrası işlem uygulanmadığında değişim olmadığı gözlendi. Leimyoma+mısıryağı grubunda ilk ve ikinci değerler karşılatırıldığında $p=0,008$ değeri ile ilk E2 seviyesine göre leiomyoma oluşumu sonrasında anlamlı bir artış olduğu gözlendi, ikinci ve son değerler karşılaştırldığında $p=0,916$ değeri istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi ve leiomyoma sonrası mısır yağı verildiğinde E2 değerinde anlamlı değişim olmadığı gözlendi. Leiomyoma+kurkumin grubunda ilk ve ikinci değerler karşılaştırıldığında $p=0,015$ değeri ile ilk E2 seviyesine göre leiomyoma oluşumu sonrasında anlamlı bir artış olduğu gözlendi, ikinci ve son değerler karşılaştırıldığında $p=0,008$ değeri ile leiomyoma oluşturulmuş deneklerde kurkumin verilmesi ile E2 değerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlendi.



Şekil 55: E2 seviye değerlendirme grafiği

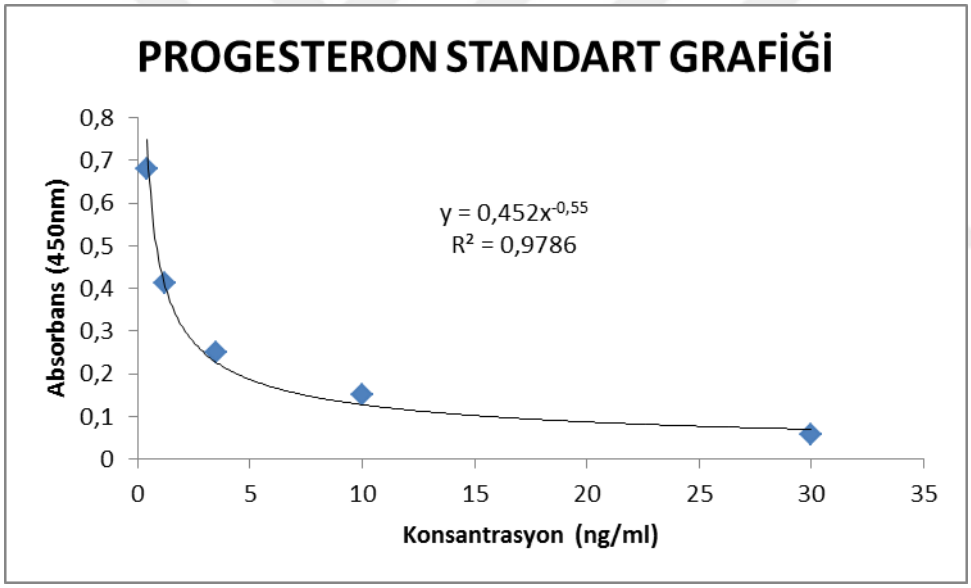
Tablo 18: Tüm deney gruplarında E2 değişimlerinin kendi içerisinde değerlendirilmesi. İstatistiksel olarak p<0,05 anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

E2 Değerlendirme	İlk ve Leiomyom oluşumu sonrası E2 Değişimi	Leiomyoma Oluşumu Sonrası ve Son E2 Değişimi
Kontrol	0,173	0,74
Etanol	0,344	_
Leiomyoma	**0,016***	0,115
Leiomyoma+Mısır yağı	**0,008***	0,916
Leiomyoma+Kurkumin	**0,015***	**0,008***

4.6.2. Progesteron (PROG) Değerlendirmesi

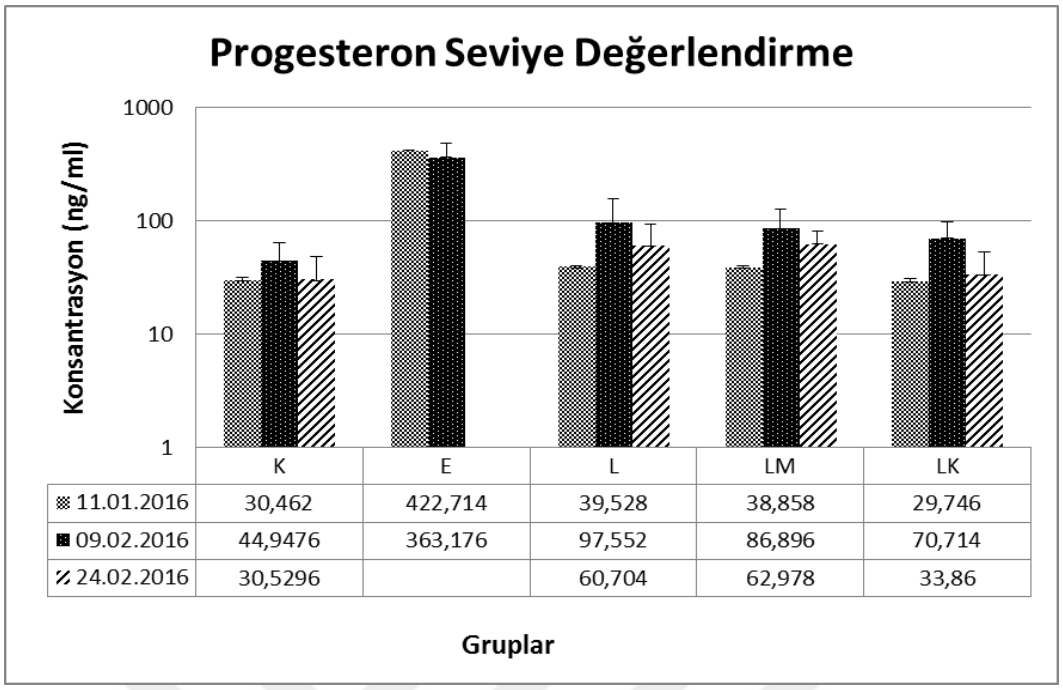
Uterus leiomyoma patogenezinde ovaryum hormonlarının rolü iyi bilinmektedir. Bu çalışmada da leiomyoma gelişimi ve büyümesinde etkili bir hormon olduğu düşünülen progesteronun etkisine bakıldı.

Progesteron analizi için PROG ELİSA yöntemi kullanıldı. Bunun için her bir denekten deney başı, leiomyoma oluşumu sonrası ve deney sonu kan örnekleri alınarak santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kan serumları alındı ve analiz için kullanıldı. ELİSA analizi yapıldıktan sonra standartların absorbanslarından blank absorbansı çıkartıldıktan sonra ortalamaları alındı ve kitteki aralığa uygun olarak standart eğri grafikleri çıkarıldı. Bu eğri grafiğinde çıkan formüle uygun olarak her bir örneğe ait değerler belirlendi.



Şekil 56: Progesteron standart grafiği.

