

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREPUBERTAL DÖNEMDE DIŞI SIÇANLARDA
MELATONİN/KİSSPEPTİN ETKİLEŞİMİNİN PUBERTA
YAŞINA VE OVULASYONDA GÖREVLİ HORMONLAR
ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Nihal TAŞKIRAN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŐMAN
Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL**

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 12.SAĞ.BİL.04 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2014-001

2014- AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

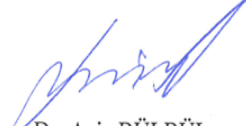
Tez Savunma Tarihi: 10/02/2014



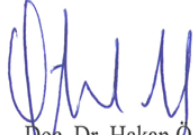
Prof. Dr. Recep ASLAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Oktay YILMAZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Nihal TAŞKIRAN'ın
“Prepubertal Dönemde Dişi Sıçanlarda Melatonin/Kisspeptin Etkileşiminin Puberta
Yaşına ve Ovulasyonda Görevli Hormonlar Üzerine Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı
tezi ..17.02.2014.. günü saat ..16:00..’da Lisansüstü Eğitim-Öğretim
Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kağan ÜÇOK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks, üreme yeteneğinin kazanılması ve sürdürülmesine aracılık eden, diğer sistemlerle kompleks ilişkileri olan merkezi bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır. Puberta sırasında bu sistemin nasıl aktive olduğu uzun yıllar gizemini korumuş, anlaşılamayan yönleri ile ilgi ve merak uyandırarak popüler bir araştırma alanı olma özelliğini hala yitirmemiştir. Melatonin ve kisspeptin; hipotalamus, hipofiz ve gonadal aks üzerinde farklı düzenleyici etkilere sahip hormonlardır. Çalışmamızda bu iki molekülün birbiri ile etkileşiminin, dişi sıçanlarda pubertaya erişmedeki fonksiyonu ile reproduktif sistem üzerindeki olası etki mekanizmaları endokrinolojik analizlerle ortaya konularak reproduktif fizyolojiye ışık tutmak ve bu alandaki araştırmacılara katkı sağlayabilmek hedeflenmiştir.

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 12.SAĞ.BİL.04 proje numarası ile desteklenmiş olup Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından 19-11 referans no ile onaylanmıştır.

Bu çalışmanın yürütülmesinde ve doktora eğitimim boyunca büyük emeği geçen danışmanım Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji ABD öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL'e, bilgi ve deneyimlerimi ile bana ışık tutan Doğum ve Jinekoloji ABD öğretim üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Oktay YILMAZ'a, eğitimime önemli katkıları bulunan Fizyoloji Anabilimdalı başkanı öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ'a, değerli görüş ve desteklerini esirgemeyerek yolumu daima aydınlatan Fizyoloji Anabilimdalı öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Recep ASLAN'a, ve her türlü desteği esirgemeyen Fizyoloji ABD Arş. Gör. Elmas ULUTAŞ ile emeği geçen diğer tüm çalışma arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Nihal TAŞKIRAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER ve RESİMLER	ix
ÇİZELGELER ve GRAFİKLER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Dişi Sıçanlarda Üreme Fizyolojisi	2
1.1.1. Fetal dönemde seksüel gelişim	2
1.1.2. Prepubertal dönemde seksüel gelişim	3
1.1.3. Dişi sıçanlarda kızgınlık döngüsü	5
1.2. Pineal Bez	7
1.2.1. Melatonin	9
1.2.1.1. Melatonin biyosentezi	10
1.2.1.2. Melatoninin etki mekanizması	12
1.2.1.3. Melatonin salınımı	12
1.2.1.4. Melatonin metabolitleri	15
1.2.1.5. Melatonin reseptörleri	16
1.2.2. Melatonin ve üreme	17
1.2.2.1. Melatoninin pubertaya etkisi	18
1.2.2.2. Melatoninin menstrual siklusa etkisi	19
1.2.2.3. Melatonin ve infertilite	20
1.3. Kisspeptinler ve Kisspeptin Reseptörü (GPR54)	20
1.3.1. Kisspeptinlerin kimyasal yapısı, etki mekanizması ve türleri	22
1.3.2. Kisspeptin analogları	24
1.3.3. Kiss1 nöronlarının moleküler fizyolojisi	25
1.3.4. Kisspeptinin GnRH nöronları üzerine doğrudan ve dolaylı etkileri	25
1.3.5. Kiss1 ve GPR54'ün hormonal regülasyonu	26
1.3.6. Kisspeptin ve puberta	29
1.4. Kisspeptin ve Melatonin	30

2.GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Gereç	32
2.2. Yöntem	32
2.2.1. Hayvanların gruplandırılması	32
2.2.1.1. Pinealektomi prosedürü	34
2.2.1.2. Sham pinealektomi prosedürü	36
2.2.1.3. Vajinal yıkama yöntemi ile östrus siklusunun tespit edilmesi	37
2.2.1.4. Melatonin, GnRH, FSH, LH ve progesteron hormonlarının ölçümü	37
2.3. İstatistiksel Değerlendirme	38
3. BULGULAR	39
4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
ÖZET	61
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

5HT : 5-hidroksitritamin (Serotonin)

5HTP : 5-hidroksitriptofan

AANAT : Aril-alkilamin-N-asetil transferaz

AR : Androjen reseptörü

ARC : Arkuat nükleus

Arg-Phe : Arginin-fenilalanin

AVPV : Anteroventral paraventriküler nükleus

AXOR12/hOT7T175 : İnsanda kisspeptin reseptörü

Ca⁺²: Kalsiyum

cAMP : Siklik adenzin monofosfat

cGMP : Siklik guanozin monofosfat

DAG : Diaçilgliserol

DNA: Deoksiribonükleik asit

E : Östrojen

ERK : Ekstra sinyal regüle edilmiş kinaz

ER_α: Östrojen reseptör α

ER_αKO : Östrojen reseptör α bloke edilmiş

ER_β : Östrojen reseptör β

ER_βKO : Östrojen reseptör β bloke edilmiş

FSH : Folikül uyarıcı hormon

GABA : Gamma amino bütirik asit

GnRH : Gonadotropin salgılayıcı hormon

GPCRs : G protein reseptörü

GPR54 : G protein 54

Gαq : G protein q reseptörlerine bağlı aktive edilmiş guanin nükleotidi

HIOMT : Hidroksiindol O-metil transferaz

HPG : Hipotalamo-hipofizer-gonadal

IHH : İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizm

IP3 : İnositol trifosfat

IV : Damar içi

İP : Periton içi

K_{ir} : Potasyum kanalları

LH : Luteinleştirici hormon

LHRH : Luteinleştirici hormon salgılatıcı hormon

ME : Median eminens

MT1(Mel1a) : Melatonin reseptörü 1

MT2(Mel1b) : Melatonin reseptörü 2

NAT : N-asetiltransferaz

NKB : Nörokinin B

PIP 2 : Fosfotidil 4,5-bifosfat

PKC : Protein kinaz C

PLC : Fosfolipaz C

POA : Preoptik alan

PR : Progesteron reseptör

PT : Persussis toksin

RFRPs : RMFR amide bağlı peptidler

RMRFamid : Phe-Met-Arg-Phe-NH₂

SF : Serum fizyolojik

SK : Deri altı

SNC : Suprakiazmatik nükleus

T : Testosteron

TRH : Tirotropin salgılatıcı hormon

TRPC : Transient receptor potential canonical

ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekil 1.1. Dişi sıçanlarda ürogenital sistem anatomisi	2
Şekil 1.2. Üreme siklusunda dişi sıçanlarda evrelere göre gonadotropin seviyeleri	6
Şekil 1.3. Pineal bezin anatomik konumu	8
Şekil 1.4. Melatoninin kimyasal yapısı	10
Şekil 1.5. Melatonin sentez basamakları	11
Şekil 1.6. Farklı canlılarda uzun ve kısa gün şartlarında pineal bezde melatonin üretimi	13
Şekil 1.7. Sirkadiyen serum melatonin düzeyi	14
Şekil 1.8. Kisspeptinlerin yapısı	23
Şekil 1.9. Kisspeptinlerin Kiss1r'e bağlanmasında nöronal depolarizasyonun mekanizması	23
Şekil 1.10. Farenin ön beyni içinde Kiss1 sinyal iletimi	29
Şekil 2.1. Sıçanlarda östrus siklusunun farklı dönemlerine göre vajinal yıkantıda gözlenen hücre tipleri	38
Resim 2.1. Sıçanlarda pineal bezin çıkarılması	34-36
Resim 2.2. Sıçanlarda tutuş ve vajinal yıkama	37

Çizelge 1.1. Üreme siklusu boyunca sıçanlarda gözlenen vajinal smear hücre tipleri	5
Çizelge 2.1. Deney gruplarında sıçanlara yapılan hormonal uygulamalar	33
Çizelge 3.1. Gruplarda prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal evre serum melatonin düzeyleri (pg/ml)	46
Çizelge 3.2. Gruplarda vajinal açıklık yaşı (gün), siklus başlangıç yaşı (gün) ile başlangıç ve kesim canlı ağırlığı (gram)	46
Çizelge 3.3. Gruplarda prepubertal 33. gün serum GnRH, FSH, LH düzeyleri	47

ÇİZELGE ve GRAFİKLER

(ng/ml)	
Çizelge 3.4. Gruplarda foliküler dönem serum GnRH, FSH, LH düzeyleri (ng/ml)	47
Çizelge 3.5. Gruplarda luteal dönem serum GnRH, FSH, LH düzeyleri (ng/ml)	48
Grafik 3.1. Prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönem serum melatonin düzeyleri (pg/ml)	40
Grafik 3.2. Gruplarda ortalama vajinal açıklık yaşı (gün)	41
Grafik 3.3. Gruplarda prepubertal 33. gün serum GnRH düzeyleri (ng/ml)	42
Grafik 3.4. Gruplarda prepubertal 33. gün serum FSH düzeyleri (ng/ml)	43
Grafik 3.5. Gruplarda foliküler dönem serum GnRH düzeyleri (ng/ml)	44
Grafik 3.6. Gruplarda foliküler dönem serum LH düzeyleri (ng/ml)	45

1. GİRİŞ

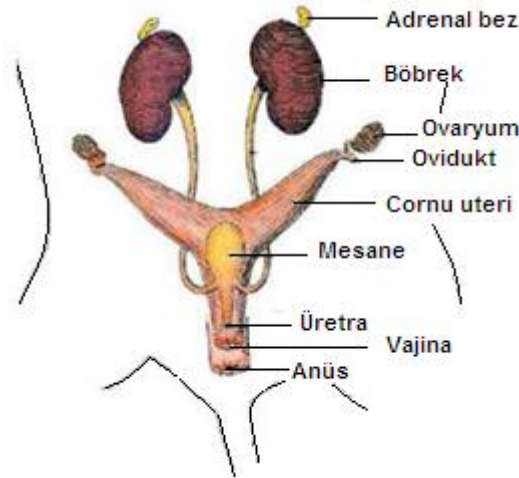
Memelilerde üreme yeteneğinin kazanılması ve sürdürülmesine aracılık eden ve merkezi bir sistem olarak kabul gören hipotalamo-hipofizer-gonadal (HPG) aks; hipotalamus, hipofiz ve gonadlardan oluşan üç temel bölümün nörohormonal düzeyde entegrasyonu ile düzenlenmektedir (Kafa ve Eyigör 2011). Memelilerde HPG aksın temel fizyolojik fonksiyonu; reproduktif faaliyetlerin oluşumu ve devamı için gerekli hormonların salgılanması, erkeklerde testis ve eklenti bezlerinin gelişimi ile sperm üretimi, dişilerde ovumun oluşumu, gebeliğin şekillenmesi ile devamını sağlamaktır. Bu üçlü aksın hipotalamus kısmını, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH); hipofiz kısmını, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH); gonad kısmını ise erkeklerde testosteron, dişilerde östrojen ve progesteron oluşturmaktadır. Hipotalamustan salınan GnRH, hipotalamo-hipofizer portal dolaşımında yüksek yoğunluğa ulaştığında ön hipofizdeki reseptörler aracılığı ile gonadotrop hücreleri uyarmakta ve bu hücrelerden FSH ve LH salgılanmaktadır. Dişilerde FSH, ovaryumda folikül gelişimini ve östrojen hormonunun salınımını uyarırken; LH, folikül olgunlaşması ve ovulasyonu gerçekleştirmektedir (Yılmaz 1999; Kafa ve Eyigör 2011; Öktem ve Urman 2012). Reiter'in (1991) yaptığı çalışmaya göre; HPG aks içerisinde pineal bez de yer almaktadır. Pineal bez, poliöstrik memelilerde reproduksiyonun kontrolünde önemli rollere sahiptir. Seksüel gelişimin zamanlaması, gonadal steroidogenezis ve ovulasyonda pineal bezden salınan melatonin hormonu işlev görmektedir. Melatonin, nöroendokrin-reproduktif aks üzerinde değiştirici etkilere sahiptir. Ovulasyon esnasında LH artışı ile birlikte plazma melatonin düzeyinde azalma meydana gelmesi ve pubertal gelişim süreci içinde gece melatonin salgılanmasının giderek azalması, pineal bezin melatonin hormonu aracılığıyla reproduktif sistemde, mevsimsel olmayan poliöstrik hayvanlar (Okatani ve ark., 1997), rodentler (Arendt, 1998) ve insanlar (Roy ve ark., 2001) üzerinde inhibitör etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu inhibitör etki hipotalamustan GnRH salınımının baskılanması ve devamında FSH ile LH sekresyonunun azalması şeklinde kendini göstermektedir (Uyar ve Alan, 2008). Buna karşın, melatonin hormonunun; son zamanlarda keşfedilen, erkek ve dişilerde pubertanın başlamasında, puberta sonrası ise reproduktif hormonların salınmasında

anahtar rolü belirlenen ve GnRH devamında FSH ve LH salınımını artırarak HPG aks üzerinde stimulatör etkisi olduğu ileri sürülen kisspeptin hormonu üzerine etkisi bilinmemektedir (Keleştimur ve ark., 2009).

Bu araştırmanın amacı, prepubertal dönemde pinealektomili dişi sıçanlarda melatonin/kisspeptin etkileşiminin puberta yaşı ile ovulasyonda görevli hormonlar üzerine etkisini incelemektir.

1.1. Dişi Sıçanlarda Üreme Fizyolojisi

Sıçanlar, postpartum dönem de dahil olmak üzere puberta başlangıcından yaşlılığa kadar yıl boyu siklik aktivite gösteren ve üreme özellikleri mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlardır (Soylu, 2011). Yetişkin dişi sıçanların böbreklerinin kranial kutbunda yer alan ovaryum, foliküllerle dolu bir yapıdadır. Helezonik yapıdaki ovidukt ise ovaryumu bikornual yapıdaki uterusu bağlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dişi sıçanlarda ürogenital sistem anatomisi (Mülazımoğlu ve ark., 2012)

Sıçanlarda cinsel gelişim evreleri; fetal dönem, prepubertal dönem ve erişkin dönem olmak üzere üç temel aşamada ele alınmaktadır (Maeda ve ark., 2000).

1.1.1. Fetal dönemde seksüel gelişim

Sıçanlarda seksüel gelişim; ilk olarak fetal dönemin 12. gününde, hipotalamustan

luteinleştirici hormon salgılatıcı hormonun (LHRH) salgılanmasıyla başlamaktadır (Aubert ve ark., 1985). Hipotalamustan LHRH salınımı, pulsatil karakterde olup doğuma kadar özellikle gestasyonel 17-18. günlerden sonra artarak devam eder (Nemeskéri ve ark., 1983; Aubert ve ark., 1985). LHRH'nın ilk salınma zamanı sıçanlarda gonadotropinler ve reproduktif kapasite üzerinde önemli değiştirici etkilere sahiptir (Szabo ve Csanyi, 1982). Hipofizden LH salınımı fetal yaşamın 17. gününden itibaren, FSH salınımı ise 19-21. günler arasında başlamaktadır (Salisbury ve ark., 1982; Nemeskéri ve ark., 1983; Aubert ve ark., 1985).

Fetal yaşamda overler steroidogenik yapıda değildir. Bu nedenle, hormon salgılama yeteneği kazanmamıştır (Parker ve Schimmer, 2006). Oositler ise maternal dolaşımdaki yüksek seviye progesteron tarafından korunmaktadır (Morrison ve Marcinkiewicz, 2002).

1.1.2. Prepubertal dönemde seksüel gelişim

Dişilerde prepubertal dönem; dolaşımdaki gonadotropin seviyeleri, steroid geri bildirim mekanizmasındaki değişiklikler, morfolojik yapı gibi fizyolojik parametreler esas alınarak dört gruba ayrılmıştır. Buna göre; doğumdan sonraki ilk yedi güne kadar neonatal dönem, postnatal 8-21. gün arası infantil dönem olmak üzere iki aşamada incelenirken, juvenil dönem 22-36. günler arası ve peripubertal dönem ise ilk ovulasyon günü esas alınarak 38-42. günler arasında kabul edilmektedir (Ramirez 1973).

Doğumdan hemen sonra yavru sıçanda prepubertal maturasyon süresince hipotalamik LHRH salınımı ve GnRH ekspresyonu artmaktadır (Matagne ve ark., 2004). Postnatal 6. gün itibariyle pulsatil GnRH salınımları ile birlikte LH konsantrasyonu da yavaş artışlarla yükselmekte, en yüksek seviyeye juvenil dönemde erişmektedir (Advis ve Ojeda, 1978). Plazma FSH seviyeleri ise doğumdan kısa bir süre sonra artmaya başlayarak maksimum seviyesine postnatal 12. günde ulaşmaktadır. Bu süreçten sonra juvenil dönemin sonuna kadar LHRH salınım sıklığındaki artış ile paralel olarak plazma FSH seviyesinde kademeli bir düşüş

gözlenmektedir (Dalkin ve ark., 1989). İnfantil dönemdeki LH artışı FSH seviyeleri ile kıyaslandığında oldukça düşüktür (Ojeda ve Ramirez 1972).

Neonatal dönemde östrojen geri bildirim mekanizması aktif değildir (Ojeda ve Ramirez, 1973). Gonadotropin salınımının kontrolü androjenler aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu dönemde ovaryumlar, FSH'nin etkisi ile testosteronu östradiol 17β 'ya metabolize etmektedir. İnfantil dönemde ise FSH ve LH etkinliği ile foliküler gelişim görülmektedir (Advis ve Ojeda, 1978). Foliküler gelişim postnatal 15-19. günlerde tamamlanmaktadır (Hage ve ark., 1978). Puberta öncesi yapılan hipofizektomi, pubertal değişimleri önlemektedir (Setchell, 1982).

Pubertanın başlaması pulsatil LH salınımının aktivasyonu ile mümkündür (Smith-White ve Ojeda, 1981). Preovulatör LH artışı pubertayı başlatan en önemli faktördür (Uilenbroek ve Van der linden, 1983). Dişi sıçanlarda pubertanın indikatörü, vajinal açıklık ve ilk proöstrustur. İlk proöstrustan 8-9 gün önce LH seviyelerinde artış olduğu bildirilmektedir (Meijs-Roelofs ve ark., 1983). Vajinal açıklık, ilk preovulatör LH artışından sonra postnatal 33-42. günlerde aynı zamanda vücut ağırlığı yaklaşık 100 gram iken meydana gelmektedir (Maeda ve ark., 2000). Düzenli östrus siklusları, yaklaşık olarak vajinal açıklık başlangıcından bir hafta sonra oluşmaktadır (Ojeda ve ark., 1986).

Pubertanın başlaması, fenotipik değişiklikler ele alındığında beş farklı evrede gerçekleşmektedir. İlk evre, geç juvenil veya anöstrus evre olarak adlandırılmaktadır. Bu evre, LH salınım modundaki değişiklikler ile karakterizedir. Yaklaşık olarak postnatal 30. güne karşılık gelir. Vajina kapalı, uterus oldukça küçük boyutlarda ve ağırlığı 100 mg'dan daha azdır. İntrauterin kavitede sıvı yoktur (Urbanski ve Ojeda, 1985). Bu evreyi erken proöstrus evresi takip eder. Uterus boyutları genişlemiştir. İntrauterin kavite bir miktar sıvı ile doludur, vajina kapalıdır. Üçüncü evre, geç proöstrus evresi olarak adlandırılmaktadır. Bu evre ilk proöstrus ile karakterizedir. İntrauterin kavite tamamen sıvı ile doludur. Uterusun ağırlığı 200 mg'ın üzerindedir. Overler büyük foliküllere sahiptir, ancak vajina açık değildir. Sonraki evre östrus evresidir. İlk ovulasyonun görüldüğü güne karşılık gelir. Vajina açıktır ve vajinal sitolojide kornifiye hücreler hakimdir. Canlı bir korpus luteum mevcuttur. Prepubertal süreçten peripubertal periyoda geçişteki son evre, ilk diöstrus evresidir.

Bu evrede vajinal sitolojide lökositler baskın yer kaplamaktadır ve overler içerisinde olgun bir korpus luteum mevcuttur (Advis ve ark., 1979)

Juvenil dönemde, foliküllerden östrojen sekresyonu başlamakta ve her üç saatte bir prolaktin salınımı meydana gelmektedir. Bu salınım, ovaryumdan östradiol ve progesteron salınımını indüklemektedir (Advis ve Ojeda., 1978).

1.1.3. Dişi sıçanlarda kızgınlık döngüsü

Cinsel olgunluğa erişmiş sıçanlarda üreme siklusu dört dönemde gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrustur. Bu dört dönemi kapsayan sıçan üreme siklusu ortalama 4-5 gün sürmektedir. (Krinke 2000; Soylu 2011). Bu dört dönem boyunca vajinal sitolojide gözlenen hücre tipleri, seksüel davranışlar ve gonadotropin seviyeleri dönemlere özgü farklılıklar göstermektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Üreme siklusu boyunca sıçanlarda gözlenen vajinal smear hücre tipleri.

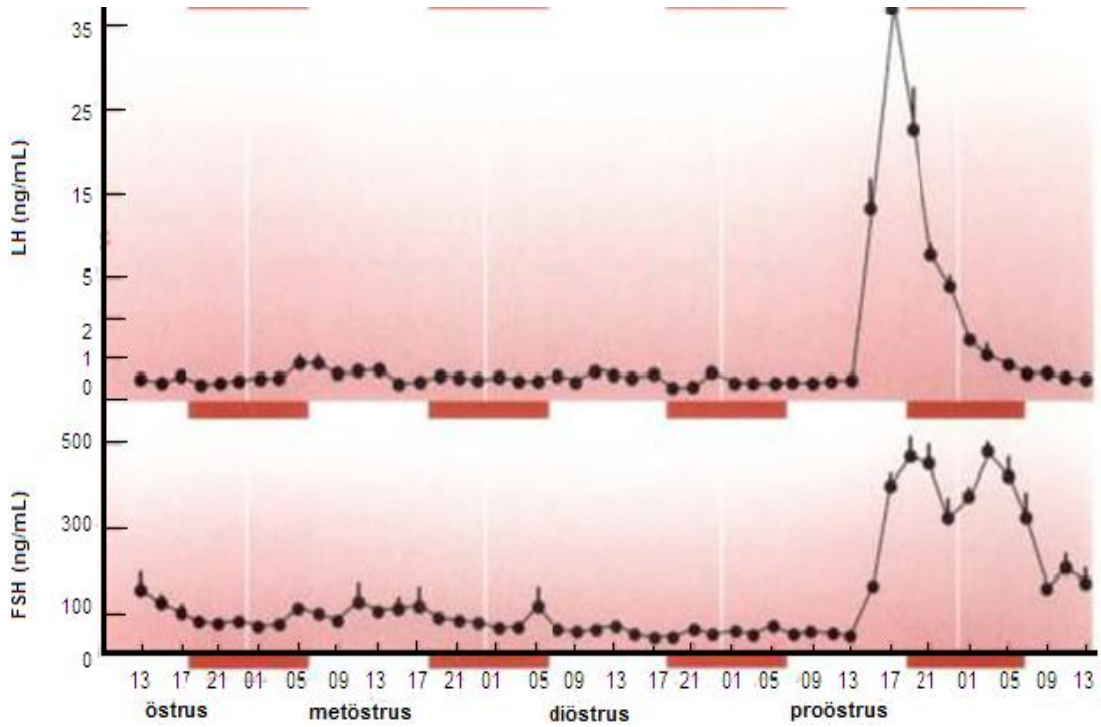
Dönem	Tipik Hücre sayıları					Güvenilirlik*
	Lökositler	Çekirdekli epitel hücreler	Kornifiye hücreler	Çekirdeksiz epitel hücreler	Toplam	
Östrus	-	-/+	+++	+/-	+++	+++
Metöstrus	-/+	-/+	-/+	+	+++	++
Diöstrus	++	+/-	+/-	+/-	+/>++	+++
Proöstrus	-	++	-/+	-	+/>++	++

(-) yok ya da çok az; (+) düşük; (++) orta; (+++) yüksek; (-/+) dönemin başlangıcında yok ya da çok az, dönemin sonunda düşük; (+/-) dönemin başlangıcında düşük, dönemin sonunda yok ya da çok az. *Vajinal smearlar ışığın saat 06:00 itibarıyla devrede olduğu 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık siklusunda 08:00 ile 10:00 saatleri arasında alınmıştır (Cooper ve Goldman, 1999).

Düzenli nükleuslu, yuvarlak, tek veya gruplar oluşturmuş epitel hücreleri ile karakterize olan proöstrus dönemi, yaklaşık olarak 12 saat sürmekte ve bu evrenin

sonunda dişi erkeği kabul etmeye başlamaktadır (Sharp ve Laregina, 1998; Soylu, 2011). Yüzlerce büyük kornifiye dejenere nükleuslu hücreler ile karakterize östrus evresi ise 9-15 saat süren, dişinin erkeği kabul etmeye devam ettiği ve lordozis gözlemlendiği dönem olarak tanımlanmaktadır. Östrus dönemi başlangıcında % 75 nükleuslu ve % 25 kornifiye epitel hücre saptanırken, dönemin ortalarına doğru bu oran, kornifiye epitel hücreler lehinde değişir. Dönemin sonlarına doğru ise bu kornifiye hücreler dejenere olarak epitelyal bir yığıntı halini almaktadır (Baker, 1979). Metöstrus dönemi; ovulasyondan sonra görülen, yaklaşık 21 saat süren ve artık dişinin erkeği kabul etmediği dönemdir. Aynı oranda lökosit, kornifiye ve çekirdekli epitel hücreler ile karakterizedir. Diöstrus dönemi, üreme siklusunda en uzun dönem olup yaklaşık 57 saat sürmektedir. İpliksi mukus ile karışık lökositler ve nükleuslu birkaç epitel hücre ile karakterizedir (Oba ve ark., 2001).

Pulsatil LH salınımında; en yüksek frekans proöstrusta, en düşük frekans ise östrus döneminde görülmektedir (Şekil 1.2). Proöstrus döneminde oluşan LH dalgaları, preovulatör foliküllerde ovulasyonun meydana gelmesine ve korpus luteumun şekillenmesine neden olmaktadır (Ackland ve ark., 1990).



Şekil 1.2. Üreme siklusunda dişi sıçanlarda evrelere göre gonadotropin seviyeleri (Krinke 2000).

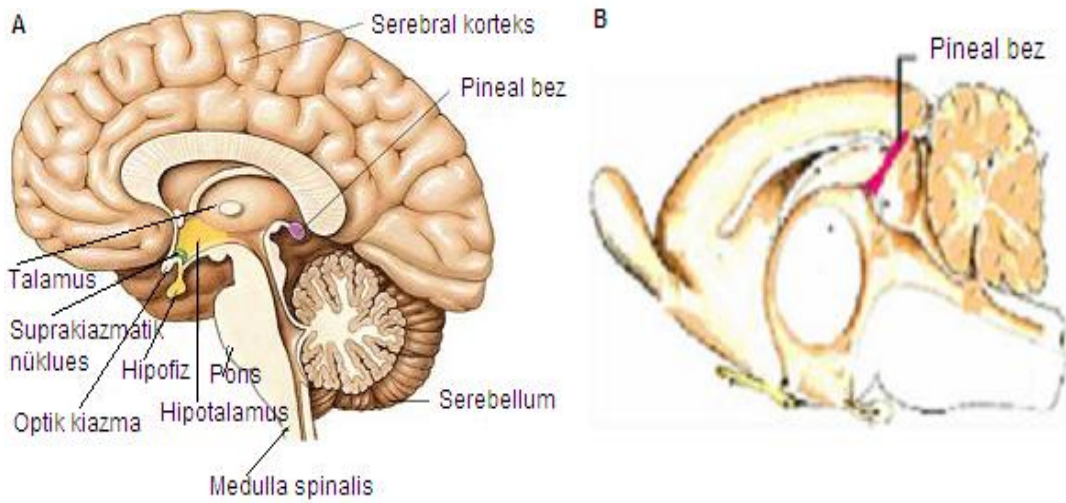
Üreme siklusu evrelerinde FSH salınımı, LH salınımı ile benzerlik göstermektedir. Farklı olarak proöstrus evrede FSH salınımında iki dalga oluşmaktadır (Şekil 1.2). Bu iki preovulatr FSH dalgasından ilki, LH salınımındaki artış, ikincisi ise inhibin hormonundaki azalış ile ilişkili olarak gerçekleşmektedir. FSH salınımındaki bu dalgalanmalar folikül gelişimini stimule etmektedir (Ackland ve ark., 1990; Fortune, 1994).

