T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN D VİTAMİNİ EKSİKLİĞİNİN İMPLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

DENİZ İREM BULUT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MART 2024


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN D VİTAMİNİ EKSİKLİĞİNİN İMPLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Deniz İrem BULUT

DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MART 2024

ETİK BEYAN

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

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

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

Deniz İrem BULUT

21/03/2024

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN D VİTAMİNİ EKSİKLİĞİNİN İMPLANTASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Deniz İrem BULUT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2024

ÖZET

D vitamini eksikliği gebelerde yaygındır ve yapılan araştırmalar gebeliğin ileri dönemlerinde D vitamini eksikliği nedeniyle meydana gelen yan etkilere odaklanmıştır. Çalışmamızda D vitamini eksikliğinin, gebeliğin erken döneminde; implantasyonun invazyon aşaması ile desidualizasyonda rol oynayan moleküllerle olan ilişkisini araştırmayı hedefledik. 4 haftalık 16 adet Sprague- Dawley sıçan, kontrol ve D vitamini eksikliği olmak üzere iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu, 9 hafta boyunca D vitamini içerecek şekilde formüle edilmiş standart rat yemiyle beslenerek, UVB ışığı yayan standart aydınlatma koşullarında 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde, D vitamini eksikliği grubu ise 9 hafta boyunca D vitamini içermeyecek şekilde formüle edilmiş rat yemiyle beslenerek, UVB ışığı yaymayan aydınlatma ortamında 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde barındırıldı. 9 haftanın sonunda D vitamini eksikliği modelinin oluştuğu doğrulandı ve denekler çiftleştirildi. Çiftleşmeyi takiben denekler 8. günde sakrifiye edilerek implantasyon alanları toplandı. İmplantasyonun invazyon aşaması, desidualizasyon ve anjiyogenezde önemli rol oynayan Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9 moleküllerinin implantasyon alanlarında lokalizasyonu ve gen ifadeleri immünohistokimya ve RT-PCR ile değerlendirildi. Osteopontin ve VEGF-A ifadesinin D vitamini eksikliği grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak azalma gösterirken, MMP-9 ifadesinde değişiklik olmadığı belirlendi. Çalışmamızda D vitamini eksikliğinin gebeliğin erken döneminde implantasyon ve desidualizasyon süreçlerinde bozukluklara yol açabileceği ortaya konmuştur. İleride yapılacak ara yolak çalışmaları gebelikte bu önemli aşamaları koordine eden mekanizmalar üzerinde D vitamini eksikliğinin etkilerini daha açık bir şekilde ortaya koyarak, D vitamini eksikliğiyle ilişkili gebelik komplikasyonlarının infertilitenin tedavisinde yeni bir bakış açısı ortaya koyabilecektir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : D vitamini, endometriyum, implantasyon
Sayfa Adedi : 140
Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

EVALUATION OF THE EFFECTS OF EXPERIMENTALLY INDUCED VITAMIN D DEFICIENCY ON IMPLANTATION BY IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS

(Ph. D. Thesis)

Deniz İrem BULUT

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2024

ABSTRACT

Vitamin D deficiency is common among pregnant women. Several studies have explored the adverse effects of this deficiency during the later stages of pregnancy. Our study aims to investigate the relationship between Vitamin D deficiency and the molecules involved in the implantation phase of pregnancy and decidualization during the early stages. Sixteen 4 week-old Sprague-Dawley rats were divided into control and Vit-D deficiency groups. Control group was fed a standard chow diet for 9 weeks and were kept in a standart light/ dark cycle (12:12). Vit-D deficiency group was kept on a Vit-D free diet for 9 weeks and were kept under incandescent lighting to avoid UVB. After 9 weeks, vitamin D deficiency was confirmed, and rats were mated. On the 8th day of gestation, rats were sacrificed, and the implantation areas were collected. The localization and gene expressions of Osteopontin, VEGF-A, and MMP-9 molecules, which play an essential role in the invasion phase of implantation, decidualization, and angiogenesis in implantation areas, were evaluated by immunohistochemistry and RT-PCR. There was a significant decrease in the expression of Osteopontin and VEGF-A in Vit-D deficiency group compared to the control. However, there was no change in MMP-9 expression. Our study revealed that vitamin D deficiency may cause complications in the implantation and decidualization processes during early pregnancy. In the future, intermediate pathway studies will provide a clearer understanding of the impact of vitamin D deficiency on the processes that coordinate vital stages of pregnancy. This may shed new light on the treatment of pregnancy complications related to vitamin D deficiency.

Science Code : 1033
Key Words : Vitamin D, endometrium, implantation
Page Number : 140
Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve engin tecrübeleriyle bana her zaman yardımcı olan, yanında öğrenim görmekten onur duyduğum, kıymetli hocam ve tez danışmanım Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS başta olmak üzere, doktor eğitimimde teorik alt tapımın oluşmasına büyük katkıda bulunan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU ve Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na ve tezime değerli katkılar sunan Prof. Dr. Canan YILMAZ'a, Tezimin deney aşamasında hoşgörü ve desteğini benden esirgemeyen, akademik çalışma disiplinini kendime her daim örnek olarak aldığım değerli hocam Doç. Dr. Cemile Merve SEYMEN'e ve değerli tavsiyelerini her zaman dikkate aldığım ve çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım hocalarım Dr. Öğr. Süheyla Esra ÖZKOÇER'e, Dr. Öğr. Duygu DAYANIR ve Dr. Öğr. Zeynep YIĞMAN'a, Yüksek lisans ve doktora eğitimime beraber başladığım, sevgi ve desteklerini her zaman gösteren birbirinden kıymetli arkadaşlarım Arş. Gör. Gökçe Nur ARIK, Arş. Gör. Asiye Aslı EMNİYET SERT, Arş. Gör. Pınar KAÇAMAK ve Arş. Gör. Müşerref Şeyma CEYHAN'a, Fikir alışverişi yapmaktan her zaman büyük keyif aldığım Uzm. Dr. Elif Seda ÖZDEMİR'e, Bugünlere gelmemde emeği olan, hayatıma kişiliğiyle ışık tutan, beni her şart ve koşulda destekleyen biricik annem İlknur KENEZ'e ve her anımda yanımda olan, sabrı ve desteğini benden esirgemeyen hayat arkadaşım değerli Abdulbaki YILDIZ'a Tezimi, TDK-2022-7804 kodlu BAP projesi dahilinde hazırlamama imkan sunan Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri birimine,

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi
RESİMLERİN LİSTESİ xii
SİMGELER VE KISALTMALAR xvi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Uterus Gelişimi 3
2.2. Uterus Anatomisi 5
2.3. Uterus Histolojisi 9
2.4. Fertilizasyon ve Yarıklanma 12
2.5. Blastosist Oluşumu ve İmplantasyon 15
2.6. Desidualizasyon 18
2.7. D Vitamini 20
2.7.1. Gebelikte D vitamini eksikliği 21
2. 8. Osteopontin 22
2.9. Matriks metalloproteinaz- 9 (MMP-9) 22
2.10. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü - A (VEGF-A) 23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 25
3.1. Deneysel Yöntemler 25
3.1.1. Deney grupları 25

Sayfa

3.1.2. Deneklerin östrus sikluslarının belirlenmesi 25
3.1.3. Deneklerin katıma alınması ve çiftleşmenin kontrol edilmesi 27
3.1.4. İmplantasyon alanlarının toplanması 28
3.2. Histokimyasal Yöntemler 28
3.2.1. Histokimyasal değerlendirme için dokuların hazırlanması 28
3.2.2. Hematoksilen eozin boyama 28
3.2.3. Masson'un üçlü boyaması 29
3.3. İmmünohistokimyasal yöntem 30
3.3.1. Semikantitatif immünohistokimyasal değerlendirme 32
3. 4. Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) 33
3.4.1. Serum 25(OH)D düzeylerinin LC-MS/MS yöntemiyle belirlenmesi 34
3.5. ELISA Yöntemi 34
3.5.1. Serum 1, 25$(OH)_2D_3$ düzeylerinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi 35
3.6. Gen İfadelerinin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler 36
3.6.1. İmplantasyon alanlarından total RNA 'nın elde edilmesi 36
3.6.2. Komplementer (tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentezi 36
3.6.3. Gen ifadesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi 37
3.6.4. Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A genleri için Real-Time PCR tepkime karışımı 37
3.7. İstatiksel Analiz Yöntemleri 38
4. BULGULAR 39
4.1. Serum 25(OH)D Düzeylerinin Değerlendirilmesi 39
4.2. Serum 1, 25$(OH)_2D_3$ Düzeylerinin Değerlendirilmesi 39
4.3. Hematoksilen-Eozin ve Masson'un Üçlü Boyaması Bulguları 40
4.3.1. Kontrol grubu 40
4.3.2. D vitamini eksikliği grubu 50

Sayfa

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular 61
4.4.1. Osteopontin bulguları 61
4.4.2. VEGF-A bulguları 74
4.4.3. MMP-9 bulguları 87
4.5. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi 101
4.5.1. Gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması 101
5. TARTIŞMA 103
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 113
KAYNAKLAR 115
EKLER 137
ÖZGEÇMİŞ 140

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Papanicolaou (PAP) boyama protokolü..... 26

Çizelge 3.2. Doku takip protokolü..... 28

Çizelge 3.3. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü 29

Çizelge 3.4. Masson'un üçlü boyaması protokolü..... 30

Çizelge 3.5. İmmünohistokimyasal yöntem..... 32

Çizelge 3.6. cDNA RT-PCR tepkime karışımı..... 37

Çizelge 3.7. Seçilen genlere özgü primerler 37

Çizelge 3.8. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları..... 38

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. D vitamininin kimyasal yapısı. 20

Şekil 3.1. Sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) bileşenleri ... 33

Şekil 3.2. Serum 1, 25 $(OH)_2D_3$ standart grafiği. 35

Şekil 4.1. Serum 25 (OH)D düzeylerine ait grafik. 39

Şekil 4.2. Serum 1, 25 $(OH)_2D_3$ düzeylerine ait grafik. 40

Şekil 4.3. Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9'a pozitif hücre yüzdelerine ait ortalama ± standart sapma grafiği. *p<0.05 Kontrol grubuna kıyasla. 101

Şekil 4.4. İmplantasyon alanlarında Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9 genlerinin mRNA ifade düzeylerindeki değişiklikler. Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edildi. *p<0.05 Kontrol grubuna kıyasla. 102

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Deneklerin östrus siklus evrelerinin ışık mikroskobik görüntüleri. 27

Resim 4.1. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. 41

Resim 4.2. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. 42

Resim 4.3. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. 43

Resim 4.4. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. 44

Resim 4.5. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. 45

Resim 4.6. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. 46

Resim 4.7. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması... 47

Resim 4.8. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması... 48

Resim 4.9. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması.. 49

Resim 4.10. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. 50

Resim 4.11. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. 52

Resim 4.12. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. 53

Resim 4.13. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. 54

Resim 4.14. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. 55

Resim 4.15. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. 56

Resim 4.17. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. 58

Resim 4.18. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. 59

Resim 4. 20. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. 61

Resim **Sayfa**

Resim 4.21. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 63

Resim 4.22. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 64

Resim 4.23. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 65

Resim 4.24. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 66

Resim 4.25. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 67

Resim 4.26. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 68

Resim 4.27. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 69

Resim 4.28. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 70

Resim 4.29. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 71

Resim 4.30. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin 72

Resim 4.31. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 73

Resim 4.32. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. 74

Resim 4.33. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 76

Resim 4.34. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 77

Resim 4.35. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 78

Resim 4.36. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 79

Resim 4.37. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 80

Resim **Sayfa**

Resim 4.38. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 81

Resim 4.39. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 82

Resim 4.40. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 83

Resim 4.41. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 84

Resim 4.42. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 85

Resim 4.43. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 86

Resim 4.44. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. 87

Resim 4.45. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 89

Resim 4.46. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 90

Resim 4.47. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 91

Resim 4.48. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 92

Resim 4.49. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 93

Resim 4.50. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 94

Resim 4.51. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 95

Resim 4.52. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 96

Resim 4. 53. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 97

Resim 4.54. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 98

Resim **Sayfa**

Resim 4.55. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 99

Resim 4.56. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. 100

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
g	Gram
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
n	Haploid
1, 25(OH)$_2$D$_3$	1,25-dihidroksivitamin D$_3$
25(OH)D	25-hidroksivitamin D
UV	Ultraviyole
nmol/L	Litre başına nanomol
kDa	Kilodalton
nm	Nanometre
°C	Santigrat
nM	Nanomolar
m/z	Kütle/yük
µL	Mikrolitre
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
PBS	Fosfat tamponlu salin
rpm	Dakikadaki devir sayısı
ml/dk	Dakika başına mililitre
ng/mL	Mililitre başına nanogram
mg	Miligram
pmol	Pikomol
pmole/µL	Mikrolitre başına pikomol
µg	Mikrogram
nmol/L	Litre başına nanomol

Kısaltmalar	Açıklamalar
AMH	Anti-Müllerian hormon
ANGPT	Anjiyopoietin
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CYP24	25-hidroksivitamin D-24-hidroksilaz
CYP27B1	1α-hidroksilaz
CYP2R1	25-hidroksilaz enzimi
DBP	D vitamini bağlayan protein
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF-23	Fibroblast büyüme faktörü- 23
HB-EGF	Heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü
ICAM-1	Hücrelerarası adhezyon molekülü-1
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IL-6	İnterlökin-6
IOM	Amerika'da Tıp Enstitüsü
IVF	İn vitro fertilizasyon
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometresi
LH	Luteinize edici hormon
LIF	Lösemi inhibitör faktör
MMP	Matriks metalloproteinaz
MMP-2	Matriks metalloproteinaz-2
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
mRNA	Haberci RNA
Na^+ K^+-ATPaz	Sodyum potasyum adenozin trifosfataz
Na^+	Sodyum
PAP	Papanicolaou
PIGF	Plasental büyüme faktörü
RGD	Arginin-glisin-aspartik asit
RNA	Ribonükleik asit
SRY	Y kromozomu üzerindeki cinsiyeti belirleyen bölge
TBF	Testis belirleyici faktör
TIMP	Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri

Kısaltmalar	Açıklamalar
uNK	Uterus doğal katil hücresi
VDR	D vitamini reseptörü
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü- A
ZP	Zona pellusida

1. GİRİŞ

İnsanlarda başarılı bir gebelik, embriyo implantasyonu, desidualizasyon, plasenta oluşumu ve doğum gibi bir dizi benzersiz olaya dayanır. İmplantasyon, embriyo ile alıcı endometriyum arasında bir diyalog gerektirir ve apozisyon, adezyon/bağlanma, invazyon gibi temel olayları içeren bir süreçtir [1, 2]. Blastosist uterusa implante olduğunda desidualizasyon sırasında meydana gelen stromal farklanma ve anjiyogenez gebeliğin sürdürülebilmesi için esastır [3]. Bu ardışık adımlar başarılı bir gebeliğin kurulmasını ve devamlılığını sağlar. Gebelik sırasında D vitamini metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelir ve maternal serumda aktif D vitamini (1, $25(OH)_2D_3$) konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir [4]. D vitamini eksikliği gebe kadınlarda yaygındır ve düşük D vitamini durumu gebelikteki yan etkilerle ilişkilendirilmiştir [5, 6]. Yapılan, araştırmaların çoğu gebeliğin sonraki dönemlerinde D vitamini eksikliği nedeniyle meydana gelen yan etkilere odaklanmıştır. Kadınlarda infertilitenin yüksek prevalansı ve D vitamininin insan üremesindeki olası rolü göz önüne alındığında, araştırmalar, kadın üreme bozukluklarının tedavisinde D vitamini takviyesi gibi yeni tedavi yaklaşımlarına yol açabilir. Biz de bu nedenle çalışmamızda gebeliğin erken döneminde D vitamini eksikliğinin implantasyon ve desidualizasyon süreçlerinde önemli roller oynayan Osteopontin, Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve Matriks metalloproteinaz -9 (MMP-9) belirteçleri üzerinden değerlendirmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus Gelişimi

Genital sistemin gelişimi, bireyin genel cinsel farklanmasında önemli bir evreyi temsil eder. Embriyonun genetik cinsiyeti, fertilizasyon sırasında yumurtada bulunan X kromozomuna bir Y kromozomu veya X kromozomu dahil olduğunda belirlense de gonadların morfolojik özellikleri embriyonik gelişimin 7. haftasına kadar ortaya çıkmaz [7]. Bu nedenle genital sistem gelişiminin başlangıç dönemi, cinsiyet gelişiminin farklanmamış evresi olarak adlandırılır. Farklanmamış evrede, embriyo cinsiyetinin temel morfolojik göstergesi Barr cisimciğinin (cinsiyet kromatini) varlığı veya yokluğudur. Barr cisimciği, hücrede X kromozomlarından birinin inaktivasyonuyla oluşur [8].

Embriyonun cinsiyet kromozomu kompozisyonunun translasyonunda ve gonadal hücrelerin farklanmasının yönlendirilmesinde pek çok gen rol oynar [9-11], ancak cinsiyet tayini öncelikle bir Y kromozomunun varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Testis belirleyici faktör (TBF), Y kromozomonun kısa kolunda bulunan SRY (Y kromozomu üzerindeki cinsiyeti belirleyen bölge=sex determining region on Y) geninin protein ürünüdür [12]. Bu transkripsiyon faktörünün etkisi altında, farklanmamış gonad testis yönünde gelişim gösterirken, bu faktörün yokluğunda ise gonadlar ovaryumları oluşturacak şekilde gelişir.

İntrauterin gelişimin 4. haftasının başlarında, embriyonun lateral olarak katlanması sırasında ara mezoderm ventral olarak taşınır ve somitlerle olan bağlantısını keser [13]. Dorsal aortanın her iki tarafında uzunlamasına bir mezoderm kabartısı olan ürogenital sırt oluşur. Ürogenital sırtın üriner sistemi meydana getiren parçasına nefrojenik kord, genital sistemi oluşturan parçasına ise gonadal (genital) kabartı adı verilir [7]. Beşinci ile yedinci servikal eksen seviyeleri boyunca yer alan ara mezodermin epitelizasyonu, mezonefrik kanalı (Wolffian, nefrik kanal) meydana getirir [14]. Mezonefrik kanallar, kaudal yönde uzarlar ve daha sonra ürogenital sinüse açılırlar.

Embriyonik gelişimin 6. haftasında, mezonefrik kanalların hemen lateralinde yeni bir kanal çifti, paramezonefrik kanallar (Müllerian kanalları), üçüncü torasik segmentten kaudal olarak ürogenital sinüsün arka duvarına uzanan, kalınlaşmış ve çoğalan sölomik epitel hücrelerinin oluşturduğu şeridin kraniyo-kaudal invajinasyonu ile ortaya çıkar [14, 15].

Paramezonefrik kanallar, gelecekteki pelvik bölgeye ulaşıncaya kadar, mezonefrik kanallara paralel olarak, kaudal yönde uzarlar [13]. Mezonefrik kanallar, paramezonefrik kanalların oluşumuna doğrudan bir katkı sağlamamakla birlikte, paramezonefrik kanalların kaudal yönde aktif epitel proliferasyonu ile büyümeleri için bir kılavuz veya migrasyon şablonu olarak hizmet eder [16, 17]. Bu nedenle, mezonefrik kanallar oluşmazsa, paramezonefrik kanal gelişimi de başarısız olur.

Mezonefrik ve paramezonefrik kanallar, embriyonik gelişimin 8. haftasına kadar hem erkek hem de dişi embriyolarda bir arada bulunan ayrı primordiyumlardır. İntrauterin gelişimin 8. haftasından sonra sadece bir tür genital kanal sistemi normal olarak devam ederek özel kanal ve salgı bezlerini oluştururken, diğeri işlevsel olmayan kalıntılar dışında üçüncü fötal ayda kaybolur [18]. Embriyoda Y kromozomu varlığında ve SRY proteininin ifadesi sonucunda Sertoli hücrelerinin farklanması başlar ve gonadın gelişimi testis olacak şekilde yönlendirilir [14]. Sertoli hücreleri tarafından spesifik olarak ifade edilen anti-Müllerian hormonun (AMH) etkisi altında, embriyonik gelişimin 8. ve 10. haftaları arasında paramezonefrik kanallar hızla geriler ve kaybolur [19-21]. Gonadal sırtın sölomik epitelinden (epitelden mezenkimale geçiş sonucu) ya da mezonefroz-gonadal sınırdan kaynaklanan mezenkimal hücrelerden köken aldığı düşünülen interstisyel Leydig hücrelerinin, gelişimin 8. haftasında ortaya çıkması ve testosteron sentezi yapmaları sonucunda mezonefrik kanallar uyarılır ve epididimis, vas deferens ve seminal vezikül yapılarını oluşturacak şekilde ileri yönde farklanır [22, 23].

Dişi embriyoda Y kromozomu bulunmadığından SRY proteini üretilmez. Dolayısıyla, somatik destek hücrelerinden Sertoli hücrelerinin farklanması gerçekleşmeyeceğinden, AMH sentezi de yapılamaz bu nedenle mezonefrik tübüller ve mezonefrik kanallar dejenere olur [14]. Ancak mezonefrik kanalın kalıntıları apendiks vesiküloza, epooforon ve parooforon veya Gartner kanalı şeklinde bulunabilir [24]. Ayrıca testosteron eksikliği mezonefrik kanalların gerilemesine neden olurken, paramezonefrik kanalların ileri yönde farklanarak tuba uterina, uterus, serviks ve vajinanın üst üçte birlik kısmının oluşumuna neden olur [25].

Paramezonefrik kanallar, embriyonik gelişimin 8. haftasında, kaudal yönde uzar ve pelvik bölgeye ulaştıklarında, mezonefrik kanalları ventralde çaprazlayarak orta hatta birbirleriyle kaynaşırlar ve Y şeklindeki uterovaginal taslağı oluştururlar [13, 15, 26]. Uterovaginal

taslak, ürogenital sinüsün arka duvarının içine uzanarak, burada yükselti şeklinde bir kabartı olan paramezonefroz (Müller) tüberkülünü meydana getirir [13, 27]. Müller tüberkülünün oluşmasından sonra embriyonik gelişimin 9. haftasında, paramezonefrik kanallar arasında bulunan septum, kanalların bazal membranlarının birbiriyle kaynaşmasıyla ortadan kalkar böylece uterovaginal kanalın oluşumu tamamlanır ve bu kanalın her tarafı tek katlı silindirik epitelle döşelidir [7, 15, 28]. Uterovaginal taslak uterusun; korpus, fundus, isthmus ve serviksinin yanı sıra vajinanın üst üçte birini oluşturur [7, 27, 29]. Ayrıca, paramezonefrik kanalların lateralinden kemikli pelvisin lateral duvarına doğru uzanan ve uterusun geniş (broad) ligamenti adı verilen geniş ve transvers bir peritoneal kat oluşur [30]. Paramezonefrik kanalların kaynaşmamış olan kraniyal dikey ve yatay parçaları ise tuba uterinaları meydana getirir [7]. Kanalların distal sonlarında bulunan huni biçimli yapı tuba uterinaların infundibulumunu oluşturur ve sölom boşluğuna açılırlar [7, 14].

Uterusun endometriyum epiteli ve bezleri uterovaginal taslaktan gelişir ve gebeliğin 20. haftasında uterus mukozası endometriyuma tamamen farklılaşır [7, 18]. Rudimenter bezler tek katlı silindirik epitel ile döşeli sığ çıkıntılar olarak gelişir. Bezler 18.haftaya kadar endometriyal stroma içinde uzar ve dallanır [31]. Epitelin altında yer alan uterus stroması ve miyometriyum tabakasının düz kasları ise paramezonefrik kanalları çevreleyen splanknik mezodermden köken alır [7, 32]. Geniş ligamentin tabakaları arasında yer alan mezenkim çoğalır, farklanır ve gevşek bağ dokusu ve düz kastan oluşan perimetriyumu meydana getirir [13].

2.2. Uterus Anatomisi

Uterus rektumun önünde, mesanenin arkasında vajinanın üst kısmında medial olarak yer alan, pelvik kavitenin tabanına yakın olarak konumlanmış armut şeklinde, içi boş, kalın duvarlı ve kaslı bir organdır. Uterusun şekli ve konumu gebelik sırasında önemli ölçüde değişse de, gebe olmayan durumda yaklaşık 7 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde ve 2,5 cm çapında olup, ortalama 60 g ağırlığındadır [33, 34]. Uterus, anatomik ve fonksiyonel olarak corpus uteri ve cervix uteri olmak üzere iki parçadan oluşur. Corpus uteri, uterusun üst üçte ikisini meydana getiren bölümü olup fundus uteri ve isthmus uteri'den oluşur [35]. Tuba uterina'ların corpus uteriye her iki lateral taraftan giriş yaptığı bölge cornu uteri'dir ve bu bölgenin üst kısmında kubbe şeklinde olan fundus uteri yer alır [36]. Fundus uteri'nin ön ve arka yüzü peritonla tamamen örtülü olup ince bağırsak kıvrımlarına komşudur [37].

Uterusun corpus uteri ve cervix uteri'yi birleştiren daralmış kısımı isthmus uteridir ve yaklaşık 1 cm uzunluğundadır [35]. Isthmus uteri ve cervix uteri'nin birleşme yerinde bulunan açıklığa ise internal os denir [38]. Corpus uteri'nin ortasında bulunan boşluk cavitas uteri olarak isimlendirilmiş olup, koronal düzlemde üçgen şeklindedir ve taban kısmı fundus uteri'ye, tepesi ise canalis cervicis uteri'ye yönelmiştir. Yaklaşık 6 cm uzunluğundadır. Ön köşelerine tuba uterinalar açılır ve açıldıkları bölgedeki deliklere ostium uterinum tubae uterinae denir [39, 40]. Normal durumda bir yetişkinde uterus anteversiyon ve antefleksiyon durumundadır. Mesane boşken cervix uterinin, vagina ile dik bir açı oluşturmasına uterusun anteversiyonu, corpus uteri'nin cervix uteri üzerine doğru eğik pozisyonda olmasına ise uterusun antefleksiyonu denir [38, 41].

Corpus uteri'nin mesaneye komşu olan ön yüzü fascies vesicalis olarak isimlendirilir ve bu yüz, isthmus uteri'ye kadar periton ile örtülüdür. İsthmus uteri'de periton mesane üzerine atlar ve iki organ arasında excavatio vesicouterina adı verilen sığ bir kese oluşturur [39, 42]. Uterusun ince bağırsaklarla komşu olan arka yüzeyine ise fascies intestinalis denir. Peritonla örtülüdür ve vaginanın arka yüzünün üstünü bölümünü de örttükten sonra rektuma geçerek uterus ile arasında bir çıkmaz oluşturur [37]. Uterus'un alt ve vaginanın üst-arka kısmıyla rektum arasında oluşan bu çıkmaza excavatio rectouterina (Douglas çıkmazı), bu çıkmazı oluşturan plikaya da plica rectouterina (Douglas plikası) denilir. Douglas çıkmazı genellikle ince bağırsak kıvrımlarını içerir [39, 43].

Uterus'u iki periton yaprağından oluşan periton kıvrımları veya fibröz dokudan meydana gelen, ligamentum latum uteri (broad ligament), ligamentum teres uteri (round ligament), lig. transversum cervicis (kardinal ligament), ligamentum ovarii proprium (utero-ovaryan ligament), ligamentum pubocervicale (puboservikal ligament) ve ligamentum sacrocervicale (uterosakral ligament), gibi pek çok ligament tarafından desteklenir [44]. Lig. latum uteri, uterusun lateral kenarlarından pelvik lateral duvarlara uzanan, iki periton yaprağından oluşan kıvrımdır. Mesosalpinx, mesovaryum ve mesometriyum olmak üzere üç kısımdan oluşur [44, 45]. Mesosalpinx, lig.latum uteri'nin superior serbest kısmıdır. Medialde, ligamentum ovarii proprium'a (ovaryan ligament), superiorda tuba uterina'ya ve lateralde ligamentum suspensorium ovarii'ye bağlanır. Mezonefrik kanalların kalıntıları olan epoophoron ve paroophoron mesosalpinxde yer alır Ayrıca uterin ve ovaryan damarlar arasındaki anastomozları da çevreler [45, 46]. Mesovaryum, lig. latum uteri'nin en küçük parçası olup, ovaryumlara bağlanan posterior uzantısıdır [35]. Mesometriyum ise lig. latum

uteri'nin en geniş parçası olup, corpus uteri'den lig. ovarii proprium'a kadar uzanır. Lig. teres uteri aynı zamanda, uterus arteri ve venini, ovaryumun asıcı ligamenti olan ovaryum arteri, veni, sinir pleksusu ve lenf damarlarını içeren ligamentum suspensorium ovarii'yi (infundibulopelvik ligament), pelvik üreterin alt parçasını, serviksin supravjinal kısmını mesaneden ayıran fibröz bağ dokusu yapısındaki parametriyumu, uterovaginal pleksusun bir parçası olan Frankenhauser gangliyonunu, uterin lenf damarlarını içerir [40, 46].

Lig. teres uteri, lig. latum uteri'nin iki yaprağı arasında cornu uteri'nin dış kısmından öne ve laterale doğru uzanan, embriyonik gubernakulumun bir kalıntısı olup lig. ovarii proprium ile devamlılık gösterir [47, 48]. Derin inguinal halkadan canalis inguinalis'den geçerek labium majus'un bağ dokusunda sonlanır [44, 48]. Corpus uteri'den gelen lenfatikler, yüzeysel inguinal düğüm grubuna ulaşmak için içinden geçer [37, 48]. Ayrıca, uterin arterin bir dalı olan Sampson arteri de bu ligamentin içinde bulunur [34]. Morfolojik olarak lig. teres uteri'nin devamı olan lig. ovarii proprium, ovaryumları uterusa bağlayan ligamenttir ve lig. latum uteri'nin katmanları arasında uzanan fibromüsküler kord benzeri bir yapıdadır [43, 46]. Ovaryumun iç kutuplarından yukarı ve içe doğru geçerek tuba uterinaların tutunma seviyesinin altında arkada cornu uteriye ulaşır [48].

Lig transversum cervicis, lig. pubocervicale ve lig. sacrocervicale uterusu taşıyan üç önemli ligamenttir ve uterusa pasif destek sağlar. Aktif destek ise diyafram tarafından sağlanır [35, 44]. Lig. transversum cervicis (Mackenrodt ligamenti), cervix uteri'den pelvisin lateral duvarlarına uzanan ve vajinanın üst kısmına yapışan, lig. latum uteri'nin tabanında bulunan parametriyumun kalınlaşması olup, uterusun pasif desteğinde önemli rol oynayan bir ligamenttir [40, 43]. Esas olarak perivasküler bağ dokusundan oluşur [49] İnternal iliak arterin yakınında tutunarak, uterus ve vajinayı besleyen damarları çevreler. Uterin arter, uterus'a giderken bu ligamentin içinden geçer ve burada üreteri üstten çaprazlar [40, 50]. Lig. pubocervicale, cervix uteri'yi pubis kemiğinin arka yüzüne asan sıkı bağ dokusundan oluşan ligamenttir [40, 43]. Lig. sacrocervicale ise uterusu cervix uteri seviyesinde sakruma bağlar ve fibromüsküler yapıda bir ligamenttir [36, 39]. Bu ligamentler bağ dokusu, küçük damar demetleri ve otonom sinirlerden ve bir miktar düz kastan oluşur [51].

Uterus esas olarak, internal iliak arterin anterior bölümünün bir dalı olan a.uterina ve kısmen de abdominal aortanın dalı olan a.ovarica tarafından beslenir [39, 44]. A. uterina, lig. latum uteri'nin tabanından, medial olarak cervix uteri'ye doğru uzanarak seyri sırasında lateralde

üreteri çaprazlayarak geçer ve burada üreter, vajina ve servikse giden alt dallara ayrılır [52]. İsthmus seviyesinde servikal dal, a.vaginalis ile anastomoz yapar [53]. A. uterina'nın çıkan dalı ise corpus uteri'nin boyunca her iki tarafta da devam eder ve organın orta hattında birbiriyle anastomoz yapan, aa. arcuatae anteriores ve posteriores adı verilen arterlere ayrılır [52]. Bu arterler miyometriyum tabakasını besler ve endometriyuma uzanan rami radiales'i verir [39]. Rami radies'in dalları, mukozada bulunan ve endometriyal siklusdan morfolojik olarak etkilenen spiral dalları rr. helicini uterinae'lere ayrılır [37, 40]. A. uterina'nın çıkan dalı ayrıca uterusun süperolateral açısında laterale doğru dönerek, tuba uterina ve ovaryuma dallar gönderir [52] A. uterina'nın tubal dalları tuba uterina'yı beslerken, ovaryan dalı ise a. ovarica ile anastomoz yaparak sonlanır [39, 52]. Uterus venleri genellikle kendi arterlerine eşlik eder ve internal iliak venlere akar, ancak aynı zamanda pelvik pleksus yoluyla vajina ve mesane venleriyle de ilişki kurar [41].

Uterus'un lenf damarları birkaç yol izler. Fundus uteri'nin ve corpus uteri'nin üst kısmından gelen lenf damarlarının çoğu, ovaryum damarları boyunca sırasıyla pre-aortik, para-aortik, eksternal iliak ve yüzeysel inguinal lenf düğümlerine boşalırken, corpus uteri'nin alt kısmından gelen lenf damarları ise lig. latum uteri yoluyla eksternal iliak lenf düğümlerine boşalır [52, 54]. Cervix uteri'nin lenf drenajı ise, eksternal, internal iliak lenf düğümlerine ve ayrıca uterosakral ligamentler boyunca sakral lenf düğümlerine doğru olur [54]. Uterus'un mukozal tabakası olan endometriyum, bazal tabakada bulunan lenf damarlarıyla beslenir. Endometriyumun bazal tabakasından gelen lenf damarları, subserozal pleksusa ulaşmak için kan damarlarıyla yakın ilişki içinde miyometriyumdan geçerler [37]. Miyometriyumda ise lenf damarlarının sayısı serozal yüzeye doğru artar ve hemen altında bol miktarda lenf pleksusu oluşturur [34].

Uterus'un sinirleri lig. latum uteri içinde yer alan ve inferior hipogastrik pleksus'dan türevlenen, uterovaginal pleksus'dan gelir ve içinde Frankenhauser gangliyonu olarak isimlendirilen bir gangliyon bulunur [35, 40]. Uterus ayrıca sempatik ve parasempatik lifler açısından zengindir. Sempatik lifler, medulla spinalisin T12-L2 segmentlerinden gelir ve corpus uteri'nin vazokonstriksiyona ve kasılmaya, S2-S4 segmentlerinden geşen parasempatik lifler ise corpus uteri'de vazodilatasyona ve gevşemeye neden olur [40, 52]. Ağrı, corpus uteri'den sempatik lifler aracılığıyla, serviks uteri'den de pelvik splanknik sinirler aracılığıyla taşınır [52].

2.3. Uterus Histolojisi

Uterus'un duvarı histolojik olarak, organın dış kısmından lümenine doğru perimetriyum (tunika seroza/adventisya), miyometriyum (tunika muskularis) ve endometriyum (tunika mukoza) olmak üzere üç tabakadan meydana gelir. Perimetriyum, uterusun anteriyor bölümünün bir kısmını, posteriyor yüzeyinin ise tamamını kaplar ve burada tunika seroza özelliğindedir [55]. Tunika seroza, tek katlı yassı epitelden oluşan mezotel tabakası ve altında elastik liflerden zengin ince bir gevşek bağ dokusu tabakasından meydana gelir. Uterus'un geri kalan anteriyor yüzeyi bağ dokusu özelliğinde olan tunika adventisya ile kaplıdır [55, 56]. Uterus'un en kalın tabakası olan miyometrium, venöz pleksuslar ve lenf damarlarını içeren, bağ dokusu lifleri ile birbirinden ayrılmış düz kas liflerinden oluşur [57]. Miyometriyum, birbirinden net sınırlarla ayırt edilemeyen ve rutin histolojik kesitlerde rasgele düzenlenmiş gibi görünen, üç düz kas tabakasından meydana gelir [55, 58].

Orta kas tabakası, en kalın tabaka olup dairesel olarak düzenlemiş düz kas liflerinden oluşmaktadır ve bu tabaka arkuat arterleri barındıran, kan damarlarından zengin bir tabaka olduğundan stratum vaskülare olarak da isimlendirilir [59]. Miyometriyumun iç ve dış düz kas tabakaları ise uzunlamasına (longitudinal) düzenlenmiş düz kas liflerini içermektedir [60]. Bu tabakaları meydana getiren düz kas hücrelerinin boyut ve sayısı östrojen düzeyleri ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle gebelik sırasında yüksek miktarlarda üretilen ve salgılanan östrojene yanıt olarak düz kas hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi görülür [61]. Böylece gebelik sırasında uterus büyük ölçüde genişler ve düz hücrelerinin uzunluğu yaklaşık olarak 500 μm'ye ulaşır. Ayrıca, bağ dokusunda da artış meydana gelir. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde ise fetüsün büyümesinden dolayı uterusun duvarı gerilir ve gittikçe incelir [55]. Gebeliğin sonlarına doğru, miyometriyumda bulunan düz kas hücreleri arasında çok sayıda sıkı bağlantı gelişir ve bu bağlantılar doğum sırasında kas hücrelerinin koordineli kasılmasına olanak sağlar [59]. Doğum esnasında kortikotropik hormonun etkisiyle miyometriyum ve fetal membranlar prostaglandinleri üretir, nörohipofizden oksitosin hormonu salgılanır [62]. Böylece uterusun güçlü bir şekilde kasılması uyarılarak fetüsün ve daha sonra da plansetanın atılması sağlanmış olur. Doğumdan sonra uterus hemen hemen orijinal boyutuna geri döner ancak gebelik öncesine göre uterin kavite daha büyük olup miyometriyum daha kalındır. Bazı düz kas lifleri dejenere olsa da çoğu orijinal boyutlarına geri döner [55]. Endometriyum, uterusun en iç tabakası olup, organın lümenine komşudur. Epitel ve lamina propria'dan meydana gelir. Epitel tek katlı prizmatik epitel olup,

mikrovilluslu salgı hücreleri ve silli hücreler olmak üzere iki tip hücre içerir [63].Yüzey epiteli derin invajinasyonlar yaparak lamina propria'ya doğru uzanan çok sayıda basit tübüler yapıdaki uterus bezlerini meydana getirir [63, 64]. Bez hücreleri de yüzey epiteline benzer şekilde tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir ancak daha az sayıda silli hücre içerir [55]. Yüzey epitelinin hemen altında yer alan lamina propria, endometriyal stroma olarak da isimlendirilir ve mezenkimal bağ dokusuna benzer [59]. Endometriyal stromada yıldız şekilli, geniş ve oval çekirdekli hücreleri, fibroblastları, makrofajları, lenfositleri ve granüler lökositleri bulunur [56]. Retiküler lifler ve hücreler arası madde açısından zengindir. Ayrıca tip III kollajen lifleri de içermektedir [62]. Endometriyumun üçte ikisi yüzeyel bir tabaka olan fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonale), üçte biri ise miyometriyuma komşu olan bazal tabaka (stratum bazale) olmak üzere yapısal ve fonksiyonel olarak iki ana tabakadan oluşur [63, 65]. Stratum fonksiyonale, östrojen ve progesterona yanıt olarak ayda bir kez menstruasyon sırasında dökülür ve yenilenir [59, 66]. Stratum bazale ovaryum hormonlarından etkilenmez ve menstruasyon sırasında korunur [61]. Ancak menstruasyon sırasında dökülen stratum fonksiyonale'nin yenilenmesi için bir hücre kaynağı olarak varlığını sürdürür [67]. Miyometriyumun orta tabakasında bulunan arkuat arterler endometriyum içerisine yalnız stratum bazale'yi besleyen düz arterler ve daha ileriye uzanarak stratum fonksiyonale'yi besleyen, progesterona duyarlı spiral arterler olmak üzere iki grup arter yollar [57]. Düz arterler kısayken, spiral arterler ise uzun, kıvrımlı ve kalın duvarlıdır [68]. Spiral arterler, genişlemiş, ince duvarlı pek çok vasküler lakünayı içeren kapiller pleksusu besleyen çok sayıda arteriyole dallanır [51]. Kapiller pleksus ise daha sonra efferent venlere drene olur [69]. Düz arterlerin ve spiral arterlerin proksimal kısımları değişmezken, östrojen ve progesteronun etkisiyle spiral arterlerin distal kısımları her menstrual siklusta dejenerasyona ve sonrasında rejenerasyona uğrar [55].

Bir kadının üreme hayatı boyunca endometriyum ve miyometriyum, uterusun embriyo implantasyonuna hazırlanması için ovaryum döngüsünün evreleriyle ilişkili olarak her ay siklik değişikliklere uğrar [55, 67]. Bu değişikliklere menstrual siklus denir ve ortalama olarak bir menstrual siklus süresinin 28 gün olduğu kabul edilir. Menstrual siklus proliferatif (folliküler), sekretuar (luteal) ve menstruasyon evresi olmak üzere üç evreden meydana gelir. Proliferatif evre, menstrual kanamanın kesildiği 4. günde başlar ve 14. güne kadar sürer [62]. Ovaryum folliküllerinden salgılanan östrojenin kontrolü altında stratum bazale'de bulunan bez epiteli hücrelerinin kalıntıları ve stromal hücreler çoğalmaya başlar [56]. Bezlerin bazal kısımlarında bulunan hücreler göç eder ve yeni yüzey epitelini oluşturur. Sekretuar evre için

gerekli olan sitoplazmik organellerin yanı sıra mikrovillus ve sil yapılarını kazanırlar [68]. Stromal hücreler ise lamina propriyayı yeniden yapılandırır ve ayrıca glikojen biriktirirler [59, 69]. Böylece stratum fonksiyonale yeniden oluşturulur ve endometriyumun kalınlığı artmaya başlar [62]. Proliferasyon evresinin sonlarına doğru endometriyum kalınlığı 2-3 mm'ye ulaşır [66]. Uterus bezleri, proliferatif evrenin başlangıcında dar, ve neredeyse boş olan lümenleri ile düz tüpler halindedir [57]. Ancak endometriyumun kalınlığı arttıkça bezler uzar, çapları artar ve kıvrımlı bir hal alırlar [58, 62]. Bezlerle eş zamanlı olarak spiral arterler de stratum bazale'den uzayarak kıvrılırlar ve endometriyumun yaklaşık üçte ikilik kısmına kadar uzanırlar [56, 69].

Ovulasyon, menstrual siklusun 14-16. günlerinde gerçekleşir [70]. Ovulasyondan kısa bir süre sonra, ovayumlardaki korpus luteum'dan salgılanan progesteronun kontrolü altında sekretuar evre başlar ve 28. güne kadar sürer [56, 63]. Progesteron'un etkisiyle uterus bezleri uzar, genişler, kıvrılarak tirbüşon şekilli hale gelir [55, 57]. Menstrual siklusun 16. gününde glikoprotein ve glikojenden zengin olan mukoid karakterdeki salgı ürünleri önce bez epiteli hücrelerinin bazal kısımlarında birikmeye vakuoller halinde başlar ve hücre çekirdekleri merkeze doğru yer değiştirmeye başlar [68, 69]. Salgı ürünlerinin miktarı artar ve daha sonra hücrelerin apikal kısımlarına doğru yer değiştirir, yuvarlaklaşmış çekirdekler bazalde lokalize olur [69, 70]. Salgı, hücrelerin apikal kısımlarından etrafı hücre membranı ile çevrili olacak şekilde yani apokrin tipte salgılama yoluyla bezin lümenine verilir [70]. Glikojen bakımından zengin olan bu salgı, implantasyonun gerçekleşmesi halinde, plasenta oluşumundan önce embriyoyu besler ve gelişimini destekler [56, 62]. Uterus bezlerinin geniş lümenleri testere dişi benzeri görünüm kazanır ve salgı ürünleri dolduğu için kesecikli hale gelir [55, 71]. Uterus bezlerine paralel seyreden spiral arterlerin boyu uzar, endometriyumun yüeyine kadar uzanırlar ve daha fazla sarmal hale gelirler [55, 60]. Stromada vaskülaritenin artması, stromal ödem ve uterus bezlerinin artan glikojen salgılarının bir sonucu olarak endometriyum yaklaşık 6-8 mm olacak şekilde maksimum kalınlığına ulaşır [61, 62, 71]. Sekretuar dönemin sonunda stratum fonksiyonale hafif ödemli olan, yüzeye yakın ince ve bezlerin düz boyun kısımlarını içeren kompakt tabaka ve onun hemen altında daha derin yerleşimli yoğun ödemli, lamina propria'nın bağ dokusu ile sarılı testere dişi görünümlü bezlerin kıvrımlı kısımlarını içeren spongiyöz tabaka olmak üzere, iki tabakalı hale gelir [56, 72].

Oosit'in fetilizasyonu ve embriyonik implantasyon gerçekleşmezse, korpus luteum 10 gün daha aktif olarak progesteron üretmeye devam eder ancak daha sonra kanda progesteron düzeyleri azalmaya başlar [73]. Progesteron düzeylerindeki düşmeye bağlı olarak, stratum fonksiyonele'ye kan desteğinde değişiklikler meydana gelir [55]. Menstruasyondan başlamadan önce, spiral arterlerin duvarlarında aralıklı olarak meydana gelen kontraksiyonlar, stratum fonksyionale'nin oksijenlenmesini sekteye uğratır, lokal hipoksiye sebep olan prostaglandinlerin sentezinde artış olur ve bu arterler iskemik hale gelir [57, 60]. Stratum bazale ise doğrudan düz arterler tarafından kanlandırılır ve menstrual evre sırasında korunur [59]. Spiral arterlerde meydana gelen bu değişikliklerle eş zamanlı olarak, bezlerin salgılaması durur, lökositlerin invazyonu görülür, stromada ödem azalır ve endometriyum yükseklik olarak büzüşür [55, 62]. Yaklaşık iki gün sonra spiral arterlerde uzun süreli vazokonstriksyonları takiben aniden meydana gelen vazodilatasyon sonucunda damar duvarlarında yırtılmalar olur ve kan stromaya akar [59, 74]. Böylece stratum fonksiyonale endometriyumdan ayrılır ve bu tabakaya ait stroma ve epitel hücrelerini içeren nekrotik doku, kan ve vajinal akıntı uterus boşluğuna menstrual akıntı ya da olarak mens atılır [55, 60, 66]. Menstrual siklusun 1. günü başlar ve 4-5 gün sürer ve endometriyum kalınlığı yaklaşık 1 mm'ye iner [55, 67, 69]. Menstrual kanama periyodu boyunca yaklaşık 35-50 mL kan kaybedilir. Menstrual evreden sonra yeni bir menstrual siklus başlar.

2.4. Fertilizasyon ve Yarıklanma

Dişi ve erkek üreme hücrelerinin (gametlerin) birbiriyle birleşip kaynaşması anlamına gelen fertilizasyon (döllenme) sonucunda yarısı anneden, diğer yarısı babadan gelen kromozom kombinasyonuna sahip olan zigotu oluşturur [7, 27]. Fertilizasyon, tek bir olaydan çok birbirini takip eden karmaşık bir süreci ifade eder. Bu süreç, spermin korona radiata hücrelerine penetre olmasıyla başlar, zona pellusida (ZP) ve oosit membranlarının geçilmesinden sonra anne ve babadan gelen kromozomların birbirine karışmasıyla sona erer [8, 75, 76]. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için dişi genital sistemde gelişen oosit ile erkek genital sistemden gelen spermin ortak bir alana taşınması gerekir.Ovulasyon esnasında tuba uterina'nın fimbriyaları ovaryumlara yaklaşır ve ritmik olarak ovaryum yüzeyini süpürmeye başlar. Böylece etrafında bulunan kumulus hücreleriyle birlikte oosit tuba uterina'ya alınır [8]. Tuba uterina'nın duvarında bulunan düz kasların kontraksiyonları ve sillerin hareketiyle oosit, döllenmenin gerçekleşeceği yer olan tuba uterina'nın ampulla bölgesine ulaşır [77, 78]. Spermin taşınması ise dişi genital kanalda asidik bir ortam olan vajinanın üst kısmında

başlar, bazik bir ortama sahip olan servikse geçiş ile devam eder, uterus miyometriyumunun düz kaslarının kasılmasıyla spermler utero-tubal bölgeye ulaşır, tuba uterina'nın isthmus bölgesinde kapasitasyonun tamamlanmasından sonra oositle karşılaşacakları yer olan tuba uterina'nın ampulla bölgesinde sonlanır [65, 73]. Kapasitasyonunu tamamlamış spermin geçmesi gereken korona radiata, zona pellusida ve oosit membranı olmak üzere üç bariyer bulunmaktadır. Yalnızca kapasitasyonunu tamamlamış olan spermler bu bariyerleri geçebilir.

Sperm, oositle karşılaştığında ilk olarak oositi çevreleyen, radyal düzenlenim gösteren ve yüksek miktarda hiyalüronik asit içeriğine sahip hücreler arası madde içeren korona radiata hücreleriyle temas eder [8, 75]. Sperm başından salgılanan hyalüronidaz enzimi, oosit etrafındaki korona radiata hücrelerini uzaklaştırır ve bu hücreler arasından spermiyuma yol açmayı sağlar [7]. Ayrıca spermlerin kuyruk hareketleri ve tuba uterina mukozasından kaynaklanan enzimlerin de korona radiata'yı aşmada etkili olduğu düşünülmektedir [13]. Korona radiata'yı geçen sperm, zona pellusida ZP1, ZP2 ve ZP3 glikoproteinlerinden ZP3'e bağlanır [73]. Böylece sperm plazma membranı ile dış akrozomal membran birleşir, başta akrozin olmak üzere sperm başından salınan nöraminidaz, asit proteinaz, arilsülfataz, kollajenaz, esteraz, beta galaktozidaz, beta glukronidaz, hyalurinidaz, fosfolipaz c, tripsin benzeri madde gibi akrozomal enzimler sperm başı çevresinde bulunan bölgeden zona pellusida'yı eriterek spermin geçmesini sağlar ve bu olaya akrozomal reaksiyon adı verilir [13, 79, 80]. Sperm zona pellusida'yı geçerek perivitellin aralığa ulaştığında, sperm başının arka kısmını çevreleyen membran ve oosit membranının birleşmesi (füzyonu) gerçekleşir [81]. Membranların füzyonu için sperm membranında bulunan Fertilin-β, İzumo-1 ve oosit membranında bulunan CD9 ve α6β1proteinlerinin etkileşimleri önemli rol oynar [82-85]. Sperm başı ve kuyruğu oosit sitoplazmasına girerken membranı dışarda oosit membranına bağlı olarak kalır [13, 79]. Boyun kısmında bulunan mitokondriler oosite girerler ancak zigotun işlevsel mitokondri birimine dahil olmazlar [79].

Spermin oositin membranına temas etmesiyle oolemmanın depolarizasyonu oosite birden fazla spermin girmesini yani polispermiyi engelleyen hızlı ve geçici bir elektriksel blok oluşturur [27, 55]. Ayrıca zona pellusida'nın yapısında da değişiklik meydana gelir. Sekonder oositin oolemmasının hemen altında yer alan kortikal granüller yüzeye doğru hareket ederek oolemma ile kaynaşır ve bu granüllerden lizozomal enzimler, perivitellin aralığa salgılanarak zona pellusida'da bulunan sperm reseptör moleküllerini hidrolize eder,

bu olaya zona reaksiyonu denir [27, 55, 62]. Böylece polispermiye karşı ikincil olarak bir hızlı polispermi bloğu oluşturulur [73].

Sekonder oosit, spermin sitoplazması içine girmesine kortikal ve zona reaksiyonları ile cevap vermesinin yanı sıra ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve bunun sonucunda hemen hemen hiç sitoplazmaya sahip olmayan, perivitellin aralığa atılan, ikinci polar cisim ve olgun (matür) oosit olmak üzere iki hücre meydana gelir [27, 59]. Ayrıca oositin aktivasyonu gerçekleşir, solunum zincir reaksiyonları ve metabolizması hızlanır [79]. Bu değişikliğe sebep olan mekanizma mekanizma anlaşılmamış olmamasına rağmen, hücre içi kalsiyum iyonlarının salımının olayların başlamasına neden olduğu düşünülmektedir [65].

