



Tıp Fakültesi

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MONOSODYUM GLUTAMATIN YETİŞKİN WİSTAR SIÇAN
OVERLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE MELATONİNİN OLASI
KORUYUCU ROLÜ: HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
İNCELEME**

Dr. HİLAL NİŞVA LEVENT
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2021



Tıp Fakültesi

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MONOSODYUM GLUTAMATIN YETİŞKİN WİSTAR SIÇAN
OVERLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE MELATONİNİN OLASI
KORUYUCU ROLÜ: HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
İNCELEME**

**DR. HİLAL NİŞVA LEVENT
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Prof. Dr. ŞULE ÇETİNEL

İSTANBUL 2021

ÖNSÖZ

Asistanlığım boyunca bilgi ve deneyimlerini aktararak eğitimimi destekleyen, sabırlı ve hoşgörölü tavrıyla her zaman motive eden, sevgili hocam, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Feriha ERCAN'a;

Eğitimim boyunca sabırla ve güleryüzlölükle eğitimimi destekleyen, her zaman saygıyla anacağım çok kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Şule ÇETİNEL'e;

Bilim aşkını yenilikçi tarzıyla aşıl原因arak engin bilgi ve ileri görüşlölüğüyle bana yön veren, kendilerinden çok değerli bilgiler öğrendiğim ve birlikte çalışmaktan gurur duyduğum kıymetli hocam Prof. Dr. Berrak YEĞEN'e;

Anabilim dalımızın kıymetli hocaları Prof. Dr. Serap ŞİRVANCI, Doç. Dr. Dilek Akakın ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem Tuğçe Kaya'ya,

Deneyimin başından son gününe dek ihtiyaç duyduğum her zaman varlığını yanımda hissettiğim, aynı zamanda eğlenceli arkadaşlığı ile asistanlığımdan keyif almamı sağlayan M.Sc. Damla KAYALI, M.Sc. Sinemcan KABATAŞ ve M.Sc. Bedia KARAKAYA'ya;

Deney ve laboratuvar çalışmalarında destek aldığım, güler yüzlölükleriyle her zaman yanımda olan ve arkadaşlığını esirgemeyen Dr. Selin AKBULUT, Dr. Gizem SUCU, Dr. Fatma KANPALTA ve Arş. Gör. Gülseren ALTAY'a;

Biyokimyasal analizdeki katkılarından dolayı Arş. Gör. Sevil ARABACI TAMER'e;

Tüm hayatım boyunca fedakârlıkllarıyla, sevgileriyle, maddi manevi her türlü destekleriyle yanımda olan, en zor zamanlarımda motivasyonlarıyla beni ayakta tutan, bugünlere gelmemi sağlayan canımdan çok sevdiğim aileme;

Tanıştığımız günden beri sevgisiyle beni şımartan, bu zor ve zahmetli süreçte sıkıntılarımı paylaşan ve bana her zaman destek olan can yoldaşım eşim Dr. Ayhan LEVENT'e ve kavuşmak için gün saydığım, varlığını ilk öğrendiğim andan beri heyecanlandıran aynı bedeni paylaştığım canımdan öte bebeğime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez projesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 1002 Hızlı Destek programı (Proje No: 120S570) tarafından desteklenmiştir.

Ocak, 2021

Dr. Hilal Nişva LEVENT



İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	iii
RESİMLER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
EKLER DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dişi Üreme Sistemi	3
2.1.1. Over Embriyolojisi	3
2.1.2. Over Histolojisi.....	4
2.1.2.1. Oogenez	5
2.1.2.2. Folikülogenez.....	6
2.1.2.3. Ovulasyon	10
2.1.2.4. Luteinizasyon ve Korpus Luteum	11
2.1.3. Dişi Üreme Fizyolojisi.....	11
2.1.3.1. Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks.....	11
2.1.3.2. Steroidogenez.....	14
2.1.4. Dişi Sıçanlarda Üreme Sistemi	18
2.1.4.1. Dişi Sıçanlarda Östrus Siklusu Evre Saptanması	19
2.2. Monosodyum Glutamat (MSG)	29
2.2.1. MSG'nin Organizma Üzerine Etkileri.....	31
2.2.2. MSG'nin Üreme Sistemi Üzerine Etkileri.....	33
2.3. Serbest Radikaller	34
2.3.1. Serbest Radikal Kaynakları	34
2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	35
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	37

2.4.1. Melatonin.....	40
2.4.1.1. Melatoninin Organizma Üzerine Etkileri.....	42
2.4.1.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri	43
2.4.1.3. Melatoninin Dişı Üreme Sistemi Üzerine Etkileri.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Deney Hayvanları	47
3.2. Deney Grupları.....	47
3.3. Kullanılan Kimyasallar	48
3.3.1. Monosodyum Glutamat (MSG).....	48
3.3.2. Melatonin.....	48
3.4. Deney Protokolü	48
3.5. Histolojik Preparasyon.....	49
3.5.1. Vajinal Sürüntü Örneklerinin Preparasyonu ve Değerlendirilmesi	49
3.5.2. Over Doku Örneklerinin Preparasyonu ve Histopatolojik Değerlendirilmesi	50
3.5.3. Folikül Sayımı ve Değerlendirilmesi.....	50
3.5.4. İmmünohistokimyasal Preparasyon ve İnceleme	51
3.6. Biyokimyasal Analizler	52
3.6.1. Over doku örneklerinde MDA ve GSH düzeylerinin ölçülmesi	52
3.6.2. Serumda GnRH, FSH, LH, E ₂ ve AMH ölçülmesi	53
3.7. İstatistiksel Analizler	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Histolojik Bulgular.....	54
4.1.1. Vajinal Sürüntü Bulguları.....	54
4.1.2. Folikül Sayım Bulguları	56
4.1.3. Histopatolojik Bulgular	58
4.1.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	64
4.1.4.1. ER- α İmmünohistokimyası Bulguları.....	64
4.1.4.2. StAR İmmünohistokimyası Bulguları	66
4.1.4.3. Aromataz İmmünohistokimyası Bulguları.....	69
4.1.4.4. SULT1E1 İmmünohistokimyası bulguları.....	72
4.2. Biyokimyasal Bulgular	75
4.2.1. Overde ölçülen MDA-GSH düzeyleri	75
4.2.2. Serumda ölçülen GnRH, FSH, LH, E ₂ ve AMH düzeyleri	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	79

6. KAYNAKÇA	92
7. EKLER.....	101
8. ÖZGEÇMİŞ.....	103



RESİMLER LİSTESİ

	Sayfalar
Resim 1. Primordiyal folikül.	7
Resim 2. Primer folikül.....	8
Resim 3. Sekonder folikül	9
Resim 4. Graaf folikül	10
Resim 5. Parabazal hücre.....	21
Resim 6. İntermediyer hücre	22
Resim 7. Kısmi kornifiye ve kornifiye hücre	23
Resim 8. Nötrofil	24
Resim 9. Proöstrus evresinde vajinal sürüntü.....	25
Resim 10. Östrus evresinde vajinal sürüntü.	26
Resim 11. Metöstrus evresinde vajinal sürüntü.	27
Resim 12. Diöstrus evresinde vajinal sürüntü..	28
Resim 13. Kontrol grubuna ait over korteksi.....	59
Resim 14. Melatonin grubuna ait over korteksi.....	59
Resim 15. Kontrol grubuna ait over medulla bölgesi.	60
Resim 16. Melatonin grubuna ait over medulla bölgesi.	60
Resim 17. MSG grubuna ait over korteksi.	61
Resim 18. MSG grubuna ait over medulla bölgesi.	61
Resim 19. MSG+Melatonin grubuna ait over korteksi.	62
Resim 20. MSG+Melatonin grubuna ait over medulla bölgesi.	63
Resim 21. Kontrol grubu orta yoğunlukta boyanması. ER- α immünohistokimyası..	64
Resim 22. Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. ER- α immünohistokimyası..	65
Resim 23. MSG grubu orta yoğunlukta boyanması. ER- α immünohistokimyası.. ...	65
Resim 24. MSG+Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. ER- α immünohistokimyası..	66
Resim 25. Kontrol grubu yoğun boyanması.StAR immünohistokimyası.	67
Resim 26. Melatonin grubu yoğun boyanması.StAR immünohistokimyası..	67
Resim 27. MSG grubu soluk boyanması. StAR immünohistokimyası.	68
Resim 28. MSG+Melatonin grubu orta yoğunlukta boyanması. StAR immünohistokimyası.	68
Resim 29. Kontrol grubu yoğun boyanması. Aromataz immünohistokimyası.	70
Resim 30. Melatonin grubu yoğun boyanması. Aromataz immünohistokimyası.. ...	70
Resim 31. MSG grubu soluk boyanması. Aromataz immünohistokimyası..	71
Resim 32. MSG+Melatonin grubu orta yoğunlukta boyanması. Aromataz immünohistokimyası.	71
Resim 33. Kontrol grubu düşük yoğunlukta boyanması. SULT1E1 immünohistokimyası.	73
Resim 34. Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. SULT1E1 immünohistokimyası..	73

Resim 35. MSG grubu orta yoğunlukta boyanması. SULT1E1 immünohistokimyası	74
Resim 36. MSG+Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. SULT1E1 immünohistokimyası.	74



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfalar
Şekil 1. Dönemlere göre germ hücre sayısı.	6
Şekil 2. Kadınlarda hipotalamo-hipofizer-gonadal aks	12
Şekil 3. Kadınlarda menstrüel siklus	14
Şekil 4. Overde steroidogenez basamakları	15
Şekil 5. Dişi sıçanlarda östrus evrelerine göre vajina epitel hücreleri	20
Şekil 6. Sıçanlarda östrus döngüsünde hormonal değişiklikler	29
Şekil 7. Monosodyum Glutamat'ın Kimyasal Yapısı	30
Şekil 8. Melatonin kimyasal yapısı	40
Şekil 9. Melatonin Sentezi	41
Şekil 10. Melatoninin antioksidan özellikleri.	44
Şekil 11. Deney gruplarının proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus indeksleri.	55
Şekil 12. Deney grupları folikül sayıları karşılaştırılması.	57
Şekil 13. Gruplara ait histopatolojik skor grafiği.	63
Şekil 14. Deney gruplarının ER- α IR açısından karşılaştırılması.	66
Şekil 15. Deney gruplarının StAR ir açısından karşılaştırılması.	69
Şekil 16. Deney gruplarının Aromataz ir açısından karşılaştırılması.	72
Şekil 17. Deney gruplarının SULT1E1 ir açısından karşılaştırılması.	75
Şekil 18. Deney grupları over dokularında ölçülen MDA ve GSH düzeyleri açısından karşılaştırılması.	76
Şekil 19. Deney gruplarında serum E ₂ , FSH, LH, GnRH ve AMH düzeyleri.	78

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfalar
Tablo 1. Başlıca endojen antioksidanlar.....	38
Tablo 2. Başlıca ekzojen antioksidanlar.	38
Tablo 3. Grupların proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evrelerine ait gün sayıları (ortalama $\pm$ standart hata).....	56
Tablo 4. Gruplara ait primer, sekonder, graaf, dejenere ve kistik folikül sayıları (ortalama $\pm$ standart hata).....	58



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
BPA	: Bisfenol-A
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
c-AMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E ₂	: Östradiol
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Deneyi
ER	: Östrojen Reseptörü
ER- α	: Östrojen Resepör- α
ER- β	: Östrojen Resepör- β
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GnIH	: Gonadotropin İnhibitör Hormon:
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
HOMT	: Hidroksiindol-O-Metil Transferaz
IVF	: İn-Vitro Fertilizasyon
İR	: İmmunreaktivite
İHK	: İmmunohistokimya
LD50	: Ortalama Öldürücü Doz
LH	: Luteinizan Hormon
MDA	: Malondialdehit
MSG	: Monosodyum Glutamat
NO	: Nitrit Oksit

NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
OMI	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
OPU	: Oosit Pick-Up
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
ROS	: Reaktif Oksijen Substratları
S.C.	: Subkutan
SOD	: Süperoksit Dismutaz
StAR	: Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
SULT	: Sülfotransferaz
17 β -HSD	: 17 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz
3 β -HSD	: 3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz

EKLER DİZİNİ

	Sayfalar
Ek 1. Etik Kurul Onay Formu	101
Ek 2. İntihal Raporu.....	102



ÖZET

Bu çalışma, monosodyum glutamat (MSG) 'nin yetişkin Wistar sıçanlarda over üzerine etkilerini histolojik ve biyokimyasal açıdan incelemek ve olası hasarın mekanizmalarını ortaya koymak için tasarlanmıştır. Aynı zamanda güçlü bir antioksidan olan melatoninin dişi üreme sistemi üzerine koruyucu etkisi araştırılması amaçlanmıştır.

32 adet erişkin dişi Wistar albino sıçan 4 gruba ayrılıp, 1 ay süreyle MSG grubuna (n=8) içme suyunda 2 gr/kg/gün MSG, Melatonin grubuna (n=8) içme suyunda 4 mg/kg/gün Melatonin, MSG+Melatonin grubuna (n=8) ise içme suyuna eşzamanlı 2 gr/kg/gün MSG ve 4 mg/kg/gün Melatonin olacak şekilde günlük uygulanmıştır. Kontrol grubuna (n=8) 1 ay boyunca normal içme suyu verilmiştir.

Deney sonunda MSG grubu sıçanlarında östrus siklusunda bozulma, overde primer, sekonder folikül sayısında azalma ve atretik, kistik folikül sayısında artma, over doku MDA düzeyinde artma ve GSH düzeyinde azalma izlenmiştir. Ayrıca östrojen sentezinden sorumlu StAR ve Aromataz immünreaktivitesinde azalma, yıkımda görevli SULT1E1 immünreaktivitesinde artma ile birlikte serum E₂ düzeyinde düşüklük, buna bağlı FSH ve LH düzeyinde artış bulunmuştur. MSG+Melatonin grubunda ise tüm bu histolojik ve biyokimyasal bulguların normale yaklaştığı gözlenmiştir.

Tez çalışmamızda MSG uygulamasının dişi üreme sisteminde görevli hormonal aksı bozarak ve oksidan hasarı arttırarak overde büyüyen folikül sayısını azalttığı ve östrus siklusunda bozulmalara yol açtığı sonucuna varılmıştır. Melatonin takviyesi ile over fonksiyonlarını düzenleyen hormonal dengeyi yeniden kurduğu, antioksidan yanıtı arttırarak oksidatif stres kaynaklı over hasarını önlediği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Dişi üreme sistemi, monosodyum glutamat, melatonin, steroidogenez, oksidatif stres.

ABSTRACT

This study was designed to investigate the effects of monosodium glutamate (MSG) on the ovary in adult Wistar rats histologically and biochemically and to reveal the mechanisms of possible damage. It was also aimed to examine the protective effect of melatonin, a powerful antioxidant on the female reproductive system.

32 Adult female Wistar Albino rats were divided into 4 groups. During one month MSG group were given (n=8) 2 g/kg/day MSG in drinking water, MSG+Melatonin group (n=8) were given 2 g/kg/day MSG and 4 mg/ kg/day Melatonin simultaneously with drinking water. Melatonin group (n=8) were given with 4 mg/kg/day Melatonin in drinking water daily. Normal drinking water was given to the control group (n = 8) for 1 month.

At the end of the experiment, distortion in the oestrus cycle, a decrease in the number of primary and secondary follicles in the ovary and an increase in the number of atretic and cystic follicles, an increase in the level of ovarian tissue MDA and a decrease in the GSH level were observed in MSG group rats. In addition, there was a decrease in StAR and Aromatase immunoreactivity responsible for estrogen synthesis, an increase in SULT1E1 immunoreactivity involved in destruction, and a decrease in serum E₂ and an increase in FSH and LH levels. It was showed that all these histological and biochemical findings approached normal in the group that was given Melatonin with MSG.

In our thesis study, it was concluded that MSG application decreased the number of follicles growing in the ovary and caused distortion in the oestrus cycle by disrupting the hormonal axis in the female reproductive system and increasing oxidant damage. Melatonin supplementation is thought to restore the hormonal balance that regulates ovarian functions and prevent oxidative stress-induced ovarian damage by increasing antioxidant response.

Keywords: Female reproductive system, monosodium glutamate, melatonin, steroidogenesis, oxidative stress.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kadın kaynaklı infertilite; günümüzde önemli bir tıbbi problemdir. Kadın üreme sistemi çevresel faktörlere karşı çok hassas olup, zararlı etkilere yol açan maddeler arasında endüstriyel kimyasallar ve gıda katkı maddeleri en belirgin olanlarıdır. Monosodyum glutamat (MSG) yaygın olarak kullanılan bir gıda katkı maddesidir ve çoğu paketli gıdada ambalajda belirtilmeden bulunabilir. MSG'nin organizma üzerindeki etkisi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır, mekanizması henüz net bilinmemekle birlikte kadın üreme sisteminde bozukluklara yol açtığı pek çok yayında raporlanmıştır.

Pineal bez tarafından salgılanan küçük lipofilik hormon olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), esas olarak sirkadiyen ritmi düzenler; ayrıca folikülogenez, oosit maturasyonu, fertilitenin düzenlenmesi ve embriyo gelişimi üzerindeki olumlu etkileri, toksisite sonrası overde gözlenen hasara karşı iyileştirici etkisi ve oosit rezervi koruyucu etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Melatonin oldukça etkili bir antioksidandır ve hücreleri lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi reaktif türlerin neden olduğu oksidatif strese karşı korur.

Lezzet arttırıcı olarak MSG'nin kullanımının yaygınlaşması, MSG'nin insan vücudu üzerinde toksik etkilerini araştıran çalışmaların da artışına neden olmuştur. Beyindeki nörotoksik etkiler, obezite ve metabolik bozukluklar, “Çin Restoranı Sendromu” ve üreme sistemi üzerindeki zararlı etkileri, MSG alımı ile bağlantılı olarak çok tartışılmaktadır. Çeşitli deney hayvanı üzerinde yapılan birçok çalışma, MSG'nin beyin, karaciğer, pankreas, over, fallop tüpü, testis ve böbrekler gibi çeşitli organlara toksik olduğunu göstermiştir [1-8]. MSG'nin bir gıda katkı maddesi olarak yaygın kullanılmasına ve bununla ilgili çok fazla araştırmaya rağmen, maruz kalan bireylerin üreme sistemleri üzerindeki etkileri hakkında nispeten az şey bilinmektedir.

Tez çalışmamız MSG'nin yetişkin Wistar sıçanlarda overler üzerindeki etkilerini histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal açıdan incelemek ve olası hasarın mekanizmalarını ortaya koymak için tasarlanmıştır. Aynı zamanda güçlü bir antioksidan olan melatoninin MSG kaynaklı dişi üreme sistemi hasarı üzerine koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda hedeflerimiz řu řekildedir;

- Deney başlangıcından itibaren tüm sıçanlardan vajinal smear rneėi alınarak mikroskopta incelenip östrus siklus evreleri ve değişikliklerin tayin edilmesi
- Deney sonunda serumda Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH), Folikül Uyarıcı Hormon (FSH), Luteinizan Hormon (LH) ve stradiol (E₂) düzeyleri tayin edilerek hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın işleyişi ve geribildirim mekanizmalarının yorumlanması
- Deney sonunda serumda Anti-Müllerian Hormon (AMH) düzeyi ölçülerek overde bulunan oosit rezervi hakkında bilgi sahibi olunması
- Overde Malondialdehit (MDA) ve Glutatyon (GSH) düzeylerinin tayin edilmesi ile MSG ile oluşabilecek oksidan hasarın düzeyi ve melatoninin etkilerinin gösterilmesi
- Over dokusunun rutin histolojik değerlendirmesi ve folikül sayımı ile oluşan değişikliklerin gösterilmesi
- Over dokusunda steroidogenezden sorumlu protein ve enzimlerden Steroidogenik Akut Düzenleyici Protein (StAR), Aromataz, strojen Reseptör- α (ER- α) ve Sulfotransferaz (SULT1E1)'in immünohistokimyasal boyanma ile gösterilmesi ve immnreaktivitenin yorumlanması

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi temel olarak; bir çift ovaryum ve fallop tüpü, uterus, vajina ve dış genital organlardan oluşmaktadır [9]. Bu sistemin düzgün işleyişi dişi gametlerin (oosit) üretimi ve maturasyonu, fertilizasyon için uygun ortam sağlanması ve embriyonun ilk aşamadan doğuma kadar beslenmesi ve gelişimi için vazgeçilmezdir [10].

Memeli dişi üreme organları üreme dönemi boyunca, hem yapı hem de işlevde sıklıkla değişiklikler gösterir. Bu değişikliklerin bütününe menstrual siklus adı verilir. Cinsel olgunluğa ulaşmış bireylerde ilk menstrual döngünün görülmesi menarş olarak adlandırılır. Menarş ile reproduktif yaşam başlar. Üreme döneminin aktif olan bu evresi 30-45 yıl sürer. Döngüler yaş ilerledikçe düzensiz hale gelir ve sonunda kaybolur, bu aşamanın adı menopozdur [11]. Bu evreden sonra özellikle overde üreme aktivitesi ile ilgili hormon üretimi dolayısıyla oosit üretimi durur ve diğer dişi üreme organlarında değişken olarak fonksiyon kaybı gözlenir [9].

2.1.1. Over Embriyolojisi

Embriyonik dönemin ilk ayında, primordiyal germ hücre popülasyonu vitellüs kesesinden **gonadal (genital) kabartıya** doğru harekete başlar. 6. haftada göçlerini tamamlar ve buraya ulaşamayan germ hücrelerinin gelişimi durur. XX kromozomlarına sahip embriyolarda gonadal kabartı içinde bulunan primitif cinsiyet kordonlarındaki hücreler düzensiz hal alarak kaybolur. Yaklaşık 7. haftada, gonadın yüzey epiteli proliferasyona devam eder, epitel altındaki mezenkim içine ilerler ve **sekonder germ kordonları** (kortikal kordonlar) oluşur. Gonadal kabartıya ulaşan öncül germ hücreleri bölünüp farklılaşarak oogoniuma dönüşürler, aynı zamanda yüzey epitelinden aşağı yerleşen hücreler de foliküler hücreleri oluşturur [12].

2.1.2. Over Histolojisi

Henüz doğum yapmamış kadınlarda yaklaşık 3 cm uzunluğu, 1,5 cm genişliği ve 1 cm kalınlığı olan bademe benzer şekilli açık pembe renkli bir çift organdır. Puberte öncesi düzgün yüzeye sahip olan overler, puberte sonrası her siklusta gerçekleşen ovulasyon kaynaklı düzensiz ve yer yer fibrotik görünümündedir. Menopoz sonrasında ise hacim olarak belirgin azalma gerçekleşir [9].

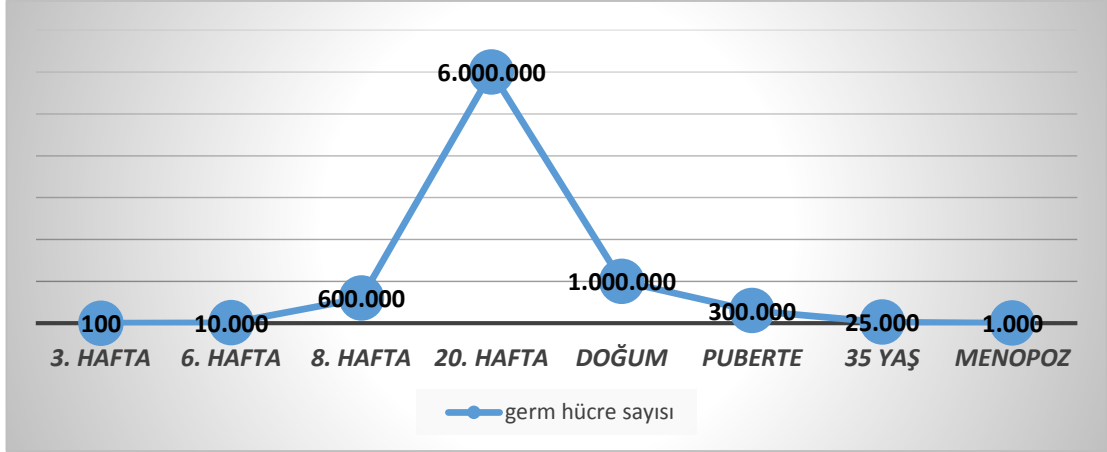
Overlerin en dış tabakası tek katlı kübik, yer yer yassı epitel ile çevrilidir. Bu tabaka **germinal epitel** olarak adlandırılmıştır ve **tunika albuginea** denilen sıkı düzensiz bağ dokuyu çevreler. Tunica albuginea'nın hemen altında ovaryum korteksi yer alır. Overlerin hacim olarak çoğunluğunu korteks oluşturur ve yoğun bağ doku stroması içinde ovaryum foliküllerini barındırır [11]. Her bir folikül içinde tek bir oosit bulunur ve folikül etrafını stromadaki dağınık yerleşimli düz kas hücreleri sarar. Stroma iç biçiminde tipik fibroblastlardan zengindir. Overin merkezinde bulunan medulla kısmı ise gevşek bağ dokusu ve organı besleyen kan damarları, sinir lifleri ve lenf damarları içerir [10].

Gametogenez (gamet hücrelerinin üretimi) ve steroidogenez (steroid hormonların üretimi) olmak üzere overlerin başlıca iki ana görevi vardır. Dışide gamet oluşum süreci **oogenez** olarak isimlendirilir. Daha anne karnında iken başlar, postpartum dönemde de devam eder. Oogenezle gelişen gametlere **oosit**, matür gamet hücrelerine de **ovum** adı verilir. Steroidogenezle overde sentezlenen başlıca iki hormon östrojen ve progesterondur. Östrojen, iç ve dış cinsiyet organlarının gelişim ve maturasyonunu sağlar, ayrıca puberte döneminde sekonder cinsiyet karakteristiklerinin oluşumunu destekler. Bununla birlikte meme duktal ve stromal gelişimi uyarak bez yapısının büyümesine katkıda bulunur. Progesteron, iç genital organlarda meydana getirdiği değişikliklerle gebelik için uygun ortam oluşturur. Ek olarak meme bezlerinde lobüller çoğalmayı arttırarak emzirme dönemi için hazırlık yapar [9].

2.1.2.1. Oogenez

Ovaryumlarda dişi gametlerin (ovum) oluşumuna oogenez adı verilir. Henüz anne karnında iken başlayan bu süreç, doğumdan sonra da devam eder. Gelişen embriyonun 2. ayında ovaryumların barındırdığı 600.000 oogonia üst üste mitotik bölünmeler geçirir. Üçüncü aydan itibaren bir grup oogoniada ilk mayotik bölünme gözlenir, ancak mayozun devam eden aşamalarına ilerlemeden profaz evresinde durdurulur ve **primer oosit**lere dönüşür. Ardışık mitotik bölünmeler sonucu 5. ayda 7 milyondan fazla primer oosit meydana getirir. Bu evreden sonra oositlerin çoğu dejenere olur. Geride kalan oositler 1. mayoz bölünmeye girerler ve profaz evresinde beklerler. Bu aşamadaki primer oositler onları çevreleyen foliküler hücrelerle birlikte **primordiyal follikül** adını alırlar [13].

Tüm primer oositler doğuma yakın dönemde 1. mayoz bölünmenin profaz evresini tamamlarlar ancak metafaz aşamasına girmeden dinlenme evresine geçerler. Bu duraksama OMI (Oosit maturasyon inhibitörü) adı verilen faktör etkisiyle olduğu bilinmektedir. Kız bebek dünyaya geldiğinde overde toplam 700.000-2.000.000 arasında primer oosit bulunmaktadır. Ancak bunların büyük kısmı puberte dönemine kadar kaybolup yaklaşık 400.000 kadarı canlılığını korur (Şekil 1). Var olan primer oositlerde yarıda kalan 1. mayoz bölünme pubertede ilk ovulasyondan önce tamamlanır. Üreme dönemi boyunca sadece 400-500 oosit mature olup atılır (ovulasyon). Ovulasyondan hemen önce 1. mayoz bölünme kaldığı yerden devam eder, metafaz evresi başlar. Primer oosit (2n=46) farklı olarak 23 kromozom içeren **sekonder oosit** ve **1. polar cisim** oluşur. Oluşan bu iki hücrenin kromozom sayıları aynı ancak sitoplazma hacimleri farklıdır. Ardından sekonder oosit II. mayoz bölünmeye girer ve metafaz evresinde durur. Sekonder oosit bir sperm ile döllenirse 2. mayoz tamamlanır. Bu bölünmede DNA replikasyonu olmadığından her biri 23 kromozom bulunduran **ovum** ve **2. polar cisim** oluşur [12].



Şekil 1. Dönemlere göre germ hücre sayısı.

2.1.2.2. Folikülogenez

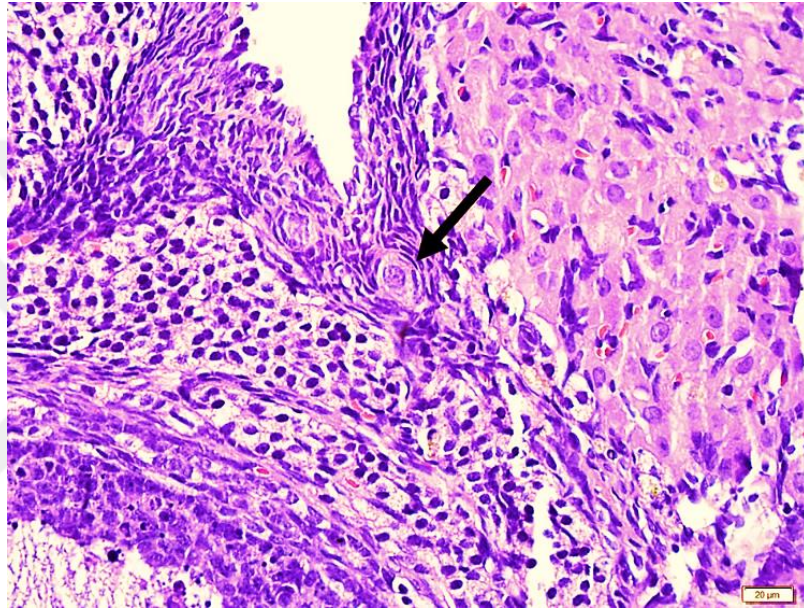
Kadın vücudunda pubertede başlayıp menopoza dönemine kadar her ay siklik olarak bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Bu siklus **menstrual döngü** olarak adlandırılmaktadır ve kadının üreme organlarını olası gebeliğe hazırlar. Hipotalamus, hipofiz bezi, over, uterus, fallop tüpleri, vajina ve meme bezlerini içine alan bu döngüde tüm organlar birbiriyle uyumlu şekilde fonksiyonlarını sürdürür.

Puberte çağına ulaşmış kız çocuklarında hipotalamusta bulunan nörosekretuar hücrelerden sentezlenen GnRH; portal damarlar aracılığıyla hipofiz bezine iletilir. Hipofiz ön lobundan özellikle over üzerinde etkili FSH ve LH salınımı gerçekleşir. FSH temel olarak over foliküllerinin büyümesi ve granüloza hücrelerini uyararak östrojen sentezlenmesini sağlar. LH'nin ana görevi ovulasyonu başlatmaktır, bunun yanı sıra ovulasyon sonrası korpus luteumdan progesteron üretimini uyarır. Bu iki hormon birlikte endometrial büyüme ve gelişmeyi de destekler [12].

FSH sayesinde her menstrual döngüde ovaryumda bulunan yüzbinlerce primordiyal folikülün 5-15 tanesinde bulunan primer oosit, folikül hücreleri ve stromada bir takım değişiklikler meydana gelir. Oositin büyüyüp folikül hücrelerinin yassı formdan kübik hale geliştiği bu evreye primer folikül evresi adı verilir. Bunların arasından sadece biri olgunlaşıp ovulasyon ile folikül içinde bulunan matur oosit ovaryumdan peritoneal boşluğa bırakılır. Bunun dışında seçilip olgunlaşamayan foliküllerin apoptoza uğrayıp kaybolduğu düşünülmektedir [9].

Primordiyal Folikül

Folikülogenezin en erken evresinde gözlenen primer oosit ve oositi çevreleyen tek katlı yassı folikül hücrelerinden oluşan folikül tipidir (Resim 1). Folikül gelişimi ilk olarak intrauterin 16. haftada başlar ve postnatal 6. aya kadar biter. Ovaryumda en fazla sayıda bulunan ve boyut olarak en küçük foliküldür. Overde bulunan oosit rezervini yansıtır ancak inaktif olduklarından herhangi bir belirteçle saptamak mümkün değildir [9].

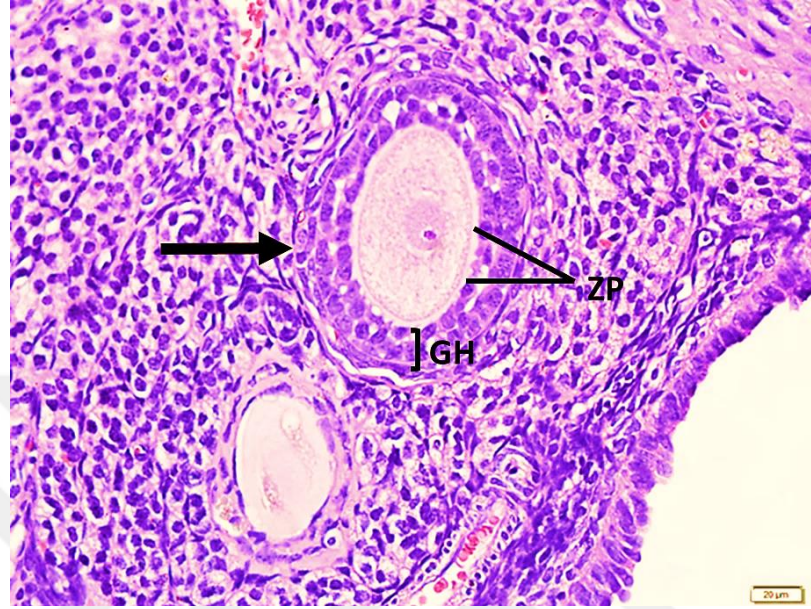


Resim 1. Primordiyal folikül. Ölçek:20 µm

Primer Folikül

Primordiyal folikül içindeki primer oosit büyür ve etrafında bulunan tek katlı yassı hücrelerden oluşan folikül hücreleri gelişerek kübik şekline dönüşür. Foliküle bu evrede “primer folikül” adı verilir (Resim 2). Zaman ilerledikçe oositin özgün proteinler salgılanmaya başlar ve birleşerek oositi hemen dışından sıkıca çevreler. Glikoprotein yapıdaki bu kılıf **zona pellusida** olarak isimlendirilir. Tek katlı kübik hücrelerden oluşan folikül hücreleri ardışık mitoz bölünmeler sonucu oosit etrafında çok tabakalı epitele dönüşür ve artık **granuloza hücreleri** olarak anılırlar. Granuloza hücrelerine komşu bazal laminanın dış çevresinde bulunan stromal hücreler folikülü kılıf benzeri sararlar. Bağ dokudan oluşan bu yapı **teka folikülü** adını alır ve zamanla 2 katmana ayrılır. İç kısımda bulunan kübik formda salgı hücreleri barındıran tabaka

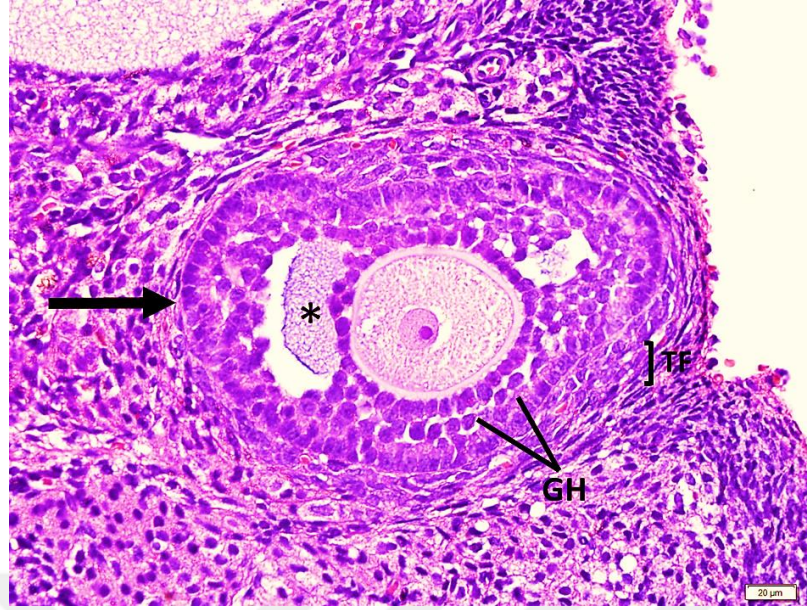
teka interna ismini alır. Bu tabakadaki hücreler LH reseptörü açısından zengindir ve uyarıya yanıt olarak androjen sentezler. Dış kısımda bulunan düz kas hücreleri ve kolajen lif demetleri de **teka eksternayı** oluşturur [9].



Resim 2. Primer folikül (Ok). GH: Granüloza hücreleri, ZP: Zona Pellusida. Ölçek: 20 µm

Sekonder (Antral) Folikül

Primer folikülde granüloza hücreleri 6-12 hücre katı olarak sıralandığında bu hücrelerin arasında boşluklar oluşmaya başlar ve içlerinde sıvı birikir. Hyaluronandan zengin sıvıyla dolu kaviteler zamanla birleşerek hilal şeklinde büyük tek bir boşluk meydana gelir (**antrum**). Bu aşamada folikül artık “sekonder folikül” olarak adlandırılır (Resim 3). Zamanla folikülün ve içindeki antrumun büyüklüğü artar ancak oositin boyutu değişmez [9].