Sıçanda korpus luteum en büyük boyutuna erken diöstrus döneminde ulaşırken, korpus luteumdan salınan progesteron en yüksek değerlerine östrus siklusunun ikinci gününde erişmektedir (Kohn ve Clifford, 2002). Diöstrus döneminde progesteron seviyesi azalmakta ve artan 17β östradiol seviyesine bağılı olarak foliküler gelişim tekrar başlamaktadır. Üreme siklusu, proöstrusta meydana gelen östrojen piklerinin ovulasyonu sağılayan gonadotropin salınımını indüklemesi ile tamamlanmaktadır (Freeman, 1988).

1.2. Pineal Bez

Pineal kelimesi Latince’de çam ağacı kozalağı anlamına gelen “pinea” kelimesinden türetilmiştir (Çam ve Erdoğan, 2003). Korpus pineale, glandula pinealis, pineapple gland, epiphysis cerebri gibi adlarla da anılmaktadır (Şahin, 2006). Pineal bez, embriyolojik olarak proensefalondan gelişmiş olup fotonöroendokrin sisteminin kontrolü altındadır (Maksimovich, 2002). Anatomik ilişkileri memeli türlerinde aynıdır (Reiter, 1981). İnsanda, her iki kollikulus superiorun arasındaki çukurlukta ve orta hatta yer alan bir yapıdır. Yukarıda corpus callosumun splenium kısmında üçüncü ventrikülün Tela choroidea’sı ile ayrılır (Şekil 1.3 A). Çok ince bir sap aracılığı ile üçüncü ventrikül tavanına bağlanmıştır. Öne doğru uzanan sap kısmı üst ve alt olmak üzere iki laminaya ayrılır (Reiter, 1980). Arteriyel beslenme posterior choroidal arterler yoluyla, venöz dolaşım ise internal serebral venler ile sağlanmaktadır. Çoğunlukla süperior servikal gangliondan sempatik innervasyonu vardır (Şahin, 2009). Önemli derecede damarlaşıma göstermekte olup kan akımı yönünden günlük 4 ml/dk’lık değerle, endokrin organlar içinde, böbreklerden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Keleştimur, 1996).

Sıçan pineal bezi ise commissura posterior ile commissura habenulorum arasında, üçüncü ventrikül tavanının arka ucundan başlayan bir sapla beyinciğe doğru uzanmaktadır (Şekil 1.3 B). İnsan ve diğer memelilerde pineal bez tek kısımdan oluşurken, kemirgenlerde yüzeysel ve derin pineal bez olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Reiter, 1981). Bezin büyük bir kısmı dorso-caudal yönde yüzeysel pineal şeklindedir ve küçük bir kısmını oluşturan derin pineal ise üçüncü ventriküle yakın şekilde yerleşmiştir. Her iki kısım da pineal sap ile birleşmektedir (Garidou ve ark., 2001; Şahin, 2006).



Şekil 1.3. Pineal bezin anatomik konumu.

A. İnsanda pineal bezin anatomik konumu (Palabıyık, 2003).

B. Sıçanda pineal bezin anatomik konumu (Şahin, 2006).

Yuvarlağımsı-oval şekilli olan pineal bez, beyazımtrak ve homojendir (Reiter, 1980; Çam ve Erdoğan, 2003). Boyutu ve pozisyonu, aynı türler içinde dahi farklılık göstermektedir. Sıçan pineal bezine ait ölçümler; transvers 1300-1500 μm , dorso-ventral 750-800 μm , longitudinal (fronto-occipital) 1500-1600 μm şeklinde olup bezin ağırlığı 0,9-1,56 mg'dır (Calvo ve Boya, 1984; Şahin, 2006). Ağırlığı ve boyutlarında pubertaya kadar artış, puberta sonrasında ise azalış görülmektedir (Maksimovich, 2002; Öztürk, 2006).

Pineal bezin parankimi, % 85-90 pinealositler ve % 10-15 glia hücrelerinden oluşmaktadır (Arendt, 1998). Nöroepitelyal hücreler olan pinealositler, hafif bazofilik stoplazmalı hücrelerdir. Belirgin olan çekirdekleri büyük, düzensiz veya

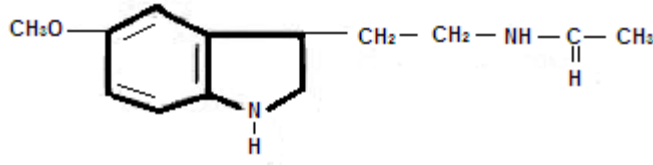
birkaç lobludur. Nöroendokrin işleve sahip olan bu hücrelerden; melatonin, serotonin ve bazı pineal peptidler salgılanmaktadır. Glia hücreleri ise uzun stoplazmik uzantılara sahip, bol miktarda ribozom içeren hücrelerdir. Pineal bezde yerleşmiş olan glia hücreleri, destekleyici işlevlerinin yanı sıra kan damarları ile parankima arasındaki madde alış verişinden sorumludur (Kuş ve Sarsılmaz, 2002; Kuş, 2011).

Pineal bez; memelilerde sekretuar, balıklarda ve amfibienlerde fotoreseptif, sürüngenlerde ve kuşlarda ise hem fotoreseptif hem de sekretuar fonksiyonları üstlenen bir organdır (Çam ve Erdoğan, 2003). Memelilerde, dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre gelen fotoelektrik sinyalleri hormonal sinyallere çeviren, organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere birçok sistemdeki değişiklikleri bu sinyaller doğrultusunda düzenleyen nöroendokrin bir iletici olarak görev yapmaktadır (Keleştimur, 1996; Vanecek, 1998).

Pineal bez; başta melatonin olmak üzere norepinefrin, serotonin, histamin, dopamin, oktopamin, LHRH, tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), somatostatin, vazotosin gibi bazı biyolojik amin ve peptidleri sekrete etmektedir (Ataş, 1998). Bu bez, sirkadiyen ritimde salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir. Böylece, günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev almaktadır (Tamarkin ve ark., 1985; Özşahin, 2006).

1.2.1. Melatonin

Melatonin, ilk olarak sığır pineal bez ekstraterinden izole edilip amfibienlere verildiğinde cilt renginin açılmasına neden olan pineal bir hormon olarak tanımlanmıştır (Koçak ve Çolak, 1996; Ataş, 1998; Brzezinski, 1997). Potansiyel pineal hormonu olarak ifade edilen melatonin, Yunanca melas=karanlık ve tonein=baskılama kelimelerinden köken almaktadır (Çam ve Erdoğan, 2003; Şahin, 2009). İndol türevi olan 232 molekül ağırlığındaki bu hormonun kimyasal isimlendirmesi, N-Acetyl-5-Methoxytryptamine şeklindedir (Koçak ve Çolak, 1996; Kuş ve Sarsılmaz, 2002).



Melatonin - N- Asetil - 5 - metoksitriptamin

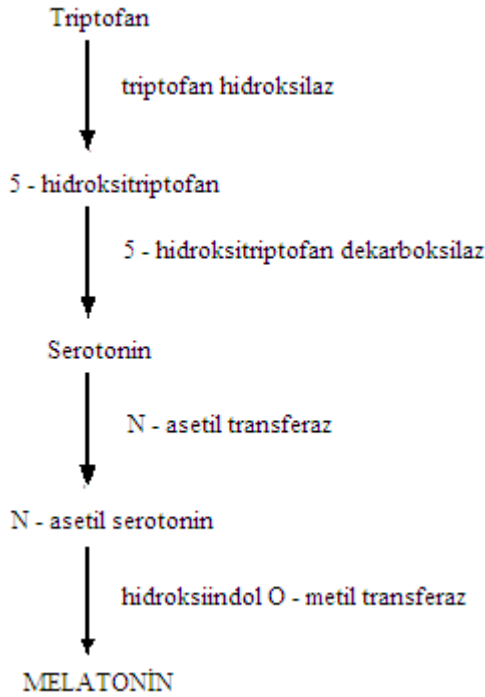
Şekil 1.4. Melatoninin Kimyasal Yapısı (Koçak ve Çolak, 1996).

1.2.1.1. Melatonin biyosentezi

Pineal bezin işlevi üzerine başlıca kısıtlayıcı etki yapan faktör ışıktır. Ayrıca ışık, merkezi sinir sistemi aracılığıyla pineal bez ritminin çevreye uyumunu sağlamaktadır. Işık durumuna (karanlık/aydınlık) bağlı olarak, dış ortamdan gelen uyarılar gözün retina katmanını ile alınır, fotoreseptörlere ulaşır ve buradan hipotalamustaki suprakiazmatik nükleusa (SCN) iletilir. Bu uyarılar daha sonra paraventriküler çekirdeğe ulaşır. Uyarı dalgaları medial ön beyin sapında ve retiküler formasyonda birleşerek omuriliğin lateral çekirdeğine gider. Bu çekirdekten sempatik sinir sisteminin pregangliyonik adrenerjik sinirleriyle alınan uyarılar postganglionik sinir lifleri ile pineal beze ulaşır (Reiter, 1980; Macchi ve Bruce, 2004).

Pineal bez içindeki en önemli nörotransmitter madde noradrenalindir. Sempatik sinirlerin pineal hücreler üzerine olan etkisi, noradrenalin salınımını karanlık/aydınlık değişimlerine bağlı olarak ritmik biçimde değiştirerek triptofan (serotonin ve melatonin öncü maddesi) salınımını düzenlemektir. Noradrenalin, pinealosit membranındaki postganglionik reseptörler olan $\beta 1$ ve $\alpha 1$ adrenerjik reseptörlere bağlanır (Palaoğlu ve Beşkonaklı, 1998; Macchi ve Bruce, 2004; Öztürk, 2006). Pineal bezde melatonin sentezinin yaklaşık % 85'inden $\beta 1$ reseptörlerinin, yaklaşık % 15'inden ise $\alpha 1$ reseptörlerinin uyarılması sorumludur (Koçak ve Çolak 1996, Palaoğlu ve Beşkonaklı, 1998; Macchi ve Bruce, 2004; Öztürk, 2006). Noradrenalin, pineal hücre zarındaki β -adrenerjik reseptörlere bağlanarak siklik adozin monofosfat (cAMP) sistemini uyarır (Macchi ve Bruce., 2004; Yenice, 2012). Aydınlıkta pineal hücrelere aktif transportla plazmadan alınan ve indol bir amino asit olan triptofana, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından -OH grubu

eklenerek 5-hidroksitriptofan (5HTP) oluşur. 5HTP, aromatik amino asit dekarboksilaz aracılığıyla serotonine (5-hidroksitriptamin, 5HT) dönüştürülür. Karanlıkta serotonin, serotonin N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonine ve sonrasında hidroksiindol-O-metiltransferaz enzim tarafından melatonine dönüştürülür (Şekil 1.5). Bu mekanizmada hız kısıtlayıcı enzim aril-alkilamin-N-asetil transferaz (AANAT) olarak adlandırılan enzimdir (Yerer, 2006).



Şekil 1.5. Melatonin sentez basamakları (Yenice, 2012)

Pineal bez içinde sentezlenen melatonin, en çok kabul gören hipoteze göre; önce galen veni içine sonra sagittal sinüs ve juguler ven yolunu izleyerek kalbe, kalpten ise karotis arter yoluyla spinal kord ve beyin dokusundaki nöral yapılara ulaşmaktadır. Diğer bir hipoteze göre ise ventrikül sistem içindeki serebrospinal sıvı aracılığı ile beyin ve spinal kord gibi nöral yapılarda yer alan hedef dokulara ulaşmaktadır (Young ve ark., 1984; Palaoğlu ve Beşkonaklı 1998; Tan ve ark., 2010).

1.2.1.2. Melatoninin etki mekanizması

Merkezi sinir sisteminde melatoninin esas hedef organı hipotalamustur. Melatonin verilmesi hipotalamusta dopamin, serotonin, norepinefrin ve gamma amino bütirik asit (GABA) gibi transmitterleri artırır (Brzezinski, 1997). Bununla birlikte, melatonin düzeyinin artması, birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Böylece, siklik guanozin mono fosfat (cGMP) düzeyi azalır ve cAMP düzeyi artar (Yerer, 2006).

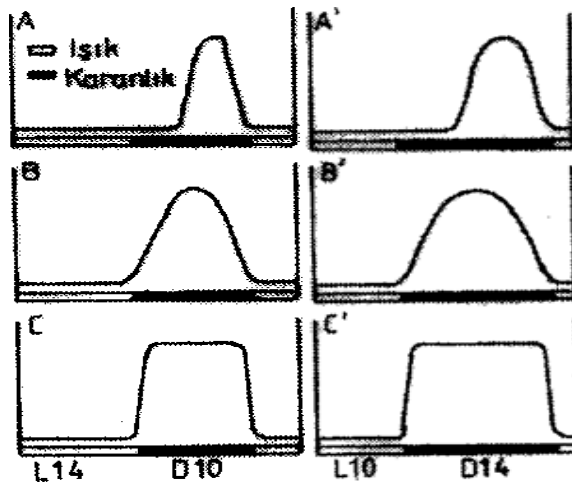
Melatonin; deoksiribonükleik asit (DNA) tamiri, membranlar ve diğer intrasellüler komponentlerin bakımı için gerekli olan guanin nükleotitlerin oluşumuna katkıda bulunur (Özşahin, 2006). Bu hormonun yaklaşık % 70'i plazmada geri dönüşümlü olarak albümine veya alfa asit glikoproteine bağlanarak hedef dokuya taşınmaktadır (Brzezinski 1997; Çam ve Erdoğan, 2003; Özşahin, 2006).

1.2.1.3. Melatonin salınımı

Melatonin oluşturulduktan sonra depolanmadan, basit difüzyonla dolaşım kanına verilmektedir (Macchi ve Bruce, 2004). Salgılanma hızı 29 mg/24 h'dir (Şener, 2010). Melatoninin kana hızlı salınımı lipofilik özelliği sayesinde olmaktadır (Kuş, 2006). Lipofilikliğinin çok yüksek olmasından dolayı tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır. Yapılan analizlerde, birçok vücut sıvısı ve dokularında (beyin omurilik sıvısı, tükürük, lenf, amniotik sıvı, idrar, sperma, retina ve siyatik sinir) melatonin hormonunun varlığı gösterilmiştir (Erlich ve Apuzzo, 1985).

Pineal bezden melatonin salınımı fotonöroendokrin kontrol altındadır. Salınımı sirkadiyen ritme sahiptir (Reiter, 1980; Öztürk, 2006; Yerer 2006). Memelilerde bu ritim, SCN'ta yer alan pacemaker'lar tarafından belirlenir (Brzezinski, 1997; Şahin, 2009). Melatonin salgılanması karanlıkla başlar, aydınlıkla sona erer (Özgüner ve ark., 1995; Öztürk, 2006). Gün ışığının bulunduğu saatlerde, retina fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir ve retina-hipotalamik-pineal sistem sessizdir, bu dönemde çok az melatonin salgılanır (Altun ve ark., 2002; Yaprak ve ark., 2003). Karanlıkla ilgili impulslar pineal beze ulaştınca norepinefrinin pinealosit membranında

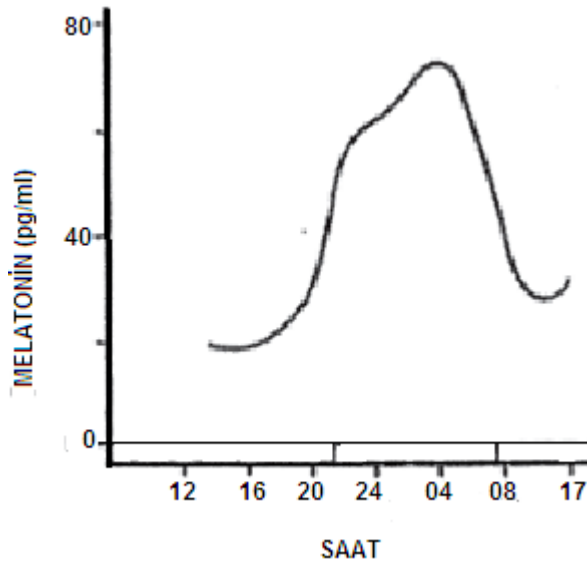
adrenerjik reseptörlere bağlanmasıyla bir seri reaksiyon başlar. Membranda adenil siklaz aktivasyonu yoluyla hücre içi cAMP yapımı ve NAT artışı olur. Melatonin sentez ve salınımı artar (Palaoğlu ve Beşkonaklı 1998; Touitou, 2001; Öztürk, 2006). Fakat melatonin salınımındaki bu sirkadiyen ritim, canlı türlerinde farklılıklar göstermektedir (Reiter, 1980; Yerer 2006). Farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilgili olup, üç değişik ritim tipi tespit edilmiştir. Birinci gruptaki deney hayvanlarında (Suriye hamsteri, ev faresi vb.) melatonin gecenin ilk yarısının bitimiyle yükselmeye başlar, gecenin ikinci yarısında yani geç karanlık fazda pik yapar ve gün ışığının başlangıcından hemen önce gündüz düzeylerine iner (Şekil 1.6 A). İkinci grup canlılarda (insan ve sıçanların da dahil olduğu en yaygın sirkadiyen ritim) melatonin karanlığın hemen başlangıcında giderek artmaya başlar, yavaş bir artma göstererek gece yarısında pik yapar. Gecenin ikinci yarısında düşmeye başlar ve güneşin doğmasından hemen önce gündüz düzeylerine ulaşır. Gün boyunca tekrar karanlık periyot başlayıncaya kadar sabit bir düzeyde kalır (Şekil 1.6 B). Üçüncü grup canlılarda ise (Sibirya hamsteri, koyun vb.) melatonin karanlık fazın başlangıcı ile çok hızlı bir şekilde artmaya başlar, karanlık periyodun büyük bir kısmında en yüksek düzeyinde sabit olarak kalır ve gün doğumuna yakın çok hızlı bir düşme göstererek gündüz düzeyine iner (Şekil 1.6 C). Her üç grup için geçerli olmak kaydıyla karanlık fazın uzaması (kış mevsiminde uzun gecelerde) ile melatonin miktarı doğru orantılı olarak artma gösterir (Şekil 1.6 A', B', C').



Şekil 1.6. Farklı canlılarda uzun (A, B, C) ve kısa gün (A', B', C') şartlarında pineal bezde melatonin üretimi (Reiter, 1991).

Plazma melatoninin yoğunluğu, gece saatlerinde gündüze göre 3-10 kat fazladır (Reiter, 1991; Ataş, 1998; Çam ve Erdoğan, 2003; Özşahin, 2006; Yerer, 2006). Salgılanması genellikle 21:00-22:00 saatleri arasında başlar, maksimum konsantrasyon 02:00-04:00 arasında gözlenir ve 07:00-09:00 arasında giderek azalır (Şekil 1.7). Bu yoğunluk, gündüz 0-20 pg/dl iken, gece 50-200 pg/dl düzeyine yükselmektedir. İnsanda bir günde 30 mg melatonin üretilmektedir ve bunun % 80'i geceleri sentezlenmektedir (Öztürk, 2006). Sağlıklı bir sıçanda ise günlük melatonin üretimi ortalama 10 µg'dır (Arendt, 1998).

Kısa süreli ama yeterli miktarda ışık maruziyeti melatonin salgısını baskılar. İnsanda 1000-2500 lüks'lük ışık melatonin salgılanmasında azalmaya yol açar ve en etkili yeşil ışıktır (Ataş, 1998; Çam ve Erdoğan, 2003).



Şekil 1.7. Sirkadiyen serum melatonin düzeyi (Yerer, 2006).

Melatonin seviyesini ışığın yanında birçok çevresel faktör (ısı, gel-git vb.) ve çeşitli ilaçlar etkilemektedir (Özgüner ve ark., 1995).

Melatoninin kandaki konsantrasyonu yaşa bağlı olarak da değişmektedir. Fetal pinealositler, en erken gestasyonun 26. haftasından sonra melatonin sentezleyebilmektedir. Doğumdan sonraki 3-4 haftaya kadar melatoninin sirkadiyen salınımı görülmemektedir. Doğum sonrası ilk üç ay süresince melatonin salınımı oldukça azdır. Pik seviyesine 1-3 yaş arası ulaşır. Bu dönemde gece melatoninin

serum pik seviyeleri 325 pg/ml (1400 pmol/l) değerlerine kadar yükselir (Macchi ve Bruce, 2004).

İnsan melatonin ritminin en karakteristik özelliği, normal bireylerde günlük ve haftalık olarak tekrarlanabilir olmasıdır. Pineal bezde üretilen melatonin miktarı genetik olarak belirlenmiştir ve birey içerisinde değişmezliğe rağmen bireyler arasında ritmin amplitüdü açısından çok büyük değişkenlik vardır (Arendt, 1988; Çam ve Erdoğan., 2003). Öyle ki, aynı yaştaki bireyler arasında bile melatonin konsantrasyonundaki gece pikleri değişkenlik göstermekte ancak bu farklılığın önemi halen bilinmemektedir (Reiter, 2003). Erişkinde cinsiyet, boy ya da vücut ağırlığına göre sekresyonda tutarlı bir değişiklik saptanmamıştır. Çocuklarda ve ergenlerde (1-20 yaş) gece görülen melatonin düşüşünün vücut ağırlığıyla ve vücut yüzey alanı ile korelasyon içinde olduğu fakat daha ileri yaşlarda bu korelasyonun devam etmediği saptanmıştır. Çocuk ve ergenlerin serum melatonin düzeyleri ile vücut ağırlıkları arasındaki negatif korelasyon, bu periyotta serum melatonin seviyesinde gözlenen düşüşün vücut ebatlarının artmasından kaynaklandığını düşündürmüştür. İleri yaşlardaki düşüşün ise diğer faktörlere bağlı olduğu düşünülmüştür (Waldhauser ve ark., 1988; Çam ve Erdoğan 2003).

1.2.1.4. Melatonin metabolitleri

Dolaşımdaki melatoninin insanda yarılanma süresi 30-60 dakika aralığında değişmektedir. Dışarıdan verilen sentetik melatonin için ise bu süre 12-48 dakika civarında olup oral biyoyararlanım (2,5-100 mg doz aralığı için) % 40-70 oranındadır. Sıçanlarda biyolojik melatoninin yarılanma süresi yaklaşık 20 dakikadır (Yeleswaram ve ark., 1997).

Melatonin, karaciğer ve böbreklerde metabolize edilmektedir. En önemli metaboliti 6-hidroksimelatonin'dir (Reiter, 1991; Ataş, 1998; Çam ve Erdoğan, 2003; Özşahin, 2006; Yerer, 2006). Ortalama atılım hızı 0-30 ng/8 h olup, bu süre yüksek oranda bireysel ve günlük farklılık gösterebilmektedir (Palaoğlu ve Beşkonaklı, 1998). Yaklaşık % 50-80 oranında sülfat derivelerine, % 5-30 oranında glukronid derivelerine dönüştürülür. Ancak sıçanda melatonin, N-asetilserotonine de

metabolize olabilir (Koçak ve Çolak, 1996). Melatoninin % 1'den daha az bir miktarı ise değişmeden atılır (Cardinali ve Pevet, 1998; Macchi ve Bruce, 2004). İdrarda 6-sülfatoksimeatonin atılımı serum melatonin konsantrasyonu ile yakın ilişki gösterir (Cardinali ve Pevet, 1998; Toutiu, 2001; Macchi ve Bruce, 2004; Öztürk, 2006).

Melatonin oluşumunda prekürsör olan N-asetilserotoninin insanlarda melatonin metaboliti olduğu bilinmektedir. Melatoninin kendi prekürsörüne dönüşmesi melatonin sentezinin kompleks bir geri bildirim mekanizma ile kontrol edildiğini göstermektedir (Palabıyık, 2003).

1.2.1.5. Melatonin reseptörleri

Melatonin hormonu hedef dokulardaki etkisini, bu dokularda yer alan spesifik reseptörler aracılığı ile göstermektedir (Lee ve ark., 1996). Melatonin reseptörleri; plazma membran yüzeyinde, sitozolde, çekirdek ve mitokondri membranı gibi hücrenin birçok alanında tespit edilmiştir (Cohen ve ark., 1978; Şahin, 2006). Reseptörlerinin de melatonine benzer bir şekilde sirkadiyen bir ritim ile fonksiyon gösterdiği saptanmıştır (Reiter, 1995).

Bilinen melatonin reseptörleri, yedi transmembran alana sahip olup G-proteinle eşleşmiş reseptör ailesindedir (Reiter, 2003). İki grup melatonin reseptörü tanımlanmıştır. Bunlardan MT1 (Mel_{1a}) reseptörü, bütün vertebralılarda mevcuttur ve başlıca beyinde eksprese edilir. MT2 (Mel_{1b}) reseptörü de bütün vertebralılarda mevcuttur ve başlıca retinada eksprese edilmektedir (Nosjean ve ark., 2000; Şahin, 2006).

İnsanlarda MT1 reseptör geninin 4q35.1 kromozomunda lokalize olduğu tespit edilmiştir. MT2 reseptör geni ise 11q21-22 kromozom bölgesinde kodlanmıştır. Melatoninin bu güne kadar saptanabilmiş spesifik bir antagonisti yoktur (Çam ve Erdoğan, 2003; Dubocovich ve ark., 2005; Özşahin, 2006).

Melatonin reseptörleri hücrenel fonksiyonlarını genelde ikincil haberciler aracılığıyla gösterir. Hem MT1 hem de MT2 reseptörü G-protein kenetli reseptörlerdir. Bu reseptörler, G-protein bağlı reseptörler vasıtasıyla geniş bir

intraselüler haberci ağıyla (cAMP, cGMP ve kalsiyum) etkinlik gösterir. Melatonin, cAMP ve cGMP'nin hücre içinde birikmesini inhibe eder, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) konsantrasyonunu azaltır ve diaçilgliserol (DAG) oluşumunu baskılar (Vanecek ve ark., 1990; Vanecek, 1998; Şahin, 2006). MT1 reseptörünün muhtemelen G-protein aracılığıyla fosfotidil inozitol hidrolizi ile adenilat siklaz inhibisyonunda rol aldığı, bunların neticesinde cAMP'yi azaltıcı etki oluşturduğu bildirilmektedir (Şahin, 2006). Bu etkinin genellikle pertussis toksin'e (PT) duyarlı G-proteini aracılığıyla olduğu ifade edilmektedir. MT2 reseptörünün de cAMP sentezi ve retinada dopamin sentezinin inhibisyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Şahin, 2006).

MT1 esas olarak, nöronal aktiviteyi düzenlemeye, arteriyel vazokonstrüksiyonu sağlamaya, kanser hücrelerinde proliferasyona, üreme ve metabolik fonksiyonların düzenlenmesine aracılık etmektedir. MT2 reseptör aktivasyonu ise SCN'un nöronal aktivasyonu ile sirkadiyen ritmin düzenlenmesine, retinada dopamin salınımının inhibisyonuna, arteriyel yatakta vazodilatasyonun artışı ve lökosit göçünün inhibisyonu ve immun sistemin aktivasyonuna neden olmaktadır (Konturek ve ark., 2007).

Melatonin moleküler etkisini hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirirken, reseptörlere ihtiyaç duymadığı durumlar da söz konusudur. Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri kalmodulin yardımı ile olmaktadır (Çetin, 2005). Sitolik kalmoduline bağlanan hormon; adenilat siklaz, fosfodiesteraz gibi hedef enzimlerle olduğu kadar yapısal proteinlerle de etkileşerek doğrudan kalsiyum uyarısı üzerinde etki gösterebilir (Aydoğdu, 2003).