Olgun oositin kromozomları (22+X), dişi pronükleusu oluşturacak şekilde veziküler çekirdekte yeniden düzenlenir [27]. Oosit sitoplazması içindeki spermin başı, orta parça ve kuyruktan ayrılır [80]. Sperm çekirdeğinde bulunan kromatinin sıkıca paketlenmesini sağlayan protaminler ortadan kalıdırılmasından sonra kromatin gevşeyerek çekirdek içinde yayılır ve şişmiş çekirdek erkek pronükleusu meydana getirir [79]. Haploid (n) sayıda kromozom içeren dişi ve erkek pronükleuslar büyümeleri sırasında DNA miktarını ve kromatidlerini iki katına çıkarırlar [13]. Böylece her bir pronükleusda iki kromatid bulunur [27, 80]. Bunu yapmadıkları takdirde iki hücreli olan zigotun her bir hücresi, normalde sahip olması gereken DNA miktarının yalnızca yarısına sahip olacaktır [27, 81].

Pronükleuslar birbirlerine yaklaşırlar ve çekirdek membranları yıkılır. İki çekirdeğin kromozomları birbirine karışarak zigotu meydana getirir [7]. Daha sonra kromozomlar kendilerini ortak bir mitotik mekikte hizalarlar [55, 81]. Anne ve babadan gelen kromozomlar (23 çift) sentromerlerinden uzunlamasına ayrılarak oluşan yavru kromotidler, karşı kutuplara doğru kayar, hücre yüzeyinde bir yarık meydana gelir ve iki hücre oluşur [27]. Fertilizasyon sonucunda; sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar, kromozomların diploid sayısının restorasyonu gerçekleşir, embriyonun kromozomal cinsiyeti belirlenir, zigotun mitotik bölünmesi başlatılır, embriyo polaritesinin ve çift taraflı simetrisi belirlenir ve genetik çeşitlilik sağlanır [27, 80].

Fertilizasyondan 24 saat sonra oluşan zigotun, hızlı bir şekilde art arda tekrarlanan mitotik bölünmeler geçirerek artan sayıda daha küçük hacimli hücreler oluşturması sürecine yarıklanma denir [14]. Yarıklanma sonucu oluşan her bir hücreye ise blastomer adı verilir

ve yarıklanma, zona pellusida ile çevrili olan zigot, tuba uterina'dan geçerek uterin kaviteye doğru hareket ederken devam eder [7, 86]. Üçüncü yarıklanmanın tamamlanmasından sonra, 8 hücreli evrede blastomerler birbirleriyle daha sıkı bir temasa geçerek, kompakt bir hücre topluluğu meydana getirirler [27]. Bu olaya kompaksiyon adı verilen bu yeniden düzenlenme, E-kadherin-katenin kompleksini içeren hücre adezyon glikoproteinleri aracılık eder [86]. Ferilizasyondan üç gün sonra yeniden yarıklanan zigot, 16 hücreli dut benzeri bir görünüm alarak morula'ya dönüşür ve hala zona pellusida ile çevrilidir [27, 80].

2.5. Blastosist Oluşumu ve İmplantasyon

Morula, fertilizasyondan yaklaşık 4 gün sonra uterin kaviteye ulaştığında dış kısımda bulunan blastomerlerde yer alan Na^+ K^+-ATPaz (sodyum potasyum ATPaz) transport sistemi tarafından uterusdan aktarılan, Na^+ (sodyum) ve su içeren sıvının zigotun iç bölümlerine taşınmasıyla içinde blastosel veya blastosist boşluğu adı verilen bir boşluk oluşmaya başlar [7, 13, 79]. Embriyonik gelişimin bu aşamasındaki embriyo blastosist adını alır [27]. Morula'nın merkezindeki blastomerler iç hücre kitlesini, bunların etrafında bulunanlar ise dış hücre kitlesini meydana getirir [8]. Dış hücre kitlesindeki hücreler daha sonra plasentayı oluşturacak olan trofoblasta farklanırken, iç hücre kitlesindeki hücreler ise ileride embriyonik dokuları meydana getirecek olan embriyoblasta farklanır [70]. Blastosist'in iç hücre kitlesinin bağlı bulunduğu tarafa embriyonik kutup, karşı tarafına ise abembriyonik kutup adı verilir [76]. Embriyo implantasyonu embriyonik kutup tarafında bulunan trofoblastlar tarafından gerçekleştirilir [7]. Blastosist yaklaşık 2 gün boyunca uterus salgılarının içinde yüzer ve boyutları da artmaya devam eder. Fertilizasyondan 4 gün sonra incelmeye başlamış olan zona pellusida, fertilizasyondan sonra 5. günde dejenere olarak kaybolur [80]. Zona pellusidanın uzaklaştırılması, trofoblastlardan salgılanan tripsin-benzeri bir enzim ile zonada açılan bir delik sayesinde meydana gelir ve blastosist bu delikten dışarı çıkar [79]. Eğer zona pellusida'nın uzaklaştırılması başarısız olursa embriyo uterus epiteline implante olamaz [60].

İmplantasyon, embriyonun uterusun endometriyal yüzeyine tutunması, uterus epiteli ve ardından plasentayı oluşturmak için maternal dolaşımı invaze etmesi süreci olarak tanımlanır [87]. Endometriyumun blastosisti kabul edebilme yeteneği (reseptivite), "implantasyon penceresi" olarak bilinen sınırlı bir zaman aralığında meydana gelebilmektedir [88, 89]. İmplantasyon penceresi, 28 günlük normal menstrual döngünün 20-24. günlerine karşılık

gelen veya luteinize edici hormon (LH) pikinden sonraki 5-10 gün ile sınırlıdır [90]. Bu süre boyunca, ovaryum steroid hormonları tarafından başlatılan doğru bir morfolojik ve fonksiyonel duruma sahip olduğu göz önüne alındığında, insan endometriyumu blastosist tutunması için hazırlanır [91]. Başarılı implantasyon, reseptif bir endometrium, blastosist gelişim aşamasında normal ve fonksiyonel bir embriyo, maternal ve embriyonik dokular arasında senkronize bir diyalog gerektirir [92].

İmplantasyon, ovulasyondan yaklaşık 9 gün sonra, 6 ile 12 gün arasında gerçekleşir ve apozisyon, adezyon (bağlanma) ve invazyon (penetrasyon) olmak üzere üç farklı aşamaya ayrılır [2, 93]. Zona pellusidasından ayrılmış olan blastosist implantasyon için uygun yeri seçerek bu bölgeye doğru yakınlaşmaya başlar [92]. Trofoblast hücrelerinde ifade edilen L-selektin ile uterusda ifade edilen oligosakkarit ligandları arasındaki etkileşimin, implantasyondaki ilk adımı oluşturabileceği düşünülmektedir [94]. Beyaz kan hücrelerinde ifade edilen L-selektin, bu hücrelerin endotelden dokulara geçmeden önce endotel boyunca yuvarlanarak endotele sıkıca tutunmasını sağlar [95]. Embriyonun uterus yüzeyine apozisyonu bu nedenle lökositlerin yuvarlanma davranışına benzer [94]. Bununla birlikte, apozisyon, trofoektodermin, kayma gerilimine karşı kararsız olan uterus epiteli ile yalnızca zayıf bir etkileşimidir. Apozisyon geri dönüşümlüdür, dolayısıyla blastosistin uterusta yeniden konumlandırılmasına izin verir [96, 97]. Ayrıca apozisyon sırasında uterus lümen epiteli mikrovilluslarını kaybeder ve apikal yüzeyinde pinopodlar olarak adlandırılan çok sayıda, geniş ve düz küçük çıkıntı gelişir ve trofoblast yüzeyindeki mikrovilluslar aracılığıyla blastosist ile iç içe geçer [98-100]. Pinopod oluşumu progesterona hormonuna bağımlıdır ve menstrual siklusun sekretuar fazında bu homonun seviyesinin yükselmesiyle pinopodların ortaya çıkışı arasındaki ilişki literatürde belirtilmiştir [101, 102].

Apozisyonda endometriyumdan ve embriyodan eş zamanlı olarak çok sayıda sitokinler ve büyüme faktörü salınır [92]. İmplantasyonda rol oynayan önemli bir sitokin olan LIF (Lösemi inhibitör faktör), östrojen etkisinin ana aracısı olan IL-6 (İnterlökin-6) sitokin ailesinin bir üyesi olup, endometriyumda ifadesi embriyonun endometriyumu tanıması için bir mesaj özelliği taşır [87, 103]. Ayrıca embriyo invazyonuna karşı bir bariyer görevi gören hücre-hücre bağlantı moleküllerinin de aşağı yönde düzenlenmesi yoluyla uterus lümen epitelini proliferatif durumdan farklılaşmış bir duruma geçmesini sağlar [87]. HB-EGF (Heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü), implantasyon sırasında embriyo ve uterus etkileşiminin erken döneminde aracılık yapan bir büyüme faktörüdür [92]. Çözünür büyüme

faktörünü serbest bırakmak üzere işlenebilen bir transmembran proteini olarak sentezlenir ve her iki form da blastosisti, bir jukstakrin yapışma faktörü olarak blastosist yüzeyinde ifade edilen EGF (Epidermal büyüme faktörü) reseptör ailesi aracılığıyla etkiler [104]. Ayrıca blastosist büyümesini ve blastosistin zona pellusida'dan çıkmasını da destekler [105]. İfadesi pinopodlarla eş zamanlı olup, reseptif uterus epitelinde maksimum düzeydedir [106].

İmplantasyonun bir sonraki aşaması olan adezyonda blastosist ve uterus epiteli arasında fiziksel etkileşim artmıştır ve stabil bağlanma gerçekleşir. Stabil bağlanmaya blastosist trofoektodermi ve endometriyal lümen epitelinde ifade edilen hücre adezyon molekülleri (integrinler, kadherinler ve immünoglobulinler) aracılık eder [107, 108]. İntegrinler, α ve β olmak üzere iki alt birimden oluşan ve hücre yüzeyi reseptörleri olarak görev yapan transmembran glikoproteinlerdir. Menstrual döngüye özgü olan integrinler endometriyumda luteal fazın ortalarında ifadeleri artar ve implantasyon penceresinin önemli bir belirteci olarak kabul edilirler [109]. İmplantasyon penceresinde integrin ifadesi eksikliğinin, kadınlarda açıklanamayan infertiliteye neden olabileceği öne sürülmüştür [110]. Kadherinler, kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon mekanizmasında yer alan bir glikoprotein ailesi olup hem trofoblastlarda hem de endometriyal epitelde E-kadherin varlığı, bu glikoproteinin ilk adezyon sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir [111, 112]. Ig süper ailesi üyeleri, homofilik veya heterofilik bağlanma özelliğiyle hücre-hücre adezyonuna aracılık eder [92]. ICAM-1, integrinler için bir ligand görevi görür ve implantasyon sürecinde endometriyal epite hücrelerin apikal yüzeylerinde ifade edilir [113, 114].

İmplantasyonun son aşaması olan invazyonda amaç küçük, yüksek dirençli damarları büyük, düşük dirençli damarlarla değiştirerek, fetüs ve anne arasında kan akışını sürdürecek olan maternal spiral arterleri yeniden yapılandırmaktır [87]. Blastosist, embriyoblastın bulunduğu embriyonik kutuptaki, trofoblastların olduğu bölgeden endometriyuma yapışır ve trofoblastlar hızla çoğalarak sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast olmak üzere iki tabakaya farklanır [7, 27]. Sinsityotrofoblastlar ile bitişik endometriyal epitel hücreleri arasında ince kıvrımlar gelişmeye başlar ve böylece endometriyal epitel hücrelerinin bazal membran bozulmaya başlar [115, 116]. Sonunda sinsityotrofoblastlar, endometriyal stromada bulunan maternal spiral arterlerin duvarını yok ederek ve bu damarları sinüzoidal keselere dönüştürür [117]. Trofoblast invazyonu sırasında çinko bağımlı matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin birer üyesi olan ve uterus bazal membranında bulunan tip IV kollajenin

yıkılmasından sorumlu olan MMP-2 (Matriks metalloproteinaz-2) ve MMP-9 proteinazlar önemli bir rol oynar [87, 118]. Gebeliğin erken döneminde trofoblast hücrelerinin bazal membranı invazyon davranışları kötü huylu tümör hücrelerine benzemektedir ancak tümör invazyonundan farklı olarak trofoblast invazyonunun uterusda sınırlandırılması ve kontrollü olarak sürdürülmesi gerekir [87]. MMP'ler, metalloproteinazların endojen doku inhibitörleri olan (TIMP) tarafından düzenlenir ve MMP/TIMP oranı genellikle hücre dışı matriks yıkımının ve dokunun yeniden şekillenmesinin derecesini belirler [119]. Trofoblastik invazyonundaki yetersizlikler, intrauterin büyüme kısıtlaması ve preeklampsi gibi olumsuz gebelik sonuçlarına yol açar [120].

2.6. Desidualizasyon

Desdiualizasyon, endometriyumun stromal kompartımanının gebeliğe uyum sağlamak için geçirmesi gereken dönüşümü ifade eder. Menstrual döngünün orta sekretuar fazı sırasında (implantasyon penceresinin başlangıcında, ovulasyon 6 gün sonra) yüksek progesteron seviyelerinin bir sonucu olarak, endometriyumun üst üçte ikilik kısmındaki spiral arterleri çevreleyen stromal hücrelerle, bir embriyonun varlığına veya yokluğuna bakılmaksızın başlar [121, 122]. Uterus stromasındaki uzamış, fibroblast benzeri mezenkimal hücrelerin yuvarlak, epiteloid benzeri hücrelere yani desidual hücrelere farklılaşırlar. Desidual hücreler ince yapı düzeyinde incelendiğinde, genişlemiş ve yuvarlak çekirdekler, çok sayıda çekirdekçik, salgı granülleri, sitoplazmada birikim yapan glikojen ve lipid damlacıkları, granüllü endoplazmik retikulum ve genişlemiş Golgi kompleksi içerdikleri görülmüştür [122, 123]. Bu hücrelerde gap junction tipi bağlantılar bulduğu da yine ince yapı yine düzeyinde izlenmiştir [124]. Ayrıca desidual hücreler fibronektin, laminin, tip IV kollajen, dekorin ve heparan sülfat gibi hücreler arası matriks proteinlerini üretirler [122, 125, 126]. Desidual hücreler, trofoblastlar tarafından salgılanan ve hücreler arası matriksin yıkımında rol oynayan MMP'lerin proteolitik aktivitelerini antagonize etmek ve endometriyumu invaziv hasardan korumak için TIMP'ler üretir. Böylece trofoblastların invazyon kapsamını sınırlar [127].

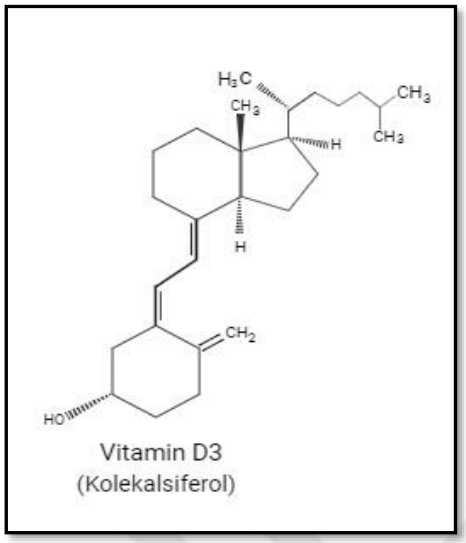
Desidua, yarı allojenik fetal-plasental birime karşı immün toleransın sağlanmasında bütünleyici bir rol oynar ve embriyoyu annenin bağışıklık sisteminden korur [128, 129]. Desidualize insan endometrial stromal hücreleri, mikro çevreye katkıda bulunur ve doğrudan veya dolaylı olarak immün hücre alımını, dağılımını ve işlevini etkiler [129, 130] Gebeliğin

erken döneminde desiduada uNK (uterus doğal katil hücresi)'lerinin sayısında artış gözlenir [131, 132]. Bu hücreler, sekretuar faz sırasında ve gebeliğin erken döneminde desidual dokuda bulunan lökositlerin yaklaşık %70'ini oluşturur [131, 133]. Sitotoksik değildirler ve gebeliğin ilk üç ayında desidual dokunun yeniden şekillenmesi, anjiyogenez ve trofoblast invazyonunun kontrolü olmak üzere immün olmayan işlevlere sahiptir [132].

Reaktif oksijen türevleri, normal hücresel metabolizmada yer alır ve endometriyumdaki hücreler tarafından sürekli olarak üretilir [134]. Fetal-maternal arayüz, gebelik sırasında oksijen geriliminde kapsamlı değişikliklere maruz kalır ve çok sayıda hücre içi reaktif oksijen türevi oluşumunu indükler [135]. Desidual hücreler, insan endometriyal stromal hücrelerle karşılaştırıldığında, oksidatif hasarına karşı oldukça dirençlidir ve gebeliğin bu çevresel stres faktörlerine karşı korunmasını sağlar [122, 136].

Desidual hücreler, embriyonun büyümesi ve hayatta kalabilmesinde kritik bir öneme sahip olan endometriyal damar sisteminin yeniden şekillenmesini ve gelişimini destekler. Endometriyumda anjiyogenezde önemli roller oynayan birkaç anjiojenik faktör tanımlanmıştır [137-140]. Bu faktörler, VEGF, ANGPT'ler (Anjiyopoietin), fibroblast büyüme faktörü, trombospondin, relaksin, adrenomedullin, prostaglandinler, prokinetikinler, anjiyogenin ve stromal hücre kaynaklı faktör 1'dir [141-147]. VEGF, fizyolojik ve patolojik vasküler yeniden şekillenmenin anahtar bir aracısıdır [148-150]. Kadın cinsiyet hormonlarının, insan endometriyal stromal hücrelerinde VEGF mRNA ve protein ifadesini düzenlediği gösterilmiştir [151-153]. Anjiyopoietinler, endotel hücrelerde spesifik olarak ifade edilen bir reseptör tirozin kinaz olan Tie2 için ligand olarak tanımlanmıştır [154]. Anjiyopoietinler, endometriyumda anjiyogenez ve damar yeniden şekillenmesinin destekleyen ikinci olarak önemli olan faktör olup VEGF ile etkileşime girer [155]. Sonuç olarak, gebelik boyunca devam eden desidualizasyon insan endometriyumunda meydana gelen kritik ve dikkat çekici olaylardan biridir. Bu sürecin bozulması infertilite, tekrarlayan düşükler ve utero-plasental bozukluklar olmak üzere gebelikte çeşitli sorunlara yol açar [156-158].

2.7. D Vitamini



Şekil 2.1. D vitamininin kimyasal yapısı.

D vitamini, klasik olarak kemik metabolizması ve kalsiyum homoeostazındaki anahtar rolü ile tanınan bir sekosteroiddir. D vitamininin yaklaşık %80-90'ı deride güneş ışığının neden olduğu üretimden kaynaklanır. Vücudun toplam D vitamininin küçük bir kısmı da diyet ve/veya takviyelerinden elde edilir [159]. D vitamini D_2 ve D_3 olmak üzere iki formda bulunur. D_2, maya sterolü ergosterolün UV (ultraviyole) ışınlarına maruz kalmasıyla elde edilir ve güneşe maruz kalan mantarlarda doğal olarak bulunur ancak insanlar D_2 vitaminini üretemezler [160]. D3 vitamini ise, lanolinden, kolesterol yolağında normal bir aracı olan ve ciltte bulunan, 7-dehidrokolesterolün ultraviyole ışınlarına maruz kalmasıyla üretilir. UV-B radyasyonu, 7-dehidrokolesterolün provitamin D_3'e dönüşmesine neden olur [161] Pro-vitamin D_3 ise kendiliğinden kolekalsiferole (vitamin D_3) izomerize olur [155]. D vitamini (D_2 ve D_3 formlarının her ikisi de) plazmada D vitamini bağlayan proteine (DBP) bağlanarak ince bağırsaklarda enterositler tarafından absorbe edildikten sonra, lenfatik sistem ve venöz kana emilen şilomikronlara içinde taşınır [162]. Şilomikronlar portal dolaşım ile karaciğere ulaşır ve burada yan zincirin C25 pozisyonunda 25-hidroksilaz enzimi (CYP2R1) ile hidroksilasyona uğrar ve dolaşımdaki başlıca D vitamini türevi olan 25-hidroksivitamin D (25 (OH)D) oluşturulur [162, 163]. Daha sonra 25(OH)D böbrekte distal tübüllerde, 1α-hidroksilaz (CYP27B1) enzimiyle aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D3'e (1, $25(OH)_2D_3$) dönüştürülür [156]. 1, $25(OH)_2D_3$'ün böbrekte üretimi, plazma paratiroid hormonu seviyeleri, serum kalsiyum ve fosfor seviyeleri tarafından sıkı bir şekilde

düzenlenir [164-167]. Ayrıca kemikten salgılanan fibroblast büyüme faktörü - 23 (FGF-23), 1, 25$(OH)_2D_3$ sentezini baskılar [168]. Böbrek ve ince bağırsaklardaki kalsiyum ve fosforun emilimi 1, 25$(OH)_2D_3$ varlığında artar [165, 166, 169]. Hem 25 (OH)D hem de 1, 25$(OH)_2D_3$, 25-hidroksivitamin D-24-hidroksilaz (CYP24) enzimi tarafından biyolojik olarak inaktif ve suda çözünebilen kalsitroik asit halinde katabolize edilir ve safra yoluyla atılır [165-167, 170]. 1,25$(OH)_2D_3$'ün aktifliği 25(OH)D'den birkaç yüz kat fazladır. Ancak serum 25(OH)D düzeyi, 1,25$(OH)_2D_3$ düzeyinden 1000 kat fazladır bu nedenle D vitamini durumunu en iyi yansıtan gösterge serum 25(OH)D düzeyidir [171].

2.7.1. Gebelikte D vitamini eksikliği

D vitamini eksikliği, yetersizliği ve normal düzeyleri için uluslararası ve ulusal literatür, ülkeler ve kuruluşlar farklı değerler belirtmektedir. Ülkemizde ve Avrupa'da serum 25(OH)D düzeylerinin 25 nmol/L'den düşük olması D vitamini eksikliği durumu olarak kabul edilirken, Amerika'da Tıp Enstitüsü'ne (IOM) göre ise 30 nmol/mL'den düşük serum 25(OH)D düzeyi D vitamini eksikliği olarak kabul edilmektedir [172-174]. Yakın zamanda yapılan sistematik derlemede Amerikalıların %64'ünde ve 59'unda, Avrupalıların %57'inde ve %23'ünde gebelik sırasında 50 ve 25 nmol/L'nin altındaki 25(OH)D konsantrasyonların rapor edildiğini göstermiştir [175]. Ülkemizde ise gebelerde ve doğurganlık çağındaki kadınlarda D vitamini eksikliğinin %46-80 arasında olduğu; bu yüksek oranın yetersiz D vitamini alımı ve yaşam tarzına bağlı olarak güneşin UV ışınıyla karşılaşılmasında yetersizlik gibi nedenlerden kaynaklandığı belirtilmektedir [176-178]. Son 20 yılda D vitamini eksikliğinin anne ve bebeğin ortak sorunu olduğu üzerinde durulmaktadır. Gebelerde D vitamini eksikliğinin; klinik gebelik ve canlı doğum elde etme olasılığında azalma, erken spontan gebelik kaybı, erken doğum riski ve gebelik yaşına göre küçük doğan bebeklerde artışa neden olduğu bildirilmiştir [179-185]. Çeşitli incelemeler ve meta-analizler, düşük serum 25(OH)D konsantrasyonlarının gebelikte preeklampsi gibi hipertansif bozukluklar, gestasyonel diyabet, çocukluk çağı astımı, alerjik rinit, hırıltılı solunum ve solunum yolu enfeksiyonları ve egzema için de risk faktörü oluşturduğu fikrini desteklemektedir [186-191]. Ayrıca, D vitamini durumunun beyin gelişimi, bilişsel işlev için önemli olabileceğini ve otizm spektrum bozuklukları riskini azaltabileceğini öne süren bazı araştırmalar da bulunmaktadır ancak veriler kesin değildir [192-194].

2. 8. Osteopontin

Osteopontin, ağırlığı 70 kDa olan, ilk olarak kemik matriksinden izole edilmiş, salgılanan glikozile bir fosfoproteindir ve adezyon proteini olarak sınıflandırılır [195]. Aynı zamanda böbrekler, gastrointestinal sistem sekresyonları, meme, testis, uterus, plansenta, lökositler ve metastastik kanser hücreleri tarafından da ifade edilir [196-200]. Osteopontin'in amino asit dizisinin analizi, hücre yüzey reseptörlerine adezyonunda rol oynadığını gösteren, korunmuş bir arginin-glisin-aspartik asit (RGD) sekansının varlığını ortaya çıkarmıştır [201]. RDG bölgesi aracılığıyla osteopontin hücre adezyonunu, yayılmasını ve göçünü desteklemek için αvβ3, αvβ1, αvβ5, α4β1, α5β1, α8β1 ve α9β1 gibi birçok farklı integrin reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir [202-204]. Osteopontin normal fertil kadınlarda menstrual siklusun proliferatif ve erken sekretuar fazı sırasında düşük konsantrasyonlarda ifade edilirken orta ve geç sekretuar fazda ifadesinin maksimum düzeye ulaştığı mikrodizi taraması ile doğrulanmıştır [205-207]. Bu proteinin mRNA'sının endometriyumun yüzey epiteli, bez epiteli ve sekresyonlarında lokalize olduğu, uterus lümenine salgılandığı ve implantasyon penceresi sırasında αvβ3 integrinle aynı anda epitelde ifade edilmesi edilmesi blastosist adezyonunda rol oynadığını ve bununla birlikte osteopontin ifadesinin perivasküler stroma hücrelerin desidualleşmeye başladığı sekretuar evrenin sonunda arttığını da ortaya koymuştur [207, 208]. Ayrıca fare ve insan endometriyal stromal hücrelerinde osteopontin'in östrojen ve progesteron tarafından aktive edildiği de gösterilmiştir [207, 209]. Osteopontin eksikliği olan fareler, düşük gebelik oranına sahiptir ve fare endometriyal stromal hücrelerinde osteopontin'in yıkılması, in vitro olarak trofoblast invazyonunda kısıtlamaya yol açmıştır [209, 210]. Bu çalışmalar osteopontin'in blastosist implantasyonu ve desidualizasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

2.9. Matriks metalloproteinaz- 9 (MMP-9)

Matriks metalloproteinazlar, dokuların yeniden şekillendirilmesinde rol oynayan çinko bağımlı proteazlardır [55, 56]. Matriks metalloproteinazlar yaygın olarak kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilizinler, membran tip matriks metalloproteinazlar ve diğer matriks metalloproteinazlar olmak üzere substratlarına ve yapısal alanlarına göre sınıflandırılırlar [57]. MMP'ler, pro-MMP'leri oluşturmak için translasyon sırasında sinyal peptidinin çıkarıldığı pre-proMMP'ler olarak sentezlenir. Zimojen formdaki pro-MMP'lerin aktivasyonu proteolitik bölünme yoluyla veya oksidasyonla tiyol grubunun modifiye

edilmesiyle meydana gelir [58]. Genel olarak, matriks metalloproteinazlar ya hücrelerden salgılanır ya da heparan sülfat glikozaminoglikanlar gibi proteoglikanlar tarafından plazma membranına sabitlenir [59]. MMP'ler bağ dokusu, proinflamatuar fibroblastlar, osteoblastlar, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, lökositler ve sitotrofoblastlar ve uteroplansetal hücreler olmak üzere birden çok doku ve hücre tarafından üretilirler [60]. Kollajen ve elastin dahil olmak üzere hücre dışı matriksdeki çeşitli proteinleri yıkarlar [57]. Normal gebelik sırasında ekstravillöz trofoblastlar, maksimum vazodilatasyonla embriyoya yeterli besin kaynağı sağlamak için maternal desiduayı invaze eder ve spiral arterleri yeniden şekillendirir. Dolayısıyla desidual stromaya trofoblast invazyonu hücre dışı matriks proteinlerinin MMP'ler gibi proteolitik enzimler tarafından parçalanmasını gerektir. Gebelik sırasında trofoblastik ve desidual dokular tarafından üretilen TIMP'ler aktive edilmiş matriks metalloproteinazlar üzerinde engelleyici bir etkiye sahiptir, bu nedenle aşırı trofoblast invazyonu sınırlar [58]. Matriks metalloproteinazların üretimi ve TIMP'ler tarafından inhibisyonu arasındaki denge normal gebeliğin sürdürülmesinde önemlidir. Matriks metaolloproteinazların jelatinazlar sınıfında bulunan MMP-9 (Jelatinaz B), menstrual döngü ve gebelik sırasında endometriyal dokunun yeniden şekillendirilmesinde rol oynar [61-63]. MMP-9, trofoblastlarda yüksek oranda ifade edilir ve aktivitesi trofoblast hücre invazivliği ile ilişkilidir [64-67].

2.10. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü - A (VEGF-A)

VEGF, yeni kan damarlarının gelişmesi anlamına gelen anjiyogenez sürecinin ana aracısı olan endotel hücreleri üzerinde etki ederek bu hücrelerin, proliferasyonunu ve göçünü yönlendirir [211, 212]. Bu büyüme faktörü kemik oluşumu, hematopoez, yara iyileşmesi gibi normal fizyolojik işlevlerin yanı sıra tümör gelişimi ve metastazı inflamatuar süreçler (örneğin; romatoid artrit), iskemi, preeklampsi gibi patolojik olaylarda da rol oynamaktadır [212-217]. Vasküler endotel büyüme faktörü ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PIGF (plasental büyüme faktörü) olmak üzere beş üyeden oluşur ve bunların reseptörleri (VEGFR1 ve VEGFR2), endometriyum ve diğer dokularda vasküler büyüme ve yeniden şekillenmenin temel aracılarıdır [218, 219]. VEGF'nin ana tipi olan VEGF-A'nın vasküler geçirgenliği güçlendirdiği ve vazodilatasyonu indüklediği bilinmektedir [220]. Ayrıca damar tonusunu düzenler, endotel hücre apoptozunu baskılar, vasküler adezyonu, trombosit agregasyonunu ve trombozu inhibe eder [221]. Bu özelliklerinin yanı sıra VEGF-A, endometriyal reseptivite, embriyo ve plasenta gelişimindeki rolleriyle de iyi tanınmaktadır

[211]. Desidual anjiyogenez ve erken post-implantasyon döneminde damar sisteminin korunması, normal gebelik gelişimi için mutlak bir gerekliliktir. Yeni oluşan desidual damar sisteminin, plasenta işlevsel olarak yetkin hale gelene kadar gelişen embriyo için ilk değişim aparatı olarak hizmet ettiği düşünülmektedir [222]. VEGF'den yoksun fareler, bozulmuş anjiyogenez ve vaskülojenez nedeniyle gebeliğin ortasından önce ölür [213, 223]. Ayrıca in situ hibridizasyon çalışmaları VEGF-A/VEGFR2 yolağına ait sinyal bileşenlerinin erken post-implantasyon periyodu sırasında desiduada ifade edildiğini göstermektedir [224]. Dolayısıyla, implantasyon ve plasenta oluşumunun erken aşamalarında yeterli anjiyogenez ve vaskülogenezin sağlanması için VEGF-A ifadesi maternal desidua ve plasentada sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu dengenin bozulması implantasyon başarısızlığına ve gebelik kaybına katkıda bulunabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu ‘nun G.Ü.ET-21.077 sayılı onayıyla, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi ‘nde gerçekleştirildi. Çalışmada, 4 haftalık (70-90 g ağırlığında), Sprague Dawley albino cinsi 16 dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, rastgele 2 gruba ayrıldı, 12 saat karanlık/ 12 saat aydınlık döngüsünde 22-24 °C sıcaklıkta içme suyuna serbest erişecek şekilde barındırıldı.

3.1. Deneysel Yöntemler

3.1.1. Deney grupları

Kontrol Grubu (n=6): 9 hafta boyunca D vitamini içerecek şekilde formüle edilmiş standart rat yemi ile beslendi Bu gruptaki denekler, standart aydınlatma (Ultraviyole B ışığı yayan floresan aydınlatma) koşulları altında ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde tutuldu. Denekler çiftleşmenin tespit edilmesinden sonraki 8. günde sakrifiye edildi.

D vitamini eksikliği oluşturulan grup (n=10): 9 hafta boyunca D vitamini içermeyecek şekilde formüle edilmiş rat yemi ile beslendi. Ayrıca bu gruptaki 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. Bu gruptaki denekler, çiftleşmenin tespit edilmesinden sonraki 8. günde sakrifiye edildi.

3.1.2. Deneklerin östrus sikluslarının belirlenmesi

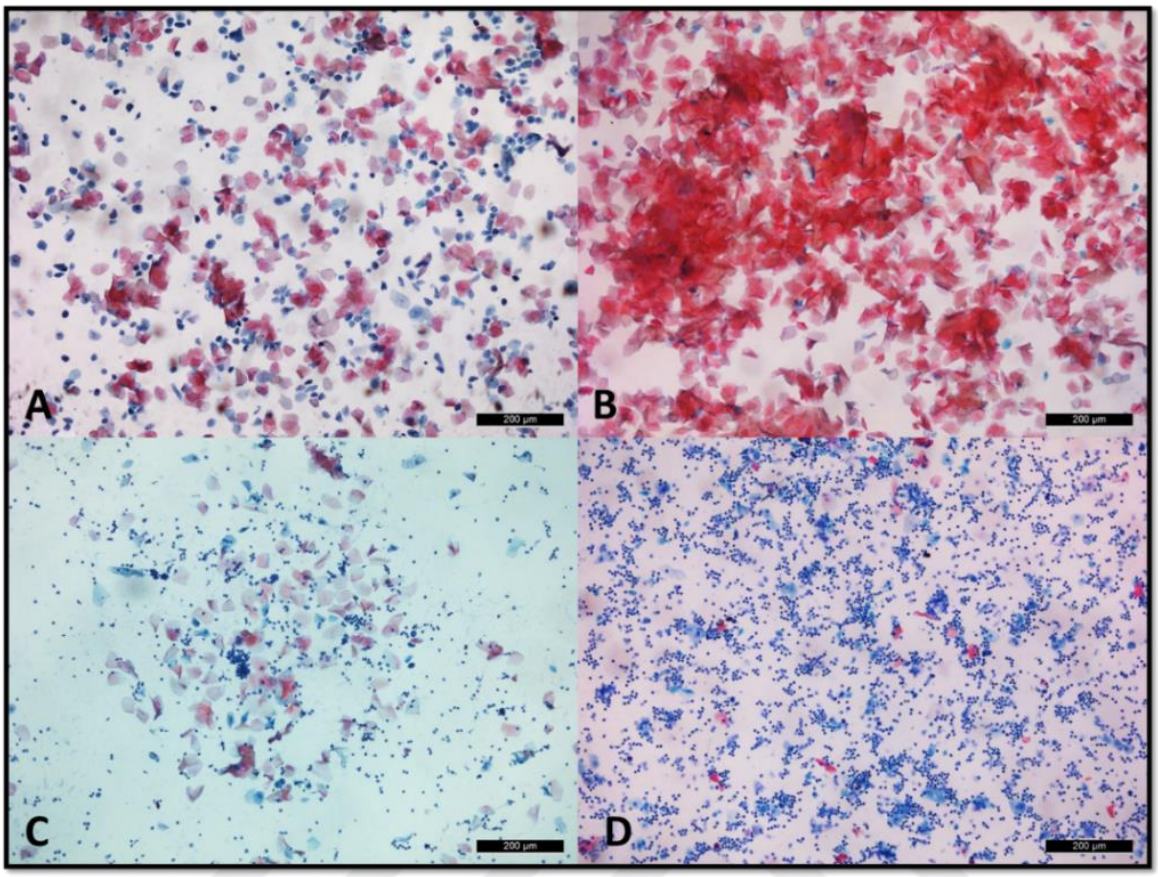
Deneklerden 6. haftanın bitiminden itibaren östrus sikluslarının takip edilmesi için amacıyla vajinal smear örnekleri toplandı. Vajinal smear örnekleri her gün sabah aynı saatte (09.00-10.00) serum fizyolojikle ıslatılan eküvyon çubuğu yardımıyla alındı. Lamlar üzerine yayılan smear örnekleri kurumadan üzerlerine alkol içeren fiksatif sprey (Atom Scientific, RRSP50/B) püskürtülerek, yaymadaki hücrelerin tespiti sağlandı. Deneklerden bütün yayma örnekleri toplandıktan sonra havada kurutulan lamlar 2 dakika boyunca %96’lık alkol çözeltisine bekletildi. Daha sonra 2 dakika boyunca distile suda yıkandı ve çekirdek

boyaması için 1 dakika Harris Hematoksilen'e alındı. Akarsu 5 dakika boyunca boyanın fazlası giderildikten sonra 15 saniye %96'lık etanole daldırıldı. Orange G boya çözeltisine alınan preparatlar 4 dakika bu çözeltide boyandıktan sonra tekrar %96'lık etanole alınarak 30 saniye bekletildi ve sonrasında EA50 boya çözeltisine alınan 8 dakika boyunca boyandı. Örnekler tekrar %96'lık etanole alınarak 15 saniye bekletildikten sonra tekrar %96'lık etanole alınarak 30 saniye bekletildi. Son olarak 2'şer kez 30 dakika ksilende tutuldu ve entellanla kapatıldı (Tablo 1).

Boyanan örnekler ışık mikroskobu altında incelenerek östrus siklusunun evreleri, nötrofillerin, keratinleşmemiş (kornifiye olmamış) çekirdekli epitel hücrelerinin ve çekirdeklerini kaybetmiş kornifiye, epitel hücrelerin vajinal yaymada bulunma sıklığı, boyanma özellikleri ve dağılımlarına bakılarak değerlendirildikten sonra sınıflandırma yapılmıştır. Nötrofiller koyu bazolofilik, çekirdekli kornifiye olmamış epitel hücreleri açık mavi, çekirdeksiz kornifiye epitel hücreleri ise kırmızı, pembe veya turuncu renkte boyanma özelliği göstermiştir. Nötrofillerin bulunmadığı, çekirdekli ve çekirdeksiz kornifiye epitel hücrelerinin eşit miktarlarda bulunduğu yaymalar proöstrus, nötrofil içermeyen, çekirdeksiz kornifiye epitel hücrelerinin çekirdekli epitel hücrelerinden sayıca fazla olduğu yaymalar östrus, nötrofiller, çekirdekli ve çekirdeksiz kornifiye epitel hücrelerinin birlikte görüldüğü yaymalar metöstrus, çok sayıda nötrofil ve daha az miktarda çekirdekli ve çekirdeksiz epitel hücrelerinin görüldüğü yaymalar ise diöstrus olarak değerlendirildi [225] (Resim 3.1).

Çizelge 3.1. Papanicolaou (PAP) boyama protokolü

PAPANİCOLAOU (PAP) BOYAMA PROTOKOLÜ	
Madde	Süre
%96 Etanol	2 dakika
Distile Su	2 dakika
Harris Hematoksilen	1 dakika
Akar Su	5 dakika
%96 Etanol	15 saniye
Orange G6 çözeltisi	4 dakika
%96 Etanol	30 saniye
EA50 çözeltisi	8 dakika
%96 Etanol	15 saniye
%96 Etanol	1 dakika
Ksilen	30 dakika x 2 tekrar



Resim 3.1. Deneklerin östrus siklus evrelerinin ışık mikroskobik görüntüleri. A) Nötrofillerin bulunmadığı, çekirdekli ve çekirdeksiz kornifiye epitel hücrelerinin eşit miktarlarda bulunduğu proöstrus evresi. B) nötrofil içermeyen, çekirdeksiz kornifiye epitel hücrelerinin çekirdekli epitel hücrelerinden sayıca fazla olduğu östrus evresi. C) Nötrofiller, çekirdekli ve çekirdeksiz kornifiye epitel hücrelerinin birlikte metöstrus evresi. D) Çok sayıda nötrofil ike karakterize, daha az miktarda çekirdekli ve çekirdeksiz epitel hücrelerinin görüldüğü diöstrus evresi (Papanicolaou, 100x).

3.1.3. Deneklerin katıma alınması ve çiftleşmenin kontrol edilmesi

Östrus siklusları takip edilen ve östrusta olduğu belirlenen dişi sıçanların yanına daha önceden çiftleştiği ve yavru oluşturduğu bilinen erkek sıçanlar, dişi/erkek oranı 2/1 olacak şekilde 24 saat süreyle katıma alındı. Ertesi gün yeniden dişi sıçanlardan vajinal smear örnekleri alınarak PAP boyama yapıldı ve smearlerde sperm varlığına incelendi. Vajinal smearlerinde sperm belirlenen ve makroskobik gözlemde vajinal plak oluşturduğu izlenen dişi ratlar gebeliğin 1. gününde kabul edildi.

3.1.4. İmplantasyon alanlarının toplanması

Sıçanlardan gebeliğin 8. gününde, sakrifikasyondan önce D vitamini ölçümü için kan alındı. İmplantasyon alanlarının toplanması için uterus dokuları disseke edildi ve elde edilen alanlar PCR analizi için sıvı nitrojene, histokimyasal analizler için %10'luk nötral formaldehite alındı. Kontrol grubunda 6 denek, deney grubunda ise 9 denek gebe kaldı.

3.2. Histokimyasal Yöntemler

3.2.1. Histokimyasal değerlendirme için dokuların hazırlanması

Toplanan implantasyon alanları, %10'luk nötral tamponlu (pH=7.4) formaldehitte tespit edildi. Ardından rutin ışık mikroskobik doku takibine alındı ve elde takip edildi. Kısaca implantasyon alanları önce artan konsantrasyonlarda alkollerden (%70, %80, %96 ve %100) 2 saat bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Şeffaflandırma için ksilolde 25 dakika bekletildikten sonra yarı yarıya ksilol-parafin karışımında 45 dakika tutularak dokular parafine alıştırıldı. Daha sonra dokular parafinde 3 saat bekletildikten sonra gömme işlemi yapılarak bloklandı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Doku takip protokolü

MANUEL DOKU TAKİP PROSEDÜRÜ		
Aşama	Madde	Süre
Fiksasyon	%10 nötral tamponlu Formaldehit	24 saat
Fiksatiften arındırma	Akarsu	16 saat
Dehidratasyon	%70	2 saat
	%80	2 saat
	%96	2 saat
	%96	2 saat
	%100	2 saat
	%100	2 saat
Şeffaflandırma	Ksilol	25 dakika
	Ksilol + Parafin karışımı (%50-%50) etüvde	45 dakika
	Sıvı parafin (etüvde)	3 saat

3.2.2. Hematoksilen eozin boyama

Parafin bloklardan 4-5µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon için 60°C'de etüvde 1 saat bekletildi. Ardından ikişer kez 15 dakika ksilene alınan dokular

şefflandırıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %80, %70 ve %50) geçirildi ve akar suda 10 dakika boyunca yıkandı. Kesitler, çekirdek boyaması için 15 dakika boyunca Harris Hematoksileninde bekletildi ve sonrasında akar suda 10 dakika boyunca yıkama yapıldı. Daha sonra lamlar %3'lük glasiyel asetik asit çözeltisine alınarak 2-3 dip yapıldı ve tekrar 10 dakika boyunca akar suda yıkandı. Sitoplazma boyaması için kesitler 17 dakika süre ile Eozin çözeltisine alındı. Boyanın fazlasının giderilmesi amacıyla akar suda tekrar yıkama yapıldı. Preparatlar daha sonra artan alkol serilerinde (sırasıyla %50, %70, %80, %96 ve %100) 1-2 dakika bekletilerek hava kurutuldu ve ikişer kez 15 dakika ksilene alınan dokular entellan ile kapatıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ		
Aşama	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüv	1 saat
Şeffaflandırma	1. Ksilen	15 dakika
	2. Ksilen	15 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	15 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
	%3'lük glasiyel asetik asit	2-3 dip
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Eozin	17 dakika
Yıkama	Akar su	1-2 dakika
Dehidratasyon	%50 etanol	1-2 dip
	%70 etanol	1-2 dip
	%80 etanol	1-2 dip
	%96 etanol	1-2 dip
	%100 etanol	1-2 dip
Şeffaflandırma	Ksilen	15 dakika
	Ksilen	15 dakika
Kapama	Entellan	

3.2.3. Masson'un üçlü boyaması

Kesitler deparafinizasyon için 60°C'de etüvde 1 saat bekletildi. Ardından ikişer kez 15 dakika ksilene alınan dokular şefflandırıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %80, %70 ve %50) geçirildi ve distile suda 10 dakika boyunca yıkandı. Kesitlerin boyanmasında Masson'un üçlü boyamasına yönelik geliştirilmiş olan Masson's Trichrome Stain-Anilin Blue (Lot: 21221, Bio-Optica, İtalya) kit kullanıldı. İlk olarak

Weigert Hematoksilen A ve B solüsyonları eşit miktarda karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca çekirdek boyaması yapıldı. Daha sonra kesitler silkelenerek pikrik asit alkol solüsyonuna 4 dakika boyunca etkin bırakıldı ve distile su ile hızlıca yıkanarak, Ponceau asit fuksin solüsyonu 4 dakika boyunca uygulandı. Tekrar distile su ile yıkamanın ardından fosfomolibdik asit solüsyonu ile 10 dakika boyunca mordantlaştırıldı. Kesit daha sonra yıkama yapılmadan silkelendi ve anilin mavisi solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkamanın ardından, artan alkol serilerinden 1-2 dip yapılarak hızla geçirildi ve iki şer kez 15 dakika ksilende bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Masson'un üçlü boyaması protokolü

MASSON'UN ÜÇLÜ BOYAMASI PROTOKOLÜ		
Aşama	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüv	1 saat
Şeffaflandırma	1. Ksilen	15 dakika
	2. Ksilen	15 dakika
Dehidratasyon	%100 etanol	7 dakika
	%96 etanol	7 dakika
	%80 etanol	7 dakika
	%70 etanol	7 dakika
	%50 etanol	17 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Boyama	Weigert Hematoksilen (A + B)	10 dakika
	Pikrik asit alkol solüsyonu (C)	4 dakika
Yıkama	Distile su	1-2 dakika
	Ponceau asit fuksin solüsyonu (D)	4 dakika
Yıkama	Distile su	1-2 dakika
	Fosfomolibdik asit solüsyonu (E)	10 dakika
	Aniline Blue solüsyonu	5 dakika
Yıkama	Distile su	1-2 dakika
Dehidratasyon	%50 etanol	1-2 dip
	%70 etanol	1-2 dip
	%80 etanol	1-2 dip
	%96 etanol	1-2 dip
	%100 etanol	1-2 dip
Şeffaflandırma	1. Ksilen	15 dakika
	2. Ksilen	15 dakika
Kapama	Entellan	

3.3. İmmünohistokimyasal yöntem

İmplantasyon alanlarına ait uterus dokularında Osteopontin (E-AB-66377, Lot: FC7539, Elabscience, ADB), MMP-9 (E-AB-70059 Elabscience, ABD), VEGFA (E-AB-40004-Elabscience, ABD) antikorlarının avidin-biotin-peroksidaz kompleksi yöntemiyle işaretlemesi yapıldı. Polilizinli lamlara alınan kesitler 60°C sıcaklıktaki etüvde deparafinizasyon işlemi için 1,5 saat bekletildi. Daha sonra 3 kez sırasıyla 10 ve 5'er dakika

ksilende bekletildi ve kesitler şeffaflandırıldı. Hava kurutulduktan sonra azalan alkol serilerinin her birinde 5'er dakika olmak üzere bekletildi. Sonrasında iki kez 5 dakika distile suda yıkanarak alkolden arındırıldı. Kesitler doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, 95°C sıcaklıkta mikrodalga fırında 10 mM sitrat tamponuna (pH: 6. 00) (Lot: MK220322, Thermo Scientific, ABD) etkin bırakılarak ısı ile indüklenen antijen retrieval gerçekleştirildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında 30 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra tekrar 5'er dakika distile su ile yıkandı ve hidrofobik doku kalemi Pap Pen (PatoLab, Pen-01) ile etrafları çizildi. Üçer kez 3 dakika PBS (phosphate buffer saline, pH: 7.4) (Lot: 2D76753, Bioshop, Kanada) ile yıkama yapıldı. Dokulardaki endojen peroksit aktivitesinin bloke edilmesi için %3'lük hidrojen peroksit (Lot: K41859197, Merck, Almanya) ile 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra tekrar üçer kez 3 dakika PBS ile kesitler yıkandı. Özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla 10 dakika Ultra V Block (Lot: AUBS166-B, Thermo Scientific, ABD) uygulandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, antikor dilüenti (Lot: UD51340, Thermo Scientific, ABD) ile seyreltilen Osteopontin ve MMP-9 primer antikorlarıyla 1 gece boyunca +4°C'de, VEGF-A primer antikoruyla da 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında kesitler tekrar üçer kez 3 dakika PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika boyunca biyotinli sekonder antikor (Lot: PBNS743-B, Thermo Scientific, ABD) uygulanarak primer antikorlara bağlanması sağlandı. Üçer kez 3 dakika PBS ile yıkamanın ardından dokular enzimin biyotine bağlanmasını sağlamak amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Lot: SHRS739-B, Thermo Scientific, ABD) etkin bırakıldı. Kesitler üçer kez 3 dakika PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olan DAB (Lot: HDX57664, Thermo Scientific, ABD) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Harris Hematoksileni (Cat: 008011, Lot: 73267432A, Invitrogen, ABD) kullanıldı ve kesitler azalan etil alkol serilerinden geçirilerek 15 dakika ksilende bekletildi. Lamlar daha sonra entellan ile kapatıldı (Çizelge 3.5).

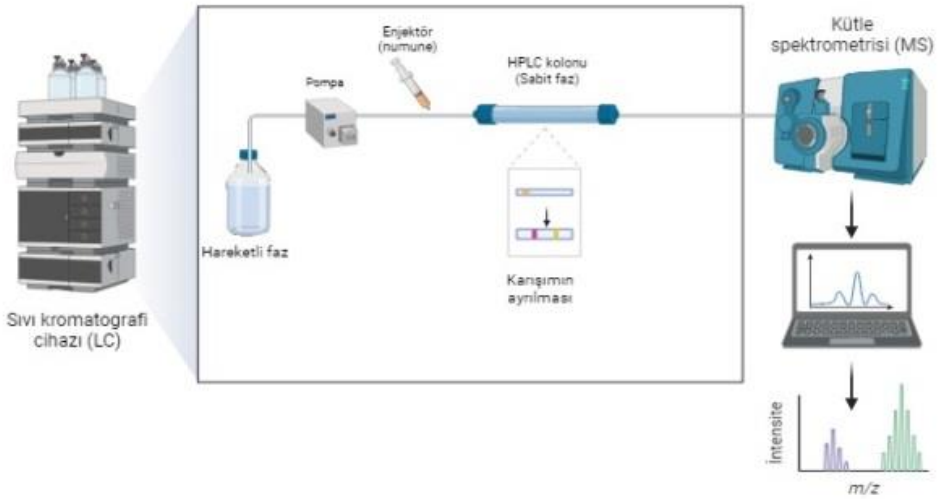
Çizelge 3.5. İmmünohistokimyasal yöntem

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM		
Aşama	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüv	1,5 saat
Şeffaflandırma	1. Ksilen	10 dakika
	2. Ksilen	5 dakika
	3. Ksilen	5 dakika
Dehidratasyon	%100 etanol	5 dakika
	%96 etanol	5 dakika
	%80 etanol	5 dakika
	%70 etanol	5 dakika
	%50 etanol	5dakika
Yıkama	Distile su	2 x 5 dakika
Antijen retrieval	Sitrat tamponu (pH: 6.00)	2 x 5 dakika
Yıkama	Distile su	2 x 5 dakika
Yıkama	PBS (pH: 7.4)	3 x 3 dakika
Dokuların sınırlandırılması	Hidrofobik doku kalemi	
Endojen peroksit aktivitesinin bloklanması	%3 H2O2	15 dakika
Yıkama	PBS (pH: 7.4)	3 x 3 dakika
Bloklama	UltraV blok	10 dakika
Primer Antikor	Osteopontin (1: 300) MMP-9 (1: 600)	1 gece, +4°C
	VEGFA (1: 300)	45 dakika, oda sıcaklığı
Yıkama	PBS (pH: 7.4)	3 x 3 dakika
Sekonder antikor	Biotinli, anti-polivalent	10 dakika
Yıkama	PBS (pH: 7.4)	3 x 3 dakika
	Streptavidin	10 dakika
Kromojen	DAB	2.5-2-2 dakika
Reaksiyonun durdurulması	Distile su	1-2 dakika
Zemin boyama	Harris Hematoksilen	50 sn
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	%50	1-2 dip
	%70	1-2 dip
	%80	1-2 dip
	%96	1-2 dip
	%100	1-2 dip
Şeffaflandırma	1. Ksilen	15 dakika
	2. Ksilen	15 dakika
Kapama	Entellan	

3.3.1. Semikantitatif immünohistokimyasal değerlendirme

İmplantasyon alanlarından elde edilen kesitlerde Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A proteinlerinin lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla immünohistokimyasal boyamalar yapıldıktan sonra kesitler görüntülü analiz sistemleri (DM4000 Leica, Almanya) ve Image J yazılımı kullanılarak, x400 büyütmede 10 farklı alanda her bir antikor için immünreaktivite yüzdeleri değerlendirildi [256].

