



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORTEZOMİB'İN OVEREKTOMİ UYGULANAN SIÇAN
UTERUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ:
HİSTOPATOLOJİK, STEREOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA**

DOKTORA TEZİ

Habib KHOSHVAGHTİ

**Samsun
Kasım-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORTEZOMİB'İN OVEREKTOMİ UYGULANAN SIÇAN
UTERUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ:
HİSTOPATOLOJİK, STEREOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA**

DOKTORA TEZİ

Habib KHOSHVAGHTİ

Danışman

Doç. Dr. Berrin Zühal ALTUNKAYNAK

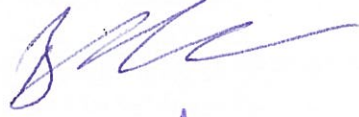
SAMSUN

Kasım-2016

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Habib KHOSHVAGHTİ tarafından Doç. Dr. Berrin. Zühal ALTUNKAYNAK danışmanlığında hazırlanan ‘‘Bortezomib’in Overektomi Uygulanan Sıçan Uterusu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi: Histopatolojik, Stereolojik ve İmmünohistokimyasal Bir Çalışma’’ başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 04 /11 /2016 tarihinde yapılan sınav ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Berrin Zühal ALTUNKAYNAK



Üye : Prof. Dr. Ersan ODACI

Yoktur

Üye : Yrd. Doç. Dr. Aysin Pınar TÜRKMEN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Emel ÖZDEŞ

emel

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ebru ANNAÇ



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca gerek bilimsel ve gerekse tez çalıŐmalarım s¼recinde tarafıma katkılarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. B. Z¼hal ALTUNKAYNAK'a, aynı zamanda Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Doç. Dr. M. Ey¼p ALTUNKAYNAK, Doç. Dr. B¼lent AYAS ve Yrd. Doç. Dr. Aysin Pınar T¼RKMEN'e teŐekk¼r¼ bir borç bilirim. Ayrıca değerli hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Emel ÖZDEŞ, Prof.Dr. Ersan ODACI, Yrd. Doç. Dr. Ebru ANNA'a ve eğitim s¼recim boyunca beni destekleyen sevgili aileme minnetlerimi sunarım.

Bu tezin deneysel b¼l¼m¼ "Bortezomib'in overektomi uygulanan sıçan uterusu ¼zerine etkilerinin incelenmesi: histopatolojik, stereolojik ve imm¼nohistokimyasal bir çalışma" başlığı ile Atat¼rk ¼niversitesi Rekt¼rl¼đ¼ Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurulu Başkanlığının 06.06.2014 tarih ve 95 sayılı kararı ile etik kurul y¼nergesine uygun olarak yapılmıŐtır.

ÖZET

BORTEZOMİB'İN OVEREKTOMİ UYGULANAN SIÇAN UTERUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ: HİSTOPATOLOJİK, STEREOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA

Amaç: Bu çalışmada; ovarektomi yapılmış sıçanlarda proteazom inhibitörü olarak kullanılan Bortezomib'in uterus üzerindeki olası koruyucu etkilerinin histolojik, morfolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile değerlendirmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Metot: Çalışmada denek olarak 12 haftalık, 250-300 gr canlı ağırlığında 30 adet *Sprague dawley* cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar başlangıçta kontrol grubu (Kont, n=6) ve ovarektomi yapılmış deney grubu (n=24) olmak üzere iki ana gruba ayrılmışlardır. Bilateral ovarektomi yapılmış gruplarda kendi arasında ovarektomi yapılan grup (Ovt, n=6), ovarektomi sonrası β -Glukan verilen grup, ovarektomi sonrası Östrojen verilen grup (Ost, n=6), ovarektomi sonrası Bortezomib verilen grup (Bort, n=6) olmak üzere 4'ü ayrılmıştır. Deneklerden elde edilen uterus dokuları çıkartılarak stereolojik, rutin ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve NF- κ B (Nükleer factor-kappa B=P65) reaktivitesi açısından immünohistokimyasal yöntemler ile incelenmiştir.

Bulgular: Stereolojik ve histopatolojik incelemelerde ovarektomi ve ovarektominin ardından östrojen uygulamasının tüm uterus tabakalarında atrofiye ve ayrıca hem epitelyal hem de stromal hücrelerde dejenerasyona neden olduğu açıkça görüldü. β -glukan ve özellikle de Bortezomib'in uterus tabakalarının ve söz konusu hücrelerin sağlıklı yapısının korunmasında etkili olabileceği görüldü.

Sonuç: Tüm bu bulgular ışığında menapozdan sonra östrojen replasman tedavisi uygulamasının uterus morfolojisi ve yapısı üzerinde herhangi bir koruyucu etkisi olmadığı, hatta mevcut durumu daha da kötüleştirebileceği, östrojen yerine β -glukan ve özellikle de bir proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in kullanılmasının proteozom inhibisyonu ve NF- κ B yolağı üzerinden faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bortezomib, β -glukan, Ovarektomi, Östrojen, Rat, Uterus, Yaşlanma

Habib KHOSHVAGHTİ, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Samsun, Kasım-2016

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BORTEZOMIB ON THE OVARIECTOMY APPLIED RAT UTERUS: A HISTOPATHOLOGICAL, STEREOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Aim: In this study; potential protective effects of bortezomib, which was used as a proteasome inhibitor, on the uterus of ovariectomized rats were investigated with histological, morphometric and immunohistochemical methods.

Materials and Methods: In this study, 30 Sprague dawley strain female rats (12 weeks old, 250-300 g body weight) were used. Animals in the control group (Cont, n=6) were not subjected to any treatment. Ovariectomy was performed on the experimental groups. They (n=24) were divided into Ovariectomy (Ovt, n=6), Estrogen (Ost, n=6), β -glucan (β -glu, n=6) and Bortezmib (Bort, n=6) groups. Twelve weeks later, the subjects were perfused while they were 24-week old. Then, uterine tissues were removed and examined by morphometrical, routine light microscopical, electron microscopical methods and in terms of NF-kB (nuclear factor-kappa B=P65) immunoreactivity.

Results: Morphometric and histopathological examination showed that ovariectomy and the application of estrogen after ovariectomy lead to the atrophy in all layers of uterus and also clearly cause the degeneration in both epithelial and stromal cells. But, β -glu and especially bortezomib was seen to be effective in the uterus and protect the layer structures and these cells.

Conclusion: In the light of these findings, we suggest the absence of any protective effect of estrogen replacement therapy after menopause, and that the therapy may worsen the current situation even more in terms of the uterine morphometry and the structure. However, β -glu, and in particular a proteasome inhibitor bortezomib was found to be useful by means of the proteasome inhibition and NF-kB pathway.

Keywords: Aging, Bortezomib, β -glucan, Estrogen, Ovariectomy, Rat, Uterus

Habib KHOSHVAGHTI, Ph.D. Thesis

Ondokuz Mayıs University- Samsun, November -2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bort	: Bortezomib
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktörler
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
En	: Endometriyum
Ep	: Epitelyum
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HO	: Hidroksil Radikal
IL-1b	: İnterlökin-1b
İkB	: İnhibitör Kabba B
LH	: Luteinizan Hormon
Lp	: Lamina Propria
Malign HT	: Malign Hipertansiyon
MM	: Multiple Myeloma
MMy	: Multiple Miyelom
My	: Miyometriyum
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAÖC	: Noktalı Alan Ölçüm Cetvelleri
NF-Kb	: Nükleer Faktör Kappa B
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü
Ovt	: Overektomi
Öst	: Östrojen
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
Pr	: Perimetriyum
RNA	: Ribonükleik Asit
SRÖ	: Rasgele Sistemik Örneklem
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
Ub	: Uterus Bezi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yaşlanma.....	4
2.2. Yaşlanma Teorileri.....	4
2.2.1. Telomer-Telomeraz Teorisi.....	4
2.2.2. Yıkıcı Hatalar ve Hasarlar Teorisi.....	6
2. 4. Yaşlanma Sürecinde Dokudaki Değişiklikler	7
2.5. Kadın Üreme Sisteminin Histoloji ve Embriyolojisi	9
2.6. Kadın Üreme Sistemi Fizyolojisi.....	11
2.6.1. Menstruasyon Süreci	11
2.6.2. Yaşlılıkta Oluşan Menopoz Süreci	12
2.7. Östrojen.....	12
2.8. Overektomi.....	13
2. 9. Nekroz	14
2.10. Apoptoz	15
2.11. Proteozom	16
2.12. Bortezomib.....	17
2.13. β -Glukanlar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Etik Kurul, Deneklerin Temini ve Deney Grupları.....	19

3.1.1. Etik Kurul Onayı	19
3.1.2. Materyal Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	19
3.2. Deney Prosedürü	20
3.2.1. Overektomi Prosedürü.....	20
3.3. Işık Mikroskopik İşlemler	22
3.3.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskopik İşlemler	22
3.5. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi	24
3.7. Stereolojik İşlemler	25
3.7.1. Uterus Tabakalarında Kalınlık Ölçümü.....	25
3.7.2. Stereolojide Hacim Hesabı	26
3.7.3. Nükleator Metoduyla Ortalama Uterus Bezi Alanının Hesaplanması	30
3.8. İstatistik	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Stereolojik Bulgular	32
4.1.1. Endometriyum Kalınlığına Ait Bulgular	32
4.1.2. Miyometriyum Kalınlığına Ait Bulgular.....	34
4.1.3. Perimetriyum Kalınlığına Ait Bulgular	36
4.1.4. Endometriyum Hacmine Ait Bulgular.....	38
4.1.5. Uterus Bezi Alanına Ait Bulgular	40
4.1.6. Uterus Bezi Hacmine Ait Bulgular.....	42
4.1.7. Miyometriyum Hacmine Ait Bulgular	43
4.1.8. Perimetriyum Hacmine Ait Bulgular.....	45
4.1.9. Damar Hacmine Ait Bulgular.....	47
4.2. Işık Mikroskop ile Elde Edilen Bulgular	48
4.2.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular.....	48
4.2.2. Ovt Grubuna Ait Bulgular	57
4.2.3. Ost Grubuna Ait Bulgular	64
4.2.4. β -glu Grubuna Ait Bulgular	71
4.2.5. Bort Grubuna Ait Bulgular	76
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	81

4.3.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular.....	81
4.3.2. Ovt Grubuna Ait Bulgular	84
4.3.3. Ost Grubuna Ait Bulgular	87
4.3.4. β -glu Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	90
4.3.5. Bort Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular	93
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular	96
4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular	96
4.4.2. Ovt Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular.....	99
4. 4. 3. Ost Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular	105
4.4.4. β -glu Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular	108
4.4.5. Bort Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular	111
5. TARTIŞMA.....	114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	122
KAYNAKLAR	123
EKLER	138
EK 1- Etik Kurul Onayı	138
ÖZGEÇMİŞ	139

1. GİRİŞ

Biyolojik yaşlanma; yaşa bağlı hücre metabolizmasının azalması sonucu kademeli olarak üretilen metabolik ürünlerin azlığı, temel işlevlerini yerine getirme kapasitesinin kaybı, vücudun fizyolojik bütünlüğü yitirildiği ve kaçınılmaz olarak ölümle sonuçlanacağı bir süreçtir (Finch ve Morgan, 1990). Yaşlanma; oksidatif stresin artması, inflamatuvar yanıtın çoğalması ve ilerleyici organ yetmezliği ile karakterizedir. Yaşlılık aşamasında hücre ve organ fonksiyonlarında pek çok değişiklik ortaya çıkmaktadır (Lepez-Otin ve ark., 2013). Sağlıklı yaşlanma ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklar bazı ortak patolojik mekanizmalar ile nöronal disfonksiyona neden olur; özellikle yaşlılıkta ortaya çıkan mitokondri hasarı, hücrelerde enerji açığına ve hücreye glikoz girişinin azalmasına yol açar (Lam ve ark., 2009). Mitokondriyal solunumun azalması sonucu yaşlı farelerin beyinde, özellikle hipokampus ve serebral kortekste mitokondriyal hasar gözlemlenmiştir. Bu beyin bölgelerinde yaşlanma ile görülen belirgin değişiklikler, yaşlanma sürecinde en çok etkilenen bölgelerin hipokampus ve serebral korteks olduğunu düşündürmektedir (Navarro ve Boveris, 2008).

Yaşlanma karmaşık bir olgu olmakla birlikte, yaşlanmaya yol açan mekanizmalar ile ilgili pek çok teori önerilmiştir. Serbest radikal teorisine göre, mitokondriyal hasar, reaktif oksijen türevlerinden kaynaklanır ve yaşlanma nedenlerinden birisidir (Schottker ve ark., 2015). Reaktif oksijen türevlerinin üretimi ve dokuların antioksidatif kapasitesi arasındaki doğal denge bozulduğunda, mitokondriyal DNA hasarı ve disfonksiyonu gerçekleşir, ardından oksidatif stres oluşur ve böylece hücrelerde apoptoz artar (Barja, 2013).

Telomer teorisine göre, daha yüksek apoptoz oranı, hücrelerin yenilenme hızının artmasına neden olur ve bu durum da telomerlerin kısalmasına yol açar. DNA uçlarının uzunluğu bu mitotik hücrelerin olası mitoz sayısını sınırlar (Shawi ve Autexier, 2008). Özet olarak, yaşla birlikte hücreler daha hızlı yaşlandığından, artan telomer kaybını reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretimi takip eder ve bu durum da yaşlanma yollarından birisidir (Starr ve ark., 2008). Serbest radikaller antioksidan sistem tarafından nötralize edilir. Bu sistem, özellikle hücre, membran fonksiyonlarını serbest radikal saldırılarına karşı korur (Sies, 1997). Günümüzde yaşlanma ve yaşla ilişkili hastalıkların gelişiminde oksidatif stresin özgül rolü araştırılmaktadır. Ancak bu

kompleks ilişkiyi tanımlayan mekanizmalar halen belirsizdir (Voss ve Siems, 2006). Karmaşık ilişkili oksidatif stres belirteçlerinin fonksiyonunu anlamak için, bu belirteçlerin normal ve patolojik süreçlerdeki düzeyleri ölçülebilir (Mateos ve Bravo, 2007).

Oksidatif hasar sonucu meydana gelen değişikliklerden birisi de hücrede yapılan yeni proteinlerin hatalı bir biçimde katlanmasıdır. Bu hasarlı proteinler chaperonlar tarafından tanınan, bir poli-ubikuitin zinciri ile etiketlenir ve proteazomlar tarafından yıkılırlar (Schottker ve ark., 2015). Hücredeki poli ubikuinasyon ve protein bozulmasının sık ve proteinlerin kısa ömürlü olması sonucu hücre ölümü gerçekleşir (Li ve Wang, 2011). Bu noktada proteozomlar hasarlı proteinleri yıkarak hücrenin apoptoza gitmesini önlemeye çalışırlar. Bu yoldan faydalanılarak geliştirilen ilaçlar ile proteazom inhibisyonu yapılarak kanser hücrelerinin apoptoza gitmesi sağlanmakta ve böylece kanserin çeşitli tiplerinin başarı ile tedavi edilmesi mümkün olabilmektedir (Hoeller ve Dikic, 2009; Hegde ve Upadhyaya, 2011; Li ve Wang, 2011; Baraibar ve Friguet, 2012). Bu durumun aksine, Huntington ve Alzheimer gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda ise proteozom aktivasyonunun yararlı olabileceği öne sürülmüştür (Huang ve Chen, 2009).

Doğal menopoz ortalama 45-55 yaşları arasında oluşur ve kadınların normal yaşlanma sürecinde mutlaka görülen bir olaydır (Gold ve ark., 2001). Bu dönemde kadınlarda birçok fizyolojik değişiklik meydana gelir (Hale ve Burger, 2009).

Kadınlarda post menapozal dönemde ortaya çıkan bu değişiklikler yaşam şekli ve kalitesini önemli düzeyde etkilemektedir (Asikainen ve ark., 2003). Bu dönemdeki tüm değişiklik ve fizyolojik bozuklukları azaltmak amacıyla östrojen tedavisi önerilmektedir. Ancak siklusun devamı ve hücrelerin sağlıklı olabilmesi açısından proteozom aktivitesi de çok önemlidir. Bu aşamada proteozomun hücrenin ihtiyaç duymadığı (oksidlenmiş, hasar görmüş, yanlış sentezlenmiş), hücre içi sinyalizasyonunda ve apoptozda önemli rol oynayan protein gruplarının düzenlenmesinde etkili olduğu bilinir (Saelens ve ark., 2004; Elmore, 2007). Literatürde kanser hücrelerinde proteozom inhibisyonunun önemli olduğu da yer almaktadır. Çalışmamızda kullanılan, proteozom inhibitörü olan bir ajandır. Multiple miyelom (MMy) hastalarının tedavisinde kullanılan pozitif sonuçlar alındığından önemi giderek artmaktadır. Proteozom inhibisyonu; hücre içindeki olan en önemli yollardan biri

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B)' nin baskılanması olarak açıklanmaktadır (Hou et al., 2014). Bu durum, hücre proliferasyonunu, büyüme faktörlerini ve ayrıca apoptotik ve anti-apoptotik proteinleri kodlayan çeşitli genlerin transkripsiyonunu inhibe eder (Chen, 2005).

Literatür taramalarında, uterus dokuları üzerine Bortezomib'in etkilerini içeren çalışma sayısının oldukça az olduğu gözlemlenmiştir (Chen, 2005). Bu çalışmada; overektomize sıçanların uterusu üzerinde proteazom önleyici bortezomib'in koruyucu etkisi morfometrik, histolojik, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan overektomize deneklere sırası ile östrojen, β -glukan ve bortezomib uygulanmış; östrojen eksikliğinin hem endometriyumda, hem de miyometriyumda belirgin atrofiye sebep olduğu gözlenmiştir. Bortezomib uygulamasının ise endometriyumu koruduğu histopatolojik ve morfometrik analizlerle gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal incelemede ise proteozom inhibisyonuna rağmen endometriyumda sitoplazmik NF- κ B aktivitesinin etkileri gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak; Ubiquitin-Proteozom Sistemi hücrel protein sağlığının korunmasında hayati bir role sahiptir. Hücrelerde bulunan 26S proteozomlar seçici olarak; yanlış katlanan proteinleri veya artık ihtiyaç olmayan proteinleri ortadan kaldırır, ayrıca protein kalitesinin kontrolünü sağlayarak, metabolizma, hücre döngüsü veya antijen sunumu gibi birçok hücrel süreçte rol oynar (Voges ve ark., 1999; Finley ve ark., 2016). Bu sistemin işlev bozukluğu nörodejeneratif hastalıklar ve kanser de dâhil olmak üzere, çeşitli patolojiler ile ilişkilidir. Bu nedenle, proteozom önemli bir ilaç hedefidir ve hatta neredeyse hücrel esaslı etkin tedavi için bu sistemin de dikkate alınması bir ön koşuldur (Sledz ve Baumeister, 2016).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bir proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in overektomize sıçan uterusu üzerinde hem morfometrik, hem de genel ve ince yapı düzeyinde olumlu etkileri olabileceğini göstermektedir. Bu etkinin proteozom inhibisyonu ve NF- κ B yolağı üzerinden olduğu düşünülmektedir. Böylece çalışmanın literatüre katkı sağlayacağını umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma

Biyolojik yaşlanma, yaşa bağlı hücre metabolizmasının azalması sonucu kademeli olarak üretilen metabolik ürünlerin azaldığı, temel işlevlerini yerine getirme kapasitesini kaybettiği, vücut fizyolojik bütünlüğünün yitirildiği ve kaçınılmaz olarak ölümle sonuçlanacağı bir süreçtir (Finch ve Morgan, 1990). Yaşlanma; molekül, hücre ve organları kapsayan bir modifikasyon mekanizması olsa da doğada en az anlaşılmiş biyolojik süreçlerden biridir. Son yıllardaki çalışmalar, özellikle yaşamın ve hastalıkların hücresel ve moleküler düzeyde genetik ve biyokimyasal süreçlerin değişimini izleyerek yaşlanma oranının kontrol edilebilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu kapsamda genomik istikrarsızlık, telomer bozulması, epigenetik değişiklikler, proteostaz kaybı, düzensiz besin almak, mitokondriyal disfonksiyon, hücre yaşlanması, kök hücre tükenişi ve değişen hücre içi iletişim gibi süreçlerin yaşlanma ile ilişkisi olabileceği bildirilmiştir (Vijg, 2004; Lombard ve ark., 2005; Garinis ve ark., 2008; Lopez-Otin ve ark., 2013).

2.2. Yaşlanma Teorileri

Bilim adamları yaşlanmanın yaklaşık 7000 genin allelik varyasyonu, genlerde meydana gelen mutasyonlar hatta bazı genlerin yokluğu ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir (Mather ve Carstensen, 2005). Bu karmaşık süreçler, farklı mekanizmalar ve multifaktöriyel nedenlerden kaynaklanmaktadır. Günümüzde yaşlanma sürecini ayrıntılarıyla olmasa da açıklamaya çalışan, pek çok teori mevcuttur (Vijg, 2004; Lombard ve ark., 2005; Garinis ve ark., 2008). Bu teoriler aşağıda kısaca özetlenmiştir:

2.2.1. Telomer-Telomeraz Teorisi

Yaşlanmanın nedenlerinden biri olduğu düşünülen "telomer kaybı" hipotezine göre ökaryotik organizmaların kromozomlarının uçlarında bulunan spesifik DNA tekrar dizileri olan telomerler, her bölünme sonunda belli miktarlarda azalarak yaşlanma ve apoptozise neden olmaktadır (Cong ve ark., 2002). Bu değişim moleküler düzeyde DNA'nın mutasyonlar noktasında, telomer yıpratma ve metilasyon kalıplarındaki değişikliklerdeki bir artış ile de ilişkilidir (Fraga ve ark., 2005; Risques ve ark., 2008),

Yine bu hipoteze göre telomerler DNA'nın son kısmının tamamlanmasında rol oynamaktadır. Telomer ile spesifik DNA bağlayıcı proteinler özel nükleoprotein yapılarının oluşturulması için birleşir ve eksonükleolitik bozulmayı önleyerek kromozomların uçtan uca füzyonu ile genomik bütünlüğün korunmasını sağlar (Hatakeyama ve ark., 2016). Kromozomal istikrarın korunmasında önemli rolü olan telomer uzunluğu, telomerik DNA'nın bir zincirinden sentezlenen, ribonükleoprotein yapısındaki telomeraz enzimleri tarafından düzenlenir (Alder ve ark., 2011). Kanser hücrelerinin çoğunun telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Natarajan ve ark., 2016). Somatik hücreler normal şartlar altında sonsuza kadar bölünemezler. Somatik hücrelerin periyodik bölünmesinde her defasında telomer ile DNA'nın kademeli kaybı görülmektedir. Telomerlerin kademeli kısalması, proliferen hücrelerin fonksiyon kaybı ile sonuçlanır. Bu durum ise hücre sağlığını ve ömrünü etkilemektedir (Lansdorp, 2000; Martinez ve Blasco, 2011; Ornish ve ark., 2013). Diğer bir değişle genetik olarak telomer uzunluğu yaşın artmasıyla birlikte azalmaktadır (Nordfjall ve ark., 2005; Shammass, 2011; Njajou ve ark., 2012). Yaşamın erken dönemlerinde, kalıtımın telomer uzunluğunda güçlü etkisi olduğu (Robertson ve ark., 2000) belirlenmiş ve bu durum daha kısa telomere sahip kişilerin daha kısa ömürlü olması ile ilişkilendirilmiştir (Salpea ve Humphries, 2010; Ludlow ve Roth, 2011). Pek çok hücrel genin regülasyon döngüsü hücrel yaşlanma sırasında değişmektedir (Zhang ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda yaşlanma sürecinde telomer uzunluğunun kısalmasının genetik bozukluklar, kanser riskleri (meme, mesane, akciğer mide ve bağırsak) ve konjenital diskeratosis sendromu gibi ailesel hastalıklar ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Adaikalakoteswari ve ark., 2007). Hatta çocuklarda erken yaş stresleri ve davranış problemlerinde genetik polimorfizmin yanı sıra telomer uzunluğundaki değişimleri de hastalığın şiddeti ile bağlaştıran çalışmalarda mevcuttur (Armanios ve ark., 2005; Comijs ve ark., 2013). Ayrıca; bazı çalışmalarda sigara, obezite, sağlıksız beslenme, oksidatif stres ve enflamasyon gibi olumsuz faktörlerin telomer kısalması ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Donate ve Blasco, 2011; Tiainen ve ark., 2012; Ornish ve ark., 2013).

2.2.2. Yıkıcı Hatalar ve Hasarlar Teorisi

Serbest radikaller tarafından oluşturulan hasar incelendiğinde, Denham Harman tarafından önerilen Yaşlanma Serbest Radikal Teorisine göre, serbest oksijen radikalleri normal metabolik süreçlerde endojen olarak ortaya çıkar ve yaşlanma sürecinde rol oynar (Boussicault ve ark., 2008). Reaktif Oksijen Türleri terimi, moleküler oksijen (O_2), süperoksit radikalleri gibi değişken metabolitleri içerir, O_2 den ve hidroksil radikal'den (HO) ve hidrojen peroksit gibi ve radikal olmayan (H_2O_2) moleküllerden daha yüksek bir reaktiviteye sahiptir (O_2) (Inoue ve ark., 2003; Winterbourn, 2008). Artan yaşla birlikte oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik, hücresel süreçlerde işlevlerin progresif kaybı ile sonuçlanan çeşitli makromoleküllerin birikmesine ve dolayısı ile oksidatif hasara yol açarak, yaşlanma fenotipine neden olur (Bokov ve ark., 2004). Diğer taraftan oksidatif strese bağlı oluşan enflamasyon, yaşlanma ve kronik hastalıklarda rol oynayan oksidatif stresin klinik etkilerini anlamada önemli bir rol oynamaktadır (Cadenas ve Davies, 2000). Birçok kanıt yaşlanmada oksidatif stres teorisini desteklemektedir (Bokov ve ark., 2004). Buna karşın hücresel yaşlanma sırasında gözlenen mitokondri kitlesinde ve reaktif oksijen türleri düzeylerindeki artışın, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma ile bağlantısı bilindiği halde bu işlemler ve yaşlanma arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Passos ve ark., 2007). Salmon ve ark. (2010), fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada antioksidan savunma sistemindeki genetik manipulasyonlar ile oluşturulan oksidatif stresin birkaç istisna dışında ömür uzunluğunda bir değişikliğe neden olmadığını vurgulamıştır.

Bilgi aktarımındaki hatalar ve gen yapısında meydana gelen değişiklikler incelendiğinde hücre fonksiyonunun, kendi DNA yapısının sağlamlığına bağlı olduğu bildirilmektedir. DNA kodlama bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar, tümör oluşumu veya yaşlanma ile sonuçlanan anormal protein ekspresyonuna veya fonksiyonuna neden olabilir. (Campisi ve Yaswen, 2009). Somatik hücrelerin bazı tiplerinde, gen ekspresyon profillerinin değişimine bağlı olarak kronolojik yaşın da değiştiği bildirilmiştir (Chambers ve ark., 2007). Diğer taraftan biyolojik yaşlanma sürecinde protein oksidasyona bağlı artan strese karşı tepki oluşturan genler belirli süreçlerde proteinlerin hasarlı veya yanlış katlanmış hale gelmesine yol açmaktadır (Chambers ve ark., 2007).

2.3. Yaşlanma Sürecinde Hücresel Değişiklikler

Farklı türden hücreler, farklı derecelerde oksidatif fosforilasyon sistemi kullanmasına rağmen, pek çok araştırma verilerine göre mitokondri disfonksiyonunun yaşlanmanın ilerlemesinde önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (Hutter ve ark., 2004). Fakat pek çok araştırmacı mitokondri disfonksiyonunun hücresel yaşlanmanın diğer uyarılarından (telomer disfonksiyonu, onkogen aktivasyonu ve genotoksik stress) bağımsız olduğunu bildirmişlerdir (Zwerschke ve ark., 2003; Hutter ve ark., 2004; Passos ve ark., 2007). Diğer taraftan stres genotoksik hücre veya replikatif yaşlanmış hücreler, Golgi komplekslerinde sitokinler, büyüme faktörleri, metalloproteinazlar ve hücre dışı matriks proteinleri salgılayarak inflamasyonu indüklemektedir (Coppe ve ark., 2010).

Yaşlanan dokuların ve organizmaların lizozomlarında değişiklikler yaygındır ve yaşlanma göstergesi olarak kullanılmaktadır. Lizozom, proteinler de dâhil olmak üzere pek çok makro moleküllerin degradasyonundan sorumlu bulunmaktadır. Lizozomlara substrat proteinlerin verilmesi için en az beş farklı yol bilinmektedir. Bu yollardan üçü, yaşla birlikte azalır ve böylece proteoliz artmaktadır (Cuervo ve Dice, 2000). Yapılan yaşlanmayla birlikte peroksizomal fonksiyonda genel düşüşe işaret etmektedir (Perichon ve Bourre, 1996). Peroksizomlar daha küçülür, ama yaşlı sıçanlarda sayısı daha da artar (Popper, 1986). Yaşlanmayla birlikte peroksizomların katalaz ve açıl-CoA oksidaz içeriğinin azaldığı buna karşın tiyolaz ve ürat oksidaz içeriğinin arttığı gösterilmiştir (Masters ve Crane, 1995). Ayrıca, nükleer yapılarıdaki organizasyon bozukluğu ya da defekt de kanser ve yaşlanmayla ciddi olarak ilişkilidir (Foster ve Bridger, 2005). Hücresel yaşlanma sırasında bu yapıların morfolojisi değişikliğe uğrayarak yaşlanmış hücrelerin daha da büyümesine ve amorf hale dönüşmesine neden olur (Sherwood ve ark., 1988).

2. 4. Yaşlanma Sürecinde Dokudaki Değişiklikler

Yaşlanma sırasında, iskelet kaslarında, kas kitlesi ve işlev kaybı ile birlikte moleküler, histolojik ve fonksiyonel değişiklikler görülür (Hasten ve ark., 2000). Yaşlanan kas; myojenik potansiyel ve fibrojenik aktivite arasında bir denge kaybına maruz kalır. Böylece yaşlanmış kas; giderek daha da fibrotik olurken, tamir kapasitesi

ve rejenarasyon yeteneğinin de azalması ile kas dokusunda önemli bir bağ dokusu birikimi meydana gelir (Wood ve ark., 2014). Yaşlanma ile birlikte kemik mineral kompozisyonunda da büyük değişiklikler olur (Koester ve ark., 2011).

Yaşlılığın kadın üreme sistemi üzerine etkisine bakıldığında; hormonal seviyedeki azalma nedeniyle uterus ve overlerde atrofi görülür. Erkeklerde genital sistem değişiklikleri daha az görülmekte; testosteron salınımında azalma daha geç ve yavaş gerçekleşmektedir (Dennerstein ve ark., 2000; Freeman ve ark., 2001; Hollander ve ark., 2001; Bromberger ve ark., 2010). Eklem kıkırdağındaki yaşa bağlı en bariz yapısal değişiklik eklem yüzeyindeki fibrilasyondur (Buckwalter ve ark., 2000). Diğer taraftan eklem kıkırdağı matriksinde yer alan kollajen çapraz bağların lif yoğunluğunda artış ve azalmış su konsantrasyonu izlenmektedir. Gastrointestinal sistemde yaşlanma ile ilgili disfonksiyon gelişme riski, özellikle orofarenks, yemek borusu, kolon ve rektumda fazladır. Yaşlı insanlarda, hipofaringeal sfinkterdeki peristaltik basınç dalgası ve amplitüd süresi artarken üst özofagus sfinkterinin amplitüdü azalmaktadır (Shaker ve ark., 1993). Yaşlanmanın gastrik ve kolonik motiliteye etkisi, mide'den sıvıların yavaş boşalması, dışkı üretimi ve geçiş hızının azalması olarak ortaya çıkmaktadır (Smits ve Lefebvre, 1996). Beyin yaşlanması nörofizyolojik süreçlerde progresif düşüş ve bellek bozukluğu ile ilişkilidir. Ayrıca memelilerde yaşlanma ile birlikte, nöronal sinapsların ve dendritik yoğunluğun azaldığı gözlenir (Page ve ark., 2002; Mostany ve ark., 2013).

Diğer yandan yaşlanma ile beraber, immün sistemde de belirgin ve kapsamlı değişikliklere uğramaktadır. Bu değişimin özellikle T hücre aracılı cevaplar ve dentritik hücre fonksiyonunda bozukluğa yol açtığı ve böylece yaşlı insanlarda enfeksiyonlara, otoimmüniteye ve kansere yatkınlığı arttırmada anahtar bir rol oynadığı bildirilmiştir (Horber ve ark., 1997; Pascot ve ark., 1999). Yaşlanmada inflamasyon kaynağının tespit edilmesi için yaşlı farelerde yapılan bir çalışmada, makrofaj ve T hücrelerinin rolünün yüksek inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lumeng ve ark., 2011). Dişilerde bu durumun nedeni östrojenin polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) fagositozunu stimüle ederken, kemik iliğinden lökosit üretimini baskılayarak bu hücrelerinden proinflamatuvar sitokin salınımını da inhibe etmesidir. Böylece T hücre bağımlı inflamasyonun azaltılmasına yol açar (Martin-Millan ve Castaneda, 2013). Yaşlanmaya bağlı östrojen düzeyinin azalması inflamasyonu tetiklemektedir (Sniekers ve ark., 2009). Yaptıkları çalışmada dişi farelerde östrojen reseptörlerinin silinmesinin

eklemlerde subkondral kemik değişimi, kıkırdak hasarı ve osteofit değişiklikler ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Klinik uygulamalar, yaşlanmaya bağlı menapoz nedeniyle osteoartrit yaygınlığının kadınlarda erkeklere nazaran daha yüksek olduğunu göstermektedir (Martin-Millan ve Castaneda, 2013). Yaşlanma süreci ile birlikte dokuların insüline yanıtının azalması ve/veya glikoza karşı insülin salgılanmasında eksilme dolayısı ile de glikoz toleransında azalma görülmektedir. Yine, tiroid bezinin küçülmesine bağlı olarak da tiroid hormon seviyesinde azalma ve bazal metabolizma hızında yavaşlama görülmektedir (Honka ve ark., 2016).

2.5. Kadın reme Sisteminin Histoloji ve Embriyolojisi

Seks farklılaşması, birçok geni içeren karmaşık bir süreçtir. Erkeklerde cinsiyet oluşumu ovumu dölleyen XY kromozom yapısına sahip spermdeki Y kromozomu üzerinde yer alan SRY proteinine bağlıdır. Bu proteinin varlığında erkek embriyodaki gonad testis olarak farklılaşır. Eğer ovumu dölleyen sperm XX kromozom yapısında ise SRY bölgesi bulunmayacağından embriyo dişi olma yönünde farklılaşır ve gonadlar over olarak gelişir. Kadınlarda, gonadların yüzey epiteli, erkeklerden farklı olarak, prolifer olmaya devam etmektedir. Yedinci haftada, bu kortikal hücre kordonları, altta yatan mezenşime nüfuz ederler, ancak yine de yzeeye yakın kalırlar. Dördüncü ayda, bu kordanlar, izole hücre kümelerini bölerek, her biri ilkel germ hücrelerini vreleyerek premordiyal folikülleri oluşturur. Her yumurtalık basık, oval bir yapı olarak, pelvis boşluğu içinde derinde yer alır. Overin bir bölümü broad ligamente peritoneal katlantının bir bölümü olan mezovaryum ile başka bir bölümü de uterus duvarına overyan ligament ile yapışır.

Over yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek bir hücre tabakası ile kaplıdır. Bu hücre tabakasının altında kalın ve düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea yer alır. Tunika albuginea altında, over korteksi bulunur (Sadler, 2012). Korteksin derin kısımlarında, çokça damar içeren bağdokusu özelliğinde medulla kısmı bulunur. Korteks ve medulla arasında belirgin bir sınır yoktur ve bu iki bölge birbirine karışır. Embriyonik gelişim sırasında, vitellüs kesesi endoderminden köken alan germ hücreleri, ilkel overlere g eder ve orada oogonyumlara dönüşür, mitoz ile bölünür ve sonra mayoz bölünmenin ilk aşamasına girer ama bölünmeyi tamamlamazlar. Gelişimin bu aşamasında beklerler ve artık primer oosit olarak

adlandırılırlar. Daha sonra yine fetal yaşamda tek katlı ve yassı over epitel hücreleri ile çevrilen primer oositler primordiyal foliküllere dönüşürler (Sadler, 2012). Ergenlik başlangıcında hipofiz hormonlarının etkisi altında, primordial folikül, büyür ve sırası ile birincil, ikincil ve büyük olgun foliküle dönüşerek korteks derinliklerine doğru uzanırlar. Böylece over korteksi; gelişimin çeşitli aşamalarda, çok sayıda folikül ile doludur. Buna ek olarak, yine over korteksi içerisinde ovule olmuş bir folikülden farklılaşan korpus luteumlar veya dejenere olmuş korpus luteumlardan meydana gelen korpus albicanslar da görülebilir. Ayrıca over folikülleri, gelişmenin çeşitli aşamalarında (primordiyal, primer, sekonder ve olgun folikül) dejenerasyon da denilen atrezik bir sürece uğrayabilir ve dejenere olan foliküller daha sonra makrofajlar tarafından fagosite edilir. Foliküler atrezi, doğumdan önce başlar ve bireyin üreme dönemi boyunca devam eder (Eroschenko ve Fiore, 2005).

Her uterin tüp yaklaşık 12 cm uzunluğundadır ve ovaryumlardan uterusu doğru uzanır. Uterin tüpün bir ucu, uterus içine nüfuz ederek açılır; diğer ucu da, yumurtalığın yakındaki periton boşluğuna açılır. Üterin tüpleri normalde, devam eden dört bölgeye ayrılmıştır. Overe en yakın bölge, huni şekilli infundibulumdur. Infundibulumdan uzanan; ince fimbriya da denilen parmaklı uzantılılar, yumurtalığa yakın yerleşmektedir. Infundibulumdan sonra devam eden ikinci bölge, ampulla, en geniş ve uzun kısımdır. Olgun ovumun bir spermle döllenmesi uterin tüplerin bu kısmında gerçekleşir. Üçüncü bölge, isthmus, duvarındaki kas tabakası kalın olmakla beraber lümeni en dar ve tüp kısmı en düz olan bölümdür. Uterin tüpün son bölümü, interstisyel (intramural) bölgesidir ve kalın uterus duvarını geçerek, lümene açılır (Eroschenko ve Fiore, 2005).

İnsan uterusu, kalın kaslı bir duvarı olan, armut şeklinde bir organdır. Gövde veya korpus uterusun büyük bölümünü oluşturur. Uterusun yuvarlak, uterin tüplerin girişi üzerinde bulunan üst bölümüne, fundus denir. Uterusun daha aşağıdaki, gövde veya korpus altında bulunan, daha dar ve terminal kısmına, uterus boynu (serviks) denir. Uterus ağzı çıkıntı yaparak, vajina içine açılır (Eroschenko ve Fiore, 2005). Uterus duvarı üç tabakadan oluşur: bu tabakalar en dışta, seroza veya adventisiya ile kaplı perimetriyum, kalın düz kas tabakasından oluşan miyometriyum ve iç tabaka endometriyumdur. Endometriyum tek katlı prizmatik epiteli, sayısız uterus bezlerini oluşturmak üzere lamina propriaya invajine olur. Endometriyum, normal olarak iki

fonksiyonel tabakaya ayrılır, lümene komşu stratum fonksiyonalis ve bazalde stratum bazalis (Eroschenko ve Fiore, 2005). Gebe olmayan bir kadında yüzeydeki fonksiyonalis tabakası menstruasyon sırasında kan damarları ile birlikte ayrılıp dökülür ve fonksiyonalis tabakası derindeki bazal tabaka tarafından tekrar yapılır. Endometrium arterleri, adet döngüsünde ve adet aşamasında önemli bir rol oynamaktadır. Broad ligament içindeki, uterin arterler arkuat arterlere dallanırlar (Eroschenko ve Fiore, 2005). Arkuat arterler endometriyumunu besleyen düz ve spiral arterlere dal verirler. Düz arterler kısadır ve endometriyumun bazal tabakasını besler, spiral arterler ise uzun ve kıvrımlıdır ve endometriyumun yüzey veya fonksiyonalis tabakasını besler. Düz arterlerin aksine, spiral arterler kandaki hormonal değişikliklere son derece duyarlıdır. Adet döngüsü sırasında ovaryum hormonların östrojen ve progesteronun kandaki seviyelerinin azalması, fonksiyonel tabakanın dejenerasyonuna ve dökülmesine yol açarak adet kanamasına sebep olur (Eroschenko ve Fiore, 2005).

2.6. Kadın Üreme Sistemi Fizyolojisi

2.6.1. Menstruasyon Süreci

Kadınların hormonal sistemi; hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), ön hipofizden salgılanan, folikül uyarıcı hormon (FSH), ve luteinizan hormon (LH), ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron olmak üzere üç bölgeden kontrol edilir. Ön hipofizden salgılanan FSH ve LH hipotalamustan GnRH salınımına serbest yanıt olarak salgılanırlar. Östrojen ve progesteron ise anterior hipofiz bezinden salınan iki kadın cinsiyet hormonuna yanıt olarak ovaryumlar tarafından salgılanır (Guyton ve Hall, 2006). Yaklaşık her 28 günde bir, ön hipofiz bezinden salınan gonadotropik hormonlar, 8-12 yeni folikülün yumurtalıklarda büyümeye başlamasına neden olur. Bu foliküllerden birinin olgunlaşması; içerisinde büyüyen oositin döngünün 14. gününde atılması ile sonuçlanır. Folikül büyümesi sırasında, özellikle östrojen salgılanır. Ovulasyondan sonra, olgun folikülün salgı hücreleri korpus luteum haline gelir ve progesteron büyük miktarlarda salgılanır. İki hafta sonra, korpus luteum, dejenere olur, yumurtalık hormonları östrojen ve progesteron bunun üzerine büyük miktarda azalır ve menstruasyon başlar (Guyton ve Hall, 2006).

2.6.2. Yaşlılıkta Oluşan Menopoz Süreci

Kadınların 45-50'li yaşlarında, cinsel döngü genellikle düzensiz hal alır ve yumurtlama sıklıkla başarısız olur. Birkaç ay ile birkaç yıl arasında değişen bir süre sonra, döngü tamamen sona erer. Döngünün durduğu ve dişi cinsiyet hormonlarının yok denecek kadar azaldığı periyoda menopoz denilmektedir. Menopozun sebebi ovaryumların tükenmesidir (Guyton ve Hall, 2006). Bir üreme çağı boyunca 400 kadar primordiyal folikül olgunlaşır ovule olurken yüz binlerce folikül ise atreziye uğrar. 45 yaşlarına gelindiğinde FSH ve LH tarafından uyarılabilecek sadece bir kaç primordiyal folikül kalmıştır ve primordiyal foliküllerin sayısı sifıra yaklaştıkça ovaryumlarda sentezlenen östrojen miktarı da azalır. Östrojen yapımı kritik bir değerin altına düştüğünde, gonadotropinler FSH ve LH ın yapımını baskılayamaz. Bu nedenle menopozdan sonra gonadotropinler FSH ve LH (özellikle FSH) sürekli ve büyük miktarlarda üretilir. Zamanla geri kalan primordiyal foliküller atreziye uğrar ve ovaryumlardan östrojen salınımı sifıra iner (Lizcano ve Guzman, 2014). Östrojen yokluğu genelde belirli fizyolojik işaretleri de beraberinde getirir: (1) Cildin aşırı kızarması ile karakterize 'sıcak basmaları' (2) dispne hissi gelmesi (3) huzursuzluk (4) yorgunluk (5) anksiyete bunlardan bazılarıdır. (6) Muhtemel değişik psikotik durumlar, (7) tüm vücutta azalmış güç ve kemik kalsifikasyonu semptomları da kadınların yüzde 15'inde tedavi gerektirecek kadar güçlüdür. Psikolojik danışmanlık fayda vermez ise, günlük küçük dozlarda östrojen verilmesi genelde semptomları tersine çevirir ve aşamalı olarak doz azaltılması ile post-menapozal kadınlarda ağır semptomlar önlenebilmektedir (Mendez ve ark., 2005; Olszowy ve ark., 2012; Seki ve ark., 2012; Van Hook ve ark., 2013; Lizcano ve Guzman, 2014).

2.7. Östrojen

Östrojenler 18 karbonlu steroid hormonlardır. Başlıca östrojenler; β -östrodiol, östron ve östriol'dur. Kanda bulunan ve östrojenlerin en aktif şekli östradiol 17β dır ve daha az aktif olanı ise östrondur. Östrondan oluşan östriol, gebelikte idrarda ve plasentada bulunan östrojendir. Östrojenler, ovaryumlar, böbrek üstü bezler, plasenta ve testislerden sentezlenirler (Watson ve Simmons, 2010). Östrojenler etkilerini ya gen aktivasyonu ya da yapı ve fonksiyon metabolizması ile ilgili enzimlerini etkilemek suretiyle gerçekleştirirler. Moleküler oksijen ve NADPH'a gereksinim gösteren bir

enzim sistemi östrojen sentezini katalize etmektedir. Östrojenler belirli proteinlerin teşkili için ribosomal- RNA ve m- RNA sentezini teşvik ederek hücre proliferasyonunu ve ayrıca genital sisteminin morfolojik ve fonksiyonel olarak gelişimini sağlamaktadır (Guyton ve hall, 2006). Diğer taraftan vücut yağlarının dağılışı, sekonder seks karakterlerinin oluşumu, uzun kemiklerin gelişimi, su, tuz ve mineral metabolizmasındaki değişiklikler de östrojenin etkilerine bağlıdır (Watson ve Simmons, 2010). Gebe olmayan kadınlarda, östrojenin önemli miktarı ovaryumlardan salgılanırken, az miktarı böbreküstü bezi tarafından salgılanır. Gebelik döneminde ise yüksek miktarda plasenta tarafından salgılanır (Guyton ve Hall, 2006). Foliküler gelişme östrodiol sekresyonunun artışına paralel olarak artar. Ovaryumların teka granuloza hücrelerinde östrojenin sentezi FSH ve kısmen de LH etkisi ile kontrol edilmektedir. Östrojenin kandaki konsantrasyonu belirli bir düzeye ulaştığında ise negatif feed back mekanizmasıyla önce hipotalamus ve hipofizden GnRH, FSH ve LH salgıları durur, böylece östrojen salgılanması da durmuş olur (Guyton ve Hall, 2006). Östrojenler karaciğerde parçalanırlar ve çeşitli steroidlere çevrilerek hidrosillenmiş metabolitler, glukoronoidler veya sülfatlar şeklinde idrar ve dışkı ile atılırlar. Konjuge östrojenin dışarı atılan metabolitleri, insan ve hayvanlarda ovaryum fonksiyonunun güvenilir indikatörleri olarak bilinmektedir (Johnson ve Williams, 2004; Kostich ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2014).