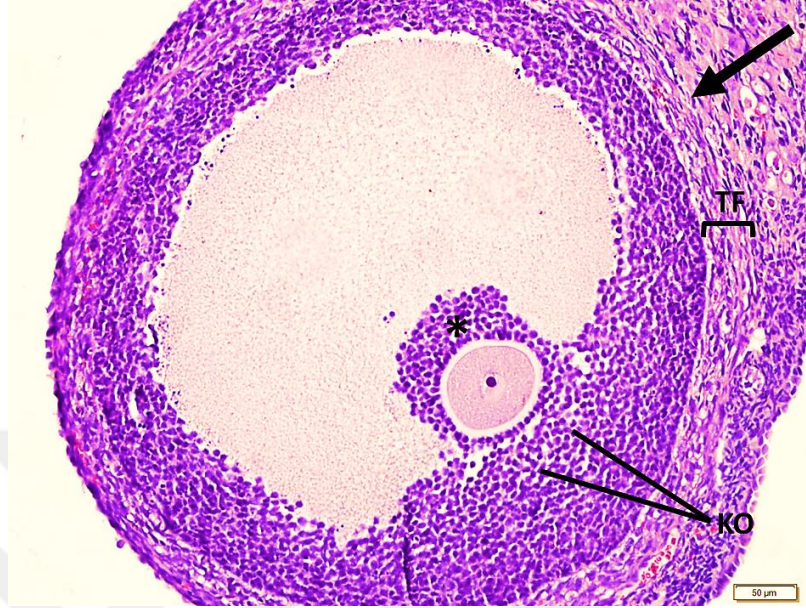


Resim 3. Sekonder folikül (Ok). GH: Granüloza hücreleri, TF: Teka Folikülü, *: Antrum. Ölçek: 20 µm

Graaf (Olgun) Folikül

Oositin etrafında bulunan granüloza hücre grubuna **kumulus ooforus** adı verilir ve antrum büyüdükçe tümsek benzeri görüntü oluşturur. Ovulasyonda oositi sıkıca çevreleyen ve peritoneal boşluğa birlikte atılan kumulus ooforus hücre topluluğu da **korona radiata** olarak adlandırılır (Resim 4). Gittikçe büyüyen folikülün içindeki granüloza hücrelerinin mitotik bölünmesi yavaşlar. Aksine antrumun boyutu artmaya devam ettikçe granüloza hücre tabakası incelik ve hücreler arası bağlantılar gevşer. Oosit ile kumulus hücreleri arası boşluklar artarak aradaki bağ azalır, böylelikle ovulasyonda oositin folikülden atılmasına zemin hazırlanır. Olgun folikülün büyük boyutu sayesinde ovaryum dış yüzeyinde dışarıdan da gözlenebilen kabarıklık meydana getirir. Teka hücrelerinin bu aşamada fonksiyonları artar. Teka internada bulunan hücrelerde LH reseptör aracılı androjen üretimi LH artışına paralel şekilde hızlanır. Teka hücrelerinde vaskülarizasyonun yüksek düzeyde olması ile granüloza hücrelerine androjenler iletilir. Granüloza hücrelerinde FSH'a cevap olarak androjenlerin östrojene dönüşümü katalizlenir. Oluşan östrojenler de folikülün büyümesini uyarır. Ovulasyondan 12-24 saat önce meydana gelen ani LH artışı sayesinde granüloza hücrelerinde bulunan reseptörler desensitizasyona uğrar ve östrojene dönüşüm hızla azalır. Primer oositin yarıda kalan mayozu bu uyarıyla

tetiklenerek ilerler ve 1. mayoz ovulasyondan demen önce tamamlanır. Bölünme sonucu **birinci polar cisim** ve **sekonder oosit** meydana gelir [9].



Resim 4. Graaf folikül (Ok). KO: Kumulus Ooforus, TF: Teka Folikülü, *: Korona Radiata. Ölçek: 50 µm

2.1.2.3. Ovulasyon

Ovulasyon, kısa süre önce 1. mayoz bölünmesini tamamlayan sekonder oositin olgun folikül dışına atılmasıdır. Bu esnada oosit ve etrafında bulunan kumulus hücreleri ovaryumu tamamen terk ederek peritoneal boşluğa bırakılır.

Daha fetal dönemde primordiyal folikül içindeki primer oositler 1. Mayotik bölünmeye başlar, yaklaşık 15-45 sene mayozun profaz evresinde duraklar. Puberteye ulaşan genç kızlarda siklusun yaklaşık 14. günü ovulasyona neden olan bir takım biyokimyasal ve strüktürel değişiklikler meydana gelir. Zamanla antral sıvı hacmi artışı dolayısıyla folikül basıncının artması, LH seviyesindeki değişiklikler sonucu ovaryuma gelen kan miktarı artışı ve teka tabakasında bulunan kapillere iletilmesiyle folikülde hücreler arası ödem artışı, folikül duvarının proteolitik aktivite ile enzimatik yıkımı ve ovaryumda prostaglandin artışı ile teka tabakasındaki düz kas hücrelerini uyarak kasılması gibi faktörlerin birlikte sorumlu olduğu düşünülür [9]. Primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamladığında oluşan her iki hücre aynı sayıda kromatin bulundurur, ancak sitoplazmik bölünme eşit şekilde olmamaktadır. Daha fazla

sitoplazma alan hücre sekonder oosit, diğer kardeş hücresi de 1. polar cisim olarak adlandırılır. Oosit ovaryumdan atılmadan önce sekonder oosit 2. mayotik bölünmeye başlar ve metafaz evresinde durur ve bu evredeyken ovulasyon gerçekleşir. Ancak bir sperm tarafından döllenme gerçekleşirse 2.mayoz bölünme tamamlanır [9].

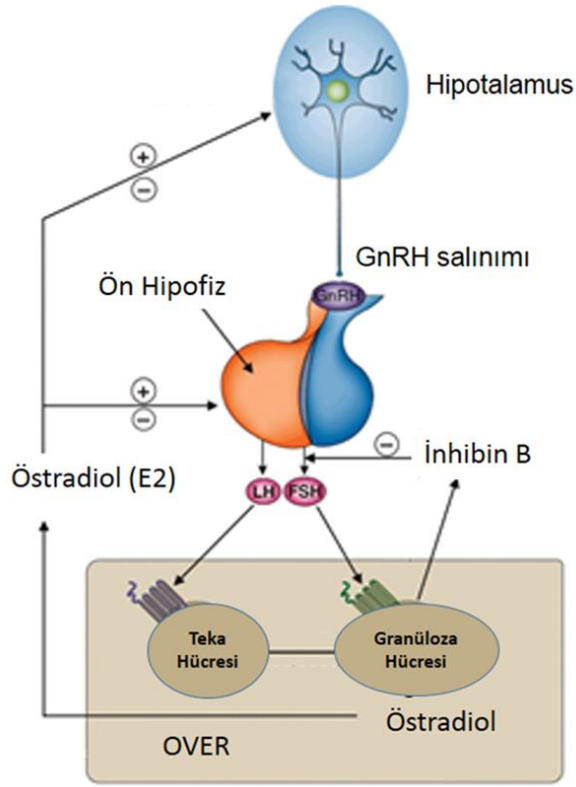
2.1.2.4. Luteinizasyon ve Korpus Luteum

Ovulasyon sonrasında geride kalan ve teka ve granüloza hücrelerinden oluşan rüptüre folikül katlanarak **korpus luteum** adı verilen yapıya dönüşür. Bu yapı bol miktarda kapiller ve bağ doku elemanları barındırır. Ayrıca içerdiği teka ve granüloza hücreleri luteinize olarak **teka lutein** ve **granüloza lutein**'e farklılanır. Hücrelerin boyutu belirgin artar, yağ dropletleri ile şişer, ultrastrüktüel düzeyde steroid sentezleyen hücre görünümü kazanır. Korpus luteum progesteron daha fazla olmak üzere östrojen sentezinden sorumludur ve olası gebelik durumu için endometriumun salgı fonksiyonunu arttırarak implantasyona hazırlar. Gebelik olmaması durumunda korpus luteum varlığını 10-14 gün idame ettirir. HCG yokluğunda sentez kapasitesi azalır ve dejenerasyon süreci başlar. Kademeli olarak hücreler hacim kaybeder ve otolize girer, hücre içi hyalin materyal artışı ile yerini **korpus albikansa** bırakır. Overin korteksinde bulunan bu yapı zamanla ortadan kaybolur [9].

2.1.3. Dişi Üreme Fizyolojisi

2.1.3.1. Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks

Kadınlarda görülen menstrual döngü her ay temel olarak overde siklus başında folikül gelişimi, aralarından dominant folikülün öne çıkması, seçilen folikül içindeki oositin overden atılması (**ovulasyon**) ve eş zamanlı olası gebeliğe karşı endometriumun uygun hale getirilmesi olaylarını içerir. Bu olayların senkronize şekilde gerçekleşmesi de aslında hipotalamus-hipofiz-over aksında indükleyici ve inhibe edici hormonların düzgün şekilde salınımından kaynaklanır (Şekil 2) [10, 14].



Şekil 2. Kadınlarda hipotalamo-hipofizer-gonadal aks [15].

Hipotalamus

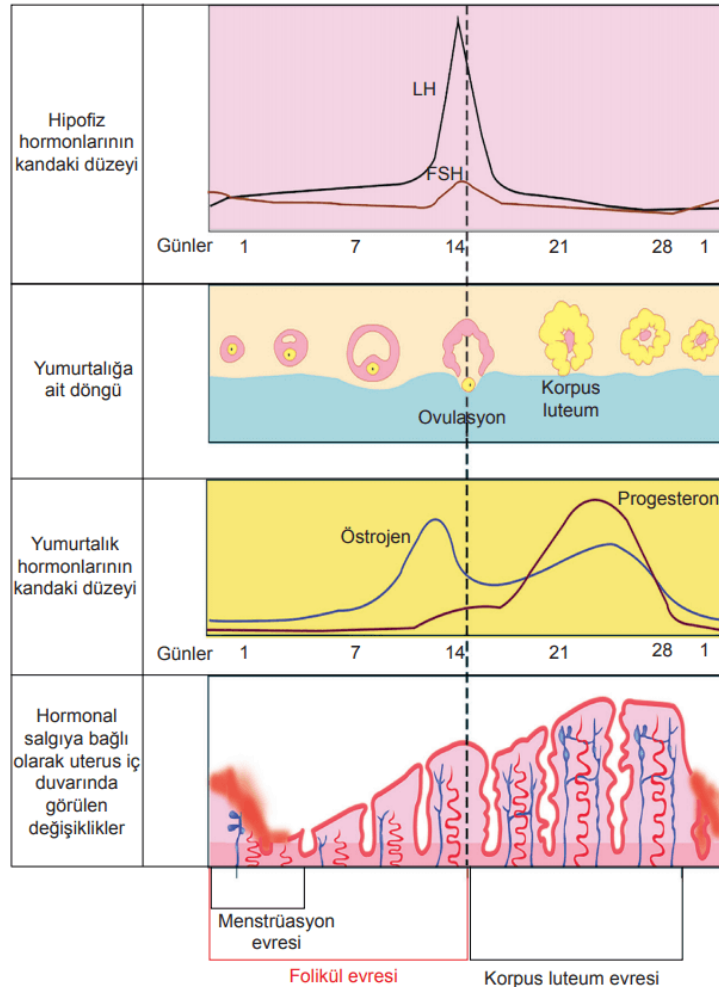
Hipotalamus, talamusun hemen altında bulunan ve içinde pek çok görevden sorumlu küçük nukleuslar barındıran önbeyin bölümüdür. En önemli fonksiyonlarından biri sentezledikleri hormonlarla hipofiz bezini uyararak endokrin sistem ve beyin arasındaki iletişimi kurmaktır. Hipotalamusta bulunan nöronların salgılarından biri olan **GnRH** reproduktif sistemde aktif rol oynayan 10 aminoasitten oluşan dekaeptid yapılı hormondur. Yarılanma ömrü çok kısa olduğundan salınımından hemen sonra hipotalamo-hipofizer portal sistem aracılığıyla hipofiz ön lobuna iletilir. Hipofizde LH ve FSH salınımını uyarabilmesi için GnRH'ın **aralıklı (pulsatil)** olarak salgılanması gereklidir. Devamlı GnRH ile uyarı yapıldığında kısa süreli uyarılmada artış izlense de zamanla hipofizde bulunan reseptörlerin duyarsızlaşmasına bağlı LH ve FSH seviyelerinde azalma görülür. GnRH salınımında olabilecek bir patolojinin zincirleme olarak hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı bozacağından, ritmik salınımı reproduktif sistem işleyişi için kritiktir [10, 14, 16].

Hipofiz

Hipotalamustan iletilen GnRH; hipofiz ön lobta yerleşen bazofilik hücrelerin reseptörleri uyararak **FSH** ve **LH** salınımı gerçekleşir. FSH ve LH, over ve testis fonksiyonunun düzenleyicileri olarak gereklidir. Bu iki hormon glikoprotein yapısında olup salınımları menstrüel sıklusa göre değişiklik gösterir. Özellikle LH salınımı GnRH miktarı ile yakından ilişkilidir. Örneğin GnRH reseptörleri antagonize edildiğinde LH salınımı %90 azalırken FSH miktarında sadece %40 civarı düşüş olur. Benzer durum GnRH artışında da gözlenir. Hipofizdeki gonadotrop hücrelerden salınan FSH ve LH kadınlarda overleri uyararak östrojen, progesteron başta olmak üzere doğrudan ve dolaylı birçok hormon ve faktör üretimini sağlar [10, 14, 16].

Over

FSH bazal değerinin %10-30 artışı over korteks tabakasında bulunan foliküllerin gelişimi için gereklidir. Bu yükseliş ile her sıklusta bir ya da birden fazla folikül büyüyüp gelişmeye başlar. Gelişen foliküllerden biri seçilerek **dominant folikül** haline gelir ve salgıladığı **östrojen** ile FSH'ı negatif feedback ile inhibe eder. Diğer foliküllerin gelişimi durur ve atreziye uğrarlar. Dominant folikül büyüdükçe içinde bulunan granüloza ve teka hücrelerinden salınan E₂ miktarı artar. Bu artış dişi genital organları geri kalan sıklusta olası fertilizasyon ve implantasyon için uygun hale getirir. Ayrıca artan E₂ pozitif feedback ile hipofizde LH pikine ve ardından ovulasyona zemin hazırlar (Şekil 3). Oosit te ovulasyondan hemen önce 1. mayoz bölünmesini bitirir, 2. mayoz bölünmeden metafaz aşamasında bekler. Fertilizasyon gerçekleşirse 2. mayoz da tamamlanır. Ovulasyondan sonra oositini kaybetmiş folikülde geri kalan hücreler progesteron ağırlıklı hormon sentezine başlar ve zamanla luteinize olurlar [10, 14, 16]

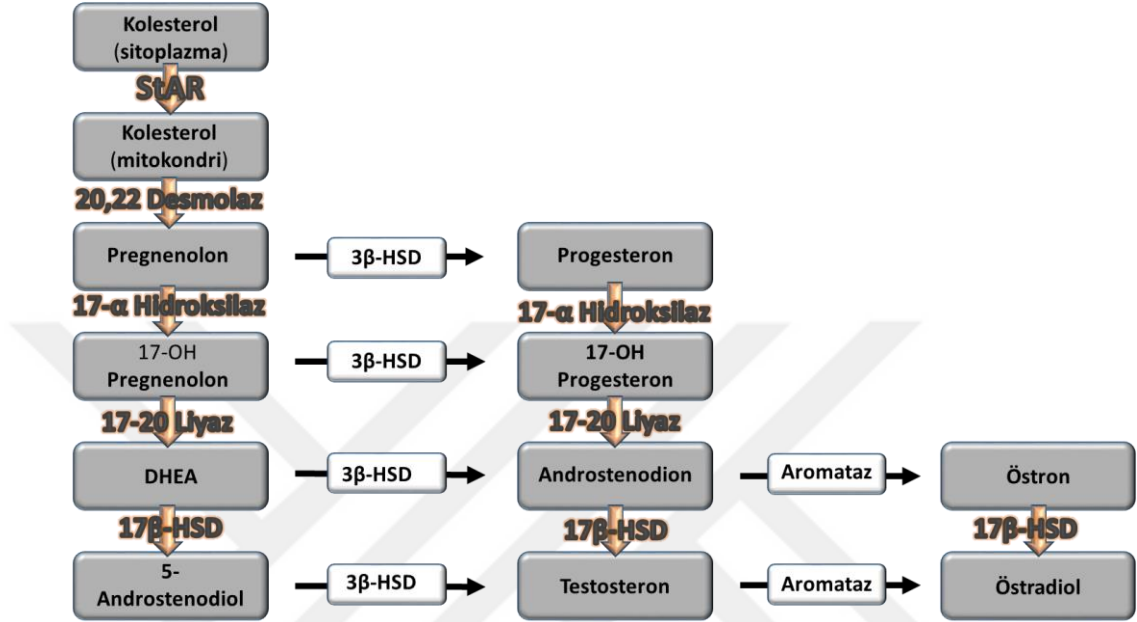


Şekil 3. Kadınlarda menstrüel siklus [14].

2.1.3.2. Steroidogenez

Steroidogenez; organizmada ilgili organlar tarafından steroid yapıda bileşik sentezlenmesi, steroid yapıda hormon üretilmesi demektir. Steroid hormonlar, fetal yaşamdan yaşlılığa dek birçok gelişimsel ve fizyolojik süreçle ilişkilidir. Bu hormonların tümünün öncülü **kolesteroldür**. Over, testis ve adrenal bezler, kolesterolden aktif steroid hormonlar üretebilen ve bu hormonları dolaşıma direkt veren başlıca organlardır. Steroidogenezle üretilen temelde 3 grup hormon vardır: **mineralokortikoidler, glukokortikoidler ve seks steroidleri**. Hangi hormonun üretileceği; sentezin gerçekleştiği organda ilgili enzimin var olup olmasına bağlıdır. Örneğin adrenal kortekste bulunan 21-hidroksilaz ve 11- β hidroksilaz enzimleri sayesinde glukokortikoid ve mineralokortikoidler sentezlenebilirken gonadlarda bu

enzimlerin olmaması nedeniyle bu hormonlar üretilemez. Esas olarak seks steroidlerin gonadlarda, glukokortikoid ve mineralokortikoidlerin adrenal kortekste sentezlendiği bilinir. Overde steroidogenezin sorumlu çoğu enzim foliküllerdeki granuloza hücrelerinde bulunur (Şekil 4) [17-19].



Şekil 4. Overde steroidogenezin basamakları. 3β-HSD: 3β-Hidroksisteroid Dehidrogenaz, 17β-HSD: 17β-Hidroksisteroid Dehidrogenaz, DHEA: Dehidroepiandrosteron.

Östrojen

Östrojen, kadınların menstruasyon döngüsünde ve diğer memeli hayvanların dişilerinde östrus siklusunda önemli rol oynayan temel steroid hormondur. Reprodüktif sistem yanı sıra vasküler, kas-iskelet, sindirim, nöroendokrin, bağışıklık sistemlerinde ve metabolizma üzerinde pek çok fonksiyonu bulunmaktadır. Östrojenin bilinen 3 formu vardır; **östron (E₁)**, **östradiol (E₂)** ve **östriol (E₃)**. Her biri puberteden menopoza sonrasına kadar farklı dönemlerde öne çıkarak dişi cinsiyet karakter oluşumunu destekler. Örneğin fertil dönemde yoğun sentezlenen E₂ en aktif türevidir. Vücutta başlıca meme duktus ve stromal doku gelişimi, genital organların maturasyonu, dişi tipi kıllanma, osteoblastik aktivite gelişimi, kalça, göğüs ve üst bacakta yağlanma artışı sağlar [20, 21].

Östrojen Reseptörleri

Östrojen, **Östrojen Reseptörü-alfa (ER- α)** ve **Östrojen Reseptörü-beta (ER- β)** olmak üzere hücre nükleusunda bulunan reseptörler aracılığıyla işlev görür. İlk olarak 1986 yılında Dr. Greene ve ark. tarafından meme kanser hücre hattında ER- α olarak, 1996 yılında Dr. Gustafsson ve ark. tarafından prostat salgı epitel hücrelerinde ER- β olarak tanımlanmıştır. Klasik ER (östrojen reseptörü) mekanizmasında nükleusta bulunan reseptöre östrojen bağlanır ve E₂-ER kompleksi hedef genlerde bulunan östrojen yanıt öğelerini dimerize eder. Bu reseptörlerin esas hedef hücreleri over, uterus ve hipofiz bezinde bulunur. Klinikte östrojenle ilişkili patolojilere yönelik birçok tedavi, ER- α ve ER- β hedef alarak sağlanır. Özellikle selektif ER- α stimülasyonu ile östrojene ait biyolojik yanıtların çoğu oluşur.

Östrojen reseptörlerinin her iki formu, memeli overlerinde farklı bölümlerde lokalizedir. ER- β daha yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen sadece foliküllerde granüloza hücrelerinde izlenir. ER- α ise teka ve stromal hücrelerde yaygın olarak, granüloza ve luteal hücrelerde ise daha az miktarda bulunur [20-22].

Son yıllarda yapılan araştırmalarda membran üzerinde yeni bir östrojen bağlayıcı protein türü bulunup 2007'de resmi olarak G-proteinine bağlı östrojen reseptörü (GPER) adıyla kaynaklara eklenmiştir. Östrojenlerin genel fizyolojik ve patolojik süreçlerde hızlı yanıtlarına aracılık etmedeki rolü, insan ve hayvan modellerinde kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır.

Hücrelerde östrojen aracılı sinyal mekanizmaları genomik ve non-genomik şeklinde ikiye ayrılır. Genomik yanıt, östrojen molekülünün reseptöre bağlanarak nükleusa göçünü ve spesifik DNA dizileriyle etkileşimi ifade eder. Genomik olmayan yanıt ise bir takım hücre içi sinyal yollarıyla gen ekspresyonun dolaylı olarak regülasyonudur [21].

Östrojen Sentezi

Östrojenlerin organizmadaki homeostazı, dengeli sentez ve deaktivasyon ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Tüm steroid yapıda hormonlar gibi östrojen de esas olarak kolesterolden sentezlenir. İlk olarak **StAR (Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein)** aracılığıyla hücre içi kolesterol mitokondri dış zardan iç zara iletilir ve iç membranda bulunan kolesterol desmolaz ile pregnenolona dönüştürülür. Overlerde ve adrenal

korteksin zona retükularis tabakasında sırasıyla 17 α -hidroksilaz ve 17,20-liyaz enzimleri sayesinde pregnanolondan önce 17 α -hidroksipregnenolon, ardından dehidroepiandrosteron (DHEA) oluşur. 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) enzimi, DHEA'nın androstenediona dönüşümünü katalizler. Sadece overde bulunan **17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz** enzimi ile androstenedion testosterona çevrilir. Overde androjen üretiminin temel yeri teka hücreleridir ve östrojen sentezinde gereken öncülleri granüloza hücrelerine aktarır. İçerdikleri LH reseptörleri sayesinde LH tarafından stimüle edilirler, FSH'tan etkilenmezler. Başlarda granüloza hücrelerinde sadece FSH reseptör bulunsa da zamanla FSH uyarımıyla hücre yüzeyinde LH reseptörleri belirir. Ayrıca artan FSH düzeyi FSH reseptör sayısını ve östrojen miktarını arttırarak granüloza hücre proliferasyonu ve folikül büyümesini indükler [19].

Östrojen sentez aşamalarından en önemlisi 19 karbonlu steroidlerin biyolojik aktif molekül olan E₂'ye dönüşümünü sağlayan **aromataz** (östrojen sentaz, CYP19A1) enzimi tarafından gerçekleştirilir [23]. Aromataz enzimi overde başlıca granüloza hücrelerinde bulunur ve FSH tarafından kontrol edilir. Puberte döneminden sonra overde östrojen sentezinde görev alan aromataz enzimi teka hücrelerinde oluşan androstenedion ve testosterondan sırasıyla östron ve E₂ oluşturur. Aromataz enzim ekspresyonu insanlarda ve sıçanlarda esas olarak foliküllerde granüloza hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda, ovulasyon sonrasında ise korpus luteumda gözlenir. Granüloza hücrelerindeki aromatisasyon kapasitesi teka hücreleri tarafından üretilen androjen prekürsörleriyle ilişkilidir. Foliküler fazda folikülde östrojen üretimi; FSH ve LH'nin sinerjistik etkisinin granüloza ve teka hücrelerini uyarmasıyla elde edilir [18, 21, 24].

Östrojenler esas olarak overlerde sentezlenirken karaciğer, pankreas, adrenal bezler, yağ dokusu, meme ve gebelikte plasenta gibi diğer dokularda az miktarda üretildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gonad dışındaki organlar kolesterolü 19 karbonlu steroide dönüştüremediği için; östrojen sentezini diğer dokulardan taşınan 19 karbonlu steroid ve yerel aromataz enzimi ile gerçekleştirir [19].

Östrojen Yıkımı

Sülfonasyon, vücutta çeşitli nörotransmitter, lipid, hormon ve ilaçların metabolizmasında gözlenen önemli bir reaksiyondur. **Sülfotransferazlar (SULT)** adı verilen enzim ailesi bu reaksiyonları gerçekleştirir. İnsanlarda, üç SULT ailesi, SULT1, SULT2 ve SULT4 keşfedilmiştir ve her grup içinde en az 13 enzim tanımlanmıştır. **Östrojen sülfotransferaz (SULT1E1)**, ailedeki diğer enzimler içinde E1, E2 ve çeşitli sentetik östrojenlere afinite gösteren tek SULT'tur. Bu enzim östrojen ve türevlerine sülfat bağlayarak reseptörlerine bağlanmalarını engeller, dolayısıyla hormonları inaktif forma dönüştürmüş olur. SULT1E1 geni 4. kromozom üzerinde bulunur ve mRNA'sı birçok dokuda tespit edilmiştir. Dolaşımda bulunan E₂ esas olarak karaciğerde, bir kısmı da overde bulunan SULT1E1 ile sülfatlanır. SULT1E1'dan sorumlu genlerin delesyonu, hem erkek hem de dişi deney hayvanlarında üreme anormallikleri ile sonuçlanır. Enzimin lokal östrojen aktivite modülasyonu sayesinde periferik dokular fazla östrojen maruziyetinden korunur. Sülfatlanan östrojen türevi dolaşımda adeta depo form şeklinde bulunur ve hedef dokuda sülfataz enzimiyle aktif hale dönüşmeye hazırdır [20, 25-28].

2.1.4. Dişi Sıçanlarda Üreme Sistemi

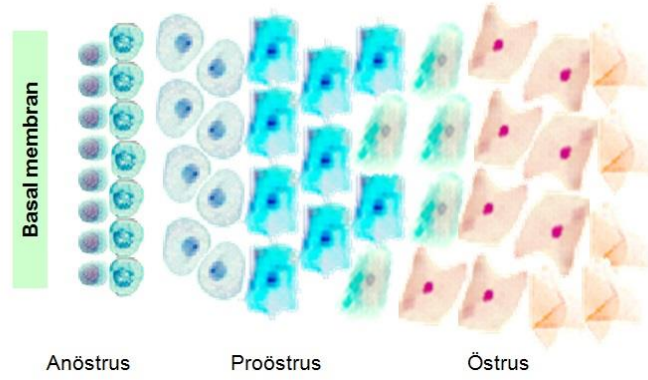
Sıçanlar, puberteden menopoza kadar mevsimden bağımsız olarak tüm yıl siklik aktiviteye sahip kemirgenlerdir. Üreme organları bir çift ovaryum, tuba uterina, uterus, serviks, vajen, klitoral bez ve klitoristir. Hızlı üreyebilmesi, küçük olduklarından deneylerde manipülasyonun rahat olması, elde etme ve bakım sürecinde az maliyetli olması, insanlarda yaklaşık 28 güne denk gelen menstrüel döngünün sıçanlarda çok daha kısa sürede tamamlanması, elde edilen bulguların insana uyarlanabilmesi gibi nedenlerle sıklıkta dişi üreme sistemi konulu çalışmalarda model olarak tercih edilmektedir [29, 30]. Kadınlarda görülen menstrüel döngünün dişi sıçanlarda karşılığı **östrus siklusu**dur ve puberte döneminden itibaren (postnatal 28-40. gün) gözlenir. Gebe olmadığı zaman düzenli aralıklarla östrus siklusu görüldüğünden poliöstrik olarak gruplandırılırlar. Cinsel açıdan matür dişi sıçanlarda östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer ve **proöstrus**, **östrus**, **metöstrus** ve **diöstrus** olmak üzere 4 evreden oluşur. Bu evrelerde cinsel davranışlar, hormon düzeyleri ve vajinal smearde elde

edilen hücre tipleri temel farklılıklar gösterir [31, 32]. Östrus döngüsünün aşamaları, boyalı smear örneklerinde hücrenin sitolojik özellikleri ve smear kalınlığı gözlemlenerek tanımlanır ve ayırt edilir.

2.1.4.1. Dişi Sıçanlarda Östrus Siklusu Evre Saptanması

Sıçanlarda östrus siklusu tayini dişi üreme sistemi ile ilgili araştırmaları, embriyonik dönem çalışmaları, koitus için uygun gün saptama ve gebelik tespiti gibi pek çok alanda önem arz eder. Bu amaçla bugüne kadar birtakım yöntemler uygulanmıştır. Başlıca hayvanın davranışsal & morfolojik değişimlerinin izlenmesi, vajinal sürüntü alınarak incelenmesi ve vajina elektriksel direncinin ölçülmesi şeklinde sıralanabilir. Davranışsal değişiklikler olarak baş ya da omurgaya dokunulduğunda kulaklarda titreme, pelvik uyarı sonrası lordozis ve genel vücut hareket artışı gözlenir. Hayvanın sık aralıklarla gözlenmesi ve tecrübe gerektirmesi dezavantajlarıdır. Vajinal mukusta elektriksel iletkenlik, vajene yerleştirilen proba ölçülür. Siklus boyunca vajinal mukustaki değişim esasına dayanır. Özellikle kızgınlık dönemini somut verilerle saptayabilir. Elektriksel direnç proöstrus döneminde en yüksek seviyede iken östrusta minimum düzeye iner. Net sonuç vermesi avantajı olarak sayılsa da cihaz gereksinimi nedeniyle pek tercih edilmemektedir [30, 33, 34].

Günümüzde östrus tayininde en sık kullanılan metod **vajinal sitolojik inceleme**dir. Metodu uygulamanın kolay olması ve kesin sonuç vermesi açısından pek çok memelide östrus evresini belirleme ve üreme fonksiyonu üzerine etkileri değerlendirmede tercih edilir. Sıçanlarda östrus siklusu boyunca östrojen düzeyindeki değişiklikler vajen epitel hücrelerinde proliferasyonu uyarak varolan hücrelerin belli dönemlere özgü değişimine zemin hazırlar. Östrojenin düşük düzeyde seyrettiği dönemde epitel hücre sitoplazmaları net seçilebilen küçük bazofilik yuvarlak hücrelerden oluşur. Östrojenin yüksek seviyelere ulaştığı evrede ise hücre boyutları artmış, nükleusu piknotik şekilli ya da kaybolmuş, asidofilik boyanan epitel hücreleri gözlenir. Östrojenik etki ile vajina epiteli çok katlı hücrelerden oluşur ve yüzeydeki hücrelerin beslenmesi zorlaşır, zamanla canlılıklarını kaybederler (Şekil 5) [33, 35].



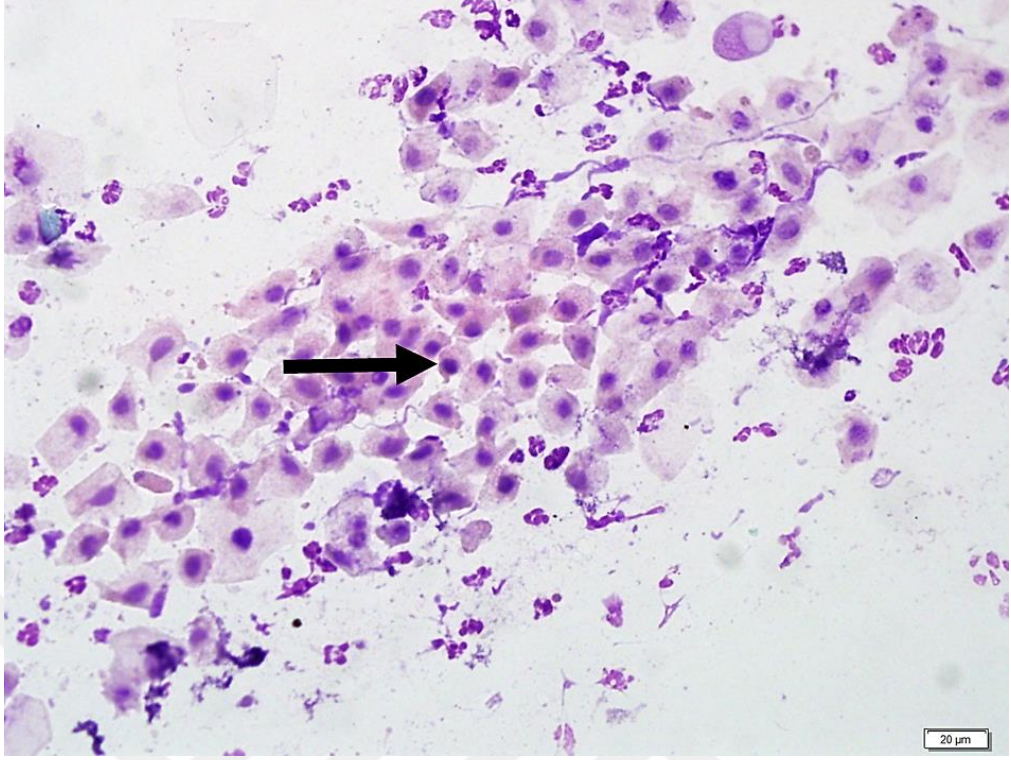
Şekil 5. Dişi sıçanlarda östrus evrelerine göre vajina epitel hücreleri [36].

Vajinal sitolojik inceleme farklı şekillerde gerçekleştirilebilir. Vajinal yıkama; vajene temiz pipetle bir miktar serum fizyolojik verilip birkaç tekrardan sonra sıvının lama yayılıp kurutulması işlemidir. Ya da steril yayma fırçaları ile vajinal bölgeden sürüntü alınarak **vajinal yayma (smear)** şeklinde elde edilir. İkisinde de vajinal bölgede bulunan hücreler örneklenmiş olur. Laboratuvarında çalışacak kişilerin deneyimine göre herhangi biri tercih edilebilir. Örneklerin mümkünse sabah 09.00-10.00 saatlerinde ve her gün aynı saatte alınıp hayvanın adı ve deney günü dikkatlice not edilerek saklanması dikkat edilmesi gereken önemli bir konudur [30, 34, 37].

Vajinadan alınan örnekleri değerlendirirken sıklıkla 4 farklı epitel hücresi ve nötrofiller gözlenir:

a. Parabazal hücreler:

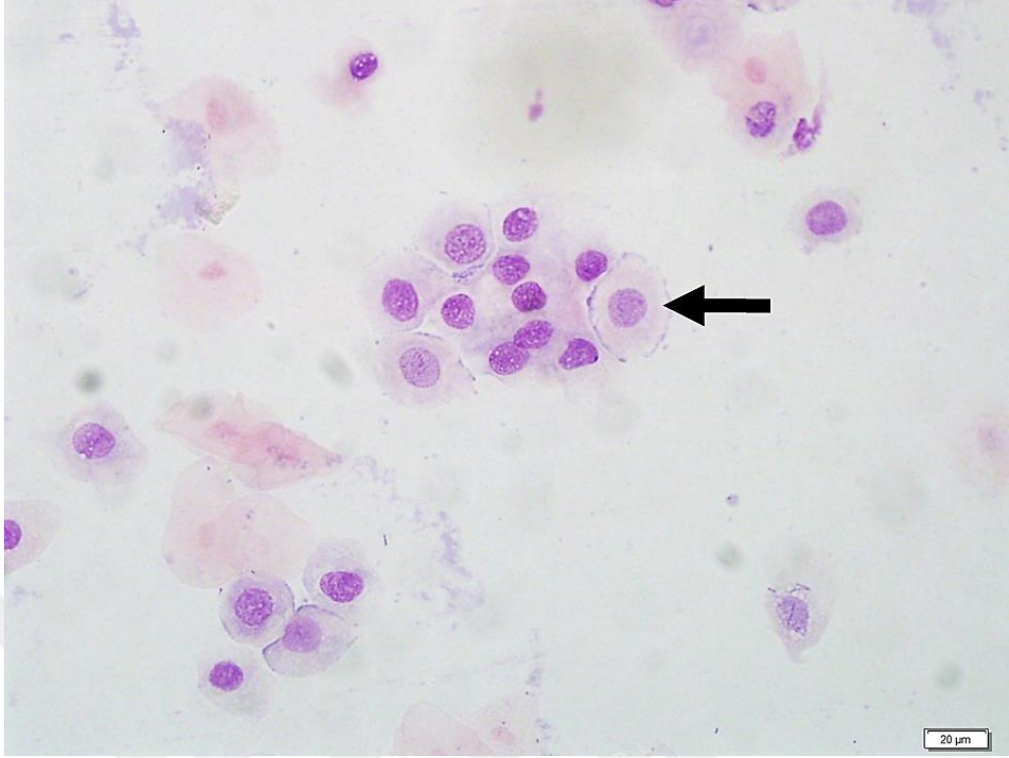
Vajen epitel bazal membranının hemen üstünde bulunan hücre grubudur. Sürüntüde görülen en küçük hücre tipidir (Resim 5). Yuvarlak şekilli, bazofilik boyanan, nükleus-sitoplazma oranı 1:1 ya da daha büyüktür. Esas olarak proöstrus evresinde ve diöstrusun sonlarına doğru görülebilir [30, 33-35].



Resim 5. Parabazal hücre (ok). Giemsa boyama. Ölçek: 20 µm.

b. İntermediyer hücreler:

Parabazal hücrelerinin üzerinde konumlanmış, nispeten büyük boyuta sahip hücrelerdir (Resim 6). Parabazal hücrelere kıyasla daha küçük nükleus-sitoplazma oranına sahiptir, daha açık mavi-mor renge boyanır. Bu hücreler östrus dışında tüm evrelerde bulunabilir [30, 33-35].



