T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MATERNAL HİPOTİROİDİLİ SIÇAN PLASENTASINDA MELATONİNİN Treg HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Melek Yeşim AK

İZMİR 2025

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MATERNAL HİPOTİROİDİLİ SIÇAN PLASENTASINDA MELATONİNİN Treg HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Melek Yeşim AK

(ORCİD: 0000-0002-9118-6861)

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:

PROF.DR. HÜSNÜ ALPER BAĞRIYANIK

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER
i

TABLO DİZİNİ
iii

ŞEKİL DİZİNİ
iv

KISALTMALAR
v

TEŞEKKÜRLER
vii

ÖZET
1

ABSTRACT
3

1.GİRİŞ VE AMAÇ
5
1.1. Problemin tanımı ve önemi
5
1.2. Araştırmanın amacı
6
1.3. Araştırmanın hipotezleri
7
2. GENEL BİLGİLER
8
2.1.Tiroid Bezi
8
2.1.1.Tiroid bezi histolojisi
8
2.1.2.Tiroid hormonlarının sentezi ve salgılanması
10
2.1.3.Tiroit hormonu salgısının düzenlenmesi
11
2.1.4.Tiroid hormonları etki mekanizması
12
2.1.5.Gebelikte tiroid fonksiyonları
13
2.1.6. Hipotiroidi
14

2.2.Plasenta
15 2.2.1.Plasenta gelişimi ve yapısı
15 2.2.1.1.Desidua
16 2.2.1.2.Bazal plak
17 2.2.1.3.Koryonik plak
18 2.2.1.4.Koryonik villuslar
18 2.2.1.5.Plasental dolaşım
19

2.2.2.Plasentanın fonksiyonları
21

2.2.3.Sıçan plasentası
22 2.2.3.1.Labirent zon
23 2.2.3.2.Bağlantı zonu (Bazal zon)
24 2.2.3.3.Maternal desidua zonu
24

2.3.Melatonin
25 2.3.1.Gebelik ve melatonin
26 2.3.2.Melatoninin
iki yönlülüğü 28

2.4.Regülatör T Hücreleri (Treg Hücreleri) 29
2.4.1.Gebelik ve İmmün Sistem (Fetomaternal İmmüntolerans) 29
2.4.2.Treg Hücreleri 30

3.GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. Araştırmanın Tipi 33

3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 33

3.3. Çalışmanın Materyali 35

3.4. Araştırmanın Değişkenleri 35

3.5. Veri Toplama Araçları 35

3.6. Araştırmada Kullanılan Yöntemler 36
3.6.1. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi 36
3.6.2. Ölçme ve Fiziksel Değerlendirme 36
3.6.3. Histokimyasal Değerlendirmeler 36
3.6.4. Hematoksilen & Eozin Boya Protokolü 37
3.6.5. Morfometrik Değerlendirmeler 39
3.6.6. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler 39
3.6.7. Biyokimyasal Değerlendirme 40

3.7.İstatistiksel Değerlendirme: 40

3.8. Etik Kurul Onayı 40

4.BULGULAR 41

4.1.Deneklerin Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi 41
4.2.Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirmesi 42

4.3.Glikojenik Hücre Oranları Değerlendirilmesi 47

4.4.Vaskülarite oranları değerlendirilmesi 49

4.5.İmmünohistokimyasal Bulgular 52
4.5.1.FoxP3 İmmünohistokimya Değerlendirmesi 52
4.5.2.CK7 İmmünohistokimya Değerlendirmesi 55

4.6.Biyokimyasal Değerlendirmeler 58

5. TARTIŞMA 61

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 69

7. KAYNAKLAR 71

8. EKLER 88
8.1. EK-1 Etik Kurul Belgesi 88

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Deney gruplarının dağılımı 33

Tablo 2: Doku takip protokolü 37

Tablo 3: Hematoksilen Eozin boyama protokolü 38

Tablo 4: Gruplara ait maternal vücut ağırlıkları 41

Tablo 5: Gruplara ait desidua bazalis kalınlıkları 46

Tablo 6: Gruplara ait spongioz tabaka kalınlıkları 46

Tablo 7: Bazal zonda glikojen hücre oranları 48

Tablo 8: Desidua bazalis ve Bazal zonda vaskülarite oranları 50

Tablo 9: Foxp3 pozitif boyanan hücre sayıları 53

Tablo 10: CK7 pozitif boyanan hücre sayıları 56

Tablo 11: Serumdaki TSH seviyeleri 59

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Tiroid bezi histolojisi 9
Şekil 2: Tiroid hormonu sentezi 11
Şekil 3: Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı 12
Şekil 4: Sağlıklı bir term plasentanın şematik diyagramı 16
Şekil 5: Plasenta Desidua Görünümleri 17
Şekil 6: Uteroplasental dolaşım 20
Şekil 7: Sıçan plasentası histolojik yapısı 23
Şekil 8: Melatonin Sentezi 26
Şekil 9: Gebelikte melatoninin faydaları 27
Şekil 10: Treg aracılı bağışıklık baskılama mekanizmaları 31
Şekil 11: Deney başlangıcında ve deney sonunda maternal ağırlık ölçümleri 42
Şekil 12: Kontrol Grubuna Ait Plasenta Kesiti (x4) 43
Şekil 13: Kontrol grubuna ait plasenta kesiti (H&E) 44
Şekil 14: Gruplara ait plasenta kesitleri (H&E, x4) 45
Şekil 15: Gruplar arası tabaka kalınlıkları karşılaştırılması 47
Şekil 16: Glikojen hücre oranları karşılaştırılması 48

Şekil 17: Gruplara ait plasenta kesitlerinde glikojen hücre görünümleri (H&E, x4) 49
Şekil 18: Desidua bazalis ve Bazal zon ile sadece Desidua bazalisteki vaskülarite oranları karşılaştırılması 51
Şekil 19: Gruplara ait plasenta kesitlerinde vaskülarite görünümleri (H&E, x4) 52
Şekil 20: FoxP3 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması 54
Şekil 21: Gruplara ait FoxP3 immünohistokimyasal boyama (x40) 55
Şekil 22: CK7 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması 57
Şekil 23: Gruplara ait CK7 immünohistokimyasal boyama (x40) 58
Şekil 24: Serum TSH seviyeleri değerlendirilmesi 59

KISALTMALAR

T3: Triiyodotironin

T4: Tiroksin

TRH: Tirotropin salgılatıcı hormon

TSH: Tiroid stimülan hormon

TBG: Tiroksin Bağlayıcı Globulin

TPO: Troid peroksidaz

MIT: Monoiyodotirozin

DIT: Diiyodotirozin

PTU: Propiltiourasil

PAS: Periyodik asit schiff

EVT: Ekstravillöz trofoblast

hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin

hPL: İnsan Plasental Laktojeni

hCT: Plasental İnsan Koryonik Tirotropini

NK: Doğal öldürücü hücreler

DC: Dendritik Hücre

IUGR: Intrauterin gelişim gerilikleri

CK7: Sitokeratin 7

IHC: Immunohistokimya

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

TNFa: Tumor nekrosiz faktor alfa

TGFB: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

MT1: Melatonin Reseptörü 1

Treg: Regulator T Hucreler

FoxP3: Forkhead ailesi transkripsiyon faktörü forkhead box p3

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

RSA: Rekürren spontan abortus (tekrarlayan düşük)

IL: Interlökin

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

FGL2: Fibrinojen benzeri protein 2

MG: Miyastenia Gravis

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

H&E: Hematoksilen- Eozin boyama

TEŞEKKÜRLER

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince daima yol gösterici olan, bilgi birikimini ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK'a,

Tıpta uzmanlık eğitimime katkılarını sağlayan Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. Ülker CANKURT, Prof. Dr. Başak BAYKARA, Prof. Dr. Serap CİLAKER MICILI ve Doç. Dr. Seda ÖZBAL'a;

Yatay geçiş öncesi eğitimimin bir kısmını sürdürdüğüm Süleyman Demirel Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki değerli hocalarım ve arkadaşlarıma;

Tez çalışmama katkılarından dolayı ve çok değerli arkadaşlıkları için Dr. Şeyda DEMİR YÜKSEL ve Dr. Gökçen BİLİCİ'ye

Tıpta uzmanlığın bana kazandırmış olduğu değerli arkadaşlarım; Dr. Elif SAĞLAM GÖKMEN, Dr. Göksu SARAK, Uzm.Dr.Tuba PERİ, Selma AYDEMİR, Dr. Gizem AKIN, Dr. Tuna KETENCİ, Dr. Hüseyin DENİZ, Dr. İrem ADANUR, Dr. Selin Nur ÇETİN, Dr. Ali Efe ÖZCAN'a

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatımda da desteklerini esirgemeyen her

zaman sevgi ile tüm zorlukları aşmamı sağlayan aileme,

Her zaman sabrı ve sevgisiyle yanımda olan sevgili yol arkadaşım Halil İbrahim AK'a ve hayatımın neşe kaynağı canım kızlarım Elif'ime ve Fatıma'ma çok teşekkür ederim.

MATERNAL HİPOTİROİDİLİ SIÇAN PLASENTASINDA MELATONİNİN Treg HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

MELEK YEŞİM AK

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Balçova, İzmir

ÖZET

Maternal hipotiroidizm, annenin tiroid bezinin yeterince hormon üretememesi sonucu gelişen bir durumdur ve plasentanın gelişimini olumsuz etkileyebilir. Hipotiroidizm, plasentadaki antiinflamatuar ortamı bozarak preeklampsi, intrauterin büyüme geriliği, spontan abortus, kardiyak disfonksiyon, nöral gelişim bozuklukları, anemi, plasental ablasyon ve düşük doğum ağırlığı gibi komplikasyonlara neden olabilir.

Melatonin, uyku düzenini ve biyolojik ritmi düzenleyen bir hormon olup, aynı zamanda plasentada da sentezlenir. Melatonin, oksidatif stresi azaltarak antioksidan etkiler gösterir, immün yanıtları düzenler ve fetüsün nörolojik gelişimi ile uyku-uyanıklık döngüsünü destekler. Bu nedenle gebelikte fetüs ve anne arasındaki biyolojik dengeyi korumada önemli rol oynar.

Fetomaternal immün tolerans**,** yarı allojenik fetüsün anne tarafından reddedilmeden kabulünü sağlar. Bu mekanizmada FoxP3+ regülatör T hücreleri (Treg) merkezi bir rol oynar. FoxP3+ Treg hücreleri, aşırı bağışıklık yanıtlarının engellenmesi ve otoimmün hastalıkların kontrol altına alınmasında görevli özel bir T hücre alt grubudur. FoxP3 ifadesi, bu hücrelerin gelişimi ve işlevi için gereklidir. Pek çok gebelik patolojisinde bu hücre popülasyonunun azaldığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, hipotiroidili ve sağlıklı sıçanların plasentalarında FoxP3+ hücrelerin dağılımını **ve** melatoninin bu dağılım üzerindeki etkisini araştırdık. Dört grup oluşturuldu: kontrol, hipotiroidi (%0,05 PTU), melatonin (10 mg/kg), hipotiroidi + melatonin. Uygulamalar içme suyuyla yapıldı. Sıçanlar gebe bırakıldı ve gebeliğin 19. gününde sezaryenle plasentalar çıkarıldı.

Dokuda FoxP3+ hücrelerin belirlenmesi icin FoxP3 ile ve trofoblast değişiminin belirlenmesi için CK7 ile immunohistokimya (IHC) yapıldı. Ayrıca H&E boyaması ile gruplar arasında plasentadaki histomorfolojik değişiklikler değerlendirildi.

Histokimyasal olarak hipotiroidi grubunda kalınlaşan bazal zonun melatonin ile birlikte verildiğinde azaldığını gözlemledik. Glikojen hücre gruplarının hipotiroidi grubunda artış gösterdiğini gözlemledik. Vaskülarite oranları değerlendirildiğinde melatonin ve hipotiroidi+melatonin gruplarında vaskülaritenin arttığını değerlendirdik.

İHC sonucuna göre hipotiroidi grubunda FoxP3 azalma eğilimi göstermiş ve melatonin grubunda artış göstermiştir. Hipotiroidi ve melatonin arasında anlamlı fark bulunmuştur.
CK7 değerlendirildiğinde hipotiroidi grubunda azalmış ancak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak plasentada FoxP3+ hucrelerin maternal hipotiroidide azaldığı ve melatonin ile arttığı, melatoninin hipotiroidi ile bozulan feto-maternal immun toleransı yeniden düzenleyebileceği sonucuna ulaştık.

Bu bulgular ile hipotiroidi ve melatoninin plasental Foxp3+ üzerinde birlikte yaptığı etkiyi gösteren ilk çalışma bizim çalışmamızdır. Melatoninin hipotiroidik gebelerde etkilerinin ve kullanımının ayrıca FoxP3'ün fetomaternal immuntoleranstaki etkilerinin daha fazla çalışma ile araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Maternal hipotiroidi, plasenta, Treg, melatonin, Forkhead ailesi transkripsiyon faktoru3, FoxP3, CK7

THE EFFECT OF MELATONİN ON TREG CELLS İN THE PLACENTA OF RATS WİTH MATERNAL HYPOTHYROİDİSM

MELEK YEŞİM AK

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology,

Balcova, Izmir

ABSTRACT:

Maternal hypothyroidism is a condition characterized by insufficient thyroid hormone production in the mother and can adversely affect placental development. Hypothyroidism may disrupt the anti-inflammatory environment of the placenta, contributing to complications such as preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous abortion, cardiac dysfunction, impaired neural development, anemia, placental abruption, and low birth weight.

Melatonin is a hormone primarily known for regulating sleep and circadian rhythms, and it is also synthesized in the placenta. Melatonin exhibits antioxidant effects by reducing oxidative stress, modulates immune responses, and supports fetal neurological development and circadian rhythm regulation. Therefore, it plays a crucial role in maintaining the biological balance between mother and fetus during pregnancy.

Fetomaternal immune tolerance ensures the acceptance of the semi-allogeneic fetus by the maternal immune system without rejection. In this mechanism, FoxP3+ regulatory T (Treg) cells play a central role. FoxP3+ Treg cells are a specialized T cell subset responsible for suppressing excessive immune responses and maintaining immune homeostasis to prevent autoimmunity. FoxP3 expression is essential for the development and function of these cells. A reduction in Treg cell populations has been reported in various pregnancy-related pathologies.

In this study, we investigated the distribution of FoxP3+ cells in the placentas of hypothyroid and healthy rats and evaluated the effect of melatonin on this distribution. Four groups were established: control, hypothyroid (0.05% PTU), melatonin (10

mg/kg), and hypothyroid + melatonin. All treatments were administered via drinking water. Rats were mated, and placentas were collected via cesarean section on gestational day 19.

To detect FoxP3+ cells in the tissue, immunohistochemistry (IHC) was performed using antibodies against FoxP3. To evaluate trophoblast differentiation, IHC with cytokeratin-7 (CK7) was also conducted. Additionally, histomorphological changes in the placenta across the groups were assessed using hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Histochemically, an increased thickness of the basal zone observed in the hypothyroid group was reduced with melatonin administration. Glycogen cell clusters were increased in the hypothyroid group. Vascularity assessments indicated increased vascularization in both the melatonin and hypothyroid + melatonin groups.

According to IHC analysis, FoxP3 expression showed a decreasing trend in the hypothyroid group and an increase in the melatonin group. A significant difference was found between the hypothyroid and melatonin groups. CK7 expression was reduced in the hypothyroid group, although the difference was not statistically significant.

In conclusion, FoxP3+ cells were found to be decreased in the placenta under maternal hypothyroidism and increased with melatonin administration. These findings suggest that melatonin may help restore fetomaternal immune tolerance disrupted by hypothyroidism.

To our knowledge, this is the first study to demonstrate the combined effect of hypothyroidism and melatonin on placental FoxP3+ cells. Further studies are needed to explore the potential use of melatonin in hypothyroid pregnancies and the role of FoxP3 in fetomaternal immune tolerance.

Keywords: Maternal hypothyroidism, placenta, Treg, melatonin, Forkhead family transcription factor3, FoxP3, CK7

1.GİRİŞ VE AMAÇ:

1.1.Problemin Tanımı ve Önemi

Plasenta, anne ile fetüs arasındaki biyomoleküler etkileşimi düzenleyerek hem maternal sağlığı korur hem de fetal büyüme ve canlılığı destekler. Bu organ, maternal-fetal madde alışverişini gerçekleştiren; aynı zamanda fetomaternal antijenlere karşı maternal immün toleransı sağlayan benzersiz ve geçici bir yapıdır. Fonksiyonları arasında oksijen ve besin taşınımı; metabolik atıkların uzaklaştırılması; hormonların (hCG, progesteron, östrojen, hPL vb.) sentezi ile fetüsün nöroendokrin gelişiminin desteklenmesi yer alır. (1) (2) (3)Bu özellikleriyle fetal gelişme ve maternal sağlık arasında karmaşık ve uyumlu bir biyolojik dengeyi sürdürür.

Tiroid bezi, metabolik süreçlerin düzenlenmesi, normal büyüme, gelişme ve homeostazın sürdürülmesi açısından temel bir endokrin organdır. Bu bez, triiyodotironin (T3), tiroksin (T4) ve kalsitonin olmak üzere üç ana hormon sentezler. T3 ve T4 hormonları, özellikle fetal ve postnatal dönemde merkezi sinir sistemi gelişimi, kardiyovasküler sistemin düzenlenmesi, protein ve lipid metabolizması gibi yaşamsal fizyolojik süreçlerde aktif rol oynar. (4) (5) Tiroidin parafoliküler (C) hücrelerinden salgılanan kalsitonin ise kanda kalsiyumun ve fosfatın homeostazını korur ve osteoklast aktivitesini inhibe eder.(6)

Tiroid hastalıkları, üreme çağındaki kadınlarda diyabetten sonra en sık görülen ikinci endokrin bozukluktur.(7) Bu bozukluklar hem fertiliteyi azaltabilir hem de gebelik sürecinde anne ve fetüs sağlığını olumsuz etkileyebilir. Gebeliğin ilk trimesterinde, plasentadan salgılanan insan koryonik gonadotropini (hCG), TSH reseptörlerine benzerliği nedeniyle tiroid bezini uyarır. Bu durum T_3 ve T_4 düzeylerinde hafif artışa, TSH düzeyinde ise geçici düşüşe neden olur. İlerleyen haftalarda hCG düzeyleri azaldıkça bu etki genellikle ortadan kalkar, ancak bazı bireylerde bu fizyolojik yanıt patolojik tiroid disfonksiyonuna yol açabilir. (8)

Tiroid hormonları (T_3 ve T_4), gebeliğin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi ve fetal gelişimin optimal seviyede gerçekleşmesi için vazgeçilmez bir rol oynar. Çalışmalar, maternal hipotiroidinin erken gebelik kayıplarının önemli risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır. (9) Ayrıca, bu hormonal dengesizliklerin preeklampsi, intrauterin büyüme geriliği (IUGR), anemi, kardiyak fonksiyon bozuklukları, plasental dekolman,

düşük doğum ağırlığı, fetal guatr ve merkezi sinir sistemi gelişimindeki çeşitli bozukluklar gibi ciddi gebelik komplikasyonlarına yol açabileceği bilinmektedir. (10)

Başarılı bir gebelik için, yarı allojenik fetüsün anne immün sistemi tarafından reddedilmemesi amacıyla maternal immün toleransın sağlanması esastır. Bu tolerans, fetüs ile annenin en yakın temas noktası olan feto-maternal ara yüzde kurulur. Burada, immün toleransta kritik rol oynayan FoxP3+ regülatör T (Treg) hücreleri öne çıkar. (11) FoxP3, Treg hücrelerin belirteci olup bağışıklık yanıtının baskılanmasında görev alır. FoxP3 fonksiyonundaki bozukluklar, immün toleransın bozulmasına, otoimmün hastalıklara ve fetüs reddine yol açabilir. Preeklampsi, tekrarlayan düşükler ve gestasyonel diyabet gibi durumlarda FoxP3 ifadesinin azaldığı görülmüştür. (12) (13)

Melatonin, vücutta başta epifiz bezi tarafından salgılanan, güçlü bir antioksidan ve düzenleyici bir hormon olarak bilinir. Gebelikte melatonin, anne ve fetüs için önemli roller oynar. Plasenta, lokal melatonin üretebilir. Bu, plasentanın oksidatif strese karşı korunmasına yardımcı olur. Plasentada serbest radikallerin neden olduğu hasarı azaltarak oksidatif stresi dengeler.(14) Bu sayede plasenta fonksiyonlarının sağlıklı devamını destekler. Maternal immün sistemi düzenleyerek fetüsün bağışıklık toleransını sağlamaya katkıda bulunabilir. Melatonin, plasental hücre proliferasyonunu ve sağlıklı gelişimini destekler. (15) Ayrıca plasental kan akışını düzenleyerek fetüsün beslenmesini optimize eder. (16)

1.2.Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada sağlıklı, hipotiroidili ve melatonin desteği almış sıçanlardan elde edilen plasentalarda FoxP3+ hücrelerin plasenta dokusundaki dağılımını araştırarak feto-maternal immun toleransa ve maternal hipotiroidi patogenezine etkisini bulmayı ve bu etkiye melatoninin iyileştirici etkisi olup olmayacağını araştırmayı amaçladık.

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

1. Maternal hipotiroidi durumunda FoxP3 ifadesi kontrole kıyasla azalmakta ve bu durum feto-maternal immün toleransın olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır.

2. Melatonin fetomaternal immun toleransa olumlu katkı sunmakta ve immunmodülatör etkisi sebebiyle hipotiroidili plasentalarda Foxp3 ifadesinin artmasına yol açmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tiroid Bezi

Tiroid bezi, tiroid ve kalsitonin isimli iki hormonun üretilmesinden sorumlu olan endokrin bir organdır. İsthmus ile birleştirilen 2 lobdan oluşur. Kelebek şekillidir ve trakeanın önünde yerleşiktir. Yetişkinlerde ortalama 15-25 gr ağırlığındadır. (17) Ancak ağırlığı hastalık durumuna ve vücut ağırlığına göre değişebilmektedir.

2.1.1.Tiroid bezi histolojisi

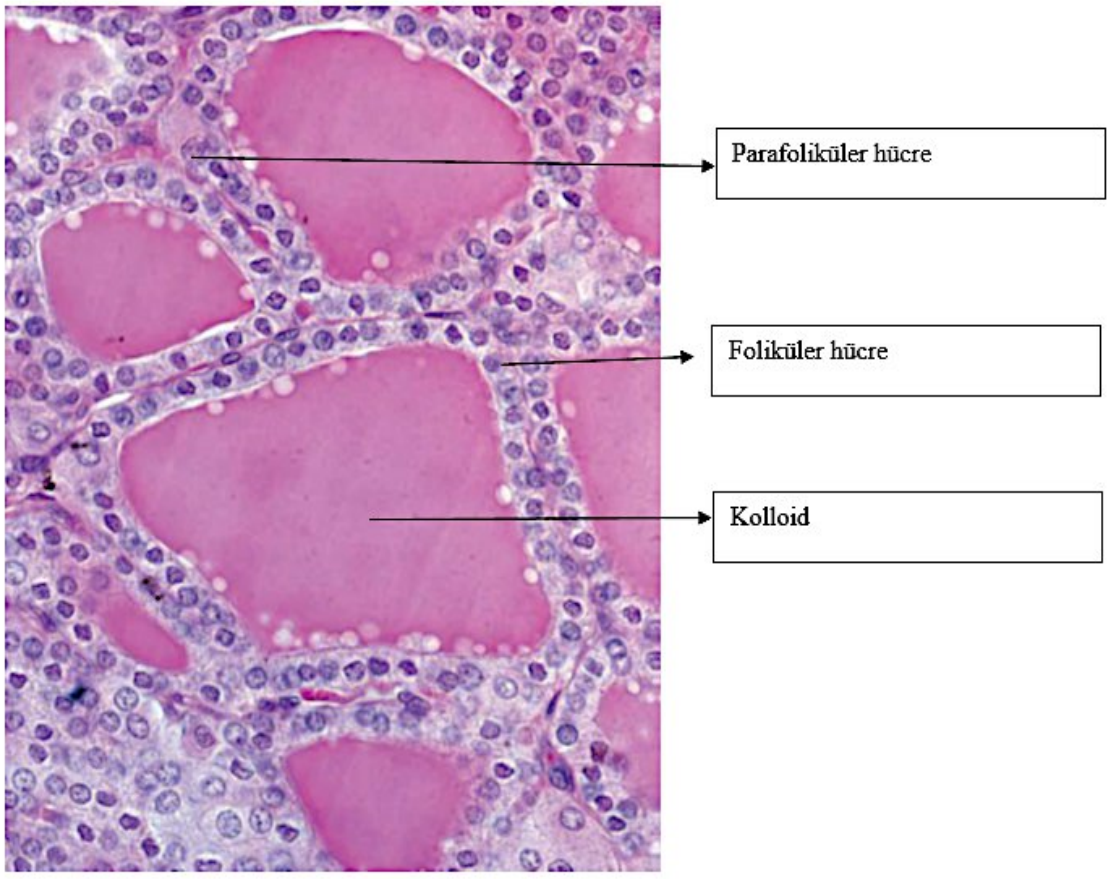
Tiroid bezi fibroelastik bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile sarılıdır. Bu kapsülden organ içerisine uzanan septalar organı farklı büyüklükte ve düzensiz loblara ayırır. (18) Tiroid bezi yapısal ve fonksiyonel olarak kolloid denilen jel benzeri madde ile dolu tiroid foliküllerinden oluşmaktadır. Folikül duvarı lümene salgı yapan tek katlı kübik ya da alçak prizmatik yapıda folikül epiteli ile döşelidir. Folikül epitel hücrelerinin lümene bakan apikal yüzeyleri kolloid ile temas ederken, ekstrafoliküler boşluğa bakan bazal yüzeyleri bazal lamina üzerinde uzanmaktadır. (19) Folliküllerin etrafı geniş kapiller ağ bağlantıları ile sarılıdır.

Foliküler epiteli 2 tip hücreden oluşmaktadır:

Foliküler Hücreler (Esas Hücreler) : Tiroid hormonları olan T3 ve T4'ün üretilmesinden sorumludur. Foliküler hücrelerin boyut ve şekilleri bezin aktiflik durumuna göre değişebilmektedir. Tiroid bezinin inaktif olduğu durumlarda follikül hücreleri yassılaşmış bulunurken, aktif sekresyon olan folliküllerde yüksek prizmatik şekillidir. H&E boyalı preparatlarda hafif bazofilik sitoplazmaları ve bir ya da daha fazla belirgin nükleolusları bulunan hücreler şeklinde görülürler. Follikül epitel hücrelerinde belirgin bir kutuplaşma mevcuttur. Nükleusu bazalde yerleşirken diğer organelleri sitoplazmaya dağılmış durumdadır. Golgi aygıtı supranükleer konumdadır. Tiroid bezinden salgılanan hormonları taşıyan kolloid proteinler; enzimlerden ve glikoproteinlerden oluştuğu için genellikle asidofiliktir ve PAS-pozitif reaksiyon verirler. Uygun boyama yöntemleri kullanılarak lipid damlacıkları ve PAS+ damlacıklar saptanabilir. Ultrastrüktürel düzeyde follikül hücreleri yaygın olarak hem absorbtif hem sekretuar hücrelerle ilişkili organelleri bulundurmaktadır. Hücrelerin apikal ucunda tipik bağlantı kompleksleri ile yüzeyinde düzensiz kısa mikrovillusları

bulunur. Hücrelerin bazal kısmında çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum kesitleri vardır. Apikal sitoplazma kısmında morfolojik olarak Golgi aygıtı ile ilişkili veziküllere benzer küçük veziküller ile kolloid rezorbsiyon damlacıkları olarak tanımlanan çok sayıda endostatik veziküller ve lizozomlar yer almaktadır.