2.8. Overektomi

Overektomi ovaryum veya ovaryumların cerrahi olarak çıkarılmasıdır. Overektomi en sık ovaryum kistleri veya kanser gibi hastalıklarda gerçekleştirilen bir işlemdir veya yumurtalık kanseri ve meme kanserine yakalanma olasılığını azaltmak için profilaktik olarak histerektomi ile birlikte uygulanır. Veteriner bilimlerinde ise yumurtalıklar, fallop tüpleri, uterus boynuzları ve uterusun tam olarak çıkarılması şeklinde olup; beşeri hekimlikteki endikasyonuna ilaveten hayvanların doğurganlıklarının kontrolü için de uygulanmaktadır. Tüm üreme sisteminin (yumurtalıklar, fallop tüpleri, uterus) çıkarılmasına total overiyo-histerektomi terimi kullanılmaktadır. Histerektomi yumurtalık veya fallop tüpleri çıkartılmadan sadece uterusun çıkarılmasıdır (Barmparas ve ark., 2010). Overektominin kanser açısından yüksek riskli olan kadınlar için hayatta kalmayı artırdığı bildirilmiştir Overektomi

ayrıca adet döngüsünü ortadan kaldırarak, endometriyozun tedavisi için de kullanılmaktadır (Barmparas ve ark., 2010). Buna karşın overektomi ameliyatının hormonal etkilerden kaynaklanan ciddi uzun vadeli sonuçları mevcuttur. Overektominin cinsel işlevler üzerinde ciddi negatif etkileri bildirilmiştir (Castelo-Branco ve ark., 2009). Bunlardan ilki, bilateral overektomi ameliyatı geçirmiş kadınların çoğunlukla üreme fonksiyonlarının yanında östrojen ve progesteron hormonları yapma kabiliyetlerinin çoğunu da kaybetmesidir. Oysa doğal menopoza yumurtalıkların hormonları özellikle de androjenler düşük seviyelerde de olsa üretilmeye devam etmektedir (Hayes ve ark., 2016). Rapor edilen diğer risk ve yan etkiler arasında erken ölüm, kardiovasküler hastalık, kognitif bozukluk, demans, parkinsonizm, osteoporoz, kemik kırıkları vardır (Parker ve ark., 2005; Rocca ve ark., 2008; Shuster ve ark., 2008). Ancak sözkonusu yan etkilerin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

2. 9. Nekroz

Canlı bir organizmada hücre ve dokunun patolojik ölümüne nekroz denilmektedir. Nekroz; hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşmaktadır (Proskuryakov ve ark., 2003). Nekroz, hücre ya da doku dış etkenlerden kaynaklanır ve hemen hemen her zaman zararlıdır ve ölümcül olabilir (Rocca ve ark., 2008). Nekroza uğramış bir hücrede şişme ve plazma membranının yıkılması sonucunda sitoplazmik içerik hücre dışı ortama verilmektedir. Bu durumda, hücrenin nekrotik artıkları enflamatuvar hücreleri dokuya çağırarak söz konusu dokunun parçalanmasına yol açar. Böylece hücre zedelenmesi sonucu gelişen irreversibl harabiyet hücrenin ölümüne neden olur (Proskuryakov ve ark., 2003). Farklı histomorfolojik özellik gösteren 6 nekroz tipi mevcuttur.

1. Koagülasyon nekrozu: Ölü dokuda jelatin benzeri maddenin oluşumu ile karakterizedir. Bu tür nekroz şekli hipoksi ve enfarktüs gibi durumlarda görünür. Koagülasyon nekrozu, böbrek, kalp ve böbrek üstü gibi bezlerde ve dokularda ortaya çıkar. Şiddetli iskemi, en sık bu formun nekrozuna neden olur (Proskuryakov ve ark., 2003).

2. Likefaksiyon nekrozu: Koagülasyon nekrozunun aksine; viskoz, sıvı bir kitle oluşturmak üzere ölü hücrelerin sindirimi ile karakterizedir (Kumar ve ark., 2005) ve bakteriyel veya fungal enfeksiyonlarda iltihabik bir yanıt sonucu oluşur. Nekrotik sıvı

kitlesi, ölü lökositlerin varlığı nedeniyle, krem rengi-sarı rengindedir (Kumar ve ark., 2005).

3. Gazlı nekroz: Genellikle büyük ve derin yaralanmalarda dokuya infiltrate olan *Clostridium welchii* gibi anaerob bakteriler tarafından oluşturulur. Dokular gaz bülleri içerir, hızla parçalanır, kötü kokar ve bu durum sonucunda ölüm gerçekleşir (Morrison ve ark., 2015).

4. Kazeöz nekroz: Koagülasyon ve likefaksiyon nekrozunun bir kombinasyonu olarak ortaya çıkar. Mycobacterium türleri (örneğin tüberküloz), mantarlar ve bazı yabancı maddeler nedeniyle oluşmaktadır. Nekrotik doku, beyaz ve sıkı yapıda olup peynir gibi görünür (Bohn, 2010).

5. Yağ nekrozu: Yağ dokusunun özel nekrozudur, örneğin akut pankreatit'de pankreas enzimlerinin pankreas ve periton boşluğuna serbestleşmesi ile fokal yağ harabiyeti oluşur. Aktif pankreas enzimleri yağ hücrelerinin membranlarında erimeye yol açarak lipaz enzimlerini aktifleştirir. Aktifleşen lipaz enzimleri yağ hücrelerindeki trigliseritleri parçalar. Açığa çıkan serbest yağ asitleri Ca^{+2} tuzları ile birleşerek sabunlaşmaya yol açar. Sonuçta makroskopik olarak kireç beyazı görünümünde hücre kitleleri oluşur. (Bohn, 2010).

6. Fibrinoid nekroz: Genellikle hipersensitibilite reaksiyonu olarak bağ dokusunda ve damarlarda görülür. Mikroskopik seviyede küçük odaklar oluştururlar. Damarlar asidofil homojen bir görünüm alır. Bağ dokusunda kollajen doku hastalıklarında, damar duvarlarında kollajen doku hastalıkları, malign HT'da ve midede peptik ülser durumlarında ortaya çıkmaktadır (Kumar ve ark., 2005).

2.10. Apoptoz

Organizmanın homeostazı; hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki sabit bir dengeye bağlıdır. Apoptoz, embriyonik dönemden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenebilen programlanmış hücre ölümü sürecidir (Lo ve ark., 2011). Hücre değişiklikleri (morfoloji) ve ölüme yol açan bu süreç, bazı biyokimyasal olaylar ile karakterizedir. Bu değişiklikler, hücrenin tomurcuklanmasını, büzülmesini, nükleer parçalanmasını, kromatin yoğunlaşmasını, kromozomal DNA parçalanmasını ve mRNA'nın ortadan kalkmasını içermektedir. Programlı hücre ölümü sürecinde, hücrenin kendi genlerinin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlatmaktadır (Iuchi

ve Yagura, 2016). Yetişkin insanlarda her gün yaklaşık 50-70 milyon hücre, apoptoz nedeniyle ölür. 8 ve 14 yaşlar arasındaki çocuklarda ise bu oran yaklaşık 20 - 30 milyon arasındadır (Iuchi ve Yagura, 2016). Nekroz, akut hasar sonucu travmatik hücre ölümü şeklinde iken, apoptoz oldukça düzenli ve kontrollü bir süreçtir ve canlının yaşam döngüsü boyunca çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Örneğin, gelişmekte olan bir insan embriyosunun el ve ayak parmakları arasındaki hücrelerin apoptoza uğramasıyla gelişimin erken dönemlerinde el ve ayak parmakları arasında mevcut bulunan perdelerin ortadan kalkması sağlanır. Apoptoz mekanizması son derece düzenli bir süreçtir, bir kez başlanan apoptoz durdurulmaz. Apoptoz, iki yoldan, başlatılmaktadır. İçsel yolda, hücre stresi algılayarak kendini öldürür. Bu durumda apoptotik proteinler mitokondrileri hedef olarak seçmektedir. Bu proteinler mitokondriyal membran geçirgenliğini azaltarak şişmelerine ya da mitokondriyal zarın geçirgenliğini artırarak efektörlerin dışarı sızmasına yol açarak apoptoza neden olur (Gyulhandanyan ve ark., 2015). Dışsal yolda ise; hücre kendi sinyalleri ile değil, diğer hücrelerden gelen sinyallere göre apoptozu başlatır. Hücre dışı uyarılar; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü, IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması ile glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarılar olabilir. Özellikle son zamanlarda otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV virüsü GP120 proteini üzerinden, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirus hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptoza götürmektedir (Wajant, 2002).

2.11. Proteozom

Proteazom, tüm ökaryotik hücrelerde ve çoğu bakteri türünde bulunan zarla çevrili bir multi katalitik enzim kompleksidir. Hem normal hücreler, hem de kanser hücreleri proteazom içermektedir. Proteazomların genel görevi, hasar görmüş veya işe yaramayan proteinleri, proteoliz adı verilen ve peptid bağlarını kırarak çalışan bir enzim aracılığıyla vücuttan atmaktır. Hücre içindeki hasar görmüş proteinlerin düzenli yıkımını sağlayan proteazomlar hücredeki protein geri dönüşümü açısından kritik öneme sahiptir. Proteazomun işlevi, proteinleri degrade etmektir (Dou ve Zonder, 2014). Proteazomun alt-tabakaları, tümör bastırıcılar, hücre döngüsü düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri, inhibe edici moleküller ve anti-apoptotik proteinler (örneğin

Bcl-2) gibi sinyal molekülleri içermektedir (Dou ve Zonder, 2014). Proteozom, hücre döngüsü, endositoz, transkripsiyon, organel biyogenezi, spermatogenez, anjiogenez, apoptoz ve protein sentezi gibi pek çok hücreysel olayda görev alan proteinlerin yıkımını veya işlenmesini sağlayarak bu hücreysel mekanizmalara direkt veya indirekt bir şekilde katkıda bulunmaktadır (Hilt ve Wolf, 1996).

Proteinlerin degradasyonu bozulduğu zaman, muhtemelen hızlandırılmış ve kontrolsüz mitoz sonucu, kanser hücreleri gelişir (Kumatori ve ark., 1990). Kanser hücrelerinin çoğalması, yayılması ve hayatta kalması proteazom tarafından regüle edilen proteinlere bağlıdır. Proteozom inhibitörleri farklılaşmış ve bölünmeyen hücrelerin aksine spesifik olarak bölünebilen tümör hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır (Frankel ve ark., 2000; MacLaren ve ark., 2001; Shah ve ark., 2001; LeBlanc ve ark., 2002; Bold, 2004).

2.12. Bortezomib

Bortezomib, kanser tedavisinde rasyonel bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Adams ve ark., 1999) ve multipl miyelom ve manto hücreli lenfoma tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ilk proteazom inhibitörüdür (Belch ve ark., 2007). Bortezomib proteazom enzim komplekslerini inhibe ederek hastalığın başlangıç tedavisi ya da çeşitli ilaçlar ile kombine halinde kullanılmaktadır. Diğer taraftan bortezomib daha önce uygulanan tedavilere karşı dirençli hale gelmiş olan ya da daha önce uygulanan tedaviler sırasında relaps meydana gelmiş olan hastalar için de önemli bir tedavi seçeneğidir. Proteazomun bortezomib tarafından inhibe edilmesi hücre içi proteinlerin yıkımını önler ve bu yolla hücrelerin içindeki birden fazla sinyal yolağını etkiler. Kanser hücrelerindeki sinyal yolaklarında meydana gelen bu bozulma hücre ölümüne ve tümör büyümesinin inhibisyonuna neden olabilir (Richardson ve ark., 2009; Richardson ve ark., 2014). Çalışmalar, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında birçok kanser hastalarının (akut myeloid leukemia, AML, Hodgkin's disease, chronic myeloproliferatif syndrome ve solid tümör hastaları) plazmalarında 26S proteozom miktarının 1000-kat kadar yükseldiğini göstermiştir (Dutaud ve ark., 2002). Bu çalışmalar, proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen hücrelerde apoptozu neden olduklarını; dolayısıyla, diğer anti-kanser ilaçlara göre daha avantajlı durumda

olduklarını ve kanser tedavisinde daha etkili olabileceklerini göstermektedir (Dutaud ve ark., 2002).

2.13. β -Glukanlar

Glukanlar yapısal bileşen olarak glukoz içeren ve birbirlerine β -glikozidik bağlarla bağlanmış polisakkaritlerdir. β -glukanlar maya, bakteri ve mantarlar ile yulaf, arpa, çavdar gibi tane yemlerin hücre duvarlarından elde edilen glikoz polimerleridir (Saraswat-Ohri ve ark., 2011). β -glukanların glukoz moleküllerinin bağlanma şekilleri farklı olabilir. Glukoz moleküllerinin birbirleri ile bağlanış şekillerindeki farklılıklar her bir β -glukana kendine has yapısal özelliğini kazandırır. Molekül ağırlığı, dallanma derecesi, uyumluluk ve moleküller arası birleşim şekilleri bakımından farklılık oluşturan β -glukanlar değişik biyolojik aktiviteler göstermektedir (Bohn ve BeMiller, 1995). Maya ve mantarların hücre duvarlarında bulunan β -glukanlar az sayıda 1,6 β bağlı dallar ile 1,3 β bağlı glikopiranosil kalıntılarında oluşurken, arpa ve yulaf hücre duvarlarındaki β -glukanlar 1,3 ve 1,4 β bağlı glikopiranosil kalıntısı içeren dalsız yapıdadır. Bakterilerde ise 1,3 β bağlı glikopiranosil kalıntısı içeren dalsız β -glukanlar bulunur (Saraswat-Ohri ve ark., 2011). Suda çözülen ve çözülmeyen β -glukanların kullanım alanları, etki mekanizmaları ve genel biyolojik aktiviteleri arasında büyük farklılık vardır. Tahıl temelli β -glukanlar suda çözülme özelliklerinden dolayı insan beslenmesinde çözünür lif desteği ve sindirim sistemi aktivitelerde rol almaktadır. Suda çözünmeyen, ekmek mayası veya mantardan elde edilen β -glukanların ise bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden faydalanılmaktadır (Bohn ve BeMiller, 1995). β -glukanlar immun sistem hücrelerini bazı özel reseptörler aracılığı ile aktif hale getirerek bağışıklık sistemini güçlendirdiği için iyi bir immun uyarıcı olarak bilinirler (Brown, 2006). Hayvan rasyonuna β -glukan ilavesinin plazma IL-6, TNF- α ve IL-10 üretimini artırdığını dolayısıyla bağışıklık fonksiyonu üzerine yararlı etki gösterdiğini bildirmişlerdir. β -glukan karsinom, sarkom ve blastom hücreleri üzerinde doğrudan sitotoksik etki göstermektedir (Brown, 2006).

Bizim çalışmamızda; overektomi cerrahi prosedürü uygulanmış sıçanlarda östrojen, β -glukan ve proteazom inhibitörü olarak kullanılan bortezomib'in uterus üzerindeki olası koruyucu etkilerinin morfometrik, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile ortaya konulması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul, Deneklerin Temini ve Deney Grupları

3.1.1. Etik Kurul Onayı

Bu tezin deneysel bölümü “Bortezomib’in overektomi uygulanan sıçan uterusu üzerine etkilerinin incelenmesi: histopatolojik, stereolojik ve immünohistokimyasal bir çalışma” başlığı ile Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının 06.06.2014 tarih ve 95 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

3.1.2. Materyal Temini ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada 30 adet 12 haftalık dişi sıçan (*Sprague Dawley*) kullanılmıştır. Denekler Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden (ATADEM) temin edilmiştir. Deney süresi boyunca tüm deneklerimiz optimum laboratuvar koşullarında ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) ve *ad libitum* ile beslenmiştir. Çalışmada beş ayrı grup oluşturulmuştur. Her bir grupta altı denek kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan deneklerin gruplara göre dağılımı

Gruplar	
Grup I	Kontrol (Kont) grubu
Grup II	Overektomi (Ovt) grubu
Grup III	Overektomi + Östrojen (Öst) grubu (0,2 mg/kg 17 β -Östradiol)
Grup IV	Overektomi + β -Glukan (β -glu) grubu (75 mg/kg β -Glukan)
Grup V	Overektomi + Bortezomib (Bort) Grubu (0,2 mg/kg Bortezomib)

Gruplara uygulanan işlemler aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

I. Grup (Kont): Sağlıklı ve hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubunu oluşturmaktadır. Bu grup aynı laboratuvar şartlarında 12 hafta beslenme sonrası hiçbir deneysel işlem uygulanmaksızın perfüze edilmiştir (24 haftalık iken).

II. Grup (Ovt): Bu gruptaki denekler overektomi operasyonunun ardından 12 hafta daha yaşamaları sağlandıktan sonra, toplamda 24 haftalık iken perfüze edildi.

III. Grup (Ost): Bu gruptaki deneklere overektomi operasyonundan sonraki 8 haftalık iyileşme süreçleri beklendikten sonra, 4 hafta boyunca, haftada 2 kez 0,2 mg/kg β -Östradiol uygulandı. Uygulamaların ardından denekler toplamda 24 haftalık iken perfüze edildi (Modena ve ark., 2005).

IV. Grup (β -glu): Bu gruptaki deneklere overektomi operasyonundan sonraki 8 haftalık iyileşme süreçleri beklendikten sonra, 4 hafta boyunca, haftada 2 kez 75 mg/kg β -Glukan uygulandı. Uygulamaların ardından denekler toplamda 24 haftalık iken perfüze edildi (Kim ve ark., 2011).

V. Grup (Bort): Bu gruptaki deneklere overektomi operasyonundan sonraki 8 haftalık iyileşme süreçleri beklendikten sonra, 4 hafta boyunca, haftada 2 kez 0,2 mg/kg borteomib uygulandı. Uygulamaların ardından denekler toplamda 24 haftalık iken perfüze edildi (Moreau ve ark., 2011).

Tüm gruplardaki denekler 24. haftada ketalar (Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg ve xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ile uyutuldu ve %10'luk formalin ile kardiyak yoldan perfüzyonları sağlandı. Hemen sonra uterus dokuları alınarak ayrı ayrı kodlandıktan sonra, %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 72 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra elde edilen doku örnekleri rutin histopatolojik, stereolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi.

3.2. Deney Prosedürü

3.2.1. Overektomi Prosedürü

II. - V. Grup olarak belirlenen dişi sıçanlar 20 mg/kg dozda tiopental sodyumla anestezi altına alındı. Daha sonra karın bölgesinden lateral 2–3 cm insizyon açılarak, overlere ulaşıldı. Overler bilateral ekzisyonla alındı. Sıçanların operasyon sonrası uygun ortamda barınması sağlanarak ilk 2 gün 25 mg/kg dozda günde 2 kez metamizol sodyum ile analjizileri sağlandı. Bir hafta boyunca sıçanlara her gün uygun dozda

penisilin verilerek ve yara yeri pansumanları yapılarak enfeksiyon kapmaları engellendi. Overektomi sonrası sıçanlar 8 hafta boyunca normal su ve diyet ile beslenerek yaşlanmaları için gerekli sürenin oluşması sağlandı (Şekil 1; Benmansour ve ark., 2016).



Şekil 1. Overektomi uygulama prosedürü izlenmektedir

Bortezomib uygulama prosedürü overektomi işleminden 8 hafta (60 gün) sonra başlandı. 7 ml izotonik içinde 3,5 mg bortezomib çözüldü. 1 ml'de 0,5 mg bortezomib çözeltisi olacak şekilde falkonlara ayrıldı. Bu çözeltiden her bir deneğe 8 µl olacak şekilde enjekte edildi. Bu uygulama 1 ay boyunca haftada 2 kez tekrarlandı. 17-β östradiol uygulaması gavaj yoluyla 0,2 mg/kg 17-β östradiol (estrofem tablet) verilerek yapıldı. β-1,3-D-glukan uygulaması için ise her bir deneğe 75 mg/kg β-1,3-D-glukan subkutan olarak verildi

3.3. Işık Mikroskopik İşlemler

3.3.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskopik İşlemler

Alınan dokuların %10'luk formalin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) içerisinde fikse edilmesinin ardından doku takip aşamaları aşağıdaki gibi uygulandı.

Akarsuda yıkama (24 saat)

Dehidratasyon işlemi:

- %70'lik Alkolde 24 saat,
- %80'lik Alkolde 1 saat,
- %96'lık Alkolde 1 saat,
- %96'lık Alkolde 1 saat,
- %100'lük Alkolde 1 saat,
- %100'lük Alkolde 1 saat bekletildi.

Şeffaflaştırma işlemi:

- Ksilende 10 dakika,
- Ksilende 10 dakika bekletildi.

İnfiltrasyon işlemi:

- Ksilen + boncuk parafin karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat,
- Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 1 saat,
- Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekletildi.

Dokuların Parafin Bloklara Gömülme İşlemi:

Dokular parafin bloklara gömülerek kesit alınması işlemine hazır hale getirildi. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile kesilen 5 µm'lik kesitler cam lamalar üzerine alındı. Bu amaçla kesitler aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

Hemotoksilen–Eozin Boyama

- Ksilen'de (20 dk.)
- Ksilen'de (10 dk.)
- %80'lik Alkol (10 dk.)
- İki ayrı %96'lık Alkol (5 dk.)
- Çeşme suyunda yıkama
- Hematoksilen boyama (1 dk.)

- Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarma
- Eozin solüsyonunda (1 dk.)
- Suda yıkama (1 dk.)
- %80'lik Alkolde (10 dk.)
- İki ayrı %96'lık Alkol (10 dk.)
- Ksilen serilerinde (20 dk.)
- Entellan ile kapama (Bancroft ve Gamble, 2008)

Masson Üçlü Boyama

- Bouin Solisyonu 60 °C etüvde (120 dk.) bekletme
- Oda sıcaklığında (12 saat-1 gece) bekletme
- Akarsuda (sarı renk gidene kadar) yıkama
- Distile suda (5 dk.) yıkama
- Weigert's hematoxylin (30 dk) bekletme
- Akarsuda (5 dk.) yıkama
- Distile suda (5 dk.) yıkama
- Biebrich scarlet (10 dk.) bekletme
- Distile suda (5 dk.) yıkama
- Fosfofungistik Asit (5 dk.) bekletme
- Aniline blue (10 dk.) bekletme
- %96 Etanol (30 sn.) bekletme
- Absolü etanol (5 dk.) bekletme
- Absolü etanol (5 dk.) bekletme
- Absolü etanol (5 dk.) bekletme
- Ksilende (30 dk.) bekletme
- Ksilende (30 dk.) bekletme
- Ksilende (30 dk.) bekletme
- Entellan ile kapama (Masson, 1929)

3.4. İmmünohistokimyasal İşlemler

İmmünohistokimyasal değerlendirme için polilizinli lama alınan kesitler streptavidin-biotin-peroksidaz metodu kullanılarak NF-κB (p65) (Rabbit polyclonal ab, p65 Ab-1, dilüsyon 1.75) ile boyandı. Deparafinizasyon işleminden sonra kesitler

endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla distile suda hazırlanmış %10'luk hidrojen peroksidazda 30 dk. bekletildi. Antijen uzaklaştırma için kesitler 10 mmol L-1 sitrate buffer (pH 6,8)'da 10 dk. yüksek dereceye ayarlanmış mikrodalga fırında tutuldu. Ultra V blok ile 20 dk. preinkübe edilen dokular, oda sıcaklığında bir saat primer antikor damlatılarak bekletildi. Daha sonra 20 dk. *biotinle* işaretlenmiş sekonder antikor ve 30 dk. streptavidin peroksidaz kompleksi ile inkübe edildi. Kromojen olarak 3-amino-9-etil karbazol ve zemin boyama için Mayer hematoksileni kullanıldı. Negatif kontrol için primer antikor damlatılmadan benzer işlemler uygulandı (Hsu, 1993).

3.5. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi

İncelemeye hazır hale gelen kesitler Olympus BH 52 (Olympus, Tokyo; Japan) marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

3.6. Elektron Mikroskopik Takip İşlemi

Denekler anestezi altında iken uterus üzerine %5'lik gluteraldehit damlatıldı ve ardından uterus dokuları çıkarıldı. Daha sonra;

- %5'lik Gluteraldehit solüsyonu içerisinde 1 saat bekletildi.
- Süre sonunda 4x15 dakika Milloning tamponuyla yıkandı.
- Tamponla yıkamanın ardından %1'lik osmium tetraoksit içerisinde 1,5 saat karanlık ortamda bekletildi.
- 4x15 dakika Milloning tamponuyla tekrar yıkandı ve dehidratasyon işlemine geçildi.

Dehidratasyon için;

- %50'lik asetonda 15 dakika,
- %75'lik asetonda 15 dakika,
- %95'lik asetonda 15 dakika,
- %100'lük asetonda 20 dakika,
- %100'lük asetonda 20 dakika bekletildi.
- Propilen oksitte 20 dakika,
- Propilen oksitte 20 dakika,
- %50 Propilen oksit + %50 Araldit karışımında 1 saat,

- %100 Aralditte 1 saat boyunca infiltrasyon işlemine tabi tutuldu.

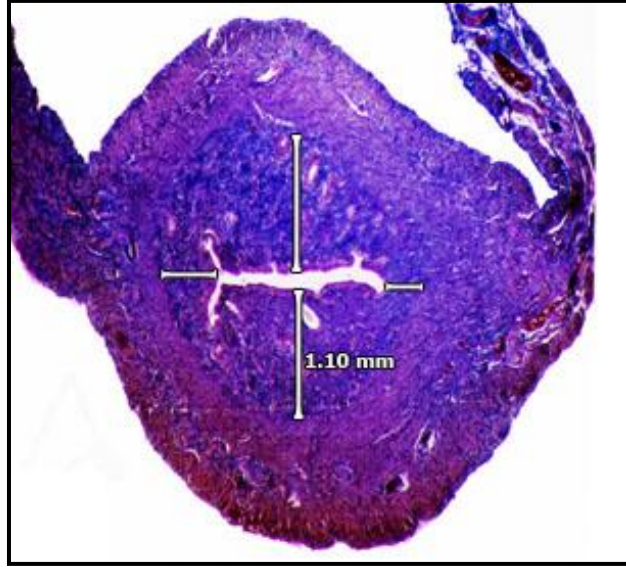
Bu süre sonunda silikon gömme kalıbı içerisinde bloklanan dokular 45 °C'deki etüve yerleştirildi ve her 30 dakikada bir 5 °C'lik ısı artışı yapılarak 62 °C'ye ulaşıldı. 62 °C'de 48 saat bekletilerek polimerizasyonu sağlanan plastik bloklardan elmas bıçaklı ultramikrotom (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems GmbH, Almanya) yardımı ile 70 nm ve 500 nm kalınlığında kesitler alındı. 70 nm kalınlığındaki kesitler 200 mesh bakır grid üzerine alınarak elektron mikroskopik analiz için uranil asetat – kurşun sitrat ile boyandı. 500 nm kalınlığındaki kesitler ise cam lam üzerine alınarak %1'lik toluidin mavisi ile boyandı. Elde edilen yarı ince kesitler ışık mikroskobu altında incelenerek elektron mikroskop altında incelenecek bölgeler belirlendi ve daha sonra ince kesitler Jeol STEM (JEOL JSM-7001FTTLS LV SEM, Tokyo, Japan) elektron mikroskop altında görüntülendi (Inaga ve ark., 2002).

3.7. Stereolojik İşlemler

Bu çalışmada; uterusun morfometrik yapısı stereolojik olarak değerlendirildi. Bu amaçla; endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum tabakalarının kalınlıkları morfometrik olarak tespit edildi. Total uterus hacminin yanında; uterus lümeninin, endometriyum, miyometriyum, perimetriyum tabakalarının ve bu tabakalarda yer alan damarların hacimleri Cavalieri Prensipleriyle hesaplandı. Ayrıca, uterus bezlerinin ortalama çapı ve alanı nükleatör metodu kullanılarak hesaplandı. Kullanılması planlanan bu yöntemlere göre hesaplamalar için aşağıda anlatılacağı gibi stratejiler belirlendi.

3.7.1. Uterus Tabakalarında Kalınlık Ölçümü

Elde edilen tüm kesitlerde endometriyum, miyometriyum, perimetriyum tabakalarının kalınlıkları kesit eksenini boyunca dört bir taraftan ölçülerek söz konusu tabakaların kalınlığı ile ilgili ortalama bir değer elde edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Elde edilen tüm kesitlerde endometriyum, miyometriyum, perimetriyum tabakalarının kalınlıklarının ölçümünü gösterilmektedir

3.7.2. Stereolojide Hacim Hesabı

Düzenli bir şekle sahip olan nesnelere hacimleri (kare, dikdörtgen, küp v.b.) $V=t.a$ (V =Hacim, t = yükseklik, a =taban alanı) formülü ile kolayca hesaplanabilir. Hacimleri rutin aritmetik formüllerle hesaplanmayan düzensiz şekilli yapıların hacimlerinin hesaplanmasında ise ‘**Cavalieri metodu**’ kullanılmaktadır. Cavalieri metodu ile düzenli bir şekle sahip olmayan üç boyutlu nesnelere birbirine paralel olan dilimlere ayrılarak her bir dilimin yüzey alanının dilimin kalınlığıyla çarpılması sonucunda her bir dilimin hacmi hesaplanır. Tüm dilimlerin hacimleri birbirleriyle toplanarak tüm yapının toplam hacmi hesaplanmış olur.

$$V=t \times a/p \times \sum P$$

V= İlgilenilen kesitin hacmi

P= Kesit yüzey alanlarında sayılan nokta sayısı

t= Ortalama kesit kalınlığı

a/p = Herbir noktanın gerçekte temsil ettiği alan

Kesitlerde uterus yüzey alanını hesaplamak için farklı boyutlarda noktalı alan ölçüm cetvelleri (NAÖC) kullanıldı (Uterus tabakalarının alanlarının ölçümü için, $d=2,5$ mm; uterus bezi ve damar alanı ölçümü için, $d= 1$ mm). NAÖC de nokta yerine "+" kullanılır. Noktalar uzayda birbirine dik iki çizginin kesişmesi sonucu elde edilir ve sıfır

boyutludur. Bu nedenle NAÖC'ndeki "+" ların kollarının kesiştiği köşe yüzey alanı ölçüm hesaplaması amacı ile kullanılan noktadır. Bu noktaların her biri, dört adet noktanın arasında kalan bir birim alanına karşılık gelir ve bu alan a/p ile gösterilir. Bu şekilde oluşturulan noktalı alan ölçüm cetvelinde her bir nokta arasındaki sabit mesafe bilinmektedir. Uterus kesitlerin görüntüsüne düşen toplam nokta sayısı bu birim alan değeri ile çarpıldığında, ilgili kesitin alanı elde edilir.

Bu çalışmada tüm deneklerin uterus örneklerinden elde edilen kesitler arasında 1/20 oranında bir örnekleme aralığının uygun olabileceğine karar verilmesinin ardından, ilk kesit rastgelelik prensibi gereği 1–20. kesitler arasından rastgele, diğer kesitler ise başlangıçta seçilen kesit üzerine 19 kesit atlanıp 20. kesitin alınmasıyla gerçekleştirildi. Bu çalışmada, sayım hesaplamasında Cavalieri prensibi ve nükleator sondaları olan Stereo-Investigator (sürüm 9.0, Microbrightfield, Colchester, VT; USA) adlı özel bir yazılım kullanıldı.

Hacim hesaplama işlemleri, stereolojinin temel prensiplerinden “**hata katsayısı**” göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi. Bunun için (Gundersen ve Jensen, 1987) tarafından geliştirilen aşağıdaki formül kullanıldı.

$$Noise = 0.0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \sum P}$$

Noise: kesit yüz alanının kompleksliği

b/\sqrt{a} : ortalama profil sınır uzunluğu/ aynı profilin ortalama alanının kökü

n: incelenen kesit sayısı

$\sum P$: kesiti kesen toplam nokta sayısı

Noise, örneğin kesit yüz alanının kompleksliği hakkında bilgi veren bir değerdir, b/\sqrt{a} ortalama profil sınır (boundary) uzunluğunun aynı profillerin ortalama alanının kareköküne bölümüne eşittir, n incelenen kesit sayısıdır ve $\sum P$ bütün kesite değen toplam nokta sayısıdır.

$$Var_{SRS} \left(\sum_{i=1}^n a \right) = (3 \cdot (A - Noise) - 4 \cdot B + C) / 12$$

$$Var_{SRS} \left(\sum_{i=1}^n a \right) : \text{toplam alanın varyansı}$$

$$\mathbf{A: P_i \times P_i}$$

$$\mathbf{B: P_i \times P_{i+1}}$$

$$\mathbf{C: P_i \times P_{i+2}}$$

Rasgele sistematik örneklemede (SRS) $Var_{SRS}(\sum_{i=1}^n a)$ toplam alanın varyansını göstermektedir. Bu bilgi kesit örneklerinde uygun çeşitliliği sağlamak için gerekli olan yeterli kesit sayısı hakkında fikir verir. A, B, ve C, Tablo 2'nin sütunlarında belirtilmiş verinin rakamsal değerlerini göstermektedir.

Tablo 2: Hata katsayısının hesaplanması

Kesit No	P_i	A	B	C
		$P_i \times P_i$	$P_i \times P_{i+1}$	$P_i \times P_{i+2}$
1	30	900	840	960
2	28	784	896	1008
3	32	1024	1152	1056
4	36	1296	1188	1260
5	33	1089	1155	1254
6	35	1225	1330	945
7	38	1444	1026	988
8	27	729	702	621
9	26	676	598	-----
10	23	529	-----	-----
Toplam	308	9726	8887	8092

$$Noise = 0.0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \sum P} = 0,0724 \times 5 \times 55,50 = 20,91$$

$$Var_{SRS}(\sum_{i=1}^n a) = (3 \cdot (A - Noise) - 4 \cdot B + C) / 12 = 3 \times (9726 - 20,91) - 4 \times 8887 + 8092 / 12 = 138,27$$

$$Total_{var} = Noise + Var_{SRS} = 159,18$$

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{Total Var}}{\sum P} = 0,0401$$

$$Hacim(mm^3) = t(mm) \times a/p(mm \times mm) \times (\sum P) = 9,63 mm^3$$

$$Total_{var} = Noise + Var_{SRS}$$

Total_{var}: Toplam varyans

Noise: kesit yüz alanının kompleksliği

Var_{SRS}: toplam alanın varyansı

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{Total Var}}{\sum P}$$

CE: hata katsayısı

Total_{var}: Toplam varyans

ΣP: kesiti kesen toplam nokta sayısı

HK son hesaplanan değerdir. Genellikle HK'nin en yüksek sınırı %5 olarak kabul edilir (Gundersen ve Jensen, 1987).

3.7.3. Nükleator Metoduyla Ortalama Uterus Bezi Alanının Hesaplanması

Bu çalışmada uterus bezinin ortalama alanı hesaplanmasında aşağıdaki işlem sırası takip edildi:

1. Sayılması istenen objeyi (uterus bezi) içeren alanlar kesitler üzerinde belirlendi.
2. İlgilenilen alanların dış hatları Stereoinvestigator programında çizildi.
3. Dış hatları belirlenen uterus kesitin alanı hesaplandı.
4. Hesaplanan referans kesit alanı uzaysal olarak X ve Y düzlemlerinde eşit aralıklı alanlar içeren adımlara bölündü.

X–Y düzlemindeki uygun adım aralığı belirlendikten sonra belirlenen bu adım aralığında uterus bezi alan ölçümlerinin yapılabilmesi için kesit düzleminde sayım kuralları önceden belirlenmiş “**tarafsız sayım çerçevesi**” kullanıldı. Böylece sayım yapılan her adımda tarafsız sayım çerçevesinin sağ üst köşesine değen en büyük çaplı uterus bezi son kısmında nükleatör metoduyla belirlendi. En büyük çaplı olduğu belirlenen bu bezler üzerinde noktalı ölçüm cetveli kullanılarak uterus bezi alanı hesaplandı.



Şekil 3. Çalışmada kullanılan Olympus DP72 digital fotoğraf makinası ataçmanlı Nikon Eclipse E600 mikroskop cihazı (Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD)

3.8. İstatistik

Bu çalışmadan elde edilen tüm stereolojik bulgulara ait istatistiksel analizler, SPSS 21.0 programı (IBM SPSS Statistics, United Stated of America) kullanılarak yapıldı. Böylece, elde edilen uterus örneklerinin epitel, endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum kalınlıkları ve hacimleri, ortalama damar ve uterus bezi alanları arasındaki karşılaştırmalar One-Way ANOVA testi (Bonferroni Post Hoc Test) kullanılarak yapıldı. Tüm karşılaştırmalarda P değeri 0,05 olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen uterus örneklerinin endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum kalınlıkları ile hacimleri, ortalama uterus bezi ve damar alanları morfometrik olarak değerlendirildi. Ayrıca, uterus örnekleri ışık mikroskopik düzeyde histopatolojik ve immünohistokimyasal (NF-Kappa B) açıdan; elektron mikroskopik düzeyde ise ince yapı açısından değerlendirildi. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular Ortalama±Standart Hata (Ort±SH) olarak tablolarda verilmiştir:

4.1. Stereolojik Bulgular

Öncelikle, kesitlerin endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum tabakalarının kalınlıkları x4 lük objektif büyütmesinde hesaplandı. Gruplara ait veriler tablo ve şekillerde ayrı ayrı verildi.

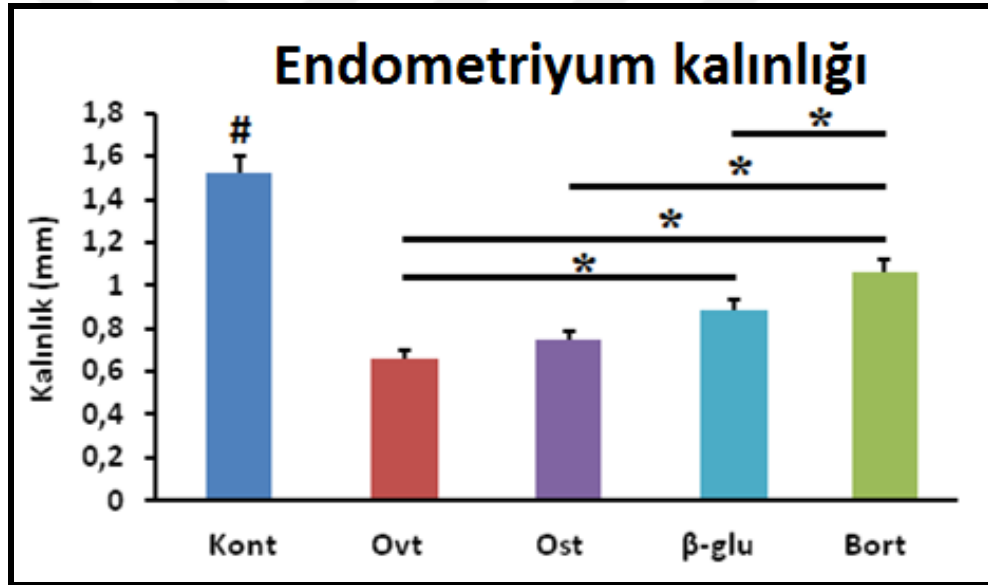
4.1.1. Endometriyum Kalınlığına Ait Bulgular

Endometriyum kalınlıklarına ait değerler incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla, diğer gruplara ait deneklerin uteruslarının endometriyum kalınlığının anlamlı bir şekilde azaldığı izlendi ve kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında ileri düzeyde anlamlı fark belirlendi ($p=0,00$). Bununla birlikte, endometriyum kalınlıklarının Ovt grubunda Ost grubundan ($p=0,36$); β -glu grubunda ise Ovt gurubundan ($p=0,81$), farklı olmadığı tespit edildi. Yine bu parametre açısından, Bort ve β -glu grupları arasında, ($p=0,00$) ve Bort ile Ovt grupları arasında ($p=0,001$) ileri derecede anlamlı fark tespit edildi.

Tüm grupların endometriyum kalınlıklarına ait bulgular Tablo 3 ve Şekil 4'de verilmiştir.

Tablo 3: Tüm gruplardan elde edilen endometriyum kalınlığı değerleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Endometriyum kalınlığı (mm)
Kont	1,523±0,0722
Ovt	0,664±0,106
Ost	0,746±0,1148
β-glu	0,886±0,1512
Bort	1,066±0,1916



Şekil 4. Tüm gruplara ait endometriyum kalınlıklarını gösteren grafik. (#), Kont grubu ile diğer tüm gruplar arasında değer ileri derecede anlamlı fark tespit edildi ($p=0,00$). Bununla birlikte, endometriyum kalınlıklarının Ovt grubunda Ost grubundan ($p=0,36$); β-glu grubunda ise Ovt grubundan ($p=0,81$), farklı olmadığı tespit edildi. Yine bu parametre açısından, Bort ve β-glu grupları arasında, ($p=0,00$) ve Bort ile Ovt grupları arasında ($p=0,001$) ileri derecede anlamlı fark tespit edildi

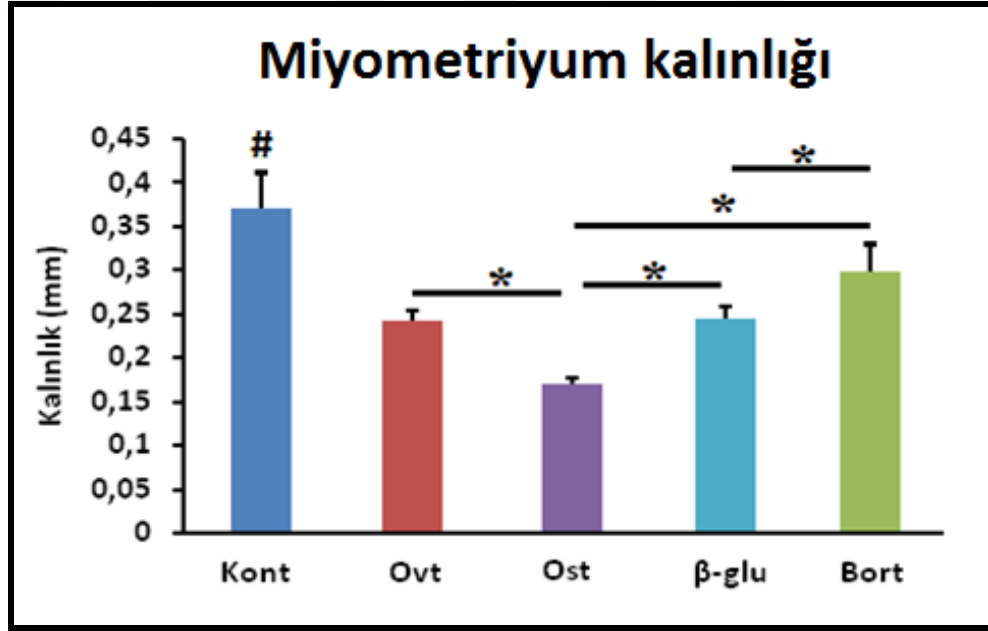
4.1.2. Miyometriyum Kalınlığına Ait Bulgular

Tüm gruplardan elde edilen uterus örneklerinde miyometriyum kalınlığı değerleri incelendiğinde; kontrol grubu ile Ovt arasında $P=0,000$; Kont grubu ile Ost grubu arasında $P=0,000$ ve Kont grubu ile β -glu grubu arasında $P=0,001$ düzeylerinde azalma izlendi. Gruplar arasında en düşük miyometriyum kalınlığının Ost grubundan elde edilmesi dikkat çekici idi. Bort grubunda Ovt grubuna kıyasla miyometriyum kalınlığının ileri düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,001$). Ovt ve β -glu grupları arasında $P=0,123$ ve Kont-Bort grupları arasında $P=0,115$ miyometriyum kalınlığı açısından anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Tüm grupların miyometriyum kalınlıklarına ait bulgular Tablo 4 ve Şekil 5’de sunulmuştur.

Tablo 4. Tüm gruplardan elde edilen miyometriyum kalınlığı değerleri (Ort ± OSH) görülmektedir

Gruplar	Miyometriyum kalınlığı (mm)
Kont	0,371±0,073
Ovt	0,242±0,0248
Ost	0,169±0,02940
β-glu	0,245±0,054
Bort	0,297±0,0516



Şekil 5. Tüm gruplara ait miyometriyum kalınlıklarını gösteren grafik. (#), Kont grubu ile Ovt arasında $P=0,000$; kontrol grubu ile Ost grubu arasında $P=0,000$ ve Kont grubu ile β-glu grubu arasında $P=0,001$ düzeylerinde deneklerin uteruslarının miyometriyum kalınlığının azaldığı izlendi; Bort grubunda Ovt grubuna kıyasla miyometriyum kalınlığının ileri düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,001$)

4.1.3. Perimetriyum Kalınlığına Ait Bulgular

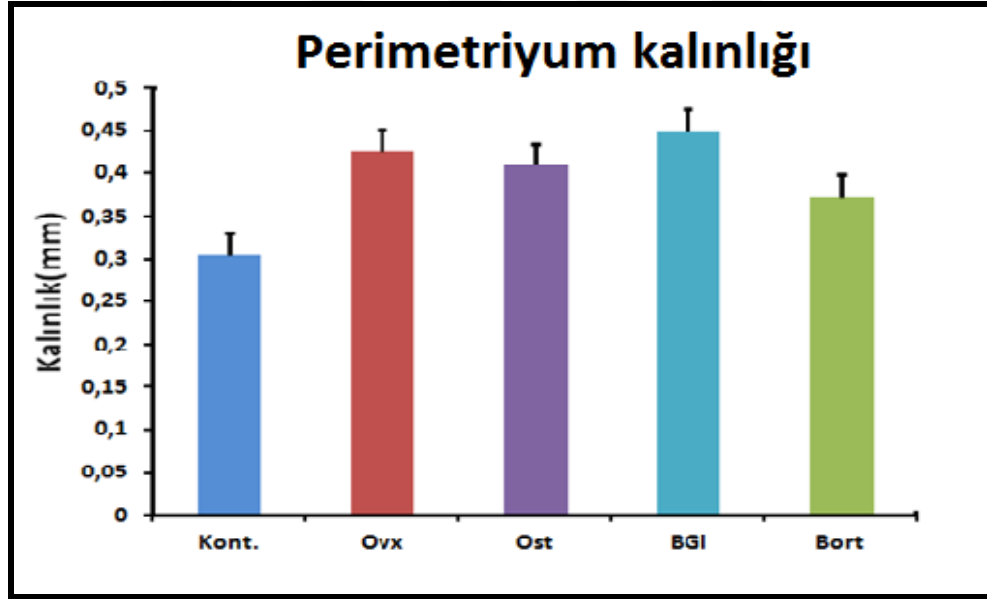
Perimetriyum kalınlıklarına ait değerler incelendiğinde gruplar arasında hiçbir fark tespit edilemedi.

Tüm grupların perimetriyum kalınlıklarına ait bulgular Tablo 5 ve Şekil 6 ve 7’de sunulmuştur.



Tablo 5. Tüm gruplardan elde edilen perimetriyum kalınlığı değerleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Perimetriyum kalınlığı (mm)
Kont	0,303 ± 0,019
Ovt	0,426± 0,060
Ost	0,410 ± 0,060
β-glu	0,449 ± 0,064
Bort	0,373 ± 0,058



Şekil 6. Perimetriyum kalınlıklarına ait değerler incelendiğinde ise, gruplar arasında hiçbir fark tespit edilemedi



Şekil 7. Deney gruplarına ait uterus endometriyum kalınlık ölçümlerini gösteren histolojik inceleme; üst kısımda soldan sağa sırası ile Kont, Ovt ve Ost gruplarına; alt satırda ise β -glu ve Bort gruplarına ait panoramik uterus görüntüleri izlenmektedir. Boya: Hematoksilen-Eozin

4.1.4. Endometriyum Hacmine Ait Bulgular

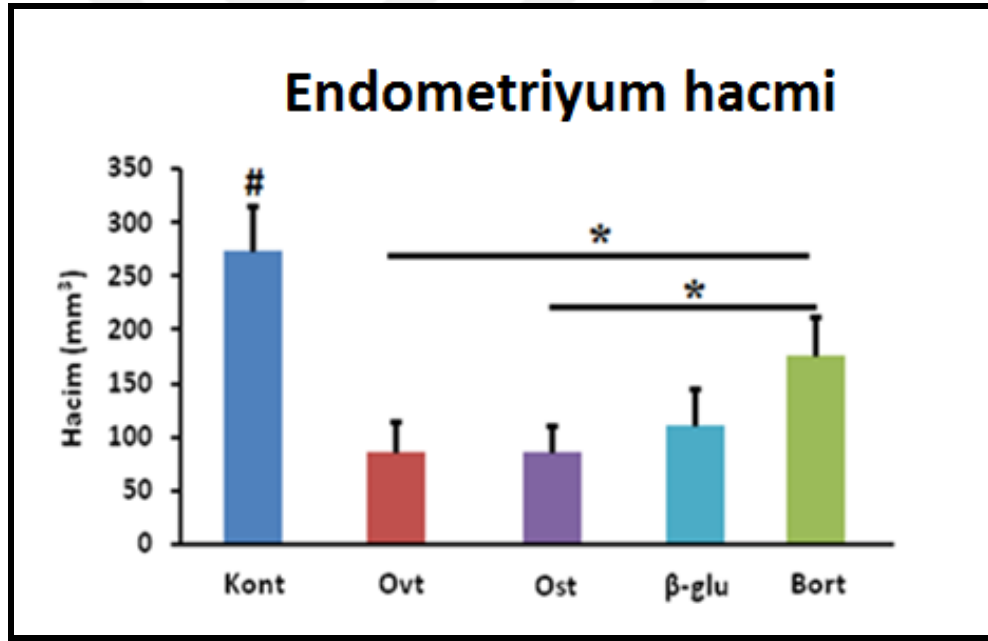
Endometriyum hacmine ait değerler incelendiğinde; Ovt grubu ($P=0,001$), Ost grubu ($P=0,001$) ve β -glu gruplarında ($P=0,004$) Kont grubuna göre endometriyum hacminin anlamlı bir şekilde azaldığı dikkat çekmekteydi. Yine, Bort grubunda, Ovt ($P=0,04$) ve Ost ($P=0,04$) gruplarına göre endometriyum hacminin anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Buna karşın Ovt grubu, β -glu ve Ost grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ($P=1,00$) görüldü. Aynı şekilde Kont ve Bort grupları arasında da anlamlı bir farklılık yoktu ($P=0,139$).

