



**SOYA İZOFLAVONOİDLERİNİN (GENİSTEİN VE DAİDZEİN)
ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Erdem TOKTAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Jale SELLİ

Doktora Tezi -2019

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOYA İZOFLAVONOİDLERİNİN (GENİSTEİN VE
DAİDZEİN) ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE ÜZERİNE
ETKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Erdem TOKTAY

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Jale SELLİ**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SOYA İZOFLAVONOİDLERİNİN (GENİSTEİN VE
DAİDZEİN) ENDOMETRİYAL RESEPTİVİTE ÜZERİNE
ETKİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Erdem TOKTAY

Tez Savunma Tarihi : 20.09.2019

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Jale Selli (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai Halıcı (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Levent Tümkiye (R. T. Erdoğan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Tuba Demirci (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Tolga Mercantepe (R. T. Erdoğan Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Uterus Anatomisi ve Histolojisi.....	5
2.2. Uterus Fizyolojisi.....	8
2.3. İnfertilite	12
2.3.1. Erkek İnfertilitesi	12
2.3.2. Kadın İnfertilitesi.....	13
2.3.3. Açıklanamayan İnfertilite	14
2.4. Endometriyal Reseptivite.....	15
2.4.1. Endometriyal Reseptivite Belirteçleri.....	16
2.4.1.1 Endometriyal Reseptivitenin Morfolojik Belirteçleri	17
2.4.1.2 Endometriyal Reseptivitenin Moleküler Belirteçleri	18
2.4.1.3 Endometriyal Reseptivitenin Biyokimyasal Belirteçleri	21
2.4.1.4 Endometriyal Reseptivitenin Hormonal Düzenlenişi	21
2.5. Soya İzoflovonoidleri	23
2.5.1. Genistein ve Daidzein.....	24
3. MATERYAL VE METOT.....	27
3.1. Etik Kurul Onayı.....	27

3.2. Deneklerin Temini ve Barınma Olanakları.....	27
3.3. Çalışma Hayvan Modeli ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	27
3.4. Cerrahi İşlemler	30
3.5. Histopatolojik Analizler.....	31
3.5.1. Doku Takip İşlemleri ve Kesitlerin Hazırlanması	32
3.5.2. Boyama Ön İşlemi	33
3.5.3. Hematoksilen ve Eosin Boyama İşlemi	34
3.5.4. Alsiyan Mavisi Boyama İşlemi.....	35
3.5.5. İmmünohistokimyasal Boyama İşlemi	36
3.6. Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama.....	38
3.7. Biyokimyasal Analizler	38
3.7.1. Östrojen ölçümü.....	38
3.7.2. Progesteron ölçümü	39
3.8. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR.....	42
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	42
4.1.1. Hematoksilen ve eozin boyama bulguları.....	42
4.1.2. Alsiyan mavisi boyama bulguları	46
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	49
4.3. Biyokimyasal Bulgular	56
4.3.1. Östrojen Hormonu Seviyeleri	56
4.3.2. Progesteron Hormon Seviyeleri.....	57
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKÇA.....	69

EKLER	85
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	85
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	86
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	87



TEŞEKKÜR

Doktora lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteklerini hissettiğim çok kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Jale SELLİ'ye şükran ve minnetlerimi sunarım.

Akademik hayatımın olgunlaşmasında bana katkısı olan anabilim dalı hocalarım; sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuba DEMİRCİ ve Dr. Öğr. Üyesi Osman Nuri KELEŞ'e, tez çalışmam süresince her daim yardımlarını esirgemeyen farmakoloji anabilim dalı hocalarımdan; Prof. Dr. Zekai HALICI' ya, doku biyokimyası analizlerimi yapan ve yorumlayan; Dr. Öğr. Üyesi Harun Ün ve Dr. Öğr. Üyesi Rüstem Anıl UĞAN'a, doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana her türlü maddi ve manevi yoldaşlık eden değerli arkadaşım Arş. Gör. Muhammet Ali GÜRBÜZ'e, tez çalışmam sırasında cerrahi işlemlerde yardımcı olan Arş. Gör. Tuğba BAL TAŞTAN'a, Arş. Gör. Dr. Raziye ALACA'ya Arş. Gör. Arş. Gör. Dr. Merve DURMUŞ KAYGISIZ'a ve Arş. Gör. Elif ERBAŞ'a, doktora eğitimimi en iyi şekilde almam için bana fırsat hazırlayan Yüksek Öğrenim Kurumu (YÖK), Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na (ÖYP), doktora çalışmamı, doktora araştırma projesi (TDK-2019-7271) olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi'ne, katkıları ve sabırlarından ötürü Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline, tüm hayatım boyunca sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen eşime ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Erdem TOKTAY

ÖZET

Soya İzoflavonoidlerinin (Genistein ve Daidzein) Endometriyal Reseptivite Üzerine Etkisinin İmmünohistokimyasal ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması

Amaç: Çalışmada, genistein ve daidzeinin düşük östrojen varlığında gerçekleşen endometriyal reseptivite üzerindeki etkisinin histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal tekniklerle araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada, 10-12 haftalık, 72 adet ve ortalama ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele 8 gruba ayrıldı. Belirlenen gruplara endometriyal reseptivite modeli uygulandı. Çalışmada, deney hayvanlarına genisteinin ve daidzeinin düşük (10 mg/kg) ve yüksek (40 mg/kg) dozları 5 gün boyunca peri-oral olarak verildi. Deney sonunda alınan uterus dokuları, histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: Histopatolojik bulgular incelendiğinde, yüksek doz genistein ve daidzein uygulanan gruplarda pinopod oluşumunda ciddi azalmalar izlendi. İmmünohistokimyasal boyama bulgularında, yüksek doz genistein ve daidzeinin gruplarında integrin $\beta 3$, integrin $\alpha v\beta 3$, LIF, HOXA 10 ekspresyonunda belirgin azalma; MUC 1 ekspresyonunda ise artış gözlemlendi. Biyokimyasal değerlendirilmelerde ise doza bağlı olarak genistein ve daidzein östrojen seviyelerini artırırken progesteron seviyesini düşürdü.

Sonuç: Genistein ve daidzeinin endometriyal reseptivite üzerinde olumsuz etkisi vardır. İnfertilite ve endokrin sistem bozucu kimyasallardan olan soya izoflavonoidleri arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Daidzein, Endometriyal reseptivite, Genistein.

ABSTRACT

Immunohistochemical and Biochemical Examination of Effects of The Soy Isoflavonoids (Genistein and Daidzein) on Endometrial Receptivity

Aim: In this study, it is aimed to examine the effect of genistein and daidzein on endometrial receptivity in the presence of low estrogen by immunohistochemical and biochemical techniques.

Material and Method: In this study, 72 female Sprague-Dawley rats with a mean weight of 180-200 grams and 10-12 week were used. Rats were randomly divided into 8 groups. Endometrial receptivity model was applied to identified groups. Experimental animals were given peri-orally low (10 mg / kg) and high (40 mg / kg) doses of genistein and daidzein for 5 days. At the end of the experiment, uterine tissues were evaluated histopathologically, immunohistochemically and biochemically.

Results: When histopathological findings were examined, significant decreases in pinopod formation were observed in a high dose of genistein and daidzein groups. Immunohistochemical staining findings showed a significant decrease in the expression of integrin $\beta 3$, integrin $\alpha v \beta 3$, LIF, HOXA 10 and an increase in MUC 1 expression in the high dose genistein and daidzein groups. In biochemical evaluations, it was determined that genistein and daidzein increased estrogen levels and decreased progesterone levels in a dose dependent manner.

Conclusion: Genistein and daidzein have a negative effect on endometrial receptivity. More detailed studies are needed to understand the relationship between infertility and soy isoflavonodies which are endocrine-disrupting chemicals.

KeyWords: Daidzein, Endometrial receptivity, Genistein.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATADEM	:	Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi
DD	:	Düşük doz
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
DZ	:	Daidzein
ER	:	Endometriyal reseptivite
FSH	:	Folikül uyarıcı hormon
GE	:	Genistein
Glr_x	:	Glutaredoksin
GlyA	:	Glikodelin A
GnRH	:	Gonadotropik serbestleştirici hormon
HAM	:	Hücre adezyon molekülleri
HB-EGF	:	Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
hCG	:	İnsan koryonik gonodotropin
HOXA 10	:	Homeobox A 10
HSG	:	Histerosalpingografi
IVF	:	İn vitro fertilizasyon
LH	:	Luteinize edici hormon
LIF	:	Lösemi inhibe edici faktör
MUC	:	Müsin
PCOS	:	Polikistik over sendromu
USDA	:	Amerika Tarım Bakanlığı
YD	:	Yüksek doz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kadın iç genital sistem organlarının şematik gösterimi	5
Şekil 2.2. Uterusun histolojik tabakaları	7
Şekil 2.3. Uterusun kanlanması	8
Şekil 2.4. Ovaryan ve menstrual siklusta hormon düzeyleri	9
Şekil 2.5. Endometriyal reseptivite ve implantasyonda gerçekleşen bazı olaylar	17
Şekil 3.1. Endometriyal reseptivite için çiftleştirme aşaması.....	30
Şekil 3.2. Uterusun diseksiyonu ve çıkarılışı	31
Şekil 4.1. Kontrol grubu histopatolojik bulguları.....	42
Şekil 4.2. ER (A-B) ve ER+SU (C-D) grupları histopatolojik bulguları	43
Şekil 4.3. ER+ÖST (A-D) grubu histopatolojik bulguları.....	44
Şekil 4.4. ER+GE+DD (A-B) ve ER+GE+YD (C-D) grupları histopatolojik bulguları	45
Şekil 4.5. ER+DZ+DD (A-B) ve ER+DZ+YD (C-D) grupları histopatolojik bulguları	46
Şekil 4.6. Alisyan mavisi boyamasına ait histopatolojik bulgular	48
Şekil 4.7. İntegrin $\beta 3$ antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları	51
Şekil 4.8. İntegrin $\alpha v \beta 3$ antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları	52
Şekil 4.9. LIF antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları	53
Şekil 4.10. HOXA 10 antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları	54
Şekil 4.11. MUC 1 antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları	55
Şekil 4.12. Östrojen serum seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması	57
Şekil 4.13. Progesteron serum seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	58

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Başlıca erkek infertilite nedenleri	13
Tablo 2.2. Başlıca kadın infertilite sebepleri	14
Tablo 3.1. Deney grupları ve yapılan işlemler	29
Tablo 3.2. Fiksasyon ve doku takibi işlem basamakları	32
Tablo 3.3. Boyama ön işlemi protokolü.....	34
Tablo 3.4. Rutin hematoxilen ve eozin boyama protokolü.....	35
Tablo 3.5. Alsiyan mavisi boyama protokolü	36
Tablo 3.6. Ventana immünohistokimyasal boyama protokolü	37
Tablo 3.7. Östrojen ve progesteron ELISA ölçüm basamakları	39
Tablo 4.1. Alsiyan mavisi boyaması müsın skorlama tablosu	47
Tablo 4.2. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları skorlama tablosu	49
Tablo 4.3. Östrojen ve progesteron hormon ortalama ve standart sapma değeri.....	56

1. GİRİŞ

Baklagiller familyasından olan soya, anavatanı olan Çin, Kore ve Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde binlerce yıldır tüketilen besin maddelerinin başında gelmektedir. Her ne kadar Uzakdoğu’da tüketilen bir bitki ise de bu bitkinin dünyaya yayılması son 300 yılda olmuştur. Başlangıçta Avrupa’ya süs bitkisi olarak getirilen soya; besin değeri, mineraller ve vitaminler açısından oldukça zengin olması nedeniyle endüstriyel devrimden nasibini almış ve günümüzde 400’den fazla endüstriyel ürün yapımında kullanılması ile tarımsal ürünler arasında önemli bir yer kazanmıştır. Amerika Tarım Bakanlığı (USDA) raporuna göre soya üretimi 1940’larda 10 milyon ton iken; 2000 yılında 175 milyon tona, 2017 yılı itibari ile 348 milyon tona ulaşmıştır.^{1, 2} Soya, maliyetinin ucuz olması, yüksek protein (% 35-45), karbonhidrat (% 30), yağ (% 18-24) ve mineral (%5) içeriği gibi nedenlerden dolayı işlenmiş gıdalarda, katkı maddelerinde, hayvan yemlerinde çokça tercih edilen bir besin maddesidir.³ Soya endüstrisi günümüzde o kadar çok büyümüştür ki, yağdan, süte, etten, peynire kadar birçok üründe doğrudan ve dolaylı olarak soya kullanılmaktadır. Öyle ki dünya genelinde en fazla üretilen yağlar sıralamasında soya yağı ilk sırayı almıştır.³

Soya, içerisinde fazla miktarda izoflovonoid barındırır. Vücutta birçok metabolizmada biyolojik olarak etkin olan soya izoflovonoidlerinin en bilinenleri genistein ve daidzein’dir. Genistein,⁴ anjiyogenez inhibitörü⁵ ve bitkisel bir östrojendir.⁶ Antioksidan⁷ ve anti-helmintik⁸ fonksiyonlarının yanı sıra, hayvan ve insan östrojen reseptörleri ile etkileştiği gösterilmiştir.⁶ Benzer şekilde daidzeinin de östrojen metabolizmasını değiştirdiği klinik çalışmalarda gösterilmiştir.⁹ Özellikle daidzeinin aktif ürünü olan equol’ün östrojen reseptörlerine büyük afinite gösterdiği çalışmalarda ispatlanmıştır.¹⁰

17 β -östrodiol (östrojen) yapısına benzerliği nedeniyle, gerek genistein gerekse daidzein onunla rekabet edebilir ve östrojen reseptörlerine bağlanabilir.⁶ Bununla birlikte, daidzein ve genistein östrojen reseptörüne karşı östrojenden çok daha yüksek afiniteye sahiptir.^{9, 11, 12} Bu özelliğinden dolayı endokrin sistem bozucu kimyasallar olarak da bilinirler.^{13, 14} Bu endokrin bozucu kimyasalların özellikle erkeklerde, dişi ikincil seks karakterlerinin ortaya çıkmasına ve sürdürülmesine yol açtığı görülmüştür.^{11, 15} Bunun yanında genisteinin testiküler hücrelerin apoptozuna ve semen parametrelerinde azalmaya yol açtığı da gösterilmiştir.¹⁶ Dişilerde ise genisteinin folikülogenezi ve steroidogenezi değiştirdiği rapor edilmiştir.^{17, 18} Yine Rice ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise izoflovonoidlerin steroidogenez sentez enzimlerinin fonksiyonunu bozduğu tespit edilmiştir.¹⁹

Sağlık alanında üremeye ilgili yapılan tedavilerin başarısı zamanla artmasına rağmen, infertilite problemleri sosyo-psikolojik olarak bireyleri hala etkilemektedir. Günümüzde mevcut çiftlerin her yıl %10-15'nin infertilite tanısı aldığı düşünüldüğünde, infertilite önemli ve sık görülen klinik problemlerden birisidir. Ne yazık ki infertilite, çeşitli sebeplerle çocuk sahibi olmayı erteleyen çiftlerde stres gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de infertilite sıklığı daha da artmaktadır.

Çiftlerin karşılaştığı infertilite problemleri erkek veya kadın kaynaklı olabilir. Her iki cinsten de bu durum birbirine yakın oranlarda görülür. İnfertilite problemleri genellikle hormonal dengesizlik ve anatomik kusurlara bağlı olurken otoimmün nedenlerle de ortaya çıkabilmektedir. Genellikle erkeklerde sperm sayısı, kalitesi ve hareketliliği, genital kanallardaki tıkanıklıklar ve sperm üretim kusurları; kadınlarda ise anovulasyon ile karakterize olan PCOS (Polikistik over sendromu), endometriyum kusurları, hormonal akstaki dengesizlikler ve implantasyon başarısızlığı gibi nedenlerle infertilite tanısı alan çift tanısı her geçen 10 yılda daha da artmaktadır.^{20, 21}

Günümüzde infertil çiftlerin etiyolojisine bakıldığında %40-55 oranında kadın faktörünün, %25-40 oranında erkek faktörünün, %10 oranında ise hem kadın hem de erkek faktörünün etkili olduğu bilinmektedir.^{22, 23} Kadın kaynaklı infertilite vakalarının %30-40'ını anovulasyon, %30-40'ını genital kanal ve organlar ile ilgili kusurlar, %10-15'ini açıklanamayan infertilite ve %10-15'ini ise diğer patolojik durumlar oluşturmaktadır.²⁴ Bu kusurların nedenleri çeşitli olmakla birlikte genetik, endokrin, yaş, anatomik, immünolojik, trombofilik, radyasyon ve diğer faktörler (nikotin, sigara, civa, kurşun, etilen oksit, formaldehit ve benzer kimyasallar) kaynaklı olabilmektedir.²⁵

Açıklanamayan infertilite, standart testlerle herhangi bir tanı alamayan bireylerin infertilite durumudur. Özellikle kadınlarda test edilebilirliği zor olduğu için implantasyon başarısızlığı ile ilişkisi olan endometriyal reseptivite problemi bu tür infertilitenin bir sebebi olabilir. Nitekim Antón ve Velasco' nun yapmış oldukları bir çalışmada bu ilişki üzerinde durulmuştur.²⁶ Bu tür açıklanamayan infertilite durumlarında hekimlerin genel tutumu kişileri in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisine yönlendirme şeklindedir.

IVF tedavisinde in vitro şartlarda fertilize edilen embriyo, anne adayının uterusuna tutunma için en ideal zaman olan implantasyon penceresi döneminde yerleştirilir. İmplantasyon penceresi dönemi, kadın menstrüasyon döngüsünün ikinci yarısı olan luteal fazın 19-24. günler arasını kapsayan ve düşük östrojen yüksek progesteron varlığında gerçekleşen kritik bir dönemdir. Bu dönemde blastokist ile uterus arasındaki karşılıklı etkileşim olarak da bilinen endometriyal reseptivite, pinopod oluşumu ve adeziv moleküllerin sentezi ile karakterizedir. Özellikle bu dönemde eksprese olan integrin beta 3 ve integrin alfa ve beta 3 seviyesi, endometriyal reseptivite için birçok çalışmada referans olarak kullanılmaktadır.^{27, 28} Lösemi inhibe edici faktör (LIF) ve Homeobox A 10 (HOXA 10) bu dönemle ilişki kurulan bir diğer moleküllerdendir.^{29, 30} Bunun yanında endometriyal reseptivite ile ters ilişkisi olan müsin 1 (Muc 1) varlığı da

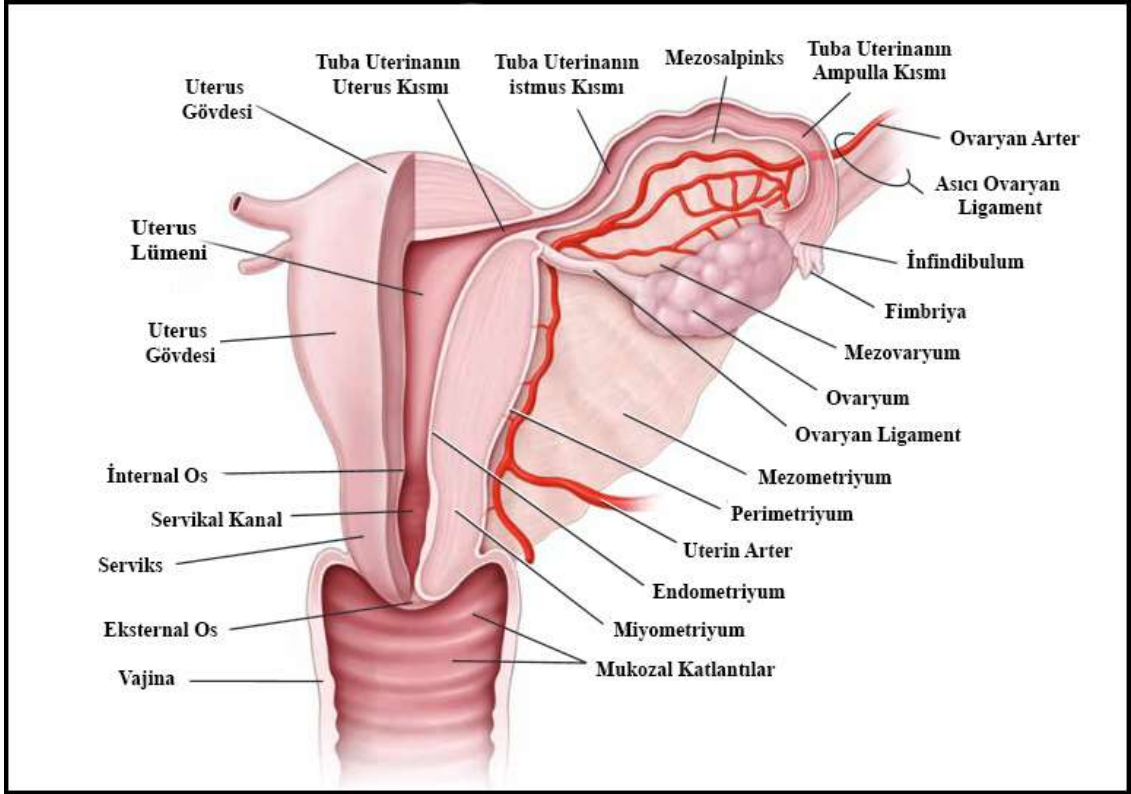
Çalışmalarda negatif ilişkili olarak tartişılmaktadır.³¹ Bu yönüyle IVF başarısı için kritik önem arz etmektedir. Her ne kadar IVF tedavisi ile infertilitenin önüne geçilmeye çalışılsa da IVF'in başarısını etkileyen birçok sebep vardır. Bunların başında implantasyon penceresi döneminde gerçekleşen endometriyal reseptivite problemi gelir.³² öyle ki bu problemin önüne geçmek ve tutunma yüzdesini artırmak için tüp bebek merkezlerinde endometriyal reseptivite kitleri kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalar, bu dönemde meydana gelen pinopod oluşumu ve adeziv moleküllerin sentez anomalilerinin gebelik başarısını doğrudan etkileyebildiğini göstermiştir.^{27, 33} Bu anomalilerin sebepleri çeşitli olmakla birlikte, özellikle beslenme ya da kimyasal maruziyet kaynaklı olabilmektedir.^{34, 35} Literatürde strojen ve progesteron hormonal mekanizmasındaki değişimlerin endometriyal reseptiviteyi değiştirdiği tespit edilmiştir.³⁶ Bu açıdan bakıldığında bitkisel östrojen olan genistein ve daidzeinin endometriyal reseptiviteye etkisinin olmaması düşünülemez. Ancak bu denli önemli bir olayda bu kadar çok tüketilen iki molekülün etkisinin nasıl olduğunun daha önce hiçbir çalışmada gösterilmemiş olması hayret uyandırmaktadır. Kısaca; bu tezde, bitkisel östrojen olan genistein ve daidzeinin, düşük östrojen varlığında gerçekleşen endometriyal reseptiviteyi bir endokrin sistem bozucu kimyasal olarak nasıl etkileyebileceğini ve açıklanamayan infertilitede rolünün histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal tekniklerle araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus Anatomisi ve Histolojisi

Uterus, boyutları değişkenlik gösteren armut şeklinde, kaslı, kalın 3 duvar yapısından oluşan, pelviste mesane ve rektum arasında yerleşmiş içi boş bir organdır (Şekil 2.1)³⁷. Doğum yapmamış kadınlarda ortalama ağırlığı 90 gram olan uterus 7,5 cm boyunda, 5 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığındadır. Erişkinlerde uterus, uterin tüplerin açıldığı üst 2/3' lük geniş gövde ve uterusun vajinaya doğru açıldığı alt 1/3' lük silindirik serviks bölgesinden oluşur.³⁸



