

Vitamin D uygulamasının endometrium üzerine etkisi

Effect of vitamin D application on the endometrium

Nazlı Çil, Cihan Kabukçu

Gönderilme tarihi:17.07.2020

Kabul tarihi:23.11.2020

Özet

Amaç: Vitamin D, mineral metabolizması, hücre çoğalması-farklılanması, apoptoz, immün sistemde görev alan bir hormondur. Endometrium Vitamin D için hedef organlardan biridir. Çalışmamızda Vitamin D uygulamasının endometrium apoptozisi üzerine etkisini göstermeyi amaçladık.

Gereç ve yöntem: Onsekiz sıçan rastgele olarak 3 gruba ayrıldı: Kontrol (grup 1, n:6), 0,5 µg/kg Vitamin D (grup 2, n:6), 1 µg/kg Vitamin D (grup 3, n:6) olarak belirlendi. Vitamin D haftada 3 gün, 8 hafta intraperitoneal olarak verildi. Deney bitiminde uterus örnekleri alındı. Apoptozun değerlendirilmesi için Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL), Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 immunohistokimyasal olarak incelendi.

Bulgular: Lümen ve bez epitelinde TUNEL pozitif hücre sayısı grup 1'de grup 2 ve grup 3'e göre anlamlı olarak yüksekti. Bax ekspresyonu lümen epiteli, bez epiteli ve stromal hücrelerde farklılık göstermedi. Lümen ve bez epitelinde Bcl-2 ekspresyonunun Vitamin D uygulanan gruplarda fazla olduğu görüldü. Bununla birlikte stromal hücrelerde grup 3'te Bcl-2 ekspresyonu grup 2 ve grup 1'e göre anlamlı olarak fazla olduğu saptandı. Kaspaz 3 ekspresyonu grup 1'in lümen ve bez epitelinde diğer iki gruba göre daha yüksek bulundu. Stromal hücrelerde grup 1 ve grup 2'deki ekspresyonun grup 3'e nazaran daha fazla olduğu belirlendi.

Sonuç: 0,5 µg/kg Vitamin D ve 1 µg/kg Vitamin D uygulaması endometriumda lümen ve bez epitelinde apoptozisi geriletmiştir. Özellikle 1 µg/kg Vitamin D dozunun tüm endometriumda etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Vitamin D, endometrium, TUNEL, bax, bcl-2.

Çil N, Kabukçu C. Vitamin D uygulamasının endometrium üzerine etkisi. Pam Tıp Derg 2021;14:175-183.

Abstract

Purpose: Vitamin D is a hormone involved in mineral metabolism, cell proliferation-differentiation, apoptosis, and immune system. Endometrium is one of the target tissue for Vitamin D. We aimed to determine the effects of Vitamin D on apoptosis in the endometrium.

Materials and methods: Eighteen rats were randomly divided into three groups, as follows:control group (group 1, n=6), 0,5 µg/kg Vitamin D -treated group (group 2, n=6), and 1,0 µg/kg Vitamin D -treated group (group 3, n=6). Vitamin D was given intraperitoneally three times a week for eight weeks. Uterus samples were obtained from the rats. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), Bax, Bcl-2, and Caspase-3 were used immunohistochemically for the evaluation of apoptosis.

Results: The number of TUNEL positive cells in the luminal and glandular epithelium was significantly higher in group 1 than in groups 2 and 3. Bax expression didn't differ in luminal epithelium, glandular epithelium, and stromal cells. Bcl-2 expression in luminal and glandular epithelium was higher in groups treated with Vitamin D. However, Bcl-2 expression in stromal cells was significantly higher in group 3 than in group 2, and 1.Caspase 3 expression was higher in the luminal and glandular epithelium of group 1 than the other groups. Caspase 3 expression in group 1 and group 2 was higher in stromal cells compared to group 3.

Conclusion: Treatment with 0.5 µg/kg and 1 µg/kg Vitamin D regressed apoptosis in the luminal and glandular epithelium. In particular, the dose of 1 µg/kg was effective on the entire endometrium.

Key words: Vitamin D, endometrium, TUNEL, bax, bcl-2.

Çil N, Kabukcu C. Effect of vitamin D on the endometrium. Pam Med J 2021;14:175-183.

Giriş

Vitamin D, esas olarak güneşin etkisi ile cilt tarafından üretilen, ayrıca gıda alımıyla da elde edilen steroid bir hormondur. Bazı balık türleri (somon, ringa balığı ve sardalya), yumurta sarısı ve mantar gibi bazı gıdalar vitamin D içerir [1]. Vitamin D'nin hücre farklılaşması, antiproliferatif, antienflamatuar etki ile immüno-supresyon gibi birçok farklı biyolojik fonksiyonda rol oynadığı bildirilmiştir [2].