Tüm grupların endometriyum, miyometriyum ve perimetrium tabakalarının ve bu tabakaların epitel, damar, uterus bezi gibi alt bileşenlerinin ve ayrıca uterus lümeninin Cavalieri yöntemine göre noktalı alan ölçüm cetveli kullanılarak hesaplanan hacim bulguları ile ilgili sonuçlar Tablo 6 ve Şekil 8-13'de sunulmuştur.

Tüm grupların endometriyum hacimlerine ait bulgular Tablo 6 ve Şekil 8’de verilmiştir.

Tablo 6. Tüm gruplardan elde edilen endometriyum hacim değerleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Endometriyum Hacmi (mm ³)
Kont	273,93±21,90
Ovt	85,61±13,75
Ost	85,77±14,27
β-glu	110,02±15,82
Bort	175,49±19,69



Şekil 8. Tüm gruplara ait endometriyum hacmini gösteren grafik. Endometriyum hacmine ait değerler incelendiğinde; Ovt grubu (P=0,001), Ost grubu (P=0,001) ve β-glu gruplarında (P=0,004) Kont grubuna göre endometriyum hacminin anlamlı bir şekilde azaldığı dikkat çekmekteydi (#). Yine, Bort grubunda, Ovt (P=0,04) ve Ost (P=0,04) gruplarına göre endometriyum hacminin anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (*). Buna karşın Ovt grubu, β-glu ve Ost grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı (P=1,00) görüldü. Aynı şekilde Kont ve Bort grupları arasında da anlamlı bir farklılık yoktu (P=0,139)

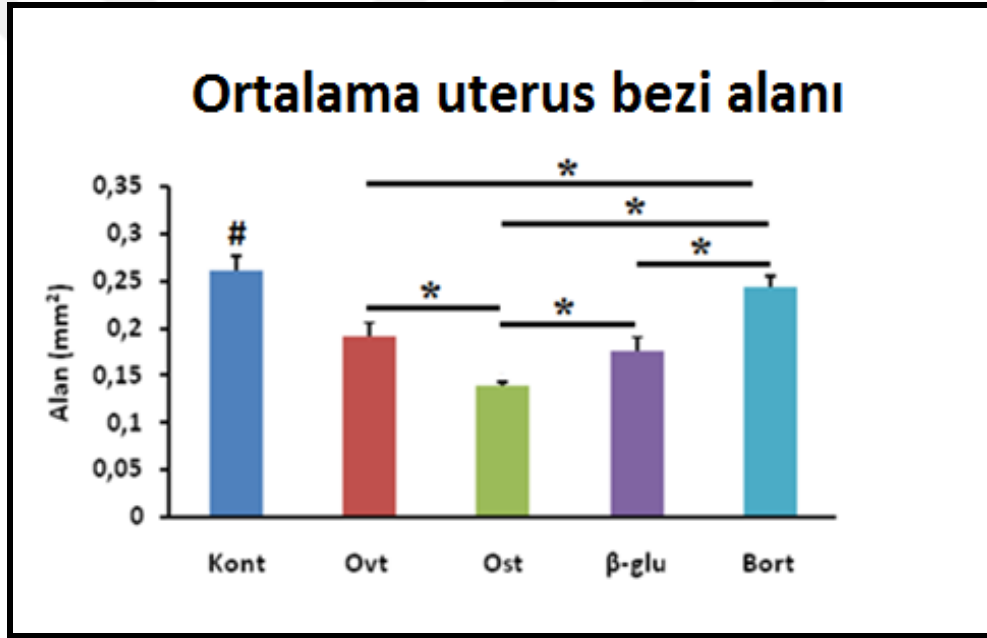
4.1.5. Uterus Bezi Alanına Ait Bulgular

Ortalama uterus bezi alanı değerleri incelendiğinde; Ovt (P=0,04), Ost (P=0,036) ve β -glu (P=0,043) gruplarına ait deneklerin ortalama uterus bezi alanının kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde azaldığı dikkat çekmekteydi. Bort grubundaki deneklerin ortalama uterus bezi alanının Ovt (P=0,047), Ost (P=0,043) ve β -glu (P=0,047) gruplarına oranla anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Buna karşı Ovt grubu, Ost ve β -glu grupları ile karşılaştırdığında ise ortalama uterus bezi alanının Ovt grubunda Ost grubundan anlamlı ölçüde fazla olduğu tespit edildi (P=0,04). Ovt ve β -glu grupları arasında ise anlamlı bir fark tespit edilmedi. Kont grubu ile Bort grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p>0,05).

Nükleator metodu ve Cavalieri prensibi kullanılarak elde edilen tüm grupların uterus bezi alanlarına ait bulgular Tablo 7 ve Şekil 9'da sunulmuştur.

Tablo 7: Tüm gruplardan elde edilen ortalama uterus bezi alanı değerleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Ortalama uterus bezi alanı (mm ²)
Kont	0,015±0,0008
Ovt	0,012±0,0011
Ost	0,011±0,0006
β-glu	0,010±0,0009
Bort	0,014±0,0012



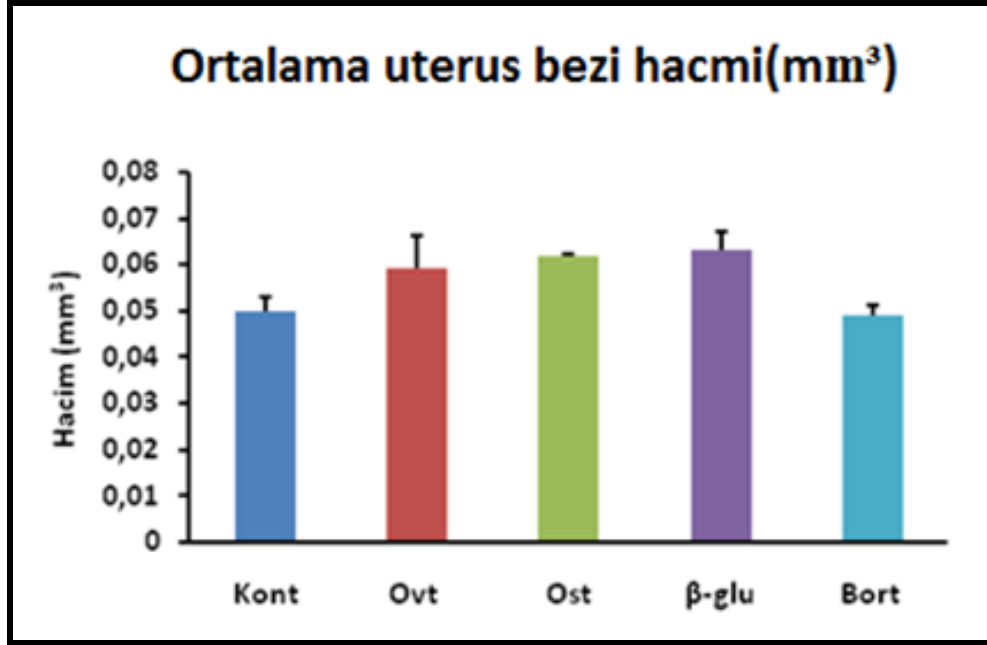
Şekil 9. Tüm gruplara ait ortalama uterus bezi alanı verileri. Ortalama uterus bezi alanı değerleri incelendiğinde; Ovt (P=0,04), Ost (P=0,036) ve β-glu (P=0,043) gruplarına ait deneklerin ortalama uterus bezi alanının kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde azaldığı dikkat çekmekteydi. Bort grubundaki deneklerin ortalama uterus bezi alanının Ovt (P=0,047), Ost (P=0,043) ve β-glu (P=0,047) gruplarına oranla anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Buna karşı Ovt grubu, Ost ve β-glu grupları ile karşılaştığında ise ortalama uterus bezi alanının Ovt grubunda Ost grubundan anlamlı ölçüde fazla olduğu tespit edildi (P=0,04). Ovt ve β-glu grupları arasında ise anlamlı bir fark tespit edilmedi. Kontrol grubu ile Bort grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p>0,05)

4.1.6. Uterus Bezi Hacmine Ait Bulgular

Tüm grupların Cavalieri prensibi ile elde edilen ortalama uterus bezi hacimlerine ait bulgular Tablo 8 ve Şekil 10’da sunulmuştur.

Tablo 8. Tüm gruplardan elde edilen uterus bezi hacmi değerleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Ortalama uterus bezi hacmi (mm ³)
Kont	0,05 ±0,003
Ovt	0,059±0,007
Ost	0,062±0,003
β-glu	0,063±0,004
Bort	0,049±0,002



Şekil 10. Deney gruplarına ait uterus bezi hacmi ölçümlerini gösteren grafik. Gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemektedir

Ortalama uterus bezi hacimlerinin incelenmesinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

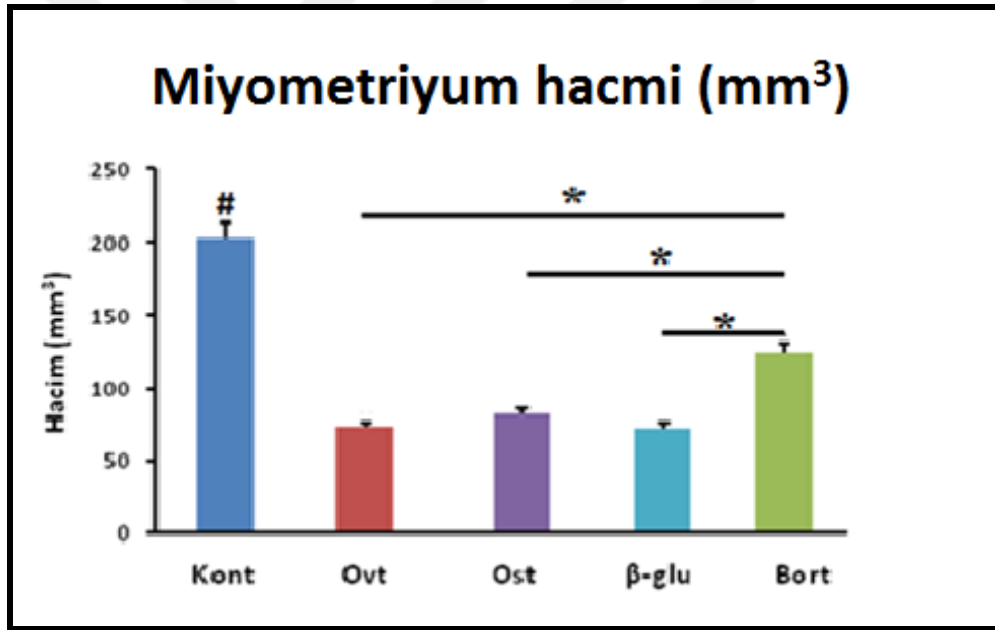
4.1.7. Miyometriyum Hacmine Ait Bulgular

Miyometriyum hacmine ait değerler incelendiğinde; Kont grubuna kıyasla, hem Ovt grubu ($P=0,003$) hem de β -glu ($P=0,003$), Ost ($P=0,006$) ve Bort ($P=0,001$) gruplarına ait deneklerin miyometriyum hacimlerinin ileri derecede azaldığı gözlemlendi. Bort grubu Ovt ve β -glu gruplarına göre ($P=0,03$); Ost grubuna göre ($P=0,04$) uteruslarının miyometriyum tabakalarının hacimleri arasında anlamlı fark gözlemlendi.

Tüm grupların miyometriyum hacimlerine ait bulgular Tablo 9 ve Şekil 11’de sunulmuştur.

Tablo 9. Deney gruplarına ait miyometriyum hacmi ölçümleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Miyometriyum Hacmi (mm ³)
Kont	203,76 ±16,93
Ovt	73,54±15,02
Ost	81,68±11,34
β-glu	73,47±8,04
Bort	124,16±11,88



Şekil 11. Deney gruplarına ait uterus miyometriyum hacim ölçümlerini gösteren grafik. (#),Kont grubuna kıyasla, hem Ovt grubu (P=0,003) hem de β-glu (0,003), Ost (P=0,006) ve Bort (P=0,001) gruplarına ait deneklerin miyometriyum hacimlerinin ileri derecede azaldığı gözlemlendi. Bort grubu Ovt ve β-glu gruplarına göre (P=0,03); Ost grubuna göre (P=0,04) uterusların miyometriyum tabakalarının hacimleri arasında anlamlı fark gözlemlendi

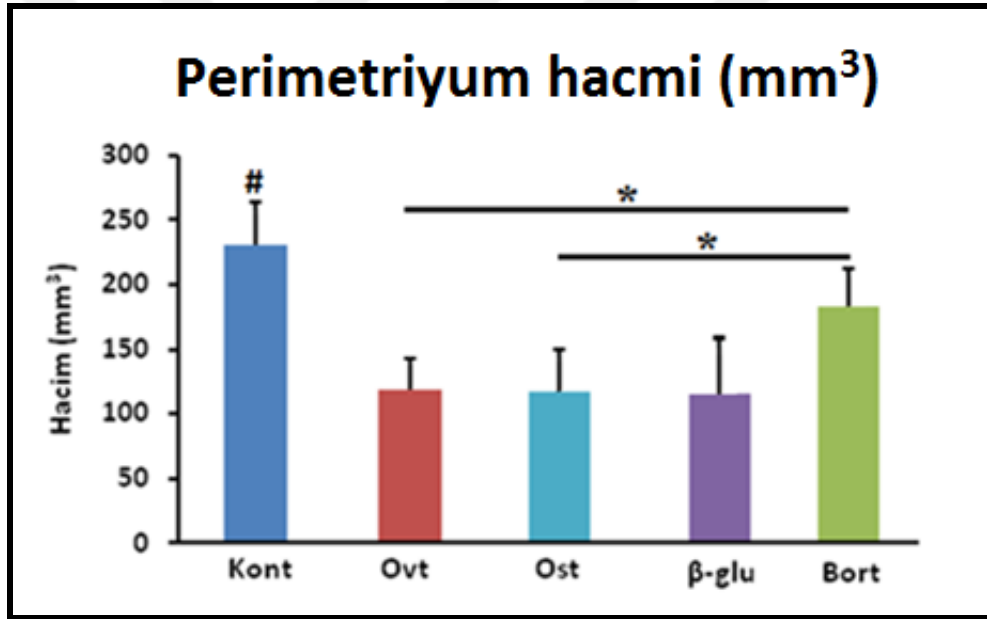
4.1.8. Perimetriyum Hacmine Ait Bulgular

Perimetriyum hacimlerine ait değerler incelendiğinde hem Ovt grubu ($P=0,003$), hem de β -glu ($P=0,002$) ve Ost grubuna ait ($p=0,002$) deneklerin kontrol grubuna kıyasla hacim değerlerinin ileri derecede azaldığı gözlemlendi. Kontrol grubu ile Bort aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$) buna karşın Bort grubunda perimetriyum hacimlerinin Ovt ($P=0,04$) ve Ost ($P=0,04$) gruplarına kıyasla anlamlı seviyede arttığı görüldü. Ovt, Ost ve β -glu grupları arasında da anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$) tespit edildi.

Tüm grupların perimetriyum hacimlerine ait bulgular Tablo 10 ve Şekil 12’de sunulmuştur.

Tablo 10. Deney gruplarına ait uterus perimetriyum hacmi ölçümleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Perimetriyum Hacmi (mm ³)
Kont	230,06±34,63
Ovt	119.25±25,57
Ost	116,30±32,55
β-glu	116,45±38,52
Bort	183,73±29,48



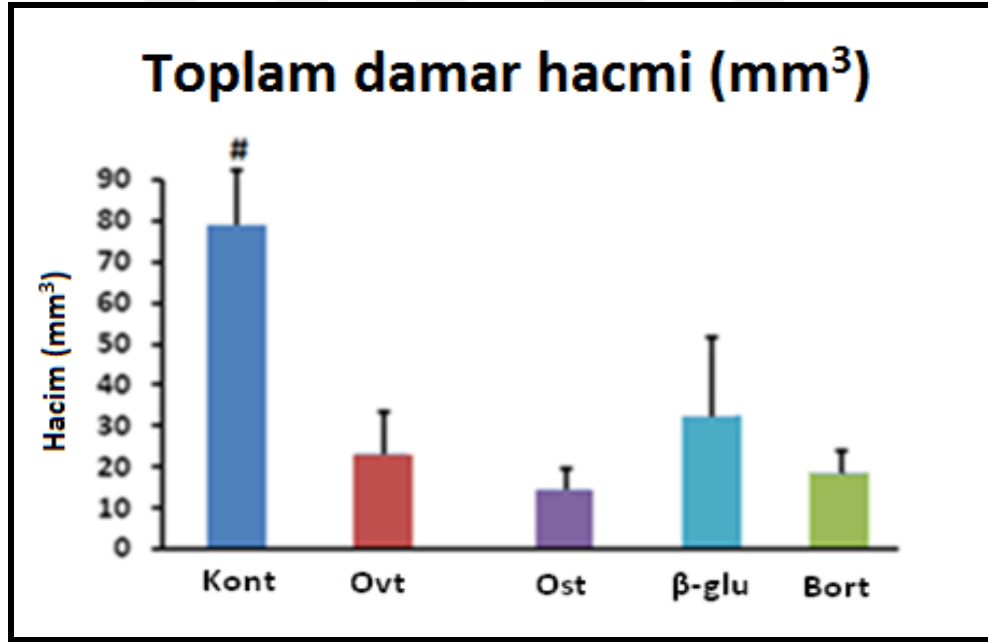
Şekil 12. Deney gruplarına ait uterus perimetriyum hacmi ölçümlerini gösteren grafik. (#),Perimetriyum hacimlerine ait değerler incelendiğinde hem Ovt grubu (P=0,003), hem de β-glu (P=0,002) ve Ost grubuna ait (P=0,002) deneklerin kontrol grubuna kıyasla hacim değerlerinin ileri derecede azaldığı gözlemlendi. Kont grubu ile Bort aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı (P>0,05) buna karşın Bort grubunda perimetriyum hacimlerinin Ovt (P=0,04) ve Ost (P=0,04) gruplarına kıyasla anlamlı seviyede arttığı görüldü. Ovt, Ost ve β-glu grupları arasında da anlamlı bir farklılık olmadığı (P>0,05) tespit edildi

4.1.9. Damar Hacmine Ait Bulgular

Tüm gruplarda damarların kapladığı ortalama hacim değerlerine ait bulgular Tablo 11 ve Şekil 13’de sunulmuştur.

Tablo 11. Tüm gruplardan elde edilen toplam damar hacmi değerleri (Ort ± OSH)

Gruplar	Toplam Damar Hacmi (mm ³)
Kont	78,89±17,57
Ovt	23,24±12,70
Ost	14,25±5,29
β-glu	32,63±20,49
Bort	18,57±4,12



Şekil 13. Deney gruplarına ait damar hacmi ölçümlerini gösteren grafik. (#), Hem Ovt grubu (P=0,007), hem de Ost (P=0,005), β-glu (P=0,009) ve Bort gruplarına ait (P=0,006) deneklerin uterus kesitlerinde damarların kapladığı toplam hacim değerlerinin Kont grubuna kıyasla ileri derecede azaldığı gözlemlendi. Ovt, Ost, β-glu ve Bort grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmadı (P>0,05)

Hem Ovt grubu (P=0,007), hem de Ost (P=0,005), β -glu (P=0,009) ve Bort gruplarına (P=0,006) ait deneklerin uterus kesitlerinde damarların kapladığı toplam hacim değerlerinin Kont grubuna kıyasla ileri derecede azaldığı gözlemlendi. Ovt, Ost, β -glu ve Bort grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmadı (p>0,05).

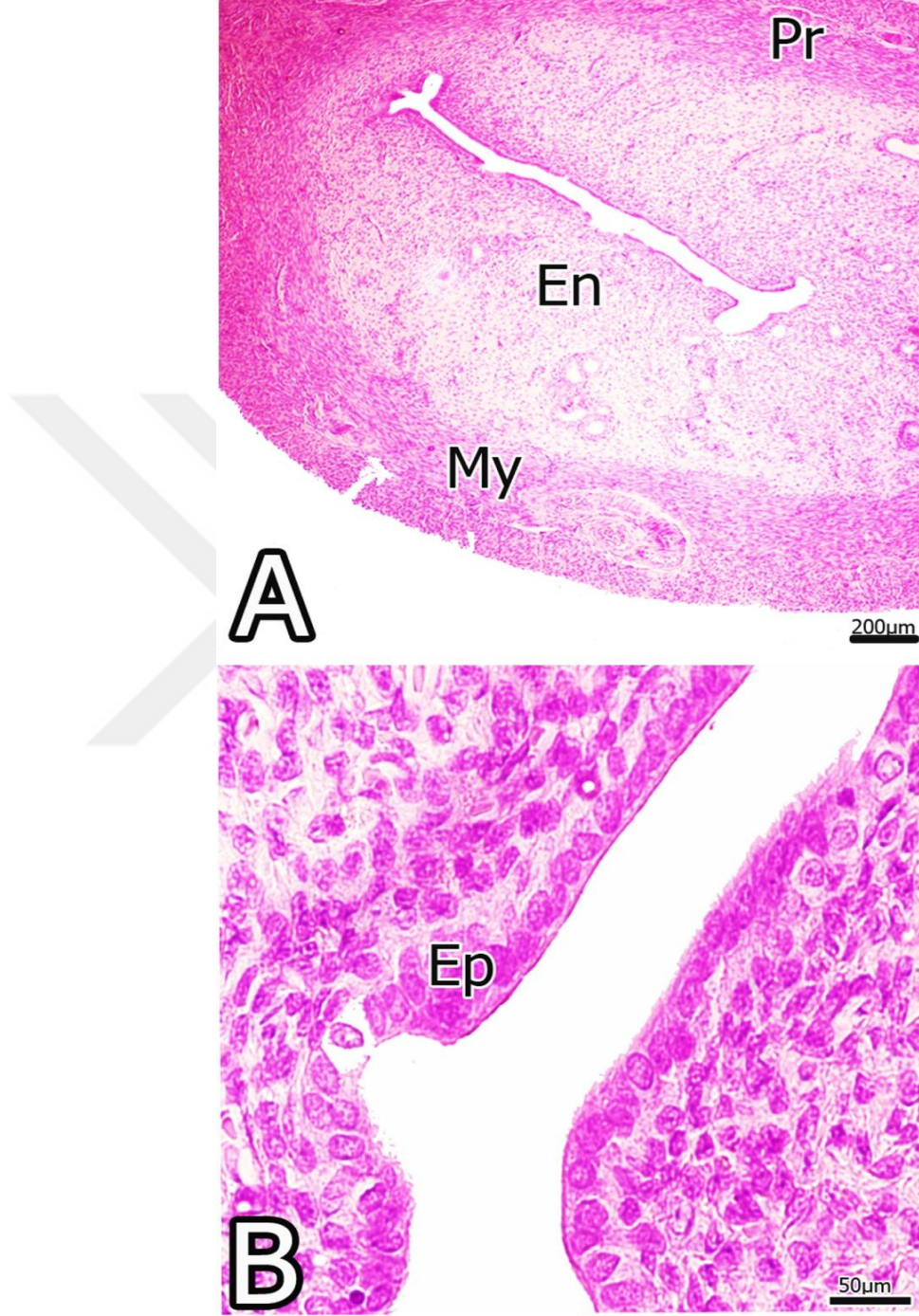
4.2. Işık Mikroskop ile Elde Edilen Bulgular

Bu çalışmada uterusun histolojik yapısına uygun olarak endometriyumun tunika mukozasını oluşturan tek katlı prizmatik epitel ile lamina propriya'yı (stroma) meydana getiren gevşek bağ doku elemanları olan bağ doku hücreleri, bağ doku lifleri (özellikle kollajen lif miktarı), kan damarları ile uterus bezleri incelenmiştir. Bununla birlikte miyometriyumun endometriyuma yakın olan iç (sirküler-dairesel) düz kas katmanı, iki kas tabakası arasında yer alan özel damarlanmaları meydana getiren stratum vaskulare ve perimetriyuma yakın seyreden dış (longitudinal-uzunlamasına) kaslardaki değişimler değerlendirilmiştir.

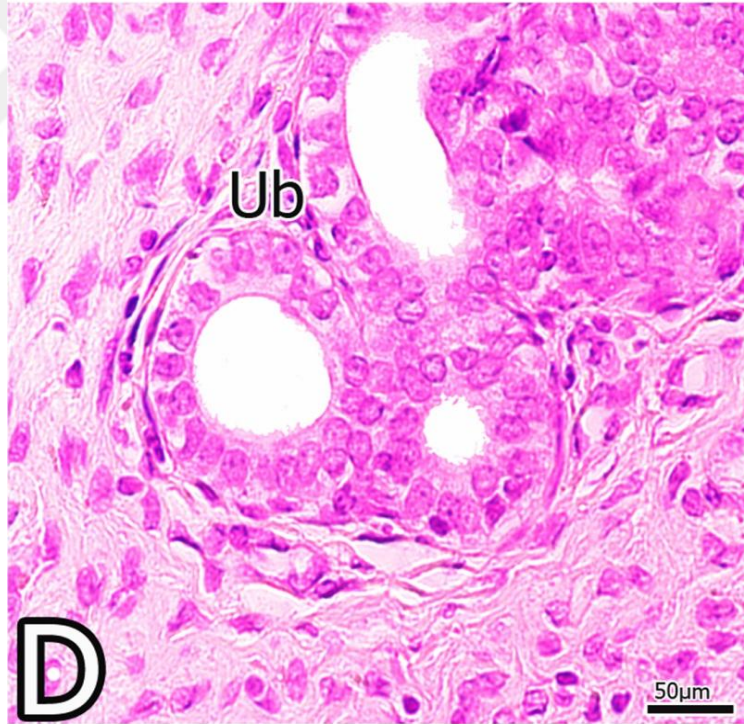
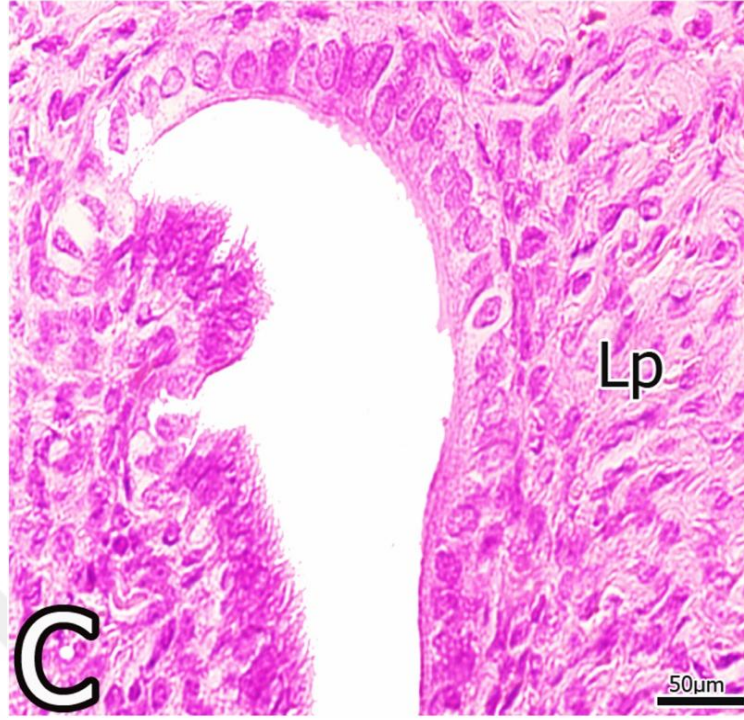
4.2.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

Işık mikroskobu ile kontrol grubunda yapılan incelemelerde merkezi yerleşimli lümeni çevreleyen endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum tabakalarından oluştuğu; bu tabakaların normal ve sağlıklı görünümde olduğu izlendi. Endometriyum, epitel tabakası ve gevşek bağ dokusundan meydana gelen lamina propria yapılarından oluşmaktaydı. Tek katlı prizmatik epitel normal görünümlü olarak izlendi. Lümeni döşeyen bu epitel hücrelerinin merkezi yerleşimli yuvarlak ve oval nükleusları ökromatik olarak gözlemlendi. Epitel tabakasının hemen altında yer alan lamina propriyada yer alan stromal hücreler, düzensiz seyirli kollajen lifleri arasında yer almaktaydı. Endometriyumun en kalın tabakasını ortaya çıkaran bu bağ dokusu içerisinde yer alan kan damarlarının yapısal olarak bütünlüğünü koruduğu görünmekteydi. Ayrıca endometriyum içerisinde yer alan uterus bezleri lümenlerinin açık bir şekilde görüldüğü ve bez epitelini oluşturan hücrelerin tek katlı kübik epitel yapısında olduğu tesbit edildi. Uterusun miyometriyum tabakasında sirküler düz kas tabakası olarak bilenen endometriyuma bitişik konumlu düz kas demetlerinin bulunduğu ve hacimsel olarak longitudinal düz tabakasına nispeten daha kalın olduğu tespit edildi.

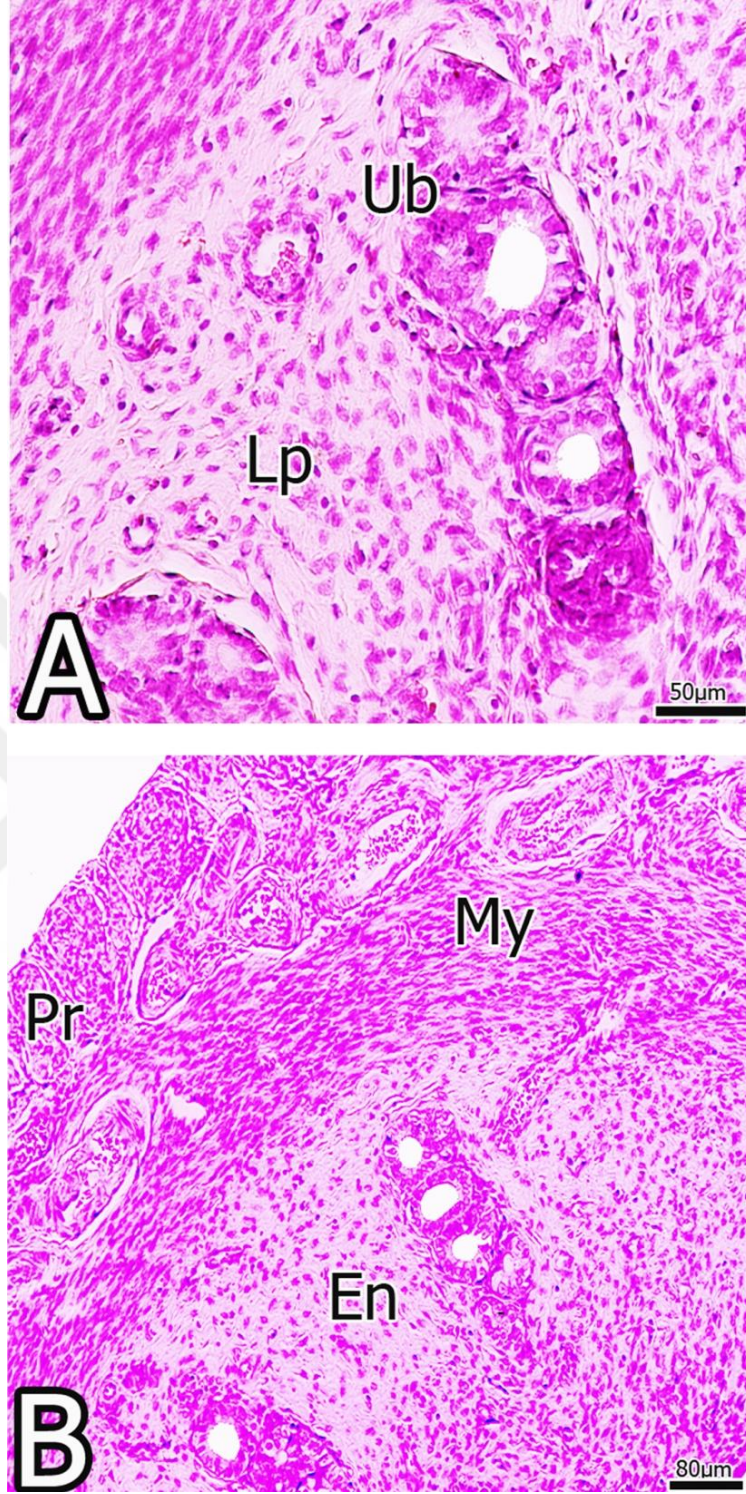
Longitudinal ve sirküler kas tabakaları arasında bulunan stratum vaskülarde bulunan kan damarları normal görünümdeydi (Şekil 14-17).



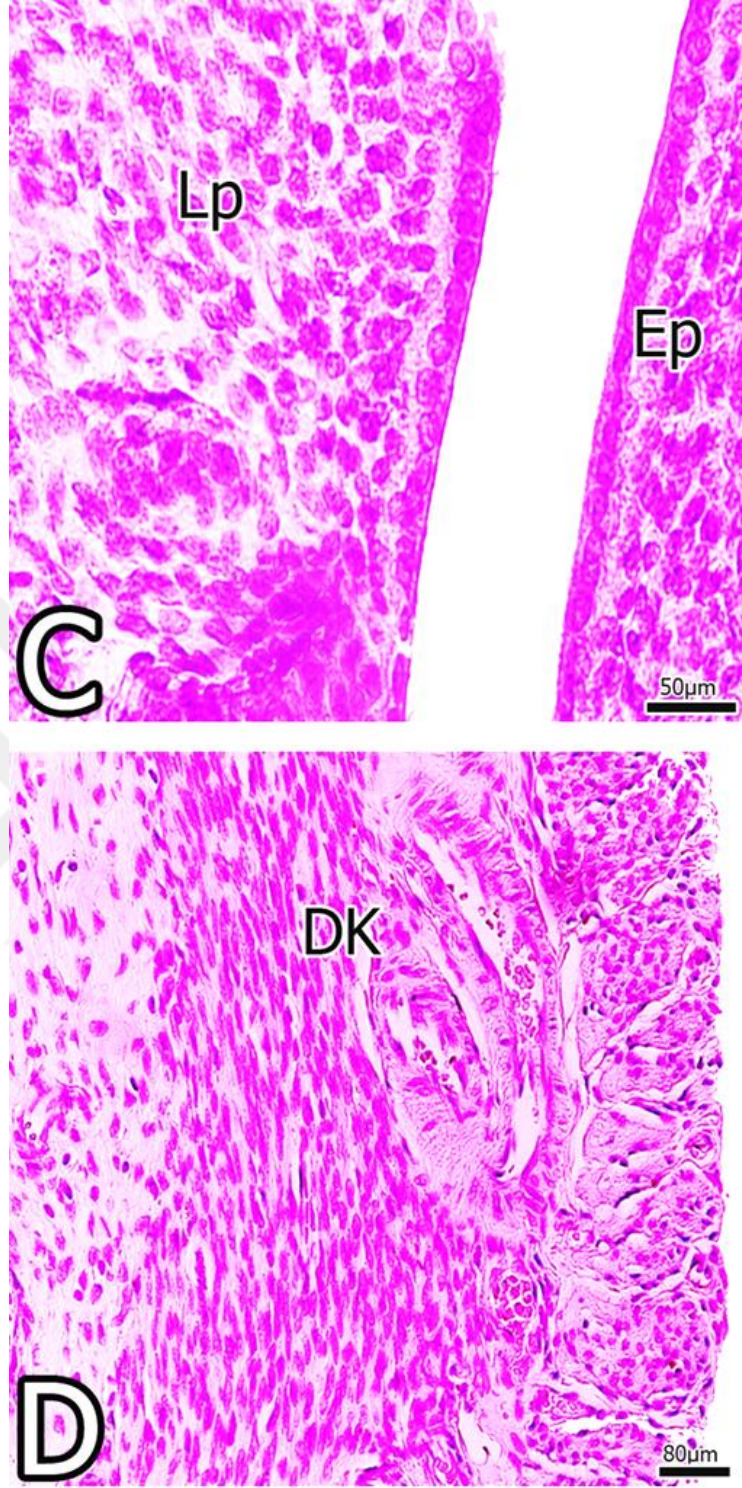
Şekil 14-a. A-B: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü izlenmektedir. **En:** endometriyum, **My:** miyometriyum, **Pr:** perimetrium, **Ep:** epitel. **A:** ×4'lük büyütme, **B:** ×40'lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen Eozin



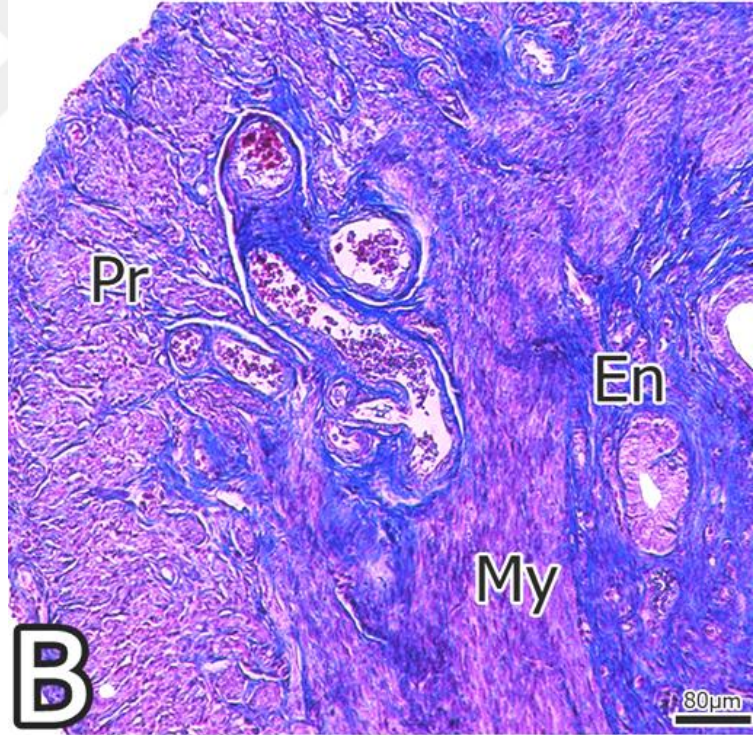
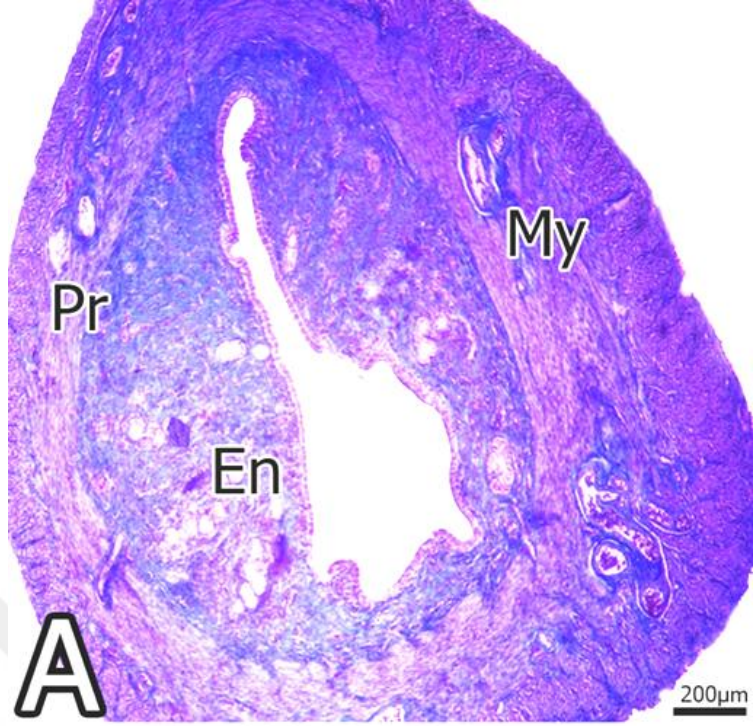
Şekil 14-b. C-D: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü izlenmektedir. **Lp:** Lamina propria, **Ub:** uterus bezi. C;×40'lık büyütme, **D;** ×40'lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen Eozin



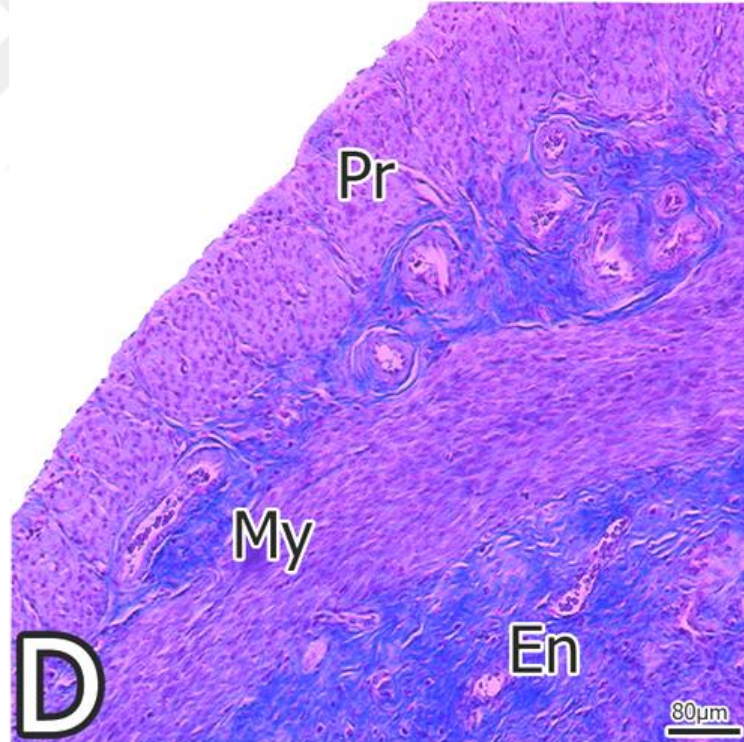
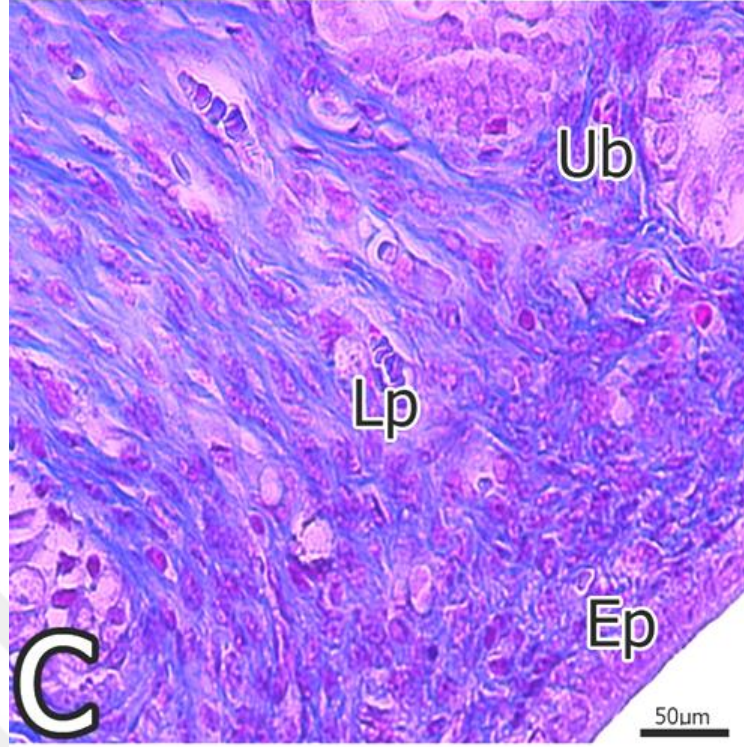
Şekil 15-a. A-B: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü; Farklı kesitlerden miyometriyum ve perimetriyumun normal görünümü görülmektedir. **En:** endometriyum, **My:** miyometriyum, **Pr:** perimetriyum, **Lp:** Lamina propria, **Ub:** uterus bezi. **A;** ×40'lık büyütme, **B;** ×10'luk **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



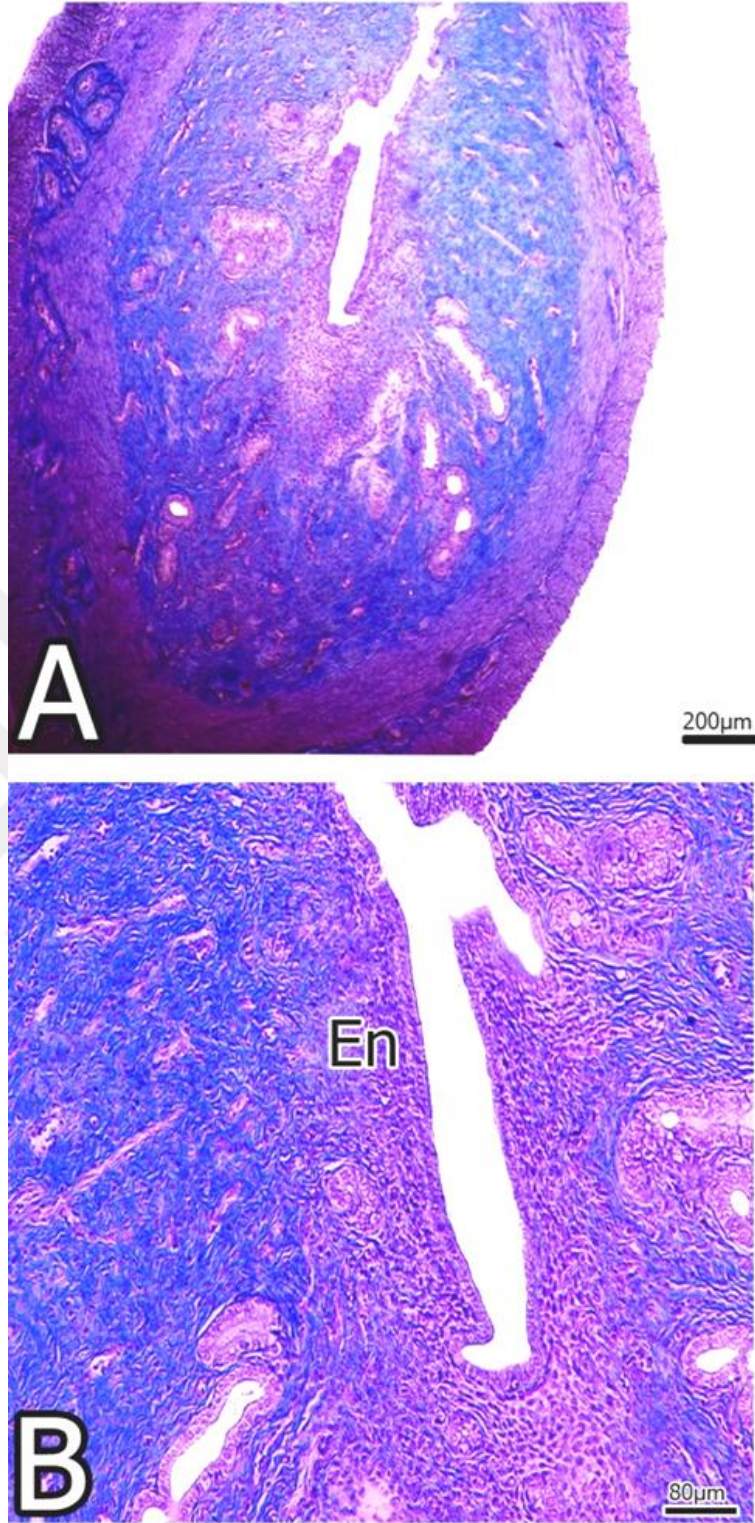
Şekil 15-b. C-D: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü; Farklı kesitlerden endometrium, miyometriyum ve perimetriumun normal görünümü görülmektedir. **Ep:** epitelyum, **Lp:** Lamina propria, **DK:** damar katmanı. **C;** ×40'lık büyütme, **D;** ×10'luk büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



