

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİŞİ FARELERDE CİNSEL SIKLUSUN
FARKLI EVRELERİNDE KİSSPEPTİNİN
BAZI BEYİN BÖLGELERİNDE
İMMÜNOFLORESAN YÖNTEMLE
GÖRÜNTÜLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

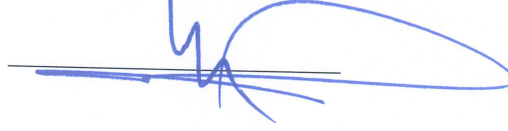
Meryem Sedef DOĞRU

2019

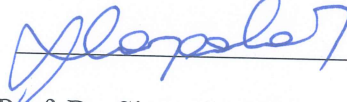
ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

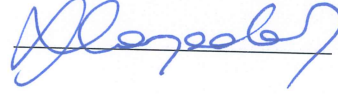


Prof. Dr. Sinan CANPOLAT

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

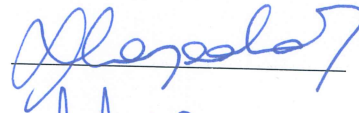
Prof. Dr. Sinan CANPOLAT



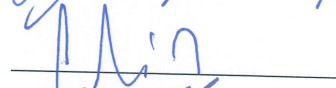
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

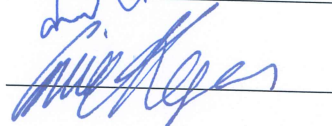
Prof. Dr. Sinan CANPOLAT

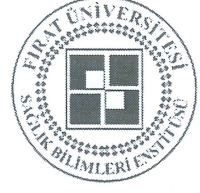


Doç. Dr. Suat TEKİN



Dr. Öğr. Üyesi Emine KAÇAR





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulguların elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarda etiğe aykırı davranışımın olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Meryem Sedef DOĞRU

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Meryem Sedef Doğru".

Prof. Dr. Sinan CANPOLAT

Fizyoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ



Canım Ailem'e
ve
Gönülden bağlı olduğu tüm dostlarıma

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince yardımını esirgemeyen kıymetli danışmanım, Temel Bilimler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sinan CANPOLAT'a ve Sn. Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a teşekkür ederim.

Kendisiyle doktora tezi aşamasında tanıştığım, iyi ki tanıdığım dediğim, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan değerli hocam, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Zübeyde ERCAN'a çok teşekkür ederim.

Deney aşamalarında tecrübelerini bizimle paylaşan, İstanbul Medipol Üniversitesi öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a, Dr. Öğr. Üyesi A. Burak ÇAĞLAYAN'a, Dr. Öğr. Üyesi. Taha KELEŞTİMUR'a, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER'e ve İstanbul Medipol Üniversitesi Beyin Araştırma Laboratuvarında çalışan kıymetli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yanına ne zaman gitsem yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, güler yüzüyle, içtenliği ile gönlümdeki yeri apayrı olan aynı zamanda çok iyi bir akademisyen olacağından emin olduğum kıymetli hocam Sn. Arş. Gör. Nazife ÜLKER'e ve değerli hocam Sn. Arş. Gör. Ahmet YARDIMCI'ya teşekkür ederim. Deney aşamalarımda bilgi, tecrübe ve deneyimleriyle yanımda olan hocam Sn. Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ'a teşekkür ederim.

Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Emine KAÇAR'a, Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerimiz Sn. Prof. Dr. Mete ÖZCAN'a ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi İhsan SERHATLIOĞLU'na teşekkür ederim.

Manevi desteğini her zaman arkamda hissettiğim, canım arkadaşım Sn. Arş. Gör. Ferah BULUT'a Biyofizik Anabilim Dalı doktoro ve yüksek lisans öğrencileri Sn. Gökhan ZORLU ve Sn. Miraç KELEŐTEMUR'a Fizyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Sn. Emre TANCAN'a teşekkür ederim.

Branşlarımız farklı olsa da, bana her konu da elinden gelenin fazlasını yapan, akademisyen olarak da hayatımda rol model aldığım canım babam Bitlis Eren üniversitesi kurucu rektörü Prof. Dr. Mahmut DOĞRU'ya, dualarıyla, hayat tecrübesiyle her zaman yanımda olan canım annem Yasemin DOĞRU'ya biricik kardeşim Arş. Gör. Arzu Ece DOĞRU ÇETİN'e ve eniştem Ali İhsan ÇETİN'e, çocukluğum, dünüm, bu günüm ve inşallah yarınım olacak kıymetli dostlarım kardeşlerim Dr. Ayşenur DOĞRU'ya Sena GENÇ'e ve Büşra GENÇ'e ve canım akrabalarım sonsuz teőekkürler.

Ayrıca çalışmanın yürütölmesi için gerekli desteği TF.18.11 numaralı proje kapsamında sağlayan FÜBAP'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Puberte Fizyolojisi	5
3.2. Pubertenin Bileşenleri	6
3.2.1. GnRH Nöron Sistemi	6
3.2.2. GnRH Sekresyonu	7
3.2.3. Gonadotropinler	8
3.2.4. Cinsiyet Steroid Hormonları	12
3.2.4.1. Testosteron	13
3.2.4.2. Östrojen ve Progesteron	14
3.2.4.3. İnhibin ve Aktivin	15
3.3. Dişi Farelerde Östrus Siklusu	16
3.4. Kisspeptin ve GPR54 Reseptörü	16

3.4.1. Kisspeptinin Sekrete Edildiği Hipotalamik Bölgeler	18
3.4.1.1. Arkuat Nükleus	19
3.4.1.2. Paraventriküler Nükleus	20
3.4.1.3. Dorsomedial Nükleus	21
3.4.1.4. Ventromedial Nükleus	21
3.5. Kisspeptinin Etkileri	22
3.5.1. Kisspeptin ve Koku	22
3.5.2. Kisspeptin ve Korku	24
3.5.3. Kisspeptin ve Duygu (Ruhsal Durum)Durumu	25
3.5.4. Kisspeptin ve İşitme	26
3.5.5. Kisspeptinin Öğrenme ve Hafıza Üzerindeki Etkileri	27
3.5.6. Kisspeptin ve İnsülin Sekresyonu	28
3.5.7. Kisspeptin ve Enerji Dengesinin Kontrolü	28
4. GEREÇ ve YÖNTEM	31
4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	31
4.2. Östrus Siklusunun Belirlenmesi	32
4.2.1. Dişı Farelerde Östrus Siklusunun Fazları	33
4.2.1.1. Metaöstrus	33
4.2.1.2. Diöstrus	34
4.2.1.3. Proöstrus	35
4.2.1.4. Östrus	36
4.3.Vajinal Smear Uygulaması	37
4.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	37
4.5. Boyama Basamakları	38

4.5.1. Beyin Kesitlerinin Alınması	38
4.6. İstatistiksel Analiz	39
5. BULGULAR	40
5.1. Arkuat Nükleus	40
5.2. Paraventriküler Nükleus	43
5.3. Dorsomedial Nükleus	44
5.4. Ventromedial Nükleus	46
6. TARTIŞMA	49
6.1. Arkuat Nükleusda Kisspeptin Yoğunluğu	49
6.2. Paraventriküler Nükleusda Kisspeptin Yoğunluğu	55
6.3. Dorsomedial Nükleusda Kisspeptin Yoğunluğu	57
6.4. Ventromedial Nükleusda Kisspeptin Yoğunluğu	59
7. KAYNAKLAR	61
8. ÖZGEÇMİŞ	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında hipotalamik çekirdeklerdeki kisspeptin yoğunluğunun Ort±SH değerleri. * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 diöstrus grubuyla karşılaştırıldığında. 40



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Erkek üreme sisteminin düzenlenmesi	11
Şekil 2. İnsanda endojen GnRH sekresyonunun markırları olarak periferal LH ve FSH serum ölçümü.....	12
Şekil 3. Smear Örnekleri.....	31
Şekil 4. Metaöstrus Fazı.....	33
Şekil 5. Diöstrus Fazı.....	34
Şekil 6. Proöstrus Fazı	35
Şekil 7. Östrus Fazı.....	36
Şekil 8. Arkuat nükleusta diöstrus, proöstrus, östrus gruplarındaki kisspeptin yoğunluğu.....	40
Şekil 9. Arkuat nükleustaki diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarındaki kisspeptin yoğunluğunun immünoreaktivitesi ve dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri 10X.....	41
Şekil 10. Paraventriküler nükleusta diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu.....	42
Şekil 11. Paraventriküler nükleusta diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğunun immünoreaktivitesi dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri 10X.....	44
Şekil 12. Dorsomedial nükleusta diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu.....	45

