

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**SÜPEROVULE EDİLEN RATLARDA MELATONİNİN
OVARYUMDAKİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Sevda DALKIRAN

Danışman

Prof. Dr. Akın YAKAN

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**SÜPEROVULE EDİLEN RATLARDA MELATONİNİN
OVARYUMDAKİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Sevda DALKIRAN

Danışman
Prof. Dr. Akın YAKAN

Bu tez Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi Projeleri Birimi tarafından 22.D.018 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**SÜPEROVULE EDİLEN RATLARDA MELATONİNİN
OVARYUMDAKİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Doktora Tezi
Sevda DALKIRAN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 09/ 09/ 2024 günü sözlü olarak yapılan
tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Gökhan DOĞRUEK

Üye : Prof. Dr. Akın YAKAN

Üye : Prof. Dr. Aytaç AKÇAY

Üye : Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN

Üye : Doç. Dr. Murat Onur YAZLIK

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (TIP) Anabilim Dalı'nda
hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora sürecimde bana inanan, tecrübelerini esirgemeyen, akademik anlamda örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışmanım sayın Prof. Dr. Akın YAKAN'a teşekkürü borç bilirim.

Doktora sürecimde ve tezimin gen ekspresyonu çalışmalarında desteklerinden dolayı Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN'a, biyoistatistik çalışmalarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Ufuk KAYA'a, vajinal sitoloji ve ovaryum konusunda bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Gökhan DOĞRUER'e şükranlarımı sunarım. Tez çalışmamın deneysel aşamasında yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Ar. Gör. Hasan Hüseyin KEÇELİ'ye teşekkür ederim.

Hem yüksek lisans hem de doktora eğitimi süreçlerimde her zaman yanımda olan desteklerini hem maddi hem manevi olarak benden esirgemeyen bana inanıp güvenen kardeşim yüksek ziraat mühendisi Recep DALKIRAN'a, annem Rasime DALKIRAN'a, babam Rehim DALKIRAN'a ve kardeşlerim Esra DALKIRAN ile Vildan TÜRK'e teşekkür ederim.

Doktora öğrenimimi Gen tedavisi ve Genom Çalışmaları alanında 100/2000 YÖK doktora bursiyeri olarak çalışma imkanı sağlayan ve doktora eğitim sürecim boyunca bana mali desteğinden dolayı Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

Bu tez projesini mali olarak destekleyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu merkezine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR	IX
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı.....	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Ovaryum.....	6
2.1.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi	9
2.2. Östrus Siklusu (Döngüsü)	12
2.3. Vajinal Sitoloji	13
2.4. Süperovulasyon	14
2.5. Ovulasyon ve Oksidatif Stres.....	15
2.6. Melatonin	17
2.7. Ovaryum ve Melatonin	20
2.8. Gen Ekspresyonu	22
2.8.1. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (NRF2).....	23
2.8.2. Oxidative stress-induced growth inhibitor 1 (OSGIN1)	26
2.8.3. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15)	27
2.8.4. Progesterone Receptor (PGR)	28
2.8.6. Cyclooxygenase2 (COX-2)	32
2.8.7. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α).....	34
2.8.8. Epiregulin (EREG)	35
2.8.9. Interleukin-1 Beta (IL-1 β)	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39

3.1. Deneme Grupları.....	39
3.2. Vajinal Sitoloji	39
3.3. Melatonin Uygulaması	40
3.4. Süperovulasyon Uygulaması.....	40
3.5. Örneklerin Toplanması.....	40
3.6. Total RNA İzolasyonu	41
3.7. cDNA Sentezi.....	42
3.8. Real-Time PCR Uygulaması.....	42
3.9. Melatonin Ölçümü, Total Protein Analizi ve Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Uygulaması	43
3.10. Malondialdehit (MDA) Analizi.....	44
3.11. İstatistiksel Analizler.....	45
4.BULGULAR.....	46
4.1. Vajinal Sitoloji Bulguları	46
4.2. Serum Melatonin Bulguları.....	46
4.3. MDA Bulguları	47
4.4. Total RNA İzolasyonu Bulguları	47
4.5. qPCR Bulguları	49
4.6. Gen Ekspresyonu Bulguları	59
4.7. Melatonin, MDA ve Hedef Genler Arasındaki Korelasyon Bulguları	61
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ.....	78
7. KAYNAKLAR	80
EKLER.....	97
ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hipotalamik- hipofiz gonadal döngüsü (Popat ve ark. 2008)	8
Şekil 2. Melatonin sentezi (Masters ve ark. 2014)	19
Şekil 3. Ovaryum folikülünde melatoninin varsayılan etkileri (Tamura ve ark. 2020).....	21
Şekil 4. Kontrol grubuna ait vajinal sitoloji görüntüsü (proöstrusdan östrusa geçiş aşaması).....	46
Şekil 5. Kontrol grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri.....	48
Şekil 6. So grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri.....	48
Şekil 7. SoM5 grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri.....	48
Şekil 8. SoM20 grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri.....	48
Şekil 9. Ovaryum dokusu ACTB geni Ct grafiği	49
Şekil 10. Ovaryum dokusu ACTB geni erime eğrisi grafiği	49
Şekil 11. Ovaryum dokusu NRF2 geni Ct grafiği	50
Şekil 12. Ovaryum dokusu NRF2 geni ait erime eğrisi grafiği	50
Şekil 13. Ovaryum dokusu OSGIN1 genine ait Ct grafiği	50
Şekil 14. Ovaryum dokusu OSGIN1 geni erime eğrisi grafiği.....	51
Şekil 15. Ovaryum dokusu BMP15 geni Ct grafiği.....	51
Şekil 16. Ovaryum dokusu BMP15 geni erime eğrisi grafiği	51
Şekil 17. Ovaryum dokusu PGR geni Ct grafiği	52
Şekil 18. Ovaryum dokusu PGR geni erime eğrisi grafiği	52
Şekil 19. Ovaryum dokusunda Bcl-2 geni Ct grafiği	52
Şekil 20. Ovaryum dokusu Bcl-2 geni erime eğrisi grafiği.....	53
Şekil 21. Ovaryum dokusu COX-2 geni Ct grafiği	53
Şekil 22. Ovaryum dokusu COX-2 geni erime eğrisi grafiği	53
Şekil 23. Ovaryum dokusu TNF- α geni Ct grafiği	54
Şekil 24. Ovaryum dokusu TNF- α geni erime eğrisi grafiği.....	54
Şekil 25. Ovaryum dokusu EREG geni Ct grafiği.....	54

Şekil 26. Ovaryum dokusu EREG geni erime eğrisi grafiği	55
Şekil 27. Ovaryum dokusu IL-1 β geni Ct grafiği.....	55
Şekil 28. Ovaryum dokusu IL-1 β geni erime eğrisi grafiği.....	55
Şekil 29. Ovaryum dokusu ACTB geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (74 bp).....	56
Şekil 30. Ovaryum dokusu NRF2 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (141 bp).....	56
Şekil 31. Ovaryum dokusu OSGIN1 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (110 bp)	56
Şekil 32. Ovaryum dokusu BMP15 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (57 bp)	57
Şekil 33. Ovaryum dokusu PGR geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (326 bp).....	57
Şekil 34. Ovaryum dokusu Bcl-2 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (111 bp).....	57
Şekil 35. Ovaryum dokusu COX-2 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (94 bp).....	58
Şekil 36. Ovaryum dokusu TNF- α geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (153 bp)	58
Şekil 37. Ovaryum dokusu EREG geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (145 bp)	58
Şekil 38. Ovaryum dokusu IL-1 β geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (140 bp)	59
Şekil 39. Gruplarda COX-2, IL-1 β , TNF α , Bcl-2, PGR, NRF2, BMP15, OSGIN1 ve EREK genlerinin ekspresyon bulguları	60

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Rat ve farelerde östrus evrelerinin uzunlukları (Ajayi ve Akhigbe 2020).....	12
Tablo 2. Amplifikasyonu yapılan genlerin Forward ve Reverse dizileri	43
Tablo 3. Grupların serum melatonin seviyeleri (pg/ml).....	46
Tablo 4. Gruplarda ovaryum dokularında ve serumda belirlenen MDA seviyeleri (nmol/mg protein).....	47
Tablo 5. Ovaryum dokusundan izole edilen total RNA'nın saflık ve konsantrasyon değerleri (Ort±Std.Hata)	47
Tablo 6. Gen ekspresyon sonuçları.....	59
Tablo 7. Melatonin, MDA ve gen ekspresyon sonuçlarının korelasyon tablosu	73

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMH:	Anti-Müllerian Hormone
ARE:	Antioxidant Response Element
ATP:	Adenosine Triphosphate
BH:	Bcl-2 homology
<i>Bcl-2:</i>	B-Cell Lymphoma 2
BDG1:	(BMSC)-Derived Growth Inhibitor 1
BMP:	Bone Morphogenetic Protein
<i>BMP15:</i>	Bone Morphogenetic Protein 15
BMSC:	Bone Marrow Stromal Cell
Ca²⁺:	Calcium
cAMP:	Cyclic AMP
CAT:	Catalase
cDNA:	Complementary DNA
COC:	Cumulus Oocyte Complex
COX:	Cyclooxygenase
Ct:	Threshold Cycle
Cul3:	Cullin 3
Cq:	Quantification Cycle
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
E2:	Estradiol
eCG:	Equine Chorionic Gonadotropin
EGF:	Epidermal Growth Factor
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>EREG:</i>	Epiregulin
FSH:	Follicle-Stimulating Hormone
FSHR:	Follicle-Stimulating Hormone Receptor
GC:	Granulosa Cell
GDF:	Growth Differentiation Factor
GDF9:	Growth Differentiation Factor 9
GnRH:	Gonadotropin-Releasing Hormone

GPx:	Glutathione Peroxidase
GR:	Glutathione Reductase
hCG:	Human Chorionic Gonadotrophin
hMG:	Human Menopausal Gonadotrophin
HPO:	Hypothalamic-Pituitary-Ovarian
<i>IL-1:</i>	Interleukin-1
KEAP1:	Kelch Like ECH Associated Protein 1
LH	Luteinizing Hormone
LH-R:	LH Receptor
MARE:	Maf Recognition Element
MDA:	Malondialdehyde
ml:	Mililitre
mRNA:	Messenger RNA
MT1:	Melatonin Receptor 1
MT2:	Melatonin Receptor 2
NAD(P)H:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<i>NRF2:</i>	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
<i>OKL38:</i>	Ovarium, Kidney and Liver Protein 38
<i>OSGIN1:</i>	Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor 1
PCOS:	Polycystic Ovary Syndrome
PGE2:	Prostaglandin E2
<i>PG:</i>	Prostaglandin
<i>PGR:</i>	Progesteron Receptor
PKA:	Protein Kinase A
PMSG:	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
P53:	Protein 53
RBX1:	RING Box Protein
Prx:	Peroksiredoksin
Quinone 1:	NQO1 NAD(P)H dehydrogenase
RBX1:	RING Box Protein 1
RNA	Ribonucleic Acid
RT-qPCR:	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction.

SCN:	Suprachiasmatic Nucleus
SOD:	Superoxide Dismutase
Trx:	Thioredoxin
TNFR1:	TNF- α Receptor 1
TNFR2:	TNF- α Receptor 2
TGF-β:	Transforming Growth Factor-B
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor Alpha
μl:	Mikrolitre
8-OHdG:	8-Hydroxy-2' -Deoxyguanosine



ÖZET

Süperovule Edilen Ratlarda Melatoninin Ovaryumdaki Bazı Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Ovaryum memelilerde endokrin ve ekzokrin faaliyet gösteren bir organdır. Ovaryumda meydana gelen fonksiyonel bozukluk infertiliteye ve folikül kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Süperovulasyon uygulamasının da ovaryum sağlığını olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı süperovulasyon uygulamasıyla birlikte farklı dozlarda uygulanan melatoninin ovaryum sağlığına etkileri moleküler ve biyokimyasal düzeyde araştırmaktır.

Çalışmada 8-10 haftalık yaşta dişi wistar albino rat kullanıldı. Kontrol (K), Süperovulasyon (So), Süperovulasyon+5 mg/kg melatonin (SoM5) ve Süperovulasyon+20 mg/kg melatonin (SoM20) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Melatonin gruplarına süperovulasyon işleminden 1 hafta önce başlanarak deney sonuna kadar her gün akşam intraperitoneal olarak saat 17:00'de melatonin enjeksiyonu yapıldı. SoM5 grubuna 5 mg/kg melatonin uygulaması yapılırken SoM20 grubuna 20 mg/kg melatonin enjeksiyonu yapıldı. Süperovulasyon uygulaması GnRH, PMSG ve hCG hormonları ile yapıldı. Deney sonunda kalpten kan alma ile ötenazi edilen ratların serum ve ovaryum dokuları alındı. Doku MDA düzeyinde kontrole kıyasla So, SoM5 ve SoM20 gruplarında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($P<0,01$). Kontrol grubuna kıyasla SoM20 grubunda *PGR* gen ekspresyonun yaklaşık 7 kat arttığı belirlendi ($P<0,001$). Kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında (So, SoM5 ve SoM20), *COX-2* geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi (sırasıyla $P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$). Kontrol grubuna kıyasla SoM20 grubundaki *EREG* geninin ekspresyon seviyesinin yaklaşık 5 kat arttığı belirlendi ($P<0,001$). Serum MDA seviyesiyle *Bcl-2* ve *NRF2* geni arasında pozitif korelasyon tespit edildi (sırasıyla $P<0,001$; $P<0,01$). *COX-2* geniyle *PGR* ve *EREG* genleri arasında pozitif korelasyon belirlendi ($P<0,001$). *IL-1 β* ile *Bcl-2* ve *OSGIN1* genleri arasında ($P<0,05$) *Bcl-2* ile *NRF2* ve *BMP15* genleri arasında (sırasıyla $P<0,01$; $P<0,05$) *PGR* ile *EREG* geni arasında ($P<0,001$) ve *NRF2* ile *BMP15* ve *OSGIN1* arasında ($P<0,05$) pozitif korelasyon tespit edildi.

Sonuç olarak süperovulasyon ile birlikte uygulanan 20 mg/kg dozda melatoninin ovaryumda *PGR* ve *EREG* genlerinin ifadesini arttırması nedeniyle ovaryum sağlığını ve folikülogenezi destekleyebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, Melatonin, MDA, Oksidatif stres, Süperovulasyon

ABSTRACT

Effect of Melatonin on the Expression of Some Genes in the Ovary of Superovulated

Rats

The ovary is an organ that has endocrine and exocrine functions in mammals. Functional disorders in the ovary cause infertility and decreased follicle quality. Superovulation may also harm ovarian health. This study aimed to investigate the effects of melatonin applied at different doses together with superovulation on ovarian health at molecular and biochemical levels.

In this study, female Wistar albino rats 8-10 weeks old were used. 4 groups were formed: Control (K), Superovulation (So), Superovulation + 5 mg/kg melatonin (SoM5), and Superovulation + 20 mg/kg melatonin (SoM20). Melatonin groups were intraperitoneally injected at 17:00 starting 1 week before the superovulation procedure until the end of the experiment. While 5 mg/kg melatonin was administered to the SoM5 group, 20 mg/kg melatonin was injected into the SoM20 group. Superovulation was induced using GnRH, PMSG, and hCG hormones. At the end of the experiment, serum and ovarian tissues from the rats were collected and euthanised via blood collection from the heart. It was determined that there was a significant decrease in tissue MDA levels in the So, SoM5, and SoM20 groups compared with the control ($P<0.01$). It was determined that *PGR* gene expression increased approximately 7-fold in the SoM20 group compared with the control group ($P<0.001$). It was found that the expression of the *COX-2* gene was significantly increased in the experimental groups (So, SoM5 and SoM20) compared with the control group ($P<0.05$; $P<0.01$; $P<0.001$, respectively). It was determined that the expression of *EREG* was increased approximately 5-fold in the SoM20 group compared with the control group ($P<0.001$). A positive correlation was detected between serum MDA levels and the *Bcl-2* and *NRF2* genes ($P<0.001$; $P<0.01$, respectively). A positive correlation was detected between *COX-2* and the *PGR* and *EREG* genes ($P<0.001$). A positive correlation was detected between *IL-1 β* and *Bcl-2* and *OSGIN1* genes ($P<0.05$); between *Bcl-2* and *NRF2* and *BMP15* genes ($P<0.01$; $P<0.05$, respectively); between *PGR* and *EREG* gene ($P<0.001$) and between *NRF2* and *BMP15* and *OSGIN1* ($P<0.05$).

In conclusion, 20 mg/kg melatonin administered during superovulation may support ovarian health and folliculogenesis by increasing the expression of the *PGR* and *EREG* genes in the ovary.

Keywords: Gene expression, Melatonin, MDA, Oxidative stress, Superovulation

1. GİRİŞ

Memelilerde dişi üreme sistemi, ovaryum, fallop tüpleri, uterus, serviks ve vajinadan oluşmaktadır. Fetal dönemde ovaryumdaki germ hücreleri oogonia olarak adlandırılmaktadır. Oogonların etrafını yüzey epitellerinden köken alan folikül hücreleri çevrelemektedir (Carroll 2006, Ovalle ve Nahirney 2020). Ovaryumu oluşturan ve oositleri saran bu foliküller, ovaryum işlevinin temelini oluşturmaktadır. Bu foliküllerin somatik bileşenlerinin gelişimiyle de oosit büyümesi ve farklılaşması koordine edilmektedir. Dişi üreme sisteminin temelini oluşturan ovaryumların iki temel işlevi bulunmaktadır. Bunların ilki östrojen ve progesteron gibi steroid hormon üretmek diğeri ise ovaryumun döngüsel fonksiyonunu bu hormonlarla kontrol ederek oosit salınımını sağlamaktır (Bates ve Bowling 2013).

Ovaryumu oluşturan oositler, fetal evrede ovaryum korteksinde farklılaşarak yassı konuma ulaşırlar. Mayoz I'ın Profaz-I evresinin Diploten aşmasında hücre döngüsü durur ve oositler cinsel olgunluğa ulaşılana kadar hücre dinlenme evresi olan G0 evresine geçer (Korkmaz Ağaoğlu 2021). Cinsel olgunluğa ulaşıldığında oosit gelişimi hipotalamik-hipofiz-ovaryum (HPO) eksen tarafından düzenlenir. HPO ekseninde Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) salınımı için nöronlar hipotalamusu uyarmaktadır (Takahashi ve Ogiwara 2021). Hipotalamustan salgılanan GnRH, hipofiz bezinden Follicle-Stimulating Hormone (FSH) ve Luteinizing Hormone (LH) salgısını tetiklemektedir. Böylelikle Mayoz I'de kalan oositlerin bir kısmı gelişimine devam ederler (Tsutsumi ve Webster 2009). FSH, folikül büyümesini ve ovaryumda östrojen sentezini desteklerken LH, hem oosit olgunlaşmasını hem de ovulasyonu teşvik etmektedir (Takahashi ve Ogiwara 2021). FSH'ın kana salınması ile birlikte folliküller gelişerek sırasıyla primer, sekonder, tersiyer ve graaf folikülü halini alırlar (Alaçam ve ark. 2007).

FSH ve LH, büyüyen foliküllerin sırasıyla granüloza hücrelerinin ve teka hücrelerinin yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak foliküler gelişimi desteklemektedirler. Foliküller sekonder aşamadan itibaren gonadotropinlere yanıt vererek gelişim gösterir ve preovülatör foliküllerin hayatta kalması için gonadotropinlere ihtiyacı vardır. Preovülatör foliküller bu hormon siklusunun dalgalanmasına yanıt olarak gelişir ve ovulasyon yeteneği kazanırlar. Östradiol (E2), progesteron ve inhibin granüloza hücreleri ile

teka hücrelerinde sentezlenmektedir. Bu hormonlar, GnRH, LH ve FSH'nin sentezini ve salgılanmasını düzenlemede görev alırlar (Luderer 2014).

Ovaryumda HPO ekseninde meydana gelen bir bozukluk infertilite ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte çiftlik hayvanlarında östrus senkronizasyonu, genomik seleksiyon, in vitro embriyo üretimi ve embriyo transferi amacıyla yardımcı üreme teknolojileri (Assisted Reproductive Technologies, ART) yaygın olarak kullanılmaktadır (Marshall ve Rivera 2018, Daly ve ark. 2020, Muller ve Enenanneam 2022, Menchaca 2023). ART teknolojisi kullanılarak 2018 yılında dünya çapında yaklaşık 2 milyon sığır embriyosunun üretildiği bildirilmiştir. Bu sayı her geçen yıl artmaktadır (Viana 2019, Menchaca 2023). ART sisteminde Gonadotropik Hormon uygulamaları sıklıkla tercih edilen yöntemler arasında bulunmaktadır. Bu uygulamalarda Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) ve Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) hormonları sıklıkla tercih edilmektedir (Agca ve ark. 2013, Talebian Moghadam ve ark. 2021). Bu hormonlar aracılığıyla oositler uyarılarak ovaryum indüksiyonu ve süperovulasyon şekillenmektedir (Agca ve ark. 2013).

Foliküler gelişim sırasında metabolik denge, artan besin ve enerji ihtiyacını karşılamak için hızlanır. Gerekli olgunluğa ulaşan oositin folikülden atılması için ise folikülün yırtılması ve luteinize olması gerekmektedir. Bu durumun gerçekleşmesi için folikül içinde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) üretilmektedir (Nikmard ve ark. 2022). ROT üretiminin artması oksidatif strese neden olmaktadır (Guo ve ark. 2021). Son yıllarda kullanılan süperovulasyon uygulamalarının ovaryumda ROT miktarını artırarak oksidatif stres oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir. Ratlarda PMSG ve hCG uygulamaları ile yapılan süperovulasyonda oosit kalitesinin düşmesinin yanı sıra sağlıklı foliküllerin de sayısı artabilmektedir. Süperovulasyon ovaryum hücrelerinde hücre ölümünün tetiklenmesine neden olmaktadır. Bu olumsuz etkiler ratların üreme sisteminde PMSG/hCG hormonları ile yapılan süperovulasyonun neden olduğu oksidatif stresten kaynaklandığı düşünülmektedir (Park ve ark. 2015). Eksojen gonadotropinler tarafından yapılan süperovulasyon uygulamaları, ratların ovaryum hücrelerinde mitokondriyal DNA mutasyonlarına, DNA, lipid ve proteinlerde ise hasara neden olmaktadır (Chao ve ark. 2005). Bu nedenle süperovulasyon uygulamaları ovaryumda oksidatif hasara neden olarak dişi sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir (Park ve ark. 2015). Bu olumsuzluğun ortadan kaldırılması için oksidatif stresi önleme veya azaltmaya yönelik yöntemler ön plana

çıkmaktadır. Diğer taraftan süperovulasyonda meydana gelen oosit kalitesindeki düşüşün sebebi ile ilgili moleküler çalışmalar sınırlıdır.

Melatoninin oksidatif hasarı önlemede ve oosit kalitesini korumada oldukça güçlü bir antioksidan olduğu belirtilmektedir (Jiang ve ark. 2021). Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), memelilerde esas olarak epifiz bezi tarafından sentezlenen ve salgılanan endojen bir indoleamin hormondur (Jiang ve ark. 2021). Melatoninin sadece epifiz bezinde salgılanmadığı retina, sindirim sistemi ve ovaryumda da sekresyonunun olduğu bildirilmiştir (Cheng ve ark. 2021). Memelilerde melatonin sentezi karanlıkta gerçekleşmekte olup immun savunma, sirkadiyen ritim, lipid profili, antioksidan mekanizma ve fizyolojik süreçleri düzenlenmektedir (Jang ve ark. 2017). Bununla birlikte melatoninin sirkadiyen ritim genleri, cinsel davranış ve bağışıklık sistemi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları da bulunmaktadır. Ayrıca melatoninin üreme döngüsü ve foliküler gelişim ile embriyo implantasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (Xu ve ark. 2021, Al-Shahat 2022). Melatonin, farklı patofizyolojik durumlarda inflamasyon, oksidatif stres, hücre çoğalması, apoptoz, metastaz ve otofaji gibi olgularda çeşitli moleküler yolları düzenlemektedir (Anadón ve ark. 2021, Tamura ve ark. 2020).

Ovaryumdaki melatonin sistemik kan dolaşımından elde edilebilmesinin yanı sıra kümülüs granüloza hücreleri ile oositler dahil olmak üzere granüler hücre tarafından da az da olsa sentezlenebilmektedir (Ezzati ve ark. 2021). Memelilerde eksojen ve endojen melatoninin oosite geçişi büyük oranda Melatonin Reseptör 1 (MT1) ve Melatonin Reseptör 2 (MT2) isimli iki reseptör aracılığıyla gerçekleşmektedir (Sun ve ark. 2020, Guo ve ark. 2021). Bununla birlikte melatonin lipofilik özelliğinden dolayı reseptör bağımsız olarak da hücrelere kolayca girebilmekte ve çeşitli dokuların fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Motta-Teixeira ve ark. 2018). Melatonin, granüloza hücrelerinde reseptörlerinden bağımsız olarak antioksidan aktivite göstermektedir. Yapılan güncel çalışmalarda melatoninin ovaryumdaki antioksidan aktivite, folikülogenez, foliküler atrezi ile ilişkili ROT'a karşı koyabildiği ve ovulasyon, oosit olgunlaşması ile korpus luteum oluşumunda önemli fizyolojik rollere sahip olduğu bildirilmiştir (Tamura ve ark. 2009, Basini ve Grasselli 2024).

1.1.Çalışmanın Amacı

Pineal bezden sentezlenen ve kan yoluyla foliküle gelen melatoninin ovaryumda ROT miktarını azaltarak oksidatif stresi önleyebileceği böylelikle de ovaryum ve oosit sağlığını koruyabileceği düşünülmüştür (Tamura ve ark. 2020). Bu çalışmada süperovulasyon durumunda meydana gelebilecek oksidatif stresi önlemek ve ovaryum sağlığını korumak amacıyla 5 mg ve 20 mg olmak üzere iki farklı melatonin doz uygulaması yapılmıştır. Bu kapsamda Wistar albino ratlara süperovulasyon uygulaması sonrasında farklı dozlarda eksojen melatonin uygulamasının etkileri moleküler düzeyde araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada süperovulasyon uygulaması ile melatonin uygulaması sonucu ovaryumda lipid peroksidasyon ürünü olan Malondialdehit (MDA) seviyeleri ve bazı genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

Melatoninin oksidatif stres durumunda hücre savunma mekanizmasının birincil hattında görev alan ve antioksidan gen olarak bilinen Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (*NRF2*) geninin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Süperovulasyon uygulaması sırasında ovaryumda gerçekleşebilecek oksidatif hasarın yanıtı olarak *NRF2* ile birlikte hareket eden ve apoptoz düzenleyicisi olarak işlev gören Oxidative Stress-Induced Growth Inhibitor 1 (*OSGIN1*) geninin ekspresyon seviyesi ile melatoninin bu gene mRNA düzeyindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca oosit sağlığından sorumlu Bone Morphogenetic Protein (*BMP15*) geninin, ovulasyon, folikül gelişimi ve inflamasyondan sorumlu Progesterone Receptor (*PGR*) geninin ve oosit gelişimi ile ovulasyonda rol alan Epiregulin (*EREG*) genlerinin ekspresyon seviyelerinin süperovulasyon ve melatonin tedavisiyle nasıl değiştiği değerlendirilmiştir.

Bununla birlikte, proinflamatuvar yanıtın önemli bir düzenleyicisi olan Tumor Necrosis Factor-Alpha (*TNF-α*) ve inflamatuvar sitokin olan Interleukin 1 Beta (*IL-1β*) genlerinin ekspresyon seviyeleri süperovulasyon ve melatonin uygulamalarının inflamasyon mekanizmasına etkileri incelenmiştir. Ovulasyon, luteinizasyon ve inflamasyonda görev alan Cyclooxygenase 2 (*COX-2*) geninin ve folikülogenezde rol alan hücre ölümünü engelleyen B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*) genlerinin ekspresyon seviyeleri de süperovulasyonla birlikte uygulanan melatoninin bu genlere etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, süperovulasyonun ovaryumda neden olabileceği oksidatif stres ve inflamasyon durumunda

melatoninin ovaryum sağlığı ve folikülogenez üzerinde potansiyel koruyucu rolü moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

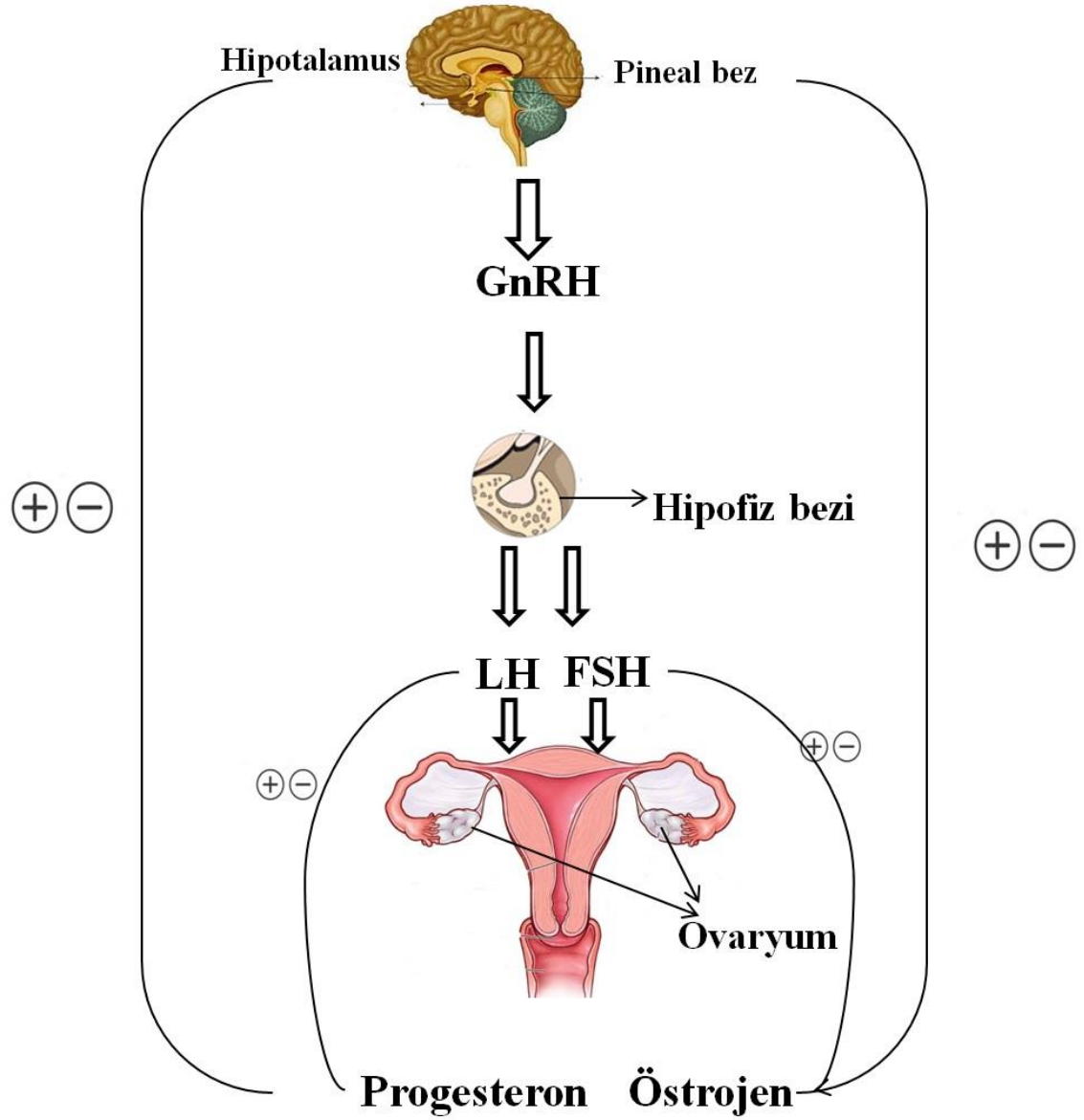
Ovaryum memelilerde östrus döngüsü, hormon salınımı, oosit olgunlaşması ve foliküler gelişimden sorumlu çeşitli sinyal moleküllerine sahip olan üreme organıdır (Adhikari ve Liu 2009). Ovaryumlar laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan rat ve farelerde böbreğin gerisinde bir çift olarak bulunur. Yoğun fibröz doku içeren ovaryumların rengi beyaz olup erişkin ratlarda boyutu yaklaşık 0,5x0,3 cm büyüklüğündedir (Alaçam ve ark. 2007). Ovaryum korteks, subkortikal medulla ve hilum olmak üzere üç kısımdan oluşur. Ovaryum korteksi, yüzey epiteli ve stromal doku olarak 2 bölüme ayrılmıştır. Korteks ovaryumun periferik bölgesinde bulunur ve medullayı çevreler (Meserve ve Crum 2018). Korteksin bağ dokusunda yer alan düz kas lifleri ise folikülü çevreler (Ross ve Pawlina 2006). Memelilerde ovaryum fonksiyonunu ovaryum folikülleri gerçekleştirir (Luderer 2014). Folikül gelişimi folikülogenez olarak adlandırılmaktadır. Folikülogenez, primordiyal foliküllerin gelişimi ile başlar ve ovulasyon ya da atrezi nedeniyle apoptozun gelişmesiyle sona erer (Williams ve Erickson 2012). Ovulasyon sonrası meydana gelen granülasyon sonucunda, folikülleri çevreleyen bu doku hormon üretimi de yapmaktadır (Ross ve Pawlina 2006, Mescher 2013). Korteksin içinde bulunan medulla büyük kan damarları ile sınırlardan oluşur (Williams ve Erickson 2012). Medulla kan ve lenf damarlarını hilum girişinden itibaren destekleyen sinirlerin bağ dokusunu içermektedir (Ross ve Pawlina 2006). Hilum, ovaryum hücrelerini ve Leyding hücrelerini içerir (Williams ve Erickson 2015). Bununla birlikte hilum mezovaryum genişlemesi ve tromboze damarları da içermektedir (Muller ve Uys 1957). Hilum, ovaryumun mezovaryuma bağlanmasında görev almaktadır (Speroff ve Fritz 2005).

Oosit gelişimi fetal yaşta başlar. Fetal yaşta gelişen germ hücreleri oogonia olarak adlandırılır. Ovaryumdaki epitel hücreler ise farklılaşarak folikülleri oluşturur. Her oogonium bir primordial folikül içinde gelişimini tamamlar (Ovalle ve Nahirney 2020). Folikül, granüloza tabakası ve teka hücreleri ile çevrili olup sıvı dolu iç antrumdan oluşur (Strauss ve Williams 2019).

Fetal dönemden pubertas dönemine kadar ovaryum dokusu hariç diğer tüm dokular büyümeyle ilgili olarak gelişirler (Beckman ve Feuston 2003). Oositler, puberte sonrasında

ilk üreme yaşına kadar Mayoz-I'in Profaz aşamasında kalmaktadır (Rimon-Dahari ve ark. 2016). Ovaryum, pubertas döneminde bir dizi hormon uyarısına bağlı olarak gelişim gösterir (Beckman ve Feuston 2003). Bu hormon, HPO ekseninin ana düzenleyicisidir. Hipotalamusun preoptik ve arkuat çekirdeğinin nöronları tarafından hipofiz portal sisteminde üretilen GnRH dişilerde folikül gelişiminde anahtar rol oynar. GnRH, hipofizde FSH ve LH salgılanmasını ve ardından ovaryum tarafından östradiol ve progesteron salgılanmasını uyarır (Kalantaridou ve ark. 2004). Üretilen bu hormonlar ovulasyonun durumuna bağlı olarak hipotalamustan salgılanan GnRH ve ön hipofizden salınan LH ile FSH üretimi için pozitif/negatif feedback yaparlar (Şekil 1).





Şekil 1. Hipotalamik- hipofiz gonadal döngüsü (Popat ve ark. 2008)

Pubertasa ulaşan dişilerin hipotalamusundan GnRH salınımı gerçekleşir (Terasawa 2022). Gonadotropin salgısının uyarımıyla da hipofiz bezinden FSH sekrete edilir. FSH salınımı ile birlikte birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında kalan oositler gelişmeye devam eder. Bu döngü ratlarda 4-5 günde bir meydana gelir (Westwood 2008). Fare ve rat gibi laboratuvar hayvanlarında üreme sistemi ve bu sistemi kontrol eden mekanizmalar çiftlik hayvanları ile benzer olsa da ovulasyon döngüsü çok daha kısadır (Westwood 2008, Ajayi ve Akhigbe 2020, Espey 1994).

Oosit gelişiminde etkili olan GnRH, FSH ve LH hormonları eksojen olarak verildiğinde oosit havuzunu oluşturan primordial foliküller uyarılarak birden fazla oositin büyümesi ve gelişmesi tetiklenir (Li ve Chian 2017). Bu hormonların salınımı ile foliküller gelişim tetiklenerek sırasıyla primordial/primer, sekonder ve graaf folikül halini alır (Zhang ve ark. 2023).