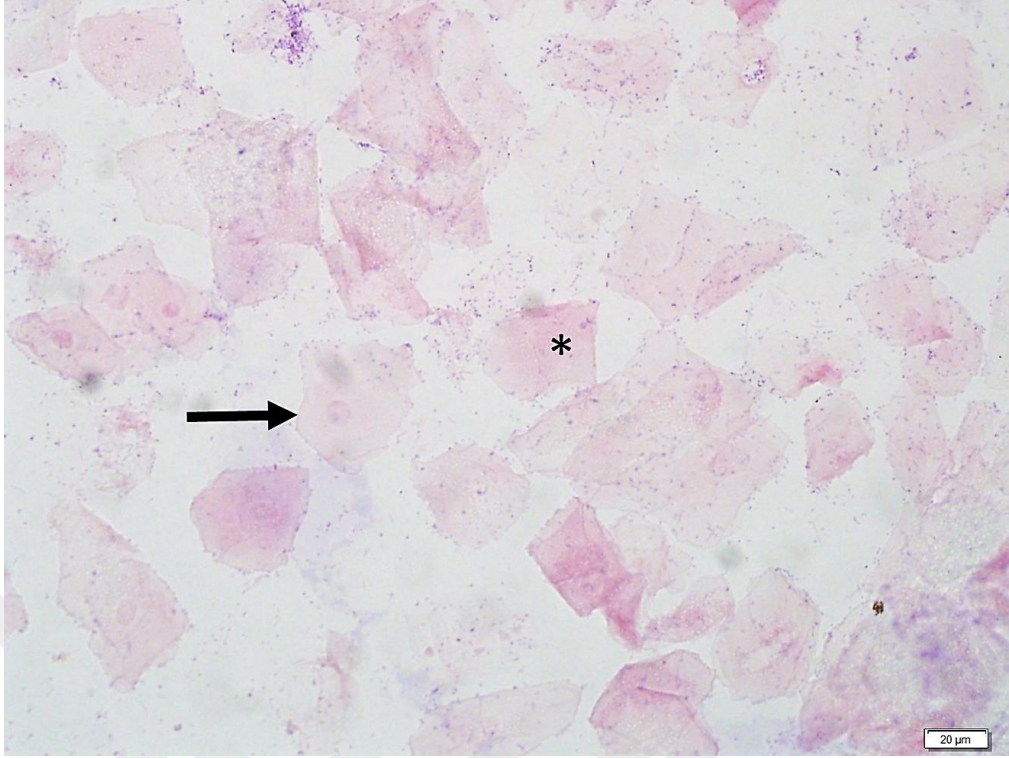
Resim 6. İntermediyer hücre (ok). Giemsa boyama. Ölçek: 20 µm.

c. Kısmi kornifiye hücreler:

Şekilleri yuvarlaktan poligonale doğru değişkendir, hücreler genelde düzensiz kenarlı ve katlanmış haldedir (Resim 7). Çekirdekleri sağlam, dejenere ya da piknotik olarak bulunur. Bazal membrandan uzak bulunduğu için bir miktar keratinize olabilir [30, 33-35].

d. Kornifiye hücreler:

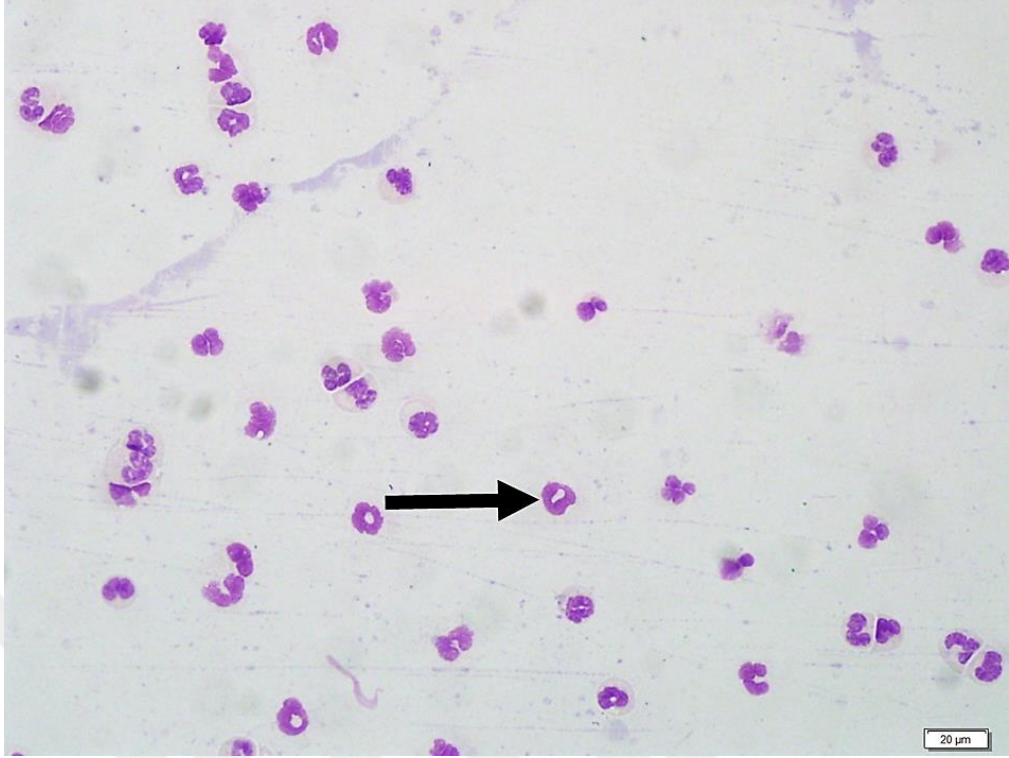
Vajina epitelinin en üst tabakasında yer alırlar. Yaş olarak en ileri hücrelerdir, çekirdeklerini kaybetmişlerdir, hücre kenarları düzensiz ve köşelidir (Resim 7). Östrojen maruziyetinin en yüksek olduğu evrede görülmeye başlarlar. Östrus evresinde baskın olmak üzere proöstrusun sonlarına doğru belirirler [30, 33-35].



Resim 7. Kısmi kornifiye (ok) ve kornifiye hücre (*). Giemsa boyama. Ölçek: 20 µm.

e. Nötrofiller:

Nötrofiller vajen epitel hücrelerine göre çok küçük olması ve çok loblu nükleusları ile diğerlerinden kolayca ayrılır (Resim 8). Preparasyon sırasında bu hücreler belli yerlerde yoğunlaşıp çekirdek görüntülenmesi zorlaşabilir. Ayrıca epitel hücrelerine göre hassas yapıda olduklarından bazen hazırlık aşamasında hücre bütünlüğü bozulabilir. Her iki durumda da tecrübeli araştırmacılar tarafından ayırt edilirler [30, 33-35].

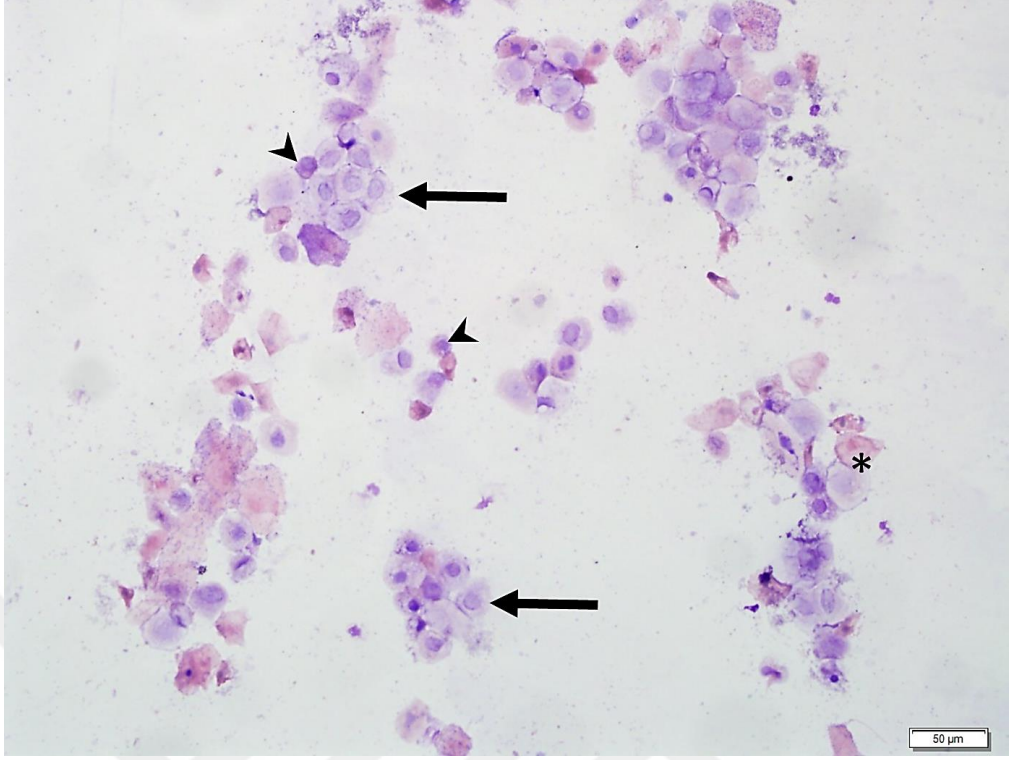


Resim 8. Nötrofil (ok). Giemsa boyama. Ölçek: 20 µm.

Proöstrus

Proöstrus yaklaşık 12 saat sürer. İnsanda görülen **proliferatif (foliküler) faz** ile uyumludur. LH pulsatil olarak salınır ve bu evrede maksimum seviyeye ulaşır. E₂ ise evrenin başlangıcında düşük miktarda iken sonlarına doğru folikül gelişimine paralel en yüksek seviyede ölçülür. Yüksek E₂ düzeyi endometrium yüzey epitel hücrelerinin proliferasyonunu uyarır, mevcut epitel hücreleri tek katlı prizmatik iken yüksek prizmatik hücrelere dönüşür (Resim 9).

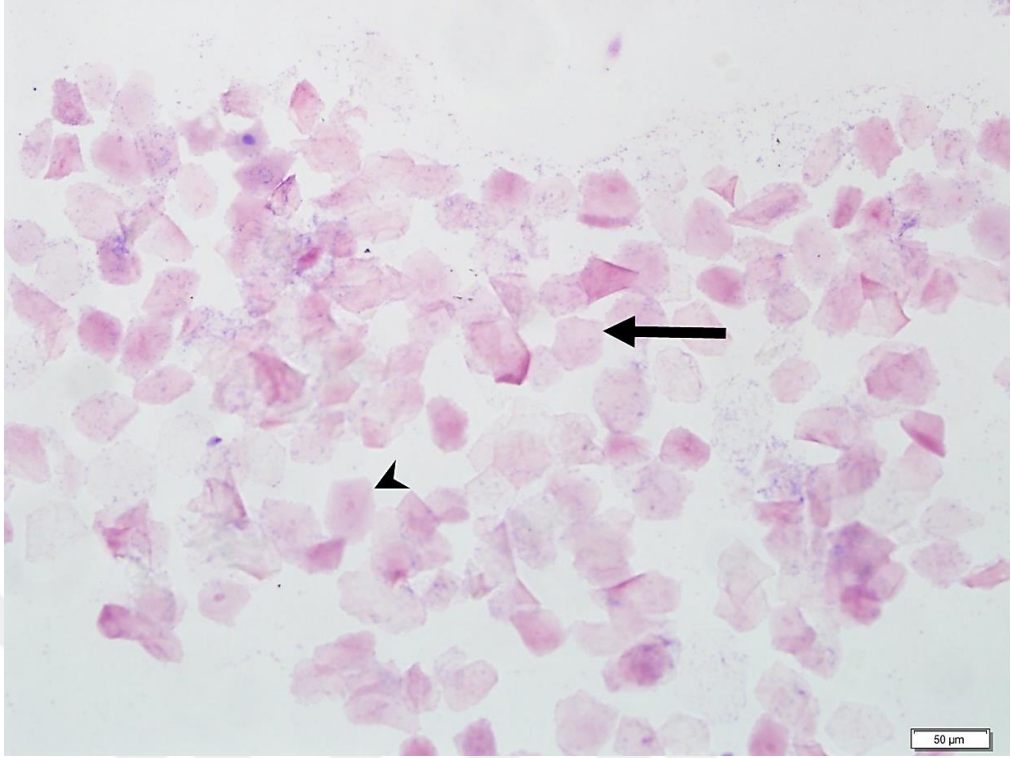
Proöstrus bitimine yakın dişi sıçan cinsel birliktelik için erkeğe izin verir, **lordozis** (omurganın ekstansiyona getirilip vajina girişinin açığa çıkarılması) hareketi gözlenir. Dişiden alınan vajinal örneklerde baskın olarak parabazal ve intermediyer hücre, az miktarda da kısmi kornifiye hücre gözlenir, nötrofile rastlanmaz. Bu evrede yaygın olarak izlenen çekirdekli epitel hücreleri kümelenme eğilimi gösterirler. Proöstrustan östrusa geçiş aşamasında gözlenen ovulasyonu LH'nin yüksek seviyede oluşu tetikler. Proöstrusun sonlarına doğru görülen progesteron artışı da ovulasyon başlamasını uyarır [30, 31, 33, 35, 38].



Resim 9. Proöstrus evresinde vajinal sürüntü. Okbaşı: parabazal hücre, ok: intermediyer hücre, *: kısmi kornifiye hücre. Giemsa boyama. Ölçek: 50 µm.

Östrus

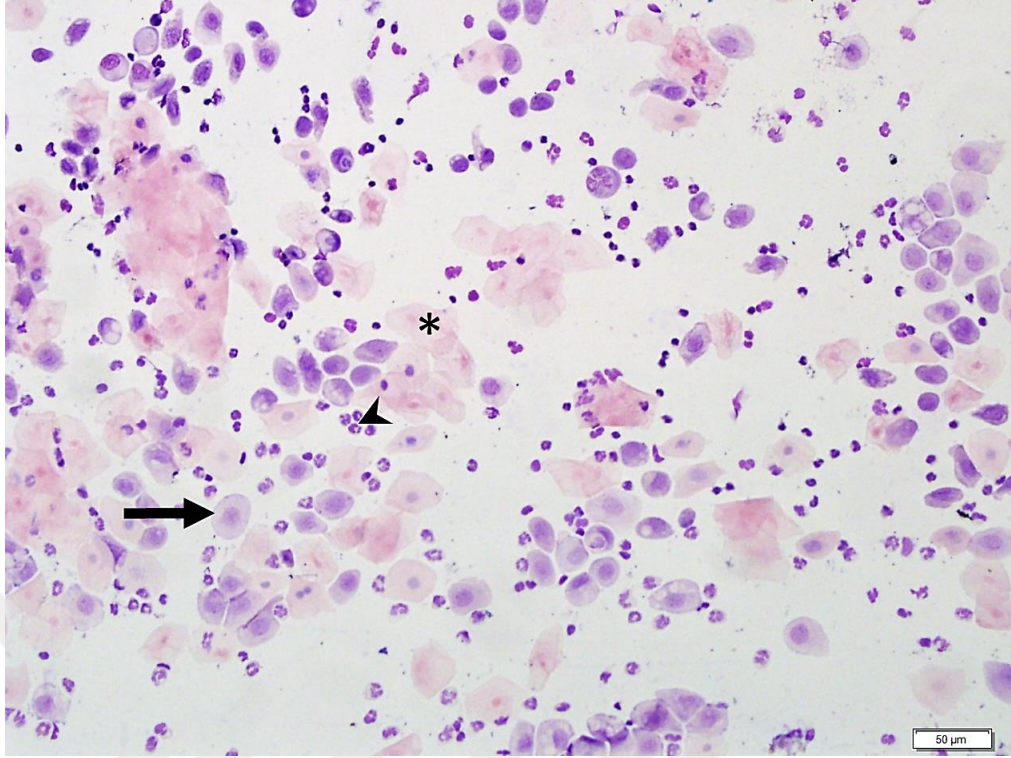
Östrus evresi 24-48 saat izlenir. İnsandaki **geç proliferatif (foliküler) faza** denk gelir. Evrenin başlangıcına yakın ovulasyon gerçekleşmiştir. Dişi sıçan bu dönemde de erkeği kabul etmeyi sürdürür. Proöstrustan sonra azalan E₂ seviyesine bağlı olarak endometrium yüzey epitelinde de proliferasyon devam etmez ama hücreler mevcut yüksekliğini korur. Yer yer yalancı çok katlı görünüm ve apoptotik hücreler izlenir. Uterus kavitesi genişler ve içi sıvı dolar, böylece blastosist varlığında implantasyon sürecine yardımcı olur. Dişi sıçandan östrus döneminde alınan örneklerde çok sayıda kısmi kornifiye ve kornifiye hücreler izlenir. Evrenin bitimine yakın çekirdekli epitel hücreleri olarak adlandırılan parabazal ve intermediyer hücrelere de rastlanır (Resim 10). İnceleme yapılan arka plan oldukça temizdir. Bu evrede kalınlıkları artan vajina duvarından nötrofiller geçemediği için gözlenmez [30, 31, 33, 35, 38].



Resim 10. Östrus evresinde vajinal sürüntü. Ok: kornifiye hücre, okbaşı: kısmi kornifiye hücre. Giemsa boyama. Ölçek: 50 µm.

Metöstrus

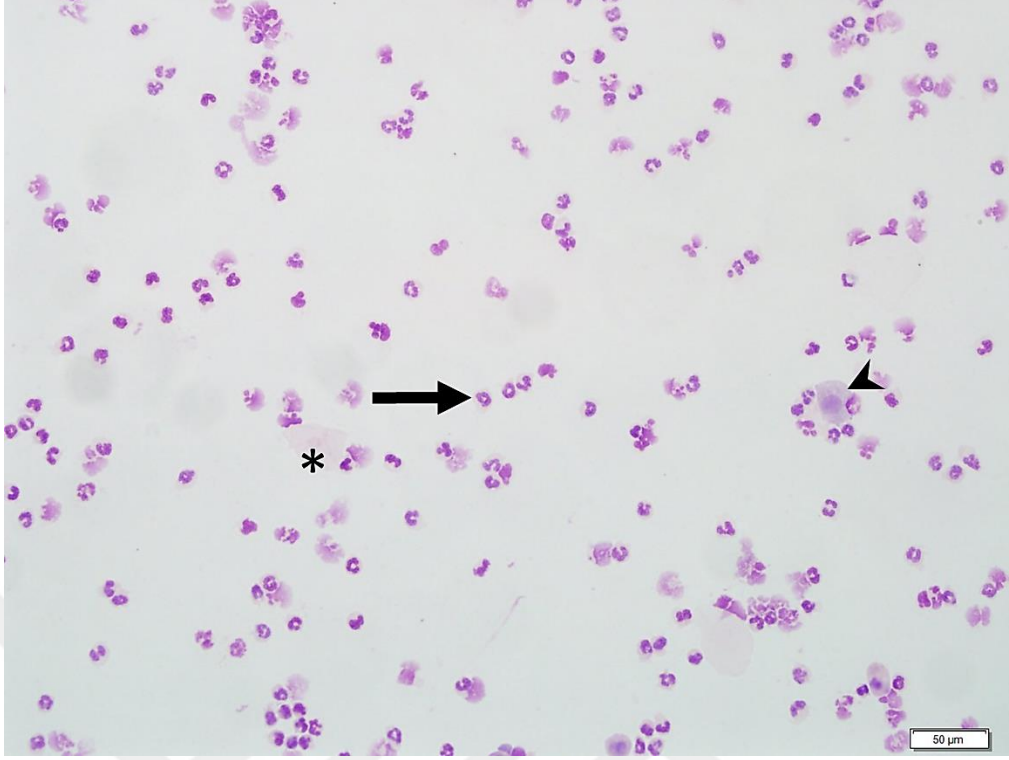
Metöstrus evresi; yaklaşık 6-8 saat gözlenir. İnsanda görülen **luteal (sekretuar) faz başlangıcı**na karşılık gelir. Diöstrus öncesinde saptanması nispeten zor bir evredir. Bu evreden sonra dişi erkeğe cinsel birliktelik için izin vermez. Metöstrus ve diöstrus evresinde östradiol ve progesteron hormonunun serum değeri düşüktür. Uterustaki kan damarları kollabe olup sayıca azalır. Vajinal sürüntüde intermediyer ve kısmi kornifiye hücre göze çarpar, ayrıca çok sayıda nötrofil bulunur (Resim11). Genel olarak hücre yoğunluğu fazladır. Evrenin sonuna doğru hücre sayısı azalır [30, 31, 33, 35, 38].



Resim 11. Metöstrus evresinde vajinal sürüntü. Ok: intermediyer hücre, okbaşı: nötrofil, *: kısmi kornifiye hücre. Giemsa boyama. Ölçek: 50 µm.

Diöstrus

Diöstrus evresi östrus siklusunda görülen en uzun evredir, yaklaşık 48-72 saat sürer. İnsanda **luteal (sekretuar) fazın sonu** ile uyumludur. Evre başlangıcında östradiol seviyesi düşüktür, ancak proöstrusa doğru aşamalı olarak artar. Alınan vajinal smearlarda parabazal, intermediyer ve kısmi kornifiye hücrelerin kombinasyonu görülür. Hücre yoğunluğu zamanla belirgin azalır. Diöstrusta baskın bulunan hücre grubu nötrofillerdir, çoğu zaman parabazal hücre etrafında grup şeklinde izlenir (Resim 12). İpliksi yapıda mukus artışı nedeniyle arka plan koyu renkli ve kirli izlenebilir [30, 31, 33, 35, 38].

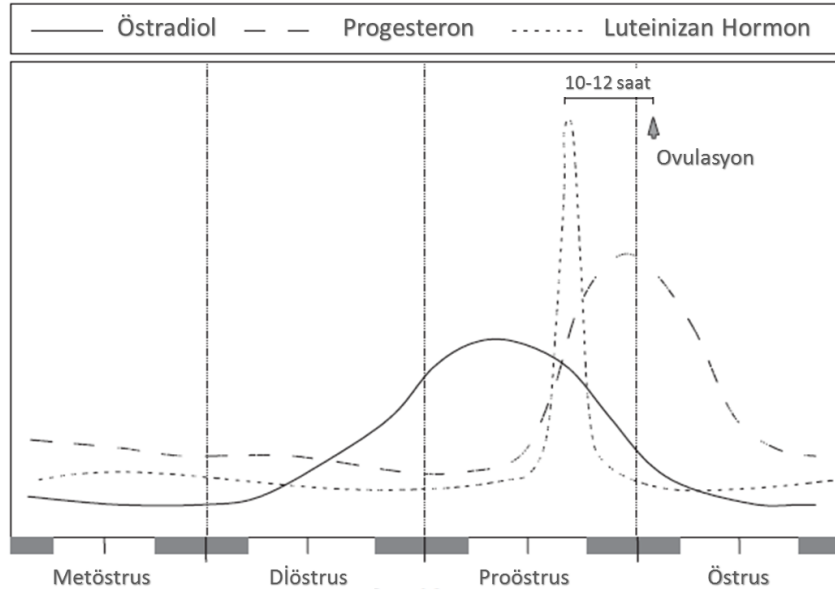


Resim 12. Diöstrus evresinde vajinal sürüntü. Ok: nötrofil, okbaşı: intermediyer hücre, *: kornifiye hücre. Giemsa boyama. Ölçek: 50 µm.

İnsana benzer şekilde fare ve sıçanlarda görülen östrus siklusu nöroendokrin sistem ile kontrol edilir. Hormonal değişimlerin sonucunda siklus evresine uygun şekilde genital organlarda değişiklik izlenir.

Proöstrus evresinin ilerleyen saatlerinde FSH, LH ve prolaktin yükselmeye başlar. FSH artışı overde bulunan foliküllerin maturasyonunu uyarır. Büyüyen foliküllerden salınan östrojen de zamanla artar ve kanda östrojen en yüksek seviyeye ulaşır. Artan östrojen düzeyi pozitif geri bildirimle LH pikini tetikler (Şekil 6). Proöstrus sonuna yakın görülen LH piki ovulasyon ve korpus luteum oluşumunu uyarır. Ovulasyon proöstrus ve östrus evreleri arasında gerçekleşir, östrus döneminin sonunda östrojen bazal seviyeye iner. Metöstrus ve diöstrus döneminde baskın hormon progesterondur, gebelik gerçekleşmezse korpus luteum bozulup progesteron seviyesi azalır. Özetle proöstrus boyunca folikül gelişimi, östrus başında ovulasyon, metöstrusta korpus luteum oluşumu gözlenir. Diöstrus dinlenme evresi olarak geçer [31].

SIÇANLARDA ÖSTRUS DÖNGÜSÜ



Şekil 6. Sıçanlarda östrus döngüsünde hormonal değişiklikler [32].

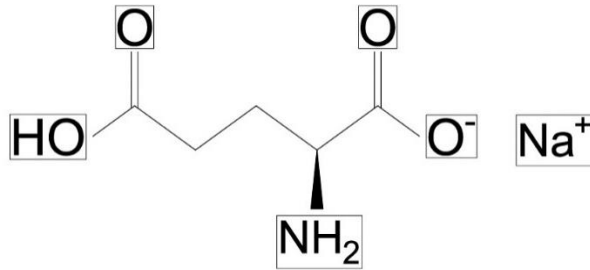
2.2. Monosodyum Glutamat (MSG)

Gıda katkı maddeleri koruyucu, renklendirici, lezzet ve iştah arttırıcı amaçla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son yıllarda dünya genelinde çeşitli sebeplerden dolayı gıda katkı maddesi (özellikle MSG) tüketimi artmıştır [39]. Temel nedeni ise organik kaynakların hızla azalması ve organik gıdaların maliyetinin yüksek oluşu, tüketicinin ucuz ve pratik olması nedeniyle hazır gıdalara yönelimin artışı ve artan ihtiyaca yönelik yapay üretilen gıdaların raf ömrünü uzatmak, lezzetini arttırmak olarak gösterilebilir.

Günümüzde gıda katkı maddesi olarak en yaygın MSG'dir. MSG, ilk kez 1908 yılında Japon bilim adamı Ikeda tarafından keşfedilmiştir; parmesan peyniri, domates, kuşkonmaz, et ve bir deniz yosunu türü olan *kombuda* tatlı, acı, tuzlu, ekşiden farklı bir tad olduğunu düşünmüş ve Japonca'da 'umami' olarak tanımlanan ve Türkçe'de "lezzetli, iştah açıcı" anlamına gelen ismi vermiştir [40, 41]. Sonrasında yapılan çalışmalarda dilde özel tad reseptörlerinin olduğu gösterilmiş ve umami tadının beşinci temel tad olduğu kabul görmüştür. Bezelye, soya, kuşkonmaz, mısır, mantar, domates, havuç gibi sebzeler, deniz yosunu, yengeç, balık, karides, istiridye gibi deniz ürünleri, et, tavuk ve parmesan peyniri doğal olarak yüksek miktarda glutamat içermektedir. Umami reseptörüyle algılanan bu tad, yiyeceklere kendilerine özgü bir lezzet katar.

Prof. Ikeda tarafından Japon mutfağında yaygın kullanılan *kombu*dan glutamat elde edilmiş ve glutamata sodyum tuzu ekleyerek suda kolay çözünebilmesini sağlanmıştır. Gıda endüstrisinde “Monosodyum Glutamat” ismiyle yerini alan bu katkı maddesi bakteriyel fermentasyon yöntemiyle seri üretime başlanıp tüm dünyaya sunulmuştur. Kolay ve ucuz maliyeti nedeniyle zamanla diğer katkı maddelerinin güçlü rakibi haline gelmiştir. Avrupa ve Amerika’da yaşayan insanların tükettikleri yiyeceklerde bulunan MSG miktarı **1 gr/gün**’dür. Ortalama ölümcül doz (LD50) sıçanlarda **15 gr/kg** ve farelerde **18 gr/kg** olarak bulunmuştur [40, 41].

MSG; glutamatın tek sodyum içeren tuzudur ve nişasta, mısır, şeker pancarı, melas veya şeker kamışının fermentasyonu ile elde edilir. İçeriğinin %78’si glutamat, %22’si sodyum ve sudan oluşur (Şekil 7). Türkiye’de paketli gıdalarda **E621** koduyla belirtilir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından resmi gazetede yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’nde en yüksek değer 10 g/kg olacak şekilde (katkı maddesi içermesine izin verilmeyen gıdalar hariç) tüm gıdalarda bulunabileceği belirtilmiştir [42].



Şekil 7. Monosodyum Glutamat’ın Kimyasal Yapısı [43].

Saf MSG kendi başına iştah arttırıcı bir tad oluşturmaz. Doğru konsantrasyonda uygun yiyeceklerle birleştiğinde diğer lezzetlerin algılanmasını arttırır ve sinerjistik etki göstererek yiyeceğin tadını optimize eder. Özellikle, et, tavuk ve balık içeren işlenmiş ve dondurulmuş besinlerde (salam, sucuk, sosis, nugget, kroket vb.), kuru karışım halindeki bütün hazır çorbalarda, baharat karışımlarında, bulyonlarda, patates ve mısır cipslerinde, bebek mamalarında, çoğu tuzlu olan paketli gıdalarda ve konservelede kullanılmaktadır [44]. Paketli gıdalar etikette belirtilmediği halde MSG içerebilir; böylece lezzeti arttırılan bu gıdaların farkında olmadan yüksek miktarda tüketimi mümkündür [45].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile toksisiteleri ispatlanan bazı katkı maddelerinin tüketimi yasaklanmıştır. Her ne kadar Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından MSG'nin “önerilen seviyelerde yenildiğinde” insan sağlığı açısından güvenli olduğu söylene de [41], birçok araştırma MSG'nin insanlar ve deney hayvanlarında birçok sistemde toksik etkilerinin olduğunu göstermiştir [2, 8, 23, 43, 45-48]; ancak toksik etkilerinin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.2.1. MSG'nin Organizma Üzerine Etkileri

Bilinen en temel etkisi dildeki tad reseptörlerini uyararak besinlerin lezzeti ve kişide iştah artışı olsa da; 100 yılı aşkın süredir yapılan birçok çalışmada MSG'ın insanlar ve deney hayvanları için toksik olduğunu göstermektedir. Deney hayvanlarına MSG uygulanarak oluşturulan çeşitli modellerde karaciğer, beyin, timus, over, tuba uterina, testis, böbrekler ve hematopoetik sistem için toksik olduğu rapor edilmiştir [43]. İnsanlarda ilk kez Çin'de yerel lokantalarda yemek yiyenlerde görülmesi nedeniyle “Çin Restoranı Sendromu” adı verilen MSG duyarlılığı bulunan insanlarda görülen bir dizi semptomlar saptanmıştır. Bunlar MSG içeren yemek tüketen kişilerde 20-30 dk sonra başlayan 2-3 saat sonra gerileyen baş ağrısı, yüzde kızarıklık, terleme, çarpıntı, halsizlik, ön kol ve göğüste yanma hissi, göğüs ağrısı, bulantı, kusma, ishal gibi belirtilerdir.

MSG dilde bulunan tad reseptörlerini uyararak yiyeceklerin lezzetini artırır. İştaha olumlu yönde katkısı vardır ve tüketen kişilerde kilo alımına neden olur. Yapılan bir çalışmada sıçanlara subkutan enjeksiyon ya da oral MSG uygulanmasının kan şekeri dengesinde bozulmaya yol açtığı, dislipidemi ve kilo artışına neden olduğu görülmüştür [49]. Benzer bir çalışmada MSG'nin sıçanlara oral uygulanmasının bozulmuş glukoz toleransı, hiperinsülinemi ile ilişkili olduğunu ve obezite ya da vücut kitle indeksi artışı açısından olumsuz etkilere yol açtığını kanıtlamıştır [50]. MSG'nin insanlarda daha fazla miktarda ve daha sık aralıklarla yemek yeme davranışına sebep olmasından, gelecekte obezite, metabolik sendrom, hipertansiyon, diyabet ve Alzheimer gibi bazı hastalıkların görülme sıklığında artış olacağı düşünülmektedir [51]. Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada postnatal ilk 10 gün boyunca MSG enjeksiyonları uygulanan yavruların erişkin dönemlerinde obezite, boy kısalığı, insülin direnci ve

subfertilite gibi birçok nöroendokrin bozukluk görüldüğü bildirilmiştir [52]. MSG verilerek obez modeli oluşturulan başka bir çalışmada dişi sıçanlarla hiperinsülinemi, obezite ve adiposit disfonksiyonu gözlemlendiği ve tüm bunlara bağlı olarak üreme sisteminde aksaklıklar olduğu kaydedilmiştir [53].

Sindirim sistemi üzerine etkilerini araştıran çalışmada 1 ay boyunca sıçanlara oral yolla verilen MSG'nin karaciğer üzerinde toksik etkiler oluşturduğu ve sindirim sistemi epiteli üzerine kostik etkilerinin görüldüğü rapor edilmiştir. Özellikle çocuklar için üretilen gıdalara MSG katkısı yapılmaması gerektiği ve çocukların MSG içeren fast-food tarzı yiyecek ve paketli ürün tüketiminden kaçınmaları gerektiği vurgulanmıştır [2]. Bir başka çalışmada MSG verilen farelerde yapılan incelemelerde sinüzoidlerde dilatasyon, inflamatuvar hücrelerde artış, parankimde özellikle santral ven çevresinde histopatolojik değişiklikler saptanmış, sonuçta hepatotoksisite ve karaciğerde artan oksidatif stresin nedeni olarak gösterilmiştir [54]. Boonnate ve ark. tarafından yürütülen çalışmada sıçanların içme sularına MSG verilip 1, 3, 6 ve 9. aydaki etkileri gözlemlenmiştir. Sıçanlarda zamana bağlı önemli ölçüde pankreas β hücre kitlesinin azaldığı, pankreas adacıklarında hemoraji ve fibroz arttığı bulunmuştur. Diyetle yüksek düzeyde MSG alımının pankreas üzerinde olumsuz etki oluşturmaya zemin hazırladığı bildirilmiştir [55].

MSG'nin ana içeriği olan glutamat; hâlihazırda beyindeki temel uyarıcı nörotransmitterdir. Fizyolojik olarak beyin fonksiyonlarını yerine getirmede esansiyeldir ve normal sınırlarda dışarıdan alımı gereklidir. Yüksek miktarda alındığında ise organizmada nörolojik semptomlara neden olduğu görülür. Deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda MSG'nin merkezi sinir sistemini olumsuz etkileyerek hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında bozulma, duygudurum stabilitesinde değişiklikler, ağrı duyarlılığında artış, hipotalamik nöronlarda dejenerasyon ve nöroendokrin anormalliklere yol açtığı yayınlanmıştır [56, 57]. Benzer konuda yapılan çalışmalarda da MSG ile ilişkili olabileceği öngörülen hastalıklar arasında migren, epilepsi, otizm, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz ve Parkinson hastalığı belirtilmiştir [41].

Dolaşım sistemi üzerine etkilerini araştıran çalışmada elde edilen bulgulara göre erişkin erkek farelere MSG uygulamasının, çeşitli antioksidan enzim

aktivitelerini düşürerek arteriyel dokuda oksidatif hasara zemin hazırladığı, dolayısıyla aterosklerozun başlamasından sorumlu olduğu saptanmıştır [58].

2.2.2. MSG'nin Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

MSG'nin erkek üreme sistemine etkileri araştırılan yayınlarda üreme sistemi için gerekli hormon ve organların işleyişini bozarak infertiliteye giden sonuçlar doğurabileceği ispatlanmıştır [59]. İsmail ve ark. yaptığı çalışmada [60] üç ay boyunca oral yolla MSG uygulanan sıçan testis dokularında histopatolojik bulgular, anormal morfolojiye sahip spermiler ve infertiliteye yol açabileceği ilk kez tespit edilerek MSG kullanımının gözden geçirilmesi gerektiği savunulmuştur. Zaman içinde yapılan çalışmalarda erkek fare ve sıçan testisinde özellikle primer spermatosit ve genel spermatogenetik seride sayıca azalma ve hücre morfolojilerinde anormallik, leydig hücrelerinde apoptoz artışı, kanda testosteron düzeyinde azalma, testiküler hemoraji ve testis doku ağırlığında azalma tespit edilmiştir [61-63]. MSG'nin bu etkileri hipotalamo-hipofizer-testis aksında regülasyonu bozması ve testis dokusunda oksidatif hasarı arttırması nedeniyle ortaya çıkardığı düşünülmüştür. Ochiogu ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise prenatal dönemden erişkin döneme kadar MSG'ye maruz kalan sıçanların epididimal sperm rezervi, testis doku ağırlığı, serum testosteron, serum AST, ALT, total protein miktarında anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiştir [64].

Benzer şekilde MSG'nin dişi üreme sistemine etkilerini inceleyen araştırmacılar; overin histomorfolojik değerlendirmesinde dejenere oosit içeren değişik evrelerde foliküller, oosit ve granüloza hücre çevresinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kortekste bulunan stromal hücre ve bazal membran destrüksiyonu, meduller dejenerasyon, atretik folikül sayısında artış, korpus luteum yokluğu, graaf folikül sayısında azalma gibi birçok patoloji gözlemiştir [44, 65, 66]. Ayrıca yayınlarda erişkin sıçanlara MSG uygulandığında kontrol grubuna kıyasla primer, sekonder ve graaf folikül sayılarında azalma, atretik ve kistik folikül sayılarında artış ve E₂, FSH düzeyinde azalma bulunmuştur [45, 46, 67]. Bu etkilere neden olarak temelde MSG'nin overde oksidatif stresi arttırması gösterilmiştir. Üreme sistemi ile ilgili yapılan bir başka çalışmada 1 ay boyunca oral yolla MSG verilen erişkin sıçanların fallop tüpü epitel hücrelerinde vakuolizasyona, organ lümeninde vasküler

permeabiliteyi arttırarak hemorajiye neden olduğunu ve tüp çapını önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır [7]. Yapılan başka çalışmalarda MSG'nin yetişkin sıçan overleri üzerinde birtakım zararlı etkilere yol açabileceği, böylece dişi subfertilite & infertilite neden olabileceği vurgulanmıştır [4, 5, 47, 68, 69].

2.3. Serbest Radikaller

Organizmadaki işleyiş sonucu meydana gelen, son yörüngelerinde bir ya da birden fazla çiftlenmemiş elektron bulunduran yüksek enerjili moleküllere **serbest radikaller** denir. Eşlenmemiş elektron içerdikleri için kararsız yapıda olup kararlı hale geçme isteğindedirler ve diğer moleküllerle rahatça elektron alışverişi yaparlar. Kimyasal yapıları stabil olmadığından organizmada protein, deoksiribo nükleik asit (DNA), nükleotid ve lipid yapılı biyolojik moleküllerle etkileşime girerek hasar oluştururlar [70].

