

Farklı Dozlarda Ekzojen Gonadotropin Uygulamasının Serotonin ve Melatonin Düzeylerine Etkisiİsmail SARI¹, Erkan GÜMÜŞ², Esmâ ÖZMEN¹, İnayet GÜNTÜK³, Serpil ERŞAN¹, Gönül ŞEYDA SEYDEL⁴

ÖZET: Ekzojen gonadotropinler vasıtasıyla ovaryum stimülasyonu (OS) hem üreme biyolojisi ile ilgili deneysel çalışmalarda hem de *in vitro* fertilizasyon (IVF) 'da yaygın olarak kullanılan bir uygulamadır. Fakat yapılan bazı çalışmalardan elde edilen veriler OS'nin oosit, embriyo niteliği ve embriyogenez süreçlerine çeşitli olumsuz etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir. Dolayısıyla, OS prosedürlerinin üreme ve diğer biyolojik süreçlerle olan olası etkilerini inceleyecek kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Serotonin ve melatoninin de oosit ve embriyo niteliğinde etkileri olan önemli hormonlar olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte farklı dozlarda uygulanan ekzojen gonadotropin uygulamalarının bu hormonlar üzerine etkisini inceleyen herhangi bir araştırma olmadığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada farklı dozlarda ekzojen gonadotropin uygulamasının serotonin ve melatonin düzeylerine etkisini fare modelinde incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda fareler 5, 7.5, 10 ve 12.5 I.U. Gebe Kırsak Serum Gonadotropin/ İnsan Koriyonik Gonadotropin (PMSG/hCG) uygulamak üzere 4 farklı gruba (n=6) ayrıldı. Ekzojen gonadotropinlerle muamele sonrasında melatonin ve serotoninin düzeyleri çalışma gruplarına ait plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile tespit edildi. Melatonin düzeyleri yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmezken, serotonin düzeyleri yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan grup içi karşılaştırmalarda 7.5 I.U. PMSG/hCG uygulanan grupta diğer gruplara nazaran serotonin düzeyleri yönünden anlamlı bir artış olduğu saptandı. Sonuç olarak uyguladığımız ekzojen gonadotropin dozlarının melatonin düzeylerini etkilemediği ancak serotonin seviyelerini 7.5 I.U. PMSG/hCG uygulaması sonrasında diğer dozlara göre anlamlı olarak artırdığı anlaşılmaktadır. Daha yüksek ekzojen gonadotropin dozlarının bu hormonlara etkisini hayvanlarda ve insanlarda da inceleyecek ilave çalışmaların üreme biyolojisine katkı sunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Serotonin, melatonin, gonadotropin, ovaryum stimülasyonu

Effect of Different Doses of Exogenous Gonadotropin Administration on Serotonin and Melatonin Levels

ABSTRACT: Ovarian stimulation (OS) by exogenous gonadotropins is a common technique both in experimental studies on reproductive biology and *in vitro* fertilization (IVF). However, the data obtained from some studies indicate that OS may have various negative effects on the quality of oocyte and embryo, and embryogenesis processes. Therefore, it is thought that further studies are needed to examine the possible effects of OS procedures on reproductive and other biological processes. It is reported that serotonin and melatonin are important hormones that have effects on the quality of oocyte and embryo. On the other hand, it is understood that there is no study to examine the effect of different doses of exogenous gonadotropin treatment on these hormones. Therefore, in this study, we aimed to examine the effects of different doses of exogenous gonadotropin on serotonin and melatonin levels in the mouse model. In our study, mice were divided into 4 different groups (n = 6) to treatment with 5, 7.5, 10 and 12.5 I.U. Pregnant Mare Serum Gonadotrophin/ Human Chorionic Gonadotropin (PMSG/hCG). After the treatment with exogenous gonadotropins, levels of melatonin and serotonin were determined by the ELISA method in the plasma samples of the study groups. While there was no significant difference between the groups in terms of melatonin levels, there was a significant difference between the groups in terms of serotonin levels. In intragroup comparisons, it was found that there was a significant increase in the serotonin levels in the group treated with 7.5 IU PMSG/hCG compared to other groups. In conclusion, it is understood that the exogenous gonadotropin doses, which we administered, did not affect melatonin levels but significantly increased serotonin levels after 7.5 I.U. PMSG/hCG administration compared to other doses. Additional studies to examine the effect of higher exogenous gonadotropin doses on these hormones in animals and also in humans, are thought to contribute to reproductive biology.

Key words: Serotonin, melatonin, gonadotropin, ovarian stimulation

¹ İsmail Sarı (Orcid ID: 0000-0003-3732-2102), Esmâ Özmen (Orcid ID: 0000-0003-3223-6854), Serpil Erşan (Orcid ID: 0000-0002-8968-4044), Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya ABD, Niğde, Türkiye

² Erkan Gümüüş (Orcid ID: 0000-0001-6432-7457), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Aydın, Türkiye

³ İnayet Güntük (Orcid ID: 0000-0002-8299-1359), Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde Zübeyde Hanım Sağlık Yüksekokulu, Ebelik ABD, Niğde, Türkiye

⁴ Gönül Şeyda Seydel (Orcid ID: 0000-0001-9317-0719), Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde Zübeyde Hanım Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Yaşlı Bakımı ABD, Niğde, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İsmail Sarı, e-mail: isari@ohu.edu.tr

ETİK KURUL ONAYI / ETHICS COMMITTEE APPROVAL: Bu makale yer alan hayvan deneyi için "Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, yerel hayvan etik komitesi" tarafından Onay No: 29.12.2015-92 kararı ile Etik Kurul Onayı almıştır.