2.1.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi

2.1.1.1. Primordiyal Folikül

Ovaryumda ortaya çıkan ilk küçük foliküllere primordial folikül adı verilir. Primordiyal foliküller pre-granüloza hücreler ve tek katlı somatik hücre ile çevrelenen oositten oluşmaktadır (Adhikari ve Liu 2009). Primordiyal foliküllerin gelişimi pre-granüloza hücrelerinden ve oositten salgılanan büyüme sinyalleri, büyüme faktörleri ve stres gibi koşullar tarafından tetiklenmektedir (Bian ve ark. 2021). Primordiyal hücreler aktive olduktan sonra pre-granüloza hücreler önce kama şekline ardından küboidal ve son olarak granüloza hücrelere dönüşürler (Kallen ve ark. 2018). Primordiyal hücrelerin granüloza hücrelerle çevrenmesiyle de primer folikül oluşur. Primer oositler gonadotropin bağımlı büyümeye başlar ve folikülü çevreleyen granüloza hücrelerinden folikül gelişimini tetikleyen sitokin üretimi gerçekleşir (Li ve Chian 2017). Bu sitokinlere cevap olarak büyüyen primordial foliküller şekil değiştirir ve oositi saran granüloza hücreler gelişerek primer oositi meydana getirir. Bu gelişme sırasında granüloza hücrelerin arasında kalın bir glikoprotein tabakası oluşur. Bu tabakaya zona pellicuda denir (Wassarman 2008). Zona pellucida oogenez, fertilizasyon ve pre-implantasyon gelişimini destekler (Hakim ve ark. 2021).

Granüloza hücrelerin çevrenmesi ile oluşan sağlıklı primer oositlerde aktivin ve Follicle Stimulating Hormone Receptor 1 (FSHR1) ve Follicle Stimulating Hormone Receptor 2 (FSHR2) ekspresyonu gerçekleşir. Aktivinler, granüloza hücrelerin hayatta kalmasını ve hücre çoğalmasını destekler ve FSH reseptörlerinin fonksiyonunu korumada görev alırlar. FSH reseptörleri ise granüloza hücrelerin farklılaşmasını, çoğalmasını desteklemede pozitif uyarıcı olarak görev görürler (Knight ve Glistler 2001). Hipofizden salgılanan FSH dolaşımıyla ovaryuma taşınır ve burada spesifik reseptörleri olan FSHR'lere

bağlanarak folikül gelişimini uyarır (Shi ve ark. 2009). Primordiyal hücreler FSH uyarısının ardından gelişerek sekonder folikül halini alır (Arroyo ve ark. 2020).

2.1.1.2. Sekonder Folikül

Primer folikül etrafındaki granüloza hücre tabakası genişleyerek iki veya daha fazla katmana ulaşır. Granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla sekonder folikül oluşur. Granüloza hücrelerin en dış katmanında bir bazal membran ve somatik hücre katmanı bulunur. Bu hücrelere teka hücreleri adı verilir ve bu hücreler folikülü çevreler. Teka hücreleri teka interna ve teka eksterna olmak üzere ikiye ayrılır. Granüloza hücreleri saran teka eksterna östrojen üretimi için androjen kaynağı olarak işlev görür. Folikül gelişmeye devam ettikçe folikül içinde bulunan teka internalar vaskülarize olurken granüloza hücreleri avaskülere kalır. Bununla birlikte bu hücreler granüloza ve teka hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek foliküler büyüme hızının düzenlenmesinde rol oynarlar (Rimon-Dahari ve ark. 2016).

Teka eksterna otonom sinirler tarafından innerve edilen düz kaslardan oluşur (Erickson ve Shimasaki 2000). Teka interna ve teka eksterna büyük epiteloid hücrelerden oluşmaktadır. Aktif olarak steroid üreten hücrelerin yapısal özelliklerine sahiptir. Sitoplazmalarında lipid damlacıkları, düz endoplazmik retikulum ve mitokondri bulunur (Erickson ve ark. 1985). Teka interna hücreleri LH ve insülin reseptörlerine sahiptir. LH ve insüline yanıt olarak androstenedion olmak üzere yüksek düzeyde androjen üretimi yaparlar (Erickson 1993, Arroyo ve ark. 2020). Teka interna, folikül büyümesi sırasında antral folikülü çevreleyerek kılcal ağ yardımıyla vaskülarizasyonda etkili rol oynar (Williams ve Erickson 2015).

Oosit büyümesinde uyarıcı görev gören androstenodin hormonu teka hücrelerinde sentezlendikten sonra granüloza hücrelere gelir ve bir takım enzimatik reaksiyon (Aromataz enzimi ile östron ardından 17 β - hidroksisteroid dehidrogenaz 1 enzimi ile östrojen oluşumu gerçekleşir) sonucunda son ürün olan östradiole çevrilir (Hillier ve ark. 1994, Gervásio ve ark. 2014). Kanda östrojen miktarının artması ise hipofiz bezinden LH salınımının artmasına neden olur (Diaz ve ark. 2007).

Folikül büyüdükçe folikül içindeki sıvı da artmaya başlar ve oosit büyümesi devam eder. Dominant folikülün geliştiği ve folikül gelişimin son evresi olan graaf/tersiyer folikül oluşumu gerçekleşir (Alaçam ve ark. 2007).

2.1.1.3. Graaf/Tersiyer Folikül

Graaf/tersiyer folikül, foliküler büyümenin son aşamasıdır. Sekonder folikülü oluşturan granüloza hücreleri büyük miktarda interstisyel sıvı üretir. Bu sıvı içinde büyümüş, olgun oositlerin bulunduğu bir antrum oluşur (Williams ve Erickson 2015). Granüloza hücreleri ile teka hücrelerinin çoğalması, tekal vaskülorizasyonun artması ve oositin büyümesi sonucunda graaf folikül oluşur (Cheon 2012). Bu aşamada yaklaşık 2 milyon somatik hücre, mural granüloza hücre ve kümülüs hücre oositi çevreler. Teka interna ve eksternada LH reseptörleri hücre yüzeyinde yerlerini alırlar (Arroyo ve ark. 2020). Dolaşımdan gelen LH buradaki LH reseptörüne bağlanarak folikülün luteinize olmasında ve korpus luteumun oluşmasında merkezi rol oynar (Aguirre ve ark. 2000, Cheon 2012). Ovulasyonun gerçekleşmesi durumunda graaf/tersiyer folikül luteinizasyona uğrar ve bu folikül içindeki oosit serbest kalır. Ovulasyon sonucu folikül yerinde luteinizasyon devam eder ve burada şekillenen bu yapı korpus luteum olarak adlandırılır. Bu yapıdan progesteron ve östrojen hormonları salgınır. Salınan bu hormonlar hipofizden salınan GnRH sekresyonunu negatif feedback ile baskılar. Gebelik gerçekleşirse korpus luteumdan bu hormonların salgınımı devam eder (Hall 2019). Gebelik gerçekleşmez ise bu kez uterustan Prostaglandin F2 α salgınır ve korpus luteum lize olur (Alaçam ve ark. 2007, Hall 2019).

Foliküler gelişim oosit olgunlaşması ve başarılı bir ovulasyon oluşumu için kritik öneme sahiptir. Dişilerde mayoz bölünme sırasında hem dış hem de iç faktörler oosit gelişimini etkileyebilmektedir (Liu ve ark. 2022). Yapılan bu çalışmada senkronizasyon, in vitro fertilizasyon gibi birçok alanda yardımcı üreme teknolojisi olarak kullanılan süperovulasyon uygulamasının ovaryumda oosit kalitesine olan etkileri moleküler düzeyde araştırılmış, süperovulasyon ile meydana gelebilecek oksidatif stresi önlemek amacıyla farklı dozlarda uygulanan melatoninin ovaryumu koruyucu etkisi moleküler ve biyokimyasal düzeylerde incelenmiştir.

2.2. Östrus Siklusu (Döngüsü)

İlk olarak Heape tarafından kullanılan östrus terimi Yunanca'da "cinsel mevsim", "çılgınlık", "sokma" veya "delilik" anlamına gelen "oistros" kelimesinin Latince uyarlaması olarak günümüze kadar gelmiştir (Heape 1900, Marcondes ve ark. 2002). Heape östrus döngüsünü günümüzde de geçerli olan proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere 4 farklı aşamada incelemiştir (Heape 1900).

Proöstrus, memelilerde bazı farklılıklarla karakterize olmakla birlikte kızgınlığa geçiş için hazırlık aşamasıdır. Östrus, memelilerde ovulasyon öncesi meydana gelen ve dişinin çiftleşmeyi kabul ettiği dönemdir. Östrus kızgınlık dönemi olarak da adlandırılmaktadır (Crowe 2022). Metöstrus, korpus luteumun şekillendiği fonksiyonlarının yeni başladığı dönemdir. Diöstrus, korpus luteumun fonksiyon gösterdiği ve aktif progesteron sentezlediği dönemdir. Anöstrus ise ovaryumun inaktif olduğu, ovulasyonun gerçekleşmediği seksüel dinlenme evresidir (McLean ve ark. 2012).

Östrus döngüsü, üreme döngüsünü ifade etmektedir. Rodentlerde östrus döngüsü çiftlik hayvanlarının üreme döngüsüne benzemektedir (Hafez ve Hafez 2013, Auta ve Hassan 2016) (Tablo 1). Dişi ratlarda pubertasa yaklaşımdan önce yani doğumdan sonraki 4. haftadan sonra pulsatil LH salınımı gerçekleşmektedir (Ekambaram ve ark. 2017). Bu durum prepubertal evrede şekillenmektedir ve proöstrustan yaklaşık 8-9 gün öncesine kadar devam etmektedir (Foitzik ve ark. 2000). Pubertastan sonra sırasıyla proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evreleri şekillenmektedir. Ratlarda doğumdan sonraki ilk östrus 5-8 haftalık yaşta olmasına rağmen ovulasyonun olduğu östrus 10-11 haftalık yaştadır. Dolayısıyla ratların ilk çiftleşmesi 200-275 g ağırlığa ulaştıklarında gerçekleşmektedir (Alaçam ve ark. 2007). Ratlarda gebelik 21-23 gün sürmektedir (Bamdad ve ark. 2017).

Tablo 1. Rat ve farelerde östrus evrelerinin uzunlukları (Ajayi ve Akhigbe 2020)

Östrus Döngüsü	Süre (saat)	
	Rat	Fare
Proöstrus	14	<24
Östrus	24-48	12-48
Metöstrus	6-8	8-24
Diöstrus	48-72	48-72

Ratlarda proöstrus fazı, dolaşımdaki östradiol konsantrasyonlarındaki artış ve prolaktindeki dalgalanma ile ilişkilidir. Kanda ilgili hormonlarda meydana gelen bu değişimler LH ve FSH salınımında artışa neden olur. Östradiol seviyesindeki düşüş FSH konsantrasyonundaki artışa neden olur. FSH miktarının artması ovulasyon ve östrus fazı ile ilişkilidir (Ekambaram ve ark. 2017, Heape 1900).

2.3. Vajinal Sitoloji

Vajinal sitoloji metodu vajinal hücrelerin mikroskopik incelemesiyle yapılan doğru ve güvenilir bir yöntemdir. Bunlar, lökositler, kornifiye epitel hücreleri ve çekirdekli epitel hücreleri içerir. Östrus evresinin tahmini vajinal sitolojide tespit edilen hücrelerin oranlarına dayanır (Auta ve Hasan 2016).

Proöstrus fazı, büyüklük ve görünümü benzer olan çok sayıda yuvarlak çekirdekli hücre ile karakterizedir. Bu fazda hücreler kümeler halinde veya ayrı ayrı görünürler. Ayrıca birkaç çekirdeksiz kornifiye epitel hücresi de bulunur. Erken proöstrusta lökositler de görülebilir. Östrus fazı, bol miktarda çekirdeksiz kornifiye epitel hücreleri içermektedir. Sitoplazma granülerdir ve hücrelerin şekli düzensizdir. Ayrıca çok sayıda bakteri ve nadiren çekirdekli epitel hücreleri de gözlenebilmektedir. Metöstrusta çok sayıda lökosit ve az sayıda büyük, granüler olmayan ve çekirdeksiz kornifiye epitel hücreleri görülmektedir. Bazı çekirdekli epitel hücreler geç metöstrusta da mevcut olabilir. Diöstrus da belirgin polimorfonükleer lökositler ve birkaç epitelyal ve kornifiye hücre bulunur. Lökositler, hücre kalıntıları ortadan kaldıran baskın hücre tipi olarak görev alır (Auta ve Hassan 2016, Barret ve ark. 2009, McLean ve ark. 2012).

Ratlarda östrus dönemini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında görsel değerlendirme, vajinal sitoloji, üreme organlarının histolojik incelenmesi, vajinal duvar empedansı ve idrar biyokimyası yer almaktadır (Ajayi ve Akhigbe 2020). Bunlardan vaginal sitoloji yöntemi invaziv bir yöntem olmaması ve pratik olarak uygulanabilir olması sebebi ile bu çalışmada östrus dönemini belirlemek için tercih edilmiştir.

2.4. Süperovulasyon

Süperovulasyon terimi ilk olarak 1927 yılında ortaya atılmıştır (Smith ve Engle 1927). Süperovulasyon, ovulasyon sırasında ovaryumdan salınan ve döllenmeye hazır olan oosit sayısını artırma yöntemidir (Agca ve ark. 2013, Taheri ve ark. 2021). Bu uygulama, birden fazla folikülün preovulasyon aşamasına alınmasını ve gelişimini teşvik etmek için bir takım hormon uygulamalarından oluşmaktadır (Wilson 2010). Süperovulasyondaki amaç herhangi bir dominant folikülü ortadan kaldırmak ve bir döngüdeki ovulasyona hazır oosit sayısını artırmaktır. Normal ovulasyon sürecinde baskın olan tek bir folikül süperovulasyon ile ortadan kaldırılır ve folikül uyarıcı gonadotropinler kullanılarak sekonder/tersiyer foliküllerin gelişimi teşvik edilir. Süperovulasyon ile ilgili protokoller son 40-50 yılda önemli ölçüde değişmiştir. Günümüzde bu uygulama in vitro fertilizasyon, infertilite ve oosit dondurma gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Agca ve ark. 2013, Lonergan ve Sánchez 2022).

Süperovulasyon uygulamasında kullanılan ilk gonadotropin preparatlarından olan human menopausal gonadotrophin (hMG) menapoz sonrası kadınların idrarlarından elde edilmiştir (Howles 2000, Abreu ve Kaiser 2022). FSH'nin foliküler büyüme ve olgunlaşmada anahtar rol oynamasının anlaşılmasıyla da bu hormonun yüksek oranda saflaştırılması için çalışmalar yapılmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda oosit olgunlaşmasının başarılı bir ovulasyon için yeterli olmadığı ve bunun için LH hormonunun da gerekli olduğu anlaşılmıştır. 1970'lerde hipofiz ekstraktı ve prostaglandinler ticari olarak üretilirken, 1980 ve 1990'larda kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktları ve progesteron salgılayan modern protokoller geliştirilmiştir (Lonergan ve Sánchez 2022).

Normal bir folikül gelişim süreci GnRH, FSH ve LH hormonlarının koordinasyonlarıyla yapılırken, süperovulasyon eksojen gonadotropinlerin uygulanmasıyla yapılmaktadır. Günümüzde laboratuvar hayvanlarında süperovulasyon için hCG ve PMSG enjeksiyonları 48 saat arayla yapılmaktadır. PMSG, FSH benzeri etki gösterirken hCG, LH benzeri etki göstermektedir (Kumari 2023). Ancak korpus luteumdan salgılanan progesteronun PMSG'yi inhibe etme özelliği bulunduğu için tekrar eden süperovulasyon uygulamalarında östrus sonlanmadan kullanımı zordur. Bu nedenle süperovulasyon uygulamasına başlanmadan önce korpus luteumun uzaklaşması önemlidir (Nie ve ark.

2018). Bununla birlikte bu gonadotropin preparatlarının saflaştırılmasında rekombinant DNA teknolojileri kullanılmaktadır (Howles 2000).

Süperovulasyon prosedürleri in vitro fertilizasyon, embriyo transferi, yüksek verimli hayvanlardan daha fazla oosit elde edilmesi, hayvan ıslahı sürecini hızlandırılması ve genetik çeşitliliğin artırılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Gordon 2003, Bo ve Mapletoft, 2014, Lonergan ve Fair 2016). Süperovulasyon her ne kadar güvenli kabul edilse de yapılan çalışmalarda bu uygulamanın bazı sınırlandırmalarının ve zararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2022, Feng ve ark. 2023). Yapılan çalışmalarda süperovulasyonun, kümülüs hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonu olumsuz etkilediği, apoptoz ve mitokondriyal hasarı indüklediği, embriyo gelişiminde histon modifikasyonlarını değiştirerek ovaryum fonksiyonunu azalttığı, oosit ve embriyo kalitesini düşürdüğü, embriyonel gelişimi geciktirdiği tespit edilmiştir (Tang ve ark. 2019, Nie ve ark. 2018). Süperovulasyon uygulamasının ise rodent oositlerinde, sitoplazmik parçalanma, anormal mitokondriyal dağılım ve iç iplikçisi hasarının şekillendiği bildirilmiştir (Kalthur ve ark. 2016). Çeşitli üreme sorunlarında kullanılan süperovulasyonun oositlerde oksidatif hasarı artırarak ovaryum ve oosit sağlığını olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir (Karasahin ve ark. 2021).

2.5. Ovulasyon ve Oksidatif Stres

Oksijenin biyolojik sistemlerde hem faydalı hem de zararlı etkileri vardır. Hücre içinde adenosin-5-trifosfat (ATP) üretimi sırasında oksijeninin elektron transferine dahil olmasıyla reaktivite meydana gelmektedir. ROT ise reaktif oksijen türevi moleküllerin (süperoksit, hidroksil, peroksil ve hidroperoksil radikalleri gibi) oluşturduğu grubu kapsayan ortak bir terimdir (Averill-Bates 2023).

ROT ve ROT ara ürünleri, normal hücresel metabolizmanın yan ürünleri olarak üretilir. Düşük konsantrasyonlardaki ROT, fizyolojik fonksiyonları yerine getirmek için bir sinyal molekülü görevi görür (Mukhopadhyay ve ark. 2022). Düşük veya orta konsantrasyonlarda ROT, hücrede patojenlerin öldürülmesi, yara iyileşmesi, doku onarımı ve ovaryumda folikül luteinizasyonu gibi fizyolojik süreçleri kolaylaştırır (Bhattacharyya ve ark. 2014, Mukhopadhyay ve ark. 2022, Agarwal ve ark. 2008). Ovaryumda ROT'un

organizma için faydalı görevleri bulunmaktadır. ROT, mayoz bölünme, foliküler büyüme, oosit olgunlaşması, ovulasyon, embriyo implantasyonu, embriyo gelişimi, korpus luteumun luteinizisi ve luteinize granüloza hücrelerin oksidatif stres kaynaklı apoptozisi gibi fizyolojik olaylara da aracılık etmektedir (Wang ve ark. 2003, Agarwal ve ark. 2008, Kala ve ark. 2017, von Mengden ve ark. 2020).

Ovulasyondan önce LH dalgalanması ovaryumdaki inflamatuvar öncüllerin seviyesini artırır. Bu durum ovaryumda ROT üretimini tetikler. Artan ROT, granüloza hücrelerde apoptozu indükler, bu da folikül duvarının yırtılmasına ve oositin serbest kalmasına yol açar. Bu nedenle ovaryumdaki foliküler yırtılmaya neden olan ROT, ovulasyon sinyali olarak kabul edilir (Pasqualotto ve ark. 2004, Shkolnik ve ark. 2011).

Fizyolojik bazı durumlar için oksidanlar gerekli olsa da süperoksit anyonu, nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve serbest radikaller gibi ROT'ların aşırı üretimi organizmada patolojik durumlara neden olabilmektedir (Aydin ve ark. 2010, Aslan ve ark. 2017). Hücre içinde oluşacak ROT konsantrasyonunu azaltmak için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi hücrenin doğal olarak geliştirdiği enzimatik savunma sistemleri bulunmaktadır (Khansari ve ark. 2009). Bu enzimatik sistemlerin yanında vitaminler ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalarda ROT'un hücre içindeki miktarını azaltmada görev alırlar (Sinbad ve ark. 2019, Mukhopadhyay ve ark. 2022). Hücre içinde ROT miktarı antioksidanlarca kontrol edilmezse veya herhangi bir nedene bağlı olarak ROT ile antioksidanlar arasındaki denge bozulursa hücrede ROT miktarı artar. Bu durum da hücrede oksidatif stres oluşumunu destekler (Halliwell ve Gutteridge 2015).

Oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna, protein bozunmasına, DNA oksidasyonuna, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve normal hücre fonksiyonlarının zarar görmesine neden olan hücre veya çevresel uyaranlardan türetilen yüksek ROT seviyesi ile ilişkilidir (Wang ve ark. 2021). Hücre içi yüksek ROT konsantrasyonu sitotoksisteye de neden olmaktadır. Folikül luteinizasyonu için ihtiyaç duyulan ROT miktarı hücrede antioksidan mekanizmalar tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Bu denge antioksidan veya ROT seviyelerinin herhangi biri yönünden bozulursa ovaryumda folikül gelişimini, ovulasyonu ve ovaryumu olumsuz etkilemektedir (He ve ark. 2016). Yapılan bir çalışmada antioksidan enzim olarak bilinen glutatyon peroksidazın foliküler sıvıda azalması dişiilerde sebebi açıklanamayan

infertilite ile ilişkilendirilmiştir (Paszkowski ve ark. 1995). Yapılan diğer çalışmalarda ise ovaryumda ROT miktarının artması ve buna bağlı olarak oksidatif stresin oluşması ile oosit ve ovaryum sağlığını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Tamura ve ark. 2013, Tamura ve ark. 2020).

ROT belirli seviyelerde olmak koşuluyla ovaryumda başarılı bir ovulasyon için gerekli olsa da süperovulasyon durumunda ovaryumda artan ROT, oksidatif stresi tetikleyerek oosit ve embriyo sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle ovaryumda meydana gelen yüksek oksidatif stres hem ovaryum hem de oosit sağlığı için tehlike arz etmektedir. Son yıllarda dişi üreme sisteminde ROT ve oksidatif stresin rolünü araştıran çalışmalara odaklanılmıştır (Tamura ve ark. 2020, Wang ve ark. 2021). Yapılan bu çalışmada da süperovulasyon uygulaması ve melatoninin ovaryuma etkileri araştırılmıştır.

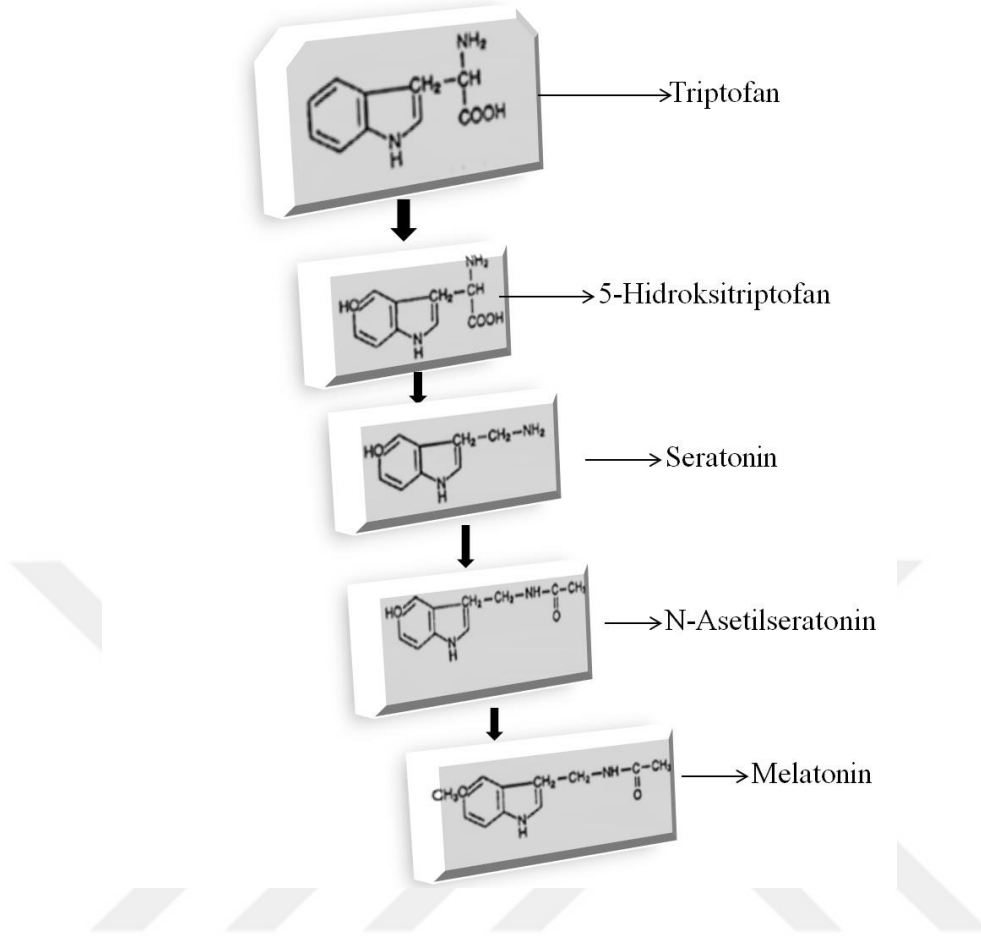
2.6. Melatonin

Melatonin, melanaform-ilişkili (melanophore-contracting) hormon olarak bilinir. İlk olarak kurbağa ve balık melanositleri üzerinde etkili cilt aydınlatıcı molekül olarak keşfedilmiştir (Lerner ve ark. 1958, Hardeland ve ark. 2006). Daha sonra Lerner ve ark. (1958) tarafından sığır pineal bezden izole edilerek tanımlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda melatoninin vitamin C, vitamin E, mannitol ve glutatyon gibi bilinen birçok antioksidandan daha güçlü bir potansiyele sahip olduğu ve doğrudan serbest radikal temizleyicisi olduğu bildirilmiştir (Mukhopadhyay ve ark. 2022, Reiter ve ark. 2023). Bununla birlikte melatoninin tüm memelilerde bulunduğu, epifiz bezi tarafından ritmik olarak salgılandığı, sirkadiyen ve mevsimsel ritimlerin düzenlenmesinde yer aldığı belirlenmiştir (Hardeland ve ark. 2006). Melatonin gastrointestinal sistem, deri, retina, kemik iliği, lenfositler, folikül hücreleri, mitokondri, oositler ve sitotrofoblastları içeren dişi üreme hücrelerinde sentezlenmektedir (Mojaverrostami ve ark. 2019).

Memelilerde genelde serum melatonin konsantrasyonu gün boyunca düşüktür. Ancak geceleri karanlığa bağlı olarak bu hormonun serumda konsantrasyonu artar. Bu nedenle melatonin karanlık hormonu olarak da adlandırılır. Melatonin sentezi ışık ile kontrol edilebilmektedir. Işıkla kontrol edilen bu fotosensör bilgi, retinada başlar. Retinadan alınan bilgi retinohipotalamik yolak yardımıyla Suprachiasmatic Nucleus (SCN)'a iletilir. SCN'ye

gelen bilgi paraventriküler çekirdeğe geçer. Ardından omuriliğin intermediolateral hücre çekirdeğine gider ve burada sempatik sinir sisteminin ganglionic adrenerjik sinirlerini uyarır. Uyarılan adrenerjik sinirler superior servikal ganglionlarla etkileşime girer. Ganglionlara gelen bu sempatik bilgi polinoral yolla epifiz bezine ulaşır. Epifiz bezine ulaşmasının ardından pinealositte bulunan α -adrenerjik reseptörler aktive olur. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile adenilat siklaz aktivitesi gerçekleşir. Bu aktivasyon melatonin sentezinde anahtar rol oynayan arilalkulamin N-asetiltransferaz aktivitesinin uyarılmasında görev alan cAMP seviyesini yükseltir. Yükselen cAMP melatonin sentezini uyarır. Melatonin biyosentezi ise amino asit L-triptofanın kan dolaşımından hipofiz bezine alınmasıyla başlar (Tamura ve ark. 2013).

Melatonin ön maddesi triptofandır (Tamura ve ark. 2020). Triptofan başlangıçta 5-hidroksitriptofana hidroksile edilir ve daha sonra serotonin oluşumu için dekarboksillenir. Serotonin ya N-asetilserotonin oluşturmak için asetillenir ya da 5-metoksitriptamin oluşturmak üzere metillenir. Bu ürünler son olarak melatonin sentezi için sırasıyla metillenme ve asetillenme geçirirler (Cipolla-Neto ve ark. 2022). Son ürün olarak melatonin sentezi gerçekleşir. Sentezlendikten sonra melatonin doğrudan beyin omurilik sıvısına ve üçüncü ventrikül ile kana geçer. Böylelikle çok kısa sürede tüm vücut dokularına ulaşır (Gelen ve ark. 2022) (Şekil 2).



Şekil 2. Melatonin sentezi (Masters ve ark. 2014)

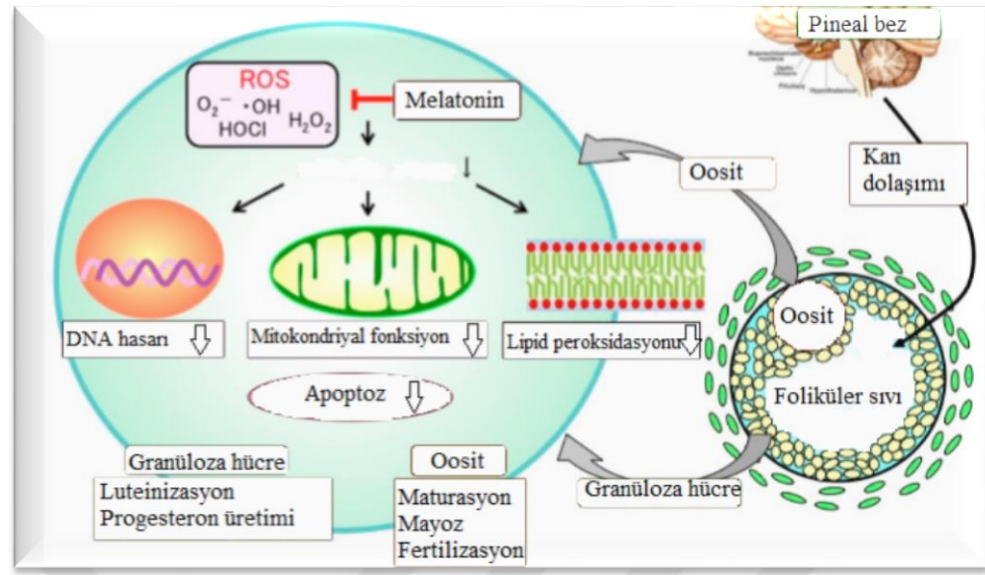
Melatonin amfilik özellikte olup hem suda hem de yağda çözünür. Bu sayede hücre zarından kolayca geçmektedir (Acuña-Castroviejo ve ark. 2018). Bu nedenle hücrede sitozol, mitokondri ve hücre çekirdeğinde görülebilmektedir. Melatoninin hücre içine reseptör bağımlı girişi melatonin reseptörleri (MT) tarafından gerçekleşmektedir (Pal ve ark. 2022). Melatoninin MT1, MT2 ve MT3 olmak üzere 3 tane reseptörü bulunmaktadır. Ancak memelilerde MT1 ve MT2 olmak üzere 2 melatoninin reseptörü bulunmaktadır (Kim ve ark. 2019).

Melatoninin ovaryum foliküllerine girişi genellikle reseptör bağımlı olmaktadır. Guaninin nükleotid bağlayıcı protein (G-protein)- bağılı reseptörlerin süper ailesini oluşturan melatonin reseptörleri melatoninin bağlanmasıyla aktif olmaktadır. Melatonin için bilinen zara bağılı reseptör olan MT1 ovaryum granüloza hücrelerinde ve luteal hücrelerde eksprese olmaktadır (Pal ve ark. 2022). MT2 ise oosit olgunlaşması, embriyo gelişimi, oosit ve

embriyoların antioksidan ile ilişkili sinyal aktivasyonunda görev almaktadır (Kim ve ark. 2020). Bu sinyal iletimi hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesini inhibe etmektedir. Bu reseptörlerin aktivasyonu hedef hücrede forskolin kaynaklı siklik adenosin monofosfat oluşumunu inhibe ederek aktive olan protein kinaz A miktarını azaltmaktadır (Luchetti ve ark. 2010, Tamura ve ark. 2013). Böylelikle ovaryum ve foliküllerde meydana gelen oksidatif stresin azaltılmasını desteklemektedir (Tamura ve ark. 2013). Ek olarak melatonin süperoksit anyonu, hidroksil radikali, tek oksijen, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve peroksinitrit anyonunu nötr etme yeteneği dahil geniş bir yelpazeye sahiptir (Reiter ve ark. 2003). Reseptör bağımsız olarak melatonin reaktif ve toksik olan hidroksil radikalini detoksifiye etmektedir. Melatonin serbest radikalleri ortadan kaldırdığında, siklik 3-hidroksimelatonin, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin ve N1-asetil-5-metoksikinuramin gibi metabolitlere dönüşür. Melatonin gibi bu metabolitlerinde güçlü antioksidan etkileri vardır. Melatonin hem süperoksit dismutaz (SOD), GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini hem de bu enzimlerin mRNA ekspresyonunu artırmaktadır (Moniruzzaman ve ark. 2018). Böylelikle de hücrelerde meydana gelen ROT miktarını düşürerek oksidatif stresi azaltmaktadır (Gurunathan ve ark. 2020).

2.7. Ovaryum ve Melatonin

Melatoninin, germ hücrelerinde oksidan stresin azalması, ovaryum yaşlanmasının gecikmesi, oosit olgunlaşmasını teşvik etme ve embriyo gelişimini destekleme gibi üreme sisteminde birçok olumlu etkisi bulunmaktadır (Jiang ve ark. 2021). Bununla birlikte melatonin granüloza hücrelerde oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon, lipid peroksidasyonu ve apoptoz oluşmasını engellemektedir. Ek olarak melatonin ovaryum hücrelerinde, nükleus, mitokondri ve plazma membranı gibi hücre bileşenlerini serbest radikallere karşı korumaktadır. Ovaryum hücrelerinde melatonin ile ROT miktarı arasındaki denge oosit olgunlaşması, mitoz ve granüloza hücrelerdeki luteinizasyon için kritiktir (Tamura ve ark. 2020). Bu nedenle melatonin ovaryum sağlığını koruyucu etkileri olan güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak da bilinmektedir (Basini ve Grasselli ve ark. 2024) (Şekil 3).



Şekil 3. Ovaryum folikülünde melatoninin varsayılan etkileri (Tamura ve ark. 2020)

Melatonin foliküler sıvıda yüksek miktarda bulunmaktadır ve konsantrasyonu folikül büyümesiyle orantılı olarak artış göstermektedir (Reiter ark. 2014, Mojaverrostami ve ark. 2019). Foliküllerdeki melatonin miktarı serum melatonin miktarına kıyasla 10 kat daha fazladır. Folikül büyüdükçe folikül içine daha fazla melatonin alınmaktadır (Gelen ve ark. 2022). Melatoninin folikül içine alınması ve folikül içindeki konsantrasyonunun fazla olmasının fizyolojik önemi uzun süredir belirsizliğini korumaktadır. Ovulasyon sırasında inflamatuvar sitokinlerin uyarımıyla folikülde üretilen ROS'a karşı oositlerin ve granuloza hücrelerin sağlığını korumada etkili rol alan melatoninin üretimi bu hücrelerde az miktarda olsa da yapılmaktadır. Ayrıca dolaşımdan gelen melatonin, spesifik reseptörleri yardımıyla da hücre içine alınmaktadır. Dişilerde melatonin üreme fizyolojisi üzerindeki etkilerini ovaryumda bulunan spesifik reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Reiter ve ark. 2014, Reiter ve ark. 2014, Mojaverrostami ve ark. 2019).

Melatonin ovaryum fizyolojisini modüle ederek folikülogenez, oosit olgunlaşması ve ovulasyonda etkili rol oynamaktadır. Ovaryumda melatonin spesifik reseptörüne bağlanarak doğrudan antioksidan aktivite göstermektedir (Takahashi ve Ogiwara 2021). İnfertil kadınlarla yapılan bir çalışmada melatonin tedavisinden sonra folikül içindeki melatonin konsantrasyonunun arttığı ve bu artışın da oksidatif stresi azalttığı belirtilmiştir (Tamura ve ark. 2008). Aynı araştırmada folikülde azalan oksidatif stresin de fertilizasyon ve gebelik

oranlarını artırdığı bildirilmiştir (Tamura ve ark. 2008). In vitro fertilizasyon sırasında hastalardan toplanan oositlerin foliküler sıvısında yapılan bir çalışmada DNA hasar belirteci olan 8-OHdG konsantrasyonu ile antioksidan enzim arasında korelasyon olduğu gözlenmiş, melatonin ile 8-OHdG arasında anlamlı bir negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Tamura ve ark. 2008). Melatonin alan hastalarda melatonin kullanmadıkları döneme kıyasla foliküler sıvıda bu hormonun anlamlı olarak arttığı ve 8-OHdG konsantrasyonunun da anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Tamura ve ark. 2008). Tanebe ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada farelerin garanüloza hücrelerine H₂O₂ uygulaması sonrası bir gruba melatonin (100ug/mL) uygulaması yaparken diğer gruba herhangi bir uygulama yapmamıştır. Melatonin uygulanmayan grupta DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon, lipid peroksidasyonu ve apoptotik hücre sayısında artış olduğu belirlenirken melatonin uygulanan grupta belirtilen parametrelerde anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir.