Parafoliküler (C) hücreler: Folikül epitelinin periferinde yer alırlar ve follikül bazal laminasının iç kısmında uzanırlar. Bu hücrelerin folikül lümeni ile ilişkisi yoktur. Bu hücreler kalsiyum metabolizmasını düzenleyici hormon olan kalsitonini salgılarlar. H&E boyalı preparatlarda soluk görünümdedirler ve tek tek hücreler ya da küçük hücre grupları şeklinde bulunurlar. İnsan parafoliküler hücrelerinin ışık mikroskobu ile tanınması zordur. Elektron mikroskobik olarak 60-550 nm aralığında çaplarda çok sayıda küçük salgı vezikülleri ve belirgin Golgi aygıtı bulundururlar.



Şekil 1: Tiroid bezi histolojisi (20)

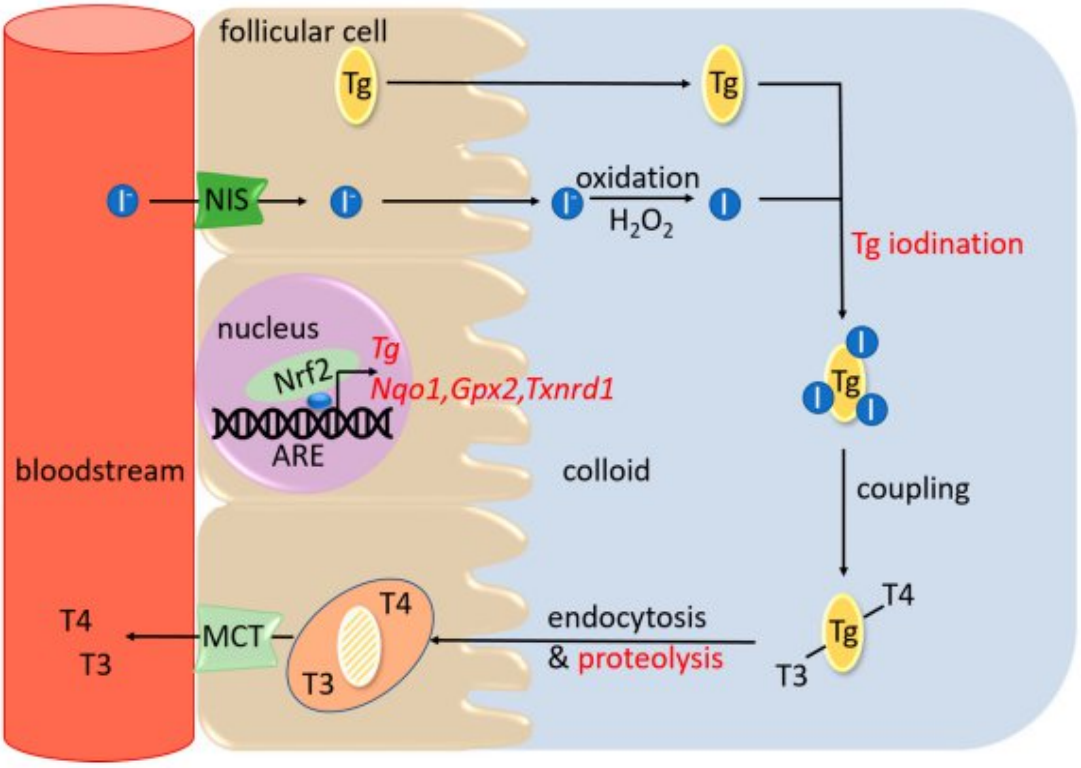
2.1.2.Tiroid Hormonlarının Sentezi ve Salgılanması

Organizmada doğum öncesinden yaşlılığa kadar metabolik süreçleri etkileyen tiroid hormonlarının sentezinde iyot elementi esas rol oynamaktadır. İyot alımının kısa vadede göstergesi idrarda iyot konsantrasyonuyken, birkaç aylık uzun vadede göstergesi tiroglobulindir. (21)

Başlıca tiroid hormonları olan Triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4) iyodine edilmiş tirozinlerdir. Tiroksin dört, triiyodotironin üç iyot elementi taşımaktadır. Tiroid bezinden salınan hormonların yaklaşık %93'ü T4, %7'si ise T3 formundadır. Dolaşımda bulunan T4'ün hemen hepsi dokularda T3'e dönüştürülür. (22)

Yetişkin insanda tiroid bezinden günlük yaklaşık 80 µg tiroksin salgılanmaktadır. Tiroid hormonlarının dengede kalabilmesi için diyetle günlük 100 ila 150 µg arasında iyot alımı yeterli olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde günlük iyot tüketimi çok daha fazladır. (23)

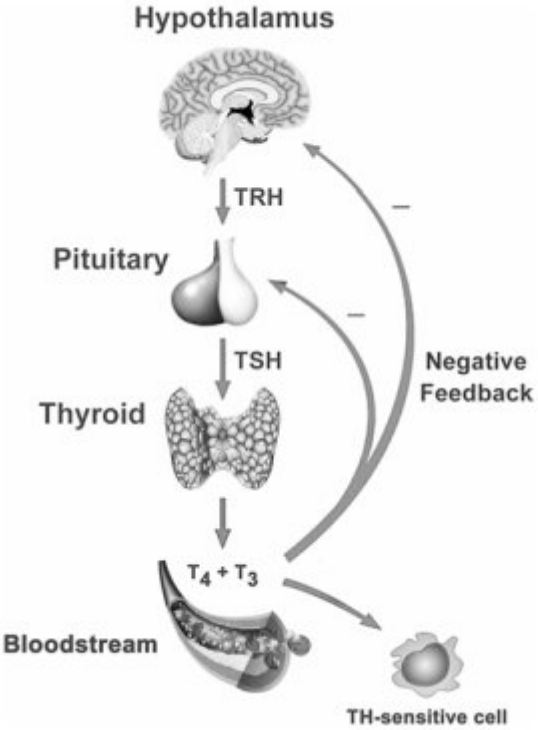
Hormon üretiminde ilk basamak, kandan iyodürün tiroid folikül hücrelerine alınmasıdır. Bu işlem Sodyum - İyot Simporter (NIS) adlı özel taşıyıcı protein aracılığıyla aktif taşıma ile gerçekleşir ve ATP gerektiren bir basamaktır. (24) Hücre içerisine alınan iyodür, apikal membrandan taşınarak kolloid boşluğuna ulaştırılır. Tiroid peroksidaz (TPO) enzimi sayesinde okside edilir ve aktif iyodine (I2) dönüşür. İyodin Tiroglobulin adlı proteinin tirozin halkalarına bağlanır ve monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) bileşikleri oluşur. (25)Aynı tiroglobulin üzerindeki MIT ve DIT molekülleri bir araya gelerek; iki DIT'in birleşmesiyle T4, bir MIT ve bir DIT'in birleşmesiyle T3 hormonları meydana gelir. (26)Tiroglobuline bağlı olarak kolloid içerisinde depolanan T3 ve T4, ihtiyaç halinde endositozla geri alınarak lizozomal enzimlerle serbest hale getirilip dolaşıma verilir. Serbest T3 ve T4, kanda Tiroksin Bağlayıcı Globulin (TBG) gibi taşıyıcı proteinlere bağlanarak taşınır. (27)



Şekil 2 : Tiroid hormonu sentezi (28)

2.1.3.Tiroit Hormonu Salgısının Düzenlenmesi

Tiroid fonksiyonlarını düzenleyen temel mekanizma negatif geri besleme yolağıdır. Hipotalamustan salgılanan TRH (tirotropin salgılatıcı hormon) ön hipofizden TSH (tiroid stimülan hormon) salınımını uyarır. TSH uyarımı tiroid bezinde iyot alımını, tiroglobulin oluşumunu, tiroid peroksidaz enzim aktivitesini ve T3 ve T4 hormonlarının sentez ve salgılanmasını artırır. Dolaşımdaki T3 ve T4 seviyesi yeterli olduğunda; hipotalamus ve hipofiz üzerine negatif geri bildirim yaparak TRH ve TSH salınımını ve hücrelerin bunlara yanıt verme düzeylerini baskılar. (29) (30)



Şekil 3: Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı (31)

2.1.4.Tiroid Hormonları Etki Mekanizması

Tiroid hormonları neredeyse tüm dokularda etkilidir ve normal büyüme, gelişme ve metabolizmanın devamı için kritik düzenleyicilerdendir. Bedensel ve ruhsal gelişimi uyarır. Kalp atış hızını ve gücünü artırır. (32) Vücutta karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında düzenleyici görevi vardır. (33) (34) Ayrıca hücresel solunum, embriyonik gelişme, doku farklılaşması ve olgunlaşması, termoregülasyon gibi çeşitli süreçleri etkilemektedir. Fetüste erken beyin gelişimi, kemik olgunlaşması ve somatik büyümede kritik rol oynayan etkilere sahiptir.(35)

Hücre bazında bakıldığında tiroid hormonları mitokondri sayısını ve büyüklüğünü, Na+/K+ ATPaz pompa aktivitesini artırır. Bazal metabolizma hızında artışa sebep olur. Yağ asidi oksidasyonu ve mitokondriyal solunumu uyarır(36)

Çocuklarda büyüme ve gelişme üzerine belirgin etkisi vardır. Hipotiroidisi olan çocuklarda büyüme geriliği görülürken, hipertiroidisi olan çocuklarda hızlı büyüme

olur ancak epifizleri erken kapandığı için boy kısalığı görülür. Beyin gelişiminde de prenatal ve postnatal dönemde önem arz etmektedir. (37) (38)

2.1.5.Gebelikte Tiroid Fonksiyonları

Normal gebelik boyunca maternal tiroid fonksiyonu belirgin farklılıklar gösterir. İlk trimesterde plasenta tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin (hCG) , yapısal benzerliği nedeniyle Tiroid uyarıcı hormonu (TSH) uyarır. Bunun sonucunda Tiroid hormonları artarken, TSH seviyesi düşme eğilimi gösterir. (39) (40) İkinci trimesterde ise serum tiroid hormon düzeyleri düşer. (41)

Gebelikte glomerüler filtrasyon hızı artar ve böbreklerden iyot atılımı artışı olur. Fetüsün de hormon üretmeye başladıktan sonra artan iyot ihtiyacı sebebiyle plasentadan fetüse iyot transferi gerçekleşir. Gebelik sırasında fizyolojik değişikliklerden dolayı dolaşımdaki iyot miktarı azalır ve tiroid bezi %40 büyür. (42) Tiroksin (T4) ve Triiyodotironin (T3) sentezinde artış görülür. Bu değişiklikler biyolojik adaptasyon olup doğum sonrası normale döner. Gebelik öncesi yeterli olan 100 – 150 µg iyot alımı, gebelikle birlikte iyot ihtiyacı arttığı için 220-250 µg'a çıkmaktadır. (43) (44)

Annede önceden var olan riskler veya çevresel nedenler varsa bu etki bozulabilir ve gebelik kaybı dahil birçok olumsuz sonuca yol açabilir.

Fetüs başlangıçta plasentadan geçen annenin tiroid hormonları ile gereksinimini karşılarken; 10.-12. Haftadan sonra fetal tiroid bezinden sentezlenmeye başlayan tiroid hormonlarını metabolizmasında kullanabilmektedir. Fetal gelişimde; özellikle merkezi sinir sistemi gelişiminde tiroid hormonları çok önemli rol oynamaktadır. Maternal ve/veya fetal tiroid eksikliği geri dönüşümsüz entelektüel kapasite eksikliklerine ve nörolojik bozukluklara, MSS hasarlarına, üriner sistem anomalilerine ve üreme sorunlarına yol açabilmektedir. (45) (46)

2.1.6.Hipotiroidi

Hipotiroidizm, teşhisi ve yönetimi kolay ancak tedavi edilmediğinde çok ciddi sağlık problemlerine ve ölüme sebep olabilen yaygın bir tiroid hormon yetersizliği durumudur. (47)

Kliniğinde en yaygın görülen semptomlar yorgunluk, soğuk intoleransı, cilt kuruluğu, nefes darlığı, kilo artışı ve saç dökülmesidir. (48) Hafif demanstan deliryuma ve nöbetlere kadar değişebilen kognitif değişikliklere neden olur. Kadınlarda amenore ve menoraji yapabilmekte; ayrıca plasentada trofoblast invazyonu, plasental vaskülarizasyon ve spiral arter remodeling bozukluklarına sebep olabilmektedir. (49) (50)

Tiroid hastalığı, üreme çağındaki kadınları etkileyen diyabetten sonraki ikinci en yaygın endokrin bozukluktur.(51) ve görülme sıklığı %2 ile %5 arasında değişmektedir. (52) Gebelikte ise belirgin hipotiroidizm prevalansı yaklaşık %0,3-0,5 iken subklinik hipotiroidizm prevalansı %4 ile %17 arasında değişmektedir.(53)

Gebelikte ilk trimesterde serum TSH konsantrasyonlarının 2,5 μU/ml'nin altına, ikinci ve üçüncü trimesterlerde ise 3 μU/ml'nin altına hızla ulaşacak ve sonrasında bu seviyede kalacak şekilde tutulması önerilmektedir. (54) Hipotiroidizm yenidoğanlarda geri döndürülebilir entelektüel kapasite azalmasının en önde gelen nedenidir. (55)

Hipotiroidi sonucunda gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi, plasental abruption, spontan düşük, erken doğum, fetusta gebelik yaşına göre büyük veya küçük olma, intrauterin fetal ölüm, gelişimsel bozukluklar.(52) (55) gibi anne ve bebeği etkileyen komplikasyonlar görülme olasılığı artmaktadır.

Tiroid hormonları plasental hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır ve eksikliğinde plasentada antiinflamatuar ortamın bozulduğu gösterilmiştir. Antiinflamatuar ortamın bozulması fetomaternal immuntoleransı bozarak erken doğum, düşük, preeklampsi gibi gebelik patolojilerine sebep olmaktadır. (56)

2.2.Plasenta

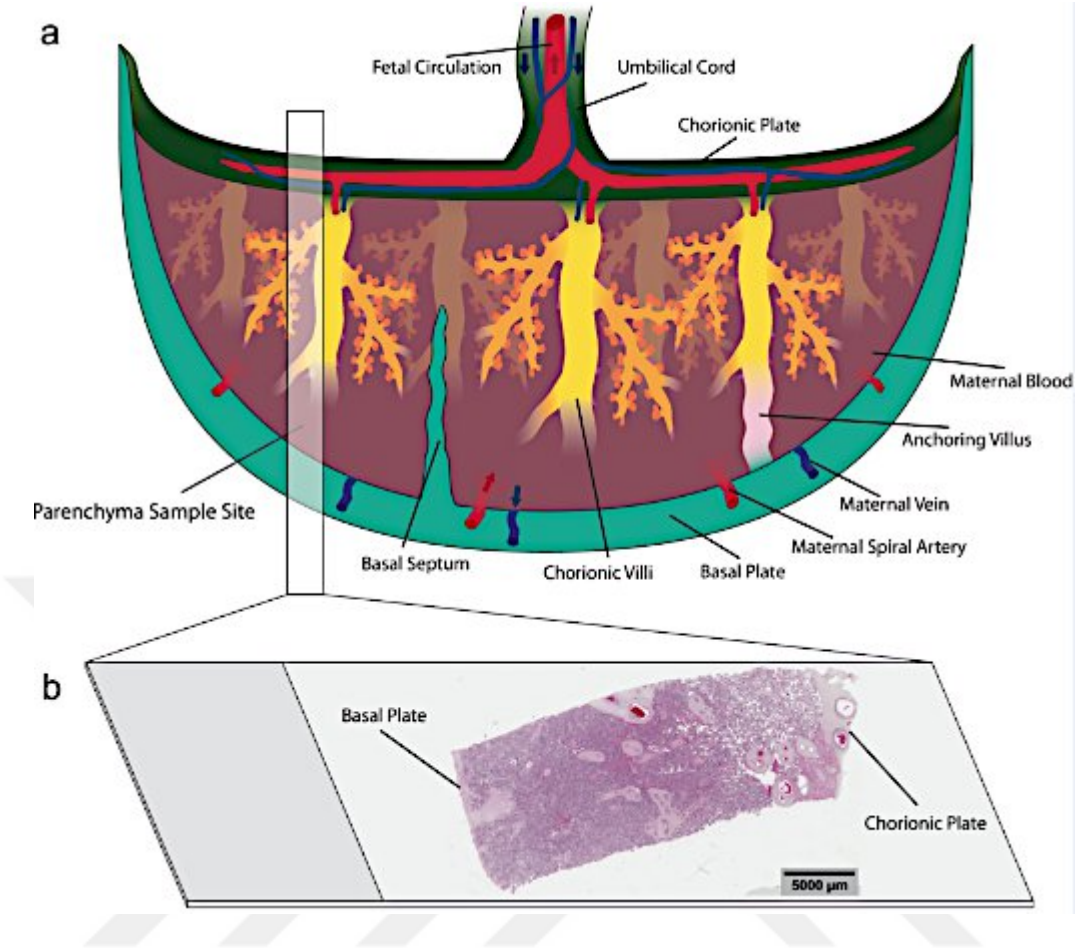
Plasenta; fetüsün canlılığını ve normal gelişimini destekleyen, özelleşmiş, benzersiz ve geçici bir organdır. Anne ve fetüs arasında, her iki tarafın hücrelerinin yakın temasta bulundukları özelleşmiş fetomaternal yüzeyler bulunmaktadır. Bu yüzeyler plasentasyon sayesinde oluşmaktadır. Plasenta anne ile fetüs arasında seçici madde değişimine ve embriyonun beslenmesi, boşaltımı, solunumu, hormon üretimi gibi fizyolojik ihtiyaçlarının karşılanmasına aracılık eder. Aynı zamanda fetal antijenlere karşı maternal intoleranstan ve fetüsün annenin bağışıklık sisteminden korunmasından da sorumludur.(57) (58) (59)

Term bir plasenta disk şeklinde ortalama 500-600 gram ağırlığında, 15-25 cm çapında ve 2-3 cm kalınlığındadır.(60)

2.2.1.Plasenta Gelişimi ve Yapısı

Plasenta oluşumunda hem maternal hem fetal dokular bir araya gelerek plasentayı oluştururlar. Plasentanın iki yüzü vardır: Fetal yüz ve Maternal yüz

Fetal yüzü koryonik plak olarak adlandırılır ve buradan umblikal kord çıkar. Maternal yüzü ise desiduadan gelişir, bazal plak olarak adlandırılır ve kotiledonlardan oluşur. Ancak çoğu zaman maternal ve fetal kısımlar iç içe geçmiş şekilde gözlenmektedir. (61)



Şekil 4 : Sağlıklı bir term plasentanın şematik diyagramı. (62)

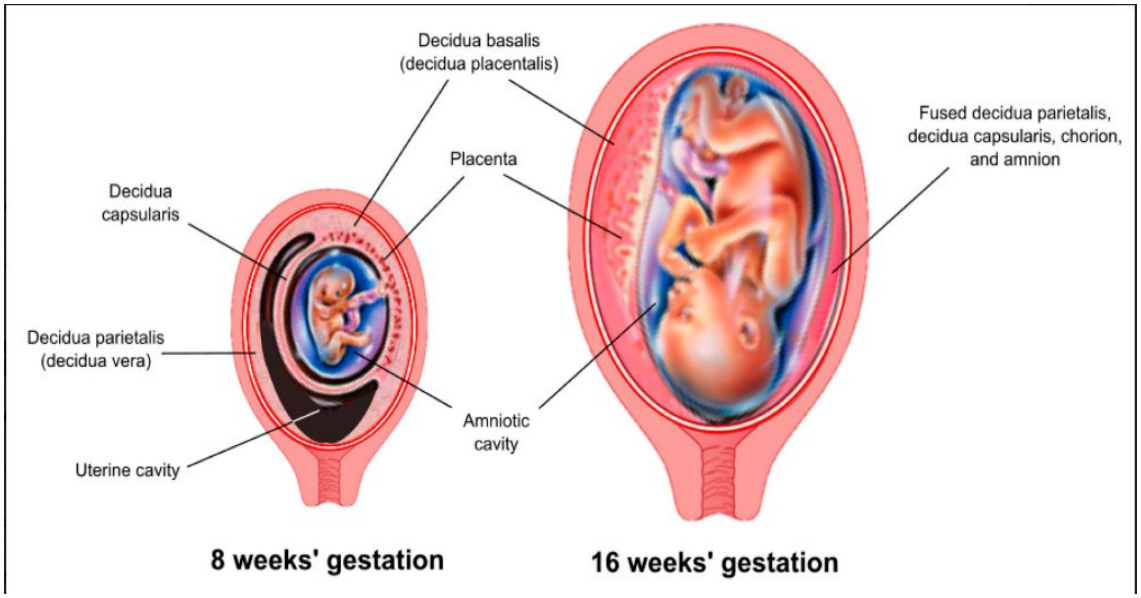
2.2.1.1.Desidua

Endometriyumda implantasyona hazırlık için stromal desidualizasyon adı verilen değişiklikler meydana gelir. Küçük iğ şekilli endometrial stromal hücreler lipit ve glikojenle dolup genişler, poligonal şekilli desidua hücrelerine dönüşürler. (63) Spiral arterlerde ve endometriyal bezlerde genişleme görülür. Genişleyen bezlerin salgılarında artış başlar. (64)

Desidualizasyon plasenta oluşmadan önce embriyoyu destekler, endometriyuma trofoblast invazyonunu ve doku homeostazisini kontrol eder. İnflamatuar sitokinlere ve oksidatif strese karşı koruma sağlar ve bağışıklık toleransında önemli mekanizmaları kontrol eder. Plasentanın oluşumunu düzenler. (65)

Blastosistin implante olmasıyla birlikte plasenta oluşmaya başlar.
Desidualizasyon ve implantasyondan sonra endometriyumda 3 bölge oluşur: (66) (67)

a) **Desidua Bazalis**: Kan damarları ve bezlerden zengin, embriyonun implante olduğu kısımdır. Plasentanın maternal kısmını oluşturur.
b) **Desidua Kapsülaris**: Embriyonun uterin lümene bakan tarafındadır, desidua pariyetalis ile devam eder. İmplante olan embriyoyu sarar.
c) **Desidua Pariyetalis**: Gebelikte uterus lümeninin implantasyon bölgesi dışındaki kısımlarını sarar. Gebeliğin başında dar bir uterus boşluğuyla birbirinden ayrılan Desidua Kapsülaris ve Desidua Pariyetalis fetüsün büyümesiyle birlikte birbirleriyle kaynaşırlar ve uterin kavite kapanır (68)



Şekil 5: Plasenta Desidua Görünümleri (69)

2.2.1.2.Bazal Plak

Bazal plak fetal yüzlerin maternal kısımla ilişkide bulunduğu en önemli bölümdür ve intervillöz aralığın maternal kısmını oluşturur. Laküner sistemi endometriyal

dokulardan ayıran kısım trofoblastik kabuktur. Trofoblastik kabuk, sitotrofoblast hücrelerinden oluşur ve endometriyum bağ dokusu ile interdigitasyonlar yapar. Trofoblastik kabuk bazal plağın öncülüdür. Gebeliğin devamında trofoblastik kabuk ve endometriyumu ayıran sınır kaybolur, artık bazal plak olarak adlandırılır. (70) (71)

Bazal plağı oluşturan yapılar şu şekildedir:

- ✓ **İç yüzey:** İntervillöz aralığa bakan kısımdır. Sinsityotrofoblastik hücrelerden oluşur. Bu hücreler devamlılık göstermez, bulunmadığı yerleri hücreler arası matriks yaprağı doldurur.
- ✓ **Esas tabaka:** Sitotrofoblastlar, fibrinoid, maternal bağ doku, desidual hücreler, makrofajlar gibi yapılardan oluşur.
- ✓ **Nitabuch'un fibrinoid tabakası:** Hücreler arası matriks yaprağıdır. Tam bulunduğu alanlarda maternal-fetal sınırı belirler ancak çoğu yerde bütün halde bulunmaz ve dokular birbiri ile temas ederler.
- ✓ **Ayrılma zonu:** En derin tabakadır ve desidual hücrelerden oluşur. Terme doğru nekroza uğrarlar. Doğum sırasında plasentanın plasental yataktan ayrılması gerçekleşir.

2.2.1.3.Koryonik Plak

İntervillöz alan ile direkt temas halinde olan tabakadır. İmplantasyondan sonra sinsityotrofoblastlar ile maternal kan damarları arasında laküna ismi verilen düzensiz boşluklar oluşmaya başlar. Lakünalar intervillöz boşluk öncülünü oluşturmak üzere birleşirler. Başlangıçta sadece sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlardan oluşan koryon, ekstraembriyonik mezenşimin de gelişip yüzeyi kaplamasıyla üç tabakalı hale gelir. (72)

2.2.1.4.Koryonik Villuslar

Embriyo gelişimin ilk haftalarında difüzyon ile beslenirken, hızlı büyüme sebebiyle daha çok besin ve gaz alışverişi ihtiyacı oluşur. Uteroplasental dolaşımın gelişmesiyle bu ihtiyacı karşılanır. (73)

a) Laküner Evre: İmplantasyonun 8.-9. gününde sinsityotrofoblastlar arasında yer yer düzensiz boşluklar şeklinde lakünalar oluşur. Lakünalara başlangıçta uterin sıvı dolar

ve embriyo beslenir. Sinsityotrofoblastlar endometriyum derinliklerine ilerler ve damar duvarını yıkar. Böylece lakünalar içerisine maternal kan dolmaya başlar.

b) Primer Villus: 11-13. günlerde sinsityotrofoblastların yaptığı trabekülleri sitotrofoblastlar penetre eder ve parmaksı çıkıntı şeklinde primer villusları oluştururlar. Embriyonel kutupta oluşmaya başlayan primer villuslar sayılarını artırarak karşı kutba doğru yayılırlar.

c) Sekonder Villus: 15-16. günlerde primer villusların içine alttaki ekstraembriyonik mezoderm hücreleri girer ve sekonder villuslar oluşur. Yani sekonder villusta sitotrofoblastlar, sinsityotrofoblastlar ve mezoderm hücreleri bulunur.

d) Tersiyer Villus: 18.-20. günde sekonder villusların ortasındaki mezodermal hücreler mezodermal bağ dokuya ve küçük kan kapillerlerine farklanır. Kan kapillerlerinin oluşmasıyla artık tersiyer villuslar oluşmuş olur. Bu damarlar sonrasında embriyonik kan damarları ile bağlanırlar. Tersiyer villus artık fetal dolaşımın başladığı fonksiyonel olgun villus çeşididir(74) (75) (76)

2.2.1.5.Plasental Dolaşım

Başarılı bir gebelik için uteroplasental dolaşım çok önemlidir. İnvaziv sitotrofoblast hücreleri sitotrofoblastik kabuğu terk eder ve spiral arterleri istila ederler. Spiral arterlerin normal hücresel yapısının yerini alır ve ekstravilloz trofoblast (EVT) hücrelerine dönüşürler. Spiral arterler genişler ve yeniden şekillenir. Kan düşük basınca sahip bu arterlerin açık uçlarına doğru akmaya başlar. EVT invazyonu yeterli ve dengeli şekilde gelişmezse spiral arter remodelingi dolayısıyla uteroplasental vaskülarizasyon yetersiz kalır. Preeklampsi, IUGR, düşük gibi gebelik patolojileri görülür. (77)

Uteroplasental dolaşımın tam olgunlaşması birinci trimesterin sonuna doğru olmaktadır. Plasentanın yapı ve fonksiyonu değerlendirildiğinde maternal ve fetal dolaşım olarak iki kısımda incelenmektedir.