Günümüzde vücudun çeşitli yerinde oluşan bu hasarın hücrelerde ve organlarda yaşlanmayı hızlandığı, çeşitli kanser türüne sebep olduğu, bağışıklık sistemini zayıflattığı, sperm ve oositte fonksiyon bozukluğu oluşturup infertiliteye zemin hazırladığı, özellikle sinir sistemi gibi birtakım sistemde dejeneratif hastalığa yol açtığı bilinmektedir [71].

Vücutta oluşan serbest radikaller ile doğal savunma sistemi arasında hassas bir denge söz konusudur. Bu radikallerin verdiği hasara karşılık serbest radikalleri yakalayıp stabilize eden, oksidan hasarı önleyen koruyucu enzim ve moleküllere “**antioksidan**” adı verilir. Normalde antioksidan ajanlar tarafından serbest radikallerin çeşitli yapılara verdiği zarar kontrol altında tutulur. Ancak bu denge oksidan ajanlar lehine bozulursa hücre ve doku hasarı kaçınılmazdır. Antioksidan kapasitenin aşıldığı bu durum **oksidatif stres** olarak adlandırılır. Bu durum antioksidan ajanlarla telafi edilemeyip ilerlemesi durumunda hücre ve dokularda oksidatif hasar gözlenir [70, 72].

2.3.1. Serbest Radikal Kaynakları

Organizma canlılığını koruduğu sürece serbest radikal oluşumu da devam eder. Serbest radikaller vücutta hem endojen olarak üretilir hem de ekzojen kaynaklar

aracılığıyla meydana gelir. Endojen kaynaklar başlıca mitokondride aerobik solunum gerçekleşirken elektron transport sisteminden, inflamasyonda patojenlere yanıt olarak nötrofil ve makrofajdan, ksantin oksidaz, sitokrom oksidaz gibi enzimlerin girdiği tepkimelerden, askorbik asit, adrenalin ve flavin gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonundan, zihinsel ya da fiziksel stres sonucu artan kortizol ve katekolamin salınımından üretilir. Asbest, benzen, formaldehit gibi hava kirleticileri, UV, gamma, X-ışınları, mikrodalgadan yayılan ışınlar, boya, parfüm, temizlik ürünü, pestisit gibi kimyasallar, trihalometan, kloroform gibi su kirleticiler, alkol, sigara, uyuşturucu kullanımı ekzojen yolla vücutta serbest radikal üretimine neden olur [70, 72].

Serbest radikaller genelde oksijen ve nitrojen kaynaklıdır. Reaktif oksijen türlerine süperoksit, hidroksi, peroksi, hidrojen peroksit, hidroperoksi, ozon ve singlet oksijendir. Reaktif nitrojen türleri ise başlıca nitrik oksit, azot dioksit, nitröz asit, nitrozil katyonu, nitronyum katyonu, diazot tetraoksit, nitroksi anyonu, peroksinitrit olarak sayılabilir. Serbest radikaller arasında en tehlikelisi olup, hücre metabolizması sırasında oksijen barındıran birçok tepkime sonucunda meydana gelir [71].

2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller fizyolojik düzeyde olduklarında organizmada faydaları gözlenir. Bazı hücreler normal fonksiyonları sırasında O_2^- , H_2O_2 ve NO üreterek ya da salınımını uyararak serbest radikal açığa çıkarırlar. Örneğin nötrofil ve makrofajın fagosite edilmiş patojenleri yok etmesinde, sitotoksik lenfosit tarafından kanser hücrelerini öldürmede, sitokrom enzimlerinin vücuttaki kesnobiyotikleri detoksifiye etmesinde, aerobik solunumda mitokondriden ATP üretiminde ve hücre proliferasyonunda serbest radikallerin yararlı etkilerinden söz edilebilir. Ayrıca intraselüler kalsiyum (Ca^{+2}) salınımı, nükleusta transkripsiyon faktörlerinin uyarılması, tirozin kinaz enzim stimülasyonu, bazı sitokin ve büyüme faktörü aktivasyonunda aktif rol alarak hücre içi sinyal düzenlenmesine katkıda bulunur. Overde de serbest radikalleri fizyolojik durumlarda görmek olasıdır. Özellikle ovulasyon döneminde oositin over duvarından atılabilmesi makrofaj, stromal ve folikül hücreleri kaynaklı lokal oksijen radikal artışı ile mümkündür. Ayrıca bu radikaller oosit olgunlaşması, folikülogenez, steroidogenez

ve luteolizde de görev alır [73]. Nitrit Oksit (NO) endotel hücrelerinden sentezlenerek lökosit adezyonunda, anjiogenezde, trombosit agregasyonunda, tromboziste ve damar düz kaslarının normal tonusunu düzenlemede önemli yere sahiptir. Nöronların ürettiği NO ise nörotransmitter olarak görev alır ve nöral plastisiteden sorumludur [70].

ROS fizyolojik sınırlarda proliferasyon ve diferansiyasyonu destekler ancak serbest radikallerin vücutta birikmesiyle genel olarak hücrenin membran lipidleri, proteinler, karbonhidrat metabolizması ve DNA üzerinde zararlı etkileri ortaya çıkar.

Lipid Üzerine Etkisi

Hücre zarı yapısında bulunan lipidler serbest radikal hasarına karşı oldukça duyarlıdır ve vücutta en çok etkilenen yapılardır. Lipidler ile reaksiyona giren serbest radikaller lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre zarında bulunan fosfolipidlerin yapısını değiştirir, dolayısıyla membran akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücrenin yapı ve fonksiyonunda büyük hasara neden olur. Bunun yanı sıra reaksiyondan çok miktarda toksik yan ürün açığa çıkar ve bunlar ikincil haberci gibi davranarak üretildiği bölgenin dışında da zararlı etkilerini gösterir. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ve serumda ya da dokuda kolayca saptanabilen malondialdehit (MDA)'ın ölçümü deneysel çalışmalarda hasar belirteci olarak sıklıkla kullanılır [70, 72].

Protein Üzerine Etkisi

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenmesi lipitlere göre nispeten azdır. Etkilenme oranını protein yapısındaki aminoasitler belirler. Serbest radikal maruziyeti sonrası aminoasit yan zincirleri modifiye olur dolayısıyla proteinde yapısal değişiklikler meydana gelir. Sonuçta proteinin işlevinde de bozulmalar görülerek hücre metabolizması etkilenir. Serbest radikaller protein yapıda enzimlerin, nörotransmitterlerin, reseptörlerin ve hormonların aktivitelerinde aksaklıklar oluşturur. Aynı zamanda kan ve yapısal proteinleri okside ederek hematolojik ve dolaşım sisteminde patolojilere yol açar. Oksitlenen proteinlerin birçoğu inaktif oldukları için metabolize edilerek vücuttan uzaklaştırılır, ancak zamanla biriken bu ürünler ileri yaşlarda yaşlanma ve bazı dejeneratif hastalıkların nedeni olarak öne sürülür. Protein oksidasyonu sonucu az miktarda protein hidroperoksit oluşur, bunlar da vücuttaki serbest metal iyonları ile etkileşerek farklı radikaller açığa çıkarır [70, 72].

Karbonhidrat Üzerine Etkisi

Karbonhidratların oksidasyonu ile oluşan bazı moleküllerin diyabet, hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, sedef hastalığı, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta rol aldığı bilinmektedir. Örneğin monosakkarit oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit ve oksoaldehitin DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak kanser ve yaşlanmayı tetiklediği kanıtlanmıştır. Serbest radikallerin karbonhidratlarla etkileşimi sonucu oluşan karbon merkezli radikaller hyaluronik asit gibi mukopolisakkaritlerde zincir kopmalarına neden olarak özellikle eklem patolojileri ve göz, deri hastalıkları oluşumuna zemin hazırlar [70, 72].

DNA Üzerine Etkisi

Başlıca DNA olmak üzere tüm nükleik asitler serbest radikallere karşı duyarlıdır ve çoğu zaman reaksiyon sonucu oksidatif hasar gözlenir. Özellikle hidroksil gibi reaktif oksijen radikalleri DNA'daki deoksiriboz ile etkileşime girerek hidrojen kaybı ya da ilavesine yol açar. DNA içeriğindeki organik bazlardan pirimidin pürine göre oksidatif hasara karşı daha hassastır. Hidroksil radikali pürin ve pirimidin bazlarıyla reaksiyona girerek bazlarda modifikasyon, delesyon, çift sarmak ayrılması ya da zincir kopmalarına neden olur. Bunun sonucunda DNA'da telafisi mümkün olmayan hatalar meydana gelir ve hücreyi mutasyon ya da ölüme sürükler. İnflamasyonda nötrofillerden salınan hidrojen peroksitin membranlardan rahat geçmesi sayesinde nükleus içine girerek DNA hasarı oluşturur, ardından hücre disfonksiyonundan hücre ölümüne kadar gidebilen süreç gelişir. Yapılan çalışmalarda süperoksit gibi serbest oksijen radikallerine maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara verildikten sonra serumlarında anti-DNA antikorlarında artış saptanmış, bu nedenle serbest radikallere maruz kalmanın organizmada otoimmün hastalıklara yol açabileceği düşünülmüştür [70, 72].

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada endojen ya da ekzojen yolla oluşan serbest radikalleri metabolize eden, zararlı etkilerini önleyen ya da oluşumunu baştan engelleyen mekanizmaların tümü **antioksidan savunma sistemi**, bunu gerçekleştiren molekül ya da enzimler de **antioksidanlar** olarak adlandırılır. Böylelikle hücrede bulunan protein, lipid,

karbonhidrat ve nükleik asitler metabolizma sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı korunur. Normalde denge içinde olan serbest radikal ve antioksidanlar artan çevre kirliliği, X ve UV ışın maruziyeti, alkol ve sigara kullanımı, beslenme tarzı değişiklikleri gibi faktörler nedeniyle organizmada oksidan hasar lehine artışa yol açar [71, 72]. Oksidan hasarın birikmesiyle oluşan oksidatif stresin doğrudan ilişkili olduğu patolojilerin engellenmesi için dengeli beslenme ve ekzojen antioksidan alımı önem arz eder.

Vücutta endojen kaynaklı antioksidanlar enzimatik veya nonenzimatik yapıları olarak gruplandırılır (Tablo 1).

Tablo 1. Başlıca endojen antioksidanlar.

Enzimatik Antioksidanlar	Non Enzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon Peroksidaz (GPx)	Ürik Asit	Transferrin
Glutasyon Redüktaz (GR)	Bilurubin	Seruloplazmin

Ekzojen kaynaklı antioksidanlar ise vitaminler ve ilaç&gıda olarak alınan antioksidanlar olarak sınıflandırılır (Tablo 2).

Tablo 2. Başlıca ekzojen antioksidanlar.

Vitamin Antioksidanlar	İlaç Olarak Alınan Antioksidanlar	
Vitamin E	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, tungsten, oksipürinol)	
Vitamin A	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, non steroid antiinflamatuvarlar)	
Vitamin C	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
Vitamin B9	Sitokinler	
	Barbitüratlar	Demir şelatörleri

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Glutasyon redüktaz (GR) enzimatik antioksidanların başlıca olanlarıdır. SOD serbest oksijen radikallerine karşı vücutta savunmayı başlatan enzimdir. Süperoksit radikalini moleküler oksijen ve hidrojen peroksit indirger, oluşan hidrojen peroksit daha sonra GPx ya da CAT enzimi ile su molekülüne ayrıştırılır. GPx ayrıca fagositik hücrelerde oluşan serbest radikalleri katalizleyerek çevre hücrelerin etkilenmesini önler. GPx tarafından hidrojen peroksitin yükseltgenmesi reaksiyonunda glutasyon da oksitlenir. Okside glutasyonu redükte edip eski haline getiren enzim de GR'dir [71, 72, 74].

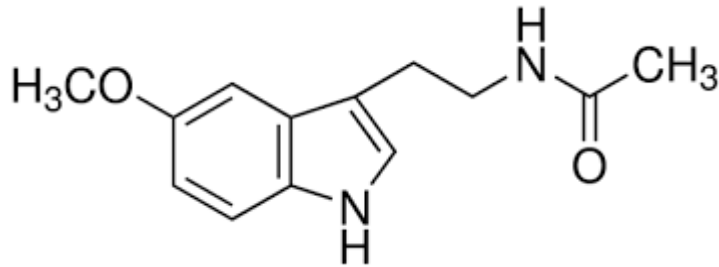
Non-enzimatik antioksidanlardan en önemlileri ise glutatyon, melatonin, albümin, koenzim Q 10, vitamin C, vitamin E, seruloplazmin ve transferrindir. **Glutatyon** neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde sentezlendiği için vücutta yüksek düzeyde bulunur. Karaciğer glutatyon üretiminde en önemli kaynaktır. Serbest radikallerle reaksiyona girerek oksidatif hasara karşı hücre ve organları korur. Güçlü antioksidan özelliğinin yanı sıra DNA, nükleik asit sentezi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre sinyal mekanizmaları kontrolü, apoptozis gibi birçok hayati fonksiyonda da rol alır. **Albümin** vücutta birçok görevi bulunan kilit bir proteindir. Organizmada farklı ortamlar arasında sıvı dağılımı ve osmotik basınç regülasyonunda primer sorumludur. Serumda bulunan en önemli ve etkisi yüksek antioksidanlardan biridir. Yapısında bulunan redükte sistein sayesinde hidroksil radikalini dolaşımdan süpürebilir. Bunun yanında nötrofil ve monositler fagositoz esnasında salınan hipokloröz asit albümin tarafından yok edilir. **Koenzim Q 10** yağda çözünürlüğü yüksek olan insan vücudunda sentezlenebilen vitamin benzeri bileşiktir. Neredeyse tüm hücre membranlarının yapısında bulunur ve mitokondri iç membranında da bulunarak oksidatif fosforilasyonda kofaktör olarak rol alır, indirgenerek elektron taşıma sisteminde proton taşınmasına yardımcı olur. Koenzim Q 10 lipid ve protein peroksidasyonunu engeller ve oksidanları yok etmek için elektron vererek kuvvetli antioksidan özellik gösterir. **Vitamin C** suda çözünebilen bir vitamin olup vücutta birçok önemli biyomolekül sentezinde görevlidir. Bununla birlikte süperoksit, singlet oksijen, hipokloröz asit, hidroperoksit gibi serbest radikalleri kolayca yok ederek oksidan hasara karşı etkin koruma sağlar. Lipid peroksidasyonunu tetikleyen radikalleri stabilize ederek lipidlerin hasar görmesini engeller. Bu etkilerin yanı sıra Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye dönüşümünü sağlayarak lipid peroksidasyonunu arttırabilir. Düşük dozlarda görülen bu etkisinden dolayı vitamin C'nin hem antioksidan hem de pro-oksidan olduğu kabul edilir. **Vitamin E** yağda çözünen kuvvetli antioksidanlardan olup en aktif formu α -tokoferol'dur. Hücre membranında bulunan fosfolipidleri serbest radikal saldırısından koruyarak membran stabilizasyonunda önemli yere sahiptir. Vitamin E, özellikle GPx ve vitamin C ile birbirini tamamlayıcı etki gösterirler. Antikanserojen etki gösterdiğinden kolon, prostat, meme kanseri tedavisinde, ayrıca iskemi, katarakt, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklara karşı iyileştirici etki gösterdiği bilinmektedir. **Seruloplazmin** ve **transferrin** de sırasıyla

dolaşımda bulunan serbest bakır ve demiri bağlayan taşıyıcı proteinlerdir. İkisi de çeşitli basamaklarda fenton reaksiyonunu inhibe ederek antioksidan özelliğini gösterir [71, 72, 74].

2.4.1. Melatonin

Pineal bez tarafından karanlıkta salgılanan küçük lipofilik bir hormon olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) (Şekil 8), esas olarak sirkadiyen ritmi düzenler; bunun yanı sıra uyku, üreme, bağışıklık regülasyonunda aktif rol alır [72].

Melatonin ilk kez dermatoloji uzmanı Dr. Lerner tarafından 1958’de “*melanophore contracting hormon*” olarak tanımlansa da serotonin hormon kökenli olması ve kurbağa derisinde melanoforların beyaz renkte görünmesine neden olduğu için **melatonin** olarak adlandırılmıştır. Pineal bezden salındığı keşfedildiğinde bu organın salgı fonksiyonunun aydınlık/ karanlık döngü ile ilişkisi olduğu da bulunmuştur [75].

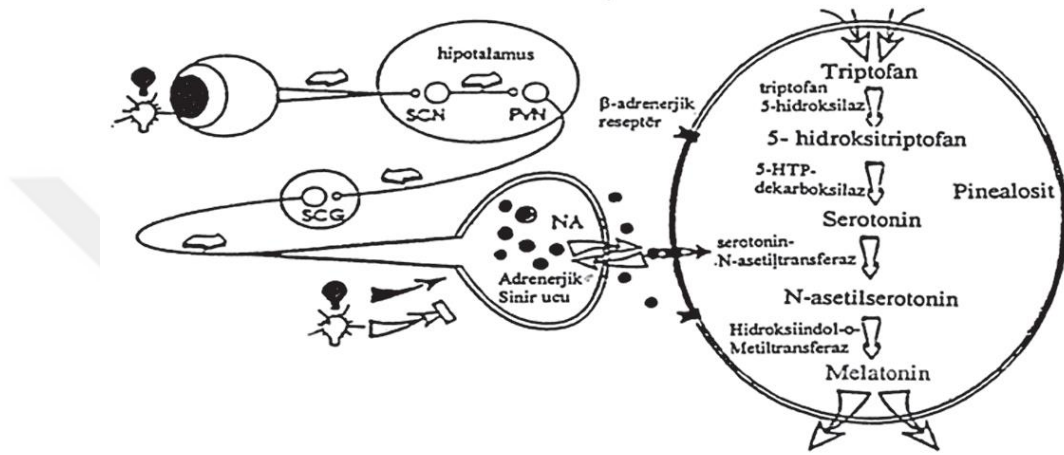


Şekil 8. Melatonin kimyasal yapısı [75].

Melatonin Sentezi ve Metabolizasyonu

Melatonin öncülü olan biyomolekül **triptofan** aminoasitidir. Sentezin ilk basamağında pinealositler içine triptofan alınması gerçekleşir. Pinealosit içinde triptofan hidroksilaz enzimiyle 5-hidroksitriptofana dönüştürülür. 5-hidroksitriptofan dekarboksilasyonla **serotonine**; serotonin de N-asetil transferaz enzimi tarafından N-asetil serotonine çevrilir. Son olarak N-asetil serotonin’den hidroksi indol-o-metil transferaz (HOMT) enzim aracılığıyla melatonin oluşturulur. Üretilen melatonin lipofilik yapısı ve küçük boyutu sayesinde hücresel kompartmanlardan kolaylıkla geçer, ilk olarak kapillerlere oradan da tüm dolaşıma verilir. Sentezin gerçekleşmesi bulunan ortamda ışığın olmayışına bağlıdır. Işık sinyal iletiminin retina ve suprakiazmatik nükleus yoluyla

süperior servikal gangliyon (SCG)'da inhibisyon oluşturması nedeniyle aydınlık ortamda melatonin sentezi için gerekli uyarı oluşmaz. Karanlık ortamda bu inhibisyonun kalkmasıyla postgagliyonik sempatik liflerden nöradrenalin salınımı başlar ve depolanan serotonin ve N-asetil transferaz hücre içine boşalır [75]. Pinealositlerde c-AMP yolağı üzerinden N-asetil transferaz aktivasyonu başlar (Şekil 9).



Şekil 9. Melatonin Sentezi [75].

Akşam 20.00-23.00 arasında yükselmeye başlayan melatonin salgısı gece 01.00-05.00 zaman diliminde en yüksek değerlere çıkar ve sabaha doğru hızla azalır. Yaklaşık olarak %80'i gece olmak üzere gün içinde 30 mg melatonin üretimi gerçekleşir. Melatonin başlıca pineal bez olmak üzere vücutta karaciğer, ovaryum, retina, kan damarları, gastrointestinal sistem gibi çeşitli yerlerde sentezlendiği son yıllarda keşfedilmiştir [72, 75]. Dolaşımdaki melatonin miktarının yaklaşık %80'i pineal bezden kaynaklanır. Bunun dışında deride bulunan melanositlerden zararlı güneş ışınlarına karşı korunmada melatonin üretilir. Gastrointestinal sistemde melatonin üretimi enterokromaffin hücrelerde tokluk sonrası ülser oluşumunun engellenmesine ve safra kesesinde okside kolesterol türevi ve safra asidine karşı mukozayı korumaya yardımcı olur [76].

Vücuttaki melatonin esas yıkım yeri karaciğerdir. Sulfonasyon ve glukuronidasyon ile metabolize edilerek 6-hidroksimelatonin sülfat haline dönüştürülür ve idrarla atılır.

Melatonin Reseptörleri

Melatonin lipofilik olması, suda kısmen çözünebilmesi ve küçük molekül yapısı sayesinde etkileri membranla sınırlı kalmayıp hücre içinde ve nükleusta da gösterir. Yapılan çalışmalarda özellikle hücre nükleusunda melatonin reseptörlerinin varlığı ve yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle nükleer fonksiyonlarda önemli rolü olduğu düşünülmüştür [77].

Reseptöre yönelik yapılan çalışmalarda başlıca beynin çeşitli bölümlerinde, over, barsak, böbrek ve kan damarlarında olmak üzere tüm vücutta yaygın melatonin reseptörleri bulunduğu saptanmıştır [75].

Günümüzde MT₁, MT₂ ve son yıllarda keşfedilen MT₃ olmak üzere 3 melatonin reseptörü tanımlanmıştır. MT₁ reseptörleri uyku, sirkadyen ritm, üreme işlevi, renal fonksiyon ve serebral arter kontraktilesinde esas rol alır. Nöronal ya da periferik bölgede yerleşim gösterebilirler. MT₁ reseptör aktivasyonu G protein aracılığıyla hedef hücrelerde adenilat siklaz inhibisyonuna neden olur. Özellikle ışığa bağımlı olaylarda bu reseptör üzerinden melatonin etkisi gözlenir. ML₂ ve ML₃ reseptörlerinin vücutta dağılımı şimdilik net olarak açıklanamamıştır [76].

2.4.1.1. Melatoninin Organizma Üzerine Etkileri

Melatonin retinadan pineal beze iletilen aydınlık/karanlık bilgisi ile vücutta sirkadiyen ritm ve buna bağlı fonksiyonların düzenlenmesinden başlıca sorumlu hormondur. Serumdaki melatonin düzeyi gün içinde yükselip alçalan bir grafik çizer. Kendine has bu ritmi hipotalamustaki suprakiazmatik nükleustaki pacemaker hücreler kontrol eder. Özellikle gece saatlerinde ışığa maruz kalınırsa pineal bezden melatonin sentezi hızla inhibe olur [75].

Organizmadaki melatonin ve kortizol seviyeleri birbirini zıt yönde etkiler. Fizyolojik sınırlarda melatonin varlığı adrenal kortekste melatonin reseptörlerini uyarak adrenokortikotropik hormon (ACTH) aracılı kortizol üretimini baskılar. Kortizol miktarı akşam saatlerine doğru azalırken, melatonin üretimi kortizol seviyesi düşüşünden birkaç saat sonra tepe noktasına ulaşır. Sabah saatlerine doğru melatonin düzeyi azalma eğilimi gösterirken, serumda kortizol seviyesi artmaya başlar.

Aralarındaki bu dengenin bozulması immün sistem fonksiyonları açısından önem arz eder. Birçok araştırmada yüksek kortizol ve düşük melatonin seviyelerinin çeşitli hastalıkla ilişkili olabileceğini vurgulanmıştır. Melatonin/kortizol oranının artışı kilo alımı, depresyon, osteoporoz, kalp hastalığı ve bazı kanser türlerine zemin hazırladığı savunulmuştur [75, 78, 79].

Saat farkı olan ülkeler arası seyahat eden kişilere (özellikle pilot ve yardımcı uçuş personelleri gibi sık seyahat edenler) yaşadığı jet lag etkisini azaltmak için klinisyenler tarafından melatonin önerilmektedir. Doğuya yapılacak seyahatlerin öncesinde, batıya yapılacak seyahatlerin ise iniş sonrasında melatonin kullanımı semptomları hafifletmeye yardımcı olur [75].

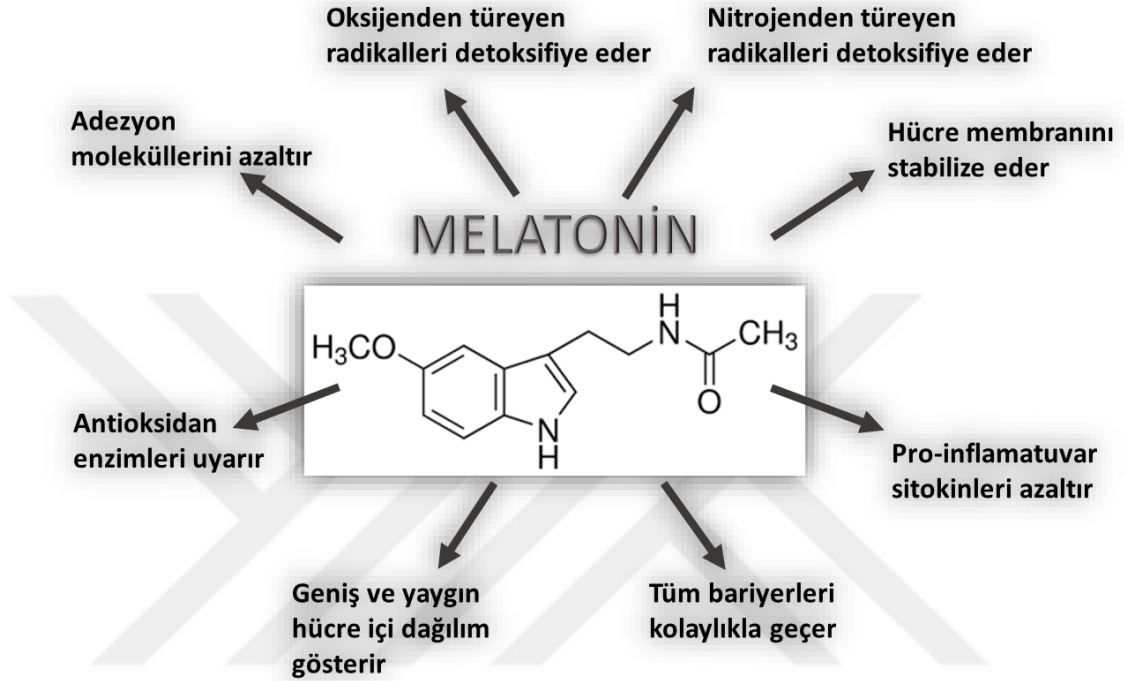
Melatoninin lipofilik, daha az oranda hidrofilik ve küçük molekül olmasıyla birlikte tüm bariyerleri kolayca geçebilmesi sayesinde vücutta yaygın antioksidan etki oluşturur. Günümüzde organizmada bilinen en etkili ve güçlü antioksidan kabul edilmiştir. Özellikle hücre zarını, sitoplazmadaki organelleri ve nükleusu aktif şekilde oksidan hasardan korumada oldukça başarılıdır. Hücreleri lipit peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi reaktif türlerin neden olduğu oksidatif strese karşı korur. HO, O₂, NO, HOCl, H₂O₂ gibi oksidatif hasara yol açabilecek birçok kuvvetli reaktif substratları detoksifikasyonla uzaklaştırdığı çalışmalarda gösterilmiştir [80, 81].

2.4.1.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri

Lokal olarak üretilen melatonin ve metabolitlerinin hücresel ortamda hem reaktif oksijen türlerini hem de reaktif azot türlerini uzaklaştırdığı gözlenmiştir. Mitokondriyal membranda reaktif türlerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Melatoninin direkt antioksidan etkileri, toksik oksijen türevlerini temizleme ve reaktif türlerin oluşumunu azaltma yeteneğinden kaynaklanır. Örneğin; hücrede üretilen serbest radikallere tutunup onları detoksifiye ederek özellikle radikallerin hücre zarına vereceği hasar engellenmiş olur.

Melatoninin indirekt antioksidan rolü ise, zararlı oksijen türevlerinin zararsız moleküllere metabolize edilmesini, prooksidan enzimleri inhibe ederek serbest radikal üretimini azaltmasını veya endojen olarak üretilen diğer antioksidanların sentezini indüklemeyi içerir. SOD, GPx, GR ve GSH gibi antioksidan moleküller, folikül içi ve

çevresinde artan oksidatif strese karşı dengeyi kontrol eder ve oosit ve granüloza hücre bütünlüğü için kritik role sahiptir [73]. Dolayışında normal düzeyde bulunan melatonin prooksidan enzimlerden olan Nitrik Oksit Sentaz'ı (NOS) inhibe ederek NO ve peroksinitritin oluşumunu yavaşlatır (Şekil 10).



Şekil 10. Melatoninin antioksidan özellikleri.

Melatoninin oksidan hasara karşı koruyucu etkisi literatürde diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli organlar üzerinde gösterilmiştir. Bir yayında yüksek yağlı diyet ile indüklenen barsak bariyeri disfonksiyonu ve hepatik inflamasyonda melatonin tedavisinin radikal temizleyici ve antioksidan aktiviteleri sayesinde oksidatif stres ve hepatik inflamasyonu azalttığı, bununla birlikte histolojik ve biyokimyasal açıdan karaciğer fonksiyonlarında iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir [82, 83]. Benzer başka bir çalışmada da kalsiyum klorür (CaCl_2) ile indüklenen abdominal aort anevrizmasının [84] ve koroner arter ligasyonu ile oluşturulan iskemik kalp yetmezliğinin [85] dokularda inflamatuvar bir yanıt ve oksidatif hasara neden olduğu, ancak melatonin tedavisinin tüm biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri tersine çevirdiği kanıtlanmıştır. Erşahin ve ark. tarafından yapılan çalışmada kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen melatoninin subaraknoid kanamaya bağlı oksidatif stres

hafiflettiğini ve kan-beyin bariyer bütünlüğünü koruyarak ve beyin ödemi azaltarak nöroproteksiyon gerçekleştirdiği bulunmuştur [86].

Ekzojen melatonin uygulanması ile esansiyel moleküllerin oksidatif hasarı önemli ölçüde azalırken antioksidan enzimlerin sentezinin arttığı iyi bilinmektedir. Bununla birlikte çok yüksek dozlarda organizmada herhangi bir toksik etki oluşturmaması da diğer antioksidan ajanlara karşı üstünlüğüdür. Yaş ilerledikçe vücutta melatonin üretiminin azaldığı, bu nedenle yaşlanma ve çeşitli patolojilerin ortaya çıktığı düşünülmektedir.

2.4.1.3. Melatoninin Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Melatoninin folikülogenez, oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi üzerindeki olumlu etkileri, herhangi bir hasar sonrası overde gözlenen iyileştirici etkisi ve oosit rezervini koruyucu etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [48, 73, 87]. Melatoninin kadın üreme sistemi üzerinde düzenleyici etkilerinden birinin hipotalamo-hipofizer-gonadal aks üzerinde olduğu iyi bilinir. GnRH sekresyonu ve gonadotropin inhibitör hormon (GnIH) inhibisyonu ile hormonların siklusa uygun salınımını kontrol eder [88]. Ayrıca, yapılan çalışmalarda melatoninin FSH ile birlikte erken folikülogenezde folikül seçimini ve gelişimini uyardığı gösterilmiştir [73]. Bir başka çalışmada melatoninin kadın üreme sistemi üzerine etkisini ovulasyon boyunca oluşan reaktif oksijen substratlarının (ROS)'un yol açtığı hasar üzerinden gösterdiği savunulmuştur [89]. Bu süreçte makrofajlar, nötrofiller ve parankimal hücreler tarafından üretilen ROS'un oosit ve kumulus ooforus hücreleri tarafından salınan endojen melatonin sayesinde dengede tutulduğu düşünülmüştür [79]. Bazı yazarlar, melatoninin koruyucu etkisinin, hücre büyümesini uyararak ve GSH, SOD gibi antioksidan düzeyini artırarak sağladığını savunmuştur [73, 75, 79, 87]. Overde steroidogenezin modülasyonu, Graaf foliküler sıvıda melatoninin yüksek konsantrasyonda varlığı ve over foliküllerinde MT₁ ve MT₂ reseptörlerinin gösterilmesi melatonin düzenleyici etkisine dair kanıtlar olarak düşünülmüştür [48]. İnsan over folikül sıvısında ölçülen melatonin konsantrasyonları, eş zamanlı olarak toplanan plazma örneklerinde bulunan konsantrasyonlarından anlamlı ölçüde daha yüksektir. Foliküler sıvıda melatonin konsantrasyonundaki artışın foliküler atreziden kaçınmada önemli bir faktör olduğuna

inanılmaktadır, çünkü melatonin hücrelerin apoptozunu azaltır, preovulatuvar foliküllerin gelişmesine izin verir ve ovulasyon için oosit maturasyonu sağlar [73].

Bütün bu veriler melatoninin başlıca antioksidan, antiapoptotik ve proliferatif özellikleri sayesinde oogeneze, folikülogenez, steroidogenez ve luteinizasyon olmak üzere genel olarak dişi üreme sisteminde her basamakta etkili olduğunu ve menstrüel siklusun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir [48].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için öncelikle Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (10.02.2020, 01.2020.mar). Çalışmamızda 3 aylık 180-200 gr genç erişkin dişi 32 adet Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar üzerinde çelik ızgara bulunan uygun kafesler içinde, her bir kafeste en fazla 4 adet olacak şekilde, oda ısısında 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutulmuştur. Deneyde kullanılan hayvanlar ticari pelet sıçan yemi ve musluk suyu ile ad libitum beslenmişlerdir. Hayvanlarda oluşabilecek stresi en düşük düzeyde tutabilmek için sıçanlar, deney boyunca mümkün olan en az gürültülü ortamda barındırılmıştır.

3.2. Deney Grupları

Kontrol Grubu (n=8): 1 ay boyunca normal içme suyu verilmiştir.

Melatonin Grubu (n=8): Literatürde seçilen doz 1 ay boyunca içme suyunda 4 mg/kg/gün Melatonin olacak şekilde günlük hazırlanmıştır [82]. Melatoninin ışıktan etkilenmemesi adına alüminyum folyo ile sarılı su şişelerinde sıçanlara verilmiştir.

MSG Grubu (n=8): Literatürden seçilen doz 1 ay boyunca içme suyunda 2 gr/kg/gün MSG olacak şekilde günlük hazırlanıp sıçanlara verilmiştir [55].

MSG+Melatonin Grubu (n=8): 1 ay boyunca içme suyuna eşzamanlı 2 gr/kg/gün MSG ve 4 mg/kg/gün Melatonin olacak şekilde günlük hazırlanıp melatoninin ışıktan etkilenmemesi adına alüminyum folyo ile sarılı su şişelerinde sıçanlara verilmiştir.

3.3. Kullanılan Kimyasallar

3.3.1. Monosodyum Glutamat (MSG)

Çalışmamızda $\geq 98.0\%$ saflık düzeyinde MSG kullanılmıştır (L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate, Sigma-Aldrich, USA, kat. no: 49621). Deneyin ilk gününden itibaren 1 ay boyunca MSG ve MSG+Melatonin grubundaki sıçanlara uygulanmıştır. Bir ay gibi uzun süreli tedavilerde içme suyunda verilen maddelerin hesaplanmasında yaygın olarak kullanıldığı gibi, kafesteki her bir sıçanın günlük ortalama tükettiği su miktarı yaklaşık 10-12 ml/100 gr olarak hesaplanmıştır. Kafesteki sıçanların vücut ağırlığına göre, 2 g/100 ml olacak şekilde içme suyu içerisinde çözündürülüp her gün taze olarak hazırlanarak verilmiştir. Böylece her bir sıçanın günlük alacağı doz 2 g/kg'dır. Verilecek olan MSG miktarı hassas terazide tartılıp içme suyunda çözündürülerek çözeltiler hazırlanmıştır.

3.3.2. Melatonin

Çalışmamızda $\geq 98.0\%$ saflık düzeyinde Melatonin kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, USA, kat. no: M5250). Deneyin ilk gününden itibaren 1 ay boyunca Melatonin ve MSG+Melatonin grubundaki sıçanlara uygulanmıştır. Melatonin, kafesteki sıçanların vücut ağırlığına göre ve sıçan başına günlük ortalama tükettiği su miktarı yaklaşık 10-12 ml/100 gr olarak hesaplanarak, içecekleri suda 4 mg/100 ml melatonin olacak şekilde verilmiştir. Su şişeleri melatoninin ışığa maruz kalmaması için alüminyum folyo ile sarılmıştır. Verilecek olan melatonin miktarı hassas terazide tartılıp öncesinde 1-2 damla etanolde çözülüp içme suyuyla karıştırılarak çözeltiler hazırlanmıştır.

3.4. Deney Protokolü

Temin edilen sıçanların ortama alışma süreci 1 hafta olarak belirlenmiştir. Deney süresi insanlarda uzun dönem maruziyeti simüle etmesi açısından 1 ay olarak planlanmıştır. Yukarıda her grup için ayrıntılı belirtilen MSG ve melatonin içme suyu ile günlük olarak hazırlanıp hayvanlara verilmiştir. Ayrıca deney süresince her gün tüm sıçanlardan vajinal smear örneği alınmıştır. 30 günün sonunda her bir sıçan günlük

smear bulgularına göre değerlendirilip belli bir standartizasyon yakalamak adına östrus evresinde iken deney sonlandırılması planlanmıştır. Kontrol grubu hariç diğer sıçanların östrus siklusunda uzama ve anormallikler saptandığı için tüm sıçanların sakrifikasyonu aynı gün gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle deney toplamda 30-40 gün sürmüştür. Deney protokolü sonunda eter anestezisi altında intrakardiyak kan örnekleri alınan sıçanlar dekapite edilmiştir. Dekapitasyon sonrası sıçanlar sırtüstü pozisyonda diseksiyon tahtasına yerleştirilip abdominal bölge orta hattın bisturi yardımı ile açılmıştır. Periton geçilerek, sağ ve sol overler pens yardımıyla etrafındaki yağ tabakası ile birlikte çıkarılmıştır. Ardından yağ tabakası ovaryum dokusuna zarar vermeyecek şekilde temizlenerek bilateral ooforektomi tamamlanmıştır. Sol over biyokimyasal analiz ve sağ over histopatolojik analizler için kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmıştır.