1.2.2. Melatonin ve üreme

Melatoninin dişi üreme sisteminde; overlerde, folikülogenez, foliküler atrezi, ve oosit maturasyonu ile ovulasyon ve korpus luteum formasyonu üzerinde rolü olduğu bilinmektedir (Tamura ve ark., 2008). Erişkin dişi sıçanlara kronik melatonin verildiğinde, over boyutları ve ağırlığı ile östrus sıklığının azaldığı bildirilmektedir (Wurtman ve ark., 1963). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, melatoninin uterus yapı ve fonksiyonları üzerine de etkilerinin olduğu, dışarıdan uygulanan melatoninin

uterus düz kas kontraksiyonlarını inhibe ettiği bildirilmektedir (Ayar ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2002; Schlabritz ve ark., 2003; Pekmez ve ark., 2004). Ayrıca bu çalışmalarda, uterusun endometriyal ve miyometriyal tabakalarında melatonin reseptörlerinin bulunduğu ve melatoninin uterus üzerindeki etkilerini bu reseptörler aracılığıyla gösterdiği ifade edilmiştir (Zhao ve ark., 2002; Schlabritz ve ark., 2003). Vriend ve ark. (1987), dişi Suriye hamsterları üzerinde yaptıkları çalışmalarında; melatonin enjeksiyonunun uterusu atrofiye sebep olduğunu bildirmektedirler. Melatoninin aynı zamanda endometriyumda hücre proliferasyonunu da engellediği bilinmektedir (Vriend ve ark., 1987). Lawson ve ark. (1992), melatonin uygulamasından 8 hafta sonra Golden hamsterlarının uterus ağırlığında azalma meydana geldiğini ifade etmektedirler. Pekmez ve ark. (2005), yaptıkları bir çalışmada; pinealektomi sonrası uterus ağırlığında artış olduğunu göstermişlerdir. Reiter (1975), günün 23 saati boyunca karanlıkta tutulan dişi hamsterların üreme organlarında involusyonun meydana geldiğini ve bu involusyonun pinealektomi ile önlendiğini bildirmiştir. Melatoninin, doza bağlı olarak, gebe ve gebe olmayan sıçanların miyometriyumunda kasılımları inhibe ettiği de bildirilmektedir (Ayar ve ark., 2001). Diğer bir çalışmada ise pineal bezin yeteri kadar melatonin salgılamaması sonucunda spontan abortus gelişebileceği ileri sürülmektedir (Sainz ve ark., 2000). Bu bildirimler ışığında melatoninin üreme üzerinde etkileri olduğu şüphesizdir.

1.2.2.1 Melatoninin pubertaya etkisi

Melatoninin sekresyon periyodu, bazı canlı türlerinde puberta zamanını belirlemektedir. Buna karşın, pubertanın başlaması için canlının yeterli derecede fiziksel gelişime de ulaşması gerekmektedir (Çam ve Erdoğan, 2003). Pineal bezin puberta dönemini etkilediği tezi, Heubner'in pineal bezi imha eden nöroparankimal bir tümörün erken pubertaya yol açtığını gösterdiği 1898 yılına kadar uzanmaktadır.

Pubertaya erişme zamanı gecikmiş ve hipotalamik amenoreli çocuklardaki melatonin düzeyi aynı yaştaki sağlıklı çocuklardan daha yüksek bulunmuştur (Cavallo, 1993). Yaşları 1-18 arası, 38 çocukta melatonin konsantrasyonu

kıyaslanarak yapılan bir çalışmada; nokturnal melatonin konsantrasyonunun yaş ilerledikçe azaldığı saptanmış, bu düşüşün bebeklikten itibaren başladığı ve büyük ölçüde ergenlik gelişimiyle ilgili olduğu vurgulanmıştır (Attanasio ve ark., 1985). Bir başka çalışmada, 8 kız ve 8 erkek çocuğu ergenlik aşamasına göre sınıflandırılmış ve melatonin ritminin kronolojik yaştan ziyade ergenlik yaşı ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Salti ve ark., 2000). Bu gözlemler doğrultusunda insanların pubertal gelişiminde melatoninin rolü olabileceği ifade edilmektedir (Çam ve Erdoğan, 2003).

1.2.2.2. Melatoninin menstrual siklusa etkisi

İnsanda ovulasyondan hemen önceki sabaha ait preovulatör serum melatonin yoğunluğunun düşük olduğu ve bunun preovulatör LH pikini kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Arendt, 1988). Ancak sonraki yıllarda, normal siklusun seyri boyunca melatonin sekresyonunun fazının ve amplitüdünün değişmediği gösterilmiştir. (Shinohara ve ark., 2000). Benzer şekilde normal döngüleri olan infertil kadınlarda serum östradiol düzeylerindeki belirgin artışlar, melatonin salgısını etkilememektedir (Brzezinski ve ark., 1988; Adriaens ve ark., 2006). Ancak melatonin, overler tarafından salgılanan ve prolaktin yapımını idame ettiren östradiol salgısını baskılamaktadır. Bunun yanında, serum melatonin konsantrasyonları, hipotalamik amenoresi olan kadınlarda artmaktadır (Cos ve ark., 2006). Fonksiyonel hipotalamik amenoreli kadınlar ile normal adet gören foliküler fazın başında olan kadınlar arasındaki 24 saatlik serum melatonin düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; hipotalamik amenoreli kadınlarda nokturnal melatonin salgısı normal kadınlara göre daha erken başlamış, daha geç bitmiş ve plazma melatonin düzeyi 3 kat fazla çıkmıştır (Berga ve ark., 1988).

Yapılan bir çalışmada, melatonin ve progesterin kombinasyonunun birbirleriyle sinerjik etki göstererek ovaryen fonksiyonu engellediği ve yan etkilerinin azlığı nedeniyle bu kombinasyonunun doğum kontrol hapları yerine de geçebileceği bildirilmektedir (Voordouw ve ark., 1992).

1.2.2.3. Melatonin ve infertilite

Melatonin poliöstrik hayvanların reproduktif sistemi üzerindeki inhibitör etkisi göz önünde tutulduğunda infertilite ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Okatani ve ark., 1997; Roy ve ark. 2001). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, kronik uygulanan melatoninin ovaryumda morfolojik değişikliklere ve folikül atrezisine neden olduğu ve bunun fertilité üzerinde olumsuz etkileri olduğu ifade edilmektedir (Ergin ve Başaloğlu, 2004; Pekmez ve ark., 2004). Ancak yapılan çalışmalarda, erkeklerde melatoninin üremenin nöroendokrin döngüsünde düzenleyici olarak etki gösterdiği ve azalmış seminal melatonin seviyesinin infertil semen parametreleri ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Luboshitzky ve ark., 2002; Awad ve ark., 2006). İnfertil erkeklerde, özellikle sperm hareketi kötü olanlarda, semen antioksidan kapasitesinin fertil erkeklerden düşük olduğu saptanmıştır (Awad ve ark., 2006; Güzel ve ark., 2013). Pineal bezi çıkartılan sıçanlarda testis regresyonu olduğu bildirilmiştir (Kuş, 2006). Diğer bir çalışmada ise üreme siklusunun değişik evrelerinde melatonin verilen köpeklerde testis regresyonunun önlendiği gösterilmiştir (Becker ve Turner, 1995).

1.3. Kisspeptinler ve Kisspeptin Reseptörü (GPR54)

Başarılı bir reproduksiyon için beyin, hipofiz ve gonadlardan gelen düzenleyici sinyaller arasındaki etkileşimin iyi şekilde kontrolü gerekmektedir. Hipotalamus, hipofiz ve gonadal aksta, GnRH - FSH/LH - östrojen/progesteron yolu birçok memeli türünde iyi tanımlanmış olmasına rağmen ön beyinde bu işlevi başlatan moleküler ve hücresele olaylar henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat son yıllarda kisspeptin hormonunun keşfedilmesi, başta GnRH salınımı olmak üzere, puberta ve üremenin metabolik düzenlenmesinde birçok bilinmeyen ortaya çıkmasına neden olmuştur (Kafa ve Eyigör, 2011).

Fenil alenin amid yapıda peptid bir hormon olan kisspeptinler, Kiss1 gen (1q32) tarafından kodlanan ve G protein 54 reseptör çiftine tutunmuş hormonlardır (Jayasena ve ark., 2009). Kisspeptin reseptörü (GPR54) ve bu reseptörün ligandı olan kisspeptin hormonu, ilk olarak 1995 yılında melanom ve meme kanseri üzerine

yapılan araştırmalarda, metastaz baskılayıcı bir genin ürünü olarak keşfedilmiştir (Lee ve ark., 1996). Bundan dolayı, ilk belirlendiği yıllarda “metastin“ olarak adlandırılırken, takip eden yıllarda "kisspeptin" olarak isimlendirilmiştir. Bu adlandırmadaki “SS“ takısı baskılayıcı diziyi ifade ederken; “KI” harfleri, keşfinin Hershey, Pensilvanya’da olmasından dolayı bu şehrin ünlü “KISS” çikolatasına ithafen "SS" ekiyle bir araya getirilmiş ve böylece "KISS" sözcüğu oluşturulmuştur. (Lee ve ark., 1996). Günümüzde her iki terim de kullanılmakla beraber, kanser biyologları büyük ölçüde “metastin” terimini tercih etmekte, diğer alanlardaki araştırmacılar ise “kisspeptin” teriminin kullanılması desteklemektedir. Terminolojide insana ait kisspeptin reseptör genler, “*KISS1*” şeklinde; insan dışındaki diğer türlere ait reseptör genler ise “Kiss1” olarak gösterilmektedir (Gottsch ve ark., 2009).

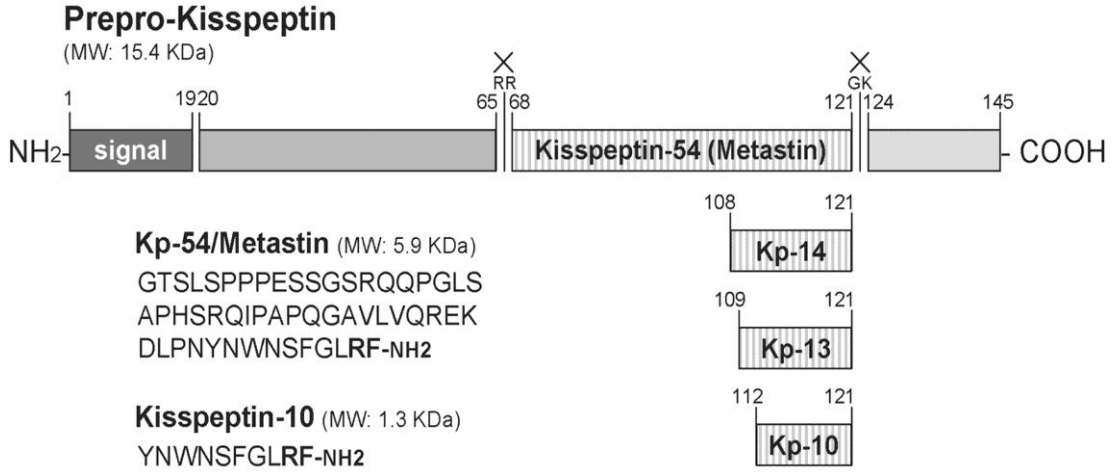
Orphan G protein kenetli membran reseptörü olan kisspeptin reseptörü, ilk olarak sıçan beyninde Lee ve ark. (1999) tarafından tanımlanmış olup sıçanlarda “GPR54” ve/veya “Kiss1r”; insanlarda “AXOR12” ve/veya “hOT7T175” ve diğer canlı türleri için “Kiss-1R” şeklinde gösterilmektedir (Lee ve ark., 1996; Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001; Ringel ve ark., 2002). GPR54, 398 amino asit kalıtı içeren heptahelik G-protein-kenetli, galanin ve opioid reseptör ailesi ile homoloji gösteren bir reseptördür (Funes ve ark., 2003; Aparicio, 2005). Kiss1r’nin de üyesi olduğu çift bağlı G-protein reseptörler (GPCRs) hücre büyümesi, çoğalması ve göçü ile ilgili değişik fonksiyonları içeren sinyal iletim yollarını etkinleştirmek için çeşitli girdilerin transdüksiyonunu sağlar (Marchese ve ark., 1999). Kiss1r, yedi transmembran alanı ile N terminalinden üç glikozilasyon sitesi içermektedir (Clements ve ark., 2001). Yapılan araştırmalarla, insan GPR54’ünün (AXOR12) sıçan ile % 85, fare ile % 80 ve memeli olmayan canlılarla % 40 homolog olduğu belirlenmiştir (Navarro ve ark., 2004).

C-terminal’de arginin-fenilalanin (Arg-Phe) içeren nöropeptidler RF-Amidleri olarak nitelendirilmektedir. Kiss1’in üyesi olduğu RMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) bağlı peptidler (RFRPs), Arg-Phe-NH₂ dizisi ile sona eren nöropeptidlerin süper ailesini teşkil etmektedir (Greenberg ve Price, 1992; Li ve ark., 1999). Bugüne kadar tanımlanmış bütün RF-Amidlerinin direk ya da indirek olarak üreme-

nöroendokrin aks üzerinde etkin oldukları gösterilmiştir (Durmaz ve Dikmen, 2007). Ayrıca, insan ve farelerde GPR54 mutasyonlarındaki delesyon ya da bozuklukların hipogonadotropik hipogonadizmle sonuçlanması, kisspeptinin üreme sistemi üzerinde önemli rollere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (De Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003; Smith, 2008). Kisspeptinin reproduktif sistem üzerindeki etkileri seks steroidlerinin negatif geri bildirim eylemine aracılık etmek, preovulatör GnRH/LH üretimi, mevsimsel üremenin kontrolü, gonadotropin hormonların salgılanması, emzirme döneminde üreme etkinliğinin engellenmesi, ergenlikte cinsel olgunlaşma sürecine rehberlik etme ve pubertanın başlatılması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca kisspeptinin reproduktif etkilerinin dışında plasental fizyoloji, vasküler dinamikler ve bazı kanserlerde metastaz üzerinde çeşitli etkileri olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (Masui ve ark., 2004; Terao ve ark., 2004; Oakley ve ark., 2009; Sawyer ve ark., 2011).

1.3.1. Kisspeptinlerin kimyasal yapısı, etki mekanizması ve türleri

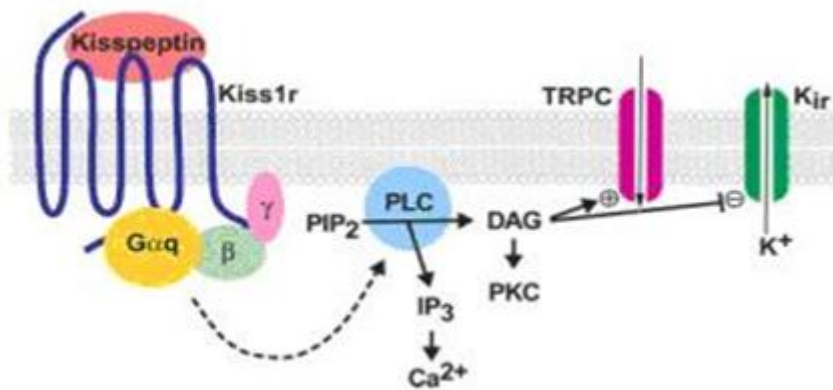
Kiss1 geninin ilk ürünü olarak bilinen kisspeptin-54, toplamda 145 amino asit içeren bir peptittir (West ve ark., 1998). İlk 19 amino asitlik kısım sinyal diziyi oluşturmaktadır. Protein 57. ve 67. pozisyonda birer kesim noktası içerir, 121-124. amino asitler arasındaki bir diğer kesim noktasından ayrılmasıyla oluşan yeni proteinde, C-terminal amidleştirilir (Şekil 1.8). Bu kısım GPR54 reseptörüne bağlanmaktan sorumlu olup intrasellüler Ca^{+2} uyarımı için gereklidir (Aparicio, 2005; Durmaz ve Dikmen, 2007).



Şekil 1.8. Kisspeptinlerin yapısı (Durmaz ve Dikmen, 2007).

Kisspeptinin, GPR54 reseptörüne bağlanması sonucunda fosfolipaz-C etkinleşir ve intrasellüler inozitol (1,4,5) trisfosfat ve Ca^{+2} yoğunluğu artar. Böylece ekstra hücrel sinyal regüle edilmiş kinaz (ERK) ve p38 mitojen-aktifli protein kinaz (MAP) yolu aktive olur (Aparicio, 2005; Durmaz ve Dikmen, 2007).

Kisspeptinin, transient receptor potential canonical (TRPC) benzeri kanalları aktive ederek GnRH salgılanmasını stimule ettiği ve olasılıkla DAG ve/veya Ca^{+2} aracılığı ile potasyum kanallarını (K_{ir}) inhibe ederek düzeltici faaliyette bulunduğu düşünülmektedir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Kisspeptinin Kiss1r'e bağlanmasında nöronal depolarizasyonun mekanizması. Kisspeptin, reseptörüne bağlanması esnasında; G proteini, $G_{\alpha q}$ (G protein q reseptörlerine bağlı aktive edilmiş guanin nükleotidi) ve G protein-aktifli fosfolipaz C (PLC)'yi aktive ederek; fosfotidil 4,5-bisfosfatı (PIP_2), inozitol trifosfat (IP_3) ve DAG olmak üzere ayrıştırır. DAG ise protein kinaz C (PKC)'yi etkinleştirerek TRPC ve K_{ir} 'na parçalı sinyaller gönderir. Diğer taraftan IP_3 ise Ca^{+2} iyonlarının mobilizasyonunu sağlayarak diğer proteinlerin aktivasyonuna katılım sağlar. Muhtemelen DAG'ün katılımıyla membran depolarizasyonu;

selektif olmayan TRPC katyon kanallarının aktivasyonu ve K_{ir} 'nin inhibasyonu ile gerçekleşmektedir (Kotani ve ark., 2001).

Kisspeptinin dolaşımdaki ve dokulardaki major formu 54 amino asit kalıtı içeren metastindir. Bunun yanısıra 10, 13 ve 14 amino asit kalıtı içeren daha kısa biyolojik formları (kisspeptin-14, kisspeptin-13 ve kisspeptin-10) bulunmaktadır. Bütün kisspeptin formlarının C-terminalinde Arg-Phe-NH₂ motifi bulunur ve toplu olarak kisspeptinler olarak isimlendirilir (Kotani ve ark., 2001; Castellano ve ark., 2006). Her dört peptid (kisspeptin-10, -13, -14, -54 ile) Kiss1r için aynı afinite ve etkinlik sergilemesine rağmen dört peptidin de C-terminal ucunda bağlayıcı ve aktivasyondan sorumlu olan reseptörünün Kiss1r olduğu gösterilmiştir (Kotani ve ark., 2001). Bu dört kisspeptin, biyolojik olarak aktif olmakla birlikte kısa peptidlerin *in vivo* ilişkisi henüz bilinmemektedir (Muir ve ark., 2001).

1.3.2. Kisspeptin Analogları

Kisspeptin sinyal iletimi, hem kanser hem de üreme biyolojisinde kritik bir rol oynamasına rağmen yeni ligandların veya farmakolojik tedavi ajanlarının (agonist veya antagonist) gelişiminde ancak son zamanlarda ilerleme görülmüştür. Potansiyel ligandları tanımlamak için Orsini ve ark. (2007); nükleer manyetik rezonans, reseptör bağlanması ve fonksiyonel testleri birleştirerek kisspeptin farmakoforunu kullanan bir model tanımlamışlardır. Araştırmacılar, kisspeptin-13 için dizinin 7'den 13'e kadar olan kısmının oldukça stabil sarmal bir yapıya sahip olduğunu ve bu sarmalın bir yüzünde farmakofor alanı tanımlayan üç fonksiyonel anahtar dizinin (Phe9, Arg12 ve Phe13) olduğunu göstermişlerdir (Orsini ve ark., 2007). Gutierrez-Pascual ve ark. (2009) ise kisspeptin-10 için 6. ve 10. pozisyonlarındaki alenin aminoasitine dikkat çekerek, bu bölgelerin kisspeptin analogları oluşturabilecek yapıda potansiyel modifikasyonlara sahip olduğunu ve önem taşıdığını belirtmişlerdir. Ayrıca birçok pentapeptid kisspeptin analogu Kiss1r agonisti olarak tanımlanmıştır (Tomita ve ark., 2006; 2007; 2008). Tanımlanan moleküller kisspeptinin kendisi ile karşılaştırıldığında, zayıf olmasına rağmen farmakofor alanının temel özellikleri bakımından tam agonist özellik göstererek hareket edebilmektedir (Orsini ve ark., 2007).

Kisspeptin ile Kiss-1R arasındaki sinyal iletimini engellemek için de çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Kinoshita ve ark. (2005), preoptik alana (POA) monoklonal kisspeptin antikoru infüze ederek, proöstrus LH artışını engellemiş ve östrus siklusunu inhibe etmişlerdir. Roseweir ve ark. (2009) ise kisspeptin-10 analogunun antagonistini geliştirmiş (peptid 234) ve bu antagonistin; fare, sıçan ve kastrasyon yapılan koyunlarda kisspeptin ile indüklenen LH artışını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu bulgu; HPG aksta kisspeptin nöronlarının, seks steroidleri negatif geri bildirim eylemine aracılık ettiğinin güçlü bir göstergesidir. Dahası, bu kisspeptin antagonisti farede GnRH nöronal ateşlemeyi inhibe etmekte ve pubertal dişi maymunlarda GnRH sekresyonunu azaltmaktadır (Roseweir ve ark., 2009).

1.3.3. Kiss1 nöronlarının moleküler fizyolojisi

Kiss1 nöronları steroid hormon geribildirimi, metabolik sinyaller ve fotoperiyodik bilginin kontrolü üzerinde birtakım etkilere sahiptir. Kiss1 nöronlarının, steroid hormon geri bildirim mekanizmalarında üstlendiği aracılık görevi ile uyumlu olarak, östrojen reseptörleri (ER_{α} ve ER_{β}) ile progesteron reseptörünün (PR) salınımında görev aldığı öne sürülmektedir (Franceschini ve ark., 2006; Smith ve ark., 2005, 2006, 2007; Adachi ve ark., 2007; Clarkson ve ark., 2008). Ayrıca Goodman ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, hipotalamusta arkuat nükleus (ARC) içinde dynorphin A ve nörokinin B (NKB) salınımı yapan kisspeptin nöronları tanımlanmaktadır.

1.3.4. Kisspeptinin GnRH nöronları üzerine doğrudan ve dolaylı etkileri

Kisspeptinin GnRH salınımı üzerine olan etkisi ilk olarak Smith (2008) tarafından, kisspeptinin GnRH antagonistini bloke ettiğini göstermesiyle ortaya konmuştur. Kisspeptinin GnRH nöronları üzerine direkt ya da dolaylı yollarla etki ettiğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Colledge, 2009). Ayrıca kisspeptinin GnRH salgılanmasını uyarmak üzere geleneksel sinaptik mekanizmalar vasıtasıyla hareket edebilmesine rağmen, hipotalamusta da özellikle median eminens (ME) içerisinde sinaptik olmayan bir şekilde doğrudan hareket edebildiği göz önüne alınmalıdır

(Pompolo ve ark., 2006; Franceschini ve ark., 2006; Decourt ve ark., 2008; Ramaswamy ve ark., 2008; d'Anglemont de Tassigny ve ark., 2008). Koyunda ise pituatar hücre kültürlerinde kisspeptine yanıt olarak LH sekresyonunun arttığı ve bu yanıtın östrus siklusunun foliküler fazında meydana geldiği ancak luteal fazda veya overektomize koyunlarda yanıt oluşmadığı gözlemlenmiştir (Smith, 2008). İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise hayvan deneylerinden çıkan sonuçtan farklı olarak kisspeptinin hiçbir aracı kullanmadan, direkt gonadotropin salınımı üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Buna göre, hipofizden eksprese edilen GPR54'ün *in vitro* hipofiz hücrelerinde gonadotropin salınımını uyardığı belirlenmiştir (Jayasena ve ark., 2009). Jayasena ve ark. (2009), 0,2-6,4 nmol/kg kisspeptinin plazma LH ve FSH düzeylerinde artışa neden olduğunu ancak LH artış oranının FSH'dan 7 kat fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca kisspeptin uygulamaları ile ilgili olarak çeşitli hayvan türlerinde sürekli/pulsatil uygulamaların farklı yanıtlar ile sonuçlandığı öne sürülmüştür. Eksojen kisspeptinin sürekli infüzyonu, Kiss-1R'yi duyarsızlaştırarak, gonadal genç ve yetişkin erkek maymunlarda LH salınımı ve testis dejenerasyonunda azalmaya neden olmaktadır (Thompson ve ark., 2006; Seminara ve ark., 2006; Ramaswamy ve ark., 2007). Buna karşılık, kisspeptinin tekrarlanan periferik enjeksiyonları erkek fare ve maymunda kontrolsüz LH sinyallerine neden olmuş ve kisspeptinin pulsatil niteliğine bağlı olarak LH salınımını ortaya çıkarmıştır (Tovar ve ark., 2006; Plant ve ark., 2006). Ayrıca, sürekli (30 veya 48 saat) intravenöz (IV) kisspeptin tedavisinin mevsimsel asiklik dışı koyunların % 80'inde ovulasyona neden olduğu bildirilmiştir (Caraty ve ark., 2007).

1.3.5. Kiss1 ve GPR54' ün hormonal regülasyonu

GnRH nöronlarının seks steroidleri üzerindeki düzenleyici etkisi şüphesizdir. Ancak GnRH nöronlarından salınan seks steroidi reseptörlerine bakıldığında; GnRH nöronlarının ER α ve PR'ni eksprese etmediği, yalnızca ER β salınımında rol aldığı anlaşılmıştır. ER β 'nın ise reproduktif aksın merkezi kontrolündeki fonksiyonel önemi belirsizdir (Smith, 2008). Tüm bunlar ele alındığında, GnRH nöronlarının GnRH ekspresyonu ile ilgili olarak seks steroidi reseptörleri üzerindeki geri bildirim etkisinin bu reseptörler yoluyla olmadığı açıktır. Son yıllarda kisspeptin ile ilgili

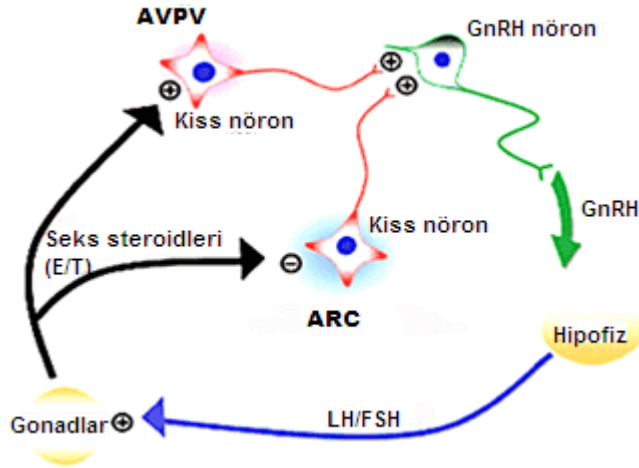
yapılan çalışmalarda, GnRH nöronlarının bu etkisini kisspeptin aracılığı ile sağladığı öne sürülmektedir (d'Anglemont de Tassigny ve ark., 2008; Clarkson ve ark., 2010). Nitekim, Kiss1 mRNA eksprese eden hücrelerin GnRH nöronları ile yakın lokalizasyon göstermesi, kisspeptinin GnRH sekresyonunu uyarma yeteneği ve Kiss hücrelerinin steroid reseptörlerini eksprese ettiği de göz önünde tutulduğunda, GnRH nöronları ile ortamda bulunan seks steroidleri arasındaki bilgi aktarımında kisspeptinin aracı olabileceği düşünülmektedir (Smith, 2008).