Vitamin D'nin, uterus düz kas kasılması ve uterus hücre çoğalmasını düzenlemek de dahil olmak üzere uterus fonksiyonlarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir [3]. Bu düzenleyici rollere Vitamin D reseptörü (VDR) aracılık eder [4]. Uterus dokusunda Vitamin D'yi aktif formuna dönüştüren 1 α -hidroksilaz enzim ve VDR ekspresyonu bildirilmiştir. Uterusta VDR'nin menstrüel siklusun foliküler ve luteal fazlarında eksprese edildiği bulunmuştur [3]. Dişi üreme organlarında VDR varlığı, kadın üreme sisteminde vitamin D'nin potansiyel bir rol oynadığını göstermiştir. Çeşitli çalışmalar, serum vitamin D seviyesi ile endometriozis, polikistik over sendromu (PCOS), prematür ovaryan yetmezlik (POF), uterin fibroidler ve jinekolojik kanserler gibi kadın fertilitasını etkileyen çeşitli jinekolojik hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştırmıştır [5]. Vitamin D'nin hücre döngüsü üzerine olumlu etkileri olduğu ve PCOS'ta apoptozu ve endometriyal kalınlığı azalttığı, böylece endometriyal kanser riskini düşürdüğü bildirilmiştir [6]. Vitamin D kadın fertilitesi üzerindeki rolü derinlemesine incelenmiştir. Fakat vitamin D'nin endometriyum üzerine etkilerini araştıran yeterli sayıda çalışma yoktur. Mevcut çalışmalar vitamin D'nin fizyolojik endometriumdaki etkileri hakkındaki bilginin zayıf olduğunu ve ilgili moleküler mekanizmaların hala tam olarak tanımlanmadığını göstermektedir [7].

Bizim bu çalışmadaki amacımız sıçanlarda normal endometriuma vitamin D'nin doz bağımlı etkisini apoptozis üzerinden değerlendirmektir.

Gereç ve yöntem

Deney prosedürü

Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (PAUHADYEK) tarafından etik kurul onayı alınarak çalışmaya başlandı. Çalışmamızda Wistar albino cinsi, sağlıklı

18 adet 200-250 gr ağırlığındaki dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 22°C 12 saat aydınlık karanlık siklusunda tutularak yemek ve suya ulaşmaları ad libitum şeklinde ayarlandı. Ergin sıçanlardan sadece diestrus dönemindekiler deneye dahil edildi. Sıçanlar kontrol (grup 1, n:6) 0,5 µg/kg Vitamin D (grup 2, n:6), 1 µg/kg Vitamin D (grup 3, n:6) olarak belirlendi. Vitamin D haftada 3 gün, 8 hafta intraperitoneal olarak verildi. Sekizinci haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edildi ve uterusları alındı. Dokulara alışılagelmiş ışık mikroskop takibi yapıldı. Parafin bloklardan seri kesitler alındı ve apoptozisinin değerlendirilmesi için TUNEL, Bcl-2-associated X protein (Bax) B hücreli lenfoma / lösemi-2 (Bcl-2), Kaspaz-3 reaksiyonları immunohistokimyasal olarak incelendi.

Histolojik değerlendirme

Eksize edilen uteruslar %10 formaldehitte 72 saat fikse edildi. Dokular akan su altında 1 saat boyunca yıkandı. Artan miktarda alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dokuları saflaştırmak için 2 saat ksilenle sonra 2 saat sıvı parafinde bekletildi. Doku takip işlemi tamamlanan dokular bloklandı.

Hematoksilen eozin boyama

Uterus dokusundan hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı (Leica mikrotom, Wetzlar, Germany). Lamlara alınan kesitler ksilenle deparafinize edildi. Azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Hematoksilen eozin boyama işlemi yapıldı.

TUNEL boyama

Kesitler ksilenle deparafinize edildi. Alkole rehidrate edilen dokular 20 µm/ml proteinaz K ile 10 dakika muamele edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi %3 hidrojen peroksitle bloklandı. Kesitler Equilibration Buffer da 5 dakika bekletildi, sonra TdT enzimi uygulandı ve kesitler 37°C 1 saat inkübe edildi. Kesitler daha sonra Working Stop / Wash Buffer solusyonunda 15 saniye çalkalandılar ve 10 dk. oda ısısında inkübe edildi. Kesitlere anti-digoxigenin peroksidaz damlatılarak oda ısısında nemli ortamda 30 dk. bekletildi. Kesitlerin üzerine DAB solusyonu damlatılarak 10 dk. bekletildiler. Zıt boyama için preparatlar %0,5'lik metilgreen içerisinde 10 dk. bekletildi.

