

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

**LAPATİNİB'İN SIÇAN OVER VE UTERUS DOKULARI ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBİK
DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Hande TOKGÖNÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Ufuk Özgü METE

ADANA-2012

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

**LAPATİNİB'İN SIÇAN OVER VE UTERUS DOKULARI ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBİK
DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Hande TOKGÖNÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Ufuk Özgü METE

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.**

Proje no: TF2009YL06

ADANA-2012

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana daima destek olan tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Ufuk Özgü METE'ye teşekkürü bir borç bilirim. Bana her konuda destek sağlayan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Sait Polat'a, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm değerli Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve öğretim elemanlarına, Anabilim Dalı personeli ve teknisyenleri Günseli Tuygun, Adile Sarıcalar, Nevriz Dural, Gülsüm Küçük'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasındaki destek ve katkılarından dolayı İç Hastalıkları Onkoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Berksoy Şahin'e, Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvar'ı sorumlusu Prof. Dr. Akgün Yaman ve personeline, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na, TIBDAM sorumlusu veteriner Dr. Kenan Dağlıoğlu ve personeline, teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalıştığımız süre boyunca yardım ve dostluklarını hep yanında hissettiğim çalışma arkadaşlarım Gülfidan Zülfikaroğlu, Leman Sencar, İrem Matur'a, yaşamımın her alanında bana sonsuz destek olan ve özverilerini esirgemeyen sevgili annem Sebiha Tokgönül, babam Feyyaz Tokgönül ve kardeşim Serkan Tokgönül'e teşekkürlerimi sunarım.

Yük.Lis.Öğr.Hande TOKGÖNÜL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ	VI
GRAFİKLER DİZİNİ	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Sıçan Over Histolojisi	3
2.1.1. Ovaryan folliküller	4
2.1.1.1. Primordiyal follikül	4
2.1.1.2. Gelişen Folliküller	4
2.1.1.3. Olgun Follikül	6
2.1.1.4. Ovulasyon	7
2.1.1.5. Korpus Luteum	7
2.1.1.6. Follikül Atrezisi	8
2.1.1.7. İnterstisyel Hücreler	10
2.2. Sıçan Uterus Histolojisi	10
2.3. Sıçan Östrus Siklusu	11
2.4. Lapatinib	12
2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Ailesi	13
2.5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ve HER2	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı	16
3.2. Deneyin Yapılışı	16
3.3. Kan örneklerinin, over ve uterus dokularının alınması	17
3.4. Işık Mikroskopi Yöntemleri	17
3.5. Elektron Mikroskopi Yöntemleri	17

3.6. İstatistiksel Analizler	19
4. BULGULAR	20
4.1. Biyokimyasal Analizler	20
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	22
4.2.1. Over Bulguları	22
4.2.2. Uterus Bulguları	23
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular	34
4.3.1. Over Bulguları	34
4.3.2. Uterus Bulguları	37
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dişi sıçanlarda ürogenital sistemin anatomisi	3
Şekil 2. Kontrol grubuna ait over ışık mikroskopik görüntüsü	25
Şekil 3: Kontrol grubuna ait over ışık mikroskopik görüntüsü	26
Şekil 4: Grup 1over ışık mikroskopik görüntüsü	27
Şekil 5: Grup 1over ışık mikroskopik görüntüsü	28
Şekil 6: Grup 2 over ışık mikroskopik görüntüsü	29
Şekil 7: Grup 2 over ışık mikroskopik görüntüsü	30
Şekil 8: Kontrol uterus ışık mikroskopik görüntüsü	31
Şekil 9: Grup 1 uterus ışık mikroskopik görüntüsü	32
Şekil 10: Grup 2 uterus ışık mikroskopik görüntüsü	33
Şekil 11: Kontrol grubu. Over yüzey epiteli elektron mikroskopik görüntüsü	39
Şekil 12: Kontrol grubu. Primordiyal follikül elektron mikroskopik görüntüsü	40
Şekil 13: Kontrol grubu. Gelişen follikül elektron mikroskopik görüntüsü	41
Şekil 14: Kontrol grubu. Granüloza hücreleri elektron mikroskopik görüntüsü	42
Şekil 15: Kontrol grubu. Korpus luteum elektron mikroskopik görüntüsü	43
Şekil 16: Kontrol grubu. Ovariyan stroma elektron mikroskopik görüntüsü	44
Şekil 17: Grup 1. Over yüzey epiteli elektron mikroskopik görüntüsü	45
Şekil 18: Grup 1. Primordiyal follikül elektron mikroskopik görüntüsü	46
Şekil 19: Grup 1. Gelişen follikül elektron mikroskopik görüntüsü	47
Şekil 20: Grup 1. Granüloza hücreleri elektron mikroskopik görüntüsü	48
Şekil 21: Grup1. Korpus luteum elektron mikroskopik görüntüsü	49
Şekil 22: Grup 1. Ovariyan stroma elektron mikroskopik görüntüsü	50
Şekil 23: Grup 2. Over yüzey epiteli elektron mikroskopik görüntüsü	51
Şekil 24: Grup 2. Primordiyal follikül elektron mikroskopik görüntüsü	52
Şekil 25: Grup 2. Primer follikül elektron mikroskopik görüntüsü	53
Şekil 26: Grup 2. Primer follikül elektron mikroskopik görüntüsü	54
Şekil 27: Grup 2. Gelişen follikül elektron mikroskopik görüntüsü	55
Şekil 28: Grup 2. Ovariyan stroma elektron mikroskopik görüntüsü	56

Şekil 29: Grup 2. Korpus luteum elektron mikroskopik görüntüsü	57
Şekil 30: Kontrol. Uterus yüzey epiteli elektron mikroskopik görüntüsü	58
Şekil 31: Kontrol. Endometriyal stroma elektron mikroskopik görüntüsü	59
Şekil 32: Grup 1. Uterus yüzey epiteli elektron mikroskopik görüntüsü	60
Şekil 33: Grup 1. Endometriyal stroma elektron mikroskopik görüntüsü	61
Şekil 34: Grup 1. Endometriyal bez elektron mikroskopik görüntüsü	62
Şekil 35: Grup 2. Uterus yüzey epiteli elektron mikroskopik görüntüsü	63
Şekil 36: Grup 2. Endometriyal stroma elektron mikroskopik görüntüsü	64
Şekil 37: Grup 2. Endometriyal bez elektron mikroskopik görüntüsü	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Elektron mikroskopik doku takip yöntemleri	18
Tablo 2. Biyokimyasal bulgular	20

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Kontrol ve deney gruplarına ait östrojen seviyeleri	21
Grafik 2: Kontrol ve deney gruplarına ait progesteron seviyeleri	21

KISALTMALAR

APD	Aksiyon Potansiyel Süresi
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FSH	Folikül Stimulan Hormon
GER	Granüler Endoplazmik Retikülüm
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
IP	İntraperitoneal
LH	Luteinleştirici Hormon
MAPK	Mitojenler ile aktive olan protein kinazlar
SER	Agranüler Endoplazmik Retikülüm
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TIBDAM	Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü

ÖZET

Lapatinib'in Sıçan Over ve Uterus Dokuları Üzerine Olan Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde Araştırılması

Moleküler onkolojideki önemli gelişmeler sonucunda gündeme gelen hedeflenmiş anti-kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan birçok ilaç, hücre reseptörleri ve hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşerek tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurmaktadır. Bu tür tedavilerin yöneldiği hedeflerin fizyolojik görevleri de bulunmakta olup bazı hedefe yönelik ilaçların kullanımı sırasında çeşitli yan etkilerin geliştiği rapor edilmiştir. Hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçlardan biri olan Lapatinib hücre içine girerek epidermal büyüme faktörü ve reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. EGFR ve HER2 birçok memeli uterusunda ve overlerde bulunmakta, uterus aktivitesi, oosit matürasyonu ve folliküler gelişim üzerinde etkili olmaktadır. Çalışmamızda Lapatinibin sıçan uterus ve over dokularında yol açabileceği değişikliklerin biyokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlandı.

24 adet Wistar cinsi dişi sıçan 3 gruba ayrılarak, deney gruplarına sırasıyla 30mg/kg ve 75mg/kg Lapatinib, kontrol grubuna ise aynı miktarda distile su oral gavaj yoluyla, sabah ve akşam günde 2 kez olmak üzere 14 gün uygulandı. Deney sonunda anestezi altındaki hayvanlardan biyokimyasal analizler için intrakardiyak kan örnekleri, ışık ve elektron mikroskopik inceleme için uterus ve over doku örnekleri alındı. E 170 İmmunoassey yöntemi ile kan serum düzeyinde östrojen, progesteron, FSH ve LH seviyeleri ölçülürken ışık ve elektron mikroskopik doku hazırlama yöntemlerine uygun olarak hazırlanan dokulardan elde edilen kesitler, Jeol 1400 TEM ve Olympus BX 50 ışık mikroskoplarında değerlendirildi.

Deney gruplarına ait sıçanlarda östrojen ve progesteron seviyelerinde azalma yanında ışık ve elektron mikroskopik kesitlerde, endometriyumda stromal hücreler ve bezlerde, overlerde ise oosit, granüloza hücreleri ile interstisyel hücrelerde yapısal değişikliklerin geliştiği ve bu değişikliklerin yüksek doz grubunda daha belirgin olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak Lapatinib gibi hedefe yönelik tedavilerde kullanılan ilaçların hedeflediği reseptörler ve sinyal moleküllerinin blokajına bağlı olarak bunların kullanıldığı doku ve organların yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler gelişebileceği kanaatine varıldı.

Anahtar sözcükler: Over, Uterus, Lapatinib, İnce yapı

ABSTRACT

The Electron and Light Microscopic Evaluation of Effects of the Lapatinib on Rat Ovary and Uterus

As a result of the important developments in molecular oncology, many drugs on the agenda started to be use in targeted anti-cancer treatment interrupt proliferation of tumor cells via interacting with cell receptors and intracellular signaling molecules. The objectives of this kind of treatments have physiological functions however it has been reported that a variety of adverse effects can be develop during the use of some targeted drugs. Lapatinib is one of the drugs which is used in targeted therapies, enters into the cell and inhibits the activity of epidermal growth factor and receptor-linked tyrosine kinase. Many mammalian uterine and ovarian tissues have EGFR and HER2 which influence uterine activity, oocyte maturation and follicular development. Our study aimed to investigate changes on uterine and ovarian tissues of rats may cause by Lapatinib on biochemical, light and electron microscopic levels.

24 female Wistar rats were divided into 3 groups, respectively we applied 30 mg/kg and 75 mg/kg Lapatinib to the experimental groups and the same amount of distilled water was given to the control group twice a day dose by gavage during the 14 days. Intracardiac blood samples were taken from the rats under anesthesia for biochemical analysis, uterine and ovarian tissue samples were taken for light and electron microscopic examination at the end of the experiment. FSH, LH, estrogen and progesterone levels in blood serum were measured via E170 Immunoassay method as well as sections from the tissues which were prepared accordance to the methods of light and electron microscopy were examined by Jeol 1400 TEM and Olympus BX50 light microscope.

Beside the reduction of estradiol and progesterone levels in the rats of experimental groups, it was observed that there were structural changes in stromal cells and glands of endometrium, oocyte, granulose cells and interstitial cells of ovaries and it was pointed out that these changes were more prominent in the high dose group.

In conclusion, depending on blockage of receptors and signal molecules are targeted by drugs which are used to targeted therapies such as Lapatinib which can cause structural and functional changes of tissues and organs.

Key Words: Ovary, Uterus, Lapatinib, Ultrastructure.

1. GİRİŞ

Son yirmi yıl içinde moleküler onkolojideki önemli gelişmeler sonucunda karsinogenez, tümör büyümesi ve invazyonu ile metastaz biyolojisinde önemli gelişmeler olmuş ve günümüzde yeni geliştirilen anti-kanser ilaçlar ile hedeflenmiş anti-kanser tedavisi gündeme gelmiştir ¹. Konvansiyonel kemoterapiler “selektif” olmadıkları için proliferen olan tümör hücrelerini yok ederken normal hücreleri de ortadan kaldırmaktadırlar. Hedeflenmiş terapötikler ise “selektif hedefleri” nedeniyle “özel moleküler defekt” olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini hedef hücre aracılığı ile öldürürken normal hücrelerin yaşamasına olanak tanımaktadırlar ^{1,2}.

Bu kapsamda son yıllarda EGFR'ye özel monoklonal ve TK inhibitörleri klinikte erken faz çalışmalarında yer almaya başlamıştır. EGFR'ye bağlanan ligandın bloke edilmesi, reseptörün monoklonal antikorlar ile bloke edilmesi veya tirozin kinaz aktivasyonu ile inhibe edilmesi önemli bir tedavi yaklaşımı oluşturmaktadır. HER2 pozitif meme kanserinde kemoterapiye ek olarak hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir ve Trastuzumab ilk hedefe yönelik ilaç olmuştur. Lapatinib ise bunlardan sonra geliştirilen, kanserli hücrede sinyal yollarını etkin bir şekilde inhibe eden EGFR ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür ^{1, 2, 3, 4}.

EGF, hücre membranlarındaki özel reseptörlere (EGF reseptörü) bağlanarak intrasellüler olaylar serisini başlatırlar ⁵. EGFR aktivasyonu tümör büyümesini ve ilerlemesini stimüle eder, proliferasyonu artırır ve anjiyogenesis, invazyon, metastaz ve apoptozis inhibisyonunu sağlar ^{6, 7}. Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin dört üyesinden biri olan HER2, tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörüdür ve normal durumda hücre büyümesi ve çoğalmasında rol alır ^{2, 8}.

EGF reseptörleri, tip 1 reseptör kinaz olarak da bilinir. EGF reseptörünün fizyolojik olmayan aktivasyonu, kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile sonuçlanır. Birçok insan tümöründe EGF reseptörünün aşırı miktarda ekspresyonu kötü prognozla ilgilidir ⁹. HER2 artışı ve aşırı ekspresyonu meme

kanserlerinin %30' unda, ovaryan kanserlerde ve mide kanserinde görülmüştür. EGFR'nin meme, endometriyum ve over kanserli dokularda fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir ¹⁰.

İnsan tümörlerinde EGF reseptörü aşırı miktarda eksprese edildiğinden kanser tedavisinde bu reseptörün inhibisyonu rasyoneldir. Günümüzde inhibisyonu sağlamak için 2 yaklaşım vardır: Monoklonal antikorlar ve EGFR tirozin kinaz inhibitörleridir. Lapatinib oral alınan, küçük molekül yapısında olan bir reversible EGFR ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür ^{11, 12, 13, 14}. Lapatinib küçük molekül yapısında olduğundan hücre içine girerek hem EGFR hem de HER2 reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder ².

Lapatinib'in faz 1 ve 2. denemelerinde birkaç tümör tipine karşı aktivitesine bakılmış ve özellikle meme kanserinde etkisi denenmiştir. Faz 3 çalışmasında ise Lapatinib HER2-pozitif ve HER2-negatif metastatik hastalarda denenmiştir ve sonuç olarak HER2-pozitif meme kanseri hastaların kullanımı için onay almıştır ^{15, 16}. Diğer tirozin kinazlara benzer şekilde, Lapatinib iyi tolere edilebilir. Başlıca toksisitesi kızarıklık (%31), ishal (%65), hand-and-foot sendromu (%53), yorgunluk (%10) ve mide bulantısıdır (%13) ^{12, 16, 17, 18,19, 20, 21, 22}. Lapatinib'in purkinje liflerinde kardiyak APD'yi (aksiyon potansiyel süresini) uzattığı belirtilmiş ayrıca HER2 yolunun inhibe olmasının kardiyak disfonksiyona neden olduğu rapor edilmiştir ^{12, 23}.

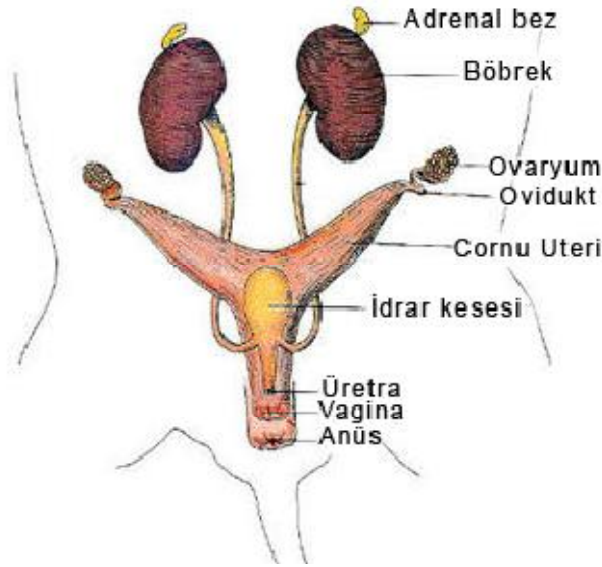
EGFR, overlerde follikül içerisinde granüloza ve teka hücrelerinin yanı sıra korpus luteumda bulunmaktadır ²⁵. İnsanın menstrual siklusunda EGFR ve HER2'nin uterus yüzey ve bez epitel hücrelerinde eksprese edildiği aynı zamanda HER2'nin (c-erbB2 veya neu) overde primordiyal germ hücrelerinde, granüloza hücrelerinde, luteal hücrelerde ve oositte eksprese olduğu ve primordiyal follikül büyümesi, granüloza hücre fonksiyonu regülasyonu, oosit olgunlaşmasında rol oynadığı öne sürülmüştür ^{24, 26}.

EGFR ve HER2'yi inhibe eden Lapatinib'in over ve uterus dokularında yapısal bir değişikliğe yol açıp açmadığını gösteren bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada Lapatinib verilen sıçanların uterus ve over dokularında meydana gelen değişikliklerin ışık ve elektron mikroskopi düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sıçan Over Histolojisi

Yetişkin sıçanlarda ovaryum, folliküllerle dolu bir yapıdır ve böbreklerin kaudalinde, uterusun her iki yanında yer alır. Helezonik yapıdaki ovidukt, ovaryumu bikornual yapıdaki uterusu bağlar (şekil 1.)^{27, 28}.



Şekil 1. Sıçanlarda ürogenital sistemin anatomisi gösterilmiştir²⁷.

Over yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik epitel ile çevrili olup mezovaryumu çevreleyen mezotelyum ile devam eder. Sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea germinal epitelin hemen altında uzanır.

Kesitlerde over korteks ve medulladan meydana gelir. Overin medullayı saran periferik kısmında yer alan korteks zengin hücresel bağ dokusuna yerleşik ovaryan folliküller içerir. Stroma, retiküler liflerden oluşan bir ağ ile fibroblast ve düz kas hücre özelliği gösteren iç şekilli hücrelerden oluşmuştur. Burada elastik doku çok az olup yalnızca kan damarları duvarında ve germinal epitelin altında bulunur. Stromal hücreler teka folliküllerinin büyümesine katkıda bulunur. Follikülleri gelişiminin farklı evrelerinde görebiliriz. Puberteden önce

yanlızca primordiyal folliküller görülür. Seksüel olgunluk, gelişen folliküller ve onların son ürünlerinin (korpora lutea, atretik follikül) varlığı ile karakterizedir. Menapozdan sonra folliküller kaybolur ve sonunda senil korteks ince bir fibröz bağ dokusu tabakası haline gelir. Medulla korteks arası sınır belirgin değildir^{29, 30, 31, 32}.

Medulla, ovaryumun en iç kısmında yer alıp, hilumda mesovaryumun vasküler bağ dokusu ile birleşen gevşek fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Çok sayıda geniş kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler içermektedir^{30, 31, 32}.

2.1.1. Ovaryan Folliküller

Folliküllerin gelişme döneminde, primordiyal folliküller, gelişen folliküller (primer follikül, sekonder follikül, tersiyer follikül) ve olgun folliküller (Graaf follikülü) olmak üzere 3 tip ovaryan follikül tanımlanabilir.

2.1.1.1. Primordiyal Follikül

Olgun overde korteksin stroması içerisinde, hemen tunika albuginea'nın altında kortikal bölgenin en üst katmanında yer alır. Primordiyal folliküller, folliküller içerisinde en küçük ve en fazla olanıdır. Primordiyal folliküller 17-20 mikron kadar çapa sahip olup merkezi yerleşimli primer oosit tek tabakalı yassı follikül hücreler ile çevrilidir. Oosit, geniş veziküler bir çekirdek ve belirgin bir çekirdekçik ile sitoplazmasında annulate lamella, belirgin bir Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyonlar ve küçük vesiküller içerir. Follikül hücrelerinin altında bir bazal lamina bulunur ve follikülleri, onları çevreleyen stromadan ayıran sınırı oluşturur^{29, 30, 31, 32, 33}.

2.1.1.2. Gelişen Folliküller (Büyüyen Folliküller)

Folliküllerin büyümesi, hipofizden salgılanan FSH (follikül uyarıcı hormon) tarafından uyarılır. Puberteden sonra aşamalı bir şekilde ovumun büyüme ve diferansiyasyonu, folliküler hücrelerin proliferasyonu ve çevre stromadan bağ dokusu kapsülünün gelişmesi ile karakterize follikül gelişimi gerçekleşir.

Primer follikül büyüyen follikül gelişiminin ilk fazıdır. Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem folliküler büyümenin birinci evresidir. Nükleus büyür, mitokondriyonların sayısı artar, endoplazmik retikülümü genişleme gösterir. Oosit büyüdükçe zona pellusidayı oluşturan spesifik proteinleri salgılar. Zona pellusida glikoprotein yapısında olup oosit ve komşu folliküler hücreler arasında yer almaktadır. Follikül hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yassı şekilli follikül hücreleri önce kübik sonra prizmatik hale geçerler. Aktif şekilde bölünerek ovumun etrafında çok katlı bir tabaka oluştururlar. Bu tabaka stratum granülozum olarak bilinir ve granüloza hücrelerinden oluşmuştur. Bu hücreler 'gap junctionlar' aracılığıyla iletişim kurar. Bu durumdaki follikül primer follikül olarak adlandırılır.

Primer follikülün hacmi arttığında, komşu ovaryan stroma teka follikülü olarak adlandırılan bir kapsül şeklinde düzenlenir. Teka follikülü stratum granülozadan bir bazal membran ile ayrılmış olup 2 tabakaya farklanır.

Teka interna iç tabakayı oluşturur. Oldukça vaskülarize olan bu tabaka salgılayıcı stromal hücreler içerir. Salgılayıcı hücreler LH stimülasyonuna cevap olarak östrojen prekürsörleri olan androjenleri sentez ederler. Bu salgılayıcı hücrelerin yanı sıra teka interna fibroblast, kollajen demetleri, zengin bir ağ oluşturan küçük damarları da içermektedir. Teka internayı çevreleyen teka eksterna, başlıca, iğ şekilli hücreler ve sıkıca paketlenmiş kollajen lif demetleri içermektedir. Teka tabakaları arasında ve teka eksterna ile çevre stroma arasındaki sınır belirgin değildir. Bununla birlikte granüloza hücreleri ve teka interna arasındaki bazal lamina kesin bir sınır göstermektedir ^{29, 30, 31, 32}.

Sekonder follikül sıvı dolu antrum ile karakterizedir:

Folliküller esas olarak granüloza hücrelerinin boyut ve sayıca artmasıyla büyüdükçe kortikal bölgenin daha alt bölgelerine doğru göç ederler. Folliküler hücreler proliferasyona devam eder ve proliferasyon ovumun bir tarafında daha hızlı meydana gelmektedir, böylece follikül ovoid şekil alır ve ovum eksantrik pozisyona sahip olur. FSH, büyüme faktörleri (EGF, insülin benzeri büyüme faktörü 1 IGF-1), kalsiyum iyonları oosit ve folliküler büyüme için gereklidir. Stratum granülozum tabakası 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında granüloza hücreleri arasında sıvı dolu kavite gözlenir. Bu hyaluronik asitten

zengin sıvı likör follikülü adını alır ve granüloza hücreleri arasında birikir. Sıvıyı içeren kaviteler birleşir ve daha büyük bir kavite olan antrumu oluşturur. Follikül bununla birlikte sekonder ya da antral follikül olarak adlandırılır.

Granüloza hücre grubu ile çevrilmiş olan ovum bir tarafından baskıya uğrar ve bunun sonucunda antrum kavitesinin içerisine doğru belirgin bir uzantı meydana gelir. Bu şekildeki eksantrik küme kümülüs ooforus olarak bilinir. Ovum ile direkt ilişkili olan kümülüs ooforusun granüloza hücreleri radyal şekilde düzenlenerek korona radiatayı oluşturur ve ovumdan zona pellusida ile ayrılmıştır. Elektron mikroskopik çalışmalar korona radiata hücrelerinin sitoplazmik uzantılarının zona pellusida boyunca uzanarak ovumun hücre membranı ile ilişki kurduğunu göstermiştir. Ayrıca ovumun mikrovillöz oluşumları da zona pellusida içerisine geçmektedir. Granüloza hücreleri, antrum kavitesi etrafında çok katlı epitel yapısındaki membrana granülozayı oluşturur ve düzenli olarak devam eder^{30, 31, 32}.

2.1.1.3. Olgun Follikül (Graaf follikülü)

Olgun follikül ya da graaf follikülü olarak adlandırılan bu ovulasyon öncesi follikül son derece büyüktür ve çapı 10mm veya daha fazla olabilir. Graaf follikülü LH dalgalanmasından sonra gözlenir²⁹. Graaf follikülü korteksin derinliğini kaplar ve ovaryum yüzeyinden dışarı doğru şişkinlik yapar. Bu bölge stigma olarak adlandırılır. Burada tunika albuginea ve teka follikülü incelmıştır. Sıvının varlığı ile gerilmiş olan geniş antrum membrana granüloza ile sarılmıştır. Ovum en büyük hacmine sahip olup zona pellusida ve korona radiata ile çevrilmiştir. Follikül maksimum büyüklüğüne ulaştığında granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalmaktadır. Antrum genişliği arttıkça granülozum tabakası incelmeye başlar. Granüloza hücreleri arası boşluk arttıkça oosit ve kümülüs hücreleri ovulasyon için giderek geriye kalan granüloza hücrelerinden ayrılmaya başlar. Kümülüs hücreleri oositi çevreler korona radiatanın tek tabakalı hücre formunu oluşturur. Ovulasyonda bu hücreler ve gevşek bağlanmış kümülüs hücreleri oosit ile birlikte kalır. Follikül olgunlaşmasının bu periyodu boyunca teka follikülü en ileri gelişimindedir. Yağ damlacıkları teka interna hücrelerinin sitoplazmasında gözlenir ve hücreler steroid salgılayan endokrin hücre

özelliğindedir. Teka eksterna kollajen lifler ve iç şekilli hücrelerden oluşmuştur ve salgılama fonksiyonu göstermez^{30, 31, 32}.

2.1.1.4. Ovulasyon

Ovulasyon, olgun follikül duvarının yırtılması ve oositin serbest kalmasıdır; serbest kalan oosit tuba uterinanın infundibulum kısmından içeri girer. Follikül olgunluğa eriştiğinde likör sıvısı sekresyonunda artma görülür ve follikül çapı genişler. Follikül duvarının küçük bir kısmı, tunika albugineadaki kollajen yıkımı, iskemi ve bazı hücrelerin ölmesi nedeniyle zayıflar. Folliküler sıvı basıncındaki artış ve büyük olasılıkla düz kas hücrelerinin kasılmasıyla birlikte bu zayıflama, follikül dış duvarının yırtılmasına ve ovulasyona yol açar. Follikül, stigma bölgesinden yırtılır ve follikül sıvısı peritoneal kaviteye sızar. Korona radiata hücreleri ve zona pellusida ile çevrili olan ovum follikül sıvısı ile birlikte peritoneal kaviteye atılır. Ovumun fertilize olma kapasitesi 24 saattir^{30, 31, 32, 34, 35}.

