



**DENEYSEL UTERİN FİBROİD MODELİNDE ULİPRİSTAL ASETAT VE
VİTAMİN D3 SİNERJİSTİK ETKİSİ**

Nagwa Bugumaa Abubaker ALEMARI

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nagwa Bugumaa Abubaker ALEMARI

07/02/2023

DENEYSSEL UTERİN FİBROİD MODELİNDE ULİPRİSTAL ASETAT VE VİTAMİN D3 SİNERJİSTİK ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Nagwa Bugumaa Abubaker ALEMARI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2023

ÖZET

Uterin fibroidleri, üreme çağındaki kadınlarda %50-%70 prevalansa sahip olan yaygın jinekolojik iyi huylu tümörlerdir. Yıllardır semptomatik fibroidlerin tedavisi cerrahi olarak yapılmaktadır. Ancak, uterin fibroidlerinin etiolojisinin anlaşılması nedeniyle, son yıllarda bu tümörlerin tedavisinde de gelişmeler olmuştur. Bu çalışma, Ulipristal Asetat (UPA) ve D3 vitamininin uterin fibroidlerin histolojik özellikleri üzerindeki sinerjik etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Bu amaca ulaşmak için, ortalama vücut ağırlığı 180-200 g olan 47 adet gebe olmayan dişi Wistar albino rat rastgele seçimle 8 gruba ayrıldı; Normal kontrol grubu, D3 vitamini grubu, UPA grubu, uterin fibroid model grubu, D3 vitamini tedavi grubu, UPA tedavi grubu, D3 vitamini+UPA tedavi grubu ve sham grup. Bu çalışmada, gruplar arasındaki kollagen içerik farklılıklarını değerlendirmek için Masson trikrom boyaması; Gruplar arasındaki serumdaki MMP-9 ve TIMP-1 içeriğini değerlendirmek için ELISA yöntemi, gruplar arasında düz kas hücre dağılımı, fibrosis, proliferasyon ve anti-apoptik etkileri değerlendirmek α -SMA, TGF- β 3, PCNA ve Bcl-2 antikoları ile immünohistokimyasal teknikler kullanılmıştır. Tüm veriler değerlendirildiğinde özellikle proliferasyonun baskılanması açısından D3 vitamini etkin bir tedavi olarak ortaya çıksa da tüm belirteçler için sinerjistik etkide UPA baskın özellik göstermiş ve tedavide etkin olduğu gösterilmiştir. Kombine kullanımda, tek başına UPA veya D3 vitamininden histopatolojik değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirdiğini, kollagen birikimini azalttığını, hücresel proliferasyonu azalttığını, apoptosisi indüklediğini ve fibrozis azalttığını bulundu. Bu, D3 vitamini ve UPA'nın, özellikle D3 vitamini eksikliği olan uterin fibroidleri hasta olan kadınlar için semptomatik uterin fibroidlerinin tedavisinde birlikte kullanılabileceği anlamına gelir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Uterin fibroidleri, UPA, D3 vitamini, İlaç, Histopatolojik özellikler
Sayfa Adedi : 88
Danışman : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

THE SYNERGISTIC EFFECT OF ULIPRISTAL ACETATE AND VITAMIN D3 ON
THE EXPERIMENTAL MODEL OF UTERINE FIBROIDS

(Ph. D. Thesis)

Nagwa Bugumaa Abubaker ALEMARI

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2023

ABSTRACT

Uterine fibroids represent the most common gynecological benign tumors, with a 50%-70% prevalence among reproductive-age females. For decades, the management of symptomatic fibroids had to be surgical. However, because of advances in understanding the etiology of uterine fibroids, there has been a noticeable improvement in the treatment of these tumors in recent years. The present study aimed to investigate the synergistic effect of Ulipristal Acetate (UPA) and vitamin D3 on the histological characteristics of uterine fibroids. In order to reach this purpose, 47 non-pregnant female Wistar albino rats with an average body weight of 180-200g have been randomly divided into 8 groups as follows: Normal control group, vitamin D3 group, UPA group, uterine fibroid model group, vitamin D3 treatment group, UPA treatment group, vitamin D3+UPA treatment group, and sham group. In this study, Masson trichrome staining was used to evaluate the collagen content differences between the groups; ELISA method was used to evaluate the serum content of MMP-9 and TIMP-1 between the groups; Immunohistochemical techniques with α -SMA, TGF- β 3, PCNA, and Bcl-2 antibodies were used to evaluate smooth muscle cell distribution, fibrosis, proliferation, and anti-apoptotic effects between the groups. When all the data were evaluated, although vitamin D3 emerged as an effective treatment, especially in terms of suppression of proliferation, UPA showed the predominant feature in the synergistic effect for all markers and was shown to be effective in the treatment. It was found that the combined use significantly improves histopathological changes, reduces collagen deposition, reduces cellular proliferation, induces apoptosis, and reduces fibrosis better than UPA or vitamin D3 alone. This means that vitamin D3 and UPA can be used together in the treatment of symptomatic uterine fibroids, especially for women who are complaining of uterine fibroids and have vitamin D3 deficiency.

Science Code : 1033

Key Words : Uterine fibroids, UPA, Vitamin D3, Treatment, Histopathological properties

Page Number : 88

Supervisor : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana yol gösteren, emeği olan, desteğini esirgemeyen, hoşgörüsu, sabrı ve tecrübesi ile yanımda olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOğLU'na; doktora eğitimim boyunca bilimsel birikimleri için Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a, sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROğLU'na; sayın Doç.Dr. Merve SEYMEN'e sayın Dr. Öđ. Üye. Zeynep YIğMAN'a, sayın Dr. Öđ. Üye. Duygu DAYANIR'a; sayın Dr. Öđ. Üye. Esra ÖZKOÇER'e,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tüm tecrübesinden de yararlandığım değerli araştırma görevlisi arkadaşım Gökçe Nur ARIK'a, Dr. Öđ. Üye. Damla Gül FINDIK'a , araştırma görevlisi Asiye Aslı EMNİYET SERT'e ve tüm Histoloji ve Embriyoloji bölümündeki araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeli Sayın Cengiz ÇATAL'a,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana güç veren, ve bana bu yolda gösterdikleri destek ve dualarından dolayı her şeyden çok değerli olan anneme, babama, ve kardeşlarıme sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Uterus Embriyolojisi	5
2.2. Uterus Anatomisi	6
2.2.1. Uterusun yapısı ve yeri.....	6
2.2.2. Uterusun bağları.....	7
2.2.3. Uterusun kan damarları	8
2.2.4. Uterusun lenfatik drenajı.....	8
2.2.5. Uterusun sinir beslemesi	9
2.3. Uterusun Histolojisi	9
2.3.1. Menstruel siklus sırasında endometriyumda olaylanan değişiklikler	11
2.4. Uterin Fibroidlerin Tarihçesi, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	12
2.5. Uterus Fibroidlerinin Histolojik Özellikleri ve Etkin Olan Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri, Sitokin ve Büyüme Faktörleri.....	14
2.6. Steroid Hormonlarının Uterin Fibroid Patogenezindeki Rolü	17
2.7. Uterin Fibroidlerinin Patofizyolojisi	20
2.7.1. Uterin fibroidleri ve infertilite.....	20

	Sayfa
2.7.2. Uterin fibroidleri ve implantasyonu	21
2.7.3. Utrin fibroidleri ve obstetrik sonuçlar	21
2.8. Leiomyomların Tedavisinde Ulipristal Asetat ve D3 Vitamininin Rolü	22
2.8.1. Uterin fibroidlerin tedavisinde UPA'nın etki mekanizması	23
2.8.2. D3 vitamini ve uterin fibroid ilişkisi	24
2.8.3. Miyom tedavisinde D3 vitamininin etki mekanizması	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	29
3.1.1. İlaç ve çözücüler	29
3.1.2. Antikorlar ve kitler	29
3.1.3. Diğer kimyasal malzemeler	30
3.2. Deney Hayvanların Gruplandırma ve Özellikleri	31
3.3. Doku Örneklerinin Alınması	32
3.4. Işık Mikroskopik İncelemeler	32
3.4.1. Masson trichrome boyama yöntemi	32
3.4.2. İmmünohistokimyasal yöntem	33
3.5. MMP-9 ve TIMP-1 Enzime Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ...	35
3.6. İstatistiksel Analizler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Uterusun Makroskopik Değişiklikleri	37
4.2. Uterus Organ Katsayısı (Uterus organ Coefficient)	37
4.3. ELISA Bulguları	39
4.3.1. Serum MMP-9 bulguları	39
4.3.2. Serum TIMP-1 bulguları	40
4.4. Masson's Trikrom Boyaması Histopatolojik Bulguları	41
4.4.1. Kontrol grubu	41

	Sayfa
4.4.2. D3 vitamini grubu	42
4.4.3. UPA grubu	43
4.4.4. Fibroid model grubu.....	44
4.4.5. Fibroid modeli + D3 vitamini tedavi grubu	45
4.4.6. Fibroid modeli +UPA tedavi grubu	46
4.4.7. Fibroid modeli UPA+D3 vitamini tedavi grubu	47
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	49
4.5.1. Immunohistokimyasal bulguların değerlendirilmesi	49
4.5.2. α -SMA bulgular	49
4.5.3. TGF- β 3 bulguları	51
4.5.4. PCNA bulgular.....	53
4.5.5. Bcl-2 bulguları	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ	69
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	83
EK-1. Etik Kurulu Onayı	84
EK-2. Deney Hayvan Katılım Sertifikası	86
ÖZGEÇMİŞ	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. İlaç ve çözücüler	29
Çizelge 3.2. Antikorlar ve kitler	30
Çizelge 3.3. Kimyasal malzemeler	30

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. A. Uterus tüpünün ve uterusun anatomik kısımları.....	7
Şekil 2.2. Fibroblastların TGF- β ile aktivasyonu	16
Şekil 2.3. Uterine fibroid patolojisinde progesteron sinyal yolları.....	19
Şekil 2.4. Ulipristal asetatın kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.5. Uterin fibroidlerin ulipristal asetat (UPA) moleküler yanıtı	24
Şekil 2.6. D vitamininin başlıca formları.....	25
Şekil 2.7. Uterin leiomyomada D3 vitamini sinyalinin şematik sunumu	28
Şekil 4.1. Gruplara göre organ katsayısı (Coefficienty) değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları	38
Şekil 4.2. Gruplara göre MMP-9 değerlerine sütun grafiği ve karşılaştırma sonuçları..	40
Şekil 4.3. Gruplara göre TIMP-1 değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları ...	41
Şekil 4.4. Gruplara göre α -SMA değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları....	51
Şekil 4.5. Gruplara göre TGF- β 3 değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları ...	53
Şekil 4.6. Gruplara göre PCNA değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları	55
Şekil 4.7. Gruplara göre Bcl-2 değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları	57

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Deney gruplarına ait uterusların makroskopik görüntüleri	37
Resim 4.2. NK grubuna ait Masson Trikrom boyaması	42
Resim 4.3. D3 grubuna ait Masson Trikrom boyaması	43
Resim 4.4. UPA grubuna ait Masson's Trikrom boyaması	44
Resim 4.5. UFM grubuna ait Masson's Trikrom boyaması	45
Resim 4.6. D3T grubuna ait Masson Trikrom boyaması.....	46
Resim 4.7. UPAT grubuna ait Masson Trikrom boyaması	47
Resim 4.8. D3+UPAT grubuna ait Masson Trikrom boyaması	48
Resim 4.9. Tüm gruplara ait uterus dokularında α -SMA immün boyaması.....	50
Resim 4.10. Tüm gruplara ait uterus dokularında TGF- β 3 immün boyaması.....	52
Resim 4.11. Tüm gruplara ait uterus dokularında PCNA immün boyaması	54
Resim 4.12. Tüm gruplara ait uterus dokularında Bcl-2 immün boyaması.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
g	Gram
Kg	Kilogram
mg	Milligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
°C	Santigrat Derece
PH	Power of Hydrogen
α	Alfa
β	Beta
Kısaltmalar	Açıklama
17β-HSD1	17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BMI	Body-Mass Index (Vücut Kitle İndeksi)
CDK1	Siklin Bağımlı Kinaz 1 (Cyclin-Dependent Kinase 1)
CYP24A1	Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1
CYP2R1	Cytochrome P450 2R1
DBP	Vitamin D-Binding Protein
DHCR7	7-Dehydrocholesterol Reductase

Kısaltmalar	Açıklama
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ERα	Estrogen Receptor- α
ERβ	Estrogen Receptor- β
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
GC	Group-Specific Component
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
HMGA2	High-Mobility Group AT-Hook 2
HPF	High-Power Field
IκBα	Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor α
L1	Lumbar Vertebrae 1
L2	Lumbar Vertebrae 2
LH	Luteinizing Hormone
LM	Leiomyoma
MED12	Mediator Complex Subunit 12
MMP-9	matriks Metalloproteinaz-9
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PR-A	Progesterone receptor-A
PR-B	Progesterone Receptor-B
S2	Sacral Vertebrae 2
S4	Sacral Vertebrae 4
T10	Thoracic Vertebrae 10
T12	Thoracic Vertebrae 12
TAF	Tumor-Associated Fibroblasts
TGF-β3	Transforme Edici Büyüme Faktör- β 3
TIMP-1	Doğal Doku İnhibitör-1
TNFα	Tumor Necrosis Factor- α
UF	Uterin Fibroid
UVB	Ultraviolet B

Kısaltmalar**Açıklama****VDR**

Vitamin D3 Receptors

 α -SMA α -Düz Kas Aktin
(α -Smooth Muscle Actin)

1. GİRİŞ

Uterin fibroidler (=UF, miyomlar, fibromiyomlar, fibromalar veya leiomyomlar olarak da ifade edilmektedir), doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen benign pelvik tümörlerdir [1]. Klinik olarak 30 yaşın üzerindeki kadınların %20-30'unda, 40 yaşın üzerindeki %40'ından fazlasında yükseldiği ve daha sonra menopoz sırasında gerilediği varsayılmaktadır [2]. 30 yaşın altındaki kadınlar için görülmesi nadirdir, ancak imkânsız değildir [1]. Dahası, histerektomi örneklerinin yaklaşık %69-77'sinde Leiomyoma görülür [2]. Malignite oranı (leiomyosarkom) 0.64/100 000 kadın / yıldır ve 40 yaşın altındaki kadınlarda çok nadirdir [3].

Daha önceki çalışmalar uterin fibroid gelişiminde östrojenin rolüne odaklanırken, progesteronun önemli rolü ancak yakın zamanda tanımlanmıştır. Progesteron, UF hücrelerinin mitotik aktivitesini artırır [4]. Progesteron fizyolojik etkilerini reseptörleri olan PRA ve PRB ile gösterir. Her iki PR izoformunun da miyometriyum ve UF'de varlığı gösterilmiştir. Bununla birlikte UF'de PR ekspresyonu, komşu miyometriyumdan daha yüksektir ve progesteronun hücre proliferasyonu ve ECM birikimi yoluyla tümör büyümesinde kritik rolünü gösterir [5]. Progesteronun EGF, TGF- β 3, PCNA ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonunu artırarak UF büyümesini ve sağ kalımını etkilediği bildirilmiştir [6]. Bunun yanında egzersiz, stres, sigara kullanımı, diyet, obezite, kafein ve alkol tüketimi, UF gelişimi ve büyümesinde rol oynayan sinyal yollarını ve moleküler mekanizmaları etkiliyor gibi görünmektedir [7].

UF'lerin %50 ile %65'i asemptomatiktir. Semptomların varlığı ve şiddeti, fibroidlerin büyüklüğüne, lokalizasyonuna ve sayısına bağlıdır, ancak büyüklük tek başına semptomları belirlemez. UF ilişkili semptomlar, hafif ile şiddetli arasında değişir. Ağır menstrasyon kanaması ve pelvik basınç en sık görülen semptomlardır ve yaşam kalitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olabilir. UF kaynaklı kan kaybı kronik demir eksikliği anemisi, baş dönmesi, halsizlik ve yorgunluğa neden olabilir. Hastalar ayrıca pelvik ağrı, kabızlık, idrar sıklığı ve hatta idrar retansiyonundan şikâyet edebilirler. Ayrıca, lokalizasyonuna göre fibroidler implantasyonu, plasentasyonu ve devam eden gebeliği etkileyebilir. Bu nedenle, UF infertilite, spontan aborsiyon, prematüre doğum ve fetal malpresyonun bir nedeni olabilir [3,8,9].

UF yönetimi semptomlara, fibroidin tipine ve büyüklüğüne, hastanın yaşına ve doğurganlığı koruma arzusuna bağlıdır. Bekleme tedavisi, cerrahi tedavi ve ilaç tedavisi olmak üzere

seçenekler bulunmaktadır. Çoğu UF vakasının tedaviye gereksinimi yoktur ve bekleme tedavisi uygundur. Büyümeyi izlemek için hekim, 6 ayda bir aktif olarak büyüyen fibroidleri olan hastayı takip etmelidir [9]. Öte yandan, semptomatik UF'ler, cerrahi ve ilaç uygulamasının kombinasyonu ile tedavi edilebilir.

Cerrahi tedavi yöntemleri sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Bunlardan histerektomi [UF'lerle birlikte uterusun da alınması], uzun yıllar boyunca tercih edilen ve halen en sık kullanılan tedavi yöntemidir. Histerektomi kesin bir işlemdir ve fibroid nüksü riski olmadan menstruasyonun tamamen sona ermesini garanti eder. Bununla birlikte, önemli morbidite, uzun hastaneye yatış ve uzun bir iyileşme süresi göz önünde bulundurulmalıdır. Histerektomi, doğurganlığı korumak istemeyen semptomatik fibroidleri olan kadınlar için endikedir [3,9,10]. Diğer bir cerrahi yöntem olan Miyomektomi [sadece UF'lerin alınması] uterusunu korumak isteyen kadınlar için bir alternatiftir. Ancak miyomektominin; miyom %20.3–22.9 olasılıkla nüks olması, ağrı ve infertiliteye neden olabilecek yapışıklıklar dezavantajlarını oluşturmaktadır [9-11].

UF tedavisinde cerrahiyi önlemeyi ve/veya en aza indirmeyi, amaçlayan yöntem ilaç tedavisidir. İlaç tedavisinin temel amacı, tümör hacmini azaltmak ve UF'lerin semptomlarını gidermektir [6]. Birden fazla tıbbi tedavi prosedürü uygulanmaktadır: Non-steroid anti-enflamatuvar ilaçlar ve antifibrinolitikler (traneksamik asit) gibi hormonal olmayan tedaviler [9] ile uzun yıllardır önerilen gonadotropin salgılayan hormon agonistleri (GnRH agonistleri) ve son yıllarda GnRH antagonistleri, aromataz inhibitörleri, progestin preparatları ve seçici progesteron reseptör modülatörleri (SPRM'ler) gibi hormonal tedaviler [3,6]. GnRH agonistleri, GnRH antagonistleri, aromataz inhibitörleri ve SPRM'ler UF'lerin boyutunu küçültür. Ayrıca SPRM'ler ameliyattan kaçınmanın yanı sıra preoperatif yönetim için de etkilidir [3,6,9,10].

Ulipristal asetat (UPA), SPRM ailesi içinde, UF'lerin tıbbi yönetimi için en umut verici ajandır. Seçici progesteron reseptör modülatörü olan UPA'nın fibroid büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir [12,13]. UPA, hücrel proliferasyonun inhibisyonu, apoptosisin indüksiyonu ve ekstrasellüler matriks (ECM) birikimini azaltmak yoluyla fibroid hacmini küçültür [14–16]. Yapılan çalışmalarda UPA'nın, PCNA ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak UF hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği buna karşın apoptosisin indüklediği gösterilmiştir [17]. Ayrıca UPA tedavisinin UF hücrelerinde matriks metalloproteinaz (MMP) ekspresyonunu arttırdığı ve TIMP ekspresyonunun azalttığı, bunun sonucunda da

ECM'de kollagen birikimini engelleyerek fibrozisi yok ettiği bildirilmiştir [18]. UPA; TGF- β 3'ün serum ve tümör dokusu konsantrasyonunu düşürerek UF dokusunda hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını da azaltır [19].

Yapılan literatür incelemesinde D3 vitamininin kemik metabolizmasına olan etkileri yanında UF ile de ilişkili olduğuna dair yapılan çalışmalara rastlanmıştır; Bu çalışmalar D3 vitamini eksikliğinin UF için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir [20–23].

UF'leri olan kadınlarda serum D3 vitamini düzeylerinin genel popülasyona göre anlamlı derecede düşük olduğu ve D3 vitamini eksikliğinin fibroid büyümesi ve gelişimi için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir [24,25]. Klinik bir çalışma; UF'li kadınlarda D3 vitamini takviyesinin fibroidlerin büyümesini stabilize ettiğini ve ilgili semptomların başlamasını önlediğini göstermiştir [26]. Bir başka randomize klinik çalışma, 12 hafta boyunca D3 vitamini tüketiminin UF büyümesini engelleyebileceğini ortaya koymuştur. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar; bu yöntemin girişimsel bir tedavi olarak kullanılmasının yararlı olabileceğini, ancak uzun vadeli etkilerinin belirlenmesi gerektiğini vurgulamışlardır [27]. 2019 yılında yayımlanan ve insan UF hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmada, D3 vitamininin UPA'nın anti-fibroid etkilerini arttırdığı bildirilmiştir [28].

Tüm literatür bilgilerinden yola çıkarak bu çalışmada deneysel uterin fibroid oluşturulan ratlarda D3 vitamini ve Ulipristal asetatın ayrı ayrı ve sinerjistik etkilerinin fibrotik, proliferatif ve apoptotik yönlerden, immünohistokimya ve ELİSA yöntemleri kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus Embriyolojisi

İkinci haftanın sonunda, embriyo epiblast ve hipoblast adı verilen iki düz hücre katmanından oluşur. Üçüncü hafta başladığında, embriyo gastrulasyon dönemine girer ve epiblasttan üç embriyonik germ tabakası (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşur. Gelişimin üçüncü ile sekizinci haftaları arasında embriyonik dönem veya organogenez dönemi olaylanır ve bu süreçte üç germ tabakası vücudun doku ve organlarının taslaklarına farklanır [29,30]. Mezoderm germ tabakasının bir bölümü olan ara mezoderm (intermedier mezoderm) esas olarak genitoüriner sistemin (gonadlar, genital kanallar ve böbrekler) kökenini oluşturur.

Hem erkek hem de dişi embriyolarda genital sistemin gelişiminin başlangıcı primitif üriner organlarla ortaktır. Ara mezoderm, intraembriyonik kölomun dorsal duvarında iki taraflı bir kabarıklık oluşturur. Ürogenital kabarıklık olarak adlandırılan bu yapının medial bölgesi genital kabarıklık olarak isimlendirilir ve bu bölge ileride erkekte testis, dişide ovaryumlara farklanır [31]. Gonadların gelişiminde germ hücreleri belirleyicidir. Gelişimin ilk 6 haftasında erkek ve dişide gonadlar benzer morfolojik özelliktedir ve bu evre “farklanmamış evre” olarak isimlendirilir. 6. Haftada germ hücrelerinin gonadlara ulaşması ile birlikte, germ hücrelerinin sahip olduğu cinsiyet kromozomuna göre gonadlar testis ya da ovaryum yönünde farklanır. Germ hücrelerinin sahip olduğu cinsiyet kromozomu bir yandan gonadların dişi ya da erkek yönünde farklanmasını sağlarken, aynı zamanda diğer iç ve dış genital organların da kaderini belirler [29].

Farklanmamış evrede, hem erkek hem de dişi embriyonda iki çift genital kanalı vardır: mezonefrik (wolffian) kanallar ve paramesonefrik (müllerian) kanallar. Paramesonefrik kanallar uterus, tuba uterina ve vaginanın bir bölümüne farklanır [30,32].

Gebeliğin 44. ve 48. günleri arasında paramesonefrik kanallar, ürogenital kabarıklığın anterolateral yüzeyinde kölom epitelinin embriyo boyuna invaginasyonu ile oluşur [29,32].

Paramezonefrik kanalların kranial uçları huni benzeri bir yapıya sahiptir ve periton boşluğuna açılır. Kaudal olarak paramesonefrik kanallar önce mezonefrik kanallara koşut uzanır, daha sonra mezonefrik kanalları çaprazlayarak median hatta uzanır. Bu düzlemde,

karşı taraftan gelen paramesonefrik kanal ile birbirine yaklaşır sonra kaynaşarak “Y” harfi şeklinde bir uterovaginal primordiyum oluşturur. Kaynaşmış kanalların kaudal ucu, ürogenital sinüsün dorsal duvarına farklanır ve burada küçük bir şişlik, sinüs tüberkülünü oluşturur [30].

Paramesonefrik kanallar kadın genital sisteminin büyük çoğunluğunu oluşturur; tuba uterinalar, paramesonefrik kanalların kaynaşmamış kranial kısımlarından farklanırken, uterovaginal primordium ise uterus ve vaginanın kranial bölümüne farklanır.

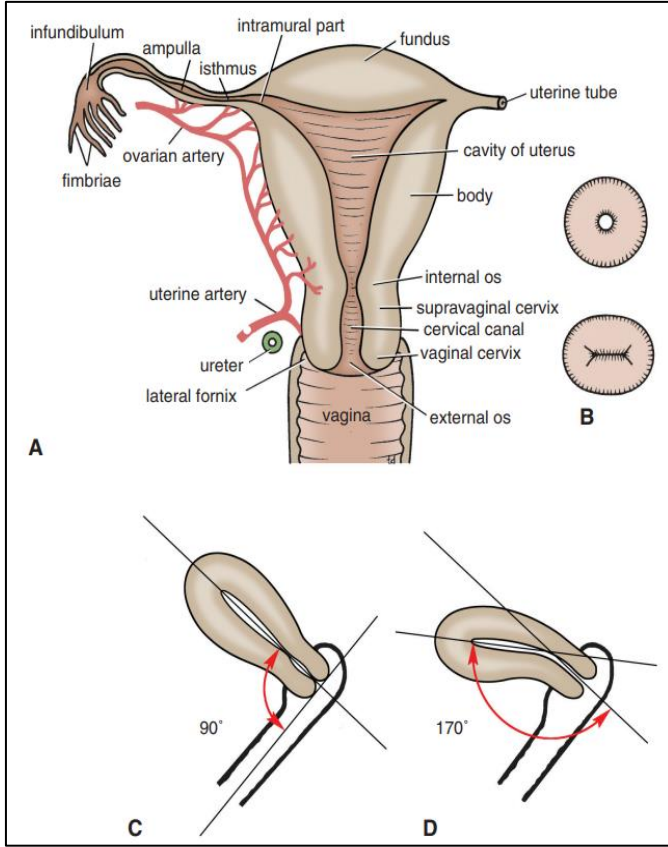
Uterusun endometriyum ve miyometriyum tabakaları splanknik mezoderm kökenlidir. Ayrıca kaynaşmış paramesonefrik kanal ligamentum latum’u oluşturur. Uterus ile ligamentum latum, pelvik boşluğu rektuterin kese ve vezikouterin keseye böler [32].

2.2. Uterus Anatomisi

2.2.1. Uterusun yapısı ve yeri

Uterus, (Womb, Metra) kalın duvarlı, armut biçimli, içi boş bir kas organıdır. Genç nullipar yetişkinde, uterus pelviste yer alır. Korpus mesane üzerinde bulunur, serviks mesane ile rektum arasında yerleşiktir. Yaklaşık 8 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde, 2-3 cm kalınlığındadır. 30-120 g ağırlığındadır ve hamilelikte 1 kg'a ulaşabilir. Uterus; fundus, korpus ve serviks bölümlerinden oluşur (Şekil 2.1-A). Fundus, tuba uterinaların girişinin üstünde, Korpus (Korpus uteri), tuba uterinaların girişinin altında bulunurken Serviks (Serviks uteri), uterusun dar kısmıdır (yaklaşık 2.5 cm uzunluğunda). Bir iç os, servikal kanal ve vaginaya açılan dış os'den oluşur. Nullipar kadınlarda dış os yuvarlak veya oval görünür, paröz kadınlarda ise enine yarıklı bir şekil alır {Şekil 2.1-B}. İsthmus (Isthmus uteri), korpusun daralmış kısmıdır (yaklaşık 1 cm uzunluğunda) [33–35]. Koronal bölümde, uterus boşluğu ters bir üçgen şeklini alır, sagittal kesitte ise dar bir alana benzer [36]. Uterus, serviks ve vaginanın boşlukları iç os (uterus ve serviks) ve dış os (serviks ve vagina) yoluyla birbirine bağlanır [33].

Anterior olarak uterusun gövdesi, uterovezikal kese ve mesanenin üst yüzeyi ile ilişkilidir. Posterior olarak uterusun gövdesi rektuterin kese (Douglas kese) ve içeriği ile komşuluktur. Lateral olarak ise ligamentum latum ve uterin arter ve ven ile komşuluk yapar [33].



Şekil 2.1. A. Uterus tüpünün ve uterusun anatomik kısımları B. Serviksin dış os'si: (yukarıda) nullipar; (aşağıda) paröz C. Uterusun ters çevrilmiş pozisyonu D. Uterusun antevvert ve anteflekslenmiş pozisyonu [33]

Çoğu kadında (80%), uterus gövdesi anterior olarak mesaneye doğru bükülmüştür (antefleksiyon) ve serviks aşağı ve geriye doğru (anteversiyon) yönelmiştir [dış os rektuma doğru işaret eder] {Şekil 2.1-C,D}. Bu pozisyon, intraabdominal basıncı artarsa uterusun vaginadan dışarı çıkmasını önler. Bazı kadınlarda ise (20%) uterus gövdesi posterior olarak rektuma doğru bükülür (retrofleksiyon) ve serviks aşağı ve ileriye doğru (retroversiyon) lokalizedir [dış os mesaneye doğru yönlendirilir] [33,35].

2.2.2. Uterusun bağları

Endopelvik fasya; pelvik boşluğu çevreler, pelvik iç organların kapsülünü yapar, kan damarları ve sinirler etrafında kılıflar oluşturur. Çeşitli yerlerde bu yoğunlaşır ve iç organları pelvik duvara tutunduran bağlar oluşturur. Uterus ile ilgili bağlar şunlardır [36]:

- Ligamentum latum uteri, uterusun kenarlarından pelvisin yan duvarlarına ve tabanına uzanan çift katmanlı mezenterdir. Ovaryumları (mezovaryum), tuba uterinaları (mezosalpinks) ve uterusu (mezometriyum) sarar.
- Ligamentum teres uteri, tuba uterinaların köşesinden anterior olarak lateral pelvik duvara uzanan ve inguinal kanaldan Labia majoraya geçen fibromusküler bir kordondur. Uterusun pozisyonunu stabilize eder.
- Ligamentum cardinale uteri, pelvisin lateral duvarlarından servikse ve vaginanın üst ucuna geçen fibromusküler pelvik fasyadır.
- Ligamentum rectouterinum, bağ dokusu, serviksin kenarlarından sakrumun ortasına kadar üstten ve hafifçe dorsal olarak seyreder.
- Ligamentum pubocervicale, serviksi pubik simfizin arka yüzeyine bağlar.

Ligamentum pubocervicale, Ligamentum cardinale uteri ve Ligamentum rectouterinum, özellikle Ligamentum cardinale uteri, perine membranı, levator ani kasları ve perine cisim ile birlikte pelvik boşlukta uterusun stabilize edilmesinde önemli bir rol oynar [33–35].

2.2.3. Uterusun kan damarları

Uterus, esas olarak internal iliak arterin bir dalı olan uterin arter tarafından beslenir. Uterin arter, üreterin önünden geçer ve iç os seviyesinde servikse ulaşır, daha sonra ligamentum latum uteri'nin iki tabakası arasında uterusun lateral duvarı boyunca yükselir ve son olarak ovaryan arteri ile anastomoz yapar. Seyri sırasında, uterin arter serviks ve vajinaya küçük bir dal verir. Uterus ayrıca ovaryan arterden kan alır. Uterin ven uterin arteri takip eder ve internal iliak vene akar [33].