Geliş tarihi / Received: 23-03-2020

Kabul tarihi / Accepted: 01-05-2020

GİRİŞ

Tüm canlıların yaşamlarını devam ettirebilmelerini sağlayan en hayati süreç başarılı bir üremedir (Reiter ve ark., 2014b; Reiter ve ark., 2014c; Salt ve ark., 2017). Ekzojen gonadotropinlerle ovaryumda OS, fazla sayıda oosit elde etmek üzere reproduktif ve *in vitro* fertilizasyon (IVF) uygulamalarında yaygın olarak başvuru bir uygulamadır (Ertzeid ve Storeng, 2001). Bununla birlikte OS protokollerinde uygulanan gonadotropin dozları çeşitlik göstermektedir. Bazı çalışmalarda OS uygulamalarının blastomer sayısını azalttığı, preimplantasyon aşamasında embriyo morfolojisini ve kalitesini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Group, 1998; Van der Auwera ve D'Hooghe, 2001). Ayrıca, fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda, OS uygulamasını takiben artan kromozomal anormallikler tespit edilmiştir. Birçok araştırma OS'nin beraberinde getirdiği bu gibi potansiyel olumsuz etkilerde uygulanan doz seviyesinin önemli olduğuna işaret etmektedir (Baart ve ark., 2006; Goldman, 2007; Sato ve ark., 2007). Bu nedenle özellikle farklı dozlarda yapılan OS prosedürlerinin organizmaya etkilerinin incelenmesi bu alanda optimum dozun belirlenmesine ve OS'nin biyolojik süreçlere olan etkilerinin anlaşılmasına katkısı olabilir. Ayrıca bu gibi çalışmalardan elde edilecek veriler reproduktif çalışmaların ve IVF uygulamalarının başarı oranlarının artırılmasına katkı sağlayabilir.

Dişi üreme sistemi ovulasyon, hormonal ve sirkadiyen ritmi de içeren kompleks bir süreçtir. Dişilerde başarılı bir üreme döngüsü için nitelikli bir ovulasyon sürecinin başarıyla tamamlanması kritik öneme sahiptir. Melatonin de ovulasyon kalitesi üzerine olumlu etkileri olan ve geceleri pineal bezden salınan amino asit türevli bir hormondur (Boden ve ark., 2013; Yücel ve ark., 2018). Melatonin, metabolitleriyle birlikte fertilitenin düzenlenmesinde kompleks bir etkiye sahiptir (Kandemir ve ark., 2017). Melatoninin sahip olduğu antioksidan işlevlerinin eşey hücrelerinin de dâhil olduğu hücrel yapıları reaktif oksijen türlerine (ROT)'ne karşı koruyarak fertilité üzerindeki olumlu etkilerinde payı olduğu bildirilmektedir (Tamura ve ark., 2014; Yücel ve ark., 2018).

Melatonin, epifiz bezi, karaciğer, retina, ovaryum ve kan damarları tarafından sentezlenmektedir (Kierszenbaum, 2006). Biyosentezindeki öncü molekül triptofan amino asitidir. Triptofan hidroksilasyon ve dekarboksilasyon yoluyla serotonine, serotonin de daha sonra arilalkilamin N-asetiltransferaz (NAT) enzimi ile N-asetil-serotonine dönüştürülür. N-asetil-serotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi aracılığı ile melatonin oluşturmak üzere metillenir (Ceinos ve ark., 2004). Üretilen melatonin lipofilik yapıdadır ve tüm organlara geçebilmektedir (Koçak ve Çolak, 1996; Reiter, 1993).

Melatonin sentezinin ara moleküllerinden biri serotoninidir (5-hidroksitriptamin, 5HT) (Reiter, 1993). Serotonin ovaryumlarda (Clausell ve Soliman, 1978), foliküler sıvı (Bodis ve ark., 1992), olgun oositler ve kümülüs hücrelerinde (Amireault ve Dubé, 2005) bulunur. Memeliler dâhil pek çok hayvan grubunda serotoninin üreme biyolojisi açısından temel fonksiyonu ovaryum olgunlaşmasının modülasyonudur (Nikitina ve ark., 2002; Sheng ve ark., 2005; Tanaka ve ark., 1993; Terranova ve ark., 1990). Bunun yanı sıra serotonin ana östrojen kaynağı olan foliküler hücrelerin fonksiyonel aktivitesini de etkiler (Graveleau ve ark., 2000; Koppan ve ark., 2004; Tanaka ve ark., 1993; Terranova ve ark., 1990). Üreme döngüsü sırasında ovaryumdaki serotonin konsantrasyonu değişir. Bu durum bazı patolojik süreçler ve ayrıca IVF prosedürünün başarısıyla ilişkilidir (Bodis ve ark., 1993). Sınırlı sayıdaki bazı çalışmalarda ekzojen gonadotropin uygulamasının melatonin ve serotonin düzeylerini değiştirdiğine işaret eden veriler bulunmaktadır (Bódís ve ark., 1992; Prasad ve ark., 2015). Fakat bu araştırmalarda farklı dozlardaki ekzojen gonadotropinlerin, melatonin ve serotonin düzeylerine etkisinin incelenmediği görülmüştür.