Navarro ve ark. (2004); seks steroidlerinin, ARC'de Kiss1 mRNA ekspresyonunu ve sekresyonunu inhibe ederek GnRH nöronlarından GnRH salınımını azalttığını bildirmektedirler. Bu araştırmacıların hipotezine göre, dolaşımdaki östrojen (E) ve testosteron (T) düzeyleri düştüğünde; inhibisyonun ortadan kalkarak, ARC'de kisspeptin sentezinin uyarıldığı ve GnRH salınımının arttığı öne sürülmüştür. Sıçan ve farede yapılan çalışmalarda ARC'den Kiss1 ekspresyonunun kastrasyon sonrasında arttığı, meydana gelen bu artışın T uygulaması ile baskılandığı anteroventral paraventricüler nükleus (AVPV)'de ise Kiss1 mRNA ekspresyonunun kastrasyon sonrası azaldığı ve bu durumun T ekspresyonunun stimülasyonu ile tedavi edildiği açıklanmıştır. Böylece, ARC'de bulunan kisspeptinin GnRH sekresyonu üzerinde negatif geri bildirim etki oluşturduğu desteklenmiştir (Navarro ve ark. 2004; Smith, 2008). Testosteronun ARC'de Kiss1 ekspresyonu üzerindeki steroid-bağımlı inhibitör etkisine, hem androjen reseptörü (AR) hem de ER α birlikte eşlik ederken; AVPV'deki stimulatör etkisine ise AR'nin aracılık etmediği düşünülmektedir (Smith, 2008). Nitekim ARC'de, AR'ü Kiss1 mRNA'lar ile % 65 kolokalizasyon gösterirken, ER α ile % 88 oranında kolokalizasyon göstermektedir (Navarro ve ark., 2004). Bu iki bölgede T'nun Kiss1 mRNA ekspresyonu üzerine olan karşıt etkileri AR ve ER'nin bu iki nükleustaki ekspresyonlarının farklı olması ile açıklanmıştır (Navarro ve ark., 2004; Smith ve ark., 2006). Yapılan çalışmada AVPV'deki kisspeptin hücrelerinin açıkça ARC'dekinlerden farklı olduğu ve buradaki hücrelerin seksüel davranışlar gibi T merkezli olaylarda rol oynadığı görülmüştür (Smith, 2008).

Dişi farelerde de E, Kiss1 mRNA ekspresyonunu ARC'da inhibe ederken; AVPV'da ise indüklemektedir. Dişi sıçan, koyun ve farede overektominin ARC'de

Kiss1 ekspresyonunu baskıladığı ve bu etkinin östradiol replasmanı ile azaltıldığı gösterilmiştir (Smith, 2008). Dişilerde hemen hemen bütün Kiss1 hücreleri ER α 'ya sahipken, sadece % 25-30'luk bir kısmı ER β içermektedir (Navarro ve ark., 2004). ER α 'sı bloke edilmiş (ER α KO) farelerde, E-bağımlı regülasyonun kaybolduğu, buna karşın ER β KO farelerde ise bu regülasyonun bozulmadığı gösterilmiştir ki, bu durum E-bağımlı regülasyonun ER α üzerinden olduğunu kanıtlamaktadır (Smith, 2008).

Kiss1 mRNA ekspresyonu, AVPV'de dişilerde erkeklere kıyasla daha fazladır. Bu durum, AVPV'deki kisspeptin nöronların görevinin cinsiyete göre farklılık gösterdiğini işaret etmektedir (Aparicio, 2005; Gottsch ve ark., 2006). Ön beyindeki nükleuslarda Kiss1 mRNA regülasyonunun farklı olması HPG aksta Kiss1'in değişik fizyolojik fonksiyonlarının ortaya çıkmasında önemlidir. ARC, GnRH ve gonadotropin sekresyonu için negatif geri bildirim regülasyon merkezi olarak; AVPV ise dişilerdeki LH dalgasından sorumlu pozitif geri bildirim regülasyon merkezi olarak görev yapar (Şekil 1.10). AVPV'de, ER α,β ve PR bol miktarda bulunur. Bu reseptörler, ligandları ile bağlandıklarında LH sekresyonunu arttırarak LH dalgasına neden olmaktadır. Ayrıca AVPV'deki Kiss1 nöronlarının GnRH nöronları ile sinaps yaptığı, AVPV'de Kiss1 mRNA ekspresyonunun GnRH/LH salınımı ile paralel olarak aynı zamanda pik yaptığı ve dişilerde E-bağımlı Kiss1 mRNA indüksiyonunun preovulasyonda GnRH/LH dalgasında da rol oynadığı düşünülmektedir (Funes ve ark., 2003; Smith ve ark., 2006; Adachi ve ark., 2007). Kisspeptin antiserum uygulaması, dişi sıçanlarda LH salınımını tamamen ortadan kaldırmıştır (Kinoshita ve ark., 2005; Adachi ve ark., 2007).



Şekil 1.10. Farenin ön beyni içinde Kiss1 sinyal iletimi (Gottsch ve ark., 2006).

Östrojenin ARC ve AVPV'deki Kiss1 ekspresyonu üzerine olan farklı etkilerinin moleküler mekanizması henüz bilinmemektedir. Fakat PR'nün de bu fenomene katıldığı düşünülmektedir. Robertson ve ark. (2009), Kiss1 nöronlarının PR nöronları ile kolokalize ya da çok yakın olduğunu gözlemleyerek, E regülasyonundaki bu farklı etkilerin dopaminden kaynaklanabileceğini de vurgulamaktadır. Tirozin hidroksilaz ve Kiss1 mRNA'lar AVPV'da kolokalize olarak bulunurken, ARC'da kolokalize değildir. Bu nedenle AVPV'da E-bağımlı Kiss1 ekspresyonunun indüksiyonunda dopaminin de rolünün olduğu düşünülmektedir (Robertson ve ark., 2009).

1.3.6. Kisspeptin ve puberta

Puberta büyümenin hızlandığı, cinsel matürasyonun tamamlanarak reproduktif özelliklerin kazanıldığı, çocukluk döneminden erişkinliğe geçiş dönemidir ve bilindiği gibi, puberta başlangıcında GnRH atım jeneratör sistem aktivasyonu anahtar rol üstlenmektedir (Yazıcı, 2011). Kisspeptinin, GnRH nöronları üzerindeki direkt/dolaylı etkileri göz önünde tutulduğunda pubertal aktivasyonda da oldukça önemli bir role sahip olduğu kuşkusuzdur (Navarro ve ark., 2004; Shahab ve ark., 2005). Nitekim farklı türler ile yapılan çalışmalarda Kiss1 ve/veya Kiss1r ekspresyonunun pubertanın başlangıcı ile birlikte belirgin bir artış sergilediği gösterilmiştir (Han ve ark., 2005; Li ve ark., 2008; Clarkson ve ark., 2009). Ayrıca

insanlarda ve farelerde GPR54 genindeki delesyon ve mutasyonların idiopatik hipogonadotropik hipogonadizme (IHH) neden olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 1996). Farede yapılan bir çalışmada, puberta boyunca AVPV’de Kiss1 mRNA ekspresyonunun önemli derecede arttığı gösterilmiştir (Han ve ark., 2005). Aynı zamanda juvenil dişi sıçanlarda santral ve periferik yolla verilen kisspeptin, LH salınımını ve ovulasyonu stimule ederek vajinal açılmanın zamanlamasını kısaltmıştır (Matsui ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2004). Benzer şekilde, primatlarda da kisspeptin-54 sinyal frekansındaki artışın, puberta döneminin başlangıcında gerçekleştiği ifade edilerek pubertal dönemdeki kisspeptin sekresyonu artışı ile ilgili bulgular desteklenmektedir (Keen ve ark., 2008). Rhesus maymunlarında puberta boyunca ARC’de Kiss1 mRNA ekspresyonunun arttığı ve bununla ilişkili olarak LH sekresyonunda da artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Shahab ve ark., 2005).

1.4. Kisspeptin ve Melatonin

Çeşitli çalışmalar, Kiss1 nöronlarının fotoperiyodik kontrol altında olabileceğini göstermektedir (Smith ve ark., 2007; 2008; Martinez-Chavez ve ark., 2008; Kanda ve ark., 2008; Gingerich ve ark., 2009). Ancak, bu fotoperiyodik işaretlerin hangi yolla ve araçlar ile kisspeptin nöronlara etki ettiği hususunda pek çok soru cevapsız kalmaktadır. Fotoperiyodun, melatonin yolu ile Kiss1 nöronlarının reproduktif akstaki etkisini azalttığı öne sürülmüştür (Ansel ve ark., 2010). Hamsterlarda gün ışığının uzun olduğu fotoperiyotta melatonin uygulamasının, AVPV ve ARC’da Kiss1 mRNA seviyelerinde düşüşe neden olduğu; uzun günlerde kısırlaştırılmış hamsterlara verilen melatoninin ARC’da Kiss1 ekspresyonunu hızla inhibe ederken, AVPV’de etmediği, ayrıca kısa güne adapte edilmiş pinealektomili dişi ve erkek hamsterlarda Kiss1 mRNA seviyelerinin ARC’da artarken AVPV’de artmadığı gösterilmektedir (Ansel ve ark., 2011). Araştırmacılar bu çalışmada; melatoninin, Kiss1 ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkisinin, hipotalamusa direkt etki ile gerçekleştiğini ancak bu etkinin muhtemelen seks steroidlerine bağımlı olarak ikincil yoldan açığa çıktığını öne sürmüşlerdir.

Gingerich ve ark. (2009), kisspeptin nöronlarının klonal popülasyonlarında sıçanlarda melatoninin doğrudan etkilerini araştırmış ve 10 nm/24h melatonin uygulamasının kisspeptin gen ekspresyonunu azalttığını öne sürmüşlerdir.

Melatonin/kisspeptin etkileşimi ile ilgili çalışmalar daha çok mevsimsel üreme özelliği gösteren canlılarda yapılmış ve fotoperiyodik etkiler üzerinde durulmuştur. Pöliöstrik canlılarda ise mevcut çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı poliöstrik bir canlı olan sıçanlarda melatonin/kisspeptin etkileşimine ışık tutmaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırmada; pubertaya ulaşmamış, 25 günlük yaşta, 60-80 gram canlı ağırlıkta, 126 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan (Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı A.Ş./Ankara) kullanıldı. Çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapıldı, etik kurul tarafından onaylandı (AKÜHADYEK-Referans No-19-11).

2.2. Yöntem

Çalışma süresince hayvanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında (20-24°C) tutularak ticari pelet sıçan yemi ve normal çeşme suyu ile *ad libitum* beslendi. Sıçanlar kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş 19x12x12 cm ölçülerinde ve tabanı yonga talaşı ile döşenen kafeslerde barındırıldı. Deneysel hayvanlarında oluşabilecek stresi en düşük düzeyde tutabilmek için kafesler, çalışma süresince mümkün olan en az gürültülü ortamda bekletildi.

2.2.1. Hayvanların gruplandırılması

Çalışmada kullanılacak sıçanlar (n = 126) yol stresini azaltmak için bir gün süreyle dinlendirildi. İntramüsküler olarak ketamin (21,1 mg/kg, Ketalar, Pfizer, Türkiye) + ksilazin (4,2 mg/kg, Egevet, Alfazyn, Türkiye) ile anestezi edildikten sonra 27. gün yaşta 108 adet sıçana pinealektomi ve 18 adet sıçana sham pinealektomi operasyonları gerçekleştirildi. Hayvanlarda oluşabilecek postoperatif enfeksiyonları önlemek amacıyla üç gün süre ile insizyon bölgesi betadin ile pansuman edilerek intramüsküler yolla, 1 mg/kg dozda antibiyotik (Forsef, Bilim İlaç, Türkiye) uygulandı.

Sıçanlar 29 günlük yaşa ulaştığında ağırlıkları kayıt altına alınarak her bir grupta 18 sıçan olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol (Sham), pinealektomi (PE), melatonin (PE+M), kisspeptin (PE+Kiss), kisspeptin antagonisti (PE+KissA), melatonin + kisspeptin (PE+M+Kiss) ve melatonin + kisspeptin antagonisti (PE+M+KissA) olacak şekilde oluşturuldu. Herbir grupta gerçekleştirilen uygulamalar Çizelge 2.1’de sunuldu. Tüm gruplarda enjeksiyonlar 21:00-23:00 saatleri arasında yapıldı (Navarro ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2006). Hormon uygulamaları her gruptan 6 sıçan olacak şekilde (PE ve Sham hariç) 30 sıçana prepubertal 33. güne kadar; 30 sıçana siklus başlangıcından sonraki ilk foliküler döneme kadar; 30 sıçana ise siklus başlangıcından sonraki ilk luteal döneme kadar sürdürüldü. Sıçanlara 12 saatte bir vajinal açıklık kontrolü yapılırken, 33 günlük yaşta vajinal açıklık oluşmamış sıçanlardan her gruptan 6 sıçan alınarak son hormon uygulamasını takiben 20. dakikada genel anestezi altında kalplerinden kan alınarak ötenazileri sağlandı.

Her grupta kalan 12 sıçanda vajinal açıklık kontrolü ile vajinal açıklığın oluştuğu gün kayıt altına alınırken, 12 saatte bir olacak şekilde vajinal yıkama yöntemiyle östrus takibi yapıldı. Foliküler ve luteal dönemde bulunan tüm grupların her birinden 6 sıçana son enjeksiyon uygulamalarının 20. dakikasını takiben kalplerinden kan alınarak ötenazi gerçekleştirildi. Vajinal yıkamanın kontrolünün yapılması için alınan kanlarda progesteron düzeyi belirlendi (Quiñones-Jenab ve ark., 2000).

Çizelge 2.1. Deney gruplarında sıçanlara yapılan uygulamalar (Herbir grup için n=18).

Gruplar*	Uygulama	Günlük uygulama dozu ve uygulama yolu	Uygulama zamanı ve süresi ¹
Kontrol (Sham)	FTS	İP	21:00-23:00
PE	FTS	İP	21:00-23:00
PE + M	Melatonin	0,5 mg/kg, SK	21:00-23:00
PE + Kiss	Kisspeptin	1 mg/kg, İP	21:00-23:00
PE + KissA	Kisspeptin antagonisti	1 µg/kg, İP	21:00-23:00
PE + M + Kiss	Melatonin Kisspeptin	0,5 mg/kg, SK 1 µg/kg, İP	21:00-23:00
PE + M + KissA	Melatonin Kisspeptin antagonisti	0,5 mg/kg, SK 1 µg/kg, İP	21:00-23:00

***PE**; pinealektomi 0,1 ml/24 h serum fizyolojik (0,09 NaCl), intraperitoneal¹ (İP), **Sham**;

sham pinealektomi 0,1 ml/24 h serum fizyolojik (0,09 NaCl), intraperitoneal¹ (İP), **M**; melatonin (Sigma M5250) günlük 0,5 mg/kg subkutan¹ (SK), **Kiss**; kisspeptin (048-56, Phoenix Pharmaceuticals) günlük 1 µg/kg intraperitoneal¹ (İP), **KissA**; kisspeptin antagonisti (Kisspeptin-234, Sigma K2644) günlük 1 µg/kg intraperitoneal¹ (İP): Foliküler ve luteal dönemde olduğu belirlenen sıçanlarda ilave hormon uygulaması sonrasında ötenazileri yapıldı.

2.2.1.1 Pinealektomi prosedürü

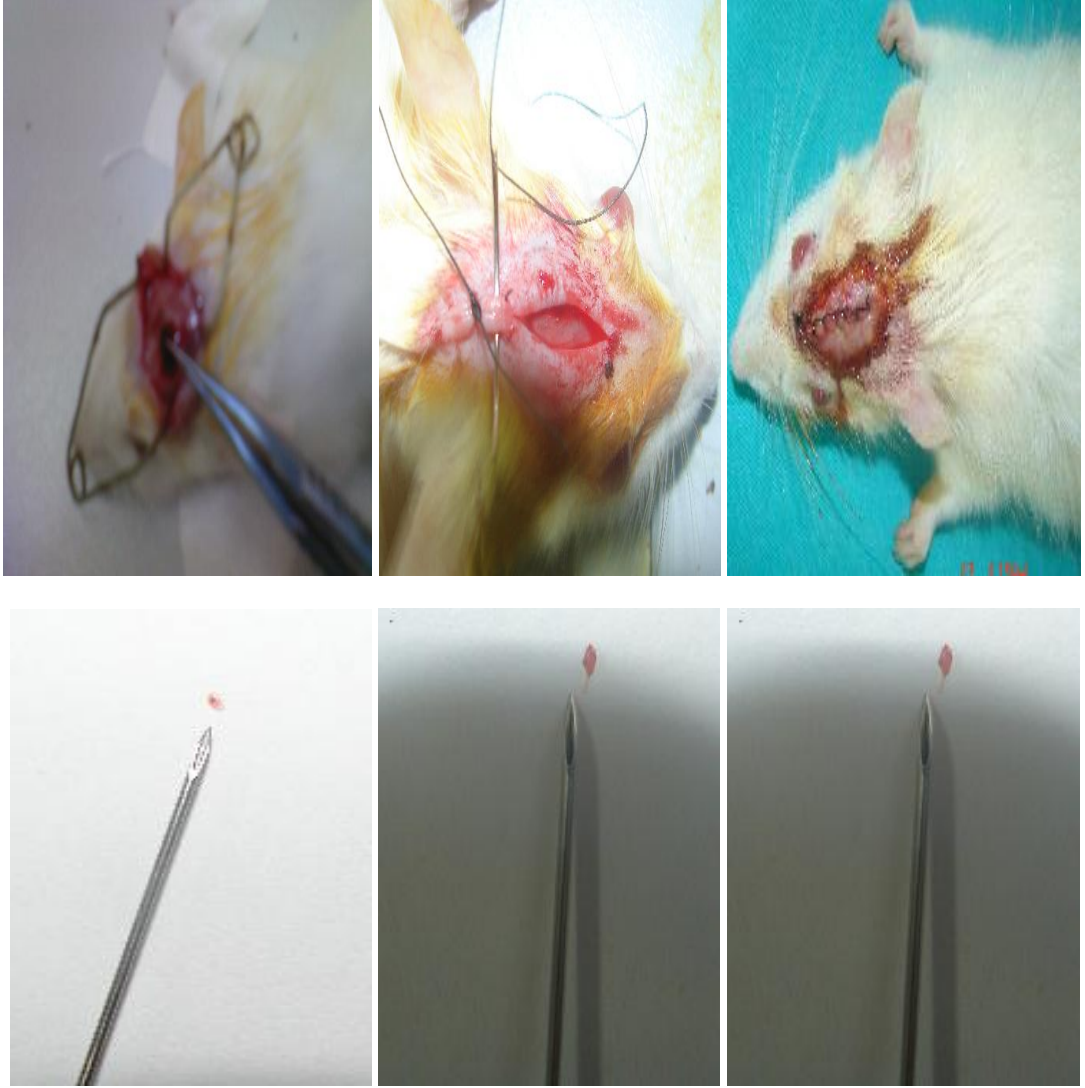
Operasyon öncesi sıçanların kafası tıraş edilerek insizyon bölgesi betadin ile temizlendi. Pinealektomi prosedüründe Kuszac ve Rodin (1977) modeli kullanıldı. Sıçanlarda, pinealektomi prosedürünü uygulamak amacıyla, skalp derisine orta hat insizyonu yapılarak, kalvaryum üzerindeki yumuşak doku temizlenerek diseke edildi. Sagittal sütür ile sağ transvers sütür birleşim noktasından tur cihazı ile 2-3 mm çapında delik açılarak, forseps yardımıyla dura materden ayrıldı. Dura mater, iris forsepsi ile yukarı ve kenara çekilerek pineal bez dikkatlice çıkarıldı. Deri 3/0 ipek ile satüre edildi (Resim 2.1). Eksize edilen pineal bezler histolojik olarak doğrulandı.



Resim 2.1. Sıçanlarda pineal bezin çıkarılması



Resim 2.1.Devam. Sıçanlarda pineal bezin çıkarılması



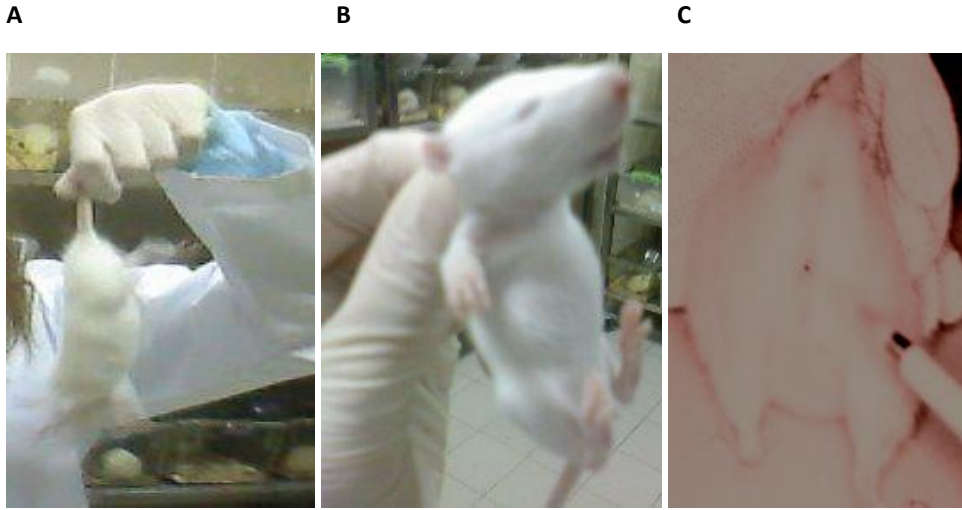
Resim 2.1.Devam. Sıçanlarda pineal bezin çıkarılması

2.2.1.2 Sham pinealektomi prosedürü

Operasyon öncesi sıçanların kafası tıraş edilerek insizyon bölgesi betadin ile temizlendi. Sıçanlarda, sham pinealektomi prosedürünü uygulamak amacıyla skalp derisine orta hat insizyonu yapılarak, kalvaryum üzerindeki yumuşak doku temizlenerek diseke edildi. Sagittal suture ile sağ transvers suture birleşim noktasından tur cihazı ile 2-3 mm çapında delik açılarak forseps yardımıyla dura materden ayrıldı. Pineal beze dokunulmadan tekrar deri 3/0 ipek ile satüre edildi.

2.2.2. Vajinal yıkama yöntemi ile östrus siklusunun tespit edilmesi

Sıçanlar buldukları kafesten nazikçe kuyruklarından tutularak çıkarıldıktan sonra hareketsizliği sağlamak için ense bölgesinden postu sıkıca kavranarak vajinal yıkamaları yapıldı. Vajinal yıkamada, öncelikle plastik pipet yardımıyla vajina içerisine 10 µl % 0,9 NaCl (serum fizyolojik) uygulandı ve daha sonra aynı pipet ile vajen içerisindeki sıvı toplandı. Toplanan vajen sıvısı lamel üzerine aseptik şekilde yerleştirildikten sonra alınan örnek ışık mikroskobu (Olympus marka CX21FS1 model) altında x10 ve/veya x40 mercekle incelendi. İşlem sırasında her hayvan için ayrı lamel ve pipet kullanıldı (Resim 2.2).



Resim 2.2. Sıçanlarda tutuş ve vajinal yıkama

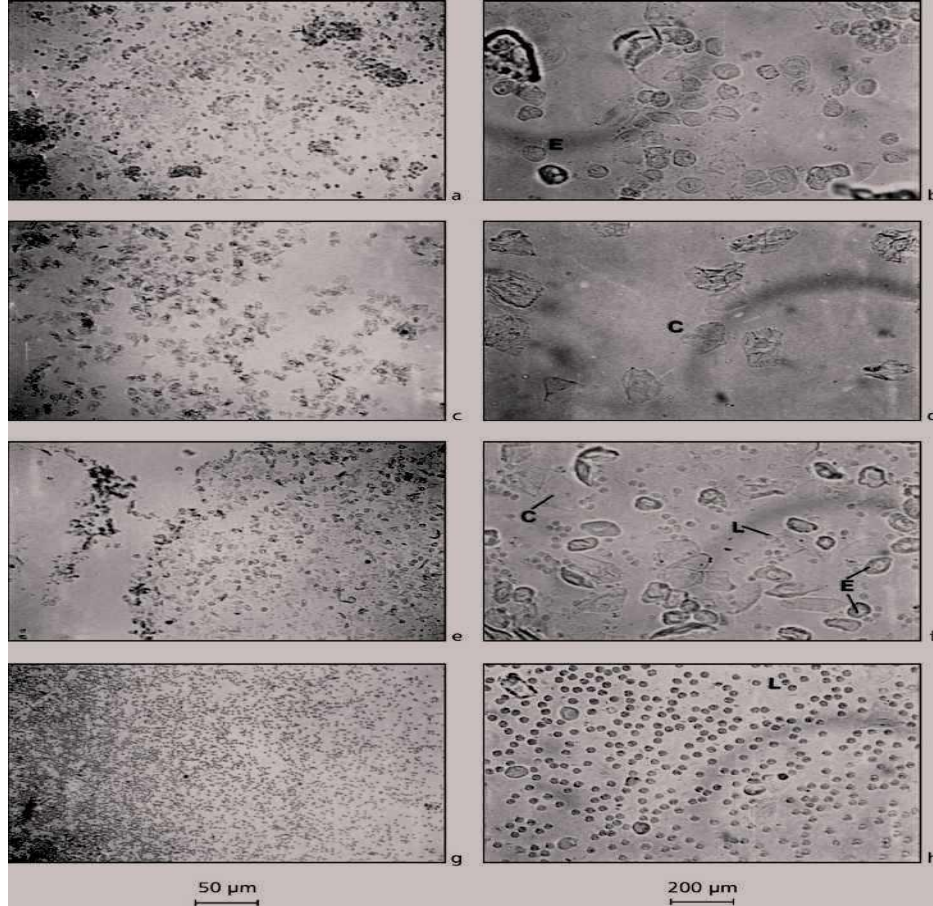
A. Sıçanların kafesten çıkarılması, B. Tutuş şekli, C. Vajinal yıkama

Vajen sıvısında, östrus siklusu evrelerinin belirlenmesinde Marcondes ve ark. (2002) tarafından tanımlanan üç tip hücre modeline göre siklus belirlendi (Şekil 2.1).

2.2.3. Melatonin, GnRH, FSH, LH ve progesteron hormon düzeylerinin belirlenmesi

Araştırmanın; prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal döneminde normal tüplere alınan sıçan kan örnekleri +4 °C'de 12 saat bekletildikten sonra +4 °C'de 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumlar elde edildi. Elde edilen serumlarda

Melatonin (CSB-E13433r), GnRH (CSB-E08037r), FSH (CSB-E06869r), LH (CSB-E12654r) ve progesteron (DRG-EI1561) hormonları sıçana özgü ticari ELİSA kitleri kullanılarak belirlendi (MWGt Lambda Scan 200, Bio-Tek Instruments).



Şekil 2.1. Sıçanlarda östrus siklusunun farklı dönemlerine göre vajinal yıkantıda gözlenen hücre tipleri. L: lökositler, E: epitel hücreler, C: kornifiye hücreler. a, b: çekirdekli epitel hücrelerin baskın olarak gözleendiği proöstrus evresi, c, d: çekirdeksiz kornifiye hücrelerin gözleendiği östrus evresi, e, f: aynı oranda lökosit, kornifiye ve çekirdekli epitel hücrelerin gözleendiği metöstrus evresi, g, h: lökositlerin baskın olarak gözleendiği diöstrus evresi (Marcondes ve ark., 2002).

2.3. İstatistiksel Değerlendirme

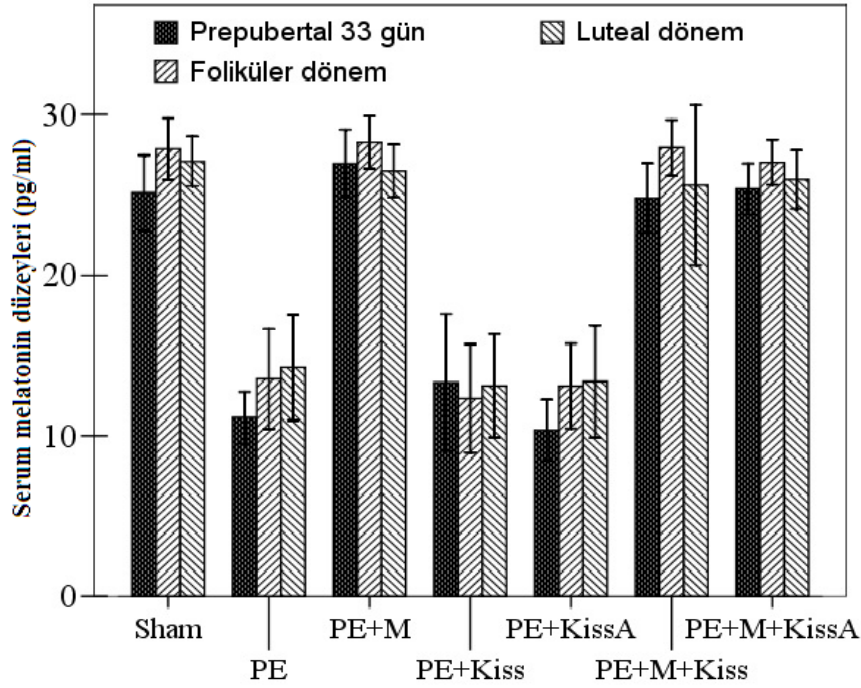
Araştırmada elde edilen hormon düzeyi sonuçlarında; gruplar arasındaki fark ANOVA testi, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı da TUKEY testi ile belirlendi (SPSS 16.0). Tüm sonuçlar ortalama \pm SE olarak sunuldu ve minimum önemlilik $p < 0,05$ kabul edildi.