2.2.4. Uterusun lenfatik drenajı

Uterusun fundusundan gelen lenf damarları ovaryan damarları boyunca lomber lenf bezlerine geçer, ancak bu damarların bazıları uterusun ligamentum teres uteri boyunca yüzeysel inguinal lenf bezlerine geçer. Uterus gövdesinin çoğundan lenfatik damarlar ligamentum latum uterin içinden dış iliak lenf bezlerine ulaşır. Serviksten gelen damarlar ise uterus damarları boyunca ligamentum cardinale uterin içinden geçerek iç iliak lenf bezlerine akar, ayrıca ligamentum rectouterinum boyunca geçer ve sakral lenf bezlerine açılır [34].

2.2.5. Uterusun sinir beslemesi

Uterus, Plexus hipogastrik inferior'dan sempatik ve parasempatik sinirler (pelvik plexus olarak da bilinir) tarafından innerve edilir. Plexus hipogastrik inferior, rektumun, mesane tabanının ve vaginanın her iki tarafında yer alır. Her plexus, bir hipogastrik sinirin (Plexus hipogastrikus superior'dan) ve pelvik splanchnik sinirin birleşmesinden oluşur. Dolaşım esnasında pelvik iç organları innerve eden rektal plexusa, uterovaginal plexusa, ve vezikal plexusa köken verirler. Plexus hipogastrik inferior postganglionik sempatik lifler, preganglionik ve postganglionik parasempatik lifler ve viseral afferent lifler içerir. Parasempatik lifler pelvik plexusa pelvik splanchnik sinirlerden (S2'den S4'e) girer, uterus gevşemesi ve vazodilatasyonunu sağlar. Sempatik lifler, hipogastrik sinirlerden ve sakral splanchnik sinirlerden (T10'dan L2'ye) Plexus hipogastrik inferiora girer; uterus kasılması ve vazokonstriksiyonuna neden olur. Viseral afferent lifler ise sempatik lifler (L1-L2 seviyelerine veya T11-T12 seviyelerine) ve parasempatik lifler (S2-S4 seviyelerine) yoluyla ağrı ve diğer hisleri taşır [33,35,36].

2.3. Uterusun Histolojisi

Histolojik olarak uterus duvarı, üç katmandan oluşur. Bu katmanlar dışarıdan içeriye doğru aşağıdaki gibi düzenlenmiştir [37,38]:

- Perimetrium, uterusun bağları ile devam eden bağ dokusu tabakasıdır, Diğer organların tunika serozasına karşılık gelir. Mesaneye komşu olan duvarı adventisyadır.
- Miyometriyum, kalın yüksek vaskülarize düz kas tabakasıdır.
- Endometriyum, uterusun mukozasıdır.

Perimetrium uterusun ön yüzü adventisya ile kaplıdır; böylece, bu alan retroperitonealdir. Fundus ve uterus gövdesinin arka yüzeyi ise mezotel ve ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından oluşan seroza ile kaplıdır. Bu nedenle bu alan intraperitonealdir [37,39].

Miyometriyum uterus duvarının en kalın tabakasıdır. Birbirinden kesin sınırlar ile ayırd edilemeyen üç düz kas katmandan oluşur. Dış ve iç tabakalar uzunlamasına düzenlenmiş düz kas liflerinden oluşur. Yüksek vaskülarize orta tabaka dairesel olarak düzenlenmiş düz kas demetlerinden oluşur ve çok sayıda büyük kan damarı ve lenfatik içerir, bu nedenle stratum vaskülare olarak adlandırılır [37,39]. Serviks yakınında düz kas dokusu yerini fibröz bağ

dokusuna bırakır. Servikste miyometriyum, elastik lifler ve dağınık düz kas hücresi içeren yoğun, düzensiz kollagenöz bağ dokusundan oluşur [39].

Miyometriyal kas hücrelerinin sayısı ve büyüklüğü östrojen seviyesine bağlı olarak değişkenlik gösterir [39]. Gebe olmayan kadınlarda miyometriyal düz kas hücreleri yaklaşık 50 µm uzunluğundadır [37]. Gebelik sırasında ise, artan östrojen seviyesine bağlı olarak uterus hacimce büyük bir genişlemeye uğrar. Öncelikle mevcut düz kas hücreleri büyük ölçüde büyür (hipertrofi) ve 500 µm uzunluğa veya daha fazlasına ulaşabilir. İkincil olarak, mevcut kas liflerinin bölünmesi ve farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile yeni düz kas lifleri (hiperplazi) oluşur [37,40].

Gebelik sırasında uterus olağan dışı genişlemesine karşın, miyometriyal düz kas hücreleri relaksinin etkisi nedeniyle büzülmez, doğum sırasında ise miyometriyal kasılma, uyarıcı bir faktör olan oksitosinin kontrolü altındadır [40]. Fötüsün sürekli büyümesi nedeniyle uterus duvarı çok ince hale gelir. Doğumdan sonra miyometriyal düz kas hücreleri küçülür ve bazıları apoptosise uğrar. Gereksiz kollagen enzimatik olarak yok edilir ve uterus neredeyse orijinal boyutuna geri döner, ancak uterus duvarı gebelik öncesine göre daha kalın ve uterus boşluğu ise öncekinden daha büyük kalır [37].

Endometriyum uterusun mukozal katmanıdır, tek katlı prizmatik epitel ve lamina propria'dan oluşur. Epitel hem silyasız salgı yapan Peg hücrelerine hem de silyalı hücrelere sahiptir. Lamina propria, tip III kollagen lifleri, bol miktarda fibroblast, makrofajlar ve lökositleri içerir. Lamina propriada basit dallı tübüler bezler olan uterus bezleri bulunur (Gl uterinae). Bu bezler, ovaryum hormonlarına göre siklik değişiklikler gösterir. Bezlerde silyalı hücreler bulunmaz [38,39].

İşlevsel olarak, endometriyum iki katmandan oluşur:

- Stratum funksiyonale kalın, yüzeysel bir tabakadır (1 - 7 mm kalınlık), bu tabaka menstruasyon sırasında dökülür [39].
- Stratum bazal (yaklaşık 1 mm kalınlıkta), miyometriyuma bitişik tabakadır. Esas olarak yüksek oranda hücresel lamina propria'dan oluşur ve uterus bezlerinin bazal bölümlerini içerir. Stratum bazale menstruasyon evresinden sonra stratum fonksiyonelinin yenilenmesinden sorumludur [38,39].

Endometriyumu besleyen kan damarları miyometriyumun orta tabakasından kaynaklanır. Uterin arter, stratum vaskülerde anastomoz yapan 6 ile 10 Arkuat artere açılır. Arkuat arterler, Stratum bazale'ye giren radyal arterlere açılır. Küçük bir dal sadece bu tabakayı besleyen küçük düz arterlere dallanır. Radyal arterin ana dalı ise endometriyuma doğru ilerler ve uzun, progesterona duyarlı spiral arterleri oluşturur. Spiral arterler daha sonra Stratum funksiyonale'nin bezlerini ve bağ dokusunu besleyen zengin bir kapiller ağ yapısı oluşturur [37–39].

2.3.1. Menstruel siklus sırasında endometriyumda olaylanan değişiklikler

Menstruel siklus, endometriyumun fonksiyonel tabakasında meydana gelen bir dizi değişimleri içerir. Stratum bazalede herhangi bir değişim olaylanmaz. Menstruel siklus, ovaryum steroidlerinin salgılanmasını düzenleyen hipofiz bezi tarafından üretilen gonadotropinlerin kontrolü altındadır. Normal mestruasyon döngüsü kanamanın başladığı günden itibaren 28 günlük bir döngüdür [37]. Döngü sırasında endometriyum birbirini izleyen üç fazdan geçer [37,39,40]:

Menstruel faz

Menstruel siklusun başlangıç fazıdır. Ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteronun azalmasından kaynaklanır. Bu hormonal düşüşün bir sonucu olarak, stratum fonksiyonle'nin kanlanması değişiklikler meydana gelir. Kanama başlamadan 1-2 gün önce, Spiral arterlerin duvarlarında birkaç saat süren periyodik kasılmalar başlar ve bu durum stratum funksiyonele'nin hipoksi ve aralıklı iskemisine yol açar [37]. (Bazı kaynaklar bu evreye iskemik veya premenstruel faz adını verir [40]). Bu sürenin sonunda, spiral arterler kalıcı olarak sıkışır. Bezler, fonksiyonel tabakaya giden oksijenin azalması nedeniyle salgılanmayı durdurur ve kapanır [39]. Kısa bir süre sonra spiral arterler tekrar genişler, ancak arteriyel kasılma sürelerinin devam etmesi kısa süreli kan akışı sebebiyle, spiral arterlerin yüzey epitelinin bozulması ve son olarak kopmaları meydana gelir. Böylece rüptüre damarlardan gelen bozulmuş kan, dejenere stratum funksiyonale ile birlikte menstruasyon kanaması olarak vagina yoluyla atılır. Kanamanın başladığı gün menstruasyonun 1. günü kabul edilir [39]. Dökülme işlemi stratum bazaleye ulaşana kadar sürer. Bu faz 3 ile 4 gün devam eder ve stratum funksiyonale ile birlikte yaklaşık 35 ml ile 50 ml kan kaybedilir [37].

Stratum bazale, düz arterlerinden kan akışının sürekliliği nedeniyle canlı kalır. Stratum bazalede bulunan bezlerinin taban kısımlarında bulunan hücreler prolifer olmaya başlar, bir yandan da yeni hücreler uterus yüzeyine göç eder ve lamina proprianın dökülen bağ dokusu ile epitelizasyona başlar. Böylece proliferatif faza girilmiş olur [39].

Proliferatif faz (östrojenik faz)

Folikülün olgunlaşması ile eşzamanlı olarak ortaya çıkar ve östrojen hormonunun kontrolü altındadır. Yaklaşık 4. veya 5. günde başlar ve 14. güne kadar devam eder [39]. Menstruel faz bittiğinde endometriyum yaklaşık 1 mm kalınlığındadır ve sadece uterus bezlerinin bazal kısımları ve düz arterleri olan stratum bazalden oluşur [37]. Sekonder foliküllerden itibaren sekrete edilen östrojenin etkisi altında, bezlerin bazal bölgesindeki hücreler bezleri yeniler ve dökülen endometriyal yüzeyi kaplamak için göç eder. Stromal hücreler çoğalır, temel madde ve kollagen salgırlar, eş zamanlı olarak spiral arterler uzar, ancak endometriyumun üçte birin üst kısmına ulaşmazlar [37]. Bu aşamada, endometriyum basit prizmatik epitel ile kaplanır ve uterus bezleri tübülerdir, lümenleri dar ve neredeyse boştur [38]. Proliferatif fazın sonunda, endometriyum yaklaşık 3 mm kalınlığındadır, bezler hafif kıvrımlı bir görünüme sahiptir ve epitel hücrelerinin tabanında glikojen birikimleri vardır [37].

Salgılama fazı (progestasyonel faz)

Luteal faz olarak da adlandırılır, ovulasyondan 1-2 gün sonra başlar, yaklaşık 13 gün sürer ve korpus luteum tarafından salgılanan progesteron hormonunun etkisi altındadır [39]. Bu faz sırasında, stromada biriken glikojen nedeniyle, endometriyum ödemli hale gelir ve 5-6 mm kalınlığa ulaşabilir. Bezler büyür, oldukça kıvrımlı ve dallı hale gelir ve salgı ürünleri ile doldukça, lümenleri kese görünümünü alır. Bezler tarafından üretilen salgı ürünleri besin bakımından zengindir ve implantasyon meydana gelirse embriyonik gelişim için önemlidir. Spiral arterler kıvrıntılı olarak endometriyal yüzeye ulaşana değin uzar [37,39].

2.4. Uterin Fibroidlerin Tarihçesi, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Uterin Fibroidler, antik dönemden itibaren bilinmekte olup; İlk olarak Hipokrat tarafından “uterus taşları” olarak adlandırılırken, Galen, M.S ikinci yüzyılda onları “skleromlar” olarak tanımlamıştır. İngiliz Müzesi'nde sergilenen bazı mumyalar üzerinde yapılan

radıyografik incelemelerde de UF olduğu düşünölen kalsifiye pelvik kitlelere rastlanmıştır [41,42].

UFlerin, tıbbi olarak tanımı ilk olarak 1793 yılında Londra'daki St. George Hastanesinden Matthew Baillie tarafından yapılmıştır [7,43]. "Fibroid" terimi Rokitansky (1860) ve Klob (1863) tarafından kullanılmıştır. Alman patolog Virchow ise bu tümörlerin uterus düz kasından kaynaklandığını göstermiş ve klinik olarak ilk "Miyom" terimini kullanmıştır. Miyom endikasyonlarına bağlı olarak ilk laparotomi ise 1809'da Danville'de yapılmıştır [41].

UF insidansında önemli etnik farklılıklar vardır. Epidemiyolojik çalışmalar, UFlerin zencilerde, Kafkas kadınlarından daha yaygın olduğunu göstermiştir. Dahası, Afrikalı-Amerikalı kadınlarda uterus fibroidleri daha erken yaşta teşhis edilir ve Kafkas kadınlarınkinden daha semptomatik ve daha büyüktür [1]. UFlerin aile öyküsü de rol oynayabilir. Birinci derece akrabalarda uterin fibroidler riskinin iki katına çıktığı, monozigotik ikizlerde, ikizlerden birinde UFler ortaya çıkarsa, dizigotik ikizlerin gebeliğinden daha yüksek risk altında oldukları bildirilmiştir [6]. Birçok çalışma tarafından doğrulandığı üzere, gebeliğin koruyucu mekanizması bilinmemekle birlikte parite, UF gelişimi riski ile ters orantılıdır [44].

UF'nin ana etiyolojisi bilinmemektedir, ancak üç yolla ilgili olayların oluşumundan kaynaklandığı düşünölmektedir: 1) Seks steroid hormonları 2) Düzensiz yara iyileşmesi ve 3) Genetik anomaliler. UF büyümesi için hem östrojen hem de progesteron önemlidir [45,46]. Fibroidler genellikle üreme yıllarında ortaya çıkar. UF sahibi kadınlar daha yüksek östrojen, aromataz, progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü- α (ER- α) konsantrasyonlarına sahiptir [46,47]. Progesteron, UF hücrelerinin gelişimine ve çoğalmasına yardımcı olurken, östrojen progesteronun kullanılabilirliğini artırarak progesterona karşı doku duyarlılığını artırır [47]. Bir başka olası teori, tekrarlanan miyometriyal hasar ve onarımın UF oluşumuna yol açabileceğidir. Patogenez, ameliyattan sonra keloidlerin (hipertrofik skarlar) gelişimiyle karşılaştırılabilir bir şekilde yaralanmaya verilen cevaba benzer olabilir [48]. Genetik olarak; UF'lerin yaklaşık %50'sinde kromozom 12'nin trizomisi, kromozom 7'nin uzun kolundaki delesyonlar, 12q15'in rreorganizasyonu ve MED12 ve HMGA2 genlerinde mutasyonlar görölmüştür [49].

2.5. Uterus Fibroidlerinin Histolojik Özellikleri ve Etkin Olan Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri, Sitokin ve Büyüme Faktörleri

Mikroskopik olarak farklı varyantlar gösterebilir: 1)- Birden fazla düzensiz çekirdeğe sahip büyük hücrelerden oluşan bir kokteyl ile karakterize Bizarre çekirdeklere sahip fibroid. 2)- Normal miyometriyuma kıyasla hiperselülerlik gösteren Hücresel fibroid. 3)- Hidropik fibroid, ödemli değişime ve kistik kavite oluşumuna yol açan geniş hidropik değişime sahip tümördür. 4)- Mitotik olarak aktif fibroid, 5-14 mitotik rakam /10 HPF olan ve koagülatif tümör nekrozu veya diffüz orta ile şiddetli nükleer atipi olmayan tümördür. 5)- Apoplektik fibroid, esas olarak progesteron tedavisi gören bir hastada gelişen geniş enfarktüs tipi nekrozlu bir tümörü ifade eder. 6)- Lipoleiomyoma tipik fibroid ve olgunlaşmış adipositlerin karışımıdır. 7)- Epitelioid fibroid, eozinofilik sitoplazmalı çokyüzlü, oval veya yuvarlak hücrelerden oluşur. Bu tümörde koagülatif tümör nekrozu yoktur ve mitotik rakamların sayısı minimaldir. 8)- Miksoid fibroid, tümör hücreleri arasında Alcian blue (+) asidik münin birikimi ile karakterizedir. Bu tümör düzgün sınıra sahiptir ve mitotik rakamlar iki veya daha az / 10 HPF'dir [2,6].

UF'lerin en önemli tanımlayıcı özellikleri ekstrasellüler matris bileşenlerinin aşırı birikmesidir [50]. Normal miyometriyum ile karşılaştırıldığında, UF'lerdeki kollagen lifler daha kısa ve anormal şekilde yapılanmışlardır. Ayrıca UF'ler, normal miyometriyuma göre daha fazla kollagen (Tip I, II, III ve V) bulundurur ve Tip I/III kollagen oranı bozulur [50–52]. Bazı çalışmalar, UF'lerin ECM'sinde baskın kollagenin tip I olduğunu bildirmiştir [53,54]. Kollagen; fibroze ve artmış UF hacmine neden olur, ayrıca düz kas hücrelerinin çoğalmasında da rol oynar [52,53,55]. Aynı zamanda apoptosise karşı dirençlidir ve sonuç olarak, uterus düz kas hücrelerinin düzensiz artan proliferasyonu izlenir [56,57].

UF hücreleri ayrıca, matris metaloproteinazlar (MMP'ler) ve MMP'lerin doku inhibitörleri olan (TIMP'ler) proteolitik enzimleri de eksprese eder. MMP'ler, ECM'nin bozunmasından sorumlu olan çinko - bağımlı endopeptidazlardır [50,58]. Bu enzimler esas olarak fibroblastlar, kondrositler, monositler, nötrofiller ve makrofajlar, ayrıca epidermisteki keratinositler gibi bazı epitel hücreleri ve kanser hücreleri tarafından üretilir [37]. İnsanlarda 24 tip MMP'ler tanımlanmıştır [37,59]. Bunlardan MMP-2 ve MMP-9, ECM moleküllerinde majör kollageni sindiren en önemli proteolitik enzimlerdir. MMP'lerin aktivitesi özellikle metaloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) tarafından inhibe edilebilir ve MMP'lerin

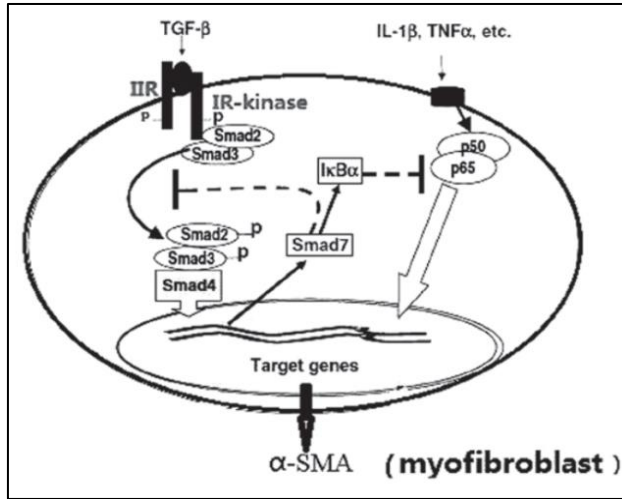
ve TIMP'lerin rolları arasındaki denge, ECM'nin yeniden şekillendirilmesi için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, bazı hastalıklarda MMP ve TIMP'lerin aşırı ekspresyonu, ECM'nin geniş ölçüde bozunmasıyla ilişkilidir [58]. TIMP-1 ve TIMP-2'nin sırasıyla MMP-9 ve MMP-2'yi bağladığı bilinmektedir [60]. Mevcut çalışmalar MMP -1,-2, -3, -9, -11, -14, -16 ve -24'in ekspresyonunun UF'lerde yükseldiğini göstermiştir [50,61,62].

UF hücrelerinde ECM sentezini düzenleyen ve fibrozise katılabilen çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler vardır. Büyüme faktörlerinin önemli bir örneği, dönüştürücü büyüme faktörünü- β 'dir (TGF- β). TGF- β , birçok dokuda hücre döngüsünün ilerlemesinde, proliferasyonda ve hipertrofide inhibitör ve uyarıcı bir rol oynayan üç izoformlu (TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3) bir polipeptittir [37,53]. Hem TGF- β hem de reseptörleri normal miyometriyumda [63] ve UF'lerde [64] eksprese edilmektedir. TGF- β 3 baskın izoformdur ve normal miyometriyuma kıyasla UF dokusunda önemli ölçüde artar. TGF- β 3, normal miyometriyal ve UF hücrelerinde başta kollajen tip I olmak üzere çoğu ECM bileşenlerinin ekspresyonunu arttırırken [50,65], MMP-2 ve MMP-11 sentezini azaltır [66]. Bu sonuçlar, TGF- β 3'ün UF'yi tanımlayan fibrotik sürecin karakterizasyonunda temel rolünü göstermektedir [62]. Lee ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada TGF- β 3 ve TGF- β 1 uygulamasının normal miyometriyuma kıyasla UF'lerde ECM birikimini ve hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür [67].

UF, fibröz ECM'ye ek olarak düz kas hücrelerinin çapraz demetlerinden oluşur. Mikroskopik incelemelerde UF'lerde düz kas hücrelerinin boyca uzadıkları ve eozinofilik sitoplazmaya, düzensiz şekilli çekirdeklere sahip oldukları bildirilmiştir. UF'de, düz kas hücreleri, çevreleyen normal miyometriyuma kıyasla daha sıkı paketlenmiş görünür ve bu UF'ye daha hücrel bir görünüm kazandırır [2]. Submukozal UF'lerin düz kas hücrelerinin (SMC) α -SMA, PCNA, vb proteinlerin işaretlenmesiyle yapılan immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda kontraktıl ve proliferatif fenotip düz kas hücrelerinden oluştuğu belirlenmiştir [68,69].

Miyofibroblastlar, hem fibroblastların hem de düz kas hücrelerinin özelliklerini gösteren modifiye fibroblastlardır. Miyofibroblastlar, ECM'nin sentezi veya bozunması ve çevresindeki dokunun kasılmasıyla bağ dokusu şekillenmesini yeniden düzenleyebilir. α -düz kas aktinin (α -SMA) ekspresyonu, miyofibroblastların kontraktıl fenotipinin ayırt edici bir özelliğidir [38]. Protik ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada UF dokusunda α -SMA

pozitif ve desmin negatif hücreler ve çok miktarda kollagen bulunduğu, bunun da ECM birikiminde miyofibroblastların varlığını ve rolünü gösterdiği bildirilmiştir [70]. Miyofibroblastlar inflamatuvar sinyallerle aktive edilir ve doku homeostazının sağlanmasında önemli rol oynar. Tekrarlanan ovulasyon, menstrüasyon, implantasyon, zararlı uyarılar, hipoksi ve oksidatif stres uterusu kronik inflamatuvar bir durum oluşturabilir. Böyle bir durumda uterus dokusunda yaralanma meydana gelebilir. Sonucunda da, TGF- β ile fibroblast hücreleri aktive edilir, bu hücrelerin bir kısmı da doku onarımı ve homeostazı desteklemek adına miyofibroblastlara farklanır (Şekil. 2.2). Bununla birlikte, kronik inflamasyon sürecinde miyofibroblastlar apoptosise direnç gösterir ve patolojik fibrozise neden olan ECM üretmeye devam eder [50,68].



Şekil 2.2. Fibroblastların TGF- β ile aktivasyonu. TGF- β , TGF- β reseptörüne bağlanır ve Smad2 / 3'ü aktive eder. Aktive olan Smad2 / 3, Smad4 ile bağlanır ve fibrozis için çok önemli olan gen ekspresyonunu düzenlemek adına çekirdeğe aktarılır. Aktive olmuş Smad2 / 3, Smad aktivasyonunu inhibe eden ve I κ B α 'yı aşırı eksprese eden ve böylece inflamatuvar yanıtı baskılayan Smad7'yi de aktive edebilir [68]

Son yapılan çalışmalarda, en yaygın iki UF alt tipi olan MED12- LM ve HMGA2- LM'ların ikisinde de, hücrelerin yaklaşık %90'ının düz kas hücreleri (SMC) ve tümörle ilişkili fibroblast (TAF) olduğu ortaya konmuştur [71].

UF dokusunda hücrelerin proliferasyonu ve apoptosise oranları arasında bir dengesizlik vardır; UF artmış hücresel proliferasyon ve azalmış hücresel ölüm ile karakterizedir [72]. Bazı deneysel ve klinik çalışmalarda, proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) ve Bcl-2 proteinlerinin saptanması, sırasıyla hücre proliferasyonunu ve apoptosise analiz etmede

yardımcı olabileceği bildirilmiştir. PCNA, proliferen hücrelerin çekirdeğinde lokalize bir moleküldür. DNA replikasyonu, onarımı ve hücre döngüsü düzenlemesi gibi çeşitli hücresel işlemler için bir kofaktör görevi görür [73]. Bir çalışmada, normal miyometriyuma karşın UF dokularında PCNA'nın aşırı ekspresyonunu gösterilmiştir [72]. Holdsworth-Carson ve arkadaşları tarafından yapılan daha yeni bir çalışma, büyük fibroidlerin küçüklerden daha fazla PCNA eksprese ettiğini, büyük fibroidlerde aşırı hücre proliferasyonu olduğunu göstermektedir [74]. Apoptosis, yaşlı, hasarlı ve istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırdığı, programlanmış hücre ölümünün aktif bir doğal şeklidir. DNA parçalanması, hücre büzülmesi, mitokondriyal işlev kaybı ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterizedir. Hücrelerde mitokondriyon, hücresel stresin algılanması ve sitokrom c gibi proteinlerin sitoplazmaya bırakılarak apoptosisin başlatılmasından sorumludur. Bu da hücre dejenerasyonundan sorumlu kaspazlar adı verilen bir proteolitik enzim kaskadını aktive eder. Bu olay Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir [37,75].

B hücreli lösemi/lenfoma-2 (Bcl-2), Bcl ailesine ait olan ve antiapoptotik bir faktör olarak hareket ederek apoptosisde merkezi bir rol oynayan bir proteindir. Eski ve yeni çalışmalar, UF'lerde Bcl-2 proteininin normal miyometriyuma karşın aşırı ekspresyonunu ortaya koymuştur ve bu durum Bcl-2'yi UF gelişiminin tanımlanması için moleküler belirteçlerden biri yapar [76,77]. Ayrıca çeşitli çalışmalarda, bir ilacın veya başka bir maddenin UF üzerindeki etkisini veya etkinliğini test etmek için standart olarak hücre proliferasyonu ve apoptosisi kullanılmıştır [13,78,79].

2.6. Steroid Hormonlarının Uterin Fibroid Patogenezindeki Rolü

Steroid hormonlar UF oluşumu ve büyümesinde önemli rol oynar. Bununla birlikte östrojen ve progesteronun UF biyolojisindeki gerçek işlevsel rolü henüz tam olarak anlaşılammıştır. UF'ler klasik olarak östrojen bağımlı tümörler olarak kabul edilmiştir [47]. Nedeni maddeler halinde sıralanacak olursa:

- UF'ler genellikle üreme yıllarında bulunurlar, menopozdan sonra azalırlar [4].
- Postmenopozal kadınlarda kombine hormon tedavisi, menopozal ovaryan durgunluğun etkisinden fibroid büyümesini kurtarabilir [80].
- UF'ler, özellikle erken gebelikte, dolaşımdaki östrojenlerin ve plasental kökenli progesteronun aşırı seviyelerine yanıt olarak büyüeyebilir [81].

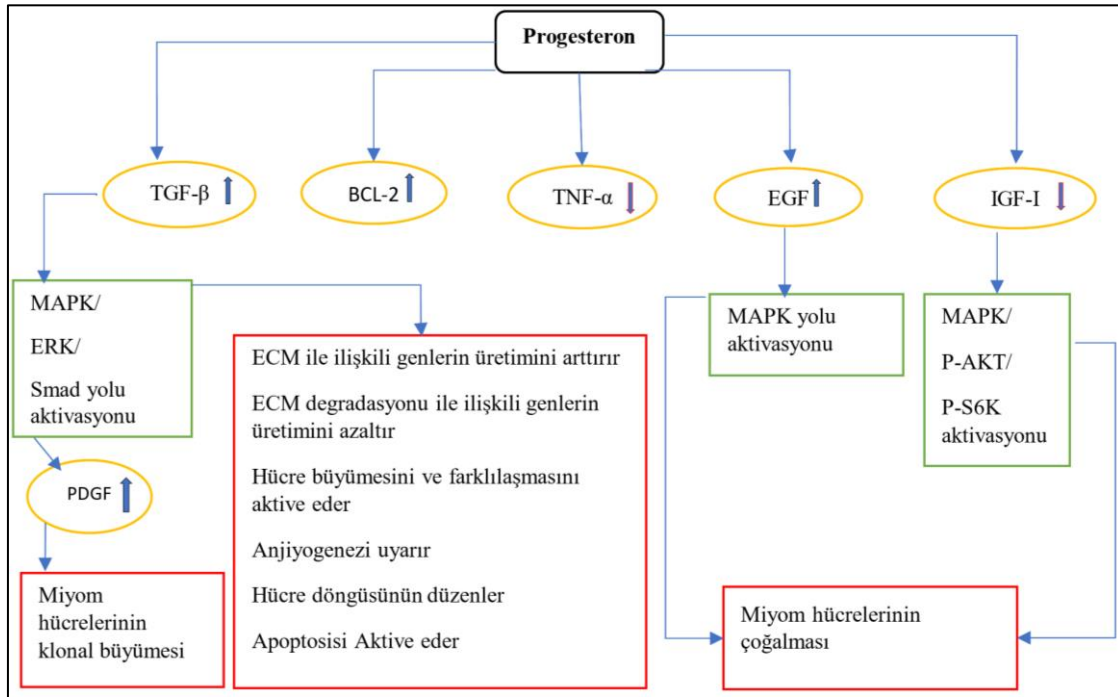
- Kombine kontraseptifler ve sadece progestin kullanımı fibroid küçülmesine yardımcı olur [82].
- Gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) agonisti veya antagonisti, olasılıkla dolaşımdaki östrojen ve progesteron seviyelerini düşürerek UF regresyonunu indükler [83].
- Son zamanlarda klinik uygulamalarda seçici östrojen reseptör modülatörleri ve Mifepriston, asoprisnil ve ulipristal asetat gibi seçici progesteron reseptör modülatörlerinin fibroid büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir [12,13].

Östrojenler, çekirdeğin içinde ve/veya hücre zarında bulunan östrojen reseptörlerine (ER) bağlanarak hedef hücreleri üzerinde çok sayıda etki gösterir; burada ER'lerin yaklaşık %90-95'i hücre çekirdeğinde lokalizedir. Nükleer ER'ler ayrıca ER α ve ER β olmak üzere iki tipe ayrılır. ER α esas olarak uterus ve memede bulunur [6]. UF'lerde normal miyometriyuma karşı artmış ER α ve ER β mRNA ve protein düzeyleri bulunmuştur [50,84,85]. UF'ler östrojene sadece ovaryan steroidogenezi yoluyla değil, aynı zamanda androjenlerin aromataz ile tümörlerin kendi içlerinde lokal dönüşümü yoluyla da etkin kalırlar. Bu durum UF'lerin kendi büyümelerini sürdürmek için yeterli östrojen üretebildikleri anlamına gelir. Son zamanlarda UF'lerin komşu miyometriyuma kıyasla daha yüksek aromataz ve 17 β -HSD tip 1 düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum daha yüksek doku östrojen seviyelerine yol açar [6,86].

Östrojenin fibroid biyolojisindeki rolü karmaşıktır ve progesteron, büyüme faktörleri ve genetik ve epigenetik faktörler dâhil olmak üzere diğer birçok faktörü içerir. Östrojen, UF patogenezinde rol oynadığı düşünülen çeşitli genlerin ekspresyonunu artırır [4,57]. Ayrıca, ER- α yoluyla progesteron reseptörlerinin (PR) ekspresyonunu düzenleyerek tümörjenik dokuyu progesteron sinyallerine daha duyarlı hale getirir ve progesteronun fibroid büyümesini indüklemesi için bir mikroortam sağlar [4].

