

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İN VİTRO FERTİLİZASYON (IVF) TEDAVİSİ UYGULANAN
KADINLARDA SERUM D VİTAMİNİ DÜZEYLERİNİN OOSİT
TOPLAMA İŞLEMİ SIRASINDA ELDE EDİLEN FOLİKÜLER
SIVI GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN DİFERANSİYASYONUNA
ETKİSİ**

Dr. Ebru ÇELİK

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İN VİTRO FERTİLİZASYON (IVF) TEDAVİSİ UYGULANAN
KADINLARDA SERUM D VİTAMİNİ DÜZEYLERİNİN OOSİT
TOPLAMA İŞLEMİ SIRASINDA ELDE EDİLEN FOLİKÜLER
SIVI GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN DİFERANSİYASYONUNA
ETKİSİ**

Dr. Ebru ÇELİK

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oya EVİRGEN**

**ANKARA
2019**

Kabul ve Onay

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

| I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN | |
|--------------------------------|--|
| Adı, Soyadı | : Ebru Çelik |
| Anabilim/Bilim Dalı | : Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı |
| Tez Danışmanı | : Prof.Dr.Oya Evirgen |
| Sınav tarihi: 04/ 02 / 2019 | |

| II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER | |
|--|--|
| Tezin Başlığı: İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Tedavisi Uygulanan Kadınlarda Serum D Vitamini Düzeylerinin Oosit Toplama İşlemi Sırasında Elde Edilen Foliküler Sıvı Granüloza Hücrelerinin Diferansiyasyonuna Etkisi. | |
| Tezin Niteliği: | <input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi |
| Kaçıncı tez sınavı olduğu: | <input checked="" type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 |

| III. KARAR | |
|---|--|
| Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne | |
| <input type="checkbox"/> Reddine | |
| <input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği | <input type="checkbox"/> Oy çokluğu ile karar verilmiştir. |

| IV. AÇIKLAMALAR | |
|---|--|
| Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız | |

Jüri Başkanı
.... Prof.Dr.Oya Evirgen..
Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
....Prof.Dr.Esra Erdemli
Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Sevda Müftüoğlu
Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Literatürde yapılan pek çok klinik çalışmada infertilite tedavisinin başarı oranıyla kadınlarda serum D vitamini düzeyinin yeterli olması arasında pozitif ilişki olduğu, düşük D vitamini düzeylerine sahip kadınlarda gebelik oranlarının azaldığı gösterilmiştir (1).

IVF tedavisine alınan polikistik over sendromlu kadınlarda yeterli D vitamini düzeyi başarılı gebeliğin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak yeterli D vitamini düzeyinin üreme sistemindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (2).

Çalışmamızda, yardımla üreme teknikleri uygulamalarında tedavi başarısını artırabileceği bildirilen D vitamininin özellikle folikülogenez sürecinde granüloza hücreleri ve oosit maturasyonuna olan etkilerini incelemeyi amaçladık.

Tıpta uzmanlık tezi çalışmalarımda her zaman yanımda olan, bana yol gösteren, bilgi birikimi ve deneyimlerini aktaran, yetişmemde büyük emekleri geçen çok değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Oya EVİRGEN'e,

Tez çalışmalarımda kullanılan materyalin alımında desteklerinden dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Cem Atabekoğlu'na, sayın Prof. Dr. Batuhan Özmen'e, sayın Prof. Dr. Ruşen Aytaç'a, sayın Prof. Dr. Bülent Berker'e, sayın Prof. Dr. Murat Sönmezer'e, AÜTF Cebeci Yardımla Üreme Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı sorumlusu sayın Doç. Dr. Sinan Özkavukçu'ya, embriyoloji laboratuvarı çalışanları sayın biyolog Ebru İbiş'e ve Süheyla Yeşilbostan'a, tez çalışmalarımda hücre bloklamayla ilgili bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Sitopatoloji Bilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Koray Ceyhan'a ve sitoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Uzmanlık eğitimimin başından bu güne dek bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Alp Can'a, Anabilim Dalımız öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Nurşen Saraç'a, sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu'na, sayın Prof. Dr. Esra Erdemli'ye, sayın Prof. Dr.

Sevim Aydın'a, sayın Prof. Dr. Belgin Can'a, sayın Prof. Dr. Özgür Çınar'a, sayın Doç. Dr. Deniz Billur'a, ve uzman doktor sayın Ferda Topal Çelikkan'a, Laboratuvar uygulamaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Remzi Ata'ya, Erdoğan Çalışkan'a,

Bu süreç boyunca yanımda olan çalışma arkadaşlarım Dr. Şule Kızıl'a, Dr. E. Nazlı Hayırlı'ya, Dr. Masoud Afshani'ye, Dr. Pınar Bayram'a, Dr. İrem İnanç'a, Dr. Derya Özdemir'e, Rukiye Kaya'ya, Selda Kahveci'ye, Fatma Alaoğlu'na, Ceren Mungan'a, Merve Sucu'ya, Özge Konak'a, Gökçe Öz'e,

İdari yazışmalar sırasında desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı çalışanlarımız; başta sekreterimiz Serap Batı'ya ve Abdülkerim Dilbaz'a,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Dr. Ebru ÇELİK
Ankara-2019

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖNSÖZ | ii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| TABLolar DİZİNİ..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1. Ovaryumun Embriyolojisi | 2 |
| 2.2. Gametogenez | 3 |
| 2.3. Oogenez | 3 |
| 2.4. Ovaryumun Histolojisi | 4 |
| 2.4.1. Ovaryumun Yapısı | 4 |
| 2.5. Folikül Gelişimi..... | 6 |
| 2.5.1. Primordial Foliküller | 6 |
| 2.5.2. Primer Folikül..... | 7 |
| 2.5.3. Çok Katlı Primer Folikül | 7 |
| 2.5.4. Sekonder Folikül | 8 |
| 2.5.5. Graaf Folikülü (Tersiyer folikül)..... | 8 |
| 2.5.6. Ovulasyon..... | 10 |
| 2.5.7. Korpus Luteum | 11 |
| 2.5.8. Korpus Albicans..... | 11 |
| 2.5.9. Atrezi | 12 |
| 2.6. Granüloza Hücreleri | 12 |
| 2.7. İnfertilite | 14 |
| 2.8. Yardımla Üreme Teknikleri..... | 15 |
| 2.8.1. Ovulasyon indüksiyonu..... | 15 |
| 2.8.2. Oosit Toplanması (OPU) | 15 |
| 2.8.3. Oosit Döllenmesi..... | 15 |
| 2.8.4. Embriyo Transferi | 15 |
| 2.9. D vitamini | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.9.1. D Vitamininin Tanımı | 16 |
| 2.9.2. D Vitamininin Metabolizması ve Eksikliğinin Tespiti..... | 16 |
| 2.9.3. D Vitamininin İnfertilite Üzerine Etkisi | 17 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER | 19 |
| 3.1. Granüloza Hücrelerinin Elde Edilmesi..... | 19 |
| 3.2. Işık Mikroskobu Doku Takibi İçin Yapılan Çalışmalar | 19 |
| 3.2.1. Granüloza Hücre Bloğu Elde Edilmesi..... | 19 |
| 3.2.2. Bloklardan Kesit Alınması | 20 |
| 3.2.3. Boyama Protokolü | 20 |
| 3.3. Elektron Mikroskobu Doku Takibi İçin Yapılan Çalışmalar | 21 |
| 3.3.1. Elektron Mikroskobik Araldit Blokların Elde Edilmesi | 21 |
| 3.3.2. Yarı İnce Kesit Alma | 22 |
| 3.3.3. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü | 22 |
| 3.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler İçin Yapılan Çalışmalar | 22 |
| 3.4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemede Kullanılan Antikorlar | 22 |
| 3.4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü (İmmünohistokimya için işaretleme prosedürü) | 23 |
| 3.4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme..... | 24 |
| 3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi | 24 |
| 4. BULGULAR..... | 25 |
| 4.1. Bulguların değerlendirilmesi..... | 25 |
| 4.2. İmmünohistokimya incelemeleri | 34 |
| 5.TARTIŞMA..... | 37 |
| 6. SONUÇLAR | 40 |
| ÖZET | 41 |
| SUMMARY..... | 43 |
| KAYNAKÇA | 45 |
| EKLER | 47 |
| EK 1. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onay Formu | 47 |
| EK 2. BGOF Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu | 49 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------|---|
| α | : Alfa |
| $\mu\text{g/L}$ | : Mikrogram/litre |
| μm | : Mikrometre |
| 1,25(OH)2D3 | : 1,25 dihidroksi vitamin D, 1,25 dihidroksi kolekalsiferol, kalsitriol |
| 25(OH)D3 | : 25 hidroksi vitamin D, 25 hidroksi kolekalsiferol |
| AMH | : Anti mülleriyeen hormon |
| BGOF | : Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu |
| dk | : Dakika |
| EGF | : Epitelyal growth faktör |
| EM | : Elektron mikroskopu |
| FSH | : Folikül stimüle edici hormon |
| FSH-R | : Folikül stimüle edici hormon reseptörü |
| GnRH | : Gonadotropin releasing hormon |
| H&E | : Hematoksilin ve Eozin |
| hCG | : Human Koryonik Gonadotropin |
| ICSI | : İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu |
| IGF-I | : İnsulin like growth faktör 1 |
| IM | : Işık Mikroskopu |
| IVF | : İn vitro fertilizasyon |
| LH | : Luteinize edici hormon |
| LH-R | : Luteinize edici hormon reseptörü |
| ng/ml | : Nanogram/mililitre |
| nm | : Nanometre |
| OMI | : Oosit maturasyon inhibitörü |
| OPU | : Oosit pick-up |
| rFSH | : Rekombinat folikül stimüle edici hormon |
| sa | : Saat |
| sn | : Saniye |
| ss | : Standart sapma |

| | |
|-------------|--------------------------------|
| USG | : USG |
| UV | : Ultraviyole |
| UVB | : Ultraviyole B |
| VDBP | : D vitamini bağlayıcı protein |
| VDR | : D vitamini reseptörü |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Oogenez..... | 4 |
| Şekil 2.2. Folikülogenez | 10 |
| Şekil 2.3. D vitamini..... | 16 |
| Şekil 4.1. Yetersiz D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Ok başı: Çekirdek, ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları x100, Giemza, bar: 20µm..... | 28 |
| Şekil 4.2. Yeterli D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Ok başı: Çekirdek, ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları , e:Eritrosit, yıldız: Nükleer fragmentler, x100, Giemza, bar: 20µm | 29 |
| Şekil 4.3. Yetersiz D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Ok başı: Çekirdek, kuyruklu ok: Hücre blok matriksi içinde preluteal granüloza hücre grupları, e: Eritrosit, x40, H&E, bar: 50µm | 30 |
| Şekil 4.4. Yetersiz D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Kuyruklu ok: Preluteal granüloza hücre grupları, e: Eritrosit, x100, H&E, bar: 20µm | 31 |
| Şekil 4.5. Yeterli D vitamini grubu. M: Hücre blok matriksi, ok başı: Çekirdek, kuyruklu ok: Hücre blok matriksi içinde preluteal granüloza hücre grupları x40, H&E, bar: 50µm | 31 |
| Şekil 4.6. Yeterli D vitamini grubu. M: Hücre blok matriksi, Ok başı: Çekirdek, ok:Lipid damlacıkları, kuyruklu ok: Hücre blok matriksi içinde preluteal granüloza hücre grupları, x100, H&E, bar: 20µm | 32 |
| Şekil 4.7. Yetersiz D vitamini grubu. Ok başı: Ökromatin çekirdek Ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları e: Eritrosit, yıldız: Apoptotik nükleer fragmentler içeren granüloza hücresi, x100, yarı ince kesit, toluidin mavisi-azur II, bar: 20µm | 33 |
| Şekil 4.8. Yeterli D vitamini grubu. Ok başı: Ökromatin çekirdek, ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları, e: Eritrosit, x100, yarı ince kesit, toluidin mavisi-azur II, bar: 20µm..... | 34 |

Şekil 4.9. (A-B) Yeterli ve yetersiz D vitamini grupları granüloza hücreleri D vitamini reseptör işaretlemeleri. Ok başı: VDR pozitif hücreler koyu boyalı olarak izlenmektedir. (C) negatif kontrol, x100, bar 20µm 36



TABLULAR DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 4.1. Hastaların adı-soyadı, yaşı, protokol numarası, OPU tarihleri ile OPU günü ölçülen serum D vitamini değerleri | 26 |
| Tablo: 4.2. D vitamini düzeylerine göre hastalardan toplanan, ICSI yapılan, döllenmiş oosit sayıları ile 2. ve 3. gün ve blastokiste ulaşan embriyo sayısı..... | 27 |
| Tablo: 4.3. D vitamini düzeylerine göre embriyo transferi yapılan hastalarda gebelik oranları | 27 |
| Tablo 4.4. Yetersiz ve yeterli D vitamini gruplarının IHC analizlerine ait verilerin ortalama ve standart sapmaları..... | 35 |

1. GİRİŞ

D vitamini tüm vücut hücrelerinde proliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptozisi ve inflamasyonu etkilemektedir. Kadın üreme sisteminde de ovaryumda gelişmekte olan foliküllerdeki granüloza hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonlarında önemli rol oynamaktadır (2). Granüloza hücreleri; ovulasyon, fertilizasyon ve sonrasında da implantasyon için optimal koşulların sağlanmasına yol açan foliküler diferansiyasyon sürecinde önemli rol oynamaktadır (3).

Literatürde yapılan pek çok klinik çalışmada infertilite tedavisinin başarı oranıyla kadınlarda serum D vitamini düzeyinin yeterli olması arasında pozitif ilişki olduğu, düşük D vitamini düzeylerine sahip kadınlarda gebelik oranlarının azaldığı gösterilmiştir (4).

Biz de çalışmamızda yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında tedavi başarısını artırabileceği bildirilen D vitamini düzeylerinin özellikle folikülogenez sürecinde granüloza hücreleri ve oosit maturasyonuna olan etkilerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Döllenme gerçekleşip gelişim başladığı zaman ilk 7 hafta erkek ve dişi için aynıdır. Bu nedenle ilk 7 hafta farklanmamış dönem (indifferent dönem) olarak adlandırılır.

4. haftanın sonunda pronefroz geriler ve pronefrozun hemen altında torakal bölgede mezonefroz gelişmeye başlar. Mezonefrozun ön tarafında (söloma bakan tarafında) intermedial mezoderm hücreleri çoğalarak gonadal kabartıyı oluştururlar. WNT, sterojenik faktör 1 gibi transkripsiyon faktörleri burada hücrelerin toplanmasını sağlar. Gonadal kabartı 10. Torakal vertebra hizasında sağlı sollu bir çift olarak mezonefrozun önünde longitudinal olarak uzanır.