OS protokolleri için kullanılan gonadotropin dozları hem hayvan deneylerinde hem de IVF çalışmalarında değişkenlik gösterebilmektedir. Tek bir döngüde çok sayıda oosit elde edebilmek için zaman zaman IVF hastalarında veya hayvan deneyi çalışmalarında daha yüksek dozlarda ekzojen gonadotropin kullanılarak OS gerçekleştirilmektedir (Combelles ve Albertini, 2003). Reprodüktif çalışmalarda süperovülasyon protokolleri için literatürde yaygın olarak fare başına 5.0 ila 10.0 IU dozları kullanılmaktadır (Ozturk ve ark., 2016; Vaseghi ve ark., 2017; Uysal ve ark., 2018). Dolayısıyla kullanılan ekzojen gonadotropin dozları değişkenlik göstermektedir. Fakat doz farklılıklarının üreme biyolojisi ile ilgili süreçlere etkisini inceleyen araştırmalar sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızda düşük doz 5.0, orta doz 7.5, yüksek doz 10.0 ve aşırı doz 12.5 IU PMSG/hCG şeklinde uygulanan farklı dozlardaki ekzojen gonadotropinlerin serotonin ve melatonin seviyeleri üzerinde bir etkisi olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma Grupları ve Gonadotropin Stimülasyonu

Bu çalışmada OS prosedürleri ve sonrasında belirlenecek hormon analizleri için 8-10 haftalık 20-30 g ağırlığında toplam 24 adet dişi BALB/c suşu fare kullanıldı. Çalışma öncesi Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, yerel hayvan etik komitesi tarafından onay (Onay No: 29.12.2015-92) alınmış olup tüm deney protokolleri deney hayvanlarının etik prosedürleri yönergelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Fareler 20-22 °C sıcaklık ve %50-65 bağıl nem ile standart yem ve içme suyu kullanılarak ad libitum beslendi. Farelerin 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık periyotları oluşturularak östrus evresine girmeleri sağlandı. Çalışma gruplarının oluşturulmasında kullanılan 24 fare Gebe Kısrak Serum Gonadotropin/ İnsan Koriyonik Gonadotropin (PMSG/hCG; Sigma, St Louis, MO, USA) dozuna bağlı olarak her birinde 6 adet deney hayvanı olacak şekilde 4 gruba ayırdı. Dişi farelere 5 (grup I), 7.5 (grup II), 10 (grup III), 12.5 (grup IV) I.U. PMSG enjekte edildi. Bundan 48 saat sonra her bir gruba sırası ile 5, 7.5, 10, 12.5 I.U. hCG intraperitoneal enjeksiyonla uygulanarak süperovüle olmaları sağlandı. Farelerin östrus siklusları günlük vajinal smear analizi yapılarak takip edildi.

Kan Örneklerinin Toplanması

Süperovüle edilen dişi farelere 5 mg kg⁻¹ Diazepam ve 200 mg/ kg⁻¹ Ketamine enjekte edildi. Fareler anestezi altında iken, heparinize şırınga ile kalbin sol ventrikülünden yaklaşık 1.5 mL kan örnekleri alındı ve etilendiamin tetra-asetik asit içeren tüplere ilave edildi. Daha sonra bu kan örneklerinden 2000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek plazmalar elde edildi. Her hayvana ait plazma serotonin ve melatonin düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmek üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

Serotonin ve Melatonin Ölçümü

Çalışma gruplarına ait plazma örneklerinde serotonin ve melatonin seviyeleri, enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) tabanlı Serotonin ve Melatonin ELISA kitleri (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, China) kullanılarak, kit protokolleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 22 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmadan elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk normallik testleri ile belirlendi. Bu testlerin sonucunda serotonin düzeylerinin normal dağılım gösterdiğinin analiz edilmesi nedeni ile tüm gruplar arasındaki karşılaştırılmasında Bir Yönlü ANOVA, melatonin düzeylerinin ise normal dağılıma uymadığının belirlenmesi sonucunda bu parametrenin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Ayrıca, serotonin düzeylerinin grup içi

karşılaştırmaları Tukey t testi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

ELISA yöntemi sonucunda elde edilen verilerin analizi ile serotonin düzeyleri yönünden çalışma grupları arasında anlamlı bir farkın olduğu belirlenirken ($p=0.001$; $p<0.05$), melatonin düzeyleri yönünden anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.886$; $p>0.05$). Tukey-t testi ile yapılan grup içi karşılaştırmalarda 7.5 I.U PMSG/hCG uygulanan grup II' ye ait serotonin düzeylerinin grup I ($P=0.001$), grup III ($p=0.007$) ve grup IV ($p=0.022$)'e göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$); bkz. Çizelge 1). Diğer gruplar arasında serotonin düzeyleri bakımından anlamlı bir farkın olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Çizelge 1. Çalışma gruplarına ait plazma serotonin, melatonin düzeyleri ve istatistiksel analizi

	Grup I (n=6)	Grup II (n=6)	Grup III (n=6)	Grup IV (n=6)	p
Serotonin (pg/mL; $\bar{x} \pm S$)	12.41 \pm 1.29	23.95 \pm 5.57*	16.31 \pm 2.36	15.69 \pm 3.33	0.001*
Melatonin (pg/mL; $\bar{x} \pm S$)	16.52 \pm 2.87	15.71 \pm 0.78	15.65 \pm 1.30	15.51 \pm 1.10	> 0.05

Veriler ortalama (\bar{x}) \pm standart sapma (S) olarak verilmiştir; * $p<0.05$

Bu çalışmada, farklı dozlarda ekzojen gonadotropin (PMSG/hCG) uygulaması ile gerçekleştirilen kontrollü OS' nin plazma serotonin ve melatonin düzeylerine etkisi ilk defa incelendi.

