



**ERKEN GEBELİKTE D VİTAMİNİ EKSİKLİĞİNİN KORPUS LUTEUM
GELİŞİMİ VE KOLESTEROL ESTERLERİNDEN PROGESTERON
SENTEZİNİ BAŞLATAN STEROİDOJENİK AKUT DÜZENLEYİCİ (StAR)
PROTEİNİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Deniz KÜÇÜKKARACA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversiteis Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

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

Deniz KÜÇÜKKARACA

16/04/2024

ERKEN GEBELİKTE D VİTAMİNİ EKSİKLİĞİNİN KORPUS LUTEUM GELİŞİMİ
VE KOLESTEROL ESTERLERİNDEN PROGESTERON SENTEZİNİ BAŞLATAN
STEROİDOJENİK AKUT DÜZENLEYİCİ (StAR) PROTEİNİ ÜZERİNE ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Deniz KÜÇÜKKARACA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2024

ÖZET

D vitamini yaşadığımız dönemde oldukça gerekli olan mikro besinlerden biridir. D vitamini eksikliğinde implantasyon başarısının azaldığı bilinir ancak bu durum hala güncel bir çalışma konusudur. D vitaminin vücutta daha çok bir hormon olarak görev yaptığı bilinir ve progesteron hormonuna benzetilir. Progesteron hormonu üreme sağlığında ve implantasyon başarısı için oldukça önemli bir hormondur ve korpus luteum tarafından sentezlenir. Erken gebelikte korpus luteum tarafından progesteron sentezi sağlıklı gebelik ve düşüklerin olmaması için oldukça önemlidir. Progesteron sentezi korpus luteumda olur ve sentezlenmesi için kolesterolün steroidojenik enzimler tarafından progesteronun öncülü olan pregnelona dönüşümünün sağlanması gerekir. Korpus luteumda steroidogenezi düzenleyen, kolesterol esterlerinden progesteron sentezini başlatan StAR (Steroidojenik akut düzenleyici) proteini bu yoloğun ilk basamağıdır. D vitamini eksikliğinde bu yoloğun nasıl etkilendiği ve StAR proteinin etkinliğinin nasıl değiştiği bu projeyle araştırılmak istenmiştir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : D Vitamini, Korpus luteum, Gebelik, Progesteron
Sayfa Adedi : 71
Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

THE EFFECT OF VITAMIN D DEFICIENCY IN EARLY PREGNANCY ON THE
DEVELOPMENT OF THE CORPUS LUTEUM AND THE STEROIDOGENIC ACUTE
REGULATORY (STAR) PROTEIN INITIATING PROGESTERONE SYNTHESIS FROM
CHOLESTEROL ESTERS

(M. Sc. Thesis)

Deniz KÜÇÜKKARACA

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL HEALTH SCIENCES

April 2024

ABSTRACT

Vitamin D is one of the essential micronutrients in our lifetime. It is known that implantation success is reduced in vitamin D deficiency, but this is still a topic of current study. It is known that vitamin D functions more as a hormone in the body and is compared to the hormone progesterone. Progesterone is a very important hormone for reproductive health and implantation success and is synthesized by the corpus luteum. Progesterone synthesis by the corpus luteum in early pregnancy is very important for a healthy pregnancy and the absence of miscarriages. Progesterone synthesis takes place in the corpus luteum and for its synthesis, the conversion of cholesterol to pregnenolone, which is the precursor of progesterone, by steroidogenic enzymes is required. StAR (Steroidogenic acute regulator) protein, which regulates steroidogenesis in the corpus luteum and initiates progesterone synthesis from cholesterol esters, is the first step of this pathway. With this project, it was aimed to investigate how this pathway is affected in vitamin D deficiency and how the activity of the StAR protein changes.

Science Code : 1033
Key Words : Vitamin D, Corpora lutea, Pregnancy, Progesterone
Page Number : 71
Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini ve bilgisini esirgemeyen, tecrübesiyle her zaman beni yönlendiren ve hep bir adım daha ileri gitmemi sağlayan değerli hocam, danışmanım, Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS’a,

Tez çalışma sürecimde benden yardımlarını esirgemeyen, tecrübelerini ve bilimsel birikimlerini benimle paylaşarak bu süreçte bana destek olan başta değerli hocalarım Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLAONĞLU’ na Doç. Dr. Cemile Merve SEYMEN’ e ve bölümde bulunan tüm değerli hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarımda bana çok destek olan, bilgi birikimlerini benimle paylaşan dostça tavırlarıyla hep yeni bir şeyler öğrenmeme katkı sağlayan başta Araş. Gör. Deniz İrem BULUT olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Sonsuz bir sevgi, bin bir emekle beni bugünlere getiren, karşılaştığım her zorlukta beni her zaman destekleyerek daha iyi yerlere gelmemi sağlayan ve her zaman kendi ayaklarımın üzerinde durmamı destekleyen annem Ayten ZORBA ve babam Tuncer ZORBA’ya

Tez sürecimde ve hayatımın her döneminde bana en büyük desteği sunan, her gün beni daha çok motive ederek daha ileri gitmemi sağlayan, her koşulda yanımda olan, sevgisini ve ilgisini her gün daha çok hissettiğim en büyük destekçim, eşim Emre KÜÇÜKKARACA’ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum Gelişimi.....	3
2.2. Ovaryum Anatomisi	3
2.3. Ovaryum Histolojisi	4
2.4. Ovaryum Foliküler Gelişimi	5
2.4.1. Primordial folikül	5
2.4.2. Primer folikül.....	6
2.4.3. Sekonder folikül (Antral folikül).....	6
2.4.4. Graff folikül (Tersiyer folikül)	7
2.4.5. Atretik folikül	7
2.5. Ovulasyon	7
2.6. Korpus Luteum.....	8
2.6.1. Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR)	8
2.7. D Vitamini.....	9
2.7.1. D vitamini sentezlenmesi.....	9

	Sayfa
2.7.2. D vitaminin eksikliği	10
2.7.3. D vitamini reseptörü	10
2.7.4. D vitamini ve ovaryumlar	11
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	13
3.1. Deney Hayvanları ve Uygulama	13
3.1.1. D vitamini eksikliğini belirlenmesi	13
3.1.2. Deneklerin çiftleştirilmesi	14
3.2. Deneyin Sonlandırılması	15
3.3. Histolojik Yöntem	15
3.3.1. Hematoksilen – Eozin boyama	15
3.3.2. Folikül sayımı	17
3.3.3. İmmünohistokimyasal inceleme	18
3.3.4. İstatistiksel analiz	20
4. BULGULAR	21
4.1. Histolojik Bulgular	21
4.1.1. Çiftleşme öncesi vajinal smear bulguları	21
4.1.2. Hematoksilen – Eozin bulguları	24
4.1.3. Folikül sayımı bulguları	40
4.1.4. İmmünohistokimyasal analiz bulguları	41
4.1.5. İstatistiksel analiz	53
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63
EKLER	67
EK-1. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Toplantı Katılım Listesi	68

	Sayfa
EK-2. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Yazısı	69
EK-3. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Deney gruplarını ve deney süresini belirten çizelge	13
Çizelge 3.2. Papanicolaou boyama basamaklarını belirten çizelge.....	14
Çizelge 3.3. Rutin histolojik takip basamaklarını belirten çizelge.....	15
Çizelge 3.4. Hematoksilen – eozin boyama basamaklarını belirten çizelge	16
Çizelge 3.5. Foliküllerin özelliklerine göre sınıflandırılmasını içeren çizelge	17
Çizelge 3.6. İmmünohistokimyasal inceleme basamaklarını belirten çizelge.....	19
Çizelge 4.1. Kontrol grubu için her bir denekten elde edilen 6 preparatta tutulum yoğunluğu ölçümü ve her bir denek için hesaplanan ortalama değerler	53
Çizelge 4.2. Deney grubu için her bir denekten elde edilen 6 preparatta tutulum yoğunluğu ölçümü ve her bir denek için hesaplanan ortalama değerler	54
Çizelge 4.3. Grup istatistiğinde grupların standart sapma ve standart hata değerlerini gösteren çizelge	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Luteal hücrelerde progesteron sentezi şeması.Kollesterol esterleri Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ile mitekondriye taşınması ..	2



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Diöstrus evresi, a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme	21
Resim 4.2. Metöstrus evresi, a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme.....	22
Resim 4.3. Prosöstrus evresi a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme	23
Resim 4.4. Östrus evresi, a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme	24
Resim 4.5. Ge: Germinal epitel, Mp: Multilaminar primer folikül, Cl: Korpus luteum, T: Teka tabakaları, Os: Ovaryum stroması. Af: Atretik folikül. 4X Büyütme	26
Resim 4.6. Sağlıklı gelişen sekonder folikül 40X Büyütme. Os: Ovaryum stroması, Sf: Sekonder folikül, O:Oosit, Gh, Granüloza hücreleri, Zp: Zona pellusida, Pf: Primordial folikül, Mp: Multilaminar primer folikül.....	27
Resim 4.7. Graf folikülde normal yapısında izlenen teka interna ve eksterna 20X Büyütme. Ge: Germinal epitel, Gh Granüloza hücreleri, Zp: Zona pellusida, A: Antrum, T: Teka tabakaları, Os: Ovaryum stroması, Cl: Korpus luteum, K: Kan damarları	28
Resim 4.8. Korpus luteum yapısında farklılaşmış hücreler ve teka interna anjiogenez oluşumu 10X Büyütme. Cl: Korpus luteum, K: Kan damarları, Os: Ovaryum stroması.....	29
Resim 4.9. Korteks yapısında sağlıklı gelişen farklı gelişim evrelerindeki foliküller 4X Büyütme. Cl: Korpus luteum, Af: Atretik folikül, Sf: Sekonder folikül, Os: Ovaryum stroması, Up: Unilaminar primer folikül	30
Resim 4.10. Ovaryum medullasında bulunan kan damarlarının sağlıklı gelişimi 40X Büyütme. S: Sinir, Os: Ovaryum stroması.....	31
Resim 4.11. D vitamini eksikliği oluşturulan grupta korpus luteum yapılarında azalma ve atretik foliküllerde artış (4x) Cl: Korpus luteum, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması, K: Kan damarları	32
Resim 4.12. Atretik foliküllerde zona pellusida kaybı (10x) Cl: Korpus luteum, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması, K: Kan damarları	33
Resim 4.13. Ovaryum stromasında damar yapılarında belirgin dilatasyon (10x) Mp: Multilaminar primer folikül, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması, K: Kan damarları, Cl: Korpus luteum	34
Resim 4.14. Sekonder foliküllerde dejenerasyon (20x) Pf: Primordial folikül, Sf: Sekonder folikül, A: Antrum, Gh: Granüloza hücreleri, Zp: Zona pellusida, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması.....	35

Resim	Sayfa
Resim 4.15. Multilaminar primer folikülde kalınlaşmış zona pellusida (40x) Mp: Multilaminar primer folikül, Zp: Zona pellusida, O: Oosit, Os: Ovaryum stroması, Af: Atretik folikül.....	36
Resim 4.16. Teka interna ve eskterna yapılarının birleşmiş olması (40x) Cl: Korpus luteum, T: Teka tabakaları, K: Kan damarları	37
Resim 4.17. Boşluklu korpus luteum yapısı (50x) Cl: korpus luteum, luteal hücreler arası oluşan boşluklar, 40x büyütme	38
Resim 4.18. Oosite doğru çekilen mekik şekilli foliküler hücreler (20x) Gh: Granüloza hücreleri, Mh: Mekik şeklinde gözlenen hücreler, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması.....	39
Resim 4.19. Dejenere olmuş korpus luteum (10x) Af: Atretik folikül, K: Kan damarları, Os: Ovaryum stroması, Sf: Sekonder folikül, Cl: Korpus luteum, Gh: Granüloza hücreleri, Mh: Mekik şeklinde gözlenen hücreler	40
Resim 4.20. Folikül sayımı istatistiksel analizi.....	41
Resim 4.21. Kontrol grubunda büyük büyütmede over dokusu. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum, *: Büyümekte olan foliküller, Ok başı: Germinal Epitel. 4X büyütme	43
Resim 4.22. Kontrol grubunda sağlıklı gelişen over dokusu. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum, SF: Sekonder folikül. 4X büyütme	43
Resim 4.23. Kontrol grubunda interstisyel bezlerde ve sekonder folikülde ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül. 20X büyütme	44
Resim 4.24. Kontrol grubunda korpus luteumlarda ve interstisyel bezlerde gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum. 4X büyütme.....	44
Resim 4.25. Kontrol grubunda büyümekte olan foliküllerde gözlenen tutulum. İ: İnterstisyel bez, *: Büyümekte olan foliküller.....	45
Resim 4.26. Sekonder foliküllerde zona pellusidada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül. 10X büyütme	45
Resim 4.27. Korpus luteum hücrelerinde ve intersitisyel bezlerde gözlenen tutulum. KL: Korpus luteum, İB: İnterstisyel bez. 20X büyütme	46
Resim 4.28. Kontrol grubunda kan damarlarının lümeninde gözlenen tutulum. Δ Kan damarları. 20X büyütme	46
Resim 4.29. Germinal epitel de ve interstisyel bezlerde gözlenen tutulum. Ok: Germinal epitel, İB: İnterstisyel bez. 20X büyütme	47

Resim	Sayfa
Resim 4.30. Sekonder folikülde zonapellusida ve ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, GH: Granüloza hücreleri, ZP: Zona pellusida. 40X büyütme	47
Resim 4.31. Korpus luteum hücrelerinde gözlenen tutulum. KL: Korpus luteum. 40X büyütme.....	48
Resim 4.32. D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubunda over dokusunda gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum. 10X büyütme.....	49
Resim 4.33. Gelişmekte olan foliküllerde gözlenen ooplazmik tutulum. *: Gelişmekte olan folikül, İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum. 10X büyütme.....	50
Resim 4.34. Korpus luteum hücrelerinde gözlenen tutulum. KL: Korpus luteum, İB: İntersitisyel bez. 20X büyütme	50
Resim 4.35. Sekonder folikülde zona pellusida da gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, ZP: Zona pellusida. 20X büyütme.....	51
Resim 4.36. Sekonder folikülde zona pellusida da ve granüloza hücrelerinde gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, ZP: Zona pellusida, O: Oosit. 40X büyütme.....	51
Resim 4.37. Kan damarlarının lümeninde gözlenen tutulum. 40X büyütme	52
Resim 4.38. Sekonder folikülde granüloza hücrelerinde ve ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, A: Antrum, GH: Granüloza hücreleri, T: Teka tabakaları. 20X büyütme.....	52
Resim 4.39. Gelişmekte olan foliküllerden multilaminar primer folikülde ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, *: Gelişmekte olan folikül. 40X büyütme	53
Resim 4.40. Tüm gruplarda tutulum alanlarının ölçümlerine dayalı toplam alan değerleri.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile beraber aşağıdaki listede belirtilmiştir.

Simgeler	Açıklamalar
25OHD3	D vitamini aktif formu
AMH	Antimüllerian hormon
CYP27B1	Mitekondriyal hidroksilaz enzimi
D2	D vitamini bitkisel formu
D3	D vitamini hayvansal formu
FGF23	Fibroblast büyüme faktörü 23
LH	Lüteinize edici hormon
PKOS	Polikistikover sendromu
PTH	Paratiroid hormon
StAR	Steroidojenik akut düzenleyici protein
UV	Ultraviole
UVB	Ultraviole B
VDBP	D vitamini bağlayıcı protein
VDR	D vitamini reseptörü

1. GİRİŞ

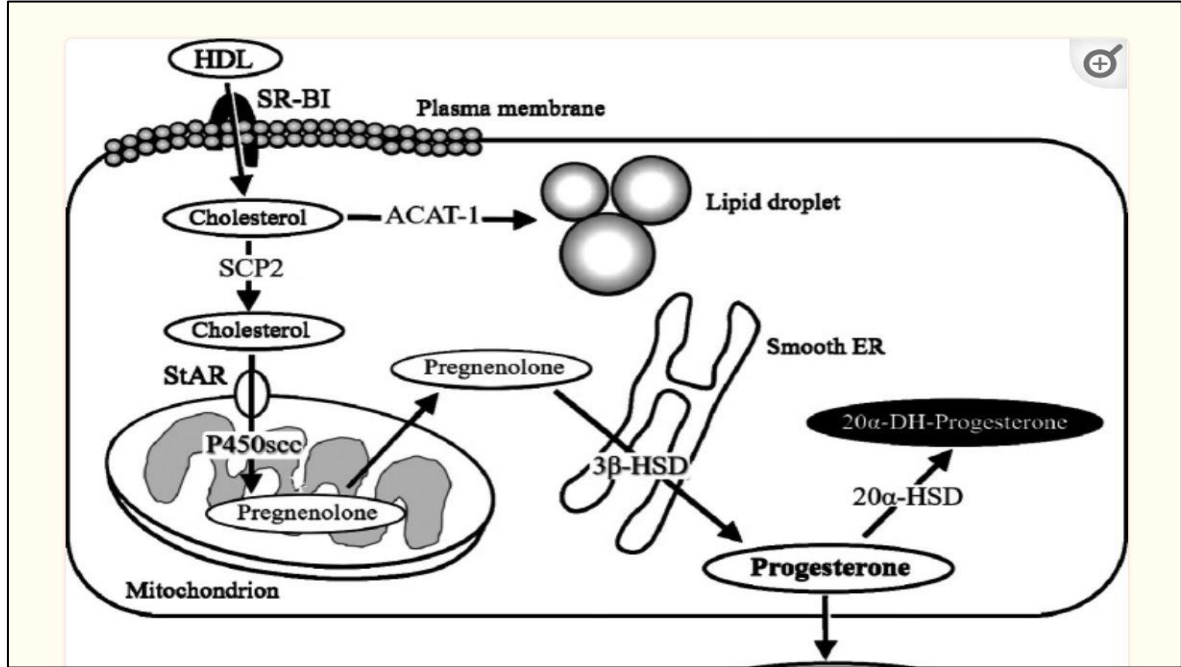
D vitamini; metabolizma, anabolizma, mineral homeostazı ve hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan önemli bir mikro besindir. D vitamininin en büyük kaynağı güneştir ancak besinler ile de D vitamini almak mümkündür. D vitaminin temel görevi intestinal kalsiyum ve fosfor emilimini sağlayarak minerallerin homeostazından sorumludur. Bunun yanı sıra D vitamininin hastalıklar üzerinde olumlu etkisinin olduğu bilinmektedir.

Yaşadığımız pandemi döneminde Covid-19 ile D vitamini ilişkisini inceleyen çalışmalar ile D vitamininin vücudumuz için daha gerekli bir besin olduğu ortaya konmuştur. Birçok araştırmada D vitamini ve Covid-19 başarılı tedavisi arasında bir ilişki olduğu ortaya koyulmuştur. Ancak kanıtların çoğu gözleme dayalıdır, yani diğer faktörleri hesaba katmadan, yalnızca D vitamini düzeyleri yüksek ya da düşük insanlar ele alınmıştır.

D vitamini eksikliği bütün dünyada çok yaygın bir sorundur. Dünya nüfusunun neredeyse % 50'sini etkiler. Birçok çalışma, düşük D vitamini seviyeleri ile artan kanser riski arasında bir bağlantı olduğunu öne sürmüştür. Son epidemiyolojik çalışmalar ise düşük D vitamini seviyeleri ile çoklu hastalık durumları arasındaki ilişkileri gözlemlemiştir. ve hayvan verileri, düşük D vitamini durumunun bozulmuş doğurganlık, endometriozis ve polikistik over sendromu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Doğurganlık ve üreme kapasitesinin önemini araştıran deneyler, D vitamini eksikliği olan dişi sıçanların doğurganlık hızlarının azaldığını, yavru boyutlarının azaldığını ve çiftleşme davranışının tehlikeye girdiğini göstermektedir. Dişi farelerde anormal yumurtalık gelişimi, uterus hipoplazisi ve infertilite gibi durumlar görülebilir. D vitamini dişi üreme sisteminde uterus desializasyonuna aracılık eden progesteron üretimini de arttırdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Erken gebelikte D vitamininin birçok fizyolojik aktivitede progesteron ile uyum içinde çalıştığı ve D vitamininin gebelik oluştuğunda endometriyumun alıcılık durumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu yüzden D vitamininin progesteron benzeri bir aktiviteye sahip olduğu tanımlanmaktadır. Korpus luteumda progesteron sentezinin başlayabilmesi için kolesterol esterlerinin hücre içinde mitokondri dış zarına daha sonra mitokondri iç zarına taşınması gerekir. Bu yolağı kontrol eden aktif enzimler bulunur ve bu enzimler sayesinde progesteron öncülü olarak bilinen pregnenolon oluşumu gözlenir. Kolesterol esterlerinin mitokondri dış zarına taşınmasında önemli görevi olduğu bilinen steroidojenik akut

düzenleyici protein (StAR), kolesterol esterlerinden progesteron sentezinin önemli bir basamağı düzenlediği bilinmektedir. Bu enzim kolesterol esterlerinin mitekondri içine alınmasında kilit rol oynadığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. (Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Luteal hücrelerde progesteron sentezi şeması. Kolesterol esterleri Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ile mitekondriye taşınması

D vitamininin, korpus luteumun sağlıklı olarak gelişiminde ve kolesterol esterlerinden progesteron sentezini başlatan ve düzenleyici olarak görev yapan steroidojenik akut düzenleyici (StAR) protein üzerinde bir etkisinin olup olmadığını inceleyen bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu yüzden bu projenin bu konudaki boşluğu tamamlayacağı düşünülür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Gelişimi

Genital sistem, intermediate (ara) mezoderden farklanır. Vücut duvarının iki yanında bulunan intermediate (ara) mezoderm gonadal çıkıntı (ürogenital kabarıklık) oluşturur [1]. Genital çıkıntılar, 5. Haftadan itibaren sölom epitelinin mezonefrozun medial bölgesine doğru kalınlaşması ile oluşur. Bu kalınlaşma sonucunda altında bulunan mezenşimi istila ederler. [2, 3]. Ürogenital kabarıklıklardan, genital kabarıklıklar gelişmeye başlar [4]. Gonadlar, epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşimin farklılaşması ile bir çift uzunlamasına gonadal sırt olarak görünmeye başlarlar [1]. Gelişimin 6. Haftasına gelindiğinde 4. Haftada vitellüs kesesi duvarında oluşan primordial germ hücreleri göç hareketine başlar. Primordial germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenterinden yukarı yönlü hareket ederler. Böylece bu hücreler farklılaşmamış gonadlara yerleşirler ve burada ovaryumlara farklılaşacaklardır [3].

Gelişimin 10. Haftasında ise farklılaşmamış gonadlar yumurtalığa dönüşmüş olarak görünür. Primer seks kordonları dejenere olarak kortikal kordonlar (sekonder seks kordonları) oluşur [4]. Seks kordonları küçük gruplara ayrılarak her bir grup ilkel folikül oluşturmak üzere ilkel germ hücresi veya oositi çevreler [2]. 10. Torasik segmentte medial bölgeye mezenşim hücrelerinin gelmesi, somatik destek hücrelerinin üretimi için kölomik epitel uyarılır. Somatik destek hücreleri kadınlarda folikül hücrelerine farklanır. Paramezonefrik kanallar genital kanallar haline gelir. Paramezonefrik kanalların proksimal uçları, fallop tüplerini oluşturur. Distal uç ise füzyona uğrar ve uterus ve vajinayı oluşturur [1]. Ovaryun ilk olarak bel bölgesinde oluşarak pelvise iner. Gubernakulum oluşur ve uterin tüp ile birleşerek uterusa bağlanır [2].

2.2. Ovaryum Anatomisi

Oval şekilli, pembe renkli intraperitoneal organlardır. 3 cm uzunluğunda, 1 cm kalınlıkta ve 2 cm genişliğindedir. Yumurtalıkların, tubal ve uterus ucu olmak üzere iki ucu, mezovaryum ve serbest arka sınır olarak iki sınırı ve medial yüzey, lateral yüzey olarak iki farklı yüzeyi vardır [5]. Pelvis yan duvarında obturator siniri içeren çöküntü olan fossa ovaricaya yerleşmiş olarak bulunur. Ovaryum pelvis yan duvarında ön bölgesinde dış iliak damarlar,

arkada ise iç iliyak damarlar ve üreter ile sınırlanır [6]. Over geniş ligamentin arka ligamentine mezovaryum ile, lateral pelvik duvara infundibulopelvik ligaman ile, uterusu ise over ligamanı ile bağlanır. Posterior kenar tubal ampulla ile ilişkilidir [5]. Ovaryumun periton örtüsü yoktur, seroza mezoovaryan bağlantıda biter [6]. Ovaryum periton ile örtülmediğinden oosit periton boşluğuna atılır buradan da uterusu geçer. Yumurtalık arteri tarafından beslenir. Yumurtalık arteri asıcı bağda bulunur ve uterus arteri ile de anastomoz yapar. Bu sayede yumurtalıkların beslenmesi sağlanır. Sağ yumurtalık damarı, inferior vena cava ile, sol yumurtalık damarı ise sol renal ven ile devam eder [7]. Lenfatikler böbrek damarları ile aort düğümlerine geçer. Ovaryumların sinir beslenmesi ise aort pleksusundan gelmektedir [6].

Her ovaryum mezovaryum ile broad ligamentin posterior yüzeyine bağlıdır. Tubal ucu ovaryum sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligamentile pelvis duvarına bağlanır. Uterin ucu ise, ovaryan ligament ile uterusu bağlıdır [8].