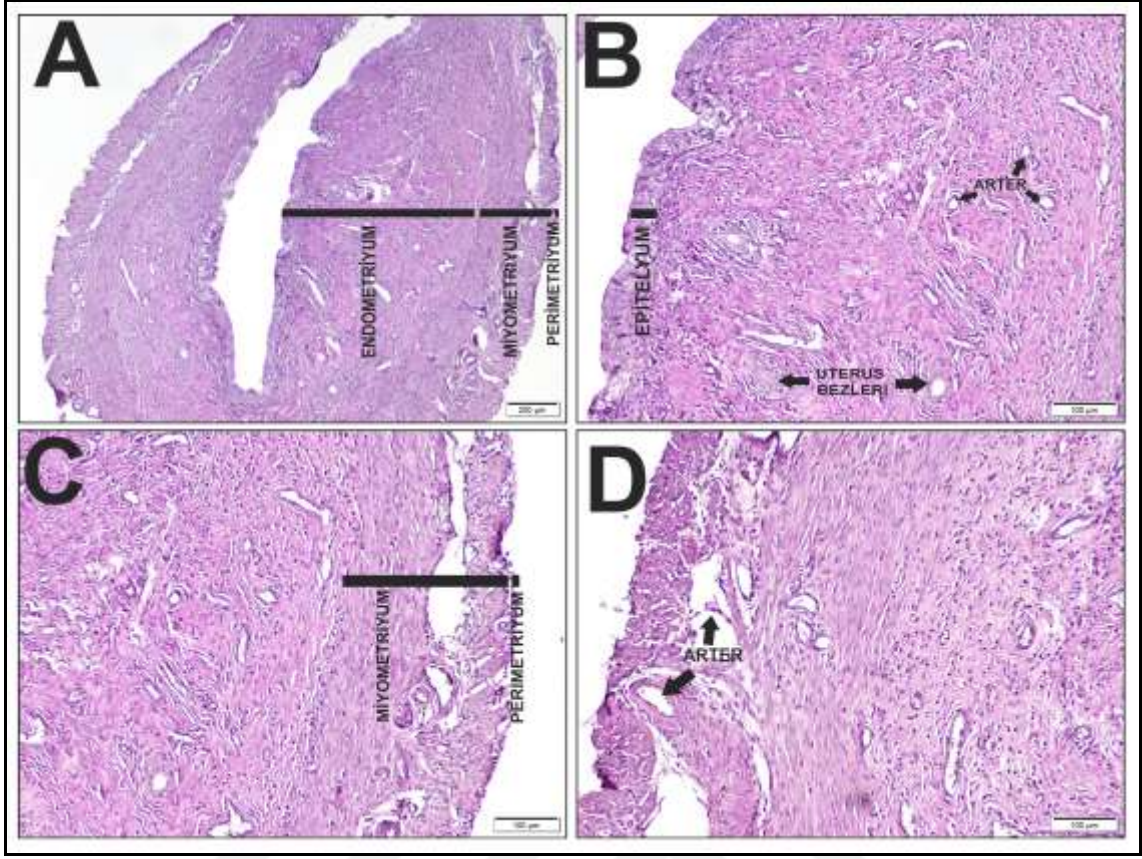
Şekil 2.1. Kadın iç genital sistem organlarının şematik gösterimi

Uterus gövdesi, organı dış taraftan çevreleyen visseral periton olan çok ince perimetrium tabakası, organın kasılma fonksiyonundan sorumlu kalın düz kastan oluşan miyometriyum tabakası ve lümene bakan yüzde embriyo için tutunma ve beslenme yüzeyi oluşturan ince endometriyum tabakasından meydana gelir.³⁹

Uterusun kasılan bir organ olmasından sorumlu olan miyometriyum kendi içinde 3 kas tabakasından oluşur. Ortada yer alan tabakada çok sayıda büyük kan damarları görülürken, dışta ve içte birbirine paralel uzanan düz kas tabakalarından meydana gelir. Bu tabaka içinde bulunan düz kas hücreleri normal koşullarda 50 µm boyunda iken, boyları gebelik durumunda 500 µm'ye ulaşabilir.³⁷

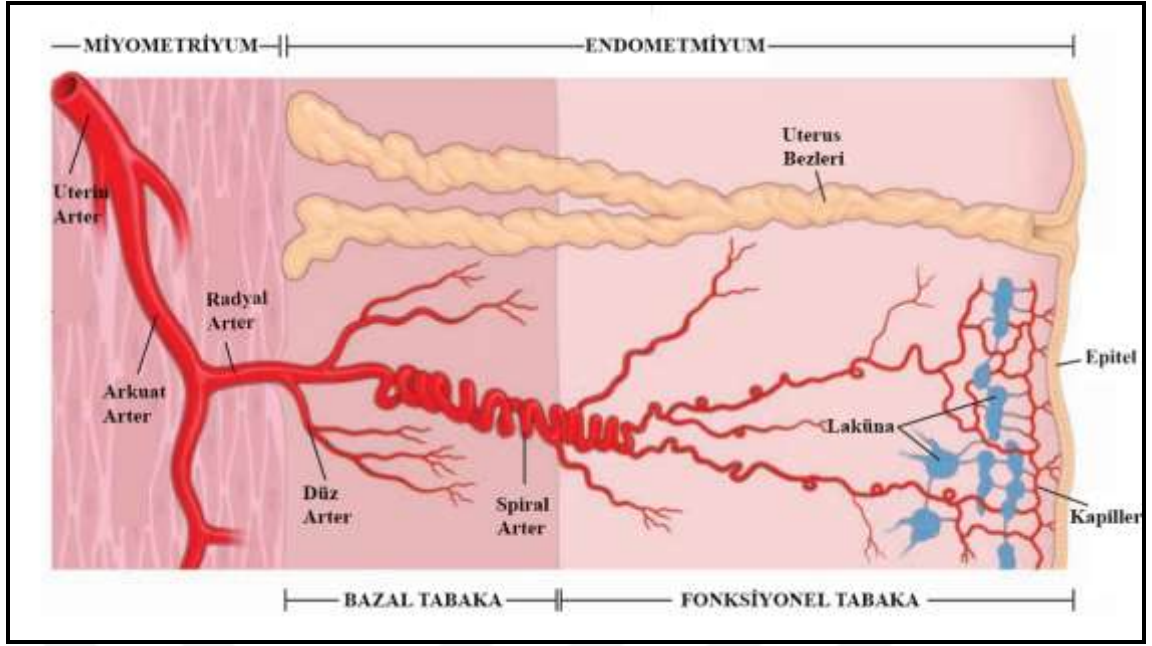
Uterusu diğer kaslı organlardan farklı kılan tabaka endometriyum tabakasıdır. Puberte sonrası dönersel olarak kalınlaşan ve incelen endometriyum, protein sentezi ve hücre bölünmesi yönünden çok aktif bir tabakadır. Üreme çağındaki kadınlarda endometriyum, yapısal ve fonksiyonel olarak iki tabakadan meydana gelir. İlki endometriyumun en kalın tabakası ve menstruasyon sırasında dökülen fonksiyonel tabakadır. İkincisi ise menstruasyon sırasında korunan ve fonksiyonel tabakanın yeniden şekillenmesini sağlayan bazal tabakadır.⁴⁰

Menstruasyon siklusu boyunca, endometriyumun fonksiyonel tabakası, sürekli yıkılan ve yapılan bir dokudur. Bu tabakanın lümene bakan yüzeyi tek katlı prizmatik epitel ile kaplıdır.³⁷ Ergenlik döneminden önce bu tabaka yalancı çok katlı silli silindirik epitel olarak görölmektedir.⁴⁰ Epitel yüzeyinin altında lamina propria içinde basit tübüler bez yapısında uterus bezleri görülür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Uterusun östrus dönemine ait histolojik tabakaları (Büyütme: **A**; X10, **B, C, D**: X40, Boya: Hematoksilen ve Eozin)

Uterusun kanlanması ovaryan ve uterin arterlerden sağlanmaktadır (Şekil 2.3)³⁷. Uterin arter miyometriyum içinde dallanarak arkuat arteri oluşturur; arkuat arterler ise radyal arterleri meydana getirir. Miyometriyumu terk eden radyal arterler endometriyumun bazal tabakasında dallanarak bazal ve spiral arterleri oluşturur. Spiral arterler siklik olarak yıkılan ve yapılan endometriyumun fonksiyonel tabakasına dallanarak kılcak bir damar ağı oluşturur. Bu yolu takip eden venler sırasıyla spiral, radyal, arkuat ve uterin ven olarak organı terk eder.^{37, 38}

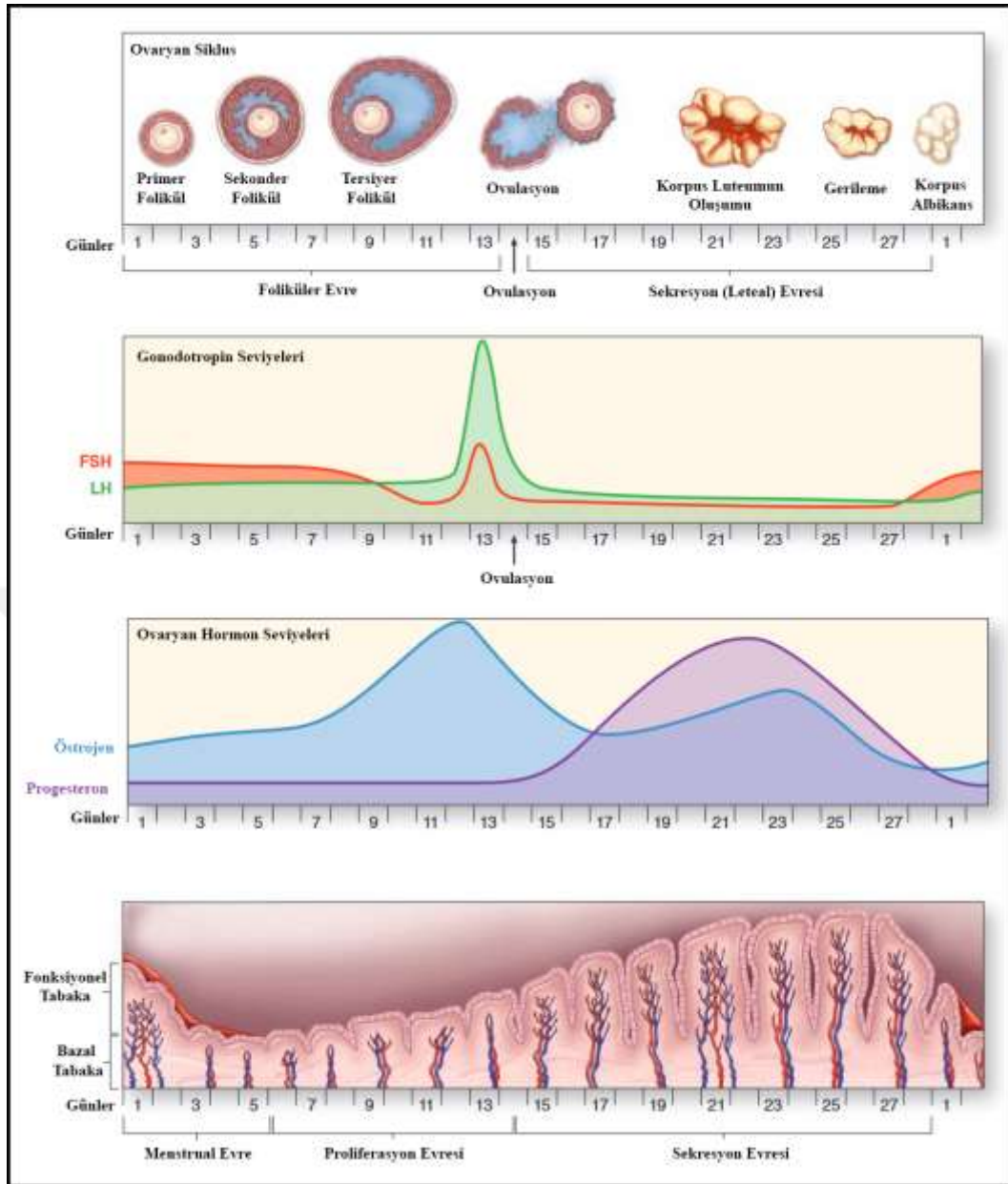


Şekil 2.3. Uterusun kanlanması

Bazal tabakanın arterleri hormonal uyarıya duyarlı değilken, fonksiyonel tabakanın arterleri hormonal uyarıya duyarlıdır. Böylece gebelikle sonuçlanmayan menstrual sikluslarda fonksiyonel tabakanın spiral arterleri hormonal uyarımla kasılmalar yaparak fonksiyonel tabakanın iskemiye uğramasına ve dökülmesine yol açar.⁴¹

2.2. Uterus Fizyolojisi

Kadınlarda menstrual kanamanın ilk görüldüğü 12-15 yaşlarından 45-55 yaşlarındaki menapoz dönemine kadar her ay periyodik olarak devam eden olaylar dizinine menstrual döngü adı verilir. Bu döngü hipotalamus, hipofiz ve ovaryum üçgeninde hormonal olarak denetlenir (Şekil 2.4)⁴¹ ve 28 günde bir tekrar eder. Her ay tekrar eden ve proliferasyon, sekresyon ve menstruasyon olarak adlandırılan üç evreden oluşur. Bazı kaynaklarda ise proliferasyon evresi kendi içinde foliküler ve ovulatuvar evre şeklinde iki ayrı evre olarak değerlendirilmiştir.⁴²



Şekil 2.4. Ovaryan ve menstrual döngüde hormon düzeyleri

Proliferasyon evresi döngünün 5 ve 14'üncü günlerinde görülen, hücre çoğalması ve endometriyum yüzey epitelinin kalınlaşması ile karakterize dönemdir.⁴¹ Östrojen hormonunun hakimiyetinde gerçekleşen bu dönem ovaryumda folikül gelişimi ile paralellik gösterir. Erken dönemde 2 mm kalınlığında olan endometriyumun lümene kadar uzanan basit tübüler bez epitel hücrelerindeki endoplazmik retikulum sisternalarının sayısında ve golgi kompleksinin boyutunda artış izlenir. Ayrıca bezlerde glikojen birikimi gözlenir ve evrenin sonlarına doğru dallanmalar ve genişlemeler izlenir.³⁷ Buna stromal

hücrelerin de eklenmesi ile endometriyumun fonksiyonel tabakası kalınlaşır. Bu evrede endometriyumun bazal tabakasındaki spiral arterler de uzanarak fonksiyonel tabakanın beslenmesine ve oksijenlenmesine destek sağlar. Ovulasyona kadar devam eden bu evrede endometriyumun kalınlığı 3 mm'ye kadar ulaşır.⁴¹

Ovulasyonu takiben başlayan sekresyon (luteal) evresi, 14 ve 28'inci günler arasında devam eder. Bu evrede baskın hormon progesteron hormonudur. Ovaryumda ovulasyondan sonra oluşan korpus luteumun gelişimine paralel olarak artan progesteron hormonu, endometriyal bezlerde sekresyonda artışa sebep olur.⁴¹ Bu evrede endometriyal bezlerde artan glikojen birikimi ve stromada görülen yoğun  dem sonucu endometriyum kalınlığı 5-6 mm' ye kadar ulaşır.³⁷ Bez lümenleri artan glikoprotein salgı ürünlerinin etkisi ile genişler. Sekretuar evre, erken ve geç olmak üzere kendi içinde iki dönemden meydana gelir. Erken dönem, 15. günden 24. güne kadar geçen dönemdir. Bu dönemde östrojen reseptörleri doku içinde çok azdır. Buna karşın progesteron reseptörlerinin miktarı fazladır.⁴³ Bu evrede izlenen düşük östrojen yüksek progesteron durumu embriyonun implantasyonu için gerekli bir fizyolojik durumdur. Bu evrede meydana gelebilecek gebelik durumu, bebeğin doğumu ve akabinde bebeğin sütten kesilinceye kadar annenin menstrual d ng n n n durmasına yol açar.⁴⁴ Gebelik gerçekleşmemesi durumunda ise ovaryum içinde korpus luteumun gerilemesine de paralellik gösteren progesteron hormonunun azalması ile karakterize olan dönem, geç sekretuar evre olarak tanımlanır. Bu dönem menstruasyondan önceki 2-3 günlük döneme denk gelir. Spiral arterlerin kasılıp gevşemeye başlaması ile birlikte menstruasyon evresine geçiş başlar.³⁷

Menstruasyon evresi, döngünün bir ve dördüncü günleri arasında izlenir. Bu dönem, spiral arterlerin kasılması ve fonksiyonel tabakaya kan akımının kesilmesi ile gelişen iskemi ve doku nekrozu ile karakterize bir dönemdir.⁴² Bu evrede düşük seyreden östrojen sonucu bir  tan yenilenen bu tabaka bir  tan da dökülür ve kanama şeklinde

atılır. Evrenin sonunda endometriyumun sadece bazal tabakası geriye kalır. Bu evrede yetişkin bir insandan yaklaşık 50 ml kan kaybı gerçekleşir. Bu durum kadınlarda sıkça izlenen aneminin temel nedenlerinden birisidir.

Endometriyumun bazal tabakasında kalan bez ve spiral arterlerin uç kısımları tekrar fonksiyonel tabakaya doğru gelişerek endometriyumda yenilenme ve yeniden şekillenme gerçekleşir ve proliferatif evre başlar. Böylece bir döngü tamamlanıp yeni bir döngü başlatılır.

Dışı genital sistemi içinde şekillenen bu olaylar dizininde başlıca beş hormonun görevi vardır. Bunlar hipotalamustan salgılanan gonadotropik serbestleştirici hormon (GnRH), hipofizden salgılanan follikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) ile ovaryumdan salgılanan progesteron ve östrojen hormonlarıdır.⁴⁴

Her aylık döngünün başlaması hipotalamustan GnRH salgılaması ile gerçekleşir. Ortalama 2 saatte bir salgılanan GnRH'nin pulsatif salınımı kandaki miktarının artması ile birlikte ön hipofiz bezinde FSH ve LH hormonlarının salınımını uyarır. Özellikle FSH'nin kandaki konsantrasyonunun artmasıyla ovaryumlarda dinlenme durumunda olan primordiyal foliküller uyarılarak primer folikül evresine geçmeye başlarlar. Bu sırada FSH ve LH etkisi ile yüksek miktarda östrojen ovaryumdan salgılanır. Yüksek östrojenin de etkisi ile endometriyum hızlı bir büyüme gösterir. Döngünün 12-13. günlerine gelindiğinde hızla yükselen östrojen hormonu, hipofiz bezine pozitif yönde geri bildirim yaparak FSH ve LH hormonunun çok hızlı bir şekilde salgılanmasına yol açar. Ovulasyondan çok kısa süre önce meydana gelen bu olay, ovulasyonun tetiklenmesine yol açar.^{41, 44}

Ovulasyon ile graff folikülü içindeki oosit etrafındaki bir grup hücre ile birlikte tuba uterinaya geçer. Ovaryum içinde oositin büyümesine ve gelişmesine öncülük eden taşıyıcı folikül yapısı ise korpus luteuma dönüşür. Bu yapı LH hormonun etkisi ile

progesteron salgılayan bir beze farklılaşır. Sekretuar dönemde etkin bir şekilde salgı yapan bu bez, uterin bezlerin salgı üretmesine yol açar.⁴⁴

Östrojen ve progesteronun seviyelerinin artması ve korpus luteumdan salınan inhibin hormonun etkisi ile FSH ve LH hormonları negatif geri besleme yaparak yeni foliküllerin gelişimini durdurur. Gebeliğin gerçekleşmemesi durumunda iyice azalan progesteron ve östrojen hormonu korpus luteumun dejenere olmasına yol açar. Gerek progesteron ve östrojen hormonu seviyelerindeki azalış gerekse de korpus luteumdan salınan inhibin hormonunun ortadan kalkması FSH, LH ve GnRH üzerindeki baskılayıcı etkiyi kaldırır. Sonuçta GnRH'in tekrardan salınmaya başlaması ile döngü yeniden başlar.⁴⁴

2.3. İnfertilite

Herhangi bir korunma olmadan ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen, bir yılın içinde gebelik oluşmaması durumuna infertilite denir. Yeni evli çiftlerin %10-15'i infertilite tanısı almaktadır.⁴⁵ Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, infertilite tanısı alan çiftlerin %20'sinde erkek, %38'inde kadın, %27'sinde hem erkek ve hem kadın faktörü birlikte görülmektedir. İnfertil çiftlerin %15'inde ise infertilite nedeni açıklanamayan infertilite şeklindedir.^{21, 46}

İnfertilitenin en sık görülen nedenleri; kadınlarda ovulatuvar bozukluklar, tubal ve peritoneal patoloji şeklindeyken; erkeklerde ise testisler, erkek genital kanallar ve aksesuar bezlerden kaynaklanmaktadır.

2.3.1. Erkek İnfertilitesi

Erkeklerde puberte ile başlayan sperm üretimi 20-30'lu yaşlarda sayı ve kalite olarak en iyi döneme ulaşır.⁴⁷ 40'lı yaşlarla birlikte kademeli bir azalış gösterse de hayat boyu sperm üretimi devam eder.⁴⁸ Son yıllarda gerek sperm kalite ve konsantrasyonunda

azalmalar gerekse de testiküler kanserlerin görülme sıklığının artması, erkek infertilitesi ile ilgili ciddi endişelere yol açmıştır.⁴⁹

Toplumda çok sık görülen erkek infertilitesi, endokrin nedenler olarak genellenebilen pretestiküler faktörler, doğrudan testislerle ve sperm üretimi ile ilgili testiküler faktörler ve spermin testisleri terk ettikten sonraki geçiş sürecini kapsayan posttestiküler faktörler olmak üzere 3 sınıfta toplanmıştır (Tablo 2.1)⁵⁰.

Tablo 2.1. Başlıca erkek infertilite nedenleri

Başlıca Faktörler	Etkiliyen Sebepler
Pretestiküler Faktörler	Hipogonadotrofik Hipogonadizm - Kallmann Sendromu, Hiperprolaktinemi, Farmakolojik
Testiküler Faktörler	Kriptorşidizm, Varikosel, Testis Kanseri, Radyasyon, Klinefelter Sendromu, Kemoterapi veya Farmakolojik, Y Kromozomu Mikrodelesyonları, Genetik Azospermi veya Oligospermi, Çevresel Faktörler, Kartagener Sendromu, Enfeksiyon, Yaralanma veya Travma, Anti-Sperm Antikorları
Posttestiküler Faktörler	Farmakolojik, Cinsel Birleşme Problemi, Retrograd Boşalma Durumu, Boşalma Kanalı Tıkanması veya Seminal Vezikül Disfonksiyonu, Vas Deferensin Konjenital Bilateral Yokluğu, Vaz Deferenslerde Vazektomi veya Latrojenik Hasar, Young Sendromu, Sinir Hasarı, Omurilik Yaralanması, Retroperitoneal Lenf Nodu Diseksiyonu, Sistemik Hastalık

2.3.2. Kadın İnfertilitesi

Kadınlarda ilk adet döngüsünün başladığı 12-14'lü yaşlardan son adet döngüsünün gerçekleştiği 40'lı yaşların sonlarına kadar her ay düzenli olarak ovaryumlardan bir oosit salınır. 20'li yaşlarda en iyi kalitede olan oosit rezervi, 35 yaşından sonra çeşitli nedenlerle düşmektedir.⁵¹ Başlıca bu nedenler; yaş,⁵² ovulatuvar,⁵³ tubal ve pelvik,⁵⁴ servikal,⁵⁵ uterin,⁵⁶ endometriyozis⁵⁷ ve diğer faktörler³³ olmak üzere yedi ana başlıkta toplanabilir (Tablo 2.2) ⁵¹.