Örneklere ait değerler belirlendikten sonra elden edilen verilere göre 11.01.2016 tarihinde ilk alınan örneklere ait sonuçlar ; kontrol grubunda(30,462±10,81), etanol grubunda(422,714±111,18), leiomyoma grubunda(39,528±14,20), leiomyoma+mısıryağı grubunda(38,858±13,99) ve leiomyoma+kurkumin grubunda(29,746±11,89) olarak hesaplandı. 09.02.2016 tarihinde leiomyoma oluşumu sonrası alınan örneklere ait veriler; kontrol grubunda(44,947±18,68), etanol grubunda(363,176±12,119,72), leiomyoma grubunda(71,64±65,05), leiomyoma+mısıryağı grubunda(69,582±32,87), leiomyoma+kurkumin grubunda(70,714±26,59) olarak hesaplandı. 24.02.2016 tarihinde deney sonu alınan örneklere ait sonuçlar; kontrol grubunda(30,529±17,88), etanol grubunda(son alınan örnekler hemolizden dolayı çalışılamamıştır), leiomyoma grubunda(55,238±36,91), leiomyoma+mısıryağı grubunda(62,978±18,49) ve leiomyoma+kurkumin grubunda(36,243±19,66) olarak hesaplandı. Bu veriler ışığında Mann Whitney-U Testi kullanılarak istatistikleri yapıldı ve istatistiksel olarak $p<0,05$'den küçük değerler anlamlı kabul edildi. Tüm grupların kendi içerisinde ilk, ikinci ve son PROG ölçümleri değerlendiridiğinde; kontrol grubunun ilk ve ikinci değerleri karşılaşırıldığında $p=0,435$ ve ikinci ve son değerler karşılaştırıldığında $p=0,172$ değerleri ile anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Etanol grubunda ilk ve ikinci değerler karşılaştırıldığında $p=0,454$ değeri anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Etanol grubunda son örnekler aşırı hemolizden dolayı çalışılmadı ve istatiksel analize dahil edilmedi. Leiomyoma grubunda ilk ve ikinci değerler karşılaştırıldığında $p=0,042$ değeri ile ilk PROG seviyesine göre leiomyoma oluşumu sonrasında anlamlı bir artış olduğu gözlendi, ikinci ve son değerler karşılaştırldığında $p=0,139$ değeri istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi ve leiomyoma sonrası işlem uygulanmadığında değişim olmadığı gözlendi. Leimyoma+mısıryağı grubunda ilk ve ikinci değerler karşılatırıldığında $p=0,035$ değeri ile ilk PROG seviyesine göre leiomyoma oluşumu sonrasında anlamlı bir artış olduğu gözlendi, ikinci ve son değerler karşılaştırldığında $p=0,461$ değeri istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi ve leiomyoma sonrası mısır yağı verildiğinde PROG değerinde anlamlı değişim olmadığı gözlendi. Leiomyoma+kurkumin grubunda ilk ve ikinci değerler karşılaştırıldığında $p=0,025$ değeri ile ilk PROG seviyesine göre leiomyoma oluşumu sonrasında anlamlı bir artış olduğu gözlendi, ikinci ve son değerler karşılaştırıldığında $p=0,031$ değeri ile leiomyoma oluşturulmuş deneklerde kurkumin verilmesi ile PROG değerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlendi.



Şekil 57:Progesteron seviye değerlendirme grafiği

Tablo 19: Tüm deney gruplarında Progesteron değişimlerinin kendi içerisinde değerlendirilmesi. İstatistiksel olarak p<0,05 anlamlı kabul edildi. Tabloda koyu yazıldı ve * ile vurgulandı.

PROG Değerlendirme	İlk ve Leiomyom oluşumu sonrası PROG Değişimi	Leiomyoma Oluşumu Sonrası ve Son PROG Değişimi
Kontrol	0,435	0,172
Etanol	0,454	_
Leiomyoma	**0,042***	0,139
Leiomyoma+Mısır yağı	**0,035***	0,461
Leiomyoma+Kurkumin	**0,025***	**0,031***

5. TARTIŞMA

Uterus leiomyomaları, üreme çağındaki kadınlarda % 77 gibi yüksek sıklıkla meydana gelen, iyi huylu myometrial tümörlerdir. Bu tümörler premenopozal kadınlarda histeroktemi için önemli bir göstergedir. ABD'de en sık histerektomi endikasyonu myoma uteridir. Her yıl yapılan 200.000'ün üstünde histerektominin yaklaşık %33'ünü oluşturmaktadır(1). Li D ve ark sıklıkla görülen uterus leiomyomasının kadın sağlığı ve yaşam kalitesi üzerine büyük bir etkisi olduğunu bildirmiştir(4). Uterus leiomyomalı olgularda tedavi ve bu hastalıkları önleyici yeni yollar tanımlamak oldukça önemlidir.

Leiomyomada anormal uterin kanama, dismenore, pelvik basınç hissi, kabızlık, dispanori, infertilite, tekraralayan gebelik kayıpları, erken doğum, abdominal distansiyon gibi semptomlar görülmektedir(12). Uterus leiomyomasında cerrahi tedavi olarak myomektomi ve histerektomi yöntemi kullanılmaktadır. Rhodes JC ve ark histerektominin leiomyomalarda kullanılan en iyi tedavi yöntemi olmasına rağmen, oluşan anksiyete ve depresyonun kadınların hayat kalitesini azaltabilecegini belirtmişlerdir(15).

Li D ve ark 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada 220±20 gr dişi Wistar suşu sıçanlara 25 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal olarak 0,5 mg/kg estradiol benzoat enjekte ettiklerini ve sonrasında 5 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal 4 mg/kg progesteron enjekte ederek leiomyoma modeli oluşturduklarını bildirmişlerdir(4). Bu nedenle biz de 200-250 gr dişi Wistar suşu sıçanlar ile çalıştık ve sıçanlara 25 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal olarak 0,5 mg/kg estradiol benzoat enjekte ettik ve sonrasında 5 gün boyunca günde birer defa intraperitoneal 4 mg/kg progesteron enjekte ederek sıçanlarda leiomyoma modeli oluşturduk.

Rocks N ve ark antikanser tedavisi için yeni bir ilaç olarak geleceği olabilecek ajanlardan birinin de kurkumin olduğunu söylemişlerdir. Bu doğal ajan yaygın hint mutfağında ve güney-doğu asya ülkelerinde ayuverdik tıbbında bir baharat olarak kullanılmış olsada kapsamlı araştırmalar son yıllarda yapılmıştır ve invivo hayvan modellerinde, kurkumin ve türetilmiş moleküllerinin anti-anjiyojenik, anti-kanser ve anti-metastatik etkisi olduğu bildirilmiştir(88). Shehzad A ve ark tarafından belirtilen doğrultuda kurkumin hücre çoğalması ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eder, sitokinler ve çeşitli kinaz proteinleri yanı sıra büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri ve enzimlerinin modulasyonuna aracılık eder. Bu nedenle, kurkumin sindirim sistemi kanserleri (özofagus, mide, bağırsak, karaciğer,

pankreas ve kolorektal), ürolojik kanserler (mesane, böbrek, prostat), üreme sistemi kanserleri (servikal, ovaryum, uterus), hematolojik kanserler [lösemi, lenfoma, çoklu miyeloma (MM)], pulmoner, timus, beyin, göğüs, kemik tümörleri için potansiyel terapötik değere sahiptir(98).