Apoptotik indeks

TUNEL metodu kullanılarak uterus epitel, bez ve stroma hücrelerinde apoptozis değerlendirildi. Nükleusları kahverengi boyananlar TUNEL pozitif hücre olarak kabul edildi. Apoptotik indeks (AI) şu şekilde hesaplandı.

$$AI = \text{Pozitif hücreler} \times 100 / \text{Total hücre sayısı}$$

İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

Doku takip yöntemi tamamlanan doku bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µm'lik kesitler alınıp, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 antikoları için immünohistokimya protokolü uygulandı. Kesitler ksilenle deparafinizasyon işleminin ardından sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinden geçirildi. Akan su altında yıkanan kesitler Phosphate Buffered Saline (PBS) içerisinde 10 dk. bekletildi. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, %30'luk H₂O₂: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı. PBS ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu (Reagent A) ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kesitler üzerine uygun primer antikolar ilave edilerek 1 gece overnight yapıldı. Bu çalışmada kullanılacak primer antikolar Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 antikolarıdır. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitler primer antikolarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikolarla (Reagent B) 20 dakika muamele edildi. Sonra biotinlenmiş-sekonder antikolarla kolayca bağlanabilen horse radish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) (Reagent C) 10 dakika muamele edildi. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3 dakika bekletildi. Zıt boyama için hematoksilen kullanıldı. Uterus epitel, bez ve stroma hücrelerinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 pozitif boyanmaları için ayrı ayrı H SCORE (histolojik skor) elde edildi. H SCORE = $\sum Pi(i+1)$. Burada, I boyama yoğunluğunu göstermektedir (0=ekspresyon yok, 1=hafif, 2=orta ve 3=yoğun) ve Pi her yoğunluk için boyanan hücre yüzdesidir.

İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi SPSS for Windows 21 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca (en küçük - en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Gruplar arasındaki

farklılık Kruskal Wallis ile analiz edildi. Bağımsız grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA, post hoc: Tukey testi) kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

TUNEL bulguları

Lümen ve bez epitelinde TUNEL pozitif hücre sayısı gruplar arasında farklılık göstermekteydi (Resim 1A). En yüksek sayı grup 1'de izlenirken grup 2'de daha düşük grup 3'te ise en düşük olarak izlendi (Resim 2A) ($p < 0,05$). Stromal hücrelerde TUNEL pozitif hücre oranında grup 1 ile grup 2 arasında farklılık izlenmezken grup 3'teki TUNEL pozitif stromal hücre oranının grup 2 ve grup 1'den daha az olduğu saptandı (Resim 2A, Tablo 4).

İmmünohistokimyasal bulgular

Tüm immünohistokimyasal analizler Tablo 1'de özetlenmiştir. Gruplar arasındaki H skoru analizleri ve apoptotik indeks oranlarının analizleri Tablo 2-4'te verilmiştir.

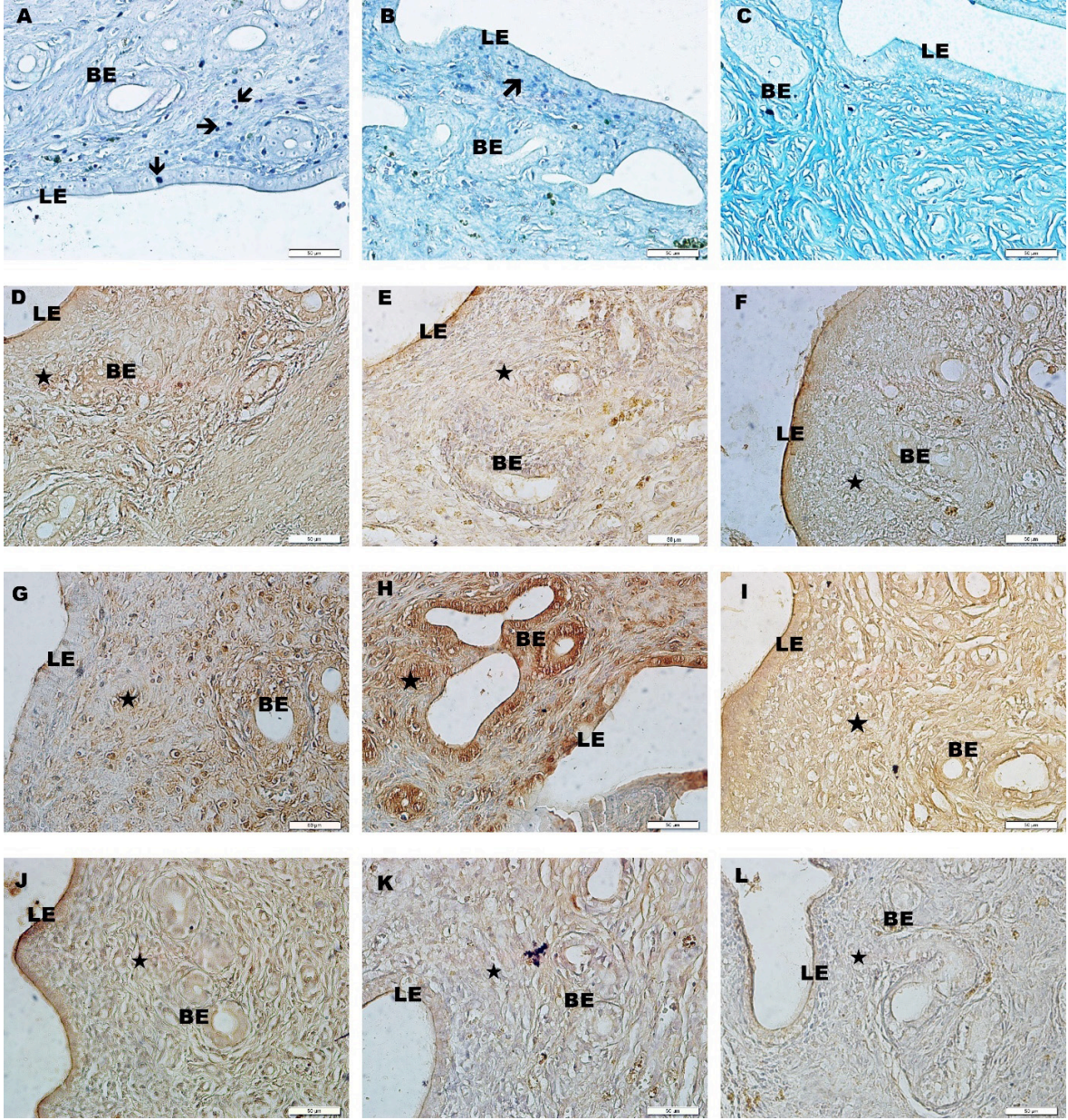
Lümen epitelinde immünohistokimyasal analiz