2.1.1.5. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra, follikülün granüloza ve teka interna hücreleri, luteinizasyon geçirerek korpus luteum veya luteal bez olarak adlandırılan geçici bir içsalgı bezi oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Korpus luteum ovaryumun korteks bölgesinde yerleşir. Follikül sıvısının boşalması ile follikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Follikül boşluğuna bir miktar kanama olur; bu kan pıhtılaşır ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteumun en iç kısmını oluşturur. Follikülün granüloza hücreleri büyük, soluk boyanan, geniş vesiküler çekirdeğe sahip hücrelere değişir. Sitoplazmada lipid damlacıkları, lipofuksin pigment granülleri, dağınık şekilde tübüler tip kristallara sahip mitokondriyonlar ve fazla sayıda agranüler endoplazmik retikülüm ile granüler endoplazmik retikülüm sisternaları bulunur. Şekil değiştirmiş granüloza hücreleri ise granüloza lutein hücreleri adını alır ve folliküler kavitenin etrafında katlantılı bir tabaka oluşturur. Bu hücreler steroid salgılayan hücrelerin özelliklerine sahiptir.

Teka internanın hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturarak korpus luteumun oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hücreler granüloza lutein hücrelerine benzer yapıda fakat daha küçüktürler ve daha koyu boyanırlar.

Folikülün granüloza hücrelerini teka interna tabakasından ayıran bazal lamina depolarizasyona uğrar ve çok sayıda kapillerler ve tekadan gelişen bağ dokusu lutein yığını istila eder. Fibroblastlar bütün korpus luteum boyunca ince bir retikülüm oluştururlar ve luteal hücrelerin iç yüzeyinde daralmış folliküler kavite ile ilişkili devamlılık gösteren bir örtü meydana getirirler.

Ovumu atan follikülün hücrelerinin yeniden düzenlenmesi ve korpus luteum oluşumu, ovulasyon öncesinde salgılanan LH'nin uyarısı sonucu gerçekleşir. Yine, LH uyarımıyla korpus luteum hücrelerinin enzimlerinde değişiklik olur ve korpus luteum progesteron ve östrojenleri salgılamaya başlar^{29, 30, 31, 32, 35}.

Atılan ovum fertilize olmazsa korpus luteum maksimum gelişmesine uğrar ve sonradan dejenere olmaya başlar. Bu yapıya menstruasyon korpus luteumu denir. Zengin vaskülarizasyon azalır ve hücrelerin hacmi küçülerek yağ dejenerasyonuna uğrar. Lutein hücreleri arasındaki bağ dokusu miktarı artar ve hyalinizasyona uğrar; korpus luteum aşamalı olarak beyaz bir nedbe dokusu olan korpus albicans'a dönüşür. Sıçanda bu yapı tam regresyon gösterir ve over içerisinde hiç fibröz doku kalıntısı bırakmaz³⁴.

Ovum fertilize olursa, korpus luteum büyür ve gebelik korpus luteumu adını alır. Hücreler gebeliğin orta aylarına kadar büyümeye devam eder ve ardından gerileme başlar. Oluşan korpus albicans menstruasyon korpus albicansından daha büyüktür^{30, 31, 32, 35}.

2.1.1.6. Follikül Atrezisi

Çok sayıda primer follikül olgunlaşma sürecine başlar; ancak, yalnızca bir follikül gelişimini tamamlar, diğerleri atrezi denilen bir olayla dejenere olur. Folliküller, gelişimlerinin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilir^{36, 37, 38}.

Atretik folliküller; glassy membran denilen kalın, kıvrılmış membranöz materyal, çok değişikliğe uğramamış zona pellusida, dejenere olmuş oosit, follikül hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile ayırt edilir³⁵.

Primordiyal folliküllerde atrezi başlangıç olarak ovum içinde görülür. Bunu folliküler hücrelerin dejenerasyonu takip eder. Primordiyal follikül atrezisinde oluşan boşluk stromal doku ile doludur. Primordiyal, küçük ve gelişen folliküllerin atrezisinde immatur oosit küçülmeye başlar ve dejenere olur. Benzer değişiklikler granüloza hücrelerinde de görülür. Atretik folliküller tekrarlayan apoptozisin sonucu olarak küçülür ve dejenere olur. Dejenere olan hücreler reabsorbe olup görünmez hale gelince etrafındaki stromal hücreler daha önce follikül bulunan boşluğa göç ederler ve atretik follikül varlığı yok olur^{30, 31, 32, 35}.

Gelişen follikülün atrezisi biraz daha karmaşıktır. Primordiyal folliküldeki gibi dejeneratif belirti ovum içerisinde ve folliküler hücrelerde görülür. Gelişen folliküllerde atrezi ilk olarak granüloza hücrelerinde görülür. Granüloza hücrelerinde apoptozis başlar, mitoz durur. Granüloza hücreleri içinde endonükleaz ve diğer hidrolitik enzimlerin ekspresyonu meydana gelir. Granüloza tabakasında çok miktarda nötrofil ve makrofaj izlenir. Granüloza hücreleri antrum içerisine dökülür. Teka interna hücreleri hipertrofiye uğrar. Glassy membranın kalınlığı artar. Follikül yıkımı ve dejenerasyonu devam eder. Bağ doku follikül antrumuna doğru ilerler. Sonuçta oluşan bağ dokusu yığını görünüş olarak korpus albikansa benzer, fakat daha küçüktür buna korpora atretika denir^{30, 31, 32, 35}.

Kemirgenlerde tersiyer folliküllerin dejenerasyonu ovaryan stroma içerisinde interstisyel hücrelerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu hücreler teka interna hücrelerinden oluşur ve genellikle dejenere zona pellusida kalıntıları çevresinde düzenlenmektedir. Sonunda interstisyel hücreler küçük kümeler halinde ayrılmakta ve medullaya yayılmaktadır³³.

Ovaryan atrezinin asıl mekanizmasının apoptozis olduğu kabul edilmektedir. Geniş antral follikülün atrezisinde, apoptotik granüloza hücrelerinde çekirdekte kromatin marjinasyonu, sitoplazmik vakuolizasyon, sitoplazmik çıkıntılar, sitoplazmik ve nüklear kondensasyon ve fragmentasyon gözlenmektedir. Yapılan bir çalışmada oositlerin ultrastrüktürel özellikleri, organellerin görünüm ve dağılımında değişiklik, mikrovillus kaybı, oositin segmentasyonu olarak değerlendirilmiştir³⁶. Hipertrofiye uğrayan teka interna hücreleri ise interstisyel hücreleri oluşturmaktadır³⁸.

2.1.1.7. İnterstisyel Hücreler

Foliküler atrezi esnasında granüloza hücreleri ile oositler çözülüp bozulmasına rağmen, teka interna hücreleri kortikal stromada çoğu kez tek tek ya da gruplar halinde kalır. Bu hücreler interstisyel hücreler olarak adlandırılır. Bu hücreler küçük lipid damlacıkları içeren, büyük sferoidal hücrelerdir. İnterstisyel hücreler steroid sentezine katkıda bulunurlar. İnsanda, interstisyel hücrelerin östrojenleri salgıladığı görülürken diğer türlerde progesteron üretirler^{31, 32}.

2.2. Sıçan Uterus Histolojisi

Sıçan uterusu bikorn yapıda olup iç mukoza tabakası olan endometriyum, bir yüzey epiteli ile endometriyal stroma olarak adlandırılan kalın bir lamina propriyadan oluşur. Yüzey epiteli lamina propriya içerisine doğru invajine olarak, çok sayıda tübüler tipte uterin bezleri oluşturur. Yüzey epiteli dağınık vaziyette silyalı hücre gruplarını içeren basit prizmatik tiptedir. Uterin bezler yüzey epitelinden başlayarak, stromanın bütün kalınlığı boyunca uzanırlar. Bezler basit tübüler olup miyometriyuma yakın alt bölümlerde dallanma gösterebilirler. Bezler birbirinden stromanın bağ dokusu ile ayrılmışlardır. Stromal hücreler ise düzensiz, yıldız şekilli olup büyük ovoid bir çekirdeğe sahiplerdir. Stroma içerisinde makrofajlara, granüler lökositlere ve lenfositlere rastlanır. Stromal hücreler retiküler ağ çerçevesi içerisinde uzanırlar. Bu retiküler lifler epitel altında bazal laminayı oluştururlar. Endometriyumun miyometriyuma yakın 1/3'lük bazal bölümün yapısı farklıdır. Bu kısımda lamina propriya fibröz bağ dokusundan yapılmıştır. Bezlerin son bölümünü içeren bazal endometriyum bölümüne endometriyum bazalis denir ve periyodik değişikliklere katılmaz. Endometriyumun 2/3'lük yüzeyel kısmı ise endometriyum fonksiyonalis denir ve periyodik değişiklikler gösterir.

Orta tabakada yer alan miyometriyum içte sirküler orta tabakada sirküler ve oblik seyreden kas lifleri, dışta ise longitudinal düz kas tabakası içermektedir. Miyometriyum ise perimetriyum ile devam eder. Perimetriyum tipik seroza olup, gevşek bağ dokusundan oluşur ve tek tabakalı mezotelyal hücreler ile çevrilidir^{28, 30, 32,39}.

2.3. Sıçan Östrus Siklusu

Birçok çalışmada sıçanlar deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. Bunların tercih edilmesinin nedeni çabuk üreyebilmesi, deney uygulamalarında kullanımının ve bakımının kolay olması ve kısa sürede genetik açıdan benzer nitelikte gruplar oluşturabilmesidir ⁴⁰.

Sıçanlar mevsime bağlı olmayan, spontan ovulasyon yapan, poliöstrus memelilerdir yani üreme dönemi boyunca birden fazla kızgınlık evresi görülen hayvanlardır ^{27, 34, 40, 41}.

Postpartum dönem de dahil olmak üzere yaşlanana kadar yıl boyu östrus gösterirler. Sıçanların menstruel döngüsü 14 günde bir meydana gelir ve seksüel siklus 4-5 gün sürer. Gebelik süreleri ise 20-22 gündür ^{27, 34, 40, 42}.

Östrus kelimesi yunanca kökenli olup, Latin adaptasyonu çılgınlık, coşkunluktur. Bu terim ilk defa Heape tarafından kullanılmış olup 'dişilerin seksüel isteklerinin olduğu özel periyod' olarak tanımlanmıştır. Heape üreme sezonu boyunca memelide siklusun belirli evrelerini tanımlamıştır. Anöstrus periyodunu üremenin olmadığı zaman olarak tanımlamıştır ve bu dönemde diş memeli dinlenme halinde olup over ve yardımcı üreme organları sessiz durumdadır. Heape ayrıca östrus periyodlar arasındaki siklus evrelerini tanımlamak için östrus kelimesinin başına pro-, di-, met- eklerini ilave etmiştir. Proöstrus'u hayvanın kızgınlık dönemine girişi, östrusu dişinin erkeği kabul ettiği dönem, metöstrus'u gebelik yokluğunda geçen kısa bir periyod ve diöstrus'u da proöstrustan sonraki farklı türlerde farklı sürelerde olan periyod olarak tanımlamıştır. Bu süre boyunca ovaryan sekresyonlar üreme yollarını ovumu kabul etmesi için hazırlar. Fertilizasyon gerçekleşmezse memeli yeniden proöstrusa döner ve yeni siklus başlar ^{34, 43}.

Siklus boyunca görülen bu evrelerden: Proöstrus 12-14 saat, Östrus 25-27 saat, metöstrus 6-8 saat ve diöstrus ise 55-57 saat sürmektedir ^{27, 34, 42, 43, 44}.

Hormonal salınımlar ön hipofizden gerçekleşir, ovaryum ve folliküler değişimlere neden olan gonadotropinler tarafından düzenlenir. LH atımlı (pulsatile) olarak salınır ve en yüksek frekansa proöstruste, en düşük frekansa östrusta ulaşır. LH atımı GnRH salınımının yüksekliğine bağlıdır. Proöstrus

sırasında salınan LH dalgaları preovulatuvar folliküllerde ovulasyonun meydana gelmesine ve korpus luteum'un şekillenmesine neden olur. İki adet preovulatuvar FSH dalgası küçük folliküllerin gelişimini stimule eder. İlk dalga LH dalgası ile alakalı ve ikinci dalga ovulasyon sonrası inhibindeki azalma ile ilişkilidir. Sıçan folliküllerinde yapılan çalışmalar 17- α -Hidroksilaz ve aromataz mRNA düzeyinin preovulatör LH dalgasından önce artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Metöstrus boyunca, korpus luteum'dan progesteron salınır. Progesteron seviyesi diöstrusta azalır ve artan östradiol-17 β 'ya bağlı olarak folliküler gelişim tekrar başlar. Siklus proöstrusta meydana gelen östrojen piklerinin ovulasyona neden olan gonadotropin salınımını indüklemesi ile tamamlanır. Prolaktinde luteotropik mekanizmaya katılmaktadır, fakat progesteron salınımını doğrudan desteklememektedir ^{27, 41, 45}.

2.4. Lapatinib

Lapatinib son yıllarda geliştirilen, oral olarak alınan, kanserli hücrede sinyal yollarını etkin şekilde inhibe eden, küçük molekül yapısında EGFR ve HER2 tirozin kinaz inhibitörüdür ^{1, 2, 46, 47, 48, 49, 50}. Lapatinib'in faz denemelerinde birkaç tümör tipine karşı aktivitesine bakılmış ve özellikle meme kanserinde etkisi denenmiştir ^{16, 18}. Sonuç olarak Lapatinib US Food and Drug Administration ve European Medicines Evaluation Agency tarafından yalnızca HER2 pozitif meme kanseri hastaların kullanımı için onay almıştır ^{15, 16}.

Meme kanseri hastalarının %20'sinde İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2; ErbB2) yüksek derecede eksprese edilir. HER2 amlifikasyonu agresif fenotip olarak değerlendirilir ^{12, 13}. Lapatinib yeni bir ilaç olup değişik mekanizması ile HER2 sinyalini inhibe etmektedir ⁴⁷. Lapatinib küçük molekül yapısında olduğundan hücre içine girerek hem EGFR hem de HER2 reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. Bu ilacın kullanılmaya başlaması ile HER2 pozitif meme kanserinde metastazların tedavisinde ve adjuvan tedavide sağkalımı uzatmak mümkün olmuştur ². Bu ilaç Trastuzumab'a direnç göstermiş tümöre sahip hastalarda hafiflemeye neden olmuş belki de beraber verildiğinde çok daha etkili olabileceği söylenmiştir. Lapatinib'in metastatik hastalarda kemoterapi ilaçlarıyla kombine tedavide,

yalnız kullanılmayla karşılaştırıldığında daha etkili olduğu söylenmektedir ⁴⁷. Bazı denemelerde ileri HER2 pozitif meme kanserinde Lapatinib'in tek uygulanması veya Capecitabine, Paclitaxel veya endokrin tedavi ile kombine tedavisi etkili ve güvenli bulunmuştur ¹².

Lapatinib intrasellüler çalışır, direk olarak tirozin kinaz alanını hedefler ¹¹. ⁴⁹. Bu küçük molekül tirozin kinazın sitoplazmik ATP bağlayıcı kısmına reversibl bağlanır, reseptör fosforilasyonunu ve aktivasyonunu bloke eder ^{3, 6, 51}. Bu etkileşim proliferasyonu ve sonraki sinyal aktarımını Ras/Raf, mitojen-aktif protein kinaz (MAPKs) ve PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz)/Akt aşağı akım yollarını önler. Apoptosis artışına yol açar ve sellüler proliferasyon azalır ^{11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 46, 52}. Tümör tipine bağlı olarak, Lapatinib uygulanmış hücreler apoptosise gider veya büyümesi durdurulur ¹⁴. EGFR ve HER2'den gelen aşağı akım Erk ve Akt yolları sırasıyla hücre proliferasyonu ve canlılıkta rol alır ⁵².

Lapatinib kan-beyin bariyerini geçer ve merkezi sinir sisteminde meme kanseri metastazında ılımlı etki göstermektedir ^{12, 17}. Ayrıca baş ve boyun karsinomuna karşı da etkilidir ¹⁷.

Diğer tirozin kinazlara benzer şekilde, Lapatinib iyi tolere edilebilir. Başlıca toksisitesi kızarıklık (%31), ishal (%65), hand-and-foot sendromu (%53), yorgunluk (%10) ve mide bulantısıdır (%13) ^{12, 16, 17, 18,19, 20, 21, 22}.

2.5. Epidermal Büyüme Faktörü Ailesi

Hücre bölünmesi ve büyümesinde görevli olan bu makromoleküller, hücre membranlarındaki özgün reseptörlere bağlanarak intrasellüler olaylar serisini başlatırlar. Bu etkileri otokrin, endokrin veya parakrin yollarla yaparlar ⁽⁵³⁾. EGF birçok mezodermal ve ektodermal kökenli hücre için mitojenik özelliktedir. Etkili olduğu hücrelerde iyon alımını, glikolizisi, DNA ve RNA ile protein yapımını artırıcı özellik gösterir ^{53, 54}. Epidermal büyüme faktörü olarak adlandırılan EGF ve reseptörlerinin birçok memeli uterusunda var olduğu bildirilmiştir. Birçok çalışmada da EGF'nin uterus aktivitesi üzerine olan etkileriyle embriyo gelişimi ve implantasyondaki önemli rolleri bildirilmiştir. Gardner ve arkadaşları EGF uyarımının invitro şartlarda sıçan uterusunda kontraksiyona yol açtığını bildirmişlerdir ⁵⁴. EGF, östradiolün uterus üzerine

etkisinin mediyatörü olan bir polipeptid'dir ⁵. Epidermal büyüme faktör ailesi bir yandan steroidin endometriyal büyüme ve endometriyal diferansiyasyonu üzerindeki etkisine sebep olup diğer yandan erken implantasyonun kanıtı olan endometriyumunu atake eden blastosisti saran luminal epitelin oluşumunu indükler ⁵. Ayrıca EGF tirozin kinaz aktivasyonu ile oosit matürasyonunu kontrol etmede fizyolojik bir öneme sahiptir. EGF oositte folliküler gelişimi sağlarken, embriyoda da blastosist başına düşen hücre sayısını arttırarak mitojenik etki ve farklılaştırma etkisi de gösterebilmektedir ⁵⁵.

2.5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ve HER2

Tip 1 tirozin kinaz reseptör ailesi 4 homolog üye içerir: EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2, ErbB3, ErbB4'tür ^{3, 6, 9, 11, 13, 14, 26, 46, 52, 56, 57}. Bu reseptörler ekstraselüler ligand-bağlayıcı alan, tek transmembran alan ve intraselüler tirozin kinaz alanına sahiptir ^{9, 13, 14, 56}.

Memeli türlerinde, bu reseptör ailesinin üyeleri bazı organlarda yerleşmiştir ve aktivasyonları hücrenin büyümesi, göçü, proliferasyonu, değişimini içerir ^{6, 8, 18, 26, 46, 52}.

Reseptörler tek ünit olarak inaktiflerdir fakat ligand bağlanınca (EGF ve diğer ligandlar tarafından aktive edildiğinde) reseptörler aktif dimer oluştururlar Dimer oluşumu internal tirozin kinazın aktivasyonunu sağlar ve protein fosforilasyonu katalizlenir ⁵⁶. Daha sonra hücre sitoplazmasında Ras proteini aktivasyonu ve sonucunda MAPK (mitojen-aktif protein kinaz) fosforilasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir (Ras, raf, MAPK, PI3K, ERK1 ve ERK2 yolları aktive olmaktadır) ^{18, 56, 57}. Bu sinyal dizisi çekirdeğe uzanır ve siklin bağımlı kinazlar aracılığı ile hücre bölünmesi, çoğalması, motilitesi, sağkalımı artırılmaktadır ^{6, 9, 56, 58}.

EGF reseptörünün fizyolojik olmayan aktivasyonu, kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile sonuçlanır. Bir çok insan tümöründe EGF reseptörünün aşırı miktarda ekspresyonu kötü prognozla ilgilidir ^{9, 58}. EGFR'nin aşırı ekspresyonu çeşitli insan kanser tiplerinde örneğin gastrointestinal sistem kanserlerinde, kolorektal kanseri, göğüs kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri ve mesane kanserinde tanımlanmıştır ^{20, 22, 46}. EGFR'nin meme,

endometriyum ve over kanserli dokularda fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir ⁶. Meme tümör biyopsilerinde EGF reseptörlerinin fazla miktarda bulunması, hormon reseptörlerinin aksine kötü prognozu gösterir ⁵⁹. EGFR ayrıca overlerde follikül içerisinde granüloza ve teka hücrelerinde bunun yanı sıra korpus luteumda bulunduğu söylenmiştir ²⁵.

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin dört üyesinden biri olan HER2 185 kD ağırlığında olup, tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörüdür ^{2, 8, 49, 58}. Normal durumda hücre büyümesi ve çoğalmasında rol alır ⁸. Bunların ekstrasellüler alanına ligand bağlanınca, HER2 proteinleri dimerizasyona gider ve bunların intrasellüler alanını transfosforile eder. HER2'nin güçlü katalitik kinaz aktivitesi vardır ve bu reseptörü içeren heterodimerler güçlü sinyal aktivitesine sahiptir ^{2, 47}. HER2/neu geninin amplifikasyonu kanser hücre yüzeyindeki HER2 reseptörlerinin sayısında normal meme epitel hücrelerine oranla 50-100 kat artışa yol açar. Transgenik farede HER2/neu onkogeninin aktiflenmiş olması, meme kanseri gelişimiyle sonuçlanmıştır. Çoğu meme kanserinde (%85) dominant olarak rol almaktadır ve olguların %20'sinde artışı görülür ^{47, 48, 60}. HER2 artışı ve aşırı ekspresyonu meme kanserlerinin %30' unda, overyan kanserlerde ve mide kanserinde görülmektedir ⁴⁶. HER2 (c-erbB2 veya neu) overde primordiyal germ hücrelerinde, granüloza hücrelerinde, luteal hücrelerde ve oositte eksprese olmaktadır. Yapılan bir çalışmada HER2'nin granüloza hücre fonksiyonu regülasyonunda ve oosit olgunlaşmasında rol aldığı öne sürülmüştür. HER2 ayrıca primordiyal follikül büyümesinin başlaması ve EGF rolünü düzenleyen anahtar sinyal molekülü olarak aracılık etmektedir ²⁴.

İnsan menstrual siklusunda ErbB/HER ailesinin bütün üyelerinin uterus yüzey ve bez epitel hücrelerinde eksprese edildiği rapor edilmiştir. ErbB1/HER1 sıçan ve fare uterusunda da gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar ErbB2/HER2'nin fare uterusunda EGF ilişkili büyüme faktörünün stimülasyonunda potansiyel mediatör olarak rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca bazı türlerde bu reseptörün uterin epitelyal hücrelerde eksprese edildiği, implantasyon için uygun şartların oluşması ve hamileliğin erken safhasında embriyonun beslenmesinde rol alabileceği kaydedilmiştir ²⁶.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda deney sırasında yapılan tüm işlemler 1986 Uluslararası Strasbourg Hayvan Hakları Evrensel Beyannemesine uygun olarak, Etik kurul onayı ile Veteriner hekim kontrolünde Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (TIBDAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı

Çalışmamızda 8-12 haftalık, 200-220 gr ağırlığında 24 adet Wistar albino türü dişi sıçan kullanıldı. Deney sırasında gebe olma olasılıklarını ortadan kaldırmak amacıyla 3 hafta süre ile erkeklerden izole edilerek 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık siklusunda bırakılan sıçanlar, ortam ısısı 22°C' de sabit tutularak paslanmaz tel kapaklı plastik kafesler içerisinde tutuldu. Kafeslere altlık olarak yerleştirilen talaşlar 4 güne bir değiştirildi. Sıçanlara adlibidum olarak hazır palet yem ve çeşme suyu verildi. 3 hafta sonunda 16 adet sıçan deney grurubu olarak 2 kafese (her kafeste 8 adet), 8 adedi ise kontrol grubu olarak ayrı kafeslere konuldu. Sadece deney grubunu oluşturan sıçanlara farklı dozlarda Lapatinib uygulandı, kontrol grubuna ise aynı doz ve sürede distile su verildi. Lapatinib'in dişi üreme sistemine olan etkilerini incelemek için kontrol ve deney gruplarına ait hormon düzeyleri, over ve uterus morfolojik verileri karşılaştırıldı.

3.2. Deneyin Yapılışı

Deneye başlanılan gün deney ve kontrol grubuna ait sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Tablet halinde bulunan Lapatinib havanda ezilerek toz haline getirildi. Deney grubu dozları 1.grup: 30mg/kg Lapatinib, 2.gruba: 75mg/kg Lapatinib, kontrol grubu: distile su olarak uygulandı⁶⁷. Çözünürlük ise 10mg/1ml distile su olarak belirlendi⁶⁸. Distile suda hesaplanarak çözündürülen Lapatinib sıçanlara oral gavaj yoluyla sabah ve akşam günde 2 kez olmak üzere 14 gün boyunca verildi⁶⁷. Deneyin sonunda anestezi altındaki tüm hayvanlardan biyokimyasal

analizler (FSH, LH, Östrojen, Progesteron) için intrakardiyak kan örnekleri, ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik inceleme için over ve uterus dokuları alındı.

3.3. Kan örneklerinin, over ve uterus dokularının alınması

Genel anestezi için 10 mg/kg Rompun (%2'lik, Bayer) ve 80 mg/kg Ketamin (Ketalar, Parke-Davis) insülin enjektörüne çekilerek intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Uyutulan sıçanlardan hormonal tetkik için 3 cc intrakardiyak kan alınmasının ardından abdominal bölgesi silinerek bistüri ile deri insizyonu yapıp overleri ve uterusu açığa çıkarıldı. Kalpten alınan kanlar 3600 devirde 3 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma kısmı ayrıldı. Serum kısmı başka bir epandorf tüpe konuldu ve -20 °C'de bekletildi. Serum örnekleri daha sonra Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına verilerek E 170 İmmunoassay (Roche, Almanya) yöntemi ile kan serum düzeyinde östrojen, progesteron, FSH ve LH seviyeleri ölçüldü.

Over ve uterus doku örnekleri, ışık mikroskopik inceleme için 1 adet over ve uterusun yarısı Bouin solüsyonu ve elektron mikroskopik inceleme için 1 adet over ve geri kalan uterus %5'lik glutaraldehit solüsyonları içerisine alınarak doku takibi yapıldı.

3.4. Işık Mikroskopi Yöntemleri ⁶¹

Bouin solüsyonu içerisine alınan dokular 4 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra %50'lik alkolde 4 saat bekletilerek pikrik asitin uzaklaşması sağlandı. 2 saat %70'lik alkolde bekletilen dokular, takibe kadar %70'lik alkole alındı ve 1 gece bekletilerek Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile rutin doku takipleri yapıldı. Bloklama işleminin ardından mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan parafin kesitler, Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı ve Olympus BX50 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda incelenerek resimleri çekildi.

3.5. Elektron Mikroskopi Yöntemleri ⁶²

Elektron mikroskopik değerlendirme için alınan over ve uterus doku örnekleri Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış, %5'lik glutaraldehit solüsyonu

içerisine konuldu. +4 C'de 1 saat kadar bekletilen doku parçaları içerisinde bir miktar %5'lik glutaraldehit bulunan dibi dışı mumu ile kaplanmış, petri kutularına alınarak jilet yardımıyla yaklaşık 1 mm³ büyüklükte parçalara ayrıldı. Doku parçaları daha sonra tekrar 3 saat süreyle %5'lik glutaraldehit solusyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra, dokular Millonig fosfat tamponu ile çalkalandı ve bir gece boyunca bu solusyonda yıkandı. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetraoksit solusyonu ile ikinci kez tespit edildi. İkinci tespitten sonra dokular tekrar Millonig fosfat tamponu ile iki defa 10'ar dakika süreyle yıkandı ve derecesi giderek artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Elektron mikroskopik doku takip yöntemleri

SOLUSYON	SÜRE (DAKİKA)	SICAKLIK (°C)
%50 Etil alkol	15	+4
%70 Etil alkol	15	+4
%86 Etil alkol	15	+4
%96 Etil alkol	15	+4
%100 Etil alkol	10	+4
%100 Etil alkol	10	+4
%100 Etil alkol	10	Oda ısısında
Propilen oksit	15	Oda ısısında
Propilen oksit	15	Oda ısısında

Son %100'lük etil alkol safhasına kadar olan işlemler +4 °C'de buz dolabında sonraki işlemler ise oda ısısında yapıldı. Dehidratasyondan sonra doku parçaları:

1 hacim propilen oksit + 1 hacim gömme materyali ile 30 dakika

1 hacim propilen oksit + 1 hacim gömme materyali ile 30 dakika immerse edildi.