Deney süresi boyunca gözlenebilecek östrus siklus değişikliklerini (siklus süresinde uzama/kısalma, vajina epitel hücrelerde gözlenebilen değişiklikler vb.) atlamamak amacıyla sürüntü işleminin her gün aynı saatte yapıp incelenmesi ve bulguların kaydedilmesine dikkat edilmiştir. İşlem sırasında her hayvan için ayrı lam ve pamuklu çubuk kullanılmıştır.

Çalışmamızda östrus siklusu tayini amacıyla literatürde belirtildiği gibi deney boyunca her gün sabah 09.00-10.00 arası tüm sıçanlardan vajinal smear örneği alınmıştır [5, 33]. Bunun için sıçanlar nazikçe hareketsizliği sağlamak üzere bel ve kuyruklarından tutularak vajen bölgeleri açığa çıkarılmıştır. Serum fizyolojik ile nemlendirilmiş pamuklu çubukla vajinadan sürüntü örneği alınıp temiz bir lama yayılmıştır.

3.5. Histolojik Preparasyon

3.5.1. Vajinal Sürüntü Örneklerinin Preparasyonu ve Değerlendirilmesi

Alınan her bir örnek havada kurutulup fikse edilerek Giemsa boyası ile 20-30 dk boyanmıştır. Durulandıktan sonra kurutulan örnekler entellan ile kapatılıp, kamera eklentisi (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) bulunan ışık mikroskobu (Olympus BX51) altında x100 ve/veya x200 büyütme ile vajinal epitel hücreleri değerlendirilmiştir.

Vajinal epitel hücrelerini tanımlamak amacıyla Cora ve ark. [33] tarafından belirtilen kriterler kullanılmıştır. Elde edilen bulgular günlük olarak not edilmiştir.

Deney sonunda östrus evre sürelerini objektif şekilde kıyaslamak için; literatürde sıklıkla kullanılan yaklaşımlardan biri olan tüm evre günlerin yüzdesi değerlendirilmiştir [32]. İndeksler şu şekilde hesaplanmıştır:

- Proöstrus indeksi = proöstrus gün sayısı / toplam deney süresi * 100
- Östrus indeksi = östrus gün sayısı / toplam deney süresi * 100
- Metöstrus indeksi = metöstrus gün sayısı / toplam deney süresi * 100
- Diöstrus indeksi = diöstrus gün sayısı / toplam deney süresi * 100

3.5.2. Over Doku Örneklerinin Preparasyonu ve Histopatolojik Değerlendirilmesi

Sıçanlardan alınan sağ over dokusu %10 nötral tamponlu formalinde 48 saat boyunca fikse edilip ardından 1 gece akan çeşme suyunda bekletilmiştir. Daha sonra dokular sırasıyla %70, %90, %96 ve %100 oranında alkollerde dehidrate edilip toluen ile şeffaflanmıştır. Sıcak parafinde en az 2 saat bekletilerek kasetlere gömülmüştür. 4 mikron kalınlığında alınan kesitler folikül sayımı ve histopatolojik analiz amacıyla Hematoksilen ve Eosin (H&E) boyası ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta incelemeye hazır hale getirilmiştir. Tüm boyalı kesitler kamera eklentisi (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) bulunan ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirilmiştir. Doku hasarının varlığını ve şiddetini belirlemek amacıyla taranan mikroskobik alanlardaki histopatolojik değişiklikler foliküler dejenerasyon, kistik değişiklikler, venöz konjesyon ve hyalinizasyon şeklinde belirlenmiştir. Hasarın şiddetine göre 0 – 3 arasında skorlama yapıp 0; patolojik bulgu yok, 1; hafif düzeyde, 2; orta düzeyde ve 3; şiddetli şeklinde tanımlanmıştır. Her hayvan için elde edilen skorlar toplanarak grup ortalaması alınmıştır.

3.5.3. Folikül Sayımı ve Değerlendirilmesi

Her bir sıçan over dokusuna ait H&E boyalı praparatlarda foliküller tanımlanıp sayılmıştır. Aynı folikülün birden fazla kez sayılmasını önlemek için aralarda 15 kesit atlanarak, toplamda 3 preparat değerlendirmeye alınmıştır. Folikül sayımında Plowchalk ve ark. [90] tarafından modifiye edilen Pederson ve Peters [91] sınıflaması

kullanılmıştır. Sırasıyla x100 ve x200 büyütmede Primer, Sekonder, Olgun (Graaf), Dejenere ve Kistik Foliküller sayılmıştır. Folikül duvarı bir ya da birden fazla granüloza hücreleri tarafından çevrelenen foliküller primer folikül, folikül duvarında birden fazla granüloza hücre tabakası ve folikül içinde antrum oluşmaya başlamışsa sekonder folikül olarak kabul edilmiştir. Toplam folikül hacminin çoğunu kaplayan ve birleşme eğiliminde antrumu olan oosit etrafında kumulus ooforus ve korona radiata hücre tabakası bulunduran folikül Olgun (Graaf) folikül olarak tanımlanmıştır. Dejenere oosit barındıran, düzensiz granüloza hücre katmanları içeren, bozulmuş zona pellusida ile karakterize foliküller de atretik folikül olarak değerlendirilmiştir. Büyük bir antrum etrafında 3-4 tabaka granüloza hücresi ve kalın teka tabakası içeren ancak oosit içermeyen foliküller kistik folikül olarak kabul edilmiştir.

3.5.4. İmmünohistokimyasal Preparasyon ve İnceleme

Over dokusunda StAR, Aromataz, ER- α ve SULT-1E1 İmmünohistokimyası

Overde gözlenebilecek değişikliklerin olası mekanizmaları hakkında bilgi sahibi olabilmek amacıyla steroidogeneizde önemli olan StAR proteinin, Aromataz, ER- α ve Sulfotransferaz enzimlerinin sırasıyla Anti- Steroidogenic Acute Regulatory Protein (Bioss, kat. no: BS-3570R, dilüsyon:1/100), Anti Aromataz (Bioss, kat. no: BS-1292R, dilüsyon:1/200), Anti Östrojen Reseptör- α (Bioss, kat. no: BS-2098R, dilüsyon:1/200) ve Anti Sulfotransferaz (Bioss, kat. no: 0629R, dilüsyon:1/200) antikorları ile immünohistokimyasal boyama işlemi uygulanmıştır.

İmmünohistokimyasal incelemeler için fikse edilmiş ve parafine gömülmüş bloklardan pozitif şarjlı lama alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C' lik etüvde bekletilip, deparafinize etmek amacıyla ksilende 2x10 dakika tutulmuştur. Saf alkol ve %96'lık alkolde 2x10 dakika bekletildikten sonra metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika bekletilerek endojen enzim blokajı yapılmıştır. Distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için sitrat tamponda 20 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakılmıştır. Oda ısısında soğutulan kesitler PBS ile 2 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletilmiştir. Primer antikorda 1 gece boyunca +4°C buzdolabında bekletilip, ertesi gün 2 kere 5'er dakika PBS'de yıkandıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikorda (SHP125, ScyTek

Laboratories, Inc., USA) 20 dakika bekletilmiştir. Tekrar PBS ile yıkamadan sonra, streptoavidin peroksidazda 20 dakika tutulup daha sonra PBS ile yıkanma sonrası 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kromojeninde (DAB Chromogen/Substrate Bulk Pack, ACK125, ScyTek Laboratories, Inc., USA) 10 saniye muamele edilmiştir. Distile suda yıkama işleminden sonra, Mayer Hematoksilende 20 sn bekletilip çeşme suyu ile kesitler yıkanmıştır. Son olarak %96 lık alkolde 2x10 dakika bekletildikten sonra kurutulan kesitler entellan ile kapatılmıştır. İmmünoreaktivite semikantitatif olarak yok (0), hafif yoğunlukta (1), orta yoğunlukta (2) ve yoğun (3) olarak değerlendirilmiştir.

3.6. Biyokimyasal Analizler

3.6.1. Over doku örneklerinde MDA ve GSH düzeylerinin ölçülmesi

Her hayvandan alınan over ve uterus doku örnekleri MDA ve GSH düzeyleri belirlenene kadar -20° C'lik derin dondurucularda saklanmıştır. Doku örnekleri Ultra Turrax doku homojenizatörü kullanılarak buzda bekletilmiş trikloroasetik asit (%10 TCA) ile homojenize edilmiştir. Lipit peroksidasyonu ürünlerinin düzeyinin belirlenmesi için MDA seviyeleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu gözlemlenerek ölçülmüştür. Lipit peroksidasyonu, $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tükenme katsayısı kullanılarak MDA cinsinden ifade edilip, sonuçlar nmol MDA/gram doku cinsinden belirtilmiştir [92].

Glutatyon seviyeleri modifiye Ellman prosedürü kullanılarak ölçülmüştür. Doku homojenatları 4° C'de 10000 devir/dk'lık santrifüjde 10 dakika santrifüj edildikten sonra 0,5 ml'lik süpernatantın 2 ml'lik 0,3 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solüsyona eklenmiştir. DTNB (0,4 mg/ml %1 sodyum sitrat)'den 0,2 ml'lik bir solüsyon da başta hazırlanan solüsyona eklenmesinden hemen sonra 412 nm absorbans değerinde ölçümü yapıp GSH seviyeleri tükenme katsayısı olan $1,36 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'de hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{mol GSH/g}$ doku cinsinden belirtilmiştir [93].

3.6.2. Serumda GnRH, FSH, LH, E₂ ve AMH ölçülmesi

Dekapitasyonla toplanan vücut kanı 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilip ayrılan serum örnekleri çalışma yapılınca kadar -20°C' de saklanmıştır. Çalışmada, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi kullanılmıştır. ELISA yöntemi; özgül antikor kullanılarak örnekteki antijen miktarını tayin edebilen immünokimyasal bir ölçüm tekniğidir. Sıçanlardan alınan serum örneklerinde her bir hormona özgül ticari alınan ELISA kit kullanılarak; reproduktif sisteminde önemli rolü olan GnRH (Sunlong, kat. no: SL0321Ra), FSH (Sunlong, kat. no: SL0297Ra), LH (Sunlong, kat. no:1093Ra), E₂ (Sunlong, kat. no: 0268Ra) ve AMH (Sunlong, kat. no:0504Ra) düzeyleri analiz edilmiştir. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan işlemlerin ardından oluşturulan standart grafikler kullanılarak örneklerdeki FSH, LH ve testosteron konsantrasyonu belirlenmiştir. Sonuçlar FSH, LH ve AMH için ng/ml; GnRH ve E₂ içinse pg/ml olarak verilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analizler

Deneylerin sonunda elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilip verilerin analizinde gruplar arası karşılaştırmalarda Anova testi, ikili grupların karşılaştırmasında Tukey testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Vajinal Sürüntü Bulguları

Her bir gruptaki sıçanların over fonksiyonu üzerine dolaylı etkilerini değerlendirmek amacıyla günlük vajinal sürüntü örnekleri değerlendirilmiştir.

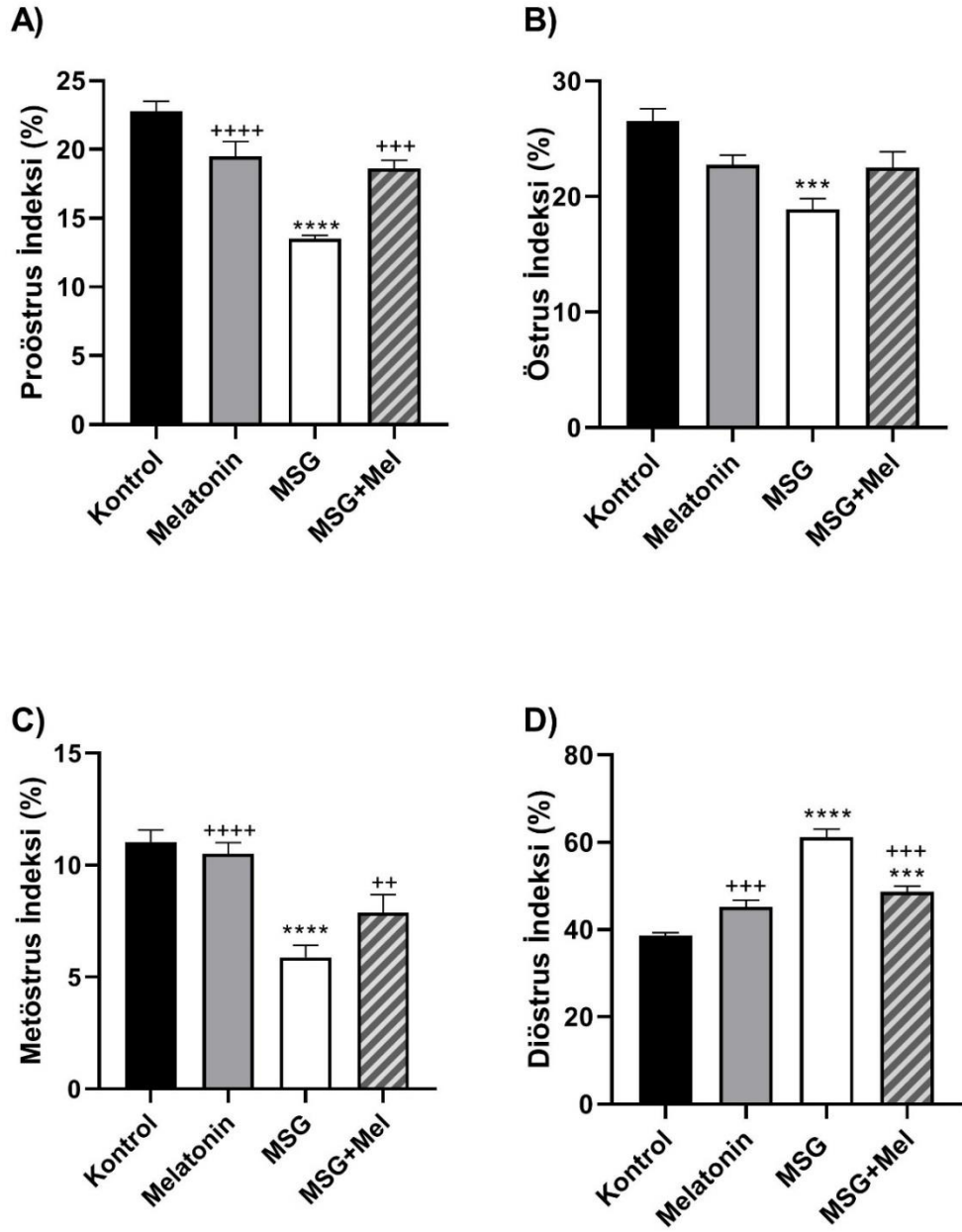
Proöstrus indeksi kontrol grubunda $22 \pm 0,7$, MSG grubunda $13 \pm 0,2$, melatonin grubunda 19 ± 1 , MSG+melatonin grubunda ise $18 \pm 0,6$ olarak hesaplanmıştır. MSG grubu diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında yüzdede belirgin azalma saptanmıştır ($p < 0,001$).

Östrus indeksi kontrol grubunda $26 \pm 1,1$, melatonin grubunda $22 \pm 0,8$, MSG grubunda $18 \pm 0,9$, MSG+melatonin grubunda ise $22 \pm 1,3$ olarak hesaplanmıştır. MSG grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında yüzdede belirgin azalma saptanmıştır ($p < 0,001$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir.

Metöstrus indeksi kontrol grubunda $11 \pm 0,5$, MSG grubunda $5 \pm 0,5$, melatonin grubunda $10 \pm 0,5$, MSG+melatonin grubunda ise $7 \pm 0,8$ olarak hesaplanmıştır. MSG grubu kontrol ve melatonin gruplarıyla kıyaslandığında yüzdede belirgin azalma saptanmıştır ($p < 0,001$).

Diöstrus indeksi kontrol grubunda $38 \pm 0,6$, MSG grubunda $61 \pm 1,7$, melatonin grubunda $45 \pm 1,5$, MSG+melatonin grubunda ise $48 \pm 1,3$ olarak hesaplanmıştır. MSG grubu diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında yüzdede belirgin artış saptanmıştır ($p < 0,0001$).

Sonuç olarak kontrol, melatonin ve MSG+melatonin gruplarına göre MSG uygulanan gruptaki sıçanların östrus siklusunda proöstrus, östrus ve metöstrus evre indekslerinde değişken derecelerde anlamlı azalma ve diöstrus evre indeksinde anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Deney gruplarının proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus indeksleri. **A) Proöstrus İndeksi.** ****: $p < 0,0001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++++: $p < 0,0001$, +++: $p < 0,001$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **B) Östrus İndeksi.** ***: $p < 0,001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. **C) Metöstrus İndeksi.** ****: $p < 0,0001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++++: $p < 0,0001$, ++: $p < 0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **D) Diöstrus İndeksi.** ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++++: $p < 0,0001$, +++: $p < 0,001$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

Tablo 3. Grupların proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evrelerine ait gün sayıları (ortalama $\pm$ standart hata).

	proöstrus	östrus	metöstrus	diöstrus
Kontrol	8,2 $\pm$ 0,3	9,75 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,2	14,1 $\pm$ 0,2
MSG	4,8 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,8
Melatonin	7,5 $\pm$ 0,4	8,7 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,6
MSG+Melatonin	7,2 $\pm$ 0,3	8,7 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,3	18,6 $\pm$ 0,7

4.1.2. Folikül Sayım Bulguları

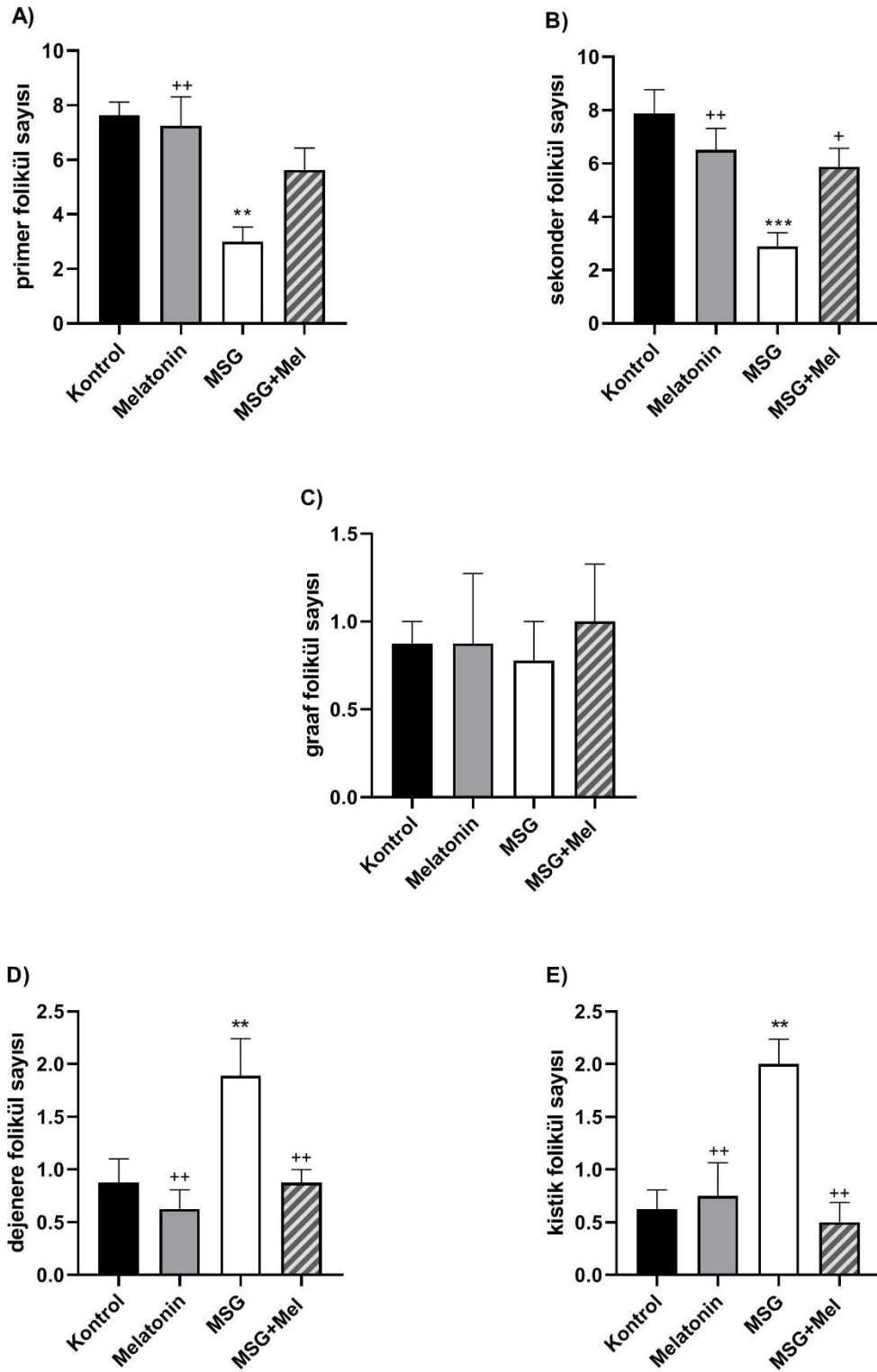
Primer folikül sayısı kontrol grubunda 7,6 $\pm$ 0,5, melatonin grubunda 7,2 $\pm$ 1, MSG grubunda 2,8 $\pm$ 0,5, MSG+melatonin grubunda ise 5,6 $\pm$ 0,8 olarak sayılmıştır. MSG grubu primer folikül sayısı kontrol ve melatonin grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,01$).

Sekonder folikül sayısı kontrol grubunda 7,8 $\pm$ 0,9, melatonin grubunda 6,5 $\pm$ 0,8, MSG grubunda 2,9 $\pm$ 0,5, MSG+melatonin grubunda ise 5,8 $\pm$ 0,6 olarak hesaplanmıştır. MSG grubu sekonder folikül sayısı diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,001$).

Graaf folikül sayısı kontrol grubunda 1,1 $\pm$ 0,1, melatonin grubunda 1 $\pm$ 0,4, MSG grubunda 1 $\pm$ 0,3, MSG+melatonin grubunda ise 0,9 $\pm$ 0,3 olarak sayılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Dejenere folikül sayısı kontrol grubunda 1 $\pm$ 0,2, melatonin grubunda 0,6 $\pm$ 0,1, MSG grubunda 1,8 $\pm$ 0,3, MSG+melatonin grubunda ise 0,9 $\pm$ 0,1 olarak bulunmuştur. MSG grubu dejenere folikül sayısında diğer tüm gruplara göre anlamlı artış saptanmıştır ($p < 0,01$).

Kistik folikül sayısı kontrol grubunda 0,6 $\pm$ 0,1, melatonin grubunda 0,7 $\pm$ 0,3, MSG grubunda 2 $\pm$ 0,2, MSG+melatonin grubunda ise 0,5 $\pm$ 0,2 olarak sayılmıştır. MSG grubu kistik folikül sayısında diğer tüm gruplara göre anlamlı artış saptanmıştır ($p < 0,01$) (Şekil 12).



Şekil 12. Deney grupları folikül sayıları karşılaştırılması. **A) Primer folikül sayısı.** **: $p < 0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, **: $p < 0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **B) Sekonder folikül sayısı.** ***: $p < 0,001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, **: $p < 0,01$, +: $p < 0,05$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **C) Graaf**

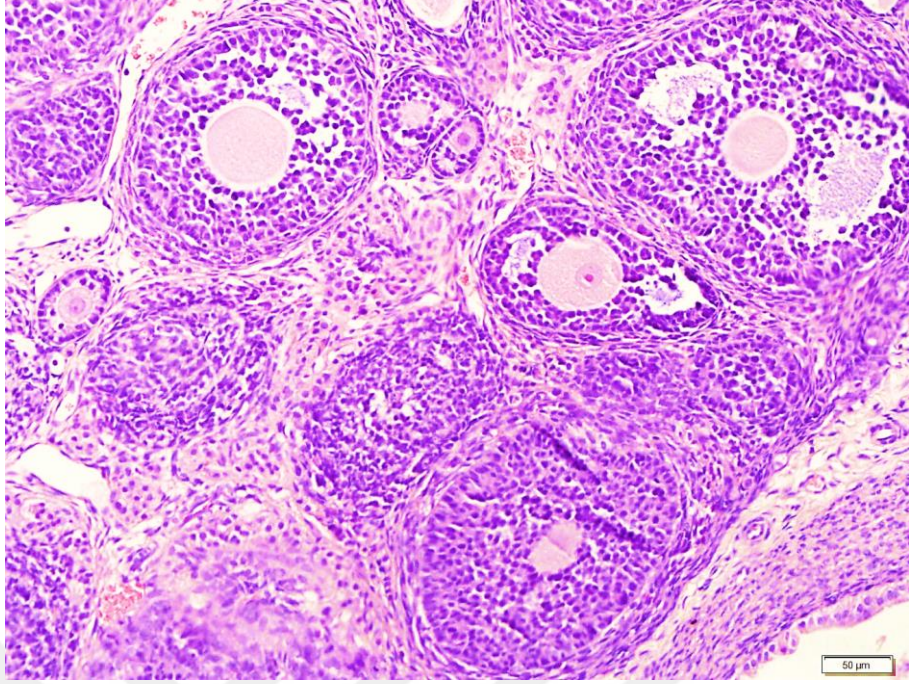
folikül sayısı. D) Dejenere folikül sayısı. **: $p<0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++: $p<0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **E) Kistik folikül sayısı.** **: $p<0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++: $p<0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

Tablo 4. Gruplara ait primer, sekonder, graaf, dejenere ve kistik folikül sayıları (ortalama $\pm$ standart hata).

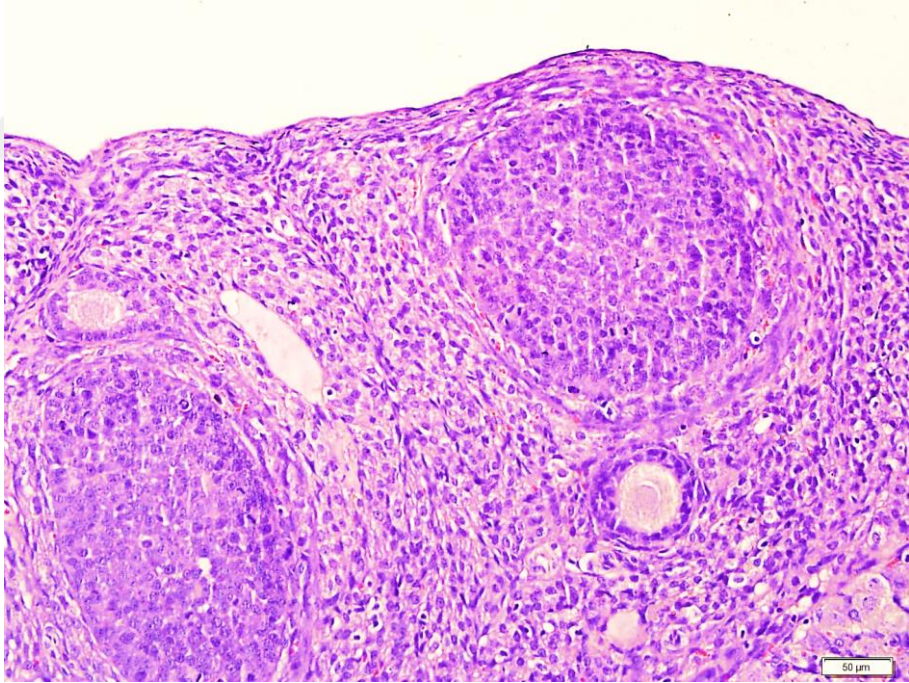
Folikül Sayısı	Kontrol Grubu	Melatonin Grubu	MSG Grubu	MSG+Mel Grubu
Primer Folikül Sayısı	7,6 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 1	2,8$\pm$0,5	5,6 $\pm$ 0,8
Sekonder Folikül Sayısı	7,8 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 0,8	2,9$\pm$0,5	5,8 $\pm$ 0,6
Graaf Folikül Sayısı	1,1 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3
Dejenere Folikül Sayısı	1 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1	1,8$\pm$0,3	0,9 $\pm$ 0,1
Kistik Folikül Sayısı	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	2$\pm$0,2	0,5 $\pm$ 0,2

4.1.3. Histopatolojik Bulgular

Kontrol (Resim 13) ve melatonin (Resim 14) grubuna ait preparatlarda ovaryumu çevreleyen germinal epitel ve altında tunika albuginea sağlıklı bir şekilde izlenmiştir. Kesitlerde kesin sınırlarla birbirinden ayrılamayan dışta korteks, içte medulla olarak adlandırılan tabakalanmalar gözlenmiştir. Kortekste gelişimin farklı aşamalarda olan birçok folikül ve korpus luteum görülmüştür. Foliküllerde oositi çevreleyen zona pellusidanın intakt olduğu ve çevresinde granüloza hücrelerinin düzenli şekilde sıralandığı bulunmuştur.

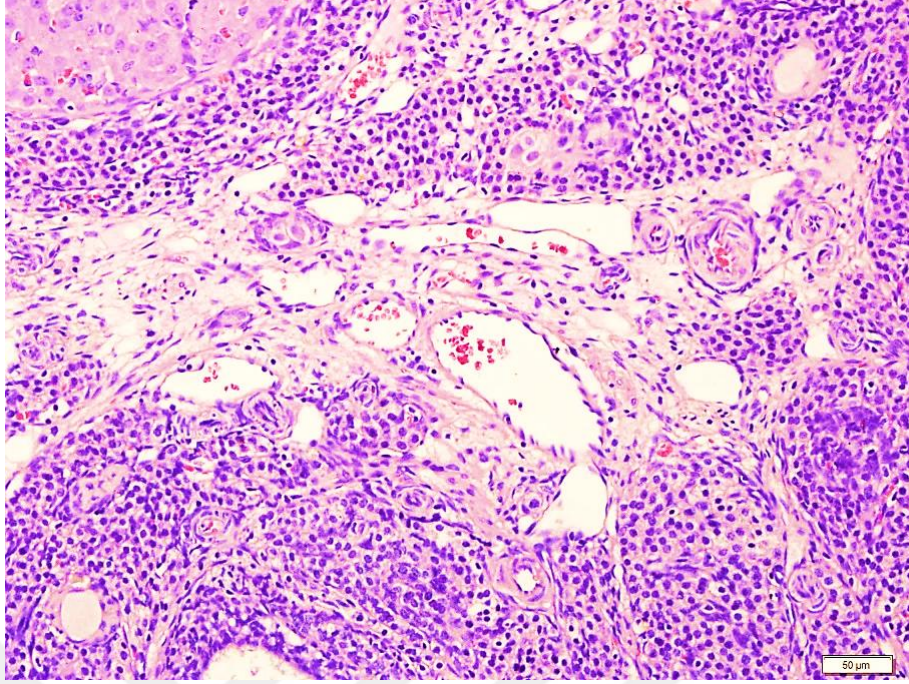


Resim 13. Kontrol grubuna ait over korteksi. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

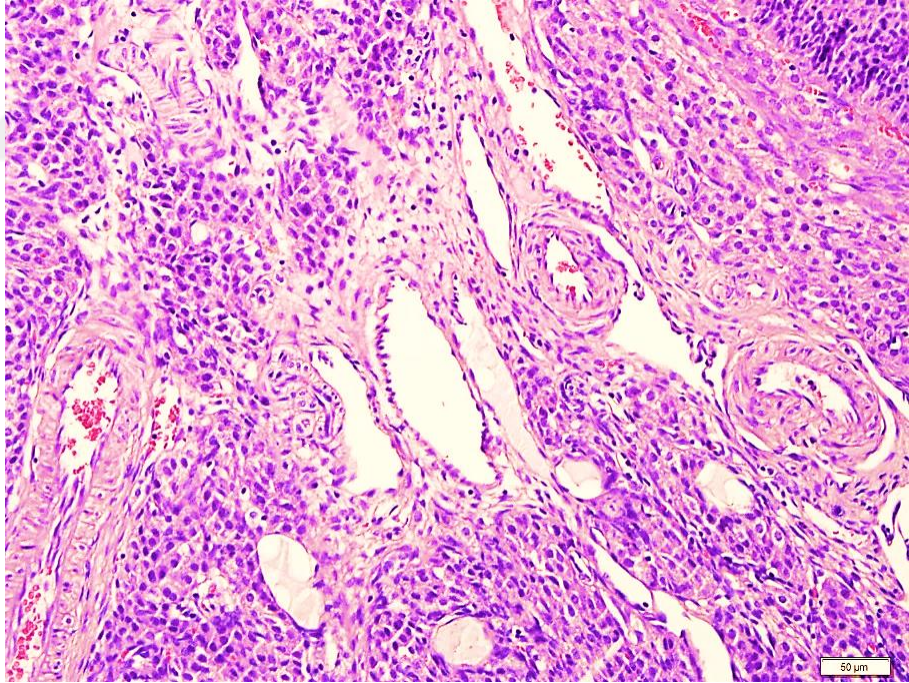


Resim 14. Melatonin grubuna ait over korteksi. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

Kontrol (Resim 15) ve melatonin (Resim 16) gruplarına ait preparatlarda izlenen medullada ise stromal hücreler ve çok sayıda kan damarı normal olarak izlenmiştir.

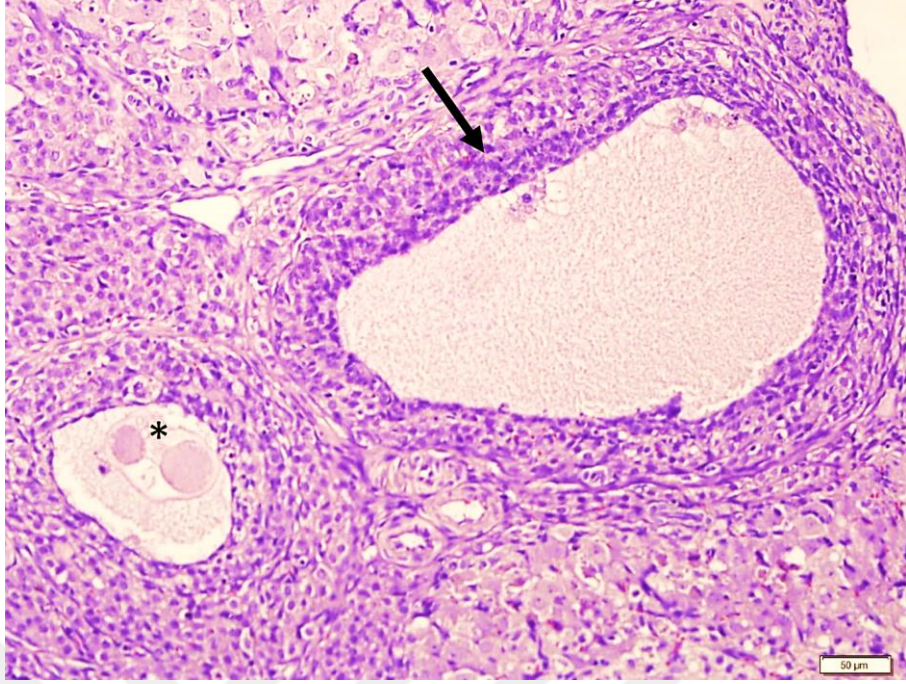


Resim 15. Kontrol grubuna ait over medulla bölgesi. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.



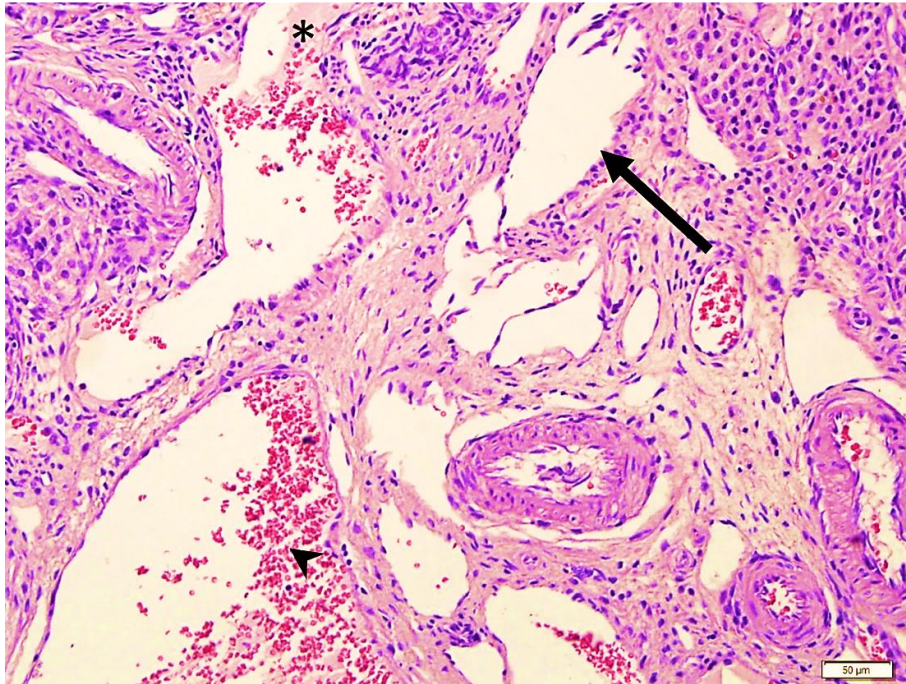
Resim 16. Melatonin grubuna ait over medulla bölgesi. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

MSG grubuna ait preparatlar incelendiğinde germinal epitelin tunika albugineadan yer yer ayrıldığı göze çarpmıştır. Kortekste farklı evrelerde folikül ve korpus luteum yanı sıra düzensiz zona pellusida ve atrofik oositleri içeren dejenere foliküllerde artış izlenmiştir (Resim 17).