- Şekil 13.** Dorsomedial nükleusta, diöstrus; proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğunun immünoreaktivitesi dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri. 10X..... 46
- Şekil 14.** Ventromedial nükleusta diöstrus, proöstrus, östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu..... 47
- Şekil 15.** Ventromedial nükleustaki diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğunun immünoreaktivitesi dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri. 10X..... 48



KISALTMALAR LİSTESİ

ARC	: Arkuat Nükleus
AVPV	: Anteroventral Periventriküler Nükleus
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
LH	: Luteinizan Hormon
NPY	: Nöropeptid Y
POA	: Preoptik Alan
DMN	: Hipotalamusun Dorsomedial Nükleus
VMN	: Hipotalamusun Paraventriküler Nükleus
SON	: Supraoptik Nükleus
SCN	: Suprakiazmatik Nükleus
APN	: Anterodorsal Preoptik Nükleus
RP3V	: 3.Ventrikülün Rostral Periventriküler Bölgesi
AVP	: Arginin Vasopressin
TSH	: Troid Stimulan Hormon
CSH	: Kortikosteroid Stimulan Hormon
CART	: Kokain Amfetamin Transkript
GABA	: Galanin,- Aminobütirik Asit
OVX	: Overektomi
WT	: Wild Type
POMC	: Proopiomelanakortin
PACAP	: Hipofizer Adenilat Siklaz Aktive Edici Peptit
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
E2	: 17 β östradiyol
HHG	: Hipotalamus Hipofiz Gonadal Aks
ER α	: Östrojen Reseptörü
Kiss1r	: Kiss-1 geninin reseptörü
Östradiol	: E
ob / ob	: Leptin gen mutasyonlu obez
RPOA	: Rostral preoptik alan
MPOA	: Medial preoptik alan
OT	: Oksitosin
Arjinin Vasopresin	:AVP

1. ÖZET

Bu tez çalışmasıyla, dişi farelerin cinsel dönemlerinin östrus, diöstrus ve proöstrus fazlarında hipotalamusun arkuat nükleus (ARC), paraventriküler nükleus (PVN), dorsomedial nükleus (DMN) ve ventromedial nükleus (VMN) bölgelerinde kisspeptin ekspresyonunun immünofloresan yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmayla, dişi farelerin belirlenen cinsel dönemlerde, ilgili hipotalamik bölgelerde immünofloresan yöntemle belirlenen kisspeptin salınımlarının etkilediği fizyolojik mekanizmaların belirlenmesi ve bu bölgelerin immünofloresan görüntülenmesinin literatüre kazandırılması hedeflenmiştir. Belirlenen amaç doğrultusunda yapılan çalışmayla, beyin dokusunda farklı östrus fazlarındaki kisspeptin ekspresyonunun varlığı immünofloresan yöntemi ile tespit edilmiş ve kisspeptin salgılayan beyin bölgelerinin etkilediği fizyolojik mekanizmaların kisspeptin ekspresyonu ile bağlantısı açığa çıkarılmaya çalışılmıştır.

Çalışmada, 40 adet ortalama ağırlığı 35-40 gram olan 5-6 aylık Balb/c ırkı dişi fare kullanılmıştır. Tüm dişi farelere, ortalama 3 östrus döngüsü olacak şekilde her gün saat 10.00-12.00 arasında 15 gün süreyle vajinal smear ile siklus takibi yapılmıştır. Ardından düzenli siklus gösteren toplam 21 adet hayvan seçilmiş ve östrus fazlarına göre 3 gruba ayrılmıştır (diöstrus proöstrus, östrus ve grupları olmak üzere, n=7). Östrus, proöstrus ve diöstrus fazında olan hayvanlar, herhangi bir anestezi madde uygulamadan dekapite edilmiştir ve ardından beyin dokuları kuru buzda dondurulmuştur. Beyin dokusundan kesitler alınıp, floresan

boyama basamakları uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda, hipotalamusun ARC, PVN, DMN ve VMN çekirdeklerinde kisspeptin yoğunluğu hesaplanmıştır.

ARC'de de östrus grubunun diöstrus grubuna göre kisspeptin yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. PVN'de kisspeptin yoğunluğu, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplara göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. DMN ve VMN bölgelerinde, östrus ve proöstrus grupları diöstrus grubuna göre kıyaslandığında kisspeptin yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmayla dişi farelerin östrus, diöstrus ve proöstrus dönemlerinde hipotalamik ARC, PVN, DMN ve VMN ve bölgelerinde kisspeptin yoğunluğunun farklı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hipotalamus, immünflorasan, kisspeptin, cinsel siklus

2. ABSTRACT

Immunohistochemical Imaging of Kisspeptin in Some Brain Regions in Different Stages of Sexual Cycles of Female Mice

The aim of the study was to determine kisspeptin intensity by immunofluorescence method in hypothalamus arcuate nucleus (ARC), paraventricular nucleus (PVN), dorsomedial nucleus (DMN) and ventromedial nucleus (VMN) in the diestrus, proestrus and estrus phases of the sexual stages of female mice. The other purpose of this study was to determine the physiological mechanisms of the kisspeptin secretions determined by the immunofluorescence method in these hypothalamic regions of the female mice during the sexual periods and to introduce the immunofluorescence imaging of these regions into the literature. With the study conducted in accordance with the specified purpose, the presence of kisspeptin expression in different oestrus phases in brain tissue was determined by immunofluorescence method and the relationship between kisspeptin expression and physiological mechanisms affected by kisspeptin secreting brain regions was investigated.

In this study, totally 40 Balb/c female mice with 5-6 months age and average weight of 35-40 grams were used. Vaginal smears were taken between 10.00-12.00 hours during 15 days in all female mice. A total of 21 animals with regular cycles were then selected and divided into 3 groups according to the oestrus phases (diestrus, proestrus and oestrus groups, $n = 7$). The animals in the diestrus, proestrus and oestrus phases were decapitated without administration of

any anesthetic, and then brain tissues were frozen on dry ice. Sections were taken from brain tissue and fluorescence staining steps were applied.

At the end of the study, the intensity of kisspeptin in ARC, PVN, DMN and VMN nuclei of hypothalamus was calculated.

It was found that the intensity of kisspeptin increased significantly in the oestrus group compared to the diestrus group in ARC. When the intensity of kisspeptin in the PVN was statistically evaluated, no significant difference was found among the groups. In the DMN and VMN regions, when the estrus and proestrus groups were compared to the diestrus group, the intensity of kisspeptin increased significantly.

As a result, it was determined that kisspeptin intensity was different in hypothalamic ARC, DMN, VMN and PVN regions at estrous, diestrus and proestrus stages of female mice.

Keywords: Hypothalamus, immunofluorescent, kisspeptin, sexual cycles

3. GİRİŞ

3.1. Puberte Fizyolojisi

Puberte; üreme organlarının ve gonadların fonksiyonel olarak geliştiği, hipotalamus- hipofiz- gonadal (HHG) aksın devreye girdiği fizyolojik bir süreçtir. Bu süreçte, gonadlar (erkeklerde testisler, kızlarda yumurtalıklar) olgunlaşır, cinsel steroid gonadal hormonlar salgılanır (erkeklerde testosteron, kızlarda östrojen ve progesteron) ve sekonder cinsel karakterlerin gelişimiyle üreme kapasitesine erişilir (1).

Puberte, öncelikle cinsel steroid hormon düzeylerinin artmasıyla, fiziksel görünümdeki değişikliklerle karakterizedir (1). Hipotalamustan pulsatil olarak salınan, Gonadotropin serbestleştirici hormona (GnRH) cevap olarak, hipofiz bezinden pulsatil luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) sekresyonunda görülen artış bu süreçte meydana gelen ilk endokrin olaydır (2).