Fertilizasyondan sonra 24. günde vitellüs kesesinin allantoise komşu bölgesindeki endoderm hücreleri arasında primordial germ hücreleri görülmeye başlarlar. Erken dönemde BMP-4, 2, 8B varlığında epiblastdan göç eden bu hücreler allantoys duvarının çevresinde yerleşmiştir. Bunlar büyük ve poligonal hücrelerdir, alkalen fosfataz, oct4 ve c-kit ile pozitif boyanırlar (Fragilis geninin bu hücrelerin burada toplanmasını ve Stella geninin de bu hücrelerin primordial hücrelere farklanmasını sağladığı hatta göçlerini kolaylaştırdığı söylenmektedir).

Primordial germ hücreleri 5. haftada ameboid hareketlerle ilkel bağırsağın mezenterini takip ederek gonadal kabartıya giderler ve 6. Haftada gonadal kabartıya gömülürler. Primordial germ hücreleri gonadal kabartıya ulaşamazlarsa gonadal agenesis oluşur.

Primordial germ hücreleri gonadal kabartıya ulaşınca 6-7 kez mitoz geçirerek prolifer olurlar. LIF ve steel gibi mitojenik faktörlerin bu hücrelerin çoğalmasında etkin olduğu gösterilmiştir.

İndiferansiye dönemde gonadal kabartının önündeki sölom epiteli hücreleri çoğalarak gonadal kabartının içine ışınsal tarzda epitelyal kordonlar halinde uzanırlar. Bunlara primitif seks kordonları adı verilir. Her iki cinste de aynıdır. Bu bölgedeki intermedial mezodermden yayılan WT1, SF1, Lim1

hem sölom epitel hücrelerinin proliferasyonunda hem de primordial germ hücrelerinin buraya göç etmesinde görevlidirler.

Fertilizasyon XX yönünde gerçekleştiyse ortamda SRY ve SOX9 olmadığından Dax1 hakimdir. WNT Dax1'i active eder. Dax1 ve etkisiyle gonad ovaryum yönünde gelişmeye başlar.

Sölom epitelinden gelişen primitif seks kordonları dejenere olarak ovaryumun medulla kısmını oluştururlar. 7. Haftada sölom epitelinden köken alan ikinci bir kordon grubu gelişir ve gonadal kabartının içine invaze olur. Bunlara kortikal kordonlar denir. Kortikal kordonlar 4. ayda oogonyumların etrafını sararak folikül hücrelerini meydana getirirler. İkinci kez sölom epitelinden alışveriş nedeniyle tunika albuginea ovaryumda incedir. Mezonefrik kanallar gerileyerek epiooforon ve paraooforon oluşur (5, 6).

2.2. Gametogenez

Germ hücreleri fertilizasyona hazırlanabilmek amacıyla gametogenez sürecine girerler. Gametogenez germ hücrelerinin kromozom sayısının azaldığı mayoz ve hücrelerin olgunlaşması olan sitodiferansiyasyon olaylarını kapsar.

Kadınlarda oosit oluşumuyla sonuçlanan gametogenez sürecine oogeneze denir.

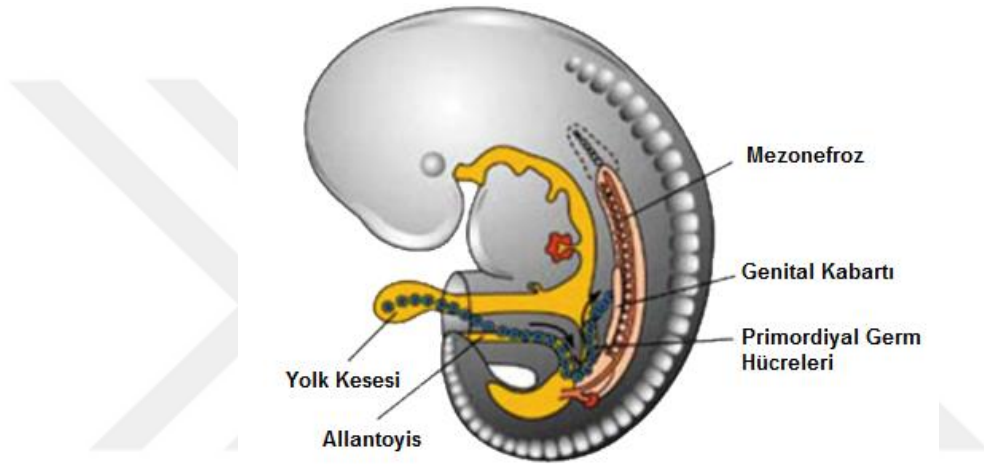
2.3. Oogeneze

Primordiyal germ hücreleri dişi gonada ulaştıktan sonra oogonyumlara farklılaşırlar. Bu hücreler çok sayıda mitoz geçirirler ve 3.ayın sonunda oogonyumların büyük kısmı mitoz geçirmeye devam ederken diğerleri I. mayozun profazının diploten evresinde durarak primer oositleri oluştururlar.

Çoğalmaya devam eden oogonyumlar intrauterin 5. ayda maksimum sayıya ulaşırlar (yaklaşık 7 milyon). 5. aydan sonra pek çok oogonyum ve primer oosit dejenere olmaya başlar ve atrezik hale gelir. Primer oosit sayısının doğumda 600.000-800.000, pubertenin başında 40.000 olduğu ve ovulasyonla atılan oosit sayısının ise 500'den az olduğu tahmin edilmektedir.

Yaşamaya devam eden primer oositler I. mayozun profazının diploten evresinde bekler ve etrafları tek katlı yassı epitel hücresiyle çevrilir. Bu yapı primordial folikül olarak adlandırılır. Primer oosit ovulasyonla atılana kadar I. mayozun profazının diploten evresinde bekler. Bu, foliküler hücrelerden salgılanan oosit matürasyon faktör (OMI) ile sağlanır.

Puberteyle birlikte her 28 günde bir ovulasyon gerçekleşir ve 30-40 yıl boyunca her 28 günde tek bir oosit atılır. Menopoz döneminde hiç oosit kalmadığı kabul edilir (7).



Şekil 2.1. Oogenez (8)

2.4. Ovaryumun Histolojisi

2.4.1. Ovaryumun Yapısı

Kadınlarda fossa ovarikada 3 cm uzunluğunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında bir çift ovaryum bulunur. Her ovaryum mezovaryum ile broad ligamentin posteriyoruna bağlıdır. Ovaryumların tubal kutbu ovaryumun damar ve sinirlerini taşıyan ligamentum suspensoryum ile pelvik duvara, uterin kutbu ise ligamentum ile uterusu bağlıdır. Ligamentum ovarium, embriyonal dönemde gelişmekte olan gonadı pelvis duvarına bağlayan fibröz kordun, gubernakulumun artığıdır.

Ovaryumlar korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Aralarında keskin bir sınır yoktur.

Medulla

Medulla ovaryumun merkezinde yer alır ve intersitisyel hücreler, kan damarları, lenfatikler ve sinirleri içeren gevşek bağ dokudan oluşur.

Korteks

Korteks, asıl parankimal yapıdır ve medullayı çevreleyerek ovaryumun periferik kısmını oluşturur. Korteks, hücreden zengin bağ dokusu içine gömülmüş ovaryum foliküllerini ve foliküllerin etrafındaki stromada dağınık olarak bulunan düz kasları içerir. Stroması diğer organların stromasından farklıdır. Fibrosite benzeyen özel stromal hücreler (fusiform, oval çekirdekli) izlenir.

Ovaryumlarda en dışta mezoovaryum bulunur. Mezoovaryumun altında ovaryumların yüzeyi germinal epitel denilen tek katlı kübik epitelle çevrilidir. Germinal epitel mezovaryumu saran mezotelle devamlıdır. Germinal epitel denmesinin nedeni geçmişte germ hücrelerinin embriyonal gelişim sırasında germinal epitelden kaynaklandığının sanılmasıdır. Artık oogonyumların primordial germ hücreleri adıyla vitellus kesesinin arka duvarında endoderm hücreleri arasındaki epiblast hücrelerinden geliştiği bilinmektedir. Daha sonra ameboid hareketlerle gonadal kabartıya gelerek yerleşirler. Germinal epitel ve altındaki korteks arasında düzensiz sıkı bağ doku yapısındaki tunika albuginea bulunur.

Kan damarları ve lenfatikleri

Ovaryan arterler abdominal aortanın dalıdır, suspensor ligament ile ovaryumlara gelerek ovaryumların ve tuba uterinanın kanlanmalarını sağlayan esas damarlardır. Ovaryan arterler ovaryumların ikinci kanlanma kaynağı olan, internal iliyak arterlerden ayrılan uterin arterlerin ovaryan

dallarıyla anastomoz yaparlar. Bu anastomozdan çıkan arterler spiral arter adını alır ve mezovaryumdan geçerek hiluma ulaşırlar.

Venler arterlere eşlik ederler. Hilusdan çıkan bu venler pampiniform pleksusu oluştururlar.

Ovaryumun korteksinde, teka tabakasındaki lenfatik damar ağı geliştirmekte olan folikülleri, atrezik folikülleri ve korpus luteumu çevreler. Lenfatikler arterlere eşlik eder ve lumbal bölgedeki paraaortik lenf nodlarına dökülürler.

Sinirleri

Ovaryumun otonom innervasyonu ovaryan pleksus tarafından sağlanır. Ovaryum hem sempatik hem de parasempatik innervasyona sahiptir. Medullada dağınık şekilde parasempatik gangliyon hücreleri bulunur. Sinir lifleri arterleri takip eder ve bu damarların duvarlarındaki düz kasları innerve ederler.

2.5. Folikül Gelişimi

Folikülogenez reproduktif yaşam boyunca büyük miktarda folikülün atrezi yoluyla elimine edildiği ve sadece bir kaç folikülün ovulasyon şansına eriştiği dinamik bir oluşumdur (9).

Pubertede gonadotropinlerin etkisiyle primordial foliküller gelişmeye başlar.

Ovaryan foliküller histolojik olarak gelişme aşamalarına göre incelenirler (Şekil 2.2).

2.5.1. Primordial Foliküller

Fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkarlar. Matür ovaryumun stromasında tunika albugineanın hemen altında bulunurlar. Primer oosit ve etrafındaki tek sıra yassı epitel hücrelerinden oluşurlar.

2.5.2. Primer Folikül

Primer oosit ve çevresindeki tek sıra küboidal hale gelmiş folikül hücrelerinden oluşur. Bu aşamada zona pellusida sentezi başlar. Oosit ve folikül hücreleri arasında mikrovilluslar ve oluklu bağlantılar vardır.

2.5.3. Çok Katlı Primer Folikül

Primer folikülün tek tabakadan ibaret folikül hücreleri çoğalarak çok katlı hale gelirler. Folikül hücrelerinin çoğalması primer oosit tarafından salgılanan aktivin, BMP15, GDF9 ile sağlanır. Bu aşamadan itibaren folikül hücrelerine granüloza hücreleri denir. Granüloza hücreleri birbirlerine desmozomlarla bağlıdır, testisteki kan-testis bariyerinde olduğu gibi sıkı bağlantılar yoktur. Oosit ve çevresindeki granüloza hücreleri arasında konneksin 37, granüloza hücrelerinin birbirleri arasında konneksin 43 bulunur.

Teka folikülü

Granüloza hücreleri çoğalırken folikülü çevreleyen stroma hücreleri de bir bağ doku tabakası oluştururlar. Buna teka folikülü denir. Teka hücreleri diferansiye olmuş stromal hücrelerdir.

Teka interna

Sekretuar hücrelerden oluşan iç tabakadır. Steroid hormon salgılayan hücre özelliği gösterirler. Bol miktarda LH reseptörüne sahiptirler. LH uyarımına yanıt olarak östrojenlerin öncüsü olan androjenleri sentezlerler ve sekrete ederler. Teka interna tabakasında bu sekretuar hücrelere ek olarak fibroblastlar, kollajen demetler ve tüm endokrin organlarda olduğu gibi zengin bir damar ağı bulunur. Granüloza hücreleri ve teka interna tabakası arasında bazal membran vardır.

Teka eksterna

Bağ doku hücrelerinin dış tabakasıdır. Düz kas hücreleri ve kollajen demetlerden oluşur.

2.5.4. Sekonder Folikül

FSH, Ca⁺⁺ iyonları ve büyüme faktörlerinin (EGF, IGF-I gibi) etkisiyle hem oosit büyür hem de granüloza hücreleri çoğalmaya devam eder ve 6-12 tabakalı hale geldiği zaman granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar oluşur. Hyaluronandan zengin bu sıvıya folikül sıvısı denir. Folikül sıvısı içeren boşluklar giderek büyür ve birbirleriyle birleşerek tek bir boşluk oluştururlar. Bu boşluğa antrum, antrum barındıran foliküle de antral folikül ya da sekonder folikül denir. Oosit egzantrik olarak yerleşmiştir. Granüloza hücrelerinden antral sıvıya salgılanan OMI ile oositin daha fazla büyümesi engellenir.

Granüloza hücreleri arasında PAS-pozitif boyanan Call-Exner cisimcikleri görülür. Call-Exner cisimcikleri granüloza hücreleri tarafından salgılanır ve hiyalüronan ile proteoglikan içerirler.

2.5.5. Graaf Folikülü (Tersiyer folikül)

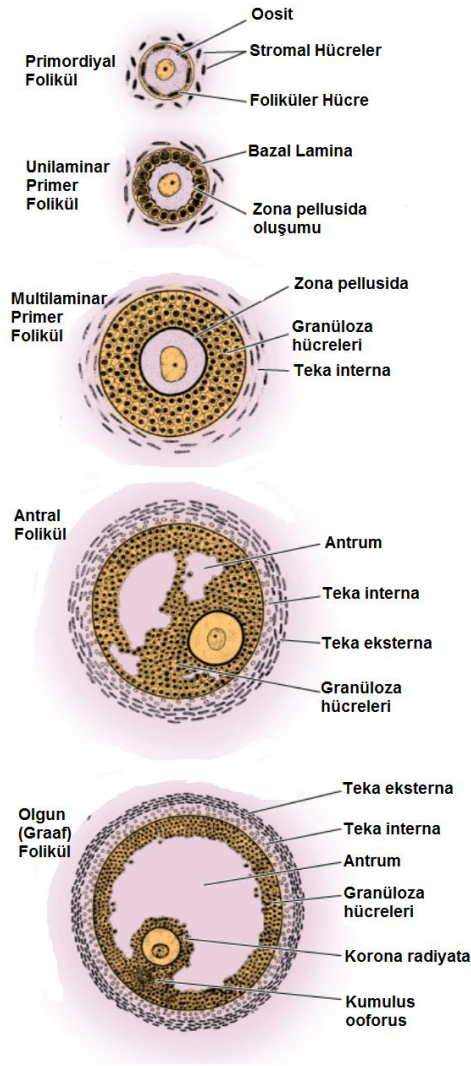
Graaf folikülü olarak da bilinen matür folikül 10mm çapında ya da daha fazladır ve bir tanedir.