2.8. Gen Ekspresyonu

Gen ifadesi transkripsiyon, transkripsiyon faktörleri, epigenetik mekanizmalar ve kromatin topolojisi tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir (Gan 2010, Montgomery ve Dermitzakis 2011, Koch 2015). Gen ekspresyonundaki ilk adım DNA molekülünün transkripsiyon aşamasından geçerek mesajcı bir RNA üretilmesidir. Transkripsiyon sonrası mRNA'nın işlenmesiyle (splaysing, cap takılması ve poliadenilasyon) olgun bir mesajcı RNA (mRNA) oluşur. Ancak mRNA ekspresyonu transport, degradasyon, RNA bağlayıcı proteinler ve kodlanmayan RNA'lar tarafından sürekli düzenlenmektedir (Buccitelli ve Selbach 2020). Bunların dışında hücre içinde veya çevresel uyaranlarla transkribe olan mRNA'nın miktarı değişiklik göstermektedir.

Gen ifadesini belirlemek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (Tang ve ark. 2022). Gen ekspresyon analizlerinde yaygın olarak tercih edilen gerçek zamanlı Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)'dur. RT-qPCR, hedef doku veya hücrelerden izole edilen RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi ve gene spesifik primerler kullanarak ilgili cDNA'nın belirli segmentini amplifiye edilmesi aşamalarından oluşmaktadır. Hedef transkriptin belirli bir doku veya hücre tipindeki başlangıç konsantrasyonu reaksiyonun üstel fazı olarak hesaplanmaktadır (Wagner ve ark. 2013, Wagner 2013). RT-qPCR yönteminde amplifikasyon sırasında araya giren boya veya

hidroliz bazlı prob ile ilgili bölgenin kopya sayısı reaksiyon sırasında görüntülenir (Adams 2020). SYBR Green en yaygın kullanılan interlokasyon boyasıdır ve yeni sentezlenen DNA'nın hidrojen bağına bağlanarak floresans bir sinyal yayar. qPCR reaksiyonu sırasında ne kadar fazla DNA üretilirse o kadar fazla floresans sinyal tespit edilir. İkinci yöntem ise prob kullanımıdır. Probun yapısında DNA iplikçisine bağlanması gerçekleşmediği zaman sinyal yaymayı önleyen Förster Resonance Energy Transfer kısmı bulunmaktadır. Bu problemler, qPCR primerlerinin down-stream bölgelerine bağlanmak üzere tasarlanmış spesifik dizilerdir. Bu tür problemler hedefe özgü olduğundan interlokasyon boyalarına kıyasla yüksek özgüllüğe sahiptir. Interlokasyon boyaları hedef spesifik değildir. Bu nedenle tespit edilen sinyalin gerçekten hedef bölge olup olmadığının kontrolünü yapmak için erime eğrisi analizi yapılmaktadır. Ayrıca reaksiyonda kullanılan primerin hedef spesifik olmasıyla da elde edilen sonuç desteklenmektedir (Regier ve Frey 2010, Adams 2020).

RT-qPCR başlatma, üstsel ve plato aşamalarına sahip bir amplifikasyon eğrisinden oluşmaktadır. Bu eğri niceliğin temelini oluşturur. Amplifikasyon başladığında floresans sinyal miktarı düşüktür. Reaksiyon üstsel büyüme aşamasına doğru ilerledikçe floresans sinyali taban çizgisinden yüksek bir seviyeye ulaşır. Buna eşik seviyesi denir. RT-qPCR konulan numunenin bu eşik düzeyini geçtiği nokta ise Ct (threshold cycle) veya Cq (quantification cycle) değeri olarak kaydedildiğinden eşik düzeyi kantitasyon için oldukça önemlidir. Eşik seviyesi üstsel aşamaya göre belirlenir böylece plato fazı ortamdaki reaktif eksikliğinden etkilenmez. Gen ekspresyonunda miktar belirlemede ikinci önemli faktör tüm örneklerde konsantrasyonunu stabil olarak koruyan referans gen kullanılmasıdır. Referans gen olarak *GAPDH* ve *ACTB* gibi genler yaygın olarak kullanılmaktadır (Swillens ve ark. 2004, Dalkıran 2017, Adams 2020).

Yapılan bu çalışmada süperovulasyon ve melatonin uygulamaları ile ovaryum dokusunda mRNA düzeyinde aktivitesi araştırılan genlerle ilgili bilgi aşağıda verilmiştir.

2.8.1. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (NRF2)

NRF2, 1994 yılında Moi ve arkadaşları tarafından yapılan klonlama deneylerinde keşfedilmiştir (Moi ve ark. 1994). *NRF2*'nin keşfinden bu yana yapılan araştırmalar, bu transkripsiyon faktörünün oksidatif strese yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyici etkisi

olduğunu göstermektedir (Nguyen ve ark. 2009, Maher ve Yamamoto 2010). Yapılan *in vitro* analizde detoksifikasyon enzimi NAD(P)H dehidrogenazın (quinone 1) (NQO1) *antioxidant response element (ARE)* güdümlü olarak düzenlenebildiği belirlenerek, *NRF2*'nin antioksidan savunma sisteminin temelini oluşturduğu ortaya konmuştur (Venugopal ve Jaiswal 1996). Aynı çalışmada *NRF2*'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak bu genin promotör bölgesinde ARE içeren genlerin de ekspresyonunu indüklediği ve regüle ettiği belirtilmiştir. ARE dizileri, farklı detoksifikasyon enzimlerini kodlayan genlerin promotör bölgelerinde de bulunmaktadır. Bu diziler hem yapısal hem de biyolojik özellikleriyle stres koşullarına yanıt verebilmektedirler (Rushmore ve ark. 1991).

NRF2'nin rolünü araştıran çalışmalarda, bu genin silindiği nakavt farelerle yapılan *in vitro* deneylerde hem bazal seviyede hem de indükleyici bir ajan varlığında ARE'ye bağlı genlerin ekspresyon seviyesinin nakavt farelerde önemli miktarda azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar *NRF2*'nin ARE genlerinin indüklenabilir ifadesinden sorumlu olduğunu doğrulamıştır (Itoh ve ark. 1997, Chanas ve ark. 2002). Sonraki çalışmalarda *NRF2*'nin oksidatif stres durumunda savunma mekanizması için önemli olduğu ve *NRF2* yolağı ile spesifik hücre tiplerinde farklı şekilde düzenlenebileceğini göstermiştir. Bu durum *NRF2* aktivasyonunun sadece hücre içinde olduğunu öne süren ilk teorilerin tersidir. Çünkü oksidatif stres altında her hücrenin DNA'sında bulunan ARE genlerinin ifadesi *NRF2*'nin çekirdeğe geçişinin gerçekleşmesiyle tetiklenmektedir. Dolayısıyla ARE genlerinin ifadesinin kontrolü *NRF2* tarafından yapılmaktadır (Lee ve ark. 2010). Bu durum birçok hücre tipinde belirgin olsa da nöronlar gibi bazı hücrelerde *NRF2* düzenlemesini destekleyen çok az veri bulunmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarda *NRF2*'nin ve bu transkripsiyon faktörünün kontrolü altındaki diğer ARE güdümlü genlerin *NRF2* tarafından nasıl kontrol edildiği moleküler düzeyde tanımlanmıştır (Brennan 2014).

NRF2, SOD, CAT, tioredoksin (Trx), peroksiredoksin (Prx), redüktaz ve peroksidaz gibi birçok antioksidan enzimin ekspresyonunu indükleyen temel bir lösin fermuar transkripsiyon faktörüdür. Vücutta meydana gelen oksidatif strese karşı savunma sağlamaktadır. Normal şartlarda sitoplazmada *NRF2*, KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin kompleksini oluşturan, Cullin 3 (Cul3), RING kutusu protein 1 (RBX1) ve E3-ubiquitin ligaza bağlanan Kelch Like ECH İlişkili Protein 1 (KEAP1) proteiniyle kompleks halde bulunmaktadır (Tossetta ve Marzioni 2022). *NRF2*'nin aktive olabilmesi için KEAP1'in proteozomlarca hedeflenmesi gerekmektedir (Tossetta ve Marzioni 2022). Oksidatif

uyaranlar altında ROT'lar, sitoplazmada *NRF2*'yi inhibe eden KEAP1'deki sistein kalıntılarına bağlanır. Bu bağlanma sonucunda KEAP1'de konformasyonel değişiklik meydana gelir ve KEAP1'in *NRF2*'yi inhibe etme özelliği ortadan kalkar. Serbest kalan *NRF2* aktif forma geçerek nükleusa girer ve transkripsiyon faktörü olarak *ARE* genlerin ekspresyonunu indükler (Baird ve Yamamoto 2020).

NRF2 proteini 605 amino asit içermektedir. *NRF2*'nin biyolojik aktivitelere katkıda bulunduğu bilinmesinin yanında bu proteinin bilinen yedi fonksiyonel alanı vardır (Itoh ve ark. 1999). DNA bağlama alanı olarak da bilinen ilk tanımlanmış alan Neh1, NF-E2 transkripsiyon faktörleri ailesini karakterize eden CNC tipi bZIP bölgesini içerir. Bir bZIP alanının varlığı, DNA bağlayıcı proteinler arasında yaygındır. *NRF2* gibi transkripsiyonel düzenleyicilerin, transkripsiyonu düzenlemek için DNA bağlanma bölgelerinin (lösin fermuarı) dimerizasyonunun yanı sıra diziye özgü DNA bağlanmasına izin vermektedir. Bu bölge, *NRF2* aracılı gen düzenlenmesinde tanımlanan Maf transkripsiyon proteinleri içindeki Maf tanıma elemanları (MARE) ile heterodimerize olabileceği yerdir. *NRF2*'nin CNC tipi bir bZIP transkripsiyon faktörü olarak karakterizasyonu solucanlar, böcekler, balıklar, kuşlar ve memeliler dahil olmak üzere birçok türde korunan 43 amino asitlik bir CNC alanının varlığıyla tanımlanır (Mohler ve ark.1991).

Neh2 alanı, bu proteinin N-terminaline doğru konumlanmış bir negatif düzenleyici alandır. Bu alan *NRF2*'ye spesifik olup proteini inhibe eden KEAP1'e bağlanmaktadır. Neh6 alanı, *NRF2*'nin baskılanmasındaki rolü önemlidir çünkü KEAP1'den bağımsız *NRF2* bozulmasına aracılık eden ikinci bir negatif düzenleyici alanı temsil etmektedir (Chowdhry ve ark. 2012, Brennan 2014).

Neh3, Neh4 ve Neh5 alanları, bu bölgelerin transkripsiyon bileşenleri ile etkileşime girme kabiliyeti nedeniyle *NRF2*'nin transkripsiyonel düzenlemeyi geliştiren işlem alanları olarak kabul edilmektedir. *NRF2*'nin karboksil terminalinde bulunan Neh3 alanı, *NRF2*'nin transkripsiyonel aktivasyonu için gereklidir. *NRF2*'ye bağımlı gen regülasyonunu indüklemek için transkripsiyonel bir ko-aktivatör olarak işlev görebilen CHD6 (bir kromo-ATPaz/helikaz DNA bağlayıcı protein ailesi üyesi) ile etkileşime girmektedir (Nioi ve ark. 2005).

İnflamatuar, oksidatif veya elektrofilik strese maruz kalındığında, hücrel redoks dengesinin korunması için birincil mekanizma *NRF2* yolağıdır (Nguyen ve ark. 2009).

NRF2, hücre stresörlerinin nötralizasyonu ve uzaklaştırılması ile ilgili hücresel süreçlerde rol oynayan genlerin ekspresyonunu upregüle etmek için gen transkripsiyonunu başlatır (Itoh ve ark. 1997, Miao ve ark. 2005). Yapılan çalışmalarda melatoninin *NRF2* yolağıyla oksidatif stresi önlediği ve *NRF2 /ARE* sinyal yolağının düzenlenmesinde aktif rol aldığı gösterilmiştir (Tripathi ve Jena 2010, Chen ve ark. 2017). Yapılan bu çalışmada süperovulasyonun ve melatonin uygulamasının ovaryumda hücre savunma mekanizmasının birincil geni olan *NRF2*'nin gen ekspresyon düzeylerine olabilecek etkileri incelenmiştir.

2.8.2. Oxidative stress-induced growth inhibitor 1 (OSGIN1)

Bone marrow stromal cell (BMSC)-derived growth inhibitor 1 (BDG1), *ovarium*, *kidney* ve *liver protein 38 (OKL38)* refere eden *OSGIN1* insan ovaryum cDNA kütüphanesinde gebe cDNA'sı olarak tanımlanmıştır (Huynh ve ark. 2001, Sukkar ve Harris 2017).

OSGIN1 ve izoformlarının hücre tipleri arasında diferansiyel olarak düzenlenip düzenlenmediği veya transkripsiyon faktörlerinin *OSGIN1* izoformlarını farklı şekilde düzenleyip düzenlemediği bilinmemektedir (Brennan ve ark. 2017). *OSGIN1* işleviyle ilgili çoğu çalışma 52 kDa izoformunun P53 kontrolü altında güçlü bir apoptotik indükleyici olarak tanımlamasına rağmen (Ong ve ark. 2004, Wang ve ark. 2005), *OSGIN1*-61 kDa izoformunun bu genin diğer izoformundan daha güçlü şekilde apoptozu indüklediği belirtilmektedir (Brennan ve ark. 2017).

OSGIN1, oksidatif stres yanıtı ve tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmaktadır (Tsai ve ark. 2017). *OSGIN1*, tümör baskılayıcı p53'ün transkripsiyonel bir hedefidir ve mitokondriyal fonksiyonu düzenlemek için doğrudan p53 ile etkileşime girer (Hu ve ark. 2012). Bununla birlikte *OSGIN1* antioksidan ve sitoprotektif hücresel yanıtları düzenleyen *NRF2*'nin transkripsiyonel hedefi olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (Brennan ve ark. 2017, Tonelli ve ark. 2018). Yapılan bir çalışma *OSGIN1*'i bir *NRF2* transkripsiyonel hedefi olarak tanımlasa da (Li ve ark. 2007), *OSGIN1* araştırmalarının çoğu bu geni tümör baskılayıcı protein 53 (P53)'ün transkripsiyonel kontrolü altında hücre büyümesine, farklılaşmasına ve ölümüne aracılık etmede görevli olarak tanımlamaktadır (Hu ve ark. 2012, Yan ve ark. 2014). *OSGIN1* geni dokuya bağlı olarak *NRF2*'nin hedef genleri arasına da girebilmektedir. Bu gen hücrelerde oksidatif stres miktarının artması durumunda

mitokondriden sitokrom c salınımını kolaylaştırmak için p53 ile etkileşime girmektedir (Khoi ve ark. 2022). Dolayısıyla oksidatif stres durumunda *OSGIN1* geninin ekspresyonu artarak apoptozu tetiklese de ovaryum dokusunda bu genin ekspresyon ve işlevi hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak oksidatif stres ve apoptozda görev alan *OSGIN1* geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.

2.8.3. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15)

BMP15, ilk olarak 1998 yılında fare oositlerinde, transforming growth factor- β (TGF- β) süperfamilyasının yeni üyesi olarak oosite özgü faktör şeklinde tanımlanmıştır (Dube ve ark. 1998). TGF- β süperfamilyasına mensup genler, transmembran serin/treonin kinaz reseptörlerini aktive ederek gelişimin birçok yönünü düzenlemektedirler (Di Pasquale ve ark. 2004). Bu ailenin üyesi olan Bone morphogenetic protein (BMP) ve Growth differentiation factor (GDF) parakrin ve otokrin mekanizmalar tarafından folikülogenezin düzenlenmesinde rol almaktadırlar (Sanfins ve ark. 2018). *BMP15* geni spesifik olarak oositlerde eksprese edilmekte olup üreme sistemi için oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Otsuka 2018).

BMP15 geni primordial foliküllerin oositlerinde çok düşük veya sıfır ekspresyona sahip olmasına rağmen gelişen foliküllerin tüm aşamalarında oositlerde ekspresyon seviyesi oldukça yüksektir (Belli ve Shimasaki 2018). Ovaryum folikülü; dış tekal hücre tabakası, iç granüloza hücre tabakası ve merkezi oosit olmak üzere üç hücre tipi içermektedir (Pangas ve Matzuk 2004). Memeliler pubertase ulaştığında, folikül gelişimi ilkel aşamadan birincil büyüme aşamasına doğru ilerlemektedir. Bu ilk adımda, granüloza hücreleri büyüyen oosit etrafında çoğalmaktadır. Büyüyen oositler, GDF/BMP benzeri proteinleri (GDF9, BMP15 ve BMP6) primer folikülden sonraki tüm foliküler aşamada eksprese etmektedir (Dube ve ark. 1998, Elvin ve ark. 2000). *BMP15*, granüloza hücrelerinin büyümesini uyararak folikülogenezin birincil aşamasından FSH bağımlı aşamaya ilerlemesini desteklemektedir (Chang ve ark. 2002, Shimasaki ve ark. 2004, Bouali ve ark. 2016). Folikülogenezin ilerlemesinde büyük ölçüde rol oynayan *BMP15*, granüloza hücrelerin proliferasyonunun güçlü bir uyarıcısıdır (Kehinde ve ark. 2016). Bu genin ekspresyonu, ovaryum fonksiyonu,

gonadotropinler, FSH, LH, inhibinler, aktivinler ve Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gibi lokal ovaryum faktörlerinin birleşik bir uyarısıyla düzenlenmektedir (Kumar ve ark. 2017).

BMP15, ovaryum regülasyonunda ve folikülogenezde merkezi rol oynamaktadır (Abir ve ark. 2014). Oosite spesifik olan *BMP15* geni folikülogenezin erken tespitinde önemli rol oynamaktadır (Bouali ve ark. 2016). Birçok memeli türünde de *BMP15* geni üreme için aday gen olarak kullanılmaktadır (Yao ve ark. 2022). Memelilerde *BMP15* geni, granüloza hücre proliferasyonu, folikül büyümesi ve gelişmesi, ratlarda foliküler granüloza hücrelerin FSH bağımlı düzenlenmesi, apoptozunu önlemesi ve oosit gelişimini desteklemede görev almaktadır (Liu ve ark. 2021). Bu nedenle *BMP15* geninde meydana gelen bir mutasyon granüloza hücre büyümesinin yavaşlaması, folikülde üretilen protein sekresyonunun azalması, baskın bir heterozigotluk ve infertilite ile sonuçlanabilmektedir. Bu gende meydana gelen bir veya daha fazla mutasyon infertilite ile ilişkilendirilmektedir (Otsuka ve ark. 2011, Laissue 2018, Liu ve ark. 2021, Otsuka 2018). Yapılan bu çalışmada süperovulasyonun ovaryumda ve oosite meydana gelebilecek olumsuz etkilerini önlemek amacıyla farklı dozlarda eksojen olarak verilen melatoninin ovaryum ve oosit sağlığına etkilerini belirlemek için *BMP15* geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir.

2.8.4. Progesterone Receptor (PGR)

Progesteron ovaryumun büyümesi, gelişmesi ve işlevinin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Progesteron, pregnenolondan türetilen 21 karbonlu steroid bir hormondur. Bu hormon gebelikte, ovulasyonda ve meme bezi gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Kanabekova ve ark. 2022). Progesteronun çekirdeğe girişi progesteron-PGR kompleksinin oluşumuyla gerçekleşmektedir. Böylelikle de PGR hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemede görev almaktadır (Kanabekova ve ark. 2022). Ovaryumda reseptör aracılı yolla gen ekspresyonunu düzenleyen progesteron ovulasyon ve luteinizasyon için oldukça önemlidir (Gava ve ark. 2004). Progesteron reseptörü olmayan fareler ile yapılan bir çalışmada, hayvanlara uygulanan hormon uygulamasına yanıt olarak bile ovulasyonun ve oosit gelişiminin gerçekleşmemesi bunu açıkça göstermiştir (Lydon ve ark. 1995).

Granüloza hücrelerde *PGR* ekspresyonu LH dalgalanması, protein kinaz A aktivasyonu ve bu genin promotöründe bulunan Sp1/Sp3 transkripsiyon faktörlerinin modifikasyonu ile indüklendiği bildirilmiştir (Robker ve ark. 2009). G-proteinine bağlı LH-reseptörünün (LH-R) LH artışına yanıt olarak mural granüloza hücrelerinde aktivasyonu, adenilat siklazı uyarır. Bu durumda hücre içi cAMP'yi artırır, böylece protein kinaz A aktive olarak *PGR* geninin ekspresyonunu indükler (Park ve Mayo 1991). LH artışına bağlı olarak bu genin ekspresyon seviyesinin artması luteinizasyon sırasında folikül içinde ROT ve proinflamatuar sitokinlerin azalmasına yardımcı olmaktadır. Çünkü ovaryumda *PGR* geninin ekspresyon seviyesinin artması NF-KB'yi inhibe eder. NF-KB'nin inhibe olması folikülde proinflamatuar gen ifadesinin ve ROT miktarının azalmasında oldukça önemlidir (Park ve ark. 2020). Ek olarak bu genin ekspresyonunun artması luteinizasyonda etkili rol alan LH sekresyonunu inhibe etmektedir (Park ve Mayo 1991).

PGR, özellikle preovülatör folikülden başarılı oosit salınımı için gerekli olan genlerin, transkripsiyonun da önemli bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. *PGR* geninde meydana gelen bir mutasyon infertilite ile ilişkilendirilmektedir. HPO ekseninin tüm aşamalarında ve üremenin düzenlenmesinde kritik roller oynayan nükleer reseptör transkripsiyon faktörü *PGR*'yi kodlamaktadır (Park ve ark. 2020). Ovaryumda *PGR*, spesifik olarak preovülatör foliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese edilmektedir. Ratlarda, LH artışına, hCG enjeksiyonuna veya oosit gelişimine yanıt olarak hızlı ancak geçici olarak indüklenmektedir. *PGR*'nin mRNA ve proteini hCG'den 4 saat sonra tespit edilebilmektedir. Bu genin ifadesi hCG enjeksiyonundan 8 saat sonra zirve yapar, ancak hCG uygulamasından 12 saat sonra saptanamamaktadır (Ismail ve ark. 2002, Park ve ark. 1991, Robker ve ark. 2000, Teilmann ve ark. 2006). Primatlarda, *PGR* proteini primordial ve primer foliküllerdeki granüloza hücrelerine lokalize olurken, en yüksek seviyeler LH dalgalanmasına yanıt veren foliküllerin luteinize edici granüloza hücrelerinde ve foliküllerin teka hücrelerinde tespit edilmiştir (Akison ve Robker 2014). LH ve *PGR* geninin aktivasyonundan sorumlu kinazların silindiği fare granüloza hücrelerine hCG uygulamasıyla da *PGR* geninin aktive olmadığı bildirilmiştir (Fan ve ark. 2009). Hem insanlarda hem de ratlarda yapılan progesteron reseptör antagonisti çalışmaları ve nakavt fare çalışmaları, *PGR*'nin oosit salınımını ve ovulasyonu kontrol etmesi nedeniyle dişi ovaryumunda kritik rolü olduğunu göstermiştir (Robker ve ark. 2009, Akison ve Robker 2012).

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak inflamasyon, ovulasyon ve folikülogenezde merkezi bir rol oynayan *PGR* geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.

2.8.5. B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2)

Apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz farklı genetik ve epigenetik yollarla programlanmış bir biyolojik aktivitedir (Kerr ve ark. 1972, Chung 2018). Moleküler açıdan apoptoz; ekstrinsik, intrinsik ve endoplazmik retikulum (ER) stres kaynaklı olmak üzere 3 şekilde gerçekleşmektedir (Green ve Llambi 2015). Granzim B yolağı gibi başka apoptotik yollar da bulunmuştur (Martinvalet 2019). Ancak apoptoz Bcl-2 ailesi proteinlerinin sinyalizasyonu sonucu gerçekleşmektedir (Solano-Gálvez 2018). Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini ise anti-apoptik ile proapoptotik üyelerin arasındaki denge belirlemektedir (Shamas-Din 2013). Bu etkileşim memelilerden sürüngenlere kadar neredeyse tüm canlılarda korunmuştur (Kvansakul ve Hinds 2015, Caria ve ark. 2017). Apoptotik sinyal yollarının spesifik düzenleyici mekanizmaları bireyden bireye farklılık göstermektedir. Anti-apoptotik genlerin ve proteinlerin kaybı pro-apoptotik genlerin aktivitelerinin artmasına neden olmaktadır. Bu dengenin korunması ve apoptoz düzenlenmesinde bu genin araştırılmasının temel nedeni apoptoz sürecinde oynadığı roldür (Banjara ve ark. 2020).

İntrinsik yolak, hücre içi ölüm uyaranlarına yanıt olarak Bcl-2 ailesinin ve bu aile üyelerinin membran etkileşimi ile düzenlenmektedir. Bcl-2 proteini gelişim, homeostaz, otofaji ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere fizyolojik birçok süreçte rol oynamaktadır (Banjara ve ark. 2020). Bcl-2 homoloji alanlarını içeren en az 16 üyesi tanımlanmış olup bu proteinler 3 ana gruba ayrılmıştır. Birinci grup proteinler (apoptotik promotörler olarak işlev gören BIM ve BID gibi) BH3 proteinleri olarak adlandırılan ve Bcl-2 homology (BH) alanı içeren proteinlerdir. BH3 içeren proteinler bu yolda görev alan diğer proteinlerden daha önce aktive olmaktadır. Bu nedenle bu proteinlere moleküler nöbetçiler denmektedir. BH3 alanının varlığı pro-apoptotik proteinlerin temel özelliği olup bu proteinlerin aktivitesi için gereklidir (Huang ve Strasser 2000, Kvansakul ve Hinds 2015). İkinci grup ise BAX ve BAK gibi 3 BH (BH1, BH2 ve BH3) alanı içeren proteinlerdir ki bunlar pro-apoptotik proteinlerden oluşmaktadır. Son grup ise 4 tane BH alanı içeren Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 gibi

anti-apoptotik proteinleri içermektedir. Bu proteinler pro-apoptotik proteinleri baskılayarak hücreyi apoptozdan koruyabilme özellikleri bulunmaktadır (Yuan ve ark. 2020). Bcl-XL ailesinin üyesi olan Bcl-2 anti-apoptotik bir proteindir (Belka ve Budach 2002).

B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2), hücre apoptozunu düzenleyen protein ailesinin bir üyesidir. Bcl-2 ailesi hem Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve HRK gibi pro-apoptotik proteinlerde hem de Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve MCL-1 gibi anti-apoptotik proteinlerinden oluşmaktadır (Sengupta ve ark. 2017). Pro-apoptotik Bcl-2 üyeleri apoptoz destekleyicisi olarak çalışırken anti-apoptotik üyeler sitokrom c'nin salımını engeller ve apoptozu önlemekle görevlidirler. Bcl-2'nin intrinsik yolda over-ekspresyonu ekstrinsik yolla gerçekleşecek olan kontrollü apoptozu baskılar (Leibowitz ve Yu 2010). Bcl-2 proteini mitokondri zarı üzerinde lokalize olmuştur ve mitokondri hücre zarının geçirgenliğinin kontrolünü yapmaktadır (Tsujimoto 2003). *Bcl-2* apoptotik hücre ölümünü, hücre içi oksidasyonları önleyen önemli anti-apoptotik bir gendir (Timucin ve Basaga 2015).

Apoptozun ovaryum hücrelerinde meydana geldiği ilk olarak 1885 yılında tavşanlarda yapılan çalışmayla belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile tavşan ovaryumunda doğum sonrası oosit dejenerasyonun ve sağlıklı olmayan oosit kaybının apoptoz ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Flemming 1885). Bu çalışmadan sonra ovaryumda germ hücrelerin tükenmesi, sağlıklı hücrelerin hayatta kalımı, sağlıklı olmayan oositlerin kaybı ve apoptoz mekanizması ile ilişkili yollar araştırma konusu olmuştur (Kim ve Tilly 2004). Araştırmacılar, doğumda neden bu kadar oosit kaybının olduğunu araştırırken komşu somatik hücrelerin gelişimi, yetersiz büyüme, hayatta kalma faktörlerinin eksikliği ve mayoz öncesi kontrol mekanizmalarından geçmediği gibi birçok fikir ortaya atmıştır (Flemming 1885). Daha sonra yapılan bir çalışmada fare oositlerinin gelişimi sırasında kistik yapının oluştuğu ve bu durumda apoptoz mekanizması ile düzenlendiği bildirilmiştir (Pepling ve Spradling 2001).

Oksidatif stres durumunda, ROT ve antioksidan enzimler ile inflamasyon ve apoptotik yollar arasında denge sağlanamamaktadır. Bu yollar, steroidogenez, folikülogenez, ovulasyon, lutealiz gibi normal ovaryum fonksiyonunu yerine getiren ovaryum fizyolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır. Yapılan çalışmalar oksidatif stresin kaspaz-3 ekspresyonunu ve Bax/Bcl-2 oranını arttırdığını, antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığını bu nedenle de granüloza hücrelerde apoptozu neden olduğunu belirtmişlerdir

(Sohel ve ark. 2019, Wang ve ark. 2019). ROT birikimi ve oksidatif stresin oluşması durumunda *Bcl-2*, ROT üretimini azaltarak hücre ölümünü engellemektedir (Cocchia ve ark. 2015). Apoptoz, dişi üreme sisteminde hücrelerin olgunlaşmasında ve işleyişinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu durumda, apoptoz intrinsik yolda mitokondriyal geçirgenlik durumunda *Bcl-2* ailesi genlerinin dengesinden etkilenmektedir. *Bcl-2* protein ailesi (özellikle *Bcl-2* ve *Bax*), ovaryum foliküllerinde ve granüloza hücrelerinin hayatta kalmasında oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Michurina ve ark. 2021). Yapılan bir araştırmada çeşitli uyaranlara ve strese karşı ovaryumda artan *Bcl-2* seviyesinin melatonin aracılığıyla azaldığı bildirilmiştir (Goktepe ve ark. 2023).

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak apoptozda merkezi bir rol oynayan *Bcl-2* geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.

2.8.6. Cyclooxygenase2 (COX-2)

Memelilerde ovaryumdan oosit salınması başarılı gebelik için oldukça önemlidir. Oosit salınımında meydana gelen bir bozukluk dişilerde infertiliteye sebep olmaktadır (Fang ve ark. 2014). Ovulasyonda ve oosit gelişiminde görev alan birçok genin ekspresyonu ile başarılı bir folikülogenez gerçekleşmektedir. Oosit ve çevresindeki kümülüs hücreleri, folikülün ana yapısal birimi olan kümülüs oosit kompleksini (COC) oluşturmaktadır. Oosit olgunlaşması ve kümülüs hücrelerin genişlemesi gibi süreçlerde biyokimyasal ve biyofiziksel değişiklikleri indükleyebilen LH dalgalanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Richards ve ark. 2002, Russell ve Robker 2007). LH ovulasyon öncesi folikülün fizyolojik ve biyolojik değişikliğe uğramasında etkili rol almaktadır. LH dalgalanması ovulasyonla ilgili genlerin ekspresyonunu uyararak bu gen ifadelerinin artışına neden olmaktadır. Bu genlerin ekspresyon seviyesindeki artış COC genişlemesine, mayozun başlamasına ve hormon sentezini uyararak ovulasyon sürecine katkıda bulunmaktadır (Poulsen ve ark. 2020).

Ovulasyonun düzenlenmesinde görevli olan birkaç endokrin faktör bulunmaktadır (Richards ve Ascoli 2018). Bu endokrin faktörler arasında prostaglandin E2 (PGE2) oosit olgunlaşması ve ovulasyona aracılık etmede önemli rol oynamaktadır. PGE2 üretimi cyclooxygenase (COX) enziminin kataliz etkisine dayanmaktadır (Wan ve ark. 2023).

Ovaryumda prostaglandinler esas olarak granüloza hücrelerden sentezlenirler (Fang ve ark. 2014).

COX yolağı, araşidonik asidin prostaglandinlere dönüşümünde oksidatif metabolizma yollarından birisidir (Hayes ve Rock 2002). COX, ovulasyonun temel düzenleyicisi olan prostaglandinlerin sentezinde hız sınırlayıcı enzimdir. COX-1 ve COX-2 olmak üzere 2 izoforma sahiptir (Li ve ark. 2023). COX-1 birçok hücrede eksprese olup homeostatik denge için gerekli olan bir enzim iken COX-2 inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar olmak üzere çeşitli faktörler tarafından indüklenmektedir (Quintana ve ark. 2008, Fang ve ark. 2014). Ayrıca COX-2, böbrek fonksiyonu ve ovulasyonun düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik süreçlerde de yer almaktadır (Hertrampf ve ark. 2005).

Siklooksijenaz 2, COX-2 geni tarafından transkribe edilir ve araşidonik asidin Prostaglandin (PG), Prostaglandin E2'nin (PGE-2) ve PGF-2 α 'ya dönüşümünden sorumludur (Nayki ve ark. 2018). PGE2'nin COX-2'ye bağımlı aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonunun indüklenmesi, lokal immünosupresyon, apoptoz inhibisyonu ve hücre mobilitesinin artması gibi moleküler olaylara neden olur. Estradiol (E2) ve progesteron, östrus döngüsü sırasında endometriyumda ve ovaryumda prostaglandin sentezini düzenlemektedir (Arosh ve ark. 2002, Hertrampf ve ark. 2005). Bu dokularda prostaglandin sentezinin modülasyonu, COX-2 ekspresyonundaki değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (Arosh ve ark. 2004). Ayrıca gonadotropinler COX-2 geninin ekspresyonunu düzenleyerek, PG'lerin granüloza hücrelerde mitozu dolaylı olarak kontrol edebilmesinde de rol oynarlar (De Los Reyes ve ark. 2021). Bu nedenle preovülatör foliküllerde COX-2 geni tarafından kodlanan siklooksijenaz 2 oosit gelişiminde oldukça önemlidir (Thill ve ark. 2009).

Memelilerde COX-2 geninde meydana gelen bir mutasyon veya bu gene bir müdahale infertiliteye neden olabilmektedir. COX-2 geninin ekspresyon seviyesinin azalması ovulasyon için gerekli COX ürünlerinin ve PG'lerin azalmasına yol açabilmektedir (Lister ve Van Der Kraak 2009, Li ve ark. 2023). COX-2^(-/-) farelerde yapılan çalışmalarda, dişilerden alınabilen oosit sayısının azaldığı ve alınan oositlerde fertilizasyonun gerçekleşmediği bildirilmiştir. Alınabilen oositlerde fertilizasyon sonrası gelişimin ve folikül büyümesinin anormal olduğu da belirtilmiştir (Lim ve ark. 1997). Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre COX-2'nin dişi doğurganlığında merkezi rol oynadığı belirlenmiştir (Lim ve ark. 1997, Hayes ve Rock 2002). Ovaryumda prostaglandin

düzeylerinin gonadotropin indüksiyonu için COX-2 gereklidir ancak COX-1 enzimi gerekli değildir. Yapılan bir çalışmada COX-2-nakavt dişi farelerin üreme fizyolojisinde sorunlar konusunda kusurlarının olduğunu ancak COX-1 delesyonunun olduğu farelerde normal üreme performansının olduğu bildirilmiştir (Langenbach ve ark. 1995, Lim ve ark. 1997). COX-2'den türetilen prostanooidler, ovulasyon sırasında kümülüs oofurumun stabilizasyonu için de gereklidir. COX-2 eksikliği olan hayvanlarda gonadotropinler, prostaglandin E2 veya *IL-1 β* ile ovulasyonun normal seyrine döndürülebileceği bilinmektedir (Lim ve ark. 1997, Hayes ve Rock 2002).

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak inflamasyon, luteinizasyon, ovulasyon ve folikülogenezde rol alan COX-2 geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.