Solimann MM ve ark parasetamol ile hepatik toksisite oluşturdukları Wistar suşu ratlarda kurkuminin etkisine bakmak amacı ile yaptıkları çalışmada kurkumini mısır yağında çözdürerek 7 gün boyunca günde birer defa oral yolla 400 mg/kg vermişlerdir. Kontrol olarak kullanılan mısır yağı grubunda bir değişiklik gözlenmezken parasetamol ile birlikte kurkumin verilen grupta karaciğerde normalleşme ve hepatik toksisitede iyileşme görülmüştür. Zhou T ve ark Wistar suşu sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan periodontitis sırasında kurkuminin inflamasyona yanıtı ve kemik kaybını inhibe etmesi ile ilgili çalışmada 30 gün boyunca günde bir defa 100 mg/kg oral yolla vermişlerdir. Bunun sonucunda kurkuminin sitoplazmadaki sitokinlerin (TNF-α ve IL-6) ve osteoklastogeneze bağlı moleküllerin (RANKL ve RANK) azaltılması yoluyla ligatürden kaynaklanan deneysel periodontitis sıçanlarında inflamatuvar yanıtları ve alveolar kemik kaybını azaltabileceğinin kanıtlarını sunmuşlardır. Biz de çalışmamızda bu iki çalışmadan esinlenerek deneysel olarak uterus leiomyoması oluşturduğumuz deneklere 15 gün boyunca günde birer defa 200 mg/kg kurkumini oral yolla vererek leiomyoma üzerine etkisini araştırdık.

Çalışmamızda deneklerin vücut ağırlıkları; ilk ağırlıkları, leiomyoma oluşturulduktan sonraki ağırlıkları ve son ağırlıkları şeklinde ölçüldü. Deneklerin vücut ağırlıkları ölçümleri sonucunda yapılan karşılaştırmalarda sonuçlar istatistiksel olarak sonuçlar anlamlı değildi . Newbold RR ve ark farelerde bisfenol A (BSA) uygulaması ile oluşturdukları uterus leiomyomalı deneklerin vücut ağırlık ölçümleri sonucunda bireysel hayvanlarda veya gruplarda vücut ağırlığı ve tümör oluşumu arasında açık bir korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir(104).

Uterus leiomyoması oluşturmak için östradiol ve progesteron yüklemesi yapılan deneklerden deney başlangıcı, leiomyoma oluşumu sonrası ve deney sonu kan örnekleri alınarak E2 ve P seviyeleri ELİSA yöntemi ile belirlenerek değerlendirildi. Bu sonuçlara göre leiomyoma sonrası E2 seviyesi başlangıç seviyesine göre uterus leiomyoması oluşturulan gruplarda anlamlı şekilde artmışken etanol grubunda ve kontrol grubunda değişim gözlenmedi. Leiomyoma oluşumundan sonraki ve son alınan değerler karşılaştırıldığında leiomyoma+kurkumin grubunda anlamlı bir azalış olurken leiomyoma+mısıryağı grubunda ve hiçbirşey uygulanmayan kontrol grubunda anlamlı bir değişim gözlenmedi. Islam MS ve ark

bir dizi gözlem ve deneysel çalışmaya ev sahipliği yapmış ve uterus leiomyomasının yüksek seviyeli östrojenlerin uzun süreli maruziyetinden kaynaklandığını bildirmişlerdir(105). Progesteron seviyeleri değerlendirildiğinde; başlangıç seviyelerine göre leiomyoma oluşumu sonrasında leiomyoma oluşturulan gruplarda anlamalı artış olduğu izlendi. Kontrol grubunda da az miktarda artış olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi. Okolo S'nin yaptığı çalışmada da progesteron verilmiş kadın hastalardan gelen leiomyoma örneklerinde artmış mitotik aktivite olduğu gösterilmiştir(107). Kurkumin verildikten sonra P seviyesinde anlamlı bir azalma görülürken hiçbirşey uygulanmayan kontrol grubunda ve leiomyoma+mısıryağı grubunda anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. Etanol grubunda ise P için anlamsız yüksek veriler çıktı. Emanuele ve ark dişi sıçan kronik etanol uygulaması sonucunda serum östradiolün bir miktar artış gösterdiğini, progesteron seviyesinde değişim olmadığını göstermişlerdir(106).

Okolo S'nin yaptığı çalışmada ovarian steroidlerin myom büyümesini uyardığı ancak düzensiz şekilde ortaya çıktığı görülmüştür. Bu nedenle östrojen ve progesteronun büyümeyi teşvik ettiğini bildirmişlerdir(107). Maruo T ve ark ovarian seks steroid hormonlarının, büyüme faktörlerinin ve apoptozise bağlı faktörlerin leiomyoma büyümesinin düzenlenmesinde kritik rol oynayabileceği konusundaki çok sayıda kanıt ile desteklendiğini ve bunlara ek olarak büyüme faktörlerinin ve seks steroidleri kontrolü altındaki leiomyoma hücrelerinin artışında rol aldığını göstermişlerdir(108). Brandon ve ark uterus leiomyomalarında bitişik myometriyuma göre östradiol ve progesteron reseptöründe ekspresyon artışı olduğunu göstermişlerdir(109). Bizim çalışmamızda da deneklere ovarian seks steroidleri olan E2 ve P verilerek uterusta leiomyoma oluşumu ve büyümesi gösterildi ve ELİSA sonuçları ile desteklendi.

Verma GB ve ark tarafından yürütülen çalışmalar kurkuminin ÖR-pozitif ve ÖR-negatif hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiğini ve kurkuminin kemopreventif etkilerini ÖR bağımlı veya bağımsız bir yol izleyerek uygulayabileceğini göstermişlerdir(110). Bizim çalışmamızda da kurkumin verilen grupta E2 seviyesinin anlamlı derecede azaldığı izlendi.

Tsuiji K ve ark Eker rat-türetilmiş uterus leiomyoma hücre hatları (ELT-3) kullanarak kurkuminin hücre proliferasyonunu inhibe edip etmediğini analiz etmişlerdir. Kurkuminin ELT-3 hücre proliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini bularak, kurkumin tedavisinin ELT-3 hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu doğrulamışlardır(5). Biz de çalışmamızda uterus leiomyomalı gruplara kurkumin

verdiğimizde proliferasyonda azalmanın olduğunu histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak gösterdik ve biyokimyasal olarak E2 ve P seviyesindeki azalma ile destekledik.