Tablo 2.2. Başlıca kadın infertilite sebepleri

Etkileyen Faktörler	Açıklamalar
Yaş Faktörü	Yaşa bağlı oosit kalitesinde azalma ve kromozom anomalisi görülme sıklığının artması
Ovulatuvar Faktörler	FSH düşüklüğü ve amenore, over yetmezliği, erken menopoz, prolaktin artışı ve ovulasyon kusurları
Tubal ve Pelvik Faktörler	Pelvis enfeksiyonu ile oluşan iltihabi hastalıkların sonucu gelişen tubal tıkanıklıklar nedeniyle fertilizasyonun gerçekleşmemesi
Servikal Faktörler	Mukusun pH'ı, kalitesi, yoğunluğuna bağlı olarak spermin uterusu geçişinin engellenmesine bağlı döllemenin gerçekleşmemesi
Uterin Faktörler	Uterus anomalileri, konjenital malformasyonlar ve intrauterin adezyonlar, miyomlar, polipler vb. uterusu etkileyen genel durumlar
Endometriyozis	Endometriyumdan kopan parçaların neden olduğu ovaryum ve karın içindeki kist oluşumları
Diğer Faktörler	Bulaşıcı hastalıklar, sigara ve alkol kullanımı, çeşitli kimyasallar, radyasyon, obezite, şeker hastalığı gibi sebepler

2.3.3. Açıklanamayan İnfertilite

Kadınlarda tubal açıklık testleri ile ovulasyonun takip ve değerlendirilmesi, erkeklerde ise semen analizi gibi standart tanı değerlendirme metodlarının herhangi birisi ile bir anomali saptanamaması durumunda kişilere açıklanamayan infertilite tanısı konulur.³³ Açıklanamayan infertilite tanısı konulan çiftlerin yaklaşık % 15' i ilk bir yıl içinde, %35'i ise iki yıl içinde gebe kalabilmektedir.⁵⁸ Herhangi bir tedavi almadan geçen 3 yıl için bu oran %80'e kadar çıkmaktadır.⁵⁹

Açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftlerden ilk olarak baba adayında sperm analiz testi yapılır. Spermelerde sayı, hareket ve canlılık açısından bir problem yoksa ikinci olarak anne adayının fertilite değerlendirilmesine başlanır. Anne adayının folikül gelişimi ultrason ile takip edilir. Adet döneminin belirli günlerinde hormon seviyeleri ölçülerek analizler yapılır. Buna ilaveten anne adayının enfeksiyon hastalıkları, adet düzeni gibi

öyküsü sorgulanır. Son olarak duruma göre tuba uterinanın hasarlı ya da tıkalı olabilme ihtimaline karşın histerosalpingografi (HSG) çekilir.³³

Bahsedilen tüm durumlar göz önünde bulundurulduğunda, açıklanamayan infertilite için muhtemel birçok sebep gözükmemektedir. Bu yönüyle kadınlarda test edilebilirliği zor olan endometriyal reseptivite problemi bu tür bir infertilitenin sebeplerinden birisi olabilir. Nitekim literatürde yapılan bazı çalışmalarda bu ilişki üzerinde durulmuştur. Öyle ki, tekrarlayan IVF başarısızlıklarını önlemek için bazı embriyoloji kliniklerinde endometriyal reseptivite kitleri kullanarak embriyo aktarma zamanı belirlenmektedir.

2.4. Endometriyal Reseptivite

Sağlıklı bir bireyin dünyaya gelmesinde, embriyonun fertilizasyondan doğuma kadar geçirmiş olduğu değişikliklerin başarısı kadar anne uterusunun sağlıklı fizyolojik durumunun da önemli bir payı vardır. Öyle ki embriyo ile uterus arasındaki uyum problemi ve anormal durumlar doğuma bile ulaşmadan düşükle sonuçlanır. Başka bir deyişle iyi bir hasat için tohum kalitesi kadar, toprağın genel mineral, azot vs. durumu ve tohumun hangi mevsimde ekildiği de önemlidir.

Gerek normal yollarla gerekse de IVF işlemi ile fertilize olan embriyonun, anne adayının uterusuna tutunmasına ve yerleşmesine implantasyon adı verilir. Bu olay için en ideal zaman, insan menstrüasyon döngüsünün ikinci yarısı olan sekretuar evrenin 19-24. günler arasını kapsar ve bu döneme implantasyon penceresi dönemi denir.⁶⁰ Bu dönem içinde başarılı bir implantasyon için sağlıklı blastokist gelişimi, kaliteli endometriyum durumu ve endometriyum ile blastokist arasında karşılıklı senkronizasyona dayalı mükemmel bir uyum gerekmektedir.⁶¹ Bu dönem içinde özellikle düşük östrojen yüksek progesteron varlığında gerçekleşen dar bir zaman aralığı bulunur. Bu kısa zaman

aralığında blastokist ile endometriyum arasındaki karşılıklı etkileşime dayanan bu olaylar dizinine endometrial reseptivite denir.⁶²

Endometrial reseptivite, cinsiyet hormonları, çeşitli sitokin ve kemokinleri ile hücre içi sinyal mekanizmalarını içeren karmaşık olaylar zinciridir.²⁸ Literatürde bu olaylar dizisinde meydana gelen istenmeyen durumların reseptiviteyi etkilediğini göstermektedir.⁶³ Özellikle hormonal akstaki dengesizliklerin başarılı reseptivitenin kurulmasını engellediği görülmüştür.⁶⁴ Bu açıdan düşünüldüğünde, düşük östrojen yüksek progesteron varlığı reseptivite için elzem olarak görülmektedir.^{65, 66} Bu gerekçe ile açıklanamayan infertilite vakalarına uygulanan IVF tedavisinde, hormonal takip yapılarak gerekirse progesteron desteğinin sağlanması endometrial reseptivitenin düzenlenmesinin ilk basamaklarından birisidir.^{33, 67}

Başarılı bir implantasyon için endometrial reseptivitenin belirlenmesi bilim dünyasının son yıllarda ilgisini çekmektedir. Mevcut reseptivite belirteçlerinin uygulamaya elverişli olmaması dolayısıyla yeni biyolojik belirteç ve markerlar bulma çabaları halen devam etmektedir.

2.4.1. Endometrial Reseptivite Belirteçleri

Endometriyum birçok biyokimyasal ve moleküler faktörün üretilip yıkıldığı karmaşık bir dokudur (Şekil 2.5)⁶⁸. Bir menstrual siklus içinde farklı histolojik görünümler gösteren endometriyum tabakasının şekillenmesi, biyokimyasal ve moleküler faktörlerin dönemsel olarak artıp azalmasına bağlıdır. Endometrial reseptivitenin gerçekleştiği dönemde meydana gelen olaylar birlikte ele alındığında, süreçte rol oynayan tüm faktörler endometrial reseptivite belirteçleri sayılabilir. Ancak bağımsız olarak tek bir belirteçin yorumlanması daha kolay olacağından, spesifiklik gösteren belirteçler üzerinde durulmaktadır.⁶⁹⁻⁷¹ Genel olarak endometrial reseptivitenin belirteçleri, üç sınıfta incelenebilir. Bunlar doku yüzeyinde görülür değişikliğe sebep olan morfolojik

izlenen mikrovillus yapıları kaybolmaya başlarken bu alanlarda düz, geniş, mantarsı çıkıntılar oluşmaya başlar. Bu oluşumlara pinopod ya da uterodom adı verilir.⁷³ İlk kez 1958 yılında farelerde gösterilen bu yapılar,⁷⁴ 1972 yılında insan uterusunda tanımlanmıştır.⁷³ Işık mikroskobu ile görülmesi zor olan yapılar elektron mikroskobu ile ancak iyi bir şekilde izlenebilir. Elektron mikrograf görüntülerinde ratlarda pek çok vakuol göslenirken, insan pinopodlarında vakuol gözlenmez. Özellikle insan elektron mikrograflarında pinopodların içinde düz endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, mitokondri ve sekretuar veziküller dikkat çekmektedir.⁷⁵

Pinopodların fonksiyonları çok az bilinmektedir. İçerisinde görülen sekretuar veziküllerin varlığı, embriyonun beslenmesini ve endometriyum yüzeyine blastokistin tutunmasını sağladığını düşündürmektedir.⁷⁵ Nitekim pek çok çalışmada, pinopodların endometriyal reseptivite için anahtar görevi üstlendiği ileri sürülmüştür. Yine pinopodlarla ilişkili olarak integrinler, LIF, L-selektin, HOXA 10, glutaredoksin (GlrX), glikodelin A (GlyA), heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve MUC 1 gibi pek çok biyomarker bulunmaktadır.⁷⁵⁻⁷⁷ Bu yönüyle düşünüldüğünde pinopodların varlığı ya da yokluğu endometriyal reseptivite için önemli bir göstergedir.

2.4.1.2 Endometriyal Reseptivitenin Moleküler Belirteçleri

Son yıllarda ilerleyen teknoloji ile doku ve hücre içi olayların anlaşılması biyokimyasal analiz yöntemleri ile daha da mümkün hale gelmiştir. Bu yöntemler ile yapılan biyokimyasal testlere gerek maliyetlerinin ucuz olması gerekse de çok hızlı ve kesin bilgi veriyor olması sebebiyle çokça başvurulmaktadır.

İmplantasyon penceresi döneminde özellikle endometriyum üzerinde pek çok biyokimyasal molekül aktif olarak yapılip yıkılmaktadır. Bu moleküllerin kimileri endometriyal reseptivitenin kurulması, kimileri ise reseptivitenin engellenmesi ile doğru

orantılı bir ekspresyon göstermektedir. Burada özellikle progesteronun ve östrojenin indükleyici ve inhibe edici etkisi başrol oynamaktadır.⁶⁵

Endometriyal reseptivite üzerine yapılan çalışmalarda özellikle integrinleri, LIF, L-selectin, E-kaderinler, HOXA 10, Glrx, GlyA, HB-EGF ve MUC üzerine yoğunlaşmıştır.^{73, 76}

Hücre adezyon molekülleri (HAM) ailesi integrinler, selektinler, kaderinler ve immüoglobülinler olmak üzere dört üyeden meydana gelir. Transmembran protein olan integrinlerin farklı alfa ve beta alt ünitelerini içeren pek çok türü bulunmaktadır. Özellikle integrin $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 4\beta 3$ ve $\alpha 6\beta 1$ implantasyon penceresinde aktif olarak izlenen integrin türlerinden bazılarıdır.⁷⁸ Çalışmalar özellikle integrin $\alpha v\beta 3$ 'ün endometriyum desidualizasyonu ve embriyonun tutunmasındaki rolünden bahsetmektedir.⁷⁹ Yine literatürde integrin $\alpha v\beta 3$ 'ün pinopod varlığı ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.⁸⁰ Pinopodun varlığını göstermede kullanılan bir diğer biyobelirteç ise integrin $\beta 3$ 'dür.^{27, 28} Kısaca implantasyon penceresi döneminde integrin molekülleri, pinopod üzerinde embriyo için tutunmada zemin oluşturan başlıca moleküllerdir.

İnterlökin 6 ailesinin bir üyesi olan LIF, sağlıklı bir embriyo gelişimi için zorunlu moleküllerin başında gelmektedir. Bu molekül blastokistin endometriyum içine adezyonunu uyarır ve trofoblastların invazyonuna yardımcı olur. İnsanlarda pinopodların salgı veziküllerinden uterus lümenine LIF salgılandığı rapor edilmiştir. İntegrinlere benzer şekilde, LIF molekülleri ile pinopod varlığı arasında da paralellik bulunur.⁸¹

Hücre adezyon moleküllerinden bir diğeri olan selektin ailesi üyesi L-selectin, pinopodların yüzeyinde eksprese olur. Blastokistin endometriyum üzerinde yuvarlanmasında rol oynar.^{82, 83}

HOXA 10, endometriyumun desidualizasyonunda, farklılaşmasında ve çoğalmasında rolü olan transkripsiyon faktörüdür. İntegrinler, selektinler, östrojen reseptörleri gibi pek çok faktörün ekspresyonu bu faktörün varlığına bağlıdır. Bunun yanında progesteron hormonun endometriyumu pinopod gelişimi yönünde uyarması için HOXA 10 proteinine ihtiyaç vardır.^{29, 84}

Tutunmayı destekleyen moleküllerin aksine MUC 1, MUC 16 ve MUC 15 gibi müsinler, uterusun luminal yüzeyinde lokalize bulunan anti adeziv moleküllerdir. Blastokistin tutunması için endometriyal yüzeyde glikoproteinden oluşan bir bariyer görevi görür. Bu moleküller implantasyon penceresi döneminde azalan bir ekspresyon gösterir.^{31, 85}

Endometriyumda reseptivite ile ilişkili diğer moleküllerden glutaredoksin antioksidan aktiviteye sahip bir moleküldür.⁸⁶ Embriyoyu ve endometriyumu oksidatif hasara karşı korur. Öte yandan desidual hücrelerden uterin lümene salınan glikodelin A, embriyo implantasyonu için immün sistem baskılayıcı olarak görev alır.⁸⁷ Son olarak HB-EGF, implantasyon penceresi döneminde pinopod yüzeyinde yapışma faktörü olarak iş görür ve blastokistin tutunmasına yardımcı olur.⁸⁸

İmmünohistokimya, en sık kullanılan moleküler uygulamaların başında gelmektedir.⁸⁹ Bu yöntem, bir doku kesitinde belli hücrelere spesifik olan antijen proteinlerinin, farklı bir canlıdan elde edilen spesifik antikorlar ile reaksiyonunun görüntülenmesi esasına dayanır. İmmünohistokimyasal boyama rutin olarak patoloji laboratuvarlarında hücre çoğalması (proliferasyon) ve hücre ölümünü (apoptoz) göstermek için gerekli özel moleküler belirteçlerin yardımıyla kanser gibi anormal durumları analiz etmede kullanılır. Bunun yanında doku ve organlarda belirli biyobelirteçlerin dağılımını ve lokalizasyonunu göstermek için bilimsel araştırmalarda da yaygın olarak kullanılır. İlerleyen teknoloji ile birlikte talep edilen birçok antikor kolay

bir şekilde üretilerek dokular immünohistokimyasal özellikleri gösterilebilmektedir. Bu yöntem sayesinde, hücre ve dokudaki spesifik moleküller boyanarak görünür hale gelir.

Endometriyal reseptivitenin karakterizasyonunda birçok antikor literatürde kullanılmaktadır. Bunların başında integrin $\beta 3$, integrin $\alpha v\beta 3$, LIF, HOXA 10 ve MUC 1 gibi biyobelirteçler gelmektedir. Bu biyobelirteçlerin endometriyum üzerinde immünohistokimyasal olarak boyanması endometriyal reseptivitenin analizinde görsel bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.^{75, 76}

İmmünohistokimyasal teknikler haricinde mRNA ekspresyonu varlığını göstermeye dayanan PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile de bu moleküllerin varlığının gösterilmesi mümkündür. Bu moleküllerin protein ürünlerinin göstermek içinse Western blot tekniği kullanılmaktadır.

2.4.1.3 Endometriyal Reseptivitenin Biyokimyasal Belirteçleri

Hücresel olaylar sırasında oluşan biyokimyasal ürünler, elektroforez, ELİSA gibi biyokimyasal yöntemlerle ölçülmesi ile ortaya çıkan veriler, hücre içinde gerçekleşen olaylar hakkında bize bilgi verebilir. Akademik çalışmalarda çokça tercih edilen bu yöntem, bulguların desteklenmesi ve güçlendirilmesi amacıyla tercih edilir.

Endometriyal reseptivite sırasında hücre içinde gerçekleşen hormonal değişimlerin başında östrojen ve progesteron gibi hormonlar gelir. Bu iki hormonun birlikte ele alınarak biyokimyasal olarak değerlendirilmesi bir belirteç olarak kullanılabilir.

2.4.1.4 Endometriyal Reseptivitenin Hormonal Düzenlenişi

Harekete geçiren, uyaran madde anlamında kullanılan hormon, endokrin bezler tarafından salgılanarak kana verilen daha sonra kan damarları vasıtasıyla organ ve dokulara taşınarak vücudun ihtiyaçlarına göre fonksiyon gören kimyasal maddelerin tümüne verilen genel isimdir. Hormonlar yapılarına göre steroid, peptit ve aminoasit

olmak üzere 3 tiptir. Genellikle genital sistem üzerinde etkili olan hormonların yapısı steroid şekildedir. Dişilerde steroid yapıdaki hormonların başında östrojen ve progesteron gelmektedir. Bu hormonlar gerek küçük yapıda hormonlar olması gerekse de lipid yapıda olması sebebiyle hücre zarından çok hızlı bir şekilde geçer ve ilgili reseptörleri ile kolayca etkileşebilir.

Başarılı bir implantasyon, birçok hormonun birlikte koordineli bir şekilde çalışmasına bağlıdır. İmplantasyon döneminde tutunma için çok dar bir dönem olan reseptivite zamanı hassas bir hormonal kontrol gerektirir. Bu durumun sağlanması için özellikle östrojenin düşük, progesteronun yüksek seviyelerde salgılanması gerekir.^{65, 90}

Hücre yüzeyinde östrojen, kendisi için spesifik reseptörler ile etkileşir. Bu etkileşim sonunda östrojen deoksiribo nükleik asit (DNA) üzerinde transkripsiyon faktörü benzeri bir işlev görür.

Menstrual siklusun ilk yarısında baskın olan östrojen hormonu, endometriyal reseptiviteyi de içine alan luteal dönemde düşük seviyelerde eksprese olmaktadır. Uterusta hücre çoğalmasından sorumlu olan östrojen hormonu, hücre ve doku olgunlaşmasından sorumlu progesteron hormonu ile ters ilişkili şekilde çalışmaktadır. Yapılan çalışmalarda östrojen hormonun seviyelerinin düşmemesinin pinopod oluşumunu engellediği ve endometriyal reseptivitenin bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir.⁶⁵ Östrojen hormonunun yükselen seyri hormonal ve fizyolojik dengede değişimlere yol açarak yeni oositlerin faaliyete geçmesine yol açmaktadır. Nitekim kadınlarda görülen infertilite durumlarının başında gelen polikistik over sendromu ile östrojen hormonu arasında sıkı bir ilişki vardır.⁹⁰

Her ne kadar östrojen ve progesteron hormonu birbirinin zıttı gibi iş görse de özellikle düşük konsantrasyonda salınan östrojen hormonunun progesteron hormonu üzerinde indükleyici etkisinin olduğu görülmüştür.^{91, 92}

Hücresel olayların biyolojik sistemler içinde hiç bitmeyeceğini düşünürsek çok dar bir sınır içinde de olsa östrojenin varlığına ihtiyaç bulunmaktadır. Anlaşılacağı üzere düşük östrojen varlığı endometrial reseptivite için elzemdir.^{91, 92}

Hamilelik hormonu olarak da bilinen progesteron, endometriyumun stromal ve epitelyal hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma yoluyla endometrial reseptivitenin kurulmasında kritik rol oynar.^{91, 93} İnsanlarda blastokist implantasyonu için endometriyumun hazırlanmasından sorumlu plasental protein 14 (PP14)'ün ekspresyonunda progesteronun düzenleyici rolü vardır.⁹⁴ PP14, uterus bez epitel hücrelerinden sentezlenen bir glikoproteindir. Bu proteinin endometriyum ve blastokist arasında immunomodulator etki oluşturarak implantasyon başarısında rol oynadığı bildirilmiştir.⁶⁵

İmplantasyonda önemli rolü olan LIF, HB-EGF, HOXA 10 gibi pek çok faktörün progesteron dominant dönemde sentezlerinin arttığı görülmüştür.⁶⁸ Bunun yanında literatürde integrin $\beta 3$, integrin $\alpha \beta 3$, kaderin-11 gibi pek çok adezyon moleküllerinin sentezinin progesteron hormonu ile düzenlendiği ortaya konulmuştur.²⁸

Anlaşılacağı gibi progesteron hormonunun implantasyon döneminde pek çok faktörün sentezi ile yakından ilişkisi endometrial reseptivite üzerindeki önemini ortaya koymaktadır. Öyle ki, bu hormonun eksikliğinin ya da yokluğunun doğrudan infertilite ile ilişkisi bulunmaktadır. Bu tür açıklanamayan infertilite durumlarında hekimler endometriyumun desteklenmesi amacıyla replasman progesteron tedavisi yapmaktadır.

2.5. Soya İzoflovonoidleri

Leguminosae (baklagiller) familyasına ait olan soya (*Glycine max* L.) yıllık tohumlu baklagillerdendir. Çin, Kore ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkeleri tarafından binlerce yıldır tüketilen besin maddelerinin başında gelmektedir. Soya, her ne kadar ilk dönemlerde Uzak Doğu'da tüketilen bir bitki olsa da son 300 yılda dünyaya yayılmıştır.

Başlangıçta Avrupa'ya süs bitkisi olarak getirilen soya; besin değeri, mineraller ve vitaminler açısından oldukça zengin olması nedeniyle endüstriyel devrimden nasibini almış ve günümüzde 400'den fazla endüstriyel ürün yapımında kullanılması ile tarımsal ürünler arasında önemli bir yer kazanmıştır. USDA raporuna göre son yüzyılda soya üretimi 1940'larda 10 milyon ton iken; 2000 yılında 175 milyon tona, 2017 yılı itibari ile 348 milyon tona ulaşmıştır.^{1, 2}

Bugün soya, maliyetinin ucuz olması, yüksek protein (% 35-45), karbonhidrat (% 30), yağ (% 18-24) ve mineral (%5) içeriği gibi nedenlerden dolayı işlenmiş gıdalarda, katkı maddelerinde, hayvan yemlerinde çokça tercih edilen bir besin maddesidir. Soya endüstrisi günümüzde o kadar çok büyümüştür ki, yağdan süte, etten peynire kadar birçok üründe doğrudan ve dolaylı olarak kullanılmaktadır. Öyle ki, dünya genelinde en fazla üretilen yağlar sıralamasında soya yağı ilk sırayı almıştır.³

Soya içerisinde fazla miktarda izoflovonoid protein barındırır. Biyolojik olarak etkin olan soya izoflovonoidlerinin en bilinenleri genistein ve daidzeindir. Bu iki izoflovonoid soyada fazla miktarda bulunur. Genistein ve daidzeinin östrojen reseptörlerine büyük afinite gösterdiğinden dolayı, fitoöstrojenler olarak da bilinirler.¹⁰ İzoflovonoidler bitkiler âleminde birçok bitkinin içinde bulunurlar ancak soya içeriğinde diğerlerine nazaran daha fazla bulunmaktadır.⁹⁵

Biyolojik sistem içinde östrojen gibi davranan moleküllerin endokrin sistem bozukluğuna yol açabileceği görülmüştür.⁹⁶ Nitekim fitoöstrojenler endokrin sistem bozucu kimyasallar listesine girmiştir.⁹⁷

2.5.1. Genistein ve Daidzein

İzoflovonoid sınıfından olan genistein ve daidzein, birçok bitki içeriğinde bulunurken, soyada nispeten daha yoğun bulunurlar.⁹⁵ Soya proteinlerini oluşturan

proteinlerin başında gelmektedirler. Bunun yanında *Streptomyces* ve *Pseudomonas* cinsi bakterilerin fermentasyon ürünlerinde de tespit edilmişlerdir.^{98, 99}

Ağız yoluyla alındığında bağırsaklarda glikozitlerle birlikte konjuge edilerek dihidrogenistein ve 6' hidroksi-O-dezmetilangolensin şeklinde metabolize edilirler.¹⁰⁰ Genistein ve daidzeinin metabolitlerinin çeşitli yöntemler kullanarak insan bedeninin birçok yerine ulaştığı görülmüştür.