2.8.7. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

TNF- α , inflamatuvar süreçteki etkisiyle tanınmış ilk sitokindir. Bu sitokin hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörleri olan TNF- α reseptör 1 (TNFR1) ve TNF- α reseptör 2 (TNFR2)'ye bağlanarak etki göstermektedir (Silva ve ark. 2020). TNF- α çok işlevli ve proinflamatuvar bir sitokindir. Aynı zamanda TNF- α glikozillenmemiş bir protein olup makrofajlar tarafından üretilmektedir (Yamamoto ve ark. 2015, Khajouei ve ark. 2021). TNF- α rat, insan ve inek gibi birçok memelide başta makrofajlar olmak üzere ovaryumda granüloza ve lutein hücrelerinde lokalize olduğu immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir (Sancho-Tello ve ark. 1992). Memeli ovaryumunda TNF- α , preovulatör hücreler tarafından sentezlenmektedir (Brännström ve ark. 1994). Bununla birlikte TNF- α ratların preovulatör foliküllerinden progesteron salgılanmasını uyarmaktadır (Roby ve Terranova 1988, Sancho-Tello ve Terranova 1991). Bu nedenle TNF- α , yalnızca pro-inflamatuvar yanıtların düzenlenmesini değil, aynı zamanda hücre farklılaşmasını, doku yenilenmesini ve yeniden yapılanmanın kontrolünü içeren birçok biyolojik eyleme aracılık etmektedir. Ovaryumda TNF- α , foliküler gelişimde, steroidogeneizde, ovulasyonda, luteolizde ve atrezide rol oynamaktadır (Guo ve ark. 2015, Khajouei ve ark. 2021). Ayrıca, TNF- α normal ovaryum fonksiyonunun düzenlenmesinde de görev almaktadır (Brännström ve ark. 1994). TNF- α oosit/folikül apoptozunu artırarak, foliküler büyüme (proliferasyon) ve atrezi (apoptoz) arasındaki dengeyi etkileyebilir. Bununla birlikte TNF- α granüloza hücreleri

tarafından gonadotropinle uyarılan östrojen ve progesteron üretimini inhibe edebilmektedir (Cui ve ark. 2011, Silva ve ark. 2020).

$TNF-\alpha$ ve $TNF-\alpha$ reseptörleri ovaryum foliküllerinde ve korpus luteumda bulunmaktadır (Spaczynski ve ark. 1999). Memelilerde ovulasyon sürecinde prostaglandin üretimi ve $TNF-\alpha$ merkezi rol almaktadır (Brännström ve ark. 1994). $TNF-\alpha$ lokal olarak granüloza hücreleri, makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanmaktadır (Spaczynski ve ark. 1999).

Ratlarda yapılan bir çalışmada hCG uygulamasıyla ovaryumda ve serumda $TNF-\alpha$ seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Rice ve ark. 1998). $TNF-\alpha$, ratlarda ovulasyon oranını arttırmaktadır (Murdoch ve ark. 1997). $TNF-\alpha$ prostaglandinler gibi preovulatuvar foliküllerde kollejenolitik aktiviteyi uyarmaktadır (Crespo ve ark. 2015). Ratlarda preovulatuvar foliküllerde prostaglandin sentezi $TNF-\alpha$ tarafından uyarılmaktadır (Brännström ve ark. 1993).

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak inflamasyon rol alan $TNF-\alpha$ geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.

2.8.8. Epiregulin (EREG)

Memelilerde LH ve FSH, normal üreme sisteminde anahtar rollere sahiptir (Richards 1980, Hirshfield 1991). Foliküler gelişim sırasında FSH, peptit hormonlara yanıt olarak ovaryuma spesifik genlerin aktivasyonunu uyarmaktadır. Bu genlerin aktivasyonu ovaryumda, granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını indüklemektedir (Sekiguchi ve ark. 2002). Farklılaşma sırasında FSH'nın gen ekspresyonunu düzenlediği bazı moleküler mekanizmalar tanımlanmıştır. FSH tarafından hızla indüklenen genler ve farklılaşmamış granüloza hücrelerinin indüksiyonuna aracılık etmek için kullanılan mekanizmayı aydınlatmak amacıyla klonlama çalışmaları yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda FSH ile hızla indüklenen granüloza hücrelerin farklılaşmasında görev alan genler arasında epidermal growth factor (EGF) ailesinin üyesi olan *EREG* geni tanımlanmıştır (Toyoda ve ark. 1995, Isobe ve ark. 1995).

Epiregulin, angiotensin II ile uyarılan ratların düz kas hücrelerinde majör bir mitojenik protein olarak izole edilmiştir. Daha sonra sığırlarda yapılan bir çalışmada oositin

gelişimini desteklediği belirlendiği için ovaryum geni olarak adlandırılmıştır. EGF büyüme faktörleri gibi epiregulin proliferatif etkilerini EGF reseptörlerinin otofosforilasyonu yoluyla yapmaktadır. EGF ve TNF α dahil olmak üzere birçok EGF büyüme faktörleri FSH'nın ovaryum granüloza hücrelerinin üzerindeki etkilere aracılık ettiğinden dolayı bu genleri ovaryum için aday gen olarak öneren çalışmalar bulunmaktadır (Sekiguchi ve ark. 2004, Yoon ve ark. 2015). Ovaryum için aday gösterilen diğer genlerin indüksiyonu FSH tarafından yapılmadığı için epiregulinin folikül gelişiminde aday gen olması ihtimalini güçlendirmektedir (Sekiguchi ve ark. 2002).

Epiregulin hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda birçok fonksiyona sahiptir. *EREG*, inflamasyon, yara iyileşmesi, oosit maturasyonu, doku onarımı, anjiogenez, hücre çoğalması gibi birçok biyolojik olayda işlev görmektedir (Riese ve Cullum 2014). *Epiregulin* ekspresyonu, ovaryumda folikül oluşumu ve oosit gelişimi sırasında ovaryum granüloza hücrelerinde saptanmaktadır (Robert ve ark. 2001). FSH, epiregulin geninin ekspresyonunu indüklemek için Sp1 ve Sp3 transkripsiyon faktörlerine bağlanarak veya bu genin promotöründeki iki CT kutusuna bağlanarak işlev gösterir (Riese ve Cullum 2014). LH ayrıca kısmen artmış hücre içi cAMP'yi uyararak ovulator folikülde *EREG* geninin ekspresyonunu indüklemektedir (Sekiguchi ve ark. 2002). Yapılan bir çalışmada hCG uygulaması ile bu genin ekspresyonunun indüklendiği bildirilmiştir (Espey ve Richards 2002). Yapılan bir başka çalışmada ratlara uygulanan hCG enjeksiyonundan 3 saat sonra bu genin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Park ve ark. 2004).

Memelilerde hipofiz bezinden salgılanan hormonlar normal üreme gelişimi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde merkezi rol oynamaktadır (Leung ve Steele 1992, Richards 1994). Çok sayıda büyüme faktörü, gonadotropine bağımlı veya bağımsız şekilde parakrin ve otokrin faktörler olarak görev yapmaktadır. Epidermal büyüme faktörü ailesinin üyesi olan epiregulin bu süreçte rol oynamaktadır. *EREG*, ovaryumun granüloza hücrelerinde mitojenler ve FSH ile uyarılan steroid sekresyonun modülatörü olarak görev almaktadır (Sekiguchi ve ark. 2004). EGF'ler LH dalgalanmasından sonra meydana gelen kümülüs hücrelerinin genişlemesini ve oosit olgunlaşmasını indüklemektedir (Downs 1989, Das ve ark. 1992).

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak folikülogenezde ve oosit sağlığında bir rol alan *EREG* geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.

2.8.9. Interleukin-1 Beta (IL-1 β)

Memelilerde oositin fizyolojik aktivitesi üreme performansını belirlemektedir. Ovaryumun çekirdek yapısını milyonlarca folikül oluşturmaktadır. Folikülogenez sürecinin düzenlenmesinde gonadotropinlerin yanı sıra birçok büyüme faktörü görev almaktadır (Richards ve Ascoli 2018). Otokrin/parakrin faktörlerin ekspresyon seviyesindeki anormallikler foliküler mikro çevrenin dengesini bozarak folikül gelişiminin durmasına neden olmaktadır. Bu nedenle folikül gelişiminde görev alan genlerin ekspresyon seviyesi memelilerde ovulasyon için önemli bir yer tutmaktadır. İnterlökin ailesinin bir üyesi olan *Interleukin-1 (IL-1)*, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve inflamasyonda görev aldığı bilinen bir büyüme faktörüdür (Moorlag ve ark. 2018). Bugüne kadar ökaryot hücrelerde tanımlanmış iki IL-1 sitokini IL-1 α ve IL-1 β 'dir. Bu sitokinler proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu indüklemeye görev almaktadır (Boraschi ve ark. 2018). IL-1 β , inflamasyon, lenfosit aktivasyonu ve akut faz protein sentezinin indüklenmesi gibi fizyolojik tepkilere aracılık etmekten sorumlu ana proinflamatuvar sitokindir (Cahill ve Rogers 2008). Bu sitokin, kaspaz 1 tarafından proteolitik olarak işlenmesiyle aktive olur ve makrofajlar tarafından üretilir. IL-1 β sitokini, inflamatuvar yanıtın önemli bir aracısıdır ve hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz dahil olmak üzere birçok hücresel faaliyette görev alır (Chaudhry ve ark. 2013, Vijayaraj ve ark. 2021). *IL-1 β* üreme fizyolojisinde önemli rol oynar ve kritik bir düzenleyici faktör olarak ovulasyon ve embriyo implantasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Adamczak ve ark. 2021, Banerjee ve ark. 2023).

Ovaryumda *IL-1*, foliküler hücre katmanlarında eksprese olmaktadır. Fakat bu genin ekspresyon seviyesi östrus fazına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Gérard ve ark. 2004). Fare ovaryumunda oositte ve büyüyen foliküldeki teka hücrelerinde *IL-1 α* ve *IL-1 β* genlerinin ekspresyonunun başladığı tespit edilmiştir. Ovulasyondan önce kümülüs hücrelerinde *IL-1 α* ve *IL-1 β* transkript seviyeleri LH artışından sonra belirgin bir şekilde artmaktadır (Simón ve ark. 1994). Bu duruma benzer olarak yakın zamanda bir proovulator granüloza hücrelerinin transkriptomik değişiklikleri üzerine yapılan çalışmada LH dalgalanmasından sonra *IL-1* geninin ekspresyon seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Poulsen ve ark. 2020). Daha önce yapılan bir başka çalışmada *IL-1 β* geninin granüloza-lutein hücrelerinde progesteron üretimini uyardığı bildirilmiştir (Di ve ark. 2018). Dişilerde *IL-1* ekspresyon seviyesi oosit yaşlanması ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da

bulunmaktadır (Hurwitz ve ark. 2010, Wan ve ark. 2023). Memelilerin üreme sisteminde *IL-1* geninin ekspresyon seviyesindeki anormal değişim birçok ovaryum hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Popovic ve ark. 2019, Wan ve ark. 2023). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise foliküler sıvı dengesinin bozulması ile başta *IL-1 β* geni olmak üzere bağışıklık sisteminde görev alan genlerin ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Liu ve ark. 2021).

Bu çalışmada süperovulasyon ve melatonine bağlı olarak folikülogenezde ve inflamasyonda bir rol alan *IL-1 β* geninin ekspresyon düzeyi ovaryum dokusunda araştırılmıştır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deneme Grupları

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HMKÜ- HADYEK) tarafından 02.09.2022 tarihli toplantıda 2022/05-07 karar numarasıyla onaylanmıştır (Ek-1). Çalışma materyali olan ratların bakımı ve deneysel uygulamalar Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Çalışmada 10-12 haftalık yaşta 28 dişi wistar albino rat kullanılmıştır. Her grupta 7 hayvan olacak şekilde Kontrol (K), Süperovulasyon (So), Süperovulasyon+5mg/kg Melatonin (SoM5), Süperovulasyon+20 mg/kg Melatonin (SoM20) gruplarına ayrılmıştır. Ratların ortama adaptasyonu için bir hafta herhangi bir uygulama yapılmamış ve ünitenin rutin şartlarında barındırılmıştır. Deney boyunca ratlar 21 ± 2 °C sıcaklık ve %55 nem oranının olduğu odalarda bulundurulmuştur. Ratlar ayrı ayrı barındırılmış olup 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta (06:00-18:00 aydınlık, 18:00-06:00 karanlık) tutulmuştur. Tüm deney boyunca ratlar polikarbonat malzemeden yapılan şeffaf kafeslerde barındırılmıştır. Çalışma süresi boyunca yem ve su ad libitum olarak tüketime sunulmuştur.

3.2. Vajinal Sitoloji

Çalışmada kontrol grubundaki ratların siklus dönemlerinin tespiti için vajinal sitolojik muayene yapılmıştır. Bu amaçla serum fizyolojik ile ıslatılan pamuk uçlu swap kullanılmıştır. Swap ratların vulvalarından içeriye yaklaşık 1 cm ilerletilerek 2 tur döndürüp vajinal tabandan örnekleme yapılmıştır. Örneklemeden sonra swaplar lamlara sürülmüş ve lamlar sürüntü kuruyana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında lam üzerine May- Grünwald (1014241022, Sigma-Aldrich, USA) boyası dökülerek 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra boyanın uzaklaştırılması amacıyla lamlar 90 derecelik açıyla çevrilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra lamlar Giemsa (1 damla Giemsa 10 ml dH₂O) (1092041000, Sigma-Aldrich, USA) boyası ile kaplanarak 25 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 90 derecelik açıyla çevrilerek distile su ile yavaşça yıkanmıştır.

Lamlar birkaç dakika oda sıcaklığında kurutulduktan sonra östrus evrelerinin belirlenmesi amacıyla mikroskop altında hücre tipleri incelenmiştir (Doğruer 2003).

3.3. Melatonin Uygulaması

Ticari olarak alınan melatonin (M25-1G, Sigma-Aldrich, ABD) %99'luk etanol (K53082583, Merck, Almanya) ile çözündürülmüştür (Sönmez 2017, Bayraktar 2021). Ardından 25 ml serum fizyolojik ile dilüe edilerek 25 mg/ml olacak şekilde ana stok hazırlanmıştır. 40 ml süspansiyon olarak hazırlanan ana stoktan 5 mg/kg ve 20 mg/kg dozlar alt stok olarak hazırlanmıştır (Sönmez 2017, Bayraktar 2021). Bu kapsamda 5 mg/kg enjeksiyon için ana stoktan 5 ml alınarak 50 ml'lik seril falkona aktarılmış ve toplam hacim 50 ml olacak şekilde üzerine serum fizyolojik eklenmiştir. 20 mg/kg enjeksiyon grubu için ise ana stoktan 20 ml alınarak yeni 50'lik steril falkona aktarılmıştır ve total hacim 50 ml olacak şekilde üzeri serum fizyolojik ile tamamlanmıştır. Her iki alt stoktan da 0,5 ml kullanılarak melatonin gruplarına süperovulasyondan bir hafta önce başlanmak üzere deney sonuna kadar saat 17:00'da intraperitoneal enjeksiyon yapılmıştır.

3.4. Süperovulasyon Uygulaması

Süperovulasyon gruplarına (So, SoM5 ve SoM20) 40 µg GnRH (Receptal, MSD Animal Health, Almanya) uygulanmış 48 saat sonra ise 300 IU/kg dozda PMSG (HIPRA, İspanya) enjeksiyonu yapılmıştır. PMSG enjeksiyonunun ardından 48 saat sonra 300 IU/kg dozda hCG (Merck, MSD Animal Health, Almanya) enjekte edilmiştir (Agca ve ark. 2013). Son hCG enjeksiyonundan 6 saat sonra ratlar ketamin (0,4 ml/250 g) ve ksilazin (0,03 ml/250 g) uygulanarak anestezide alınmış ve kalpten kan alma yöntemiyle ötenazi edilerek kan ve ovaryum dokuları toplanmıştır. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal uygulanmıştır.

3.5. Örneklerin Toplanması

Ratlardan alınan kan örnekleri 3000xg'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen serumlar yeni steril ependorfa aktarılmış ve analizler yapılincaya kadar -80 °C muhafaza edilmiştir.

Ovaryum dokuları ötenaziyi takiben hızlı bir şekilde alınarak nükleaz içermeyen 2 ml hacimli ependorflara koyulmuştur. Daha sonra örnekler sıvı azotta dondurulmuştur. Dondurulan örnekler moleküler analizler yapılncaya kadar -80 °C muhafaza edilmiştir.

3.6. Total RNA İzolasyonu

Ovaryum örneklerinden yapılan total RNA izolasyonu modifiye edilmiş Trizol metoduna göre yapılmıştır (Rio ve ark. 2010). Bu amaçla yaklaşık 50 mg doku için 1 ml TRIzol™ Reagent (15596018, Thermo Fisher, ABD) kullanılmıştır. Trizolün yüzey alanını artırmak için doku homojenizatörü (Daihan Scientific, Kore) ile homojenizasyon yapılmıştır. Homojenizasyon işleminden sonra örnekler 1,5 ml'lik yeni steril nükleaz içermeyen ependorflara alınmıştır. Üzerine başlangıçta kullanılan Trizol miktarının prensip olarak dörtte biri oranında kloroform (K37655831, Merck, Almanya) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen örnekler 12000xg'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj (Allegra X- 30R, Beckman Coulter, ABD) edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatanttan 400 µl yeni steril nükleaz içermeyen 1,5 ml'lik ependorflara alınmıştır. Üzerine başlangıçta kullanılan Trizol miktarının yarısı kadar 2-propanol (K5969395, Merck, Almanya) eklenerek 12000xg'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra pellet kontrolü yapılarak süpernatant tek hamlede dökülmüştür. Bu işlem basamağından sonra ependorflara 1 ml %75 etil alkol (K53082583, Merck, Almanya) eklenmiştir. 7500xg'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Daha sonra örnekler üzerine 1 ml %99 etanol eklenerek 7500xg'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant tek hamlede dökülerek oda sıcaklığında 10-15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kurutma aşamasından sonra elde edilen total RNA'lar pellet büyüklüklerine göre 30-100 µl nükleaz içermeyen su ile sulandırılmıştır. RNA kalite kontrolü nükleik asitölçer (Merinton, SMA 1000 UV spectrophotometer, Çin) ve %1'lik agaroz jel elektroforezinde (Bio-Rad, PowerPac™ Basic, Singapur) yapılmıştır (100V ve 25 dakika). RNA'ların bütünlük kontrolü Transillüminatör (WUVL50, Daihan Scientific Co. Ltd., Kore) ile yapılmıştır. Uygun olmayan örneklerden RNA izolasyonu tekrarlanmıştır.

3.7. cDNA Sentezi

Örnekler kontrol edildikten sonra olabilecek DNA kontaminasyonunun eliminasyonu için DNA digestion işlemi ticari kit (EN0521, DNase I, RNase-free, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Kit kapsamında ilk olarak izole edilen total RNA'lar 1000 ng konsantrasyona fikse edilmiştir. Fiksasyon sonucunda miktarı belirlenen RNA'lar yeni striplere alınmıştır. Üzerine DNase I enzimi ve kit içeriğindeki buffer eklenmiştir. Ardından striplere kısa bir santrifüj-vorteks-santrifüj işlemi uygulanmıştır. Daha sonra örnekler 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir (T100, Bio-Rad, Singapur).

İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için örnekler 1 µl hacimde EDTA eklenmiştir. Daha sonra örnekler yeniden kısa bir santrifüj-vorteks-santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Ardından örnekler 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir (T100, Bio-Rad, Singapur). Bu işlemlerden sonra örneklerden High Capacity cDNA sentez kiti (4368814, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile cDNA dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Kit protokolüne göre örnekler thermal cycler'da (T100, Bio-Rad, Singapur) 42 °C'de 60 dakika, 25 °C'de 5 dakika ve 70 °C'de 5 dakika olacak şekilde reaksiyona maruz kalmıştır. Reaksiyon sonrası cDNA örnekleri nükleaz içermeyen su ile 200 µl'ye tamamlanarak gen ekspresyon analizleri yapılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Tüm bu işlemler sırasında nükleaz içermeyen steril koşullar altında çalışılmıştır.

3.8. Real-Time PCR Uygulaması

Kalıp olarak kullanılan cDNA örneklerinden Real-time PCR (5 PLEX HRM, Rotor-Gene Q, Qiagen, Almanya)'da *OSGIN1*, *BMP15*, *EREG*, *PGR*, *COX-2*, *NRF-2*, *IL-1β*, *TNF-α* ve *Bcl-2* genlerinin analizleri yapılmıştır. Amplifikasyon için SYBR Green boya içeren ticari kit (Power SYBR Green PCR Master Mix, 4368577, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. İnternal kontrol olarak ise *ACTB* (*Actin Beta*) (Rakha ve ark. 2024) housekeeping geni kullanılmıştır. Genlerin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri literatür ve Primer-BLAST (NCBI) aracılığıyla oluşturulmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Amplifikasyonu yapılan genlerin Forward ve Reverse dizileri

Gen	Primer Dizileri (Forward+Reverse)	bp	Kaynak
<i>ACTB</i>	F:5'- GCAGGAGTACGATGAGTCCG-3' R:5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'	74	Özkan ve Kerman (2020)
<i>NRF2</i>	F:5'- TTGTAGATGACCATGAGTCGC -3' R:5'- TGTCTGCTGTATGCTGCTT -3'	141	Güvenç ve ark. (2019)
<i>OSGIN1</i>	F:5'-TGTGAAACCAGGAGCTGTCC-3' R:5'-CGAGGCCTTCGGAAAGGTAT-3'	110	*
<i>BMP15</i>	F:5'-TGATAAAGCCGTCAGCCAGT-3' R:5'-TCTGTATATGCCAAGGACCTCT-3'	57	Tsoulis ve ark. (2016)
<i>PGR</i>	F:5'-CCCACAGGAGTTTGTCAAGCTC-3' R:5'-TAACTTCAGACATCATTTCGG-3'	326	Varas ve Jahn (2005)
<i>Bcl-2</i>	F:5'-TGGCCTTCTTTGAGTTCGGT-3' R:5'-GATGCCGTTTCAGTACTCA-3'	111	Lu ve ark. (2022)
<i>COX-2</i>	F:5'-TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG-3' R:5'- GTTTGGAACAGTCGCTCGTCATC -3'	94	Güvenç ve ark. (2019)
<i>TNF-α</i>	F:5'- ACTGAACTTCGGGGTGATCG -3' R:5'-GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'	153	Yurtal ve ark. (2023)
<i>EREG</i>	F:5'-TATCAGCACAAACCGTGATTCC-3' R:5'-ATGCAAGCAGTAGCCGTCC-3'	145	Samardzija ve ark. (2016)
<i>IL-1β</i>	F:5'- ACAAGGAGAGACAAGCAACGAC -3' R:5'- TCTTCTTTGGGTATTGTTTGGG -3'	140	Castro ve ark. (2015)

bp: Baz çifti, **F:** Forward, **R:** Reverse, *:Bu çalışmada dizayn edilmiştir.

RT-qPCR'da örnekler 95 °C' de 10 dakika denatürasyon sonrası 95 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 30 saniye ve 40 siklus olacak şekilde protokole tabi tutulmuştur. RT-qPCR uygulamaları duplike olarak yapılmıştır.

3.9. Melatonin Ölçümü, Total Protein Analizi ve Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Uygulaması

Serum melatonin seviyeleri Rat Melatonin ELISA kit (EA0048Ra, BT Lab, Çin) aracılığıyla ölçülmüştür. İnkübasyon uygulaması inkübatör (Mipro Laboratuar Cihazları İmalat Sanayi, Türkiye)'de 37 °C'de 60 dakika yapılmıştır. Absorbans ve konsantrasyon

değerlerinin ölçümü AMR-100 mikropate okuyucu (Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd., Çin)'da 450 nm dalga boyunda yapılmıştır. Sonuçlar pg/ml olarak hesaplanmıştır.

Serum ve doku örneklerinde bulunan MDA miktarını belirlemek için total protein analizi yapılmıştır. Total protein analizi BCA Assay kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225, Thermo Fisher Scientific, ABD) protokolüne göre yapılmıştır. Absorbans ve konsantrasyon değerlerinin ölçümü AMR-100 mikropate (Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd., Çin) okuyucuda 562 nm dalga boyunda yapılmıştır.

3.10. Malondialdehit (MDA) Analizi

MDA analizi hem serum hem de ovaryum dokusunda yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak Phosphate Buffered Saline (PBS, P4417, Sigma, Kanada)'den 1 tablet alınarak 200 ml distile su da çözündürülmüştür. Daha sonra yaklaşık 0,15 g alınan ovaryum dokusunun üzerine yaklaşık 1,5 ml PBS eklenerek buz altında homojenizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Homojenizasyon sonrasında örnekler 3000xg'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant yeni steril ependorflara alınmıştır.

MDA analizi kapsamında serum örneklerinden ve doku homojenatlarından 500 µl alınarak 10 ml hacimli cam tüplere konulmuştur. Üzerine 2,5 ml %10 TCA (Trichloroacetic acid) (AC31301000 Scharlau, Barselona) ilave edilerek cam tüpler vortekslenmiştir. Daha sonra 10 ml'lik cam tüpler ısı blokta (IKA, DBH2S000, Almanya) 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler buz yardımı ile hızla soğutulmuştur. Soğutma işleminden sonra cam tüpler +4 °C'de 3000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatanttan 2 ml alınarak yeni 10 ml'lik cam tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu cam tüplerin üzerine 1 ml TBA (2- Thiobarbutric acid) (T5500, Sigma-Aldrich, Çin) ilave edilerek vortekslenmiştir. Ardından örnekler ısı blokta 15 dakika inkübe edilmiş ve buz yardımıyla hızla soğutulmuştur. Soğutulan örnekler UV Spektrofotometre'de 532 nm'de köre karşı ölçülmüştür (Esterbauer ve Cheeseman 1990).

MDA standardı hazırlamak için 25 µl TEP solüsyonu (1,1,3,3-Tetraethoxypropane) (T9889, Sigma-Aldrich, ABD) 100 ml distile su içerisinde çözündürülerek stok hazırlanmıştır. Stok solüsyon içerisinde 1 ml alınarak %1'lik 50 ml H₂SO₄ (Sülfürik Asit %96-98), (TK.170581.02500 Tekkim, Türkiye) solüsyonu içerisine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 2

saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 20 nmol/ml’lik standart elde edilmiştir. Elde edilen bu standart ile 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 nmol düzeylerinde konsantrasyona sahip toplamda 6 standart numunesi oluşturulmuştur.

Seri dilüsyon için, steril ependorf tüplere 750 µl distile su konularak üzerine stok standart solüsyonundan 750 µl eklenmiştir. Daha sonra homojen hale gelene kadar pipetaj yapılmıştır. Homojen hale gelen bu karışımdan 750 µl alınarak içerisinde distile su olan diğer ependorfa alınmıştır. Bu işlem 0,625 nmol konsantrasyonda dilüsyon elde edilecek olan ependorfa kadar devam edilmiştir. Dilüsyonlar oluşturulduktan sonra cam tüplere 2500 µl %10’luk TCA solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra üzerine 500 µl hazırlanan standart solüsyonlardan eklenerek ve solüsyonlar ısı blokta (IKA, DBH2S000, Almanya) 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler buz yardımı ile hızla soğutulmuştur. Soğutma işleminden sonra cam tüpler +4 °C’de 3000 xg’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatanttan 2 ml alınarak yeni 10 ml’lik cam tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu cam tüplerin üzerine 1 ml’lik TBA (T5500, Sigma-Aldrich, Çin) ilave edilerek vortekslenmiştir. Örnekler ısıtıcı blokta 95 °C’de 15 dakika inkübe edilmiştir ve tekrar buz yardımıyla hızla soğutulmuştur. Ardından UV Spektrofotometre’de 532 nm’de köre karşı ölçülmüştür.

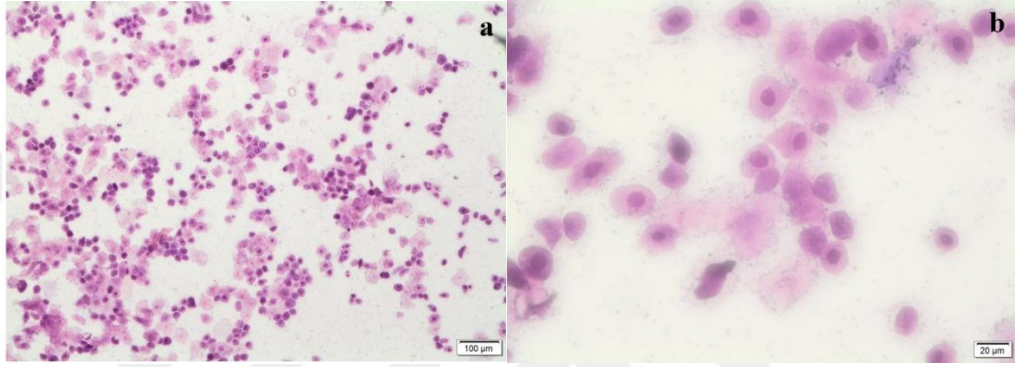
3.11. İstatistiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 24 paket programı kullanılmıştır. Melatonin ve MDA düzeylerinin örneklerdeki homojenliğini belirlemek için Shapiro Wilk testi yapılmıştır. Elde edilen veriler normal dağılım gösterdiği için gruplar arasında tek yönlü varyans (One way Anova) analizi yapılmıştır. Gruplar arasında farklılığı test etmek için Tukey testi yapılmıştır. RT-qPCR verilerinin değerlendirilmesi ise Livak ve Schmittgen (2001)’in belirttikleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna göre yapılmış ve kat değişimi olarak gösterilmiştir. Genlerin gruplar arasındaki değişiminin istatistiksel analizi T-testi ile yapılmıştır. Genler normal dağılıma uymadığı için MDA, serum melatonin ve genler arasındaki korelasyon spearman testi ile yapılmıştır.

4.BULGULAR

4.1. Vajinal Sitoloji Bulguları

Çalışmada kontrol grubu örneklerinde yapılan vajinal sitoloji sonuçlarına göre bu gruptaki hayvanların östrus döneminde oldukları belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Kontrol grubuna ait vajinal sitoloji görüntüsü (proöstrusdan östrusa geçiş aşaması) **a**: 100x’lik büyütme **b**: 20x’lik büyütme

4.2. Serum Melatonin Bulguları

Çalışmada kontrol ve deneme gruplarında serum melatonin seviyelerinin yaklaşık 40 pg/ml düzeylerinde olduğu ve gruplar arasında fark olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Grupların serum melatonin seviyeleri (pg/ml)

Gruplar	Ortalama± SH	P
K	39,99±1,20	0,220
So	42,41±1,52	
SoM5	39,74±0,55	
SoM20	39,29±0,41	

K: Kontrol grubu; **So:** Süperovulasyon grubu; **SoM5:** Süperovulasyon+5mg Melatonin grubu; **SoM20:** Süperovulasyon+20 mg Melatonin grubu, **SH:** Standart Hata

4.3. MDA Bulguları

Serum MDA seviyeleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, ovaryum dokusu MDA seviyeleri bakımından süperovulasyon uygulaması yapılan grupların tamamında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$) (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplarda ovaryum dokularında ve serumda belirlenen MDA seviyeleri (nmol/mg protein)

Gruplar	Doku	Serum
	Ortalama $\pm$ SH	Ortalama $\pm$ SH
K	5,96 $\pm$ 1,09 ^a	0,95 $\pm$ 0,17
So	3,25 $\pm$ 0,42 ^b	1,46 $\pm$ 0,47
SoM5	2,90 $\pm$ 0,37 ^b	1,10 $\pm$ 0,33
SoM20	2,70 $\pm$ 0,69 ^b	0,99 $\pm$ 0,22
P	P= 0,004	P=0,726

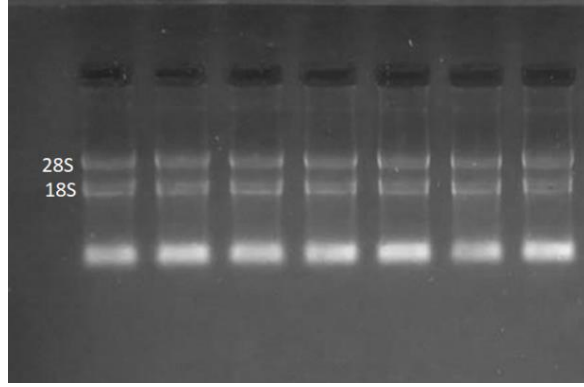
K: Kontrol grubu; **So:** Süperovulasyon grubu; **SoM5:** Süperovulasyon+5mg Melatonin grubu; **SoM20:** Süperovulasyon+20 mg Melatonin grubu, **SH:** Standart Hata, Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı gösterir.

4.4. Total RNA İzolasyonu Bulguları

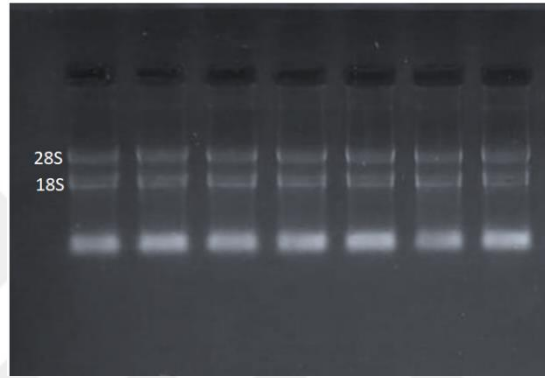
Ovaryum dokusundan izole edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri Tablo 5'te verilmiştir. Jel elektroforez görüntüleri ise Şekil 5-9'da sunulmuştur.

Tablo 5. Ovaryum dokusundan izole edilen total RNA'nın saflık ve konsantrasyon değerleri (Ort $\pm$ Std.Hata)

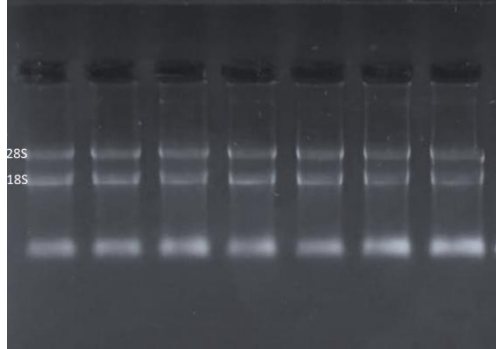
Gruplar					
Doku	Özellik	Kontrol	So	SoM5	SoM20
Ovaryum	Konsantrasyon (ng/ μ l)	676,95 $\pm$ 56,70	684,35 $\pm$ 40,60	735,08 $\pm$ 24,35	617,01 $\pm$ 35,21
	Saflık (A_{260}/A_{280})	1,83 $\pm$ 0,01	1,81 $\pm$ 0,12	1,84 $\pm$ 0,01	1,86 $\pm$ 0,01



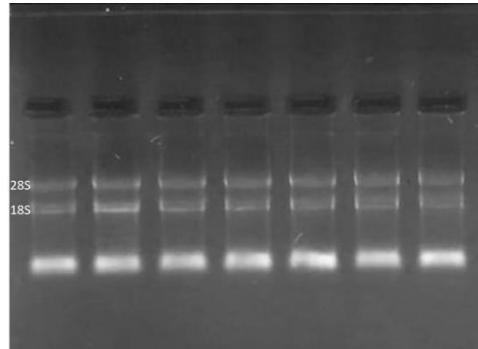
Şekil 5. Kontrol grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri



Şekil 6. So grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri



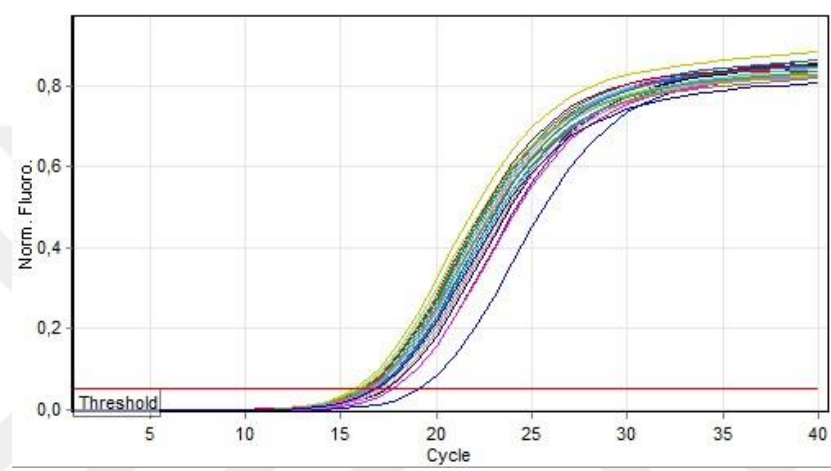
Şekil 7. SoM5 grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri



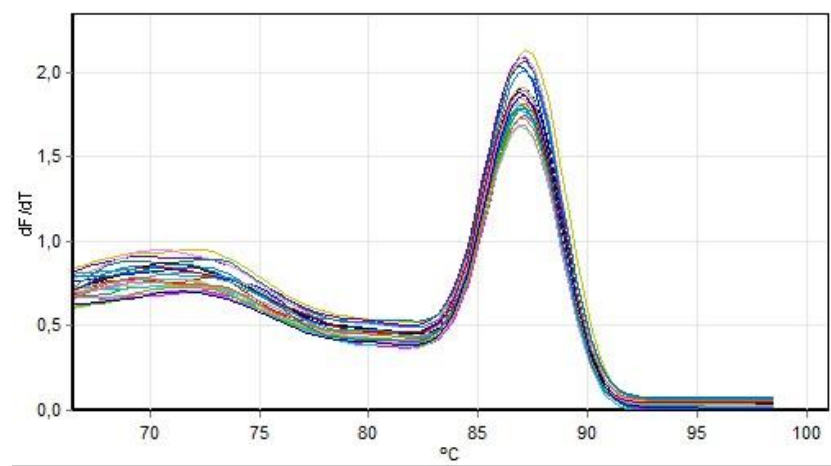
Şekil 8. SoM20 grubundaki ratların ovaryum dokularından izole edilen total RNA jel elektroforez görüntüleri

4.5. qPCR Bulguları

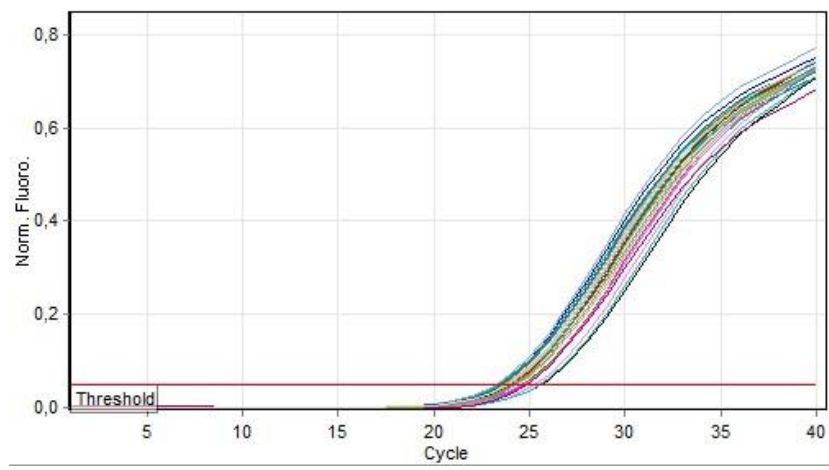
Ovaryum dokusundan izole edilen total RNA'ların cDNA'ya dönüşümü gerçekleştiikten sonra *NRF2*, *OSGIN1*, *BMP15*, *PGR*, *Bcl-2*, *COX-2*, *TNF- α* , *EREG* ve *IL-1 β* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. RT-qPCR reaksiyonu sonrası tüm örnekler için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmış ve ovaryum dokusunda housekeeping gen ve hedef genlerin Ct ve erime eğrisi grafikleri Şekil 9-28'da verilmiştir.