3. BULGULAR

Sıçanların prepubertal (33. gün), foliküler ve luteal dönemlere ait serum melatonin düzeyleri Çizelge 3.1’de, vajinal açıklık yaşı (gün) ile ilk siklus görülme zamanı (gün), hormon uygulamaları başlamadan önceki ilk ve siklus başlangıcındaki vücut ağırlıkları (gram) Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

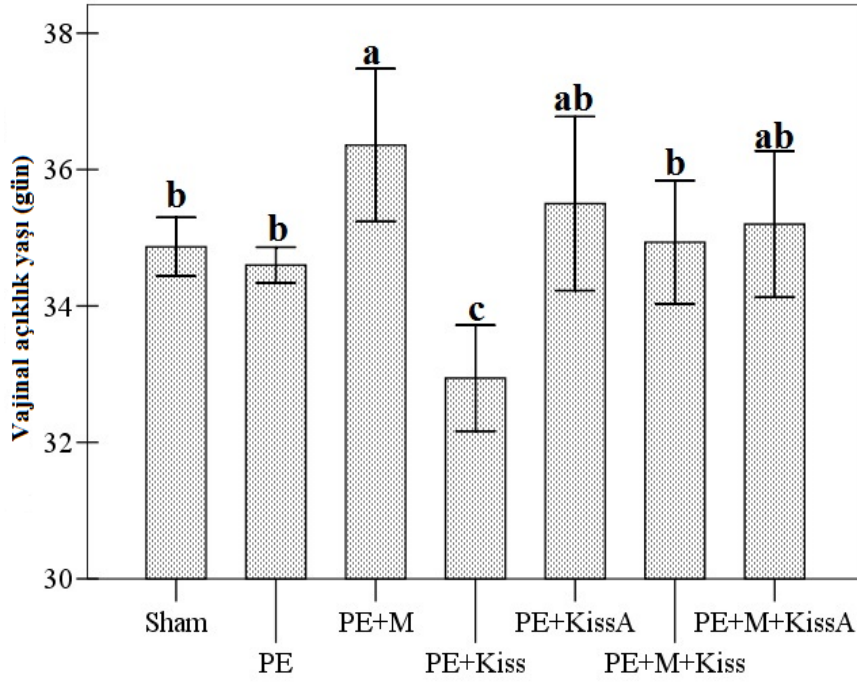
Araştırmada serum melatonin düzeyi; Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla prepubertal 33. günde $27,36\pm 0,88$, $11,59\pm 0,55$, $27,15\pm 0,77$, $13,03\pm 1,23$, $10,78\pm 0,79$, $25,13\pm 0,71$ ve $25,78\pm 0,70$ pg/ml; peripubertal foliküler dönemde $25,94\pm 0,56$, $13,54\pm 1,20$, $28,26\pm 0,66$, $12,33\pm 1,31$, $13,10\pm 1,02$, $26,87\pm 1,17$ ve $27,03\pm 0,57$ ng/ml; peripubertal luteal dönemde ise $25,49\pm 0,69$, $14,25\pm 1,28$, $26,43\pm 0,92$, $13,11\pm 1,25$, $13,38\pm 1,36$, $25,59\pm 1,79$ ve $25,92\pm 0,64$ ng/ml olarak belirlenmiştir. Gruplarda her üç dönemde de serum melatonin düzeyi; Sham, PE+M, PE+M+Kiss, PE+M+KissA gruplarında PE, PE+Kiss, PE+KissA gruplarına kıyasla yüksek belirlenmiştir ($p<0,001$). Ancak Sham, PE+M, PE+M+Kiss, PE+M+KissA grupları kendi aralarında ve PE, PE+Kiss, PE+KissA grupları da kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Gruplarda prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönem serum melatonin düzeyi bakımından dönemlere göre fark görülmemiştir (Grafik 3.1).



Grafik 3.1. Prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönem serum melatonin düzeyleri (pg/ml). Herbir grup içerisinde istatistiksel fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). **Sham**; sham pinealektomi, **PE**; pinealektomi, **PE+M**; melatonin, **PE+Kiss**; kisspeptin, **PE+KissA**; kisspeptin antagonisti, **PE+M+Kiss**; melatonin+kisspeptin, **PE+M+KissA**; melatonin+kisspeptin antagonisti.

Gruplarda vajinal açıklık yaşının Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $34,86\pm 0,21$, $34,60\pm 0,13$, $36,35\pm 0,56$, $32,94\pm 0,38$, $35,50\pm 0,63$, $34,93\pm 0,45$ ve $35,20\pm 0,57$ gün olarak belirlenmiştir (Grafik 3.2). Vajinal açıklık yaşı bakımından Sham, PE, PE+M, PE+KissA ve PE+M+KissA grupları arasında fark görülmezken; vajinal açıklık yaşının bu gruplara göre PE+M grubunda arttığı, PE+Kiss grubunda ise azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.2; $p<0,001$).



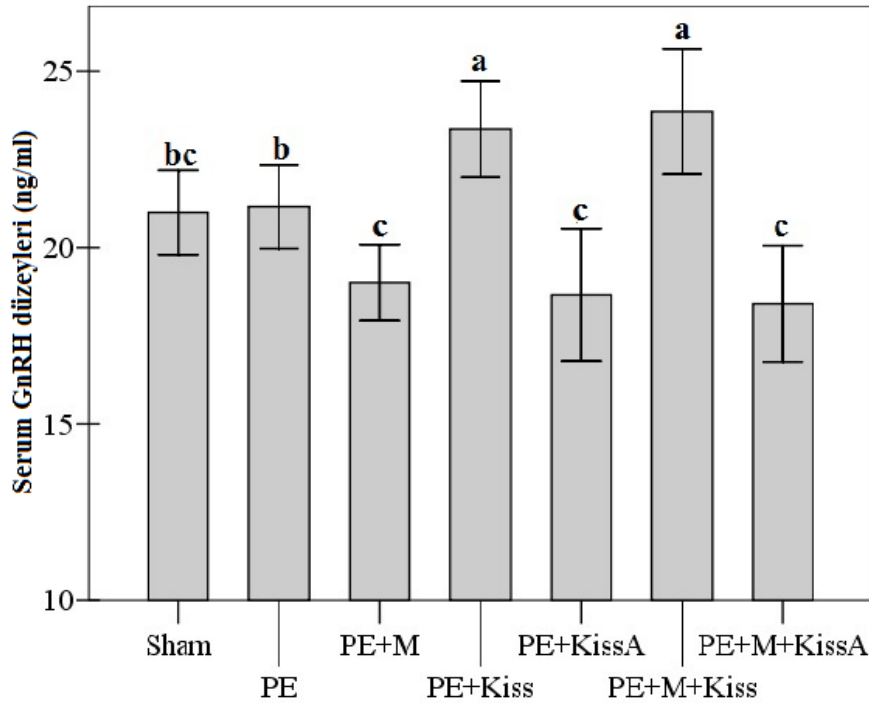
Grafik 3.2. Gruplarda ortalama vajinal açıklık yaşı (gün). Farklı harfler (a, b, c) gruplar arasında fark ifade eder ($p<0,001$). **Sham**; sham pinealektomi, **PE**; pinealektomi, **PE+M**; melatonin, **PE+Kiss**; kisspeptin, **PE+KissA**; kisspeptin antagonisti, **PE+M+Kiss**; melatonin+kisspeptin, **PE+M+KissA**; melatonin+kisspeptin antagonisti.

Siklus başlangıç zamanı Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss, PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $36,41\pm0,42$, $35,70\pm0,23$, $37,24\pm0,49$, $35,07\pm0,17$, $37,12\pm0,54$, $36,03\pm0,25$ ve $37,40\pm0,48$ gün olarak tespit edilmiştir. Ortalama siklus başlangıç zamanı bakımından Sham, PE, PE+KissA ve PE+M+KissA grupları arasında fark görülmezken; bu gruplara kıyasla PE+Kiss grubunda ortalama siklus başlangıç zamanının azaldığı ve Sham, PE gruplarına kıyasla ise PE+M grubunda arttığı belirlenmiştir (Çizelge 3.2; $p<0,001$).

Araştırmada kullanılan sıçanların araştırma başlangıç canlı ağırlıkları; Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $75,66\pm3,60$, $74,09\pm2,19$, $75,85\pm3,04$, $73,50\pm1,72$, $74,00\pm3,11$, $73,80\pm3,26$, $73,57\pm1,82$ gram; pubertaya erişme günündeki ağırlıkları aynı gruplarda sırasıyla $105,90\pm5,25$, $99,88\pm5,41$, $90,63\pm3,65$, $103,30\pm3,63$, $100,20\pm4,62$, $100,60\pm5,24$ ve $93,90\pm3,06$ gram olarak belirlenmiştir. Buna göre araştırma başlangıcı ve pubertaya erişme günü canlı ağırlıklar bakımından gruplar arasında fark görülmemiştir (Çizelge 3.2; $p>0,05$).

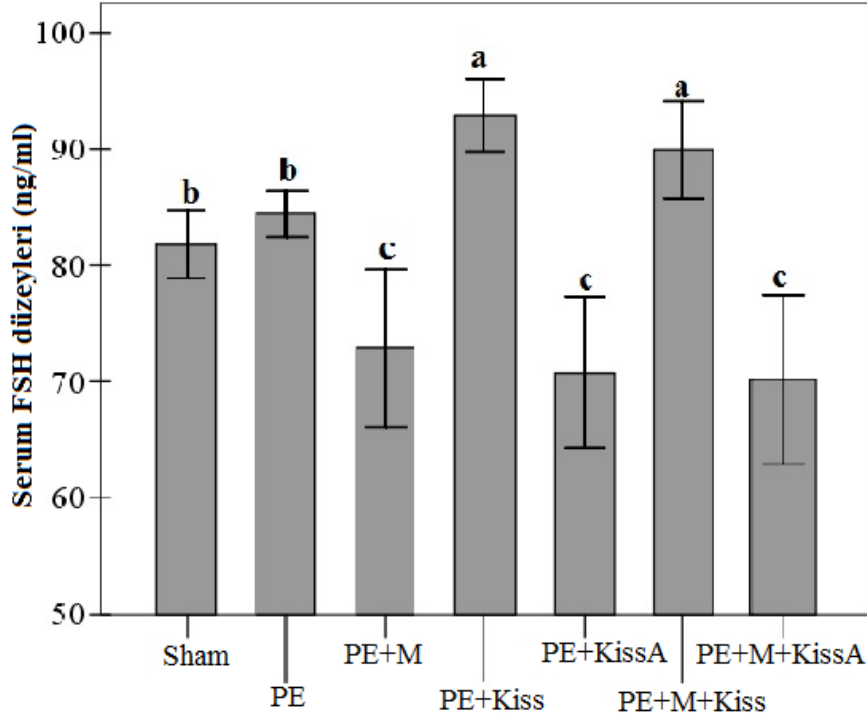
Araştırma grubunda yer alan sıçanların prepubertal 33. gün, serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Prepubertal 33. gün serum GnRH düzeyi; Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $20,99\pm 0,81$, $21,15\pm 0,59$, $19,00\pm 0,53$, $23,45\pm 0,68$, $18,65\pm 0,99$, $23,85\pm 0,88$ ve $18,40\pm 0,52$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Buna göre serum GnRH düzeyinin PE+Kiss ve PE+M+Kiss gruplarında Sham ve PE gruplarına göre arttığı; PE+M, PE+KissA, PE+M+KissA gruplarına göre ise azaldığı belirlenmiştir (Grafik 3.3; $p<0,05$).



Grafik 3.3. Gruplarda prepubertal 33. gün serum GnRH düzeyleri (ng/ml). Farklı harfler (a, b, c) gruplar arasında fark ifade eder ($p<0,05$). **Sham**; sham pinealektomi, **PE**; pinealektomi, **PE+M**; melatonin, **PE+Kiss**; kisspeptin, **PE+KissA**; kisspeptin antagonisti, **PE+M+Kiss**; melatonin+kisspeptin, **PE+M+KissA**; melatonin+kisspeptin antagonisti.

Sıçanların prepubertal 33. gün serum FSH düzeyleri incelendiğinde ise Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $81,76\pm 1,44$, $84,45\pm 0,99$, $72,88\pm 3,37$, $92,89\pm 1,56$, $70,74\pm 3,25$, $89,27\pm 2,18$ ve $70,15\pm 3,61$ ng/ml olduğu görülmüştür. Buna göre; serum FSH düzeyinin Sham ve PE gruplarına kıyasla PE+Kiss, PE+M+Kiss gruplarında yükseldiği; PE+M, PE+KissA, PE+M+KissA gruplarında azaldığı belirlenmiştir (Grafik 3.4; $p<0,001$).



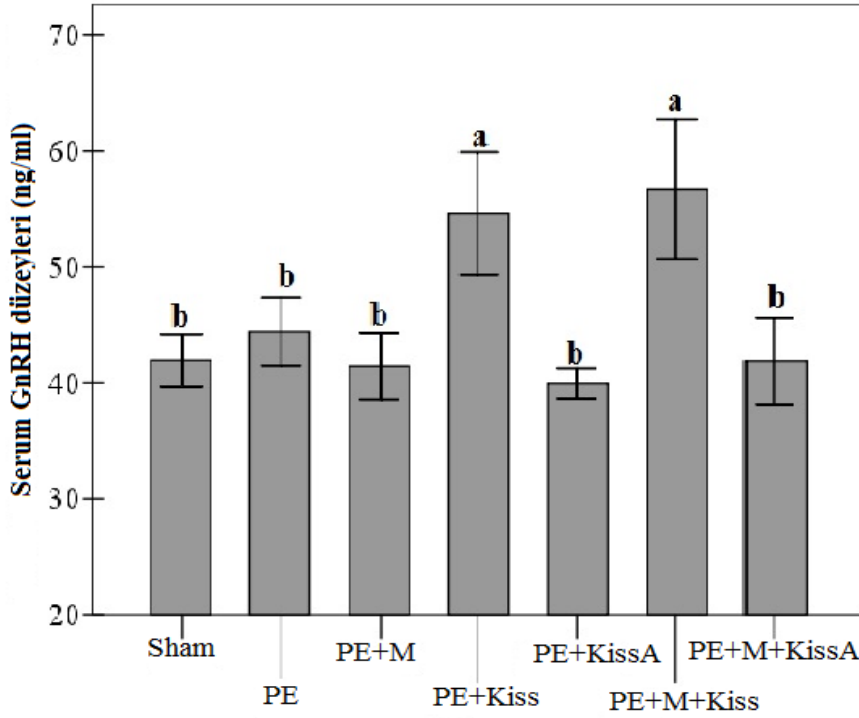
Grafik 3.4. Gruplarda prepubertal 33. gün serum FSH düzeyleri (ng/ml). Farklı harfler (a, b, c) gruplar arasında fark ifade eder ($p < 0,000$). **Sham**; sham pinealektomi, **PE**; pinealektomi, **PE+M**; melatonin, **PE+Kiss**; kisspeptin, **PE+KissA**; kisspeptin antagonisti, **PE+M+Kiss**; melatonin+kisspeptin, **PE+M+KissA**; melatonin+kisspeptin antagonisti.

Prepubertal 33. gün serum LH düzeyleri Sham, PE, PE+Kiss, PE+M+Kiss, PE+M, PE+KissA ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $9,06 \pm 0,97$, $10,49 \pm 0,42$, $11,98 \pm 0,59$, $10,83 \pm 1,81$, $9,10 \pm 0,79$, $9,66 \pm 0,55$ ve $9,30 \pm 1,33$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Sıçanlarda serum LH düzeyi açısından gruplar arasında fark tespit edilmemiştir (Çizelge 3.3; $p > 0,05$).

Araştırma grubundaki sıçanların foliküler dönem serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Sıçanların peripubertal foliküler dönem serum GnRH düzeyleri; Sham, PE, PE+Kiss, PE+M+Kiss, PE+M, PE+KissA ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $41,94 \pm 1,12$, $44,41 \pm 1,46$, $54,61 \pm 2,64$, $56,68 \pm 3,01$, $41,43 \pm 1,43$, $39,94 \pm 0,65$ ve $41,87 \pm 1,86$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Buna göre foliküler dönem serum GnRH seviyesi PE+Kiss ve PE+M+Kiss deney gruplarında diğer gruplara kıyasla yüksek bulunmuştur (Grafik 3.5; $p < 0,001$).

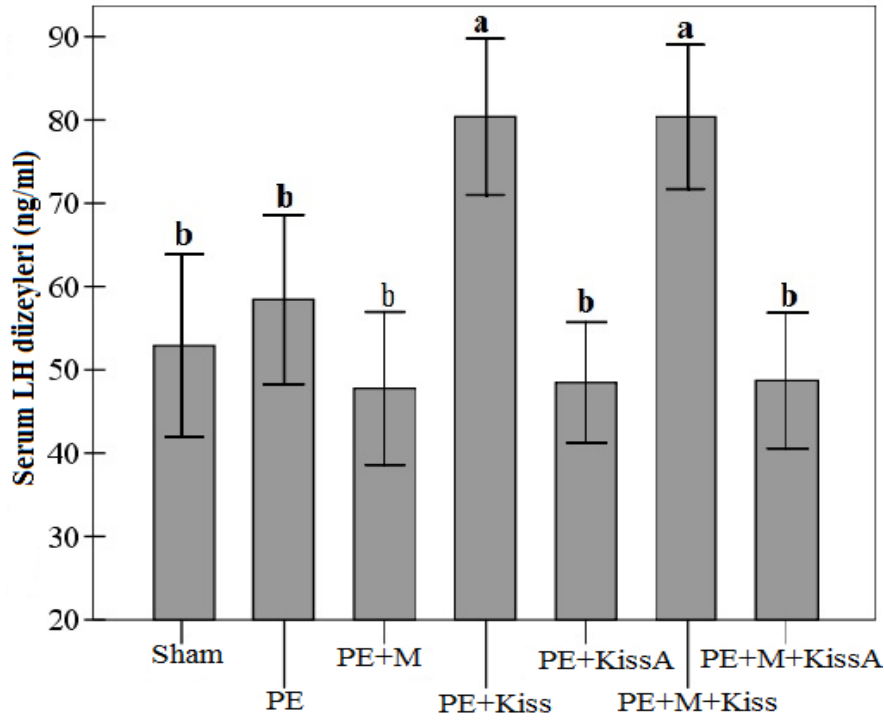
Foliküler dönem serum FSH düzeyleri ise Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $284,03 \pm 14,33$,

276,59±23,11, 252,94±23,11, 322,07±31,22, 274,42±26,21, 305,02±22,11 ve 258,18±29,33 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Serum FSH düzeyi açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır (Çizelge 3.4; $p>0,05$).



Grafik 3.5. Graplarda foliküler dönem serum GnRH düzeyleri (ng/ml). Farklı harfler (a, b, c) gruplar arasında fark ifade eder ($p<0,000$). **Sham**; sham pinealektomi, **PE**; pinealektomi, **PE+M**; melatonin, **PE+Kiss**; kisspeptin, **PE+KissA**; kisspeptin antagonisti, **PE+M+Kiss**; melatonin+kisspeptin, **PE+M+KissA**; melatonin+kisspeptin antagonisti.

Sıçanların foliküler dönem serum LH düzeyleri; Sham, PE, PE+M, PE+Kiss, PE+KissA, PE+M+Kiss ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla 52,89±5,48, 58,44±5,08, 47,77±4,59, 80,38±4,69, 48,47±3,62, 80,36±4,33 ve 48,71±4,07 ng/ml olarak gözlemlenmiştir. Buna göre foliküler dönem serum LH düzeyinin, PE+Kiss ve PE+M+Kiss gruplarında diğer gruplara kıyasla yüksek olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.6; $p<0,001$).



Grafik 3.6. Gruplarda foliküler dönem serum LH düzeyleri (ng/ml). Farklı harfler (a, b, c) gruplar arasında fark ifade eder ($p < 0,000$). **Sham**; sham pinealektomi, **PE**; pinealektomi, **PE+M**; melatonin, **PE+Kiss**; kisspeptin, **PE+KissA**; kisspeptin antagonisti, **PE+M+Kiss**; melatonin+kisspeptin, **PE+M+KissA**; melatonin+kisspeptin antagonisti.

Araştırma grubundaki sıçanların luteal dönem serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre luteal dönem serum GnRH düzeyleri; Sham, PE, PE+Kiss, PE+M+Kiss, PE+M, PE+KissA ve PE+M+KissA gruplarında sırasıyla $25,70 \pm 0,54$, $27,19 \pm 0,36$, $28,63 \pm 0,68$, $27,83 \pm 0,73$, $27,21 \pm 1,57$, $26,78 \pm 1,11$ ve $27,38 \pm 0,98$ ng/ml; serum FSH düzeyleri aynı sırayla $57,44 \pm 4,29$, $59,29 \pm 4,34$, $55,96 \pm 3,43$, $50,05 \pm 3,10$, $57,88 \pm 6,99$, $49,24 \pm 3,12$ ve $54,75 \pm 3,39$ ng/ml; serum LH seviyeleri ise $4,84 \pm 0,40$, $6,00 \pm 0,43$, $6,67 \pm 0,87$, $5,04 \pm 0,55$, $5,07 \pm 0,21$, $5,75 \pm 0,80$ ve $6,41 \pm 0,63$ ng/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgulara göre luteal dönem serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri açısından istatistiksel fark yoktur ($p > 0,05$).

Çizelge 3.1. Gruplarda prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal evre serum melatonin düzeyleri (pg/ml).

	Sham	PE	PE+M	PE+Kiss	PE+KissA	PE+M+Kiss	PE+M+KissA	p <
Prepubertal 33. gün	27,36±0,88a	11,59±0,55b	27,15±0,77a	13,03±1,23b	10,78±0,79b	25,13±0,71a	25,78±0,70a	0,001
Foliküler dönem	25,94±0,56a	13,54±1,20b	28,26±0,66a	12,33±1,31b	13,10±1,02b	26,87±1,17a	27,03±0,57a	0,001
Luteal dönem	25,49±0,69a	14,25±1,28b	26,43±0,92a	13,11±1,25b	13,38±1,36b	25,59±1,79a	25,92±0,64a	0,001

a, b: Herbir satırdaki farklı harfler arasında istatistiksel önem vardır.

Sham: Sham pinealektomi grubu; PE: Pinealektomi grubu; PE+M: Pinealektomi+Melatonin grubu; PE+Kiss: Pinealektomi+Kisspeptin grubu; PE+M+Kiss: Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin grubu; PE+KissA: Pinealektomi+Kisspeptin Antagonisti grubu; PE+M+KissA: Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin Antagonisti grubu.

Çizelge 3.2 Gruplarda vajinal açıklık yaşı (gün),siklus başlangıç yaşı (gün) ile başlangıç ve kesim canlı ağırlığı (gram)

	Sham	PE	PE+M	PE+Kiss	PE+KissA	PE+M+Kiss	PE+M+KissA	p <
Başlangıç ağırlığı	75,66±3,60	74,09±2,19	75,85±3,04	73,50±1,72	74,00±3,11	73,80±3,26	73,57±1,82	0,994
Siklus baş. ağırlığı	105,90±5,25	99,88±5,41	90,63±3,65	103,30±3,63	100,20±4,62	100,60±5,24	93,90±3,06	0,201
Vajinal açık. yaşı	34,86±0,21b	34,60±0,13b	36,35±0,56a	32,94±0,38c	35,50±0,63ab	34,93±0,45b	35,20±0,57ab	0,000
Siklus baş. yaşı	36,41±0,42ab	35,70±0,23bc	37,24±0,49a	35,07±0,17c	37,12±0,54a	36,03±0,25bc	37,40±0,48a	0,001

a, b, c: Herbir satırdaki farklı harfler arasında istatistiksel önem vardır

Sham: Sham pinealektomi grubu; **PE:** Pinealektomi grubu; **PE+M:** Pinealektomi+Melatonin grubu; **PE+Kiss:** Pinealektomi+Kisspeptin grubu; **PE+M+Kiss:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin grubu; **PE+KissA:** Pinealektomi+Kisspeptin Antagonisti grubu; **PE+M+KissA:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin Antagonisti grubu.

Çizelge 3.3. Gruplarda prepubertal 33. gün serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri (ng/ml).

	Sham	PE	PE+M	PE+Kiss	PE+KissA	PE+M +Kiss	PE+M+KissA	p <
GnRH	20,99±0,81bc	21,15±0,59bc	19,00±0,53d	23,45±0,68a	18,65±0,94d	23,85±0,88a	18,40±0,52d	0,01
FSH	81,76±1,44b	84,45±0,99b	72,88±3,37c	92,89±1,56a	70,74±3,25c	89,27±2,18a	70,15±3,61c	0,001
LH	9,06±0,97	10,49±0,42	9,10±0,79	11,98±0,59	9,66±0,55	10,83±1,81	9,30±1,33	0,294

a, b, c, d: Herbir satırdaki farklı harfler arasında istatistiksel önem vardır.

Sham: Sham pinealektomi grubu; **PE:** Pinealektomi grubu; **PE+M:** Pinealektomi+Melatonin grubu; **PE+Kiss:** Pinealektomi+Kisspeptin grubu; **PE+M+Kiss:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin grubu; **PE+KissA:** Pinealektomi+Kisspeptin Antagonisti grubu; **PE+M+KissA:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin Antagonisti grubu.

Çizelge 3.4. Gruplarda foliküler dönem serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri (ng/ml).

	Sham	PE	PE+M	PE+Kiss	PE+KissA	PE+M+Kiss	PE+M +KissA	p <
GnRH	41,94±1,12b	44,41±1,46b	41,43±1,43b	54,61±2,64a	39,94±0,65b	56,68±3,01a	41,87±1,86b	0,001
FSH	284,03±14,33	276,59±23,11	252,94±23,11	322,07±31,22	274,42±26,21	305,02±22,11	258,18±29,33	0,134
LH	52,89±5,48b	58,44±5,08b	47,77±4,59b	80,38±4,69a	48,47±3,62b	80,36±4,33a	48,71±4,07b	0,001

a, b: Herbir satırdaki farklı harfler arasında istatistiksel önem vardır.

Sham: Sham pinealektomi grubu; **PE:** Pinealektomi grubu; **PE+M:** Pinealektomi+Melatonin grubu; **PE+Kiss:** Pinealektomi+Kisspeptin grubu; **PE+M+Kiss:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin grubu; **PE+KissA:** Pinealektomi+Kisspeptin Antagonisti grubu; **PE+M+KissA:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin Antagonisti grubu.

Çizelge 3.5. Gruplarda luteal dönem serum GnRH, FSH ve LH düzeyleri (ng/ml).

	Sham	PE	PE+M	PE+Kiss	PE+KissA	PE+M+K	PE+M+KissA	p <
GnRH	25,70±0,54	27,19±0,36	27,21±1,57	28,63±0,68	26,78±1,11	27,83±0,73	27,38±0,98	0,467
FSH	57,44±4,29	59,29±4,34	57,88±6,99	55,96±3,43	49,24±3,12	50,05±3,10	54,75±3,39	0,445
LH	4,84±0,40	6,00±0,43	5,07±0,21	6,67±0,87	5,75±0,80	5,04±0,55	6,41±0,63	0,243

Sham: Sham pinealektomi grubu; **PE:** Pinealektomi grubu; **PE+Kiss:** Pinealektomi+Kisspeptin grubu; **PE+M+Kiss:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin grubu; **PE+M:** Pinealektomi+Melatonin grubu; **PE+KissA:** Pinealektomi+Kisspeptin Antagonisti grubu; **PE+M+KissA:** Pinealektomi+Melatonin+Kisspeptin Antagonisti grubu.