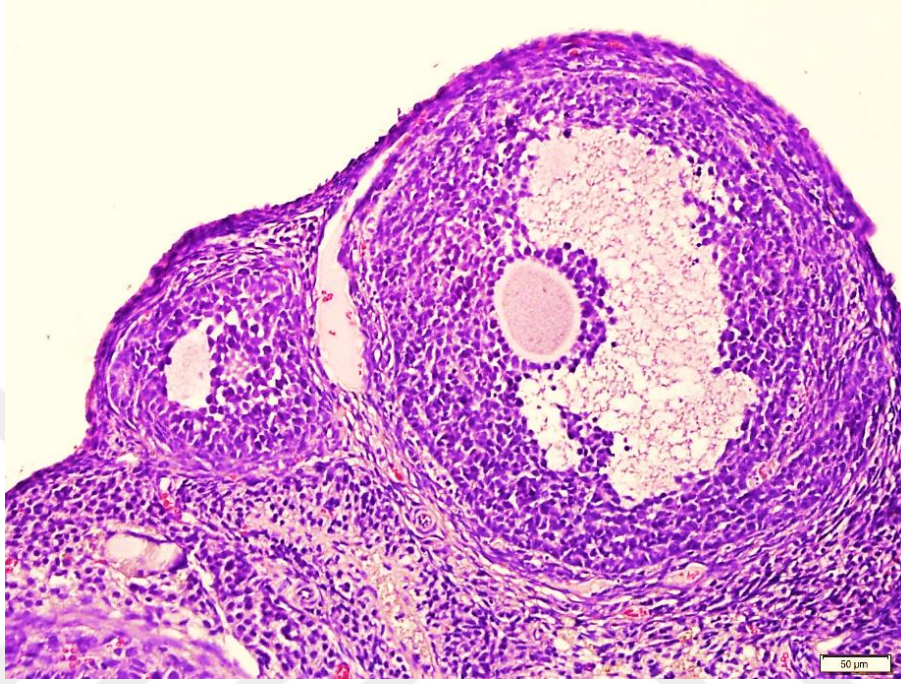
Resim 17. MSG grubuna ait over korteksi. Ok: kistik folikül, *: dejenere oosit. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

Medullar bölgede belirgin kistik değişiklikler, venöz konjesyon ve damar yapılarında hyalinizasyon görülmüştür (Resim 18).



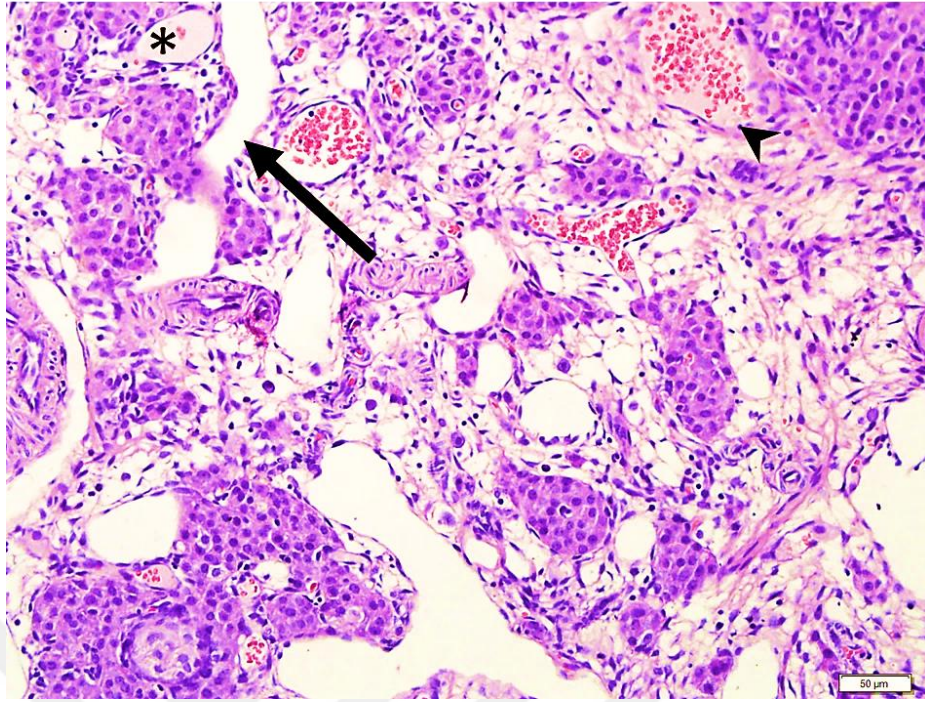
Resim 18. MSG grubuna ait over medulla bölgesi. Ok: kistik genişleme, okbaşı: venöz konjesyon, *: hyalinizasyon. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

MSG ile birlikte melatonin uygulanan gruba ait preparatlarda normal yapıda germinal epitel ve tunika albuginea izlenmiştir. Kortekste gelişimin farklı aşamalarda olan birçok folikül ve korpus luteum ile birlikte yer yer dejenere folikül yapılarına rastlanmıştır (Resim 19).

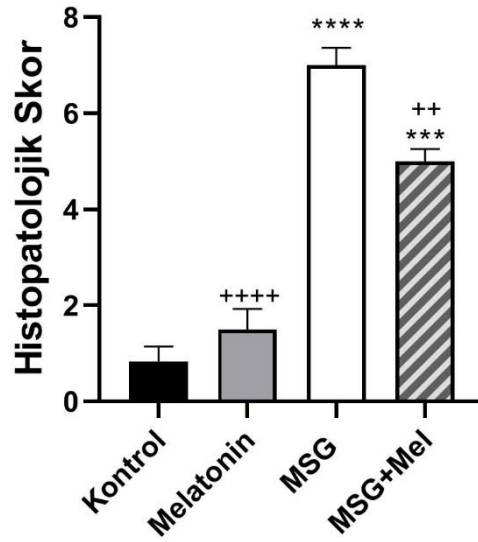


Resim 19. MSG+Melatonin grubuna ait over korteksi. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

MSG+Melatonin uygulanan grubun medullasında orta derecede kistik değişiklikler, venöz konjesyon ve hyalinizasyonda MSG verilen gruba göre azalma gözlenmiştir (Resim 20).



Resim 20. MSG+Melatonin grubuna ait over medulla bölgesi. Ok: kistik genişleme, okbaşı: venöz konjesyon, *: hyalinizasyon. H&E boyama. Ölçek: 50 µm.

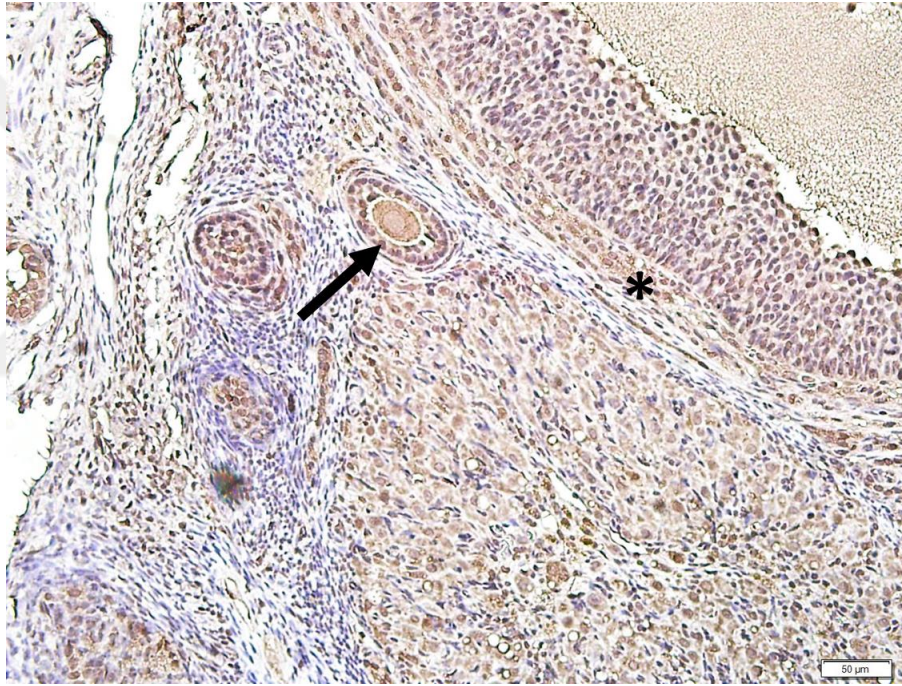


Şekil 13. Gruplara ait histopatolojik skor grafiği. ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. ++++: $p < 0,0001$, ++: $p < 0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

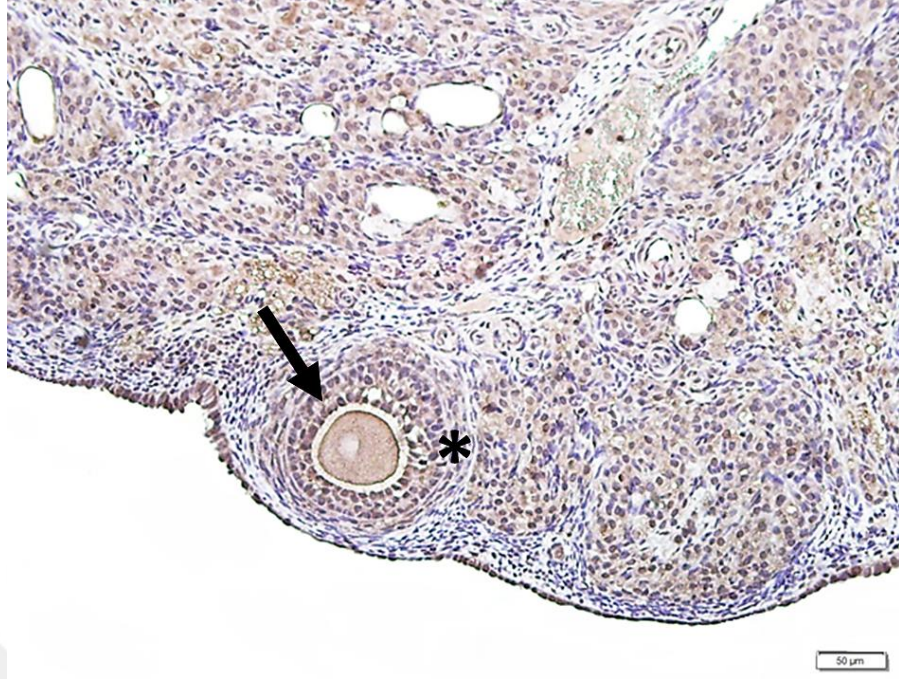
4.1.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.1.4.1. ER- α İmmunohistokimyası Bulguları

Kontrol (Resim 21) ve MSG grupları (Resim 22) overlerinde yaygın olarak granüloza, teka ve interstisyel hücrelerde orta yoğunlukta ER- α boyanması izlenmiştir. Melatonin (Resim 23) ve MSG+Melatonin grubuna (Resim 24) ait dokularda ise yukarıda belirtilen hücrelerde nispeten düşük immünoreaktivite (ir) göstermiştir. Melatonin grubunda boyanmadaki bu farklılık kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bulunmuştur (Şekil 14).



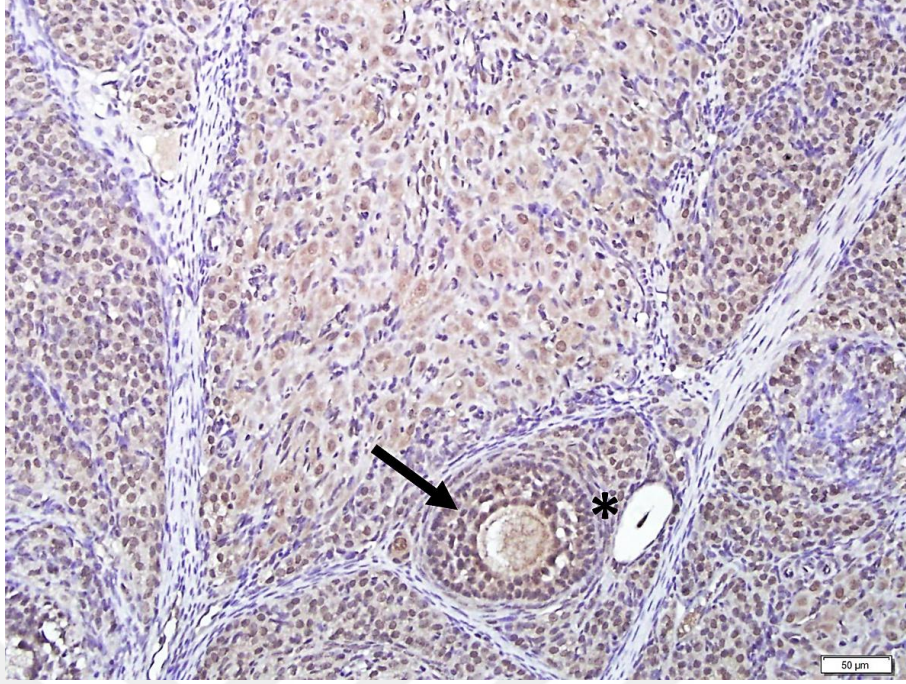
Resim 21. Kontrol grubu orta yoğunlukta boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: teka hücreleri. ER- α immünohistokimyası. Ölçek: 50 μ m.



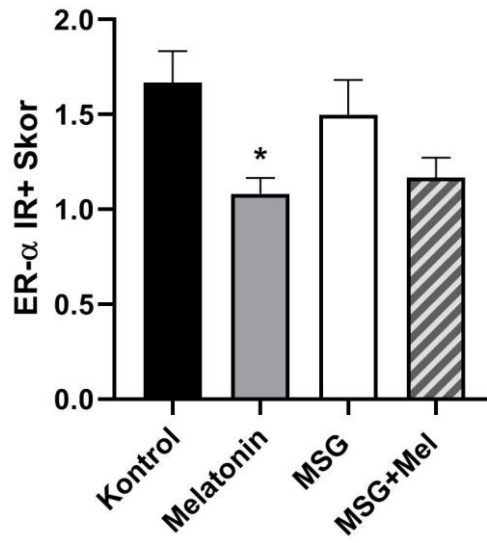
Resim 22. Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: teka hücreleri. ER- α immünohistokimyası. Ölçek: 50 μ m.



Resim 23. MSG grubu orta yoğunlukta boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: teka hücreleri. ER- α immünohistokimyası. Ölçek: 50 μ m.



Resim 24. MSG+Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: teka hücreleri. ER-α immünohistokimyası. Ölçek: 50 μm.

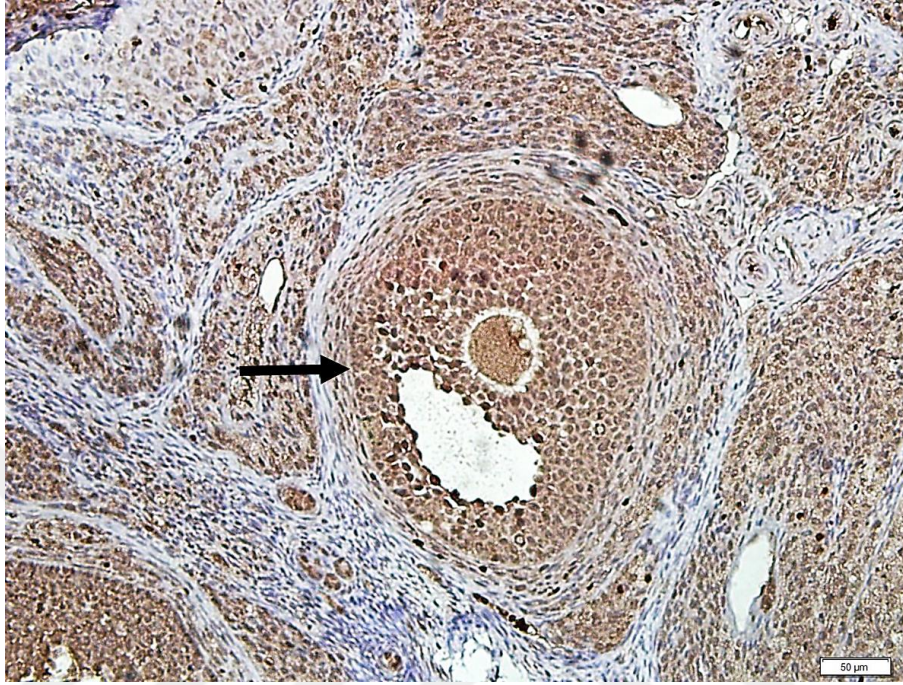


Şekil 14. Deney gruplarının ER-α IR açısından karşılaştırılması. *: $p < 0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında.

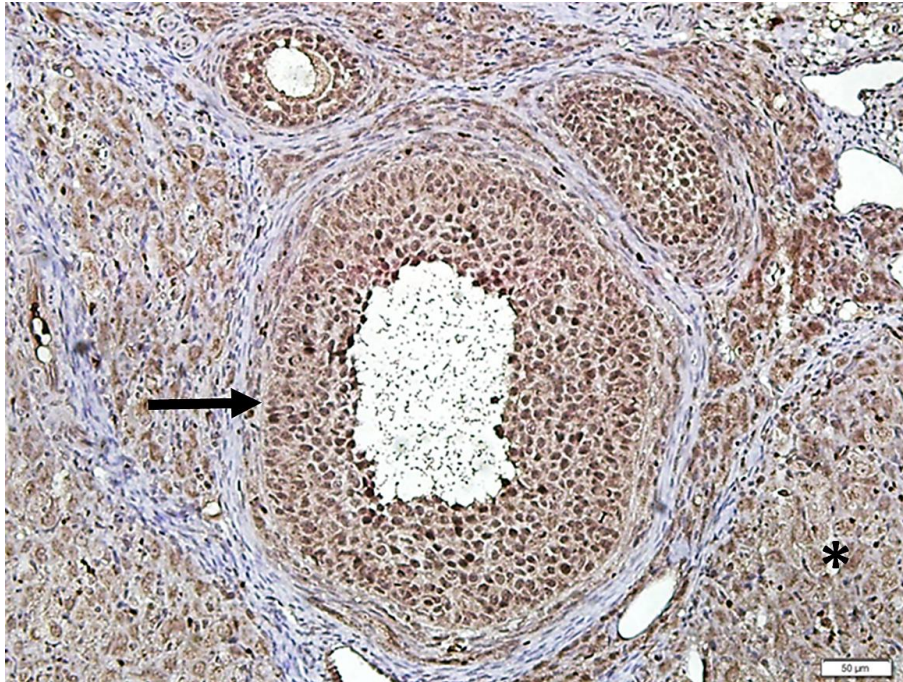
4.1.4.2. StAR İmmünohistokimyası Bulguları

Steroidogenezin gerçekleştiği granüloza hücreleri, luteal hücreler başta olmak üzere kontrol grubu (Resim 25) ve melatonin grubunda (Resim 26) yoğun ir mevcutken

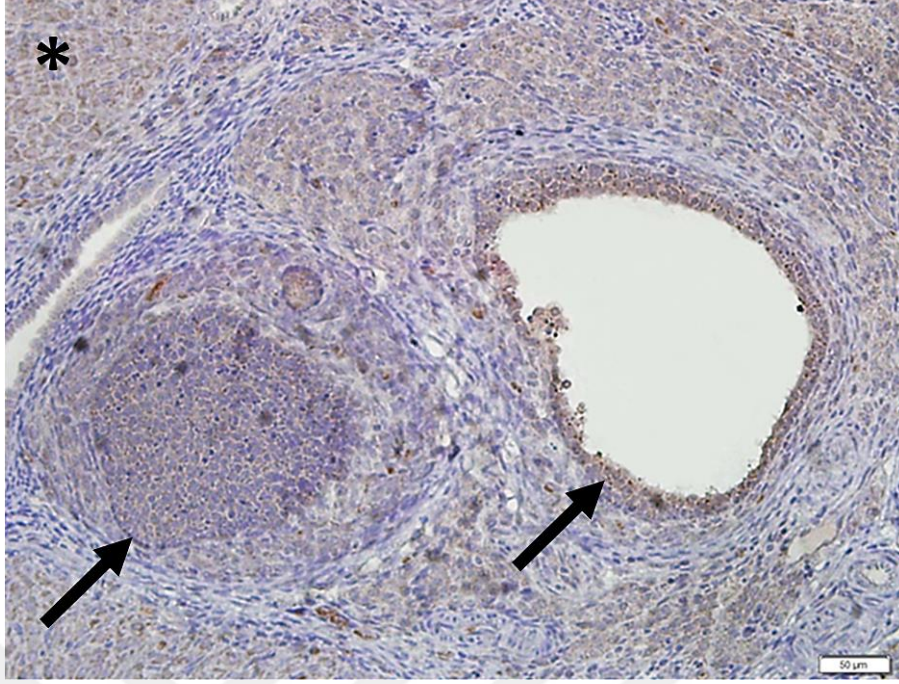
MSG grubunda (Resim 27) soluk boyanma izlenmiştir. MSG+Melatonin grubunda (Resim 28) ir orta yoğunlukta saptanmıştır. MSG grubundaki ir’de diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede azalma bulunmuştur (Şekil 15).



Resim 25. Kontrol grubu yoğun boyanması. Ok: granüloza hücreleri. StAR immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



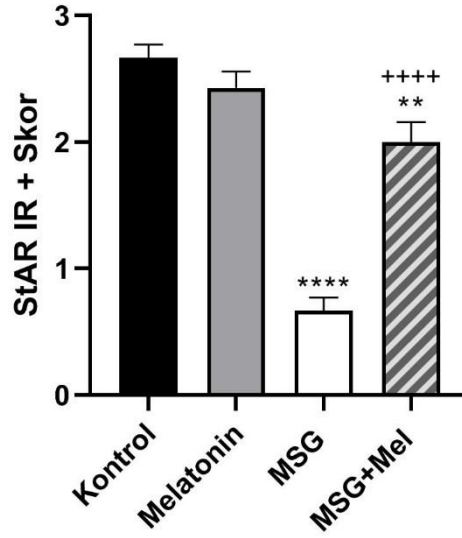
Resim 26. Melatonin grubu yoğun boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: luteal hücreler. StAR immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



Resim 27. MSG grubu soluk boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: luteal hücreler. StAR immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



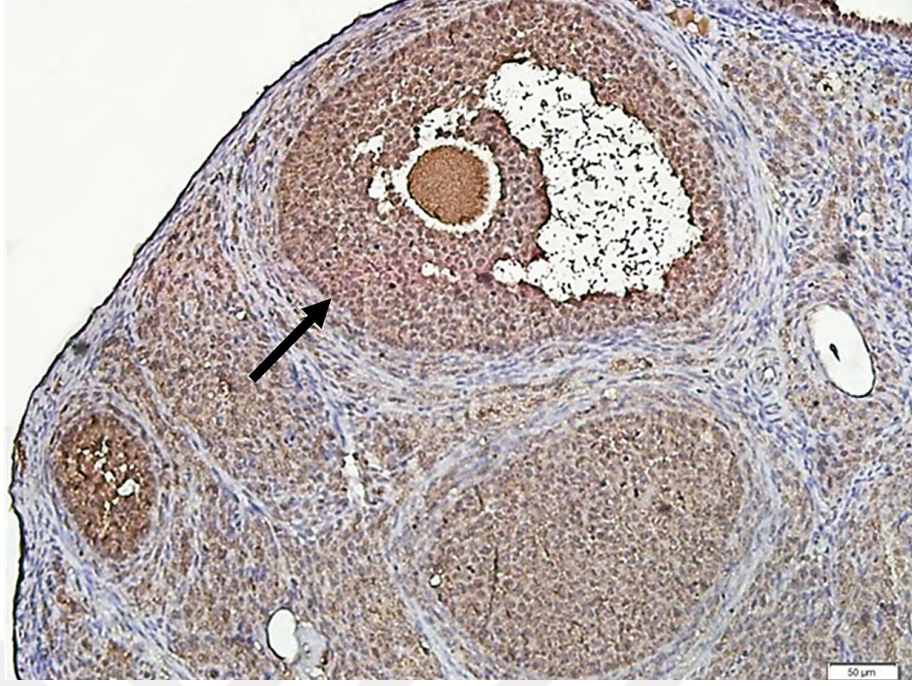
Resim 28. MSG+Melatonin grubu orta yoğunlukta boyanması. Ok: granüloza hücreleri, *: luteal hücreler. StAR immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



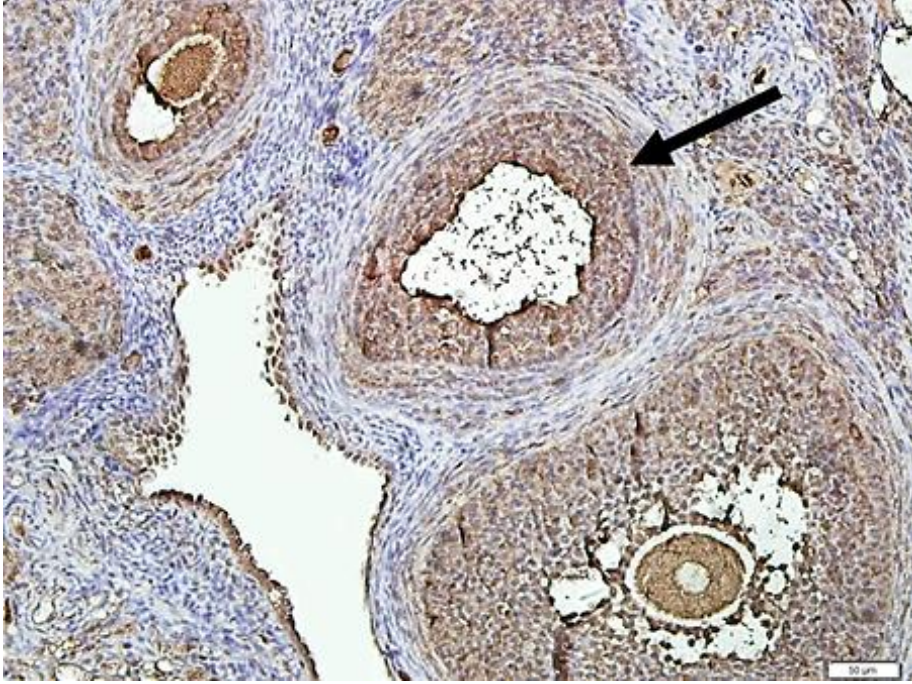
Şekil 15. Deney gruplarının StAR ir açısından karşılaştırılması. ****: $p < 0,0001$, **: $p < 0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. ++++: $p < 0,0001$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

4.1.4.3. Aromataz İmmunohistokimyası Bulguları

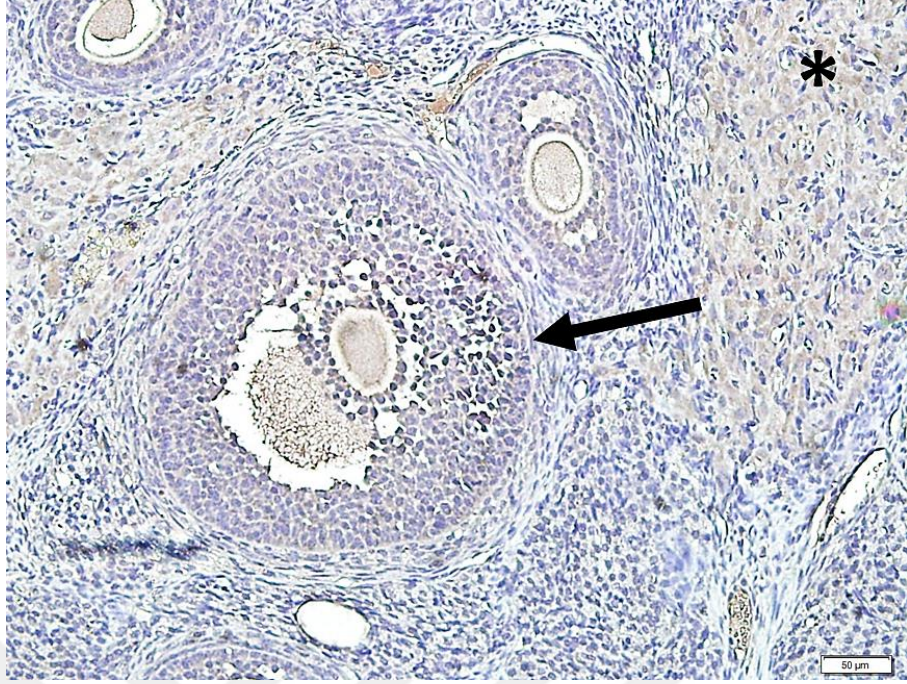
Kontrol grubu (Resim 29) ve melatonin verilen gruba (Resim 30) ait dokularda, granüloza hücreleri ve korpus luteum hücreleri başta olmak üzere stromal hücrelerde aromataz ir'nin yoğun olduğu izlenmiştir. MSG uygulanan sıçanlara ait dokularda (Resim 31) yukarıda belirtilen hücrelerde düşük ir görülürken, MSG+melatonin grubunda (Resim 32) ise orta yoğunlukta ir saptanmıştır. MSG grubunda aromataz ir düşüşü kontrol grubuna göre anlamlı iken ($p < 0,0001$), MSG ile birlikte uygulanan melatoninin ir skorunu anlamlı ölçüde arttırdığı ($p < 0,01$) bulunmuştur (Şekil 16).



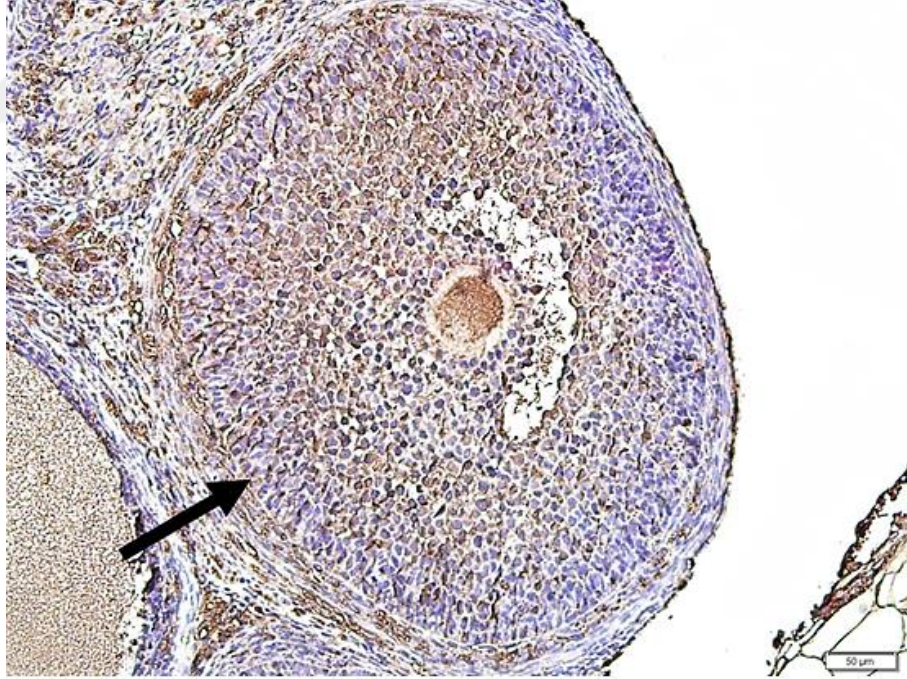
Resim 29. Kontrol grubu yoğun boyanması. Ok: granüloza hücreleri. Aromataz immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



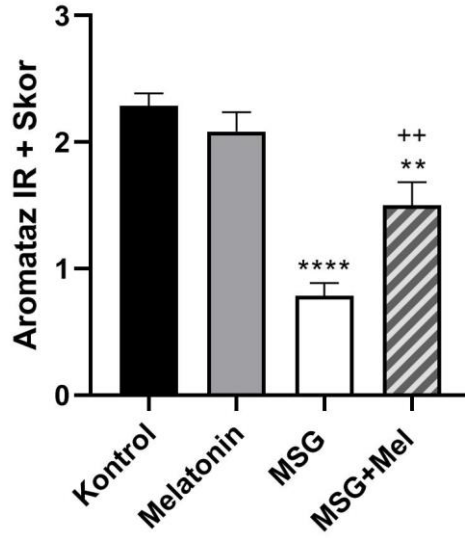
Resim 30. Melatonin grubu yoğun boyanması. Ok: granüloza hücreleri. Aromataz immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



Resim 31. MSG grubu soluk boyanması. Ok: granuloza hücreleri, *: luteal hücreler. Aromataz immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



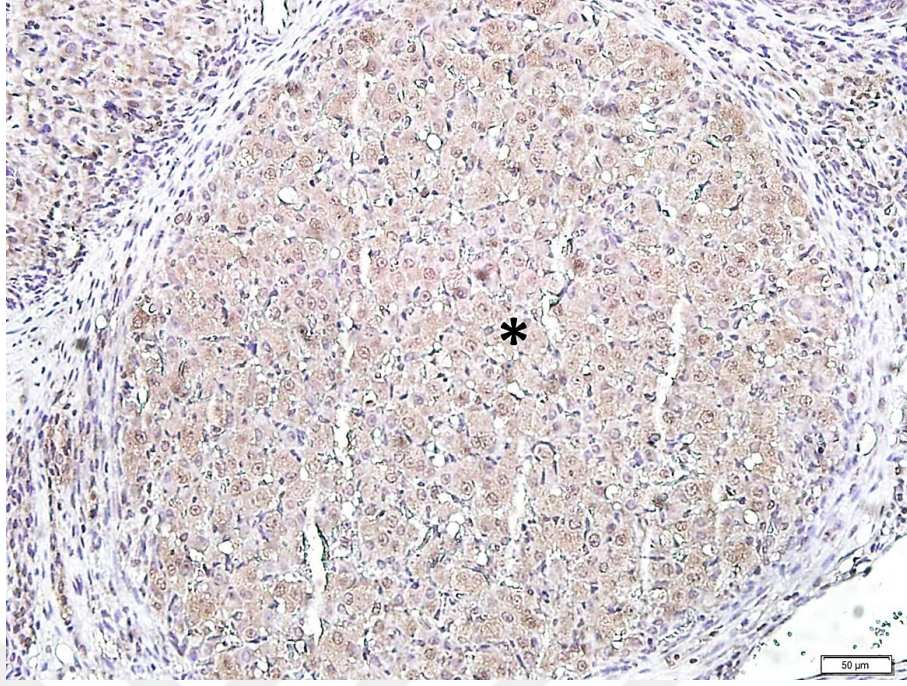
Resim 32. MSG+Melatonin grubu orta yoğunlukta boyanması. Ok: granuloza hücreleri, *: luteal hücreler. Aromataz immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



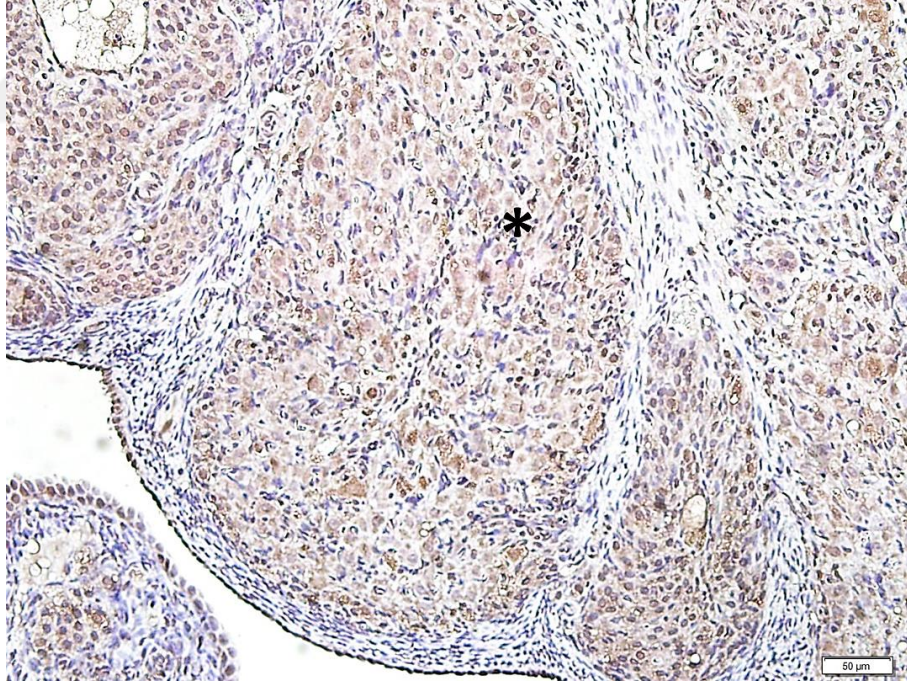
Şekil 16. Deney gruplarının Aromataz ir açısından karşılaştırılması. ****: $p < 0,0001$, **: $p < 0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. ++: $p < 0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

4.1.4.4. SULT1E1 İmmunohistokimyası bulguları

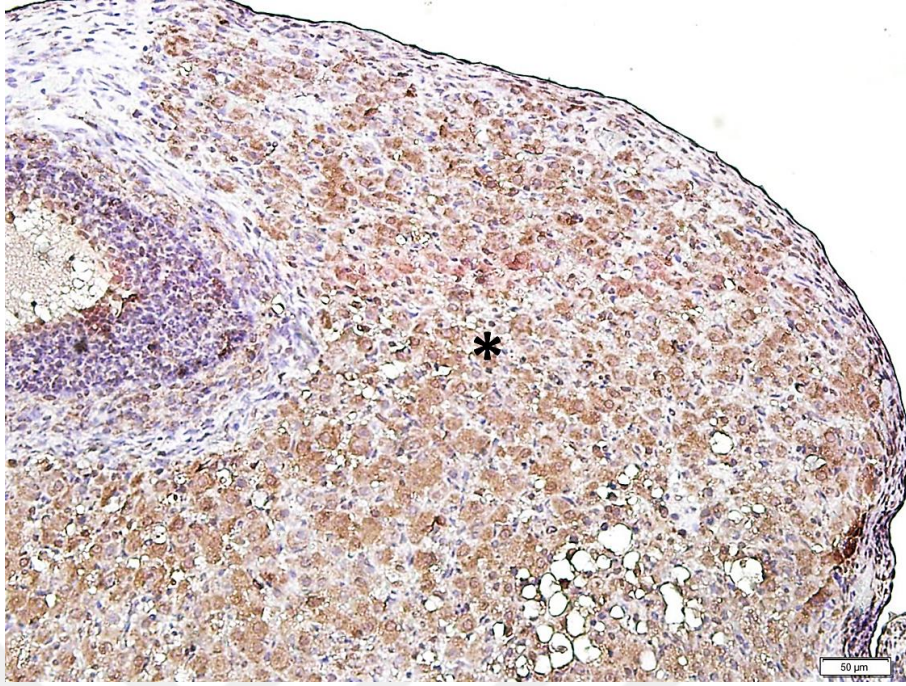
Kontrol grubu (Resim 33) ve melatonin verilen gruba (Resim 34) ait dokularda, korpus luteum hücreleri başta olmak üzere SULT1E1 ir'nin düşük olduğu izlenmiştir. MSG uygulanan sıçanlara ait dokularda (Resim 35) luteal hücrelerde orta ir görülürken, MSG+melatonin grubunda (Resim 36) ise düşük yoğunlukta ir saptanmıştır. MSG grubunda SULT1E1 ir artışı kontrol ve melatonin gruplarına göre anlamlı iken ($p < 0,01$), MSG ile birlikte uygulanan melatoninin ir şiddetini kontrol seviyesine düşürdüğü görülmüştür (Şekil 17).