2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, badem şeklinde üreme bezleridir. Östrojen ve progesteron hormonlarını üretmekte görevlidir. Aynı zamanda sekonder cinsiyet özelliklerinin gelişmesini ve gebeliğin kontrolünden sorumlu organlardır [9]. Ovaryum korteks ve medulla olarak iki bölümden oluşmaktadır. Korteks ve medulla birbirinden keskin bir şekilde ayrılmaz [10]. Medulla, sıkı bağ dokudan oluşur ve kan damarlarını ve sinirleri içerir [11]. Korteks bölgesi ise medullayı çevreleyen bölümdür böylece periferik bölgede yer alır [8]. Korteks bağ dokusunun içinde primordial foliküller bulunur. Medulla ise hilustan ovaryumun içine giren bağ dokusu, sinirler, lenf ve kan damarları, interstisyel hücrelerden oluşmaktadır [10]. Spiral arterler ovaryuma hilus bölgesinden girer. Folikül gelişmesinde ve korpus luteum gelişimde rol oynarlar. Ayrıca hilusta cinsel farklılaşmadan önce fetal döneme ait kalıntıların bulunduğu hücreler de bulunur [3]. Ergenlikten önce yani yumurtlama başlamadan önce yüzeyleri prüzüzdür ancak yumurtlama başladıktan sonra yüzey düzensiz hale gelir. Yumurtalık yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan yüzey epiteli ile kaplıdır. Germinal epitel basit kübik epitelden oluşur [8].

Germinal epitel tek katlı yassı epitelden kısa kübik epitele kadar değişkenlik gösteren bir epitelidir [10]. Germinal epitelin altında tunika albuginea denilen ve yoğun bağ dokudan oluşan bir kapsül bulunur [2].

2.4. Ovaryum Foliküler Gelişimi

Yumurtalığın fonksiyonel birimi foliküllerdir [12]. Oosit, teka hücreleri ve granüloza hücrelerinden oluşmaktadır. Folikül gelişimi ve ovulasyon süreci steroidogenezi ve oogenezi karmaşık sinyal mekanizmaları ile kontrol edilmektedir [13]. Fetal yaşamda oluşan primordial foliküllerin seçimi ergenlikten sonra gelişen tüm folikülleri sağlamaktadır [14].

Ovaryum folikülleri tek bir oosit içerir ve foliküller korteks stromasında dağınık olarak bulunur. Siklusta bulunan ovaryumda her gelişim evresinde foliküller bulunabilmektedir. Ancak primordial foliküller her zaman daha baskın olarak bulunan foliküllerdir. Gelişim evresine göre histolojik olarak 3 ovaryum folikülü bulunmaktadır [8].

- Primordial foliküller
- Primer ve sekonder foliküller
- Graaf foliküller

2.4.1. Primordial folikül

Folikül gelişiminin en erken evresi olarak bilinmektedir [8]. Sayı olarak en fazla bulunan foliküllerdir [10]. Doğumdan önce, anne karnında ilk olarak 3. Haftada görülür [8]. Fetal ovaryumda oluşan primordial foliküller bu evrede dinlenme evresine geçer [10]. Fetal yaşamda primordial foliküllerin sayısı 20. Haftada en yüksek seviyeye ulaşır ve yaşam süreci boyunca bu sayı logaritmik olarak azalmaktadır [15]. Fetal yaşamda oluşan primordial folikül sayısı doğurganlığı sınırlayabilmektedir [16]. Bir dişide bulunan primordial foliküller o canlının yumurtalık rezervidir [17].

Olgun bir ovaryumda primordial foliküller korteks bölgesinde tunika albuginea altında yer alır [8]. Primordial foliküller gelişimini ilerlettikçe yumurtalığın merkezine doğru çekilirler [3]. Bu folikülde oositin etrafı tek tabakalı yassı hücreler ile çevrilidir. Oosit ve etrafındaki epitel hücreleri birbiri ile çok yakındır. Oosit sitoplazmasında Balbiani cisimciği adı verilen

golgi kompleksi, veziküller ve endoplazmik retikulumun oluşturduğu özel yapı bulunur. İnsan ooplazmasında ise bu yapıya ek olarak anular lameller içerir [8].

2.4.2. Primer folikül

Folikül büyümesinde ilk evredir. Oosit büyür ve primordial folikülde oositi çevreleyen yassı hücreler kübik şekil alır. Oosit büyüdükçe salgılanan proteinler birleşerek oositin dışında ekstraselüler bir örtü olan Zona pellusidayı oluşturmaktadır [8]. Zona pellusida folikül hücrelerini oositin ayırır. Foliküler hücrelerin uzantıları zona pellusidayı geçerek oluklu bağlantılar ile geçiş oluştur [10]. Oosit etrafındaki folikül hücreleri proliferasyona uğrayarak granüloza tabakasını oluşturur. Hücreler membrana granüloza (granülozum strotum) olarak oositin çevreleyen çok katlı yassı epiteli oluştur ve bu hücreler arasında oluklu bağlantılar gelişir. Granüloza hücreleri bağ doku ve folikül hücreleri arasında bulunmaktadır [8].

2.4.3. Sekonder folikül (Antral folikül)

Zona pellusidanın tam olarak oluşmuş ve belirgin haliyle bulunması sekonder folikülü oluşturur. Folikül hücreleri kendi aralarında farklanarak Teka tabakasını oluşturur. Teka tabakası bir kapsül şeklindedir [10]. Teka tabakası bazal laminanın dışında oluşur [8]. Kısa zamanda içte damarlı ve glandular yapıda olan teka interna, ve bunu çevreleyen kapsül benzeri bir yapıda bulunan teka eksterna olmak üzere iki farklı bölüme ayrılır [9]. Teka interna iç kısmında bulunan kübik salgı hücreleri bulunduran vaskülarize bir yapıdır. Bu tabakada bulunan hücreler tamamen proliferasyon olarak steroid üreten hücre özelliği kazanmış hücrelerdir. Bu tabakada bulunan hücreler çok sayıda LH (Lüteinize edici hormon) reseptörleri bulundur ve androjenleri sentezlemekte görevli oldukları bilinir [8]. Teka eksterna ise Bağ dokusunun dış kısmında kalan hücrelerdir. Düz kas hücrelerini ve kollajen demetlerini içerir. Bu tabaka ile stroma arasındaki sınır belirgin değildir [8]. Teka eksterna ovaryum stroması ile devam eder [10]. Granüloza hücrelerinin kalınlaşmasıyla birlikte aralarında sıvı dolu aralıklar görülmeye başlar. Bu aralıklara likör folikülleri denir ve sıvı birikimi oldukça aralıklar birleşerek antrumu oluşturur [8]. Antrum oluşuktan sonra folikül sekonder folikül adını alır. Ovaryum folikülü oval bir şekil alır ve oosit eksantrik konuma yerleşir [9]. Sekonder folikülde oosit artık büyümesini durdurur ve bu olay granüloza hücreleri tarafından sentezlenen, oosit maturasyon inhibitörü tarafından sağlanmaktadır [8].

2.4.4. Graff folikül (Tersiyer folikül)

Antrum oluşumu primer oosit etrafındaki hücrelerin yeniden düzenlenmesine neden olmaktadır [10]. Granüloza hücreleri oosit ile yakın olukları bölgede kümülüs ooforus yapısını oluşturur. Bu yapı antruma doğru bir çıkıntı şeklinde ortaya çıkmaktadır [8]. Kümülüs ooforus hücreleri ovulasyon sırasında oositle birlikte atılmaktadır. Bu şekilde oositle birlikte kalan hücrelere de korona radiata adı verilmektedir [8]. Folikül olgunlaşmaya devam eder ve yüzeyinde bir çıkıntı oluşur [9]. Folikül en büyük halindedir ve ovulasyondan hemen önceki halini alır. Yaklaşık olarak 15-20 mm çapında olduğu bilinmektedir. Folikül içinde primer oosit eksentrik bir konum almış halde gözlenmektedir [10].

2.4.5. Atretik folikül

Ovaryan foliküller granüloza hücrelerinin apoptoza uğraması ile kaybedilir. Embriyonik dönemde başlayan folikül oluşumu sırasında foliküllerden çoğu maturasyonu tamamlayamaz ve atreziye uğrar. Foliküller dejenere olur ve böylece folikül kayıpları başlamaktadır. Foliküllerin çoğu fetal gelişim aşamasında ve pubertede atreziye uğramaktadır. Gelişmekte olan küçük foliküllerde oosit küçülerek dejenere olur aynı zamanda granüloza hücrelerinin de dejenere olduğu apoptoza uğradığı bilinmektedir. Böylece atretik foliküller ovaryum stromasında kaybolur. Gelişmekte olan daha büyük foliküller de ise bu durum daha karmaşık olduğu bilinmektedir. Bu foliküllerde oosit dejenerasyon daha geç olmaktadır [8]. Atretik foliküller kalın ve büzülmüş mebran materyali yani camsı membran ve dejenere olmuş zona pellusida ve oosit bulunması ayrıca folikül hücre kalıntıları ile diğer foliküllerden ayırt edilmektedir. Bu foliküllerde makrofajlar da bulunabilir [10].

2.5. Ovulasyon

Folikül gelişimi ve olgun oositin folikülden atılması endokrin mekanizmalara bağlı olan karmaşık bir süreçtir. FSH ve LH hormonlarının folikül gelişiminde ve olgun folikülün bırakılmasında önemli görevleri vardır [18]. Menstrual döngüde ovulasyona uğrayacak folikül döngünün ilk günlerinde primer oositlerin arasından seçilir. Ovulasyon menstrual döngünün ortasında yani 14. günde gerçekleşir [8]. Olgunlaşmış folikül ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru bir çıkıntı yapar. Bu çıkıntı Stigma olarak adlandırılır. Kanda LH

seviyesinin ani artışına bağlı olarak uyarılan teka eskterna tunika albuginea olgun folikülün yırtılmasını kolaylaştırır [10]. Sekonder oosit graaf folikülden dışarı atılır. Ovulasyon sırasında oositle beraber germinal epitel de atılır. Sekonder oositin atılmasını, foliküler sıvının hacmindeki artış ve basınç artışı, folikül duvarının proteolize uğraması ve teka eksterna tabakasında bulunan düz kas liflerinin kasılması gibi olaylar tetikler [8].

2.6. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra geriye kalan hücre tabakası büzüşerek hormon salgılayan bir bez haline gelir [10]. Korpus luteum oluşmaya başladığında teka internadan gelen kan damarları granüloza hücre gtabakasına doğru büyür. Bu vaskülarize yapı ovaryumun korteks tabakasında yer alır. Esas olarak progesteron hormonu salgılamakla görevli olan bir yapıdır. Progesteron hormonuna ek olarak bir miktar östrojen de salgılar. Foliküler hücrelerin korpus luteum hücrelerine dönüşümü yumurtlamadan sonra gerçekleşir. Büyüyen foliküler hücrelerin sitoplazmaları lütein adı verilen sarı pigment ile dolar. Böylece hücreler luteal hücrelere dönüşür. Sarı pigmentten dolayı sarı renk alır korpus lutuma sar cisim de denir [2].

2.6.1. Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR)

Steroidojenik dokularda steroid üretiminin akut regülasyonunda rol oynadığı düşünülen bir başka protein grubu da, mitokondriyal proteinler ailesidir [19]. Steroidojenik akut düzenleyici proteinin (StAR), steroid hormon biyosentezinin düzenleyicisi olduğuna inanılmaktadır. Kolesterolün iç mitokondriyal membrana geçişi, StAR proteininin mitokondriye alınması ve işlenmesi sırasında gerçekleştirilir [20]. Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR), insan yumurtalık dokularında steroidojenik bölgelerde sentezlendiği bilinmektedir [21]. Steroidojenik akut düzenleyici protein sitokrom mitekondri iç zarına kolesterol girişini sağlar böylece kolesterolün steroid hormon öncülü olan pregnelona dönüşümünü başlatan enzim olarak görev yapar [22].

StAR geninde oluşan mutasyonlar sonucunda steroid hormon biyosentezinin bozulduğu bilinmektedir [23]. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında bu proininin adrenal korteks gibi steroid üreten bir çok dokuda eksprese edildiğini ortaya koymaktadır [24].

2.7. D Vitamini

D vitamini yaşam için gerekli mikroblesinlerden biridir. Parat hormon ve kalsitonin ile birlikte kalsiyum ve fosfor metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar [25].

Bu görevlerin yanı sıra insan vücudunda yağda çözünen stroid bir hormon olduğu bilinir [26, 27]. D3 (Kolekalsiferol) ve D2 (Ergokalsiferol) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. D vitamini sinirim yoluyla emilerek ya da güneş ışınları sayesinde ciltte üretilmektedir. D vitamini ciltte güneş ışığı sayesinde üretilen tek vitamindir. D2 formu mantarlarda doğal olarak bulunurken D3 formu, güneş ışığının cilde çarpmasıyla birlikte sentezlenmeye başlar [28]. Deride epidermal hücrelerin UVB ışınlarına maruz kalmasıyla cilt tarafından üretilen D3 miktarı belirlenebilir. D3'ün dolaşımdaki ana formu 25-Hidroksivitamin D3 (25 OH D3)'tür. Bu form vücudumuzdaki D vitamini seviyesinin bir ölçüsüdür [29].

D vitamini takviyelerinin kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu takviyeler sayesinde yeterli miktarda D vitamini alımı sağlanmış olur [30]

2.7.1. D vitamini sentezlenmesi

İnsan için temel D vitamini kaynakları, endojen cilt sentezi ve diyetdir. D vitamini kaynağı olan çok az besin kaynağı vardır. Kırmızı et, balık ve yumurta sarısı diyetle D vitamini alımını sağlayan yiyeceklerdir [30]. D2 vitamini, bitkilerde, mayalarda ve mantarlarda UV ile üretilir. İnsan vücuduna besinler yani diyet yoluyla alınabilir. Deri ve diyet yoluyla alınan D vitamini, D vitamini bağlayıcı proteine (VDBP) bağlanarak karaciğere taşınır [31].

Deride D3 vitamin sentezi, 90-315 nm (UVB) aralığındaki ışınlara maruz kalındığında ciltte sentezlenmektedir [30]. Ultraviyole radyasyonun doğal kaynağı güneştir. D vitamini sentezinin başlaması için ultraviyole ışınlarının, epidermal hücrelerde bulunan 7-dehidrokolesterol molekülüne çarpması gerekir [32]. 7-dehidrokolesterol, UVB aracılı enzimatik olmayan bir reaksiyonla pre-vitamin D3'e dönüşür [33]. Pre-vitamin D3 vitamini deride termal izomerizasyonla D3 vitamini üretilir ve dolaşıma girer. Karaciğerde D3 vitamini, sitokrom P450 enzimlerinden biri (25- hidroksilaz) ile 25 hidroksivitamin D3 (25 OH D3)'e sentezi sağlanır. Daha sonra böbrekte, 25 OH D3 vitamininden mitokondriyal

CYP27B1-hidroksilaz enzimi ile aktif form 1,25 dihidroksivitamin D [$1,25 (OH)_2 D$] sentezlenir. Bu sentezi böbreklerin proksimal tüplerinde paratroid hormon (PTH) tarafından uyarılır ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF 23) tarafından baskılanır [34].

2.7.2. D vitaminin eksikliği

D vitamini eksikliği son yıllarda oldukça fazla araştırmaya konu olmaktadır. Birçok farklı hastalıkla D vitamini eksikliğin bağlantısı ortaya çıkarılmış ancak halen daha tüm etkileri bilinmemektedir. D vitamini eksikliği gebe olan bireyleri, bebekleri ve çocukları etkileyen en büyük sorunlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır [35].

Dünya genelinde düşük D vitamini seviyeleri ile çok yaygın olarak karşılaşılmalıdır. Dünya çapında 1 milyar insanın D vitamini yetersizliğine ya da eksikliğine sahip olduğu tahmin edilmektedir [36]. D vitamini durumunu en iyi şekilde değerlendirmek için serum 25(OH)D belirteç olarak kabul edilir [37]. 25 (OH) D seviyesini ölçmek için kullanılan immün bazlı ve kromatografi bazlı testler bulunmaktadır. Kromatografi bazlı testler genellikle araştırmalar için kullanılmaktadır. D vitamini serum seviyeleri, nMol/L ya da ng/mL olarak ölçülür ($1 \text{ ng/mL} = 2,5 \text{ nMol/L}$) [36].

2.7.3. D vitamini reseptörü

Biyolojik olarak D vitamininin etkileri D vitamini reseptörü (VDR) tarafından sağlanır. VDR hedef hücrelerin çekirdeklerinde bulunur [31]. VDR, kas, kemik, böbrekler, paratiroid bezi, bağırsak, dalak, retina ve meme dokularında bulunmaktadır [26].

Yumurtalıklarda granüloza hücrelerinin çekirdek ve stoplazmasında bulunur. Dişi üreme sisteminde VDR bulunması, D vitamininin üreme sürecinde etkili olduğunu düşündürür [31]. D vitamini reseptör enzimleri, merkezi ve periferik üreme sistemlerinde eksprese edildiği bilinmektedir [38]. D vitaminin enzimlerinin erkek ve dişi üreme sisteminde yaygın olarak bulunması doğurganlık için gerekli olduğunu göstermektedir [26].

2.7.4. D vitamini ve ovaryumlar

D vitamininin etkilediği hedef organlar arasında son yapılan çalışmalarda üreme organları yer almaktadır [38]. D vitamini dişi üreme sisteminde, Endometriozis, polikistik over sendromu (PKOS) ve yumurtalık rezervi ile ilgili olduğu bilinmektedir [26].

D vitamininin yumurtalık rezervini etkilediği konusunda birçok çalışma yapılmıştır. AMH, büyümekte olan yumurtalık foliküllerinin granüloza hücreleri tarafından üretilir ve AMH yumurtalık rezervinin en iyi belirteçlerinden biridir. D vitamini eksiliğinin, AMH sentezlenmezini ve serumda AMH seviyelerini değiştirdiği görülmüştür [31].

Son yapılan çalışmalarda, D vitamininin seks hormonlarının üretimini etkilediği belirlenmiştir [31].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Uygulama

Çalışmada 4 haftalık *Sprague Dawley* albino cinsi 12 adet dişi rat kullanıldı. Ratlar ortalama $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık döngüde, ad libitum içme suyu ve standart yem ile beslendi. Ratlar rastgele olarak seçilerek 2 deney grubu oluşturuldu. (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. Deney gruplarını ve deney süresini belirten çizelge

DENEY GRUPLARI				
GRUP NUMARASI	ADI	ETKEN MADDE	DENEK SAYISI	UYGULAMA SÜRESİ
1.	Sham	D vitamini içeren yem	n=6	6 hafta
2.	D Vitamini Eksikliği	D vitamini içermeyen yem	n=6	6 hafta

1. Grup 6 hafta boyunca D vitamini içerecek şekilde formüle edilen standart yem ile beslendi. Bu gruptaki denekler standart aydınlatma koşulları altında 12 saat aydınlık/karanlık döngüde barındırıldı.

2. Grupta 6 hafta boyunca D vitamini içerecek şekilde formüle edilmiş rat yemi ile beslendi [39]. Ayrıca bu grupta bulunan denekler, D vitamini aktivasyonuna neden olan etki spektrumunda (290-315 nm dalga boyuna sahip) ultraviyole B ışını yaymayan akkor ampüllerin (200-500 lüks aydınlatma şiddetine sahip) kullanıldığı aydınlatma ortamında, standart 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde barındırıldı [40].

3.1.1. D vitamini eksikliğini belirlenmesi

6 hafta sonunda deneklerin kuyruk veninlerinden kan alındı. Kan alınma saatleri kaydedildi ve kan alımından 40 dakika sonra kanlar santrifüj edilerek serumları elde edildi. Kan örneklerinden bakılacak olan D vitaminine [25(OH)D₃] spesifik olan ELISA kitleri kullanılarak tüm gruplardan alınan kan örneklerinin serumlarından D vitamini düzeyi ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmalarda standart bir değer olmamakla birlikte, genellikle serumda 20 – 30 ng/mL (50- 75 nmol/L) 25(OH)D₃ seviyeleri tespit edildiğinde, denekler “D vitamini eksik” olarak kabul edildi [39, 41, 42].

3.1.2. Deneklerin çiftleştirilmesi

Kolpositolojik ölçümler için araştırmanın 4. haftasından itibaren 2 hafta süresince her gün aynı saatte olmak üzere vajinal smear örnekleri alındı. Örnekler alkol içeren fiksatif ile tespit edildikten sonra Papanicolaou boyama protokolü uygulanarak incelendi. (Çizelge 3.2) Boyanan preparatlar mikroskop ile incelenerek östrus döngüleri takip edilecektir. Böylece deneklerin östrus döngülerinin düzenli olup olmadığı kontrol edildi. 6. haftanın sonunda çiftleşme için uygun evrede olduğu bilinen, östrus evresinde bulunan dişi ratlar, dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde 24 saat süreyle aynı kafese katıma alındı [43]. Katıma alınacak olan erkek sıçanlar daha önceden çiftleştiği ve yavru oluşturduğu bilinen erkek sıçanlardan seçildi. Böylelikle erkek sıçanlardan kaynaklı bir infertilite sorununun önüne geçilmiş olundu.

Çiftleşmeyi takip eden günde makroskobik olarak vajinal plak görülmesi durumunda denekler gebe kabul edildi. Vajinal plak görülemeyen deneklerden ise vajinal smear örnekleri alındı ve Papanicolaou boyama protokolü uygulanarak incelendi. Vajinal smearde sperm görülmesi durumunda denekler gebe kabul edildi [44]. Gebelik sağlanamayan denekler çalışmaya dahil edilmedi.

Çizelge 3.2. Papanicolaou boyama basamaklarını belirten çizelge

PAPANİCOLAOU BOYAMA PROTOKOLÜ (PAP)	
MADDE	ZAMAN
% 96 Etanol	2 dakika
Distile su	2 dakika
Harris hematoksilen	1 dakika
Akar su	5 dakika
% 96 Etanol	15 saniye
Orange G Solüsyonu	4 dakika
% 96 Etanol	2 x 15 saniye
EA 50 Solüsyonu	8 dakika
% 96 Etanol	15 saniye
% 100 Etanol	2 x 30 saniye
Ksilen	2 dakika
Ksilen	2 dakika
Entellan	

3.2. Deneyin Sonlandırılması

Gebeliğin olduğu gözlenen denekler 1 hafta sonra 45mg/kg Ketamin ve 5mg/kg Xylazine olacak şekilde yüksek doz altında, intrakardiyak kan alınarak feda edilerek ovaryum dokuları alındı.

3.3. Histolojik Yöntem

3.3.1. Hematoksilen – Eozin boyama

Alınan ovaryum dokuları, % 10 nötral formalinde 36 saat tespit edildi. Daha sonra rutin histolojik takip işlemlerinin geçirilerek parafin bloklar elde edildi. (Çizelge 3.3) Tespit edilen dokular akarsu altında 16 saat yıkandıktan sonra artan alkol derecelerinden (%70, %70, %80, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra dokular 1 saat süreyle ksilole alındı. Ksilolden sonra ksilol + parafin (%50 / %50 oranında) karışımında etüvde 15 dakika bekletildi. Son olarak dokular etüv içinde sıvı parafine 3 saat bırakıldı ve sürenin sonunda dokulardan, kesit almak için parafin bloklar hazırlandı.

Çizelge 3.3. Rutin histolojik takip basamaklarını belirten çizelge

DOKU TAKİBİ PROSEDÜRÜ		
AŞAMA	MADDE	ZAMAN
Fiksasyon	%10 nötral Formaldehit	36 saat
Fiksatif Çözeltilisinden Arındırma (Yıkama)	Akar su	16 saat
Dehidratasyon	% 70 Etanol	1 saat
	% 70 Etanol	1 saat
	% 80 Etanol	1 saat
	% 80 Etanol	12 saat
	% 96 Etanol	1 Saat
	%100 Etanol	1 Saat
Şeffaflaştırma	Ksilen	40 dakika
	Ksilen + Parafin	15 dakika (Etüvde)
	Sıvı Parafin	3 saat (Etüvde)

Gruplar arasında, ovaryum yapısındaki değişiklikleri ışık mikroskopisi düzeyinde incelemek amacıyla Hematokilen – eozin boyaması protokolü uygulandı (Çizelge 3.4). Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom ile 4-5 mikron boyutunda kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinizasyon için etüvde 57⁰C’de 1 gece inkübe edildi ve etüvden alındıktan sonra 3 x 20 dakika ksilolden geçirilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra azalan alkol derecelerinden (%100, %96, %80, %70, %50) sırasıyla geçirildi. Kesitler 10 dakika akarsuda yıkayıp alkol uzaklaştırıldıktan sonra Harris Hematoksilen solüsyonunda 10 dakika tutuldu. Sonra 10 dakika akarsuya alınan kesitlerden boyanın fazlası uzaklaştırıldı. % 3’lük glasiyel asetik asit solüsyonunda 4 – 5 dip yapılarak kesitler yeniden akarsu altına alındı. Kesitler 10 dakika eozin solüsyonunda tutuldu ve ardından fazla boyayı uzaklaştırmak için 10 dakika akarsuda yıkandı. Daha sonra kurutularak artan alkol derecelerinden (% 50, % 70, % 80, % 96, % 100) sırasıyla geçirildi böylece fazla su kesitlerden uzaklaştırıldı. Kesitleri şeffaflaştırmak için 2x20 dakika ksilolde bekletildi ve sürenin sonunda entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak incelendi ve resimlendirildi.