Sekonder folikül büyüdükçe antrum da genişlemeye devam eder. Oosit granüloza hücrelerinden oluşan bir tepecik üzerine oturur. Bu tepeciğe kumulüs ooforus denir. Oositi çevreleyen ilk sıra hücrelere korona radiata denir. Korona radiatanın etrafında dizilmiş folikül hücreleri vardır. Bunlara kumulüs granüloza hücreleri denir. Antrumu çevreleyen granüloza hücrelerine ise mural granüloza hücreleri denir.

Korona radiatadan oosite uzanan mikrovilluslar zona pellusidayı penetre eder ve oositden uzanan mikrovilluslarla oluklu bağlantılar aracılığıyla bağlantı kurar. Foliküler matürasyon boyunca granüloza

hücrelerindeki mikrovillus sayısı artar ve bununla orantılı olarak serbest antral yüzeydeki LH reseptörlerinin sayısı artar.

Folikül maksimum büyüklüğüne ulaştıkça granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır ve antrum büyür. Granüloza hücreleri arasındaki mesafe giderek büyür ve oosit ve kumulus hücreleri diğer granüloza hücrelerinden yavaş yavaş ayrılarak ovulasyona hazırlanırlar. Bu sırada teka hücreleri de daha belirgin hale gelirler. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıkları görülmeye başlar ve steroid sentezleyen hücrelerin özelliklerini gösterirler. LH uyarımıyla teka hücreleri östrojen prokürsörü olan androjen salgırlarlar. Androjenler granüloza hücrelerindeki düz endoplazma retikulumuna taşınırlar ve FSH varlığında östrojene dönüşürler. Ovulasyondan 24 saat önce FSH ve LH salınımı pik yapar. LH piki oositin I. mayozunu tamamlamasını sağlar ve LH pikinden 24 saat sonra sekonder oosit ile I. polar cisimcik oluşur. Bundan sonra granüloza ve teka hücreleri lüteinize olarak progesteron üretmeye başlarlar.



Şekil 2.2. Folikülogenez (7)

2.5.6. Ovulasyon

Sekonder oositin Graaf folikülünden atılmasıdır. Ovulasyon süresince oosit folikül duvarını ve germinal epiteli aşar. 28 gün süren siklusun 14. gününde sekonder oositin atılmasından hem enzimatik olaylar hem de hormonal değişiklikler sorumludur. Oosit kendisini çevreleyen korona radiata ve kumulus ooforus ile birlikte folikülden atılır ve fimbria tarafından yakalanarak tuba uterinaya geçer. 24 saat içinde fertilizasyon gerçekleşmezse dejenere olarak atılır.

Her siklusta sadece bir folikül matürasyonunu tamamlar ve sekonder oosit atılır. Primer oositler I. mayozun diploten evresinin profazında bekler ve ovulasyondan hemen önce I. mayozu tamamlarlar. Ovulasyonla atılan sekonder oositdir. Sekonder oosit II. mayozun metafaz evresinde bekler ve ancak spermle döllenme olursa II. mayoz tamamlanır.

2.5.7. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra geride kalan mural granüloza hücreleri ve teka hücrelerinden oluşan folikül duvarı kollabe olarak korpus luteuma (lüteal bez) dönüşür. İlk önce, teka interna tabakasındaki kapillerlerden oluşan kanama nedeniyle korpus hemorajikum oluşur. Stromanın bağ dokusu foliküler kaviteyi invaze eder. Granüloza ve teka interna hücreleri luteinize olur. Bunlar lütreinize granüloza hücreleri ve lüeinize teka hücreleri olarak adlandırılırlar.

Luteinize granüloza hücreleri:

Granüloza hücrelerinden köken alan büyük hücrelerdir ve merkezde bulunurlar. İri, soluk, mikrovilluslu, bol tübüler mitokondriyonlu, bol düz endoplazma retikulumu içeren hücrelerdir. Progesteron ve östrojen salgırlar. %80 oranında bulunurlar.

Luteinize teka hücreleri:

Teka interna hücrelerinden köken alan daha küçük hücrelerdir ve periferde bulunurlar. Mikrovillusları yoktur. Andrestenodion salgırlar. %20 oranında bulunurlar.

2.5.8. Korpus Albicans

Eğer döllenme olmazsa korpus luteum korpus albicansa dönüşür. Hücrelerin boyutları küçülür ve otolize uğrarlar. Dejenere olan hücreler

arasında hyalin material birikerek korpus albicans denen beyaz skarı oluşturur. Korpus albicans korteksin derinlerine gider ve bir kaç ay sonra kaybolur.

Eğer gebelik oluşursa korpus luteum hCG etkisiyle plasenta oluşana kadar progesteron salgılamaya devam eder. Bu yapıya korpus luteum gravidarum denir ve iz bırakarak kaybolur.

2.5.9. Atrezi

Ovaryan foliküllerin çok azı matürasyonunu tamamlar, foliküllerin çoğu dejenere olur ve kaybolurlar. Buna ovaryan foliküler atrezi denir. Atrezi granüloza hücrelerinin apoptozu aracılığıyla olur. Foliküllerin büyük kısmı fetal gelişim, erken postnatal dönem ve pubertede atreziye uğrar. Puberteden sonra her menstrüel siklusta folikül grupları matüre olmaya başlarlar; ancak sadece bir folikül matürasyonunu tamamlar (7, 10).

2.6. Granüloza hücreleri

Granüloza hücreleri; folikül oluşumundan ovulasyonla oositin atılımına kadarki süreçte oositle ilişki halindeki tek somatik hücrelerdir(11).

Ovaryum granüloza hücreleri belki de en çok çalışılan endokrin hücrelerdir. Bu hücreler oosit büyümesi ve maturasyonu için benzersiz bir mikroçevre oluşturmaktadırlar. İn vitro fertilizasyondaki başarı birçok faktöre dayanmaktadır. Bunlardan birisi iyi kalitede ve maturasyondaki oositir. Birçok çalışmada oositin maturasyonu hormon profilleriyle, morfolojiyle, histoenzimolojiyle ilişkisi çalışılmıştır. Her ne kadar granüloza hücrelerinin belirgin önemi olduğu belirtilse de morfolojik olarak insan granüloza hücreleriyle ilgili az çalışma bulunmaktadır(12).

Granüloza hücreleri tek tek hücreler halinde ya da kümeler şeklinde gözlemlenirler, silyumları bulunmaz.

Şekilleri polihedral görünümündedir, boyutları 6 ile 8 mikrometre çapındadır ve iri çekirdekleri vardır. Çekirdek değişken miktarda heterokromatin ve bir ya da iki çekirdekçik içerir. Hücrelerin sitoplazmaları

çeşitli sayıda elektron yoğunlukları değişken lipid damlacıkları içerir. Granüllü ve düz endoplazma retikulumu vardır. Golgi membranları çok gelişmemiştir. Mitokondriyon profilleri çeşitli formlardadır.

Gonadotropin artışıyla birlikte granüloza hücrelerinde preludeinizasyon meydana gelir. Hücrelerin hacmi artar ve mitokondriyonda morfometrik değişiklikler meydana gelir. Lipid damlacıklarının, lizozomların ve düz endoplazma retikulumunun hacmi artar. Bu değişikliklere steroid sentezi için gerekli enzimlerle ilgili organeller ve buna müteakip progesteron salınımındaki artış eşlik eder.

LH artışını takiben lipid inklüzyonlarının hacmi artar ve bu lipid damlacıkları progesteron sentezi için gerekli prekürsörleri temsil ederler. Lipid damlacıklarının hacminde kişiden kişiye büyük değişkenlik görülür. Bu LH'ya farklı zamanlarda maruz kalmaktan ya da LH salınımına farklı kadınlarda farklı cevap oluşmasından, granüloza hücrelerinin yetersiz matürasyonundan, LH salınımının yetersiz ya da prematüre oluşundan ya da aspirasyonla alınan hücrelerin folikül içindeki farklı bölgelerden gelmesinden kaynaklı olabilir.

Folikülde bulunan granüloza hücreleri konumlanmasına göre farklı fenotipler göstermektedir. Mural granüloza ve kumulus granuloza hücrelerinin her biri ayrı belirgin özellikler göstermektedir. Antral folikül içindeki mural granüloza hücreleri en fazla steroidojenik aktivite göstermekte ve en yüksek seviyede 3-beta hidrosisteroid dehidrogenaz ve aromataz ifadenmesi olmaktadır. Bunun yanı sıra preovulatuvar foliküldeki mural granuloza hücrelerinin LH reseptörleri en yüksek seviyededir. Antral kaviteye en yakın konumdaki granüloza hücrelerinin daha düşük seviyede steroidojenik enzim ifadenmesi olurken orta hattaki granüloza hücreleri diğerlerine göre daha fazla mitotik aktiviteye sahiptir.

Ovulasyonda oositle atılan kumulus hücrelerinde aromataz ekspresyonu olmaz ve bu hücrelerde LH'ya cevap oluşturma mural granüloza hücrelerine göre nispeten daha azdır. Bu hücreler prostaglandinler aracılığıyla stimülasyon sonucunda ekstraselüler matrikste bulunan hyalüran, proteoglikanlar ve proteoglikan bağlayıcı proteinlerin üretiminde etkinleşirler.

Granüloza hücrelerinden üretilen anahtar steroid hormon östradioldür. Bu hormonun sentezlenmesi folikülü çevreleyen teka hücreleriyle ilişki halinde olmasını gerektirmektedir. LH'ya cevap olarak teka hücreleri androjenleri üretir. Bu androjenler granüloza hücrelerine geçerek FSH'ya cevap olarak aromataz ile granüloza hücrelerinde östrojenlere çevrilir.

Yapılan çalışmalarda preovulatuvar foliküllerden izole edilen granüloza hücrelerinde hücreler aromatazsal bir substratla desteklendiğinde FSH'nın östrojen üretimini düzenlediği görülmüştür. İzole edilen insan teka hücrelerinin farkedilir miktarda östrojen üretmediği belirlenmiştir. Aromataz aktivitesinin teka hücreleriyle karşılaştırıldığında granüloza hücrelerinde 700 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.

FSH, preovulatuvar folikülün granüloza hücrelerinde LH reseptörlerini indüklemektedir. Luteinize edici hormon reseptör mRNA'sı antral folikülde belirlenebilir seviyedeysen preovulatuvar foliküllerin granüloza hücrelerinde maksimum seviyeye ulaşır. Buna zıt olarak folikül çapı arttıkça granüloza hücrelerinde FSH reseptör (FSHR) mRNA seviyeleri düşmektedir.

Ovulasyonla oluşan LH pikiyle mural granüloza hücreleri terminal farklanmaya giderek granüloza lutein hücrelerini oluşturur. Bu hücreler korpus luteumun büyük luteal hücre popülasyonlarını temsil etmektedir (11-14).

2.7. İnfertilite

İnfertilite bir yıl düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması durumu olarak tanımlanmaktadır (15). Genel kabul gören infertiliteye etkili faktörler sırasıyla şunlardır;

Maternal yaş: En önemli faktördür. Kadın fertilitesi 24 yaşından itibaren düşmeye başlar. Yaşlanma ile yumurta sayısının azalmasına ek olarak yumurta kalitesi de düşer.

Baba yaşı: Yaşlanma ile semen hacmi ve motilitesi azalır, sperm morfolojisi bozulmaya başlar. Ancak erkek infertilitesindeki azalma kadınlara göre daha hafiftir.

İlişki zamanlaması: Gebelik elde edilmesi ovulasyona göre zamanlanmış cinsel ilişkiye bağlıdır.

Yukarıdakilere ek olarak önceki kontrasepsiyon, mesleki riskler, diyet, sigara, kafein, alkol, stress ve anksiyete de infertiliteye etkili olabilmektedir.

2.8. Yardımla Üreme Teknikleri

Dört aşamadan oluşur:

2.8.1. Ovulasyon indüksiyonu

IVF için ovaryan stimülasyon yapmanın amacı çok sayıda matür ve iyi kalitede oosit toplayabilmek için çok sayıda dominant folikül elde etmektir (16). Gonadotropinler uygulanmadan önce GnRH agonistleriyle hipofizin down regülasyonu standarttır. GnRH antagaonistleriyle LH'nın premature yükselişi engellenir (17).

Ovaryan stimülasyon için rFSH kullanılır. Ovulasyonun en son tetiklenmesi için de hCG kullanılır.

2.8.2. Oosit Toplanması (OPU)

Vajinal USG ile foliküller lokalize edilir ve iğne ile vajen arka duvarından geçilerek foliküller aspire edilir.

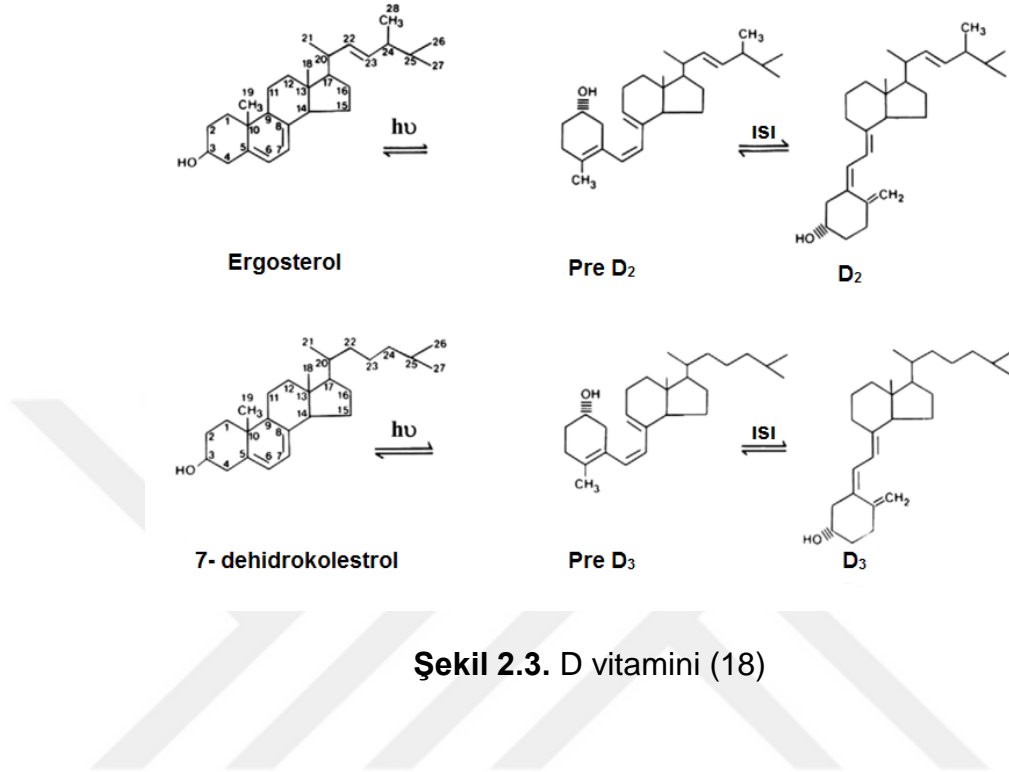
2.8.3. Oosit Döllenmesi

İnverted mikroskop altında immobilize edilen sperm ICSI pipetiyle kuyruk tarafından aspire edilerek oolemma içine bırakılır (ICSI).