Bu işlemlerden sonra doku parçaları, içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (rezin) bulunan tüplere alındı ve bir gece süreyle rotatorda (döndürücü) karıştırıldı.

Gömme materyali:

Araldit	CY 212	20 ml
Sertleştirici	HY 964	20 ml
Hızlandırıcı	DY 064	0,6 ml
Plastikleştirici-dibütil ftalat		1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak Beem kapsüllere gömüldü ve 60 °C etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomuyla alınan yarı ince kesitlerin değerlendirilmesini takiben 500 A° kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı. %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyanan kesitler JEOL-JEM, 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda 3 gruba ait tüm hayvanlardan biyokimyasal analizler için alınan intrakardiyak kan örneklerinde FSH, LH, Östrojen, Progesteron değerleri ölçüldü. Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizinde SPSS 11.0 paket programı kullanılarak değerler Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı. Farklılığın bulunduğu gruplar Mann-Whitney U testi ile araştırılıp, tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda anestezi altındaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde östrojen, progesteron, FSH ve LH değerleri incelendi. FSH ve LH değerlerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Östrojen ve progesteron değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre grup 1 ve grup 2'de değerlerin azaldığı izlendi. 2. grupta azalma daha belirgindi (Tablo 2, Grafik 1-2).

Tablo 2. Deney sonunda sıçanlardan intrakardiyak alınan kan örneklerindeki serum FSH, LH, östrodiol ve progesteron ortalama değerleri ve standart sapmaları. (p<0,05)

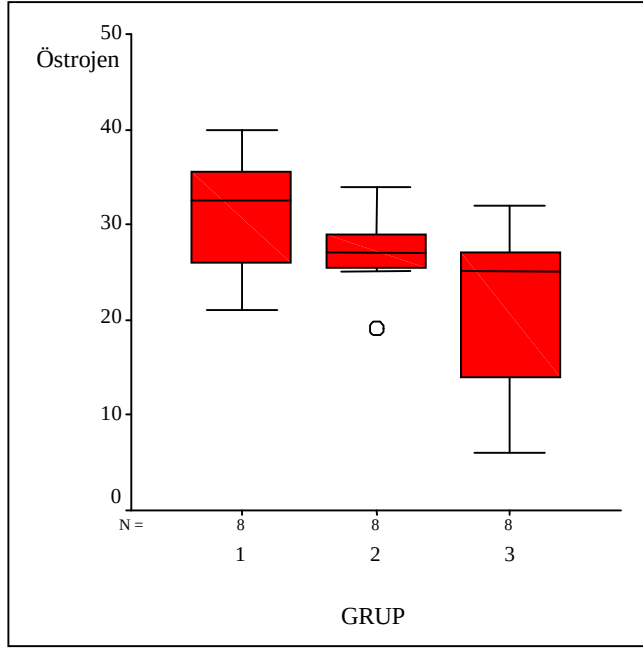
	FSH Ort±SS Medyan(min-max)	LH Ort±SS Medyan(min-max)	Östrojen Ort±SS Medyan(min-max)	Progesteron Ort±SS Medyan(min-max)
Kontrol	0,077±0,031 0,100(0,04-0,10)	0,100±0,000 0,100(0,10-0,10)	0,318±0,677 0,32(0,21-0,40)	0,294±0,956 0,26(0,14-0,40)
Grup 1 (30 mg/kg)	0,06±0,04 0,1(0,01-0,10)	0,100±0,000 0,1(0,10-0,10)	0,270±0,427 0,270(0,19-0,34)	0,239±0,130 0,185(0,118-0,40)
Grup2 (75 mg/kg)	0,100±0,000 0,100(0,10-0,10)	0,100±0,000 0,100(0,10-0,10)	0,212±0,894 0,250(0,60-0,32)	0,224±0,121 0,209(0,52-0,40)
p[†]	0,141	1,000	0,047	0,246
P*	0,585	1,000	0,092	0,201
P**	0,063	1,000	0,035	0,110
P***	0,064	1,000	0,153	0,832

[†] Üç grup karşılaştırması

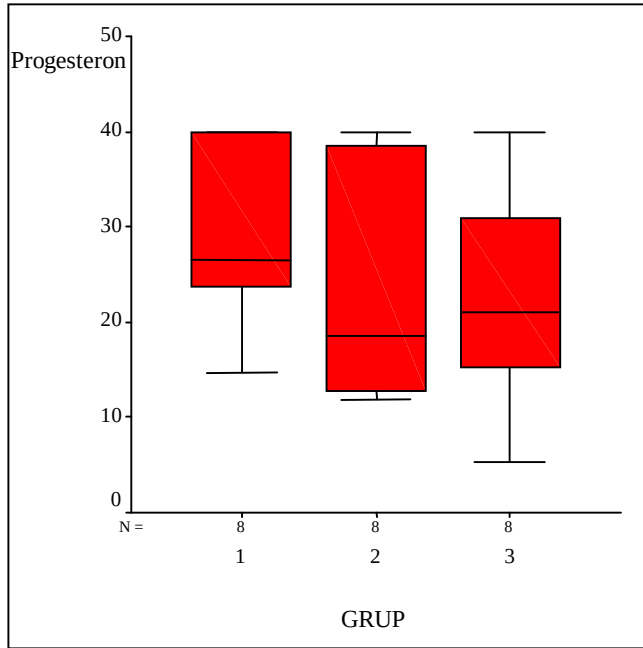
*grup 1 ve grup 2 karşılaştırması

**grup 1 ve grup 3 karşılaştırması

***grup 2 ve grup 3 karşılaştırması



Grafik 1: Kontrol ve deney gruplarına ait östrojen seviyeleri



Grafik 2: Kontrol ve deney gruplarına ait progesteron seviyeleri

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Over Bulguları

Kontrol Grubu: Kontrol grubuna ait over kesitlerinin ışık mikroskopik incelemelerinde over yüzeyinin tek katlı kübik epitel tabakası ile örtülü olduğu izlendi. Yüzey epitelinin altında, sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea bulunmaktaydı. Korteks boyunca yerleşen folliküllerin arasında iğ şekilli stromal hücreler, lifler ve kan damarları yer almaktaydı.

Tunika albugineanın hemen altında, primordiyal folliküller ile gelişimin farklı evrelerindeki folliküller bulunmaktaydı (Şekil 2). Primordiyal folliküllerin, sferikal şekle sahip merkezi yerleşimli oosit ve oositi çevreleyen yassı şekilli folliküler hücrelerden meydana geldiği görülmekteydi. Gelişme sürecine girmiş primer folliküllerin merkezinde, veziküler bir çekirdek ve belirgin bir çekirdekçik içeren geniş sitoplazmalı primer oosit yerleşim göstermekteydi. Oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida bulunmaktaydı.

Sekonder folliküllerde, granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar görülmekteydi. Bu boşlukların birleşmesiyle oluşan antruma sahip gelişen folliküllerin etrafında düzenli bir teka tabakası bulunmaktaydı. Bazı folliküllerde ise atretik değişikliklerin olduğu görülmekteydi. Atreziye giden folliküllerin granüloza hücrelerinde çekirdek densitesinin arttığı ve bazı granüloza hücrelerinin birbirleri ile olan ilişkilerinin bozulduğu izlenmekteydi (Şekil 3).

Korpus luteumlar, büyük, soluk boyanan vesiküler çekirdeğe ve geniş bir sitoplazmaya sahip luteinize hücreler tarafından oluşturulmuştu.

Medullanın ise çok sayıda geniş kan damarları içeren gevşek, fibroelastik bağ dokusundan meydana geldiği görülmekteydi.

Grup I Bulguları (30 mg/kg): Bu grupta yer alan overlerin ışık mikroskopik incelemesinde, kübik şekilli over yüzey epitelinin ve altında uzanan sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albugineanın normal histolojik yapıda olduğu izlendi.

Tunika albugineanın altında yerleşen korteks tabakasında bulunan folliküllerin farklı gelişim aşamalarında olduğu gözlemlendi. Normal morfolojik özellik gösteren folliküllerin yanında yapı olarak histolojik özelliklerini kaybetmiş

folliküller de bulunmaktaydı (Şekil 4). Bu folliküllerde granüloza hücrelerinin birbirleri ile olan ilişkilerini kaybettikleri ve granüloza hücrelerinin antral boşluğa döküldüğü izlenmekteydi. Bununla birlikte gelişimin ileri evresindeki antral folliküllerde granüloza hücrelerinin antral kavitede serbest olarak bulunduğu gözlenmekteydi. Bazı folliküllerde geniş antrumu çevreleyen granüloza hücrelerinin yassılaştığı dikkati çekmekteydi (Şekil 5).

Çok sayıda kan damarı içeren fibroelastik bağ dokusu yapısındaki medulla normal olarak izlenmekteydi.

Grup II Bulguları (75 mg/kg): Bu grupta yer alan over kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, over yüzey epiteli ve sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea tabakası normal yapıdaydı.

Tunika albuginea altında, over korteksi boyunca primordiyal folliküller, primer ve gelişen folliküllerin varlığı izlendi. Az sayıda primordial follikülün yanı sıra atretik folliküllerin diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Atretik folliküllerde, granüloza hücrelerinin birbirlerinden ayrıldığı ve oldukça koyu bir çekirdeğe sahip olduğu görüldü (Şekil 6). Kortekste, normal morfolojiye sahip korpus luteumlar izlendi (Şekil 7).

Merkezi yerleşimli, gevşek, fibroelastik bağ dokusu yapısındaki medulla normal histolojik görünümde olup çok sayıda kan damarı içermekteydi.

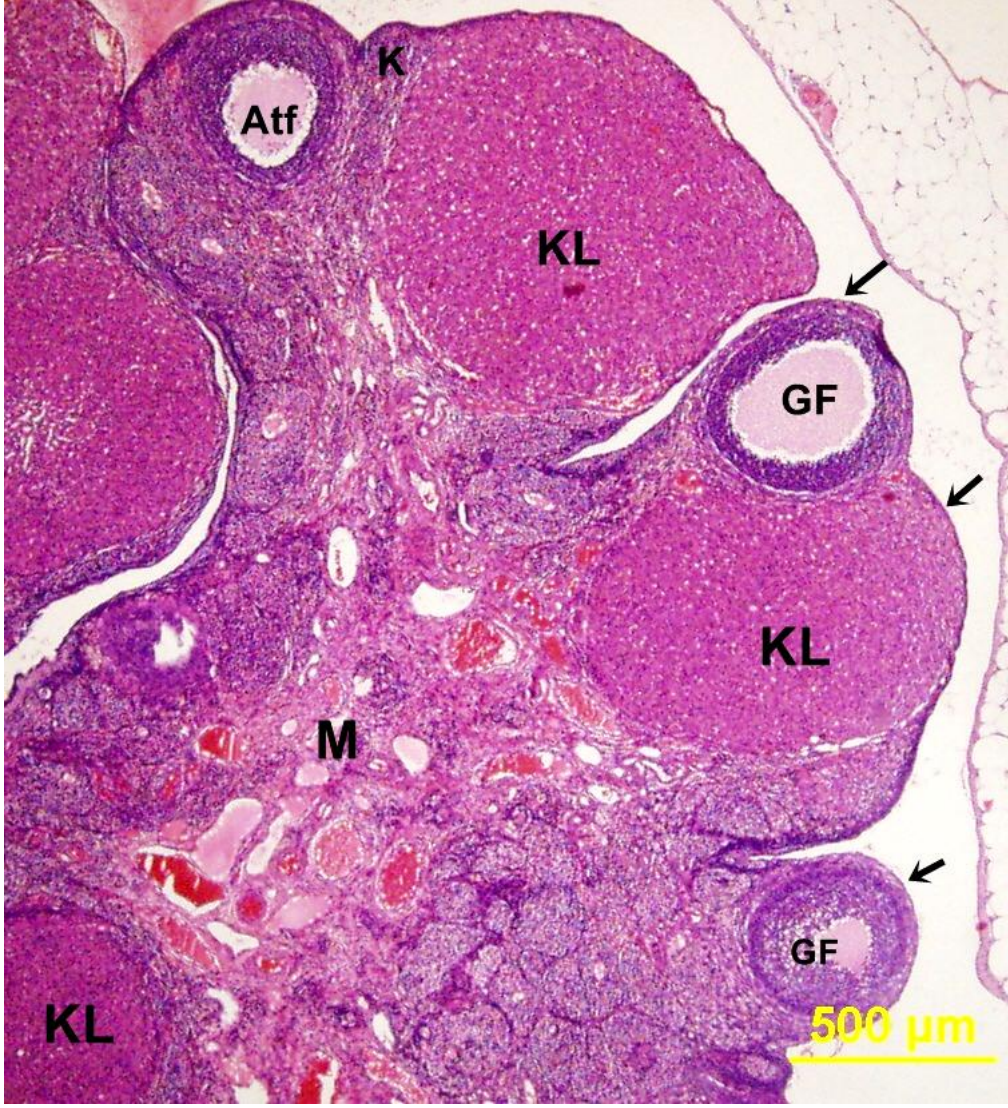
4.2.2. Uterus Bulguları:

Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait uterus kesitleri incelendiğinde yüzey epiteli, endometriyal bezler ve stromadan oluşan endometriyumda; lümeni çevreleyen epitel hücrelerinin prizmatik şekilli oldukları, altında yer alan endometriyal stroma içerisinde tübüler tipte endometriyal bezlerin bulunduğu görülmekteydi. Bezlerin düzgün bir sınır gösterdiği ve alçak prizmatik epitel ile döşeli olduğu izlendi (Şekil 8). Endometriyal stroma içerisinde çok sayıda stromal hücreler, kollajen lifler ve kan damarları yer almaktaydı.

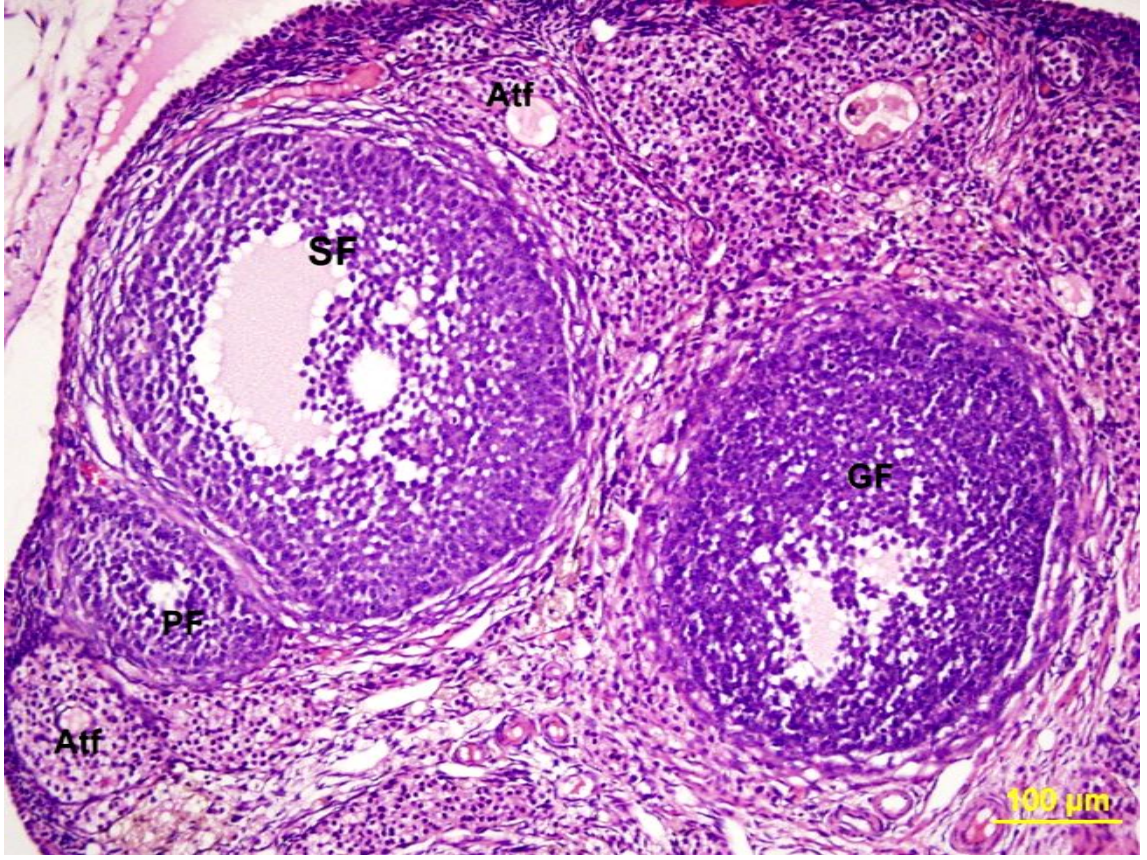
Grup I Bulguları (30 mg/kg): Bu grupta yer alan uterusların endometriyum tabakasında yüzeyde normal yapıda prizmatik epitel bulunmaktaydı. Epitel hücreleri uzun, oval, düzenli sınırlı bazale yakın yerleşimli çekirdeklere sahipti. Epitel altındaki endometriyal stromada yer alan alçak

prizmatik hücrelerle döşeli bezler, bezlerin arasında yerleşim gösteren stromal hücreler normal olarak izlenirken, kollajen liflerin hafifçe arttığı dikkati çekmekteydi (Şekil 9).

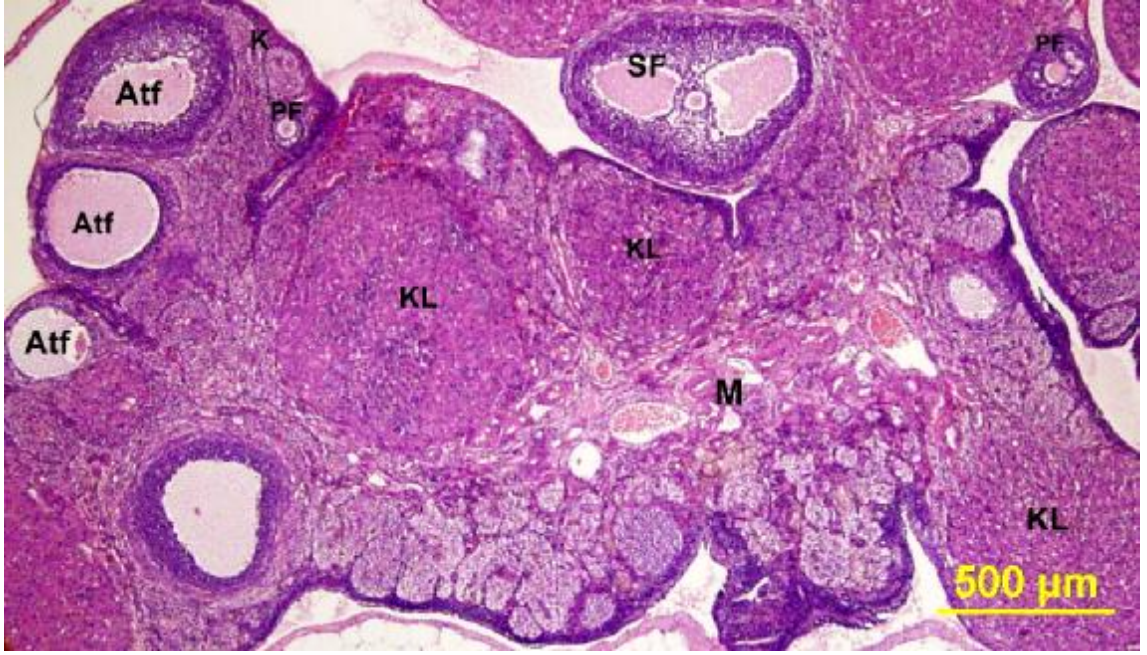
Grup II Bulguları (75 mg/kg): Bu gruba ait uterus kesitlerinde endometriyum yüzeyinin basit prizmatik epitel ile döşeli olduğu ve epitel altında yerleşim gösteren endometriyal bezlerin sayıca azaldığı, bazı alanlarda bezlerin lümenlerinin genişlemiş olduğu ve bez epiteli hücrelerinin yassılaştığı dikkati çekmekteydi. Bezlerin arasını dolduran endometriyal stromanın diğer gruplara göre daha fibröz bir görünüm kazandığı izlenmekteydi (Şekil 10).



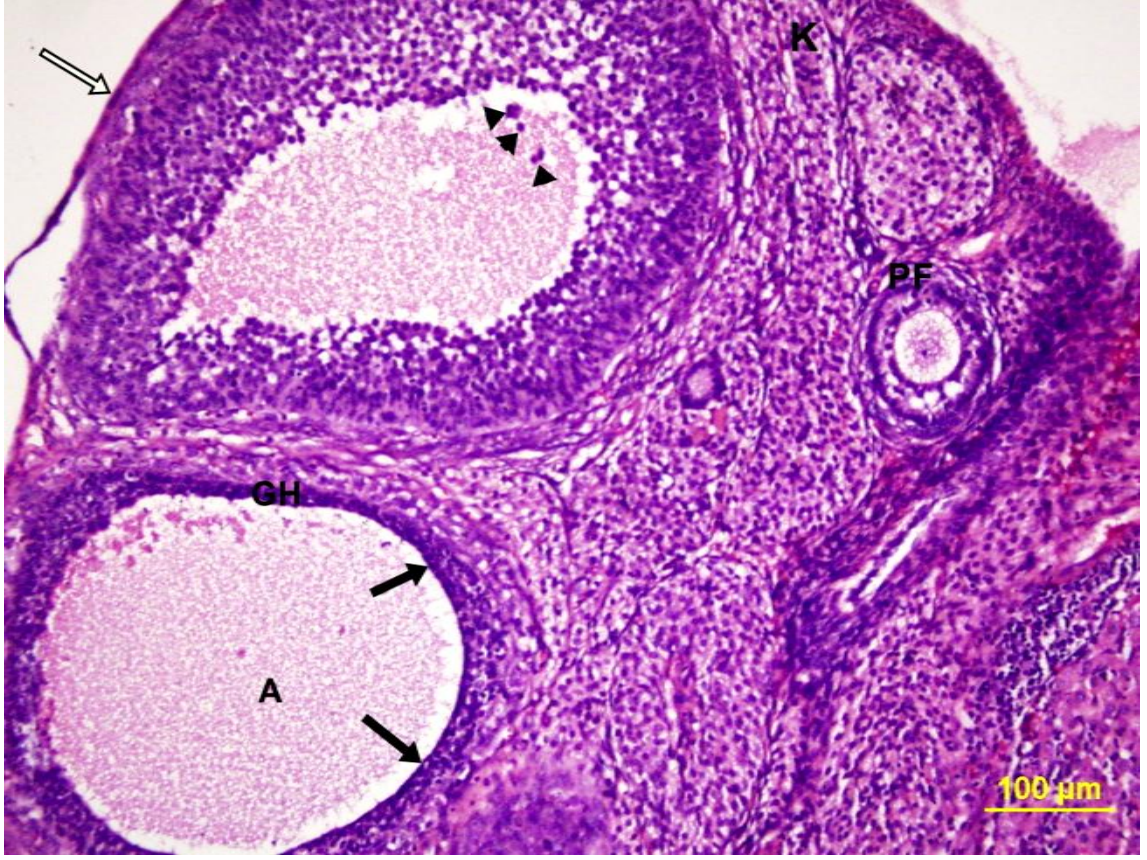
Şekil 2: Kontrol grubuna ait overlerde tek katlı kübik yüzey epitel hücreleri (siyah ok), overin dış kısmını oluşturan korteks (K) ile iç kısımda yerleşen medulla (M) normal yapıda olup over korteksinde bulunan gelişen folliküller (GF), atretik folliküller (AtF) ve korpus luteumlar (KL) izlenmekte.



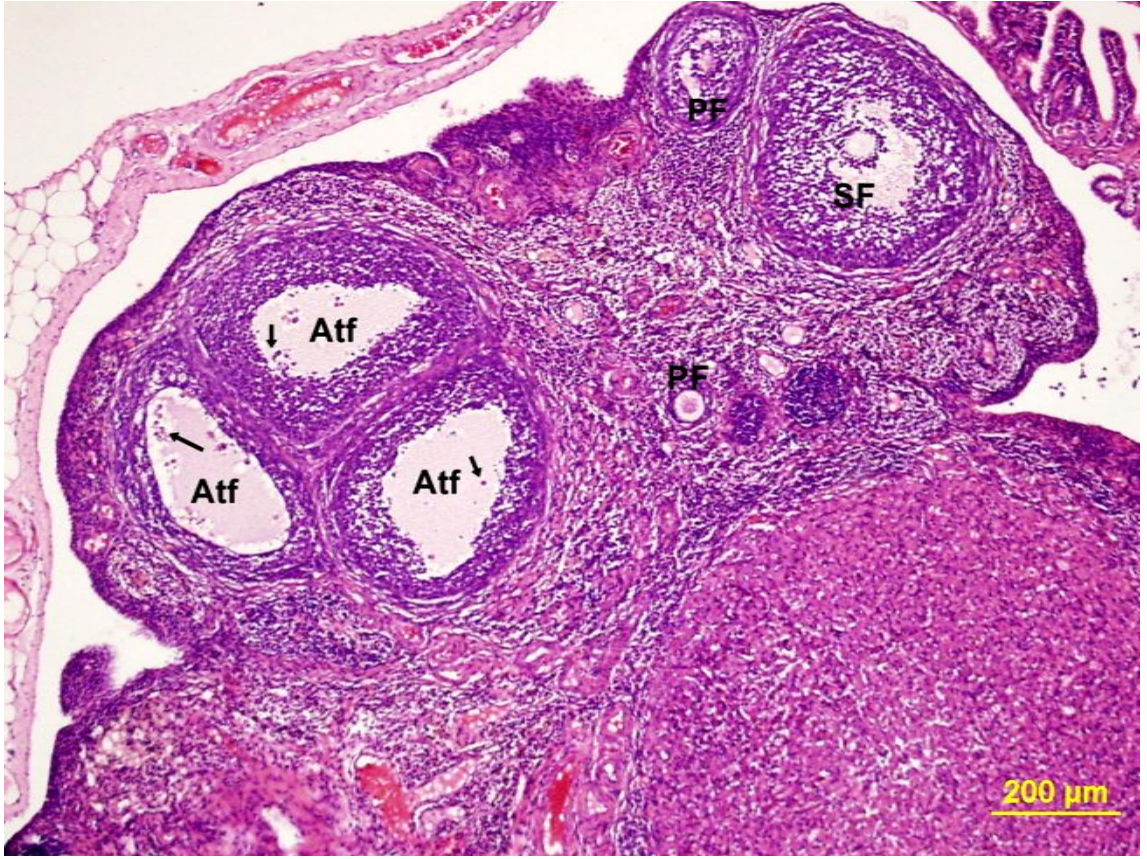
Şekil 3: Kontrol grubuna ait over korteksinde primer follikül (PF), atretik follikül (Atf), gelişen follikül (GF), sekonder follikül (SF) izlenmekte.