Çizelge 3.4. Hematoksilen – eozin boyama basamaklarını belirten çizelge

HEMATOKSİLEN – EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ (H&E)		
AŞAMA	MADDE	ZAMAN
Deparafinizasyon	57 ⁰ C etüv	1 Gece
	1.Ksilol	20 dakika
	2.Ksilol	20 dakika
	3.Ksilol	20 dakika
Dehidratasyon	% 100 Etanol	10 dakika
	%96 Etanol	10 dakika
	% 80 Etanol	10 dakika
	% 70 Etanol	10 dakika
	% 50 Etanol	10 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Harris hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
	% 3’lük glasiyel asetik asit	4-5 dip
	Akar su	10 dakika
Boyama	Eozin	12 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika

Çizelge 3.4. (devam) Hematoksilen – eozin boyama basamaklarını belirten çizelge

HEMATOKSİLEN – EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ (H&E)		
Dehidratasyon	% 50 Etanol	1 dakika
	% 70 Etanol	1 dakika
	% 80 Etanol	1 dakika
	%96 Etanol	1 dakika
	% 100 Etanol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	20 dakika
	Ksilol	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.3.2. Folikül sayımı

Hematoksilen eozin boyanmasından sonra mikroskopta incelenen foliküller özelliklerine göre sınıflandırılarak sayımları yapıldı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Foliküllerin özelliklerine göre sınıflandırılmasını içeren çizelge

Folikül	Özelliği
Primordial Folikül	Merkezde oosit ve etrafında tek katlı yassı epitel hücreleri bulunan foliküller
Unilaminar Primer Folikül	Merkezde yerleşen oosit ve etrafında tek tabakalı kübik epitel bulunan foliküller
Multilaminar Primer Folikül	Oosit etrafında çok tabakalı kübik epitel ve oosit etrafında oluşmaya başlayan zona pellusidayı içeren foliküller
Sekonder Folikül	Çok katlı granüloza hücre tabakası, antrum sıvısının birikmeye başlaması ve zona pellusidası belirgin olan foliküller
Graff Folikül	Geniş bir antrum ve periferde çekilmiş oosit içeren foliküller
Atretik Folikül	Granüloza hücreleri arasında oluşan boşlukları ve incelmış ya da büzüşmüş zona pellusida içeren foliküller
Korpus Luteum	Teka lutein ve granüloza lutein hücrelerini içeren, oositin atıldığı ve kan damrlarının gelişmesi ile hormon sentezleyen endokrin yapı haline gelen foliküller

Tek katlı yassı epitel hücreleri ile çevrili en küçük foliküller primordial folikül, tek katlı kübik epitel hücreleri ile çevrili foliküller primer olarak sınıflandırıldı. Primer foliküller kendi arasında tek katlı ya da çok katlı kübik epitel ile çevrili olması durumuna göre iki gruba ayrıldı. Tek katlı kübik epitelle çevrili foliküllere unilaminar primer folikül, çok katlı kübik epitel ile çevrili ve oositin etrafında oluşmaya başlayan zona pellusida içeren foliküller

multilaminar primer folikül olarak incelendi. Belirgin bir zona pellusida içeren ve antrum sıvısının oluşmaya başladığı büyümüş foliküller sekonder, Daha geniş bir antruma sahip ve oositin periferde olduğu foliküller ise graf folikül olarak değerlendirildi. Oosit etrafında bozulmuş zona pellusida ya da folikül içinde boşluklar olması durumunda folikül, atretik folikül olarak kabul edildi. Korpus luteum yapıları foliküllere ek olarak sayıldı.

3.3.3. İmmünohistokimyasal inceleme

Hazırlanan parafin bloklardan poly-l-izin lamlara mikrotom ile 4 - 5 µm'lik kesitler alındı. deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 60 °C' ye çıkartılarak 2 saat daha bekletildi. Deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15 dakika ksilolde bekletildi ve sonra kesitler sırasıyla azalan alkol derecelerinden (%100, %96, %80, %70, %50) 7'şer dakika geçirilerek dehidrate edildi. Ardından 2 kez 5'er dakika distile suda bekletilerek alkolden arındırıldı. Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 1 M sitrat tamponuna (pH: 6.0) 2 kez 5 dakika etkin bırakıldı ve oda ısısında 30 dakika soğutulduktan sonra Pap pen ile lamaların üzerindeki kesitte dokuların etrafı çizildi. Lamalar % 3'lük hidrojen peroksitle etkin bırakılarak dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra, lamalar PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile 3 kez 5 dakika yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Ultra V Block solüsyonu ile dakika 10 dakika yıkandı. Bu işlemden sonra primer antikor StAR (1/25) (Bioss, StAR Polyclonal Antibody 100µl, ref: bs-3570R Bioss-USA) uygulanarak +4°C'de 1 gece inkübe edildi. Daha sonra PBS ile 3 kez 3 dakika yıkayıp 10 dakika biyotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar 3 kez 3 dakika PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin biyotine bağlanması amacıyla streptavidin peroksidaz enzim kompleksine 10 dakika etkin bırakıldı ve kromojen olan DAB (3,3'diaminobenzidine) uygulanarak immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Harris'in Hematoksileni (0B52Y092, Merck, Germany) kullanıldı ve lamalar entellan (Merck, lot:HX378130, Germany) ile kapatıldı. (Çizelge 3.6)

İmmünohistokimyasal tutulumlar her bir antikor ve her grup için değerlendirildi. Gruplar arasındaki tutulum yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespit edilmesi için uygun istatistiksel veriler oluşturuldu.

Hazırlanan preparatlar Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, mikroskop altında değerlendirilecek ve sisteme bağlı Leica Q Vin 3 programında resimlendirildi.

Çizelge 3.6. İmmünohistokimyasal inceleme basamaklarını belirten çizelge

İMMÜNOHİSTOKİMYA (IHC) PROTOKOLÜ		
AŞAMA	MADDE	ZAMAN
Deparafinizasyon	60 °C etüv	2 saat
	1.Ksilol	20 dakika (etüvde)
	2.Ksilol	20 dakika
Dehidratasyon	%100 Etanol	7 dakika
	%96 Etanol	7 dakika
	% 80 Etanol	7 dakika
	% 70 Etanol	7 dakika
	% 50 Etanol	7 dakika
Rehidratasyon	Distile su	2 x 5 dakika
Antijen retrieval	Sitrat (mikrodalgada)	2 x 2 dakika 3 x 2 dakika
Yıkama	Distile su	2 x 5 dakika
	PBS	3 x 3 dakika
Dokuları sınırlama	Pap Pen	
Endojen Enzim bloklama	Hidrojen peroksit	15 dakika
Yıkama	PBS	3 x 3 dakika
	Ultra V blok	10 dakika
Primer antikör	StAR (+4 °C)	1 gece
Yıkama	PBS	3 x 3 dakika
Sekonder bağlanma	Sekonder biotinli anti - polivaent (IgG)	10 dakika
Yıkama	PBS	3 x 3 dakika
	Streptavidin peroksidaz	10 dakika
Kromojen	DAB	1,5 ve 4 dakika
Yıkama	PBS	1 – 2 dakika
	Distile su	5 dakika
Zemin boyama	Harris hematoksilen	10 saniye
Yıkama	Distile su	5 dakika
Kapama	Entelllan	

3.3.4. İstatistiksel analiz

Histokimyasal boyamalar sonunda kesitler, Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntülü analiz sistemleri değerlendirildi. ImageJ Software programı ile sayısal veriler oluşturuldu. Uygun istatistik programı ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi yapıldı.

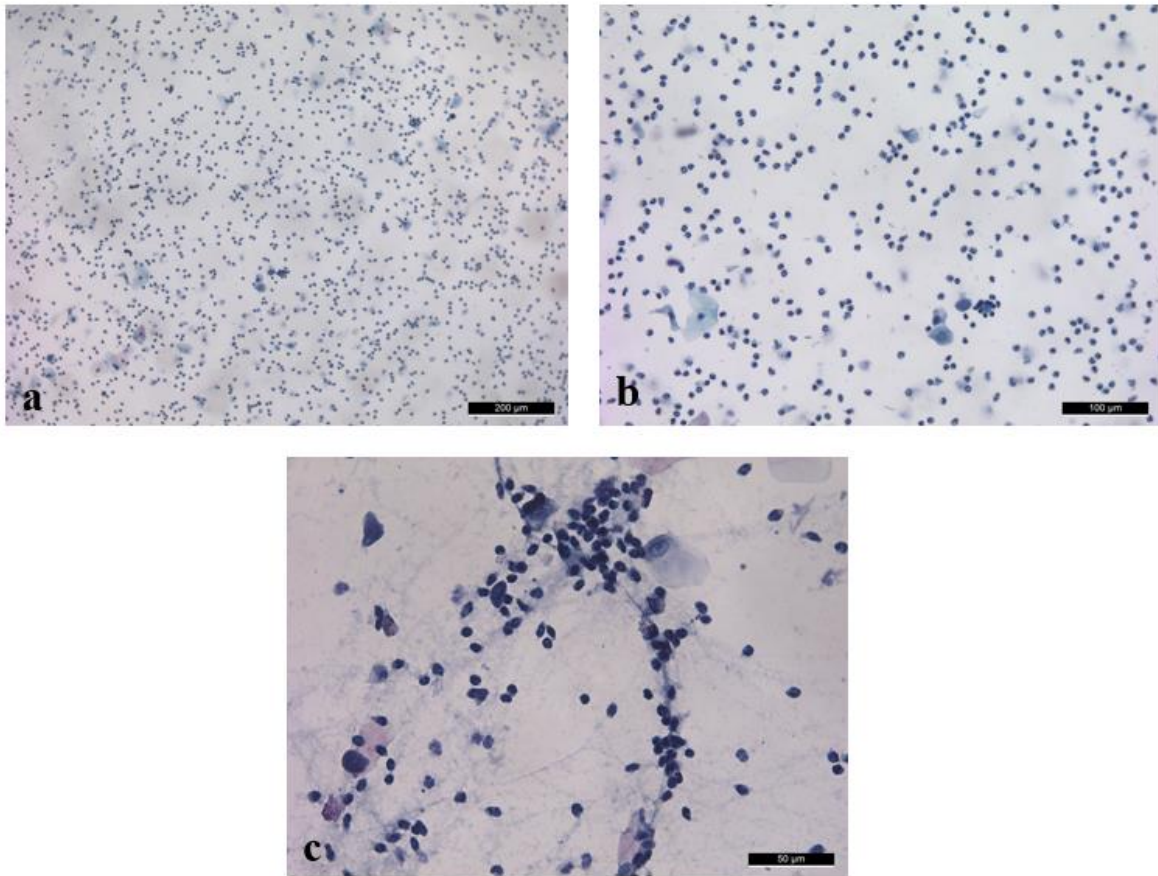


4. BULGULAR

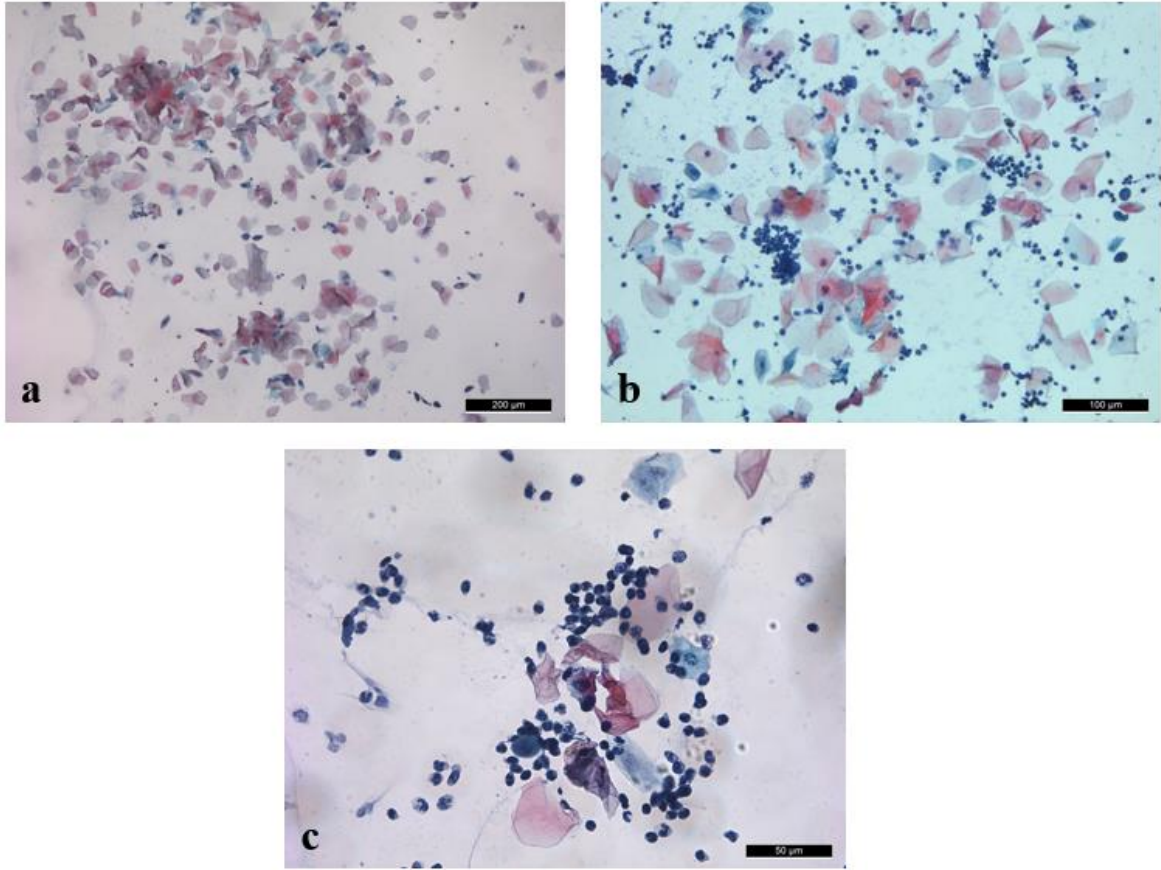
4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Çiftleşme öncesi vajinal smear bulguları

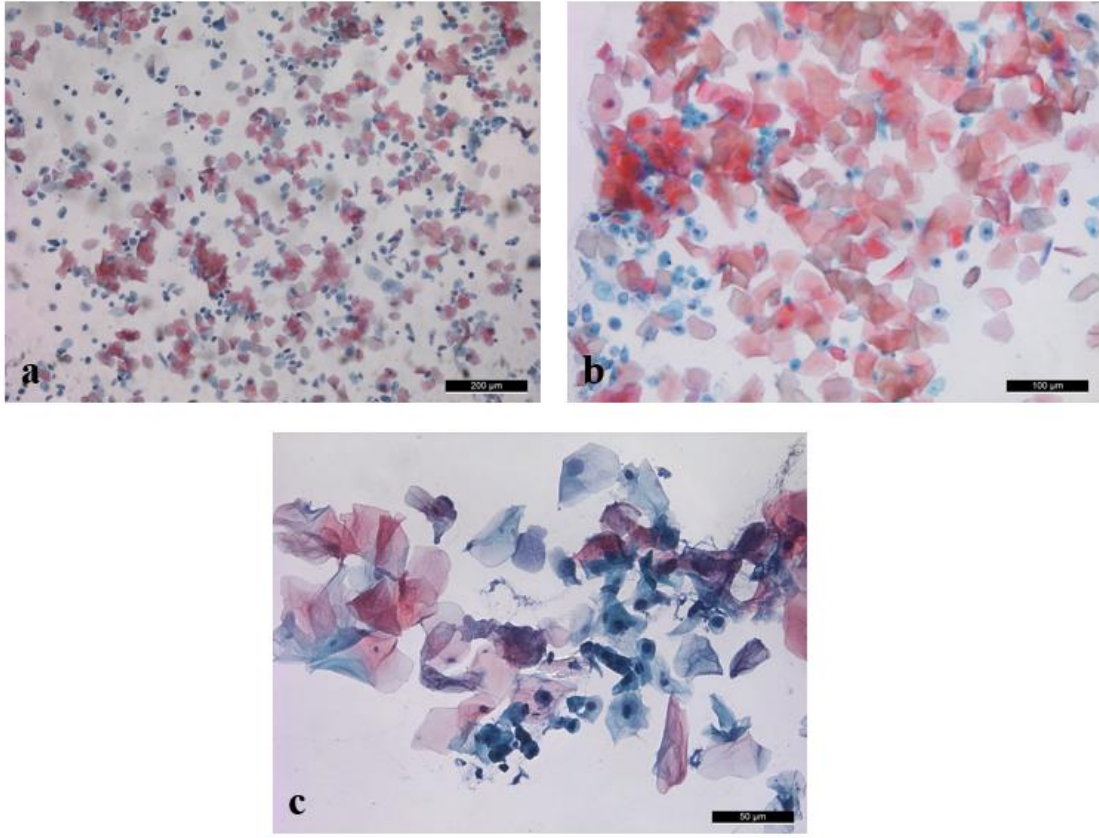
Ratların çiftleşmesi için uygun östrus evresinde olduğunun belirlenmesi gerekir. Çalışmada 4 hafta sonra her iki gruptaki deneklerden vajinal smear örnekleri alındı. Pappenicolau ile boyanan vajinal smear örnekleri östrus döngüsünün evresini belirlemek için ışık mikroskobu ile incelendi. İnceleme sonucunda çalışmamızda proöstrus evresi belirteci olarak, küçük çekirdekli epitelyal hücreler (Resim 4.1), diöstrus evresi belirteci olarak, çok sayıda bulunan nötrofil hücreleri (Resim 4.2), metöstrus evresi belirteci olarak, lökositlerin bulunması (Resim 4.3) ve östrus evresi belirteci olarak ise çok sayıda kornifiye hücreler (Resim 4.4) kabul edildi. Vajinal smear sonuçları doğrultusunda östrus evresinde olduğu tespit edilen deneklerin çiftleşmeye uygun oldukları belirlendi.



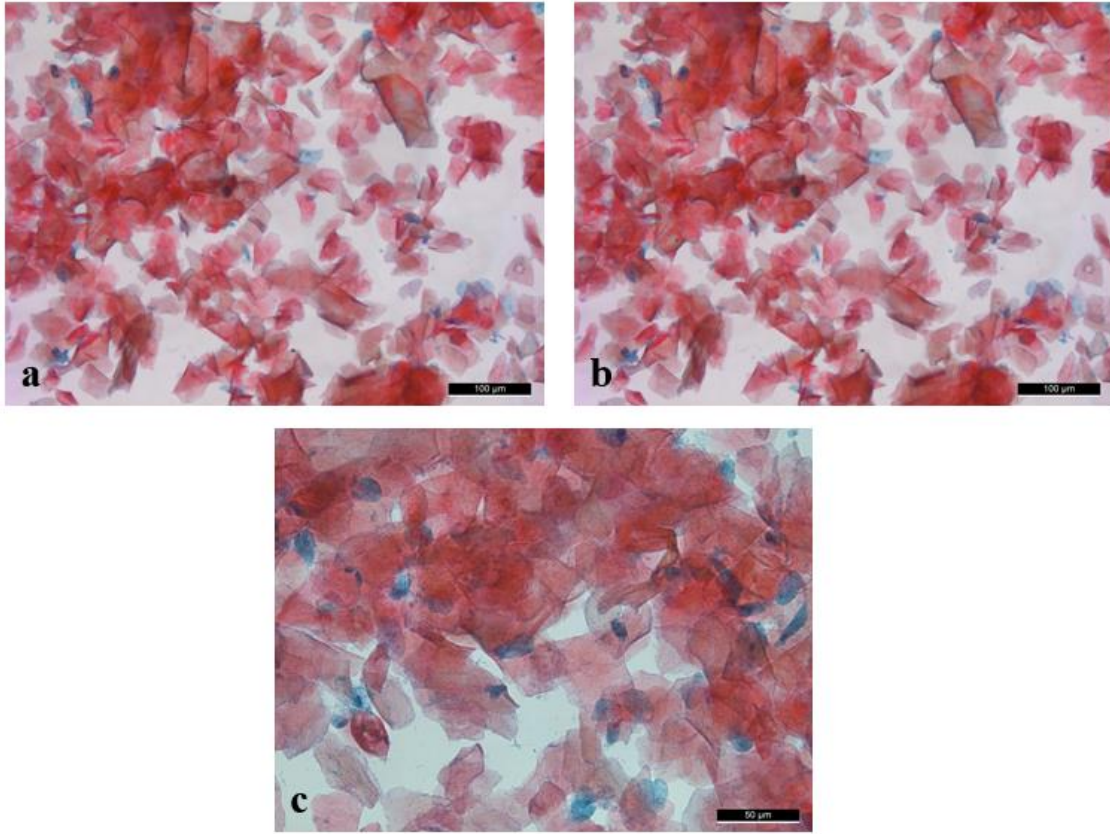
Resim 4.1. Diöstrus evresi, a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme



Resim 4.2. Metöstrus evresi, a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme



Resim 4.3. Prosöstrus evresi a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme



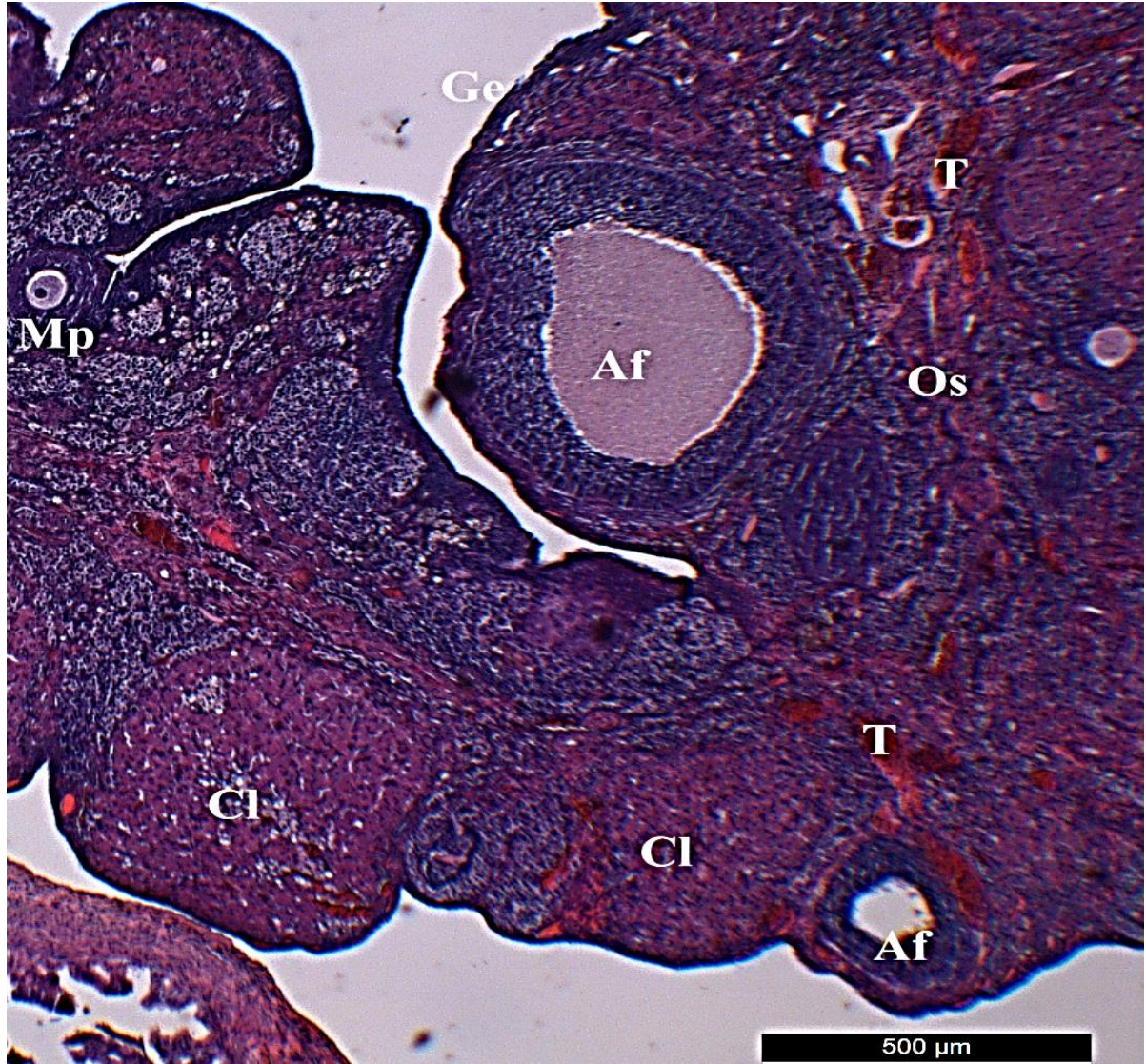
Resim 4.4. Östrus evresi, a:10X büyütme, b:20X büyütme, c:40X büyütme

4.1.2. Hematoksilen – Eozin bulguları

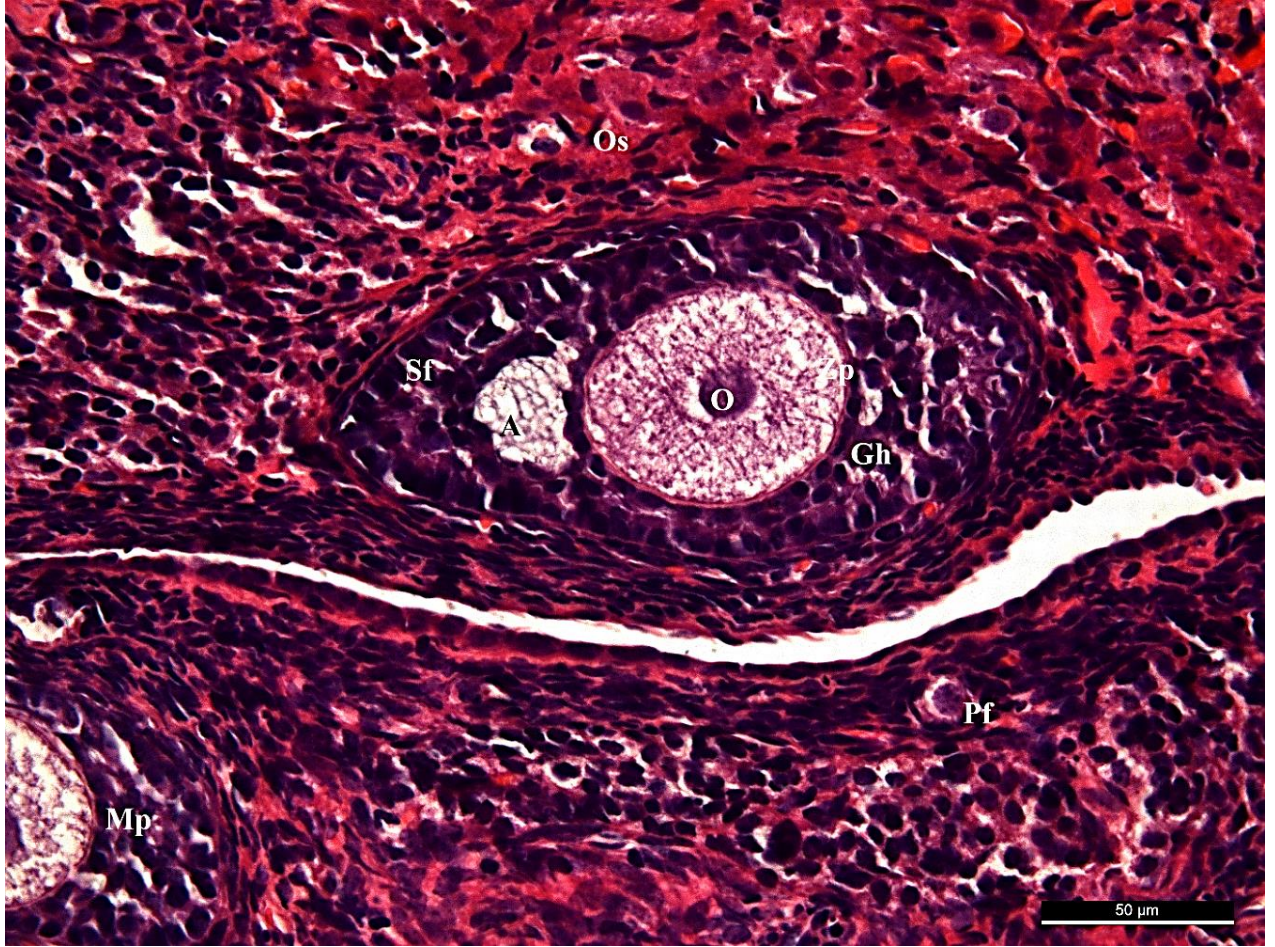
Kontrol grubuna ait farklı over dokusu histopatolojik kesitlerde, iyi gelişmiş ovaryan foliküller, normal yapılarında görülen kan damarları ve stromal hücreler belirlendi (Resim 4.5). Oositin etrafı tek katlı yassı epitelle çevrili primordial foliküllerin normal yapıda geliştiği tespit edildi. Unilaminar primer folikülde epitel hücreleri belirgin olarak izlendi. Multilaminar primer folikülde oosit etrafında zona pellusida oluşmaya başladığı gözlemlendi. Sekonder (pre-ovulator) foliküllerin yapısında tipik oosit morfolojisi ve ökromatik çekirdeği izlenen çevresinde iyi gelişmiş zona pellusida ve onun da çevresinde iyi gelişmiş granüler hücreler görülmektedir (Resim 4.6). Graf foliküllerde granüloza hücreleri, teka interna ve eksterna hücreleri normal yapısında izlendi (Resim 4.7). Korpus luteum hücrelerindeki hipertrofi ve proliferasyon ile birlikte steroidogenik hücrelerin farklılaşmış oldukları belirlendi. Teka interna yapısında anjiyogenez belirgindir (Resim 4.8). Kontrol grubuna ait over dokularını çevreleyen kübik germinal epitel hücreleri de normal yapılarında izlendi. Korteks yapısında gelişimin farklı aşamalarında bulunan foliküller sağlıklı yapılarında görüldü (Resim 4.9). Bunun yanı sıra foliküllerin normal histolojik yapılarında sayıca fazla

korpus luteum yapısı gözlemlendi. Ovaryum medullası ve burada bulunan kan damarlarının gelişimi normal olarak değerlendirildi (Resim 4.10).