Aleksandravych ve ark mikroskobik olarak, leiomyomalarda tek ve fusiform hücrelerin anastomozlaşmış fasikül helezonları olduğunu, tipik olarak hücrelerin iğ formlu, bol fibrilli, eosinofilik sitoplazmalı, belirsiz sınırlı olduğunu söylemişlerdir. Ayrıca uterus leiomyomasında; mitotik olarak aktif, hücresel, hemorajik, epiteloid ,miksoid, atipik ve lipoleiomyom gibi histolojik varyantların mevcut olduğunu bildirmişler(49). Biz de çalışmamızda bu leiomyoma varyantlarından atipik leiomyoma, epiteloid leiomyoma, hücresel leiomyoma olgularına rastladık.

Mittal P ve ark MED12 knockout farelerde oluşturdukları uterus leiomyoması çalışmasında histolojik olarak bu leiomyomaların insan uterus leiomyomalarında görülen patoloji ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Ekstraselüler matriks birikimi ve eosinofilik sitoplazmanın artışı ile fusiform düz kas hücrelerinin helezonik fasiküller oluşturduğunu ve düz kas tabakasından meydana geldiğini doğrulamışlardır(111). Stewart EA yapmış olduğu çalışmada aynı bulguları elde etmiş ve bunlara ek olarak leiomyomalı hücrelerde eozinofilik sitoplazmaların bol miktarda bulunduğunu ve nukleusların üniform büyüklük, şekil ve kromaziye sahip olduğunu belirtmişlerdir(112). Biz de uterus leiomyomalı slaytlara ait görüntüleri incelediğimizde leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubunda Stewart EA ve Mittal P ve ark'nın çalışmalarıyla paralellik gösteren eosinofilik sitoplazmalı fusiform hücrelerin arttığını ve nukleusların üniform, büyük ve kromaziye sahip olduğunu ve daha az nukleuslu nodüller olduğunu çalışmamızda gözlemledik.

Mozzachio K ve ark domuz(Sus Scrofa) üzerinde yaptıkları çalışmada histolojik olarak, leiomyomanın, değişken miktarda kollajen bakımından zengin stroma arasında fasiküllerin birbirine geçerek düzenlendiği iyi diferansiye düz kas hücrelerinden oluştuğunu söylemişlerdir. Hücrelerin, eosinofilik sitoplazmalı ve fusiform şekilli, küt uçlu nukleusla birlikte belirsiz nukleolusa sahip ve iğ şekilli olduklarını bildirmişlerdir(113). Bizim çalışmamızda da hematoksilen eosin boyama ile bol miktarda eosinofilik sitoplazmalı, fusiform şekilli hücreler saptandı.

Prizant H ve ark deneysel çalışmalarında farelerde Tsc2 geninin baskılanması ile ilerleyen uterus ve myometriyum büyümesinin 24 haftada uterusta leiomyoma oluşumu ile sonuçlandığını göstererek oluşturdukları modelde; uterus boyutu ve ağırlığının heterozigot ve kontrol uterusları ile kıyaslandığında belirgin olarak büyük olduğunu belirtmişler. Histolojik

analiz ve Ki-67 boyaması ile birlikte myometriyal kalınlığın ölçümü yapıldığında kontrol ve heterozigot farelere kıyasla Tsc2 knockout farelerin uterusunda belirgin olarak artmış myometriyal proliferasyon gösterilmiştir(114). Çalışmamızda myometriyum kalınlıklarını belirlemek için mikroskopta en küçük büyütmede (X4) UTHSCSA ImageTool Version 3.0 programı kullanılarak 5 farklı myometriyum bölgesinin kalınlık ortalamaları alınarak morfometrik değerlendirme yapıldı. Bu sonuçlar doğrultusunda leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı gruplarında kontrol grubuna göre myometriyum kalınlıklarında anlamlı bir artış gözlenirken etanol ve leiomyoma+kurkumin gruplarında anlamlı bir değişim olmadığı izlendi.

Uterus kesitlerine ait hematoksilen&eosin boyamalar incelendiğinde büyük yuvarlak ya da poligonal şekilli eosinofilik hücrelerin görüldüğü epiteloid leiomyoma bulguları belirlendi. Ayrıca hücrelerde vakualizasyona rastlandı. Everitt JI ve ark da rodent modellerinde üreme sistemi leiomyomaları ile ilgili yaptığı çalışmada olağan leiomyomaların aksine, epiteloid varyantların, belirgin olmayan hücre boşlukları ve nadiren soluk eosinofilik sitoplazmalı yuvarlak hücrelerden oluştuklarını göstermişlerdir. Veziküler yuvarlak nukleus genellikle tek ve belirgin nukleolus içeriyordu. Epiteloid varyantlı hücre kümesinin bazen tipik leiomyomatöz hücrelerden oluşan bir kitle içinde de çıkabileceğini bildirmişlerdir(115).

Ly ve ark klinikte 51 uterus leiomyomalı hasta ile yaptıkları çalışmada mikroskobik incelemede tüm olgularda önemli atipik hücrelerin bulunduğunu bunlardan 21 hastada fokal, multifokal veya diffüz orta-şiddetli atipi(klasik"simplastik leiomyoma"olarak adlandırılan) olduğunu göstermişlerdir(116). Manxhuka-Kerliu S ve ark iyi vaskülarize bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinin bir fasikül modeli sergilediğini, düz kas hücrelerinin, eozinofilik yada nadiren fibriller sitoplazmalı ve belirgin hücre zarları ile elonge olduğunu ve mitotik aktivitenin artarak anlamlı atipi oluşturduğunu göstermişlerdir(75). Bu bulgular bizim çalışmamızdaki hematoksilen&eozin boyama bulguları ile paralellik göstermektedir. Sun X ve ark simplastik leiomyomaya ait atipik hücrelerin anormal DNA'ya sahip olup olmadıklarının henüz bilinmediğini, ancak çok büyük ve pleomorfik nukleusların, poliploidi ve anöploidi varlığını gösterdiklerini göstermişlerdir(117).

Koneko T ve ark uterus leiomyoma modeli oluşturulmuş Tsc2 knockout farelerde myometriyumda gözlenen genişlemenin büyük kısmı, Masson trikrom boyaması ile belirlendiği üzere ekstraselüler matriksten oluşmuştur ve bu da fibrosis seviyelerinin arttığını düşündürmektedir(118). Drosch M ve ark Masson trikrom boyama ile primer tümörlerde

kollajenlerin karakteristik artışını onaylamıştır(54). Biz de çalışmamızda leiomyomlu kesitlerde kollajen birikiminin değişken biçimde interfasiküler, intrafasiküler ya da bu ikisinin bir arada görüldüğü kollajen birikimi olduğunu ve kontrol grubuna göre kollajen miktarının artış gösterdiğini belirledik.