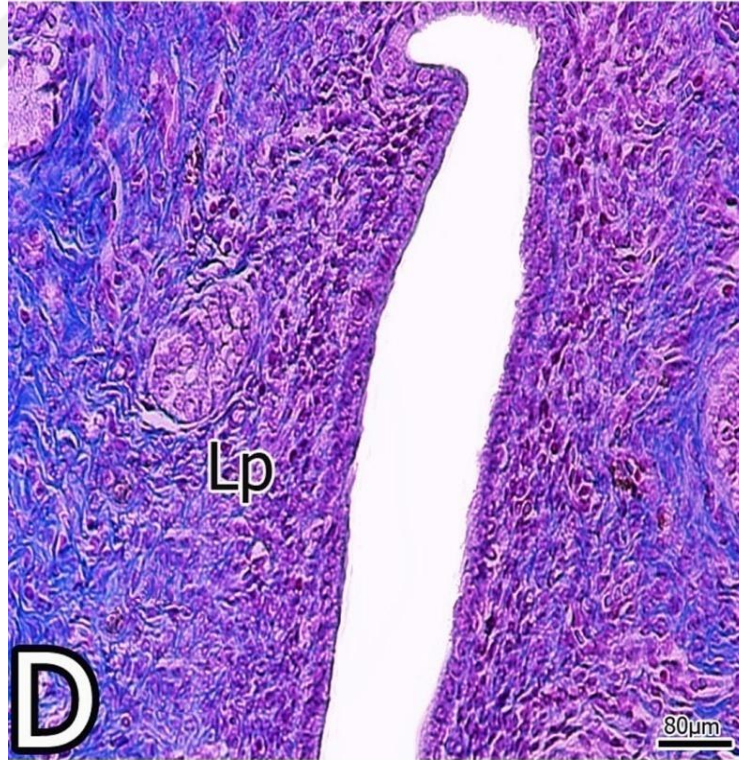
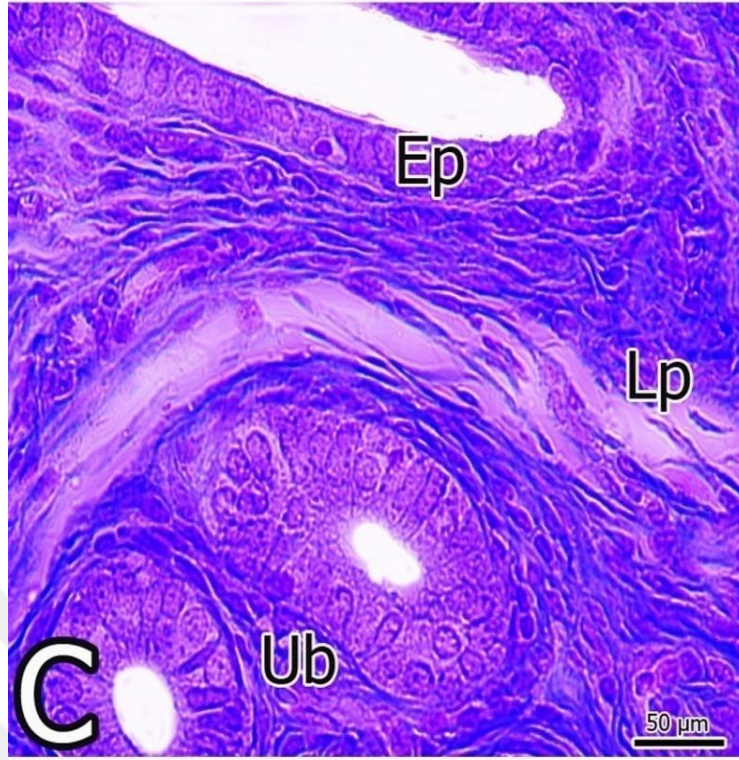
Şekil 16-a. A-B: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü. A-B Farklı kesitlerden endometrium, miyometriyum ve perimetriumun normal görünümü görülmektedir. **En:** endometrium, **My:** miyometriyum, **Pr:** perimetrium. **A;** ×4'lük büyütme, **B;** ×10'lük büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası



Şekil 16-b. C-D: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü. Farklı kesitlerden endometrium, miyometriyum ve perimetriumun normal görünümü görülmektedir. **En:** endometrium, **My:** miyometriyum, **Pr:** perimetrium, **Ep:** epitelyum, **Lp:** Lamina propria, **Ub:** uterus bezi. **C;** $\times 10$ 'luk büyütme, **D;** $\times 40$ 'lık büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası



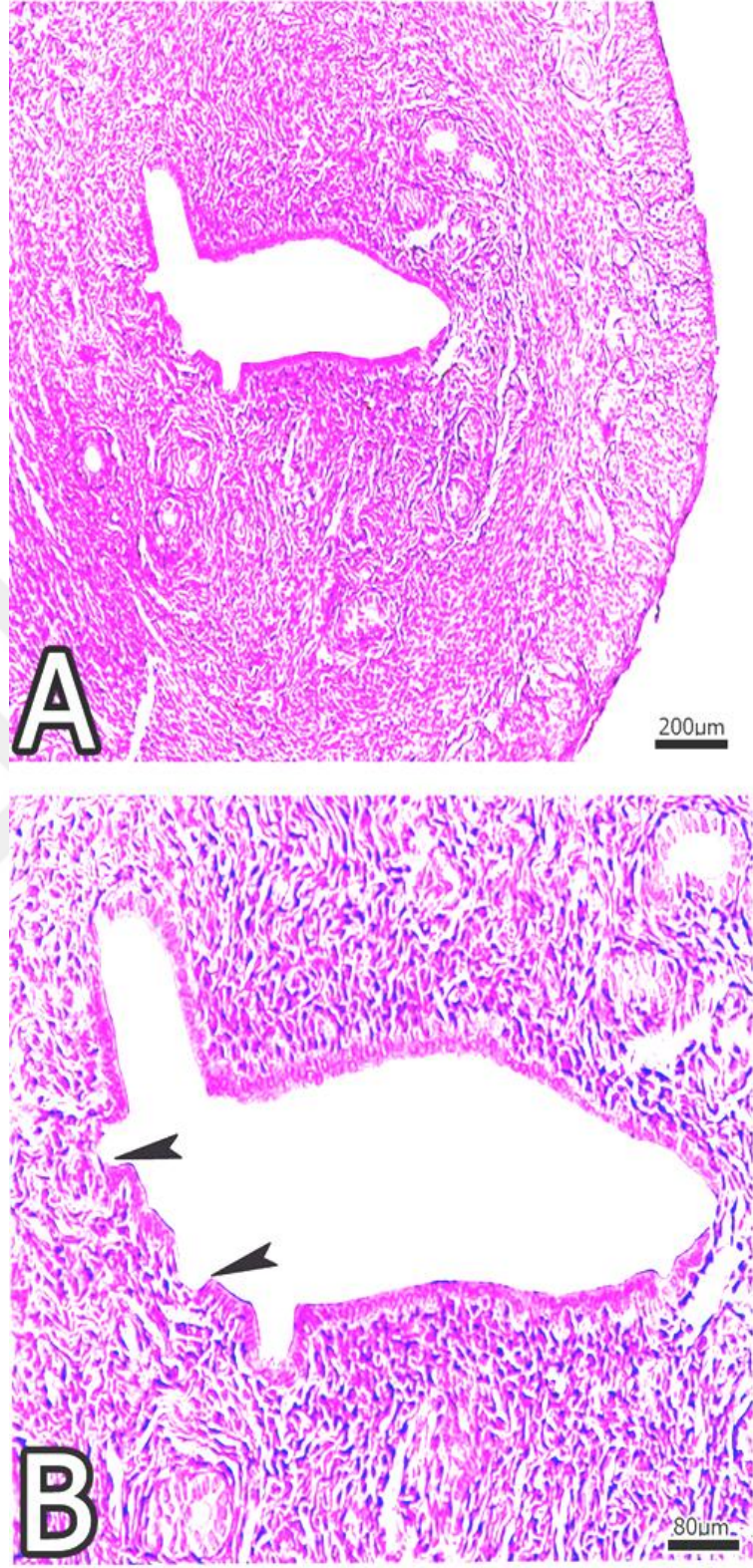
Şekil 17-a. A-B: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü. Farklı kesitlerden endometrium, miyometriyum ve perimetriumun normal görünümü görülmektedir. **En:** endometriyum. **A;** $\times 4$ 'lük büyütme, **B;** $\times 10$ 'lük büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası



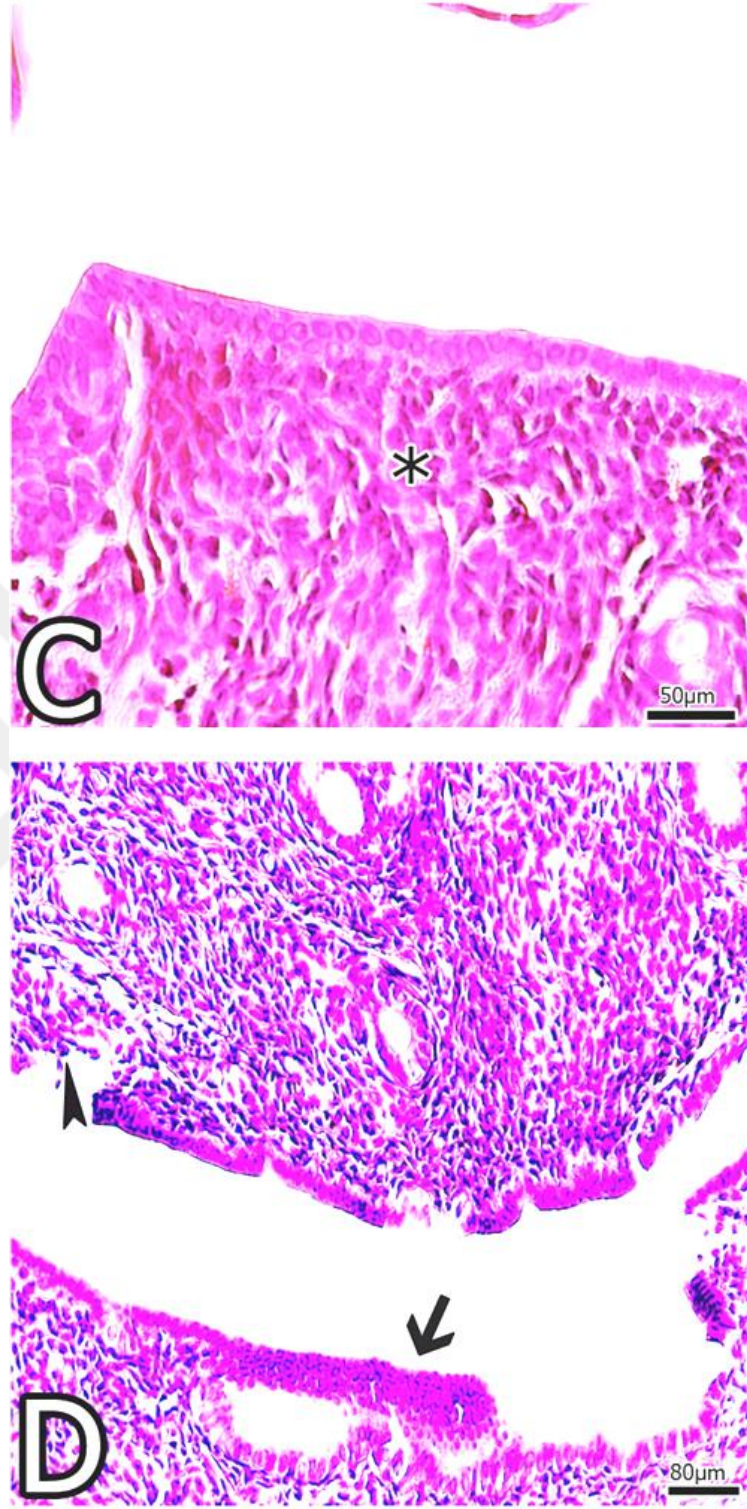
Şekil 17-b. C-D: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü. Farklı kesitlerden epitel, lamina propria ve uterus bezi normal görünümü görülmektedir. **Ep:** epitel, **Lp:** Lamina propria, **Ub:** uterus bezi. **A;** $\times 40$ 'lık büyütme, **B;** $\times 10$ 'lık büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası

4.2.2. Ovt Grubuna Ait Bulgular

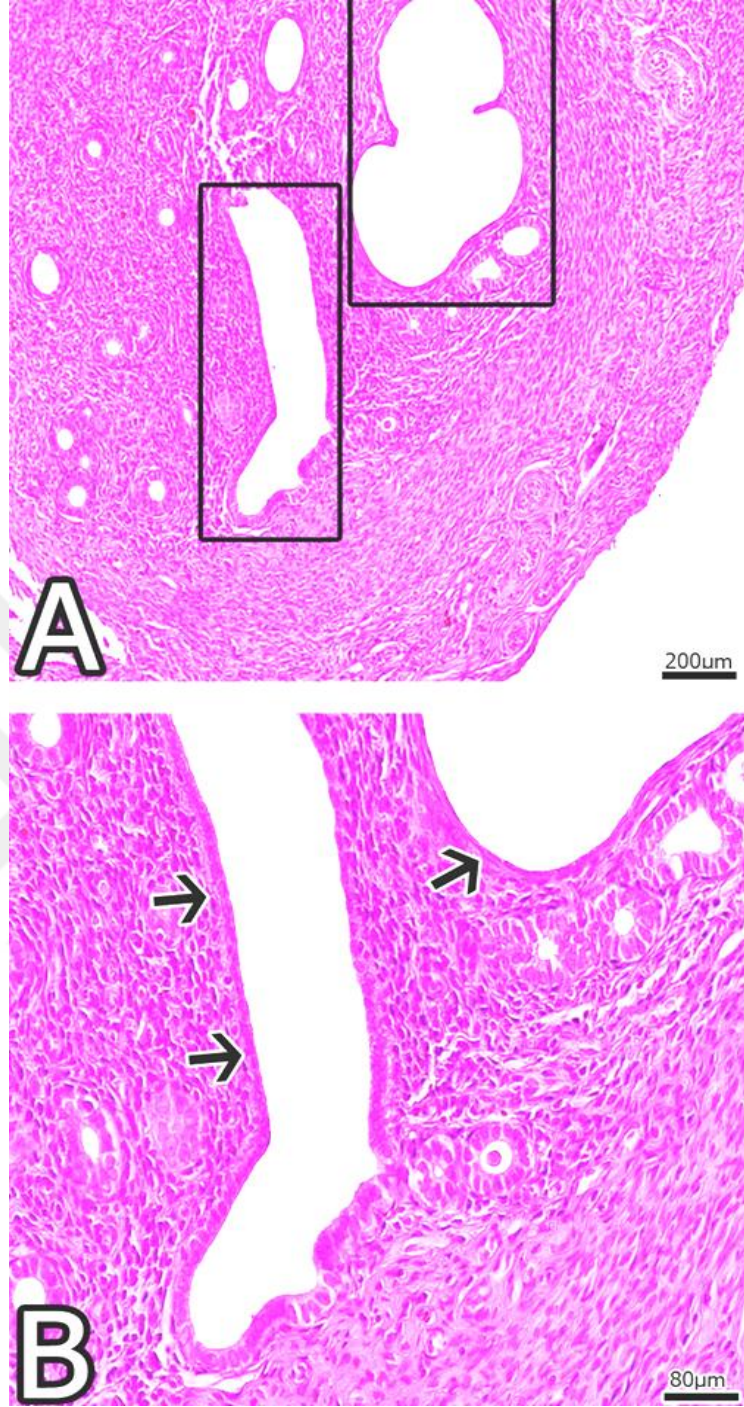
Ovt grubunun ışık mikroskopik görüntüleri histolojik olarak incelendiğinde; endometriyum ve miyometriyumda belirgin değişiklikler gözlemlendi. Uterus lümenini çevreleyen tek katlı prizmatik epitelin değişikliğe uğrayıp, yerini yassı ve tek katlı kübik epitele bıraktığı fark edildi. Epitelin altında yer alan lamina propria içerisinde yer yer enflamatuvar hücreler görüldü. Bu değişikliklerin arasında en çok dikkat çeken endometriyumun stromasında olan dejenaratif değişimlerdi. Özellikle stromadaki kollajen liflerde azalma ve stromal hücrelerde bir çoğalma gözlemlendi. Aynı zamanda endometriyal bezlerde atrofi ve bezin yapısını oluşturan kübik epitel hücrelerindeki heterokromatik nükleuslar fark edildi. Bezlerin yapısını oluşturan kübik epitelin yerini yassı epitele bıraktığı gözlemlendi. Bununla birlikte stromal kan damarlarının sayılarında azalma ve lümenlerinde daralma olduğu belirlendi. Miyometriyum kalınlığında gözle görülür bir azalma tespit edildi. Miyometriyumun yapısını oluşturan düz kas hücrelerinde hiperkromatik çekirdek yapısı ile beraber bir küçülme izlendi ve stratum vaskülaresindeki kan damarlarında dejenerasyon izlendi (Şekil 18-20).



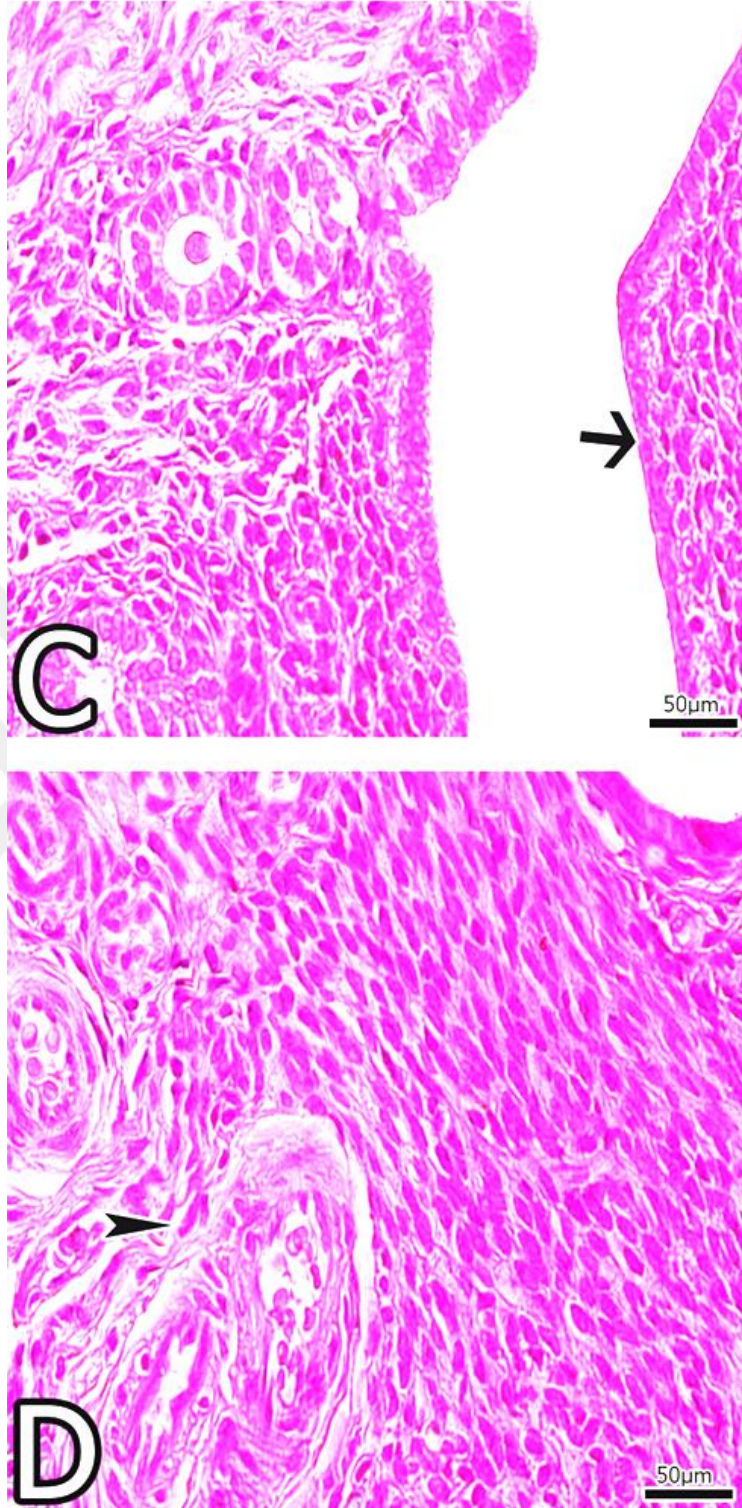
Şekil 18-a. A-B: Ovt grubuna ait uterusun görünümü. ➤ işareti: B resimlerinde epitelin dejenerasyonunu göstermektedir. A; $\times 4$ 'lük büyütme, B; $\times 10$ 'luk büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



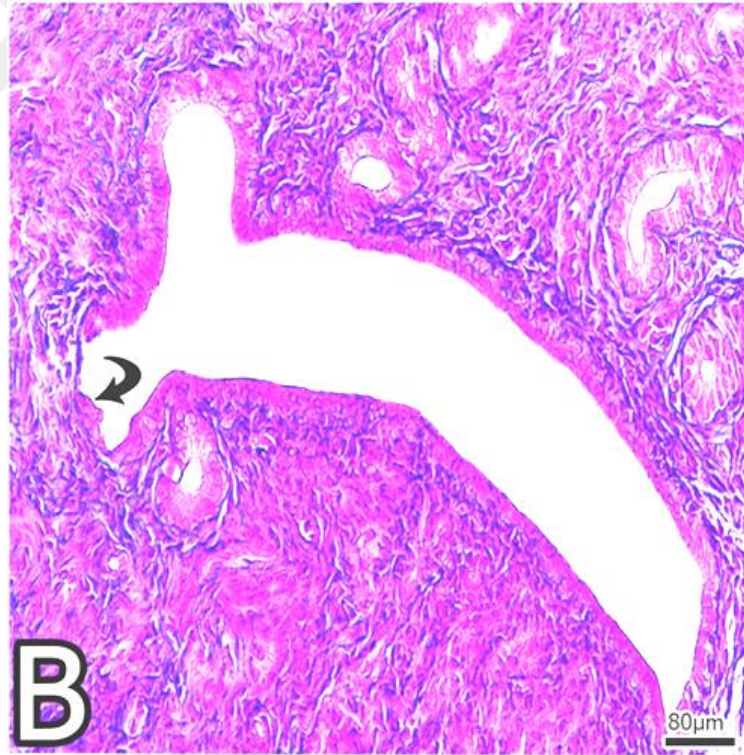
Şekil 18-b. C-D: Ovt grubuna ait uterusun görünümü. **➤** işareti: D resimlerinde epitelin dejenerasyonunu, *****: stromayı; **➔** işareti: epitelin proliferasyonunu göstermektedir. **C;** $\times 40$ 'lık büyütme, **D;** $\times 10$ 'lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



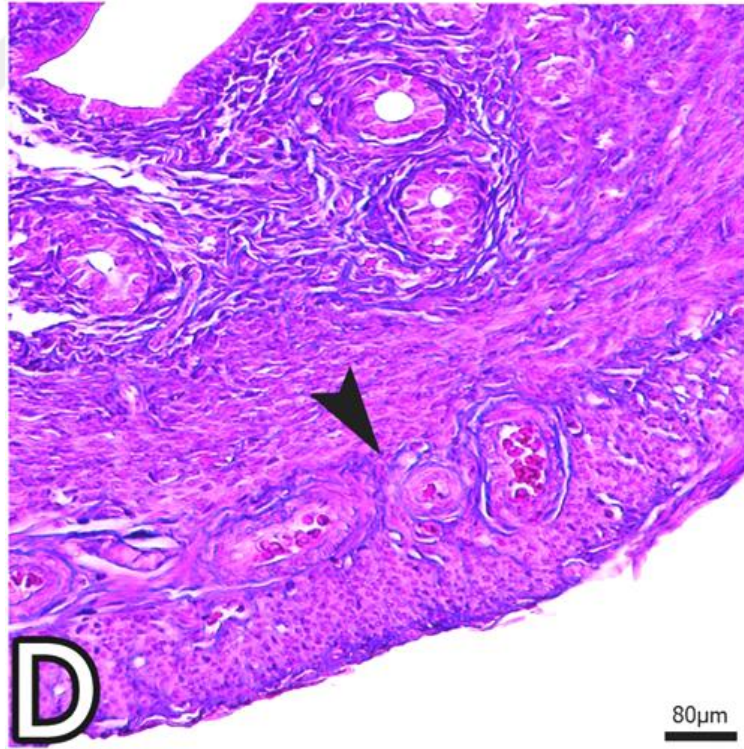
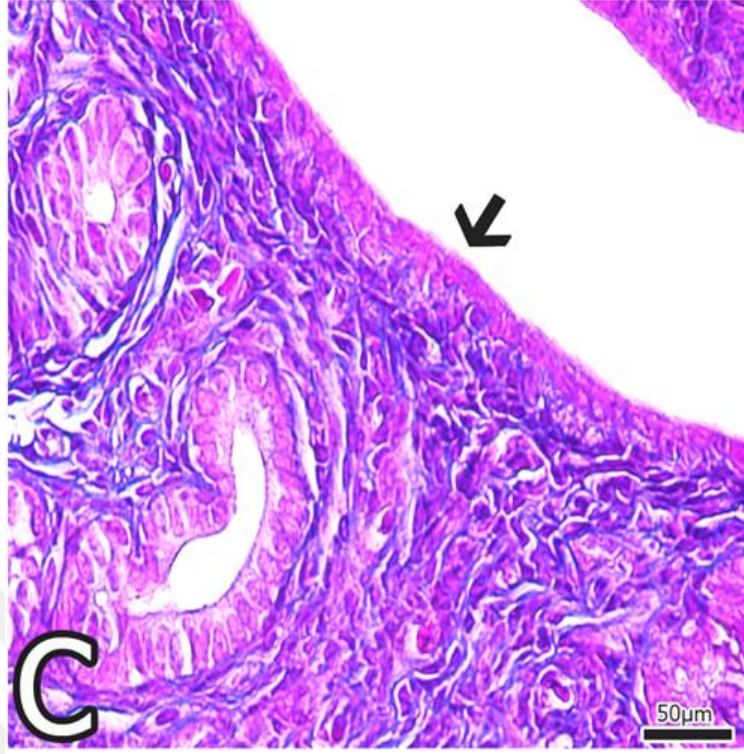
Şekil 19-a. A-B: Ovt grubuna ait uterusun görünümü; A'daki çerçeveler, küçük büyütmede epitel yüksekliği azalmış uterus bezlerinin görünümü; → işareti: yüzey epitelinin incelendiği alanları göstermektedir. **A;** ×4'lük büyütme, **B;** ×10'luk büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



Şekil 19-b. C-D: Ovt grubuna ait uterusun görünümü; → işareti: yüzey epitelinin inceldiği alanları, ► işareti: endometriumun damarlarının dejenerasyonunu göstermektedir. C; ×40'lık büyütme, D; ×40'lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



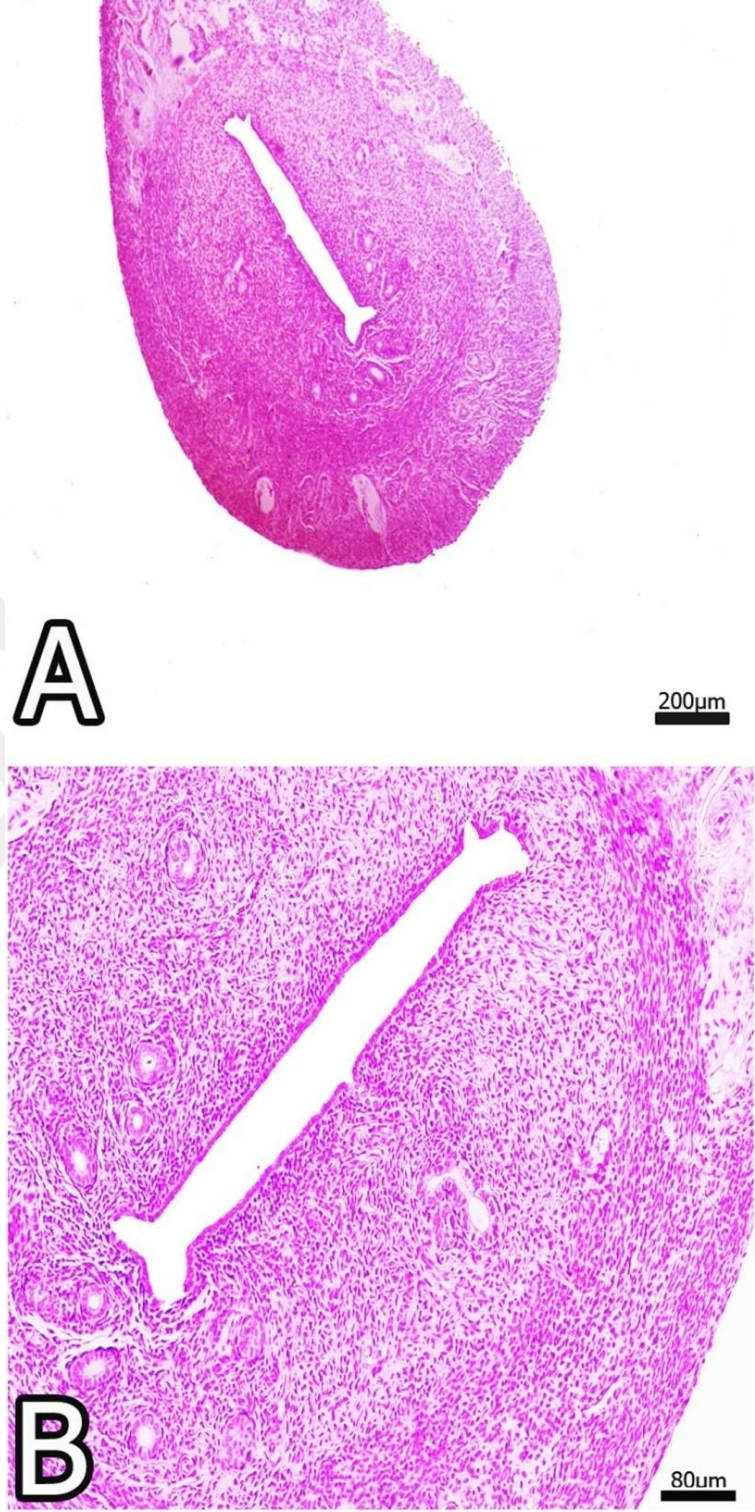
Şekil 20-a. A-B: Ovt grubuna ait uterusun görünümü. ↪ işareti: epitelde incelme, göstermektedir.
A; $\times 10$ 'luk büyütme, B; $\times 10$ 'luk büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası



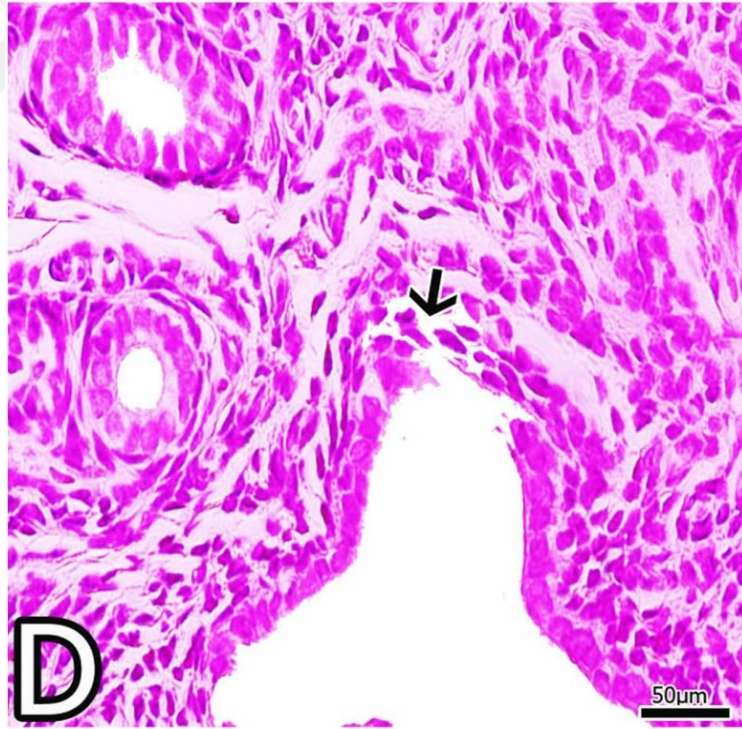
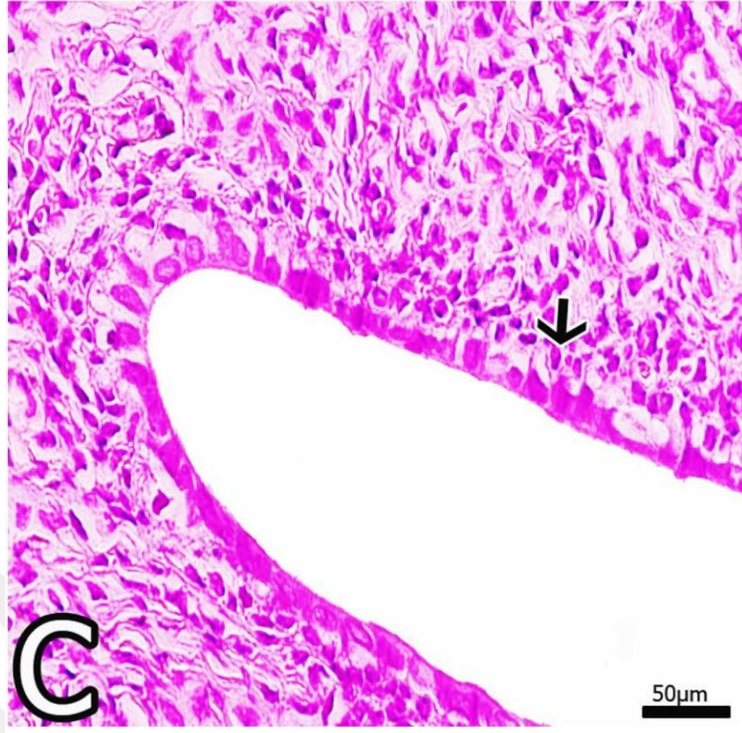
Şekil 20-b. C-D: Ovt grubuna ait uterusun görünümü. → işareti: epitel incelmelerini göstermektedir. **C;** ×40'lık büyütme, **D;** ×40'lık büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası

4.2.3. Ost Grubuna Ait Bulgular

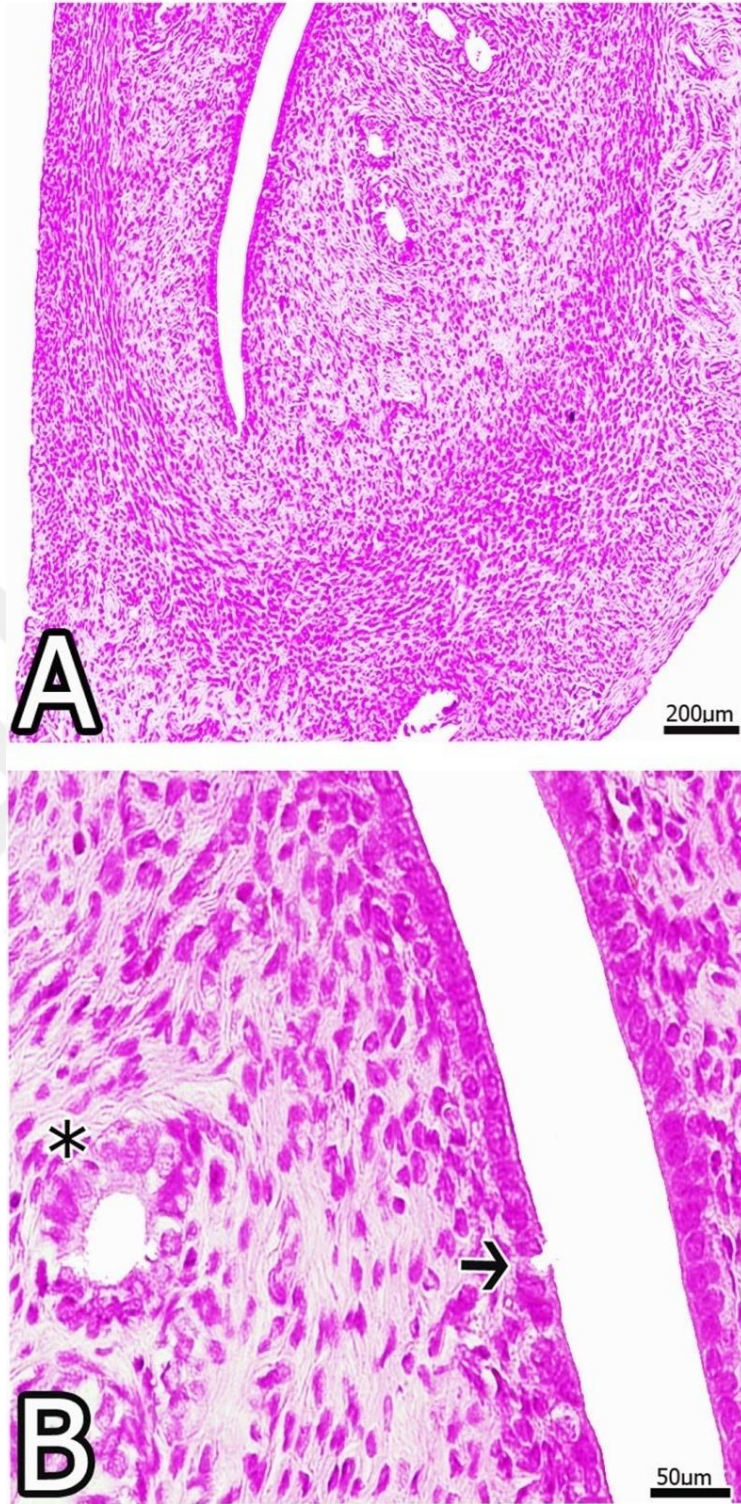
Ost grubunun ışık mikroskopik uterus görüntüleri histolojik olarak incelendiğinde, Ovt grubunun bulgularına benzer özellikler sergilediği görüldü. Uterus yüzey epitelinde incelmeye ve dejenerasyona uğrayan kısımlar görünmekteydi. Ayrıca yüzey epitelini oluşturan tek katlı prizmatik epitelin morfolojik olarak değişikliğe uğrayıp, yerini yassı veya tek katlı kübik epitele bıraktığı fark edildi. Bu hücrelerin bir kısmı bazalde vakuoler dejenerasyonlar içermekteydi. Miyometriyum tabakasında yer alan kas hücrelerinin rutin fibriller kas görüntüsünden uzak oluşu dikkati çekti. Miyometriyum ve perimetriyumun arasında yer alan damarların duvarının sağlıklı görünümünü kaybettiği gözlemlendi (Şekil 21-23).



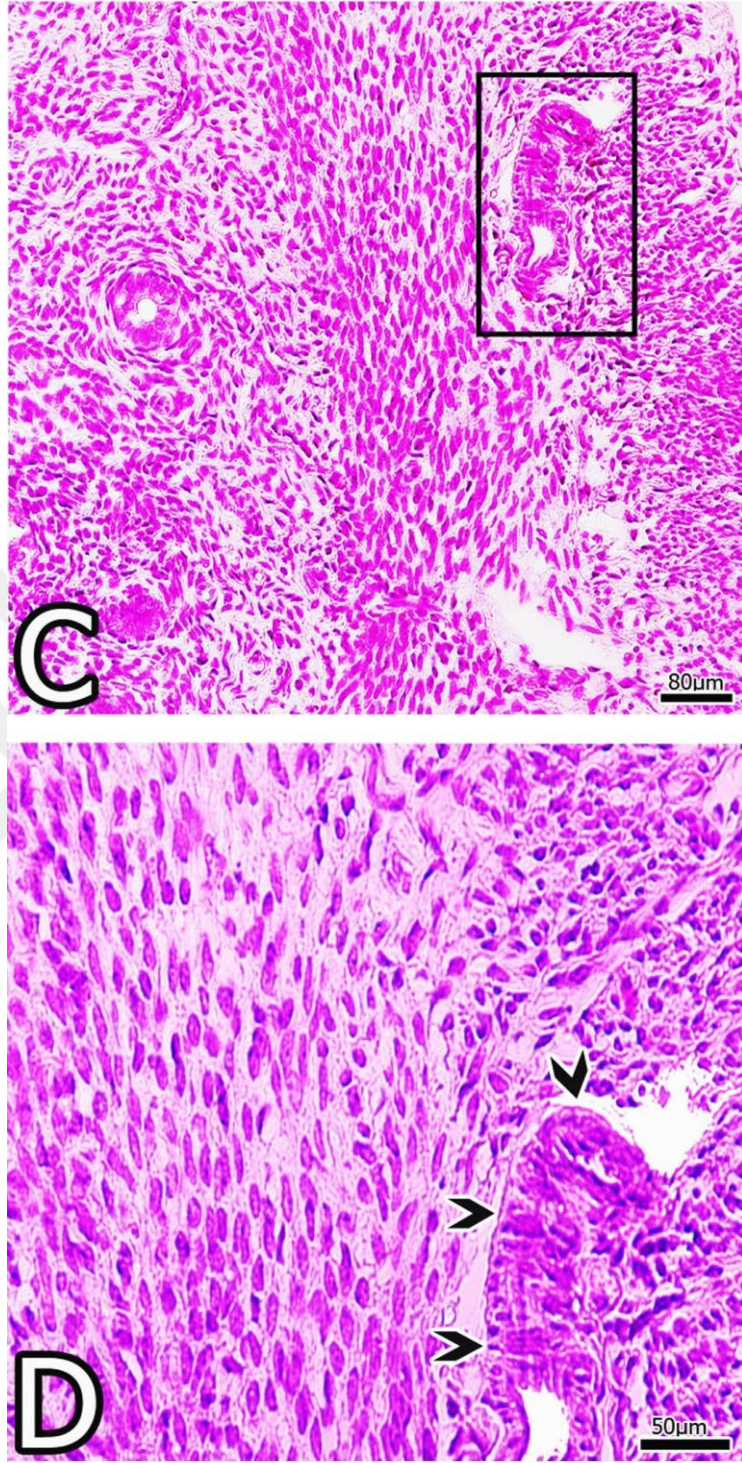
Şekil 21-a. A-B: Ost grubuna ait uterusun görünümü; B’de miyometriyum tabakasının sağlıklı kas tabakası görünümünü kaybettiği dikkat çekmektedir. **A;** ×4’lük büyütme, **B;** ×10’luk büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



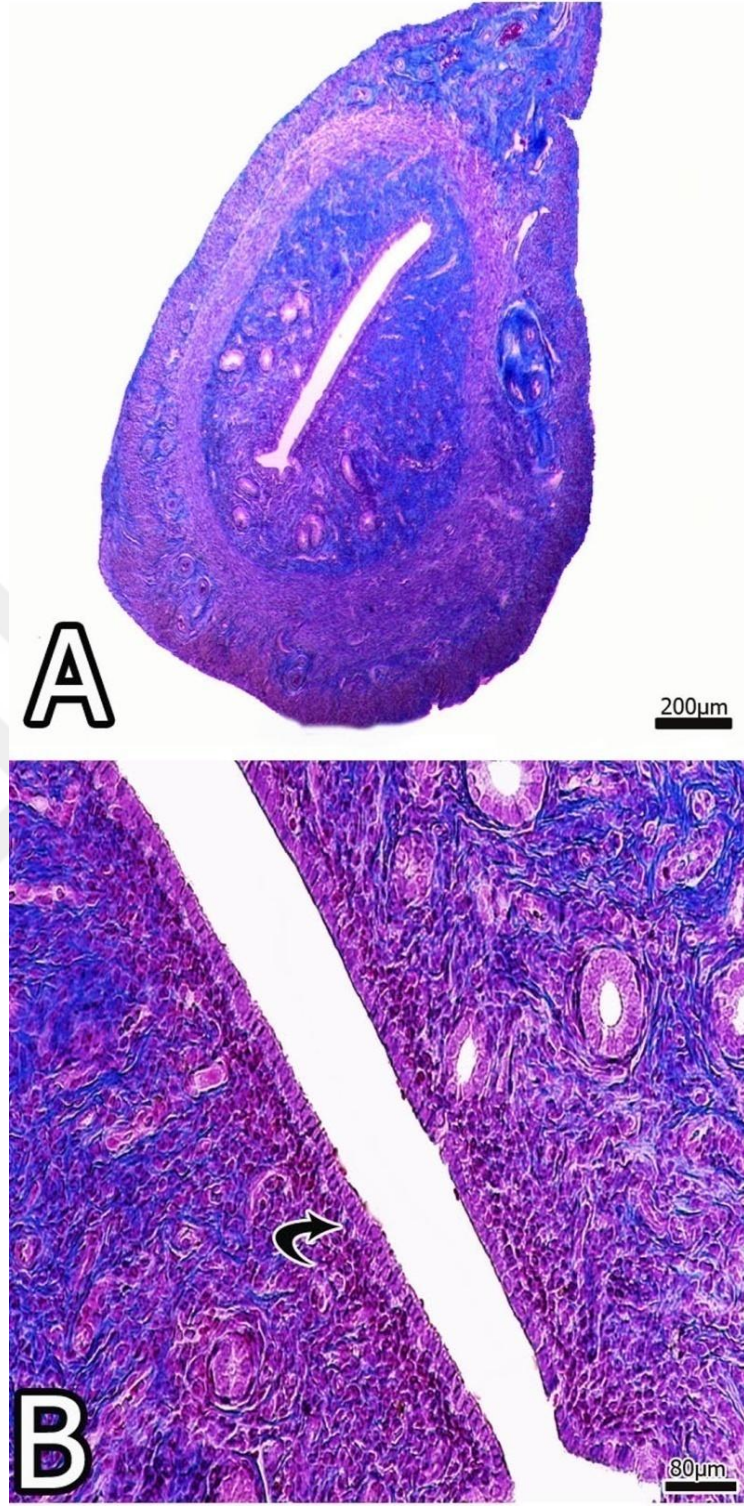
Şekil 21-b. C-D: Ost grubuna ait uterusun görünümü; →: epitelde incelmeyi ve dejenerasyonu göstermektedir. C'de ok ile işaret edilen epitel hücrelerinin bazal kısmında gözlenen vakuoller dejenerasyonlar dikkat çekmektedir. C; ×40'luk büyütme, D; ×40'luk büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin




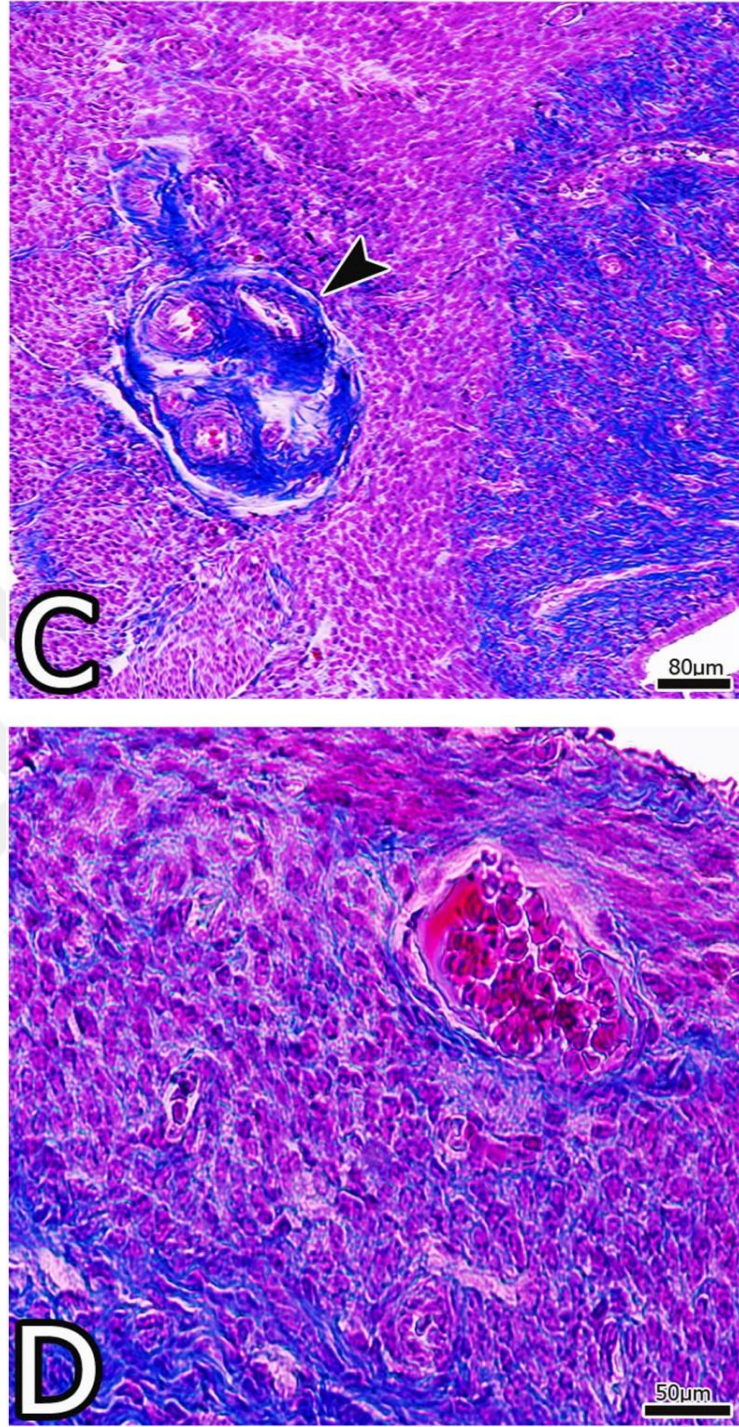
Şekil 22-a. A-B: Ost grubuna ait uterusun görünümü; →: epitelde incelmeyi ve dejenerasyonu, *: çekirdekleri heterokromatik olarak gözlenen uterus bezini göstermektedir. A; ×10'luk büyütme, B; ×40'luk büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



Şekil 22-b. C-D: Ost grubuna ait uterusun görünümü; ➤: damar duvarındaki hasarı göstermektedir. C’de ki çerçeveli alanda gösterilen damar D’de detaylı olarak izlenmektedir. C; $\times 10$ ’lık büyütme, D; $\times 40$ ’lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



Şekil 23-a. A-B: Ost grubuna ait uterusun görünümü;  : epitelde incelmeyi ve dejenerasyonu göstermektedir. A; $\times 4$ 'lük büyütme, B; $\times 10$ 'lük büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası

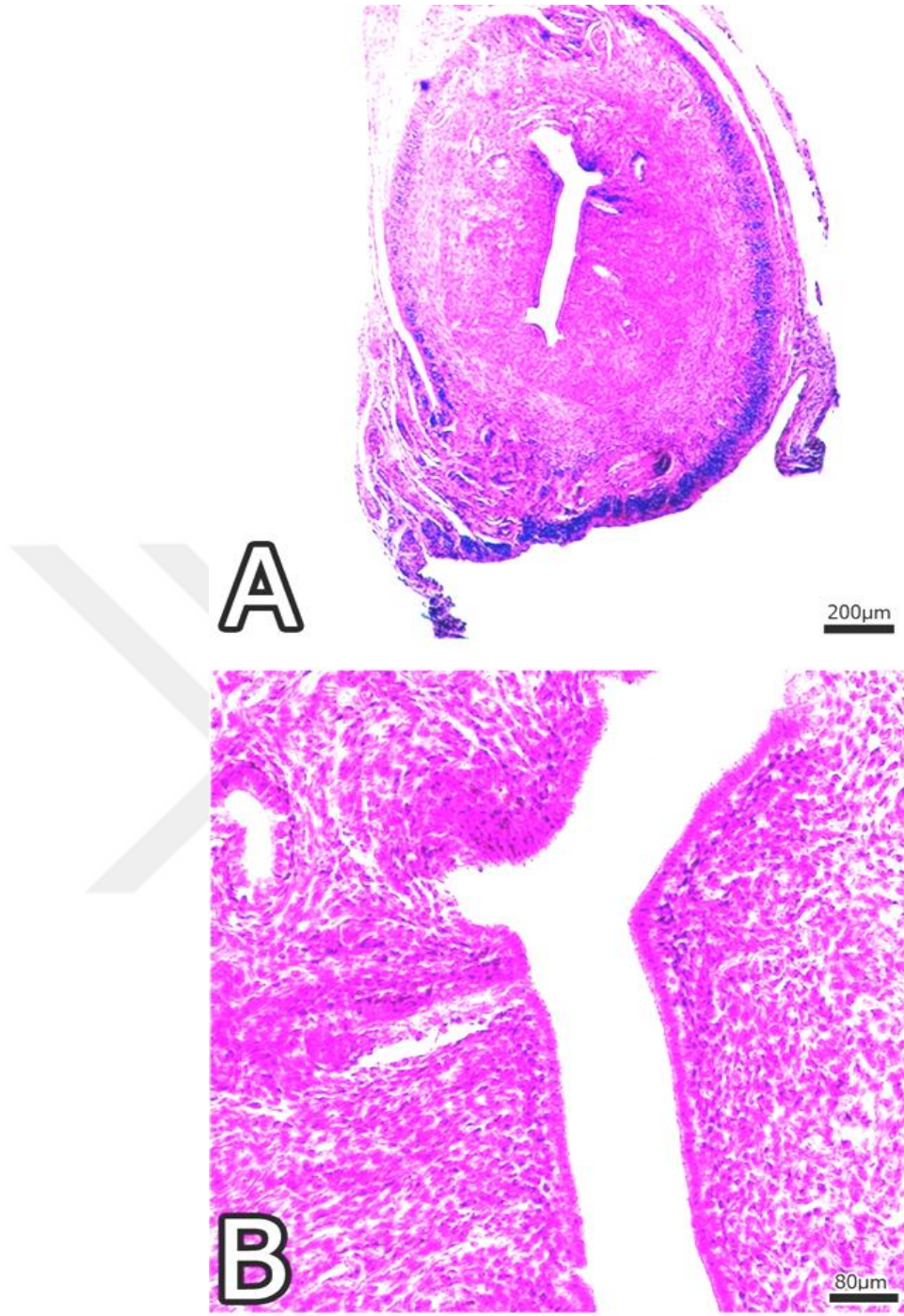


Şekil 23-b. C-D: Ost grubuna ait uterusun görünümü; ➤: damar duvarlarındaki hasarı göstermektedir. D'de üst kısımda görülen damara ait tunika muskularis tabakasındaki hasar detaylı olarak izlenmektedir. C; ×40'lık büyütme, D; ×40'lık büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası

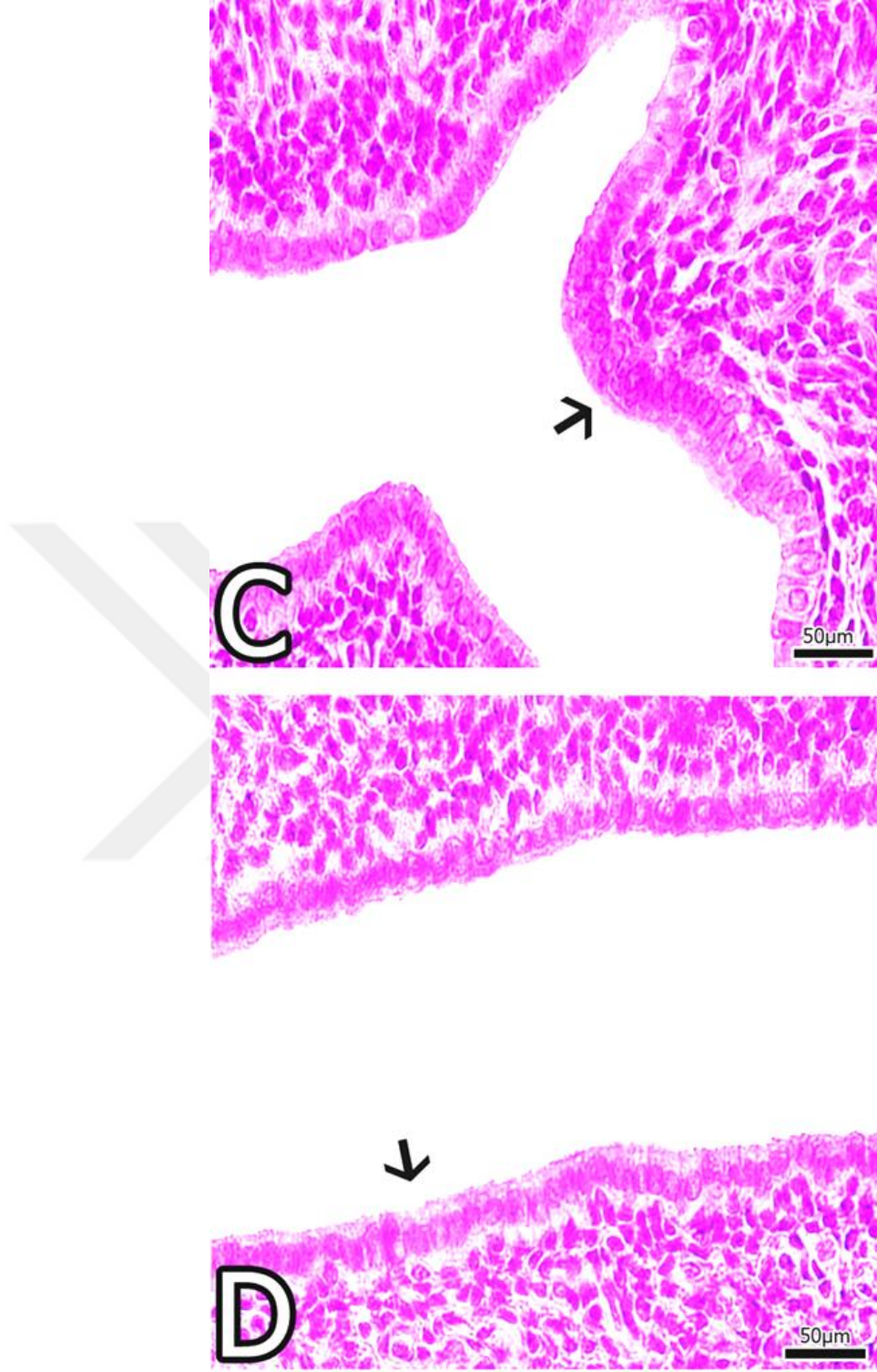
4.2.4. β -glu Grubuna Ait Bulgular

Overektomi yapılan ve β -Glukan ile tedavi edilen grubun ışık mikroskopik görüntüsü histolojik olarak incelendiğinde, endometriyumun epitel kısmında hem hücrelerin proliferasyonunu gösterir tarzda çok katlı görünüm; hem de bazı alanlarda epitel dejenerasyonu tespit edildi. Uterus bezleri ise çoğunlukla sağlıklı görünümde izlendi. Yine endometriyumun lamina propriyası hem stromal hücreler hem de kollajen lifler açısından zengindi. Ayrıca hem endometriyumun lamina propria tabakasında hem de miyometriyum-perimetriyum arasında çok sayıda kan damarı bulunduğu gözlemlendi (Şekil 24, 25).

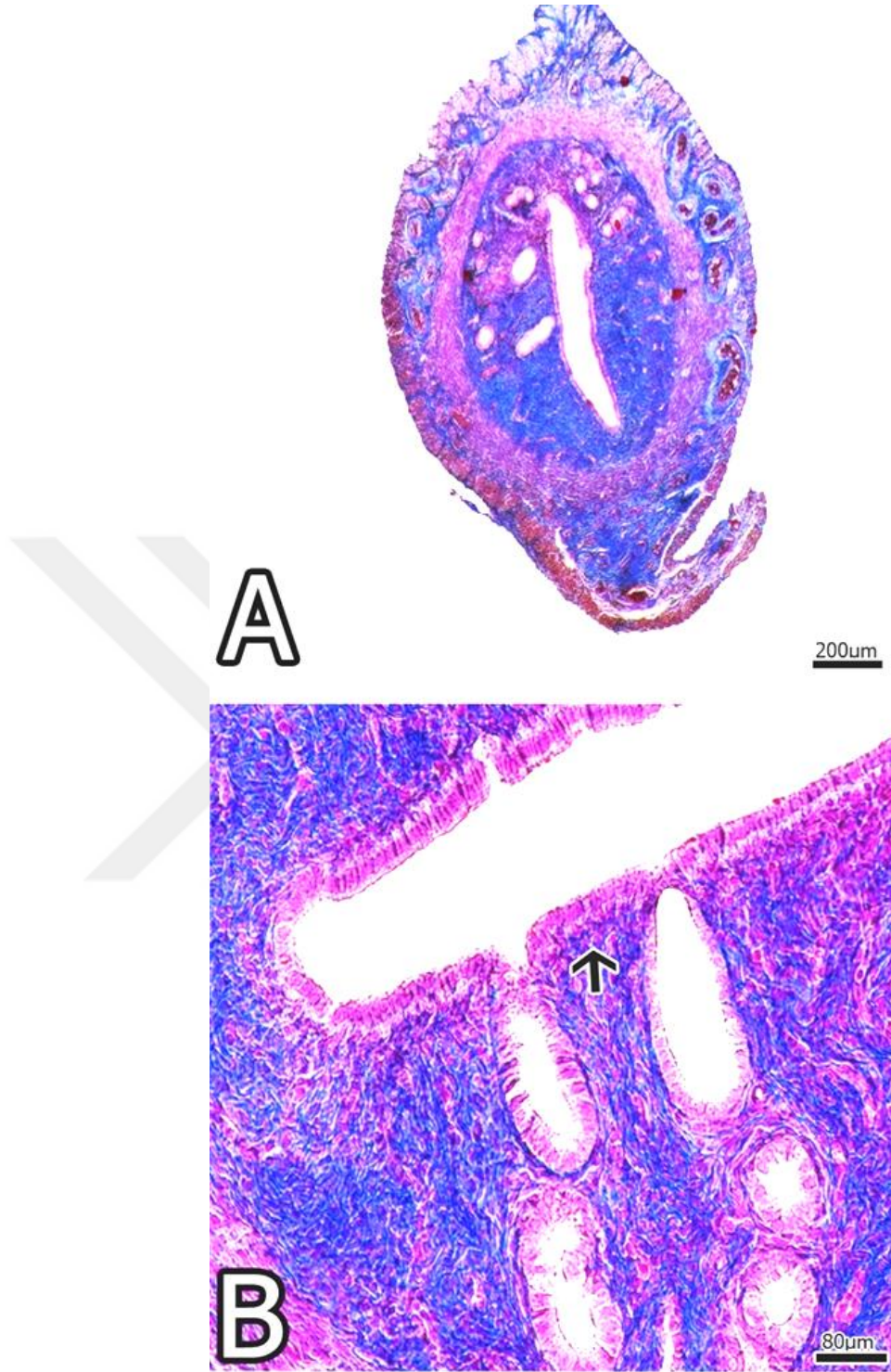




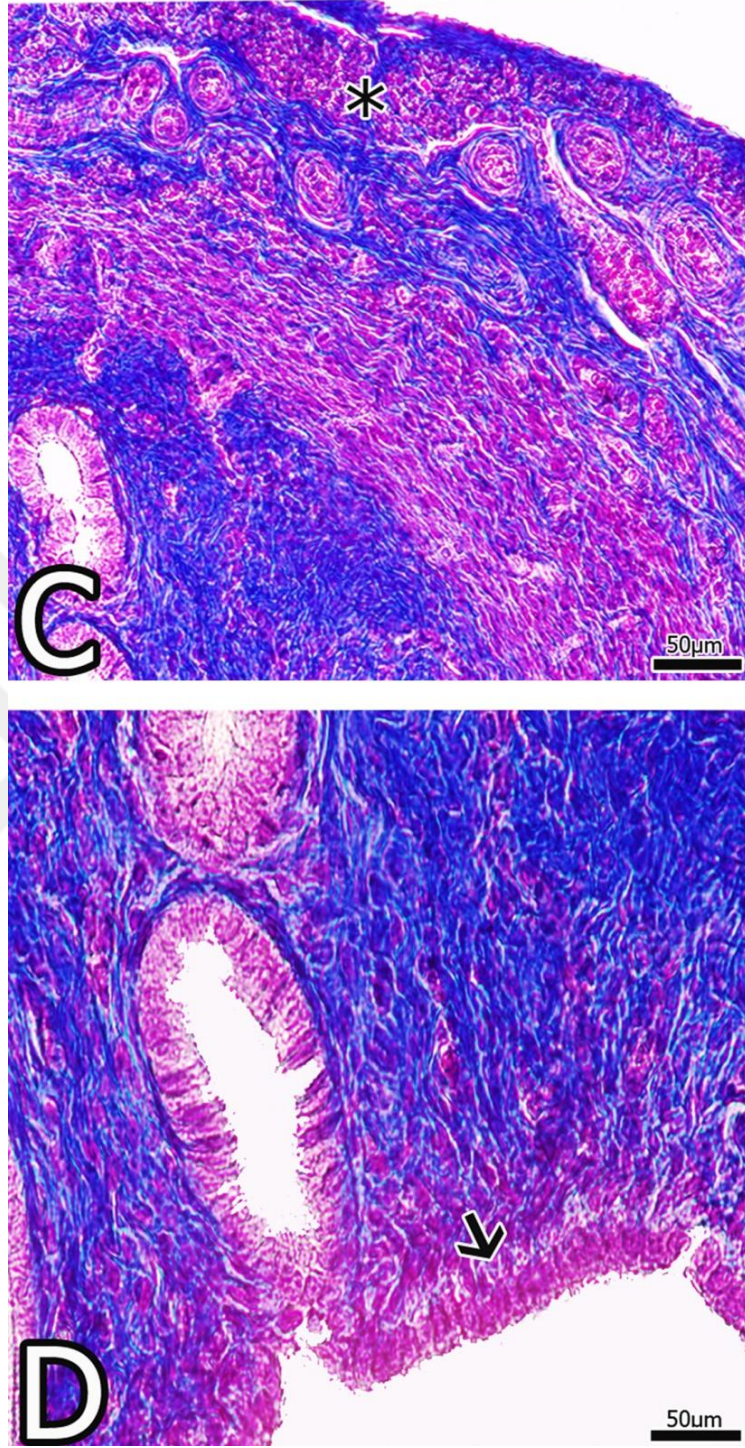
Şekil 24-a. A-B: β -glu grubuna ait uterusun görünümü; B’de çok katlı epitelin görüldüğü alanlar belirginken olduğu dikkat çekmektedir. **A;** $\times 4$ ’lük büyütme, **B;** $\times 10$ ’lük büyütme.
Boyama: Hematoksilen-Eozin



Şekil 24-b. C-D: β -glu grubuna ait uterusun görünümü; \rightarrow : etrafındaki hücelere kıyasla daha sık yerleşimli ve ökromatilk çekirdekli epitelyum hüceleri gözlenmektedir. C'de çok katlı epitelin görüldüğü alanlar belirginken; D de epitel yüksekliğinin fazla, hücelerin sık konumlu olduğu dikkat çekmektedir. C; $\times 40$ 'lık büyütme, D; $\times 40$ 'lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



Şekil 25-a. A-B: β -glu grubuna ait uterusun görünümü; \rightarrow : etrafındaki hücelere kıyasla daha ökromatik çekirdekli ve sık konumlu epitel gözlenmektedir. B’de çok katlı epitelin görüldüğü alanlar ve uterus bezlerinde proliferasyon belirginken dikkat çekmektedir. A; ×4’lük büyütme, B; ×40’lık büyütme. **Boyama:** Masson’un Üçlü Boyası

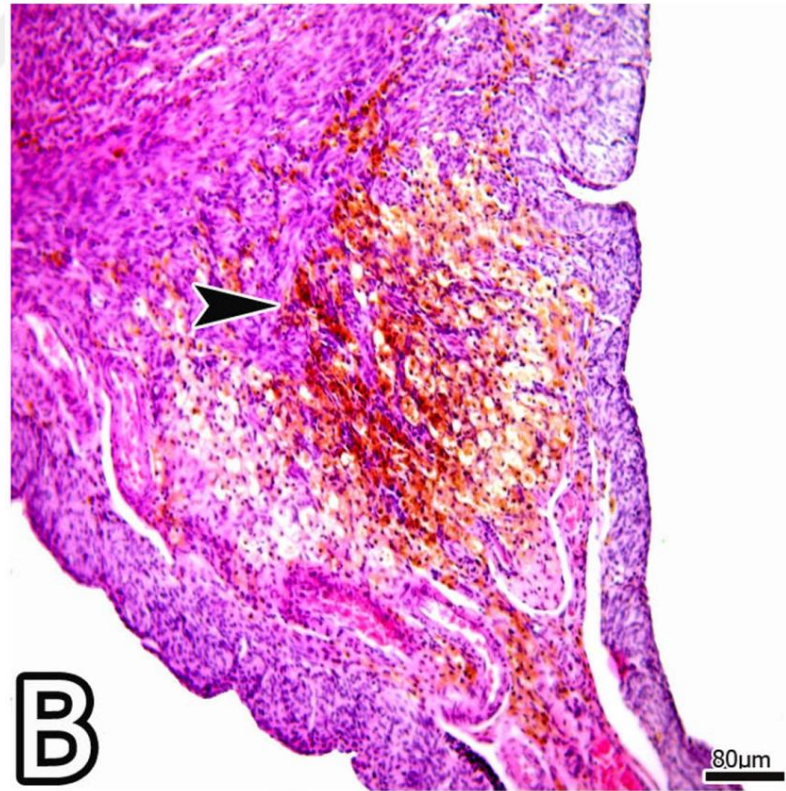
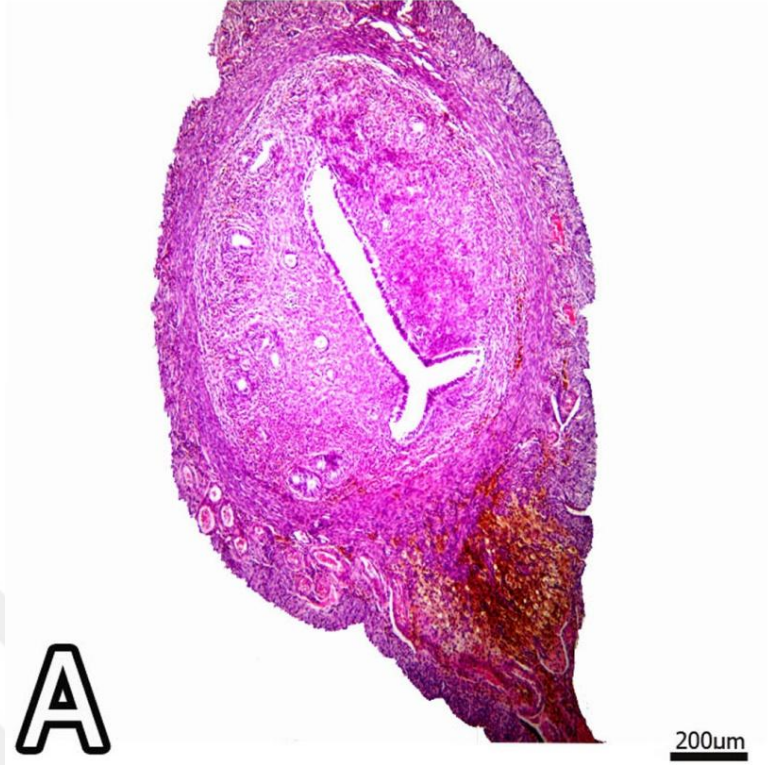


Şekil 25-b. C-D: β -glu grubuna ait uterusun görünümü; \rightarrow : etrafındaki hücelere kıyasla daha ökromatik çekirdekli ve sık konumlu epitel gözlenmektedir. D'de çok katlı epitelin görüldüğü alanlar ve uterus bezlerinde proliferasyon belirgin; *: C kan damarlarının çokluğu dikkat çekmektedir. C; $\times 40$ 'lık büyütme, D; $\times 40$ 'lık büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası

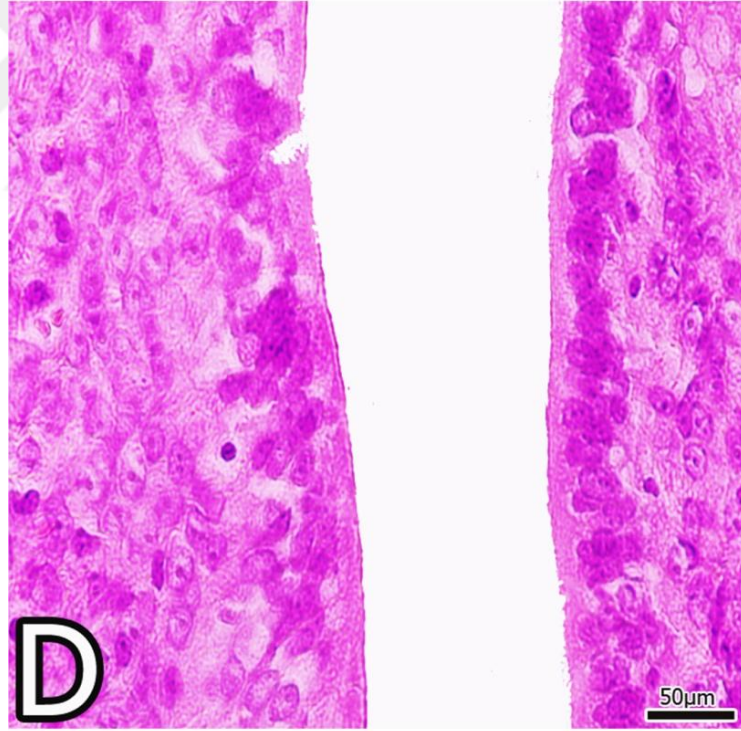
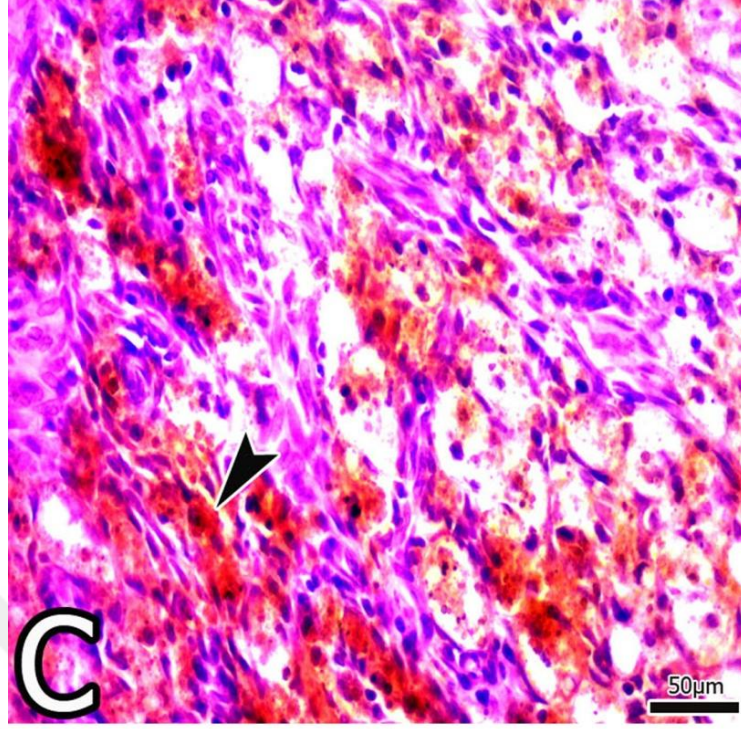
4.2.5. Bort Grubuna Ait Bulgular

Overektomi yapılan ve borteomib ile tedavi edilen grubun ışık mikroskopik görüntüleri histolojik olarak incelendiğinde, lümeni döşeyen tek katlı prizmatik epitelin çoğunlukla korunduğu görüldü. Uterus bezlerinde de herhangi bir anormallik gözlenmedi. Özel olarak stromal bağ doku liflerindeki azalmayla birlikte, stromal hücrelerin sıklığı dikkati çekti. Miyometriyumun yapısını oluşturan düz kas hücreleri de bu grupta daha sıklıkla gözlemlendi (Şekil 26-27).

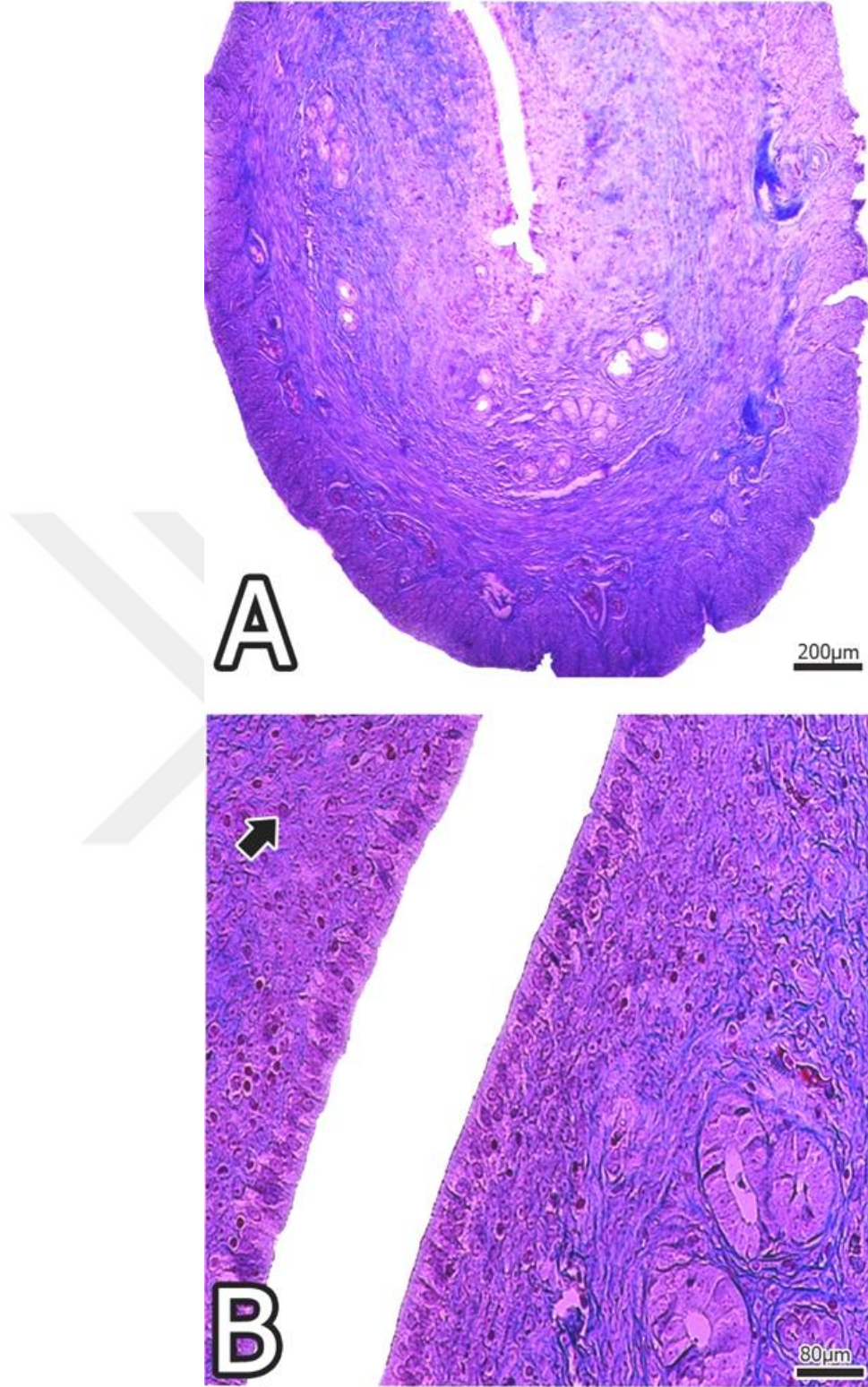




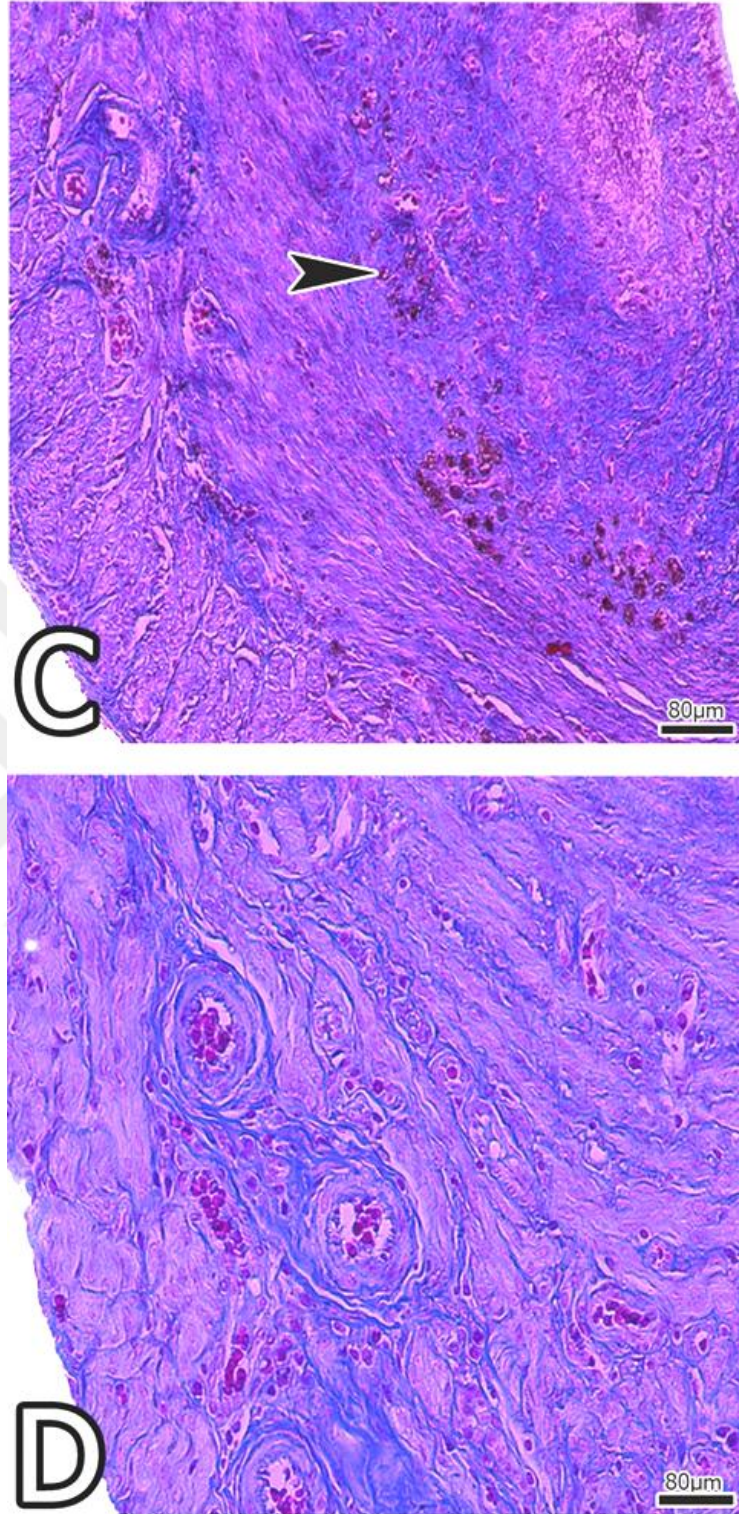
Şekil 26-a. A-B: Bort grubuna ait uterusun görünümü; **➤:** miyometriyumdaki kas hücrelerinin proliferasyonunu göstermektedir. **A;** $\times 4$ 'lük büyütme, **B;** $\times 10$ 'lük büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



Şekil 26-b. C-D: Bort grubuna ait uterusun görünümü; **►**: miyometriyumdaki kas hücrelerinin proliferasyonunu göstermektedir. D'de yüzey epiteli ve stromanın sağlıklı görünümü dikkat çekmektedir. C; $\times 40$ 'lık büyütme, D; $\times 40$ 'lık büyütme. **Boyama:** Hematoksilen-Eozin



Şekil 27-a. A-B: Bort grubuna ait uterusun görünümü; **➡**: lamina propriadaki stromal hücrelerin proliferasyonunu göstermektedir. **A;** ×4'lük büyütme, **B;** ×10'lük büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası



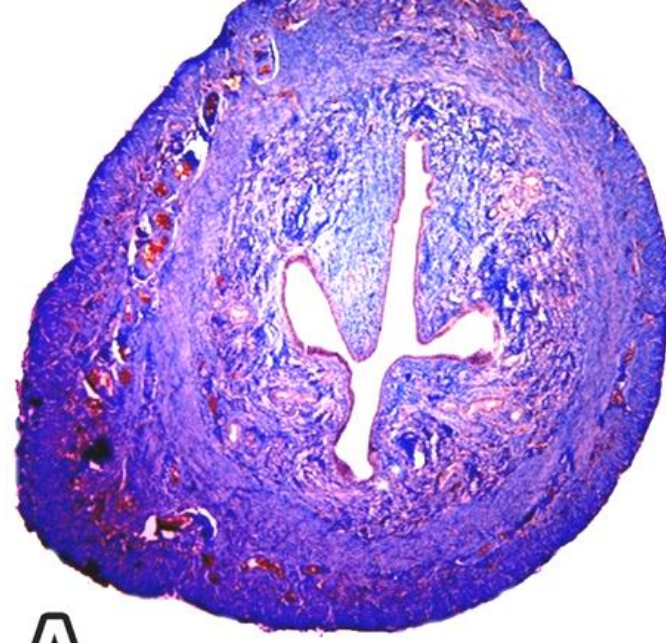
Şekil 27-b. C-D: Bort grubuna ait uterusun görünümü; **➤:** miyometriyumdaki kas hücrelerinin proliferasyonunu göstermektedir. D'de miyometriyum ve perimetriumun sağlıklı görünümü dikkat çekmektedir. **C;** $\times 10$ 'luk büyütme, **D;** $\times 10$ 'luk büyütme. **Boyama:** Masson'un Üçlü Boyası

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal değerlendirme için polilizinli lama alınan kesitler streptavidin-biotin-peroksidaz metodu kullanılarak NF-κB (P65) (Rabbit polyclonal ab, p65 Ab-1, dilüsyon 1.75) ile boyandı. Tüm gruplardan elde edilen bulgular ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

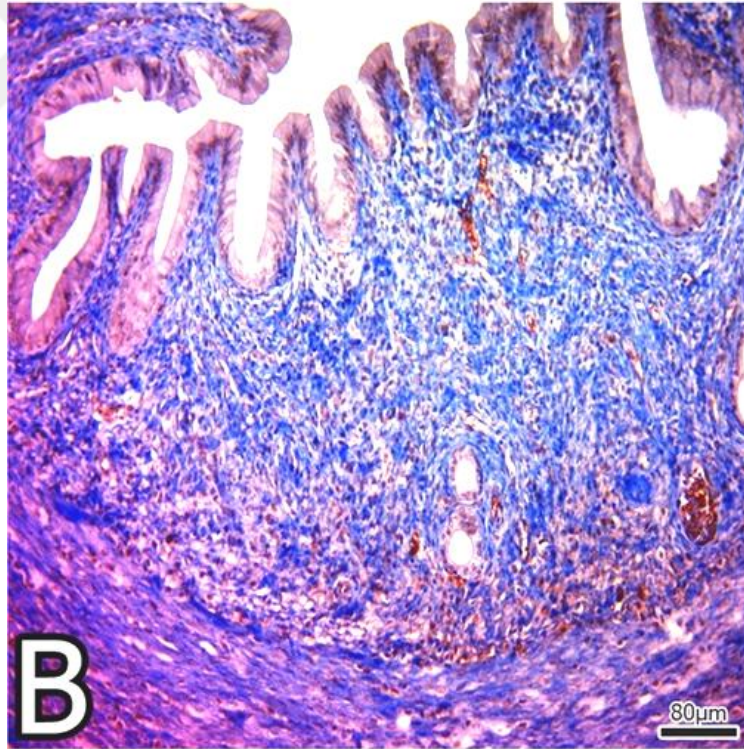
4.3.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

Kontrol grubuna ait olarak uterusun her üç histolojik katmanı (endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum) küçük mikroskop büyötmeleri ile (x4 ve x10) incelendiğinde immün pozitif boyanmaya rastlanmadı. Detaylı inceleme sonunda ise NF-κB pozitifliğinin az sayıda endotel hücresi ve kan damarlarında olduğu göröldü. Miyometriyum ve perimetriyum arasındaki stratum vaskölare stromasında seyrek immün pozitif aktivitenin olduğu dikkat çekiciydi. Bunların haricinde stromal hücreler, endometriyumun tek katlı yüzey epitelinde, uterus bezlerinde ya da miyometriyumu oluşturan düz kas hücrelerinde immün pozitif boyanma görölmedi (Şekil 28).



A

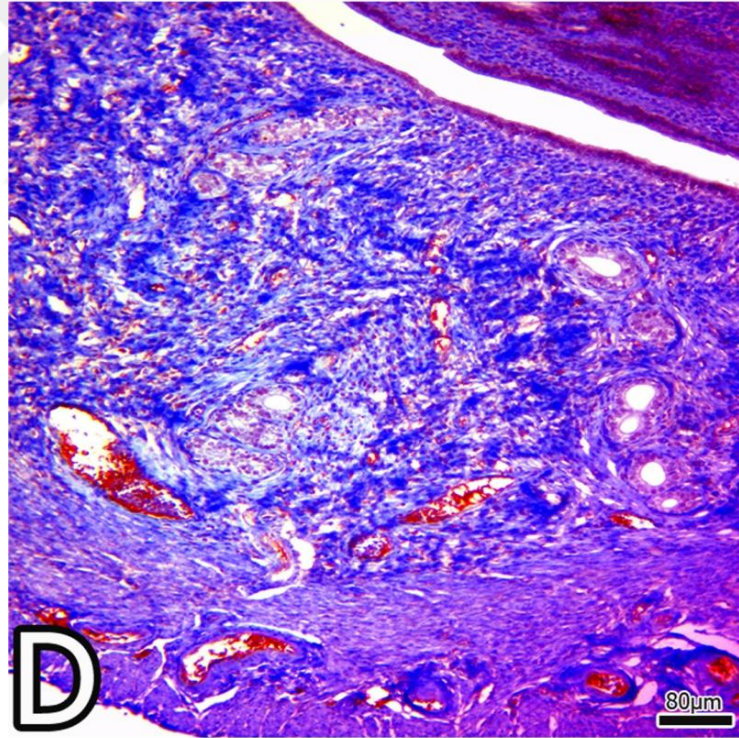
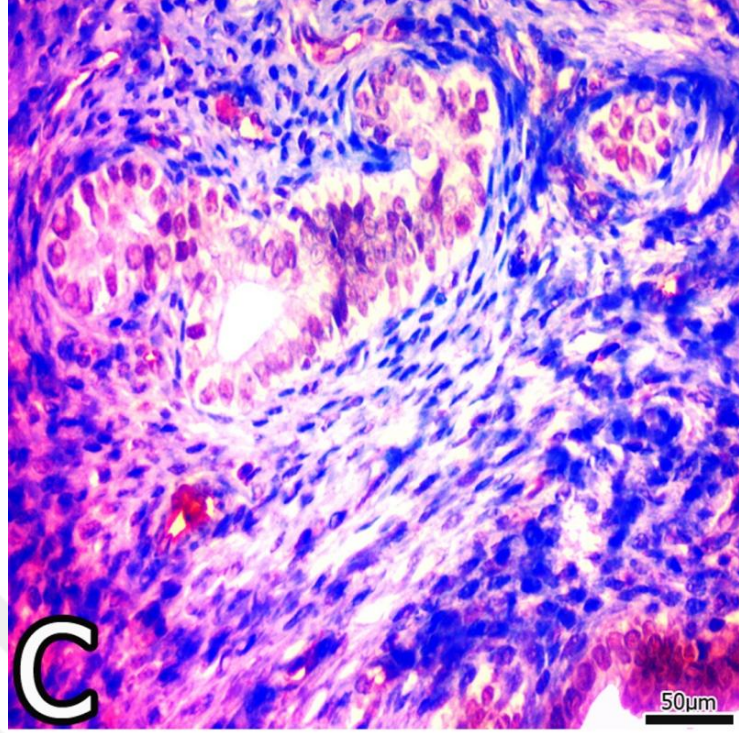
200μm



B

80μm

Şekil 28-a. A-B: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü; immün pozitif boyanmanın zayıflığı dikkati çekmektedir. **A;** ×4'lük büyütme, **B;** ×10'luk büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

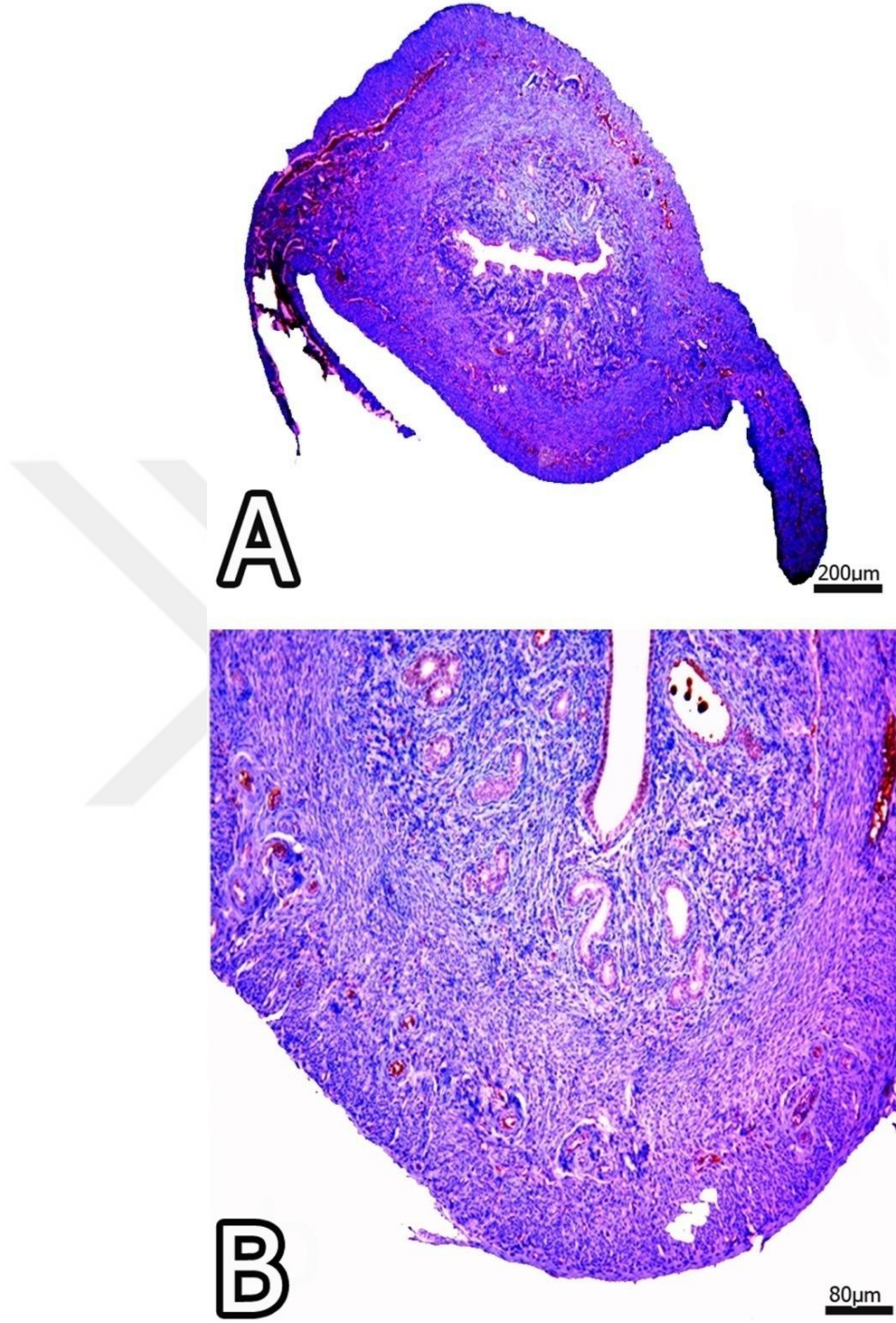


Şekil 28-b. C-D: Kontrol grubuna ait uterusun görünümü; immün pozitif boyanmanın zayıflığı dikkati çekmektedir. **C;** ×40'lık büyütme, **D;** ×10'luk büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

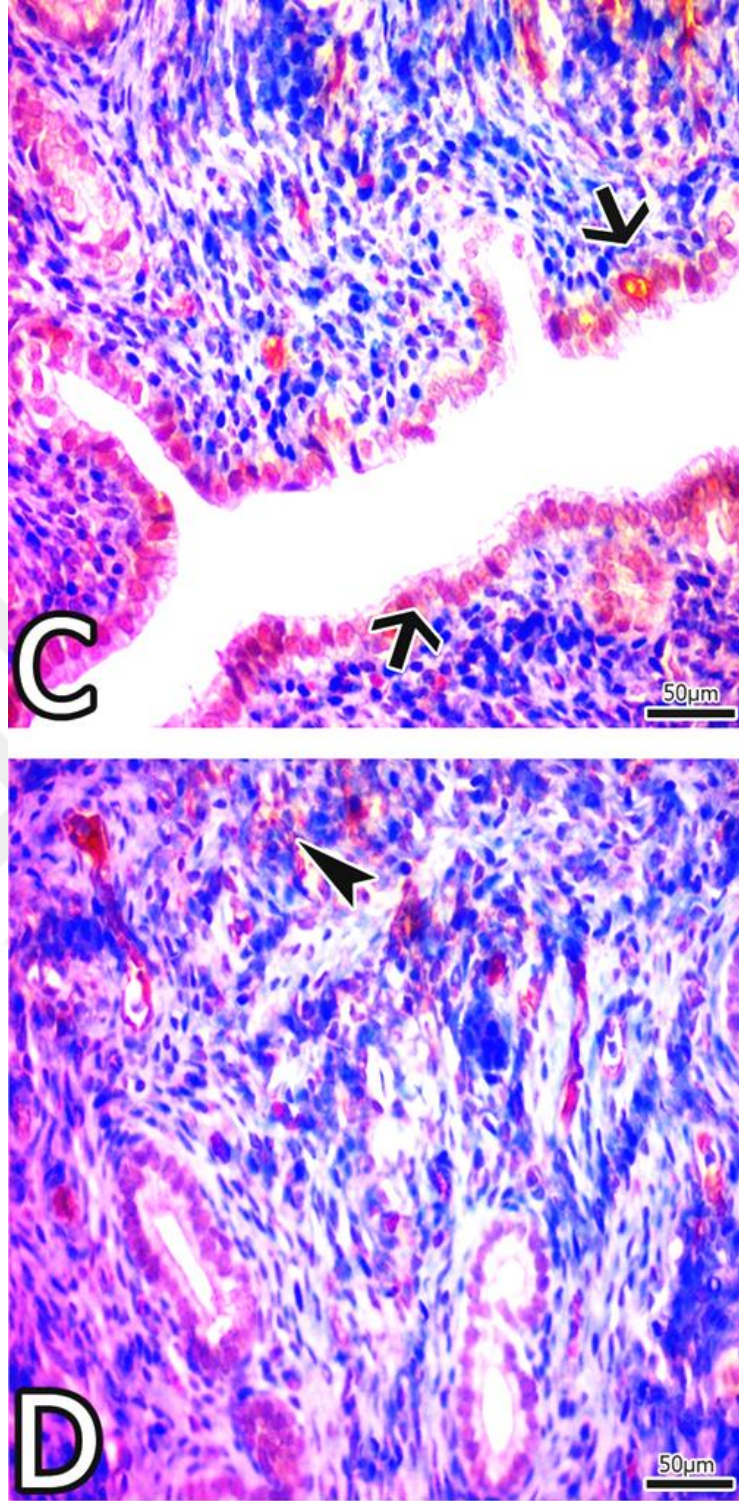
4.3.2. Ovt Grubuna Ait Bulgular

Overektomi yapılan grubun NF-κB p65 immün pozitif aktivitesi değerlendirildiğinde, uterus bez epitel hücreleri ve endometriyumu oluşturan tek katlı prizmatik epitel hücrelerinde immün pozitif boyanma saptandı. Aynı şekilde, miyometriyumdaki sirküler ve longitudinal düz kas tabakalarında da immün pozitiflik gözlemlendi. İmmün reaktivite stratum vasküladeki ve stromadaki çok sayıda kan damarları ve endotel hücrelerinde de yoğun bir şekilde görüldü. Ayrıca stromal hücrelerde de kuvvetli bir NF-κB tutulumu gözlemlendi. Genellikle bu hücresel tutulumun hem sitoplazmik düzeyde hem de çekirdekte olduğu izlendi (Şekil 29).