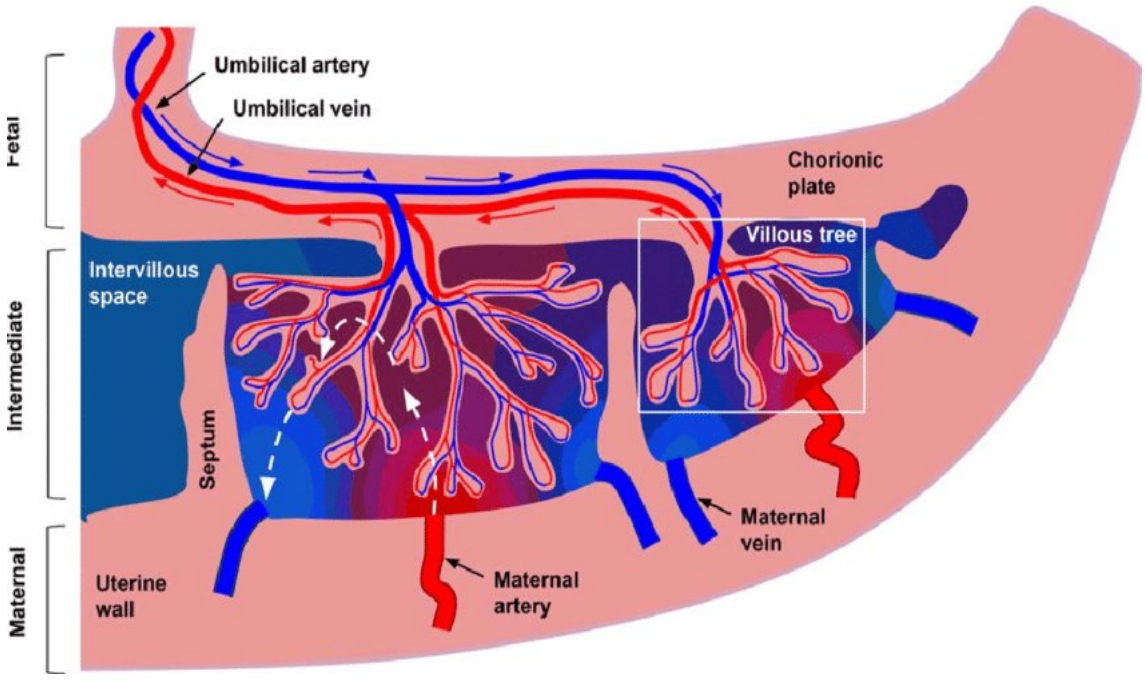
Fetal Dolaşım:

Fetüsü plasentaya bağlayan yapı umblikal korddur ve ortalama 2 cm çapta, 50-70 cm uzunluktadır. Umblikal kord Wharton jeli içerisinde bulunan iki umblikal arter,

bir umblikal venden oluşmaktadır. Fetüsün oksijenden fakir kanı umblikal arterler ile plasentaya getirilir. Umblikal arterler villusların içerisinde yoğun bir arteriovenöz kapiller sistem oluştururlar. Böylece maternal ve fetal kan çok yakın hale gelirler ancak birbirlerine karışmazlar. Maternal ve fetal kan arasında besin ve gaz alışverişi gerçekleşir ve oksijenden zengin kan umblikal ven aracılığı ile fetüse taşınır. (78) (79)

Maternal Dolaşım:

80-100 adet spiral arter ile bazal plaktan plasentaya giren maternal kan intervillöz aralığa ulaşır. Anneden gelen kanın basıncı intervillöz aralıktan çok daha yüksek olduğu için villusların duvarı maternal kan ile yıkanır. İntervillöz aralığa yaklaştığında kanın basıncı azalır ve besin ve gaz alışverişine olanak sağlar. İntervillöz aralıkta dolaşan maternal kan bazal plaktaki venöz boşluklardan geçerek maternal sisteme dahil edilir. (80) (81)



Şekil 6 : Uteroplasental dolaşım (82)

Tam gelişmiş bir plasentada, plasental kan akışı ortalama 600-700 ml/dakikadır ve intervillöz aralıktaki kan dakikada üç- dört kez yenilenmektedir. (83) Birbiri ile çok yakın temasta olan fetus kanı ile maternal kanın karışmasını plasental membran engellemektedir. Bu membran aslında feto-maternal değişimin arayüzü ve kontrolcüsü olarak görev yapar. (84)

Plasental bariyer erken gebelik döneminde şu yapılardan oluşmaktadır:

- Sinsityotrofoblastlar
- Sitotrofoblastlar
- Trofoblastik bazal membran
- Villöz bağ doku
- Fetal kapiller endotelinin bazal laminası
- Fetal kapiller endoteli

Madde alışveriş hızını artırmak için 16.haftadan itibaren fetal damarlar sinsityotrofoblastlara doğru yaklaşır ve difüzyon mesafesi kısalır. Sitotrofoblastik tabaka kaybolmaya başlar ve 20.haftada neredeyse tamamı yok olur. (85)

Olgun plasental bariyerde:

- Sinsityotrofoblastlar
- Trofoblastik bazal membran
- Fetal kapiller endotelinin bazal laminası
- Fetal kapiller endoteli bulunmaktadır.

2.2.2.Plasentanın Fonksiyonları

Plasenta fetüs için gerekli olan besin ve oksijenin maternal damarlar aracılığıyla fetüse ulaşmasını sağlar. Madde taşınımı basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport ile gerçekleşmektedir. (86)

Östrojen, progesteron gibi steroid hormonlar, hCG, hPL, hCT gibi protein hormonlar, iştahı düzenleyen leptin ve ghrelin gibi hormonlar, adiponektin ve GH gibi metabolizmayı düzenleyen hormonlar plasentadan sentezlenmektedir. (3) (87)

Plasenta, genetik olarak anneye yabancı olan fetüsün anne immün sisteminden korunmasını annenin bağışıklık sistemini regüle eden sinyaller sağlayarak ve fetüsün tehlikeli uyarılara maruz kalmasını önleyerek gerçekleştirir. Böylelikle fetüsün reddi önlenir ve başarılı gebeliğin devamı sağlanır.(88) (89)

2.2.3.Sıçan Plasentası

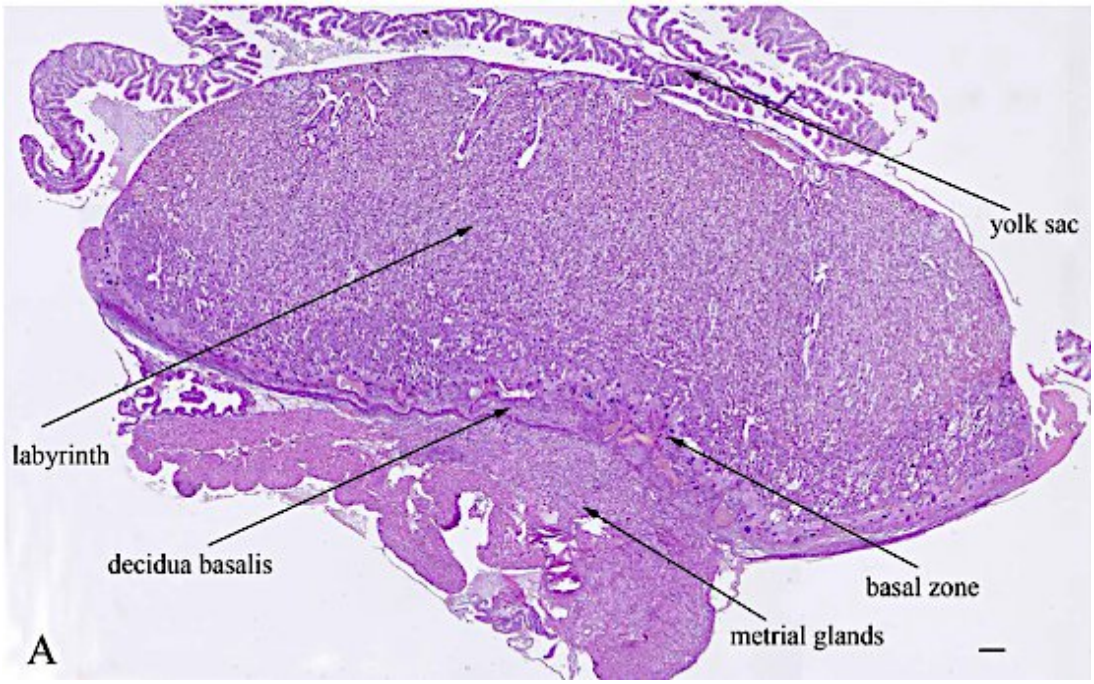
Ortalama 19-21 gün kadar süren kısa gebelik süreleri ve bakım kolaylığı sebebiyle sıçanlar sıklıkla üreme çalışmalarında kullanılmışlardır. (90)

İmplantasyon aşamasında insanlarla farklılıkları olsa da desidualizasyon, uterus yeniden şekillenmesi ve fetoplasental gelişim gibi araştırmalar için kullanılması uygun bulunmuştur. Yetişkin bir sıçan ortalama 200-400 gram ağırlığındadır ve uterusları çift boynuzludur. (91) (92)

İnsan ve sıçan plasentasındaki en önemli ortak özelliklerden biri, ikisinde de hem maternal hem embriyo kaynaklı hücreler bulunmasıdır. Yine ikisinde de gebelik süreci üç trimesterden meydana gelir. Sıçanlarda gebelik yaklaşık üç haftadır ve olgun plasenta yapısına ortalama 12.günde ulaşır. (93)

Olgun sıçan plasentası belirgin şekilde üç tabakalı görülmektedir: (94)

- Labirent Zon (insanda fetal plasenta)
- Bağlantı (Bazal) Zonu (insanda bazal plak)
- Maternal Desidua Zonu (insanda plasental yatak)



Şekil 7: Sıçan plasentası histolojik yapısı (95)

2.2.3.1.Labirent Zon:

Labirent zon 9.gebelik gününde oluşmaya başlar ve insan fetal plasentasının fonksiyonel analoğudur. Maternal ve fetal kanın birbirlerine en yakın temasta olduğu bölüm olduğu için besin ve gaz değişiminin çoğu burada gerçekleşir. Üç tabakadan oluşan trofoblast hücreleri (koryon plağı) ve embriyo kökenli fenestralı kapiller bulunmaktadır. Maternal boşlukları ve fetal damarları ayıran trofoblast hücrelerinin 3 tabakası şu şekildedir: 1. tabaka maternal kan ile doğrudan temasta bulunan sitotrofoblast hücreleri, 2. ve 3. tabaka ise sinsityotrofoblastlardan oluşur. Trofoblast hücreleri villusları oluşturur. Fetal arter ve venlerden oluşan göbek kordonu da koryon plağına katılır. (96)

Diğer plasenta bölümleri ilerleyen gebelik dönemlerinde gerilerken, labirent zon ana plasenta bölümü haline gelir.

2.2.3.2.Bağlantı Zonu (Bazal Zon):

İnsan bazal plağının fonksiyonel analoğudur ve labirent bölümünün maternal kısmını sınırlar. Sadece maternal damarlar bulunmaktadır, fetal kan damarı içermez. (58)

Bağlantı zonunda üç farklı hücre çeşidi bulunmaktadır.

1) Spongiotrofoblast hücreleri: Spongiotrofoblastlar bağlantı zonunda bulunan esas hücrelerdir. Trofoblastik dev hücrelerin hemen alında bulunmaktadır. Bağlantı zonunda labirent zonla direkt ilişkide olan hücrelerdir. Maternal kan damarlarını döşemektedir.

2) Trofoblastik dev hücreler: Trofoblastik dev hücreler maternal-plasental ara yüzde yerleşik bulunan multifonksiyonel hücrelerdir. Plasentanın önemli endokrin hücreleridir. Prolaktin ailesine ait hormon/sitokin grubu sentezler. (97) (98) Gebeliğin başında embriyonun implantasyonunda rol alır, uterusun desidualize olmasını düzenler. İlerleyen gebelik dönemlerinde maternal fizyolojiyi ve vaskülarizasyonu düzenleyen, feto-maternalara yüzün korunmasında da görevli olan çeşitli hormon ve sitokinleri salgılar. (99)

3) Glikojenik hücreler: Küçük gruplar halinde bulunan, glikojenik vakuoller içeren özelleşmiş hücrelerdir.Net fonksiyonları tam olarak bilinmese de glikojen metabolizmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Plasentadan sentezlenen IGF II'nin ikinci trimesterden itibaren ana sentezleyicisi olduğu gösterilmiştir. (58)(100)

2.2.3.3.Maternal Desidua Zonu

Bazal plağın maternal kısmını sınırlayan uterus yapısıdır. Uterus stroma hücrelerinin epitel benzeri hücrelere farklanmasıyla oluşan desidua hücrelerinden ve vasküler değişikliklerle birlikte kapsamlı olarak yeniden şekillenmiş endometriyal dokudan oluşur. (101)

Desidualizasyondan sonra desidua hücrelerinden trofoblastların invazyonu için uygun ekstraselüler ve immünolojik ortam oluşturmak amacıyla çeşitli hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve immünmodülatör maddeler sentezlenmektedir. (102)

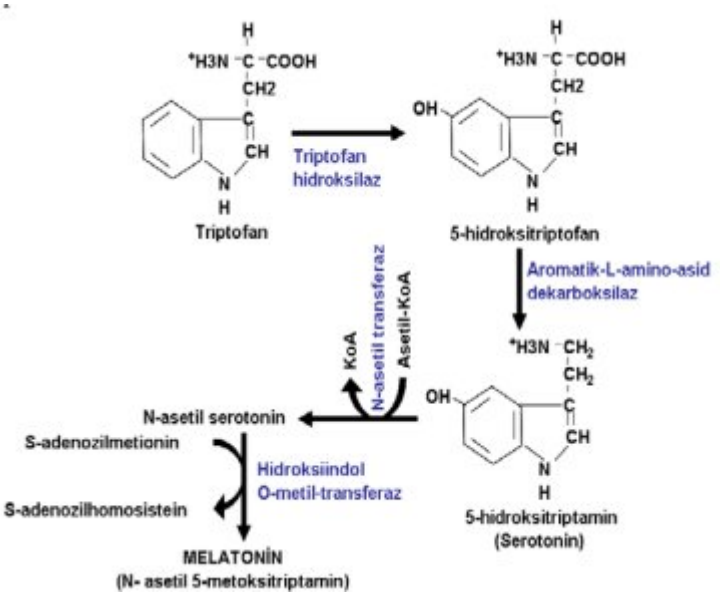
Desiduada maternal spiral arter ve venler ile birlikte metriyal bezler de bulunur. Desiduadaki metriyal bezler erken gebelik dönemlerinde ileri gelişim gösterip, ilerleyen gebelik dönemlerinde gerilemektedir. Metriyal bezlerde; desidualize olmuş endometriyal hücreler, uterin natural killer hücreler (uNK), endometriyum spiral arterleri ve fibroblastlar bulunmaktadır. uNK hücreleri çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılayarak trofoblastların desiduaya invazyonunda ve plasentasyonda rol almaktadır. Ayrıca bağışıklık toleransı gelişmesi ve sürdürülmesinde de kolaylaştırıcı görev yapmaktadır. (103)

Fetüs tarafından iki trofoblastik hücre türü de metriyal beze invaze olur. Bunlar endovasküler trofoblastlar ve interstisyel trofoblastlardır. Endovasküler trofoblastlar, 'vaskülojenik taklit'adı da verilen bir durumla uterin damarlardaki endotel hücrelerine benzer bir durum benimsemektedirler. (104) İnterstisyel trofoblastlar ise uterus stromasına penetre olur ve genellikle perivasküler yerleşimli olarak bulunurlar. (105)

2.3.Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ağırlıklı olarak pineal bezden salınan endojen bir indolamindir ve salınımı; nokturnal dalgalanma ve ışık fazındaki en düşük seviye ile birlikte sirkadiyen bir ritmi takip etmektedir. (106) Melatonin ayrıca az miktarlarda deri, gastrointestinal sistem, retina, kemik iliği, ovaryum gibi diğer dokularda ve beyin omurilik sıvısı, amniyotik sıvı, sinovyal sıvı, safra, tükrük ve anne sütü gibi vücut sıvılarında da bulunmaktadır. (107) (108)

Melatonin üretimi gözlerden alınan ışık sinyallerine bağlı olarak kontrol edilir. Karanlıkta melatonin salgılanması artarken, ışık varlığında baskılanmaktadır. Sentezinde ilk basamak esansiyel aminoasit olan triptofanın serotonine dönüştürülmesidir. Serotoninin asetilasyonu ve metilasyonu yoluyla melatonin oluşmaktadır (109) (110)



Şekil 8: Melatonin Sentezi (111)

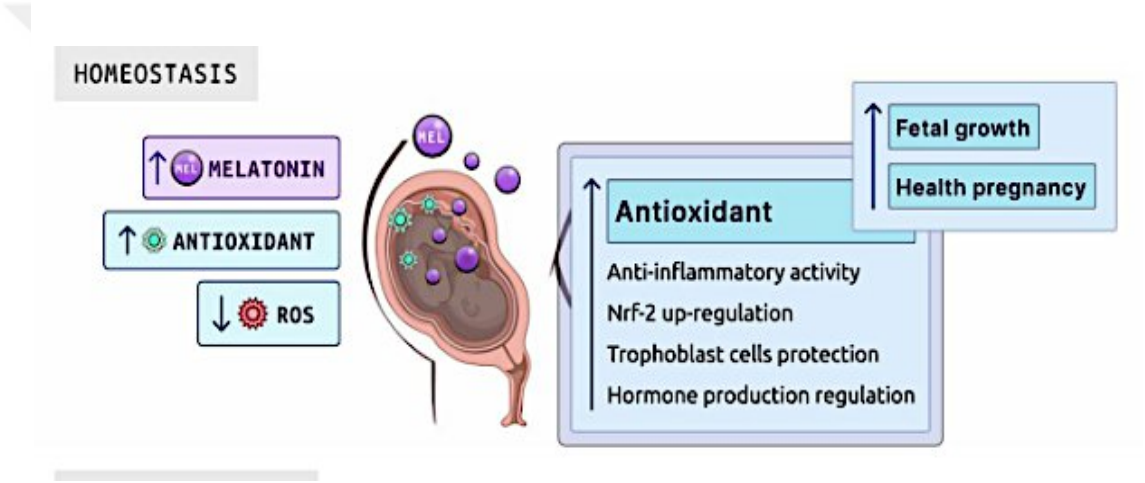
Melatonin vücutta uyku uyanıklık döngüsünü ve sirkadiyen ritmi düzenlemektedir. Kronobiyotik işlevinin yanı sıra melatonin, oksidatif stresi, apoptozu ve mitokondriyal homeostazı düzenleyerek sitoprotektif etkiler göstermektedir. (112) Ayrıca güçlü antioksidan ve antiinflamatuar etkilere sahiptir. Hücre proliferasyonunu ve anjiogenezi düzenleyerek antikanser özellik göstermektedir. Bağışıklık sistemini güçlendirici ve immünmodülatör etkileri bulunmaktadır. Kardiyoprotektif, nöroprotektif özelliği yanında diyabet ve obeziteye karşı koruyucu özellikleri de vardır. (113) (114) Melatonin foliküler gelişimi teşvik etmekte, embriyonun implantasyonunda katkıda bulunmaktadır. Plasental perfüzyon hasarlarını ve fetal büyüme kısıtlamasını hafifletebilmektedir. Düşük, erken doğum, nörogelişim bozukluğu, düşük doğum ağırlığı, preeklampsi gibi durumları etkili bir şekilde engelleyebilmektedir. Üreme hormonlarının sekresyonunu düzenlemekte ve üreme sağlığını etkilemektedir. (115) (116)

2.3.1.Gebelik ve Melatonin

Melatonin, gebelikte hem anne hem de fetüs için önemli roller oynamaktadır. Gebelik boyunca melatonin seviyesinin artması ve doğumdan sonra aniden düşmesi

plasentanın da melatonin kaynağı olabileceğini göstermektedir. (117) Plasenta tarafından üretilen melatoninin sinsityum oluşumunu teşvik ettiğini gösteren çalışmalar vardır. (118)

Gelişmekte olan fetüsün epifiz bezi melatonin üretememekte ancak doğumdan birkaç ay sonra üretmeye başlayabilmektedir.(119) Gebelerde melatonin plasentayı kolayca geçerek fetal dolaşıma girebilmektedir. Anne-plasenta-fetal sistemin tüm seviyelerinde sirkadiyen ritim modülatörü, endokrin modülatörü, immünomodülatör, doğrudan serbest radikal temizleyici ve dolaylı antioksidan ve sitoprotektif ajan olarak çeşitli şekillerde çalışmaktadır.(120)



Şekil 9: Gebelikte melatoninin faydaları

Gebeliğin yaygın bozuklukları olan ölü doğum, tekrarlayan fetal kayıp, preeklampsi, fetal büyüme geriliği, erken doğum ve fetal teratoloji, yüksek oksidatif stresin rol oynadığı durumlardır ve melatonin ile deneysel takviyenin bu durumların sıklığını veya şiddetini azalttığı gösterilmiştir.(121)

İntrauterin gelişme geriliği ile komplike olan kadınların plasentalarında melatonin reseptör ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir.(122) Preeklamptik gebeliklerde normotansif gebeliklere kıyasla azalmış plasental melatonin üretimi ve plasentada melatonin reseptörlerinin daha düşük ekspresyonu tespit edilmiştir.(123)

Yine gebe sıçanlarda yüksek doz kafein uygulamasının neden olduğu fetal hipokampüs hasarına karşı eksojen melatoninin nöroprotektif etkisini araştıran bir çalışmada eksojen melatonin uygulamasının yavru sıçan beyinlerindeki negatif etkileri hafiflettiğini göstermiştir.(124)

Ayrıca melatonin bazal veya immün baskılanmış koşullarda bir bağışıklık aktivatörü olarak etki ederken, geçici veya kronik şiddetlenmiş bağışıklık tepkisi altında negatif bir düzenleme uygulayabilmektedir. Yani bir immünmodülatör olarak işlev görmektedir.(125)

2.3.2.Melatoninin İki Yönlülüğü

Birçok çalışma melatoninin antioksidan özelliklerine yoğunlaşsa da bazı durumlarda melatonin prooksidan etki de gösterebilmektedir. Melatonin bazal durumdaki veya immün sistemi baskılanmış durumlarda bir immün aktivatörü olarak görev yaparken, geçici veya kronik alevlenen immün yanıt altında negatif bir düzenleme uygulayabilir.

Farelerle yapılan Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) çalışmasında melatonin uygulanması dişi farelerde proinflamatuar sitokinleri azaltıp immünolojik parametreleri iyileştirirken, erkek farelerde otoantikor titrelerini ve proinflamatuar sitokinleri artırmış ve hastalığı kötüleştirmiştir. (126)

İnflamatuar barsak hastalığı modeli oluşturulan farelerde melatonin uygulanması; hastalığın sistemik ve inflamatuar parametrelerini kötüleştirmiştir. Klinik hastalık skorunu artırmış ve iyileşmeyi geciktirmiştir(127)

Bir çalışmada nörolojik defisiti olan çocuklara melatonin uygulandığında antikonvülzan etki gösterirken(128) bir başka çalışmada prokonvülzan etki gösterdiği ve nöbet aktivitesini artırdığı bulunmuştur. (129)

Melatoninin etkileri doza bağımlıdır ve henüz aydınlatılamamış çok yönü vardır.

2.4.Regülatör T Hücreleri (Treg Hücreleri)

2.4.1.Gebelik ve İmmün Sistem (Fetomaternal İmmüntolerans)

Sağlıklı bir doğumun gerçekleşebilmesi için, başarılı bir fertilizasyonun ardından gebeliğin doğru şekilde devam ettirilmesi ve uygun zamanda tamamlanması önemlidir.

Annenin immün sistemi implantasyon, trofoblast invazyonu, plasentasyon ve fetal büyüme için gereken sitokinlerin üretilmesini destekleyecek şekilde aktive olur. Aynı zamanda fazla aktive edilmesi de implantasyon başarısızlığı, spontan düşük ve ya preeklampsi gibi gebelik patolojilerinin oluşmasına sebep olur. İşte bu dengenin yani fetomaternal immüntoleransın sağlanması başarılı bir gebelik için zorunludur. Makrofajlarda M1/M2 dengesizliği**,** Th1/Th2 oranlarında Th1 aşırı baskınlığı, yetişkin dendritik hücrelerin artışı ve düşük Treg sayısı gibi alterasyonlar aşırı inflamasyona ve implantasyon sorunlarına neden olabilmektedir. (130)

Paternal olarak kalıtılan alloantijenleri eksprese eden fetüsün, gebelik sırasında anne tarafından kabul edilmesi bağışıklık sisteminin yıkıcı bir alloimmün tepkiyi bir tolerans durumuna nasıl yeniden şekillendirdiğinin benzersiz bir örneğidir. Fetomaternal immuntoleransın sağlanması ve sürdürülmesi için Regülatör T hücrelerinin (Treg) aracılık ettiği aktif bir anne bağışıklık toleransı durumu esastır.(131) Yapılan çalışmalar normal gebelikte Treg sayılarının arttığını ve azalmış Treg sayılarının fetüsün immünolojik reddi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

Regülatör T hücreleri (Treg'ler); inflamasyonu baskılamak, efektör savunma mekanizmalarını sınırlamak ve annenin damar yapılarında gebeliğe uygun değişimleri desteklemek amacıyla işlev görür. Bu mekanizmalar sayesinde trofoblastların invazyonu kolaylaşır ve plasenta, maternal dolaşıma daha etkin bir şekilde ulaşabilir. Treg hücrelerinin sayıca yetersiz olması veya işlevsel açıdan bozukluk göstermesi, tekrarlayan gebelik kayıpları ve açıklanamayan infertilite gibi erken dönem sorunlarının yanı sıra, preeklampsi ve fetal gelişme geriliği gibi daha geç dönemde ortaya çıkan, plasenta fonksiyon bozukluğuna bağlı komplikasyonların gelişmesinde de etkili olabilir. (132)

2.4.2.Treg Hücreleri

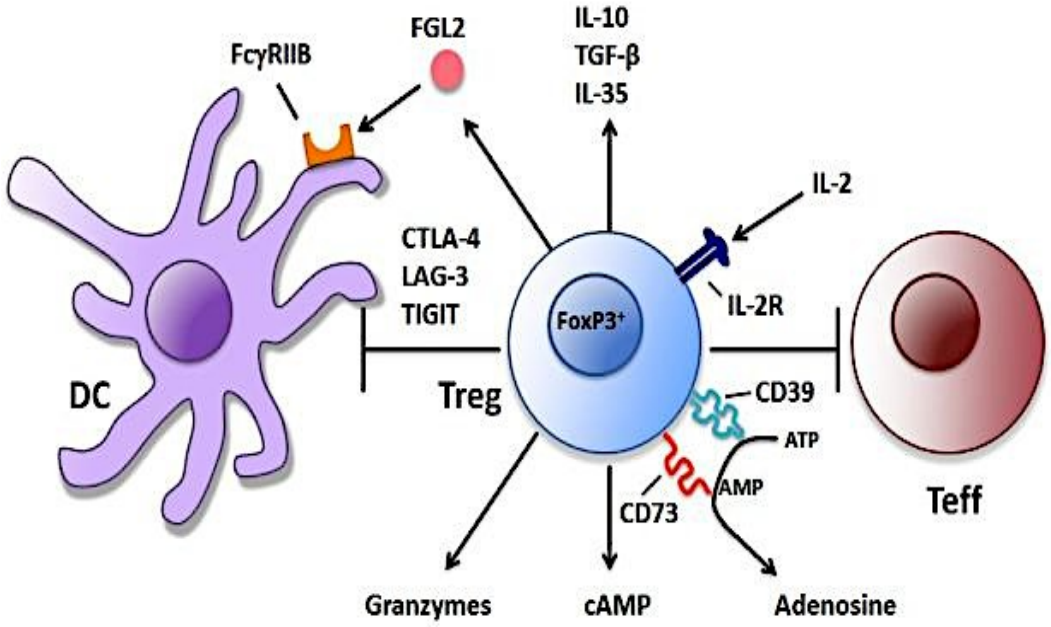
Vücutta otoimmün hastalıkların gelişmesini engellemek, bağışıklık sisteminin dengesini sağlamak ve çevresel etkenler ile patojenlerin yol açtığı inflamasyonu kontrol altında tutmak amacıyla çeşitli karmaşık düzenleyici sistemler devreye girer. Bu sistemlerin en önemlilerinden biri ise, günümüzde periferik bağışıklık toleransının temel sağlayıcıları olarak kabul edilen düzenleyici T (Treg) hücreleridir.