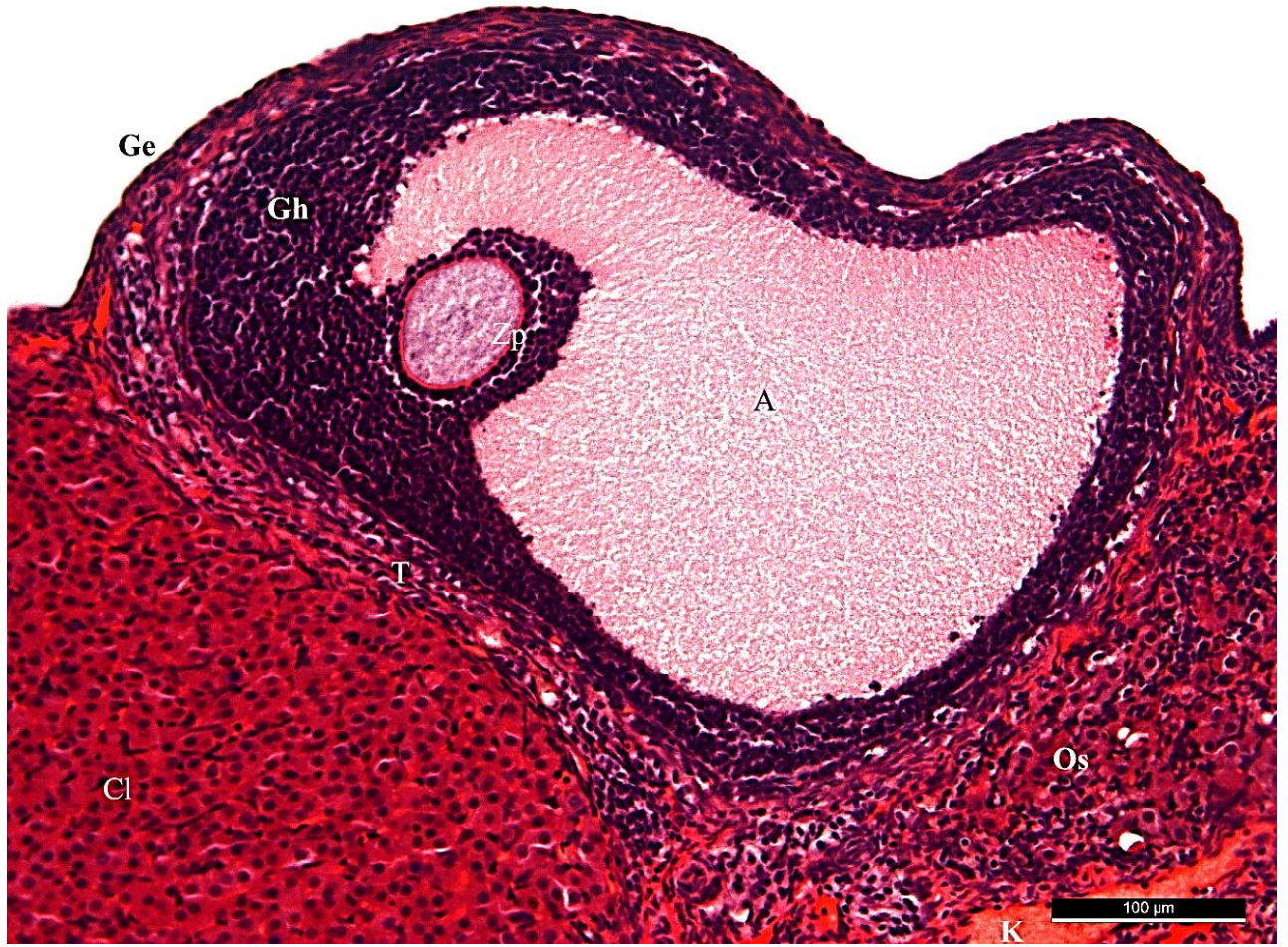
D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubu histolojik kesitlerinde en belirgin histopatolojik değişim korpus luteum yapılarındaki belirgin azalma olarak değerlendirildi (Resim 4.11). Luteal hücrelerde ooplazmada çeşitli foliküllere ait granüloza hücrelerindeki vakuolizasyon ile birlikte hem stromada hem de foliküler granüloza hücreleri ve korpus luteum hücreleri arasında oluşan belirgin boşluklar olarak izlendi. Zona pellusidası silinmiş atretik foliküllerde bulunan oositlerde mikroçekirdek oluşumu DNA hasarının belirteci olarak izlendi. Atretik folikül yapısındaki oosit nükleoplazma ve sitoplazmasında belirgin vakuoler oluşumlar görülmekteydi (Resim 4.12). Deney grubunda sekonder folikül aşamasından sonraki foliküler yapılar azalırken atretik foliküllerin arttığı belirlendi. Stromal hücrelerin piknotik çekirdekleri dikkat çekmekteydi. Stroma ve teka internaya ait damar yapılarında belirgin dilayasyon görüldü (Resim 4.13). Birçok sekonder folikül yapısındaki oosit plazmasında çekilme, boşalma gibi ciddi histopatolojik bulguların varlığının yanı sıra, zona pellusida yapısında silinme, bozulma, granüloza hücrelerinde piknotik çekirdekli ya da vakuollü dejeneratif oluşumlar, granüloza hücreleri arasında oluşan yarı benzeri boşluklar saptandı (Resim 4.14). Germinal epitel deney grubunda yer yer dökülmüş olarak izlendi. Germinal epitelin altındaki korteks stromal hücreleri arasında oluşan hemorajik alanların oluştuğu belirlendi. Piknotik çekirdekli granüloza hücrelerine sahip multilaminar primer foliküllerin bazılarında kalınlaşmış düzensiz zona pellusida yapısı izlendi (Resim 4.15). D vitamini eksikliği oluşturulmuş deneklere ait over dokusunda medullar damarların oldukça dilate olduğu ve yapılarının bozulduğu dikkat çekti. Foliküllere ait teka interna ve teka eksterna yapılarında bütünleşme izlendi. Bu iki yapı birbirinden ayırt edilemez durumda izlendi (Resim 4.16). Korpus luteum yapısındaki teka lutein ve granüloza lutein hücrelerinde vakuolizasyon, piknotik çekirdekler ve aralarında oluşan boşluklar belirgin değişiklikler olarak görüldü (Resim 4.17). Foliküllerde mekik benzeri granüler hücre oluşumları dikkat çekti. Bu hücrelerin oosite, merkeze doğru bir çekim varmış gibi organize oldukları belirlendi (Resim 4.18). Bazı korpus luteum yapılarında görülen şekil bozuklukları yapının ayırt edilemez duruma gelmesine neden oldu (Resim 4.19). Over stromasında yayılmasına kadar ilerlemiş durumda olduğu görüldü. Çok sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücreleri ile çevrelenmiş hemorajik alanları kapsayan multilaminar dejeneratif foliküllerin varlığı dikkat çekiciydi.



Resim 4.5. Ge: Germinal epitel, Mp: Multilaminar primer folikül, Cl: Korpus luteum, T: Teka tabakaları, Os: Ovaryum stroması. Af: Atretik folikül. 4X Büyütme



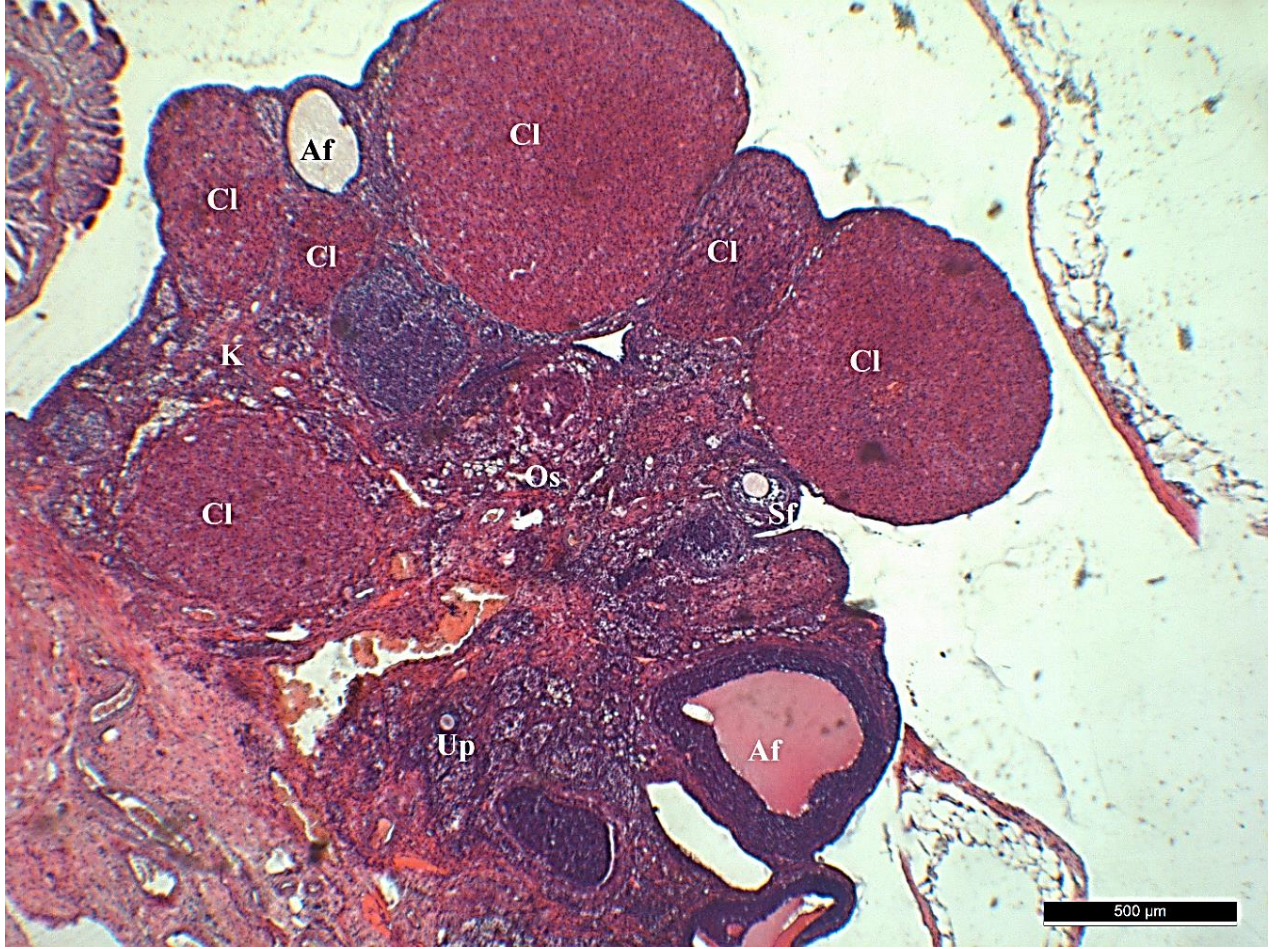
Resim 4.6. Sağlıklı gelişen sekonder folikül 40X Büyütme. Os: Ovaryum stroması, Sf: Sekonder folikül, O:Oosit, Gh, Granüloza hücreleri, Zp: Zona pellusida, Pf: Primordial folikül, Mp: Miltilaminar primer folikül



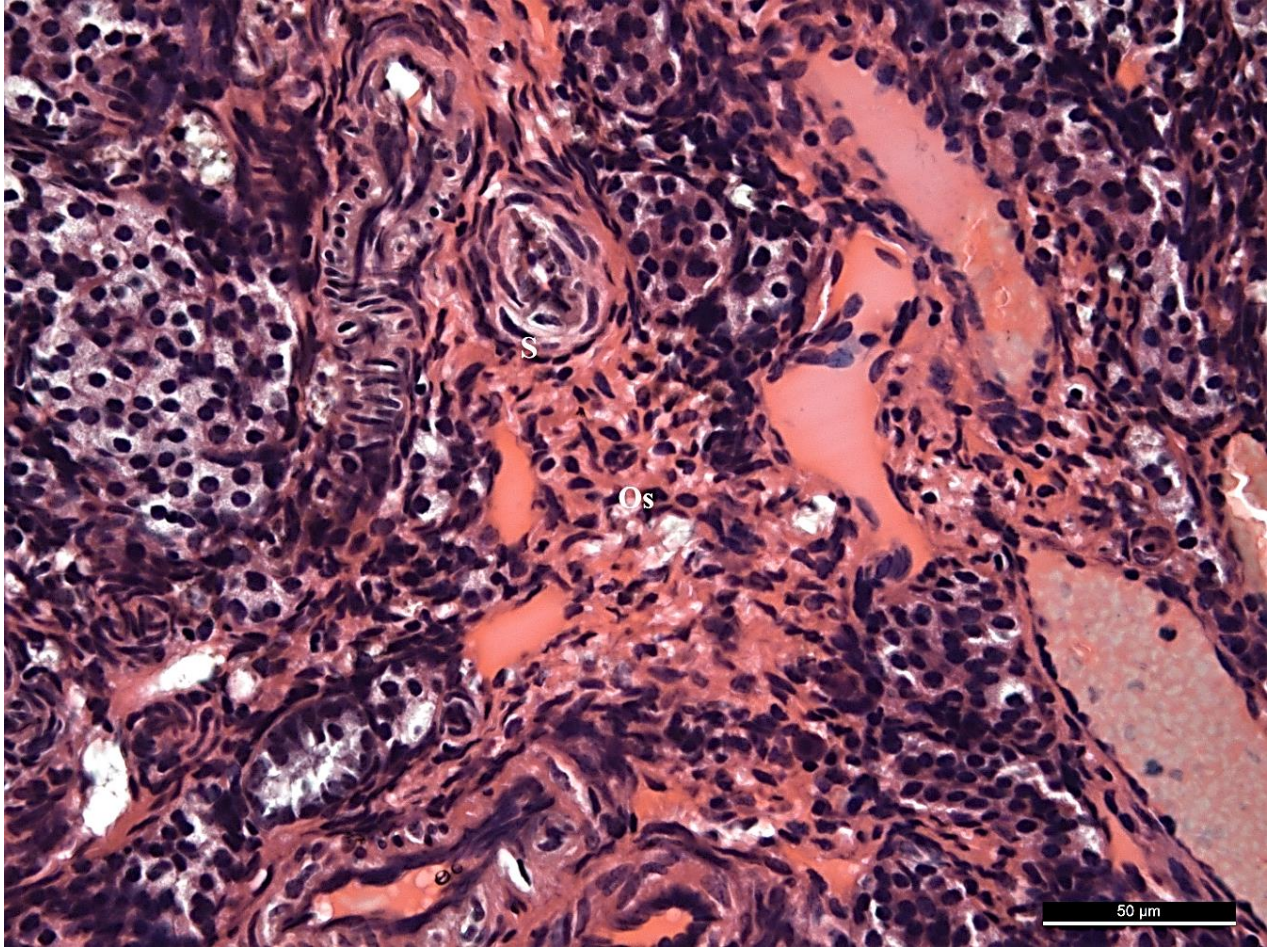
Resim 4.7. Graf folikülde normal yapısında izlenen teka interna ve eksterna 20X Büyütme.
Ge: Germinal epitel, Gh Granüloza hücreleri, Zp: Zona pellusida, A: Antrum,
T: Teka tabakaları, Os: Ovaryum stroması, Cl: Korpus luteum, K: Kan damarları



Resim 4.8. Korpus luteum yapısında farklılaşmış hücreler ve teka interna anjiogenez oluşumu 10X Büyütme. Cl: Korpus luteum, K: Kan damarları, Os: Ovaryum stroması



Resim 4.9. Korteks yapısında sağlıklı gelişen farklı gelişim evrelerindeki foliküller 4X Büyütme. Cl: Korpus luteum, Af: Atretik folikül, Sf: Sekonder folikül, Os: Ovaryum stroması, Up: Unilaminar primer folikül



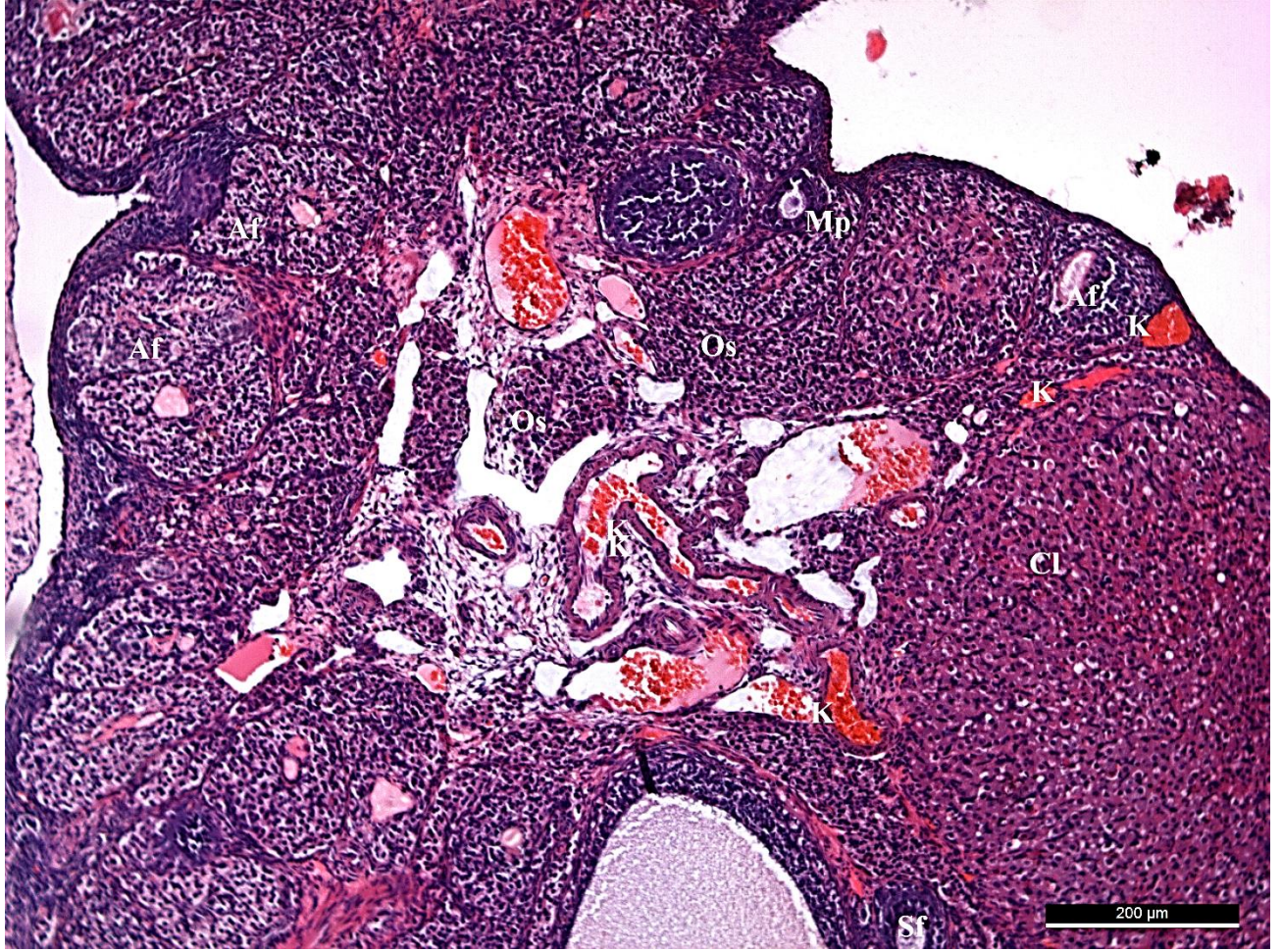
Resim 4.10. Ovaryum medullasında bulunan kan damarlarının sağlıklı gelişimi 40X
Büyütme. S: Sinir, Os: Ovaryum stroması



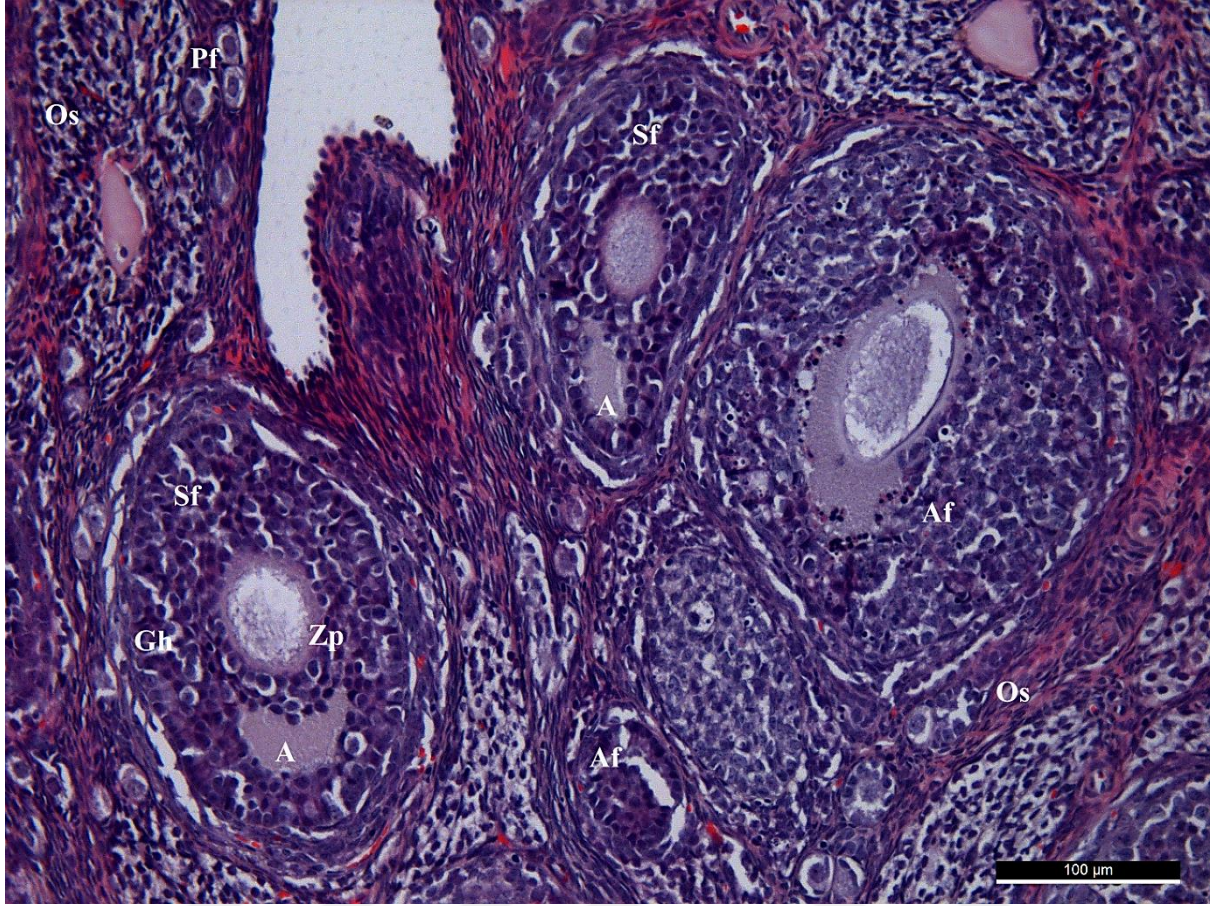
Resim 4.11. D vitamini eksikliği oluşturulan grupta korpus luteum yapılarında azalma ve atretik foliküllerde artış (4x) Cl: Korpus luteum, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması, K: Kan damarları