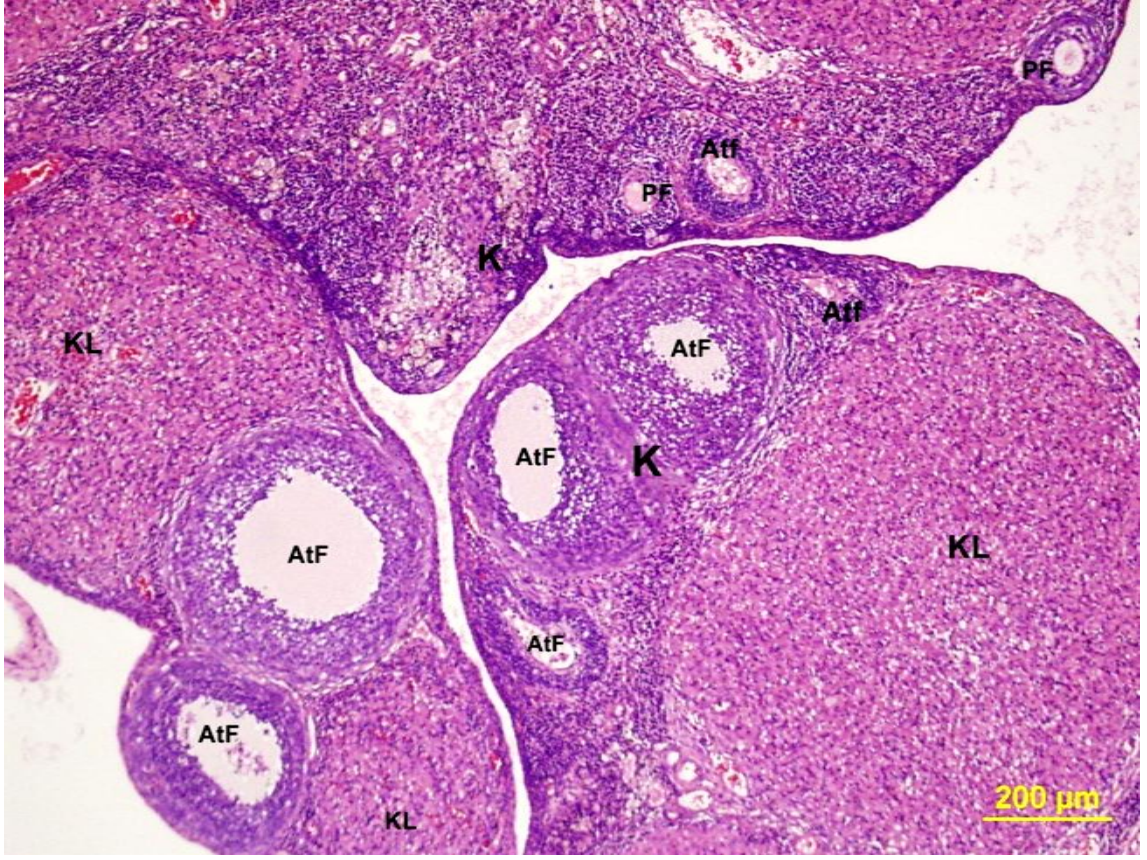
Şekil 4: 1.gruba ait over korteksinde (K) atretik folliküller (AtF), primer follikül (PF), sekonder follikül (SF), korpus luteum (KL) ve iç kısımda medulla (M) izlenmekte.



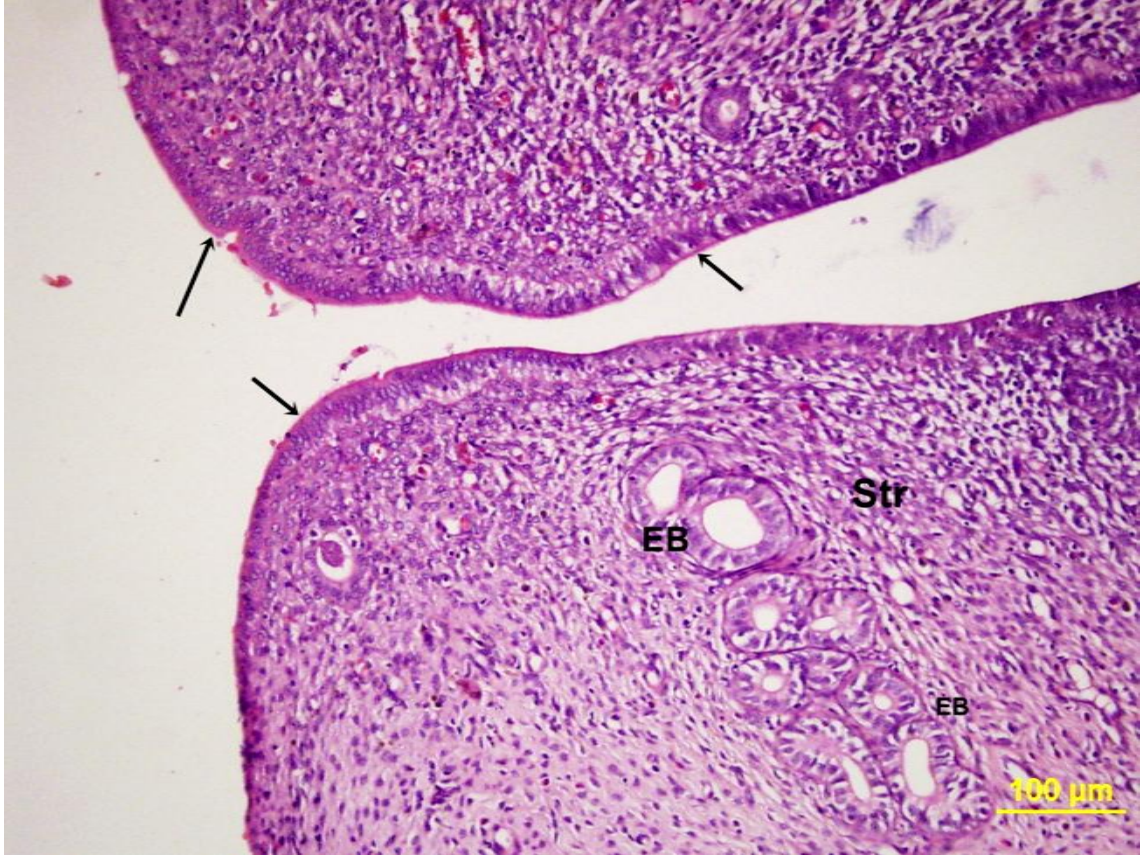
Şekil 5: 1.grup. Gelişimin ileri evresindeki antral folliküllerde bazı granüloza hücrelerinin antral kavitede serbest olarak bulunduğu (ok başı) gözlenmekte. Bazı folliküllerde geniş antrumu (A) çevreleyen granüloza hücrelerinin (GH) yassılaştığı (siyah ok) izlenmekte. Korteks (K), yüzey epiteli (beyaz ok), primer follikül (PF).



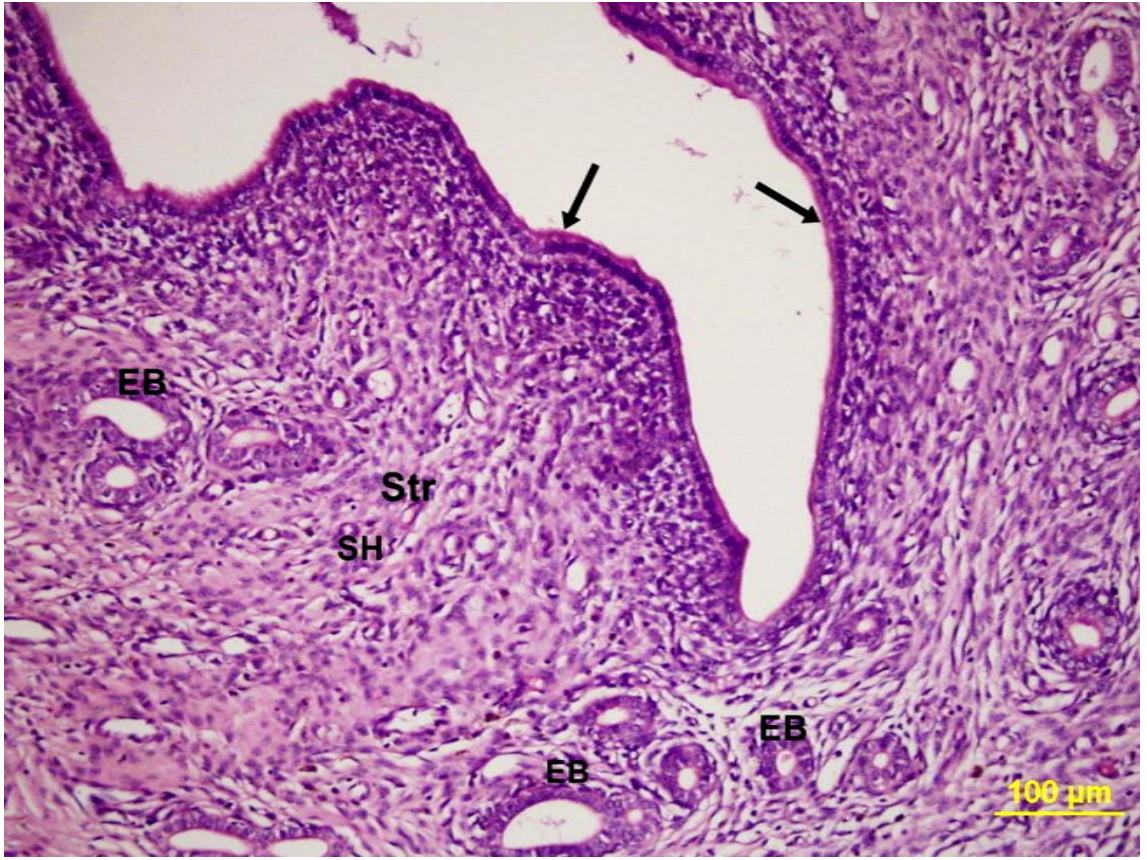
Şekil 6: 2.grup. Atretik folliküllerde (AtF), granüloza hücrelerinin (siyah ok) birbirlerinden ayrıldığı ve oldukça koyu bir çekirdeğe sahip olduğu gözlenmekte. Sekonder follikül (SF), primer follikül (PF).



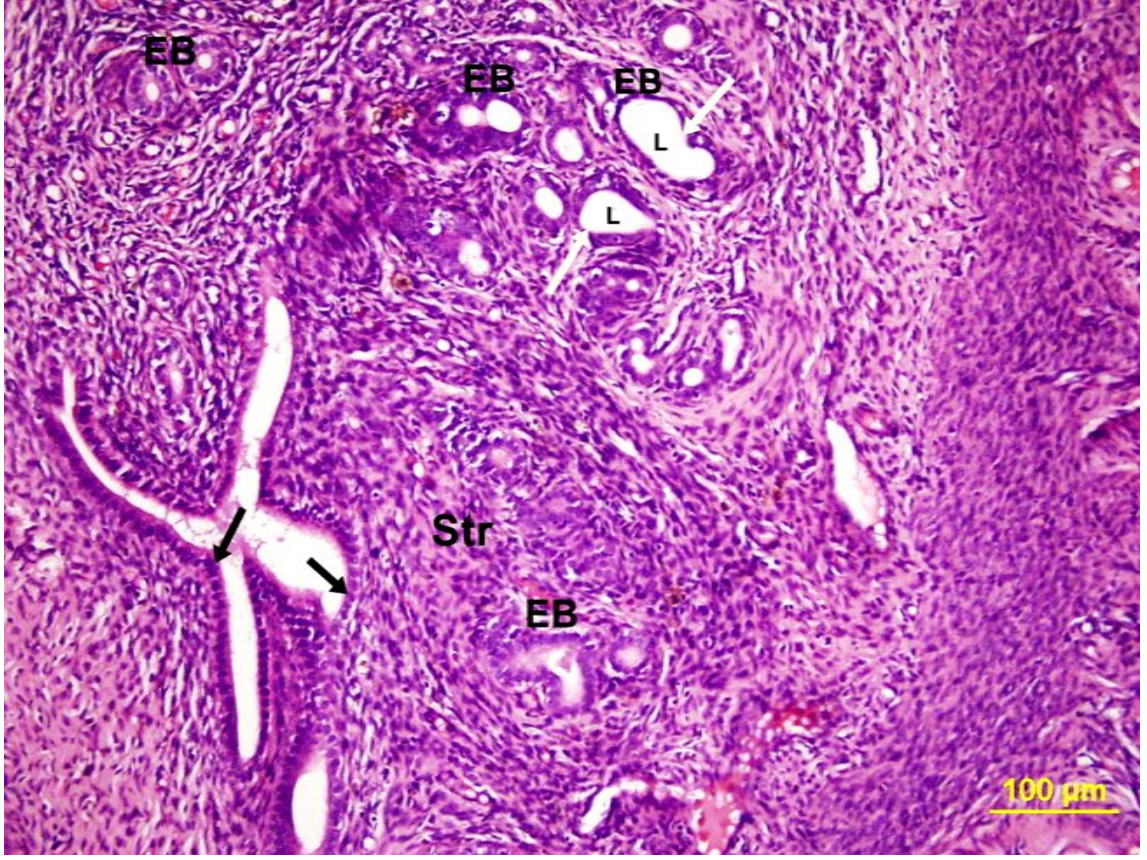
Şekil 7: 2.grup. Over korteksinde (K) fazla sayıda atretik folliküller (AtF), primer folliküller (PF), normal morfolojiye sahip korpus luteumlar (KL) izlenmekte.



Şekil 8: Kontrol grubuna ait uterus kesitinde lümeni çevreleyen prizmatik şekilli epitel hücreleri (siyah ok), altında yer alan endometriyal stroma (Str) içerisinde tübüler tipte endometriyal bezlerin (EB) alçak prizmatik epitel ile döşeli olduğu görülmekte.



Şekil 9: 1.grup. Uterus kesitinin endometriyum tabakasında yüzeyde normal yapıda prizmatik epitel (siyah ok), endometriyal stromada (Str) yer alan alçak prizmatik hücrelerle döşeli endometriyal bezler (EB), bezlerin arasında yerleşim gösteren stromal hücreler (SH) normal yapıda izlenmekte.



Şekil 10: 2.gruba ait uterusların lümeninin prizmatik epitel (siyah ok) ile döşeli olduğu ve endometriyal bezlerin (EB) sayıca azaldığı, bazı alanlarda bezlerin lümenlerinin (L) genişlemiş olduğu ve bez epiteli hücrelerinin (beyaz ok) yassılaştığı izlenmekte. Endometriyal stromanın (Str) diğer gruplara göre daha fibröz bir görünüm kazandığı izlenmekte.

4.3 Elektron Mikroskopik Bulgular

4.3.1. Over Bulguları

Kontrol Grubu: Kontrol grubuna ait sıçanların over kesitlerinin elektron mikroskopik düzeyde incelemesinde; over yüzey epiteli tek katlı kübik şekilli olup, apikal yüzeylerinde kısa mikrovilluslara sahipti. Lateral yüzeylerinden birbirlerine bağlantı kompleksleri ile bağlanmış olan epitel hücreleri bazal lamina aracılığı ile tunika albuginea'dan ayrılmıştı. Sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea içerisinde kollajen lifler ve iç şekilli çekirdeğe sahip olan fibroblastlar bulunmaktaydı (Şekil 11).

Over korteksindeki primordiyal folliküllerde, yuvarlak şekilli, merkezi yerleşimli oositlerin sitoplazmasında, lamellar tarzda düzenlenmiş kristallara sahip mitokondriyonlar, lizozomlar, granüler endoplazmik retikülüm sisternaları, Golgi kompleksi ve serbest ribozomların varlığı izlenmekteydi. Oositi çevreleyen yassı şekilli folliküler hücrelerin ince ve uzun çekirdeklere sahip olduğu görülmekteydi. İnce bir bazal lamina ile ovaryan stromadan ayrılan folliküler hücrelerin sitoplazması içerisinde mitokondriyonlar, granüler endoplazmik retikülüm sisternaları, serbest ribozomlar, az miktarda lizozomal yapılar bulunmaktaydı (Şekil 12).

Gelişimin ileri evresindeki folliküllerde, oosit ile granüloza hücreleri arasında düzenli, kesintisiz zona pellusidanın yer aldığı ve oositin yüzeyinden çıkan mikrovillusların ve folliküler hücrelerden uzanan sitoplazmik uzantıların zona pellusida içerisine girdiği görülmekteydi. Oositlerin çekirdeği sferikal şekilli ve ökromatik görünümlü olup ooplazma içerisinde birbirine paralel tarzda düzenlenmiş membranöz yapılar ve ooplazma periferinde ise membranla çevrili kortikal granüllerin varlığı izlendi (Şekil 13). İndentasyonlar gösteren heterokromatik bir çekirdek içerdiği görülen granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında granüler endoplazmik retikülüm sisternaları, Golgi kompleksi, serbest ribozomlar ve mitokondriyonlar gözlenmekteydi (Şekil 14).

Folliküler hücreleri çevreleyen teka interna tabakasındaki iç şekilli hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları, mitokondriyonlar ve agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları (SER) görülmekteydi.

Korpus luteum, granüloza lutein hücreleri, teka lutein hücreleri ve kapillerler içermekte olup geniş, vesiküler, yuvarlak şekilli ve merkezi yerleşimli çekirdekleri olan granüloza lutein hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları, tübüler kristalara sahip mitokondriyonlar ve endoplazmik retikülüm sisternaları bulunmaktaydı (Şekil 15). Teka lutein hücrelerinin ise granüloza lutein hücrelerinden daha küçük ve sitoplazmalarının daha koyu olduğu gözlenmekteydi.

Ovariyan stroma içerisinde, stromal hücreler, interstisyel hücreler, kollajen lifler ve kan damarları izlenmekteydi. İnterstisyel hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları, agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları (SER), tübüler kristalara sahip mitokondriyonlar ve Golgi kompleksi bulunmaktaydı (Şekil 16).

Grup I bulguları: 30 mg/kg Lapatinib verilen deney grubundaki sıçanlardan alınan overler elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde, yüzey epiteli hücre çekirdeklerinin indentasyonlara sahip olduğu ve apikal yüzeylerinde yer alan mikrovillusların ve hücre organellerinin normal yapılarını korudukları görülmekteydi (Şekil 17).

Primordiyal folliküllerde, oosit sitoplazması içerisinde lamellar tarzda düzenlenmiş kristalara sahip mitokondriyonların, lizozomların ve genişlemiş Golgi kompleksine ait sisternaların varlığı izlenirken, oositi çevreleyen yassı şekilli folliküler hücrelerin sitoplazmasında lizozomlar ve mitokondriyonların varlığı gözlenmekteydi (Şekil 18).

Gelişme sürecine girmiş folliküllerin oositlerinde periferik kısımlarda yerleşen membranla çevrili kortikal granülleri, birbirine paralel tarzda düzenlenmiş membranöz yapıları, gelişmiş endoplazmik retikülüm sisternaları, serbest ribozomlar ve Golgi kompleksleri bulunmaktaydı. Oositleri düzenli şekilde saran zona pellusida içerisinde oositte uzanan mikrovilluslar ve granüloza hücrelerinden uzanan sitoplazmik uzantılar yer almaktaydı (Şekil 19). Granüloza hücrelerinin çekirdeklerinin heterokromatinden zengin olup indentasyonlar gösterdiği, sitoplazmalarında mitokondriyonlarda dejenerasyon, endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme olduğu ve çok sayıda apoptotik cisimciklerin bulunduğu görülmekteydi (Şekil 20).

Korpus luteum, geniş, vesiküler çekirdeğe, belirgin çekirdekçiklere sahip olan granüloza lutein hücreleri ile periferik yerleşimli teka lutein hücreleri ve bunların arasında yer alan kapillerlerden oluşmaktaydı. Granüloza lutein hücrelerinin sitoplazmasında tübüler kristaya sahip olan mitokondriyonlar, agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları, küçük lizozomal yapılar ve lipid damlacıkları görülmekteydi (Şekil 21).

Ovarian stromada ise interstisyel hücrelerin çekirdekleri heterokromatinden zengin olup sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları bulunmaktaydı (Şekil 22).

Grup II Bulguları: 75 mg/kg Lapatinib verilen deney grubundaki sıçanlardan alınan overler elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde over yüzeyini döşeyen kübik epitel hücrelerinin derin indentasyon içeren çekirdeğe sahip olduğu ve sitoplazmalarında lipid damlacıklarının bulunduğu görülmekteydi. Epitel hücrelerinin apikal kısımlarındaki mikrovilluslar normal yapılarını korumaktaydı (Şekil 23).

Primordiyal folliküllerde oosit sitoplazması içerisinde lamellar tarzda düzenlenmiş kristalara sahip mitokondriyonların ve Golgi kompleksine ait sisternaların genişlemiş olduğu dikkati çekmekteydi. Ayrıca ooplazma boyunca değişik hacim ve şekillerde vesikül ve vakuollerin varlığı da saptandı. Oositi çevreleyen yassı şekilli folliküler hücreler ise normal ultrastrüktürel özelliklerini korumaktaydılar (Şekil 24).

Primer folliküllerde ise oosit sitoplazması içerisinde lizozomal yapılar, birbirine paralel tarzda düzenlenmiş membranöz yapılar, mitokondriyonlar ve oositin periferik kısımlarında kortikal granüller gözlenmekteydi. Oosit ve granüloza hücreleri arasında yer alan zona pellusidada, oosit ve granüloza hücrelerinden kaynaklanan hücresel uzantıların varlığını izlemekteydi (Şekil 25). Oosit çevresinde yer alan granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde perinükleer sisternalarda genişlemeler, sitoplazmasında lipid damlacıkları ve mitokondriyonlarda dejenerasyon olduğu görülmekteydi (Şekil 26).

Bu gruptaki antral folliküllerde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıklarının bulunduğu, antruma yakın olan granüloza hücrelerinin çekirdeklerinin yassı bir hal aldığı ve hücrelerin sitoplazmalarında yaygın

vakuolizasyon olduğu görölmekteydi. Antruma dökölmüş olan granüloza hücrelerinde lipid damlacıkları ve sitoplazmik vakuolizasyon izlenmekteydi (Şekil 27).

Ovarian stromada fibroblastlar ile interstisyel hücreler görölmekteydi. İnterstisyel hücrelerin çekirdeklerinde artmış heterokromatin granüllerinin ve genişlemiş perinökleer sisternalar varlığı, sitoplazmalarında yaygın olarak lipid damlacıkları, genişlemiş tübüler kristallara sahip mitokondriyonlar, SER sisternaları izlenmekteydi (Şekil 28). Korpus luteum kapsamındaki hücrelerin sitoplazmalarında yaygın lipid damlacıkları, mitokondriyonlarda dejenerasyon, lizozomal yapılar ve sitoplazmik vakuoller bulunmaktaydı (Şekil 29).

4.3.2. Uterus Bulguları

Kontrol Grubu: Kontrol grubuna ait sıçanların uterus kesitlerinin elektron mikroskopik düzeyde incelemesinde; prizmatik şekle sahip yüzey epitel hücrelerinin indentasyonlar içeren çekirdeğe sahip olduğu gözlenmekteydi. Hücrelerin apikal yüzeyinde kısa mikrovilluslar, lateral yüzeylerinin apikalinde bağlantı kompleksleri bulunmaktaydı. Hücrelerin apikal sitoplazmalarında oval şekilli mitokondriyonların varlığı gözlenmekteydi. Hücrelerin sitoplazması içerisinde GER sisternaları, lizozomal yapılar, lipid damlacığı ve Golgi kompleksi yer almaktaydı. Hücreler endometriyal stromadan belirgin bir bazal lamina ile ayrılmaktaydı (Şekil 30).

Endometriyal stromada, stromal hücreler yassı bir çekirdeğe sahip olup, sitoplazmalarında GER sisternaları, mitokondriyonlar ve serbest ribozomlar içermektedirler. Ayrıca stromal hücrelerin ince, uzun sitoplazmik uzantılara sahip olduğu ve kollajen lif demetleri ile yakın yerleşimli olduğu gözlenmekteydi.

Stromada yer alan bez epitel hücreleri kübik-alçak prizmatik epitel tipinde olup, çekirdeklerinde az miktarda heterokromatin granülleri içermektedirler. Bez epitel hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde, çekirdeğe yakın olarak yerleşen Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, ER sisternaları, serbest ribozomlar yer almaktaydı. Belirgin bir bazal lamina üzerine yerleşen bu hücrelerin arasında bağlantı kompleksleri bulunmaktaydı (Şekil 31).

Grup I Bulguları (30 mg/kg): Endometriyumunu döşeyen prizmatik epitel hücrelerinin hafif indentasyon içeren çekirdekleri heterokromatin granüllerinden zengin bir yapı ve belirgin bir çekirdekçik içermektedir. Hücrelerin yüzeylerinde mikrovilluslar, apikal sitoplazmalarında mikropinositotik veziküllerin varlığı izlenmektedir. Hücrelerin sitoplazmalarında endoplazmik retikülüm sisternaları, hafifçe genişlemiş mitokondriyonlar, yaygın lipid damlacıkları ve lizozomal yapıların varlığı gözlenmektedir. Uterus lümenini döşeyen epitel hücreleri bir bazal lamina ile endometriyal stromadan ayrılmıştır (Şekil 32).

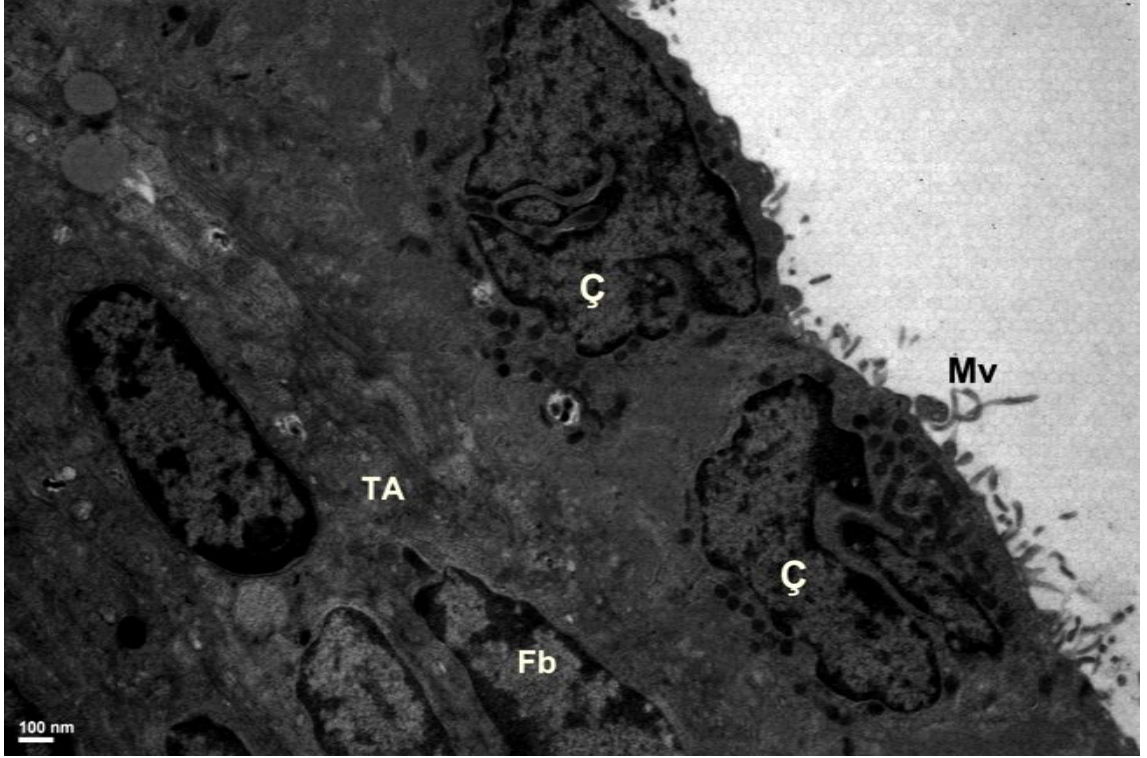
Endometriyal stromada yer alan stromal hücrelerin indentasyonlar içeren çekirdekleri belirgin bir çekirdekçik içermektedir. Stromal hücrelerin sitoplazmalarında yaygın mitokondriyonlar, GER sisternaları, serbest ribozomlar bulunmaktaydı (Şekil 33).