Treg hücreleri ilk olarak 1970 yılında Gershon ve ark. tarafından yapılan çalışmada timektomi yapılan farelerde otoimmün benzeri semptomların görülmesiyle bulunmuş ve süpresör T hücreleri olarak adlandırılmıştır. (133) 1995 yılında Sakaguchi ve ark. timektomi yapılan farelerde interlökin-2 (IL-2) reseptörü α zinciri (IL-2Rα (CD25)) bulunduran ve otoimmün tepkileri inhibe etme yeteneğine sahip CD4+ T hücre alt tipini yani Treg hücrelerini tanımlamışlardır.(134) (135)

Supresör $CD4^+$ T hücrelerinin bir alt kümesi olan düzenleyici T (Treg) hücreleri, self toleransı koruyarak otoimmün hastalıkların önlenmesinde; alerji, astım ve patojen kaynaklı immünopatolojinin baskılanmasında, oral tolerans ve feto-maternal immuntoleransta oldukça baskın rol oynamaktadır. Bu hücreler timus kontrolünden kaçan ve ya timus harici antijenleri tanıyan otoreaktif T hücrelerinin çoğalmasını ve aktive olmasını önlerler. (136) (137) (138)

Treg'ler CD4, CD25 ve FoxP3 (Forkhead ailesi transkripsiyon faktörü forkhead box p3) ile karakterize edilir. FOXP3 Treg hücrelerinin gelişmesi ve fonksiyonunu sürdürebilmesi için gereklidir. FoxP3 ekspresyonundaki eksiklik bu hücrelerin fonksiyonlarını bozar. (139) (140)

Treg hücreleri bağışıklık cevaplarını engellemek için farklı mekanizmalar kullanmaktadır. Bunlardan bazıları direkt T efektör hücreler üzerinden etki ederken, bazıları antijen sunan dendritik hücre gibi hücreler üzerinden dolaylı olarak T efektör hücreleri inhibe etmektedir.



Şekil 10: Treg aracılı bağışıklık baskılama mekanizmaları (141) DC, dendritik hücre; IL-2R, IL-2 reseptörü; Teff, efektör T hücresi; Treg, düzenleyici T hücresi.

- Treg hücreleri IL-2 reseptörü ile IL-2'ye yüksek affiniteli bağlanmakta ve bölünen T hücrelerini IL-2'den mahrum ederek sitokin yoksunluğu aracılı apaptozlarını indüklemektedir. (142)
- Yine Treg hücreleri Granzim B salgılayarak hücre teması aracılı olarak aktive olmuş T hücrelerini apoptoza gönderebilmektedir.(143)
- Treg hücreleri; potansiyel olarak otoreaktif T hücrelerinde proliferasyonu baskılayan, sitotoksik ve proenflamatuar etkinliği azaltan, dokuya göç etmelerini engelleyen Adenozin ve cAMP üretir. (144) (145)
- Treg hücreleri Fibrinojen benzeri protein 2 (FGL2) salgılayarak dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve T hücrelerini uyarma yeteneklerini azaltır. (146) (147)
- Ayrıca antijen spesifik olmayan bir şekilde TGF-β, IL-10 ve IL-35 gibi baskılayıcı immün düzenleyici sitokinleri salgılayarak bağışıklık sisteminin aşırı fonksiyon göstermesini engellemektedir.

Treg hücrelerinin sayı ve ya fonksiyon olarak azalması otoimmün hastalıkların artışıyla sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda bu azalma birçok gebelik patolojisini de beraberinde getirmektedir.

Shima ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada çoğalan Paternal Antijen-spesifik Treg hücrelerinin, çiftleşme sonrası 3,5. günde, çiftleşmemiş gebe olmayan farelere kıyasla, uterus boşaltan lenf düğümlerinde daha fazla arttığını göstermişlerdir. Ayrıca implantasyondan sonra CD4+T hücreleri arasında toplam Treg hücreleri allojenik gebelikte uterus, dalak ve yüzeysel lenf düğümlerinde de artmıştır. (148) (149)

Düzenleyici T hücrelerinin (Treg) sayı ve işleviyle ilgili düzensizliklerin komplike gebeliklerin patofizyolojisinde rol oynadığı varsayılmaktadır. Birçok gebelik patolojisi durumunda Treg hücre popülasyonunun azaldığı gösterilmiştir ancak altta yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Preeklampsili kadınların periferik kanında ve plasental desidualarında sağlıklı gebelere kıyasla azalmış sayıda Treg hücresi bulunduğu gösterilmiş ve bunun fetüse karşı maternal toleransı bozabileceği düşünülmüştür. (150) (151) (152)

Düşük ve canlı doğumların karşılaştırıldığı bir çalışmada canlı doğum grubunda periferik kan Treg hücre seviyesi daha yüksek bulunmuş; Treg hücre sayısı daha azsa, kendiliğinden düşük meydana gelebileceği düşünülmüştür. (153)

Yine başka bir çalışmada tekrarlayan spontan düşük (RSA) geçiren kadınlar, hem foliküler hem de luteal fazlarda periferik kanda düşük Treg sayıları göstermiştir. RSA'lı kadınlarda üreme başarısızlığının, preimplantasyon fazında Treg'lerin artamaması ve daha düşük işlevsel kapasiteleri nedeniyle ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. (154)

Bu bulgulardan yola çıkılarak Treg hücrelerinin gebelikte fetomaternal immüntoleransı sağlamada ve sürdürmede önemli rol oynadıkları ve azalmalarının ciddi gebelik patolojilerine sebep olduğu görülmüştür. Sonuç olarak Treg hücreleri preeklampsi, tekrarlayan düşük, erken doğum gibi gebelik patolojilerinde düşük bulunmuştur. Treg hücrelerinin gebelik patolojilerinden birisi olan maternal hipotiroidide nasıl değiştiğini çalışmamızda hayvan modeli üzerinden bulmayı amaçladık.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Prospektif deneysel bir araştırma

3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam dört grup oluşturulmuştur. Denekler rastgele seçilerek dört kişilik dört çalışma gruplarına ayrılmıştır. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir: **(Tablo 1)**

Tablo 1: Deney gruplarının dağılımı

GRUP-1: Kontrol Grubu	n:4
GRUP-2: Hipotiroidi (PTU) Grubu	n:4
GRUP-3: Melatonin Grubu	n:4
GRUP-4: Hipotiroidi +Melatonin Grubu	n:4

i. **Kontrol Grubu (n=4):**

Bu grup histolojik ve biyokimyasal parametrelerin bazal değerlerini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Bu gruptaki sıçanlara deney süresince normal dinlendirilmiş musluk suyu verilmiştir. 5 gün sonunda vajinal smear ile deneklerin östrus dönemleri belirlenmiştir. Proöstrusta bulunan denekler 2 dişi 1 erkek sıçan olacak şekilde 24 saat boyunca aynı kafes içerisinde katıma alınmıştır. Ertesi gün makroskopik olarak vajinal tıkaç görülmesi ile denekler gebe kabul edilmiştir. Sonrasında deneklere gebelik boyunca 19 gün dinlendirilmiş musluk suyu uygulamasına devam edilmiştir.

ii. Hipotiroidi (PTU) Grubu (n=4) :

Deneklere 5 gün boyunca %0,05 propiltiourasil (6- n -propil -2-tiourasil; PTU; Sigma, St Louis, MO, ABD) içme suyunda verilmiştir. (155) (156) (157) (158) (1000 ml içme suyu içerisinde 0,5 gram PTU çözülerek eklenmiştir.) 5 gün sonunda vajinal

smear ile deneklerin östrus dönemleri belirlenmiştir. Proöstrusta bulunan denekler 2 dişi 1 erkek sıçan olacak şekilde 24 saat boyunca aynı kafes içerisinde katıma alınmıştır. Ertesi gün makroskopik olarak vajinal tıkaç görülmesi ile denekler gebe kabul edilmiştir. Sonrasında deneklere içme suyunda %0,05 propiltiourasil uygulaması 19 gün gebelik süresi boyunca devam edilmiştir. Gebelerde Propiltiourasil kullanımının Metimazolden daha güvenli bir alternatif olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlandığı için çalışmamızda antitiroid ilaç olarak Propiltiourasil tercih edilmiştir. (159) (160)

iii. Melatonin Grubu (n=4):

Deneklere Melatonin (MedChemExpress; HY-B0075) tedavisi günlük 10 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde içme sularında verilmiştir (161) (162) (163) (164)

Melatonin her iki üç günde bir taze olarak hazırlanmış ve ışığa duyarlı olduğu için su şişeleri alimünyum folyo ile kaplanmıştır. 5 gün sonunda vajinal smear ile deneklerin östrus dönemleri belirlenmiştir. Proöstrusta bulunan denekler 2 dişi 1 erkek sıçan olacak şekilde 24 saat boyunca aynı kafes içerisinde katıma alınmıştır. Ertesi gün makroskopik olarak vajinal tıkaç görülmesi ile denekler gebe kabul edilmiştir. Sonrasında deneklere içme suyunda 10 mg/kg vücut ağırlığı günlük dozda Melatonin uygulaması 19 gün gebelik süresi boyunca devam edilmiştir.

iv. Hipotiroidi + Melatonin Grubu (n=4):

Deneklere içme suyunda %0,05 propiltiourasil (6- n -propil -2-tiourasil; PTU; Sigma, St Louis, MO, ABD) ve 10 mg/kg vücut ağırlığı Melatonin (MedChemExpress; HY-B0075) verilmiştir. 5 gün sonunda vajinal smear ile deneklerin östrus dönemleri belirlenmiştir. Proöstrusta bulunan denekler 2 dişi 1 erkek sıçan olacak şekilde 24 saat boyunca aynı kafes içerisinde katıma alınmıştır. Ertesi gün makroskopik olarak vajinal tıkaç görülmesi ile denekler gebe kabul edilmiştir. Sonrasında deneklere içme suyunda %0,05 propiltiourasil (PTU) ve 10 mg/kg vücut ağırlığı Melatonin 19 gün gebelik süresi boyunca uygulanmaya devam edilmiştir. (165)

Bütün gruplardaki sıçanların gebeliklerinin 19.gününde eter anestezisi altında sezeryan ile plasentaları ve fetüsleri alınmıştır. Her sıçana ait rastgele seçilen beş plasenta histolojik ve biyokimyasal incelemeler için kullanılmıştır. Fetüsler ise doğum ağırlıkları gibi parametreleri içeren sonuçlarla kayıt altına alınmıştır.

3.3. Çalışmanın Materyali

Araştırmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden elde edilen, Wistar suşu 250 - 300 gr toplam 16 yetişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 20–22 °C oda sıcaklığında, 12 saatlik aydınlık/karanlık periyodunda barındırılmıştır. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad libitum beslenmiştir. Enfeksiyon, ilaç reaksiyonu, genel durum bozukluğu vs gibi herhangi bir sebeple deneyi devam ettiremeyecek olan ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanan hayvanlar deney ve istatistik kapsamından çıkarılmıştır.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Deneyde birinci gruba sadece içme suyu verilmiş ve araştırmada elde edilen bu grubun hormon değerleri, gebelik sonucu, plasenta ve fetüsleri bazal değer olarak kabul edilmiştir.

Hipotiroidi ve melatonin gruplarına verilen PTU ve Melatonin bağımsız değişkenlerimiz olup bu gruplardan alınan hormon değerleri, fetüs ve plasentalar ise bağımlı değişkenler olmuştur.

3.5. Veri Toplama Araçları

Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerin başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını, fetüs ve plasenta ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi; deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom ve su banyosu, boyamalarda kullanılan distile su ihtiyacı için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity

chamber ve otomatik mikro pipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, ELISA cihazı ve buzluk kullanılmıştır.

3.6. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen plasenta doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, bir takım histokimyasal ve immünohistokimyasal boya işlemleri uygulanmıştır. Araştırmamızda histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen & Eozin (H-E) boyaması, immünohistokimyasal değişiklikler için CD4 ve FOXP3 immünohistokimya boyaması yapılmıştır.

3.6.1. Deneklerin Menstrüel Sikluslarının Belirlenmesi

Deneklere deney başlangıcında vajinal smear uygulanmıştır. Steril smear çubuklarının pamuk kaplı uçları serum fizyolojik ile nemlendirilmiş ve sıçanların vajinasından nazikçe sürüntü alınmıştır. Sürüntüler lam üzerine yayılmış ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. %96'lık, %80'lik, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirilen preperatlar 30 saniye eozinde bekletilmiştir. Daha sonra %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirilip oda sıcaklığında kurutulup mikroskop altında incelenmiştir. İncelenen görüntüler Schaberg (1992)'nin elde ettiği döngüsel değişim bulguları rehberliğinde değerlendirilmiştir.

3.6.2. Ölçme ve Fiziksel Değerlendirme:

Deneyin başında ve sonunda anne ağırlıkları ölçülmüştür. Deney sonunda sezaryenle alınan fetüs ve plasentaların ağırlıkları hassas terazi ile ayrı ayrı ölçülmüştür. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma yaparken Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırılmasını yaparken de Mann-Whitney U testi analiz için kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirilirken $P<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.6.3. Histokimyasal Değerlendirmeler

Sakrifikasyon yapıldıktan sonra plasentalar çıkarıldı. İmmünohistokimyasal analizler ve ELİSA analizi için her plasenta ikiye bölündü. Plasentanın yarısı ELİSA

analizi için buz üzerine alındı ve işlem yapılıncaya kadar -80ºC' de saklandı. Diğer yarısı %10'luk formaldehit içerisine alınarak fiksasyonu sağlandı. Dokular 48 saat fikse edildikten sonra kasetlendi ve fazla formaldehitten uzaklaştırmak için bir gece akan musluk suyunda bekletildi. Yıkama işlemi sonrası rutin doku takibi işlemleri 60°C etüv içerisinde gerçekleştirildi. Doku içerisindeki suyu uzaklaştırmak amacıyla 20'şer dakika artan yüzdelikte alkol serilerden geçirildi. (%70, %80, %96 etanol). Daha sonra dokuyu alkolden uzaklaştırmak için 20'şer dakika 3 kez aseton değişimi ile doku dehidrate edildi. Şeffaflandırma için 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutuldu. 60˚C'lik etüv içerisinde 1'er saat parafin içerisinde immersiyon sağlandıktan sonra parafin bloklar içerisine gömme işlemi gerçekleştirildi. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin bir kısmı normal lamlara, bir kısmı ise poly-L lysine kaplı lamlara alındı. **(Tablo 2)**

Tablo 2: Doku takip protokolü

İŞLEM	**MADDE**	**SÜRE**
Fiksasyon	%10'luk formol	48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
Parafin emdirme	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.4. Hematoksilen & Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitlerden hematoksilen eosin boyanacak olanlar deparafinizasyon işlemi için 60˚C'lik etüv içerisinde bir gece tutuldu. Sonrasında ilki etüv içerisinde diğer ikisi oda sıcaklığında 20'şer dakika üç farklı ksilenden geçirildi. Takibinde azalan alkol serilerinden geçirildi. (absolü , %96, %80, %70 etanol) Distile su ile çalkalandıktan sonra önce hematoksilen ile 3 dakika muamele edildi ve nukleusların boyanması sağlandı. Boyama sonrasında 10 dakika akarsu altında fazla boya uzaklaştırıldı. Ardından eosin ile 30 saniye tutularak hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı ve

artan alkol serilerinden (%70, %80,%96 etanol) ve 2 kez absolü alkolden geçirilerek şeffaflandırma basamağı için ksilol içerisine alındı. 3 kez 20 dakika ksilol değişiminde sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapama yapıldı.
(Tablo 3)

Tablo 3: Hematoksilen Eozin boyama protokolü

Aşama	İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	Etüv	60°C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	Ksilen 1 (Etüvde)	20 Dakika
	Ksilen	Ksilen 2	20 Dakika
	Ksilen	Ksilen 3	20 Dakika
Dehidrasyon	Alkol	Absolu Alkol	Çalkalama
	Alkol	Absolu Alkol	Çalkalama
	Alkol	%96'lık Alkol	Çalkalama
	Alkol	%80'lik Alkol	Çalkalama
	Alkol	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Su	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	Mayer's Hematoksilen	3 Dakika
Yıkama	Su	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eozin	Eozin	30 saniye
Dehidrasyon	Alkol	%70'lik Alkol	Çalkalama
	Alkol	%80'lik Alkol	Çalkalama
	Alkol	%96'lık Alkol	Çalkalama
	Alkol	Absolu Alkol	Çalkalama
	Alkol	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen	Ksilen 1	20 Dakika
	Ksilen	Ksilen 2	20 Dakika
	Ksilen	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	Entellan	-

3.6.5. Morfometrik Değerlendirmeler

Plasental Tabakaların Kalınlık Değerlendirmesi

Deney gruplarındaki her bir denekten rastgele seçilen 5 plasenta H&E ile boyandıktan sonra medialden ve periferlerden 5 farklı alanda plasental tabakaların kalınlık ölçümleri yapıldı. . Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma yaparken Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırılmasını yaparken de Mann-Whitney U testi analiz için kullanıldı. Sonuçlar değerlendirilirken $P<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.6.6. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

İmmünohistokimya Boya Protokolü:

İmmünohistokimyasal olarak CK7 ve FoxP3 primer antikorları kullanılmıştır.
İmmünohistokimyasal incelemeler için parafin bloklardan 5µm'lik kesitler mikrotom aracılığı ile poly-l lizin kaplı lamlara alındı.
Alınan kesitler bir gece 60 ^{0}C'lik etüvde bekletildi. Sonrasında deparafinizasyon için ilki etüvde sonraki ikisi oda sıcaklığında 20'şer dakika üç değişim ksilol içerisinde bekletildi.

Azalan alkol serilerinden geçirilip distile su içerisnde çalkalandı.

Dokular mikrodalga cihazında 2 kez her biri 5 dakika olacak şekilde pH'ı 6 10 mM sitrat tampon ile kaynatıldı ve 20 dakika soğumaya bırakıldı.
Soğuduktan sonra dokuların etrafı Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çizildi.

Çizme işleminden sonra dokuların kurumaması için PBS ilave edildi. Ardından kesitler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında 10 dakika H_2O_2 ile bekletildi ve dokunun endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.
Tekrar PBS ile 3 yıkama yapıldı ve spesifik olmayan antijen-antikor reaksiyonunu önlemek için bloklama solüsyonu ile 20 dakika bekletildi.

Yıkama yapmadan primer antikor rat spesifik CK7 (1:100,Thermo ABD, AB_2234498) ve FoxP3 (1:300, Thermo ABD, AB_2278500) ile + 4 ºC' de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün PBS ile yıkama yapılarak primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra anti-mouse biotinli sekonder antikor solüsyonu ile 20 dakika bekletildi.
PBS ile 3 yıkama sonrası Streptavidin/HRP solüsyonunda 10 dakika beklendi.
Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptayabilmek için DAB ile muamele edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile zemin boyaması sağlandı ve akarsu ile yıkandı. Artan alkol serilerinden ve 3 seri ksilolden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatma yapıldı.

Antikorlar immünohistokimyasal boyama için Foxp3 1/300 ve CK7 1/100 dilusyon oranında uygulandılar. IHC işaretleme sonrası kesitte FoxP3 pozitif alanlar ImageJ programı kullanılarak yuzde olarak belirlendi.

3.6.7. Biyokimyasal Değerlendirme:

Biyokimyasal analizler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) yapılmıştır. Deneyde kullanılan tüm hayvanlardan deney başlamadan önce ve deney bitiminde %10-%10 kuralına uygun olarak kuyruk veninden kan örnekleri alınmış ve oda sıcaklığında 3000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Ayrılan serumlar analiz yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır. Daha sonra TSH hormon seviyeleri ELİSA yöntemi ile (ELABSCIENCE, ABD, E-EL-R0976) analiz edilmiştir.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme:

Tüm veriler Graphpad Prism (Version10.0) istatistik programına yüklenmiştir. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklar non-parametrik Mann–Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Tüm deneylerde $P< 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.8. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 35/2024 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4.BULGULAR

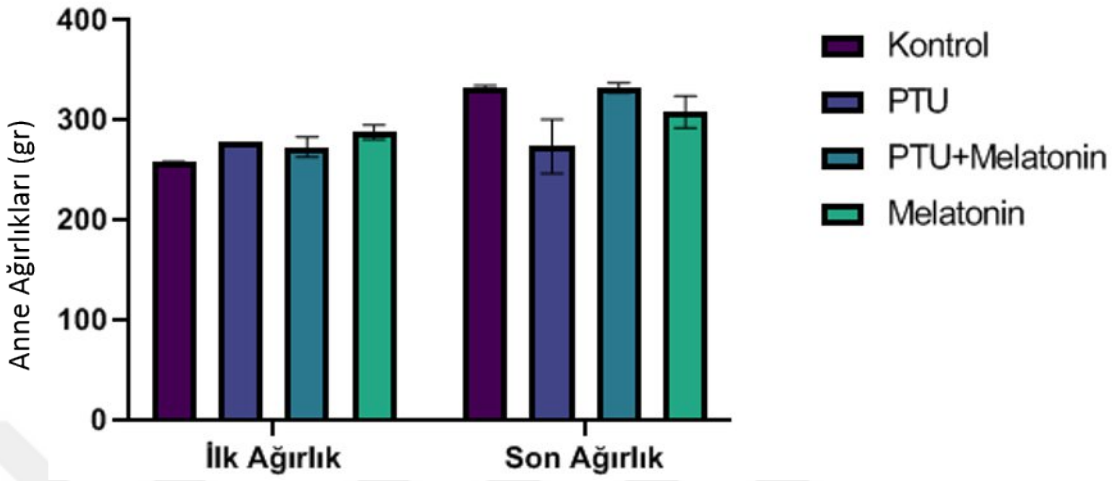
4.1.Deneklerin Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneyin başlangıcında ve sonunda maternal sıçan ağırlıkları ölçülmüştür. Deneklerin başlangıç ağırlıkları ortalamaları kontrol grubunda 257±1 gr, hipotiroidi grubunda 278 gr, melatonin grubunda 272,6±10,2 gr ve hipotiroidi+melatonin grubunda 287,3±7,2 gr olarak bulunmuştur. Deney sonunda ağırlık ortalamaları ise kontrol grubunda 332,50 ±1,5 gr, hipotiroidi grubunda 273±27 gr, melatonin grubunda 331,6±5,2 gr ve hipotiroidi+melatonin grubunda ise 307,6±15,8 gr olarak bulunmuştur. **(Tablo 4)**

Tablo 4: Gruplara ait maternal vücut ağırlıkları.

Grup	Başlangıç Ağırlığı (g)	Deney Sonu Ağırlığı (g)
Kontrol Grubu	257 ± 1	332,50 ± 1,5
Hipotiroidi Grubu	278	273 ± 27
Melatonin Grubu	272,6 ± 10,2	331,6 ± 5,2
Hipotiroidi + Melatonin	287,3 ± 7,2	307,6 ± 15,8

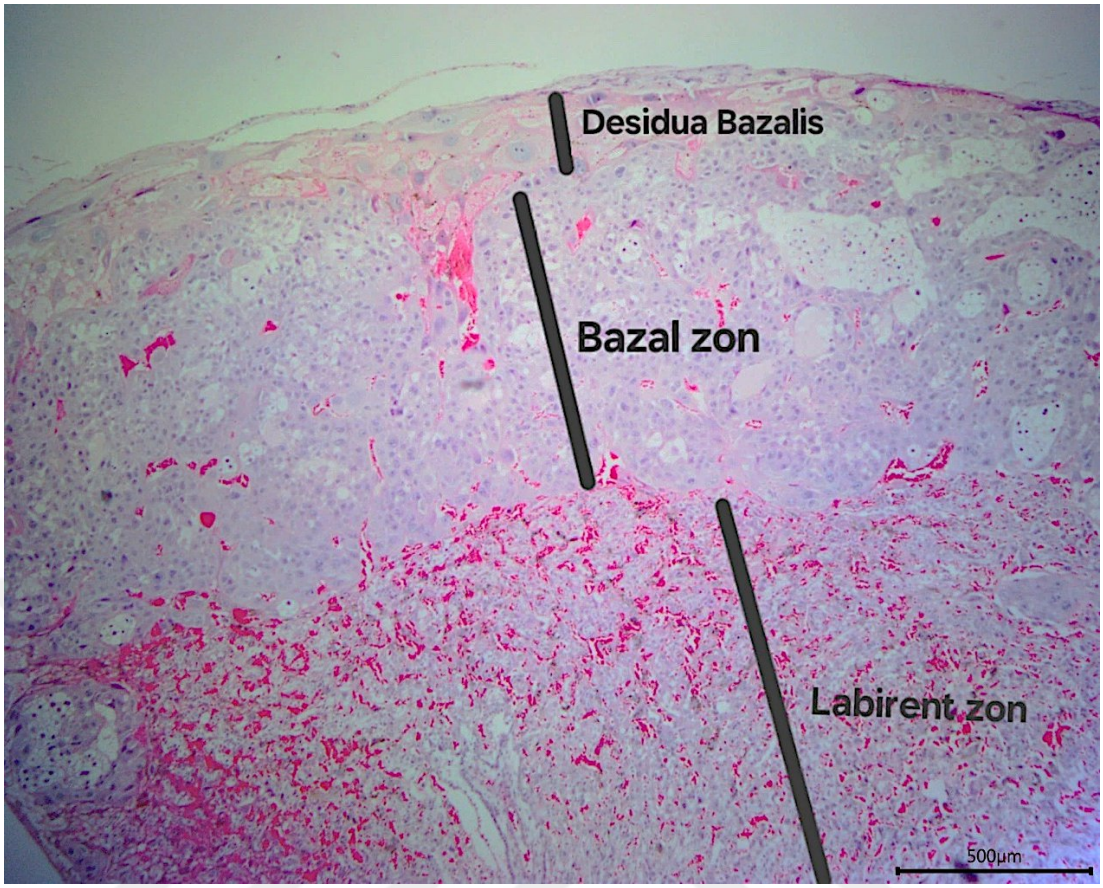
Gruplar arasında deney sonu maternal ağırlıklar karşılaştırıldığında $p>0,05$ bulunmuştur. Her ne kadar hipotiroidi grubundaki annelerde kilo artışı diğer gruplara göre daha az olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. **(Şekil 11)**



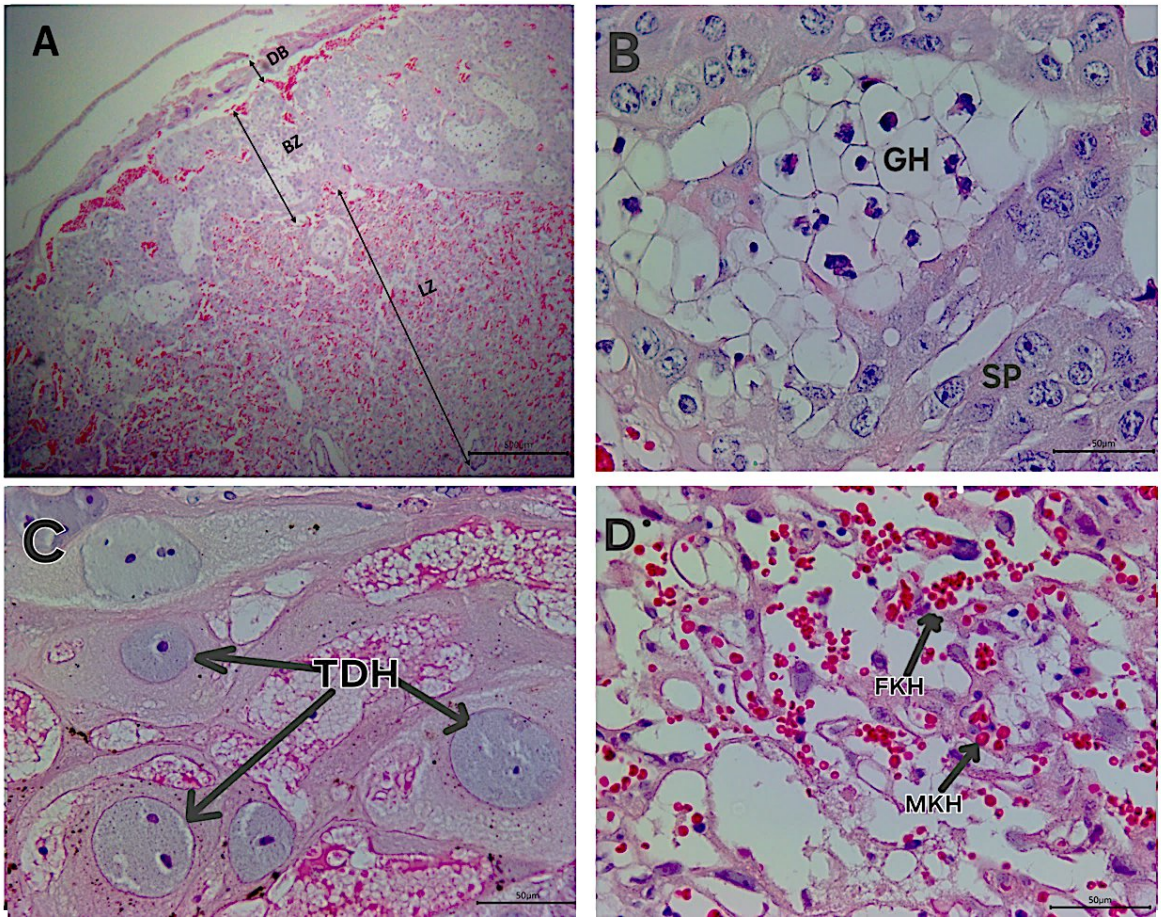
Şekil 11: Deney başlangıcında ve deney sonunda maternal ağırlık ölçümleri. Barlar ortalama±standart hatayı göstermektedir.

