

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANDA YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OLUŞTURULAN
OBEZİTE MODELİNDE MELATONİN VE LEPTİN'İN
OVARYUM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN STEREOLOJİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze TÜMENTEMUR

**Samsun
Kasım-2013**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANDA YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OLUŞTURULAN
OBEZİTE MODELİNDE MELATONİN VE LEPTİN'İN
OVARYUM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN STEREOLOJİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze TÜMENTEMUR

Berrin Zuhâl ALTUNKAYNAK

**Samsun
Kasım-2013**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek lisans öğrencisi **Gamze TÜMENTEMUR** tarafından **Doç. Dr. B. Zuhal ALTUNKAYNAK** danışmanlığında hazırlanan “**Sıçanda Yüksek Yağlı Diyetle Oluşturulan Obezite Modelinde Melatonin ve Leptin’in Ovaryum Üzerindeki Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması**” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından **26/11/2013** tarihinde yapılan sınav ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. B. Zuhal ALTUNKAYNAK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /



Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem akademisyenlik mesleğine hem de hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a, tez boyunca yaptığı katkılardan dolayı sevgili danışmanım Doç. Dr. B. Zuhâl ALTUNKAYNAK'a, OMÜ Tüp Bebek merkezinde görev yapmakta olan bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan hocalarım Doç. Dr. Bülent AYAS ve Doç. Dr. M. Eyüp ALTUNKAYNAK'a, tez çalışmamın her aşamasında yardımını, desteğini esirgemediği özveri ve hoşgörüsüyle hep birlikte çalıştığımız değerli çalışma arkadaşım, N.Hande TÜFEK'e, cerrahi süreç boyunca yardımlarını, bilgilerini esirgemeyen sayın Mustafa İNCE'ye, ayrıca doku biyokimya örneklerinin çalışılmasında yol gösteren OMÜ Veteriner Biyokimya ABD'daki öğretim üyelerine, hayatımın her aşamasında sevgi, hoşgörü ve sabırla yanımda olan, maddi manevi her zaman destekleyen, beni yetiştiren canım babam Sedat TÜMENTEMUR, canım annem Ayşe TÜMENTEMUR ve birtanecik abim Dr. Volkan TÜMENTEMUR'a, tüm sabrı ile çevirilerime yardımda bulunan ve her an desteği ile yanımda hissettiğim sayın Ömür KIRIKÇI ve ailesine; tez projemi destekleyerek bana maddi olanak sağlayan, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No:1904.11.022), en içten gelen duygularıyla sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

SIÇANDA YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OLUŞTURULAN OBEZİTE MODELİNDE MELATONİN VE LEPTİN'İN OVARYUM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada yüksek yağlı diyetin dişi sıçanlarda ovaryum üzerine etkilerinin melatonin ve leptin'in rollerinin saptanması; melatoninin leptin salınımındaki etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod: Sıçanlar yüksek yağlı diyet (%40 yağ) (obez kontrol grubu; OK) ve standart diyet (nonobez-kontrol grubu; NK) ile beslenmek üzere iki gruba ayrıldı ve her iki grup nonobez-melatonin (NM grubu, 10 mg/kg ip melatonin uygulanan), obez-melatonin (OM grubu mg/kg ip melatonin uygulanan), nonobez-leptin (NL grubu, 1 µ/kg ip leptin uygulanan), obez-leptin (OL grubu, 1 µ/kg ip leptin uygulanan), nonobez-melatonin-leptin (NM-L grubu, 10 mg/kg ip melatonin-1 µ/kg ip leptin uygulanan) ve obez-melatonin-leptin (OM-L grubu, 10 mg/kg ip melatonin-1 µ/kg ip leptin uygulanan) olarak gruplandırıldı. Bu çalışmada yüksek yağlı diyet ile obezite modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde melatonin, leptin, melatonin-leptin hormonlarını kullanarak bu sıçanlardaki vücut ağırlığı, folikül sayısı, over ağırlığı ve hacmi, apoptotik hücreler, LH reseptörü açısından pozitif hücrelerin yanı sıra biyokimyasal değişimlerin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca doku homojenatlarında miyeloperoksidaz (MPO) ve katalaz (CAT) aktiviteleri de değerlendirildi.

Bulgular: Ortalama vücut ağırlığının obez gruplarda kontrole kıyasla önemli derecede arttığı görüldü ($p<0,001$). Gruplar arasında over ağırlığı bakımından önemli fark yok iken over hacimleri arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Toplam primordial ve primer folikül sayısı bakımından gruplar arasında önemli fark tespit edilmiş; fakat toplam folikül sayısı açısından herhangi bir fark bulunmamıştır. MPO aktiviteleri NK grubuna kıyasla OK grubunda önemli artmıştır ($p<0,05$) fakat CAT aktiviteleri arasında önemli fark bulunmamıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları sıçan ovaryal dokusunda yüksek yağlı diyete bağlı olarak gözlenen over rezervi ve morfolojisindeki farklılıkların melatonin ve leptin'in dokudaki koruyucu etkileri ve önemli rollerinin olduğunu destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite; leptin; melatonin; reaktif oksijen türleri; stereoloji; yüksek yağlı diyet

**Gamze TÜMENTEMUR, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Kasım-2013**

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MELATONIN AND LEPTIN USING THE STEREOLOGICAL METHODS IN HIGH-FAT DIET INDUCED OBESITY MODEL ON RAT OVARY

Aim: In this study the targeted to observe the effects of high fat diet on female rats ovary, to detect melatonin and leptin's roles and to observe melatonin's effect on leptin release.

Material and Method: The animals were divided into high-fat (40% fat) (Obese-control; OC), and standard diet (Non-obese - control; NC) groups; then, each group was allocated non-obese-melatonin (NM a dose of 10 mg/kg ip), obese-melatonin (OM a dose of 10 mg/kg ip), non-obese-leptin (NL a dose of 1 μ /kg ip), obese-leptin (OL a dose of 1 μ /kg ip), non-obese-melatonin-leptin (NM-L a dose of 10 mg/kg melatonin ip - a dose of 1 μ /kg ip leptin) and obese-melatonin-leptin (OM-L a dose of 10 mg/kg ip melatonin - a dose of 1 μ /kg ip leptin) groups. The present paper describes the history of using high-fat diets to induce obesity in animals, aims to clarify the consequences of changing the amount and type of dietary fats on weight gain and ovarian weight, follicles counting, ovarian reserve, apoptotic cells, LH receptor as well as the biochemical basis and the roles of hormones such as leptin, melatonin and melatonin-leptin in animal models of dietary obesity. Myeloperoxidase (MPO) and catalaz activity (CAT) were determined in the tissues.

Results: The mean body weight of Ob group was significantly higher than Cont group; ($p < 0.001$). No significant difference was observed ovarian mass but ovarian volume was different between all groups ($p < 0.001$). Total primordial and primary follicles were different but total follicle number, no significant difference was observed between all groups. Although MPO activities of Ob group were significantly higher than Cont group ($p < 0.05$), CAT activities showed no significant difference between Cont and Ob groups.

Conclusions: The results of this study confirm the change in the ovary reserves and the morphology of the ovary tissue due to high fat diet, as well as melatonin and leptin's protective effect on these changes.

Keywords: High fat diet; infertility; leptin; melatonin; reactive oxygen species; stereology

Gamze TÜMENTEMUR, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, November-2013

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ACTH:** Adrenokortikotropik hormon
ABC : Avidin-Biotin
BKO : Bel-Kalça Oranı
Camp : Siklik Adenozin Monofosfat
Cat : Katalaz
db : Diabet
DM : Diabetes Mellitus
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
ER : Endoplazmik retikulum
FSH : Folikül stimüle edici hormon
GSHPx: Glutasyon peroksidaz
GnRH : Gonadotropin hormon
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
H-E : Hematoksilen-Eozin
i.p : İntaperitoneal
IVF : İnvitro fertilizasyon
LH : Luteinize edici hormon
LH/CG: Anti-luteinizing hormone/choriogonadotropin
MPO : Miyeloperoksidaz
MDA : Malondialdehit
NAÖC: Noktalı alan ölçüm cetvelleri
ob : Obez
PCOS : Polikistik over sendromu
PBS : Fosfat tamponu solüsyonu
ROS : Reaktif oksijen türleri
SHBG : Seks hormon bağlayıcı globulin
STZ : Streptozotosin
SRÖ : Sistemik rastgele örnekleme
SOD : Superoksit dismutaz
TdT : Terminal deoksinükleotidil transferaz
VKİ : Vücut kitle indeksi
YYD : Yüksek yağ içeren diyet

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Obezite Nedir?.....	4
2.1.1. Tanım ve Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Obezite Etiyolojisi	6
2.1.3. Obezitenin Değerlendirilmesi.....	7
2.1.4. Obezitenin Komplikasyonları.....	8
2.1.5. Obezite ve Antioksidanlar	9
2.1.6. Obezitede Görülen Hormonal Değişiklikler ve İnfertilite.....	10
2.2. Ovaryum.....	12
2.2.1. Ovaryum Histolojisi	12
2.2.2. Folikülogenez	13
2.2.3. Ovulasyon.....	21
2.3. Leptin	22
2.3.1. Leptin Molekülü ve Yapısı	22
2.3.2. Ob Geni	23
2.3.3. Sentez ve Salınması.....	23
2.3.4. Leptin'in Etki Mekanizması	24
2.3.5. Obezitede Leptin	25
2.3.6. Leptin ve Oksidatif Stres	26
2.3.7. Leptin'in İnfertilite Üzerine Etkisi	27
2.3.8. Leptin ve Melatonin	29
2.4. Melatonin	30
2.4.1. Melatonin ve Yapısı	30
2.4.2. Sentez ve Salınması.....	30
2.4.3. Melatonin Reseptörleri	32
2.4.4. Melatonin'in Biyolojik Etkileri	33

2.4.5. Melatonin ve Obezite	33
2.4.6. Melatonin ve Antioksidan Etki.....	34
2.4.7. Melatonin ve Üreme	35
2.5. Stereoloji	36
2.5.1. Stereoloji Nedir?.....	36
2.5.2. Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik Prensipleri	37
2.5.3. Stereolojik Çalışmalarda Sistemik Rastgele Örneklemeye	38
2.5.4. Stereolojide Toplam Hacim Hesabı: Cavalieri Prensipleri.....	38
2.5.5. Stereolojide Tanecik Sayımı: Disektör.....	40
2.5.6. Fiziksel Disektör.....	40
2.5.7. Tarafsız Sayım Çerçevesi	42
3. MATERYAL ve METOD	43
3.1. Metod	43
3.1.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Deneklerin Seçimi	43
3.2. Materyal	47
3.2.1. Histolojik Yöntemler	47
3.2.2. Biyokimyasal Analiz Yöntemi	52
3.3. Stereolojik Yöntemler	56
3.3.1. Kesitlerin Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	56
3.3.2. Stereolojik İşlemler	56
3.4. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR.....	61
4.1. Obezitenin Değerlendirilmesi	61
4.1.1. Ağırlık Bulguları	62
4.2. Stereolojik Bulgular	64
4.2.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Over Örneklerindeki Folikül Sayısı Bulguları.....	64
4.2.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Over Örneklerindeki Hacim Bulguları.....	67
4.3. Biyokimya Analiz Bulguları	71
4.4. Histolojik Bulgular	72
4.4.1. Hemotoksilen – Eozin Boyası İle Elde Edilen Bulgular	72
4.4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	80

4.4.3. TUNEL -Apoptotik inceleme bulguları	86
5. TARTIŞMA	91
5.1. Vücut Ağırlığı Bulgularının Yorumu	92
5.2. Over Yaş Ağırlığı Bulgularının Yorumu	94
5.3. Over Çevresi Yağ dokusu Ağırlığı Bulgularının Yorumu	95
5.4. Follikül Sayımı Bulgularının Yorumu	96
5.5. Overe ilişkin Hacim Bulgularının Yorumu	98
5.6. Biyokimyasal Bulguların Yorumu	101
5.6.1. Doku MPO Seviyelerine İlişkin Bulguların Yorumu	101
5.6.2. Doku CAT Seviyelerine İlişkin Bulguların Yorumu	102
5.7. Mikroskopik Bulgularının Yorumu	104
5.7.1. TUNEL Boyaması ile Elde Edilen Bulguların Yorumu	105
5.7.2. Anti-LHR Boyaması ile Elde Edilen Bulguların Yorumu	107
5.8. Melatonin ve Leptin'in Obezite Üzerindeki Etki Mekanizması	109
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	112
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ	139

1. GİRİŞ

Tüm dünyada sıklığı giderek artan obezite önemli bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlanmaktadır. Son 20 yılda ucuz, lezzetli ve yüksek yağ içeren fazla kalorili yiyecek ve içeceklerin oluşturduğu sağlıksız beslenmeyle birlikte diyetteki yağ miktarının hızla artması obezite prevalansının artmasında ilk neden olarak yer almaktadır (Schrauwen ve Westerterp, 2000). Özellikle de gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde her geçen gün obez popülasyonu daha da artmaktadır. Böylece obezite, neden olduğu hastalıklar ve toplumsal sorunlar ile birlikte, kronik ilerleyici, mortalitesi ve morbiditesi yüksek bir hastalık olarak görülmektedir. Obezite, enerji alımı ve enerji harcanması arasındaki denge bozukluğu sonucu olduğundan, tedavide kullanılan ilaçlar; yemek alımını azaltmayı, metabolizmayı düzenlemeyi ve enerji harcanmasını arttırmayı hedefler (Karasu ve Arı, 2005).

Obez hastalar üzerinde yapılan birçok çalışmada vücutta oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği ve antioksidan savunma enzimlerinde ise azalma olduğu gösterilmiştir (Vincent ve Taylor, 2006). Bu nedenle obezitenin vücutta inflamasyon ve kronik oksidatif stres durumu olduğu belirtilmektedir (Higdon ve Frei, 2003; Urakawa ve ark., 2003). Reaktif oksijen türleri (ROS) ya da prooksidanlar denen bu atıklar düşük dozlarda zararlı olmayıp hatta yararlı olurken, yeterince temizlenmemesi ve ortamda artması durumunda oksidatif stres ve sonrasında hücre, doku ve organ hasarı oluşur, organın içinde bulunduğu sistem çalışmamaya başlar. Bu sistem üreme sistemi olunca infertilite ortaya çıkar (Küçük, 2012). Kadın üreme sağlığında ROS ve antioksidan dengesinin bozulması çeşitli hastalıklara yol açar. Bunlar arasında kısırlık, polikistikover sendromu (PCOS), endometriyozis ve çikolata kistleri, düşükler, gebelikte hipertansiyon vardır.

Obezite pek çok nöroendokrin ve ovarian fonksiyonu etkileyebilir, bu nedenle sağlıklı kadınlarda hem ovulasyon hem de fertilite oranlarının azalmasına neden olabilir (Körükçü ve Kukulcu, 2011). Çeşitli çalışmalar obezitenin over rezervi parametreleri üzerindeki negatif etkilerini aklı getirir. Son yirmi yılda, yumurtalık rezervi testleri bir dizi folikül sayısı ve kalitesini belirlemek ve yardımcı üreme işlemleri sonucu tahminler için kullanılır olmuştur (Broekman ve ark., 2006). Bir kadının üreme yeteneğinin ne kadar süreceğini belirleyen majör faktör overlerindeki primordial foliküllerin sayısıdır.

Dorman fazda bekleyen primordial foliküller primer foliküllere dönüşerek büyümeye başlar sırası ile preantral ve antral aşamaya ulaşırlar (Öktem ve Urman, 2011). Over rezervi, oosit kalitesi, sayısı ve foliküler tükenme süreciyle ilgili olarak bir kadının üreme potansiyelini tanımlar. Rezerv azalmasının mekanizması tam bilinmemektedir. Fakat çevresel faktörlerin etkisiyle oksidatif hasar ve hormonal dengesizlik folikülü atreziye götürmektedir. Oksidatif stresin özellikle oosit mitokondrisinde antioksidan mekanizmalarla durdurulamamasının, hücre membran lipitlerinin bozulmasına DNA'nın parçalanmasına, hücre apoptosizi ve doğurganlığın inhibisyonuna neden olarak gerçekten de kötü oosit kalitesine, bunların da over yaşlanmasında diğer bir mekanizma olduğu ileri sürülmüştür (Pru ve Tilly, 2001). Düşük kalitede olan oosit, bazı kromozom eksiklikleri ya da bölünememe gibi çeşitli sorunlara yol açabilir.

Memelilerde üreme fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde vazgeçilmez öneme sahip olan overlerdeki foliküllerin gelişmesi, bir yandan döllenme yeteneği olan ovumu üretirken diğer yandan da üreme sisteminin belli bölgelerinde eş zamanlı değişim ve gelişmeleri sağlar ve kadına bağlı infertilitenin %30-40'ını oluşturur (Greenwald ve Terranova, 1988). Ovulasyon, hipotalamus, hipofiz ve over aksının düzenli çalışmasıyla sağlanır. Bu aksın herhangi bir aşamasındaki aksamalar sonucu, anovulasyon oluşabilir.

Obezitenin hormonlar ve genlerle ilişkisine olan ilgi, adipositlerden salgılanan bir molekül olan leptinin keşfinden sonra yakın zamanda yapılan çalışmalarda daha da artmıştır. Leptin, iştahı düzenlemesi ve enerji harcanmasını artırması nedeniyle vücut ağırlığının uzun süreli kontrolünü düzenleyen bir hormondur (Giacobino, 1996). Leptinin bulunmaması durumunda besin tüketimi engellenememekte, enerji harcaması azaltılmakta ve böylece obezite oluşmaktadır (Özmen ve Moran, 2010). Gelişen hiperandrojeneminin, granuloza hücre apoptozuna neden olurken androjenlerin perifer yağ dokusunda östrojenlere dönüşmesi hipofizden gonadotropin salınımını durdurması ile üreme aksındaki olumsuz etkilere neden olmaktadır (Pandey ve ark., 2011). Obezite gen ürünü olan leptinin çeşitli metabolik etkilerinin yanı sıra oksidan/antioksidan dengenin düzenlenmesinde de rolü olduğu ileri sürülmektedir fakat halen artırdığı ya da azalttığı yönünde çelişkili sonuçları vardır. Obeziteden dolayı etkilenen leptinin yüksek konsantrasyonunun PCOS patogenezinde ve üreme bozukluklarında bir rol alacağı speküle edilebilir.

Leptinden sonra, yeni çalışmalarla birlikte şişmanlıkla ilgisi olduğu belirtilen melatonin hormonu, geceleri epifiz bez'den salgılanan ve sentezlenen endojen bir moleküldür (Reiter, 1991). Enerji metabolizması ve vücut ağırlığı üzerinde önemli bir rol oynayabileceği (Korkmaz ve ark., 2009b), hatta melatoninin enerji harcanımı ve vücut yağ kütlesini düzenlediği yaptıkları çalışmalar tarafından ortaya konarak anti-obezite etkileri bulunmuştur (Korkmaz, 2009; Tan ve ark., 2011). Obezite kaynaklı bozukluklarda melatoninin etkisi, antioksidan aktivitelerinden daha çok birleşik pleiotropik düzenleyici etkisinden kaynaklanır (Hardeland ve ark., 2006). Melatoninin hidroksil radikali nötralize etme özelliğinin glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliğinin ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Palaoğlu ve ark., 1998). Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, melatoninin toksik bir etki göstermemesidir (Reiter, 1993). Araştırmacılar, yıllarca sadece üreme ile ilgili olduğu ve genel olarak da üreme yeteneğini bastırıldığına inanılmış olan melatonin hormonunun aynı zamanda folikülogenesizi ve ovulasyonu düzenlediğini işaret etmektedirler (Zhao ve ark., 2000). Tamura ve ark. (2008), melatonin hormonunun kadınların invitro fertilizasyon (IVF) tedavisinde yumurta kalitesini artırmaya yardımcı olabilir olarak bulmuştur. Konu üzerinde yapılan çalışmalardan birinde melatoninin yağ depolarını azaltarak daha iyi bir yaşam süreci sunduğu, bilinen detoks etkisine ek olarak lipid oksidasyonu azaltarak üreme için faydalı olabileceğini ortaya koyar (Prunet-Marcassus ve ark., 2003). Melatonin büyük olasılıkla progesteron üretimini artırarak, yumurtlama sırasında oksijen radikalleri tarafından gerçekleştirilen saldırılara karşı granüloza hücrelerini korumuştur (Nakamura ve ark., 2003).

Melatonin, leptin hassasiyetini önceki değerlerine çekerek leptin seviyesi kontrolünde önemli bir rol oynar ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonunu etkileyebildiği ispatlanmıştır. Bununla birlikte, melatoninin leptin salınımını üzerindeki pozitif-negatif etkisi henüz netlik kazanmamıştır (Song ve Chen, 2009). Buna dayanarak, deneysel olarak yüksek yağlı diyet ile beslenen ve obezite geliştirilen sıçanların over dokusunda oluşabilecek değişiklikleri leptin, melatonin ve melatonin-leptin'in üzerindeki etkilerinin stereolojik biyokimyasal, immünohistokimyasal ve olarak belirlenmesi bu hormonlar arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite Nedir?

2.1.1. Tanım ve Epidemiyolojisi

Obezite, vücutta aşırı miktarda yağ dokusunun bulunması olarak tanımlanmakta (Tüzün, 1995) olup bu kelime latince çok yemek yiyen anlamına gelen “obese (obesus)” sözcüğünden türemiştir (Hammoud ve ark., 2008). Vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan, vücut yağ kitlesinin, yağsız vücut kitlesine oranla artması ile kendini gösteren kronik bir hastalıktır (Altunkaynak ve Özbek, 2006). Besinler ile alınan enerjinin vücutta yağ şeklinde depolanması, besin gereksinimi duyulduğu zamanlarda vücut için yaşamsal değere sahiptir. Enerjiyi oluşturan besin öğelerinin oranı önemlidir. Glikojen ve proteinlerin aksine, trigliseridler depolanma için su ve elektrolit desteğine gereksinim göstermez ve saf yağ şeklinde depolanabilir. Enerjinin yağ dokusunda bu denli etkili bir şekilde depolanabilme özelliği nedeniyle, normal vücut ağırlığındaki bir insan yaklaşık olarak total açlığa 2 ay süreyle dayanabilmektedir (Olefsky, 1991). Ancak yağın bu şekilde kolay depolanabilir olması, çeşitli faktörlere bağlı olarak yağın vücutta normalden fazla birikimine ve obeziteye yol açabilmektedir.

Beslenmeyle alınan yağ çoğunlukla şişmanlıktaki artışın sorumlusu olarak gösterilir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar yağ oranı yüksek (enerjinin \geq %30 ‘unun yağdan geldiği) diyetlerin obeziteyi kolayca tetikleyebildiğini göstermişlerdir (Bray ve Popkin 1998; Hill ve ark., 2000; Schrauwen ve Westerterp 2000; Jequier 2002; French ve Robinson, 2003). Çin, Kanada ve ABD gibi ülkelerde gerçekleştirilen epidemiyolojik çalışmalar diyetteki mevcut yağ miktarı arttıkça obezite görülme sıklığının da arttığını göstermişlerdir (George ve ark., 1990; Tucker ve Kano, 1992; Popkin ve ark., 1993). Bu da insanların diyetlerindeki yağ miktarını düşürmek için dünya çapında bir çabaya yol açmıştır. Yüksek yağ içeren diyet (YYD) ile beslenmenin, insan metabolik sendromuna paralel olarak kemirgenlerde de obezite ve metabolik hastalıkları tetiklediği (Song ve ark., 2006; Buettner ve ark., 2007) ve YYD’in sıçanlarda vücut yağ oranı artışına ek olarak hiperleptinemi, hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemiye sebep olduğu bildirilmiştir (Bahçeci ve ark., 1999; Kalaivanisailaja ve ark., 2003).

Fakat obezitenin gelişiminden sadece aşırı yağ alımı sorumlu değildir; protein ve karbonhidratlarla alınan fazla kalorilerin yağ dokusu olarak depolanması da vücut

ağırlığının artmasına neden olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar yüksek oranda yağ tüketen toplumlarda obezite prevalansının daha çok karbonhidratla beslenenlere göre yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Thomas, 1995). KH ve protein ile alınan enerji 4 kkal/gr, alkol ile 7 kkal/gr iken (Serter, 2003) yağda bu oran yüksektir kuramsal bir değerlendirme ile 1 gram yağ dokusu, 38 kJoule (9 kcal.) enerjiye eşittir (Olefsky, 1991). Obezite gelişiminde diğer önemli faktör gelişmekte olan ülkelerin sosyoekonomik düzeylerinde ve yaşam tarzlarında uğradıkları hızlı değişim ile teknolojik gelişmelerin sağladığı kolaylıklardan oluşan hareketsizlikten dolayı günlük aktivitelerde harcanan enerji miktarının azalmasıdır (Caballero, 2001). Pozitif enerji dengesinin sağlanmasında beslenmenin çok önemli rolü bulunmaktadır (Jequier ve Tappy, 1999).

Yıllarca obezitenin derecelendirilmesinde birçok ülke kendine özgü kriterler kullanmış ve bu nedenle obezitenin epidemiyolojik incelenmesinde büyük güçlükler ortaya çıkmıştır (Taşan, 2005). Gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada obezite prevalansı giderek artmaktadır ve bu prevalans %8,2 olarak hesaplanmaktadır ki bu değer tüm dünyadaki zayıflık prevalansından (BKİ<17 olanlar %5,8) daha yüksektir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) verilerine göre, dünyada 400 milyonun üzerinde obez ve 1,6 milyar civarında da hafif şişman birey bulunmaktadır. 2015 yılında bu oranın sırasıyla 700 milyon ve 2,3 milyara ulaşacağı düşünülmektedir (WHO, 2006). Bu sebeple obezite ile mücadele, aynı diyabet programları gibi uluslararası zeminde başarıyı arttıracak yeni yaklaşımlar ve programlar geliştirilerek yaygınlaşmaktadır (Formiguera ve Canton, 2004; Serter, 2004; Taşan, 2005). Avrupa'da obezite prevalansı ülkeler arasında farklılık göstermesine rağmen, Amerika ve Avustralya'dan daha düşüktür (Cateron ve Gill, 2002). TURDEP' in (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans) yaptığı araştırmaya göre; bölgesel dağılımlar göz önüne alındığında obezite, Doğu Anadolu'da en düşük (%17,2) ve İç Anadolu'da en yüksek (%25) olmak üzere, güneyde %24, kuzeyde %23,5 ve batıda %21,6 bulunmuştur. Obezite prevalansının bölgelere göre cinsiyet dağılımı incelendiğinde; erkeklerde en yüksek Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde (%16,9 ve %16), en düşük Ege'de (%2,5), kadınlarda en yüksek Karadeniz'de (%35,6), en düşük Akdeniz'de % 14,1 olarak bulunmuştur (Sansöz ve Onat, 2007).

Ülkemizde çok merkezli olarak yapılan epidemiyolojik bir araştırmada erkeklerde $>30 \text{ kg/m}^2$, kadınlarda ise $>29 \text{ kg/m}^2$ obez olarak kabul edilmiştir (Erden, 1998). Türkiye genelinde yapılan TOHTA (Türkiye Obezite ve Hipertansiyon Taraması) çalışmasında, 20 yaş ve üzeri 23,888 kişi değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre; obezite oranı kadınlarda %36,17, erkeklerde %21,56, toplam olarak %25,20 bulunmuştur (Hatemi ve ark., 2002). Obezite, kadınlarda erkeklere oranla daha sık olarak görülmektedir (Olefsky, 1991). Bunun nedeni daha çok gebelikte alınan kiloların, alınması gerekenden fazla olması, oral kontraseptif kullanımı, östrojen etkisi, sosyal yaşamdaki kısıtlılıklar ve sınırlı fiziksel aktivitenin varlığı olarak kabul edilebilir. Erkeklerle kadınlar arasındaki fark ileri yaşlarda daha da artmaktadır.

2.1.2. Obezite Etiyolojisi

Obezite, irade ve oto-kontrol eksikliğine bağlı basit bir problem değil, iştah regülasyonu ve enerji metabolizmasını içine alan kompleks bir hastalıktır (Serter, 2004). Obezitenin giderek epidemi halini almasında fazla enerji alımı, yetersiz enerji tüketimi, genetik yatkınlık, düşük yağ oksidasyonu, azalmış sempatik aktivite, psikolojik stres, sosyoekonomik düzeyde düşüklük (Eker ve Şahin, 2002), yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, evlilik ve doğum sayısı oluşturmaktadır (Adams ve ark., 2006; Altunkaynak ve Özbek, 2006). Vücut ağırlığı, hipotalamusun; lateral hipotalamik nükleusta bulunduğu düşünülen açlık merkezi ve ventromediyal nükleustaki doyma merkezi gibi çeşitli nöron merkezleri yoluyla adipoz dokuyu kontrol etmesiyle ilişkilidir (Konturek ve ark., 2005). Günümüzde, obezitenin yemek yeme davranışı bozukluğu ve hipotalamik termojenez kontrol mekanizmalarının bozulması sonunda adipoz doku ile hipotalamus arasındaki denge ve kompensasyonun bozulması ile oluştuğu düşünülmektedir (Başkal, 2003). Enerji dengesinin bozulmasını tetikleyen çeşitli çevresel faktörler yanında psikolojik, hormonal ve metabolik bozukluklar ve farmakolojik maddeler obezitenin oluşumunda rol almaktadırlar. Kalıtımın %35 rol oynadığı ve modifiye edici genlerin de %15 rol oynadığı düşünülürse geri kalan %50 olguda çevresel faktörler ve yaşam stiline etkili olduğu ortaya çıkar (Özata, 2007).

Besinlerle alınan enerji girişi, egzersiz, bazal metabolizma, termogenezis ve yağ biyosentezi yoluyla harcanan enerji çıktısına eşittir. Termogenesis besinler yendikten sonra vücutta oluşan ısı miktarıdır (Baysal, 1999). Gıdaların termogenik

etkisi gıdanın sindirimi, metabolizması ve depolanması için harcanan enerji ile beraber gıda alımına eşlik eden sempatik aktivitedeki ve enerji harcanmasındaki artışı kapsar (Lustig, 2001). Besinlerin termik etkisi ise toplam enerji harcanmasının yaklaşık %10'u kadardır. Normal ağırlıktaki bireylerde şişman olanlara göre termik etki daha yüksektir (Baysal, 1999). Dışarıdan alınan kalori fazlalığı termogenez arttırılarak yok edilir. Bu olay başlıca kahverengi yağ dokusunda, kısmen karaciğer ve iskelet kasında olmaktadır.

Diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, infertilite, serebrovasküler hastalıklar, osteoartrit, uyku apne ve belli kanser türlerinde karşılaşılan morbiditenin, vücut yağının azaltılmasıyla orantılı olarak azalacağını gösteren çeşitli epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Merkezi sinir sistemi ve periferik sinyal yollarının daha iyi anlaşılmasıyla adipozitenin düzenlenmesinde rol oynayacak etkili obezite ilaçlarının çok yakın gelecekte geliştirilebileceği düşünülmektedir (Chaput ve ark., 2007).

2.1.3. Obezitenin Değerlendirilmesi

Fazla kiloluluk ve obezite erişkinler için vücut kitle indeksi (VKİ) adı verilen kilo ve boy kullanılarak hesaplanan değerler ile gösterilir (Kuczmarski ve Flegal 2000). Vücut yağ oranı erkekte %12-20, kadında %20-30 olmalıdır (Paydaş, 2004), erkekte %25, kadında ise %33'ün üzerine çıkması durumunda obezite olarak tanımlanır (Vega, 2001). Obezitenin klinik tayini için çeşitli ölçümler geliştirilmiştir. Bunlardan en basiti Broca indeksi olarak tanımlanan "İdeal ağırlık = Boy (cm)-100" formülü kullanılmıştır (Serter, 2004). Ancak Broca indeksinin çok duyarlı bir hesaplama yöntemi olmaması nedeniyle, bugün daha çok DSÖ'nün tanımlayarak standardize ettiği VKİ kullanılmaktadır (Üçkaya, 1999). VKİ 1990'lı yıllardan itibaren obezitenin ölçümünde genel kabul gören bir ölçüt haline gelmeye başlamıştır. Vücuttaki yağ miktarı yüzdesinin obezitedeki morbidite ve mortalite artışı ile yakından ilişkili olduğu bilindiğinden vücuttaki yağ oranı ile korelasyonu çok iyi olan VKİ bu derecelendirme için oldukça uygundur (Taşan, 2005). Belçikalı ünlü astronom ve istatistikçi olan Quetelet tarafından ileri sürülen VKİ vücut ağırlığının kilogram olarak değerinin metre olarak değerinin karesine bölünmesi vücut ağırlığı (kg)/boy (m²) ile hesaplanır (Tanyeri, 1996).

Obezitenin değerlendirilmesinde ikinci ölçüt Bel-Kalça Oranı (BKO) ya da bel çevresi değeridir. BKO ilk defa TEKHARF çalışmasında 1995 yılında bakılmıştır ve

kadınlarda ideal değeri 0,8'den, erkeklerde 0,95'den küçük olmasıdır (Antipatis ve Gill, 2002). 1995 yılında TEKHARF çalışmasında Türk kadınları android tipte (elma tip) obez bulunmuştur. BKO, 0,5'i geçen kadın oranı %34,5, 0,95'i aşan erkek oranı %28,9 olarak belirtilmiştir (Yılmaz, 2003). Daha önceleri ideal kilo formülleri ile ideal kilo bulunmakta, bunun %10 fazlası fazla kilolu, %20 fazlası ise obez olarak tanımlanmaktaydı. DSÖ'nün VKİ değerlerine göre yaptığı sınıflamada, yetişkinler zayıf (underweight), normal, fazla kilolu (overweight) ve obez olarak değerlendirilmektedir (Tanyeri, 1996). Örneğin 70 kg ağırlığında, 1,75m boyundaki bir yetişkinin $VKİ = 70 (kg)/1,75^2 (m^2) = 22,9$ olarak hesaplanmaktadır. Vücuttaki yağ miktarı yüzdesinin obezitedeki morbidite ve mortalite artışı ile yakından ilişkili olduğu bilindiğinden vücuttaki yağ oranı ile korelasyonu çok iyi olan VKİ bu derecelendirme için oldukça uygundur (Tanyeri, 1996), fakat dolaylı olarak vücut yağ miktarının genel bir göstergesi olup yağın dağılımı hakkında bilgi vermez.

Obezitenin klinik sınıflaması ve tanımı: Tanı iki şekilde yapılır (Tablo 1).

Tablo 1. Yetişkinlerde zayıflık, fazla kiloluluk ve obezitenin VKİ'ne göre uluslararası sınıflaması

SINIFLAMA	VKİ (kg/m ²)
Zayıf (underweight)	<18,50
Şiddetli derecede zayıf	<16
Orta derecede zayıf	16-16,99
Hafif derecede zayıf	17-18,49
Normal aralık	18,5-24,9
Fazla kilolu	≥ 25
Pre-obez	25-29,99
Obez	≥30
Obez Grade 1	30-34,99
Obez Grade 2	35-39,99
Obez Grade 3	≥40

2.1.4. Obezitenin Komplikasyonları

Dünya sağlık örgütü tarafından en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilen obezite ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır (Altunkaynak ve Özbek, 2006). ABD'de bir yılda yaklaşık 300.000 kişi obezite ile ilişkili hastalıklardan ölmektedir

(Allison ve ark., 1999). Obez bireylerdeki fazla yağlanma; insan vücudunda kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, hormonal sistem, sindirim sistemi gibi sistemleri etkileyen birçok önemli rahatsızlığa zemin hazırlar (Baltacı, 2012). Kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi, solunum rahatsızlıkları, eklem hastalıkları, menstrual düzensizlikler, impotans, safra kesesi hastalıkları, taş oluşumu, tip 2 diyabet, bazı kanser türleri ve kadınlarda hormonal bozukluklar (aşırı tüylenme) ve PCOS, hamilelik döneminde anneye bağlı komplikasyonlar gibi üreme rahatsızlıkları (Ogden ve ark., 2006; Sneed ve ark., 2008). reproduktif bozukluklar obezite ile doğrudan ilişkili hastalıklardan birkaçıdır (Wright ve ark., 1994; Pijl, 2001; Must ve Anderson, 2003; Galinier ve ark., 2005). Bu komplikasyonlardan olan infertilite günümüzde yoğun çalışmalara sebep olmaktadır. Reproduktif sistem ile ilgili olarak kadınlarda düzensiz menstruasyon ve oosit kalitesi ile anovulatuvar siklus görülebilir (Clark ve ark., 1998; Hossain ve ark., 2007).

2.1.5. Obezite ve Antioksidanlar

Oksidatif stres; oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulması sonucu lipid peroksidasyonu ve ROS'un açığa çıkarak organizmada hücresel hasara yol açması olarak tanımlanır (Fearon ve Faux, 2009). Oksidatif stres sonucunda protein, lipit, nükleik asit ve enzimlerin yapı ve fonksiyonları bozulmaktadır (McCord, 1993). Serbest radikaller, hücre zarındaki yağlardan birine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Bu değişim bitkisel yağların acılaşmasına sebep olan küçük bir değişikliktir. Yağlar vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarara uğrar, hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz ve bu yüzden harcanan ürünlerin atılmasını düzenleyemez (Yılmaz, 2008). Serbest radikallerin saldırısının devamı; hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, zarın yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Yağların Oksidasyonu" veya "Oksidatif Hasar" olarak adlandırılır. Obez hastalar üzerinde yapılan birçok çalışmada vücutta oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği ve antioksidan savunma enzimlerinde ise azalma olduğu gösterilmiştir (Vincent ve Taylor, 2006) Bu nedenle obezitenin vücutta inflamasyon ve kronik oksidatif stres durumu olduğu belirtilmektedir (Higdon

ve Frei, 2003; Urakawa ve ark., 2003). Prooksidan etki gösteren serbest radikallerin hasarına karşı, antioksidan adı verilen ajanlarla savunma oluşturulur (Cros, 1987). Antioksidanların birçok tanımı yapılmakla beraber en genel tanımı, lipit peroksidasyonunu yavaşlatan veya başlamasını geciktiren kimyasal bileşikler şeklindedir. Vücudumuzda gelişmiş olan doğal antioksidan savunması ise, oksidatif strese neden olan serbest radikallerin üretimini ve DNA'nın hasar görmesini engellemek konusunda önemli rol oynar (Halifeoğlu ve ark., 2005).

Obezitede oksidatif stresi arttıran etkenler arasında hiperglisemi, hiperleptinemi, doku lipit düzeylerinin artması, yetersiz antioksidan defans, ROS oluşumunun artması ve kronik enflamasyon olarak bildirilmiştir (Vincent ve Taylor, 2006) ve bu etkenler sonuçta doku hasarına yol açmaktadırlar.

2.1.6. Obezitede Görülen Hormonal Değişiklikler ve İnfertilite

Fazla kilonun ya da obezitenin genel sebebi hormonlardır. Yağ dokusu hormon üretimi yapar; androjen, östrojen ve progesteron için bir depodur (Serter, 2004) ve östrojenin 2/3'ü yağ hücrelerinde üretilir. Yağ dokusundaki stromal vasküler hücrelerde androjenlerin östrojene aromatisasyonu ile östrojen miktarı artar, progesteron miktarı azalır ve östrojen/androjen oranındaki bu artış ile, diğer taraftan seks hormon bağlayıcı globulinde (SHBG) azalma olur. Kandaki yüksek androjen sindirim sistemindeki bazı dokuların ölmesine neden olurken yumurtalıkları uyaran düzenli ovulasyon için gerekli olan gonadotropin hormonunun (GnRH) salgılanması kısıtlanır (Metwally ve ark., 2007). Yüksek miktardaki östrojen ise yumurtlamayı engeller (Serter, 2004) ve GnRH özellikle yumurtaların gelişimi için kritik olan luteinize edici hormon (LH) ile folikül stimüle edici hormon (FSH) salınımını tetikler.

Hormonların düzenli çalışması vücudun gerekli besinleri alıp sağlıklı yaşamasına olanak verir. Fakat hormonların çalışma fonksiyonları düzgün değil ise fonksiyonlarını yerine getiremez ve bu durumda olumsuz etkiler oluşumuna yani obeziteye kaynak oluşturur. Hormonal problemler, tiroid ve böbrek üstü bezlerindeki bozukluklar, stres, aşırı kilo kaybı ve kilo artışı ovulasyonda düzensizliklere yol açabilir (Coşkun, 2010). Üreme çağındaki kadınlarda hiperandrojenizm ve anovülasyon riskinin obezite ile arttığı açıkça görülmektedir (Körükçü ve Kukulcu, 2011). Kilosu yüksek olanların insülin salınımındaki ve hormon seviyesindeki değişiklikler, nöroendokrin

fonksiyonları, siklus bozuklukları (Wittermer ve ark., 2000; Carrell ve ark., 2001; Dokras ve ark., 2006; Esinler ve ark., 2008), fertilitede azalma, libido ve potense azalma (Rich-Edwards ve ark., 1994) hiper androjenizme bağlı PCOS (Bağrıaçık ve ark., 2003) embriyo ve oosit kalitesini/olgunlaşmasını (Wittermer ve ark., 2000; Carrell ve ark., 2001; Dokras ve ark., 2006; Esinler ve ark., 2008) bozarak ovarian fonksiyonlarına etki eder, bu durum embriyonun rahime tutunmasını, gebe kalmayı ya da gebeliğin devamını olumsuz yönde etkiler (Yetkin ve Çimen, 2010). Böylece sağlıklı kadınlarda hem ovulasyon hem de fertilité oranları azalabilir (Pasquali ve ark., 2003).

Kilo kaybı aynı zamanda fazla androjen salgılanma problemini azaltırken (serbest androjen indexinde azalma, serbest ya da total testesteron miktarında azalma ve SHBG'de artma olarak ölçümlenmiştir) menstrual fonksiyonlarda, ovulasyon ve döllenme oranlarında artış sağlar (Kiddy ve ark., 1989; Pasquali ve ark., 1989; Kiddy ve ark., 1992; Botwood ve ark., 1995; Holte ve ark., 1995; Jakubowicz ve Nestler, 1997; Van Dam ve ark., 2002; Moran ve Phillip, 2003). LH oranında değişiklikler, azalmalarıyla (Pasquali ve ark., 1989), artışlarıyla (Van Dam ve ark., 2002) ve değişiklik olmamasıyla daha az raporlanmıştır (Kiddy ve ark., 1992; Holte ve ark., 1995; Jakubowicz ve Nestler, 1997). Üremeye yardımcı teknikleriyle tedavi gören kadınların obez ya da kilolu olanlarında normal kilodaki kadınlara oranla daha yüksek oranda gonadotropin, arttırılmış döngü iptal oranları ve azaltılmış oosit alımı gereksinimi tespit edilmiştir (Fedorcsak ve ark., 2004).

Obezitenin hormonlar ve genlerle ilişkisine olan ilgi, leptinin keşfinden sonra yakın zamanda yapılan çalışmalarda daha da artmıştır. Leptin, vücut ağırlığının uzun süreli kontrolünü düzenleyen bir hormondur (Giacobino, 1996). Leptinden sonra, yeni çalışmalarla birlikte şişmanlıkla ilgisi olduğu belirtilen melatonin hormonunun enerji metabolizması ve vücut ağırlığı üzerinde önemli bir rol oynayabileceği (Korkmaz ve ark., 2009b), hatta melatoninin enerji harcanımı ve vücut yağ kütesini düzenlediği (Korkmaz, 2009; Tan, 2011) yaptıkları çalışmalar tarafından ortaya konmuştur. PCOS' lu hastaların yaklaşık % 50'si obezdir. Ancak obezitenin PCOS'u kolaylaştırıcı bir etken mi yoksa hastalığın bir sonucu mu olduğu halen tartışmalıdır. PCOS' lulara karın duvarında, visseral mezenterik bölgelerde yağ doku birikimi şeklinde meydana gelen android tipte obezite olur. Özellikle abdominal obezitesi olan kadınlarda menstrüel düzensizlikler artmıştır ve çoğu olguda menstrüel bozukluk başlamadan önce belirgin

kilo artışı bulunur. Androjen seviyesinde artma normal foliküler gelişmeyi önlerken, prematür folikül atrezi indüklenir (Taylor, 1998; Harwood ve ark., 2007). Foliküler atrezi ovarian stromal dokuyu artırır. Artmış stromal doku, LH uyarımı ile daha fazla androstenedion periferel dokularda testosterona (Speroff ve ark., 2005) dönüşmektedir.

2.2. Ovaryum

2.2.1. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, dişi üreme sisteminin çift fonksiyon yapan organlarıdır. Yumurta üretmeleri bakımından ekzokrin, çeşitli eşey hormonlarını üretmeleri bakımından, endokrin fonksiyon gören, karın boşluğunda, her biri uterusun bir yanına yerleşmiş olan ovaryumlar, badem şeklindeki organlardır (Aksoy, 2008).

Ovaryumda östrojen ve progesteron olmak üzere iki ana grup hormon salgılanır;

- 1- Östrojenler:** İç ve dış seks organlarının büyüme ve olgunlaşmasını destekler. Puberteyle birlikte gelişen dişi seks karakterlerinden sorumludur. Östrojenler meme bezi üzerine de etki edip duktal ve stromal büyümeyi uyarırlar. Ayrıca yağ birikimine de neden olup meme gelişiminde önemli rol alırlar.
- 2- Progesteronlar:** Başta uterus olmak üzere iç seks organlarını hamilelik için hazırlarlar. Bununla birlikte lobular çoğalmayı da destekleyerek meme bezini süt vermeye hazırlar (Gartner ve Hiatt, 2001).

Ovaryum'da üç katman gözlenir:

1. Epitel: Ovaryum epiteli prizmatik, kübik, yaş ilerledikçe yassıya kadar dönen germinal epiteli içerir, mezovaryumu örten mezotelyum ile devam eder. Epitelin peritona bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar izlenir. Hücre sitoplazması mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir.

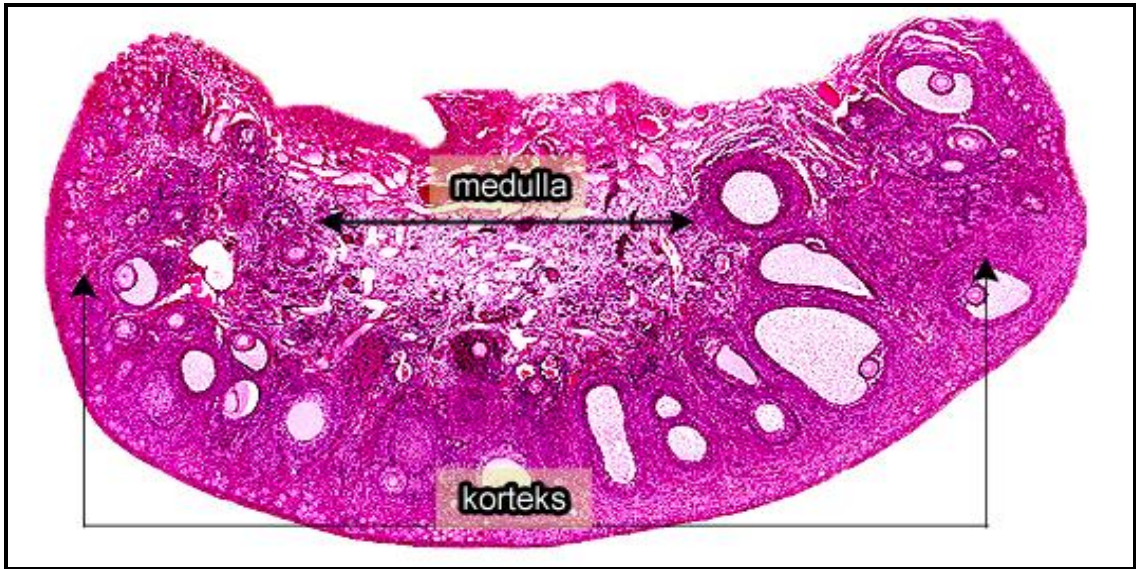
2. Tunika albuginea: Bağ dokusundan yapıli kattır. Yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında olup kollajen lifler yüzeye koşut demetler oluştururlar.

3. Ovaryum stroması: Ovaryum'un temel ve destek dokusudur. Ovaryumlar dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki bölgedir (Andolf, 1987) (Şekil 1).

a. Korteks (cortex ovarii): Organın dış ve işlevsel bölümüdür. Çeşitli gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapılarını içerir. Korteks stromasında kollajen, elastik lifler ve lif ağları ile ince uzun mekik şeklinde stroma

hücreleri bulunur. Stroma hücreleri fibroblastlardan ayrıcalı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir.

b. Medulla (medulla ovarii): Bu bölge, gevşek bağ dokusu, kollajen ve elastik demetlerden yapılmış olup, geniş kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirlerin bulunduğu açık renk iç bölgedir. Korteks ve medullayı yapısal olarak kesin sınırla ayırmak olası değildir ancak yaşlılıkta bu fark gittikçe kaybolur. Medulla stroması korteks'e benzer. Elastik liflerden zengin, düz kas hücreleri içeren fibroelastik gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Medullada ayrıca oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla artar, menopozda %80 oranında bulunurlar. İntertisyel hücreler poligonal şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği ve belirgin çekirdekçikleri olan epitelooid hücrelerdir. Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları bulunur. Luteinize hücelere benzedikleri için atreziye giden foliküllerin teka internalarından oluştukları düşünülmektedir. Bunlar ovaryum stromasında tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar ve östrojen salgırlar. Bu hüceler, çok doğuran memelilerde fazladır ve intertisyel bezler olarak adlandırılırlar; insanda ilk adet kanamasından sonra azalır, erişkinde son derece azdırlar (Aksoy, 2008).



Şekil 1. Genel ovaryum görüntüsü (Veterinary histology'den uyarlanmıştır)

2.2.2. Folikülogenez

Foliküller, değişen büyüklükte, her biri tek oosit içeren tamamen olgunlaşmamış bir yumurta ve bunu çeviren epitel hüceleri ile birlikte bağ dokusu

unsurlarının oluşturdıkları yapılardır. Gelişim evrelerine göre foliküller, üç esas grup altında toplanırlar (Şekil 2-5).