3. 4. Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)



Şekil 3.1. Sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) bileşenleri

Sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometrisi, hedeflenen bileşiklerin (veya analitlerin) fiziksel olarak ayrılmasını ve ardından bunların kütle bazlı tespitini içeren, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip analitik bir tekniktir [226]. Sıvı kromatografide numuneden ayrımı yapılacak molekülün veya bileşiğin, hareketli (mobil) bir faz ile sabit faz (kolon) boyunca değişik hızlarda hareket ettirilerek, sabit fazda belirli bir alıkonma zamanında ayrımı yapılır (Şekil 3.1) [227]. Sabit faz (malzeme, parçacık boyutu ve gözeneklilik), kolon tipi, uzunluğu ve çapı, hareketli faz ve akış hızlarının kombinasyonu, numunedeki her bir bileşiğin ayırılma verimliliğini ve alıkonma süresini belirler. Ayırma verimliliği artan kolon uzunluğu, daha yüksek gözeneklilik, azalan çap ve daha küçük parçacık boyutuyla artar [228]. Kromatografik ayırmanın ardından numuneler kütle spektrometresine aktarılır ve burada gaz fazına geçirilerek iyonlaştırılır. Daha sonra iyonlar, kütle/yük (m/z) oranlarına göre iyonları filtreleyen elektrik yüklü kuadrupollerden geçer. Birinci kuadrupol yalnızca belirli bir m/z değerine sahip iyonların geçişine izin verir ve diğer iyonlar elimine edilir. İkinci kuadrupolde ise birinci kuadrupolden geçen öncü iyonlar azot, helyum veya argon gibi gazlarla parçalanarak fragment iyonlara ayrılır daha sonra fragment iyonlar üçüncü kudrupole geçer ve detektöre ulaşarak her biri bir iyon spektrumu üretir ve cihaz yazılımı oluşan pikleri okur [228, 229].

3.4.1. Serum 25(OH)D düzeylerinin LC-MS/MS yöntemiyle belirlenmesi

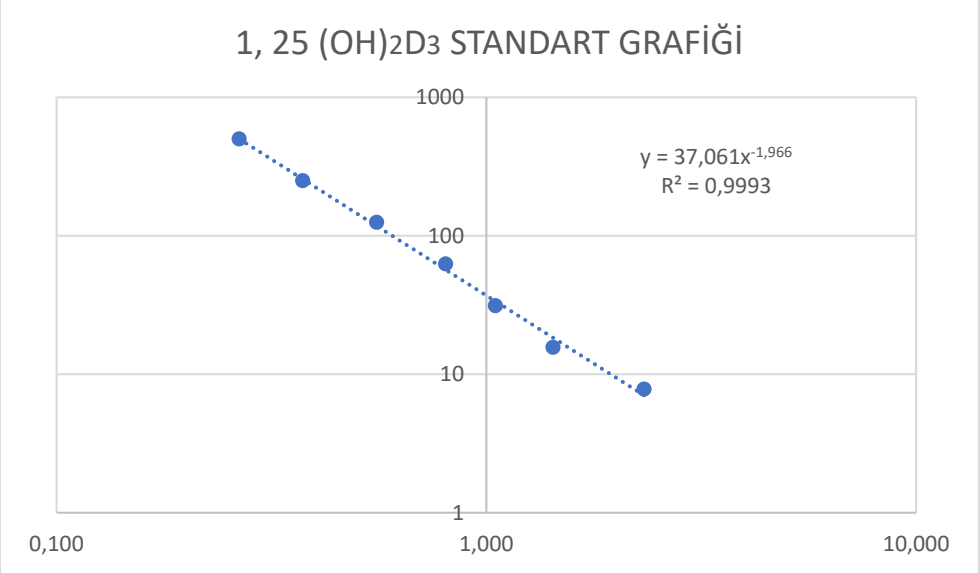
Deneklerden alınan intrakardiyak kan örnekleri sarı kapaklı, jelli kan alma tüplerine konuldu. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serumlar elde edildi. Analizlerde kullanılmak daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye saklandı. Serumda 25(OH)D düzeylerinin belirlenmesi amacıyla OBIKROM kit (Rotakim, Ankara, Türkiye) ile çalışıldı. 50 µL serum üzerine, 150 µL reaktif A (internal (iç) standart ve çöktürücü) pipetlenerek vortekslendi ve 13 dakika 2-8°C sıcaklıkta inkübe edildi. Serum numuneleri daha sonra 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar, kit prosedürüne uygun olarak 25 (OH)D3-25(OH)D2 kolonu kullanılarak, Sciex marka 3500 model (AB, Framingham, MA, USA) LC-MS/MS cihazı, enjeksiyon hacmi 15 µL, akış hızı 0,4 ml/dk, dwell time 5, kolon sıcaklığı ise 25°C olacak şekilde ayarlandı ve çalıştırıldı.

3.5. ELISA Yöntemi

Deneklerden alınan kan örnekleri 3000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatanları ayrıldı, elde edilen serum örnekleri eppendorf tüplere konularak analiz gününe kadar -20°C'de saklandı. Serum örneklerinden 1, 25$(OH)_2D_3$ düzeylerinin belirlenmesinde 25-HVD3 (25-Hidroksi Vitamin D3) (Cat: E-EL-0015, Elabscience, ABD) kiti kullanıldı. Bu ELISA kiti, kompetitif ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kitte bulunan mikroplakanın yüzeyine antijen veya antikorlar bağlanır. Daha sonra mikroplakanın kuyucuklarına işaretli ve işaretli olmayan antijen veya antikor eklenerek inkübe edilir. İnkübasyon sırasında işaretli olan ve olmayan ligandlar (antijen veya antikor) bağlanmak için yarışırlar. Yıkama işlemiyle kuyucuklardan bağlanmamış ligandlar uzaklaştırılır ve substratın eklenmesiyle meydana gelen renk değişimi bir spektrofotometre yardımıyla ölçülür [230]. Elde edilen renkli solüsyon, işaretli ligand miktarıyla doğru orantılı olup, işaretsiz ligand miktarıyla ters orantılıdır. Spektrofometrede ölçülen standart çözeltilerinin konsantrasyonları, okunan absorbans değerleri dikkate alınarak standart eğri elde edildikten sonra oluşturulan lineer regresyon denklemi ile hesaplanır.

3.5.1. Serum 1, 25$(OH)_2D_3$ düzeylerinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi

96 kuyucuklu mikroplakanın bir kuyucuğu kör olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı, 15 kuyucuğa 100 µl farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltileri eklendi. 1, 25$(OH)_2D_3$ için standartlar 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 ve 0 ng/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Diğer kuyucuklar serumlar için kullanıldı. Her bir kuyucuğa (kör hariç) 50 µl serum örneği koyuldu ve 45 dakika 37°C'de inkübe edildi. Kuyucuklardaki solüsyon tamamen aspire edildikten sonra 50 µl biyotin işaretli antikor tüm kuyucuklara eklendi. 37°C'de 45 dakika inkübasyon yapıldı. Kuyucuklara 350 µl yıkama solüsyonu eklenerek 5 kez yıkandı. 100 µl Avidin - HRP konjugatı konuldu. 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Kuyucuklardaki solüsyonlar aspire edildikten sonra 350 µl yıkama solüsyonu eklenerek 5 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara 90 µl substrat solüsyonu eklendi, 37°C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve mikroplaka okuyucuda 450 ± 2 nm' de absorbans değerleri okundu ve veriler analiz edildi. 1, 25$(OH)_2D_3$ için analiz aralığı: 3.13-200 ng/mL, duyarlılık: 1.88 ng/mL, CV <%10'dur. Standartlardan Microsoft Office 2010 Excel programı kullanılarak standart grafiği elde edilmiş ve sonuçları bu grafik ile hesaplanmıştır (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Serum 1, 25 $(OH)_2D_3$ standart grafiği.

3.6. Gen İfadelerinin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler

3.6.1. İmplantasyon alanlarından total RNA ‘nın elde edilmesi

Deneklerin sakrifikasyonundan sonra implantasyon alanları çıkartılarak steril petri bir kabına alındı. Steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun olarak, (100 mg’dan az olmayacak şekilde) 1 mL’lik RNaz içermeyen kryotüplere aktarıldıktan sonra sıvı azot içerisine alınarak hızla donduruldu. Doku örnekleri analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C’de saklandı. Örneklerden total RNA izolasyonu için Bioneer marka ExiPrep^{TM} Plus Tissue total RNA Kit kullanıldı. Kryotüplerde bulunan doku örneklerine 500µL Tissue Lizis Buffer (1) eklendi ve ALLSHENG marka, BIOPREP24 model homojenizatörde 1 dakika homojenize edildi. Daha sonra örneklerin üzerine 200 µl Tissue Lizis Buffer (2) eklendi ve 15 saniye vorteks yapıldı ve 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 12.000 rpm’de, +4°C’de 3 dakika santrifüj edildi. Yalnızca süpernatant kısmından 200 µl’lik örnek alınarak, Tissue Total RNA Kit’inin 1 numaralı kartuşunun örnek kısmına pipetlendi. ExiPrep™ 16 Plus, Bioneer (Güney Kore) marka cihaza yüklenen örneklerin uygun protokol numarası seçilerek RNA izolasyonu tamamlandı. Edilen RNA‘ların miktar ve saflığı Denovix marka DS-11 model MikroHacim Spektrofotometre (ABD) cihazında ölçüldü ve RT-PCR’da kullanılana kadar -80°C’de saklandı.

3.6.2. Komplementer (tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentezi

Bioneer marka AccuPower® RT PreMix cDNA sentez kiti ile total RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. 10-30 pmol ters primerden, 3 µL ise elde edilen total RNA’dan 10 µL alınarak, toplamda 13 µL olacak şekilde karışım hazırlandı ve daha sonra karışım 70 ˚C’de 5 dakika inkübasyon edildi ve buz kalıbına konuldu. İnkübasyondan sonra Bioneer marka AccuPower® RT PreMix kit tüplerine karışım aktarılarak kit içinde vakumla kurutulmuş olan pelet pipetlenir veya vortekslenerek çözüldü. 42°C’de 60 dakika cDNA sentezi yapıldı ve daha sonra 94°C’de 5 dakika ters transkriptaz ısı ile inaktive edildi. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3. 6’da verilmiştir. Elde edilen örnek DNA’larının saflık ve miktar tayinleri DENOVIX marka (ABD) DS-11 model mikro hacim spektrofotometre ile yapıldı ve cDNA örnekleri Real-Time PCR‘da kullanılıncaya kadar -20°C‘lik derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 3.6. cDNA RT-PCR tepkime karışımı

Kalıp RNA	Reaksiyon Hacmi	20 µL reaksiyon
	Total RNA	0.5~1.0 µg
	Poly(A) RNA	0.05~0.1 µg
Primer	Sekans spesifik	10~30 pmol
M-MLV Ters Transkriptaz	200 U	20 µl/rxn
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Her biri 250 µM	
5X Reaksiyon tamponu	1X	
DTT	0.25 mM	
Stabilizatör	1X	
Distile su	37 µl	

3.6.3. Gen ifadesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A genlerinin mRNA ifadesinin kantitatif değerlendirilmesi Real-time PCR yöntemi ile LongGene Q2000B (Çin) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, ve Hibrigen PCR Master (SYBR) Mix karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A genlerinin ifade düzeylerini normalize etmek için beta aktin (ACTB) mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Seçilen genlere özgü primerler

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer
ACTB	5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT-3'	5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3'
Osteopontin	5'-TTCTGATGAACAGTATCC-3'	5'-GACCTTGATAGCCTCATC-3'
MMP-9	5'-TTCACTACCAAGACAAGG-3'	5'-CAGGAGGTCATAGGTCAC-3'
VEGF-A	5'-GCAGACCAAAGAAAGATAGAACAA-3'	5'-ACAGTGAACGCTCCAGGAT-3'

3.6.4. Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A genleri için Real-Time PCR tepkime karışımı

Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A genlerine uygun verilen primer kullanılarak Real-time PCR tepkimesi, LongGene Q2000B (Çin) cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları

Bileşen	Hacim	Son konsantrasyon
2X SYBR Green qPCR Mix	10µL	1X
Forward Primer (10µM)	0.8 µL	0.4 µM (0.2-0.6µM)
Reverse Primer (10µM)	0.8µL	0.4 µM (0.2-0.6µM)
Kalıp DNA	Değişken	10pg-1µg
Su (nükleaz bulundurmayan)	20µL'y tamamlayacak şekilde	-

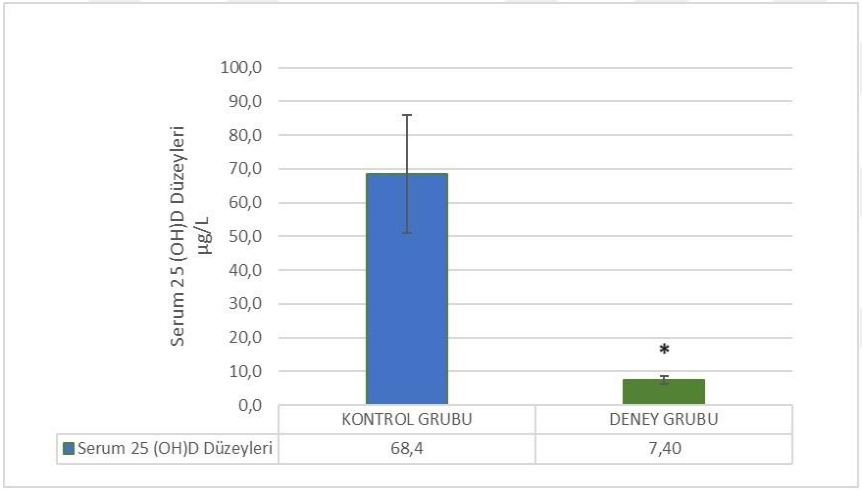
3.7. İstatiksel Analiz Yöntemleri

Çalışmadaki istatistik IBM SPSS 26 kullanılarak yapılmıştır. Bütün değerler ortalama ve standart sapmalar kullanılarak ifade edilmiştir. Serum 25(OH)D ve 1, 25(OH)2D3 düzeyleri ve immünohistokimyasal analizlerde değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda gruplar arası farklar parametrik olmayan Mann Whitney U, değişkenlerin normal dağılım göstermesi durumunda ise tek yönlü ANOVA testleri kullanılmıştır. Osteopontin, MMP-9 ve VEGF-A mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar karşılaştırıldı. 0,05'den küçük olan p değerleri ($p<0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Serum 25(OH)D Düzeylerinin Değerlendirilmesi

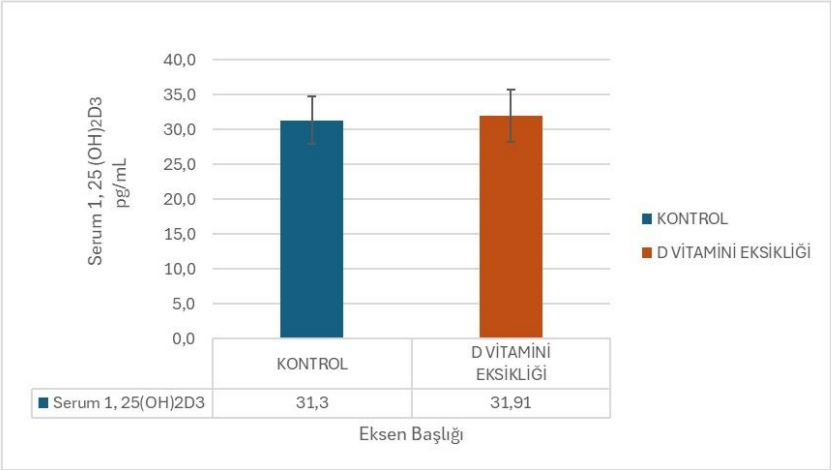
Deneklerden sakrifikasyon sırasında alınan kan örneklerinden LC-MS/MS yöntemiyle, kontrol ve D vitamini eksikliği gruplarının serum 25 (OH)D düzeylerine ait ortalamaların değerlendirilmesinde Independent Sample t-Testi, gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için tek yönlü ANOVA testleri kullanıldı. Kontrol grubu ve D vitamini eksikliği grubu kıyaslandığında serum 25 (OH)D düzeyleri açısından istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Serum 25 (OH)D düzeylerine ait grafik.

4.2. Serum 1, 25$(OH)_2D_3$ Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Deneklerden sakrifikasyon sırasında alınan kan örneklerinden ELISA yöntemiyle, kontrol ve D vitamini eksikliği gruplarının serum 1, 25 $(OH)_2D_3$ düzeylerine ait ortalamaların değerlendirilmesinde Independent Sample t-Testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile D vitamini eksikliği grubu kıyaslandığında serum 1,25 $(OH)_2D_3$ düzeyleri açısından istatiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.2).



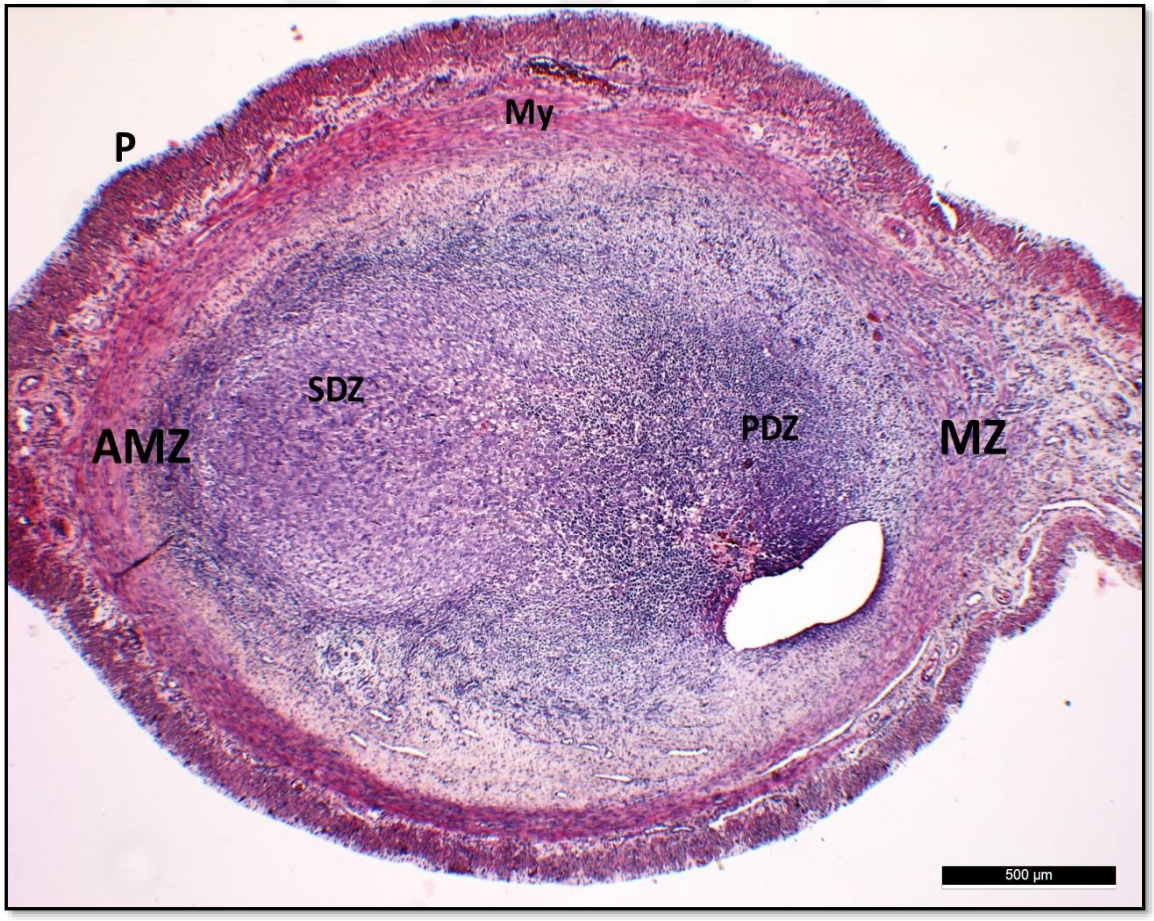
Şekil 4.2. Serum 1, 25 $(OH)_2D_3$ düzeylerine ait grafik.

4.3. Hematoksilen-Eozin ve Masson'un Üçlü Boyaması Bulguları

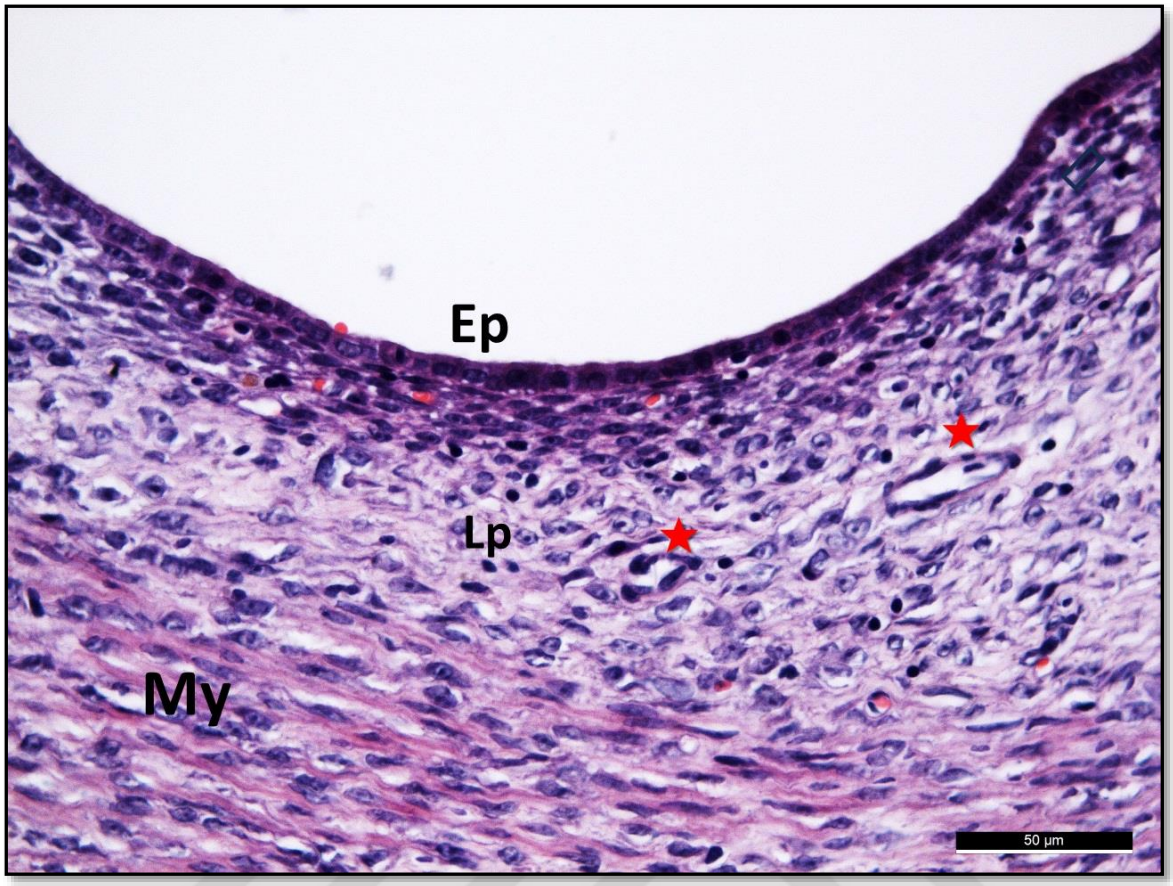
4.3.1. Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanan kesitler değerlendirildiğinde, uterusun gebeliğin 8. gününe uygun histolojik bulgular sergilediği ve normal histolojik yapısında olduğu gözlendi (Resim 4. 1). Lümen epiteli alçak prizmatik ve yer yer kübik özellikteydi. Epitelin altında yer alan bazal membranın da normal histolojik yapısında olduğu ve süreklilik gösterdiği belirlendi. Epitel hücrelerinin çekirdeklerinin yuvarlak veya oval ve bazal yerleşimli oldukları görüldü. Ayrıca embriyo implantasyonu sonrasında dejenere olan epitelin proliferasyonunu tamamladığı izlenmekteydi ve mitotik figürler bulunmamaktaydı Subepitelyal bölgede lamina propria gevşek bağ dokusu özelliğindeydi (Resim 4. 2). Bezlerin miyometriyuma oldukça yakın olarak konumlanmış ve az sayıda olduğu ilgi çekmekteydi (Resim 4. 3). Gebeliğin 8. gününde olan kontrol grubu deneklerinde, endometriyumun anti-mezometriyal bölgesinde stromal fibroblastların farklılaşarak, büyük, çift çekirdekli, bol sitoplazmalı desidual hücrelere dönüşmüş olduğu ve desidualizasyonun mezometriyal bölgeye doğru süreklilik gösterdiği saptandı. Anti-mezometriyal bölgedeki desidual hücrelerin, damar içermeyen (avasküler) primer desidual zonu oluşturduğu ve primer desidual zonun da etrafında bu alanı çepeçevre saran sekonder desidual zonun da belirgin bir şekilde gelişmiş olduğu belirlendi (Resim 4.1). Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücrelerle karşılaştırıldığında, primer desidual zonda yer alan desidual hücrelerin, boyut olarak daha küçük oldukları, iğ şeklinde ve tek çekirdekli oldukları izlendi. (Resim 4. 4). Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücreler ise çift çekirdekli, yuvarlak şekilli,

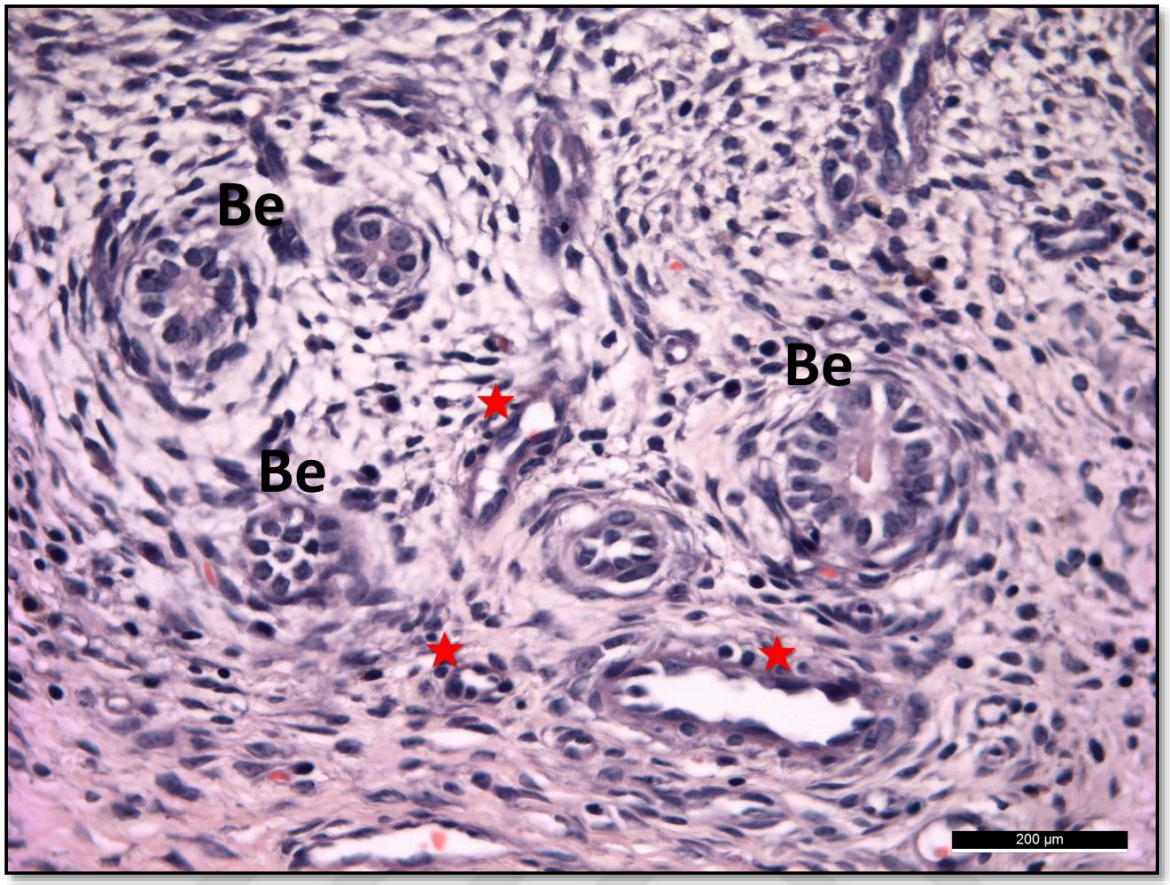
bol sitoplazmalı ve sayıları 1-4 arasında değişen çekirdekçiğe sahip hücreler olarak görüldü (Resim 4. 5). Miyometriyumun içte sirküler, dışta longitudinal ve orta kısımda oblik yerleşimli düz kas katmanlarından oluştuğu, gebeliğin 8. gününe uygun olarak, prolifere olan desidual hücreler nedeniyle, artan endometriyum kalınlığına bağlı olarak perimetriyuma doğru itilmiş olduğu belirlendi. Perimetriyumun tek katlı yassı epitel tipinde mezotel ile altında bulunan ince gevşek bağ dokudan meydana geldiği ve normal histolojik yapısında olduğu izlendi. Miyometriyumun orta tabakasında bulunan arkuat arterlerin ise normal histolojik yapılarında oldukları gözlendi (Resim 4. 6). Kontrol grubunun Masson'un üçlü boyamasına ait kesitlerinde kollajen liflerin, artan endometriyal kalınlığa bağlı olarak miyometriyuma doğru itildikleri ve oldukça yoğun oldukları izlendi (Resim 4. 7). Bu gruba ait Masson'un üçlü boyaması örnekleri Resim 4. 7- 4.8- 4.9- 4.10'da verilmiştir.



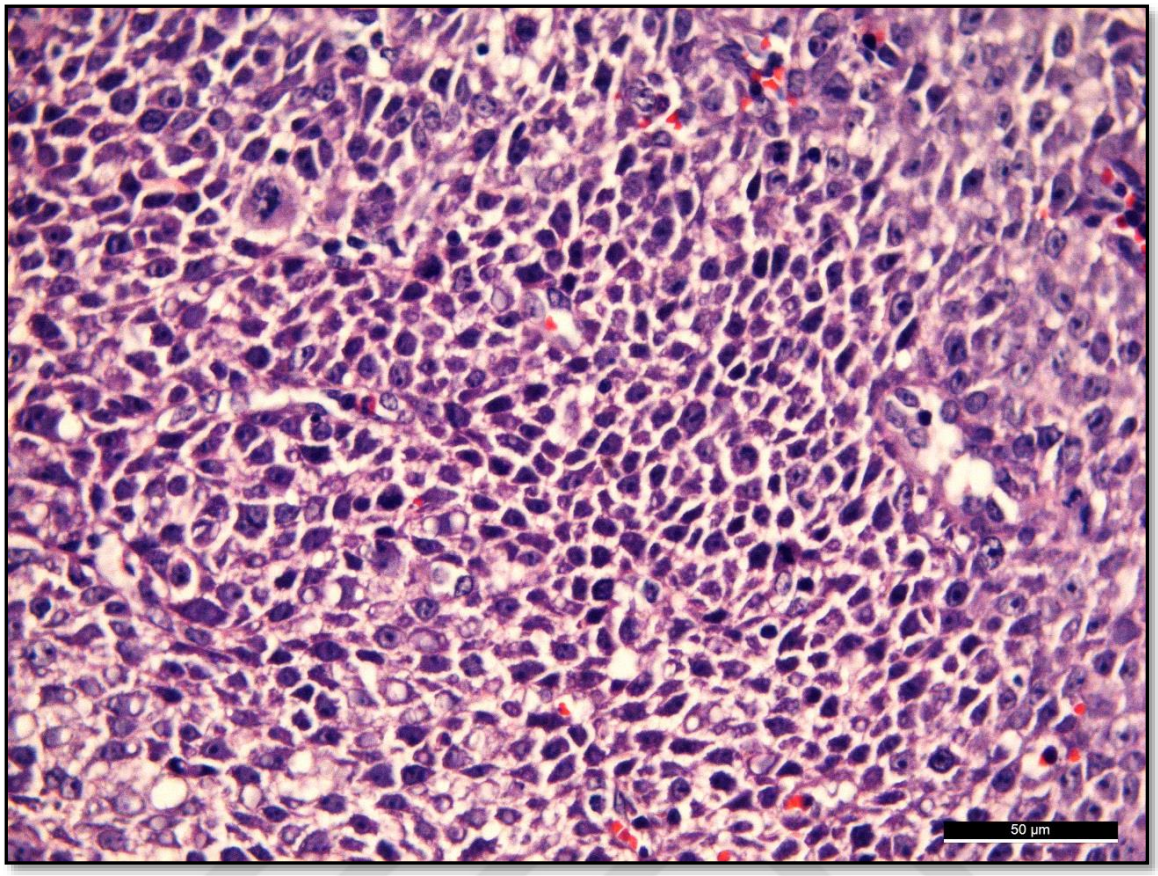
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ), miyometriyum (M), perimetriyum (P) (Hematoksilen-Eozin x 40).



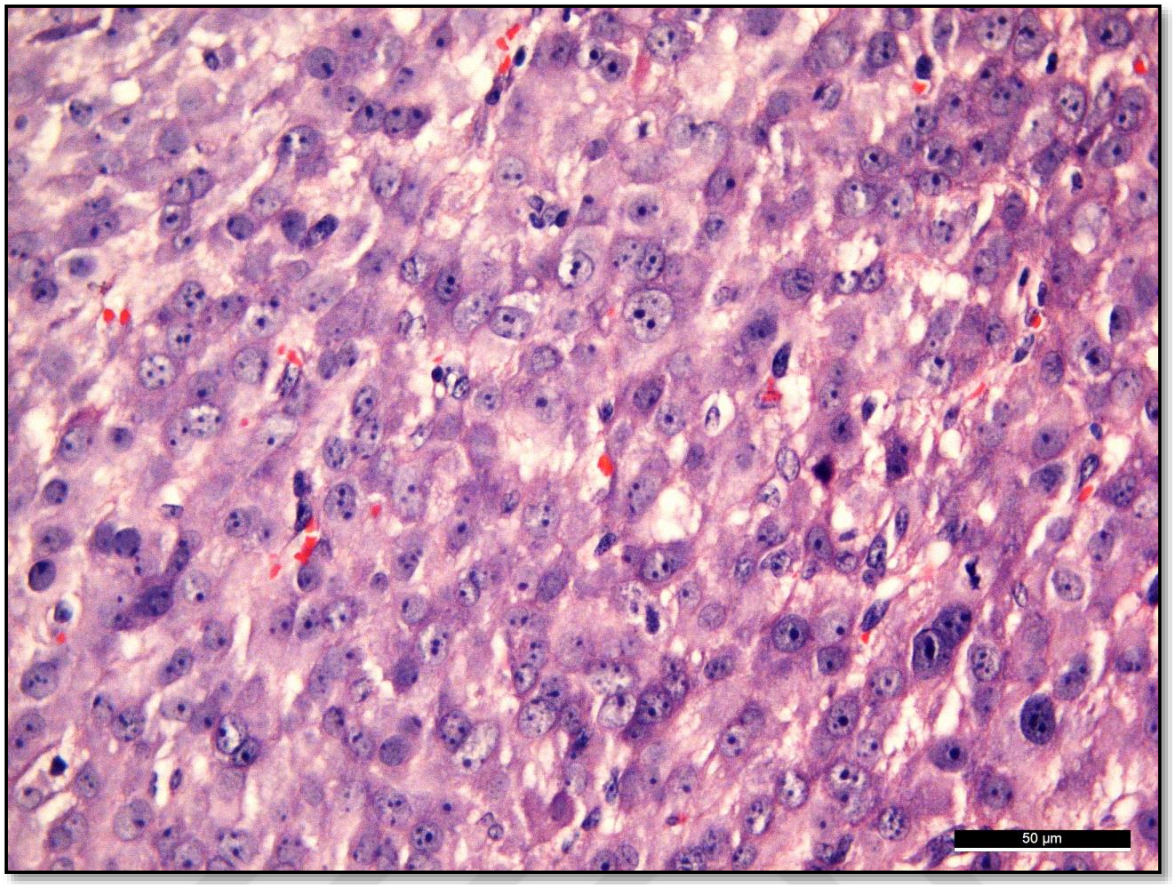
Resim 4.2. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. Lümen epiteli (Ep) ve lamina propria. (Lp), miyometriyum (My) ve lamina propria'da yer alan kan damarları (★) normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



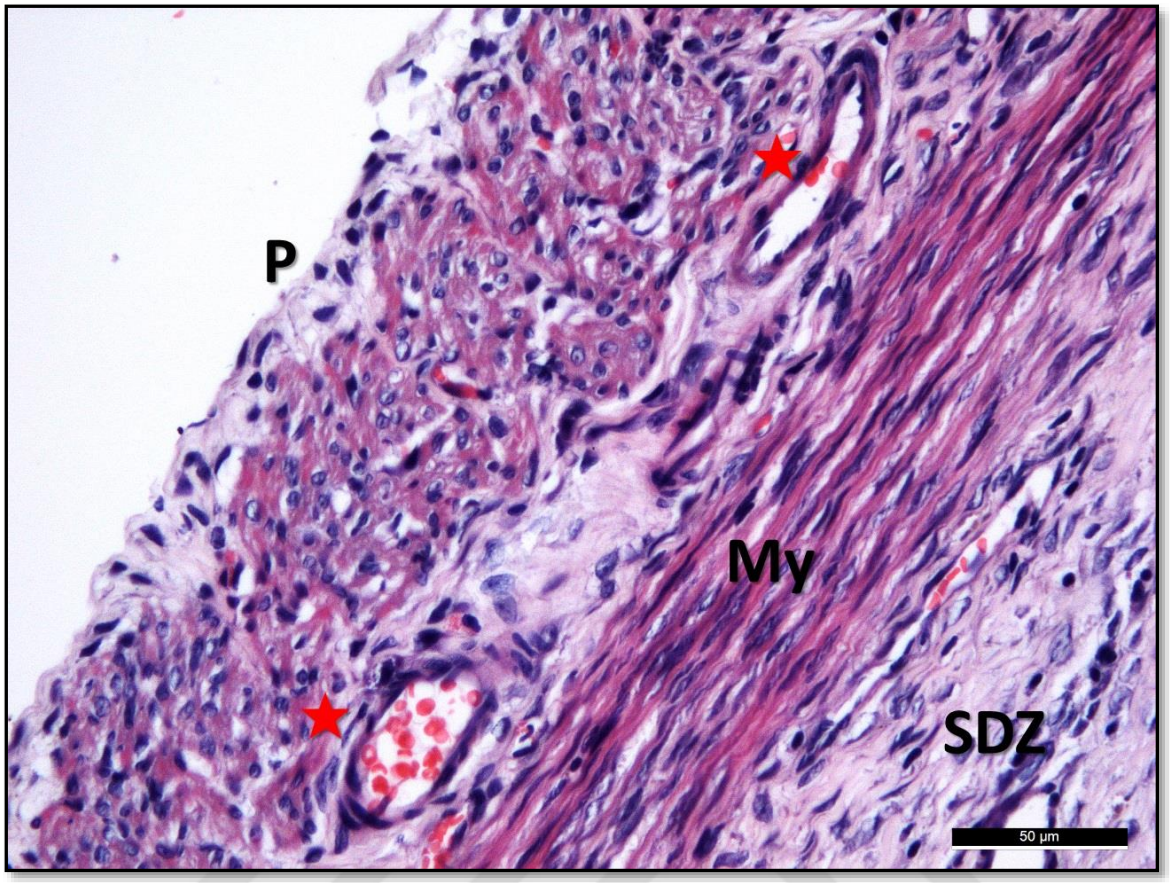
Resim 4.3. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. Miyometriyuma bitişik yerleşim gösteren bezler (Be) ve kan damarları (★) normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



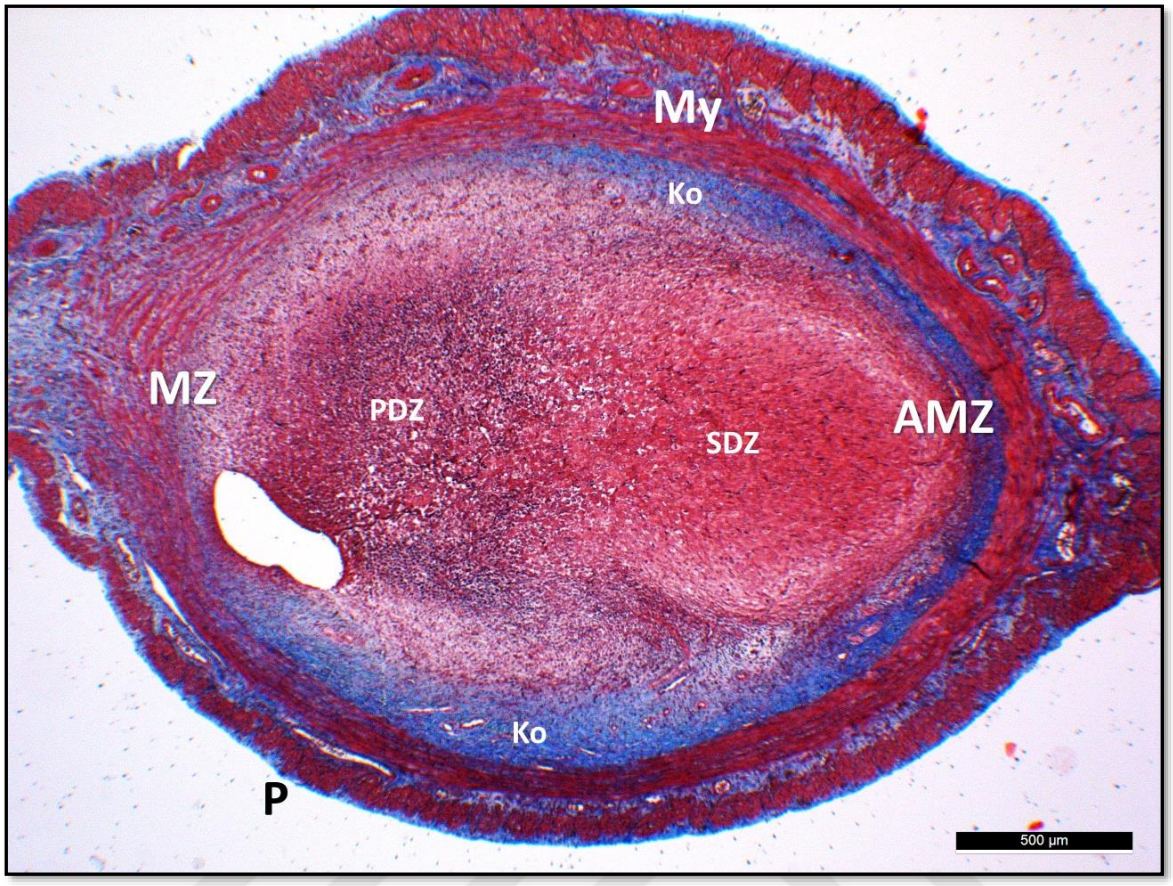
Resim 4.4. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. Primer desidual zonda bulunan küçük boyutlu desidual hücreler (Hematoksilen-Eozin x 400).



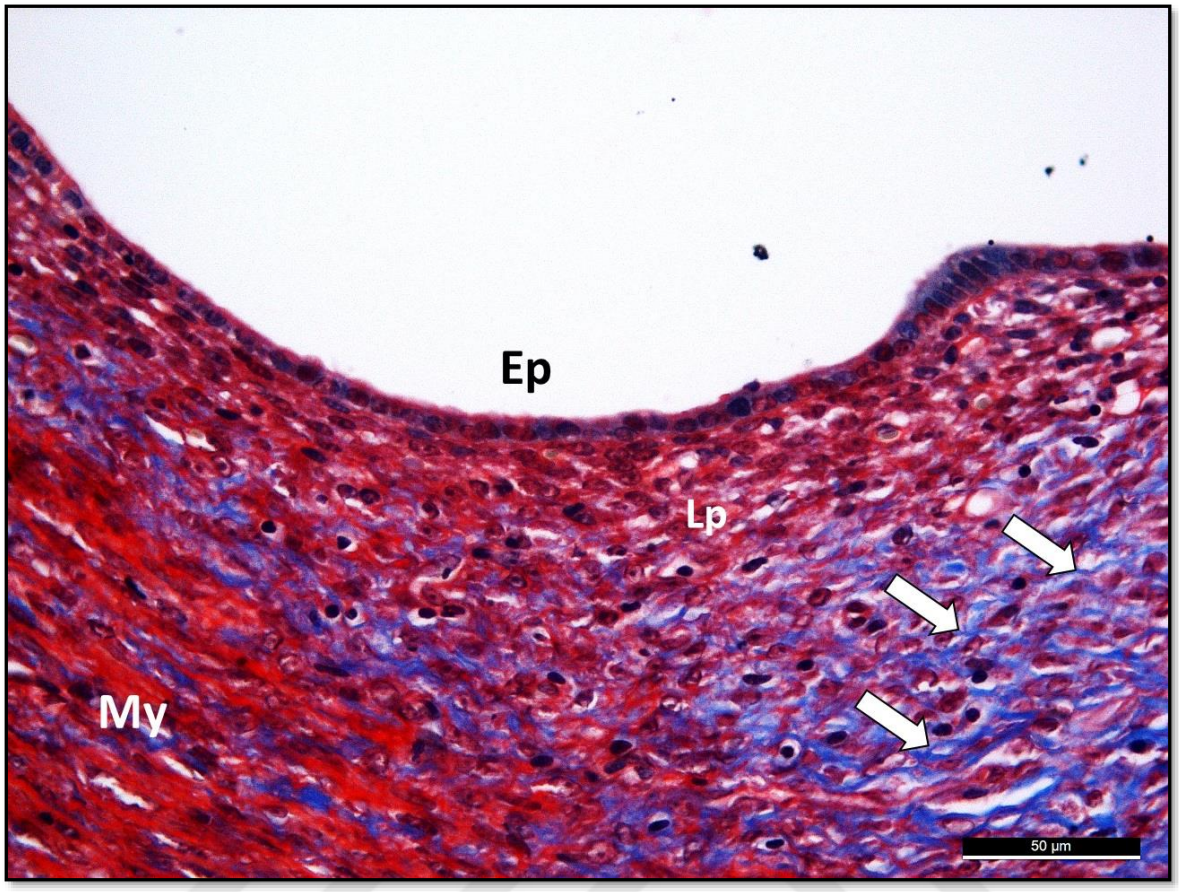
Resim 4.5. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



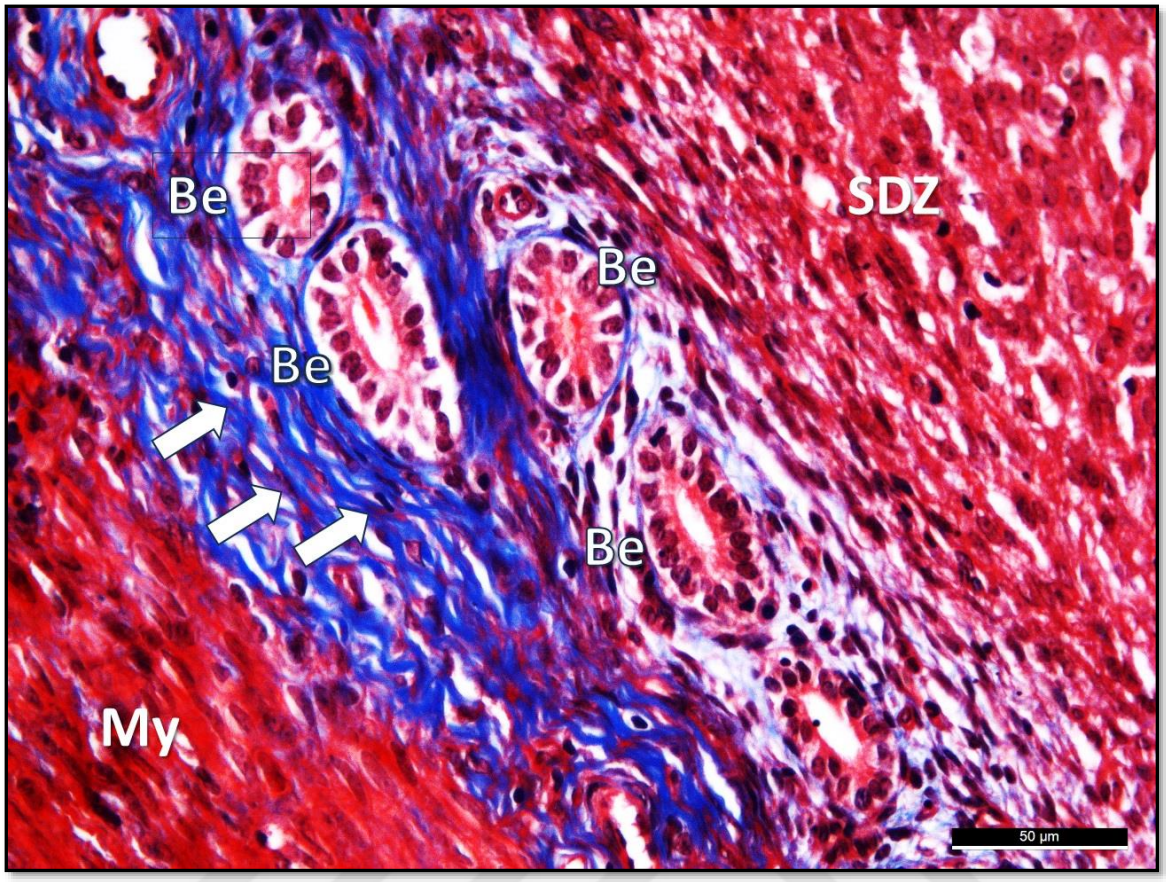
Resim 4.6. Kontrol grubu implantasyon bölgesinin hematoksilen eozin boyaması. Miyometriyum (My), perimetriyum (P) ve miyometriyumun düz kas katmanları arasında bulunan bağ dokuda yer alan kan damarları (★) normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



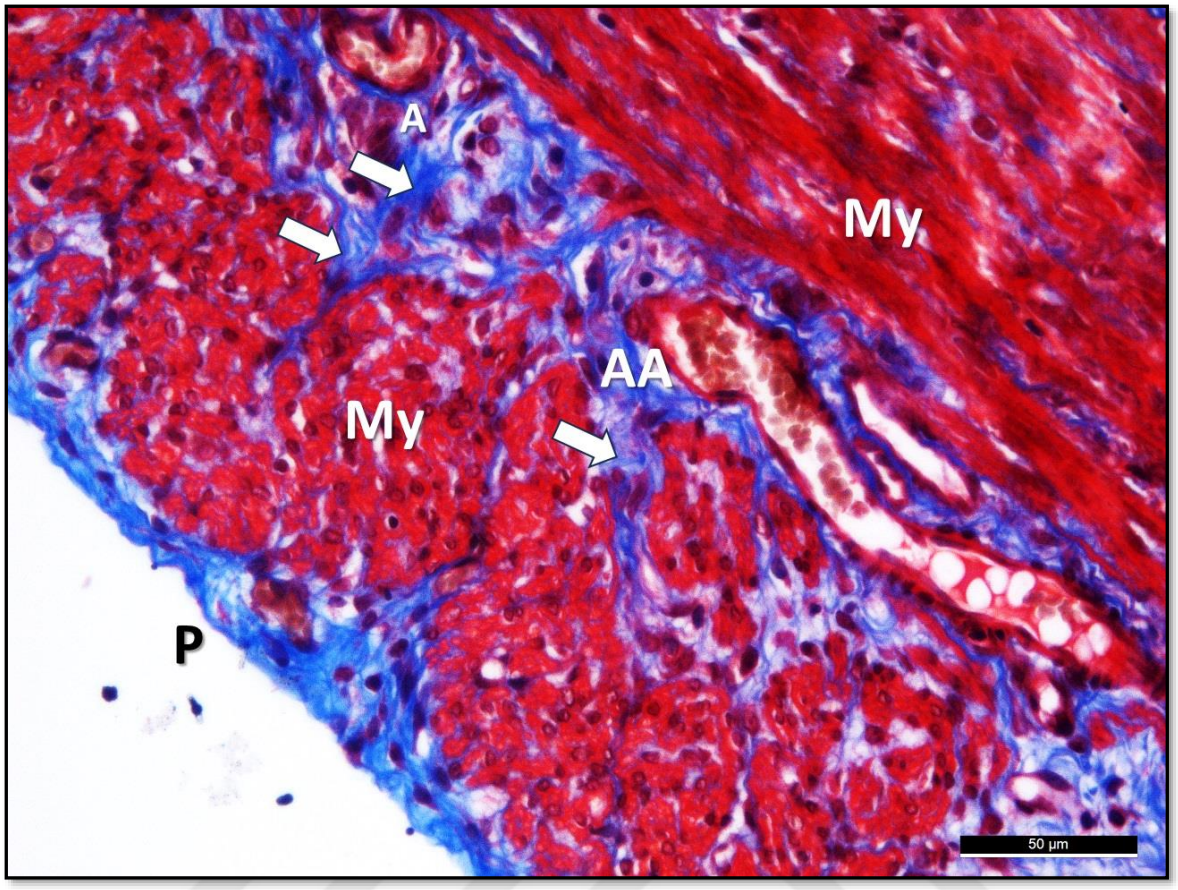
Resim 4.7. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), ve sekonder desidual zon (SDZ) alanları, kollajen lifler (Ko) ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) tabakaları ayırt ediliyor (Masson Trikrom x 40).