4.2.Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirmesi

Plasenta dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler alındı ve H&E boyaması yapıldı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu ile incelendi ve morfolojik olarak değerlendirildi. (**Şekil 12, Şekil 13)**

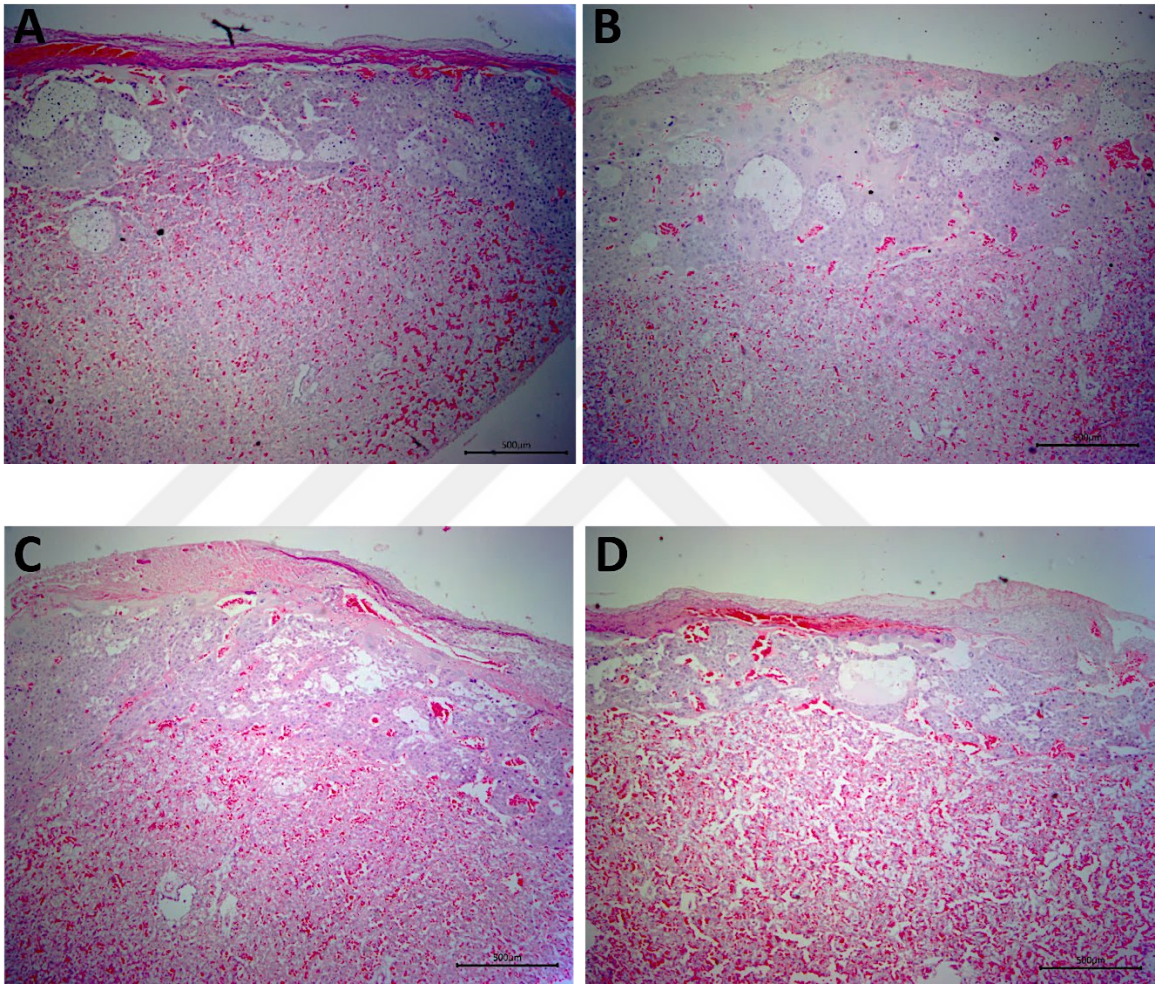


Şekil 12: Kontrol Grubuna Ait Plasenta Kesiti (x4)



Şekil 13: Kontrol grubuna ait plasenta kesiti (H&E). **(A)** plasentaya ait genel görünüm (x4). DB desidua bazalis, BZ bazal zon, LZ labirent zon. **(B)** bazal zondaki glikojen (GH) ve
spongiyotrofoblast (SP) hücreleri (x40). **(C)** bazal zondaki trofoblast dev hücreler (TDH,
x40). **(D)** labirent zondaki fetal (FKH) ve maternal (MKH) kan hücreleri
(x40).

H&E boyama ile gruplar arasında morfolojik karşılaştırma yapıldığında genel olarak belirgin bir farklılık gözlenmemekle birlikte, hipotiroidi gruplarında bazal zonun kalınlaştığı ve glikojen içeren hücre gruplarında artış olduğu dikkati çekmiştir. (**Şekil 14, Şekil 17**).



Şekil 14: Gruplara ait plasenta kesitleri (H&E, x4).
Hipotiroidi grubunda bazal zonun (spongiyoz tabaka) görsel olarak kalınlaştığı görülmektedir.(**B)**
(A) Kontrol grubu, **(B)** Hipotiroidi grubu**,**
(C) Melatonin grubu, **(D)** Hipotiroidi+ Melatonin grubu**.** (x4)

Plasenta tabakalarının kalınlıkları her gruptan en az 5 farklı plasenta kullanılarak ve her preperattan en az 5 farklı alandan ölçüm yapılarak bulundu. Desidua bazalis kalınlıkları ölçüm ortalaması kontrol grubunda 133,3±8,4 µm, hipotiroidi grubunda 114,7±4,5 µm, melatonin grubunda 171±9,3 µm ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise 151,1±6,4 olarak ölçüldü. **(Tablo 5)**

Tablo 5: Gruplara ait desidua bazalis kalınlıkları.

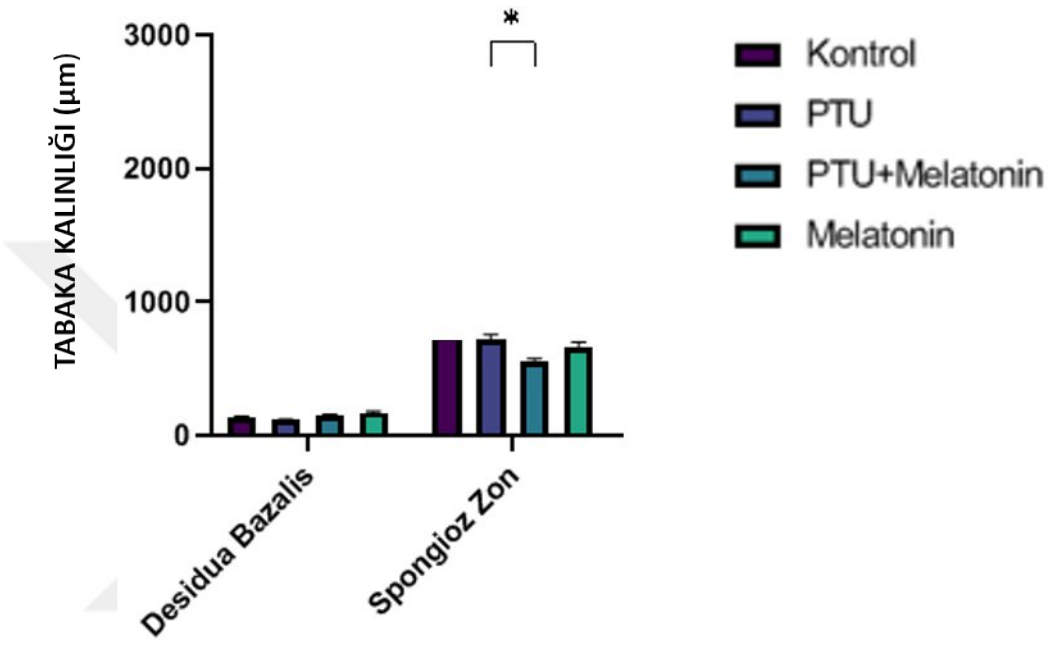
Grup	Desidua Bazalis Kalınlığı (µm)
Kontrol Grubu	133,3 ± 8,4
Hipotiroidi Grubu	114,7 ± 4,5
Melatonin Grubu	171 ± 9,3
Hipotiroidi + Melatonin	151,1 ± 6,4

Spongioz tabaka (Labirent zon) kalınlıkları ölçüm ortalaması ise kontrol grubunda 693,9±58,1 µm, hipotiroidi grubunda 721±33 µm, melatonin grubunda 661,4±36,2 µm ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise 551,9±24,7 olarak bulundu. **(Tablo 6)**

Tablo 6: Gruplara ait spongioz tabaka kalınlıkları.

Grup	Spongioz Tabaka Kalınlığı (µm)
Kontrol Grubu	693,9 ± 58,1
Hipotiroidi Grubu	721 ± 33
Melatonin Grubu	661,4 ± 36,2
Hipotiroidi + Melatonin	551,9 ± 24,7

İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında desidua bazalis tabakasında gruplar arası $p>0,05$ bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Spongioz zon için değerlendirme yapıldığında ise hipotiroidi ve hipotiroidi+melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p =0,04$) Hipotiroidi grubunda görsel olarak tabaka kalınlaşmasını görmüş olsak da anlamlı fark bulunamamıştır. **(Şekil 15)**



Şekil 15: Gruplar arası tabaka kalınlıkları karşılaştırılması

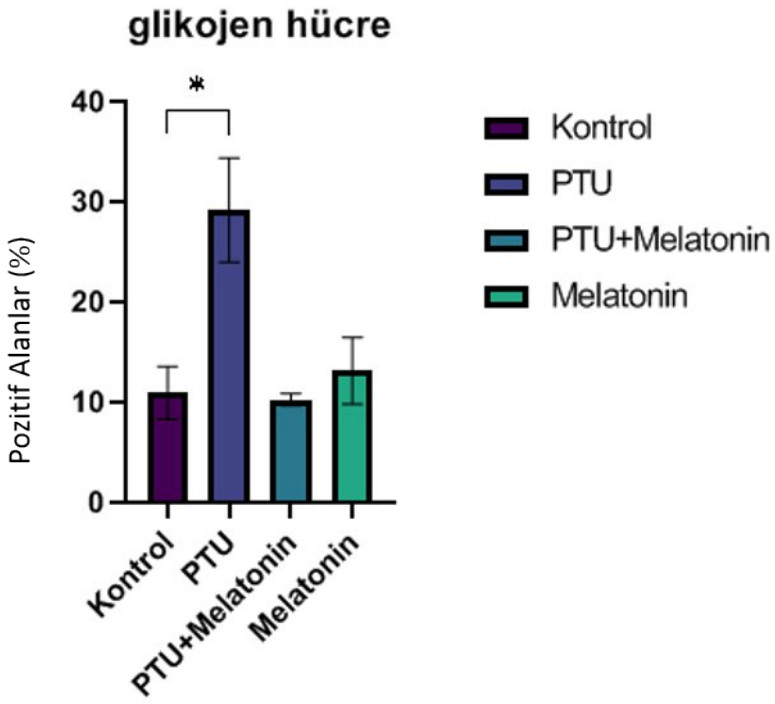
4.3.Glikojenik Hücre Oranları Değerlendirilmesi

Bazal zonda bulunan glikojen hücrelerin oranı her gruptan en az 5 farklı plasenta ve her preperattan x10 çekilmiş en az 5 farklı alan fotoğrafı kullanılarak İmageJ programı ile ölçüldü. Glikojen hücre oranları ölçüm ortalaması kontrol grubunda %10,9±2,6, hipotiroidi grubunda %29,1±5,2, melatonin grubunda %13,1±3,3 ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise %10,2±0,6 olarak bulundu. **(Tablo 7)**

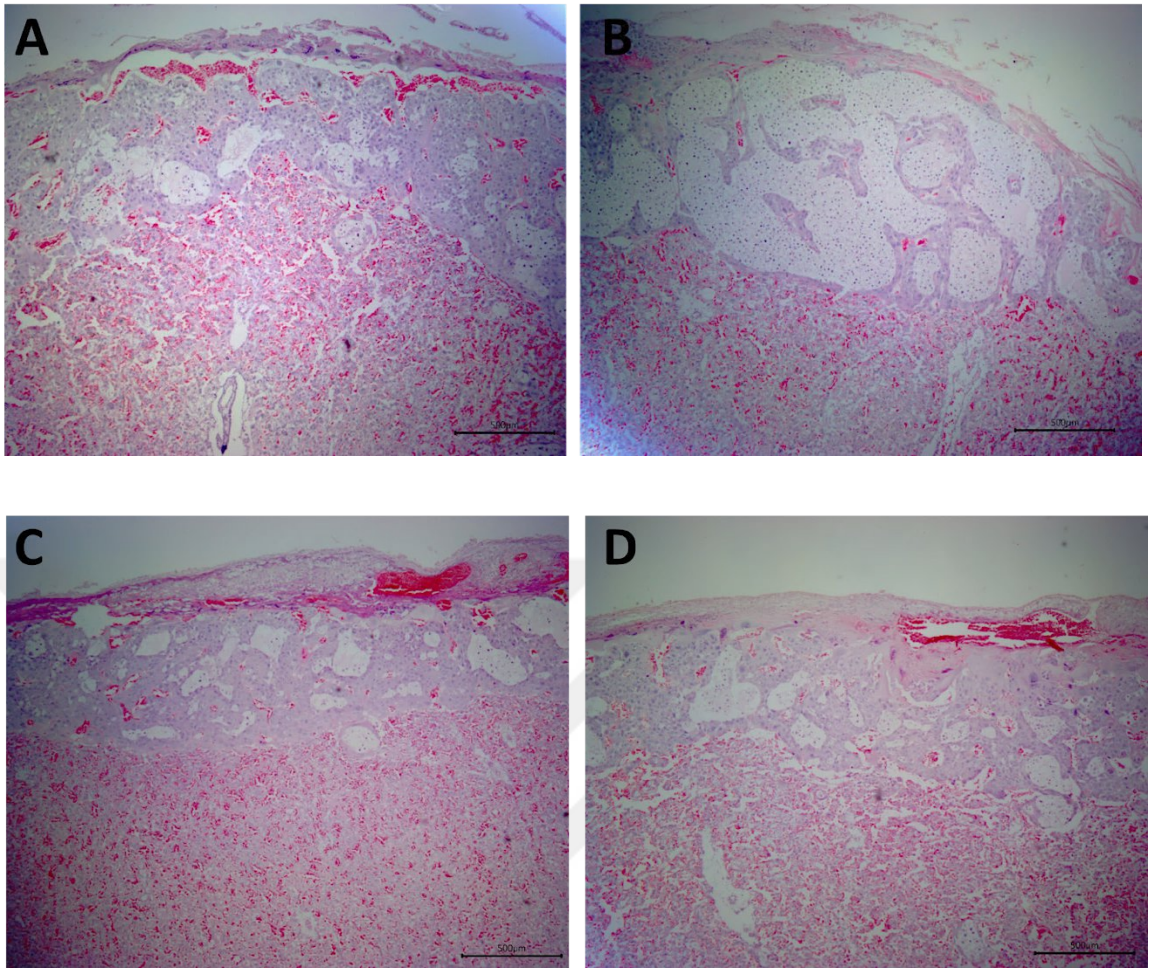
Tablo 7: Bazal zonda glikojen hücre oranları

Grup	Glikojen Oranı (%)
Kontrol Grubu	10,9 ± 2,6
Hipotiroidi Grubu	29,1 ± 5,2
Melatonin Grubu	13,1 ± 3,3
Hipotiroidi + Melatonin Grubu	10,2 ± 0,6

İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında kontrol ve hipotiroidi grupları karşılaştırılmasında p=0,03 çıkmış ve anlamlı fark bulunmuştur. Diğer gruplar arasındaki değerlendirmelerde p>0,05 bulunmuş ve anlamlı fark bulunamamıştır. **(Şekil 16)**



Şekil 16: Glikojen hücre oranları karşılaştırılması



Şekil 17: Gruplara ait plasenta kesitlerinde glikojen hücre görünümleri (H&E, x4). Hipotiroidi grubunda bazal zonda glikojen hücre yüzdesinin arttığı görülmektedir.(**B)**
(A) Kontrol grubu, **(B)** Hipotiroidi grubu**,**
(C) Melatonin grubu, **(D)** Hipotiroidi+ Melatonin grubu**.** (x4)

4.4.Vaskülarite oranları değerlendirilmesi

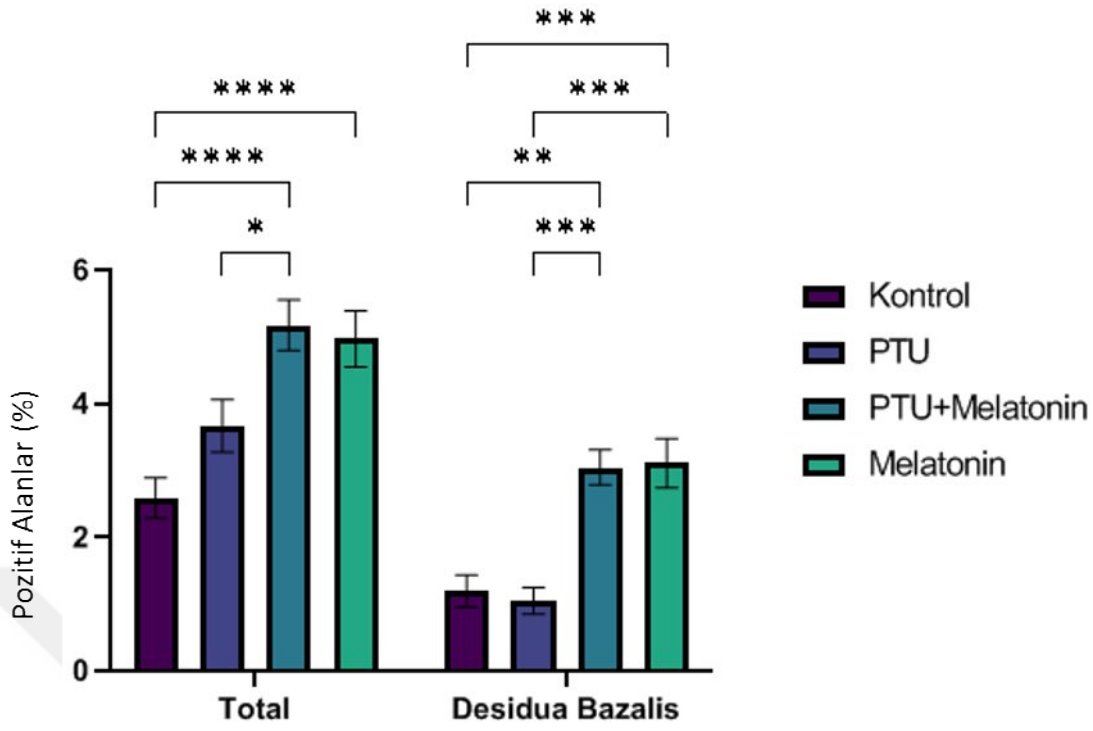
Desidua bazalis ve bazal zonda bulunan damarlanma oranı her gruptan en az 5 farklı plasenta ve her preperattan x10 çekilmiş en az 5 farklı alan fotoğrafı kullanılarak İmageJ programı ile ölçüldü. Vaskülarite oranları ölçüm ortalaması kontrol grubunda %2,5±0,2, hipotiroidi grubunda %3,6±0,3, melatonin grubunda %4,9±0,4 ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise %5,1±0,3 olarak bulundu. **(Tablo 8)**

Tablo 8: Desidua bazalis ve Bazal zonda vaskülarite oranları

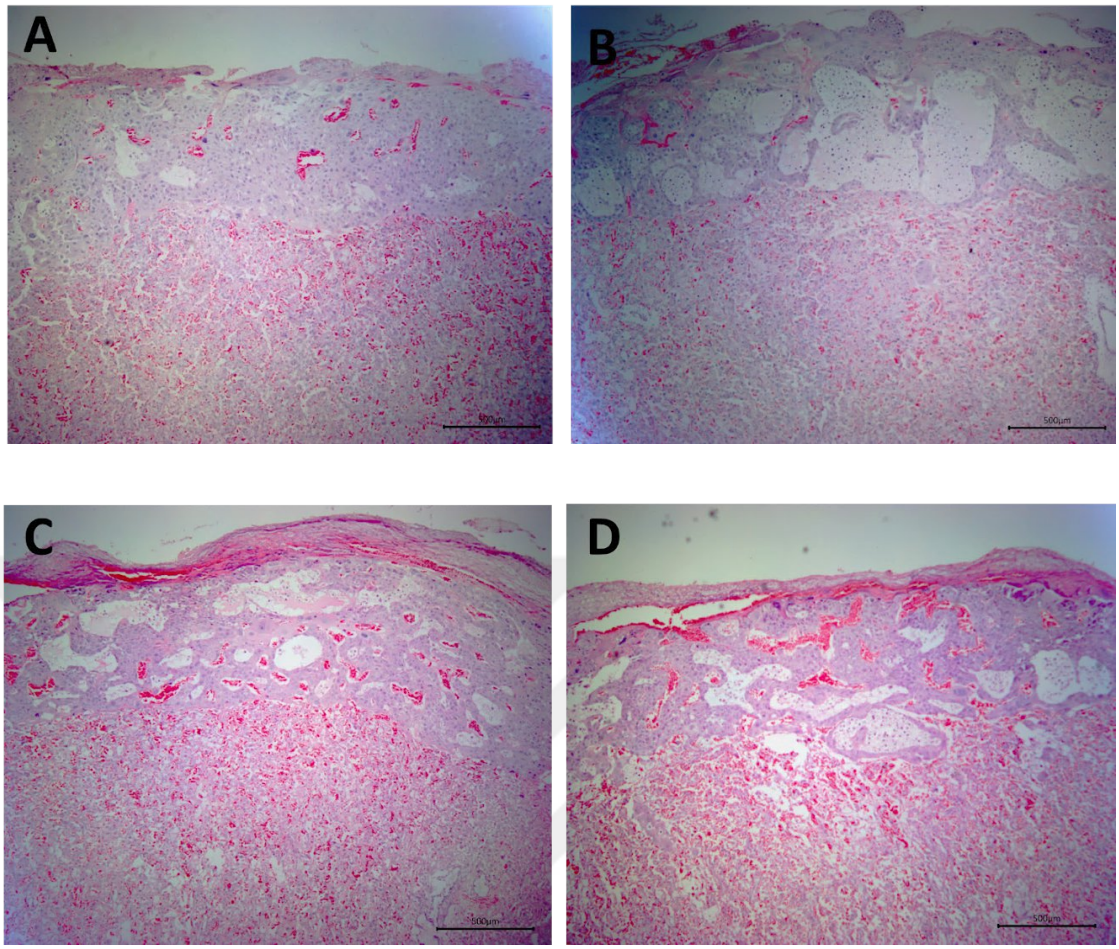
Grup	Vaskülarite Oranı (%)
Kontrol Grubu	2,5 ± 0,2
Hipotiroidi Grubu	3,6 ± 0,3
Melatonin Grubu	4,9 ± 0,4
Hipotiroidi + Melatonin Grubu	5,1 ± 0,3

Desidua bazalis ve bazal zon totalinde istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında kontrol ile melatonin grupları ve kontrol ile hipotiroidi+melatonin grupları arasında $p<0,0001$ çıkmış ve anlamlı fark bulunmuştur. Hipotiroidi ve hipotiroidi+melatonin grupları arasında $p=0,01$ olarak hesaplanmış ve anlamlı fark bulunmuştur.

Sadece desidua bazalis vaskülarizasyonu değerlendirildiğinde ise kontrol ile melatonin grupları ve kontrol ile hipotiroidi+melatonin grupları arasında $p=0,01$ çıkmış ve gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Hipotiroidi ile melatonin grupları ve hipotiroidi ve hipotiroidi+melatonin grupları arasında $p=0,0003$ olarak hesaplanmış ve anlamlı fark bulunmuştur. **(Şekil 18, Şekil 19)**



Şekil 18: Desidua bazalis ve Bazal zon ile sadece Desidua bazalisteki vaskülarite oranları karşılaştırılması



Şekil 19: Gruplara ait plasenta kesitlerinde vaskülarite görünümleri (H&E, x4). Melatonin ve hipotiroidi+ melatonin gruplarında desidua bazalis ve bazal zonda vaskülarite yüzdesinin arttığı görülmektedir.(**C,D)**
(A) Kontrol grubu, **(B)** Hipotiroidi grubu**,**
(C) Melatonin grubu, **(D)** Hipotiroidi+ Melatonin grubu**.** (x4)

4.5.İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1.FoxP3 İmmünohistokimya Değerlendirmesi

FoxP3 (Forkhead box P3), bağışıklık sisteminde kritik bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Özellikle regülatör T hücrelerinin (Treg) gelişiminde ve fonksiyonlarında merkezi bir öneme sahiptir. Foxp3, Treg hücrelerinin spesifik bir belirteci (marker) olarak kullanılır. FoxP3, bağışıklık sisteminin düzenleyici T

hücrelerini tanımlamak ve onların fonksiyonunu anlamak için kullanılan, bağışıklık dengeleyici bir proteindir.