- a- Primordiyal foliküller,
- b- Gelişen foliküller (büyüyen foliküller),
 - b.1- Primer Folikül- Preantral Folikül
 - b.2- Sekonder veya Antral Folikül
- c- Olgun foliküller (Graaf folikülleri)
- d- Atretik foliküller

Altı aylık bir insan fetüsünün ovaryumu 6.000.000 dan fazla üreme hücresi ihtiva eder. Doğuma yakın bu sayı 2.000.000 civarına kadar düşerken ergenlik çağına doğru bu sayı 300.000 kadardır. Her ovaryum siklusunda yaklaşık 20 kadar primordiyal folikül, FSH etkisiyle olgunlaşmaya gider.

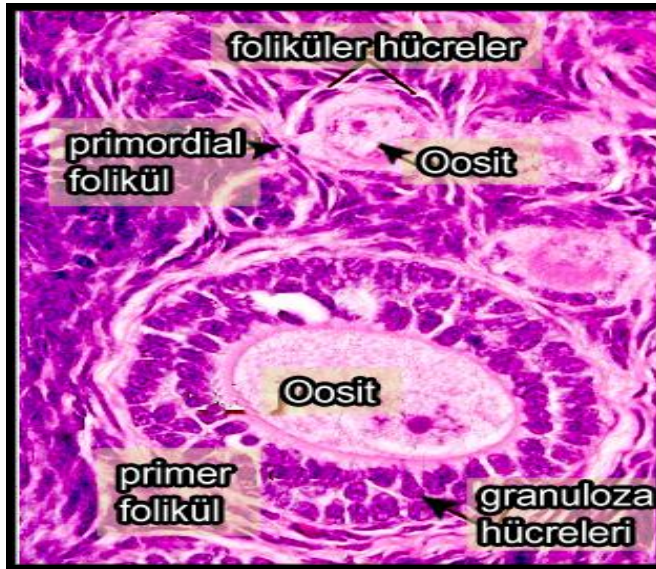
Ovaryum, dönemsel olarak aktivite gösteren bir organdır. Aktivitesi menarş ve menopoz arası devam eder. Bu süre boyunca; insanda, her ovaryum siklusunda, ovaryumların birinden bir yumurta atılır. Bir kadında menarş ve menopoz arası yaklaşık 30-40 yıl sürer. Buna göre bu sürede, ovaryumlardan toplam 450 kadar yumurta atılmış olur. Geri kalan foliküllerin ve dolayısıyla yumurtaların hepsi bozulur. Ovaryumda, folikülün ilk evresi olan primordiyal foliküllerden bir kısmının olgunlaşmaya gitmesi, bunlardan yalnız birinin olgunlaşması ve yumurtasının ovaryumdan atılması, yumurtanın atılmasından sonra folikülden arta kalan yapıların şekil değiştirip korpus luteum denilen yapıyı oluşturması, insanda, yaklaşık 28 gün sürer. Olaya, ovaryum siklusu denir. Ovaryum siklusunun iki fazı vardır.

- 1- Foliküler faz
- 2- Luteal faz

Ortalama 14 gün süren foliküler faz, siklusun ilk fazıdır. Bu faz, primordiyal folikülden başlayarak foliküllerin gelişmesi, Graaf folikülünün tamamen olgunlaşması ve yumurtanın ovaryumdan atılmasına kadar geçen evredir. Foliküler fazı izleyen luteal faz, yumurtanın atılmasından sonra, korpus luteumun oluşması ile başlar ve bu faz da ortalama 14 gün sürer. Luteal fazın başlarında, korpus luteum fonksiyoneldir, sonlarına doğru ise, korpus luteum bozulur ve fazın bitimi ile yeni bir ovaryum siklusu başlar (Fair, 2003).

a-Primordiyal Foliküler

Fetal gelişimin 3. ayında ovaryumda belirir. Fötüs gelişmesinin daha ileri evrelerinde oogonyumlar, kromozom sayılarını somatik hücrelerin kromozom sayılarının yarı sayısına indirmek için mayoz bölünmeye giderler. Ancak, birinci mayoz bölünmelerini tamamlamazlar ve birinci mayoz bölünmenin, profazının diploten evresinde uzun bir bekleme periyoduna girerler. Birey doğduğunda, ovaryumlarındaki foliküllerin hepsi, gelişmelerinin birinci mayoz bölünmesinin diploten evresindeki primer oositleri içeren, primordiyal foliküllerdir. Primordiyal foliküller, ovaryum korteksinde, tunika albuginea altında dağılmışlardır. Fötal yaşam sırasında oluşan foliküller (primordiyal foliküller, folliculus ovaricus primordialis) tek sıralı yassı folikül hücreleriyle çevrilidirler ve ortada bir primer oosit içerir (Şekil 2). Primordiyal folikülün içindeki oosit yaklaşık 25 µm çapında ve yuvarlak biçimdedir. Eksantrik yerleşmiş nükleusu içinde çok belirgin nükleolusu vardır. Kromozomlar çoğunlukla çözülmüş haldedir ve koyu boyanmazlar. Bireyin cinsel olgunluğa erişmesi ile her ovaryum siklusunun başında 20 kadar primordiyal folikül, hipofiz bezi hormonlarından birisi olan, FSH etkisiyle, olgunlaşmaya gider. Ancak, insanda sadece bir folikül tamamen olgunlaşır. Diğerleri, gelişmelerinin değişik evrelerinde bozulurlar (Channing ve ark., 1980; Gartner ve Hiatt, 2001; Kierszenbaum, 2002; Fair, 2003; Demeestere ve ark., 2005; Sathananthan, 2006; Gürsoy ve Ergin, 2007).



Şekil 2. Primer ve primordial folikül görüntüsü (Blue histology'den uyarlanmıştır)

b.1- Primer Foliküler – Preantral Folikül

Puberteden itibaren çeşitli faktörlerin etkisiyle oositler ve buna eşlik edecek şekilde folikül hücreleri bir büyüme evresine girerler. Büyümenin ilk sinyali, yassı folikül epitel hücrelerinin kübiğe dönüşmesidir. Bu aşamada folikül tek tabakalı (erken/unilaminar) primer folikül adını alır. İlerleyen aşamalarda folikül hücrelerinin çoğalmasıyla çok tabakalı (geç/multilaminar) primer folikül meydana gelir. Çoğalan folikül epitel hücreleri granuloza hücreleri adını alır (Miyano, 2005). Granuloza hücreleri çoğalırken çevredeki stroma hücreleri de folikülü bağ dokusu bir kılıfla sararak teka tabakasını oluşturur. Teka tabakası geliştikçe iki tabakaya farklılaşır. Teka interna adı verilen iç tabaka oldukça damarlanmış, kübik salgı hücrelerinden oluşarak fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağıyla tipik bir endokrin organ görünümü sergiler. Bu hücreler oldukça farklılaşarak steroid üreten hücreler haline geçerler. Teka internada yerleşimli tekal interstisyel hücrelerin membranında yaklaşık olarak 20.000 LH reseptörleri (LHR) yer almaktadır. LH'a yanıt olarak LHR taşıyan teka hücreleri östrojen öncülü androjenleri salgırlar ve androjenler buradan granuloza hücrelerinin düz endoplazmik retikulumlarına göç eder ve FSH'ın etkisiyle granuloza hücrelerinde östrojenlere dönüştürülür. Artan östrojen seviyeleri granulozaların çoğalmasını ve dolayısıyla da folikülün genişlemesini artırır (Ross ve ark., 2003). Sonuçta; ovulasyondan önce folikülden östrojen salınımı LH ve FSH'ın birlikte iki hücre tipini; teka ve granulozayı uyarmasının bir sonucudur. Ovulasyondan sonra iki hücre tipinin "iki hücre sistemi" olarak fonksiyon görmeye devam ettiğine inanılmaktadır (Young ve Heath, 2000). Dışta bulunan diğer tabaka, teka eksterna, içerdiği kollajen demetleri ve düz kaslarıyla daha çok bir kapsül görevi görür. Teka eksterna tabakası ile ovaryumun stroması arasındaki sınır tam olarak belirgin olmamasına rağmen teka interna ile granuloza tabakası arası sınır, burada bulunan bazal lamina ile oldukça iyi belirlenmiştir (Channing ve ark., 1980; Ross ve ark., 2003). İn vivo foliküler fazda granuloza tabakasının aktivitesi teka tabakasının aktivitesinden birkaç yüz kat daha büyüktür ve buna göre granuloza, büyümekte olan foliküldeki biyosentetik kaynaktır. Folikülerin gelişimi ancak FSH yüksek ve LH düşük olduğu sırada ortaya çıkar ise devam edecektir. Bir folikülün başarısı androjenik mikroçevreyi östrojenik mikroçevreye dönüştürebilme yeteneğine bağlıdır (Greisen ve ark., 2001). Bu aşamada oositi kendini saran foliküller hücrelerden ayıran bir amorf madde (Zona

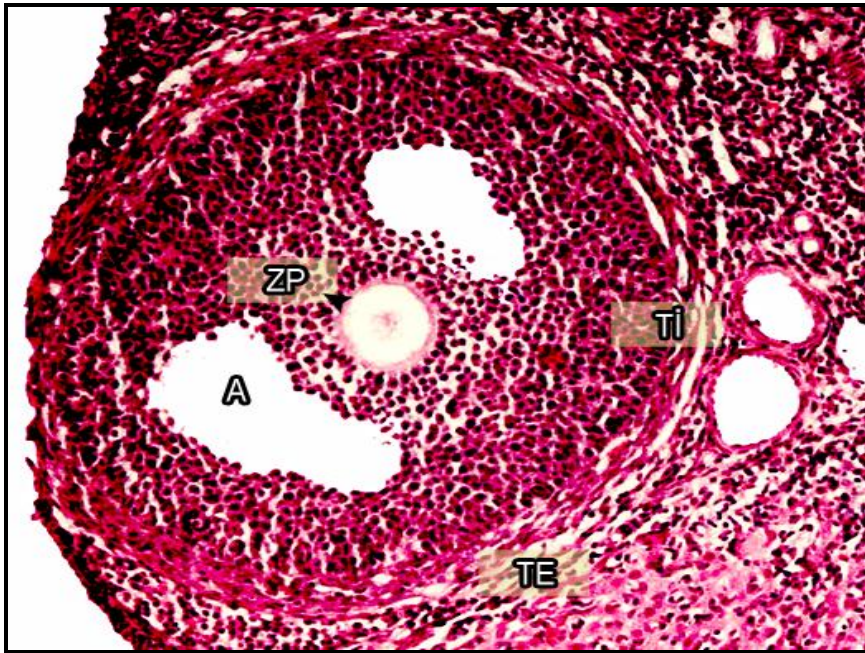
Pellucida, ZP) görülür (Şekil 3). Zona pellusida'nın sentezine hem oositlerin hem de folikül hücrelerinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Folikül hücrelerinin uzantıları (filopodlar) ve oositlerin mikrovillusları, zona pellusida içine uzanırlar ve birbirleriyle iletişim kurarlar. Zona pellucida oosit tarafından salgılanan 3 farklı glikoproteinden (ZP1, ZP2 ve ZP3) oluşur.

Granuloza hücreleri ile oositler arasında küçük köprücükler (gap junctions) oluşur. Foliküler hücrelerin filopodları oosit plazmalemması ile temas edecek ve foliküller gelişim sırasında iletişimi sağlayacak olan gap junctionları oluşturacak şekilde zonula pellucidayı kaplar. Gap junctionların varlığı oositin mayoz geçirebilmesi için gereklidir. Bunlar besleyici maddelerin, iyonların ve düzenleyici moleküllerin değiş tokuşuna olanak tanır. Bu sekresyona folikül hücreleri de katılır (Young ve Heath, 2000; Gartner ve Hiatt, 2001; Kierszenbaum, 2002; Gürsoy ve Ergin, 2007). 2001 yılında yapılan bir çalışmada, oogonyumların çevresini saran folikül epitel hücrelerinin, oogonyumlar için kontrollü bir çevre sağlayarak, kan akışıyla gelebilecek zararlı maddelere karşı korudukları belirlenmiştir (Himmelstein-Braw, 1976; Channing ve ark., 1980; Syrop ve ark., 1995; Mc Gee ve Hsueh, 2000; Gürsoy ve Ergin, 2002; Kierszenbaum, 2002; Fair, 2003; Ross ve ark., 2003; Miyano, 2005).

b.2- Antral Folikül

Multilaminar primer foliküller gelişmeye devam eder ve çapları 200 µm' ye ulaşana kadar büyürler. Bu noktada çapı sabit kalan primer oositin etrafını saran granuloza hücreleri tarafından büyük bir küresel folikül oluşturulur. Folikül büyüdükçe folikül hücreleri arasındaki boşluklara sıvı (Liquor folliculi) birikmeye başlar. Bu boşluklar birleşmek suretiyle daha büyük boşlukları (antrum) oluşturur (Şekil 3). Likör foliküli, içeriğinde hyaluronik asitten zengin olup granuloza hücreleri tarafından üretilen glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar, büyüme faktörleri, gonadotropinlerden ve steroid-bağlayan proteinleri de içeren bir plazma sıvısıdır (Gordon ve Lu, 1990). Boşluğun oluştuğu andan itibaren folikül sekonder (Antral) folikül adını alır. Üstelik LH ve FSH salınımını düzenleyen progesteron, östradiol, inhibin, follistatin (foliküllostatin) ve aktivin hormonlarını da içermektedir. FSH varlığında östrojen folikül sıvısındaki ana madde halini almaktadır. Buna karşın, FSH yokluğunda, androjenler hakim olmaktadır (Mc Natty ve ark., 1979; Gürsoy ve Ergin, 2007).

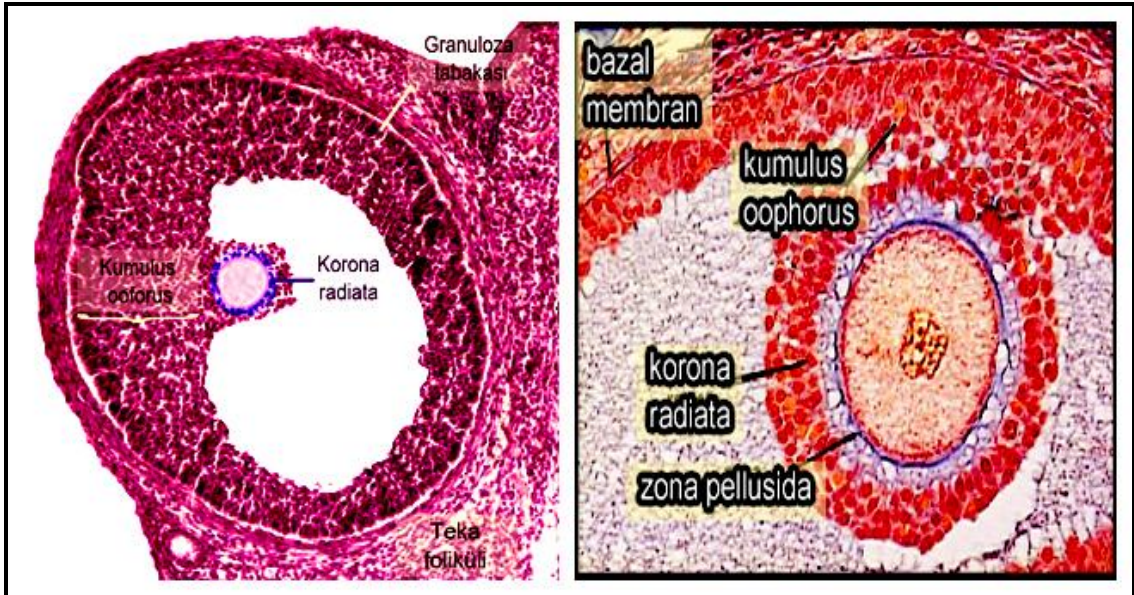
Ovaryumdaki gelişim unsurlarıyla belli bir çapa ulaşmış boşluk meydana getiren foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerine devam edebilmek için gonadotropinlere ihtiyaç duyarlar. Yeterli miktarda hormona maruz kalan foliküller arasında meydana gelen seçilme sonucu, (canlı türüne göre değişmekle birlikte) insanlar için genellikle bir folikül baskın hale gelerek gelişimini son aşamaya kadar sürdürür. Folikül gelişimi puberte öncesi ve hamilelik sırasında da meydana gelir ancak uygun bir hormonal uyarım olmadığından gelişim devam etmez (Ross ve ark., 2003). İnsanlarda preantral bir folikülden preovulatuvar folikül oluşumuna kadar yaklaşık 85 günlük bir süre geçer. Farelerde bu 10-12 gün kadardır (Demeestere ve ark., 2005). İnsandaki preantral ve antral foliküllerde, LH reseptörleri sadece teka hücrelerinde, FSH reseptörleri de sadece granuloza hücrelerinde bulunmaktadır (Channing ve ark., 1980; Yamoto ve ark., 1992; Scheffer ve ark., 1999; Young ve Heath, 2000; Gartner ve Hiatt, 2001; Oss ve ark., 2003; Demeestere ve ark., 2005; Miyano, 2005).



Şekil 3. Sekonder folikül görüntüsü. ZP: Zona pellucida, A: Antrum, Tİ: Teka interna folikülü, TE: Teka externa folikülü

c- Graaf Folikülü (Olgun Folikül)

İnsanlarda, 10 mm veya daha büyük bir çapa ulaşan foliküller olgun folikül olarak adlandırılır bu sırada tekada vakuoller ve preovulatar foliküle hiperemik görünüm veren zengin damarlanma gelişmektedir. Son büyüklüğüne erişen ve folikülün bir tarafına itilen oosit, birinci mayoz bölünmesini tamamlamak üzeredir. Granuloza hücreleri oosit etrafında tek sıra, antrum duvarında ince bir tabaka oluşturacak düzende yerleşmişlerdir. Oosit etrafındaki granuloza hücreleri ise ışınal konumlu olarak yerleşmişlerdir. Bu tabakaya, korona radiata denir (Şekil 4). Oositin ovaryumdan atılması esnasında, korona radiata hücreleri de, oosit ile birlikte atılırlar. Spermin oosite yaklaştığı evrede, bu bölgedeki korona radiata hücreleri, akrozom enzimleri aracılığıyla bozulurlar ve bu yolla da, spermin oosite girmesi kolaylaşmış olur. Graaf folikülündeki oosit, zona pellusida ve korona radiatası ile birlikte çevre folikül hücrelerine, sap şeklindeki folikül hücre kümesi aracılığı ile bağlanır. Bu, kumulus ooforusdur. Folikül azami büyüklüğüne yaklaştıkça granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Granuloza hücre tabakası antrumun genişlemesine bağlı olarak incelir. Granuloza hücreleri arasındaki boşluk büyüdükçe, ovulasyona hazırlık olarak, birbirleriyle olan bağlantıları ve ilişkileri zayıflar (Gürsoy ve Ergin, 2002).

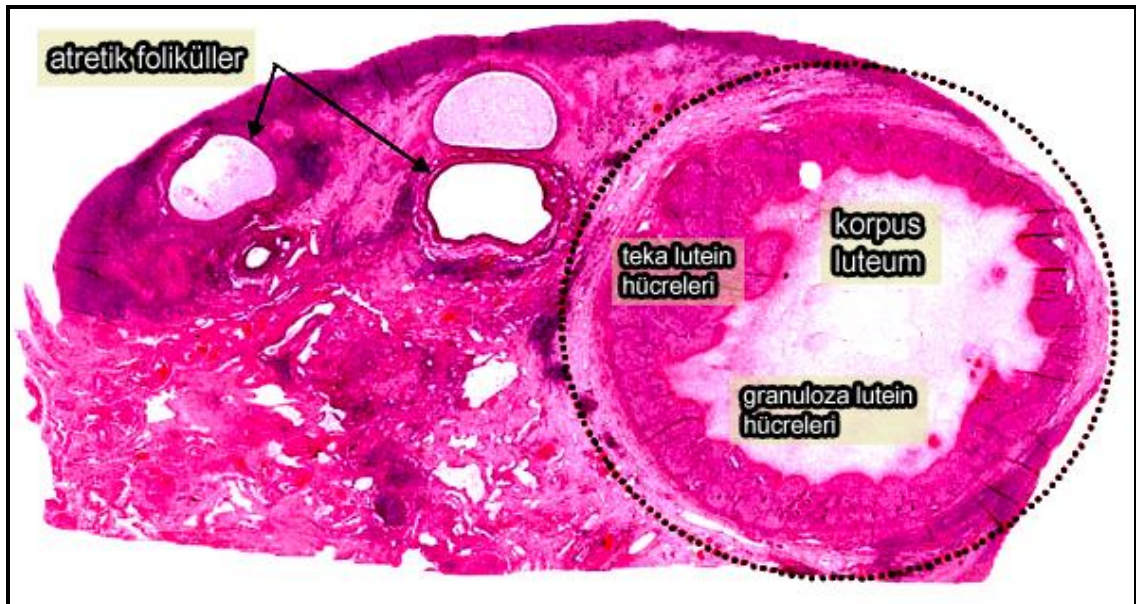


Şekil 4. Graaf folikülü görüntüsü

Graaf folikülünün tamamen olgunlaşmasını, oositin ovaryumdan atılması (ovulasyon) olayı izler. Bu evreye gelmiş olan folikülün oositi, birinci mayoz bölünmesini tamamlamış ve Sekonder oosit ile birinci kutup hücrelerini vermiştir. Sekonder oosit ovulasyondan önce ikinci mayoz bölünmesine başlar, ancak bu bölünmeyi tamamlayamaz, ikinci mayoz bölünmenin metafaz safhasında bekleme evresine girer ve bu evrede ovaryumdan atılır (Channing ve ark., 1980; Scheffer ve ark., 1999; Syrop ve ark., 1999; Young ve Heath, 2000; Oss ve ark., 2003).

d- Atretik Foliküller:

Ovaryum foliküllerinin büyük bölümü, folikül hücreleri ve oositin ölümüyle geriler ve bunlar fagositoz yapan hücrelerce ortadan kaldırılırlar. Bu süreçte granuloza hücrelerinde mitoz durur, granuloza hücreleri bazal membrandan ayrılır ve folikül hücreleri dejenere olur. Atretik foliküller doğum öncesinden başlayıp menopozun birkaç yıl sonrasına değin ovaryum'da oluşurlar. Foliküller atrezi sırasında granuloza hücreleri ile oositler dejenerasyona uğrarlarken, teka interna hücreleri steroid salgılamayı sürdürürler. Bu hücelere interstisiyal hücreler (endocrinocytus interstitialis) denir. Bu hücelere işlevlerini puberteden başlayıp menopoza değin sürdürürler ve androjenlerin kaynağını oluştururlar (Scheffer ve ark., 1999; Young ve Heath, 2000; Kierszenbaum, 2002; Gürsoy ve Ergin, 2007).



Şekil 5. Korpus luteum ve atretik foliküllerin görünümü (UNSW Embryology'den uyarlanmıştır)

2.2.3. Ovulasyon

Ovulasyon, LH pikinden 10-12 saat sonra, pik östradiel seviyesine ulaşıldıktan 24-36 saat sonra gerçekleşir (Pauerstein ve ark., 1978). LH piki ovulasyonun en güvenilir indikatörüdür. Kandaki LH hormonu seviyesinde meydana gelen aşırı yükselme (pik) sonucu granüloza hücrelerindeki LHR hassasiyetlerini kaybeder ve LH'a yanıt olarak daha fazla östrojen üretmezler. LH pikinden 12-24 saat kadar sonra gerçekleşen bu olay oositin mayoz I' i tamamlayarak ilk kutup cisimciğini oluşturması (maturasyonu-olgunlaşması) ve ovulasyon ile sonuçlanır (Ross ve ark., 2003).

Ovulasyondan hemen önce germinal epitelin preovulatuvar folikülle temasta olan kısmında kan akışı durur. Stigma adı verilen bir çıkıntı yapar, ardından çatlayarak folikül içeriğinin karın boşluğuna dökülmesine olanak sağlar (Ross ve ark., 2003). Ovulasyon anında oosit hızla telofaz ve anafaz aşamalarını geçirerek, birinci mayoz bölünmeyi ya ovulasyondan hemen önce ya da ovulasyon sırasında tamamlar ve bir Sekonder oosit bir tanede polar cisimcik oluşur her ikisi de 23 kromozoma sahiptir ve 2n sayıda DNA içerir, birinci kutup hücresi (polar body) previtellin aralıkta izlenir. Sekonder oosit II. Mayoz bölünmeye girer ve II. mayozun fertilizasyonla tamamlanan stigma LH piki ile balon şeklinde şişer ve 1dk içerisinde yırtılır. Sekonder oosit bir miktar folikül sıvısı korona radiatası ile birlikte periton boşluğuna atılır ve burada tuba uterinanın fimbriaları tarafından yakalanır ve tüp içerisine alınır (Gürsoy ve Ergin, 2007).

Korpus luteum oluşumu

Ovulasyonda sekonder oosit atıldıktan sonra Graff folikülünün kalan kısmında teka interna içeriye doğru çöküntüler yapar. Teka damarları yırtılır ve folikül boşluğuna bir miktar kanama olur; bu kan pıhtılaşır (koagülasyon) ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteum'un en iç kısmını oluşturur. Dolayısıyla oluşan bu yapı "Korpus luteum hemorrhajik" adı verilir. Granuloza ve teka folikülleri büyür ve içlerine lipit ve lutein pigmenti birikir. Lutein sarı renkli bir madde olduğu için oluşan bu yapıya korpus luteum (sarı cisim) adı verilir. Korpus luteum ovaryum'un korteks bölgesinde görülür (Channing ve ark., 1980; Gartner ve ark., 2001; Kierszenbaum, 2002; Sathananthan ve ark., 2006).

Korpus luteumdan az miktarda östrojen ve bol miktarda progesteron salınır. Bu hormonlar uterus endometriyumunun büyümesini ve sekresyon aktivitesini uyarır. Fertilizasyon sonrası ise gelişen zigotun implantasyonu için endometriyumu hazırlar. Eğer gebelik gerçekleşmiş ise korpus luteum gebelik korpus luteumu adını alır ve işlevini gebeliğin 9–10. haftalarına kadar sürdürür. 9–10. haftalardan sonra gerilemeye başlar. Ancak gerilemesine rağmen az miktarlarda salgı aktivitesini korur. Bu aşamada salgıları arasında relaxin denilen hormon vardır. Relaxin uterus kaslarının gevşemesini sağlar. Korpus luteum, hamilelikten ya da ovulasyondan sonra dejenere olur ve yavaş şekilde geriler. Eğer gebelik meydana gelmemiş ise korpus luteum varlığını 10 gün kadar sürdürür ve sonra yok olur. Bu yapıya mensturasyon korpus luteumu adı verilir. Hücreler yağ damlacıklarıyla dolmaya başlar, boyutları küçülür ve otolize gider. Dejenere olan korpus luteumda hücreler arası hyalin maddesi birikmesiyle “Korpus albicans” oluşur (Syrop ve ark., 1999; Gürsoy ve Ergin, 2007).Yok olmasının nedeni plasentadan hCG (human corionic gonodotropin) salınımının olmamasıdır.

2.3. LEPTİN

2.3.1. Leptin Molekülü ve Yapısı

Jackson laboratuvarı 1950’de, önce ob/ob (obez) olarak adlandırılan otozomal resesif bir mutasyon keşfetti ve bu mutasyon; erken yaşlarda ciddi obezite, hiperfaji, diyabet ve enerji tüketiminde azalmaya sebep olmaktaydı. 1953 yılında Kennedy ve ark. spontan obez ratlarda yaptıkları bir çalışma sonucu vücut yağ dokusu depolarının durumunu beyine bildirerek enerji alımını ayarlayan, yağ dokusunda yapılan ve dolaşıma verilen bir faktörün var olduğunu ileri sürdüler ve vücut ağırlığı kontrolünün lipostatik teorisini ilk ortaya atan kişiler oldular. Harvey (1958), ilk defa vücut ağırlığını düzenleyen bir hormonu ve bu hormonun yağ dokusundan salgılandığını deneylerle göstermeye çalışmıştır. 1959’da Hausberger, genetik olarak ob/ob farenin, normal (obez olmayan) farenin kanında bulunan bir madde ile zayıfladığını göstermiş olup bu çalışmada ob/ob farenin, normal farenin kanında bulunan maddeyi üretmediği, bu yüzden hayvanın şişmanladığı belirtmiştir (Ergün, 1999). Daha sonra 1990 yıllarına kadar genetik açıdan şişman sıçanlarda, özellikle otozomal resesif kalıtımla geçen ob ve db (diabetik) genlerindeki mutasyonlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Fridman ve Zhang (1994), uzun süren yağ hücresi kültürü çalışmaları sonucu ob-genini izole ettiler. Leptinin ob-gen tarafından yağ hücresinde üretildiği ve plazmada belirli bir kan seviyesi oluşturduğu ilk defa aynı ekip tarafından bildirildi, ob-genin yokluğunda farenin ağırlığının iki katına çıktığı gösterildi. Üzerinde geniş incelemeler yapılan, yağ hücresinden salgılanan ve kan yoluyla merkezi sinir sistemine ulaşarak reseptörü aracılığıyla etkide bulunan leptin, 16 kDa ağırlığında, 167 amino asitli globular yapıda olan polipeptit tabiatlı bir hormondur (Zhang ve ark., 1994). Yunancada ince, zayıf anlamına gelen “*leptos*” kelimesinden türetilmiştir (Aurwerx ve Staels, 1998; Moran ve Phillip, 2003; Ahima ve Osei, 2004; Zhang ve ark., 2005) ve *ob* geninin bir ürünü olan leptin hipotalamik-hipofiz eksenleri düzenleyen bir hormon olarak kabul edilmektedir (Lancet 1998).

2.3.2. Ob geni

Ob geni ilk olarak Jeffrey Friedman ve ark. (1998) tarafından Rockefeller üniversitesinde 8 yıl süren araştırmalar sonrası 1994 yılında klonlanmış ve analizi yapılmıştır (Zhang ve ark., 1994). *ob* geninin *ob/ob* sıçanlarda 6. kromozomda yerleşik olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda ise 7. kromozomun uzun kolunun 7q31.3 lokusunda lokalizedir ve kemirgen hayvanlarla benzerdir. Bu genin DNA'sı 1500 baz çifti içerir ve protein sentezini yöneten ana kodlama bölgelerini kapsayan 3 ekzona ve 2 introna sahiptir (Prolo ve ark., 1998). Spontan *ob/ob* (genetik olarak obez) sıçanlarda bu hormonun eksik olduğu, spontan obez *db/db* sıçanlarda ise etkisiz olduğu gösterilmiştir (Üçkaya, 1999). Zhang ve ark. (1994) tarafından *ob/ob* sıçanların klonlanmasıyla yapılan bir çalışmada spontan obez sıçanlardaki *ob* geninin, insandakiyle homoloğu tespit edilmiş ve bu genin ürünü olan leptin adlı hormonun varlığı tanımlanmıştır. İnsan leptininin %84 farelerle, %83 sıçanlarla homologtur.

2.3.3. Sentez ve Salınması

Leptin esas olarak beyaz yağ dokusunda adipositlerce sentezlenip salınmakla beraber (Zhang ve ark., 2005) plasentadan, mideden, meme dokusundan, kemik iliğinden, bağırsaktan, ovaryumlardan ve testislerden (Moran ve Phillip, 2003) salınmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kahverengi yağ dokusundan da leptin salındığını gösteren kanıtlar ortaya konmuştur. Çeşitli hormonlar ve kimyasal ajanlar,

leptinin sentez ve salgılanmasında düzenleyici olarak görev yapmaktadırlar. Bu ajanlar, leptin mRNA düzeyini azaltarak veya arttırarak etkilerini gösterirler (Zhang ve ark., 2005). Steroid hormonların, insülinin ve noradrenalinin leptin salınmasında uyarıcı etkiye sahip olduğu, melatonin hormonunun ise, leptin üretimini azaltıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir (Ahima ve Osei, 2004; Zhang ve ark., 2005) fakat bunun üzerine çelişkili sonuçlar vardır. Glukokortikosteroidler, beyaz yağ dokusuna etki ederek leptin sentez ve salgılanmasını doğrudan uyarırken, prostaglandin E2 ve araşidonik asit de leptin salınmasını dolaylı olarak arttırmaktadır. Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP) düzeyinin artması, leptin salınımını inhibe ederken, adenilat siklaz uyarıcıları (forskalin ve isoproterenol gibi) leptin salgılanmasını baskılamaktadır (Zhang ve ark., 2005).

Leptin pulsatilitesini etkileyen bilinmeyen faktörler olmakla beraber insanlarda plazma leptin seviyelerinin anlamlı olarak açık bir nokturnal pik varyasyonu ile beraber sirkadiyen ve ultradiyen ritim (bir günde birden fazla döngüsü olan ritim) gösterdiği belirlenmiştir (Mantzoros, 1999).

2.3.4. Leptin'in Etki Mekanizması

Leptinin vücuttaki başlıca rolü, başlangıçta beyin (özellikle hipotalamus) üzerine negatif "feedback" etki ile gıda alımı ile enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemek olduğu düşünülmüştür (Pelleycounter ve ark., 1995), ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar, leptinin insanlarda sadece bir anti-obezite ve doyumluk hormonu olmadığını göstermiştir. Leptinin gıda alımı ve enerji kullanımı üzerine olan etkilerinden başka, birçok fizyolojik olayda (üreme sistemi, anjiogenez, hematopoez, immün sistem, lipit metabolizması, insülin etkisi, sempatik aktivasyon, gastrointestinal fonksiyon ve kemik metabolizması gibi) rol oynadığı gösterilmiştir (Moran ve Phillip, 2003; Zhang ve ark., 2005).

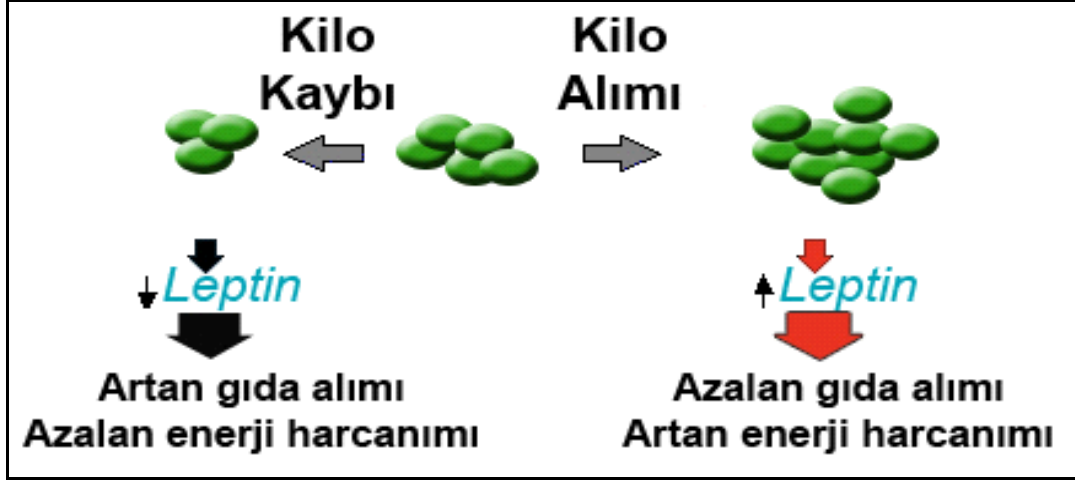
Leptin tüm fizyolojik etkilerini reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Leptin reseptörü (OBR), sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir ve farklı kesimler sonucu en az beş farklı izoformunun olduğu kabul edilmektedir. Bunlar; OBRa, OBRb, OBRc, OBRd, OBRe'dir (Moran ve Phillip, 2003; Ahima ve Osei, 2004; Zhang ve ark., 2005). Bu reseptörlerin N terminalleri aynıdır fakat C terminal bölgeleri farklılık gösterir (Zhang ve ark., 2005). Leptin, dolaşımında hem serbest hem proteine bağlı olarak bulunmaktadır. Leptin hormonunun aktivasyonundan serbest formun sorumlu olduğu

düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir (Sinha ve ark., 1996; Brabant ve ark., 2000). Dolaşımda çözülmüş olarak bulunan OBRe, plazmada leptin bağlayıcı protein olarak görev yapar ve aktif leptinin plazmadaki konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev alır. Leptin ve OBRe anlatımı negatif-geri bildirim mekanizması ile düzenlenir. Plazma OBRe konsantrasyonu fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda leptinden bağımsız olarak kontrol edilir (Moran ve Phillip, 2003; Smith ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2005).

Leptin ve reseptörlerinin birçok periferal dokuda ve sinir sisteminde gen anlatımının olması, leptinin çok fazla fizyolojik etkiye sahip olduğunu gösterir. Leptinin etkileri, merkezi ve periferal olmak üzere iki kısma ayrılabilir. Leptinin merkezi etkilerinde, genel olarak açlık ve tokluk ile üremenin düzenlenmesi ele alınmaktadır. Periferal etkileri arasında otonom sinir sistemi metabolizması, linear büyüme, hematopoez, diyabet, transplantasyon ve onkolojik hastalıklar sayılmaktadır (Moran ve Phillip, 2003).

2.3.5. Obezitede Leptin

Leptinin 1994'de ob geninin bir ürünü olarak keşfedilmesinden sonra obezite alanındaki araştırmalar yeni bir boyut kazanmıştır (Field ve ark., 2003). Leptin hormonu obezitenin görüldüğü durumlarda vücudun kendini bir çeşit savunma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. Obezitenin, vücutta yağ dokusu oranının artması, yani vücutta aşırı miktarda yağ depolanması sonucu açığa çıkan bir hastalık olduğu bilinmektedir (Tüzün, 1995). Dolayısıyla obez insanların yağ doku kitlesi arttıkça, leptin sentezi yükselmekte; doyumluk merkezindeki leptin duyarsızlığına bağlı olarak ise, gıda alımı ve vücut yağ doku kitlesi artmaya devam etmektedir (Şekil 6),(Friedman ve Halas, 1998; Kirel ve Doğruel, 1998).



Şekil 6. Leptinin etki mekanizması görünümü (Montague ve ark., 1997'dan uyarlanmıştır)

Genetik olarak leptin eksikliği bulunan ve şişman olan *ob/ob* farelere leptin verildiğinde; fiziksel aktivitelerin arttığı, yiyecek alımlarının azalarak kilo kaybettikleri, adiposit sayısının azaldığı, glikoz intoleransının kaybolduğu ve diyabetlerinin düzeldiği saptanmıştır. İnsanlarda rekombinant leptin ile yapılan klinik deneylerde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalar, yağ dokusunda sentezlenerek dolaşıma verilen leptinin beyindeki doyma merkezini etkilediğini, vücut yağ dokusu kitlesini ve vücut ağırlığını düzenlediğini düşündürmüştür. Ancak bazı şişman insanlarda, şişman olan *ob/ob* farelerin tersine leptin düzeylerinin yüksek olarak saptanması, şişmanlarda leptin etkisinin yetersiz olduğunu ya da bir direncin var olabileceğini akla getirmiştir (Taşçı, 2007).

Leptin duyarsızlığının nedeni, leptin reseptörlerinde ve post-reseptör fonksiyonunda bir bozukluğun ve/veya leptin hormonunun kan-beyin bariyerini geçişini sağlayan taşıyıcı proteinlerin fonksiyonlarındaki bir aksaklığın şekillenmesidir (Meier ve ark., 2002; Ziylan, 2003). Obezite tedavisinde en sık önerilen ilaçlar iştah baskılayıcı ajanlar olmuştur. Serotonin agonistleri, sempatomimetikler ve yakın zamanda leptin gibi çeşitli ilaç sınıfları kullanılmıştır (Aslan, 2010).

2.3.6. Leptin ve Oksidatif Stres

Obezite gen ürünü olan leptinin çeşitli metabolik etkilerinin yanı sıra oksidan/antioksidan dengenin düzenlenmesinde de rolü olduğu ileri sürülmektedir. Fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmada en fazla hidrojen peroksit (H_2O_2) üretiminin yağ dokusunda olduğu ve oksidatif stresten esas sorumlu olduğu

gösterilmiştir (Furukawa ve ark., 2004). Leptinin serbest yağ asidi oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu tetikleyerek bu etkilere yol açtığı ve reaktif oksijen ürünlerinin de leptinin vücuttaki diğer etkilerinin ortaya çıkması için tetikleyici sinyalleri taşıyan ikincil haberciler olduğu ileri sürülmektedir (Bouloumie ve ark., 1999). Obezite gibi hiperleptinemik durumlarda leptinin pekçok mekanizma ile oksidatif stresi artırabildiği gözlenmiştir (Watson ve ark., 1999). Diğer yandan leptin eksikliğinin antioksidanlardaki yetersizlikle birlikte olması da söz konusudur (Dinçer ve Gülen, 2010). Antioksidan enzim olan (katalaz ve glutatyon peroksidaz) aktiviteleri *ob / ob* farelerde çok düşük bulunmuştur ve bu etkiyi leptin tedavisi normalize etmiştir (Watson ve ark., 1999).

2.3.7. Leptin'in İnfertilite Üzerine Etkisi

İnsanlarda (Agarwal ve ark., 1999; Lofer ve ark., 2001) ve kemiricilerde (Duggal ve ark., 2000; Ryan ve ark., 2002) ovulasyon ve over steroidogenesisin üzerinde leptinin köklü etkisi göz önüne alındığında, obeziteden dolayı etkilenen leptinin yüksek konsantrasyonunun PCOS patogenezinde ve üreme bozukluklarında bir rol alacağı speküle edilebilir. Kemirgenlerde leptin, iştah ve enerji harcanması ile ilgili olarak negatif etkiye sahiptir ve fertilitiyi ilerletir (Moran ve Phillip, 2003; Ahima ve Osei, 2004). Leptinin insanlarda FSH, LH, adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortizol ve büyüme hormonu düzeylerini etkilediği bildirilmekte iken FSH ve LH'nin sentez ve salınmasını uyarmaktadır (Ahima ve Osei, 2004).

Leptin geni mutant olan *ob/ob* fareler doğuştan leptinden yoksun ve infertildir (Moran ve Phillip, 2003). Bu farelerde doyma hissi oluşmaz ve hiperfaji görülür; sonuçta obezite, insülin direnci ve infertilite gelişebilir. *ob/ob* olan dişi farelere leptin uygulandığında serum LH düzeyinin yükseldiği, ovaryum ve uterus ağırlıklarının arttığı belirlenmiştir ve dişi üreme yolunun olgunlaşmasını hızlandırıp üreme faaliyetinin daha önce başlamasına yol açar ve fertilitate sağlanabilmiştir. Bununla birlikte, leptin uygulanan erkek *ob/ob* farelerin FSH düzeylerinin, testis ve seminal bezlerin ağırlığının, seminal vesikülün epitel yüksekliğinin ve sperm sayısının da kontrollere göre arttığı gözlenmiştir. Elde edilen bilgiler leptinin her iki eşeyde de üreme sistemini uyardığını ve normal bireylerde de üremenin devamından sorumlu olduğunu destekler niteliktedir (Barash ve ark., 1996; Moran ve Phillip, 2003).

Obezitenin subfertiliteyi arttırmasının mekanizmaları çeşitlilik arz etmektedir. Öngörülen mekanizmalardan bir tanesi yağ dokusundan leptin salınımında artış olmasıdır. Leptin hipotalamustan salınan nöropeptid Y aracılığı ile kontrol edilmektedir (CASRM, 2008) teka ve granuloza hücrelerinde reseptörleri mevcut olup overdeki steroidogenezi (hormon yapımı) inhibe eder (Ola ve Ledger, 2006). Yüksek leptin konsantrasyonlarının dominant folikül gelişimi üzerinde etkilediği ve estradiol üretimini baskıladığı ihtimali mevcuttur. Leptin aynı zamanda puberte başlangıcının düzenlenmesinde de önemlidir. Çok zayıf kadınlarda genelde ovulasyon durur ve anormal derecede zayıf yetişkin kadınlar, daha ağır olan benzerlerinden daha geç puberteye girer, bu da yağ dokusunun üremeyi düzenleyen bir sinyal üretebileceğini göstermektedir. Bu faktör leptin olabilir.

Kadınlardaki leptin konsantrasyonu genellikle erkeklerden daha fazla seviyelerde olması nedeniyle adipoz doku ve üreme sistemi arasındaki etkileşimin farklı cinsiyetlerde androjenik ve östrojenik hormonlar aracılığı ile farklı yollarla oluşabileceği öne sürülüyor (Licinio ve ark., 1998; Casabiell ve ark., 2001). Ancak yapılan bir başka çalışmada ise, bunun sebebinin cinsiyet hormonlarındaki farklılık değil, erkeklerde görülen santral (visseral) android yağ dokusunun, kadınlarda görülen periferik jinekoid yağ dokusundan daha az leptin üretmesi olduğu bildirilmektedir (Mantzoros ve Moschos, 1998; Mantzoros, 1999; Ülgey, 1999; Hekimoğlu, 2006).

Kadınlardaki leptin seviyeleri menstrüel siklus esnasında değişim göstermektedir. Leptin seviyeleri ovulasyonda en yüksek seviyelere çıkmakta, luteal fazda yüksek kalmakta ve mestruasyondan önce düşmektedir (Hardie ve ark., 1997; Quinton ve ark., 1999). Dünyada bu tip bozuklukların görüldüğü üç aile vardır ve bunlardan biri de Türkiye'dedir (Ahima ve Osei, 2004). Obez çocukların yüksek leptin seviyesine rağmen ergenliğe girememesinde, leptin-hipotalamus-üreme sistemi yolu arasındaki hormonal geri bildirim sinyal yolunun bozulmasının (Andreelli ve ark., 2000) ve hipotalamusta gelişen leptin direncinin (Moran ve Phillip, 2003) neden olduğu düşünülmektedir.

İştahın ve üreme fonksiyonlarının hormonal olarak kontrol edildiği hipotalamusta yer alan ventromedial ve arkuat nükleuslarda leptin reseptörlerinin bulunması da, leptinin üreme fonksiyonlarındaki olası rolünü destekler niteliktedir (Moran ve Phillip, 2003; Ahima ve Osei, 2004). Leptin reseptörü mRNA'sı insan

ovaryum ve testislerinde (Andreelli ve ark., 2000) ölümsüz GnRH nöronlarında ve ovaryum granüloza hücrelerinde tespit edilmiştir (Moran ve Phillip, 2003). Leptinin gonadlara doğrudan ve dolaylı etkilerinin olduğu bilinmektedir. İnsan seminal plazmasında leptin ve çözülmüş leptin reseptörü, spermatozoanın kuyruğunda ise leptin reseptörü tespit edilmiştir (Jope ve ark., 2003).

Sonuç olarak önceleri enerji dengesi ve vücut yağ dağılımı üzerinde etkili bir hormon olarak tanımlanan leptinin günümüzde fetal büyümeden pubertal gelişmeye, hematopoezden iskelet sistemi gelişimine kadar fizyolojik fonksiyonlardaki rolü araştırılmaktadır ve fizyopatolojik olaylardaki bilinmeyen yönleri yapılmakta olan çalışmalarla önümüzdeki yıllarda açıklığa kavuşacaktır. Son zamanlarda, leptinin üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde rolü olabileceği düşünülerek, bu konudaki çalışmalar yoğunlaşmıştır.

2.3.8. Leptin ve Melatonin

Yaşam tarzı biçimi leptin seviyelerini kontrol etmede önemli iken, kilo verebilmek için bireylerin leptin seviyelerini düşürücü destekler almaya ihtiyaç duyabilirler. Araştırmacılar bu, kiloyu kontrol eden hormon seviyelerini düşürebilecek besin desteklerinin varlığını araştırmaktadırlar. Melatonin, leptinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Her iki hormon birlikte hareket ederek vücut ağırlığının ve enerji dengesinin düzenlenmesinde etkili olur. Buna ek olarak, yakın zamanda leptinin sentezlendiği adipozitlerde melatonin reseptörlerinin varlığı tespit edilmiştir (Alonso-Vale ve ark., 2005). Blask ve ark. (1999), melatoninin adipozitler üzerinde direk etkisi olabileceğini ve melatoninin fizyolojik seviyelerinin melatonin reseptörü yardımıyla yağ asidi taşınımını bloke ettiği raporlanmıştır. Leptinin adipozitlerde besin döngüsüne yanıt olarak üretildiği bilinir (Wang ve ark., 1998). Bu yüzden melatonin, adipozitlerdeki yağ asidi taşınımını bloke ederek dolaşıma leptin salımını azaltabilir. Pinealoktomy sonrası, adipozitlerdeki yağ asidi taşınımının artışa bağlı olarak dolaşımdaki leptin salımını artırabilir.

Baydaş ve ark. (2001), sıçanlarda, pinealektomi ile leptin salınımının arttığını eksojen melatonin uygulaması ile leptin salınımının azaldığını hem sağlıklı (Canpolat ve ark., 2001) hem de obez sıçan modellerinde (Wolden- Hanson ve ark., 2000) göstermiştir. Melatoninin leptini azaltıcı etkisi sadece sıçanlar üzerinde kullanılan bir

çalışmada gözlenmiştir (Rasmussen ve ark., 1999). Ancak hala melatoninin leptin üretimi üzerinde azaltıcı ya da artırıcı etkisinin olup olmadığı kesin değildir.