Resim 4.8. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Lümen epiteli (Ep), lamina propria (Lp) ve miyometriyum (My) normal histolojik yapılarında izleniyor (Masson Trikrom x 400).



Resim 4.9. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Miyometriyuma (My) bitişik, sekonder desidual zonun altında yer alan bezler (Be) ve miyometriyumun düz kas tabakaları arasında yer alan kollajen lifler (kalın oklar) gözleniyor (Masson Trikrom x 400).

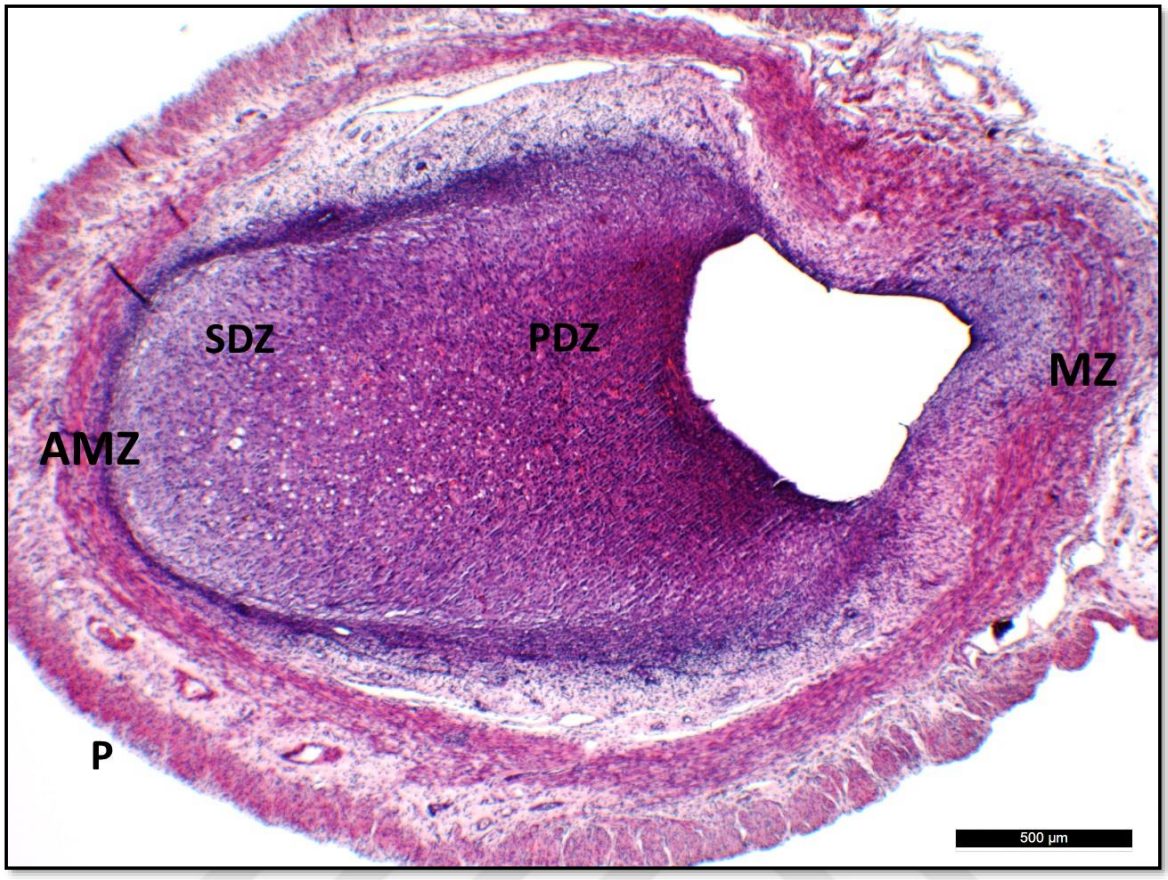


Resim 4.10. Kontrol grubuna ait implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Miyometriyuma (My) ve miyometriyumun düz kas katmanları arasında bulunan bağ dokuda yerleşik arkua arterler (AA) ve küçük arterler (A), kollajen lifler (kalın oklar), perimetriyum (P) normal histolojik yapılarında izleniyor (Masson Trikrom x 400).

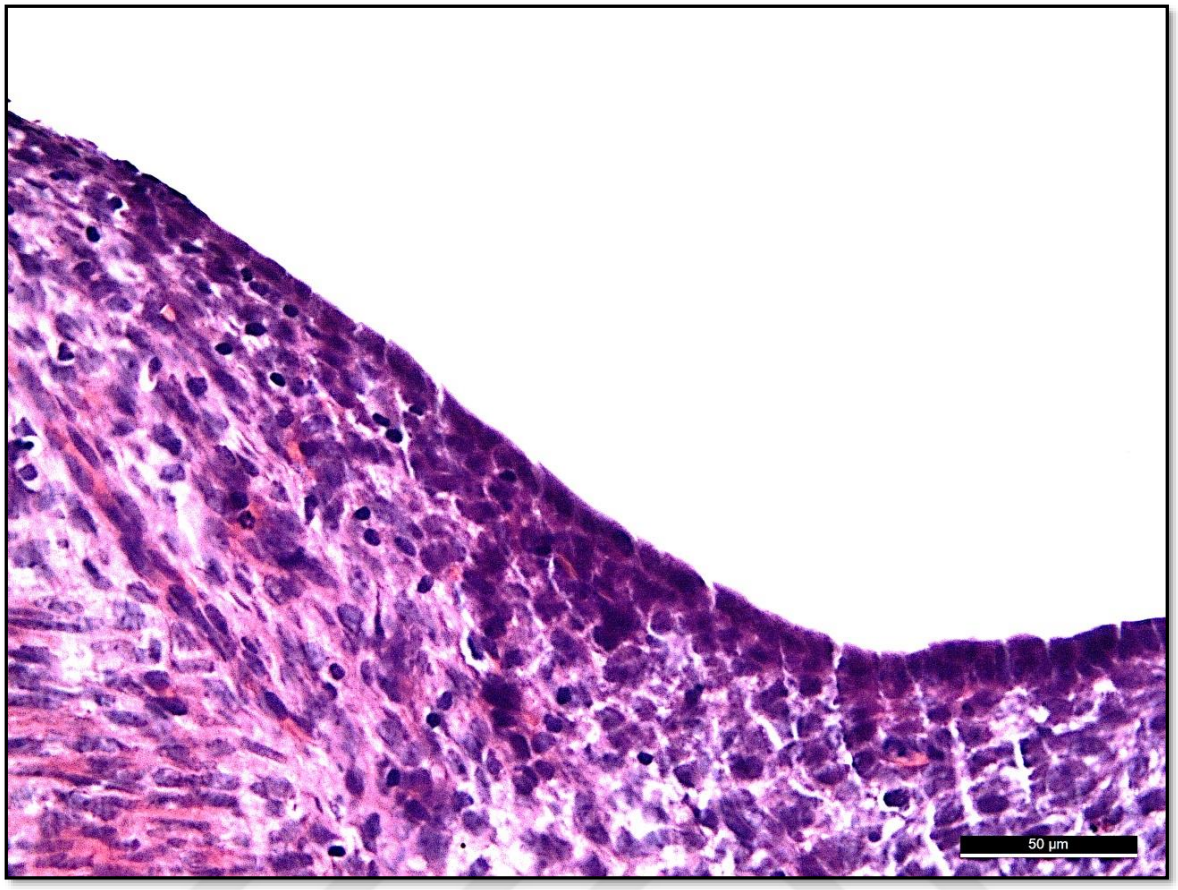
4.3.2. D vitamini eksikliği grubu

D vitamini eksikliği grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanan kesitler değerlendirildiğinde, mezometriyal bölgeye yakın olan lümen epitelinin alçak prizmatik veya kübik hücrelerden meydana geldiği görüldü (Resim 4. 11). Epitelin altında yer alan bazal membranın da normal histolojik yapısında olduğu ve süreklilik gösterdiği belirlendi. Epitel hücrelerinin çekirdeklerinin yuvarlak ve bazale yakın yerleşimli oldukları görüldü (Resim 4. 12). Kontrol grubuna benzer olarak uterus bezleri miyometriyuma yakın konumlanmış ve az sayıda bulunmaktaydı (Resim 4. 13). Gebeliğin 8. günüyle uyumlu olarak bu gruptaki deneklerde de anti-mezometriyal bölgede stromal fibroblastların farklılaşarak desidual hücrelere dönüştüğü ve desidual reaksiyonun mezometriyal bölgeye doğru süreklilik gösterdiği izlendi (Resim 4. 11). Anti-mezometriyal bölgedeki desidual

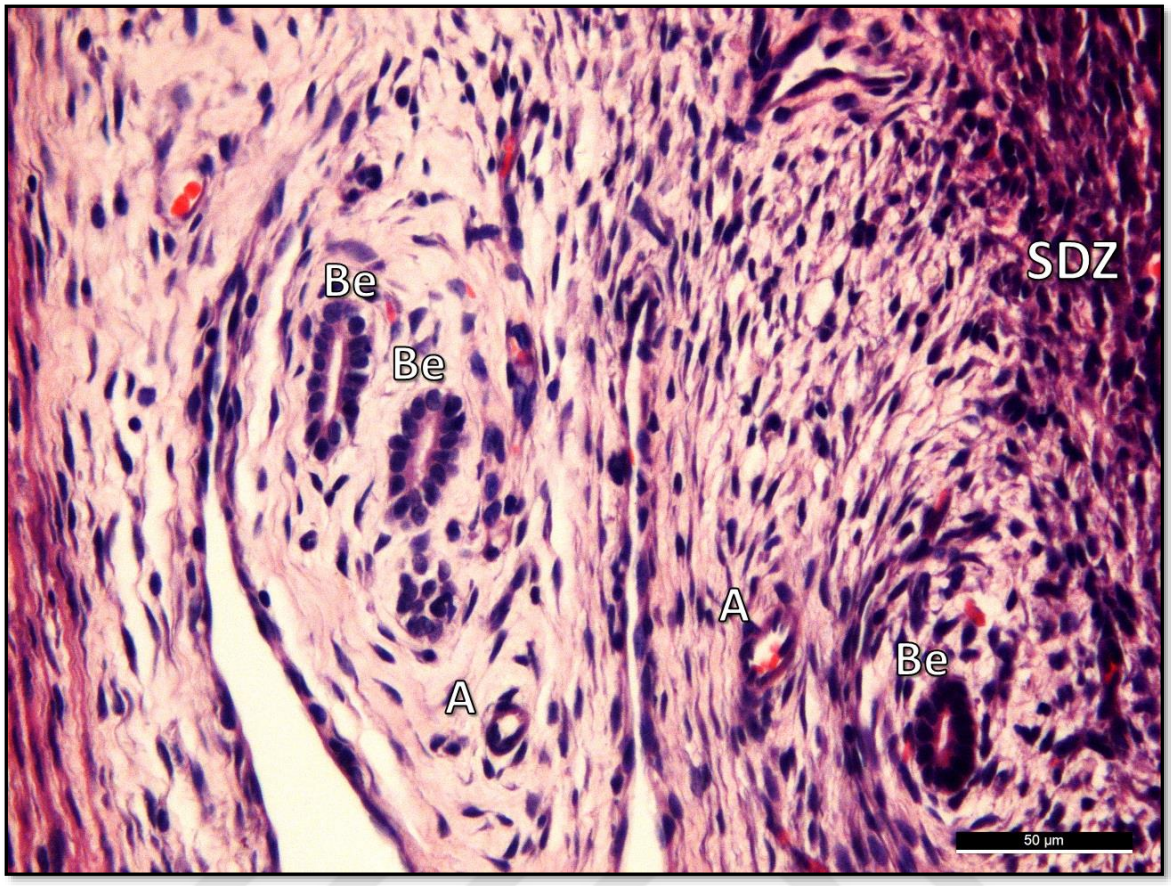
hücrelerin, primer ve sekonder desidual zonları kontrol grubuna benzer olarak meydana getirdikleri izlendi ancak kontrol grubundan ayrıcalıklı olarak, normal şartlar altında avasküler olması gereken ve bir bariyer özelliğine sahip olan primer desidual bölgede yaygın hemorajik alanlar olduğu dikkat çekmekteydi (Resim 4. 14). Ayrıca bu bölgedeki hücreler kontrol grubundan farklı olarak daha yuvarlak bir morfolojiye sahipti. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücreler ise kontrol grubuna benzer şekilde bol sitoplazmalı, genellikle çift çekirdekli ve birden fazla çekirdekçik içermekteydi. Ayrıca bu bölgede yeni damar oluşumları da normal olarak izlendi (Resim 4. 15). Miyometriyumun normal histolojik yapısında olduğu, içte sirküler, dışta longitudinal ve orta kısımda oblik düzenlenim gösteren düz kas katmanlarından meydana geldiği izlendi. Ayrıca gebeliğin 8. günü ile uyumlu olarak desidual hücre proliferasyonu nedeniyle artan endometriyum kalınlığına bağlı olarak bu tabakanın perimetriyuma oldukça yaklaşmış olduğu izlendi. Perimetriyumun tek katlı yassı epitel tipinde mezotel ile altında bulunan ince gevşek bağ dokudan meydana geldiği ve normal histolojik yapısında olduğu izlendi. Miyometriyumun orta tabakasında bulunan arterlerin ise normal histolojik yapılarında oldukları gözlendi (Resim 4. 16). D vitamini eksikliği grubunun Masson'un üçlü boyamasına ait kesitlerinde, kontrol grubuna benzer olarak kollajen liflerin, artan endometriyal kalınlık nedeniyle miyometriyuma doğru itildikleri izlendi (Resim 4. 17). Bu gruba ait Masson'un üçlü boyaması örnekleri Resim 4.18- 4.19- 4.20'de verilmiştir.



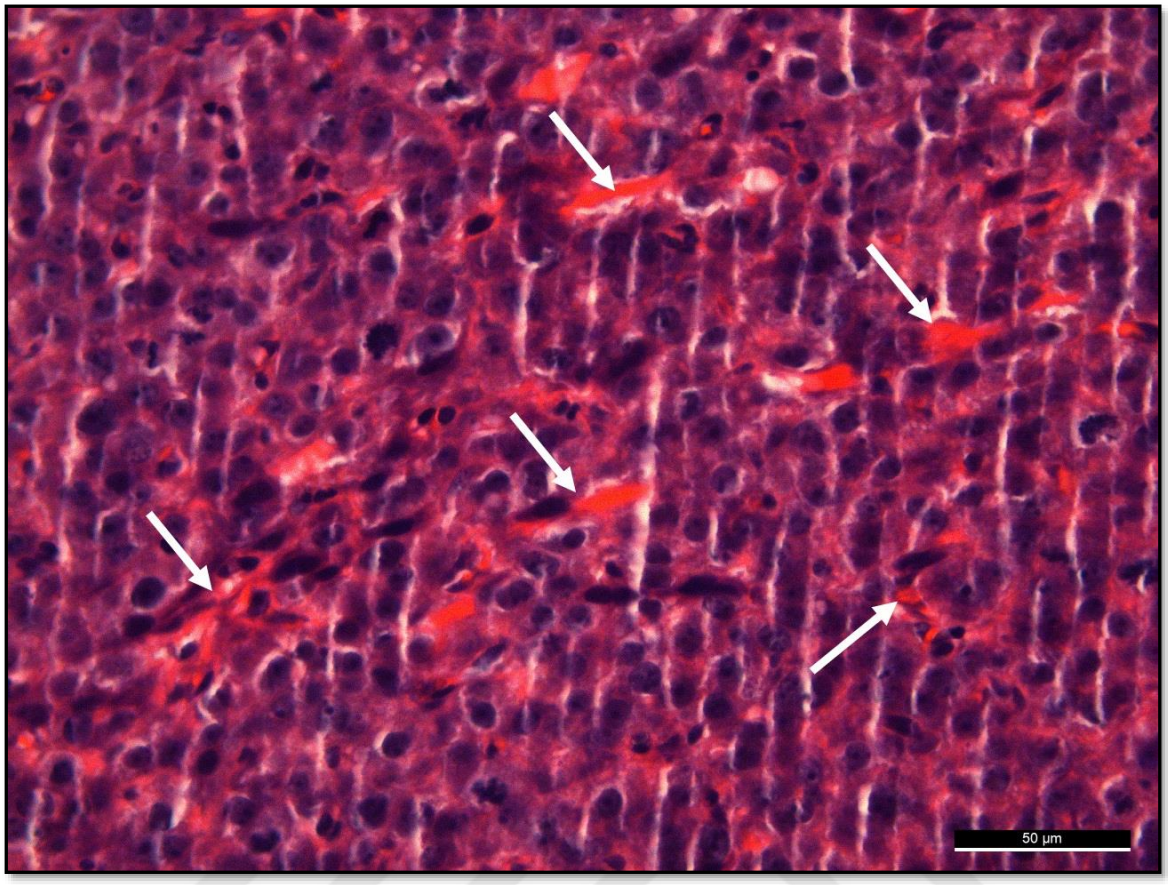
Resim 4.11. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) ayırt ediliyor (Hematoksilen-Eozin x 40).



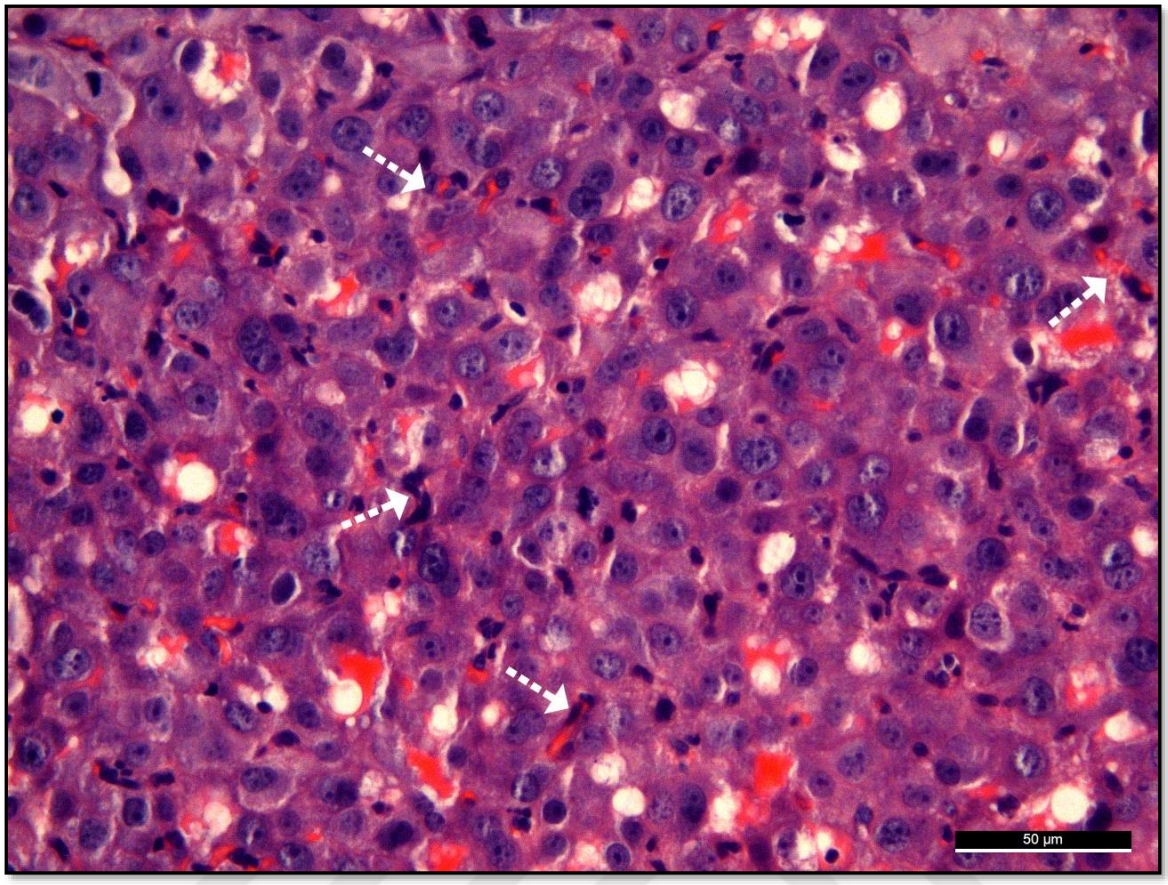
Resim 4.12. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. Lümen epiteli (Ep) ve lamina propria. (Lp), ve miyometriyum (My) normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



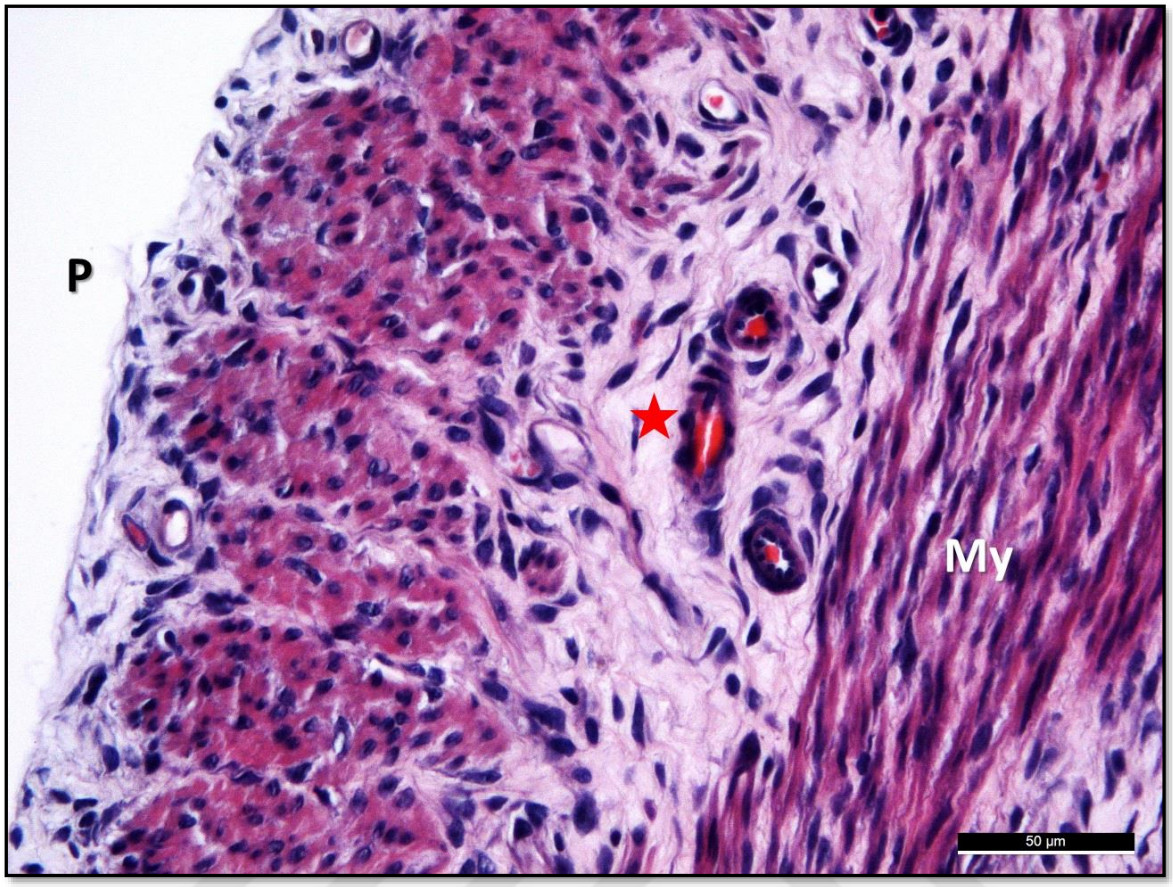
Resim 4.13. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. Miyometriyuma bitişik, sekonder desidual zona yakın (SDZ) yerleşim gösteren bezler (Be) ve kan damarları (A) normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



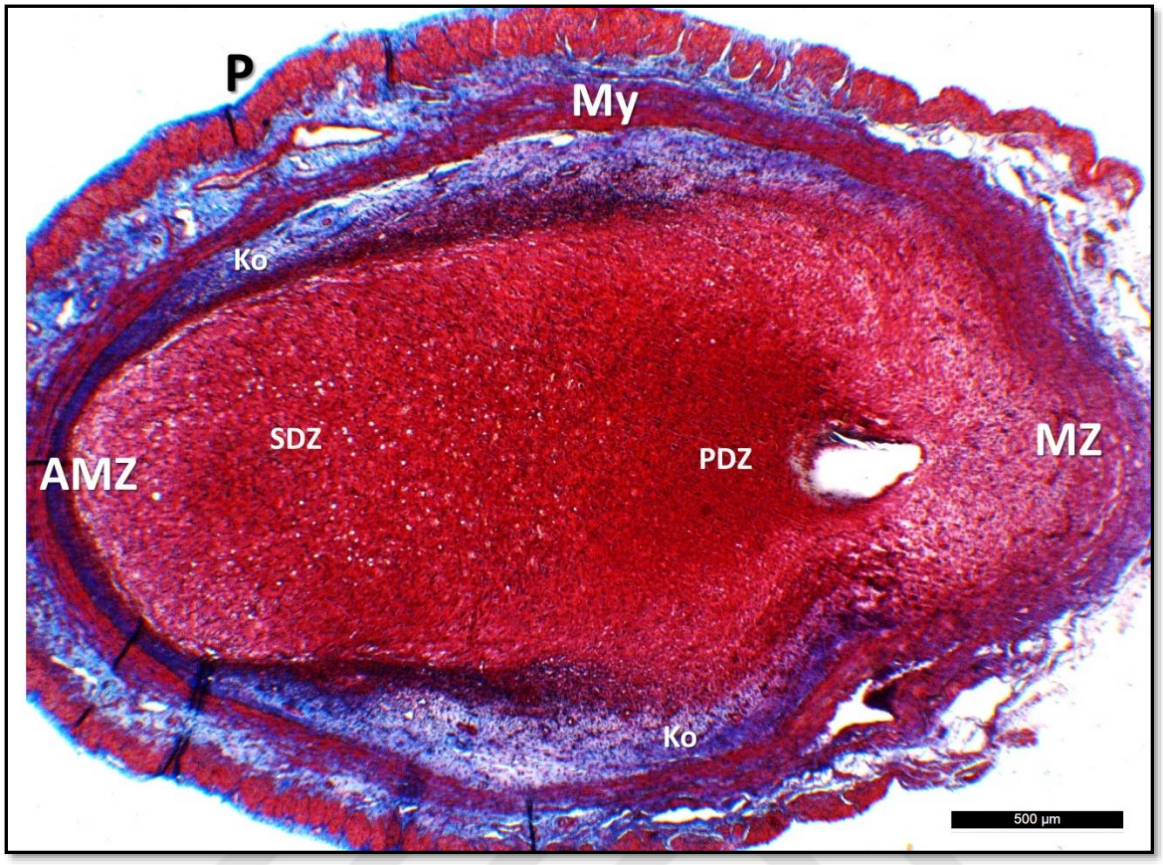
Resim 4.14. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücreler ve hemorajik alanlar (beyaz oklar) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



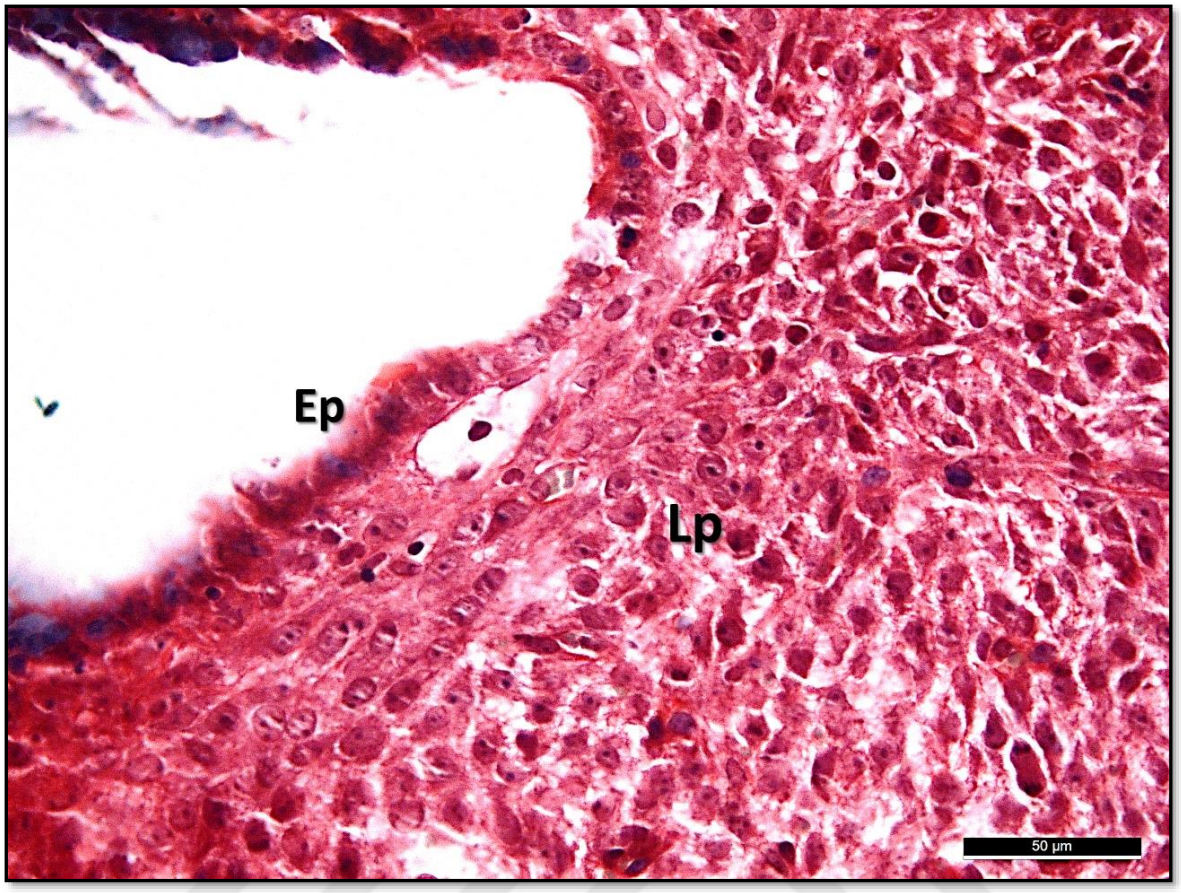
Resim 4.15. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücreler ve yeni damar oluşumları normal histolojik yapılarında (beyaz kesintili) gözleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



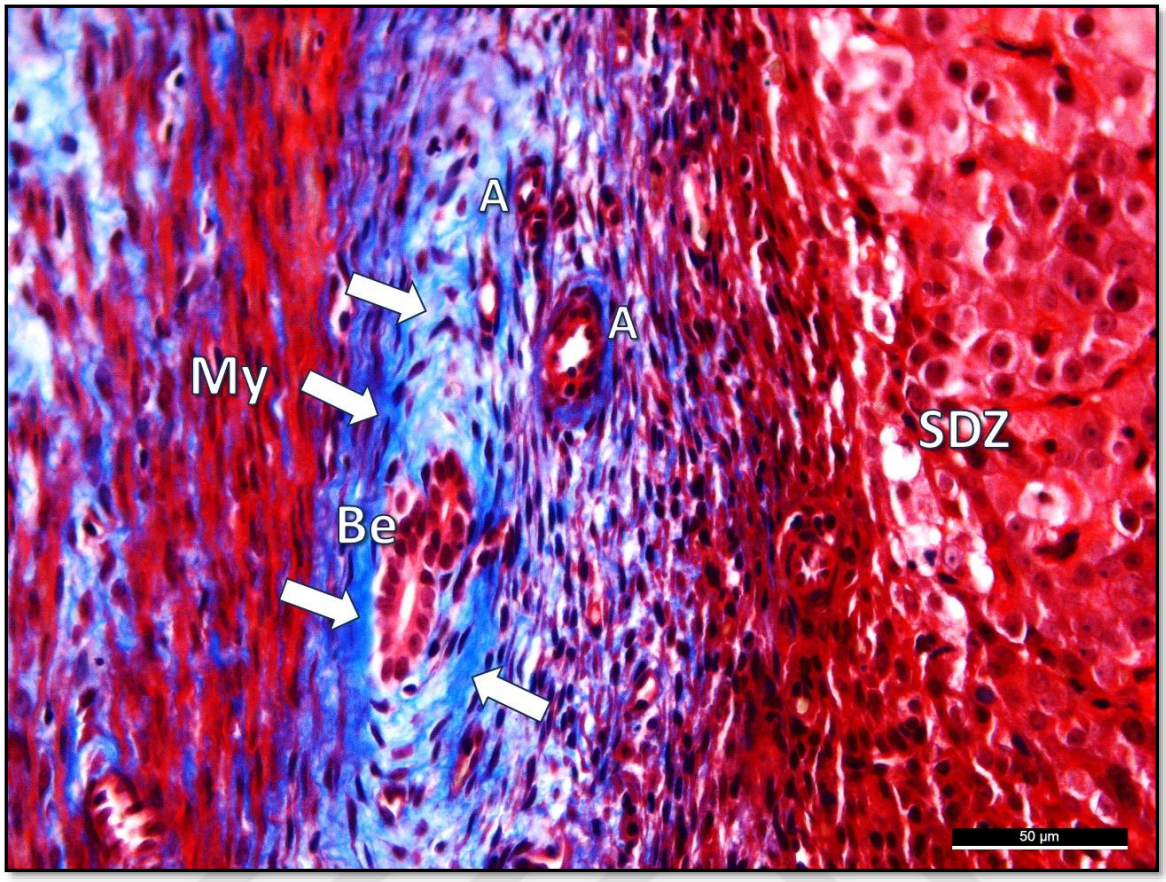
Resim 4. 16. D vitamini eksikliği grubuna ait implantasyon bölgesinin hematoksilen-eozin boyaması. Miyometriyum (My), perimetriyum (P) ve miyometriyumun düz kas katmanları arasında bulunan bağ dokuda yer alan kan damarları (★) normal histolojik yapılarında izleniyor (Hematoksilen-Eozin x 400).



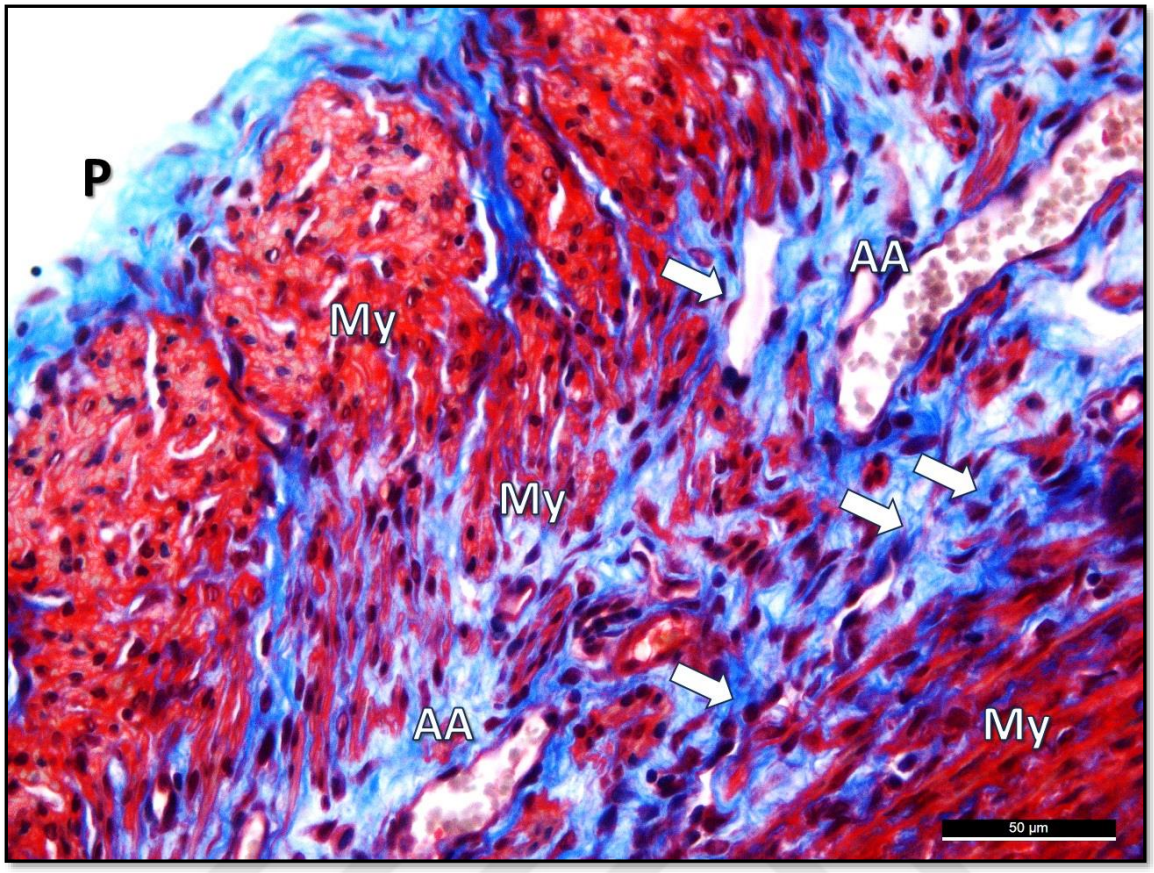
Resim 4.17. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), Primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları, kollajen lifler (Ko) ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) tabakaları ayırt ediliyor (Masson Trikrom x 40).



Resim 4.18. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Lümen epiteli (Ep), lamina propria (Lp) normal histolojik yapılarında izleniyor (Masson Trikrom x 400).



Resim 4.19. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Miyometriyuma (My) bitişik, sekonder desidual zonun (SDZ) altında yer alan bez (Be) ve miyometriyuma doğru itilmiş kollajen lifler (kalın oklar) ve bu liflerin arasında bulunan damar yapıları (A) gözleniyor (Masson Trikrom x 400).



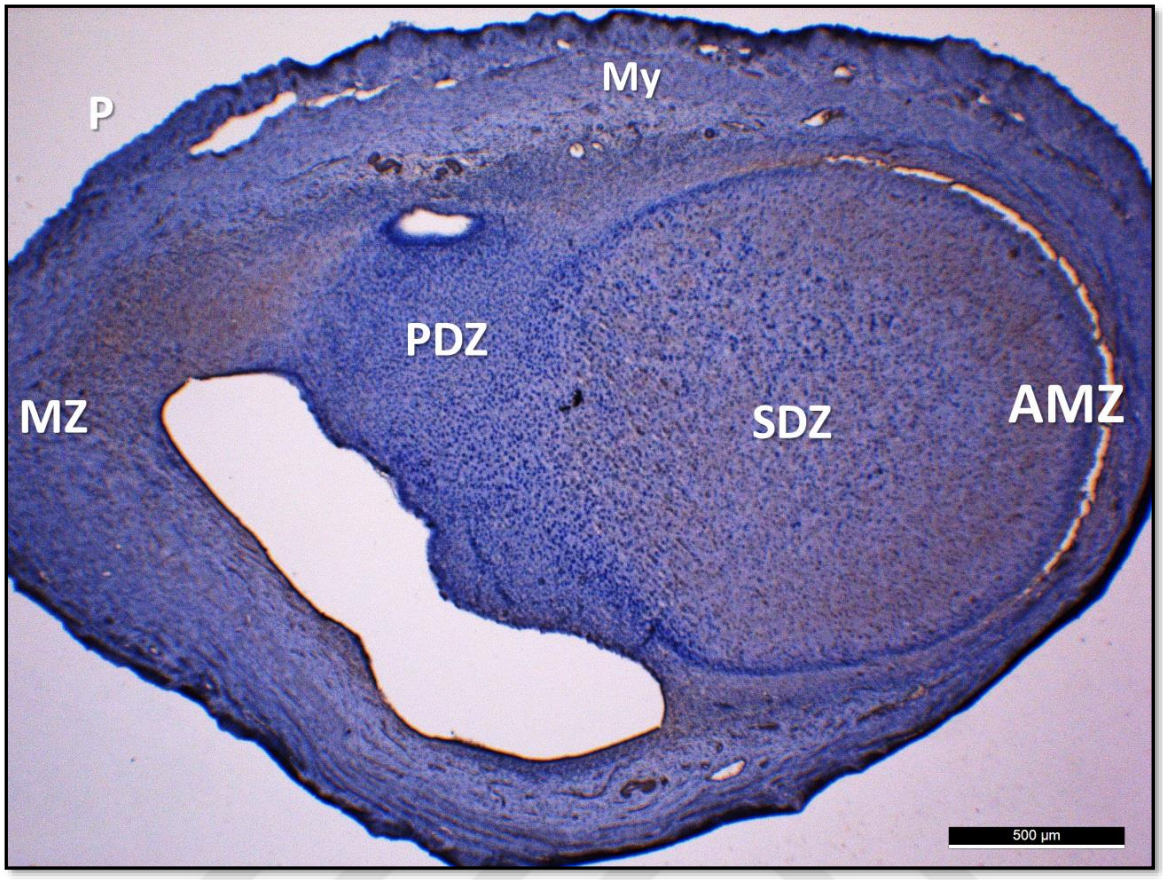
Resim 4. 20.D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesinin Masson'un üçlü boyaması. Miyometriyum (My) ve miyometriyumun düz kas katmanları arasında bulunan bağ dokuda yerleşik arkuat arterler (AA), kollajen lifler (kalın oklar), perimetriyum (P) normal histolojik yapılarında izleniyor (Masson Trikrom x 400).

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

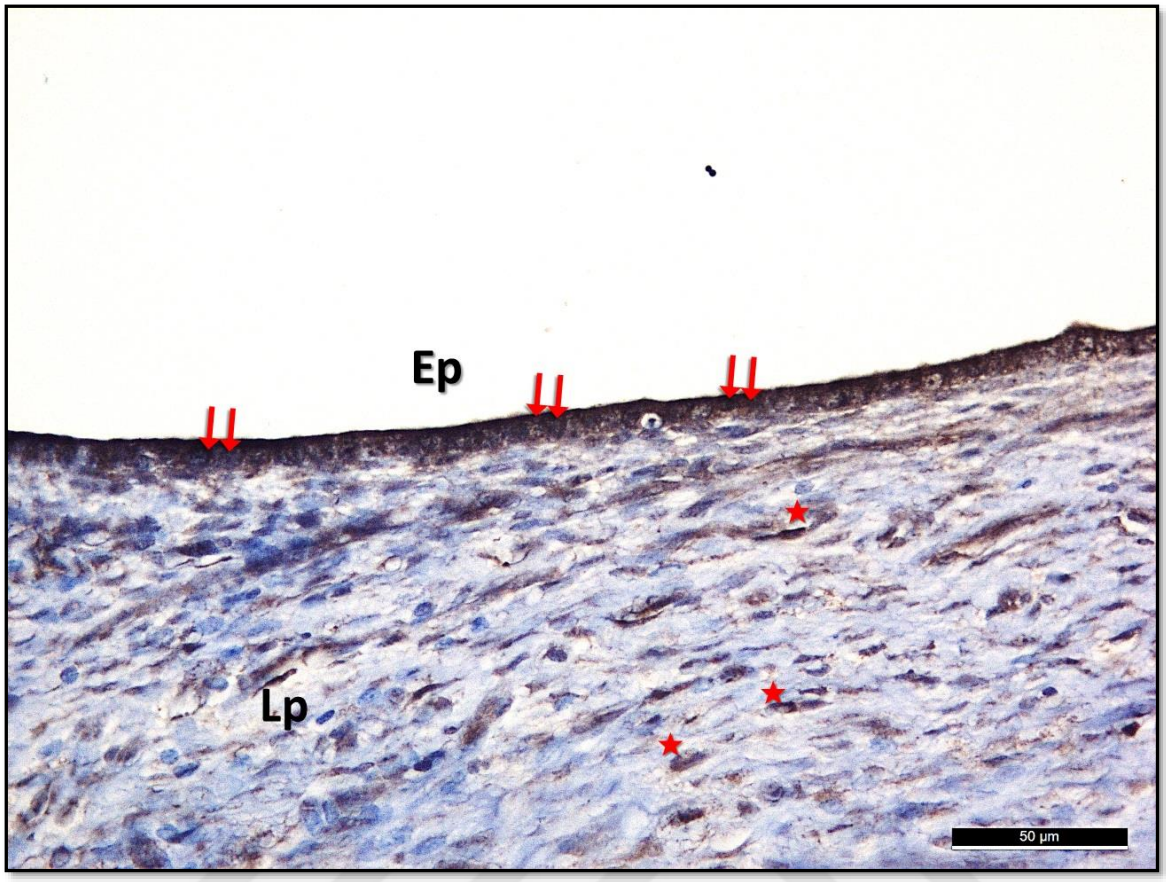
4.4.1. Osteopontin bulguları

Kontrol grubunda, hematoksilen-eozin bulguları ile tutarlı olarak gebeliğin 8.gününe ait implantasyon alanlarının kesitleri incelendiğinde anti-mezometriyal bölge, mezometriyal bölge, primer desidual zon, sekonder desidual zon ile miyometriyum ve perimetriyum tabakaları ayırt edilmekteydi (Resim 4. 21). Bu grupta Osteopontin immün tutulumu değerlendirildiğinde, lümen epiteli hücrelerinin çekirdek, epitel ve membranlarında oldukça kuvvetli (++++) immünreaktivite dikkat çekmekteydi (Resim 4. 22). Bez epiteli hücrelerinin ise çekirdek ve sitoplazmalarında kuvvetli (+++) Osteopontin immün tutulumu olduğu görüldü (Resim 4. 23). Lümen epitelinin altında yerleşik bulunan primer desidual alandaki hücrelerde ise zayıftan ortaya değişen immünreaktivite görüldü (Resim 4. 24). Anti-

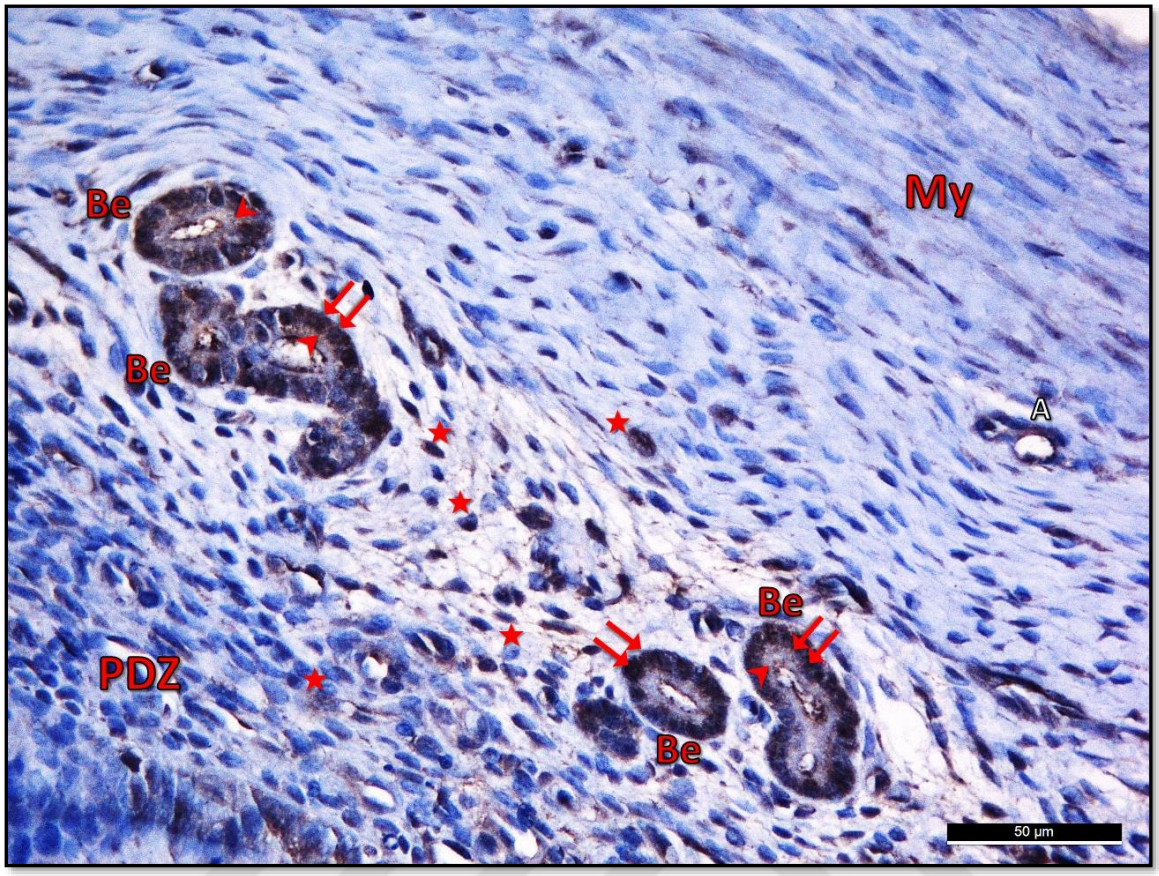
mezometriyal bölgede yerleşik sekonder desidual alanda Osteopontin immün tutulumu oldukça kuvvetli (++++) ve yaygın izlendi (Resim 4. 25). Miyometriyum tabakasını meydana getiren içte sirküler, dışta longitudinal ve orta kısımda oblik düzenlenim gösteren düz kas liflerinde Osteopontin immün tutulumu zayıf (+) olarak gözlenirken perimetriyumda ise negatiften zayıfa doğru değişen immün tutulum olduğu belirlendi (Resim 4. 26). Ayrıca hem uterus bezlerine yakın konumlanan hem de miyometriyumun kas tabakaları arasında yerleşik bulunan kan damarlarının duvarlarında da kuvvetli (+++) immünreaktivite dikkat çekmekteydi (Resim 4. 23 ve Resim 4. 26). D vitamini eksikliği grubuna ait kesitlerde, gebeliğin 8. gününe ait implantasyon alanlarında anti-mezometriyal bölge, mezometriyal bölge, primer desidual zon, sekonder desidual zon ile miyometriyum ve perimetriyum tabakaları ayırt edilmekteydi (Resim 4. 27). Kontrol grubundan ayrıcalı olarak, lümen epiteli hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında Osteopontin immün tutulumunun oldukça zayıf olduğu (+) dikkat çekmekteydi (Resim 4. 28). Bez epitelini oluşturan hücrelerde de lümen epitelindeki hücrelere benzer olarak Osteopontin immünreaktivitesi azalmış ve daha çok hücre çekirdeklerinde zayıf (+) immün tutulum olduğu görülmekteydi (Resim 4. 29). Primer desidual bölgede ise immün tutulum kontrol grubuna benzer olarak zayıf izlendi (Resim 4. 30). Ancak sekonder desidual alanda bulunan hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde Ostepontin immünreaktivitesi zayıftan ortaya doğru değişmekle birlikte immün tutulumun yaygınlığının azaldığı ilgi çekmekteydi (Resim 4. 27 ve Resim 4. 31). Miyometriyum ve perimetriyum tabakalarında ise kontrol grubuna benzer olarak yine zayıf immünreaktivite olduğu görüldü (Resim 4. 32). Ostepontin pozitif hücre yüzdelerine ait grafik Şekil 4.3'de verilmiştir.



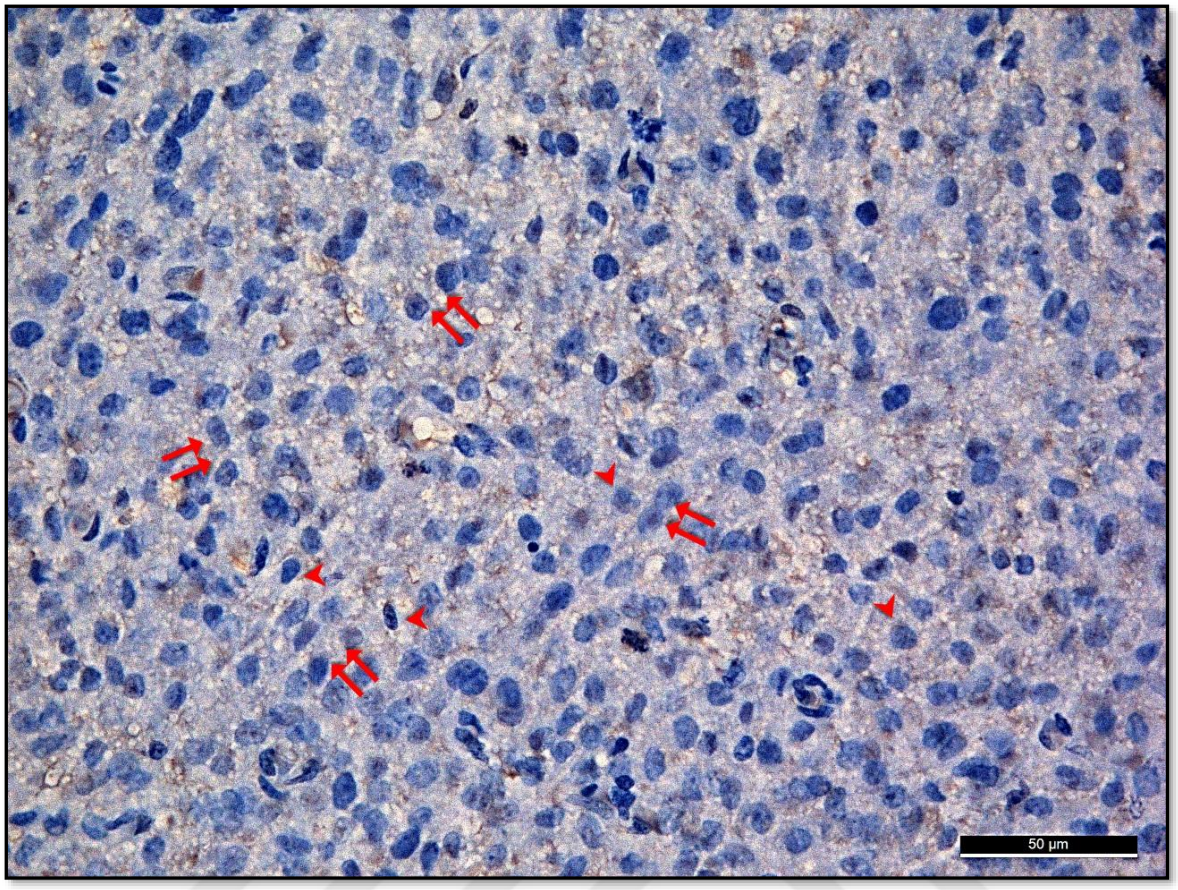
Resim 4.21. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) ayırt ediliyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



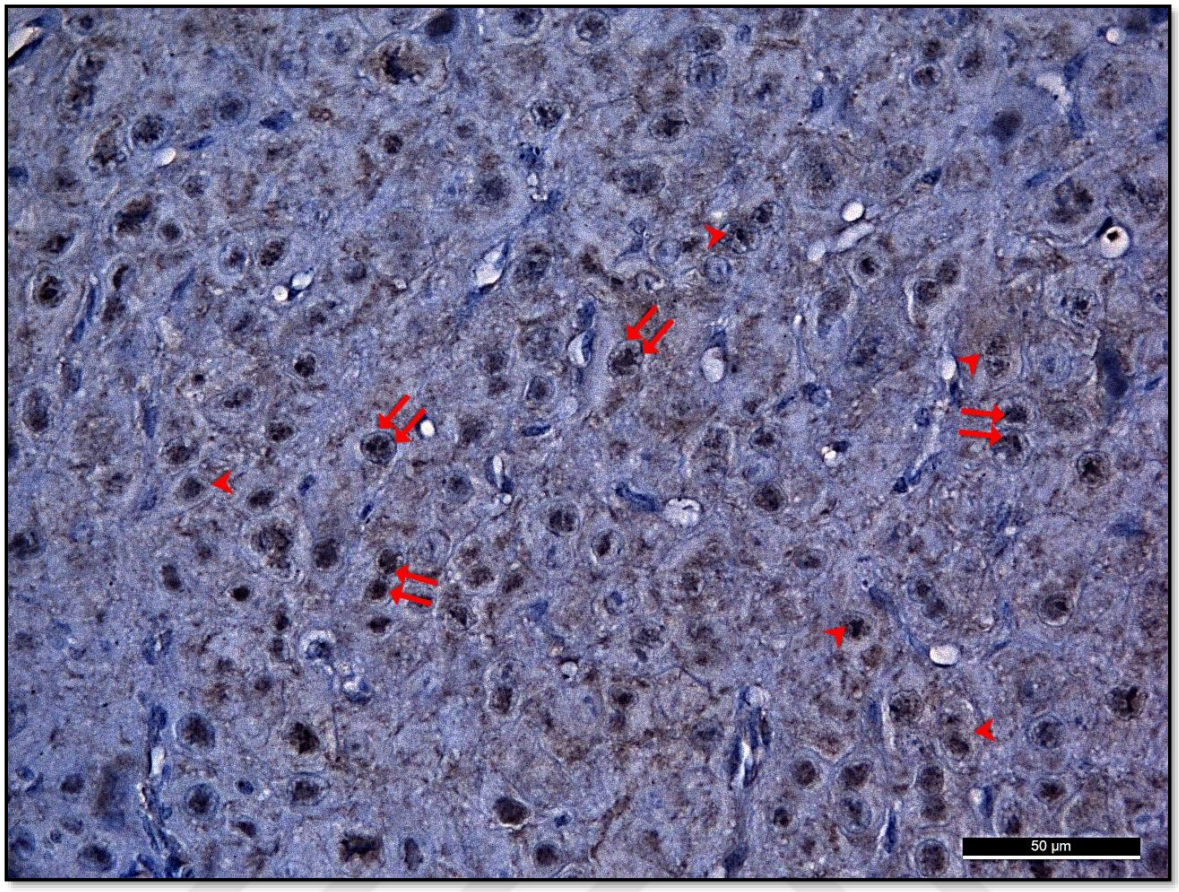
Resim 4.22. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Lümen epiteli hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında (⇉), lamina propriada bulunan primer desidual hücrelerde (★) oldukça kuvvetli Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



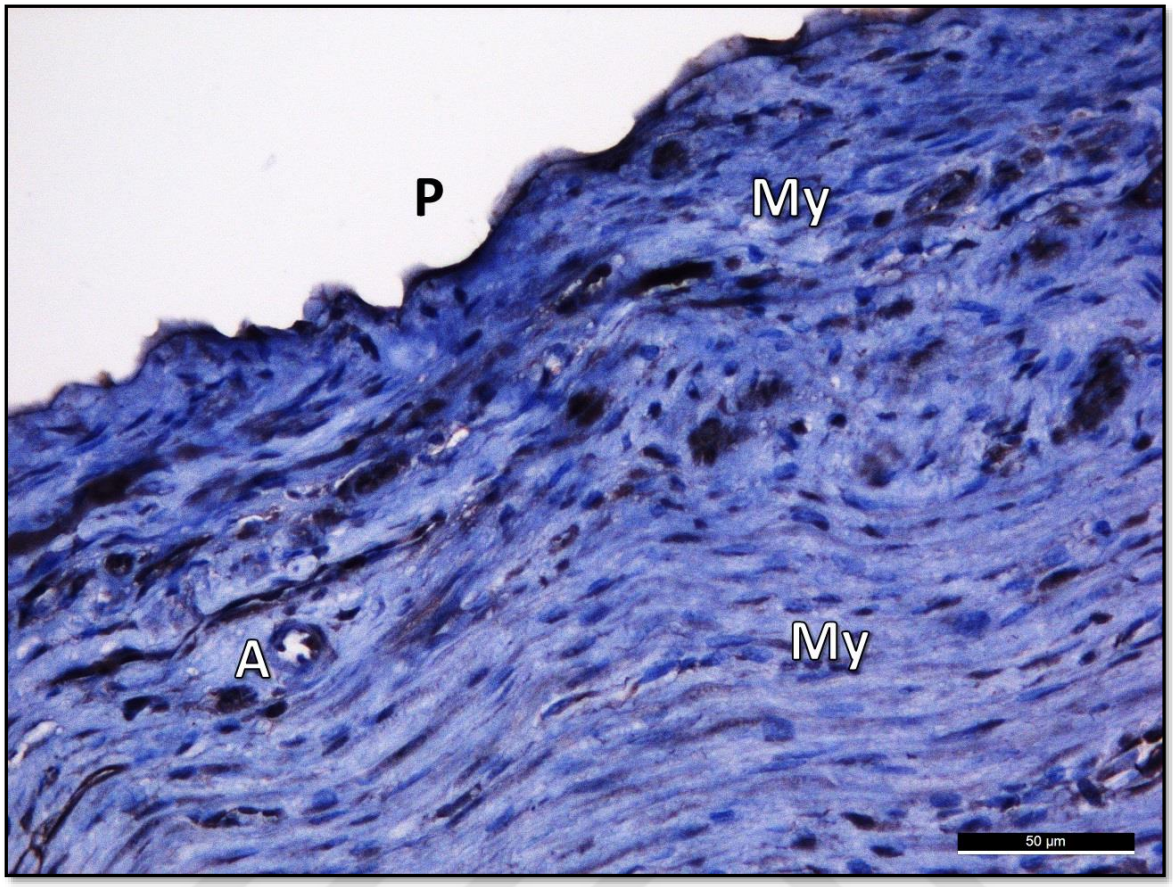
Resim 4.23. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyuma (My) yakın konumlanmış, primer desidual (PDZ) zonun yakınında bulunan bezlerde (Be) çekirdek (⇉) ve sitoplazmada (➤) ve stromal hücrelere ait çekirdeklerde (★) kuvvetli Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



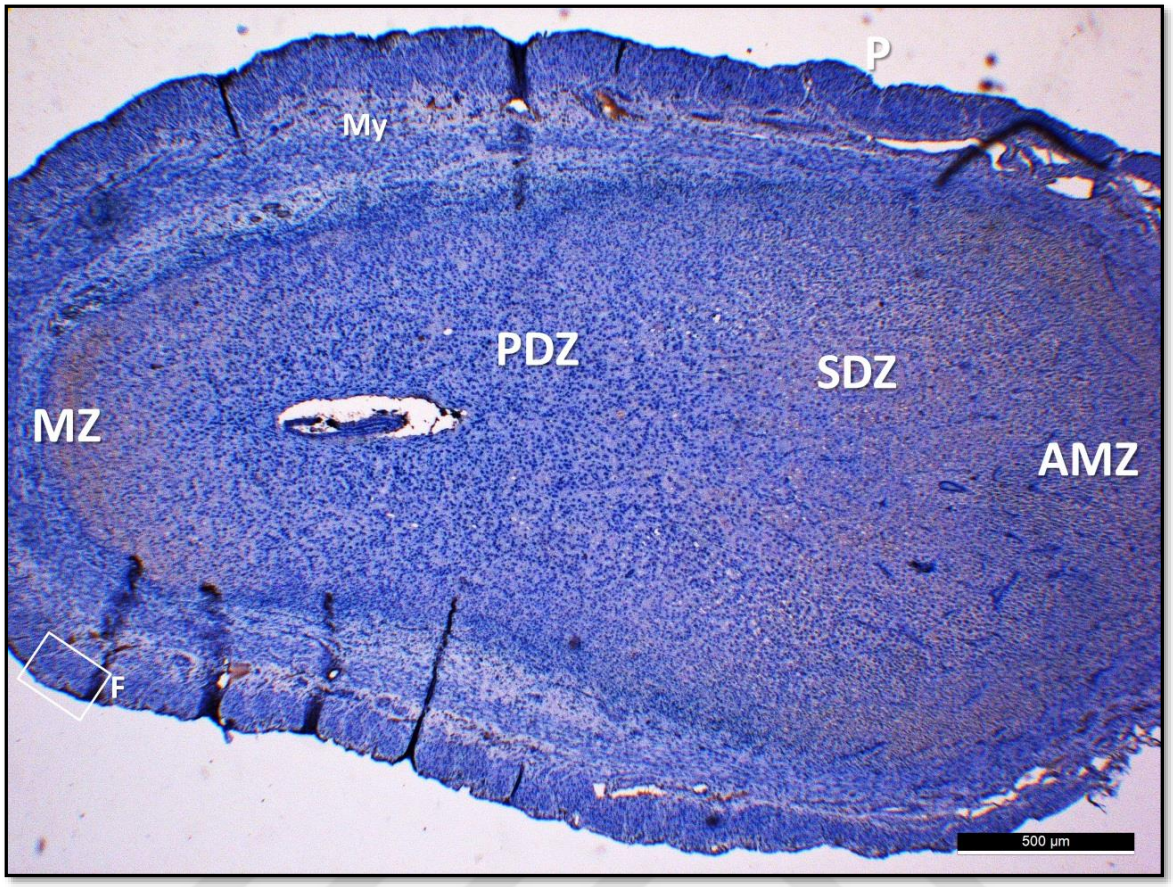
Resim 4.24. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazma (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) zayıftan ortaya değişen Osteopontin immünreaktivitesi görülüyor. (Osteopontin primer antikoru, x 400).



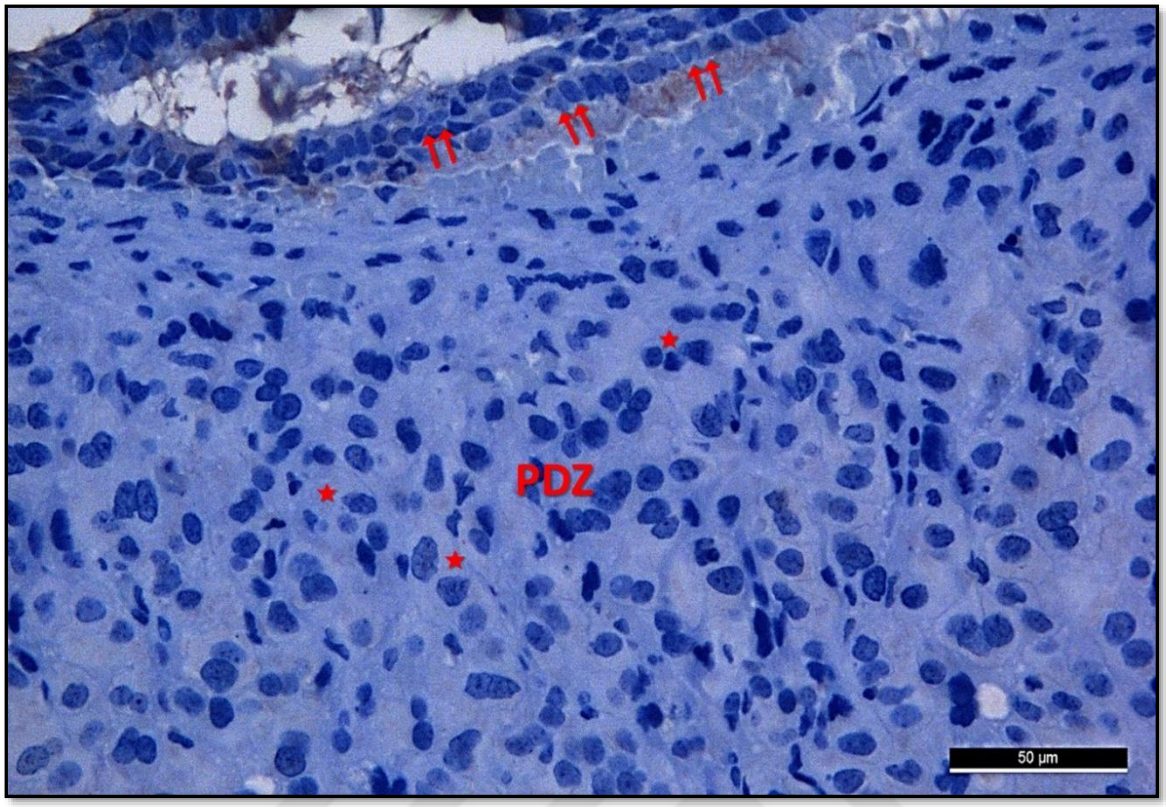
Resim 4.25. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazma (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) oldukça kuvvetli Osteopontin immünreaktivitesi gözleniyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



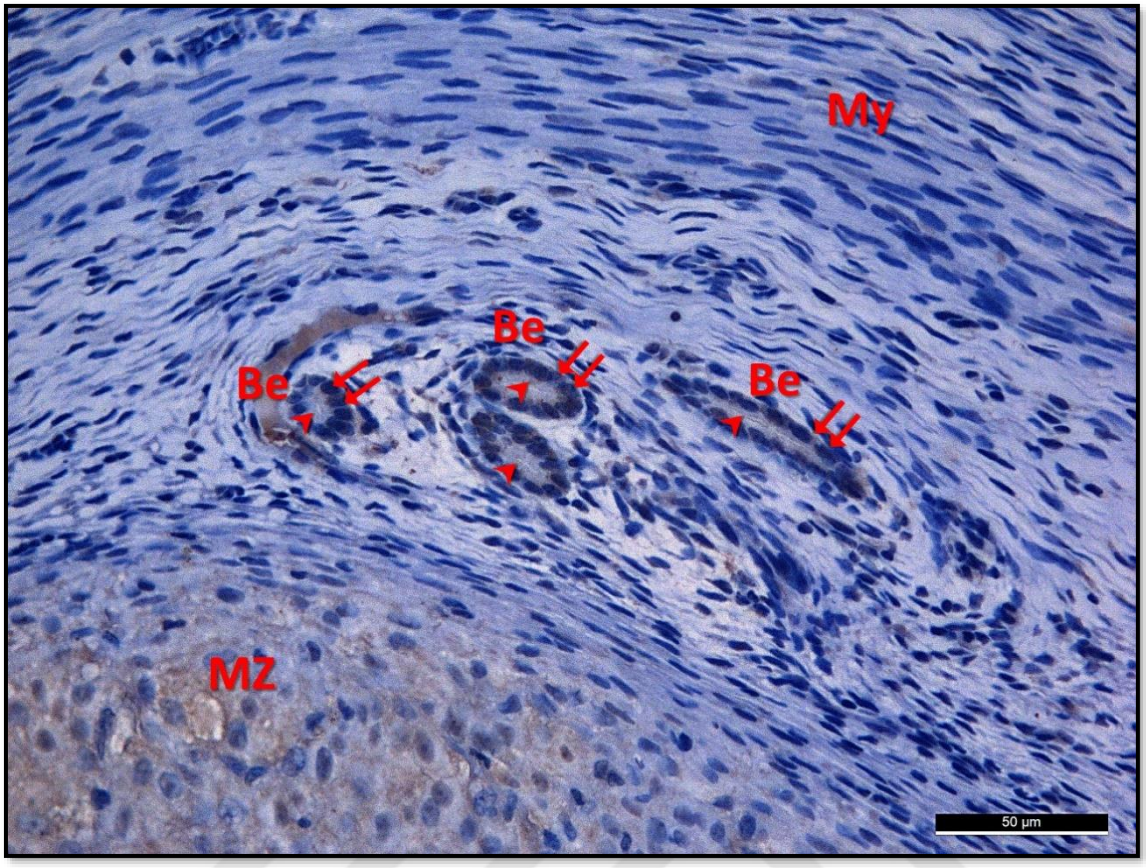
Resim 4.26. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) ve perimetriyumda (P) zayıf, kan damarı duvarında (A) kuvvetli Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Ostepontin primer antikoru, x 400).



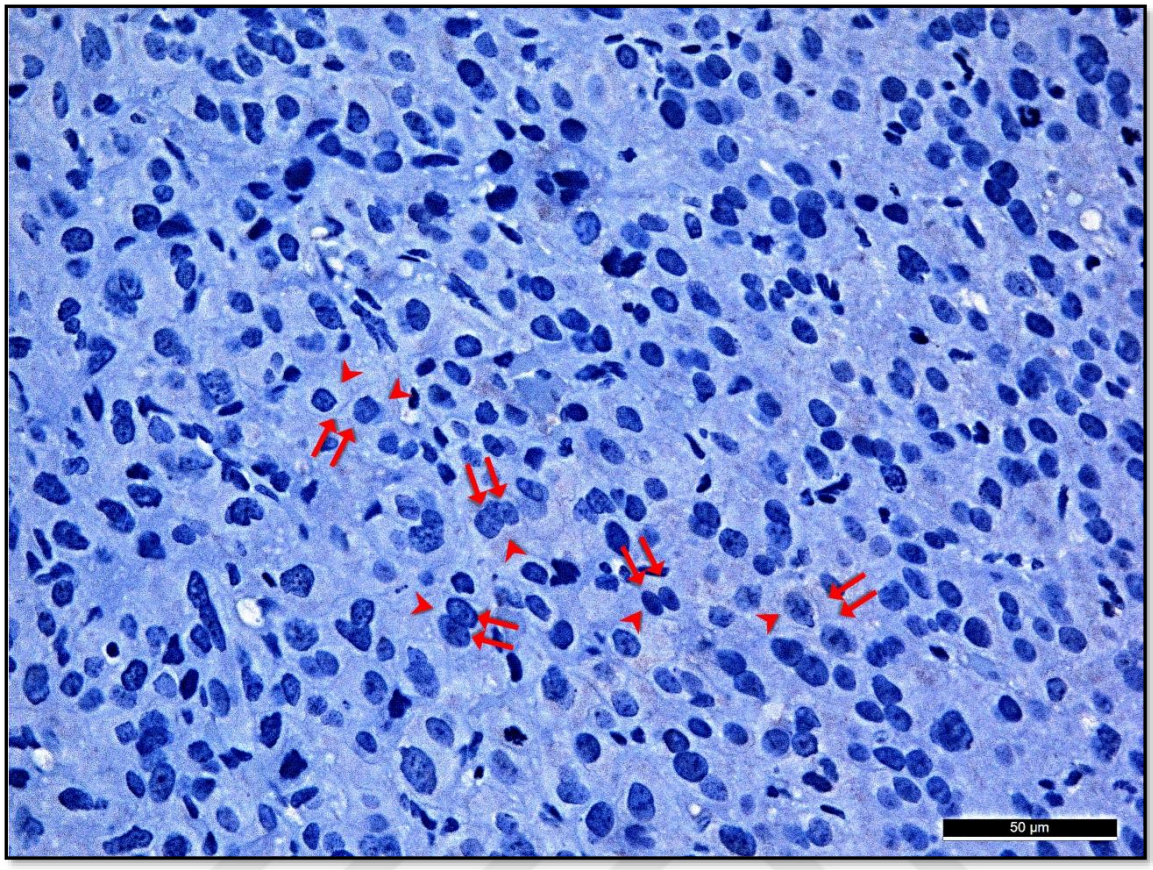
Resim 4.27. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) ayırt ediliyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



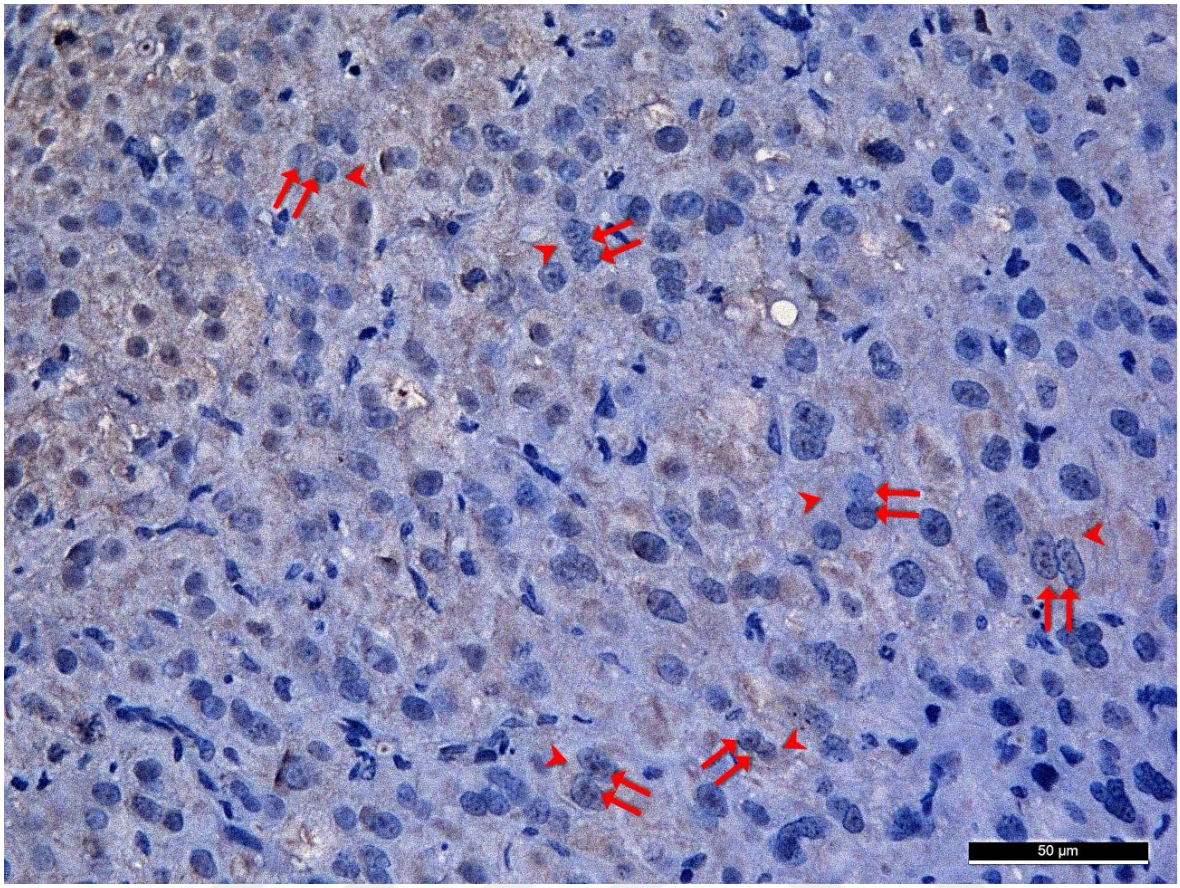
Resim 4.28. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Lümen epiteli hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında (⇉), primer desidual zonnda bulunan desidual hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında (★) zayıf Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



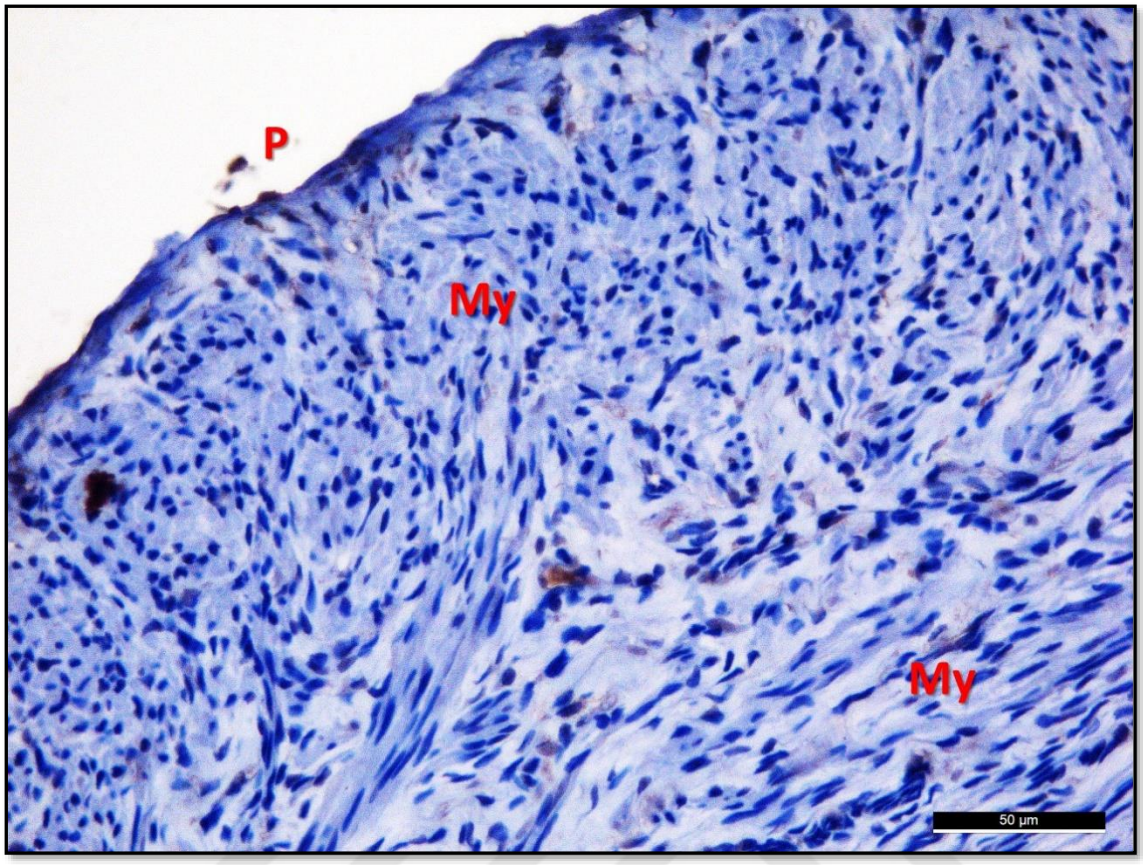
Resim 4.29. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyuma (My) yakın konumlanmış, mezometriyal bölgenin yakınında bulunan bezlerde (Be) çekirdek (⇉) ve sitoplazmada (➤) zayıf Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



Resim 4.30. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazma (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) zayıf Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Osteopontin primer antikoru, x 400).



Resim 4.31. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan bulunan desidual hücrelerin sitoplazma (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) orta dereceli Osteopontin immünreaktivitesi görülüyor (Ostepontin primer antikoru, x 400).



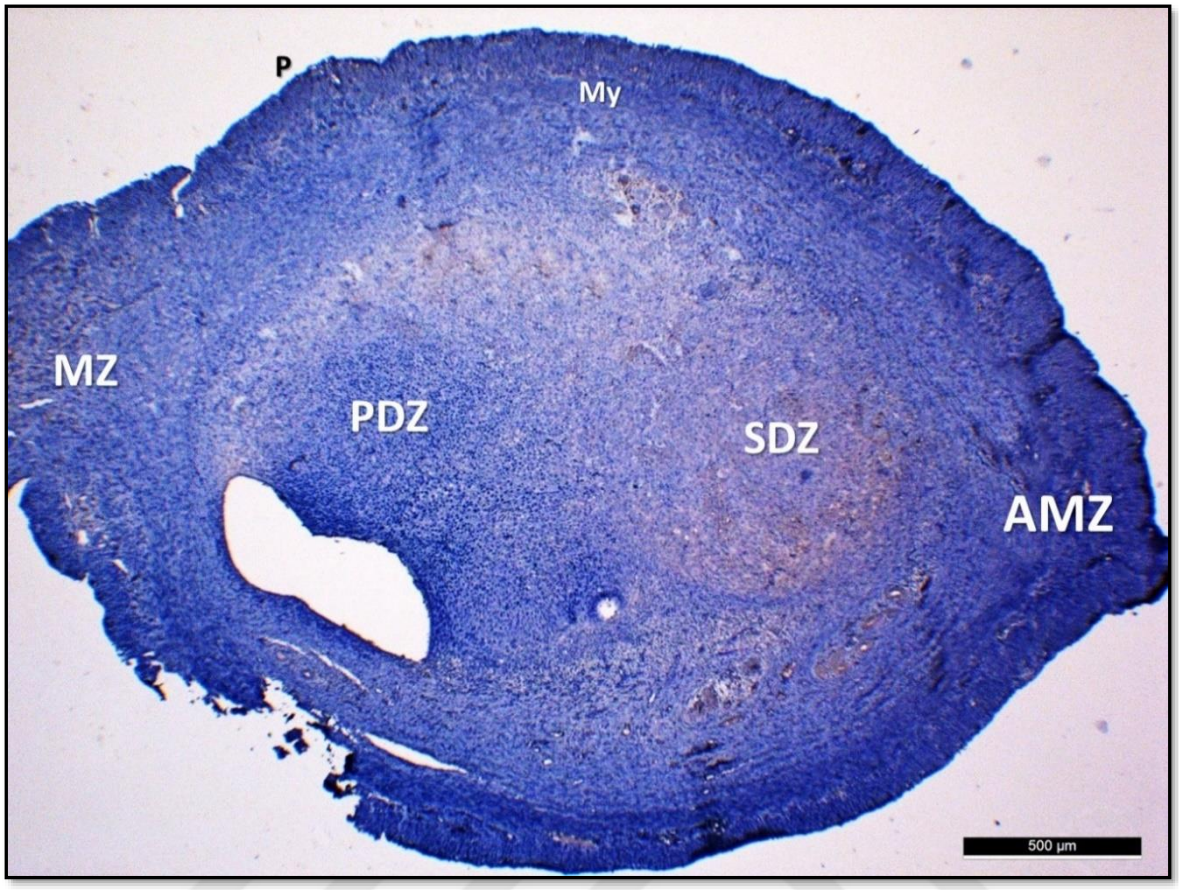
Resim 4.32. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait Osteopontin immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) ve perimetriyumda (P) zayıf Osteopontin immünreaktivitesi izleniyor (Ostepontin primer antikoru, x 400).

4.4.2. VEGF-A bulguları

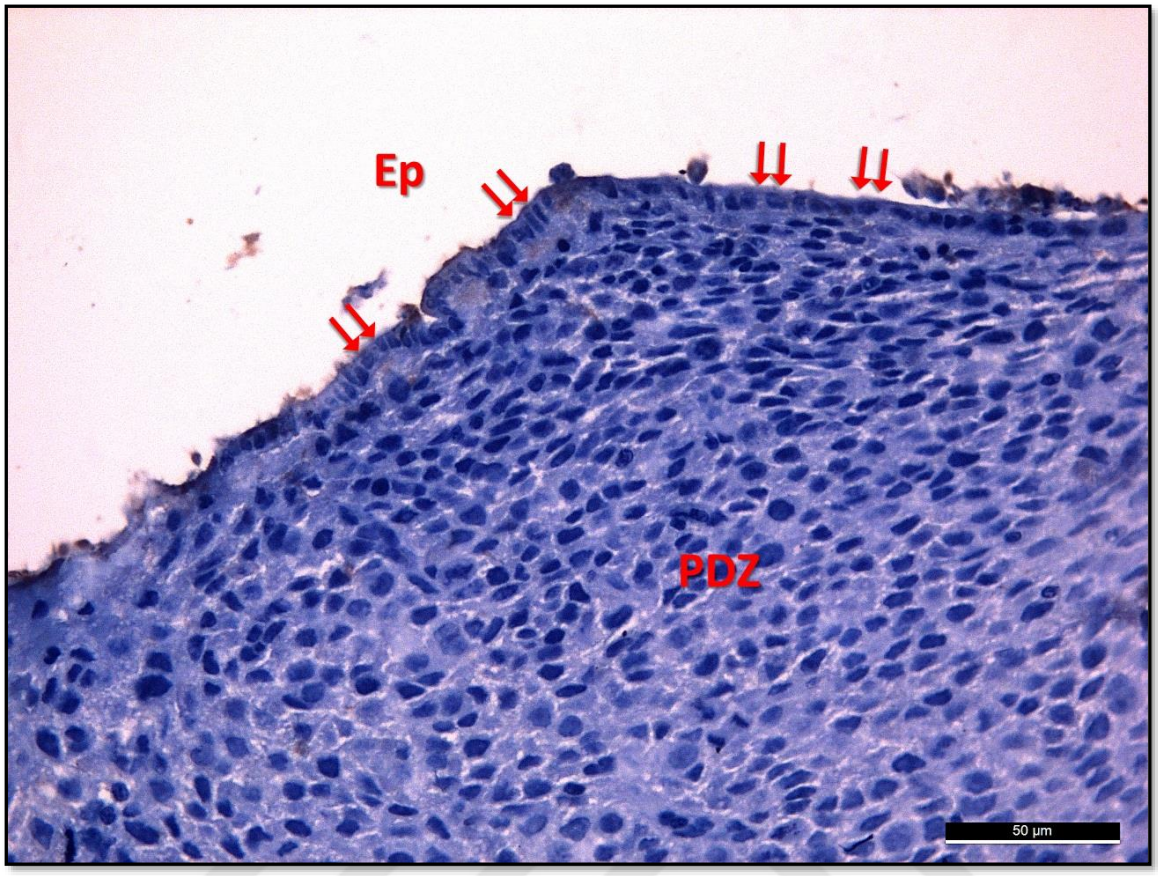
Kontrol grubunda yapılan VEGF-A immün boyamalarında, implantasyon alanlarından elde edilen kesitlerin lümen epitelleri değerlendirildiğinde VEGF-A'nın negatiften zayıfa (+) doğru değişmekte olan immünreaktivite sergilediği saptandı (Resim 4. 33 ve Resim 4. 34). Bu gruba ait kesitlerde, bez epitel hücrelerinde, ortadan kuvvetliye doğru değişen immünreaktivite dikkat çekiciydi (Resim 4. 35). Sekonder desidual bölgenin çevrelediği primer desidual bölgede bulunan desidual hücrelerde zayıf (+) sitoplazmik VEGF-A immünreaktivitesi belirlendi (Resim 4. 36). Mezometriyal bölgeye yakın olan sekonder desidual hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde, kuvvetli (+++) VEGF-A immün tutulumu olduğu gözlendi (Resim 4. 37). Ayrıca, miyometriyum VEGF-A immün tutulumu açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda düz kas lifleri ve bu liflerin arasında bulunan bağ dokuda oldukça zayıf (+) immünreaktivite tespit edildi. Ancak düz kas lifleri arasında

bulunan bağ dokuda yerleşik ve aynı zamanda bezlerin etrafında yer alan kan damarların duvarlarında ortadan kuvvetliye (++) değişen VEGF-A immünreaktivitesi olduğu görüldü. Perimetriyumda ise negatiften zayıfa (+) doğru değişen VEGF-A immün tutulumu olduğu izlendi (Resim 4. 38).

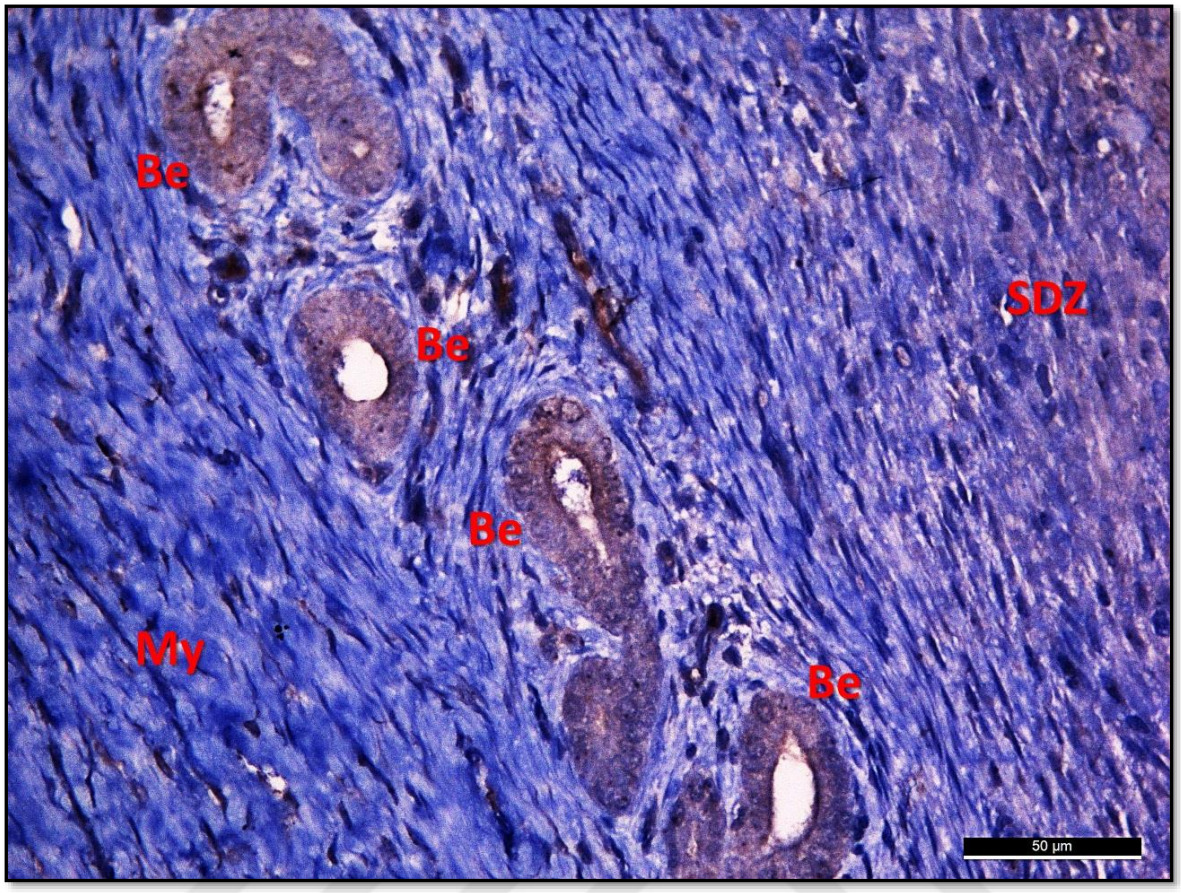
Kontrol grubuna benzer olarak, D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubuna ait kesitlerde lümen epitelinde VEGF-A immün boyamalarının da oldukça zayıf (+) immün tutuluma sahip olduğu izlendi (Resim 4. 39 ve Resim 4. 40). Kontrol grubundan ayrıcalı olarak bez epitel hücrelerinde VEGF-A immün tutulumun zayıf olduğu belirlendi (Resim 4. 41). Primer desidual bölgede yerleşik bulunan desidual hücrelerde negatiften zayıfa doğru değişen immünreaktivite izlenirken, sekonder desidual bölgede ise VEGF-A immün tutulumunun orta dereceli (++) olduğu ancak kesitlerin genelinde ve ayrıca hem mezometriyal hem de anti-mezometriyal bölgelere bitişik olan sekonder desidual alanlarda VEGFA-immünreaktivitesinin yaygınlığının kontrol grubuna göre oldukça azaldığı belirlendi (Resim 4. 42 ve Resim 4. 43). Miyometriyum VEGF-A immün tutulumu açısından değerlendirildiğinde bu grupta düz kas lifleri ve bu liflerin arasında bulunan bağ dokuda oldukça zayıf (+) immünreaktivite tespit edildi. Ancak düz kas lifleri arasında bulunan bağ dokuda yerleşik ve aynı zamanda bezlerin etrafında yer alan kan damarların duvarlarında ortadan kuvvetliye (++) değişen VEGF-A immünreaktivitesi olduğu görüldü. Perimetriyumda ise negatiften zayıfa (+) doğru değişen VEGF-A immün tutulumu olduğu izlendi (Resim 4. 44). VEGF-A pozitif hücre yüzdelerine ait grafik Şekil 4.3'de verilmiştir.



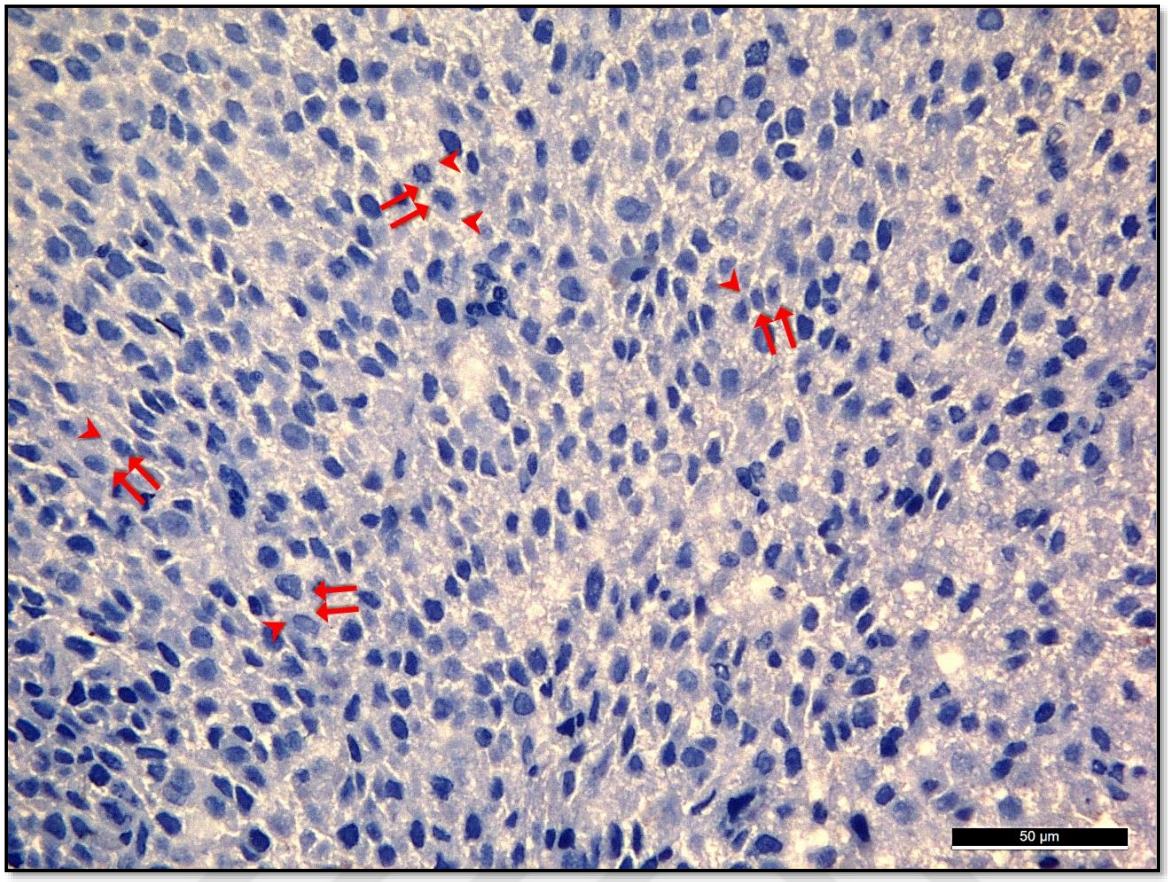
Resim 4.33. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) ayırt ediliyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



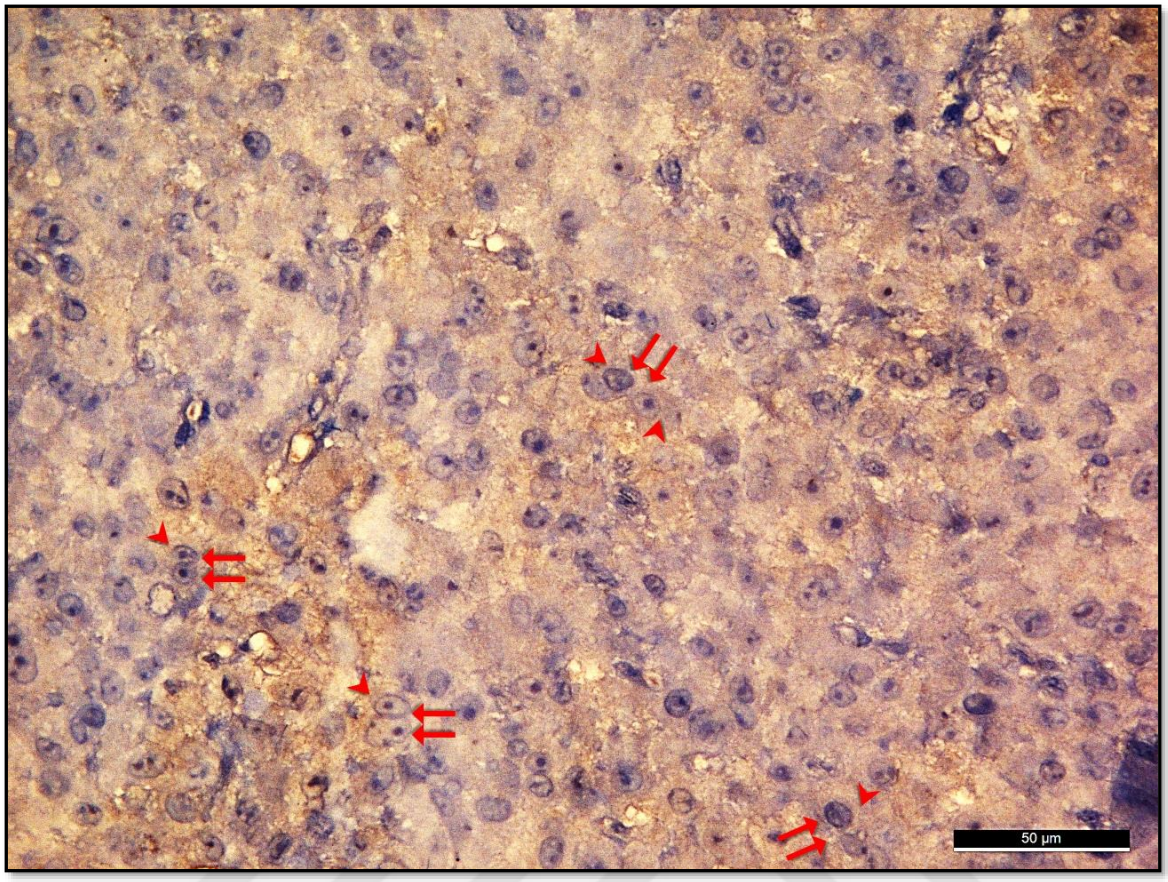
Resim 4.34. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Lümen epiteli (Ep) hücrelerinde zayıf (⇉), primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerde ise zayıftan orta dereceye değişen VEGF-A immünreaktivitesi izleniyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



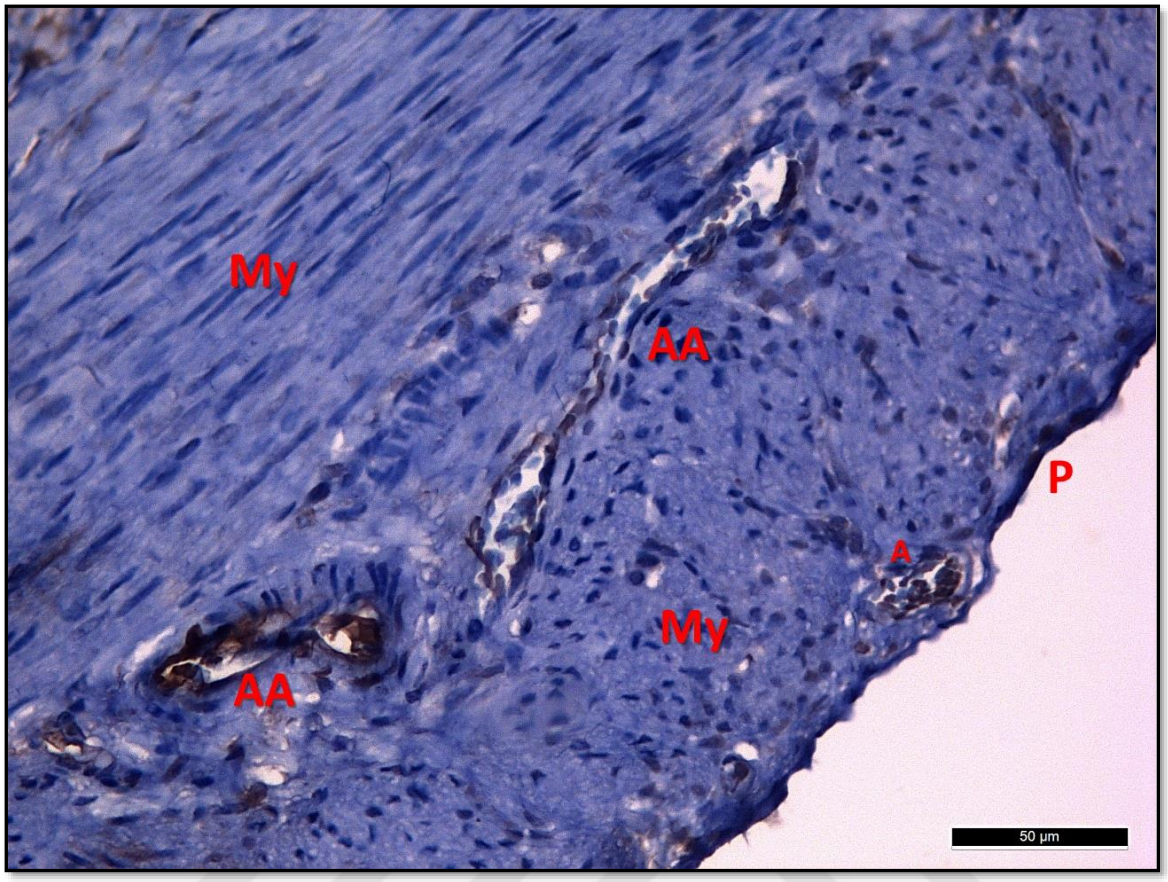
Resim 4.35. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) yakın konumlanmış, sekonder desidual zonun (SDZ) yakınında bulunan bezlerde (Be) kuvvetli VEGF-A immünreaktivitesi izleniyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



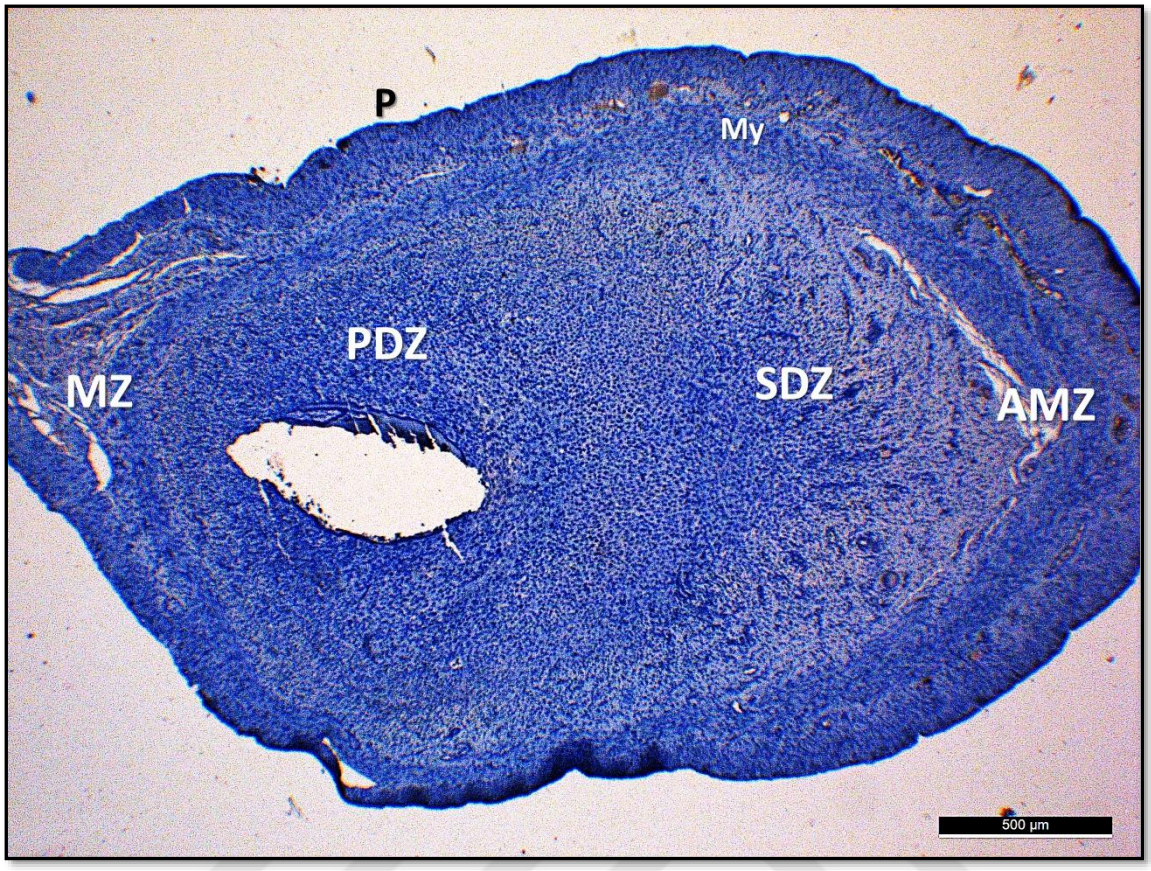
Resim 4.36. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazma (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) zayıftan ortaya değişen VEGF-A immünreaktivitesi görülüyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



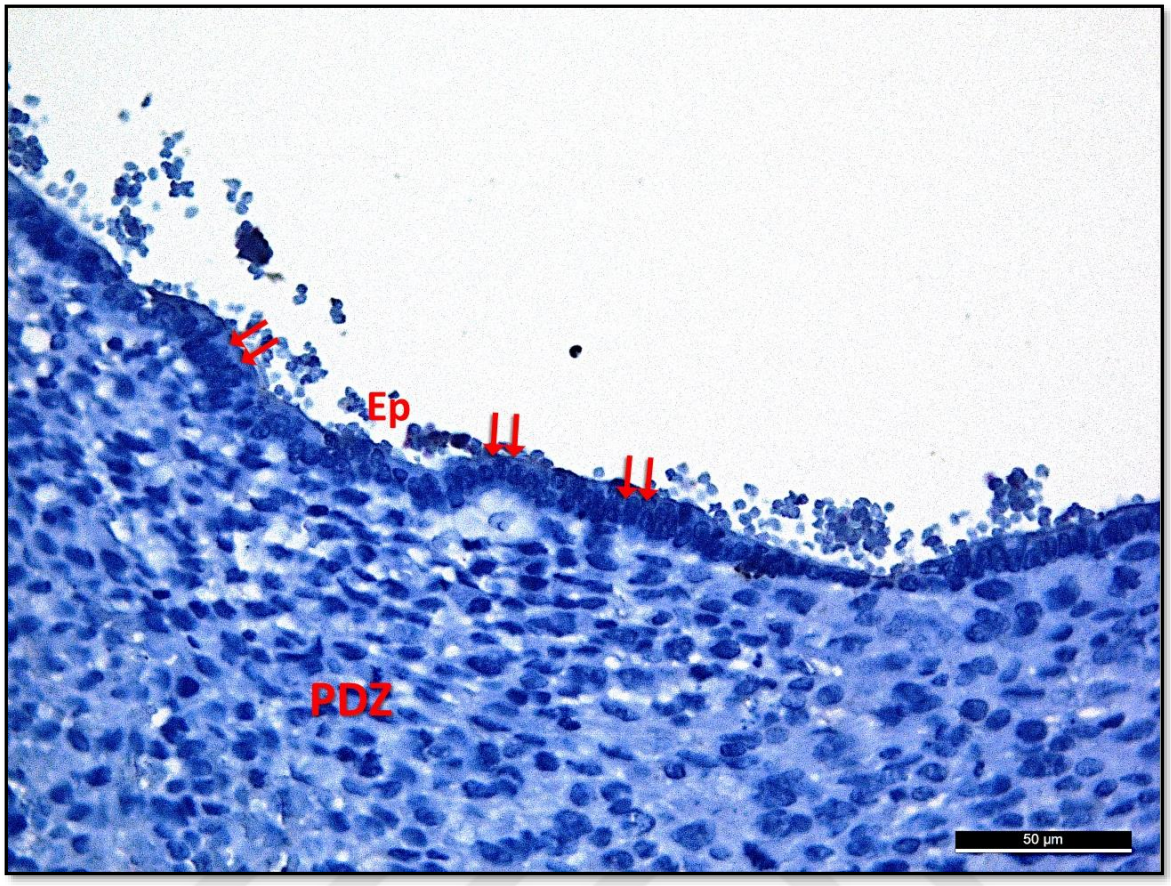
Resim 4.37. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazmalarında (➤) kuvvetli ve çekirdeklerinde (⇉) zayıf VEGF-A immünreaktivitesi görülüyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



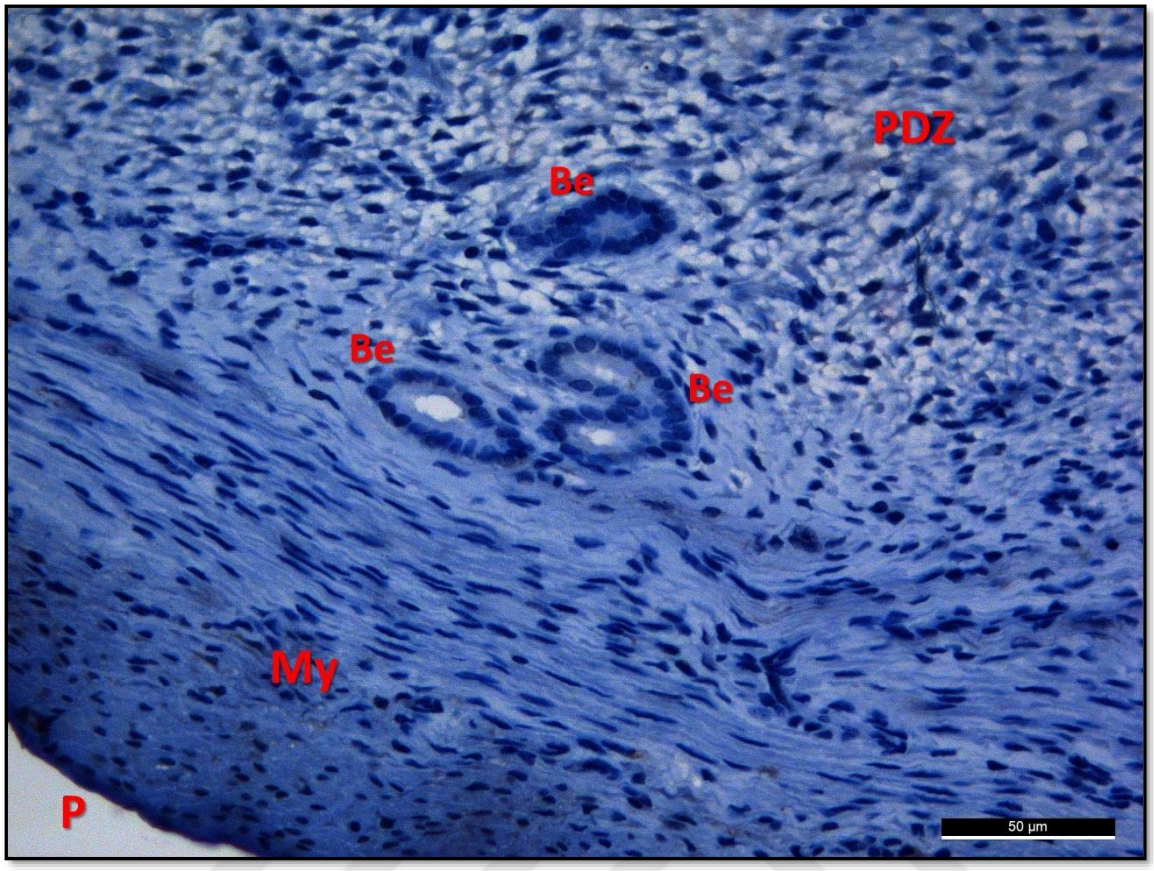
Resim 4.38. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) ve perimetriyumda (P) zayıf, miyometriyum kas tabakaları arasında bulunan bağ dokusunda yerleşik olan arkuat arterler (AA) ve diğer küçük arterlerde (A) kuvvetli VEGF-A immünrekativitesi görülüyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



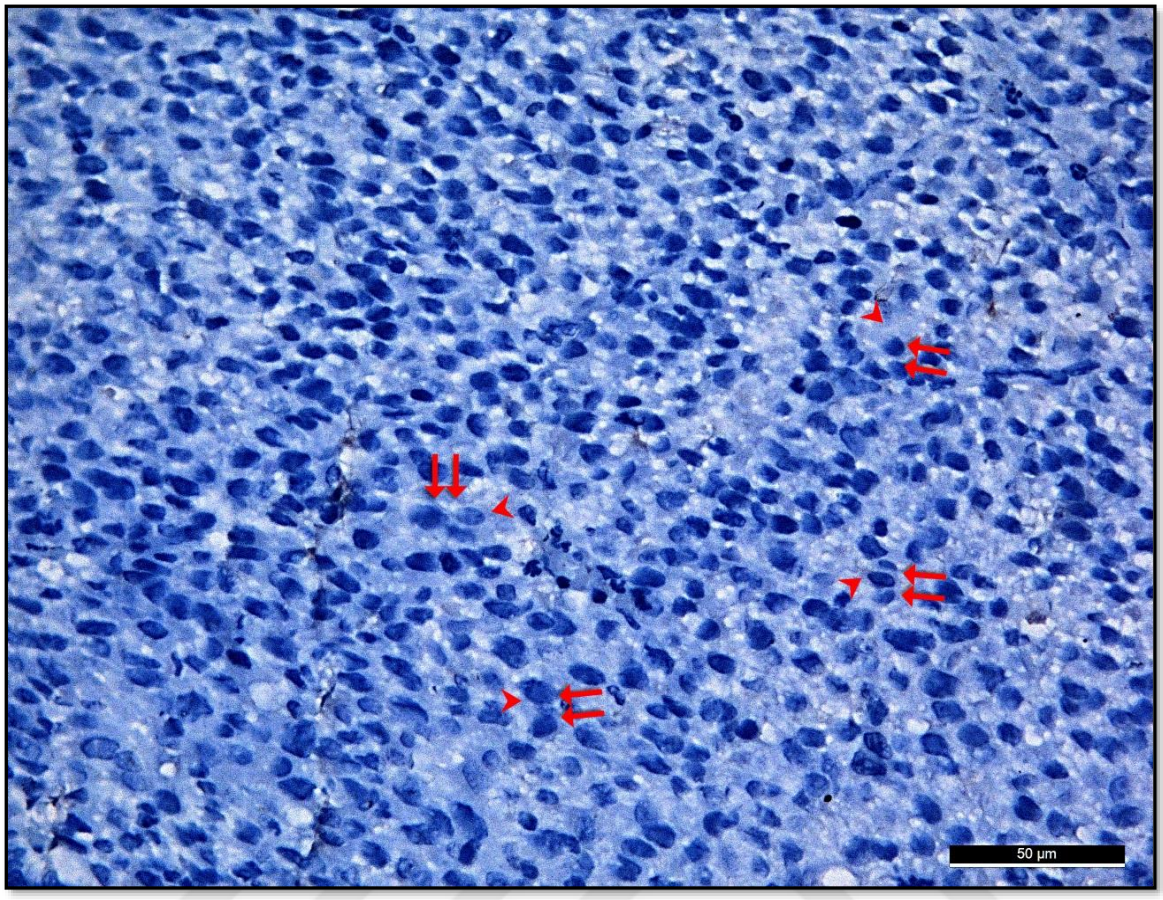
Resim 4.39. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) ayırt ediliyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



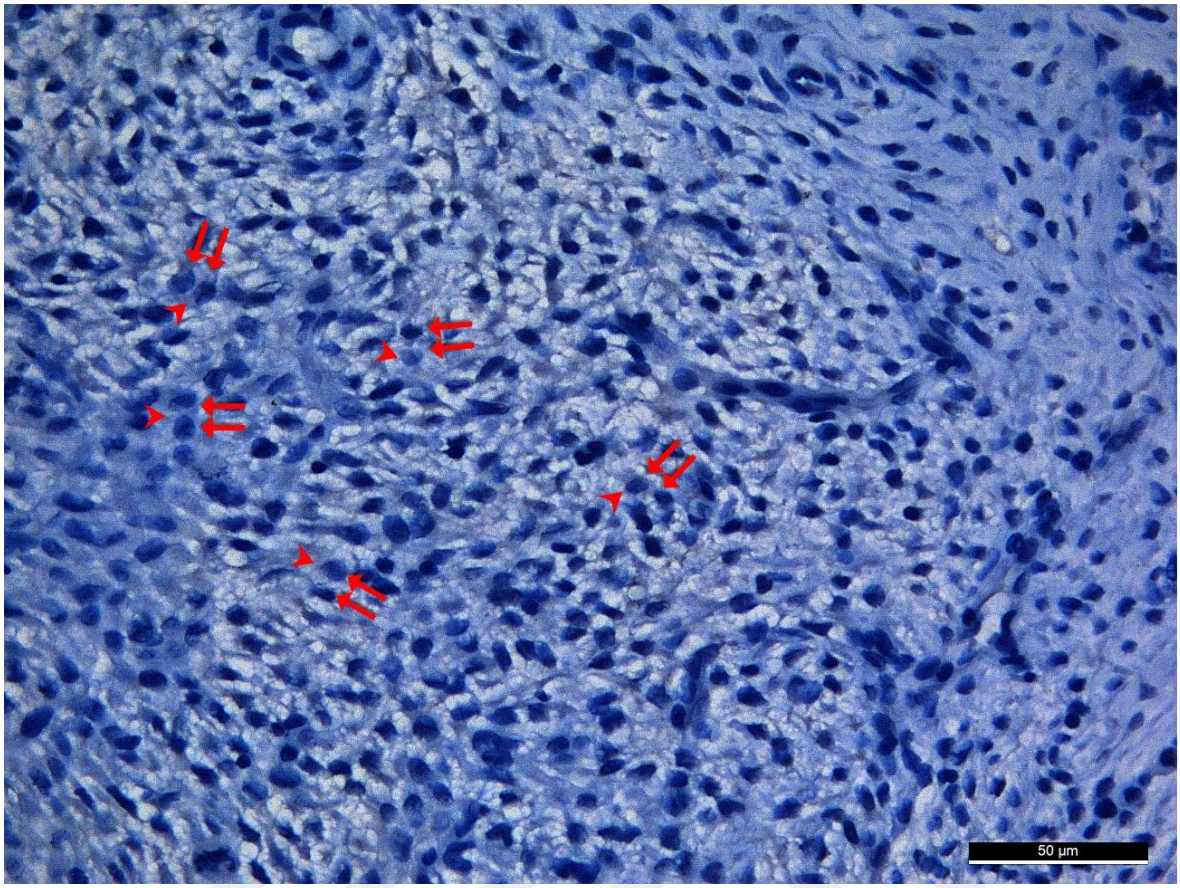
Resim 4.40. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Lümen epiteli (Ep) hücrelerinde zayıf (⇉) ve primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerinde de zayıf VEGF-A immünreaktivitesi izleniyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



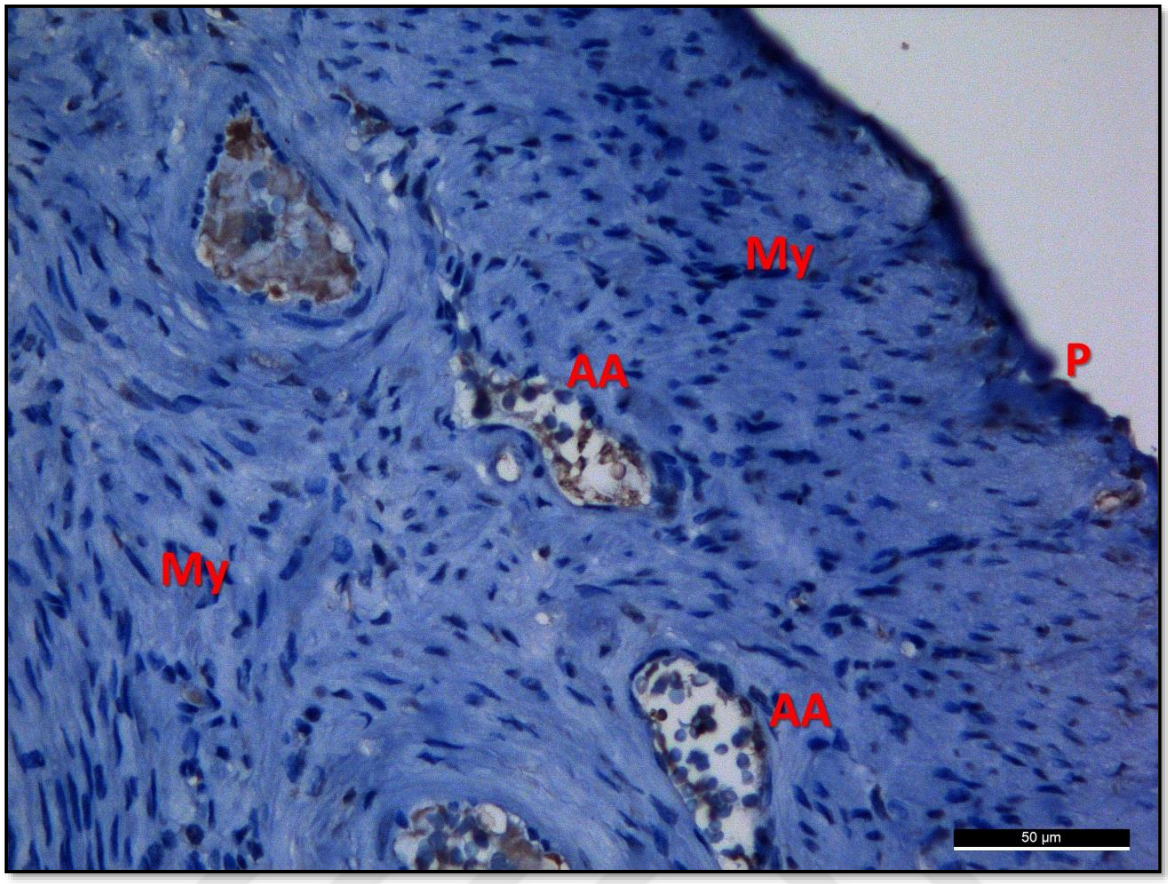
Resim 4.41. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) yakın konumlanmış, primer desidual zonun (PDZ) yakınında bulunan bezlerde (Be) zayıf VEGF-A immünreaktivitesi izleniyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



Resim 4.42. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazmalarında (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) zayıf VEGF-A immünreaktivitesi izleniyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



Resim 4.43. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazmalarında (➤) ve çekirdeklerinde (⇉) zayıf VEGF-A immünreaktivitesi izleniyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).



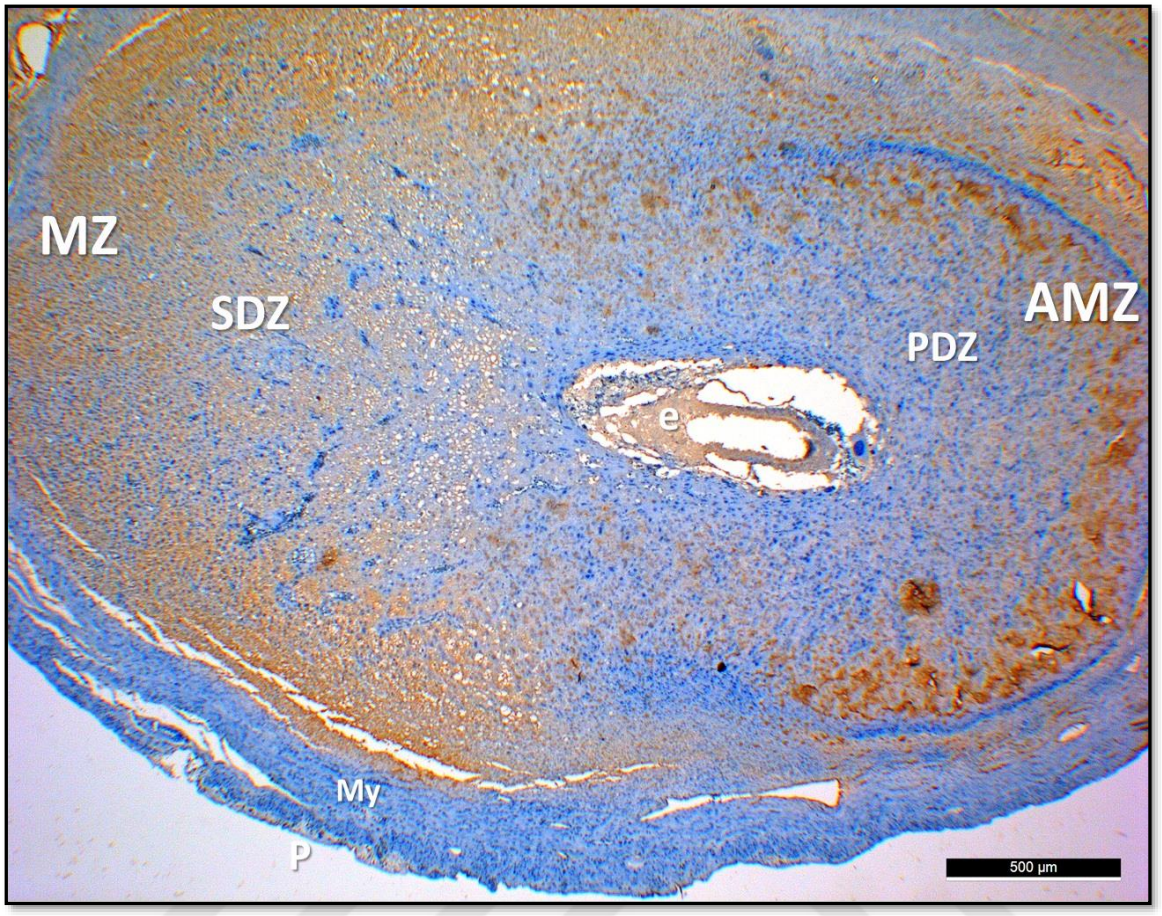
Resim 4.44. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait VEGF-A immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) ve perimetriyumda (P) zayıf, miyometriyumun kas tabakaları arasında bulunan bağ dokuda yerleşik arkuat arterlerin (AA) duvarlarında kuvvetli VEGF-A immün tutulumu görülüyor (VEGF-A primer antikoru, x 400).

4.4.3. MMP-9 bulguları

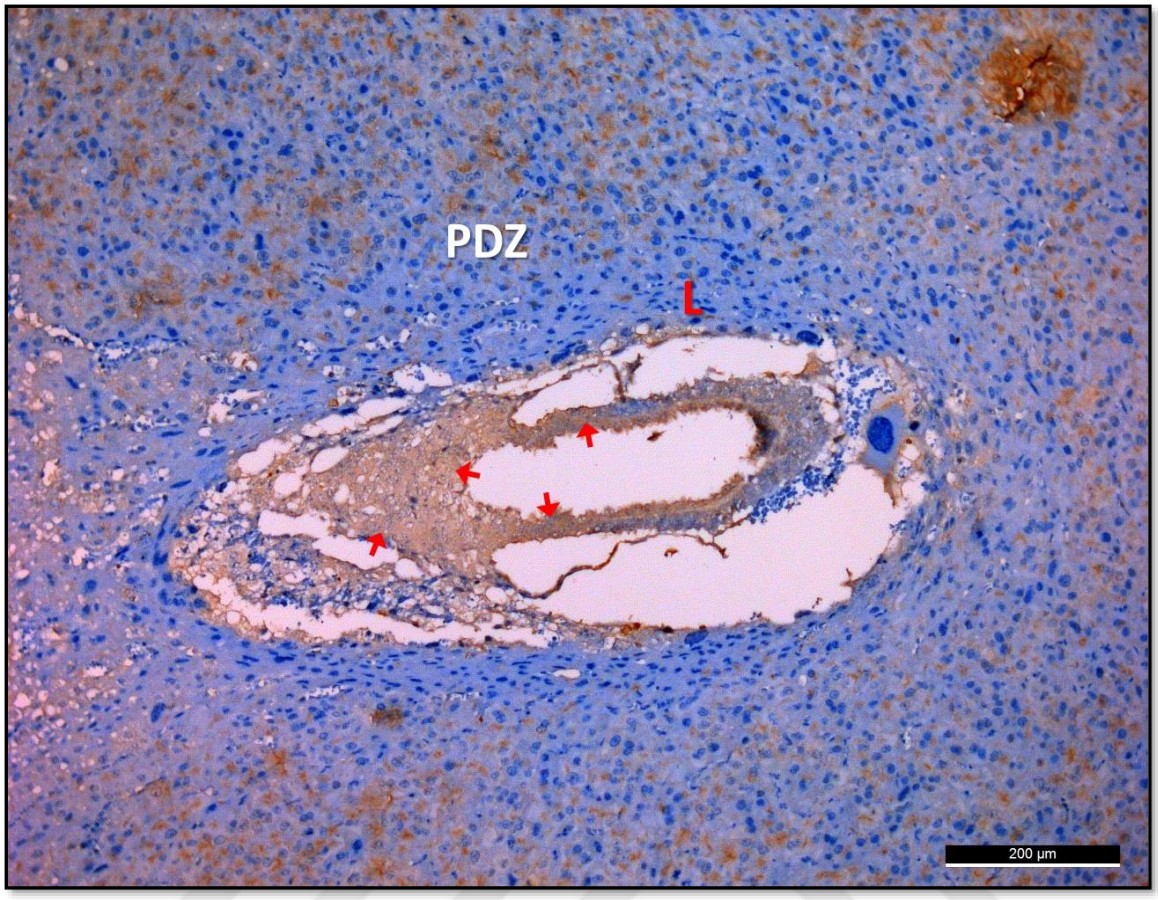
Kontrol grubunda yapılan MMP-9 immün boyamalarında implantasyon alanlarından elde edilen kesitlerin lümenlerinde yerleşik bulunan embriyoya ait trofoblast hücreleri değerlendirildiğinde MMP-9'un bu hücrelerde kuvvetli (+++) immünreaktivite sergilediği saptandı (Resim 4. 45 ve Resim 4. 46). Bu gruba ait kesitlerde, bez epiteli hücrelerinin bazılarının sitoplazma ve çekirdeklerinde yaygın olmayan orta düzeyde (++) MMP-9 immünreaktivitesi izlenirken bezlerin büyük bir çoğunluğunun çekirdek ve sitoplazmalarında MMP-9 immün tutulumunun zayıf (+) olduğu belirlendi (Resim 4. 47). Primer desidual bölgede bulunan desidual hücrelerin membranlarında kuvvetli MMP-9 immün tutulumu izlenirken bu hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında zayıf (+) MMP-9 immünreaktivitesi dikkat çekmekteydi (Resim 4. 48). Mezometriyal bölgeye yakın olan

sekonder desidual hücrelerin sitoplazma ve membranlarında kuvvetli (+++) MMP-9 immünreaktivitesi gözlendi (Resim 4. 49). Miyometriyum MMP-9 immün tutulumu açısından değerlendirildiğinde düz kas katmanları ve bu katmanların arasında bulunan bağ dokuda oldukça zayıf (+) immünreaktivite tespit edildi. Ancak düz kas katmanları arasında bulunan bağ dokuda yerleşik ve aynı zamanda bezlerin etrafında bulunan kan damarlarının duvarında ortadan kuvvetliye değişen MMP-9 immünreaktivitesi olduğu görüldü (Resim 4. 50).

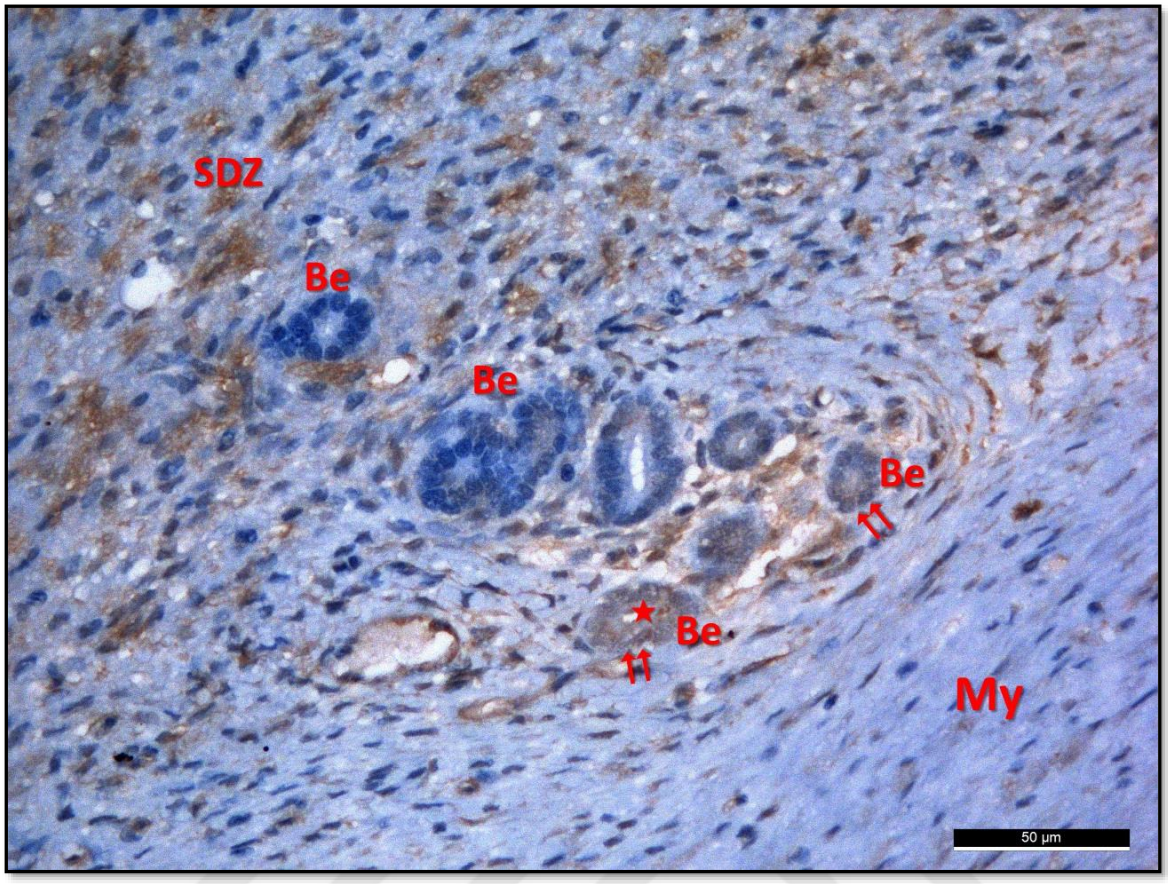
D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubuna ait kesitlerde lümende yerleşik bulunan embriyoya ait trofoblast hücrelerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hücrelerde MMP-9 immünrektivitesinin oldukça zayıf (+) olduğu belirlendi (Resim 4. 51 ve 4. 52). Bu gruba ait kesitlerde, bez epiteli hücrelerinin membranlarında, çekirdeklerinde ve sitoplazmalarında negatiften zayıf değişen MMP-9 immün tutulumun olduğu izlendi (Resim 4. 53). Primer desidual bölgede yerleşik bulunan desidual hücrelerde ise kontrol grubundan ayrıcalı olarak bu hücrelerin membranlarında ortadan kuvvetliye doğru değişen MMP-9 immün tutulumu olduğu belirlenirken, çekirdeklerde ise MMP-9 immün tutulumun oldukça zayıf olduğu belirlendi (Resim 4. 54). Sekonder desidual bölgede bulunan desidual hücrelerin membranlarında kontrol grubuna benzer olarak kuvvetli (+++) MMP-9 immünreaktivitesi dikkat çekmekteydi (Resim 4. 55). Miyometriyum MMP-9 immün tutulumu açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna benzer olarak düz kas katmaları ve bu katmanların arasında bulunan bağ dokuda oldukça zayıf (+) immünreaktivite tespit edildi. Perimetriyumda ise negatiften zayıfa (+) doğru değişen MMP-9 immün tutulumu olduğu izlendi (Resim 4. 56). MMP-9 pozitif hücre yüzdelerine ait grafik Şekil 4.3'de verilmiştir.



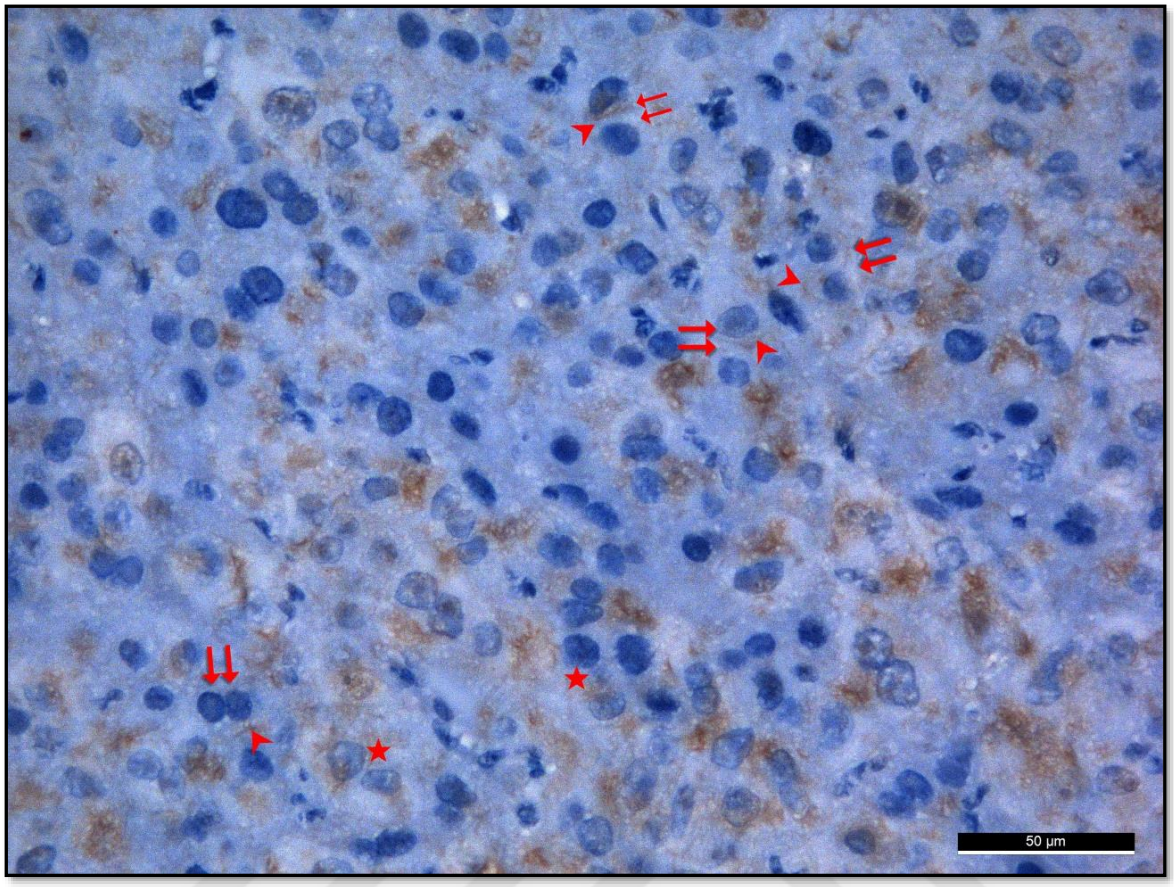
Resim 4.45. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), embriyo (e), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile miyometriyum (My) ve perimetriyum (P) ayırt ediliyor (MMP-9 primer antikoru, x 40).



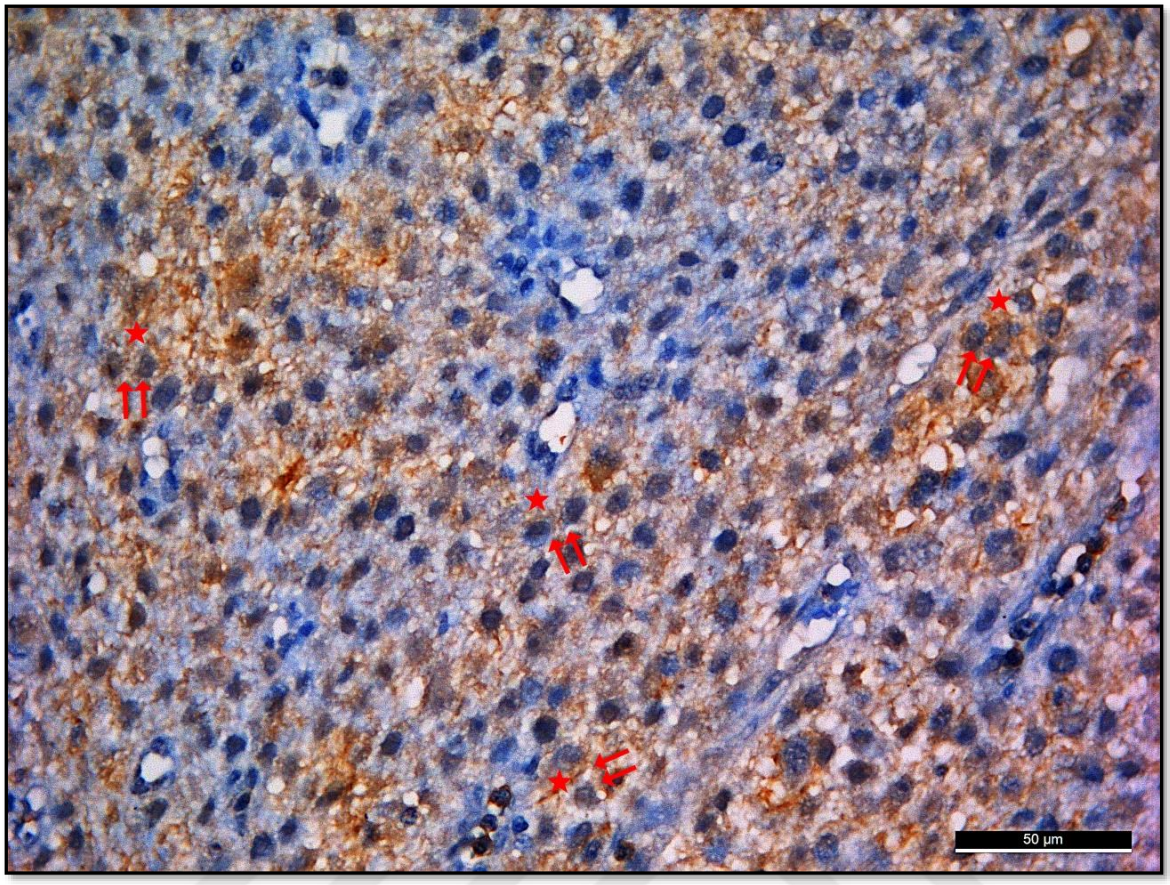
Resim 4.46. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Lümende (L) yerleşik bulunan embriyoyu oluşturan trofoblast hücrelerinde (➜) kuvvetli MMP-9 immünreaktivitesi gözleniyor. Primer desidual zon (PDZ) (MMP-9 primer antikoru, x 100).



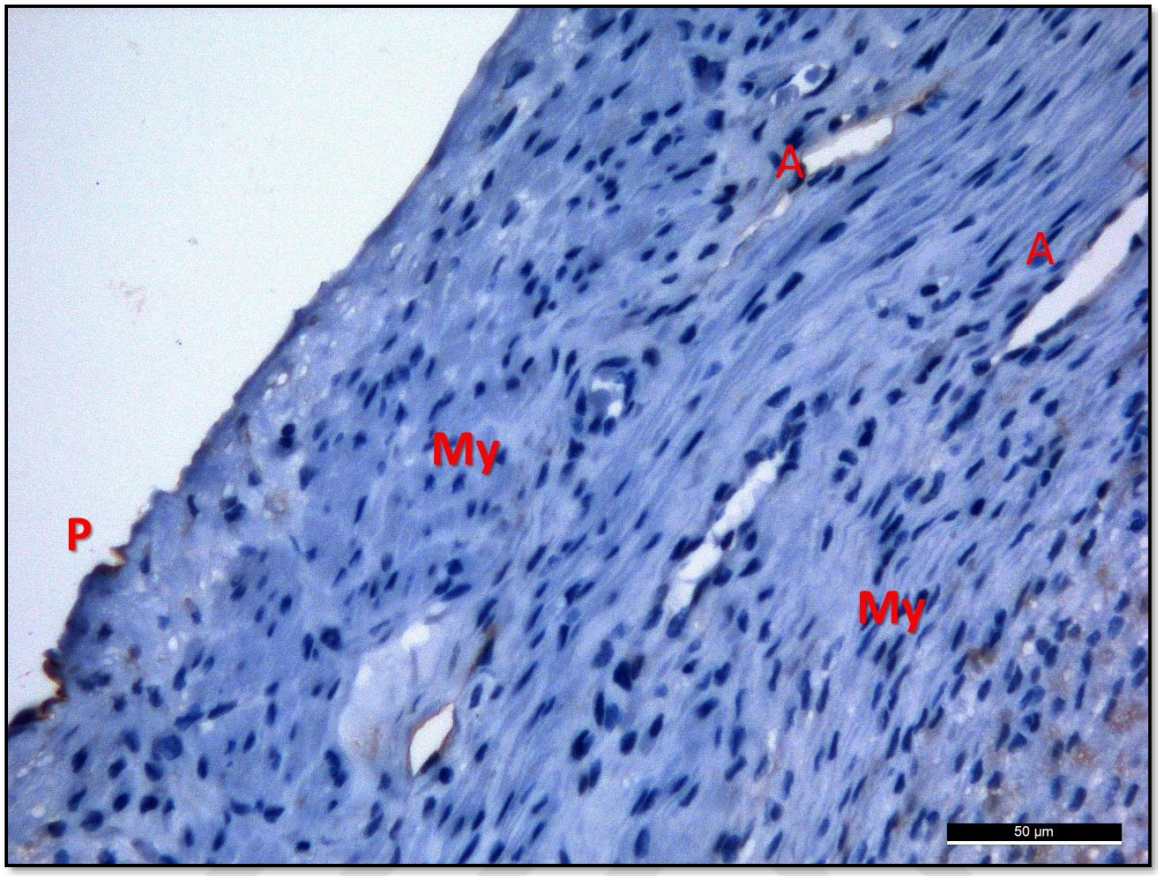
Resim 4.47. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyuma (My) yakın konumlanmış, sekonder desidual zonun yakınında (SDZ) bulunan bezlerin (Be) bazılarında, bez epiteli hücrelerinin sitoplazma (★) ve çekirdeklerinde (⇉) kuvvetli MMP-9 immün tutulumu gözlenirken, bezlerin çoğunda ise bez epiteli hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde MMP-9 immünreaktivitesi zayıf olarak ayırt ediliyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



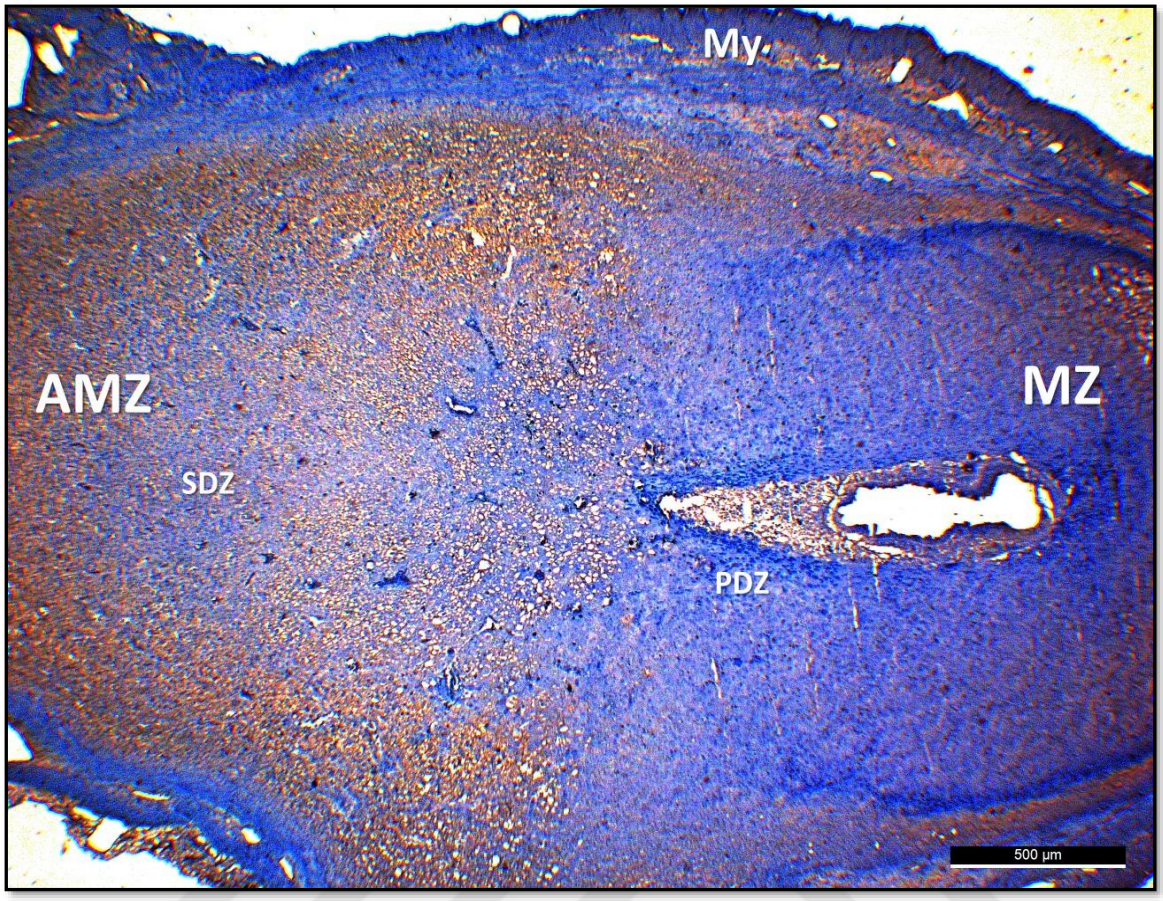
Resim 4.48. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazmalarında orta dereceli (★) membranlarında kuvvetli (➤), çekirdeklerinde (⇉) zayıf MMP-9 immünreaktivitesi izleniyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



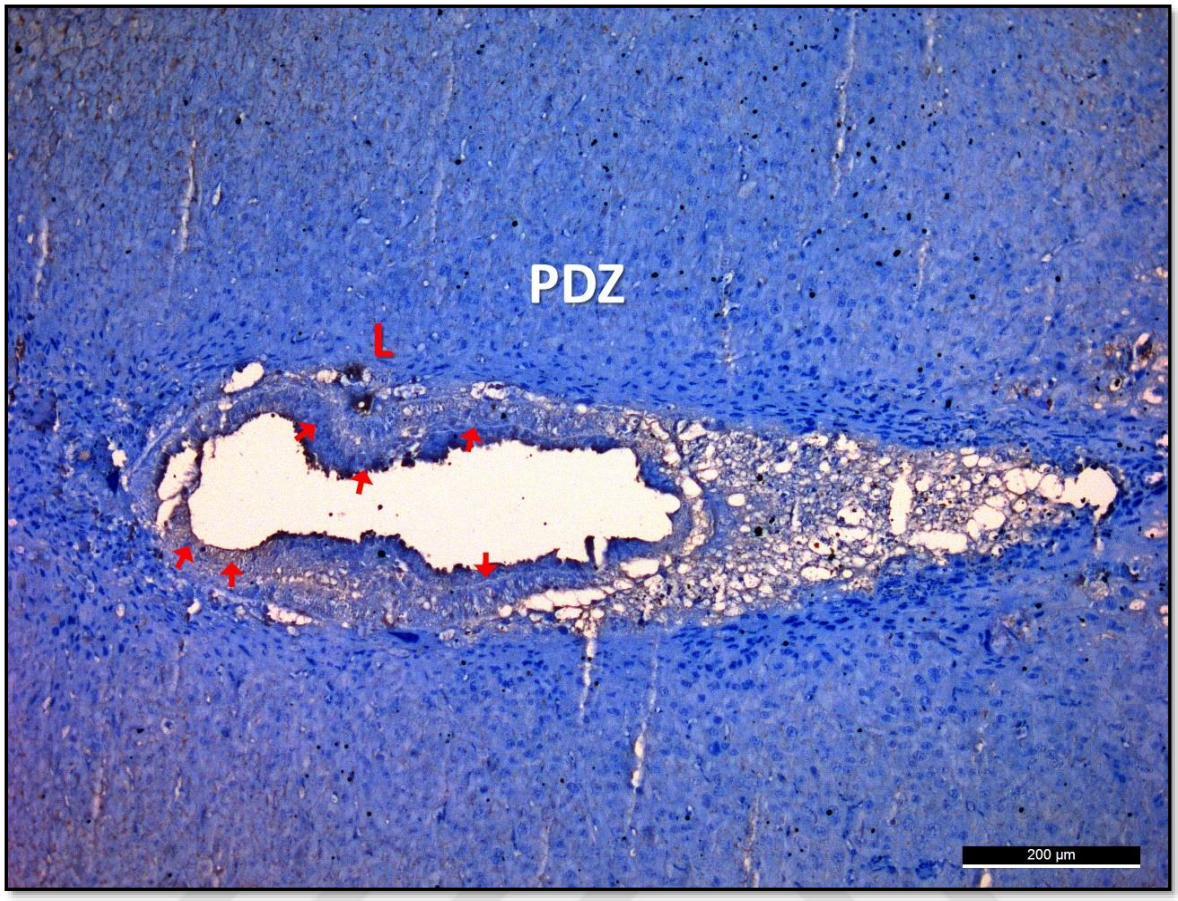
Resim 4.49. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücrelerin sitoplazma ve membranlarında (★) kuvvetli, çekirdeklerinde (⇉) zayıf MMP-9 immünreaktivitesi görülüyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



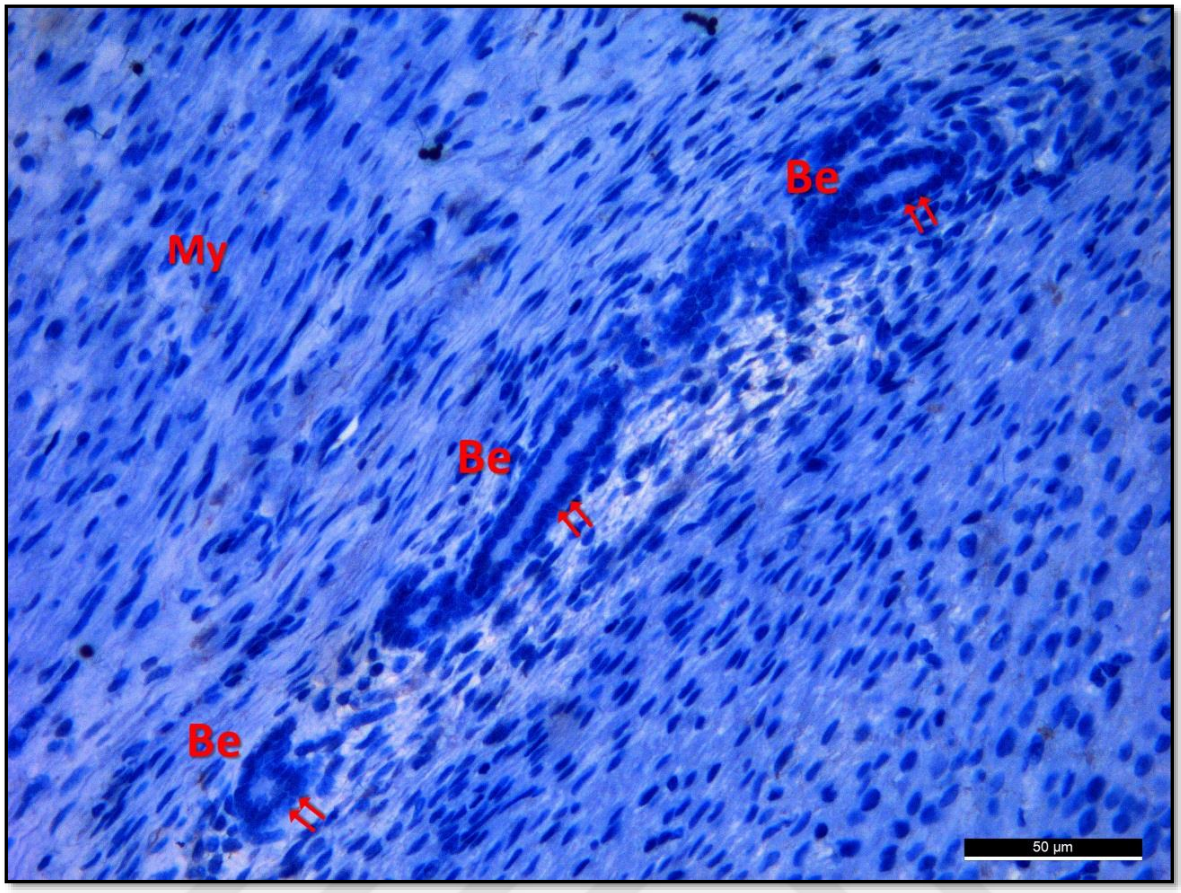
Resim 4.50. Kontrol grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyum (My) ve perimetriyumda (P) zayıf, miyometriyumun kas tabakaları arasında bulunan bağ dokuda yerleşik arterlerin duvarlarında (A) hafif dereceli MMP-9 immünreaktivitesi izleniyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



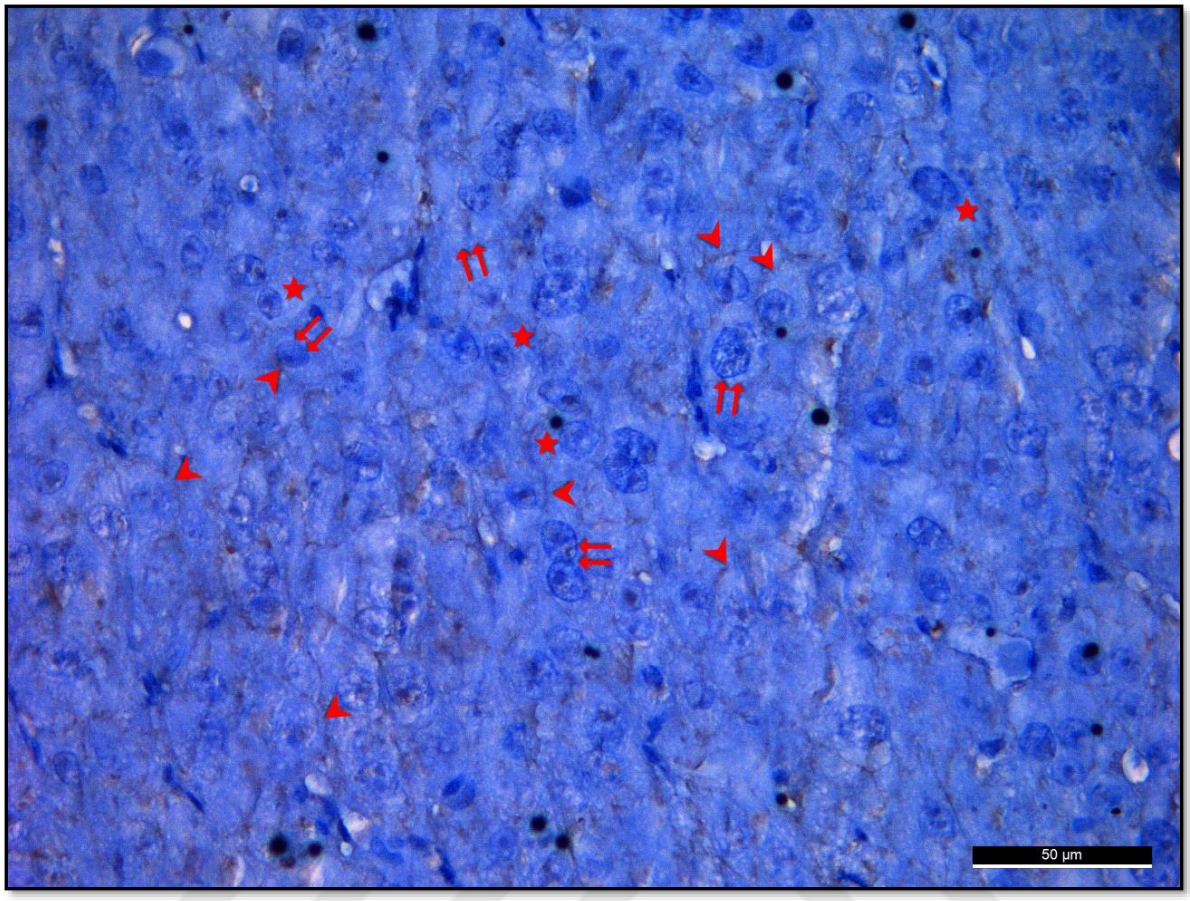
Resim 4.51. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Anti-mezometriyal bölge (AMZ), mezometriyal bölge (MZ), primer desidual zon (PDZ), sekonder desidual zon (SDZ) alanları ile, lümende embriyo (e) ve miyometriyum (My) (MMP-9 primer antikoru, x 40).



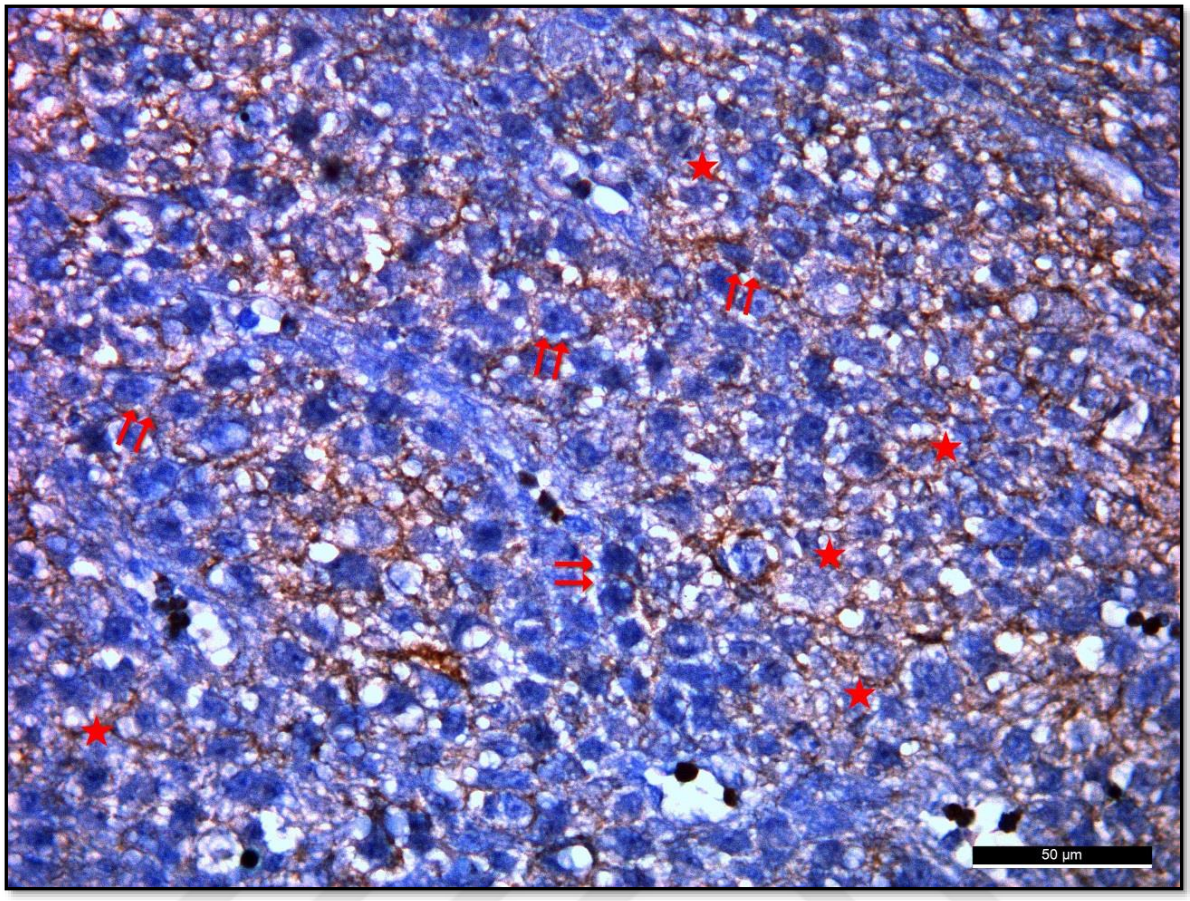
Resim 4.52. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Lümende (L) yerleşik bulunan embriyoyu oluşturan trofoblast hücrelerinde (➔) zayıf MMP-9 immünreaktivitesi gözleniyor. Primer desidual zon (PDZ) (MMP-9 primer antikoru, x 100).



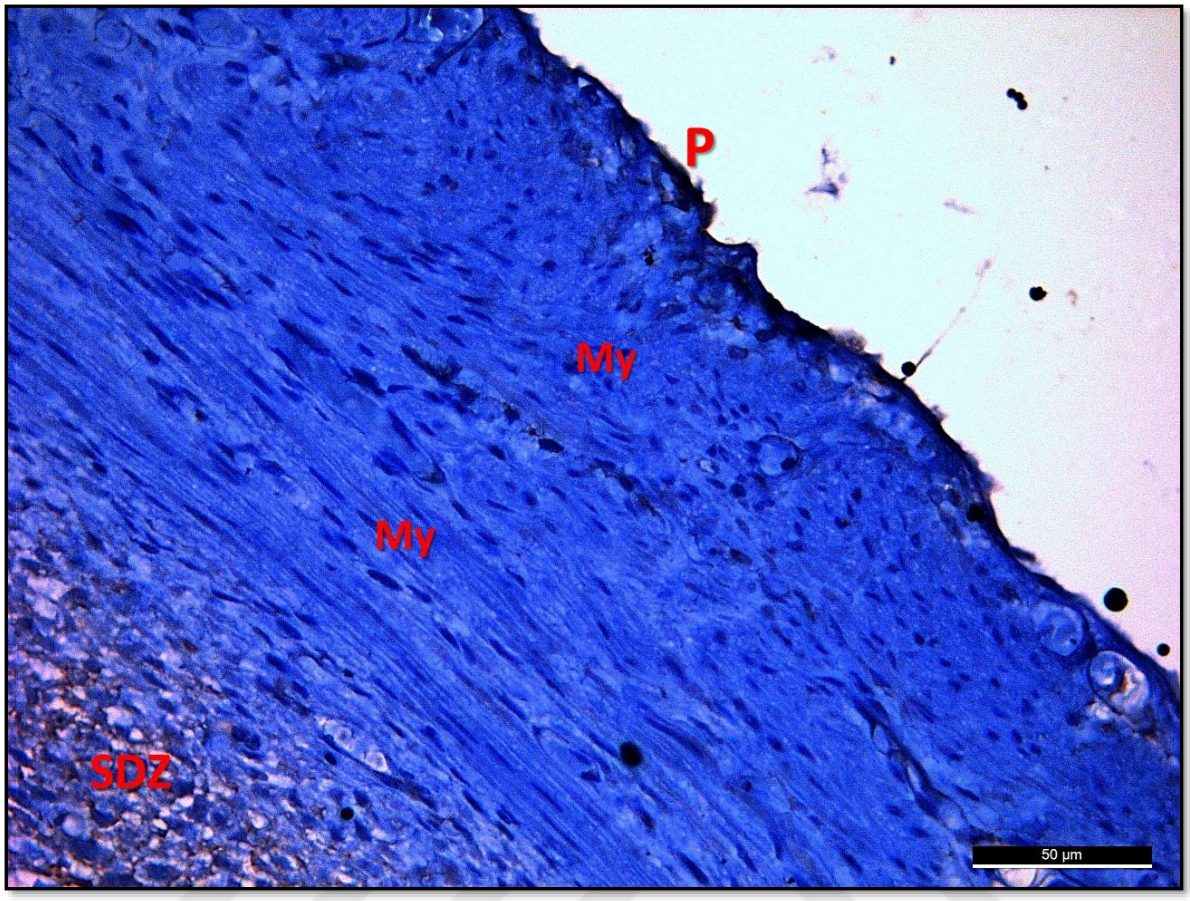
Resim 4. 53. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyuma (My) yakın konumlanmış, sekonder desidual zonun yakınında (SDZ) bulunan bezlerin (Be) epitel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde (⇉) negatif MMP-9 immünreaktivitesi ayırt ediliyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



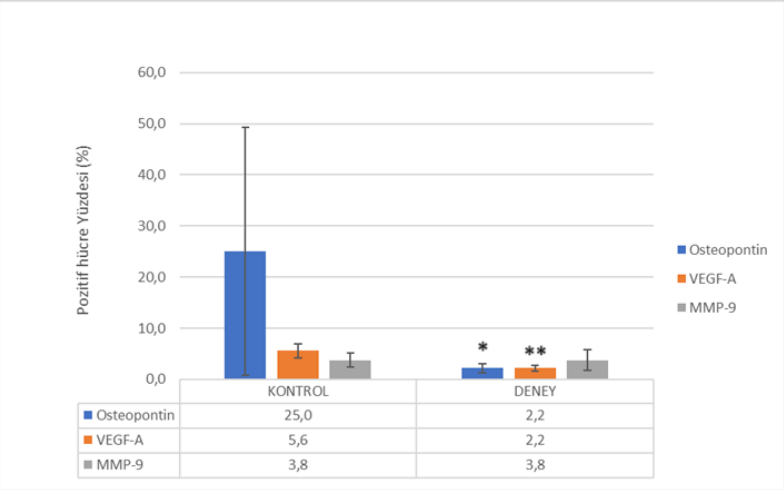
Resim 4.54. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Primer desidual zonda bulunan desidual hücrelerin membranlarında (➤) orta dereceli, sitoplazmalarında (★) ve çekirdeklerinde (⇉) zayıf MMP-9 immünreaktivitesi gözleniyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



Resim 4.55. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Sekonder desidual zonda bulunan desidual hücrelerin membranlarında (★) kuvvetli, çekirdeklerinde (⇉) zayıf MMP-9 immünreaktivitesi görülüyor (MMP-9 primer antikoru, x 400).



Resim 4.56. D vitamini eksikliği grubu implantasyon bölgesine ait MMP-9 immünohistokimyasal boyaması. Miyometriyumu (My) oluşturan düz kas tabakalarında ve perimetriyumda zayıf MMP-9 immünreaktivitesi izleniyor. Sekonder desidual zon (SDZ) ve perimetriyum (P) (MMP-9 primer antikoru, x 400).



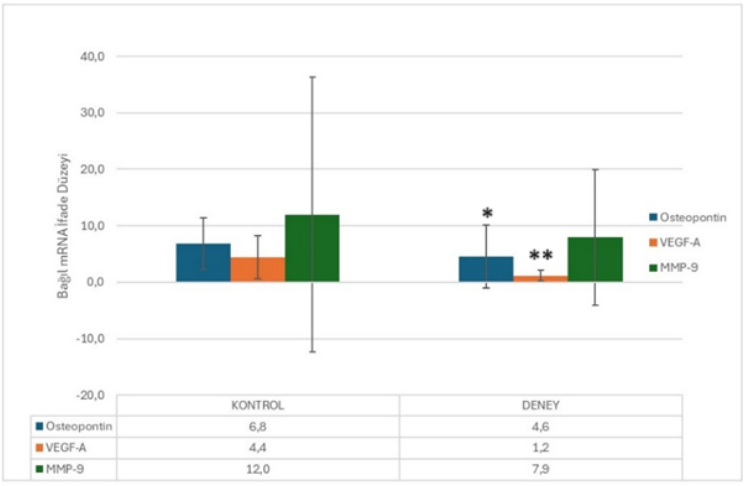
Şekil 4.3. Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9'a pozitif hücre yüzdelerine ait ortalama ± standart sapma grafiği. *p<0.05 Kontrol grubuna kıyasla.

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif olarak değerlendirilmesi için LongGene Q2000B cihazı kullanıldı. Kontrol grubu ve D vitamini eksikliği gruplarından elde edilen implantasyon alanları Osteopontin, VEGF-A, MMP-9 ve bu genlerin ifadelerini normalize etmek amacıyla ACTB genine özgü primerler ve UPL probları kullanılarak çalışıldı.

4.5.1. Gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCT) yöntemiyle hedef genlerin ortamdaki derişimleri primerlerin ilgili gen dizilerine bağlanmasıyla doğru orantılı olduğundan ve hedef gene ait mRNA'ların ortamda bulunma miktarlarıyla doğru orantılı olarak amplifikasyonlar ışımanın erken gerçekleşmesine neden olur. Bu bilgiler doğrultusunda, Gerçek Zamanlı PCR yöntemiyle kantitatif olarak Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9 genlerinin mRNA ifadelenme düzeylerinin karşılaştırmalı olarak analizi eş zamanlı olarak yapıldı. Kontrol grubu denekleriyle karşılaştırıldığında D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubunda Osteopontin ve VEGF-A genlerinin mRNA ifadelenme düzeylerinde istatiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken ($p<0.05$), MMP-9 geninin mRNA ifadelenme düzeyinde kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu ancak bu farkın istatiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Gruplara ait mRNA ifade düzeyleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. İmplantasyon alanlarında Osteopontin, VEGF-A ve MMP-9 genlerinin mRNA ifade düzeylerindeki değişiklikler. Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi baz alınarak normalize edildi. *p<0.05 Kontrol grubuna kıyasla.

5. TARTIŞMA

D vitamini, biyolojik etkilerini D vitamini reseptörü (VDR) üzerinden gerçekleştirir ve bu reseptör iskelet ve paratiroid bezlerinin yanı sıra üreme organları olmak üzere çeşitli dokularda da ifade edilmektedir. Kadınlarda, VDR mRNA'sının ovaryumlarda, karışık ovaryum hücrelerinde ve saflaştırılmış granüloza hücre kültürlerinde sentezlendiği gösterilmiştir, bu da seks hormonlarının steroidogenezinde rol oynadığına işaret etmektedir [231, 232]. Benzer şekilde, insan plasentası da CYP27B1 ve VDR ifade eder [233, 234]. Bir çalışmada D vitamini ile tedavi edilen endometriyal hücrelerin süpernatanındaki 1,25 (OH) 2D3 seviyelerinin ölçülmesiyle endometriyumun aktif D vitamini formunun ekstrarenal sentezini yapabildiğini, ayrıca 1α-hidroksilaz geninin aktif formunun, insan endometrial stromal hücrelerinde, siklus fazından bağımsız olarak, ancak erken gebe desidua'da önemli bir artışla ifade edildiğini tespit etmişlerdir [235].

D vitamininin implantasyon süreci üzerindeki kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. İn vitro fertilizasyon tedavisi uygulanan 84 infertil kadında yapılan bir çalışmada, serumda ve folliküler sıvıda daha yüksek 25(OH)D_2 düzeyleri olanların, IVF'den sonra klinik gebeliğe ulaşma olasılığı anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur [236]. Ancak bu çalışmadan farklı olarak 82 infertil kadını kapsayan başka bir çalışmada, serum ve foliküler sıvıda 25 (OH)D düzeylerinin IVF sonuçlarıyla anlamlı bir ilişkisi bulanamamıştır [237]. IVF ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanan 101 kadında yapılan başka bir araştırmada ise folliküler sıvıda normal D vitamini düzeylerine sahip olan kadınların (25(OH)D> 30 ng/mL) yetersiz (25(OH)D_2 = 20.1- 30 ng/mL) ve eksik (25(OH)D<20 ng/mL) D vitamini durumunu olan kadınlara kıyasla klinik gebelik elde etme olasılıkları daha düşük bulunmuştur [238]. D_3 vitamini, miyo-inositol, folik asit ve melatoninin oral yoldan verilmesinin IVF sonuçlarını etkileyip etkilemediğini değerlendirmek amacıyla yapılan ve daha yeni olan başka bir çalışmada ise luteal fazın erken başlangıcından itibaren 45 gün boyunca akşam kolekalsiferol (D_3 vitamini) uygulanan deney grubunda D3 vitamini seviyelerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca deney grubunda implantasyon oranları (%37,1) kontrol grubu kadınlarla (%19 p<.0151) karşılaştırıldığında daha yüksek tespit edilmiştir [239].

D vitamininin etkileri hayvan modelleri ve hücre kültürlerinde de araştırılmıştır. 1,25 (OH) $_2D_3$'nin, insan endometriyal stromal hücrelerinde homeobox geni HOXA10'un ifadesini

düzenlediği gösterilmiştir [240]. HOXA10, fetal yaşam sırasında uterusun gelişimi için önemlidir ve daha sonra yetişkinlikte endometriyal gelişim için gereklidir ve uterusun implantasyona alıcı olmasını sağlar [241]. Deney hayvanlarındaki çalışmalar, D vitamini eksikliğinin dişi sıçanlarda çiftleşme başarısını ve doğurganlığını azalttığını göstermiştir. D vitamini eksik olan diyetle beslenen dişi sıçanlar üreme yeteneğine sahiptir, ancak implantasyonun başarısızlığı da dahil olmak üzere genel doğurganlık azalır [242]. Knock out fare modellerini kullanan diğer çalışmalarda, her ikisi de uterin hipoplazisi ve infertilite gösteren Vdr $^{-/-}$ ve Cyp27b1 $^{-/-}$ dişi farelerde, implantasyon sürecinde D vitamininin metabolik ve sinyal sisteminin önemini daha da vurgulamıştır [243, 244]. Ayrıca 1,25 $(OH)_2D_3$ enjeksiyonunun uterus ağırlığını artırdığı ve endometriyumda desidual farklılaşmaya yol açtığı gösterilmiştir [245].

Yapılan literatür taramalarına göre, D vitamini düzeylerinin eksik olduğu kadınlarda implantasyon sürecini etkileyebileceği görülmüş, bu klinik bulgular ve deneysel çalışmaların ise başlangıç niteliğinde olduğu belirlenmiştir. D vitamini eksikliğinin implantasyonla olan ilişkisini inceleyen çalışmalar literatürde ayrıca oldukça sınırlı olup bu ilişkinin altında yatan mekanizmalar yeteri kadar açıklanmamıştır. Biz de literatür bilgisinden yola çıkarak çalışmamızda sıçanlarda D vitamini eksikliğinin implantasyona olan etkilerini immünohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle tespit etmeyi amaçladık.

D vitamini eksikliği modelimizi oluştururken, Johnson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer olarak 4 haftalık dişi Sprague-Dawley ratlar deney grubumuzda 9 hafta boyunca D vitamini eksik yem (% 20 laktoz, % 2 kalsiyum ve % 1.25 fosfor içeren) ile beslendi ve UV-B ışığı içermeyen ortamda 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsüne uygun olarak barındırıldı [246]. Deney süresi bitiminde ise kontrol ve deney gruplarında toplanan serum örneklerinde vücutta D vitamini düzeylerinin en önemli belirteci olan 25(OH)D'nin ölçümleri, sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometresi yöntemi ile tayin edildi. Bu yöntem, immünolojik testlere özgü sınırlamaların çoğundan etkilenmediği için D vitamini metabolitlerinin ölçümünde altın standart olarak kabul edilir [228]. Bu yöntem ile yapılan ölçümler sonrasında kontrol grubuna kıyasla deney grubumuzda 20 ng/mL ve altında sonuçlar (7,3983 ± 0,26551 ng/mL = 7.66381 nmol/L) elde ettik. Stavenuiter ve arkadaşlarının 9-10 haftalık erkek Wistar sıçanlarında D vitamini eksikliği indüklemek için yaptıkları bir çalışmada 3 hafta boyunca deneklere D vitamini eksik yeme ek olarak 32 ng intraperitoneal parikalsikol enjeksiyonu yaptıkları çalışmada, deney sonunda D vitamini

düzeylerinin 15 nmol /L (37.44 ng/mL) ve altında olduğunu belirlemişlerdir [247]. Dolayısıyla elde ettiğimiz bu sonuç, Stavenuiter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın bulgularıyla uyumludur ve D vitamini eksikliği grubumuzda deney modelimizin oluştuğunu doğrulamış olduk.

Fare ve sıçanlarda gebeliğin ilk günü, vajinal tıkaç veya vajinal yaymalarda spermin bulunduğu gün olarak kabul edilir ve implantasyon gebeliğin 4. ve 5. günleri arasında gerçekleşir [248, 249]. İmplantasyonu takiben, endometriyumda bulunan fibroblast benzeri stromal hücreler çoğalarak desidual hücrelere farklanırlar. Kemirgenlerde desidualizasyon, implantasyon veya yapay bir uyarana yanıt olarak meydana gelir [250]. Abrahamson ve arkadaşları kemirgenlerde implantasyon ve desidualizasyon ile ilgili yayınladıkları çalışmada gebeliğin erken döneminde uterus lümeninin, mezometriyal ve anti-mezometriyal düzenlenime sahip mukozal kriptlerden oluştuğunu hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde göstermişlerdir. Ayrıca blastosistlerin lümen epiteline ilk bağlanmalarından önce bu kriptaların anti-mezometriyal uçlarına yakın konumlandıklarını bu nedenle kemirgenlerde implantasyonun anti-mezometriyal (yani lümenin mezometriyumunun karşı tarafında) olduğunu belirtmişlerdir [251]. Bizim çalışmamızda ise Abrahamson ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olarak, gebeliğin 8. gününde kontrol ve deney gruplarından alınan implantasyon alanları hematoksilen-eozin ve Masson'un üçlü boyaması yöntemleriyle değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak anti-mezometriyal ve mezometriyal olmak üzere kesitlerimizde iki farklı bölgenin oluştuğunu gördük.

Desidualizasyon başlangıçta uterus lümeninin anti-mezometriyal bölgesinde başlar. Anti-mezometriyal bölgedeki desidual reaksiyonunun başlamasından birkaç gün sonra da mezometriyal bölgede de desidualizasyon başlar ve desidual hücreler endometriyumun merkezi bölgesinde ortaya çıkar [250]. Anti-mezometriyal bölgedeki desidual hücreler primer desidual zonu meydana getirir [252]. Parr ve arkadaşları sıçanların primer desidual zonlarını ince yapı düzeyinde incelediklerinde bu zonda yer alan hücrelerin bazofilik boyanan sitoplazmaya, iki veya daha fazla çekirdeğe, bol miktarda endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozomlar ve iyi gelişmiş Golgi komplekslerine sahip olan büyük hücreler olduğunu görmüşlerdir [253]. Ayrıca Christofferson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada primer desidual zonun kılcal damarlar ve venüller içerdiğini ancak bu damarların çökmüş olduğunu ve kan içermediği sonucuna varmışlardır [254].

Mezometriyal bölgede bulunan hücreler, anti-mezometriyal bölgede bulunan desidual hücrelerden daha küçüktür, düzensiz ve tek çekirdek içerirler. Primer desidual zonun ortaya çıkmasıyla birlikte bu bölgeyi çevreleyen stromal hücreler mitozla çoğalır ve böylece anti-mezometriyal bölgede sekonder desidual zon oluşur. Gebeliğin 8. gününde, desidualizasyon miyometriyumun kas tabakalarına bitişik olan endometriyumun bazal bölgesine yayılmış olur [255]. Biz de çalışmamızda implantasyon alanlarına ait kesitlerde anti-mezometriyal bölgelerde primer ve sekonder desidual zonların farklandığını ayırt ettik. Primer desidual zonda bulunan hücrelerin daha küçük ve tek çekirdekli olduğunu, sekonder desidual zonda bulunan hücrelerin ise daha büyük ve çok çekirdekli olduğunu tespit ettik. Kamar ve arkadaşları D vitaminin eksikliği oluşturdukları sıçanlarda gebeliğin 8. gününde elde ettikleri implantasyon alanlarını histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirmişlerdir [256]. Bizim çalışmamızın da hematoksilen-eozin boyaması bulguları bu çalışma ile benzerlik göstermekle birlikte, D vitamini eksikliği oluşturulan deney grubumuzun kesitlerinde primer desidual bölgede normal koşullarda bulunmaması gereken çok sayıda hemorajik alan ve kollabe olmuş kan damarlarına ait bulgular elde ettik.

İlk olarak kemikten izole edilmiş bir hücreler arası madde proteini olan Osteopontin'in epitel hücrelerinde, gastrointestinal sistem salgılarında, böbreklerde, tiroid ve meme bezinde, testiste, uterus ve plasentada da ifade edildiği yapılan çalışmalarla literatürde gösterilmiştir [196, 197, 257-263]. Apparao ve arkadaşları erken sekretuar faz sırasında Osteopontin'in insan endometriyal epitel hücrelerinde zayıf bir şekilde ifade edildiğini, sekretuar fazın ortasında ise lümen epiteli hücrelerinin apikal kısımlarında güçlü immün tutulum sergilediğini immünohistokimyasal boyama ile göstermişlerdir [208]. Ayrıca Young ve arkadaşları yaptıkları immünohistokimyasal bir çalışmada Osteopontin'in sekretuar fazdaki insan endometriyumunda bez epitelinde de lokalize olduğunu ortaya koymuşlardır [197]. Apparao ve Lessey insanlarda yaptıkları çalışmalarda implantasyon penceresi sırasında endometriyumda αvβ3 ve Osteopontin'in eş zamanlı olarak ifade edildiği ve ayrıca αvβ3 ve α4β1 integrin heterodimerlerinin Osteopontin'de bulunan arginin-glisin-aspartat (RGD) amino asit dizisini bağladığına dikkat çekerek, Osteopontin ve integrinlerin implantasyonun adezyon fazı sırasında trofoblast ve endometriyum arasındaki etkileşimlere dahil olmasının makul olduğunu ve daha yakından incelemeyi hak ettiğini öne sürmüşlerdir [208, 264]. Weintraub ve arkadaşları ise Osteopontin geni nakavt farelerin infertil olduklarını ancak bu farelerin düşük gebelik oranları sergilediklerini göstermişlerdir [210].

Dolayısıyla Osteopontin, embriyo implantasyonunda αvβ3 integrinle birlikte önemli bir rol oynamaktadır.

Osteopontin'in implantasyon penceresi sırasında ve menstrual döngünün sonunda artan konsantrasyonları, bu proteinin implantasyonun sonraki aşamalarında ve gebeliğin erken dönemlerinde de bir rol oynayıp oynamayacağı sorusunu gündeme getirmiştir. von Wolff ve arkadaşları, invaziv trofoblastların desidualize olan stromal hücrelerle etkileşime girdiği ve yalnızca epitelin değil aynı zamanda desidual hücrelerin de Osteopontin ifade etmesi gerektiğini düşünmüşlerdir. Bu nedenle insan desidual hücrelerinde Osteopontin ifadesini daha detaylı olarak çalışmalarında değerlendirmişler ve endometriyal stromal hücreleri 7, 14 ve 21 gün boyunca östrojen ve progesteron ile uyararak desidualize etmişler ve Osteopontin mRNA ifadesinin, 7-21. günler arasında desidualizasyon boyunca arttığını göstermişlerdir [207].

Osteopontin geninin transkripsiyonunun, Craig ve arkadaşları tarafından farelerde yapılan in vivo bir çalışmada östrojen ve progesteron tarafından indüklendiği gösterilmiştir [265]. Ayrıca Vigano ve arkadaşları insan uterusunda lokal olarak üretilen 1,25 (OH)2D3'ü araştırmak ve hem menstrual döngü sırasında hem de gebeliğin erken döneminde 1, 25 (OH)2D3'ün sentezinde rol oynayan 1α-hidroksilaz enziminin endometriyal ifadesini analiz ettikleri çalışmada, insan desidual hücrelerinin primer kültürlerine 1000 nM konsantrasyonda 4 saat süreyle $1,25(OH)_2D_3$ ilave ettiklerinde bu hücrelerde Osteopontin ifade seviyelerini yaklaşık %60-70 oranında arttığını ve D vitamini Osteopontin gen ifadesi üzerinde doğrudan etkisi olduğunu kanıtlamışlardır [235]. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaların bulguları ile korele olarak, D vitamini eksikliği oluşturduğumuz deney grubunda RT-PCR ile yaptığımız deney sonucunda kontrol grubuna göre Osteopontin gen ifadesinin azaldığını ve bu azalmanın istatiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. Ayrıca, Kamar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kontrol sıçanlarında, implantasyon alanlarına ait kesitlerde lümen ve bez epitellerinde, vasküler endotelde, mezometriyal ve anti-mezometriyal bölgelerde bulunan çok sayıda stromal hücrede Osteopontin güçlü sitoplazmik ve nükleer immün reaktivite göstermiştir. D vitamini eksikliği oluşturdukları deney grubunda ise desiduanın mezometriyal ve anti-mezometriyal bölgelerinde az sayıda zayıf sitoplazmik Osteopontin immün tutulumu olduğunu belirtmişlerdir [256]. Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna ait implantasyon alanları değerlendirildiğinde lümen ve bez epiteli hücrelerinde, primer ve sekonder desidual hücrelerin çekirdek ve

sitoplazmalarında, kan damarlarının duvarını oluşturan endotelde kuvvetli Osteopontin immün tutulumun olduğunu ve D vitamini eksikliği grubunda ise Osteopontin immünreaktivitesinin azaldığını benzer şekilde gösterdik.

Desidual anjiyogenez ve erken post-implantasyon dönemde damar sisteminin korunması, normal gebelik gelişimi için mutlak bir gerekliliktir. Yeni oluşan desidual damar sisteminin, plasenta işlevsel olarak yetkin hale gelene kadar gelişen embriyo için ilk değişim aparatı olarak hizmet ettiği düşünülmektedir [222]. Endometriyum, desidua ve plasenta anjiyojenik büyüme faktörleri açısından zengindir [266]. Genel olarak anjiyogenik süreçler, bFGF, VEGF veya plasental büyüme faktörü (PIGF) gibi büyüme faktörleri tarafından başlatılır. VEGF ailesi VEGF-A, VEFGA-B, VEGF-C, VEGF-D ve PIGF olmak üzere beş üyeden oluşur ve bunların reseptörleri insan endometriyumu da dahil olmak üzere çeşitli dokularda vasküler büyüme ve yeniden şekillenmenin temel aracılarıdır [218, 219]. VEGF-A, her ikisi de endometriyum bez epitel hücrelerinin apikal kısımlarında bulunan VEGFR-1 ve VEGFR-2 olmak üzere iki tirozin kinaz reseptörüne bağlanır ve bu reseptör aracılığıyla etki eder [267]. Çeşitli gruplar, VEGF ve reseptörlerinin, ovulasyon sonrası ve peri-implantasyonda önemli ölçüde arttığını göstermiştir [268-270]. Ayrıca VEGF proteini ve VEGF mRNA konsantrasyonları menstrual döngü sırasında sekretuar faz ve menstruasyon öncesinde ve desidualizasyon ile pozitif korelasyon gösterir [271]. Matsui ve arkadaşları, VEGF üretiminin endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonuyla bağlantılı olarak arttığını göstermiştir [272]. Chakraborty ve arkadaşları ise farelerde yaptıkları çalışmada gebeliğin 6-8. günleri arasında hem mezometriyal hem de anti-mezometriyal bölgelerde bulunan desidual hücrelerde VEGF mRNA birikiminin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, gebeliğin 5-8. günlerinde hem mezometriyal hem de anti-mezometriyal bölgelerde anjiyogenezde yer alan hücrelerin VEGF reseptörleri olan VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFFR-2 (Flk-1) mRNA'larını da ifade ettiklerini tespit etmişlerdir [224]. Kim ve arkadaşları ise farelerde gebeliğin 8.5. gününde VEGF-A ifadesinin implantasyon alanının merkezi bölgesinde, anti-mezometriyal bölgede, vasküler sinüs katlanmalarında bulunan desidual stromal hücrelerde yüksek oranda ifade edildiğini ancak mezometriyal bölgede ifade edilmediğini göstermişlerdir [273]. Bizim çalışmamızda da gebeliğin 8. gününde kontrol grubunda VEGF-A ifadesi anti-mezometriyal bölgede ve mezometriyal bölgeye kıyasla kuvvetli, sekonder desidual zonda primer desidual zon ile karşılaştırıldığında kuvvetli VEGF-A immün tutulumu sergilemiştir. Dolayısıyla bu bulgularımız Chakraborty ve Kim'in çalışmalarında elde ettikleri bulgular ile uyumluluk göstermektedir.

D vitamini eksikliği, anjiyogenezin indüksiyonu için erken desidualizasyon sırasında normalde yüksek düzeyde ifade edilen VEGF-A gibi anjiyojenik faktörlerin ifadesinin azalmasına neden olur. Tesic ve arkadaşlarının D vitamini eksikliği oluşturulan gebe dişi farelerde maternal kortikosteron artışına ve buna bağlı olarak fetüsün artan derecede glukokortikoid maruziyetine etkin kaldığını gösterdikleri çalışmalarında ayrıca D vitamini eksikliğinin plasentanın vasküler gelişiminde de bozulmaya neden olduğunu, embriyonik gelişimin 14.5-17.5. günlerinde olan dişi ve erkek fare fetüslere ait plasentalarda VEGF-A ifadesinin azaldığını da göstermişlerdir [274]. Literatürde D vitamini eksikliğinin gebeliğin erken döneminde VEGF-A ifadesi üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlı olup genellikle D vitamini eksikliğinin gebeliğin daha ileri dönemlerinde meydana gelen preeklampsi ile ilişkisi üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak gebeliğin erken döneminde de anjiyogenezin sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi ve bu süreçte rol oynayan anjiyojenik faktörler üzerinde D vitamininin etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi de literatüre şüphesiz ki katkı sağlayacaktır. Bu nedenle biz de çalışmamızda gebeliğin 8. gününde D vitamini eksikliğinin deney grubunda VEGF-A ifadesini azalttığını hem RT-PCR hem de immünohistokimyasal yöntemlerle gösterdik. Wang ve arkadaşlarının desidualizasyon ve gebelik başarısında Osteopontin'in rolünü değerlendirdikleri bir çalışmada Osteopontin ifadesinin, anjiyogenez ile ilgili genlerin ifadesini de destekleyebildiğini belirterek, desidualize insan endometriyal stromal hücrelerinde yaptıkları deneyde Osteopontin ifadesinin bu hücrelerde inhibe edilmesiyle VEGF-A ve reseptörü VEGFR-2 ifadesini de azalttığını göstermişlerdir [275]. Bizim çalışmamızda da bu in vitro çalışmanın bulgularına benzer olarak Osteopontin ve VEGF-A ifadelerinin kontrol gruplarımızda yüksek oranda ifade edildiklerini ancak D vitamini eksikliği oluşturduğumuz deney grubunda ise her iki protein ifadesinin de azaldığını gösterdik. Dolayısıyla hem D vitamini eksikliğindeki azalma hem de bu duruma bağlı olarak Osteopontin gen ifadesindeki azalma, gebeliğin 8. gününde implantasyon bölgelerinde VEGF-A ifadesinin azalmasına neden olmuş olabilir.

Embriyo implantasyonu sonrasında, trofoblastın maternal endometriyumu invaze ederek, maternal kan kaynağı ile temas kurması gebeliğin sürdürülebilmesi oldukça kritiktir. Uterus epitel hücrelerine adezyonun ardından, oldukça invaziv karakterde olan blastosistlerin esas olarak tip IV kollajen, laminin ve diğer hücreler arası madde bileşenlerinden oluşan ve embriyo implantasyonu sırasında bir bariyer görevi gören lümen epitelinin altında bulunan bazal membrana nüfuz etmesi (gebeliğin 7. günü ve sonrası) gerekir [276, 277]. Bu

penetrasyon süreci ve blastosist hücrelerinin stroma boyunca devam eden invazyonu, hücreler arası maddenin yeniden şekillenmesiyle düzenlenir. Hücreler arası maddenin yıkımından proteinazlar sorumlu olduğundan, implantasyon sırasında endometriyumda spesifik proteinaz ve proteinaz inhibitörlerine ait genlerin ifadesini tanımlamak için kemirgenlerde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak katepsinler, plazminojen aktivatörü ve bunların inhibitörleri, kallikriens, nöropsin, matriks metalloproteinazlar ve bunların doku inhibitörleri gösterilebilir.

Omurgalılarda MMP ailesi 28 üyeden oluşur ve en az 23'ü insan dokularında ifade edilir [278]. MMP'ler yaygın olarak substratlarına ve yapısal alanlarının kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membran tipi (MT)-MMP'ler ve diğer MMP'ler olarak sınıflandırılır [119]. MMP'lerin jelatinazlar sınıfında bulunan MMP-9 (Jelatinaz B), menstrual döngü ve gebelik sırasında endometriyal dokunun yeniden şekillendirilmesinde rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [279-281]. MMP-9, aktif blastosistlerden salgılanan baskın MMP'dir ve ifadesi, gebeliğin 6. gününde blastosistin maternal stromayı invaze etmeye başladığı dönemde artış gösterir [282].

Zhao ve arkadaşlarının sıçanlarda erken gebelikte uterusta MMP-2, MMP-9 ve bunların doku inhibitörlerine ait mRNA'ların ifadesini değerlendirdikleri çalışmada, in situ hibridizasyon yöntemiyle MMP-9 mRNA'sı gebeliğin 6. gününde implantasyon bölgesinin anti-mezometriyal kutbunda primer desidual zonda bulunan desidualize stromal hücrelerde, 7. günde ise hem primer hem de sekonder desidual zonlarda yer alan tüm desidualize stromal hücrelerde yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca, MMP-9 ifadesinin trofoblastik hücrelerde ve trofoblasta ait ektoplasental konide de ifade edildiğini tespit etmişlerdir [277].

Hamutoğlu ve arkadaşları sıçanlarda östrus döngüsü boyunca ve gebeliğin erken dönemlerinde (7.5-9.5. günler) MMP-2, MMP-7 ve MMP-9'ün uterus dokuları ve implantasyon alanlarında ifadesini immünofloresan yöntemiyle değerlendirdikleri çalışmada, gebeliğin 7.5. gününde sekonder desidual zonda, primer desidual zona göre MMP-9 ifadesinin daha kuvvetli olduğunu ve dev trofoblast hücrelerinde ise ifadesinin negatif olduğunu göstermişlerdir. Gebeliğin 8.5. gününde ise primer desidual zonda, sekonder desidual zon ile kıyaslandığında MMP-9 ifadesinin daha kuvvetli olduğunu ve dev trofoblast hücrelerinde MMP-9'un kuvvetli immünfloresan tutulumunun olduğunu tespit

etmişlerdir. Ayrıca kan damarlarının endotellerinde de yine kuvvetli MMP-9 immünfloresan tutulumunun olduğunu göstermişlerdir [283]. Bizim çalışmamızda da Hamutoğlu ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olarak kontrol grubunda primer ve sekonder desidual zonlarda kuvvetli MMP-9 immünreaktivitesi izlenmekteydi. Yine bu çalışmanın bulgularıyla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da kontrol grubuna ait kesitlerde kan damarı endotellerinde güçlü MMP-9 immün tutulumu vardı. Ayrıca kontrol grubuna ait kesitlerimizde trofoblastlarda benzer şekilde ektoplasental konide ve trofoblast hücrelerinde kuvvetli MMP-9 immünreaktivitesi olduğunu belirledik.

Hurst ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları çalışmada gebeliğin 6-8. günlerinde MMP-9 ifadesini değerlendirmiş ve gebeliğin 8. gününde elde edilmiş implantasyon alanlarına ait kesitlerde mezometriyal bölgenin miyometriyuma bitişik dış stromal bölgesinde belirgin partikül boyama gözlendiğini göstermişlerdir [284]. Hurst ve arkadaşlarının çalışmasının aksine bizim çalışmamızda kontrol grubunda MMP-9 immünreaktivitesi yalnızca miyometriyuma bitişik olan dış stromal bölgede aynı zamanda değil oldukça kuvvetli olarak hem primer hem de sekonder desidual zonda dikkat çekmekteydi. Hurst ve arkadaşları çalışmalarında ayrıca MMP-9 immünreaktivitesinin sitoplazmik mi yoksa hücreler arası madde içinde mi olduğunu optik çözünürlüğün yetersiz olması nedeniyle belirleyememişlerdir ancak bizim çalışmamızda MMP-9 immün tutulumu desidual stromal hücrelerin hem membranlarında hem de sitoplazmalarında kontrol grubunda oldukça belirgindi.

Chan ve arkadaşlarının ilk trimester gebeliklerine ait plasental dokulardan izole edilen primer insan ekstravillöz trofoblastları üzerinde 1, 25-dihidroksivitamin D3 ve 25-hidroksivitamin D3'ün etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, 0-10 nM konsantrasyonlarında 1, 25 $(OH)_2D_3$ veya 0-100 nM konsantrasyonlarında 25(OH)D ile muamele edildiğinde Matrigel üzerine ekilmiş ekstravillöz trofoblastların invazyon kapasitelerinin D vitamininin bu iki formunun artan konsantrasyonlarına bağlı olarak zaman içinde artış gösterdiğini ve 100 nM 25 (OH)D konsantrasyonunda ekstravillöz trofoblastlarda pro-MMP-9 sekresyonunun maksimum düzeye ulaştığını jelatin zimografi yöntemi ile belirlemişlerdir. Dolayısıyla D vitamininin aktif formu olan 25(OH)D'nin trofoblast invazyon kapasitesi ve bu hücreler tarafından üretilen önemli bir invazyon belirteci olan MMP-9 üzerinde doğrudan etkisi olduğunu yaptıkları in vitro deneylerde ortaya koymuşlardır [285]. Bizim çalışmamızda ise Chan ve arkadaşlarının in vitro

deneylerindeki sonucu destekleyecek şekilde, D vitamini eksikliği oluşturduğumuz deney grubuna ait kesitlerde lümende yer alan trofoblastlarda MMP-9 immünreaktivitesinin kontrol grubuyla kıyaslandığında azaldığını tespit ettik. Dolayısıyla D vitamini eksikliği invazyon kapasitesini ve invazyon için kritik bir belirteç olan MMP-9 ifadesini azaltmaktadır.

Literatürdeki bazı çalışmalar tümör hücrelerinin invazyonuna aracılık etmek için Osteopontin'in, MMP-9 ifadesini indükleyebileceğini düşündürmektedir [286, 287]. Endometriyumdan salgılanan Osteopontin'in, MMP-9 ifadesini artırarak trofoblast invazyonunu teşvik edip edemeyeceği hala tam olarak anlaşılamamıştır. Qi ve arkadaşlarının fare blastosistlerinin adezyonu ve invazyonu üzerinde Osteopontin'in etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, fare endometriyal stromal hücrelerinde Osteopontin gen ifadesi siRNA'lar aracılığıyla susturulmuş ve daha sonra Osteopontin ifade etmeyen bu hücrelerle fare blastosistleri birlikte kültürlendiğinde, trofoblastlarda MMP-9 ifadesinin ve enzimatik aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde baskılandığını ve in vitro trofoblast invazyon kapasitesinin de yine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir [209]. Dolayısıyla bizim çalışmamızda da hem D vitamini eksikliğine bağlı olarak hem de D vitamini eksikliğinin desidual hücrelerde Ostepontin ifadesinin azalmasına neden olarak embriyo invazyonunda önemli bir belirteç olan MMP-9 ifadesinin trofoblastlarda baskılaması yoluyla bu proteinin ifadesini düzenlediğini ve bu durumun hem bizim yaptığımız in vivo çalışma hem de Qi ve arkadaşlarının yaptığı in vitro deneyde birbirini destekleyen bulgular ortaya koyduğunu söyleyebiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gebelik sırasında D vitamini metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelir ve D vitamini eksikliği pek çok ülkede olduğu gibi ülkemizde de gebe kadınlarda oldukça yaygındır. Düşük D vitamini durumu çeşitli gebelik komplikasyonuyla ilişkilendirilmiştir ancak araştırmaların pek çoğu gebeliğin daha ileri dönemlerinde olan etkilere odaklanmıştır. Ayrıca, D vitamini yetersizliğinin yanı sıra kadınlarda infertilitenin yüksek prevalansı ve D vitamininin insan üremesindeki olası rolü göz önüne alındığında, araştırmalar, kadın üreme bozukluklarının tedavisinde D vitamini takviyesi gibi yeni tedavi yaklaşımlarına yol açabilir. Biz de bu nedenle çalışmamızda gebeliğin erken döneminde D vitamini eksikliğinin implantasyon ve desidualizasyon süreçlerine olan etkilerini MMP9, Osteopontin ve VEGF-A bu süreçlerde önemli roller oynayan belirteçler üzerinden değerlendirmeyi hedefledik. Çalışmamızda gebeliğin 8. gününde D vitamini eksikliği oluşturduğumuz deney grubumuzda gebelikte desidualizasyon ve anjiyogenezde önemli işlevleri olan Osteopontin ve VEGF-A proteinlerinin immünreaktivitesi ve gen ifadelerinin kontrol grubunda kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiğini ancak MMP-9 proteinin immün tutulumu ve gen ifadesinde kontrol grubuna göre azalma olmasına rağmen anlamlı bir farklılık olmadığını tespit ettik. D vitamini eksikliğinin bu üç moleküler düzenleyiciden ikisinin ifadelerini önemli ölçüde azaltması D vitamini eksikliğinin implantasyonun desidualizasyon ve anjiyogenezis aşamalarında önemli bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Gebeliğin erken dönemlerinde D vitamini eksikliğinde anjiyogenezle ilgili örneğin Tie2, HIF-1α ve Angiopoietin 1 gibi yolaklarının da araştırılması ve D vitamini eksikliğinin bu yolaklar üzerindeki etkileri de araştırılmalıdır. Ayrıca literatürde embriyo invazyonunda MMP-9 gibi önemli rol oynayan bir invazyon belirteci olan MMP-2'nin de in vitro koşullarda D vitaminiyle ilişkisi gösterilmiş olup bu belirtecin de gebeliğin erken döneminde D vitamini eksikliği ile ilişkisi ortaya net bir şekilde konulmalı ve her iki invazyon belirteci üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak açıklanmalıdır. Yapılacak ileri düzeyde moleküler ara yolak çalışmaları konuya ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mor, G., Aldo, P. and Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews. Immunology*, 17(8), 469-482.

2. Achache, H. and Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 12(6), 731-746.

3. Ochoa-Bernal, M. A. and Fazleabas, A. T. (2020). Physiologic events of embryo ımplantation and decidualization in human and non-human primates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1-21.

4. Kovacs, C. S. and Kronenberg, H. M. (1997). Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocrine Reviews*, 18(6), 832-872.

5. Gernand, A. D., Simhan, H. N., Baca, K. M., Caritis, S. and Bodnar, L. M. (2017). Vitamin D, pre-eclampsia, and preterm birth among pregnancies at high risk for pre-eclampsia: an analysis of data from a low-dose aspirin trial. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 124(12), 1874-1882.

6. Shao, B., Mo, M., Xin, X., Jiang, W., Wu, J. and Huang, M. (2020). The interaction between prepregnancy BMI and gestational vitamin D deficiency on the risk of gestational diabetes mellitus subtypes with elevated fasting blood glucose. *Clinical Nutrition*, 39(7), 2265-2273.

7. Şeftalioğlu, A. (1998). *Genel ve özel insan embriyolojisi*. (Üçüncü Baskı). Ankara: Tıp ve Teknik Yayıncılık, 346-347.

8. Carlson, B. M. (2018). *Human embryology and developmental biology*. (Sixth edition). United States of America: Elsevier, 383-405.

9. Fleming, A. and Vilain, E. (2005). The endless quest for sex determination genes. *Clinical Genetics*, 67(1), 15-25.

10. Wilhelm, D., Palmer, S. and Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews, 87*(1), 1-28.

11. Matzuk, M. M. and Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine, 14*(11), 1197-1213.

12. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., ve Smith, M. J. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244.

13. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. and Torchia, M. G. (2016). *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi*. (Çev H. Dalçık). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri (Eserin orijinali 1973'de yayımlandı), 260-268.

14. Gary C. Schoenwolf, S. B. B., Philip R. Brauer, Philippa H. Francis-West. (2014). *Larsen's human embryology*. (Fifth edition). China: Elsevier Saunders, 377-396.

15. Cunha, G. R., Robboy, S. J., Kurita, T., Isaacson, D., Shen, J., ve Cao, M. (2018). Development of the human female reproductive tract. *Differentiation; research in biological diversity*, *103*, 46-65.

16. Guioli, S., Sekido, R. and Lovell-Badge, R. (2007). The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. *Developmental Biology*, *302*(2), 389-398.

17. Orvis, G. D. and Behringer, R. R. (2007). Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Developmental Biology*, *306*(2), 493-504.

18. Hugh S. Taylor, L. P., Emre Seli. (2019). *Speroff's clinical gynecologic endocrinology and infertility*. (Ninth edition). China: Wolters Kluwer, 122-123.

19. Behringer, R. R., Cate, R. L., Froelick, G. J., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature*, *345*(6271), 167-170.

20. Drews, U., Sulak, O. and Oppitz, M. (2001). Immunohistochemical localisation of androgen receptor during sex-specific morphogenesis in the fetal mouse. *Histochemistry and Cell Biology*, *116*(5), 427-439.

21. Lee, M. M. and Donahoe, P. K. (1993). Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews*, *14*(2), 152-164.

22. DeFalco, T., Takahashi, S. and Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology*, *352*(1), 14-26.

23. Huhtaniemi, I. and Pelliniemi, L. J. (1992). Fetal leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *201*(2), 125-140.

24. Wilson, J. D., Griffin, J. E., Leshin, M. and George, F. W. (1981). Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes. *Human Genetics*, *58*(1), 78-84.

25. Roly, Z. Y., Backhouse, B., Cutting, A., Tan, T. Y., Sinclair, A. H., ve Ayers, K. L. (2018). The cell biology and molecular genetics of Müllerian duct development. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology*, *7*(3), e310.

26. Rey, R. and Picard, J. Y. (1998). Embryology and endocrinology of genital development. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, *12*(1), 17-33.

27. Sadler, T. W. (2015). *Langman's medical embryology*. (Thirteenth edition). China: Wolters Kluwer Health, 264-268.

28. Hashimoto, R. (2003). Development of the human Müllerian duct in the sexually undifferentiated stage. *The Anatomical Record Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, *272*(2), 514-519.

29. Horii, M., Boyd, T. K., Quade, B. J., Crum, C. P. and Parast, M. M. (2018). *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology*. (Third edition). Philadelphia: Elsevier, 1-21.

30. Acién, P. (1992). Embryological observations on the female genital tract. *Human Reproduction, 7*(4), 437-445.

31. Robboy, S. J., Kurita, T., Baskin, L. and Cunha, G. R. (2017). New insights into human female reproductive tract development. *Differentiation; research in biological diversity, 97*, 9-22.

32. Wilson, J. D. (1978). Sexual differentiation. *Annual Review of Physiology, 40*, 279-306.

33. Shier, D. N., Shier, D., Butler, J. and Lewis, R. (2006). *Hole's human anatomy & physiology*. (Ninth edition). USA: McGraw-Hill Higher Education, 903-905.

34. Leveno, K. J., Spong, C. Y., Dashe, J. S., Casey, B. M., Hoffman, B. L., Cunningham, F. G. and Bloom, S. L. (2018). *Williams obstetrics.* (Twenty Fifth edition). USA: McGraw-Hill Medical, 25-26.

35. Moore, K. L. and Dalley, A. F. (1999). *Clinically oriented anatomy*. (Seventh edition). China: Lippincott Williams & Wilkins, 374-378.

36. Beckmann, C. R. B., Ling, F. W., Barzanksy, B. M., Herbert, W. N. P., Douglas, W. L. and Smith, R. P. (2010). *Obstetrics and gynecology*. (Sixth edition). China: Lippincott Williams & Wilkins, 29-41.

37. Çimen, A. (1994). *Anatomi*. Bursa: Uludağ Üniversitesi, 416-421.

38. Kahle, W., Leonhardt, H. and Platzer, W. (1993). *Color atlas and textbook of human anatomy: internal organs*. (Third edition). New York: Thieme, 294-301.

39. Arıncı, K. and Elhan, A. (2006). *Anatomi 1. cilt: Kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar*. (3. Baskı). Ankara: Güneş kitapevi, 340-345.

40. Ozan, H. (2014). *Ozan anatomi klinik, mikroskobik, fonksiyonel, gelişimsel*. (3. Baskı). Ankara: Klinisyen Tıp Kitabevleri, 453-455.

41. Ellis, H. (2006). *Clinical anatomy: applied anatomy for students and junior doctors*. (Eleventh edition). USA: Blackwell Publishing Ltd, 139-144.

42. Van De Graaff, K. M. (2001). *Human anatomy*. (Sixth Edition). Boston: McGraw-Hill College, 734-736.

43. Chung, K. W. and Chung, H. M. (2012). *BRS gross anatomy*. (Seventh edition). USA: Wolters Kluwer Health, 244-282.

44. Ergun, M. and Hayran, M. (Editörler). (2014). *Anatomi*. (1. Baskı). Ankara: Mn Medikal & Nobel Tıp Kitabevleri, 501-503.

45. Drake, R. L., Vogl, W. and Mitchell, A. W. M. (2015). *Gray's anatomy for students*. (Third Edition). Canada: Churchill Livingstone Elsevier, 421-526.

46. Kumar, S. (2018). *Howkins & bourne, shaw's textbook of gynecology*, (Seventeenth edition). India: Elsevier, 18-21.

47. Acién, P., Sánchez del Campo, F., Mayol, M. J. and Acién, M. (2011). The female gubernaculum: role in the embryology and development of the genital tract and in the possible genesis of malformations. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproduction Biology, 159*(2), 426-432.

48. Konar, H. (2016). *DC dutta's textbook of gynecology*. (Seventh edition). New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 6-8.

49. Range, R. L. and Woodburne, R. T. (1964). The Gross and microscopic anatomy of the transverse cervical ligament. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 90*, 460-467.

50. Cunningham, F. G., Hoffman, B. L., Yeomans, E. R. and Gilstrap, L. C. (Editörler). (2017). *Cunningham and gilstrap's operative obstetrics*, (Third Edition). USA: McGraw-Hill Education, 106-110.

51. Campbell, R. M. (1950). The anatomy and histology of the sacrouterine ligaments. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 59*(1), 1-12.

52. Singh, V. (2011). *Anatomy of abdomen and lower limb*. (First edition). New Delhi: Elsevier Health Sciences, 281-290.

53. Smith, R. P. (2018). *Netter's obstetrics and gynecology*. (Third edition). China: Elsevier, 15-16.

54. Sinnatamby, C. S. (2011). *Last's anatomy: regional and applied*. (Twelft edition). London: Churchill Livingstone Elsevier, 463-466.

55. Ross, M. H. and Pawlina, W. (2010). *Histology: a text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. (Sixth edition). USA : Lippincott Williams & Wilkins, 848-854.

56. Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel histoloji*. (2. Baskı). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 313-316.

57. Mescher, A. L. (2016). *Junqueria's basic histology: text and atlas*. (Fourteenth edition). USA : McGraw-Hill Education, 471-478.

58. Vasudeva, N. and Mishra, S. (2014). *Inderbir singh's textbook of human histology*. (Seventh edition). New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publishers, 355-359.

59. Gartner, L. P. and Hiatt, J. L. (2015). *Cell biology and histology*. (Seventh edition). USA: Wolters Kluwer Health, 339-341.

60. Kierszenbaum, A. L. (2002). *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. (First edition). USA: Mosby, 578-581.

61. Cormack, D. H. (2001). *Essential histology*. (Second edition). USA : Lippincott Williams & Wilkins, 401-404.

62. Gartner, L. P. and Hiatt, J. L. (2001). *Color textbook of histology*. (Second edition). USA : W.B. Saunders, 474-475.

63. Erdoğan, D., Görgün, M., Hatipoğlu, T. and Ilgaz, C. (2007). *Özel histoloji*. (2. Baskı). Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, 181-186.

64. Lowrie, D. J. (2020). *Histology - an essential textbook*. (First edition). USA : Thieme Medical Publishers, 358-362.

65. Çelik, Ö. (Editör). (2011). *Yardımcı üreme teknikleri, temel klinik ve embriyolojik uygulamalar*, Adana: Nobel Kitabevi, 5-9.

66. Gunasegaran, J. P. (2010). *Textbook of histology and practical guide*. (Second edition). India : Elsevier, 321-323.

67. Johnson, K. E. (1991). *Histology and cell biology*. (Second edition). USA : Harwal Publishing Company, 286-288.

68. Young, B., O'Dowd, G. and Woodford, P. (2013). *Wheater's functional histology : a text and colour atlas*. (Sixth edition). USA : Churchill Livingstone Elsevier, 361-367.

69. Ovalle, W. K. and Nahirney, P. C. (2007). *Netter's essential histology*. (First edition). USA : Saunders, 412-416.

70. Lowe, J. S. and Anderson, P. G. (2014). *Stevens & lowe's human histology*. (Fourth edition). China: Mosby Elsevier, 340-344.

71. Kühnel, W. (2003). *Color atlas of cytology, histology, and microscopic anatomy*. (Fourth edition). Germany : George Thieme Verlag, 568-582.

72. van Lommel, A. T. L. (2003). *From cells to organs: a histology textbook and atlas*. (First edition). Germany: Springer, 230-232.

73. Gürsoy, E. and Ergin, K. (2007). *Dişi üreme sistemi atlası*. (1. Baskı). İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri, 11.

74. Hewer, E. E. and Bradbury, S. (1969). *Hewer's textbook of histology for medical students*. (Ninth edition). USA : Heinemann Medical, 383-388.

75. Elder, K. and Dale, B. (2010). *In-vitro fertilization*. (Third Edition). Cambridge: Cambridge University Press, 50-51.

76. Singh, V. (2017). *Textbook of clinical embryology*. (Second edition). India : Elsevier, 41-42.

77. Hardy, D. M. and Garbers, D. L. (2001). *Fertilization*. (First edition). United States of America : Academic Press, 3-4.

78. Mahi-Brown, C. A. and Yanagimachi, R. (1983). Parameters influencing ovum pickup by oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamete Research, 8* (1), 1-10.

79. Eşrefoğlu, M. (2017). *Embriyoloji*. (1. Baskı.). İstanbul : İstanbul Tıp Kitabevleri, 55-65.

80. Devi, V. S. (Editör). (2018). *Inderbir singh's human embryology*. (Eleventh edition). New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publishers, 46-54.

81. Demir, R. (1995). *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*. (1. Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık, 78-95.

82. Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature, 434*(7030), 234-238.

83. Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., ve Ryu, F.(2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science, 287*(5451), 321-324.

84. Almeida, E. A., Huovila, A. P., Sutherland, A. E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D. G. and White, J. M. (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell, 81*(7), 1095-1104.

85. Kim, E., Yamashita, M., Nakanishi, T., Park, K. E., Kimura, M., ve Kashiwabara, S. (2006). Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry, 281*(9), 5634-5639.

86. Akkuş, M. (Editör). (2023). *Sağlık & bilim: genel embriyoloji-I.* (1. Baskı). İstanbul : Efe Akademi Yayınları, 14.

87. Kim, S. M. and Kim, J. S. (2017). A review of mechanisms of implantation. *Development& Reproduction, 21*(4), 351-359.

88. Psychoyos, A. (1986). Uterine receptivity for nidation. *Annals of the New York Academy of Sciences, 476*, 36-42.

89. Ma, W. G., Song, H., Das, S. K., Paria, B. C. and Dey, S. K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100*(5), 2963-2968.

90. Navot, D., Scott, R. T., Droesch, K., Veeck, L. L., Liu, H. C. and Rosenwaks, Z. (1991). The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertility and Sterility, 55*(1), 114-118.

91. Finn, C. A. and Martin, L. (1974). The control of implantation. *Journal of reproduction and Fertility. 39*(1), 195-206.

92. Yilmaz, F. and Tekmen, I. (2019). İmplantasyon sürecinde embriyo, endometriyum farklanması ve moleküler yolaklar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 39*(2), 212-220.

93. Wilcox, A. J., Baird, D. D. and Weinberg, C. R. (1999). Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine, 340*(23), 1796-1799.

94. Genbacev, O. D., Prakobphol, A., Foulk, R. A., Krtolica, A. R., Ilic, D., ve Singer, M. S.(2003). Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, *299*(5605), 405-408.

95. Alon, R. and Feigelson, S. (2002). From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Seminars in immunology*, *14*(2), 93-104.

96. Singh, H., Nardo, L., Kimber, S. J. and Aplin, J. D. (2010). Early stages of implantation as revealed by an in vitro model. *Reproduction*, *139*(5), 905-914.

97. Norwitz, E. R., Schust, D. J. and Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, *345*(19), 1400-1408.

98. Qiong, Z., Jie, H., Yonggang, W., Bin, X., Jing, Z. and Yanping, L. (2017). Clinical validation of pinopode as a marker of endometrial receptivity: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 513-517.

99. Bentin-Ley, U., Sjögren, A., Nilsson, L., Hamberger, L., Larsen, J. F. and Horn, T. (1999). Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Human Reproduction*, *14*(2), 515-520.

100. Lopata, A., Bentin-Ley, U. and Enders, A. (2002). "Pinopodes" and implantation. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *3*(2), 77-86.

101. Martel, D., Monier, M. N., Roche, D. and Psychoyos, A. (1991). Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Human Reproduction*, *6*(4), 597-603.

102. Develioglu, O. H., Hsiu, J. G., Nikas, G., Toner, J. P., Oehninger, S. and Jones, H. W., Jr. (1999). Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertility and Sterility*, *71*(6), 1040-1047.

103. Kondera-Anasz, Z., Sikora, J. and Mielczarek-Palacz, A. (2004). Leukemia inhibitory factor: an important regulator of endometrial function. *American Journal of Reproductive Immunology*, *52*(2), 97-105.

104. Raab, G., Kover, K., Paria, B. C., Dey, S. K., Ezzell, R. M. and Klagsbrun, M. (1996). Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development*, *122*(2), 637-645.

105. Paria, B. C., Elenius, K., Klagsbrun, M. and Dey, S. K. (1999). Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*, 126(9), 1997-2005.

106. Stavreus-Evers, A., Aghajanova, L., Brismar, H., Eriksson, H., Landgren, B. M. and Hovatta, O. (2002). Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Molecular Human Reproduction*, *8*(8), 765-769.

107. Fukuda, M. N. and Sugihara, K. (2007). Signal transduction in human embryo implantation. *Cell Cycle*, 6(10), 1153-1156.

108. McEwan, M., Lins, R. J., Munro, S. K., Vincent, Z. L., Ponnampalam, A. P. and Mitchell, M. D. (2009). Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(3), 241-249.

109. Lessey, B. A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S. M. and Buck, C. A. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(1), 188-195.

110. Klentzeris, L. D., Bulmer, J. N., Trejdosiewicz, L. K., Morrison, L. and Cooke, I. D. (1993). Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Human Reproduction*, 8(8), 1223-1230.

111. Rowlands, T. M., Symonds, J. M., Farookhi, R. and Blaschuk, O. W. (2000). Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Reviews of Reproduction*, 5(1), 53-61.

112. Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4), 639-655.

113. Lai, T. H., Chen, H. T. and Wu, W. B. (2022). Trophoblast coculture induces intercellular adhesion molecule-1 expression in uterine endometrial epithelial cells through TNF-α production: Implication of role of FSH and ICAM-1 during embryo implantation. *Journal of Reproductive Immunology*, (152) 103650, 1-11.

114. Carlson, M., Nakamura, Y., Payson, R., O'Connell, P., Leppert, M. and Lathrop, G. M. (1988). Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT108.2) on chromosome 18 [D18S24]. *Nucleic Acids Research*, 16(9), 4188.

115. Bischof, P. and Campana, A. (1996). A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Human Reproduction Update*, 2(3), 262-270.

116. Giudice, L. C. (1999). Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Human Reproduction*, (14) 2, 3-16.

117. Burrows, T. D., King, A. and Loke, Y. W. (1996). Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update*, 2(4), 307-321.

118. Shimonovitz, S., Hurwitz, A., Dushnik, M., Anteby, E., Geva-Eldar, T. and Yagel, S. (1994). Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 171(3), 832-838.

119. Cui, N., Hu, M. and Khalil, R. A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147, 1-73.

120. Hunkapiller, N. M., Gasperowicz, M., Kapidzic, M., Plaks, V., Maltepe, E. and Kitajewski, J. (2011). A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Development*, 138(14), 2987-2998.

121. Okada, H., Tsuzuki, T. and Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), 220-227.

122. Gellersen, B. and Brosens, J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine Reviews*, 35(6), 851-905.

123. Kajihara, T., Tanaka, K., Oguro, T., Tochigi, H., Prechapanich, J. and Uchino, S. (2014). Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reproductive Sciences*, 21(3), 372-380.

124. Laws, M. J., Taylor, R. N., Sidell, N., DeMayo, F. J., Lydon, J. P. and Gutstein, D. E. (2008). Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development*, 135(15), 2659-2668.

125. Okada, H., Tsuzuki, T., Shindoh, H., Nishigaki, A., Yasuda, K. and Kanzaki, H. (2014). Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(5), 1180-1187.

126. Schatz, F., Guzeloglu-Kayisli, O., Arlier, S., Kayisli, U. A. and Lockwood, C. J. (2016). The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding. *Human Reproduction Update*, 22(4), 497-515.

127. Sharma, S., Godbole, G. and Modi, D. (2016). Decidual control of trophoblast invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(3), 341-350.

128. Vinketova, K., Mourdjeva, M. and Oreshkova, T. (2016). Human decidual stromal cells as a component of the implantation niche and a modulator of maternal immunity. *Journal of pregnancy*, 2016, 1-17.

129. Lee, S. K., Kim, C. J., Kim, D. J. and Kang, J. H. (2015). Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network*, 15(1), 16-26.

130. Mori, M., Bogdan, A., Balassa, T., Csabai, T. and Szekeres-Bartho, J. (2016). The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Seminars in Immunopathology*, 38(6), 635-649.

131. Santoni, A., Carlino, C. and Gismondi, A. (2008). Uterine NK cell development, migration and function. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(2), 202-210.

132. Wallace, A. E., Fraser, R., Gurung, S., Goulwara, S. S., Whitley, G. S. and Johnstone, A. P. (2014). Increased angiogenic factor secretion by decidual natural killer cells from pregnancies with high uterine artery resistance alters trophoblast function. *Human Reproduction*, 29(4), 652-660.

133. Lobo, S. C., Huang, S. T., Germeyer, A., Dosiou, C., Vo, K. C. and Tulac, S. (2004). The immune environment in human endometrium during the window of implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 52(4), 244-251.

134. Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J. and Goldman, M. B. (2008). Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update*, 14(4), 345-357.

135. Almada, M., Fonseca, B. M., Amaral, C., Diniz-da-Costa, M., Correia-da-Silva, G. and Teixeira, N. (2017). Anandamide oxidative metabolism-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, (6), 816-826.

136. Kajihara, T., Jones, M., Fusi, L., Takano, M., Feroze-Zaidi, F. and Pirianov, G. (2006). Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Molecular Endocrinology*, 20(10), 2444-2455.

137. Tsuzuki, T., Okada, H., Shindoh, H., Shimoi, K., Nishigaki, A. and Kanzaki, H. (2016). Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production and apoptosis in human ectopic endometriotic stromal cells. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal of The International Society of Gynecological Endocrinology*, 32(4), 323-328.

138. Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Fraser, H. M. and Critchley, H. O. (2006). Endocrine regulation of menstruation. *Endocrine Reviews*, 27(1), 17-46.

139. Hey-Cunningham, A. J., Peters, K. M., Zevallos, H. B., Berbic, M., Markham, R. and Fraser, I. S. (2013). Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis. *Frontiers in Bioscience* (Elite edition), 5(3), 1033-1056.

140. Bradford, L. S., Rauh-Hain, J. A., Schorge, J., Birrer, M. J. and Dizon, D. S. (2015). Advances in the management of recurrent endometrial cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 38(2), 206-212.

141. Albrecht, E. D. and Pepe, G. J. (2010). Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3), 397-408.

142. Tsuzuki, T., Okada, H., Cho, H., Shimoi, K., Miyashiro, H. and Yasuda, K. (2013). Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 168(1), 95-101.

143. Tsutsumi, A., Okada, H., Nakamoto, T., Okamoto, R., Yasuda, K. and Kanzaki, H. (2011). Estrogen induces stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) production in human endometrial stromal cells: a possible role of endometrial epithelial cell growth. *Fertility and Sterility*, 95(1), 444-447.

144. Koga, K., Osuga, Y., Tsutsumi, O., Yano, T., Yoshino, O. and Takai, Y. (2001). Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(11), 5609-5614.

145. Soufla, G., Sifakis, S. and Spandidos, D. A. (2008). FGF2 transcript levels are positively correlated with EGF and IGF-1 in the malignant endometrium. *Cancer Letters*, 259(2), 146-155.

146. Dai, H., Zhao, S., Xu, L., Chen, A. and Dai, S. (2010). Expression of Efp, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Oncology Reports*, 23(3), 795-799.

147. Evans, J., Catalano, R. D., Brown, P., Sherwin, R., Critchley, H. O. and Fazleabas, A. T. (2009). Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *Faseb Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(7), 2165-2175.

148. Smith, S. K. (2001). Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends in Endocrinology and Metabolism : TEM* , 12(4), 147-151.

149. Tsuzuki, T., Okada, H., Cho, H., Tsuji, S., Nishigaki, A. and Yasuda, K. (2012). Hypoxic stress simultaneously stimulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1α and inhibits stromal cell-derived factor-1 in human endometrial stromal cells. *Human Reproduction*, 27(2), 523-530.

150. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581-611.

151. Shifren, J. L., Tseng, J. F., Zaloudek, C. J., Ryan, I. P., Meng, Y. G. and Ferrara, N. (1996). Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8), 3112-3118.

152. Okada, H., Tsutsumi, A., Imai, M., Nakajima, T., Yasuda, K. and Kanzaki, H. (2010). Estrogen and selective estrogen receptor modulators regulate vascular endothelial growth factor and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2680-2686.

153. Hervé, M. A., Meduri, G., Petit, F. G., Domet, T. S., Lazennec, G. and Mourah, S. (2006). Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *The Journal of Endocrinology*, 188(1), 91-99.

154. Thomas, M. and Augustin, H. G. (2009). The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 12(2), 125-137.

155. Hewett, P., Nijjar, S., Shams, M., Morgan, S., Gupta, J. and Ahmed, A. (2002). Down-regulation of angiopoietin-1 expression in menorrhagia. *The American Journal of Pathology*. 160(3), 773-780.

156. Wu, D., Kimura, F., Zheng, L., Ishida, M., Niwa, Y. and Hirata, K. (2017). Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells. Reproductive *Biology and Endocrinology : RB&E*, 15(1), 16.

157. Cha, J., Sun, X. and Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*, 18(12), 1754-1767.

158. Garrido-Gomez, T., Dominguez, F., Quiñonero, A., Diaz-Gimeno, P., Kapidzic, M. and Gormley, M., (2017). Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), e8468-e8477.

159. Lerchbaum, E. and Obermayer-Pietsch, B. (2012). Vitamin D and fertility: a systematic review. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 166(5), 765-778.

160. Nair, R. and Maseeh, A. (2012). Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 3(2), 118-126.

161. Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 357(3), 266-281.

162. Yavuz, R., Mete, T., Yavuz, D. and Altunoglu, A. (2014). D Vitamini, kalsiyum & mineral metabolizması, D vitaminin iskelet dışı etkileri ve kronik böbrek yetmezliğinde nutrisyonel D vitamini kullanımı. *Ankara Medical Journal*, 14(4), 162-169.

163. Lips, P. (2006). Vitamin D physiology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), 4-8.

164. Holick, M. F. (2006). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2062-2072.

165. Favus, M. (Edt.). (2006). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Washington : American Society for Bone and Mineral Research 129-137.

166. De Groot, L. and Jameson, J. (Eds.) (2001). *Endocrinology*. (Third edition). Australia : WB Saunders, 1009-1028.

167. DeLuca, H. F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6 Suppl), 1689s-1696s.

168. Hruska, K. A. (1993). Hyperphosphatemia and hypophosphatemia. In Favus, M. (Ed.), *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism*, Washington : American Society for Bone and Mineral Research, 213.

169. Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(1), F8-28.

170. Jeon, S.-M. and Shin, E.-A. (2018). Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 1-14.

171. Uçku, R., Acikgoz, A. ve Günay, T. (2013). Gebelikte D vitamini gereksinimi ve desteklenmesi. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 12(5), 597-608.

172. Bilgiç, D., Okumuş, H., Yagcan, H. ve Guler, B. (2019). Gebelikte beslenme desteğine ilişkin güncel rehberlerin incelenmesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*, 12(2), 143-151.

173. Ross, A. C., Taylor, C. L., Yaktine, A. L. and Del Valle, H. B. (Editörler). (2011). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. USA : The National Academies Press, 96.

174. Spiro, A. and Buttriss, J. L. (2014). Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition bulletin /British Nutrition Foundation*, 39(4), 322-350.

175. Saraf, R., Morton, S. M., Camargo, C. A., Jr. and Grant, C. C. (2016). Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Maternal and Child Nutrition*, 12(4), 647-668.

176. Hatun, S., Bereket, B., Çalıkoğlu, A. S. ve Özkan, B. (2003). Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nütrisyonel rikets. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46(3), 224-241.

177. Hatun, S., Bereket, A., Özkan, B., Coşkun, T., Köse, R. and Çalıkoğlu, A. S. (2007). Free vitamin D supplementation for every infant in Turkey. *Archives of disease in Childhood*, 92(4), 373-374.

178. Hatun, Ş., Ozkan, B. and Bereket, A. (2011). Vitamin D deficiency and prevention: Turkish experience. *Acta Paediatrica*, 100(9), 1195-1199.

179. Mumford, S. L., Garbose, R. A., Kim, K., Kissell, K., Kuhr, D. L. and Omosigho, U. R. (2018). Association of preconception serum 25-hydroxyvitamin D concentrations with livebirth and pregnancy loss: a prospective cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 6(9), 725-732.

180. Hewison, M. (2018). The earlier the better: preconception vitamin D and protection against pregnancy loss. *The lancet. Diabetes & Endocrinology*, 6(9), 680-681.

181. Zhang, H., Huang, Z., Xiao, L., Jiang, X., Chen, D. and Wei, Y. (2017). Meta-analysis of the effect of the maternal vitamin D level on the risk of spontaneous pregnancy loss. *International Journal of gynaecology and obstetrics : The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 138(3), 242-249.

182. Gonçalves, D. R., Braga, A., Braga, J. and Marinho, A. (2018). Recurrent pregnancy loss and vitamin D: A review of the literature. *American Journal of Reproductive İmmunology : AJRI*, 80(5), e13022.

183. Chen, Y., Zhu, B., Wu, X., Li, S. and Tao, F. (2017). Association between maternal vitamin D deficiency and small for gestational age: evidence from a meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ Open*, 7(8), e016404.

184. Wei, S. Q., Qi, H. P., Luo, Z. C. and Fraser, W. D. (2013). Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(9), 889-899.

185. Qin, L. L., Lu, F. G., Yang, S. H., Xu, H. L. and Luo, B. A. (2016). Does maternal vitamin d deficiency increase the risk of preterm birth: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*, 8(5), 1-10.

186. Purswani, J. M., Gala, P., Dwarkanath, P., Larkin, H. M., Kurpad, A. and Mehta, S. (2017). The role of vitamin D in pre-eclampsia: a systematic review. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 17(1), 1-15.

187. Amraei, M., Mohamadpour, S., Sayehmiri, K., Mousavi, S. F., Shirzadpour, E. and Moayeri, A. (2018). Effects of Vitamin D deficiency on incidence risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*, (9)7, 1-11.

188. Song, H., Yang, L. and Jia, C. (2017). Maternal vitamin D status during pregnancy and risk of childhood asthma: A meta-analysis of prospective studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(5), 1-9.

189. Aryan, Z., Rezaei, N. and Camargo, C. A., Jr. (2017). Vitamin D status, aeroallergen sensitization, and allergic rhinitis: A systematic review and meta-analysis. *International Reviews of Immunology*, 36(1), 41-53.

190. Christensen, N., Søndergaard, J., Fisker, N. and Christesen, H. T. (2017). Infant respiratory tract infections or wheeze and maternal vitamin d in pregnancy: a systematic review. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(4), 384-391.

191. Wei, Z., Zhang, J. and Yu, X. (2016). Maternal vitamin D status and childhood asthma, wheeze, and eczema: A systematic review and meta-analysis. *Pediatric Allergy and Immunology : Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 27(6), 612-619.

192. Pet, M. A. and Brouwer-Brolsma, E. M. (2016). The impact of maternal vitamin d status on offspring brain development and function: a Systematic Review. *Advances in Nutrition*, 7(4), 665-678.

193. Veena, S. R., Gale, C. R., Krishnaveni, G. V., Kehoe, S. H., Srinivasan, K. and Fall, C. H. (2016). Association between maternal nutritional status in pregnancy and offspring cognitive function during childhood and adolescence; a systematic review. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16 (220), 1-24.

194. Wang, T., Shan, L., Du, L., Feng, J., Xu, Z. and Staal, W. G.(2016). Serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 25(4), 341-350.

195. Butler, W. T. (1989). The nature and significance of osteopontin. *Connective Tissue Research*, 23(2-3), 123-136.

196. Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A. and Manseau, E. J. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Molecular Biology of the Cell*, 3(10), 1169-1180.

197. Young, M. F., Kerr, J. M., Termine, J. D., Wewer, U. M., Wang, M. G. and McBride, O. W.(1990). cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, 7(4), 491-502.

198. Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshioka, K. and Iguchi, M. (1993). Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 15180-15184.

199. Denhardt, D. T. and Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(15), 1475-1482.

200. Bautista, D. S., Saad, Z., Chambers, A. F., Tonkin, K. S., O'Malley, F. P. and Singhal, H., (1996). Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clinical Biochemistry*, 29(3), 231-239.

201. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238(4826), 491-497.

202. Barry, S. T., Ludbrook, S. B., Murrison, E. and Horgan, C. M. (2000). A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267(3), 764-769.

203. Barry, S. T., Ludbrook, S. B., Murrison, E. and Horgan, C. M. T. (2000). Analysis of the α4β1 integrin–osteopontin interaction. *Experimental Cell Research*, 258(2), 342-351.

204. Shiokawa, S., Yoshimura, Y., Sawa, H., Nagamatsu, S., Hanashi, H. and Sakai, K. (1999). Functional role of arg-gly-asp (RGD)-binding sites on β1 integrin in embryo implantation using mouse blastocysts and human decidua. *Biology of Reproduction*, 60(6), 1468-1474.

205. Carson, D. D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M. C. and Vernon, M. (2002). Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Molecular Human Reproduction*, 8(9), 871-879.

206. Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P. and Germeyer, A. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 143(6), 2119-2138.

207. von Wolff, M., Bohlmann, M. K., Fiedler, C., Ursel, S. and Strowitzki, T. (2004). Osteopontin is up-regulated in human decidual stromal cells. *Fertility and Sterility*, 81(1), 741-748.

208. Apparao, K. B., Murray, M. J., Fritz, M. A., Meyer, W. R., Chambers, A. F. and Truong, P. R. (2001). Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(10), 4991-5000.

209. Qi, Q. R., Xie, Q. Z., Liu, X. L. and Zhou, Y. (2014). Osteopontin is expressed in the mouse uterus during early pregnancy and promotes mouse blastocyst attachment and invasion in vitro. *PLOS One*, 9(8), 1-12.

210. Weintraub, A. S., Lin, X., Itskovich, V. V., Aguinaldo, J. G., Chaplin, W. F. and Denhardt, D. T. (2004). Prenatal detection of embryo resorption in osteopontin-deficient mice using serial noninvasive magnetic resonance microscopy. *Pediatric Research*, 55(3), 419-424.

211. Binder, N. K., Evans, J., Gardner, D. K., Salamonsen, L. A., Hannan, N. J. and Hannan, N. J. (2014). Endometrial signals improve embryo outcome: functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice. *Human Reproduction*, 29(10), 2278-2286.

212. Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z. and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, 5(6), 623-628.

213. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L. and O'Shea, K. S. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573), 439-442.

214. Chintalgattu, V., Nair, D. M. and Katwa, L. C. (2003). Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(3), 277-286.

215. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1(1), 27-31.

216. Lopez, J. J., Laham, R. J., Stamler, A., Pearlman, J. D., Bunting, S. and Kaplan, A., (1998). VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovascular Research*, 40(2), 272-281.

217. Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dällenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2009). Potential markers of preeclampsia--a review. *Reproductive Biology Endocrinolgy*, 7 (70), 1-14.

218. Hornung, D., Lebovic, D. I., Shifren, J. L., Vigne, J. L. and Taylor, R. N. (1998). Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertility and Sterility*, 69(5), 909-915.

219. Girling, J. E. and Rogers, P. A. (2009). Regulation of endometrial vascular remodelling: role of the vascular endothelial growth factor family and the angiopoietin-TIE signalling system. *Reproduction : the official journal of the Society for the Study of Fertility*, 138(6), 883-893.

220. Ku, D. D., Zaleski, J. K., Liu, S. and Brock, T. A. (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *The American Journal of Physiology*, 265(2 Pt 2), H586-H592.

221. Zachary, I. (2001). Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 280(6), C1375-1386.

222. Kashiwagi, A., DiGirolamo, C. M., Kanda, Y., Niikura, Y., Esmon, C. T. and Hansen, T. R. (2007). The postimplantation embryo differentially regulates endometrial gene expression and decidualization. *Endocrinology*, 148(9), 4173-4184.

223. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L. and Gertsenstein, M. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 265 (2), 435-439.

224. Chakraborty, I., Das, S. K. and Dey, S. K. (1995). Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *The Journal of Endocrinology*, 147(2), 339-352.

225. Cora, M. C., Kooistra, L. and Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793.

226. Rocha-Santos, T. and Duarte A. C. (2014). *Comprehensive analytical chemistry*. (First Edition), London: Elsevier Science, 193-218.

227. Eser, B. and Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57.

228. Zelzer, S., Goessler, W. and Herrmann, M. (2018). Measurement of vitamin D metabolites by mass spectrometry, an analytical challenge. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 3, 1-14.

229. Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A. and Clarke, W. A. (2022). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nature Reviews. Methods Primers*, 2(1), 1-14.

230. Kabala, S. İ. ve Çelik, S. (2022). Tıbbi laboratuvarlarda kullanılan ELISA ve LC-MS cihazlarının analiz ölçümleri üzerinden karşılaştırılması, *Kırklareli Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 427-438.

231. Agic, A., Xu, H., Altgassen, C., Noack, F., Wolfler, M. M. and Diedrich, K. (2007). Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reproductive Sciences*, 14(5), 486-497.

232. Parikh, G., Varadinova, M., Suwandhi, P., Araki, T., Rosenwaks, Z. and Poretsky, L. (2010). Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Hormone and Metabolic Research*, 42(10), 754-757.

233. Tanamura, A., Nomura, S., Kurauchi, O., Furui, T., Mizutani, S. and Tomoda, Y. (1995). Purification and characterization of 1,25(OH)2D3 receptor from human placenta. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 21(6), 631-639.

234. Henry, H. L. and Norman, A. W. (1984). Vitamin D: metabolism and biological actions. *Annual Review of Nutrition*, 4, 493-520.

235. Viganò, P., Lattuada, D., Mangioni, S., Ermellino, L., Vignali, M. and Caporizzo, E. (2006). Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 415-424.

236. Ozkan, S., Jindal, S., Greenseid, K., Shu, J., Zeitlian, G. and Hickmon, C. (2010). Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 94(4), 1314-1319.

237. Aleyasin, A., Hosseini, M. A., Mahdavi, A., Safdarian, L., Fallahi, P. and Mohajeri, M. R. (2011). Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 159(1), 132-137.

238. Anifandis, G. M., Dafopoulos, K., Messini, C. I., Chalvatzas, N., Liakos, N. and Pournaras, S. (2010). Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E, 8 (91), 1-5.

239. Bezerra Espinola, M. S., Bilotta, G. and Aragona, C. (2021). Positive effect of a new supplementation of vitamin D(3) with myo-inositol, folic acid and melatonin on IVF outcomes: a prospective randomized and controlled pilot study. *Gynecological endocrinology : The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, *37*(3), 251-254.

240. Du, H., Daftary, G. S., Lalwani, S. I. and Taylor, H. S. (2005). Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)2D3 in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Molecular Endocrinology*, *19*(9), 2222-2233.

241. Bagot, C. N., Troy, P. J. and Taylor, H. S. (2000). Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Therapy*, *7*(16), 1378-1384.

242. Halloran, B. P. and DeLuca, H. F. (1980). Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *The Journal of Nutrition*, 110(8), 1573-1580.

243. Panda, D. K., Miao, D., Tremblay, M. L., Sirois, J., Farookhi, R. and Hendy, G. N. (2001). Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(13), 7498-7503.

244. Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K. and Yoshihara, Y. (1997). Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature Genetics*, *16*(4), 391-396.

245. Halhali, A., Acker, G. M. and Garabédian, M. (1991). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, *91*(1), 59-64.

246. Johnson, L. E. and DeLuca, H. F. (2002). Reproductive defects are corrected in vitamin d-deficient female rats fed a high calcium, phosphorus and lactose diet. *The Journal of Nutrition*, *132*(8), 2270-2273.

247. Stavenuiter, A. W., Arcidiacono, M. V., Ferrantelli, E., Keuning, E. D. and Vila Cuenca, M. (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, 1-5.

248. Reinius, S. (1967). Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 77(2), 257-266.

249. Mayer, G., Nilsson, O. and 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.

250. Fonseca, B. M., Correia-da-Silva, G. and Teixeira, N. A. (2012). The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. *Reproductive Biology*, 12(2), 97-118.

251. Abrahamsohn, P. A. and Zorn, T. M. (1993). Implantation and decidualization in rodents. *The Journal of Experimental Zoology*, 266(6), 603-628.

252. Enders, A. C. and Schlafke, S. (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *American Journal of Anatomy*, 120(2), 185-225.

253. Parr, M. B., Tung, H. N. and Parr, E. L. (1986). The ultrastructure of the rat primary decidual zone. *The American Journal of Anatomy*, 176(4), 423-436.

254. Christofferson, R. H. and Nilsson, B. O. (1988). Morphology of the endometrial microvasculature during early placentation in the rat. *Cell and Tissue Research*, 253(1), 209-220.

255. Tachi, S., Tachi, C. and Lindner, H. R. (1970). Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 21(1), 37-56.

256. Kamar, S. S. (2018). Histological evaluation of vitamin-D deficiency on the endometrial decidualization in early pregnancy in rat model. *Egyptian Journal of Histology*, 41(3), 300-310.

257. Franzén, A. and Heinegård, D. (1985). Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochemical Journal*, 232(3), 715-724.

258. Johnson, G. A., Spencer, T. E., Burghardt, R. C. and Bazer, F. W. (1999). Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. *Biology of Reproduction*, 61(4), 884-891.

259. Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Papadopoulos, A. and Tenen, D. G. (1989). Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 996(1-2), 43-48.

260. Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshioka, K. and Iguchi, M. (1993). Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 15180-15184.

261. Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Spencer, T. E., Newton, G. R., Ott, T. L. and Bazer, F. W. (1999). Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biology of Reproduction*, 61(4), 892-899.

262. Daiter, E., Omigbodun, A., Wang, S., Walinsky, D., Strauss, J. F. and Hoyer, J. R. (1996). Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinology*, 137(5), 1785-1790.

263. Luedtke, C. C., McKee, M. D., Cyr, D. G., Gregory, M., Kaartinen, M. T. and Mui, J. (2002). Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1437-1448.

264. Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W. and Sun, J. (1995). Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 63(3), 535-542.

265. Craig, A. M. and Denhardt, D. T. (1991). The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene*, 100, 163-171.

266. Zygmunt, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U. and Liang, O. D. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 110, S10-S18.

267. Möller, B., Rasmussen, C., Lindblom, B. and Olovsson, M. (2001). Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, 7(1), 65-72.

268. Gordon, J. D., Shifren, J. L., Foulk, R. A., Taylor, R. N. and Jaffe, R. B. (1995). Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 50(9), 688-697.

269. Licht, P., Russu, V., Lehmeyer, S., Wissentheit, T., Siebzehnrübl, E. and Wildt, L. (2003). Cycle dependency of intrauterine vascular endothelial growth factor levels is correlated with decidualization and corpus luteum function. *Fertility and Sterility*, 80(5), 1228-1233.

270. Malamitsi-Puchner, A., Sarandakou, A., Tziotis, J., Stavreus-Evers, A., Tzonou, A. and Landgren, B. M. (2004). Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles. *Fertility and Sterility*, 81(5), 1322-1327.

271. Nardo, L. G. (2005). Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 17(4), 419-423.

272. Matsui, N., Kawano, Y., Nakamura, S. and Miyakawa, I. (2004). Changes in vascular endothelial growth factor production associated with decidualization by human endometrial stromal cells in vitro. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 83(2), 138-143.

273. Kim, M., Park, H. J., Seol, J. W., Jang, J. Y., Cho, Y. S. and Kim, K. R. (2013). VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Molecular Medicine*, 5(9), 1415-1430.

274. Tesic, D., Hawes, J. E., Zosky, G. R. and Wyrwoll, C. S. (2015). Vitamin D deficiency in BALB/c mouse pregnancy increases placental transfer of glucocorticoids. *Endocrinology*, 156(10), 3673-3679.

275. Wang, X. B., Qi, Q. R., Wu, K. L. and Xie, Q. Z. (2018). Role of osteopontin in decidualization and pregnancy success. *Reproduction*, 155(5), 423-432.

276. Schlafke, S. and Enders, A. C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology of Reproduction*, 12(1), 41-65.

277. Zhao, Y. G., Xiao, A. Z., Cao, X. M. and Zhu, C. (2002). Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*, 62(2), 149-158.

278. Visse, R. and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, *92*(8), 827-839.

279. Ulbrich, S. E., Meyer, S. U., Zitta, K., Hiendleder, S., Sinowatz, F. and Bauersachs, S. (2011). Bovine endometrial metallopeptidases MMP14 and MMP2 and the metallopeptidase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1-2), 48-57.

280. Mishra, B., Kizaki, K., Koshi, K., Ushizawa, K., Takahashi, T. and Hosoe, M. (2010). Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology* : RB&E, 8(60), 1-11.

281. Zhang, X., Qi, C. and Lin, J. (2010). Enhanced expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and vascular endothelial growth factors (VEGF) and increased microvascular density in the endometrial hyperplasia of women with anovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Fertility and Sterility*, 93(7), 2362-2367.

282. Whiteside, E. J., Jackson, M. M., Herington, A. C., Edwards, D. R. and Harvey, M. B. (2001). Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1331-1337.

283. Hamutoğlu, R., Bulut, H. E., Kaloğlu, C., Önder, O., Dağdeviren, T. and Aydemir, M. N. (2020). The regulation of trophoblast invasion and decidual reaction by matrix metalloproteinase-2, metalloproteinase-7, and metalloproteinase-9 expressions in the rat endometrium. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(4), 385-397.

284. Hurst, P. R. and Palmay, R. D. (1999). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. *Reproduction, Fertility, and Development*, 11(7-8), 395-402.

285. Chan, S. Y., Susarla, R., Canovas, D., Vasilopoulou, E., Ohizua, O. and McCabe, C. J. (2015). Vitamin D promotes human extravillous trophoblast invasion in vitro. *Placenta*, 36(4), 403-409.

286. Desai, B., Rogers, M. J. and Chellaiah, M. A. (2007). Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 6 (18), 1-16.

287. Chen, Y. J., Wei, Y. Y., Chen, H. T., Fong, Y. C., Hsu, C. J. and Tsai, C. H. (2009). Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), 98-108.

EKLER

EK-1. Deney hayvanları uygulama ve etik sertifikası



30 Kasım-08 Aralık
2011

X. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Deniz İrem BULUT

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 30 Kasım-08 Aralık 2011 tarihleri arasında düzenlenen **"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu X"**a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
Rektör

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Merkez Müdürü

Sertifika No. 2011/10-58

EK-2. Etik kurul onay

Evrak Tarih ve Sayısı: 20.12.2021-E.241941

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

Sayı : E-66332047-604.01.02-241941 20.12.2021
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Çigdem ELMAS
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Çiğdem ELMAS, Deniz İREM BULUT, Elif Seda ÖZDEMİR'den oluşan, G.Ü.ET-21.077 kod numaralı ve ***"Deneysel Olarak Oluşturulan D Vitamini Eksikliğinin İmplantasyon Üzerine Etkilerinin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.077 and entitled ***"Evaluation of the effects of experimentally induced vitamin D deficiency on implantation by immunohistochemical methods"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Sprague-Dawley Albino
Hayvan Sayısı :16

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Bu be[illegible]

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BULUT, Deniz İrem

Uyruğu : T. C.

Eğitim Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet tarihi**
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2018
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2010

İş Deneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
2015- devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce.

Yayınlar

1. Seymen, C. M., Gündoğdu, A. C., Bulut, D. İ., Demirtaş, C., and Elmas, Ç. (2020). Royal jelly increased map-2 expression in hippocampal neurons of hypothyroid rats: an immunohistochemical study. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(1), 46-54.

2. Sakiner, L., Bulut, İ. D., Yalçınkaya, P., and Elmas, Ç. (2018). Effects of controlled ovarian hyperstimulation protocols on uterine markers. *Annals of Medical Research*, 25(3), 495-498.

Hobiler

Kitap Okumak, Film izlemek, Seyahat etmek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