İlk kez 1946'da Avustralyada yaşayan koyunlardaki infertilite krizinin altında yeraltı yoncasındaki genisteinin rol oynadığının anlaşılmasıyla bu moleküle ilgi başlamıştır.¹⁰¹ 17 β -östrodiol (östrojen) yapısına benzerliği nedeniyle, gerek genistein gerekse de daidzein östrojenle rekabet edebilir ve östrojen reseptörlerine bağlanabilir.⁶ Bununla birlikte, daidzein ve genistein östrojen reseptörüne karşı östrojenden çok daha yüksek afiniteye sahiptir.^{9, 11, 12} Bu özelliğinden dolayı endokrin sistem bozucu kimyasallar olarak da bilinirler.^{13, 14} Bu endokrin bozucu kimyasalların özellikle erkeklerde, dişi ikincil seks karakterlerinin ortaya çıkmasına ve sürdürülmesine yol açtığı görülmüştür.^{15, 86} Bunun yanında genisteinin testiküler hücrelerin apoptozuna ve semen parametrelerinde azalmaya yol açabildiği de gösterilmiştir.¹⁶ Dişilerde ise genisteinin folikülogenezi ve steroidogenezi değiştirebildiği rapor edilmiştir.^{17, 18} Yine Rice ve arkadaşları yapmış olduğu başka bir çalışmada ise izoflovonoidlerin steroidogenez sentez enzimlerinin fonksiyonunu bozduğunu tespit etmişlerdir.¹⁹

Daha sonraki genisteinin yıllarda onkogenlerin sentezinde rol alan protein kinazın güçlü inhibitörü olduğunun keşfedilmesiyle, kanser tedavisi için bir ışık yakmıştır.¹⁰² Bunun yanında literatürde genisteinin antioksidan etkileri ile oksidatif stres kaynaklı hücre hasarında koruyucu rolü olduğunu gösteren birçok çalışma da vardır.¹⁰³⁻¹⁰⁶

Bir bütün halinde düşünülürse bu izoflovonların hem olumlu hemde olumsuz yönde etkilerinin, hangi kişilerce ve ne sıklıkla alındığı ile yakından ilişkisi vardır. Burada

asıl problem soya tüketiminin artmasıyla kontrolünün mümkün olmamasından kaynaklanmaktadır. Nitekim küresel ülkelerde yaşayan insanların hiçbirisi kesin olarak ne kadar soya tükettiğini bilemez. Bu durum soya izoflovonların olumlu yanlarından çok, aşırı tüketimine bağlı olarak ortaya çıkması muhtemel olumsuz yanlarını daha çok akla getirmektedir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı

“Soya İzoflavonoidlerinin (Genistein ve Daidzein) Endometriyal Receptivite Üzerine Etkisinin İmmünohistokimyasal ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması” adlı çalışmanın, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun (HADYEK) 22.05.2018 tarihli 6. toplantısının 131 nolu kararıyla, etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

3.2. Deneklerin Temini ve Barınma Olanakları

Çalışmamızda 10-12 haftalık, ortalama ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen 72 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) laboratuvarından temin edildi. Temin edilen sıçanlara, deney süresince, yeteri kadar (ad libitum) su ve pellet yem verilmiştir. Hayvanlar deneyden bir gün önce birbirlerine alışmaları için gruplandırıldı ve laboratuvarında normal oda sıcaklığında (24°C) ve nem seviyesinde (%45-50) barındırıldı.

3.3. Çalışma Hayvan Modeli ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Ve Uygulama Merkezi’nden temin edilen toplam 72 adet deney hayvanı, her grupta 9 hayvan olacak şekilde rastgele 8 gruba bölündü (Tablo 3.1). Deney grupları aşağıdaki gibidir.

1. Kontrol Grubu (KONT)
2. Endometriyal Receptivite Grubu (ER)
3. Endometriyal Receptivite+ Susam Yağı Grubu (ER+SU)
4. Endometriyal Receptivite+ Östrojen Grubu (ER+ÖST)
5. Endometriyal Receptivite+Genistein Düşük Doz Grubu (ER+GE+DD)
6. Endometriyal Receptivite+Genistein Yüksek Doz Grubu (ER+GE+YD)
7. Endometriyal Receptivite+Daidzein Düşük Doz Grubu (ER+DZ+DD)

8. Endometriyal Reseptivite+ Daidzein Yüksek Doz Grubu (ER+DZ+YD)

Endometriyal reseptivite (ER) modeli için vajinal smear alınarak östrus safhasında olan sıçanlar seçildi ve iki dişiye bir erkek olacak şekilde bir gece çiftleşmeye bırakıldı (Şekil 3.1). Ertesi sabah erkekler ayrıldı ve bu gün hamileliğin birinci günü sayıldı. Vajinal plakın oluşumu kontrol edilerek hamilelik durumu teyit edildi.¹⁰⁷ Daha önce yapılan çalışmalarda beşinci gün implantasyonda endometriyal reseptivite safhası kabul edildiğinden, sıçanlar beşinci gün sakrifiye edildi.³⁴ Son olarak sakrifiye işleminden sonra uterin tüplerde ard arda konseptus yapılarıda gözlendi.

Tablo 3.1. Deney grupları ve yapılan işlemler

Gruplar	Grup Adı	Yapılan İşlem
1.Grup	Kontrol	Bu grupta çiftleştirme yapılmadı ve herhangi bir işlem uygulanmadı.
2.Grup	ER	Bu gruba çiftleşmeyi takiben herhangi bir uygulama yapılmadı.
3.Grup	ER + Susam Yağı	Bu gruba çiftleşmeyi takiben beş gün boyunca 0,5 ml gavaj yoluyla susam yağı verildi.
4.Grup	ER grubu + Östrojen	Çiftleşmeyi takiben beş gün boyunca 5 mg/kg östrojen valerate 0,5 ml susam yağında çözülerek gavaj yoluyla uygulandı.
5.Grup	ER + Genistein Düşük Doz	Çiftleşmeyi takiben beş gün boyunca 10 mg/kg genistein 0,5 ml susam yağında çözülerek gavaj yoluyla uygulandı.
6.Grup	ER + Genistein Yüksek Doz	Çiftleşmeyi takiben beş gün boyunca 40 mg/kg genistein 0,5 ml susam yağında çözülerek gavaj yoluyla uygulandı.
7.Grup	ER + Daidzein Düşük Doz	Çiftleşmeyi takiben beş gün boyunca 10 mg/kg daidzein 0,5 ml susam yağında çözülerek gavaj yoluyla uygulandı.
8.Grup	ER + Daidzein Yüksek Doz	Çiftleşmeyi takiben beş gün boyunca 40 mg/kg daidzein 0,5 ml susam yağında çözülerek gavaj yoluyla uygulandı.

Çalışmada çözücü olarak daha önce yapılan çalışmalarda nötr (olumlu yada olumsuz etkisi olmayan) etkisi gösterilen ve çözücü olarak kullanılan susam yağı (Balen Susam Yağı, Arı Mühendislik Tarımsal ve Hayvansal Ürünler San. Tic. Ltd. Şirketi, Ankara) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan genistein (Kat: J68241) ve daidzein (Kat:B22877) maddeleri Alfa Aesar (Almanya), Beta estrodiol 17 Valerate Sigma Aldrich (Almanya) şirketinden temin edildi.

Süspansiyon çözeltiler günlük olarak hazırlandı ve uygulamadan önce pipetleme işlemi yapılarak çözölen maddelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı.



Şekil 3.1. Endometriyal reseptivite için çiftleştirme aşaması

3.4. Cerrahi İşlemler

Çalışmanın cerrahi işlemleri Eczacılık Fakötesi ATADEM biriminde steril ortamda, steril malzemeler ile gerçekleştirildi. Deneyin sonlandırılması için tüm hayvanlar, 100 mg/kg ketamin (*Ketalar, Pfizer*) ve 15 mg/kg Ksilazin (*Xylanzinbio, Bioveta*) karışım halinde periton içine enjekte edilerek anestezi altına alındı. Hayvanların kas gerim refleksi kontrol edilerek bilinçsiz durumları onaylandı ve diyaftam hattan transvers, abdominal bölgenin medial hattından sagital 3 cm'lik iki kesi oluşturularak batın açıldı. Bağırsaklar dışarıya doğru alınarak uterusun çift boynuzsu yapısı gözlemlendi ve dikkatli bir şekilde çıkartıldı (Şekil 3.2.). Çıkarılan uterin boynuz histolojik inceleme için %10'luk formalin çözeltisine alındı.



Şekil 3.2. Uterusun diseksiyonu ve çıkarılışı

Son olarak biyokimyasal incelemede kullanılacak kan örneği, diyafram açılarak enjektör yardımıyla doğrudan kalpten sol ventrikülden alındı. Kan örneği santrifüj sonrasında serum ve kan hücreleri arasında fiziksel bir engel oluşturması için, vakumlu sarı kapaklı plastik jelli tüpe alındı. Santrafüj işleminin ardından biyolojik örneklerin korunması için kademeli bir şekilde önce -20 °C’de, daha sonra -80 °C’de biyokimyasal inceleme amacıyla saklandı.

3.5. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik analizlerin tümü Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Analizlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıdaki gibi yapıldı.

Formalin Çözeltisi (%10’luk), % 37’lik formaldehit (*Merck*, Katolog no: 104003) çözeltisi, 1/9 oranında distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Seyreltik Etanol Çözeltileri, % 99’luk etanol (*Merck*, Katolog no: 1009832500) ile uygun miktarlarda distile su karıştırılarak %50, %60, %70, %80’lik etanol çözeltileri hazırlandı. % 96 ve % 99’lık alkoller doğrudan kullanıldı.

3.5.1. Doku Takip İşlemleri ve Kesitlerin Hazırlanması

Cerrahi işlem sonunda formalin çözeltisine alınan uterus doku örnekleri, 48 saat fiksasyonu takiben plastik doku takip kasetleri içine alınarak etiketleme yapıldı. 2 saat boyunca akan su altında yıkandıktan sonra doku örnekleri, yarı otomatik doku takip cihazına (Leica TP 1050) yerleştirilerek doku takip işlemi başlatıldı. İlgili cihazın protokolü ile sırasıyla; %50'lik (2 saat), %70'lik (1 saat), % 80'lik (1 saat), % 96'lık (1 saat), % 99'luk alkol (1 saat) serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. Akabinde üç seri ksilenden (3x15 dakika) geçirilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Son olarak dokular yumuşak ve sert parafin serilerinden (46-48 °C- 1 saat ve 56- 58 °C- 1 saat) geçirilerek takip işlemi tamamlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Fiksasyon ve doku takibi işlem basamakları

İŞLEM SIRASI	YAPILAN İŞLEM	İŞLEM İÇERİĞİ	SÜRE
1	Kimyasal fiksasyon	Formalinde bekletme	48 saat
2	Yıkama	Akan suda bekletme	2 Saat
3		Distile suda bekletme	1 Saat
4		% 50'lik Etanolde bekletme	2 Saat
5	Dehidratasyon	% 60'lık Etanolde bekletme	1 Saat
6		% 70'lik Etanolde bekletme	1 Saat
7		% 80'lik Etanolde bekletme	1 Saat
8		% 96'lık Etanolde bekletme	1 Saat
9		%99'luk Etanolde bekletme	1 Saat
10	Şeffaflaştırma	Ksilende bekletme	15 dk
11		Ksilende bekletme	15 dk
12		Ksilende bekletme	15 dk
13	İnfiltrasyon	Parafinde Bekletme	1 Saat
14		Parafinde Bekletme	1 Saat

Takip sonunda plastik kasetler açılmış ve doku örnekleri metal bloklama kalıbı içine kesit düzlemine uygun olarak sabitlendi. Son olarak, kalıplar eriyik 56- 58 °C'lik parafin ile doldurularak oda sıcaklığında donmaya bırakıldı ve bloklama işlemi tamamlandı.

Elde edilen bloklar yarı otomatik mikrotom cihazına yerleştirildi ve her bir bloktan 5'er mikrometre kalınlığında ardışık seri kesitler alındı. Mikrotomdan çıkan seri kesitler, sıcak su havuzu yardımıyla histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için polilizinli ve pozitif şarjlı lamlara alındı.

3.5.2. Boyama Ön İşlemi

Polilizin kaplı lam üzerine alınan uterus doku örnekleri parafinin uzaklaştırılması ve dokunun lam üzerine sabitlenmesi amacıyla 20 dakika boyunca 60°C'deki etüvde tutuldu. Akabinde ise üç kez, beşer dakika ksilen serisinden geçirilerek parafin iyice uzaklaştırıldı. Ksileni dokudan uzaklaştırarak suya yaklaştırmak için lamlar azalan alkol serilerinde (%99, %96, %80, %70, %50) ikişer dakika tutuldu. Alkolün uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika akan suda yıkama işlemi yapıldı. (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Boyama ön işlemleri protokolü

İŞLEM SİRASİ	İŞLEM AMACI	İŞLEM İÇERİĞİ	İŞLEM SÜRESİ
1		Kesit Alma	
2	Lam üzerine dokuyu sabitleştirme	60 °C Etüv bekletme	20 dakika
3		Ksilende bekletme	5 dakika
4	Parafini uzaklaştırma	Ksilende bekletme	5 dakika
5		Ksilende bekletme	5 dakika
6		% 99'luk Etanolde bekletme	2 dakika
7		% 96'lık Etanolde bekletme	2 dakika
8	Ksileni uzaklaştırma ve suya yakınlaştırma	% 80'lik Etanolde bekletme	2 dakika
9		% 70'lik Etanolde bekletme	2 dakika
10		% 60'lik Etanolde bekletme	2 dakika
11		% 50'lik Etanolde bekletme	2 dakika
12	Alkolden uzaklaştırma için yıkama	Akan suda bekletme	5 dakika

3.5.3. Hematoksilen ve Eosin Boyama İşlemi

Boyama ön işlemi takiben üç dakika Harris hematoksilen boyası ile nükleus boyama işlemi yapıldı. Boyama işlemi sonunda fazla boyanın giderilmesi için beş dakika akan suda yıkama yapıldı. Örnekler, zıt boyama amacıyla Eozin Y solüsyonunda 2 dakika bekletildi. Fazla boyanın giderilmesi için lamalar %96'lık alkole beş kez yavaşça daldırıp çıkarıldıktan sonra %100'lük alkolde iki dakika ve üç seri ksilolde iki dakika bekletildi. Entellan yapıştırma balzamu kullanarak doku yüzeyleri lamel ile kapatıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Rutin hematoksilen ve eozin boyama protokolü

İŞLEM SİRASİ	İŞLEM AMACI	İŞLEM İÇERİĞİ	İŞLEM SÜRESİ
1	Boyama ön işlemi	Boyaya kadar hazırlık işlemleri	52 dakika
2	Nükleus boyama	Hematoksilende boyama	3 dakika
3	Fazla boyanın uzaklaşması İçin Yıkama	Akan Suda bekletme	5 dakika
4	Sitoplazma boyama	Eozinde boyama	5 defa
5	Fazla boyanın uzaklaşması için yıkama	% 96'lık Etanolde bekletme	3 dakika
6	Boyayı sabitleme ve kapatmaya Hazırlık	% 99'luk Etanolde bekletme	2 dakika
7		Ksilende bekletme	2 dakika
8		Ksilende bekletme	2 dakika
9		Ksilende bekletme	2 dakika
10	Doku yüzeyini lamel ile kapatma	Entellan ile yapıştırma	

3.5.4. Alsiyan Mavisi Boyama İşlemi

Boyama ön işlemini takiben doku kesitleri 30 dakika alsian mavisi boyasında tutuldu. İki dakika akan suda yıkandıktan sonra karşı boyama için mayer hematoksilen boyasında beş dakika bekletildi. Fazla boyanın giderilmesi amacıyla akan suda 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, %99' luk alkol ve üç değişim ksilen serisinden geçtikten sonra entellan ile kapatma işlemi yapıldı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Alsiyan mavisi boyama protokolü

İŞLEM SİRASİ	İŞLEM AMACI	İŞLEM İÇERİĞİ	İŞLEM SÜRESİ
1	Boyama ön işlemi	Boyaya kadar hazırlık işlemleri	52 dakika
2	Musin boyama	Alsiyan mavisinde boyama	30 dakika
3	Fazla boyanın uzaklaşması için yıkama	Akan suda yıkama	5 dakika
4	Karşı boyama	Nükleus boyaması yapma	5 dakika
5	Fazla boyanın uzaklaşması için yıkama	Akan suda yıkama	3 dakika
6	Boyayı sabitleme ve kapatmaya hazırlık	% 99'luk Etanolde bekletme	2 dakika
7		Ksilende bekletme	2 dakika
8		Ksilende bekletme	2 dakika
9		Ksilende bekletme	2 dakika
10	Doku yüzeyini lamel ile kapatma	Entellan ile yapıştırma	

3.5.5. İmmunohistokimyasal Boyama İşlemi

İmmünohistokimyasal analizler için parafine gömülen dokulardan mikrotom ile 5 µm'lik kesitler pozitif şarjlı cam lamalar üzerine alındıktan sonra aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutularak immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi (Tablo 3.6)

Pozitif şarjlı lamlara alınan beş mikrometre kalınlığında kesitler Ventana BENCHMARK GX otomatik immünohistokimya boyama cihazına yerleştirildi. Cihazdan çıkarılan lamalar, sabunlu suda birkaç kez daldır çıkar yapılarak yağlı yüzeyden arındıldı. Akabinde %100'lük alkolde iki dakika ve üç seri ksilolde ikişer dakika tutulduktan sonra entellan yapıştırma balzamu kullanarak doku yüzeyleri lamel ile kapatıldı.

Tablo 3.6. Ventana immünohistokimyasal boyama protokolü

İŞLEM SIRASI	İŞLEM AMACI	İŞLEM İÇERİĞİ	İŞLEM SÜRESİ
1	İnkübasyon	Isı (75 °C) uygulama	4 dakika
2		EZ PRep uygulama	4 dakika
3	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
4	İnkübasyon	EZPRep uygulama	4 dakika
5	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
6	İnkübasyon	EZPRep uygulama	4 dakika
7	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
8	İnkübasyon	Isı (75 °C) uygulama	4 dakika
9	Yıkama	Reaction Buffer uygulama	3 Kez
10	İyileştirme	CC 1 (95 °C) uygulama	8 dakika
11		EZPrep / CC 1 (100 °C) uygulama	30 dakika
12		EZPrep / CC 1 (100 °C) uygulama	60 dakika
13	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
14	İnkübasyon	Isı (37 °C) uygulama	2 dakika
15	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
16	İnkübasyon	UltraView inhibitor (3% H ₂ O ₂)	4 dakika
17	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
18	İnkübasyon	Antikor uygulaması	8 dakika
19	Yıkama	Reaction Buffer uygulama	1 Kez
20	İnkübasyon	UV HRP UNIV MULTI uygulama	8 dakika
21	Yıkama	Reaction buffer uygulama	3 Kez
22	İnkübasyon	UV DAB ve UV DAB H ₂ O ₂ uygulama	8 dakika
23	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
24	İnkübasyon	UV Copper uygulama	4 dakika
25	Yıkama	Reaction Buffer uygulama	1 Kez
26	Boyama	Hematoksilen uygulama	8 dakika
27	Yıkama	Reaction buffer uygulama	1 Kez
28	İnkübasyon	Bluing reagent uygulama	4 dakika
29	Fiksasyon	Reaction buffer uygulama	1 Kez
30		Deterjanlı su uygulama	3 Kez
31		Distile su ile yıkama	6 Kez
32	Kapatma	Etanolden geçirme	3 Kez
33		Ksilenden geçirme	3 Kez
34	Kapatma	Entallan ile kapatma	

Boyamada kullanılan antikorlar, monoklonal İntegrin $\beta 3$ (Santa Cruz, 200 $\mu\text{g/ml}$, Kat No: sc-365679), İntegrin $\alpha\text{v}\beta 3$ (Santa Cruz, 200 $\mu\text{g/ml}$, Kat No: sc-7312), LIF (Santa Cruz, 200 $\mu\text{g/ml}$, Kat No: sc-515931), HOXA 10 (Biorbyt 100 $\mu\text{g/ml}$, Kat No: orb-13476), MUC 1 (Santa Cruz, 200 $\mu\text{g/ml}$, Kat No: sc-53381) primer antikorları tavsiye edilen sulandırma oranı dikkate alınarak kullanıldı.

3.6. Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama

Hematoksilen-eozin, alsiyan mavisi ve immünohistokimyasal boyama işlemi sonunda hazırlanan preparatlar, bilgisayar destekli ve kamera eklentili Nikon Eclipse E600 marka mikroskop ile incelenerek fotoğraflandı.

Çekilen mikrograflar karşılaştırmalı incelemenin kolay olması amacıyla, Adobe Photoshop CS6 programı ile bir araya getirildi.

3.7. Biyokimyasal Analizler

Tüm biyokimyasal işlemler Atatürk üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneyin sonunda şırınga yardımıyla doğrudan kalpten alınan tam kan örnekleri sarı kapaklı vakumlu plastik jelli tüpe aktarıldı. 4000 rpm'de santrafütde (Hettich EBA 20) 10 dakika çökeltilme işlemi yapıldı. Santrafüt işlemi sonunda tüp içinde jel üstünde kalan serum sıvısı 2 ml'lik saklama tüplerine alınarak kademeli şekilde -80 dereceli dondurucuda (Nuair 9483E) alındı ve ölçüm anına kadar saklandı.

3.7.1. Östrojen ölçümü

Östrojen ölçümü, sıçan için özel olarak hazırlanmış hazır ELISA kitinin (Biotec, 96 kuyu, Cat. No: e0176Ra) protokolüne göre yapıldı. Kit klavuzunda belirtilen dilüsyonlara göre standart solüsyonları hazırlandı. Standart kuyularına 50 μl standart solüsyon eklendi. Numune kuyularına 40 μl örnek ve 10 μl anti-E antikör eklendi. Daha sonra tüm kuyulara 50 μl streptavidin-HPR (kör kontrol kuyusu hariç) eklendi. Hafif

hareketlerle iyice karıştıktan sonra yapışkan bir bant ile kuyu plaka, yüzeyi hava girmeyecek şekilde kapatılıp 37 derecede 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından yapışkan bant çıkarılıp tüm kuyulardaki sıvılar döküldükten sonra yıkama cihazı (*thermo Scientific Wellwash 1x8, Kat. No: 5165000*) yardımıyla 5 kez yıkandı. Bütün kuyulara 50 µl A solüsyon ve ardından 50 µl B solüsyon eklendi. Tekrar kuyu plaka yüzeyi yapışkan bant ile kapatıldı ve 37 derecede 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu konulup reaksiyon durduruldu. Durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı (Tablo 3.8).

Tablo 3.7. Östrojen ve Progesteron ELISA ölçüm basamakları

İŞLEM SIRASI	İŞLEM AMACI	SOLÜSYON TİPİ	KÖR KUYU	STANDART KUYULAR	TEST KUYULARI
1	YÜKLEME	Doku Örneği Antikor Standart Streptavidin HPR		50 µl 50 µl	40 µl 10 µl 50 µl
2	İNKÜBASYON				(37°C de 60 dakika)
3	YIKAMA				Yıkama solüsyonu ile 5 kez
4	YÜKLEME	Solüsyon A Solüsyon B	50 µl 50 µl	50 µl 50 µl	50 µl 50 µl
5	İNKÜBASYON				(37°C de 10 dakika)
6	YÜKLEME	Durdurma Solüsyonu	50 µl	50 µl	50 µl
7	OKUTMA				(450 nm'de)

3.7.2. Progesteron ölçümü

Progesteron ölçümü, sıçan için özel olarak geliştirilen hazır ELISA kitinin (Biotec, 96 kuyu, Cat. No: e0176Ra) protokolüne göre yapıldı. Kit klavuzunda belirtilen dilüsyonlara göre standart solüsyonları hazırlandı. Standart kuyularına 50 µl standart solüsyon eklendi. Numune kuyularına 40 µl örnek ve 10 µl anti-P antikor eklendi. Daha sonra tüm kuyulara 50 µl streptavidin-HPR (kör kontrol kuyusu hariç) eklendi. Hafif

hareketlerle iyice karıştıktan sonra yapışkan bir bant ile kuyu plaka, yüzeyi hava girmeyecek şekilde kapatılıp 37 derecede 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından yapışkan bant çıkarılıp tüm kuyulardaki sıvılar döküldükten sonra yıkama cihazı (*thermo Scientific Wellwash 1x8, Kat. No: 5165000*) yardımıyla 5 kez yıkandı. Bütün kuyulara 50 µl A solüsyon ve ardından 50 µl B solüsyon eklendi. Tekrar kuyu plaka yüzeyi yapışkan bant ile kapatıldı ve 37 derecede 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu konulup reaksiyon durduruldu. Durdurma solüsyonun eklenmesinden sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı (Tablo 3.8).

3.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızın verileri IBM 20.00 SPSS programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Verilerimizin homojen dağılıp dağılmadığına bakmak amacıyla varyans homojenite testi yapıldı. Akabinde verilerimizin sağa veya sola yatık olup olmadığını tespit etmek amacıyla skewness testi yapıldı. Sonucunda verilerimizin normal dağıldığını tespit ettik ve gruplar arasındaki anlamlılık, One Way Anova çoklu karşılaştırma testinden Tukey post-hoch testlerine göre yapıldı.

Tukey testinde değerlendirilmesi, KONT, ER ve ER+ÖST grublarına göre karşılaştırarak yapıldı. Kontrol grubu için * (yıldız), ER grubuna için # (diyez) ve ER+ Östrojen grubu için Δ (delta) sembolü kullanıldı. Buna göre örneğin; kontrol grubuna göre değerlendirmede $p < 0,05$ için *, $p < 0,001$ için ** ve $p < 0,0001$ için ise *** şeklinde ifade edildi.