2.4. MELATONİN

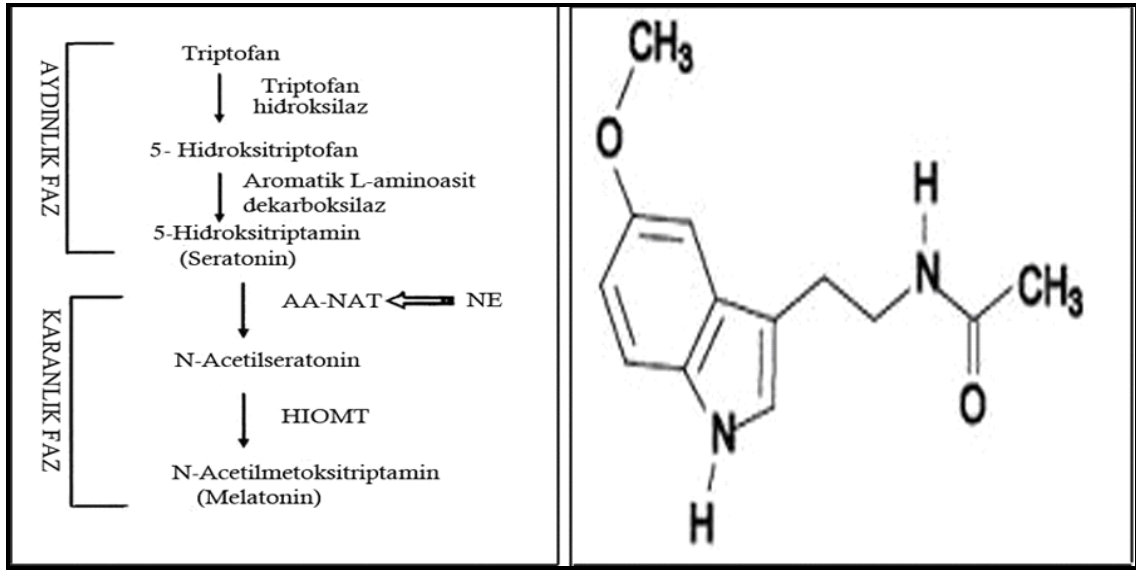
2.4.1. Melatonin ve Yapısı

Melatonin, beynin tabanında bulunan kimi kaynaklara göre 100-150 mg ağırlığında kimi kaynaklara göre de bezelye büyüklüğünde küçücük bir salgı bezi olan pineal veya epifiz de denilen bezden salgılanan bir hormondur ve hipotalamustaki suprakiazmatik nukleusun kontrolü altında çalışır. Yazıcı ve Köse'nin (2004) bildirdiğine göre pineal bez, yaklaşık üç yüz yıl önce Fransız filozof Descartes tarafından “ruhun tahtı” olarak tanımlanmış, ancak melatoninin pineal bezden salgılanmasının ilk olarak keşfi 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından gerçekleştirilmiştir. Sığır pineal bez ekstrelerinin, kurbağa deri rengini açtığını gözleyen Lerner, melanin granüllerinin agregasyona uğradığını belirlemiş ve ekstrelerden izole ettiği bu maddeye melatonin adını vermiştir (Lerner ve ark., 1958; Brzezinski, 1997). Melatoninin bu dönemde tanımı “*melanophorecontracting hormon*” olarak yapılmış ve gerek kurbağa derisindeki **melanofor**ların beyaz görünüşüne neden olduğu için ve gerekse serotoninden türediği için bu isim verilmiştir (Hardeland ve ark., 2006). Lerner ve ark., bu maddeye yunanca melas: karanlık ve tonein: baskılama kelimelerinden oluşan melatonin adını vermişlerdir (Lerner ve ark., 1958).

2.4.2. Sentez ve Salınması

Melatonin, memelilerin beyinde serebral yarıküreler arasındaki pineal bezden ve ayrıca over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur (Reiter ve ark., 1995). Salınımı geceleri pineal bezden olurken, gündüzleri sindirim kanalından özellikle gıda alımı sonrası gastrointestinal mukozada olur ve enteroendokrin hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Gupta ve Spessert (2007)' e göre melatonin omurgalıların hepsinde triptofan amino asidinden sentezlenmektedir. İlk önce triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksi triptofana, sonra aromatik L-amino asit dekarboksilaz enzimiyle 5-hidroksitriptamin yani serotonine dönüşür. Triptofan hidroksilaz, serotonin sentezinde hız sınırlayıcı enzimdir. Serotonin AA-NAT (Arylalkylamine-N-acetyltransferase)

enzimiyle N-acetylserotonin formuna dönüştürülür. Son olarak N-asetylserotonin HIOMT (hidroksiindole-O-metiltransferase) enzimi aracılığıyla N-asetylmetoksitriptamin'e yani melatonine dönüşür. AA-NAT gündüz oldukça düşük aktiviteyle melatonin salgısını sınırlarken, gece yüksek aktiviteye ulaşır. Sonuç olarak, serotoninin melatonine dönüşüm hızı gündüz pinealositlerde serotonin toplanmasına yol açtığından minimumdur. Karanlık başlangıcında AA-NAT aktivitesi artar ki melatonin sentez hızı düzenlenir (Şekil 7).



Şekil 7. Melatonin biyosentezi ve kimyasal yapısı (N-asetil-5-metoksitriptamin) (Şener, 2010'den uyarlanmıştır)

Sentezlenen melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla salgılanmaktadır, salgılanma hızı 29 mg/gün'dür (Reiter ve ark., 1997). Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Bir günde yaklaşık 30 mg (%80' i gece) melatonin üretilir (Şener, 2010). Araştırmacılara göre, beynin tabanında yer alan epifiz bezi böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır (Yazıcı ve Köse, 2004).

Pineal beze ulaşan, sempatik sinir sonlanmalarındaki başlıca nörotransmitter norepinefrindir. Gün ışığında postganglionik sempatik sinir lifleri yoluyla norepinefrin salınımını baskılar. Karanlığın başlaması ile norepinefrin salınımı artar. Norepinefrin hem triptofanın dolaşımından beze girişini artırmakta, hemde pineal bezdeki alfa ve beta adrenerjik reseptörleri etkileyerek, pinealosit membranındaki adenilat siklazı aktive

eder. Böylece sitoplazmada cAMP ve NAT düzeyi artar ve bu durum melatonin sentezinde artışa neden olur. Melatonin sentez ve salımı arttıkça hormon dolaşıma pasif difüzyonla geçmektedir (Reiter, 1991, Brzezinski, 1997; Boutin ve ark., 2000).

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde olmaktadır. Karaciğerde melatonin mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonin'e dönüştürülür. İndol halkasının 6. konumundan hidroksile olan melatonin, daha sonra sülfat ve glukronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır (Hardeland, 2006). Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimeleatonin olup, plazma melatonin düzeyinin iyi bir göstergesidir. Diğer metaboliti ise; N1-acetyl- N2-formyl-5 methoxykynuramine (AFMK) molekülüdür (Brezezinski, 1997).

Dolaşımdaki melatoninin, %50-75'i geri dönüşümlü olarak albümin veya alfa-asit glikoproteine bağlanarak dolaşır. Melatoninin yarı ömrü 30 ile 60 dakikadır. Dışarıdan verilen melatoninin yarılanma ömrü ise daha kısa olup 12 ile 48 dakika arasındadır, endojen melatonin gibi aynı yolları kullanarak metabolize olur (Çam, 2003). Doğumdan itibaren 3 aya kadar çok az olan melatonin salınımı, giderek artmakta ve sirkadiyen doğasını kazanmaktadır. Normal genç erişkinlerde gündüze göre, gece 3-10 kat daha yüksek olan serum melatonin konsantrasyonunun (Reiter, 1993) salgısı sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır (Reiter, 1980). Uyku esnasında salgılanan bu hormon, özellikle 23 ile 05 saatleri arasında en yoğun salgılanmaktadır. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3-10 kat daha yüksektir. Bu yoğun salgının gerçekleşebilmesinde ortamın karanlık da olması gerekmektedir (Şekil 8),(Jainudeen 2000; Anonymous 2010b).

2.4.3. Melatonin Reseptörleri

Melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır (Reiter, 1991). Melatonin reseptörlerinin 3 grubu tanımlanmıştır. MT1, yüksek afiniteli, guanozin trifosfat (GTP) bağlama proteinleri ailesinin bir üyesidir. MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur. Bu reseptörler olasılıkla retina işlevine, sirkadyen ritme ve üreme işlevine katılmaktadır (Ebisawa ve ark., 1999; Conway ve ark., 2000). MT2 ve MT3 reseptörleri ise düşük afiniteli, fosfoinositol hidrolizi ile etki

gösterir ancak dağılımları henüz tam olarak belirlenmemiştir (Reppert, 1997; Pintor ve ark., 2001).

2.4.4. Melatonin'in Biyolojik Etkileri

Melatonin'in uyku, yaşlanma, sirkadiyen ritim, duygu durumu, cinsel olgunlaşma ve üreme, kanser, termoregülasyon gibi birçok etkisi olduğu bildirilmiştir (Brzezinski, 1997). Melatonin metabolik değişiklikler, iştah sinyalizasyonu ile dişi üremesinde koruyucu faktörlerin altında yatan fizyolojik ve hücrel mekanizmaların kavranmasında yeni anlayışlar sağlayabilir. Melatonin yağ depolarını azaltarak (Prunet-Marcassus ve ark., 2003) iyi bir yaşam sağlar ve bilinen bir detoksifiye rolünün olmasının yanısıra lipit oksidasyonunu azaltarak üreme üzerinde yararlı etki sağlar. Ancak, melatoninin bu olaylarda rolü belirsizdir ve çelişkili sonuçlar gözlenmiştir.

2.4.5. Melatonin ve Obezite

Melatoninin yağ birikimini azaltarak hem enerji alımı hem de enerji harcanımını, yağ indeksini ve vücut kitlesini etkileyerek obeziteyi önlediği tespit edilmiş (Mustonen ve ark., 2002; Prunet-Marcassus ve ark., 2003), metabolik düzenlemede de rol oynadığı gösterilmiştir (Korkmaz ve ark., 2009b, Tan ve ark., 2011). Uzun süreli melatonin tedavisinin vücut ağırlık artışını, kalori depolama ve gıda alımını düzenlediği gözlenmiştir (Prunet-Marcassus, 2003). Yüksek kalori alımı olan sıçanlarda melatoninin etkisi normal diyet altında tutulan sıçanlardan daha çarpıcıdır. Gıda alımında belirgin bir değişiklik olmadığı halde melatonin ile elde edilen vücut ağırlığındaki düşüşün sebepleri daha detaylı araştırılmalıdır (Mari'a ve ark., 2010). Orta yaşlı sıçanlarda günlük melatonin tedavisi abdominal obeziteyi azaltmıştır. Aynı şekilde melatonin, orta yaşlı erkek sıçanlarda gıda alımı ve total vücut yağından bağımsız olarak vücut ağırlığını, abdominal yağı ve plasma leptin ve insülin seviyelerini baskılamıştır (Wolden-Hanson ve ark., 2000). Bu nedenle, kilo kaybını sağlayan melatoninin etkisi enerji harcamasındaki artışa bağlı olabilir; bazal metabolizma hızında artışa, fiziksel aktiviteye teşvik edebilir.

Genç sıçanlarda da vücut ağırlığı ve viseral yağlanma üzerinde benzer etkiler görülmüştür (Bojkova ve ark., 2006; Kassayova ve ark., 2006). Obezitedeki melatoninin etkileri diyete bağlı obez hayvan modellerinde incelenmiştir (Nishida ve ark., 2002;

Prunet-Marcassus ve ark., 2003; Puchalski ve ark., 2003; Hussein ve ark., 2007; Sartori ve ark., 2009; She ve ark., 2009; Shieh ve ark., 2009; Rios-Lugo ve ark., 2010; Cardinali ve ark., 2011; Nduhirabandi ve ark., 2011) ve bazı çalışmalar gösterir ki obez hayvanlarda nocturnal pineal amplitudu (Cano ve ark., 2008) ve serum melatonin seviyesi (Peschke ve ark., 2006) önemli derecede azalmıştır. Melatonin sıçanlarda hipolipidemik etki gösterir (Hussain ve ark., 2004; Al-Mahbashy ve ark., 2006). Overektomize (Ladizesky ve ark., 2003) ve tip 2 diabetli sıçanlarda (Nishida ve ark., 2002) yüksek yağlı beslenen tavşanlarda (Hussein ve ark., 2007) melatoninin obeziteyi azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Journal of Pineal Research de yayınlanan çalışmalarda, Granada üniversitesinin araştırmacıları, melatoninin gıda alımında azaltma olmadan doğal olmayan kilo alımını kontrol altına almaya yardımcı olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.4.6. Melatonin ve Antioksidan Etki

Melatoninin bir antioksidan olduğu (Korkmaz ve ark., 2009a) literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve ark. tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla bu hipotez desteklenmiştir. Melatonin, birçok doku ve hücrelerin antioksidan profilinin önemli bir bileşenidir (Reiter ve ark., 1999).

Melatonin, lipofilik ve hidrofilik özellikte olması nedeniyle bütün morfofizyolojik bariyerleri geçerek organizmada çok geniş bir alanda antioksidan etki gösterebilmektedir (Reiter, 2003; Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007). Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin tüm intrasellüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikallerin hasarından koruyabilmektedir (Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007). Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan O_2^- , H_2O_2 ve OH^- , NO ve peroksit gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır (Reiter, 1993; Reiter, 2003; Konturek ve ark., 2007). Daha da fazlası, melatonin, hücrelerin pro-oksidan nitrik oksit sentezini hızlandırarak oksidatif zararlara karşı koyma yeteneğini güçlendirir (Pozo ve ark., 1997).

Melatoninin Alzheimer hastalığında amiloid β protein toksisitesini düşürdüğü, parkinson hastalığının çeşitli tiplerinde oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir.

Melatonin, antioksidan etkisini ROS süpürücü ve nötrofil birikimini önlemekle direkt olarak göstermekle beraber, indirekt etkisini ise glutasyon peroksidaz (GSH-Px), superoksit dismutaz (SOD) gibi bazı antioksidatif enzimlerin aktivitesini arttırarak ve lipit peroksidasyonunu engelleyerek göstermektedir (Reiter, 1995). Bilinen en güçlü antioksidan olan melatoninin, değişik dokulardaki koruyucu etkileri halen çeşitli deneysel modellerde araştırılmaktadır.

Melatoninin genomdaki reseptörleri etkileyerek katalaz (CAT), SOD, GPx, glutasyon redüktaz (GRx) ve α -glutamil sisteine sentetaz (GSS) gibi antioksidan enzim sistemlerinin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttıran uyarıcı etkisi vardır. Bu etkileriyle hücreyi oksidatif hasardan korur, inflamasyonu azaltır ve doku ödemi geriiletir (Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007).

2.4.7. Melatonin ve Üreme

Yıllarca melatoninin sadece üreme ile ilgili olduğu ve genel olarak da üreme yeteneğini bastırıldığına inanılmış ancak melatoninin over aktivitesini uyarması nedeniyle üreme fonksiyonunda önemli roller oynadığı, folikülogenez ve ovulasyonu (Zhao ve ark., 2000) düzenlediği gösterilmiştir. Melatonin tedavisi sonrası luteinize hormon düzeylerini baskılaması dikkat çekicidir (Luboshitzky ve ark., 1999).

Epifiz bezin hormonu olan melatonin insan foliküler sıvısında güçlü bir serbest radikal temizleyicidir. Melatonin, vücudun ürettiği doğal bir hormon olup kalitesiz yumurtaya sahip olan kadınlarda yararlı olabilir. Oksidatif hasara karşı yumurtayı korumaya çalışır. Yüksek ROS konsantrasyonları hem parçalanmış embriyo hem de döllenenmiş oositlerde bulunmuş olup bu da melatoninin oosit kalitesini geliştirdiğini göstermektedir. Ovulasyon sırasında, folikül içinde üretilen ROS oosit matürasyonu bozukluğunun bir nedeni olarak düşünülmektedir ve melatonin serbest radikal hasarından korur ve oositlerin fertilizasyon oranını arttırır (Tamura ve ark., 2008).

Araştırmacılar, melatoninin yumurta kalitesini ve doğurganlık oranını arttırmak için muhtemel faydaları olduğuna inanmışlardır (Takazuki ve ark., 2003). Klinik çalışmalarda melatonin kullanımı in vitro fertilizasyonda daha önce gebe kalımında başarısız olan hastalarda oosit kalitesini arttırmak için bir tedavi stratejisi olarak araştırılmıştır (Takazuki ve ark., 2003). Melatoninin günlük 3 mg dozu geçerli faydalar

sağlamıştır. Farelerde (Ishizuki, 2000) melatonin içeren kültür ortamı desteğinin in vitro embriyo gelişiminde faydalı etkileri olduğu rapor edilmiştir.

Kemirgenlerde, (Djeridane ve ark., 1998) LH ve melatonin, hipotalamus ile birlikte hareket ederek GnRH salgısının değişimiyle gonadotropin üretilir (Chan ve Ng, 1995). Melatoninin hamster hipofiz bezlerinden LH ve FSH salgılanmasını baskıladığı gözlenmiştir (Gay ve Tomacarini, 1974; Ozaki ve ark., 1978; Wun ve ark., 1986) Melatonin yokluğunda LH in artması ve FSH in azalması ile gonodotropin salguların salınımı değişir. LH salınımının artması PCOS lularda da gözlenen önemli bir durumdur, bazı hayvanlarda da intertsiyel doku proliferasyonundan sorumlu olabilir (Polson ve ark., 1988; Lobo ve Carmina, 1997).

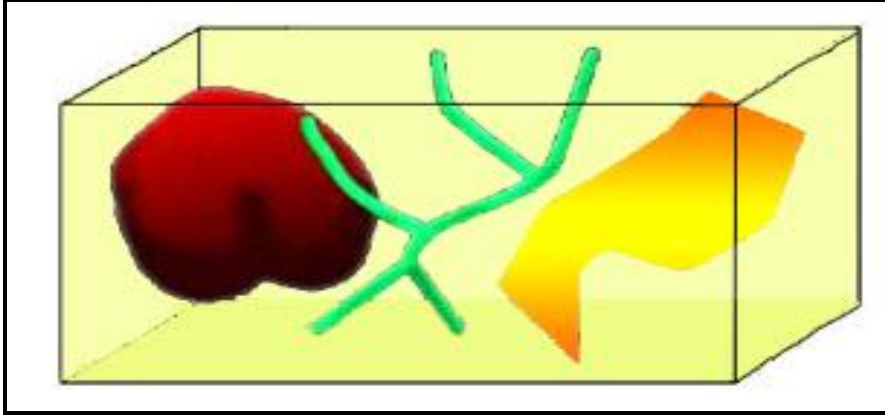
Melatonin verilen dişi sıçanlarda ileri vajinal açılış, bloke ovulasyon ve bozulmuş östrojen döngüsünü göstermiştir (Wurtman ve ark., 1963; Ying ve Greep, 1973; Villanua ve ark., 1989). Münih Fertility and Sterility Dünya Kongresi'nde sunulan yeni araştırmalar melatonin hormonunun kadınların invitro fertilizasyon (IVF) tedavisinde yumurta kalitesini artırmaya yardımcı olabilir olarak bulmuştur. Ekip melatonin tedavisinin kadınların foliküllerinde anlamlı derecede melatonin konsantrasyonunu arttırdığını ve harabiyet veren 8-OhdG konsantrasyonunu azalttığını bulmuştur. Melatonin alan kadınlarda yumurtaların %50'si başarılı bir şekilde döllenmiş, buna karşılık kontrol grubunda bu oran %22,8 olmuştur. Yumurtalar rahime transplante olduğunda kadınların %19'u (56'da 11) gebe kalırken kontrol grubunda oran %10,2 (59'da 6) olmuştur. Melatonin tedavisi her ne kadar oosit kalitesini koruyucu tedaviler gibi birçok terapi için sıkça kullanılan etkili ve faydalı bir destekleyici olsa da (Takasaki ve ark., 2003) zamana dayalı yan etkileri hala belirsizdir ve detaylı çalışma gerektirmektedir.

2.5. STEREOLOJİ

2.5.1. Stereoloji Nedir?

Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan canlı yada cansız yapıların, iki boyutlu düzlemde elde edilen görüntülerinden yola çıkarak geometrik ve sayısal özellikleri hakkında bilgi elde edilmesini sağlayan bir yöntem bilimidir (Şekil 8), (Howard ve Reed, 1998). Bu yöntem bilimi, belli kurallar dahilinde yapılardan elde edilen dilimlerden, histolojik kesitlerin mikroskop altında izlenebilen ya da bu kesitlerden

değişik şekillerde elde edilen görüntülerinden veya bilgisayarlı tomografi yada manyetik rezonans gibi cihazlardan elde edilen radyolojik görüntülerden ilgili yapılar hakkında güvenilir veriler elde etmek için kullanılan bir dizi yöntemi içerir. Stereolojik yöntemler hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi birçok önemli sayısal değere ulaşabilmeyi sağlamaktadır (Gundersen,1986).



Şekil 8. Uzayda üç boyutlu yapıların genel görünümü (Russ ve Dehoff, 1999'den uyarlanmıştır)

2.5.2. Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik Prensipleri

Stereolojide tarafsızlık sözcüğü, plan tabanlı stereolojik yöntemlerin uygulanması ile ortaya çıkan kavramlardan biridir. Tarafsızlık (unbiased), tekrarlayan ölçümler sonucu, örnekleme sayısı arttırıldıkça gerçek değere daha fazla ihtimallikle yaklaşılabilen, yani gerçek değerden istatistiksel bir sapma göstermeyen ölçümleri belirtmek için kullanılan terimdir (Gundersen, 1988). Bazı durumlarda araştırmacı, boyut azalmasına bağlı olarak yapının üç boyutlu özellikleriyle ilişkilendirilmesinde uygun yöntem kullanmayarak tesadüfen doğru sonuçlar elde edebilir. Fakat izlediği yöntemdeki hataların etkilerini belirleyemediği için, sonuçların ne derece gerçeği yansıttığı belirlenemez. Stereolojide, hata kaynaklarından etkilenen ve örnekleme sayısı artsa bile gerçek değerden sistematik sapma gösteren yöntemler taraflı (biased) metodlar olarak nitelendirilmektedir (Gundersen, 1988; Canan ve ark., 2002b).

Etkinlik, stereolojik yöntemlerde tarafsızlık kadar önemli bir kavramdır. Etkinlik prensibi bilimsel çalışmalarda kısa zamanda daha az değişkenlik gösteren güvenilir sonuca ulaşmak olarak özetlenebilir. Stereolojik metodların temelini "Sistemik Rasgele Örnekleme" (SRÖ) stratejisi oluşturmaktadır (Howard and Reed, 1998).

2.5.3. Stereolojik Çalışmalarda Sistemik Rastgele Örneklem

Stereolojik çalışmalarda elde edilen verilerin güvenilir olması ve gerçek değerden sistemik bir sapma göstermemesi için uyulması gereken en önemli noktalardan birisi de örnekleme doğru yapılmasıdır. ‘Sistemik rastgele örnekleme’ terimindeki ‘rastgele’ ve ‘sistemik’ sözcükleri yapılan örnekleme şeklinin kurallarını açık olarak ifade eder. Sistemik sözcüğü, bir ön çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda yani önceden belirlenen sabit bir aralıkla yapının örnekleme şeklini ifade eder. Rastgele sözcüğü ise sistemik olarak tekrarlanan örnekleme her aşamasında ilk elemanın tarafsız yani tesadüfen seçilmesidir (Howard ve Reed, 1998; Canan ve ark., 2002a; Canan ve ark., 2002b). SRÖ, pilot bir çalışmayla belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilk aralık içinden rastgele bir noktadan başlanarak, ilgilenilen yapının tamamının etkin bir şekilde örnekleme şeklini içerir. Örnekleme sistematik kısmını, pilot çalışmayla belirlenen örnekleme aralığı, örnekleme rastgelelik özelliğini ise ilk aralık içinde rastgele bir noktadan başlanması belirler. İstatistiksel açıdan bu tip bir örneklemede, yapının üzerinde örnekleme sayısı ne kadar artarsa gerçek değere o kadar yaklaştığı için homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansı da o kadar artar (Gundersen ve Jensen, 1987).

2.5.4. Stereolojide Toplam Hacim Hesabı: Cavalieri Prensipleri

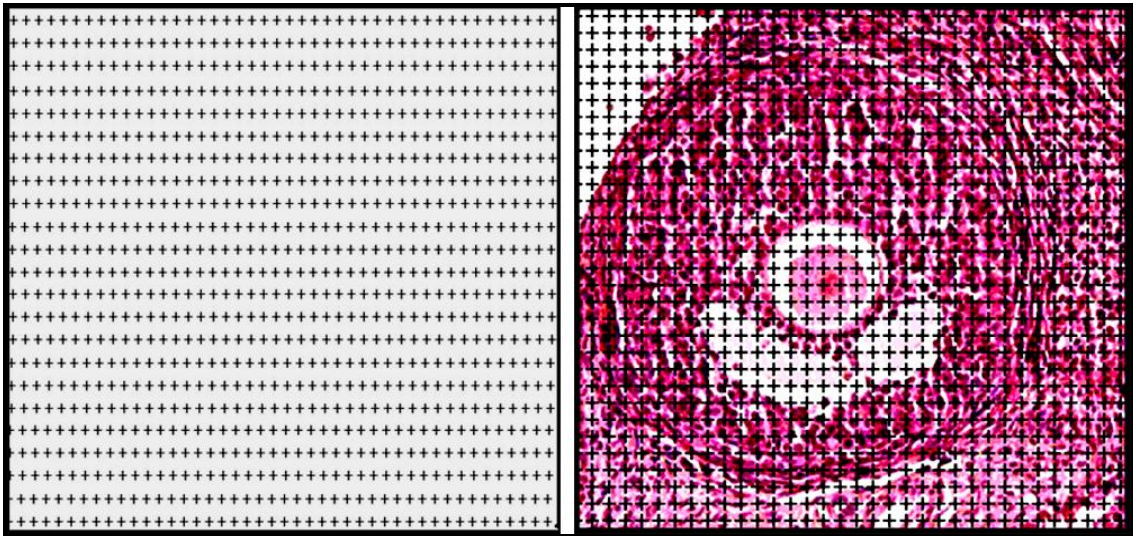
Düzenli bir şekle sahip olan nesnelerin hacimleri (kare, dikdörtgen, küp v.b.) $V=t.a$ (V =Hacim, t = yükseklik, a =taban alanı) formülü ile kolayca hesaplanabilir. Ancak düzensiz şekilli nesnelerin hacim hesaplamalarında ise değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak bilineni Arşimet prensibi’dir. Bu prensibe göre içi su dolu dereceli bir kaba hacmi ölçülecek yapı daldırılır ve yükselen su miktarı ölçülür. Bu yükselen su miktarı yapının hacmini verir. Ancak çoğu zaman bazı madde veya biyolojik yapıları (beyindeki hippokampus, akciğerdeki bronşların tamamı gibi) suya daldırarak hesaplamak imkânsızdır. Hacimleri hesaplanmayan düzensiz şekilli yapıların hacimlerin hesaplanmasında son yıllarda sıkça kullanılan ve İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından 17.YY’da geliştirilen ilk defa matematiksel prensiplerle açıklanan, Cavalieri metodudur. Cavalieri metodu ile düzenli bir şekle sahip olmayan üç boyutlu nesnelerin hacimlerinin birbirine paralel dilimlere ayrılarak her bir dilimin yüzey alanı kalınlığı ile çarpılırsa her bir dilimin hacimi

bulunur. Tüm dilimlerin hacimi toplanarak tüm yapının hacimi hesaplanmış olur (Howard ve Reed, 1998).

$$V = t \times a/p \times \sum P$$

- V** = İlgilenilen kesitin hacmi
P = Kesit yüzey alanlarında sayılan nokta sayısı
T = Ortalama kesit kalınlığı(cm)
a/p = Herbir noktanın gerçekte temsil ettiği alan

Kesitlerde ortaya çıkan yüzey alanını hesaplamak için noktalı alan ölçüm cetvelleri (NAÖC) kullanmak stereolojide sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. NAÖC eşit aralıkta herbirinin temsil ettiği alanı bilinen noktaların dizilimi ile elde edilir. NAÖC de nokta yerine + kullanılır. Noktalar uzayda iki çizginin kesişmesi sonucu elde edilir ve sıfır boyutludur görünmez. Bu nedenle NAÖC'ndeki + ların kollarının kesiştiği köşe yüzey alanı ölçüm hesaplaması amacı ile kullanılan noktadır. Bu noktaların herbiri dört adet noktanın arasında kalan bir birim alanına karşılık gelir ve bu alan a/p ile gösterilir. Bu şekilde oluşturulan noktalı alan ölçüm cetvelinde herbir nokta arasındaki sabit mesafe bilinmektedir. Kesit görüntüsüne düşen toplam nokta sayısı bu birim alan değeri ile çarpıldığında, ilgili kesitin alanı elde edilir. Bu şekilde alan hesabı yapmak basit olduğu gibi istatistiksel olarak da güvenilir sonuç verir (Şekil 9).



Şekil 9. Noktalı alan ölçüm cetveli görünümü (d= 0,4mm)

2.5.5. Stereolojide Tanecik Sayımı: Disektör

Disektör ilk kez 1984 yılında Sterio tarafından tarif edilmiştir. Tanecik, ilgilenilen doku bileşeni olarak ifade edilir. Bu sözcüğün anlamı ve içeriği yapılan çalışmaya göre değişir. Örneğin overdeki granuloza hücreleri ile ilgili bir çalışmada granuloza, sinir hücreleri ile ilgili bir çalışmada ise sinir hücresi tanecik olarak adlandırılır (Howard ve Reed, 1998; Ünal ve ark., 2002c). Disektör, bilinen bir ‘t’ aralığıyla birbirinden optik veya fiziksel olarak ayrılmış iki kesit düzleminden oluşan 3 boyutlu bir hacim sondası olup, sayı parametresinin hesaplanmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ilk defa Cruz- Orive (1980), tarafından kullanılmıştır ve modern plan-tabanlı Stereolojik yöntemlerin ilki olarak tanımlanır. Sterio tarafından önerilen ve disektör sayım yöntemi olarak adlandırılan bu yöntem diğerlerine göre daha basit olmasından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Howard ve Reed, 1998; Kirino, 2000). Disektörün temel mantığı, taneciklerin kesit alma doğrultusu boyunca ilk ortaya çıktıkları veya son görüldükleri kısımları, yani taneciklerin “uçlarını” bulmaktır. Her taneciğin şekli ve yöneliminden bağımsız olarak, bir yönde bir tek ucu olduğu düşünülürse, bu mantıkla iş gören bir metot, gerçek tanecik sayısına ulaşılmasını sağlar.

2.5.6. Fiziksel Disektör

Disektörün ilk ortaya çıkan biçimidir (Sterio, 1984). Bu yöntemde, iki tane ardışık veya birbirlerinden belli bir aralıkla ayrılmış olan iki kesit alınır, bu iki adet iki boyutlu kesit düzleminden birisi ‘örnek’, diğeri ‘gözlem’ kesiti olarak adlandırılır. İki kesit arasındaki mesafe “disektör yüksekliği” adını alır ve yapılan sayım sonucunda, disektör yükseklikleri boyunca örneklenebilen disektör taneciklerinin, yani, tanecik uçlarının sayısı bulunur. Bu da, çalışılan taneciklerin sayısal yoğunluğunu (N_V) verir. Bunun nedeni taneciğin bir başlangıç ve bir bitiş olmak üzere iki ucunun olmasıdır. Uygulamada tek yöndeki uçlardan biri sayıldığında gerçekte taneciğin kendisi sayılmış olur. Tanecik her iki kesitte de mevcut ise sayılmaz. Çünkü bu durum taneciğin devam etmekte olduğunu, taneciğin bitiş ya da başlangıç ucunun henüz görülmediğini ifade eder (Şekil 10),(Howard ve Reed, 1998; Ünal ve ark., 2002b).

Fiziksel olarak kesit alma aşamasında, seri kesit düzlemlerinin birbirlerine paralel olmaları önemlidir. Kesitlerin paralel olmaması, daha sonra belirlenecek disektör hacimlerinin yanlış hesaplanmasına ve dolayısıyla, buradan hesaplanacak tanecik

sayısal yoğunluk hesabının yanlış olmasına neden olacaktır. Disektör sayımı için seçilen bu kesit çiftleri üzerinde belli alanlar sınırlandırılır ve her bir kesit, çiftlerine karşılık gelen alanların bulunması gerekir. Alanlar belirlendikten sonra, sayımların gerçekleştirilebilmesi için, uygun büyüklükteki belli bir bölgenin bir sayım çerçevesiyle sınırlandırılması, disektör sayım metodunun diğer önemli basamağıdır. Tanecik sayısının tarafsız bir şekilde hesaplanabilmesi için, sayım çerçevesinin ve sayımda kullanılan kurallarında önemi büyüktür. Sayım çerçeveleri arasında bilinen en tarafsız kurallara sahip olanı, ‘tarafsız sayım çerçevesidir’.

$$N = \frac{\sum Q^-}{h \cdot \sum a(\text{çer})} \cdot V(\text{ref})$$

N = Toplam tanecik sayısı

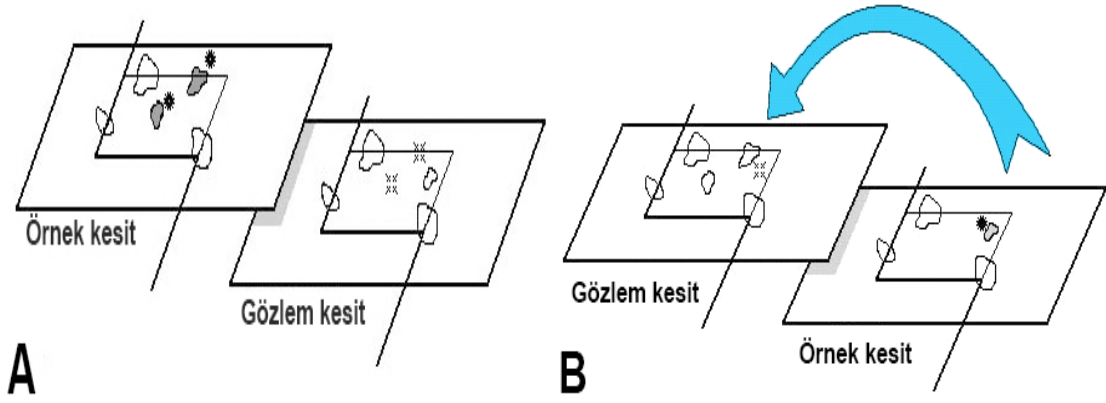
Q⁻ = Disektör taneciklerinin sayısı

H = Kesitler arasındaki mesafeyi (yani disektör yüksekliğini)

a(çer) = Sayımda kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin alanı

V(ref) = Toplam (veya referans) hacmini belirtmektedir.

Eğer bu formülden V(ref) değeri çıkartılacak olursa, sonuçta elde edilecek olan değer, toplam hacim hesaba katılmadığından taneciklerin sayısal yoğunlukları olacaktır. Fakat birçok durumda, sayısal yoğunluk değeri, toplam tanecik sayısı değişimiyle ilgili doğrudan bilgi vermediğinden, özellikle karşılaştırmalı çalışmalarda bu değer kullanılması ve buna bağlı biyolojik yorumlar yapılması sakıncalı olabilmektedir.



Şekil 10. A. Fiziksel disektör uygulamasının şematik şekli. Kesitlerden birisi örnek, diğeri gözlem kesiti olarak adlandırılarak, örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan partikül izdüşümleri, disektör partikülleri (Q) olarak sayılır. **B.** Disektör örneklerinin sayısını artırmak üzere, kesitlerin rolleri değiştirilerek iki yönlü bir disektör sayımı da uygulanabilir

2.5.7. Tarafsız Sayım Çerçevesi

Tanecik sayımı yapmak için tanecik izdüşümlerinden yararlanılan durumlarda, kesitlerde ortaya çıkan tanecik izdüşümlerinin belli bir alanla sınırlandırılarak sayılmaları gerekmektedir. Tarafsız sayım çerçevesi, en genel olarak kullanılan şekliyle, bir kalın ve düz, bir de ince ve kesikli iki tip çizgi ile sembolize edilen dört kenara sahip basit bir dikdörtgen veya karedir. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler “dahil” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Yani kesikli çizgilere rastlayan izdüşümler sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden izdüşümler sayım dışı bırakılır (Şekil 10). Tarafsız sayım çerçevesinin en önemli özelliği, yasak kenarların uzantılarıdır. Bu uzantılar, çerçevenin yerleştirildiği görüntü alanının tamamını kaplayacak şekilde uzatılırlar. Tarafsız sayım çerçevesi, tanecik sayımı için, hali hazırda en etkin ve güvenilir sayım çerçevesidir. Bu çerçevenin tanecik izdüşümlerini en doğru biçimde saymayı sağladığı, geometrik hesaplamalarla da kanıtlanmıştır (Gundersen, 1977). Obezite ve komplikasyonları ile ciddi hastalıklara sebebiyet vermektedir ve bunlardan biri olan infertilite günümüzde araştırmalara konu olmaktadır ve obezitenin ovaryum üzerinde melatonin, leptin melatonin+leptin hormonlarını kullanarak yapılan çalışmalarda sonuçlar halen tartışmalıdır. Bu çalışmada sıçan modelinden elde edilen over üzerinde stereolojik, immünohistokimyasal ve mikroskopik yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Metod

3.1.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Deneklerin Seçimi

Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Çalışma Etik Kurulu'na sunuldu ve 28 Nisan 2011 tarihinde 2011/24 nolu onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde yetiştirilen, Wistar Albino cinsi, 180- 210 gr ağırlığında 7-8 haftalık, 48 adet dişi sıçan kullanıldı. Hayvanların bakımı ve beslenme süreci Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, diğer tüm histolojik ve biyokimyasal analizler ile stereolojik çalışmalar Anabilim dalımızda gerçekleştirildi.

Sıçanlar, deney süresince Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde oda sıcaklığında, 12 saat gündüz 12 saat gece sirkadiyen ritimde, paslanmaz tel kapakları olan plastik kafesler içerisinde, üzeri hava alabilecek şekilde tutuldu. Çalışma başında sıçanlar rastgele kendi içlerinde 8 gruba ayrılıp sekiz farklı grup için bireylerin dağılımları, ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde eşit olarak yapıldı ve 4 grup obez 4 grup da nonobez olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Yüksek yağlı diyetle beslenme süreleri 9 haftaya ulaştıktan sonra VKİ hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi; obez olan gruplar ile, nonobez olan gruplara 42 gün boyunca her gün aynı saatte (16.00-17.00 arası) intaperitonal (i.p.) olarak melatonin, leptin, melatonin-leptin uygulaması yapıldı.

Grupların oluşturulması

Çalışma kapsamına alınan 48 sıçan 8 gruba ayrıldı.

Grup 1: Nonobez kontrol grubu (NK), 15 hafta boyunca standart yem ile beslenen ve üzerinde hiçbir işlem yapılmayan hayvanları içeren grup (n=6)

Grup 2: Obez kontrol grubu (OK), 15 hafta boyunca yüksek yağ içerikli (%40 yağ içeren) diyet ile beslenip obez yapılan hayvanları içeren grup (n=6).

Grup 3: Nonobez-Melatonin grubu (NM), Standart yemle 9 hafta süresince beslenen ve aynı yeme devam ederek 42 gün boyunca i.p. 10mg/kg melatonin uygulanan hayvanları içeren grup (n=6, 16-17 h)

Grup 4: Obez-Melatonin grubu (OM), Yüksek yağ içerikli (%40 yağ içeren) diyetle 9 hafta süresince beslenip obez yapılan ve aynı yeme devam ederek 42 gün boyunca i.p. 10mg/kg melatonin uygulanan hayvanları içeren grup (n=6, 16-17 h)

Grup 5: Nonobez-Leptin kontrol grubu (NL), Standart yemle 9 hafta süresince beslenen ve aynı yeme devam ederek 42 gün boyunca i.p. 1 µg/kg leptin uygulanan hayvanları içeren grup (n=6, 16-17h)

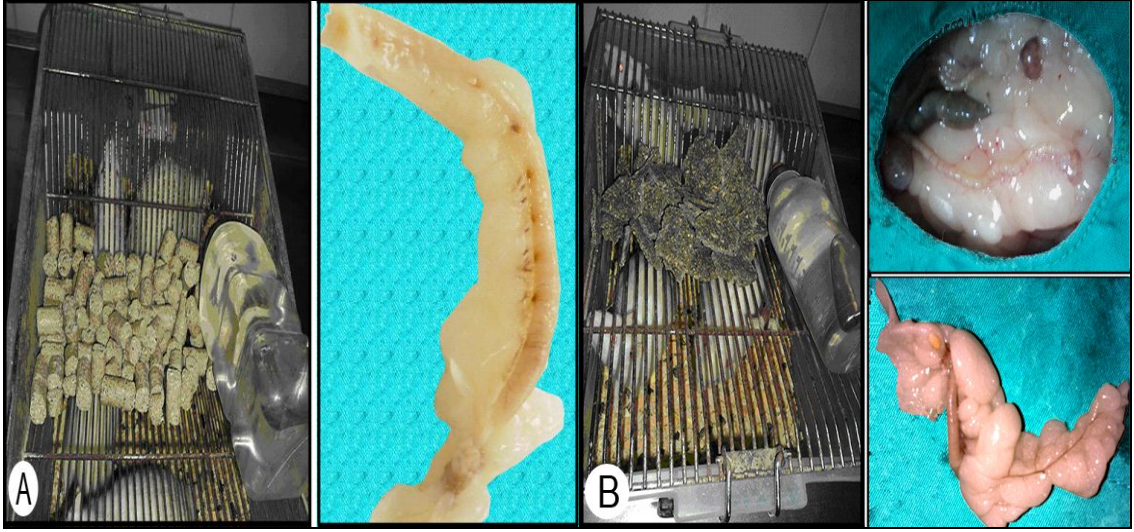
Grup 6: Obez-Leptin grubu (OL), Yüksek yağ içerikli (%40 yağ içeren) diyetle 9 hafta süresince beslenip obez yapılan ve aynı yeme devam ederek 42 gün boyunca i.p. 1µg /kg leptin uygulanan hayvanları içeren grup (n=6, 16-17h)

Grup 7: Nonobez-Melatonin-Leptin grubu (NM-L), Standart yemle 9 hafta süresince beslenen ve aynı yeme devam ederek 42 gün boyunca i.p. 1 µg/kg leptin ve 10mg/kg melatonin uygulanan hayvanları içeren grup (n=6, 16-17h)

Grup 8: Obez-Melatonin-Leptin grubu (OM-L), Yüksek yağ içerikli (%40 yağ içeren) diyetle 9 hafta süresince beslenip obez yapılan ve aynı yeme devam ederek 42gün boyunca i.p. 1 µg/kg leptin ve 10 mg/kg melatonin uygulanan hayvanları içeren grup (n=6, 16-17h)

Yağ oranı %40 olan yem; standart toz sıçan yemine hayvansal yağ ilave edilerek hazırlandı. Hayvansal yağ eritilerek toz sıçan yemi ile karıştırıldı ve karışım pelet haline getirildi, peletler oldukça kuru olduğundan yağı kolayca çektiği gözlemlendi. Sonrasında bu haliyle soğumaya bırakıldı. Yüksek yağlı diyet haftada bir kez taze olarak hazırlandı ve deney grubuna verildi (Altunkaynak ve ark., 2008). Hayvanlar standart ve yüksek yağlı diyet ile beslenirken, su ihtiyaçları çeşme suyundan serbest olarak karşılandı. Deney başlangıcından sonuna kadar sıçanların yağlı diyete uyum sağladığı gözlemlendi (Şekil 11 A-B). Deney başlangıcında tüm sıçanlar tartıldı ve tartım işlemi, deney süresince haftada bir yapılarak kaydedildi. Çalışma, gruplarda herhangi bir ölüm olmadan 48 hayvan ile 15 hafta boyunca sürdü.

Deneyin ilk 9 haftası boyunca süren takip sonucunda her iki gruptaki deneklerin VKİ hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi (Altunkaynak ve ark., 2008). VKİ hesaplamasında; burun ucundan kuyruk başlangıcı arası mesafe boy olarak kabul edildi. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri VKİ formülü kullanılarak hesaplandı ve VKİ sonuçları 5 kg/m²'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi.



Şekil 11. A. Standart diyetle beslenen sıçanların yemleri ve over görüntüsü **B.** Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanların yemleri ve over görüntüsü

Melatonin'in Hazırlanması: MLT (Sigma M-5250), (10mg/kg/ 42gün) %2' lik etanol de çözüldükten sonra steril deiyonize suda çözüldü. Çözüldükten sonra, günlük dozlar ayrı tüplere konuldu ve -20°C de dondurularak saklandı. Günlük doz, uygulamadan önce dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıldı. Uygulamaya 42 gün boyunca devam edildi.

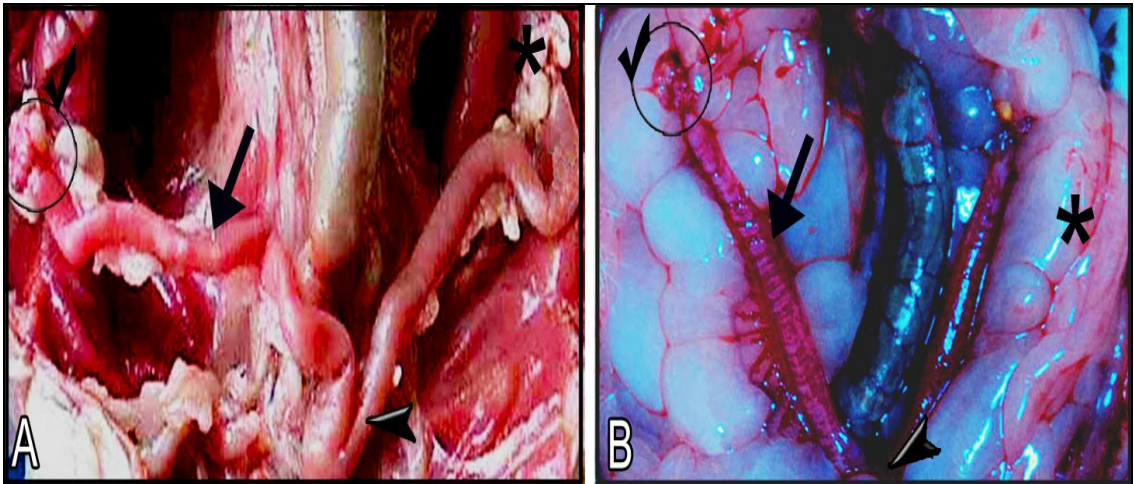
Leptin Solüsyonunun Hazırlanması: Sigma' dan temin edilen 1 L-3772 (OB) mouse recombinant leptin, 100 ml serum fizyolojik içine leptin vorteks yapıldıktan sonra ilave edildi. Hazırlanan solüsyon +4°C de muhafaza edildi. Leptin uygulaması: 1 µg / kg /42 gün

Her bir rat tartılarak, ağırlığı başına gereken melatonin ve leptin miktarı hesaplandı ve 42 gün boyunca, steril şartlarda taze olarak hazırlanan melatonin ve leptin çözeltileri i.p. yol ile her gün düzenli bir şekilde aynı saatlerde (16.00-17.00) enjekte edildi (Şekil 12).



Şekil 12. Sıçanlara intraperitoneal yolla enjeksiyon yapılması

Sıçanlardan 15 hafta süreyle devam eden kalori alımını takiben 15 haftanın sonunda aynı gün içerisinde, i.p. olarak uygulanan %10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) %2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında over doku örnekleri alındı (Şekil 13 A-B). Deneklerden çıkarılan over dokuları hemen soğuk izotonikle yıkanarak kan ve diğer dokulardan temizlendi ve alüminyum folyoya sarılarak buzlu kap içinde üzerinde laboratuvara taşındı. Sağ overler doku biyokimyası analizlerinin yapılacağı ana kadar -80°C 'de saklandı. Histolojik, stereolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için alınan sol overler ise %10 luk formole konuldu.



Şekil 13. A. Standart diyetle beslenen sıçandaki genital organ görüntüsü. B. Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçandaki genital organ görüntüsü. √: Over ; →: Tuba uterina; >: Uterus; *: sırasıyla standart diyetin yapmış olduğu yağlanma ve yüksek yağlı diyetden dolayı oluşan yağlanma

3.2. Materyal

3.2.1. Histolojik Yöntemler

Işık mikroskobu incelemeleri için, over dokuları, %10'luk nötral formalin fiksatifinde tespit edildikten sonra doku takibine geçildi. Daha sonra, alkol serilerinden geçirilerek ksilende saydamlaştırılan parçalar, 58°C'lik parafine gömüldü. Stereolojik analizler için parafin bloklardan Leica mikrotomu aracılığı ile alınan 6 µm kalınlığında kesitler sistematik ve rastgele örnekleme kuralına uyularak 1/15 örnekleme oranıyla, numaralandırılıp ve lamlara alınıp, hematoksilin-eozin (H-E) boya, üçlü boya ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri kesit serilerine uygulandı. Hazırlanan preparatlar Leica ışık mikroskobu ile incelenerek, stereoinvestigator stereolojik analiz çalışma istasyonu ile fotoğrafları çekildi ve fiziksel disektör yöntemi ile folikül sayımı ve Cavalier metodu ile hacimleri ölçüldü.

Tespit ve Doku Takibi

Dokular %10'luk nötralformalinde 72 saat tespit edildi, bir gece akarsuda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek, suları giderildi.

%70 Alkol	1 saat
%80 Alkol	1 gece
%96 Alkol	1 saat
%100 Alkol	1 saat
%100 Alkol	1 saat
Ksilen 'de şeffaflaştırıldı	
Ksilen 1	1 saat
Ksilen 2	1 saat
Ksilen 3	1 saat

56°C- 58°C' de eriyen parafinin ksilen ile yer değiştirerek dokuya nüfuz etmesi sağlandı.

Ksilen / Parafin	(1:1) x 1 saat
Parafin	1 x 1 saat
Parafin	1x1,5 saat

Hemotoksilen-Eozin Boyama

Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış 6 µm'lik örnek kesitler lam tutacağına yerleştirilerek 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 3 değişik ksilende, rehidratasyon işlemi için, %96, %80, %70 etil alkol serilerinde 5 er dakika bekletildi.

Akar su 5 dk

Hematoksilen 5 dk

Akar suda 5 dk

Diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarıldı.

Akar su 5 dk

Eosin 2-3 dk

Akar su 1-5 dk

% 80 alkol 3 dk

% 96 alkol 3 dk

% 100 alkol 5 dk

Ksilen 1,5 saat

Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılıp penset yardımıyla hava kabarcıkları çıkartıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimya

Antijen-Antikor reaksiyonuna dayanan bu boyama yöntemleri ile saptanması zor olan birçok yapı görüntülenebilmektedir. İmmünohistokimyada en önemli rolü oynayan ajan olan antikorlar, dokudaki antijenleri tanımları için kullanılır.