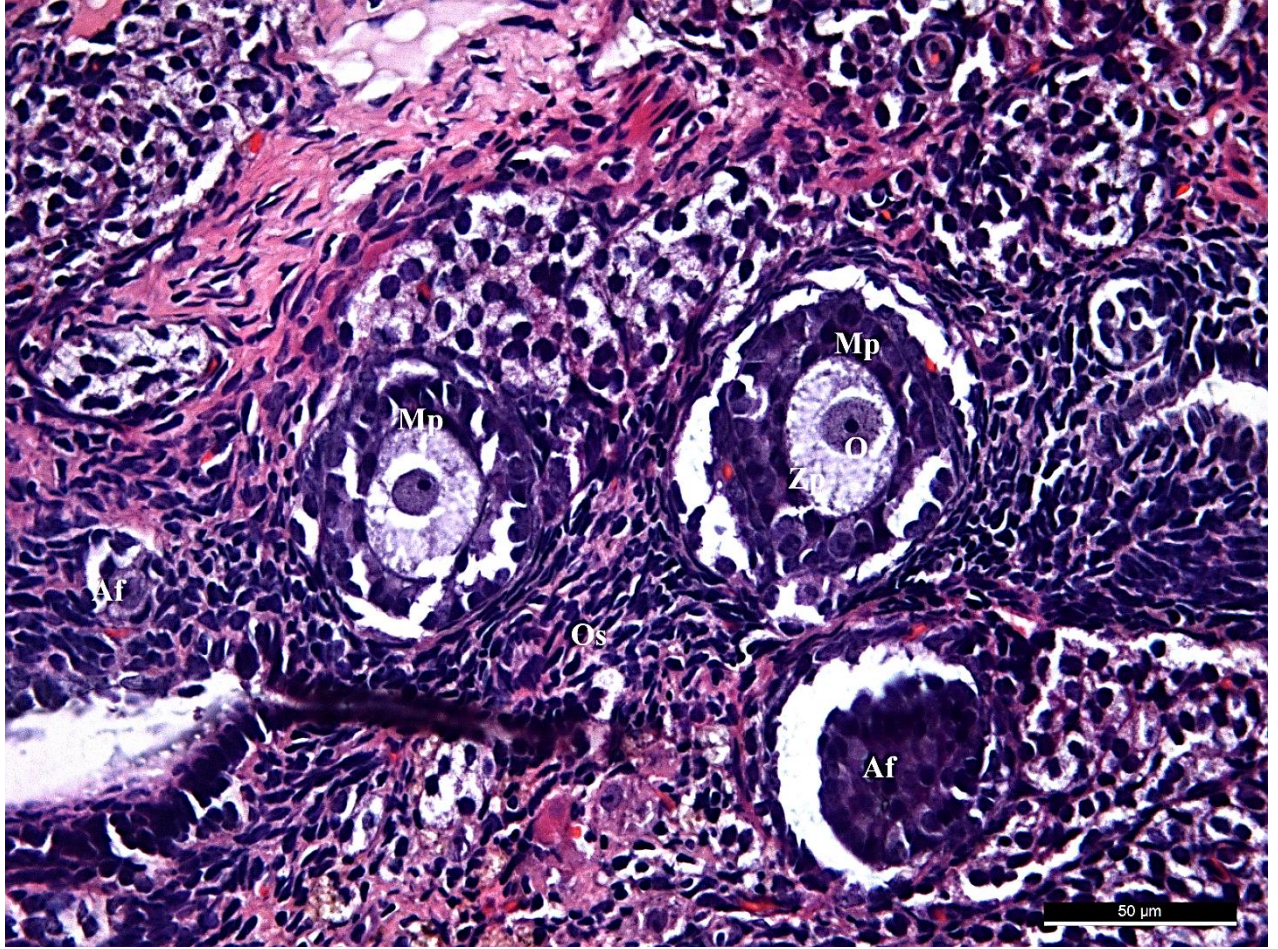
Resim 4.12. Atretik foliküllerde zona pellusida kaybı (10x) Cl: Korpus luteum, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması, K: Kan damarları



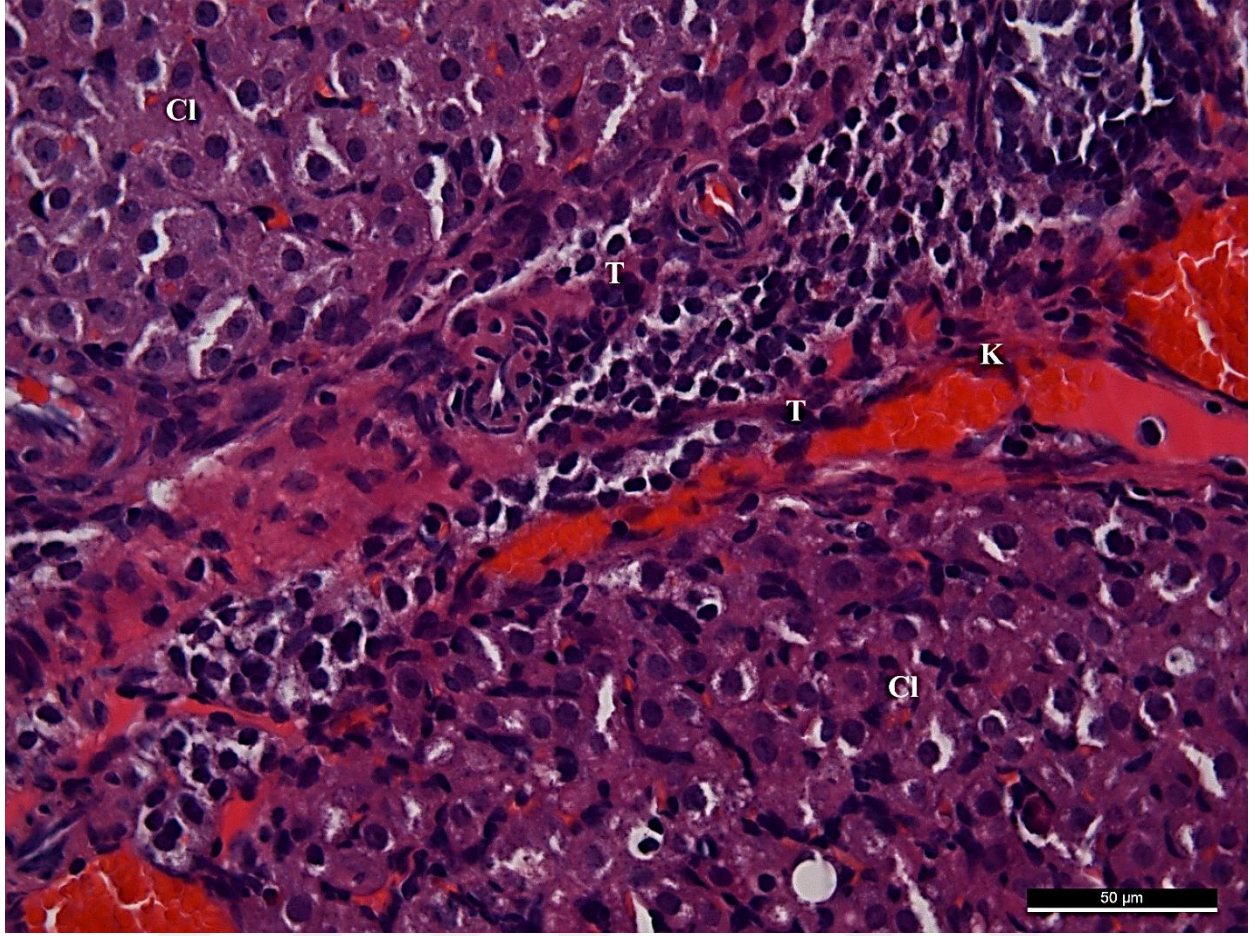
Resim 4.13. Ovaryum stromasında damar yapılarında belirgin dilatasyon (10x)
Mp: Multilaminar primer folikül, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması,
K: Kan damarları, Cl: Korpus luteum



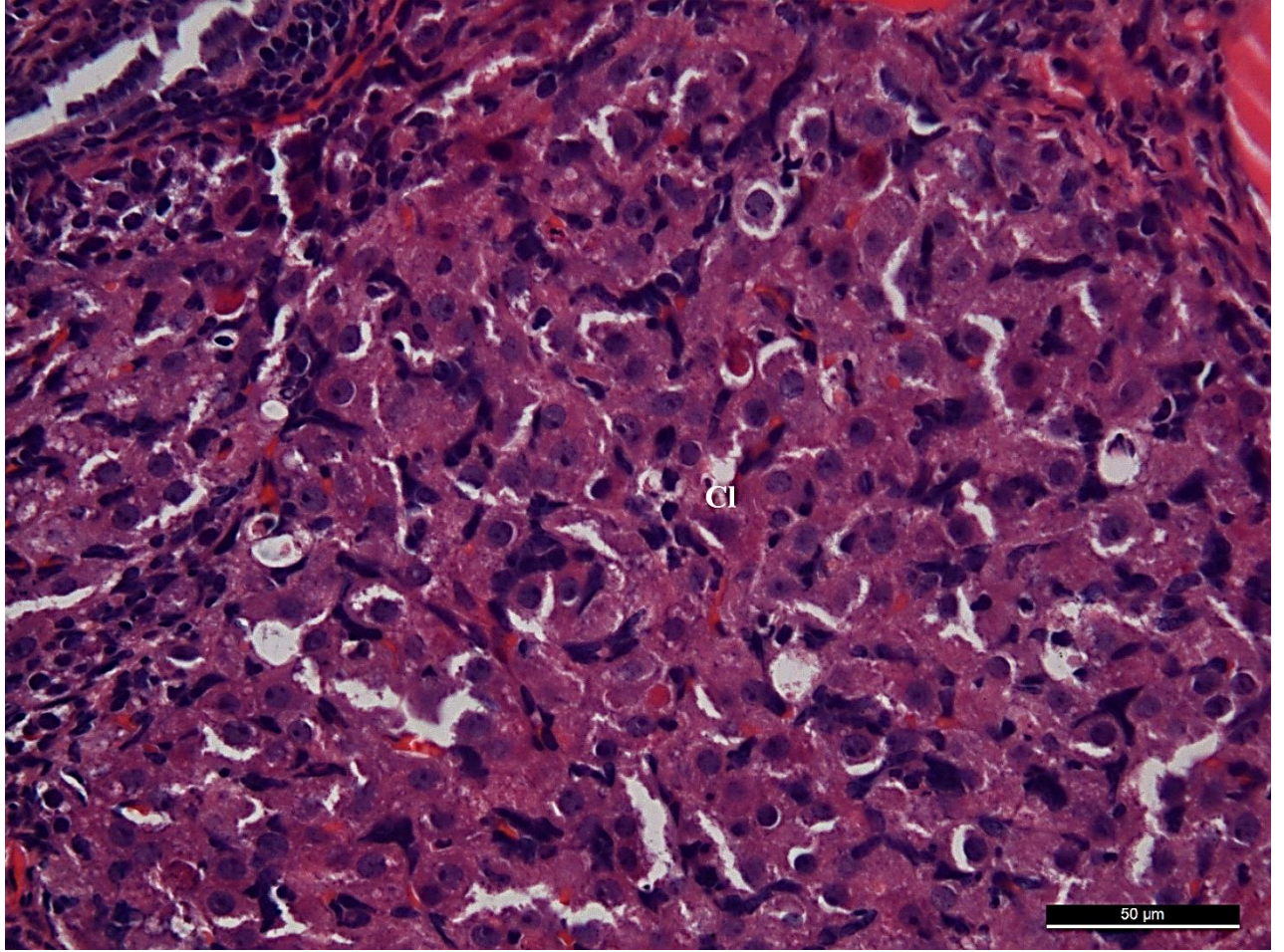
Resim 4.14. Sekonder foliküllerde dejenerasyon (20x) Pf: Primordial folikül, Sf: Sekonder folikül, A: Antrum, Gh: Granüloza hücreleri, Zp: Zona pellusida, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması



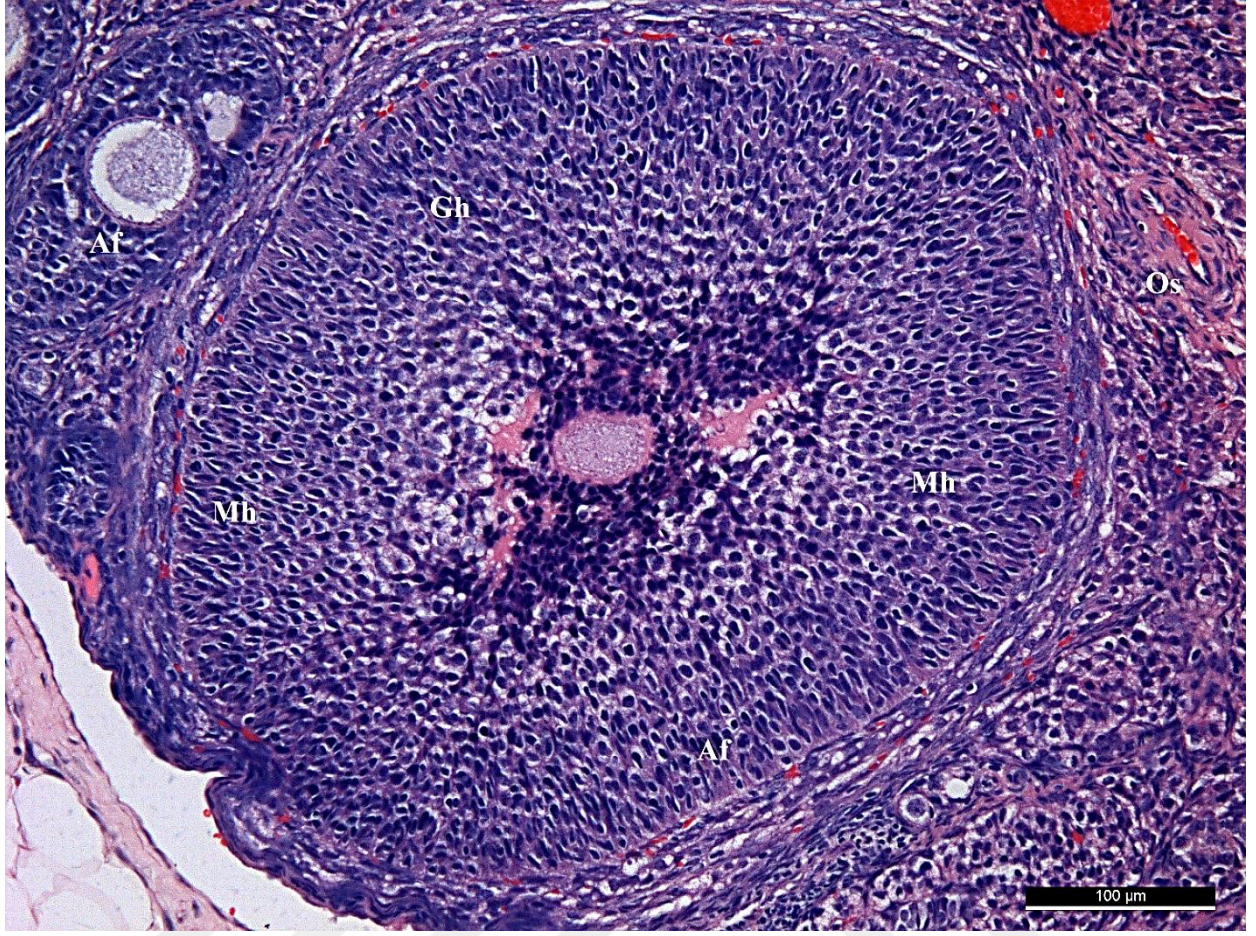
Resim 4.15. Multilaminar primer folikülde kalınlaşmış zona pellusida (40x)
Mp: Multilaminar primer folikül, Zp: Zona pellusida, O: Oosit, Os: Ovaryum stroması, Af: Atretik folikül



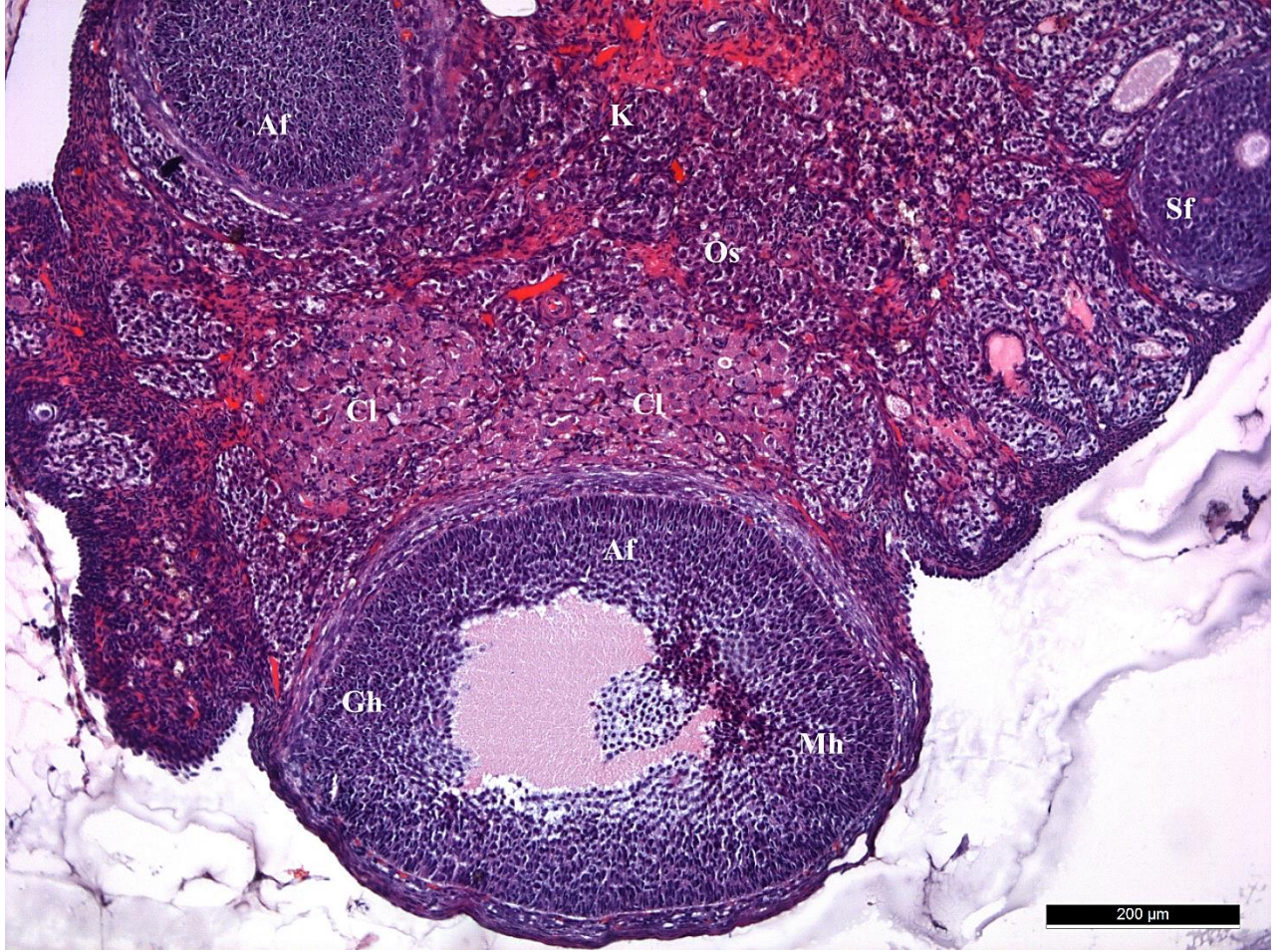
Resim 4.16. Teka interna ve eskterna yapılarının birleşmiş olması (40x) Cl: Korpus luteum, T: Teka tabakaları, K: Kan damarları



Resim 4.17. Boşluklu korpus luteum yapısı (50x) Cl: korpus luteum, luteal hücreler arası oluşan boşluklar, 40x büyütme



Resim 4.18. Oosite doğru çekilen mekik şekilli foliküler hücreler (20x) Gh: Granüloza hücreleri, Mh: Mekik şeklinde gözlenen hücreler, Af: Atretik folikül, Os: Ovaryum stroması

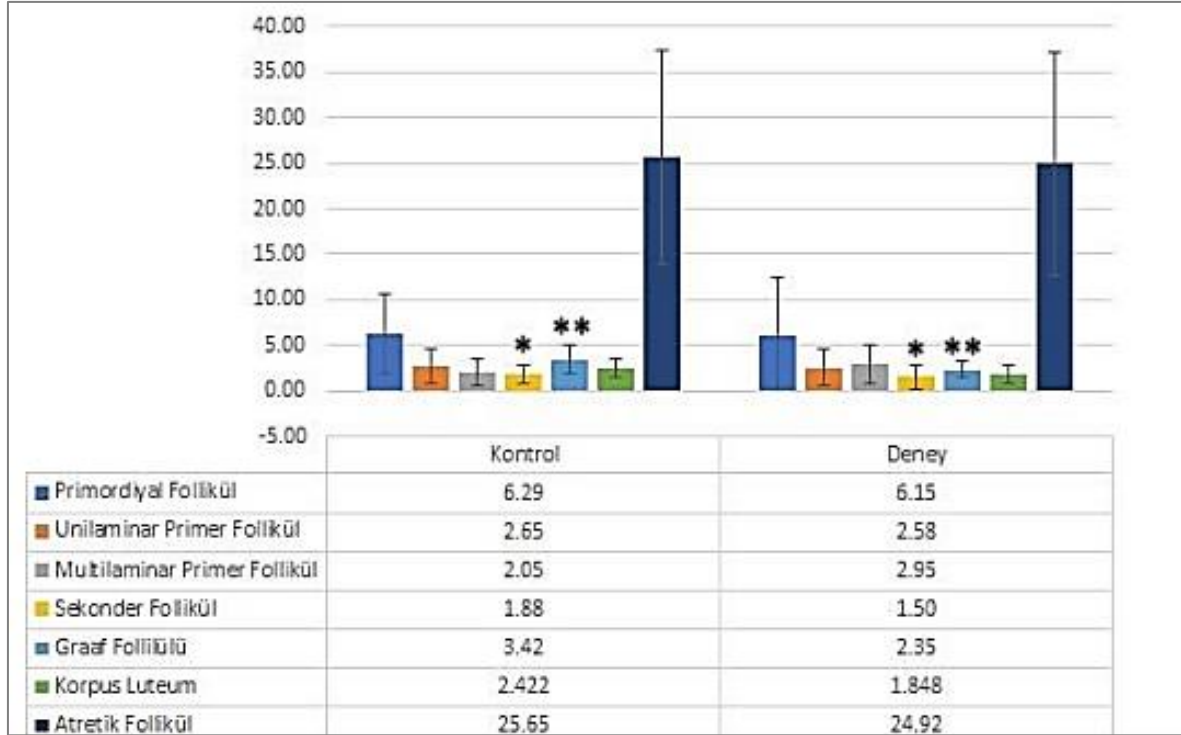


Resim 4.19. Dejenere olmuş korpus luteum (10x) Af: Atretik folikül, K: Kan damarları, Os: Ovaryum stroması, Sf: Sekonder folikül, Cl: Korpus luteum, Gh: Granüloza hücreleri, Mh: Mekik şeklinde gözlenen hücreler

4.1.3. Folikül sayımı bulguları

Histolojik inceleme sonunda over dokusunda bulunan foliküller gelişim evrelerine göre sınıflandırılan foliküllerin sayımları yapıldı.

Foliküllerin sayımları çift tekrarlı olarak yapıldı ve sonuçlar Spss programı ile değerlendirildi. Kontrol ve deney gruplarında primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer folliküller, korpus luteum ve atretik folliküler karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Sekonder ve Graaf folikülleri ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma gösterdi (Resim 4.20).



Resim 4.20. Folikül sayımı istatistiksel analizi

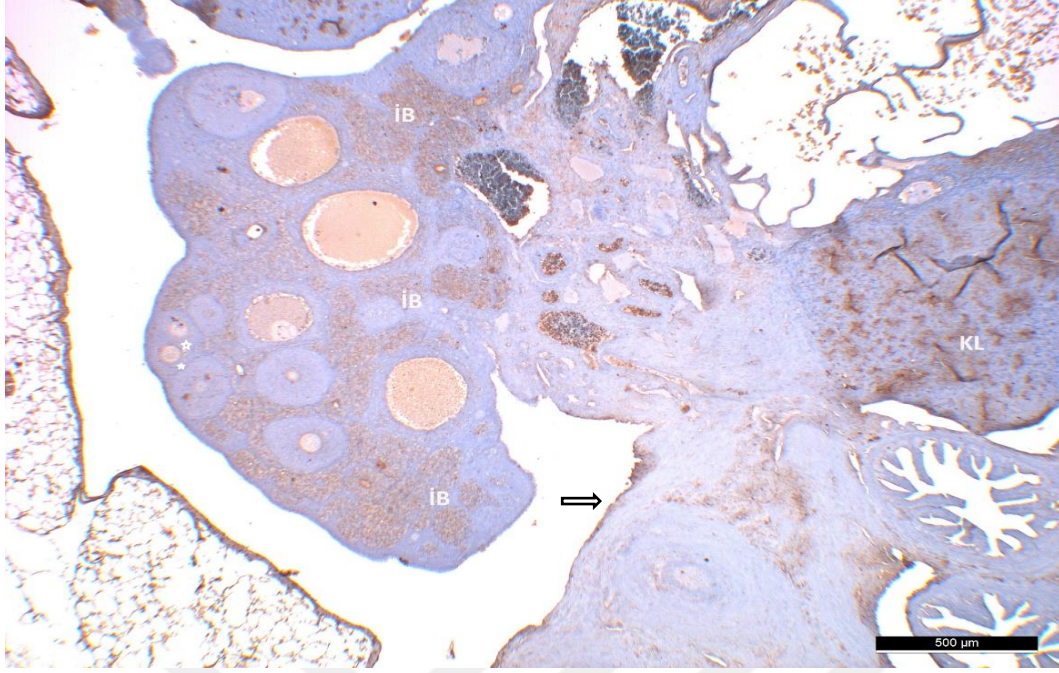
4.1.4. İmmünohistokimyasal analiz bulguları

Steroidogenik akut düzenleyici protein StAR (STARD1), mitokondrinin içine kolesterolün taşınmasında görev yapan bir taşıyıcı proteindir. Bu nedenle, birincil olarak teka hücreleri, luteal hücreler gibi over hücreleri ile testis dokusunun Leydig hücreleri ve adrenal bezin korteks hücreleri gibi steroid sentezi yapan hücrelerde tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan güncel çalışmalarda Gonadlarda, Beyin dokusunda ve Plasenta'da birçok farklı hücrede gösterilmiştir. Çalışmamızda StAR proteini immünreaksiyonu kontrol ve deney grupları over dokularında 6 ayrı kesitte ve her kesitte bir merkez 6 perifer bölgede incelenmiş ve şu şekilde tanımlanmıştır.