Luteinizan hormon, GnRH'nın kontrolünde adenohipofizden salınan protein yapılı hormon olarak sınıflandırılır ve hedef hücre zarı üzerindeki reseptör aracılığı ile biyolojik etkinlik gösterir. Salınım sıklığı ve dalga boyunun artması ile oosit matürasyonunu ve ovülasyonu uyarırken, salınım sıklığının ve dalga boyunun azalmasıyla luteal yapının devamına katkıda bulunmaktadır (3). FSH ise, glikoprotein hormon ailesinin bir üyesi olup, overlerde foliküllerin proliferasyonunu ve östrojen salınımını uyarır (4).

Prepubertal dönem boyunca GnRH nöronlarının sekresyonu, gonadal büyüme için yeterli değildir (5). Puberteyle birlikte, HHG aksını olgunlaşması GnRH nöronlarının aktivasyonu ile başlar (6). GnRH, hipofiz bezini uyarak gonadotropinlerin (LH ve FSH) sentezini ve sekresyonunu sağlar. Sonuç olarak, LH ve FSH'nin salgılanmasındaki artış testis ve ovaryumun hedef dokularından östradiyol ve testosteron üretimine neden olur (1).

Gonadal steroid hormonların salgılanması; meme, uterin dokusu, testis ve penisin yapısı ve boyutunda artış meydana getirir. Bu durum, sekonder cinsiyet özelliklerinin gelişimini ve üreme fonksiyonunun başlamasını sağlar (2).

Gonadal steroidler hem üremede hem de gonadal fonksiyonlarda rol almaktadırlar. Gonadlarda, steroid hormonlar dişilerde foliküllerin olgunlaşmasını sağlarken; erkeklerde sperm oluşumunu (spermatogenez) sağlar. Bu steroidler, nöroendokrin feedback mekanizması ile GnRH sekresyonunu etkilerler (7).

3.2. Pubertenin Bileşenleri

3.2.1. GnRH Nöron Sistemi

Gonadotropin serbestleştirici hormon, GNRH1 geni tarafından kodlanır. GnRH dalgalarının ve atımlarının anlık kontrolünde, GNRH1 ekspresyonunun düzenlenmesi kritik bir rol oynar. GnRH hipofizden gonadotropin üzerindeki etkisini G-protein bağlı reseptör aracılığıyla gösterir (8). Memelilerin çoğunda, GnRH nöronları preoptik alanda ve hipotalamusun rostral bölgesinde yer alır (9). GnRH, hipotalamusun bazal kısmında yer alan median eminens sinir uçlarından

pulsatil olarak sekrete edilir (7). Pulsatil salınımı, hipotalamustaki yaklaşık olarak 1500 tane GnRH nöronunun aktivasyonu ile gerçekleşir (9).

Gonadotropin serbestleştirici hormon nöronlarının birçoğu, unipolar ya da bipolar morfolojiye sahiptir. Bu nöronlar, diğer nöronlara kıyasla daha az uyarılmalarına rağmen GnRH nöronları, median eminense epizodik hormon salınımını eş zamanlı olarak gerçekleştirirler (7). GnRH, hipofizeyal portal sistemde yer alan yaklaşık 1000 adet nöronun sinir uçlarından her 30-120 dakikada senkronize atımlar şeklinde salınmaktadır. Bu salınım sayesinde hipofiz gonadotropinlerinden hem FSH ve LH'nin biyosentezini hem de sekresyonunu uyarmaktadır (10).

3.2.2. GnRH Sekresyonu

Gonadotropin serbestleştirici hormonun epizodik nöropeptid sekresyonu, GnRH nöronunun kendine özgü bir özelliğidir (8, 9). Pulsatil salınım ise, kalsiyuma bağımlı olup siklik adenozin monofosfat (cAMP) ile uyarılır (11).

Gonadotropin serbestleştirici hormonun hipofizde oluşan pulsatil gonadotropin sekresyonu, bir anlamda dişilerde overler erkeklerde testislerle beyin arasında bağlantıyı sağlar (12). İnsanlarda gebeliğin 9. haftasından itibaren salgılanır fakat sekresyon cinsiyete göre farklılık gösterir. Erkek fetüsta gebeliğin 34-38. haftalarında; dişi fetüste ise gebeliğin 22-25. haftalarında GnRH artışı maksimumdur (13).

İnsanlarda, şu ana kadar tanımlanmış 3 tip GnRH vardır. Bunlar sırayla GnRH-I, GnRH-II ve GnRH-III'tür. Omurgalılarda ise, GnRH'nin tanımlanması

yapılarak ortaya çıkarılmış 23 farklı formu bulunmaktadır ve bu formlar pek çok dokuda dağılmış halde bulunur. Merkezi ve periferik sinir sisteminde GnRH'nın bu formları; nöroendokrin, parakrin, otokrin ve nörotransmitter/nöromodülatör fonksiyonel olarak da farklılık gösterirler (10, 14).

Gonadotropin serbestleştirici hormonun formlarının özellikleri ve görevleri sırayla tanımlanacak olursa: GnRH-I, Hipotalamus hormonudur. LH ve FSH'nın sentezinden, sekresyonundan ve düzenlenmesinden sorumludur. GnRH-II, ilk önce beyinde keşfedilmiştir daha sonra diğer periferik dokularda (over, meme, endometriyum) da varlığı tanımlanmıştır. Son olarak, GnRH-III'ün ise insan fizyolojisindeki görevi araştırılmaktadır (14).

Gonadotropin serbestleştirici hormonun insanlarda tanımlanmış iki reseptörü vardır. Bu reseptörlerin ilki GnRH-I (GnRH-IR) reseptörüdür. Bu reseptör, başta beyin olmak üzere çeşitli dokularda (ovaryan, plasenta, periferik kan, karaciğer, foliküller, iskelet kası gibi) yer alır. İkincisi ise, GnRH-II (GnRH-IIR) reseptörü'dür. GnRH-II ise tıpkı GnRH-I gibi vücudun pek çok bölgesinde (hipofiz, plasenta, overler, uterus, prostat, olgun sperm ve karaciğer) bulunur (14).

3.2.3. Gonadotropinler

Ön hipofiz bezinin gonadotrop hücrelerinden salgılanan gonadotropik hormonlar glikoprotein yapıdadırlar. LH ve FSH salgısı, GnRH'nın salınımının ardından dakikalar içerisinde salgılanmaya başlar. Her yaşta gonadotropinler pulsatil olarak sekrete edilirler. (15, 16). GnRH etkisi ile önce depolanmış olan gonadotropinler salınır. Yeni sentezlenen gonadotropinler ise, daha geç serbestleşir (17).

Gonadotropin serbestleştirici hormon tamamen pulsatil olarak salınır ve LH'nın salgılanması da GnRH'ya bağlı olarak oluşur. Bu durum, GnRH'nın aynı zamanda LH-serbestleştirici hormon olarak adlandırılmasının da sebebidir. Döngü içerisinde GnRH'nın salgı miktarındaki değişimler, FSH salgısında hafif azalış ve artışlar meydana getirir (18).

Erkeklerde LH Leydig hücrelerinden testosteron salınımını uyardığı zaman, FSH da testislerden sperm oluşumunu (spermatogenezi) düzenler. Kadınlarda ise ovaryan foliküllerin gelişimi ve salgısı FSH tarafından uyarılırken, LH; ovulasyonu ve korpus luteumun oluşumunu sağlar. Ayrıca, FSH kadınlarda östrojen ve progesteron yapımını da uyarır (19). Dişilerde menstrüasyon, gebelik ve emzirme dönemlerinde gonadotropinlerin düzenli bir şekilde ve belirli bir sırayla salgılanması gerekirken; erkeklerde puberteden sonra, düzenli akışla salgılanmaz (20).

Gonadotropinlerin neonatal dönemde de salınım formu pulsatildir. Bu dönemde kadınlarda FSH salınımı LH salınımına göre daha baskın iken, erkeklerde tam tersi gerçekleşir. Cinsiyet steroidlerinin yetişkin seviyesini etkilemesi neonatal dönemdeki GnRH-etkili LH salınımından kaynaklanır (21).