Bimonte S ve ark tümör büyümesi ve anjiyogenezinde kurkuminin rolünü incelemek için fare meme kanseri modelini oluşturmuşlardır. Kurkumin fare vücudunda tespit edildikten sonra değerlendirilmiş ve hiçbir toksik etkisinin olmadığı bulunmuştur. Meme kanseri oluşturulan farelere kurkumin verilmesi sonrası meme kanseri oluşturulan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör büyüklüğünde anlamlı derecede azalma olduğunu gözlemlemişlerdir(119). Biz de histokimyasal analizlerimiz sonucunda uterus leiomyoması oluşturulduktan sonra kurkumin verdiğimiz grupta leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubuna göre proliferasyonda azalma gördük ve kurkumin verilen gruba ait slaytlar incelendiğinde kontrol grubuna yakın bulgular gözledik.

PCNA, hücre proliferasyonunun son derece hassas ve kesin bir göstergesidir. Sadece proliferatif hücrelerde sentez ve ekspresyon yapar. Li D ve ark sıçanlarda uterus leiomyoması modeli oluşturmuşlardır. Kontrol grubu ile model grubundaki PCNA seviyeleri karşılaştırıldığında model grubunda önemli derecede artış olduğunu, PCNA'nın yüksek ekspresyonunun uterus leiomyomasının moleküler temeli olduğunu göstermişlerdir(4). Maruo T ve ark leiomyoma ve bitişik normal myometriyum doku kesitlerinde PCNA pozitif nukleusların ortalama yüzdesinin leiomyomada normal myometriyuma oranla daha fazla olduğunu saptamışlardır(2). Halder SK ve ark Eker rat modelinde 1,25-Dihydroxyvitamin D3 verdikleri çalışmada PCNA ekspresyonunun 1,25-Dihydroxyvitamin D3 tedavisi uygulanan gruba göre uterus leiomyomalı Eker sıçanlarda daha yüksek olduğunu göstermişlerdir(52). Shimomuro Y ve ark 72 saat boyunca kültürlenen normal myometriyal düz kas hücrelerinden ve leiomyoma hücrelerinden ekstrakte edilen proteinlerin Western immunoblot analizi ile PCNA ekspresyonunun tedavi edilmemiş leiomyoma kültürlerinde normal myometriyal hücrelere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir(120). Bizim çalışmamızda da immunohistokimyasal boyama yöntemi ile PCNA boyandığında kontrol grubuna göre leiomyoma ve leiomyoma oluşturulup mısıryağı verilen grupta pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış olduğu gösterildi.

Halder SK ve ark Eker rat modelinde 1,25-Dihydroxyvitamin D3 verdikleri çalışmada Ki-67(MKI67) ekspresyonunun 1,25-Dihydroxyvitamin D3 tedavisi uygulanan gruba göre

uterus leiomyomalı sıçanlarda önemli ölçüde yüksek olduğunu göstermişlerdir(52). Biz de kontrol grubu ile leiomyoma ve leiomyoma oluşturulup mısıryağı verilen grupları karşılaştırdığımızda immunohistokimyasal olarak Ki-67 pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış olduğunu belirledik.

Ahmed HH ve ark karaciğerde kurkuminin NDEA(N-Nitrosodietilamin) kaynaklı hepatokarsinogenez sırasında hücre proliferasyonunu etkileyip etkilemediğini belirlemek için PCNA ve Ki-67 immunohistokimyasal tekniklerini kullanılmışlardır. PCNA için hepatokarsinogenezli grupta ve doksorubisin verilen grupta kontrol grubuna göre nukleuslarda şiddetli pozitif reaksiyon görülürken kurkumin verilen grupta PCNA hafif bir reaksiyon göstermiştir. Kurkumin verilen grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında Ki-67 için negatif boyanmıştır(89). PCNA ve Ki-67 için immunohistokimyasal analiz yaptığımızda her iki analiz için de leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı verilen gruplara göre leiomyoma oluşturulup kurkumin verilen grupta pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi.

Leiomyomada güçlü şekilde eksprese edilen anjiyojenik faktörler ADM ve VEGF'dir. Bunlar hem endotele hem de vasküler düz kaslara lokalizedir. Hague S ve ark 52 tanesi leiomyoma içeren 91 hastadan alınan histerektomi örneği ile çalışmışlardır. Makrofajlar, arter duvarları, venüller ve düz kas hücrelerinin leiomyoma varlığında ekspresyon artışı ile VEGF için pozitif boyandığını göstermişlerdir(10). Kunnumakkara AB ve ark VEGF'in anjiyogenezis ve tümör gelişiminde anahtar rol oynadığını, kolon, meme, akciğer ve pankreas kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde aşırı derecede eksprese edildiğini ve bu nedenle VEGF ekspresyonunu inhibe edebilen ajanların kanser tedavisinde önemli rol oynadığını ifade etmişlerdir. Bu maddenin araştırmaları, kurkuminin NIH3T3 hücrelerinde VEGF ekspresyonunu ER negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde iki önemli anjiyogenez faktör VEGF ve bFGF'nin transkript seviyesini inhibe ettiği gösterilmiştir(87). Biz de çalışmamızda immunohistokimyasal olarak leiomyoma ve leiomyoma+mısıryağı grubunda kontrol grubuna göre VEGF pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış gözlemlerken leiomyoma+kurkumin grubunda leiomyoma grubuna göre anlamlı azalma olduğunu tespit ettik.

Prizant H ve ark farelerde Tsc2nin baskılanması ile uterus leiomyoma modeli oluşturdukları çalışmada Tsc2 knockout farelerin myometriyumunda kaba kenarlı, düzensiz ve oryante olmamış hücrelerin α-SMA için kontrol grubuna göre belirgin şekilde pozitif

boyandığını bildirmişlerdir(114). Tsc2 knockout farelerde immunoflorasan boyaması ile α-SMA pozitif boyanmış ve myometriyal hipertrofi derecesi de belirlenmiştir(118). Yao Q ve ark karaciğer fibrozisi oluşturulan sıçanlarda kurkuminin etkisine bakmışlardır. CCl4 verilen sıçanlarda karaciğer lobüllerinin sinuzoidal endotelinde α-SMA pozitif hücreler gözlenmiştir. Bilgisayar destekli yarı kantitatif analiz kurkumin verilen grupta CCl4 verilen gruba göre α-SMA pozitif hücrelerin sayısında anlamlı azalma olduğunu göstermiştir(121). Biz de çalışmamızda leiomyoma grubunda ve leiomyoma oluşturulup mısır yağı verilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında immunohistokimyasal olarak α-SMA pozitif hücrelerin anlamlı biçimde arttığını; leiomyoma oluşturulup kurkumin verilen grupta ise leiomyoma grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğunu belirledik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız literatür taramasında kurkuminin deneysel olarak oluştulmuş sıçan uterus leiomyomasına etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlar kurkuminin leiomyomalar üzerine olumlu etkilerini, histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak göstermiştir. Bu çalışmanın daha sonra yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Li B, Takeda T, Tsuiji K, Kondo A et al. “The antidiabetic drug metformin inhibits uterine leiomyoma cell proliferation via an AMP-activated protein kinase signaling pathway”. Gynecological Endocrinology, 2013; 29(1): 87-90.

2. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomuro Y et al.”Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis”.Steroids, 2000; 65: 585-592.

3. Mercorio F, De Simone R, Di Spiezio Sardo A, Cerrota G et al. “The effect of levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of myomarelatedmenorrhagia”.Contraception, 2003; 67: 277-280.

4. Li D, Zhang Y, Han H, Geng J et al.”Effect of Lichong Decoction on expression of IGF-I and proliferating cell nuclear antigen mRNA in rat model of uterine leiomyoma”. J Tradit Chin Med , 2012; 32(4): 636-640.

5.Tsuiji K, Takeda T, Li B, Wakabayashi A et al.”Inhibitory effect of curcumin on uterine leiomyoma cell proliferation”. Gynecological Endocrinology, 2011; 27(7): 512-517.

6. Soliman MM, Nassan MA and Ismail TA.”Immunohistochemical and molecular study onthe protective effect of curcumin against hepatic toxicity induced by paracetamol in Wistar rats”. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014; 14: 457.

7. Das L, Vinayak M. ”Long Term Effect of Curcumin in Regulation of Glycolytic Pathway and Angiogenesis via Modulation of Stress Activated Genes in Prevention of Cancer”. PLOS ONE, 2014; 9(6)

8. Mayerhofer K, Lozanov P, Bodner K, Bodner –Adler B et al. ”Ki-67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS)”. Acta Obstet Gynecol Scand, 2004; 83: 1085-1088.

9. Filizel F, Erktek S, İlvan Ş, Calay Z et al. ”Meme Karsinomlarında Proliferating Cell Nuklear Antijenin (PCNA) Prognostik Önemi”. Türk Patoloji Dergisi, 1996; 12(1): 50-52.

10. Hague S, Zhang L, Oehler MK, Manek S et al. “Expression of the Hypoxically Regulated Angiogenic Factor Adrenomedullin Correlates with Uterine Leiomyoma Vascular Density”. Clinical Cancer Research, 2000; 6: 2808–2814.

11. Chen S, Liu R, Li T. “Pulmonary benign metastasizing leiomyoma: a case report andliterature review”. J Thorac Dis, 2014; 6(6): 92-98.

12. Buttram VC, Reiter RC.”Uterine leiomyomas: etiology, symptomatology and management.” Fert Steril, 1981; 36: 433-45.

13. Dubuisson JB, Fauconnier A, Deffarges JV et al.” Pregnancy outcome and deliveries following laparoscopic myomectomy.” Human Reprod , 2000; 15: 869-73.

14. Emanuel MH, Wamsteker K, Hart AAM et al.” Long-term results of hysteroscopic myomectomy for abnormal uterine bleeding.” Obstet Gynecol, 1999; 93: 743-8.

15. Rhodes JC, Kjerulff KH, Langenberg PW et al.” Hysterectomy and sexual functioning.” JAMA, 1999; 282: 1934-41.

16. Andrew Healey. “Embryology of the Female ReproductiveTract”. Springer-Verlag, 2012; 21-30.

17. Sadler TW. Langman’s Medical Embriology. 12th Edition. Philadelphia, Wolters Kluwer, 2012; 246-250.

18. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen’s Human Embryology. Fourth Edition. Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier, 2009; 518-520.

19. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology. Fifth Edition. Philadelphia, Elsevier, 2014; 826-830.

20. Polat S. Ürogenital Sistem. In: Dalçık H, Yıldırım M,editors. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 2.baskı. İstanbul:Nobel Kitabevi; 2009. s.269.

21. Reardon SN, King ML, MacLean II JA, Mann JL et al. "Cdh1 Is Essential for Endometrial Differentiation, Gland Development, and Adult Function in the Mouse Uterus". Biology Of Reproduction, 2012; 86(5), 1–10.

22. Gökmen FG. Sistematik Anatomi. 4. Baskı.İzmir, İzmir Güven Kitabevi, 2003; 571-580.

23. Standring S. Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice. Thırty-Ninth Edition. Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier, 2004; 1131-1337.

24. Mader SS. Understanding Human Anatomy&Physiology. Fifth Edition. New York, McGraw-Hill Education, 2004; 352-354.

25. Snell RS. Clinical Anatomy. Seventh Edition. Philadelphia, LWW, 2003; 392-400.

26. Baggish MS, Valle RF, Guedj H. Hysteroscopy: Visual Perspectives of Uterine Anatomy, Physiology, and Pathology. Third Edition. Philadelphia, LWW, 2007; 15.

27. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 4. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 2006; 340-345.

28. Ozan H. Anatomi. 2. Baskı. Ankara, Klinisyen Tıp Kitabevleri, 2005; 316-319.

29. Ross MH, Pawlina W. Ross A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology. Sixth Edition. Philadelphia, LWW, 2010; 848-852.

30. Paker Ş. Histoloji. 1. Baskı. Bursa, Uludağ Üniversitesi, 1990; 236-242.

31. Junequeira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology a LANGE Medical Book. Sixth Edition. London, Prentice-Hall, 1989; 447-450.

32. Şeftalioğlu A. İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara, Teknik Yayıncılık, 1998

33. Akbay C, Sabuncuoğlu BT. Özel histoloji ince yapı ve gelişme. Ankara ,Antıp A.Ş. Tıp Kitapları Bilimsel Yayınları, 2002

34. Stenberg, SS. Histology for Pathology.12 th Edition. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997; 879-929.

35. Erkoçak A. Özel histoloji. 4.Baskı. Ankara, AÜTF yayınları, 1982

36. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology.1st Edition. Philadelphia, Elsevier / Mosby, 2002; 577-580.

37. Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi Çeviri. Ankara, Palme Yayıncılık, 1995

38. Snell SR. Clinic Anatomy, (Türkçe Çeviri). 5. Baskı.İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1998; 323-326.

39. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi fizyoloji. 9. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1989; 1022-1029.

40. Long JA, Evans HM. The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. Mem. Univ. California., 1922; 6: 1-148.

41. Atasü T, Sahmay S. Jinekoloji. 1. Baskı. İstanbul,Üniversal Bilimsel Yayınları 6, 1996; 159-164.

42. Berne RM, Levy MN. Physiology. Fourth Edition. Philadelphia, Mosby, 2005; 990-997.

43. Widmair EP, Raff H, Strong KT. Human Physiology. 13 Edition. New York, McGraw-Hill Education, 2013; 391-393.

44. Ganong WF. Review of Medical Physiology.17th Edition. New Jersey, Prentice-Hall International Inc., 1995; 537-538.

45. Westwood F. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. Toxicologic Pathology, 2008; 36: 375-384.

46. Kantre M., Öztaş E., Dalçık C. Sıçan , fare ve kobaylarda gebeliğin ilk gününü teyin etmede vajinal smear yönteminin kullanılması. Van Tıp Dergisi, 1996; 3(2): 112-116.

47. Mellanby J, Dunyer J, Hawkins C and Hitchen C. Effect of exprimental limbic on the estrus cycle and reproductive succed in rat. Epilepsia, 1991; 34(2): 220-227.