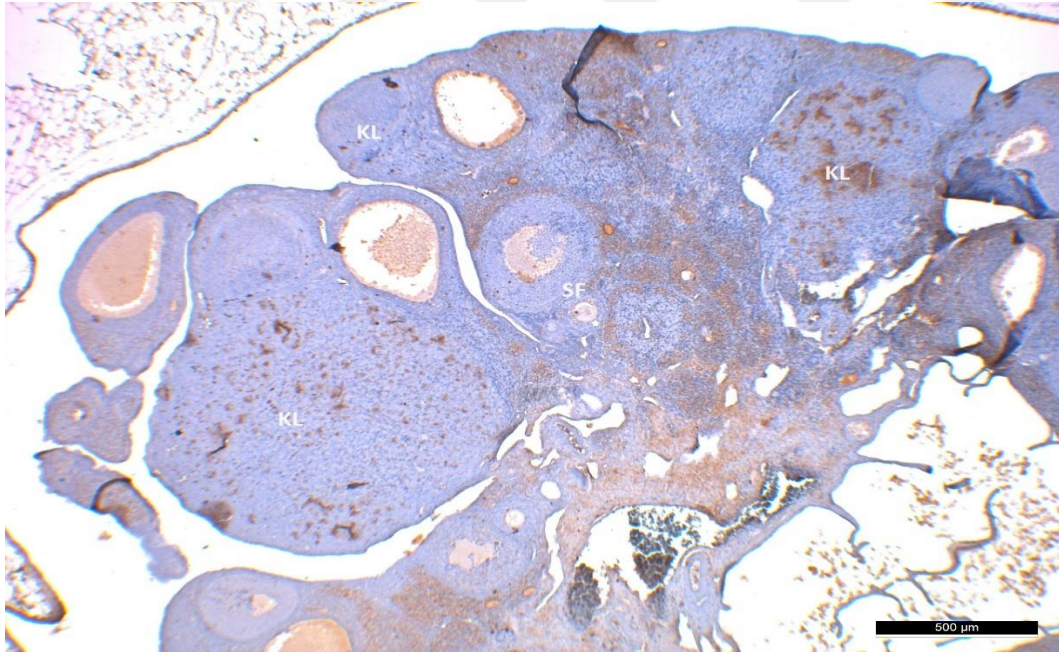
Kontrol grubunda normal yapısındaki yetişkin ratların over dokusunda, kübik yapıdaki Geminal Epitel hücrelerinde pozitif immün reaksiyon görüldü (Resim 21, Resim 28, Resim 4.29). Korteks stromasında immün reaksiyon oluşumu belirlenmedi (Resim 4.21, Resim 4.22). Primordial foliküllerde immün boyama izlenmedi. Multilaminar primer foliküllerde oosit sitoplazmasında ve çekirdeğinde zayıf immün reaksiyon görüldü ancak bu foliküllerin granüloza hücreleri çoğunlukla immün negatif olarak gözlemlendi. Seyrek olarak bazı granüloza hücrelerinde orta dereceli immün reaksiyon görüldü (Resim 4.25). Sekonder

foliküllerin ise erken aşamalarında oosit sitoplazması, nükleoplazma zayıftan ortaya tutulum gösterirken çekirdekçikte ve zona pellusida da kuvvetli tutulum görüldü (Resim 4.23). Literatüre geçmiş oosit maturasyonu boyunca oositin birçok steroid yapıda molekül sentezlediği bilgisi ile doğru orantılı olarak hem oosit sitoplazmasında hem de nükleoplasmasında kuvvetli immünreaksiyon izlendi. Folikül büyüdükçe sekonder ve tersiyer folikül yapısı içindeki primer oositlerde sitoplazma ve çekirdekte reaksiyonun arttığı görüldü. Sekonder folikülde geç aşamada, oosit sitoplazması ve çekirdek ortadan şiddetliye değişen immün pozitif reaksiyon gösterdi (Resim 4.26). Antruma komşu granüloza hücrelerinde kuvvetli Star tutulumunun arttığı gözlenmekteydi. Graf foliküllerde nükleoplazmada daha kuvvetli tutulum gözlenirken sitoplazmada orta tutulum izlendi. Tersiyer foliküllerin oosit çevresindeki korona radiata ve kümülüs ooforus hücrelerinde kuvvetli immün pozitif reaksiyon izlendi. Korpus luteum yapısındaki Granüloza hücreleri kuvvetli pozitif tutulum gösterdi (Resim 4.27, Resim 4.31). Bunun yanı sıra en belirgin ve güçlü tutulum interstisyel bezlerde görüldü (Resim 4.24). Korpus Luteumun, çevre granüloza hücrelerinde merkeze doğru artan immün reaksiyon izlendi. Atretik foliküllerde kuvvetli immünreaksiyon saptandı. Kapiller endotel hücrelerinde güçlü pozitif reaksiyon izlenirken, bu kapillerin lümenindeki yapılarda yine oldukça kuvvetli immün reaksiyon izlendi. Bunun yanı sıra bazı daha büyük damarların endotel hücrelerinde immün reaksiyon zayıf ya da izlenmedi fakat bu damarların lümen yapılarında oldukça kuvvetli immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 4.28).

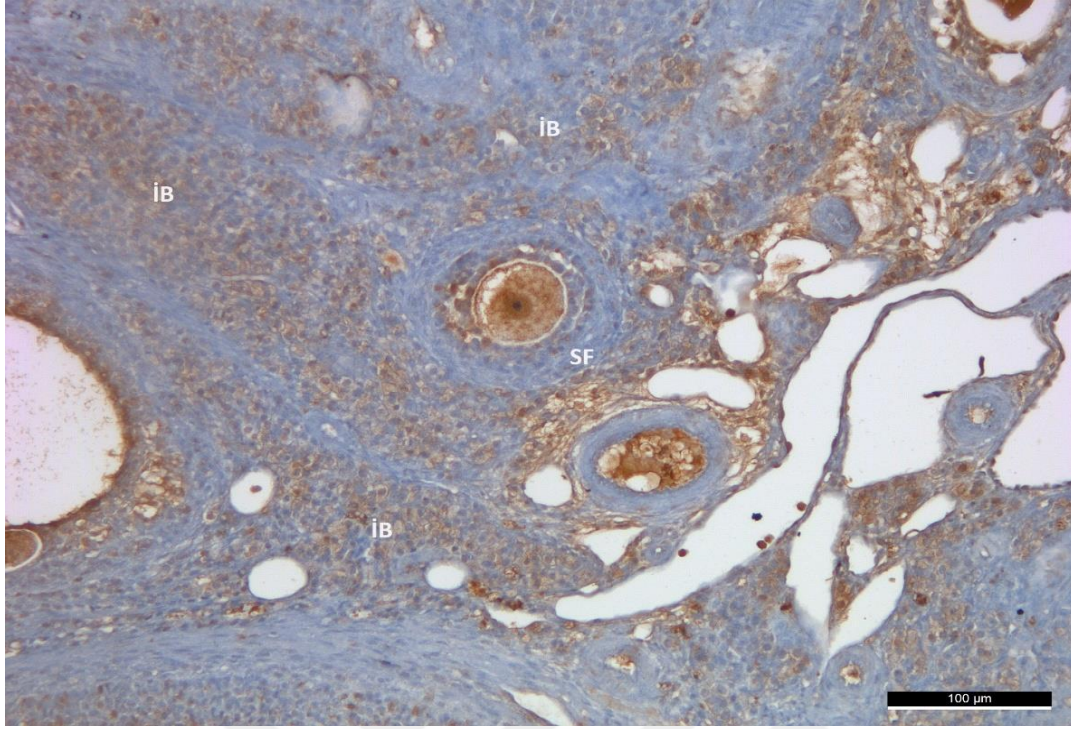
Özellikle sekonder ve tersiyer foliküllerin Zona pellusida yapılarında da oldukça güçlü immün reaksiyon görüldü (Resim 4.30). Bu reaksiyonun da primer oosit tarafından sentezlenerek salgılanan steroid yapıların sentez bileşenlerinde ve foliküler sıvının yapısındaki steroid yapıdaki bileşenlerin sentezi ile ilişkilendirilebileceği literatür bilgisi ile desteklendi.



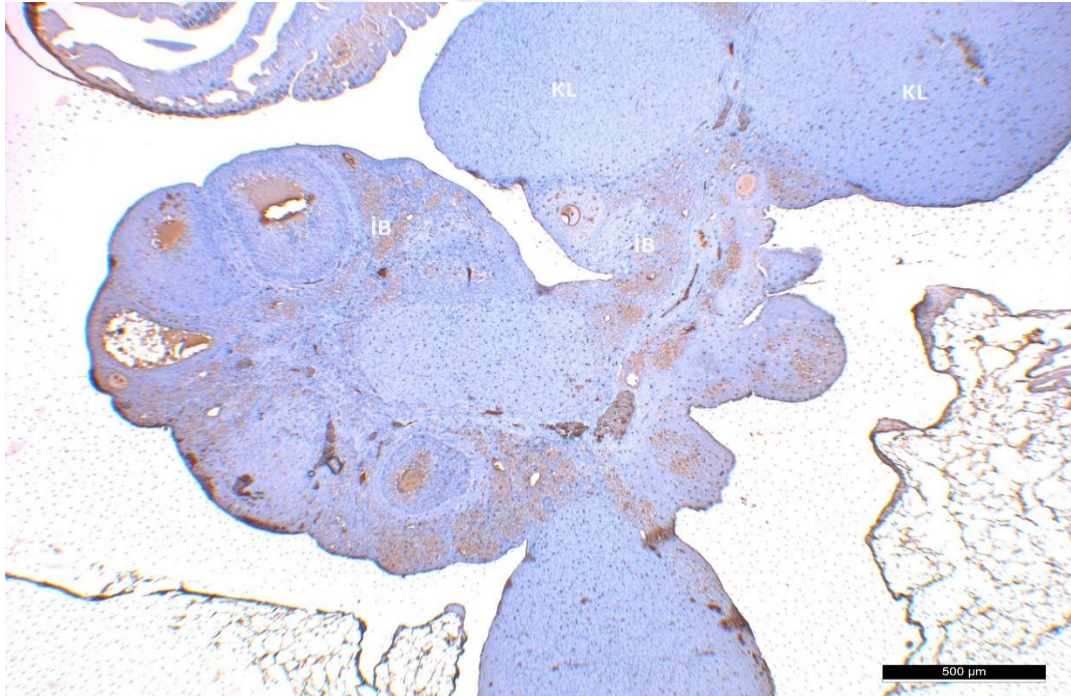
Resim 4.21. Kontrol grubunda büyük büyütmede over dokusu. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum, *: Büyümekte olan foliküller, Ok başı: Germinal Epitel. 4X büyütme



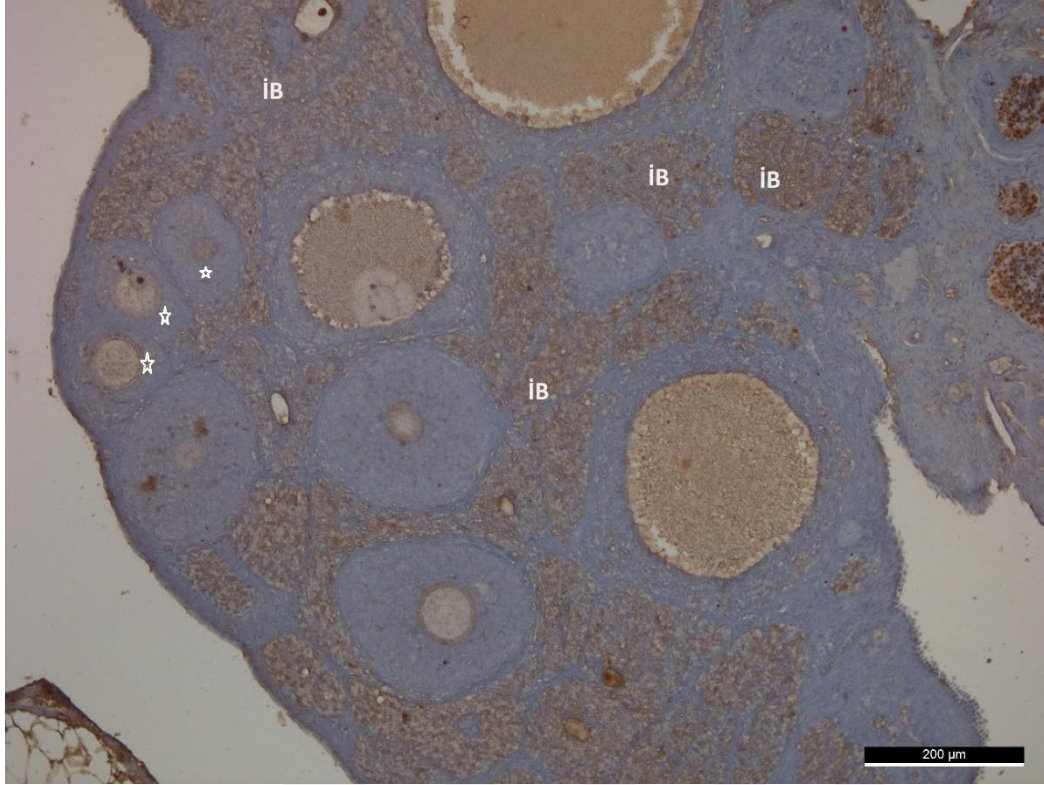
Resim 4.22. Kontrol grubunda sağlıklı gelişen over dokusu. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum, SF: Sekonder folikül. 4X büyütme



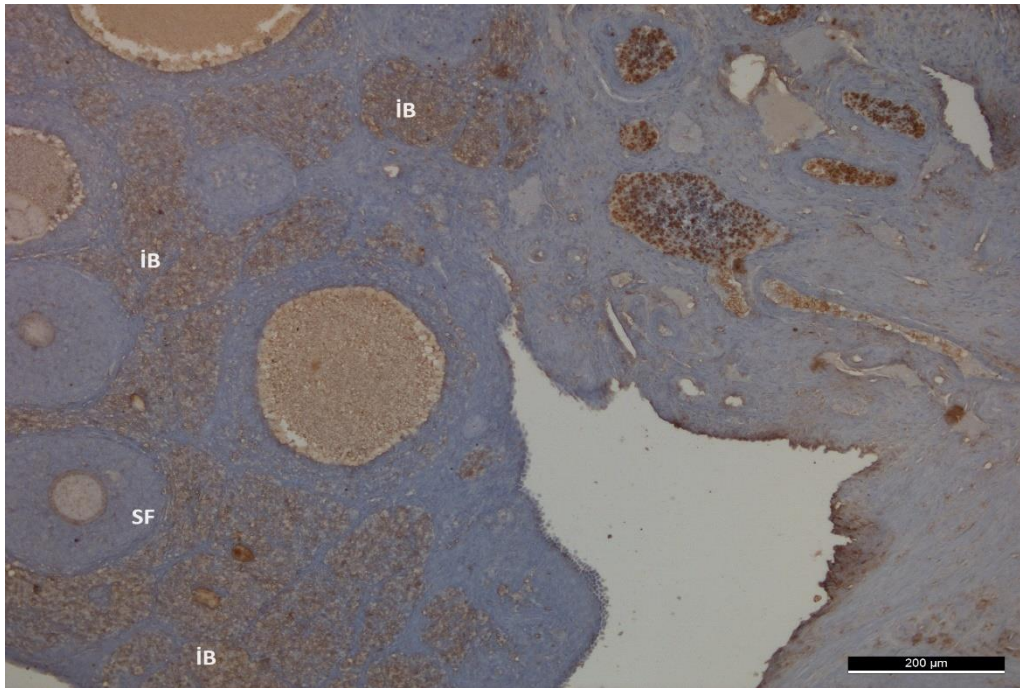
Resim 4.23. Kontrol grubunda interstisyel bezlerde ve sekonder folikülde ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül. 20X büyütme



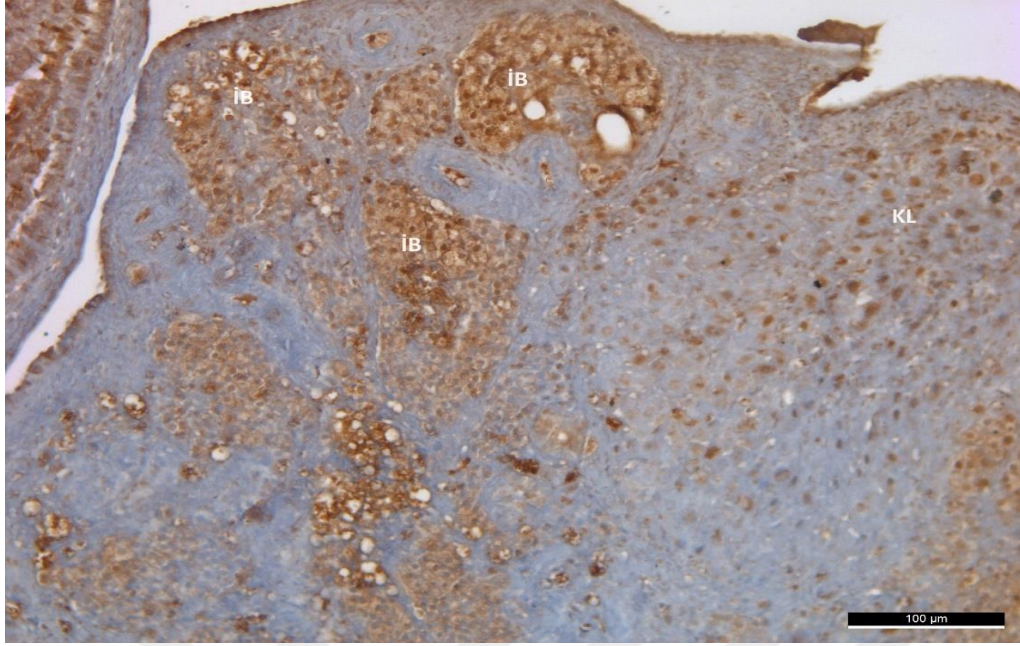
Resim 4.24. Kontrol grubunda korpus luteumlarda ve interstisyel bezlerde gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum. 4X büyütme



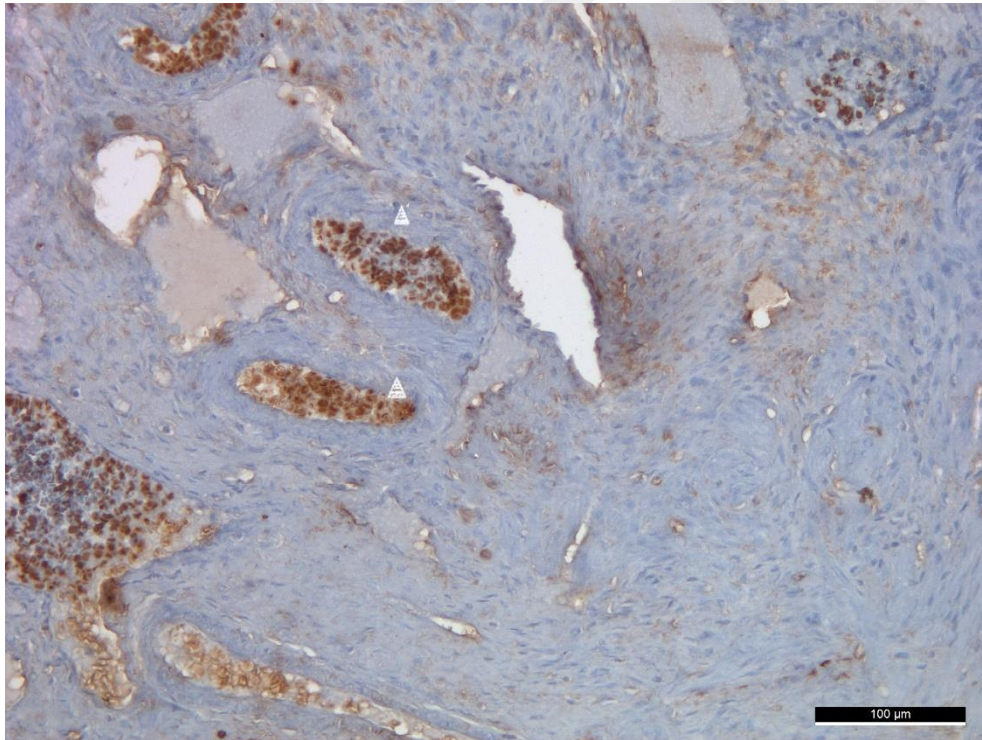
Resim 4.25. Kontrol grubunda büyümekte olan foliküllerde gözlenen tutulum. İ: İnterstisyel bez, *: Büyümekte olan foliküller



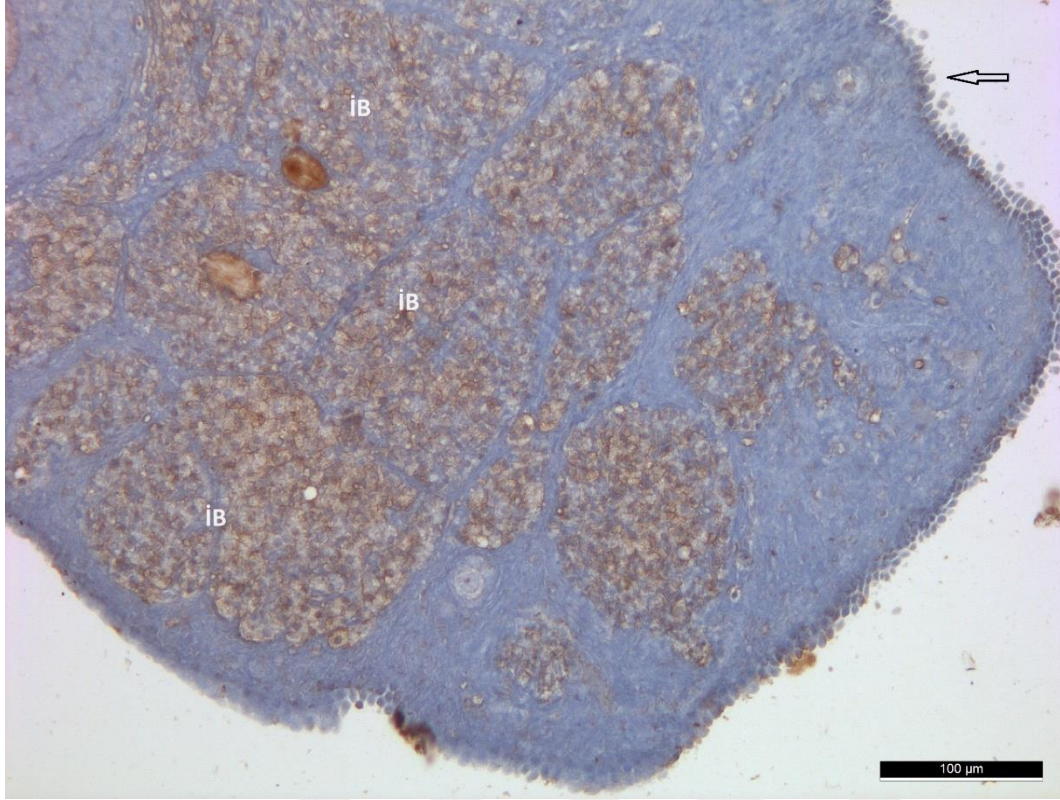
Resim 4.26. Sekonder foliküllerde zona pellusidada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül. 10X büyütme



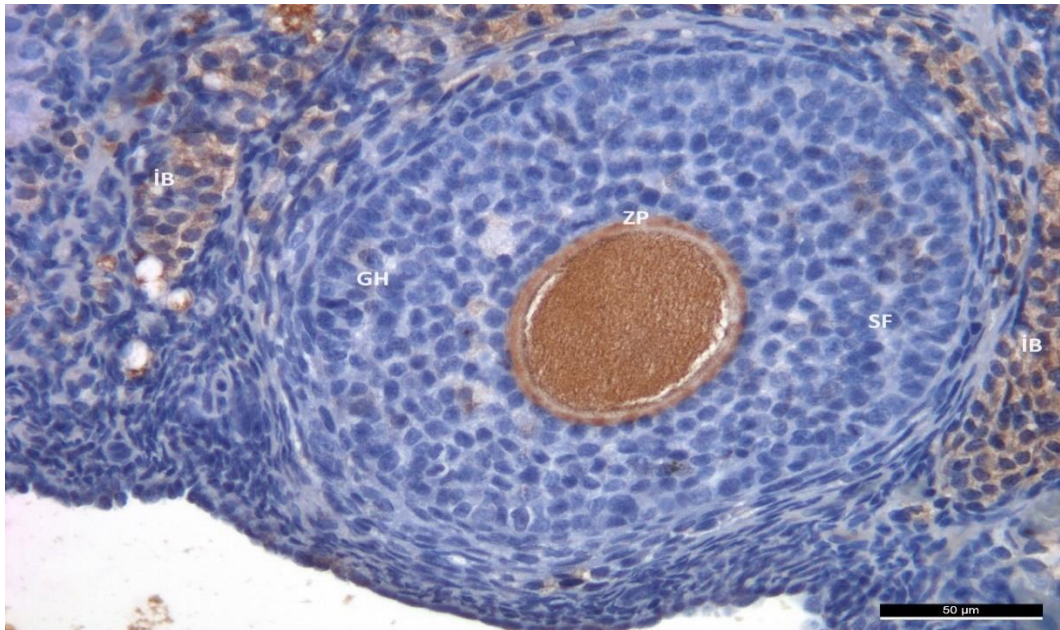
Resim 4.27. Korpus luteum hücrelerinde ve intersitisyel bezlerde gözlenen tutulum.
KL: Korpus luteum, İB: İntersitisyel bez. 20X büyütme