Şekil 29-a. A-B: Ovt grubuna ait uterusun görünümü; A, Küçük büyütmede genel görünüm, B'de Endometriyum stromasındaki kan damarlarının belirgin immün pozitifliğinin görünümü dikkat çekmektedir. **A;** ×4'lük büyütme, **B;** ×10'luk büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

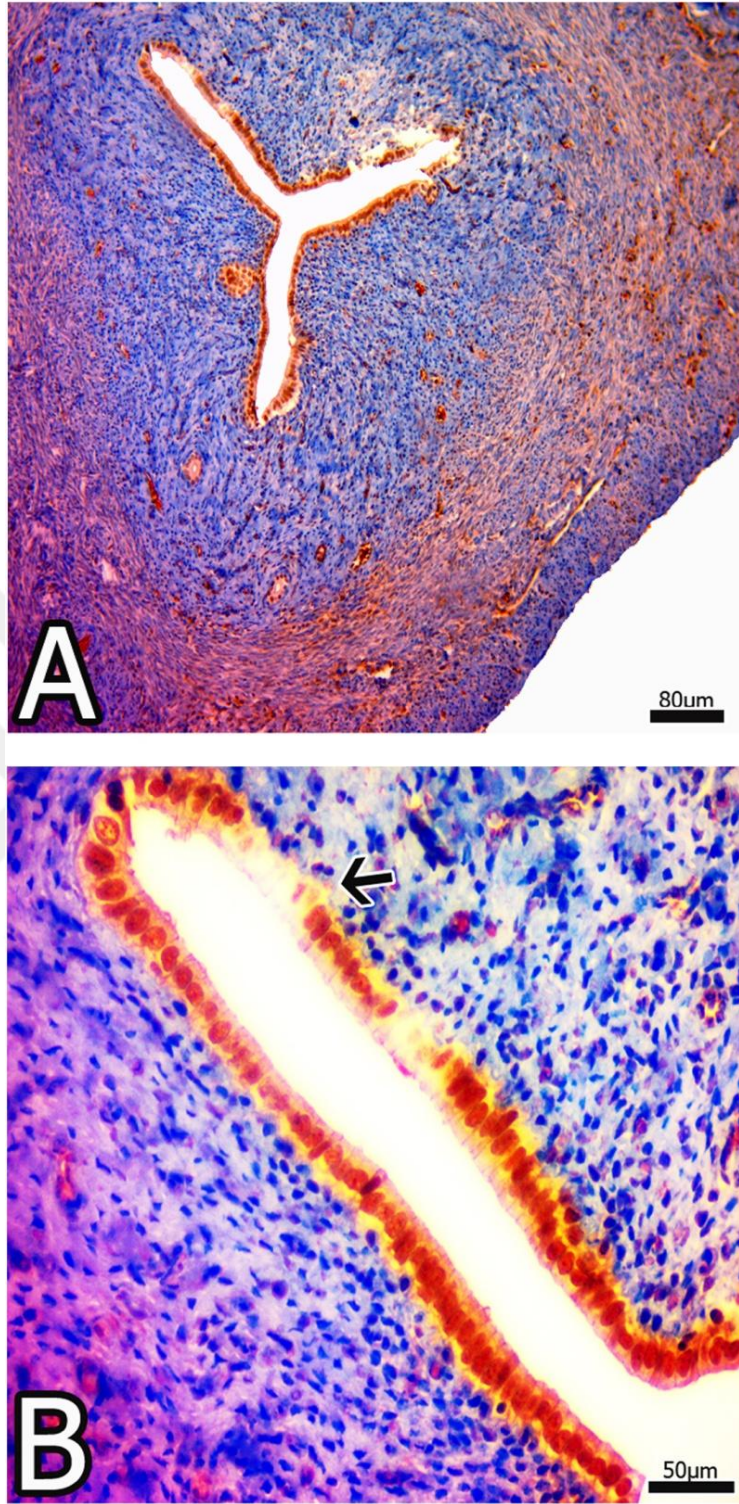


Şekil 29-b. C-D: Ovt grubuna ait uterusun görünümü; C ve D'de Endometriyumda uterus stromasını oluşturan bağ doku hücrelerinde immün pozitif boyanma izlenmektedir. → ve ►: sırası ile epitel ve stromal hücrelerde immün pozitif boyanmayı göstermektedir. C; ×40'lık büyütme, D; ×40'lık büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

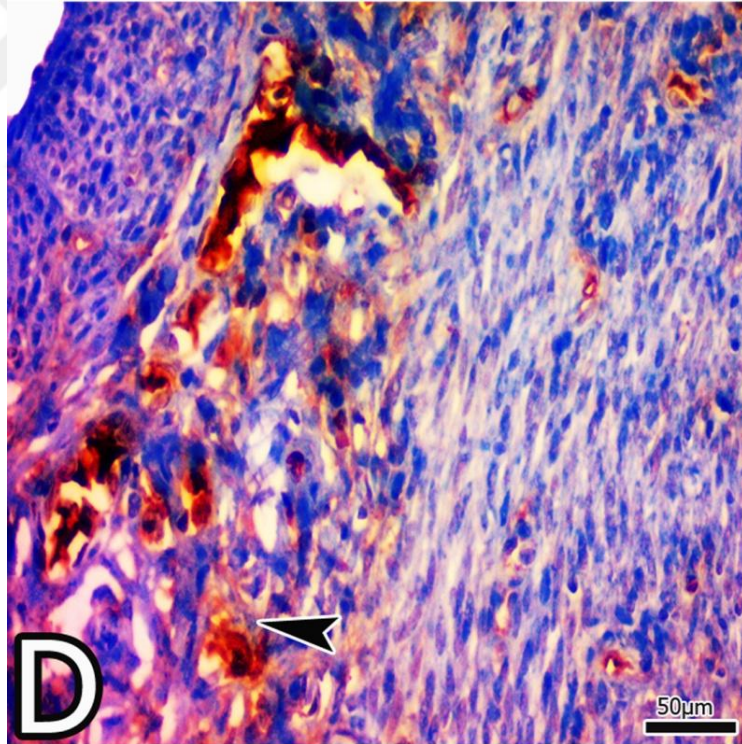
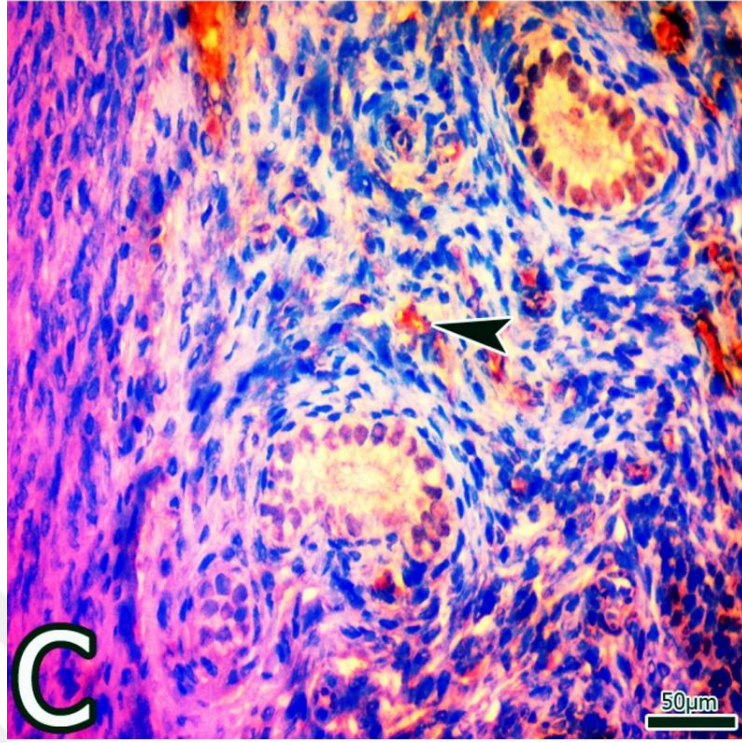
4.3.3. Ost Grubuna Ait Bulgular

Overektomi yapılan ve östrojen ile tedavi edilen grupta, uterus bez epiteli hücreleri ve endometriyumunu oluşturan tek katlı prizmatik epitel hücrelerinde yoğun NF- κ B immün pozitifliği görüldü. Endometriyumda uterus stromasını oluşturan bağ doku hücrelerinde de kuvvetli immün pozitif boyanma görülmekteydi (Şekil 30).





Şekil 30-a. A-B: Ost grubuna ait uterusun görünümü; A, küçük büyütmede genel görünüm; B, endometriyum epitelinde belirgin immün pozitiflik görünümü dikkati çekmektedir. →: epitel hücrelerde immün pozitif boyanmayı göstermektedir. **A;** ×10'luk büyütme, **B;** ×40'luk büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

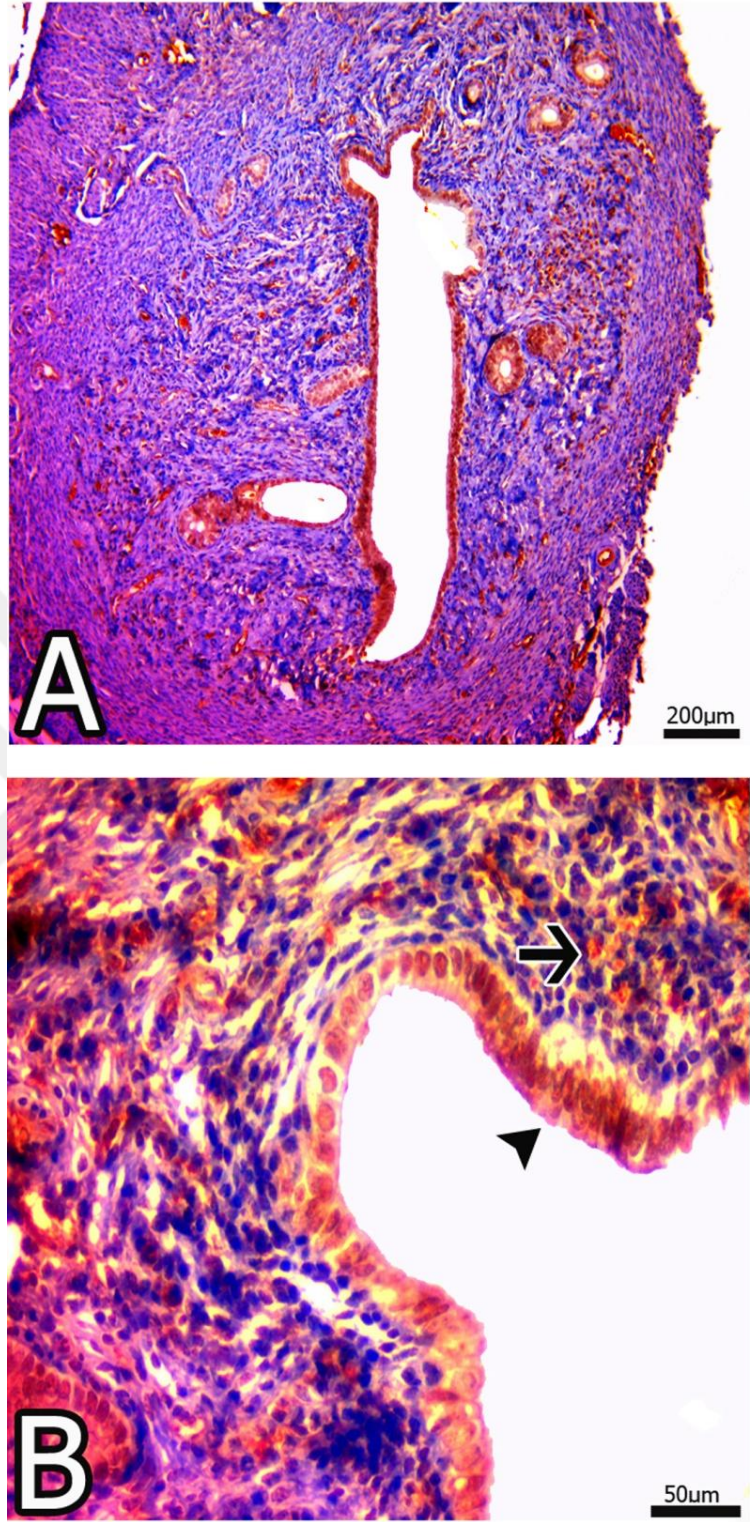


Şekil 30-b. C-D: Ost grubuna ait uterusun görünümü; C ve D’de endometriyumda uterus stromasını oluşturan bağ doku hücrelerinde kuvvetli immün pozitifliğin görünümü dikkati çekmektedir. ►: stromal hücrelerde immün pozitif boyanmayı göstermektedir. **C;** ×40’lık büyütme, **D;** ×40’lık büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer’in Hematoksileni

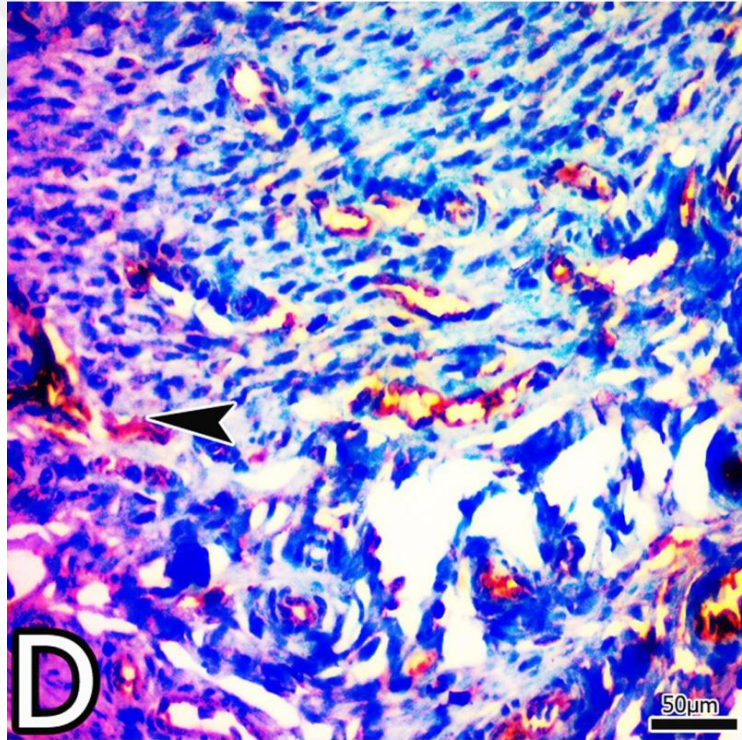
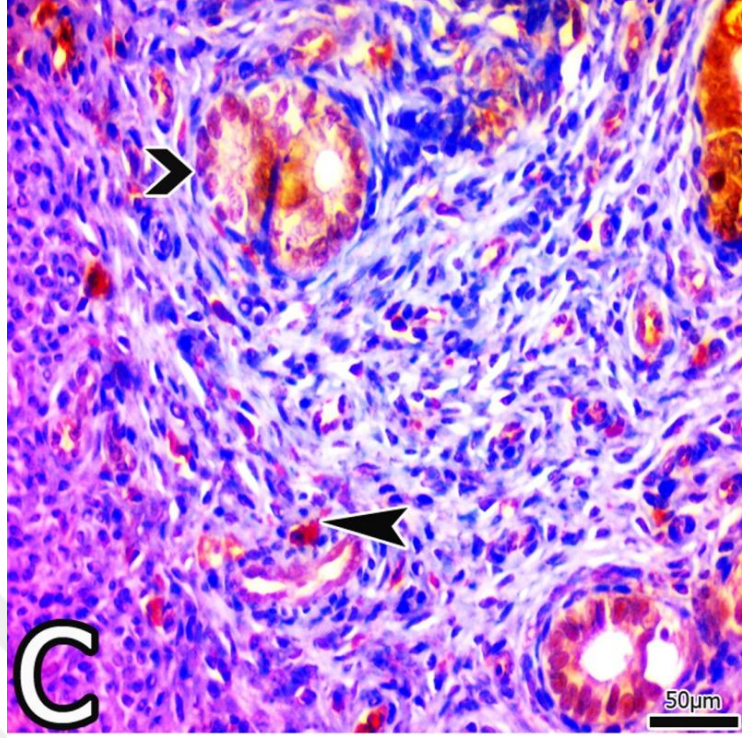
4.3.4. β -glu Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

Overektomi yapılan ve β -glukan ile tedavi edilen grupta, endometriyum yüzey epiteli ve stromal hücrelerinde yoğun NF- κ B immün pozitifliği görüldü. Ayrıca stromadaki kapiller endoteli hücrelerinde de zayıf immün pozitiflik izlendi (Şekil 31).





Şekil 31-a. A-B: β -glu grubuna ait uterusun görünümü; A) Küçük büyütmede genel görünüm, B'de Endometriyum epitelinde belirgin immün pozitiflik izlenmektedir. \blacktriangleright ve \rightarrow : sırası ile yüzey epiteli, stromal hücreler, pozitif boyanmayı göstermektedir. **A;** $\times 10$ 'luk büyütme, **B;** $\times 40$ 'lık büyütme. **Boyama:** Anti-NF- κ B İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

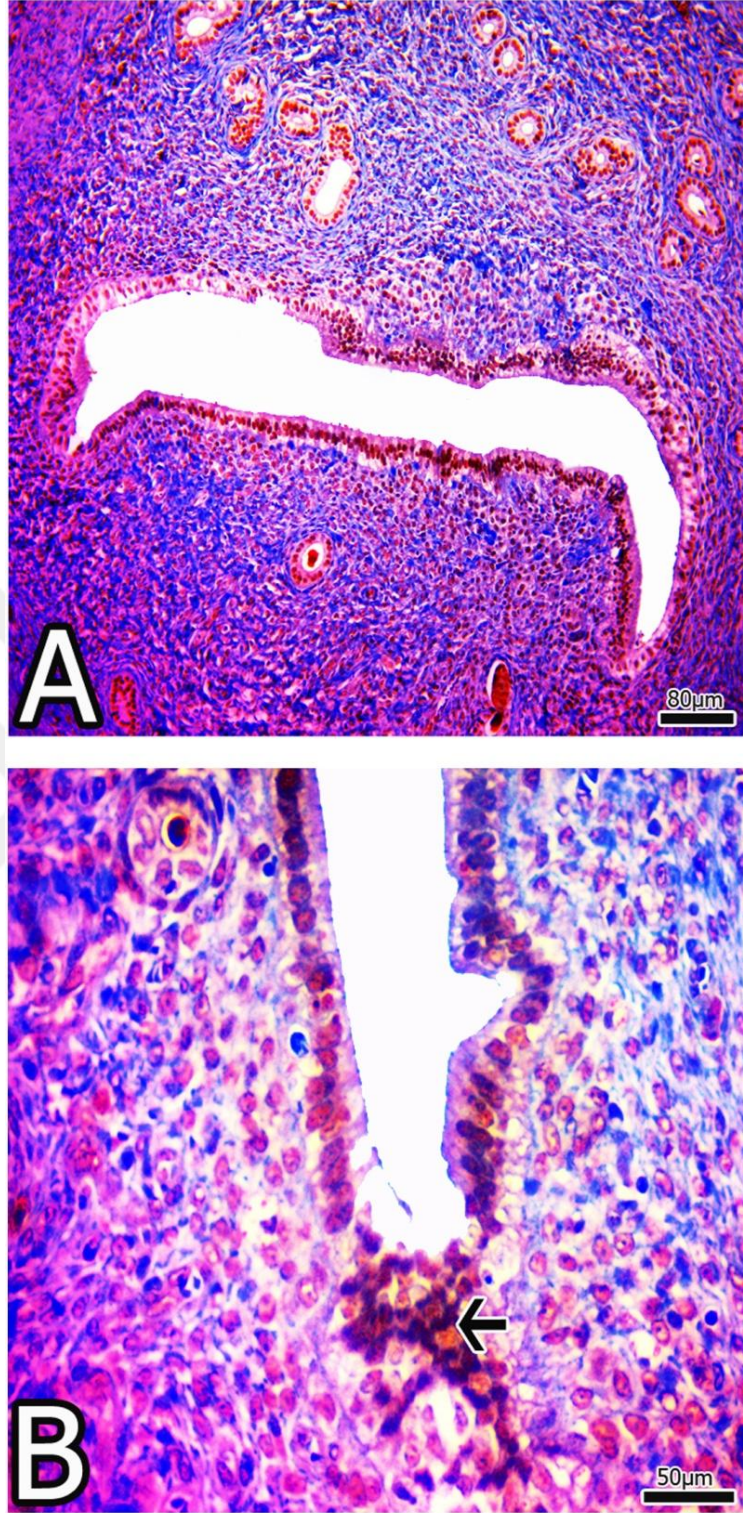


Şekil 31-b. C-D: β -glu grubuna ait uterusun görünümü; \blacktriangleright : damar duvarındaki pozitif boyanmayı göstermektedir. C; $\times 40$ 'lık büyütme, D; $\times 40$ 'lık büyütme. **Boyama:** Anti-NF- κ B İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

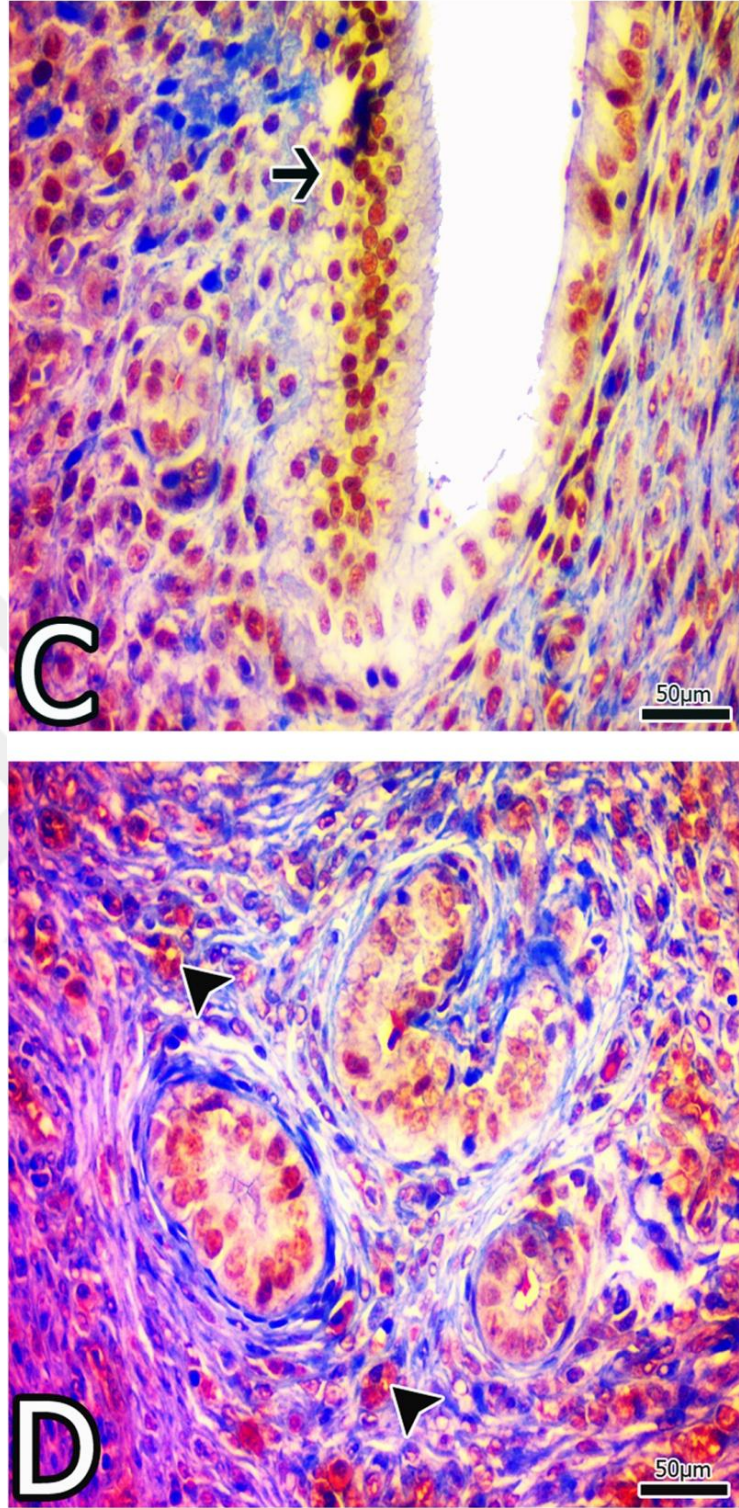
4.3.5. Bort Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular

Overektomi yapılan ve Bort ile tedavi edilen grupta ise, epitel ve stromal hücrelerde NF-κB immün reaktivitesi belirgindi. Pozitiflik gösteren hücre sayısı oldukça yoğun olarak gözlemlendi. Pozitif boyanma bazı stromal hücrelerin sitoplazmalarında kuvvetli olarak gözlemlenirken çekirdekte zayıf olarak izlendi. İmmün pozitiflik uterusun stromada yerleşik olan bez epiteli hücrelerinde ve endometriyumun tek katlı epitelinde görüldü. Damarlarda da immünreaktivite belirgin olarak gözlemlendi. Miyometriyumdaki kas katmanları arasındaki damarlarının ve stromadaki kan damarlarında endotel hücrelerinde NF-κB pozitifliğinin yoğun olduğu görülmekteydi (Şekil 32).





Şekil 32-a. A-B: Bort grubuna ait uterusun görünümü; A, küçük büyütmede genel görünüm; B endometriyumdaki stromal hücrelerde yoğun sitoplazmik immün pozitiflik izlenmektedir. → uterus yüzey epiteli pozitif boyanmayı göstermektedir. A; ×10'luk büyütme, B; ×40'lık büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer'in Hematoksileni

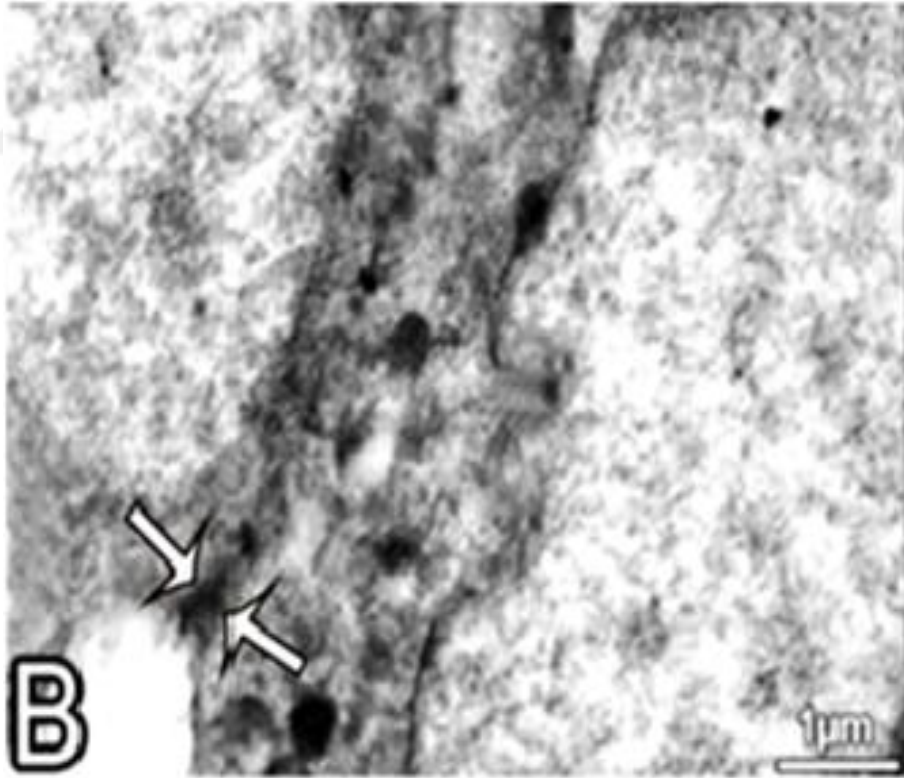
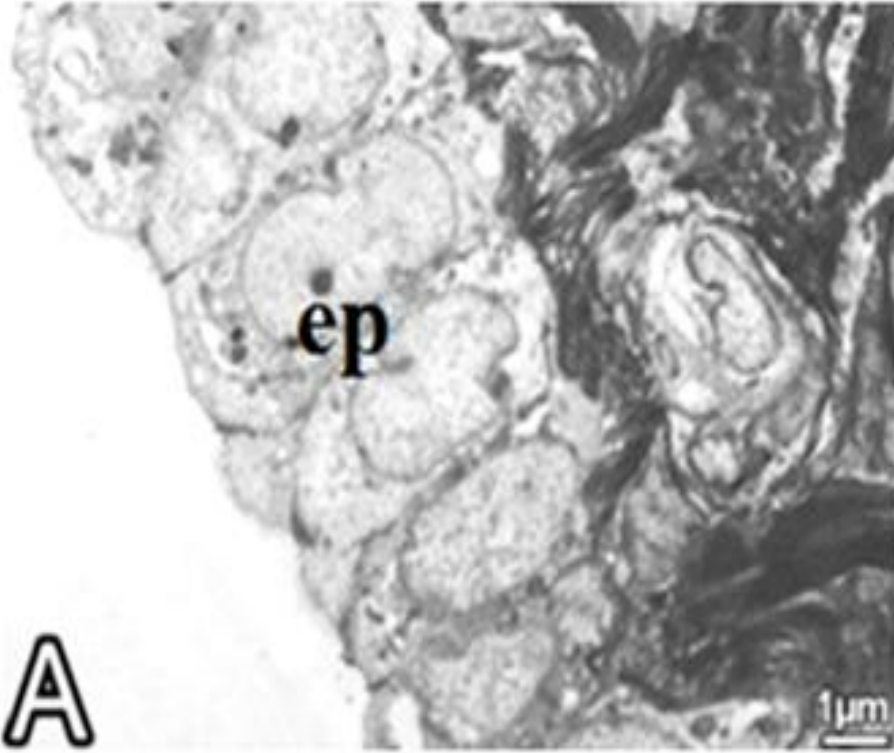


Şekil 32-b. C-D: Bort grubuna ait uterusun görünümü; C’de endometriyumdaki stromal hücrelerde yoğun sitoplazmik immün pozitiflik; D’de kapiller duvarında immün pozitiflik izlenmektedir. → ve ► : sırasıyla uterus yüzey epiteli ve damar duvarında gözlenen pozitif boyanmayı göstermektedir. C; ×40’lık büyütme, D; ×40’lık büyütme. **Boyama:** Anti-NF-κB İmmünperoksidaz & Mayer’in Hematoksileni (Mitsiades ve ark., 2003)

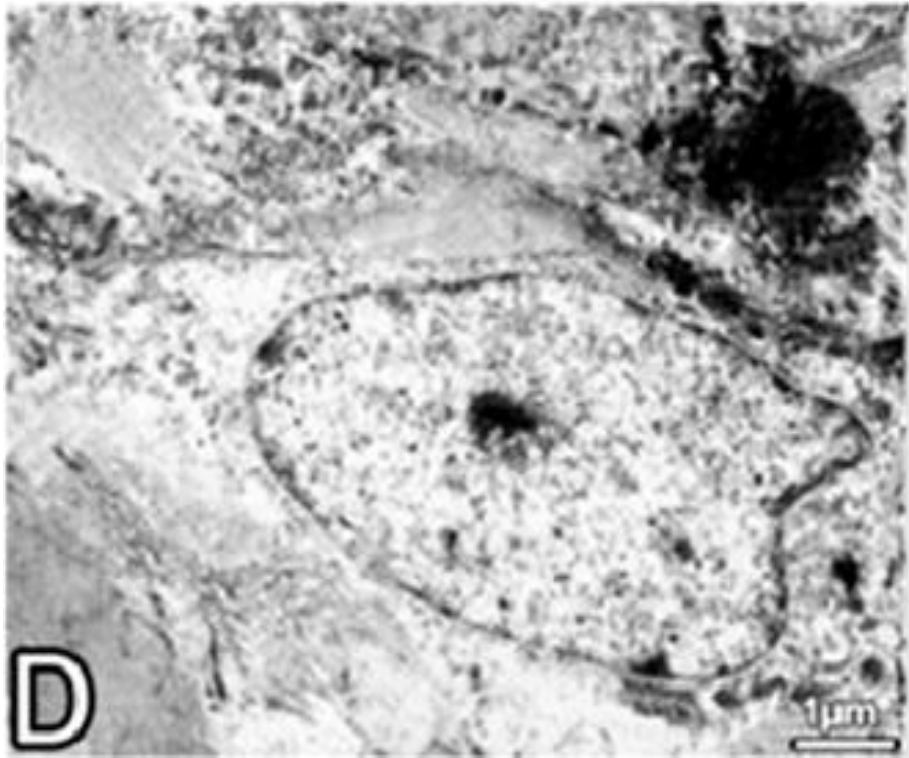
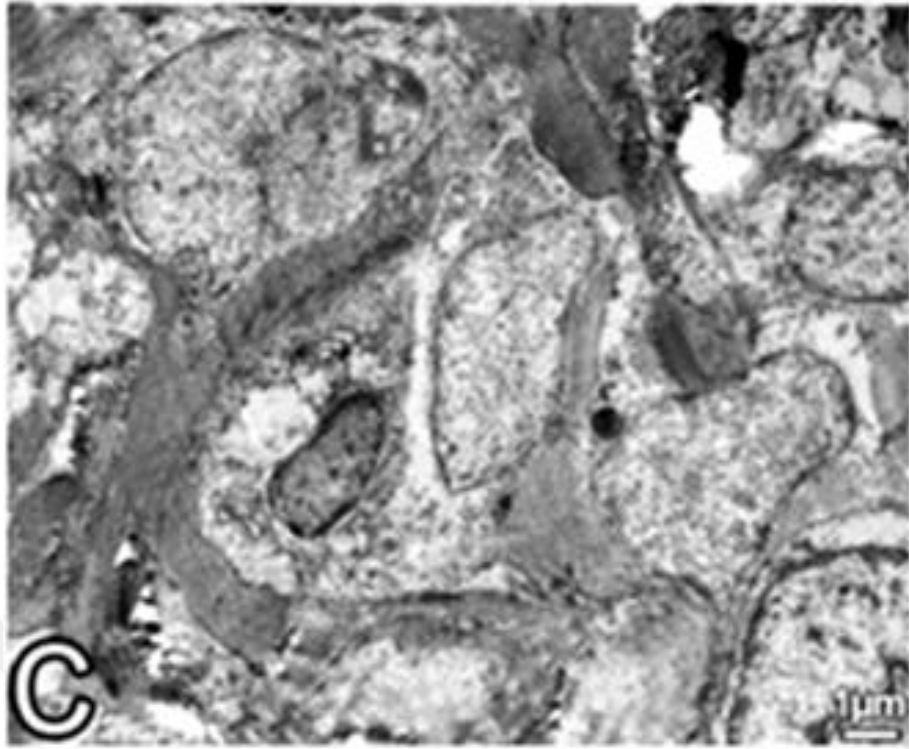
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubundan elde edilen uterus örneklerinin endometriyumları elektron mikroskobu düzeyinde, ince yapı açısından incelendiğinde; epitel hücrelerinin sağlıklı yapıda olduğu ve ince bir bazal membran üzerine oturduğu tespit edildi. Bu hücrelerin organel yönünden son derece zengin olduğu görüldü. Çekirdekler ökromatik görünümde ve çekirdekçikler belirgindi. Mitokondriyonlar yuvarlak ya da oval görünümdeydi. Matriks elektron yoğunluğu orta düzeydeydi. Golgi vezikülleri iyi gelişmişti. Epitel hücrelerinin apikal sitoplazmasının poliribozomlar açısından zengin oluşu dikkat çekmekteydi. Epitel pinopodları olgun yapıda olup küçük çıkıntı şeklinde izleniyorlardı. Hücre yan yüz bağlantıları normal epitel yapısı ile uyumlu idi. Lamina propriada yer alan stromal hücreler ve bağ dokusu liflerinde herhangi bir anormallik izlenmedi. Bu hücreler sağlıklı görünümde ve organel açısından zengindi. Bu hücreler birbirlerine son derece yakın yerleşimliydi ve aralarındaki bağ dokusu lifleri demetler halinde belirgin olarak izlenmekteydi (Şekil 33).



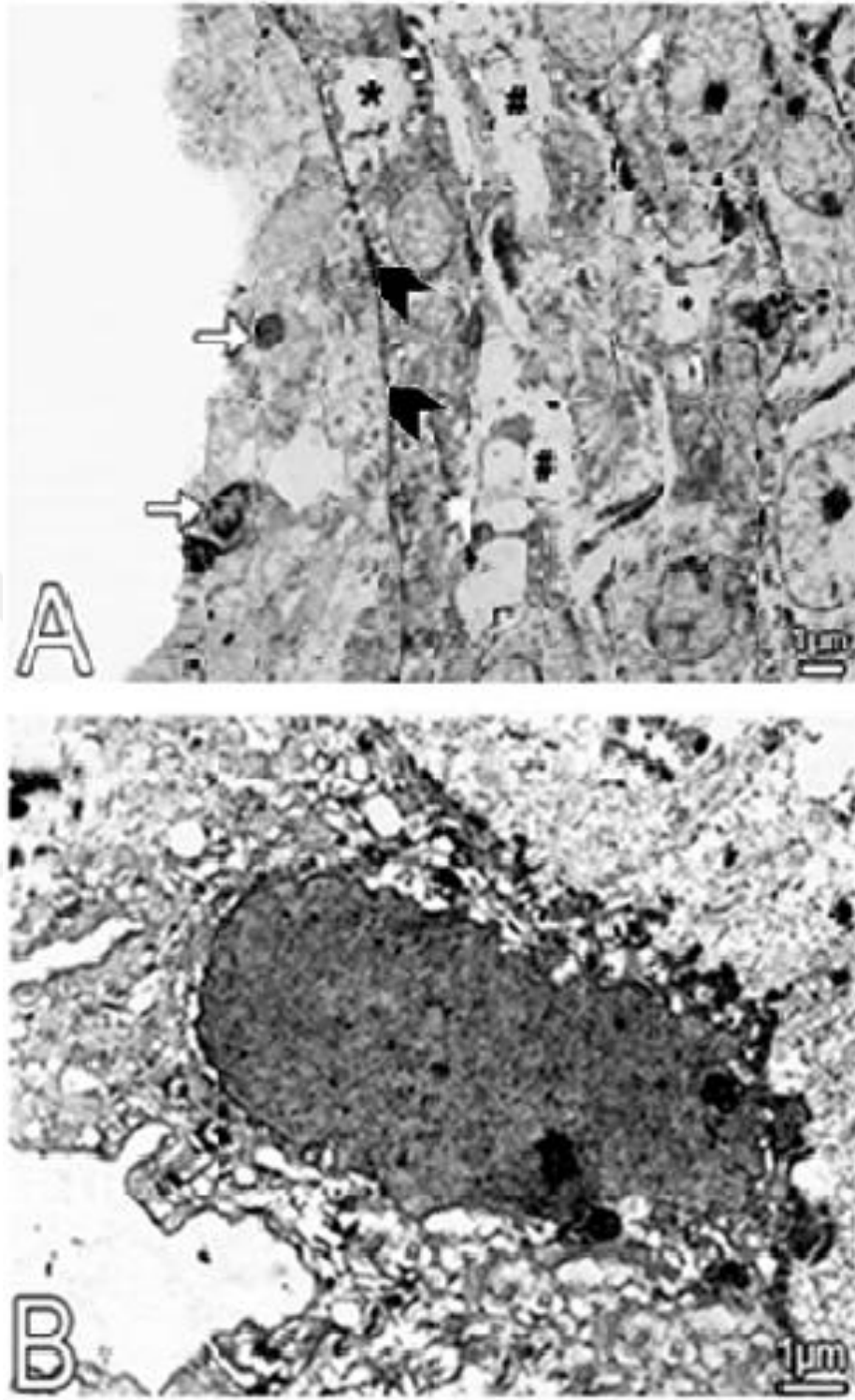
Şekil 33-a. A-B: Kont grubuna ait uterusun elektron mikroskopik görünümü. A'da endometriyum yüzey epiteli (ep); B'de \Rightarrow : epitel hücreleri arasındaki yan yüzey bağlantı komplekslerini göstermektedir



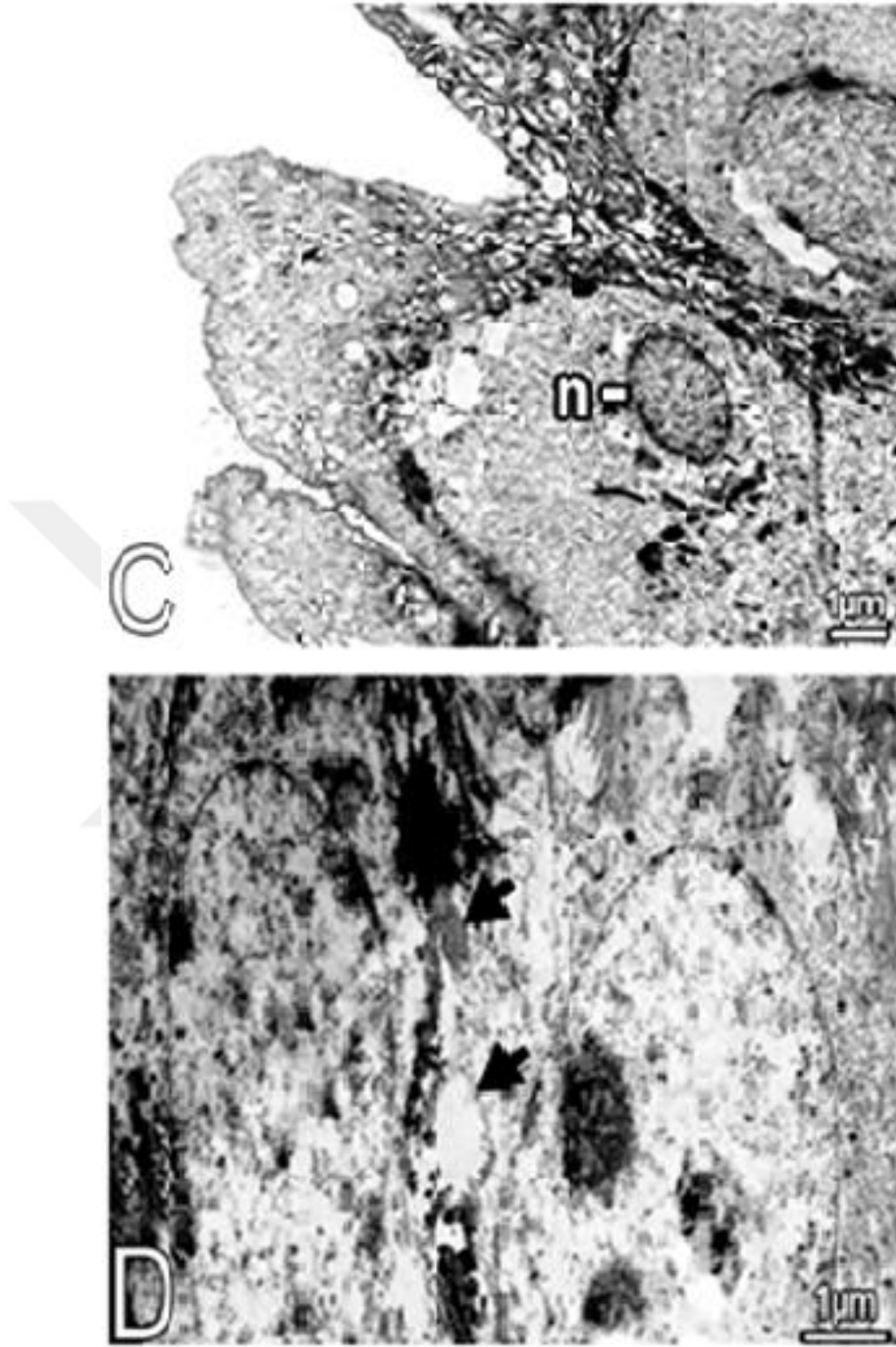
Şekil 33-b. C-D: Kont grubuna ait uterusun elektron mikroskobik görünümü. C’de stromal hücreler ve bağ dokusu; D’de stromal hücreler ve bağ dokusu görülmektedir

4.4.2. Ovt Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular

Ovt grubunda yer alan deneklerin uteruslarından elde edilen örneklerin elektron mikroskop incelemelerinde, endometriyumun yüzey epitelinde pinopodların azaldığı, apikal sitoplâzma uzantılarının düzensizleştiği ve kütleştiği, matriksin kontrol grubuna kıyasla daha elektron yoğun olduğu, hücre apikal ve lateral sitoplazmasında GER tübüllerinin artarak elektron yoğun salgı içeriğine sahip oluşu dikkati çekti. Bununla birlikte lizozomların sayısında artış görülmekteydi. Bu hücrelerin küçülmüş ve bir kenara doğru itilmiş çekirdeklerinin elektron yoğun görünümde oldukları tespit edildi. Epitel hücrelerinin üzerine oturduğu bazal laminanın kontrol grubuna kıyasla kalın olduğu dikkat çekti. Hücre yan yüz bağlantıları ile uyumlu bölgelerde yer alan elektron yoğun içerik ve sınırların birbirine yapışık olmayışı oldukça belirgindi. Epitel altında yer alan lamina propria elektron yoğunluğu açısından fakir görünümdeydi. Lamina propria içerisinde yer alan düzensiz boşluklar dikkat çekiciydi. Stromal hücrelerin bazıları hem çekirdek, hem de hücre matriksi açısından elektron yoğun görünümdeydi. Stromal hücreler arasındaki ekstrasellüler matriks ise bağ dokusu lifleri açısından kontrol grubuna kıyasla fakirdi (Şekil 34).