Çalışmamızda antikor olarak polyclonal Rabbit anti-luteinizing hormone/choriogonadotropin (LH/CG) reseptör kullanıldı (rb x-50ug Millipore, 1:500). Folikül sayımı dışında kalan 6 µm kalınlığındaki kesitler immünohistokimyasal çalışmalar için lamlara alındı ve üzerinde Avidin-Biotin (ABC) metodu ile LHR boyaması gerçekleştirildi. Bu boyama metodunda, öncelikle primer antikorun antijene bağlanması gerçekleşir, sonra işaretlenmiş olan sekonder antikor devreye sokulur. Sekonder antikor, primer antikor-antijen kompleksini "antijen" olarak kabul eder ve

bağlanır. Biotin ihtiva eden sekonder antikorun üzerine peroksidaz enzimiyle işaretli avidin-biotin kompleksi ilave edilir. Bu ikili antikor yapısının üzerine substrat kromojen solüsyonu eklenerek doku antijeni görünür hale getirilir (Hsu ve ark., 1981).

Ovaryumda LH reseptörü luteal fonksiyon, ovulasyon ve foliküllerin olgunlaşması için gereklidir, FSH ve östradiol tarafından uygun hormon uyarımını sağlar. LH reseptörü granuloza hücreleri, teka, luteal ve interstiyel hücreler üzerinde mevcuttur (Dufau, 1998). Ovulasyonla atılan folikülün LH reseptörlerine sahip granuloza hücreleri ve teka internal hücrelerinin her ikisi de korpus luteumu oluşturmak üzere LH tarafından aktive edilir. Bu amaçla çalışmamızda, granuloza, teka ve korpus luteum hücrelerinde LH aktivasyonunu göstermek için immunohistokimyasal boyama teknikleriyle LHR' nin işaretlenmesi yapılmıştır.

İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Ksilen ile parafini giderilen ve dereceli alkollerden geçirilen doku kesitleri, distile suda bekletildi. İndirek streptavidin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimya boyaması yapılmadan önce deparafinizasyon işlemi için 37⁰C etüvde 1 gece bekletildi.

Ksilen	4x10 dk
%100 Alkol	10 dk
%96 Alkol	10 dk
%80 Alkol	10 dk
Distile Su	2x3 dk
% 3 H ₂ O ₂	10 dk

Endojen Peroksidazları bloke etmek için parafin kesitlere %3 H₂O₂ uygulandı.

PBS ile Yıkama	2x5 dk
Ficin solüsyonu	15 dk

Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için ficin solüsyonunda. 37⁰C de bekletildi.

PBS ile Yıkama	3x5 dk
Süper block	7 dk

Nonspesifik immünoreaktiviteyi ortadan kaldırmak için kullanıldı.

Antikor Dilüsyonu	2 saat
-------------------	--------

Anti LH antikoru, antibody diluent (Zymed) ile 1/500 oranında dilüe edildi.

İnkübasyon 90 dk

Prepatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisine yerleştirilerek +37°C'de bekletildi ve primer antikorun bağlanması sağlandı.

PBS ile Yıkama 3x5 dk

Sekonder Antikor 30 dk

Preparatlar biotinlenmiş sekonder antikor ile oda sıcaklığında inkübe edildi

PBS ile Yıkama 3x5 dk

Streptavidin Peroxidase 20 dk

Streptavidin-HRP ile preparatlar oda sıcaklığında inkübe edildi.

PBS ile Yıkama 4x1

Substrat-Kromojen (AEC) 30 dk

Preparatlar DAB substrat-kromojen solüsyonunda kırmızı renk oluncaya kadar tutuldu.

PBS ile Yıkama 3x5 dk

Zıt boyama

Boyama öncesinde preparatlar distile su içinde 5 dakika tutuldu.

Mayer-hemotoksilen ile 10 saniye zıt boyama yapıldı (Bu işlem süresince dokular mikroskopta incelenir, eğer çekirdekler yeteri kadar mavileşmemiş ise tekrar hematoksilene girebilir ya da amonyaklı suya batırılarak mavileştirilir).

PBS ile yıkama 3x5 dk

Alkol Serilerinden Geçirilmesi

% 96 Alkol 2 X 3 dk

%100 Alkol 2 X 3 dk

Havada kurut 15-20 sn

Distile su batır 2-3 sn

İmmün boya kapatıcısından 1 damla damlatılarak lamel ile kapama yapılır.

TUNEL boyama

Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling kelimelerinin kısaltmasıdır. DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)

kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Parçalanma sonucu birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ, bütünlüğünü kaybeder açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinukleotidler eklenir. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları digoxigenin konjugatı ile tespit edilir Bu yöntem yaygın olarak "TdT-dUTP nick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılması olan "TUNEL" yöntemi adıyla anılmakta ve tek tek hücrelerde insitu apoptozisi gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir (Gavriel ve Ben-Sasson, 1992; Kressel ve Groscurth, 1994; Aral, 1996; Kockx ve ark., 1998; Yılmaz, 2005; Elmore, 2007).

Apoptotik Hücre Taraması:

Parafin bloklara gömülmüş dokulardan 6 µm kalınlığında kesitler alınarak prepare edildi. Preperatlara üreticinin (Trevigen, Inc. USA) talimatına uygun olarak in situ apoptosis detection kit kullanılarak TUNEL boyaması yapıldı ve ışık mikroskopunda (Olympus) incelendi.

TUNEL Boyama Prosedürü

Kesitler, deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C etüvde tutulur

1- Kesitler soğuduktan sonra 2X30 dk ksilende tutulur

Gerekli bilgiler lamın üzerine kurşun kalemle yazılır

2- Kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lik etil alkolde 2'şer dk tutulur

3- Kesitler PBS ile 5 dk yıkanır

Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.

4- Kesitler 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu ile 15 dk oda sıcaklığında tutulur

5- PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır

6- Endojen peroksit blokajı yapılır (%3 H₂O₂) (5 dakika)

7- PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır

8- Equilibration tampon solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında yıkanır

9- Her kesit için 100 µl TdT solüsyonu hazırlanarak (77 µl reaksiyon tampon solüsyonu + 33 µl TdT), kesitler üzerine damlatılır

10- TdT konmuş kesitler üzerine plastik lamel konularak 37°C'de 1 saat bekletilir

- 11- Reaksiyon durdurma tampon solüsyonu hazırlanarak (1 ml Stop washing buffer + 34 ml distile su) 10 dk oda sıcaklığında yıkanır
 - 12- Anti-digoxigenin konjugatı ile 30 dakika oda ısısında bekletilir
 - 13- PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır
DAB solüsyonu damlatılır, 5-10 dk kapalı nemli kutuda bekletilir.
 - 14- PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır
 - 15- Distile su ile yıkanır
 - 16- Mayer'in hematoksileni ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 1-5 dk boyama yapılır
 - 17- Distile su ile yıkanır
 - 18- Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 1'er dakika bekletilir
 - 19- Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilende şeffaflaştırılır
- Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kesitler kapatılır.

3.2.2. Biyokimyasal Analiz Yöntemi

Biyokimyasal analizler OMÜ Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında yapıldı. Biyokimyasal analiz sırasında, öncelikle alınan doku örneklerinin homojenizasyonu sağlandı.

Biyokimyasal Ölçümler

Over Doku Homojenatlarının Hazırlanması:

Biyokimyasal analizler için alınan sağ over doku örnekleri soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, buz içeren kapta laboratuvara taşınarak analize kadar -80°C' de muhafaza edildi. Analiz edilmek üzere yaş ağırlıkları 0,05 gr olarak ayarlanan dokular, soğukluğu muhafaza edilerek yağları ilk önce tartılıp temiz cerrahi makasla sonra dokudan ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üstüne 3 ml fosfat tamponu (0,5M; pH:7,0) eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku, homojenizatörde (Heidolph slientcrusher), 16000 rpm'de, 3 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenatlar 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan CAT, MPO enzimleri spektrofotometrik olarak çalışıldı. Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar ya taze ya da

stok olarak hazırlandı. Kullanılmayan stok solüsyonlar derin dondurucuda muhafaza edilirken, dilüsyonla hazırlanan solüsyonlar buzdolabında +4⁰C’de saklandı.

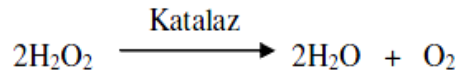
Katalaz Aktivitesinin Tayini

CAT, doğada özellikle bitkilerde bolca bulunan ve H₂O₂’yi indirgeyen veya parçalayan, peroksizomların ise yapısal bir bileşeni olan oksidaz enzimlerinden biridir (Higashi ve ark., 1974; Halliwell ve ark., 1990). CAT’ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, hidrojen peroksit ve ROOH gibi peroksitlerin, özellikle membranlarda zamanla oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Çünkü hidrojen peroksit, single oksijen ve hidroksil radikalının potansiyel kaynağıdır (Huang ve ark., 1983).

CAT, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak kullanılmaktadır (Lanir ve Schejter, 1975; Jones ve Masters 1976). CAT, H₂O₂’ i parçalayan bir enzim olduğundan, H₂O₂’ in kullanıldığı ve aşırısının ortamdaki uzaklaştırılmasının gerekli olduğu tüm proseslerde kullanılabilir. Ancak enzimin bu işlem koşullarında aktivite gösterebilmesi gereklidir.

Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Over dokusundaki katalaz aktivitesi ölçümü, Aebi (1994) metodu ile yapıldı. Bu metodun ölçüm prensibi, doku homojenatında bulunan CAT enziminin dışarıdan eklenen H₂O₂’yi parçalaması ile 240 nm’de H₂O₂’nin absorbansında zamana bağlı olarak oluşturduğu azalmanın belli aralıklarla ölçülmesi esasına dayanır. Ölçümler 30 sn’lik aralıklarla 60 sn boyunca yapıldı. İstatistik hesaplaması için absorbans azalmasının en fazla olduğu aralıktaki değerler kullanıldı.



Deneyin Prensibi: Hidrojen peroksidin CAT tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile CAT aktiviteleri tayin edilmiştir. CAT aktivitesi tayini için iki tüp alındı, kör ve numune tüpü olarak ayrılan bu tüplerden kör tüpüne 0,01ml 30 mM H₂O₂ ilave edildi ve üzerine 2,99 ml PBS eklendikten sonra spektrofotometrede 240 nm’de 30. saniye ve 60. saniyedeki absorbans değerleri okundu.

Numune için kullanılan tüpe 2,99 ml H₂O₂ konuldu ve üzerine 0,01 ml örnek eklenerek 240 nm'deki 30. saniye ve 60. saniyedeki absorbanları okunarak absorban azalması bulundu ve k değeri aşağıdaki şekilde hesaplandı (Bradley ve ark., 1982).

$$U = (2,3 / \Delta t) \times (\log A_1 / A_2) \times (a / \text{gr doku})$$

A₁: 240 nm deki 30 sn. deki başlangıç absorbanı (t₁=30)

A₂: 240 nm deki 60. sn' deki absorbanı (t₂=60)

a: dilüsyon faktörü

Bir Ünite (U) CAT, özel koşulların sağlandığı durumlarda 1 µmol H₂O₂/dk ayrıştıran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Sonuçları standardize etmek için; veriler U/gr enzim aktivitesi olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Katalaz aktivitesini ölçmede kullanılan ölçüm değerleri

ÇÖZELTİLER	KÖR	NUMUNE
SUPERNATANT	-----	0,01 ml
PBS (ph=7)	2,99 ml	----
H ₂ O ₂ li PBS	0,01 ml	2,99 ml

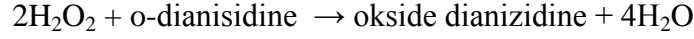
Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini

Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerinde, bir hem enzimi olan MPO ihtiva ederler. Polimorf nötrofil lökositlerin %90' dan fazlasını oluşturan nötrofiller; kompleman fragmanları, HO, reaktif oksijen radikalleri, ve sitokinler tarafından aktive edilirler. Dokuya gelen aktive lökositler MPO, elastaz, proteaz, kollojenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olur. İnflamasyon durumunda MPO ekstrasellüler ortama salınır. Bu nedenle nötrofil sekestrasyonunun göstergesi olarak MPO aktivitesinin ölçülmesi duyarlı bir testtir (Krawisz ve ark., 1984).

Miyeloperoksidaz Ölçümü

Ovaryum dokusundaki miyeloperoksidaz aktivitesi over homojenatları oluşturularak Bradley ve ark'ın tariflediği şekilde ölçüldü (Bradley ve ark., 1982).

Deneyin Prensibi: Bu tekniğe göre over buz soğukluğunda potasyum fosfat tamponu ile (pH:6.0) homojenize edildi. Homojenat 3 kez freeze low döngüsüne tabi tutuldu ve süpernatant kısmı 5 dk boyunca 5000 devirde +4⁰C'de santrifüj edildi. O–Dianisidin–H₂O₂ buffer süpernatanta eklendi ve absorbands değişikliği (c=410 nM) 1 dk boyunca ölçüldü. 1 MPO aktivite ünitesi 1 dk'da degrade olan 1 mMol H₂O₂'e karşılık gelmektedir. Sonuçlar gram doku başına enzim aktivite ünitesi (U/g doku) olarak saptanmıştır.



Miyeloperoksidaz Ölçümü İçin Gerekli Olan Tampon ve Substratların Hazırlanması: pH' sı 5,4 olan 160 mM potasyum fosfat tamponuna birkaç damla K₂HPO₄ eklenmesiyle pH 6 ya ayarlandı. Serum örnekleri aşağıdaki gibi hazırlanarak spektrofotometrede köre karşı okutuldu. Doku MPO ölçümü, hidrojen peroksinin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianosidini redüklemesi ve redükte o-dianosidin ilk okunan değeri ve 60.sn de okunan değerinin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanılarak yapıldı. Sonuçlar spesifik aktivite, ünite/gr doku olarak hesaplandı.

Tablo 3. Miyeloperoksidaz aktivitesini ölçmede kullanılan ölçüm değerleri

ÇÖZELTİLER	KÖR	NUMUNE
PBS (ph=6)	2 ml	1,9 ml
Supernatant	----	0,1 ml
O–Dianisidin	1 ml	1 ml

Miyeloperoksidaz Sonuçların Hesaplanması:

Ölçülen absorbands değerleri aşağıdaki denkleme göre değerlendirilerek sonuçlar elde edildi.

$$U = \frac{\Delta A (A_2 - A_1) \times 1 \text{ gr doku}}{\Delta t}$$

ΔA =1 dakika boyunca ölçülen absorbans değerlerinin farkı

Formülü ile hesaplanarak miyeloperoksidaz birimi $\Delta A/\text{dk}/\text{gr}$ doku olarak ifade edildi.

3.3. Stereolojik Yöntemler

3.3.1. Kesitlerin Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi

İncelemeye hazır hale gelen kesitler stereo investigator sistemi ile incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi (Şekil 14).



Şekil 14. Stereo-investigator analiz sistemi

3.3.2. Stereolojik İşlemler

Bu çalışmada, daha önce giriş kısmında kısaca bahsedilen stereolojik metotlardan birisi olan Cavalieri prensibi (Gundersen ve Jensen, 1987; Mayhew ve Gundersen, 1996) ile noktalı alan cetveli kombinasyonu kullanılarak mikroskobik kesitler üzerinde over hacimleri ve fiziksel disektör metodu (Sterio, 1984) kullanılarak folikül sayımları hesaplandı. Cavalieri ve fiziksel disektör prensibine göre aşağıda anlatılacağı gibi belirli stratejiler belirlendi.

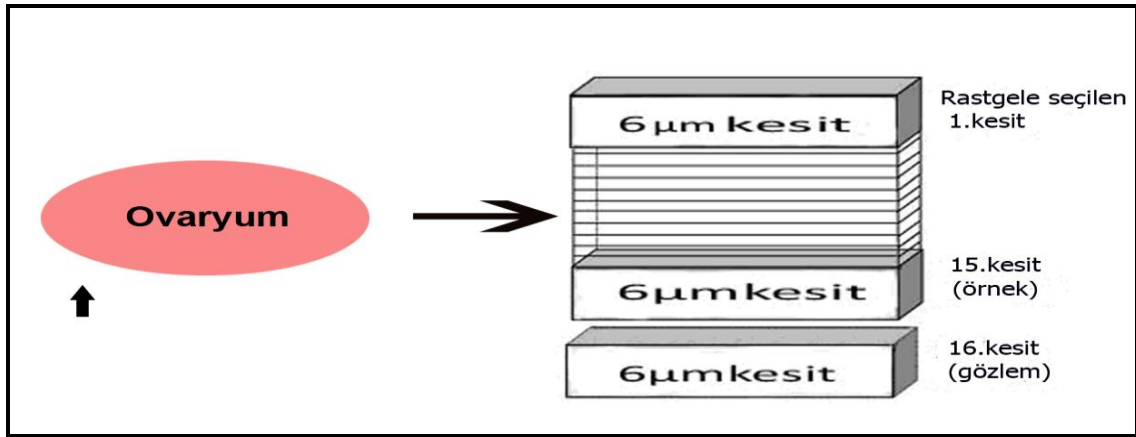
Folikül Sayımı

Stereolojik sayımlar için, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında bulunan Stereo-investigator analiz sistemi kullanıldı ve primordiyal, primer, preantral ve antral folikül sayısal yoğunlukları fiziksel disektör ile;

korteks, medulla, granuloza, teka ve antrum hacimleri ise Cavalieri metodunu kullanılarak hesaplandı. Elde edilen veriler SPSS programıyla istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kesit Örnekleme İşlemi

Cavalieri prensibine uygun olarak organın hacminin hesaplanması için sistematik rastgele örnekleme yapıldı. Örnekleme yapılırken dikkat edilmesi gereken uygun bir hata katsayı değerine (0,05 veya daha az) göre hesaplama yapılmasıdır (Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark., 1999). Çalışmaya başlamadan önce bir pilot çalışmada, Cavalieri prensipleri doğrultusunda ve uygun hata katsayı değeri göz önüne alınarak dokuda kesit örnekleme oranı belirlendi ve 1/15 oranında sistematik rastgele bir örnekleme yapıldı. Cavalieri ve fiziksel disektör metodunu kullanacağımız için overden elde edilen ilk 15 kesit arasından rastgele bir tanesi seçildikten sonra bunu takip eden her 15. kesit, sistematik olarak yapının tamamı kesilip bitene kadar seçildi (Şekil 15).

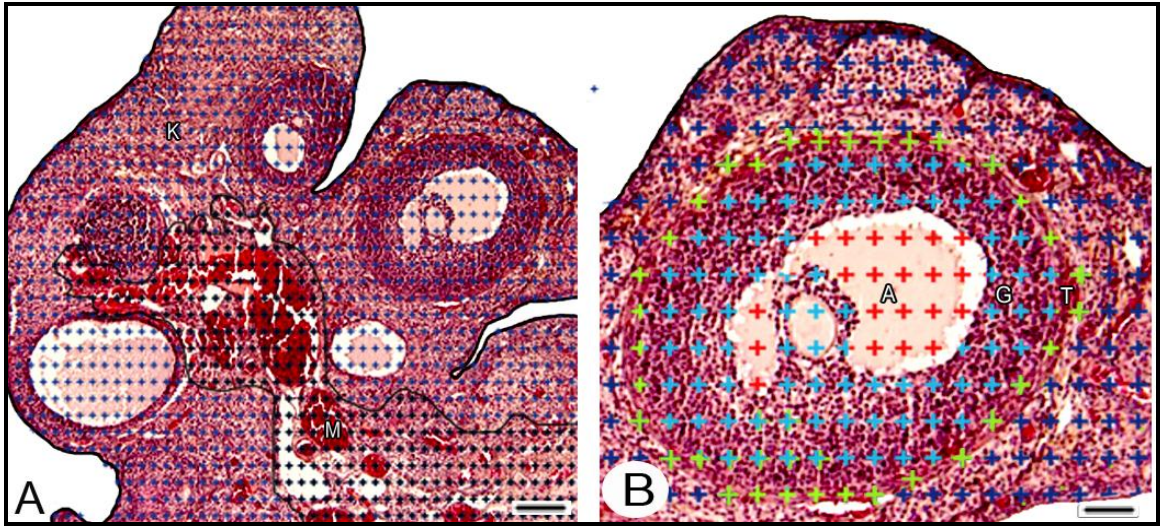


Şekil 15. Fiziksel disektör metodunda peşpeşe alınan 2 kesit. 15. kesit: Örnek kesit; 16. kesit: Gözlem kesit (Myers 2004'den uyarlanmıştır)

Kesitler Üzerinde Alan Ölçümü ve Toplam Hacim Hesaplaması

Cavalieri metodu doku veya organların hacmini hesaplamak için kullanılan bir metottur (Gundersen ve Jensen, 1987; Altunkaynak ve ark., 2012). Bu çalışmada, alan hesaplaması için Cavalieri metodunu kullanan ve bir noktalı alan ölçüm cetveli kullanıldı. Çalışmada, yukarıda tarif edilen örnekleme biçimiyle elde edilen kesit serilerinin (bir hayvana ait) ilki, monitör ekranına yerleştirdikten sonra kesit üzerinde

ölçüm yapacağımız alanın (overin) dış hatları bu program yardımıyla çizildi (Şekil 10). Son olarak sözü edilen uygulama sırasıyla diğer tüm kesitlere de uygulandı. Ölçüm yapılacak alanlar belirlendikten sonra, birbirinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan meydana gelen ve stereoloji terminolojisinde noktalı alan ölçüm cetveli (Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark., 1988) diye adlandırılan rastgele bir açıyla bilgisayarda kesit üzerine yerleştirildi (Şekil 16 A-B).



Şekil 16. A. Over dokusu sınırlarının belirlenmiş görüntüsü. Korteks (K) ve medulla (M) kısımları belirlendi ve üzerine noktalı alan cetveli atıldı. Bar: 50µm; **B.** Granuloza (G), teka (T) ve antrum(A) kısımları belirlendi ve üzerine noktalı alan cetveli atıldı. Bar: 50µm

Ölçüm yapılacak alanlar üzerine düşen noktalar işaretlendikten sonra, aşağıda ifade edilen formül (Gundersen ve Jensen, 1987; Garcia-Finana, 2003, Altunkaynak ve ark., 2012) yardımıyla kesitlerin referans hacmi yazılım tarafından otomatik olarak ölçüldü.

$$\hat{V} = t \times \frac{a}{p} \times \sum_{i=1}^m P_i$$

Formüldeki;

V= Referans hacim,

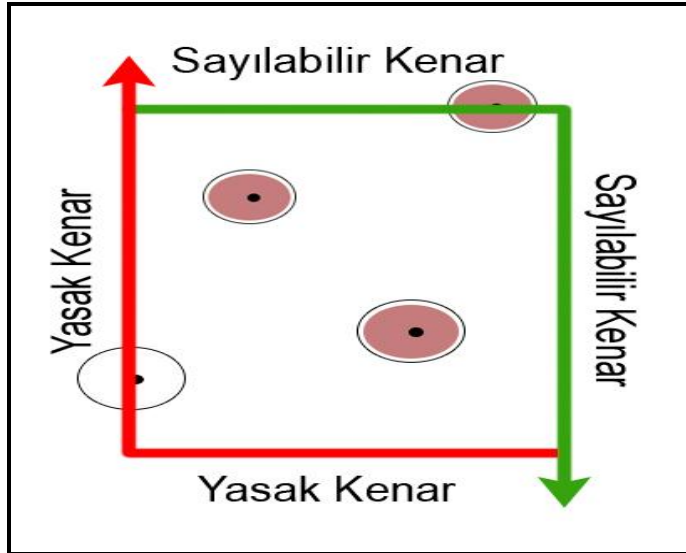
T= Kesit kalınlığı,

a/p= Bir noktanın temsil ettiği alan,

ΣP= Bir ovaryumun kesitleri üzerine düşen nokta sayısıdır.

Fiziksel Disektör ile Örnekleme ve Folikül Sayımı

Fiziksel disektör kuralına (Sterio, 1984) göre foliküllerin sayımı bilgisayar monitöründe power point programında gerçekleştirildi. Eşdeğer sayım alanları yan yana görüntülendikten sonra, üzerlerine (Gundersen, 1977) bu programda hazırlanan tarafsız sayım çerçevesi düşürüldü. Disektör sayım kuralına göre, önce örnek alanında çerçeve içerisinde kabul edilen folikül çekirdekleri örneklendi. Şöyle ki: çerçevenin içerisinde olsa bile, çerçevenin sol ve alt kenarlarına temas eden çekirdekler örneklemeyle dahil edilmedi. Çerçevenin dışında olsa bile, çekirdeği çerçevenin sağ ve üst kenarlarına temas eden folikül çekirdekleri de sayıma dahil edildi (Şekil 17). Sayıma dahil edilmenin bir diğer kuralı da bu çekirdeklerin çerçevenin sol ve alt kenarı ile bunların uzantılarına temas etmemesidir. Örnek kesitinde örneklenen bu folikül çekirdeklerinden gözlem kesitinde yer almayanlar o alan çiftine ait folikül sayısı olarak kaydedildi. Çalışmanın etkinliğini artırmak için disektör çiftlerindeki örnek ve gözlem alanları literatürde önerildiği şekilde (Gundersen, 1986; Pakkenberg ve Gundersen, 1988) ters çevrilerek de kullanıldı. Yani gözlem alanı örnek olarak alınırken, önceki örnek alanı gözlem alanı konumunda ele alındı. Bu şekilde tamamen farklı görüntü ve değerler elde edileceğinden, çalışmanın etkinliği çok az bir ek çalışmayla artırılmış oldu.



Şekil 17. Tarafsız sayım çerçevesi görüntüsü. Disektör hacim sayımında oosit nukleolusu var olduğu zaman sayım kuralı kullanılır. Eğer oosit nukleolusu disektör çerçevesi içinde ya da üst ya da sağ sınırda ise oosit sayılır, eğer oosit nukleolusu disektör çerçevesi içinde değilse ya da alt ya da sol sınırda ise oosit sayılmaz

Toplam Folikül Sayısının Hesaplanması

Fiziksel disektörde, birim hacimdeki foliküllerin sayısı (N_v), sayım yapılan ardışık kesit çiftinin birinde olup diğerinde olmayan foliküllerin (Q =disektör taneciği) sayılması ile hesaplanır. İki komşu kesitin yondeş yüzeyleri arasındaki mesafe (t , kesit kalınlığı) ve örneklenen kesitlerin üzerine yerleştirilen tarafsız sayım çerçevesinin alanı (a), disektörün hacmini ($V_{(dis.)}$) belirler. Buradan ovaryumdaki foliküllerin sayısal yoğunluğu için aşağıdaki eşitliği yazabiliriz:

$$N_v = \frac{\sum Q}{\sum V \text{ Disektör}} = \frac{\sum Q}{h \cdot \sum a}$$

Her hayvanın overindeki foliküllerin toplam sayısını hesaplamak için, sayısal yoğunluk, N_v , ortalama hacmi $V_{(ref)}$ ile çarpılır.

$$N = N_v \cdot V_{ref}$$

a = Sayım çerçevesinin alanı

t = Her kesit çifti arasındaki mesafe

N = Hesaplanan toplam sayı

N_v = Sayısal yoğunluk

V_{ref} = Yapının toplam (referans) hacmi

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 15.0 for Windows” paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı anova varyans analiziyle değerlendirildi. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için One Way ANOVA ve Post Hoc testlerinden Bonferroni testi kullanıldı. Sonuçlar yüzde ortalama \pm SD olarak verildi. P değerinin 0,05’den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

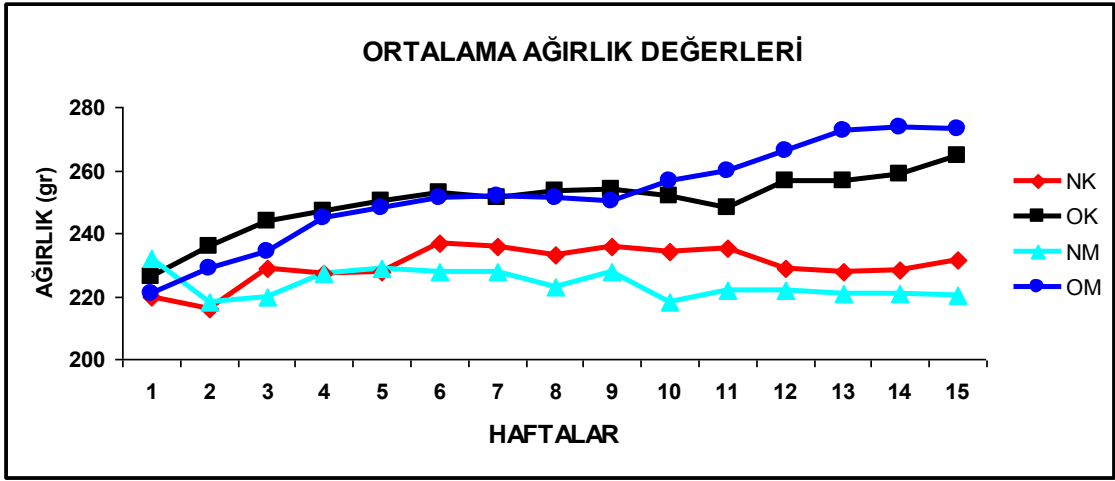
4. BULGULAR

Çalışmamızda NK, OK, NM, OM, NL, OL, NML ve OML olmak üzere sekiz grup kullanıldı. Obezite, yüksek yağlı diyet (%40 yağ içeren) ile 9 haftalık bir süreçte oluşturuldu ve aynı zaman içinde kontrol grubu standart diyet yemi ile beslendi. Dokuz hafta sonunda kontrol ve obez olan gruplara 42 gün boyunca melatonin, leptin ve melatonin+leptin uygulanarak ovaryumdaki folikül sayısı, ovaryum hacmi ve doku düzeyinde CAT ve MPO tayini yapılmak üzere sağ ve sol overler çıkarıldı. Tedavi sonrası sıçanlarda ortalama vücut ağırlıkları, over yaş ağırlıkları ve over çevresi yağ ağırlıkları tartıldı. Primordial, primer, sekonder, Graaf ve atretik folikül sayısı, over hacmi, korteks, medulla, granuloza, teka folikülü, antrum hacimleri stereolojik yöntemlerle hesaplandı. Ayrıca aynı kesitler üzerinde rutin histopatolojik ve immünohistokimyasal boyamalarla değerlendirmeler de yapıldı ve bu değerlendirmeler sonucunda aşağıdaki bulgular elde edildi.

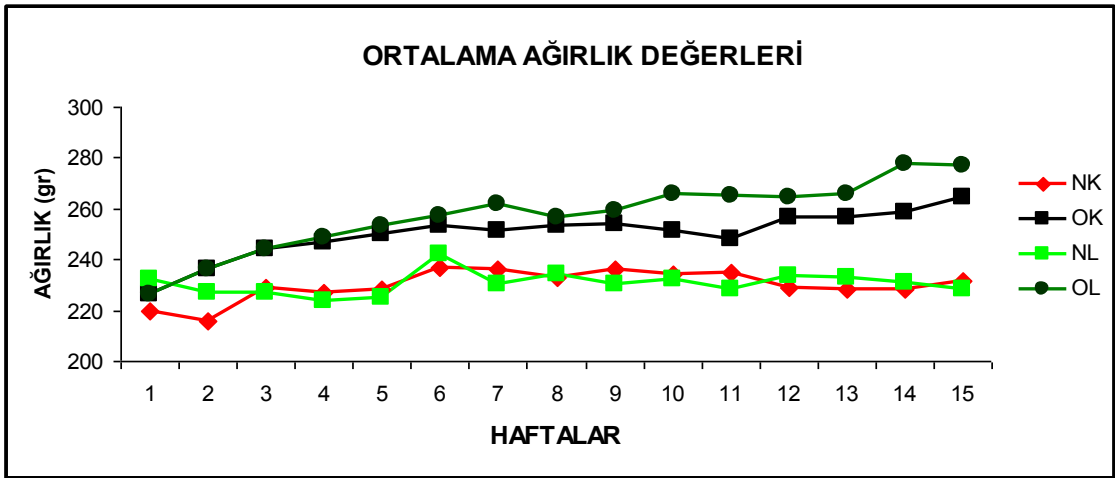
4.1. Obezitenin Değerlendirilmesi

Tüm gruplardaki deneklerin haftalık kilo alımları izlendi. Toplam dokuz hafta boyunca süren bu takip sonucunda her sekiz gruptaki deneklerin VKİ hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları belirlendi (Altunkaynak ve ark., 2008; Marie-Claude ve ark., 2008). Boy ve vücut ağırlığı arasındaki ilişkiyi kullanarak kişinin obez olup olmadığına karar vermek, en pratik ve oldukça doğru sonuç veren nesnel bir yoldur. Bunun için VKİ adı verilen ve vücut ağırlığının, metre cinsinden boyun karesine bölünmesiyle elde edilen (kg/m^2) bir indeks kullanılır. VKİ hesaplamasında; burun ucundan kuyruk başlangıcı arası mesafe boy olarak kabul edildi. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri VKİ formülü kullanılarak hesaplandı ve VKİ sonuçları 5 kg/m^2 'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi. Obez olarak değerlendirilen gruplarda kontrol grubuna oranla daha hızlı kilo alımı gözlemlendi (Şekil 18-20).

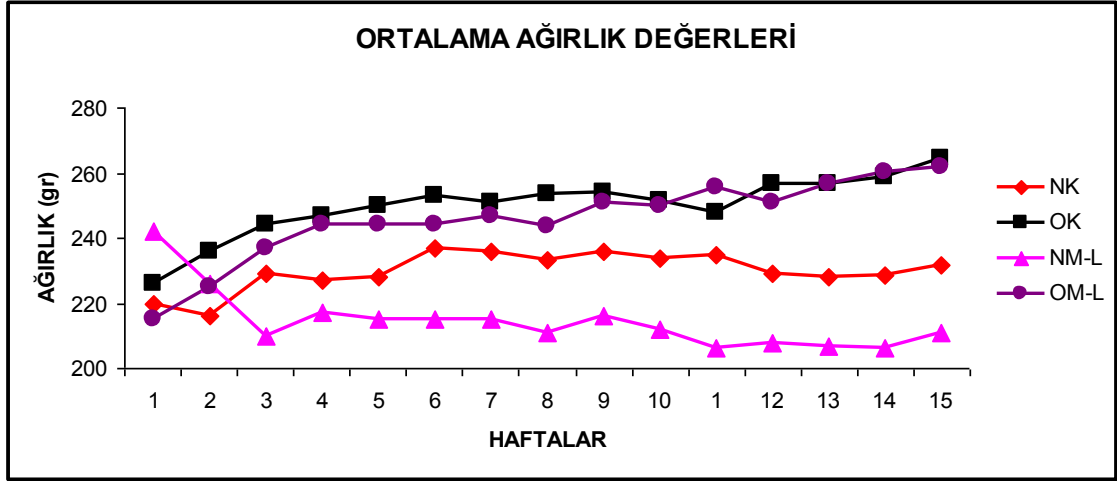
4.1.1. Ağırlık Bulguları



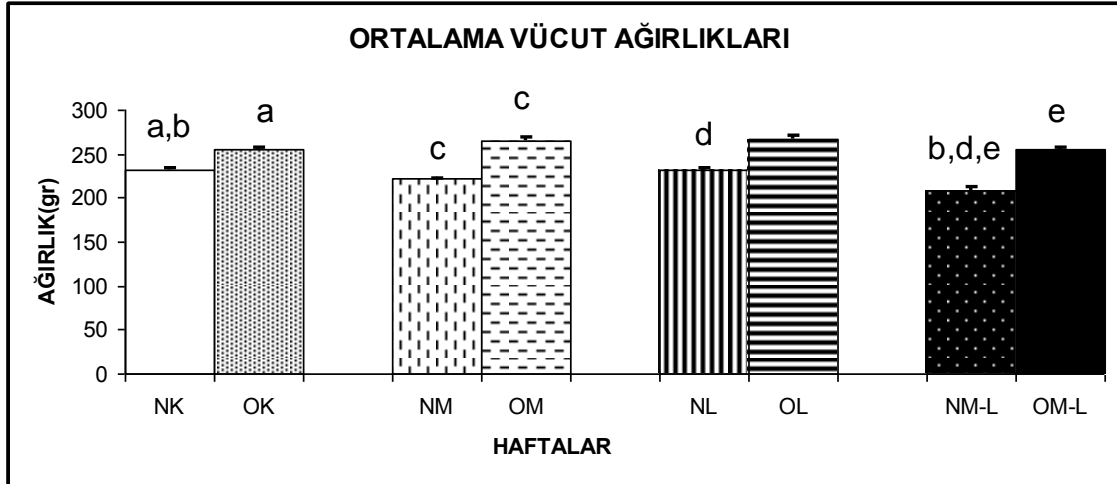
Şekil 18. Melatonin uygulama öncesi ve sonrası değerlerinin karşılaştırılması. NK, OK, NM ve OM gruplarının **1-9. hafta:** Melatonin uygulaması öncesi, **9-15. hafta:** Melatonin uygulaması sonrası ortalama vücut ağırlık grafiği görülmektedir. NM grubunda ortalama vücut ağırlık değeri OM grubuna göre azalmıştır ($p < 0,001$)



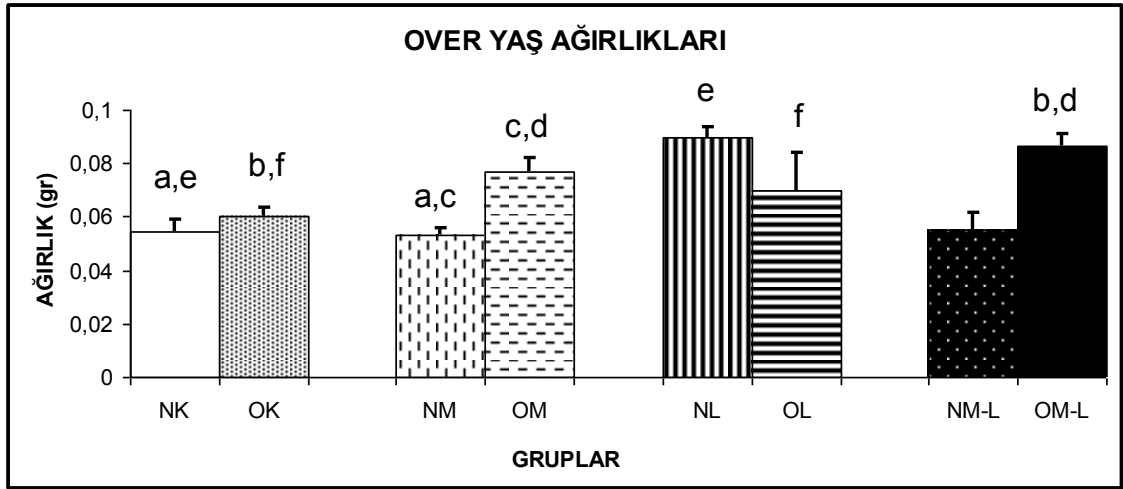
Şekil 19. Leptin uygulama öncesi ve sonrası değerlerinin karşılaştırılması. NK, OK, NL ve OL gruplarının **1-9. hafta:** Leptin uygulama öncesi, **9-15. hafta:** Leptin uygulama sonrası ortalama vücut ağırlık değerleri grafiği görülmektedir. NL grubundaki ortalama vücut ağırlığı değeri OL grubuna göre azalmıştır ($p < 0,001$)



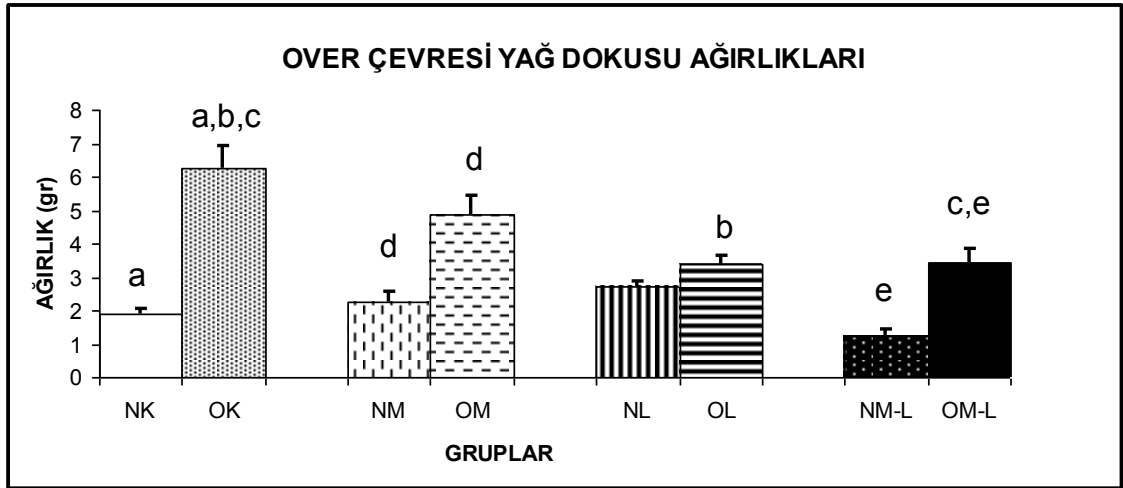
Şekil 20. Melatonin-Leptin uygulama öncesi ve sonrası değerlerinin karşılaştırılması. NK, OK, NM-L ve OM-L gruplarının **1-9. hafta:** Melatonin-Leptin uygulama öncesi, **9-15. hafta:** Melatonin-Leptin uygulama sonrası ortalama vücut ağırlık değeri grafiği görülmektedir. NML grubundaki ortalama ağırlık değeri kontrol grubuna azalmıştır ($p < 0,01$)



Şekil 21. Tüm grupların ortalama vücut ağırlıklarını gösteren grafik. a;b;c;d;e sırasıyla: NK-OK; NK-NM-L; NM-OM; NL-NM-L; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir ($a, c, d, e, p < 0,001$; $b, p < 0,01$)



Şekil 22. Over yaş ağırlık bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f sırasıyla: NK-NM; OK-OM-L; NM-OM; OM-OM-L; NK-NL ve OK-OL grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,d, $p < 0,01$; e, f, $p < 0,05$)

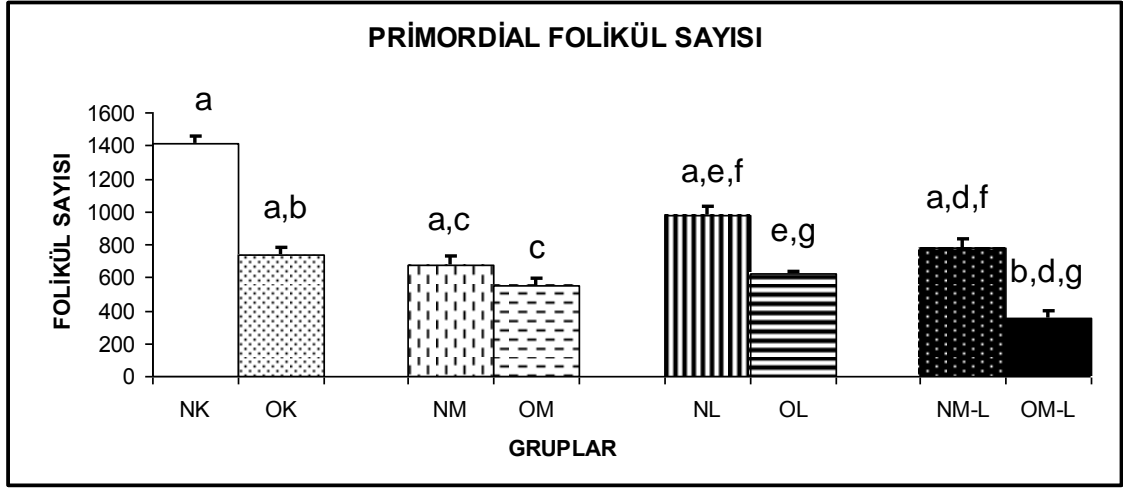


Şekil 23. Tüm grupların over çevresi yağ dokusu ağırlıklarını gösteren grafik. a;b;c;d;e sırasıyla: NK-OK; OK-OL; OK-OM-L; NM-OM; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c, $p < 0,001$; d,e, $p < 0,01$)

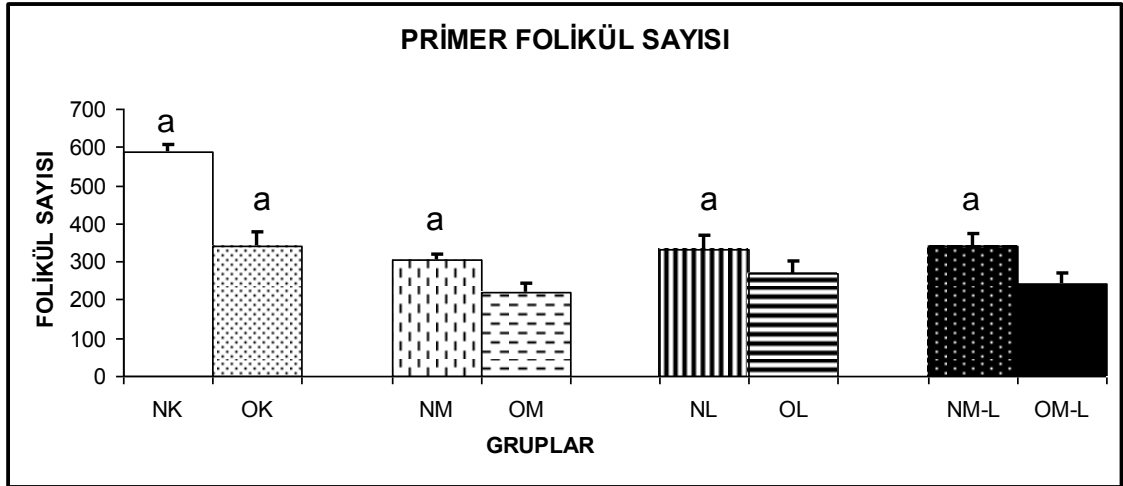
4.2. Stereolojik Bulgular

4.2.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Over Örneklerindeki Folikül Sayısı Bulguları

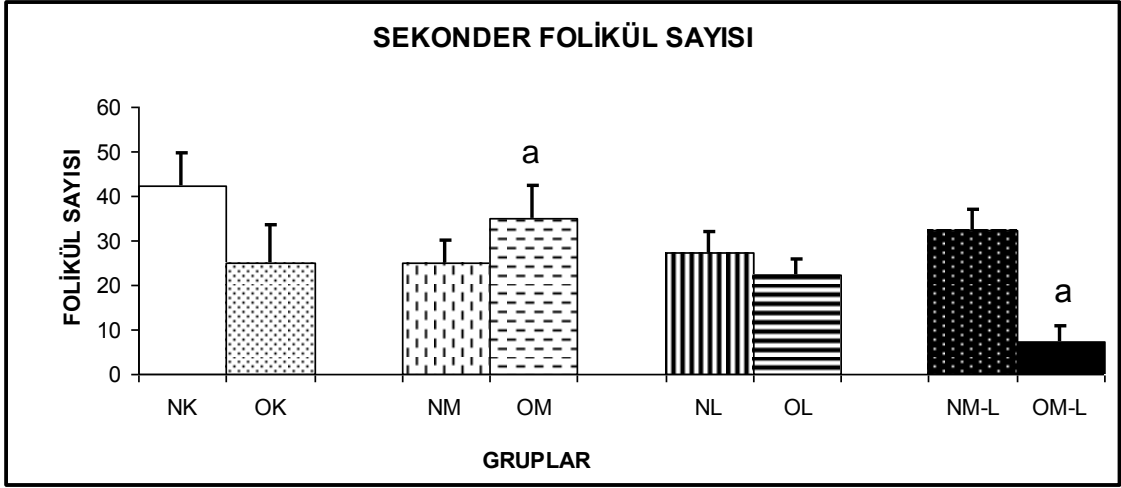
Tüm gruplardaki deneklere ait ışık mikroskopik kesitleri üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda folikül sayıları her bir denek ve grup için aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil 24-29) (one-way ANOVA, Bonferroni test).