Daha önceki çalışmalar UF gelişiminde östrojenin rolüne odaklanırken, progesteronun önemli rolü yakın zamanda tanımlanmıştır. Progesteron, menstruel siklusun salgılama (progestasyonel) fazı sırasında UF hücrelerinin mitotik aktivitesinin artırır. Bu durum UF baskın steroidale etki gibi görünmektedir [4]. Östrojen reseptörlerine benzer, progesteron da fizyolojik etkilerini reseptörleri olan PRA ve PRB ile gösterirler. Her iki reseptör de iki baskın yoldan biriyle gen ekspresyonunu değiştirerek hücre fonksiyonunu etkiler: nükleer

transkripsiyonun modülasyonu ve hızlı sinyallemenin aktivasyonu [57]. Her iki PR izoformunun da hem miyometriyumda hem de UF'de varlığı gösterilmiştir. Bununla birlikte UF'de PR ekspresyonu, komşu miyometriyumdan daha yüksektir ve progesteronun hücre proliferasyonu ve ECM birikimi yoluyla tümör büyümesinde kritik rolünü gösterir [5]. Progesteronun EGF, TGF- β 3, PCNA ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonunu arttırıp TNF- α ekspresyonunu azaltarak UF büyümesini ve sağ kalımını etkilediği bildirilmiştir (Şekil 2.3) [6].



Şekil 2.3. Uterine fibroid patolojisinde progesteron sinyal yolları. MAPK: mitojen-aktive protein kinaz; PDGF: platelet kaynaklı büyüme faktörü; PI3K: fosfatidilinositol-3-kinaz; AKT: serin / treonin protein kinaz B; Bcl-2: B-cell İleukemia/lymphoma-2 protein; EGF: epidermal büyüme faktörü; TGF- β 3: dönüştürücü büyüme faktörü β 3; P-AKT: Fosforile AKT; P-S6K: Fosforile edilmiş p70 ribozomal S6 kinaz; IGF-I: İnsülin benzeri büyüme faktörü I; TNF- α : tümör nekroz faktörü α ; ERK: ekstraselüler sinyal regüleli kinaz; Smad: Dekapentaplejiye Karşı Annelerin Baskılayıcısı

Her ne kadar östrojenler fibroid büyümesinde birincil uyarıcı olarak düşünülse de klinik çalışmalar östrojenle ilişkili fibroid büyümesi için progesteronun gerekli olduğunu göstermiştir. Bu da östrojenlerin fibroid proliferasyonunu uyarmak için gerekli olduğunu, ancak yeterli olmadığını göstermektedir. Ishikawa ve arkadaşları E2 + P4 kombinasyonunun fibroid boyutunda anlamlı farklılıklar oluşturduğu sonucuna varmışlardır. Buna göre her ikisinin de UF hücresi proliferasyonu yoluyla miyomatöz büyümeyi uyardığı sonucuna

ulaşımıştır [87]. Başka bir deyişle, östrojen progesteronla birlikte hücre sayısını ve ECM hacmini artırarak UF büyümesini arttırır [88].

2.7. Uterin Fibroidlerinin Patofizyolojisi

UF'ler, monoklonal uterusun benign düz kas tümörleridir. Tipik olarak, uterusun korpusunda (98%) ortaya çıkar, ancak servikste, uterus ligamentlerinde ve nadiren de ovaryum veya tuba uterinada bulunabilmektedir [2]. Uterin fibroidler, enine kesitte genellikle beyaz spiral görünüme sahip sert tümörler olarak izlenir. Çevreleyen miyometriyumdan daha soluklurlar ve genellikle normal uterus kas tabakası ile aralarında çok keskin bir sınıır çizgisi (psödo kapsüllü tümörler) vardır [3]. Ayrıca brüt görünümde hiyalin ve miksoid değişim alanları, hidropik dejenerasyon, kanama, nekroz, kistik dejenerasyon ve kalsifikasyonlar görülebilir. Kanama ve nekroz, özellikle tümörler büyükse, hamile veya progesteron kullanan kadınlarda da görülmekle birlikte, UF'lerde de sıklıkla rastlanır. Hidropik bölgeler yarı saydamdır ve ekstraselüler sıvının birikmesi nedeniyle kistik bir boşluğun oluşmasına neden olabilir. Hemorajik bölgeler koyu bir görünüme sahipken, nekrotik alanlar sarı veya ten rengi görünür [2,6,49]. UFler genellikle (80%) çoğuldur, boyutları büyük ölçüde değişir ve birkaç milimetreden 20 cm çapında ve hatta daha büyük boyutlara kadar görülebilir [3,49].

UF, kadınlarda morbiditenin önemli bir nedenidir. Büyüklüklerine ve konumlarına bağlı olarak farklı klinik semptomları vardır: Bunlara pelvik ağrı (hastaların %20-40'ı), anormal uterin kanama (hastaların %30'u), anemi ve idrar kaçırma dâhildir. İnfertilite (subfertilite), implantasyon ile ilgili sorunlar, erken doğum, kürtaj, malprezantasyon, da UF ile ilintili diğer sorunları oluşturur.

2.7.1. Uterin fibroidleri ve infertilite

UF, infertil kadınların %5-10'unda bulunur ve bunların %1-2.4'ünde infertilitenin tek nedenidir [89,90]. Doğurganlık üzerindeki etkisi, tümörün yeri ve büyüklüğü ile belirlenir; Servikal fibroidler serviksin yer değiştirmesine veya tıkanmasına neden olabilir, benzer şekilde submukozal ve intramural fibroidler, sperm ve embriyon taşınmasını ve tuba uterina işlevini engelleyebilecek düzeyde olabilir. Uterus boynuzunun yakınında bulunan fibroidler tuba uterinayı tıkayabilir ve oosit taşınmasını önleyebilir [88,91].

2.7.2. Uterin fibroidleri ve implantasyonu

UF, uterus kontraktilesini artırıp sitokin profilini bozarak veya anormal vaskülarizasyona ve kronik inflamasyona neden olup implantasyonu etkileyebilir. İntramural fibroid vakalarında, implantasyon faktörlerinin, implantasyon sırasında azaldığı görülmüştür. Bu durum embriyo implantasyonunun başarısız olmasına ve infertiliteye neden olabilir [92]. İmplantasyon sırasında, doğal öldürücü hücreler (NKC) uterustaki en önemli ve en bol bulunan immün hücreleridir ve sayılarındaki herhangi bir değişiklik implantasyon başarısızlığı ile bağlantılıdır. Miyomlarda, miyom yakınındaki endometriyumda, miyomdan uzak endometriyuma kıyasla NK hücre sayıları belirgin şekilde azalır ve makrofajlar önemli ölçüde artar [90,93,94].

2.7.3. Utrin fibroidleri ve obstetrik sonuçlar

Fibroidler klinisyenler tarafından gebe kalmadan doğuma kadar olumsuz üreme sonuçlarına neden olan bir faktör olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, fibroidlerin obstetrik sonuçlardaki gerçek etkisi tam olarak açık değildir. İlaveten, fibroidlerin sayısının, büyüklüğünün ve tipinin obstetrik sonuçlar üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalar submukozal veya intramural fibroidlerin varlığında spontan abortus riskinin arttığını bulmuş olsa da diğerleri, fibroid lokalizasyonunun spontan abortusun ortaya çıkması için öngörücü öneme sahip olmadığını belirtmiştir [91,95–97]. Fibroidlerin büyüklüğünün gebelik kaybı üzerinde etkisi görülmemiştir [97,98]. Ancak sayısı göz önüne alındığında, çoklu olan kadınlardaki gebelik kaybı riski, tekil olan kadınlara oranla daha yüksek olabilir [95]. Çoğu çalışma erken doğum, plasental abrupsiyon, makat prezentasyonu gibi malprezentasyon ve doğum sonrası kanamanın gebelikte fibroidlerin komplikasyonları olduğunu göstermektedir [91,95]. Doğumda aşırı kan kaybı, büyük fibroidlerle daha fazla ilişkili görünmektedir [99]. Plasental abrupsiyon ise fibroid lokalizasyonu ile daha bağlantılı görünmektedir [95]. Fibroidler ayrıca fetüsün malprezentasyonu ile de ilişkilendirilmiştir. [95,100]. Fibroidli hamile kadınlarda sezaryen riski artar, ancak fibroidlerin büyüklüğü, sayısı ve lokalizasyonunun sezaryen doğum insidansını arttırıp arttırmadığı konusunda fikir birliği yoktur [100,101]. Ancak bir çalışma, fibroid büyüklüğünün, sayısının veya pozisyonunun sezaryen oranı üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermiştir [96].

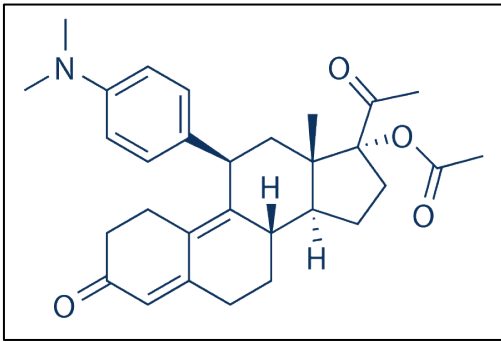
2.8. Leiomyomların Tedavisinde Ulipristal Asetat ve D3 Vitamininin Rolü

Attlee'nin ilk başarılı miyomektomiye başladığı 1845'ten beri UF tedavisi tamamen cerrahi olmuştur. Total abdominal histerektomi ve miyomektomi ile başlayan ve miyoliz, uterin arter embolizasyonu ve daha yakın zamanda MRG odaklı ultrason cerrahisi gibi daha az invaziv teknikler de kullanılmıştır. 20. yüzyılın ikinci yarısında, ameliyata alternatif olarak ve genellikle ameliyattan önce veya sonra tedaviye yardımcı olarak bir dizi tıbbi öneriler bulunmuştur [56]. UF'ler hormon bağımlı tümörler olduğundan tıbbi yönetimi hormonal tedaviye odaklanmıştır. En kullanışlı tıbbi rejimler GnRH agonistleri, GnRH antagonistleri, aromataz inhibitörleri, progesterin preparatları ve son zamanlarda selektif progesteron reseptör modülatörleridir (SPRM) [6].

SPRM'ler progesteron reseptörleri için sentetik ligandlardır ve progesteron reseptörlerine (PR) karşı agonistler veya antagonistler olarak görev yaparlar. Üreme sisteminin her yerinde PR'ler üzerinde çalışarak, SPRM'ler fibroid büzülmesine yardımcı olan ve semptomları kontrol eden çeşitli etkilere sahiptir. Normal miyometriyal hücreleri etkilemeden apoptosisi indükler ve UF hücrelerinde proliferasyonu azaltırlar. Ayrıca luteinize edici hormon dalgalanmasını inhibe ederek anovülasyona ve amenoreye yol açabilir ve GnRH analoglarının aksine SPRM'lerin östrojen eksikliğine neden olmazlar [102]. SPRM'ler progesteronun etkisini bloke ettiğinden, uzun süreli uygulanması, “progesteron reseptörleri modülatörü ile ilişkili endometriyal değişiklikler” (PAEC) olarak adlandırılan iyi huylu geri dönüşümlü endometriyal değişikliklere neden olabilir. PAEC'ler sırasında, endometriyum hafif kalınlaşma gösterir, endometriyal bezler kistik olarak genişler. Ancak mitotik aktivite göstermezler. Ayrıca ‘kümes teli’ görünümünde, anastomoz yapan kapiller ağlar görülebilir [6,103]. Mifepristonun ortaya çıkmasından bu yana SPRM ailesindeki ilaç sayısı, ulipristal asetat (UPA), asoprisnil, unoprostone, lonaprisan, vilaprisan ve telapristonu içerecek şekilde belirgin şekilde genişlemiştir [102].

Ulipristal asetat (UPA), SPRM ailesi içinde UF'lerin tıbbi yönetimi için en umut verici ajan haline gelmiştir. Kod adı CDB-2914 veya VA-2914 olan Ulipristal, 19-norprogesterondan türetilmiş sentetik bir steroiddir (Şekil.2.4), PR-A ve PR-B için yüksek afiniteye sahiptir; bir antagonist ve kısmen bir agonist olarak çalışır. 2000 yılında farmakolojik ve klinik endikasyonları üzerine bir dizi araştırmaya başlanmış, [83] 2008'den başlayarak da ulipristal'in selektif etkisi klinik olarak incelenmeye başlanmıştır. 3 aylık CDB-2914

uygulamasının, plasebo grubuna kıyasla ve ciddi yan etkiler olmaksızın UF hacmini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur [104]. Takip eden yıllarda, UPA'nın etkisi, Avrupa faz III çalışmalarında “Uterin Leiomyomataya Bağlı Semptomların Azaltılmasında PGL4001 (ulipristal) Etkinlik Değerlendirmesi”nde (PEARL) iyi sonuç vermiştir. UPA sadece menorajiyi kontrol etmekle kalmayıp aynı zamanda fibroid boyutunu önemli ölçüde azaltma yeteneği göstermiştir [105,106]. UPA'nın uzun süreli kullanım analizlerinde de etkinlik ve güvenlik insidansında bir değişim saptanmamış endometriyal hiperplazi veya endometriyal kanser oluşmamıştır [107,108].



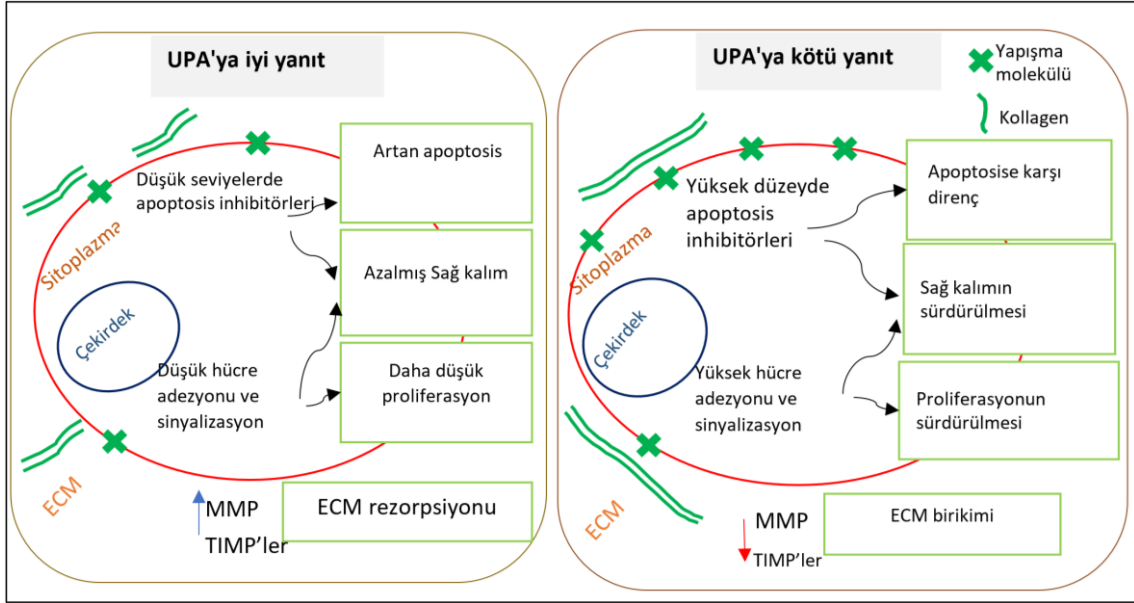
Şekil 2.4. Ulipristal asetatın kimyasal yapısı

Ulipristal Asetat ve diğer tüm SPRM'ler; hipofiz bezi, endometriyum ve UF'ler üzerinde doğrudan etki yapabilir. Hipofiz bezine yaptığı etki sonucunda, UPA ovulasyonu engeller veya geciktirir ve fizyolojik aralıktaki LH, FSH ve östrogen seviyelerini kısmen azaltır. Bu da Hipoöstrogenizm belirtileri ortaya çıkmadan kanama kontrolü ve amenore ile sonuçlanır. Endometriyumda, kanamayı durdurabilir ve daha önce de belirtildiği gibi iyi huylu ve tamamen geri dönüşümlü olan progesteron reseptör modülatörlerine bağlı endometriyal Değişikliklere (PAEC) neden olabilir. UF'lerde ise UPA, hücrel proliferasyonun inhibisyonu, apoptosisin indüksiyonu ve ECM birikiminin azaltılması yoluyla fibroid hacmini azaltır [14–16].

2.8.1. Uterin fibroidlerin tedavisinde UPA'nın etki mekanizması

Progesteron genellikle UF büyümesini iki şekilde destekler: 1) Epidermal büyüme faktörünü (EGF) ve Bcl-2 ekspresyonunu artırır; 2) Tümör nekroz faktörü (TNF) ekspresyonunu azaltır. Progesteron antagonisti olarak UP, PCNA ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak UF hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve apoptosisi indükler [17]. Ayrıca UPA, fibroid

hücrelerinde MMP ekspresyon artışı ve TIMP ekspresyon azalmasını sağlayarak, ECM'de kollagen birikimini engeller [18]. TGF- β 3'ün serum ve tümör konsantrasyonunu azaltır ve böylece dolaylı yoldan UF dokusunda hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını engelleyebilir (Şekil.2.5) [19].



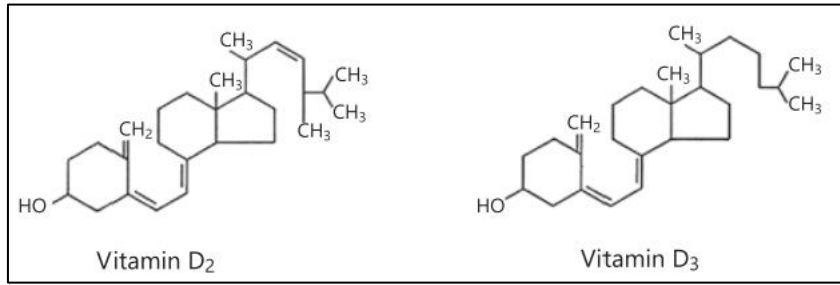
Şekil 2.5. Uterin fibroidlerin ulipristal asetat (UPA) moleküler yanıtı. Not: Donnez J, Courloy GE, Donnez O, Dolmans MM. Ulipristal acetate for the management of large uterine fibroids associated with heavy bleeding: a review. *Reprod Biomed Online* 2018; dan esinlenilmiştir [109]

2.8.2. D3 vitamini ve uterin fibroid ilişkisi

D3 vitamini eksikliğinin birçok sağlık sorunuyla ilişkili olduğu konusunda farkındalık gün geçtikçe artmaktadır. Günümüze dek; kalsiyum homeostazı ve kemik sağlığında D3 vitamininin rolleri iyi karakterize edilmiştir. Son 10 yılda, D3 vitamininin; enfeksiyonların, kardiyovasküler hastalıkların, olumsuz gebelik sonuçlarının ve tümörlerin önlenmesinde de yardımcı olduğu gösterilmiştir [110–112].

D3 vitamini yağda çözünen bir vitamindir. "D vitamini" terimi, ilgili pro-vitaminleri, ergosterol ve 7-dehidrokolesterolden (7-DHC) oluşan ergokalsiferol (D2 vitamini) ve kolekalsiferol (D3 vitamini) anlamına gelir (Şekil.2.6). D3 vitamini metabolizması cilt, karaciğer ve böbrek tarafından düzenlenir. İnsanlarda D3 vitamini, diyetten (10–20%) veya ağırlıklı olarak cildin epidermis tabakasındaki (80–90%) üretimden olmak üzere iki farklı

kaynaktan elde edilebilir. Endojen D3 vitamini sentezi deride başlar. Epidermis ve dermisin her ikisi de 7 dehidrokolesterol (7-DHC) içerir. UV radyasyonu (280-315 nm) cilt katmanlarından geçtiğinde, 7 dehidrokolesterol'ün UV fotonlarını emerek previtamin D3'e dönüşümünü indükler. Bu fotoizomerizasyonu, D3 vitamin molekülünün (kolekalsiferol) oluşumuna yol açan previtamin D3 termal bağımlı izomerizasyonu izler [113,114]. Diyet D vitamini (D2 veya D3 vitamini) genellikle ince bağırsakta emilir. Emildikten sonra ekzojen D vitamini, superior vena kavaya akan lenfatik sisteme giren şilomikronlar yoluyla paketlenir. Deri ya da bağırsak yolu ile kan dolaşımına girdikten sonra, karaciğerde 25-hidroksivitamin D'ye [25 (OH) D] ve daha sonra böbreklerde 1,25- dihidroksi D vitaminine [1,25 (OH) 2D] dönüştürülür. Bu bileşiklerin her ikisi de çoğunlukla D vitamini bağlayıcı proteine (DBP) bağlanarak kanda dolaşır. Dokularda 1,25 (OH) 2D DBP'den ayrışır ve çeşitli metabolik eylemleri aktive eden hücre içi D3 vitamini reseptörlerine (VDR) bağlanarak işlevini gerçekleştirir [115,116].



Şekil 2.6. D vitamininin başlıca formları

D3 vitamininin başlıca iki rolü vardır: I- Kemik, paratiroid, bağırsak ve böbreklerde çalışarak kandaki kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarının kontrolünü içeren kalsemik roller. II- Kemik iliği, bağışıklık sistemi, deri, kas, bağırsak, meme ve prostat gibi çeşitli doku tiplerinde hücre farklılaşmasını ve antiproliferatif fonksiyonu içeren nonkalsemik roller [115].

Endokrin Derneği'nin Klinik Kılavuzlar Alt Komitesi ve Klinik İşler Kore Komitesine göre D3 vitamini yetersizliği 21-29 ng/mL serum 25-hidroksivitamin D, D3 vitamini eksikliği ise 20 ng/ml'nin altında serum 25-hidroksivitamin D olarak tanımlanmaktadır. Serum D3 vitamini düzeyleri vücut ağırlığı, yaş, ten rengi, yüksek enlemler, mevsim, güneş ışığı yoğunluğu ve maruz kalma gibi birçok faktörden etkilenebilir [117,118]. Serum 25-hidroksivitamin D seviyesi ırktan ırka değişir: Kafkas kadınlarının serum D3 vitamini

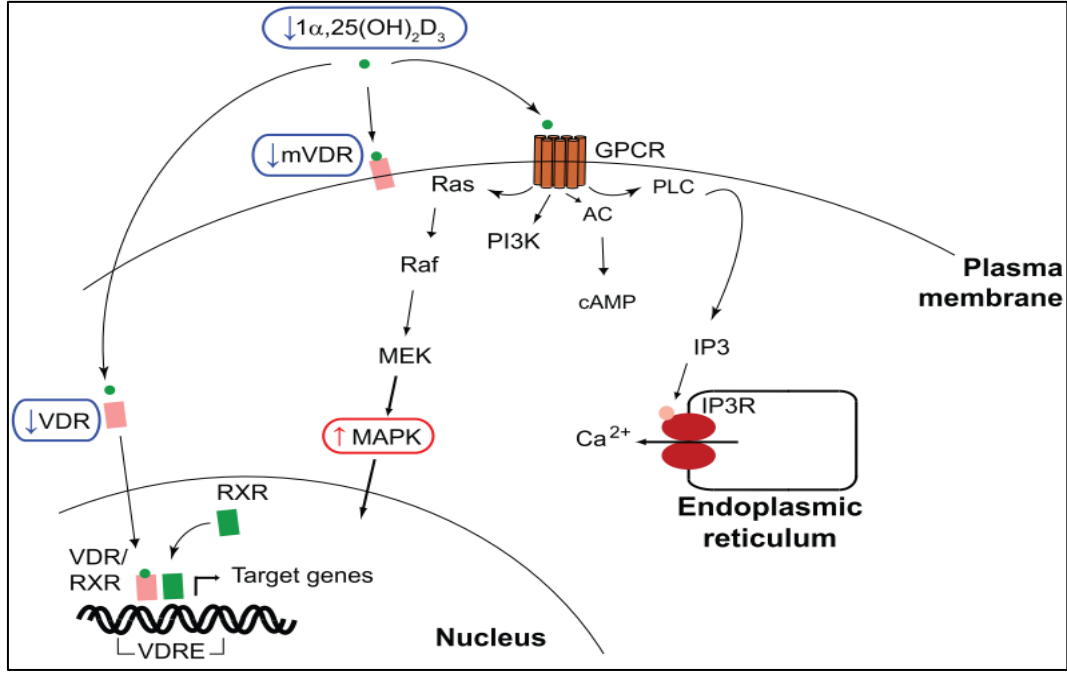
konsantrasyonlarının diğerklerine göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir, oysa Afrikalı Amerikalılar gibi daha koyu tenli olanlar daha düşük temel D3 vitamini konsantrasyonlarına, 15-20 kat daha yüksek şiddetli D3 vitamini eksikliği prevalansına sahiptirler [119,120]. Bu sağlıklı varyasyon kısmen, sentezi için gerekli olan UV güneş radyasyonunu bloke eden derideki yüksek melanin seviyelerinin neden olduğu yetersiz D3 vitamini üretiminden kaynaklanmaktadır. Afrikalı Amerikalılar olarak, koyu ten rengi ve daha düşük UV radyasyon seviyeleri kombinasyonu nedeniyle yüksek enlemlerde D3 vitamini eksikliği artmaktadır [121]. Obez kadınlarda D3 vitamini eksikliği daha yüksek oranda bulunur. BMİ'si 30'dan yüksek olan hamile kadınlar D3 vitamini eksikliği riski altındadır. Yağ dokusu, dolaşıma girmeyen D3 vitamini için bir depo görevi görür [117]. Birçok hücre tipi üzerindeki önemli etkileri nedeniyle Hipovitaminoz D, yetişkinlerde osteoporoz hastalığına; çocuklarda osteomalazi ve raşitizme neden olabilir. Ayrıca tip 2 diabetes mellitus, olumsuz gebelik ve doğum sonuçları, kanser ve multipl skleroz gibi otoimmün durumlar da dahil olmak üzere çeşitli sağlık sorunları gözlenebilir [122]. Ancak geçmişte inanılanın aksine D3 vitamininin toksisitesi son derece nadirdir [117].

Son çalışmalar, D3 vitamini konsantrasyonu ile uterin fibroid gelişimi arasında ters bir orantı olduğunu göstermiştir. UF'leri olan kadınlarda serum D3 vitamini düzeylerinin genel popülasyona göre anlamlı derecede düşük olduğu ve D3 vitamini eksikliğinin fibroid büyümesi ve gelişimi için bir risk faktörü olabileceği gösterilmiştir [24,25]. Wise ve arkadaşları, D3 vitamini metabolizmasında ve cilt pigmentasyonunda rol oynayan genlerde polimorfizm ile ilişkili olarak UF insidansını araştırdıkları çalışmalarında, 8 gende 12 polimorfizmle ilişkili olarak UF riskini inceleyerek, bu polimorfizmlerin, D3 vitamini taşınmasında (GC), kolesterol sentezinde (DHCR7) ve hidroksilasyonunda (CYP2R1 ve CYP24A1) yer alan genlerin içinde veya yakınında lokalize olduğunu belirlediler. 12 Polimorfizmden 3'ünün UF ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu bildirdiler [123]. Yapılan başka bir çalışmada da UF'li kadınlarda D3 vitamini takviyesinin fibroidlerin büyümesini stabilize ettiği ve ilgili semptomların başlamasını önlediği gösterilmiştir [26]. Başka bir randomize klinik çalışmada, 12 hafta boyunca D3 vitamini tüketiminin UF büyümesini engelleyebileceğini ortaya koymuştur. Buna göre bu yöntemin girişimsel bir tedavi olarak kullanılması faydalı olabileceği, ancak uzun vadeli etkileri belirsizliğini koruduğu ve bunun belirlenmesi gerektiği vurgulanmıştır [27]. Suneja ve arkadaşları, D3 vitamini takviyesi almanın, semptomatik fibroidleri ve D3 vitamini eksikliği olan kadınlarda fibroid

semptomlarını azaltmada, uterus ve UF boyutunu dengelemede etkili olduğu sonucuna varmışlardır [124].

2.8.3. Miyom tedavisinde D3 vitamininin etki mekanizması

D3 vitamininin fizyolojik etkisi, proliferasyon, apoptosis, DNA onarımı, ECM birikimi ve sinyalizasyon dâhil olmak üzere çoklu hücrel yolakların aktivasyonu ile ilişkilidir (Şekil.2.7). UF'lerin büyümesinin düzenlenmesinde D3 vitamininin biyolojik rolünü anlamak için Blauer ve arkadaşları histerektomi uygulanan premenopozal kadınlarda D3 vitamininin hem miyometriyal hem de UF hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini ortaya koyan bir çalışma yapmışlardır [125]. Farklı birkaç çalışma bu ön sonucu doğrulamıştır ve D3 vitamininin, PCNA, siklin D1, CDK1, Bcl 2'nin azaltılması yoluyla fibroid hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir [126–128]. Deneysel çalışmalar, östrogen sinyal modülasyonunun D3 vitamininin proliferasyon üzerindeki etkilerini açıklamada da rol oynayabileceği önerisini doğurmaktadır. Bu bağlamda D3 vitamini, UF hücrelerinde doza bağlı ER ve PR ekspresyonunu inhibe edici etkiler göstermiştir [129]. Corachán ve arkadaşları, insan primer UF hücrelerinde D3 vitamininin Wnt / β -katenin ve TGF β sinyal yollarına etkilerini incelemişler ve D3 vitamininin UF'lerin farklı moleküler alt tiplerinde proliferasyonu ve ECM oluşumunu azaltabileceğini öne sürmüşlerdir [130]. Başka bir çalışmada, D3 vitamininin insan UF hücrelerinde TGF- β 3'ün fibrozis üzerindeki etkisini baskıladığı görülmüştür [131]. D3 vitamininin insan UF hücrelerinde MMP'lerin ekspresyonu ve aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan başka bir çalışmada, D3 vitamininin MMP-2 ve MMP-9 seviyesini düşürdüğü ve buna bağlı olarak VDR ve TIMP-2 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir [58]. D3 vitamini ayrıca UF hücrelerinde kollagen tip 1, fibronektin ve plazminojen aktivatör-1'in (PAI-1) ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır [128]. D3 vitamininin DNA onarım proteinlerinin düzenlenmesi üzerinde doğrudan etkili olduğu gösterilmiştir. UF'lerde, DNA onarım mekanizmaları işlevsiz olabilir ve DNA onarım protein üyelerinin miyometriyuma kıyasla az olması buna bağlı olabilir. Fibroid hücrelerinde D3 vitamininin uygulanması, DNA hasarını önemli ölçüde azaltır ve VDR indüksiyonu ile birlikte DNA hasar yanıtını geri kazandırır [132]. Ayrıca Elkaffas ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırma, D3 vitamini tedavisinin, dietilstilbestrol (DES) gibi endokrin bozucu kimyasallara maruz kalan miyometriyal kök hücrelerdeki DNA hasarı azalttığını göstermiştir [133].