Bilgilerimize göre farklı dozlarda ekzojen gonadotropin (PMSG/hCG) uygulamasının serotonin düzeyindeki değişimini inceleyen herhangi bir araştırma bulunmasa da, bazı çalışmalarda serotoninin ovaryum dokusunda önemli işlevlere sahip olduğu, üreme ve gametogenezde rol aldığı bildirilmiştir (Koppan ve ark., 2004; Sharker ve ark., 2020). Serotoninin *Oryzias latipes* balığına ait ovaryum dokusunda hem steroidogenez hem de oosit maturasyonu üzerinde düzenleyici işlevlere sahip olduğu (Iwamatsu ve ark., 1993), insan granuloza (Bódis ve ark., 1992) ve sığır luteal hücrelerinde progesteron üretimini stimüle ettiği gösterilmiştir (Battista ve Condon, 1986; Battista ve ark., 1987). Önceki çalışmalarda serotoninin omurgalılarda gonadotropin salgılatıcı hormon (GNRH) salınımını ve ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Li ve Pelletier, 1995; Prasad ve ark., 2015). GNRH ise daha sonra hipofiz üzerine etki ederek ederek Follikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH) salınımını stimüle eder. Bu iki hormon ise ovaryum dokusundan steroidogenez, folikülogenez ve oogenezi gibi üreme ile ilgili önemli süreçlerin düzenlenmesinden sorumludur (Bódis ve ark., 2019). Bu bilgiler ışığında, serotoninin dolaylı yönden bu süreçlere etkisi olduğu çıkarımı yapılabilir.

Ayrıca IVF tedavisi alan kadınlarda serotoninin beyin kaynaklı nörotrofik faktör ve kisseptin ile olan etkileşimleri üzerinden üreme potansiyelini ve oosit sayısını artırdığı tespit edilmiş, serotonin ve kisseptin'in IVF başarısını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Prasad ve ark., 2015). Dahası, serotoninin doza bağlı olarak, insan granuloza hücrelerinden progesteron salınımını artırıcı bir etkisi olduğu da belirlenmiştir (Bódis ve ark., 1992). Serotoninin insan granuloza hücrelerinde gonadotropinler tarafından indüklenen steroid sekresyonuna etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise insan granuloza hücre hatlarına serotonin, LH+serotonin ve FSH + serotonin uygulanmış ve bu uygulamayı takiben 17- β östradiol (E_2) ve progesteron salınımını anlamlı olarak artırdığı tespit edilmiştir. Serotoninin gonadotropinlerle kombine olarak uygulanmasının progesteron seviyelerinde ilave bir etki oluşturmadığı gözlenirken E_2 düzeylerinin daha fazla artmasına neden olduğu saptanmıştır (Koppan ve ark., 2004). Serotoninin, granuloza hücrelerindeki gonadotropinlerle indüklenen steroid

salınımı üzerine gözlenen bu etkileri, granuloza hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahip olduğuna işaret etmektedir.

Özetle serotoninin üreme işlevlerinde kritik rollere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle farklı dozlarda uygulanan ekzojen gonadotropinlerin serotonin düzeylerine etkisinin incelenmesi gerek OS, gerekse IVF başarısı yönünden optimum gonadotropin dozlarının belirlenmesine katkı sağlayabilir.