4. TARTIŞMA

Melatonin hormonunun, pineal bez dışında retina (Kvetnoy 1999), bağırsak (Bubenik ve Brown 1997), ovaryum (Tamura ve ark., 2008) gibi birçok organ ve dokuda salındığı gösterilmiş olmasına karşın; sistemik kan dolaşımındaki günlük sirkadiyen melatonin ritmi, tamamen pineal bezden salgılanan melatonin ile ilişkilidir (Arendt, 1988; Tosini ve Fukuhara 2002). Nitekim, yapılan araştırmalarda pineal bezden kana salınan melatoninin diğer kaynaklardan 20 ile 1000 kat fazla olduğu belirlenmiştir (Dubocovich ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007). Klinik bir tablonun sonucu ya da deneysel olarak sempatik sinirlerin kesilmesi, gangliotomi veya pinealektomi durumlarında melatonin sentez ve sirkadiyen salınım ritminin bozulması sonucu, geceleri pineal bez ve sistemik dolaşımdaki melatonin düzeyinde artış olmadığı, dahası plazma melatonin düzeyinin bu durumlarda ölçülemeyecek seviyelere düştüğü gösterilmiştir (Dubocovich ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007). Bu nedenle pinealektomi modeli, melatonin hormonunun çeşitli sistemler üzerine etkilerinin değerlendirildiği araştırmalarda yaygın olarak uygulanmaktadır (Ataş, 1998; Dubocovich ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007; Moğulkoç ve Baltacı, 2008). Bu çalışmada da melatonin hormonunun etkilerinin incelenebilmesi için pinealektomi modeli kullanılmıştır.

Melatonin düşük toksisite göstermesinden dolayı çalışmalarda 0,1 mg'dan 2000 mg'a kadar çok geniş bir doz aralığında uygulanmaktadır. (Sack ve ark, 1998; Özşahin, 2006). Buna karşın melatoninin 0,5 mg'ın üzerindeki dozları farmakolojik doz olarak kabul edilir ve bu dozlar endojen pik seviyelerinin üzerinde bir serum konsantrasyonuna neden olmaktadır (Özşahin, 2006). Fizyolojik dozlarda ise intraperitoneal ve subkutan uygulamaları takiben 20-45 dakikada sistemik dolaşıma geçerek en yüksek plazma düzeyine çıkmaktadır (Dawson ve ark., 1996; Uz ve ark., 1996). Bu çalışmada melatonin, fizyolojik etkilerini değerlendirmek için 0,5 mg/kg dozunda uygulanmış, son uygulamayı takiben 20 dakika sonra sıçanlardan kan alınmıştır.

Bu çalışmada, prepubertal 33. gün ile foliküler ve luteal dönemlerde serum melatonin düzeyinin melatonin uygulanmayan pinealektomili gruplarda Sham grubuna göre önemli düzeyde azaldığı görüldü (Çizelge 3.1; $p < 0,001$). Bubenik ve Brown (1997), sağlıklı sıçanlarda serum 20,1 pg/ml olan melatonin düzeyinin, pinealektomi sonrasında 8,6 pg/ml'e düştüğünü gözlemlemiştir. Dardes ve ark. (2000), pinealektomize sıçanlarda plazma melatonin düzeyinin azaldığını, ancak tamamen kaybolmadığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde melatoninin idrardaki metaboliti olan 6-sulphatoxymelatoninin de pinealektomi sonrası % 20 oranında azaldığı bildirilmiştir (Dardes ve ark., 2000; Bubenik 2002). Çalışmamızda prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönemde melatonin uygulanmayan pinealektomili gruplarda (PE+Kiss ve PE+KissA) ve PE grubunda, Sham grubuna göre melatonin düzeyinin düşmesi literatürlerle uyumlu bulunmakla beraber aynı zamanda yapılan pinealektomi operasyonunun da başarılı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda aynı zamanda serum melatonin düzeyi bakımından PE grubu ile PE+Kiss grupları arasında fark belirlenmemesi ($p > 0,05$), kisspeptin uygulamasının melatonin salınımını etkilemediğini göstermektedir. Melatonin uygulamasının mevsimsel üreme özelliği gösteren hamsterlarda kısa gün periyotta hipotalamusta kisspeptin salınımını azalttığı bildirilmesine karşın (Revel ve ark., 2006; Ansel ve ark., 2010), kisspeptinin melatonin salınımı üzerine olan etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, tüm gruplarda prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönem serum melatonin düzeyi bakımından dönemlere göre istatistiksel fark görülmedi (Grafik 3.1). Buna karşın pek çok çalışmada melatoninin sekresyon periyodunun, gelişim dönemlerine göre farklılık gösterdiği ifade edilmektedir (Hariharasubramanian ve ark., 1986; Mortola ve ark., 1993; Römsing ve ark., 2003). Pong ve ark. (1984), yetişkin sıçanlar ile kıyaslandığında prepubertal dönemde serum melatonin düzeyinin yüksek olduğunu, benzer şekilde Waldhauser ve Dietzel (1985) de prepubertal dönemde yüksek seyreden serum melatonin düzeyinin seksüel olgunlaşmanın ilk sinyalleri ile birlikte düştüğünü belirtmişlerdir. Pubertal döneme gelindiğinde ise üreme siklusunun ana iki evresinde de melatonin plazma seviyesinde farklılıklar mevcuttur. Yapılan çalışmalar

plazma melatonin düzeyinin luteal evrede artış gösterdiğini foliküler evrede ise düşük seviyelerde seyrettiğini göstermektedir (Hariharasubramanian ve ark., 1984; Hariharasubramanian ve ark., 1986; Römsing ve ark., 2003). İnsanlarda ise ovulasyondan hemen önceki sabaha ait serum melatonin yoğunluğunun düşük olduğu ve bunun preovulatör LH pikini kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Arendt, 1988). Ancak sonraki çalışmalar normal siklusun seyri boyunca melatonin sekresyonunun fazının ve amplitudünün değişmediğini göstermiştir (Mortola ve ark., 1993; Shinohara ve ark., 2000). Bu çalışmada prepubertal 33. gün ile foliküler ve luteal dönemlerde serum melatonin düzeyinde fark belirlenememesi; biyolojik melatonin salınımının pinealektomi sonucu baskılanması, sentez basamaklarının gerçekleşmemesi ve melatoninin dışardan uygulanması nedeniyle olabilir.

Dişi sıçanlarda pubertaya erişme yaşına etki eden faktörlerden birisi somatik gelişimdir (Morgan ve ark., 2003). Melatonin hormonunun vücut kütlesi üzerindeki etkisine bakıldığında; yapılan araştırmalarda melatoninin uygulama şekli (Le Gouic ve ark., 1996), dozu (Prunet-Marcassus ve ark. 2003) ve süresine (Elliott ve ark. 1989) bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Prunet-Marcassus ve ark. (2003)'nın, melatoninin vücut ağırlığı üzerinde inhibitör etkisi olduğunu öne sürdükleri çalışmada; yağlı diyet ile beslenen pinealektomize sıçanlarda vücut ağırlığının artış gösterdiği, bu artışın günlük 30 mg/kg dozda 3 hafta süre ile uygulanan melatonin ile durdurulduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Gündüz ve Karakaş (2001), pinealektomili prepubertal hamsterlara 20:00-21:00 saatleri arasında 50 ng/h dozda uygulanan melatonin infüzyonunun, vücut ağırlıklarındaki artışı inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmaların aksine; Le Gouic ve ark. (1996) fındık farelerinde, Elliott ve ark. (1989) ise pinealektomize hamsterlarda kısa gün periyodunda 10 ng/h dozda sürekli uygulanan melatonin infüzyonunun vücut ağırlığında artışa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. İnsanlarda ise büyüme ve gelişme döneminde melatonin seviyesindeki azalmanın vücut kütlesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Young ve ark., 1988). Çalışmamızda ise melatonin uygulaması kilo artışını rakamsal olarak azaltmış olmasına karşın istatistiksel bir farka yol açmamıştır (Çizelge 3.2; $p>0,05$). Araştırma bulgumuz ve melatoninin kilo

artışını artırdığı (Elliott ve ark., 1989; Le Gouic ve ark., 1996) veya azalttığı (Prunet-Marcassus ve ark., 2003) ile ilgili bildirimler doğrultusunda, uygulanan melatonin dozu ve uygulama periyoduna bağlı olarak kilo artışı üzerinde farklı etkiler oluşturduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda kisspeptin ve kisspeptin antagonisti uygulaması vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Çizelge 3.2; $p>0,05$). Yapılan araştırmalarla kisspeptin uygulamasının da vücut kütlesi üzerinde farklı etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Roa ve ark. (2008), yetişkin dişi sıçanlara 7,5 nmol/24 h dozda 7 gün süreyle intraserebral yolla infuze edilen kisspeptinin bu hayvanlarda vücut ağırlıklarını değiştirmediğini, aynı doz ve süredeki kisspeptinin ise prepubertal sıçanlarda (postnatal 30-37. gün) vücut ağırlıklarında düşüşe neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Pineda ve ark. (2010), postnatal 30-36. günlerde 10 nmol/24 h dozda ve 7 gün süreyle uygulanan kisspeptin antagonistinin vücut ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmalardaki farklı bulgular, kisspeptinin yaş ve seksüel döneme göre farklı etkiler oluşturduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada ortalama vajinal açıklık yaşı, Sham ve PE gruplarında sırasıyla 34,86 ve 34,60 gün olarak belirlendi (Grafik 3.2). Maeda ve ark. (2000), dişi sıçanlarda pubertanın ve ilk proöstrusun indikatörü olan vajinal açıklığın 29-42. günlerde, düzenli östrus siklusların ise yaklaşık olarak vajinal açıklık başlangıcından itibaren bir hafta sonra meydana geldiğini bildirmektedir. Bu bağlamda araştırma bulgumuz Maeda ve ark. (2000)'nın bildiri ile uyumlu bulunmaktadır.

Çalışmada aynı zamanda vajinal açıklık görülme yaşının PE+M grubunda PE ve Sham gruplarına göre geciktiği ortaya konuldu (Çizelge 3.2; $p<0,001$). Sizoneko ve ark. (1985), melatonin uygulamasının seksüel olgunlaşmayı inhibe etmediğini ancak pubertaya erişme süresini uzattığını, melatonin uygulanan sıçanlarda pubertanın postnatal 45. günden sonra başladığını ileri sürmüşlerdir. Birçok araştırmacı Sizoneko ve ark. (1985)'nin yapmış olduğu bu çalışmaya paralel olarak, günlük melatonin uygulamasının vajinal açılmayı geciktirdiğini, hipofizer GnRH reseptör seviyesini

azalttığını ve siklus döngülerinde östrus görülme insidansını azalttığını ifade etmişlerdir (Rivest ve ark., 1986; Lang, 1986; Meredith ve ark., 2000; Roy ve ark 2001). Benzer şekilde Rivest ve ark. (1985), melatoninin sıçanlarda östrus döngüsünde bozulmaya neden olduğunu; prepubertal dişi sıçanlara gün doğumundan 9-11 saat sonra postnatal 15. gün itibariyle uygulanan 100 ng/24 h melatoninin vajinal açılma zamanını 10 gün geciktirdiğini öne sürmüşlerdir. Başka bir çalışmada ise postnatal 5. ve 10. gün itibariyle yavru sıçanlara 20 gün boyunca hergün saat 15:00'de, 100 µg dozda subkutan uygulanan melatonin; 5 günlük yavrularda vajinal açılma gününü erkene çekerken 10 günlük yavrularda vajinal açılma gününde gecikmeye neden olmuştur. Buna göre 5 günlük yavrularda ilk vajinal açıklık postnatal 29. günde görülmeye başlarken grup ortalaması 40 gün; 10 günlük yavrularda ise grup ortalaması 50 gün olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda 5 günlük yavru sıçanlarda melatoninin vajinal açılma gününü 2-7 gün öne çektiği bildirilmiştir (Meredith ve ark., 2000). Okatani ve ark. (1997), çalışmalarında 2-12 haftalık dişi sıçanlarda melatonin seviyesinin pubertaya kadar yaş ilerledikçe artış gösterdiğini ve postnatal 6. haftaya kadar sıçanların % 66'sında vajinal açıklığın oluştuğunu, ancak postnatal 8. haftadan sonra melatonin düzeyinde önemli derecede düşüş gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu bağlamda araştırma bulgumuz melatoninin reproduktif sistem ve puberta üzerindeki düzenleyici etkisini desteklemektedir. Ancak çalışmamızda kontrol (Sham) grubuna kıyasla tek başına pinealektomi uygulaması, serum melatonin seviyesini önemli ölçüde azaltmasına rağmen vajinal açılma zamanını etkilememiştir ($p>0,05$). Bu sonuç vajinal açıklık yaşı üzerine melatoninin yokluğunun değil, varlığının etkili olduğunu düşündürmekle birlikte; aynı zamanda melatoninin pinealektomi sonrası geçen süre ile sıçanın yaşına bağlı olarak da puberta üzerinde değişken etki oluşturduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada, melatoninin tersine; pinealektomili sıçanlara kisspeptin uygulaması vajinal açıklık oluşma zamanını öne çekmiş ve en erken vajinal açılma prepubertal 32,94. günde (Grafik 3.2), kisspeptin uygulanan grupta görülmüştür (Çizelge 3.2; $p<0,001$). Seminara ve ark. (2003), yaptıkları çalışmada GPR54 geni homozigot delesyona uğratılan dişilerde foliküler matürasyonun görülmediğini ve vajinal açılmada

gecikme olduğunu tespit ederken; Navarro ve ark. (2004), bu araştırmanın tersine postnatal 26-31. günlerde intraserebral yolla her 12 saatte bir uygulanan 1 nmol kisspeptinin vajinal açılma zamanını öne çektiğini, ilk vajinal açılmanın kontrol grubunda postnatal 35. günde başladığını kisspeptin uygulanan grubun ise % 74'ünde 31. günde tamamlandığını ileri sürmüşlerdir. Buna ilaveten; çalışmamızda kisspeptin, melatoninin artırmış olduğu vajinal açıklık oluşma yaşını (34,93. gün) düşürmüştür (Grafik 3.2). Birçok çalışmada juvenil dişi sıçanlarda, santral ve periferik yolla uygulanan kisspeptinin, LH salınımı ve ovulasyonu stimule ederek vajinal açılma zamanını kısalttığı gösterilmiştir (Matsui ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2004; Pineda ve ark., 2010). Bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen; kisspeptinin vajinal açılma zamanını öne çektiği bulgusu, literatür ile benzerlik göstermektedir. Buna karşın; bu çalışmada kisspeptin antagonisti uygulaması, vajinal açılma yaşı üzerinde etkisiz görülmüştür. Araştırma bulgusundan farklı olarak literatürde, postnatal 30-36. günlerde 10 nmol/24 h dozda 7 gün süreyle kisspeptin antagonisti uygulanmış ve kontrol grubu ile kıyaslandığında sıçanların sadece %13'ünde vajinal açılma gözlemlenmiştir (Pineda ve ark., 2010). Çalışmamızdan elde edilen bu bulgu, kisspeptin antagonistinin uygulama dozu ve süresindeki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Pubertaya erişme ölçütlerinden biri de düzenli siklusların görülmeye başlamasıdır. Bu nedenle siklus başlangıç zamanı pubertanın başladığını gösteren önemli kriterlerden birisidir (Krinke 2000). Çalışmamızda, siklus başlangıç zamanı ortalaması PE grubunda 35,70 gün olarak belirlenmiş ve melatonin uygulaması istatistiksel fark oluşturarak ($p<0,001$), bu süreyi 37,24 güne uzatmıştır (Grafik 3.2; Çizelge 3.2). Rivest ve ark. (1985), melatonin uygulamasının sıçanlarda, vajinal açıklık görülme süresindeki gecikmeye bağlı olarak ilk siklus görülme zamanında da gecikmeye neden olduğunu bildirmektedir. Hansel (2010), sıçanlarda ilk östrusun vajinal açılmadan ortalama 1,8 gün sonra görüldüğünü ifade etmektedir. Kachi ve ark. (2006) ise pinealektomi modelinin östrus görülme insidansını artırdığını, bu artışın melatonin uygulaması ile inhibe edildiğini belirtmektedir. Benzer şekilde insanlarda da melatonin uygulamasının siklus başlama yaşını geciktirdiği ifade edilmektedir (Parent ve ark., 2003; Mao ve ark.

2011). Bu araştırmada, melatoninin siklus gösterme yaşını geciktirdiği bulgusu diğer araştırma bulgularıyla uyum içerisinde görülmekle beraber PE grubunda Sham grubuna göre ortalama siklus başlangıç yaşı bakımından fark görülmemesi ilginçtir. Bu durumun, pinealektomi operasyonunun 28 gün yaşta yapılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kisspeptinin reproduktif sistem ve puberta üzerindeki uyarıcı etkisi göz önünde tutulduğunda, vajinal açıklık görülme zamanında görülen kısalmaya paralel olarak siklus başlangıç zamanını da kısaltması beklenmektedir. Nitekim Clarkson ve Herbison (2006), çalışmalarında prepubertal 10. günden itibaren kisspeptin uygulanan farelerde vajinal açıklığın 27. günde, ilk siklus başlangıcının ise 29. günde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak ilk siklus, vajinal açıklık gerçekleştikten ortalama iki gün sonra (35,07. gün) başlamış ve en erken siklus başlangıcı kisspeptin uygulanan grupta görülmüştür (izelge 3.2; $p < 0,001$). Aynı zamanda çalışmada; kisspeptinin, melatonin tarafından geciktirilmif puberta başlangıç gününü aşağıya çektiği gözlenmiştir.

Pubertanın başlamasında ve başarılı bir üremenin devamının sağlanmasında gonadotropinlerin rolü oldukça önemlidir. Puberta ile birlikte hipotalamustan salgılanan GnRH, adenohipofizden LH ve FSH salgılanmasını uyarır. FSH, foliküllerin büyümesini sağlarken LH ovulasyonu indükler (Gn, 2009). Melatonin mevsimsel olmayan poliöstrik hayvanlar (Okatani ve ark., 1997), rodentler (Arendt, 1998) ve insanların (Roy ve ark., 2001) reproduktif sisteminde HPG aks üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Melatonin hormonunun yokluğunun/eksikliğinin GnRH ve LH sentezini artırırken, FSH sentezini azalttığı birçok araştırmada gösterilmiştir (Faigon ve ark., 1982; Moguilevsky ve ark., 1982; Polson ve ark., 1988; Lobo ve Carmina, 1997). Bu bildirimlerden farklı olarak bu çalışmada, pinealektominin prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönemde GnRH, FSH ve LH düzeyine etki etmediği görülmüştür (izelge 3.3; $p > 0,05$). Yapılan bir araştırmada özellikle plazma GnRH seviyesi ile ilişkili olarak; sistemik kan dolaşımdaki GnRH seviyesinin oldukça düşük ve önemsiz seviyelerde olduğu asıl hipotalamo-hipofizer portal sistem kanında

yüksek konsantrasyonlarda olduğu bildirilmiştir (Vander ve Luciano, 1980). Dardes ve ark. (2000), pinealektomi operasyonunun erken döneminde melatoninin baskılayıcı etkisinin hemen ortadan kalkmadığını, bu yüzden pinealektominin plazma LH ve FSH seviyelerini erken dönemde etkilemediğini bildirmektedirler. Bu bağlamda prepubertal 33. gün, foliküler ve luteal dönemlerde pinealektomi grubunda GnRH, FSH ve LH düzeyinin değişmemesi, operasyondan sonra geçen sürenin kısalığından kaynaklanabilir.

Melatoninin, HPG sistem üzerindeki inhibitör etkisinin direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde gerçekleştiği ifade edilmektedir (Roy ve ark., 2001; Dellal ve Cedden, 2002; Pekmez ve ark., 2004). Direkt antigonadal etkisini gonadlarda mevcut olan reseptörleri aracılığıyla, progesteronun salınımını uyararak ortaya koymaktadır (Webley ve Luck, 1986). İndirekt inhibitor etkisini ise hem hipotalamus düzeyinde GnRH üretimini ve sekresyonunu baskılayarak hem de doğrudan hipofiz üzerine etki ederek Ca^{+2} ve cAMP gibi hücre içi ikincil habercilerin düzeylerini değiştirmek suretiyle LH salınımını baskılayarak göstermektedir (Roy ve ark., 2001; Dellal ve Cedden, 2002; Pekmez ve ark., 2004; Yerer, 2006). Ayrıca melatonin, endorfin gibi GnRH salgılanmasını azaltan opioid maddelerin sekresyonunu artırmak suretiyle de etki göstermektedir (Keleştimur, 1996). Bu inhibitör etki hipotalamustan GnRH salınımının baskılanması sonucunda devamında FSH ile LH sekresyonunun azalması şeklinde kendini göstermektedir. (Uyar ve Alan 2008). Bu çalışmada, sıçanlarda prepubertal dönem (28-33. gün) melatonin uygulaması, Sham ve PE gruplarına göre serum GnRH düzeyini azaltmıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde, GnRH seviyesi ile paralel olarak aynı grupta FSH ($p<0,001$) düzeyi azalmış, buna karşın LH düzeyi değişmemiştir (Çizelge 3.3).

Bu çalışmada, prepubertal sıçanlarda (prepubertal 28-33. gün) intraperitoneal yolla günlük uygulanan 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kisspeptin, serum GnRH ($p<0,01$), FSH ($p<0,001$) düzeylerinde artışa neden olurken serum LH ($p>0,05$) düzeyini değiştirmemiştir. Ayrıca kisspeptin antagonisti uygulaması, serum GnRH, FSH düzeylerini Sham ve PE gruplarına göre azaltmıştır (Çizelge 3.3; $p<0,05$). GPR54 reseptörü fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların, insanlar ve farelerde pubertal gelişim ve üreme aktivitelerinde

kayıp ile birlikte IHH'e neden olduğu bilinmektedir (Lee ve ark., 1996; Seminara ve ark., 2003; De Roux ve ark., 2003; Semple ve ark., 2005; Cerrato ve ark., 2006). Aynı zamanda kisspeptinin GnRH nöronlarında hızlı gen üretimi ve ekspresyonunu indüklediği, GnRH nöron hücre gövdelerinin kisspeptinler ile sıkı immünoreaktif bağlar yaptığı ve kisspeptinin GnRH nöron ekstabilesini doğrudan artırdığı gösterilmiştir (Smith, 2008). Benzer şekilde prepubertal sıçanlarda 30-37. günler arasında 7,5 nmol/24 h dozda 7 gün süreyle intraserebral yolla uygulanan kisspeptin, plazma FSH seviyesini yükseltmiştir (Roa ve ark., 2008). Çalışmamız, bu bulgusuyla Roa ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışma ile benzerlik göstermekte olup kisspeptinin pubertayı tetikleyici bir faktör olduğunu desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmada kisspeptinin, melatoninin reproduktif aks üzerindeki baskılayıcı etkisini engellediği/azalttığı da görülmüştür ($p<0,05$).

Kızgınlık döngüsünün melatonin salınımından etkilendiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Dardes ve ark., 2000; Diekman ve ark., 2002). Proöstrus dönemde, östrojenin melatonin üzerindeki etkisi ile ilişkili olarak melatonin salınımı azalmaktadır (Johnson ve ark., 1982; Kachi, 2007). Tamarkin ve ark. (1985), ovulasyon esnasında LH artışı ile birlikte plazma melatonin düzeyinde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Chiba ve ark. (1994) ise melatoninin proöstrus dönemde GnRH aracılığıyla LH salınımı üzerinde doza bağımlı olarak baskılayıcı etki gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda pinealektomi ve/veya melatonin uygulaması foliküler dönemde kontrol grubuna (Sham) kıyasla serum GnRH, FSH ve LH değerlerini değiştirmemiştir ($p>0,05$). Bu bağlamda çalışmamız, doza bağlı farklı sonuçlar olabileceğini desteklemektedir.

Sıçanlarda (Matsui ve ark., 2004), farelerde (Messenger ve ark., 2005), koyunlarda (Caraty ve ark., 2007), insanlarda (Jayasena ve ark., 2009) ve primatlarda (Seminara ve ark., 2006) yapılan birçok çalışma; kisspeptinin GnRH salınımını artırmak suretiyle preovulatör dönemde LH salınımını uyararak ovulasyona katkıda bulunduğunu ve pubertayı başlatan önemli bir tetikleyici olduğunu desteklemiştir. Kisspeptinin subkutan enjeksiyonu; kadınlarda preovulatör fazda daha belirgin olmak üzere, hem LH hem de FSH düzeylerinde artışa neden olmuş, bu artışın FSH seviyesine kıyasla LH'da yedi kat

fazla olduğu bildirilmiştir (Dhillon ve ark., 2007a; Jayasena ve ark., 2009). Mason ve ark. (2007) ise mevsimsel üreme özelliği gösteren dişi Sibirya hamsterlarında kısa gün periyotta akut kisspeptin uygulamasının LH salınımını tetiklediğini öne sürmüşlerdir. Roa ve ark. (2008), kisspeptinin FSH seviyelerine kıyasla LH salınımı üzerinde daha kuvvetli stimulator etki gösterdiğini ileri sürmüştür. Pineda ve ark. (2010), siklik yetişkin dişi ratlarda 10 nmol/24 h dozda 7 gün süreyle uygulanan kisspeptin antagonistinin LH ve FSH salınımını büyük ölçüde azalttığını öne sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar, erkek ratlarda 100 pmol dozda sistemik yolla uygulanan kisspeptinin serum LH seviyesini 6 kat, FSH düzeyini ise 2 kat artırdığını; kisspeptin antagonisti uygulaması ile bu artışın önemli derecede azaldığını gözlemlemişlerdir. Castellano ve ark. (2006) ise kisspeptin seviyesinin proöstrus fazda hızlı bir yükseliş gösterdiğini sonrasında keskin bir düşüş sergileyerek östrus boyunca düşük seviyelerde seyrettiğini bildirmişlerdir. Roa ve ark. (2008) da çalışmalarında benzer bir sonuç elde ederek kisspeptin antagonistinin kisspeptinin etkisini baskıladığını; kisspeptinin neden olduğu LH seviyelerindeki hızlı artışın sonrasında kisspeptin antagonistinin etkisiyle keskin bir düşüş göstererek normal seviyesine geri döndüğünü; FSH seviyelerinin ise diöstrus ve proöstrus dönemde düşük seyrederken östrus döneminde pik yaptığını gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda, kisspeptin enjeksiyonu foliküler evrede serum GnRH ve LH seviyesini önemli ölçüde artırırken (Çizelge 3.4; $p < 0,001$), FSH seviyesinde rakamsal bir yükseliş oluşturduysa da anlamlı bir artış oluşturmamıştır ($p > 0,05$). Literatür ile benzer şekilde kisspeptin antagonisti kisspeptinin neden olduğu artış baskılamıştır.

Pinealektomi luteal evrede LH salınımını değiştirmemiştir (Tamura ve ark., 1998). Çalışmamızda, pinealektomi ve/veya melatonin uygulaması luteal evrede serum GnRH, LH ve FSH seviyelerini değiştirmemiştir (Çizelge 3.5; $p > 0,05$). Bu sonuç literatür ile benzerlik göstermektedir. Bu durum kan progesteron ve östrodiol seviyeleri ile ilişkili olabilir.

Smith ve ark. (2011), koyunlar üzerinde yaptıkları çalışmada kisspeptinin plazma GnRH seviyesini luteal dönem boyunca değiştirmedeğini göstermişlerdir. Dhillon ve ark.

(2007b) ise kisspeptinin kadınlarda luteal faz dahil olmak üzere tüm dönemlerde LH konsantrasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, luteal dönem kisspeptin uygulaması serum GnRH, LH ve FSH seviyesini değiştirmemiştir (Çizelge 3.5; $p>0,05$). Bu bulgu, Smith ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırma, melatonin ve kisspeptin hormonlarının reproduktif sistem üzerindeki etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir. Buna göre, melatoninin prepubertal dönemde vajinal açıklık ve siklus başlangıç zamanını geciktirdiği, bu etkisini ise GnRH ve FSH düzeylerini düşürerek yaptığı anlaşılmaktadır.

Kisspeptinin reproduktif sistem üzerindeki etkisi melatonin ile ters yönde olup; kisspeptin, prepubertal dönemde hem vajinal açıklık ve siklus başlangıç zamanını kısaltarak hemde gonadotrop seviyelerini artırarak pubertanın erken başlamasına neden olmuştur. Bu sonuç, kisspeptinin reproduktif aks üzerinde stimulatör rolünü desteklemektedir. Ayrıca kisspeptinin prepubertal dönemde; melatoninin pubertaya erişme süresi üzerindeki baskılayıcı etkisini önlemektedir.

Siklusa girmiş sıçanlarda kisspeptin, foliküler dönemde LH salınımı uyarmıştır. Foliküler ve luteal dönemde melatoninin tek başına veya kisspeptin ile beraber uygulanması GnRH, FSH veya LH üzerine inhibitör etki yapmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular infertilite, erken/geç puberta gibi günümüz reproduktif sorunlarının çözümüne yardımcı olabilecektir. Ancak bu konuda örneklem sayısının fazla olduğu, farklı doz ve zamanlarda (yaşlarda) yapılacak araştırmalar konunun daha iyi anlaşılmasına katkılar sağlayacaktır.