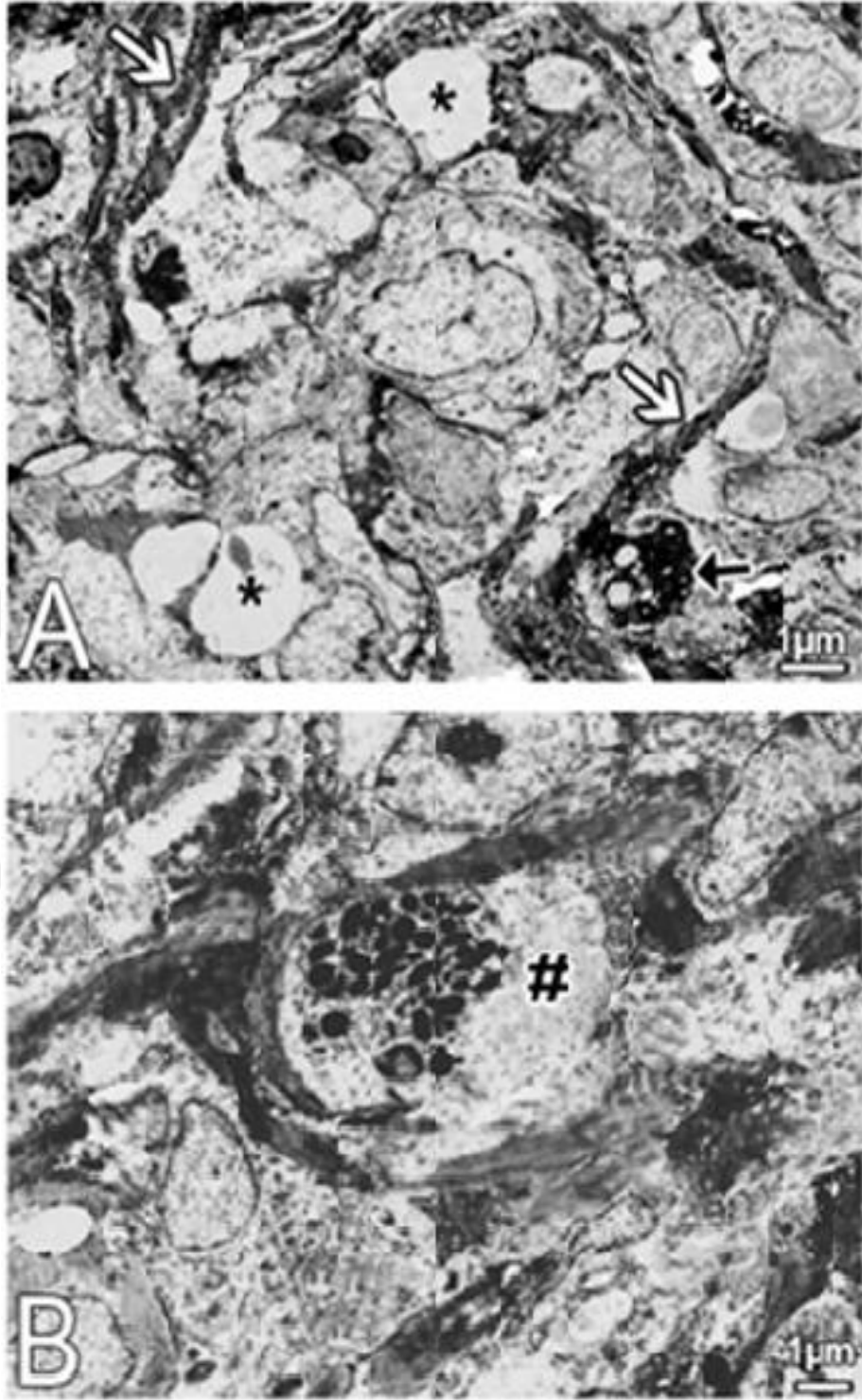
Şekil 34-a. A-B: Ovt grubuna ait uterusun endometriyum yüzey epiteli izlenmektedir. \Rightarrow : küçülmüş ve piknotik görünümdeki epitel hücresi çekirdeklerini, *: stromada bulunan damarlar, #: stromada bulunan düzensiz sınırlı boşluklar, \blacktriangleright : kalınlaşan bazal membran; B'de kabalaşmış organel yapısı ve elektron yoğun, küçülmüş çekirdeği ile epitel hücreleri dikkat çekmektedir



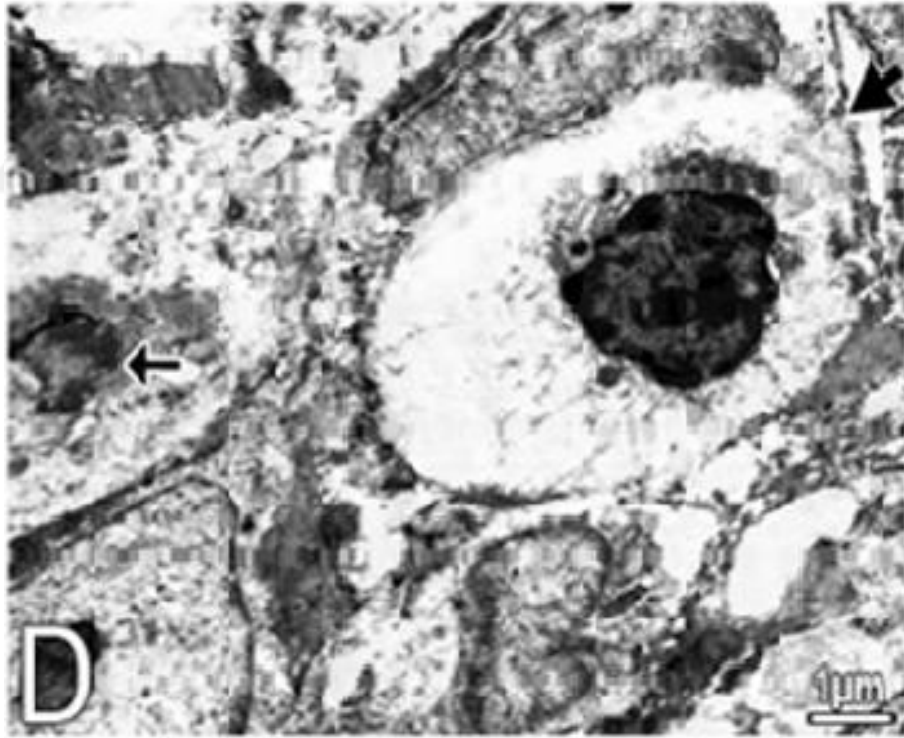
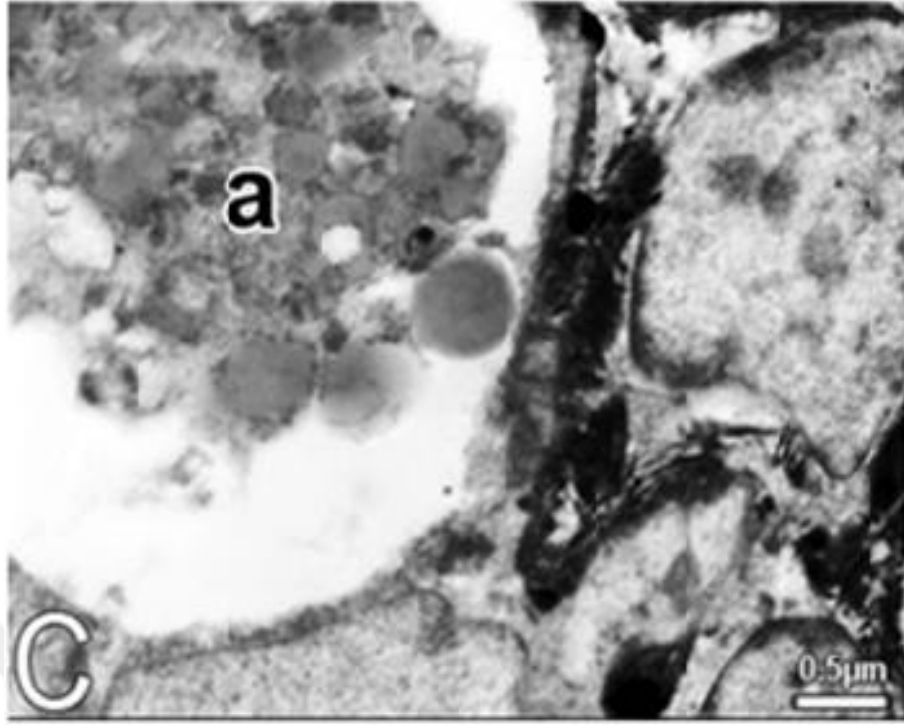
Şekil 34-b. C-D: Ovt grubuna ait uterusun elektron mikroskopik görünümü. **n:** küçülmüş ve kenara itilmiş epitel hücresi çekirdeğini, **→** : epitel hücreleri arasındaki bozulmuş ve elektron yoğun materyal içeren hücreler arası bağlantı komplekslerini göstermektedir

Ovt grubunda yer alan deneklerin uteruslarından elde edilen örneklerin miyometriyum tabakaları ince yapı açısından değerlendirildiğinde, miyometriyumda yer alan düz kas hücrelerinden bazılarının normal yapılarının bozulduğu, çentikli ya da elektron yoğun çekirdekli oldukları gözlemlendi. Bir kısım hücrelerde karyoreksisi çağrıştıran elektron yoğun değişimler izlendi. Hücreler arasındaki bağ dokusu liflerinin oluşturduğu demetler kontrol grubuna göre ince ve elektron yoğun görünümdeydi. Ayrıca hücreler arasında apoptotik cisim olabileceği düşünülen yapılar ve enflamatuar hücreler de bulunmaktaydı (Şekil 35).





Şekil 35-a. A-B: Ovt grubuna ait uterusun elektron mikroskopik görünümü. A-B’de stromal hücreler ve bağ dokusu lifleri detaylı olarak izlenmektedir. → : küçülmüş ve kenara itilmiş çekirdekli stromal hücre A’da; ⇨ : yapısı incelmış ve elektron yoğun görünümdeki kollajen lifler, *: stromada bulunan damarlar, #: stromada bulunan karyoreksise uğramış çekirdeği olan hücreni göstermektedir

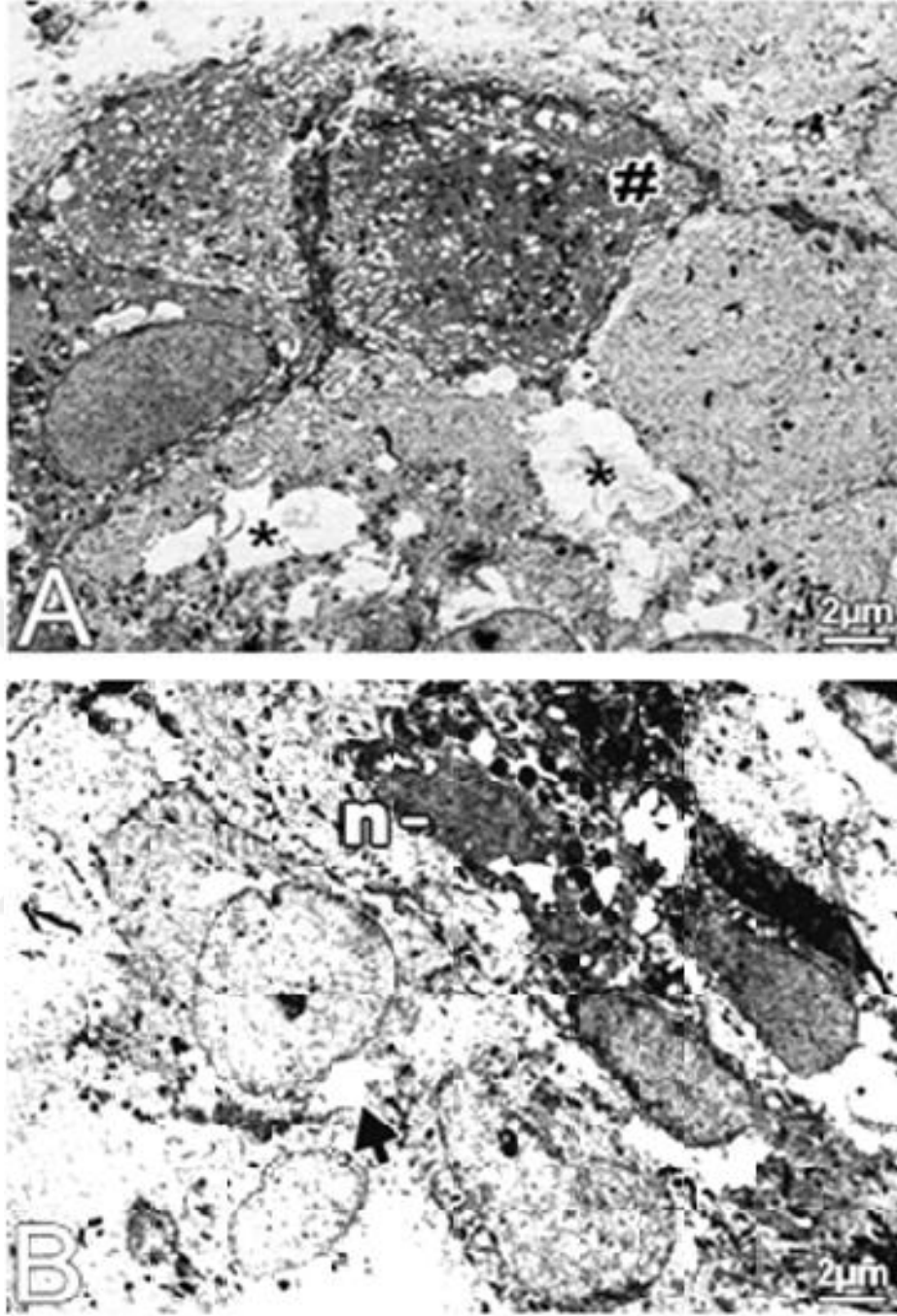


Şekil 35-b. C-D: Ovt grubuna ait uterusun elektron mikroskobik görünümü. a: apoptotik cisimciği, D'de;

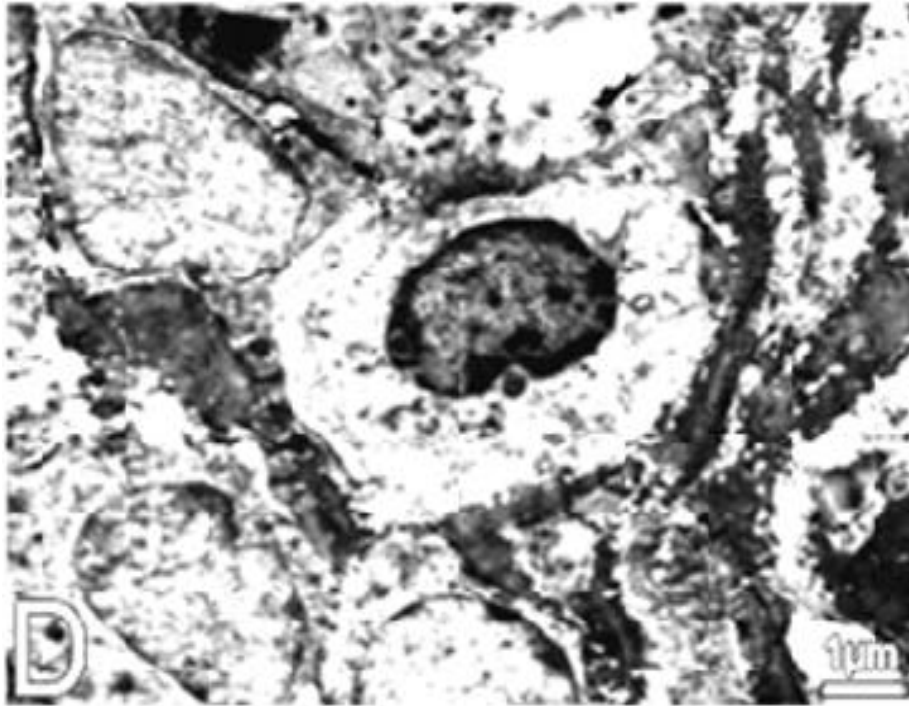
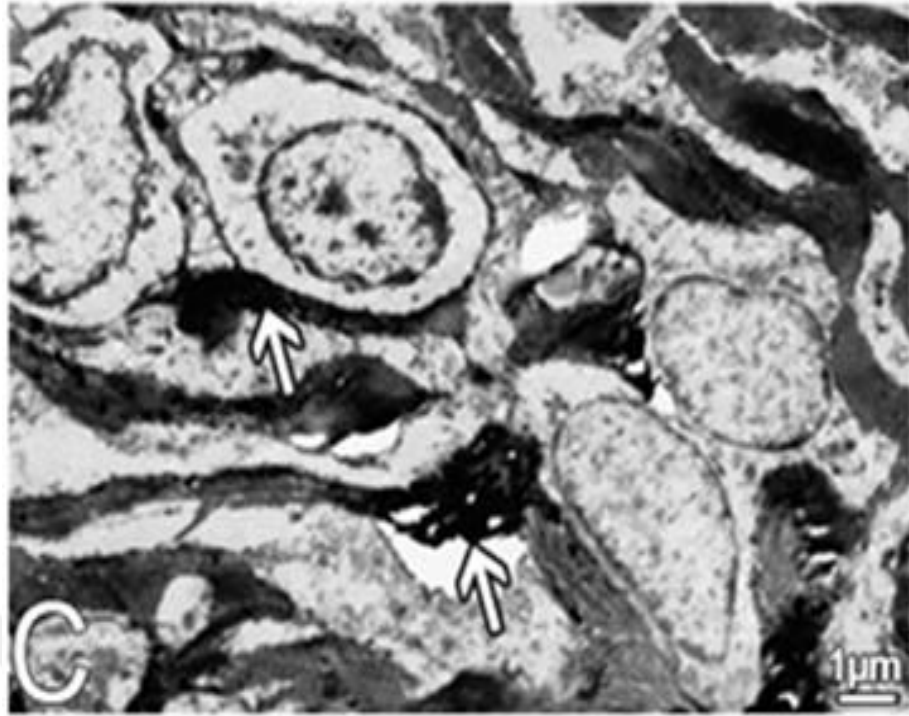
→ : yapısı incelmış ve elektron yoğun görünümdeki kollajen lifler, → : içerisinde enflamatuar hücre içeren (lenfosit) duvar yapısı bozulmuş görünen damarı göstermektedir

4. 4. 3. Ost Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular

Ost grubuna ait deneklerin uterusları elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilirken; endometriyumun yüzey epitelinde apikal sitoplazma hatlarının düzleştiği ve elektron yoğun görünümde olduğu izlendi. Bu hücrelerde sitoplazma-nükleus sınırları ayırd edilememekteydi. Çekirdek içeriği elektron yoğun yapıda olup sitoplazma içerisinde sınırı belirsiz alanlar şeklinde gözlemlendi. Hücreler içerisindeki vakuollerin fazlalığı dikkat çekiciydi. Hücre yan yüz bağlantıları düzenli ve sıkı yapısını kaybetmişti. Epitel altında yer alan lamina propria'da düzensiz boşluklar izlenmekteydi. Stromal hücrelerin kontrol grubuna kıyasla daha küçük boyutta olduğu gözlemlendi. Bu hücrelerden bazıları hem çekirdek, hem de hücre matriksi açısından elektron yoğun görünümdeydi. Bu hücrelerin lizozom ve vakuoller açısından zengin olduğu tespit edildi. Stromal hücreler arasındaki ekstra sellüler matriks ise bağ dokusu lifleri açısından kontrol grubuna kıyasla fakirdi. Hücreler arasındaki bağ dokusu liflerinin oluşturduğu demetler kontrol grubuna göre ince ve elektron yoğun görünümdeydi. Ayrıca hücreler arasında enflamatuar hücreler de bulunmaktaydı (Şekil 36).



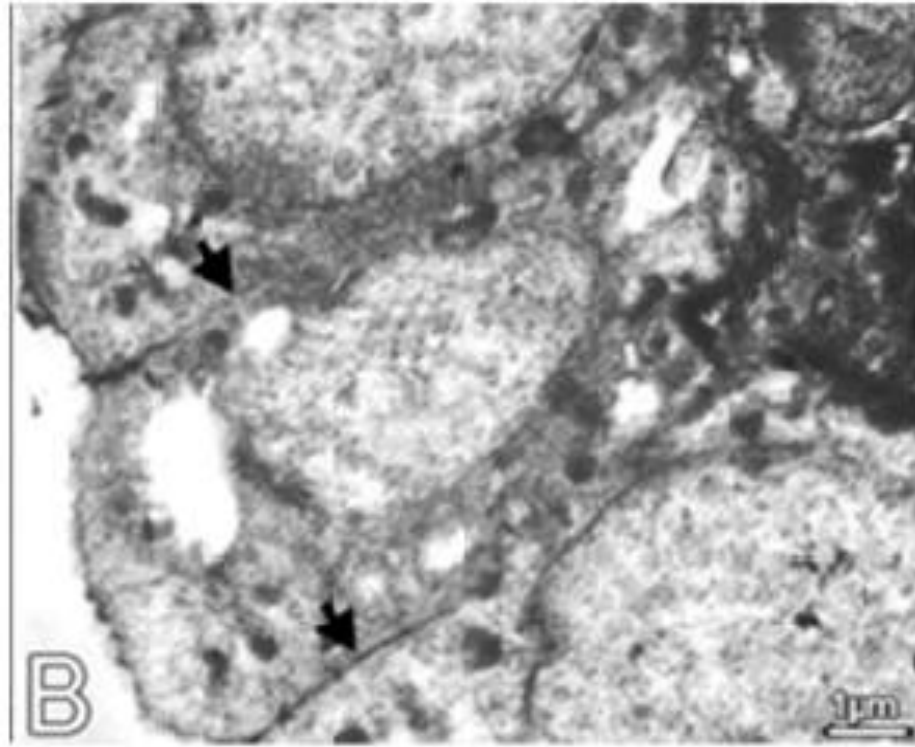
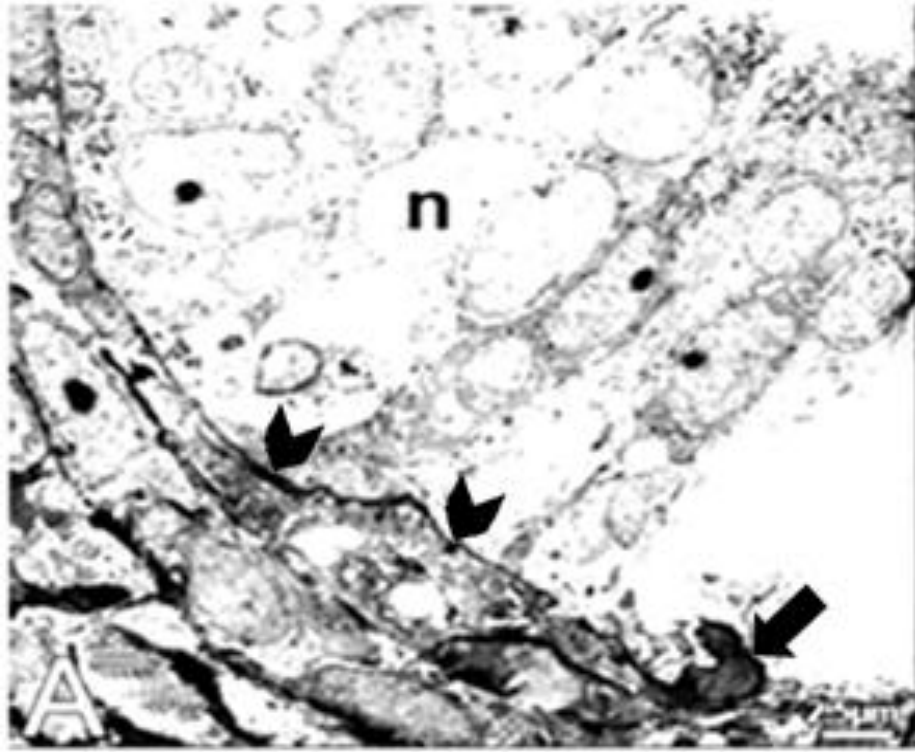
Şekil 36-a. A-B: Ost grubuna ait uterusun elektron mikroskobik görünümü. A-B’de endometriyum yüzey epitelinde gözlenen dejenerasyon ve epitelyum hücreleri arasındaki yan yüzey bağlantı kompleksleri detaylı olarak izlenmektedir. #: hücre membranı elektron yoğun, hücre çekirdeği ve sitoplazma sınırları ayırt edilemeyen epitel hücresi, *: sınırları düzensiz damar olası boşluklar, n: kaba organel yapı ve çok sayıda sekonder lizozom içeren stromal hücrede elektron yoğun görümlü çekirdek, →: sıkı yapısı bozulmuş hücreler arası bağlantı komplekslerini görülmektedir



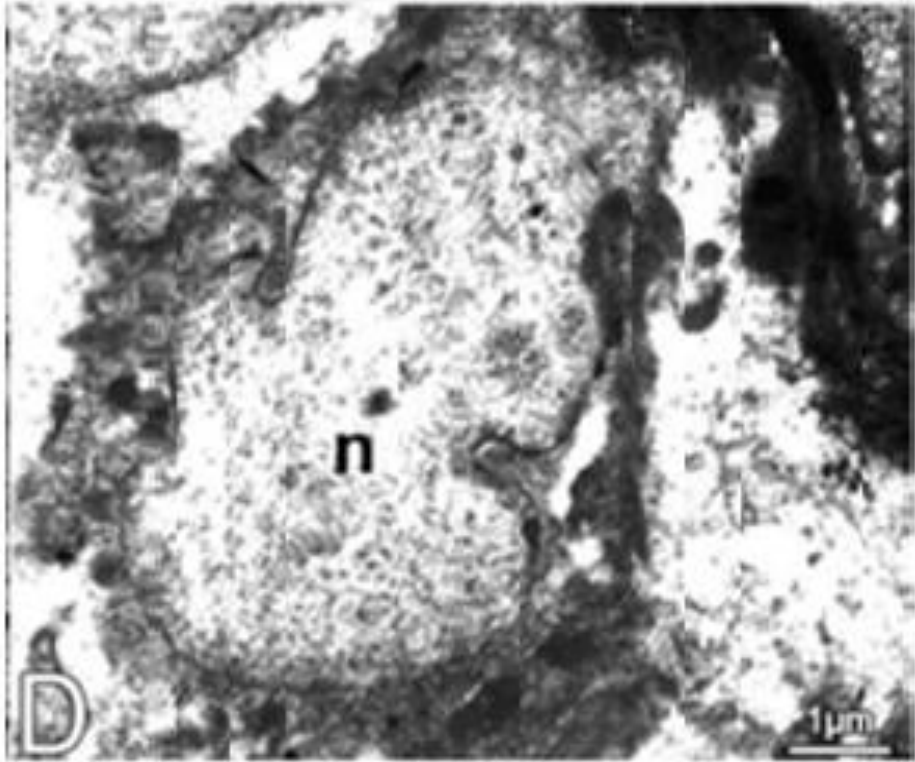
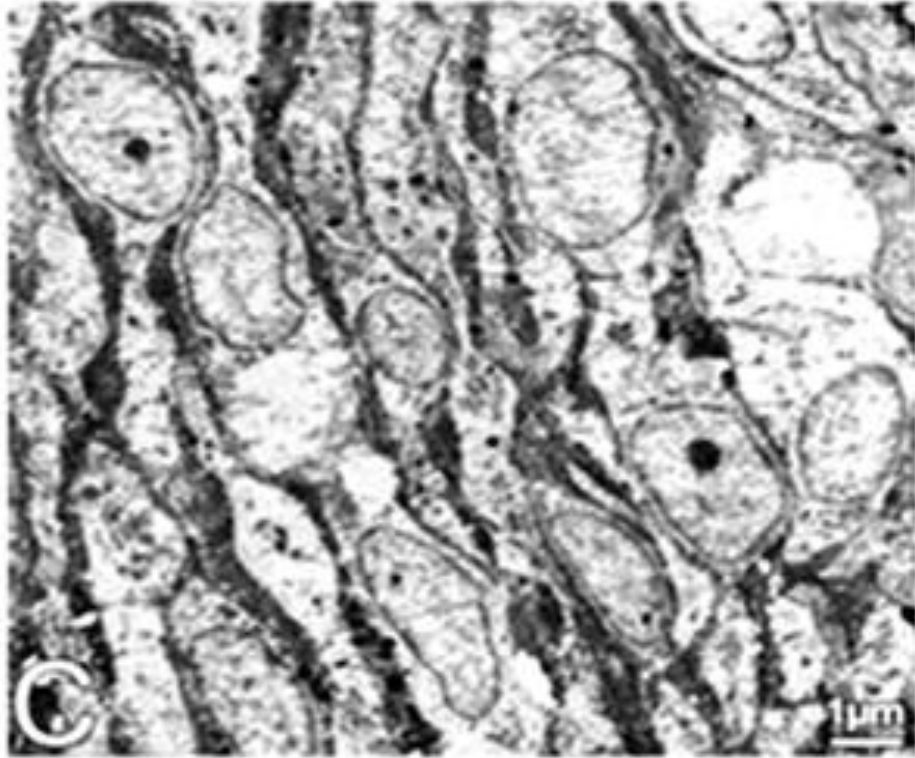
Şekil 36-b. C-D: Ost grubuna ait uterusun elektron mikroskobik görünümü. C-D’de endometriyum yüzey epitelinde gözlenen dejenerasyon ve epitelyum hücreleri arasındaki yan yüzey bağlantı kompleksleri detaylı olarak izlenmektedir. \Rightarrow : elektron yoğun görümlü bağ dokusu lifleri; D’de damar olası yapı içerisinde görülmektedir

4.4.4. β -glu Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular

β -glu grubuna ait uterusların elektron mikroskop incelemelerinde endometriyum yüzey epitelinin çok katlı yapısı, normal görünümde sitoplazması ve özellikle üst tabakalarda yer alan hücrelerin apikal sitoplazmalarındaki organel yoğunluğu belirgindi. Epitel içerisinde yer alan birtakım hücreler diğerlerine nisbeten elektron yoğun çekirdek ve nükleolusa sahipken diğer hücreler elektron geçirgen bir nucleus içermektedir. Son olarak bahsedilen elektron-soluk çekirdekli hücrelerde nükleolusa da rastlanmadı. Epitelin bazal tabakalarında nadiren apoptotik cisimlere rastlandı. Hücre yan yüz bağlantıları sıkı ve düzgün yapıdaydı. Bazal lamina yer yer kalınlığı değişken ve elektron yoğun bir kat şeklinde belirgin olarak izlendi. Lamina propria kollajen lifler ve stromal hücreler dikkati çekmekteydi. Bununla birlikte bu hücrelerin bazılarının elektron yoğun sitoplazmalı ve çentikli nükleuslu oldukları tespit edildi. Hücreler arasında yer yer damar olası yapılar izlendi. Yine, hücreler arası alanda bulunan bağ dokusu lifleri de sağlıklı görünümdeydi (Şekil 37).



Şekil 37-a. A-B: β -glu grubuna ait uterusun elektron mikroskobik görünümü. A'da endometriyum yüzey epitelini görülmektedir. **n**, sağlıklı görünümlü hücre çekirdekleri; **➔**: elektron yoğun görünümlü epitel hücre çekirdeği, **➤**: kalınlaşan bazal membran, B'de **➔**: sıkı yapısı ile sağlıklı görünümdeki hücreler arası bağlantı kompleksleri görülmektedir

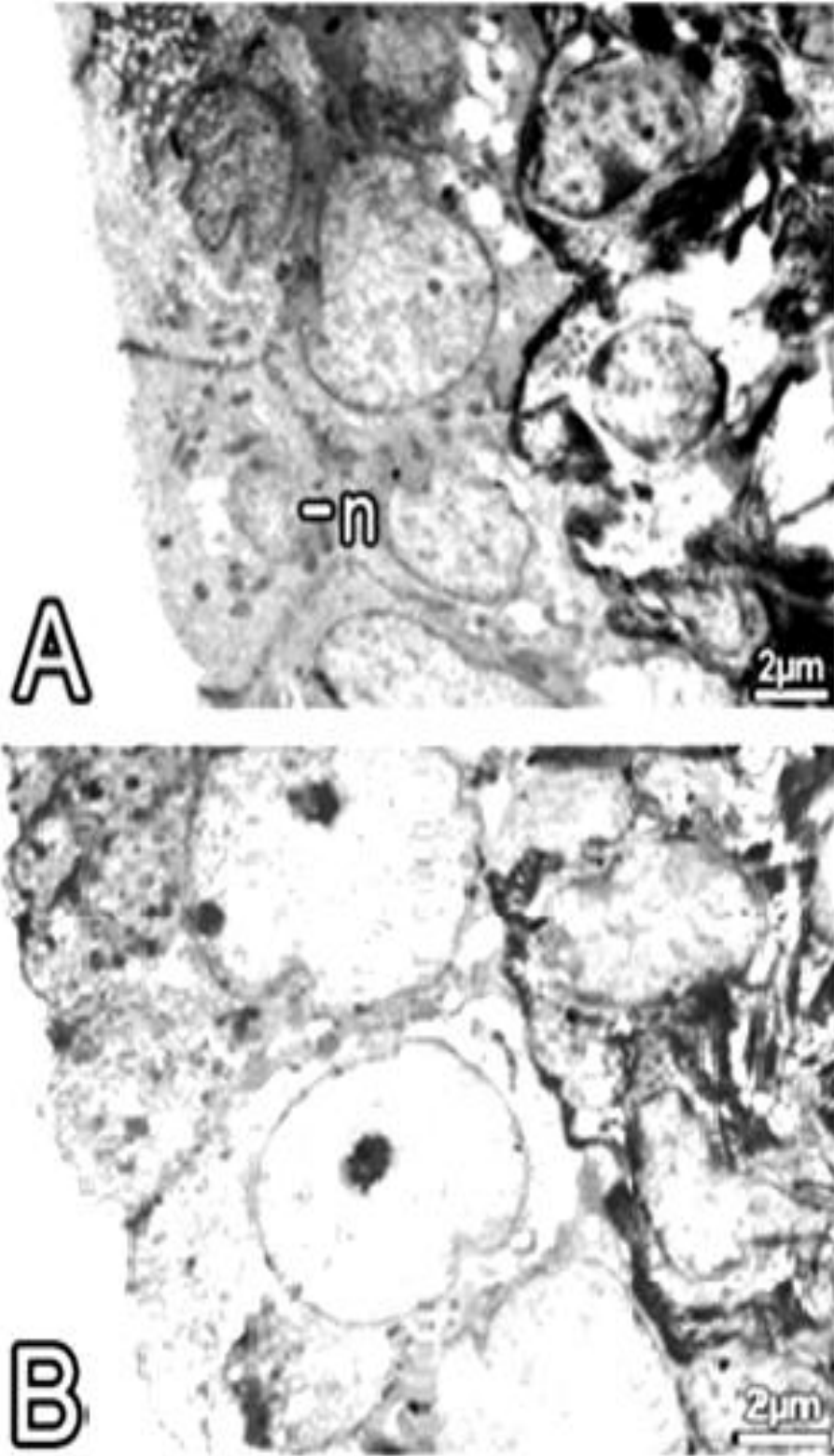


Şekil 37-b. C-D: β -glu grubuna ait uterusun elektron mikroskopik görünümü. **n:** sağlıklı görümlü stromal hücre çekirdekleri görülmektedir

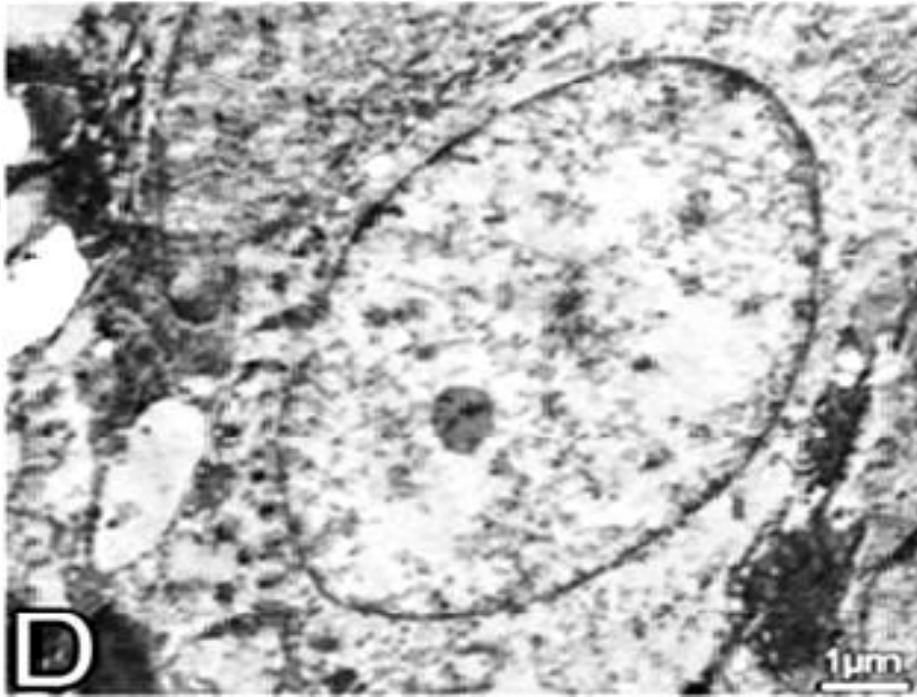
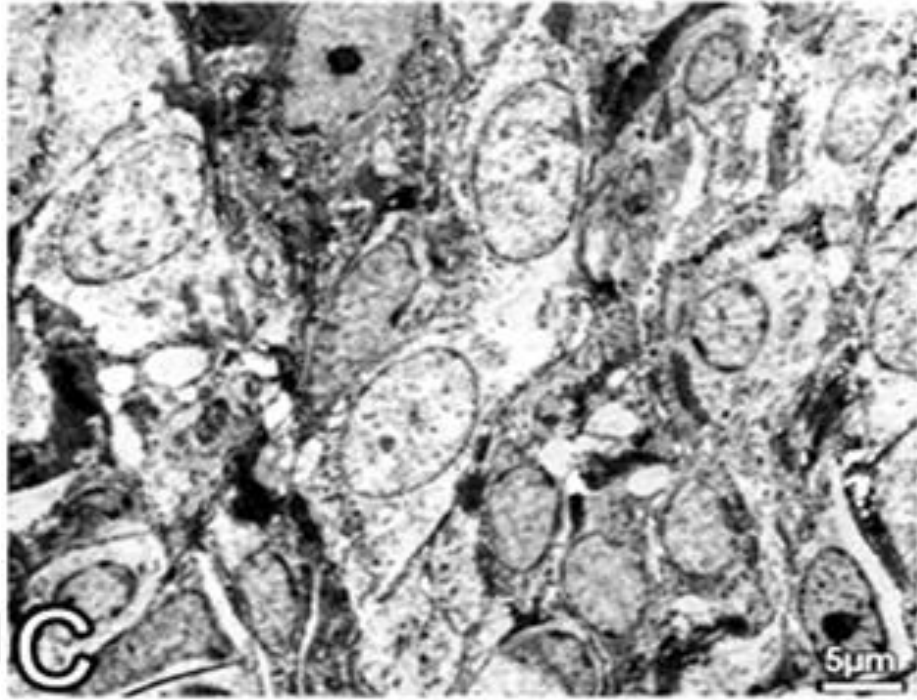
4.4.5. Bort Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular

Bort grubundaki uterusların ince yapısına bakıldığında; endometriyum yüzey epitelinin yapısı normal görünümdeydi. Lizozom ve mitokondri gibi organeller hücre sitoplazması içerisinde sağlıklı görünümleri ile dikkati çekmekteydi. Epitel hücrelerinin apikal yüz özelleşmeleri de düzenli ve normal görünümdeydi. Sağlıklı epitel hücreleri arasında nadiren elektron yoğun ve çentikli nükleusa sahip hücreler görüldü. Hücre yan yüz bağlantıları sıkı ve düzgün yapıdaydı. Bazal lamina normal olarak izlendi. Lamina propriada kollajen lifler ve stromal hücreler dikkati çekmekteydi. Hücreler arası alanda bulunan bağ dokusu lifleri de sağlıklı olarak izlenmekteydi (Şekil 38).





Şekil 38-a. A-B: Bort grubuna ait uterusun elektron mikroskopik görünümü. Uterus yüzey epiteli ve endometriyum stromasının çoğunlukla sağlıklı görünümü dikkat çekmektedir. **n:** bazal yerleşimli epitel hücresi çekirdeğini göstermektedir



Şekil 38-b. C-D: Bort grubuna ait uterusun elektron mikroskopik görünümü. Uterus yüzey epiteli ve endometriyum stromasının çoğunlukla sağlıklı görünümü dikkat çekmektedir

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, overektomize edilen sıçanların uterusu üzerine post-menopozal dönemde bir proteozom inhibitörü olan bortezomib, österojen ve β -Glukan uygulamalarının dejeneratif ve protektif etkileri; stereolojik, histopatolojik, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemleri kullanılarak incelendi.

Menopoz sonrası östrojen hormonunun tek başına tedavi amacı ile kullanılması miyometriyum ve endometriyumda proliferasyona neden olmaktadır. Endometriyum ve miyometriyum hücrelerinde proliferasyonun olması uterus ağırlığının artması ile sonuçlanır (Bachmann ve ark., 2009; Freedman ve ark., 2009). Kullanılan östrojen türevleri ve hormon tedavileri endometriyumda hiperplaziye yol açar ve neticede bu durum kanser riskini 10 kat artırır (Vaccaro ve ark., 2013). Örnek olarak post-menopozal hormonal (progesteron ve östrojen) replasman tedavisinin mesane kanserine yakalanma riskinde (bir kohort çalışması) artışa neden olabileceği bildirilmiştir (Datta ve ark., 2002; Gull ve ark., 2003).

Kadınlarda östrojen hormonu eksikliği, post-menopozal dönemde başta osteoporoz olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimini etkileyen faktörlerin başında yer almaktadır. Östrojen noksanlığının osteoklastlara uyarı vererek kemik kaybına neden olduğu ve ayrıca tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin-1b (IL-1b) gibi bazı inflamatuvar sitokin düzeylerinin artmasını da tetiklediği bilinir (Ucer ve ark., 2016). Östrojen tedavisinin güvenliği hala bir endişe kaynağıdır. Östrojen replasmanının kemik korumada yararları olup olmadığı, yan etkisi ve potansiyel riskleri halen tartışılmaktadır (Martin-Millan ve ark., 2010). Dişi memelilerde, yaşam süresi üzerinde Ovt'nin olumsuz etkisi bilinmektedir, ancak bu süreçte yer alan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır (Unsal ve Sonmez, 2014). Östrojenler, vücuttaki doğal anti-enflamatuvar maddelerdendir (Monteiro ve ark., 2014), bu seks hormonlarının overaracılı üretiminin eksikliği, enflamatuvar moleküllerinin aşırı birikmesine yol açmaktadır (Monteiro ve ark., 2014).

Bir proteozom inhibitörü olarak bortezomib 2013 yılında Velcade adıyla kullanıma başlanmış ve multiple myeloma (MM) tedavisinde kullanımı yaygınlaşmıştır (Driscoll ve Woodle, 2012). Bortezomib daha çok hücre içi proteinlerin parçalanmasına neden olan bir multikatalitik proteinaz kompleksidir ve proteozom işlevlerini önleyerek antitümöral özellik gösteren bir ajan olarak tanımlanabilir (Adams ve ark.,

1999; Conrad ve ark., 2011; Driscoll ve Woodle, 2012). Tüm hücrelerde 26S proteozom tarafından yapılan proteoliz, zorunlu bir metabolik olay olarak düşünülür. Çünkü bu yolak hücre siklusu, bazı proteinlerin transkripsiyonu, tirozin metabolizması gibi hücrenin hayati fonksiyonlarında bulunan proteinlerin yapısından sorumludur. Ayrıca proteozom yaşlanmış, okside olan ve hasarlı proteinlerin yıkımını da sağlamaktadır (Mackay ve ark., 2005; Veschini ve ark., 2007; Driscoll ve Woodle, 2012). Bu düzenin bozulması ise hücreyi apoptoza kadar götürmektedir. Şöyle ki; yıkılması gereken düzenleyici proteinlerin hücrede birikimi ve proteozom inhibitörleri aracılığı ile apoptoz uyarımı yapılarak ubiquitin/proteozom yolağı oluşmaktadır (Mackay ve ark., 2005; Veschini ve ark., 2007; Driscoll ve Woodle, 2012).

Ubikütin/proteozom yolağı substratları; Myc onkogen proteini, siklinler, p53 gibi düzenleyici moleküllerdir. Bu moleküllerin imhası, hücre proliferasyonunun ve döngüsünün kontrolünü değiştirir. Örneğin, proteozom tarafından apoptoz düzenleyicilerinden biri olan p53 ubiquitinize edilir ve yıkılır (Richardson ve ark., 2009).

Bortezomib'in hücresel seviyede etkileri incelendiğinde; MAP kinaz sinyal yolağını ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, kaspaz bağımlı apoptozu indüklediği NF- κ B'yi inhibe ettiği, adezyon moleküllerinin ekspresyonunun azalmasına yol açtığı görülür (Orlowski ve ark., 2002). Bortezomib'in NF- κ B transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisi ise şu şekildedir: Normal hücre siklusunda, NF- κ B'nin inhibitörü olan I κ B (I kapa B) sitoplazmada NF- κ B ile bağılı bulunur ve NF- κ B'nin nükleer transformasyona girmesini engeller. I κ B serin protein üzerinden fosforile olduğunda proteozomun hedefi şekline gelir ve yapısı bozulur. Bu sebeple serbest kalan NF- κ B nükleusa girip anti-apoptotik ve proliferasyon faktörlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Proteozom inhibitörleri ise NF- κ B inhibitörü olan I κ B proteininin bozulmasını durdurarak NF- κ B aktivasyonunu engeller. Başka bir ifadeyle, bortezomib proteozom inhibisyonu yoluyla I κ B'nin bozulmasını inhibe ederek NF- κ B aktivasyonunu engeller (Richardson ve ark., 2014). Böylece, p53 tümör supresor geni, p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, Bax pro-apoptotik protein ve p21 gibi önemli intrasellüler proteinlerin transkripsiyonu artar. Ancak bu etki sırf proteozom ve pro-apoptotik faktörleri imha etmekle kalmayıp aynı zamanda anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu da uyarılmaktadır (Richardson ve ark., 2009).