Şekil 2.7. Uterin leiomyomada D3 vitamini sinyalinin şematik sunumu. ↑ ve ↓ sırasıyla artan (kırmızı) veya azalan (mavi) seviye veya işlevi gösterir. mVDR: membrana bağlı D3 vitamini reseptörü; PLC: fosfolipaz C; AC: adenilat siklaz; IP3: inositol trisfosfat; IP3R: inositol trisfosfat reseptörü [4]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları için Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan G.Ü.ET-19.041 sayılı etik kurul izni alınmıştır. Deneyde, 47 adet, 6-8 haftalık, gebe olmayan 180-200 gr ağırlığında dişi Wistar albino rat kullanılmıştır. Hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirilmiş olup, Denekler 12 saatlik fotoperiyotta, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığında, %55 nem ortamında ve ad libitum içme suyu ve standart yemle beslenmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1. İlaç ve çözücüler

Çalışmalar sırasında kullanılan ilaç ve çözücüler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. İlaç ve çözücüler

Sıra No	İlaçların adı	Katalog Numarası	Marka ve üretim yeri
1.	Dietilstilbestrol (DES)	D4628-1G	Sigma Aldrich, Almanya
2.	Progestan 100mg	A06396	Koçak Farma.Türkiye
3.	Ulipristal asetat 30mg	G03AD02	Abdî İbrahim İlaç. Türkiye
4.	D3 vitamini 1000IU	TR-34-K-046654	Vefa İlaç San. ve Tic. Ltd. Türkiye

3.1.2. Antikorlar ve kitler

Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar ve kitler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antikorlar ve kitler

Sıra No	Antikorlar ve Kitlerin adı	Katalog Numarası	Marka ve üretim yeri
1.	Fare PCNA (pc10) antikor	sc-56 Lot:J2219	Santa Cruz Biyoteknolojisi-USA
2.	Fare α -SMA (1A4) antikor	sc-32251 Lot:F0319	Santa Cruz Biyoteknolojisi-USA
3.	Tavşan Bcl-2 antikor	bs-4563R	Bioss-USA
4.	Tavşan TGF β 1+2+3 antikor	bs-4538R	Bioss-USA
5.	Rat MMP-9 ELISA Kiti 96T	E-EL-R 3021	ElabScience-USA
6.	Rat TIMP-1 ELISA Kiti 96T	E-EL-R0540	ElabScience-USA
7.	Masson Trichrome with Aniline blue kiti	04-010802 Lot:09211	Bio Optica-Milano S.p.A.
8.	Ultra vision Detection system HRP kit 125 ml	Lot:PHL659660 REF:TP-125-HL	Thermo Scientific-USA
9.	AEC Chromogen & Substrat System 125 ml	Lot:HA53704 REF:TA-125-HA	Thermo Scientific-USA

3.1.3. Diğer kimyasal malzemeler

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal malzemeler 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kimyasal malzemeler

Sıra No	Malzeme adı	Katalog no	Marka ve üretim yeri
1.	Vision Mount 125 ml 1250 test	Lot:462249 REF:TA-125-UG	Thermo Scientific-USA
2.	Ultra Ab Diluent 125 ml	Lot:UD51273 REF:TA-125-UD	Thermo Scientific-USA
3.	Mayer’s Hematoxylin 50 ml	ZD-RRSP60A	Thermo Scientific-USA
4.	Eosin gelblich 100g	Art. 1345	MERCK- Germany
5.	Citrate Buffer (10 \times) 500 ml	Lot:MK170706 REF:AP-9003-500	Thermo Scientific-USA
6.	EDTA buffer (10 \times) 500 ml	Lot:MK170923 REF:AP-9004-500	Thermo Scientific-USA
7.	PBS Tablets PH (1tab/100ml)	Lot: 0C65263	BioShop- Canada
8.	Hydrogen Peroxide Block 125ml	Lot:Pp101104 REF:TA-125-HP	Thermo Scientific-USA
9.	Teksoll (%96)	TK.200650.05001 Lot:150120185001	Tekkim-Türkiye
10.	Ksilol	Lot:081118134001 TK.090270.05003	Tekkim-Türkiye
11.	%9 Serum fizyolojik	A11760069A	Polifarma- Türkiye
12.	Formaldehit % 10	TK.060160.05001 Lot:250119117001	Tekkim-Türkiye

3.2. Deneş Hayvanların Gruplandırma ve Özellikleri

Deneş hayvanlarından rastgele 8 gruba oluşturuldu. Deneş gruplarında kullanılan hayvan sayısı ve uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir:

- Grup 1: (n = 6) Normal kontrol grubu (NKG): Bu grupta 5 hafta boyunca her bir deneş 0.05 ml serum fizyolojik gavajla her gün ve 0.02ml serum fizyolojik intramusküler haftada 3 gün olarak uygulandı. Sonraki 3 hafta boyunca her gün 0.05ml serum fizyolojik gavaj yolu ile verildi.
- Grup 2: (n=7) D3 vitamini grubu (D3G): Bu grupta 3 hafta boyunca her gün 300ng/gün 1,25 Dihidroksivitamin D3 gavaj yoluyla uygulandı [134].
- Grup 3: (n=7) ulipristal asetat grubu (UPAG): Bu grupta 5 hafta süresince her gün serum fizyolojik içinde 3 mg/kg/gün UPA gavajla verildi [135].
- Grup 4: (n=6) uterin fibroid model grubu (UFMG): Bu grupta UF modelini indüklemek için, 5 hafta boyunca haftada 3 gün 1.35mg/kg/gün Dietilstilbesterol (DES) gavajla ve 1mg/kg progesteron intramusküler olarak uygulandı [136].
- Grup 5: (n=6) uterin D3 vitamini tedavi grubu (D3TG): Bu grupta 5 hafta boyunca haftada 3 gün 1.35mg/kg/gün Dietilstilbesterol (DES) gavajla ve 1mg/kg progesteron intramusküler olarak uygulandı. Ardından 3 hafta boyunca da 300ng/gün 1,25 Dihidroksivitamin D3 gavajla verildi [134,136].
- Grup 6: (n=7) ulipristal asetat tedavi grubu (UPATG): Bu grupta 5 hafta boyunca haftada 3 gün 1.35mg/kg/gün Dietilstilbesterol (DES) gavajla ve 1mg/kg progesteron intramusküler olarak uygulandıktan sonraki 5 hafta boyunca da serum fizyolojik içinde 3 mg/kg/gün ulipristal asetat gavajla verildi [135,136].
- Grup 7: (n=7) ulipristal asetat + D3 vitamin tedavi grubu (D3+UPATG): Bu grupta ilk 5 hafta boyunca haftada 3 gün gavajla 1.35mg/kg/gün Dietilstilbesterol (DES) ve 1mg/kg progesteron intramusküler olarak uygulandı. Sonraki 3 hafta boyunca gavaj yoluyla 300ng/ gün dozda 1,25 Dihidroksivitamin D3 ve 3 mg/kg/gün serum fizyolojik içinde çözülen UPA verildi. UPA uygulamasının literatürde belirtilen süresini tamamlamak adına 2 hafta boyunca sadece 3 mg/kg/gün % 0.9 fizyolojik salin içinde dozda UPA tedavisine devam edildi [134–136].
- Grup 8: (n=1) Sham Grubu (SG): Bu grupta 5 hafta boyunca haftada 3 gün gavajla 0.05ml serum fizyolojik ve intramusküler 0.02ml serum fizyolojik uygulaması yapıldı.

Tüm çalışma boyunca, sıçanların ağırlığı günlük olarak ölçüldü. Ayrıca tedavi sonrası komplikasyonları ve yan etkileri kaydetmek için günlük olarak yiyecek veya su alımları ve hareketliliklerinde herhangi bir değişikliğin olup olmadığı gözlemlendi.

3.3. Doku Örneklerinin Alınması

Deney hayvanlarına 40 mg/kg ketamin hidroklorür ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür enjeksiyonu ile derin anestezi yapıldı. İntrakardiyak kan örnekleri silika tüplerinde toplandı ve sonra santrifüjlenerek serumları alındı. Serum örnekleri MMP-9 ve TIMP-1 ELISA analizi için -20°C'de saklandı. UF'lerinin makroskopik olarak doğrulanması açısından uterus örnekleri alındı. Uterus ağırlıkları ölçüldü ve organ katsayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı [136]:

$$\text{Organ katsayısı} = \text{Organ ağırlığı (mg)} / \text{Rat vücut ağırlığı (g)} \times 100. \quad (3.1)$$

Histolojik incelemeler için, tüm gruplardan alınan uterus örnekleri, oda sıcaklığında 72 saat boyunca %10'luk nötral formalin solüsyonunda fikse edildi. Süre sonunda rutin ışık mikroskopik takip basamaklarından geçirilen doku örnekleri parafine gömülerek bloklandı. Bloklardan mikrotom ile (Leica SM 2000, Germany) 4 -5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı.

3.4. Işık Mikroskopik İncelemeler

3.4.1. Masson trichrome boyama yöntemi

Deparafinizasyon için 37°C'lik etüvde bir gece bekletilen kesitler, deparafinizasyonun devamı için etüv ısısı 57-63°C' ye çıkarılarak 2 saat daha bekletildi. Kesitler deparafinizasyonu tamamlamak için 2×15 dakika ksilolde bırakıldı. Daha sonra rehidrasyon işlemi için, kesitler sırasıyla % 100'lük, % 96'lık ve % 80'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek sudan, 2×5 dakika distile sudan geçirilerek alkolden kurtarıldı. Daha sonra, "Anilin mavisi ile Masson Trikrom" kit prosedürüne uygun olarak aşağıdaki basamaklar takip edilerek boyama işlemi gerçekleştirildi:

1. Bir tüpte 6 damla Weigert'in demir hematoksilin - A solüsyonu ve 6 damla Weigert'in demir hematoksilin - B solüsyonu birlikte karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan solüsyon kesit üzerindeki dokulara damlatılarak 10 dakika bekletildi.
2. Yıkanmadan, kesitlerin üzerindeki solüsyonları boşaltıldı ve daha sonra dokulara 10 damla Pikrik asit alkollü solüsyon konuldu ve 4 dakika boyunca etki etmeye bırakıldı.
3. Kesitler distile suda hızlı bir şekilde (3-4 saniye) yıkandı ve daha sonra dokulara 10 damla Ponceau asit fuchsin konuldu ve aktivasyon için 4 dakika bırakıldı.
4. Kesitler tekrar distile suda yıkandı ve dokuların üzerine 10 damla Fosfomolibdik asit solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika boyunca etki etmeye bırakıldı.
5. Yıkama yapmadan kesitlerin üzerindeki solüsyon boşaltıldı ve dokulara 10 damla Masson anilin mavisi damlatıldı ve 5 dakika boyunca aktivasyonu için beklendi.
6. Kesitler distile suda yıkandı, sırasıyla %70'lik, %80'lik, %96'lık ve %100'lük alkollerden hızlıca geçirildi. Son alkolde 1 dakika boyunca bekletildi. Ksilen içinde şeffeleştirildi ve entellan ile kapatıldı.

Fibrozis, Masson Trikrom boyaması ile boyanan gruplarda bulunan kollagen liflerinin yoğunluğu karşılaştırılarak değerlendirildi.

Boyanan kesitler Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda incelendi ve Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.4.2. İmmünohistokimyasal yöntem

- Deparafinizasyon amacıyla, Polilizinli lamlara alınan kesitler 37 °C' deki etüvde bir gece tutuldu, daha sonra etüv ısısı 57-63°C' ye çıkartılarak 2 saat bekletildi.
- Deparafinizasyonu tamamlamak için 2×15 dakika ksilende tutuldu ve sonrasında rehidrasyon işlemi gerçekleştirmek için, kesitler sırasıyla % 100'lük, % 96'lık ve % 80'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek sudan, 2×5 dakika distile sudan geçirildi.
- Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarmak amacıyla, preparatlar üretici firma önerisine göre EDTA (pH: 8.0) (TGF-β3 ve Bcl-2) ve sitrat tamponunda (pH: 6.0) (α-SMA, PCNA) sırasıyla 4 dakika, 3.5 dakika ve 3 dakika mikrodalga fırına konuldu. Oda ısısında 20dk soğutulduktan sonra Pap pen ile kesit üzerindeki dokuların etrafı sınırlandırıldı.

- Kesitler PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile 3×2 dakika yıkandıktan sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılarak dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi ve işlem bitiminde kesitler 3 kez PBS ile yıkandı.
- Özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Ultra V Block ile 5-10 dakika etkin bırakıldı.
- Sonrasında yıkama yapmadan kesitlerin üzerindeki Ultra V Block solüsyonu döküldü ve primer antikolar dokulara konuldu. kesitler 45 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 1 gece +4°C'de inkübe edildi. Kullanılan primer antikolar:
 1. Anti-PCNA (Proliferatif hücre nükleer antijeni) (1:100); Gruplar arasındaki hücre proliferasyonundaki farkı belirlemek amacıyla kullanılmıştır.
 2. Anti-TGF-β3 (Transforme edici büyüme faktörüm β3) (1:200); Gruplar arasında fibrozis farkını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.
 3. α-SMA (α-düz kas aktin) (1:100) ; Myometriyumda düz kasların gruplar arasındaki farkını belirlemek amacıyla kullanılmıştır .
 4. Anti-Bcl 2 (B hücreli lenfoma 2) (1:200); Gruplar arasında apoptosis farkını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.
- Süre sonunda dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, 10 dakika boyunca biyotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı.
- Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular 10 dakika boyunca enzimin biyotine bağlanması amacıyla streptavidin peroksidaz enzim kompleksi ile konjuge edildi.
- PBS ile tekrar yıkama sonrasında, kromojen olan AEC uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Yaklaşık 3-5 dakika bekletildi ve immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.
- Zemin boyamasında Mayer's Hematoksilen kullanılarak, preparatlar ultramont ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, mikroskop altında değerlendirildi ve sisteme bağlı Leica Q Vin 3 programında resimleri çekildi. İmmünohistokimyasal tutulumlar her bir antikor ve her grup için değerlendirilerek kantitatif veriler oluşturuldu ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar istatistiksel analizler ile değerlendirildi.

3.5. MMP-9 ve TIMP-1 Enzime Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA) Yöntemi

- İntrakardiyak kan alımı ile toplanan kan örnekleri oda sıcaklığında 1 saat boyunca pıhtılaşması beklendi ve sonra 20 dakika boyunca 1000 × g'de 2-8 derecede santrifüjlendi. Bundan sonra, süpernatant (serum) toplandı ve kullanım zamanına kadar -20 derecede korundu.
- Kullandığımız ELISA kiti ile Sandviç-ELISA prensibi uygulandı. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, Sıçan MMP-9 ve TIMP-1 antikoruna özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır.
- Çalışmaya başlamadan önce kitler ve ratlara ait serum örnekleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.
- Yıkama tamponu, standart çalışma solüsyonu, biyotinli Antikor çalışma solüsyonu ve HRP konjugatı çalışma solüsyonu firmanın talimatlarına göre hazırlandı.
- Tabanında özgül antikora özgü yüzeyler bulunan mikropate kuyucuklarına 100 mikrolitre hazırlanan standart çalışma solüsyonu ya da serum eklendi ve 90 dk 37 derece sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda fazla sıvı uzaklaştırıldı ve 100 mikrolitre biyotinli antikor çalışma solüsyonu eklendi ve 60 dakika 37 derece sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi.
- Mikropate, tüm bağlanmamış bileşenleri çıkarmak için yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
- Yıkama sonrasında kuyucuklara 100 mikrolitre HRP konjugatı çalışma solüsyonu eklendi ve 30 dakika 37 derece sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi ve ardından 5 kez yıkandı.
- Örneklerin üzerine 90 mikrolitre substrat çözeltisi eklendi ve 15 dakika 37 derece sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi. İçinde sadece MMP-9 ve TIMP-1 antikoru içeren örneklerin bulunduğu kuyucuklar maviye döndü.
- Enzim-substrat solüsyonu, 50 mikrolitre stop solüsyonu ilave edilerek durduruldu, ardından renk sarıya döndü.
- Spektrofotometrik olarak optik dansite değeri (OD) 450 nanometre dalga boyunda ölçüldü (ALLSHENG Microplate Reader-AMR-100, China). Standart solüsyonları ile oluşturulan OD değerleri ile oluşturulan standart eğri üzerinden örnekteki antikorun konsantrasyonu hesaplandı.

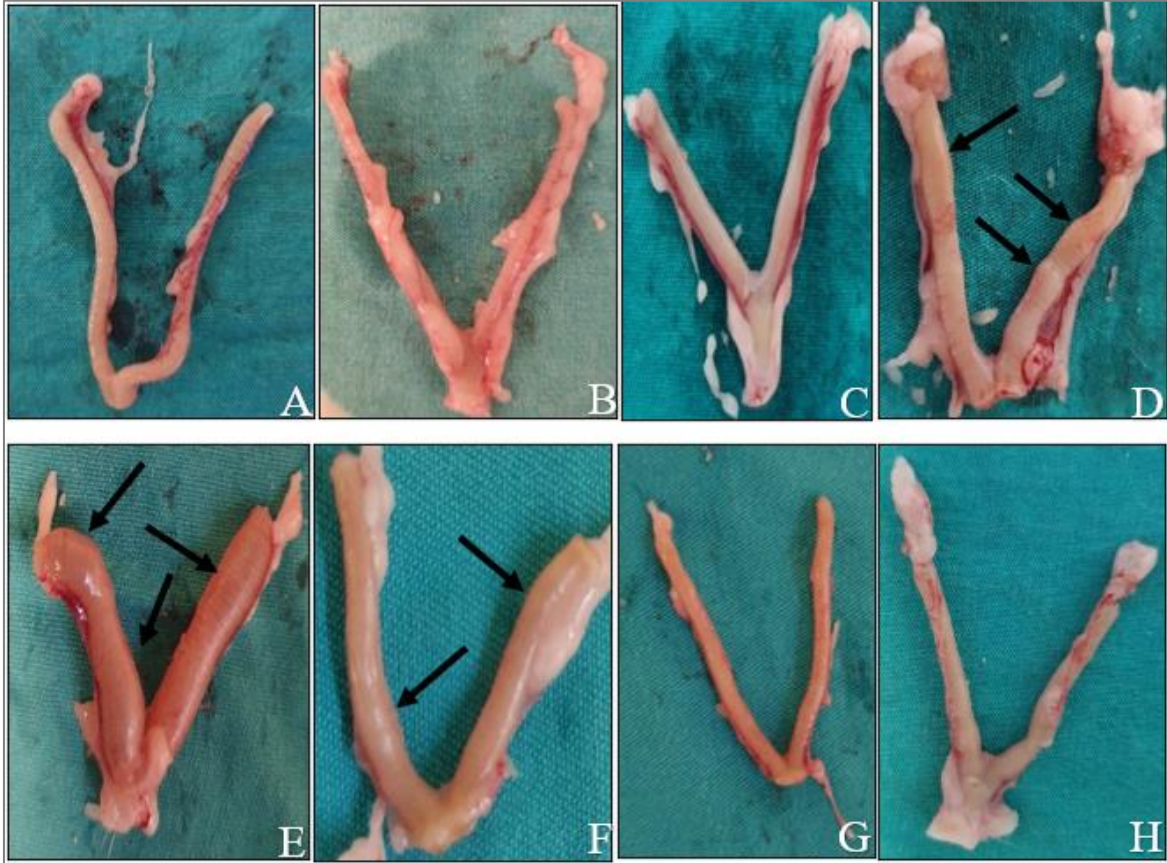
3.6. İstatistiksel Analizler

Uterusa organ katsayısı ile serum MMP-9 ve TIMP-1seviyelerin ELISA, ve PCNA, α -SMA,TGF- β 3, Bcl-2 IHC sayısal verileri istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistikler Eistatistik Firması (Samsun/Türkiye) tarafından hizmet alımı şeklinde yapıldı. Veriler IBM SPSS V23 ile analiz edildi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Üç ve üzeri gruplara göre normal dağılan verilerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Duncan testi ile incelendi. Üç ve üzeri gruplara göre normal olmayan verilerin dağılım karşılaştırmasında Kruskall Wallis H testi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile incelendi. Analiz sonuçları nicel veriler için ortalama + standart sapma ve ortanca (minimum – maksimum) şeklinde sunuldu. $p<0,050$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı Kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Uterusun Makroskopik Değişiklikleri

NK grubu (Resim 4.1A) , D3 grubu (Resim 4.1B), UPA grubu (Resim 4.1C), ve Sham (Resim 4.1H), grubuna ait uteruslar normal görünümdeydi. Ancak, UFM (Resim 4.1D), D3T (Resim 4.1E) ve UPAT (Resim 4.1F) gruplarına ait uteruslar asimetric hornlu ve hemarojik görünümdeydi ek olarak UFM grubunda kistik yapı belirgindi. D3+UPAT (Resim 4.1G) grubuna ait uterusların makroskopik görüntüsü NK grubundakine neredeyse benzerdi.



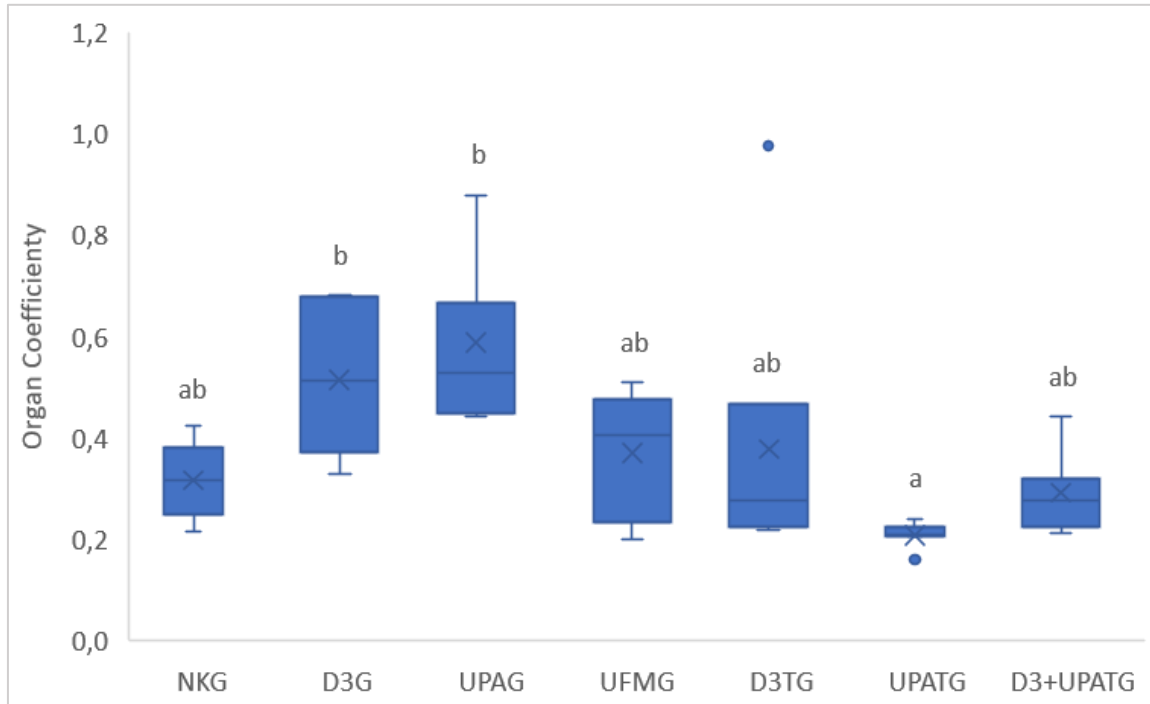
Resim 4.1. Deney gruplarına ait uterusların makroskopik görüntüleri. NKG (A), D3G (B), UPAG (C) UFMG (D), D3TG (E), UPATG (F), D3+UPATG (G,) SG (H)

4.2. Uterus Organ Katsayısı (Uterus organ Coefficient)

Deneyin başından sonuna kadar, sıçanların ağırlığı günlük olarak ölçüldü. Deney bitiminden sonra, her gruba ait sıçanların uterus dokuları tartıldı. Sıçanların ağırlığı ve uterusun ağırlığı,

organ katsayısını hesaplamak için kullanıldı. Uterus katsayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: Organ katsayısı = Uterus ağırlığı (mg)/Sıçan vücut ağırlığı (g) × 100.

Gruplara göre Organ Katsayısı ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$). D3 ve UPA gruplarına ait uterus organ katsayısı NK grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p < 0,001$) ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). İkili karşılaştırmalarda D3G ile UPAG anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.1). UFM grubuna ait uterusların organ katsayısı NK grubundakinden daha yüksekti ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). UPAT grubuna ait uterusların organ katsayısı UFM grubundakinden daha düşüktü ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). Ancak D3T grubuna ait uterusların organ katsayısı UFM grubundakinden daha yüksekti ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). D3+UPAT grubuna ait uterus organ katsayısı UFM grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldı ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). D3T grubuna ait uterusların organ katsayısı NK grubundakinden daha yüksekti ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). UPAT grubuna ait uterusların organ katsayısı NK grubundakinden daha düşüktü ($p < 0,001$) (Şekil 4.1). Üç tedavi grubu arasında, D3+UPAT grubuna ait uterus organ katsayısı, NK grubunkine en benzer olanıydı.



Şekil 4.1. Gruplara göre organ katsayısı (Coefficient) değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları, Kruskal Wallis H testi ($p < 0,001$), a-b: Aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur (Dunn testi)

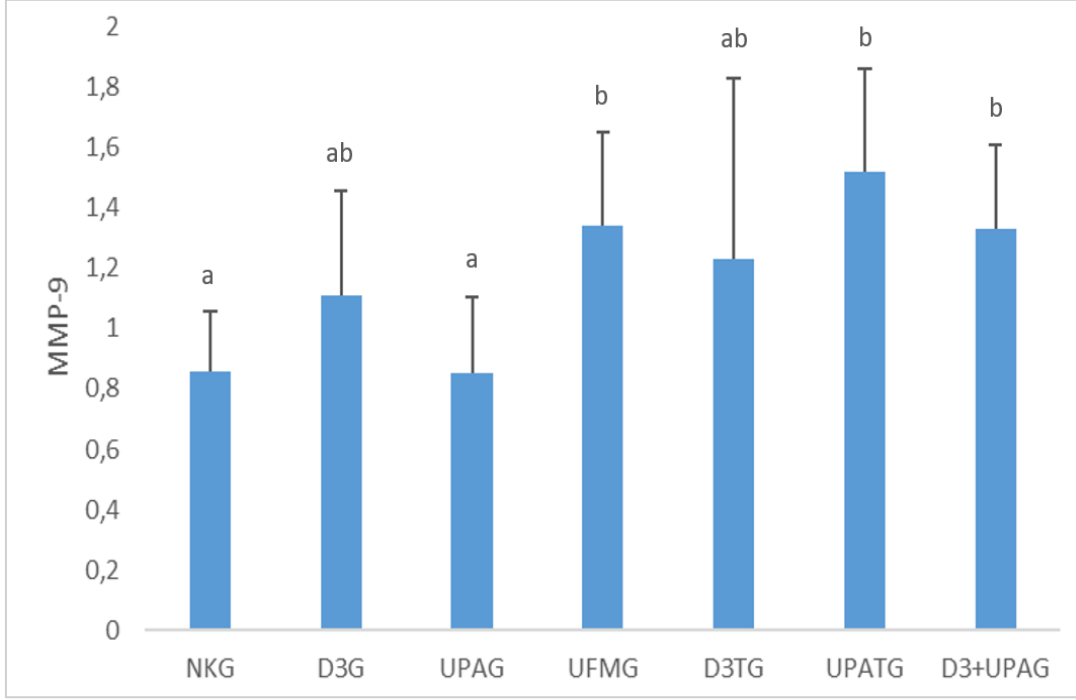
D3T, UPAT ve D3+UPAT gruplarını karşılaştırdığımızda UFM grubuna göre, en yüksek organ katsayısı D3T grubunda gözlemlenirken, en düşük organ katsayısı UPAT grubunda tespit edildi (Şekil 4.1). Bu bulgular, tek başına D3 vitamini uygulanan uterin fibroid boyutunun, tek başına UPA ya da D3+UPA kombine tedavisine kıyasla azaltmadığını göstermektedir.

4.3. ELISA Bulguları

Tüm gruplara ait serum MMP-9 ve TIMP-1 değerleri ELİSA yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

4.3.1. Serum MMP-9 bulguları

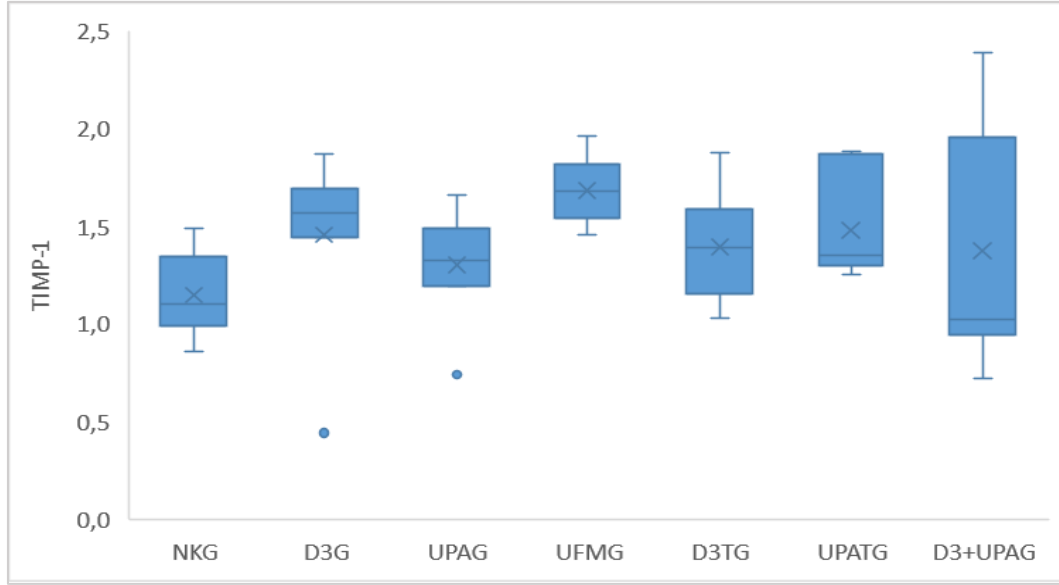
MMP-9 için yapılan ELİSA sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; NK ve UPAG arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmazdan, D3G ve D3TG'nun birbirine yakın olduğu, ancak NK ve UPAG'a göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış MMP-9 seviyelerine ulaşıldığı dikkati çekti. UFMG, UPATG ve D3+UPATG gruplarında ise kendi aralarında benzer ancak NKG ve D3 uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artmış MMP-9 düzeyi izlendi. Bu bulgular UPA 'nın UF modelinde kollagenaz aktivitesi açısından D3 vitaminine göre daha etkin olduğunu, ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. D3 vitamini ve UPA' nın birlikte uygulandığı grupta ise MMP-9 seviyesi açısından D3 vitamini baskın etki gözlenmiş olup, bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($P<0.008$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Gruplara göre MMP-9 değerlerine sütun grafiği ve karşılaştırma sonuçları, tek yönlü varyans analizi ($p < 0,008$), a-b: Aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur (Duncan testi)

4.3.2. Serum TIMP-1 bulguları

Tüm grupları kıyasladığımızda, gruplar arası serum TIMP-1 ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,109$). D3 ve UPA gruplarına ait ratların serum TIMP-1 seviyelerinde NK grubuna göre bir artış bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p < 0,109$) (Şekil 4.3). UFM grubuna ait ratlarda serum TIMP-1 seviyeleri, NK grubuna kıyasla daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p < 0,109$) (Şekil 4.3). İkili karşılaştırmalarda, D3T ve UFM grubu arasında serum TIMP-1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p < 0,109$) (Şekil 4.3). UPAT ve D3+UPAT gruplarına ait ratlarda serum TIMP-1 seviyelerinin UFM grubuna kıyasla azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı tespit edildi ($p < 0,109$) (Şekil 4.3). D3T ve UPAT gruplarına ait ratlarda serum TIMP-1 seviyelerinin NK grubuna kıyasla bir artış bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı tespit edildi ($p < 0,109$) (Şekil 4.3). Ayrıca D3+UPAT grubuna ait ratlarda serum TIMP-1 seviyelerinin NK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p < 0,109$) (Şekil 4.3). Bu bulgular uygulanan tedavinin dokudaki MMP-1 inhibitörü üzerinden anlamlı bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