Bax ekspresyonu her üç grubun lümen epitelinde orta derecede ekspresyon gösterdi. Yerleşimi ve dağılımı birbirine benzer şekildeydi. Bcl-2 ekspresyonu kontrol grubu lümen epitelinde çok zayıf ekspresyon gösterirken vitamin D uygulanan gruplarda kuvvetli pozitif. Özellikle grup 3'te apikal membranda ve apikal sitoplazmadaki reaksiyon oldukça kuvvetliydi. Kaspaz-3 ekspresyonu kontrol grubu lümen epitelinde kuvvetli boyanma gösterdi (Resim 1).

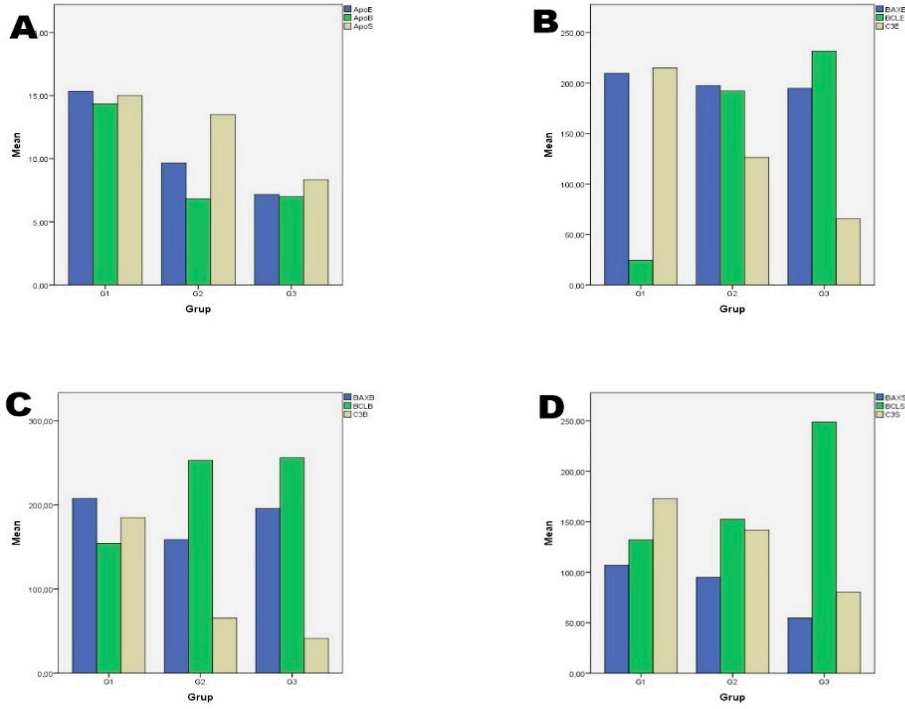
Yapılan semikantitatif H skoru analizinde Bax ekspresyonunda her üç grupta farklılık göstermediği, grup 2 ve grup 3'teki Bcl-2 ekspresyonunun grup 1'e nazaran daha yüksek olduğu, Kaspaz-3'ün grup 1'deki ekspresyon oranının grup 2 ve grup 3'e karşın daha yüksek olduğu saptandı (Resim 2B, Tablo 2)