Seyyedi ve ark. (2016), yaptıkları bir çalışmada, cinsel ve üriner problemleri olan postmenopozal kadınlarda vajinal arı sütü jeli kullanımının vajinadaki atrofiyi engelleme, cinsel ve üriner fonksiyonları iyileştirme ve hayat kalitesini artırmada konjuge östrojenler ve ticari kayganlaştırıcılardan daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, menopoz ve sonrası süreçte cinsiyet hormonlarının noksanlığı ile proteozom inhibitörü olan bortezomib'in rat uterusu üzerindeki etkileri özellikle NF-κB aktivitesi açısından değerlendirildi.

Çalışmamıza ait sıçanların uteruslarının miyometriyum ve endometriyum kalınlıklarında meydana gelen değişimler ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda, overektomi ve overektomi sonrasında ekzojen olarak uygulanan östrojenin uterus kas ve bağ dokuları üzerindeki etkileri histopatolojik olarak değerlendirilmiş; overektomi grubunda uterus lümenlerinde daralma, uterus bezlerinde, damar ve miyometriyum düz kas hücrelerinde sayıca azalma gözlemlenmiştir.

Östrojen kullanımından sonra ise kas tabakasında kalınlaşma, bağ dokusu artışı, kollajen lif miktarında artış ve kas hücrelerinde hipertrofi tespit edilmiştir (Colenda ve ark., 2010; Espeland ve ark., 2010). Farklı östrojen tedavilerinin uterus üzerine olan etkileri overektomize ratlarda karşılaştırmalı olarak incelendiğinde uterus ağırlığında östrojen uygulaması ile birlikte ciddi bir artış gözlenmiştir. Bu durum miyometriyal ve endometriyal kalınlıkların artması şeklinde değerlendirilmiştir (Estevez ve ark., 2010; Cano ve ark., 2012). Östrojen salınımı, miyometriyumun gelişmesine sebep olmaktadır. Bu gelişim hem kas hücrelerinin büyümesi, hem de bölünüp çoğalmaları ile gerçekleşir. Östrojen kullanımı ile birçok düz kas hücresi protein sekresyonu yapan hücrelerin ultra-strüktürel özelliğine sahip olarak, kollajen sentezi yapımına katılırlar. Böylelikle uterusda bulunan kollajen lif miktarı önemli derecede artar (Kierszenbaum, 2006; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2011).

Unsal ve Sonmez (2014) 'in yaptıkları bir çalışmada, overektomiden sonra hiç bir histolojik değişiklik görülmemiş, yani, endometriumdaki, tek katlı prizmatik epitelde ve miyotriumda herhangi bir anormallik gözlenmemiştir. Uterus duvarının incelenmesi 5.-7. günler arasında görülmemekle beraber Ovt uygulanmasından ancak 15 gün sonra uterus duvarında incelenme tespit edilmiştir. Overektomiden sonra östrojen uygulanan grupta hiç bir değişiklik gözlenmemiştir. Jelinsky ve ark. (2008) transkripsiyonel seviyede yaptıkları bir çalışmada ise overektomize sıçan ve vajinal atrofi bulguları olan

insan gruplarının östrojen tedavisine verdikleri yanıtların birbirleri ile önemli ölçüde örtüştüğünü rapor etmiştir.

Uterin siklusta hem endometriyumun, hem de miyometriyumun etkilendiği gözlemlenmiştir. Miyometriyumdaki düz kas hücrelerinde cinsiyet hormonlarına ait reseptörler bulunmaktadır. Buna dayalı olarak siklusta değişiklikler gösterdiği bilinmektedir. Bu bulgulara göre post-menopozal zamanda ve cinsiyet hormonlarının (özellikle östrojen) noksanlığında miyometriyumu oluşturan düz kaslarda, hem hücre hacminde, hem de hücre sayısında bir azalmanın olduğu ifade edilmiştir (Carbonel ve ark., 2011).

Sunulan çalışmada elde ettiğimiz morfometrik sonuçlar, yukarıda kısaca özetlediğimiz literatürdeki sonuçlardan farklıdır. Kontrol grubuna ait hayvanların endometriyum kalınlığı ile Ovt, Ost ve β -glukan ve üç deney grubuna ait deneklerin endometriyum kalınlığı ile kıyasladığımızda, overektomi uygulanan deneklere ait uterusların tüm tabakalarında kontrol grubundakilere kıyasla kalınlık ve hacim azalması olduğu görüldü. Bu tabakaların kalınlık ve hacimleri açısından en yüksek değerlerin kontrol grubuna ait hayvanlarda olduğu gözlenirken, overektominin etkisi ile en az değerlerin overektomi grubunda olduğu tespit edildi. Overektominin ardından östrojen uygulamasının literatürde belirtildiği gibi tabakaların kalınlığında ve hacminde herhangi bir artışa neden olmadığı, hatta miyometriyum ve perimetriyum kalınlığını ve hacmini anlamlı ölçüde düşürdüğü gözlemlendi. Buna karşın çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre β -glukan ve özellikle de bortezomibin uterus tabakalarının kalınlığını ve hacmini artırdığını tespit ettik.

Uterus bezi alanı açısından en düşük değerler Ovt ve Ost gruplarında, en yüksek değerler ise Bort grubunda elde edilmiştir. Bununla birlikte ortalama bez hacmi açısından gruplar arasında herhangi bir fark elde edilemedi. Damarların kapladığı hacim değerleri açısından tüm gruplarda, Kont grubuna göre azalma gözlenirken deney grupları arasında (Ovt, Ost, β -glu ve Bort) en yüksek hacim değerlerine β -glu grubunda rastlandı. Fakat grup içi deneklerin ortalama değerleri arasındaki standart sapma fazla olduğundan bu farklılık istatistiğe yansımada.

Prizmatik epitelin kübik epitele dönüştüğü fark edilmiş ve ayrıca endometrium bezlerinde atrofi görülmüş, stromada olan bağ doku liflerinin sıkı ve yoğun şekilde düzenlendiği, düz kas hücrelerinde ve stromal hücrelerde hiperkromazi ve küçülme

olduğu gösterilmiştir (Carbonel ve ark., 2011). Overektomi uygulanan grupta lamina epitelyalisi oluşturan tek katlı prizmatik epitelin bazı yerlerde tek katlı kübik ve yassı epitele dönüştüğü görüldü. Endometriyumda olan stroma bağ dokusu liflerinde azalma ile beraber stromal hücrelerde bir artış tespit edildi. Aynı zamanda uterin hücrelerde morfolojik değişiklikler ve bezlerde atrofi görüldü. Ayrıca, stratum vaskülaresindeki kan damarlarının lümenlerinde ve stromal kan damarlarında daralmaya rastlandı. Genellikle overektominin uterusu karşı etkileri literatür ile uygun bir şekil göstermekte olup benzer bulgular bizim çalışmamızda da elde edildi. (Carbonel ve ark., 2011).

Yaş ile birlikte uterus endometriyumunda bazı epitelyal değişiklikler görüldüğü ve epitelin bazal laminasının kalınlaştığı bilinmektedir. Çalışmamızda özellikle Ovt ve Ost grubundaki epitel hücrelerinde çekirdeklerin küçülmüş ve elektron yoğunluğunun artmış olduğu ve hücre sitoplazmasının ise kaba organel yapısında olduğu gözlemlendi. Ayrıca Ovt ve Ost grubundaki hücrelerin yan yüz bağlantılarının sağlıklı yapısının bozulduğu görüldü. Bu durum hücrelerin ölüm sürecinin bir parçası olarak düşünülebilir. Sivridis ve Giatromanolaki (2004), 84 post menopozal kadın üzerinde yaptıkları bir çalışmada, tüm endometriyum örneklerinde hücre yoğunluğunun yaşlanmayla birlikte azaldığını gözlemlemiştir. Bu durumu hormona bağlı uterus metabolizmasındaki azalmaya bağlamışlardır. Çalışmamızda kontrol grubundaki stromal hücreler sağlıklı ve normal histolojik yapıda gözlemlendi. Bu hücrelerin aktif protein sentezi yapan hücrelerin organel yapısında olduğu, sentezlenen bu kollajen liflerin elektron yoğunluğunun normal, yapısı ve dağılımının düzenli olduğu görüldü. Ovt grubundaki deneklerde ise lamina propriada stromal hücrelerin seyrek ve sağlıklı yapıda olmadığı, buna karşın kollajen lif demetlerinin daha az miktarda ve elektron yoğun yapıda olduğu tespit edildi.

Steroid hormon ve büyüme faktörleri, endometriyumda gerçekleşen çoğalma, farklılaşma ve apoptoz olaylarını düzenlemektedir. Hücre çoğalması ve apoptoz arasındaki dengenin yaşlanmaya bağlı olarak bozulması endometriyal kanser gibi birçok problemi de beraberinde getirebilir (Estevez ve ark., 2010; Cano ve ark., 2012). Literatürde, yaşlı sıçanların endometriyum'unda yüksek apoptotik indeks izlendiği bildirilmektedir (Estevez ve ark., 2010; Cano ve ark., 2012). Biz de çalışmamızda Ovt grubundaki deneklerimizin endometriyumlarında özellikle stromada apoptotik hücreler gözlemledik. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, bortezomib uygulamasının

hem histopatolojik, hem de morfometrik açısından koruyucu bir etkisi olduğu düşünülebilir. Morfometrik açısından bortezomib'in endometriyum kalınlığını artırdığı gözlenirken, histopatolojik olarak ta overektomi uygulanan gruba kıyasla tek katlı prizmatik epitel yapısının korunmuş olduğu izlendi.

Beta-glukan "*Saccharomyces cerevisiae*" gibi maya türlerinin hücre duvarından elde edilmektedir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda β -glukan'ın bağışıklığı düzenlediği düşünülmektedir. Çeşitli yabancı antijenlere karşı konak direnci, *S. cerevisiae*'den izole edilen β -glukan uygulanması suretiyle artırılabilir. Buna ek olarak β -glukan immün-stimulatör rolü ile tümörlere karşı koruyucu olabilir (Yoon ve ark., 2008).

Kim ve ark. (2009), yaptıkları bir çalışmada bakteriler tarafından üretilen β -glukan'ın, insan kolon kanseri hücrelerinde apoptoza neden olabileceğini tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada sırası ile 10, 50 ve 100 mg/ml dozlarında β -glukan uygulanmış; kolon kanseri hücrelerinde doza bağlı bir şekilde, kromatin yoğunlaşması canlı hücre oranlarında azalma gibi morfolojik değişiklikler gözlemlenmiş ve ayrıca TUNEL tekniği ile bu hücrelerin apoptoza uğradığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, β -glukan (100 mg/ml) uygulanan grupta tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla Bcl 2 geninin ekspresyonunda 0,6 kez azalma tespit edilmiştir. Aksine yine β -glukan (100 mg/ml) uygulanan grupta tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla; Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonu β -glukan (100 mg/ml) uygulanan grupta tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla ise sırasıyla 3.1 ve 2.3 kez artma gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda da β -glukanın uterus tabakalarının kalınlıklarında ve uterus bezi alanı açısından özellikle östrojene karşı daha faydalı sonuçlar sağladığı söylenebilir. Ayrıca damarlanma açısından da sayısal olarak damar hacimlerinin artmasını sağladığı, bu nedenle de sınırlı bir faydasının olduğu düşünülebilir.

Hücresele düzeyde yaşlanmanın etkileri arasında NF- κ B indüksiyon yolunu aktive edebileceği iddia edilmektedir (Rovillain ve ark., 2011). Bortezomib tedavisine dayalı ve bazı komplikasyonlar proteozom serbest mekanizmalar tarafından indüklenen NF- κ B sinyalinin kaynaklanıyor olabilir (Adler ve ark., 2007). Bazı çalışmalar proteozom inhibisyonunun bu atipik NF- κ B cevabını sonlandırabileceğini iddia etmektedir. Cullen ve ark. (2010), fosfotirozin bağımlı, proteozom bağımsız üst mekanizma ile uyarılan NF- κ B aracılı enflamatuar gen transkripsiyonuna proteozom

inhibisyon etkilerini incelediklerinde ilerleyen yaş, geriatric hastalıklar ve bortezomib direnci gibi proteozomal disfonksiyonların hiperaktif NF-κB yanıtları ile ilgili olduklarını göstermişlerdir. İleri yaşlarda görülen enflamasyonda yaşla ilgili hastalıkların da tesiri olabilir. Alzheimer hastalığı, artrit, kemik erimesi, kalp-damar hastalığı, kemik kırılabilirliği gibi hastalıklar pro-enflamatuvar sitokinler tarafından etkilendiği bilinmektedir (Pratheeshkumar ve ark., 2014).

İnflamatuvar genlerin yaşlılık aşamasında indüksiyonu altında yatan temel mekanizma belirsizliğini korumakla birlikte bu olası mekanizmaların (inflamatuvar genler regülasyonu) NF-κB bağımlı yolu sayesinde açığa çıkarılabilir. Bu aşamada NF-κB'nın bir yöntemi olduğunu düşündüren bazı ifadeler vardır. Örnek olarak yaşlı farelerin kemik iliği ve dalaklar gibi ana lenfoid organlar ve epidermisin yanı sıra hipokampus, karaciğer ve kalp kası gibi organlarda yaşla beraber NF-κB aktivitesini çoğalmasını gösteren çalışmalar mevcuttur (Adler ve ark., 2007; Batsi ve ark., 2009; Rovillain ve ark., 2011).

Çalışmamızda NF-κB p65 immünreaktivitesi uterusun perimetriyum, miyometriyum ve endometriyum tabakalarında değerlendirildiğinde her beş grupta uterusun endometriyumunun tek katlı epiteli ile uterus bezlerinde, muskular katmandaki kas demetlerinde pozitiflik görülmedi. Bu çalışmanın tüm gruplar için benzer sayılabilecek ortak bulgulardan biri de NF-κB p65 immün tutulumunun sadece kan damarı ve endotel hücrelerinde belli bir şekilde pozitif olmasıdır. Overektomi grubu bulguları literatür ile uyumluluk göstermekteydi. Kontrol grubundan farklı olarak overektomi yapılan grupta endometriyumun stromal hücrelerinde, özel olarak endometriyum bazalindeki bazı stromal hücrelerde, sitoplazmik ve kuvvetli nükleer NF-κB tutulumu görülmektedir. Kontrol grubundan farklı olarak overektomi yapılan ve bortezomib ile tedavi olan deney grubunda ise, stromal hücrelerde NF-κB immünreaktivitesi belli olmakla beraber genel itibarıyla sitoplazmik tutulum söz konusuydu. Bu bilgiler rehberliğinde elde ettiğimiz verileri inceleyecek olursak; öncelikle menopozun ve dolayısıyla cinsiyet hormonlarının (özellikle östrojenin) eksikliğinde uterusun miyometriyum (düz kas doku) ve endometriyum (bağ doku) tabakalarında belirgin bir dejenerasyon olduğu, bunun literatürde bilinen bulgular ile uyum içerisinde olduğu görüldü. Ancak proteozom inhibisyonu gerçekleştiren bortezomib grubundaki endometriyumda oluşan morfometrik farklılıklar istatistiksel açılarından

belirlenmemektedir. Bu durumda bortezomib'in (proteozom inhibisyonunun) endometriyum üzerinde fazla koruyucu veya iyileştirici bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Proteozom inhibisyonu (bortezomib uygulaması) NF-κB'nin inhibisyonu anlamına geldiği düşünülebilir. Çalışmamızda ise tam tersi bir sonuç elde edilmiştir. Sağlıklı grupta NF-κB p65 reaksiyonu gözlemlenmiş, Ovt grubunda hem nükleer, hem de sitoplazmik tutulum olmak üzere yoğun bir NF-κB p65 immün pozitivilik gözlenmiştir. Ovt +Bort grubunda sadece sitoplazmik NF-κB p65 immün pozitivilik belirlenmiştir. Bu bulgular menopoz durumunda bazı stromal hücrelerin endometriyumda oluşan bu fizyopatolojik duruma karşı hücrel cevap oluşturarak NF-κB p65 aktivitesini artırdığını göstermektedir. Bunun proteozom inhibisyonunu ile NF-κB yolağını IκB (İnhibitör Kabba B) üzerinden baskılaması beklenirken overektominin bir sonucu olarak NF-κB p65'in sitoplazmik reaksiyon göstermesine neden olduğu söylenmektedir. Bu durum ise, NF-κB yolağını atipik ikinci bir yol üzerinden (NF-κB'nin fosfotirozin bağımlı aktivasyonu) aktive edilebileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Cerrahi yaşlanma aşaması olarak bilinen cerrahi menopoz ile ortaya çıkan östrojen hormon noksanlığında NF-κB fosfotirozin bağımlı yol ile aktive edilebilmektedir. Bu düşünce proteozom inhibisyonun da desteklemektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada overektominin uterus üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu tespit edildi. Bu süreçte proteozom inhibisyonunun kısıtlı bir koruyucu etkisinin olduğu immünohistokimsiyal ve morfometrik metodlar ile gösterilmiştir. Bu çalışma ile östrojen eksikliğinin endometriyumda NF-κB yolağını aktive ettiği ve NF-κB'nin proteozom bağımsız yol ile sitoplazmada reaksiyon gösterdiği gözlenmiştir. Fakat menopozun östrojen reseptörlerine sahip yağ dokusu, beyin ve kas gibi diğer birçok organda NF-κB yolağı üzerinden olan etkileri bilim insanları arasında merak edilmektedir. Bir sonraki aşamadaki çalışmalarda ise menopoz modelinde meme dokusunda oluşabilecek kanserler üzerine yapılması gerekliliğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sonuç itibariyle bu çalışmada, overektominin uterus üzerinde negatif etkilerinin var olduğu bir kez daha ortaya konulmuştur.
2. Menopoz sürecinde, proteozom inhibisyonunun koruyucu etkisinin olduğu morfolometrik, elektron mikroskopik ve immünohistokimsyal metodlar ile tespit edilmiştir.
3. Çalışmanın sonucunda, östrojen eksikliğinin endometriyumda NF-κB yolağını aktive ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, β-glukanın, uterus bezi alanı açısından özellikle östrojene kıyasla daha faydalı sonuçlar sağladığı, endometriyumun kalınlaşmasına yol açtığı ve damar hacimlerinin artmasını sağladığı ve son olarak NF-κB'nin proteozomdan bağımsız bir yolak ile sitoplâzma da reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir.
4. Menopozun östrojen reseptörlerine sahip kas, beyin ve yağ doku gibi diğer birçok organda NF-κB yolağı üzerinden olan etkileri bilim insanları arasında merak konusu olmaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda ise menopoz modelinde deri ve kemik dokusunda bunun gibi çalışmalar tasarlanabileceğine, menopozun deri ve örtü sistemi ve kemik metabolizması gibi çeşitli sistemlerdeki yaşlanma süreçleri ile ilişkisinin moleküler tabanlı olarak aydınlatılması gerektiğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- Adaikalakoteswari A, Balasubramanyam M, Ravikumar R, Deepa R, Mohan V. Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis* 2007; 195(1): 83-89.
- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59(11): 2615-2622.
- Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev* 2007; 21(24): 3244-3257.
- Alder JK, Guo NN, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy AI, Walsh F, Sussan T, Biswal S, Mitzner W, Tudor RM, Armanios M. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(8): 904-912.
- Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, Eshleman, JR, Cohen AR, Chakravarti A, Hamosh A, Greider CW. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(44): 15960-15964.
- Asikainen TM, Miilunpalo S, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Pasanen M, Rinne M, Uusi-Rasi K, Oja P, Vuori I. Walking trials in postmenopausal women: effect of low doses of exercise and exercise fractionization on coronary risk factors. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13(5):284-292.
- Bachmann G, Bouchard C, Hoppe D, Ranganath R, Altomare C, Vieweg A, Graepel J, Helzner E. Efficacy and safety of low-dose regimens of conjugated estrogens cream administered vaginally. *Menopause* 2009; 16(4): 719-727.
- Bancroft J, Gamble M, Eds. *The hematoxylin and eosin. Theory and Practice of Histological Techniques*, 6th ed. Philadelphia, PA 2008; 121 – 134.
- Baraibar MA, Friguet B. Changes of the proteasomal system during the aging process. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;109: 249-275.
- Barja G. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal* 2013;19(12):1420-1445.
- Barmparas G, Branco BC, Schnuriger B, Lam L, Inaba K, Demetriades D. The incidence and risk factors of post-laparotomy adhesive small bowel obstruction. *J Gastrointest Surg* 2010; 14(10): 1619-1628.

- Batsi C, Markopoulou S, Vartholomatos G, Georgiou I, Kanavaros P, Gorgoulis VG, Marcu KB, Kolettas E. Chronic NF-kappa B activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(7): 409-419.
- Belch A, Kouroukis CT, Crump M, Sehn L, Gascoyne RD, Klasa R, Powers J, Wright J, Eisenhauer EA. A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150. *Ann Oncol* 2007; 18(1): 116-121.
- Benmansour S, Adeniji OS, Privratsky AA, Frazer A. Effects of long-term treatment with estradiol and estrogen receptor subtype agonists on serotonergic function in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 2016;103(3-4):269-281.
- Bohn D. Understanding the pathophysiology of cerebral edema in diabetic ketoacidosis: another brick in the wall? *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11(3): 421-423.
- Bohn JA, BeMiller JN. (1->3)-beta-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 1995; 28(1): 3-14.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 2004; 125(10-11): 811-826.
- Bold R. "Development of the proteasome inhibitor Velcade (TM) (Bortezomib)" by Julian Adams, Ph.D., and Michael Kauffman, MD, Ph.D. *Cancer Invest* 2004; 22(2): 328-329.
- Boussicault F, Kaloudis P, Caminal C, Mulazzani QG, Chatgililoglu C. The fate of C5' radicals of purine nucleosides under oxidative conditions. *J Am Chem Soc* 2008; 130(26): 8377-8385.
- Bromberger JT, Schott LL, Kravitz HM, Sowers M, Avis NE, Gold EB, Randolph JF Jr, Matthews KA. Longitudinal change in reproductive hormones and depressive symptoms across the menopausal transition: results from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67(6): 598-607.
- Brown G D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(1): 33-43.
- Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ. Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2000; 49: 481-489.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4): 222-230.
- Campisi J, Yaswen P. Aging and cancer cell biology. *Aging Cell* 2009; 8(3): 221-225.

- Cano A, Estevez J, Usandizaga R, Gallo JL, Guinot M, Delgado JL, Castellanos E, Moral E, Nieto C, del Prado JM, Ferrer J. The therapeutic effect of a new ultra low concentration estriol gel formulation (0.005% estriol vaginal gel) on symptoms and signs of postmenopausal vaginal atrophy: results from a pivotal phase III study. *Menopause* 2012; 19(10): 1130-1139.
- Carbonel AA, Baracat MC, Simões RS, Simões MJ, Baracat EC, Soares JM Jr. The soybean concentrated extract proliferates the vagina of adult rats. *Menopause* 2011; 18(1): 93-101.
- Castelo-Branco C, Palacios S, Combalia J, Ferrer M, Traveria G. Risk of hypoactive sexual desire disorder and associated factors in a cohort of oophorectomized women. *Climacteric* 2009; 12(6): 525-532.
- Chambers SM, Shaw CA, Gatza C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* 2007; 5(8): e201.
- Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005; 7(8):758-765.
- Colenda CC, Legault C, Rapp S R, DeBon M W, Hogan P, Wallace R, Hershey L, Ockene J, Whitmer R, Phillips L S, Sarto G E. Psychiatric Disorders and Cognitive Dysfunction Among Older, Postmenopausal Women: Results From the Women's Health Initiative Memory Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2010; 18(2): 177-185.
- Comijs HC, van Exel E, van der Mast RC, Paauw A, Oude Voshaar R, Stek M L. Childhood abuse in late-life depression. *J Affect Disord* 2013; 147(1-3): 241-246.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66(3): 407-425.
- Conrad C, Podolsky MJ, Cusack JC. Antiproteasomal agents in rectal cancer. *Anti-Cancer Drugs* 2011; 22(4): 341-350.
- Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 99-118.
- Cuervo AM, Dice JF. When lysosomes get old. *Exp Gerontol* 2000; 35(2): 119-131.
- Cullen S, Ponnappan U, Ponnappan S. Proteasome inhibition up-regulates inflammatory gene transcription induced by an atypical pathway of NF- κ B activation. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(5): 706-714.

- Datta SN, Allen GM, Evans R, Vaughton KC, Lucas MG. Urinary tract ultrasonography in the evaluation of haematuria--a report of over 1,000 cases. *Ann R Coll Surg Engl* 2002; 84(3): 203-205.
- Dennerstein L, Dudley E, Guthrie J, Barrett-Connor E. Life satisfaction, symptoms, and the menopausal transition. *Medscape Womens Health*. 2000; 5(4): E4.
- Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366 (1561): 76-84.
- Dou QP, Zonder JA. Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets* 2014; 14(6): 517-536.
- Driscoll JJ, Woodle ES. Targeting the ubiquitin plus proteasome system in solid tumors. *Semin Hematol* 2012; 49(3): 277-283.
- Dutaud D, Aubry L, Henry L, Levieux D, Hendil KB, Kuehn L, Bureau JP, Ouali A. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J Immunol Methods* 2002; 260(1-2): 183-193.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
- Eroschenko VP. *Di Fiore's atlas of histology with functional correlations*. 11th ed, Philadelphia, USA, Lippincott Williams &Wilkins. 2005; 439-440.
- Espeland MA, Brunner RL, Hogan PE, Rapp SR, Coker LH, Legault C, Granek I, Resnick SM, Cogni WHIS. Long-term effects of conjugated equine estrogen therapies on domain-specific cognitive function: results from the women's health initiative study of cognitive aging extension. *J Am Geriatr Soc* 2010; 58(7): 1263-1271.
- Estevez J, Cano A, Gallo JL, Castellanos E, Moral E, Nieto C, Ferrer J. The therapeutic effect of a new ultra-low concentration estriol gel formulation (0.005% Estriol vaginal gel) on the signs of postmenopausal vaginal atrophy. *Menopause* 2010; 17(6): 1228-1228.
- Finch CE, Morgan DG. RNA and protein metabolism in the aging brain. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 75-88.
- Finley D, Chen X, Walters KJ. Gates, Channels, and Switches: Elements of the Proteasome Machine. *Trends Biochem Sci* 2016; 41(1): 77-93.
- Foster HA, Bridger JM. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Genome organisation and nuclear architecture*. *Chromosoma* 2005; 114(4): 212-229.

- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(30): 10604-10609.
- Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(9): 3719-3728.
- Freedman M, Kaunitz AM, Reape KZ, Hait H, Shu H. Twice-weekly synthetic conjugated estrogens vaginal cream for the treatment of vaginal atrophy. *Menopause* 2009; 16(4): 735-741.
- Freeman, E.W., Grisso, J.A., Berlin, J., Sammel, M., Garcia-Espana, B., Hollander, L. Symptom reports from a cohort of African American and white women in the late reproductive years. *Menopause*. 2001; 8(1): 33-42.
- Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* 2008; 10(11): 1241-1247.
- Gold EB, Bromberger J, Crawford S, Samuels S, Greendale GA, Harlow SD, Skurnick J. Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *Am J Epidemiol* 2001; 153(9): 865-874.
- Gull B, Karlsson B, Milsom I, Granberg S. Can ultrasound replace dilation and curettage? A longitudinal evaluation of postmenopausal bleeding and transvaginal sonographic measurement of the endometrium as predictors of endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(2): 401-408.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147(Pt 3): 229-63.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed, Philadelphia, USA, Elsevier's Health Sciences. 2006; 1011-1024.
- Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Mitochondrial permeability transition pore (MPTP)-dependent and -independent pathways of mitochondrial membrane depolarization, cell shrinkage and microparticle formation during platelet apoptosis. *Br J Haematol* 2015; 169(1): 142-145.
- Hale GE, Burger HG. Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2009; 23(1): 7-23.
- Hasten DL, Pak-Loduca J, Obert KA, Yarasheski KE. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(4): E620-626.

- Hatakeyama H, Yamazaki H, Nakamura KI, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Suzuki H, Tsuchida S, Matsuura M, Takubo K, Ishikawa N. Telomere attrition and restoration in the normal teleost *Oryzias latipes* are linked to growth rate and telomerase activity at each life stage. *Aging-Us* 2016; 8(1): 62-76.
- Hayes MG, Urbanek M, Ehrmann DA, Armstrong LL, Lee JY, Sisk R, Karaderi T, Barber TM, McCarthy MI, Franks S, Lindgren CM, Welt CK, Diamanti-Kandarakis E, Panidis D, Goodarzi MO, Azziz R, Zhang Y, James RG, Olivier M, Kissebah AH, Reproductive Medicine Network, Stener-Victorin E, Legro RS, Dunaif A. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nat Commun* 2016; (7): 10762.
- Hegde AN, Upadhyya SC. Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809(2): 128-140.
- Hilt W, Wolf DH. Proteasomes: Destruction as a programme. *Trends BiochemSci* 1996; 21(3): 96-102.
- Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 2009; 458(7237): 438-444.
- Hollander LE, Freeman EW, Sammel MD, Berlin JA, Grisso JA, Battistini M. Sleep quality, estradiol levels, and behavioral factors in late reproductive age women. *Obstet Gynecol* 2001; 98(3): 391-397.
- Honka MJ, Bucci M, Andersson J, Huovinen V, Guzzardi MA, Sandboge S, Savisto N, Salonen MK, Badeau RM, Parkkola R, Kullberg J, Iozzo P, Eriksson JG, Nuutila P. Resistance training enhances insulin suppression of endogenous glucose production in elderly women. *J Appl Physiol* (1985)2016b; 120(6): 633-639.
- Horber FF, Gruber B, Thomi F, Jensen EX, Jaeger P. Effect of sex and age on bone mass, body composition and fuel metabolism in humans. *Nutrition* 1997; 13(6): 524-534.
- Hou Y, Zhang Z, Xu Q, Wang H, Xu Y, Chen K. Inhibitor of growth 4 induces NFkappaB/p65 ubiquitin-dependent degradation. *Oncogene* 2014; 33(15): 1997-2003.
- Huang L, Chen CH. Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Curr Med Chem* 2009; 16(8): 931-939.
- Hutter E, Renner K, Pfister G, Stockl P, Jansen-Durr, P, Gnaiger E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* 2004; 380(3): 919-928.

- Inaga, S., Tanaka, K., Iino, A. Three-dimensional helical coiling structures and band patterns of hydrous metaphase chromosomes observed by low vacuum scanning electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology* 2002; 65(5): 415-423.
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003; 10(23): 2495-2505.
- Iuchi K, Yagura T. DNA binding activity of Ku during chemotherapeutic agent-induced early apoptosis. *Exp Cell Res* 2016; 342(2): 135-144.
- Hsu, S.M. Avidin-Biotin Detection Methods - a Citation-Classic Commentary on Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (Abc) in Immunoperoxidase Techniques - a Comparison between Abc and Unlabeled Antibody (Pap) *Current Contents/Life Sciences* 1993; (18): 9-9.
- Jelinsky SA, Choe SE, Crabtree JS, Cotreau MM, Wilson E, Saraf K, Dorner AJ, Brown EL, Peano BJ, Zhang X, Winneker RC, Harris HA. Molecular analysis of the vaginal response to estrogens in the ovariectomized rat and postmenopausal woman. *BMC Med Genomics* 2008; 127.
- Johnson AC, Williams RJA. Model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *EnvironSci Technol* 2004; 38(13): 3649-3658.
- Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. Solakoğlu S, Aytekin Y. Editor, *Temel Histoloji*. 11. Baskıdan Çeviri. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2009; 435-450.
- Kierszenbaum AL. Histology and cell biology. Demir R. Editör, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 2006; 635-650.
- Kim MJ, Hong SY, Kim SK, Cheong C, Park HJ, Chun HK, Jang KH, Yoon BD, Kim CH, Kang SA. Beta-Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. *Nutr Res Pract* 2009; 3(3): 180-184.
- Kim, H.S., Hong, J.T., Kim, Y., Han, S.B. Stimulatory Effect of beta-glucans on Immune Cells. *Immune Netw* 2011; 11(4): 191-5.
- Koester KJ, Barth HD, Ritchie RO Effect of aging on the transverse toughness of human cortical bone: evaluation by R-curves. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011; 4(7): 1504-1513.
- Kostich M, Flick R, Martinson J. Comparing predicted estrogen concentrations with measurements in US waters. *Environ Pollut* 2013; 178: 271-277.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 18th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders 2005.

- Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S, Ichihara A. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(18): 7071-7075.
- Lam PY, Yin F, Hamilton RT, Boveris A, Cadenas E. Elevated neuronal nitric oxide synthase expression during ageing and mitochondrial energy production. *Free Radic Res* 2009; 43(5): 431-439.
- Lansdorp PM. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* 2000; 118(1-2): 23-34.
- LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neuberger D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002; 62(17): 4996-5000.
- Li YF, Wang X. The role of the proteasome in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809(2): 141-149.
- Lizcano F, Guzman G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 757461.
- Lo AC, Woo TT, Wong RL, Wong D. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. *Ophthalmologica* 2011; 226: Suppl 1, 10-17.
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 2005; 120(4): 497-512.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153(6): 1194-1217.
- Ludlow AT, Roth SM. Physical activity and telomere biology: exploring the link with aging-related disease prevention. *J Aging Res* 2011; 2011: 790378.
- Lumeng CN, Liu JH, Geletka L, Delaney C, Delproposto J, Desai A, Oatmen K, Martinez-Santibanez G, Julius A, Garg S, Yung RL. Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *J Immunol* 2011; 187(12): 6208-6216.
- Mackay H, Hedley D, Major P, Townsley C, Mackenzie M, Vincent M, Degendorfer P, Tsao MS, Nicklee T, Birle D, Wright J, Siu L, Moore M, Oza A. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5526-5533.

- MacLaren AP, Chapman RS, Wyllie AH, Watson CJ. p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell Death Differ* 2001; 8(3): 210-218.
- Martinez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(3): 161-176.
- Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol* 2010; 24(2): 323-34.
- Martin-Millan M, Castaneda S. Estrogens, osteoarthritis and inflammation. *Joint Bone Spine* 2013; 80(4): 368-373.
- Masson P. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *Bull. Int. Assoc. Med.* 1929; 12: 75-90.
- Masters CJ, Crane DI. On the role of the peroxisome in ontogeny, ageing and degenerative disease. *Mech Ageing Dev* 1995; 80(2): 69-83.
- Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* 2007; 30(2): 175-191.
- Mather M, Carstensen LL. Aging and motivated cognition: the positivity effect in attention and memory. *Trends Cogn Sci* 2005; 9(10): 496-502.
- Mendez MA, Monteiro CA, Popkin BM. Overweight exceeds underweight among women in most developing countries. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(3): 714-721.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., Poulaki, V., Tai, Y.T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Schlossman, R., Munshi, N.C., Hideshima, T., Anderson, K.C. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003; 101(6): 2377-80.
- Modena, M.G., Sismondi, P., Mueck, A.O., Kuttann, F., de Lignieres, B., Verhaeghe, J., Foidart, J.M., Caufriez, A., Genazzani, A.R., Grp, T.C.S. New evidence regarding hormone replacement therapies is urgently required - Transdermal postmenopausal hormone therapy differs from oral hormone therapy in risks and benefits. *Maturitas* 2005; 52(1): 1-10.

- Monteiro R, Teixeira D, Calhau C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 615917.
- Moreau, P., Pylypenko, H., Grosicki, S., Karamanesht, I., Leleu, X., Grishunina, M., Rekhtman, G., Masliak, Z., Robak, T., Shubina, A., Arnulf, B., Kropff, M., Cavet, J., Esseltine, D.L., Feng, H., Girgis, S., van de Velde, H., Deraedt, W., Harousseau, J.L. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol* 2011; 12(5): 431-40.
- Morrison JP, Sharma AK, Rao D, Pardo ID, Garman RH, Kaufmann W, Bolon B. Fundamentals of translational neuroscience in toxicologic pathology: optimizing the value of animal data for human risk assessment. *Toxicol Pathol* 2015; 43(1): 132-139.
- Mostany R, Anstey JE, Crump KL, Maco B, Knott G, Portera-Cailliau C. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J Neurosci* 2013; 33(9): 4094-4104.
- Natarajan S, Begum F, Gim J, Wark L, Henderson D, Davie JR, Hombach-Klonisch S, Klonisch T. High mobility group a2 protects cancer cells against telomere dysfunction. *Oncotarget* 2016; 7(11): 12761-12782.
- Navarro A, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60 (13-14): 1534-1544.
- Njajou OT, Cawthon RM, Blackburn EH, Harris TB, Li R, Sanders JL, Newman AB, Nalls M, Cummings SR, Hsueh WC, Study HA. Shorter telomeres are associated with obesity and weight gain in the elderly. *Int J Obes* 2012; 36 (9): 1176-1179.
- Nordfjall K, Larefalk A, Lindgren P, Holmberg D, Roos G. Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (45): 16374-16378.
- Olszowy KM, Dufour DL, Bender RL, Bekelman TA, Reina JC. Socioeconomic status, stature, and obesity in women: 20-year trends in urban Colombia. *Am J Hum Biol* 2012; 24(5): 602-610.
- Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA, Soignet SL. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20(22): 4420-4427.
- Ornish D, Lin J, Chan JM, Epel E, Kemp C, Weidner G, Marlin R, Frenda SJ, Magbanua MJ, Daubenmier J, Estay I, Hills NK, Chainani-Wu N, Carroll PR,

- Blackburn EH. Effect of comprehensive lifestyle changes on telomerase activity and telomere length in men with biopsy-proven low-risk prostate cancer: 5-year follow-up of a descriptive pilot study. *Lancet Oncol* 2013; 14(11): 1112-1120.
- Page TL, Einstein M, Duan H, He Y, Flores T, Rolshud D, Erwin JM, Wearne SL, Morrison JH, Hof PR. Morphological alterations in neurons forming corticocortical projections in the neocortex of aged Patas monkeys. *Neurosci Lett* 2002; 317(1): 37-41.
- Parker WH, Broder MS, Liu ZM, Shoupe D, Farquhar C, Berek JS. Ovarian conservation at the time of hysterectomy for benign disease. *Obstet Gynecol* 2005; 106(2): 219-226.
- Pascot A, Lemieux S, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, Nadeau A, Couillard C, Tchernof A, Bergeron J, Despres JP. Age-related increase in visceral adipose tissue and body fat and the metabolic risk profile of premenopausal women. *Diabetes Care* 1999; 22(9): 1471-1478.
- Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, Birch-Machin MA, Kirkwood TB, von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 2007; 5(5): e110.
- Périchon R, Bourre JM. Aging-related decrease in liver peroxisomal fatty acid oxidation in control and clofibrate-treated mice. A biochemical study and mechanistic approach. *Mech Ageing Dev* 1996; 87(2): 115-126.
- Popper H. Aging and the liver. *Prog Liver Dis* 1986; 8: 659-683.
- Pratheeshkumar P, Son YO, Wang X, Divya SP, Joseph B, Hitron JA, Wang L, Kim D, Yin Y, Roy RV, Lu J, Zhang Z, Wang Y, Shi X. Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 280(1): 127-137.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003; 283(1): 1-16.
- Richardson PG, Xie W, Jagannath S, Jakubowiak A, Lonial S, Raje NS, Alsina M, Ghobrial IM, Schlossman RL, Munshi NC, Mazumder A, Vesole DH, Kaufman JL, Colson K, McKenney M, Lunde LE, Feather J, Maglio ME, Warren D, Francis D, Hideshima T, Knight R, Esseltine DL, Mitsiades CS, Weller E, Anderson KC. A phase 2 trial of lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone in patients with relapsed and relapsed/refractory myeloma. *Blood*. 2014; 123(10):1461-1469.
- Richardson PG, Chanan-Khan A, Lonial S, Krishnan A, Carroll M, Alsina M, Albitar M, Berman D, Szatrowski T, Kaplita S, Anderson KC. Tanespimycin and

- Bortezomib in Patients with Relapsed and Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: Final Results of a Phase 1/2 Study. *Hematologica* 2009; 94: 152-153.
- Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, Li L, Feng ZD, Gallaher J, Mandelson MT, Potter JD, Bronner MP, Rabinovitch PS. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: Evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology* 2008; 135(2): 410-418.
- Robertson JD, Gale RE, Wynn RF, Dougal M, Linch DC, Testa NG, Chopra R. Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns. *Br J Haematol* 2000; 109(2): 272-279.
- Rocca WA, Bower JH, Maraganore DM, Ahlskog JE, Grossardt BR, de Andrade M, Melton LJ. Increased risk of parkinsonism in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology* 2008; 70(3): 200-209.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 6th Ed. Philadelphia, Williams & Wilkins 2011; 831-849.
- Rovillain E, Mansfield L, Caetano C, Alvarez-Fernandez M, Caballero OL, Medema RH, Hummerich H, Jat PS. Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. *Oncogene*. 2011; 30(20): 2356-2366.
- Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 12th ed, Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins 2012; 244-251.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16): 2861-2874.
- Salmon AB, Richardson A, Perez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic Biol Med* 2010; 48(5): 642-655.
- Salpea KD, Humphries SE. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* 2010; 209(1): 35-38.
- Saraswat-Ohri S, Vashishta A, Vetvicka V, Descroix K, Jamois F, Yvin JC, Ferrieres V. Biological properties of (1 -> 3)-beta-d-glucan-based synthetic oligosaccharides. *J Med Food* 2011; 14(4): 369-376.
- Schottker B, Brenner H, Jansen EH, Gardiner J, Peasey A, Kubinova R, Pajak A, Topor-Madry R, Tamosiunas A, Saum KU, Holleczeck B, Pikhart H, Bobak M. Evidence for the free radical/oxidative stress theory of ageing from the CHANCES consortium: a meta-analysis of individual participant data. *BMC Med* 2015; 13300.

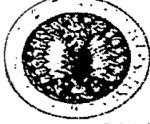
- Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ. Minireview: epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models. *Endocrinology* 2012; 153(3): 1031-1038.
- Seyyedi F, Rafiean-Kopaei M, Miraj S. Comparison of the effects of vaginal royal jelly and vaginal estrogen on quality of life, sexual and urinary function in postmenopausal women. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(5): QC01-5.
- Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ, Adams J, Callery MP. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2001; 82(1): 110-122.
- Shaker R, Ren J, Podvrsan B, Dodds WJ, Hogan WJ, Kern M, Hoffmann R, Hintz J. Effect of aging and bolus variables on pharyngeal and upper esophageal sphincter motor function. *Am J Physiol* 1993; 264 (3pt1): G427-432.
- Shammas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14(1): 28-34.
- Shawi M, Autexier C. Telomerase, senescence and ageing. *Mech Ageing Dev* 2008;129 (1-2):3-10.
- Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23): 9086-9090.
- Shuster LT, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA. Prophylactic oophorectomy in premenopausal women and long-term health. *Menopause Int* 2008;14 (3): 111-116.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82(2): 291-295.
- Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57 (8): 840-844.
- Sledz P, Baumeister W. Structure-driven developments of 26s proteasome inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016;56191-56209.
- Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of age on cholinergic and inhibitory nonadrenergic noncholinergic responses in the rat ileum. *Eur J Pharmacol* 1996; 303 (1-2): 79-86.
- Sniekers YH, van Osch GJ, Ederveen AG, Inzunza J, Gustafsson JA, van Leeuwen JP, Weinans H. Development of osteoarthritic features in estrogen receptor knockout mice. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(10): 1356-1361.
- Starr JM, Shiels PG, Harris SE, Pattie A, Pearce MS, Relton CL, Deary IJ. Oxidative stress, telomere length and biomarkers of physical aging in a cohort aged 79

- years from the 1932 Scottish Mental Survey. *Mech Ageing Dev* 2008; 129(12): 745-751.
- Tiainen AM, Mannisto S, Blomstedt PA, Moltchanova E, Perala MM, Kaartinen NE, Kajantie E, Kananen L, Hovatta I, Eriksson JG. Leukocyte telomere length and its relation to food and nutrient intake in an elderly population. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66 (12): 1290-1294.
- Ucer, S., Iyer, S., Kim, H.N., Han, L., Rutlen, C., Allison, K., Thostenson, J.D., de Cabo, R., Jilka, R.L., O'Brien, C., Almeida, M., Manolagas, S.C. The Effects of Aging and Sex Steroid Deficiency on the Murine Skeleton Are Independent and Mechanistically Distinct. *J Bone Miner Res* 2016.
- Unsal F, Sonmez MF. The effects of ovariectomy on ghrelin expression in the rat uterus. *Adv Clin Exp Med.* 2014; 23(3): 363-370.
- Vaccaro CM, Mutema GK, Fellner AN, Crisp CC, Estanol MV, Kleeman SD, Pauls RN. Histologic and cytologic effects of vaginal estrogen in women with pelvic organ prolapse: a randomized controlled trial. *Female Pelvic Med Reconstr Surg* 2013; 19(1): 34-39.
- Van Hook J, Altman CE, Balistreri KS. Global patterns in overweight among children and mothers in less developed countries. *Public Health Nutr* 2013; 16(4): 573-581.
- Veschini L, Belloni D, Foglieni C, Cangi MG, Ferrarini M, Caligaris-Cappio F, Ferrero E. Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 2007; 109(6): 2565-2570.
- Vijg J. Impact of genome instability on transcription regulation of aging and senescence. *Mech Ageing Dev* 2004; 125 (10-11): 747-753.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 1015-1068.
- Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res* 2006; 40(12): 1339-1349.
- Wajant H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Sci* 2002; 296(5573): 1635-1636.
- Watson NL, Simmons LW. Male and female secondary sexual traits show different patterns of quantitative genetic and environmental variation in the horned beetle *Onthophagus sagittarius*. *J Evol Biol* 2010; 23(11): 2397-2402.
- Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 2008; 4(5): 278-286.

- Wood LK, Kayupov E, Gumucio JP, Mendias CL, Claflin DR, Brooks SV. Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J Appl Physiol* 2014; 117(4): 363-369.
- Yoon TJ, Kim TJ, Lee H, Shin KS, Yun YP, Moon WK, Kim DW, Lee KH. Anti-tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(1): 36-42.
- Zhang H, Pan KH, Cohen SN. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(6): 3251-3256.
- Zhang QQ, Zhao JL, Ying GG, Liu YS, Pan CG. Emission estimation and multimedia fate modeling of seven steroids at the river basin scale in china. *Environ Sci Technol* 2014;48(14): 7982-7992.
- Zwerschke W, Mazurek S, Stockl P, Hutter E, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P. Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* 2003; 376(2): 403-411.

EKLER

EK 1- Etik Kurul Onayı



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-115
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

09.06.2014
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 20.05.2014 tarih ve 42190979-01-02/2349 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Bünyami ÜNAL'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülecek olan "Botezomib'in Overektomi Uygulanan Sıçan Uterusu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi: Histopatolojik, Stereolojik ve İmmünohistokimyasal Bir Çalışma" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 06.06.2014 tarih ve 4 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 95 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI	
Kayıt No	2860
Tarih	10.06.2014

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

Prof. Dr. Mevlâ AKKÖNÜL
Dekan Yardımcısı

ASLI GİBİDİR

Toplantı Tarihi : 06.06.2014

Toplantı Sayısı : 4

KARAR NO : 95- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Bünyami ÜNAL'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülecek olan "Botezomib'in Overektomi Uygulanan Sıçan Uterusu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi: Histopatolojik, Stereolojik ve İmmünohistokimyasal Bir Çalışma" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 20.05.2014 tarih ve 42190979-01-02/2349 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-231 47 30 Fax : 0-442-231 55 63 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Habib KHOSHVAGHTİ

Doğum Yeri: İran-Tebriz

Doğum Tarihi: 13.07.1978

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: Farsça, Türkçe, İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Doktora : Ondokuz mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 2011-

Lisans: Urmia Azad Üniversitesi Veteriner Fakültesi, IRAN (1997-2003).

E-Posta: khoshvakhti57@yahoo.com