Çalışmamızda immünohistokimyasal değerlendirilmesinde yarı kantitatif skorlama yapıldı. Bu yöntem İmmünohistokimyasal çalışmaların anlaşılmasında çokça tercih edildiğinden bizde çalışmamızda bu metodu kullanıldı. Buna göre; Her bir uterus

slayti için en az beş alan değerlendirip ve değerlendirmede, ortalama boyama yoğunluğu dikkate alınarak skorlama yapıldı.¹⁰⁸

Skorlamaya göre immün reaktivite çok az ya da yok ise – (% 0), immün pozitiflik hafif ise + (% 0–30), orta ise ++ (% 30–60), ve şiddetli ise +++ (% 60–100) ile skorlandı.¹⁰⁹

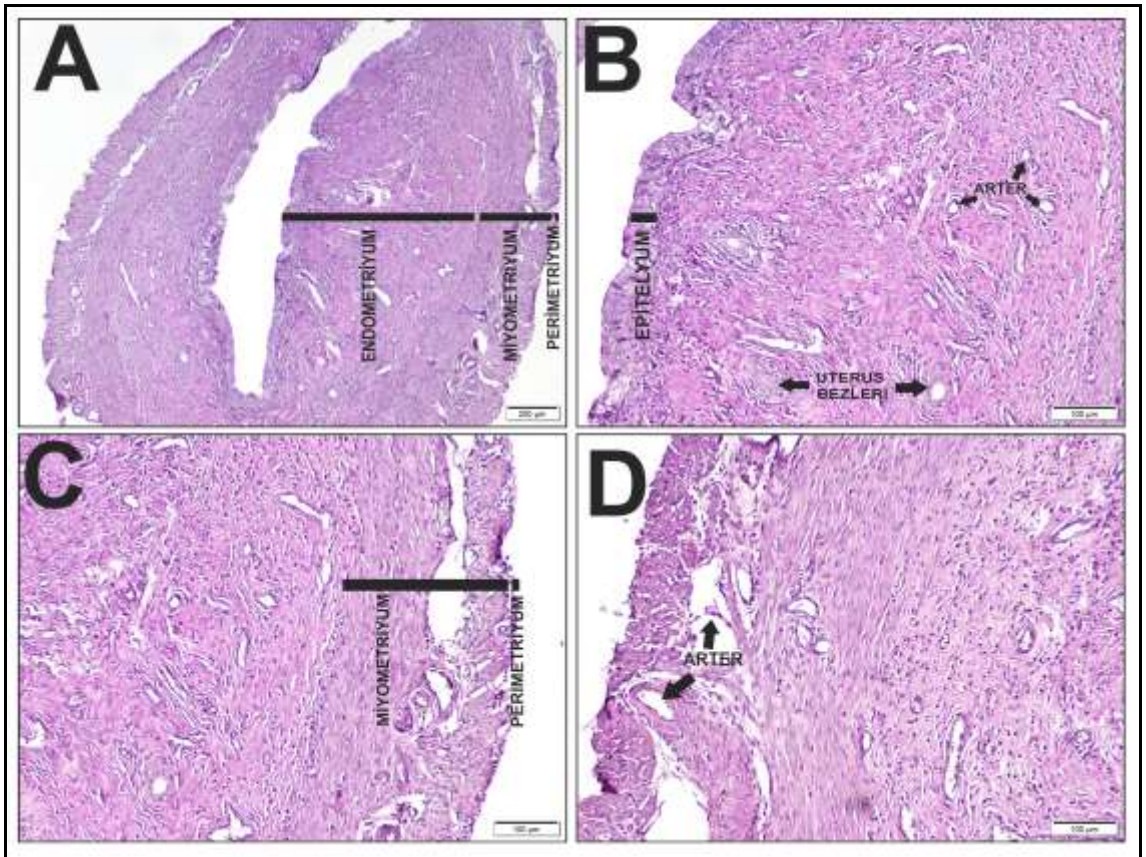


4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Hematoksilen ve eozin boyama bulguları

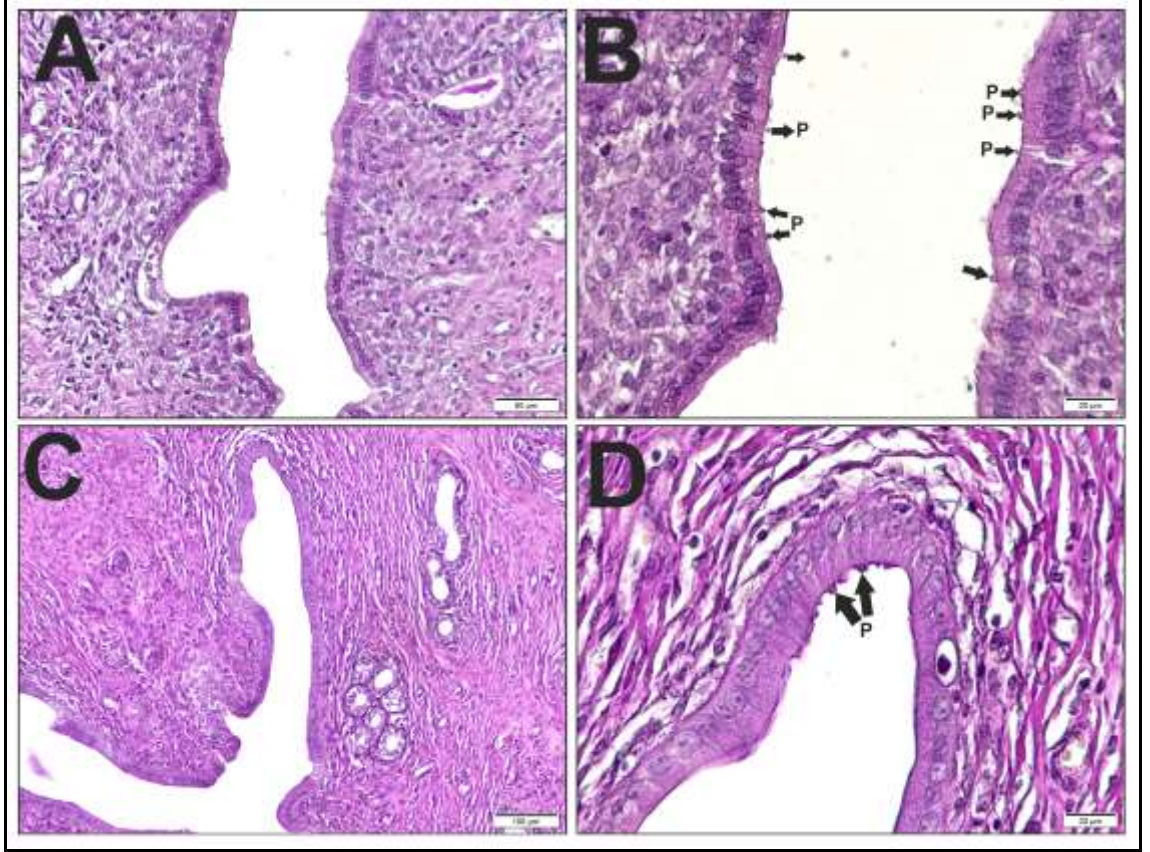
Kontrol grubuna ait görüntülerde yapılan histopatolojik incelemede endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumun sağlıklı görünümde olduğu izlendi. Endometriyumda tek katlı silli pirizmatik epitel ve lamina propriada normal görünümde uterus bezleri ve arter yapıları görüldü (Şekil 4.1 A-D).



Şekil 4.1. Kontrol grubu histopatolojik bulguları (Büyütme: **A;** X10, **B,C,D:** X40 Boya: Hematoksilen ve Eozin)

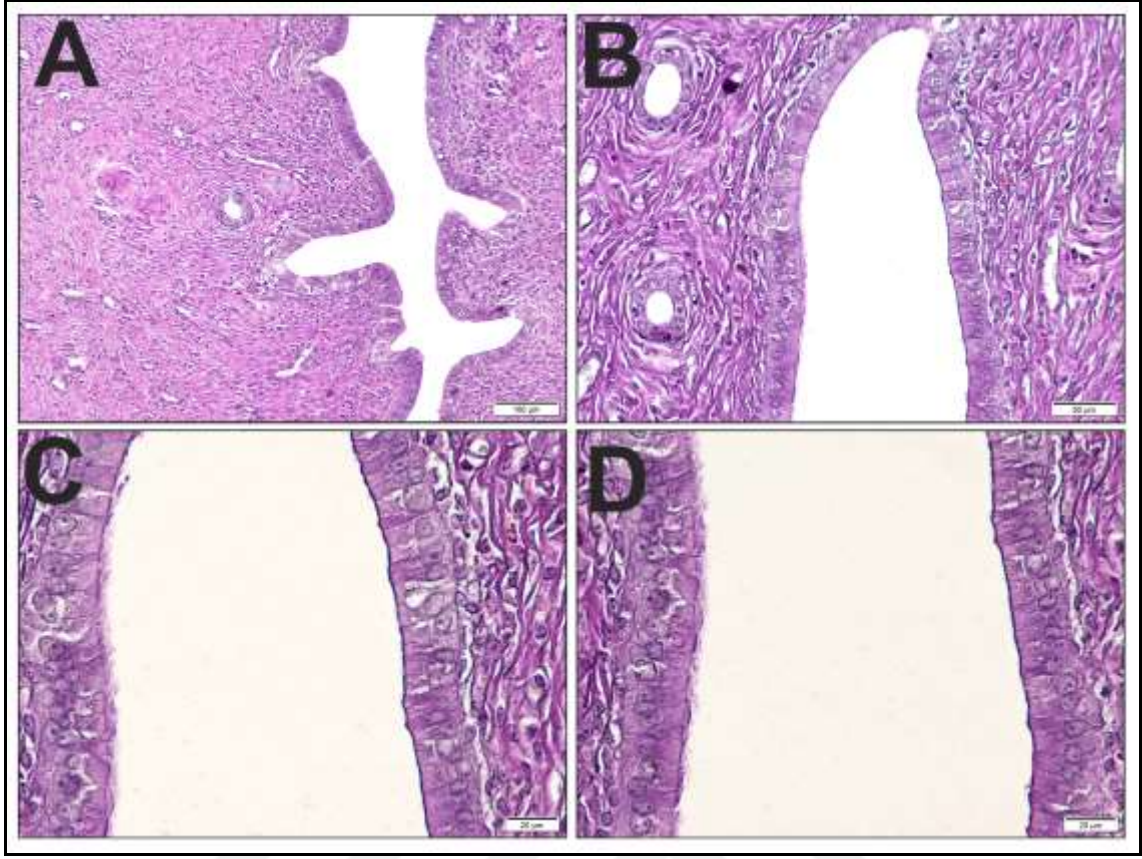
ER grubunda yapılan histopatolojik analizde endometriyum yüzeyinde pinopod oluşumlarına dikkat çekmeteydi. Bunun yanında genişlemiş uterin bez yapıları gözlemlendi (Şekil 4.2 A-B).

ER+ SU grubunda yapılan histopatolojik incelemede ER grubunda görülen pinopod oluşumlar gözlemlendi. Bu grupta gelişmiş uterin bez yapıları görüldü (Şekil 4.2 C-D).



Şekil 4.2. ER (A-B) ve ER+SU (C-D) grupları histopatolojik bulguları (P: Pinopod, Büyütme: **A, B, C**; X40, **D**: X100, Boya: Hematoksilen ve Eozin)

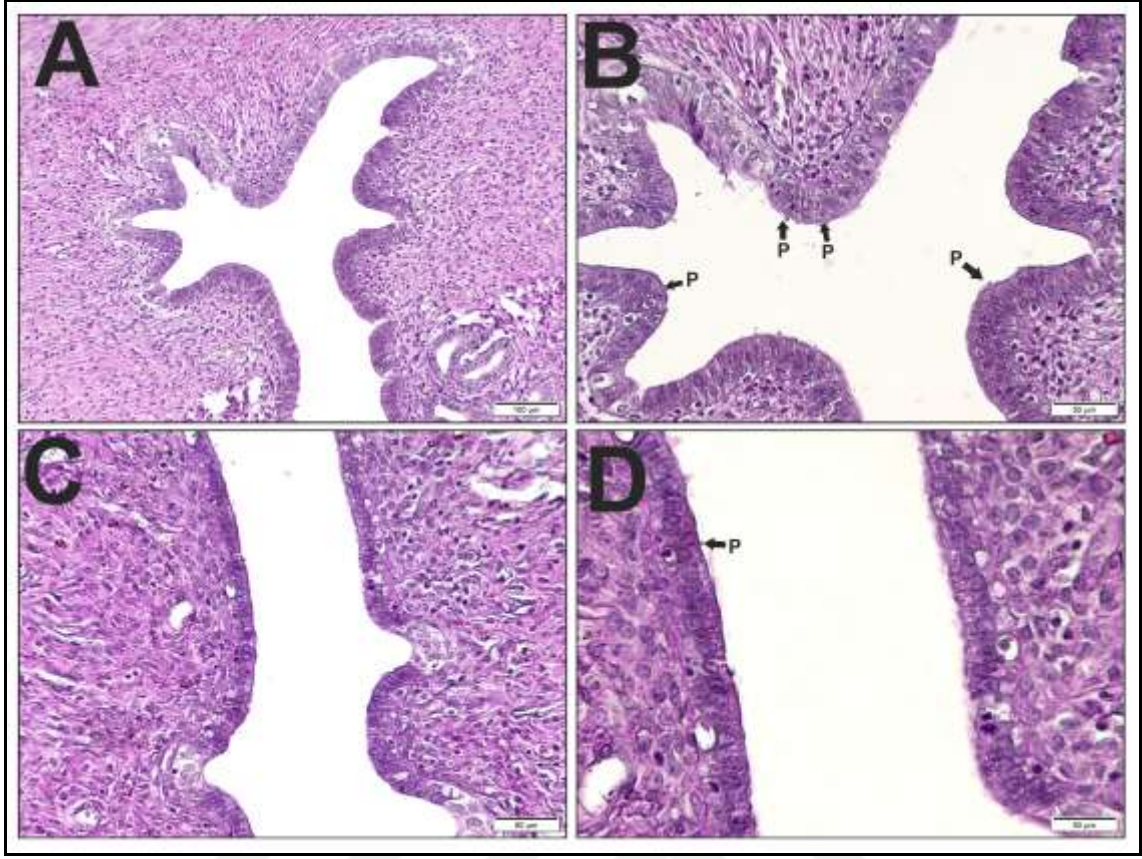
ER+ ÖST grubunda yapılan histopatolojik incelemede ise endometriyum epitelinde pinopod oluşumları çok nadir olarak görüldü. ER gruplarına kıyasla bez yapısında daha az genişlemeler izlendi (Şekil 4.3 A-D).



Şekil 4.3. ER+ÖST (A-D) grubu histopatolojik bulguları (Büyütme: **A, B, C, D:** X40, Boya: Hematoksilen ve Eozin)

ER+GE+DD grubunda yapılan histopatolojik incelemede lümende belirgin pinopod oluşumları izlendi. Ancak ER grubuna göre daha az pinopod oluşumları görüldü. ER grubunda görülen uterus bez yapıları bu grupta da gözlemlendi (Şekil 4.4 A-B).

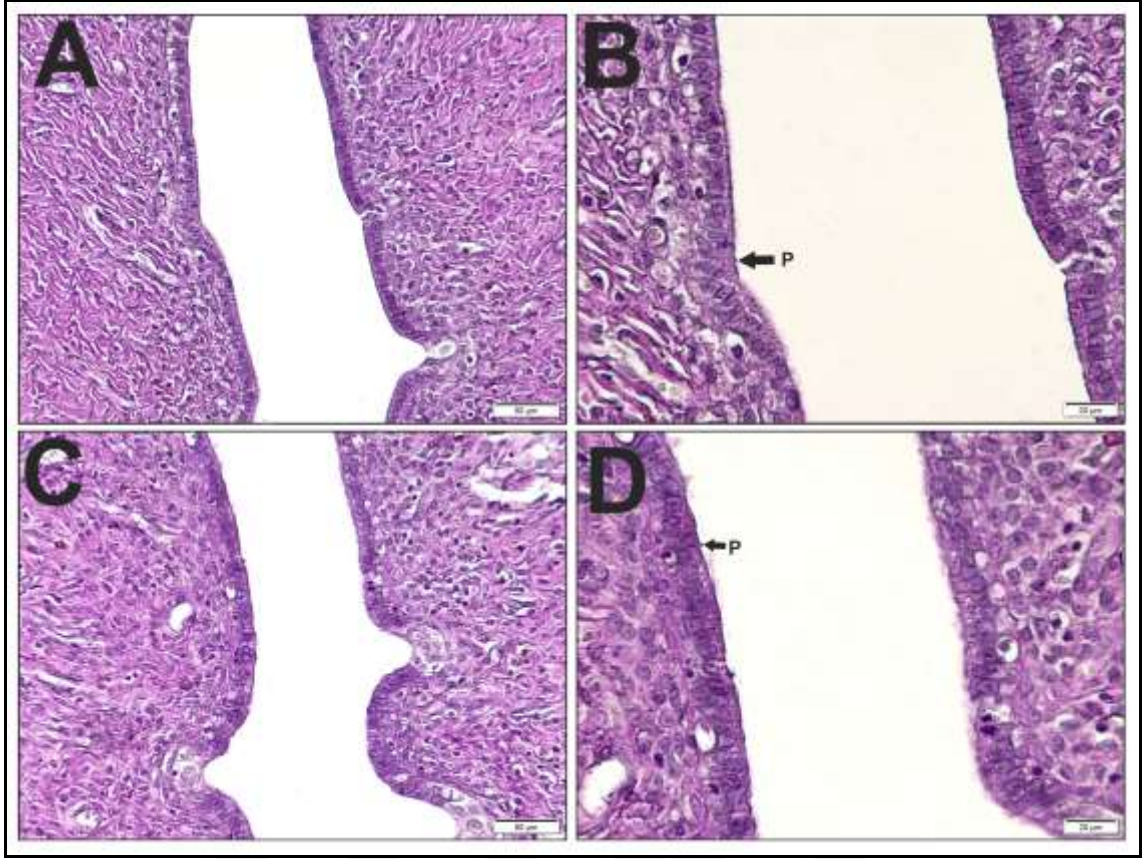
ER+GE+YD grubunda yapılan histopatolojik incelemede ise lümende pinopod oluşumları nadir olarak izlendi. Ayrıca bez yapılarının ER grubuna kıyasla az geliştiği tespit edildi. (Şekil 4.4 C-D).



Şekil 4.4. ER+GE+DD (A-B) ve ER+GE+YD (C-D) grupları histopatolojik bulguları (Büyütme: **A, B, C, D:** X40, Boya: Hematoksilen ve Eozin)

ER+DZ+DD grubunda yapılan histopatolojik incelemede lümende belirgin pinopod oluşumları izlendi. Ancak ER grubuna göre daha az pinopod oluşumları görüldü. ER grubunda görülen uterus bez yapıları bu grupta da gözlemlendi (Şekil 4.5 A-B).

ER+DZ+YD grubunda yapılan histopatolojik incelemede ise lümende nadir olarak pinopod oluşumları izlendi. Ayrıca bez yapılarının ER grubuna kıyasla az geliştiği görüldü. Kontrol grubuna göre ise bu durumun normal olduğu tespit edildi (Şekil 4.5 C-D).



Şekil 4.5. ER+DZ+DD (A-B) ve ER+DZ+YD (C-D) grupları histopatolojik bulguları (Büyütme: **A, B, C, D:** X40, Boya: Hematoksilen ve Eozin)

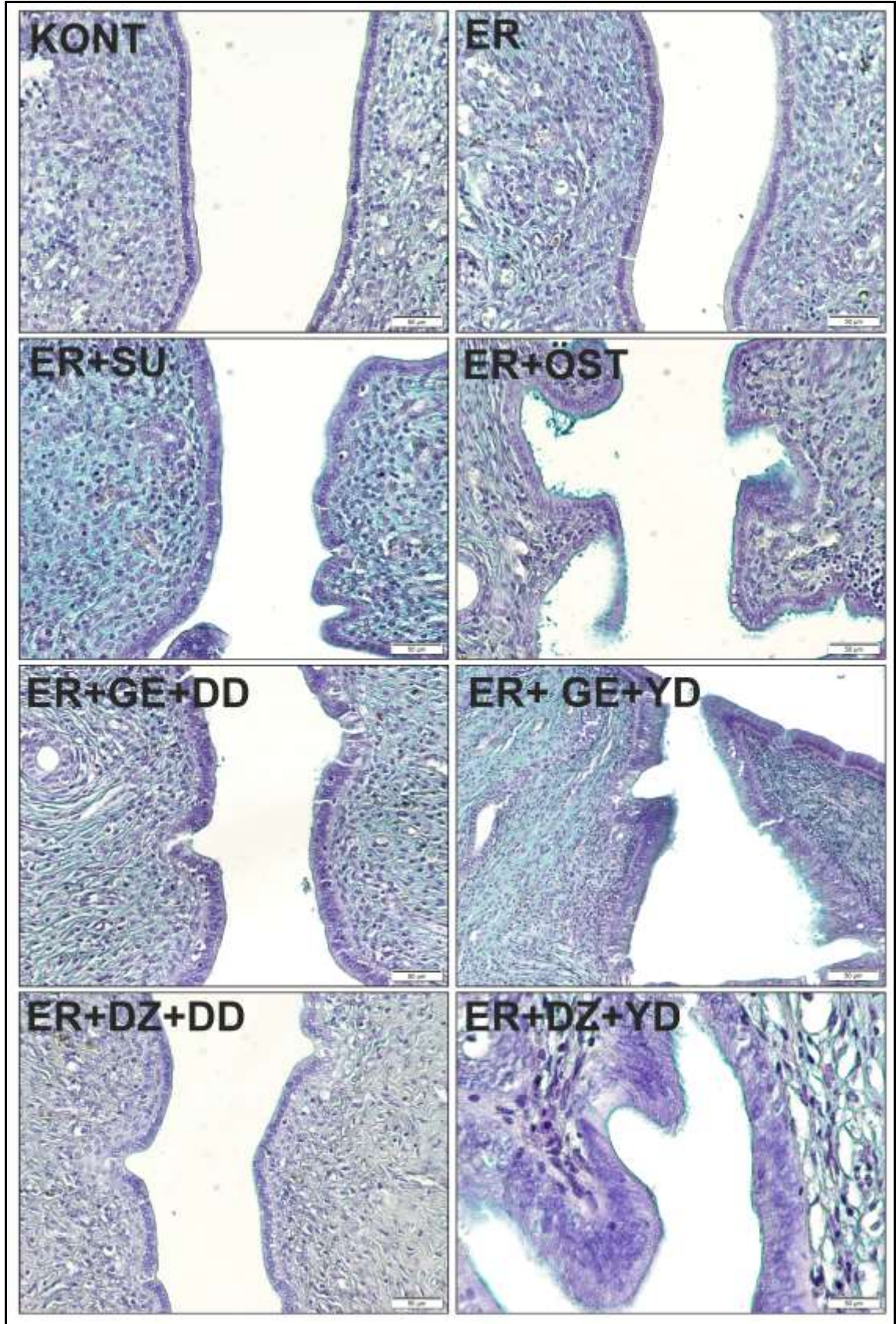
4.1.2. Alsiyan mavisi boyama bulguları

Alsiyan mavisi ile yapılan boyama ile uterusun endometriyal yüzeyinde izlenen asidik musinlerin gösterilmesi amaçlandı. Epitelyal yüzeyde görülen müsin salgısı miktarına göre gruplar arasında değerlendirmenin daha anlaşılır olması amacıyla skorlama yapıldı. Buna göre musin; hiç ya da çok az miktarda ise -, az miktarda ise +, orta miktarda ise ++ ve fazla miktarda ise +++ ile skorlandı.¹¹⁰

Alsiyan mavisi müsin boyama sonuçlarına göre; KONT, ER ve ER+SU grubuplarında hiç ya da çok az (-), ER+GE+DD ve ER+DZ+DD gruplarında az (+), ER+GE+YD ve ER+DZ+YD gruplarında orta (++) ve ER+ÖST grubunda ise fazla (+++) miktarda musin salgılandığı görüldü.