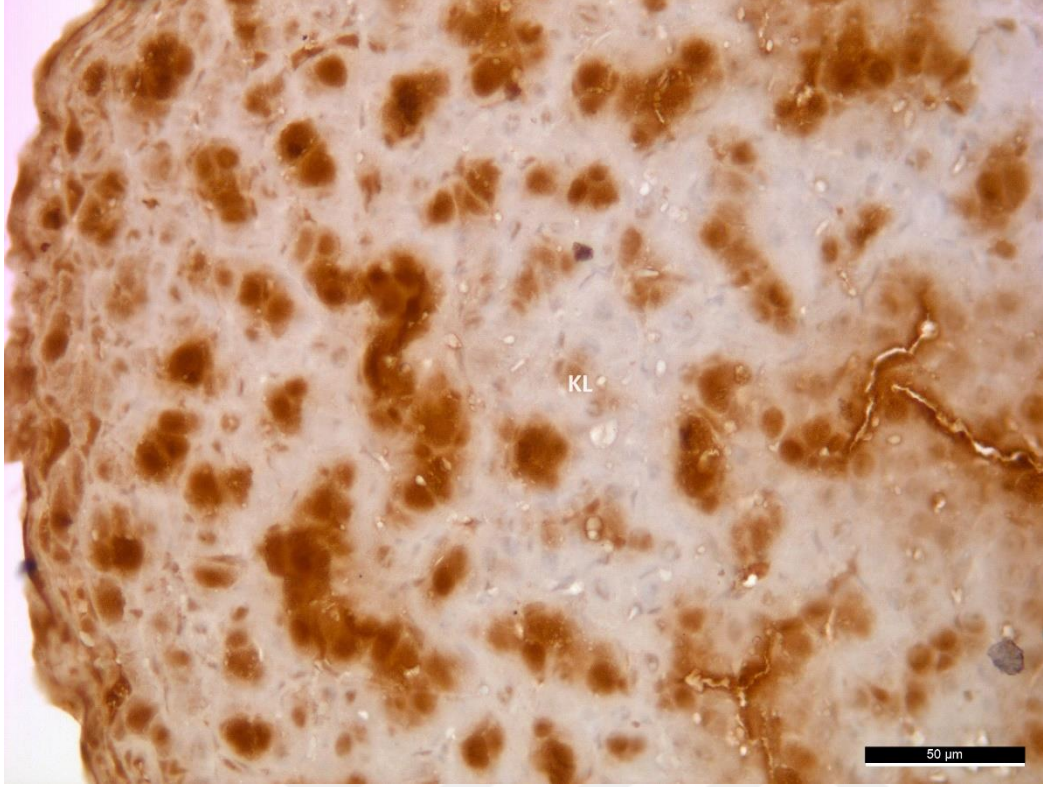
Resim 4.28. Kontrol grubunda kan damarlarının lümeninde gözlenen tutulum. Δ Kan damarları. 20X büyütme



Resim 4.29. Germinal epitel de ve interstisyel bezlerde gözlenen tutulum. Ok: Germinal epitel, İB: İnterstisyel bez. 20X büyütme



Resim 4.30. Sekonder folikülde zonapellusida ve ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, GH: Granüloza hücreleri, ZP: Zona pellusida. 40X büyütme



Resim 4.31. Korpus luteum hücrelerinde gözlenen tutulum. KL: Korpus luteum. 40X büyütme

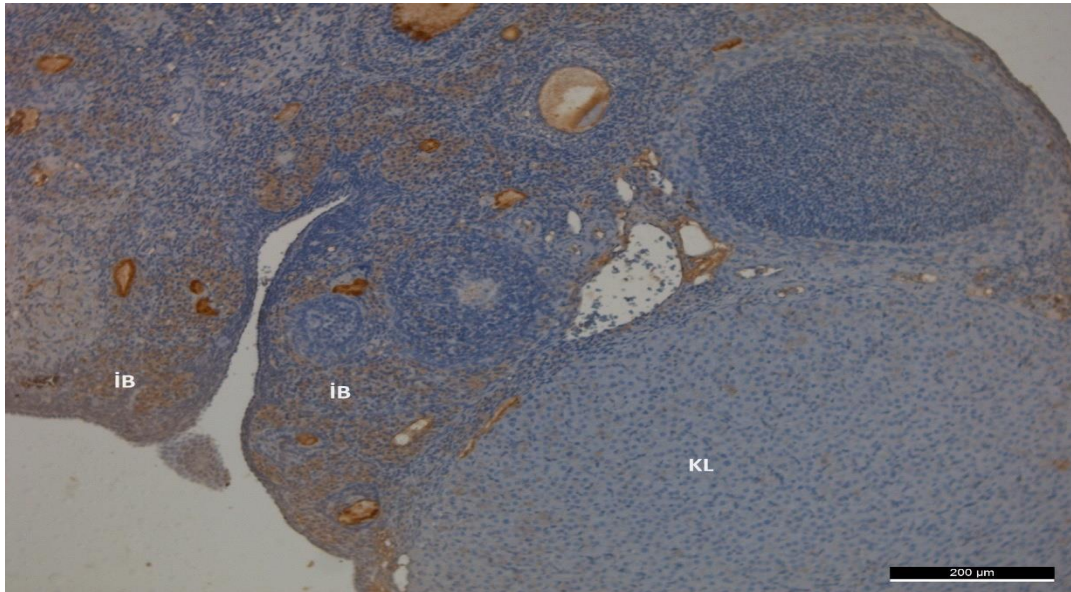
D vitamini eksikliği oluşturulan Deney gruplarına ait over dokularında immünreaksiyon over dokusunu oluşturan ve kontrol grubunda değerlendirilen tüm yapılarda karşılaştırıldı.

Tutulumlar hem kontrol hem deney grubunda aynı yapılarda olmakla beraber bahsi geçen tüm yapılarda deney grubunda çok daha zayıf reaksiyon izlendi.

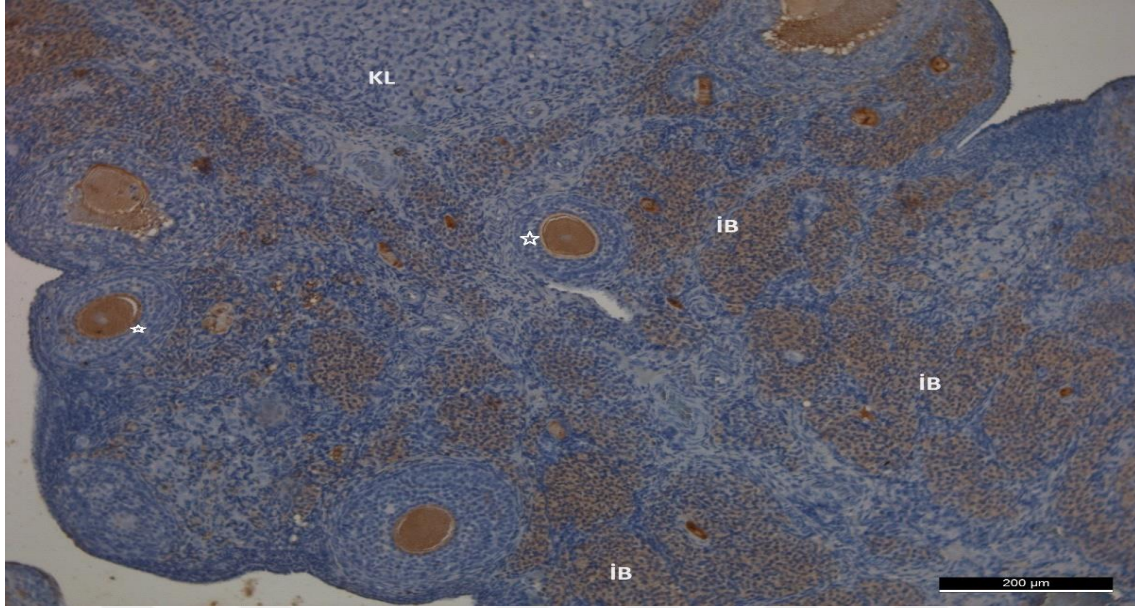
Kübik epitelden oluşan germinal epitelin bazı hücrelerinde kuvvetli olmakla birlikte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında zayıf ya da orta dereceli immün tutulum gözlemlendi. Korteks stromasında negatif immün reaksiyon izlendi (Resim 4.32). İntersitisyel bezlerde kontrol grubuna oranla daha az da olsa tutulum gözlemlendi (Resim 4.32). Kapiller endotel hücreleri ve lümen yapılarında kuvvetliden ortaya değişen reaksiyon görüldü. Primordial foliküllerde immün reaksiyon izlenmedi. Unilaminar primer folikülde sitoplazmada orta dereceli immün tutulum gözlemlendi. Multilaminar primer folikülde Kontrol grubuna kıyasla daha zayıf immün reaksiyon görüldü (Resim 4.33, Resim 4.39). Korpus luteum yapılarının çoğunda negatif immün reaksiyon göstermekteydi. Kontrol grubuna göre yaygın bir tutulum izlenmedi (Resim 4.34). Sekonder foliküllerin erken evresinde genel olarak zayıf tutulum

izlendi (Resim 4.35, Resim 4.36, Resim 4.38). Bazı kan Damarlarının lümen,nde ppozitif immün reaksiyon izlendi (Resim 4. 37). Tersiyer folikül ya da Graff foliküllerinde de kontrol grubuna oranla tüm yapılarda çok daha zayıf immün reaksiyon görüldü. Atretik foliküller orta dereceli pozitif reaksiyon göstermekteydi. Bazı korpus luteum yapılarının merkezlerinde immün pozitif reaksiyon izlendi. Granüloza hücreleri zayıftan ortaya değişen ve bazıları belirgin şekilde orta dereceli immün pozitif reaksiyon göstermekteydi.

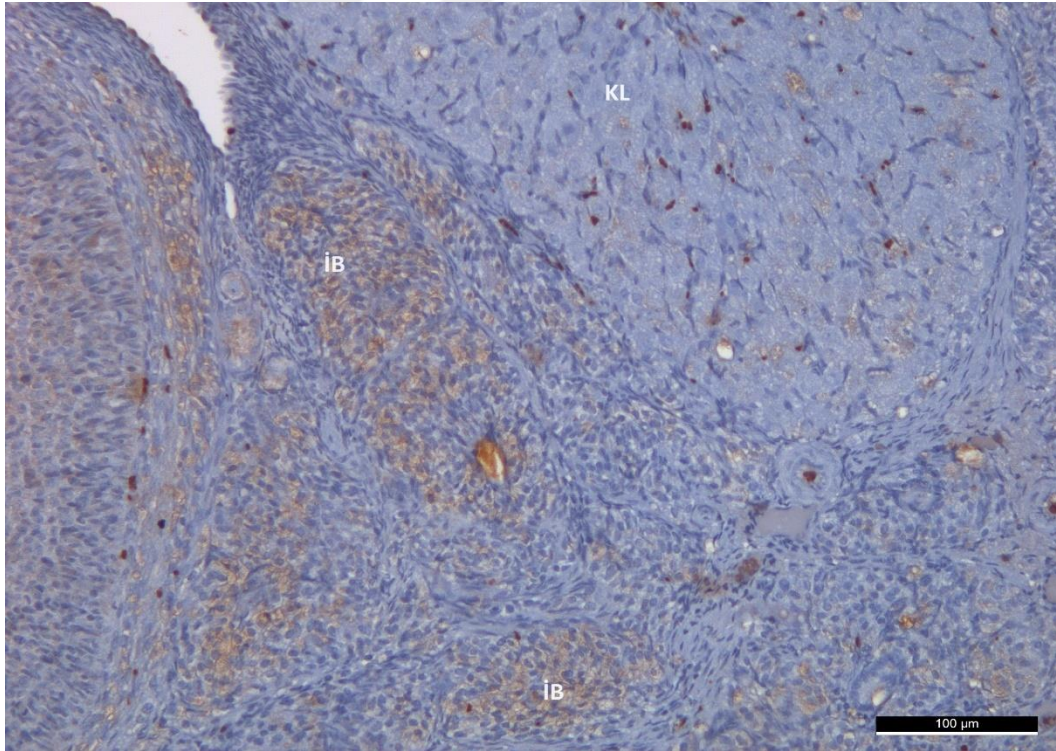
StAR proteininin deney grubunda daha güçlü reaksiyon göstermesi literatür bilgileri ile de örtüşmekteydi. Bu protein steroid sentezi yapan hücrelerde sentezlenmekte olup over yapısında ise literatürde en çok interstisyel bezlerde, teka interna ve granulosa lutein hücrelerinde tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda da immün reaksiyon hem deney hem kontrol grubunda en güçlü reaksiyonu interstisyel bezlerde gösterdi. Deney grubundaki reaksiyon, sağlıklı kontrol grubuna oranla çok da az yaygın ve daha az reaktif olarak saptandı. Sonuç olarak steroid sentezinde son derece önemli olan Star proteininin D vitamini eksikliğinde özellikle teka interna, granulosa lutein ve intersitisiyal bezlerdeki zayıf tutulumu, gebeliğin devamının sağlanması ve korunmasında negatif bir etki oluşturabilir kanısına varılmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmekle birlikte daha ileri ve farklı metodolojiler ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



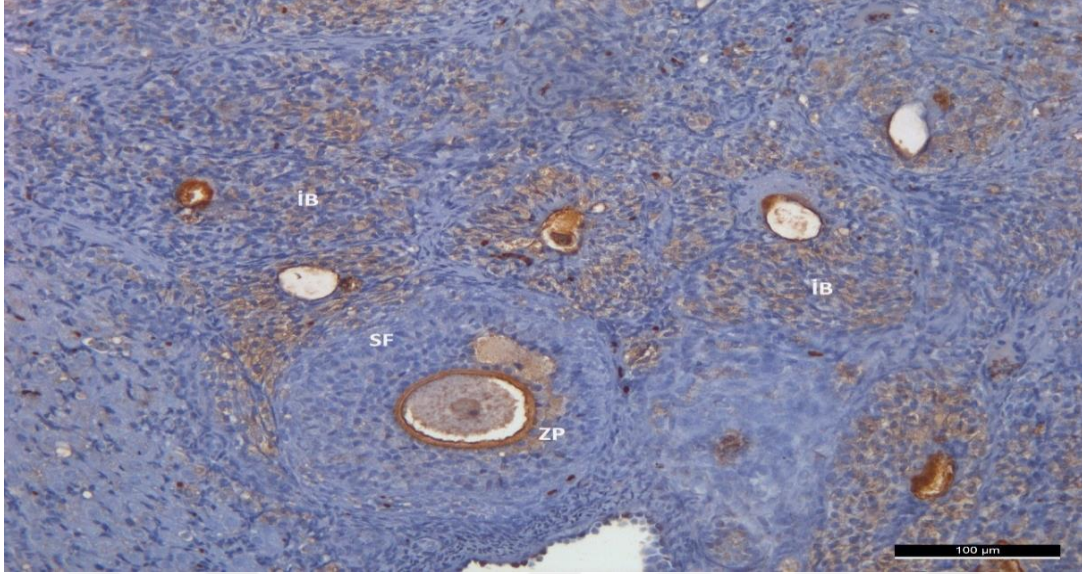
Resim 4.32. D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubunda over dokusunda gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, KL: Korpus luteum. 10X büyütme



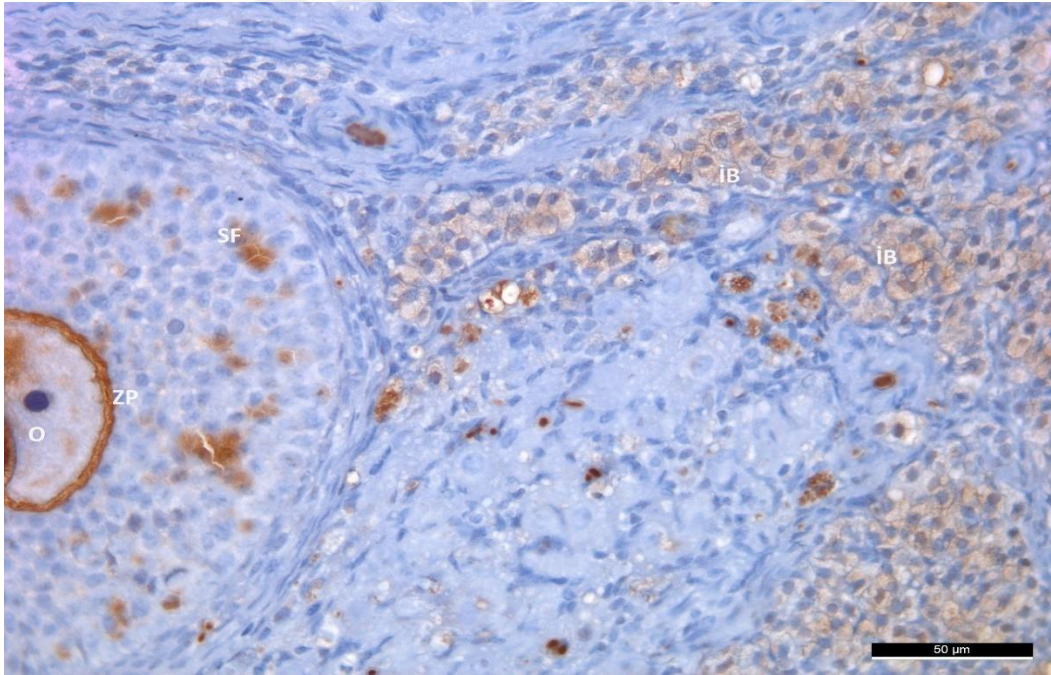
Resim 4.33. Gelişmekte olan foliküllerde gözlenen ooplazmik tutulum. *: Gelişmekte olan folikül, İB: İnterstitiyel bez, KL: Korpus luteum. 10X büyütme



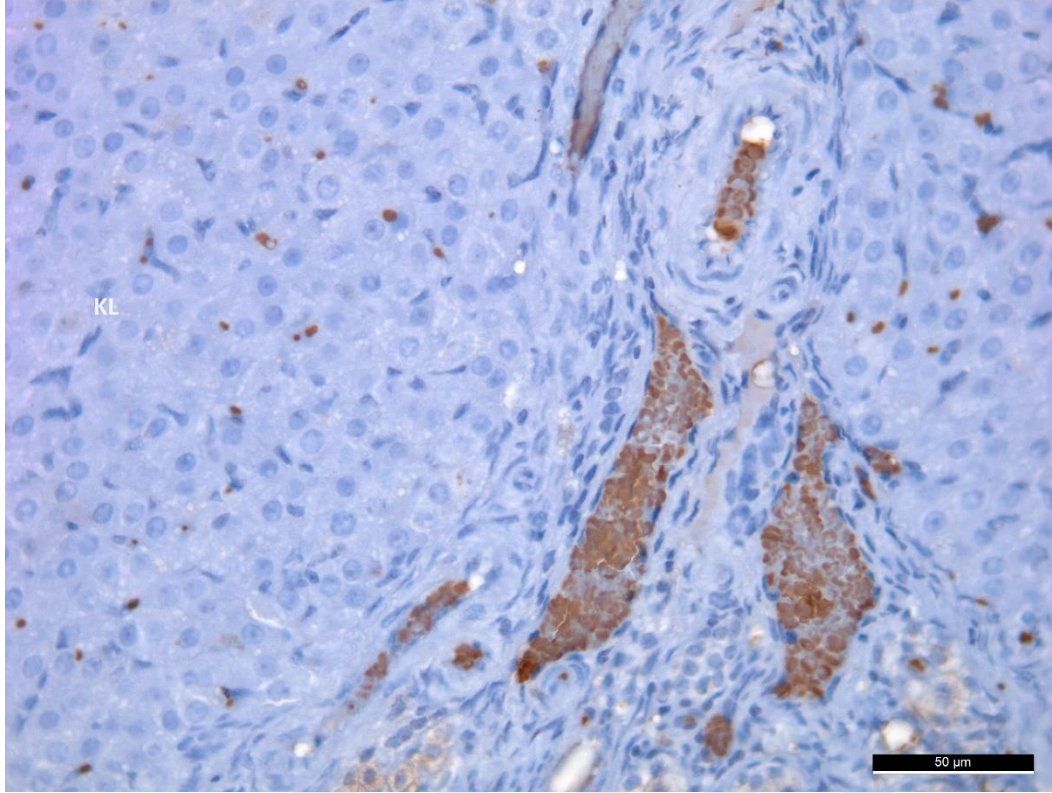
Resim 4.34. Korpus luteum hücrelerinde gözlenen tutulum. KL: Korpus luteum, İB: İnterstitiyel bez. 20X büyütme



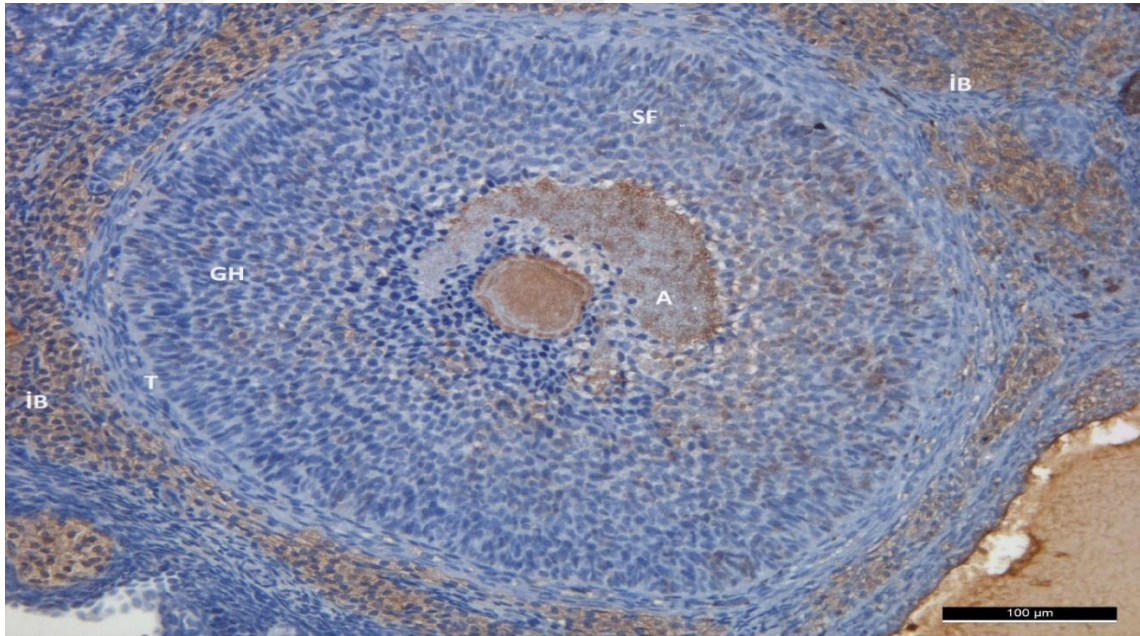
Resim 4.35. Sekonder folikülde zona pellusida da gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, ZP: Zona pellusida. 20X büyütme



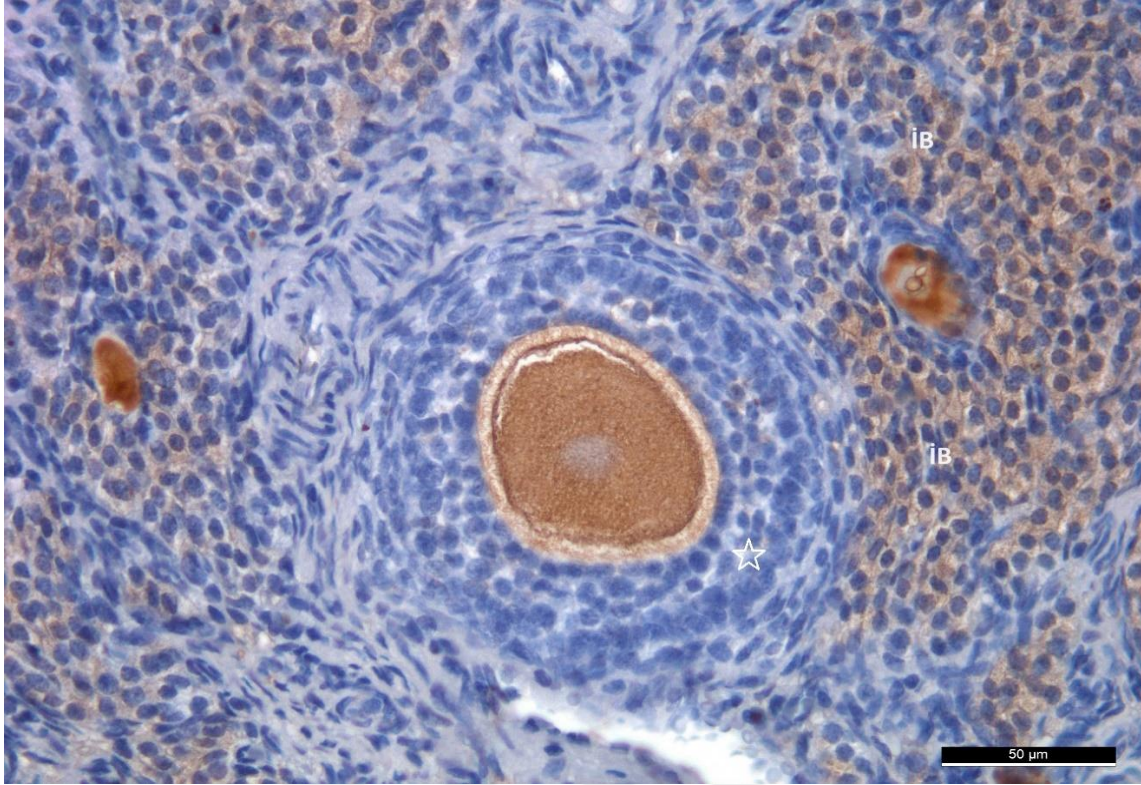
Resim 4.36. Sekonder folikülde zona pellusida da ve granüloza hücrelerinde gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, ZP: Zona pellusida, O: Oosit. 40X büyütme.