Stromada, endometriyal bezlerin kübik-alçak prizmatik şekilli epitel hücrelerinin çekirdeklerinde belirgin çekirdekçikleri bulunmaktaydı. Sitoplazmalarında mitokondriyonların hacminde ve sayılarında artış olduğu, yaygın lipid damlacıklarının ve lizozomal yapıların bulunduğu gözlenmektedir (Şekil 34).

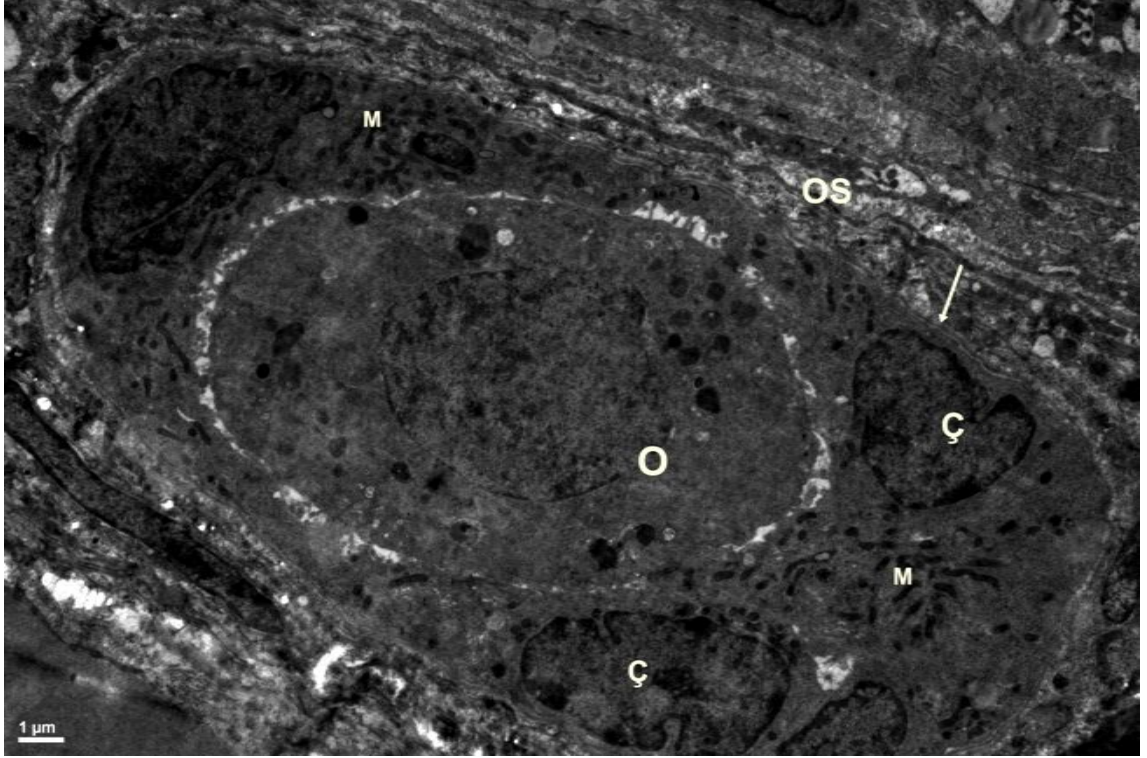
Grup II Bulguları (75 mg/kg): Endometriyumunu döşeyen prizmatik epitel hücrelerinin çekirdeklerinin indentasyonlar gösterdiği, belirgin bir çekirdekçik içerdikleri gözlenmektedir. Hücrelerin lateral yüzeylerinin, apikalinde bağlantı kompleksleri bulunmaktaydı. Hücrelerin sitoplazmalarında genişlemiş GER sisternalarının ve veziküllerin varlığı ile mitokondriyonların ve lipid damlacıklarının sayılarının artış gösterdiği izlenmektedir (Şekil 35).

Endometriyal stromada yer alan stromal hücrelerin yassı çekirdeklerinin heterokromatin granüllerinden zengin olduğu gözlenmektedir. Stromal hücreler sitoplazmalarındaki yaygın serbest ribozomlar, mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş GER sisternaları ile aktif bir hücrenin ince yapı özelliğine sahipti (Şekil 36).

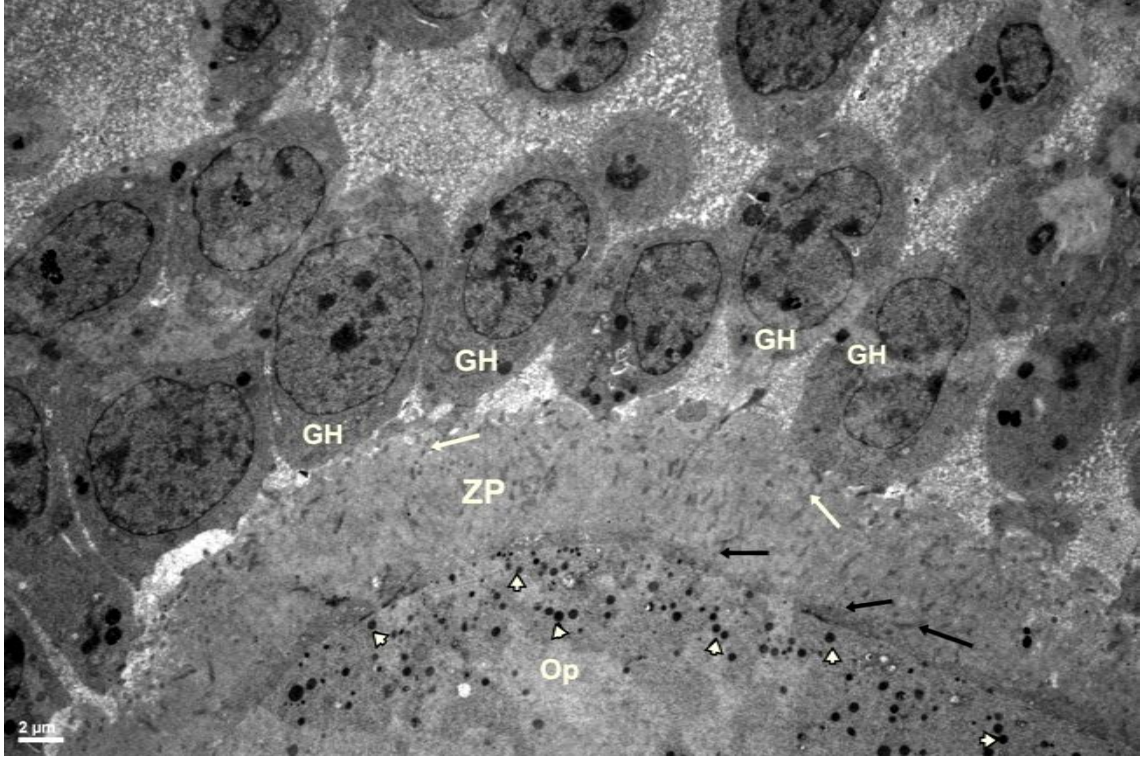
Endometriyal stromada yer alan endometriyal bez hücrelerinin sitoplazmasında yaygın lipid damlacıkları ve lizozomal yapılar, mitokondriyonlarda hacim artışı ve dejenerasyon gözlenmektedir (Şekil 37).



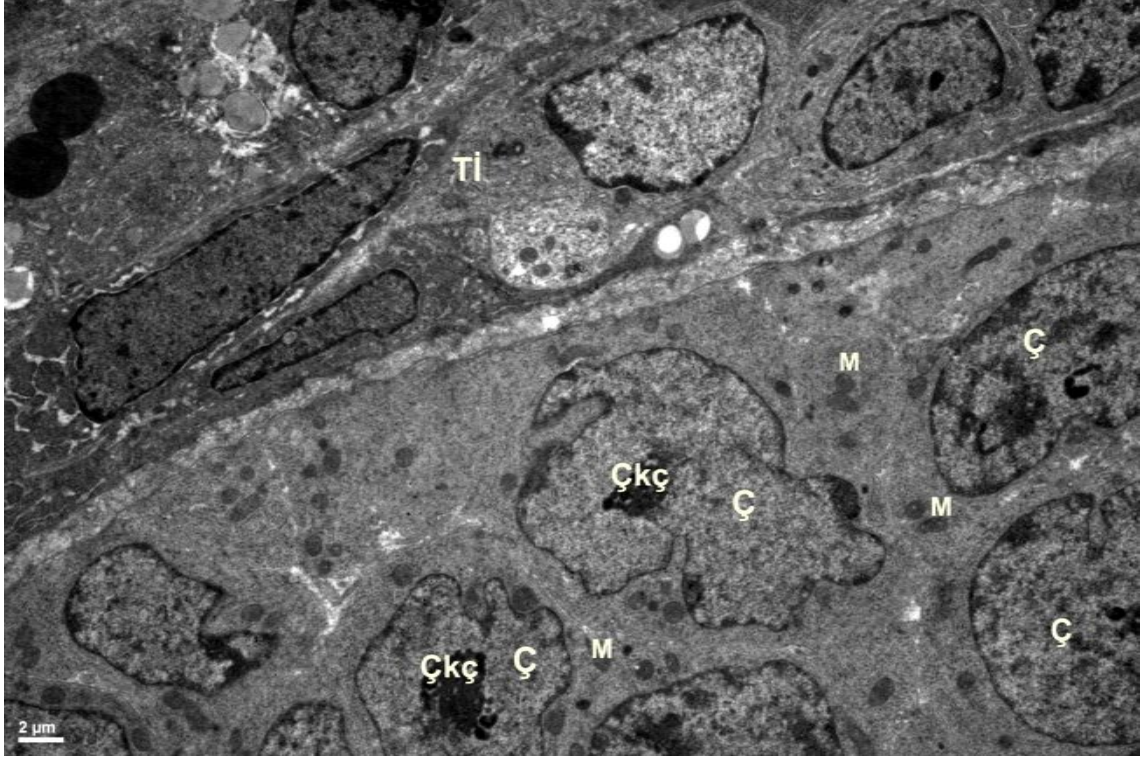
Şekil 11: Kontrol grubuna ait over yüzey epitel hücrelerinin çekirdekleri (Ç) derin indentasyonlar içermekte, apikal sitoplazmik yüzeyde mikrovilluslar (Mv) görülmekte. Over yüzey epiteli altında tunika albuginea (TA) tabakası bulunmakta. Fibroblast (Fb).



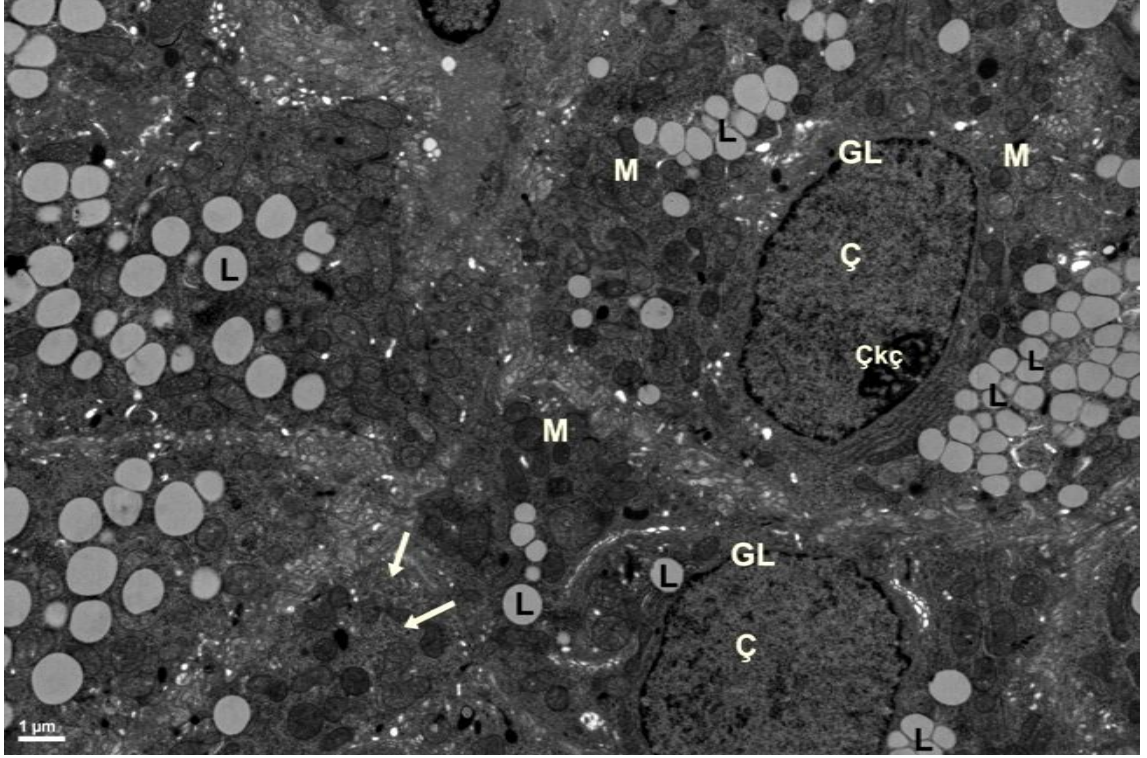
Şekil 12: Kontrol grubuna ait primordiyal follikülde, yuvarlak şekilli, merkezi yerleşimli oositi (O) çevreleyen yassı şekilli folliküler hücrelerin ince ve uzun çekirdekleri (Ç) izlenmekte. İnce bir bazal lamina (beyaz ok) ile ovaryan stromadan (OS) ayrılan folliküler hücrelerin sitoplazması içerisinde mitokondriyonlar (M) görülmekte.



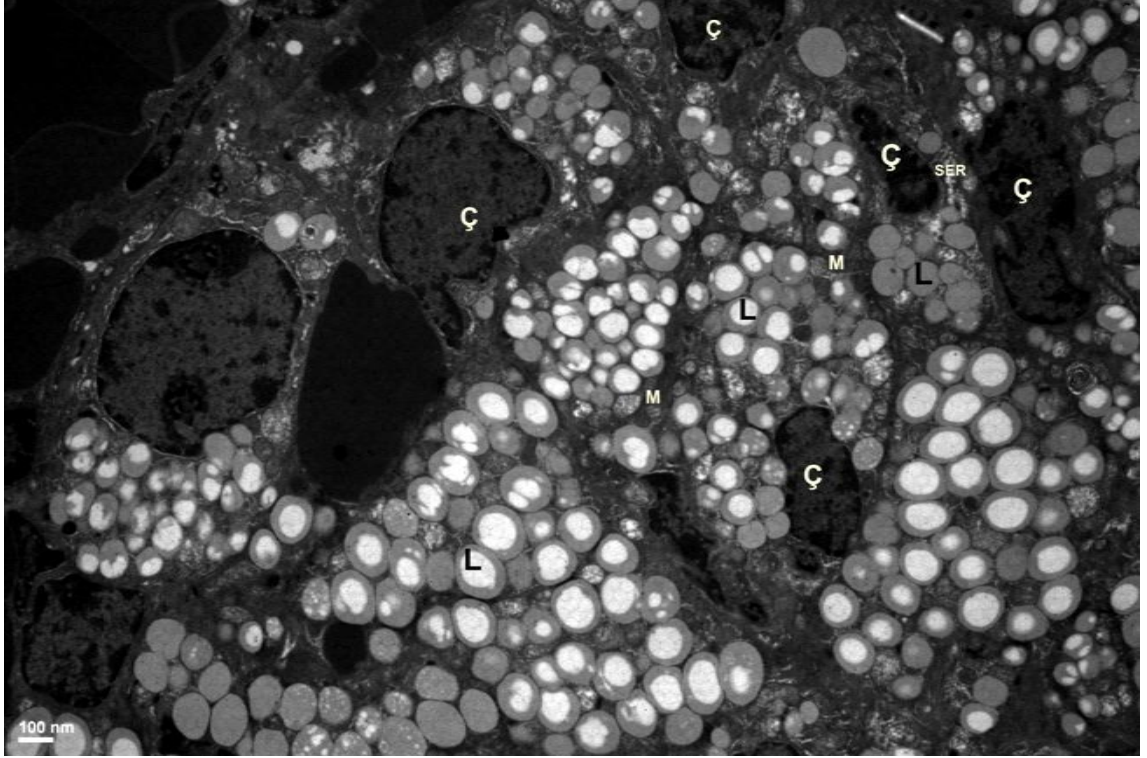
Şekil 13: Kontrol grubuna ait gelişimin ileri evresindeki folliküllerde, oosit ile granüloza hücreleri (GH) arasında düzenli zona pellusidanın (ZP) yer aldığı ve oositin yüzeyinden çıkan mikrovillusların (siyah ok) ve folliküler hücrelerden uzanan sitoplazmik uzantıların (beyaz ok) zona pellusida içerisine girdiği görülmekte. Ooplazma (Op) periferinde ise membranla çevrili kortikal granüllerin (ok başı) varlığı izlenmekte.



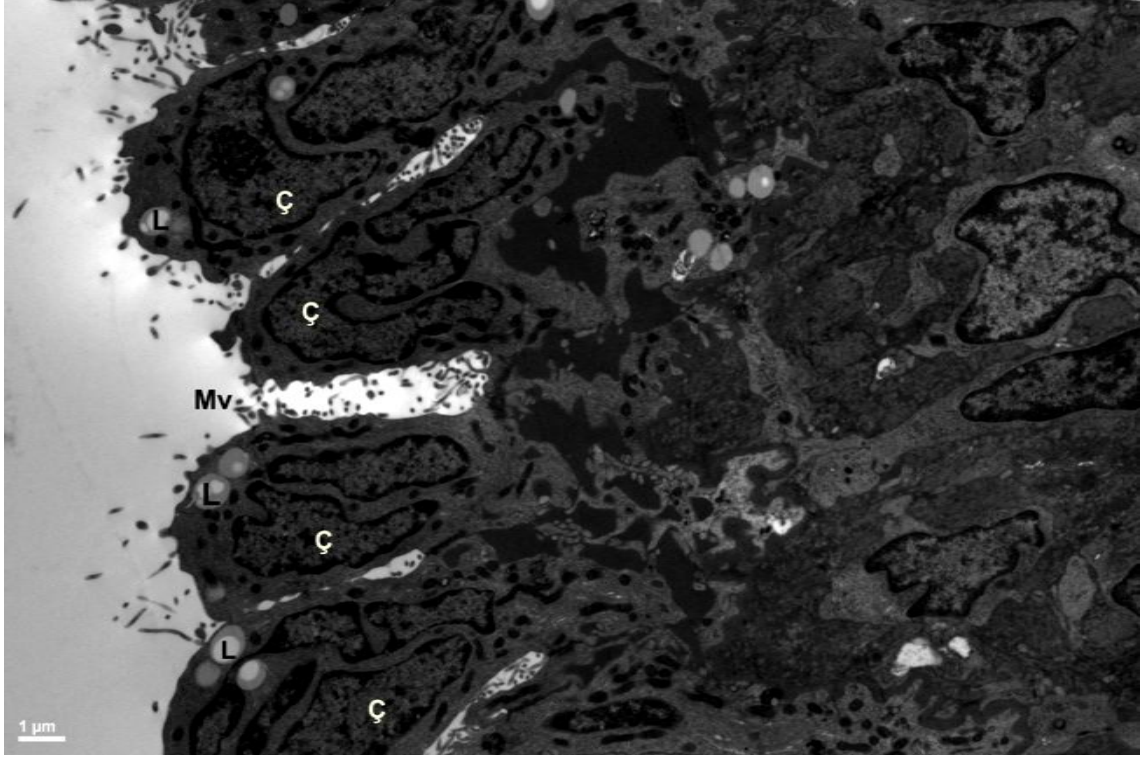
Şekil 14: Kontrol grubuna ait granüloza hücrelerinin indentasyonlar gösteren çekirdekleri (Ç), belirgin çekirdekçikleri (Çkç), sitoplazmasında mitokondriyonlar (M) gözlenmekte. Teka interna (Ti).



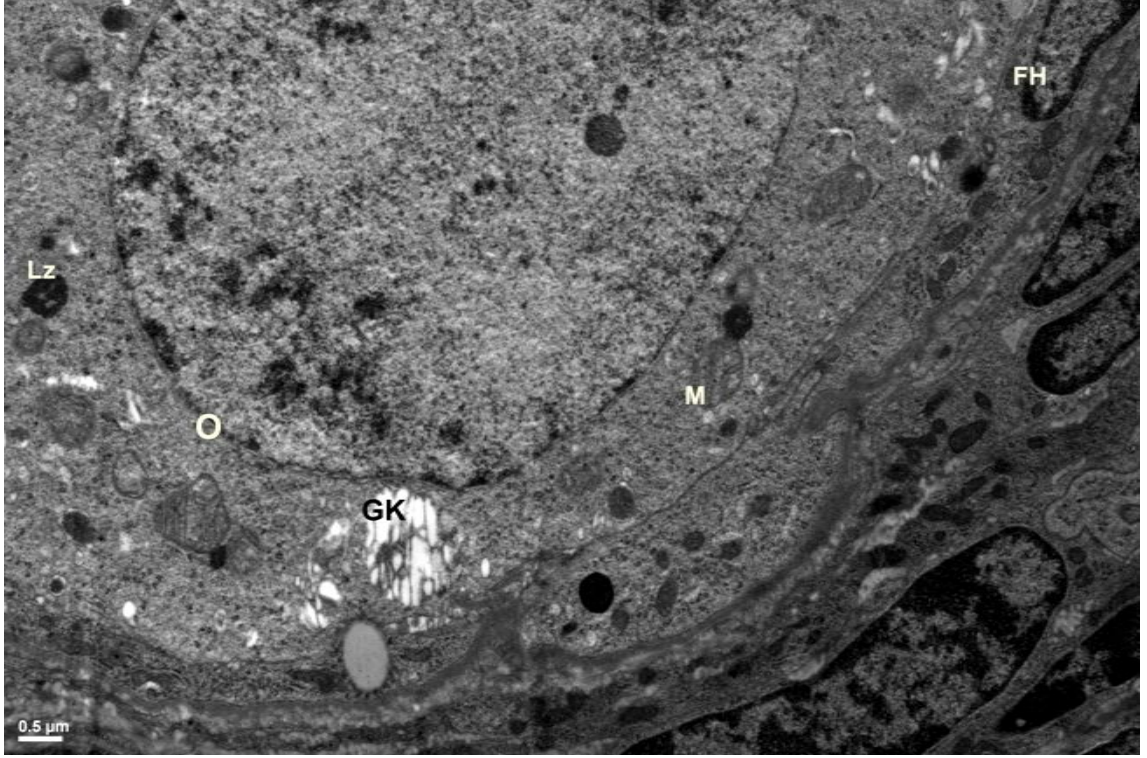
Şekil 15: Kontrol grubuna ait korpus luteum kapsamındaki granüloza lutein hücrelerinin (GL) sferikal şekilli çekirdeği (Ç), belirgin çekirdekçisi (Çkç), sitoplazmasında lipid damlacıkları (L), tübüler tarzda kristalara sahip mitokondriyonlar (M), agranüler endoplazmik retikülüm sisternalarının (beyaz ok) varlığı izlenmekte.



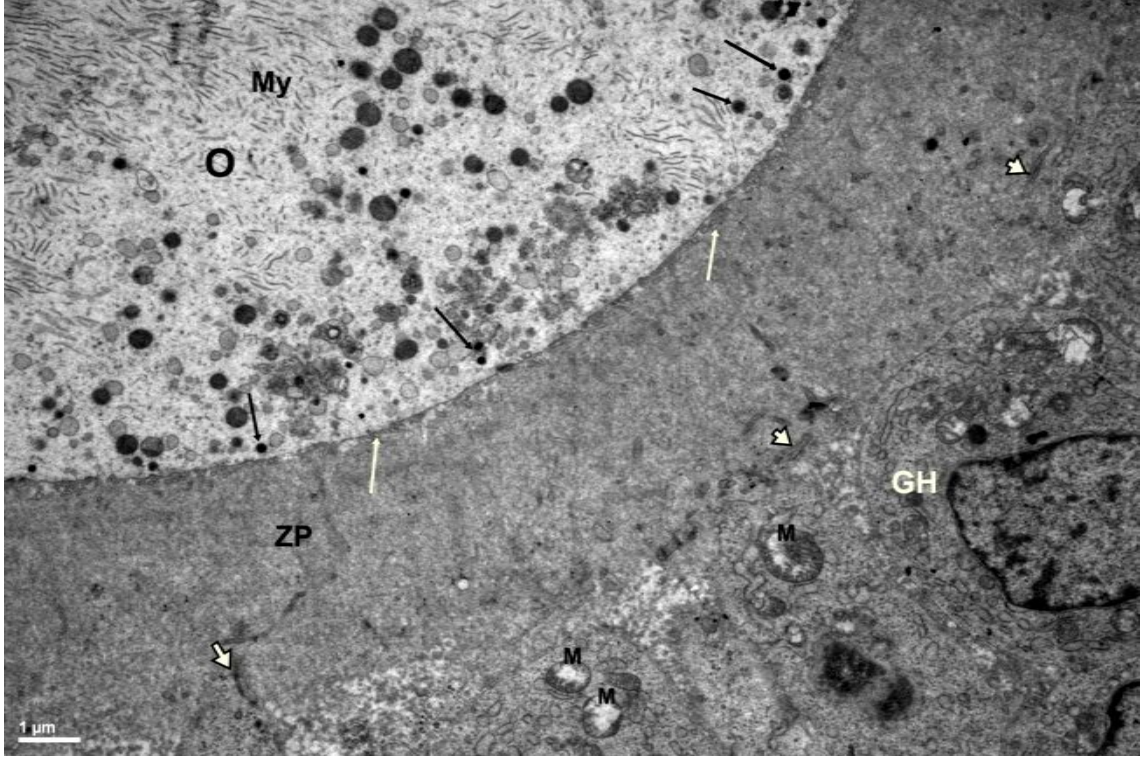
Şekil 16: Kontrol grubuna ait interstisyel hücrelerin çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L), agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları (SER), tübüler kristalara sahip mitokondriyonlar (M) görülmekte.



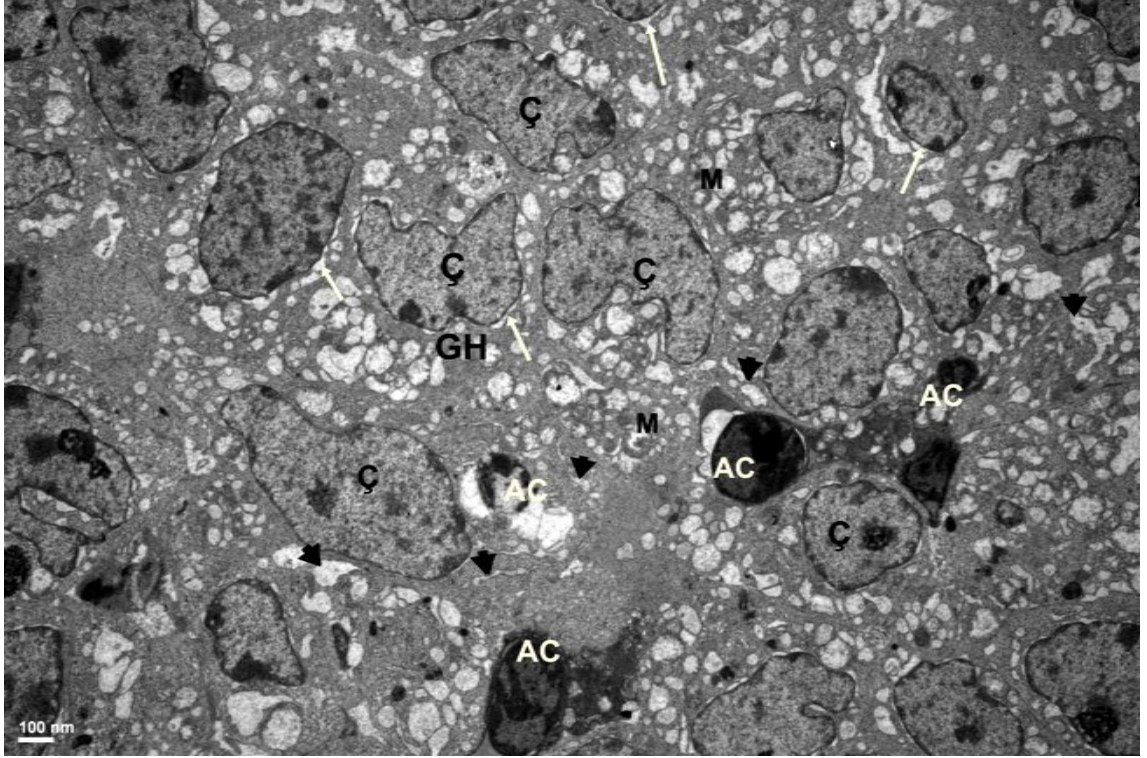
Şekil 17: 1.gruba ait over yüzey epitel hücre çekirdeklerinin (Ç) indentasyonlara sahip olduğu, apikal yüzeylerinde yer alan mikrovillusların (Mv) ve hücre organellerinin normal yapılarını korudukları ve apikal sitoplazmada lipid damlacıklarının (L) bulunduğu görülmekte.