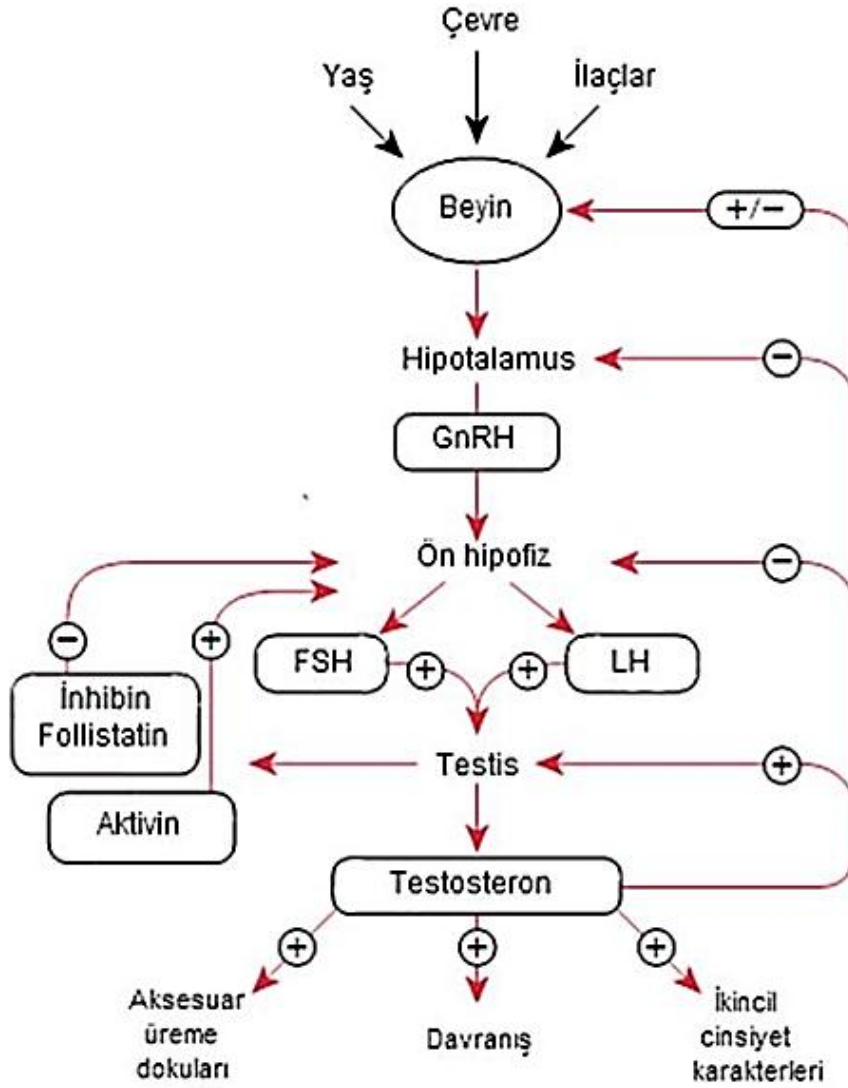
Gonadotropin serbestleştirici hormonun salınımında, yaşamın bazı dönemlerinde (kızlarda 12; erkeklerde 6. ayın başında) belirgin azalmalar görülür. Sonuç olarak, GnRH-etkili LH salınımı, cinsiyet steroid sekresyonu ve gonadotropin seviyesi orta-çocukluk dönemi boyunca azalır. Özellikle son zamanlarda literatürde yer alan çalışmalardan bu dönem süresince gonadotropin

atımlarının devam etmesine rağmen amplitütlerinde belirgin azalmalar olduğu rapor edilmiştir (21).

Gonadotropin sekresyonundaki artışlar, puberte başlangıcının birkaç yıl öncesinde gerçekleşir. Bu durum, özellikle yetişkinlerde 90'ar dakikalık periyodik süredeki gonadal cevaplar için oldukça önemli olan gonadotropinlerin pulsatil salınımıyla gerçekleşir. Nokturnal olarak başlayan pulsatil gonadotropin salınımı zamanla gonadotropin amplitütünde ve atım sıklığında ileri yönde bir artışın olmasına neden olur. Gonadal cinsiyet steroidleri ikincil cinsiyet karakterlerini etkileyecek düzeyde salgılandığı zaman fenotip olarak pubertenin başladığı kabul edilir (2, 13).

Luteinizan hormon, testislerden testosteron salgılanması için temel uyarandır. Bu sebeple, LH sekresyonunun artması testislerden salınan testosteronun dolaşımdaki seviyesini artırır (22). Gonadal steroidlerin negatif feedback etkisine LH oldukça duyarlıdır. Öyle ki testosteronda meydana gelebilecek en küçük artış LH salınımındaki artışı durdurabilir niteliktedir (Şekil 1). Şekil 1'den de anlaşılacağı üzere testosteron; androjen reseptörleri ve östrojen reseptörü- α ($ER\alpha$)'nin aktivasyonu vasıtasıyla gonadotropin sekresyonunu baskıladığı görülmektedir (22).

LH'nın salınım amplitütündeki artış, puberte ilerledikçe, testosteron seviyesindeki artışla beraber devam etmektedir (22). Bununla birlikte, hipotalamustaki feedback hassaslığı da azalmış olur. Yetişkinlikteki LH salınımı, hem gece hem de gündüz düzenli bir şekilde devam eder (21, 23).

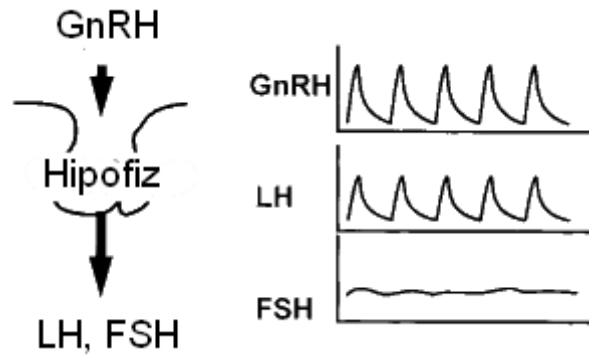


Şekil 1. Erkek üreme sisteminin düzenlenmesi. Pozitif ve negatif düzenlemeler sırası ile + ve – işaretleri ile gösterilmiştir (24).

Pulsatil gonadotropin salınımı, puberte ilerledikçe 24 saat boyunca ve yüksek genlikte oluşur. Erkeklerde testosteron seviyesindeki artışın başlaması LH'nın ilk nokturnal salınımından sonradır. Bu salınım sabahın erken saatlerinde en üst düzeye ulaşır ve devamında gün içerisinde düşüş oluşur. Dişilerde ise sabah saatlerinde östrojen seviyesi en üst seviyeye gelir (2, 13).

Literatürden elde edilen bilgilere göre yapılan birçok çalışmada, GnRH'nın pulsatil salınımını göstermek için LH ve FSH değerleri ölçülmüş ve sonuçlar yayınlanan bilimsel çalışmalarda rapor edilmiştir.

İnsanda, periferal LH ve FSH serum ölçümleri GnRH salınımının belirteçleri olarak kullanılmaktadır (Şekil 2). FSH ve LH'nın yarılanma ömürleri birbirinden farklıdır. Buna göre; LH'nın ve FSH'nın yarılanma ömürleri sırasıyla 20-30 dakika ve 120-180 dakikadır (10). Görüldüğü gibi FSH'nın yarılanma ömrü LH'nın yarılanma ömrüne göre ortalama altı kat daha fazladır. Bu sebeple, FSH'nın pulsatil aktivitesinin daha az olması, GnRH salınımı anlamında LH kadar etkin bir rol oynamamasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, GnRH'nın salınımı yarı ömürden ziyade aktiviteye bağlı olması dolayısıyla, yapılan çalışmalarda GnRH sekresyonunun klasik belirtecisi olarak FSH'dan ziyade LH kullanılmaktadır (10).



Şekil 2. İnsanda endojen GnRH sekresyonunun markırları olarak periferal LH ve FSH serum ölçümü (21).

3.2.4. Cinsiyet Steroid Hormonları

Gonadlar, her iki cinsiyette hem cinsiyet hormonlarının salgılanmasını hem de germ hücrelerinin yapımını (gametogenez) sağlarlar. Ovaryumdan salınan

ana androjen östradiyol, testislerden salınan ise testosterondur. Bu steroidlerin görevleri; büyüme ve gelişmeyi düzenlemek, eşeyssel davranışları ve üreme döngülerini kontrol etmektir (20, 25).