2.8.4. Embriyo Transferi

Döllenen embriyolar içinden en iyi kalitede olanı servikal katater yardımıyla uterin kaviteye transfer edilir.

2.9. D vitamini



Şekil 2.3. D vitamini (18)

2.9.1. D Vitamininin Tanımı

D vitamini klasik olarak böbrek, bağırsaklar ve paratiroid beze etki ederek vücutta kalsiyum fosfor dengesini ve kemik mineralizasyonunu sağlayan bir hormondur.

Diyetle alınan D vitamini yetersizdir, çünkü çok az yiyecekte (somon balığı, yumurta) D vitamini bulunur. Asıl kaynak güneş ışınlarıdır (19).

2.9.2. D Vitamininin Metabolizması ve Eksikliğinin Tespiti

Deride 7-dehidrokolesterolün güneş ışınlarının ultraviyole B (spektrum 280-320 UVB) etkisiyle fotolitik dönüşümü ve termal izomerizasyonu sonucu nonenzimatik yolla prohormon olarak sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D3) serumda D vitamini bağlayıcı protein (VDBP) ile taşınarak karaciğerde hepatic sitokrom P-450s (CYP2R1) ile 25-hidroksi kolekalsiferole (25(OH)D3)

daha sonra da böbrekte biyoaktif D vitamini hormonu olan 1,25 dihidroksi kolekalsiferole (1,25(OH)₂D₃) (kalsitriol) dönüşür. Kalsitriol endokrin etkilerini bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören ve steroid hormonlar için nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanarak gösterir (20).

1,25(OH)₂D₃ neredeyse vücudun hemen her dokusundaki çok sayıda hücrenin çekirdeğinde ve membranında yerleşimli olan VDR'ler aracılığıyla hem non-genomik hem de genomik yollarla etki gösterir. Non-genomik etkileri protein kinaz aktivasyonu, iyon kanalları aktivasyonu ile hızla oluşurken, genomik etkileri ise nükleer D vitamini reseptörleri aracılığıyla gen ifadenmesinin başlatılması, mRNA üretimi ve protein sentezi ile daha uzun sürede gelişir (21).

Literatürde serum D vitamini düzeyinin 20ng/ml'nin altında olması D vitamini eksikliği, 20-30ng/ml olması D vitamini yetersizliği kabul edilmektedir. 150ng/ml'nin üstündeki düzeylerde D vitamini toksisitesi görülmektedir (22).

2.9.3. D Vitaminin İnfertilite Üzerine Etkisi

VDR'nin pek çok doku ve organın yanı sıra erkekte testiste, kadında ovaryumda granüloza hücrelerinde, tuba uterina epitel hücrelerinde, endometriyumda ve plasenta dokusunda bulunması son yıllarda D vitamininin üremeye ilgili moleküler mekanizmalarını açıklamaya yönelik yapılan çalışmaları arttırmıştır (18).

D vitamini eksikliğinin spermatogenez, folikülogenez, fertilizasyon ve implantasyon süreçlerine olumsuz etkileri sonucunda subfertiliteye/infertiliteye, implantasyon başarısızlığına ve tekrarlayan düşüklere neden olduğu, implantasyon sonrası gebelik sürecinde ise preeklampsi ve fetal gelişim geriliğine yol açtığı literatürde bildirilmiştir (23).

Ülkemizde ve dünyada önemli bir sağlık problemi olan infertilitenin tedavisinde uygulanan yardımcı üreme teknikleri sikluslarının başarısı ile D vitamini düzeyi arasındaki korelasyonu araştıran çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır. Bu çalışmaların sonuçları çelişkili olmakla birlikte D vitamini

eksikliği olanlarla kıyaslandığında D vitamini düzeyleri yeterli olan kadınlarda gebelik ve implantasyon oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (24).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 12.02.2018 tarih ve 03-146-18 sayılı izni ile yapılmıştır (Ek 1). Çalışmaya katılan IVF tedavisi uygulanan çiftler bilgilendirilerek kadınlardan gönüllü onam alınmıştır (Ek 2).

3.1. Granüloza Hücrelerinin Elde Edilmesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim Merkezi'ne 01 Nisan-30 Kasım 2018 tarihleri arasında ÜYTE tedavisi için başvuran hastalardan OPU işlemi öncesinde kan alınarak D vitamini serum düzeylerine bakıldı. Serum D vitamini düzeyleri için AÜTF Laboratuvarları referans değerleri (yaz: 20-120µg/L, kış: 10-60µg/L) esas alınarak hastalar yetersiz D vitamini düzeyi olanlar ve yeterli D vitamini düzeyi olanlar olmak üzere gruplandı. GnRH agonist ve antagonistleri sonrası gonadotropinlerle yapılan ovaryan stimülasyonu takiben USG eşliğinde yapılan OPU işlemi ile foliküllere girilerek aspire edilen folikül sıvısı beraberinde toplanan kumulus-granüloza oosit kompleksleri döllendirme işlemleri için ayrı bir kültür kabına MOPS ortamına transfer edildikten sonra arta kalan mural granüloza hücrelerini içeren foliküler aspirat falkon tüplerde toplanarak mikroskopik çalışmalar için alınmıştır.

3.2. Işık Mikroskobu Doku Takibi İçin Yapılan Çalışmalar

3.2.1. Granüloza Hücre Bloğu Elde Edilmesi

Toplanan foliküler aspirat sıvıları içinde granüloza hücrelerinin varlığı sitospin sonrası elde edilen preparatların Giemza ile boyanarak incelenmesi ile belirlenmiştir. Granüloza hücrelerini içeren ve falkon tüplerde toplanan foliküler aspirat sıvısı 1500rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp pellet sitoblok solüsyonları kullanılarak sitoblok kasetlerine alınmıştır.

Kasetlerin %10 tamponlu formalin solüsyonunda tespiti sonrasında rutin histolojik takip işlemlerinden geçirilen granüloza hücre sitobloğu parafine gömülerek parafin hücre bloğu hazırlanmıştır.

3.2.2. Bloklardan Kesit Alınması

Parafin bloklar oda sıcaklığında tamamen sertleştikten sonra buzdolabında önce +4 °C'de daha sonra -20 °C'de bekletildi. Her bir bloktan Leica RM 2010R model mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. İmmünohistokimyasal boyamalar için önceden poly-L-lysine kaplanmış lamlara kesit alındı. Kesitler 60 °C etüvde bir gece bekletilerek parafinin uzaklaştırılması ve lamlara iyice yapışmaları sağlandı.

3.2.3. Boyama Protokolü

Giemsa boyama protokolü

- 4 dk May-Grünwald solüsyonu
- 1 dk distile su
- 45 sn distile su
- 20 dk Giemsa solüsyonu (1 birim Giemsa, 7 birim distile su)
- 1 dk distile su
- 1 dk distile su
- 1 dk distile su
- 45 sn distile su
- Kurutma ve kapatma

Hematoksilin-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

- Ksilen ile 2 değişim 20'şer dakika deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisinden geçirilerek hidrasyon
- Suda yıkama
- Hematoksilin solüsyonu, 1 dakika
- Suda yıkama

- Eozin solüsyonu, 1 dakika
- Suda yıkama
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisinden geçirilerek dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan ile kapatma
-

3.3. Elektron Mikroskobu Doku Takibi İçin Yapılan Çalışmalar

- TEM için tespit ve takip işlemleri aşağıdaki sıra ile uygulandı.

3.3.1. Elektron Mikroskopik Araldit Blokların Elde Edilmesi

- Elektron mikroskobu çalışması için ayrılan foliküler aspirat sıvılarından sterio mikroskop altında pastor pipeti ile toplanan mural granüloza hücreleri 1ml PBS içeren ependorf tüpler içinde 500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Birinci tespit: Süpernatant atıldıktan sonra elde edilen granüloza hücre pelleti üzerine tamponlu %2,5'lük glutaraldehit eklenerek 24 sa süreyle fikse edildi.
- Birinci yıkama: 0,1 M fosfat tamponunda 2x15 dk rotatorda yıkandı.
- İkinci tespit: 0,1 M fosfat tamponu içinde %1 OsO₄ ile rotatorda ve karanlıkta 2sa bekletildi.
- İkinci yıkama: 0,1 M fosfat tamponunda 3x20 dk yıkandı.
- Distile su ile yıkandı.
- Blok boyama: %70 etanolde %0,5 uranil asetat ve %1 fosfotungustik asitle rotatorda karanlıkta 2 sa süre ile yapıldı.
- Dehidratasyon: %70, %96, %100 alkol ve propilen oksit ile yapıldı.
- 1:1 oranda propilen oksit/araldit ile rotatorda 1sa inkübe edildi.
- Araldit ile 2 sa inkübe edildi.
- Gömme (bloklama): Mikrotüp içine konan doku parçalarının üzerine araldit eklenmesi ile bloklama işlemi yapıldı.
- Polimerizasyon: Araldit blokları polimerizasyon için 80 °C etüvde 1

gece tutuldu sonrasında etüv kapatılarak bloklar kendi halinde soğumaya bırakıldı.

3.3.2. Yarı İnce Kesit Alma

Bu bloklardan Leica Ultracut R ultramikrotom ile 800 nm kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi-azur II boyası ile boyandı.

3.3.3. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü

- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu
- Distile su içinde %1 boraks, %1 toluidin mavisi, %1 azur II içeren toluidin mavisi-azur II boyasıyla 50°C-60°C ısıtıcıda boya kuruyana kadar bekletildi.
- Distile su ile yıkandı.
- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu.
- Soğuduktan sonra ksilene alınarak şeffaflandırıldı.
- Entellan ile kapatıldı.
- Boyanan preparatlar kuruduktan sonra Axio Scope A1 marka mikroskop ile incelendi ve fotoğraflandı.

3.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler İçin Yapılan Çalışmalar

3.4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemede Kullanılan Antikorlar

Çalışmamızda granüloza hücrelerinin işaretlenmesinde kullanılan antikor ve özellikleri aşağıda sıralanmıştır.

- (ABCAM, 134826); Nükleer hormon reseptörü. Hormon duyarlı genlerin ekspresyonunu kontrol ederek D vitamininin etkisine aracılık eden transkripsiyon faktörüdür.

3.4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü (İmmünohistokimya için işaretleme prosedürü)

- Ksilen ile 2 değişim 20'şer dakika deparafinize edildi.
- %100, %96 ve %75 etanol serisinden geçirilerek hidrate edildi.
- Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı
- Antijenlere ait epitoplara açığa çıkarılması için sitrat tamponu solüsyonu (ph: 6) içerisinde mikrodalgada 20 dk kaynatıldı.
- Kesitler soğuduktan sonra dokular hidrofobik pap-pen ile çevrelendi ve nemli ortam kabı içerisinde yerleştirildi.
- Endojen peroksidaz aktivitesine bağlı özgün olmayan arka plan boyanmasını azaltmak için %3'lük hidrojen peroksit ile 10 dk inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- Özgün olmayan arka plan boyanmasını azaltmak için Ultra V Blok ile 5dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Primer antikor ile buzdolabında +4 °C'de bir gece inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- Primer antikor enhancer ile oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- HRP Polimer ile oda sıcaklığında 15dk inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- DAB ile 2 dk boyandı.
- Distile su ile 3 kez yıkandı.
- Hematoksilin ile 30 saniye çekirdek boyaması yapıldı.
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisi ile dehidrate edildi.
- Ksilen ile şeffaflandırıldı.
- Entellan ile kapatıldı.

3.4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Her preparattan x100 büyütmede 5 farklı alanın fotoğrafları çekildi. Boyanma yoğunluğuna göre histolojik skora (HSCORE) yapılacak olan antikor için ImageJ dijital görüntü analiz programının IHC Profiler eklentisi kullanılarak boyanma düzeylerine (i) göre; negatif: 0, düşük pozitif 1, pozitif: 2, yüksek pozitif: 3 değerleri verildi. Boyanma düzeylerinin %0-100 arasında değişen piksel oranları (Pi) belirlendi. Elde edilen değerler HSCORE= $\sum Pi(i+1)$ formülü kullanılarak sayısallaştırıldı. Formüldeki 1 optik yoğunluğun düzeltilmesi için kullanıldı (25-27).

3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Veriler median, minimum, maksimum olarak verilmiştir. Normal dağılmayan veriler non parametric Mann-Whitney U testiyle analiz edilmiştir. Gebelik oranları açısından gruplar arası istatistiksel olarak fark olup olmadığı Fisher's exact test kullanılarak analiz edilmiştir. İmmünohistokimyasal HSCORE değerleri Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmanın tüm istatistiksel analizleri IBM SPSS 22 paket programı kullanılarak yapılmıştır. $p < 0,05$ 'in altındaki p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Bulguların değerlendirilmesi

AÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ÜYTE Merkezi'nde IVF tedavisi uygulanan hastaların adı-soyadı, yaşı, protokol numarası, OPU tarihi bilgileri ile OPU günü ölçülen serum D vitamini değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

D vitamini yetersiz hastalarda ortalama yaş 30.5 iken, D vitamini yeterli hastalarda 33.4 idi ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu.

Çalışmaya katılan on sekiz hastanın dokuzunda serum D vitamini düzeyleri yetersizken dokuzunda ise yeterli bulunmuştur.

D vitamini düzeyi yetersiz hastaların çoğunluğunda (dokuz hastanın sekizi) OPU işlemi yaz döneminde yapılmışken D vitamini yeterli hastaların (dokuz hastanın yedisi) OPU işlemi kış döneminde gerçekleştirilmiştir.