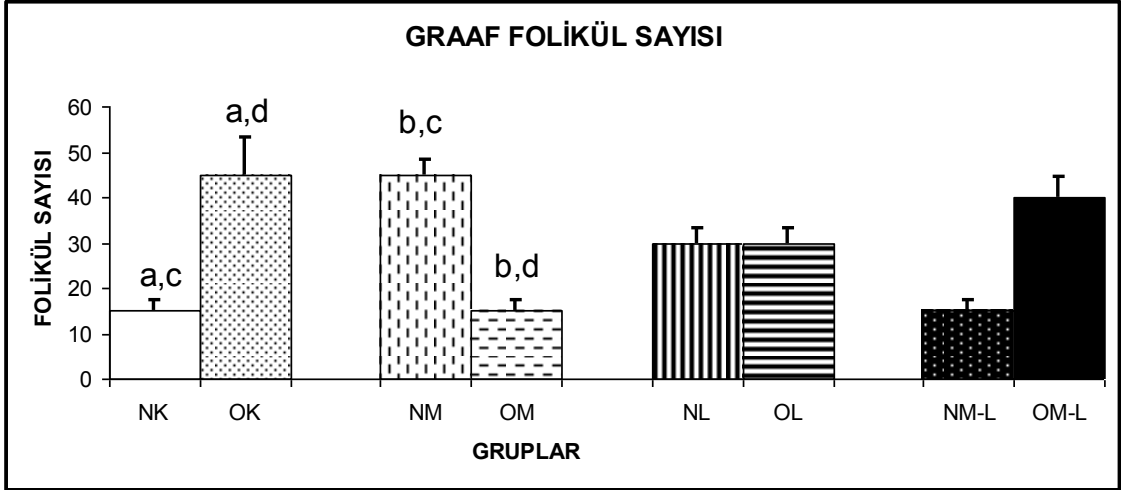
Şekil 24. Primordial folikül sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g sırasıyla: NK ile diğer tüm gruplar; OK-OM-L; OK-OM-L; NM-OM; NM-L-OM-L; NL-OL; NL-NM-L; OL-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,d,e, $p<0,001$; f, g, $p<0,01$)



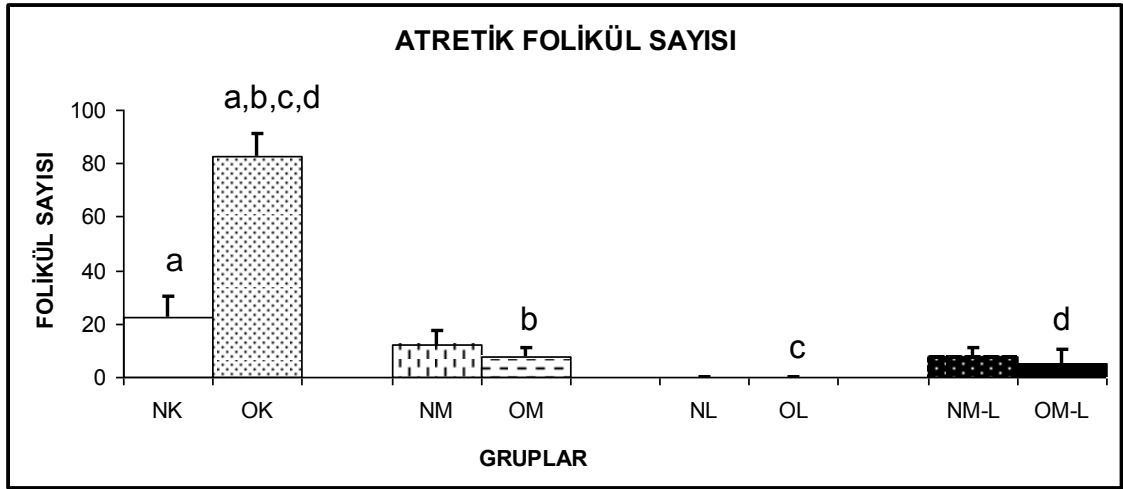
Şekil 25. Primer folikül sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a; NK ile diğer tüm gruplar arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a, $p<0,001$)



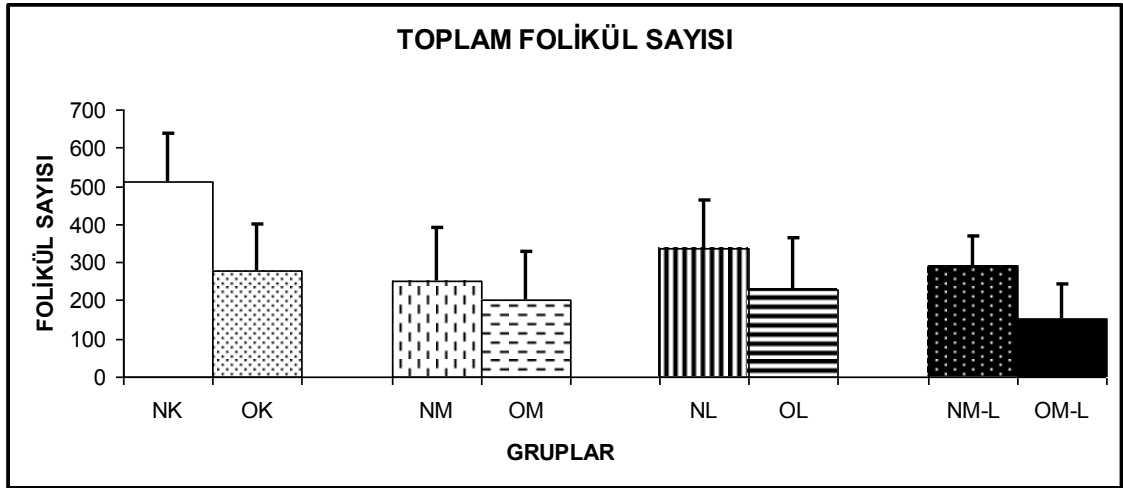
Şekil 26. Sekonder folikül sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a; OM-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a, $p < 0,05$)



Şekil 27. Graaf folikül sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d sırasıyla: NK-OK, NM-OM, NK-NM, OK-OM grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,d, $p < 0,05$)



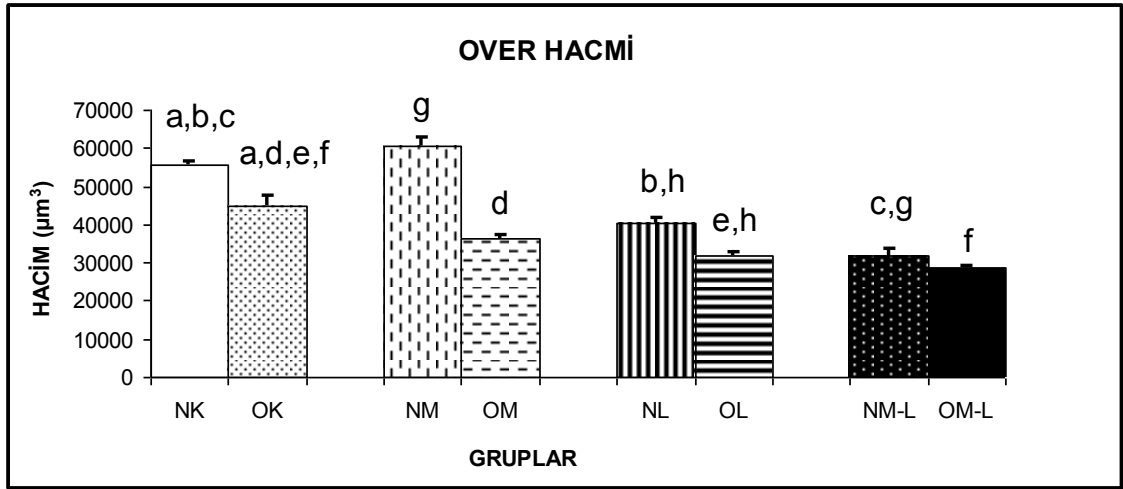
Şekil 28. Atretik folikül sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d sırasıyla: NK-OK; OK-OM; OK-OL; OK-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,d, $p<0,001$)



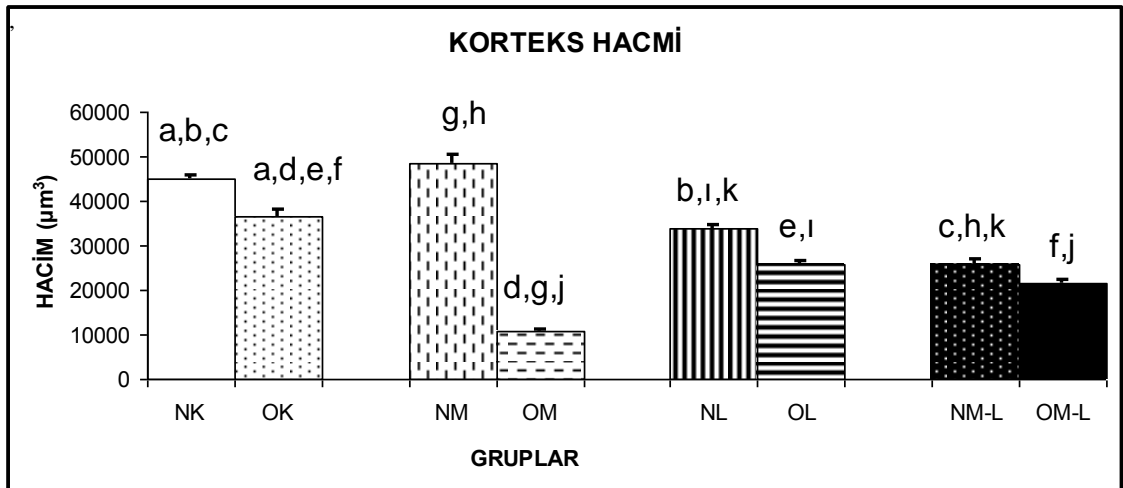
Şekil 29. Toplam folikül sayısı bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. (Folikül sayısı $\times 10$). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$)

4.2.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Over Örneklerindeki Hacim Bulguları

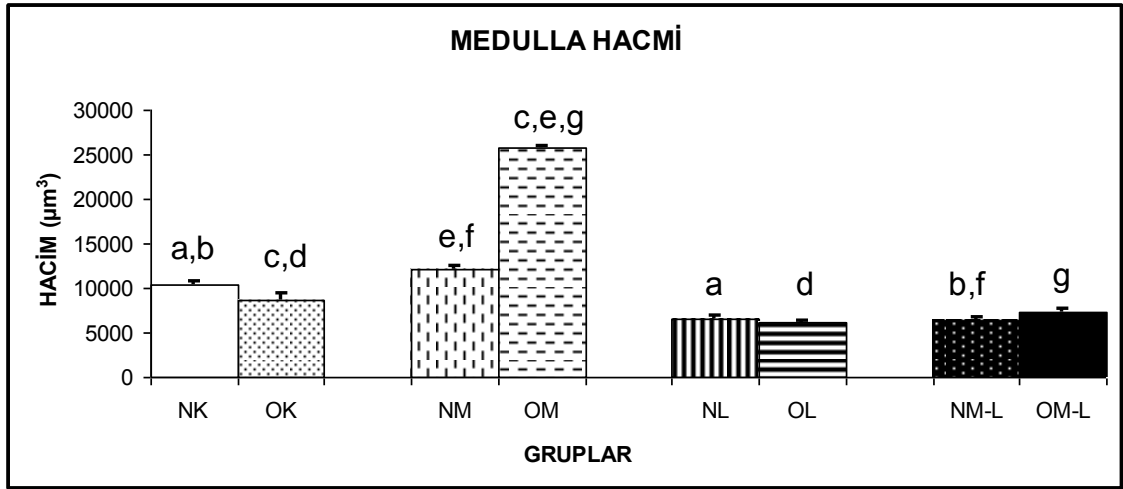
Tüm gruplardaki deneklere ait ışık mikroskopik kesitleri üzerinde yapılan hesaplamalar sonucunda hacimleri her bir denek ve grup için aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil 30-37) (one-way ANOVA, Bonferroni test).



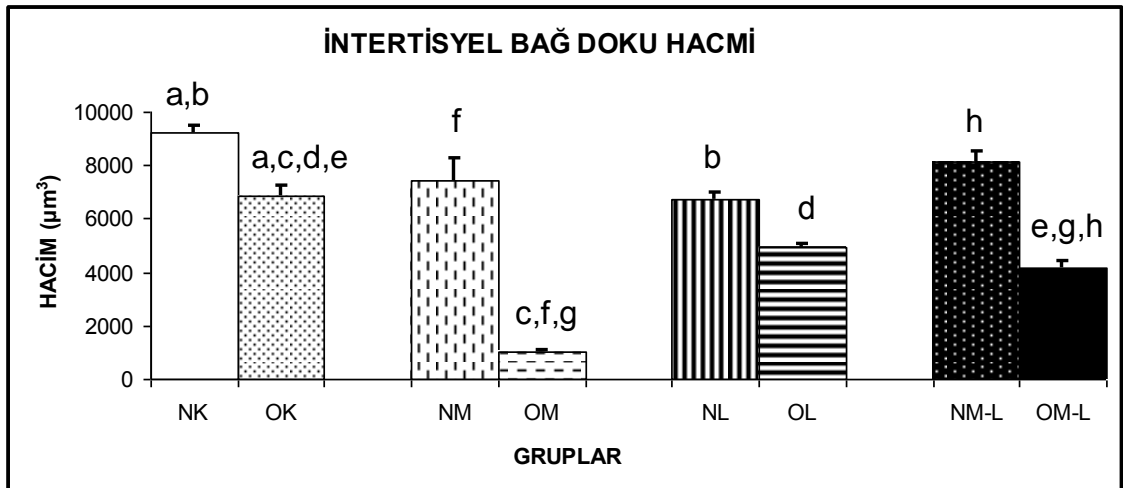
Şekil 30. Over hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g;h sırasıyla: NK-OK; NK-NL; NK-NM-L; OK-OM; OK-OL; OK-OM-L; NM-NM-L; NL-OL grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,e,f,g, $p < 0,001$; d, $p < 0,01$; h, $p < 0,05$)



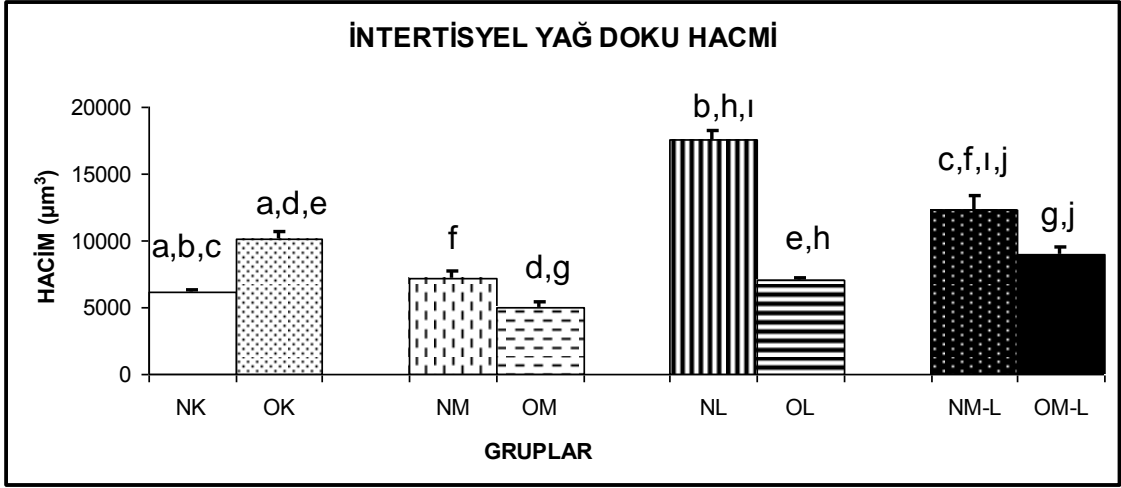
Şekil 31. Korteks hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g;h;i;j;k sırasıyla: NK-OK; NK-NL; NK-NM-L; OK-OM; OK-OL; OK-OM-L; NM-OM; NM-NM-L; NL-OL; OM-OM-L; NL-NM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,e,f,g,h,i,j,k, $p < 0,001$)



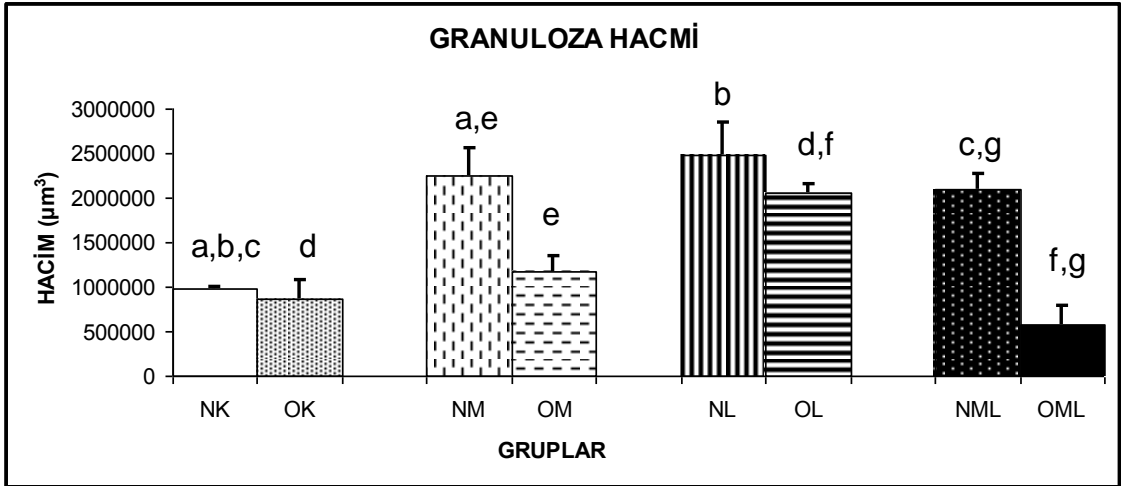
Şekil 32. Medulla hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g sırasıyla: NK-NL; NK-NM-L; OK-OM; OK-OL; NM-OM; NM-NM-L; OM-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,e,f,g, $p<0,001$; d, $p<0,01$)



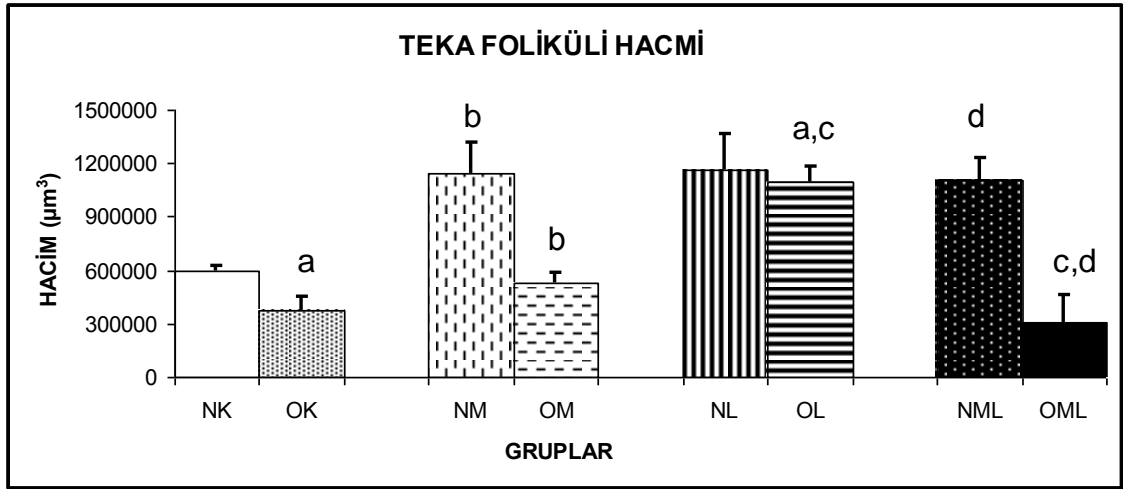
Şekil 33. Bağ doku hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g;h sırasıyla: NK-OK; NK-NL; OK-OM; OK-OL; OK-OM-L; NM-OM; OM-OM-L; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b, $p<0,001$; c,e,f,g,h, $p<0,01$; d, $p<0,05$)



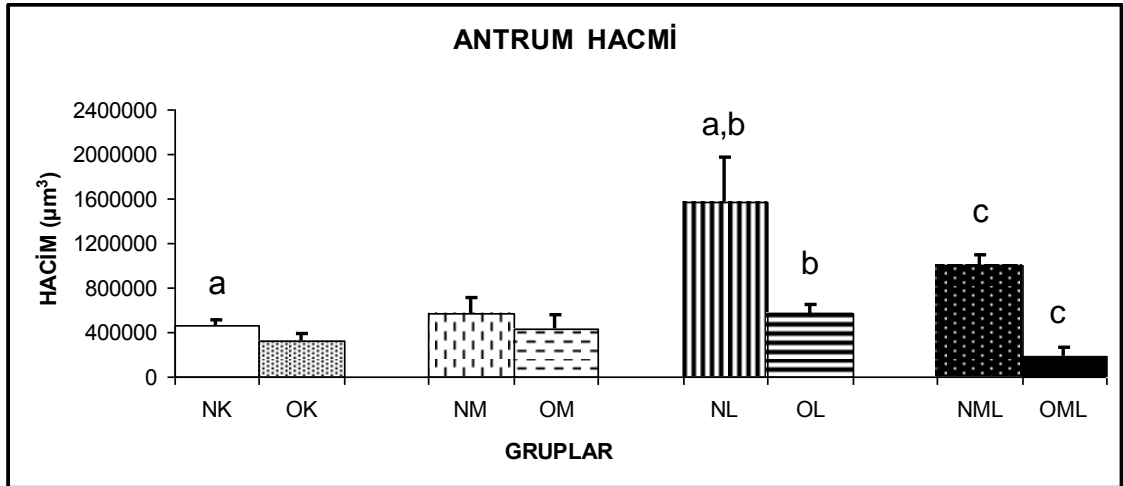
Şekil 34. Yağ doku hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g;h;i;j sırasıyla: NK-OK; NK-NL; NK-NM-L; OK-OM; OK-OL; NM-NM-L; OM-OM-L; NL-OL; NL-NM-L; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,e,f,g,h, $p<0,001$; d,i, $p<0,01$)



Şekil 35. Granuloza doku hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d;e;f;g sırasıyla: NK-NM; NK-NL; NK-NM-L; OK-OL; NM-OM; OL-OM-L; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,b,c,d,e,f,g, $p<0,01$)



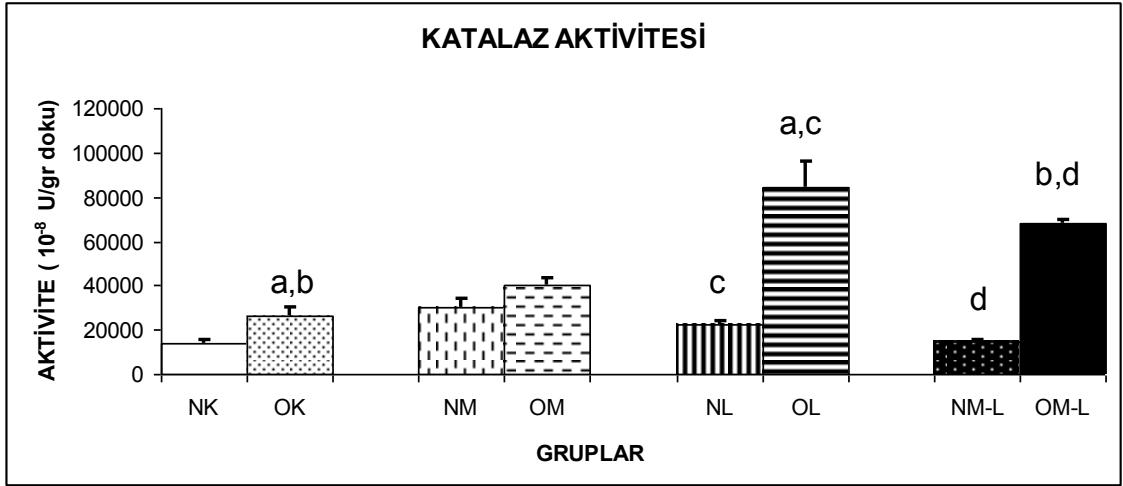
Şekil 36. Teka folikülü hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d sırasıyla: OK-OL; NM-OM; OL-OM-L; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a, $p<0,05$; b, $p<0,01$; c,d, $p<0,001$)



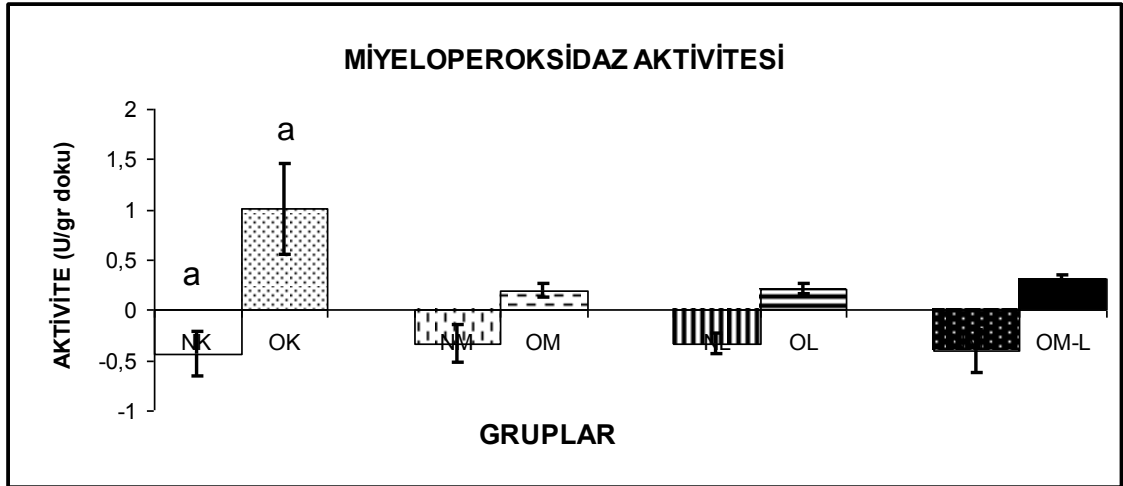
Şekil 37. Antrum hacmi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c sırasıyla: NK-NL; NL-OL; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a, $p<0,01$ b,c, $p<0,05$)

4.3. Biyokimya Analiz Bulguları

Tüm gruplara ait over doku örneklerinin biyokimyasal analizlerinde miyeloperoksidaz ve katalaz değerleri tablolarda ortalama (Ort) ve standart sapma (S.E.M.) şeklinde verilmiştir.



Şekil 38. Katalaz aktivitesi bakımından grupların karşılaştırılmasını gösteren grafik. a;b;c;d sırasıyla: OK-OL; OK-OML; NL-OL; NM-L-OM-L grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a,c,d, $p<0,001$; b, $p<0,01$)



Şekil 39. Miyeloperoksidaz aktiviteilerinin gruplar arasında karşılaştırılmasını gösteren grafik. a: NK-OK grupları arasında gözlenen anlamlı farkı göstermektedir (a, $p<0,05$)

4.4. Histolojik Bulgular

4.4.1. Hemotoksilen – Eozin Boyası İle Elde Edilen Bulgular

Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik olarak incelenmesinde folikül sınıflaması aşağıda belirtilen özelliklere göre yapıldı.

Primordial folikül: Zona Pellusida'sız oositlerin çevresinde tek sıra yassı hücre ile kuşatılmış olan folikül,

Primer folikül: Oositlerin her birinin etrafında tek bir sıra kübik granuloza hücreleri tarafından sarılı gözlenen folikül,

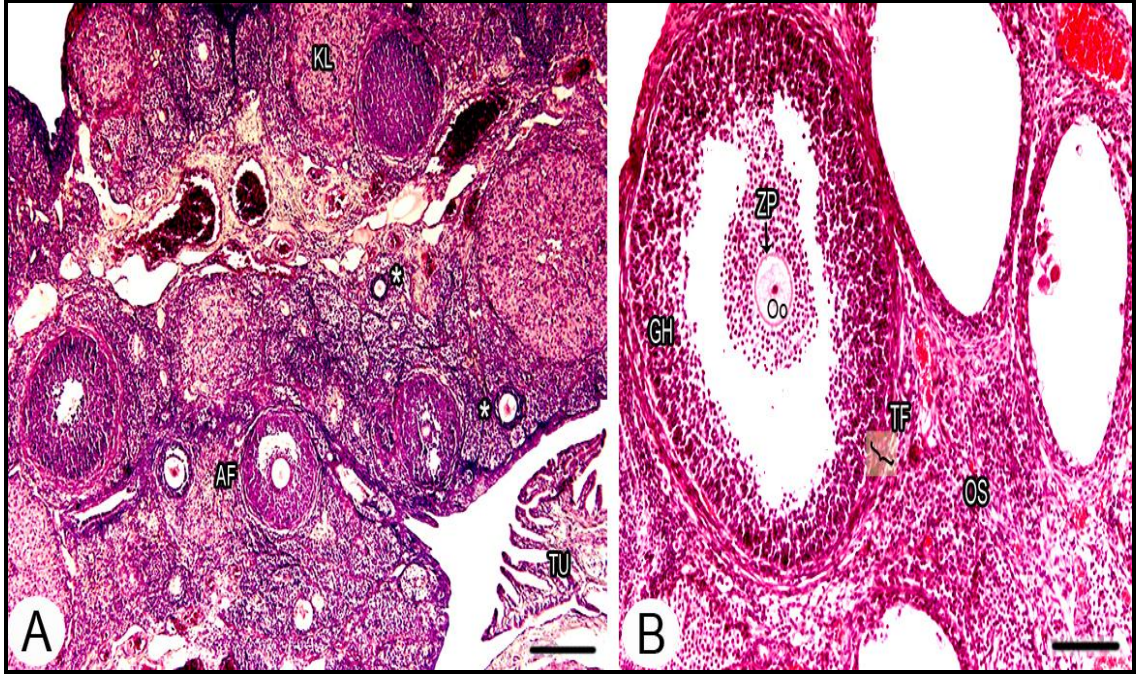
Preantral folikül: Oositler etrafında 2 ya da çok katlı granuloza hücre tabakası bulunan ancak, granuloza hücreleri arasında boşluk gözlenmeyen folikül,

Antral folikül: Granuloza hücreleri arasındaki boşluklarda folikül sıvısı olarak adlandırılan sıvı birikimi başlamış veya antrum olan folikül,

Graaf folikülü: Tek ve büyük bir boşluğa (antrum) sahip olup, sayısı azalan granuloza hücrelerinin antrumu çevrelemekte olduğu, oositin kümülüs hücreleri tarafından çevrelenmiş olduğu folikül.

Kontrol grubundan elde edilen bulgular:

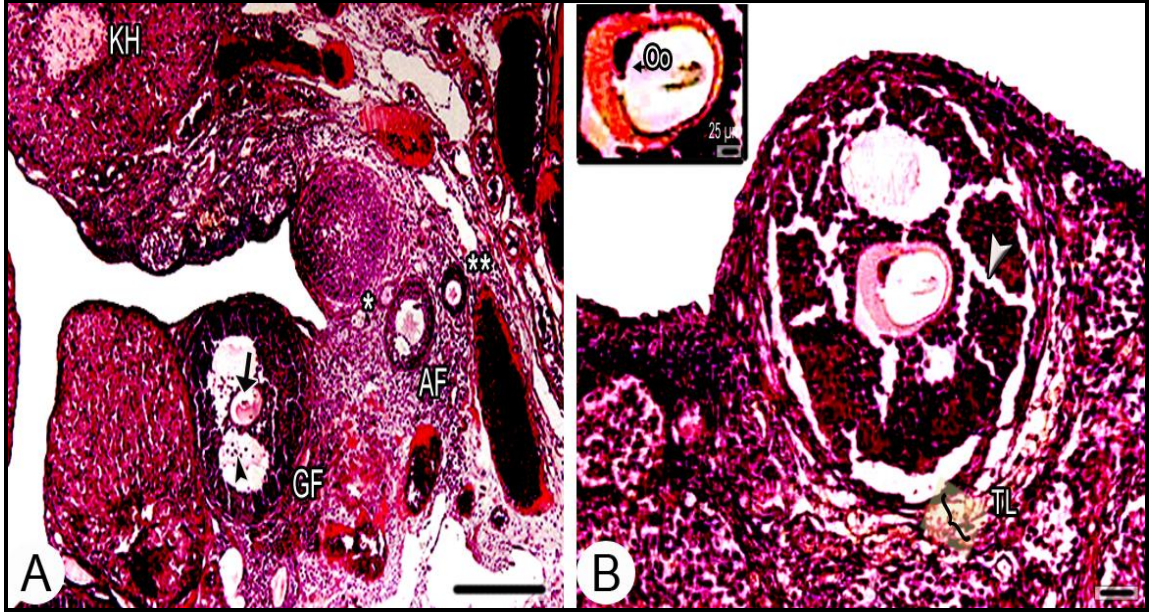
Germinal epitel altındaki kortikal alanda primordiyal, primer ve preantral aşamalardaki foliküller normal görünüm sergilemekte idi (Şekil 40A). Medulla bölgesine yakın kısımda ise daha çok antral foliküller bulunmaktaydı. Tüm foliküllerin merkezinde yuvarlak ya da oval şekilli, açık boyanmış sitoplazması ile oositler yer almaktaydı. Granuloza hücreleri ise gelişen foliküllerin maturasyonuna göre değişik büyüklüklerde ve düzgün dizilimliydi, oosit ile granuloza hücre tabakası arasında asidofilik karakterde gözlenen asellüler yapıdaki zona pellusida bulunmaktaydı ayrıca birbirlerine ve zona pellusidaya sıkı bir şekilde tutunmuşlardı (Şekil 40B). Kontrol grubuna ait ovaryumlardan elde edilen ışık mikroskopik kesitlerde fragmentasyon veya yapısal bozukluk bulgularına rastlanmadı.



Şekil 40. A. Kontrol grubuna ait ovaryumun genel ışık mikroskopi görüntüsü. Kontrol grubunda, değişik seviyelere kadar gelişme gösteren folliküller, antral foliküller (AF), dağınık yerleşmiş preantral foliküller (*), korpus luteumlara (KL) rastlanmaktadır. TU: Tuba uterina Bar: 125µm **B.** Ovarian stroma (OS) içerisinde yer alan antral folikül merkezinde homojen sitoplazmasıyla oosit (Oo) yer almakta olup normal görünümlü bir foliküle ait granuloza hücreleriyle (GH) oosit arasında zona pellusidanın (ZP) oluştuğu gözlenmektedir. Granuloza hücreleriyle ovarian stroma teka folikülü (TF) ile birbirinden ayrılmaktadır. Boya: H+E, Bar: 125µm

Obez grubundan elde edilen bulgular:

Atretik Graaf foliküllerinde granuloza hücre tabakasının oldukça azaldığı ve antrumda asidofilik boyanan hücresel atıklarla birlikte (Şekil 41A) ileri atrezi sürecinde asidofil sitoplazma gözlenen oositin fragmentasyonu, oosit- granuloza hücreleri bağlantılarında kopmalar, teka tabakasında ayrılmalar olduğu gözlenmekte idi. Oosit ile zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta vakuol benzeri genişlemelere rastlandı. Korona radiata hücreleri birbirlerine ve zona pellusidaya gevşek bir şekilde tutunmuştu (Şekil 41B).



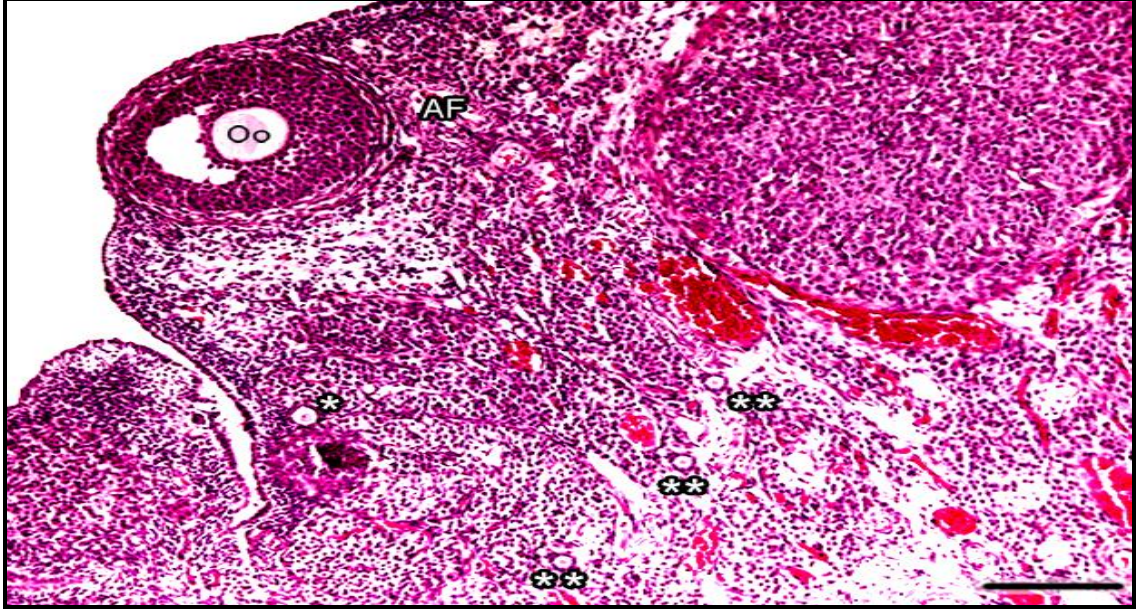
Şekil 41. A. Obez grubuna ait ovaryumun genel ışık mikroskopi görüntüsü. Atretik Graaf folikülünün antrumunda çok sayıda hüresel atıklar (**ok başı**) ve granuloza hücreleri folikülün periferine yerleşmiştir. Eozinofilik sitoplazmasıyla serbest halde bulunan oosite (**Oo**) ait fragmentasyonlar (→) gözlenmektedir. (*) :Primer folikül, (**): Preantral folikül, (**AF**): Antral folikül, Bar: 125µm **B.** Granuloza hücrelerinin kübik biçimleri ve düzenli dizilimleri (**ok başı**) bozulmuştu. Teka luteolizasyonu (**TL**) ve vakuolizasyon gözlendi. Zona pellusida kalınlaşmış ve oosit (**Oo**) kenara itilmişti. Boya: H+E, Bar: 125µm

Melatonin gruplarından elde edilen bulgular:

Standart diyet ve yüksek yağlı diyetle tabi tutulan 42 gün boyunca 10 mg/kg uygulanan melatoninin, ovaryum folikülleri üzerine etkileri incelendi.

Kontrol Melatonin grubundan elde edilen bulgular:

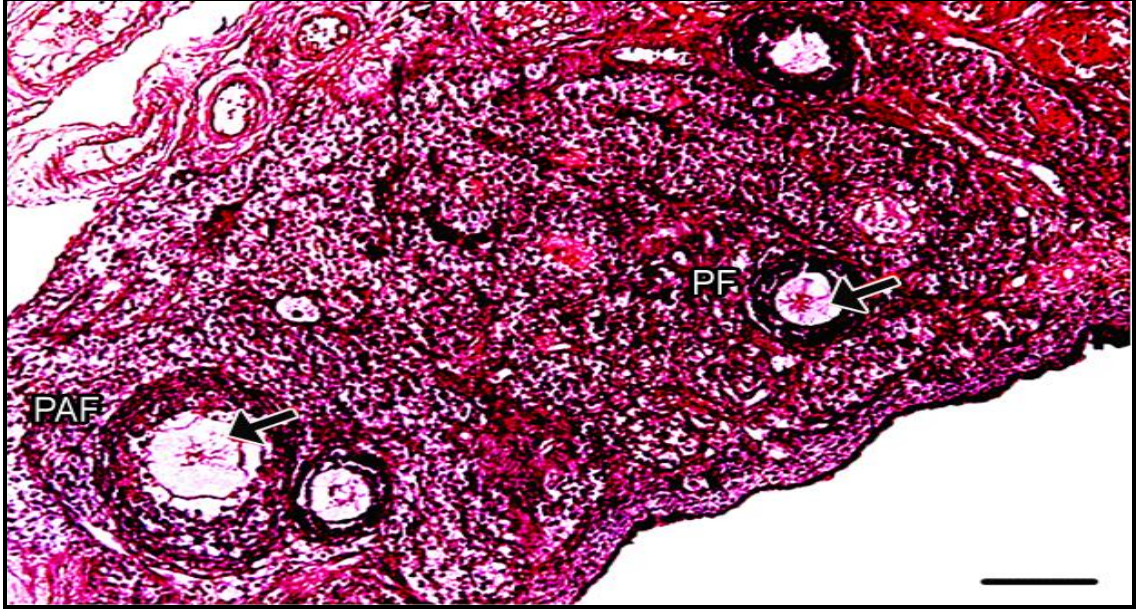
Melatonin uygulanmış ovaryumda germinal epitelyum tek katlı kübik biçimde, kontrol grubundan farklı olarak, germinal epitel altında yer alan tunika albuginea içerisinde, primordiyal foliküllere nadiren rastlanmakta, primer foliküller medullaya yakın yerleşmişlerdi. Bunun yanı sıra gerek korpus luteum oluşumları (Şekil 42) gerekse ileri gelişim aşamasındaki antral foliküller normal görünüm sergilemekte idi. Kontrol grubuna göre atretik folikül sayısında azalma izlendi, korteks alanı ise daha fazla idi. Kontrol grubuyla benzer şekilde, folikül popülasyonunun büyük çoğunluğunu sağlıklı foliküller oluşturmaktaydı. Melatonin tedavisi ile stromal hücreler azaldı. Kontrol grubuna göre Graaf folikül sayısı fazla idi.



Şekil 42. Melatonin uygulamasını takiben over ışık mikroskopi görüntüsü. Normal görünüme sahip antral folikül ve granuloza hücreleri ile oosit (Oo) arasındaki bağlantının korunmuş olduğu görülmektedir. Medullaya yaklaştıkça küçük çaplı primer foliküllerin (*) yoğun olarak bulunduğu dikkati çekmektedir. **AF:** Antral folikül, *: Primordial folikül **: Primer folikül
Boya: H+E, Bar:125µm

Obez-Melatonin grubundan elde edilen bulgular:

Primordiyal ve preantral folliküllerde dejenerasyonun ilk bulgusu oosit üzerinde gözlemlendi ve oositte dejenerasyona bağlı sitoplazmada vakualizasyon, nükleolemmada dalgalanma, düzensizlik ve invaginasyonlar izlendi (Şekil 43). Kortikal ve medüller venüllerde eritrosit yoğunluğu oldukça fazla gözlemlendi. Primordial folikül sayısı nadirdi. Obez grubuna göre medulla alanı daha fazla olup bağ doku ve yağ doku alanı az idi.



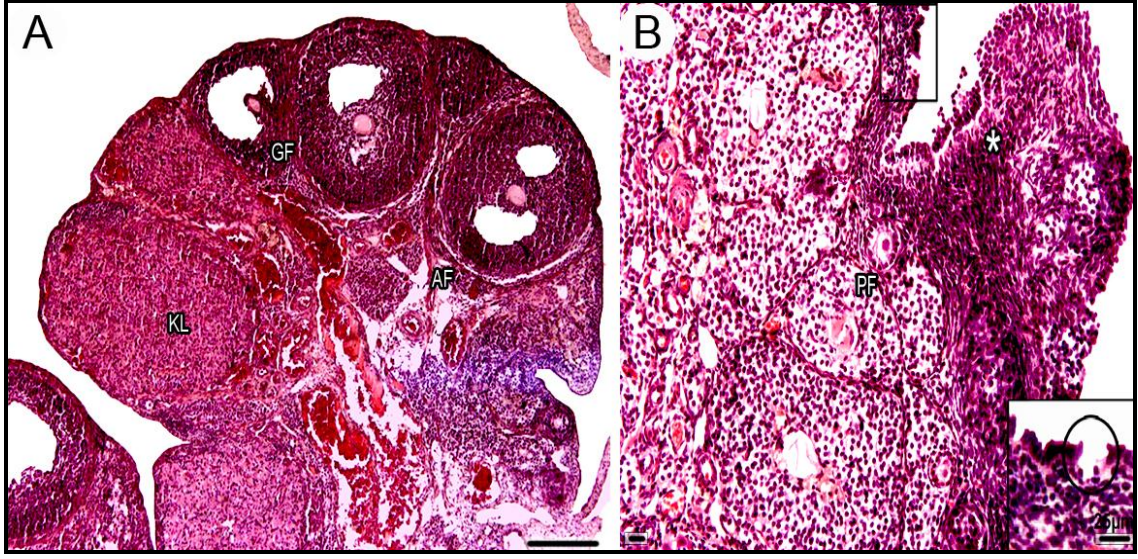
Şekil 43. Obez-melatonin grubundaki over ışık mikroskopik görüntüsü. Bir-iki granuloza hücre tabakasına sahip preantral folikülde (**PAF**) düzensiz bazal membran yapısı ve oosit-foliküler hücre bütünlüğü (**ok**) biraz bozulmuş ve sitoplazma alanı dağınıktı. **PF**: Primer folikül. Boya: H+E, Bar:125µm

Leptin gruplarından elde edilen bulgular:

Standart ve yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlara 42 gün 1µg leptin uygulanması ile ovaryum folikülleri üzerine etkileri incelendi.

Kontrol -Leptin grubundan elde edilen bulgular:

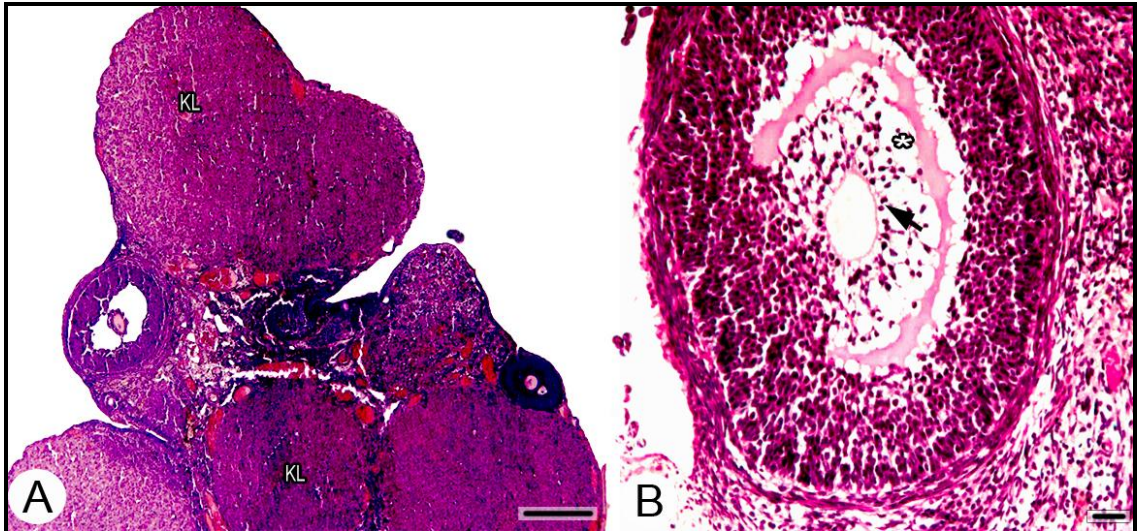
Leptin uygulanmış gruptaki ovaryum kesitinde, kontrol grubundan farklı olarak, atretik dejenerasyonlar yok denecek kadar azdı (Şekil 44A). Yüzey epitelyum proliferasyonu gözlemlendi (Şekil 44B). Tunika albuginea tabakası fibroblastların ve kollejen liflerin birikiminden dolayı kalınlaşmış olup bu birikim FSH kontrolü altında hormonal eksenlerle ilişkilidir (Grant ve Dekel, 2002).



Şekil 44. A. Kontrol-leptin grubu over ışık mikroskopi görüntüsü. Tunika albuginea altında primordial folikül sayısı yok denecek kadar azdı. **KL:** Korpus luteum, **GF:** Graaf folikül, **AF:** Antral folikül. Bar:125µm B. Germinal epitelyum altında primer foliküllerin (**PF**), morfolojisi normal görünümde izlendi fakat over yüzey epitelyinde boşluklar ve epitelyal proliferasyonu görünümü (*). Boya: H+E, Bar:25µm

Obez-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

Kontrol grubuna göre bağ ve yağ doku bölgesi daha azdı. Atretik folikül sayısı yok denecek kadar az idi. Vakuolleşmenin korona radiata hücreleri arasında yoğunluğu dikkat çekti (Şekil 45A-B).



Şekil 45. A. Obez-leptin grubu over ışık mikroskopi görüntüsü. Korteks bölgesinin çoğunda korpus luteumlar (**KL**) yer almakta idi. Bar: 125µm B. Oosit membranı düzensiz, korona radiata hücreleri ayrılmış (**ok**) ve düzenini yitirmiş ve vakuolleşmenin yoğun olduğu görülmekte(*). *: vakuolizasyon Boya: H+E, Bar: 125µm

Melatonin-Leptin gruplarından elde edilen bulgular:

Standart ve yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlara 42 gün 10mg/kg melatonin ve 1µg leptin uygulanması ile ovaryum folikülleri üzerine etkileri incelendi.

Kontrol Melatonin-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

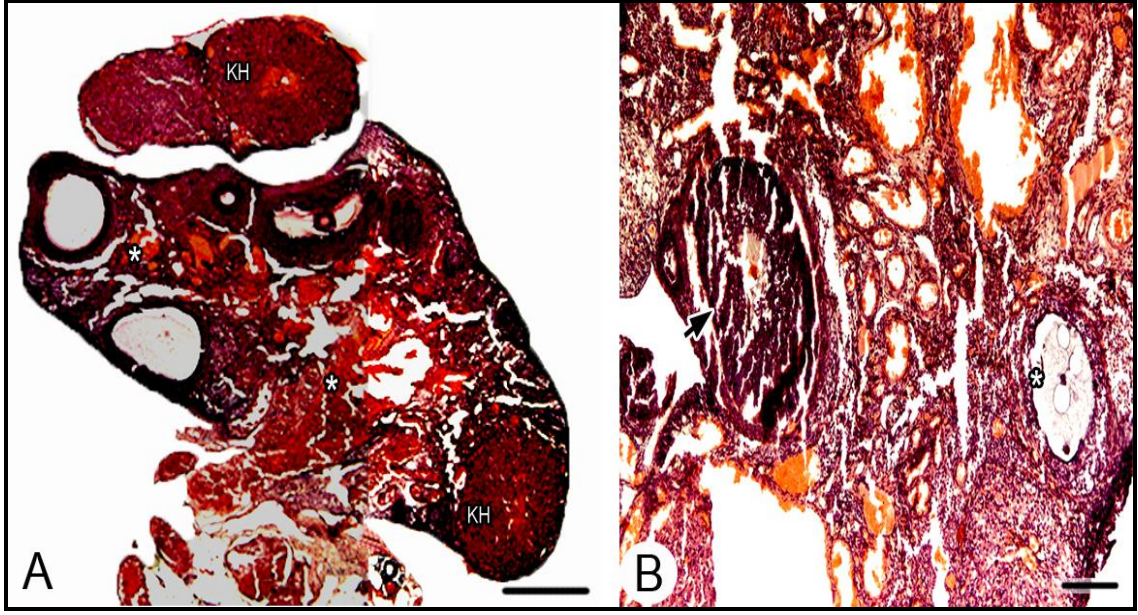
Granuloza hücre bağlantılarında kopukluklar, sitoplazmasında boş alanlar gözlemlendi (Şekil 46). Graaf folikül sayısı kontrol grubuna fazla, atretik folikül sayısı az idi.



Şekil 46. Kontrol Melatonin-Leptin grubu ışık mikroskopi görüntüsü. Atretik foliküllerin (**) oositinde (Oo) dejenerasyon izlenmekte idi. *: Primordial foliküller KL: Korpus luteum Boya: H+E, Bar: 125µm

Obez Melatonin-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

Obez sıçanlara melatonin+leptin uygulanan sıçanların ovaryumlarından alınan parafin kesitlerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında folliküllerin gelişmenin değişik düzeylerinde atreziye gittiği tespit edildi. Damarlanma çok fazla ve eritrositler foliküllerin çevresine yoğunlaşmıştı (Şekil 47). Granuloza hücrelerinin sayıca azaldığı, hücrelerin birbirinden uzaklaşıp düzenli görünümünü kayb ettikleri tespit edildi. Kortikal bölgede ve korpus luteumlar içerisindeki kapillerlerde dilatasyon dikkat çekici idi.