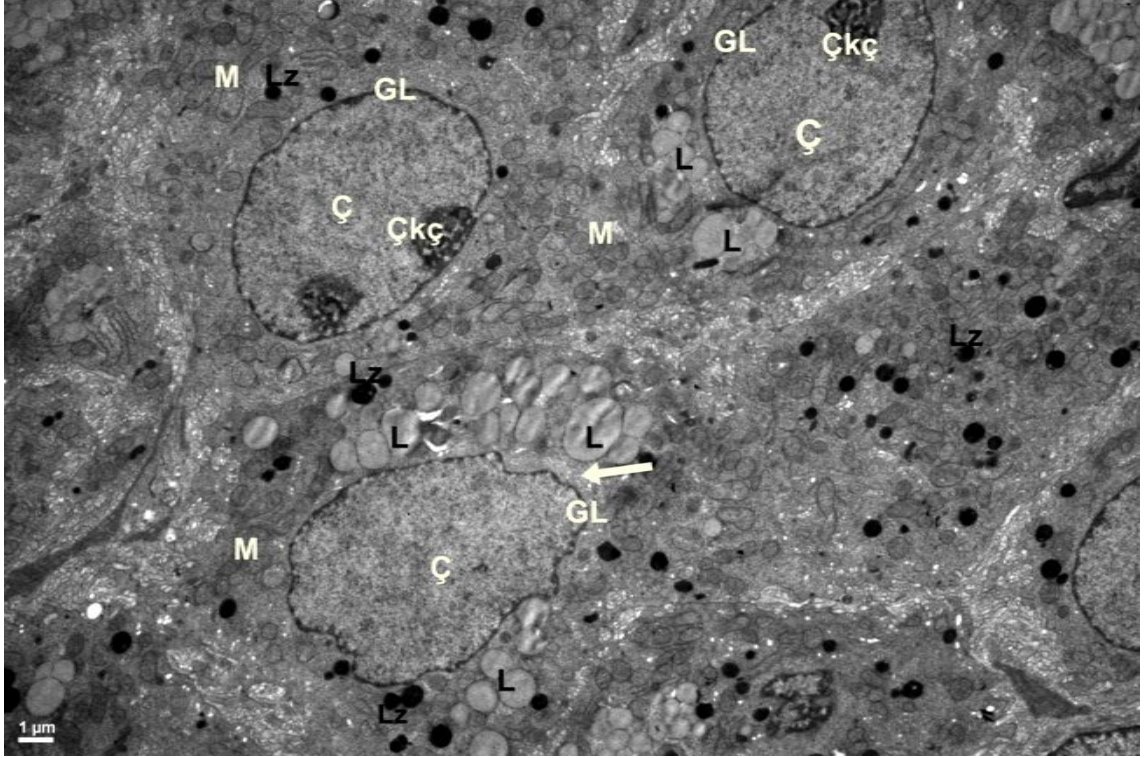
Şekil 18: 1.gruba ait primordiyal folliküllerde oosit (O) sitoplazması içerisinde lamellar tarzda düzenlenmiş kristalara sahip mitokondriyonlar (M), lizozomlar (Lz), ve genişlemiş Golgi kompleksi (GK) sisternaları ile oositi çevreleyen yassı şekilli folliküler hücreler (FH) görülmekte.



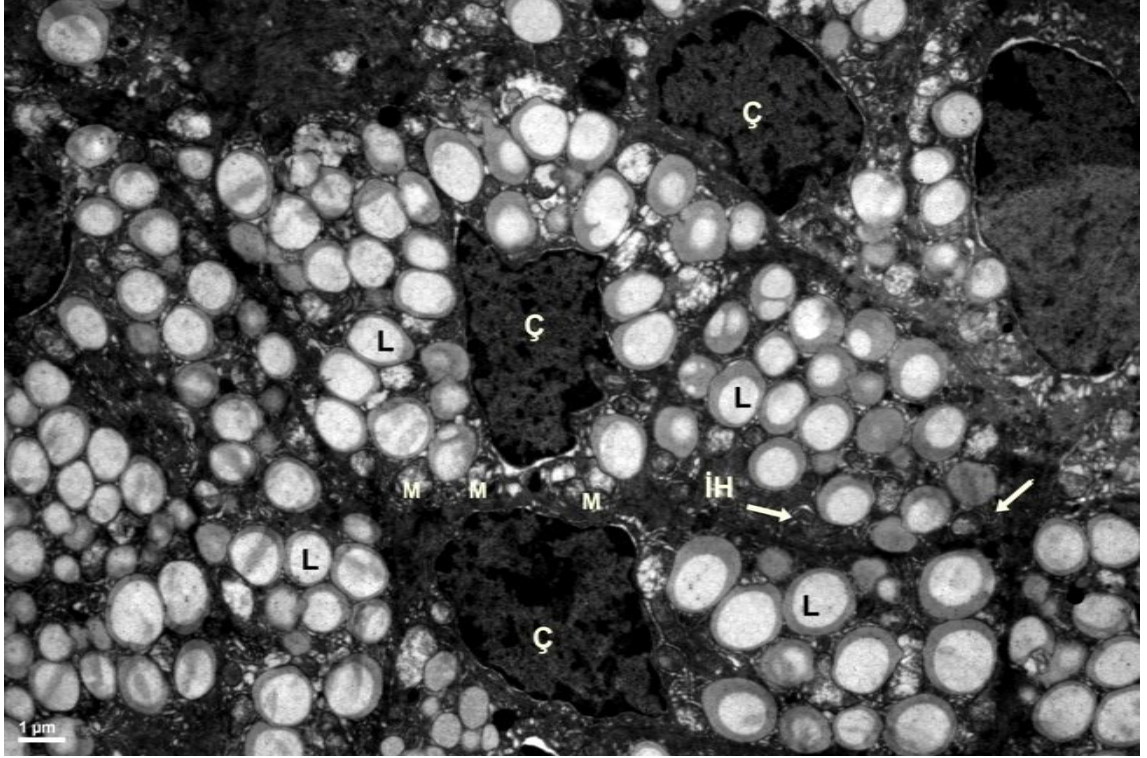
Şekil 19: 1.gruba ait antral follikülde oosit (O) sitoplazmasında periferal kısımlarda yerleşen kortikal granüller (siyah ok), serbest ribozomlar, birbirine paralel tarzda yerleşmiş membranöz yapılar (My) görülmekte. Oositleri düzenli şekilde saran zona pellusida (ZP) içerisinde oositin uzanan mikrovilluslar (beyaz ok) ve granüloza hücrelerine (GH) ait sitoplazmik uzantıların (ok başı) varlığı ve granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında yer alan mitokondriyonlarda (M) dejenerasyon izlenmekte.



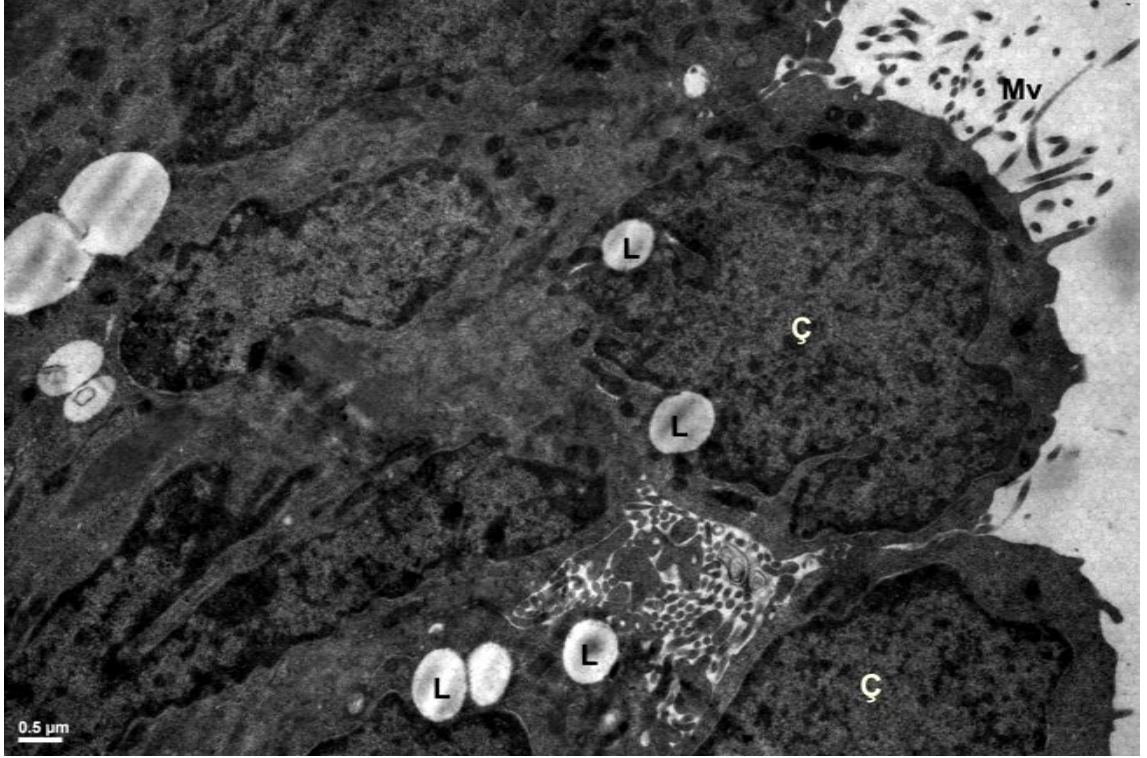
Şekil 20: 1.grupta granüloza hücrelerinin (GH) çekirdeklerinin (Ç) indentasyonlar gösterdiği, perinüklear sisternaların yer yer genişlemiş olduğu (beyaz ok), mitokondriyonlarda (M) dejenerasyon, endoplazmik retikülüm sisternalarında (ok başı) genişleme olduğu ve granüloza hücreleri arasında apopitotik cisimciklerin (AC) bulunduğu görülmekte.



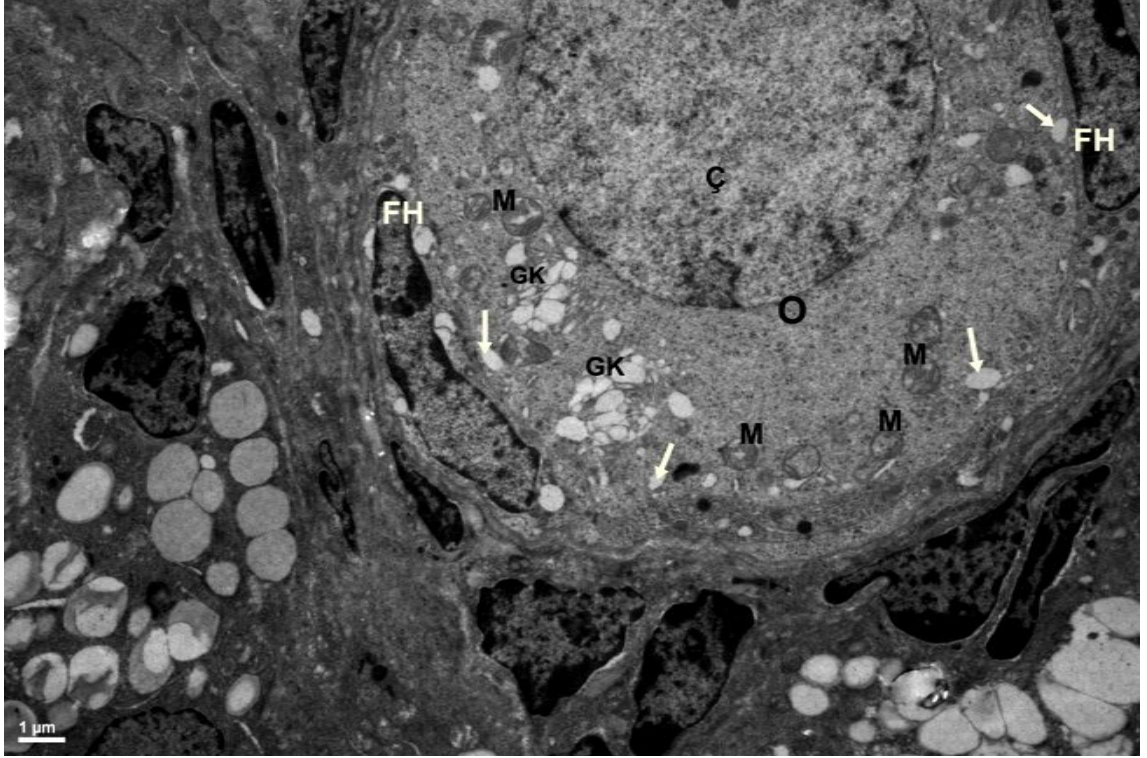
Şekil 21: 1.gruba ait korpus luteum kapsamındaki granüloza lutein hücrelerinin (GL) sferikal şekilli çekirdeği (Ç), belirgin çekirdekçisi (Çkç), sitoplazmasında lipid damlacıkları (L), tübüler tarzda kristalara sahip mitokondriyonlar (M), agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları (beyaz ok) ve çok sayıda lizozomun (Lz) varlığı izlenmekte.



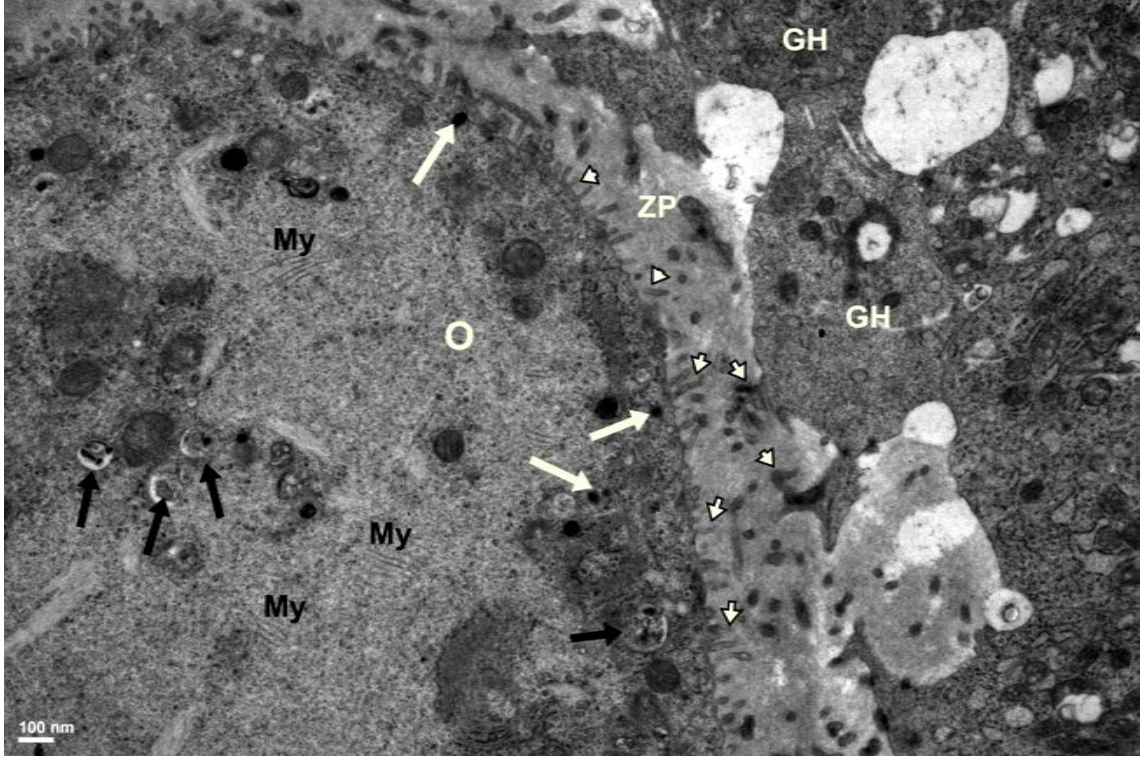
Şekil 22: 1.gruba ait ovaryan stromada interstisyel hücrelerin (İH) heterokromatinden zengin çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları (L), mitokondriyonlar (M) ve agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları bulunmakta (beyaz ok).



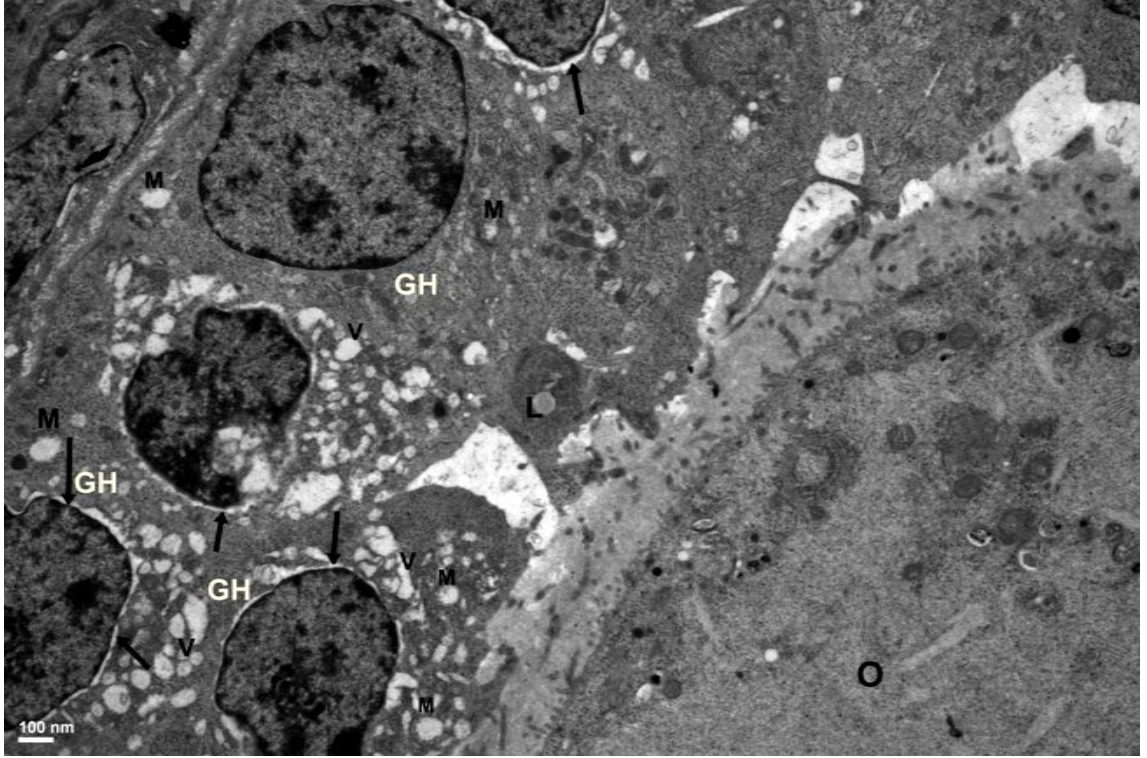
Şekil 23: 2.gruba ait over yüzeyini döşeyen kübik epitel hücrelerinin derin indentasyon içeren çekirdeğe (Ç) sahip olduğu ve sitoplazmalarında lipid damlacıklarının (L) bulunduğu ve apikal yüzeylerinde yerleşen mikrovillusların (Mv) varlığı izlenmekte.



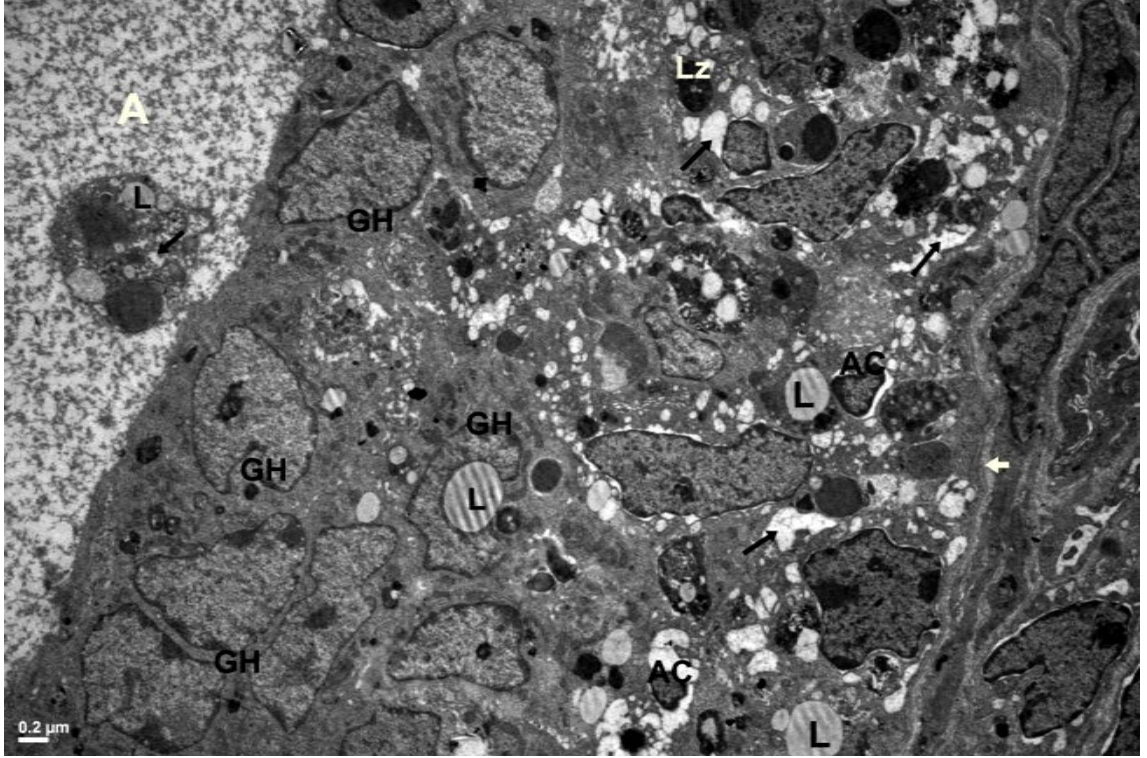
Şekil 24: 2.grupta primordiyal follikülde oosit (O), veziküler görünümlü bir çekirdeği (Ç) ve ooplazma boyunca değişik hacim ve şekillerde vesikül ve vakuollerin varlığı (beyaz ok), genişlemiş lamellar tarzda düzenlenmiş kristaya sahip mitokondriyonlar (M) ve genişlemiş Golgi kompleksi (GK) içermekte. Oositi çevreleyen folliküler hücreler (FH).



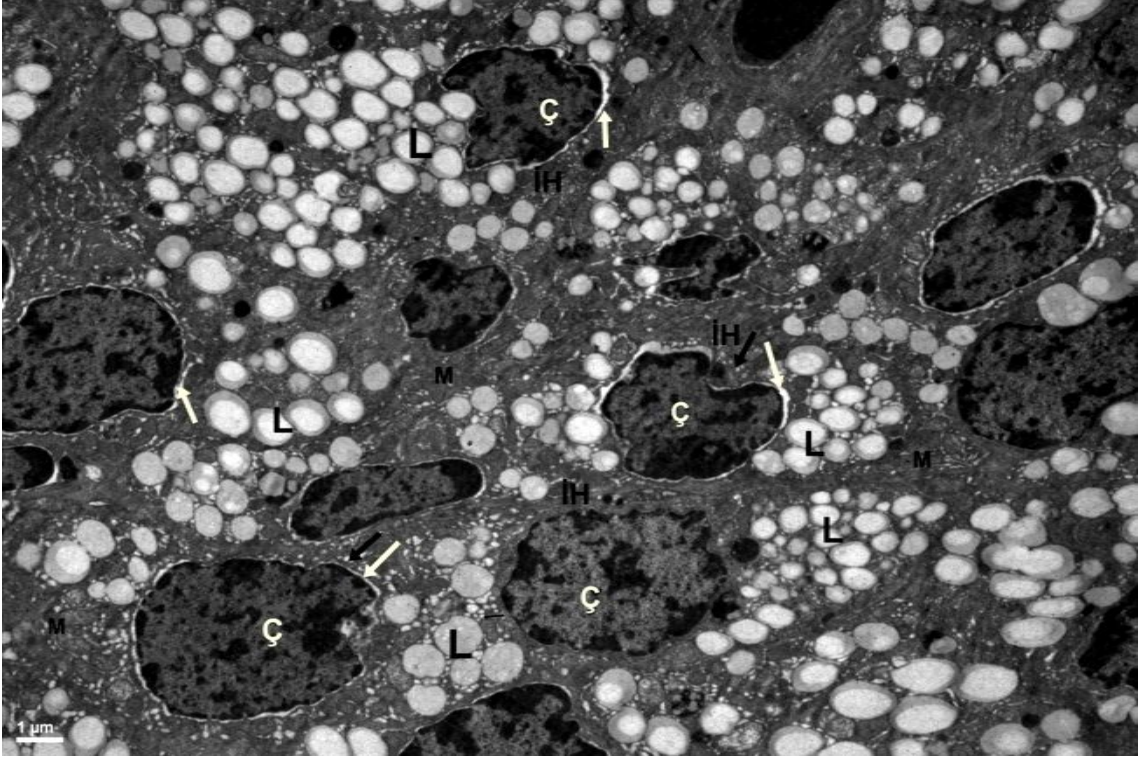
Şekil 25: 2.grupta primer follikülde oosit (O) sitoplazması içerisinde lizozomal yapılar (siyah ok), birbirine paralel tarzda düzenlenmiş membranöz yapılar (My), oositin periferel kısımlarında kortikal granüller (beyaz ok) gözlenmekte. Oosit etrafında zona pellusida (ZP) ve zona pellusida içerisinde oosit ve granüloza hücrelerinden (GH) uzanan mikrovilluslar ve sitoplazmik uzantılar (ok başı) izlenmekte.