Bez epitelinde immünohistokimyasal analiz

Bez epitelindeki Bax ekspresyonu lümen epiteline benzer şekilde her üç grupta da farklılık göstermedi (Tablo 1). Bcl-2 kontrol grubu bez epitelinde orta derecede boyanma gösterirken



Resim 1. Grup 1 (A, D, G, J), Grup 2 (B, E, H, K), Grup 3 (C, F, I, L). TUNEL ekspresyonu (A-C), Bax ekspresyon; (D-F), Bcl-2 ekspresyonu; (G-I), Kaspaz-3 ekspresyonu; (J-L). TUNEL pozitif hücre; (Ok). Lümen epiteli; (LE), Bez epiteli; (BE), Stromal hücreler; (Yıldız). İmmunopreksidaz-Hematoksilen Bar; 50µm, 400X



Resim 2. G1:Grup 1, G2:Grup 2, G3:Grup 3. A; TUNEL pozitif hücre sayısı, ApoE: Lümen epitelindeki apoptotik indeks. ApoB: Bez epitelindeki apoptotik indeks. ApoS: Stromal hücrelerdeki apoptotik indeks. B; Grupların lümen epitelinde Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ekspresyon eden hücrelerin H-Skoru analizi, BAXE: Bax lümen epiteli, BCLE: Bcl-2 lümen epiteli, C3E: Kaspaz-3 lümen epiteli. C; Grupların bez epitelinde Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ekspresyon eden hücrelerin H-Skoru analizi, BAXB: Bax bez epiteli, BCLB: Bcl-2 bez epiteli, C3B: Kaspaz-3 bez epiteli. D; Grupların stromal hücrelerde Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ekspresyon eden hücrelerin H-Skoru analizi, BAXS: Bax stromal hücreler, BCLS: Bcl-2 stromal hücreler, C3S: Kaspaz-3 stromal hücreler.

Tablo 1. Lümen, bez epitelinde ve stromal dokuda Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

	Bax			Bcl-2			Kaspaz-3		
	Grup1	Grup2	Grup3	Grup1	Grup2	Grup3	Grup1	Grup2	Grup3
Lümen Epiteli	++	++	++	+/-	+++	+++	+++	+	+
Bez Epiteli	++	++	++	++	+++	+++	++	+	+
Stroma	++	++	++	++	++	+++	++	+	+

Tablo 2. Gruplar arası lümen epitelinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 ekspresyonunun H-skor analizi ve apoptotik indeks sonuçları

	Bax	Bcl-2	Kaspaz-3	TUNEL
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Grup1-Grup2	0,823	0,00	0,00	0,007
Grup1-Grup3	0,750	0,00	0,00	0,000
Grup2-Grup3	0,991	0,165	0,001	0,282

İstatistiksel olarak anlamlılık: $p < 0,05$

Tablo 3. Gruplar arası bez epitelinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 ekspresyonunun H-skor analizi ve apoptotik indeks sonuçları

	Bax <i>p</i>	Bcl-2 <i>p</i>	Kaspaz-3 <i>p</i>	TUNEL <i>p</i>
Grup1-Grup2	0,091	0,001	0,000	0,000
Grup1-Grup3	0,848	0,001	0,000	0,000
Grup2-Grup3	0,229	0,988	0,014	0,980

İstatistiksel olarak anlamlılık: $p < 0,05$ **Tablo 4.** Gruplar arası stromal dokuda Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 ekspresyonunun H-skor analizi ve apoptotik indeks sonuçları

	Bax <i>p</i>	Bcl-2 <i>p</i>	Kaspaz-3 <i>p</i>	TUNEL <i>p</i>
Grup1-Grup2	0,626	0,527	0,181	0,729
Grup1-Grup3	0,626	0,000	0,000	0,010
Grup2-Grup3	0,017	0,000	0,006	0,046

İstatistiksel olarak anlamlılık: $p < 0,05$

vitamin D uygulanan gruplarda kuvvetli pozitif boyanma gösterdi. Kaspaz-3 reaksiyonu kontrol grubu bez epitelinde orta derecede izlenirken grup 2 ve grup 3'te zayıf olduğu belirlendi. Grup 3'teki reaksiyonun grup 2'ye nazaran daha da zayıf olduğu dikkat çekiciydi (Resim 1).

Semikantitatif H skoru analizinde Bax ekspresyonunun her üç grupta farklılık göstermediği saptandı. Bcl-2 ekspresyonu grup 2 ve grup 3'ün grup 1'e nazaran daha yüksek olduğu görüldü. Kaspaz-3'ün ise grup 1'deki ekspresyon oranının grup 2 ve grup 3'e karşı daha yüksek olduğu saptandı. Grup 2 ile grup 3 arasında farklılık yoktu (Resim 2C, Tablo 3).