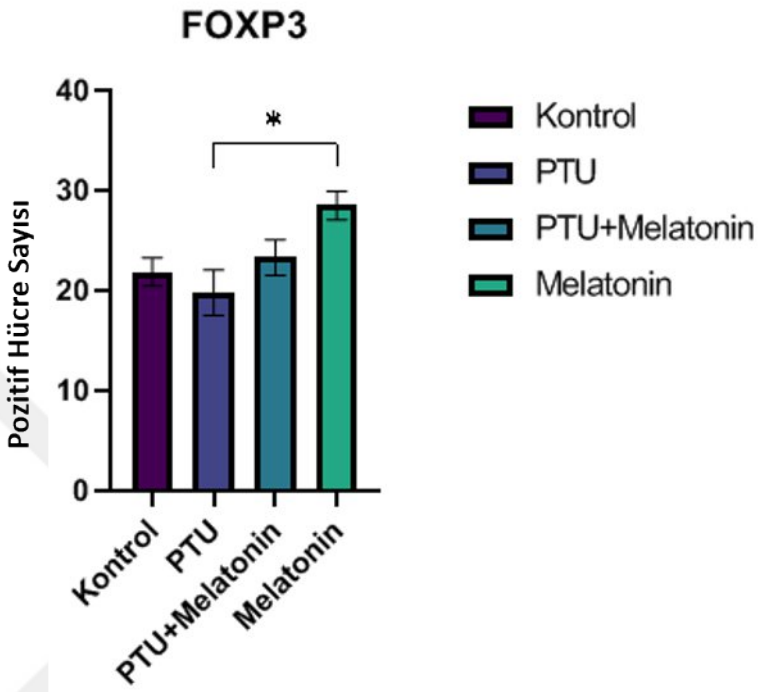
Plasenta dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler lizinli lamlara alındı ve plasentadaki Treg hücrelerini işaretlemek amacıyla FoxP3 boyaması yapıldı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu ile incelendi. İstatistiksel değerlendirme için preperatlardan rastgele seçilen 10 alandan x40 büyüme ile görüntüleri alındı ve İmageJ programı ile immün pozitif boyanan hücreler sayıldı.

Yapılan sayım sonucunda ortalama pozitif boyanan hücre sayısı kontrol grubunda 21,8±1,4, hipotiroidi grubunda 19,7±2,2, melatonin grubunda 28,5±1,4 ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise 23,3±1,7 olarak bulundu. **(Tablo 9)**

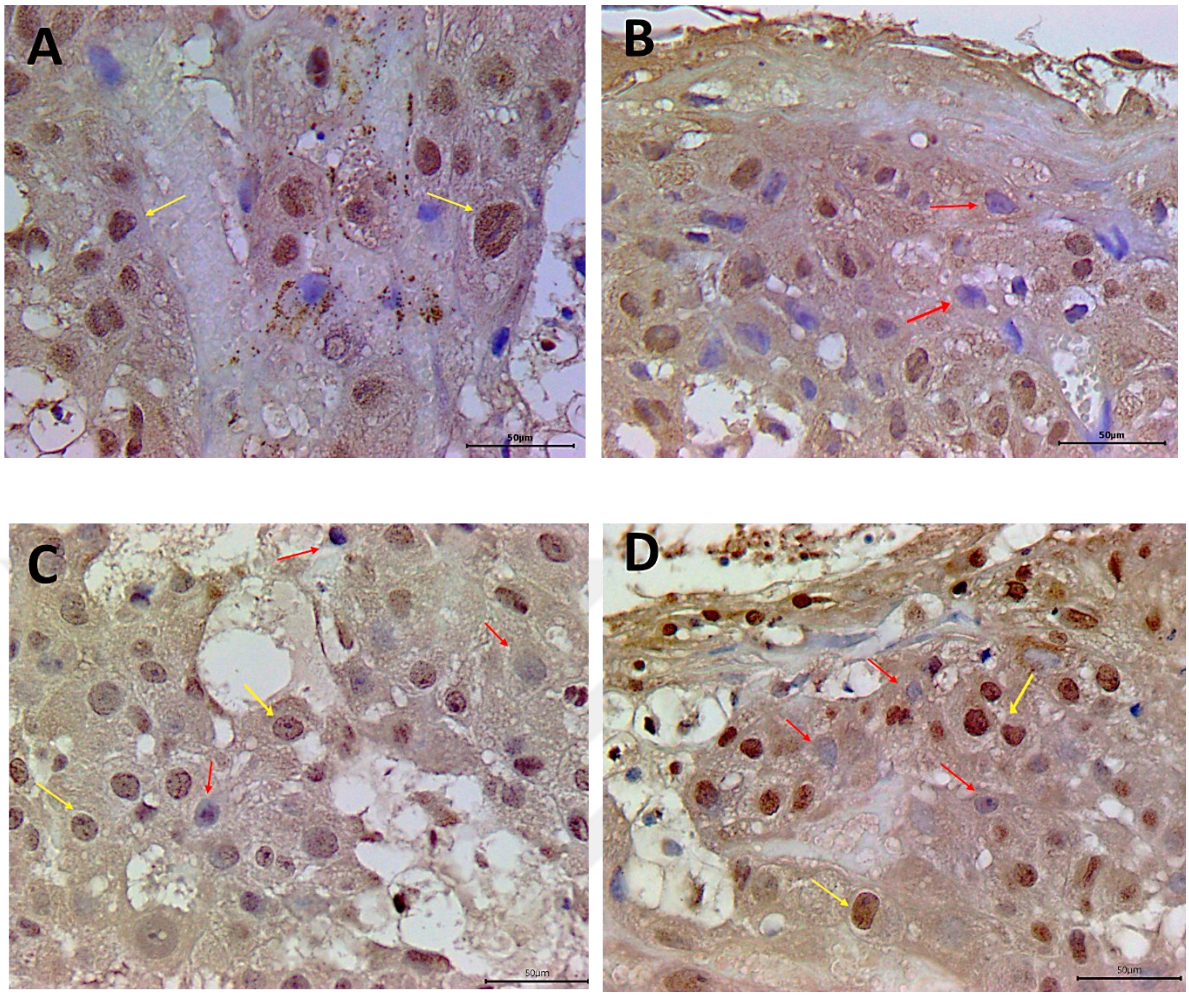
Tablo 9: Foxp3 pozitif boyanan hücre sayıları

Grup	Pozitif Hücre Sayısı (ortalama ± SD)
Kontrol	21,8 ± 1,4
Hipotiroidi	19,7 ± 2,2
Melatonin	28,5 ± 1,4
Hipotiroidi + Melatonin	23,3 ± 1,7

Kontrol grubu ile kıyaslandığında hipotiroidide FoxP3 pozitif boyanan hücre sayısında azalma olmuş olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hipotiroidi ve melatonin grupları karşılaştırılmasında p=0,01 olarak bulunmuş ve anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Diğer gruplar arasındaki değerlendirmelerde p>0,05 bulunmuş ve anlamlı fark bulunamamıştır. **(Şekil 20, Şekil 21)**



Şekil 20: FoxP3 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması



Şekil 21: Gruplara ait FoxP3 immünohistokimyasal boyama (x40).

FoxP3 pozitif hücreler sarı ok ile negatif hücreler kırmızı ok ile gösterilmiştir. **(A)** Kontrol grubu, **(B)** Hipotiroidi grubu**, (C)**Melatonin grubu, **(D)** Hipotiroidi+ Melatonin grubu**.** (x40)

4.5.2.CK7 İmmünohistokimya Değerlendirmesi

CK7, epitelyal hücrelerde bulunan sitokeratin 7 proteinidir. Hücrelerin sitoplazmasında bulunur. CK7, plasental dokularda özellikle trofoblastik hücreleri tanımlamak amacıyla kullanılan önemli bir immünohistokimyasal belirteçtir.

CK7 plasenta hücrelerinde, çeşitli trofoblastik proliferasyonları**,** gebeliğe bağlı hastalıkları ve metastatik lezyonları ayırt etmede kritik rol oynar**.** Sinsityotrofoblast**,**

sitotrofoblast ve intermedyer trofoblastlar CK7 ile pozitif boyanır. CK7, maternal hipotiroidide plasentada ifadesini korur, ancak trofoblastların sayısal ve morfolojik değişiklikleri, dağılımı ve yoğunluğunda dolaylı değişikliklere neden olabilir.

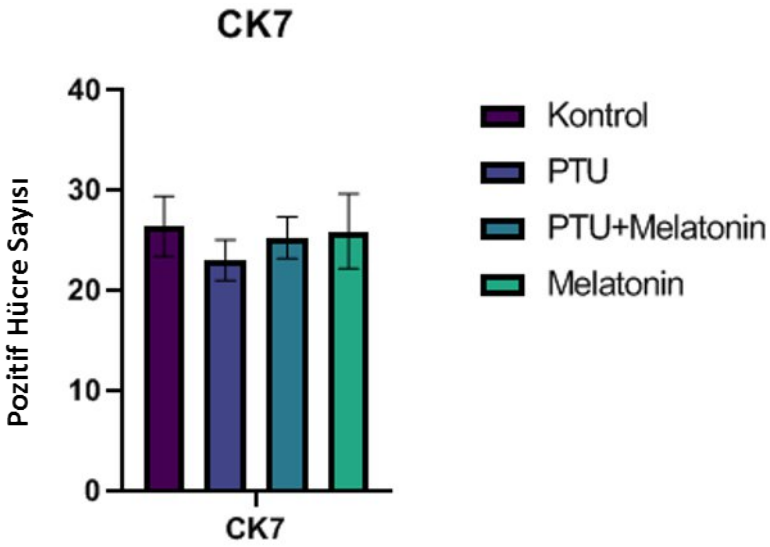
Plasenta dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler lizinli lamlara alındı ve plasentada trofoblast sayı ve morfolojisinde değişiklik olup olmadığını saptamak amacıyla CK7 boyaması yapıldı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu ile incelendi. İstatistiksel değerlendirme için preperatlardan rastgele seçilen 10 alandan x40 büyüme ile görüntüleri alındı ve İmageJ programı ile immün pozitif boyanan hücreler sayıldı.

Yapılan sayım sonucunda ortalama pozitif boyanan hücre sayısı kontrol grubunda 26,3±2,9, hipotiroidi grubunda 23±2, melatonin grubunda 25,8±3,7 ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise 25,2±2 olarak bulundu. **(Tablo 10)**

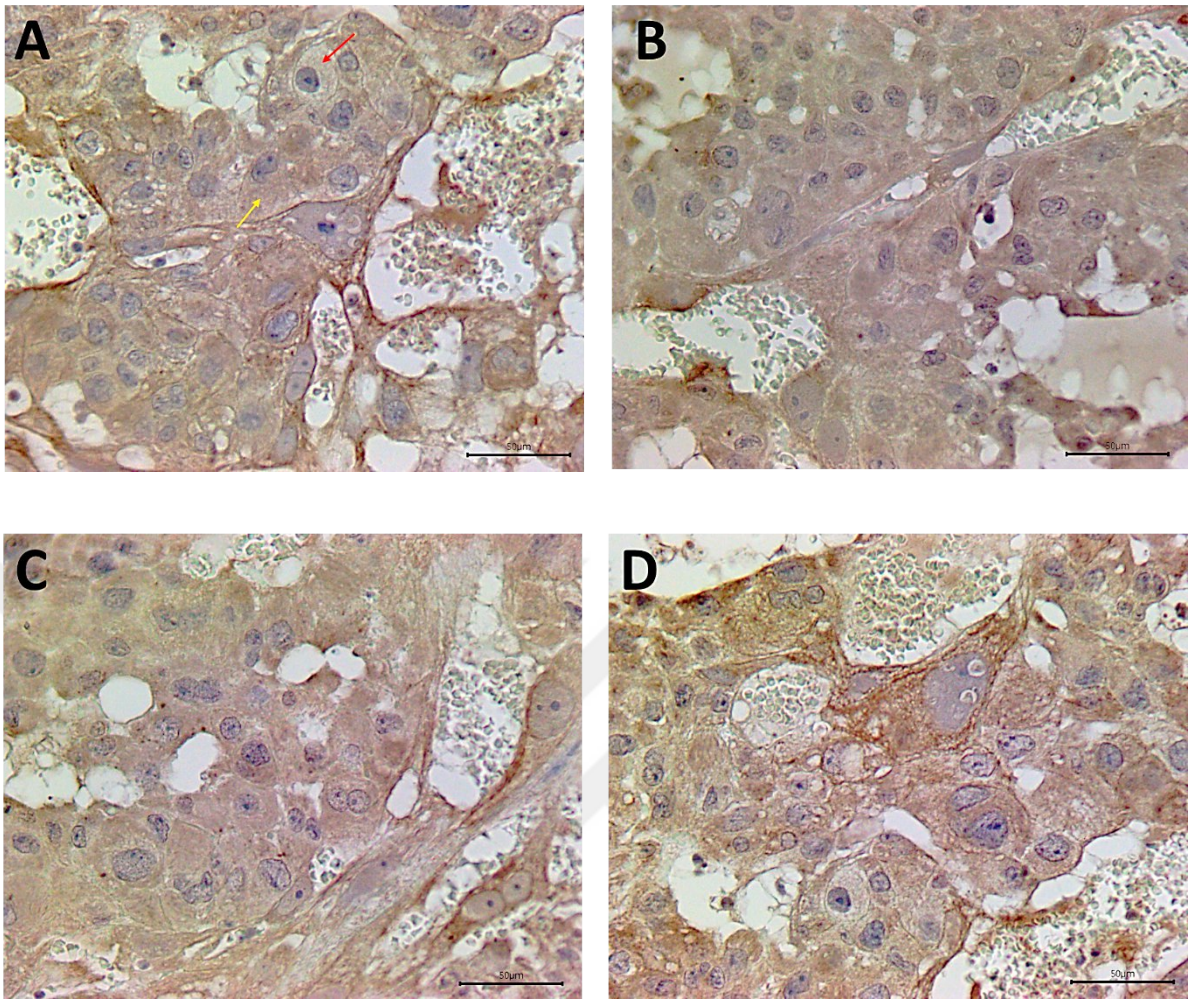
Tablo 10: CK7 pozitif boyanan hücre sayıları

Grup	Pozitif Hücre Sayısı (Ort. ± SS)
Kontrol	26,3 ± 2,9
Hipotiroidi	23,0 ± 2,0
Melatonin	25,8 ± 3,7
Hipotiroidi + Melatonin	25,2 ± 2,0

Kontrol grubu ile kıyaslandığında hipotiroidide CK7 pozitif boyanan hücre sayısında azalma olmuş olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmelerde $p>0,05$ bulunmuş ve anlamlı fark bulunamamıştır. **(Şekil 22, Şekil 23)**



Şekil 22: CK7 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması



Şekil 23: Gruplara ait CK7 immünohistokimyasal boyama (x40). CK7 pozitif hücreler sarı ok ile negatif hücreler kırmızı ok ile gösterilmiştir. **(A)** Kontrol grubu, **(B)** Hipotiroidi grubu**, (C)**Melatonin grubu, **(D)** Hipotiroidi+ Melatonin grubu**.** (x40)

4.6.Biyokimyasal Değerlendirmeler

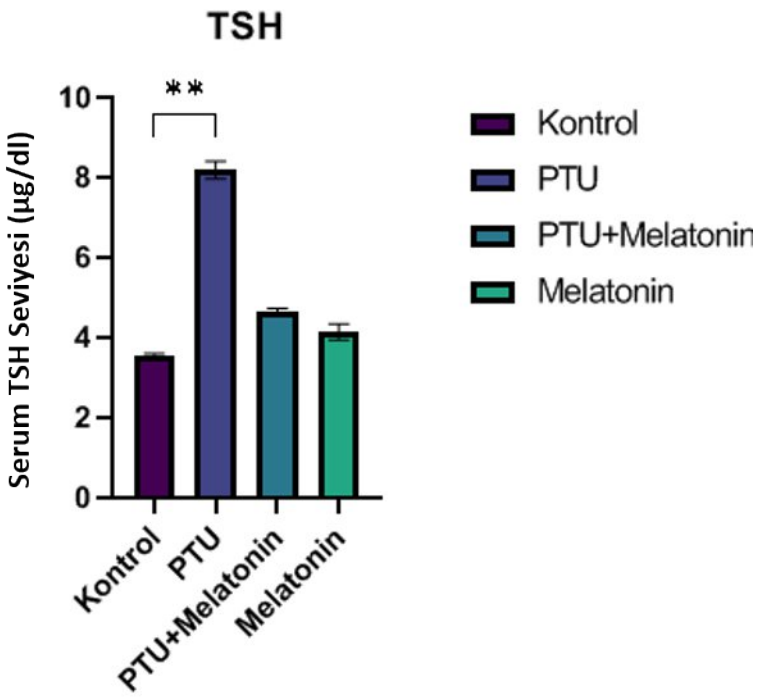
Deneyin başlangıcında ve sonunda, deneklerden %10 - %10 kuralına uygun şekilde kan örnekleri alınmıştır. Bu örneklerden serumlar ayrılmış ve serum içerisindeki TSH hormon düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol grubundan elde edilen ilk kan örnekleri ise bazal (başlangıç) değer olarak kabul edilmiştir.

Deney sonunda serum TSH seviyeleri kontol grubunda 3,5±0,05, hipotiroidi grubunda 8,1±0,2, melatonin grubunda 4,1±0,2 ve hipotiroidi + melatonin grubunda ise 4,6±0,07 olarak bulundu. **(Tablo 11)**

Tablo 11: Serumdaki TSH seviyeleri

Grup	TSH Seviyesi (mIU/L)
Kontrol Grubu	3,5 ± 0,05
Hipotiroidi Grubu	8,1 ± 0,2
Melatonin Grubu	4,1 ± 0,2
Hipotiroidi + Melatonin Grubu	4,6 ± 0,07

Kontrol ve Hipotiroidi grupları serum TSH seviyeleri karşılaştırılmasında p=0,003 olarak bulunmuş ve anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Diğer gruplar arasındaki değerlendirmelerde p>0,05 bulunmuş ve anlamlı fark bulunamamıştır. Bu sonuçlara göre oluşturduğumuz deneysel hipotiroidi modeli başarılı olmuştur. **(Şekil 24)**



Şekil 24: Serum TSH seviyeleri değerlendirilmesi

Sonuç olarak;

1. Maternal ağırlıkta istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da hipotiroidi grubunda kontrol grubuna kıyasla daha az kilo artışı olmuş ve PTU melatoninle birlikte verildiğinde bu fark azalmıştır.
2. H&E boyama ile plasental tabakalar ölçümünde; desidua bazaliste gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır.
3. H&E boyama ile spongioz zon kalınlıkları ölçüldüğünde hipotiroidi grubunda kontrole kıyasla artma olmuş ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır. Hipotiroidi grubunda kalınlaşan bazal zon, hipotiroidi + melatonin birlikte verildiğinde incelmiş ve istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır.
4. H&E boyama ile glikojenik hücre oranları değerlendirildiğinde hipotiroidi grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
5. H&E boyama ile vaskülarite oranları değerlendirildiğinde hem desidua bazaliste, hem de desidua bazalis ve bazal zon toplamında kontrol ve melatonin grupları ile kontrol ve hipotiroidi+ melatonin grupları arasında anlamlı fark gözlenmiş, melatonin gruplarında vaskülarite oranı artmıştır.
6. Foxp3 ile işaretlenen Treg hücre sayılarında hipotiroidi ve melatonin grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur.
7. CK7 ile işaretlenen trofoblast hücrelerinde hipotiroidi grubunda görece düşüş olsa da istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
8. ELİSA ile serum TSH düzeyleri değerlendirildiğinde hipotiroidi grubunda anlamlı artış göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Plasenta, gebelik süresince anne ile bebek arasında kurulan hayati bağlantıyı sağlayan, geçici ancak oldukça işlevsel bir organdır. Bu yapı, annenin sağlığını desteklerken, bebeğin büyümesi ve yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan biyolojik alışverişi gerçekleştirir. Plasenta, annenin bağışıklık sistemi ile bebeğin genetik olarak farklı yapısı arasında bir uyum oluşturarak, annenin bebeğe karşı bağışıklık tepkisi geliştirmesini engeller. Aynı zamanda oksijen ve besin maddelerinin bebeğe taşınmasını sağlarken, bebeğin atık ürünlerinin de anneden uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Hormon üretimiyle gebeliğin sürdürülmesini destekler ve bebeği dış çevresel tehditlere karşı koruyarak, hamileliğin sağlıklı şekilde ilerlemesinde önemli roller üstlenir. (166)

Tiroid hastalıkları, üreme çağındaki kadınlarda erkeklere kıyasla daha yaygın olarak görülmektedir. Bu durum, gebelik sürecinde tiroid fonksiyonlarına bağlı çeşitli klinik sorunların ortaya çıkma riskini artırır. Gebeliğe özgü hormonal ve metabolik değişiklikler, tiroid hormon düzeylerinde fizyolojik dalgalanmalara yol açabilir. Anne adayının tiroid fonksiyonu, gebeliğin dönemlerine göre farklılık gösterir. Özellikle ilk trimesterde, plasentadan salgılanan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonunun geçici olarak yükselmesi, tiroid bezini uyararak tiroksin (T4) üretimini artırabilir. Bu durum, anne ile fetüs arasındaki hormonal dengenin korunmasında önemli rol oynar ve her iki bireyin sağlığı açısından klinik açıdan dikkate değerdir. (167)

Tiroid hormonları gebeliğin sağlıklı devamı için kritik öneme sahiptir. Hipotiroidi erken gebelik kayıplarıyla, preeklampsi, düşük doğum ağırlığı, fetal gelişim bozuklukları, anemi ve plasental komplikasyonlar gibi çeşitli obstetrik sorunlarla ilişkilidir. (168)

Melatonin, başlıca pineal bezden salgılanan bir hormondur ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Ancak gebelikteki rolü bu işlevin çok ötesine geçer. Melatonin plasenta aracılığıyla anneden fetüse geçtiği gibi plasentada da sentezlenir ve antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresi azaltarak fetal gelişimi destekler. Bu özellikle preeklampsi, tekrarlayan fetal kayıp, intrauterin büyüme geriliği (IUGR), erken doğum gibi durumların önlenmesinde önemlidir. Melatonin,

endometriyumda reseptörlere bağlanarak embriyonun tutunmasını kolaylaştırır. Aynı zamanda fertilizasyonu ve erken embriyo gelişimini destekler. (121) (169)

Melatonin, plasentada temel bir antioksidan işlevi görür; sürekli olarak serbest radikalleri nötralize ederek oksidatif stresi azaltır ve böylece plasental yapının korunmasına katkı sağlar. Gebelik süresince annenin bağışıklık sistemi, gelişmekte olan fetüsün ihtiyaçlarına uyum sağlamak üzere dinamik şekilde değişirken, melatonin hem erken hem de geç dönemlerde bağışıklık dengesini sağlayarak güçlü bir anti-inflamatuar etki oluşturur. (14) (170) (171)

Feto-maternal intolerans, annenin bağışıklık sisteminin, fetüsü kısmen yabancı (alloantijenik) bir yapı olarak tanıyarak ona karşı immünolojik tepki geliştirmesi durumudur. Çünkü fetüs, babadan gelen genetik materyali de taşır ve bu, annenin bağışıklık sistemi için "yabancı" olarak algılanır. (172)

Normal gebelikte bu tarz bir bağışıklık tepkisinin oluşması baskılanır. Bu baskılama sayesinde fetüs, annenin immün sistemi tarafından reddedilmeden büyüyebilir. Ancak bu tolerans bozulursa, tekrarlayan düşükler, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği (IUGR), fetal kayıp gibi durumlar gelişebilmektedir. Bu tür bağışıklık sorunları, özellikle otoimmün hastalığı olan veya bağışıklık regülasyonunda bozukluk bulunan annelerde daha sık gözlenir. (173)

Silva ve ark. (174) gebe sıçanlarda yaptıkları hipotiroidi çalışmalarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hipotiroidi grubundaki maternal ağırlık artışının daha az olduğunu göstermişlerdir. J Sack ve ark. (175) hipotiroidi modeli oluşturdukları gebe sıçanlarda maternal ağırlık artışının kontrol grubuna göre daha az olduğunu bulmuşlardır.

Kent ve ark. (176) sıçanlarla yaptıkları hipotiroidi çalışmasında, gebelikte orta derece hipotiroidi ve şiddetli hipotiroidi gruplarında kontrole göre daha az su ve yiyecek tüketimi ve dolayısıyla daha az ağırlık artışı saptamışlardır. Çalışmamızda maternal ağırlık değişimleri incelendiğinde, hipotiroidi grubundaki annelerin gebelik süresince kilo alımının diğer gruplara göre daha az olduğu görülmüş, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Organizmada sistemik tiroid fonksiyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem, serum tiroid hormonları (T4 ve T3) ve TSH seviyelerinin ölçülmesidir. Sun ve ark. (177) içme suyuna PTU ekledikleri gebe sıçanlarda serum TSH düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Guo ve ark. (178) hipotiroidizm oluşturdukları sıçanlarda serum TSH seviyesini kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Sofronova ve ark. (179) ve Ahmed ve ark. (180) yaptıkları çalışmalarda deneysel hipotiroidi modeli oluşturdukları gebe sıçanlarda serum TSH düzeyinde artış saptamışlardır. Yen-Jui Chang ve ark(181) tiroidektomi ve PTU enjeksiyonu ile hipotiroidi oluşturdukları sıçan gruplarında TSH seviyelerini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Biz de kendi çalışmamızda, bu çalışmalara benzer şekilde hipotiroidi oluşturduğumuz gebe sıçanlarda serum TSH düzeylerinin yüksek olduğunu saptayarak hipotiroidi modeli oluşturduğumuzu gösterdik.

Melatonin ve tiroid hormonları arasındaki ilişki daha önce de incelenen ve hala araştırılmakta olan bir konudur. Yapılan çalışmalar aralarındaki ilişkinin karmaşık olduğunu göstermiştir. Farklı çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur.

Gordon ve ark. (182) 21 gün melatonin uyguladıkları sıçanlarda melatoninin, periferik tiroid hormon seviyelerini değiştirmediğini ancak bazal TSH seviyesini artırdığını göstermişlerdir.

Wright ve ark. (183) melatoninin, TSH uyarısına karşı tiroid yanıtını nasıl etkilediğini incelemişler ve yüksek doz melatoninde tiroid yanıtının baskılanırken, daha düşük konsantrasyonlarda önemli düzeyde baskılanmadığını göstermişlerdir.

Laskar ve ark. (184) farklı yaş gruplarındaki erkek ve dişi farelere eksojen melatonin uygulamışlar ve tiroid hormonları üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Erkek farelerde melatonin, erken yaş grubunda T4 inhibisyonuna neden olurken, ileri yaş grubundaki erkek farelerde ve tüm yaş gruplarındaki dişilerde T4 seviyesi artışına neden olmuştur. Ayrıca hem dişi hem erkek farelerde tiroid bezi üzerindeki MT1 melatonin reseptör ekspresyonu azalmıştır.

RVN Paiva ve ark. (185) akut hipotiroidizm oluşturdukları sıçanların epifiz bezinde ve gonadlarında melatonin sentez enzimlerinin ekspresyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Buldukları sonuçta hipotiroidizmin üreme organlarında meydana getirdiği değişiklikleri melatonerjik sistem bileşenleri özellikle de melatonin sentez enzimleri ekspresyonu üzerinden yaptığını öne sürmüşlerdir.