Tablo 4.1. Alsiyan mavisi boyaması müsin skrlama tablosu

Gruplar	Müsin Miktarı
KONT	-
ER	-
ER+SU	-
ER+ST	+++
ER+GE+DD	+
ER+GE+YD	++
ER+DZ+DD	+
ER+DZ+YD	++



Şekil 4.6. Alisyan mavisi boyamasına ait histopatolojik bulgular (Büyütme: **A, B, C, D:** X40, Boya: Alsiyan mavisi)

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal boyamada uterus dokusunda İntegrin $\beta 3$, İntegrin $\alpha \nu \beta 3$, LIF, HOXA 10 ve MUC 1 antikorları boyandı. Epitelyal yüzeyde görülen immünpozitif boyamanın şiddetine göre gruplar arasında değerlendirmenin anlaşılır olması amacıyla semi-kantitatif skorlama yapıldı. Buna göre immün negatif ise -, immün pozitiflik hafif ise +, orta ise ++ ve şiddetli ise +++ ile skorlandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları skorlama tablosu

Gruplar	İntegrin $\beta 3$	İntegrin $\alpha \nu \beta 3$	LIF	HOXA 10	MUC 1
KONT	+	+	+++	++	++
ER	+++	+++	++	++	+
ER+SU	+++	+++	++	++	+
ER+ÖST	-	+	-	-	+++
ER+GE+DD	++	+	+	++	+
ER+GE+YD	+	+	+	-	++
ER+DZ+DD	+	+	+	+	+
ER+DZ+YD	+	+	-	+	+++

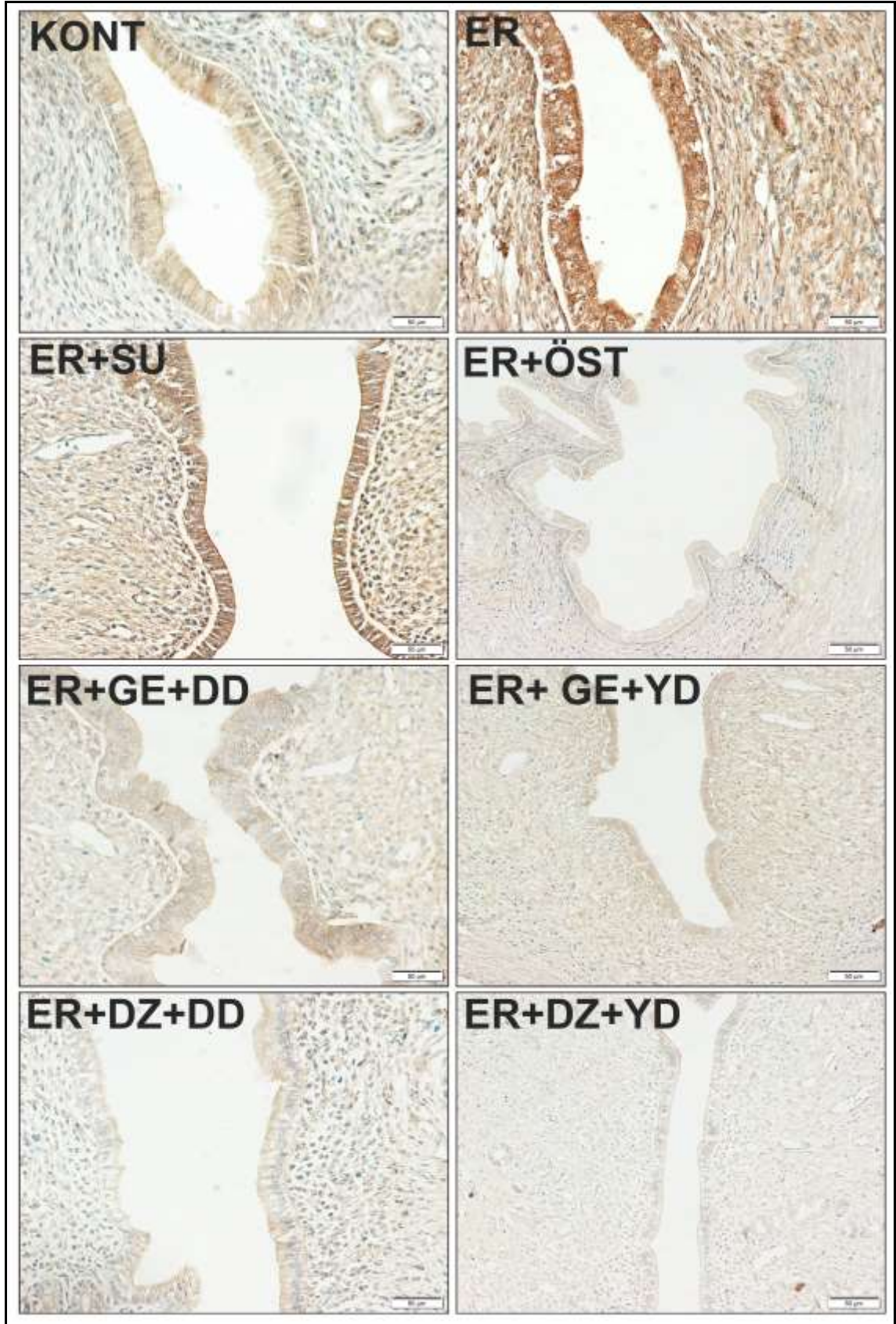
İntegrin $\beta 3$ antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; KONT, ER+GE+YD, ER+DZ+DD ve ER+DZ+YD gruplarında hafif (+), ER+GE+YD grubunda orta (++) , ER ve ER+SU gruplarında şiddetli (+++) immün pozitiflik izlenirken ER+ÖST grubunda immün negatiflik (-) görüldü (Şekil 4.7).

İntegrin $\alpha \nu \beta 3$ antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; KONT, ER+ÖST, ER+GE+DD, ER+GE+YD, ER+DZ+DD ve ER+DZ+YD gruplarında hafif (+) derecede immün pozitif görülürken, ER ve ER+SU gruplarında şiddetli (+++) immün pozitiflik izlendi (Şekil 4.8).

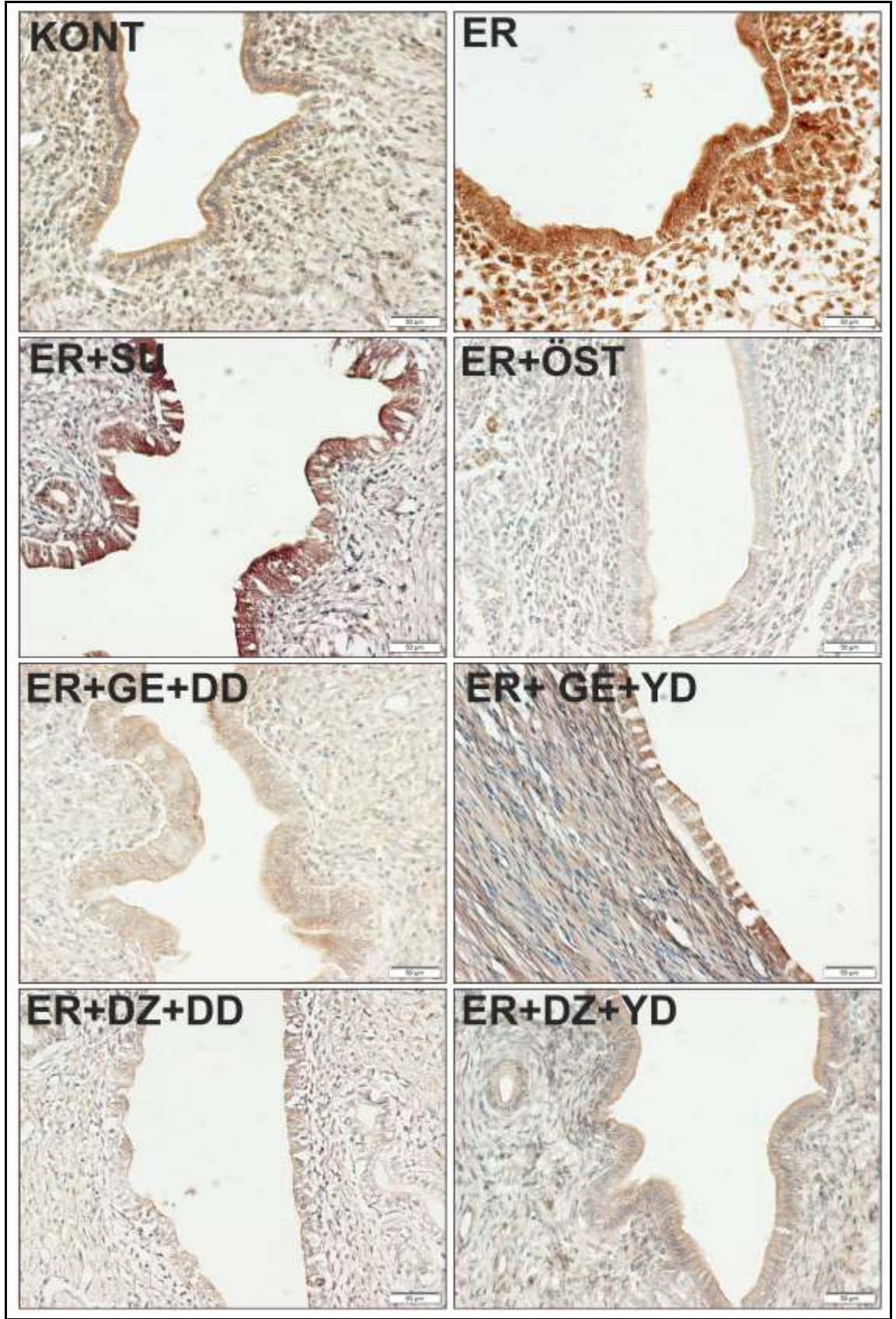
LIF antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; ER+GE+DD, ER+GE+YD ve ER+DZ+DD gruplarında hafif (+), ER ve ER+SU gruplarında orta (++) KONT grubunda şiddetli (+++) immün pozitiflik görülürken ER+ÖST grubunda immün negatiflik (-) izlendi (Şekil 4.9).

HOXA 10 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; ER+DZ+DD ve ER+DZ+YD gruplarında hafif (+), KONT, ER, ER+SU ve ER+GE+DD gruplarında orta (++) immün pozitiflik izlenirken ER+ÖST ve ER+GE+YD gruplarında immün negatiflik (-) görüldü (Şekil 4.10).

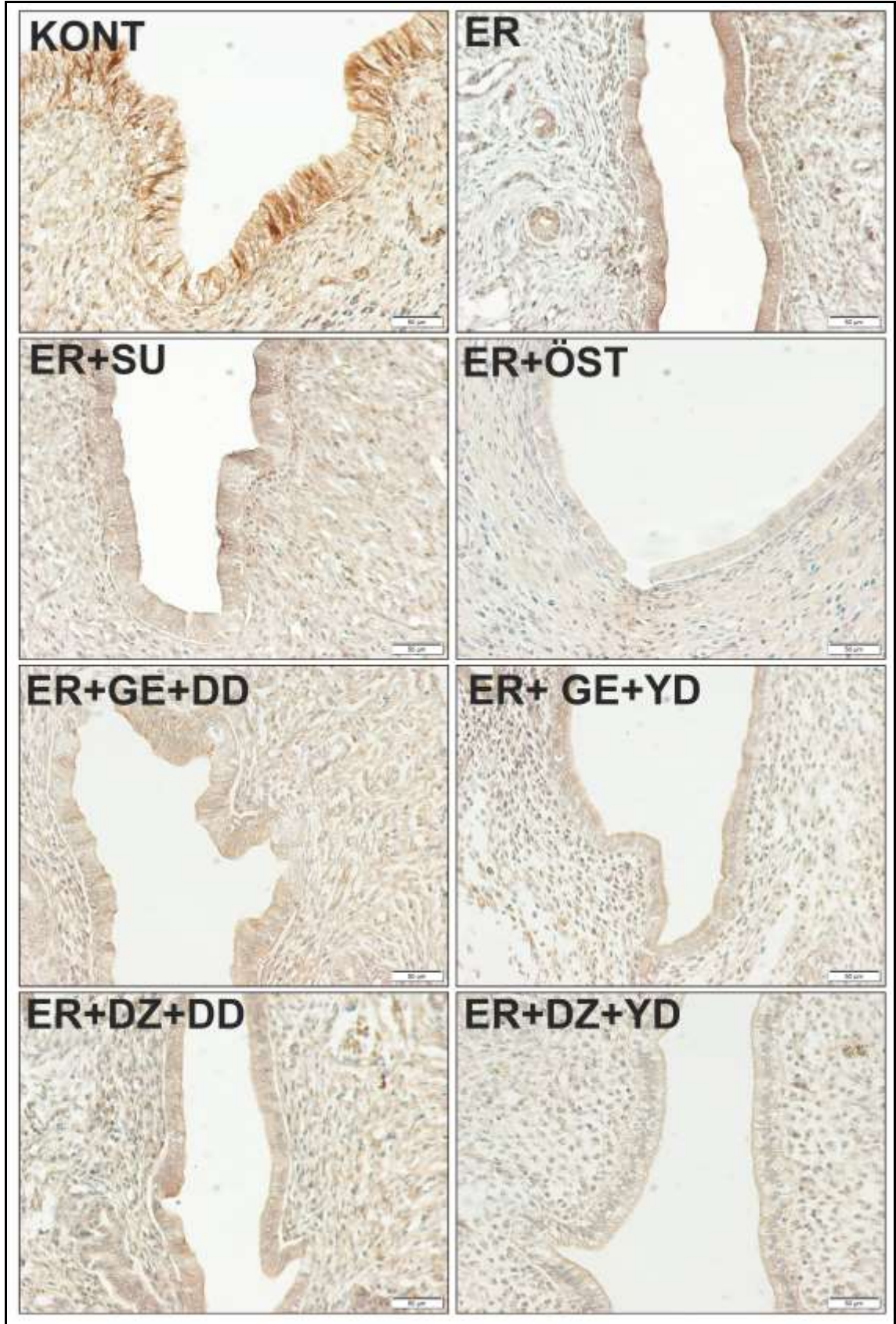
MUC 1 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; ER, ER+SU, ER+GE+DD ve ER+DZ+DD gruplarında hafif (+), KONT ve ER+GE+YD gruplarında orta (++) ER+ÖST ve ER+DZ+YD gruplarında şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.11).



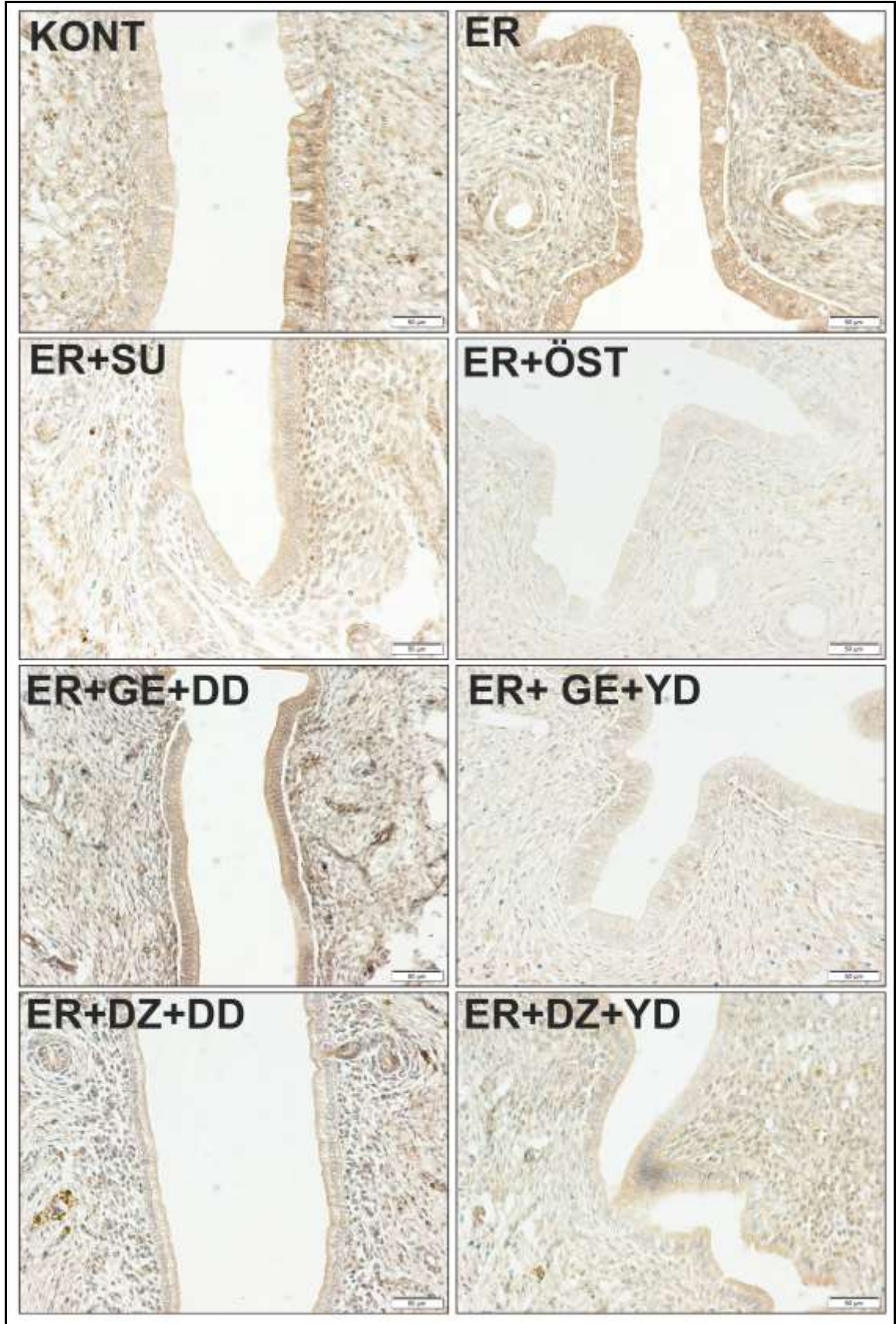
Şekil 4.7. İntegrin $\beta 3$ antikoruna immünohistokimyasal boyama bulguları (Büyütme: **A**, **B**, **C**, **D**: X40, Boya: DAB (3,3'-diaminobenzidine) ve Hematoksilen)



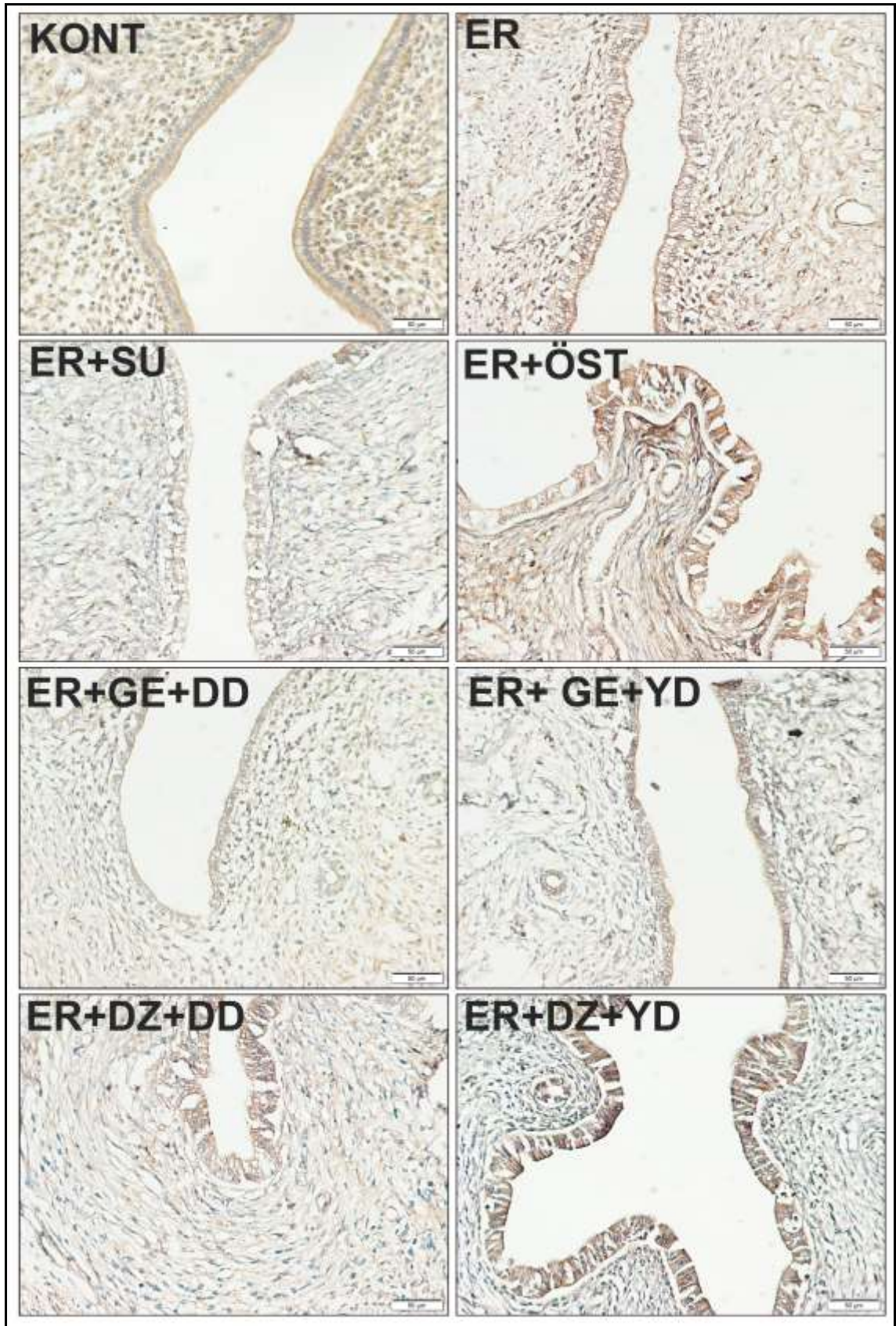
Şekil 4.8. İntegrin $\alpha v \beta 3$ antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları (Büyütme: **A**, **B**, **C**, **D**: X40, Boya: DAB (3,3'-diaminobenzidine) ve Hematoksilen)



Şekil 4.9. LIF antikorı immünohistokimyasal boyama bulguları (Büyütme: **A, B, C, D:** X40, Boya: DAB (3,3'-diaminobenzidine) ve Hematoksilen)



Şekil 4.10. HOXA 10 antikoru immünohistokimyasal boyama bulguları (Büyütme: **A**, **B**, **C**, **D**: X40, Boya: DAB (3,3'-diaminobenzidine) ve Hematoksilen)



Şekil 4.11. MUC 1 antikoruna immünohistokimyasal boyama bulguları (Büyütme: **A, B, C, D:** X40, Boya: DAB (3,3'-diaminobenzidine) ve Hematoksilen)

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Östrojen ve progesteron serum hormon seviyeleri tablo 4.3’de özetlendi. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verildi. Ölçümlerde Tukey istatistiksel yorumlama, kontrol grubuna göre değerlendirmede * (yıldız), ER grubuna göre değerlendirmede # (diyez) ve ER+Östrojen grubuna göre değerlendirmede ise Δ (delta) sembolü ile gösterildi. Buna göre örneğin; kontrol grubuna göre değerlendirmede $p < 0,05$ için *, $p < 0,001$ için ** ve $p < 0,0001$ için ise *** şeklinde ifade edildi.