Araştırmamızda, farklı dozlarda ekzojen gonadotropin uygulamasını takiben serotonin düzeyleri yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Grup içi karşılaştırmalar sonucunda 7.5 I.U. PMSG/hCG uygulanan gruba ait serotonin düzeylerinin anlamlı olarak diğer gruplardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 5, 10, 12.5 I.U. PMSG/hCG uygulanan gruplarda ise elde edilen serotonin düzeylerinin benzer olduğu tespit gözlenmiştir. Serotonin üreme biyolojisine olan pozitif etkileri göz önünde bulundurulduğunda 7.5 I.U. dozda PMSG/hCG ile OS işleminin olumlu etkileri olabilir. Ancak serotoninin kadın üreme döngüsünde önemli fonksiyonları olan E₂ düzeylerini artırıcı etkisi göz önüne alındığında OS sürecinde bazı olumsuz etkileri olabilir. E₂, sadece üreme ve cinsiyet fonksiyonları üzerine değil kemik gibi diğer organlar üzerine de kritik etkilere sahip bir steroid hormondur. E₂ menstrüasyonda rol almasının yanı sıra ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimine katkı sağlar ve endometriyal preparasyon, blastosist implantasyonu ve endometriumun progesteron tarafından implantasyona hazırlanması için de gereklidir (Vardar ve ark., 1993; Kara ve ark., 2012; Rehman ve ark., 2012) Bununla birlikte farklı E₂ seviyelerinin ovaryumda oosit sayısı ve kalitesini etkilediği bildirilmiştir (Chenette ve ark., 1990; Gelety ve Buyalos, 1995; Kondapalli ve ark., 2012). Yüksek E₂ seviyelerinin oosit ve embriyo kalitesini düşürdüğü (Tarumi ve ark., 2014; Valbuena ve ark., 2001), endometriyuma negatif etkileri üzerinden fertilize ovumun implantasyonunu engellediği bildirilmiştir (Forman ve ark., 1988). Tarafımızdan daha önce gerçekleştirilen bir araştırmada aynı dozlarda ekzojen gonadotropin uygulanan farelerde, E₂ düzeylerinin en fazla 7.5 I.U. PMSG/hCG uygulanan grupta anlamlı oranda artış gösterdiği tespit edildi (Sari ve ark., 2020). Dolayısıyla iki çalışmadan elde ettiğimiz veriler serotonin ve E₂ düzeylerinin bu gruplarda korale bir şekilde artış gösterdiğine işaret etmektedir. Yüksek E₂ düzeylerinin üreme biyolojisine olumsuz etkileri göz önüne alındığında artan serotonin düzeylerinin etkilerinin üreme biyolojisinde rol alan diğer hormon veya faktörler de dahil edilerek gonadotropin dozu bakımından detaylı araştırmalarla açığa kavuşturulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Embriyo niteliği, oosit kalitesi, foliküler gelişim, ovulasyon, implantasyon gibi üreme sistemini yakından ilgilendiren birçok faktör oositlerin ve foliküler sıvının mikroçevresi ile yakından ilişkilidir (Reiter ve ark., 2014a). DNA, RNA, Protein gibi çeşitli makromoleküllere atak yapıp zarar verme potansiyeline sahip olan ROT' ların oositler ve foliküler sıvının mikroçevresinde artışına neden olabilecek durumların bu gibi süreçleri etkileyebileceği ileri sürülmektedir (Cooke ve ark., 2003; Williams ve Jeffrey, 2000). ROT' ların bu mikroçevrede oosit ve/veya embriyoya ait makromoleküllere de atak yaparak yapılarını etkileyebileceği, bu durumun da implantasyon ve IVF başarı oranlarını azaltabileceği iddia edilmektedir. Melatonin de antioksidan özellikleri nedeniyle ROT' ların zararlı etkilerinin azaltılmasına katkısı olan bir hormondur ve serotonin gibi ovaryumda, üreme işlevlerinde etkilidir (Agarwal ve ark., 2006; Clausell ve Soliman, 1978; Tan ve ark., 2005; Yücel ve ark., 2018). Bu nedenle oosit niteliği ve embriyo kalitesi üzerinde olumsuz etkileri olabilecek DNA ve diğer makromoleküllerde meydana gelebilecek kusurlara karşı koruyucu etkileri olabilir. Melatonin dışı üreme sistemindeki etkilerini özellikle ovulasyon süresince üretilen ROT' un neden olduğu hasar üzerinde gösterdiği bildirilmektedir (Kandemir ve ark., 2017). Nitekim yapılan bazı çalışmalarda melatoninin, oositlerin ROT' lar tarafından hasarlanma oranını ve IVF başarısını artırdığı gösterilmiştir (Espino ve ark., 2019; Reiter ve ark., 2005).

Melatoninin birçok organda sentezlenmesinin yanı sıra yapılan ölçümlerle ovaryumdaki melatonin seviyesinin dolaşımdaki melatonin seviyesinden fazla olduğu ve folikül büyüdükçe ovaryum melatonin miktarının arttığı tespit edilmiştir (Clausell ve Soliman, 1978; Yücel ve ark., 2018). Melatoninin memeli türlerinde reproduktif işlevleri hipotalamo-hipofizer-gonad aksındaki reseptör bölgelerinin aktivasyonu ile etkilediği ileri sürülmektedir (Soares ve ark., 2003). Endojen melatonin düzeylerinin pinealektomi ile azaltılmasının korpus luteum ve granuloza hücrelerinde mitotik aktivite artışıyla beraber ovaryum morfolojisinde hiperplazi ve/veya hipertrofi ile sonuçlanan değişime neden olduğu gösterilmiştir (Lewiński ve ark., 1993). Ayrıca, Schwartz ve ark. tarafından melatonin düzeylerinin sabit ışık maruziyetiyle azalmasını takiben ovaryum ağırlığı ve büyüklüğünde anlamlı bir artış saptanmıştır (Schwartz ve McCobmack, 1972).