D vitamini düzeylerine göre hastalardan OPU günü toplanan, ICSI yapılan, döllenmiş oosit sayıları ile 2. gün, 3. gün ve blastokiste ulaşan embriyo sayıları non-parametrik Man-whitney U testi ile analiz edilmiştir. Veriler median (minimum-maximum) değerleri olarak Tablo 4.2'de verilmiştir. D vitamini yetersiz ve yeterli gruplar arasında toplanan, ICSI yapılan, döllenmiş oosit sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p değerleri sırasıyla 0,666, 0,605, 0,666)

D vitamini yetersiz grupta 2. gün gününüyle uyumlu gelişen embriyo sayısı ve 5. gün blastokiste ulaşan embriyo sayısı D vitamini yeterli gruba göre yüksek olmasına karşın (sırasıyla 5,3), (sırasıyla 6,2) iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p değerleri sırasıyla, 0,387, 0,082)

D vitamini yetersiz grupta embriyo transferi sonrası (5 transfer blastokist transferidir) gebelik oranı %50 iken D vitamini yeterli grupta (3 transfer blastokist transferidir) gebelik oranı %14,28 bulunmuştur (Tablo:4.3). Gebelik oranları istatistiksel olarak Fisher's exact test ile değerlendirilmiş, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p=0,282)

Hücre bloğu eldesinde granüloza hücrelerinin varlığı gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların adı-soyadı, yaşı, protokol numarası, OPU tarihleri ile OPU günü ölçülen serum D vitamini değerleri

| | Sıra no | Adı-soyadı | Yaş | Protokol | Tarih | D vitamini |
|----------------------------|---------|------------|-----|----------|----------|------------|
| Yetersiz D vitamini düzeyi | 2 | H.İ. | 36 | 1690063 | 4.04.18 | *9,3 |
| | 4 | Ü.K. | 26 | 1820348 | 19.04.18 | *17,94 |
| | 5 | S.B. | 20 | 1744672 | 4.05.18 | *8,97 |
| | 6 | T.İ. | 25 | 1503408 | 7.05.18 | *5,63 |
| | 11 | D.C. | 39 | 1551121 | 7.06.18 | *16,6 |
| | 13 | F.U.B. | 33 | 1860464 | 6.07.18 | *14,87 |
| | 15 | F.C. | 28 | 1884609 | 9.07.18 | *6,9 |
| | 17 | N.A. | 32 | 1848754 | 9.07.18 | *17,8 |
| | 28 | A.A. | 36 | 1796019 | 23.10.18 | **8,46 |
| Yeterli D vitamini düzeyi | 9 | N.S. | 36 | 850915 | 28.05.18 | 25,07 |
| | 10 | Z.Ç. | 36 | 757537 | 28.05.18 | 30,02 |
| | 26 | S.B. | 32 | 1869822 | 3.10.18 | 14,7 |
| | 27 | C.Y. | 30 | 733589 | 3.10.18 | 16,5 |
| | 29 | C.K. | 35 | 1723425 | 1.11.18 | 18,15 |
| | 30 | N.Ü.V. | 29 | 1063566 | 1.11.18 | 12,13 |
| | 31 | K.T. | 40 | 1904919 | 2.11.18 | 27,01 |
| | 32 | B.U. | 29 | 1668232 | 7.11.18 | 10,61 |
| | 33 | B.E.E.D | 34 | 1888606 | 7.11.18 | 13,97 |

AÜTF Laboratuvarları referans değerleri * yaz:20-120µg/L, ** kış:10-60µg/L

Tablo: 4.2. D vitamini düzeylerine göre hastalardan toplanan, ICSI yapılan, döllenmiş oosit sayıları ile 2. ve 3. gün ve blastokiste ulaşan embriyo sayısı

| D vitamini düzeyi | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------|----------|
| | Yetersiz Median (min-mak) | Yeterli Median (min-mak) | p değeri |
| Toplanan oosit sayısı | 10,00 (4,00-18,00) | 10,00 (2,00-19,00) | (0,066) |
| ICSI yapılan oosit sayısı | 9,00 (2,00-16,00) | 8,00 (2,00-15,00) | (0,605) |
| Döllenme (2PN) | 6,00 (1,00-11,00) | 6,00 (2,00-12,00) | (0,666) |
| 2.gün gelişen embriyo sayısı (günüyle uyumlu) | 5,00 (1,00-14,00) | 3,00 (1,00-12,00) | (0,387) |
| 3.gün gelişen embriyo sayısı (günüyle uyumlu) | 3,00 (1,00-16,00) | 4,00 (1,00-12,00) | (0,918) |
| Blastokist gelişimi | 6,00 (1,00-13,00) | 2,00 (1,00-4,00) | (0,082) |

P<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır

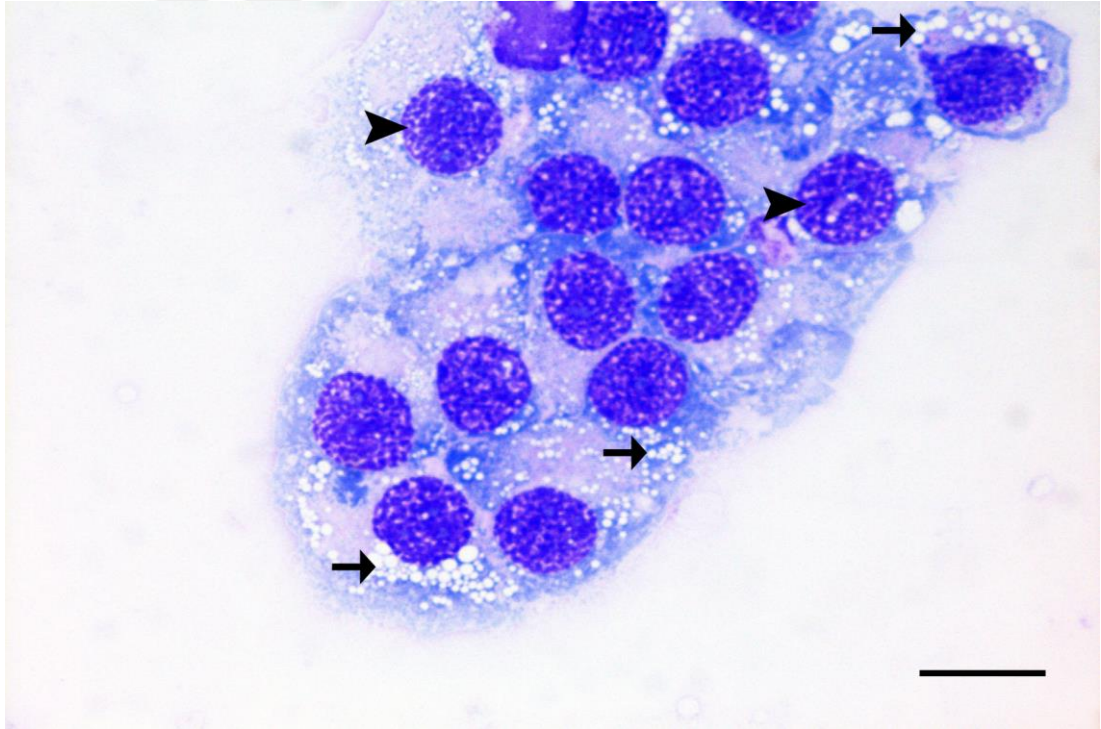
Tablo: 4.3. D vitamini düzeylerine göre embriyo transferi yapılan hastalarda gebelik oranları

| D vitamini | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Yetersiz n=9 | Yeterli n=9 |
| Embriyo transferi (toplam) | 8 (1 iptal) 8/9=%88,88 | 7 (2 iptal) 7/9=%77,77 |
| Blastokist transferi | 5 5/8=%62,5 | 3 3/7=%42,85 |
| Gebelik oranı | 4 4/8=%50 | 1 1/7=%14,28 |

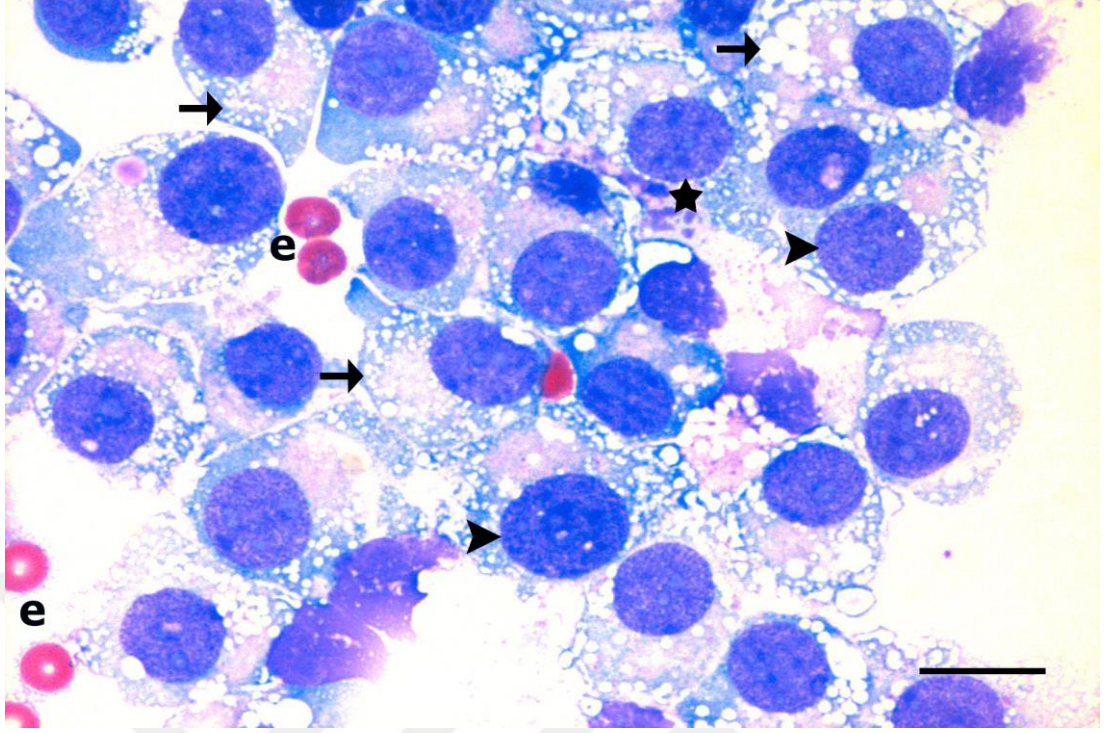
Hastalara ait foliküler aspirat sıvılarından sitospin sonrası elde edilen Giemza ile boyalı preparatlarda mural granüloza hücrelerinin varlığı izlenmiştir. Mural granüloza hücrelerinin birbirleriyle kontakt kuracak şekilde gruplar halinde bulunduğu görüldü.

Granüloza hücreleri LH piki (sıçraması) ya da hCG uygulaması sonrası preluteinizasyon bulgularıyla uyumlu, büyük poligonal hücre grupları oluşturacak şekilde izlendi. Çekirdekleri yuvarlak ve sitoplazma ortasında yerleşimli izlendi. Sitoplazmalarının steroid sentezi için lipid damlacıklarını içerdikleri izlendi. Yeterli D vitamini içeren grupta hücre boyutlarının daha büyük ve lipid damlacıklarının daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 4.1).

Granüloza hücreleri arasında yer yer foliküler aspirat kaynaklı eritrositlere ve küçük yoğun nükleer fragmentlar içeren hücelere rastlandı (Şekil 4.2).

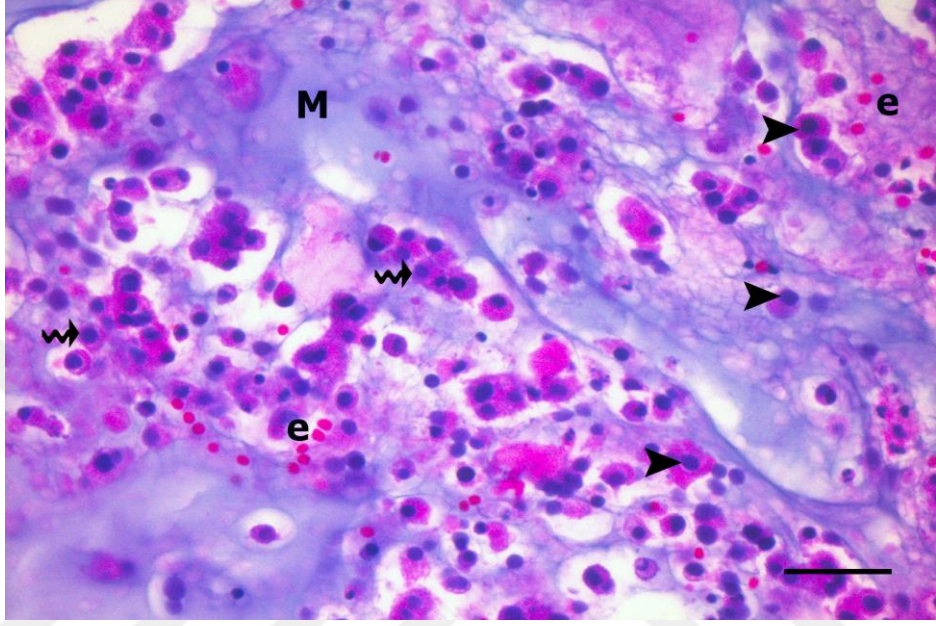


Şekil 4.1. Yetersiz D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Ok başı: Çekirdek, ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları x100, Giemza, bar: 20µm

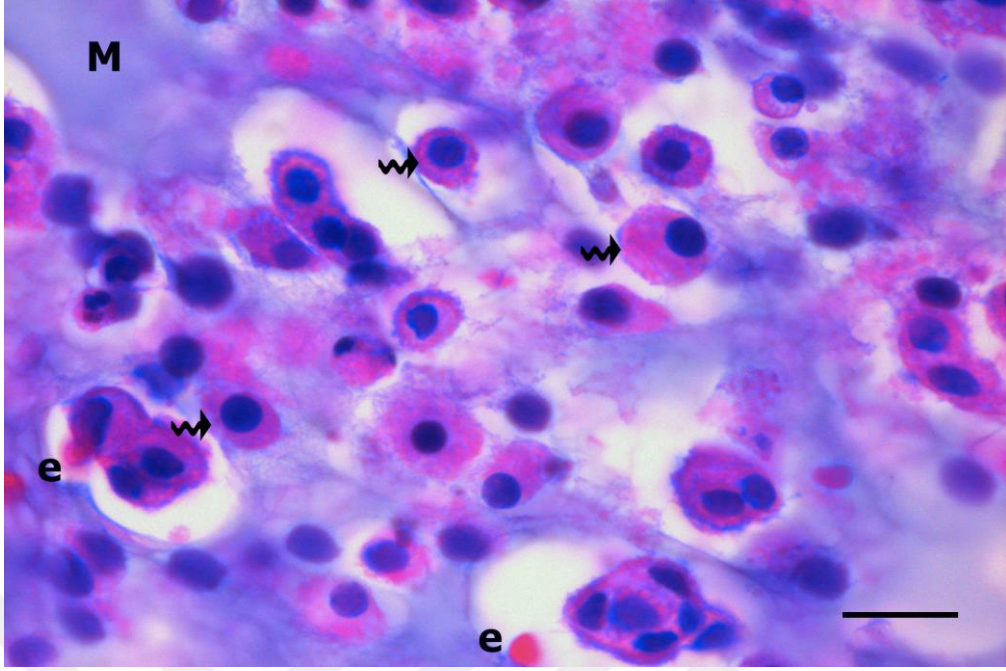


Şekil 4.2. Yeterli D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Ok başı: Çekirdek, ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları , e:Eritrosit, yıldız: Nükleer fragmentler, x100, Giemza, bar: 20µm