Stromada immunohistokimyasal analiz

Stromal hücrelerde Bax ekspresyonu her üç grupta da orta derecede reaksiyon gösterdi. Bcl-2 ekspresyonu grup 1 ve grup 2'de orta derecede ekspresyon gösterirken grup 3'te reaksiyonun kuvvetli olduğu saptandı. Kaspaz 3 reaksiyonu ise grup 1'de orta derecede, grup 2'de zayıf ve grup 3'te ise çok zayıf olarak izlendi (Resim1).

Semikantitatif H skoru analizinde Bax ekspresyonu gruplar arasında farklılık göstermezken Bcl-2 grup 1 ile grup 2 arasında anlamsızdı. Bununla birlikte grup 2 ile grup 3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Kaspaz 3 reaksiyonu kontrol gruplarına nazaran vitamin D uygulanan gruplarda azalmıştı. En

düşük grup 3'te izlenirken grup 2'deki reaksiyon da grup 1'e nazaran daha düşüktü (Resim 2D, Tablo 4).

Tartışma

Vitamin D eksikliğinin infertiliteye etkisini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. Yapılan literatür taramasında normal endometrium dokusuna vitamin D uygulamasının etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada artan dozlarda uygulanan vitamin D'nin endometriumdaki apoptozise etkisi araştırılmıştır. Lümen ve bez epitelinde ve stroma dokusunda Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 reaksiyonu immunohistokimyasal olarak analiz edilmiş, apoptotik hücreler ise TUNEL yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmamızda lümen ve bez epitelinde TUNEL pozitif hücre sayısının vitamin D uygulanan gruplarda anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Stromal hücrelerde TUNEL pozitif hücre sayısı grup 1'de en fazla izlenirken grup 2 'de ve grup 3'te azalmıştır. Bununla birlikte kontrol grubuna göre grup 2'deki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken grup 3'teki azalma hem grup 1'e hem de grup 2'ye göre anlamlı bulunmuştur. Bulgularımız vitamin D'nin özellikle epitel dokuda apoptozise etki ettiği yüksek dozunun ise tüm endometriumda rol oynadığını göstermektedir. İmmunohistokimyasal analizlerde kontrol grubuna ait lümen ve bez epitel dokusunda Bcl-2 ekspresyonu zayıf pozitif izlenirken vitamin

D uygulanan gruplarda hem ekspresyonun derecesinin artarak kuvvetlendiği hem de reaksiyon gösteren hücrelerde artış olduğu saptandı. Kaspaz 3 reaksiyonu vitamin D uygulanan gruplarda özellikle lümen ve bez epitelinde azalmıştı. Bununla birlikte grup 1 ve grup 2 stromal hücrelerde Kaspaz-3 reaksiyonu farklı değildi. Bax ekspresyonu her üç grupta da benzerlik gösterirken Bcl-2'nin farklı olması vitamin D'nin endometriumun apoptozise gitmesinin önlenmesinde Bcl-2'nin rol oynadığını düşündürdü.

Apoptozisin düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi proteinleri önemli rol oynar [8-13]. Onsekizinci kromozomda yerleşmiş olan Bcl-2 geni, bir hücrenin geri dönüşü olmayan bir şekilde apoptozise gidip gitmeyeceğinin belirlenmesinde önemlidir [8].

Bax geni Bcl-2'nin tersine proapoptotik bir genidir. Antiapoptotik ve proapoptotik protein ekspresyonları arasındaki denge apoptozisin sonucunu belirler [8-11]. Grup 3'te stromal hücrelerde ekspresyonun ve eksprese olan hücrelerin fazla olması 1 µg vitamin D'nin Bcl ekspresyonunu artırarak Bax/Bcl oranını etkilediğini ve apoptozisi inhibe ettiğini gösterdi. Grup 2 'de de Bcl artışı olmakla beraber bu artışın Bax/Bcl oranını etki etmemiş olabilir. Buna karşın lümen epitelinde ve bez epitelindeki grup 2'de ve grup 3'teki artış Bax/Bcl oranını Bcl yönünde değiştirmiş olduğu gözükmektedir. Önceki çalışmalarda Bcl-2'nin bezlerde etkin olduğu ve Bcl-2 yoksunu farelerde özellikle bezlerde pek çok apoptotik hücre izlendiği belirtilmiş ve Bcl-2'nin bezler için esansiyel gen olduğu öne sürülmüştür [14]. Gerek fetal gerekse yetişkin dokularda Bcl-2, hücrelerin canlılığını sağlayan apoptozis inhibitörüdür [15, 16]. Bcl-2 ekspresyonu, hücre dışı ve hücre içi apoptozis uyarımlarını apoptozis yolunu kapatarak belirgin biçimde azaltır. Proapoptotik Bax protein yapısal olarak Bcl-2 ye benzemesine karşın apoptozisi uyaran bir proteindir. Bax proteinin aşırı eksprese olduğunda bcl-2 protein ile heterodimer formu oluşturarak mitokondriden sitokrom c salınmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınması sırasıyla Kaspaz-9'un ve ölüm kaspazı olan kaspaz-3 aktiflenmesine neden olur [15, 16]. Kaspaz-3 kontrol grubunda epitel ve bez epitel hücrelerinde yüksek olarak izlenirken vitamin D uygulanan gruplarda azalması buna karşın stromal hücrelerde Kaspaz-3'ün grup 1