Melatoninin ovaryum gelişimi, morfolojisi ve reproduktif sisteme olan etkileri nedeni ile çalışmamızda farklı dozlarda ekzojen gonadotropin uygulanan gruplarda plazma serotonin düzeyinin yanı sıra melatonin düzeyi de belirlendi. Fakat elde edilen bulgular sonucunda çalışma grupları arasında melatonin düzeyleri yönünden anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Buna göre farklı dozlarda uyguladığımız (5, 7.5, 10, 12.5 I.U. PMSG/hCG) ekzojen gonadotropinlerin, melatonin düzeylerine etkisinin benzer oranda olduğu anlaşılmaktadır. Triptofandan sentezlenen serotonin, melatonin biyosentezi sırasında başlıca ürün olduğundan 7.5 I.U. PMSG/hCG uygulanan grupta serotonin düzeyi anlamlı olarak artmasına rağmen melatonin düzeylerinin buna eşlik etmemesi ilk bakışta şaşırtıcı bir sonuçmuş gibi görünmektedir. Fakat melatonin en çok gece karanlıkta, başlıca pineal bezden salınan ve omurgalı fizyolojisinde günlük ritmi korunmuş özelliğe sahip bir hormondur. Melatonin ve serotonin biyosentezinde öncelikle triptofan hücrelerden triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksile edilir ve daha sonra L-aromatik amino asit dekarboksilazla dekarboksile edilerek serotonin sentezlenir. Serotonin kan-beyin bariyerini geçemediğinden N-asetil transferaz enzimi aracılığı ile asetillenerek N-asetilserotonine dönüştürülür. N-asetil serotonin pineal bez içine alınabilir ve son olarak O-metiltransferazla O-metilasyona uğratarak melatonine dönüştürülür (Lv ve ark., 2020). Pineal bezde serotonin seviyeleri gündüz gecedan daha yüksektir, buna karşılık pineal bezde N-asetilserotonin ve melatonin düzeyleri gündüz düşük ve gece yüksektir (Ganguly ve ark., 2002). Sonuç olarak pineal bez tarafından kullanılan serotonin (N-asetilserotonin) günlük serotoninin yalnızca bir kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca melatonin düzeyini belirleyen sadece serotonin düzeyleri değil aynı zamanda sentez yolundaki enzimlerin aktivite ve/veya ekspresyon oranları da bunda etkili olabilir. Çalışmamızda uygulanan 7.5 I.U PMSG/hCG' nin de etkisi bu aşamalarda farklılık gösteriyor olabilir. Tüm bunlara ek olarak çalışmamızda deney düzeneğimizi oluştururken tüm deney gruplarından gündüz aynı saate denk gelecek şekilde kan örnekleri alınmıştır. Gece ve gündüz boyunca kan ve beyin omurilik sıvısında melatonin seviyelerinin bir ritmik düzende seyretmesi nedeni ile uyguladığımız ekzojen gonadotropinler melatonin seviyesine etkisini tam anlamıyla yansıtmayabilir. Bu deney hayvanlarından melatonin seviyelerinin pik yaptığı saatlerde kan örneği alınması ile daha farklı sonuçlar elde edilebilir. Dolayısıyla bu düşüncelerin netlik kazanması için biyosentezin tüm enzimlerini ve günlük ritmi de dikkate alacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada farklı dozlarda uygulanan ekzojen gonadotropinlerin OS sürecinde melatonin ve serotonin düzeylerine etkisi ilk kez incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda uyguladığımız ekzojen gonadotropin dozlarının melatonin düzeylerini anlamlı olarak değiştirmedeği belirlenirken, serotonin seviyelerinin 7.5 I.U. PMSG/hCG uygulanan grupta anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmada uygulanan PMSG/hCG dozları, literatürde reproduktif hayvan deneyi araştırmalarında sıklıkla 5-10 I.U. aralığında kullanılması nedeniyle 5, 7.5, 10 ve yüksek doz olarak da

12.5 I.U. olacak şekilde kurgulanmıştır. IVF merkezlerinde zaman zaman daha fazla oosit elde edilmesi amacıyla bazı kadınlar farklı ve yüksek dozlarda gonadotropin uygulamalarına maruz kalmaktadır. Çalışmamızda uygulanan değerlerin dışında daha yüksek gonadotropin dozlarının bu hormonların düzeylerine etkilerinin incelenmesi ekzojen gonadotropinlerin serotonin ve melatonin salınımına etkisinin anlaşılmasında ilave bilgiler sağlayabilir. Her iki hormonun da üreme biyolojisinde gerek oositler gerekse ovaryum dokusu ve embriyo üzerine dikkate değer etkileri olması nedeni ile farklı dozlarda ekzojen gonadotropin uygulamalarının bu hormonlara etkilerini inceleyecek detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Agarwal A, Gupta S, Sikka S, 2006. The Role of Free Radicals and Antioxidants in Reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(3):325-332.
- Amireault P, Dubé F, 2005. Serotonin and Its Antidepressant-Sensitive Transport in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and Early Embryos. *Biology of reproduction*, 73(2):358-365.
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon N, Galjaard RH, Fauser B *et al.*, 2006. Preimplantation Genetic Screening Reveals a High Incidence of Aneuploidy and Mosaicism in Embryos from Young Women Undergoing Ivf. *Human Reproduction*, 21(1):223-233.
- Battista P, Condon W, 1986. Serotonin-Induced Stimulation of Progesterone Production by Cow Luteal Cells in Vitro. *Reproduction*, 76(1):231-238.
- Battista P, Rexroad Jr C, Condon W, 1987. Mechanisms Involved in the Action of Serotonin-Induced Stimulation of Progesterone Production by Bovine Luteal Cells in Vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 51(1-2):145-151.
- Boden MJ, Varcoe TJ, Kennaway DJ, 2013. Circadian Regulation of Reproduction: From Gamete to Offspring. *Progress in biophysics and molecular biology*, 113(3):387-397.
- Bodis J, Bognár B, Hartmann G, Török A, Csaba I, 1992. Measurement of Noradrenaline, Dopamine and Serotonin Contents in Follicular Fluid of Human Graafian Follicles after Superovulation Treatment. *Gynecologic and obstetric investigation*, 33(3):165-167.
- Bodis J, Hartmann G, Tinneberg H-R, Török A, Hanf V, Papenfuss F *et al.*, 1993. Relationship between the Monoamine, Progesterone and Estradiol Content in Follicular Fluid of Preovulatory Graafian Follicles after Superovulation Treatment. *Gynecologic and obstetric investigation*, 35(4):232-235.
- Bódis J, Török A, Tinneberg H-R, Hanf V, Hamori M, Cledon P, 1992. Influence of Serotonin on Progesterone and Estradiol Secretion of Cultured Human Granulosa Cells. *Fertility and sterility*, 57(5):1008-1011.
- Bódis J, Sulyok E, Kőszegi T, Prémusz V, Várnagy Á, Koppán M, 2019. Serum and Follicular Fluid Levels of Serotonin, Kisspeptin, and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients Undergoing in Vitro Fertilization: An Observational Study: Neurohormones in Patients Receiving Ivf. *Journal of International Medical Research*:0300060519879330.
- Ceinos R, Chansard M, Revel F, Calgari C, Miguez J, Simonneaux V, 2004. Analysis of Adrenergic Regulation of Melatonin Synthesis in Siberian Hamster Pineal Emphasizes the Role of Hiomt. *NeuroTsignals*, 13(6):308-317.
- Chenette PE, Sauer MV, Paulson RJ, 1990. Very high serum estradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 54(5):858-863.
- Clausell D, Soliman K, 1978. Ovarian Serotonin Content in Relation to Ovulation. *Experientia*, 34(3):410-411.

- Combelles Catherine MH, ve Albertini DF, 2003. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse." *Biology of Reproduction*, 68(3):812-21.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, 2003. Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease. *The FASEB Journal*, 17(10):1195-1214.
- Ertzeid G, Storeng R, 2001. The Impact of Ovarian Stimulation on Implantation and Fetal Development in Mice. *Human Reproduction*, 16(2):221-225.
- Espino J, Macedo M, Lozano G, Ortiz Á, Rodríguez C, Rodríguez AB *et al.*, 2019. Impact of Melatonin Supplementation in Women with Unexplained Infertility Undergoing Fertility Treatment. *Antioxidants*, 8(9):338.
- Forman R, Belaisch-Allart J, Fries N, Hazout A, Testart J, Frydman R, 1988. Evidence for an Adverse Effect of Elevated Serum Estradiol Concentrations on Embryo Implantation. *Fertility and sterility*, 49(1):118-122.
- Ganguly S, Coon SL, Klein DC, 2002. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell and tissue research*, 309(1):127-137.
- Gelety TJ, Buyalos RP, 1995. The influence of supraphysiologic estradiol levels on human nidation. *J Assist Reprod Genet.* 12(7):406–412.
- Goldman B 2007. Reproductive Medicine: The First Cut: Nature Publishing Group.
- Graveleau C, Paust H-J, Schmidt-Grimminger D, Mukhopadhyay AK, 2000. Presence of a 5-Ht7 Receptor Positively Coupled to Adenylate Cyclase Activation in Human Granulosa-Lutein Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(3):1277-1286.
- Group IW 1998. Art into Science: Regulation of Fertility Techniques: Islat Working Group: American Association for the Advancement of Science.
- Iwamatsu T, Toya Y, Sakai N, Terada Y, Nagata R, Nagahama Y, 1993. Effect of 5-Hydroxytryptamine on Steroidogenesis and Oocyte Maturation in Pre-Ovulatory Follicles of the Medaka *Oryzias Latipes*: (Medaka/Steroidogenesis/5-Hydroxytryptamine/Foillicle/Oocyte Maturation). *Development, growth & differentiation*, 35(6):625-630.
- Kandemir YB, Aydin C, Gorgisen G, 2017. The Effects of Melatonin on Oxidative Stress and Prevention of Primordial Follicle Loss Via Activation of Mtor Pathway in the Rat Ovary. *Cell Mol Biol(Noisy le Grand)*, 63(100-106).
- Kara M, Kutlu T, Soguglu K, Devranoglu B, Cetinkaya T. 2012. Association between serum estradiol level on the hCG administration day and IVF-ICSI outcome. *Iran J Reprod Med*, 10(1):53–58.
- Kierszenbaum AL, 2006. Histoloji Ve Hücre Biyolojisi. *Ankara, Palme Yayıncılık*.
- Koçak A, Çolak A, 1996. Melatonin Ve Santral Sinir Sistemi. *J Turgut Özal Medical Center*, 3(237-244).
- Kondapalli LA, Molinaro TA, Sammel DA, 2012. A decrease in serum estradiol levels after human chorionic gonadotrophin administration predicts significantly lower clinical pregnancy and live birth rates in vitro fertilization cycles. *Hum Reprod*, 27(9):2690–2697.
- Koppan M, Bodis J, Verzar Z, Tinneberg H-R, Torok A, 2004. Serotonin May Alter the Pattern of Gonadotropin-Induced Progesterone Release of Human Granulosa Cells in Superfusion System. *Endocrine*, 24(2):155-159.
- Lewiński A, Szymczykiewicz P, Sewerynek E, Wajs E, 1993. Effects of Pinealectomy and Melatonin Administration on Certain Indices of Ovarian Hyperplasia and/or Hypertrophy in Rats with Both Ovaries Intact or after Unilateral Ovariectomy. *Joal of pineal research*, 14(3):117-127.
- Li S, Pelletier G, 1995. Involvement of Serotonin in the Regulation of GnRh Gene Expression in the Male Rat Brain. *Neuropeptides*, 29(1):21-25.

- Lv Y, Li Y, Li J, Bian C, Qin C, Shi Q, 2020. A comparative genomics study on the molecular evolution of serotonin/melatonin biosynthesizing enzymes in vertebrates. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7.
- Nikitina L, Buznikov G, Galanov AY, Malchenko LA, Trubnikova OB, 2002. The Control of Oocyte Maturation in the Starfish and Amphibians by Serotonin and Its Antagonists. *International Journal of Developmental Biology*, 37(2):363-364.
- Ozturk S, Yaba-Ucar A, Sozen B, Mutlu D, Demir N, 2016. Superovulation alters embryonic poly(A)-binding protein (Epab) and poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1 (Pabpc1) gene expression in mouse oocytes and early embryos. *ReprodFertil Dev*, 28(3):375-383.
- Prasad P, Ogawa S, Parhar I (2015). Role of Serotonin in Fish Reproduction. *Front. NeuROTci*. 9, 1e9.
- Rehman R, Hussain Z, Faraz N, 2012. Effect of estradiol levels on pregnancy outcome in obese females. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 24(3):3-5.
- Reiter RJ, 1993. The Melatonin Rhythm: Both a Clock and a Calendar. *Experientia*, 49(8):654-664.
- Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD, 2005. Melatonin as an Antioxidant: Physiology Versus Pharmacology. *Journal of pineal research*, 39(2):215-216.
- Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu X-Y, 2014a. Melatonin and the Circadian System: Contributions to Successful Female Reproduction. *Fertility and sterility*, 102(2):321-328.
- Reiter RJ, Tan D-X, Tamura H, Cruz MHC, Fuentes-Broto L, 2014b. Clinical Relevance of Melatonin in Ovarian and Placental Physiology: A Review. *Gynecological Endocrinology*, 30(2):83-89.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, ROTales-Corral SA, 2014c. Melatonin and Stable Circadian Rhythms Optimize Maternal, Placental and Fetal Physiology. *Human reproduction update*, 20(2):293-307.
- Salt A, Çenesiz M, Çenesiz S, 2017. Melatonin, Etkileri Ve Kullanım Alanları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1):7-12.
- Sari I, Gumus E, Taskiran AS, Sokmensuer LK, 2020. Effect of ovarian stimulation on the expression of piRNA pathway proteins. *PloS one*, Doi: 10.1371/journal.pone.0232629.
- Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T, 2007. Aberrant DNA Methylation of Imprinted Loci in Superovulated Oocytes. *Human reproduction*, 22(1):26-35.
- Schwartz NB, McCobmack C, 1972. Reproduction: Gonadal Function and Its Regulation. *Annual review of physiology*, 34(1):425-472.
- Sharker MR, Sukhan ZP, Kim SC, Lee WK, Kho KH, 2020. Identification, Characterization, and Expression Analysis of a Serotonin Receptor Involved in the Reproductive Process of the Pacific Abalone, *Haliotis Discus Hannai*. *Molecular biology reports*, 47(1):555-567.
- Sheng Y, Wang L, Liu XS, Montplaisir V, Tiberi M, Baltz JM *et al.*, 2005. A Serotonin Receptor Antagonist Induces Oocyte Maturation in Both Frogs and Mice: Evidence That the Same G Protein-Coupled Receptor Is Responsible for Maintaining Meiosis Arrest in Both Species. *Journal of cellular physiology*, 202(3):777-786.
- Soares JM, Masana MI, Erşahin Ç, Dubocovich ML, 2003. Functional Melatonin Receptors in Rat Ovaries at Various Stages of the Estrous Cycle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2):694-702.
- Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Lee L, Tamura I *et al.*, 2014. Melatonin and Female Reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(1):1-11.
- Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Hardeland R *et al.*, 2005. Interactions between Melatonin and Nicotinamide Nucleotide: NADH Preservation in Cells and in Cell-Free Systems by Melatonin. *Journal of pineal research*, 39(2):185-194.

- Tanaka E, Baba N, Toshida K, Suzuki K, 1993. Serotonin Stimulates Steroidogenesis in Rat Preovulatory Follicles: Involvement of 5-Ht₂ Receptor. *Life sciences*, 53(7):563-570.
- Tarumi W, Itoh MT, Suzuki N, 2014. Effects of 5 α -Dihydrotestosterone and 17 β -Estradiol on the Mouse Ovarian Follicle Development and Oocyte Maturation. *PloS one*, 9(6).
- Terranova P, Uilenbroek JTJ, Saville L, Horst D, Nakamura Y, 1990. Serotonin Enhances Oestradiol Production by Hamster Preovulatory Follicles in Vitro: Effects of Experimentally Induced Atresia. *Journal of endocrinology*, 125(3):433-438.
- Uysal F, Ozturk S, Akkoyunlu G, 2018. Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *J Assist Reprod Genet*, 35(3):503–513.
- Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C, 2001. Increasing Levels of Estradiol Are Deleterious to Embryonic Implantation Because They Directly Affect the Embryo. *Fertility and sterility*, 76(5):962-968.
- Van der Auwera I, D'Hooghe T, 2001. Superovulation of Female Mice Delays Embryonic and Fetal Development. *Human Reproduction*, 16(6):1237-1243.
- Vardar MA, Çetin T, Burgut R, Demır C, 1993. Klomifen sitrat veya HMG/HCG ile indüklenen siklularda luteal fazın değerlendirilmesi: Kısa luteal faz, luteal faz yetmezliği. *Kadın Doğum Dergisi*, 9(2): 127-131
- Vaseghi H, Mogheiseh A, Sepehrimanesh M, Kafi M, Nooranizadeh MH. Super pregnancy in a BALB/c mouse superovulated with PMSG. *Lab Anim Res.* 2017;33(3):280–282. doi:10.5625/lar.2017.33.3.280
- Williams GM, Jeffrey AM, 2000. Oxidative DNA Damage: Endogenous and Chemically Induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(3):283-292.
- Yücel GN, Kaplanođlu GT, Seymen CM, 2018. Karanlığın Mucizesi: Melatonin Ve Ovaryum Etkileşimi. *Dicle Tıp Dergisi*, 45(1):85-92.