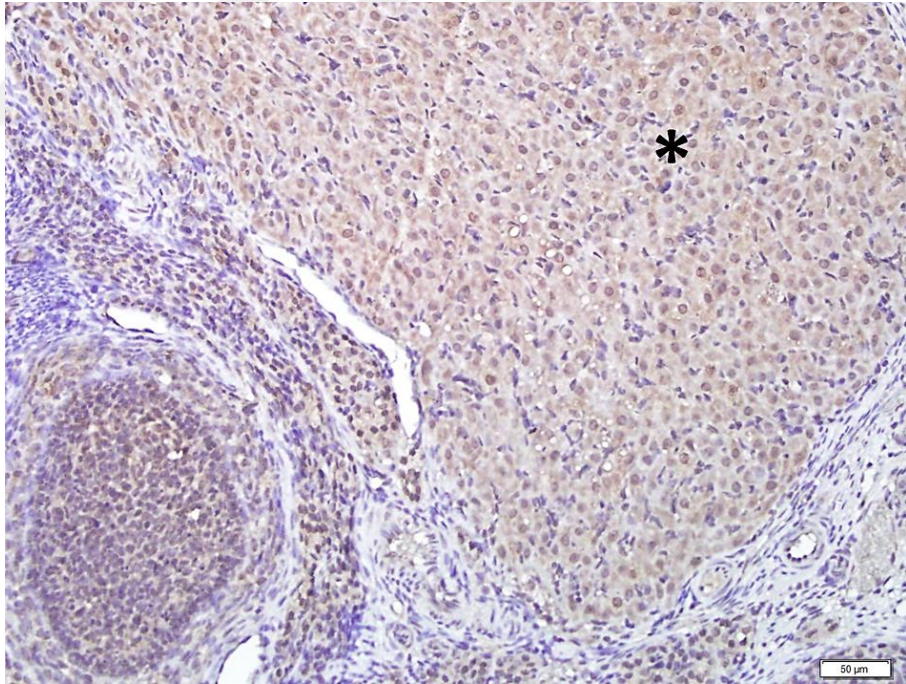
Resim 33. Kontrol grubu düşük yoğunlukta boyanması. *: luteal hücreler. SULT1E1 immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



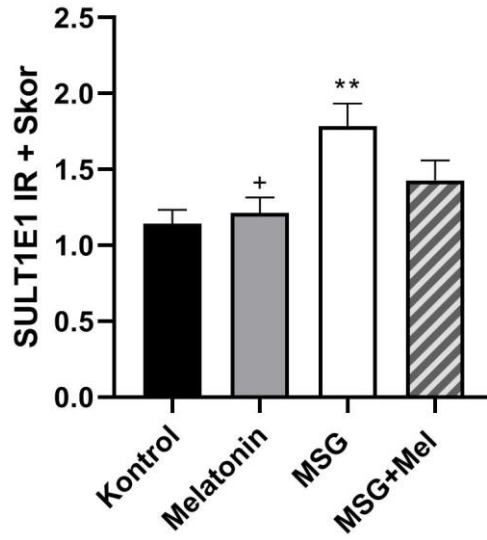
Resim 34. Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. *: luteal hücreler. SULT1E1 immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



Resim 35. MSG grubu orta yoğunlukta boyanması. *: luteal hücreler. SULT1E1 immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



Resim 36. MSG+Melatonin grubu düşük yoğunlukta boyanması. *: luteal hücreler. SULT1E1 immünohistokimyası. Ölçek: 50 µm.



Şekil 17. Deney gruplarının SULT1E1 ir açısından karşılaştırılması. **: $p < 0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. +: $p = 0,01$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

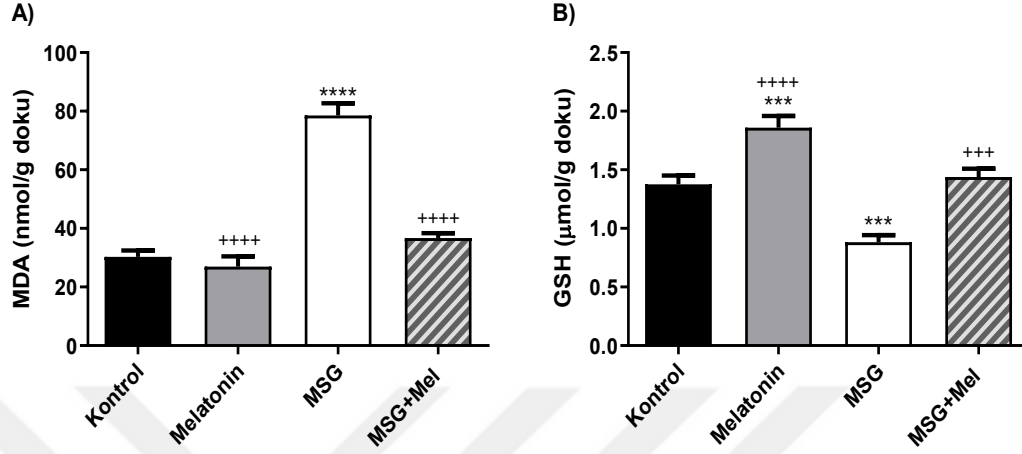
4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Overde ölçülen MDA-GSH düzeyleri

Kontrol grubu over doku MDA düzeyi $30,2 \pm 2,2$ nmol/gr doku, melatonin grubunda $26,9 \pm 3,5$ nmol/gr doku, MSG grubunda $78,5 \pm 4,4$ nmol/gr doku, MSG+melatonin grubunda ise $36,6 \pm 1,7$ nmol/gr doku'dur. Lipit peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeyinin kontrol ve melatonin grubu overlerinde benzer olduğu belirlenmiştir. MSG grubu overlerinde ölçülen MDA seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış ($p < 0,0001$) göstermiştir. Buna karşın, MSG+melatonin grubunda ise over MDA düzeyleri MSG grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış ($p < 0,0001$) bulunmuştur (Şekil 18A).

Kontrol grubu over doku GSH düzeyi $1,37 \pm 0,07$ μ mol/gr doku, melatonin grubunda $1,86 \pm 0,08$ μ mol/gr doku, MSG grubunda $0,8 \pm 0,06$ μ mol/gr doku, MSG+melatonin grubunda ise $1,42 \pm 0,06$ μ mol/gr doku'dur. Over dokusunda ölçülen GSH düzeyi melatonin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Bununla birlikte GSH düzeyi MSG grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış iken ($p < 0,0001$),

MSG+melatonin grubunda MSG grubuna göre yüksek olduğu ($p < 0,001$) ve kontrol seviyesine geri döndüğü saptanmıştır (Şekil 18B).



Şekil 18. Deney grupları over dokularında ölçülen MDA ve GSH düzeyleri açısından karşılaştırılması. **A) MDA düzeyleri.** ****: $p < 0,0001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++++: $p < 0,0001$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **B) GSH düzeyleri.** ***: $p < 0,001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ++++: $p < 0,0001$, +++: $p < 0,001$ MSG grubu ile kıyaslandığında.

4.2.2. Serumda ölçülen GnRH, FSH, LH, E₂ ve AMH düzeyleri

Kontrol grubunda serum E₂ düzeyi $51,6 \pm 1,3$ pg/ml, melatonin grubunda $49,4 \pm 1,3$ pg/ml, MSG grubunda $36,8 \pm 1,1$ pg/ml, MSG+Melatonin grubunda ise $47,7 \pm 1,4$ pg/ml'dir. MSG grubu serum E₂ düzeyinde diğer tüm gruplara göre anlamlı oranda düşüş ($p < 0,0001$) izlenmiştir (Şekil 19A).

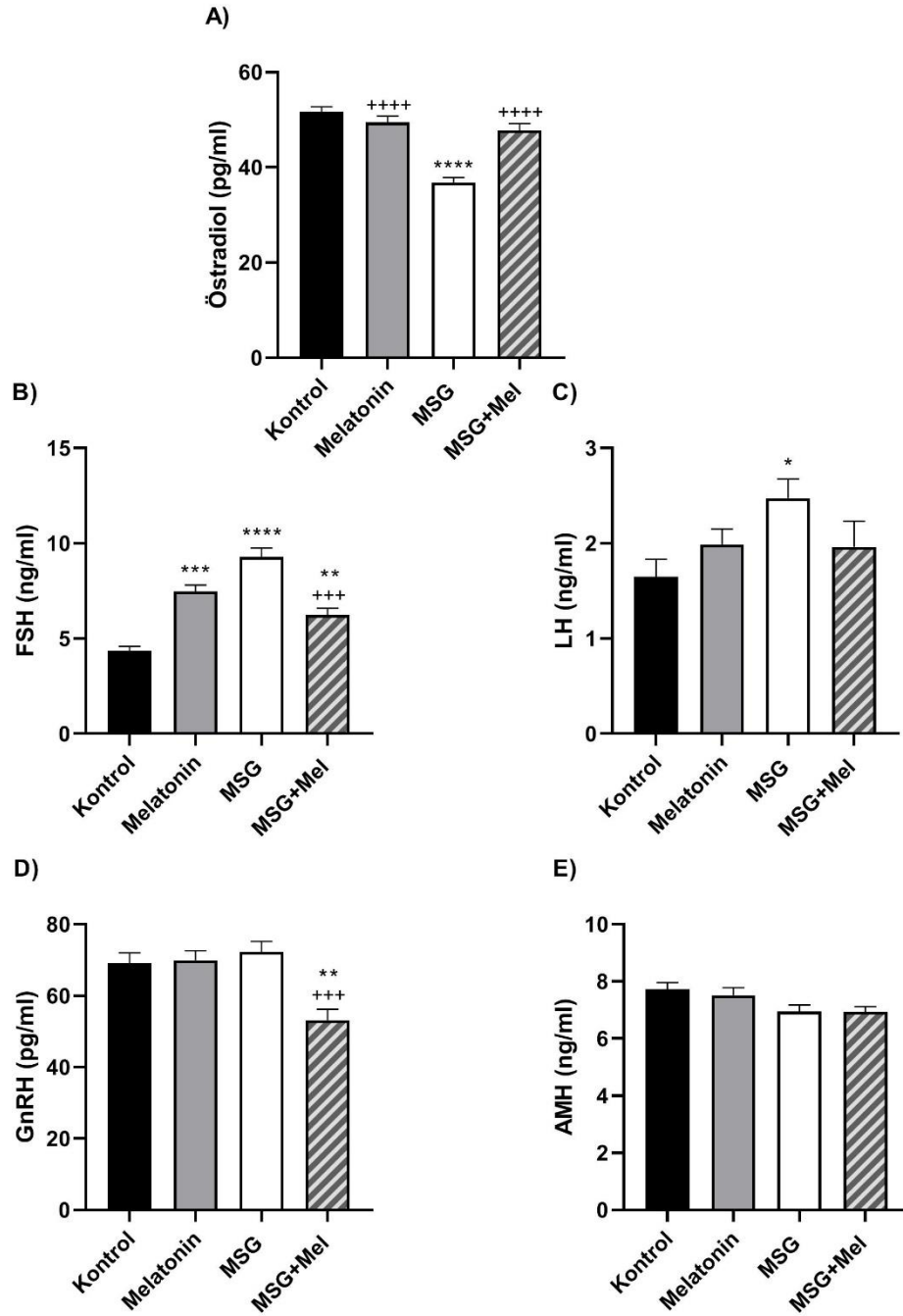
Kontrol grubunda serum FSH düzeyi $4,3 \pm 0,2$ ng/ml, melatonin grubunda $7,4 \pm 0,3$ ng/ml, MSG grubunda $9,3 \pm 0,5$ ng/ml, MSG+Melatonin grubunda ise $6,2 \pm 0,3$ ng/ml'dir. Kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı artış gözlenirken ($p < 0,0001$), MSG+Melatonin grubunda MSG grubuna göre anlamlı düşüş ($p < 0,001$) göze çarpmaktadır (Şekil 19B).

Kontrol grubunda serum LH düzeyi $1,6 \pm 0,1$ ng/ml, melatonin grubunda $1,9 \pm 0,1$ ng/ml, MSG grubunda $2,4 \pm 0,2$ ng/ml, MSG+Melatonin grubunda ise $1,9 \pm 0,2$ ng/ml'dir. Kontrol grubuna göre MSG grubunda anlamlı artış gözlenirken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında belirgin fark bulunmamıştır (Şekil 19C).

Kontrol grubunda serum GnRH düzeyi $69\pm2,9$ pg/ml, melatonin grubunda $69,9\pm2,7$ pg/ml, MSG grubunda $72,3\pm3,1$ pg/ml, MSG+Melatonin grubunda ise $53,1\pm3$ pg/ml'dir. MSG+Melatonin grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı düşüklük ($p < 0,001$) gözlenmiştir (Şekil 19D).

Kontrol grubunda serum AMH düzeyi $7,7\pm0,2$ ng/ml, melatonin grubunda $7,5\pm0,2$ ng/ml, MSG grubunda $7,1\pm0,2$ ng/ml, MSG+Melatonin grubunda ise $7\pm0,1$ ng/ml'dir. Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmesi de MSG ve MSG+Melatonin gruplarındaki düşme eğilimi dikkat çekmiştir (Şekil 19E).





Şekil 19. Deney gruplarında serum E₂, FSH, LH, GnRH ve AMH düzeyleri. **A) E₂ düzeyleri.** ****: $p < 0,0001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ****: $p < 0,0001$ melatonin ve MSG+melatonin grupları ile kıyaslandığında. **B) FSH düzeyleri.** ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, +++: $p < 0,001$ MSG grubu ile kıyaslandığında. **C) LH düzeyleri.** *: $p < 0,05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. **D) GnRH düzeyleri.** +++: $p < 0,001$ MSG grubu ile kıyaslandığında, **: $p < 0,01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında. **E) AMH düzeyleri.**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, MSG'nin dişi sıçan östrus siklusunda diöstrus evresinde uzamaya yol açtığı, primer ve sekonder folikül sayısında azalma ile birlikte dejenere ve kistik folikül sayısında artışa neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca MSG grubu sıçanlarının over doku örneklerinde medullar bölgede belirgin kistik değişiklikler, venöz konjesyon ve damar yapılarında hyalinizasyon gözlenmiştir. MSG uygulanmasıyla over dokusunda oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesinin arttığı, bununla birlikte antioksidan belirteçlerden olan GSH seviyesinin ise azaldığı izlenmiştir. İlaveten, MSG uygulanmasıyla serum FSH ve LH'ta artışla birlikte E₂ düzeyinde azalma elde edilmiştir. Östrojen sentezinde görevli olan StAR ve aromataz miktarının azaldığı, östrojen yıkımında rol alan SULT1E1 düzeyinin ise arttığı immünohistokimyasal olarak bulunmuştur. Melatonin uygulaması ile MSG verilen sıçan overlerinde görülen tüm bu histolojik ve biyokimyasal sonuçları iyileştirdiği görülmüştür.

Erişkin ve gebe olmayan bir dişi sıçan **östrus siklusu** adı verilen karakteristik bir üreme döngüsü gösterir. Bu döngünün vajinal sürüntü ile tespiti normal ve patofizyolojik koşullarda overlerin üreme fonksiyonlarını gösteren önemli bir methoddur. Üreme toksisitesine yönelik yapılan birçok çalışmada kullanılan ajanlar proöstrus, östrus ve metöstrus süresinde doza bağlı bir kısalma gösterirken diöstrus süresini uzattığı saptanmıştır. Proöstrus ve östrus toplam evre uzunluğu bir nevi dişi doğurganlığını yansıtabilir [32, 94]. Diöstrus evresinde uzama gibi östrus siklusunda anormallikler, dişinin erkeği kabul ettiği dönem olan proöstrus ve östrus evre gün sayısını azaltarak doğurganlığı dolaylı yoldan baskılar [32, 95]. Bu durum, proöstrus ve östrus evreleri sırasında foliküler faz ve folikül sayısını azalttığından östrus döngüsü üzerindeki olumsuz etkileri düşündürür. Bunu, konuyla ilgili sistemlerde hormonal dengesizliklere yol açarak yaptıkları savunulmuştur [94].

Güvenli kontrasepsiyon ajanı elde etmek için yapılan araştırmalarda bazı bitki ekstratlarının proöstrus ve östrus evre sürelerinde belirgin kısalma ve diöstrus evre süresinde anlamlı uzamaya yol açtığı, böylece preovulatuvar fazda folikül olgunlaşmasını geciktirdiği ve graaf folikülün oluşamadığı gösterilmiştir [95-97]. Graaf folikül sayısında azalma ovulasyonun gerçekleşmemesi (anovulasyon) ve

sonuçta fertilitenin azalması şeklinde yorumlanmıştır. Bitkilerin anti-östrojenik etkisi ile hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın hassas dengesini bozarak over fonksiyonlarında ve östrus siklusunda anormalliklere yol açtığı düşünülmüştür [95, 97].

MSG'nin östrus siklusu üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda oral yolla çeşitli dozlarda MSG verilen sıçan gruplarında kontrol grubuna göre proöstrus, östrus ve metöstrus evre sürelerinde anlamlı kısalma, diöstrus evre süresinde doza ve uygulanma süresine bağlı olarak uzama gözlemlenmiştir [5]. Bir başka çalışmada da dişi sıçan yavrularına neonatal 2, 4, 6, 8 ve 10. gün subkutan yolla verilen 4 mg/g MSG'nin sıçanlarda diöstrus evre sürelerini uzatarak östrus siklusunda düzensizleşmeye neden olduğu öne sürülmüştür [44].

Melatonin uygulamasının dişi üreme döngüsündeki düzenleyici etkisini kanıtlayan birçok çalışma mevcuttur [98-100]. Tasarlanan bir çalışmada Polikistik Over Sendromu (PCOS) sıçan modelinde östrus siklus bozulmalarından önce ve sonra melatonin uygulamasının over üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Melatonin uygulaması ile PCOS sıçan modelinde siklusa uzama ve anormalliklerin önlenildiği görülmüştür. Bu iyileşmeyi melatoninin hormonal aksı modüle ederek sağladığı savunulmuştur [101]. Bir başka çalışmada ise uzun süreli melatonin uygulamasının ovulasyonda artan lipid peroksidasyonun düşürerek ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini artırarak östrus döngüsünü düzenlediği savunulmuştur. Bu koruyucu etkiler, melatoninin hem ROS temizleyicisi hem de antioksidan aktiviteleri arttıran bir molekül olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir [99].

Tez çalışmamızda MSG uygulanan grupta diöstrus evresinde uzama, bunun yanı sıra diğer tüm östrus evrelerinde anlamlı derecede kısalma gözlenmiştir. Östrus siklusunda proöstrus, östrus ve metöstrus evre süresindeki kısalmanın, ön hipofizden LH ve FSH sekresyonu ve overde büyüyen foliküllerden E₂ salgılanmasında bozukluğa bağlı olabileceğini düşündürmektedir. MSG ile birlikte melatonin uygulanması ile tüm evrelerde gözlenen değişikliğin kontrol değerlerine yaklaştığı elde edilmiştir. Sonuçlarımız melatonin uygulamasının MSG verilen sıçanlarında oluşan östrus döngüsünün işlev bozukluğunu kısmen iyileştirdiğini göstermektedir.

Günümüze kadar farklı hayvan türlerinde çok sayıda çalışma, çeşitli dozlarda MSG uygulamasının overe toksik etki mekanizmasını aydınlatmak amacıyla yapılmıştır. Bojanik ve ark. tarafından yenidoğan sıçanlara s.c. 5 gün boyunca 4 mg/g MSG uygulanması ile yavruların erişkin döneminde over kortekste atrezik folikül artışı, fibrotik değişiklikler, stromada kistik dejenerasyon ve arteriolar hyalinizasyon gözlenmiştir. Bu bulgular Ca^{+2} kanal blokörü olan Diltiazem 5 mg/g verilmesi ile gerilediği saptanmış ve bu nedenle MSG toksisite mekanizmasının aşırı Ca^{+2} artışı nedeni olabileceği savunulmuştur [44]. Mustafa ve ark. yaptığı çalışmada MSG'nin (4 g/kg) fare overlerine histopatolojik etkisi ve vitamin C'nin (100 mg/kg) olası koruyucu rolü araştırılmıştır. Sonuçta MSG uygulaması ile over kortekste büyüyen folikül sayısını azalttığı, atretik folikül sayısını arttırdığı ve medulla kan damarlarında konjesyonu arttırdığını saptayan araştırmacılar bunun MSG'ye bağlı oksidatif hasar sonucu meydana geldiğini savunmuştur. MSG'nin serbest oksijen radikalleri artışı nedeniyle DNA, proteinler ve lipidlerle reaksiyona girerek hücresel hasara ve organlarda fonksiyon bozukluklarına yol açtığı bulunmuştur. Ayrıca MSG'nin sebep olduğu hasarların Vitamin C ile geri döndürüldüğü de aynı çalışmada kanıtlanmıştır [66]. Benzer şekilde 1 ay süre ile MSG verilen farelerde ışık mikroskopik incelemede kortekste dejenere oosit ve geniş atretik foliküllerde artış, granuloza hücrelerinde vakuolizasyon, stromada damarlarda konjesyon ile over disfonksiyonuna neden olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar ayrıca *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* ekstraktı içindeki mikroalglerin bu hasara yönelik etkileri geri döndürebildiğini savunmuşlardır [47]. MSG maruziyetinin dişi sıçanlarda üreme sağlığına etkilerini araştıran diğer çalışmalarda foliküllerde dejeneratif değişiklikler, medullada damarlarda konjesyon gibi patolojik değişiklikler saptanmıştır [45, 46].

Bugüne kadar dişi üreme sistemi üzerine çeşitli toksik ajanlarla yapılan çalışmalarda melatoninin over histopatolojisine yönelik iyileştirici rolü birçok kez kanıtlanmıştır [89, 101-103]. Melatoninin hasara karşı koruyucu etkisi; endokrin sistem regülasyonu, sitoprotektif, antioksidan ve serbest radikal süpürücü özellikleriyle ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada da MSG'nin overde dejenere foliküllerde artış, medullar bölgede belirgin kistik değişiklikler, venöz konjesyon ve damar yapılarında hyalinizasyonu arttırdığı gözlenmiş ve bu parametreler semikantitatif skora ile desteklenmiştir.

MSG grubunda saptadığımız değişiklikler daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur. Melatonin takviyesiyle MSG'nin neden olduğu bulguların anlamlı olarak gerilediği ve kontrol grubu histolojisine yaklaştığı izlenmiştir. Bu tez çalışması MSG'nin overde yol açtığı histopatolojik bulgulara karşı melatoninin iyileştirici etkisini gösteren ilk çalışma olması yönünden önemlidir.

MSG'nin organizmada birçok organda oksidatif hasara neden olduğu araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır [104-106]. MSG'nin dişi sıçan overleri üzerinde histolojik etkilerini ve yeşil çayın olası koruyucu rolünü araştıran bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla MSG grubunda primer, sekonder ve graaf foliküllerinin sayısında oldukça önemli bir düşüş, atretik folikül sayısında önemli bir artış elde edilmiştir. MSG verilen grupta saptanan over folikül ve oosit dejenerasyon artışının MSG'nin neden olduğu oksidatif strese bağlı oluşabileceği vurgulanmıştır. Buna karşılık yeşil çay ekstraktı verilen grupta MSG kaynaklı zararlı etkilere iyileştirici rolü olduğu bulunmuştur. Bu etkiyi yeşil çayın MSG'nin arttırdığı ROS'u azaltarak sağladığı savunulmuştur [45]. Benzer başka bir çalışmada da MSG uygulanan sıçanların overlerinde atretik folikül sayısında diğer gruplara göre anlamlı artış ve foliküllerde kistik dejenerasyon saptanmıştır [44]. Rani ve ark. yaptığı araştırmada doğada bulunan herbominerallerden iyi bir antioksidan olan *Dooshi Visha*'nın Wistar sıçanlarda MSG kaynaklı dişi üreme toksisitesindeki iyileştirici etkinliğini değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Sonuçta MSG'nin primordiyal, primer, sekonder, Graaf folikül ve korpus luteum sayılarını azaltıp atretik folikül sayısını arttırarak over toksisitesi ürettiği bir kez daha kanıtlanmış ve bu etkilere oksidatif stresin yol açtığı savunulmuştur. MSG'nin oksijen türleriyle reaksiyona girip serbest radikaller oluşturarak DNA ve lipid proteinlerine zarar verdiği ve hücrel hasara yol açtığı vurgulanmıştır [46]. Benzer başka bir çalışma ise *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* mikroalg ekstraktlarının MSG tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan over fonksiyon bozukluğuna karşı etkinliğini ortaya çıkarmaya yöneliktir. Sonuçta 28 gün boyunca oral yolla 1,2 g/kg MSG verilen sıçan grubunda primer, sekonder ve graaf foliküllerde anlamlı olmayan azalma gösterdiği ancak atretik foliküllerin kontrole göre oldukça anlamlı arttığı bulunmuştur. MSG ile birlikte mikroalg özütlerinin uygulanması, gelişen folikül sayısını önemli ölçüde artırıp atretik folikülleri neredeyse kontrol grubu değerine düşürmüştür. MSG'nin antioksidan enzimlerden CAT, SOD

ve GSH-R düzeylerini kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaltırken; mikroalg ekstraktları verilen gruplarda bu enzimleri önemli ölçüde arttırdığı ancak kontrol grubuna ulaşamadığı bulunmuştur [47]. Oladipo ve ark. tarafından yürütülen çalışmada MSG'nin genç erişkin sıçanların over dokusu üzerinde yaptığı değişiklikleri incelemeyi amaçlamıştır. Oral yoldan 14 gün süreyle farklı dozlarda (100, 150 ve 200 mg/kg) MSG uygulanan sıçanlarda over folikül ve oositte kistik ve dejeneratif değişikliklerin MSG'nin oksijen türevi serbest radikal ve ilgili reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açması ile açıklanabileceği ifade edilmiştir [69].

Serbest radikaller ve diğer reaktif türler over fizyolojisinde rol oynar. Ancak dengenin bozulması halinde oksidatif strese yol açarak hücresel molekülleri (proteinler, lipidler ve DNA) etkiler ve işlevlerini değiştirirler. Serbest radikal artışı ile hücre içi antioksidanlar arasındaki denge bozulunca lipid peroksidasyonu, proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ve nükleik asitlerde hasar kaçınılmazdır. Hücre, çekirdek zarları ve özellikle memeli oositleri, yüksek oranda kolayca oksitlenebilen lipid içeriğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı hassastır. Lipid peroksidasyonu sonucu zar akışkanlığı ve elektrik direnci azalır, hücreler dejenerasyona gider [73]. Bu nedenle oksidatif hasarda artış, kadın doğurganlığını önemli ölçüde etkileyen bozuklukların başında gelir. Dengenin yeniden kurulmasında günümüzde antioksidan takviyesi oldukça ilgi uyandırıcıdır. Melatoninin üreme sistemi üzerinde olumlu etkileri birçok çalışmada kanıtlanması ve toksisitesinin yüksek dozlarda bile oldukça düşük olması nedeniyle çalışmalarda akla ilk gelen antioksidanlardandır.

Hazırlanan kapsamlı bir derlemede melatoninin serbest radikal türlerini temizleyerek, antioksidan enzimlerin sentezini ve aktivitesini indükleyerek oksidan/antioksidan dengeyi düzenlediğini, ayrıca mitokondriyal DNA hasarına bağlı apoptoz yolunun indüklenmesini önleyip granüloza hücrelerinin ve oositin korunmasında rol oynadığı ve böylece insanda fertilizasyon ve gebelik oranlarını arttırdığı rapor edilmiştir [73]. Ayrıca melatoninin reaktif oksijen türevlerini zararsız moleküllere metabolize ederek ya da glutatyon gibi endojen olarak üretilen antioksidanların sentezini artırarak dolaylı antioksidan rolü iyi bilinmektedir [107]. Artmış glutatyon (GSH) aktivitesi gibi oksidatif strese karşı koruyucu mekanizmalar, foliküldeki ROS ve antioksidanlar arasındaki dengeyi kontrol eder ve oosit ve granüloza hücrelerinin işlevi için kritik öneme sahiptir [108].

Melatoninin over folikülleri üzerinde etkilerinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmada pinealektomili sıçan foliküllerinde diğer gruplara göre anlamlı olarak dejenere foliküllerde artış saptanmıştır. Melatoninle tedavi edilmiş pinealektomili sıçanlarda ise dejenere folikül sayısının kontrol ve melatonin grubuna göre farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. Araştırmacılar melatonin, pinealektomi uygulanan sıçanlarda normal yumurtalık fonksiyonunu ve histolojisini geri yüklediğini ve melatoninin normal foliküler fonksiyonun sürdürülmesinde önemli rol oynadığını vurgulamışlardır [48]. Başka bir başka çalışmada melatoninin sıçanlarda polikistik over sendromunun (PCOS) metabolik ve üreme sistemi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. PCOS modeli oluşturulan dişi erişkin sıçanların bazılarına 35 gün boyunca 1 mg/kg ve 2 mg/kg dozlarında melatonin ve metformin uygulanmıştır. Histopatolojik incelemede melatonin ve metformin grubu sıçan overlerinde PCOS grubuna göre kistik folikül sayısında belirgin azalma ve teka interna kalınlığında azalma gözlenmiştir. Elde edilen bu bulguların PCOS patolojisinde iyileşme lehine olduğu ve melatoninin antioksidan yönü ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür [102].

Özetle; MSG'nin kadın üreme sistemi üzerindeki etkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Kabul edilen genel görüş; MSG'nin oksidan hasarı arttırarak folikül ve oosit için toksik olduğu, bununla birlikte büyüyen folikülün olgun bir foliküle dönüşmesi gibi birçok süreçte over fonksiyonunu engellediği şeklindedir. Tez çalışmamızda önceki araştırmalar ile benzer şekilde MSG'nin büyüyen folikül sayısında azalmaya yol açtığı, dejenere ve kistik folikül sayısını ise diğer gruplara göre anlamlı ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca bu olumsuz etkilerin MSG ile birlikte melatonin verilen tedavi grubunda anlamlı derecede azaldığı da gösterilmiştir. Bugüne dek yapılan birçok araştırmada MSG'nin meydana getirdiği histopatolojik bulgular yorumlanarak oksidan hasarı arttırdığı düşünülmüş ancak oksidan/antioksidan belirteçler over dokusunda ölçülmemiştir.

Çalışmamızda oksidan ve antioksidan başlıca belirteçlerden olan MDA ve GSH düzeylerini over dokusunda ölçerek çoğu çalışmayı destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Melatoninin serbest radikallerin çoğunu doğrudan temizlediği ve dolaylı olarak hücrenin tüm komponentlerinde oksidatif hasarı azaltmada oldukça etkili olduğu kabul edilen bir gerçektir. Birçok yayında, melatoninin güçlü serbest

radikal temizleyici olarak oosit olgunlaşmasına, embriyo gelişimine ve granüloza hücrelerinin luteinizasyonuna katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. Bu tezde elde edilen veriler doğrultusunda tek başına melatonin uygulamasına bağlı over dokusunda GSH düzeyinin diğer tüm gruplara göre anlamlı artışı gösterilmiştir. Ayrıca MSG uygulaması ile overde düşen antioksidan düzeyinin geriye döndürüldüğü de gösterilmiştir. MSG'nin overde neden olduğu oksidatif strese karşı melatoninin koruyucu etkisi de ilk kez bu çalışmada raporlanmıştır.

Over; hormonal regülasyonla her siklusta yapısal ve fonksiyonel değişikliklere uğrayan vücuttaki en dinamik organlardandır. Üreme aksının hipotalamo-hipofizer-gonadal bileşenlerinde oluşan anormallik siklusta belirgin değişikliklere neden olabilir. Bunu saptamak adına üreme toksisitesi çalışmalarında cinsiyet hormonlarının ölçümü menstrüel döngü açısından önemli bilgiler verir. Ön hipofizden FSH salgısı, over foliküllerinin olgunlaşmasına yardımcı olur ve endometrium proliferasyonunu uyarır. Ön hipofizden salgılanan LH ise, olgun folikülde oosit atılmasını uyarır ve ovulasyon sonrası geride kalan folikülden aşamalı olarak korpus luteum gelişimine yardımcı olur. Kandaki gonadotropin (FSH, LH) düzeyleri normalde over rezervi ile ters orantılıdır. Eğer overde yeteri kadar oosit mevcutsa, FSH ve LH değeri normal sınırlar içinde olacaktır. Oosit sayısı veya kalitesinin azaldığı durumlarda oosit salınan E₂ salgısının azalması hipofiz üzerinde negatif geri bildirimi ortadan kaldırır ve gonadotropin düzeyleri artar. Fizyolojik olarak bu durum menopoza döneminde gözlenirken, genç kadınlarda gonadotropin artışı over rezervi ve oosit kalitesinin yeterince iyi olmadığını düşündürür, bu da infertiliteye işaret edebilir [46].

Mondal ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada MSG'nin over ve östrus siklusu dinamikleri üzerine olası toksik etkilerini incelemek için; 30 ve 40 gün boyunca oral yolla 0.8, 1.6 ve 2.4 g/kg MSG uygulanmış ve serum FSH, LH ve E₂ seviyeleri analiz edilmiştir. Sonuçta, MSG'ye maruz kalan sıçan gruplarında serum LH ve FSH düzeyinde doz bağımlı bir şekilde anlamlı artış gözlemlenmiştir. MSG'nin muhtemelen hipotalamo-hipofiz-gonadal ekseninin işlevini arttırarak over fonksiyonunu bozduğunu savunmuşlardır [5]. Yapılan bir başka çalışmada neonatal dönemde erkek sıçanların yetişkinliğe kadar MSG maruziyeti sonucunda üreme sistemi üzerine toksik etkileri değerlendirilmiştir. İçme suyu ile % 2 MSG uygulanan sıçanların ortalama serum testosteron seviyeleri, ortalama testis ağırlıkları, epididimal

sperm rezervlerinde kontrol grubu sıçanlara göre anlamlı olarak ($p<0.05$) azaldığını bulmuşlardır [64]. Benzer bir çalışmada MSG'nin ortalama insan günlük tüketim dozunda alındığında üreme organlarındaki değişiklik ve sperm kalitesi üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. 24 yetişkin erkek sıçana 1 ay boyunca oral yolla 120 mg/kg MSG uygulanmıştır ve MSG grubunda kontrole göre FSH seviyesinin anlamlı oranda artış, testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre düşüş ve sperm anormalliğinde anlamlı oranda artış saptanmıştır. Bu bulgular; MSG'nin spermatogenezdeki bozukluk nedeniyle sperm üretimini arttırmak için hipofize aşırı sinyal gönderilmesine ve FSH düzeyinin artışına yol açtığını düşündürmüştür [59].

Nitekim yapılan bazı çalışmalarda MSG uygulanan sıçan grupları GnRH ve gonadotropin düzeylerinde kontrole göre anlamlı olarak azaldığı raporlanmıştır [47, 60]. Farklı olarak bu yayınlarda MSG'nin nörotoksisiteye yol açarak beyinde üreme ile ilgili hormon salgısında azalmaya neden olduğu öne sürülmüştür. MSG alımı ile artan glutamat aktivasyonunun, hipotalamus ve hipofizin nörosekretuar hücrelerine zarar vererek GnRH, FSH ve LH sentezinde ve salgılanmasında bozulmalara yol açtığı savunulmuştur [109]. Benzer mantıkta bir çalışmada perinatal dönemde MSG maruziyetinin erişkin dişi sıçanların üreme sistemi üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Neonatal dişi sıçanlara 2, 4, 6, 8, 10. günlerde s.c. MSG (4 g/kg) uygulanmıştır. Sıçanlar 12 ve 18 aylık olduğunda deney sonlandırılıp MSG enjekte edilen dişilerde serum E_2 seviyesinin kontrole göre anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır [54]. Benzer bir çalışmada da MSG verilen dişi sıçanlarda LH, FSH ve E_2 'nin önemli ölçüde daha düşük saptandığı ifade edilmiştir [110]. Sonuç olarak MSG uygulanan sıçanlarda düşük gonadotropin seviyeleri, hipotalamo-hipofizer-gonadal eksenindeki bozukluğu yansıtmaktadır.

Bu çalışmada MSG grubunda E_2 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, FSH ve LH düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve MSG+Melatonin grubunda ise bu değişikliklerin kontrol düzeyine yaklaştığı görülmüştür. MSG grubunda görülen E_2 düşüklüğü, oksidan hasar artışı sonucu büyüyen folikül azalması ile açıklanabilir. Aynı grupta FSH ve LH seviyelerinde saptanan artış da, azalan E_2 düzeyine karşı kompanse edici bir yanıt olarak karşımıza çıktığını desteklemektedir. Başka bir düşünce de MSG'nin hipofizdeki hormonal sentez yolağında ya da reseptör düzeyinde hasara neden olabileceği şeklindedir. Bu

konuda yapılacak ileri incelemeler ile mekanizmanın tam olarak aydınlatılması sağlanabilir. Melatonin grubunda E₂ normal seviyede iken FSH'ı arttırması da folikül gelişimini uyarıcı etki olarak düşünülebilir. MSG ile birlikte verilen melatoninin E₂'yi normal düzeye döndürerek FSH ve LH artışını engellediği gözlenmiştir. Sonuçta MSG uygulamasıyla gözlenen hormonal aksta bozulmaya karşı melatoninin düzenleyici etkisi göze çarpmaktadır.