ve grup 2'de farksız olması Bax ekspresyonuyla ilgili olabilir.

Yapılan bir çalışma steroid tipte hormonların Bcl-2 ekspresyonunu etkileyebileceğini belirtmiştir [17]. Vitamin D'nin de steroid tipte olduğu düşünülürse Bcl ekspresyonu artırması beklenen bir sonuçtur. Buna karşın başka bir çalışmada sıçanlarda pentylenetrazol ve kainik asit kullanılarak hipokampal apoptoz oluşturulmuş ve vitamin D'nin etkisini incelenmiştir. Çalışmada vitamin D Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak apoptozisi geriletmediği bildirilmiştir [18]. Vitamin D anti-proliferatif etkilere sahiptir ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eder [19]. Lupus hastalarında vitamin D 'nin hücre döngüsü ve apoptoz indüksiyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada vitamin D'nin Bax ve Fas L genlerini azaltırken, Bcl-2 genini ise arttırdığı bildirilmiştir [20]. Bu çalışmaların aksine, biz Bax ekspresyonunu her üç grupta da benzer bulduk.

Mineral metabolizması, hücre içi kalsiyum düzeyi, protein kinazların etkin olduğu hücre çoğalması ve farklanması, apoptozis, kas gelişimi ve kasılması ve immün sistemde görev alan bir hormon olan vitamin D VDR'ye bağlanarak işlev görür [21-24]. VDR ovaryum, vajen, gibi pek çok organda gösterilmiştir. Endometriumdaki varlığı ilk kez Vienonen ve ark. [25] tarafından gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) kullanılarak gösterilmiştir. VDR uterus dokusunda önemlidir. VDR'nin hasarlandırıldığı bir çalışmada dişi farelerde uterus defektlerinin olduğu ve bu nedenle çoğalamadıkları bildirilmiştir [26]. Uterus dokusundaki VDR'nin dağılımı ve ekspresyon derecesi ile ilgili farklı görüşler vardır. Otuzsekiz-elli yaş aralığında olan ve histerektomi geçiren premenopozal üç kadından uterus örnekleri alınmış ve yapılan analizde temel olarak bireyler arasında ekspresyon düzeylerinde önemli farklılıklar bulunmuş olmasına karşın ekspresyon seviyeleri döngünün proliferatif ve sekretuar fazları arasında farklılık göstermemiştir [25]. Bununla birlikte başka bir çalışmada mid sekretuar evredeki VDR ekspresyonunun erken sekretuar evredesine oranla daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir [27]. Vitamin D hem apoptozisi hem de hücre proliferasyona etki etmektedir. Hücrelerin çoğalma ya da apoptozisine gidişinde VDR'nin etkili olduğu düşünülmektedir. Vitamin D reseptörleri

kalsiyumun hücre içindeki toksisitesiyle ilgilidir. Kanser ve obezite hastalarında VDR ekspresyonunun yoğun olduğu belirtilmekte ve bu yoğun ekspresyon apoptozisi uyarırken sağlıklı dokularda ekspresyon normal olduğu için proliferasyon artmaktadır [28].

Sonuç olarak bizim çalışmamızda vitamin D apoptozisi önlemiştir. Menstrüel döngü sırasında endometrium çoğalır, farklılaşır ve eğer gebelik gerçekleşmezse dejenere olarak dökülür. Bu olaylarda apoptozis etkilidir. Apoptozis hücre homeostazında önemli bir süreçtir. Bu nedenle Vitamin D'nin sağlıklı dokudaki etkilerinin ileri araştırmalarla detaylı şekilde incelenmesi gerekmektedir.

Çıkar ilişkisi: Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmiştir.