Şekil 47. A. Obez melatonin-leptin grubu ışık mikroskopi görüntüsü. Korpus hemorajikumun (KH) ve damarlanmanın (*) fazlalığı dikkat çekici idi. Bar: 125 µm **B.** Foliküllerin çoğunda birbirinden ayrılma (ok) ve sitoplazmasında yağlanma gözlemlendi (*). Boya: H+E, Bar: 125 µm

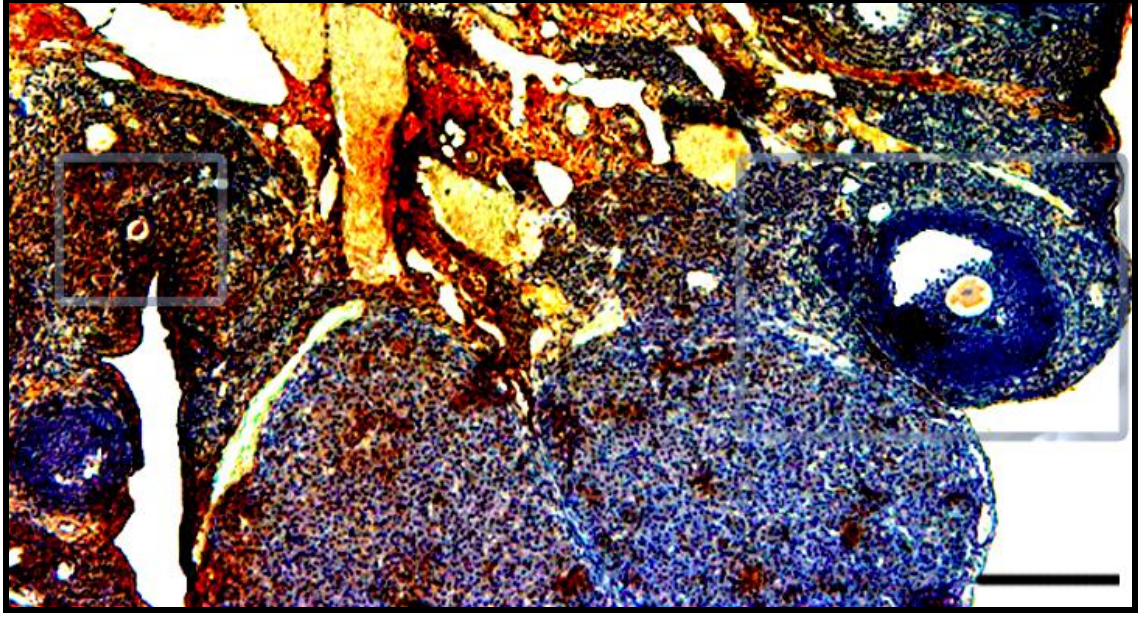
4.4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Ovaryum dokusundaki tüm follikül sınıflarında LHR immunreaksiyonu granuloza, teka hücrelerinde, korpus luteumda, oosit, ovaryum yüzey epitel hücreleri ve intertisyel hücrelerde sitoplazmik boyanma şeklinde belirlendi.

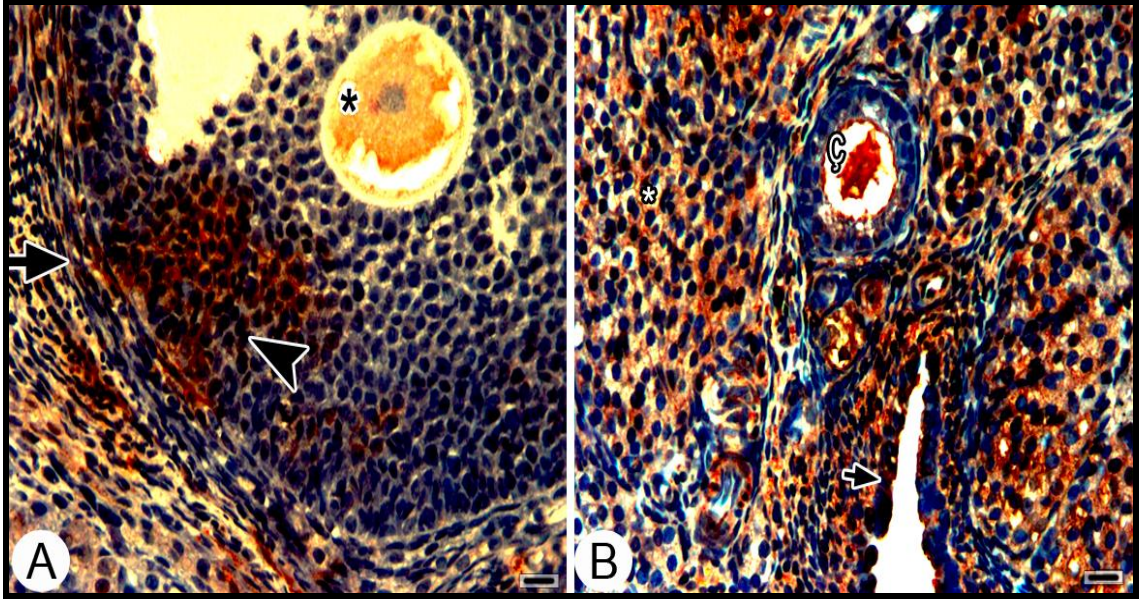
Kontrol ve Obez gruplarından elde edilen bulgular:

Kontrol grubundan elde edilen bulgular:

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda LHR ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda çok sıralı granuloza hücre katmanı içeren primer foliküllerden Graaf foliküllerine kadar tüm granuloza hücrelerinde korona radiata katmanında, teka hücrelerinde, korpus luteumda ve çekirdekte yoğun immün reaktivite belirlendi (Şekil 48). Follikül sınıflarının oosit ve granuloza hücrelerindeki boyanma, diğer gruplardaki follikül sınıflarına göre daha şiddetliyen, bazı gruplarda büyük antral foliküllerin sadece lümene bakan granuloza hücrelerinde boyanma gözlemlendi (Şekil 49A). Yüzey epitelinde belirgin LHR tutulumu ilgiyi çekti (Şekil 49B).



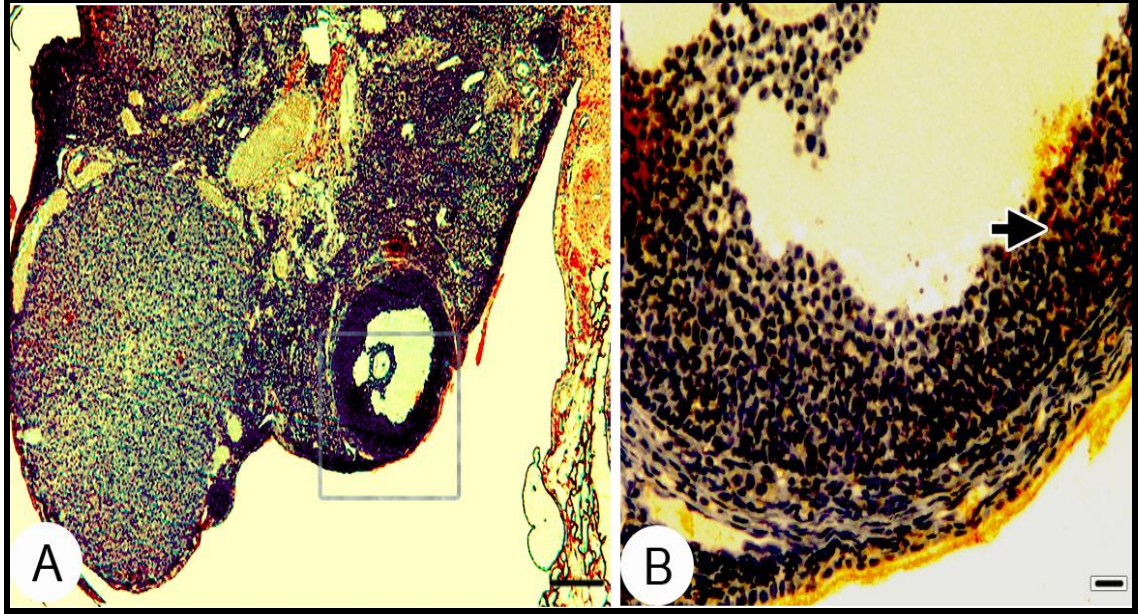
Şekil 48. Kontrol sıçanlardaki over dokusunun LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125 µm



Şekil 49. A. Kontrol sıçanlardaki over dokusunun LHR boyamasını gösteren ışık mikroskopi görüntüsü. Teika interna ve externa (ok), granulosa hücrelerinde (ok başı), korpus luteumda ve oosit sitoplazmasında (*), oosit yoğun LHR tutunumu gözlemlendi. Bar: 25 µm B. Oosit çekirdeğinde (Ç), stromada (*) ve germinal epitelde (ok) şiddetli LHR tutulumu görülüyor Bar: 25 µm

Obez grubundan elde edilen bulgular:

Obez grubuna ait ovaryum dokusunda antrum oluşan foliküllerdeki oositlerde sitoplazmada ve çekirdekte immünreaktivitenin biraz daha azaldığı dikkati çekti (Şekil 50A-B). Folliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde çok zayıf ve germinal epitelinde orta şiddette boyanma gözlemlendi (Şekil 50B).

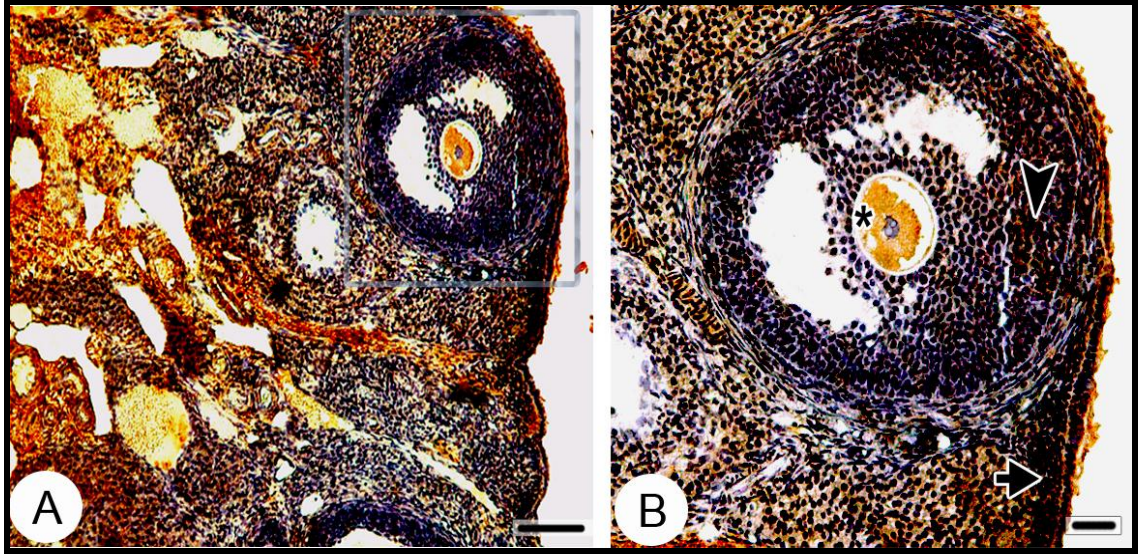


Şekil 50. A. Obez sıçanlardaki over dokusunun LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskobik görüntüsü. Korpus luteum'da hafif sitoplazmik tutulum izlendi. Bar: 125 μ m B. Teka internada az sayıda hücrenin reaksiyon gösterdiği ilgiyi çekerken, antrum oluşan foliküllerde granuloza hücrelerinde tutulumun yer yer yoğun (**ok**) olduğu dikkat çekti. Bar: 25 μ m

Melatonin gruplarından elde edilen bulgular:

Kontrol-Melatonin grubundan elde edilen bulgular:

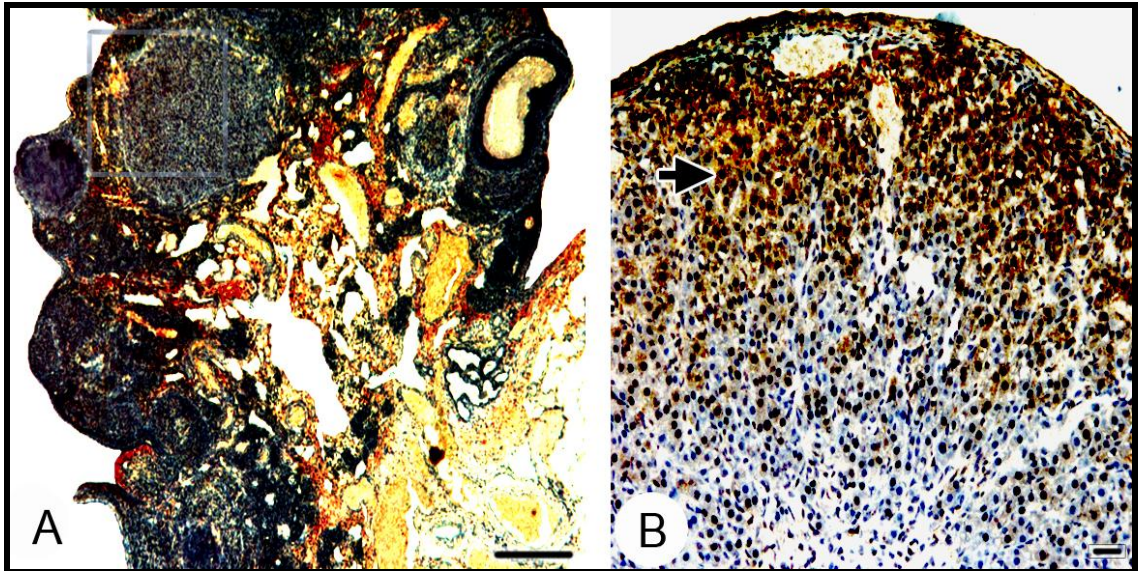
Melatonin uygulanan ovaryum dokusundaki korpus luteumda ve tüm foliküllerde tutunma yoğunluğu.



Şekil 51. A. Kontrol sıçanlara melatonin uygulanması ile over dokusundaki LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm **B.** Granuloza hücrelerinde (**ok başı**), korpus luteumda ve germinal epitelde (**ok**), oosit çekirdeğinde, oosit sitoplazmasında (*) yoğun LHR tutunumu gözlemlendi. Bar: 25 µm

Obez-melatonin grubundan elde edilen bulgular:

Yüksek yağlı diyetle beslenen deneklere melatonin uygulanması ile sıçanların ovaryum dokusundaki germinal epitelde ve tunika albugineaada orta şiddette boyanma izlendi (Şekil 52 A-B).

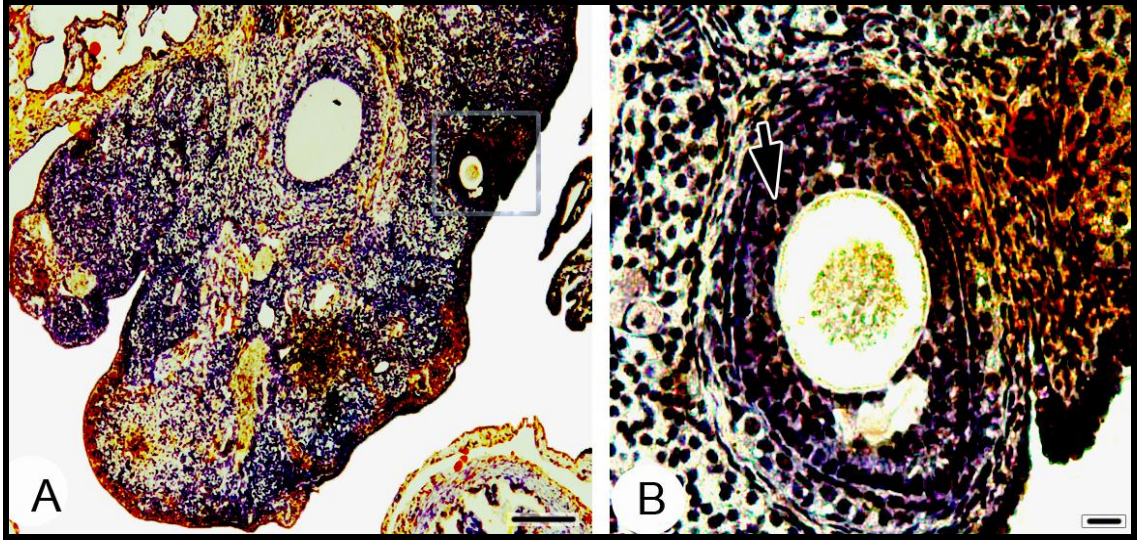


Şekil 52. A. Obez sıçanlara melatonin uygulanması ile over dokusundaki LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125 µm **B.** Korpus luteumun yoğun bir şekilde belirginleştiği (**ok**) ayırt edildi. Bar: 25 µm

Leptin gruplarından elde edilen bulgular:

Kontrol-leptin grubundan elde edilen bulgular:

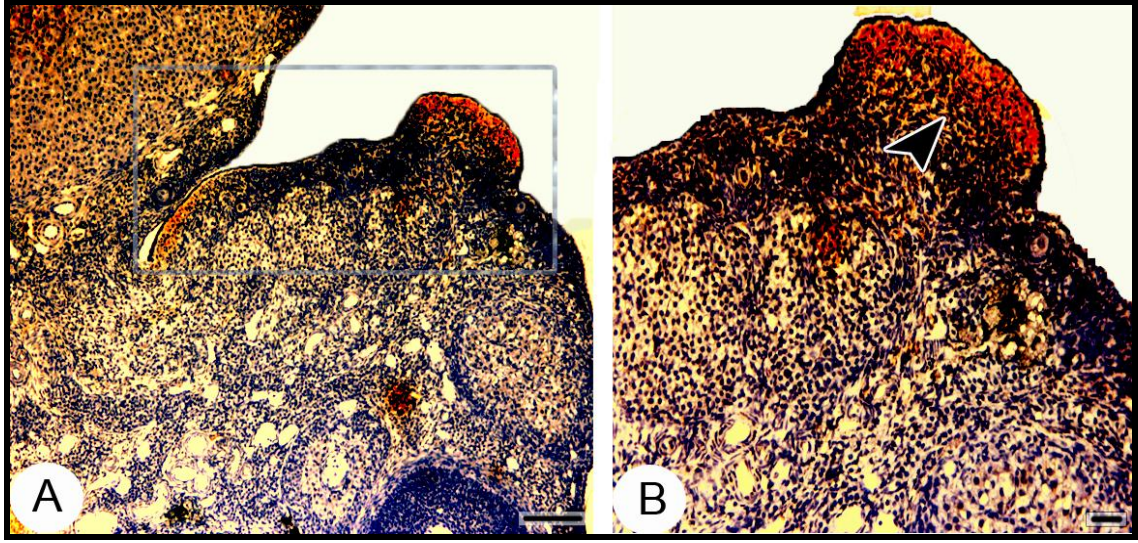
Leptin uygulanan deneklerden alınan ovaryum dokusunda LHR ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda antrum oluşan foliküllerde, granuloza ve teka hücrelerinde aynı şiddette orta derecede boyanma gözlemlendi. Kontrol grubundaki gibi antrum oluşan foliküllerde teka ve granuloza hücrelerinde tutulumun daha az ve yer yer daha yoğun olduğu dikkat çekti (Şekil 53).



Şekil 53. A. Kontrol sıçanlara leptin uygulanması ile over dokusundaki LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskobisi görüntüsü. Bar: 125µm B. Granuloza hücreleri (ok) boyanmanın hafif olduğu gözlemlendi. Bar: 25 µm

Obez-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

Primer folikülden başlayarak graff folikülüne kadar granuloza hücrelerinde de çekirdek ve sitoplazmik LHR tutulumları çok hafifti.

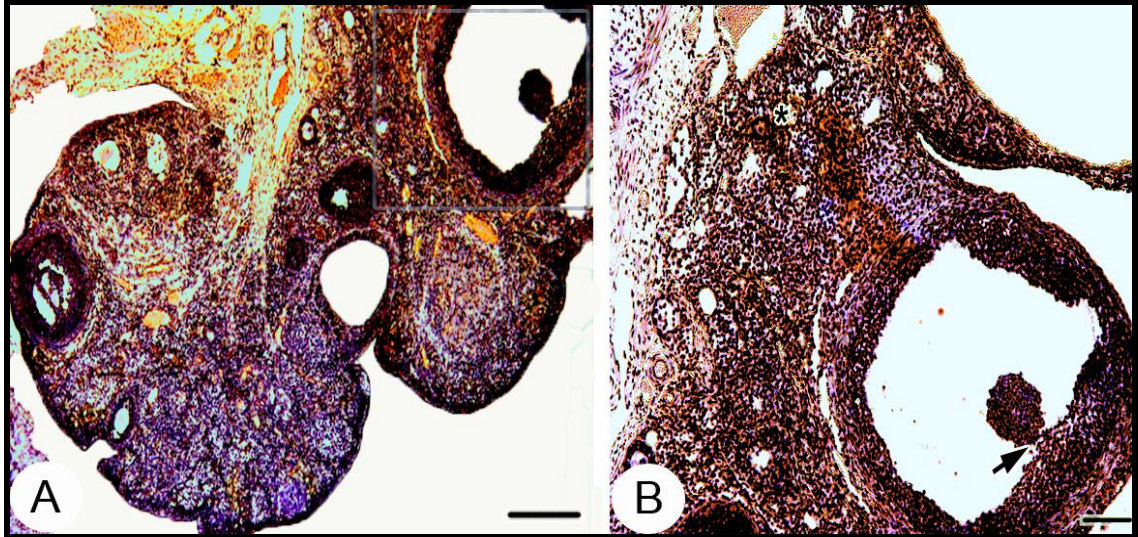


Şekil 54. A. Obez sıçanlara leptin uygulanması ile over dokusundaki LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125 µm **B.** Epitelyal proliferasyonunda (ok başı) tutulum olduğu dikkat çekti. Bar:25 µm

Melatonin-Leptin gruplarından elde edilen bulgular:

Kontrol Melatonin-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

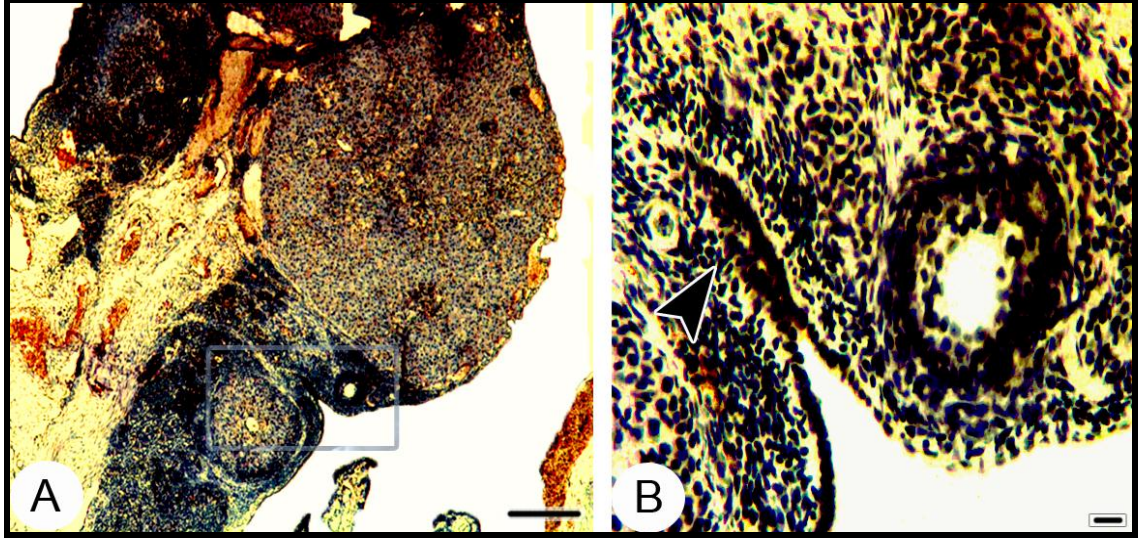
Atretik foliküllerde tutunma gözlenmemiştir, fakat intertisyel alanda tutunma belirgindi (Şekil 55 A-B).



Şekil 55. A. Kontrol sıçanlara melatonin-leptin uygulanması ile over dokusundaki LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm **B.** Graaf foliküllerin granuloza hücrelerinde (*), stromada ve kumulus ooforusda (ok) yeryer tutunma gözlendi. Bar: 25 µm

Obez Melatonin-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

Teka interna, teka eksternada Graaf foliküllerde tutulum hiçbir şekilde yoktu fakat yer yer germinal epitelde LH reseptörü tutulması görüldü (Şekil 56 A-B).



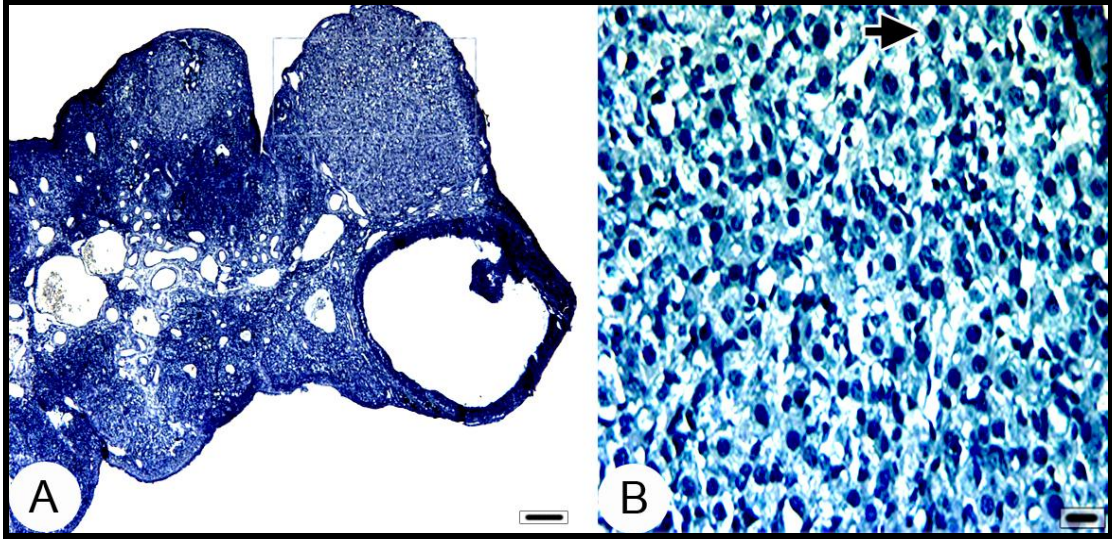
Şekil 56. A. Obez sıçanlara melatonin-leptin uygulanması ile over dokusundaki LHR boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 25 μ m B. Ovaryum dokusunda kübik epitel hücrelerinde LHR tutulumu gözlemlendi. Bar: 25 μ m

4.4.3. TUNEL -Apoptotik inceleme bulguları:

Kontrol ve Obez gruplarından elde edilen bulgular:

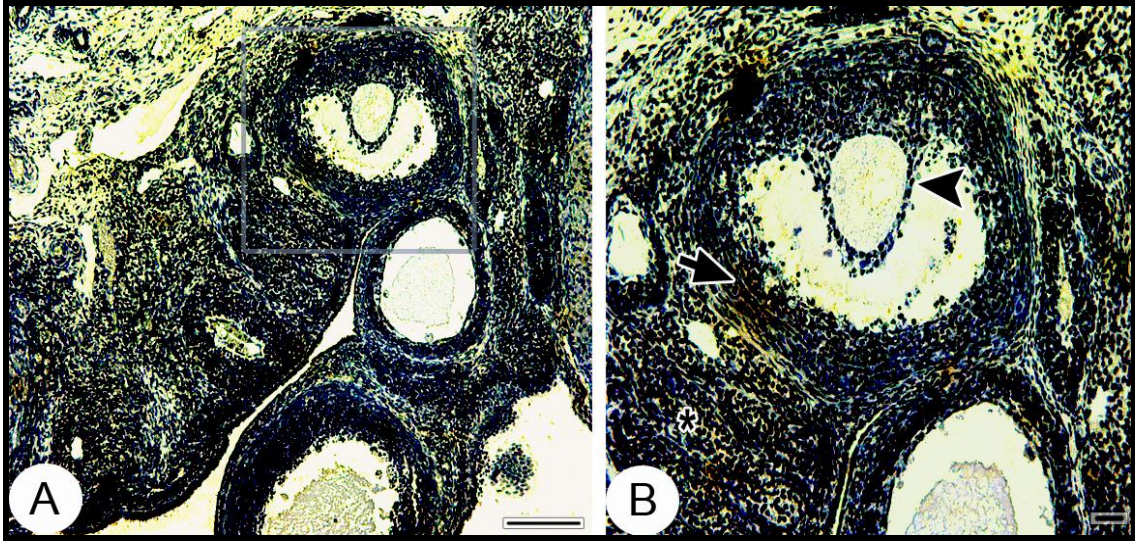
Kontrol grubundaki overlere göre (Şekil 57) ob/ob overlerin foliküllerin granuloza hücrelerinde (Şekil 58) TUNEL ile değerlendirilen apoptosiz çok daha fazla idi ve preantral ve erken antral foliküllerle daha baskın olarak sınırlıydı. Apoptotik hücre boyanması obez grubundaki sıçanlarda apoptotik hücrelerin kontrol grubuna göre şiddetli boyandığı görüldü.

Kontrol grubundan elde edilen bulgular:



Şekil 57. A. Kontrol sıçanlardaki over dokusunun TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125 µm B. TUNEL ile az pozitif apoptotik granuloza hücreleri (ok) görülmekte idi. Bar: 25 µm

Obez grubundan elde edilen bulgular:

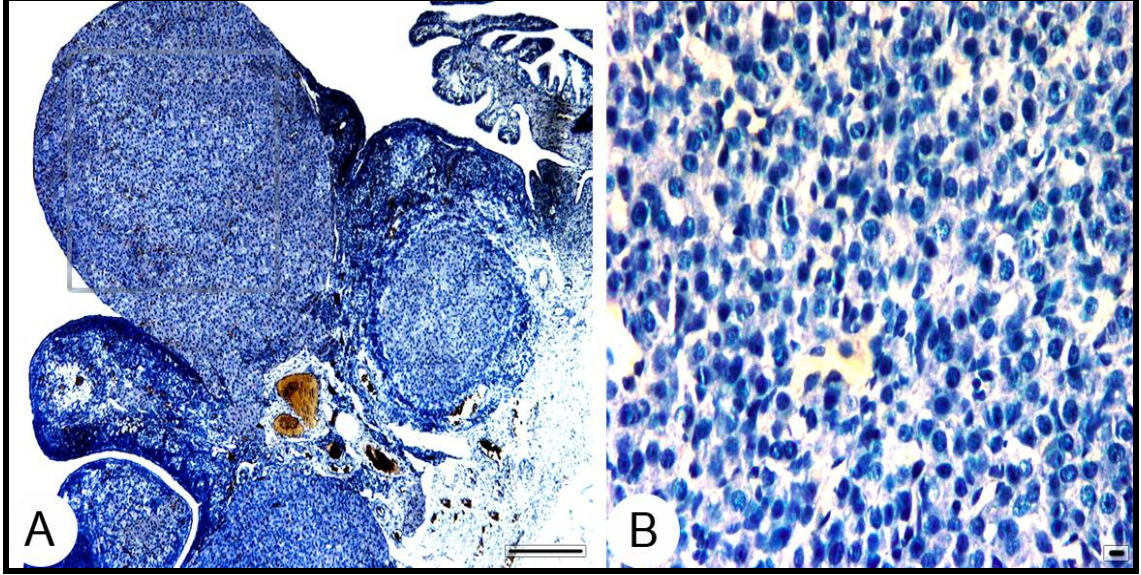


Şekil 58. A. Obez sıçanların over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm B. Oositin çevrelediği kumulus oophorus ve korona raiatadaki (ok başı) granuloza hücreleri ve teka folikülü hücrelerindeki (ok) TUNEL ile siyah boyanmış apoptozis oldukça artmıştı. Bu artış bazı bölgelerde apoptotik hücre odakları meydana getirecek kadar fazlaydı. Bar: 25 µm

Melatonin gruplarından elde edilen bulgular:

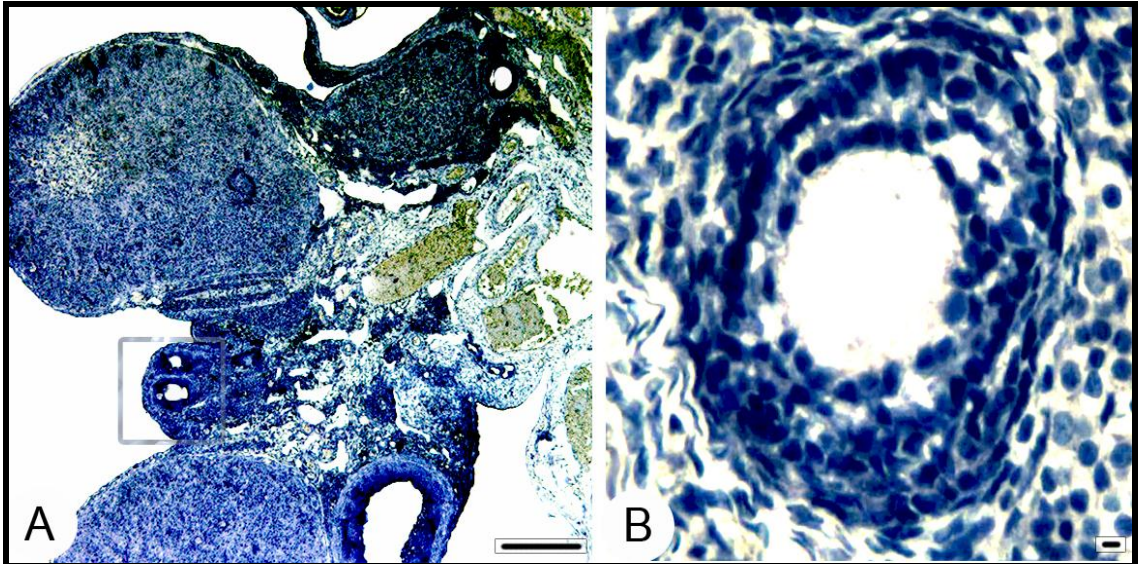
Melatonin verilen her iki diyet türünde de apoptotik hücreler gözlenmedi (Şekil 59-60).

Kontrol-Melatonin grubundan elde edilen bulgular:



Şekil 59. A. Kontrol sıçanlara melatonin uygulanması ile over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm **B.** Korpus luteumda ve tüm folikül aşamalarında apoptotik hücreler gözlenmedi. Bar: 25 µm

Obez-Melatonin grubundan elde edilen bulgular:

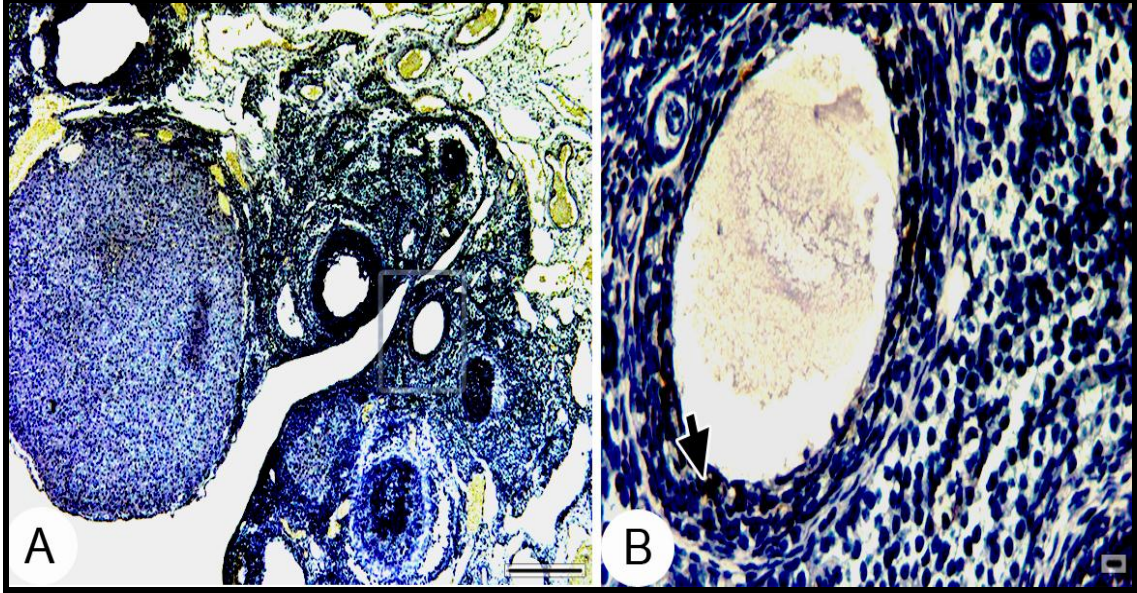


Şekil 60. A. Obez sıçanlara melatonin uygulanması ile over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm **B.** Preantral ve antral foliküllerde apoptotik hücreler gözlenmedi. Bar: 25 µm

Leptin gruplarından elde edilen bulgular:

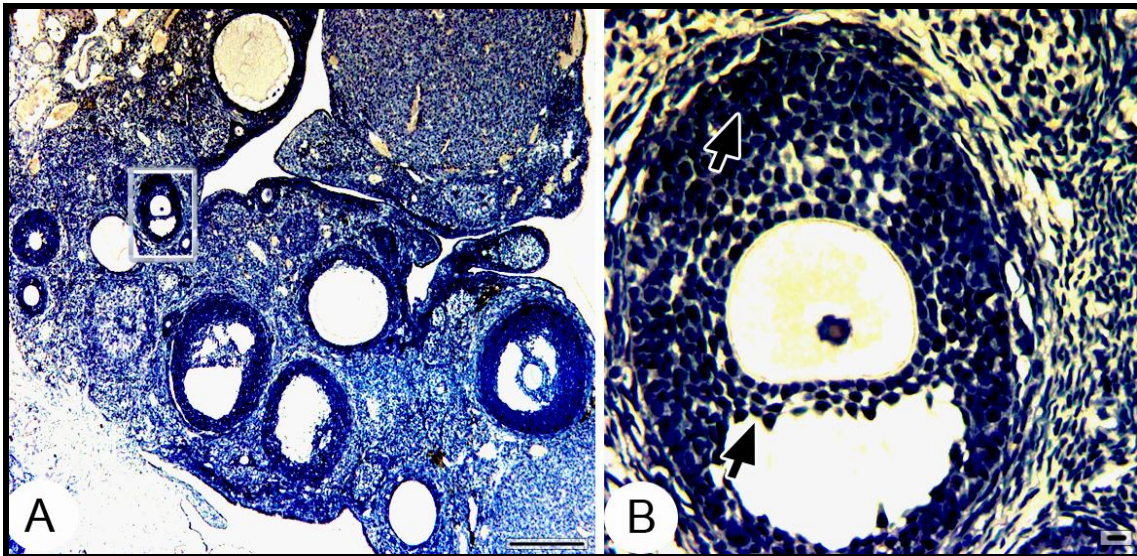
Leptin verilen over preantral ve erken antral/antral foliküllerin granuloza hücrelerinde apoptotik hücreleri azalttığı gözlemlendi (Şekil 61-62).

Kontrol-Leptin grubundan elde edilen bulgular:



Şekil 61. A. Kontrol sıçanlara leptin uygulanması ile over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm B. Granuloza hücrelerinde çok hafif apoptotik hücreler (ok) gözlemlendi. Bar: 25 µm

Obez-Leptin grubundan elde edilen bulgular:

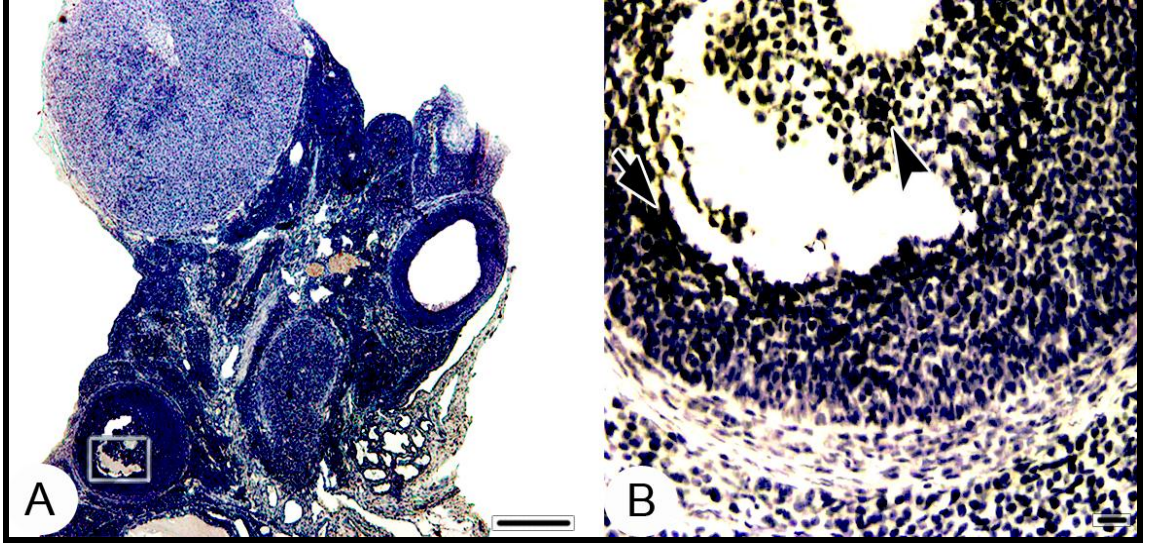


Şekil 62. A. Obez sıçanlara leptin uygulanması ile over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm B. Sekonder folikül hücrelerinde apoptotik hücreler granuloza hücrelerinde belirgindi (ok). Bar: 25 µm

Melatonin -Leptin gruplarından elde edilen bulgular:

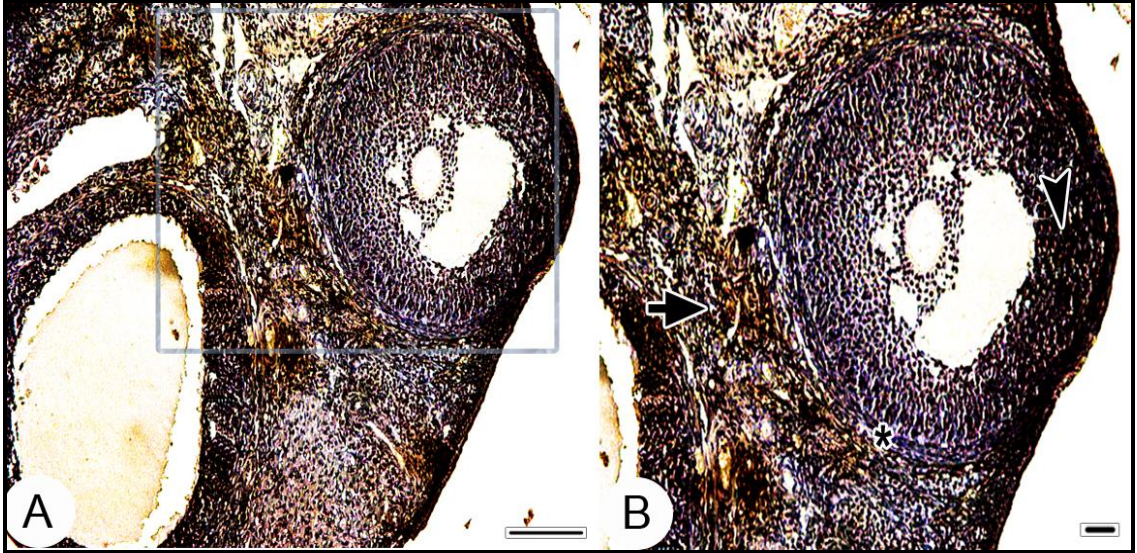
Melatonin+leptin verilen grupta obez deneklerde (Şekil 64) daha fazla olmak üzere leptinin salınımı artarak granuloza hücrelerinde apoptotik hücreler daha fazla idi.

Kontrol Melatonin -Leptin grubundan elde edilen bulgular:



Şekil 63. Kontrol sıçanlara melatonin-leptin uygulanması ile over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125 µm (B) Korona radiata, kumulus ooforusu (okbaşı) oluşturan granuloza hücrelerindeki (ok) şiddetli apoptotik hücreler. Bar: 25 µm

Obez Melatonin-Leptin grubundan elde edilen bulgular:



Şekil 64. A. Obez sıçanlara melatonin-leptin uygulanması ile over dokusundaki TUNEL boyamasını gösteren genel ışık mikroskopi görüntüsü. Bar: 125µm B. Granuloza hücrelerinde (ok başı) ve stromada (ok) şiddetli siyaha boyanmış apoptotik hücreler gözlemlendi. Bar: 25 µm

5. TARTIŞMA

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD), 25 yıl önce obezite oranı yüksek olan eyaletlerin sayısı yaklaşık 5-10 iken şu anda hemen hemen bütün eyaletlerde ciddi bir obezite sorunu vardır. Bu sorun ülkemizde de giderek artmaktadır. Dünya genelindeki obezitenin başlıca nedeni olarak yağlı yiyecek tüketimindeki artış ve bu yağlı yiyeceklerin ulaşılabilirliği gösterilmektedir (Golay ve Bobbioni 1997; Bray ve Popkin 1998; Rolls, 2000; Schrauwen ve Westerterp 2000; Jequier 2002; French ve Robinson 2003). Obezite, genellikle tüketilenden fazla kalori alımına bağlı olmakla birlikte bazı endokrinolojik hastalıklar ve hormon bozuklukları da obeziteden sorumlu olabilir (Gönen, 1998).

Obezite, vücutta aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanan bir enerji metabolizma bozukluğudur (Gönen, 1998). Obezlerde gözlenen karın bölgesi yağlanması periferik yağlanmaya kıyasla daha zararlıdır ve kadınlarda üreme sorunlarına neden olmaktadır (Grodstein ve ark., 1994). Obezitenin ilerlemesi durumunda karşılaşılan komplikasyonların en önemli nedenlerinden biri olarak “oksidatif strese bağlı antioksidan savunma mekanizmalarındaki yetersizlik” öne sürülmektedir (Norman ve Clark, 1998). Bu nedenle, gerek kontrol altına alınmamış, gerekse diyet, egzersiz ve anti-obezite ilaç uygulamalarıyla kontrol altında tutulmaya çalışılan obezlerde, antioksidan savunma mekanizmalarındaki değişiklikler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Kilodaki azalma metabolik düzeni iyileştirmekte ve bu kayıp ta obezite tedavisinin esas amacını oluşturmaktadır. Obezite sadece tıbbi bir konu olmayıp dünyada sosyal ve ekonomik boyutlarıyla da düşünülmesi gereken önemli bir sağlık sorunudur. ABD’de bir yılda yaklaşık 300.000 kişi obezite ile ilişkili hastalıklardan ölmektedir (Allison ve ark., 1999).

İnsan diyetindeki yağ miktarının azaltılmaya çalışılması oldukça zordur. Çin, Kanada ve U.S. deki epidemiyolojik çalışmalar diyetdeki yağ miktarının artmasının obeziteyi tetiklediğini göstermiştir (George ve ark., 1990; Tucker ve Kano 1992; Popkin ve ark., 1993; Bray ve Popkin 1998; Hill ve ark., 2000; Schrauwen ve Westerterp 2000; Jequier 2002; French ve Robinson 2003). Yağdan zengin diyet ile beslenme sadece insanlarda değil farelerde (Rothwell ve Stock 1984; Warwick ve Schiffman 1992; Takahashi ve ark., 1999; Buettner ve ark., 2007) ve sıçanlarda (Boozer ve ark., 1995; Ghibaudi ve ark., 2002) da obeziteye neden olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden de fare

ve sıçanlar beslenmeye bağılı obezite araştırmaları için uygun bir model olarak değerlendirilirler (Deuel, 1944; 1947). Spontan obez sıçanlar, doğuştan itibaren aşırı beslenme ihtiyacı duyup aşırı miktarda besin alan ve bunun sonucu olarak da kısa sũrede morbid obez hale gelerek erken dũnemde ȓlen bir tũrdũr ve insan obezitesini araştırmak için uygun bir model olarak değerlendirilmektedir (ũçkaya, 1999). Bu teoriye gȓre spontan obez sıçanlarda eksik olduğu dũřũnũlen bir hormonun homoloğu insanlarda da mevcuttur ve bu hormonun ağırlığı kontrol altında tuttuğu iddia edilmektedir (Kennedy, 1953).

Fareler ȓzerinde yapılan obezite çalışmaları ilk kez 1949 yılında, lezzetli yarı sıvı bir diyetin isteğe bağılı zamanlarda uygulanması ile başlamıştır (Ingle, 1949). Daha sonra Fenton ve Dowling (1953), sũtten yeni kesilmiş sıçanları obezleştirmek için enerjisinin %50 si yağdan gelen bir diyet uygulamış ve buna beslenmeye dayalı obezite adını vermişlerdir ama bu modelin adı daha sonra diyete bağılı obezite (Sclafani ve Springer 1976) olarak değiştirilmiştir. Birçok araştırmacı hayvanları obezleştirmek için gerekli olan yağ miktarını incelemiştir (Hariri ve Louise, 2010). Bu incelemeler esnasında yağ içerikleri birbirinden farklı birçok diyet obezite modeli oluşturmak ȓzere kullanılmıştır (Mickelsen ve ark., 1955; Harrold ve ark., 2000). Bu alışmalar sonucunda toplam enerji miktarının %30'undan fazlasını yağın oluşturduğu diyetlerin obezite gelişimine yol açtığı kanaatine varılmıştır (Hariri ve Louise, 2010).

Biz de bu nedenle çalışmamızda sıçanlar ȓzerinde obezite modeli oluşturmak için %40'ı yağdan oluşan yũksek yağ içerikli diyet kullandık (Altunkaynak ve ark., 2008). Bu diyetle oluşturulan obezite modeli ȓzerinde melatonin, leptin ve melatonin-leptin uygulamaları yapıldı. Tũm bu uygulamaları takiben elde edilen over ȓrneklere makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal olarak değerlendirildi. Çalışmamızın mikroskobik aşamasında stereolojik parametre değerlendirmeleri ve immũnohistokimyasal boyamalar yapıldı. Elde edilen bulguların yorumu aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

5.1. Vũcut Ağırlığı Bulgularının Yorumu:

Çalışmamızda *Wistar albino* cinsi sıçanlar dokuz hafta boyunca yũksek yağlı diyet (%40 yağ içeren) ile obez yapıldıktan sonra altı hafta boyunca hergũn melatonin (10 mg i.p.), leptin (1µg i.p) ve melatonin-leptin (10 mg i.p. melatonin + 1µg i.p leptin)

uygulanmasına tabi tutulmuştur. Enjeksiyon yapılan grupların yanısıra bu grupların kontrolleri olan sağlıklı ve obez denekler çalışma boyunca haftalık olarak tartıldı. Elde edilen bulguların yorumu aşağıda sunulmuştur:

Çalışmamızda obez deneklerde leptin tedavisi öncesi ağırlık artışı %15 iken tedavi sonrası (1µgr i.p.) ağırlık artışı %2,6' ya düşmüştür. Aynı sürede standart diyet ile beslenen sıçanların tedavi öncesi ağırlık artışı %0,8 iken leptin tedavisi (1µgr i.p.) sonrası %0,7 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda uygulanan leptin tedavisinin obez deneklerin ağırlıklarının azalmasında etkili olduğunu göstermektedir.