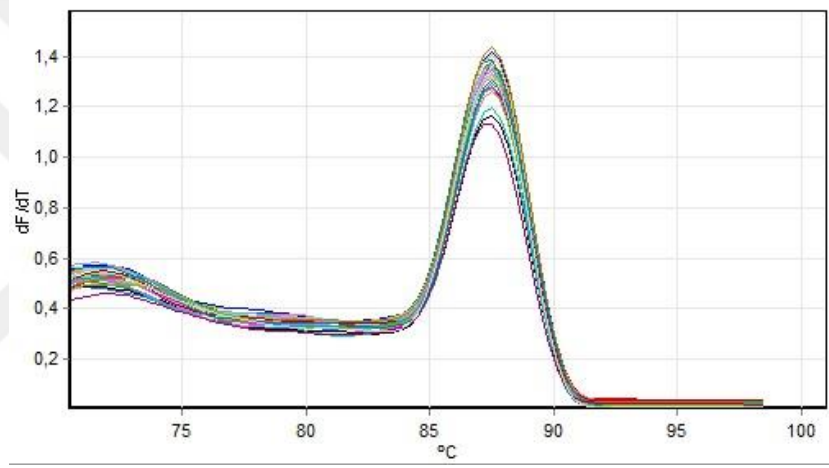
Şekil 9. Ovaryum dokusu ACTB geni Ct grafiği



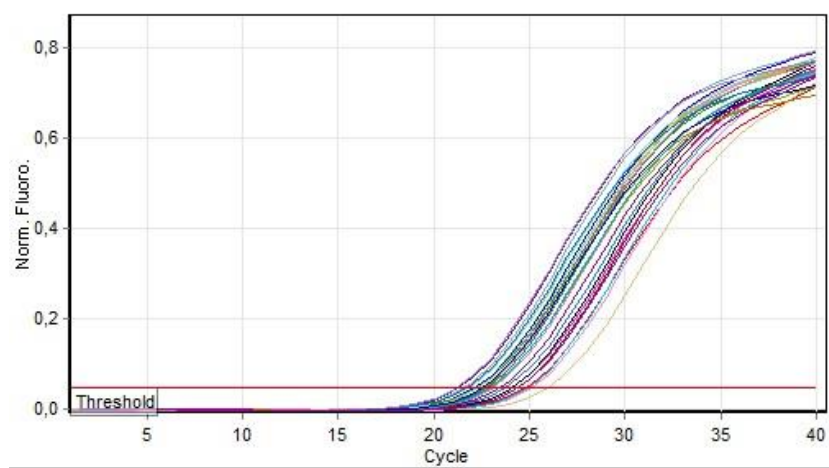
Şekil 10. Ovaryum dokusu ACTB geni erime eğrisi grafiği



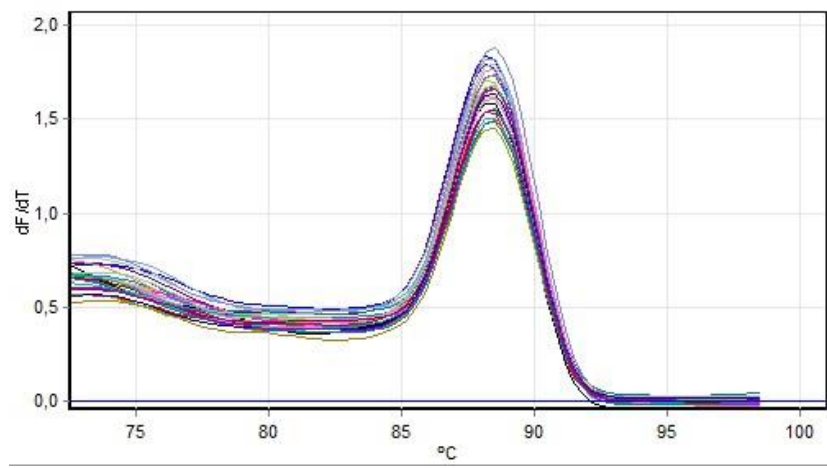
Şekil 11. Ovaryum dokusu NRF2 geni Ct grafiği



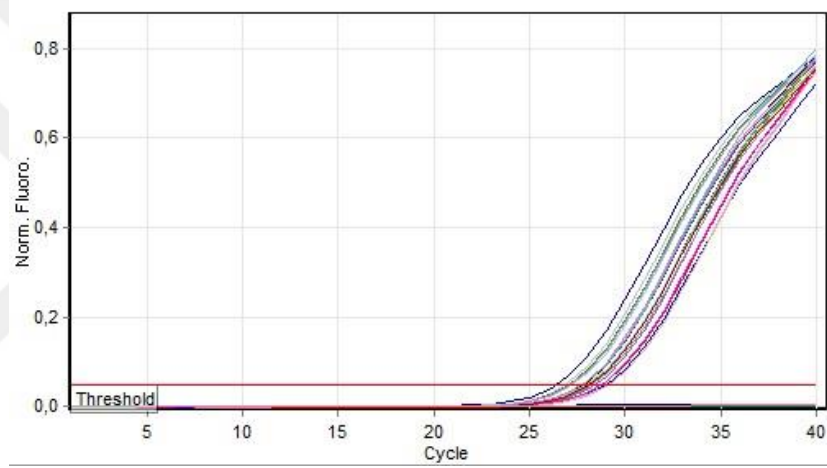
Şekil 12. Ovaryum dokusu NRF2 geni ait erime eğrisi grafiği



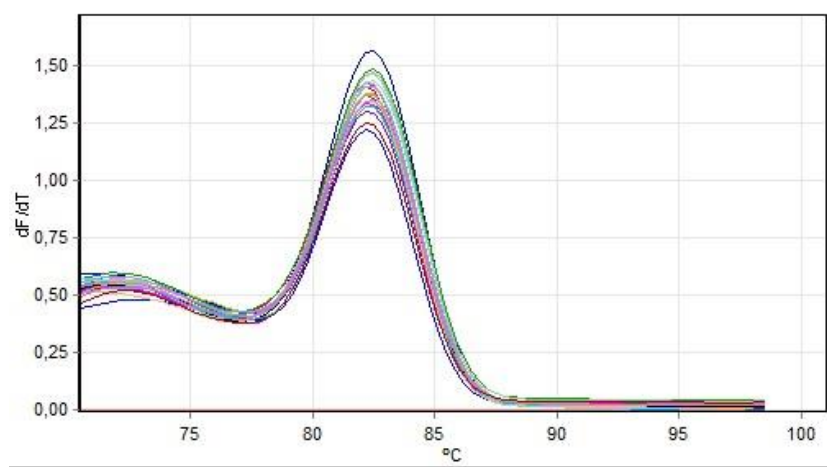
Şekil 13. Ovaryum dokusu OSGIN1 genine ait Ct grafiği



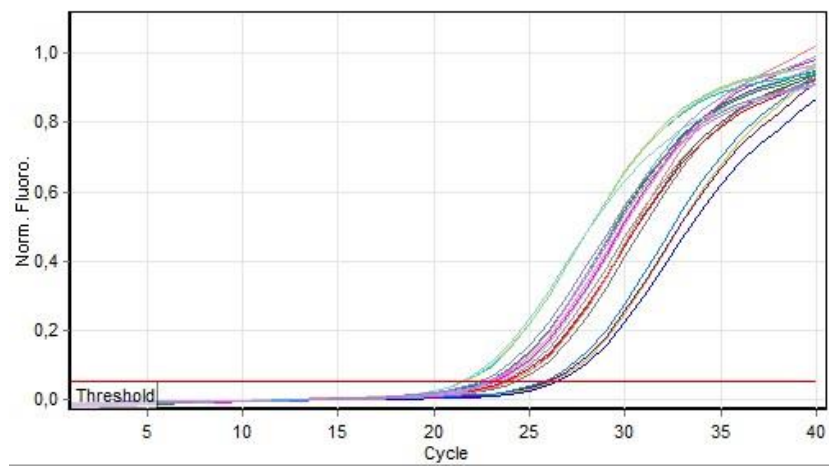
Şekil 14. Ovaryum dokusu OSGIN1 geni erime eğrisi grafiği



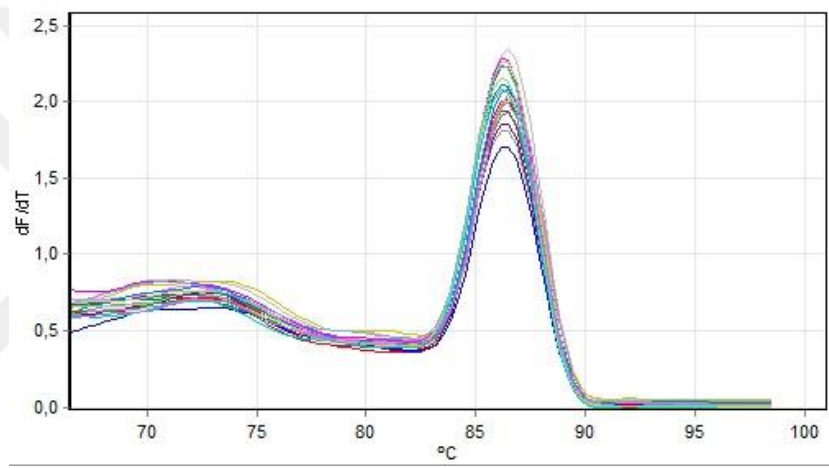
Şekil 15. Ovaryum dokusu BMP15 geni Ct grafiği



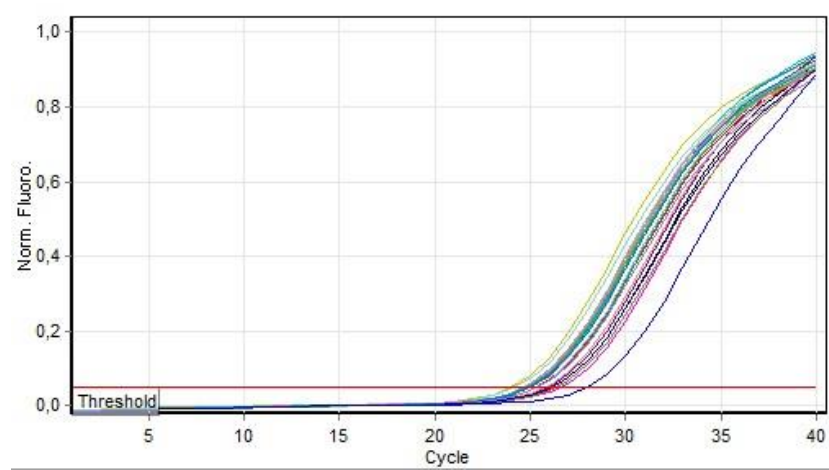
Şekil 16. Ovaryum dokusu BMP15 geni erime eğrisi grafiği



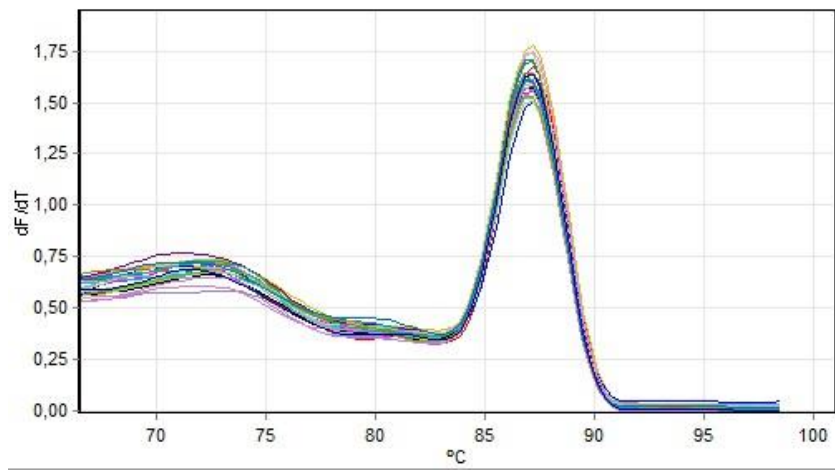
Şekil 17. Ovaryum dokusu PGR geni Ct grafiği



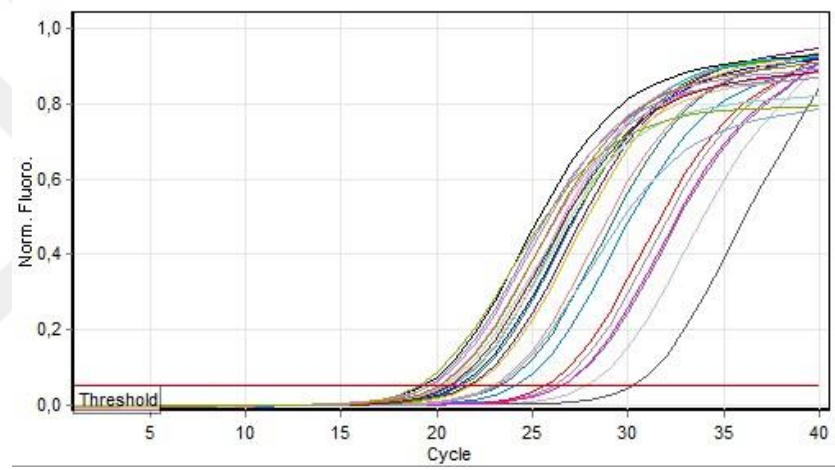
Şekil 18. Ovaryum dokusu PGR geni erime eğrisi grafiği



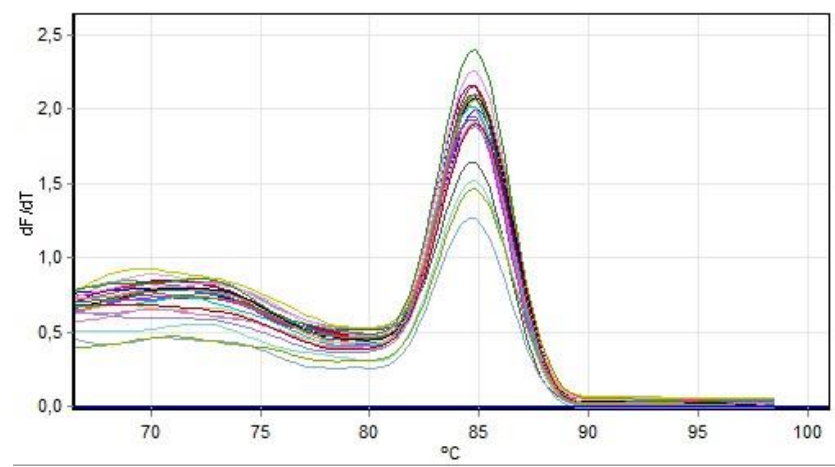
Şekil 19. Ovaryum dokusunda Bcl-2 geni Ct grafiği



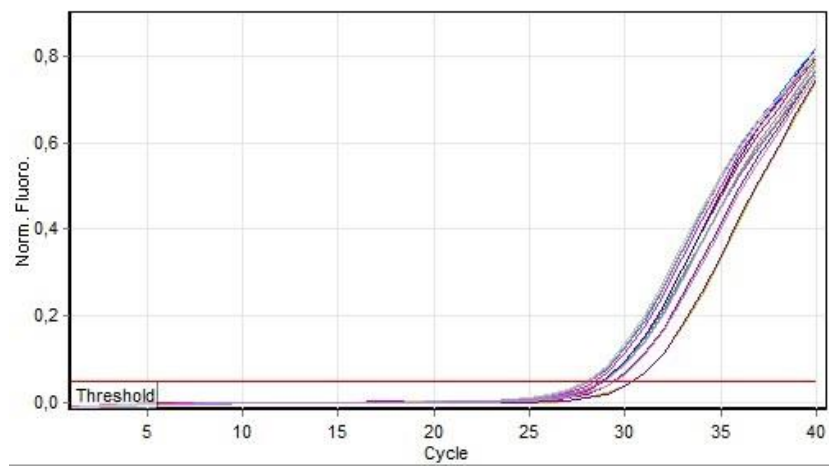
Şekil 20. Ovaryum dokusu Bcl-2 geni erime eğrisi grafiği



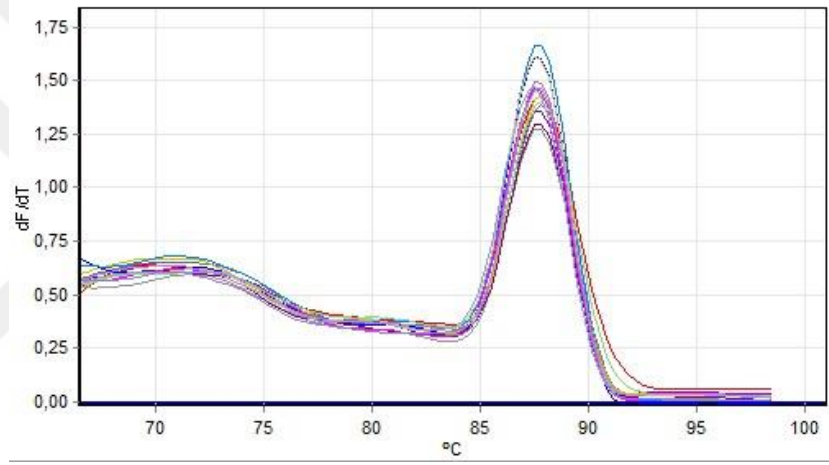
Şekil 21. Ovaryum dokusu COX-2 geni Ct grafiği



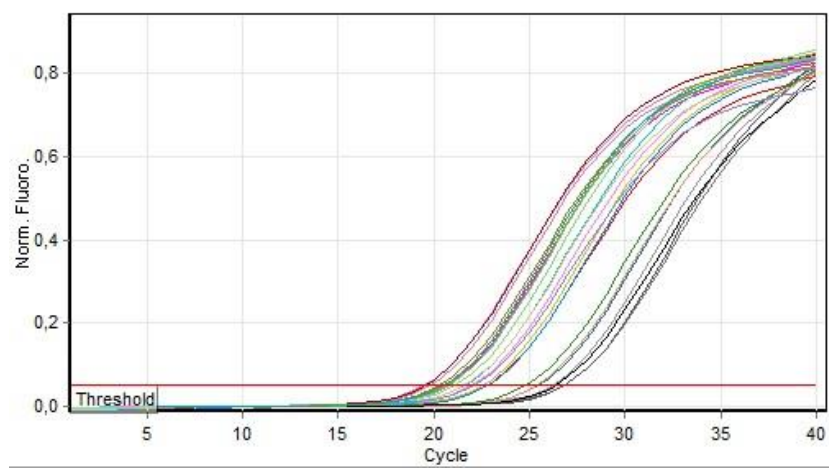
Şekil 22. Ovaryum dokusu COX-2 geni erime eğrisi grafiği



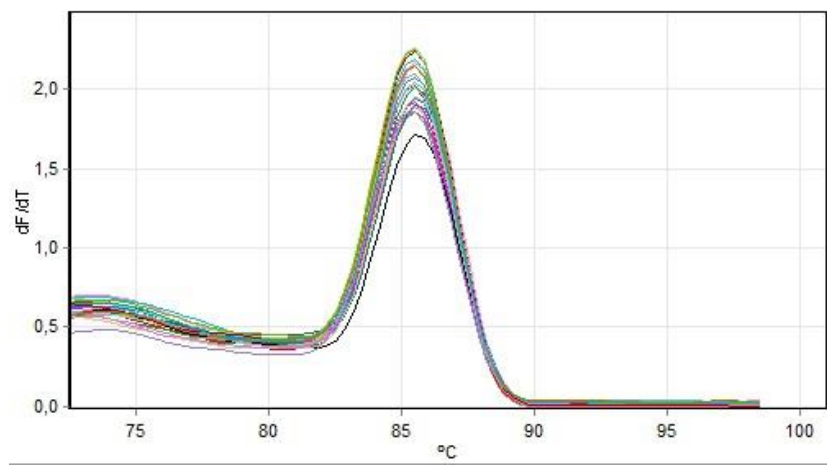
Şekil 23. Ovaryum dokusu TNF- α geni Ct grafiği



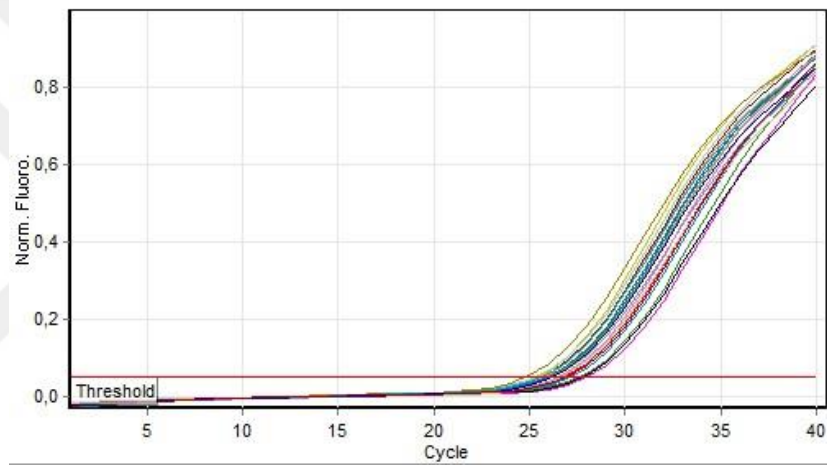
Şekil 24. Ovaryum dokusu TNF- α geni erime eğrisi grafiği



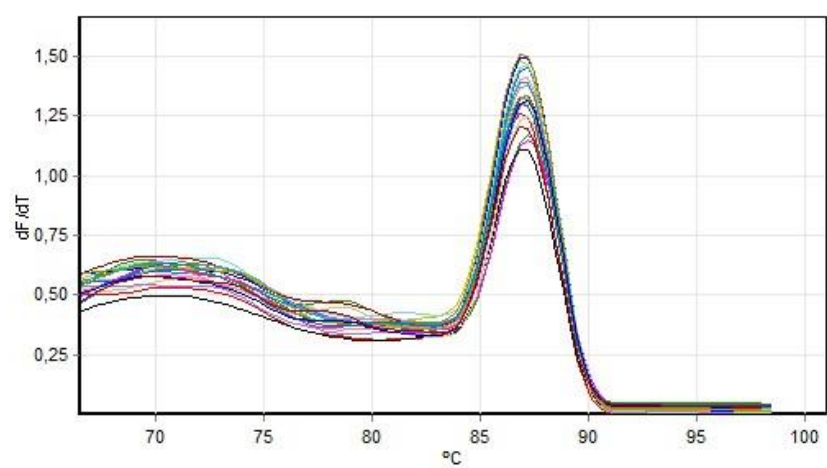
Şekil 25. Ovaryum dokusu EREG geni Ct grafiği



Şekil 26. Ovaryum dokusu EREG geni erime eğrisi grafiği

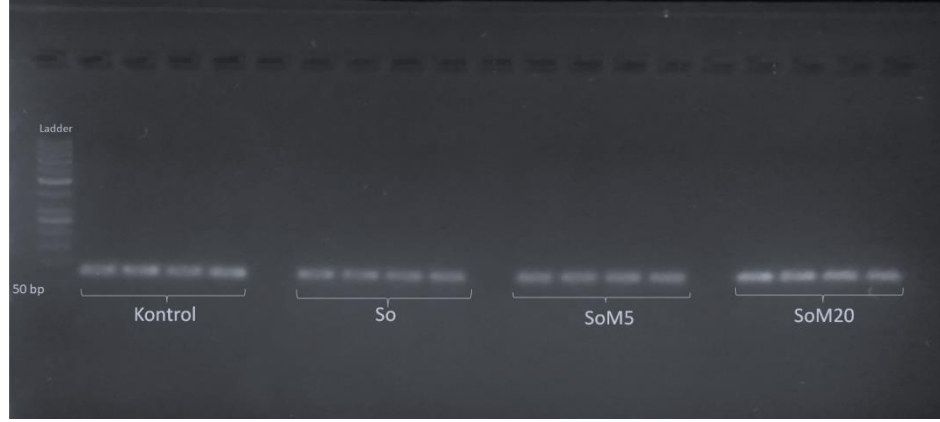


Şekil 27. Ovaryum dokusu IL-1 β geni Ct grafiği

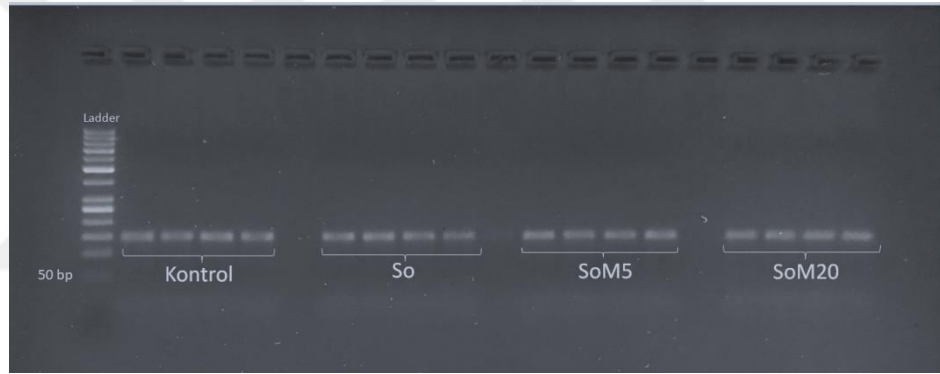


Şekil 28. Ovaryum dokusu IL-1 β geni erime eğrisi grafiği

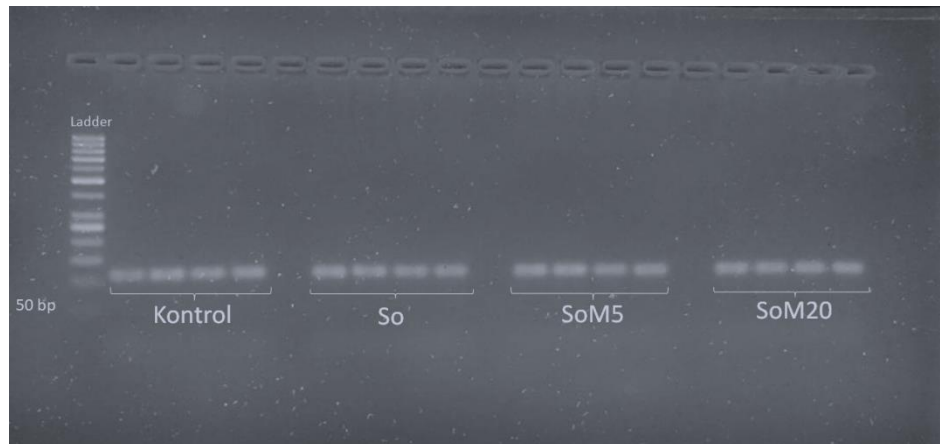
Çalışma kapsamında ovaryum dokusunda çalışılan genlerin qPCR ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 29-38’de sunulmuştur.



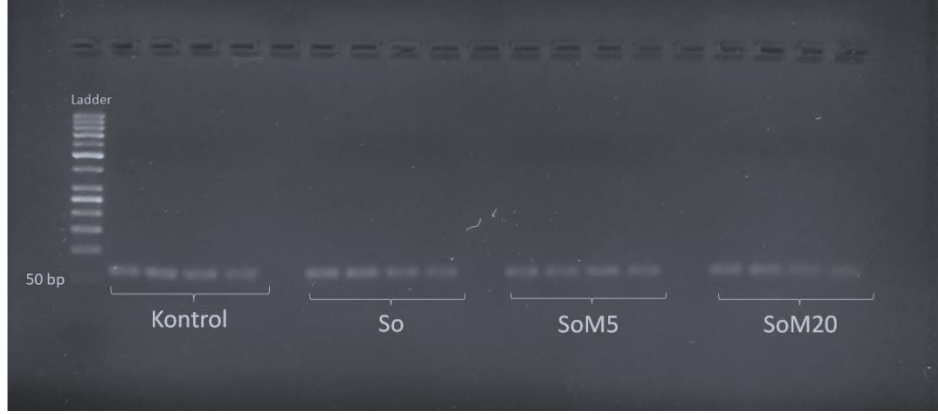
Şekil 29. Ovaryum dokusu ACTB geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (74 bp)



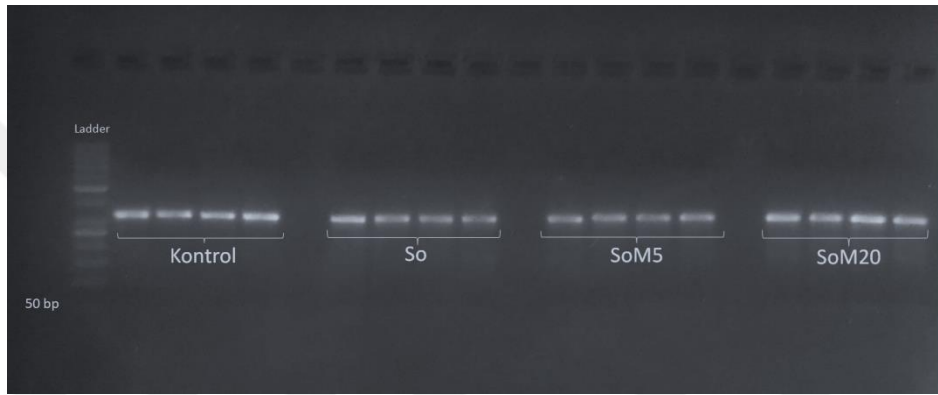
Şekil 30. Ovaryum dokusu NRF2 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (141 bp)



Şekil 31. Ovaryum dokusu OSGIN1 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (110 bp)



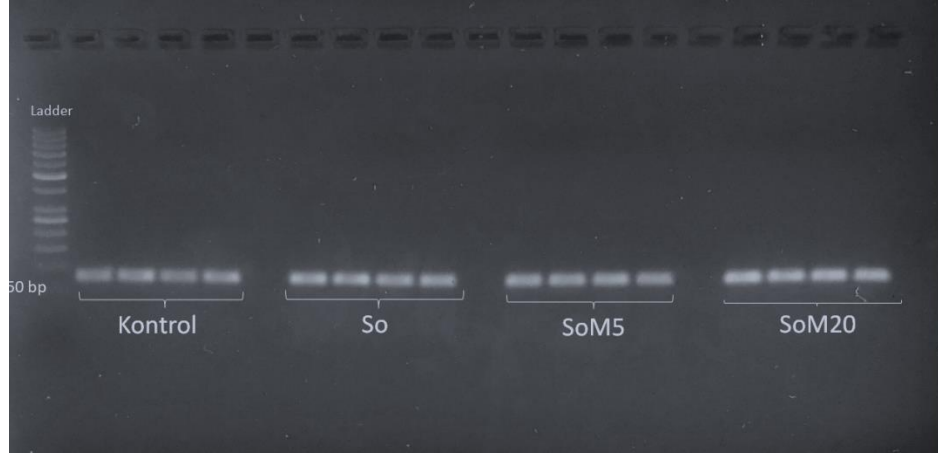
Şekil 32. Ovaryum dokusu BMP15 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (57 bp)



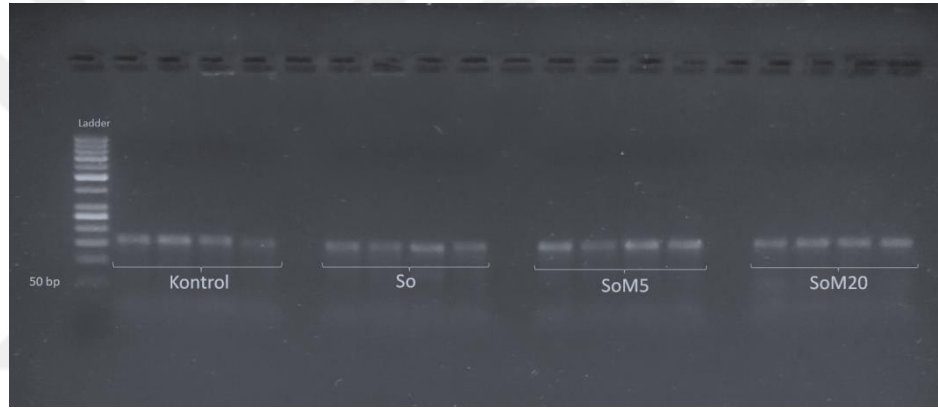
Şekil 33. Ovaryum dokusu PGR geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (326 bp)



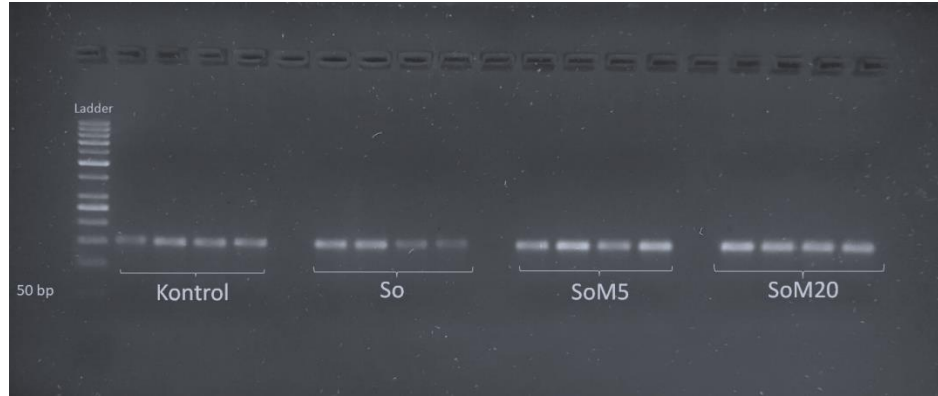
Şekil 34. Ovaryum dokusu Bcl-2 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (111 bp)



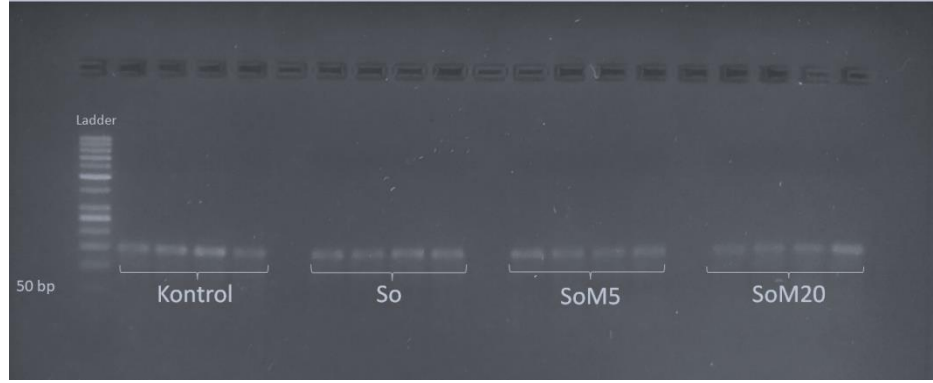
Şekil 35. Ovaryum dokusu COX-2 geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (94 bp)



Şekil 36. Ovaryum dokusu TNF- α geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (153 bp)



Şekil 37. Ovaryum dokusu EREG geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (145 bp)



Şekil 38. Ovaryum dokusu IL-1β geni qPCR ürünlerinin jel görüntüsü (140 bp)

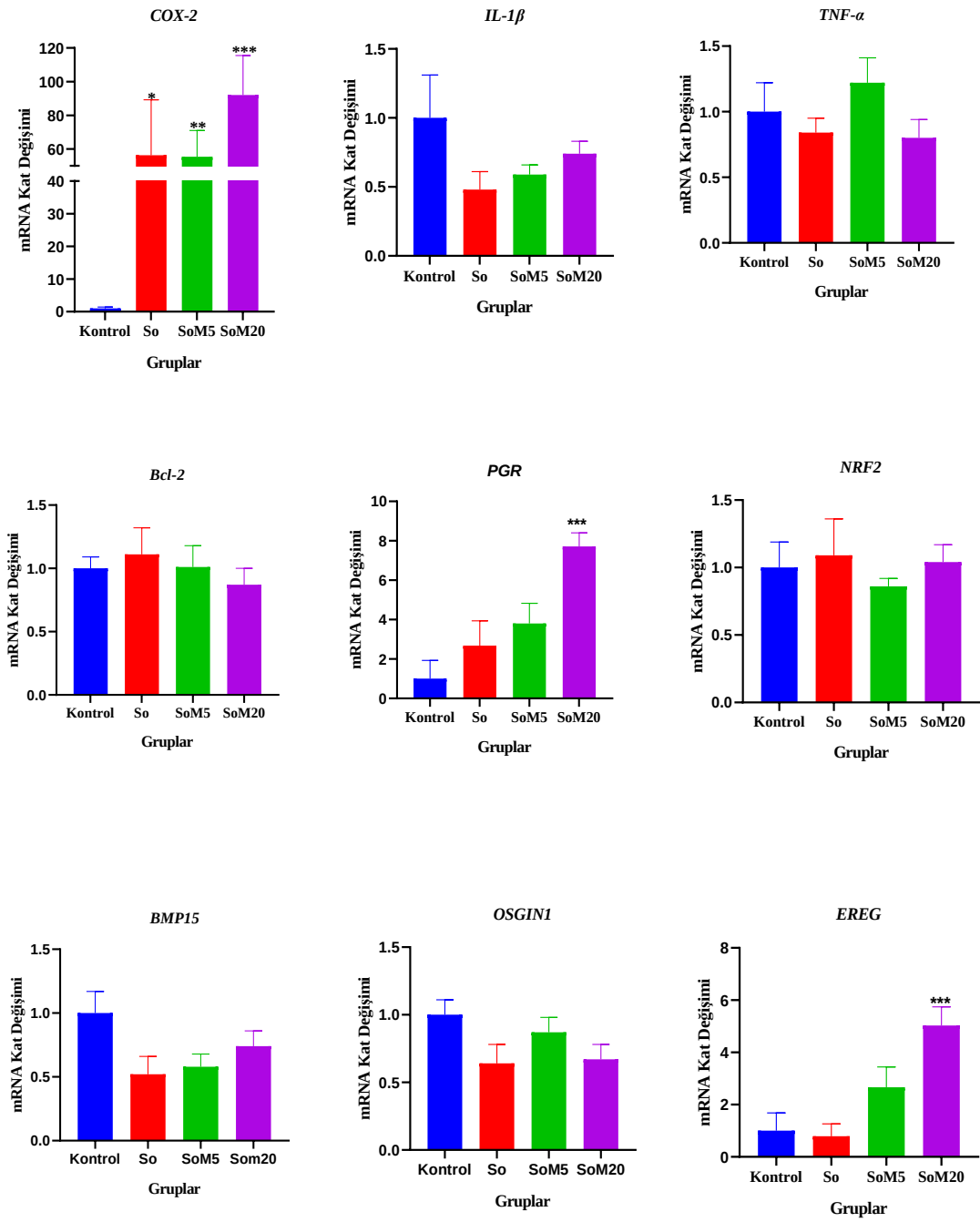
4.6. Gen Ekspresyonu Bulguları

COX-2 geninde kontrol grubuna kıyasla süperovulasyon gruplarında (So, SoM5, SoM20) anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $P<0,05$, $P<0,01$, $P<0,001$). Bununla birlikte kontrole kıyasla deneme gruplarında *IL-1β*, *TNF-α* ve *Bcl-2* genlerinde anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla So ve SoM5 gruplarında *PGR* geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olmazken, SoM20 grubunda bu genin ekspresyon seviyesinin kontrole kıyasla yaklaşık 7 kat arttığı belirlenmiştir ($P<0,001$). Ayrıca, kontrol grubuna kıyasla So, SoM5 ve SoM20 gruplarında *BMP15* gen ekspresyon seviyelerinin benzer olduğu tespit edilmiştir. Deney gruplarından SoM20 grubunda kontrol grubuna kıyasla *EREG* geninde yaklaşık 5 kat anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($P<0,001$). Ancak kontrol grubuna kıyasla So ve SoM5 grubunda *EREG* gen ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 6; Şekil 39).