Overlerde çok miktarda östrojen ve az miktarda da androjen salgılanmasına karşılık testisler başta testosteron olmak üzere çok miktarda androjen ve az miktarda da östrojen sentezlerler. Östrojenler feminizan androjenler ise maskülinizan, etki gösterirler. Her ne kadar testis ve overlerin karşı cinslerde yüklendikleri görevler farklı olsa da her iki cinste androjenler adrenal bezin korteksinden salgılanır (20, 25).

3.2.4.1. Testosteron

Testisler erkek cinsiyet hormonlarını salgırlar. Bu hormonlar testosteron, dihidrotestosteron (DHT) ve androstenedion olarak tanımlanan androjenlerdir. Bu üç androjen arasında testosteron nispeten diğer androjenlere göre daha fazla miktarda bulunur. Bu sebeple testosteron en önemli testis hormonu olarak gösterilir (18, 26).

Testosteron doğrudan da kullanılabilen bir androjen olmakla birlikte bu kullanıma ek olarak bazı hedef dokular testosteronu DHT'ye dönüştürme özelliği de vardır. Bu özelliğinden dolayı testosteron, 5- α redüktaz ve aromataz için bir substrat görevi de görür. Testosteron, 5- α redüktaz enzimi ile DHT'ye ve aromataz enzimi ile östradiyole dönüştürülmesini sağlar (22). Sonuç olarak, testosteron ve DHT, spermatogenezde, erkek ürogenital sistemin gelişiminde, kemik artışı ve kasların hipertrofinde önemli rol oynarlar (27).

3.2.4.2. Östrojen ve Progesteron

Kadının plazmasında belirgin 3 tip östrojen bulunur. Bunlar, 17β östradiyol (E2), östron (E1) ve östriyol'dür (E3) (18). Bu östrojenler; korpus luteumdan, over foliküllerinin granüloza hücrelerinden ve plasentadan sekrete edilirler (25). Bir kadında gebelik olup olmama durumuna göre östrojenin salgılandığı yer ve miktar farklılık gösterir. Gebelik yok ise, östrojenlerin büyük bir kısmı overlerden, çok az miktar da adrenal korteksten sekrete edilir. Gebelikte ise, plasentadan da büyük miktarda östrojen salgılanır (18).

Östradiyol, overlerden salgılanan en önemli östrojendir. Östron, esas olarak periferik dokularda sentezlenirken az miktarda overlerden de sentezlenir. Östriyol zayıf bir östrojendir, östradiyol ve östrondan üretilen oksidatif bir üründür (18). Zayıf bir östrojen olan östriyol'ün gebelik süresince sekresyonu yüksektir (26, 27).

Progesterinler de over cinsiyet hormonlarındandır. Birbirinden farklı üç progesterin bulunur. Bunlar sırasıyla; progesteron, 7α -hidroksiprogesteron ve 20α -hidroksiprogesterondur (18). Progesteron progesterinlerin en önemlisi olarak kabul edilir. Gebelik haricinde bir kadında progesteron, menstrual siklusun luteal fazında sekrete edilir. Gebe olan bir kadında ise 3. aydan sonra progesteron salınımı artar. Bu bilgiler ışığında, gebeliğin sürdürülmesi, mens döneminde uterusun olgunlaşması için progesteronun rolü önemlidir (14, 15). Östrojen; gonadotropinlerin salgılanmasında negatif ve pozitif olmak üzere her iki geri bildirimde sahiptir. Yapılan çalışmalarda östrojenin ovulasyondan 36-48 saat önce pozitif geri bildirim etkisine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde de östrojenin bu özelliği iyi bilinmektedir. Ovulasyon; östrojenin artışıyla birlikte ön

hipofiz bezinden LH ve LH 'ya göre daha az miktarda FSH salgılanmasıyla oluşur. (14, 20).

Portal dolaşım içerisindeki stabil ve orta seviyedeki östrojen LH, FSH salgılarının her ikisinde negatif geri bildirim etkisi yapar. Tek başına progesteronun inhibe edici etkisi oldukça düşüktür. Ancak, östrojenin inhibe edici etkisi progesteron varlığında çok daha fazladır. Bu durum karşısında geri bildirim mekanizması özellikle ön hipofiz bezini etkilerken az miktarda da olsa hipotalamusun da inhibisyona neden olmaktadır. Sonuç olarak bu döngü sırasında, GnRH salgısında ve dolayısıyla LH ve FSH salınımında nispeten azalma söz konusu olur (18, 20).

3.2.4.3. İnhibin ve Aktivin

Progesterona ve östrojene ek olarak inhibinin de geri bildirim etkisinin olduğu bilinir (14). İnhibin hem erkek de hem de kadında salgılanan bir polipeptittir. İnhibin testislerde sertoli hücrelerinde; overde ise korpus luteumun granüloza hücrelerinden salgılanmaktadır (18, 20). İnhibin salgısındaki artışın östrojen/androjen artışıyla ilgili olduğu Şekil 1'den de rahatlıkla görülebilmektedir. İnhibin'in LH'daki etkisi çok daha az olmakla beraber FSH'nın inhibisyonu esas olarak inhibin B hormonuyla sağlandığı bilinir (14). LH'nın inhibisyonu testosteron ile sağlanırken testosteronun FSH'ya etkisi oldukça zayıftır (15).

Aktivin, granuloza ve sertoli hücrelerinden salınır (14). Alfa ve beta olmak üzere iki alt grubu vardır. Aktivin prolaktin ve büyüme hormonunun

salgılanmasını engeller (28). GnRH reseptör oluşumunda ve FSH sekresyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir (14).

3.3. Dişi Farelerde Östrus Siklusu

Laboratuvar fareleri, doğumdan sonra 2-3 ay içerisinde cinsel olgunluğa ulaşırlar. Seksüel siklusları ise 4-5 günde tamamlanır. Dişi fareler, yıl boyunca poliöstriktir. Erkek bulunmayan veya gruplar halinde yaşayan dişi fareler anöstrus gösterme eğilimine girebilirler. Bu durum, feromonlarla engellenebilir. Farelerde reproduktif feromonlar, gonadlar ve idrar gibi ekstraktlarca sekrete edilebilir. Erkek farelerin idrarları iki feromonal etkiye sahiptir. İlk feromonal etki (Bruce efekt), prolaktin sekresyonunun inhibisyonuna bağlı olarak gebeliğin bloke edilmesidir. İkinci feromonal etki ise (Whitten efekt) gonadotropinlerin salıverilmesine bağlı olarak farelerde östrus siklusunun uyarılması ve senkronizasyonudur (29).

3.4. Kisspeptin ve GPR54 Reseptörü

Kisspeptin, 2001 yılında kiss-1 geni tarafından kodlanan G-protein bağlı reseptör 54 (GPR54) için yüksek afiniteli bir RF-amid (Arg-Phe-NH₂) peptid ligandı olarak adlandırılmıştır (30). Kisspeptin – kisspeptin reseptör sinyalleşmesi memelilerde üreme için kilit öneme sahiptir. Kisspeptin, ortak bir prekürsör proteinden proteolitik bölünme ile oluşturulan dört peptid ailesidir (Kisspeptin-54, -14, -13 ve -10). Bütün kisspeptinler, GPR54 (31) olarak bilinen kisspeptin reseptörüne (Kiss1r) spesifik olarak bağlanarak onu aktive eder (30-32) ve reseptörün mutasyonları hipogonadotropik hipogonadizme neden olur (33, 34). Kisspeptin, hipotalamustaki GnRH nöronlarında kiss1r yoluyla GnRH

sekresyonunu uyarır. GnRH salgılanmasıyla kisspeptin HHG aksın aktivitesini kontrol eder ve sonuç olarak, puberte başlangıcı, östrus döngüsü ve spermatogenezis de dâhil olmak üzere üreme sistemi fonksiyonunu birçok yönden düzenler (35-37).