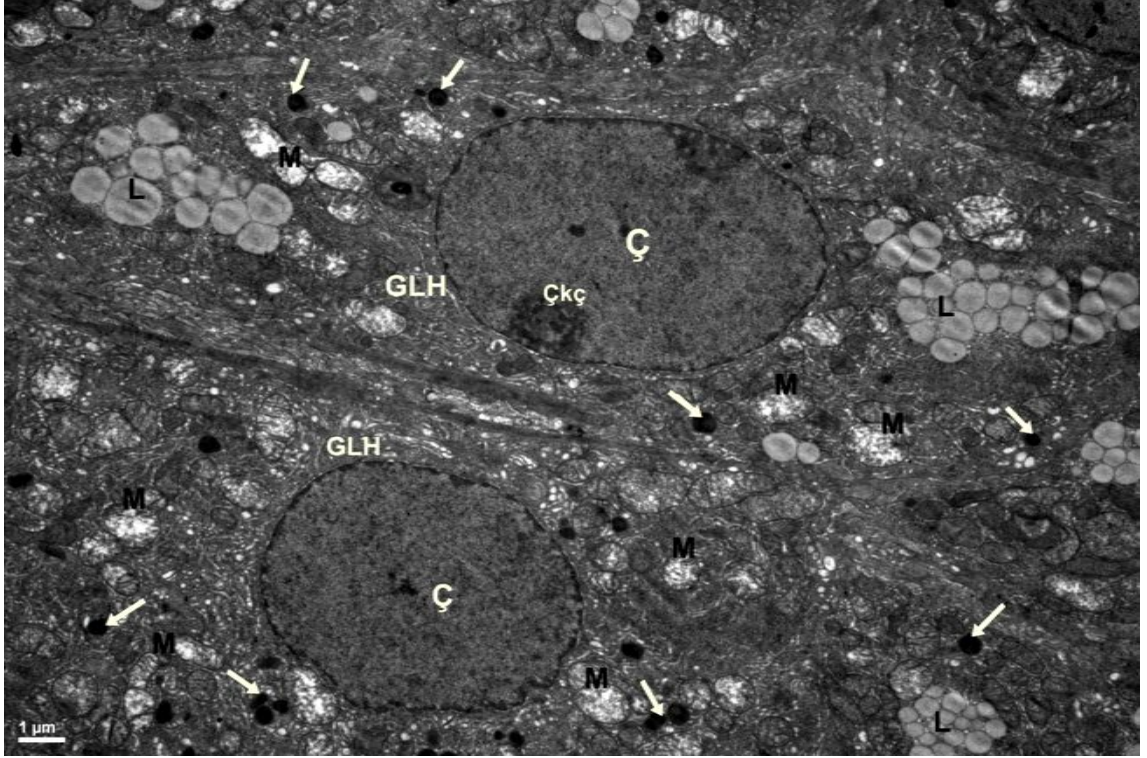
Şekil 26: 2.grupta primer folliküle ait oosit (O) ve çevresinde yer alan granüloza hücrelerinin (GH) sitoplazmasında lipid damlacıkları (L) ve perinükleer sisternalarda genişlemeler (siyah ok), mitokondriyal dejenerasyon (M) ve vakuolizasyon (V) olduğu dikkati çekmekte.



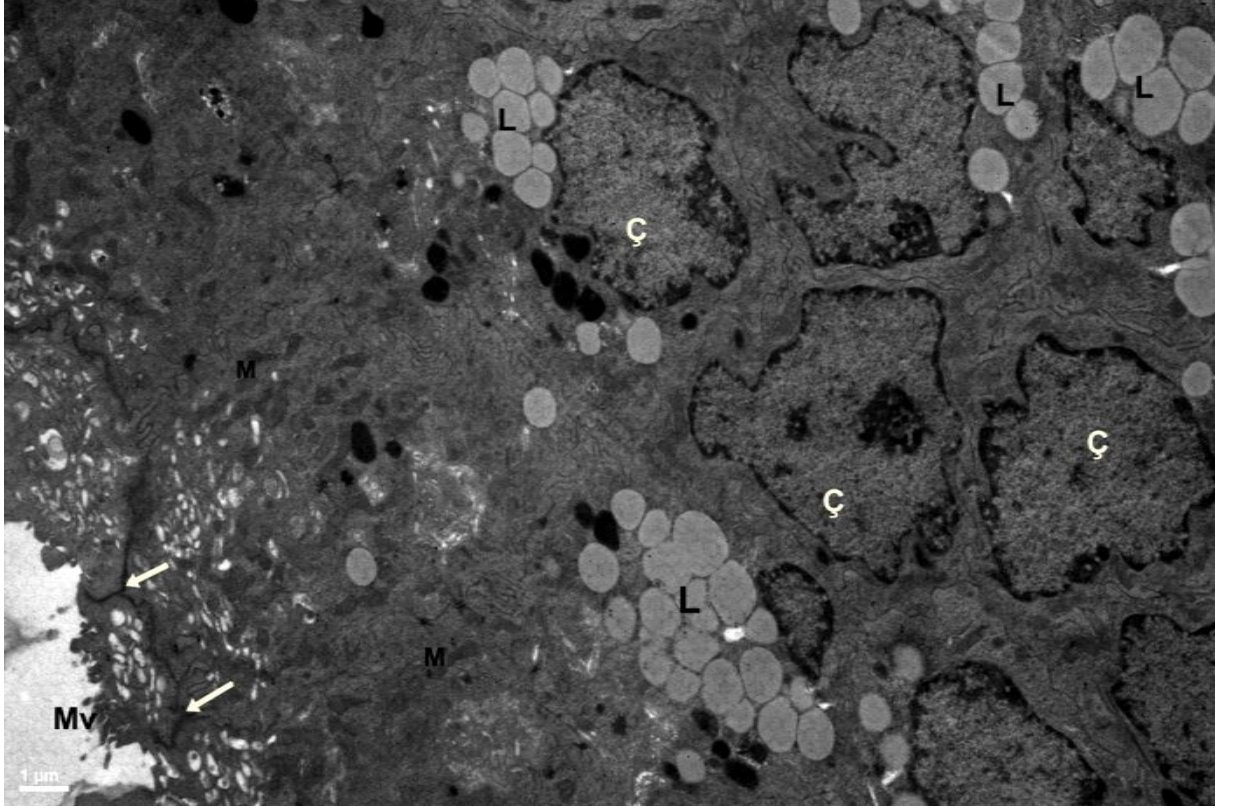
Şekil 27: 2.gruba ait antral follikülde granüloza hücrelerinin (GH) sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L) bulunmakta, sitoplazmalarında yaygın vakuolizasyon (siyah ok), apoptotik cisimcikler (AC), lizozomlar (Lz) görülmekte. Antruma (A) dökülmüş olan granüloza hücresine ait sitoplazmik parçacıkta lipid damlacıkları (L) ve sitoplazmik vakuolizasyon (siyah ok) izlenmekte. Bazal lamina (beyaz ok başı).



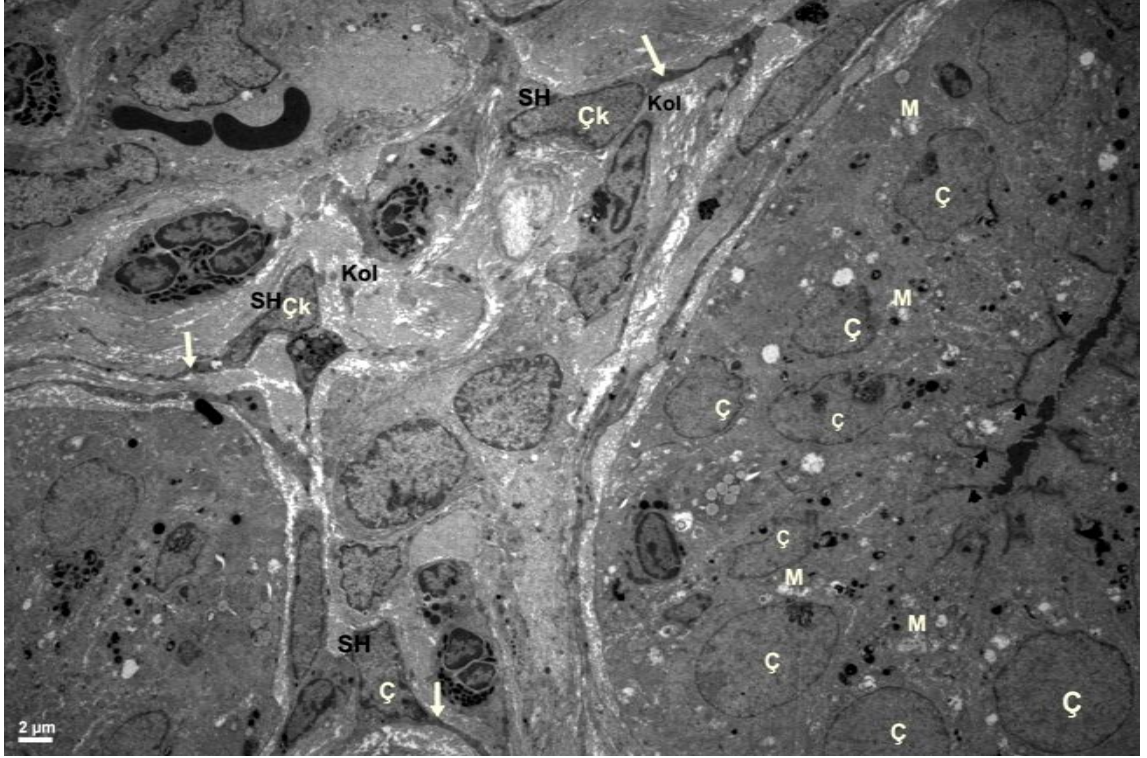
Şekil 28: 2.gruba ait interstisyel hücrelerin (IH) heterokromatinden zengin, indentasyon içeren çekirdekleri (Ç), perinükleer sisternalarında genişleme (beyaz ok), sitoplazmalarında yaygın olarak lipid damlacıkları (L), mitokondriyonlar (M), SER sisternaları (siyah ok) görülmekte.



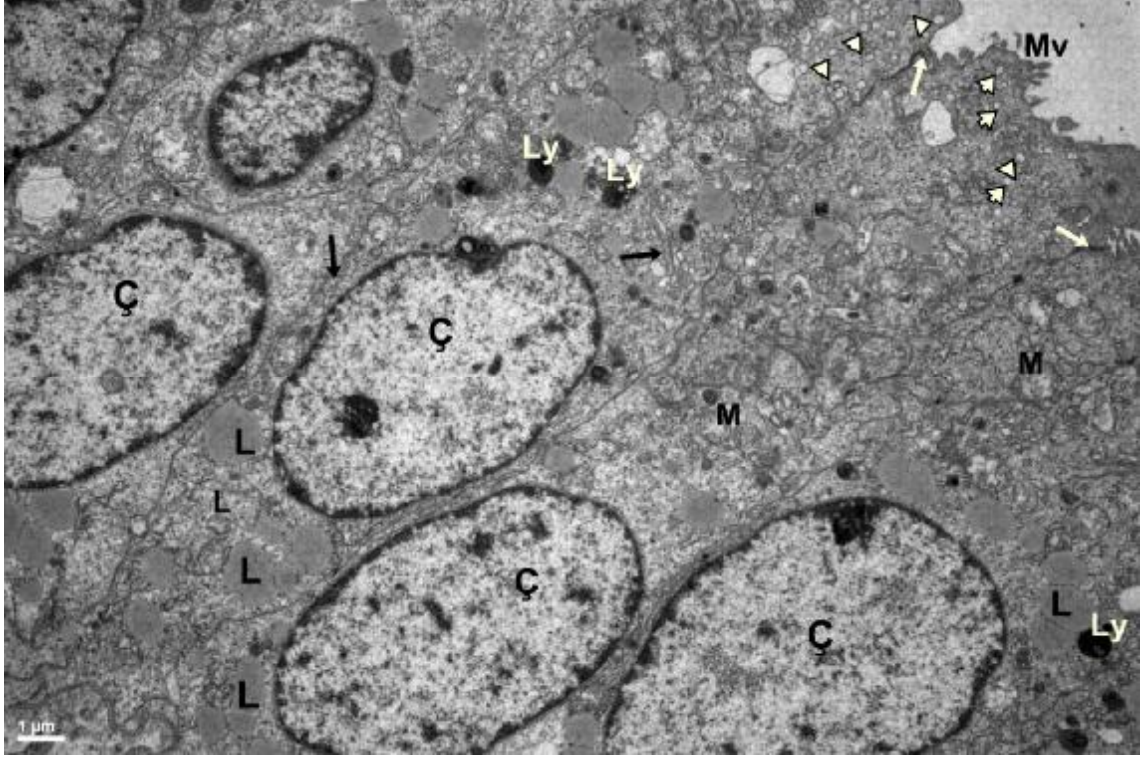
Şekil 29: 2.gruba korpus luteum kapsamındaki granüloza lutein hücrelerin (GLH) çekirdekleri (Ç), belirgin çekirdekçiği (Çkç) izlenmekte. Hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L), dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (M) ve lizozomal yapılar (beyaz ok) bulunmakta.



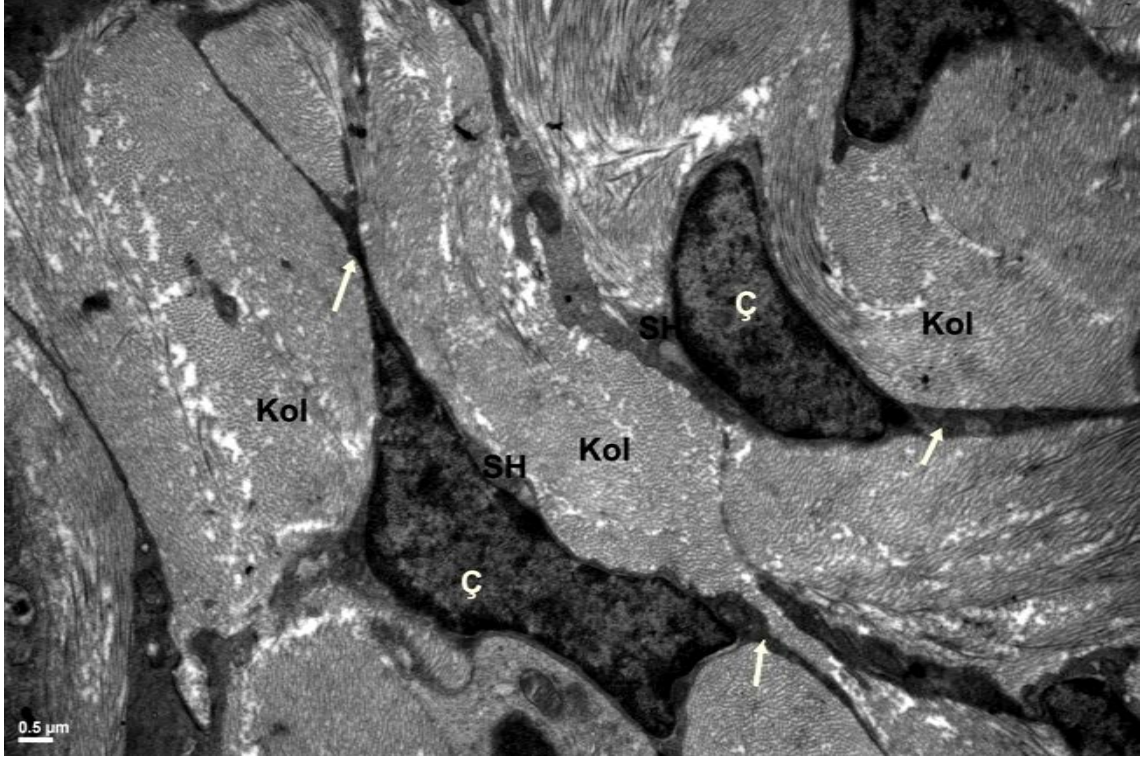
Şekil 30: Kontrol grubuna ait uterusun prizmatik şekilli epitel hücrelerinde indentasyonlara sahip çekirdekler (Ç), oval şekilli mitokondriyonlar (M), lipid damlacıkları (L) izlenmekte. Hücrelerin apikal yüzeylerinde mikrovilluslar (Mv), lateral yüzeylerin apikal kısımlarında bağlantı kompleksleri (beyaz ok) görülmekte.



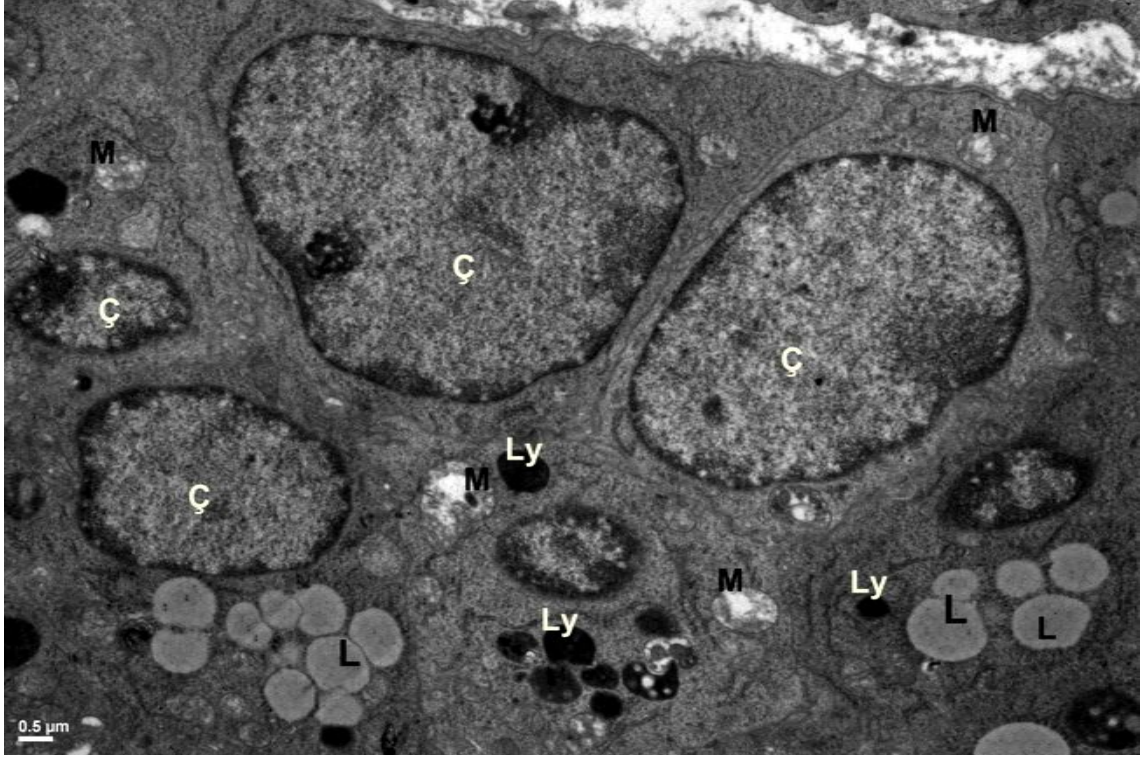
Şekil 31: Kontrol grubuna ait uterusların endometriyal stromasında, stromal hücrelerin (SH) çekirdekleri (Çk) ve sitoplazmik uzantıları (beyaz ok) izlenmekte. Stromal hücrelerin arasında bu hücreler ile ilişkili kollajen lifler (Kol) yer almakta. Endometriyal bezlerinin lümenini döşeyen alçak prizmatik hücrelerin çekirdekleri (Ç), mitokondriyonlar (M), lateral kısımlarda hücreler arası bağlantı kompleksleri (ok başı) izlenmekte.



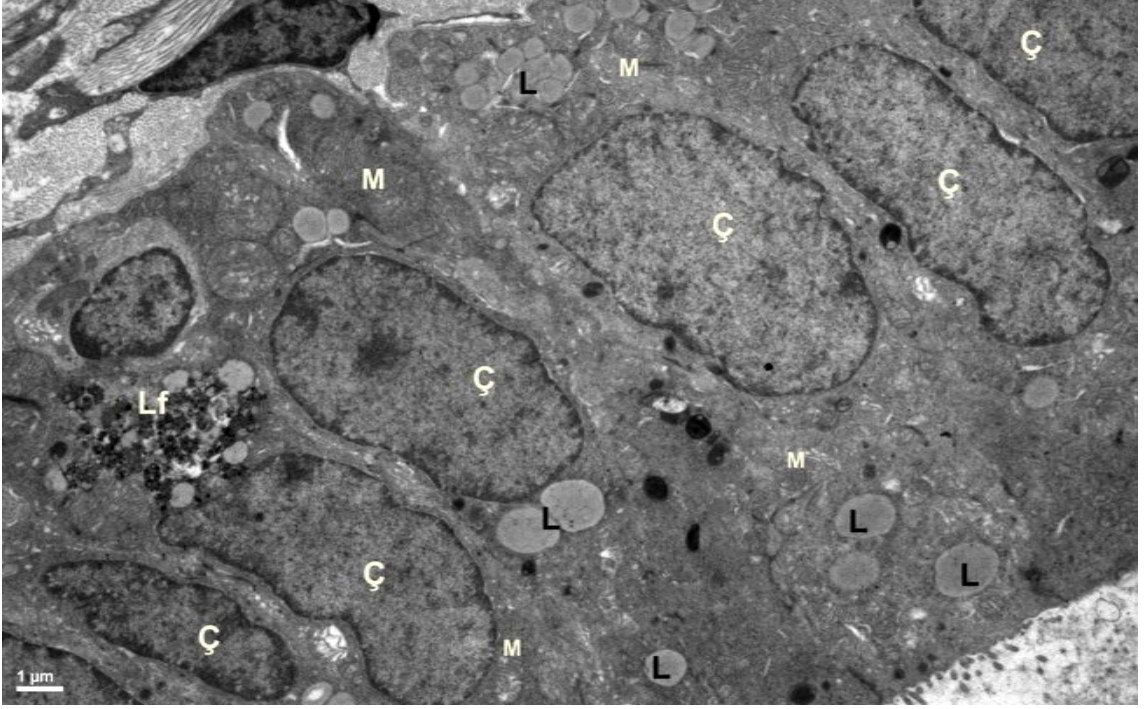
Şekil 32: 1.grupta bulunan uterus yüzey epitel hücrelerinin çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında hafif genişlemiş mitokondriyonlar (M), lipid damlacıkları (L), endoplazmik retikülüm sisternaları (siyah ok), apikal sitoplazmalarında mikropinositotik veziküller (ok başı), lizozomal yapılar (Ly) izlenmekte. Hücrelerin apikal kısımlarında mikrovilluslar (Mv), lateral kısımlarında bağlantı kompleksleri (beyaz ok) görülmekte.



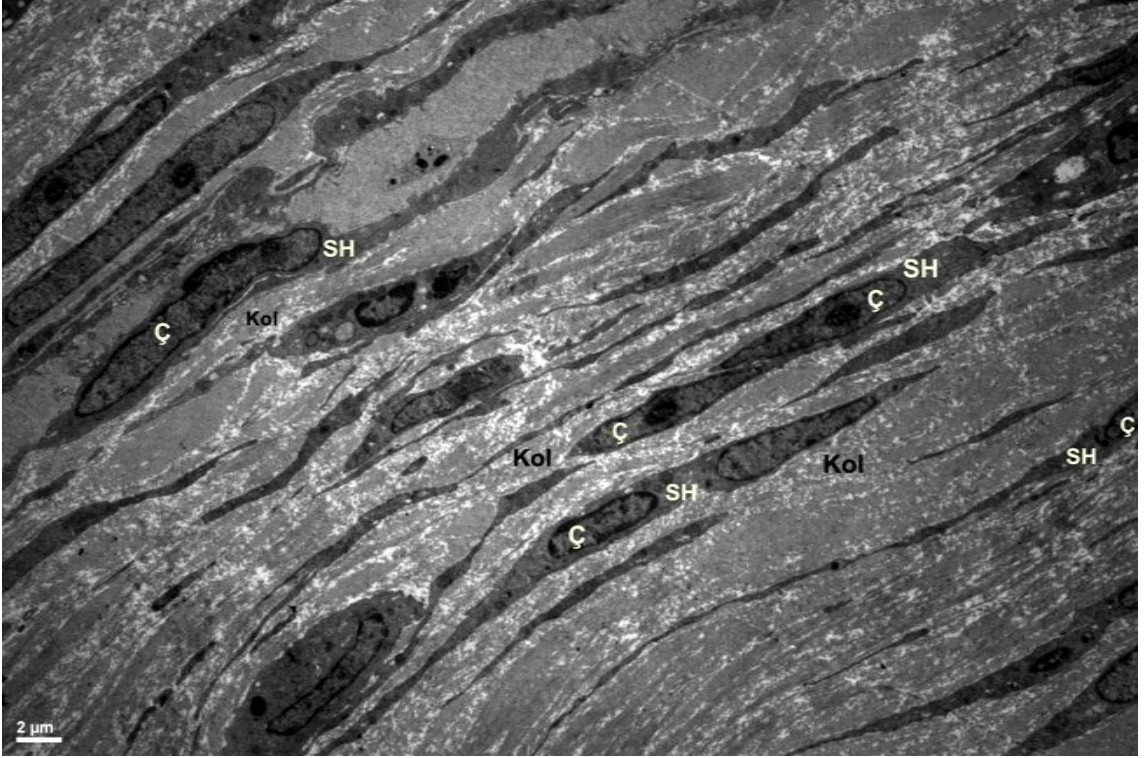
Şekil 33: 1.grupta yer alan uterus endometriyal stromasında stromal hücrelerin (SH) çekirdekleri (Ç), sitoplazmik uzantıları (beyaz ok) ve kollajen lifler (Kol) izlenmekte.



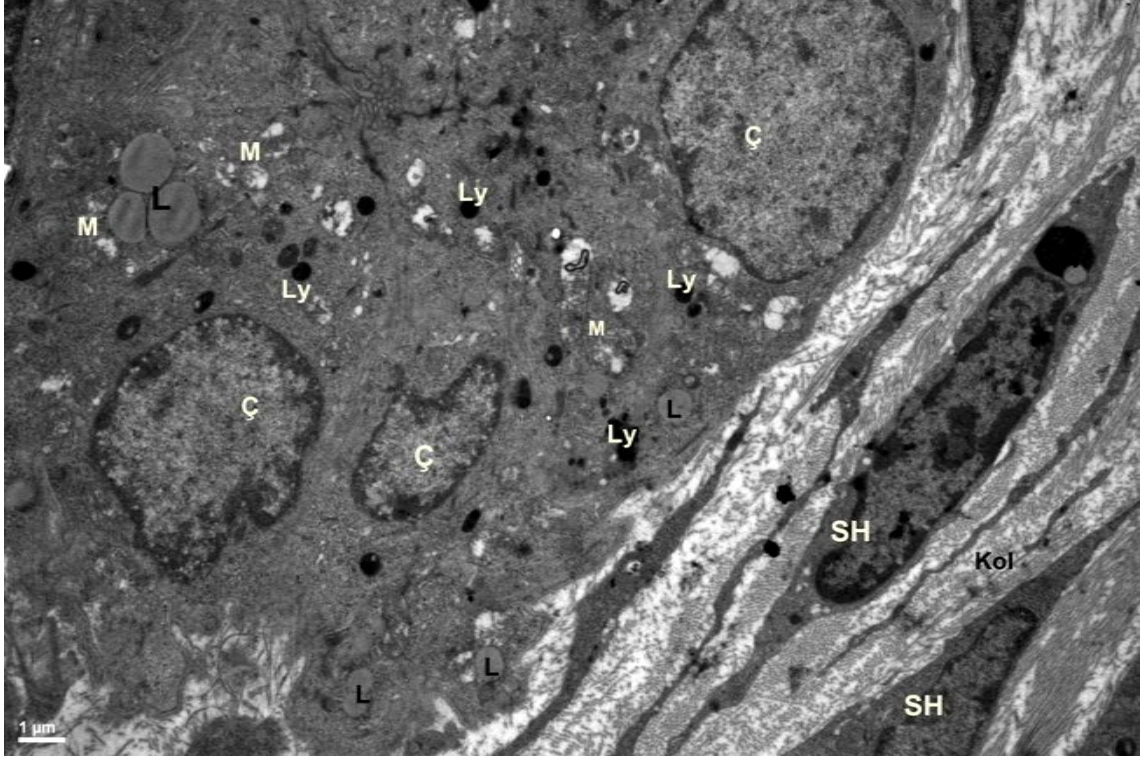
Şekil 34: 1.grupta endometriyal stromada yer alan bezlerin lümenini döşeyen kübik şekilli epitel hücrelerinin yuvarlak çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L), lizozomal yapılar (Ly), dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (M) izlenmekte.



Şekil 35: 2.grupta yer alan uterusların yüzeyini döşeyen prizmatik epitel hücrelerinde uzun çekirdekler (Ç), sitoplazmalarında sayıca artış gösteren lipid damlacıkları (L), lipofuksin granülleri (Lf) ve mitokondriyonlar (M) izlenmekte.