Tablo 6. Gen ekspresyon sonuçları

	Kontrol	So	SoM5	SoM20
	Kat Değişimi	Kat Değişimi	Kat Değişimi	Kat Değişimi
<i>COX-2</i>	1,00±0,45	56,32±32,90*	55,43±15,55**	92,06±23,46***
<i>IL-1β</i>	1,00±0,31	0,48±0,13	0,59±0,07	0,74±0,09
<i>TNF-α</i>	1,00±0,22	0,84±0,11	1,22±0,19	0,80±0,14
<i>Bcl-2</i>	1,00±0,09	1,11±0,21	1,01±0,17	0,87±0,13
<i>PGR</i>	1,00±0,93	2,68±1,26	3,80±1,03	7,71±0,69***
<i>NRF2</i>	1,00±0,19	1,09±0,27	0,86±0,06	1,04±0,13
<i>BMP15</i>	1,00±0,17	0,52±0,14	0,58±0,10	0,74±0,12
<i>OSGIN1</i>	1,00±0,11	0,64±0,14	0,87±0,11	0,67±0,11
<i>EREG</i>	1,00±0,68	0,79±0,47	2,66±0,78	5,03±0,71***

*: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ***: $P<0,001$, So: Süperovulasyon, SoM5: Süperovulasyon+5mg/kg melatonin, SoM20: Süperovulasyon+20mg/kg melatonin



Şekil 39. Gruplarda COX-2, IL-1 β , TNF α , Bcl-2, PGR, NRF2, BMP15, OSGIN1 ve EREG genlerinin ekspresyon bulguları

4.7. Melatonin, MDA ve Hedef Genler Arasındaki Korelasyon Bulguları

Serum MDA seviyesi ile *Bcl-2* ve *NRF2* genleri arasında pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $P<0,001$, $P<0,01$). Ayrıca, *COX-2* ile *PGR* ve *EREG* genleri arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir ($P<0,001$). *IL-1 β* ile *Bcl-2* ve *OSGIN1* genleri arasında ise pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Bununla birlikte *Bcl-2* ile *NRF2* ve *BMP15* arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $P<0,01$, $P<0,05$). *PGR* geni ile *EREG* geni arasında istatistiksel açıdan anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($P<0,001$). *NRF2* geni ile *BMP15* ve *OSGIN1* genleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$) (Tablo 7).

Tablo 7. Melatonin, MDA ve gen ekspresyon sonuçlarının korelasyon tablosu

D-MDA: Ovaryum Dokusu MDA Seviyeleri; **S-MDA:** Serum MDA Seviyeleri *:P<0,05; **:P<0,01; ***:P<0,001

[illegible]

5. TARTIŞMA

Memelilerde ovaryumun temel işlevi, steroid hormon üretimi yapmak ve her östrus döngüsünde döllenmeye hazır bir oosit üretmektir. Oosit dondurma, in vitro fertilizasyon, ovaryum hiperstimülasyonu, transgenik hayvan üretimi, çiftlik hayvan yetiştiriciliği gibi birçok alanda süperovulasyon yaygın olarak uygulanmaktadır (Marshall ve Rivera 2018).

Süperovulasyon uygulaması ovaryum foliküllerinin gelişimini uyaran gonadotropinler (GnRH, FSH ve LH) aracılığıyla eksojen olarak yapılmaktadır (Li ve ark. 2024). Bu uygulamanın farklı sektörlerde değişen başarı oranlarıyla kullanıldığı bilinmekle birlikte dişi üreme sistemine potansiyel zararlarının olabileceği yapılan güncel çalışmalarda gösterilmiştir (Miyamoto ve ark. 2010, Lee ve ark. 2017, Feng ve ark. 2023). Süperovulasyon uygulamalarının, ovaryum hiperstimülasyonuna, başarısız ovulasyona, serumda bazı hormon düzeylerinin azalmasına, ovaryum hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına, oosit ve embriyo kalitesinin düşmesine ve ovaryumda oksidatif stresin artmasına neden olabileceği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Ding ve ark. 2017, Nie ve ark. 2018, Tang ve ark. 2019, Liu ve ark. 2020).

Süperovulasyon uygulamalarına bağlı olarak ovaryum sağlığında meydana gelecek hasarı önlemede çeşitli ajanların değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (Cao ve ark. 2020, Liu ve ark. 2020,). Endojen bir hormon olan melatonin birçok doku ve organda homeostazinin sağlanması ve oksidatif hasarın düşürülmesi için görev alan önemli bir hormondur (Basini ve Grasselli 2024). Ovaryum dokusunda süperovulasyona bağlı oluşabilecek oksidatif hasarın önlenmesinde melatonin etkileri ile ilgili moleküler düzeyde bilinenler ve yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Melatonin antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkiler gibi organizmada önemli biyolojik fonksiyonlara sahip endojen indolamin bir hormondur (Lv ve ark. 2023). Bu hormonun antioksidan özelliği bilinen diğer antioksidanlara kıyasla daha yüksektir. Bu nedenle melatoninin ovaryum, oosit ve gamet sağlığını koruyarak üreme sistemine katkı sağladığı düşünülmektedir (Feng ve ark. 2023). Ovaryum foliküllerinde melatonin konsantrasyonunun serum melatonin konsantrasyonuna kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Gelen ve ark. 2022). Ayrıca, foliküllerdeki melatonin konsantrasyonu folikül büyümesine bağlı olarak da artış gösterebilmektedir. Memelilerde primer foliküllere

kıyasla graaf foliküllerde melatoninin konsantrasyonu daha yüksektir. Bu durum melatoninin ovaryum ve folikül sağlığını korumadaki rolünü desteklemektedir (Nakamura ve ark. 2003, Basheer ve Rai 2016).

Eksojen melatonin uygulamasının serum melatonin konsantrasyonlarına olan etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar tartışmalıdır. Zira, yapılan çeşitli çalışmalarda farklı dozlarda ve sürelerde eksojen melatonin uygulamasının serum melatonin seviyelerine olan etkileri farklı bulunmuştur (Song ve ark. 2016, Dokoochaki ve ark. 2017). Işığa duyarlı bir hormon olan melatoninin gündüz ve ışığa maruziyet durumunda aktivitesinin azaldığı bazı araştırmalarda belirtilmiştir (Kennaway ve ark. 2002, Kasahara ve ark. 2010, Zhao ve ark. 2018, Berbest ve ark. 2019). Bu çalışmaların yanı sıra melatoninin yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle serum melatonin seviyesinin değişiklik gösterdiğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Fourtillan ve ark. 2001, Kennaway ve ark. 2019). Ayrıca, Yeleswaram ve ark. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, melatoninin intravenöz uygulanmasına kıyasla oral alımının etkisinin daha büyük olduğu bildirilmiştir. Terrón ve ark. (2013) ratlarda 15 hafta süreyle 20 mg/kg dozda eksojen melatonin uygulamasının serum melatonin düzeylerine anlamlı bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise 5 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarda eksojen melatonin uygulamasının ratlarda serum melatonin seviyelerine anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ratların ötenazi yapıldığı gün melatonin enjeksiyonun yapılmaması ve örnek alım zamanının gündüz olması serum melatonin seviyeleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark olmamasına neden olmuş olabileceği değerlendirilmiştir. Gerek literatürdeki benzer çalışmalar gerekse bu çalışmadan elde edilen bulgular eksojen melatonin uygulamasının süresi, örnek alım zamanı, melatonin dozu ve yöntem gibi faktörlere bağlı olarak serum melatonin konsantrasyonlarının etkilenebileceğini göstermektedir.

Foliküler gelişim sırasında oksidan ve antioksidan üretimi arasındaki denge önemli bir yer tutmaktadır. Bu denge bozulduğunda folikül ve ovaryum sağlığı olumsuz etkilenerek ovaryum hasarı meydana gelebilmektedir (Xiao ve ark. 2019). Yapılan birçok çalışmada tekrarlanan süperovulasyonun ovaryum sağlığını olumsuz etkilediği bildirilse de bazı çalışmalarda tek sefer uygulanan süperovulasyonun da dişi üreme hücrelerini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Diamond ve ark. 1987, Van der Auwera ve ark. 2001, Van Blerkom ve ark. 2001, Chao ve ark. 2005, Zhang ve ark. 2018). Yapılan bu çalışmada tek seferde yapılan süperovulasyon uygulamasının ovaryumda meydana getirdiği hasar lipid

peroksidasyon son ürünü olarak bilinen MDA ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla süperovulasyon gruplarında ovaryum MDA seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı ($P<0,01$) belirlense de ratlarda ovaryum dokusunda normalde olması gereken MDA seviyeleri ile ilgili referans aralık bulunmamaktadır. Zira yapılan çalışmalarda ovaryum dokusunda MDA miktarının sağlıklı kontrol gruplarında 4-10 nmol/mg protein arasında değişen miktarlarda bulunduğu bildirilmektedir (Rezaee ve ark. 2015, Bandariyan ve ark. 2021, Demir ve ark. 2021, Nie ve ark. 2018). Her ne kadar süperovulasyon gruplarındaki ovaryum MDA seviyeleri kontrol grubu ovaryum MDA seviyelerinden daha az olsa da kontrol grubu ovaryum MDA seviyeleri literatürdeki benzer çalışmalarda bildirilen seviyelerden yüksek bulunmamıştır. Eksojen gonadotropinlerin uygulandığı çalışmalarda ovaryum dokusundaki MDA miktarının yaklaşık 10-20 nmol/mg protein olduğu bildirilmiştir (Nie ve ark. 2018, Ma ve ark. 2021, Wang ve ark. 2021, Fan ve ark. 2022). Bu çalışmada kontrole kıyasla So, SoM5 ve SoM20 gruplarında ovaryum MDA seviyelerinin düşük olması eksojen gonadotropin uygulamasının ovaryumda meydana gelebilecek hasara karşı koruyucu bir rolünün olabileceğini akla getirmekle birlikte melatonin uygulaması sonucunda oluşabilecek etkinin daha iyi anlaşılabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmada serum MDA düzeylerinin kontrol ve deney gruplarında benzer seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda herhangi bir nedene bağlı olarak gelişen ovaryum hasarının tedavisinde kullanılan farklı dozlardaki melatoninin serum MDA düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Kandemir ve ark. 2017, Jamilian ve ark. 2019, İşgüder ve ark. 2021). Bu çalışmada elde edilen bulguların ilgili çalışmalardan farklı olmasındaki temel sebebin kullanılan melatoninin uygulama dozu ve süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Süperovulasyonun ovaryumda olası etkilerini önlemek amacıyla farklı dozlarda eksojen olarak verilen melatoninin ovaryum sağlığı ve ovulasyona olan etkilerini araştırmak amacıyla COX-2 geninin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Ovulasyon süreci, folikülün yırtılması ve maternal germ hücrelerinin salınmasına yol açan bir dizi karmaşık biyokimyasal ve biyofiziksel olayı içermektedir. Bu süreç, lökosit ekstrasvasyonu, proteolitik ve kollajenolitik aktivitelerin indüklenmesi gibi akut inflamatuvar reaksiyon prosesine sahiptir. İnflamasyonda merkezi rol oynayan prostaglandinler ovulasyonun merkezi araçlarıdır (Duffy ve ark. 2019). Prostaglandinlerin ovaryumdaki sentezini ve işlevini araştırmak için yapılan çalışmalarda fare ve tavşanlara verilen anti-prostaglandinin foliküler

yırılmayı inhibe ettiği ve ovulasyonun tamamlanmadığının belirlenmesiyle prostaglandinlerin ovaryum sağlığı için önemi belirlenmiştir (Armstrong 1981, Lau ve ark. 1974). Prostaglandinlerin sentezinde rol alan COX-2, sağlıklı oosit olgunlaşmasının sürdürülmesinde, folikül yırtılmasında ve ovulasyonun indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır (Kokabiyan ve ark. 2023). Preovulasyonda LH ve gonadotropinlerin etkisi ile COX-2 geninin ekspresyon seviyesi artış göstermektedir (Berisha ve ark. 2019, Derkach ve ark. 2023). Süperovulasyon uygulamasında kullanılan gonadotropinler bu genin ekspresyonunu geçici olarak indüklemektedir. PMSG enjeksiyonundan 24 saat sonra hCG enjeksiyonundan ise 4 saat sonra COX-2 geninin ekspresyon seviyesi tetiklenmektedir. Agca ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada tek seferde gerçekleştirilen süperovulasyon uygulamasından sonra ovaryum dokusunda COX-2 geninin ekspresyon seviyesinin yaklaşık 52 kat artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da süperovulasyon gruplarının tamamında COX-2 gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır (So, SoM5 ve SoM20 grupları için sırasıyla $P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$). COX-2 gen ekspresyonunun Agca ve ark. (2013) tarafından bildirilen bulgulara benzer olarak So ve SoM5 gruplarında yaklaşık 55 kat artış göstermesinin yanı sıra SoM20 grubunda yaklaşık 92 katlık bir artış olduğu belirlenmiştir. Choi ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada hCG enjeksiyonundan sonra kandaki prostaglandin sentezinin arttığını buna bağlı olarak da COX-2 geninin ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Benzer olarak yapılan bu çalışmada süperovulasyon gruplarında ovaryum dokusunda bu genin ekspresyon seviyesinin artmasının temel nedeninin süperovulasyon uygulamasında kullanılan hCG enjeksiyonu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte yüksek doz melatonin grubuna göre fazla artış göstermesinin sebebinin melatoninle ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Ancak COX-2 geninin ekspresyonunu melatoninin inhibe ettiğini belirten çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır (Tamura ve ark. 2009, Yao ve ark. 2019, Pal ve ark. 2022). Bu bulguların aksine melatoninin gonadotropin salgısını düzenleyerek folikülogenezi desteklediği bilinmektedir. Eksojen olarak verilen gonadotropinler folikül gelişimini, luteinizasyon mekanizmasını ve prostaglandin sentezini de tetiklemektedir. Prostaglandin miktarının artması folikülde COX-2 gen ekspresyon seviyesinin artmasına ve inflamasyona neden olmaktadır. Ancak Park ve ark. (2020) ve Kokobiyan ve ark. (2023) yaptıkları çalışmada luteinizasyon veya oksidatif stres durumunda COX-2 mRNA seviyesinin artması ile ovaryum dokuda anti-inflamatuvar genlerin ekspresyonunun tetiklendiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada *COX-2* geninin ekspresyon seviyesinin artması bu genin ovaryum dokuda ovulasyonu desteklediği ve melatoninin bu gene etkisinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Süperovulasyon uygulamasıyla birlikte alınan eksojen melatoninin ovaryumdaki rolleri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yapılan çalışmada süperovulasyon uygulamasının ovaryumda fonksiyonel rol oynayan proinflamatuvar gen olan *TNF- α* ve inflamasyonda aktif rol alan *IL-1 β* genlerinin ekspresyon seviyelerinin melatonine bağılı olarak nasıl değiştiği araştırılmıştır. Bu genlerin seçilmesinin amacı ise melatoninin süperovulasyon durumunda ovaryumda meydana gelebilecek oksidatif stres ve inflamasyona etkilerini değerlendirmektir. Kontrole kıyasla deneme gruplarında benzer bulunan *IL-1* ve *TNF- α* genleri hücre proliferasyonu, foliküler atrezi ve oosit olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum oluşumu ve gerilemesi gibi ovaryumda çeşitli fonksiyonlara sahiptir (Devoto ve ark. 2009, Basheer ve Rai 2016). Ovaryum sağlığında *TNF- α* ile birlikte hareket eden *IL-1* bağışıklık sistemi ve çevre dokular arasındaki etkileşimleri koordine etmek için spesifik hücre yüzey reseptörü aracılığıyla lokalize olan küçük proteinlerdir. Makrofajlar, *IL-1*, *TNF- α* ve granülosit dahil olmak üzere çeşitli sitokinler ovaryumda görev alırlar. Dişilerde bu sitokinlerin inflamasyona bağılı olarak ovaryum ve folikül sağlığı üzerinde etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Lliberos ve ark. 2021). Folikül luteinizasyonunda görev alan ROT'un kaynağı da makrofajlar ve bu sitokinlerdir (Lliberos ve ark. 2021). Bazı çalışmalarda ovaryum hasarının gelişmesiyle birlikte verilen melatoninin *TNF- α* ve *IL-1 β* genlerinin ekspresyon seviyesini azalttığı bildirilmiştir (Jamilian ve ark. 2019, Pal ve ark. 2022, Al-Shahat ve ark. 2022). Yapılan bu çalışmada kontrole kıyasla deneme gruplarında *TNF- α* ve *IL-1 β* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark olmamasında melatonin dozu, uygulama şekli ve süresinin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bcl-2 apoptozu önlemede ve hücrenin hayatta kalmasında görev almaktadır. Ancak oksidatif stres durumunda *Bcl-2* geninin ekspresyonu doku ve hücrelerde azalmaktadır (Roshanaee ve ark. 2022). Rodentlere eksojen olarak uygulanan gonadotropinlerin ovaryumda bu genin ekspresyonunu tetiklediği ve hücre sağlığına olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Xiao ve ark. 2001). Yapılan bir çalışmada ratlarda gonadotropin eksikliği durumunda ovaryumda *Bcl-2* geninin ekspresyonunun azaldığı ve hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (Tilly ve ark. 1995). Bu bulguların yanı sıra gonadotropin salınımını düzenleyen ve hücre ölümünü önlediği bilenen melatoninin de ovaryumda *Bcl-2*

geninin ekspresyonunu arttırarak apoptozu inhibe ettiği bildirilmektedir (Barberino ve ark. 2017, Jang ve ark. 2017). Yapılan bu çalışmada *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyesinin benzer çıkması tek seferde ve belirli dozlarda yapılan süperovulasyon uygulamasının luteinizasyonu desteklediği bu nedenle anti-apoptotik bu genin ekspresyonunu etkilemediğini düşündürmektedir. Nie ve ark. (2018) 5 kez tekrarlanan süperovulasyon uygulamasının farelerde *Bcl-2*'yi inhibe ettiği ve apoptozu desteklediğini bildirmişlerdir. Bulgular yapılan bu çalışma bulgularını destekler niteliktedir.

Süperovulasyonun folikülogenez ve ovaryum sağlığına olası olumsuz etkilerine karşı melatoninin doz bağımlı etkilerini belirlemek amacıyla *PGR* geninin ekspresyon seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Folikülogenezin sürdürülmesi ve sağlıklı ovulasyonun gerçekleşmesinde birçok gen görev almaktadır. Bunlardan en bilineni ve bu çalışmada aktivitesi araştırılan *PGR* geni kontrol grubuna kıyasla SoM20 grubunda yaklaşık 7 kat fazla ifade edilmiştir ($P<0,001$). *PGR*, ovaryumdan oosit salınmasını ve ovulasyonu kontrol etmesi nedeniyle dişi üreme sisteminde ovulasyon için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür ve progesteronun artışına paralel olarak hücre içinde ifadesi artmaktadır (Robker ve ark. 2009). Rodentlerde ovulasyon öncesi LH artışı bu genin ekspresyonunu geçici olarak tetiklemektedir (Friberg ve ark. 2009, Coelho ve ark. 2022). Yapılan bir çalışmada gonadotropinlerce uyarılan folikülogenezde ovulasyon başarısının bu genle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Akison ve ark. 2014). Ancak yapılan bir başka çalışmada ovaryum hasarının oluşması durumunda toplam folikül miktarında bir azalma olduğu fakat *PGR* geninin ekspresyon seviyesinde herhangi değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Kathy ve ark. 2023). Diğer bazı çalışmalarda ise süperovulasyon uygulamasının ardından bu genin ekspresyon seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Agca ve ark. 2013, Choi ve ark. 2018). Bu bulguların yanı sıra melatonin de ovaryumda *PGR* geninin ekspresyonunu tetiklemektedir (Abd-Allah ve ark. 2003). Ezzati ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada melatonin uygulama süresine bağlı olarak ovaryumda *PGR* geninin mRNA miktarını yaklaşık 5 kat arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak ovaryum dokusunda *PGR* geninin mRNA seviyesinin artmasının nedeni 20 mg/kg dozda uygulanan melatonin olduğu düşünülmektedir.

Süperovulasyonun ovaryumda yol açabileceği oksidatif strese karşı melatoninin doz bağımlı etkisini belirlemek amacıyla antioksidan sisteminin temelini oluşturan *NRF2*'nin gen ekspresyon seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır. *NRF2* geni oosit farklılaşması sırasında ovaryum hücrelerinde oluşan oksidatif strese karşı antioksidan genlerin ekspresyonunu

uyararak hücre içindeki olası hasarı engellemede görev almaktadır (Baird ve Yamamoto 2020). Bu genin baskılanması ovaryum sağlığını, folikül gelişimini ve fertilizasyonu olumsuz etkileyerek ovaryumda meydana gelen oksidatif stresin artmasına ve ovaryum hasarının meydana gelmesine neden olmaktadır (Jiang ve ark. 2021). Yapılan çalışmalarda melatoninin ovaryum hücrelerinde *NRF2* genini etkileyerek ovaryum sağlığını koruduğu ancak bu durumun doz bağımlı olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark. 2019, Kim ve ark. 2020, Sun ve ark. 2020, Zhan ve ark. 2022). Benzer olarak yapılan bu çalışmada kontrol grubuna kıyasla deneme gruplarında *NRF2* geninin mRNA seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmaması melatonin dozundan kaynaklandığını düşündürmüştür.

Süperovulasyon durumunda melatonin uygulamasının ovaryum sağlığı üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla oosit sağlığından sorumlu aday gen olan *BMP15* geninin ekspresyon seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır. *BMP15* folikül gelişiminde, kümülüs hücreleri ve oosit arasında iletişimi sağlamada, FSH duyarlılığının düzenlenmesinde, apoptozun önlenmesinde, oosit gelişiminin desteklenmesinde ve folikülogenezin sürdürülmesinde rol almaktadır (Yoon ve ark. 2015, Liu ve ark. 2021). Bu genin ekspresyon seviyesinin düşmesi fertilizasyon ve ovaryum sağlığını olumsuz etkilemektedir (Li ve ark. 2014). Yapılan çeşitli çalışmalar süperovulasyon ve ovaryum yaşlanması gibi ovaryum hasarının olduğu durumlarda bu genin ekspresyon seviyesinin azaldığını bildirmektedir (Thornton ve ark. 2015, Jahanbakhsh ve ark. 2018). Bununla birlikte bu çalışmada gruplar arasında *BMP15* gen ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Süperovulasyon uygulamasının ovaryum hasarına neden olmadığı bu nedenle de *BMP15* geninin ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişiklik olmaması beklenir bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Melatoninin süperovulasyona karşı ovaryumda meydana gelebilecek oksidatif stres durumuna etkilerini belirlemek amacıyla *OSGIN1* geninin ekspresyon seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır. *OSGIN1* hem apoptotik hem de antioksidan özelliklere sahip olan, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar düzenleyici olarak hücrel homeostaziste anahtar rol oynayan bir gendir (Romanoski ve ark. 2011, Schrottmaier ve ark. 2014). Hedef dokularda oksidatif strese yanıt olarak p53'ün aktivasyonu ile *OSGIN1* geninin ekspresyonu indüklenmektedir (Yao ve ark. 2008). Dokularda oksidatif stresin azalmasında etkili olan bu genin granüloza hücrelerinde ekspresyon seviyesinin LH aktivitesine bağlı olarak arttığı belirtilse de bazı çalışmalarda LH indüksiyonu ile bu gen aktivitesinde anlamlı değişiklikler

olmadığı bildirilmiştir (Ong ve ark. 2004, Gilbert ve ark. 2012, Agca ve ark. 2013, Komuczki ve ark. 2022). Bu durumun doku spesifik olduğu, her doku ve hücrede aynı etkiyi göstermediği belirtilmektedir (Gilbert ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmada kontrol grubuna kıyasla deneme gruplarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu duruma temel sebebin oksidatif stresin ovaryum dokusunda yüksek olmamasından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir.

Süperovulasyonun ovaryumda meydana gelebilecek olası hasarı önlemek amacıyla farklı dozlarda eksojen olarak verilen melatoninin ovaryum ve oosit sağlığına etkilerini incelemek için *ERE*G geninin ekspresyon seviyesi araştırılması amaçlanmıştır. *ERE*G, memelilerde in vitro oosit olgunlaşmasını ve kümülüs hücrelerinin genişlemesini indüklediği için LH sinyaline bağlı olarak hareket etmektedir (Prohazka ve ark. 2000, Su ve ark. 2002). LH dalgalanmasının ardından *ERE*G mural granüloza hücreleri tarafından salgılanır ve kümülüs hücreleri üzerinde parakrin araçlar olarak görev alır (Adir ve ark. 2017). Folikülogenezin son aşamasında *ERE*G geni upregüle olmaktadır (Richani ve Gilchrist 2018). *ERE*G genin ekspresyon seviyesinde meydana gelen bu artış sağlıklı bir ovulasyonun gerçekleşmesi için önemlidir. Zira *ERE*G geni ovulasyonda ve kümülüs oosit hücrelerinin genişlemesinde düzenleyici olarak görev almaktadır (Liu ve ark. 2010). Yapılan çeşitli çalışmalarda ovaryum dokusunda bu genin ekspresyonunun gonadotropinlerce hızlı ancak geçici olarak tetiklendiği bildirilmiştir (Espey ve ark. 2002, Sekiguchi ve ark. 2004, Agca ve ark. 2013, Assidi ve ark. 2010). Yapılan bu çalışmada süperovulasyon uygulamasının bu genin ekspresyon seviyesine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgu eksojen gonadotropin uygulamasının folikülogenezi moleküler olarak olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda melatoninin doz bağımlı olarak *ERE*G geni üzerinde etkili olmadığı bildirilse de bazı çalışmalarda melatoninin *ERE*G geninin ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (Contreras-Navarro ve ark. 2020, Yang ve ark. 2021). Benzer olarak yapılan bu çalışmada 20 mg/kg dozda uygulanan melatoninin ovaryum dokusunda *ERE*G gen ekspresyon seviyesinin yaklaşık 5 kat anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir ($P<0,001$). Elde edilen bu bulgu melatonin bu gen üzerinden ovulasyon ve oosit sağlığı için olumlu etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan korelasyon analizlerinde serum MDA seviyesi ile *Bcl-2* ve *NRF2* genleri arasında pozitif korelasyon bulunması (sırasıyla $P<0,001$; $P<0,01$), serumda meydana gelen

hasarın apoptoz ve antioksidan mekanizmaları tetiklediğini göstermektedir. Serum MDA miktarının *Bcl-2* ve *NRF2* genleriyle korelasyonuna dair net bir çalışma bulunmamasına rağmen yapılan çalışmalar ROT miktarının artışına bağlı olarak bu genlerin ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmiştir (Abdelrahman ve Abdel-Rahman 2019, Qiao ve ark. 2021). Bu bulguların yanı sıra bazı çalışmalar serum MDA seviyesindeki artışın *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyesini azalttığını belirtmiştir (Luo ve ark. 2015, Faawzy ve ark. 2021). Süperovulasyon durumunda serum MDA seviyesi ile *Bcl-2* geni arasındaki ilişkiye dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ancak gonadotropinlerin (FSH ve LH) oositin hayatta kalma mekanizmasını tetiklediği bilinmektedir. Bazı çalışmalarda, eksojen gonadotropinlerin ovaryumda *Bcl-2* genini indüklediği bildirilmiştir (Tilly ve ark. 1999, Hsu ve Hsueh 2000, Parborell ve ark. 2008). Eksojen gonadotropin uygulamasının yapıldığı bu çalışmada serum MDA miktarıyla *Bcl-2* geninin pozitif korelasyon göstermesi sistemik bir hasarın ovaryum dokusunda *Bcl-2* genini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu bulgunun desteklenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Serum MDA seviyesinin *NRF2* geni ile olan pozitif korelasyonu da mevcut literatür ile uyum göstermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ovaryumda meydana gelen hasar durumunda bu genin ekspresyon seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Liu ve ark. 2018, Chen ve ark. 2022, Sun ve ark. 2020, Taheri ve ark. 2021, Fan ve ark. 2022).

IL-1 β geni ile *Bcl-2* ve *OSGIN1* genleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). *IL-1 β* geni ile *Bcl-2* ve *OSGIN1* genleri arasındaki ilişki hakkında bilinenler sınırlıdır. Ancak ovaryum dokusunda meydana gelen inflamasyon durumunda *IL-1 β* geninin ekspresyonunun arttığı ve apoptoz mekanizmasında görev alan *OSGIN1* geninin ekspresyon seviyesinde etkilendiği bilinmektedir. Bu çalışmanın korelasyon sonuçları genlerin temel işlevleri bakımından literatürü desteklemektedir. Rodentlerde *IL-1 β* 'nin ovulasyonda, apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Brännström ve ark. 2004, Yang ve ark. 2018, Silva ve ark. 2020). *Bcl-2* geni ise granüloza hücrelerde foliküler artreziyi önleyerek ovulasyona katkı sağlamaktadır (Yang ve ark. 2018). Yang ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada primer oosit eksikliği olan hastalarda bu iki genin ekspresyonunun hasta grupta birlikte azaldığını bildirmişlerdir. *IL-1 β* geni ile *OSGIN1* ve *Bcl-2* genlerinin birbirlerine etkilerini belirlemek amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bcl-2 geni ile *NRF2* ve *BMP15* genleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $P<0,01$; $P<0,05$). *Bcl-2* ve *NRF2* genlerinin korelasyon göstermesi bu genlerin hücrenin hayatta kalmasında birbirlerini pozitif yönde etkilediklerini göstermektedir. Anti-apoptotik gen olan *Bcl-2* ve hücrenin antioksidan mekanizmasında merkezi rol oynayan *NRF2* geninin korelasyonu yapılan literatür çalışmaları ile uyumludur (Guo ve ark. 2021, Jiang ve ark. 2021, Sun ve ark. 2020). *BMP15* geni apoptoz mekanizmasını önleyerek ovaryum sağlığını ve oosit gelişimini olumlu etkilemektedir (Liu ve ark. 2021). Anti-apoptotik etki gösteren *Bcl-2* geni ile *BMP15* geninin korelasyonu ise ovaryum sağlığında bu genlerin birlikte hareket ederek folikülogenez desteklemede görev aldıklarını göstermektedir. Bu genler arasındaki korelasyon mevcut literatür ile uyumludur.

NRF2 geni ile *BMP15* ve *OSGIN1* genleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). *NRF2* geni ile *BMP15* geninin korelasyonunu belirten bir çalışma olmamasına karşılık folikülogenez sırasında oosit sağlığını koruma da her iki geninin ekspresyon seviyesinin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Yoon ve ark. 2015, Kim ve ark. 2020). Hücrede oksidatif stresin artması *NRF2* sinyal yolağı aracılığıyla *OSGIN1* geninin tetiklenmesine neden olmaktadır (Tsai ve ark. 2017). Ancak bu durum dokuya bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Yan ve ark. 2014, Khoi ve ark. 2022). Komuczki ve ark. (2022) ovaryumda ROT miktarının artışına paralel olarak *NRF2* sinyal yolağının aktive olduğunu buna bağlı olarak da *OSGIN1* geninin ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Korelasyon sonuçları literatür ile uyum göstermesine karşılık ovaryum sağlığı ve folikülogenezde bu genlerin birbirleriyle ilişkilerini belirlemek amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

COX-2 geni ile *PGR* ve *EREG* genleri arasında korelasyon olması ($P<0,001$) folikülogenez ve ovulasyonda bu genlerin birlikte hareket ettiklerini göstermektedir. Ovaryum dokusunda ROT miktarının ve prostaglandin sentezinin artması *COX-2* genini indüklemektedir. Bu genin ekspresyonunun artışı *PGR* genini tetikleyerek ovaryum dokusundaki ROT konsantrasyonunun azalmasına yardımcı olmaktadır (Park ve ark. 2020). Yapılan çalışmalarda ovaryum dokuda *COX-2* ve *PGR* genlerinin ekspresyonun birlikte arttığı bildirilmiştir (Sekiguchi ve ark. 2004, Park ve ark. 2004, Shimada ve ark. 2006). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular *PGE2*'nin artışıyla indüklenen *COX-2* geni ile luteinizasyon şekillenmesinde görev alan *PGR* genlerinin pozitif korelasyon gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Park ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada ovaryum dokusunda *COX-2*

geninin EGF ailesine mensup genlerin ekspresyon seviyesi tetikleyebileceğini bildirmişlerdir. *COX-2* geninin ovaryum dokuda ve folikülogenezde aktif rol alan *EREG* geninin ekspresyonunu tetiklemesi ise ovulasyonun tetiklenmesinde birlikte rol aldığını göstermektedir. Zira *COX-2* geni her ne kadar pro-inflamatuar gen olarak bilinse de ovaryum dokusunda ovaryum sağlığı ve folikül gelişiminde önemli rol aldığı yapılan bu tez çalışmasında ortaya konmuştur. Ovaryum dokusunda süperovulasyon uygulamasıyla birlikte alınan melatoninin bu genlerin ekspresyon seviyesine etkisi ve genler arasındaki ilişkilerin araştırılacağı ek çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ

Yapılan bu çalışmada süperovulasyon uygulamasının ovaryum sağlığına etkileri hem moleküler hem de biyokimyasal açıdan araştırılmıştır. Elde edilen bu bulguda tek seferde ve 40 µg dozda GnRH, 300 IU/kg dozda PMSG ve 300 IU/kg dozda hCG hormonları ile yapılan süperovulasyonun ovaryum dokuda hasara neden olmadığını ve eksojen gonadotropinlerin folikülogenezi desteklediğini göstermektedir. Ancak süperovulasyon uygulamasının ovaryum sağlığını ve folikülogenezi moleküler düzeyde olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir.

İnflamasyonda ve prostaglandin sentezinde görev alan *COX-2* gen ekspresyon seviyesinin deneme gruplarında artması (So, SoM5, SoM20) eksojen olarak uygulanan gonadotropinlerin folikülogenezi desteklediği buna bağlı olarak da prostaglandin sentezini arttırdığını düşündürmektedir. Prostaglandin sentezine yanıt olarak artan *COX-2* geninin ekspresyon seviyesinin SoM20 grubunda yaklaşık 92 katlık bir artış göstermesinin nedeni ise melatoninin bu gene etkisinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Ovaryum dokusunda *EREG* ve *PGR* genlerinin ekspresyon seviyelerinin süperovulasyonla birlikte uygulanan 20 mg/kg melatonin dozunda anlamlı olarak artış göstermesi melatonin ovaryum ve folikülogenez sağlığına doz bağımlı olarak olumlu etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmada yapılan korelasyon analizlerinin sonucunda serum MDA seviyeleri ile *Bcl-2* ve *NRF2* genleri arasında pozitif korelasyon olması serum MDA seviyesinde meydana gelecek bir artışın ovaryum dokuda antioksidan sistemi ve apoptoz mekanizmasını tetikleyebildiğini ortaya koymaktadır. Bu durum serum MDA seviyesine bakarak ovaryum dokuda bu genler ile ilgili fikir sahibi olunabileceğini düşündürmektedir. Ovaryumda *COX-2* geni ile *PGR* ve *EREG* genleri arasında pozitif korelasyon olması bu genin ovaryum sağlığı ve folikülogenezde aktif rol aldığını göstermektedir. *IL-1β* geni ile *Bcl-2* ve *OSGIN1* geni arasında pozitif korelasyon olması ovaryumda meydana gelen bir hasar durumunda apoptoz mekanizmasının tetikleyebileceğini akla getirmektedir. *Bcl-2* geni ile *NRF2* ve *BMP15* geni arasında pozitif korelasyon olması ise ovaryum dokuda *Bcl-2* aktivitesi ile *NRF2* ve *BMP15* genlerinin ekspresyonunun etkilenebileceğini göstermektedir. Bu bulgu ovaryum dokusunda ROT veya oksidatif stres durumunda *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyesindeki artışın

ovaryum sağlığını doğrudan etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu bulgunun doğrulanmasında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Folikülogenez ve ovulasyonda merkezi rol alan *PGR* geni ile *EREG* geni arasında pozitif korelasyon olması ovaryum sağlığı için bu genlerin birbirlerini pozitif olarak uyardığını göstermektedir.

Sonuç olarak süperovulasyonla birlikte 20 mg/kg dozda melatonin uygulamasının ovaryum sağlığını koruyarak folikülogenezi destekleyebileceği değerlendirilmiştir. Ancak tekrarlanan süperovulasyon uygulamasıyla birlikte melatonin enjeksiyonunun ovaryum dokusuna etkilerini belirlemek için yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.



7. KAYNAKLAR

1. **Abd-Allah AR, El-Sayed ESM, Abdel-Wahab MH, Hamada FM.** Effect of melatonin on estrogen and progesterone receptors in relation to uterine contraction in rats. *Pharmacological research*, **2003**, 47(4), 349-354.
2. **Abdelrahman RS, Abdel-Rahman N.** Dimethyl fumarate ameliorates acetaminophen-induced hepatic injury in mice dependent of Nrf-2/HO-1 pathway. *Life sciences*, **2019**, 217, 251-260.
3. **Abir R, Fisch B.** Invited commentary: a single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to controlled ovarian hyperstimulation. *Reproductive BioMedicine Online*, **2011**, 23(1), 77-80.
4. **Abir R, Fisch B, Johnson MH.** BMP15, fertility and the ovary. *Reproductive BioMedicine Online*, **2014**, 29(5), 525-526.
5. **Abreu AP, Kaiser UB.** *Gonadotrophin Hormones*. In *The Pituitary*, Academic Press, **2022**, pp. 209-255).
6. **Abbott S, Fairbanks DJ.** Experiments on plant hybrids by Gregor Mendel. *Genetics*, **2016**, 204(2), 407-422.
7. **Acuña-Castroviejo D, Noguiera-Navarro MT, Reiter RJ, Escames G.** Melatonin actions in the heart; more than a hormone. *Melatonin Research*, **2018**, 1(1), 21-26.
8. **Adams G.** A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, **2020**, 42(3), 48-53.
9. **Adamczak R, Ukleja-Sokolowska N, Lis K, Dubiel M.** Function of follicular cytokines: roles played during maturation, development and implantation of embryo. *Medicina*, **2021**, 57(11), 1251.
10. **Adhikari D, Liu K.** Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews*, **2009**, 30(5), 438-464.
11. **Adir M, Combelles CM, Mansur A, Ophir L, Hourvitz A, Orvieto R, ... Machtinger R.** Dibutyl phthalate impairs steroidogenesis and a subset of LH-dependent genes in cultured human mural granulosa cell in vitro. *Reproductive toxicology*, **2017**, 69, 13-18.
12. **Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R.** Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*, **2008**, 10(8), 1375-1404.
13. **Agca C, Yakan A, Agca Y.** Estrus synchronization and ovarian hyper-stimulation treatments have negligible effects on cumulus oocyte complex gene expression whereas induction of ovulation causes major expression changes. *Molecular reproduction and development*, **2013**, 80(2), 102-117.
14. **Aguirre C, Jayes FCL, Veldhuis JD.** Luteinizing hormone (LH) drives diverse intracellular calcium second messenger signals in isolated porcine ovarian thecal cells: preferential recruitment of intracellular Ca²⁺ oscillatory cells by higher concentrations of LH. *Endocrinology*, **2000**, 141(6), 2220-2228.
15. **Ajayi AF, Akhigbe RE.** Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility research and practice*, **2020**, 6(1), 1-15.
16. **Akison LK, Boden MJ, Kennaway DJ, Russell DL, Robker RL.** Progesterone receptor-dependent regulation of genes in the oviducts of female mice. *Physiological Genomics*, **2014**, 46(16), 583-592.
17. **Akison LK, Robker RL.** The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, **2012**, 47, 288-296.
18. **Korkmaz Ağaoğlu Ö.** *Veteriner Genetik*. Hücre ve Hücre Bölünmeleri. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Ankara, **2021**, s.11-28.
19. **Alaçam E, Alan M, Apaydın M, Bekyürek T, Çolak A, Deveci H, Dinç A, Horoz H, Kalkan C, Kılıçarslan R, Öcal H, Salmanoğlu R, Şenünver A, Tekeli T, Ünal F.** *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*. 6. Baskı, Medisan yayınevi Tıbbi Alet İlaç Kimyasal Mad. Gıda Sanayi İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti. Ulus-Ankara. ISBN: 975-7774-37-5. **2007**, s.1-378.
20. **Al-Shahat A, Hulail MA, Soliman NM, Khamis T, Fericean LM, Arisha AH, Moawad RS.** Melatonin mitigates cisplatin-induced ovarian dysfunction via altering steroidogenesis, inflammation, apoptosis, oxidative stress, and PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK signaling pathway in female rats. *Pharmaceutics*, **2022**, 14(12), 2769.
21. **Albert FW, Kruglyak L.** The role of regulatory variation in complex traits and disease. *Nature Reviews Genetics*, **2015**, 16(4), 197-212.
22. **Armstrong DT.** Prostaglandins and follicular functions. *Reproduction*, **1981**, 62(1), 283-291.

23. **Anadón A, Ares I, Martínez-Larrañaga MR, Martínez, MA.** Melatonin: a safe nutraceutical and clinical agent. In *Nutraceuticals Academic Press*. 2021, pp. 537-553.
24. **Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA.** Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **2002**, 67(1), 161-169.
25. **Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA.** Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, **2004**, 145(5), 2551-2560.
26. **Arroyo A, Kim B, Yeh J.** Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact. *Reproductive Sciences*, **2020**, 27, 1223-1252.
27. **Aslan M, Senturk GE, Akkaya H, Sahin S, Yilmaz B.** The effect of oxytocin and Kisspeptin-10 in ovary and uterus of ischemia-reperfusion injured rats. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, **2017**, 56(4), 456-462.
28. **Assidi M, Dieleman SJ, Sirard, M. A.** Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction*, **2010**, 140(6), 835.
29. **Auta T, Hassan AT.** Alteration in oestrus cycle and implantation in *Mus musculus* administered aqueous wood ash extract of *Azadirachta indica* (neem). *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **2016**, 5(3), 188-192.
30. **Averill-Bates D.** Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **2023**, 119573.
31. **Aydin M, Oktar S, Yonden Z, Ozturk OH, Yilmaz B.** Direct and indirect effects of kisspeptin on liver oxidant and antioxidant systems in young male rats. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, **2010**, 28(4), 293-299.
32. **Ayazoglu Demir E, Mentese A, Livaoglu A, Turkmen Alemdar N, Demir S.** Ameliorative effect of gallic acid on cisplatin-induced ovarian toxicity in rats. *Drug and chemical toxicology*, **2023**, 46(1), 97-103.
33. **Baird L, Yamamoto M.** *The Keap1-Nrf2 pathway: From mechanism to medical applications*. In *Oxidative Stress Academic Press*. **2020**, pp. 125-147.
34. **Bamdad S, Bamdad M, Khanlari M, Daneshbod Y, Khademi B.** Teratogenic effects of intravitreal injection of bevacizumab in a pregnant rat model. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, **2017**, 16(2), 670.
35. **Bandariyan E, Mogheiseh A, Ahmadi A.** The effect of lutein and *Urtica dioica* extract on in vitro production of embryo and oxidative status in polycystic ovary syndrome in a model of mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **2021**, 21, 1-11.
36. **Banerjee S, Cooney LG, Stanic AK.** Immune dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Immunohorizons*, **2023**, 7(5), 323-332.
37. **Banjara S, Suraweera CD, Hinds MG, Kvensakul M.** The Bcl-2 family: ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms. *Biomolecules*, **2020**, 10(1), 128.
38. **Barberino RS, Menezes VG, Ribeiro AE, Palheta Jr RC, Jiang X, Smitz JE, Matos MHT.** Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biology of reproduction*, **2017**, 96(6), 1244-1255.
39. **Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL.** *Reproductive development and function of the female reproductive system*. Ganong's review of medical physiology. 24th edition, McGraw Hill Education. **2009**.
40. **Basheer M, Rai S.** Melatonin vs. phytemelatonin: Therapeutic uses with special reference to polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Cogent Biology*, **2016**, 2(1), 1136257.
41. **Basini G, Grasselli F.** Role of Melatonin in Ovarian Function. *Animals*, **2024**, 14(4), 644.
42. **Bates GW, Bowling M.** Physiology of the female reproductive axis. *Periodontology 2000*, **2013**, 61(1), 89-102.
43. **Battle A, Mostafavi S, Zhu X, Potash JB, Weissman MM, McCormick C, ... Koller D.** Characterizing the genetic basis of transcriptome diversity through RNA-sequencing of 922 individuals. *Genome research*, **2014**, 24(1), 14-24.
44. **Bayraktar AU.** Sıçanlarda sisplatin ile oluşturulan nörotoksositeye melatoninin etkisi. Uzmanlık tezi, Hacettepe Üniversitesi tıp fakültesi fizyoloji anabilim dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2021**.
45. **Beckman DA, Feuston M.** Landmarks in the development of the female reproductive system. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **2003**, 68(2), 137-143.
46. **Belli M, Shimasaki S.** Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. *Vitamins and hormones*, **2018**, 107, 317-348.

47. **Belka C, Budach W.** Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *International journal of radiation Biology*, **2002**, 78(8), 643-658.
48. **Berisha B, Rodler D, Schams D, Sinowatz F, Pfaffl MW.** Prostaglandins in superovulation induced bovine follicles during the preovulatory period and early corpus luteum. *Frontiers in Endocrinology*, **2019**, 10, 467.
49. **Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE.** Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, **2014**, 94(2), 329-354.
50. **Bian X, Xie Q, Zhou Y, Wu H, Cui J, Jia L, Suo L.** Transcriptional changes of mouse ovary during follicle initial or cyclic recruitment mediated by extra hormone treatment. *Life Sciences*, **2021**, 264, 118654.
51. **Brennan MS.** The Nrf2 transcriptional target, OSGIN1, contributes to the cytoprotective properties of dimethyl fumarate. Doctoral dissertation, Boston University, Boston, **2014**.
52. **Brennan M S, Matos MF, Richter KE, Li B, Scannevin RH.** The NRF2 transcriptional target, OSGIN1, contributes to monomethyl fumarate-mediated cytoprotection in human astrocytes. *Scientific reports*, **2017**, 7(1), 1-15.
53. **Brännström M, Norman RJ, Seamark RF, Robertson SA.** Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biology of reproduction*, **1994**, 50(1), 88-94.
54. **Brannstrom M.** Potential role of cytokines in ovarian physiology: the case for interleukin-1. *The ovary*, **2004**.
55. **Bouali N, Francou B, Bouligand J, Lakhal B, Malek I, Kammoun M, ... Guiochon-Mantel A.** NOBOX is a strong autosomal candidate gene in Tunisian patients with primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics*, **2016**, 89(5), 608-613.
56. **Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU.** The family of the interleukin-1 receptors. *Immunological reviews*, **2018**, 281(1), 197-232.
57. **Buccitelli C, Selbach M.** mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, **2020**, 21(10), 630-644.
58. **Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA.** Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, **2012**, 7(4), e35538.
59. **Cahill CM, Rogers JT.** Interleukin (IL) 1 β induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/I κ B kinase α pathway targeting activator protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283(38), 25900-25912.
60. **Carroll RG.** *Elsevier's Integrated Physiology*: Elsevier's Integrated Physiology E-Book. Elsevier Health Sciences. **2006**.
61. **Caria S, Hinds MG, Kvensakul M.** Structural insight into an evolutionarily ancient programmed cell death regulator—the crystal structure of marine sponge BHP2 bound to LB-Bak-2. *Cell death & disease*, **2018**, 8(1), e2543-e2543.
62. **Castro MC, Massa ML, Arbeláez LG, Schinella G, Gagliardino JJ, Francini F.** Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life sciences*, **2015**, 137, 1-6.
63. **Cao Y, Zhao H, Wang Z, Zhang C, Bian Y, Liu X, ... Zhao Y.** Quercetin promotes in vitro maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell Death & Disease*, **2020**, 11(11), 965.
64. **Chao HT, Lee SY, Lee HM, Liao TL, Wei YH, Kao SH.** Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries. *Ann N Y Acad Sci*, **2005** May, 1042:148-56.
65. **Champlin AK, Dorr DL, Gates AH.** Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biology of reproduction*, **1973**, 8(4), 491-494.
66. **Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, et al.** Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochemical Journal*, **2002**, 365, 405–416.
67. **Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocrine reviews*, **2002**, 23(6), 787-823.
68. **Chaudhry H, Zhou J, Zhong YIN, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M.** Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo*, **2013**, 27(6), 669-684.
69. **Chao HT, Lee SY, Lee HM, Liao TL, Wei YH, Kao SH.** Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**, 1042(1), 148-156.

70. **Chen LY, Renn TY, Liao WC, Mai FD, Ho YJ, Hsiao G, ... Chang HM.** Melatonin successfully rescues hippocampal bioenergetics and improves cognitive function following drug intoxication by promoting NRF2 -ARE signaling activity. *Journal of Pineal Research*, **2017**, 63(2), e12417.
71. **Chen Y, Fan X, Ma K, Wang K, Tian C, Li M, Gong L.** Bushen cullan decoction ameliorates premature ovarian insufficiency by acting on the Nrf2/ARE signaling pathway to alleviate oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, **2022**, 13, 857932.
72. **Cheng LY, Sun TC, Liu XC, Yu H, Zhou SJ, Tian L, ... Liu BX.** Melatonin induction of HSP90 expression exerts cryoprotective effect on ovarian tissue. *Cryobiology*, **2021**, 98, 134-138.
73. **Cheon YP.** Regulation and 3 dimensional culture of tertiary follicle growth. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **2012**, 39(3), 95.
74. **Choi Y, Rosewell KL, Brännström M, Akin JW, Curry Jr TE, Jo M.** FOS, a critical downstream mediator of PGR and EGF signaling necessary for ovulatory prostaglandins in the human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2018**, 103(11), 4241-4252.
75. **Choi Y, Wilson K, Hannon PR, Rosewell KL, Brännström M, Akin JW, ... Jo M.** Coordinated regulation among progesterone, prostaglandins, and EGF-like factors in human ovulatory follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2017**, 102(6), 1971-1982.
76. **Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, Sutherland C, Cuadrado A, Hayes JD.** Nrf2 is controlled by two distinct b-TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, **2012**, 32(32), 3765–3781.
77. **Chung, C.** Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway. *The Bulletin of the American Society of Hospital Pharmacists*, **2018**, 75(13), 945-952.
78. **Cipolla-Neto J, Amaral FG, Soares Jr JM, Gallo CC, Furtado A, Cavaco JE, ... Quintela T.** The crosstalk between melatonin and sex steroid hormones. *Neuroendocrinology*, **2022**, 112(2), 115-129.
79. **Cocchia N, Corteggio A, Altamura G, Tafuri S, Rea S, Rosapane I, ... Ciani F.** The effects of superoxide dismutase addition to the transport medium on cumulus–oocyte complex apoptosis and IVF outcome in cats (*Felis catus*). *Reproductive Biology*, **2015**, 15(1), 56-64.
80. **Contreras-Navarro LE, Boeta M, Gonzalez-Lopez, R, Guerrero-Netro H, Diaw M.** Melatonin promotes equine cumulus-oocyte complex survival during in vitro maturation. *Reprod. Biol*, **2020**, 4, 16-30.
81. **Coelho LA, Gomes PR, Scialfa JH, Maganhin CC, Soares Jr JM, Amaral FG, ... Cipolla-Neto J.** Pineal melatonin deprivation alters the mRNA expression of melatonin and steroidogenic-related receptor genes in rat oviduct and uterus during the estrus stage of estrous cycle. *Melatonin Research*, **2022**, 5(1), 68-83.
82. **Crowe, M. A.** *Reproduction, events and management| estrous cycles: characteristics*. Encyclopedia of Dairy Sciences (Third edition), Academic Press, **2022**, pp: 948-953.
83. **Cui P, Yang C, Zhang K, Gao X, Luo L, Tian Y, ... Ding J.** Effect of estrogen on the expression of GnRH and kisspeptin in the hypothalamus of rats during puberty. *Theriogenology*, **2015**, 84(9), 1556-1564.
84. **Dalkıran S.** Laktasyondaki keçilerde lökosit sayı gen ekspresyon seviyesi ile plazma kalsiyum seviyesinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Hatay, **2017**.
85. **Das K, Phipps WR, Hensleigh HC, Tagatz GE.** Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation in vitro. *Fertility and sterility*, **1992**, 57(4), 895-901.
86. **De Los Reyes M, Palomino J, Araujo A, Flores J, Ramirez G, Parraguez VH, Aspee K.** Cyclooxygenase 2 messenger RNA levels in canine follicular cells: interrelationship with GDF-9, BMP-15, and progesterone. *Domestic animal endocrinology*, **2021**, 74, 106529.
87. **Derkach KV, Lebedev IA, Morina IY, Bakhtyukov AA, Pechalnova AS, Sorokoumov VN, ... Shpakov AO.** Comparison of Steroidogenic and Ovulation-Inducing Effects of Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor in Immature Female Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, 24(23), 16618.
88. **Devoto L, Fuentes A, Kohen P, Céspedes P, Palomino A, Pommer R, ... Strauss III JF.** The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and sterility*, **2009**, 92(3), 1067-1079.
89. **Di F, Liu J, Li S, Yao G, Hong Y, Chen ZJ, ... Du Y.** ATF4 contributes to ovulation via regulating COX2/PGE2 expression: a potential role of ATF4 in PCOS. *Frontiers in Endocrinology*, **2018**, 9, 669.
90. **Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L.** Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *The American Journal of Human Genetics*, **2004**, 75(1), 106-111.

91. **Diamond MP, DeCherney AH, Hill GA, Nero F, Wentz AC.** Response to repetitive cycles of ovulation induction in the same women. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*, **1987**, 4, 251-255.
92. **Diaz, F. J., Wigglesworth, K, Eppig JJ.** Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of cell science*, **2007**, 120(8), 1330-1340.
93. **Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, ... Trzaskos JM.** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, **1995**, 378(6555), 406-409.
94. **Ding J, Tan X, Song K, Ma W, Xiao J, Zhang M.** Effect of controlled ovarian hyperstimulation on puberty and estrus in mice offspring. *Reproduction*, **2017**, 154(4), 433-444.
95. **Doğruer G.** İneklerde endometritis tanısında klinik muayene, endometriyal sitoloji, biyopsi ve mikrobiyolojik muayene bulgularının karşılaştırılması. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, **2003**.
96. **Dokoochaki S, Ghareghani M, Ghanbari A, Farhadi N, Zibara K, Sadeghi H.** Corticosteroid therapy exacerbates the reduction of melatonin in multiple sclerosis. *Steroids*, **2017**, 128, 32-36.
97. **Downs SM.** Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biology of Reproduction*, **1989**, 41(2), 371-379.
98. **Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM.** The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular endocrinology*, **1998**, 12(12), 1809-1817.
99. **Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry Jr TE.** Ovulation: parallels with inflammatory processes. *Endocrine reviews*, **2019**, 40(2), 369-416.
100. **Ekambaram G, Kumar SKS, Joseph LD.** Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, **2017**, 11(1), AC05.
101. **Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.** Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Molecular and cellular endocrinology*, **2000**, 159(1-2), 1-5.
102. **Erickson GF.** Normal regulation of ovarian androgen production. *Semin Reprod Endocrinol*, **1993**, 11:307-312.
103. **Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C.** The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev*, **1985**, 6:371-399
104. **Erickson GF, Shimasaki S.** The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **2000**, 11(5), 193-198.
105. **Esterbauer H, Cheeseman KH.** [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* Vol. 186, Academic Press. **1990**, pp: 407-421.
106. **Espey LL.** Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of reproduction*, **1994**, 50(2), 233-238.
107. **Espey LL, Richards JS.** Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biology of reproduction*, **2002**, 67(6), 1662-1670.
108. **Ezzati M, Velaei K, Kheirjou R.** Melatonin and its mechanism of action in the female reproductive system and related malignancies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2021**, 476, 3177-3190.
109. **Ezzati M, Roshangar L, Rad JS, Karimian N.** Evaluating the effect of melatonin on HAS2, and PGR expression, as well as cumulus expansion, and fertility potential in mice. *Cell Journal (Yakhteh)*, **2018**, 20(1), 108.
110. **Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, ... Monniaux D.** Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2006**, 4(1), 1-12.
111. **Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS.** MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, **2009**, 324(5929), 938-941.
112. **Fan H, Wang S, Wang H, Sun M, Wu S, Bao W.** Melatonin ameliorates the toxicity induced by deoxynivalenol in murine ovary granulosa cells by antioxidative and anti-inflammatory effects. *Antioxidants*, **2021**, 10(7), 1045.
113. **Fan L, Guan F, Ma Y, Zhang Y, Li L, Sun Y, ... He M.** N-Acetylcysteine improves oocyte quality through modulating the Nrf2 signaling pathway to ameliorate oxidative stress caused by repeated controlled ovarian hyperstimulation. *Reproduction, Fertility and Development*, **2022**, 34(10), 736-750.
114. **Fang L, Chang HM, Cheng JC, Leung PC, Sun YP.** TGF- β 1 induces COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through Smad signaling pathways. *The Journal of Clinical*. **2014**.
115. **Feng X, Zhang Y, Li N, Zhang Y, Zheng Q, Sun M, ... Xu Z.** Melatonin in Reproductive Medicine: A Promising Therapeutic Target?. *Current Medicinal Chemistry*, **2023**, 30(27), 3090-3118.

116. **Flemming W.** Über die bildung von richtungsfiguren in saugethiereiern beim untergang graaf'scher follikel. *Arch Anat Ent Gesch*, **1885**, 221-244.
117. **Friberg PA, Larsson DJ, Billig H.** Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis. *Biology of reproduction*, **2009**, 80(6), 1160-1167.
118. **Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ.** Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy?. *International journal of colorectal disease*, **2000**, 15(3), 127-135.
119. **Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt J, Girault J.** Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **2001**, 280(1), E11-E22.
120. **Gann A.** Jacob and Monod: from operons to EvoDevo. *Current Biology*, **2010**, 20(17), R718-R723.
121. **Gava N, Clarke CL, Byth K, Arnett-Mansfield RL, deFazio A.** Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*, **2004**, 145(7), 3487-3494.
122. **Gelen V, Şengül E, Kükürt A.** An overview of effects on reproductive physiology of melatonin. *Melatonin-Recent Updates*. **2022**.
123. **Gervásio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sá MF, Rosa-e-Silva ACJDS.** The role of androgen hormones in early follicular development. *International Scholarly Research Notices*, **2014**.
124. **Gilbert I, Robert C, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA.** Impact of the LH surge on granulosa cell transcript levels as markers of oocyte developmental competence in cattle. *Reproduction*, **2012**, 143(6), 735.
125. **Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, ... Barberi I.** Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2001**, 53(10), 1393-1401.
126. **Goktepe O, Balcioglu E, Baran M, Cengiz O, Ceyhan A, Suna PA, ... Yay A.** Protective effects of melatonin on female rat ovary treated with nonylphenol. *Biotechnic & Histochemistry*, **2023**, 98(1), 13-19.
127. **Gong Y, Li-Ling J, Xiong D, Wei J, Zhong T, Tan H.** Age-related decline in the expression of GDF9 and BMP15 genes in follicle fluid and granulosa cells derived from poor ovarian responders. *Journal of Ovarian Research*, **2021**, 14, 1-10.
128. **Green DR, Llamby F.** Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2015**, 7(12), a006080.
129. **Grundberg E, Small KS, Hedman ÅK, Nica AC, Buil A, Keildson S, ... Multiple Tissue Human Expression Resource (MuTHER) Consortium.** Mapping cis-and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. *Nature genetics*, **2012**, 44(10), 1084-1089.
130. **Guo S, Yang J, Qin J, Qazi IH, Pan B, Zang S, ... Zhou G.** Melatonin promotes in vitro maturation of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes, potentially by reducing oxidative stress through the NRF2 pathway. *Animals*, **2021**, 11(8), 2324.
131. **Guo YM, Sun TC, Wang HP, Chen X.** Research progress of melatonin (MT) in improving ovarian function: A review of the current status. *Aging (Albany NY)*, **2021**, 13(13): 17930.
132. **Guo R, Zheng Y, Yang J, Zheng N.** Association of TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *BMC genetics*, **2015**, 16, 1-13.
133. **Gurunathan S, Kang MH, Kim JH.** Role and therapeutic potential of melatonin in the central nervous system and cancers. *Cancers*, **2020**, 12(6), 1567.
134. **Güvenç M, Cellat M, Özkan H, Tekeli İO, Uyar A, Gökçek İ, ... Yakan A.** Protective effects of tyrosol against DSS-induced ulcerative colitis in rats. *Inflammation*, **2019**, 42(5), 1680-1691.
135. **Hafez, ESE, Hafez, B.** Reproduction in farm animals. John Wiley & Sons. Blackwell Publishing. USA, **2013**, pp:1-490.
136. **Hakim BA, Tyagi V, Agnihotri SK, Nath A, Agrawal AK, Jain A, ... Sachdev M.** Electroporation of mouse follicles, oocytes and embryos without manipulating zona pellucida. *Journal of Developmental Biology*, **2021**, 9(2), 13.
137. **Hall JE.** *Neuroendocrine control of the menstrual cycle*. In Yen and Jaffe's reproductive endocrinology Elsevier. **2019**, pp. 149-166.
138. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA. **2015**.
139. **Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA.** A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online*, **2011**, 23(1), 97-104.
140. **Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP.** Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, 38(3), 313-316.

141. Harpsøe NG, Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *European journal of clinical pharmacology*, 2015, 71, 901-909.
142. Hayes EC, Rock, JA. COX-2 inhibitors and their role in gynecology. *Obstetrical & gynecological survey*, 2002, 57(11), 768-780.
143. Heape, W. Memoirs: The" Sexual Season" of Mammals and the Relation of the" Pro-œstrum" to Menstruation. *Journal of Cell Science*, 1900, 2(173), 1-70.
144. Hertrampf T, Schmidt S, Laudénbach-Leschowsky U, Seibel J, Diel P. Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. *Molecular and cellular endocrinology*, 2005, 243(1-2), 51-57.
145. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Molecular and cellular endocrinology*, 1994, 100(1-2), 51-54.
146. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. International review of cytology, 1991, 124, 43-101.
147. Hofker MH, Fu J, Wijmenga, C. The genome revolution and its role in understanding complex diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2014, 1842(10), 1889-1895.
148. Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function. *Molecular and cellular endocrinology*, 2000, 161(1-2), 25-30.
149. Huang DC, Strasser A. BH3-only proteins—essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 2000, 103(6), 839-842.
150. Hu J, Yao H, Gan F, Tokarski A, Wang Y. Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function. 2012.
151. Hurwitz JM, Jindal S, Greenseid K, Berger D, Brooks A, Santoro N, Pal L. Reproductive aging is associated with altered gene expression in human luteinized granulosa cells. *Reproductive sciences*, 2010, 17, 56-67.
152. Huynh H, Ng CY, Ong CK, Lim KB, Chan TM. Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland. *Endocrinology*, 2001, 142(8), 3607-3615.
153. Ismail PM, Li J, DeMayo FJ, O'Malley BW, Lydon JP. A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. *Molecular endocrinology*, 2002, 16(11), 2475-2489.
154. Isobe T, Okuyama T, Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Hanada K. Epiregulin: A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(13), 7495-7500.
155. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, ... Nabeshima YI. An NRF2 /small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications*, 1997, 236(2), 313-322.
156. İsgüder ÇK, Uysal M, Can ÖK, Pektaş MK, Arici A, Unsal V. Protective effects of apocynin and melatonin on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 2021, 48(1), 98-104.
157. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 1961, 3(3), 318-356.
158. Jahanbakhsh-Asl E, Salehi M, Ghaffari-Novin M, Kato Y. Superovulation affects the gene expression patterns of mice oocytes and preimplantation embryos produced by different assisted reproductive technologies. *Int. J. Women's Health Reprod. Sci.*, 2018, 6, 444-451.
159. Jamilian M, Foroozanfard F, Mirhosseini N, Kavossian E, Aghadavod E, Bahmani F, ... Asemi Z. Effects of melatonin supplementation on hormonal, inflammatory, genetic, and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome. *Frontiers in endocrinology*, 2019, 10, 273.
160. Jang H, Hong K, Choi Y. Melatonin and fertoprotective adjuvants: prevention against premature ovarian failure during chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(6), 1221.
161. Jiang X, Xing X, Zhang Y, Zhang C, Wu Y, Chen Y, ... Su J. Lead exposure activates the NRF2 /Keap1 pathway, aggravates oxidative stress, and induces reproductive damage in female mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 207, 111231.
162. Kala M, Shaikh MV, Nivsarkar M. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive medicine and biology*, 2017, 16(1), 28-35.
163. Kalantaridou SN, Makriganakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Reproductive functions of corticotropin-releasing hormone. Research and potential clinical utility of antalarmins (CRH receptor type 1 antagonists). *American Journal of Reproductive Immunology*, 2004, 51(4), 269-274.

164. **Kallen A, Polotsky AJ, Johnson J.** Untapped reserves: controlling primordial follicle growth activation. *Trends in molecular medicine*, **2018**, 24(3), 319-331.
165. **Kalthur G, Salian SR, Nair R, Mathew J, Adiga SK, Kalthur SG, ... Hande MP.** Distribution pattern of cytoplasmic organelles, spindle integrity, oxidative stress, octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) expression and developmental potential of oocytes following multiple superovulation. *Reproduction, Fertility and Development*, **2016**, 28(12), 2027-2038.
166. **Kanabekova P, Al-Awadi AM, Bauyrzhanova Z, Tahtouh T, Sarraz S, Almawi, WY.** Genetic variation in progesterone receptor gene and ovarian cancer risk: A case control study. *Gene*, **2022**, 820, 146288.
167. **Kandemir YB, Aydin C, Gorgisen G.** The effects of melatonin on oxidative stress and prevention of primordial follicle loss via activation of mTOR pathway in the rat ovary. *Cellular and Molecular Biology*, **2017**, 63(2), 100-106.
168. **Karasahin T, Alkan H, Satilmis F, Dursun S, Ozturk C, Bulut G. ... Erdem, H.** Relationship between total antioxidant/oxidant status, and oxidative stress index and superovulation response in donor cows. *Livestock Science*. **2021**, 244, 104340.
169. **Kasahara T, Abe K, Mekada K, Yoshiki A, Kato, T.** Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2010**, 107(14), 6412-6417.
170. **Kathy M, Lee Y, Safar A, Laws MJ, Meling DD, Thompson LM, ... Flaws JA.** Prenatal and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls alter follicle numbers, gene expression, and a proliferation marker in the rat ovary. *Reproductive Toxicology*, **2023**, 120, 108427.
171. **Kehinde BA, Abolhassani F, Yazdekhesti H, Abbasi N, Heydari L, Daneshi E, ... Abbasi M.** The effects of unilateral varicose ovarian vein on antioxidant capacity and oocyte quality in rat ovary. *Iranian journal of basic medical sciences*, **2016**, 19(8), 863.
172. **Kennaway DJA** critical review of melatonin assays: Past and present. *Journal of pineal research*, **2019**, 67(1), e12572.
173. **Kennaway DJ, Voultsios A, Varcoc TJ, Moyer RW.** Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **2002**, 282(2), R358-R365.
174. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **1972**, 26(4), 239-257.
175. **Khajouei A, Hosseini E, Abdizadeh T, Kian M, Ghasemi S.** Beneficial effects of minocycline on the ovary of polycystic ovary syndrome mouse model: molecular docking analysis and evaluation of TNF- α , TNFR2, TLR-4 gene expression. *Journal of Reproductive Immunology*, **2021**, 144, 103289.
176. **Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M.** Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, **2009**, 3(1), 73-80.
177. **Khoi CS, Xiao CQ, Hung KY, Lin TY, Chiang CK.** Oxidative Stress-Induced Growth Inhibitor (OSGIN1), a Target of X-Box-Binding Protein 1, Protects Palmitic Acid-Induced Vascular Lipotoxicity through Maintaining Autophagy. *Biomedicines*, **2022**, 10(5), 992.
178. **Kim EH, Kim GA., Taweechaipaisankul A, Lee SH, Qasim M, Ahn C, Lee BC.** Melatonin enhances porcine embryo development via the NRF2 /ARE signaling pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*, **2019**, 63(3), 175-185.
179. **Kim EH, Ridlo MR, Lee BC, Kim GA.** Melatonin-Nrf2 signaling activates peroxisomal activities in porcine cumulus cell-oocyte complexes. *Antioxidants*, **2020**, 9(11), 1080.
180. **Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK.** Control of ovulation in mice by progesterone receptor-regulated gene networks. *Molecular human reproduction*, **2009**, 15(12), 821-828.
181. **Kim MR, Tilly JL.** Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **2004**, 1644(2-3), 205-210.
182. **Knight PG, Glistler C.** Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, **2001**, 121(4), 503-512.
183. **Koch, L.** Adding another dimension to gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, **2015**, 16(10), 563-563.
184. **Kokabiyan Z, Yaghmaei P, Jameie SB, Hajebrahimi Z.** Effect of eugenol on lipid profile, oxidative stress, sex hormone, liver injury, ovarian failure, and expression of COX-2 and PPAR- α genes in a rat model of diabetes. *Molecular Biology Reports*, **2023**, 50(4), 3669-3679.
185. **Komuczki D, Stadermann A, Bentele M, Unsoeld A, Grillari J, Mueller MM, Paul A, Fischer S.** High cysteine concentrations in cell culture media lead to oxidative stress and reduced bioprocess performance of recombinant CHO cells. *Biotechnology Journal*, **2022**, 17(11), 2200029.

186. **Krinke, GJ.** The laboratory rat. Elsevier. Academic Press. USA, **2000**, pp: 10-171
187. **Kumar R, Alwani M, Kosta S, Kaur R, Agarwal S.** BMP15 and GDF9 gene mutations in premature ovarian failure. *Journal of reproduction & infertility*, **2017**, 18(1), 185.
188. **Kumari N.** *Gonadotropins: In Specific Context To The Mare Placental Gonadotropins*. BFC Publications. **2023**.
189. **Kvansakul M, Hinds MG.** The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. *Apoptosis*, **2015**, 20, 136-150.
190. **Laissue P.** The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2018**, 460, 170-180.
191. **Langenbach R, Morham SG, Tianio HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, ... Smithies O.** Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*, **1995**, 83(3), 483-492.
192. **Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR, 't Hoen PA, Monlong J, Rivas MA., ... Dermitzakis ET.** Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature*, **2013**, 501(7468), 506-511.
193. **Lau IF, Saksena SK, Chang MC.** Prostaglandins F and ovulation in mice. *Reproduction*, **1974**, 40(2), 467-469.
194. **Lee J, Kosaras B, Signore SJ, Cormier K, McKee A, Ratan RR, et al.** Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function improves neuropathology in Huntington's disease mice. *Acta Neuropathologica*, **2010**, 121(4), 487-498.
195. **Lee M, Ahn JI, Lee AR, Ko DW, Yang WS, Lee G, ... Lim JM.** Adverse effect of superovulation treatment on maturation, function and ultrastructural integrity of murine oocytes. *Molecules and cells*, **2017**, 40(8), 558-566.
196. **Legge M, Sellens MH.** Optimization of superovulation in the reproductively mature mouse. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **1994**, 11, 312-318.
197. **Leibowitz B, Yu J.** Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer biology & therapy*, **2010**, 9(6), 417-422.
198. **Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the american chemical society*, **1958**, 80(10), 2587-2587.
199. **Lester G, Bonner DM.** The occurrence of β -galactosidase in escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **1952**, 63(6), 759-769.
200. **Leung PC, Steele GL.** Intracellular signaling in the gonads. *Endocrine reviews*, **1992**, 13(3), 476-498.
201. **Lliberos C, Liew SH, Zareie P, La Gruta NL, Mansell A, Hutt K.** Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice. *Scientific reports*, **2021**, 11(1), 278.
202. **Li H, Chian RC.** Mitochondrial dysfunction and age-related oocyte quality. *Reproductive and Developmental Medicine*, **2017**, 1(01), 45-54.
203. **Li H, Chian RC.** Follicular development and oocyte growth. *Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes: Natural and Mild Approaches to Clinical Infertility Treatment*, **2017**, 37-57.
204. **Li M, Han J, Yang N, Li X, Wu X.** Transcriptome profiling reveals superovulation with the gonadotropin-releasing hormone agonist trigger impaired embryo implantation in mice. *Frontiers in Endocrinology*, **2024**, 15, 1354435.
205. **Li R, Chen W, Yanes R, Lee S, Berliner JA.** OKL38 is an oxidative stress response gene stimulated by oxidized phospholipids. *Journal of lipid research*, **2007**, 48(3), 709-715.
206. **Li R, Li E, Kamili G, Ou S, Yang D.** Effect of resveratrol on superovulation in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2022**, 146, 112565.
207. **Li X, Zhu Y, Zhao T, Zhang X, Qian H, Wang J, ... Ye L.** Role of COX-2/PGE2 signaling pathway in the apoptosis of rat ovarian granulosa cells induced by MEHP. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2023**, 254, 114717.
208. **Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK.** Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, **1997**, 91(2), 197-208.
209. **Liu B, Wang JL, Wang XM, Zhang C, Dai JG, Huang XM, Gao JM.** Reparative effects of lycium barbarum polysaccharide on mouse ovarian injuries induced by repeated superovulation. *Theriogenology*, **2020**, 145, 115-125.
210. **Liu MN, Zhang K, Xu TM.** The role of BMP15 and GDF9 in the pathogenesis of primary ovarian insufficiency. *Human Fertility*, **2021**, 24(5), 325-332.
211. **Liu T, Qu J, Tian M, Yang R, Song X, Li R, ... Qiao J.** Lipid metabolic process involved in oocyte maturation during folliculogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2022**, 10, 806890.

212. **Liu Y, Liu H, Li Z, Fan H, Yan X, Liu X, ... Wei X.** The release of peripheral immune inflammatory cytokines promote an inflammatory cascade in PCOS patients via altering the follicular microenvironment. *Frontiers in immunology*, **2021**, 12, 685724.
213. **Liu Z, Fan HY, Wang Y, Richards JS.** Targeted Disruption of Mapk14 (p38MAPK α) in Granulosa Cells and Cumulus Cells Causes Cell-Specific Changes in Gene Expression Profiles that Rescue COC Expansion and Maintain Fertility. *Molecular endocrinology*, **2010**, 24(9), 1794-1804.
214. **Liu X, Lin X, Zhang S, Guo C, Li J, Mi Y, Zhang C.** Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Aging (Albany NY)*, **2018**, 10(8), 2016.
215. **Lister AL, Van Der Kraak GJ.** Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **2009**, 76(11), 1064-1075.
216. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, **2001**, 25(4), 402-408.
217. **Lonergan P, Sánchez JM.** Gamete and embryo technology: multiple ovulation and embryo transfer. **2022**.
218. **Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, ... Galli F.** Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB Journal*, **2010**, 24(10), 3603-3624.
219. **Luderer U.** Ovarian toxicity from reactive oxygen species. *Vitamins & hormones*, **2014**, 94, 99-127.
220. **Lu QJ, Li JY, Lin HX, Cai YS, Liu CS, Fu LP, ... Yuan LX.** Danggui Niantong granules ameliorate rheumatoid arthritis by regulating intestinal flora and promoting mitochondrial apoptosis. *Pharmaceutical Biology*, **2022**, 60(1), 1606-1615.
221. **Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, ... O'Malley BW.** Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & development*, **1995**, 9(18), 2266-2278.
222. **Lv T, Cao B, Qin J, Wei Y, Pan B, Ye J, Zhou G.** Melatonin promotes parthenogenetic development of vitrified-warmed mouse MII oocytes, potentially by reducing oxidative stress through SIRT1. *Theriogenology*. **2023**.
223. **Ma Y, Zhao Z, Hao G, Cui N, Fan Y, Cao Y, ... Gao B.** Effects of multicycle gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols on oxidative stress of follicular fluid and ovarian granulosa cells. *Human Cell*, **2021**, 34(5), 1324-1334.
224. **Maher J, Yamamoto M.** The rise of antioxidant signaling—the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicology and applied pharmacology*, **2010**, 244(1), 4-15.
225. **Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP.** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, **2002**, 62, 609-614.
226. **Margulis S, Abir R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B.** Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women. *Fertility and sterility*, **2009**, 92(5), 1666-1673.
227. **Marshall KL, Rivera RM.** The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo. *Molecular reproduction and development*, **2018**, 85(2), 90-105.
228. **Masters A, Pandi-Perumal SR, Seixas A, Girardin JL, McFarlane SI.** Melatonin, the hormone of darkness: from sleep promotion to ebola treatment. *Brain disorders & therapy*, **2014**, 4(1).
229. **Martinvalet D.** Mitochondrial entry of cytotoxic proteases: a new insight into the granzyme B cell death pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2019**, 2019(1), 9165214.
230. **McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA.** Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **2012**, (67), e4389.
231. **Mescher LA.** Junqueira's basic histology: text and atlas. **2013**.
232. **Menchaca, A.** Assisted Reproductive Technologies (ART) and genome editing to support a sustainable livestock. *Animal Reproduction*, **2023**, 20(2), e20230074.
233. **Meserve EE, Crum CP.** *Benign conditions of the ovary*. In Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology Elsevier. **2018**, pp. 761-799.
234. **Michurina SV, Kolesnikov SI, Ishchenko IY, Bochkareva AL, Arkhipov SA.** Effect of melatonin on expression of apoptosis regulator proteins Bcl-2 and Bad in ovarian follicular apparatus after high temperature exposure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **2021**, 170, 598-603.
235. **Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, ... Inoue M.** Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**, 49(4), 674-681.
236. **Mojaverrostami S, Asghari N, Khamisabadi M, Khoei HH.** The role of melatonin in polycystic ovary syndrome: A review. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, **2019**, 17(12), 865.

237. **Mohler J, Vani K, Leung S, Epstein A.** Segmentally restricted, cephalic expression of a leucine zipper gene during *Drosophila* embryogenesis. *Mechanisms of Development*. **1991**, 34(1):3-9.
238. **Moniruzzaman M, Ghosal I, Das D, Chakraborty, S. B.** Melatonin ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFκB pathway. *Biological Research*, **2018**, 51.
239. **Montgomery SB, Dermitzakis ET.** From expression QTLs to personalized transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, **2011**, 12(4), 277-282.
240. **Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW.** Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1994**, 91(21), 9926-9930.
241. **Moorlag SJ, Röring RJ, Joosten LA, Netea MG.** The role of the interleukin-1 family in trained immunity. *Immunological Reviews*, **2018**, 281(1), 28-39.
242. **Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Battagello DS, Diniz GB, Andrade-Silva J, Silva Jr S, ... Cipolla-Neto J.** The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. *Hormones and behavior*, **2018**, 105, 146-156.
243. **Mukhopadhyay M, Majumder R, Banerjee A, Bandyopadhyay DA.** Comparative overview on the role of melatonin and vitamins as potential antioxidants against oxidative stress induced degenerative infirmities: An emerging concept. *Melatonin Research*, **2022**, 5(3), 254-277.
244. **Muller WH Uys C.** Haemorrhagic infarction of the ovary in early pregnancy. *South African Medical Journal*, **1957**, 31(29), 726-728.
245. **Murdoch WJ, Colgin DC, Ellis JA.** Role of tumor necrosis factor-α in the ovulatory mechanism of ewes. *Journal of animal science*, **1997**, 75(6), 1601-1605.
246. **Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H.** Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and sterility*, **2003**, 80(4), 1012-1016.
247. **Nayki C, Nayki U, Keskin Cimen F, Kulhan M, Yapca OE, Kurt N, Bilgin Ozbek A.** The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecological Endocrinology*, **2018**, 34(9), 809-814.
248. **Nguyen T, Nioi P, Pickett CB.** The NRF2 -antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of biological chemistry*, **2009**, 284(20), 13291-13295.
249. **Nie X, Dai Y, Zheng Y, Bao D, Chen Q, Yin Y, ... Hou, D.** Establishment of a mouse model of premature ovarian failure using consecutive superovulation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2018**, 51(5), 2341-2358.
250. **Nikmard F, Hosseini E, Bakhtiyari, M, Ashrafi M, Amidi F, Aflatoonian R.** The boosting effects of melatonin on the expression of related genes to oocyte maturation and antioxidant pathways: a polycystic ovary syndrome-mouse model. *Journal of Ovarian Research*, **2022**, 15(1), 11.
251. **Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB.** The Carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. *Molecular and Cellular Biology*, **2005**, 25(24), 10895–10906.
252. **Ong CK, Ng CY, Leong CNgCP, Foo, KT, Tan PH, Huynh H.** Genomic structure of human OKL38 gene and its differential expression in kidney carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279(1), 743-754.
253. **Ong CK, Ng CY, Leong C, Ng CP, Ong CS, Nguyen TTT, Huynh H.** Structural characterization of three novel rat OKL38 transcripts, their tissue distributions, and their regulation by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, **2004**, 145(10), 4763-4774.
254. **Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S.** Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular reproduction and development*, **2011**, 78(1), 9-21.
255. **Otsuka F.** Modulation of bone morphogenetic protein activity by melatonin in ovarian steroidogenesis. *Reproductive Medicine and Biology*, **2018**, 17(3), 228-233.
256. **Ovalle WK, Nahirney PC.** Netter's Essential Histology E-Book: With Correlated Histopathology. Elsevier Health Sciences. **2020**.
257. **Özkan H, Kerman E.** Comparative evaluation of RNA later solution and snap frozen methods for gene expression studies in different tissues. *Revista Română de Medicină de Laborator*, **2020**, Vol, 28(3).
258. **Pal S, Haldar C, Verma R.** Melatonin attenuates LPS-induced ovarian toxicity via modulation of SIRT-1, PI3K/pAkt, pErk1/2 and NFκB/COX-2 expressions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2022**, 451, 116173.
259. **Pangas SA, Matzuk MM.** Genetic models for transforming growth factor β superfamily signaling in ovarian follicle development. *Molecular and cellular endocrinology*, **2004**, 225(1-2), 83-91.

260. **Park CJ, Lin PC, Zhou, S, Barakat R, Bashir ST, Choi JM., ... Ko, C. J.** Progesterone receptor serves the ovary as a trigger of ovulation and a terminator of inflammation. *Cell reports*, **2020**, 31(2), 107496.
261. **Park JY, Su Y Q Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M.** EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, **2004**, 303(5658), 682-684.
262. **Park SJ, Kim TS, Kim JM, Chang KT, Lee HS, Lee DS.** Repeated superovulation via PMSG/Hcg administration induces 2-Cys peroxiredoxins expression and overoxidation in the reproductive tracts of female mice. *Molecules and Cells*, **2015**, 38(12), 1071.
263. **Park OK, Mayo KE.** Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Molecular endocrinology*, **1991**, 5(7), 967-978.
264. **Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY. McMaster, D.** Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica Chimica Acta*, **1995**, 236(2), 173-180.
265. **Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose, B I.** Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and sterility*, **2004**, 81(4), 973-976.
266. **Pepling ME, Spradling, AC.** Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental biology*, **2001**, 234(2), 339-351.
267. **Popovic M, Sartorius G, Christ-Crain M.** (2019, July). Chronic low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome: is there a (patho)-physiological role for interleukin-1?. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 41, No. 4, pp. 447-459). Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
268. **Popat VB, Prodanov T, Calis KA, Nelson LM.** The menstrual cycle: a biological marker of general health in adolescents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, 1135(1), 43-51.
269. **Popova E, Krivokharchenko A, Ganten D, Bader M.** Comparison between PMSG-and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **2002**, 63(2), 177-182.
270. **Poulsen LC, Bøtkjær JA, Østrup O, Petersen KB, Andersen CY, Grøndahl ML, Englund ALM.** Two waves of transcriptomic changes in periovulatory human granulosa cells. *Human Reproduction*, **2020**, 35(5), 1230-1245.
271. **Prochazka R, Blaha M, Němcová L.** Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. *Biology of Reproduction*, **2017**, 97(4), 537-549.
272. **Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Young E, Yovanovich C, Paz DA.** Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Fertility and sterility*, **2008**, 90(4), 1511-1516.
273. **Qiao P, Zhang Y, Yang Y, Meng R, Xu Z. Jiang X. ... Su J.** Oral isoniazid causes oxidative stress, oocyte deterioration and infertility in mice. *Toxicology*, **2021**, 455, 152749.
274. **Rakha SI, Ateya AI, Safhi FA, Abdellatif AM.** Ameliorative Effect of Lycopene on Follicular Reserve Depletion, Oxidative Damage, Apoptosis Rate, and Hormonal Profile during Repeated Superovulations in Mice. *Veterinary Sciences*, **2024**, 11(9), 414.
275. **Regier N, Frey B.** Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC molecular biology*, **2010**, 11, 1-8.
276. **Richards JS, Ascoli M.** Endocrine, paracrine, and autocrine signaling pathways that regulate ovulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **2018**, 29(5), 313-325.
277. **Riese II DJ, Cullum RL.** *Epilegulin: roles in normal physiology and cancer*. In *Seminars in cell & developmental biology* Academic Press. **2014**, Vol. 28, pp. 49-56.
278. **Reiter RJ, Sharma R, Cuciolo MS, Tan DX, Rosales-Corral S. Gancitano G, de Almeida Chuffa L G.** Brain washing and neural health: role of age, sleep, and the cerebrospinal fluid melatonin rhythm. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2023**, 80(4), 88.
279. **Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu XY.** Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertility and sterility*, **2014**, 102(2), 321-328.
280. **Reiter R, Tan DX, Mayo J, Sainz R, Leon J, Czarnocki Z.** Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, **2003**, 50(4), 1129-1146.
281. **Reiter RJ, Tan DX, Tamura H, Cruz MHC, Fuentes-Broto L.** Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. *Gynecological Endocrinology*, **2014**, 30(2), 83-89.
282. **Rice VM, Limback SD, Roby KF, Terranova PF.** Changes in circulating and ovarian concentrations of bioactive tumour necrosis factor α during the first ovulation at puberty in rats and in gonadotrophin-treated immature rats. *Reproduction*, **1998**, 113(2), 337-341.

283. **Richards JS.** Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine reviews*, **1994**, 15(6), 725-751.
284. **Richards JS.** Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological reviews*, **1980**, 60(1), 51-89.
285. **Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL.** Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual review of physiology*, **2002**, 64(1), 69-92.
286. **Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, ... Sharma SC.** Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent progress in hormone research*, **2002**, 57(1), 195-220.
287. **Richani D, Gilchrist RB.** The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human reproduction update*, **2018**, 24(1), 1-14.
288. **Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N.** Ovarian folliculogenesis. *Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development*, **2016**, 167-190.
289. **Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW.** Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, **2010**, 2010(6), pdb-prot5439.
290. **Rezaee N, Nematollahi Z, Hoseini E.** Effect of sodium metabisulfite on rat ovary and lipid peroxidation. *Iranian Journal of Toxicology*, **2016**, 10(2), 23-28.
291. **Russell DL, Robker RL.** Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human reproduction update*, **2007**, 13(3), 289-312.
292. **Robert C, Gagné D, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA.** Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. *Biology of reproduction*, **2001**, 64(6), 1812-1820.
293. **Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP., O'malley BW, Richards, JS.** Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2000**, 97(9), 4689-4694.
294. **Robker RL, Akison LK, Russell DL.** Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nuclear receptor signaling*, **2009**, 7(1), nrs-07012.
295. **Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'malley BW, Richards JS.** Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2000**, 97(9), 4689-4694.
296. **Roby KF, Terranova PF.** Tumor Necrosis Factor Alpha Alters Follicular Steroidogenesis In Vitro. *Endocrinology*, **1988**, 123(6), 2952-2954.
297. **Romanoski CE, Che N, Yin F, Mai N, Pouladar D, Civelek M, ... Lusis AJ.** Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1. *Circulation research*, **2011**, 109(5), e27-e41.
298. **Sekiguchi, T., Mizutani, T. Yamada, K. Yazawa T., Kawata H. Yoshino M. ... Miyamoto, K.** Transcriptional regulation of the epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinology*, **2002**, 143(12), 4718-
299. **Roshanaee MK, Abtahi-Eivary SH, Shokoohi M, Fani M, Mahmoudian A, Moghimian M.** Protective effect of minocycline on Bax and Bcl2 gene expression, histological damages and oxidative stress induced by ovarian torsion in adult rats. *International Journal of Fertility & Sterility*, **2022**, 16(1), 30.
300. **Ross MH, Pawlina W.** Histology. Lippincott Williams & Wilkins, **2006**.
301. **Rushmore TH, Morton MR, Pickett C. B.** The Antioxidant Responsive Element. *The Journal of Biological Chemistry*, **1991**, 266(18), 11632-11639.
302. **Samardzija D, Pogrmic-Majkic K, Fa S, Glisic B, Stanic B, Andric N.** Atrazine blocks ovulation via suppression of Lhr and Cyp19a1 mRNA and estradiol secretion in immature gonadotropin-treated rats. *Reproductive toxicology*, **2016**, 61, 10-18.
303. **Sancho-Tello M, Perez-Roger I, Imakawa K, Tilzer L, Terranova PF.** Expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*, **1992**, 130(3), 1359-1364.
304. **Sancho-Tello MARIA, Terranova PF.** Involvement of protein kinase C in regulating tumor necrosis factor α -stimulated progesterone production in rat preovulatory follicles in vitro. *Endocrinology*, **1991**, 128(3), 1223-1228.
305. **Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF.** GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **2018**, 35(10), 1741-1750.
306. **Schrottmaier WC, Oskolkova OV, Schabbauer G, Afonyushkin T.** MicroRNA miR-320a modulates induction of HO-1, GCLM and OKL38 by oxidized phospholipids in endothelial cells. *Atherosclerosis*, **2014**, 235(1), 1-8.

307. **Sekiguchi T, Mizutani T, Yamada K, Kajitani T, Yazawa T, Yoshino M, Miyamoto K.** Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary. *Journal of molecular endocrinology*, **2004**, 33(1), 281-292.
308. **Sengupta P, Chattopadhyay S, Chatterjee S.** G-Quadruplex surveillance in BCL-2 gene: a promising therapeutic intervention in cancer treatment. *Drug Discovery Today*, **2017**, 22(8), 1165-1186.
309. **Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW.** Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2013**, 5(4), a008714.
310. **Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, ... Taketani Y.** Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin β subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, **2009**, 92(5), 1794-1798.
311. **Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS.** Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular endocrinology*, **2006**, 20(6), 1352-1365.
312. **Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine reviews*, **2004**, 25(1), 72-101.
313. **Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N.** Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. Proceedings of the National Academy of Sciences, **2011**, 108(4), 1462-1467.
314. **Silva JR, Lima F., Souza, AL. Silva AW.** Interleukin-1 β and TNF- α systems in ovarian follicles and their roles during follicular development, oocyte maturation and ovulation. *Zygote*, **2020**, 28(4), 270-277.
315. **Simón C, Frances A, Piquette G, Polan ML.** Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation, and luteinization. *Biology of Reproduction*, **1994**, 50(2), 449-457.
316. **Sinbad OO, Folorunsho AA, Olabisi OL, Ayoola OA, Temitope EJ.** Vitamins as antioxidants. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, **2019**, 2(3), 214-235.
317. **Smith PE, Engle ET.** Experimental evidence regarding the role of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system. *American Journal of Anatomy*, **1927**, 40(2), 159-217.
318. **Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ.** Tumor necrosis factor- α stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *biology of reproduction*, **1999**, 61(4), 993-998.
319. **Speroff L, Fritz MA. (Eds.).** *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. lippincott Williams & wilkins. 2005.
320. **Sohel MMH, Akyuz B, Konca Y, Arslan K, Sariozkan S, Cinar MU.** Oxidative stress modulates the expression of apoptosis-associated microRNAs in bovine granulosa cells in vitro. *Cell and tissue research*, **2019**, 376, 295-308.
321. **Sönmez S.** Sıçanlarda pinealektomi ve melatonin uygulamasının serum melatonin, nesfatin-1 ve ghrelin düzeylerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, **2017**.
322. **Strauss III JF, Williams CJ.** Ovarian life cycle. In Yen and Jaffe's reproductive endocrinology. Elsevier, **2019**, pp. 167-205.
323. **Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ.** Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, **2002**, 143(6), 2221-2232.
324. **Sukkar MB, Harris J.** Potential impact of oxidative stress induced growth inhibitor 1 (OSGIN1) on airway epithelial cell autophagy in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Journal of thoracic disease*, **2017**, 9(12), 4825.
325. **Sun TC, Liu XC, Yang SH, Song LL, Zhou SJ, Deng SL, ... Cheng LY.** Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in cryopreserved ovarian tissues via Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **2020**, 7, 163.
326. **Solano-Gálvez SG, Abadi-Chiriti J, Gutiérrez-Velez L, Rodríguez-Puente E, Konstat-Korzenny E, Álvarez-Hernández DA, ... Vázquez-López R.** Apoptosis: activation and inhibition in health and disease. *Medical Sciences*, **2018**, 6(3), 54.
327. **Swillens S, Goffard JC, Marechal Y, de Kerchove d'Exaerde A, & El Housni H.** Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic acids research*, **2004**, 32(6), e56-e56.
328. **Taheri M, Roudbari NH, Amidi F, Parivar K.** The protective effect of sulforaphane against oxidative stress in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) through activation of AMPK/AKT/NRF2 signaling pathway. *Reproductive Biology*, **2021**, 21(4), 100563.

329. **Takahashi T, Ogiwara K.** Roles of melatonin in the teleost ovary: A review of the current status. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **2021**, 254, 110907.
330. **Talebian Moghadam SZ, Jorsaraei SGA, Khanbabaei R, Gholamitabar Tabari M, Ahmadi AA.** The Effect of follicular fluid on in Vitro Maturation of Mouse Immature Oocytes. *International Biological and Biomedical Journal*, **2021**, 7(2), 0-0.
331. **Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, ... Sugino N.** Importance of melatonin in assisted reproductive technology and ovarian aging. *International journal of molecular sciences*, **2020**, 21(3), 1135.
332. **Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, ... Sugino N.** Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocrine journal*, **2013**, 60(1), 1-13.
333. **Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, ... Sugino N.** The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *Journal of ovarian research*, **2012**, 5(1), 1-9.
334. **Tamura H, Takasaki A, Miwa, I, Taniguchi K., Maekawa R., Asada, H., ... Sugino, N.** Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of pineal research*, **2008**, 44(3), 280-287.
335. **Tanabe M, Tamura H, Taketani T, Okada M, Lee L, Tamura I, ... Sugino N.** Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *Journal of Reproduction and Development*, **2015**, 61(1), 35-41.
336. **Tang SB, Yang LL, Zhang TT, Wang Q, Yin S, Luo SM, ... Sun QY.** Multiple superovulations alter histone modifications in mouse early embryos. *Reproduction*, **2019**, 157(6), 511-523.
337. **Tang S, Yuan K, Chen L.** Molecular biomarkers, network biomarkers, and dynamic network biomarkers for diagnosis and prediction of rare diseases. *Fundamental Research*, **2022**, 2(6), 894-902.
338. **Teilmann SC, Clement CA, Thorup J, Byskov AG, Christensen ST.** Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *Journal of Endocrinology*, **2006**, 191(3), 525-535.
339. **Terasawa E.** The mechanism underlying the pubertal increase in pulsatile GnRH release in primates. *Journal of neuroendocrinology*, **2022**, 34(5), e13119.
340. **Terrón MP, Delgado-Adámez J, Pariente JA, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB.** Melatonin reduces body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats. *Physiology & behavior*, **2013**, 118, 8-13.
341. **Thill M, Becker S, Fischer D, Cordes T, Hornemann A, Diedrich K, ... Friedrich M.** Expression of prostaglandin metabolising enzymes COX-2 and 15-PGDH and VDR in human granulosa cells. *Anticancer Research*, **2009**, 29(9), 3611-3618.
342. **Thornton K, Asemota OA, Jindal SK, Charron M, Buyuk E.** Obesity and high fat diet impair response to superovulation by suppressing genes involved in ovarian folliculogenesis. *Fertility and Sterility*, **2015**, 104(3), e121.
343. **Tilly JL, Tilly KI, Kenton L, Johnson AL.** Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, **1995**, 136(1), 232-241.
344. **Timucin AC, Basaga H.** Pro-apoptotic effects of lipid oxidation products: HNE at the crossroads of NF- κ B pathway and anti-apoptotic Bcl-2. *Free Radical Biology and Medicine*, **2017**, 111, 209-218.
345. **Tsai CH, Shen YC, Chen HW, Liu KL, Chang JW, Chen PY, ... Li CC.** Docosahexaenoic acid increases the expression of oxidative stress-induced growth inhibitor 1 through the PI3K/Akt/NRF2 signaling pathway in breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, **2017**, 108, 276-288.
346. **Tsujimoto Y.** Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of cellular physiology*, **2003**, 195(2), 158-167.
347. **Tsoulis MW, Chang PE, Moore CJ, Chan KA, Gohir W, Petrik JJ, ... Sloboda DM.** Maternal high-fat diet-induced loss of fetal oocytes is associated with compromised follicle growth in adult rat offspring. *Biology of Reproduction*, **2016**, 94(4), 94-1.
348. **Tripathi DN, Jena GB.** Effect of melatonin on the expression of NRF2 and NF- κ B during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *Journal of pineal research*, **2010**, 48(4), 324-331.
349. **Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA.** Transcriptional regulation by NRF2. *Antioxidants & redox signaling*, **2018**, 29(17), 1727-1745.
350. **Tossetta G, Marzioni D.** Natural and synthetic compounds in Ovarian Cancer: A focus on NRF2/KEAP1 pathway. *Pharmacological Research*, **2022**, 183, 106365.

351. **Toyoda H, Komurasaki T, Ikeda Y, Yoshimoto M, Morimoto S.** Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS letters*, **1995**, 377(3), 403-407.
352. **Tsutsumi R, Webster NJ.** GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine journal*, **2009**, 56(6), 729-737.
353. **Wagner GP, Kin K, Lynch VJ.** A model based criterion for gene expression calls using RNA-seq data. *Theory in Biosciences*, **2013**, 132, 159-164.
354. **Wagner EM.** Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols*, **2013**, 19-45.
355. **Wan S, Chen Q, Xiang Y, Sang Y, Tang M, Song Y, ... Zhu Y.** Interleukin-1 increases cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human granulosa-lutein cell via nuclear factor kappa B/P65 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2023**, 566, 111891.
356. **Wang J, Jia R, Gong H, Celi P, Zhuo Y, Ding X, ... Zhang K.** The effect of oxidative stress on the chicken ovary: Involvement of microbiota and melatonin interventions. *Antioxidants*, **2021**, 10(9), 1422.
357. **Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, Li F.** Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *Journal of cellular physiology*, **2021**, 236(12), 7966-7983.
358. **Wang T, Xia D, Li N, Wang C, Chen T, Wan T, ... Cao X.** Bone marrow stromal cell-derived growth inhibitor inhibits growth and migration of breast cancer cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280(6), 4374-4382.
359. **Wang Y, Yang C, Nahla Abdalla Hassan E, Li C, Yang F, Wang G, Li L.** HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. *Aging (Albany NY)*, **2019**, 11(15), 5535.
360. **Wang Z, Tamura K, Yoshie M, Tamura H, Imakawa K, Kogo H.** Prostaglandin F2 α -induced functional regression of the corpus luteum and apoptosis in rodents. *Journal of pharmacological sciences*, **2003**, 92(1), 19-27.
361. **Wassarman PM.** Zona pellucida glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283(36), 24285-24289.
362. **Westwood FR.** The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology*, **2008**, 36(3), 375-384.
363. **Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, ... Franke L.** Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nature genetics*, **2013**, 45(10), 1238-1243.
364. **Williams CJ, Erickson GF.** Morphology and physiology of the ovary. **2015**
365. **Wilson D.** Clinical veterinary advisor: the horse. *elsevier Health sciences*. **2010**.
366. **Wright FA, Sullivan PF, Brooks AL, Zou F, Sun W, Xia K, ... Boomsma DI.** Heritability and genomics of gene expression in peripheral blood. *Nature genetics*, **2014**, 46(5), 430-437.
367. **Xu H, Mu X, Ding Y, Tan Q, Liu X, He J, ... Chen X.** Melatonin alleviates benzo (a) pyrene-induced ovarian corpus luteum dysfunction by suppressing excessive oxidative stress and apoptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2021**, 207, 111561.
368. **Van Blerkom J, Davis P.** Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Human reproduction*, **2001**, 16(4), 757-764.
369. **Van der Auwera I, D'Hooghe T.** Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction*, **2001**, 16(6), 1237-1243.
370. **Varas SM, Jahn GA.** The expression of estrogen, prolactin, and progesterone receptors in mammary gland and liver of female rats during pregnancy and early postpartum: regulation by thyroid hormones. *Endocrine Research*, **2005**, 31(4), 357-370.
371. **Venugopal R, Jaiswal AK.** Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1996**, 93(25), 14960-14965.
372. **Viana J.** 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, **2019**, 36(4), 14-26.
373. **Vijayaraj SL, Feltham R, Rashidi M, Frank D, Liu Z, Simpson DS, ... Vince JE.** The ubiquitylation of IL-1 β limits its cleavage by caspase-1 and targets it for proteasomal degradation. *Nature Communications*, **2021**, 12(1), 2713.
374. **von Mengden L, Klamt F, Smitz J.** Redox biology of human cumulus cells: basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. *Antioxidants & redox signaling*, **2020**, 32(8), 522-535.

375. **Yamamoto Y, Kuwahara A, Taniguchi Y, Yamasaki M, Tanaka Y, Mukai Y, ... Irahara M.** Tumor necrosis factor alpha inhibits ovulation and induces granulosa cell death in rat ovaries. *Reproductive Medicine and Biology*, **2015**, 14, 107-115.
376. **Yan X, Lee S, Gugiu BG, Koroniak L, Jung ME, Berliner J, Cheng J, Li R.** Fatty acid epoxyisoprostane E2 stimulates an oxidative stress response in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **2014**, 444(1), 69-74.
377. **Yang H, Pang H, Miao C.** Ovarian IL-1 α and IL-1 β levels are associated with primary ovarian insufficiency. *International journal of clinical and experimental pathology*, **2018**, 11(9), 4711.
378. **Yang L, Xu H, Chen Y, Miao C, Zhao Y, Xing Y, Zhang Q.** Melatonin: multi-target mechanism against diminished ovarian reserve based on network pharmacology. *Frontiers in Endocrinology*, **2021**, 12, 630504.
379. **Yao Y, Wang Y, Wang F, Meng C, Niu J, Guo M, ... Xu Y.** BMP15 Modulates the H19/miR-26b/SMAD1 Axis Influences Yak Granulosa Cell Proliferation, Autophagy, and Apoptosis. *Reproductive sciences*, 2022, 1-15.
380. **Yao H, Li P, Venters BJ, Zheng S, Thompson PR, Pugh BF Wang Y.** Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283(29), 20060-20068.
381. **Yao C, Liu X, Zhou Z, Xiang Y, Yuan S, Xie W, ... Cai T.** Melatonin attenuates expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in activated microglia induced by lipopolysaccharide (LPS). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **2019**, 82(7), 437-446.
382. **Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D.** Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *Journal of pineal research*, **1997**, 22(1), 45-51.
383. **Yoon JD, Jeon Y, Cai L, Hwang SU, Kim E, Lee E, Kim E, Lee E, Kim DY, Hyun SH.** Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*, **2015**, 83(2), 294-305.
384. **Yuan J, Lan H, Jiang X, Zeng D, Xiao S.** Bcl-2 family: Novel insight into individualized therapy for ovarian cancer. *International journal of molecular medicine*, **2020**, 46(4), 1255-1265.
385. **Yurtal Z, Özkan H, Kutlu, T, Deveci MZY, Urfali B, Urfali S.** The Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Reduces Epidural Fibrosis After Laminectomy in Rats. *Turkish Neurosurgery*, **2023**, 33(1).
386. **Zhan C, Cao X, Zhang T, Guo J, Xu G, Wang H, ... Ma X.** Melatonin protects porcine oocyte from copper exposure potentially by reducing oxidative stress potentially through the NRF2 pathway. *Theriogenology*, **2022**, 193, 1-10.
387. **Zhang J, Lai Z, Shi L, Tian Y, Luo A, Xu Z, ... Wang S.** Repeated superovulation increases the risk of osteoporosis and cardiovascular diseases by accelerating ovarian aging in mice. *Aging (Albany NY)*, **2018**, 10(5), 1089.
388. **Zhang T, He M, Zhang J, Chen T, Wang C.** Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. *Frontiers in Physiology*, **2023**, 14, 1113684.
389. **Zhang S, Ma Y, Zuo Q, Liu M, Yu Z, Sun Y, ... Chen J.** Repeated controlled ovarian stimulation-induced ovarian and uterine damage in mice through the PI3K/AKT signaling pathway. *Human Cell*, **2023**, 36(1), 234-243.
390. **Zhao Y, Chen Y, Miao C, Wang R, Yang L, Liu J, ... Ma, J.** He's Yangchao Recipe Ameliorates Ovarian Oxidative Stress of Aging Mice under Consecutive Superovulation Involving JNK-And P53-Related Mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2022**.
391. **Zhao X, Wang D, Wu, Z, Pan B., Yang H, Zeng C, ... Zhou G.** (Female reproductive performance in the mouse: effect of oral melatonin. *Molecules*, **2018**, 23(8), 1845.
392. **Zolbin, M. M., Nematian, S, Daghigh F, Namdar F, Zaree ST, Madadian M, ... Takzaree N.** PMSG and HCG hormones effect on the development and growth of ovarian follicles. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, **2018**, 4(1), 51-54.
393. **Xiao P, Nie J, Wang X, Lu K, Lu Liang X.** Melatonin alleviates the deterioration of oocytes from mice subjected to repeated superovulation. *Journal of Cellular Physiology*, **2019**, 234(8), 13413-13422.
394. **Xiao CW, Ash, Tsang BK.** Nuclear factor- κ B-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *Endocrinology*, **2001**, 142(2), 557-563.

EKLER

Ek-1: Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurul Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 07/09/2022-205814



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-40595970-020-205814
Konu : Etki onay

07/09/2022

SAYIN PROF.DR. AKIN YAKAN
ÖĞRETİM ÜYESİ

İlgi : 06/09/2022 tarihli 22975264-020-205334 sayılı yazı.

Kurulumuzun 02/09/2022 tarihli toplantısında almış olduğu **2022/05-07** numaralı karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

KARAR 2022/05-07: Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Akın YAKAN'ın (Veteriner Genetik ABD) yürütücüsü olduğu ve Sevda DALKIRAN'ın (Moleküler Biyokimya ve Genetik AD) ortak çalışmaları "Süperovule edilen ratlarda melatoninin ovaryumdaki bazı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi" adlı proje Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Prof.Dr. İlker YAVAŞ
Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve Orta öğretimini Şirinyurt İlkokulunda okudu. Lise eğitimini Denizciler Lisesi'nde tamamladı. Lisansını Ordu Üniversitesi Balıkçılık Teknoloji Mühendisliği alanında tamamladı. Yüksek lisansını Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalında yaptı.