Genetik olarak leptinden yoksun obez (*ob/ob*) farelere leptin verildiğinde gıda alımının azaldığı ve vücut ağırlığının azaldığı gözlemlenmiştir (Campfield ve ark., 1995; Weigle ve ark., 1995; Barash ve ark., 1996; Chehab ve ark., 1996). İnsanlarda günlük 0,01-0,30 mg/kg subkutan leptin uygulamasının güvenilir olduğu, hafif bir diyete ek olarak bir aylık leptin tedavisi ile kilo kaybının yaklaşık 1 kg, altı aylık tedavi sonunda ise yaklaşık 5,4 kg olduğu bildirilmiştir (Mantzoros, 1999). Daha yakın tarihli bir çalışma, iki hafta boyunca yüksek yağlı diyetle (%60 enerji) beslenen yetişkin erkek *Sprague dawley* cinsi sıçanların ICV uygulanan leptinin (3µg) beslenmeyi azaltıcı etkisine karşı aşırı duyarlı olmasına rağmen diyetin 5. haftasında leptinin bu etkisine duyarsız hale geldiklerini göstermiştir (Fam ve ark., 2007).

Vücut ağırlığı birçok metabolik ve hormonal sinyali içeren kompleks mekanizmalarla regüle edildiğinden leptinin etki mekanizmasının ve vücut parametreleriyle etkileşiminin aydınlatılması obezite ve ona eşlik eden diyabet hastalığının patogenezi ve tedavisinde uzun zamandır ihtiyaç duyulan bilgilere ulaşmamızı sağlayacaktır.

Genç *Wistar albino* cinsi sıçanlarda sürekli ışık ve melatonin uygulaması vücut ağırlığı üzerinde herhangi bir etki yaratmazken (Mustonen ve ark., 2002) orta yaşlı farelerde melatoninin vücut ağırlığını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Rasmussen ve ark., 1999; Wolden-Hanson ve ark., 2000).

Raskind ve ark. (2007), çalışmalarında özellikle beşinci ve sekizinci haftalar arasında sıçanlara melatonin uygulamasının vücut ağırlığını azalttığını göstermiştir (çalışma 8 hafta sonra sonlandırılmıştır). Başka bir çalışmada melatoninin vücut ağırlığı artışı üzerindeki engelleyici etkisinin uygulamanın 3. haftasında belirgin bir hale geldiği tespit edilmiştir (Marı'a ve ark., 2010). Çalışmamızda da standart diyet ile beslenen dişi

sıçanlarda melatoninin (10mg/kg; 6 hafta boyunca) vücut ağırlığında üçüncü haftada %2,6; altıncı haftada ise %3,5 azalmaya neden olduğu tespit edildi. Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda melatonin verilen gruptaki ağırlık artışı üçüncü haftada %1,83; altıncı haftada ise %0,91 olarak gözlenmiştir. Böylece obez-melatonin grubundaki deneklerin altıncı haftada üçüncü haftaya göre daha az kilo aldığı; ayrıca hem yüksek yağlı diyetle hem de standart diyet ile beslenen deneklerde melatoninin kilo alımına karşı koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, dokuzuncu ve 15. haftalar arasında ortalama vücut ağırlığının kontrol grubunda %1,69; kontrol-melatonin grubunda %3,50; kontrol-leptin grubunda %0,65; kontrol-melatonin-leptin grubunda %2,77 azaldığı tespit edildi. Yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda ortalama vücut ağırlığı obez grubunda %3,94; obez-melatonin grubunda %9,2; obez-leptin grubunda %6,94; obez-melatonin-leptin grubunda %4,3 arttığı gözlemlenmiştir. Melatoninin leptinin salınımı üzerindeki etkisi diyet türüne göre değişiklik gösterebilir. Çalışmamızda kullanılan yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda melatonin, leptinin ağırlık düşürücü etkisini artırmış gibi görünmektedir.

Yukarıdaki sonuçlara bakıldığında çalışmamızda oluşturulan obezite modeli üzerinde tedavi amaçlı kullanılan melatonin ve leptin hormonlarının özellikle yağlı diyet ile beslenen deneklerin ağırlıklarında artışa neden olduğu söylenebilir. Fakat sonuçlar kısmındaki ağırlık değişim eğrileri dikkatle incelenirse; hem kontrol hemde yağlı diyet ile beslenen deneklerde melatonin, leptin ve melatonin-leptin hormonlarının uygulamaların üçüncü ve dördüncü haftalarında ağırlık azaltıcı yönde optimum etki gösterdiği, uygulamaya devam edilen beşinci ve altıncı haftalarda ise bu etkinin kaybolduğu görülür. Bu durum da söz konusu hormonlara karşı uzun vadede gelişen direnç mekanizmalarıyla açıklanabilir.

5.2. Over Yaş Ağırlığı Bulgularının Yorumu:

Çalışmamızda standart diyet ile beslenen sıçanların over ağırlığı 0,05 gr iken, altı hafta boyunca leptin uygulanmış (1 µg, i.p.) sıçanların over ağırlığı 0,08 gr olarak belirlendi. Yüksek yağlı diyet ile beslenen gruptaki *obez* sıçanların over yaş ağırlığı 0,04 gr iken, yüksek yağlı diyet ile beslenerek 6 hafta boyunca leptin uygulanmış (1 µg, i.p.) sıçanların over yaş ağırlığı 0,1 gr olarak tespit edildi. Bu sonuçlara göre yapılan

istatistiksel değerlendirmede, sıçanlarda leptin uygulaması over yaş ağırlığını artırdı ($p<0,05$). Literatürde de genetik olarak leptinden yoksun obez (*ob/ob*) farelere leptin verildiğinde over ağırlığının arttığı gözlemlenmiştir (Campfield ve ark., 1995; Weigle ve ark., 1995; Barash ve ark., 1996; Chehab ve ark., 1996). İnfertil ve gonadotropin seviyesi düşük *ob/ob* farelere leptin enjekte edildiğinde, uterus ve overlerinin ağırlıklarının arttığı gözlemlenmiştir (Ahima ve ark., 1997). Bu çalışmaların sonuçlarına bakıldığı zaman leptinin over ağırlığı üzerindeki etkisi çoğu çalışmaya göre arttırıcı yöndedir. Prata Lima ve ark. (2004)' nın çalışmasına göre melatonin (200 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ gr}$ vücut ağırlığı) tedavisi over ağırlığını azaltmıştır, bununla birlikte hayvanların vücut ağırlıkları da düştüğü için ovaryum ağırlığının vücut ağırlığına oranı değişmemiştir. Chuffa ve ark. (2011)' nin yaptıkları çalışmada 100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ lık melatonin tedavisi over ağırlığında azalmaya sebep olmuştur.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre standart diyet ile beslenen sıçanlara melatonin uygulanması sonucunda over ağırlığında azalma bulundu ($p<0,01$), yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda melatonin uygulamasından sonra over yaş ağırlığı değişmedi ($p>0,05$). Over yaş ağırlığı standart diyet ile beslediğimiz kontrol grubunda melatonin ve leptin uyguladığımız gruptaki over ağırlığı 0,06 gr olarak tartıldı. Yüksek yağlı diyet ile beslenen melatonin ve leptin uyguladığımız grupta 0,086 gr dı. Ayrıca hem kontrol ($p<0,05$) hem de obez grubunda ($p<0,05$) leptin melatonine kıyasla over yaş ağırlığını daha fazla artırırken, yüksek yağlı diyet uygulamasında melatonin ve leptinin birlikte uygulanmasının over yaş ağırlığını arttırdığı gözlemlendi ($p<0,01$).

5.3. Over Çevresi Yağ dokusu Ağırlığı Bulgularının Yorumu:

Çalışmamızda yüksek yağlı diyet ile beslenerek obez olması sağlanan sıçanların (8-9 haftalık) over çevresi yağ dokusu ağırlığı 4,96 gr iken, aynı diyet ile birlikte altı hafta boyunca leptin uygulanmış (1 μg , i.p.) sıçanların over çevresindeki yağ dokusu ağırlığı 4,03 gr olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre, obez-leptin grubundaki over çevresi yağ dokusu ağırlığının obez grubuna göre %18 azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$). Yağlı diyetle beslenen ve melatonin (10 mg/kg) verilen sıçanların yağ dokusu ağırlığı ise 4,21 gr olarak belirlendi. Böylece obez-melatonin grubundaki over çevresi yağ dokusu ağırlığının obez grubuna göre azaldığı bulundu ($p<0,01$). Yüksek yağlı diyet ile beslenerek melatonin ve leptin uygulanan obez grupta

ise over çevresi yağ dokusu ağırlığı 3,77 gr idi. Görüldüğü üzere melatoninin leptin ile birlikte uygulanması obez gruplarda over çevresi yağ dokusu ağırlığını anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0,001$).

Aynı süre boyunca standart diyetle beslenmiş sıçanlardaki over çevresindeki yağ dokusu ağırlığı 2,12 gr iken leptin uygulanmış (1 µg, i.p.) sıçanların over çevresindeki yağ dokusu ağırlığı 2,54 gr olarak belirlendi. Standart diyetle beslenerek melatonin verilen sıçanların over çevresi yağ dokusu ağırlığı 1,91 gr olarak ölçüldü. Standart diyet ile beslenerek melatonin ve leptin uygulanan kontrol grubunda ise 1,21 gr olarak bulundu. Standart diyet ile beslenen gruplarda over çevresi yağ dokusu ağırlığı açısından fark gözlenmedi ($p>0,05$). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre obez deneklerde hem melatonin hem de leptin over çevresi yağ dokusu ağırlığı açısından anlamlı ölçüde azalma sağlamıştır. Fakat leptin over çevresi yağ dokusunu azaltmada melatonininden daha etkilidir. Ayrıca yine obez bireylerde melatonin ve leptinin birlikte uygulanması over çevresi yağ dokusu ağırlığını etkin bir şekilde azaltmıştır ($p<0,001$).

5.4. Follikül Sayımı Bulgularının Yorumu:

Çalışmamızda stereolojik bir metod olan fiziksel disektör yöntemi ile follikül sayımı yapılarak kontrol grubundaki primordial ve primer follikül sayısının obez grubuna göre anlamlı ölçüde daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Graaf ve atretik follikül sayısı ise obezite grubunda kontrol grubuna kıyasla oldukça artmış olarak bulundu ($p<0,05$; $p<0,001$). Yeni Zelanda obez fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada da ovaryum hacmi, toplam follikül sayısı, primordial follikül sayısı, atretik follikül sayısında kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiştir (Radavelli-Bagatini ve ark., 2011).

Çalışmamızın sonucundan da anlaşılacağı üzere yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanların ovaryumlarındaki primordial follikül sayısında önemli bir azalma ve atretik follikül sayısındaki artışın ovaryum rezervinde olumsuz etki yapabileceğini düşündürmektedir. Histolojik analizler, kalori alımı %25 ve %45 oranında kısıtlanan farelerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek oranda primordial folliküle ve daha fazla sayıda sağlıklı folliküle sahip olduğunu, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin ise follikül sayısı ve bu folliküllerin sağlıklı oluşu açısından kontrol grubundan farklı olmadığını göstermiştir (Luo ve ark., 2012).

Birçok çalışma over dokusu üzerinde leptinin direkt etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Spicer ve Francisco 1997; Zachow ve Magoffin 1997; Agarwal ve ark., 1999; Zachow ve ark., 1999). Araştırmalar sıçanlarda ovulasyon evresinin, aşırı leptin uygulaması ile kayda değer oranda baskılandığını ortaya koymuştur (Duggal ve ark., 2000, 2002; Ricci ve ark., 2006; Usta ve ark., 2012). Leptin uygulamasının sıçanlarda folikülogenezi arttırdığı tespit edilmiştir (Barkan ve ark., 2005; Elshafie ve ark., 2006). *ob/ob* dişi farelere uygulanan leptinin kontrollere kıyasla toplam folikül sayısını (primordial, primer, erken primer, sekonder ve Graaf folikülleri) arttırdığı gözlenmiştir (Barash ve ark., 1996).

Çalışmamızda standart diyetle beslenen sıçanlarda leptinin (6 hafta 1 µg/gr) primordial folikül sayısını anlamlı ölçüde azalttığı; yani folikülogenezi hızlandırdığı tespit edildi ($p<0,001$). Kontrol-leptin grubundaki primordial folikül sayısı ise obez-leptin grubuna göre yüksekti ($p<0,001$). Literatürde, kontrol grupları ile kıyaslandığı zaman leptin eksikliği olan hayvanlarda atretik folikül sayısının yüksek olduğu gözlenmiştir (Hamm ve ark., 2004). Çalışmamızda ise normal diyet uygulamasını takiben leptin uygulanan grupta atretik folikül sayısı üzerinde anlamlı bir etki gözlenmezken yüksek yağlı diyet uyguladığımız sıçanlarda leptinin (6 hafta-1 µg/gr) atretik folikül sayısını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Melatonin oosit gelişimini; fare ve sıçanlarda invitro fertilizasyonu takiben erken embriyo gelişimini ve üremeyi de destekler (Fernandez, 1995; Ishizuka, 2000). Melatonin, farelerdeki atretik follikül sayısını artırmıştır (Kim ve ark., 2000) ve follikül sayısı üzerinde etkili değildir (Khajeh ve ark., 2012; Mohammadghasemi ve ark., 2012). Dişi hamster ve farelerde melatonin uygulaması sonrasında Graaf folikülü sayısında azalma ile ovaryum interstisyel doku hacminde artış gözlemlenmiştir. Primer foliküller de dâhil bazı follikül tiplerinin melatoninden etkilenmediği öne sürülmüştür (Ooi ve Ng, 1989; Chan ve Ng, 1995). Çalışmamızda, standart diyet ile beslenen kontrol grubundaki sıçanların primordial follikül sayısı kontrol-melatonin grubundakine göre anlamlı ölçüde fazla olarak gözlemlendi ($p<0,001$). Ayrıca kontrol-melatonin grubundaki primordial folikül ve Graaf folikülü sayısı obez-melatonin grubuna göre daha yüksekti ($p<0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubundaki Graaf folikülü sayısı kontrol-melatonin grubuna göre daha azdı ($p<0,05$), fakat obez deneklere melatonin uygulanması obez kontrol deneklere kıyasla Graaf follikülü sayısını azaltmıştır ($p<0,05$). Ayrıca melatoninin obez

grubunda atretik folikül sayısını da azalttığı gözlemlendi ($p<0,001$). Bizim bulgularımıza benzer şekilde literatürde fare overinde follüküler atreziye sebep olan radyasyona karşı melatonin koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (Kim ve Lee, 2000).

Merinos koyunlarına uygulanan melatoninin primer folikül sayısında değişiklik yapmadığı bulunmuştur (Foldes ve ark., 1992). Bulgularımıza göre kontrol-melatonin grubundaki primordial folikül sayısı kontrol grubundan anlamlı ölçüde azdır ($p<0,001$). Melatonin uygulamasının primordial folikül sayısında yarattığı azalma ilgi çekicidir (Chan ve ark., 1995). Merinos koyunlarına melatonin uygulamasının sekonder folikül sayısını azalttığı ve olgun folikül yoğunluğunu arttığı gösterilmiştir (Foldes ve ark., 1992). Fakat görüldüğü gibi follükül sayıları üzerinde melatoninin oluşturduğu sayısal farklılıklar anlamlılık oluşturacak derecede değildi.

Çalışmamızda melatonin ve leptinin birlikte uygulanması ile folikül sayısı değerlendirmelerinde elde edilen bulgulara göre, kontrol melatonin-leptin grubundaki sıçanlardaki primordial folikül sayısı kontrol-leptin grubuna göre azdı ($p<0,01$). Sekonder folikül sayısı obez melatonin-leptin grubundaki sıçanlarda obez melatonin grubundaki sıçanlardan azdı ($p<0,05$). Yüksek yağlı diyetle beslenerek melatonin-leptin verilen gruptaki sıçanlarda atretik folikül sayısının obez-kontrol grubuna göre azaldığı bulundu ($p<0,001$).

Tüm sayım bulguları birlikte değerlendirildiğinde ise leptinin follükülogenezi hızlandırdığı, melatoninin ise anlamlı olmamakla birlikte follükülogenezi hem tek başına hemde leptin ile birlikte uygulandığında baskıladığı sonucuna varılabilir. Bu noktada bize göre obez kadınlarda kilo azalmasıyla birlikte follükül sayısının optimum düzeyde tutulması isteniyorsa leptin melatonin ile birlikte kullanılmalıdır. Böylece obezlerde hem leptinle etkin ağırlık düşüşü sağlanabilir, hem de obezlerde zaten artmış olan hızlı follükülogenezin leptin ile iyice artması melatonin sayesinde baskılanabilir.

5.5. Overe ilişkin Hacim Bulgularının Yorumu:

Obezite gittikçe yaygınlaşan bir sağlık sorunu olup dişi üreme sisteminde de birçok hastalığa yol açabilir (Grodstein ve ark., 1994; Norman ve Clark, 1998). Obez hastalarda gonadotropin salgılanma mekanizmasının değiştiği bilinmekle birlikte, fazla kilolu kadınlarda menstrüel disfonksiyon, anovulasyon ve infertilite daha sık rastlanılmaktadır (Grenman ve ark., 1986). Böylece, yağ dokunun azalması metabolik

ve üreme fonksiyonlarının geri kazanılmasında önem arz etmektedir. (Holte ve ark., 1995; Huber-Buchholz ve ark., 1999).

Kadınlarda üreme fonksiyonlarının başlaması ve korunması optimal vücut ağırlığı ile ilişkilidir. Zayıf (VKİ 19kg/m^2 'den düşük), kilolu (VKİ 25kg/m^2 'den yüksek) ve obez (VKİ 30kg/m^2 'den büyük) olan kadınlar belirli rahatsızlıklarda risk altındadırlar (WHO, 2000). VKİ 30'dan fazla olanlarda mortalite artmaya başlar ve özellikle 35'den sonra mortalite eğrisi daha da dikleşir (Serter, 2004). Obez kadınlarda sıklıkla menstrual siklus, ovulasyon bozuklukları (Metwally ve ark., 2007) yüksek androjen salgılama, çok sayıda foliküler kist, düşük doğurganlık gibi durumlarla nitelenebilecek bir durum olan polikistik over sendromu görülebilir (Pasquali ve Gambineir, 2006; Diamanti-Kandarakis, 2007).

Başka bir tartışmalı nokta da VKİ ve ovaryum hacmi arasındaki ilişkidir. Çalışmalarda ovaryum hacminin sağlıklı kadınlara oranla obez kadınlarda anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edilmiştir. Zaidi ve ark. (2009), normal kilodaki ve fazla kilodaki kadınları içeren çalışmalarında, VKİ'deki artışla ovaryum hacminin düştüğünü, dolayısıyla kadınların kilosundaki artışın doğurganlıkta muhtemel bir düşüşe neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, başka çalışmalara göre obezite over hacminde artışa sebep olmuştur (Pasquali ve Gambineir, 2006 ve Diamanti-Kandarakis, 2007) ve ovaryum hacmi vücut boyutuna göre değişiklik göstermemiştir (Su ve ark., 2008). Çeşitli ultrason parametreleri, ovaryum hacmi (Syrope ve ark., 1995; Lan ve ark., 1997) ve yumurtalık rezervi değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Bancsi ve ark., 2002). Halawaty ve ark. (2010)'nın çalışmasında ovaryum hacmi üç boyutlu ultrason ile ölçülmüş; ortalama ovaryum hacmi sağlıklı kadınlara ($6,6 \pm 0,4$ mL) oranla obez kadınlarda ($3,7 \pm 0,8$ mL) dikkat çekici bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,03$).

Literatürde obezitenin over hacmi üzerine olan etkileri konusunda çelişkili bulgular bulunması, farklı topluluk özellikleriyle ve ovaryum hacmini hesaplamak için kullanılan taraflı yöntemlerle alakalı olabilir. Ya da obez kadınlardaki ultrason görüntüsü almada yaşanan güçlükler ovaryum hacim ölçümlerinin daha az hassas olmasına neden olabilir. İlerleyen çalışmalarda ultrason görüntüleri üzerinde taraflı yöntemler yerine tarafsız stereolojik yöntemlerin uygulanması daha güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlayabilir.

Bu çalışmada over hacmi stereolojik bir yöntem olan Cavalieri metodu ile değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda elde edilen bulgulara göre ovaryum ve korteks hacminin obez olan grupta kontrole kıyasla azaldığı ($p<0,001$) bulundu. Yine, korteks ve medulla hacminin kontrol-leptin grubunda, kontrol grubuna ($p<0,001$); obez-leptin grubunda, obez-kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulundu ($p<0,001$). Ayrıca, leptinin standart diyet ile beslenen sıçanlarda over içi yağ dokusu hacmini artırdığı ($p>0,001$) bununla birlikte obez sıçanlarda hem yağ dokusu ($p<0,001$) hem de bağ dokusu hacmini azalttığı tespit edildi ($p<0,001$).

Folikül etrafındaki tabakaların ve follikül antrumlarının hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde; granuloza hücre tabakası hacminin leptin uygulanan kontrol ve obez gruplarda kontrollerine göre daha fazla olduğu ($p<0,001$), teka folikülü tabakası hacminin ise obez-leptin grubunda obez grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Ayrıca kontrol-leptin grubundaki antrum hacmi obez-leptin grubuna göre daha fazla olarak tespit edildi ($p<0,05$).

Ovaryum hacim parametreleri açısından bakıldığında; melatoninin obez sıçanlarda ovaryum ve korteks hacmini, obez-kontrole göre azalttığı görüldü ($p<0,001$). Granuloza ve teka folikülü tabakalarının hacimlerinin melatonin uygulamasından sonra hem standart diyet ile beslenen ($p<0,001$) hem de obez sıçanlarda ($p<0,01$) arttığı bulundu. Hem kontrol hem de obez gruplarımızda melatoninin intersitisiyel yağ ve bağ doku hacimleri üzerinde azaltıcı etki gösterdiği bulunmuştur ($p<0,01$). Bizim bu bulgumuzun aksine dişi hamster ve farelerde yapılan bazı çalışmalarda melatonin uygulaması sonrasında ovaryum interstisiyel doku hacminde artış gözlemlenmiştir (Ooi ve Ng, 1989; Chan ve Ng, 1995).

Elde edilen hacim bulguları birlikte değerlendirildiğinde obezlerde over ve korteks hacminin artmış follikülogenezden ötürü kontrole kıyasla düşük olduğu, özellikle obez bireylerde leptin uygulaması ile birlikte follikülogenezin iyice hızlandığı ve böylece over hacminin daha da düştüğü görülmektedir. Melatoninin ve leptin'in over üzerindeki hacim azaltıcı etkisi ise interstisiyel yağ ve bağ dokusu hacimlerini azaltmasına bağlanabilir. Follikül tabakalarının hacimlerine bakıldığında hem leptin hem de melatonin söz konusu hacim değerlerinde anlamlı yükselmeye neden oldu. Leptinin follikülogenezi hızlandırmasıyla birlikte follikül tabakalarının hacmini de artırması zaten beklenen bir sonuç olarak düşünülürken, melatoninin follikülogenezi

baskılayıp sadece granuloza tabakasının hacmini artırıp teka ve antrum follikül tabakalarının gelişimini nasıl olup da engellememesi bize göre ilginçti.

5.6. Biyokimyasal Bulguların Yorumu:

5.6.1. Doku MPO Seviyelerine İlişkin Bulguların Yorumu:

Uzun süreli yüksek yağ tüketimi obeziteyi tetikler (Abel ve ark., 2008). Birçok araştırmacı tarafından obezitenin insülin rezistansı ve dislipidemi gibi durumlarla ilişkili olarak oksidatif stresi artırdığını göstermiştir (Bakos, 2010; Tunç, 2011). Buna bağlı oluşan ROS olası patolojik mekanizmada rol almaktadır. MPO, hidrojen peroksiti kullanarak daha yüksek oksidatif potansiyele sahip reaktif oksidan türleri geliştirmek suretiyle oksidatif stresi artırma yeteneğine sahiptir. Ayrıca, enflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili bir enzim olan MPO, patojenleri öldürerek doğal bağışıklık sistemini koruyucu bir rol oynayan çok reaktif türlerin salgılanmasını arttırmaktadır (van der Zwan ve ark., 2010).

Obezite, düşük kolesterol, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet gibi yüksek oksidatif strese dayalı rahatsızlıkları olan bireylerde MPO ve kan basıncı arasında çok kuvvetli bir ilişki gözlenmiştir (van der Zwan ve ark., 2010). Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda oksidan durum belirteçlerinden MPO aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (Arı ve ark., 2008). Çalışmamızda da yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlardaki MPO aktivitesinin standart diyet ile beslenen gruba göre arttığı tespit edildi ($p < 0,05$).

İlginç bir şekilde melatonin en önemli MPO inhibitörü olarak gösterilmiştir. (Galijasevic ve ark., 2008). Lu ve ark. (2008)' nin çalışmaları melatoninin MPO'nun katalizör aktivitesini birçok yönden engelleyebileceğini bildirmektedir. Melatonin MPO'nun katalizör aktivitesini ve fonksiyonunu baskılayarak çeşitli bozuklukların patogenezinin engellenmesinde faydalı bir rol oynayabilir. Çalışmamızda melatonin MPO düzeyleri üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir ($p > 0,05$).

Leptin bağışıklık, inflamasyon ve hematopoezde önemli rol oynar ve leptin üretimi enfeksiyon ve inflamasyon sırasında artar (Fantuzzi ve Faggioni, 2000). Leptinin anti-inflamatuar etkisi dokuda nötrofil bağımlı mekanizmalara ve glukokortikoidlerin salınımına bağlıdır (Çakır ve ark., 2004). Leptin esasen gıda tüketimini düzenler aynı zamanda makrofajları ve nötrofilleri uyarır ve çeşitli hücre

tiplerinde anti-apoptotik aktivite gösterir (Barbier ve ark., 1998; Parco, 2010). Çakır ve ark. (2004), akut leptin uygulamasını takiben anti-inflamatuvar etki gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda ise leptinin MPO aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi görülemedi (p>0,05). Çalışmamızda hem kontrol-leptin-melatonin hem de obez-leptin-melatonin gruplarındaki MPO aktivitesi sadece melatonin ve sadece leptin verilen gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p>0,05).

Doku MPO seviyelerine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde yüksek MPO düzeylerine bakılarak obezitenin enflamatuvar bir hastalık olduğu söylenebilir. Melatonin ve leptinin birlikte kullanılması ile daha yüksek olarak gözlenen MPO düzeyleri ise obezlerde gelişen enflamatuvar olaylara karşı savunma mekanizması geliştirmede bu iki hormonun birlikte kullanılmasının tek başlarına kullanılmalarından daha etkili olabileceğini göstermektedir.

5.6.2. Doku CAT Seviyelerine İlişkin Bulguların Yorumu:

Yüksek yağlı diyet ile beslenmenin vücutta aşırı yağ artışına neden olduğu ve artmış yağ metabolizması tarafından üretilen mitokondriyal H₂O₂'nin de arttığı buna bağlı olarak katalaz aktivitesinde artış olduğu bildirilmektedir (Rindler ve ark., 2012). Memelilerde, beyinde görülen CAT seviyeleri genellikle diğer dokulardakinden daha azdır (Haris, 1992). Tıpkı diğer antioksidatif enzimlerde olduğu gibi CAT'ın aktifliği bazen, yoğun oksidatif stres altında azalır. Bu koşullar altında melatonin kullanıldığında CAT aktivitesindeki bu düşüş azalır (Montilla Lopez ve ark., 2000). Bu, melatoninin protein içeren makromoleküller üzerindeki genel koruyucu etkisinden kaynaklanıyor olabilir.

Kilo azalmasını hızlandırmanın yanı sıra melatonin, leptin seviyeleri yüksek olduğunda yağ hücrelerinde üretilen nitrik oksite dayalı serbest radikal hasarını azaltmaya da yardımcı olur (McCann ve ark., 2005). Melatoninin antioksidan etkisi çalışmalarla iyice anlaşılmıştır (Tan ve ark., 2007; Korkmaz ve ark., 2009a). Hem in vitro hem de in vivo deneylerde melatonin uygulaması ROS (Reiter ve ark., 2000, 2008) ve serbest radikalleri de içeren çok sayıda zehirli reaktanı nötralize edebilmiş, hayvan ve insan deneklerine günlük 1 ve 300 mg (Bonfont-Rousselot ve Collin, 2010) arasında değişen dozlarda melatonin verildiğinde sözkonusu zehirli reaktanların olumsuz etkilerinin ortadan kalktığı görülmüştür. Aynı zamanda melatoninin GPx, SOD

ve CAT 'ın salınımını ve aktivitesini; ve ayrıca E vitamini, C vitamini ve GSH gibi klasik antioksidanların da etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Gitto ve ark., 2001).

Naidu ve ark. (2002), 1-5 mg/kg melatonin uygulaması ile beyin haloperidol kaynaklı SOD ve katalaz aktivitelerinde azalmada geri dönüş olduğunu bildirmişlerdir. Pekmez ve ark. (2008)' nın çalışmasına göre formaldehite maruz bırakılan sıçanların SOD, GSH-Px, CAT, XO ve MDA seviyeleri kontrol değerlerinden anlamlı derecede yüksek bulunmuşken formaldehitle birlikte melatonin uygulanan sıçanların bu biyokimyasal değerleri melatonin uygulanmayan gruba nazaran düşük olduğu gözlenmiştir. Çam ve ark. (2003)' nın çalışmalarına göre kronik melatonin uygulamasının diabetik sıçanlarda böbrek hasarını azalttığı belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının melatonin uygulanmamış diyabetik gruba kıyasla CAT seviyesini belirgin bir şekilde arttırdığı bulunmuştur (Armağan ve ark., 2006). Prata Lima ve ark. (2004)' nın çalışmasına göre ovulasyon sırasında melatonin (200 µg·100 g vücut ağırlığı) alan sıçanların over dokusunda SOD, GSH-Rd ve CAT aktiviteleri artmıştır. Yirmisekiz günlük (6 mg/kg) melatonin tedavisi testis dokusunda CAT aktivitesine istatistiksel olarak etki etmemiştir (Patil ve Balaraman, 2009).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre standart diyet ile beslenen sıçanlardaki CAT aktivitesi melatonin (10mg/kg/ 6 hafta) verdiğimiz gruptan farksızdı. Aynı durum yüksek yağlı diyet uyguladığımız sıçanlardaki CAT aktivitesi melatonin (10 mg/kg/6 hafta) uyguladığımız sıçanlardan anlamlı farklılık göstermedi ($p>0,05$). Melatonin hakkında daha çok çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte; melatoninin hem normal diyetle hemde yüksek yağlı diyetle CAT aktivitesini bir miktar artırdığı düşünülebilir. Melatonin yüksek yağlı diyetten dolayı oluşabilecek hasara karşı ovaryumu antioksidan özelliği ile koruyabilir, bunun da üreme üzerinde olumlu sonuçlar doğurabileceği düşünülebilir.

Düşük katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin izlendiği *ob/ob* fareler bozulmuş antioksidan savunma mekanizmaları ile karakterize edilirler. CAT, glutatyon peroksidaz aktivitelerinin azalması antioksidan savunma mekanizmaları ile ilgilidir ve leptin tedavisi bu anormallikleri düzeltir (Watson ve ark. 1999). Leptin uygulaması SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde belirgin bir artışa neden olmuştur (Ramsay, 2001). Leptin uygulamasında kullanılan dozdan bağımsız SOD ve GSH-Px aktivitelerinde artış meydana gelirken CAT aktivitesi kullanılan doza bağlı olarak

artmıştır (Zwirska-korczala ve ark., 2007). Kronik leptin uygulaması ile yağ asidi oksidasyonunu uyarıcı, glukoz oksidasyonunu ve domuz adipozitlerindeki lipogenesisi baskılayıcı bir sonuç elde edilmiştir (Ramsay, 2001). Oksidatif enzimler CAT ve GSH-Px aktiviteleri ob/ob farelerde daha azdır ve leptin uygulaması bu değişiklikleri tersine çevirebilir.

Çalışmamızda obez sıçanlarda leptinin (1µg-6hafta) over dokusundaki CAT aktivitesini obez-kontrol sıçanlara göre oldukça anlamlı ölçüde artırdığı gözlenmiştir (p<0,001). Leptinin CAT aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır. Dahası, zayıf sıçanlarda, CAT ve GSH-Px aktiviteleri üzerinde leptinin herhangi bir etkisi gözlenmezken, zayıf ve ob/ob farelerde leptin glutatyon reduktaz aktivitesini önemli derecede artmıştır (Watson ve ark., 1999). Yaptığımız çalışmada standart diyetle beslenen sıçanlarda leptin (1µg-6hafta) uygulaması ile görülen CAT aktivitesi obez-leptin grubuna kıyasla daha azdı (p<0,001) leptin obez sıçanlarda daha etkili bir CAT aktivitesi göstermiştir.

Yüksek yağlı diyetle beslenen obez sıçanlarda melatonin-leptin verilen gruptaki CAT aktivitesi obez-kontrol grubuna göre fazladır (p<0,01). Standart diyetle göre yüksek yağlı diyetde uygulanan melatonin-leptin ikilisi daha etkili olmuştur. Obez-melatonin-leptin verilen gruptaki CAT aktivitesi kontrol melatonin-leptin verilen gruptan daha fazladır (p<0,001). Böylece bu çalışmada, özellikle yüksek yağlı diyet uygulamalarında leptinin CAT aktivitesi üzerinde melatoninden çok daha etkili bir antioksidan olduğu; standart diyet uygulamalarında ise CAT aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı söylenebilir. Ayrıca, obez deneklerde melatoninin leptinle birlikte uygulanmasının leptinin antioksidan etkisini etkilemediği de görüldü.

5.7. Mikroskopik Bulgularının Yorumu:

Akamine ve ark. (2010)' nın yaptığı çalışmada 120 gün boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenmenin ovaryum morfolojisinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı; bununla birlikte, 180 gün boyunca yağlı diyet almış dişi sıçanların ovaryumlarında kontrol grubuna kıyasla morfolojik farklılıklar tespit edilmiştir. Çalışmamızda da obez deneklerin ovaryumlarındaki foliküllerin atretik olduğu; antrumlarında yağ damlacıklarının ve vakuolleşmenin bulunduğu görüldü.

5.7.1. TUNEL Boyaması ile Elde Edilen Bulguların Yorumu:

Kerr ve arkadaşları 1972 yılında, nekrozdan farklı yolla oluşan bir hücre ölümü göstermiş ve buna eski Yunanca'da sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen "apoptoz" adını vermiştir. Apoptoz, DNA'nın parçalanması, hücre membran değişiklikleri, komşu hücrelere hasar vermeden ve inflamasyona yol açmadan birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda meydana gelen programlanmış bir hücre ölümüdür (Saraste ve Pulkki, 2000). Apoptoz, memelilerde folliküler atrezi ve ovulasyon sonrası regresyondaki en temel mekanizmalardan biridir (Mayes, 2002; Zeuner ve ark., 2003). Apoptoz, aynı zamanda korpus luteumun luteolizisini de sağlayan mekanizmadır. Granuloza hücreleri, folikülogenezde apoptozdan ilk etkilenen hücrelerdir. Foliküler gelişimin primordial ve preantral safhalarında ise apoptozdan ilk etkilenen hücre oositir. Teka hücrelerinde ise apoptoz daha geç olarak görülmektedir.

Sitoplazmik fragmentasyon, gelişimin durması ve nükleer yoğunlaşma apoptozise maruz kalan embriyoların en tipik özellikleridir (Koçyiğit ve Çevik, 2011). İn vitro çalışmalarda, atretik foliküllerden elde edilen kumulus-oosit kompleksleri'nden (COCs) elde edilen embriyolarda blastosist aşamasına erişim durumunun oldukça zayıf olduğu görülmüştür. Kumulus hücreleri, sinyal salınımı ve düzenlenmesi fonksiyonları ile oosit maturasyonu ve fertilizasyonunda kritik rol oynar (Mayes, 2002; Zeuner ve ark., 2003).

Gonadotropinler, ovaryum foliküllerinin büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Preovulator gonadotropin artışı bloke edilir veya hipofizektomi sonrası serum gonadotropinleri azalır, foliküller atreziye maruz kalır. Folikül yaşamı ve atrezisi üzerinde etkili diğer önemli regülatörler seks steroidleridir. Sıçan ovaryumunda östrojenler yaşamsal faktör olarak etkiliyken, androjenler apoptozu teşvik ederler (Svensson, 2001; Kollé ve ark., 2002). Geçmiş çalışmalar gösteriyor ki, gonadotropinlerin azalması ovaryumda kuvvetli atreziye yol açmaktadır. Granuloza hücrelerinde GnRH, androjenler, IL-6, ROS ve TNF- α apoptozu uyarır (Palumbo ve Yeh, 1994; Svanberg, 1999; Yang ve Rajamahendran; 2000). Oksidanların, gonadal hücreleri de kapsayan birçok hücre türünde in vitro apoptotik sürecin bir kısmından sorumlu oldukları bilinmektedir.

TUNEL yönteminde preapoptotik hücrelerin dahi boyanması yöntemin sensitivitesini daha da arttırmaktadır. Bu yüzden TUNEL apoptozis

değerlendirilmesinde standart yöntemdir (Kockx ve ark., 1998). Bununla beraber belirtmek isteriz ki oldukça hassas olan bu yöntemin uygulamasından önce dokunun alınması esnasında perfüzyon yöntemiyle dokunun tam olarak kan hücrelerinden temizlenmesi, %10 formol ile tespit edilmesi, boyanın deneyimli bir ekip tarafından dikkatle uygulanması önemli püf noktalarıdır (Kockx ve ark., 1998). Çalışmamızda TUNEL boyaması ile elde edilen sonuçlara göre obez sıçanlarda özellikle granuloza hücrelerinde, kumulus ooforusda, antral foliküllerin oositlerinde ve nukleusunda apoptozun kontrol grubuna kıyasla arttığı belirlendi.

Melatonin mitokondri üzerinde etki göstererek yaşlanmayla birlikte meydana gelen doku hasarını önler (Okatani ve ark., 2002). Melatonin tedavisinin prefrontal korteks dokusunda apoptotik hücre sayısını belirgin bir şekilde azalttığı görülmüştür (Taş ve ark., 2012). Sekiz-Oniki haftalık melatonin tedavisinden sonra retinal hücrelerin apoptozu ve apoptotik indeksi azalmıştır. Böylece melatonin retinanın nöronal apoptozu üzerinde yararlı etki yapmıştır (Li ve ark., 2013). Bazı deneysel çalışmalar melatoninin kanser hücrelerini apoptozdan korumadığını hatta bu hücrelerin apoptozunu artırdığını göstermiştir (Hermann ve ark., 2002; Gong ve ark., 2003; Sainz ve ark., 2003; Andrabi ve ark., 2004). Çalışmamızda melatonin hormonunun bu çalışmalara paralel bir etki göstererek dokuyu koruduğu bunun neticesi olarak melatonin grubundaki sıçanlarda TUNEL pozitif hücrelerin kontrol grubundakine kıyasla daha az olduğu görüldü. Hem literatürdeki çalışmaların sonuçları hem de bizim bulgularımız, melatoninin apoptozu azalttığını göstermektedir.

TUNEL ile yapılan değerlendirmelerde leptin eksikliği sonucu hipogonadotropik durumdan dolayı ob/ob farelerde foliküler atrezi ve granuloza hücre apoptozunun arttığı (özellikle preantral ve antral foliküllerde) görüldü (Hamm ve ark., 2004; Marissa ve ark., 2004; Barouch ve ark., 2006). Leptin eksikliğinde gözlenen foliküler atrezi ve granuloza hücrelerindeki apoptozun altında yatan mekanizma hala bilinmemesine karşın muhtemelen leptin eksikliğinde ortaya çıkan hipogonadotropik durumdan kaynaklanıyor olabilir. Gonadotropinler over folikülerindeki granuloza hücre apoptozunu inhibe eden primer sağkalım faktörüdür (Chun ve ark., 1994; Kaipia ve Hsueh, 1997). Almog ve ark. (2001), yirmibir günlük dişi sıçanlara leptin verilmesi ile granuloza hücre proliferasyonunun arttığını ve granuloza hücre apoptozu ve foliküler atrezinin azaldığını gözlemladiler. Leptinin hücre ölümünü düşük seviyelerde korumak

için gerekli olduğu ve lipotoksisite-apoptozuna karşı koruma sağladığı bildirilmektedir (Yang ve Barouch, 2007). Aynı zamanda leptin overlerinde Bcl-2'nin ekspresyonunu artırıp folliküler apoptozun ve dolayısıyla da atrofiye giden follikül sayısının azalmasına neden olmaktadır (Usta ve ark., 2012). Çalışmamızda ise leptinin granuloza hücrelerindeki apoptozu azalttığı gözlemlendi. Yapmış olduğumuz değerlendirmelerde yüksek yağlı diyetle obezite modeli sonucu teka ve özellikle granuloza hücrelerinde meydana gelen apoptozun melatonin ve leptin tarafından baskılanmış olduğu tespit edilmiştir. Böylece, çalışmamız sonucunda obezitenin granuloza ve teka hücrelerinde oksidatif hasara bağlı olarak apoptozu neden olduğu ve bu apoptotik değişikliklerin melatonin ve leptin verilmesiyle önlenebileceği gösterilmiştir. Bu durum melatonin ve leptin kombinasyonunun obezite tedavisinde iyi bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

5.7.2. Anti-LHR Boyaması ile Elde Edilen Bulguların Yorumu:

FSH foliküler büyümeyi tetikler ve granuloza hücreleri üzerinde LHR' nin tanımlanmasını indükler (Zeleznick ve ark., 1974; Amsterdam ve ark., 1981; Knecht ve ark., 1981; Richards ve Hedin, 1988). Normal menstruel döngü ve folikül gelişimi için, FSH ve LH düzgün salgılanması ve bu hormonların etki edeceği reseptörlerinin olması gereklidir (Vassart ve ark., 2004; Jamnongjit ve Hammes, 2006). Hormon ya da reseptöründeki herhangi bir bozukluğun, üreme fonksiyonlarında ciddi aksaklıklara neden olabileceği bilinmektedir (Costagliola ve ark., 2005).

FSH ile indüklenen LHR, luteinizasyonun başlaması için gerekli iken granuloza hücre farklılaşması ve olgunlaşmasında zorunlu bir adımdır (Richards, 1980; Hsueh ve ark., 1984; Jia ve Hsueh, 1984). LHR ovaryumda korpus luteum, luteal hücrelerde ve preovulatar foliküllerin granuloza, teka ve intertisyel hücrelerinde mevcuttur (Zeleznick ve ark., 1974; McFarland ve ark., 1989; Ascoli ve ark., 2002). Endojen LH artışı ve ovülasyona ait hCG yüklemesi ovüle olmuş foliküllerdeki LH reseptörlerinin geçici kaybına neden olur. Foliküler lüteanizasyon ve korpus luteum oluşumu sırasında hCG ile ovülasyon indüksiyonu sonrasında LHR de ikinci bir artış olur (Amsterdam ve ark., 1981). hCG konsantrasyonundaki düşüklük ovülasyon öncesi foliküllerin granuloza hücrelerindeki LH reseptörlerinde artışa neden olur. Bunun tersine, yüksek hCG dozları LH reseptörlerinde derin azalmalara ve yalancı hamilelik

geçiren sıçan ovaryumundaki lutenize hücreler ile olgun Leydig hücrelerindeki adenilat siklazın duyarlılığında azalmaya neden olur (Conti ve ark., 1977; Dufau, 1988). Korpus luteum 'un devamlılığı ve hamileliğin sürdürülebilmesi için önemli olan koryonik gonadotropin aynı zamanda LHR'ye de tutunur ki bu tutunma LH'ninkine oranla 10 kat daha zayıftır (Bousfield ve ark., 1996).

Domuz overlerinde, preovulator foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde LHR'lerine rastlanırken, olgun korpus luteumların granuloza lutein hücrelerinde gözlenmemiştir (Meduri ve ark., 1996). İnsan ovaryumunda da ovulasyon öncesi foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde LHR izlerine rastlanırken olgun korpus luteum luteal hücrelerinde daha şiddetli izlenip korpus lutemun gerilemesi esnasında görülmemiştir. İnsanlarda hamileliğin erken evrelerinde alınan korpus luteum örneklerinde luteal hücrelerin yüzey ve sitoplazmik bölgelerinde çeşitli yoğunlukta LHR varlığı (zayıftan yoğun) gözlenmiştir (Takao ve ark., 1997).

Melatonin LHR, GnRH, GnRHR'lerini düzenler (Ireland ve Roche, 1983; Woo ve ark., 2001). Melatonin ile tedavinin FSH düzeylerinden bağımsız olarak LH reseptör mRNA düzeylerini artırdığı gözlemlenmiştir (Woo ve ark., 2001). Önceki çalışmalar atretik foliküllerde granuloza hücre sayısının normal foliküllerden daha düşük olduğunu, ayrıca normal foliküllerden elde edilen granuloza hücrelerinde FSH ve LH reseptörlerinin atretik foliküllerden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Lee ve ark. 1998). Ayrıca teka hücrelerindeki LH reseptörlerinin de granuloza hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu bildirilmektedir (Ireland ve Roche, 1983). Ovaryumda LHR ekspresyonundaki azalma nedeniyle, aşırı miktarda hCG ile bağlanan teka hücre tabakasında kalınlaşma gözlenebilir (Mazaud-Guittot ve ark., 2006).

Memeli türlerinde leptin hipotalamik-hipofiz-over aksında işleyiş ve aktivasyonunda hem merkezi, hem de periferik etki göstererek invivo ve invitro çalışmalarda hipotalamustan LH reseptörü, hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle eder (Caprio ve ark., 2001; Moschos ve ark., 2002; Barb ve Kraeling, 2004). Leptin FSH ve LH reseptör sayılarını arttırarak ovaryumda önemli roller oynar. Bu hormonun ovaryum fonksiyonları üzerindeki etkisi, ilgili düzenleyici genler baskılanarak ya da arttırılarak belirlenir (Cavalcante ve ark., 2013). Melatoninin, hipofiz bezindeki leptin sentezi üzerinde bir etkisinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bir çalışmada

melatoninin, erkek farelerin ön hipofizlerindeki leptin sentezi üzerinde fiziksel ve farmakolojik etkilerinin olabileceği iddia edilmektedir (Sarsılmaz ve ark., 2004).

Çalışmamızda standart diyet ile beslediğimiz gruptaki deneklerin ovaryumlarında bulunan LHR immünreaktivitesi olgun korpus luteumlarda, intertisyel hücrelerde, foliküler teka interna, teka extarna ve granuloza hücrelerinde yoğun olarak belirlendi. Aynı zamanda granüler sitoplazmik LHR immünreaktivitesi antral ve preovulatar foliküllerin olgun granuloza hücrelerinde de belirlendi. Yüksek yağlı diyet ile beslediğimiz gruptaki deneklerin ovaryumlarının korpus luteumlarında ve granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin kaybına rastlandı. Standart ve yüksek yağlı diyet ile beslenerek melatonin verilen sıçanların ovaryumlarındaki korpus luteum, granuloza, teka ve intertisyel hücrelerinde LHR tutulumu kontrol ve obez-kontrol gruplarına göre oldukça fazla idi. Standart diyet ile beslenen gruba leptin verildiğinde preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde LHR immün reaktivitesi kontrol grubuna kıyasla belirgindi. Obez olan gruba leptin verildiğinde; ovaryumların foliküler teka hücrelerinde ve granuloza hücrelerinde ise LHR aktivitesi kontrol-leptin grubuna göre azdı. Melatonin ve leptin verdiğimiz gruplara ait ovaryumlardaki granuloza ve teka hücrelerinde LHR boyanması sadece melatonin uygulanan gruplara göre daha azdı. Bu durum da leptinin melatoninin anti-apoptotik özelliklerini baskılayabileceğini göstermektedir.

5.8. Melatonin ve Leptinin Obezite Üzerindeki Etki Mekanizması:

Leptin, ilk kez Rockefeller Üniversitesi bilim adamları tarafından 1994 yılında tanımlanan, gıda alımı ve vücut ağırlığının kontrolünde etkili önemli bir hormondur (Zhang ve ark., 1994). Bu görevinin dışında leptin üreme ve nöroendokrin sinyallerde de önemli rol oynayan bir protein olarak bilinmektedir. Leptinin ovaryan fonksiyon üzerindeki etkileri; hem uyarıcı (Ahima ve ark., 1997; Cle'ment ve ark., 1998; Strobel ve ark., 1998; Almog ve ark., 2001; Barkan ve ark., 2005) hem de inhibe edici (Zachow ve Magoffin 1997; Agarwal ve ark., 1999; Barkan ve ark., 1999; Zachow ve ark., 1999; Duggal ve ark., 2000, 2002) olarak tanımlanmıştır. Birçok obez kişide leptin dencini düşündürecek şekilde yüksek endojen leptin seviyeleri görülür. Endojen leptine direnç geliştiren bireylerin dışardan verilecek leptin için de direnç oluşturup oluşturmayacağı bilinmemektedir. Obez ve/veya diyabetik kişilerde leptin tedavisinin iyi sonuçlar

vereceği beklenmekle birlikte, etkili ve güvenilir bir tedavi yolunun belirlenmesi şarttır. Gelecekte leptin ve leptin reseptörlerinin farmakolojik manipülasyonları ile kilo kontrolü, diyabet ve üreme bozukluklarının tedavisi mümkün olabilir.