ÖZET

Prepubertal Dönemde Dişi Sıçanlarda Melatonin/Kisspeptin Etkileşiminin Puberta Yaşına ve Ovulasyonda Görevli Hormonlar Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bu araştırmanın amacı, prepubertal dönemde pinealektomili dişi sıçanlarda melatonin/kisspeptin etkileşiminin puberta yaşı ile ovulasyonda görevli hormonlar üzerine etkisini incelemektir.

Araştırmada; pubertaya ulaşmamış, 25 günlük yaşta ve 60-80 gram canlı ağırlıkta, 126 adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışma süresince hayvanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında (20-24°C) tutularak, ticari pelet sıçan yemi ve normal çeşme suyu ile *ad libitum* beslendi. Sıçanların 108'ine pinealektomi, 18'ine ise sham pinealektomi operasyonu gerçekleştirildi. Sıçanlar 29 günlük yaşa ulaştığında ağırlıkları kayıt altına alınarak her bir grupta 18 sıçan olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol (Sham), pinealektomi (PE), melatonin (PE+M), kisspeptin (PE+Kiss), kisspeptin antagonisti (PE+KissA), melatonin + kisspeptin (PE+M+Kiss) ve melatonin + kisspeptin antagonisti (PE+M+KissA) olacak şekilde oluşturuldu. Sham ve PE gruplarına 0,1 ml/24 h intraperitoneal serum fizyolojik; PE+M grubuna günlük 0,5 mg/kg subkutan melatonin; PE+Kiss grubuna günlük 1 µg/kg intraperitoneal kisspeptin, PE+KissA grubuna günlük 1 µg/kg intraperitoneal kisspeptin antagonisti uygulandı. Tüm gruplarda enjeksiyonlar 21:00-23:00 saatleri arasında yapıldı. Hormon uygulamaları her gruptan 6 sıçan olacak şekilde (PE ve Sham hariç) 30 sıçana prepubertal 33. güne kadar; 30 sıçana siklus başlangıcından sonraki ilk foliküler döneme kadar; 30 sıçana ise siklus başlangıcından sonraki ilk luteal döneme kadar sürdürüldü. Sıçanlara 12 saatte bir vajinal açıklık kontrolü yapılırken, 33 günlük yaşta vajinal açıklık oluşmamış sıçanların her gruptan 6 adeti alınarak son hormon uygulamasını takiben 20. dakikada genel anestezi altında kalplerinden kan alınarak ötenazileri sağlandı. Vajinal açıklık kontrolü ile vajinal açıklığın olduğu gün kayıt altına alınırken, 12 saatte bir olacak şekilde vajinal yıkama yöntemiyle östrus takibi yapıldı. Vajinal yıkamanın kontrolünün yapılması için alınan kanlarda progesteron düzeyi belirlendi. Foliküler ve luteal dönemde bulunan tüm grupların her birinden altı sıçana son enjeksiyon uygulamalarının 20. dakikasını takiben kalplerinden kan alınarak ötenazi gerçekleştirildi.

Araştırmada prepubertal 33. günde, melatonin uygulamasının pinealektomi (PE) grubuna kıyasla vajinal açıklık ile siklus görülme yaşını geciktirdiği, serum GnRH ve FSH düzeylerini azalttığı görülmüştür. Kisspeptin uygulaması ise tersine, Sham ve PE gruplarına göre vajinal açıklık yaşı ile siklus başlangıç yaşını kısaltırken, serum GnRH ve LH düzeylerini artırmıştır. Aynı zamanda prepubertal dönemde (33. gün); kisspeptinin, melatonin tarafından geciktirilmiş vajinal açıklık ile siklus başlangıç yaşını kısalttığı, aynı şekilde azalmış GnRH ve LH düzeylerini yükselttiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmada; kisspeptin antagonisti, PE grubuna göre siklus başlangıç yaşını düşürürken, prepubertal 33. gün GnRH ve FSH düzeylerini de PE ve Sham grubuna göre azaltmıştır. Foliküler dönemde ise; kisspeptin uygulanan PE+Kiss ve PE+M+Kiss

gruplarında diğer gruplara göre serum GnRH ve LH düzeyleri daha yüksek belirlenmiştir.

Sonuç olarak; melatoninin GnRH ve FSH'ı baskılayarak pubertaya erişme süresi üzerindeki olumsuz etkisini kisspeptinin önlediği belirlenmiştir. Kisspeptinin aynı zamanda foliküler dönemde LH salınımını uyarak ovulasyonda görev aldığı görülmekle beraber; gerek pinealektomi operasyonunun yapıldığı yaş gerekse melatonin ve kisspeptinin uygulama doz, sre ve şekline bağlı olarak sonuların değişebileceği dşnlmektedir.

Anahtar sözcükler: Kisspeptin, melatonin, puberta, sıan, reme

SUMMARY

Determination of the Effect of Melatonin/Kisspeptin Interaction on Puberty Age and Hormones Responsible for Ovulation in Female Rats in Prepubertal Period

The aim of this study is to examine the effect of melatonin/kisspeptin interaction on puberty age and hormones responsible for ovulation in pinealectomized female rats in prepubertal period.

In the study, 126 female Wistar albino rats at the age of 25 days with 60-80 grams of live weight were used. During the study, animals were kept at 12 hours light and 12 hour dark at room temperature (20-24°C), and fed *ad libitum* with commercial pelleted rat chow and regular tap water. Pinealectomy operation was performed to 108 of the rats and sham pinealectomy operation was performed to 18 of the rats. The weights of the rats were taken under record when they reached to 29 days of age and divided into 7 groups so that each group consists of 18 rats. Groups were created as; control (Sham), pinealectomy (PE), melatonin (PE+M), kisspeptin (PE+Kiss), kisspeptin antagonist (PE+KissA), melatonin + kisspeptin (PE+M+Kiss) and melatonin + kisspeptin antagonist (PE+M+KissA). 0.1 ml/24 h intraperitoneal serum physiologic to Sham and PE groups, daily 0.5 mg/kg subcutaneous melatonin to PE+M group, daily 1 mg/kg intraperitoneally kisspeptin to PE+Kiss group, daily 1 mg/kg intraperitoneal kisspeptin antagonist to PE+KissA group were administered. In all groups, injections were applied between 21:00 and 23:00 hours. Hormone administrations to 6 rats from each group (except PE and Sham) were continued until prepubertal 33th day to 30 rats, the first follicular period following the start of cyclus to 30 rats, and the first luteal period following the start of cyclus to 30 rats. Rats were checked for vaginal opening every 12 hours, and 6 rats with no vaginal opening at the 33 days of age from each group were taken and euthanized at the 20th minute following the final hormone administration under general anesthesia by taking blood from their hearts. The day of vaginal opening formation was taken under record with vaginal opening control, and oestrus monitoring was carried out every 12 hours by using vaginal douche method. Six rats from every group at follicular and luteal phase euthanized at the 20th minute following the final hormone administration under general anesthesia by taking blood from their hearts. For the control of vaginal douche, progesterone levels in the blood samples taken were determined.

In the research, it was found that, on the 33th day, melatonin administration, compared to pinealectomy (PE) group, delayed the vaginal opening and cyclus formation, whilst decreased the serum GnRH and FSH levels. Kisspeptin administration, on the contrary, compared to Sham and PE groups, expedited the vaginal opening and

cyclus starting age, while increased the serum GnRH and LH levels. At the same time in prepubertal period (33th day), it was found that kisspeptin shortened the vaginal opening and cyclus starting age delayed by melatonin, and likewise, increased the reduced levels of GnRH and LH. Also in the study, kisspeptin antagonist, compared to PE group, shortened the cyclus starting age, while decreased the prepubertal 33th day GnRH and FSH levels, compared to PE and Sham groups. In the follicular phase, in kisspeptin administered PE+Kiss and PE+M+Kiss groups, serum GnRH and LH levels were found higher than the other groups.

As a result, it was found that kisspeptin avoided the negative impact of melatonin on the duration to reach puberty by suppressing GnRH and FSH. Also, it was seen that kisspeptin takes a role in ovulation by stimulating LH secretion in follicular period, and it is contemplated that the results may change depending on both the age the pinealectomy operations were performed and the dose, duration and method of melatonin and kisspeptin administration.

Keywords: Kisspeptin, melatonin, puberty, rats, reproduction

KAYNAKLAR

- ACKLAND, J.F., D'AGOSTINO, J., RINGSTROM, S.J., HOSTETLER, J.P., MANN, B.G., SCWARTZ, N.B. (1990). Circulating radioimmunoassayable inhibin during periods of transient folliclestimulating hormone rise: secondary surge and unilateral ovariectomy. *Biology of Reproduction*, **43**: 347-352.
- ADACHI, S., YAMADA, S., TAKATSU, Y., MATSUI, H., KINOSHITA, M., TAKASE, K., SUGIURA, H., OHTAKI, T., MATSUMOTO, H., UENOYAMA, Y., TSUKAMURA, H., INOUE, K., MAEDA, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *The Journal of Reproduction and Development*, **53**: 367-378.
- ADRIAENS, I., JACQUET, P., CORTVRINDT, R., JANSSEN, K., SMITZ, J. (2006). Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*, **228(2)**: 333-343.
- ADVIS, J.P., OJEDA, S.R. (1978). Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: ovarian site of action. *Endocrinology*, **103**: 924-935.
- ADVIS, J.P., ANDREWS, W.W., OJEDA, S.R. (1979). Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, **104**: 653-658.
- ALTUN, A., YAPRAK, M., AKTOZ, M., VARDAR, A., BETUL, U.A., ÖZBAY, G. (2002). Impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with cardiac syndrome X. *Neuroscience letters*, **327(2)**: 143-145.
- ANSEL, L., BENTSEN, A.H., ANCEL, C., BOLBOREA, M., KLOSEN, P., MIKKELSEN, J.D., SIMONNEAUX, V. (2011). Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GnRH release. *Reproduction*, **142**: 417-425.
- ANSEL, L., BOLBOREA, M., BENTSEN, A.H., KLOSEN, P., MIKKELSEN, J.D., SIMONNEAUX V. (2010). Differential regulation of Kiss1 expression by Melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*, **25(2)**: 81-91.
- APARICIO, S. (2005). Kisspeptins and GPR54 - The new biology of the mammalian GnRH axis. *Cell Metabolism*, **1**: 293-6.
- ARENDRT, J. (1988). Melatonin. *Clinical Endocrinology*, **29**: 205-229.
- ARENDRT, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, **3**: 13-22.
- ATAŞ, M. (1998). Diabetik Ratlarda Retina Lipit Peroksidasyonu Üzerine Melatoninin Etkisi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları ABD Uzmanlık Tezi, Elazığ.
- ATTANASIO, A., BORELLI, P., GUPTA, D. (1985). Circadian rhythms in serum Melatonin from infancy to adolescence. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **61(2)**: 388-390.
- AUBERT, M.L., BEGEOT, M., WINIGER, B.P., MOREL, G., SIZONENKO, P.C., DUBOIS, P.M. (1985). Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology*, **116**: 1565-1576.

- AWAD, H., HALAWA, F., MOSTAFA, T., ATTA, H. (2006). İnfertil erkeklerde melatonin hormon profili. *International Journal of Andrology*, **29(3)**: 409-413.
- AYAR, A., KUTLU, S., YILMAZ, B., KELEŞTİMUR, H. (2001). Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinology Letters*, **22**: 199-207.
- AYDOĞDU, N. (2003). Deneysel Miyoglobüinirik Akut Böbrek Yetmezliğinde Eksojen Melatoninin Böbrek Fonksiyonuna Etkisi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji ABD Doktora Tezi, Edirne.
- BAKER, D.E.J. (1979). Reproduction and Breeding. In: BAKER, H.J., LINDSEY, J.R., WEISBROTH, S.H., editors, *The Laboratory Rat*, Volume 1, pp. 153-168, New York: Academic Press.
- BECKER, E.J., TURNER, T.T. (1995). Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *Journal of Andrology*, **16**: 342-346.
- BERGA, S.L., MORTOLA, J.F., YEN, S.S. (1988). Amplification of nocturnal Melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **66(1)**: 242-244.
- BRZEZINSKI, A. (1997). Melatonin in humans, *The New England Journal of Medicine*, **336(3)**: 186-195.
- BRZEZINSKI, A., LYNCH, H.J., SEIBEL, M.M., DENG, M.H., NADER, T.M., WURTMAN, R.J. (1988). The circadian rhythm of plasma melatonin during the normal menstrual cycle and in amenorrheic women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **66(5)**: 891-895.
- BUBENIK, G.A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive Diseases and Sciences*, **47(10)**: 2336-2348. In: OZAKI, Y., LYNCH, H.J. (1976). Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology*, **99(2)**: 641-644.
- BUBENIK, G.A., BROWN, G.M. (1997). Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Neurosignals*, **6**: 40-44.
- CALVO, J., BOYA, J. (1984). Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. *Journal of Anatomy*, **138**: 45-53.
- CARATY, A., SMITH, J.T., LOMET, D., SAID, S.B., MORRISSEY, A., COGNIE, J., DOUGHTON, B., BARIL, G., BRIANT, C., CLARKE, I.J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, **148**: 5258-5267.
- CARDINALI, D.P., PEVET, P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews*, **2**: 175-190.
- CASTELLANO, J.M., NAVARRO, V.M., FERNANDEZ-FERNANDEZ, R., ROA, J., VIGO, E., PINEDA, R., DIEGUEZ, C., AGUILAR, E., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M. (2006). Expression of hypothalamic KISS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes*, **55**: 2602-2610.
- CAVALLO, A. (1993). Melatonin and human puberty: Current perspectives. *Journal of Pineal Research*, **15**: 115-121.
- CERRATO, F., SHAGOURY, J., KRALICKOVA, M., DWYER, A., FALARDEAU, J., OZATA, M., VLIET, G.V., BOULOUX, P., HALL, J.E., HAYES, F.J., PITTELOU, N., MARTIN, K.A., CORRINE, W., SEMINARA, S.B. (2006). Coding sequence analysis of GnRHR and GPR54 in

- patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *European Journal of Endocrinology*, **155(1)**: 3-10.
- CHIBA, A., AKEMA, T., TOYODA, J. (1994). Effects of pinealectomy and melatonin on the timing of the proestrous luteinizing hormone surge in the rat. *Neuroendocrinology*, **2**: 163-168.
- CLARKSON, J., D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X., COLLEDGE, W.H., CARATY, A., HERBISON, A.E. (2009). Distribution of kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Journal of Neuroendocrinology*, **21**: 673-682.
- CLARKSON, J., D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X., MORENO, A.S., COLLEDGE, W.H., HERBISON, A.E. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *The Journal of Neuroscience*, **28**: 8691-8697.
- CLARKSON, J., HAN, S.K., LIU, X., LEE, K., HERBISON, A.E. (2010). Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **324(1)**: 45-50.
- CLARKSON, J., HERBISON, A.E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **147**: 5817-5825.
- CLEMENTS, M.K., MCDONALD, T.P., WANG, R., XIE, G., O'DOWD, B.F., GEORGE, S.R., AUSTIN, C.P., LIU, Q. (2001). FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **284**: 1189-1193.
- COHEN, M., ROSELLE, D., CHABNER, B., SCHMIDT, T.J., LIPPMAN, M. (1978). Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*, **274**: 894-895.
- COLLEDGE, W.H. (2009). Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **20**: 115-121.
- COOPER, R.L., GOLDMAN, J.M. (1999). Vaginal cytology. In: DASTON, G., KIMMEL C., editors. *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*. Washington, pp 42-56, DC: ILSI Press.
- COS, S., GONZALEZ, A., MARTINEZ-CAMPA, C., MEDIAVILLA, M.D., ALONSO-GONZALEZ, C., SANCHEZ B.E.J. (2006). Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention*, **30(2)**: 118-128.
- ÇAM, A., ERDOĞAN, M.F. (2003). Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2**: 103-112.
- ÇETİN, E. (2005). Melatonin ve bağışıklık sistemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2(2)**: 119-123.
- D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X., FAGG, L.A., CARLTON, M.B., COLLEDGE, W.H. (2008). Kisspeptin can stimulate gonadotropin releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology*, **149**: 3926-3932.
- DALKIN, A.C., HAISENLEDER, D.J., ORTOLANO, G.A. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, **125**: 917-924.

- DARDES, R.C., BARACAT, E.C., SIMÕES, M.J. (2000). Modulation of estrous cycle and LH, FSH and melatonin levels in pinealectomy and sham-pinealectomy in female rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **24(3)**: 441-453.
- DAWSON, D., GIBBON, S., SINGH, P. (1996). The hypothermic effect of melatonin on core body temperature: is more better? *Journal of Pineal Research*, **20(1)**: 192-7.
- DE ROUX, N., GENIN, E., CAREL, J.C., MATSUDA, F., CHAUSSAIN, J.L., MILGROM, E.(2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**: 10972-10976.
- DECOURT, C., TILLET, Y., CARATY, A., FRANCESCHINI, I., BRIANT, C. (2008). Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus interactions with GnRH neuronal system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **36**: 131-137.
- DELLAL, G., CEDDEN, F., (2002). Koyun ve keçide üremenin mevsime bağlılığı ile üreme ve fotoperiyot ilişkileri, *Hayvansal Üretim*, **43(1)**: 64-73.
- DHILLO, W.S., MURPHY, K.G., BLOOM, S.R. (2007a). The neuroendocrine physiology of kisspeptin in the human. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **8**: 41-46.
- DHILLO, W.S., CHAUDHRI, O.B., THOMPSON, E.L., MURPHY, K.G., PATTERSON, M., RAMACHANDRAN, R., NIJHER, G.K., AMBER, V., KOKKINOS, A., DONALDSON, M., GATEI, M.A., BLOOM, S.R. (2007b). Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **92(10)**: 3958-3966.
- DIEKMAN, M.A., BRAUN, W., PETER, D., COOK, D. (2002). Seasonal serum concentrations of melatonin in cycling and noncycling mares. *Journal of Animal Science*, **80(11)**: 2949-2952.
- DUBOCOVICH, M.L., HUDSON, R.L., SUMAYA, I.C., MASANA, M.I., MANNA, E. (2005). Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse, *Journal of Pineal Research*, **39(2)**: 113-120.
- DURMAZ, A., DİKMEN, N. (2007). Chemical Kisses: Kisspeptin. *Archives Medical Review Journal*, **16(3)**: 172-184.
- ELLIOTT, J.A., BARTNESS, T.J., GOLDMAN, B.D. (1989). Effect of melatonin infusion duration and frequency on gonad, lipid, and body mass in pinealectomized male Siberian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*, **4(4)**: 439-455.
- ERGİN, K., BAŞALOĞLU, K. (2004). Kronik melatonin uygulamasının sıçan ovaryumuna etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*, **43(1)**: 41-45.
- ERLICH, S.S., APUZZO, M.L.J. (1985). The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *Journal of Neurosurgery*, **63(3)**: 321-341.
- FAIGON, M.R., CARDINALI, D.P., MOGUILLEWSKY, J.A. (1982). Pinealectomy advances the time of development of steroid feedback on luteinizing hormone release in immature female rats. *Brain Research*, **241**: 366-369.
- FORTUNE, J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. **50**: 225-232.

- FRANCESCHINI, I., LOMET, D., CATEAU, M., DELSOL, G., TILLET, Y., CARATY, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, **401**: 225-230.
- FRASCHINI, F., MESS, B., MARTINI, L. (1968a). Pineal gland, melatonin and the control of luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, **82(5)**: 919-924.
- FRASCHINI, F., MESS, B., PIVA, F., MARTINI, L. (1968b). Brain receptors sensitive to indole compounds: function in control of luteinizing hormone secretion. *Science*, **159**: 1104-1105.
- FREEMAN, M.E. (1988). The ovarian cycle in the rat. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D., editors. *The Physiology of Reproduction*, pp. 1983, New York: Raven Press.
- FUNES, S., HEDRICK, J.A., VASSILEVA, G., MARKOWITZ, L., ABBONDANZO, S., GOLOVKO, A., YANG, S., MONSMA, F.J., GUSTAFSON, E.L. (2003). The KISS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **312**: 1357-1363.
- GARIDOU, M.L., BARTOL, I., CALGARI, C., PEVET, P., SIMONNEAUX, V. (2001). In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience*, **105**: 721-729.
- GINGERICH, S., WANG, X., LEE, P.K., DHILLON, S.S., CHALMERS, J.A., KOLETAR, M.M., BELSHAM, D.D. (2009). The generation of an array of clonal, immortalized cell models from the rat hypothalamus: analysis of melatonin effects on kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone neurons. *Neuroscience*, **162**: 1134-1140.
- GOODMAN, R.L., LEHMAN, M.N., SMITH, J.T., COOLEN, L.M., DE OLIVEIRA, C.V., JAFARZADEHSHIRAZI, M.R., PEREIRA, A., IQBAL, J., CARATY, A., CIOFI, P., CLARKE, I.J. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, **148**: 5752-5760.
- GOTTSCH, M.L., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, **30(1)**: 4-9.
- GOTTSCH, M.L., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2006). Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **254**: 91-96.
- GÖNÇ, E.N. (2009). Normal puberte gelişimi ve puberte prekoks. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **40**: 164-168.
- GREENBERG, M.J., PRICE, D.A. (1992). Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Progress in Brain Research*, **92**: 25-37.
- GUTIERREZ-PASCUAL, E., LEPRINCE, J., MARTINEZ-FUENTES, A.J., SE'GALAS-MILAZZO, I., PINEDA, R., ROA, J., DURAN-PRADO, M., GUILHAUDIS, L., DESPERROIS, E., LEBRETON, A., PINILLA, L., TONON, M.C., MALAGO, N.M.M., VAUDRY, H., TENA-SEMPERE, M., CASTANO, J.P. (2009). In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of kisspeptin-10-related peptides. *Molecular Pharmacology*, **76**: 58-67.
- GÜNDÜZ, B., KARAKAŞ, A. (2001). Effects of photoperiod and melatonin infusions on body weight in pinealectomized juvenile Siberian hamsters. *Turkish Journal of Biology*, **25**: 301-321.
- GÜZEL, Ö., TUNCEL, A., YILMAZ, A., ATAN, A. (2013). Varikoselde güncel görüşler. *Androloji Bülteni*, **54**: 180-183.

- HAGE, A.J., GROEN-KLEVANT, A.C., WELSCHEN, R. (1978). Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta Endocrinologica*, **88**: 375-382.
- HAN, S.K., GOTTSCH, M.L., LEE, K.J., POPA, S.M., SMITH, J.T., JAKAWICH, S.K., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A., HERBISON, A.E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *The Journal of Neuroscience*, **25**: 11349-11356.
- HANSEL, W. (2010). The essentiality of the epididymal fat pad for spermatogenesis. *Endocrinology*, **151**(12): 5565-5567. In: ASDELL, A., CROWELL, M.F. (1935). The effect of retarded growth upon the sexual development of rats. *The Journal of Nutrition*, **10**: 13-24.
- HARIHARASUBRAMANIAN, N., NAIR, N.P.V., PILAPIL, C. (1984). Circadian rhythm of plasma melatonin and cortisol during the menstrual cycle. In: BROWN, G.M., WAINWRIGHT, S.D., editors. *The Pineal Gland Endocrine Aspects*, pp 31–35, Pergamon Press, Toronto.
- HARIHARASUBRAMANIAN, N., NAIR, N.P.V., PILAPIL, C., THAVUNDAYIL, J.X., ANDQUIRION, R. (1986). Plasma melatonin levels during menstrual cycle: changes with age. In: GUPTA, D., REITER, R.J., editors. *The Pineal Gland During Development: from Fetus to Adult*. pp.166-173, Croom Helm., London, Sidney.
- HEUBNER, O. (1898). Tumor der glandula pinealis. *Dtsch Med Wochenschr*, **24**(2): 215.
- JAYASENA, C.N., DHILLO, W.S., BLOOM, S.R. (2009). Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. *Peptides*, **30**: 76-82.
- JOHNSON, L.Y., VAUGHAN, M.K., RICHARDSON, B.A., PETERBORG, L.J., REITER, R.J. (1982). Variation in pineal melatonin content during the estrus cycle of the rat. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Society for Experimental Biology and Medicine, pp.169: 416-419, New York.
- KACHI, T. (2007). Pineal structures and functions in mammalian body mechanisms coping with exogenous and endogenous changes. *Hiroaki Medical Journal*, **59**: 262-277. In: WURTMAN, R.J., AXELROD, J., KELLY, D.E. (1968). *The pineal*, pp. 1-199, New York: Academic Press.
- KACHI, T., TANAKA, D., WATANABE, S., SUZUKI, R., TONOSAKI, Y., FUJIEDA, H. (2006). Physiological pineal effects on female reproductive function of laboratory rats: prenatal development of pups, litter size and estrous cycle in middle age. *Chronobiology International*, **23**(1-2): 289-300.
- KAFA, İ.M., EYİĞÖR, Ö. (2011). Kisspeptinler ve kisspeptin nöronları: Üreme sistemi üzerine etkileri ve hipotalamik yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **37**(1): 53-60.
- KANDA, S., AKAZOME, Y., MATSUNAGA, T., YAMAMOTO, N., YAMADA, S., TSUKAMURA, H., MAEDA, K., OKA, Y. (2008). Identification of KISS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*, **149**: 2467-2476.
- KEEN, K.L., WEGNER, F.H., BLOOM, S.R., GHATEI, M.A., TERASAWA, E. (2008). An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology*, **149**: 4151-4157.

- KELEŞTİMUR, H., YILMAZ, B., AYAR, A., KILIÇ, E., ÖZCAN, M., KILIÇ, U., ALÇIN, E. (2009). Can the pineal gland modulate the effects of kisspeptin on the puberty onset in female rats? *Endocrine Abstracts*, **20**: 597.
- KELEŞTİMUR, H. (1996). İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **10(1)**: 141-147.
- KINOSHITA, M., TSUKAMURA, H., ADACHI, S., MATSUI, H., UENOYAMA, Y., IWATA, K., YAMADA, S., INOUE, K., OHTAKI, T., MATSUMOTO, H., MAEDA, K. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*, **146**: 4431-4436.
- KOÇAK, A., ÇOLAK, A. (1996). Melatonin ve santral sinir sistemi, *Turgut Özal Tıp Dergisi*, **3(3)**: 237-244.
- KOHN, D.F., CLIFFORD, C.B. (2002). Biology and diseases of rats. In: ANDERSON, L.C., LEOW, F.M., QUIMBY, F.W., editors. *Laboratory Animal Medicine*, pp. 121-165, San Diego: Academic Press.
- KONTUREK, S.J., KONTUREK, P.C., BRZOZOWSKA, I., PAWLIK, M., SLIWOWSKI, Z., CZENIKIEWICZ-GUZIŁ, M., (2007). Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *Journal of Physiology and Pharmacology*, **58**: 381-405.
- KOTANI, M., DETHEUX, M., VANDENBOGAERDE, A., COMMUNI, D., VANDERWINDEN, J.M., POUL, E.L., BREZILLON, S., TYLDESLEY, R., SUAREZ-HUERTA, N., VANDEPUT, F., BLANPAIN, C., SCHIFFMANN, S.N., VASSART, G., PARMENTIER, M. (2001). The metastasis suppressor gene KISS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G Protein-Coupled Receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 34631-34636.
- KRINKE, G.J. (2000). The Laboratory Rat. Part 4, Chapter 9, pp 145-173. New York: Academic Press.
- KUSZAC, J., RODIN, M. (1977). A new technique of pinealectomy for adult rats. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **33**: 283-284.
- KUŞ, İ., SARSILMAZ, M. (2002). Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **22**: 221-226.
- KUŞ, M.A. (2006). Sıçanlarda formaldehit maruziyetiyle testislerde oluşan morfolojik değişiklikler üzerine melatonin hormonunun koruyucu etkisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi (Tıp) ABD Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar.
- KUŞ, M.A. (2011). Pinealektomi yapılan sıçanlarda melatonin hormonunun hipokampus üzerindeki etkisi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD Doktora Tezi, Elazığ.
- KVETNOY, I.M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role with in diffuse neuroendocrine system. *The Histochemical Journal*, **31**: 1-12.
- LANG, U. (1986). Melatonin and puberty. *Pineal Research Reviews*, **4**: 199-243.
- LAWSON, N.O., WEE, B.E., BLASK, D.E., CASTLES, C.G., SPRIGGS, L.L., HILL, S.M. (1992). Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters. *Biology of Reproduction*, **47(6)**: 1082-1090.
- LE GOUIC, S., DELAGRANGE, P., ATGIE, C., NIBBELINK, M., HANOUN, N., CASTEILLA, L., RENARD, P., LESIEUR, D., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., AMBID, L. (1996). Effects of both

- a melatonin agonist and antagonist on seasonal changes in body mass and energy intake in the garden dormouse. *International Journal of Obesity*, **20(7)**: 661-667.
- LEE, D.K., NGUYEN, T., O'NEILL, G.P., CHENG, R., LIU, Y., HOWARD, A.D., COULOMBE, N., TAN, C.P., TANG-NGUYEN, A.T., GEORGE, S.R., O'DOWD, B.F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*, **446**: 103-107.
- LEE, J.H., MIELE, M.E., HICKS, D.J., (1996). KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, **88**: 1731-1771.
- LI, C., KIM, K., NELSON, L.S. (1999). FMRamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Research*, **848**: 26-34.
- LI, S., REN, J., YANG, G., GUO, Y., HUANG, L. (2008). Characterization of the porcine kisspeptins receptor gene and evaluation as candidate for timing of puberty in sows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **125**: 219-227.
- LOBO, R.A., CARMINA, E. (1997). Polycystic ovary syndrome. In: LOBO, R.A., MISHALL, D.R., PAULSON, R.J., SHOUBE, D., editors. *Infertility, Contraception and Reproductive Endocrinology*. Blackwell Science, pp 364-383. Malden, USA.
- LUBOSHITZKY, R., SHEN-ORR, Z., HERER, P. (2002). Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **48(3)**: 225-232.
- MACCHI, M.M., BRUCE, J.N. (2004). Human physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **25**: 177-195.
- MAEDA, K.I., OHKURA, S., TSUKAMURA, H. (2000). Physiology of reproduction. In: KRINKE, G.J., editor. *The Laboratory Rat*, Part 4: Reproduction and Breeding, Chapter 9, pp 145-176, New York: Academic Press.
- MAKSIMOVICH, A.A. (2002). Structure and function of the vertebrate pineal gland. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **38**: 1-15.
- MAO, S.H., JIANG, J., SUN, X., ZHAO, Q., QIAN, B.P., LIU, Z., SHU, H., QIU, Y. (2011). Timing of menarche in Chinese girls with and without adolescent idiopathic scoliosis: current results and review of the literature. *European Spine Journal*, **20(2)**: 260-265.
- MARCHESE, A., GEORGE, S.R., KOLAKOWSKI, L.F., LYNCH, K.R., O'DOWD, B.F. (1999). Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, **20**: 370-375.
- MARCONDES, F.K., BIANCHI, F.J., TANNO, A.P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, **62(4A)**: 609-614.
- MARTINEZ-CHAVEZ, C.C., MINGHETTI, M., MIGAUD, H. (2008). GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, **156**: 224-233.
- MASON, A.O., GREIVES, T.J., SCOTTI, M.A., LEVINE, J., FROMMEYER, S., KETTERSON, E.D., DEMAS, G.E., KRIEGSFELD, L.J. (2007). Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. *Hormones and Behavior*, **52**: 492-498.

- MASUI, T., DOI, R., MORI, T., TOYODA, E., KOIZUMI, M., KAMI, K., ITO, D., PEIPER, S.C., BROACH, J.R., OISHI, S., NIIDA, A., FUJII, N., IMAMURA, M. (2004). Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **315(1)**: 85-92.
- MATAGNE, V., RASIER, G., LEBRETHON, M.C., GÉRARD, A., BOURGUIGNON, J.P. (2004). Estradiol stimulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro: correlation with prenatal exposure to sex steroids and induction of sexual precocity in vivo. *Endocrinology*, **145**: 2775-2783.
- MATSUI, H., TAKATSU, Y., KUMANO, S., MATSUMOTO, H., OHTAKI, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **320**: 383-388.
- MEIJS-ROELOFS, H.M.A., KRAMER, P., SANDER, H.J. (1983). Changes in serum concentrations of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. *Journal of Endocrinology*, **98**: 241-249.
- MEREDITH, S., JACKSON, K., DUDENHOEFFER, G., GRAHAM, L., EPPLE, J. (2000). Long-term supplementation with melatonin delays reproductive senescence in rats, without an effect on number of primordial follicles. *Experimental Gerontology*, **35(3)**: 343-352.
- MESSAGER, S., CHATZIDAKI, E.E., MA, D., HENDRICK, A.G., ZAHN, D., DIXON, J., THRESHER, R.R., MALINGE, I., LOMET, D., CARLTON, M.B., COLLEDGE, W.H., CARATY, A., APARICIO, S.A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 1761-1766.
- MOGUILEVSKY, J.A., FAIGON, M.R., SZWARCFARB, B., SCACCHI, P., CARDINALI, D.P. (1982). Factors influencing the positive feedback effect of ovarian steroids of LH secretion. *Progress in Clinical and Biological Research*, **82**: 49-59.
- MOĞULKOÇ, R., BALTACI, A.K. (2008). The effect of pinealectomy on plasma vasopressin response to isotonic, hypertonic and hypovolemic treatments in rats supplemented with L-thyroxine, *Acta Biologica Hungarica*, **59(2)**: 163-72.
- MORGAN, P.J., ROSS, A.W., MERCER, J.G., BARRETT, P. (2003). Photoperiodic programming of body weight through the neuroendocrine hypothalamus. *Journal of Endocrinology*, **177(1)**: 27-34.
- MORRISON, L.J., MARCINKIEWICZ, J.L. (2002). Tumor necrosis factor α enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. *Biology of Reproduction*, **66**: 450-457.
- MORTOLA, J.F., LAUGHLIN, G.A., YEN, S.S. (1993). Melatonin rhythms in women with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **77(6)**: 1540-1544.
- MUIR, A.I., CHAMBERLAIN, L., ELSHOURBAGY, N.A., MICHALOVICH, D., MOORE, D.J., CALAMARI, A., SZEKERES, P.G., SARAU, H.M., CHAMBERS, J.K., MURDOCK, P., STEPLEWSKI, K., SHABON, U., MILLER, J.E., MIDDLETON, S.E., DARKER, J.G., LARMINIE, C.G., WILSON, S., BERGSMAN, D.J., EMSON, P., FAULL, R., PHILPOTT, K.L., HARRISON, D.C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KISS-1. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 28969-28975.
- MÜLAZIMOĞLU, S.B., İDE, T., ASLAN, S. (2012). Ratlarda üreme. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 39-44.

- NAVARRO, V.M., CASTELLANO, J.M., FERNA 'NDEZ-FERNA 'NDEZ, R., BARREIRO, M.L., ROA, J., SANCHEZ-CRIADO, J.E., AGUILAR, E., DIEGUEZ, C., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KISS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KISS-1 peptide. *Endocrinology*, **145**: 4565-4574.
- NAVARRO, V.M., CASTELLANO, J.M., FERNANDEZ-FERNANDEZ, R., TOVAR, S., ROA, J., MAYEN, A., BARREIRO, M.L., CASANUEVA, F.F., AGUILAR, E., DIEGUEZ, C., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M. (2005). Effects of KISS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **146**:1689-1697.
- NEMESKÉRI, A., HALÁSZ, B., KURCZ, M. (1983). Ontogenesis of the rat hypothalamo-adenohypophyseal system and inherent capacity of the fetal pituitary to differentiate into hormone-synthesizing and releasing cells. In: BHATNAGAR, A.S., editor. *The Anterior Pituitary Gland*, p. 341-354. Raven Press, New York.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGE, F., BEAUVERGER, P., HENLIN, J.M., LEFOULON, F., FAUCHERE, J.L., DELAGRANGE, P., CANET, E., BOUTIN, J.A. (2000). Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 31311-31317.
- OAKLEY, A.E., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2009). Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews*, **30**(6): 713-743.
- OBA, G., ASLAN, S., KAYMAZ, M. (2001). Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vajinal sitolojinin kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **48**: 51-57.
- OHTAKI, T., SHINTANI, Y., HONDA, S., MATSUMOTO, H., HORI, A., KANEHASHI, K., TERAO, Y., KUMANO, S., TAKATSU, Y., MASUDA, Y., ISHIBASHI, Y., WATANABE, T., ASADA, M., YAMADA, T., SUENAGA, M., KITADA, C., USUKI, S., KUROKAWA, T., ONDA, H., NISHIMURA, O., FUJINO, M. (2001). Metastasis suppressor gene KISS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **411**: 613-617.
- OJEDA, S.R., RAMIREZ, V.D. (1972). Plasma levels of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology*, **90**: 466-472.
- OJEDA, S.R., RAMIREZ, V.D. (1973). Short-term steroid treatment on plasma LH and FSH in castrated rats from birth to puberty. *Neuroendocrinology*, **13**: 100-114.
- OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F., KATZ, K.H., COSTA, M.E., CONN, P.M. (1986). Activation of two different but complementary biochemical pathways stimulates release of hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**: 4932-4936.
- OKATANI, Y., WATANABE, K., MORIOKA, N., HAYASHI, K., SAGARA, Y. (1997). Nocturnal changes in pineal melatonin synthesis during puberty: Relation to estrogen and progesterone levels in female rats. *Journal of Pineal Research*, **22**: 3341.
- ORSINI, M.J., KLEIN, M.A., BEAVERS, M.P., CONNOLLY, P.J., MIDDLETON, S.A., MAYO, K.H. (2007). Metastin (KISS-1) mimetics identified from peptide structure-activity relationship-derived pharmacophores and directed small molecule database screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**: 462-471.
- ÖKTEM, Ö., URMAN, E. (2012). Reprodüktif yaşam siklusu: Folikülogenez ve menstruasyon. *Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology*, **9** (1): 1-24.

- ÖZGÜNER, F., ÖZCANKAYA, R., DELİBAŞ, N., KOYU, A., ÇALIŞKAN, S. (1995). Melatonin ve klinik önemi. *Süleyman Demirel Üniversitesi. Tıp Fakültesi Dergisi*, **2(4)**: 1-6.
- ÖZŞAHİN, M. (2006). Ooferektomize ve Pinealektomize Ratlarda Egzojen Melatonin Uygulamanın Kemik Mineral Dansitometresi Üzerine Etkileri, İnönü Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Uzmanlık Tezi, Malatya.
- ÖZTÜRK, S. (2006). Jinekolojik Ameliyat Geçiren Olgularda Ameliyat Sonrası Titreme Sıklığı ile Melatonin Düzeyleri Arasındaki Bağlantının Değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD Uzmanlık Tezi, Isparta.
- PALABIYIK, O. (2003). Farklı Türde Kanserli Hastalarda Melatonin Salınım Ritmi ve G mutasyonları. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik ABD Yüksek Lisans Tezi, Edirne.
- PALAOĞLU, S., BEŞKONAKLI, E. (1998). Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*, **1(1)**: 13-18.
- PANG, S.F., TANG, F., TANG, P.L. (1984). Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *Journal of Experimental Zoology*, **229(1)**: 41-47.
- PARENT, A.S., TEILMANN, G., JUUL, A., SKAKKEBAEK, N.E., TOPPARI, J., BOURGUIGNON, J.P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine Reviews*, **24(5)**: 668-693.
- PARKER, K.L., SCHIMMER, B.P. (2006). Embryology and genetics of the mammalian gonads and ducts. In: NEILL, J.D., editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3th edition, Chapter 8, pp. 313-336. Elsevier, St. Louis.
- PEKMEZ, H., KUŞ, İ., ÇOLAKOĞLU, N., ÖGETÜRK, M., KULOĞLU, T., SARSILMAZ, M. (2005). Pinealektomili sıçanlarda uterusun ışık mikroskop düzeyde incelenmesi, *Fırat Tıp Dergisi*, **10(3)**: 92-95.
- PEKMEZ, H., KUŞ, İ., ÖGETÜRK, M., KUTLU, S., ZARARSIZ, İ., SARSILMAZ, M. (2004). Sıçanlarda oksitosinle indüklenmiş miyometriyum kasılmaları üzerine melatonin hormonunun etkisi, *Fırat Tıp Dergisi*, **9**: 1-5.
- PINEDA, R., GARCIA-GALIANO, D., ROSEWEIR, A., ROMERO, M., SANCHEZ-GARRIDO, M.A., RUIZ-PINO, F., MORGAN, K., PINILLA, L., MILLAR, R.P., TENA-SEMPERE, M. (2010). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology*, **151(2)**: 722-730.
- PLANT, T.M., RAMASWAMY, S., DIPIETRO, M.J. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology*, **147**: 1007-1013.
- POLSON, D., WADSWORTH, J., ADAMS, J., FRANCK, S. (1988). Polycystic ovaries: a common finding in normal women. *Lancet*, **1**: 870-872.
- POMPOLO, S., PEREIRA, A., ESTRADA, K.M., CLARKE, I.J. (2006). Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*, **147**: 804-810.

- PRUNET-MARCASSUS, B., DESBAZEILLE, M., BROS, A., LOUCHE, K., DELAGRANGE, P., RENARD, P., CASTEILLA, L., PÉNICAUD, L. (2003). Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*, **144** (12): 5347.
- QUIÑONES-JENAB, V., PERROTTI, L.I., HO, A., JENAB, S., SCHLUSSMAN, S.D., FRANCK, J., KREEK, M.J. (2000). Cocaine affects progesterone plasma levels in female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **66**(2): 449-453.
- RAMASWAMY, S., SEMINARA, S.B., POHL, C.R., DIPIETRO, M.J., CROWLEY, W.F., PLANT, T.M. (2007). Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, **148**: 3364-3370.
- RAMASWAMY, S., GUERRIERO, K.A., GIBBS, R.B., PLANT, T.M. (2008). Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immuno-fluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, **149**: 4387-4395.
- RAMIREZ, V.D. (1973). Endocrinology of puberty. In: GREEP, R.O., ASTWOOD, E.B., editors. *Handbook of Physiology*, Volume:2, Section 7, pp. 1-28. American Physiological Society, Washington, DC.
- REITER, R.J. (1995). The pineal gland and melatonin relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Experimental Gerontology*, **30**: 199-212.
- REITER, R.J. (1975). The pineal gland and seasonal reproductive adjustments. *International Journal of Biometeorology*, **19**(4): 282-288.
- REITER, R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals, *Endocrine Reviews*, **1**: 109-131.
- REITER, R.J. (1981). The mammalian pineal gland: Structure and function. *American Journal of Anatomy*, **162**: 287-313.
- REITER, R.J. (1991). Pineal Melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, **12**: 151-180.
- REITER, R.J. (2003). Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, **17**: 273-285.
- REVEL, F.G., SABOUREAU, M., MASSON-PE'VET, M., PE'VET, P., MIKKELSEN, J.D., SIMONNEAUX, V. (2006). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Current Biology*, **16**: 1730-1735.
- RINGEL, M.D., HARDY, E., BERNET, V.J., BURCH, H.B., SCHUPPERT, F., BURMAN, K.D., SAJI, M. (2002). Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **87**: 2399.
- RIVEST, R.W., LANG, U., AUBERT, M.L., SIZONENKO, P.C. (1985). Daily administration of melatonin delays rat vaginal opening and disrupts the first estrus cycles: Evidence that these effects are synchronized by the onset of light. *Endocrinology*, **116**: 770-787.
- RIVEST, R.W., AUBERT, M.L., LANG, U., SIZONENKO, P.C. (1986). Puberty in the rat: modulation by melatonin and light. *Journal of Neural Transmission, Supplementum*, **21**: 81.

- ROA, J., VIGO, E., GARCIA-GALIANO, D., CASTELLANO, J.M., NAVARRO, V.M., PINEDA, R., DIÉGUEZ, C., AGUILAR, E., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M. (2008). Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **294**(6): E1088-E1096.
- ROBERTSON, J.L., CLIFTON, D.K., DE LA IGLESIA, H.O., STEINER, R.A., KAUFFMAN, A.S. (2009). Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, **150**: 3664-3671.
- ROSEWEIR, A.K., KAUFFMAN, A.S., SMITH, J.T., GUERRIERO, K.A., MORGAN, K., PIELECKA-FORTUNA, J., PINEDA, R., GOTTSCH, M.L., TENA-SEMPERE, M., MOENTER, S.M., TERASAWA, E., CLARKE, I.J., STEINER, R.A., MILLAR, R.P. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *The Journal of Neuroscience*, **29**: 3920-3929.
- ROY, D., ANGELINI, N., FUJIEDA, H., BROWN, G.M., BELSHAM, D.D. (2001). Cyclical regulation of GnRH gene expression in GTI-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology*, **142**: 4711-4720.
- RÖMSING, S., ULFBERG, J., BERGQVIST, Y. (2003). Determination of melatonin in human plasma with solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, **63**(1): 81-88. In: ARENDT, J. (1978). Melatonin assays in body fluids. *Journal of Neural Transmission, Supplementum*, **(13)**: 265-278.
- SACK, R.L., LEWY, A.J., HUGHES, R.J. (1998). Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. *Annals of Medicine*, **30** (1): 115-121.
- SAINZ, R.M., REITER, R.J., MAYO, J.C. (2000). Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. *Journal of Reproduction and Fertility*, **119**: 143-149.
- SALISBURY, R.L., DUDLEY, S.D., WEISZ, J. (1982). Effect of gonadotropin-releasing hormone on circulating levels of immunoreactive luteinizing hormone in fetal rats. *Neuroendocrinology*, **35**: 265-269.
- SALTI, R., GALLUZZI, F., BINDI, G., PERFETTO, F., TARQUINI, R., HALBERG, F., CORNÉLISS, G. (2000). Nocturnal melatonin patterns in children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **85**(6): 2137-2144.
- SAWYER, I., SMILLIE, S.J., BODKIN, J.V., FERNANDES, E., O'BYRNE, K.T., BRAIN, S.D. (2011). The vasoactive potential of kisspeptin-10 in the peripheral vasculature. *PLoS one*, **6**(2): E14671.
- SCHLABRITZ, N., HELLNER, N., MIDDENDOR, F.R., MÜLLER, D., OLCESE, J. (2003). The human myometrium as a target for melatonin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **88**: 908-913.
- SEMINARA, S.B., DIPIETRO, M.J., RAMASWAMY, S., CROWLEY, W.F., PLANT, T.M. (2006). Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*, **147**: 2122-2126.
- SEMINARA, S.B., MESSENGER, S., CHATZIDAKI, E.E., THRESHER, R.R., ACIERNO, J.S., SHAGOURY, J.K., BO-ABBAS, Y., KUOHUNG, W., SCHWINOF, K.M., HENDRICK, A.G.,

- ZAHN, D., DIXON, J., KAISER, U.B., SLAUGENHAUPT, S.A., GUSELLA, J.F., O'RAHILLY, S., CARLTON, M.B., CROWLEY, W.F., APARICIO, S.A., COLLEDGE, W.H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*, **349**: 1614-1627.
- SEMPLE, R.K., ACHERMANN, J.C., ELLERY, J., FAROOQI, I.S., KARET, F.E., STANHOPE, R.G., O'RAHILLY, S., APARICIO, S.A. (2005). Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**: 1849-1855.
- SETCHELL, B.P. (1982). Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R., SHORT, R.V., editors. *Reproduction in Mammals*, Volume 1, p. 63-101, New York: Cambridge University Press.
- SHAHAB, M., MASTRONARDI, C., SEMINARA, S.B., CROWLEY, W.F., OJEDA, S.R., PLANT, T.M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 2129-2134.
- SHARP, P.E., LAREGINA, M.C. (1998). *The Laboratory Rat*. New York, CRC Press; second edition, p.15-19.
- SHINOHARA, K., UCHIYAMA, M., OKAWA, M., SAITO, K., KAWAGUCHI, M., FUNABASHI, T., KIMURA, F. (2000). Menstrual changes in sleep, rectal temperature and melatonin rhythms in a subject with premenstrual syndrome. *Neuroscience Letters*, **281(2)**: 159-162.
- SIZONEKO, P.C., LANG, U., RIVEST, R.W., AUBERT, M.L. (1985). The pineal and pubertal development. *Ciba Foundation Symposium 117: Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*, **13**: 208-230.
- SMITH, J.T., ACOHIDO, B.V., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2006). KISS-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of Neuroendocrinology*, **18**: 298-303.
- SMITH, J.T. (2008). Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Research Reviews*, **57**: 288-298.
- SMITH, J.T., CLAY, C.M., CARATY, A., CLARKE, I.J. (2007). KISS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, **148**: 1150-1157.
- SMITH, J.T., CUNNINGHAM, M.J., RISSMAN, E.F., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2005). Regulation of KISS1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, **146**: 3686-3692.
- SMITH, J.T., LI, Q., YAP, K.S., SHAHAB, M., ROSEWEIR, A.K., MILLAR, R.P., CLARKE, I.J. (2011). Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology*, **152(3)**: 1001-1012.
- SMITH, J.T., RAO, A., PEREIRA, A., CARATY, A., MILLAR, R.P., CLARKE, I.J. (2008). Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology*, **149**: 1951-1959.
- SMITH-WHITE, S., OJEDA, S.R. (1981). Changes in ovarian luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the rat. *Endocrinology*, **109**: 152-161.

- SOYLU, S.M. (2011). Rat fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **431**: 1-3.
- SZABO, K., CSANYI, K. (1982). The vascular architecture of the developing pituitary-median eminence complex in the rat. *Cell and Tissue Research*, **224**: 563-577.
- ŞAHİN, S. (2009). Romatoid Artritli Hastalarda Serum Melatonin Seviyesi ve Bunun Hastalık Aktivitesi ve Sabah Tutukluğu İle Olan İlişkisi. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon ABD Uzmanlık Tezi, Sivas.
- ŞAHİN, Z. (2006). Melatoninin Sıçan Timüs Hücre Kültürlerinde Th1/Th2 Dengesi Üzerine Etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Tıp) ABD Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.
- ŞENER, G. (2010). Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, **14**: 112-120.
- TAMARKIN, L., BAIRD, C.J., ALMEDIA, O.F. (1985). Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction, *Science*, **227**: 714-720.
- TAMURA, H., NAKAMURA, Y., TAKIGUCHI, S., KASHIDA, S., YAMAGATA, Y., SUGINO, N., KATO, H. (1998). Pinealectomy of melatonin implantation does not affect prolactin surge or luteal function in pseudopregnant rats. *Endocrine Journal*, **45(3)**: 377-383.
- 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, R.J., SUGINO, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, **44**: 280-287.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., SANCHEZ-BARCELO, E., MEDIAVILLA, M.D., REITER, R.J. (2010). Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, **8(3)**: 162.
- TERAO, Y., KUMANO, S., TAKATSU, Y., HATTORI, M., NISHIMURA, A., OHTAKI, T., SHINTANI, Y. (2004). Expression of KISS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, **1678(2)**: 102-110.
- THOMPSON, E.L., MURPHY, K.G., PATTERSON, M., BEWICK, G.A., STAMP, G.W., CURTIS, A.E., COOKE, J.H., JETHWA, P.H., TODD, J.F., GHATEI, M.A., BLOOM, S.R. (2006). Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **291**: 1074-1082.
- TOMITA, K., NIIDA, A., OISHI, S., OHNO, H., CLUZEAU, J., NAVENOT, J.M., WANG, Z.X., PEIPER, S.C., FUJII, N. (2006). Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**: 7595-7603.
- TOMITA, K., OISHI, S., CLUZEAU, J., OHNO, H., NAVENOT, J.M., WANG, Z.X., PEIPER, S.C., AKAMATSU, M., FUJII, N. (2007). SAR and QSAR studies on the N-terminally acylated pentapeptide agonists for GPR54. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**: 3222-3228.
- TOMITA, K., OISHI, S., OHNO, H., FUJII, N. (2008). Structure-activity relationship study and NMR analysis of fluorobenzoyl pentapeptide GPR54 agonists. *Peptide Science*, **90(4)**: 503-511.
- TOSINI, G., FUKUHARA, C. (2002). The mammalian retina as a clock. *Cell and Tissue Research*, **309(1)**: 119-126.

- TOUITOU, Y. (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental Gerontology*, **36**: 1083-1100.
- TOVAR, S., VA'ZQUEZ, M.J., NAVARRO, V.M., FERNA'NDEZ-FERNA'NDEZ, R., CASTELLANO, J.M., VIGO, E., ROA, J., CASANUEVA, F.F., AGUILAR, E., PINILLA, L., DIEGUEZ, C., TENA-SEMPERE, M. (2006). Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology*, **147**: 2696-2704.
- UILENBROEK, J.T.J., VAN DER LINDEN, R. (1983). Changes in gonadotrophin binding to rat ovaries during sexual maturation. *Acta Endocrinologica*, **103**: 413-419.
- URBANSKI, H.F., OJEDA, S.R. (1985). In vitro simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17 β -estradiol secretion from immature ovaries. *Endocrinology*, **117**: 638-643.
- UYAR, A., ALAN, M., (2008). Koyunlarda erken anöstrus döneminde melatonin uygulamalarının ovulasyon ve gebelik üzerine etkisi, *Yüzüncü Yıl Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19(1)**: 47-54.
- UZ, T., GIUSTI, P., FRANCESCHINI, D., KHARLAMOV, A., MANEV, H. (1996). Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. *Neuroscience*, **73**: 631-636.
- VANECEK, J. (1998). Cellular mechanism of melatonin action. *Physiological Reviews*, **78**: 687-721.
- VANECEK, J., KOŞAR, E., VOLLRATH, L. (1990). Daily changes in melatonin binding sites and the effect of castration. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **73**: 165-170.
- VOORDOUW, B.C., EUSER, R., VERDONK, R.E. (1992). Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **74(1)**: 108-16.
- VANDER, A.J., JH LUCIANO, D.S. (1980). Human physiology: the mechanisms of body function. In: *Control of Ovarian Function*, 8th edition, part three, 654-656.
- VRIEND, J., BERTALANFFY, F.D., RALCEWICZ, T.A. (1987). The effects of melatonin and hypothyroidism on estradiol and gonadotropin levels in female Syrian hamsters. *Biology of Reproduction*, **36(3)**: 719-728.
- WALDHAUSER, F., DIETZEL, M. (1985). Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: Role in puberty control. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **453**: 205-214.
- WALDHAUSER, F., WEISZENBACHER, G., TATZER, E., GISINGER, B., WALDHAUSER, M., SCHEMPER, M., FRISCH, H. (1988). Alternations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **66(5)**: 648-52.
- WEBLEY, G.E., LUCK, M.R. (1986). Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, **78(2)**: 711-717.
- WEST, A., VOJTA, P.J., WELCH, D.R., WEISSMAN, B.E. (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KISS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics*, **54**: 145-148.
- WURTMAN, R.J., AXELROD, J., CHU, E.W. (1963). Melatonin, a pineal substance: Effect on the rat ovary. *Science*, **141(3577)**: 277-278.

- YAPRAK, M., ALTUN, A., VARDAR, A., AKTOZ, M., ÇİFTÇİ, S., ÖZBAY, G. (2003). Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*, **89(1)**: 103-107.
- YAZICI, P. (2011). Eksitator-Inhibitör Aminoasitlerin, Leptin ve Kisspeptin Düzeylerinin Uyku Profili ile Değerlendirilmesi ve Puberte Prekoks Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD Uzmanlık Tezi, Manisa.
- YELESWARAM, K., MCLAUGHLIN, L.G., KNIPE, J.O., SCHABDACH, D. (1997). Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *Journal of Pineal Research*, **22**: 45-51.
- YENİCE, H. (2012). Kardiyopulmoner Bypass Uygulanan Hastalarda Melatonin Sırs Bağlantısı. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD Uzmanlık Tezi, Mersin.
- YERER, B.M. (2006). Sirkadiyen Ritme Bağlı Olarak Fizyolojik Melatonin Seviyesindeki Değişikliklerin Göz ve Beyin Dokusunda Antioksidan Önemi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji ABD Doktora Tezi, Kayseri.
- YILMAZ, B. (1999). Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi, Ankara Üniversitesi Fizyoloji ABD Fizyoloji Ders Kitabı, Ankara.
- YOUNG, I.M., FRANCIS, P.L., LEONE, A.M., STOVELL, P., SILMAN, R.E. (1988). Constant pineal output and increasing body mass account for declining melatonin levels during human growth and sexual maturation. *Journal of Pineal Research*, **5(1)**: 71-85.
- YOUNG, S.N., GOUTHIER, S., KIELJ, M.E., LAL, S., BROWN, G.M. (1984). Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indolacetic acid and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology*, **39**: 87.
- ZHAO, H., PANG, S.F., POON, A. (2002). Mt(1) receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin on the rat uterine antimesometrial stromal cells. *Molecular Reproduction and Development*, **61**: 192-199.