Memelilerde HHG aks da GnRH'nın pulsatil salınımı, fetal dönemde veya neonatal dönemin başlarında oluşur daha sonra puberde dönemine kadar baskılanır. GnRH sekrete eden nöronların yeniden aktive olması pubertal dönemi başlatan kilit olaydır (38). GPR54 reseptörü ilk kez 1999 yılında sıçanlarda keşfedilmiştir. Galanin benzeri peptitin reseptörüne güçlü bir afiniteyle bağlandığı bilinmekle birlikte, bu reseptör Galanin reseptörü ile %45 oranında benzerlik gösterdiğinden GPR54 reseptörünün galanin ailesinden olduğu kabul edilir (39).

Östrojen döngüsü boyunca, GnRH salgısı gonadal steroidler tarafından tonik negatif feedback mekanizmanın kontrolü altındadır. Bununla birlikte, diöstrustan başlayarak proöstrus ortasına kadar artarak devam eden östradiol (E), beyinde, negatiften pozitif feedback mekanizmaya bir geçiş başlatmak üzere hareket eder ve preovulatör GnRH/LH dalgalanmasını oluşturur (40).

G-protein bağlı reseptör-54, beyinde özellikle hipotalamusta, preoptik alan (POA), hipokampus, orta beyin, amigdala ve medulla, limbik sistem ve bazal gangliyonlarda yüksek oranda eksprese edilirken (30, 39, 41) periferde; plesanta, hipofiz, pankreas, kalp, kas, böbrek, karaciğer, akciğer, timüs, bağırsak ve testislerde eksprese edilir (42).

3.4.1. Kisspeptinin Sekrete Edildiği Hipotalamik Bölgeler

Ön beynin ventral kısmında yer alan hipotalamus; enerji homeostazı, sıvı dengesi, stres, büyüme, üreme davranışı, duygu ve sirkadiyen ritimlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (43). Hipotalamusta, paraventriküler nükleus (PVN), dorsomedial nükleus (DMN), arkuat nükleus (ARC), ventromedial nükleus (VMN), gibi anatomik ve fizyolojik özellikleri çok iyi bilinen birkaç önemli bölge bulunmaktadır (44). Bu nükleuslar, besin alımı ve iştahın düzenlenmesi, açlık-tokluk durumları, stres, vücudun enerji metabolizması ve vücut ağırlığının homeostatik düzenlenmesinde önemli rolleri vardır (44).

Kisspeptin sentezleyen hücre popülasyonlarının nöroanatomik dağılımı, memeli türleri arasında korunmaktadır. Kisspeptin eksprese eden nöronlar, üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesi (RP3V) ve ARC olmak üzere beyinde başlıca iki ayrı hipotalamik bölgede yerleşim göstermektedir (40, 45, 46). ARC'deki kisspeptin ekspresyonu, fare (46-48), sıçan (49), hamster (50) ve insan (51) gibi farklı türlerde de gösterilmiştir. Bu nükleusta kisspeptin, nörokinin B (NkB), endojen opioid peptid dinorfin A (Dyn) ve diğer sinyal molekülleriyle birlikte eksprese edilir. Bu nöronlar, kenedy nöronları (KNDy) olarak tanımlanır ve pulsatil GnRH nörosekresyonunun kritik aracılığı olarak işlev gösterirler (52, 53).

İkinci büyük kisspeptin-pozitif hücre popülasyonu, fare (46, 48, 54), sıçan (45, 49), hamster (50) ve insanlarda (51) RP3V'de lokalizedir. (RP3V, anterior ventral periventriküler bölge (AVPV) ve periventriküler nükleusu (PeN) içerir). Bu iki hipotalamik bölge testosteron ve östradiol ile hem büyüme döneminde hem

de yetişkinlikte farklı şekilde düzenlenir (47, 54). Östrojen RP3V'de kisspeptin ekspresyonunu artırırken, ARC'de kisspeptin ekspresyonunu azaltır (55).

Bu iki ana kisspeptin hücre popülasyonun yanı sıra Kiss1 mRNA ve/veya kisspeptin immünoreaktif nöronları beyin sapında (56), medial amigdala (46, 49), DMN ve PVN bildirilmiştir (48, 56, 57). Kisspeptin immünoreaktif lifleri de DMN, ARC ve PVN'de bulunur ve preoptik bölgelere projeksiyon gönderir (56, 58). In situ hibridizasyon yöntemiyle, GPR54'ün medial preoptik alanda (MPOA), DMN, ARC ve lateral hipotalamik bölgede sentezlendiği gösterilmiştir (58-60).

3.4.1.1. Arkuat Nükleus

Arkuat nükleus, üçüncü ventrikülün her iki tarafında hipotalamusun tabanında yer alır. Memelilerde hücre gövdesi, optik kiazmanın posteriorunda rostro-kaudala kadar uzanır. Bu nükleus hem aneroksijenik hem de oreksijenik nöronların eksprese edildiği yerdir (61). Enerji dengesinin modüle edilmesinde hipotalamik entegrasyonu ile ilişkili bölgeler arasında yer alır. Nöropeptit Y (NPY), dinorfin, β -endofin, Galanin- Aminobütirik Asit (GABA), glutamat gibi iştah arttıran nöronları ihtiva eder. Agouti ilişkili peptit (AgRP), ARC'de NPY mRNA ile birlikte eksprese edilir (62).

Morfolojik çalışmalar, ARC'de NPY ve GABA'nın birlikte sekrete edildiğini kanıtlamıştır (63-65). Mevcut çalışmalar, anoreksijenik etkiye sahip Kokain Amfetamin Transkript'in (CART) ARC'den sekrete edildiğini göstermektedir (66).

Arkuat nükleusta kan beyin bariyeri bulunmaz. Hipotalamustaki yerleşimi, leptin ve insülin gibi peptitlerle birlikte beyin-omurilik sıvısı aracılığıyla da

adrenal ve gonadal steroidlerle doğrudan iletişim halinde olacak şekildedir. Bu, sebeple ARC'nin yerleşimi anatomik olarak stratejik bir öneme sahiptir (67).

3.4.1.2. Paraventriküler Nükleus

Paraventriküler nükleus, üçüncü ventriküle bitişik diensefalonun ventralinde yer alır. Heterojen parvoküler nöronlar, magnoselüler nöronlar ve uzun aksonlu nöronlardan oluşur (68). Parvoküler nöronlar, median eminense akson göndererek hipotalamus-hipofizyal-troid aks ve hipotalamus-hipofizel-adrenal akstan sırayla Tiroid Stimulan Hormonun (TSH) ve Kortikosteroid Stimulan hormonun (CSH) portal dolaşıma geçmesine yol açar (68).

PVN'deki kortikosteroid nöronları, AMP-aktifleştirilmiş protein kinazın aktivasyonu yoluyla yağ üzerinde karbonhidrat tercihleri ile ilişkilidir (69). PVN ayrıca bazı somatostatin (SST) -pozitif nöronları içerir. Bu nöronlar ön hipofiz bezinden büyüme hormonu ve TSH'nın salgılanmasını önler (70).

Magnoselüler nöronlar, esas olarak hipofiz bezinin arka lobunda yer alırlar. Hipotalamik-nörohipofizyal sistem (HNS) aracılığıyla arjinin vasopressin (AVP) ve oksitosin (OT) hormonlarının sekrete edilmesini sağlayarak vücudun sıvı dengesini, anne sütünün salgılanmasını, uterus kasılmasını ve ejakülasyon gibi fizyolojik olayların düzenlenmesini sağlar (68).

Paraventriküler nükleustaki nöronlar beslenme davranışı üzerinde de etkilidirler. Anoreksijenik özelliğe sahip kortikotropin serbestleştirici hormon, tirotropin serbestleştirici hormon, oksitosin ve aynı zamanda melanokortin reseptör 3/4R ve çeşitli NPY reseptörlerini eksprese eder (71-73).

3.4.1.3. Dorsomedial Nükleus

Dorsomedial nükleus, çeşitli nöronal ağları içinde barındırdığından, merkezi sinir sisteminde önemli bir yere sahiptir (74). İntra ve ekstra hipotalamik bağlantılara sahip olduğundan, özellikle nöroendokrin ve otonomik homeostazda (vücut ısısı, uyarılma, lokomotor aktivite, sirkadiyen ritim gibi fonksiyonlarla) vücudun temel fonksiyonlarının yerine getirilmesinde katkı sağlar (75). DMN, anoreksijenik ve oreksijenik nöronların merkezi olup, tüm gastrik vagal afferent lifleri, kolesistokinin ve beslenmenin kontrolünde önemli bir yere sahip olan leptin reseptörlerini içermektedir. Bu sebeple DMN, beslenme davranışının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (74, 76-78).