Şekil 36: 2.grupta endometriyal stromada bulunan stromal hücreler (SH), yassı çekirdekleri (Ç) ve kollajen lifler (Kol) izlenmekte.



Şekil 37: 2.grupta endometriyal stromada bulunan bezlerin lümeni döşeyen kübik şekilli hücrelerin çekirdekleri (Ç), sitoplazmalarında dejenerasyon gösteren mitokondriyonlar (M), sayıca artmış lizozomal yapılar (Ly) ve lipid damlacıkları (L) izlenmekte. Stromal hücreler (SH), kollajen (Kol).

5. TARTIŞMA

Son yıllarda moleküler biyolojideki kaydedilen ilerlemeler sayesinde biyolojik temelli, hedefe yönelik tedaviler klinik kullanıma girerek yaygınlaşmaya başlamıştır. Kanserin klasik tedavisinde amaçsız ve kontrolsüz çoğalan hücrelerin sitotoksik tedavi ile yok edilmesi hedeflenir. Kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapi mitozu durdurarak ya da DNA sentezini bozarak bunu gerçekleştirir. Fizyolojik olarak çoğalan normal hücreler de bu tedaviden etkilenir ve çeşitli yan etkiler ortaya çıkar. Hedefe yönelik tedavilerde ise kanseri başlatan, gelişmesine izin veren moleküler bozukluğa doğrudan saldırı söz konusudur. Kanser moleküler biyolojisi ve hücre biliminin ilerlemesi ile kanserin nasıl başladığı, büyüdüğü, ilerlediği ve yayıldığı daha iyi anlaşılmış ve her kademede bloklar ve inhibitörler geliştirilerek yeni ilaçlar tedavide kullanılmaya başlanmıştır ^{1, 58, 63}.

Hedefe yönelik tedaviler kanser hücresinin yüzeyinde bulunan ve kanserin gelişmesinden sorumlu spesifik bir reseptörü ya da onların hücre içindeki bağlantı yollarını bloke ederek çekirdeğe giden bölünme sinyali durdurur. Bu şekilde tümör hücre çoğalması durdurulur. Standart sitotoksik kanser kemoterapisi ile fizyolojik olarak çoğalması gereken hücreler zarar görür ve buna ait yan etkiler ortaya çıkarken hedefe yönelik tedavilerde böyle bir yan etki beklenmez ^{1, 63, 64}.

Hedefe yönelik tedavilerde öncü ilaç İmatinib olmuştur. İmatinib, kronik myelositer lösemide anormal tirozin kinaz aktivitesini durdurmuş gastrointestinal stromal tümörlerdeki c-kit reseptörünü de inaktive ederek hastalığı hiç bir tedavi ile kıyaslanmayacak ölçüde kontrol altına almıştır ^{1, 57}. Bunu hodgkin-dışı lenfomalarındaki CD-20 hücre membran reseptörüne yönelik Rituximab ve meme kanserindeki HER2 reseptörüne yönelik Trastuzumab, kolon kanseri, küçük hücreli dışı akciğer ve baş-boyun kanserlerinde kullanılan EGFR inhibitörü monoklonal antikorlar Cetuximab ve Panitumumab izlemiştir ^{1, 6, 57}. Monoklonal antikorların hücre membranı içinden geçme yeteneği yoktur sadece hücre

yüzeyinde eksprese veya sekrete edilen moleküller üzerinden etki gösterebilir. Lapatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ise hücre reseptörlerinin sitoplazmik parçaları ve hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşirler. Sinyal iletimini hücre içinde bloke eden küçük moleküllu tirozin kinaz inhibitörleri Erlotinib, Gefitinib akciğer ve pankreas kanserlerinde, çoğul hedefe yönelik küçük moleküllu tirozin kinaz inhibitörleri metastatik böbrek kanserlerinde ve hepatosellüler karaciğer kanserlerinde sağ kalımı uzatmıştır ^{6, 9, 57, 63}.

Hedefe yönelik tedavilerin yöneldiği hedeflerin fizyolojik görevleri de vardır. EGFR (ErbB1), Her2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) ve Her4 (ErbB4)'den oluşan ERB ailesi, hem EGFR hem de Her2, MAPK ve PI3K/Akt yolağını aktive ederek normal hücreler ve kanser hücrelerinde, hücre büyümesi farklılaşması ve motilitesinde kritik öneme sahiptir. Örneğin; EGFR reseptörleri deri ve mukozanın yenilenmesi, onarımı ve bütünlüğünden sorumludur. Bu nedenle EGFR blokajında dermatolojik toksisite ve gastrointestinal toksisite gelişir. Erlotinib ve Gefitinib gibi EGFR inhibitörleri, deri ve gastrointestinal toksisite dışında interstisyel akciğer hastalığına %2-5 oranında neden olabilirler ^{6, 63}.

Aynı şekilde HER-2 reseptörleri yoğun biçimde miyokardda bulunur ve miyokardiyositlerin büyümesi, yaşaması, onarımı ve kontraktilitesinden sorumludur. HER2 bloke edilmiş kalpte dilate kardiyomiyopati gelişmekte, sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonu düşmektedir. Çünkü kalp miyokardı onarım prosesini, HER2 reseptörü aracı ile gelişmektedir. Yeni grup ilaçlar her ne kadar iyi tolere edilseler de, bazı hedefe yönelik ilaçların kullanımı sırasında aralarında kalp yetersizliği, sol ventrikül sistolik fonksiyonlarında bozulma, hipertansiyon, tromboembolik olaylar ve nadir olarak miyokard infarktüsünün de bulunduğu kardiyak yan etkiler bildirilmiştir ^{23, 63, 65}.

Hücre bölünmesi ve büyümesinde görevli olan epidermal büyüme faktörü ve reseptörleri birçok memeli uterusunda var olup birçok çalışmada da EGF'nin uterus aktivitesi ve embriyo gelişimi üzerine önemli rolleri bildirilmiştir. İnsan menstrual siklusunda ErbB/HER ailesinin bütün üyeleri uterusu yüzey ve bez epitel hücrelerinde eksprese edilir. ErbB2/HER2'nin fare uterusunda EGF ilişkili büyüme faktörünün stimülasyonunda potansiyel mediatör olarak rol oynadığı

öne sürülmüş, ayrıca bazı türlerde bu reseptörün uterin epitelyal hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir ²⁶.

Oral olarak alınan, EGFR ve HER2 reversibl inhibitörü olan Lapatinib hem EGFR hem de HER2 reseptörüne bağlı tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. Lapatinibin uterus ve over dokularında yol açabileceği değişikliklerin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada uterus kesitlerinin elektron mikroskopik değerlendirilmesi sonucunda, deney gruplarından elde edilen örneklerde endometriyum dokusu kontrol grubuna göre belirgin ultrastrüktürel değişiklikler göstermekteydi. I. gruba ait uterus dokularında yüzey epitel hücrelerde çekirdeklerin indentasyon gösterdiği, heterokromatinden zengin olduğu, endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme, mitokondriyonlarda hacim artışı, lizozomal yapılarda ve lipid damlacıklarında artış bulunduğu, izlenirken bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında yaygın lipid damlacıkları ve lizozomal yapılar gözlendi. II. gruba ait uterus dokularında ise incelenen yüzey epitel hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıklarının ve mitokondriyonların sayıca artış gösterdiği, stromal hücrelerin sitoplazmalarında mitokondriyonların genişleyip dejenere olduğu dikkati çekmekteydi. Bez epiteli hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları, lizozomal yapılar diğer gruba göre daha fazla olup mitokondriyonlarında hacim artışı ve dejenerasyon görüldü. Uterus mukozasında meydana gelen yapısal değişikliklerin EGFR blokajıyla ilişkili olduğu düşünüldü.

EGFR'nin overlerde follikül içerisinde granüloza ve teka hücreleri ile korpus luteumda bulunduğu, epidermal büyüme faktörünün tirozin kinaz aktivasyonu ile oosit matürasyonunu kontrol etmede fizyolojik bir öneme sahip olduğu ve folliküler gelişimi sağladığı bildirilmiştir ^{25, 55}. HER2 overde primordiyal germ hücrelerinde, granüloza hücrelerinde, luteal hücrelerde ve oositte eksprese olmaktadır. HER2, granüloza hücre fonksiyonu regülasyonunda, primordiyal follikül büyümesinin başlaması ve oosit olgunlaşmasında rol alır. Ayrıca EGF rolünü düzenleyen anahtar sinyal molekülü olarak aracılık eder ²⁴.

30 mg/kg Lapatinib uygulanan deney grubuna ait over kesitlerinde primordiyal folliküllerde oosit sitoplazması içerisinde lizozomların ve genişlemiş Golgi kompleksine ait sisternaların bulunduğu, gelişme sürecine girmiş

folliküllerde granüloza hücrelerinin çekirdeklerinin heterokromatinden zengin olduğu ve indentasyonlar gösterdiği, perinüklear sisternalarında genişleme, mitokondrial dejenerasyon, endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme ve çok sayıda apoptotik cisimciklerin bulunduğu görüldü. 75 mg/kg Lapatinib uygulanan deney grubuna ait overlerde primordiyal folliküllerde ooplazma içerisinde Golgi kompleksine ait sisternaların genişlemiş olduğu, değişik hacim ve şekillerde vesikül ve vakuollerin varlığı dikkati çekiciydi. Deney gruplarında gözlenen ve doza bağlı olarak artan bu bulgular Lapatinib'in etkisiyle, oosit ve granüloza hücrelerinin yapısının ve gelişiminin etkilendiğini gösteren ultrastrüktürel değişiklikler olarak değerlendirildi.

Tümör hücrelerinin proliferasyonunda, büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerini aktive etmesi önemli bir basamaktır. EGF reseptörünün fizyolojik olmayan aktivasyonu kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ve sonunda tümör büyümesi ile sonuçlanır. EGF reseptörünün aktivasyonu, sadece hücre bölünmesine neden olan ras yolunun hücre içi aktivasyonuna yol açmakla kalmaz, aynı zamanda apoptozisin inhibisyonu, anjiyogenez stimülasyonu ve metastaz/invazyon ile sonuçlanan diğer hücre içi yolların da aktivasyonuna yol açar. Sunulan çalışmada yüksek doz Lapatinib verdiğimiz grubun (75mg/kg) over dokularındaki folliküllerde tanımladığımız apoptotik değişiklikler yanında bazı folliküllerdeki granüloza hücrelerinde gözlenen perinüklear sisterna ve endoplazmik retikulum genişlemeleri, vakuolizasyon ile karakterize değişiklikler apoptozdan farklı bir yolla oluşan ve büyüme faktörleriyle bağlantılı olarak gelişen paraptoz ile uyumluluk göstermektedir. Sperandio ve arkadaşları çalışmalarında sitoplazmik vakuolizasyon ve mitokondrial şişme ile karakterize farklı bir hücre ölümü tipi olan paraptosisi tanımlamışlardır ⁶⁶. Çalışmamızda yüksek doz Lapatinib alan deney grubunda overlerde gözlenen bu değişikliklerin, EGFR inhibisyonu ile ilişkili olarak, doza bağlı olarak artan apoptoz ve paraptoz nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir ^{36, 66}.

Çalışmanın, biyokimyasal verileri değerlendirildiğinde östrojen ve progesteron değerlerinde değişiklikler olduğu görülmektedir. Deney sonunda kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlardan alınan kan örneklerinin progesteron ve östrojen değerleri karşılaştırıldığında, 30mg/kg ve 75mg/kg Lapatinib

uygulanan gruplarda, progesteron ve östrojen değerlerinin doza bağılı olarak giderek düştüğü dikkati çekmekte ve bu azalmanın EGFR inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim Kennedy, Steward ve Cullinan, Wollenhouth gibi araştırmacılar östradiol ve progesteronun, hücrelerdeki EGF ve EGFR ekspresyonunu, EGF ve EGFR'nin ise steroid hormon bağımlı uterus büyümesini, proliferasyonu ve diferansiyasyonu stimüle ettiği bildirmişlerdir ²⁶. Aynı zamanda farelerin genital sisteminde EGF ve EGFR ekspresyonunda östrojenin artış gösterdiği bildirilmiştir ²⁶. İnsanlarda ise menstrüel siklus boyunca EGFR ekspresyonundaki artışın serum östradiol seviyesine bağımlı olduğu bildirilmiştir ²⁶.

Sonuç olarak, farklı dozlarda uygulanan Lapatinibin over ve uterus üzerine etkilerinin kontrol ve deney gruplarında karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmamızda özellikle yüksek doz grubunda, over ve uterus dokularında yapısal değişikliklerin geliştiği gözlenmiş ancak bu değişikliklerin geriye dönüşümlü olduğu düşünülmüştür. Günümüzde birçok hedefe yönelik ilaç araştırma aşamasındadır. Ümit veren bu ilaçlarla yapılan araştırmalar halen devam etmekte ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir. Ancak hedefe yönelik ajanlar kullanıldıkça bazı beklenmeyen yan etkiler de ortaya çıkmaktadır. Çünkü bu ajanların devre dışı bıraktığı reseptörler ve sinyal molekülleri normal hücreler tarafından da gereğinde kullanılmaktadır. Böylece normal hücreler de zaman zaman hedefin içinde kalabilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

8-12 Haftalık sıçanlara oral yoldan verilen Lapatinib'in etkilerinin incelendiği çalışmamızda; östrojen ve progesteron değerleri istatistiksel olarak irdelenirken, over ve uterus dokularının morfolojik özellikleri ışık ve elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmiştir. Elde edilen deney grubu bulguları, kontrol grubunun bulgularıyla karşılaştırıldığında, aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- 1- Lapatinib'e maruz kalan deney gruplarında östrojen ve progesteron değerleri azalmaktadır.
- 2- Lapatinib'e maruz kalan sıçanlarda primordiyal folliküllerde, gelişen folliküllerin granüloza hücrelerinde belirgin olmak üzere overde dejeneratif değişiklikler gelişmekte ve apoptozis artmaktadır.
- 3- Lapatinib'e maruz kalan sıçanlarda uterus, endometriyal stromada yapısal değişiklikler gelişmektedir.
- 4- Over ve uterus gözlenen değişiklikler doza bağlı olarak artmaktadır.
- 5- EGFR ve HER2 tirozin kinaz inhibitörü olan Lapatinib uygulamasıyla over ve uterus gözlenen yapısal değişikliklerin, hedefe yönelik tedavilerin devre dışı bıraktığı reseptör ve sinyal moleküllerin kullanıldığı fizyolojik proseslerin de etkilenmesi sonucu gelişmiş olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR:

- 1- **Kansu E.** Hedeflenmiş tedavilerde “hedef” moleküller. *ANKEM Derg*, **2005**;19 (Ek 2): 112-116.
- 2- **Atalay C.** Her2 pozitif meme kanserine cerrahi yaklaşım nasıl olmalı? *The Journal of Breast Health Meme Sağlığı Dergisi*, **2010**; vol6, No1: 1-4.
Erişim: http://www.memesagligi.dergisi.org/pdf/pdf_MSD_194.pdf Erişim tarihi:19.12.2011
- 3- **İlhan Ö.** Baş boyun tümörlerinde hedefe yönelik tedavi. *UHOD*, **2008**; Sayı1, Cilt18: 46-56.
- 4- **Oztop I.** Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi. *UHOD*, **2009**; Sayı 3, Cilt19: 184-194.
- 5- **Duvan Cİ, Şatıroğlu H, Berker B, Çetinkaya E, Kahraman K.** Yardımla üreme tekniklerinde implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen faktörler. *T. Klin. Jineco.*, **2003**; 13: 466-475.
- 6- **Harari PM.** Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer*, **2004**; 11: 689–708.
- 7- **Chen HX, Cleck JN, Coelho R, Dancey JE.** Epidermal growth factor receptor inhibitors: current status and future directions. *Curr Probl Cancer*, **2009**; 33(4):245-294.
- 8- **Küçükzeybek Y, Küçükzeybek BB, Demir C.** HER2 pozitif metastatik meme kanserlerinde trastuzumab içeren kemoterapi ile progresyon sonrasında tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi*: **2010**; 17(4): 164-169.
- 9- **Yazıcı S, Özen H.** Böbrek tümörlerinde hedefe yönelik tedavi. *Üroonkoloji bülteni*, **2007**; sayı 3: 3-10.
Erişim: http://www.uroonkoloji.org/ebulten/pdf/pdf_URO_161.pdf Erişim tarihi: 19.12.2011
- 10- **Gadducci A, Cosio S, Genazzani AR.** Old and new perspectives in the pharmacological treatment of advanced or recurrent endometrial cancer: Hormonal therapy, chemotherapy and molecularly targeted therapies. *Oncology/Hematology*, **2006**; 58: 242–256.
- 11- **Giampagliaa M, Chiuria VE, Tinellib A, De Laurentiisc M, Silvestrise N, Lorussoa V.** Lapatinib in breast cancer: clinical experiences and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, **2010**; 36S3: 72–79.
- 12- **Kroep JR, Linn SC, Boven E, Bloemendal HJ, Baas J, Mandjes IAM, van den Bosch J, Smit WM, de Graaf H, Schröder CP, Vermeulen GJ, Hop WCJ, Nortier JWR.** Lapatinib: clinical benefit in patients with HER 2-positive advanced breast cancer. *Netherlands Journal of medicine*, **2010**; Vol68, No9:371-376.
- 13- **Medina PJ and Goodin S.** Lapatinib: A dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clinical Therapeutics*, **2008**; Vol30, No8:1426-1446.
- 14- **Tevaarwerk AJ, and. Kolesar JM.** Lapatinib: A Small-Molecule Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor–2 Tyrosine Kinases Used in the Treatment of Breast Cancer. *Clinical Therapeutics*, **2009**; Vol31, Part2: 2332-2348.

- 15- Jagiello-Grusfeld A, Tjulandin S, Dobrovolskaya N, Manikhas A, Pienkowski T, DeSilvio M, Ridderheim M, Abbey R. A single-arm phase II trial of first-line paclitaxel in combination with Lapatinib in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Oncology* **2010**; 79: 129–135.
- 16- Amir E, Ocaña A, Seruga B, Freedman O, Clemons M. Lapatinib and HER2 status: Results of a meta-analysis of randomized phase III trials in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **2010**; 36: 410–415.
- 17- Fouladi M, Stewart CF, Blaney SM, Onar-Thomas A, Schaiquevich P, Packer RJ, Gajjar A, Kun LE, Boyett JM, and Gilbertson RJ. Phase I Trial of Lapatinib in Children With Refractory CNS Malignancies: A Pediatric Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* **2010**; 28: 4221-4227.
- 18- Burris III HA. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/Erb B-2 inhibitor Lapatinib. *The Oncologist*, **2004**; 9 (Supp3):10-15.
- 19- Halterman PA. Lapatinib and ixabepilone for the treatment of metastatic breast cancer. *Pharmacotherapy*, **2008**; 28(10):1255–1266.
- 20- Kimball KJ, Numnum TM, Kirby TO, Zamboni WC, Estes JM, Barnes M N, Matei D E., Koch KM, AlvarezKristopher RD. A phase I study of lapatinib in combination with carboplatin in women with platinum sensitive recurrent ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, **2008**; 111: 95–101.
- 21- Van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar H-J. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, **2009**; 35: 692–706.
- 22- Galsky MD, Von Hoff DD, Neubauer M, Anderson T, Fleming M, Nagarwala Y, Mahoney JM, Midwinter D, Vocila L, Zaks TZ. Target-specific, histology-independent, randomized discontinuation study of lapatinib in patients with HER2-amplified solid tumors. *Invest New Drugs*, **2010**; DOI 10. 1007/s10637-010-9541-0.
- 23- Lee HA, Kim EJ, Hyun SA, Park SG and Kim KS. Electrophysiological effects of the anti-cancer drug Lapatinib on cardiac repolarization. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2010**;107: 614–618.
- 24- Li-Ping Z, Da-Lei Z, Jian H, Liang-Quan X, Ai-Xia X, Xiao-Yu D, Dan-Feng T, Yue-Hui Z. Proto-oncogene c-erbB2 initiates rat primordial follicle growth via PKC and MAPK pathways. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2010**; 8,66: 1-9.
- 25- Moreno-Cuevas J, Khan-Dawood FS. Epidermal growth factor receptors in rat ovarian tissue. *Tissue & Cell*, **1997**; 29(1): 55-62.
- 26- Sağsöz H, Ketani MA, Saruhan BG. Expression of the erbB/HER receptor family in the bovine uterus during the sexual cycle and the relation of this family to serum sex steroids. *Biotechnic & Histochemistry*, **2011**; Early Online, (doi:10.3109/10520295.2011.556666): 1-12.
- 27- Mülazımoğlu SB, İde T, Aslan S. Ratlarda üreme. *Journal of clinical and Analytical Medicine, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD*, Ankara, Türkiye, **2011**.
- 28- Bayraktaroğlu AG. Deneklerin histolojik özellikleri bunların deneysel çalışmalarda sınırlayıcı yönleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **2010**; 1-6.

- 29- **Boubekri A, Gernigon-Spychalowicz T, Khammar F, Exbrayat J-M.** Histological and immunohistological aspects of the ovarian cycle of the algerian wild sand rat, *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **2007**; Vol.45: 41-49.
- 30- **Ross MH, Pawlina W.** *Histology: A Text And Atlas: with correlated cell and molecular biology*. Baltimore, Philadelphia, 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins, **2010**.
- 31- **Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO.** Dişi Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji*. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2005**; 431-448.
- 32- **Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö, Özgür H.** *Özel Histoloji Ders Notları*. Adana, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, **2006**;156-161.
- 33- Female reproductive system. <http://www.oecd.org/dataoecd/29/38/43754782.pdf> 57-70. 25.11.2011
- 34- **Neill JD.** *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. London, USA, 3rd ed, Elsevier Academic Press, 2006.
- 35- **Abraham L.** Üreme Sistemi. Demir R. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2006**; 531-564.
- 36- **Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, and Hoyer PB.** Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles1. *Biology Of Reproduction*, **2000**; 63: 1245–1252.
- 37- **Tabarowski Z, Szoltyś M, Bik M and Słomczyn'ska M .** Atresia of large ovarian follicles of the rat. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, **2005**; Vol43, No1: 43-50.
- 38- **Guigon CJ and Magre S.** Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. *Biology of Reproduction*, **2006**; 74: 450–458.
- 39- **Moore DM.** Rats and mice: Biology V-9041 Laboratory Animal Medicine And Science Series II, **2000**; ISBN: 1-55910-051-6,1-22.
Erişim: <http://ehs.uc.edu/lams/data/pdfs/9041.pdf> Erişim tarihi: 19.12.2011
- 40- **Sadettin MS.** Rat fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **2010**; 1-3.
- 41- **Oba G, Aslan S, Kaymaz M.** Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vaginal sitolojinin kullanılması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **2001**; 48.
- 42- **Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR.** A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry*, **2005**; 80(2): 79-87.
- 43- **Westwood FR.** The female rat reproductive cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, **2008**; 36: 375-384.
- 44- **Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP.** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, **2002**; 62(4A): 609-614.
- 45- **Sözen EO.** Menstrüel döngüde sıçan uterus epiteline sıkı ve oluklu bağlantı proteinlerinin dağılımlarının immünohistokimyasal olarak belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara, **2008**.

- 46- **Mimura K, Kono K, Maruyama T, Watanabe M, Izawa S, Shiba S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Inoue M, Kono T, Choudhury A, Kiessling R, Fujii H.** Lapatinib inhibits receptor phosphorylation and cell growth and enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity of EGFR- and HER2-overexpressing esophageal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, **2011**; 15;129(10): 2408-16.
- 47- **Gutierrez C, Schiff R.** HER2 Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*, **2011**; vol:135(1): 55-62.
- 48- **Cameron D, Casey M, Oliva C, Newstat B, Imwalle B, Geyer CE.** Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2–positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *The Oncologist*, **2010**; 15: 924–934.
- 49- **Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, Ferriola D, Majsterek I.** Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2009**; 9: 66-76.
- 50- **Hall PS, Hanby A, Cameron D.** Lapatinib for inflammatory breast cancer. *The Lancet Oncology*, **2009**; vol10, issue6: 538-539.
- 51- **Gril B, Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Vega-Valle E, Feigenbaum L , Liewehr DJ, Steinberg SM, Merino MJ, Rubin SD, Steeg PS.** Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain. *J Natl Cancer Inst*, **2008**;100: 1092-1103.
- 52- **Kim JW, Kim HP, Im SA, Kang S, Hur HS, Yoon YK, Oh DY, Kim JH, Lee DS, Kim TY, Bang YJ.** The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines. *Cancer Letters*, **2008**; 272: 296–306.
- 53- **Gürel A.** Menstrüel siklusta tuba uterinada epidermal büyüme faktör reseptörlerinin dağılımlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Yüksek lisans tezi, Ankara **2007**.
- 54- **Ketani MA, Saruhan BG.** Sialodenektomi ve eksojen epidermal growt faktör uygulamasının sıçan uterus dokusu üzerindeki etkilerinin araştırılması. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **2006**; 12(2):167-173.
- 55- **Bulgurcuoğlu S, Özsaıt B, Attar E.** Büyüme Faktörlerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkisi. *Artemis*, **2003**; Vol4(1): 18-26.
- 56- **Oztop I.** Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi. *UHOD*, **2009**; Sayı 3, Cilt19: 184-194.
- 57- **Demirkazık A, Özal G.** Prostat kanserinde hedefe yönelik tedavinin yeri. *Üroonkoloji Bülteni*, **2010**; sayı2: 65-68.
Erişim: http://www.uroonkoloji.org/ebulten/pdf/pdf_URO_279.pdf Erişim tarihi: 19.12.2011
- 58- **Öztürk M.** Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. *Meme Kanseri Sempozyum Dizisi*, **2006**; No54: 15-26.
- 59- **Türkçapar N, Özden A.** Tümör markırları ve klinik önemi. *Güncel Gastroenteroloji*, **2005**; 9/4: 271-281.
- 60- **Süzme R.** HER2/NEU+ meme kanserli hastaların CD8+ T lenfositlerinde hücre siklusu proteinlerinin incelenmesi. Doktora tezi, İstanbul, **2007**.
- 61- **Luna LG.** *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. 3th Ed., New York: Van Nostrad Reinhold Company, **1972**. Chapter 53.
- 62- **Kaya M.** Elektron mikroskopi teknikleri. *Ç.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, **1984**; 9 (1) ; 1-21.

- 63- **Üskent N.** Hedefe yönelik tedaviler ne kadar isabetli ?. *Onkoloji Bülteni Onkovital*, **2010**; sayı:4 s:1.
Erişim: <http://www.anadolusaglik.org/uploads/Files/File/Onkovital-4con.pdf>. Erişim tarihi:19.12.2011
- 64- **Demirelli F.H,** Kanserin Moleküler Genetik Temelleri. *Güncel Klinik Onkoloji*, **2003**; No: 37: 9-15.
- 65- **Aktürk E, Kurtoğlu E, Harputluoğlu H.** Kanseri ilaçlarının Kardiyovasküler Yan Etkileri: Bu Yan Etkiler Nasıl Belirlenmeli, Tedavi ve Takip Nasıl Yapılmalı?. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2011**; 18(2): 137-42.
- 66- **Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J and Bredesen DE.** Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death and Differentiation*, **2004**; 11: 1066–1075.
- 67- **Strecker TE, Shen Q, Zhang Y, Hill J. L, Li Y, Wang C, Kim H-T, Gilmer TM, Sexton KR, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Brown PH.** Effect of lapatinib on the development of estrogen receptor – negative mammary tumors in mice. *JNCI*, **2009**; Vol. 101, Issue 2: 107-113.
- 68- **Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJW, Almenara JA, DeWitt JL, and Sirica AE.** Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ERBB1) and ERBB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology*, **2010**; 52: 975-986.

ÖZGEÇMİŞ

Hande Tokgönül 1986 yılında Adana’da doğdu. İlk öğretim ve lise eğitimini Adana’da tamamladı. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2009 yılı Şubat ayında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı. Hande Tokgönül halen aynı anabilim dalında eğitim-öğretimi sürdürmektedir.