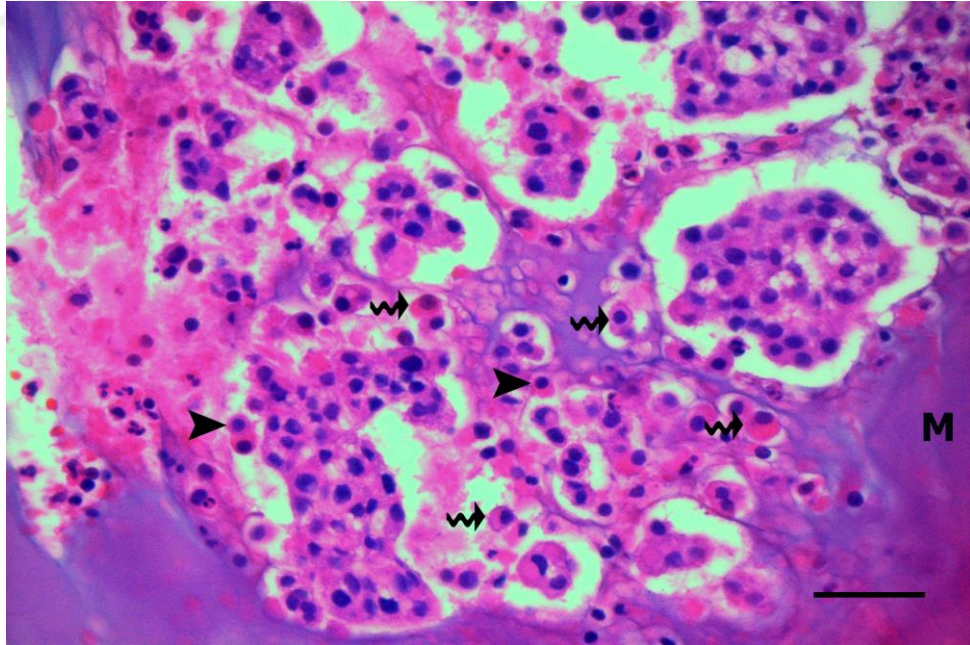
Hücre bloğu parafin kesitlerin H&E boyamalarında yetersiz ve yeterli D vitamini düzeyi olan gruplarda x40 ve x100 büyütmelerde granüloza hücreleri birbirleriyle sıkı temas içinde gruplar oluşturacak şekilde izlendi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6).



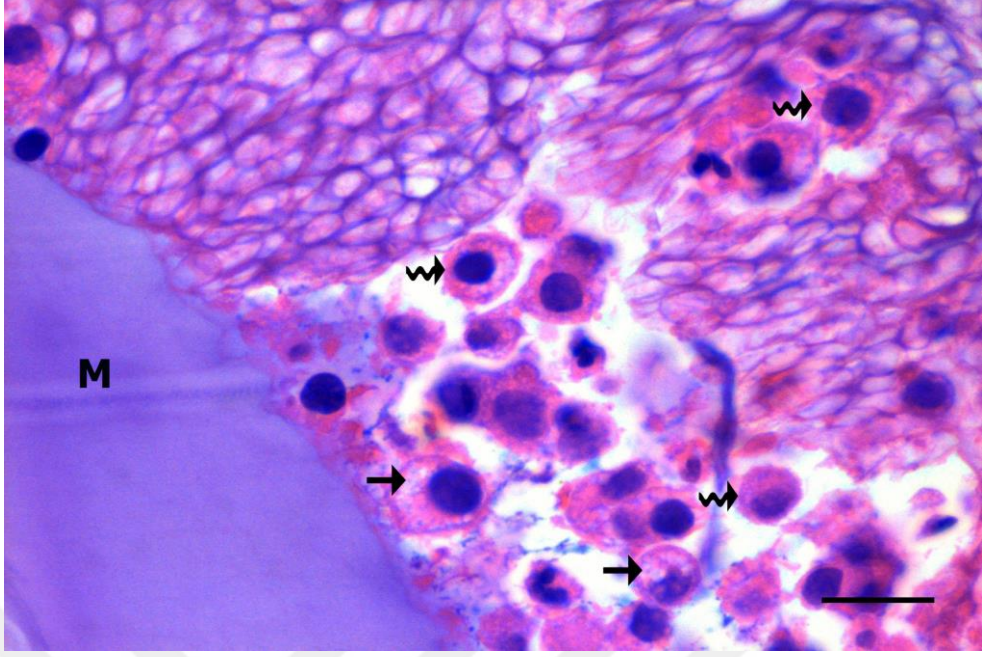
Şekil 4.3. Yetersiz D vitamini grubu preleukal granüloza hücreleri. Ok başı: Çekirdek, kuyruklu ok: Hücre blok matriksi içinde preleukal granüloza hücre grupları, e: Eritrosit, x40, H&E, bar: 50µm



Şekil 4.4. Yetersiz D vitamini grubu preluteal granüloza hücreleri. Kuyruklu ok: Preluteal granüloza hücre grupları, e: Eritrosit, x100, H&E, bar: 20µm

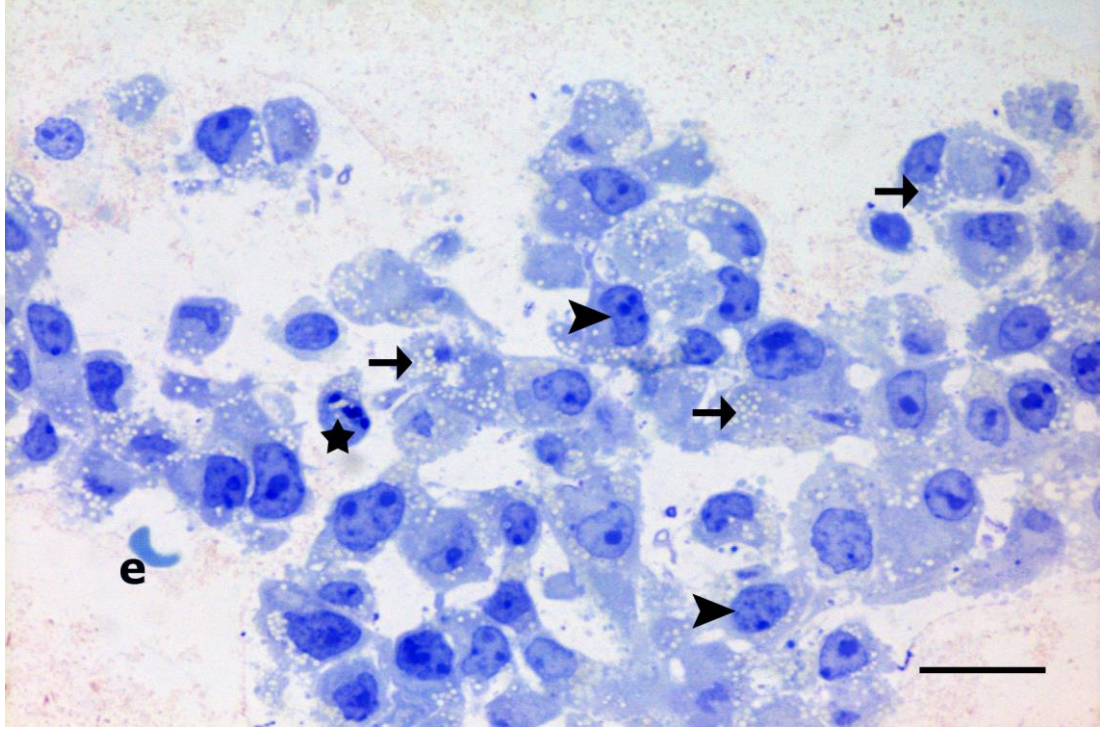


Şekil 4.5. Yeterli D vitamini grubu. M: Hücre blok matriksi, ok başı: Çekirdek, kuyruklu ok: Hücre blok matriksi içinde preluteal granüloza hücre grupları x40, H&E, bar: 50µm

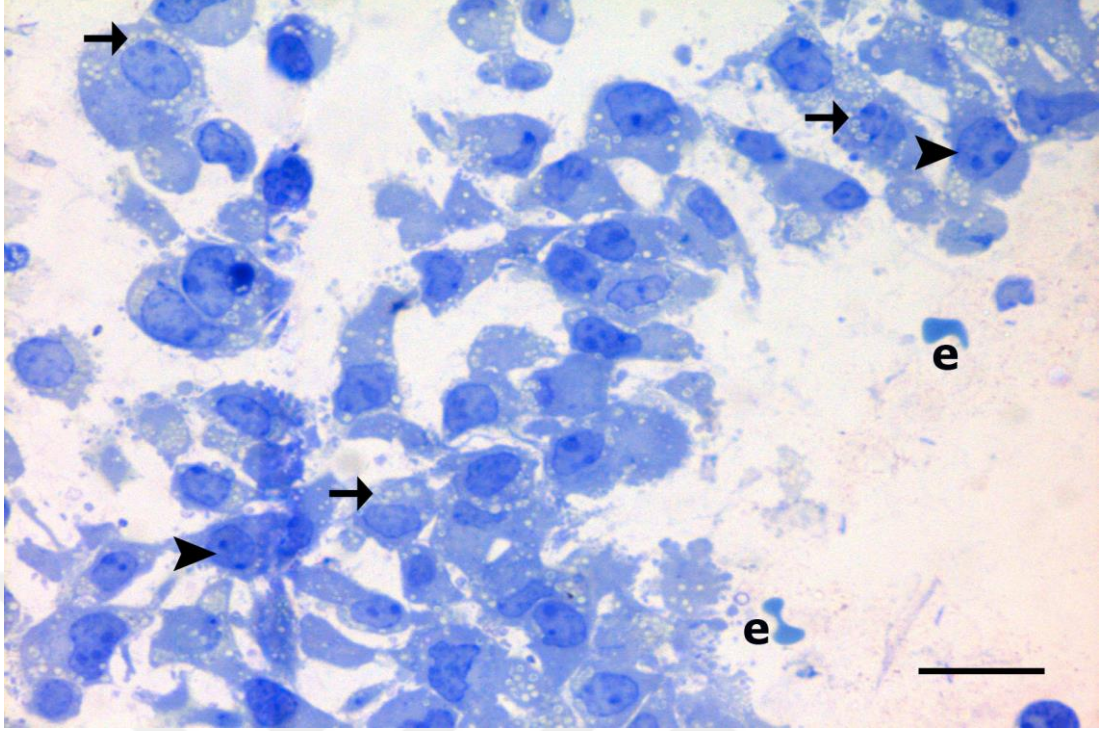


Şekil 4.6. Yeterli D vitamini grubu. M: Hücre blok matriksi, Ok başı: Çekirdek, ok:Lipid damlacıkları, kuyruklu ok: Hücre blok matriksi içinde preleukal granüloza hücre grupları, x100, H&E, bar: 20µm

Yetersiz ve yeterli D vitamini gruplarında elde edilen yarı ince kesitlerde granüloza hücrelerinin ökromatin çekirdek içerdikleri ve sitoplazmalarında lipid damlacıkları izlendi. Yetersiz D vitamini grubunda apoptotik çekirdek parçaları içeren granüloza hücreleri mevcuttu (Şekil 4.7, 4.8)



Şekil 4.7. Yetersiz D vitamini grubu. Ok başı: Ökromatin çekirdek Ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları e: Eritrosit, yıldız: Apoptotik nükleer fragmentlar içeren granüloza hücresi, x100, yarı ince kesit, toluidin mavisi-azur II, bar: 20µm



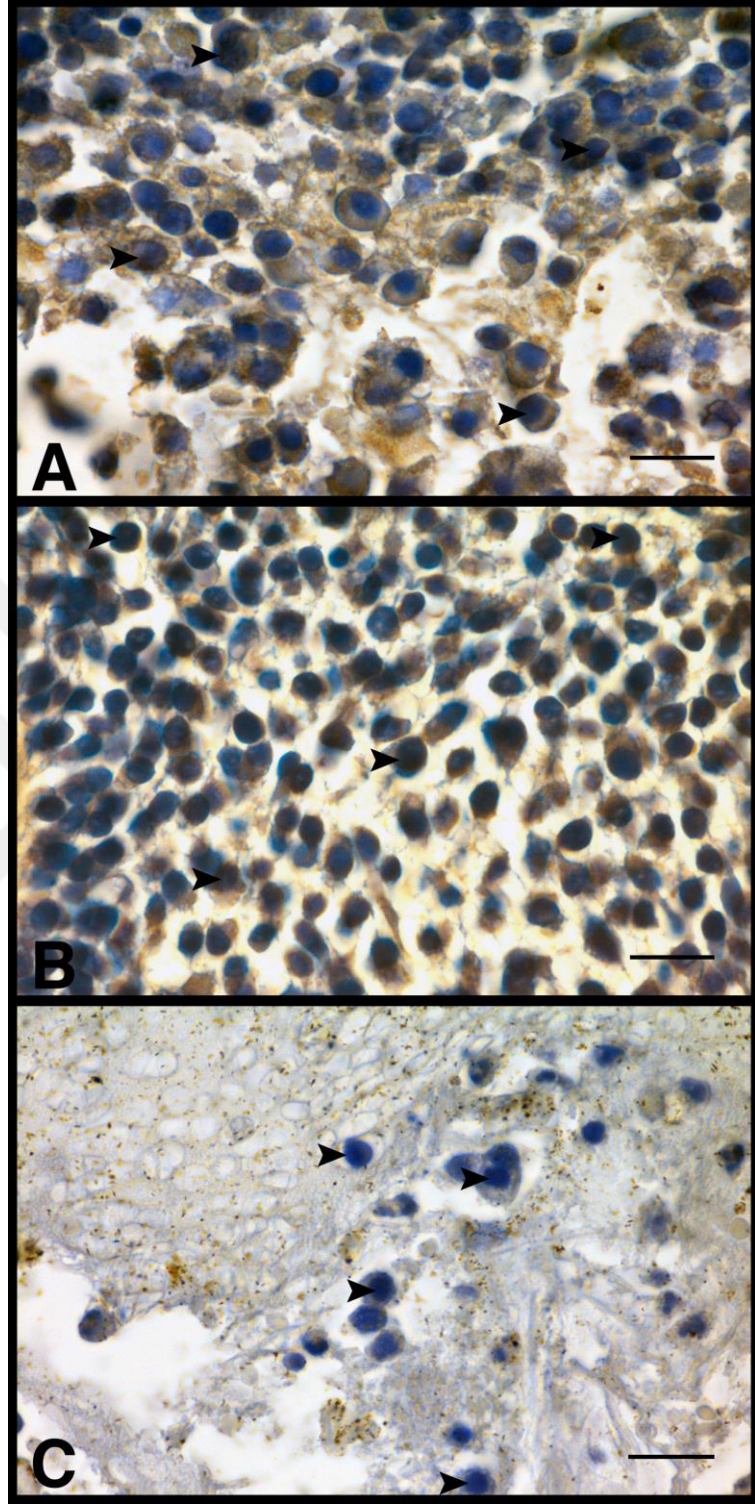
Şekil 4.8. Yeterli D vitamini grubu. Ok başı: Ökromatin çekirdek, ok: Sitoplazma içinde lipid damlacıkları, e: Eritrosit, x100, yarı ince kesit, toluidin mavisi-azur II, bar: 20µm