Hipoglisemiye duyarlı glikojenik nöronlar hipotalamusun birçok bölgesinde yer aldığı gibi DMN'de de bulunmaktadır. Bu sebeple DMN nöronal bağlantılarla visseral ve somatik yanıtlarla vücudun glikoz homeostazının korunmasında da rol alır (79).

3.4.1.4. Ventromedial Nükleus

Ventromedial nükleus, median eminens üzerinde yer alan eliptik bir şekle sahip bilateral hücre grubundan oluşur (80). Vücut ağırlığını ve enerji homeostazını düzenleyen ilk hipotalamik alandır (81). Vücudun “Tokluk merkezi” olarak tanımlanır. VMN'de kimyasal lezyon oluşturulmuş çalışmalarda enerji tüketiminin arttığı ifade edilmiştir (82). Bu bölgede leptin reseptörü yoğun olarak bulunurken aynı zaman da melanokortin 4 reseptör (MCR4) de eksprese edilmektedir. Steroidojenik faktör 1 ve hipofizer adenilat siklaz aktive edici peptit (PACAP) içeren nöronlar da bu bölgede yer alır (83, 84).

Stereoidojenik faktör 1; VMN'de leptin reseptörünü eksprese eder ve enerji tüketimini düzenler (85). PACAP ise, POMC nöronlarının aktivasyonunu sağlar, ARC'de Proopiomelanokortin (POMC) mRNA ekspresyon seviyesinin artmasına katkıda bulunur (86).

3.5. Kisspeptinin Etkileri

3.5.1. Kisspeptin ve Koku

Koku uyarıcıları, çeşitli duysal (duygu durumu) durumun ve bununla birlikte sosyal davranışların oluşumunu başlatır (87). Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda, koku alma sisteminin merkezi olan amigdalada kisspeptinin rolü tanımlanmış ve koku reseptörlerinin kisspeptin nöronlarıyla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (88). Ayrıca, floresan immünokimyasal çalışmalarda, amigdalada yer alan kisspeptin nöronlarının sosyal davranış üzerinde etkili olan vazopressinerjik ve dopaminerjik nöronlarla da yakın ilişkili olduğu da ortaya konulmuştur (89, 90).

Kisspeptinin, mitral hücrelerin yarısını inhibe ettiği bilinmesine rağmen koku almada önemli olan granül hücreleriyle etkileşimi tam olarak bilinmemektedir (88). Östrus siklusunda, kokunun amigdalada kisspeptin ekspresyonunu etkileyebileceği düşünülse de, bu etkinin ispatlanması için daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır (91).

Kiss1 reseptörü nakavt erkek farelerle yapılan bir çalışmada, olfaktör üreme davranışında kisspeptinin rolü ortaya konulmuştur (92). Bu çalışmada, erkek hayvanların zamanlarının %70'inden fazlasını dişi farelerin yanında geçirerek araştırmacı davranış (koklama gibi) gösterdikleri görülmüştür. Ancak

testosteron replasmanı yapılmış Kiss1r nakavt erkek farelerin (gizli bir kurabiye testiyle doğrulanan normal koku alma işlevine rağmen) tercihli bir şekilde dişileri araştırmadığı belirlenmiştir (92).

Bu bulgular, dişi ve erkelerde kisspeptin reseptörünün kokunun üreme davranışındaki rolü için önemli bir gösterge sağlamıştır. Sonuç olarak, posterodorsal medial amigdalada yer alan kisspeptin nöronlarının, erkek farelerin östrus fazındaki dişileri bulmak için geçirdiği zamanı arttırdığı ifade edilmiştir (93). Bununla birlikte, cinsel olgunluğa erişmemiş farelerle sosyalleşmek için harcanan sürenin uzamasına neden olduğu ve bu nedenle amigdalada kisspeptin sinyalleşmesinin sadece karşı cins tercihini değil aynı zamanda cinsel olgunluğa erişmemiş farelerde koku tercihini de değiştirebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmadaki etkilerin, kisspeptin salgılamasıyla mı yoksa kisspeptin nöronlarından salınan diğer nörotransmitterlerle mi ilişkili olduğu ise henüz belirlenememiştir (91).

Karşı cinsin üriner kokularının kullanıldığı çalışmalarda, erkek ve dişi kemirgenlerde kisspeptinin **koku-üreme** yolağında önemli olduğunu gösteren çalışmalar vardır.

Örneğin, östrus fazındaki dişinin idrarına maruz kalan erkek farelerin, erkek idrarına veya kontrol suyuna maruz kalan erkeklere kıyasla, RP3V’de kisspeptin nöronlarında Fos ekspresyonunu belirgin şekilde arttırdığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte, erkek idrarına maruz kalan wild tip dişilerin östrus fazındaki dişi veya kontrol suyuna maruz kalan dişilere kıyasla RP3V’de kisspeptin nöronlarındaki Fos ekspresyonlarındaki artışın daha fazla olduğu belirtilmiştir (94, 95).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, daha önce erkek kokusuna maruz kalan kafeslerde yaşayan overektomi yapılmış dişi sıçanların AVPV'de ve limbik (Arkuat nükleus hariç) bölgelerde kisspeptin nöronlarındaki Fos ekspresyonlarında artış olduğu ifade edilirken; aynı zamanda ovorektomili dişi sıçanların, temiz veya dişi kafeslerine maruz kalan dişi sıçanlara kıyasla LH düzeylerindeki artışın daha fazla olduğu ifade edilmiştir (95).

Sonuç olarak, mevcut çalışmalarla erkek ve dişi kemirgenlerde kokunun HHG aks ile kisspeptin nöronlarını etkilediği ifade edilmektedir (91).

3.5.2. Kisspeptin ve Korku

Korku, reme performansını olumsuz yönde etkileyebilen, türlere yönelik tehditlere karşı korunma yönünde ileriye dönük davranışları etkileyebilecek önemli bir duygudur. Zebra balığında (96) yapılan çalışmada, korku uyarılarının Kiss1 ve serotonin ile ilgili gen transkripsiyonunu (pet1 ve slc6a4a) nemli ölçüde azalttığı; intrakraniyal kisspeptin uygulamasının ise, korku uyarılarına karşı uyarıcı faktörleri inhibe ettiği ifade edilmektedir (96). Daha sonraki çalışmalarda, serotonin reseptörlerinin (5-HT_{1A} ve 5-HT₂) farmakolojik blokajının kisspeptinin anksiyolitik etkisini kaldırdığını ve kisspeptinin buradaki serotonerjik sistemi öncelikle glutamaterjik nörotransmisyon yoluyla modüle ettiği ifade edilmiştir (97, 98). Ayrıca, Kiss1 nöronlarının selektif olarak etkisiz hale getirilmesine bağlı olarak habenula ve raphe çekirdeklerinde Kiss1'in immnoreaktivitesinde Fos ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (96).

Kisspeptinin korku üzerindeki rolü, diğer türlerde henüz araştırılmamış olmasına rağmen, zebra balığında yapılan bu çalışmalarla, kisspeptinin,

serotonerjik yollar aracılığıyla korkma eylemlerini hafifletebildiğini, üreme ve diğer canlı türlerine karşı savunma mekanizmasında da olumlu sonuçlar doğurduğu ortaya konulmuştur (91).

3.5.3. Kisspeptin ve Duygu (Ruhsal Durum) Durumu

Hipotalamus-hipofizyal-adrenal aks, anksiyeteye cevaben adrenokortikotropin hormonu ve kortikosteroid salınımını düzenler. Fakat anksiyetenin, insanlarda ve kemirgenlerde periferal dokularda kisspeptin üzerindeki etkisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte stresin, plazma kortikosteroid seviyesini ve hipotalamustaki kisspeptin sinyallerinde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (99-101). Bu durum stres, anksiyete ve kisspeptinin hormonal durumla da ilişkili olduğunu göstermektedir.