Over rezervi, kadında fertilizasyon potansiyeli olan oosit sayısını yansıtır. Over rezervinin yüksek oluşu, organda çok sayıda canlı ve iyi kalite oosit bulunduğunu gösterir. Düşük over rezervi ise, döllenme için uygun oosit sayısının az olduğunu ifade eder. Önceden kliniklerde over rezervi hakkında fikir sahibi olmak amacıyla serumda FSH düzeyine bakılırken, son yıllarda siklusun her günü bakılabilen ve daha güvenilir olduğu kanıtlanan AMH düzey ölçümü tercih edilmektedir. AMH büyümekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinden salınmaktadır [111]. Günümüzde artan üremeye yardımcı tedavi uygulamaları ve ilgili çalışmalarda kadının fertilite potansiyeli hakkında fikir sahibi olmak için başka belirteçler de araştırılmaktadır. Bu amaçla sayılı kliniklerde melatonin düzeyleri bakılmaya başlanmıştır. Güncel çalışmalarda oosit pick-up (OPU) sırasında toplanan foliküler sıvıda melatonin seviyeleri ile AMH, toplanan oosit sayısı, elde edilen zigot sayısı ve embriyo kalitesi arasında iyi bir korelasyon olduğu bulunmuştur [112, 113]. Bu veriler over rezervi ve in-vitro fertilizasyon (IVF) sonuçlarını öngörmek için klinisyenlere ve embriyologlara yardımcı olabilir.

Literatürde MSG ve AMH ilişkisini gösteren bir çalışma bugüne dek bulunmamaktadır. Konu ile ilgili bir çalışmada sisplatinin kanser hastalarında neden olduğu üreme toksisitesine karşı melatoninin over fonksiyonları üzerinde koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla over dokusunda bakılan AMH immünohistokimyasal incelemede sisplatin grubunda ir'nin önemli ölçüde azaldığını ($p < 0.005$), ancak sisplatin ile melatonin kombinasyonunun AMH ekspresyonunu kontrol grubuna benzer düzeye getirdiği raporlanmıştır [114]. Bir başka çalışmada ise organik çözücülerden olan tripterjium glikozit (TG) ile indüklenen prematür over yetmezliğine (POF) karşı melatoninin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. TG uygulanan farelerde hem serumda hem de dokuda azalan SOD, GSH ve AMH seviyesinin melatonin uygulaması ile geri yükseldiği, bunun yanı sıra TG sonrası artan MDA düzeyini de

düşürdüğü gösterilmiştir [115]. Melatoninin özellikle büyüyen folikül granüloza hücrelerindeki lipid peroksidasyonunu önleyerek folikül sayısında azalmaya engel olabileceği savunulmuştur.

Bu tezde de deney gruplarının over rezervini yorumlayabilmek adına serum AMH düzeyi ölçülmüştür. Gruplar arası anlamlı fark elde edilmese de MSG grubu ve MSG ile melatonin uygulanan grupta AMH düzeyi düşme eğilimindedir. Deneyin 1 ay olması nedeniyle AMH düzeylerinin gruplar arası değişikliğe uğramadığı, MSG maruziyet süresinin uzamasına bağlı AMH düzeyinde anlamlı düşüklük olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılacak ileri çalışmalar ile durum netlik kazanacaktır.

E₂ over üzerindeki etkilerini çeşitli hücrelerde farklı yoğunlukta bulunan ER- α ve ER- β reseptörler aracılığıyla gerçekleştirir. Yang ve ark. overde ER- α immünofloresan incelemesinde interstisyel hücrelerde daha yoğun olmak üzere granüloza, teka ve luteal hücre nükleuslarında immunoreaktivitenin gözlemlendiğini bildirmişlerdir [116]. Belli hücre tiplerine özgü lokalizasyonlarının yanı sıra sıçan, maymun ve insan granüloza, teka, luteal ve interstisyel hücrelerde iki reseptörün birden varlığına dair yayınlar mevcuttur. Ayrıca bu reseptör alt tiplerinin hücrelerde dağılımı henüz çok net değildir [117, 118]. C'ardenas ve Pope tarafından yapılan çalışmada overde bulunan hücrelerin çoğunun nükleusunda çeşitli derecelerde ER- α immün boyanması elde edilmiştir. Özellikle primer ve sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde boyanma baskın şekilde izlenmiştir. Çalışmada domuzlara uygulanan dihidrotestosteronun (DHT) over folikülünde ER- α immunoreaktivitesini azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak DHT'nin overde reseptör düzeyinde azalmaya yol açarak anti-östrojenik etkisi olduğu düşünülmüştür [119]. Yapılan benzer bir çalışmada dişi erişkin sıçanlara 15 gün süreyle sentetik steroid olan Nandrolon dekanoat uygulamasının overde östrojen reseptör immunoreaktivitesinde düşüklüğe neden olduğu saptanmıştır. Melatonin takviyesiyle overdeki anti-östrojenik etkilerin geri döndürüldüğü gözlenmiştir [120]. Yapılan başka bir çalışmada ER- α nakavt olan dişi farelerde overlerinde sadece primordiyal ve preantral foliküller gözlemlendiği ve korpus luteum izlenmediği görülmüştür. Bunun yanı sıra kortekste çok sayıda hemorajik, kistik foliküller ve hipertrofik teka hücreleri izlenmiştir. Tüm bu sonuçlar anovulatuvar siklusların bulgusu olarak yorumlanıp infertiliteye yol açtığı savunulmuştur [20].

Günümüze dek yapılan birçok çalışmada melatoninin çeşitli dokuda (meme, over, uterus, fallop tüpü, yağ doku vb.) ER- α düzeyini azalttığı raporlanmıştır [121-124]. Yapılan bir çalışmada melatoninin sıçan uterus östrojen ve progesteron reseptörleri üzerindeki olası modülatör etkisi ve ayrıca oksitosine uterus yanıtı araştırılmıştır. Sonuçta, kontrole kıyasla melatonin uygulanmış sıçanlarda uterus östrojen reseptörlerinin sayısında önemli bir azalma (% 59) elde edilmiştir. Böylece melatoninin serum E₂ düzeyini düşürerek oluşturduğu anti-östrojenik özelliğini desteklediğini belirtilmiştir [125].

Bu çalışmada da MSG uygulanan sıçan overlerinin ER- α immunoreaktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı fark oluşturmadığı saptanmıştır. Melatonin uygulanan grupta ise literatüre paralel olarak ER- α immunoreaktivitesinde diğer tüm gruplara göre anlamlı azalma söz konusudur. Bu bilgilerden yola çıkarak MSG tüketiminin over korteksinde bulunan hücrelerde östrojen reseptör düzeyinde değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur.

Overde steroidogenik enzimlerin ekspresyonunda ve steroid hormonu salgılanmasında herhangi bir anormallik, foliküler gelişimin bozulmasına yol açan endokrin düzensizliklere neden olabilir. Günümüzde yaygın kullanılan eşyalarda bulunan endokrin bozuculardan biri olan Bisfenol-A (BPA) overde anahtar steroidogenik enzimlerin ekspresyonunu bozarak hormon üretimini etkilemektedir. Tasarlanan çeşitli modellerde deney hayvanlarına BPA uygulanmasının, over granüloza hücrelerinde aromataz ekspresyonunu ve E₂ üretimini azalttığı [126], StAR, 3 β -HSD ve aromataz ekspresyonu azaldığı, böylece E₂ sentezinin inhibe olduğu [127], progesteron, testosteron, StAR ve 17- α hidroksilaz ekspresyonunu arttırdığı ancak E₂ sentezini ve aromataz ekspresyonunu azalttığı raporlanmıştır [128]. Başka bir çalışmada sepsiste steroid hormon üretiminin önemli ölçüde engellendiğini ve hormon senteziyle ilişkili genlerin (StAR, aromataz ve 3 β -HSD) ekspresyonlarını düşürdüğü ve ROS seviyesinin sepsis şiddetine bağlı önemli ölçüde arttığı bulunmuştur [129]. Sonuç olarak steroidogenezin farklı basamaklarında sorumlu enzim ekspresyonunun azalmasının üreme disfonksiyonuna yol açtığı ortak görüştür.

Literatürde MSG'nin steroidogenez ile östrojen sentez basamaklarına ve östrojen metabolizasyonuna olan etkisini inceleyen herhangi bir çalışma

bulunmamaktadır. Bu tezde MSG uygulanan grupta E₂ sentezinde görevli StAR ve aromataz immunoreaktivitesinin diğer tüm gruplara göre anlamlı oranda azaldığı, ayrıca overde E₂ yıkımından sorumlu SULT1E1 immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı arttığı ilk kez raporlanmıştır. Bu sonuç MSG grubunda görülen serum E₂ düzey düşüklüğü ile birbirini desteklemektedir. Bu veriler eşliğinde MSG'nin steroid hormon sentezi için gerekli anahtar steroidojenik enzimlerin ekspresyonunu değiştirerek üreme sistemi üzerine zararlı sonuçlar doğurduğunu söylemek mümkündür.

Bugüne kadar kabul gören bilgiler daha çok melatoninin üreme fonksiyonları üzerine etkilerinin hipotalamo-hipofizer aks düzeyinde gerçekleştirdiği yönündedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar melatoninin over üzerindeki hormon düzenleyici rolünü hedef almıştır. Günümüzde melatoninin iyi bilinen antioksidan özelliklerinin yanı sıra anti-östrojenik etkisi de kabul görmüştür. Özellikle obezite ile ilişkili meme kanseri görülen bireylerde artan aromataz ekspresyonunu düşürerek östrojeni normal sınırlara çektiği gösterilmiştir [130]. Yapılan birçok çalışmada melatoninin selektif östrojen enzim modülatörü gibi davranarak aromataz, östrojen sülfataz gibi steroidlerden biyolojik olarak aktif östrojen oluşumundan sorumlu enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği raporlanmıştır [131-135]. Ayrıca östrojen sülfotransferazların ekspresyonunu arttırarak östrojenlerin inaktif haline dönüşümünü desteklediği de araştırmacılar tarafından bulunmuştur [136, 137]. Meme kanseri gibi östrojen kaynaklı kanser tedavilerinde yan etki ve toksisite açısından oldukça güvenli olduğu için mevcut tedavileri geliştirmede melatoninin kullanılması araştırmacılar tarafından düşünülmektedir ancak konu ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu tezde de benzer şekilde serum E₂ düzeyi, steroidogenezden sorumlu kilit enzim ve proteinler olan StAR ve aromataz immünohistokimyasal incelemelerinde tek başına melatonin verilen gruplarda kontrol grubuna göre immunoreaktivitesinde düşüklük ve SULT1E1 immunoreaktivitesinde artış gözlenmiştir, ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildir. MSG ile birlikte verilen melatoninin serum E₂ düzeyi, StAR ve aromataz immünoaktivitelerini sadece MSG alan gruba göre anlamlı derecede arttırdığı elde edilmiştir. Sonuçta melatoninin MSG'nin yarattığı belirgin anti-östrojenik etkilerine karşı modülatör gibi davranıp steroidogenez basamaklarında meydana gelen anormallikleri kısmen düzelttiği bulunmuştur.

Sonuç olarak, tez çalışmamızda monosodyum glutamat tüketimi ile görülen over fonksiyon bozukluklarına karşılık melatonin takviyesinin bozulan oksidan/antioksidan dengenin yeniden kurulmasına, histopatolojik bulguların geri döndürülmesine, steroidogeneizde görevli enzim aktivitelerini normal düzeylere dönmesine ve hipotalamo-hipofizer-over aksın regüle edilmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. MSG ile yapılacak ileri çalışmalar ile diğer mekanizmaların aydınlatılması sağlanabilir.



6. KAYNAKÇA

1. López-Miranda, V., et al., *Effects of chronic dietary exposure to monosodium glutamate on feeding behavior, adiposity, gastrointestinal motility, and cardiovascular function in healthy adult rats*. Neurogastroenterol Motil, 2015. **27**(11): p. 1559-70.
2. Othman, S.I. and M. Bin-Jumah, *Histomorphological Changes in Monosodium Glutamate Induced Hepato-renal Toxicity in Mice*. Int. J. Pharmacol, 2019. **15**: p. 449-456.
3. Boonnate, P., et al., *Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic β -Cell Mass in Adult Wistar Rats*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0131595.
4. Mondal, M., et al., *Monosodium glutamate impairs the contraction of uterine visceral smooth muscle ex vivo of rat through augmentation of acetylcholine and nitric oxide signaling pathways*. Reprod Biol, 2018. **18**(1): p. 83-93.
5. Mondal, M., et al., *Monosodium glutamate suppresses the female reproductive function by impairing the functions of ovary and uterus in rat*. Environmental Toxicology, 2017. **33**.
6. Marcincakova Husarova, V. and D. Ostatníková, *Monosodium Glutamate Toxic Effects and Their Implications for Human Intake: A Review*. JMED Research, 2013. **2013**:171.
7. Abbasi S, K.S., Malik S., *Protective Effect Of Vitamin C On Monosodium Glutamate Induced Changes In The Oviduct Of Rats*. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2018. **30**(4): p. 592-595.
8. El Morsi, D., et al., *Monosodium Glutamate Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress: Pathophysiological, Biochemical and Electron Microscopic Study*. The Medical Journal of Cairo University, 2019. **87**: p. 397-406.
9. Michael H. Ross, W.P., *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas (Çev: Baykal B)*. Palme Yayınevi, İstanbul, 2014.
10. Mescher, A.L., *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas (Çev: Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS)*. Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2019.
11. Eroschenko, V.P., *Di Fiore Histoloji Atlası (Çev: Demir R)*. Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2013.
12. Keith L. Moore, T.V.N.P., Mark G. Torchia *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (Çev: Dalçık H)*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2017.
13. İsmail Seçkin, A.Ş.E., Mustafa Taşyürekli, Oktay Arda, Faruk Alkan, Hüseyin Oktar, *Embriyoloji Ders Kitabı*. . İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 2008.
14. Özgür Öktem, B.U., *Reproduktif Yaşam Siklusu: Folikülogenez ve Menstruasyon*. Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, 2012. **9**: p. 1-24.
15. Wilkinson, M. and S. Imran, *Clinical Neuroendocrinology: An Introduction*. 2018.
16. Leslie P. Gartner, J.L.H., *Renkli Histoloji Atlası (Çev: Dağdeviren A, Müftüoğlu S, Karabay G)*. İstanbul, 2009.
17. Luu-The, V., *Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **137**: p. 176-82.

18. Bakhshalizadeh, S., et al., *Vitamin D3 regulates steroidogenesis in granulosa cells through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in a mouse model of polycystic ovary syndrome*. Cell Biochem Funct, 2018. **36**(4): p. 183-193.
19. Akyürek, F., *17-Hidroksiprogesteron Ölçümünde İmmunoassay ve Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) Metodlarının Karşılaştırılması*. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, Konya, 2014.
20. Secky, L., et al., *The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors*. Journal of drug delivery, 2013. **2013**: p. 957605-957605.
21. Fuentes, N. and P. Silveyra, *Estrogen receptor signaling mechanisms*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2019. **116**: p. 135-170.
22. Kumral, Z.N., et al., *Estrogen alleviates acetic acid-induced gastric or colonic damage via both ER α - and ER β -mediated and direct antioxidant mechanisms in rats*. Inflammation, 2014. **37**(3): p. 694-705.
23. Yılmaz MB, P.A., Lüleyap HÜ , Alptekin D , Ozpak L, Kasap H, Kasap M, Erkoç MA. , *Gelişmekte Olan Fare Fetüs Beyninde Aromataz, Östrojen Reseptör Alfa ve Progesteron Reseptörünün Birbirleriyle Olan İlişkileri*. Cukurova Medical Journal, 2013. **38**: p. 174-180.
24. Payne, A.H. and D.B. Hales, *Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 947-70.
25. Gamage, N., et al., *REVIEW Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 2006. **90**: p. 5-22.
26. Ihunnah, C.A., et al., *Estrogen sulfotransferase/SULT1E1 promotes human adipogenesis*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(9): p. 1682-94.
27. Thomas, M.P. and B.V. Potter, *The structural biology of oestrogen metabolism*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **137**: p. 27-49.
28. Song, W.C., *Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **948**: p. 43-50.
29. Taşkiran, N., *Prepubertal Dönemde Dişi Sıçanlarda Melatonin/Kisspeptin Etkileşiminin Puberta Yaşına ve Ovulasyonda Görevli Hormonlar Üzerine Etkisinin Belirlenmesi*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Doktora Tezi, Afyonkarahisar, 2014.
30. Serkan Barış Mülazımoğlu, T.İ., Selim Aslan, *Ratlarda Üreme*. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2012: p. s. 39-44.
31. Yaralı, A., *Rat Vaginal Smear Hücrelerinde AgNor Protein Alan Oranı, Yoğunluk ve Kütlelerinin Hormonal Siklusla Değişiminin Araştırılması*. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2015.
32. Goldman, J.M., A.S. Murr, and R.L. Cooper, *The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2007. **80**(2): p. 84-97.
33. Cora, M.C., L. Kooistra, and G. Travlos, *Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears*. Toxicol Pathol, 2015. **43**(6): p. 776-93.

34. Zehra Dilşad Çoban, Ş.G., Ertan Altaylı, Hakan Kayır, Barış Baykal, *Farede Östrus Siklusu Tayininde Hızlı, Kolay ve Etkin Bir Yöntem*. Gülhane Tıp Dergisi, 2016. **58**: p. s. 82-87.
35. Gülçin Ekizceli , S.İ., Gülperi Öktem , Ece Onur , Kemal Özbilgin, *Siçanlarda Östrus Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusların Histolojik Değerlendirmesi*. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2015. **41**: p. s. 65-72.
36. *Hayvanlarda vajinal sitoloji*. . 04.01.2021];
<https://baytarizm.files.wordpress.com/2013/01/81e4e-resim5.jpg>].
37. Marcondes, F.K., F.J. Bianchi, and A.P. Tanno, *Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations*. Braz J Biol, 2002. **62**(4a): p. 609-14.
38. Soylu, S.M., *Rat fizyolojisi*. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2012. **23**: p. 2.
39. Kurihara, K., *Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami)*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(3): p. 719s-722s.
40. Kurihara, K., *Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 189402.
41. Bera, T., et al., *Effects of monosodium glutamate (MSG) on human health: a systematic review*. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. **5**: p. 139-144.
42. Çetin, M. and M. Cömert, *Beşinci Tat: Umami (Fifth Taste: Umami)*. Journal of Tourism and Gastronomy Studies, 2018. **3**: p. 397-408.
43. Hamdalla, H., *Monosodium Glutamate as a Food Additive: Toxic Implications and the Protective Role of Quercetin*. 2018.
44. Bojanić, V., et al., *Diltiazem prevention of toxic effects of monosodium glutamate on ovaries in rats*. Gen Physiol Biophys, 2009. **28 Spec No**: p. 149-54.
45. Ali, A., et al., *Effect of monosodium glutamate on the ovaries of adult female albino rats and the possible protective role of green tea*. Menoufia Medical Journal, 2014. **27**: p. 793.
46. Rani, J. and M.P. Savalagimath, *Effect of Dooshivishari Agada over MSG-induced reproductive toxicity w.s.r. ovary and follicle count*. Ayu, 2017. **38**(1-2): p. 88-92.
47. Abdel-Aziem, S.H., et al., *Evaluation of the alleviative role of Chlorella vulgaris and Spirulina platensis extract against ovarian dysfunctions induced by monosodium glutamate in mice*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2018. **16**(2): p. 653-660.
48. Maganhin, C.C., et al., *Effects of melatonin on ovarian follicles*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. **166**(2): p. 178-84.
49. Oluba, O., et al., *Effect of Soy Protein on Monosodium Glutamate (MSG)-induced Obesity in Rats*. Asian J Phar Biol Res, 2010. **1**.
50. Hirata, A.E., et al., *Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake*. Braz J Med Biol Res, 1997. **30**(5): p. 671-4.
51. Špolcová, A., et al., *Anorexigenic lipopeptides ameliorate central insulin signaling and attenuate tau phosphorylation in hippocampi of mice with*

- monosodium glutamate-induced obesity*. J Alzheimers Dis, 2015. **45**(3): p. 823-35.
52. Olney, J.W., *Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study*. J Neuropathol Exp Neurol, 1971. **30**(1): p. 75-90.
 53. Gaspar, R.S., et al., *Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats*. J Endocrinol, 2016. **229**(2): p. 61-72.
 54. Miśkowiak, B., et al., *Long-term effect of neonatal monosodium glutamate (MSG) treatment on reproductive system of the female rat*. Folia Morphol (Warsz), 1999. **58**(2): p. 105-13.
 55. Boonnate, P., et al., *Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic β -Cell Mass in Adult Wistar Rats*. PloS one, 2015. **10**(6): p. e0131595-e0131595.
 56. Quines, C.B., et al., *Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats*. Life Sci, 2014. **107**(1-2): p. 27-31.
 57. Beas-Zárate, C., M. Pérez-Vega, and I. González-Burgos, *Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats*. Brain Res, 2002. **952**(2): p. 275-81.
 58. Singh, K. and P. Ahluwalia, *Studies on the effect of monosodium glutamate [MSG] administration on some antioxidant enzymes in the arterial tissue of adult male mice*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2003. **49**(2): p. 145-8.
 59. Jubaidi, F.F., et al., *Monosodium glutamate daily oral supplementation: study of its effects on male reproductive system on rat model*. Syst Biol Reprod Med, 2019. **65**(3): p. 194-204.
 60. Ismail, N.H., *Assessment of DNA damage in testes from young Wistar male rat treated with monosodium glutamate*. Life Science Journal, 2012. **9**: p. 930-939.
 61. Alalwani, A.D., *Monosodium glutamate induced testicular lesions in rats (histological study)*. Middle East Fertility Society Journal, 2014. **19**(4): p. 274-280.
 62. Das, R.S. and S.K. Ghosh, *Long term effects of monosodium glutamate on spermatogenesis following neonatal exposure in albino mice--a histological study*. Nepal Med Coll J, 2010. **12**(3): p. 149-53.
 63. Onakewhor, J.U.E.O.I.A.O.a.S., S. P., *Chronic Administration of Monosodium Glutamate Induces Oligozoospermia and Glycogen Accumulation in Wistar Rat Testes*. Afr. J. Repr. Health., 1998. **2** (2): p. 190-197.
 64. Ochiogu, I., et al., *Exposure of male rats to monosodium l-glutamate from prenatal life to adulthood: the effects on serum testosterone, cholesterol and proteins, serum enzymes, epididymal sperm reserves and testes*. Veterinary Archives, 2016. **86**: p. 421-436.
 65. Eweka, A., P. Igbigbi, and R. Ucheya, *Histochemical Studies of the Effects of Monosodium Glutamate on the Liver of Adult Wistar Rats*. Annals of medical and health sciences research, 2011. **1**: p. 21-9.

66. Snoor, J., et al., *Effect of Monosodium Glutamate on Mice ovaries and the possible protective role of Vitamin C*. Annals of Applied Bio-Sciences, 2015. **2**.
67. Rohmawati, W., Istiananingsih, Y , Nurdiana, N , Barlianto, W , Dwijayasa, P., *Vitamin C-E ve Monosodyum Glutamata Bağlı Ovaryan Toksisite*. Cukurova Medical Journal, 2014. **39**: p. 517-524.
68. Eweka, A. and F. Om'iniabohs, *Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the ovaries of adult wistar rats*. Ann Med Health Sci Res, 2011. **1**(1): p. 37-43.
69. Oladipo, I., A. E.A, and M. Kuye, *Effects of Monosodium Glutamate in Ovaries of Female Sprague-Dawley Rats*. 2015. **4**: p. 737-745.
70. Karabulut H, G.M., *Serbest radikaller*. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. , 2016. **4** (1): p. 50-59.
71. Çavdar C, S.A., Çamsarı T., *REACTIVE OXYGEN PARTICLES AND ANTIOXIDANT DEFENCE*. Office Journal of the Turkish Nephrology, 1997. **3-4**: p. 92-95.
72. Şahin, S., *Şıçanlarda Monosodyum Glutamat'ın Neden Olduğu Oksidatif Streste Eritrosit ve Karaciğer Dokusundaki Değişiklikler; Melatoninin Koruyucu Rolü*. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2016.
73. Cruz, M., et al., *Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage*. Theriogenology, 2014.
74. Karabulut H , G.M., *Antioksidanlar*. Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University, 2016. **1**: p. 65-76.
75. G., Ş., *Karanlığın hormonu: Melatonin*. Marmara Eczacılık Dergisi, 2010. **14**: p. 112-120.
76. Atasoy ÖB, E.O., *Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri*. FNG & Bilim Tıp Dergisi, 2017. **3** (1): p. 52-62.
77. Tan, D.X., et al., *One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?* J Pineal Res, 2007. **42**(1): p. 28-42.
78. Reiter, R.J., et al., *Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis*. Integr Cancer Ther, 2009. **8**(4): p. 354-60.
79. Yücel, G., G. Kaplanoğlu, and C.M. Seymen, *Karanlığın Mucizesi: Melatonin ve Ovaryum Etkileşimi*. Dicle Tıp Dergisi, 2018. **45**: p. 85-92.
80. İ., Ö., *Gıda Katkı Maddeleri ve Toksinler*. Deomed Medikal Yayıncılık, 2004. **41**: p. 39-44.
81. Hill, A.M. and D.V. Belsito, *Systemic contact dermatitis of the eyelids caused by formaldehyde derived from aspartame?* Contact Dermatitis, 2003. **49**(5): p. 258-9.
82. Yildirim, A., et al., *The effects of antibiotics and melatonin on hepato-intestinal inflammation and gut microbial dysbiosis induced by a short-term high-fat diet consumption in rats*. Br J Nutr, 2019. **122**(8): p. 841-855.
83. Arabacı Tamer S, Y.A., Sahin D, Bagriacik F, Kahraman MM , Onur ND, Cayirli YB, Cilingir OT, Cetinel S, Yegen B. , *Hepatic Inflammation in Rats Induced by Short-Term Ingestion of High-Fat Diet is Attenuated by the Antioxidant Melatonin*. Gastroenterology, 2017. **152**: p. 687.

84. Tekin, G., et al., *The preventive and curative effects of melatonin against abdominal aortic aneurysm in rats*. J Vasc Surg, 2018. **67**(5): p. 1546-1555.
85. Şehirli, A., et al., *Melatonin protects against ischemic heart failure in rats*. J Pineal Res, 2013. **55**(2): p. 138-48.
86. Ersahin, M., et al., *Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms*. J Pineal Res, 2009. **46**(3): p. 324-32.
87. Ferreira, S.G., et al., *Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2013. **46**: p. 278-286.
88. Tamura, H., et al., *Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle*. Endocr J, 2013. **60**(1): p. 1-13.
89. Gül, S., M. Gül, and B. Yigitcan, *Melatonin preserves ovarian tissues of rats exposed to chronic TCDD: An electron microscopic approach to effects of TCDD on ovarian cells*. Toxicol Ind Health, 2018. **34**(4): p. 228-236.
90. Plowchalk DR, S.B., Mattison DR. , *Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantification and morphometrics*. Methods in Toxicology, 1993. **3B**: p. 57-68.
91. Pedersen, T. and H. Peters, *Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary*. J Reprod Fertil, 1968. **17**(3): p. 555-7.
92. Buege, J.A. and S.D. Aust, [30] *Microsomal lipid peroxidation*, in *Methods in Enzymology*, S. Fleischer and L. Packer, Editors. 1978, Academic Press. p. 302-310.
93. Weissman, S.M., *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. 2nd Edition*. The Yale Journal of Biology and Medicine, 1976. **49**(3): p. 310-311.
94. Adeniyi, M., *Estrous Cycle Ratio as a Reproductive Index in the Rats*. American Journal of Biomedical Science & Research, 2019. **4**.
95. M, S., *Antifertility Activity of Eugenia Jambolana Seed Extract in Female Albino Rat*. Biochemistry & Physiology: Open Access, 2018. **07**.
96. Gbotolorun, S.C., et al., *Antifertility potential of Neem flower extract on adult female Sprague-Dawley rats*. African health sciences, 2008. **8**(3): p. 168-173.
97. Ganguly, M., et al., *Effect of Mimosa pudica root extract on vaginal estrous and serum hormones for screening of antifertility activity in albino mice*. Contraception, 2007. **76**(6): p. 482-5.
98. García-Macia, M., et al., *Selective autophagy, lipophagy and mitophagy, in the Harderian gland along the oestrous cycle: a potential retrieval effect of melatonin*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 18597.
99. Chuffa, L.G., et al., *Long-term exogenous melatonin treatment modulates overall feed efficiency and protects ovarian tissue against injuries caused by ethanol-induced oxidative stress in adult UChB rats*. Alcohol Clin Exp Res, 2011. **35**(8): p. 1498-508.
100. Bochkaryova, A.L., et al., [CHANGES IN THE FOLLICULAR APPARATUS AND BLOOD VESSELS OF THE OVARIES IN RATS INDUCED BY MELATONIN UNDER CONDITIONS OF HYPERTHERMIA]. Morfologiya, 2015. **148**(5): p. 71-6.
101. Lombardi, L.A., et al., *Melatonin may prevent or reverse polycystic ovary syndrome in rats*. Rev Assoc Med Bras (1992), 2019. **65**(7): p. 1008-1014.

102. Pai, S.A. and A.S. Majumdar, *Protective effects of melatonin against metabolic and reproductive disturbances in polycystic ovary syndrome in rats*. J Pharm Pharmacol, 2014. **66**(12): p. 1710-21.
103. KÜÇÜK, Z., et al., *The role of melatonin in preventing ovarian tissue damage in rats exposed to magnetic fields*. TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, 2018. **48**: p. 1073-1079.
104. Al-Mosaibih, M.A., *Effects of Monosodium glutamate and acrylamide on the liver tissue of adult wistar rats*. Life Science Journal, 2013. **10**: p. 35-42.
105. Pavlovic, V., et al., *Effect of monosodium glutamate on oxidative stress and apoptosis in rat thymus*. Molecular and cellular biochemistry, 2007. **303**: p. 161-6.
106. Kumar, N., et al., *Role of ascorbic acid in monosodium glutamate mediated effect on testicular weight, sperm morphology and sperm count, in rat testis*. J. Chin. Clin. Med., 2008. **3**: p. 1-5.
107. Tamura, H., et al., *Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications*. Fertil Steril, 2009. **92**(1): p. 328-43.
108. Tamura, H., et al., *The role of melatonin as an antioxidant in the follicle*. J Ovarian Res, 2012. **5**: p. 5.
109. Onaolapo, O.J., et al., *Evidence of alterations in brain structure and antioxidant status following 'low-dose' monosodium glutamate ingestion*. Pathophysiology, 2016. **23**(3): p. 147-56.
110. Nemeroff, C.B., et al., *Marked Reduction in Gonadal Steroid Hormone Levels in Rats Treated Neonatally with Monosodium-Glutamate: Further Evidence for Disruption of Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Regulation*. Neuroendocrinology, 1981. **33**(5): p. 265-267.
111. Cimino, I., et al., *Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 10055.
112. Tong, J., et al., *Melatonin levels in follicular fluid as markers for IVF outcomes and predicting ovarian reserve*. Reproduction, 2017. **153**(4): p. 443-451.
113. Zheng, M., et al., *Melatonin concentration in follicular fluid is correlated with antral follicle count (AFC) and in vitro fertilization (IVF) outcomes in women undergoing assisted reproductive technology (ART) procedures*. Gynecol Endocrinol, 2018. **34**(5): p. 446-450.
114. Huang, J., et al., *Melatonin provides protection against cisplatin-induced ovarian damage and loss of fertility in mice*. Reprod Biomed Online, 2020.
115. Ma, M., et al., *Premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycoside: Does melatonin offer protection?* 2016. **9**: p. 10727-10736.
116. Yang, P., A. Kriatchko, and S.K. Roy, *Expression of ER-alpha and ER-beta in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and ovarian steroid hormones*. Endocrinology, 2002. **143**(6): p. 2385-98.
117. Sar, M. and F. Welsch, *Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary*. Endocrinology, 1999. **140**(2): p. 963-71.
118. Mowa, C. and T. Iwanaga, *Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization*. Journal of Endocrinology, 2000. **165**(1): p. 59.

119. Cárdenas, H. and W.F. Pope, *Estrogen receptors in the uterus and ovarian follicles of gilts treated with dihydrotestosterone*. Domest Anim Endocrinol, 2005. **29**(3): p. 523-33.
120. de Souza, B.R., et al., *Histopathological changes in androgenized ovaries are recovered by melatonin treatment*. International journal of experimental pathology, 2018. **99**(4): p. 158-171.
121. Bondi, C.D., et al., *The effect of estradiol, progesterone, and melatonin on estrous cycling and ovarian aromatase expression in intact female mice*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014. **174**: p. 80-5.
122. Chuffa, L.G., et al., *Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 108.
123. Lopes, J., et al., *Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells*. Genes Cancer, 2016. **7**(5-6): p. 209-17.
124. Chuffa, L.G., et al., *Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats*. Reprod Toxicol, 2013. **39**: p. 40-9.
125. Abd-Allah, A.R., et al., *Effect of melatonin on estrogen and progesterone receptors in relation to uterine contraction in rats*. Pharmacol Res, 2003. **47**(4): p. 349-54.
126. Ptak, A., M. Hoffmann, and A. Rak, *The Ovary as a Target Organ for Bisphenol A Toxicity*. 2017.
127. Peretz, J., et al., *Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway*. Toxicol Sci, 2011. **119**(1): p. 209-17.
128. Zhou, W., et al., *Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **283**(1-2): p. 12-8.
129. Qu, X., et al., *ROS-Induced GATA4 and GATA6 Downregulation Inhibits StAR Expression in LPS-Treated Porcine Granulosa-Lutein Cells*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 5432792.
130. González-González, A., M.D. Mediavilla, and E.J. Sánchez-Barceló, *Melatonin: A Molecule for Reducing Breast Cancer Risk*. Molecules (Basel, Switzerland), 2018. **23**(2): p. 336.
131. Cos, S., et al., *Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells*. J Pineal Res, 2005. **38**(2): p. 136-42.
132. Cos, S., et al., *Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions*. Cancer Detect Prev, 2006. **30**(2): p. 118-28.
133. Cos, S., et al., *Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 274-8.
134. Gonzalez, A., et al., *Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells*. J Pineal Res, 2008. **45**(1): p. 86-92.
135. Alvarez-García, V., et al., *Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells*. Oncol Rep, 2013. **29**(5): p. 2058-64.

136. González, A., et al., *In vivo inhibition of the estrogen sulfatase enzyme and growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(3): p. 279-86.
137. Sánchez-Barceló, E.J., et al., *Melatonin-estrogen interactions in breast cancer*. J Pineal Res, 2005. **38**(4): p. 217-22.



7. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Formu



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	01.2020.mar	ÇALIŞMA	TEZ
	PROJE ADI	Monosodyum Glutamatın yetişkin wistar sıçan overleri üzerindeki etkisi ve Melatoninin olası koruyucu rolü: Histolojik ve Biyokimyasal inceleme		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Şule ÇETİNEL		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER		
	DESTEKLEYİCİ			
KARAR BİLGİLERİ	TARİH	10.02.2020		
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.			
KURUL ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.			
Hayvan türü ve sayısı				
ÜYELER				
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile ilişkisi	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi HADYEK Başkanı	Yok	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji-Embriyoloji AbD	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Doç. Dr. Dilek AKAKIN	Histoloji-Embriyoloji AbD	M.Ü. Tıp Fakültesi HADYEK Üyesi	Yok	
Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Sağlık Hizmetleri MYO HADYEK Üyesi	Yok	
Vet. Hek. Deniz Mukaddes Türet	Veteriner Hekim	DEHAMER Sorumlu Veteriner HADYEK Üyesi	Yok	
Alper Şimşek	Serbest	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Yok	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbet Danışmanlık	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı	Yok	

Ek 2. İntihal Raporu

MONOSODYUM GLUTAMATIN YETİŞKİN WİSTAR SIÇAN OVERLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE MELATONİNİN OLASI KORUYUCU ROLÜ: HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL İNCELEME

ORJİNALLİK RAPORU

% 3	% 2	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	% 1
2	Peixin Yang, Alexie Kriatchko, Shyamal K. Roy. "Expression of ER- α and ER- β in the Hamster Ovary: Differential Regulation by Gonadotropins and Ovarian Steroid Hormones", Endocrinology, 2002 Yayın	<% 1
3	abis-files.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	mascomarmarastudentcongress.files.wordpress.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)	<% 1

8. ÖZGEÇMİŞ

İsim Soyisim : Hilal Nişva LEVENT
Doğum Tarihi :
Doğum Yeri :
Medeni Durum : Evli
E-Posta :

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans/Üniversite : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi (2009-2015)
Lise : Ümraniye Anadolu Lisesi (2005-2009)

ÇALIŞMA DURUMU

- TUS Asistanı (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi)

YABANCI DİL

- İngilizce

SERTİFİKA BİLGİLERİ

- Mezenkimal Kök Hücre, Klinik Kanıtları ve İn-Vivo Deneysel Kullanım Kursu (8-9 Aralık 2018/ Sakarya Üniversitesi Tıp Fak.)
- Kanser ve Kök Hücre Konusunda Temel Bilgiler, Yenilikçi Yaklaşımlar (1-5 Nisan 2019 / Maltepe Üniversitesi Tıp Fak.)
- Deney Hayvanları Kullanımına Ait Eğitim Sertifikası Programı (13-24 Mayıs 2019 / Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi)

İŞ DENEYİMLERİ

- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji&Embriyoloji Anabilim Dalı / TUS Asistanlığı (Kasım 2017-Halen)
- Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları / TUS Asistanlığı (Nisan 2016-Kasım 2016)
- Sancaktepe Toplum Sağlığı Merkezi/ Pratisyen Hekim (Eylül 2015-Nisan 2016)