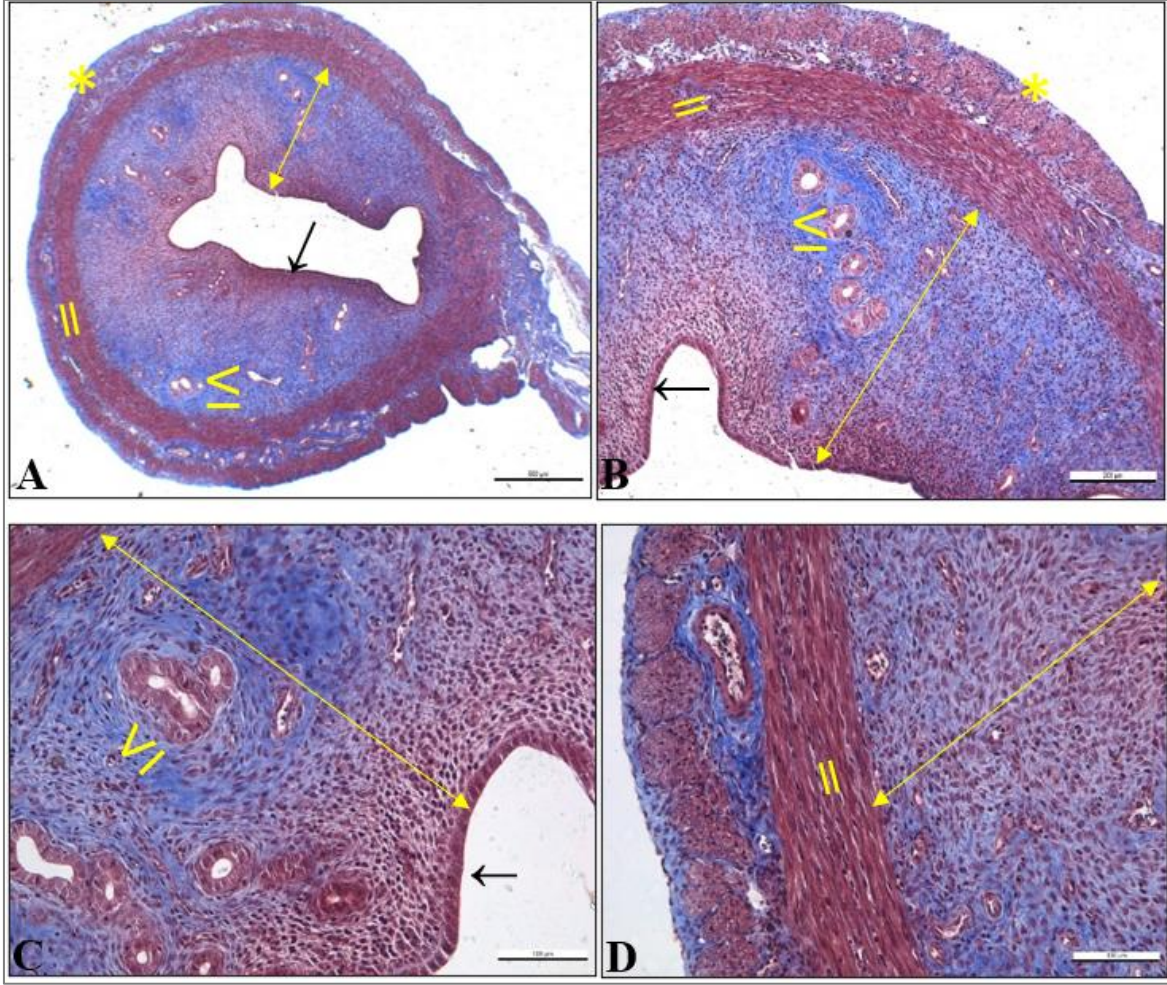


Şekil 4.3. Gruplara göre TIMP-1 değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları, Kruskal Wallis H testi ($p < 0,109$)

4.4. Masson's Trikrom Boyaması Histopatolojik Bulguları

4.4.1. Kontrol grubu

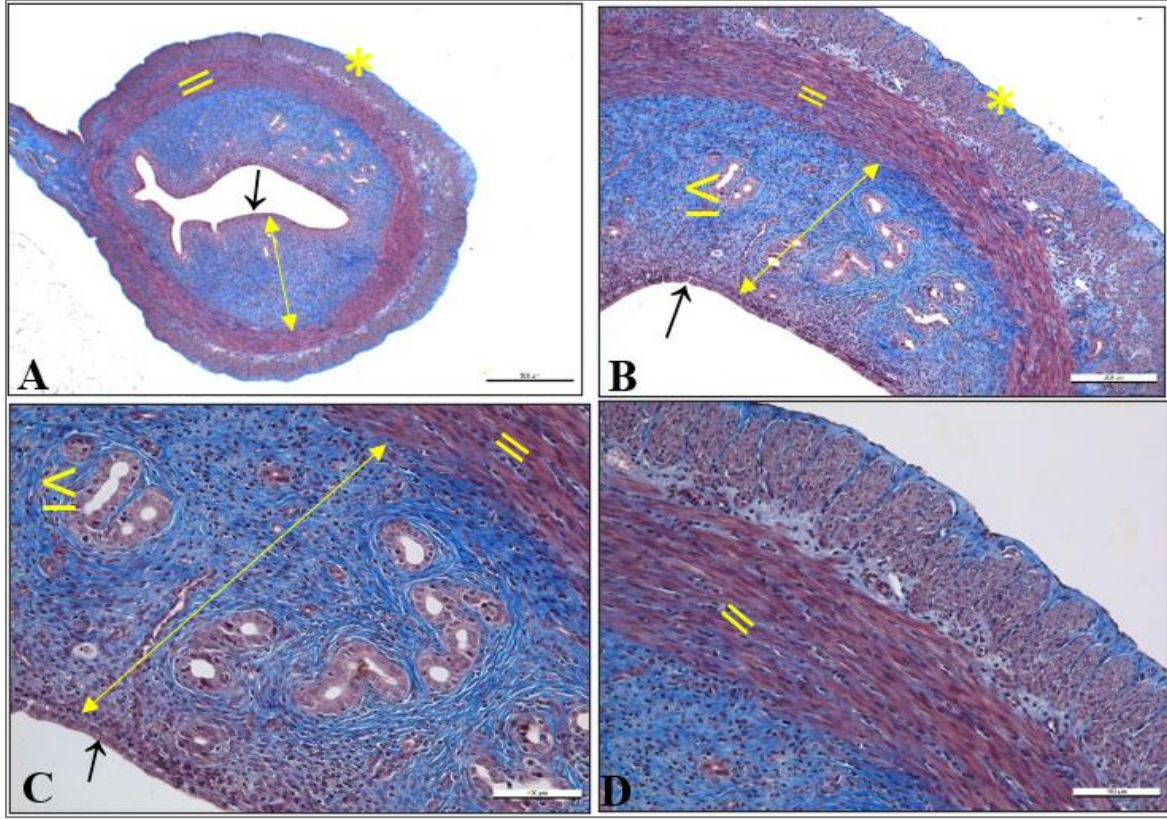
Kontrol grubuna ait incelemelerde, uterusun; endometriyum, myometriyum ve perimetriyum sınırları belirgin bir şekilde, normal histomorfolojik yapılarıyla ayırt edildi (Resim 4.2.A,B). Endometriyumda, lümenin tek katlı prizmatik epitel ile döşeli olduğu, lamina propriada uterus bezlerinin ve ekstraselüler matriksin homojen bir dağılım gösterdiği (Resim 4.2.C), myometriyumda sirküler ve longitudinal kas tabakalarının sınırlarının belirgin olduğu görüldü (Resim 4.2.D). Perimetriyum normal seroza yapısında izlendi (Resim 4.2.A,B,D).



Resim 4.2. NK grubuna ait Masson Trikrom boyaması (A). Endometriyum (↔), myometriyum (=) ve perimetriyum (*), normal histomorfolojik yapılarıyla ayırt edilmektedir (B). Endometriyumda, tek katlı prizmatik epitel (←), lamina propriada uterus bezleri (≤) izleniyor (C). Myometriyumda (=) sirküler ve longitudinal kas tabakaları görülmüyor (D). (Masson's Trikrom A: 4X , B: 10X, C: 20X , D: 20X)

4.4.2. D3 vitamini grubu

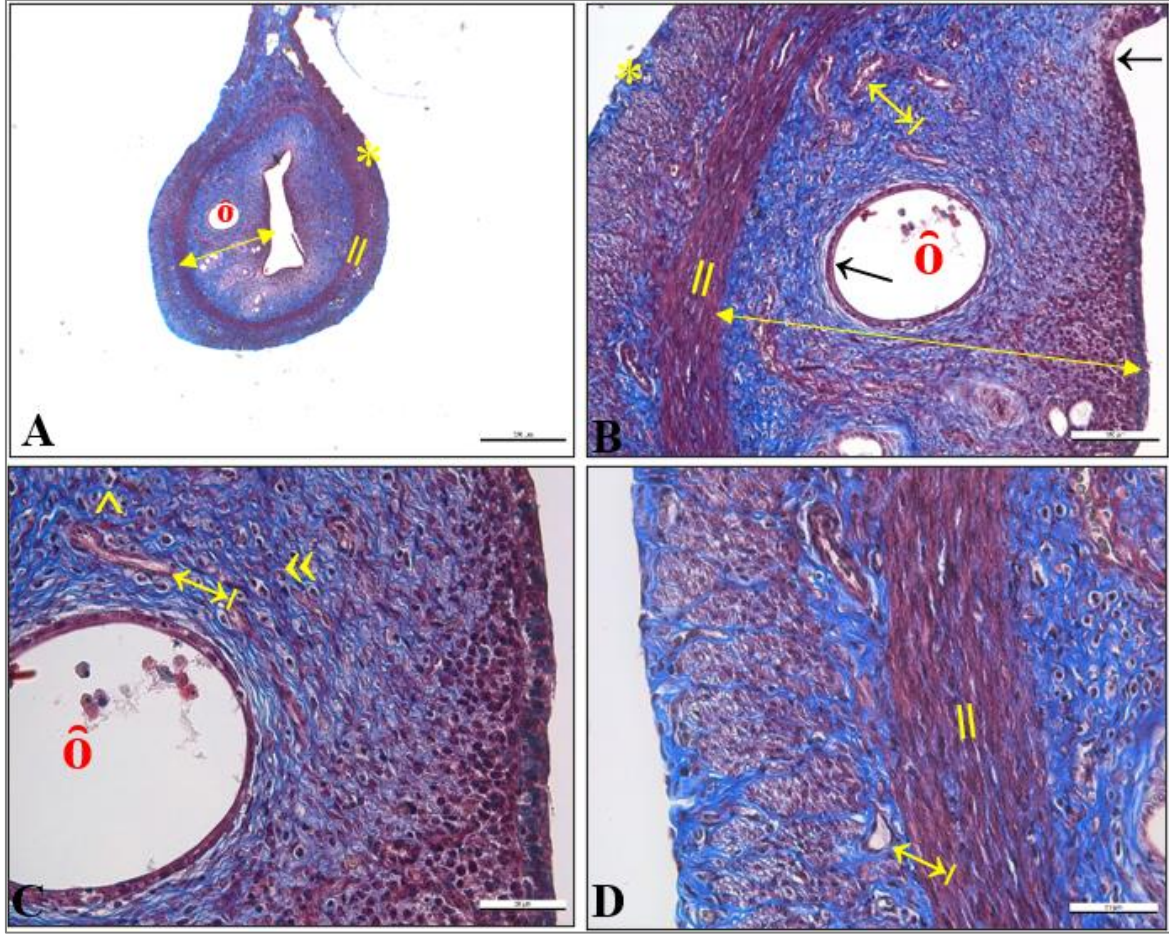
D3 vitamini uygulanan grupta yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, kontrol grubuna benzer şekilde, uterus tabakaları ve tabakalara ait histolojik yapılar normal histomorfolojik görüntüleriyle ayırt edildi (Resim 4.3.A,B,C,D).



Resim 4.3. D3 grubuna ait Masson Trikrom boyaması (A).Endometriyum (\leftrightarrow), myometriyum (=) ve perimetriyum (*) sınırları belirgin bir şekilde, normal histomorfolojik yapılarıyla ayırt edilmektedir (B). Endometriyumda, tek katlı prizmatik epitel (\leftarrow) . Lamina propriada uterus bezleri (\leq) görülüyor (C). Myometriyum (=) (D). (Masson's Trikrom A: 4X , B: 10X, C: 20X , D: 20X)

4.4.3. UPA grubu

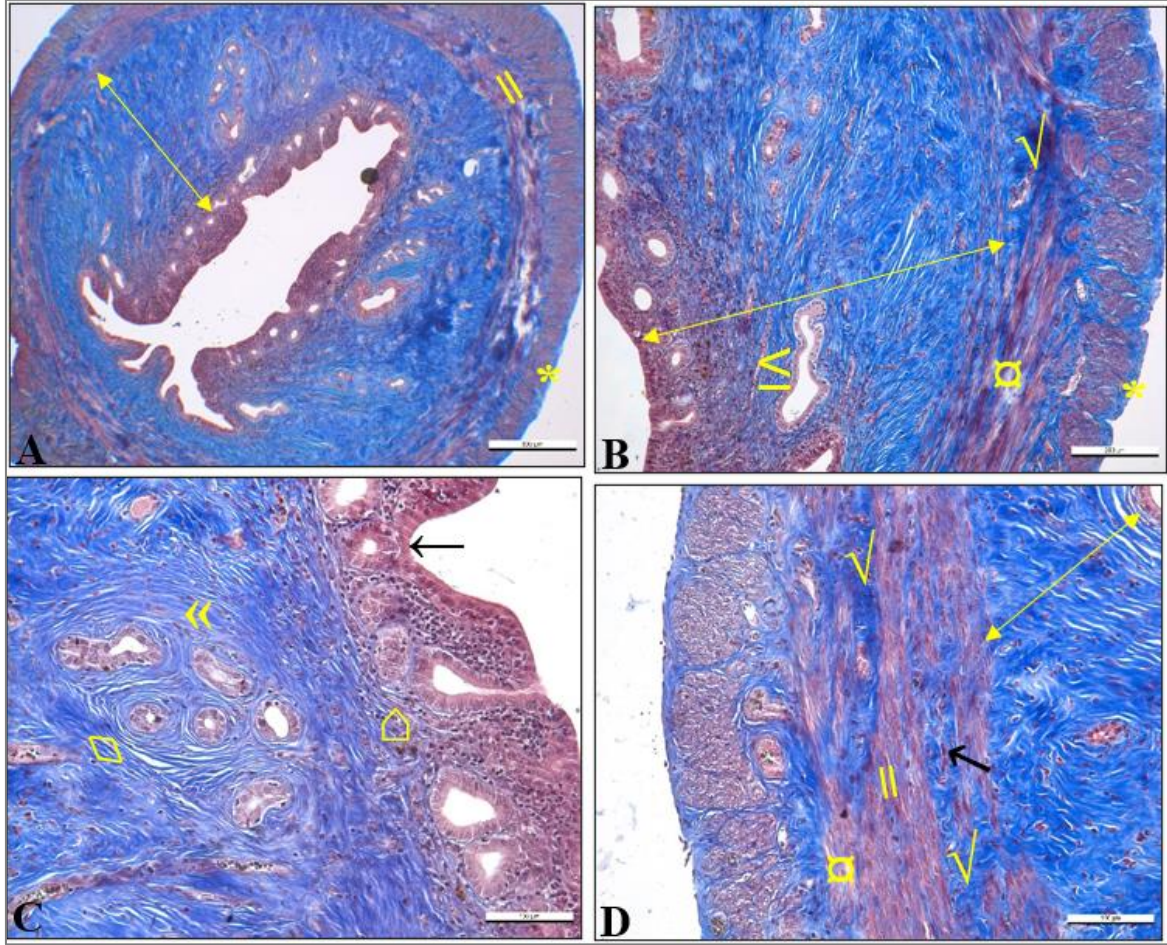
Kontrol grubu ve D3 vitamini uygulanan kontrol grubuna benzer şekilde bu grupta da uterus tabakalarının sınırları belirgin olarak ayırt edilebildi (Resim 4.4.A,B,D). Farklı olarak epitel hücrelerinin boyunun kısalarak yer yer tek katlı kübik epitele dönüştüğü göze çarptı. Epitelde meydana gelen bu değişikliklik, uterus bezlerinde daha belirgin olarak ayırt edildi (Resim 4.4.B,C). Doku boyunca kapiller dilatasyon ilgiyi çekti (Resim 4.4.C,D). Diğer gruplardan ayrıcalı olarak bu grupta lamina propriada bulunan hücrelerin artış gösterdiği beraberinde apoptotik hücrelerin de göreceli olarak arttığı izlendi (Resim 4.4.C). Bu bulgu UPA'nın matriks metalloproteinazların üretimini artırması ve apoptosisi indüklemesiyle uyumlu olarak değerlendirildi. Kas hücrelerinde normal histomorfolojik yapı izlendi.



Resim 4.4. UPA grubuna ait Masson's Trikrom boyaması (A). Endometriyum (↔), myometriyum (=) ve perimetriyum (*) sınırları belirgin bir şekilde, normal histomorfolojik yapılarıyla ayırt edilmektedir (B). Uterus bezlerinde kistik dilatasyon (ô), kapiller dilatasyon (⇓), lamina propriada apoptotik hücreler (^), stromal hücreler («) (C). Myometriyumda (=) sirküler ve longitudinal kas tabakaları, kapiller dilatasyon (⇓) (D). (Masson's Trikrom A: 4X , B: 10X, C: 40X , D: 40X)

4.4.4. Fibroid model grubu

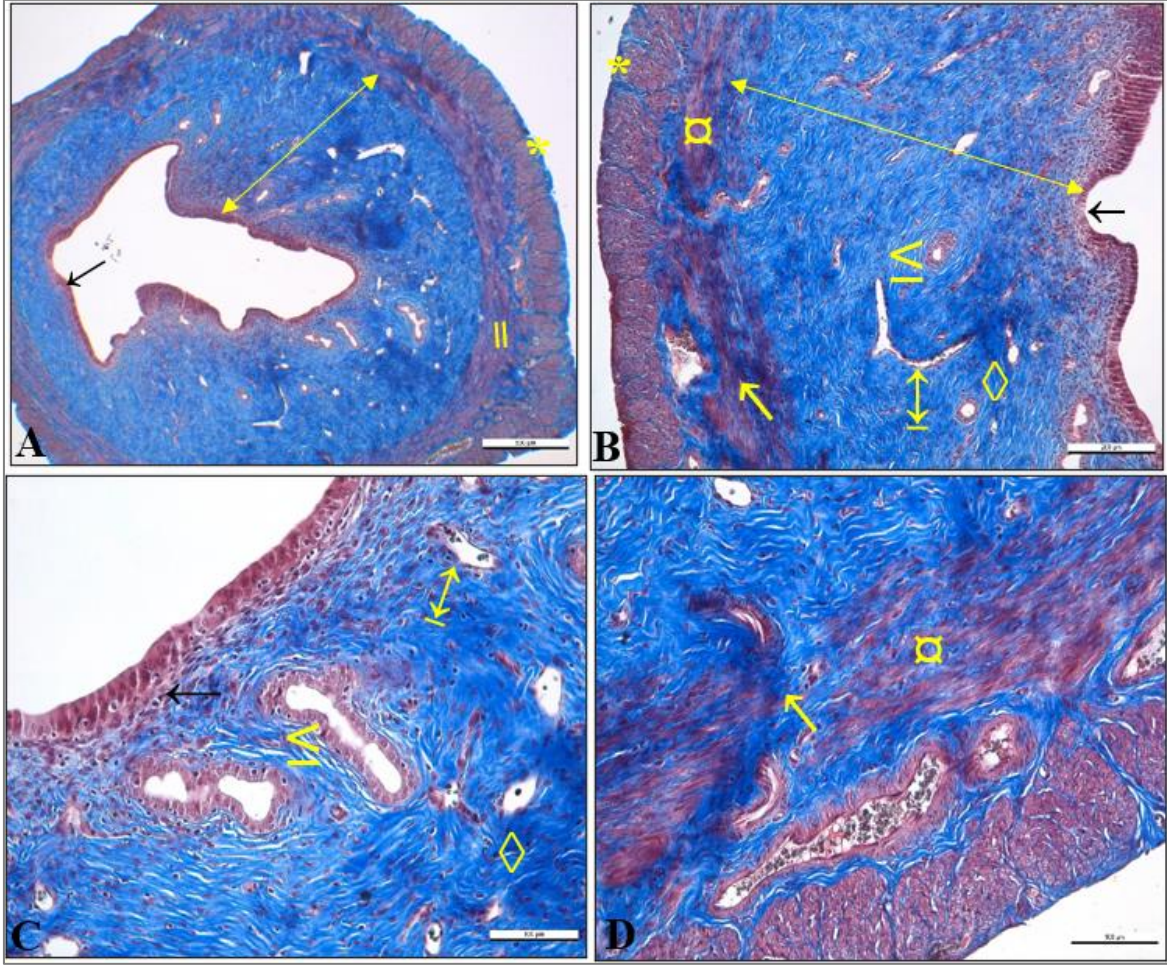
Bu grupta yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, endometriyum yüzey epitelinde dejeneratif değişiklikler ve lamina propriada yoğun fibrozisi destekler şekilde kollagen lif boyanması dikkati çekti (Resim 4.5.A,B,C). Lamina propriadaki yoğun kollagen yapısı ve heterojen fibrotik alanların doku boyunca yayıldığı gözlemlendi. Subepitelial bölgede hemosiderin yüklü histiyositler görüldü (Resim 4.5.C). Myometriyumda kas hücrelerinde dejenerasyon ve ödem olduğu, kas hücrelerin birbirleriyle düzensiz kesişim göstererek kıvrımlar oluşturduğu izlendi, bu yapı fasikül organizasyonunun dejenere olmasıyla uyumluydu. Dejenere kas hücrelerinin arasında fibrotik doku görüldü (Resim 4.5.D).



Resim 4.5. UFM grubuna ait Masson's Trikrom boyaması (A). Bu grupta uterus katmanlarının sınırları belirgin değildir, endometriyum (↔), myometriyum (=), myometriyumda ödem (⊞), fibrotik alan (√), perimetriyum (*), (B). Yüzey epitelinde dejeneratif değişiklikler (←), heterojen ekstraselüler matriks (◇), subepiteliyal bölgede hemosiderin yüklü histiyositler (△), azalmış stromal hücreler (≪) (C). Myometriyum (≡), kas hücrelerinde dejenerasyon (↖), ödem (⊞), fibrotik alan (√) görülmekte (D) . (Masson's Trikrom A: 4X , B: 10X, C: 20X , D: 20X)

4.4.5. Fibroid modeli + D3 vitamini tedavi grubu

Uterin fibroid oluşturulup, tedavi amaçlı D3 vitamini uygulanan grupta yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, endometriyumda tek katlı prizmatik epitel yapısı, kontrol grubuna benzer şekilde ayırt edildi (Resim 4.6.A,B). Kapiller dilatasyon bu grupta da belirgindi (Resim 4.6.B). Kollagen liflerin , fibroid grupla uyumlu olarak heterojen dağılım gösterdiği izlendi (Resim 4.6.C). Miyometriyumun kas tabakasının fibroid gruba benzer özellikler göstererek, dejenerasyona uğradığı görüldü. Kas hücrelerinde ödem bu grupta göze çarptı (Resim 4.6.D).

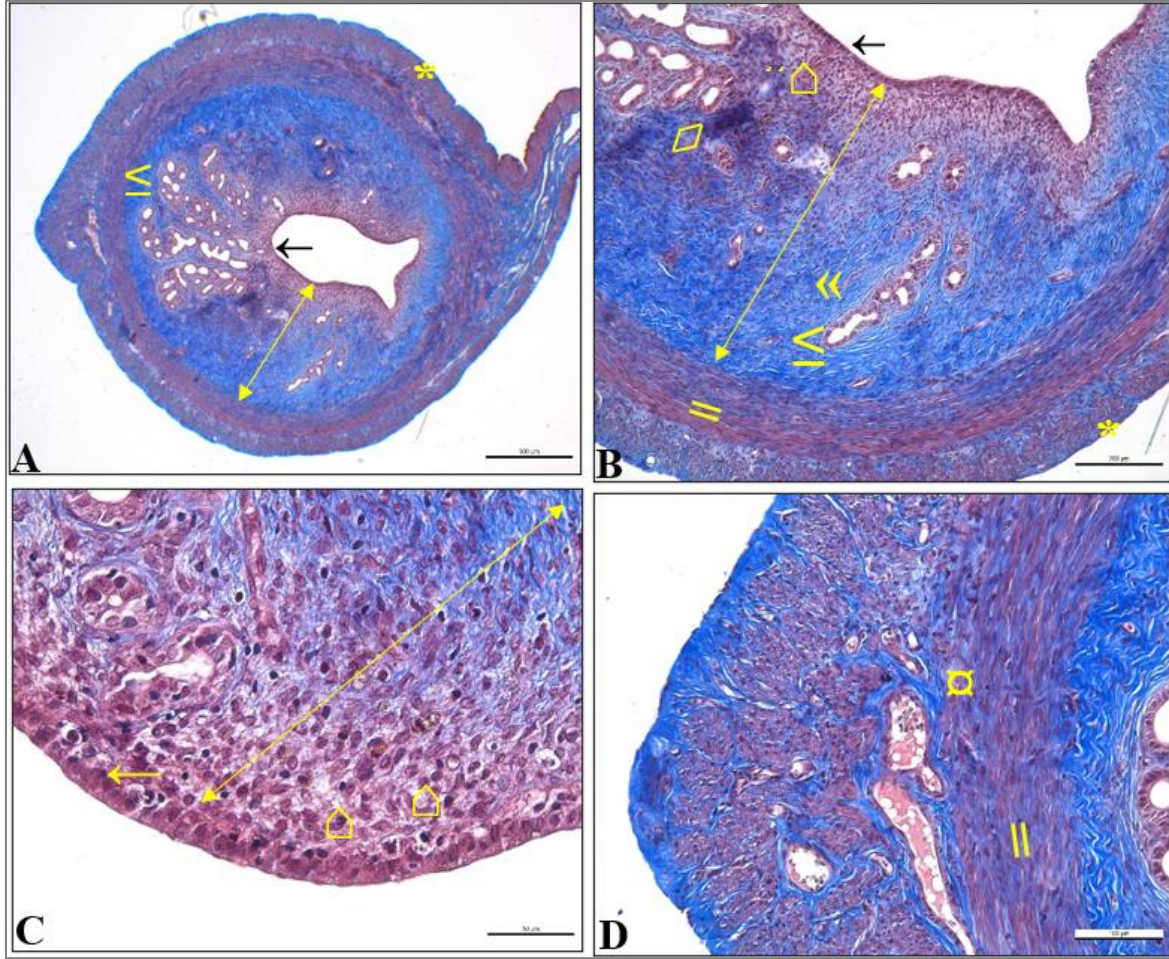


Resim 4.6. D3T grubuna ait Masson Trikrom boyaması. (A). Endometriyumda (\leftrightarrow), tek katlı prizmatik epitel (\leftarrow) yapısı, kapiller dilatasyon (\updownarrow), lamina propriada uterus bezleri (\leq), heterojen ekstraselüler matriks (\diamond), myometriyumda ödem (\square), kas hücrelerinde dejenerasyon (∇), perimetriyum (*) (B). lamina propriada uterus bezleri (\leq), heterojen ekstraselüler matriks (\diamond), kapiller dilatasyon (\updownarrow) (C). Kas tabakasında dejenerasyon (∇), myometriyumda ödem (\square) görülmektedir (D). (Masson's Trikrom A: 4X , B: 10X , C: 20X , D: 20X)

4.4.6. Fibroid modeli +UPA tedavi grubu

Uterin fibroid oluşturulup, tedavi amaçlı UPA uygulanan grupta yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, endometriyumda tek katlı prizmatik epitel yapısı, kontrol grubuna benzer şekilde ayırt edildi (Resim 4.7.A,B). Subepiteliyal bölgede hemosiderin yüklü histiyositlerin varlığı bu grupta da görüldü ancak görece fibroid gruptan az oldukları saptandı (Resim 4.7.B). Yer yer dejenerasyona uğramış, kollagen lif demetleri ile çevrelenmiş bez yapıları da görüldü (Resim 4.7.B). Ancak yoğunluğun fibroid gruba kıyasla oldukça azalmış olduğu belgindi. Lamina proprianın hücre sayısında artış belgindi ve kollagen yapısının fibroid model grubundan daha homojen bir şekilde dağıldığı görüldü (Resim 4.7.B,C).

Miyometriyumun kas tabakasının kontrol grubuna benzer olarak daha düzenli bir yapı sergilediği ve kas hücrelerinin ve nükleuslarının daha iğsi formda olduğu görülse de kontrol grubundan ayrıcalıklı olarak yer yer kas hücrelerinde dejenerasyonun ve ödemin de devam ettiği izlendi (Resim 4.7.D). Bu deformasyon fibroid gruba kıyasla oldukça azalmış düzeydeydi.

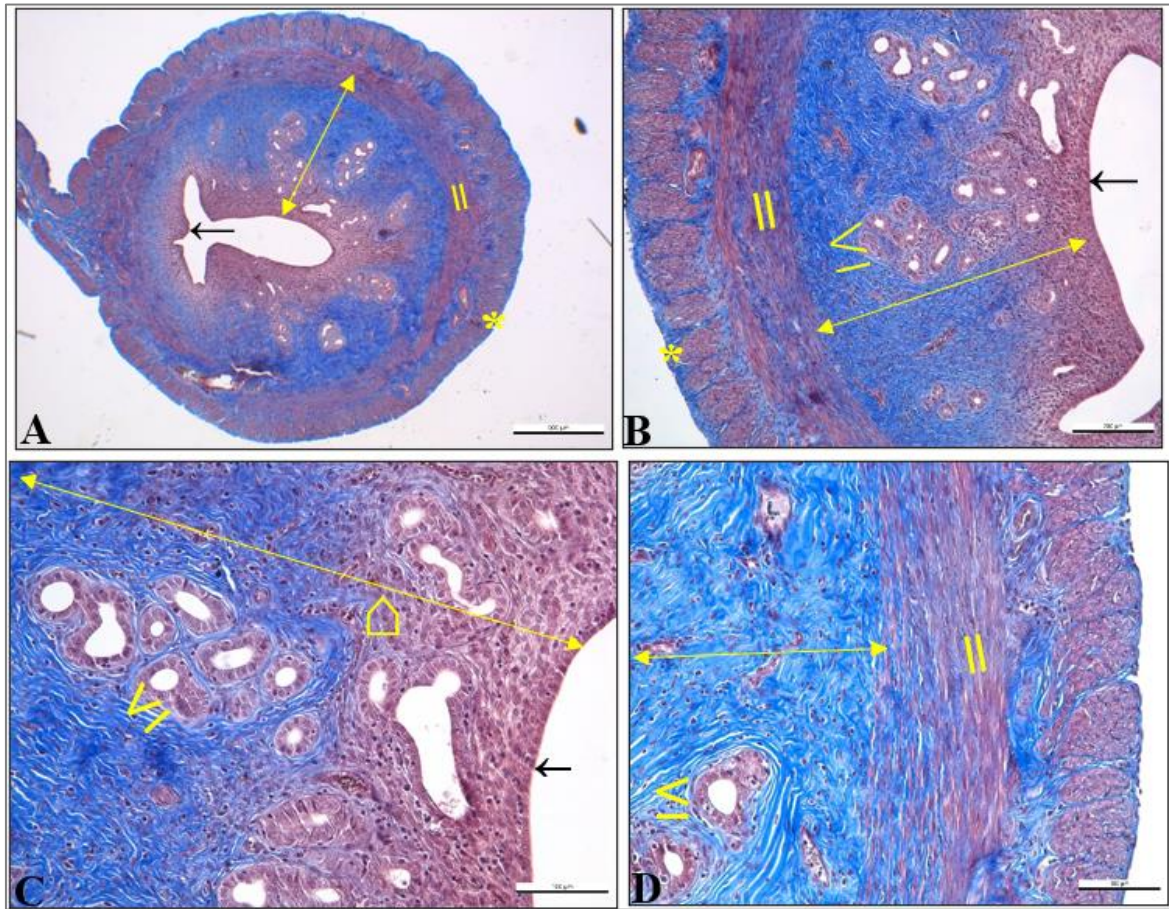


Resim 4.7. UPAT grubuna ait Masson Trikrom boyaması (A). Tek katlı prizmatik epitel (←), heterojen ekstraselüler matriks (◊), subepiteliyal bölgede hemosiderin yüklü histiyositler (△), azalmış stromal hücreler (◊), lamina propriada uterus bezleri (◻), perimetriyum (*) (B). Endometriyumda (↔) tek katlı prizmatik epitel (←), subepiteliyal bölgede hemosiderin yüklü histiyositler (△) (C). Miyometriyumda düzenli kas tabakası ve iğsi kas hücreleri (=), yer yer kas hücrelerinde ödem (≡) (D). (A:4X, B: 10X, C: 40X, D: 20X; Masson's Trikrom)

4.4.7. Fibroid modeli UPA+D3 vitamini tedavi grubu

Uterin fibroid oluşturulup, tedavi amaçlı UPA+D3 vitamini uygulanan grupta yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, uterus tabakalarının sınırları NK grubuna benzer bir şekilde

düzenli sınırlarla ayırt edilmektedir (Resim 4.8.A,B). Endometriyumda tek katlı prizmatik epitel olağan yapısındaydı (Resim 4.8.B,C). Lamina proprianın subepiteliyal bölgesinde lokalize hemosiderin yüklü histiyositler bu grupta da görüldü ancak fibroid model oluşturulan gruplar arasında görece en az olan grup olarak belirlendi (Resim 4.8.C). Lamina propriadaki fibroze bağlı heterojenitenin en aza inerek kontrol grubuna yaklaştığı görüldü (Resim 4.8.C). Miyometriyumun, homojen organize kas liflerinden oluştuğu görüldü. Kas lifleri arasında ödem izlenmedi (Resim 4.8.D). Kontrol grubuna en yakın histomorfolojik yapıya sahip grubun bu grup olduğu görüldü.