4.2. İmmünohistokimya incelemeleri

D vitaminin bağlanacağı D vitamini reseptör antikoruyla yapılan immün işaretleme analizleri incelendiğinde D vitamini yetersiz ve yeterli gruplar arasında HSCORE değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,730$), (Şekil 4.9), (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Yetersiz ve yeterli D vitamini gruplarının IHC analizlerine ait verilerin ortalama ve standart sapmaları

| D vitamini | | | |
|------------|--------------------|-------------------|----------|
| | Yetersiz ort±ss | Yeterli ort±ss | p değeri |
| VDR | 128,57±17,39 | 132,24±11,40 | 0,730 |



Şekil 4.9. (A-B) Yeterli ve yetersiz D vitamini grupları granüloza hücresi D vitamini reseptör işaretlemeleri. Ok başı: VDR pozitif hücreler koyu boyalı olarak izlenmektedir. (C) negatif kontrol, x100, bar 20µm

5.TARTIŞMA

Steroid bir hormon olarak kabul edilen D vitamini esas olarak deride UV ışınları etkisi ile sentezlenir. %10-20den az kısmı diyetle (mantar, somon balığı) vücuda alınır. D vitamini karaciğerde 25 hidroksilaz ile 25 hidroksi vitamin D'ye (25(OH)D3) dönüştürülür. Dolaşıma geçen 25(OH)D3 böbreklerde 1 α -hidroksilaz enzimi ile aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D'ye (1,25 (OH)² D3) dönüştürülür.

1 α -hidroksilaz enzimi böbrek dışında diğer dokularda beyin, meme, kolon, prostat, ve ovaryumda bulunur. Dolayısıyla bu dokularda D vitamininin aktif formu lokal olarak sentezlenebilmektedir (28).

D vitamini biyolojik etkilerini steroid/tiroid nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olan D vitamini reseptörü üzerinden gösterir (28, 29).

D vitamini reseptörünün kalsiyum düzenleyen dokular olan bağırsaklar, böbrekler ve paratiroid bezlerinin yanı sıra üreme organları olan ovaryum (özellikle granüloza hücreleri), uterus, plasenta, testis, hipotalamus ve hipofizde bulunduğu bildirilmiştir. D vitamini reseptörü ve D vitamini metabolizmasında rol alan enzimlerin dişi üreme sistemi organlarında bulunduğu bildirilmesi dişi üreme fonksiyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir (28-30).

Yapılan hayvan çalışmalarında dişi sıçanlarda D vitamini eksikliğinin çiftleşme başarısı, fertilitite oranı, gebelik oranı, yaşayan yavru oranı ve doğan yavru büyüklüğünde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (31, 32).

Son yıllarda D vitamini eksikliği ve infertilite arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok çalışma yapılmıştır.

Literatürde insanlarda D vitamini düzeyleri ile ovaryum folikül rezervi ve yardımcı üreme teknikleri tedavi başarısı arasındaki ilişkinin araştırıldığı pek çok çalışmada D vitamininin etkisi konusunda olumlu ve olumsuz, birbiriyle çelişen sonuçlar bildirilmiştir (28, 29).

D vitamini eksikliği gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde üreme çağındaki kadınlarda yaygın olarak görülmektedir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada D vitamini eksikliğinin ovaryan streoidogeneze ve

folikülogeneze etki ederek infertiliteye, gebelikte ise tekrarlayan düşükler, intrauterin gelişme geriliği, preeklampsi, gestasyonel diyabet riskinde artış gibi komplikasyonlara neden olabileceği bildirilmektedir (28, 30, 33).

Başarılı bir yardımcı üreme (IVF) tedavisi için ilk aşama gonad hücrelerinin elde edilmesidir. Kadında yeterli sayıda ve olgun (metafaz II) oosit ile erkekde yeterli sayıda motil ve morfolojisi düzgün spermatozoon elde edilmesi gerekmektedir.

Kadında OPU sonrası yeterli sayıda ve olgun oosit elde edilmesi için ovaryum rezervi ve gonodotropinlerle (GnRH ve FSH-LH uygulaması) yapılan ovaryan stimülasyonuna folikülogenez cevabı önemlidir (28, 33).

Bu çalışmada IVF tedavisine alınan ve OPU yapılan kadınların ortalama yaşları D vitamini yetersiz=30.5 ve D vitamini yeterli=33.4 olmak üzere ileri yaş grubuna dahil değildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Çalışmamızda serum D vitamini yetersiz ve yeterli olan kadınlarda toplanan oosit sayıları benzerdi (median değer sırasıyla 10,10). Granüloza hücreleri enzimatik olarak temizlendikten sonra her iki grupta ICSI işlemine alınan matür oosit sayısı (median değer sırasıyla 9,8) açısından fark yoktu. Bu sonuç OPU günü ölçülen D vitamini düzeylerinin foliküler gelişim ve ovaryan hiperstimülasyona cevabı ortaya koyan toplanan oosit sayısı ve matür oosit sayısını etkilenmediğini düşündürdü. Döllenen oosit sayıları her iki grupta da (median değer sırasıyla 6,6) serum D vitamini düzeylerinden etkilenmemişti. İkinci gün ve üçüncü gün günüyle uyumlu embriyo gelişimi açısından D vitamini yetersiz ve yeterli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Buna karşın blastokist gelişimi D vitamini yetersiz grupta yeterli gruba göre daha yüksekti. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Foliküler sıvı D vitamini düzeyleriyle korele olduğu bildirilen serum D vitamini düzeylerini esas aldığımız çalışmamızda yeterli D vitamini düzeyi grubundaki düşük sayıdaki blastokist gelişimi Anifandis ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada foliküler sıvı yüksek D vitamini seviyelerinin embriyo gelişim kapasitesini negatif etkilediğini bildirdiği sonuçlarıyla açıklanabilir (28, 34).

Serum D vitamini yetersiz grupta blastokist transfer oranı %62,5 iken yeterli grupta %42,85 idi. Gebelik oranları D vitamini yetersiz grupta daha yüksek (%50) iken D vitamini yeterli grupta daha düşüktü (%14). Fisher's exact testle klinik gebelik oranları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Klinik gebelik sayısının D vitamini yetersiz grupta daha fazla olmasının nedeni daha fazla sayıda blastokist transferi yapılması sonucunda endometriyum ile blastokist arasında senkronizasyonun sağlanmasının implantasyon şansını arttırdığını düşündürdü.

D vitamini yetersiz ve yeterli grupta aspire edilen tüm foliküler sıvı içerisinde toplanan mural granüloza hücrelerinden elde edilen hücre bloğu parafin kesitlerinde her iki grupta da birbiriyle sıkı temasda gruplar halinde preluteal granüloza hücreleri izlendi. Yarı ince kesitlerde izlenen granüloza hücrelerinin hCG enjeksiyonu sonrası preluteal granüloza hücresi yönünde diferansiye olamaya başlayarak sitoplazmalarında bol lipid damlacıkları içerdikleri görüldü. Yetersiz D vitamini grubunda apoptotik nükleer fragmantlar içeren granüloza hücrelerine rastlandı. D vitamini yeterli ve yetersiz grupta ışık mikroskobu düzeyinde preluteal granüloza hücre morfolojisi açısından belirgin fark gözlenmedi.

D vitamininin biyolojik etkilerini gösterdiği özellikle granüloza hücrelerinde bulunan D vitamini reseptörü için immün işaretleme sonrası D vitamini yeterli grupta HSCORE ortalamasının ($132,24 \pm 11,40$) D vitamini yetersiz gruba ($128,57 \pm 17,39$) göre yüksek olmasına karşın iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır.. Bu sonuç VDR ifadenmesinin ve boyanma derecesinin serum D vitamini düzeyinden etkilenmediğini düşündürdü.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda OPU günü ölçülen serum D vitamini düzeyi ile IVF başarısında etkili olan toplanan oosit sayısı, ICSI yapılan oosit sayısı, döllenmiş oosit sayısı, ikinci gün gelişen embriyo sayısı, üçüncü gün gelişen embriyo sayısı, blastokist gelişimi, blastokist transfer oranı, gebelik oranı arasında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır. Aspirat sıvısından toplanan mural granüloza hücrelerinde immünohistokimyasal olarak gösterilen VDR ifadenmesi ve HSCORE ortalamaları ile OPU günü serum D vitamini düzeyi arasında ilişki bulunamamıştır.

Literatürde D vitamini düzeyleri ile IVF başarısı arasında olumlu ve olumsuz sonuçlar bildiren çalışmalar vardır. D vitamininin üreme fonksiyonları açısından etkileri ve üreme organlarında özellikle ovaryum granüloza hücrelerine ve folikülogenez sürecine, uterus endometriyum ve plasenta dokularına etki mekanizmalarının açıklanmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Günümüzde tüm dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde özellikle üreme çağı kadınlarda yaygın görülen D vitamini eksikliği, bazı açıklanamayan infertilite vakalarının nedeni olabilir.

Çocuk sahibi olmak isteyen kadınlarda ve erkeklerde D vitamini desteğinin yeterli D vitamini seviyeleri oluşturarak üreme kapasitesini iyi yönde etkilemesine yönelik ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Tedavisi Uygulanan Kadınlarda Serum D Vitamini Düzeylerinin Oosit Toplama İşlemi Sırasında Elde Edilen Foliküler Sıvı Granüloza Hücrelerinin Diferansiyasyonuna Etkisi

Steroid bir hormon olarak kabul edilen D vitamini deride UV ışınları etkisi ile sentezlendikten sonra önce karaciğerde 25 hidroksilaz ile 25 hidroksi vitamin D'ye (25(OH)D₃) sonra da böbreklerde 1 α -hidroksilaz enzimi ile aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D'ye (1,25(OH)₂D₃) dönüştürülür.

D vitamini nükleer reseptör süper ailesine ait D vitamini reseptörü için doğal liganddır. D vitamini reseptörünün hemen her dokuda bulunduğu gösterilmesinden sonra günümüzde D vitamininin obezite, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, deri hastalıkları, immün sistem hastalıkları ve infertilite üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar giderek artmıştır. D vitamininin dişi üreme sisteminde de önemli etkileri vardır (oosit gelişimi, AMH üretimi, ovaryan steroidogenezis, endometriyal reseptivite gibi) ve IVF ile oluşan klinik gebeliklerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Biz de çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim Merkezi'ne başvuran 18 kadından serum D vitamini yetersiz ve yeterli olanların OPU sonrası artan folikül sıvısından elde edilen granüloza hücrelerinin mikroskopik yapısı, granüloza hücrelerinde VDR ifadenmesi, toplanan oosit sayısı, ICSI yapılan oosit sayısı, dölllenme oranı, 2. ve 3. gün embriyo gelişimi, blastokist oranı ve gebelik oranını karşılaştırdık.

Işık mikroskobu çalışmaları için; toplanan hücreler sitospin sonrası elde edilen preparatların Giemza ile boyanması ile gösterildi. Foliküler aspirat sıvısı santrifüj edilerek elde edilen pellet sitoblok solüsyonları kullanılarak sitoblok kasetlerine alınmış ve formalin solüsyonunda tespit edilerek rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi. Elde edilen granüloza hücre sitobloğu parafine gömülerek parafin hücre bloğu hazırlandı ve bu bloklardan elde edilen kesitler H&E boyama ve immünohistokimyasal boyama için kullanıldı.

Elektron mikroskobu çalışmaları için granüloza hücreleri protokole uygun

şekilde tespit ve takip edildikten sonra araldit bloklara gömüldü. Bu bloklardan ultramikrotomla alınan kesitler toluidin mavisıyla boyandı. Literatürde serum D vitamini düzeyleri ile IVF başarısı arasında hem olumlu hem de olumsuz ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Biz de çalışmamızda da D vitamini yetersiz ve yeterli grup arasında toplanan oosit sayısı, ICSI yapılan oosit sayısı, döllenme oranı, 2. ve 3. gün embriyo gelişimi, blastokist oranı, gebelik oranı ve granüloza hücrelerinde VDR ifadelenmesinin HSCORE oranları ile serum D vitamini düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemedik.

D vitamininin IVF başarısına etkilerini anlamak için daha fazla sayıda vaka içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: D vitamini, gebelik, granüloza hücresi, ICSI, IVF

SUMMARY

The Effects Of Serum Vitamin D Levels On Differentiation Of Granulosa Cells Obtained From Follicular Fluid During Oocyte Pick Up From Women Undergo IVF Treatment

Vitamin D a steroid hormone is produced in the skin from 7-dehydrocholesterol by UV irradiation and further metabolized to 25(OH)D in liver then to 1,25(OH)₂D₃ in kidney by the enzyme 1 α -hydroxylase.

Vitamin D is the ligand for the Vitamin D receptor a transcription factor and member of the steroid hormone nuclear receptor family. With the vitamin D receptor being found in nearly every tissue the investigations on its impact on obesity, cancer, cardiovascular disease, skin disease, immune system disease and infertility has accelerated. Vitamin D has important effects on female reproductive system as well (oocyte maturation, AMH synthesis, ovarian steroidogenesis, endometrial receptivity) and its suggest that it plays an important role on clinical pregnancies after IVF.

In our study we compared total oocytes retrieved, number of oocytes microinjected, rate of fertilized oocytes, rate of embryonic development on second and third day, rate of blastocyst development, rate of pregnancy, microscopy of granulosa cells and expression of VDR in granulosa cells obtained from follicular fluid retrieved during OPU from 18 infertile women that insufficient and sufficient serum vitamin D levels undergoing IVF treatment in Ankara University Faculty Of Medicine Center for Assisted Reproduction, Department of Obstetrics an Gynecology.

For the light microscopy studies, collected granulosa cells demonstrated staining with Giemsa after cytopspin procedure. Follicular fluid centrifugated and the cell consentrate transferred to cytoblock cassettes after adding cytoblock solutions and fixed with formalin. The cytoblock embedded in parafin wax following histologic tissue processing to obtain parafin block and sections were taken from those parafin cell blocks for H&E and immunohistochemical staining.