Tablo 4.3. Östrojen ve progesteron hormon ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Östrojen	Progesteron
KONT	51,03 $\pm$ 1,61	52,25 $\pm$ 2,70
ER	57,24 $\pm$ 1,82	156,08 $\pm$ 1,97
ER+SU	56,98 $\pm$ 0,68	153,51 $\pm$ 1,03
ER+ÖST	94,98 $\pm$ 2,245	121,02 $\pm$ 3,49
ER+GE+DD	65,96 $\pm$ 0,54	144,33 $\pm$ 1,30
ER+GE+YD	76,28 $\pm$ 1,03	133,03 $\pm$ 0,35
ER+DZ+DD	63,19 $\pm$ 1,37	142,17 $\pm$ 2,15
ER+DZ+YD	73,41 $\pm$ 2,05	132,36 $\pm$ 1,17

4.3.1. Östrojen Hormonu Seviyeleri

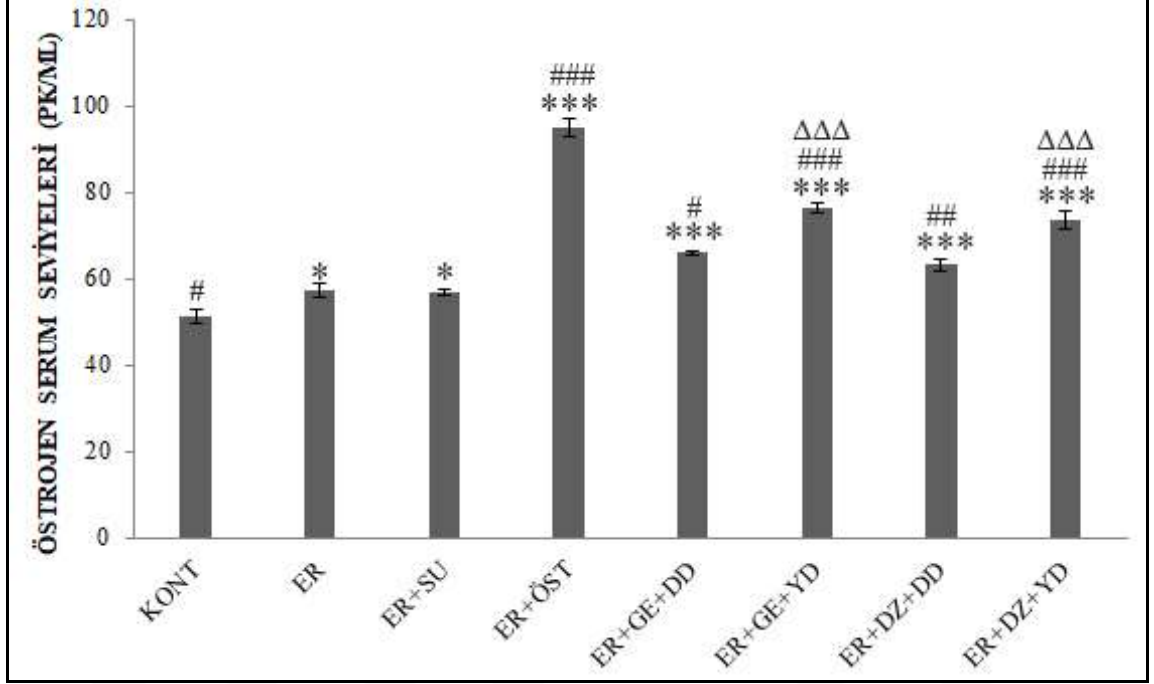
Östrojen hormonu serum seviyeleri gruplar arası değerlendirmesine göre;

Kontrol grubuna kıyasla; ER ve ER+ SU gruplarında az derecede anlamlılık (*) görülürken ER+GE+DD, ER+GE+YD, ER+DZ+DD, ER+DZ+YD ve ER+ÖST gruplarında ileri derecede anlamlılık (***) görüldü (Şekil 4.12).

ER grubuna kıyasla; KONTROL ve ER+DZ+DD gruplarında az derecede anlamlılık (#), ER+GE+DD grubunda orta derece anlamlılık (##), ER+GE+YD,

ER+DZ+YD ve ER+ÖST gruplarında ileri derecede anlamlılık (###) görüldü. Öte yandan ER ve ER+SU grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 4.12).

ER+ÖST grubuna kıyasla; ER+GE+YD ve ER+DZ+YD gruplarında ileri derecede anlamlılık (Δ Δ Δ) görüldü (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Östrojen serum seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması

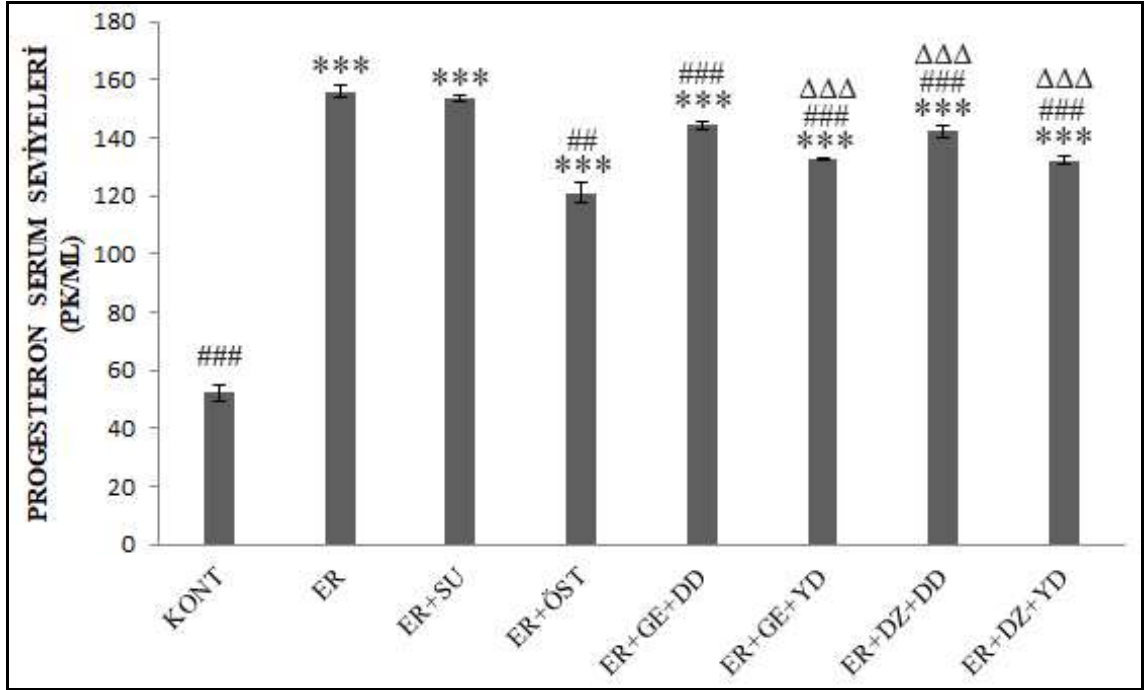
4.3.2. Progesteron Hormon Seviyeleri

Progesteron hormonu serum seviyeleri gruplar arası değerlendirmesine göre;

Kontrol grubuna kıyasla; ER ve ER+ SU, ER+GE+DD, ER+GE+YD, ER+DZ+DD, ER+DZ+YD ve ER+ÖST gruplarında ileri derecede anlamlılık (**) görüldü (Şekil 4.13).

ER grubuna kıyasla; ER+GE+DD grubunda orta derece anlamlılık (##), KONT, ER+GE+YD, ER+DZ+DD, ER+DZ+YD ve ER+ÖST gruplarında ileri derecede anlamlılık (###) görüldü. Öte yandan ER ve ER+SU grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 4.13).

ER+ÖST grubuna kıyasla; ER+GE+YD, ER+DZ+DD ve ER+DZ+YD gruplarında ileri derecede anlamlılık ($\Delta \Delta \Delta$) görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Progesteron serum seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

İnfertilite, toplum bireylerini etkileyen çağımızın en büyük sosyopsikolojik problemlerinden birisidir. Toplumda % 10-15 oranlarına ulaşan infertilite problemi, gerek yanlış ve yetersiz beslenme gerekse de toplumsal stresin yükselmesine bağlı olarak her geçen yıl daha da artmaktadır.¹¹¹ Düzenli ilişkiye rağmen ilk bir yıl içinde çocuk sahibi olamayan çiftler infertilite hastası sınıfına alınırlar. Kadın ve erkek faktörlü tüm durumlar göz önüne alınarak çiftlerin infertilite sebebi araştırılır. Çıkan sonuca göre bir tedavi şekli uygulanır. Ancak bir kısım çiftler için ise durum biraz farklıdır. Bu çiftlerde infertilite için herhangi bir neden bulunamaz. Bu durumda açıklanamayan infertilite vakaları ortaya çıkar. Kadınlarda tüm normal durumlara rağmen gebeliğin gerçekleşmemesinden, gerek kadının hormonal düzeyleri gerekse de endometriyumla ilgili kusurlar olsun birçok sebep ön görülebilir. Burada özellikle implantasyonda en önemli rolü üstlenen endometriyumla ilgili durumlar ana infertilite nedeni olabilirler.^{112, 113}

Taşlı yüzük şeklindeki blastokist denilen hücre kitlesi daha ileri bir gelişme için endometriyuma ihtiyaç duyar. Fertilizasyonun akabinde 4-5. günlerde uterus tüplerden uterusa ulaşan blastokist serbestçe uterus lümeninde yüzer. Bu sırada uterus ile endometriyum arasında yapışma moleküllerinin sentezini de içine alan karmaşık olaylar dizisi meydana gelir. Bu olaylar ile uterus ve endometriyum arasında reseptif bir ilişki kurulur ve başarılı bir implantasyon gerçekleşir. Bu noktada başarılı bir implantasyon için embriyo kalitesi kadar iyi kurulmuş endometrial reseptivite de bir gerekliliktir. Normal şartlarda başarılı bir şekilde kurulan bu endometrial reseptivite, integrin, selektin, HOXA 10 ve LIF molekülleri ile östrojen ve progesteron gibi faktörlerin fazla ya da az salınmasına bağlı sekteye uğrayabilir.^{75, 114} Yetersiz endometrial reseptivitenin implantasyon başarısızlıklarında üçte ikisinden sorumlu olduğu düşünüldüğünde endometrial reseptivitenin önemi daha da iyi anlaşılır.¹¹⁵ Son yıllarda teknolojinin

gelişmesine rağmen IVF tedavisi alan hastalarda ortaya çıkan başarısızlıklarda endometriyal reseptivitenin rolü daha da ön plana çıkmaktadır. Öyle ki, Bazı IVF merkezlerinde başarı yüzdesini artırmak amacıyla, bireysel farklılıklar göz önüne alınarak embriyo transfer zamanını kesin olarak belirlemek amacıyla endometriyal reseptivite kitleri kullanılmaktadır. Bu noktada biyobelirteçlerin önemi ortaya çıkmaktadır.²⁸

Endometriyal reseptivite sırasında uterusda özellikle de endometriyumda önemli morfolojik, moleküler ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin varlığı ya da yokluğu endometriyal reseptivite için biyobelirteçler olarak kullanılabilirler.

Endometriyal reseptivite ile ilgili morfolojik belirteçlerin başında pinopodlar gelir. Doğal menstrual siklusun 20-22. günleri arasında ortaya çıkan pinopod oluşumları, implantasyonda önemli bir rol oynar. Bu rolünden dolayı morfolojik belirteç olarak kabul edilirler.¹¹⁶ Yapılan araştırmalarda endometriyal reseptivite ile ilişkili birçok molekülün pinopodlarla ilişkili olduğu görülmüştür. Yine pinopodların uterus lümeninde fazla sıvının pinopodlar yardımıyla azaltılarak tutunmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir.¹¹⁷

Biz de yaptığımız çalışmada hematoksislen ve eozin boyama sonuçlarında ER ve ER+SU gruplarında uterin reseptivitesi ile ilişkili olarak pinopodların varlığını gösterdik. Aynı zamanda ER+ÖST grubunda östrojen hormonu artışının pinopod oluşumunu azalttığını tespit ettik. Nitekim Zhao ve arkadaşları, farelerin benzopirene maruziyetinin endometriyal reseptivite ile ilişkili olarak implantasyon alanlarının sayısında azalmayı gösterdikleri çalışmada bizim bulgularımıza paralel bulgular bulmuşlardır.¹¹⁸ Yine testesteronun uterin reseptivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada bizim bulgularımızı destekler bulgular görülmüştür.¹¹⁹

Molekül yapısı ile östrojen hormonuna benzerliği ile bilinen genistein ve daidzein soya izoflavonoidleri canlı organizmada östrojen hormonu gibi davrandığı hatta onunla rekabet ettiği bilinen bir gerçektir.¹⁰ Bu özelliğinden dolayı bu iki molekül endokrin

sistem bozucu kimyasallar listesine girmiştir. Bu açıdan dikkatli tüketilmesi gereken moleküllerdendir. Endometriyal reseptivitenin gerçekleşmesinde birçok hormon ve molekülün rolü vardır. Özellikle düşük östrojen ve yüksek progesteron seviyeleri ile endometriyal reseptivite arasında anahtar bir ilişki vardır. Nitekim yapılan araştırmalar, östrojen ve progesteron düzeylerindeki değişimin endometriyal reseptiviteyi etkilediğini ortaya çıkarmıştır.^{120, 121} Bu yönüyle östrojen gibi davranan daidzeinin ve genisteinin endometriyal reseptivite üzerinde bir etkisinin olabileceğini akla getirmektedir. Çalışmamızda hematoksilen ve eozin boyama sonuçlarında genisteinin ve daidzeinin yaptığımız gözlemler sonucunda doza bağlı olarak pinopodların oluşumunu azalttığı görülmüştür. Bu sonuç, Zhenlong ve arkadaşlarının daidzeinin blastokist implantasyon üzerine etkilerini araştıran çalışmada, daidzeinin hipotalamus, hipofiz ve gonadlarla ilgili hormonal aksta meydana gelen bozulmaya bağlı olarak implantasyon engelleyici etkenlerden birisi olabileceğini ileri sürdükleri hipotezi açıklamaktadır.¹²²

İmplantasyon penceresi döneminde canlı organizma içinde pek çok biyokimyasal molekül aktif olarak sentezlenip ortadan kaldırılmaktadır. Bu moleküllerin bazıları endometriyal reseptivitenin kurulması ile ilişkiliyken bazıları ise endometriyal reseptivitenin engellenmesi ile ilişkilidir. Burada özellikle doğrudan organ üzerinde reseptör ile etkileşerek varlığını gösteren progesteron ve östrojen hormonlarının indükleyici ve inhibe edici etkisi başrol oynamaktadır.⁶⁵

Yaptığımız çalışmanın biyokimyasal bulguları sonucunda, östrojen hormonun endometriyal reseptivite üzerinde olumsuz bir etki ortaya koyduğunu göstermektedir. Zigler ve arkadaşlarının endometriyal reseptivitenin hormonal kontrolünde progesteron ve östrojenin rolünü anlatan çalışma bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.⁶⁵ Buna ilaveten bulgularımızda genisteinin ve daidzeinin doza bağlı olarak östrojen hormonu seviyelerini yukarıya çektiği ve bu şekilde endometriyal reseptiviteyi bozduğunu tespit

ettik. Çalışmamızı destekler nitelikte olan, Kawakita ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada overektomize edilen sıçanlarda izoflovonoidlerin serum östrojen değerlerini yükselttiği gösterilmiştir¹²³

Östrojen hormonunun aksine progesteron hormonu endometriyal reseptivite döneminde yüksek seyretmektedir. Yapmış olduğumuz araştırmada ER, ER+SU gruplarında progesteronun yüksek olduğu görülürken KONT ve ER+ÖST gruplarında düşük bir sekresyon gösterdiği anlaşılmıştır. Bu bulgu yüksek östrojen hormonun progesteron hormonu üzerinde baskılayıcı bir rol üstlendiğini ortaya çıkarmaktadır. Ruihua ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir araştırmada bizim bulgularımızdaki gibi östrojen valatere uygulanan gruplarda serum progesteron düzeylerinde düşüş tespit etmişlerdir. ¹²⁴ Endometriyal reseptivite üzerine soya izoflovonoidlerinin etkisini araştırdığımız bu çalışma ise bu iki soya izoflovonoidinin östrojen hormonu gibi davrandığını ve doza bağımlı olarak progesteron hormonu üzerine baskılayıcı bir rol oynadığını ve progesteron hormonu seviyelerini düşürdüğünü ortaya çıkarmıştır. Soya diyeti sürecinde azalan ovaryan hormonların meme kanserinin önlenmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu sonucu destekler bulgular elde edilmiştir.¹²⁵

Endometriyal reseptivite ile ilişkili en çok bilinen moleküler biyobelirteçlerin başında integrin $\beta 3$ ve integrin $\alpha v\beta 3$, LIF, HOXA 10 ve MUC 1 gibi moleküller gelmektedir.

İmplantasyon penceresi döneminde adezyon molekülleri embriyonun tutunmasına katkıda bulunur.¹²⁶ Bu moleküllerin en bilinenleri integrin molekülleridir. Bu sınıfın iki üyesi olan İntegrin $\beta 3$ ve integrin $\alpha v\beta 3$ yapışma molekülleri endometriyal reseptivite ile ilgili çalışmalarda destekleyici bulgu olarak tercih edilmiştir. Yapılan araştırmalarda implantasyon başarısızlıklarında yapışma moleküllerinin önemli bir rolü olduğunu ortaya koymuştur.^{127, 128}

Akpak ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, nikotin maruziyetinin endometriyal reseptivite üzerindeki etkinliğinin gösterilmesinde moleküller bir biyobelirteç olarak İntegrin $\beta 3$ 'ü tercih etmişlerdir.¹²⁹ Bu çalışmaya benzer şekilde yapılan başka bir araştırmada, metoklopramid maruziyetinin endometriyal reseptivite üzerindeki etkisini göstermede integrin $\beta 3$ biyobelirteçleri kullanılmıştır.¹³⁰ Yapılan araştırmalarda endometriyal reseptivite durumunu göstermek ve vurgulamak için tercih edilen bir diğer molekül, integrin $\alpha v\beta 3$ 'dür. Tei ve arkadaşları fertil ve infertil kadınlarda integrin $\alpha v\beta 3$ 'ün immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre karşılaştırma yapmışlardır. Sonuçta Tei ve arkadaşları infertil kadınlarda, integrin $\alpha v\beta 3$ ekspresyonunda ciddi bir azalma olduğunu tespit etmiş ve bu durumun açıklanamayan infertilite ile ilişkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹³¹

Yapmış olduğumuz çalışmada biz de önemli biyobelirteçlerden olan integrin $\alpha v\beta 3$ ve İntegrin $\beta 3$ 'ü endometriyal reseptivite durumunu analiz etmek için kullandık. İntegrin $\beta 3$ 'ün immünohistokimyasal bulgularında ER ve ER+SU gruplarında yüksek derecede ifade edildiği tespit edildi. Ancak ER+ÖST grubunda ise neredeyse hiç tutulma olmaması dikkatten kaçmadı. Bunun yanında genistein ve daidzein soya izoflovanoidlerinin endometriyal reseptivite üzerindeki etkisinin araştırıldığı gruplarda doza bağlı olarak İntegrin $\beta 3$ immün reaktivitesinin belirgin şekilde azaltıldığını gösterdi. İntegrin $\alpha v\beta 3$ ile yapılan immünohistokimyasal boyama bulgularına gelindiğinde ise integrin $\beta 3$ bulgularımıza paralel olarak ER ve ER+SU gruplarında şiddetli immün pozitiflik görülürken, ER+GE ve ER+DZ gruplarında doza bağlı olarak ciddi şekilde immün pozitiflik şiddetinin azaldığı görüldü. Bu iki sonuç bize genistein ve daidzein soya proteinlerinin özellikle yüksek dozlarda kullanıldığında, integrin $\beta 3$ ve integrin $\alpha v\beta 3$ ekspresyonunu azaltma yoluyla endometriyal reseptivitenin bozulmasına yol açtığını göstermektedir.

İnterlökün 6 ailesinin bir üyesi olan LIF embriyo implantasyonu için gerekli moleküllerden bir tanesidir.^{132, 133} Kemik iliğinde kan hücrelerinin farklılaşmasında bir inhibitör olarak iş gören LIF, blastokistte embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasında özellikle de iç hücre kitlesinin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir.³⁰ Yapılan araştırmalarda anormal LIF seviyelerinin infertilite ile ilişkili olabileceğini ve LIF seviyelerinin düşük konsantrasyonunun açıklanamayan infertilite ile ilişkisi olabileceğini öne sürülmüştür.^{134, 135}

Yapmış olduğumuz araştırmada, açıklanamayan infertilite durumlarından birisi olan kusurlu endometriyal reseptiviteye yol açtığını düşündüğümüz soya izoflovonoidlerinin, immünohistokimyasal boyama sonuçlarımız LIF sentezini doza bağımlı olarak azalttığını gösterdi. Bu sonuçlar, Cullinan ve arkadaşlarının, insan endometriumundaki LIF ve LIF reseptörü ekspresyonunun embriyo implantasyonunun düzenlenmesinde potansiyel bir otokrin, parakrin işlevini anlatan çalışmayı destekler niteliktedir.¹³⁶

Embriyo implantasyonu için gerekli moleküllerden birisi de HOXA 10 transkripsiyon faktörüdür. Menstrual dönemin orta sekresyon döneminde yüksek olarak ifade edilen bu gen endometriyumun gelişmesinde, çeşitli hormonlara cevap oluşmasında rolü olduğu ileri sürülmüştür.¹³⁷ Daftary ve Taylor, farelerde yapmış oldukları araştırmada HOXA 10'un fertilite için gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır.¹³⁸ Araştırmalarda HOXA 10'un progesteron baskın dönemde uterus stromal hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında rol alan genlerin indüklenmesinde görev aldığını ortaya koymuştur.¹³⁹ Bu durumla ilişkili olarak HOXA 10 fertilizasyon sonrası embriyonun uterusu tutunma döneminde mutlak gerekli bir faktördür.

Çalışmamızın immünohistokimyasal bulgularıda endometriyal resptivite üzerinde östrojen hormonunun varlığının HOXA 10'un ekspresyonunun ciddi şekilde azalttığını ortaya çıkardı. Bunun yanında genistein ve daidzein soya proteinlerinin doza bağlı olarak HOXA 10'un ekspresyonunun azalmasına yol açtığını gösterdi.

Musinler, yüksek molekül ağırlığına sahip glikoproteinlerdir. Yüksek su tutma kapasitelerinden dolayı sindirim, solunum ve üreme organlarının lümenli yüzeylerinde özellikle ortamı kayganlaştırmak ve nemlendirmek için salgılanırlar. İnsanlarda 14'den fazla musin bilinmesine rağmen, özellikle MUC 1 endometriyumla ilişkilendirilmiştir.¹⁴⁰ Endometriyumda kalın glikokaliks yapısında bulunan MUC-1'in embriyo implantasyonunda uterus için doğru yer ve zamanın ayarlanmasında rol üstlendiği bildirilmiştir.^{141, 142} MUC 1 bu özelliklerinden dolayı anti adeziv molekül olarak bilinir. Çalışmamızda immünohistokimyasal bulgularımızda pinopod varlığının gösterildiği ER ve ER+SU gruplarında MUC 1 immün pozitifliğinin azaldığını gösterdik. Bunun yanında uterus ile ilişkili musinlerin gösterilmesi için yapılan alsiyan boyama bulgularında ER ve ER+SU gruplarında musin birikimlere rastlanmamış olması immünohistokimyasal bulgularımızı desteklemektedir. Horne ve arkadaşları, taramalı elektron mikroskopu ile endometriyal epitelyum üzerindeki epitopların araştırılması isimli çalışmada MUC 1'in pinopodlarda bulunmadığı göstermesi bizim bulgularımızı desteklemektedir.¹⁴³

Yapılan araştırmalar, östrojenin hormonunun MUC 1 ekspersyonunu uyarıdığını, yüksek progesteron düzeylerinin ise MUC 1 ekspersyonunu önemli oranda azalttığını göstermiştir.^{144, 145} Çalışmamızın alsiyan boyama sonuçlarında ER+ÖST grubunda fazla miktarda görülen musin birikimlere rastanırken östrojene benzer özellik gösteren genistein ve daidzein soya izoflovonoidlerinin endometriyal reseptivite gruplarında doza bağımlı olarak musin birikimlerinde artma olduğu tespit edildi. Bu bulgulara ilaveten

immünohistokimyasal bulguların ER grubuna göre; MUC 1'in genistein ve daidzein uygulanan ER gruplarında belirgin derecede ekspresyonunu artırdığını gözlemledik.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda soya izoflavonoidlerinin (genistein ve daidzein) endometriyal reseptivite üzerine etkisini histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile araştırdık. Bu amaçla genistein ve daidzein soya izoflavonoidlerinin düşük (10 mg/kg) ve yüksek (40 mg/kg) dozunu endometriyal reseptivite modelinde sıçanlarda uyguladık. Bunun yanında endometriyal reseptivite üzerinde yüksek östrojen seviyelerinin etkisini genistein ve daidzein ile karşılaştırmak amacıyla deneyimizin bir grubuna da östrojen valarete (5mg/kg) uyguladık.