48. Montes GS, Luqoe EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. Acta Anat., 1998; 133: 192-199.

49. Aleksandrovych V, Bereza T, Sajewicz M, Walocha MA et al. Uterine fibroid: common features of widespread tumor. FOLIA MEDICA CRACOVIENSIA, 2015; 1: 61–75.

50. Augensen K. Uterine myoma in a 15-year-old girl. Acta Obstet Gynecol Scand, 1981; 60(6): 591.

51. Kjerulff KH, Langenberg P, Seidman JD, Stolley PD et al. Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. J Reprod Med, 1996; 41(7): 483-490.

52. Halder SK,Sharan C, Al-Hendy A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Treatment Shrinks Uterine Leiomyoma Tumors in the Eker Rat Model. BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2012; 86(4): 1–10.

53. Rollason T.P., Wilkinson N. Non-neoplastic conditions of the myometrium and pure mesenchymal tumours of the uterus. In: Fox H., Wells M., editors. Obstetrical and Gynaecological Pathology. Spain: Churchill, Livingstone; 2003.497-548.

54. Drosch M, Bullerdiek J, Zollner TM, M.D, Prinz F et al. A novel mouse model that closely mimics human uterine leiomyomas. Fertility and Sterility, 2013; 99(3): 927-935.

55. Romana A. Nowak. Fibroids: pathophysiology and current medical treatment. Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology, 1999; 13(2): 223-238.

56. Marshall LM, Spiegelman D, Manson JE et al. Risk of uterine leiomyomata among premenopausal women relation to body size and cigarrete smoking. Epidemiology, 1998; 9: 511-517.

57. He Y, Zeng Q, Dong S, Qin L at al. Associations between uterine fibroids and lifestyles including diet, physical activity and stress: a case-control study in China. Asia Pac J Clin Nutr, 2013; 22(1): 109-117.

58. Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. Environ Health Perspect, 2000; 108(5): 791-793.

59. Burroughs KD, Fuchs-Young R, Davis B, Walker CL. Altered Hormonal Responsiveness of Proliferation and Apoptosis During Myometrial Maturation and the Development of Uterine Leiomyomas in the Rat. BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2000; 63: 1322–1330.

60. Hassan MH, Fouad H, Bahashwan S, Al-Hendy A. Towards non-surgical therapy for uterine fibroids: catechol-O-methyl transferase inhibitor shrinks uterine fibroid lesions in the Eker rat model. Human Reproduction, 2011; 22(11): 3008–3018.

61. Englund K, Blanck A, Gustavsson I et al. Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: Changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. J Clin Endocrinol Metab, 1998; 83: 4092-4096.

62. Otubu JA, Buttram VC, Besch NF, Besch PK. Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor-bearing myometrium. Am J Obstet Gynecol, 1982; 143: 130-133.

63. Liehr JG, Ricci MJ, Jefcoate CR, Hannigan EV et al. 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci US, 1995; 92: 9220-9224.

64. Shen Y, Wu Y, Lu Q , Zhang P et al. Transforming growth factor-β signaling pathway cross-talking with ERα signaling pathway on regulating the growth of uterine leiomyoma activated by phenolic environmental estrogens in vitro. Tumor Biol., 2016; 37(1): 455-62.

65. Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B et al. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. Hum Reprod, 1997; 12: 815-822.

66. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ et al.Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. Am J Obstet Gynecol, 1993; 169(1): 78-85.

67. Matsuo H, Maruo T and Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its upregulation by progesterone. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1997; 82: 293-299.

68. Jeong J, Lee HS, Lee KY, White LD et al. Mig-6 modulates uterine steroid hormone responsiveness and exhibits altered expression in endometrial disease. PNAS, 2009; 106(21): 8677–8682.

69. Robboy SJ, Mutter GL,Prat J, Bentley R et al. Robboy's pathology of the female reproductive tract. Second Edition. New York, Churchill Livingstone, 2009; 457-470.

70. Chair DD, Alison R, BaCH U, Colman K et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System. J Toxicol Pathol, 2014; 27 : 1–107.

71. Nucci M.R, Quade B.J. Uterine mesenchymal tumors. In: Crum C.P., Lee K.R, editors.Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. China: Elsevier Saunders; 2006.611-73.

72. Zaloudek C., Hendrickson M.R. Mesenchymal tumors of the uterus. In: Kurman R.C., editor.Blaustein's Pathology of the Genital Tract. New York: Heidelberg Springer; 2002.561-615.

73. Perrone T, Dehner LP. Prognostically favorable "mitotically active" smooth-muscle tumors of the uterus. A clinicopathologic study of ten cases. Am J Surg Pathol, 1988; 12(1): 1-8.

74. Oliva E, Young RH, Clement PB, Bhan AK et al. Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. Am J Surg Pathol, 1995; 19(7): 757-68.

75. Manxhuka-Kerliu S, Kerliu-Saliu I, Sahatciu-Meka V, Kerliu L et al. Atypical uterine leiomyoma: a case report and review of the literature. Journal of Medical Case Reports, 2016; 10: 22-27.

76. Ip PP, Tse KY, Tam KF. Uterine smooth muscle tumors other than the ordinary leiomyomas and leiomyosarcomas: a review of selected variants with emphasis on recent advances and unusual morphology that may cause concern for malignancy. Adv Anat Pathol., 2010; 17(2): 91-112.

77. Brooks JJ, Wells GB, Yeh IT, LiVolsi VA. Bizarre epithelioid lipoleiomyoma of the uterus. Int J Gynecol Pathol, 1992; 11(2): 144-9.

78. Downes KA, Hart WR. Bizarre leiomyomas of the uterus: a comprehensive pathologic study of 24 cases with long-term follow-up. Am J Surg Pathol, 1997; 21(11): 1261-1270.

79. Roth LM, Reed RJ. Dissecting leiomyomas of the uterus other than cotyledonoid dissecting leiomyomas: a report of eight cases. Am J Surg Pathol 1999; 23(9): 1032-1039.

80. Mittal K, Popiolek D, Demopoulos RI. Uterine myxoid leiomyosarcoma within a leiomyoma.Hum Pathol, 2000; 31(3): 398-400.

81. Oliva E, Clement PB, Young RH, Scully RE. Mixed endometrial stromal and smooth muscle tumors of the uterus: a clinicopathologic study of 15 cases. Am J Surg Pathol, 1998; 22(8): 997-1005.

82. Devaney K, Tavassoli FA. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the interpretation of unusual mesenchymal tumors of the uterus. Mod Pathol, 1991; 4(2): 225-31.

83. Wang X, Kumar D,Seidman JD. Uterine lipoleiomyomas: a clinicopathologic study of 50 cases. Int J Gynecol Pathol., 2006; 25(3): 239-242.

84. Prichard JG, Lowenstein MH, Silverman IJ, Brennan JC. Streptococcus milleri pyomyoma simulating infective endocarditis. Obstet Gynecol, 1986; 68(3): 46-49.