Resim 4.8. D3+UPAT grubuna ait Masson Trikrom boyaması. (A). Endometriyum (↔), endometriyal bezler (≤), myometriyum (=) ve perimetriyum (*) sınırları belirgin bir şekilde, normal histomorfolojik yapılarıyla ayırt edilmektedir (B). Endometriyumda tek katlı prizmatik epitel (←), lamina propriada subepiteliyal bölgede lokalize hemosiderin yüklü histiyositler (Δ),endometriyal bezler (≤) (C). Endometriyum (↔), miyometriyum (=), endometriyal bezler (≤) (D). (A: 4X B:10X, C:20X, D:20X; Masson's Trikrom)

Sonuç olarak; klinikte fibroid tedavisinde rutin olarak kullanılan UPA'nın fibroid patolojisinde önemli bir iyileşme sağladığı bir kez daha izlenmiş oldu. D3 vitamini

uygulanan grupta uygulanan dozun uterus genelinde olumlu etki gösterdiği ancak yetersiz kaldığı belirlendi. Kontrol grubuna en yakın iyileşmenin ise UPA ile D3 vitamininin birlikte uygulandığı grupta olduğu saptandı. Bu bulgular ışığında uterin fibroid tedavisinde D3 vitamininin UPA ile sinerjistik etki gösterdiği ve, klinik kullanım için destek tedavi olarak D3 vitamininin de protokole eklenebileceği kanısına varıldı.

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

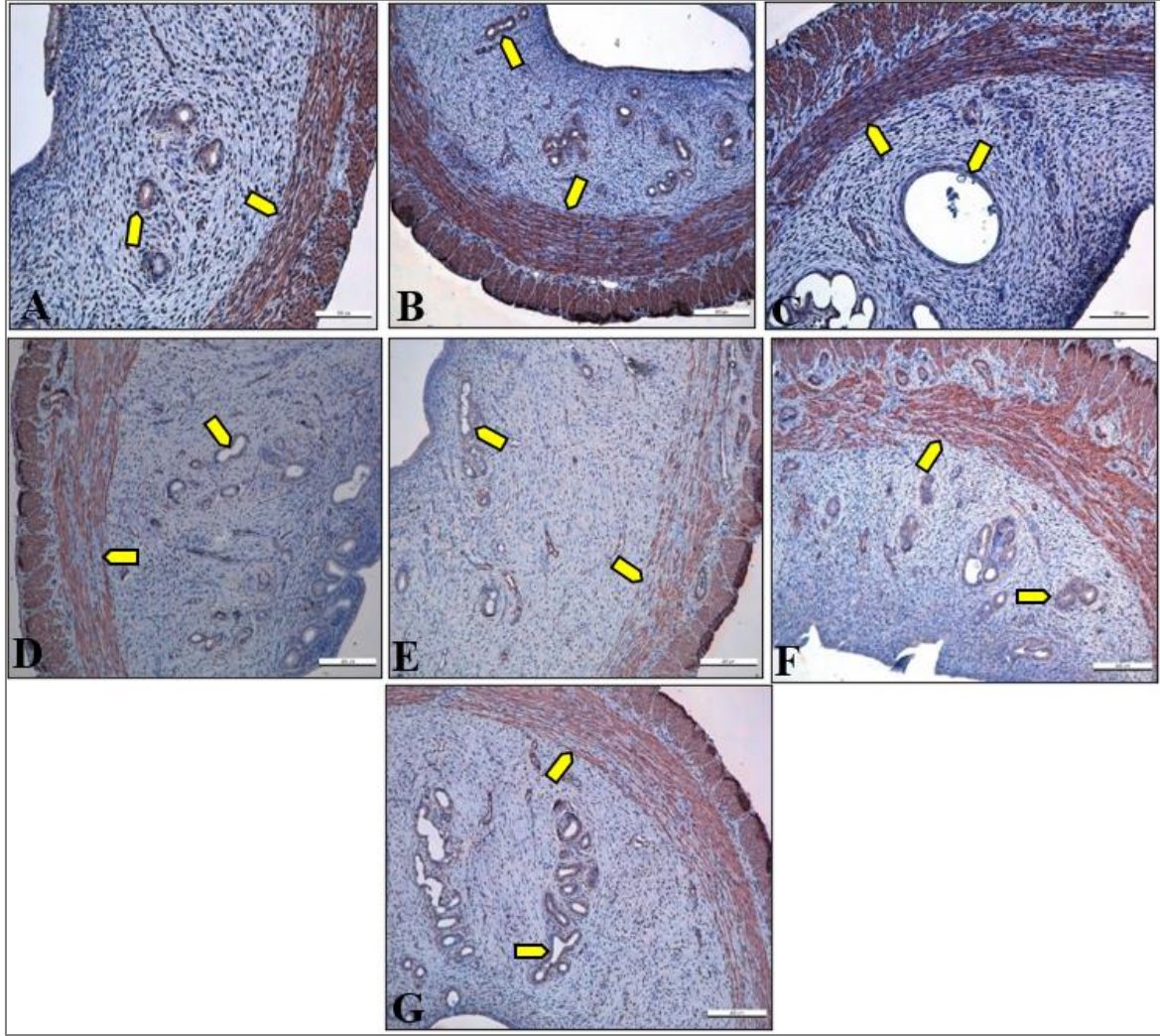
4.5.1. Immunohistokimyasal bulguların değerlendirilmesi

Uterus dokularına ait α -SMA, PCNA, TGF- β 3 ve Bcl-2 antikorlarının immünohistokimyasal H- skor yapıldı. Hiç tutulum göstermeyen hücreler 0, % 50'den az tutulum gösterdiyse 1. Derece, %50-%75 tutulum gösterdiyse 2. Derece, %75'ten fazla tutulum gösterdiyse, 3. Derece olarak sınıflandırıldı.

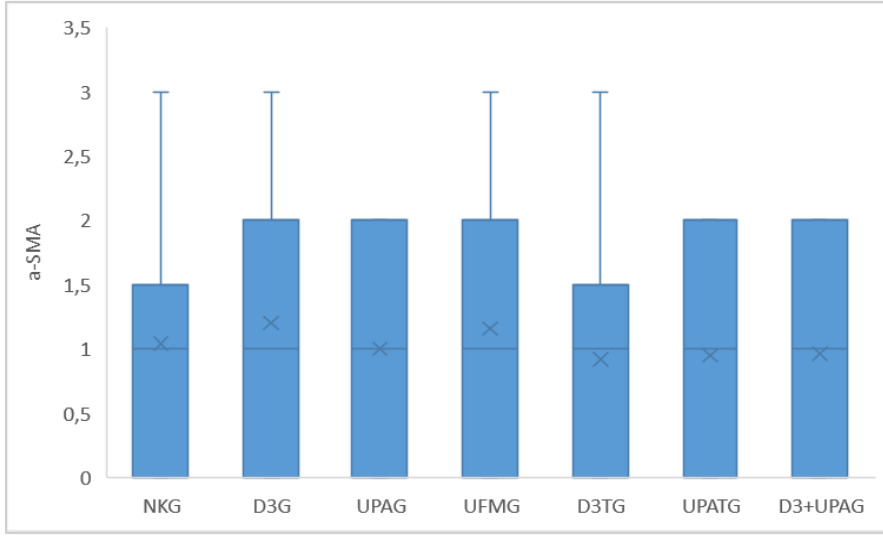
4.5.2. α -SMA bulgular

Tüm gruplarda, α -SMA tutulumu esas olarak düz kas hücrelerinde ve stromal hücrelerde izlendi ve gruplar arası farklılıklar bu bağlamda değerlendirildi (Resim 4.9). NK, D3G ve UPAG da özellikle miyometriyumda kuvvetli tutulum ayırt edilirken, stromada da göreceli çok sayıda hücrede immünreaktivite izlendi (Resim 4.9.A,B,C). UFM grubunda miyometriyumdaki tutulumun, azalan düz kas hücresine bağlı olarak azaldığı görülürken, stromal hücrelerde immünreaktivitenin korunduğu ilgiyi çekti (Resim 4.9.D). D3T grubunda immünreaktivite yoğunluğu tüm gruplara karşın göreceli daha da azalmış olarak gözlemlendi; stromal hücrelerdeki immünreaktivitenin UFM grubuna göre daha zayıf olduğu ilgiyi çekti (Resim 4.9.E). UPAT grubunda immünreaktivitenin UF oluşturulan gruba yakın olduğu; özellikle miyometriyumda ve stromal hücrelerde var olduğu görülürken, son grupta da benzer tutulum yoğunluğu ilgiyi çekti (Resim 4.9.F, G). Işık mikroskop düzeyinde belirlenen bu bulgusal farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0,958$) (Şekil 4.4).

Sonuç olarak UFM grubunda, fibrozise bağlı düz kas hücre yoğunluğunda meydana gelen azalmanın α -SMA tutulumunu belirgin olarak etkilediği, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da özellikle UPA tedavisinin düz kas kaybını engellediği, ikili uygulamada da UPA baskın etkinin devam ettiği görüldü.



Resim 4.9. Tüm gruplara ait uterus dokularında α -SMA immün boyaması. (A): NKG, (B): D3G, (C): UPAG, (D):UFMG, (E):D3TG; (F):UPATG; (G) D3+UPATG Miyometriyumda, uterus bezlerinde ve stromal hücrelerinde (◀) sitoplazmik α -SMA immünoreaktivitesi. (AEC & Hematoksilen, A:20X, B:10X, C:20X, D:10X, E:10X, F:10X, G:10X)

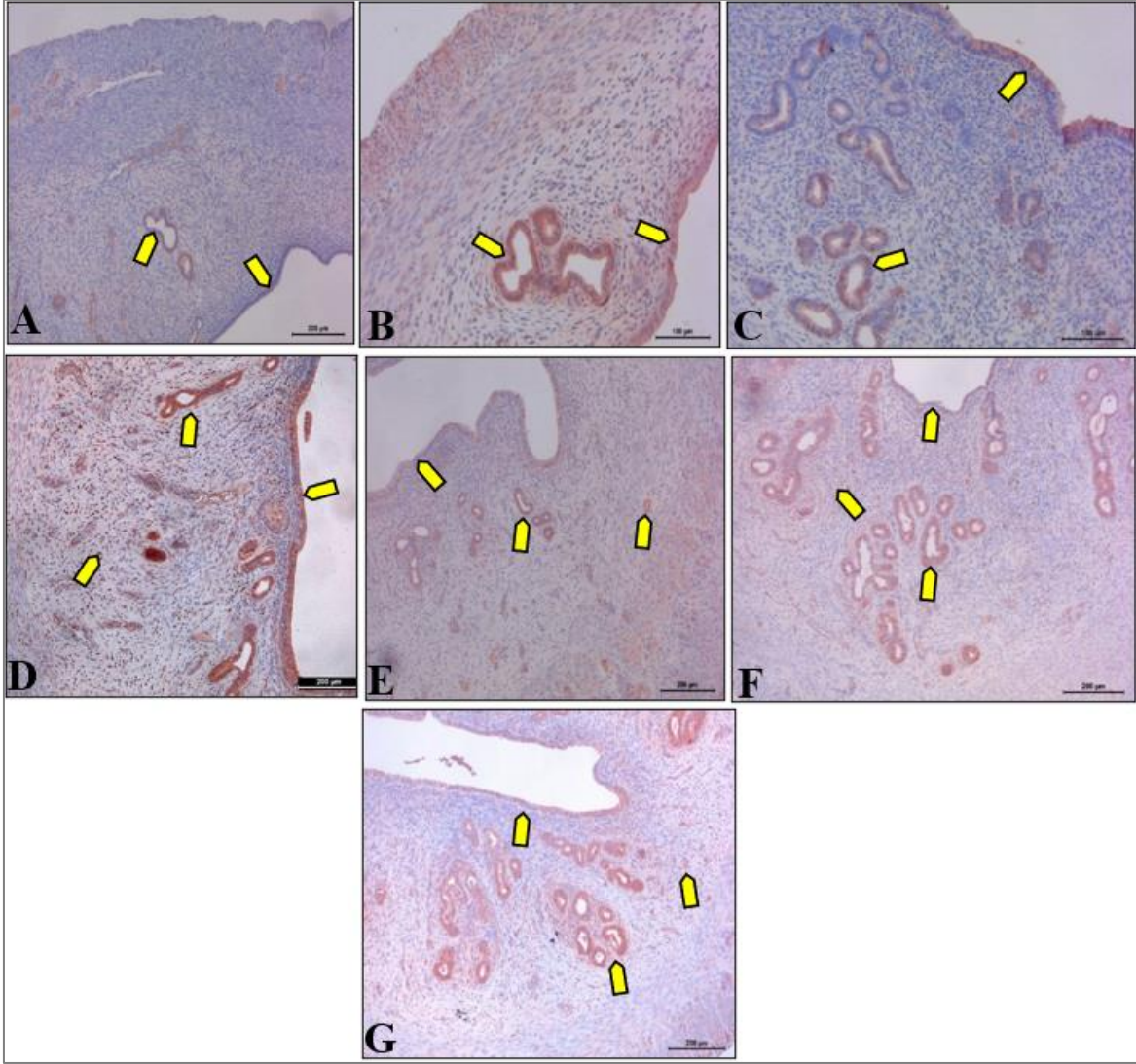


Şekil 4.4. Gruplara göre α -SMA değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları, Kruskal Wallis H testi ($p < 0,958$)

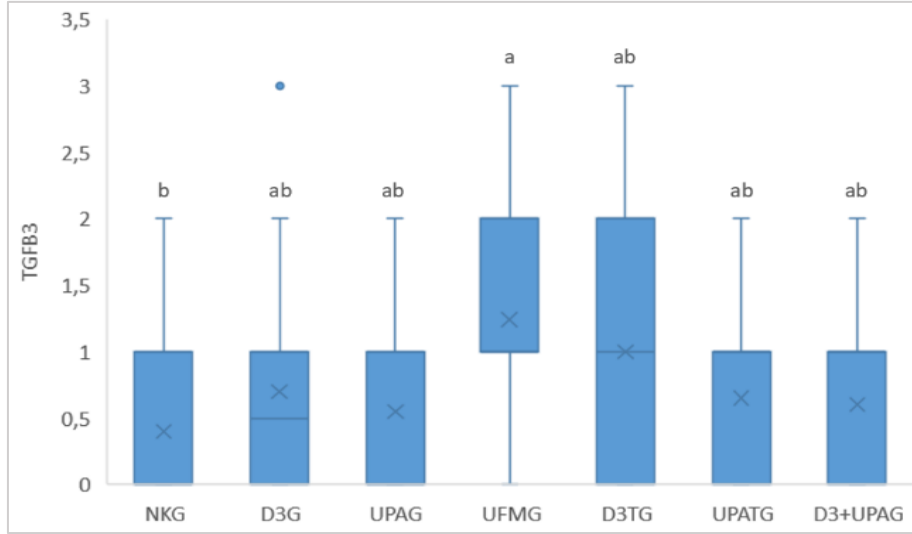
4.5.3. TGF- β 3 bulguları

Tüm gruplarda TGF- β 3 pozitif hücrelerde tutulum sitoplazmik olarak izlendi. Kontrol grubunda tüm gruplar arasında en zayıf immünreaktivite görüldü. TGF- β 3 immünreaktivitesi; özellikle bez epitel hücrelerinde ve daha zayıf olarak da yüzey epiteli ve stromal hücrelerde ayırt edildi (Resim 4.10.A). D3G ve UPA gruplarında tutulumun kontrol grubuna kıyasla yoğun olduğu görüldü (Resim 4.10.B,C), bu bulgu istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. En kuvvetli TGF- β 3 immünreaktivitesi UFM grubunda ilgiyi çekti. Bu grupta epitel hücrelerine ek olarak stromal hücrelerde de yaygın tutulum saptandı (Resim 4.10.D). Bu bulgu istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. D3T grubunda immünreaktivitenin fibroid oluşturulan gruba yakın pozitiflik gösterdiği belirlendi ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Resim 4.10.E). UPAT ve D3+UPAT gruplarında immünreaktivitenin özellikle stromal hücrelerde belirgin olarak zayıfladığı izlenirken, bez ve yüzey epitel hücrelerinde yoğun olduğu görüldü (Resim 4.10.F, G). Tüm tedavi grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0,015$) (Şekil 4.5).

Sonuç olarak TGF- β 3 tutulumunun UF grubunda belirgin olarak arttığı, bunun da fibrozisi tetiklediği görülürken, tedavi amaçlı D3 vitamininin tek başına yada UPA ile kombine kullanımının olumlu etki yaratmadığı saptandı. Bu sitokin için UPA'nın tedavi edici özelliğinin baskın olduğu kanısına varıldı.



Resim 4.10. Tüm gruplara ait uterus dokularında TGF- β 3 immün boyaması. (A): NKG, (B): D3G, (C): UPAG, (D):UFMG, (E):D3TG; (F):UPATG; (G) D3+UPATG stromada, bezlerde ve yüzey epitelinde ve stromal hücrelerde (➡) TGF- β 3 immünoreaktivitesi görülmekte. (AEC & Hematoksilen, A:10X, B:20X, C:20X, D:10X, E:10X, F:10X, G:10X)



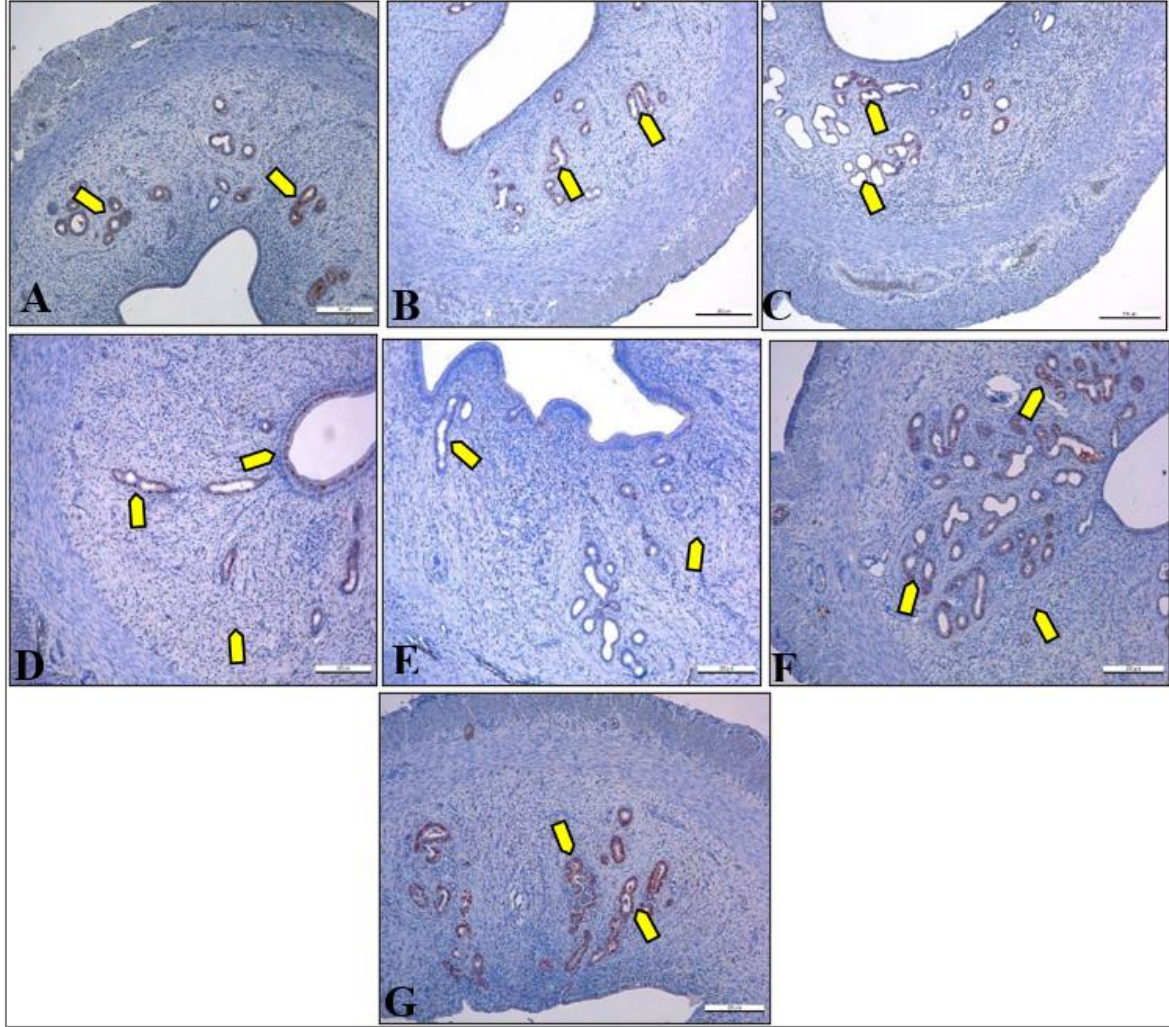
Şekil 4.5. Gruplara göre TGF- β 3 değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları, Kruskal Wallis H testi ($p < 0,015$), a-b: Aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur (Dunn testi)

4.5.4. PCNA bulgular

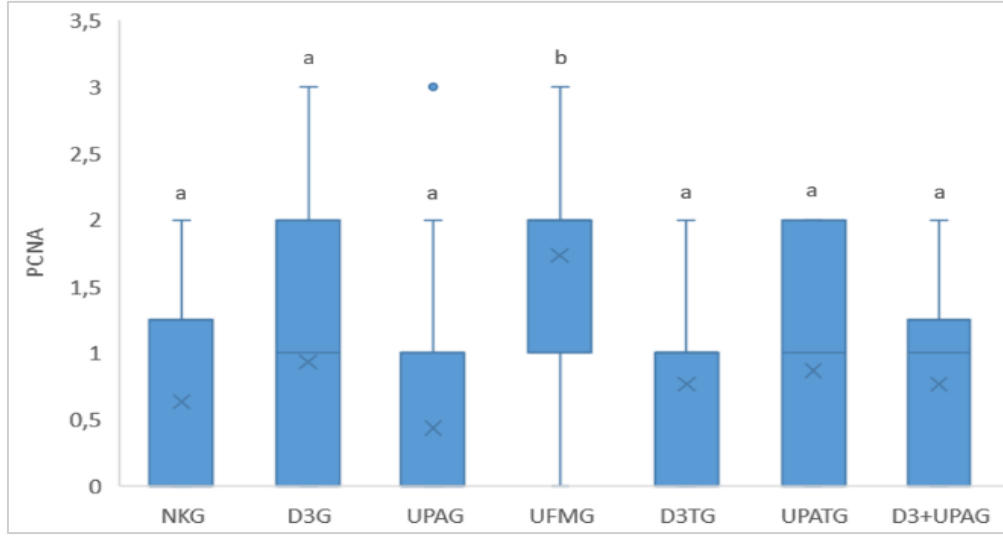
Tüm gruplarda, PCNA tutulumu nükleer olarak değerlendirildi. NK grubu, D3 grubu ve UPA gruplarında az sayıda bez epitel ve yüzey epitel hücreleri ile stromada PCNA pozitif hücreler saptandı (Resim 4.11.A,B,C). Bu gruplar arasında PCNA pozitif hücre sayıları bakımından istatistiksel olarak da anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.6). En çok pozitif hücrenin olduğu grubun UFM oluşturulan grup olduğu ilgiyi çekti. Bu grupta özellikle stromada bulunan hücrelerin genelinde tutulum ilgiyi çekti (Resim 4.11.D). UFM ile tedavi verilmeyen gruplar arasında PCNA tutulum farkı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 4.6). D3T uygulanan grupta UFM grubuna kıyasla bez ve yüzey epitelinde az, lamina propriyada ise UFM grubuna benzer PCNA tutulumu dikkati çekti (Resim 4.11.E). UPAT ve D3+UPAT gruplarında ise bez epitel hücrelerinde PCNA pozitifliği belirgindi. (Resim 4.11.F,G). Bu gruplar ile UFM grubu arasında tutulum istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Ancak D3T, UPAT ve D3+UPAT ile NK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.6).

Sonuç olarak UF grubunda hücre proliferasyonunun diğer tüm gruplara kıyasla arttığı, bu sonucun istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi. Yapılan mikroskopik değerlendirmede D3 tedavi grubunda en az PCNA tutulumu olduğu, dolayısıyla D vitamini uygulamasının hücre proliferasyonunu en etkin azalttığı gözlenirken, bu bulgu istatistiksel

olarak anlamlı bulunmadı. Sinerjistik etkiyi değerlendirdiğimiz son grupta ise UPA baskın bir sonuç ilgiyi çekti.



Resim 4.11. Tüm gruplara ait uterus dokularında PCNA immün boyaması (A): NKG, (B): D3G, (C): UPAG, (D):UFMG, (E):D3TG; (F):UPATG; (G) D3+UPATG Stromada ve uterus bezlerinde (➡) PCNA immünoreaktivitesi görülmekte. (AEC & Hematoksilen, A,B,C,D,E,F,G:10X)

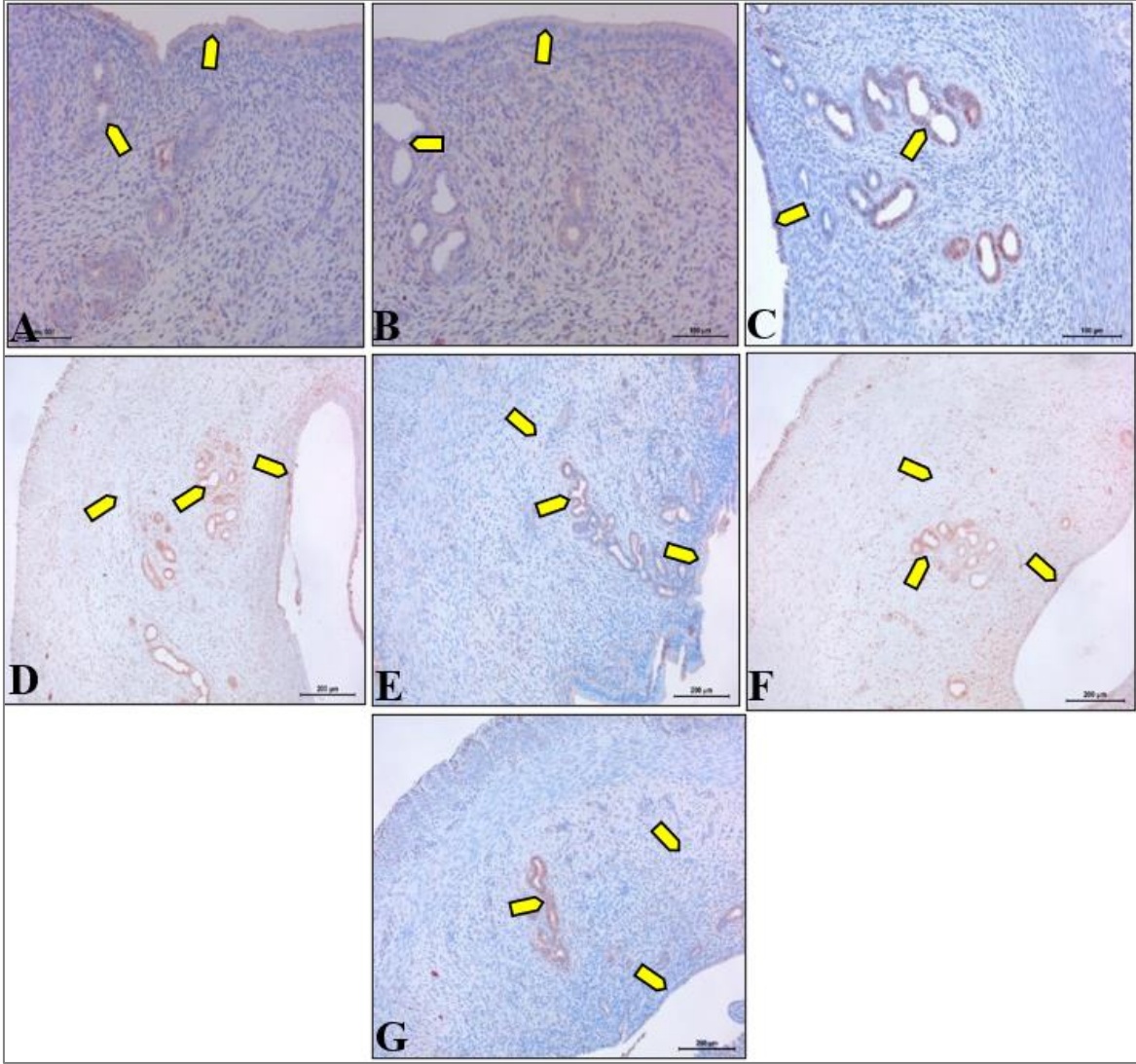


Şekil 4.6. Gruplara göre PCNA değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları, Kruskal Wallis H testi ($p < 0,001$), a-b: Aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur (Dunn testi)

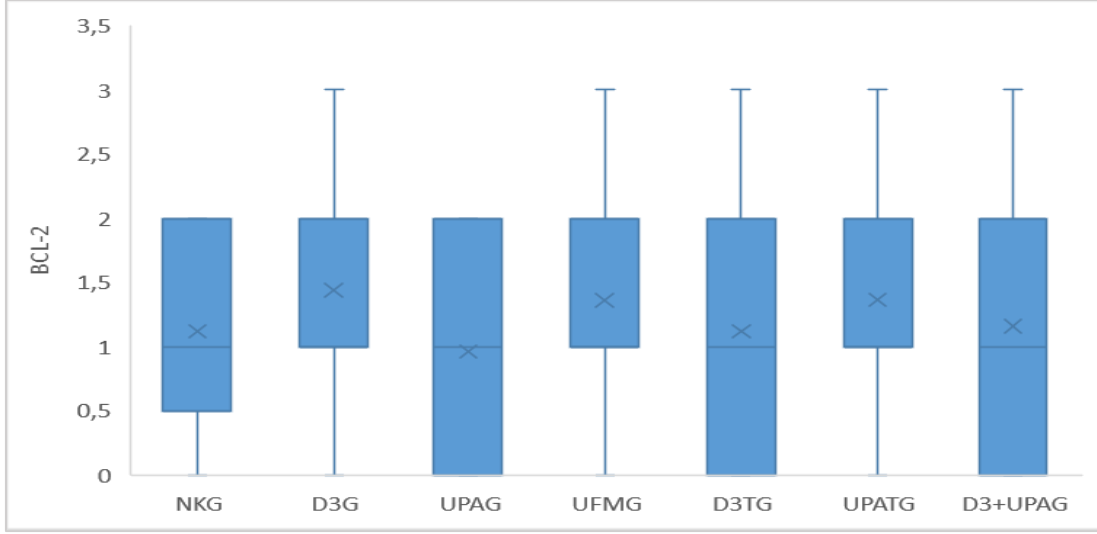
4.5.5. Bcl-2 bulguları

Tüm gruplarda Bcl-2 immünreaktivitesi başta epitel hücreleri olmak üzere endometriyuma ait stromal hücreler ve miyometriyumun kas hücrelerinde izlendi ve gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi (Resim 4.12.). Anti-apoptotik bir faktör olan Bcl-2 immünreaktivitesi NK ve D3 gruplarında zayıf olarak gözlenirken (Resim 4.12.A.B), UPA grubunda, özellikle bez epitel hücrelerinde orta dereceli olarak izlendi (Resim 4.12.C). UFM grubundaki tutulum zayıftan ortaya değişiyordu (Resim 4.12.D). Tedavi gruplarında ise en zayıf tutulumun D3T grubunda olduğu dikkati çekti (Resim 4.12.E). UPAT grubunda UFM grubuna benzer orta dereceli immünreaktivite izlenirken (Resim 4.12.F), D3+UPAT grubunda tutulumun D3 vitamini baskın etki gösterdiği; zayıf olduğu ilgiyi çekti (Resim 4.12.G). Ancak yapılan istatistiksel analizler sonucunda Bcl-2 tutulumu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p < 0,442$) (Şekil 4.7).