Kaynaklar

1. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: an overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull* 2014;39:322-350. <https://doi.org/10.1111/nbu.12108>
2. Norman AW. The history of the discovery of vitamin D and its daughter steroid hormone. *Ann Nutr Metab* 2012;61:199-206. <https://doi.org/10.1159/000343104>
3. Sayem ASM, Giribabu N, Karim K, Si LK, Muniandy S, Salleh N. Differential expression of the receptors for thyroid hormone, thyroid stimulating hormone, vitamin D and retinoic acid and extracellular signal-regulated kinase in uterus of rats under influence of sex-steroids. *Biomed Pharmacother* 2018;100:132-141. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.008>
4. Pawlowska E, Wysokinski D, Blasiak J. Nucleotide excision repair and vitamin D-relevance for skin cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2016;17:372. <https://doi.org/10.3390/ijms17040372>
5. Fichera M, Török P, Tesarik J, et al. Vitamin D, reproductive disorders and assisted reproduction: evidences and perspectives. *Int J Food Sci Nutr* 2020;71:276-285. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1661978>
6. Kuyucu Y, Çelik LS, Kendirinan Ö, Tap Ö, Mete UÖ. Investigation of the uterine structural changes in the experimental model with polycystic ovary syndrome and effects of vitamin D treatment: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Reprod Biol* 2018;18:53-59. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.01.002>
7. Cermisoni GC, Alteri A, Corti L, et al. Vitamin D and endometrium: a systematic review of a neglected area of research. *Int J Mol Sci* 2018;19:2320. <https://doi.org/10.3390/ijms19082320>
8. Diebold J, Baretton G, Felchner M, et al. Bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996;105:341-349. <https://doi.org/10.1093/ajcp/105.3.341>
9. Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M, et al. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer* 1999;85:1514-1522.
10. Rossen K, Karabulut Thorup A, Hou Jensen K, Krag Jacobsen G. BAX protein is not expressed by basal cell carcinomas. *British J Dermatol* 1998;139:472-474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02412.x>
11. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001;26:61-66. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01740-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01740-0)
12. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001;26:390-397. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01844-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01844-8)
13. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004;52:821-831. <https://doi.org/10.1369/jhc.3A6112.2004>
14. Daikoku E, Ito Y, Otsuki Y. The induction of apoptosis in ovaries and uteri of bcl-2 deficient mice. *Med Electron Microsc* 1998;31:68-76.
15. Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:35-46. <https://doi.org/10.1023/a:1005508311495>
16. Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D. Society for Medicines Research. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect* 2000;13:378-384.
17. Rogers PAW, Lederman F, Plunkett D, Affandi B. Bcl-2, Fas and caspase 3 expression in endometrium from levonorgestrel implant users with and without breakthrough bleeding. *Hum Reprod* 2000;15:152-161. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_3.152
18. Şahin S, Gürgen SG, Yazar U, et al. Vitamin D protects against hippocampal apoptosis related with seizures induced by kainic acid and pentylene tetrazol in rats. *Epilepsy Res* 2019;149:107-116. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.12.005>
19. Mantel DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 α , 25-dihydroxy vitamin D3 inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 2000;87:214-220. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.3.214>
20. Tabasi N, Rastin M, Mahmoudi M, et al. Influence of vitamin D on cell cycle, apoptosis, and some apoptosis related molecules in systemic lupus erythematosus. *Iran J Basic Med Sci* 2015;18:1107-1111.

21. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 1992;355:446-449. <https://doi.org/10.1038/355446a0>
22. Hansen CM, Binderup L, Hamberg KJ, Carlberg C. Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front Biosci* 2001;6:820-848. <https://doi.org/10.2741/hansen>
23. Cantorna MT, Mahon BD. D-hormone and the immune system. *J Rheumatol Suppl* 2005;76:11-20.
24. Hii CS, Ferrante A. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients* 2016;8:135. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>
25. Vienonen A, Miettinen S, Bläuer M, et al. Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:104-112. <https://doi.org/10.1016/j.jsg.2003.09.003>
26. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 1997;16:391-396. <https://doi.org/10.1038/ng0897-391>
27. Zelenko Z, Aghajanova L, Irwin JC, Giudice LC. Nuclear receptor, coregulator signaling, and chromatin remodeling pathways suggest involvement of the epigenome in the steroid hormone response of endometrium and abnormalities in endometriosis. *Reprod Sci* 2012;19:152-162. <https://doi.org/10.1177/1933719111415546>
28. Sergeev IN. Vitamin D-mediated apoptosis in cancer and obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;20:43-49. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0035>

Etik kurul onayı: Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (PAUHADYEK) tarafından 09.10.2019 ve 2019/30 karar no ile onay alınmıştır.

Yazarların makaleye olan katkıları

N.Ç. ve C.K. çalışmanın ana fikrini ve hipotezinikurgulamışlardır.N.Ç.teoriyigeliştirmiş ve materyal metod bölümünü düzenlemiştir. Deneysel aşamaları tamamladıktan sonra sonuçların değerlendirilmesi kısmındaki verilerin değerlendirmesini N.Ç. yapmıştır. Makalenin tartışma bölümü N.Ç. ve C.K. tarafından yazılmış, C.K. tarafından gözden geçirilip gerekli düzeltmeler yapılmıştır.