Deney sonunda elde ettiğimiz doku örneklerinde morfolojik ve histopatolojik değişiklikleri incelemek amacıyla hematoksilin-eozin ve alsiyan mavisi boyamaları, endometriyal reseptivite ile ilişkili moleküler belirteçlerdeki değişiklikleri göstermek amacıyla integrin $\beta 3$, integrin $\alpha \nu \beta 3$, LIF, HOXA 10 ve MUC 1 antikorları ile immünohistokimyasal boyamaları yaptık. Son olarak kan örneklerinde östrojen ve progesteron serum seviyelerini biyokimyasal yöntemler ile analiz ettik.

Çalışmamızın sonucunda genistein ve daidzein özellikle yüksek dozda verildiğinde endometriyal reseptivite döneminde pinopod oluşumunu azalttığını ve uterus epitel yüzeyinde musin birikimini artırdığını; integrin $\beta 3$, integrin $\alpha \nu \beta 3$, LIF, HOXA 10 immünohistokimyasal boyamalarda immün pozitifliğini azalttığını, bunun aksine MUC 1'in immün pozitifliğini ciddi şekilde yükselttiğini tespit ettik. Bu bulguları östrojen verilen grupla kıyasladığımızda östrojen grubuna benzer bulgular görmüş olmamız bu iki soya izoflavonoidinin endometriyal reseptivite üzerinde benzer bir etki oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak, soya izoflavonoidleri olan genisteinin ve daidzeinin bilinçsiz ve fazla tüketimi, endometriyal reseptivitenin bozulmasına bağlı olarak açıklanamayan infertilite olgularında bir neden olabilir. Bu durum, son yıllarda artan soya üretimi ve

infertilite vakaları arasında bir ilişkinin olabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Bunun yanında, endokrin sistem bozucu bu iki soya proteininin diğer sistemler ve organlar üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

Kısaca; infertilite tanısı alan ya da infertilite için risk olarak sayılan şartlara sahip bireylerin, soya tüketimine dikkat etmeleri gereklidir. Bu açıdan bakıldığında gıda güvenilirliği konusunda bitkisel östrojen olarak tanımlanan maddeleri içeren gıdaların tüketiminde bir farkındalık gerekmektedir. Gelecekte gıda güvenilirliği için, bitkisel östrojen içeren gıdaların östrojenik özelliğinin kaldırılmasına veya etkisizleştirilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Masuda T, Goldsmith PD. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. *International Food and Agribusiness Management Review*, 2009, 12: 143-161.
2. The News & What it Means – Rising Production and Declining Demand a Bad Combination for Soybeans, Baskı, 2018.
3. Dilara Nilüfer DB. Soya ve Soya Ürünlerinin Fonksiyonel Gıda Bileşenleri. *Dergipark*, 2008, 33: 241 - 250.
4. Dalu A, Haskell JF, Coward L, Lamartiniere CA. Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. *Prostate*, 1998, 37: 36-43.
5. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a Dietary-Derived Inhibitor of Invitro Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90: 2690-2694.
6. Cooke PS, Selvaraj V, Yellayi S. Genistein, estrogen receptors, and the acquired immune response. *Journal of Nutrition*, 2006, 136: 704-708.
7. Wei HC, Bowen R, Cai QY, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and Antipromotional Effects of the Soybean Isoflavone Genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1995, 208: 124-130.
8. Kar PK, Tandon V, Saha NN. Anthelmintic efficacy of genistein, the active principle of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alterations in the free amino acid pool and ammonia levels in the fluke, *Fasciolopsis buski*. *Parasitology International*, 2004, 53: 287-291.

9. Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HD. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicological Sciences*, 1999, 51: 236-244.
10. Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y. Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition*, 2004, 134: 2623-2627.
11. Strauss L, Makela S, Joshi S, Huhtaniemi I, Santti R. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, 144: 83-93.
12. Nynca A, Sadowska A, Orlowska K, Jablonska M, Ciereszko RE. The Effects of Phytoestrogen Genistein on Steroidogenesis and Estrogen Receptor Expression in Porcine Granulosa Cells of Large Follicles. *Folia Biologica-Krakow*, 2015, 63: 119-128.
13. Okazaki K, Okazaki S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Wakabayashi S, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M. A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Archives of Toxicology*, 2002, 76: 553-559.
14. Lephart ED, Setchell KDR, Handa RJ, Lund TD. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: Phytoestrogens. *Ilar Journal*, 2004, 45: 443-454.
15. Latendresse JR, Bucci TJ, Olson G, Mellick P, Weis CC, Thorn B, Newbold RR, Delclos KB. Genistein and ethinyl estradiol dietary exposure in multigenerational and chronic studies induce similar proliferative lesions in mammary gland of male Sprague-Dawley rats. *Reproductive Toxicology*, 2009, 28: 342-353.

16. Kumi-Diaka J, Rodriguez R, Goudaze G. Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biology of the Cell*, 1998, 90: 349-354.
17. Medigovic I, Ristic N, Trifunovic S, Manojlovic-Stojanoski M, Milosevic V, Zikic D, Nestorovic N. Genistein affects ovarian folliculogenesis: A stereological study. *Microscopy Research and Technique*, 2012, 75: 1691-1699.
18. Gregoraszczyk E, Slomczynska M, Stoklosowa S. Effect of genistein, tyrphostin and herbimycin on prolactin-stimulated progesterone production by porcine theca and luteal cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 1999, 50: 477-484.
19. Rice S, Mason HD, Whitehead SA. Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 101: 216-225.
20. Bhattacharya S, N. Johnson, H. A. Tijani, R. Hart, S. Pandey, and A. F. Gibreel. . Female infertility *BMJ Clin Evid*, 2010.
21. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, 2012, 9: e1001356.
22. MD JSB. *Berek & Novak's Gynecology*. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins 2007.
23. Devarashetty A, Sultana H, Parveen GN, Iqbal Y. Sequential use of clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin in anovulatory infertility. *International Archives of Integrated Medicine*, 2017, 4: 236-249.
24. Speroff L GN, H. Kase R. . *Clinical gynaecologic endocrinology and infertility*. Baskı. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2005: 84-133.

25. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online*, 2001, 2: 41-53.
26. volume C. *Unexplained Infertility-Pathophysiology, Evaluation and Treatment*. Baskı. Springer, 2015: 185-191.
27. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2006, 12: 731-746.
28. Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta*, 2003, 24 Suppl B: S39-47.
29. Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL, Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol*, 1999, 13: 1005-1017.
30. Stewart CL. Leukaemia Inhibitory Factor and the Regulation of Blastocyst Implantation. *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions*, 1994: 269-278.
31. Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, 1995, 136: 3639-3647.
32. Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, Fauser BC. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15: 84-90.
33. Quaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. *Rev Obstet Gynecol*, 2008, 1: 69-76.
34. Akpak YK, Cekmez Y, Erdogan Cakir A, Karaca N, Batmaz G, Gulsen S, Tustas Haberal E. An animal model of effects of nicotine exposure on endometrial receptivity and embryo implantation in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2017, 30: 2818-2823.

35. Danielsson KG, Marions L, Bygdeman M. Effects of mifepristone on endometrial receptivity. *Steroids*, 2003, 68: 1069-1075.
36. Young SL. Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online*, 2013, 27: 497-505.
37. Michael H. Ross WP. *Histology, A Text And Atlas*. 7th edition Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 2016.
38. Keith L. Moore AFD, A. M. R. Agur,. *Moore Clinically Oriented Anatomy*. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
39. Standring S EH, Johson D, Williams A, Colins P, Widley C. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Baskı. Elsevier Limited, 2016.
40. Woodford BYGODP. *Wheater's Functional Histology*. 8. Edition Baskı. Elsevier, 2014.
41. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*. 14. Edition Baskı. 2016.
42. Rodney A. Rohoades DRB. *Tıbbi Fizyoloji, Klinik Tıbbın Temelleri*. Baskı. İstanbul Tıp Kitap Evi, 2017.
43. Kerr JB. *Fonctional Histology*. 2. Edition Baskı. Elsevier, 2010.
44. Arthur C. Guyton JEH. *Guyton Tıbbi Fizyoloji*. 13. Edition Baskı. 2017.
45. Mother or nothing: the agony of infertility, Baskı, 2010: 877-953.
46. Comhaire F H WHO. *Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility*; . Baskı. Oxford ; Melbourne : Blackwell Scientific, , 1987.
47. Harris ID, Fronczak C, Roth L, Meacham RB. Fertility and the aging male. *Rev Urol*, 2011, 13: e184-190.
48. Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update*, 2010, 16: 65-79.

49. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci*, 2015, 8: 191-196.
50. Katz DJ, Teloken P, Shoshany O. Male infertility - The other side of the equation. *Aust Fam Physician*, 2017, 46: 641-646.
51. Assisted Reproductive Technology Surveillance, Baski, 2005: 1-24.
52. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Human Reproduction*, 2008, 23: 538-542.
53. Dennett CC, Simon J. The role of polycystic ovary syndrome in reproductive and metabolic health: overview and approaches for treatment. *Diabetes Spectr*, 2015, 28: 116-120.
54. Masoumi SZ, Parsa P, Darvish N, Mokhtari S, Yavangi M, Roshanaei G. An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemeh Hospital in Hamadan. *Iran J Reprod Med*, 2015, 13: 513-516.
55. Tan Y, Bennett MJ. Urinary catheter stent placement for treatment of cervical stenosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2007, 47: 406-409.
56. Shuiqing M, Xuming B, Jinghe L. Pregnancy and its outcome in women with malformed uterus. *Chin Med Sci J*, 2002, 17: 242-245.
57. de Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet*, 2010, 376: 730-738.
58. Isaksson R, Tiitinen A. Obstetric outcome in patients with unexplained infertility: comparison of treatment-related and spontaneous pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1998, 77: 849-853.
59. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 1998, 70: 207-213.

60. Lessey BA. The role of the endometrium during embryo implantation. *Human Reproduction*, 2000, 15 Suppl 6: 39-50.
61. Narvekar SA, Gupta N, Shetty N, Kottur A, Srinivas M, Rao KA. Does local endometrial injury in the nontransfer cycle improve the IVF-ET outcome in the subsequent cycle in patients with previous unsuccessful IVF? A randomized controlled pilot study. *J Hum Reprod Sci*, 2010, 3: 15-19.
62. Wang L, Qiao J, Li R, Zhen X, Liu Z. Role of endometrial blood flow assessment with color Doppler energy in predicting pregnancy outcome of IVF-ET cycles. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8: 122.
63. Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 2012, 97: 1028-1032.
64. Abide Yayla C, Ozkaya E, Beydilli Nacak G, Sanverdi I, Devranoglu B, Bostanci Ergen E, Kilicci C, Kutlu T. High estrogen exposure may not be detrimental on endometrial receptivity in women with PCOS. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34: 798-803.
65. de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *Journal of Reproductive Immunology*, 1998, 39: 149-166.
66. Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 2011, 96: 530-535.
67. Quaas AM, Hansen KR. The role of steroid hormone supplementation in non-assisted reproductive technology treatments for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 2016, 106: 1600-1607.
68. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, 2012, 18: 1754-1767.

69. Zhu LJ, Cullinan-Bove K, Polihronis M, Bagchi MK, Bagchi IC. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology*, 1998, 139: 3923-3934.
70. Dvoran M, Vodicka J, Dostal J, Hajduch M, Dzubak P, Peskova M, Pilka R. Implantation and diagnostics of endometrial receptivity. *Ceska Gynekol*, 83: 291-298.
71. Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, Coomarasamy A. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2019, 25: 202-223.
72. Lessey BA. Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14: 775-788.
73. Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat*, 1973, 138: 277-299.
74. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*, 1975, 122: 262-263.
75. Rarani FZ, Borhani F, Rashidi B. Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and microRNAs. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 9145-9158.
76. Xu B, Sun X, Li L, Wu L, Zhang A, Feng Y. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin-beta3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 2012, 98: 389-395.
77. Hannan NJ, Salamonsen LA. Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19: 266-272.
78. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest*, 1992, 90: 188-195.

79. Casals G, Ordi J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Casamitjana R, Balasch J. Osteopontin and α v β 3 integrin as markers of endometrial receptivity: the effect of different hormone therapies. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21: 349-359.
80. Ordi J, Creus M, Casamitjana R, Cardesa A, Vanrell JA, Balasch J. Endometrial pinopode and α v β 3 integrin expression is not impaired in infertile patients with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*, 2003, 20: 465-473.
81. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 3115-3120.
82. Fukuda MN, Sugihara K. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *J Obstet Gynaecol Res*, 2008, 34: 129-136.
83. Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 801-806.
84. Yang Y, Chen X, Saravelos SH, Liu Y, Huang J, Zhang J, Li TC. HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, 2017, 107: 136-143 e132.
85. Shokrzadeh N, Alivand MR, Abedelahi A, Hessam Shariati MB, Niknafs B. Calcitonin administration improves endometrial receptivity via regulation of LIF, Muc-1 and microRNA Let-7a in mice. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 12989-13000.
86. Stavreus-Evers A, Masironi B, Landgren BM, Holmgren A, Eriksson H, Sahlin L. Immunohistochemical localization of glutaredoxin and thioredoxin in human endometrium: a possible association with pinopodes. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8: 546-551.

87. Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M. [Is glycodeclin an important marker of endometrial receptivity?]. *Ginekol Pol*, 2005, 76: 770-781.
88. Wang H, Shi G, Li M, Fan H, Ma H, Sheng L. Correlation of IL-1 and HB-EGF with endometrial receptivity. *Exp Ther Med*, 2018, 16: 5130-5136.
89. Calzolari A, Chiarelli I, Bianchi S, Messerini L, Gallo O, Porfirio B, Mattiuz PL. Immunohistochemical vs molecular biology methods. Complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. *Am J Clin Pathol*, 1997, 107: 7-11.
90. de Ziegler D. Hormonal control of endometrial receptivity. *Human Reproduction*, 1995, 10: 4-7.
91. Ozturk S, Demir R. Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. *Histol Histopathol*, 2010, 25: 1215-1228.
92. Simon C, Dominguez F, Valbuena D, Pellicer A. The role of estrogen in uterine receptivity and blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14: 197-199.
93. Bhurke AS, Bagchi IC, Bagchi MK. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 75: 237-245.
94. Westergaard LG, Wiberg N, Andersen CY, Laursen SB, Kliem A, Westergaard JG, Teisner B. Circulating concentrations of placenta protein 14 during the natural menstrual cycle in women significantly reflect endometrial receptivity to implantation and pregnancy during successive assisted reproduction cycles. *Human Reproduction*, 1998, 13: 2612-2619.
95. Krizova L, Dadakova K, Kasparovska J, Kasparovsky T. Isoflavones. *Molecules*, 2019, 24.

96. Branca F, Lorenzetti S. Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr*, 2005: 100-111.
97. Lauretta R, Sansone A, Sansone M, Romanelli F, Appetecchia M. Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 178.
98. Chin YP, Tsui KC, Chen MC, Wang CY, Yang CY, Lin YL. Bactericidal activity of soymilk fermentation broth by in vitro and animal models. *J Med Food*, 2012, 15: 520-526.
99. Pandit NT, Patravale VB. Design and optimization of a novel method for extraction of genistein. *Indian J Pharm Sci*, 2011, 73: 184-192.
100. Zava DT, Dollbaum CM, Blen M. Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998, 217: 369-378.
101. Adams NR. Permanent Infertility in Ewes Exposed to Plant Estrogens. *Australian Veterinary Journal*, 1990, 67: 197-201.
102. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-Specific Protein-Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262: 5592-5595.
103. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 1035-1042.
104. Mazumder MAR, Hongsprabhas P. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in in vivo and in vitro: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 82: 379-392.
105. Ma WW, Yuan LH, Yu HL, Ding BJ, Xi YD, Feng JF, Xiao R. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by beta-amyloid

peptides 25-35 in PC12 cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2010, 28: 289-295.

106. Han RM, Tian YX, Liu Y, Chen CH, Ai XC, Zhang JP, Skibsted LH. Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57: 3780-3785.

107. Voipio HM, Nevalainen T. Improved method for vaginal plug detection in rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 1998, 25: 5-9.

108. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG. A Robust Automated Measure of Average Antibody Staining in Immunohistochemistry Images. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2010, 58: 95-107.

109. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F, Leclere J, Duprez A, Weryha G. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001, 86: 656-658.

110. Meyerholz DK, Beck AP, Goeken JA, Leidinger MR, Ofori-Amanfo GK, Brown HC, Businga TR, Stoltz DA, Reznikov LR, Flaherty HA. Glycogen depletion can increase the specificity of mucin detection in airway tissues. *BMC Research Notes*, 2018, 11: 763.

111. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertility and Sterility*, 1991, 56: 192-193.

112. Edwards RG. Human uterine endocrinology and the implantation window. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, 541: 445-454.

113. Edwards RG. Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation. *Human Reproduction*, 1995, 10 Suppl 2: 60-66.

114. Makker A, Tandon I, Goel MM, Singh M, Singh MM. Effect of ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on biomarkers of endometrial receptivity and

pinopode development and its relation to fertility and infertility in Indian subjects. *Fertility and Sterility*, 2009, 91: 2298-2307.

115. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Human Reproduction*, 2002, 17: 213-218.

116. Bentin-Ley U. Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation. *Human Reproduction*, 2000, 15 Suppl 6: 67-73.

117. Afami M, Martin, F., Fullwood N. Identify and characterise stem cell population of the human endometrium. Lancaster University., 2015).

118. Zhao Y, Chen X, Liu X, Ding Y, Gao R, Qiu Y, Wang Y, He J. Exposure of mice to benzo(a)pyrene impairs endometrial receptivity and reduces the number of implantation sites during early pregnancy. *Food Chem Toxicol*, 2014, 69: 244-251.

119. Mohd Helmy M. Investigating the effects of testosterone on uterine fluid regulation and endometrial receptivity in a rat model. University of Malaya, 2016.

120. de Ziegler D, Fondop JJ, Le Gal F, Liberek C, Jauch T, Stalberg A. The hormonal control of endometrial receptivity. *Proceedings of the 13th World Congress on In Vitro Fertilization, Assisted Reproduction & Genetics*, 2005: 461-471.

121. de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E-2) and progesterone. *Journal of Reproductive Immunology*, 1998, 39: 149-166.

122. Wu ZL, Yang Y, Chen Y, Xia GL, Zhang RQ. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43: 167-172.

123. Kawakita S, Marotta F, Naito Y, Gumaste U, Jain S, Tsuchiya J, Minelli E. Effect of an isoflavones-containing red clover preparation and alkaline supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. *Clinical Interventions in Aging*, 2009, 4: 91-100.
124. Zhong RH, Xie SW, Li GT, Yang WJ, Guo XJ, Li Z, Zhou JY, Ma AY, Zhu Y. Hormone-like activities of Kuntai capsule in the uteri of ovariectomized rats and immature rabbits. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 38: 853-861.
125. Lu LJW, Anderson KE, Grady JJ, Kohen F, Nagamani M. Decreased ovarian hormones during a soya diet: Implications for breast cancer prevention. *Cancer Research*, 2000, 60: 4112-4121.
126. Yelian FD, Yang Y, Hirata JD, Schultz JF, Armant DR. Molecular-Interactions between Fibronectin and Integrins during Mouse Blastocyst Outgrowth. *Molecular Reproduction and Development*, 1995, 41: 435-448.
127. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 2006, 12: 731-746.
128. Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S. The role of integrins in human embryo implantation. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2001, 16: 364-371.
129. Akpak YK, Cekmez Y, Cakir AE, Karaca N, Batmaz G, Gulsen S, Haberal ET. An animal model of effects of nicotine exposure on endometrial receptivity and embryo implantation in pregnancy. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2017, 30: 2818-2823.
130. Cekmez Y, Korkmaz V, Cakir A, Gocmen A, Ergun Y, Gulsen S, Akpak YK. Does metoclopramide exposure alter endometrial receptivity and decrease pregnancy rates? *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2016, 29: 2703-2706.
131. Tei C, Maruyama T, Kuji N, Miyazaki T, Mikami M, Yoshimura Y. Reduced expression of alpha v beta 3 integrin in the endometrium of unexplained infertility patients

with recurrent IVF-ET failures: Improvement by danazol treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2003, 20: 13-20.

132. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine Expression of Leukemia Inhibitory Factor Coincides with the Onset of Blastocyst Implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 11408-11412.

133. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst Implantation Depends on Maternal Expression of Leukemia Inhibitory Factor. *Nature*, 1992, 359: 76-79.

134. Smith SK, Charnock-Jones DS, Sharkey AM. The role of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. *Human Reproduction*, 1998, 13: 237-243.

135. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: Presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Human Reproduction*, 1997, 12: 569-574.

136. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine paracrine function in regulating embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 3115-3120.

137. Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101: 1379-1384.

138. Daftary GS, Taylor HS. Molecular markers of implantation: clinical implications. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 2001, 13: 269-274.

139. Lim HJ, Ma L, Ma WG, Mass RL, Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13: 1005-1017.
140. Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The Polymorphic Epithelial Mucin Muc1 in Human Endometrium Is Regulated with Maximal Expression in the Implantation Phase. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1994, 78: 337-342.
141. Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. Expression and Steroid Hormonal-Control of Muc-1 in the Mouse Uterus. *Endocrinology*, 1995, 136: 3639-3647.
142. Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Human Reproduction Update*, 1998, 4: 465-471.
143. Horne AW, White JO, Lalani EN, Mobberley MA, Margara RA, Trew GH, Ryder TA. Analysis of epitopes on endometrial epithelium by scanning immunoelectron microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292: 102-108.
144. Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biology of Reproduction*, 1996, 55: 1098-1106.
145. HildPetito S, Fazleabas AT, Julian J, Carson DD. Mucin (Muc-1) expression is differentially regulated in uterine luminal and glandular epithelia of the baboon (*Papio anubis*). *Biology of Reproduction*, 1996, 54: 939-947.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Erdem TOKTAY
Doğum tarihi:	5 Ocak 1987
Doğum Yeri:	Erzurum
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, 25240 / ERZURUM
Tel:	0544 836 54 16
Faks:	-
E-mail:	erdemtoktay@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Bolu Canip Baysal Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta Derece
İlgi Alanları ve Hobiler	
Android programlama, Doğa ve kültür gezileri, Tarih ve doğa belgesel	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Doç. Dr. Jale SELLİ* danışmanlığında sunulan “Soya izoflavonoidlerinin (genistein ve daidzein) endometrial reseptivite üzerine etkisinin immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	15
Genel Bilgiler	1	30
Materyal ve Metod	5	35
Bulgular	4	10
Tartışma	0	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 05 / 09/ 2019

Öğrenci Adı-Soyadı

İmza

Erdem TOKTAY



Danışman Adı-Soyadı

İmza

Doç Dr. Jale SELLİ



EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



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

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800159524
Konu : HADYEK Kararı.

23.05.2018

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 18.05.2018 tarihli ve 42190979-000-E.1800153410 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 22.05.2018 tarih ve 6 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 131 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmanın yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nın Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ : 22.05.2018

TOPLANTI SAYISI : 6

KARAR NO 131: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş.Gör.Erdem TOKTAY'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Soya İzoflavonoidlerinin (Genistein ve Daidzein) Endometrial Reseptivite Üzerine Etkisinin İmmünohistokimyasal ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması" isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 18.05.2018 tarih ve 42190979-000-E.1800153410 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel : +90 442 2317222
Elektronik Ağ : <http://www.atauni.edu.tr/birim-veteriner-fakultesi>

Bilgi : Melinets KOC A
Faks : +90 442 2317244
E-Posta : vetfak@atauni.edu.tr

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=09AAE0E>

birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