Sonuç olarak Bcl-2 tutulumunun gruplar arasında istatistiksel olarak da kanıtlandığı üzere belirgin bir farklılık göstermediği ilgiyi çekti. Ancak D3T grubu yine de en zayıf tutulum gösteren grup olarak belirlendi. Sinerjistik etkiyi değerlendirdiğimizde ise Bcl-2 tutulumu açısından D3 vitamininin UPA uygulamasına baskın olduğu dikkati çekti.



Resim 4.12. Tüm gruplara ait uterus dokularında Bcl-2 immün boyaması. (A): NKG, (B): D3G, (C): UPAG, (D): UFMG, (E): D3TG; (F): UPATG; (G) D3+UPATG, bez epiteli, yüzey epitel hücreleri ve stromal hücrelerde (→) Bcl-2 immünoreaktivitesi görülmekte. (AEC & Hematoksilen, A:20X, B:20X, C:20X, D:10X, E:10X, F:10X, G:10X)



Şekil 4.7. Gruplara göre Bcl-2 değerlerine kutu grafiği ve karşılaştırma sonuçları, Kruskal Wallis H testi ($p < 0,442$)

5. TARTIŞMA

Uterin fibroidler, iyi huylu miyometriyal tümörler olmalarına rağmen, kadınların yaşam kalitesi ve sağlık hizmetleri endüstrileri üzerinde olumsuz etkileri vardır. Üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen jinekolojik tümörler olan UF'lerin prevalansı, 50 yaşına kadar %70 ile %80'dir. Ayrıca, etkilenen kadınların %25 ile %50'si ağır menstrüasyon kanaması ve pelvik ağrı, infertilite, tekrarlayan abortus ve preterm doğuma kadar önemli klinik morbidite yaşamaktadırlar [28,82].

UF'lerde hücre proliferasyonu ve hücre ölümü (apoptosis) arasındaki dengesizlik kilit faktördür. "Fibroid" isminden de anlaşılacağı gibi fibrozisin temel özellikleri ile ayırt edilirler [53,137]. UF'lerin en ayırt edici özelliği, kollagenlere ek olarak ECM bileşenlerinin aşırı sentezi ve birikimidir. Buna bağlı olarak, ECM remodelinginde önemli rol oynayan yüksek spesifik MMP ve TIMP seviyelerine sahiptirler [50,55].

Kadınlarda sezaryenden sonra en sık yapılan ikinci ameliyat histerektomidir ve histerektominin de en sık nedeni UF'leridir [11]. Ancak UF tedavisinde total cerrahiye alternatifler aranmaya devam edilmektedir. Günümüzde, bu tür tümörlerin minimal invaziv bir şekilde çıkarılmasını sağlayan histeroskopik cerrahi teknikler geliştirilmektedir. Ancak birçok bilimsel grup, UF'yi cerrahi müdahaleye başvurmadan medikal yöntemlerle tedavi etmek için protokoller benimsemeye teşvik etmektedir. Ulipristal asetat (UPA) seçici progesteron reseptör modülatörü (SPRM) olup, UF tedavisi için klinik onay alarak kullanılmaya başlanmıştır [138].

Son 10 yılda UPA, başarı oranları ve güvenilirlik açısından umut verici sonuçlar göstermiştir. Üreme çağındaki kadınlarda orta ile şiddetli UF semptomları için güvenli ve etkili bir preoperatif tedavidir. Ayrıca UF boyutunu azaltmada etkinliğini göstermiştir [109,139].

Yapılan çalışmalarda, hipovitaminoz D, UF gelişimine önemli bir katkı olarak tanımlanmıştır [140]. Sonuç olarak, D3 vitamin takviyesinin, UF semptomlarını azaltmanın yanı sıra uterus ve UF hacmini stabilize etmede etkili olduğu bildirilmiştir [124].

Bu çalışmada da ratlarda deneysel olarak oluşturulan UF'lerde UPA ve D3 vitamininin sinerjistik etkileri histolojik yöntemlerle araştırıldı.

Ciebiera ve arkadaşları, yayınladıkları vaka çalışmalarında 37 ve 49 yaşındaki iki kadın hastada üç ay boyunca UPA'nın (günde 5mg) D3 vitamini (oral olarak günde 7000IU) ile kombine verilmesinin, toplam tümör hacmini 37 yaşındaki bir kadında %47.8, 49 yaşındaki kadında da %63.3 azalttığını bildirmişlerdir [141]. Bizim çalışmamızda, uterusların makroskopik muayenesi sırasında, UFM grubu ile karşılaştırıldığında, D3+UPA uygulamasının, tümör boyutunu, NK grubuna yakın şekilde azalttığı belirlendi ($p<0,001$). Tek başına UPA uygulaması da UF boyutunu önemli ölçüde azaltmaktadır ($p<0,001$). Ancak tek başına D3 vitamini uygulaması, UF boyutunu üzerinde UPA kadar etkili olmamıştır ($p<0,001$).

Donnez ve arkadaşları, UPA ile 13 haftalık UF tedavisinin, UF boyutunu etkili bir şekilde azalttığını göstermişlerdir [105]. Yapılan araştırmalarda, Donnez ve arkadaşları, semptomatik UF'lerin tedavisi için günde 5 veya 10 mg ulipristal asetatın 12 haftalık uygulamasının etkinliğini araştırmışlar, etkinlik açısından, her iki dozun da UF hacminde azalma sağladığını bildirmişlerdir [142]. Önceki çalışmaları destekler şekilde, bu çalışmada da D3 vitaminiyle karşılaştırıldığında UPA uygulamasının, tümör hacmini gözlemlenebilir derecede azalttığı görülmüştür ($p<0,001$). UPA tedavi grubunun, tek başına D3 vitamininden daha etkili şekilde tümör hacmini küçülttüğü sonucuna varılmıştır.

2012 yılında Halder ve arkadaşları, eker rat modelinde D3 vitamini tedavisinin UF tümörlerini önemli ölçüde küçülttüğünü bildirmiştir [20]. Hajhashemi ve arkadaşları tarafından yürütülen ve kadın hastalar üzerinde yapılan bir araştırmada benzer sonuçlara ulaşılmıştır [143]. Arjeh ve arkadaşlarının çalışmasında ise, D3 vitamini tüketiminin deney grubundaki UF hacmini önemli ölçüde azaltmayacağı, ancak tümör büyümesini yavaşlatabileceği vurgulanmıştır [27]. Suneja ve arkadaşları, D3 vitamini takviyesinin UF hacmini stabilize etmede etkili olduğunu bularak aynı sonuca ulaşılmıştır [124]. Arjeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde bu çalışmada da tek başına D3 vitamininin UF boyuntunda önemli bir azalmaya neden olmayacağı sonucuna varıldı.

Mikroskobik olarak, UFM grubuna ait uteruslar, NK grubu ile karşılaştırıldığında çok sayıda histopatolojik değişiklik gözlemlendi; bu grupta epitel hücrelerinin boyunda kısalma, kapiller dilatasyon, heterojen ekstraselüler matriks görünümü, apoptotik hücre sayısında artma ve miyometrium organizasyonunda bozulmalar olduğu görüldü. Zhao ve arkadaşları, UF'ler için bir sıçan modeli oluşturduklarında da benzer patolojik değişiklikleri gösterdiler

[136]. Öte yandan Whitaker ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da, UPA, progesteron reseptör modülatörü ile ilişkili endometriyal değişiklikler (PAEC) adı verilen; inflamasyon, hiperplazi veya neoplazi bulgusu olmaksızın değişen derecelerde kistik glandüler dilatasyon gösterdirdiği bulundu. UPA uygulamasının UF hastalarının endometriyumu üzerindeki etkilerini araştırdıkları bu çalışmada; UPA ile tedavinin endometriyal morfolojide ve endometriyal hücre proliferasyonunu arttırmadan değişikliklere neden olduğu sonucuna varmışlardır [144].

Çalışmamızda; D3+UPA ile tedavinin, UF'nin neden olduğu histopatolojik değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Endometriyal epitel hücrelerinde de NK grubuna benzer şekilde düzelmeler olduğu, miyometriyum kas tabakasının göreceli eşit kalınlıkta olduğu ve dejenerasyonun ve ödemin azaldığı dikkati çekti. UPA'nın, D3 vitamininden daha iyi sonuçlar vermesine rağmen, D3 vitamini veya UPA ile tedavinin patolojik değişiklikleri bir dereceye kadar iyileştirebileceği kanısına varıldı.

Kamel, Wagih, Kılıç ve arkadaşları, kollagen çapraz bağlama ile UF gelişimi arasındaki ilişkinin yanı sıra kollagen çapraz bağlama enzimlerinin bu tümörlerin büyümesindeki rolünü incelemişlerdir. Kollagen ve kollagen çapraz bağlayıcı enzimlerin aşırı hidrosilasyonunun ECM sertliğini ve dolayısıyla UF büyümesini arttırdığını saptamışlardır [145]. Jayes ve arkadaşları da sekiz kadından elde edilen 19 UF dokusunda yoğun Masson trikrom boyaması olduğunu bildirmiştir. İncelenen tüm UF kesitlerinde en az %37 kollagen içerdiği bildirilmiştir [52]. Ali ve arkadaşları, D3 vitamin eklenmesinin UPA'nın UF hücreleri üzerindeki antifibrotik etkisini artırıp arttırmayacağını değerlendirdikleri çalışmalarında UPA'nın kollagen tip I ekspresyonunu %35 (P.001) azalttığını ve bu oranın, D3 vitamini eklendiğinde % 37 (P.001) oranına kadar gerilediğini bildirmişlerdir. İmmünofloresan verilerinde, tek başına UPA tedavisinin yoğun ve düzensiz kollagen liflerde %20 (P.05) azalma ve UPA/D3 vitamin kombinasyonu ile %80 (P.001) azalma olduğu ortaya konmuştur [28]. Cox ve arkadaşları, masson trikrom boyası kullanılarak plasebo ile tedavi edilen gruba kıyasla UPA ile tedavi edilen grubun ECM'sinde daha az kollagen üretimi olduğunu saptamışlardır [146]. Çalışmamızda, uterus dokularındaki kollagen dağılımını değerlendirmek için Masson'un trikrom boyama yöntemi kullanıldı. Literatür ile uyumlu olarak UFM grubunda, neredeyse dokunun tamamını kaplayacak şekilde yüksek kollagen içeriği dikkati çekti. Kas tabakasının kollagen lifleri ile büyük ölçüde infiltre edilerek kas organizasyonunu oldukça bozduğu izlendi. UPA'nın kollagen

miktarını tek başına da azalttığı ancak D3 vitamini ile birleştirilince daha etkin olduğu saptanmıştır.

MMP-9, ECM bileşenlerinde majör kollajeni parçalayan anahtar enzimlerden biridir ve proteolitik aktiviteleri TIMP-1 tarafından düzenlenir. Bazı patolojik koşullarda aşırı ekspresyonları, kapsamlı ECM bozulmasıyla bağlantılıdır. Donnez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, uterin fibroidlerin UPA'ya iyi bir yanıt verdiği, MMP seviyelerinin artarken ve TIMP seviyelerinin düştüğünü ve MMP/TIMP dengesinin, ECM rezorpsiyonunda ve fibroid hacminin azaltılmasında önemli bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır [109]. Çalışmamızda, UF modelinde D3 vitamini ve UPA ile her ikisinin birlikte uygulandığı guplarda MMP-9 ve TIMP1 seviyelerini değerlendirmek için ELISA yöntemi kullanıldı. UFM grubundaki MMP-9'un serum seviyeleri, NK grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı ($p<0,008$) ve TIMP-1 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde arttığı ($p<0,109$) bulundu. NK grubu ile karşılaştırıldığında, UF oluşturulan ve D3 vitamini uygulanan gruba ait MMP-9 serum seviyeleri anlamlı derecede yüksek ($p<0,008$) buna karşın TIMP-1 seviyeleri hafif yüksekti ($p<0,109$). Tedavi amaçlı UPA uygulanan gruptaki MMP-9 serum seviyeleri önemli ölçüde artmış bulunurken ($p<0,008$) TIMP-1 seviyelerinin hafif arttığı ($p<0,109$) belirlendi.

Halder ve arkadaşları, D3 vitamininin MMP'lerin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir ve D3 vitamininin, insan fibroid hücrelerinde MMP-9 mRNA ekspresyonunu, tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla doza bağlı bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir [58]. Bu çalışma ile uyumlu şekilde bizim çalışmamızda da D3+UPAT grubuna ait MMP-9 serum düzeylerinin UFM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ancak TIMP-1 düzeylerinin bir miktar azaldığı ($p<0,109$) gözlemlendi. D3T grubuna ait MMP-9 serum seviyelerinin ise UFM grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,008$) ve TIMP-1 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p<0,109$) görüldü.

Düz kas hücreleri ve fibroblastlar, UF'lerin ana hücresele bileşenleridir. Fibroidlerde, fibroblastlardan özelleşen miyofibroblastlar bulunur. Histolojik olarak miyofibroblastlar hem düz kas hücrelerinin hem de fibroblastların özelliklerine sahiptir. Benzer şekilde, Protik ve arkadaşları, UF içinde α -SMA-pozitif olan hücreleri ve ayrıca nodülü çevreleyen büyük yoğunlukta kollajen birikimini göstermiş ve bu durumu miyofibroblastların varlığına ve

ECM üretimindeki rollerine bağlamışlardır [70]. Benzer şekilde Kamel, Wagih, Kılıç ve meslektaşları, UF'de normal miyometriyal dokulara karşı α -SMA ekspresyonunda bir artış olduğunu vurgulamışlar. Ayrıca, kollagen çapraz bağlanma seviyesinin α -SMA ekspresyonunun derecesine körele olarak arttığını saptamışlardır ($r = 0.63$, $P = 0.01$). Bu bulgu, UF dokularında artan kollagen çapraz bağlanması ile miyofibroblast fenotip ekspresyonu arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymaktadır [145]. Biz de çalışmamızda düz kas hücre ve miyofibroblast popülasyonlarının klonalitesini araştırmak için doku örneklerinde α -SMA ekspresyonu değerlendirmek için immünohistokimyasal yöntem kullandık. Çalışmamız, NK grubunda, miyometriyum ve stromal hücrelerde sınırlı α -SMA'nın sitoplazmik ekspresyonu gösterdi. Kas tabakasının hem uzunlamasına hem de enine kesitleri açıkça görüntülendi. NK grubuna kıyasla, UFM grubunun kas katmanlarında α -SMA düşük ekspresyonu ve stromada hafif ekspresyonunu ayırd ettik ($p < 0,958$). Ayrıca kollagen liflerin, kas tabakasındaki α -SMA'nın sürekli ekspresyonunu bozduğu ve kas dokusunun stromadaki α -SMA pozitif hücreler ile çevrelendiği dikkati çekti. α -SMA pozitif hücreler bize bu gruptaki miyofibroblastların varlığını ve bunun sonucu olarak kontrolsüz kollagen üretiminin nedenini gösterdi. D3 vitamini ile tedavi edilen grupta miyometriyumda α -SMA düşük ekspresyonunun yanı sıra stromada da düşük ekspresyonu bulundu ($p < 0,958$). Ayrıca, bu tabakadaki yoğun kollagen lifi nedeniyle kas tabakasındaki α -SMA ekspresyonu büyük ölçüde bozulmuştu. Öte yandan UPAT grubunda α -SMA immünreaktivitenin UFM gruba yakın olduğu; özellikle miyometriyumda ve stromal hücrelerde var olduğu, ancak kas tabakasının organizasyonunu daha düzelttiği görüldü. Bununla birlikte, UPA'ya D3 vitamini eklenmesinin UPA baskın etki gösterdiği belirlendi.

Büyüme faktörleri, UF'nin gelişiminde ve çoğalmasında önemli faktörleridir. TGF β 3'ün, UF biyolojisinde en önemli izoform olarak kabul edilir. Çoğu hücrede proliferasyonu ve farklanmayı düzenler. Fibrozisle ilişkili hastalıkların patogenezinde en önemli faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir [66]. Kamalipooya ve arkadaşları, UF'lerin varlığı ve şiddeti açısından serum TGF- β 'in tanısal değerini inceledikleri çalışmalarında, ELISA kullanarak, UF grubundaki serum TGF- β düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlediler ($p < 0.05$). Böylece TGF- β , bu tümörlerin teşhisi ve izlenmesi için güvenilir biyobelirteçler görevi görebilir [147]. Arici ve Sozen, UF ve miyometriyumda TGF- β 3 ekspresyonu araştırdıkları çalışmalarında, TGF- β 3 mRNA düzeylerinin UF örneklerinde miyometriyal örneklerle göre 3,5 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [148]. Başka bir çalışmada, normal miyometriyum ve UF'lerde TGF- β 3 ekspresyonlarını

karşılaştırılmış, UF'nin normal miyometriyuma göre 5 kat daha yüksek TGF- β 3 mRNA ekspresyonu seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir [67].

Biz de çalışmamızda, uterus fibroidlerinin fibrotik özelliğini ve kombine tedavinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla immünohistokimyasal yöntemler ile TGF- β 3 ekspresyonunu inceledik. Literatür ile uyumlu olarak UFM grubunda NK grubuna kıyasla daha yüksek TGF- β 3 tutulumu belirlendi ($p<0,015$). Sonuç olarak, TGF- β 3 aşırı ekspresyonunun, UF'lerde artan hücresel proliferasyon ve buna bağlı aşırı kollagen üretiminden kaynaklı olabileceği kanısına varıldı. Neden olarak da, UF'de ki proliferatif ve ECM üretimi artıran yollar olabileceği düşünüldü.

Halder ve arkadaşları, UF hücrelerinde D3 vitamininin TGF- β 3 ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, D3 vitamininin, insan UF hücrelerinde TGF- β 3'ün fibrotik etkilerini azalttığını bildirmişlerdir. Bu bulgu, D3 Vitamininin UF için cerrahi olmayan bir tedavi olarak kullanılabilecek antifibrotik bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır [131]. Daha yakın zamanlarda, Ciebiera ve arkadaşları, yaptıkları çalışmanın sonucunda UF grubundaki D3 vitamini serum konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük TGF- β 3 serum konsantrasyonlarının ise anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdiler. Sonuç olarak, düşük D3 vitamini ve daha yüksek TGF- β 3 serum konsantrasyonları UF için risk faktörü olarak doğrulandı [149]. Bu çalışmada UFM grubuyla karşılaştırıldığında, D3 vitamininin, TGF- β 3 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmadığı belirlendi. UPA ise, TGF- β 3 ekspresyonunu azaltma açısından D3 vitamininden daha başarılı bulundu ($p<0,015$).

Ciebiera ve arkadaşları, UPA tedavisi almayan UF hastalarda, UPA tedavisi alan UF hastalarda ve sağlıklılarda TGF- β 3 serum konsantrasyonlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, UPA tedavisi almayan UF hastalarında, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek TGF- β 3 serum konsantrasyonu bulduklarını bildirmişlerdir ($P=.0001$). Kontrol ve UPA ile tedavi edilen gruplar arasında TGF- β 3 serum konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür [19]. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da UPA'nın UPAT grubundaki TGF- β 3 ekspresyonunu UFM grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığı saptandı ($p<0,015$). Çalışmamızda UF tedavisinde D3 vitamininin UPA ile kombine etkisini değerlendirmek için oluşturduğumuz grupta, TGF- β 3 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı belirlendi ($p<0,015$). UPAT ve D3+UPAT

gruplarında TGF- β 3 immünreaktivitenin özellikle stromal hücrelerde belirgin olarak zayıfladığı izlenirken, bez ve yüzey epitel hücrelerinde yoğun olduğu görüldü. Sinerjistik etkiyi değerlendirdiğimizde TGF- β 3 immüno-ekspresyonunu azaltma açısından UPA'nın D3 vitamini uygulamasına baskın olduğu dikkati çekti.

UF büyümesi, aşırı miktarda ECM bileşeni birikimiyle beraber hücresel proliferasyondan da kaynaklanır. Eski bir çalışmada, premenopozal kadınlarda tümörlerde ve normal miyometriyumda UF büyümesinde hücre proliferasyonunun rolü incelenmiştir. PCNA ve Ki-67'yi çoğalan hücreler için bir belirteçler olarak kullanan çalışmada, PCNA pozitif hücrelerin UF miyometriyal örneklerine anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir [72]. Holdsworth-Carson ve arkadaşları, büyük fibroidlerde, bitişik miyometriyuma kıyasla PCNA ekspresyonunun arttığını, küçük fibroidlerde ise miyometriyuma kıyasla PCNA ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir [74]. Kamel, Wagih, Kılıç ve arkadaşları, kollagen çapraz bağlanması arttıkça, PCNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Bu bulgular, kollagen çapraz bağlanmasının UF'deki hücre proliferasyon yollarının pozitif bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir [145].

Çalışmamızda proliferatif belirteç olarak PCNA kullanarak uterus dokularındaki hücresel proliferasyonu araştırıldı. NK grubunda bezlerde, mukozada ve stromal hücrelerinde az sayıda PCNA-immünopozitif hücreler gözlemledik. NK grubu ile karşılaştırıldığında, UFM grubunda endometriyal bezlerinde ve mukozada artmış PCNA ekspresyonu ve stromada PCNA'nın aşırı ekspresyonu saptandı. UFM grubuna kıyasla, D3T grubunda PCNA ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı ($p<0,001$) belirlendi. Halder ve arkadaşları, D3 vitamini tedavisinin PCNA ekspresyonunu ve diğer proliferatif belirteçleri önemli ölçüde baskıladığını ve Eker sıçanlarında fibroid boyutunda bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur [20]. Sharan ve arkadaşları, Western blot kullanarak D3 vitamininin PCNA pozitifliğini azaltarak insan UF hücrelerinin büyümesini engellediği sonucuna varmışlardır. Sonuç olarak, D3 vitamini eksikliğini uterin fibroidleri için bir risk faktörü olarak görmüşlerdir [126]. Halder ve arkadaşların aksine çalışmamızda, D3 vitamininin fibroid boyutunun azalması üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını gözlemledik, Sharan ve arkadaşlarının bulgularına paralel olarak, bizim çalışmamızda da D3 vitamininin fibroid boyutunun artmasını engelleyebildiği sonucuna vardık. UFM grubuyla karşılaştırıldığında UPA'nın, PCNA ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ($p<0,001$) belirlendi. UPA/D3 vitamin kombinasyon tedavisinin, PCNA ekspresyonunun azalmasında UPA baskın sonuç

verdiği dikkati çekti ($p < 0,001$). Bu bulgu Ali ve ark çalışmaları ile desteklenmekteydi; Ali ve arkadaşları, UPA'nın tedavi UF hücrelerine kıyasla PCNA ekspresyonunu yaklaşık %50 azalttığını ($P < .05$), ancak D3 vitamin ile kombine edildiğinde, PCNA ekspresyonunun, UF hücrelerine kıyasla %85 ($P < .001$) ve tek başına UPA ile tedavi edilen hücrelere kıyasla da %35 azaldığını ($P < .05$) bildirmişlerdir. UPA/D3 kombinasyon tedavisinin, PCNA'nın mRNA ekspresyonunu tek başına UPA'ya kıyasla 1.66 kat azalttığı vurgulanmıştır ($P < .05$) [28]. Biz de bulgularımız sonucunda, literatür ile uyumlu olarak UPA'nın D3 vitamininden daha iyi bir antiproliferatif ajan olduğu, ancak kombine kullanımın antiproliferatif özelliklerini desteklediği kanısına vardık.

Uterin fibroidler, hücre proliferasyonunun artması ve apoptosisin azalması gibi normal döngüde oluşturduğu dengesizlikle karakterizedir. Bcl-2, anti-apoptotik bir belirteç olup, hücre içi zarla ilişkili bir proteindir. Aşırı ekspresyonu, kaspazların aktivasyonunu kısıtlayarak apoptosisin inhibisyonu yoluyla uzun süreli hücre sağkalımına neden olur. Dixon, Flake, Moore ve arkadaşları, IHC kullanılarak, uterin fibroid ve miyometriyal dokulardaki düz kas hücrelerinde Bcl-2 dağılımını inceledikleri çalışmalarında, UF ve bitişik miyometriyal doku arasında Bcl-2 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir [72]. Biz de çalışmamızda, immünohistokimyasal yöntemler ile Bcl-2 ekspresyonunun gruplar arasındaki tutulumunu, böylece anti-apoptotik süreçleri değerlendirdik. NK grubunda miyometriyal düz kas hücrelerinde Bcl-2 tutulumu saptanmadı ($p < 0,442$), ancak daha önce bahsedilen çalışmanın aksine, UFM grubundaki yüzey ve bez epiteli ile stromal hücrelerde Bcl-2'nin orta derecede tutulum gösterdiği saptandı ($p < 0,442$).

Halder ve arkadaşları, D3 vitamini tedavisinin hücrel apoptosisle ilişkisini belirleme amacıyla yaptığı çalışmada Eker sıçanlarının UF tümörlerinde D3 vitamininin Bcl-2 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı sonucuna varmıştır [20]. Benzer sonuçlar Sharan, Halder, Thota ve arkadaşları tarafından da yapılan çalışmalarınca desteklenmiştir [126]. Biz de, benzer şekilde, D3 vitamininin UFM grubuna kıyasla Bcl-2 immüno ekspresyonunu büyük ölçüde azalttığını belirledik.

Benzer şekilde, D3 vitamini ve UPA'nın kombine uygulandığı UFM grubunda, Bcl-2 ekspresyonunun D3 vitamini baskın özellik göstererek zayıfladığı ilgiyi çekti. D3+UPA grubunda da Bcl-2 ekspresyonu UFM grubuna göre zayıftı ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0,442$). Bizim sonuçlarımız değerlendirildiğinde, gruplar arasında

çok belirgin olmayan farklılıklar gözlemlenmiştir. Benzer bulguları nedeniyle Dixon, Flake, Moore ve arkadaşları, apoptosis ile ilgili verilerin UF'lerin belirgin bir özelliği olmadığı sonucuna vurgulamışlardır [72].

6. SONUÇ

Histolojik olarak, UF tedavisi için D3vitaminin UPA ile kombine kullanımının UPA'nın anti-UF özelliklerini önemli ölçüde desteklediği sonucuna varıldı. UPA tek başına UF'ye bağlı histopatolojik değişikliklerin giderilmesinde etkili olduğu bulundu, ancak D3 vitamini ile birleştirildiğinde senkronize ve çoklu anti-UF etki gösterdiği dikkati çekti. Kombine kullanımın UF'nin hücresel proliferasyonunu daha güçlü inhibe ederken, apoptosis üzerinde çok belirgin etki göstermediği, buna karşın düz kas hücre organizasyonunu ve anti-kollagen özellikleri indüklediği belirlendi. Her ne kadar kombine tedavi daha etkin sonuç verse de genellikle tüm belirteçler için UPA baskın etkinin ortaya çıktığı dikkati çekti.

Sonuç olarak D3 vitamini ve UPA ikili tedavisi, özellikle D3 vitamin eksikliği olan kadınlarda terapötik etkinliğe sahip olabilir. Ayrıca, uzun süreli UPA tedavi protokollerinde, UPA'nın aralıklı kullanımında, UPA'sız aralıklarla prospektif fibroid büyümesini engelleyebilecek D3 vitaminin sürekli kullanımı tedavide alternatif bir protokol olabilir kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. van Beekhuizen, H., and Unkels, R. (2012). *Textbook of gynecology for less-resourced locations*. New York: Global Library of Womens Medicine-Sapiens Publishing Ltd, 212-220.
2. Mutter, G.L., and Prat, J. (2014). *Pathology of the female reproductive tract* (3rd Ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone, 402-411.
3. Edmonds, K., Lees, C., and Bourne, T. (2018). *Dewhurst's textbook of obstetrics & gynaecology* (9th Ed.). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 1615-1624.
4. Borahay, M.A., Al Hendy, A., Kilic, G.S., and Boehning, D. (2015). Signaling pathways in leiomyoma: Understanding pathobiology and implications for therapy. *Molecular Medicine*, 21, 242-256.
5. Tsigkou, A., Reis, F.M., Lee, M.H., Jiang, B., Tosti, C., Centini, G., Shen, F.R., Chen, Y.G., and Petraglia, F. (2015). Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: Correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms. *Fertility and Sterility*, 104, 170-175.
6. Sugino, N. (2018). *Uterine fibroids and adenomyosis (comprehensive gynecology and obstetrics)*. Singapore: Springer Nature Ltd, 3-24,104-108.
7. Sparic, R., Mirkovic, L., Malvasi, A., and Tinelli, A. (2016). Epidemiology of uterine myomas: A review. *International Journal of Fertility and Sterility*, 9, 424-435.
8. Crum, C.P., Lee, K.R., Nucci, M.R., Granter, S.R., Howitt, B.E., Parast, M.M., Boyd, T., and Peters III, W.A. (2017). *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology* (3rd Ed.). Philadelphia: Elsevier, 1721-1725.
9. Callahan, T.L., and Caughey, A.B. (2018). *Blueprints obstetrics & gynecology* (7th Ed.). Baltimore: Wolters Kluwer, 526-533.
10. Casanova, R., and Chuang, A. (2019). *Beckmann and Ling's obstetrics and gynecology* (8th Ed.). Baltimore: Wolters Kluwer, 974-981.
11. Vilos, G.A., Allaire, C., Laberge, P.Y., Leyland, N., Vilos, A.G., Murji, A., and Chen, I. (2015). The management of uterine leiomyomas. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 37(2), 157-178.
12. Szydłowska, I., Marciniak, A., Nawrocka-Rutkowska, J., Rył, A., and Starczewski, A. (2020). Predictive factors of response to selective progesterone receptor modulator (Ulipristal acetate) in the pharmacological treatment of uterine fibroids. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 1-11.
13. Palomba, S., Orio, F., Russo, T., Falbo, A., Tolino, A., Lombardi, G., Cimini, V., and Zullo, F. (2005). Antiproliferative and proapoptotic effects of raloxifene on uterine leiomyomas in postmenopausal women. *Fertility and Sterility*, 84(1), 154-161.

14. Donnez, J., and Dolmans, M.M. (2016). Uterine fibroid management: From the present to the future. *Human Reproduction Update*, 22, 665-686.
15. Rabe, T., Saenger, N., Ebert, A.D., Roemer, T., Tinneberg, H.R., De Wilde, R.L., and Wallwiener, M. (2018). Selective progesterone receptor modulators for the medical treatment of uterine fibroids with a focus on ulipristal acetate. *BioMed Research International*, ID 1374821.
16. Dolmans, M.M., Donnez, J., and Fellah, L. (2019). Uterine fibroid management: Today and tomorrow. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45, 1222-1229.
17. Xu, Q., Takekida, S., Ohara, N., Chen, W., Sitruk-Ware, R., Johansson, E.D.B., and Maruo, T. (2005). Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, 953-961.
18. Courtoy, G.E., Henriot, P., Marbaix, E., De Codt, M., Luyckx, M., Donnez, J., and Dolmans, M.M. (2018). Matrix metalloproteinase activity correlates with uterine myoma volume reduction after ulipristal acetate treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 103, 1566-1573.
19. Ciebiera, M., Włodarczyk, M., Wrzosek, M., Słabuszewska-Józwiak, A., Nowicka, G., and Jakiel, G. (2018). Ulipristal acetate decreases transforming growth factor β 3 serum and tumor tissue concentrations in patients with uterine fibroids. *Fertility and Sterility*, 109, 501-507.
20. Halder, S.K., Sharan, C., and Al-Hendy, A. (2012). 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment shrinks uterine leiomyoma tumors in the eker rat model. *Biology of Reproduction*, 86, 1-10.
21. Paffoni, A., Somigliana, E., Vigano', P., Benaglia, L., Cardellicchio, L., Pagliardini, L., Papaleo, E., Candiani, M., and Fedele, L. (2013). Vitamin D status in women with uterine leiomyomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98, 1374-1378.
22. Li, S., Chen, B., Sheng, B., Wang, J., and Zhu, X. (2020). The associations between serum vitamin D, calcium and uterine fibroids in Chinese women: a case-controlled study. *Journal of International Medical Research*, 48, 1-11.
23. Tinelli, A., Vinciguerra, M., Malvasi, A., Andjić, M., Babović, I., and Sparić, R. (2021). Uterine fibroids and diet. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 1-15.
24. Sabry, M., Halder, S.K., Ait Allah, A.S., Roshdy, E., Rajaratnam, V., and Al-Hendy, A. (2013). Serum vitamin D3 level inversely correlates with uterine fibroid volume in different ethnic groups: A cross-sectional observational study. *International Journal of Women's Health*, 5, 93-100.