For electron microscopy studies, granulosa cells embedded in araldite

after fixation and proper histological tissue processing. Semi-thin sections were taken and stained with toluidine blue.

Some studies have indicated that deficient vitamin D was associated with IVF success rate. In contrast, some researchers found no association between vitamin D status with outcomes after IVF cycles. In our study, no statistically significant difference was observed between total oocytes retrieved, number of oocytes microinjected, rate of fertilized oocytes, rate of embryonic development on second and third day, rate of blastocyst development, rate of pregnancy, microscopy of granulosa cells and HSCORE rates of VDR expression in granulosa cells in the vitamin D insufficient and sufficient vitamin D groups.

It's necessary to conduct more studies with higher number of cases to evaluate further vitamin D has effects on IVF success.

Key words: Vitamin D, pregnancy, granulosa cell, ICSI, IVF

KAYNAKÇA

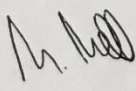
1. Ozkan S, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, et al. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1314-9.
2. Xu J, Hennebold JD, Seifer DB. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimullerian hormone production. *Fertil Steril*. 2016;106(7):1815-20 e1.
3. Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*. 2008;23(5):1118-27.
4. Polyzos NP, Anckaert E, Guzman L, Schiettecatte J, Van Landuyt L, Camus M, et al. Vitamin D deficiency and pregnancy rates in women undergoing single embryo, blastocyst stage, transfer (SET) for IVF/ICSI. *Hum Reprod*. 2014;29(9):2032-40.
5. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*, 2012 2012.
6. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, 2015 2015.
7. Ross MH, Pawlina, W. *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*, 2011.
8. Kousta E, Papathanasiou A, Skordis N. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *Hormones (Athens)*. 2010;9(3):218-131.
9. Dubey PK, Sharma GT. Nitric oxide and ovarian folliculogenesis: a possible role in follicular atresia. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016.
10. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, 2011.
11. Baumgarten SC, Stocco C. granulosa cell. *Encyclopedia of Reproduction*, 2018.2:8-13.
12. Dhar A, Dockery P, O WS, Turner K, Lenton EA, Cooke ID. The human ovarian granulosa cell: a stereological approach. *J Anat*. 1996;188 (Pt 3):671-6.
13. Liu Y, Han M, Li X, Wang H, Ma M, Zhang S, et al. Age-related changes in the mitochondria of human mural granulosa cells. *Hum Reprod*. 2017;32(12):2465-73.
14. Bruin Jpd, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, Haaften Mv, Looman CWN, et al. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biol Reprod*. 2002;66(4):1151-60.
15. Silber SJ. Evaluation and treatment of male infertility. *Clin Obstet Gynecol*. 2000;43(4):854-88.
16. Steven R. Bayer MMA, Alan S. Penzias. *İnfertilite El Kitabı*, 2014.
17. Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):333-40.
18. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014;21(3):319-29.


19. Lorenzen M, Boisen IM, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. Reproductive endocrinology of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;453:103-12.
20. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *American journal of physiology Renal physiology.* 2005;289(1):F8-28.
21. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients.* 2016;8(3):135.
22. Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(5):765-78.
23. von Websky K, Hasan AA, Reichetzedder C, Tsuprykov O, Hocher B. Impact of vitamin D on pregnancy-related disorders and on offspring outcome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017.
24. Garbedian K, Boggild M, Moody J, Liu KE. Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *CMAJ Open.* 2013;1(2):E77-82.
25. Bacus S, Flowers JL, Press MF, Bacus JW, McCarty KS, Jr. The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *Am J Clin Pathol.* 1988;90(3):233-9.
26. Cayli S, Ocakli S, Erdemir F, Tas U, Aslan H, Yener T, et al. Developmental expression of p97/VCP (Valosin-containing protein) and Jab1/CSN5 in the rat testis and epididymis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:117.
27. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PloS one.* 2014;9(5):e96801.
28. Irani M, Merhi Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. *Fertil Steril.* 2014;102(2):460-8 e3.
29. Shahrokhi SZ, Kazerouni F, Ghaffari F. Anti-Mullerian Hormone: genetic and environmental effects. *Clin Chim Acta.* 2018;476:123-9.
30. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int.* 2010;78(2):140-5.
31. Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 restores fertility of vitamin D-deficient female rats. *Am J Physiol.* 1989;256(4 Pt 1):E483-7.
32. Halloran BP, DeLuca HF. Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *J Nutr.* 1980;110(8):1573-80.
33. Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E1137-45.
34. Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289(1):201-6.

EKLER

EK 1. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onay Formu

| KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU | | | | | |
|---|--|--|--|---------------------------------------|--|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | | İn vitro fertilizasyon (İVF) tedavisi uygulanan kadınlarda serum D vitamini düzeylerinin oosit toplama işlemi sırasında elde edilen foliküller sıvı granüloza hücrelerinin diferansiyasyonuna etkisi | | | |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU | | | | | |
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu | | | |
| | AÇIK ADRESİ: | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA | | | |
| | TELEFON | 0312 595 82 27 | | | |
| | FAKS | 0312 310 63 70 | | | |
| | E-POSTA | etik@medicine.ankara.edu.tr | | | |
| BAŞVURU BİLGİLERİ | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI | Prof.Dr.Oya EVİRGEN | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Histoloji ve Embriyoloji | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı | | | |
| | VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI | | | | |
| | DESTEKLEYİCİ | | | | |
| | PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için) | | | | |
| | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ | | | | |
| | ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ | FAZ 1 | <input type="checkbox"/> | | |
| | | FAZ 2 | <input type="checkbox"/> | | |
| | | FAZ 3 | <input type="checkbox"/> | | |
| FAZ 4 | | <input type="checkbox"/> | | | |
| Gözlemsel ilaç çalışması | | <input type="checkbox"/> | | | |
| Tıbbi cihaz klinik araştırması | | <input type="checkbox"/> | | | |
| İn vitro tıbbi tam cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları | | <input type="checkbox"/> | | | |
| İlaç dışı klinik araştırma | | <input type="checkbox"/> | | | |
| Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması | | | | | |
| ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> | ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> | ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI <input type="checkbox"/> | |

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza: 


Funda BAYKAL KILIÇ
A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Asst. Gıbnül

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | | | | |
|----------------------------------|---|---|-------------------|---|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | | In vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi uygulanan kadınlarda serum D vitamini düzeylerinin oosit toplama işlemi sırasında elde edilen foliküler sıvı granüloza hücrelerinin diferansiyasyonuna etkisi | | |
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU | | | | |
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | Belge Adı | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili |
| | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ | | | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
| | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNDÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
| | OLGU RAPOR FORMU | | | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
| | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ | | | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | Belge Adı | Açıklama | | |
| | SİGORTA | <input type="checkbox"/> | | |
| | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ | <input type="checkbox"/> | | |
| | BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU | <input type="checkbox"/> | | |
| | İLAN | <input type="checkbox"/> | | |
| | YILLIK BİLDİRİM | <input type="checkbox"/> | | |
| | SONUÇ RAPORU | <input type="checkbox"/> | | |
| | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ | <input type="checkbox"/> | | |
| DİĞER | <input type="checkbox"/> | | | |
| KARAR BELGELERİ | Karar No:93-146-18 | Tarih:12 Subat 2018 | | |
| | Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgelet araştırmanın çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sorunca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üve tam sayısal salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. | | | |

| | |
|--|--|
| KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU | |
| ETİK KURULUNUN ÇALIŞMA ESASI | İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |
| BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Prof.Dr.Mehmet MELLİ |

| Unvanı/Adı/Soyadı | Unvanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | Araştırma ile İlişki | Katılım * | İmza |
|----------------------------|-------------------------------|---|--|--|--|----------------------|
| Prof.Dr.Mehmet MELLİ | Farmakoloji | A.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>M. Mellî</i> |
| Prof.Dr.İrfan SOYKAN | Gastroenteroloji | A.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>M. Soykan</i> |
| Doç.Dr.Serdar ÖZTÜRK | Tıbbi Biyokimya | A.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>S. Öztürk</i> |
| Prof.Dr.Leylan YAZICIOĞLU | Kalp ve Damar Cerrahisi | A.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>L. Yazıcıoğlu</i> |
| Prof.Dr.Süleyman SÖZÜT | Nefroloji | A.U. Tıp Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>S. Sözütlü</i> |
| Dr.F.İnci İLHAN | Rah. Sağlığı ve Hastalıkları | A.U. Tıp Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>F. İlhan</i> |
| Prof.Dr.Serap SIVRİ | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları | H.U. Tıp Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>S. Sivri</i> |
| Dr.F. Zeynep SİNORAK | Ekoloji | A.U. Hukuk Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Z. Sinorak</i> |
| Prof.Dr.Binnur ÇAKIR | Halk Sağlığı | H.U. Tıp Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>B. Çakır</i> |
| Doç.Dr.Derva GÖKMEN | Biyostatistik | A.U. Tıp Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>D. Gökmén</i> |
| Doç.Dr.Selma Koçak TOPRAK | Hematoloji | A.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>S. Koçak</i> |
| Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY | Tıbbi Genetik | A.U. Tıp Fakültesi | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>N. Kutlay</i> |
| Yrd.Doç.Dr.Ah.Dogan DURSUN | Özyoloji | A.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>A. Dursun</i> |
| Yrd.Doç.Dr.Önder İLÇİLİ | Tıp Tarihi ve Etik | H.U. Tıp Fakültesi | F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>O. İlçili</i> |
| İffet BERKTAŞ | Maternal ve Çocuk Sağlığı | Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü | F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | <i>I. Berktaş</i> |

* Temsilatçı Bütünleşme
Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Mellî

Funda BAYKAL KURU
A.U. Etik Kurul Başkanı
Aslı Çibacı

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

EK 2. BGOF Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Değerli anne ve baba adayı,

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezi ortak çalışması olmaktadır. Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı kabul ettikten sonra da araştırma sürecinde hiçbir neden göstermeksizin araştırmadan çekilebilirsiniz.

Lütfen biraz zaman ayırın ve aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun, isterseniz başkalarıyla tartışın. Açık olmayan bir bölüm varsa ya da daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız lütfen bizi arayın. Ancak araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

Araştırmamızın bilimsel adı "D vitamini eksik ve yeterli hastalarda ovaryum stimülasyonu sonrası toplanan folikül sıvılarında granüloza hücrelerinin genel yapısal özelliklerinin tanımlanmasıdır.

Daha basit anlatmak gerekirse tüp bebek tedavisi alan, D vitamini eksikliği olan ve olmayan hastalarda yumurta toplandıktan sonra arta kalan ve çöpe atılacak materyalde bulunan hücrelerin incelenmesidir.

Araştırmanın amacı tüp bebek kliniğine başvuran kadın kısır (infertil) hastalardan yumurta (oosit) toplanması sonrası arta kalan sıvıda bulunan ve çöpe atılacak olan hücreler (granüloza hücreleri) üzerinde D vitamini etkisini detaylı olarak incelemektir. Bu amaç doğrultusunda, yumurta toplama işlemi yapıldıktan ve yumurtalar alındıktan sonra geriye kalan ve çöpe atılacak hücreler laboratuvar koşullarında uygun tekniklerle hücre bloğu haline getirilecektir. Bu bloklardan uygun kalınlıkta alınan kestilerde çeşitli boyamalar yapılacak ve mikroskop altında araştırmacılar tarafından değerlendirilecektir.

Araştırmaya katılan gönüllülerin araştırma için ek bir süre ve para harcamalarına gerek yoktur.

Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı 20 ile 50 kişi arasındadır.

Gönüllülere hiç bir tedavi uygulanmayacak, tüm uygulamalar çöpe gidecek materyal üzerinde yapılacaktır. Dolayısıyla araştırmanın hastalar üzerinde hiç bir yan etkisi ve riski mevcut değildir. Eğer araştırma hakkında, kendi haklarınız veya araştırmayla ilgili herhangi bir yan etki hakkında daha fazla bilgi temin etmek isterseniz aşağıdaki numaralardan bizimle 24 saat temasa geçebilirsiniz.

Araştırma sonucunda gönüllüye tedavi açısından herhangi bir fayda sağlanmayacaktır. Bilime katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

Araştırma bir yıl içinde tamamlanacaktır.

Gönüllü anne adayları araştırmaya katılmayı kabul etmemeleri ya da araştırmadan ayrılmaları durumunda herhangi bir olumsuz sonuçla karşılaşmayacaklardır.

Gönüllünün kimliği gizli tutulacak, kamuoyuna ağıklanmayacak; araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

Etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulunabilir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya kanuni temsilcisi söz konusu erişime izin vermiş olacaktır.

Üzerinde çalışma yapacağımız materyal yumurta toplanıp ayıklandıktan sonra arta kalan ve çöpe gidecek olan sıvıdır. Bütün analizler Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi laboratuvarlarında yapılacaktır.

Çöpe atılacak materyalle çalışılacağından dolayı gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek herhangi bir durum yoktur. Eğer araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edilirse gönüllü veya kanuni temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra istediğiniz bir zamanda

bırakabilirsiniz. Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından araştırmadan çıkarılmanız halinde, sizinle ilgili veriler kullanılmayacaktır. Sizden elde edilen tüm bilgiler gizli tutulacak, araştırma yayınlandığında da varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllülere verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (ya da sözlü olarak dinledim). Eksik kaldığını düşündüğüm konularda sorularımı araştırmacılara sordum ve doyurucu yanıtlar aldım. Yazılı ve sözlü olarak tarafıma sunulan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladığım kanısındayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğim konusunda karar vermem için yeterince zaman tanındı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Bu koşullar altında, araştırma kapsamında elde edilen şahsıma ait bilgilerin bilimsel amaçlarla kullanılmasını, gizlilik kurallarına uyulmak kaydıyla sunulmasını ve yayınlanmasını, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı Soyadı

Tel:
İmza, tarih

Sorumlu Araştırmacının Adı Soyadı

Tel:
İmza tarih

Diğer Araştırmacıların Adı Soyadı

Tel:
İmza Tarih

Ayrıca, araştırma kapsamında daha ileride planlanacak çalışmalarda gönüllüden alınan mevcut materyal yukarıdaki şartlar altında tekrar kullanılabilir. Yeni planlanacak araştırma kapsamında şahsıma ait materyalin yukarıdaki şartlar altında, bilimsel amaçlarla kullanılmasını, gizlilik kurallarına uyulmak kaydıyla sunulmasını ve yayınlanmasını, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı Soyadı

Tel:
İmza, tarih

Sorumlu Araştırmacının Adı Soyadı

Tel:
İmza tarih

Diğer Araştırmacıların Adı Soyadı

Tel:
İmza Tarih