Garcia-Marin ve ark. (186) yaptıkları çalışmada tiroiddeki C hücrelerinin melatonin biyosentezinde bulunan önemli enzimlere sahip olduğunu ve burada üretilen melatoninin parakrin ve otokrin etki ile tiroid hücrelerini oksidatif stresten koruyabileceğini söylemişlerdir.

Gładysz ve ark. (187) melatoninin tiroidde oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu ve potansiyel ajan olarak değerlendirilebileceğini öne sürmüşlerdir.

Bellipanni ve ark. (188) perimenopoz ve menopozdaki kadınlarda eksojen melatonin uygulanmasının 3 ila 6 ay sonrasında plasebo grubuna kıyasla daha yüksek tiroid hormon düzeyleri sergilediğini ve bu grubun ruh hali ile genel uyanıklık düzeylerinde belirgin iyileşmeler yaşadığını ortaya koymuştur. Çalışma yazarları, yaşlanma ile birlikte azalan melatonin düzeylerinin tiroid hormonlarındaki düşüşle ilişkili olabileceğini ve melatonin takviyesinin tirotropin (TSH) düzeylerini düzenlemedeki etkisinin bu ilişki üzerinden açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Belviranlı ve ark. (189) deneysel olarak indüklenmiş hipotiroidi oluşturdukları ratlarda melatonin düzeylerini incelemek istemişlerdir. Sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla hipotiroidi oluşturulan hayvanlarda melatonin seviyesinin azalmış olduğunu göstermişlerdir.

Singh ve ark. (190) 2022 yılında yayınladıkları çalışmalarında bizim de yaptığımız gibi hipotiroidi modeli oluşturmuş ve tedavi olarak melatonin uygulaması yapmışlardır. Serum TSH analizlerinde hipotiroidi grubunda TSH seviyesinin arttığını, melatonin grubunda ise serum TSH seviyesinin kontrole benzer olduğunu ancak melatoninin tiroid bezindeki TSH reseptör ekspresyonunu arttırdığını bulmuşlardır. Aynı zamanda sağlıklı farelerde melatonin uygulanması dolaşımdaki T3 ve T4 seviyelerini önemli ölçüde düşürürken, hipotiroidi oluşturulmuş farelere

melatonin uygulanması hipotiroidi grubuna kıyasla T3 ve T4 hormon seviyelerinde artışa sebep olmuştur. Tiroid bezi incelemelerinde ise hipotiroidi ile bozulan tiroid bezi morfolojisinin, birlikte melatonin uygulanmasıyla daha normale döndüğünü gözlemlemişlerdir.

Yine Mariyah Hidayet ve ark. (191) tarafından yapılan çalışmada hipotiroidi, melatonin ve hipotiroidi+melatonin grubu oluşturulmuştur. Serum TSH seviyeleri kontrol ve melatonin gruplarında benzer bulunurken, hipotiroidi grubunda anlamlı olarak TSH yüksekliği saptamışlardır. Ayrıca maternal hipotiroidili ve melatonin tedavisi alan annelerden doğan yavruların beyinlerini karşılaştırmışlardır. Hipotiroidili anneden doğan yavruların beyinlerinde apoptoz oranlarında ve nöron sayılarında düşüş gözlenirken, tedaviye melatonin eklenmiş annelerden doğan yavrularda bu bulgular azalmış bulunmuştur. Böylece gebelikte melatonin kullanımının fetal beyni yoğun apoptozdan koruyacağını söylemişlerdir.

Biz de bu çalışmalar ile uyumlu şekilde hipotiroidi grubunda artmış, melatonin grubunda ise kontrole yakın bir TSH seviyesi tespit ettik.

Silva ve ark. (174) ve Pickard ve ark. (192) propiltiyourasil (PTU) ile oluşturdukları hipotiroidizmin etkisi altındaki plasentalarda, özellikle spongiotrofoblastik zonda (bazal tabaka), glikojenik hücrelerin oranında belirgin bir artış gözlemlemişlerdir. Lozano ve ark. da (193) tavşanlarla yaptıkları hipotiroidizm çalışmasında, hipotiroidi grubunda kontrole oranla daha yüksek glikojen hücre oranı bulmuşlardır. Anjos Cordeiro ve ark. (194) PTU ile oluşturulan hipotiroidik gebe sıçanlarda glikojenik hücre oranını kontrole göre yüksek bulmuşlardır. Biz de bu çalışmalara benzer şekilde hipotiroidi grubunda spongiotrofoblastik zonda gikojenik hücre oranında anlamlı artış tespit ettik.

Bilici ve ark. (195) ve Santos ve ark. (196) tarafından bildirilen spongiotrofoblast tabaka kalınlığında artışa paralel olarak, biz de H&E boyama ile yaptığımız histolojik incelemelerde hipotiroidi grubunda bazal zon (spongiyoz tabaka) kalınlığında artış saptadık; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Buna karşın spongiyoz zon kalınlığı hipotiroidi grubunda artmış ve hipotiroidi+melatonin grubunda

azalmıştır. Bu farklar anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu da melatoninin, hipotiroidi ile artan spongioz zon kalınlığını azalttığını göstermiştir.

Yaptığımız çalışmada desidua bazalis ve bazal zon totalinde ve sadece desidua bazalis özelinde vaskülarizasyon değerlendirildiğinde plasental vaskülarite oranı, özellikle melatonin ve hipotiroidi+melatonin gruplarında belirgin şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Bu durum, melatoninin anjiyogenez üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir. Hipotiroidi grubunda ise vaskülarite düzeyinin kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen, bu artış anlamlı bulunmamıştır. Hipotiroidi ve hipotiroidi+melatonin grupları karşılaştırıldığında hipotiroidi+melatonin grubunda daha yüksek oranda vaskülarite artışı saptanmış ve gruplar arası anlamlı fark bulunmuştur. ($p<0,05$). Klettner ve ark. (197) ve Yiran Li ve ark. (198) yaptıkları çalışmalarda melatoninin VEGF'i arttırdığını ve damarlanma artışına olumlu etki ettiğini bulmuşlardır. Behram ve ark. (199) yaptıkları çalışmalarda melatoninle tedavi edilen sıçanlarda, özellikle vaskülogenezin yoğun olduğu alanlarda, VEGF ve VEGFR1'in artmış olduğunu göstermişlerdir. Miller ve ark. da (200) koyunlar üzerinde yaptıkları çalışmada VEGF-A izoformunu çalışmışlar ve melatoninin VEGF-A ekspresyonunu artırdığını kanıtlamışlardır. Bizim de bulgularımız, melatoninin antioksidan özellikleri aracılığıyla plasental damar gelişimini desteklediği yönündeki hipotezle uyumludur. Tüm bu dolaylı kanıtlar melatoninin damar oluşumunu kontrol edebileceğini düşündürmektedir.

Maternal hipotiroidizm sonucunda gözlenen olumsuz gebelik patolojileri için farklı mekanizmalar önerilmekte ve araştırılmaya devam edilmektedir. Maternal hipotiroidizmin fetomaternal arayüzde oksidatif strese sebep olması ve antiinflamatuar ortamın bozulmasına neden olarak gebelik patolojilerine yol açması çokça araştırılmaktadır.

Noriyuki Ohara ve ark. (201) ve Silva ve ark. (202) tiroid hormonlarının trofoblastların gelişimi ve göçünde önemli rol oynadıklarını göstermişlerdir. Literatürde doğrudan bir "tiroid hormonu → CK7 geni" bağlantısı tanımlanmamıştır**,** ancak tiroid hormonlarının trofoblast hücrelerine olan etkileri dolaylı olarak CK7 ekspresyonunu değiştirebilir. Tiroid hormon eksikliği trofoblast proliferasyonu/diferensiasyonu azaltır ve CK7 pozitif hücre sayısı azalabilir. Bu

durum, hipotiroidizmin trofoblast hücre yapısı ve fonksiyonu üzerinde dolaylı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bizim de bulgularımız CK7 pozitif hücre sayısında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$), ancak anlamlı olmasa da hipotiroidi grubunda belirgin azalma eğilimi dikkat çekicidir. Yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Haibo Xue ve ark. (203) hipotiroidinin en yaygın sebeplerinden olan Hashimato tiroiditinde Treg hücre durumunu incelemişler ve periferik dolaşımda Treg hücrelerinde anlamlı bir azalma olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca Foxp3 mRNA ekspresyonunu ve TGF-β seviyelerini de düşük bulmuşlardır.

Glick ve ark. (204) ve XiaoYang ve ark. (205) yaptıkları çalışmalarda hipotiroidinin FoxP3'ü azalttığını ve T-reg sayısı/fonksiyonu bozukluğu yaptığını söylemişlerdir.

Biz de kontrol grubu ile kıyaslandığında hipotiroidide Foxp3 pozitif boyanan hücre sayısında azalma olmuş olduğunu bulmuş olsak da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Melatonin ve Treg hücreleri arasındaki ilişki karmaşık görünmektedir. Glebezdina ve ark. (206) naif CD4+ hücrelerin Treg hücrelerine farklılaşmasında melatonin etkisi olup olmadığını incelemişler ve melatonin ilave edilen kültürde FoxP3+ Treg hücrelerine dönüşümde azalma olduğunu göstermişlerdir.

Yine Vinther ve Claesson (207) melatoninin antitümör tedavide kullanımında Treg sayısında önemli bir düşüşe neden olduğunu, bunun da tümörde azalmaya yol açtığını söylemişlerdir.

Ting Chang ve ark. (208) Miyastenia Gravis hastalarında yaptıkları çalışmada; MG hastalarında FoxP3+ hücre sayısının azalmış olduğunu ve Melatoninin FoxP3 ifadesini anlamlı şekilde arttırdığını, $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ Treg oranı yükselttiğini göstermişlerdir.

L. Liu ve ark. (209) 2018 Amerikan Organ Nakli Kongresinde sundukları çalışmalarında kalp allotransplantasyonuna melatoninin etkisini ve mekanizmasını araştırmışlardır. Melatonin sağkalım süresini uzatmış ve drenaj yapan lenf nodlarındaki FoxP3+ Treg hücre yüzdesini artırmıştır. Ayrıca naif CD4+ hücre inkübasyonuna melatonin eklediklerinde Treg hücre oranının önemli derecede arttığını göstermişlerdir.

Campillo ve ark (210) sağlıklı kişilerde ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastalarında melatoninin FoxP3 üzerine etkisini incelemişlerdir. Melatonin ile sağlıklı kişilerde FoxP3+ hücre düzeyi değişmezken, SLE hastalarında CD4+ FoxP3+hücre sıklığı ve floresan yoğunluğunu anlamlı şekilde artmış bulmuşlardır.

Biz de çalışmamızda kontrol grubu ile kıyaslandığında melatonin grubunda FoxP3 pozitif boyanan hücre sayısında artma olduğunu bulduk ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yine FoxP3+ hücreler hipotiroidi grubunda kontrole göre düşme eğiliminde ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Hipotiroidi grubuna melatonin tedavisi uygulanması FoxP3+ hücre sayısını görece artırmış ama istatistiksel anlamlı çıkmamıştır. Melatonin hipotiroidi ile bozulan fetomaternal immuntoleransı düzeltmeye çalışmış ancak yeterince düzeltememiştir.

Hipotiroidi ve melatonin grupları karşılaştırıldığında ise FoxP3+ boyanan hücre sayılarında anlamlı fark bulunmuştur. ($p<0,05$)

Bu sonuçlara dayanarak hipotiroidinin azalttığı Foxp3 oranının, melatoninin uygulanan grupta arttığını gözlemledik. İlk defa bizim çalışmamızda hipotirodide azalarak feto-maternal immün toleransın bozulmasına katkıda bulunan FoxP3+ hücre sayısının, melatonin uygulanan grupta anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak literatürde hipotiroidi ve melatoninin kombine olarak Treg hücre üzerine etkisinin araştırılmadığını gözlemledik. Bu çalışma ile ilk defa sıçanlarda hipotiroidinin ve melatoninin maternal-fetal arayüzdeki Foxp3+ hücreler üzerindeki etkilerini inceledik.

Foxp3 ifadesinin hipotiroidi grubunda kontrol plasentalara göre azalma eğiliminde olduğunu ve melatonin grubunda ise artma eğilimde olduğunu gösterdik. Aynı zamanda hipotiroidi ve melatonin grupları karşılaştırılmasında Foxp3+ hücreler arasında anlamlı fark olduğunu bulduk ve birlikte uygulandığında hipotiroidi grubuna göre Foxp3'ün artma yönelimi olduğunu gösterdik.

Maternal hipotiroidide fetomaternal immuntoleransın bozulmasında FoxP3+ hücrelerinin etkisi olabileceğini ve melatonin uygulanmasının bu bozulmayı düzeltmede umut vadedebileceğini gösterdik. Maternal hipotiroidinin plasenta histopatolojisinde değişikliklere neden olduğunu, melatoninin bu değişiklikleri azalttığını gösterdik.

Ancak biz melatonin tedavisini belirlediğimiz tek bir dozda uyguladık. Melatonin etkileri doza, yaşa, cinsiyete vb. faktörlere göre değişebilmektedir. Farklı çalışma koşulları ve farklı melatonin dozları ile çalışmanın genişletilmesi, melatoninin hipotiroidi ve Foxp3+ hücreler üzerindeki etkisi hakkında daha fazla bilgi verecektir.

Gebelik sürecinde maternal tiroid fonksiyonlarının düzenli olması, fetal gelişimin sağlıklı ilerlemesi açısından kritik öneme sahiptir. Hipotiroidi ile plasental yapısal ve fonksiyonel bozulmalar arasındaki ilişkinin açıklanmasına yönelik çalışmalar son yıllarda artmış olsa da, halen bu ilişkiyi tam olarak aydınlatmak mümkün olmamıştır.

Benzer şekilde, melatoninin gebelikteki fizyolojik rolleri ile ilgili çalışmalar artış göstermektedir. Plasentada melatonin sentezlenmesi ve lokal etkiler göstermesi, onu sadece sistemik değil lokal regülasyon açısından da önemli kılmaktadır. Melatoninin antioksidan, anti-inflamatuar ve immünmodülatör özellikleri sayesinde plasental fonksiyonları destekleyebileceği öne sürülmüştür. Ancak, bu potansiyel koruyucu etkilerin özellikle hipotiroidili gebeliklerde nasıl ortaya çıktığı ve immün regülasyon üzerinden FoxP3^{+} hücreleri nasıl etkilediği konusunda halen bilinenler

yeterli değildir. Melatoninin hipotiroidili bireylerde güvenli ve etkili olduğuna dair kapsamlı ve geniş çaplı çalışmalar da henüz mevcut değildir.

Biz çalışmamızda melatoninin hipotiroidi üzerinde FoxP3+ hücreler, vaskülarizasyon ve plasental morfoloji açısından baktığımızda olumlu değişiklikler yaptığını gözlemledik fakat melatoninin, hipotiroidi gebeler üzerindeki etkisinin daha geniş çaplı olarak araştırılması ve tedavi olarak kullanılması için daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Petroff MG, Nguyen SL, Ahn SH. Fetal-placental antigens and the maternal immune system: Reproductive immunology comes of age*. Immunol Rev. 2022 Jul 29;308(1):25–39.
2. Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. Reproductive Biology and Endocrinology. 2003 Dec 2;1(1):121.
3. Costa MA. The endocrine function of human placenta: an overview. Reprod Biomed Online. 2016 Jan;32(1):14–43.
4. Forhead AJ, Fowden AL. Thyroid hormones in fetal growth and prepartum maturation. Journal of Endocrinology. 2014 Jun;221(3):R87–103.
5. Morreale de Escobar G, Obregon M, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development. Eur J Endocrinol. 2004 Nov 1;U25–37.
6. Hsiao CY, Chen TH, Chu TH, Ting YN, Tsai PJ, Shyu JF. Calcitonin Induces Bone Formation by Increasing Expression of Wnt10b in Osteoclasts in Ovariectomy-Induced Osteoporotic Rats. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Sep 8;11.
7. Krassas GE, Poppe K, Glinoer D. Thyroid Function and Human Reproductive Health. Endocr Rev. 2010 Oct 1;31(5):702–55.
8. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. Thyroid. 2017 Mar;27(3):315–89.
9. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Stagnaro-Green A. Increased Pregnancy Loss Rate in Thyroid Antibody Negative Women with TSH Levels between 2.5 and 5.0 in the First Trimester of Pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Sep;95(9):E44–8.
10. Casey BM, Dashe JS, Wells CE, McIntire DD, Byrd W, Leveno KJ, et al. Subclinical Hypothyroidism and Pregnancy Outcomes. Obstetrics & Gynecology. 2005 Feb;105(2):239–45.
11. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004 Mar 1;5(3):266–71.
12. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, et al. Systemic Increase in the Ratio between Foxp3+ and IL-17-Producing CD4+ T Cells in Healthy Pregnancy but Not in Preeclampsia. The Journal of Immunology. 2009 Dec 1;183(11):7023–30.
13. Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. Springer Semin Immunopathol. 2006 Sep 13;28(1):31–9.

14. Joseph TT, Schuch V, Hossack DJ, Chakraborty R, Johnson EL. Melatonin: the placental antioxidant and anti-inflammatory. Front Immunol. 2024 Feb 1;15.

15. Richter HG, Hansell JA, Raut S, Giussani DA. Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. J Pineal Res. 2009 May 9;46(4):357–64.

16. Hannan NJ, Binder NK, Beard S, Nguyen TV, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S. Melatonin enhances antioxidant molecules in the placenta, reduces secretion of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFLT) from primary trophoblast but does not rescue endothelial dysfunction: An evaluation of its potential to treat preeclampsia. PLoS One. 2018 Apr 11;13(4):e0187082.

17. Hoyes AD, Kershaw DR. Anatomy and development of the thyroid gland. Ear Nose Throat J. 1985 Jul;64(7):318–33.

18. Rykova Y, Shuper S, Shcherbakovsky M, Kikinchuk V, Peshenko A. [MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE THYROID GLAND OF MATURE RATS IN MODERATE DEGREE CHRONIC HYPERTHERMIA]. Georgian Med News. 2019;(292–293):75–81.

19. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. Development. 2017 Jun 15;144(12):2123–40.

20. Ross M PW. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. Wolters Kluwer Health: Philadelphia. 2016. 757–764 p.

21. BÍLEK R, DVOŘÁKOVÁ M, GRIMMICHOVÁ T, JISKRA J. Iodine, Thyroglobulin and Thyroid Gland. Physiol Res. 2020 Sep 30;S225–36.

22. Hall JE HME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology,14th Ed. 2021.

23. Bürgi H. Iodine excess. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2010 Feb;24(1):107–15.

24. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature. 1996 Feb;379(6564):458–60.

25. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. Mol Cell Endocrinol. 2017 Dec;458:6–15.

26. Mondal S, Mugesh G. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action. Mol Cell Endocrinol. 2017 Dec;458:91–104.

27. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. Journal of Clinical Investigation. 2012 Sep 4;122(9):3035–43.

28. Thanas C, Ziros PG, Chartoumpekis D V., Renaud CO, Sykiotis GP. The Keap1/Nrf2 Signaling Pathway in the Thyroid—2020 Update. Antioxidants. 2020 Nov 4;9(11):1082.

29. Fliers E, Kalsbeek A, Boelen A. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Beyond

the fixed setpoint of the hypothalamus–pituitary–thyroid axis. Eur J Endocrinol. 2014 Nov;171(5):R197–208.

30. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: Role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. Front Neuroendocrinol. 2007 Aug;28(2–3):97–114.

31. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebæk NE, Main KM. Environmental chemicals and thyroid function. Eur J Endocrinol. 2006 May;154(5):599–611.

32. Delitala AP, Scuteri A, Maioli M, Mangatia P, Vilardi L, Erre GL. Subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk factors. Minerva Med. 2020 Jan;110(6).

33. Yamamotoya T, Ohata Y, Akasaka Y, Hasei S, Inoue MK, Nakatsu Y, et al. Trk-fused gene plays a critical role in diet-induced adipose tissue expansion and is also involved in thyroid hormone action. PNAS Nexus. 2024 Mar 28;3(4).

34. Forrest D, Visser TJ. Thyroid hormone signaling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2013 Jul;1830(7):3859.

35. Saranac L, Zivanovic S, Bjelakovic B, Stamenkovic H, Novak M, Kamenov B. Why Is the Thyroid So Prone to Autoimmune Disease? Horm Res Paediatr. 2011;75(3):157–65.

36. Yau WW, Singh BK, Lesmana R, Zhou J, Sinha RA, Wong KA, et al. Thyroid hormone (T 3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. Autophagy. 2019 Jan 2;15(1):131–50.

37. Cammisa I, Rigante D, Cipolla C. Growth Outcomes and Final Height in Children with Acquired Hypothyroidism: A Systematic Review. Children. 2024 Dec 11;11(12):1510.

38. Wong GWK, Lai J, Cheng PS. Growth in childhood thyrotoxicosis. Eur J Pediatr. 1999 Sep 8;158(10):776–9.

39. Nishioka E, Hirayama S, Ueno T, Matsukawa T, Vigeh M, Yokoyama K, et al. Relationship between maternal thyroid-stimulating hormone (TSH) elevation during pregnancy and low birth weight: A longitudinal study of apparently healthy urban Japanese women at very low risk. Early Hum Dev. 2015 Mar;91(3):181–5.

40. Sert UY, Buyuk GN, Engin Ustun Y, Ozgu Erdinc AS. Is There Any Relationship Between Thyroid Function Abnormalities, Thyroid Antibodies and Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development in Pregnant Women? Medeni Med J. 2020;

41. Pande A, Anjankar A. A Narrative Review on the Effect of Maternal Hypothyroidism on Fetal Development. Cureus. 2023 Feb 9;

42. Mallawa Kankanamalage O, Zhou Q, Li X. Understanding the Pathogenesis of Gestational Hypothyroidism. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 May 25;12.

43. Fu M, Ren Z, Gao Y, Zhang H, Guo W, Zhang W. Study of iodine transport and

thyroid hormone levels in the human placenta under different iodine nutritional status. British Journal of Nutrition. 2024 May 14;131(9):1488–96.

44. Zimmermann MB. The impact of iodised salt or iodine supplements on iodine status during pregnancy, lactation and infancy. Public Health Nutr. 2007 Dec 1;10(12A):1584–95.

45. Rao JN, Liang JY, Chakraborti P, Feng P. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. J Endocrinol Invest. 2003 May 18;26(5):435–43.

46. Bernal J. Thyroid Hormones in Brain Development and Function. 2000.

47. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. The Lancet. 2017 Sep;390(10101):1550–62.

48. Carlé A, Bülow Pedersen I, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P. Gender differences in symptoms of hypothyroidism: a population-based study. Clin Endocrinol (Oxf). 2015 Nov 6;83(5):717–25.

49. Silva JF, Ocarino NM, Serakides R. Thyroid hormones and female reproduction. Biol Reprod. 2018 May 14;

50. Barjaktarovic M, Korevaar TIM, Chaker L, Jaddoe VWV, de Rijke YB, Visser TJ, et al. The association of maternal thyroid function with placental hemodynamics. Human Reproduction. 2017 Jan 26;

51. Carney LA, Quinlan JD, West JM. Thyroid disease in pregnancy. Am Fam Physician. 2014 Feb 15;89(4):273–8.

52. Tirosh D, Benshalom-Tirosh N, Novack L, Press F, Beer-Weisel R, Wiznitzer A, et al. Hypothyroidism and diabetes mellitus – a risky dual gestational endocrinopathy. PeerJ. 2013 Mar 19;1:e52.

53. Springer D, Jiskra J, Limanova Z, Zima T, Potlukova E. Thyroid in pregnancy: From physiology to screening. Crit Rev Clin Lab Sci. 2017 Feb 17;54(2):102–16.

54. Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot LJ, Glinoer D, et al. Management of Thyroid Dysfunction during Pregnancy and Postpartum: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Aug 1;92(8_supplement):s1–7.

55. STAGNARO-GREEN A. Overt Hyperthyroidism and Hypothyroidism During Pregnancy. Clin Obstet Gynecol. 2011 Sep;54(3):478–87.

56. Adu-Gyamfi EA, Wang YX, Ding YB. The interplay between thyroid hormones and the placenta: a comprehensive review. Biol Reprod. 2019 Sep 9;

57. Bauer MK, Harding JE, Bassett NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, et al. Fetal growth and placental function. Mol Cell Endocrinol. 1998 May;140(1–2):115–20.

58. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Ogawa I. Toxicological

pathology in the rat placenta. J Toxicol Pathol. 2011 Jun;24(2):95–111.

59. Gauster M, Moser G, Wernitznig S, Kupper N, Huppertz B. Early human trophoblast development: from morphology to function. Cell Mol Life Sci. 2022 Jun 5;79(6):345.

60. Sathasivam R, Selliah P, Sivalingarajah R, Mayorathan U, Munasinghe BM. Placental weight and its relationship with the birth weight of term infants and body mass index of the mothers. Journal of International Medical Research. 2023 May 16;51(5).

61. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015 Mar 5;370(1663):20140066.

62. Vanea C, Džigurski J, Rukins V, Dodi O, Siigur S, Salumäe L, et al. Mapping cell-to-tissue graphs across human placenta histology whole slide images using deep learning with HAPPY. Nat Commun. 2024 Mar 28;15(1):2710.

63. Tamura I, Shiroshita A, Fujimura T, Tanaka-Doi Y, Shirafuta Y, Taketani T, et al. Glucose and lipid metabolisms in human endometrial stromal cells during decidualization. Endocr J. 2023;70(5):EJ23-0099.

64. Gellersen B, Brosens I, Brosens J. Decidualization of the Human Endometrium: Mechanisms, Functions, and Clinical Perspectives. Semin Reprod Med. 2007 Nov;25(6):445–53.

65. Jia Z, Wei Y, Zhang Y, Song K, Yuan J. Metabolic reprogramming and heterogeneity during the decidualization process of endometrial stromal cells. Cell Communication and Signaling. 2024 Jul 30;22(1):385.

66. Moore KL PTTM. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. Tenth Ed. 2016.

67. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Twelfth Ed.

68. Ochoa-Bernal MA, Fazleabas AT. Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. Int J Mol Sci. 2020 Mar 13;21(6):1973.

69. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. Int J Mol Sci. 2020 Jun 8;21(11):4092.

70. Cao B, Mysorekar IU. Intracellular bacteria in placental basal plate localize to extravillous trophoblasts. Placenta. 2014 Feb;35(2):139–42.

71. Kim JS, Romero R, Cushenberry E, Kim YM, Erez O, Nien JK, et al. Distribution of CD14+ and CD68+ Macrophages in the Placental Bed and Basal Plate of Women With Preeclampsia and Preterm Labor. Placenta. 2007 May;28(5–6):571–6.

72. Demir R. Fetal ve plasental membranlar ve plasenta gelismesi. İnsanın Gelisimi ve Implantasyon Biyolojisi. . 1. Baski. 1995. 148–209 p.

73. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? Am J Obstet Gynecol. 2015 Oct;213(4):S6.e1-S6.e4.

74. Huppertz B. The feto–maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. Semin Immunopathol. 2007 Jun 13;29(2):83–94.

75. Wang Y. Vascular Biology of the Placenta. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. 2010 Aug 27;2(1):1–98.

76. Vornic I, Buciu V, Furau CG, Zara F, Novacescu D, Barb AC, et al. The Interplay of Molecular Factors and Morphology in Human Placental Development and Implantation. Biomedicines. 2024 Dec 20;12(12):2908.

77. Brosens I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. Am J Obstet Gynecol. 2019 Nov;221(5):437–56.

78. Parada Villavicencio C, Adam SZ, Nikolaidis P, Yaghmai V, Miller FH. Imaging of the Urachus: Anomalies, Complications, and Mimics. RadioGraphics. 2016 Nov;36(7):2049–63.

79. Degner K, Magness RR, Shah DM. Establishment of the Human Uteroplacental Circulation: A Historical Perspective. Reproductive Sciences. 2017 May 30;24(5):753–61.

80. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. Placenta. 2009 Jun;30(6):473–82.

81. Moll W. Structure adaptation and blood flow control in the uterine arterial system after hemochorial placentation. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2003 Sep;110:S19–27.

82. Slator PJ, Hutter J, McCabe L, Gomes ADS, Price AN, Panagiotaki E, et al. Placenta microstructure and microcirculation imaging with diffusion MRI. Magn Reson Med. 2018 Aug 11;80(2):756–66.

83. Labarrere CA, DiCarlo HL, Bammerlin E, Hardin JW, Kim YM, Chaemsaithong P, et al. Failure of physiologic transformation of spiral arteries, endothelial and trophoblast cell activation, and acute atherosis in the basal plate of the placenta. Am J Obstet Gynecol. 2017 Mar;216(3):287.e1-287.e16.

84. Vähäkangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. Br J Pharmacol. 2009 Oct 14;158(3):665–78.

85. Liu L, Liu X. Contributions of Drug Transporters to Blood-Placental Barrier. In 2019. p. 505–48.

86. Bushway ME, Gerber SA, Fenton BM, Miller RK, Lord EM, Murphy SP. Morphological and Phenotypic Analyses of the Human Placenta Using Whole Mount Immunofluorescence1. Biol Reprod. 2014 May 1;90(5).

87. Newbern D, Freemark M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2011 Dec;18(6):409–16.

88. Ding J, Maxwell A, Adzibolosu N, Hu A, You Y, Liao A, et al. Mechanisms of immune regulation by the placenta: Role of type I interferon and interferon-stimulated genes signaling during pregnancy*. Immunol Rev. 2022 Jul 20;308(1):9–24.

89. Svensson L, Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R, Mattsson R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. J Reprod Immunol. 2001 Jul;51(1):3–7.

90. Enders AC, Blankenship TN. Comparative placental structure. Adv Drug Deliv Rev. 1999 Jun;38(1):3–15.

91. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. Reprod Biol. 2012 Jul;12(2):97–118.

92. Spradley FT, Ge Y, Granger JP, Chade AR. Utero-placental vascular remodeling during late gestation in Sprague-Dawley rats. Pregnancy Hypertens. 2020 Apr;20:36–43.

93. Furukawa S, Hayashi S, Abe M, Hagio S, Irie K, Kuroda Y, et al. Background Data on Developmental Parameters During the Gestation Period in Rats. J Toxicol Pathol. 2013;26(1):83–8.

94. Serman L, Zunic I, Vrsaljko N, Grbesa D, Gjurcevic E, Matasin Z, et al. Structural changes in the rat placenta during the last third of gestation discovered by stereology. Biomolecules and Biomedicine. 2015 Jan 22;15(1):21–5.

95. Manojlović-Stojanoski M, Borković-Mitić S, Nestorović N, Ristić N, Trifunović S, Stevanović M, et al. The Effects of BSA-Stabilized Selenium Nanoparticles and Sodium Selenite Supplementation on the Structure, Oxidative Stress Parameters and Selenium Redox Biology in Rat Placenta. Int J Mol Sci. 2022 Oct 28;23(21):13068.

96. Furukawa S, Tsuji N, Sugiyama A. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. J Toxicol Pathol. 2019;32(1):1–17.

97. Soares MJ, Linzer DIH. Rodent Prolactin Family and Pregnancy. In 2001. p. 139–67.

98. Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Dai G, Kamei T, Orwig KE. Differentiation of trophoblast endocrine cells. Placenta. 1996 Jul;17(5–6):277–89.

99. Hu D, Cross JC. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. Int J Dev Biol. 2010;54(2–3):341–54.

100. Simmons DG, Cross JC. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. Dev Biol. 2005 Aug;284(1):12–24.

101. Herington JL, Bany BM. Do molecular signals from the conceptus influence endometrium decidualization in rodents? J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009 Dec 15;312B(8):797–816.

102. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. Reproduction. 2006 Aug;132(2):217–32.

103. Wei XW, Zhang YC, Wu F, Tian FJ, Lin Y. The role of extravillous trophoblasts and uterine NK cells in vascular remodeling during pregnancy. Front Immunol. 2022 Jul 22;13.

104. Rai A, Cross JC. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. Dev Biol. 2014 Mar;387(2):131–41.

105. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. Dev Biol. 2003 Aug;260(1):176–90.

106. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. Pharmacological Reports. 2009 May;61(3):383–410.

107. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cellular and Molecular Life Sciences. 2014 Aug 20;71(16):2997–3025.

108. Ivanov DO, Evsyukova II, Mironova ES, Polyakova VO, Kvetnoy IM, Nasyrov RA. Maternal Melatonin Deficiency Leads to Endocrine Pathologies in Children in Early Ontogenesis. Int J Mol Sci. 2021 Feb 19;22(4):2058.

109. Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, et al. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Apr 17;10.

110. Tosini G, Baba K, Hwang CK, Iuvone PM. Melatonin: An underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. Exp Eye Res. 2012 Oct;103:82–9.

111. OZCELIK F, ERDEM M, BOLU A, GLSN M. An Overview On Melatonin Hormone. Psikiyatride Guncel Yaklasimlar - Current Approaches in Psychiatry. 2013;5(2):1.

112. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. Prog Neurobiol. 2011 Mar;93(3):350–84.

113. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. FEBS J. 2006 Jul 15;273(13):2813–38.

114. Agil A, Elmahallawy EK, Rodríguez-Ferrer JM, Adem A, Bastaki SM, Al-abbadi I, et al. Melatonin increases intracellular calcium in the liver, muscle, white adipose tissues and pancreas of diabetic obese rats. Food Funct. 2015;6(8):2671–8.

115. Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. Front Neuroendocrinol. 2010 Jul;31(3):284–95.

116. Li Q, Zheng T, Chen J, Li B, Zhang Q, Yang S, et al. Exploring melatonin's multifaceted role in female reproductive health: From follicular development to lactation and its therapeutic potential in obstetric syndromes. J Adv Res. 2025 Apr;70:223–42.

117. Ejaz H, Figaro JK, Woolner AMF, Thottakam BM V., Galley HF. Maternal Serum Melatonin Increases During Pregnancy and Falls Immediately After Delivery Implicating the Placenta as a Major Source of Melatonin. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Feb 18;11.

118. Soliman A, Lacasse A, Lanoix D, Sagrillo-Fagundes L, Boulard V, Vaillancourt C. Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. J Pineal Res. 2015 Aug 20;59(1):38–46.

119. Schenker S, Yang Y, Perez A, Acuff RV, Papas AM, Henderson G, et al. Antioxidant transport by the human placenta. Clinical Nutrition. 1998 Aug;17(4):159–67.

120. TAMURA H, NAKAMURA Y, TERRON M, FLORES L, MANCHESTER L, TAN D, et al. Melatonin and pregnancy in the human. Reproductive Toxicology. 2008 Apr;25(3):291–303.

121. Reiter RJ, Sharma R, DA Chuffa LG, Zuccari DA, Amaral FG, Cipolla-Neto J. Melatonin-mediated actions and circadian functions that improve implantation, fetal health and pregnancy outcome. Reproductive Toxicology. 2024 Mar;124:108534.

122. Berbets AM, Davydenko IS, Barbe AM, Konkov DH, Albota OM, Yuzko OM. Melatonin 1A and 1B Receptors' Expression Decreases in the Placenta of Women with Fetal Growth Restriction. Reproductive Sciences. 2021 Jan 17;28(1):197–206.

123. Lanoix D, Guérin P, Vaillancourt C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. J Pineal Res. 2012 Nov 11;53(4):417–25.

124. Köse Y, Şirin C, Turgut AÇ, Tomruk C, Uyanıkgil Y, Turgut M. The neuroprotective effect of exogen melatonin upon fetal hippocampus damage caused by high-dose caffeine administration in pregnant rats. International Journal of Developmental Neuroscience. 2024 May 12;84(3):251–61.

125. Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM, Carrillo-Vico A. Multiple Facets of Melatonin in Immunity: Clinical Applications. In: Melatonin and Melatonergic Drugs in Clinical Practice. New Delhi: Springer India;

2014. p. 117–41.

126. Jimenez-Caliani AJ, Jimenez-Jorge S, Molinero P, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Rubio A, et al. Sex-Dependent Effect of Melatonin on Systemic Erythematosus Lupus Developed in Mrl/Mpj-Faslpr Mice: It Ameliorates the Disease Course in Females, whereas It Exacerbates It in Males. Endocrinology. 2006 Apr 1;147(4):1717–24.

127. da Silva JL, Barbosa LV, Pinzan CF, Nardini V, Brigo IS, Sebastião CA, et al. The Microbiota-Dependent Worsening Effects of Melatonin on Gut Inflammation. Microorganisms. 2023 Feb 11;11(2):460.

128. Peled N, Shorer Z, Peled E, Pillar G. Melatonin Effect on Seizures in Children with Severe Neurologic Deficit Disorders. Epilepsia. 2001 Sep 12;42(9):1208–10.

129. Sheldon SH. Pro-convulsant effects of oral melatonin in neurologically disabled children. The Lancet. 1998 Apr;351(9111):1254.

130. Saito S, Nakashima A, Shima T, Tsuda S. Pregnancy depends on a delicate balance of immune activation and regulation.Exploration of Immunology. 2021 Dec 31;

131. Guleria I, Sayegh MH. Maternal Acceptance of the Fetus: True Human Tolerance. The Journal of Immunology. 2007 Mar 15;178(6):3345–51.

132. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. Journal of Clinical Investigation. 2018 Oct 1;128(10):4224–35.

133. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology. 1970 May;18(5):723–37.

134. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995 Aug 1;155(3):1151–64.

135. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. J Exp Med. 1996 Aug 1;184(2):387–96.

136. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? Scand J Immunol. 2009 Oct 8;70(4):326–36.

137. La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. Immunol Lett. 2014 Nov;162(1):41–8.

138. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. Cd4+Cd25+ Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. J Exp Med. 2001 Jun 4;193(11):1311–8.

139. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. 2001 Jan;27(1):68–73.

140. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003 Apr 3;4(4):330–6.

141. Chruscinski A, Sadozai H,Rojas-Luengas V, Bartczak A, Khattar R, Selzner N, et al. Role of Regulatory T Cells (Treg) and the Treg Effector Molecule Fibrinogen-like Protein 2 in Alloimmunity and Autoimmunity. Rambam Maimonides Med J. 2015 Jul 30;6(3):e0024.

142. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat Immunol. 2007 Dec 4;8(12):1353–62.

143. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. The Journal of Immunology. 2005 Feb 15;174(4):1783–6.

144. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5′-Adenosine Monophosphate to Adenosine. The Journal of Immunology. 2006 Nov 15;177(10):6780–6.

145. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Heßling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell–mediated suppression. J Exp Med. 2007 Jun 11;204(6):1303–10.

146. Chan CWY, Kay LS, Khadaroo RG, Chan MWC, Lakatoo S, Young KJ, et al. Soluble Fibrinogen-Like Protein 2/Fibroleukin Exhibits Immunosuppressive Properties: Suppressing T Cell Proliferation and Inhibiting Maturation of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. The Journal of Immunology. 2003 Apr 15;170(8):4036–44.

147. Shalev I, Liu H, Koscik C, Bartczak A, Javadi M, Wong KM, et al. Targeted Deletion of *fgl2* Leads to Impaired Regulatory T Cell Activity and Development of Autoimmune Glomerulonephritis. The Journal of Immunology. 2008 Jan 1;180(1):249–60.

148. Shima T, Inada K, Nakashima A, Ushijima A, Ito M, Yoshino O, et al. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. J Reprod Immunol. 2015 Apr;108:72–82.

149. Tsuda S, Nakashima A, Shima T, Saito S. New Paradigm in the Role of Regulatory T Cells During Pregnancy. Front Immunol. 2019 Mar 26;10.

150. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4+ CD25bright regulatory T cells in pre-eclampsia. Clin Exp Immunol. 2007 Apr 25;149(1):139–45.

151. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toermer A, Meuer S, et al. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: Is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? Clinical Immunology. 2008 Dec;129(3):401–12.

152. TOLDI G, ŠVEC P, VÁSÁRHELYI B, MÉSZÁROS G, RIGÓ J, TULASSAY T, et al. Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008 Nov 31;87(11):1229–33.

153. Wang Q, Zhang J, Wang F. A Study of the Predictive Value of Treg and Th1/Th2 Cytokines on Pregnancy Outcome in Patients with Recurrent Pregnancy Loss. Altern Ther Health Med. 2023 Oct;29(7):400–3.

154. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction. The Journal of Immunology. 2007 Feb 15;178(4):2572–8.

155. Ghenimi N, Alfos S, Redonnet A, Higueret P, Pallet V, Enderlin V. Adult-Onset Hypothyroidism Induces the Amyloidogenic Pathway of Amyloid Precursor Protein Processing in the Rat Hippocampus. J Neuroendocrinol. 2010 Aug 16;22(8):951–9.

156. Yu J, Tang YY, Feng HB, Cheng XX.A behavioral and micro positron emission tomography imaging study in a rat model of hypothyroidism. Behavioural Brain Research. 2014 Sep;271:228–33.

157. Korkmaz FN, Yilmaz-Oral D, Asker H, Guven B, Turkcan D, Kirlangic OF, et al. Combined levothyroxine and testosterone treatment for restoring erectile dysfunction in propylthiouracil-induced hypothyroid rats. J Sex Med. 2023 May 26;20(6):732–41.

158. Baghcheghi Y, Mansouri S, Beheshti F, Shafei MN, Salmani H, Reisi P, et al. Neuroprotective and long term potentiation improving effects of vitamin E in juvenile hypothyroid rats. International Journal for Vitamin and Nutrition Research. 2020 Jan;90(1–2):156–68.

159. Andersen SL, Knøsgaard L, Olsen J, Vestergaard P, Andersen S. Maternal Thyroid Function, Use of Antithyroid Drugs in Early Pregnancy, and Birth Defects. J Clin Endocrinol Metab. 2019 Dec 1;104(12):6040–8.

160. Yap YW, Onyekwelu E, Alam U. Thyroid disease in pregnancy. Clinical Medicine. 2023 Mar;23(2):125–8.

161. Salagre D, Navarro-Alarcón M, Villalón-Mir M, Alcázar-Navarrete B, Gómez-Moreno G, Tamimi F, et al. Chronic melatonin treatment improves obesity by inducing uncoupling of skeletal muscle SERCA-SLN mediated by

CaMKII/AMPK/PGC1α pathway and mitochondrial biogenesis in female and male Zücker diabetic fatty rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2024 Mar;172:116314.

162. Zhou L, Yang Y, Mou L, Xia X, Liu M, Xu L, et al. Melatonin Ameliorates Age-Related Sarcopenia via the Gut–Muscle Axis Mediated by Serum Lipopolysaccharide and Metabolites. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2025 Feb 3;16(1).

163. Agil A, Rosado I, Ruiz R, Figueroa A, Zen N, Fernández-Vázquez G. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. J Pineal Res. 2012 Mar 25;52(2):203–10.

164. Corpas R, Griñán-Ferré C, Palomera-Ávalos V, Porquet D, García de Frutos P, Franciscato Cozzolino SM, et al. Melatonin induces mechanisms of brain resilience against neurodegeneration. J Pineal Res. 2018 Nov 4;65(4).

165. de Albuquerque YML, Ferreira CGM, D´assunção CG, Baptista MGP, Alves R da C, Wanderley Teixeira V, et al. Effect of melatonin on gonad and thyroid development of offspring of hypothyroid pregnant rats. Biotechnic & Histochemistry. 2020 Oct 2;95(7):522–31.

166. Zhang Y, Liu Z, Sun H. Fetal-maternal interactions during pregnancy: a 'three-in-one' perspective. Front Immunol. 2023 Jun 7;14.

167. Joshi JS, Shanoo A, Patel N, Gupta A. From Conception to Delivery: A Comprehensive Review of Thyroid Disorders and Their Far-Reaching Impact on Feto-Maternal Health. Cureus. 2024 Feb 1;

168. Chen A, Luo Z, Zhang J, Cao X. Emerging research themes in maternal hypothyroidism: a bibliometric exploration. Front Immunol. 2024 Mar 26;15.

169. Cui L, Xu F, Wang S, Jiang Z, Liu L, Ding Y, et al. Melatonin-MT1 signal is essential for endometrial decidualization. Reproduction. 2021 Aug 1;162(2):161–70.

170. Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu XY. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. Fertil Steril. 2014 Aug;102(2):321–8.

171. Chen YC, Sheen JM, Tiao MM, Tain YL, Huang LT. Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. Int J Mol Sci. 2013 Mar 6;14(3):5380–401.

172. Gaunt G, Ramin K. Immunological Tolerance of the Human Fetus. Am J Perinatol. 2001;18(06):299–312.

173. Wang J, Han T, Zhu X. Role of maternal–fetal immune tolerance in the establishment and maintenance of pregnancy. Chin Med J (Engl). 2024 Jun 20;137(12):1399–406.

174. Silva JF, Vidigal PN, Galvão DD, Boeloni JN, Nunes PP, Ocarino NM, et al. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative

activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. Reprod Fertil Dev. 2012;24(7):923.

175. Sack J, Weller A, Rigler O, Rozin A. A Simple Model for Studying the Correction of In Utero Hypothyroidism in the Rat. Pediatr Res. 1995 Apr;37(4):497–501.

176. Kent NL, Atluri SC, Cuffe JSM. Maternal Hypothyroidism in Rats Reduces Placental Lactogen, Lowers Insulin Levels, and Causes Glucose Intolerance. Endocrinology. 2022 Feb 1;163(2).

177. Sun J, Hui C, Xia T, Xu M, Deng D, Pan F, et al. Effect of hypothyroidism on the hypothalamic–pituitary–ovarian axis and reproductive function of pregnant rats. BMC Endocr Disord. 2018 Dec 24;18(1):30.

178. Guo J, Yu X, Liu Y, Lu L, Zhu D, Zhang Y, et al. Prenatal hypothyroidism diminished exogenous NO-mediated diastolic effects in fetal rat thoracic aorta smooth muscle via increased oxidative stress. Reproductive Toxicology. 2022 Oct;113:52–61.

179. Sofronova SI, Gaynullina DK, Shvetsova AA, Borzykh AA, Selivanova EK, Kostyunina DS, et al. Antenatal/early postnatal hypothyroidism alters arterial tone regulation in 2-week-old rats. Journal of Endocrinology. 2017 Nov;235(2):137–51.

180. Ahmed OM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. International Journal of Developmental Neuroscience. 2010 Oct 25;28(6):437–54.

181. Chang YJ, Hwu CM, Yeh CC, Wang P, Wang SW. Effects of Subacute Hypothyroidism on Metabolism and Growth-Related Molecules. Molecules. 2014 Jul 30;19(8):11178–95.

182. Gordon J, Morley J, Hershman J. Melatonin and the Thyroid. Hormone and Metabolic Research. 1980 Feb 14;12(02):71–3.

183. Wright ML, Pikula A, Babski AM, Labieniec KE, Wolan RB. Effect of Melatonin on the Response of the Thyroid to Thyrotropin Stimulationin Vitro. Gen Comp Endocrinol. 1997 Nov;108(2):298–305.

184. Prashanjit Laskar Samik Acharjee Shiv Shankar Singh. Effect of Exogenous Melatonin on Thyroxine (T4), Thyrotropin (TSH) Hormone Levels and Expression patterns of Melatonin Receptor (MT1 and MT2) Proteins on Thyroid gland during Different age groups of Male and Female Swiss albino Mice. advances in bioresearch .

185. Paiva RVN, Mondes PH de L, Brandão B de J, Sant'Anna JN, Freire dos Santos ME, Fighera YM, et al. Effects of acute hypothyroidism on plasma melatonin and Aanat and Asmt expression in the pineal gland and gonads of rats. Front Endocrinol (Lausanne). 2024 Aug 1;15.

186. Rocío García-Marín Melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptor in rat thyroid cells. Histol Histopathol.

187. Gładysz AK, Stępniak J, Karbownik-Lewińska M. Exogenous Melatonin Protects against Oxidative Damage to Membrane Lipids Caused by Some Sodium/Iodide Symporter Inhibitors in the Thyroid. Antioxidants. 2023 Aug 29;12(9):1688.

188. Bellipanni G, Bianchi P, Pierpaoli W, Bulian D, Ilyia E. Effects of melatonin in perimenopausal and menopausal women: a randomized and placebo controlled study. Exp Gerontol. 2001 Feb;36(2):297–310.

189. Belviranli M, Baltaci AK. The relation between reduced serum melatonin levels and zinc in rats with induced hypothyroidism. Cell Biochem Funct. 2008 Jan 24;26(1):19–23.

190. Shankar Singh S, Laskar P, Deb A, Sutradhar S. Melatonin Modulates Hypophyseal-Thyroid Function through Differential Activation of MT1 and MT2 Receptors in Hypothyroid Mice. In: Hypothyroidism - New Aspects of an Old Disease. IntechOpen; 2022.

191. Hidayat M, Saleemi MA. Does melatonin protect fetal brain during maternal hypothyroidism? An experimental study. Pak J Med Sci. 2022 Apr 25;38(5).

192. Pickard M, Leonard A, Ogilvie L, Edwards P, Evans I, Sinha A, et al. Maternal hypothyroidism in the rat influences placental and liver glycogen stores: fetal growth retardation near term is unrelated to maternal and placental glucose metabolic compromise. Journal of Endocrinology. 2003 Feb 1;176(2):247–55.

193. Espindola-Lozano M, Méndez-Tepepa M, Castillo-Romano M, Rojas-Juárez R, Nicolás-Toledo L, Rodríguez-Antolín J, et al. Methimazole-Induced Hypothyroidism Increases the Content of Glycogen and Changes the Expression of LDH, GLUT4, and Aromatase in the Pregnant Uterus of Rabbits. Metabolites. 2025 Jan 30;15(2):82.

194. dos Anjos Cordeiro JM, Santos LC, Santos BR, de Jesus Nascimento AE, Santos EO, Barbosa EM, et al. Manganese porphyrin-based treatment improves fetal-placental development and protects against oxidative damage and NLRP3 inflammasome activation in a rat maternal hypothyroidism model. Redox Biol. 2024 Aug;74:103238.

195. Bilici G, Ural C, Saçik U, Çavdar Z, Erbil G. The effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on placental Hofbauer cells of pregnant rats. Biotechnic & Histochemistry. 2022 Feb 17;97(2):126–35.

196. Santos BR, dos Anjos Cordeiro JM, Santos LC, Barbosa EM, Mendonça LD, Santos EO, et al. Kisspeptin treatment improves fetal-placental development and blocks placental oxidative damage caused by maternal hypothyroidism in an experimental rat model. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Jul 28;13.

197. Klettner A, Kampers M, Töbelmann D, Roider J, Dittmar M. The Influence of Melatonin and Light on VEGF Secretion in Primary RPE Cells. Biomolecules. 2021

Jan 16;11(1):114.

198. Li Y, Fang L, Zhang R, Wang S, Li Y, Yan Y, et al. Melatonin stimulates VEGF expression in human granulosa-lutein cells: A potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. Mol Cell Endocrinol. 2020 Dec;518:110981.

199. Kandemir YB, Konuk E, Katırcı E, Xxx F, Behram M. Is the effect of melatonin on vascular endothelial growth factor receptor-2 associated with angiogenesis in the rat ovary? Clinics. 2019;74:e658.

200. Castle-Miller J, Bates DO, Tortonese DJ. Mechanisms regulating angiogenesis underlie seasonal control of pituitary function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017 Mar 21;114(12).

201. Ohara N, Tsujino T, Maruo T. The Role of Thyroid Hormone in Trophoblast Function, Early Pregnancy Maintenance, and Fetal Neurodevelopment. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. 2004 Nov;26(11):982–90.

202. Silva JF, Ocarino NM, Serakides R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. REPRODUCTION. 2014 Jun;147(6):803–16.

203. Xue H, Yu X, Ma L, Song S, Li Y, Zhang L, et al. The possible role of CD4+CD25highFoxp3+/CD4+IL-17A+ cell imbalance in the autoimmunity of patients with Hashimoto thyroiditis. Endocrine. 2015 Dec 13;50(3):665–73.

204. Glick AB, Wodzinski A, Fu P, Levine AD, Wald DN. Impairment of Regulatory T-Cell Function in Autoimmune Thyroid Disease. Thyroid. 2013 Jul;23(7):871–8.

205. Yang X, Lun Y, Jiang H, Liu X, Duan Z, Xin S, et al. SIRT1-Regulated Abnormal Acetylation of FOXP3 Induces Regulatory T-Cell Function Defect in Hashimoto's Thyroiditis. Thyroid. 2018 Feb;28(2):246–56.

206. Glebezdina NS, Olina AA, Nekrasova I V., Kuklina EM. Molecular Mechanisms of Control of Differentiation of Regulatory T-Lymphocytes by Exogenous Melatonin. Dokl Biochem Biophys. 2019 Jan 26;484(1):13–6.

207. Vinther AG. The Influence of Melatonin on Immune System and Cancer. Int J Cancer Clin Res. 2015 Oct 31;2(4).

208. Chang T, Niu C, Sun C, Ma Y, Guo R, Ruan Z, et al. Melatonin exerts immunoregulatory effects by balancing peripheral effector and regulatory T helper cells in myasthenia gravis. Aging. 2020 Nov 2;12(21):21147–60.

209. Liu L. SQ, XY, BZ, HH, PY, WC. Melatonin Prolongs Heart Allograft Survival by Induction of Foxp3+ Regulatory T Cells Am J Transplant. 2018 American Transplant Congress; 2017.

210. Medrano-Campillo P, Sarmiento-Soto H, Álvarez-Sánchez N, Álvarez-Ríos AI, Guerrero JM, Rodríguez-Prieto I, et al. Evaluation of the immunomodulatory effect

of melatonin on the T-cell response in peripheral blood from systemic lupus erythematosus patients. J Pineal Res. 2015 Mar 4;58(2):219–26.

8.EKLER

8.1. Etik kurul onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 04/18/2024
Toplantı Tarihi : 16 Ekim 2024

Sayın, Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

35/2024 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "**Maternal Hipotiroidili Sıçan Plasentasında Melatoninin Treg Hücreleri Üzerine Etkisi**" isimli; Melek Yeşim AK, Şeyda DEMİR YÜKSELin araştırıcı olduğu projenin uygulanmasında 16 adet erişkin ve 8 adet erkek sıçan kullanılacak olan projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca görülmediğine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

(imzalı)
Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Zahide ÇAVDAR
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ SÜTPİDELER
Üye

Prof.Dr.Pınar AKAN
Üye

Prof.Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK
Üye

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Öğr.Gör.Dr.Aslı ÇELİK
Üye

Öğr.Gör.Dr.Sevim KANDİŞ
Üye

Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Asım OKTAN
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Zehra KINAM
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

MATERNAL HİPOTİROİDİLİ SIÇAN PLASENTASINDA MELATONİNİN Treg HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%16	%13	%15	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%10
2	Bilici, Gökçen. "Gebe Ratlarda Hipotiroidi ve Hipertiroidinin Sonuçları ve Hofbauer Hücre Davranışı", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	%1
3	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
4	abis-files.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Akkaya, ErhanCaner. "Hipotiroidi Oluşturulan Adölesan Sıçanlarda Yüksek şIddetli Aralıklı Egzersizin Kognitif Fonksiyonlar üZerine Etkisinin Değerlendirilmesi", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
6	Çakmak, Süleyman. "Sıçan Modelinde Radyoterapiye Bağlı Oluşturulacak Cilt	<%1