25. Rosen, L.D., Fenske, S.K., Isola, H.M., and Ascher-Walsh, C.J. (2018). Vitamin D deficiency in women with uterine fibroids versus Vitamin D deficiency in the general population. *Clinicals Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine*, 4, 1-3.
26. Ciavattini, A., Carpini, G.D., Serri, M., Vignini, A., Sabbatinelli, J., Tozzi, A., Aggiusti, A., and Clemente, N. (2016). Hypovitaminosis D and “small burden” uterine fibroids: Opportunity for a Vitamin D supplementation. *Medicine (United States)*, 95(52), e5698.
27. Arjeh, S., Darsareh, F., Asl, Z.A., and Azizi Kutenaeei, M. (2020). Effect of oral consumption of vitamin D on uterine fibroids: A randomized clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 39, 101159.
28. Ali, M., Shahin, S.M., Sabri, N.A., Al-Hendy, A., and Yang, Q. (2019). 1,25 Dihydroxyvitamin D3 enhances the antifibroid effects of ulipristal acetate in human uterine fibroids. *Reproductive Sciences*, 26, 812-828.
29. Carlson, B.M. (2014). *Human embryology and developmental biology* (5th Ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier Inc., 74,372-381.
30. Sadler, T.W. (2015). *Langman's medical embryology* (13th Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 43,246-250.
31. Schoenwolf, G., Bleyl, S., Brauer, P., Francis-West, P. (2014). *Larsen's human embryology*. (5th Ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone, 394.
32. Moore, K.L., Persaud, T.V.N., and Torchia, M.G. (2015). *The developing human: clinically oriented embryology* (10th Ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier Inc., 262-266.
33. Snell, R.S. (2012). *Clinical anatomy by regions* (9th Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 284-288.
34. Agur, A.M.R., and Dalley, A.F. (2019). *Moore's essential clinical anatomy* (6th Ed.). Baltimore: Wolters Kluwer, 371-375.
35. Waschke, J., Böckers, T.M., and Paulsen, F. (Eds.) (2019). *Sobotta anatomy textbook English edition with Latin nomenclature*. Munich: Elsevier GmbH, 388,389.
36. Drake, R., Vogl, A.W., and Mitchell, A. (2019). *Gray's anatomy for students* (4th Ed.). New York: Elsevier Inc, 475-477,486-488.
37. Ross, M.H., Pawlina, W., and Wojciech-Pawlina, M.H.R. (2016). *Histology: a text and atlas – with correlated cell and molecular biology* (5th Ed.). Philadelphia, Wolters Kluwer Health, 850-856.
38. Mescher, A.L. (2016). *Junqueira's basic histology: text and atlas* (14th Ed.). New York: McGraw-Hill Education, 471-481.
39. Gartner, L.P. (2017). *Textbook of histology* (4th Ed.). New York: Elsevier Inc., 541-546.
40. Kierszenbaum, A.L., and Tres, L.L. (2019). *Histology and Cell biology: an introduction to pathology* (5th Ed.). New York: Elsevier Inc., 737-743.

41. Bozini, N., and Baracat, E.C. (2007). The history of myomectomy at the Medical School of University of São Paulo. *Clinics*, 62, 209-210.
42. Aleksandrovykh, V., Bereza, T., Sajewicz, M., Walocha, J.A., and Gil, K. (2015). Uterine fibroid: common features of widespread tumor (Review article). *Folia Medica Cracoviensia*, 55, 61-75.
43. Sieroń, D., Wiggermann, P., Skupiński, J., Kukawska-Sysio, K., Lisek, U., and Koczy, A. (2011). Uterine artery embolisation and magnetic resonance-guided focused ultrasound treatment of uterine fibroids. *Polish Journal of Radiology*, 76, 37-39.
44. Khan, A.T., Shehmar, M., and Gupta, J.K. (2014). Uterine fibroids: Current perspectives *International Journal of Women's Health*, 6, 95-114.
45. Moravek, M.B., and Bulun, S.E. (2015). Endocrinology of uterine fibroids: Steroid hormones, stem cells, and genetic contribution. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 27, 276-283.
46. McWilliams, M.M., and Chennathukuzhi, V.M. (2017). Recent advances in uterine fibroid etiology. *Seminars in Reproductive Medicine*, 35, 181-189.
47. Reis, F.M., Bloise, E., and Ortiga-Carvalho, T.M. (2016). Hormones and pathogenesis of uterine fibroids. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 34, 13-24.
48. Flake, G.P., Andersen, J., and Dixon, D. (2003). Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: A review. *Environmental Health Perspectives*, 111, 1037-1054.
49. Williams, A.R.W. (2017). Uterine fibroids – what’s new? *F1000Research*, 6, 2109.
50. Islam, M.S., Ciavattini, A., Petraglia, F., Castellucci, M., and Ciarmela, P. (2018). Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: A potential target for future therapeutics. *Human Reproduction Update*, 24, 59-85.
51. Leppert, P.C., Jayes, F.L., and Segars, J.H. (2014). The extracellular matrix contributes to mechanotransduction in uterine fibroids. *Obstetrics and Gynecology International*, 2014, ID 783289.
52. Jayes, F.L., Liu, B., Feng, L., Aviles-Espinoza, N., Leikin, S., and Leppert, P.C. (2019). Evidence of biomechanical and collagen heterogeneity in uterine fibroids. *PLoS One*, 14, 1-16.
53. Fujisawa, C., and Castellot, J.J. (2014). Matrix production and remodeling as therapeutic targets for uterine leiomyoma. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8, 179-194.
54. Iwahashi, M., Muragaki, Y., Ikoma, M., Mabuchi, Y., Kobayashi, A., Tanizaki, Y., and Ino, K. (2011). Immunohistochemical analysis of collagen expression in uterine leiomyomata during the menstrual cycle. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2, 287-290.

55. Koohestani, F., Braundmeier, A.G., Mahdian, A., Seo, J., Bi, J.J., and Nowak, R.A. (2013). Extracellular matrix collagen alters cell proliferation and cell cycle progression of human uterine leiomyoma smooth muscle cells. *PLoS One*, 8, 1-15.
56. Brosens, I., and Pinn, V.W. (2013). *Uterine leiomyomas pathogenesis and management* (1st Ed.). Philadelphia: Taylor & Francis Group, 25,26.
57. Botia, C.P., Camarasa, S.C., Baixauli, F.R., and Sanchez, A.C. (2017). Uterine fibroids review: understanding their origins to better understand their future treatments. *Journal of Tumor Research*, 3(3), 1-13.
58. Halder, S.K., Osteen, K.G., and Al-Hendy, A. (2013). Vitamin D3 inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. *Human Reproduction*, 28, 2407-2416.
59. Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92, 827-839.
60. Olson, M.W., Bernardo, M.M., Pietila, M., Gervasi, D.C., Toth, M., Kotra, L.P., Massova, I., Mobashery, S., and Fridman, R. (2000). Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9: Differential rates for activation by stromelysin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 2661-2668.
61. Tsigkou, A., Reis, F.M., Ciarmela, P., Lee, M.H., Jiang, B., Tosti, C., Shen, F.R., Shi, Z., Chen, Y.G., and Petraglia, F. (2015). Expression levels of myostatin and matrix metalloproteinase 14 mRNAs in uterine leiomyoma are correlated with dysmenorrhea. *Reproductive Sciences*, 22, 1597-1602.
62. Malik, M., Norian, J., McCarthy-Keith, D., Britten, J., and Catherino, W.H. (2010). Why leiomyomas are called fibroids: The central role of extracellular matrix in symptomatic women. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28, 169-79.
63. Tang, X.M., Dou, Q., Zhao, Y., McLean, F., Davis, J., and Chegini, N. (1997). The expression of transforming growth factor- β s and TGF- β receptor mRNA and protein and the effect of TGF- β s on human myometrial smooth muscle cells in vitro. *Molecular Human Reproduction*, 3, 233-240.
64. Ding, L., Xu, J., Luo, X., and Chegini, N. (2004). Gonadotropin releasing hormone and transforming growth factor β activate mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase and differentially regulate fibronectin, type I collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 expression in leiomy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 5549-5557.
65. Ciarmela, P., Islam, M.S., Reis, F.M., Gray, P.C., Bloise, E., Petraglia, F., Vale, W., and Castellucci, M. (2011). Growth factors and myometrium: Biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*, 17, 772-790.
66. Joseph, D.S., Malik, M., Nurudeen, S., and Catherino, W.H. (2010). Myometrial cells undergo fibrotic transformation under the influence of transforming growth factor β -3. *Fertility and Sterility*, 93, 1500-1508.

67. Lee, B.S., and Nowak, R.A. (2001). Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- β 3 (TGF β 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF β . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86, 913-920.
68. Zheng, L.H., Cai, F.F., Ge, I., Biskup, E., and Cheng, Z.P. (2014). Stromal fibroblast activation and their potential association with uterine fibroids. *Oncology Letters*, 8, 479-486.
69. Mladenović-Mihailović, A., and Mladenović-Bogdanović, Z. (2010). Imunocitohemijske karakteristike submukoznih mioma materice Immunocytochemical characteristics of submucosal uterine myomas. *Vojnosanitetski Pregled*, 67(12), 977-982.
70. Protic, O., Toti, P., Islam, M.S., Occhini, R., Giannubilo, S.R., Catherino, W.H., Cinti, S., Petraglia, F., Ciavattini, A., Castellucci, M., Hinz, B., and Ciarmela, P. (2016). Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids. *Cell and Tissue Research*, 364, 415-427.
71. Wu, X., Serna, V.A., Thomas, J., Qiang, W., Blumenfeld, M.L., and Kurita, T. (2017). Subtype-specific tumor-associated fibroblasts contribute to the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Cancer Research*, 77, 6891-6901.
72. Dixon, D., Flake, G.P., Moore, A.B., He, H., Haseman, J.K., Risinger, J.I., Lancaster, J.M., Berchuck, A., Barrett, C.J., and Robboy, S.J. (2002). Cell proliferation and apoptosis in human uterine leiomyomas and myometria. *Virchows Archiv*, 441, 53-62.
73. González-Magaña, A., and Blanco, F.J. (2020). Human PCNA structure, function, and interactions. *Biomolecules*, 10(4), 570.
74. Holdsworth-Carson, S.J., Zhao, D., Cann, L., Bittinger, S., Nowell, C.J., and Rogers, P.A. (2016). Differences in the cellular composition of small versus large uterine fibroids. *Reproduction*, 152(5), 467-480.
75. Klanova, M., and Klener, P. (2020). BCL-2 proteins in pathogenesis and therapy of B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Cancers*, 12(4), 938.
76. Matsuo, H., Maruo, T., and Samoto, T. (1997). Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(1), 293-299.
77. Elnaghy, W.S., Abdel Khalek H.S, Ramdan, M.O., Mohamed, D.A.E., Hamam, S.A., Elsharaby, R.M., El Shwaikh, S.L., and El Khyat, A.M. (2018). Role of Bcl-2 Expression in the Diagnosis of Uterine Leiomyoma. *Life Science Journal*, 15(11), 7-12.
78. Pauzi, N., Mohd, K.S., Halim, N.H.A., and Ismail, Z. (2018). Orthosiphon stamineus extracts inhibits proliferation and induces apoptosis in uterine fibroid cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19, 2737-2744.
79. Zhao, W., Zhao, Y., Chen, L., Sun, Y., and Fan, S. (2022). Effects of miRNA-199a-5p on cell proliferation and apoptosis of uterine leiomyoma by targeting MED12. *Open Medicine*, 17(1), 151-159.

80. Moro, E., Degli Esposti, E., Borghese, G., Manzara, F., Zanello, M., Raimondo, D., Gava, G., Arena, A., Casadio, P., Meriggiola, M.C., and Seracchioli, R. (2019). The impact of hormonal replacement treatment in postmenopausal women with uterine fibroids: a state-of-the-art review of the literature. *Medicina*, 55(9), 549.
81. De Vivo, A., Mancuso, A., Giacobbe, A., Maggio Savasta, L., De Dominici, R., Dugo, N., Dugo, A., and Vaiarelli, A. (2011). Uterine myomas during pregnancy: a longitudinal sonographic study. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 37(3), 361-365.
82. Stewart, E.A., Cookson, C.L., Gandolfo, R.A., and Schulze-Rath, R. (2017). Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 124, 1501-1512.
83. Farris, M., Bastianelli, C., Rosato, E., Brosens, I., and Benagiano, G. (2019). Uterine fibroids: an update on current and emerging medical treatment options. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 15, 157-178.
84. Kovács, K.A., Oszter, A., Göcze, P.M., Környei, J.L., and Szabó, I. (2001). Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (α and β) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 7(11), 1085-1091.
85. Bakas, P., Liapis, A., Vlahopoulos, S., Giner, M., Logotheti, S., Creatsas, G., Meligova, A.K., Alexis, M.N., and Zoumpourlis, V. (2008). Estrogen receptor α and β in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. *Fertility and Sterility*, 90, 1878-1885.
86. Kasai, T., Shozu, M., Murakami, K., Segawa, T., Shinohara, K., Nomura, K., and Inoue, M. (2004). Increased expression of type I 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase enhances in situ production of estradiol in uterine leiomyoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89:, 5661-5668.
87. Ishikawa, H., Ishi, K., Serna, V.A., Kakazu, R., Bulun, S.E., and Kurita, T. (2010). Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*, 151(6), 2433-2442.
88. Petrozza, J.C. (2020). *Uterine fibroids* (1st Ed.). Philadelphia: Taylor & Francis Group, 36,37.
89. Khaund, A., and Lumsden, M.A. (2008). Impact of fibroids on reproductive function. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 22, 749-760.
90. Freytag, D., Günther, V., Maass, N., and Alkatout, I. (2021). Uterine fibroids and infertility. *Diagnostics*, 11(8), 1455.
91. Levy, B.S. (2020). *Modern management of uterine fibroids-Vol. 87*. Cambridge University Press. 812-821.
92. Pier, B.D., and Bates, G.W. (2015). Potential causes of subfertility in patients with intramural fibroids. *Fertility Research and Practice*, 1, 12.

93. Lash, G.E., and Bulmer, J.N. (2011). Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? *Journal of Reproductive Immunology*, 88, 156–164.
94. Ikhen, D.E., and Bulun, S.E. (2018). Literature review on the role of uterine fibroids in endometrial function. *Reproductive Sciences*, 25, 635–643.
95. Coutinho, L.M., Assis, W.A., Spagnuolo-Souza, A., and Reis, F.M. (2021). Uterine fibroids and pregnancy: how do they affect each other? *Reproductive Sciences*, 29, 2145-2151.
96. Saleh, H.S., Mowafy, H.E., Hameid, A.A., Sherif, H.E., and Mahfouz, E.M. (2018). Does uterine fibroid adversely affect obstetric outcome of pregnancy?. *BioMed Research International*, 2018, ID 8367068.
97. Hartmann, K.E., Velez Edwards, D.R., Savitz, D.A., Jonsson-Funk, M.L., Wu, P., Sundermann, A.C., and Baird, D.D. (2017). Prospective cohort study of uterine fibroids and miscarriage risk. *American Journal of Epidemiology*, 186(10), 1140-1148.
98. Sundermann, A.C., Edwards, D.R.V., Bray, M.J., Jones, S.H., Latham, S.M., and Hartmann, K.E. (2017). Leiomyomas in Pregnancy and Spontaneous Abortion: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 130(5), 1065-1072.
99. Shavell, V.I., Thakur, M., Sawant, A., Kruger, M.L., Jones, T.B., Singh, M., Puscheck, E.E., and Diamond, M.P. (2012). Adverse obstetric outcomes associated with sonographically identified large uterine fibroids. *Fertility and Sterility*, 97, 107-110.
100. Zhao, R., Wang, X., Zou, L., Li, G., Chen, Y., Li, C., and Zhang, W. (2017). Adverse obstetric outcomes in pregnant women with uterine fibroids in China: a multicenter survey involving 112,403 deliveries. *PLoS One*, 12(11), e0187821.
101. Kesmodel, U.S., Mogensen, O., Humaidan, P., and Ravn, P. (2020). Relationship between a uterine fibroid diagnosis and the risk of adverse obstetrical outcomes: a cohort study. *BMJ Open*, 10(2), e032104.
102. Singh, S.S., Belland, L., Leyland, N., von Riedemann, S., and Murji, A. (2018). The past, present, and future of selective progesterone receptor modulators in the management of uterine fibroids. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(6), 563-572.
103. Mutter, G.L., Bergeron, C., Deligdisch, L., Ferenczy, A., Glant, M., Merino, M., Williams, A.R.W., and Blithe, D. L. (2008). The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators. *Modern Pathology*, 21(5), 591-598./.
104. Levens, E.D., Potlog-Nahari, C., Armstrong, A.Y., Wesley, R., Premkumar, A., Blithe, D.L., Blocker, W., and Nieman, L.K. (2008). CDB-2914 for uterine leiomyomata treatment: a randomized controlled trial. *Obstetrics and Gynecology*, 111(5), 1129-1136.
105. Donnez, J., Tatarchuk, T.F., Bouchard, P., Puscasiu, L., Zakharenko, N.F., Ivanova, T., Ugocsai, G., Mara, M., Jilla, M.P., Bestel, E., Terrill, P., Osterloh, I., Loumaye, E., and PEARL I Study Group. (2012). Ulipristal acetate versus placebo for fibroid treatment before surgery. *New England Journal of Medicine*, 366, 409-420.

106. Donnez, J., Tomaszewski, J., Vázquez, F., Bouchard, P., Lemieszczuk, B., Baró, F., Nouri, K., Selvagg, L., Sadowski, K., Bestel, E., Terrill, P., Osterloh, I., Loumaye, E., and PEARL II Study Group. (2013). Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 68(2), 99-100.
107. Donnez, J., Vázquez, F., Tomaszewski, J., Nouri, K., Bouchard, P., Fauser, B.C.J.M., Barlow, D.H., Palacios, S., Donnez, O., Bestel, E., Osterloh, I., Loumaye, E., and PEARL III and PEARL III Extension Study Group. (2014). Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertility and Sterility*, 101, 1565-1573.
108. Donnez, J., Hudecek, R., Donnez, O., Matule, D., Arhendt, H.J., Zatik, J., Kasilovskiene, Z., Dumitrascu, M.C., Fernandez, H., Barlow, D.H., Bouchard, P., Fauser, B.C.J.M., Bestel, E., Terrill, P., Osterloh, I., and Loumaye, E. (2015). Efficacy and safety of repeated use of ulipristal acetate in uterine fibroids. *Fertility and Sterility*, 103, 519-527..
109. Donnez, J., Courtoy, G.E., Donnez, O., and Dolmans, M.M. (2018). Ulipristal acetate for the management of large uterine fibroids associated with heavy bleeding: a review. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(2), 216-223.
110. Grant, W.B., Lahore, H., McDonnell, S.L., Baggerly, C.A., French, C.B., Aliano, J.L., and Bhattoa, H.P. (2020). Evidence that vitamin d supplementation could reduce risk of influenza and covid-19 infections and deaths. *Nutrients*, 12, 1-19.
111. Akoh, C.C., Pressman, E.K., Cooper, E., Queenan, R.A., Pillittere, J., and O'Brien, K. O. (2018). Low vitamin D is associated with infections and proinflammatory cytokines during pregnancy. *Reproductive Sciences*, 25(3), 414-423.
112. Fari Faridi, K.F., Lupton, J.R., Martin, S., Banach, M., Quispe, R., Kulkarni, K., Jones, S.R., and Michos, E.D. (2017). Vitamin D deficiency and non-lipid biomarkers of cardiovascular risk. *Archives of Medical Science*, 13(4), 732-737.
113. Pludowski, P., Holick, M.F., Grant, W.B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M.R., Haq, A., Povoroznyuk, V., Balatska, N., Barbosa, A.P., Karonova, T., Rudenka, E., Misiorowski, W., Zakharova, I., Rudenka, A., Lukaszkiwicz, J., Öarcinowska-Suchowierska, E., Laszcz, N., Abramowicz, P., Bhattoa, H.P., and Wimalawansa, S.J. (2018). Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175, 125-135.
114. Halfon, M., Phan, O., and Theta, D. (2015). Vitamin D: A review on its effects on muscle strength, the risk of fall, and frailty. *BioMed Research International*, 2015, ID 953241.
115. Jones, G. (2012). Metabolism and biomarkers of Vitamin D. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 72, 7-13.
116. Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., and Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), 482-496.
117. Weishaar, T., Rajan, S., and Keller, B. (2016). Probability of vitamin D deficiency by body weight and race/ethnicity. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 29(2), 226-232.

118. Holick, M.F., Binkley, N.C., Bischoff-Ferrari, H.A., Gordon, C.M., Hanley, D.A., Heaney, R.P., Murad, M.H., Weaver, C.M., and Endocrine Society. (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96, 1911-1930.
119. Alzaman, N.S., Dawson-Hughes, B., Nelson, J., D'Alessio, D., and Pittas, A.G. (2016). Vitamin D status of black and white Americans and changes in vitamin D metabolites after varied doses of vitamin D supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104(1), 205-214.
120. Powe, C.E., Evans, M.K., Wenger, J., Zonderman, A.B., Berg, A.H., Nalls, M., Tamez, H., Zhang, D., Bhan, I., Karumanchi, A., Powe, N.R., and Thadhani, R. (2013). Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *New England Journal of Medicine*, 369(21), 1991-2000.
121. Ames, B.N., Grant, W.B., and Willett, W.C. (2021). Does the high prevalence of vitamin D deficiency in African Americans contribute to health disparities?. *Nutrients*, 13(2), 499-524.
122. Khadilkar, S.S. (2013). The emerging role of vitamin D3 in Women's health. *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 63, 147-150.
123. Wise, L.A., Ruiz-Narváez, E.A., Haddad, S.A., Rosenberg, L., and Palmer, J.R. (2014). Polymorphisms in vitamin D-related genes and risk of uterine leiomyomata. *Fertility and Sterility*, 102, 503-510.
124. Suneja, A., Faridi, F., Bhatt, S., Guleria, K., Mehndiratta, M., and Sharma, R. (2021). Effect of vitamin D3 supplementation on symptomatic uterine leiomyoma in women with hypovitaminosis D. *Journal of Mid-life Health*, 12, 53-60.
125. Bläuer, M., Rovio, P.H., Ylikomi, T., and Heinonen, P.K. (2009). Vitamin D inhibits myometrial and leiomyoma cell proliferation in vitro. *Fertility and Sterility*, 91, 1919-1925.
126. Sharan, C., Halder, S.K., Thota, C., Jaleel, T., Nair, S., and Al-Hendy, A. (2011). Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase. *Fertility and Sterility*, 95, 247-253.
127. Brakta, S., Diamond, J.S., Al-Hendy, A., Diamond, M.P., and Halder, S.K. (2015). Role of Vitamin D in uterine fibroid biology. *Fertility and Sterility*, 104, 698-706.
128. Halder, S.K., Osteen, K.G., and Al-Hendy, A. (2013). 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduces extracellular matrix-associated protein expression in human uterine fibroid cells. *Biology of Reproduction*, 89, 1-13.
129. Al-Hendy, A., Diamond, M.P., El-Sohehy, A., and Halder, S.K. (2015). 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates expression of sex steroid receptors in human uterine fibroid cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100, 572-582.

130. Corachán, A., Trejo, M.G., Carbajo-García, M.C., Monleón, J., Escrig, J., Faus, A., Pellicer, A., Cervello, I, and Ferrero, H. (2021). Vitamin D as an effective treatment in human uterine leiomyomas independent of mediator complex subunit 12 mutation. *Fertility and Sterility*, 115, 512–521.
131. Halder, S.K., Goodwin, J.S., and Al-Hendy, A. (2011). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces TGF- β 3-induced fibrosis-related gene expression in human uterine leiomyoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96, 754–762.
132. Ali, M., Shahin, S.M., Sabri, N.A., Al-Hendy, A., and Yang, Q. (2019). Hypovitaminosis D exacerbates the DNA damage load in human uterine fibroids, which is ameliorated by vitamin D3 treatment. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(7), 957-970.
133. Elkafas, H., Ali, M., Elmorsy, E., Kamel, R., Thompson, W.E., Badary, O., Al-Hendy, A., and Yang, Q. (2020). Vitamin D3 ameliorates DNA damage caused by developmental exposure to endocrine disruptors in the uterine myometrial stem cells of Eker rats. *Cells*, 9(6), 1459.
134. Bang, W.S., Lee, D.H., Kim, K.T., Cho, D.C., Sung, J.K., Han, I.B., Kim, D.H., Kwon, B.K., Kim, C.H., Park, K.S., Park, M.K., Seo, S.Y., and Seo, Y. J. (2018). Relationships between vitamin D and paraspinal muscle: human data and experimental rat model analysis. *The Spine Journal*, 18(6), 1053-1061.
135. Pohl, O., Osterloh, I., and Gotteland, J.P. (2013). Ulipristal acetate—safety and pharmacokinetics following multiple doses of 10–50 mg per day. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 38(4), 314-320.
136. Zhao, H., Li, Y., Xu, Q., Peng, F., Zhao, J., Webb, R.C., Peng, C., and Yu, C. (2018). Establishment of a rat model for uterine leiomyomas based on Western and traditional Chinese medicine theories. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51, 1–8.
137. Szydłowska, I., Grabowska, M., Nawrocka-Rutkowska, J., Piasecka, M., and Starczewski, A. (2021). Markers of cellular proliferation, apoptosis, estrogen/progesterone receptor expression and fibrosis in selective progesterone receptor modulator (ulipristal acetate)-treated uterine fibroids. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4), 562-574.
138. Mas, A., Tarazona, M., Dasí-Carrasco, J., Estaca, G., Cristóbal, I., and Monleón, J. (2017). Updated approaches for management of uterine fibroids. *International Journal of Women's Health*, 9, 607-617.
139. Ferrero, S., Vellone, V.G., Barra, F., and Scala, C. (2019). Ulipristal acetate before hysteroscopic and laparoscopic surgery for uterine myomas: help or hindrance?. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 84(4), 313-325..
140. Sheng, B., Song, Y., Liu, Y., Jiang, C., and Zhu, X. (2020). Association between vitamin D and uterine fibroids: A study protocol of an open-label, randomised controlled trial. *Bmj Open*, 10(11), e038709.

141. Ciebiera, M., Męczekalski, B., Łukaszuk, K., and Jakiel, G. (2019). Potential synergism between ulipristal acetate and vitamin D3 in uterine fibroid pharmacotherapy—2 case studies. *Gynecological Endocrinology*, 35(6), 473-477.
142. Donnez, J., Donnez, O., Matule, D., Ahrendt, H.J., Hudecek, R., Zatik, J., Kasilovskiene, Z., Dumitrascu, M.C., Fernandez, H., Barlow, D.H., Bouchard, P., Fauser, B.C.J.M., Bestel, E., and Loumaye, E. (2016). Long-term medical management of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertility and Sterility*, 105, 165-173.
143. Hajhashemi, M., Ansari, M., Haghollahi, F., and Eslami, B. (2019). The effect of vitamin D supplementation on the size of uterine leiomyoma in women with vitamin D deficiency. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 10(2), 125-131
144. Whitaker, L.H.R., Murray, A.A., Matthews, R., Shaw, G., Williams, A.R.W, Saunders, P.T.K., and Critchley, H.O.D. (2017). Selective progesterone receptor modulator (SPRM) ulipristal acetate (UPA) and its effects on the human endometrium. *Human Reproduction*, 32, 531-543.
145. Kamel, M., Wagih, M., Kilic, G.S., Diaz-Arrastia, C.R., Baraka, M.A., and Salama, S.A. (2017). Overhydroxylation of lysine of collagen increases uterine fibroids proliferation: roles of lysyl hydroxylases, lysyl oxidases, and matrix metalloproteinases. *BioMed Research International*, 2017, ID 594613.
146. Cox, J., Malik, M., Britten, J., Lewis, T., and Catherino, W.H. (2018). Ulipristal acetate and extracellular matrix production in human leiomyomas in vivo: a laboratory analysis of a randomized placebo controlled trial. *Reproductive Sciences*, 25, 198–206.
147. Kamalipooya, S., Zarezadeh, R., Latifi, Z., Nouri, M., Fattahi, A., and Salemi, Z. (2021). Serum transforming growth factor β and leucine-rich α -2-glycoprotein 1 as potential biomarkers for diagnosis of uterine leiomyomas. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 50(3), 102037.
148. Arici, A., and Sozen, I. (2000). Transforming growth factor- β 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertility and Sterility*, 73, 1006–1011.
149. Ciebiera, M., Włodarczyk, M., Słabuszewska-Józwiak, A., Nowicka, G., and Jakiel, G. (2016). Influence of vitamin D and transforming growth factor β 3 serum concentrations, obesity, and family history on the risk for uterine fibroids. *Fertility and Sterility*, 106, 1787–1792.

EKLER

EK-1. Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.10.2019-E.123657



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Gülnur KAPLANOĞLU (TAKE)
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Nagwa B. Abubaker ALEMARI ve Gökçe Nur ARIK'tan oluşan G.Ü.ET-19.041 kod numaralı ve "*Deneysel Uterin Fibroid Modelinde Ulipristal Asetat ve Vitamin D3 Sinerjistik Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-19.041 and entitled "*The Synergistic Effect of Ulipristal Acetate and Vitamin D3 on the Treatment of Uterine Fibroids-An Experimental Study*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 48

Ek: 1 Liste



EK-1. (devam) Etik Kurulu Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :27/09/2019		TOPLANTI SAYISI : 07	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

EK-2. Deneý Hayvan Katılım Sertifikası


T.C. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın **NAGWA BUGUMAA ABUBAKER ALEMARI**

15.05.2018 - 23.05.2018 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen “Deneý Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. **ABDULKADİR BEDİRLİ**
HADYEK BAŞKANI

Prof. Dr. **İBRAHİM USLAN**
REKTÖR


hadimék Hayvan Deneýleri Merkezi Etik Kurulu

EK-2. (devam) Deney Hayvan Katılım Sertifikası

Ders Adı	Ders Saati	
	Teorik	Uygulama
Mevzuat, Etik, Hayvan Davranışları ve 3R*	3	
Deney hayvanlarının anatomisi, fizyolojisi, histolojisi ve biyokimyası	5	4
Kan ve örnek alma teknikleri	1	4
Tutuş teknikleri	1	4
İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri	1	4
Anestezi ve ötenazi teknikleri	2	4
Ağrı, ıstırap, sıkıntı ve insani sonlandırma noktalarının belirlenmesi	2	
Laboratuvar işleyişi (temizlik, güvenlik, çalışma sağlığı)*	2	4
Deney hayvanlarının beslenmesi	2	
Hayvan hastalıkları a) mikrobiyolojik, virolojik, parazitolojik, mikolojik b) klinik dışı vurumlar c) sağlık tarama programları	4	4
Biyostatistik (mümkün olan en düşük hayvan sayısının belirlenmesi)*	2	
Standardizasyon a) Genetik standardizasyon b) Mikrobiyolojik standardizasyon c) Bakım-barındırma d) Araştırma	3	
Spesifik deney modelleri	4	4
Hayvan deneylerinin tasarlanması*	2	4
Temel Cerrahi	2	
Deney hayvanlarının yetiştirilmesi	2	4
Alternatif Yöntemler*	2	
TOPLAM	40	40

Başarı Puanı : 92

Sertifikanın geçerli olduğu hayvan türü/türleri : Fare (*Mus musculus*) , Sıçan (*Rattus norvegicus*) , Kobay (*Cavia porcellus*) , Tavşan (*Oryctolagus cuniculus*)

Bu Sertifika Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nın 30.11.2017 tarih ve 2017/7 sayılı Genelgesine uygun olarak düzenlenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALEMARI, Nagwa Bugumaa Abubaker
Uyruğu : Libya

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Sirte Üniversitesi/Tıp Fakültesi	2006
Lise	Al-thawra Alarabiya Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2007-2013	İbn Sina Hastanesi/Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	Asistan

Yabancı dil

İngilizce, Fransızca, Türkçe

Yayınlar

1. Alemari, N. B. A., and Take, G. (2022). Current Understanding of Pathogenesis, Histopathology, Diagnosis, and Treatment Options of Uterine Fibroids-Review. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute*, 4(2), 107-124.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..