Resim 4.37. Kan damarlarının lümeninde gözlenen tutulum. 40X büyütme



Resim 4.38. Sekonder folikülde granüloza hücrelerinde ve ooplazmada gözlenen tutulum.
İB: İnterstisyel bez, SF: Sekonder folikül, A: Antrum, GH: Granüloza hücreleri,
T: Teka tabakaları. 20X büyütme



Resim 4.39. Gelişmekte olan foliküllerden multilaminar primer folikülde ooplazmada gözlenen tutulum. İB: İnterstisyel bez, *: Gelişmekte olan folikül. 40X büyütme

4.1.5. İstatistiksel analiz

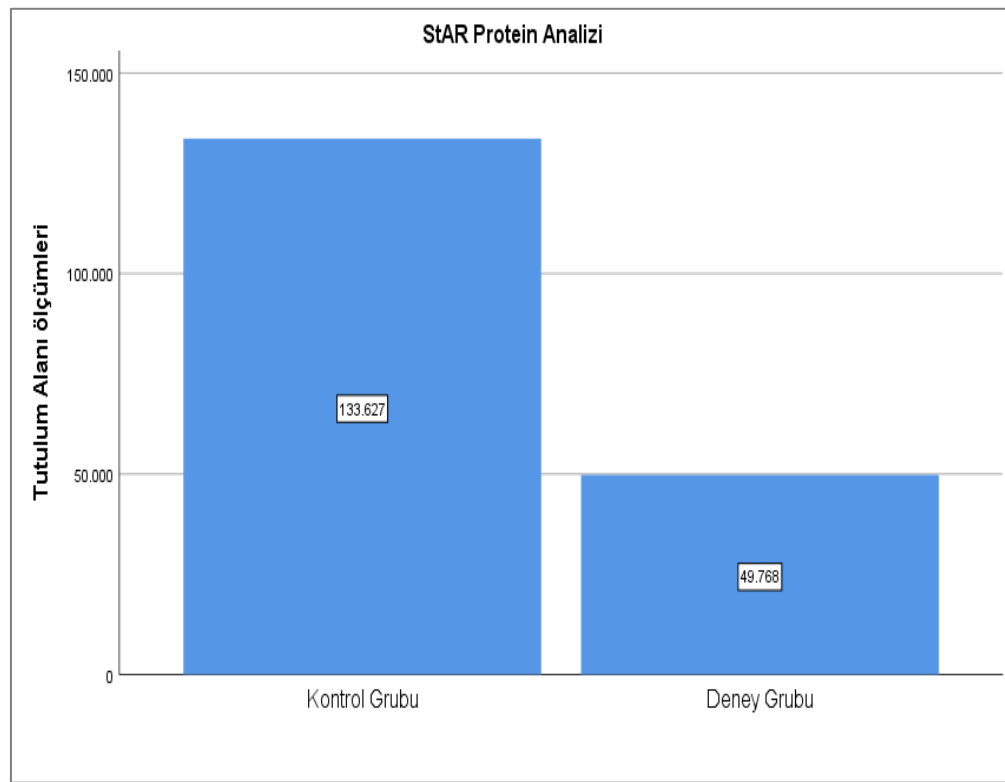
Her bir denekten elde edilen 6 preparatta boyanma yoğunluğu ölçümü yapıldı. İmage j Programında analiz edilen görüntülerin boyanma yoğunlukları sayısal olarak elde edildi. Elde edilen verilerden her bir denek için ortalama değer hesaplandı.

Çizelge 4.1. Kontrol grubu için her bir denekten elde edilen 6 preparatta tutulum yoğunluğu ölçümü ve her bir denek için hesaplanan ortalama değerler

Denek numarası	Kontrol Grubu					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tutulum yoğunlukları ölçümü	19.202	10.274	17.570	30.069	20.308	28.605
	26.249	13.177	22.953	21.912	21.502	28.547
	20.625	25.801	23.185	29.081	21.529	24.024
	21.410	16.809	14.253	22.493	25.558	23.808
	20.138	17.165	23.466	26.240	27.873	27.435
	22.290	19.574	13.131	17.690	28.792	29.026
Ortalama	21.652	17.133	19.093	24.581	24.260	26.908

Çizelge 4.2. Deney grubu için her bir denekten elde edilen 6 preparatta tutulum yoğunluğu ölçümü ve her bir denek için hesaplanan ortalama değerler

Deney Grubu						
Denek numarası	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tutulum yoğunlukları ölçümü	7.346	1.945	10.116	5.901	11.152	12.840
	5.730	4.690	6.123	9.407	9.376	9.775
	4.219	11.486	8.336	6.737	15.579	9.888
	5.205	2.450	4.314	12.855	10.405	9.771
	7.943	7.416	6.912	12.131	9.588	9.710
	4.505	4.552	8.899	8.390	12.797	10.118
Ortalama	5.825	5.423	7.450	9.237	11.483	10.350



Resim 4.40. Tüm gruplarda tutulum alanlarının ölçümlerine dayalı toplam alan değerleri

SPSS programında yapılan normallik testine göre verilerin normal dağıldığı tespit edildiği için ($p > 0.05$) T testi yapılmıştır.

Çizelge 4.3. Grup istatistiğinde grupların standart sapma ve standart hata değerlerini gösteren çizelge

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
Kontrol	n=6	22,27117	3,679018	1,501953
Deney	n=6	8,29467	2,463211	1,005602

Gruplardan her bir denek için elde edilen ortalama veriler SPSS programında bağımsız değişkenler için T testi ile analiz edildi. Kontrol ve deney grubu, tutulum yoğunlukları arasında yapılan T testi sonucunda $p < 0.05$ bulundu ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi.





5. TARTIŞMA

D vitamini eksikliği günümüzde oldukça sık karşılan bir problem olmaktadır. Dünya genelinde D vitamini eksikliği güncel bir araştırma konusudur. Özellikle üreme sistemi rahatsızlıklarında D vitamininin etkisinin son zamanlarda literatürde en fazla araştırılan konulardan birisi olmuştur. Dişi üreme sisteminde D vitamini eksikliğin polikistik over sendromu, preklaamsi, ani düşükler ve kısırlıkla bağlantılı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ancak bunlara nasıl sebep olduğu ve maternal D vitamininin gebelik sırasındaki önemini araştıran çalışmalar devam etmektedir.

Ovaryum foliküllerinde D vitamini önemini araştıran çalışmalarda D vitamini reseptörünün etkinliği ile belirlenmektedir. Xu ve arkadaşları (2016) Araştırmacılar, 14 dişi denek kullandı. Uygun koşullar altında ötanazi yapılarak alınan ovaryum dokularına real time PCR ve VDR protein lokalizasyonu için immünohistokimya yöntemleri uygulamışlardır. Araştırmacılar deney sonucunda, VDR ifadesi, granüloza hücrelerinde, oosit çekirdeklerinde ve sitoplazmalarında bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır. Primordial foliküllerin granüloza hücrelerinde belirgin tutulum görülmezken folikül büyüdükçe tutulumun arttığını belirlemişlerdir [45].

Literatürde bulunan başka bir çalışmada Behmanesh ve arkadaşları da (2019) araştırmacılar bu deneyde 8 haftalık 40 adet wistar albino rat kullanarak standart koşullarda bakımları sağlandı ve 4 grup (n=10) oluşturulan bir çalışma planlamışlardır. [46]. Deney gruplarında PKOS indüklediler ve bir gruba tedavi amacı ile D vitamini ve uygulandı. PKOS indüklemesi için 2mg/kg estradiol valerat enjekte ettiler. PKOS indüklemesi vajinal smear örnekleri ile doğrulamışlardır. Kontrol grubuna ve PKOS grubuna 14 gün boyunca 1mg/kg D vitamini tedavisi uyguladılar. Deneyden 1 hafta önce kızgınlık döngülerini değerlendirmek için vajinal smaer örnekleri alarak ve incelemişler. Çalışma için düzenli bu örnekler 4-5 gün incelenerek adet döngüsü olan denekleri belirlemişler. Deney sonunda histopatolojik değerlendirme için ovaryum dokularını elde etmişlerdir. Ovaryum dokularına hematoksilin eozin yöntemi uygulamış ve gruplar arasında ovaryum foliküllerini değerlendirmişlerdir. Kontrol ve pkos indüklenmeyen ama D vitamini tedavisi uygulanan deneklerde gelişim aşamalarındaki ovaryum foliküllerinin sağlam olduğunu belirlemişlerdir. PKOS indüklenen ve D vitamini ile tedavi edilen diğer grupta normal folikül gelişimi, sağlıklı granüloza hücreleri, teka hücreleri ve korpus luteum yapılarının görülmesi ile

sağlıklı folikül gelişimi olduğu belirlemiş oldular. Aynı zamanda folikül sayımı yapmış ve PKOS indüklenen grupta folikül ayısında azalma gözlemlemişler. D vitamini tedavi grubunda ise folikül sayılarının anlamlı olarak arttığını tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise Grzeczka ve arkadaşları, D vitamini ve eksikliğin yumurtalık folikülleri üzerindeki önemi araştıran bir inceleme yapmışlardır [47]. D vitamini eksikliğin infertilite ile ilgili olduğunu tespit etmişlerdir. D vitamininin oosit kalitesini etkilediğini ve oosit olgunlaşması üzerine etkisinin olduğunu bu çalışma ile göstermişlerdir. Hamilelik dönemi öncesinde ve sonrasında D vitamini takviyesi hala tartışılan bir konu olsa da D vitamini eksikliğinde dişi üreme sisteminin ve gebeliğin olumsuz etkilendiğini göstermişlerdir. Dişi üreme sisteminin sağlığını korumak için D vitamini seviyelerinin önemini vurgulamışlardır.

Literatürde bulunan diğer bir çalışma ise, Nelson ve arkadaşları tarafından yapılan korpus luteumda hücrelerini araştırmaktadır [48]. Bu çalışmada gebe deneklerin korpus luteumunda bulunan hücreleri izole etmek amaçlanmıştır. Büyük ve küçük hücre popülasyonu hücre kültüründe morfolojilerine göre farklılık gösterdiğini belirlediler. Küçük luteal hücreler, oval bir çekirdek bulundurması ile karakterize edildi aynı zamanda az miktarda lipid damlacığı içerdiği tespit edildi. Büyük luteal hücrelerin ise küçük çekirdekli ve bol lipid damlacıklı morfolojik yapılarını gördüler. Büyük ve küçük luteal hücrelerin her ikisinde sitokrom P450 enzimlerini sentezlediğini belirttiler. Ancak büyük luteal hücrelerdeki P450 enzim sentezi ve progesteron üretiminin daha fazla olduğunu ortaya çıkardılar. Steroidojenik olmayan hücrelerle birlikte büyük luteal hücreler kültürlendiğinde is progesteron sentezinin arttığı görüldü. Bu çalışmanın sonucu olarak iki hücre tipinin steroidojenik kapasitesindeki farklılığın boyutlarından dolayı daha belirgin olduğunu gösterdiler. Aynı zamanda korpus luteumda bulunan steroidojenik olmayan hücrelerin de luteal hücre steroidogenezi üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu da kanıtlamışlardır.

Bir diğer çalışmaya bakıldığında Stocco ve arkadaşları, korpus luteum oluşumunun moleküler kontrolünü araştırmışlardır [49]. Korpus luteumun gelişim sebebi progesteron sentezini sağlamaktır. Progesteronun gebelik boyunca uygun seviyelerde tutulması farklı moleküler düzenlemeler ile sağlandığını söylemişlerdir. Gebelik sırasında korpus luteumun hayatta kalmasının plasental düzenleyicilerin, yumurtalığın ve hipofizin etkileşimlerine bağlı olduğunu görmüşlerdir. Granüloza hücrelerinin luteal hücrelere farklanmasında korpus

luteum fonksiyonunun moleküler kontrolünde bazı moleküllerin etkisini ortaya çıkardığını belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda StAR antikorunun görevini inceleyen olanlar incelendiğinde Taketa Y'nin yaptığı bir çalışma dikkat çekmektedir [50]. Bu çalışmada sıçanlarda yapılan deneylere bakıldığında korpus luteumda progesteron sentezlenmesinin basamaklarını belirtilmiştir. Korpus luteumda progesteron biyosentezini incelemiştir. Korpus luteum için ana kolesterol kaynağının yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) olduğunu belirtti. Bu molekülden üretilen kolesterol esterlerinin hücre içine girmesi için birçok enzimin görev yaptığını söylemiştir. Steroidojenik akut düzenleyici protein ise hücre içine alınmış kolesterol esterlerini mitokondri mebranına ve daha sonra mitokondri iç membranına taşınmasında görevli olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada korpus luteumda bulunan StAR proteini progesteron sentezi için önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir.

Literatürde yapılan başka bir çalışmada ise Ramayya M.S. ve arkadaşları yumurtalık yüzey epitelinde StAR proteininin eksprese edildiğini söylemişlerdir [51]. Parafin bloklardan alınan kesitleri immünohistokimyasal olarak inceleyen çalışmada germinal epitel hücrelerinde steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) eksprese edildiğini göstermişlerdir.

Erken gebelikte D vitamini eksikliği olan bireylerde progesteron sentezini etkileyen StAR proteininin nasıl değiştiğinin belirlenmesi amaçlanan bu çalışmada ovaryum dokusunda StAR proteininin immünohistokimyasal bulguları sonucunda kontrol grubunda germinal epitelde, interstisyel bezlerde, sekonder folikül, antral folikül, atretik foliküllerde ve korpus luteumlarda tutulum yoğunluklarının deney grubuna oranla daha fazla olduğu dikkat çekmekteydi. Korpus luteum yapılarında ise tutulum yoğunlukları kontrol grubunda kuvvetli immün reaksiyon gösterirken deney grubunda ise zayıf immün reaksiyon olarak görüldü. Deney grubunda ovaryum dokusunda tutulum yoğunluğunun azaldığı istatistiksel olarak analiz edildi ve kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Sonuç olarak erken gebelikte korpus luteumda D vitaminin eksikliğine bağlı olarak StAR protein sentezinin azaldığını ve bu durumun progesteron sentezini olumsuz yönde etkileyebileceği kanısına varıldı.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak histopatolojik değişimin D vitamini eksikliği oluşturulmuş over dokusunda izlenmesi, D vitamini eksikliğinin dişi üreme sistemi ve fonksiyonu üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir.

D vitamini eksikliği oluşturulan grupta, atretik foliküllerde artış ve sekonder folikülde sonra foliküllerde atreziye gitme eğiliminin artması folikül gelişiminin engellenmesinden dolayı doğurganlığı etkilediği için ovaryum dokusu üzerinde D vitamininin hayati bir önem taşıdığının bir göstergesi olabilir. Özellikle korpus luteum yapılarının azalması ve mevcut korpus luteum yapılarındaki bulgular kısmında açıklanan dejenerasyonlar, progesteron ve östrojen sentezinde bozulma ve erken gebelik döneminde oluşabilecek olası progesteron eksikliği nedeniyle abortus oluşumuna neden olabilecektir. Yapılan immünohistokimyasal analizlerde progesteron hormonu sentezinin başlamasında ilk aşama olan kolesterol esterlerinin mitokondri iç zarına taşınmasını sağlayan StAR proteini D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubunda azaldığı görülmüştür. Bu durumun progesteron sentezinin başlamasını engelleyerek vücutta progesteron seviyesinin azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Böylece, gebe bireylerde oluşan bazı olumsuzlar karşımıza çıkmakta ve gebelik durumunda uterus sağlıklı gelişiminin de etkilenebileceği düşünülmektedir.

Yapılacak olan başka çalışmalarla, StAR proteininin etkisiyle gebelikte normal uterus düzenlenmesinin bozulduğu ve olumsuz sonuçlanan implantasyonların nedenini ortaya koymak için bu çalışmadan yararlanılabilir. Bu çalışma, ileride yapılacak olan diğer çalışmalara bir ışık tutacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R. ve Francis-West, P. H. (2014). *Larsen's human embryology*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
2. Devi, V. S. (2017). *Inderbir Singh's human embryology*. Tirupati: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Limited.
3. Smith, R. P. ve Netter F. H. (2018). *Netter's obstetrics and gynecology*. London: Elsevier.
4. Beckmann, C. R., Herbert, W., Laube, D., Ling, F. ve Smith, R. (2013). *Obstetrics and gynecology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
5. Konar, H. (2014). *DC Dutta's textbook of gynecology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Limited.
6. Ellis, H. (2006). *Clinical anatomy: Applied anatomy for students and junior doctors*. New Jersey: Wiley.
7. Chung, K. W. ve Chung, H. M. (2012). *Gross anatomy*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
8. Ross, M. H. ve Pawlina, W. (2006). *Histology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. ve Torchia, M. G. (2013). *The developing human: Clinically oriented embryology*. India: Saunders/Elsevier.
10. Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık.
11. Nergiz, Y. (2020). Over ve uterus histolojisi. İçinde Y. K. Haspolat, F. Aktar, S. Ege ve S. Bilici (Editörler). *Çocuk ve ergenlerde gonad hastalıkları*. Ankara: Orient, s. 9-24.
12. McGee, E. A. ve Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-214.
13. Li, L., Shi, X., Shi, Y. ve Wang, Z. (2021). The signaling pathways involved in ovarian follicle development. *Frontiers in Physiology*, 12, 730196.
14. Findlay, J. K., Dunning, K. R., Gilchrist, R. B., Hutt, K. J., Russell, D. L. ve Walters, K. A. (2019). Follicle selection in mammalian ovaries. İçinde P. C. K. Leung ve E. Y. Adashi (Editör). *The Ovary*. New York: Academic Press, s. 3-21.
15. Macklon, N. S. ve Fauser, B. C. J. M. (2000). Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Hormone Research*, 52(4), 161-170.
16. Picton, H. M. (2001). *Activation of follicle development: The primordial follicle*. *Theriogenology*, 55(6), 1193-1210.

17. Williams, C. J. ve Erickson, G. F. (2000). *Morphology and physiology of the ovary*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
18. Bingöl, B. ve Güneç, Z. (2004). The role of luteinizing hormone in ovulation induction. *Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology*, 14(2), 120-125.
19. Stocco, D. M. ve Clark, B. J. (1996). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 51(3), 197-205.
20. Chen, Y. J., Feng, Q. ve Liu, Y. X. (1999). Expression of the steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor and their regulation by tumor necrosis factor α in rat corpora lutea. *Biology of Reproduction*, 60(2), 419-427.
21. Kiriakidou, M., Mcallister, J. M., Sugawara, T. ve Strauss, J. F. (1996). Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(11), 4122-4128.
22. Ronen-Fuhrmann, T., Timberg, R., King, S. R., Hales, K. H., Hales, D. B., Stocco, D. M. ve Orly, J. (1998). Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*, 139(1), 303-315.
23. Stocco, D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 193-213.
24. Anuka, E., Gal, M., Stocco, D. M. ve Orly, J. (2013). Expression and roles of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in 'non-classical', extra-adrenal and extra-gonadal cells and tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1-2), 47-61.
25. Norman, A. (2012). *Vitamin D*. San Diago: Elsevier.
26. Chen, Y. ve Zhi, X. (2020). Roles of vitamin D in reproductive systems and assisted reproductive technology. *Endocrinology*, 161(4), bqaa023.
27. Fidan, F., Alkan, B. M. ve Tosun, A. (2014). Çığın pandemisi: D vitamini eksikliği ve yetersizliği. *Türk Osteoporoz Dergisi*, 20(2), 71-74.
28. Nair, R. ve Maseeh, A. (2012). Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(2), 118-126.
29. Henry, H. L. (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 531-541.
30. Prentice, A. (2008). Vitamin D deficiency: A global perspective. *Nutrition Reviews*, 66(2), 153-164.
31. Shahrokhi, S. Z., Ghaffari, F. ve F. Kazerouni, (2016). Role of vitamin D in female reproduction. *Clinica Chimica Acta*, 455, 33-38.
32. Webb, A. R. (2006). Who, what, where and when—influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), 17-25.

33. Thomson, R. L., Spedding, S. ve Buckley, J. D. (2012). Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 77(3), 343-350.
34. Adams, J. S. ve Hewison, M. (2010). Update in vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), 471-478.
35. Hatun, Ş., Bereket, A., Çalıkoğlu, A. ve Özkan, B. (2003). Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nütrisyonel rikets. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46(3), 224-241.
36. Sahota, O. (2014). Understanding vitamin D deficiency. *Age and Ageing*, 43(5), 589-591.
37. Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstenberger, M., Tmava Berisha, A. ve Malle, O. (2020). Vitamin D deficiency 2.0: An update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(11), 1498-1513.
38. Arslan, S. ve Akdevelioğlu, Y. (2018). The relationship between female reproductive functions and vitamin D. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(6), 546-551.
39. Stavenuiter, A. W., Arcidiacono, M. V., Ferrantelli, E., Keuning, E. D., Vila Cuenca, M., Ter Wee, P. M. ve Dusso, A. S. (2015). A novel rat model of vitamin D deficiency: Safe and rapid induction of vitamin D and calcitriol deficiency without hyperparathyroidism. *BioMed Research International*, 2015, 604275.
40. Eyles, D., Brown, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J. ve Feron, F. (2003). Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience*, 118(3), 641-653.
41. Börekçi, N. Ö. (2019). D Vitamini eksikliği ile ilgili güncel bilgiler. *The Journal of Turkish Family Physician*, 10(1), 35-42.
42. Bingül, İ., Aydın, F., Küçükgergin, C., Ekici, A. I. D., Abbasoğlu, S. D. ve Uysal, M. (2021). The effect of vitamin D deficiency and 1, 25 (OH) 2D3 treatment on oxidative stress and Nrf2-antioxidant signaling in ethanol-induced hepatotoxicity. *Archives of Clinical and Experimental Medicine*, 6(3), 127-133.
43. Steiner, D. A. ve Brown, M. B. (1993). Impact of experimental genital mycoplasmosis on pregnancy outcome in Sprague-Dawley rats. *Infection and Immunity*, 61(2), 633-639.
44. Mayer, G., Nilsson, O. ve Reinius, S. (1967). Cell membrane changes of uterine epithelium and trophoblasts during blastocyst attachment in rat. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 126(1), 43-48.
45. Xu, J., Lawson, M. S., Xu, F., Du, Y., Tkachenko, O. Y., Bishop, C. V. ve Hennebold, J. D. (2018). Vitamin D3 regulates follicular development and intrafollicular vitamin D biosynthesis and signaling in the primate ovary. *Frontiers in Physiology*, 9, 1600.
46. Behmanesh, N., Abedelahi, A., Charoudeh, H. N. ve Alihemmati, A. (2019). Effects of vitamin D supplementation on follicular development, gonadotropins and sex hormone concentrations, and insulin resistance in induced polycystic ovary syndrome. *Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology*, 16(3), 143.

47. Grzeczka, A., Graczyk, S., Skowronska, A., Skowronski, M. T. ve Kordowitzki, P. (2022). Relevance of vitamin D and its deficiency for the ovarian follicle and the oocyte: An update. *Nutrients*, 14(18), 3712. Doi: 10.3390/nu14183712.
48. Nelson, S. E., McLean, M. P., Jayatilak, P. G. ve Gibori, G. (1992). Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology*, 130(2), 954-966.
49. Stocco, C., Telleria, C. ve Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, 28(1), 117-149.
50. Taketa, Y. (2022). Luteal toxicity evaluation in rats. *J Toxicol Pathol*, 35(1), 7-17.
51. Ramayya, M. S., Sheng, M., Moroz, K., Hill, S. M. Rowan, B. G. (2010). Human steroidogenic factor-1 (hSF-1) regulates progesterone biosynthesis and growth of ovarian surface epithelial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 119(1-2), 14-25.



EK-1. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Toplantı Katılım Listesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 22.07.2022-E.414563

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 21/07/2022		TOPLANTI SAYISI : 07	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.İlker ŞEN			
Prof.Dr.Mustafa KAVUTCU			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Serkan YAVUZ			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Doç.Dr.Elvan ANADOL			
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Öğr.Gör.Dr.Şevki Mustafa DEMİRÖZ			
Öğr.Gör.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

EK-2. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Yazısı



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

Sayı :
Konu :

22.07.2022

Araştırmacı grubu Çiğdem ELMAS, Deniz ZORBA, Deniz İrem BULUT ve Elif Seda ÖZDEMİR'den oluşan, G.Ü.ET-22.079 kod numaralı ve "*Erken Gebelikte D Vitamini Eksikliğinin Korpus Luteum Gelişimi ve Kolesterol Esterlerinden Progesteron Sentezini Başlatan Steroidojenik Akut Düzenleyici (StAR) Proteinini Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim

It is unanimously approved the research project numbered G.Ü.ET-22.079 and entitled "*Effect of Vitamin D Deficiency in Early Pregnancy on Corpus Luteum Development and Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein, Which Initiates Progesterone Synthesis From Cholesterol Esters*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards,

EK-3. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KÜÇÜKKARACA, Deniz
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri :
Medeni hali :
Telefonu :
e-mail :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Histoloji, Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2018
Lise	Eryaman Lisesi	2014

İş Deneyimi

--

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. **Küçükkaraca D.**, Elmas Ç., ÖZDEMİR E.S., BULUT D., TAKE KAPLANOĞLU G., SEYMEN C.M., Erken Gebelikte D vitamini Eksikliğinin Ovaryum Üzerindeki Etkileri, 6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2023), October 11-13, 2023.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR