

TÜBİTAK

2008-268



TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

R 95362

VİTAMİN D'NİN OVARYUM APOPTOZİSİNDEKİ YERİ

Proje No: 106S071

Doç.Dr. Gülçin Abban
Doç.Dr. N. Başak Yıldırım
Prof. Dr. Simin Rota

Ekim 2008
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Vitamin D₃ hücrelerde çoğalmayı, farklanmayı ve apoptozisi uyarabilen bir hormondur. Vitamin D₃'nin bu zıt işlevlerinden dolayı pek çok farklı tipte hastalığın tedavisinde kullanılması planlanmakta ve bu konudaki araştırmalar gün geçtikçe çoğalmaktadır. Genel olarak bilindiği gibi kadınlar üreme hayatı boyunca apoptozis yoluyla oosit kaybına uğrarlar. Biz bu çalışmada, vitamin D₃'ün ovaryum folliküllerinde apoptozisi mi yoksa hücre çoğalmasını mı uyardığını araştırdık. Bu araştırma TÜBİTAK, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Önsöz	
İçindekiler	
Tablolar.....	3
Özet.....	4
Abstract.....	5
1. Giriş.....	6
2. Genel Bilgiler.....	6-8
3. Gereç ve Yöntem.....	8-10
3.1 Ergin Sıçanlar.....	8
3.2 Yavru Sıçanlar.....	8
3.3 Apoptozisi belirleme Yöntemi.....	9
3.4 İstatiksel Analiz.....	9
3.5 İmmunohistokimyasal İşlem.....	9-10
4. Bulgular.....	10-29
4.1 Ergin Gruplar.....	10-21
4.2 Yeni doğan grupları.....	22-29
4.2.1 14 günlük gruplar.....	22-26
4.2.2 1 Aylık Grup.....	26-29
5. Tartışma.....	30-32
6. Kaynaklar.....	33-35

	Sayfa No
Tablo 1: Ergin ovaryum dokusunda follikül sayısı.....	10
Tablo 2: Ergin ovaryum dokusunda kaspaz 3 dağılımı.....	11
Tablo 3: Ergin ovaryum dokusunda kaspaz 9 dağılımı.....	12
Tablo 4: Ergin ovaryum dokusunda kaspaz 8 dağılımı.....	14
Tablo 5: Ergin varyum dokusunda Bcl-2 dağılımı.....	15
Tablo 6: Ergin varyum dokusunda Bax dağılımı.....	17
Tablo 7: Ergin ovaryum dokusunda PCNA dağılımı.....	19
Tablo 8: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bax dağılımı.....	24
Tablo 9: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bcl-2 dağılımı.....	24
Tablo 10: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 8 dağılımı.....	24
Tablo 11: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 9 dağılımı.....	24
Tablo 12: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 3 dağılımı.....	25
Tablo 13: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bcl-2 dağılımı.....	27
Tablo 14: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bax dağılımı.....	27
Tablo 15 : 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 8 dağılımı.....	28
Tablo 16: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 9 dağılımı	28
Tablo 17: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 3 dağılımı.....	28
Grafik 1: Ergin Ovaryum Dokusunda Follikül Sayısı.....	10

etmedikleri ancak primeriyakden primer kistlerin varlığına işaret ederler.

gösterir.

Anahat Başlıkları: Ovaryum , epoptozis, kistler

1. Giriş

2. Materyal

3. Bulgular ve Tartışma

4. Sonuç

5. Kaynaklar

ÖZET

Araştırmamızda vitamin D₃'ün ovaryum apoptozisindeki rolünü belirlemeyi amaçladık. Bu çalışmada 16 ergin sıçan 24 yeni doğan sıçan kullanıldı. Ergin sıçanlar iki gruba ayrıldı. Grup I (n=8) sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Grup II(n=8) sıçanlara 0,5 µg/ kg Vitamin D (calsitriol) 8 hafta süreyle intraperitoneal olarak uygulandı. Son enjeksiyondan sonra ovaryumlar çıkarıldı ve immunohistokimyasal işlem için hazırlandı. Ergin sıçan ovaryumunda TUNEL, PCNA, Bax, Bcl-2, kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 3 reaksiyonları immunohistokimyasal olarak belirlendi. Yavru sıçanlar ise 4 gruba ayrıldı. Grup I (n=6) ve grup III (n=6) kontrol olarak kullanıldı. Grup II ve grup IV yeni doğan sıçanlara (n=12) doğumun 1. gününden itibaren 2 hafta süreyle 0,2µg/kg vitamin D₃ subkutan olarak uygulandı. Son enjeksiyondan sonra grup I ve grup II, son enjeksiyondan 2 hafta sonra grup III ve IV sıçanların ovaryumları alındı ve immunohistokimya için hazırlandı. Yavru sıçan ovaryumunda TUNEL, Bax, Bcl-2, kaspaz3, kaspaz 9 reaksiyonları immunohistokimyasal olarak incelendi.

Vitamin D₃ hem ergin sıçan ovaryumunda hem de yavru sıçan ovaryumunda Bcl-2, Bax, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9 reaksiyonuna etki göstermedi. Erginve yavru gruplarda reaksiyonun şiddeti ve yerleşimi benzer şekildeydi. Ancak ergin dokularda primordiyal folliküllerde sayı değişmezken primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin sayısının anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti. Sonuçlarımız bize vitamin D'nin ovaryan apoptozise etki etmediğini ancak primordiyalden primer folliküle geçiş aşamasında etkili olabileceğini gösterdi.

Anahtar sözcükler: Ovaryum , apoptozis, bcl-2, bax, vitamin D

Key Words: Ovary, apoptosis,

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the respective role of vitamin D₃ on ovarian apoptosis.

In this study, 16 adult and 24 new born rats were used. All adult animals were divided into 2 groups. Group I(n=8) served as control. In group II animals(n=8) were injected with vitamin D₃ (0,5 µgr/kg)IM for 8 weeks. After the last injection, ovaries of animals in group I and group II were removed and processed for immunohistochemistry. In adult groups, TUNEL, PCNA, caspase 8, Bcl-2 and Bax and caspase 3 expression were determined. New born rats were divided into 4 groups. Group I and group II animals(n=12) served as control. In group III and group IV rats (n=12) were injected with vitamin D₃ (0,2 µgr/kg, subcutan) for 2 weeks. After the last injection, ovaries of group I and group II rats and two weeks after the last injections, ovaries of group III (n=6) and group IV(n=6) rats were removed and processed for immunohistochemistry. In new born groups, Bcl-2, Bax, caspase 8,3,9 expression were investigated.

Vitamin D₃ didn't have an effect on the expression of Bcl-2, Bax, caspase 3, caspase 8, caspase 9 in adult and new born rats. Similiar staining intensity and localization for TUNEL, Bcl, Bax, caspase 3, 8,9 were observed in all the groups. In adult groups, there were a few primary, secondary and tertiary follicles in vitamin D₃ treated adult ovaries when they were compared with control ovaries.

This study has demonstrated that vitamin D₃ did not have an effect on ovarian apoptosis but may have an effect on transition from promordial to primary follicle.

Key Words: Ovary, apoptosis, bcl-2, bax, vitamin D

1. GİRİŞ

1 α 25 vitamin D₃, mineral metabolizması, hücre içi kalsiyum düzeyi, protein kinazların etkin olduğu hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptozis, kas gelişimi ve kasılması ve immün sistem de görev alan bir hormondur (İkeawa, 1993). Bu etkileri nedeni ile kanser, vajinal atrofi, diabetes mellitus, ve psöriasis gibi değişik hastalıkların etiyoloji ve/veya tedavilerinde yer almaktadır (Morales 2004, Eckert 2002, Bao 2006, Zitterman 2003). Kendine özgün vitamin D reseptörleri ile işlevlerini yaparken, ras proteinleri, mitojen aktive protein kinazlar (MAPKs), protein kinaz A, fosfatidil inozitol 3 fosfat ve kalsiyum gibi sinyal yollarını kullanırlar. Bu yollar ile hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ya da hücre gelişiminin inhibe edilmesinde ve apoptozisinde etkili olurlar. Hücre çoğalmasında MAPKs yolunda ERK1/2 rol oynar. ERK, G proteinini uyarak hücre çoğalmasını indükler. Hücre gelişiminin inhibisyonunda ve apoptozisinde MAPKS lardan P38 ve JUNK yolu aktive olur (Johnson 2003). Dişilerde üreme hayatı boyunca hem doğum öncesi hem de doğum sonrası dönemlerde apoptozis yolu ile follikül kaybı görülür. Vitamin D₃'ün bu yollarla yapmış olduğu etkileri göz önüne alınarak, çalışmamızda çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve hücre çoğalması ve apoptozisinde rol oynayan vitamin D₃ ün ovaryum follikülleri üzerine olan etkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

Oosit ölümü en çok ilgi duyulan araştırma alanlarından biridir. Walter Fleming ilk olarak 1885 yılında tavşan ovaryumu granuloza hücrelerinde fragmentasyonlar gözlemlemiş ve bu görüntülere kromolizis adını vermiştir. Günümüzde ise gözlenen bu morfolojik özellikler apoptozisi tanımlamaktadır. Pek çok türde ovaryum apoptozisinde, kaspazların, Bcl ailesinin ve ölüm reseptörlerinin rol aldığı bilinmektedir. Kadınlar bir milyondan daha az oositle doğarlar. Pubertede bu oran 300.000 olur bunlarında ancak 400 tanesi ovulasyona uğrayabilir (Gougeon 1996, Guyton 2003, Matova 2001, Richardson1987, Rolaki 2005). Doğum sonrası dönemde atretik follikül olarak adlandırılan dejeneratif follikül, gelişen follikülden başlayarak her aşamadaki folliküllerde görülebilir. Follikülerde atrezi granuloza tabakasında başlar. Hücreler arasındaki yaygın hücre kaybı folliküllerde hücre ölümünü tetikler. Ovaryum folliküllerinde gelişme ve atrezi gonodotropinler aracılığı ile düzenlenir.

Ovaryum içi düzenleyiciler ve bunlar arasındaki ilişki çoğalmayı, olgunlaşmayı ya da apoptozisi uyarır. Oositlerdeki apoptozisi düzenleyen genlerin ve proteinlerin ovaryum apoptozisindeki yeri ve tetikleyici faktörleri çok iyi bilinmemektedir (Krysko 2008). Ancak henüz çok net olarak açıklanmamakla birlikte hormonal faktörlerin apoptozisi başlattığı düşünülmektedir. Bcl-2 ve fas sistemi üyeleri ovaryum apoptozisinin temel oyuncularındır (Guo 1994, Kondo 1996, Kugu 1998, Kim 1999). Fas, kaspaz 8 ekspresyon yoğunluğuna göre iki farklı hücre yolu izler. I. yolda hücreler yüksek oranda kaspaz 8 eksprese ederler ve bu kaspazın 3' ün salınımına ve sonrasında hücrenin ölümüne neden olur. II. yol da ise çok az miktarda aktif kaspaz 8 içeren hücreler apoptozisi başlatmak için Bcl-2 ailesinden pro-apoptatik Bid'i aktive ederler. Bid proteini mitokondriyondan Bax salınımını, Bax proteinide sitokrom c' yi aktive eder. Sitokrom c apaf-1'e bağlanarak apoptosomların oluşumuna neden olur. Apoptosomlarda kaspaz 9'u ve ve ölüm kaspazı olan kaspaz 3' ü aktifler (Scaffidi 1998). Anti-apoptotik faktör olan Bcl-2'nin hücreleri apoptozisten koruduğu bilinir. Bununla birlikte Bcl-2'nin apoptozis üzerindeki negatif işlevinde aynı aileden olan pro-apoptotik Bax proteini etkilidir. Bcl-2 Bax ile heterodimer oluşturur ve koruyucu işlevini kaybeder. Bcl-2 proteininin ekspresyonu fazla olduğunda hücreler apoptozisten korunurken Bax proteini fazla olduğunda Bcl-2 ve Bax arasında heterodimerler oluşur ve hücreler apoptozise doğru giderler (Oltvai 1993). Bcl-2 ve Bax arasındaki ilişki hücrelerin apoptozise uğramasında önemlidir. Oositlerin azalmasında Bcl-2 ve Bax genlerinin önemli rol oynadığını ve bunlar arasındaki dengenin apoptotik süreçte oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Tilly 2001, Tilly 1996, Boise 1993 Albamonte 2008). Özellikle Bax geni baskılanan hayvanlarda primordiyal follikül sayısını artması ve dolayısı ile üreme hayatının uzaması ovaryum apoptozisindeki çalışmaların çoğunu bu iki protein üzerine yoğunlaştırmıştır.

Vitamin D₃ steroid tipte bir hormon olup , mineral metabolizması, hücre içi kalsiyum düzeyi, protein kinazların etkin olduğu hücre çoğalmasında ve farklanmasında , apoptozisde, kas gelişiminde ve immün sistem de görev alan bir hormondur (İkeawa, 1993). Bu özelliklerinden dolayı deneysel olarak vajinal atrofi, diabetes mellitus, ve psöriasis gibi değişik hastalıkların tedavilerinde yer almaktadır (Morales 2004, Eckert 2002, Zitterman 2003). Kendine özgün vitamin D reseptörleri ile etkilerini oluştururken, ras proteinleri, mitojen aktive protein kinazlar (MAPKs), protein kinaz A, fosfatidil inozitol 3 fosfat ve kalsiyum gibi sinyal yollarını kullanırlar. Bu yollar ile hücre çoğalması, farklanması ya da hücre gelişiminin inhibe edilmesi ve apoptozisinde etkili olurlar. MAPKs yolunda ERK1/2 hücre çoğalmasında rol oynar. ERK1/2 bu etkisini G proteinini uyararak gerçekleştirir. Hücre

gelişiminin inhibisyonunda ve apoptozisinde MAPKS lardan P38 ve JUNK yolu aktive olur (Gniadecki 1996, Johansen 2003, Johnson 1996) Vitamin D₃ hem hücrelerin çoğalmasını uyarmakta hem de apoptozisine neden olmaktadır. Yapılan literatür taramalarında follüküllerde vitamin D reseptörlerini araştıran çalışmalara rastlanılmıştır (Johnson 1996). Ancak vitamin D₃'ün follüküllere etkisini araştıran çalışmalar bulunamamıştır. Günümüzde vitamin D₃ deneysel olarak bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte yakın gelecekte insanlarda pek çok hastalığın tedavinde kullanılması planlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Ergin Sıçanlar

Bu çalışmada 16 adet ergin sıçan kullanıldı. Sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimin'den elde edildi. Ergin sıçanlardan sadece diestrus dönemindekiler deneye dahil edildi. 16 ergin sıçanın 8 tanesine 0,5 µg/ kg Vitamin D₃ (calsitriol) haftada 3 gün olmak üzere 8 hafta süreyle intraperitoneal olarak uygulandı. Sekiz sıçan ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Sekizinci haftanın sonunda sıçanların hepsi servikal dislokasyon yoluyla öldürüldü ve ovaryumları çıkarıldı. Ovaryumlar nötral formalinle tesbit edildikten sonra alışılagelmiş ışık mikroskobu takip yöntemi uygulandı. Ksilen ve dereceli alkol serilerinden geçirilen dokular parafine gömüldü.

Parafin bloklardan seri kesitler yüklü camlara alındı. TUNEL, PCNA, Bcl-2, Bax, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 reaksiyonları immunohistokimyasal olarak incelendi.

3.2 Yavru Sıçanlar

Bu çalışmada 24 adet yavru sıçan kullanıldı. Sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimin'den elde edildi. Doğumun 1. gününden itibaren 12 tane yeni doğan sıçana 0.2 µg/ kg Vitamin D₃ (calsitriol) 2 hafta süreyle haftada 3 gün olmak üzere subkutan olarak verildi. 2. haftanın sonunda (14. günde) 6 adet vitamin D verilen gruptan, 6 adette kontrol grubundan, 30. günde de yine 6 tane deney grubundan 6 tanede kontrol grubundan yavru sıçan dekapite edildi ve ovaryumları alındı. Ovaryumlar nötral formalinde tesbit edildi. Normal ışık mikroskobik takibi yapıldıktan sonra dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan seri kesitlerde TUNEL, Bcl-2, Bax, kaspaz 8, kaspaz 3, kaspaz 9 reaksiyonları immunohistokimyasal olarak belirlendi.

3.3 Apoptozisi Belirleme Yöntemi

Apoptozisi belirlemek için ergin dokularda deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling (TUNEL) yöntemi uygulandı. Kesitlere *In Situ Cell Death Detection Kit, AP* (Roche, Penzberg, Germany, Lot# 13184900) ürününün parafin blok için olan protokolü uygulandı. BM Purple AP Substrate, (Roche, Penzberg, Germany) alkalın enzim için kromojenik substrat olarak kullanıldı. Yavru dokularda ise *Apoptosis Detection kit*, (Chemicon Apoptok, S7101 Lot# VR1361529) kullanıldı. Bu grupta substrat olarak metil yeşili uygulandı.

3.4 İstatiksel Analiz

SPSS software (version 10.00) istatiksel analiz için kullanıldı. Her iki grupta da sayılan follüküller ManWhitney-U testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5 İmmunohistokimyasal İşlem

Kesitler 1 gece 37°C derecede etüvde bekletildi. Daha sonra ksilen ve dereceli alkol serilerinden geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için %0.3 H₂O₂ uygulandı. PBS ile yıkanan kesitlere bloking uygulandı. Kesitler primer antikorda +4 derecede bir gece bekletildi. Sekonder antikor ve enzim uygulamasından sonra reaksiyonu belirlemek için kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) kullanıldı.

Araştırmada Kullanılan Primer Antikorlar Ve Dilüsyon Dereceleri

PCNA 1/200 oranında PBS ile dilüe edildi (sc-25280), santa Cruz, Lot# H1506),
 Bcl2 1/150 oranında PBS ile dilüe edildi (sc-492, santa Cruz, Lot# H0107),
 Bax 1/200 oranında PBS ile dilüe edildi (sc-526 santa Cruz, Lot#E1607),
 caspaz 3 1/200 oranında PBS ile dilüe edildi (sc-1226, santa cruz, Lot# F080G),
 caspaz 8 1/200 oranında PBS ile dilüe edildi (Ab-4 Neomarkers, Lot# 1200 P708D)
 caspaz 9 1/ 150 oranında dilüe edildi(Ab-4 Lot# 1205P608G)

PCNA, Bcl-2, caspaz 3 için Zymed kiti kullanılırken (Zymed Histatin Plus, Lot# 1400570) ,
 caspaz8 ve 9 için ultravision Dako HRP kiti kullanıldı (DAKO Cytomataion LSAB+System-
 HRP, Lot# 00008050). Tüm immunohistokimyasal işlemlerde kromojen olarak DAB (Zymed
 DAB Plus, Lot# 421138A) kullanıldı. Zıt boyama Mayer's hematoksileni ile yapıldı. Ayrıca
 tüm antikorlar için negatif boyama yapıldı.

Reaksiyonun değerlendirilebilmesi için aşağıdaki skala uygulandı.

- (-) : Boyanma yok
 (+/-) : Çok zayıf boyanma
 (+) : Zayıf boyanma
 (++) : Orta derecede boyanma
 (+++): Kuvvetli boyanma

4. BULGULAR

4.1 Ergin Gruplar

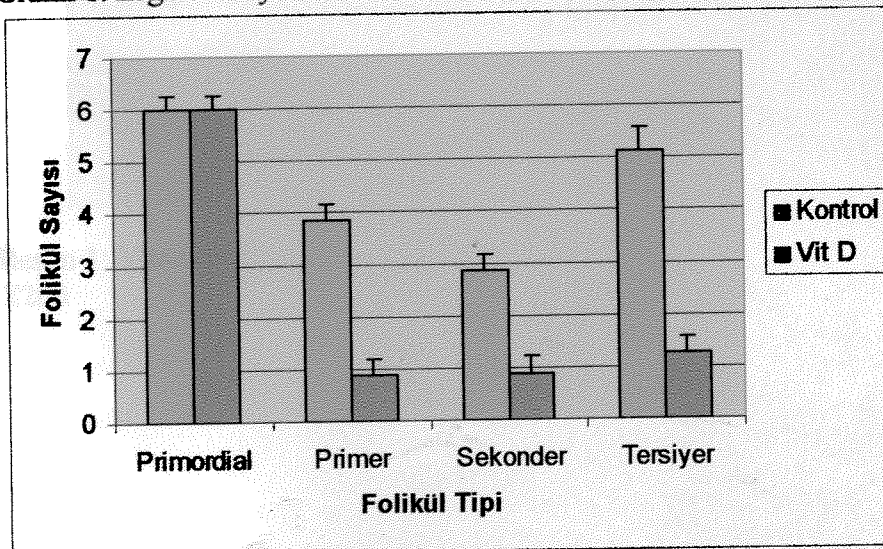
Vitamin D₃ verilen grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında iki grup arasında histolojik olarak belirgin farklılık vardı. Kontrol grubunda korteks ve medulla ayrımı belirgindi ve gelişimin her safhasındaki folliküller korteks bölgesinde ayırt ediliyordu. Vitamin D₃ verilen grupta ise tüm alan bağ dokusuyla kaplanmış gibiydi ve primordiyal follikül dışında diğer folliküller çok azdı. Deney gruplarındaki primordiyal folliküllerin kontrol grubuyla hemen hemen aynı olması, buna karşın primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin ise çok az olması oldukça ilginçti ($p < 0,05$), (Tablo 1 ve grafik 1). Apoptotik hücre sayısı açısından çok belirgin farklılık yoktu.

Tablo 1: Ergin ovaryum dokusunda follikül sayısı

	Primordiyal follikül	Primer follikül	Sekonder follikül	Tersiyer Follikül
P	1	0,001	0,003	0,001

$p \leq 0,05$ anlamlı

Grafik 1: Ergin Ovaryum Dokusunda Follikül Sayısı

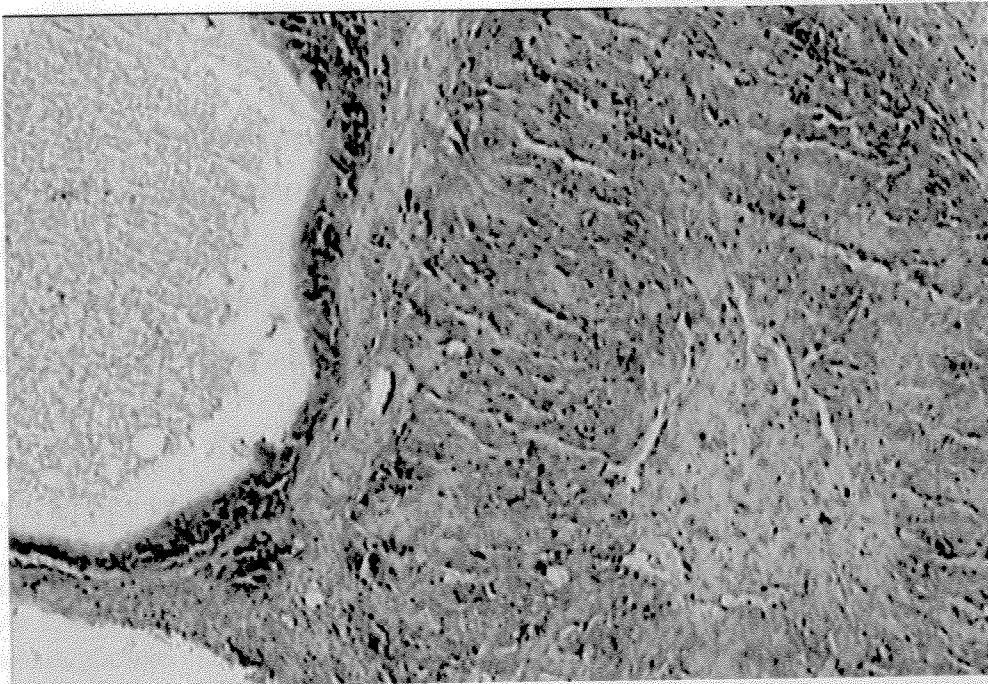


Kaspaz 3

Sonuçlar tablo 2’de özetlenmiştir. Kontrol grubunda ve vitamin D₃ uygulanan grupta genel olarak oositler ve granuloza hücreleri tüm folliküllerde pozitif reaksiyon gösterdi. Boyanma yaygındı ve çekirdeklerde de pozitif reaksiyon izlendi. Teka tabakası negatif (Resim 1,2).

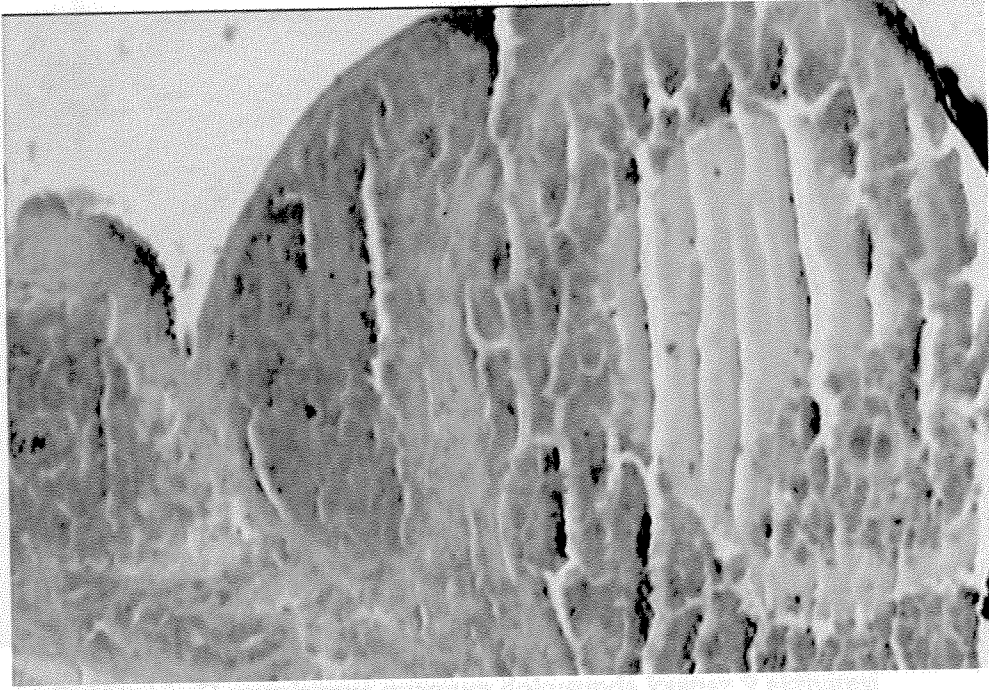
Tablo 2: Ergin ovaryum dokusunda kaspaz 3 dağılımı

	Kontrol Grubu	Vitamin D uygulanan grup
Oosit (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	–	–
Granuloza hücreleri (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	–	–
Teka tabakası(Primer, skonder ve tersiyer follikül)	–	–
Corpus Luteum	–	–
Ovaryum epiteli	–	–



Resim 1: Vitamin D₃ uygulanmış ovaryum dokusunda kaspaz 3 aktivitesi. Immunperoksidaz, X200

Corpus Luteum
Ovaryum epiteli



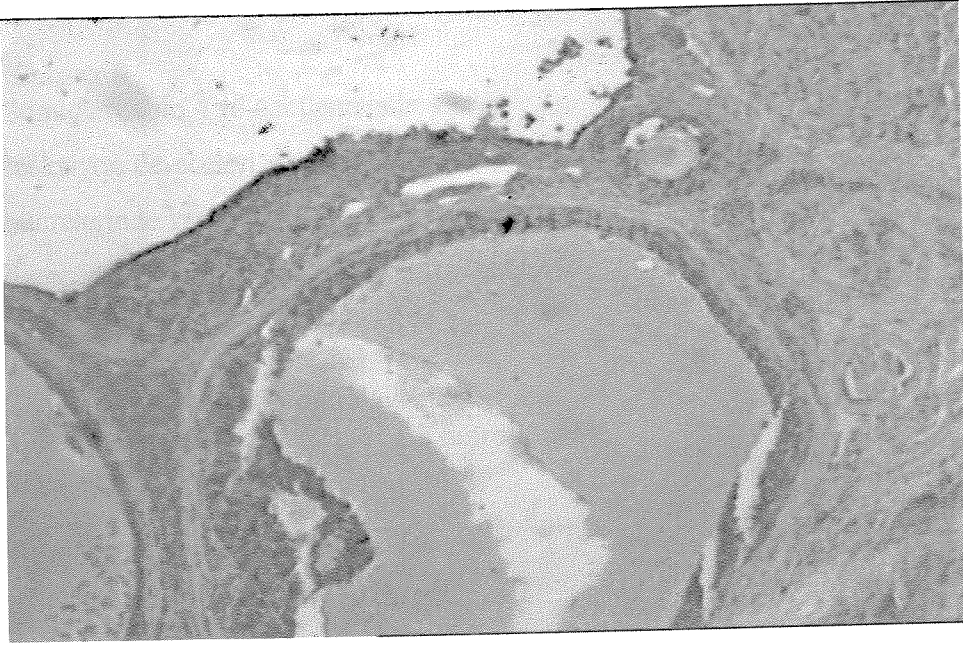
Resim 2: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda kaspaz 3 aktivitesi. İmmunperoksidaz, X400

Kaspaz 9

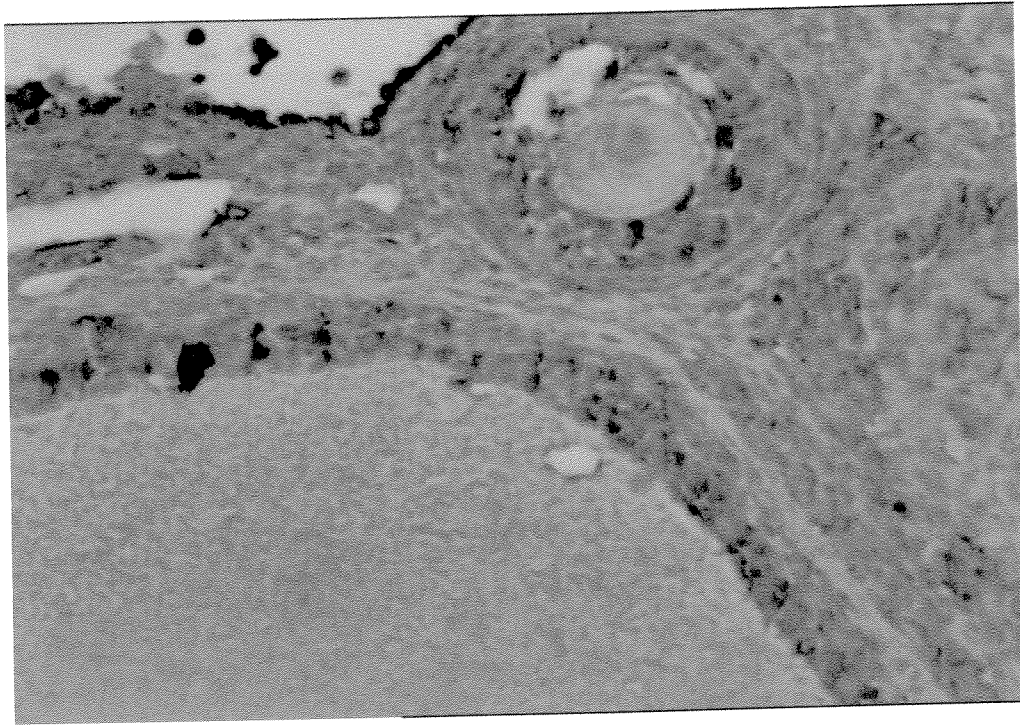
Sonuçlar tablo 3'te özetlenmiştir. Her iki grupta da oositlerde ve granulosa hücrelerinde pozitif reaksiyon izlendi. Bu grupta primer folliküllerde granulosa hücreleri yoğun pozitif reaksiyon gösterirken tersiyer folliküllerde ise pozitif ve negatif reaksiyon gösteren granulosa hücreleri belirlendi. Pozitif boyanan granulosa hücreleri negatif granuloza hücreleri arasında dağılmış şekildeydi. Bu grupta da teka tabakası negatif (Resim 3,4).

Tablo 3: Ergin ovaryum dokusunda kaspaz 9 dağılımı

	Kontrol Grubu	Vitamin D uygulanan grup
Oosit (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	+ / ++	-
Granulosa hücreleri (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	+	-
Teka tabakası (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	-	-
Corpus Luteum	++	++
Ovaryum epiteli	+++	+++



Resim 3: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda kaspaz 9 aktivitesi İmmunperoksidaz, X50



Resim 4: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda kaspaz 9 aktivitesi İmmunperoksidaz, X200

Kaspaz 8

Sonuçlar tablo 4'te özetlenmiştir. Bu grupta da kontrol ve vitamin D₃ uygulanan gruplarda reaksiyon dereceleri ve şekilleri birbirine paraleldi. Her iki grupta da oositlerde ve granuloza hücrelerinde zayıftan orta dereceye değişen reaksiyon izlendi. Korpus luteum bu grupta orta derecede pozitif boyanma gösterdi. Teka tabakası negatif boyanma gösterdi (Resim 5,6).

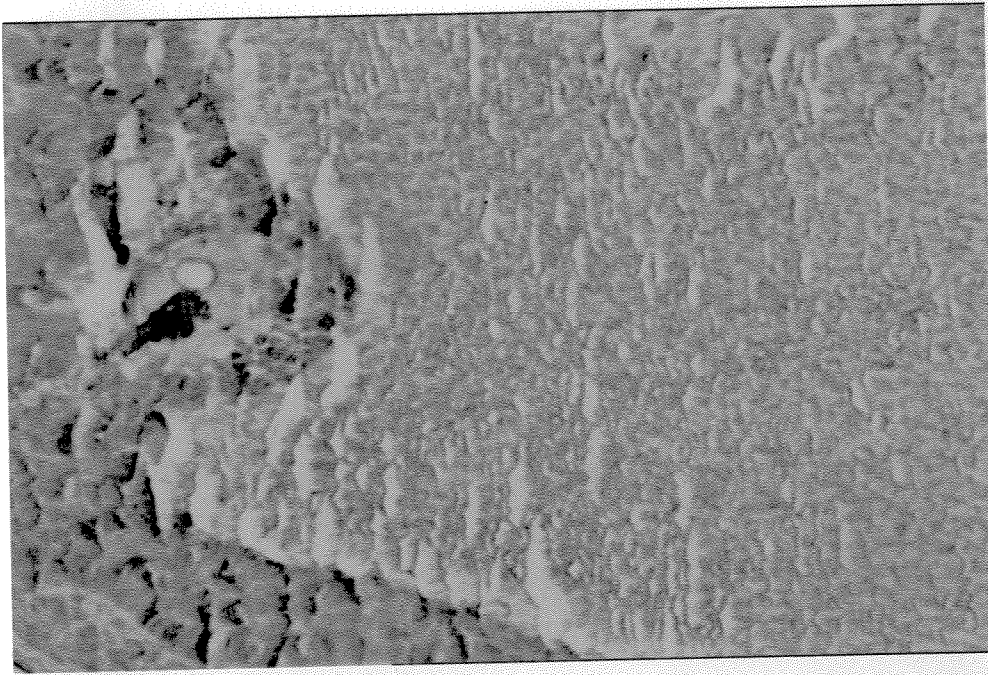
Tablo 4: Ergin ovaryum dokusunda kaspaz 8 dağılımı

	Kontrol Grubu	Vitamin D uygulanan grup
Oosit (Primer, skonder ve tersiyer follükül)	+ / +++*	+
Granuloza hücreleri (Primer, skonder ve tersiyer follükül)	++	++
Teka tabakası (Primer, skonder ve tersiyer follükül)	-	-
Corpus Luteum	+++	+++
Ovaryum epiteli	+++	+++

* Primer follükülde yoğun pozitif



Resim 5: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda kaspaz 8 aktivasyonu İmmunperoksidaz, X100



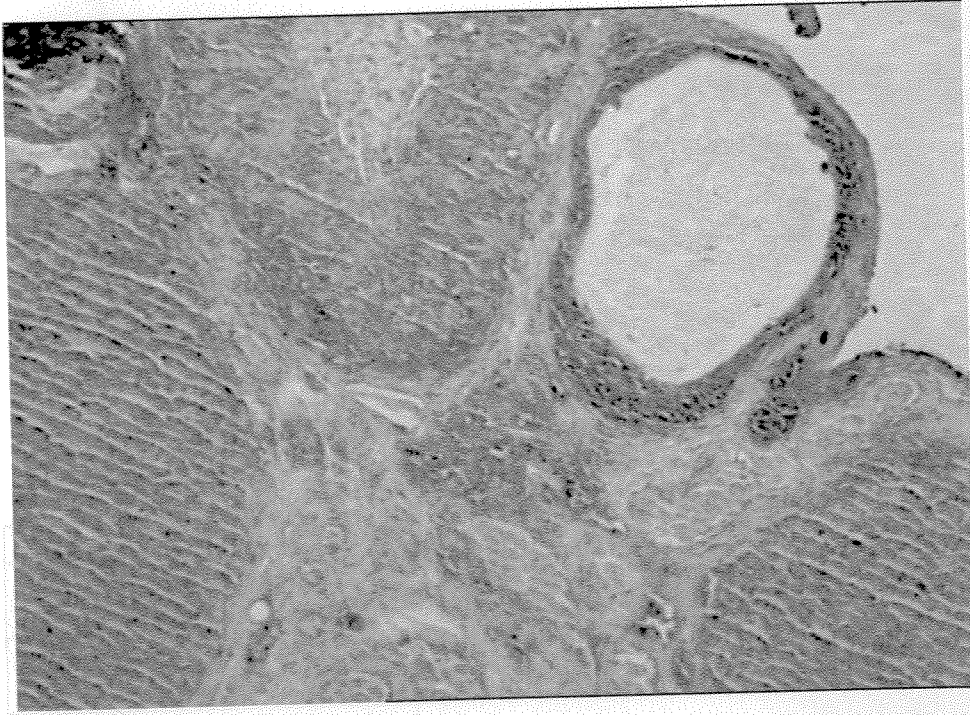
Resim 6: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda kaspaz8 aktivasyonu İmmunperoksidaz, X400

Bcl-2

Sonuçlar tablo 5'te özetlenmiştir. Bcl -2 reaksiyonu boyanma şekli ve derecesi bakımından kontrol grubunda da vitamin D uygulanan grupta da hemen hemen aynı idi. Primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde hem oosit hem de granulosa hücrelerinde pozitif reaksiyon izlendi. Boyanma sitoplazmik ve yaygın şekildedeydi. Korpus luteum hücreleri kuvvetli reaksiyon gösterirken teka hücrelerinde hiç reaksiyon izlenmedi. Medulla bölgesindeki hücrelerde de boyanma pozitifliği (Resim 7,8).

Tablo 5: Ergin ovaryum dokusunda Bcl-2 dağılımı

	Kontrol Grubu	Vitamin D uygulanan grup
Oosit (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	+++	+++
Granulosa hücreleri (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	++/+++	+++
Teka tabakası(Primer, skonder ve tersiyer follikül)	-	-
Corpus Luteum	+++	+++
Ovaryum epiteli	+++	+++



Resim 7: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda Bcl-2 aktivasyonu
İmmunperoxidaz, X50



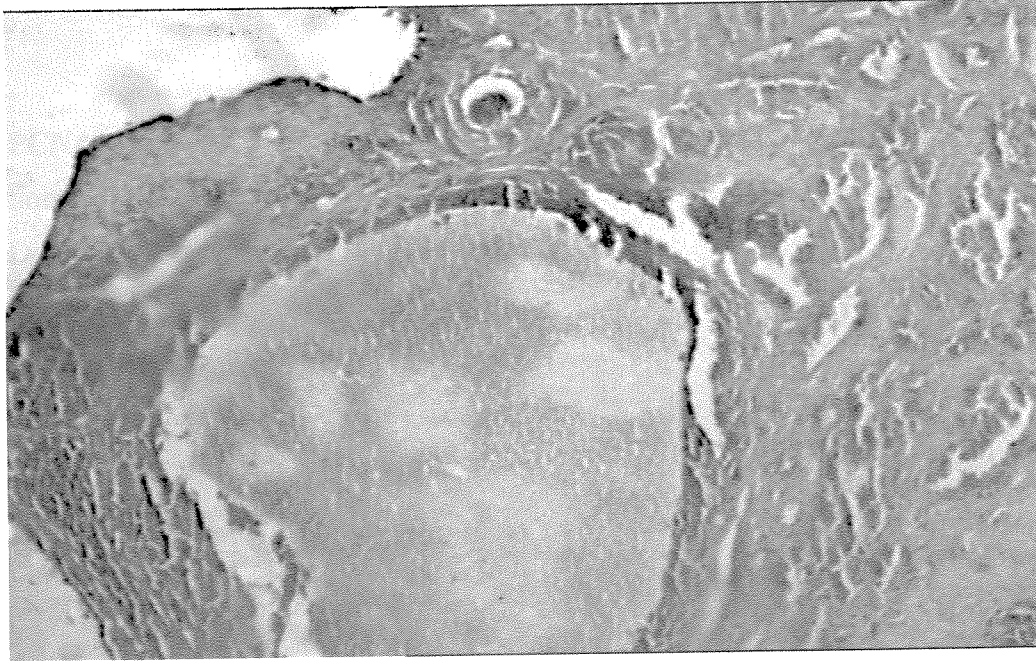
Resim 8: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda Bcl-2 aktivasyonu
İmmunperoxidaz, X100

Bax

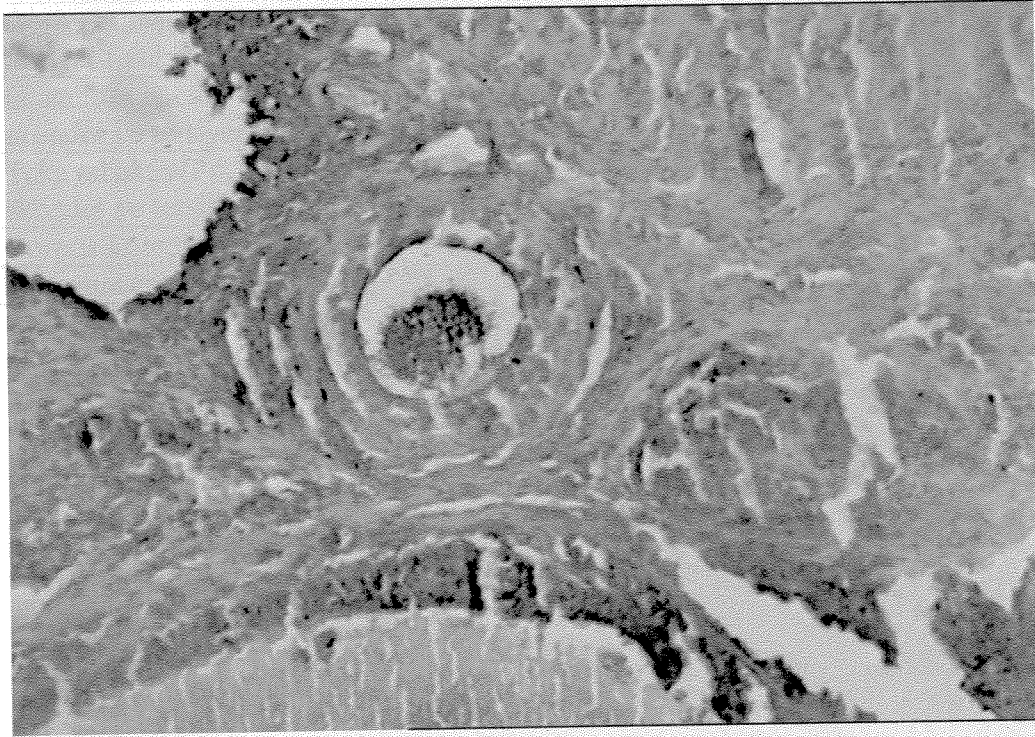
Sonuçlar tablo 6'da özetlenmiştir. Hem kontrol hem vitamin D uygulanan grupta oositler kuvvetli reaksiyon gösterirken granuloza hücreleri oositlere göre daha zayıf reaksiyon gösterdi. Korpus luteum, medullar hücreler ve kan damarlarında kuvvetli reaksiyon izlenirken teka tabakası yine negatifti (Resim 9,10).

Tablo 6: Ergin ovaryum dokusunda Bax dağılımı

	Kontrol Grubu	Vitamin Uygulanan grup
Oosit (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	+++ / +++	+++
Granuloza hücreleri (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	+++	+++
Teka tabakası (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	-	-
Corpus Luteum	+++	+++
Ovaryum epiteli	+++	+++



Resim 9: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda Bax aktivasyonu. İmmunperoksidaz, X100



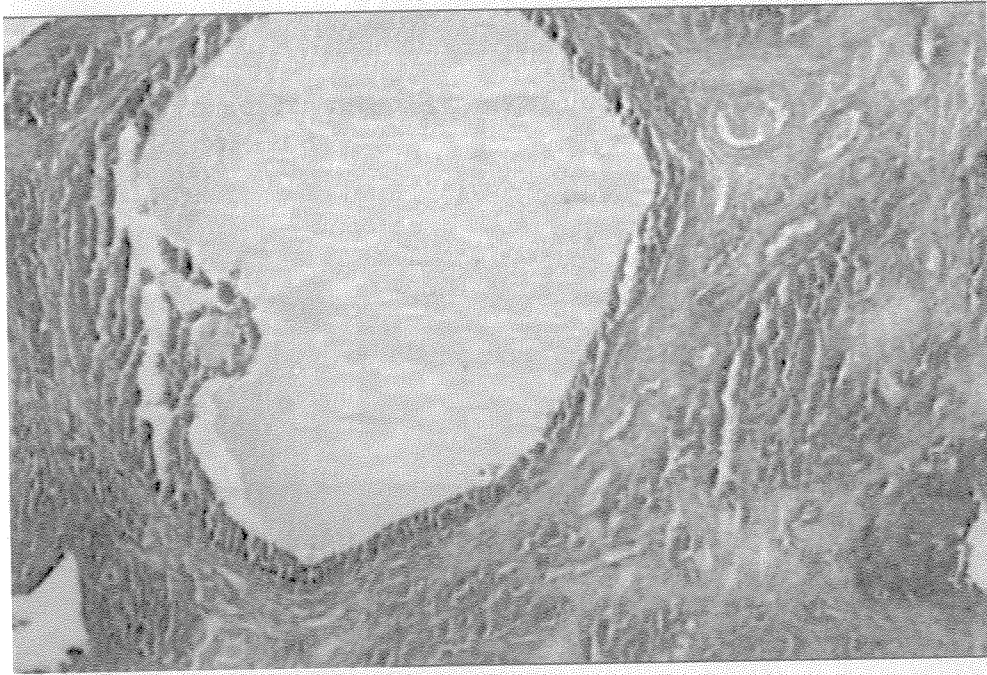
Resim 10: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda Bax aktivasyonu. İmmunperoksidaz, X 200

PCNA

Sonuçlar tablo 7'de özetlenmiştir. Bu grupta diğer gruplarda olduğu gibi kontrol ve vitamin D₃ uygulanan grupta reaksiyon çok benzerdi. Folliküllerde pozitif reaksiyon izlenmesine karşın primer ve tersiyer folliküllerde reaksiyon derecesi farklı idi. Primer folliküllerde oosit PCNA açısından oldukça yoğun reaksiyon gösterirken tersiyer folliküllerde yoğunluk daha azdı. Bununla birlikte granulosa hücrelerindeki reaksiyon birbirine eşit şekildeydi. Bu grupta da teka tabakasında reaksiyon izlenmezken medullar hücrelerde, korpus luteumda reaksiyon pozitifliği. (Resim 11,12).

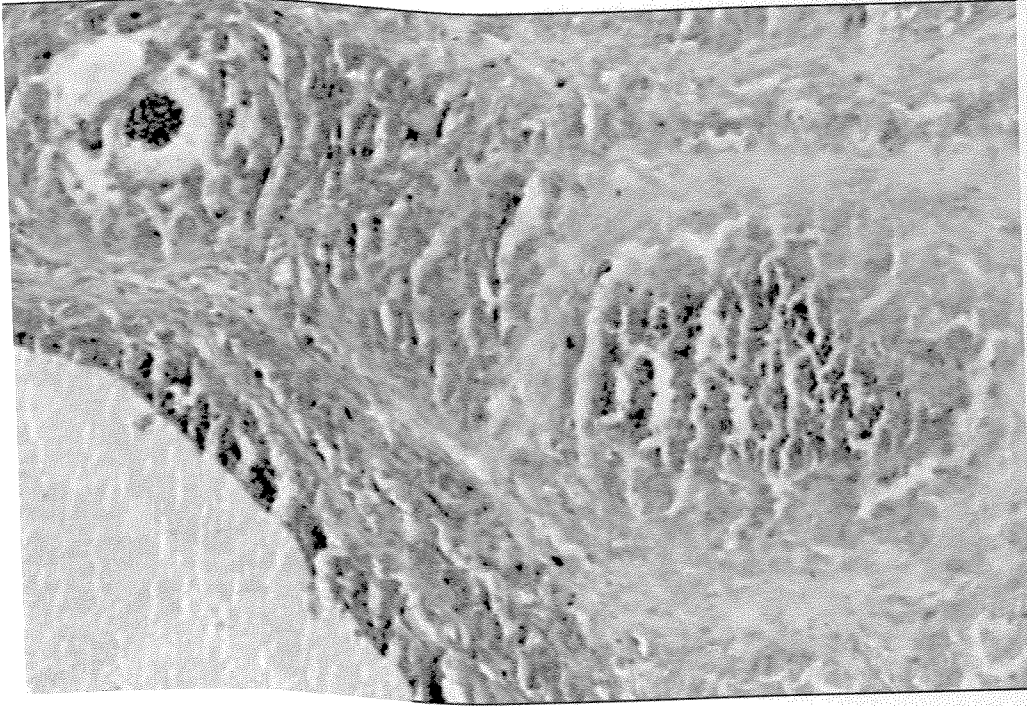
Tablo 7: Ergin ovaryum dokusunda PCNA dağılımı

	Kontrol Grubu	Vitamin D uygulanan grup
Oosit (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	++++	++++
Granulosa hücreleri (Primer, skonder ve tersiyer follikül)	++/+++	++/+++
Teka tabakası(Primer, skonder ve tersiyer follikül)	-	-
Corpus Luteum	+++	+++
Ovaryum epiteli	+++	+++



Resim 11: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda PCNA aktivasyonu. Immunperoksidaz, X 100

Resim 13: Vitamin D uygulanmış ve 20 mg/kg dozunda Naturogen uygulanan ovaryum dokusunda PCNA aktivasyonu. Immunperoksidaz, X100



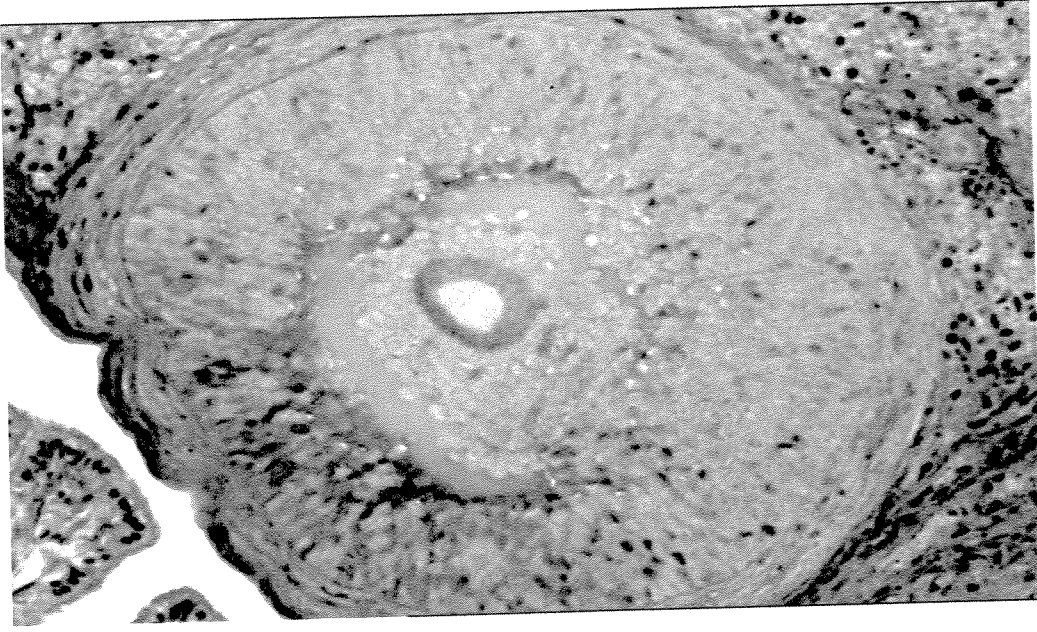
Resim 12: Vitamin D uygulanmış ovaryum dokusunda PCNA aktivasyonu İmmunperoksidaz X200

TUNEL

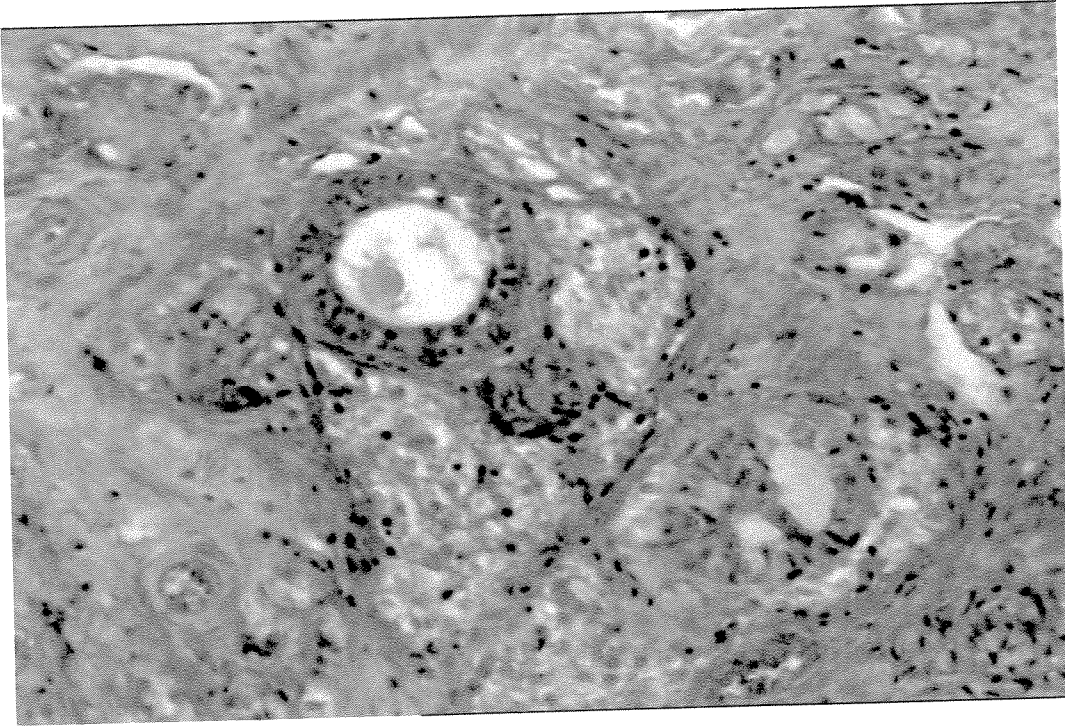
TUNEL pozitif hücre sayısı vitamin D₃ verilen grupta bazı kesitlerde biraz daha fazla olmasına karşın, sayılar genel olarak iki grup arasında birbirine yakın izlendi (Resim 13-15).



Resim 13: Vitamin D uygulanmış ve TUNEL yöntemiyle boyanmış ovaryum dokusundan bir kesit. İmmunperoksidaz, X100



Resim 14: Vitamin D uygulanmış ve TUNEL yöntemiyle boyanmış ovaryum dokusundan bir kesit, immunperoksidaz, X 400



Resim15: Vitamin D uygulanmış ve TUNEL yöntemiyle boyanmış ergin ovaryum dokusundan bir kesit, immunperoksidaz, X200

4.2 YENİDOĞAN GRUPLARI

4.2.1 14 Günlük Grup

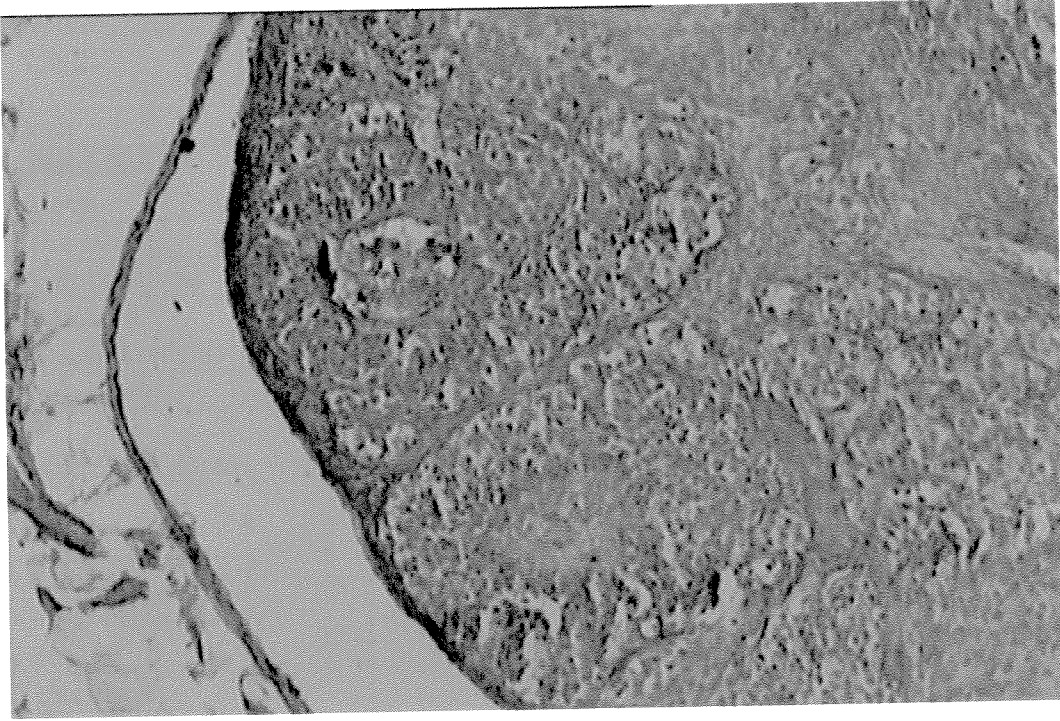
Doğumun 1. gününden itibaren vitamin D₃ uygulanan grubu ile kontrol grubu ovarium dokusunda korteks ve medulla ayrımı net olarak yapılamıyordu. Folliküller çoğunlukla primordiyal ve primer follikül aşamasındaydı.

TUNEL

Hem kontrol hem de deney gruplarında oositlerin çoğu TUNEL pozitif. Follikül epitel hücrelerinde ise TUNEL pozitif hücre çok azdı. (Resim 16,17).



Resim16: Vitamin D uygulanmış ve TUNEL yöntemiyle boyanmış 14 günlük ovarium dokusundan bir kesit, immunperoksidaz, X200



Resim 17: TUNEL yöntemiyle boyanmış 14 günlük kontrol ovaryum dokusundan bir kesit, immunperoksidaz, X200

Bax , Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9

Sonuçlar tablo 8,9,10,11,12 de özetlenmiştir. Bulgular ergin gruplardakine benzer şekildeydi, kontrol ve deney grupları arasında farklılık yoktu. Bu grupta follikül epitel hücreleri Bax ve Bcl-2 açısından negatiflik göstermesine karşın, oositlerde ortadan kuvvetliye değişen immun reaksiyon izlendi. Kaspaz 8 bu dokularda çok belirgin reaksiyon göstermedi. Sadece bazı folliküler epitel hücrelerinde çok zayıf boyanma vardı. Kaspaz 3 oositlerde ve bazı follikül epitel hücrelerinde reaksiyon gösterdi (Resim 18,19,20).

Tablo 8: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bax dağılımı

	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	++	++	-	-
Granulosa hücresi	-	-	-	-
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	++	++	+	-
Granulosa hücresi(kontrol)	-	-	-	-
Teka hücresi	-	-	-	-

Tablo 9: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bcl-2 dağılımı

	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	++	++	-	-
Granulosa hücresi	-	-	-	-
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	++	++	+	-
Granulosa hücresi(kontrol)	-	-	-	-
Teka hücresi	-	-	-	-

Tablo 10: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 8 dağılımı

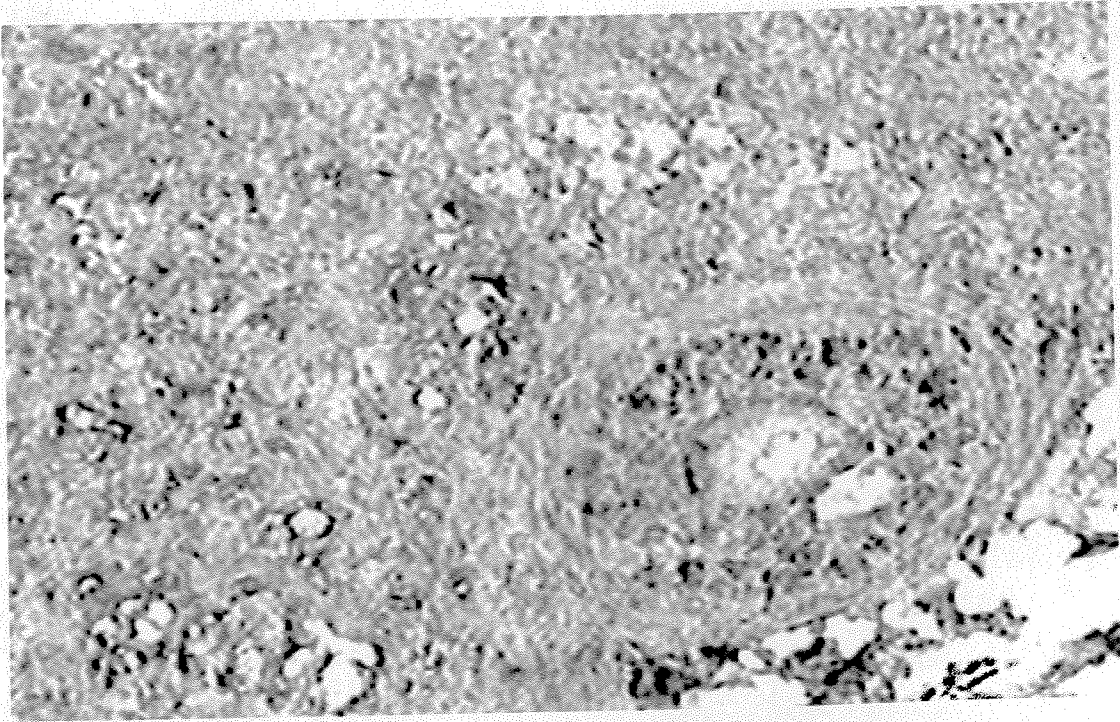
	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	-/+	-/+	-	-
Granulosa hücresi	++	++	-	-
Oosit (kontrol)	-/+	-/+	-	-
Granulosa hücresi(kontrol)	++	++	-	-
Teka hücresi	-	-	-	-

Tablo 11: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 9 dağılımı

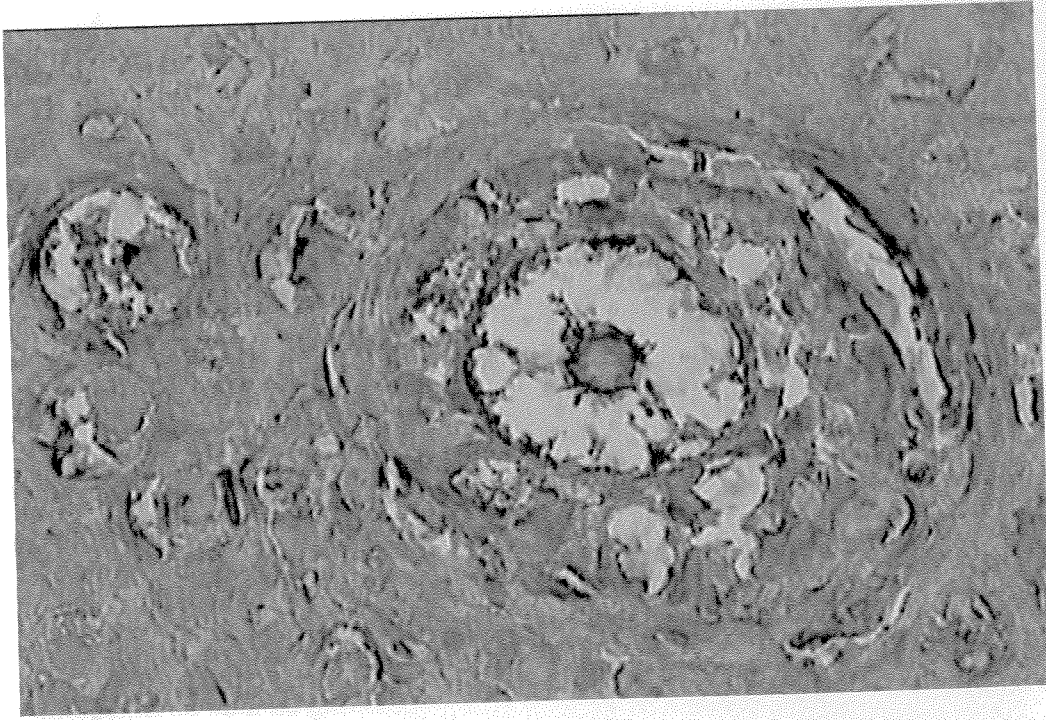
	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	+	+	-	-
Granulosa hücresi	++	++	-	-
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+	+	+	-
Granulosa hücresi(kontrol)	++	++	++	-
Teka hücresi	-	-	-	-

Tablo 12: 14 günlük vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 3 dağılımı

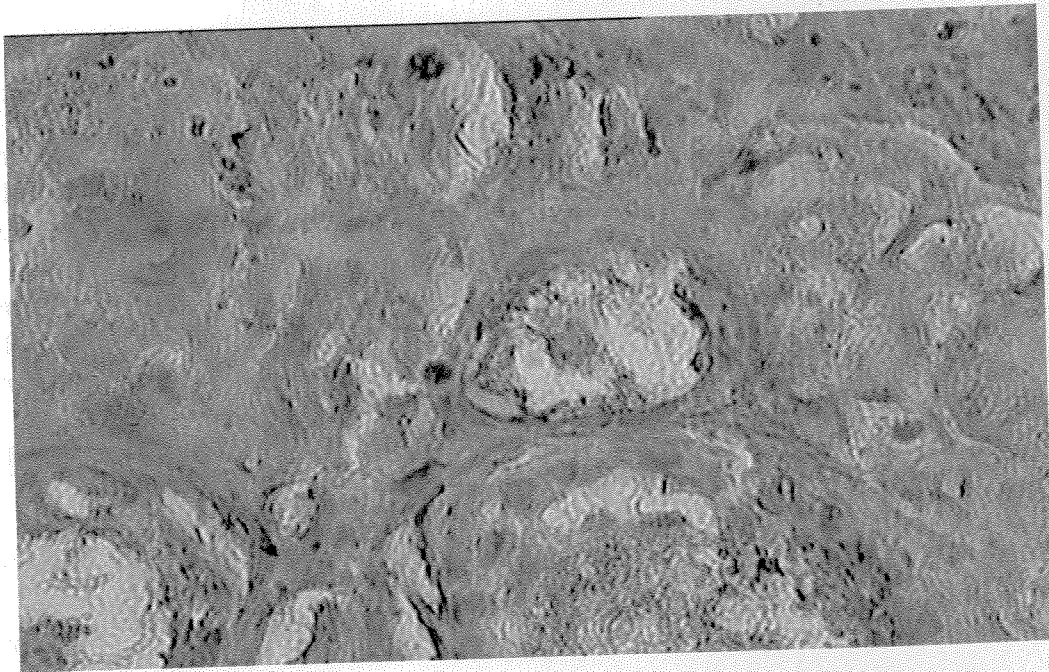
	Primordiyal Follkül	Primer Follkül	Sekonder Follkül	Tersiyer Follkül
Oosit	+	+	-	-
Granulosa hücreleri	++	++	-	-
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+	+	+	-
Granulosa hücresi(kontrol)	++	++	++	-
Teka hücresi	-	-	-	-



Resim 18: Vitamin D uygulanmış 14 günlük ovaryum dokusunda kaspaz 8 reaksiyonu
İmmunperoksidaz X 200



Resim 19: Vitamin D uygulanmış 14 günlük ovaryum dokusunda Bcl-2 reaksiyonu
İmmunperoksidaz X 400



Resim 20: Vitamin D uygulanmış 14 günlük ovaryum dokusunda Bax reaksiyonu
İmmunperoksidaz X 400

4.2.2. 1 Aylık Grupta

Bir aylık grupta ovaryum dokusu genel olarak olgun ovaryum dokusuna benzer görünümdeydi. Korteks ve medulla ayrımı yapılabiliyordu. Ancak vitamin D₃ verilen grupta sekonder ve tersiyer foliküllerin kontrol grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi.

TUNEL

TUNEL pozitif hücreler diğer gruplarla paralellik gösteriyordu. Bu grupta da oositler pozitif olmasına karşın epitel hücrelerinde TUNEL pozitif hücre sayısı azdı. TUNEL pozitif hücre açısından kontrol ve deney grupları arasında farklılık yoktu.

Bax , Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9

Sonuçlar tablo 13,14,15,16,17 de özetlenmiştir. Bu grupta Bax ve Bcl-2 reaksiyonu oositlerde izlenirken kaspaz 8 folliküler epitelde reaksiyon gösterdi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 hem oositlerde hem de granuloza hücrelerinde pozitif. Bu grupta da kontrol ve deney grupları arasında farklılık yoktu (Resim 21,22).

Tablo 13: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bcl-2 dağılımı

	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	+++	+++	+++	+++
Granuloza hücresi	+/-	+/-	+	++/+++
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+++	+++	+++	+++
Granuloza hücresi(kontrol)	+ ₋	+/ ₋	+	++
Teka hücresi(kontrol)	-	-	-	-

Tablo 14: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında Bax dağılımı

	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	+++	+++	+++	+++
Granuloza hücresi	+/-	+/-	+	++/+++
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+++	+++	+++	+++
Granuloza hücresi(kontrol)	+ ₋	+/ ₋	+	++
Teka hücresi(kontrol)	-	-	-	-

Tablo 15: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 8 dağılımı

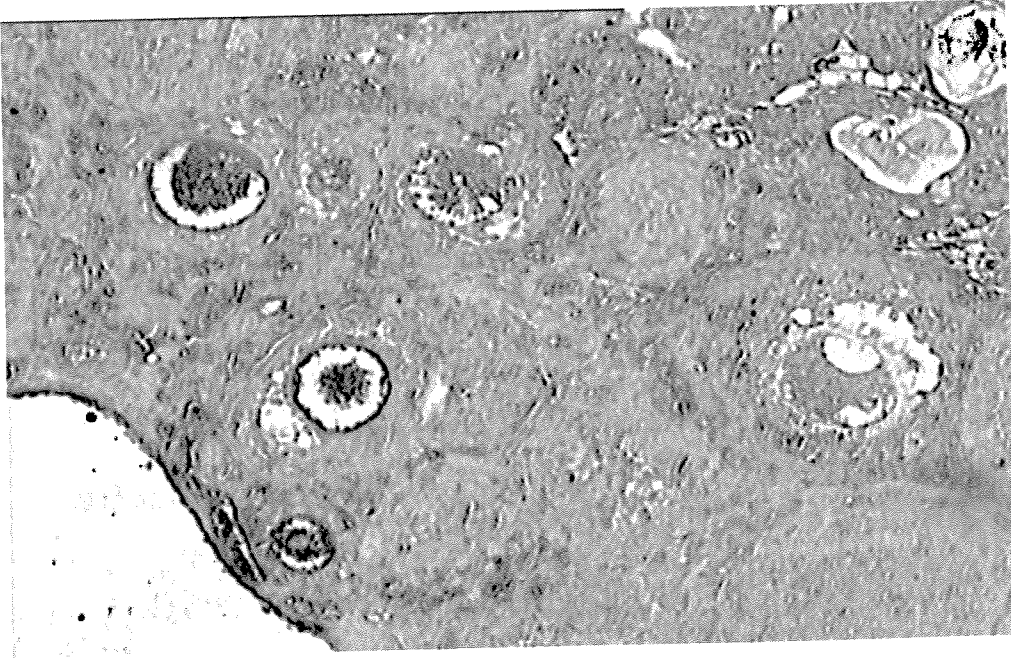
	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	-/+	+/-	+	+
Granulosa hücresi	+++	+++	+++	+++
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+/-	+/-	+	+
Granulosa hücresi (kontrol)	+++	+++	+++	+++
Teka hücresi	-	-	-	-

Tablo 16: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 9 dağılımı

	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	+++	+++	+++	+++
Granulosa hücresi	+++	++	++/+++	++/+++
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+++	+++	+++	+++
Granulosa hücresi(kontrol)	++	++	+++	+++
Teka hücresi(kontrol)	-	-	-	-

Tablo 17: 1 aylık vitamin D uygulanan ve kontrol gruplarında kaspaz 3 dağılımı

	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül	Tersiyer Follikül
Oosit	++	++	++	++
Granulosa hücresi	++	++	++/+++	++/+++
Teka hücresi	-	-	--	-
Oosit (kontrol)	+	+	+	-
Granulosa hücresi(kontrol)	++	++	+++	+++
Teka hücresi(kontrol)	-	-	-	-



Resim 21: Vitamin D uygulanmış 1 aylık ovaryum dokusunda Bcl-2 aktivasyonu.
İmmunperoksidaz X 100



Resim 22: Vitamin D uygulanmış 1 aylık ovaryum dokusunda Bax aktivasyonu.
İmmunperoksidaz X 100

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada ilk defa vitamin D₃'ün follikül gelişimine ve apoptozisine etkisi araştırıldı. TUNEL reaksiyonu, Bcl, Bax, kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 3 ekspresyonları incelendi. Araştırmamızda Vitamin D₃ verilen ergin dokularda follikül sayısının anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti. Kesitlerin çoğunda bir ya da iki follikül vardı. Bazı kesitlerde sadece primer folliküllere rastlanırken bazı kesitlerde sekonder bazılarında da tersiyer follikül bulunmaktaydı. Bu gruplarda primordiyal folliküllerin sayısının kontrol grubuyla hemen hemen aynı olması oldukça dikkat çekiciydi (Grafik-1).

14 günlük ve 1 aylık gruplarda kontrol ve deney grupları arasında follikül sayısı olarak farklılık yoktu. Bununla birlikte az da olsa gelişimsel farklılık dikkat çekiciydi. 14 günlük vitamin D₃ uygulanan grupta primer ve primordiyal folliküller izlenirken 14 günlük kontrol grubunda gelişen ve sekonder folliküllere de rastlandı. 1 aylık kontrol ve vitamin D verilen grupta follikül sayısı ve gelişim açısından farklılık izlenmedi. Hem ergin grupta hem de yeni doğan gruplarında oositlerde ve granuloza hücrelerinde TUNEL pozitif hücelere rastlandı. TUNEL pozitif hücre açısından kontrol ve deney grupları arasında farklılık gözlenmedi.

Programlanmış hücre ölümü veya apoptozis normal üreme işlevinde ve ovaryum gelişiminde temel komponentdir. Oosit rezervleri apoptozis yoluyla ya direkt olarak germ hücre ölümüyle ya da indirekt olarak folliküller atrezi olarak tükenir (Hsueh 1994). Buna bağlı olarak apoptozis üreme hayatının süresini belirlemede temel mekanizmadır (Tilly 2001)

Oositlerdeki apoptozisi düzenleyici genlerin ve proteinlerin ovaryum apoptozisindeki yeri ve tetikleyici faktörleri çok iyi belirlenmemiştir. Ancak henüz çok net olarak açıklanmamakla birlikte hormonal faktörlerin apoptozisi başlattığı düşünülmektedir. Bcl-2 ve fas sistemi üyeleri ovaryum apoptozisinde temel oyuncular (Guo 1994, Kondo 1996, Kugu 1998, Kim 1999). Fas iki farklı hücre yolu izler I. yolda hücreler yüksek oranda kaspaz 8 eksprese ederler ve bu kaspaz 3' ün salınımına neden olur ki böylece hücre apoptotik olarak ölüme gider. II. yol da hücreler çok az miktarda aktif kaspaz 8 ihtiva ederler ve az miktarda aktive olmuş kaspaz apoptozisi başlatmak için Bcl-2 ailesinden pro-apoptatik Bid'i aktive eder. Bid proteini mitokondrial yolu uyarır. Mitokondriyondan Bax salınımı sitokrom c yi aktive eder. Sitokrom c apaf-1'e bağlanır apoptosomların oluşumuna neden olur. Apoptosomlarda kaspaz kaskadını aktive ederek kaspaz 9 kaspaz 3 ü aktifler. (Scaffidi 1998). Bcl-'nin anti apoptotik faktör olduğu ve apoptozisi başlatan faktörlerden

hücreleri koruduğu bilinir. Bununla birlikte Bcl-2'nin apoptozis üzerindeki inhibitör etkisinde aynı aileden olan Bax proteini etkilidir. Anti-apoptotik Bcl-2 Bax ile heterodimer form oluşturur ve koruyucu ilişkisini kaybeder. Bcl-2 proteinin ekspresyonu fazla olduğunda hücreler apoptozisden korunurken Bax proteini fazla olduğunda heterodimerler oluşur ve hücreler proglanmış ölüme yani apoptozise doğru giderler. Bcl-2 ve Bax arasındaki ilişki hücrelerin apoptozise uğramasında önemlidir. Ovaryan germ hücre azalmasında Bcl-2 ve Bax genlerinin önemli rol oynadığını ve bunlar arasındaki dengenin apoptotik süreçte oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Tilly 2001, Tilly 1996, Boise 1993, Albamonte 2008). Bax işlevinin inhibisyonunu primordiyal follikül sayısını artırarak üreme hayatın uzatmaktadır. Bundan dolayıdır ki ovaryan apoptozisinde çalışmaların çoğu bu iki protein üzerine olmuştur. Bizde çalışmamızda diğer apoptotik proteinlerle birlikte bu iki proteinin ekspresyonunu da inceledik. Çalışmamızda deney gruplarındaki Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyon yoğunluğu ve yerleşimi hem ergin hem de yenidoğan kontrol gruplarında farklılık göstermiyordu. Bcl-2 ve Bax proteinleri primer folliküllerde daha çok oositlerde izlenmekteydi. Primer folliküllerdeki granuloza hücreleri negatif reaksiyon göstermişti. Sekonder ve tersiyer folliküllerde ise hem granuloza hücrelerin de hem de oositlerde Bcl-2 ve Bax pozitif reaksiyon gösterdi. Teka hücreleri grupların hiçbirinde pozitif reaksiyon göstermedi. Slot ve arkadaşlarının östrus siklusu süresince inceledikleri dokularda Bcl-2 ve Bax reaksiyon sonuçları bizim bulgularımızla hemen hemen benzer şekildeydi. Onlarda oositlerde kuvvetli fakat granuloza hücrelerinde zayıf Bcl2 ve Bax reaksiyonu saptamışlardı (Slot, 2006). Gursoy ve arkadaşları hem yeni doğan hem de ergin dokularda Bcl-2 ve Bax reaksiyonlarını incelemişler ve yeni doğan grupta Bcl-2 ve Bax reaksiyonlarını oositlerde zayıf pozitif granuloza hücrelerinde orta derecede bulmuşlardır. Ergin dokularda bizim bulgularımızdan farklı olarak primer folliküllerin granuloza hücrelerinde orta derecede immunreaksiyon belirlemişlerdir (Gursoy 2008).

Kaspazlar ovarian apoptozisinde başlangıç ve son safhalarda önemli yere sahiptirler. Kaspaz 3'ün daha çok granuloza hücrelerinde bulunduğu ve apoptozisin son döneminde etkili olduğu bildirilmektedir (Johnson 2002). Kaspaz 9'un da granuloza hücrelerinin apoptozisinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Kaspaz 9 geninden yoksun farelerin ovaryumlarında çok sayıda gelişen folliküller olduğu ve de bu hayvanlarda folliküler atrezinin olmadığı gösterilmiştir (Jhonson 2002) . Bizim çalışmamızda kaspaz 9 her grupta hem oositlerde hem de granuloza hücrelerinde yoğun pozitif reaksiyon gösterdi. Kaspaz 8 ise kaspaz 9 dan ve Bcl-2 ve Bax ekspresyonundan biraz daha farklıydı. Bu protein daha çok

granuloza hücrelerinde yerleşim göstermişti. Bu ekspresyonun yoğunluğu ve yerleşimi / vitamin D uygulanan grupla kontrol grubu arasında önemli farklılıklar göstermedi.

Vitamin D verilen gruplarla kontrol grupları arasında apoptotik protein ekspresyonunda belirgin farklılıkların olmaması vitamin D'nin ovaryum apoptozisinde ilerletici ya da geriletici etkisinin olmadığını gösterdi. Ancak, özellikle ergin ovaryum dokularında primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde anlamlı azalış dikkat çekiciydi. Buna zıt olarak primordiyal folliküllerin her iki grupta da aynı olması ise oldukça ilginçti. Primordiyalden primer folliküle geçiş oldukça önemlidir. Bu geçişte LIF, Kit ligand, BMP-9 gibi pek çok molekül rol alır. Bilindiği gibi oositlerin pek çoğu bu geçiş sırasında ölmektedir. Biz vitamin D'nin primordiyalden primere geçişte etkili olan molekülleri inhibe ettiğini ya da inhibitor olarak işlev yapan molekülleri uyarmış olabileceğini düşünmekteyiz. Bundan sonraki planımız vitamin D'nin primordiyal follikülden primer folliküle geçişte rol oynayan moleküller üzerine etkisini araştırmaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Albamonte M.S., Willis M.A, Albamonte M.I., Jensen F., Espinosa M.B., Vitullo A.D., The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Hum Reprod.* Aug;23(8):1895-901, (2008).
2. Bao B.Y., Yeh S.D., Lee Y.F., 1{alpha}, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis*, 32-42. (2006)
3. Boise L.H., Gonza'lez-Garcia M., Postema C.E., Ding L.Lindsten T., Turka L.A, Mao X., Nu'n'ez G., Thompson C.B., Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cel*,14:597-608, (1993).
4. Eckert R.L., Efimova T., Dashti S.R., Balasubramanian S, Deucher A, Crish JF, Sturniolo M, Bone F.,Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase, *J Investig Dermatol Symp Proc*,7(1):36-40, (2002)
5. Gniadecki R., Activation of Raf-mitogen-activated protein kinase signalling pathway by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in normal human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol*, 1212-1217 (1996).
6. Gougeon A., Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17:121-155, (1996).
7. Guo MW, Xu JP, Mori E, Sato E, Saito S, Mori T)Expression of Fas ligand in murine ovary. *Am J Reprod Immunol* ,37:391-398,(1994)
8. Gursoy E., Ergin K., Bařalođlu H., Koca Y., Seyrek K., Expression and localisation of Bcl-2 and Bax proteins in developing rat ovary. *Res Vet Sci.* Feb;84(1):56-61, (2008)
9. Guyton K.Z., Kensler T.W., Posner G.H., Vitamin D and vitamin D analogs as cancer chemopreventive agents. *Nutr Rev*, 227-38 (2003)
10. Hsueh A.J., Billig H., & Tsafirri A., Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*,707-724, (1994).
11. Ikekawa N., and Ishizuka S., Molecular structure and biological activity of vitamin D metabolites and their analogs. In *Molecular Structure and Biological Activity of Steroids*, pp. 293-316, CRC Pres (1993).
12. Johnson A.,L, Bridgham JT., Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary, *Reproduction*, 124:19-27(2002).

13. Johnson J.A., Grande J.P, Roche P.C., Kumar Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol*,105(1):7-15, (1996)
14. Johansen C., Kragballe K., Henningsen J., Westergaard M., Kristiansen K., Iversen L., 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates activator protein 1 DNA-binding activity by a phosphatidylinositol 3-kinase/Ras/MEK/extracellular signal regulated kinase 1/2 and c-Jun N-terminal kinase 1-dependent increase in c-Fos, Fra1, and c-Jun expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*,120(4):561-70 (2003).
15. Kim JM, Yoon YD, Tsang BK. Involvement of the Fas/ Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*, 140:2307–2317 (1999).
16. Kondo H, Maruo T, Peng X, Mochizuki M. Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab* ,81:2702–2710 (1996).
17. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau et al (1998) Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death . Differentiation* 5:67–76 (1998).
18. Krysko D.V., Diez-Fraile A., Criel G., Svistunov A.A., Vandenabeele P., D'Herde K., Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*, 1-23,(2008).
19. Morales O., Samuelsson M.K., Lindgren U., Haldosén L.A., Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and growth hormone on apoptosis and proliferation in UMR 106 osteoblast-like cells, *Endocrinology*, 145(1):87-94 (2004).
20. Matova N., Cooley L., Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol*,15;231(2):291-320,(2001)
21. Nilsson E.E., Skinner M.K., Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*,12;214(1-2):19-25 (2004).
22. Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74:609–619, (1993).
23. Richardson S.J., Senikas V., Nelson JF, Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab*, 65:1231–1237,(1987)
24. Rolaki A., Drakakis P., Millingos S., Loutradis D., Makrigiannakis A., Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod Biomed Online*.11: 93-103, 2005

25. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 16;17(6):1675-87 (1998).
26. Slot K.A.Voorendt M., De Boer-Brouwer M., Van Vugt H.H., Teerds K.J., Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *J Endocrinol*, 188(2):179-92, (2006).
27. Tilly J.L., Apoptosis and ovarian function, *Rev Reprod*, 1:162-172, (1996).
28. Tilly J.L., Commuting the death sentence: How oocytes strive to survive. *Nat Rev*, 2:838-848, (2001).
29. Zittermann A., Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr*, 89:552-72, (2003)

EK-2

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 106S071

Proje Başlığı: Vitamin D'nin Ovaryum Apoptozisindeki Yeri

Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç Dr. Gülçin Abban, Doç.Dr. Başak Yıldırım,
Prof. Dr. Simin Rota

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve
Embriyoloji Anabilim Dalı

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 2006- 2008

Öz (en çok 70 kelime)

Bu çalışmada vitamin D'nin ovaryum apoptozisine etkisi bulunmadı. Bununla birlikte bulgularımızda deney gruplarında follikül kaybı oldukça belirgindi. Sonuçlarımız bize vitamin D'nin primordial follikülden primer folliküle geçişte etkisi olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Vitamin D, Ovaryum, apoptosiz

Projeden Yapılan Yayınlar: 1uluslararası kongrede 1 tanede ulusal kongrede sunulmuş iki bildiri vardır. İki makale yazılmıştır. 1 tanesi *fertility sterility* dergisine gönderilmiştir. Diğerleri ise henüz gönderilme aşamasındadır.