85. American College of Obstetricians and Gynecologists . ACOG practice bulletin. Alternatives to hysterectomy in the management of leiomyomas. Obstet Gynecol, 2008; 112: 387-400.

86. Brakta S, Diamond JS, Al-Hendy A, Diamond MP. Role of vitamin D in uterine fibroid biology. Fertility and Sterility, 2015; 104(3): 698-706.

87. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett., 2008; 269(2): 199-225.

88. Rocks N, Bekaert S, Coia I, Paulissen G et al. Curcumin–cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an orthotopic mouse model of lung cancer. Br J Cancer., 2012; 107(7): 1083-1092.

89. Ahmed HH, Shousha WG, Shalby AB, El-Mezayen HA. Curcumin: a unique antioxidant offers a multimechanistic approach for management of hepatocellular carcinoma in rat model. Tumour Biol., 2015; 36(3): 1667-1678.

90. Lampe V, Kostanecki V. Curcumin. Ber Dtsch Chem Ges, 1910; 43: 2163.

91. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer, 2005; 41: 1955-1968.

92. Menon VP and Sudheer AR. ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF CURCUMIN.In: Bharat B. Aggarwal BB , Young-Joon Surh YJ, Shishir Shishodia S editors. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. 1st Edition. US, Springer;2007.107-110.

93. Wright JS. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. J Mol Struct, 2002; 591: 207-217.

94. Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. J Am Chem Soc, 1999; 121: 9677-9681.

95. Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, et al. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. Free Radic Biol Med, 2003; 35: 475-484.

96. Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS et al. Curcumin - Biological and Medicinal Properties. In: Ravindran PN, Babu KN, and Sivaraman K editors. Turmeric : the genus Curcuma. 1st Edition. USA, CRC Press; 2007.298-348.

97. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. Life Sci., 2006; 78(18): 2081-7.

98. Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in Various Cancers. Biofactors., 2013; 39(1): 56-68.

99. Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X et al. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. Acta Odontol Scand., 2013; 71(2): 349-56.

100. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Lett. 2005 Jun 8; 223(2): 181-90.

101. Rahmani AH, Al Zohairy MA, Aly SM, Khan MA.Curcumin: A Potential Candidate in Prevention of Cancer via Modulation of Molecular Pathways. Biomed Res Int., 2014; 2014: 1-15.

102. Moravek MB, Yin P, Ono M, Coon JS 5th, Dyson MT et al. Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications. Hum Reprod Update., 2015; 21(1): 1-12.

103. Tüzün F, Gençpınar P, Özbal S, Dilek M. Neuroprotective effect of neotrofin in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia. Neuroscience Letters, 2012; 520: 6-10.

104. Newbold RR, Jefferson WN ve Banks PS. Long-term Adverse Effects of Neonatal Exposure to Bisphenol A on the Murine Female Reproductive Tract. Reprod Toxicol., 2007; 24(2): 253–258.

105. Islam MS, Protic O, Giannubilo SR et al. Uterine leiomyoma: available medical treatment and new possible therapeutic options. J Clin Endocrinol Metab., 2013; 98(3): 921-34.

106. Emanuele NV, LaPaglia N, Steiner J, Kirsteins L et al. Effect of chronic ethanol exposure on female rat reproductive cyclicity and hormone secretion. Alcohol Clin Exp Res., 2001; 25(7): 1025-9.

107. Okolo S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol., 2008; 22(4): 571-88.

108. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. Hum Reprod Update., 2004; 10(3): 207-20.

109. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ et al. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. Am J Obstet Gynecol., 1993; 169(1): 78-85.

110. Verma SP, Goldin BR, Lin PS. The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. Environ Health Perspect.,1998; 106(12): 807-12.

111. Mittal P, Shin YH, Yatsenko SA, Castro CA et al. Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. J Clin Invest., 2015; 125(8): 3280-4.

112. Stewart EA. Uterine fibroids. Lancet., 2001; 357(9252): 293-298.

113. Mozzachio K, Linder K, Dixon D. Uterine Smooth Muscle Tumors in Potbellied Pigs (Sus scrofa) Resemble Human Fibroids: A Potential Animal Model. Toxicol Pathol, 2004; 32(4): 402-7.

114. Prizant H, Sen A, Light A, Cho SN et al. Uterine-specific loss of Tsc2 leads to myometrial tumors in both the uterus and lungs. Mol Endocrinol., 2013; 27(9): 1403-14.

115. J. I. Everitt, D. C. Wolf, S. R. Howe, T. L. Goldsworthy et al. Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Clinical and pathological features. Am J Pathol.,1995; 146(6): 1556–1567.

116. Ly A, Mills AM, McKenney JK, Balzer BL et al. Atypical leiomyomas of the uterus: a clinicopathologic study of 51 cases. Am J Surg Pathol., 2013; 37(5): 643-9.

117. Sun X, Mittal K. MIB-1 (Ki-67), estrogen receptor, progesterone receptor, and p53 expression in atypical cells in uterine symplastic leiomyomas. Int J Gynecol Pathol., 2010; 29(1): 51-4.

118. Kaneko-Tarui T, Commandeur AE, Patterson AL, DeKuiper JL et al. Hyperplasia and fibrosis in mice with conditional loss of the TSC2 tumor suppressor in Müllerian duct mesenchyme-derived myometria. Mol Hum Reprod., 2014; 20(11): 1126–1134.

119. Bimonte S, Barbieri A, Palma G, Rea D et al. Dissecting the role of curcumin in tumour growth and angiogenesis in mouse model of human breastcancer. Biomed Res Int., 2015; 2015: 878134.

120. Shimomura Y, Matsuo H, Samoto T, Maruo T. Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. J Clin Endocrinol Metab., 1998; 83(6): 2192-8.

121. Yao Q, Lin Y, Li X, Shen X et al. Curcumin ameliorates intrahepatic angiogenesis and capillarization of the sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. Toxicol Lett., 2013; 222(1): 72-82.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL BELGESİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK

35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/06/2015
Toplantı Tarihi : 17 Mart 2015

Sayın, Prof.Dr.Ülker CANKURT
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

12/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz **"Deneysel olarak oluşturulan sıçan uterus leiomyoması modelinde kurkuminin etkisinin histolojik olarak incelenmesi"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Yunus KARSLI
Fakülte Sekreteri

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye
(topl. katılamadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Üye

Prof.Dr.M.Ensari GÜNELİ
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye
(topl. katılamadı)

Doç.Dr.Meral KARAMAN
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye
(topl. katılamadı)

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-2 ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

AYŞEGÜL KİRAZ

Tc Kimlik No/Pasaport No:	10281089694
Doğum Yılı:	01/06/1989
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Balçova/İzmir
Telefon:	05079118761
Fax:	
e-posta:	aysglkiraz@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2012
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Histoloji ve Embriyoloji	Yüksek Lisans	2016

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı

YAYINLAR

SCI,SSCI,AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