Melatoninin vücut ağırlığını, şişmanlığı ve hem enerji alımı hem de enerji tüketimini etkilediği bilinmektedir (Himms-Hagen, 1984; Bartness, 1995). Farelerde, melatoninin vücut ağırlığına etkisini incelemek için yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular; obez farelere melatonin verildiğinde genç hayvanlarda kilo almada yavaşlama (Pan ve ark., 2006; Gonzalez ve ark., 2010; Tan ve ark., 2011) yaşlılarda ise zayıflama olduğunu ortaya koymuştur (Rasmussen ve ark., 1999; Puchalski ve ark., 2003). Normal diyetle gerçekleştirilen çalışmalarda, içme suyuna melatonin (25 µg/mL) karıştırılması, dokuz haftalık bir periyod içinde hayvanların yaklaşık %25 daha az kilo almasıyla sonuçlanmıştır (Rios-Lugo ve ark., 2010). Prunet-Marcassus ve ark. (2003), süttten kesilmiş ve aşırı kilolu olana kadar yağlı diyet ile beslenen sıçanlara, üç hafta boyunca ışıklar kapanmadan 1 saat önce melatonin (30 mg/kg) uygulamıştır. Uygulama kilo alımını azaltmış; bununla birlikte yağ doku kütlesinde belirgin bir azalma sağlamamıştır.

Melatonin, üreme üzerindeki asıl etkisini beyin seviyesinde ve hipofiz bezinde gerçekleştirir. Melatonin hipotalamus üzerindeki etkisiyle üremeye tesir eder (Glass ve Lynch, 1981). Melatoninin üreme üzerindeki etki mekanizmasını araştıran birçok çalışma bu hormonun ovaryum üzerindeki etkisine odaklanmak yerine hedef dokular olarak hipotalamus ve hipofiz üzerine yoğunlaşmıştır (Malpoux ve ark., 2001). Melatoninin beyaz ayaklı farelerin beyin (Glass ve Lynch, 1981; Vanecek ve ark., 1987) ve hipofizleri (Williams ve ark., 1991) üzerinde etkili olduğu ve gonadotropin (Martin ve Sattler, 1979) salgılanmasını ayarladığı ispatlanmış (Glass ve Lynch, 1981; Vanecek ve ark., 1987) ve melatoninin birçok üreme sürecini düzenlediği bildirilmiştir (Cagnacc ve Volpe, 1996). Bu durum, melatoninin gonadların üzerinde direk etkili olduğunu gösterir.

SCN (Suprakiazmatik nukleus)' nin insülinle beslenen faredeki günlük plazma leptin konsantrasyon salınımını diğer zamana dayalı salınımlardan bağımsız olarak doğrudan kontrol ettiğini göstermişlerdir. Hipotalamik SCN'de ısı kaynaklı doku bozukluğuyla biyolojik saatin devre dışı bırakılmasının, dolaşımdaki plazma leptin konsantrasyonunun günlük salımını tamamen elimine ettiğini göstermişlerdir (Kalsbeek

ve ark., 2001). SCN, epifiz bezinin sempatik uyarılarını kontrol eder (Gündüz, 2002). Bu yüzden, günlük leptin salımının kontrolü önemlidir ve melatonine benzer şekilde kontrol edilir. Aralarındaki ters ilişki her ne kadar tam olarak anlaşılammış olsa da melatoninin leptin üretimi üzerinde baskılayıcı bir etkisi olabilir (Canpolat ve ark., 2001).

Çok sayıda çalışma melatonin takviyesinin leptin seviyelerini düşürebileceğini ve epifiz bezin leptin salınımını kontrol etmeye yardımcı olduğunu gösterir. Epifiz bezli sıçanlara melatonin verilmesi, melatonin uygulanmayan kontrol gruplarına oranla leptin seviyelerinde düşüşle sonuçlanmıştır. Pinealektomi uygulanan sıçanlarda serum leptin seviyeleri belirgin bir şekilde yükselmiştir ve bu sıçanlara melatonin uygulaması leptin salgılanmasının baskılanmasıyla sonuçlanmıştır (Canpolat ve ark., 2001). Bazı çalışmalarda ise pinealektomize ve kontrol sıçanların leptin seviyeleri arasında bir fark gözlemlenmemiştir (Nishida ve ark., 2001). Görünüşe göre melatonin ve leptin arasında fonksiyonel açıdan ters bir ilişki vardır. Melatoninin hipotalamik seviyede gonadotropin salımını engellediği bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2003). Tam tersine, leptinin gonadotropin salgılanmasını arttırdığı ve ergenleşmeyi tetiklediği bilinir. Epifiz bez'in yeterli melatonin salgılayamaması vaktinden önce ergenleşmeye neden olurken yetersiz leptin salımı ise ergenleşmede gecikmeyle sonuçlanabilir (Waldhauser ve ark., 1991). Buna göre ergenleşme, melatonin seviyesinde azalma ve leptin seviyesinde artış ile tetiklenir. Aynı zamanda yaşlanmanın her iki hormon seviyesi üzerindeki etkisi arasında da ters ilişki vardır (Matsumoto ve ark., 2000). Melatonin salgılanması yaşlanmayla düşerken, leptin salgılanması yaşlanmayla artar. Sonuç olarak epifizin çıkarılması ve dışarıdan melatonin alımı leptin salgılanmasını etkiler. Melatonin ve leptin salgılanması arasındaki etkileşimi belirleyebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda yağlı diyet ile oluşturulan obezitenin ovaryum üzerinde bazı olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır. Yağdan zengin diyetle beslenen sıçanların obeziteden dolayı overlerinde oluşabilecek histopatolojik, stereolojik ve biyokimyasal değişimlerin apoptotik hücrelerin ve ayrıca melatonin ve leptin'in obezitenin neden olduğu bu olumsuz değişimler üzerine olan etkileri sunulmuştur. Obezitenin gerek vücut ağırlığı ve yağ dokusu parametreleri, gerekse over yapısı ve fonksiyonu üzerinde yol açtığı olumsuz etkilerin giderilmesinde melatonin ve leptinin bir arada kullanılacağı etkin bir tedavinin geliştirilmesi faydalı olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Vücut ağırlığı birçok metabolik ve hormonal sinyali içeren kompleks mekanizmalarla düzenlendiğinden leptin ve melatoninin etki mekanizmasının ve vücut parametreleriyle etkileşiminin aydınlatılması obezite ve ona eşlik eden infertilite hastalığının tedavisinde uzun zamandır ihtiyaç duyulan bilgilere ulaşmamızı sağlayacaktır.

Çalışmamız kapsamında incelediğimiz parametreleri değerlendirdiğimizde; yüksek yağlı diyet ile dokuz hafta boyunca beslenen sıçanlarda kilo artışını takiben over çevresinde yağlanma, over hacminde azalma, primordial folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında artma ve apoptotik hücrelerin yoğunluğunun yanısıra folliküllerin antrumlarında yağ damlacıklarının ve vakuolleşmenin bulunması da dikkat çekiciydi.

Obezitenin over üzerindeki bu negatif etkilerinin melatonin ve leptin tedavisiyle önemli ölçüde düzeldiği görüldü. Yine bu çalışmada melatoninin hem yüksek yağlı diyetle hem de standart diyet beslenen hayvanlarda kilo alımını önleyici etkisi gözlenmiş ve güçlü anti-apoptotik etki gösterdiği dikkat çekmiştir. Fakat melatonin, folikül sayısı üzerinde leptin kadar etkili olmamıştır ve bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada ayrıca leptinin vücut ağırlığını azaltarak toplam folikül sayısında artış ve atretik folikül sayısında azalma sağladığı gösterilmiştir. Böylece, gelecekte leptinin farmakolojik manipülasyonları ile kilo kontrolü ve üreme bozukluklarının tedavisi mümkün olabilir. Leptinin antioksidan özelliği halen tartışılıyor olmakla birlikte çalışmamızda serbest radikaller üzerinde koruyucu etkisi de gösterilmiştir.

Bu hormonların obezite tedavisindeki etkinliğine ilişkin yapılacak detaylı çalışmalar ile olumlu sonuçların alınabileceğini, böylelikle insanlar üzerinde obezitenin yol açtığı reproduktif bozuklukların söz konusu hormonlar ile tedavi edilerek folikül hücrelerindeki hasarın kısmen düzeltilerek; obeziteden dolayı azalan primordial folikül sayısının normal seviyelere çıkarılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 2008; 88: 389-419.
- Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med.* 2006; 355(8): 763-778.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.
- Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 1072–1076.
- Ahima RS, Osei SY. Leptin Signaling, *Physiology & Behavior.* 2004; 81: 223-241.
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest.* 1997; 99:391-395.
- Akamine EH, Marc' al AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, Carvalho C.R.O. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *J Endocrinol.* 2010; 206: 65-74.
- Aksoy A. Yaşlanmaya koşut sıçan ovaryum'unda folikül ince yapısı ve folikül uyarıcı hormon reseptörlerinin (FSHR), östrojen reseptörlerinin (ER), progesteron reseptörlerinin (PR) immünohistokimyasal olarak belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA.* 1999; 282:1530-1538.
- Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhe GF, das Neves Borges-Silva C, Neto JC, Lima FB. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288(4): E805-812.
- Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkan D, Homburg R, Lessing JB, Nevo N, Gertler A, Amsterdam A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 183:179-191.
- Altunkaynak BZ, Özbek E. Obezite: nedenleri ve tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi.* 2006;13(4):138-142.
- Altunkaynak ME, Özbek E, Altunkaynak BZ, Can İ, Ünal D, Ünal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *J Anat.* 2008; 212: 845-852.

- Altunkaynak BZ, Önger ME, Altunkaynak ME, Ayrancı E, Canan S. "A Brief introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology." *NeuroQuantology*. 2012;1:31-43.
- Al-Mahbashy H, Hussain S, Numan N. Effect of melatonin on oxidative stress, protein glycation, microalbuminuria and lipid profile in type 2 diabetes mellitus. *Iraqi J Pharm Sci*. 2006; 15:17–32.
- Amsterdam A, Knecht M, Catt KJ. Hormonal regulation of cytodifferentiation and intercellular communication in cultured granulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78: 3000-3004.
- Antipatis VJ, Gill TP. Küresel bir sorun olarak obezite. A.N. Dursun (Ed.) (M. Kahramanoğlu, Çeviri), *International Textbook of Obesity*. 1. Baskı. İstanbul: AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti. 2002.
- Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for antiapoptotic effects of melatonin. *FASEB J*. 2004;18: 869-871.
- Andreelli F, Hanaire- Broutin H, Laville M, Tauber JP, Riou JP, Thivolet C. Normal reproductive function in leptin deficient patients with lipotrophic diabetes, *J Clin Endocrinol Metabol*. 2000; 85(2): 715-719.
- Aral H. Apoptotik hücrelerin tanıma yöntemleri. *Sendrom*. 1996;38-42.
- Armağan A, Uz E, H. Yılmaz R, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J Androl*. 2006; 8 (5): 595-600.
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. "The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective". *Endocr Rev*. 2002; 23(2): 141–174.
- Bağrıaçık N, Büzer A, Görpe U. Obezite riskleri ve komplikasyonları. N. Bağrıaçık (Ed.). T.C. Sağlık Bakanlığı Ulusal Diyabet ve Obezite Programı Kapsamında Diyabet ve Obezite Eğitim Kursu Notları. İstanbul, 2003.
- Bahceci M, Tuzcu A, Akkus M, Yaldiz M, Ozbay A. The effect of high-fat diet on the development of obesity and serum leptin level in rats. *Eat Weight Disord*. 1999; 4: 128-132.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl*. 2010;1-9.
- Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in invitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2002; 77: 328-336.

- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 1996; 137: 3144-3147.
- Barb CR, Kraeling RR. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci*. 2004; 8(83): 155-167.
- Barbier M, Cherbut C, Aubé AC, Blottière HM, Galmiche JP. Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. *Gut*. 1998; 43(6): 783-790.
- Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology*. 1999; 140: 1731-1738.
- Barkan D, Hurgin V, Dekel N, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice. *FASEB J*. 2005; 19:133-135.
- Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, Kittleson MM, Minhas KM, Berkowitz DE, Wei C, Hare JM. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res*. 2006; 98: 119-124.
- Baydaş G, Gursu F, Canpolat S, Konar V, Yasar A, Canatan H, Kelestimur H. Effects of pinealectomy on the circadian release pattern of leptin in male rat. *Neuro Endocrinol Lett*. 2001; 22:449-452.
- Baysal A. Beden ağırlığının denetimi. *Diyet El Kitabı* (3. bs.).(s. 39- 60). Ankara: Hatiboglu Yayınevi, Erge, S. Diyet tedavisi ile birlikte uygulanan davranış değişikliği tedavisinin sisman kadınların ağırlık kaybı ve korunması üzerine etkileri. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Doktora tezi, 1999.
- Blask DE, Daucky RT, Sauer LA. Physiological melatonin inhibits lipogenesis and fasting-induced lipolysis in the inguinal fat pad perfused in situ in the rat. 81st Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, Abstract P2-208, 1999; 324.
- Bojkova B, Markova M, Ahlersova E, Ahlers I, Adamekova E, Kubatka P, Kassayova M. Metabolic effects of prolonged melatonin administration and short - term fasting in laboratory rats. *Acta Vet Brno*. 2006; 75:7521-7532.
- Boozer CN, Schoenbach G, Atkinson RL. Dietary-fat and adiposity a dose-response relationship in adult male-rats fed isocalorically. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1995; 268:E546-E550.
- Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*. 1999; 13: 1231-1238.

- Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT. Structural features of mammalian gonadotropins *Mol Cell Endocrinol.* 1996; 125:3-19.
- Boutin JA, Delagrang P, Rettori MC. Melatonin: Molecular pharmacology and therapeutic applications. *Medicographia.* 2000; 22:72-80.
- Brabant G, Horn R, Mayr M, Wurster U, Schnabel D, Heidenreich F. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia.* 2000; 43: 438-442.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3): 206-269.
- Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 1157-1173.
- Broekman FJ, Kwoe J, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systemic review of tests predicting ovarian reserve and in vitro fertilization outcome. *Hum Rreprod.* 2006; 21: 685–718.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 1997; 336: 186-195.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007; 15: 798-808.
- Bülbüller N, Doğru O, Umaç H, Gürsu F, Akpolat N. The effects of melatonin and pentoxiphylline on L-arginine induced acute pancreatitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2005;11:108-114.
- Caballero B. Obesity in developing countries: biological and ecological factors. *J Nutr.* 2001; 131: 866S-870S.
- Çakır B, Bozkurt A, Ercan F, Yeğen BÇ. The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids. *Peptides.* 2004; 25(1): 95-104.
- Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2003; 56: 103-112.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995; 269: 546-549.
- Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalier Prensibi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Özel Sayısı; Streolojide temel kavram ve yöntemler.* 2002a; 22(1):7-14.

- Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: Parçalama. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Özel Sayısı; Streolojide temel kavram ve yöntemler. 2002b; 22(1):30-46.
- Cano P, Jimenez - Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI. Effect of a high fat diet on 24h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine*. 2008; 33: 118-125.
- Canpolat S, Sandal S, Yilmaz B, Yasar A, Kutlu S, Baydas G, Kelestimur H. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol*. 2001; 428(1): 145-148.
- Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12: 65–72.
- Cardinali DP, Cano P, Jimenez Ortega V, Esquifino AI. Melatonin and the metabolic syndrome: physiopathologic and therapeutical implications. *Neuroendocrinology*. 2011; 93: 133-142.
- Carrell DT, Jones KP, Peterson CM, Aoki V, Emery BR, Campbell BR. Body mass index is inversely related to intrafollicular hCG concentrations, embryo quality and IVF outcome. *Reproductive Biomedicine Online*. 2001; 3:109-111.
- Casabiell X, Pineiro V, Vega F, De la Cruz LF, Dieguez C, Casanueva FF. Leptin, reproduction and sex steroids. *Pituitary*. 2001; 4: 93-99.
- Caterson ID, Gill PT. Obesity: epidemiology and possible prevention. *Best Pract Res Clin En*. 2002; 16: 595-561.
- Cavalcante FS, Aiceles V, Ramos C da F. Leptin regulates gonadotropins and steroid receptors in the rats ovary. *Nutr Hosp*. 2013; 28(1): 164-168.
- Chan WY, Ng TB. Effects of pineal indoles on ovarian response to gonadotropin-induced ovulation in mice. *Journal of Neural Transmission*, 1995;100: 239-246.
- Channing CP, Chaerf FW, Anderson LD, Tsafiriri A. Ovarian follicular and luteal physiology. *Int Rev Physiol*. 1980; 22: 117-201.
- Chaput JP, St-Pierre S, Tremblay A. Currently available drugs for the treatment of obesity: Sibutramine and Orlistat. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*. 2007; 7: 3-10.
- Chehab F, Lim M, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human leptin. *Nat Genet*. 1996; 12: 318-320.

- Chuffa LGA, Amorim JPA, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci BA, Pinheiro PFF, Seiva FRF, Novelli ELB, Júnior WM, Martinez M, Martinez FE. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(3): 217-223.
- Chun S, Billig H, Tilly JL, Furutal I, Tsafiriri A, Huesh A. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinol.* 1994; 135:1845-1853.
- Clark AM, Thornley B, Tomlinson L, Galletley C, Norman RJ. Weight loss in obese infertile women results in improvement in reproductive outcome for all forms of infertility treatment. *Hum Reprod.* 1998; 13: 150–155.
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998; 392 :398–401.
- Conti M, Harwood JP, Dufau ML, Cart KJ. Effect of gonadotropin-induced receptor regulation on biological responses of isolated rat luteal cells. *J Biol Chem.* 1977; 252(24): 8869-8874.
- Conway S, Canning SJ, Barrett P, Morgan J. Characterization of Human Melatonin MT1 and MT2 Receptors by CRE-luciferase Reporter Assay. *Eur J Pharmacol.* 2000; 390: 15-24.
- Coşkun A. Kilo vermek doğurganlığı artırıyor. www.bebek.com. 2010.
- Costagliola S, Urizar E, Mendive F, Vassart G. Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction.* 2005; 130: 275 –281.
- Cros CE, Halliwell B, Borish E, Pryor WA, Ames BN, Saul RL. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987; 107: 526-545.
- Cruz –Orive LM. On the estimation of particle number. *J Microsc.* 1980; 120: 15-27.
- Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction.* 2005; 130: 147–156.
- Dinçer S, Gülen Ş. Leptin uygulanan sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda yara dokusu malondialdehit ve glutatyon düzeyleri. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2010; 32(3): 161-166.
- Djeridane Y, Vivien-Roels B, Simonneaux V, Miguez JM, Pévet P. Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: A dynamic in vitro study. *J Pineal Res.* 1998; 25(1): 54-64.

- Dokras A, Baredziak L, Blaine J, Syrop C, VanVoorhis BJ, Sparks A. Obstetric outcomes after in vitro fertilization in obese and morbidly obese women. *Obstet Gynecol.* 2006; 108:61-69.
- Dufau ML. "The luteinizing hormone receptor." *Annu Rev Physiol.* 1998; 60: 461–496.
- Dufau ML. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Phys.* 1988; 50: 483-508.
- Duggal P, Van der Hoek K, Milner C, Ryan N, Armstrong D, Magoffin D, Norman R. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinol.* 2000; 141: 1971-1976.
- Duggal PS, Ryan NK, Van der Hoek KH, Ritter LJ, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leukocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles. *Reproduction.* 2002;123: 891-898.
- Ebisawa T, Kajimura N, Uchiyama M, Katoh M, Sekimoyo M, Watanabe T, et al. Allelic Variants of Human Melatonin 1a Receptor: Function and Prevalence in Subjects with Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 262:832-837.
- Eker E, Şahin M. Birinci basamakta obeziteye yaklaşım. *Sted.* 2002; 11(7) : 246.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
- Elshafie MAA, Fouad GMM, Ewies AA. The effect of leptin on maturation of the ovarian follicles of albino rats – An electron microscopic study. *Endocrine Abstracts.* 2006; 12: P102
- Ergün A. Leptin (Ob Protein). *T Klin Tıp Bilimleri.* 1999; 19:130-136.
- Esinler I, Bozdog G, Yarali H. Impact of isolated obesity on ICSI outcome. *Reproductive Biomedicine Online.* 2008; 17: 583–587.
- Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78(3-4): 203-216.
- Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn AW. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9: 840-852.
- Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68(4): 437-446.

- Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 47: 372-381.
- Fedorcsak P, Olav Dale P, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S, Oldereid N, Omland AK, Abyholm T, Tanbo T. Impact of overweight and overweight on assisted reproduction treatment. *Hum Reprod.* 2004; 19: 2523–2528.
- Fenton PF, Dowling MT. Studies on obesity.1. Nutritional obesity in mice. *J Nutr.* 1953; 49: 319-331.
- Fernandez B, Diaz E, Colomenro MD, Diaz B. Maternal pineal gland participates in prepubertal rats' ovarian oocyte development. *Anat Rec.* 1995; 243: 461-465.
- Field AE, Barnoya J, Colditz GA. “Handbook of Obesity Treatment 1th edition”, Wadden TA, Stunkard AJ, The Guilford Press, 2003;12-13.
- Formiguera X, Canton A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Cl Ga.* 2004; 18: 1125-1146.
- French S, Robinson T. Fats and food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 629-634.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395: 763-770.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1752-1761.
- Galijasevic S, Abdulhamid I, Abu-Soud HM. Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase. *Biochemistry.* 2008; 47: 2668 -2677.
- Galinier M, Pathak A, Roncalli J, Massabuau P. Obesity and cardiac failure. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005; 98(1): 39-45.
- Gartner LP, Hiatt, JL. *Color Textbook of Histology*, W.B. Saunders Company. 2001; 461-487.
- Gay VL, Tomacarini RL. Follicle stimulating hormone in the female rat: cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science.* 1974; 184: 75-77.
- George V, Tremblay A, Despres JP, Leblanc C, Bouchard C. Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. *Int J Obes.* 1990; 14:1085-1094.
- Ghibaoudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. *Obes Res.* 2002; 10: 956–963.

- Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, et al. Individual and synergistic actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53: 1393-401.
- Glass JD, Lynch GR. Evidence for a brain site of melatonin action in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Neuroendocrinology.* 1981; 34:1-6.
- Grenman S, Ronnema T, Irjala K, Kaihola HL. and Gronroos M. Sex steroid, gonadotropin, cortisol, and prolactin levels in healthy, massively obese women: correlation with abdominal fat cell size and effect of weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 63: 1257-1261.
- Greisen S, Ledet T, Ovesen P. Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Hum Reprod.* 2001; 16: 2061-2065.
- Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Body mass index and ovulatory infertility. *Epidemiology.* 1994; 5: 247-250.
- Golay A, Bobbioni E. The role of dietary fat in obesity. *Int J Obes.* 1997; 21: S2-S11.
- Gong LH, Ren DH, Xiong M, Lu ZQ, Wang XM. Melatonin in in vitro apoptosis of H22 hepatocarcinoma cells. *Chinese Journal of Oncology* 2003; 25: 550-554.
- Gonzalez A, Alvarez-Garcia V, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez EJ, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. In vivo inhibition of the estrogen sulfatase enzyme and growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010; 10: 279-286.
- Grant I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin 43: regulation by gonadotrophins. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(7): 310-313.
- Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. *J Microsc.* 1986; 143: 3-45.
- Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microscopy.* 1987; 147 (3): 229-263.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96: 379-394.
- Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. *J Microsc.* 1999; 193(3): 199-211.

- Gündüz B, Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus aureatus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002; 132(2): 393-401.
- Gupta BBP, Spessert R. Regulation of melatonin synthesis: animal versus human studies, in: melatonin: from molecules to therapy, S.R. Pandi-Perumal and Daniel P. Cardinali (ed), 2007;117-134.
- Gürsoy E, Ergin K. Dişi üreme sistemi atlası, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007.
- Halawaty S, ElKattan E, Azab H, ElGhamry N, Al-Inany H, Effect of obesity on parameters of ovarian reserve in premenopausal women. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010; 32(7): 687-690.
- Halliwel B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Method Enzymol*. 1990; 186:185.
- Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod*. 2004; 71: 66-72.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril*. 2008; 90: 897-904.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38: 313-316.
- Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol*. 1997; 47: 101-106.
- Hariri N, Thibault L. High-fat diet induced obesity in animal models. *Nutr Research Rev*. 2010; 23(2): 270-299.
- Harrold JA, Williams G, Widdowson PS. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurochem*. 2000; 74: 1224-1228.
- Harwood K, Vuguin P, DiMartino-Nardi J. Current approaches to the diagnosis and treatment of polycystic ovarian syndrome in youth. *Horm Res*. 2007; 68(5): 209-217.
- Hatemi H, Turan N, Arık N, Yumuk V. Türkiye obezite ve hipertansiyon taraması sonuçları (TOHTA). *Endokrinolojide Yönelişler Dergisi* 2002; 11(Ek 1):1-16.
- Hekimoğlu A. Leptin ve fizyopatolojik olaylardaki rolü *Dicle Tıp Dergisi* 2006;33(4): 259-267.

- Hermann R, Podhajsky S, Jungnickel S, Lerchl A. Potentiation of antiproliferative effects of tamoxifen and ethanol on mouse hepatoma cells by melatonin: possible involvement of mitogen-activated protein kinase and induction of apoptosis. *J Pineal Res.* 2002; 33: 8-13.
- Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress a direct link to CVD. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 365-367.
- Higashi T, Kawamata F, Sakamoto T. Studies on rat liver catalase. VII. Double-Labeling of Catalase by ¹⁴C-Leucine and ³H-d- Aminolevulinic Acid. *Tokyo, J Biochem.* 1974; 76: 703-708.
- Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: Implications for obesity. *J Nutr.* 2000; 130: 284S-288S.
- Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L, Lithell H. Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 2586–2593.
- Hossain P, Kawaar B, Nahas EM. Obesity and diabetes in the developing world. A growing challenge. *N Engl J Med.* 2007; 356: 213.
- Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three dimensional measurement in microscopy.* U.K. Bios Scientific Publishers. 1998.
- Huang AHC, Trelease RN, Moore TS. *Plant peroxisomes,* Academic press, New York, 1983; 213.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-580.
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh Jr TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 1984; 5:76-127.
- Hussain SA, Hussein KI, Saieed BN. Improvement of the hypolipidemic effect of lovastatin with melatonin. *Iraqi Postgrad Med J.* 2004; 6: 73-78.
- Ingle D. A simple means of producing obesity in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949; 72: 604-605.
- Ireland JJ, Roche F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology.* 1983; 112:150-156.

- Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh M. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J Pineal Res.* 2000; 28:48-51.
- Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE. Sheep and Goats (Chapter 12), *Reproduction in Farm Animals*, Hafez E.S.E and Hafez B. (ed), 2000; 172-179.
- Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad and the signals that raise them. *Cell Cycle* 2006; 5: 1178-1183
- Jequier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev.* 1999; 79(2): 451-480.
- Jequier E. Pathways to obesity. *Int J Obes.* 2002; 26: S12-S17.
- Jia XC, Hsueh AJ. Homologous regulation of hormone receptors: luteinizing hormone increases its own receptors in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* 1984; 115: 2433-2439.
- Jones GL, Masters CJ. On the comparative characteristics of mammalian catalases. *Biochem Mol Biol.* 1976; 55(4): 511-518.
- Joep T, Lammert J, Paasch U, Glander HJ. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2003; 26(6): 335.
- Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol.* 1997;59: 349-363.
- Kalaivanisailaja J, Manju V, Nalini N. Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Polish J Pharmacol.* 2003; 55: 763-769.
- Kalsbeek A, Fliers E, Roming JA. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology.* 2001; 142: 2677-2685.
- Karasu Ç, Arı N. Enerji Metabolizmasının Regülasyonu, Pankreasın Rolü, Gastroenteropankreatik hormonlar. *J Int Med Sci.* 2005; 1(35):1-61
- Kassayova M, Markova M, Bojkova B, Adamekova E, Kubatk P, Ahlersova E, & Ahlers I. Influence of long - term melatonin administration on basic physiological and metabolic variables of young Wistar: Han rats. *Biologia.* 2006; 61: 313-320.
- Keha EE. Küfrevioğlu Öİ. *Biyokimya, muhtelif kısımlar.* Erzurum. Şafak yayınevi, 1997; 36.
- Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control food intake in the Rat. *Proc R Soc.* 1953; 140: 578- 592.

- Khajeh F, Jahromi S, Hajizadeh H, Homafar MA, Saadat N. The protective effects of exogenous melatonin on nicotine-induced changes in mouse ovarian follicles. *J Reprod Infertil*. 2012; 13(3): 143-150.
- Kirel B, Doğruel N. Yeni bir hormon: Leptin. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. 1998; 7: 421.
- Kim JK, Lee CJ. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. *Mutat Res*. 2000; 449(1-2): 33-39.
- Kirino T. Delayed neuronal death. *Neuropathology*. 2000; 20:95-7.
- Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998; 97: 2307-2315.
- Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, de Meyer GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998; 152(4): 885-888.
- Koçyiğit A, Cevik M. Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*. 2011; 8(1): 33-41.
- Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 2002; 61 (2): 180-186.
- Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M, Kwiecień S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*. 2007; 58: 381-405.
- Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek S J. Neuro-hormonal control of food intake; basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56 (6): 525.
- Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009b; 10: 261-270.
- Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med*. 2009a; 15: 43–50.
- Körükçü Ö, Kukulcu K. The Effect of the obesity on reproductive System. *TAF Prev Med Bull*. 2011; 10(2): 231-238.
- Knecht M, Amsterdam A, Catt KJJ. The regulatory role of cyclic AMP in hormone-induced of granulosa cell differentiation. *Biol. Chem*. 1981; 256: 10628-10633.

- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assays and methods of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984; 87: 1344-1350.
- Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res*. 1994; 278: 549-556.
- Kuczmarski RJ, Flegal KM. CDC Growth charts: United States. *Adv Data*. 2000; 314:1-27.
- Ladizesky MG, Boggio V, Albornoz LE, Castrillón PO, Mautalen C, Cardinali DP. Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. *J Pineal Res*. 2003; 34: 143-151.
- Lan A, Skull J, McVeigh E, Margara R, Winston RM. Measurement of ovarian volume by transvaginal ultrasound before ovulation induction with human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod*. 1997; 12: 294-297.
- Lee YK, Chang H, Kim W, Kim J, Yoon Y. Effects of Gamma-Radiation on ovarian follicles. *Arch Hig Rada Toksikol*. 1998; 49:147-153.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*. 1958; 80: 258.
- Li X, Zhang M, Tang W. Effects of melatonin on streptozotocin-induced retina neuronal apoptosis in high blood glucose rat. *Neurochem Res*. 2013; 38(3): 669-676.
- Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 4140-4147.
- Lobo RA, and Carmina E. Polycystic Ovary Syndrome. In Lobo, R.A., Mishell, D.R., Jr, Paulson, R.J. and Shoupe, D. (eds), *Mishell's Textbook of Infertility, Contraception and Reproductive Endocrinology*, 4th edition. Blackwell Science Publishers, Oxford, 1997; 363-383.
- Lu T, Galijasevic S, Abdulhamid I, Abu-Soud HM. Analysis of the mechanism by which melatonin inhibits human eosinophil peroxidase. *Br J Pharmacol*. 2008; 154(6): 1308-1317.
- Luboshitzky R, Shen-Orr Z, Shochat T, Herer P, Lavie P. Melatonin administered in the afternoon decreases next-day luteinizing hormone levels in men: lack of antagonism by flumazenil. *J Mol Neurosci*. 1999; 12: 75-80.

- Luo LL, Xiao-Chun C, Yu-Cai F, Jin-Jie X, Xuan-Hao L, Yan-Fang X and Xing-Mei Z. The effects of caloric restriction and a high-fat diet on ovarian lifespan and the expression of SIRT1 and SIRT6 proteins in rats. 2012; 24(2): 125-133.
- Lustig RH. The neuroendocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001; 30(3):765- 785.
- Malpoux B. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001; 16 (4): 336-347.
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med.* 1999; 130(8): 671-680.
- Mantzoros CS, Moschos SJ. Leptin: in Search of Role(s) in Human Physiology and Pathophysiology. *Clin Endocrinol.* 1998; 49: 551-567.
- Martin JE, Sattler C. Developmental loss of the acuteinhibitory effect of melatonin on the in vitro pituitaryluteinizing hormone and follicle-stimulating hormone responsesto luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinol.* 1979; 105: 1007-1012.
- Mayes M. The meiotic arrest of bovine oocytes. Laval University, Quebec, Canada, Doctora Thesis, 2002.
- Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of u and me: A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anatomy.* 1996; 188:1-15.
- Mazaud-Guittot S, Guigon C.J, Coudouel N, Magre S. Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biol Reprod.* 2006; 75: 749-759.
- Mc Cann SM, Mastronardi C, DE, Laurentiis A, Rettori V. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1057: 64-84.
- Mc Farland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosembliit N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 1989; 245: 494-499.
- Mc Gee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 21(2): 200-214.
- Mc Natty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the statusof the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 49: 851-860.

- Meduri G, Vu Hai MT, Jolivet A, Takemori S, Kominami S, Driancourt MA, Milgrom E. Comparison of cellular distribution of LH receptors and steroidogenic enzymes in the porcine ovary. *J Endocrinol.* 1996; 148: 435-446.
- Meier AC, Bobbioni E, Gabay C. IL-1 Receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: A possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 1184.
- Metwally M, Li TC, and Ledger WL. The impact of obesity in ovarian female reproductive function. *Obesity Review.* 2007; 8: 515-523.
- Mickelsen O, Takahashi S & Craig C. Experimental obesity. 1. Production of obesity in rats by feeding high-fat diets. *J Nutr.* 1955; 57: 541-554.
- Miyano T. In Vitro Growth Of Mammalian Oocytes. *J Reprod Dev.* 2005; 51(2): 169-176.
- Mohammadghasemi F, Jahromi SK, Hajizadeh H, Homafar AM, Saadat N . The Protective Effects of Exogenous Melatonin on Nicotine-induced Changes in Mouse Ovarian Follicles *J Reprod Infertil.* 2012;13(3):143-50.
- Montague CT, Faroozi IS, Whitehead JP, etc: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997;387:903.
- Montilla Lopez P, Tunez I, Munoz de Agueda MC, Cabrera E, Montilla MC, Plascencia J, de la Torre EJ. Protective effect of melatonin against oxidative stress induced by ligation of extra-hepatic bile duct in rats: Comparison with the effect of s-adenosyl-L-methionine. *J Pineal Res.* 2000; 28:143-149.
- Moran O, Phillip M. Leptin: obesity, diabetes, and other peripheral effects. *Pediatric Diabetes.* 2003; 4: 101-109.
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction. *Fertil Steril.* 2002; 77:433-444.
- Must A, Anderson SE. Effects of obesity on morbidity in children and adolescents. *Nutr Clin Care.* 2003; 6(1): 4-12.
- Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H. Effects of continuous light and melatonin treatment on energy metabolism of the rat. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25: 716-723.
- Myers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJP, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 2004; 127:569-580
- Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H, Asikainen J. Exogenous melatonin elevates the plasma leptin and thyroxine concentrations of the mink (*Mustela vison*). *Z Naturforsch.* 2000; 55: 806-813.

- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK. Carvedilol attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia: Possible antioxidant mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2002; 13; 193-200.
- Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicle does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril.* 2003; 80: 1012-1016.
- Nduhirabandi F, Du Toit EF, Blackhurst D, Marais D, Lochner A. Chronic melatonin consumption prevents obesity - related metabolic abnormalities and protects the heart against myocardial ischemia and reperfusion injury in a prediabetic model of diet - induced obesity. *J Pineal Res.* 2011; 50(2): 171-182.
- Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res.* 2002; 32: 26-33.
- Norman RJ and Clark AM, Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev.* 1998; 10: 55-63.
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States 1994–2004. *JAMA.* 2006; 295: 1549–1555.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 2002; 32: 143-148.
- Ozaki Y, Wurtman R, Alonso R & Lynch HJ. Melatonin secretion decreases during the proestrous stage in the rat estrous cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* 1978;75: 531-534.
- Öktem Ö ve Urman B. Over hayat döngüsünü anlamak. *J Turk Soc Obstet Gynecol.* 2011; 8 (2): 71-82.
- Özmen MM, Moran M. Diyabet ve obezite. *Numune Sağlık Dergisi.* ISSN 1309-9213. Eylül 2010.
- Palaoğlu OS, Beşkonaklı E. Pineal gland and aging. *Turkish Journal of Geriatrics.* 1998; 1: 13-18
- Palumbo A, Yeh J. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod.* 1994; 51 (5): 888-895.
- Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res.* 2006; 41: 79-84.

- Pandey S, Maheshwari A, Bhattacharya S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 3: 62-67.
- Patil L, Balaraman R. Effect of melatonin on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Int J Pharm.* 2009; 1(3): 879-884.
- Pasquali R, Antenucci D, Casimirri F, Venturoli S, Paradisi R, Fabbri R, Balestra V, Melchionda N, Barbara L. Clinical and hormonal characteristics of obese amenorrheic hyperandrogenic women before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68(1): 173-179.
- Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update.* 2003; 9: 359-372.
- Pasquali R, Gambineri A. Polycystic ovarian syndrome: A multifaceted disease from adolescence to adult age. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1092: 158-174.
- Pauerstein CJ, Eddy CA, Croxatto HD, Hess R, Siler-Khodr TM, Croxatto HB. Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in. *Am J Obstet Gynecol.* 1978; 130(8): 876-886.
- Pekmez H, Colakoğlu Camcı N, Zararsız İ, Kus İ, Ogeturk M, Yılmaz HR, Sarsılmaz M. The effect of melatonin hormone on formaldehyde-induced liver injury: a light microscopic and biochemical study. *Firat Tıp Dergisi.* 2008; 13(2): 92-97.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995; 269: 540-543.
- Pijl H. Abdominal obesity: metabolic complications and consequences for the liver. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2001; 145(27): 290-294.
- Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle HV, Peral A. Involvement of Melatonin MT3 receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2001; 416: 251-254.
- Polson D, Wadsworth J, Adams J, Francks S. Polycystic ovaries: a common finding in normal women. *Lancet.* 1988; 1: 870-872.
- Popkin BM, Keyou G, Fengying Z, Guo X, Haijiang M, Zohoori N. The nutrition transition in china: A cross-sectional analysis. *Eur J Clin Nutr.* 1993; 47: 333-346.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem.* 1997; 65: 430-442.

- Prata Lima MF, Baracat EC, Simoes MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37: 987-995.
- Prolo P, Wong ML, Licinio J: Molecules in focus: Leptin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 1285-1253.
- Pru JK, Tilly JL. Programmed cell death in the ovary: Insights and future prospects using genetics Technologies. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 845-853.
- Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrance P, Renard P, Casteilla L, Pénicaud L. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2003; 144: 5347-5352.
- Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high - fat diet at middle age. *Endocrine.* 2003; 21: 163-167.
- Quinton ND, Laird SM, Okon MA, Li TC, Smith RF, Ross RJ, Blakemore AI. Serum leptin levels during the menstrual cycle of healthy fertile women. *Br J Biomed Sci.* 1999; 56: 16-19.
- Radavelli-Bagatini S, Blair AR, Proietto J, Spritzer PM, Andrikopoulos S. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. *J Endocrinol.* 2011; 209: 307-315.
- Ramsay TG. Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes in vitro. *J Anim Sci.* 2001; 79(3): 653-657.
- Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middleage suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinol.* 1999; 140:1009-1012.
- Raskind MA, Burke BL, Crites NJ, Tapp AM, Rasmussen DD. Olanzapine-induced weight gain and increased visceral adiposity is blocked by melatonin replacement therapy in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32: 284-288.
- Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev.* 1980; 1: 109-131.
- Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991; 79: C153-C158.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991;1: 151-180.

- Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res.* 1993; 26: 1141-1155.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow- Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995; 19: 149-165.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995; 18(1): 1-11.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997; 29: 363-372.
- Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC, Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept.* 1999; 8: 56-63.
- Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17:273-285.
- Ricci AG, Di Yorio MP, Faletti AG. Inhibitory effect of leptin on the rat ovary during the ovulatory process. *Reproduction.* 2006; 132: 771-780.
- Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell development. *Endocrinology.* 1980; 60: 51-89.
- Richards JS, Hedin L. Molecular Aspects of Hormone Action in Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization. *Annu Rev Physiol.* 1988; 50: 441-463.
- Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 171(1): 171-177.
- Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI, Kinter M. High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. *J Biol Chem.* 2013; 288(3): 1979-1990.
- Rios - Lugo MJ, Cano P, Jimenez Ortega V, Fernandez Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, Esquifino AI. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat - fed rats. *J Pineal Res.* 2010; 49: 342-348
- Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas.* 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.
- Rothwell NJ, Stock MJ. The development of obesity in animals the role of dietary factors. *Clin Endocrinol Metab.* 1984; 13: 437-449.

- Russ JC, Dehoff RT. Practical Stereology. New York. Published by Plenum Press, 1999; 1-4.
- Ryan NK, Van der Hoek KH, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod.* 2002; 66: 1548–1554.
- Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 1407-1426.
- Sansoy V, Onat A. Türk erişkinlerde obezite, abdominal obezite, belirleyicileri ve sonuçları. *TEKHARF*, 2007.
- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 528- 537.
- Sarsılmaz KM, Colakoglu N, Kukner A, Ozen OA, Yilmaz B, Kelestimur H. Pinealectomy Increases and Exogenous Melatonin Decreases Leptin Production in Rat Anterior Pituitary Cells: an Immunohistochemical Study. *Physiol Res.* 2004; 53: 403-408.
- Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, Scherrer U, Duplain H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high - fat diet - fed insulin - resistant mice. *Endocrinol.* 2009; 150: 5311-5317.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh, V, Selvaraj P, Trounson O. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech.* 2006; 69(6): 396-407.
- Scheffer GJ, Broekmans FJM, Dorland M, Habbema JDF, Looman CWN, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*, 1999; 72(5): 845-851.
- Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr.* 2000; 84: 417-427.
- Sener G. Karanlığın hormonu: Melatonin. 2010; 14(3) :112-120.
- She M, Deng X, Guo Z, Laudon M, Hu Z, Liao D, Hu X, Luo Y, Shen Q, Su Z, Yin W. NEUP11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high fat/high sucrose fed rats. *Pharmacol Res.* 2009; 59: 248–253.
- Shieh JM, Wu HT, Cheng KC, Cheng JT. Melatonin ameliorates high fat diet induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC ζ Akt GSK3 β pathway in hepatic cells. *J Pineal Res.* 2009; 47: 339-344.

- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1277-1282.
- Sneed ML, Uhler ML, Grotjan HE, et al. Impact on In vitro Fertilization success appear age related. *Hum Reprod.* 2008; 23: 1835-1839.
- Song GY, Gao Y, Di YW, Pan LL, Zhou Y, Ye JM. High-fat feeding reduces endothelium-dependent vasodilation in rats: differential mechanisms for saturated and unsaturated fatty acids? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33: 708-713.
- Song YM, Chen MD. Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice. *Acta Biol Hung.* 2009; 60(4): 399-407.
- Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; Chapter 12 Anovulation and the Polycystic Ovary. 2005; 465-491.
- Spicer LJ, Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinol.* 1997; 138: 3374-3378.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.* 1998; 18: 213-215.
- Svanberg B. Apoptosis the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia. Doctora Thesis, Goteborg University, Sweden. 1999.
- Syrop CH, Dawson JD, Humsan KJ, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod.* 1999; 14(7): 1752-1756.
- Syrop H, Willhoite A, Van voorhis BJ. Ovarian volume: a novel outcome predictor of assisted reproduction. *Fertil Steril.* 1995; 64: 1167-1171.
- Takao Y, Honda T, Ueda M, Hattori N, Yamada S, Maeda M, Fujiwara H, Mori T, Wimalasena J: Immunohistochemical localization of the LH/hCG receptor in human ovary: HCG enhances cell surface expression of LH/hCG receptor on luteinizing granulosa cells in vitro. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3: 569-578.
- Takahashi M, Ikemoto S, Ezaki O. Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1999; 45: 583-593.
- Takazuki A, Nakamura A, Tamura A, Shiamura K, Morioka H. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. *Reprod Medic Biol.* 2003; 2: 139-144.

- Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res.* 2008; 44(3): 280-287.
- Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev.* 2011; 12: 167-188.
- Taş U, Ögetürk M, Sapmaz H I, Karaca Zİ, Özyurt B, Söğüt E, Sarsılmaz M. Sıçan prefrontal korteksinde tolüenin neden olduğu apoptoza karşı melatoninin koruyucu etkisinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi.* 2012; 26(1): 001-006.
- Taşan E. Obezitenin tanımı, değerlendirme yöntemleri ve epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 2005; 1(37):1-4.
- Taşçı E. Tip I Diyabetli çocuk ve adölesan hastalarda adiponektin, leptin ve inflamatuvar markırlar ile metabolik kontrol arasındaki ilişki. Çukurova üniversitesi tıp fakültesi çocuk sağlığı ve hastalıkları Anabilim dalı uzmanlık tezi Adana. 2007.
- The practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine(CASRM). Obesity and reproduction. *Fertil Steril.* 2008; 90: S21-29.
- Thomas PR. Weighing the options: Criteria for evaluating weight-management programs. Washington DC, National Academy Press. 1995.
- Tucker LA, Kano MJ. Dietary fat and body fat: A multivariate study of 205 adult females. *Am J Clin Nutr.* 1992; 56: 616-622.
- Tüzün M. Obezite: tanım, sıklık, sınıflandırma tipleri, dereceleri ve komplikasyonları. *Obezite, Nobel Tıp Kitabevleri Limited Şirketi,* 1995; 1-20.
- Urakawa H, Katsuki A, Yasuhiro S, Gabbaza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y. Oxidative stres is associated with adiposity and insülin resistance in men. *Endocrinol Metab.* 2003; 88: 4673-4676.
- Usta A, Oruç H, Abban Mete G. Leptinin yenidoğan sıçanların testis germ hücrelerine etkisinin ışık mikroskop düzeyinde incelenmesi *Pam Tıp Derg.* 2012; 5(2): 75-83.
- Üçkaya G. Primer hipertansiyon patogeneğinde leptinin rolü. *GATA Uzmanlık Tezi,* Ankara, 1999; 39s (yayınlanmamış).

- Ülgey M. Egzersizin Plazma Leptin Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. GATA Uzmanlık Tezi, Ankara, 1999; 40s. (yayınlanmamış).
- Ünal B, Bradley PM, Şahin B, Canan S, Aslan H, Kaplan S. Estimation of numerical density and mean synaptic height in chick hippocampus 24 and 48 hours after passive avoidance training. *Dev Brain Res.* 2002c; 136: 135-44.
- van der Zwan LP, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CDA, Heine RJ, Teerlink T. Hyperglycemia and oxidative stress strengthen the association between myeloperoxidase and blood pressure. *Hypertension.* 2010; 55: 1366–1372.
- van der Zwan LP, Scheffer PG, Teerlink T. Reduction of myeloperoxidase activity by melatonin and pycnogenol may contribute to their blood pressure lowering effect. 2010.
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 1987; 435: 359-362.
- Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29: 119-126.
- Vega GL. Obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease *Am Heart J.* 2001; 142(6): 1108-1116.
- Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes. (London)* 2006; 30 (3): 400-418.
- Villanua MA, Agrasal C, Esquifino AI. Neonatal melatonin administration advances rat vaginal opening and disrupts estrous cyclicity and estrogen-dependent regulatory mechanism of luteinizing hormone and prolactin. *J Pineal Res.* 1989;7: 165-174.
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature.* 1998; 393: 684-688.
- Warwick ZS, Schiffman SS. Role of dietary-fat in calorie intake and weight-gain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992; 16: 585-596.
- Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27: 695–700.
- Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ ob mouse. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2065-2070.

- Weigle DS, Breen PA, Matthys CC, Callahan HS, Meeuws KE, Burden VR, JQ Purnell. A high protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82: 41–48.
- Williams LM, Martinoli MG, Titchener LT, Pelletier G. The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat, *Endocrinol.* 1991; 128.
- Wittemer C, Ohl J, Bailly M, Bettahar-Lebugle K, Nisand I. Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome? *J Assist Reprod Genet* 2000;17: 547–552.
- Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinol.* 2000; 141: 487-497.
- Woo MM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PC. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(10): 4789-4797.
- World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.
- Wright DT, Cohn LA, Li H, Fisher B, Li CM, Adler KB. Interactions of Oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Perspect.* 1994; 102(10): 85-89.
- Wun WS, Jackson FL, Preslock JP, Berkowitz AS. Effect of melatonin in vivo upon FSH and LH release from hamster pituitary glands, *Mol Cell Endocrinol.* 1986; 46: 227-234.
- Wurtman RJ, Axelrod J, Chu EW. Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. *Science.* 1963; 141: 277-278.
- Yamamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res.* 1992; 37(1): 5-1
- Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity. *Circ Res.* 2007; 101: 545-559.
- Yang YM, Rajamahendran R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 2000;62 (5): 1209-1217.
- Yazıcı C, Köse K. Melatonin: karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi E.Ü.* 2004; 13(2):56-65.

- Yetkin İ, Çimen AR. Obezite ve güncel tedavi yöntemleri. 2010; 69: 23-24.
- Yılmaz M. Beslenme eğitiminin obez hastalarda ağırlık kaybı üzerine etkisi. TURKJEM. 2003; 2: 83-85.
- Yılmaz N. Spor antioksidanı artırıyor. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Ana Bilim Dalı. 2008.
- Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikozektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul. 2005.
- Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology, Sydney: Churchill Livingstone, 2000.
- Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17b production by rat ovarian granulosa cells. Endocrinology. 1997; 138: 847-850.
- Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-b of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. Biol Reprod. 1999; 61: 1104-1109.
- Zaidi S, Usmani A, Shokh IS, Alam SE. Ovarian reserve and BMI between fertile and subfertile women. J Coll Physicians Surg Pak. 2009; 19(1): 21-24.
- Zelevnick AJ, Midgley AR, Reichert LE. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. Endocrinology. 1974; 5: 818-828.
- Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. Theriogenology. 2003; 59(5-6): 1421-1433.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994; 372(6505): 425-432.
- Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. Leptin: Structure, Function and Biology. Vitamins and Hormones. 2005; 71: 345-372.
- Zhao H, Poon AM, Pang SF. Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. Life Sci. 2000; 66: 1581-1591.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Gamze
Soyadı : TÜMENTEMUR
Doğum Yeri : Samsun
Doğum Tarihi : 20.03.1985
Medeni Hali : Bekar
Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitimi

2010-2013 : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Samsun

2009-2010 : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bilimsel Hazırlık Programı (Temel Tıp Bilimleri)

2005–2009 : Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum

E-posta: gtumentemur.omu@gmail.com