Erkek kemirgenlerde intraserebroventriküler (i.c.v.) kisspeptin enjeksiyonun, bir labirentin açık kollarında geçirilen zamanı azalttığını, bu sebeple kisspeptinin anksiyeteyi artırdığını ortaya koyan çalışmanın (102) aksine erkek kemirgenlerde medial amigdaladaki kisspeptin nöronlarının DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) aktivasyonunun, bir labirentin açık kollarında geçirilen zamanı artırarak anksiyeteyi azalttığını düşündüren çalışmalar da mevcuttur (93). Farklı türlerde yapılan çalışmalarda, kisspeptinin anksiyeteyle ilişkili verilerinde türler arası farklılıkların da mevcut olduğu gösterilmiştir (96, 103). Bu sebeple, kisspeptin ve anksiyete arasındaki ilişkiyi net bir şekilde ortaya koymak için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Kisspeptinin serotonerjik sistemi modüle etmesinden dolayı kisspeptin ve ruhsal durum arasındaki ilişki de incelenmiştir. Kemirgenler üzerinde yapılan bir çalışmada, kisspeptin i.c.v. uygulanmış ve hayvanlara zorunlu yüzme testi uygulanarak depresif (tırmanma, yüzme, hareketsiz kalma) hareketlerin olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Çalışma sonucunda, kisspeptin dozuna bağlı olarak depresif hareketlerin azaldığı sonucuna varılmıştır (104).

İnsanlarda, prefrontal kortekste kisspeptin eksprese eden mRNA reseptörünün olduğu bilinmektedir (30). Prefrontal korteks korku, stres gibi negatif durumları azaltmada aktif olan beyin bölgesidir (105). Sağlıklı genç erkeklerde periferik kisspeptin uygulamasının negatif olarak uyarılmış görsel uyaranlara (araba kazası, ölecek olan hastanın son anı gibi) yanıt olarak prefrontal aktiviteyi fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) ile belirlendiği şekilde arttırdığı ifade edilmektedir (100). Ayrıca, periferik kisspeptin uygulamasının kemirgenlerde de yapılan çalışmaya paralel olarak sağlıklı erkeklerde psikometrik testlere bağlı olarak olumsuz ruh halini azalttığı çalışmalar da bulunmaktadır (104).

Farklı türlerde (insan, kemirgen) yapılan çalışmalara bağlı olarak elde edilen bu veriler, klinik etkilere sahip olabilecek antidepresan benzeri etkilerle duygu durum ve kaygı modülasyonunda kisspeptinin önemini ortaya koymaktadır.

3.5.4. Kisspeptin ve İşitme

Üremede etkili olan bir diğer uyaran işitmedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, erkek farelerin dişiyi uyarmak için ultrasonik bir ses çıkardığı ve bu

sesin bir sonraki cinsel birleşmeye de yol açtığı gösterilmiştir. Aynı zamanda ultrasonik sesin varlığının yokluğuna kıyasla dişilerde yavru sayısını arttırdığı da ifade edilmiştir (106).

Dişilerde, pCREB (phosphorylation of Cyclic AMP Response Element Binding) yöntemiyle erkeğin çıkardığı ultrasonik seslerin ARC'de (AVPV'de değil) kisspeptinin nöronal aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir (106). Bu bilgiler ışığında, dorsal kohlea nükleusta da kisspeptin ekspresyonunun varlığının işitmeye bağlı olarak kisspeptinin üremede etkin olduğu gösterilmiştir (107).

3.5.5. Kisspeptinin Öğrenme ve Hafıza Üzerindeki Etkileri

G-protein bağlı reseptör-54, öğrenme ve hafıza ile ilgili beyin bölgelerinden eksprese edilir. Bu bölgeler; Hipokampusün dentat gyrusu ve Amigdala'nın korteks ve medial çekirdeği'dir (108).

Kisspeptin/G-protein bağlı reseptör-54 sisteminin bilişsel etkisi tam olarak bilinmemektedir. Telegdy ve arkadaşlarının (109) yaptığı çalışmada kisspeptin-13'ün farelerde i.c.v. enjeksiyonu ile öğrenme ve hafızadaki etkisi araştırılmıştır. Araştırmada yeni objeleri tanıma ve objelerin yerlerini hatırlama testleri uygulanmıştır. Ayrıca *in vitro* çalışmada Kisspeptin'in Amyloid- β ($A\beta$) peptidin nörotoksik etkilerini önlediği rapor edilmiştir (109). $A\beta$, senil plakları oluşturur ve hücre dışı sıvıda senil plakların birikmesi Alzheimer hastalığının oluşumuna neden olur. Alzheimer, bozulmuş bellek ve bozulmuş bilişsel fonksiyonlar ile karakterize nörodejeneratif bozukluktur (110).

Yapılan çalışma aynı zamanda kisspeptin-13'ün $A\beta_{1-42}$ ile karakterize bellek bozukluklarının iyileştirip iyileştiremeyeceği de araştırılmıştır. Sonuç

olarak, hipokampüse enjekte edilen kisspeptin-13'ün unutkanlığı engellediği aynı zamanda hafızayı da güçlendirdiği rapor edilmiştir. Kisspeptin-13'ün Alzheimer gibi $A\beta_{1-42}$ karakterize hastalıklarda önemli ölçüde iyileşmelere yol açtığı ifade edilmiştir (111).

3.5.6. Kisspeptin ve İnsülin Sekresyonu

İnsan ve farelerde yapılan bir çalışmada kisspeptin-54'ün insülin sekrete ettiği bulunurken (112), başka bir çalışmada Kisspeptin-13'ün sıçanlarda insülin sekresyonunu azalttığı ifade edilmiştir (113). Aynı zamanda Kisspeptin-13'ün beta (β) hücresi üzerinden farklı yollarda da insülini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (113). Kisspeptin seviyelerinin plazmada açlık insülin seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (114).

3.5.7. Kisspeptin ve Enerji Dengesinin Kontrolü

Metabolik sinyallerin üreme aksına aktarılmasında kisspeptinin rolünü gösteren çalışmaların yanısıra, kisspeptinin enerji dengesinin düzenleyicisi olarak işlev gördüğünü gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (115). Kisspeptin reseptörü, beynin pek çok yerinden sekrete edildiği gibi pankreas, adipoz doku gibi metabolik dokulardan da sekrete edilmektedir. Bu sebeple, kisspeptinin üremenin kontrolünün dışında başka fonksiyonları da bulunur fakat bununla ilgili yeterli çalışma henüz yoktur (116).

Kisspeptin nöronları önemli homeostatik bilgilerin GnRH nöronlarına iletilmesinden sorumlu santral bir yol olarak kabul edilmektedir. Bu yolun enerji dengesi ve üreme işlevi arasındaki kurulmuş bir bağlantıya aracılık etmesi muhtemeldir. Bu nedenle, ciddi şekilde değişen enerji dengesi durumlarında

(negatif veya pozitif), ARC'deki kiss1 ekspresyonunda olduğu gibi üremede de problemler yaşanabilir. ARC'de kisspeptin nöronlarının leptin, grelin, POMC ve NPY dahil olmak üzere bir dizi metabolik düzenleyicileri bulunmaktadır (117). Ayrıca, GnRH nöronlardaki ekspresyonunun yanı sıra, Kiss1r'nin beynin diğer bölgelerinde ve periferde ekspresyonunun olması kisspeptinin üreme dışında alternatif rolleri olduğunu göstermektedir. Kisspeptinin ARC'de anoreksijenik POMC nöronlarını direk olarak uyardığı, oreksijenik NPY nöronlarını ise indirek olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (117). Bu nedenle, kisspeptinin enerji dengesini düzenlemede doğrudan bir rolü olabilir. Kiss1 nakavt ve wild tip farelerin vücut ağırlığında bir farklılık bulunmasa da, veriler kisspeptinin besin alımı ve glikoz homeostazında rol oynayabileceğini göstermektedir (117). Bu nedenle, üremenin düzenlenmesine ve enerji dengesinin üreme fonksiyonu üzerindeki etkisine aracılık etmenin yanı sıra, kisspeptin sinyalleşmesi metabolizmanın doğrudan bir düzenleyicisi olabilir. Düzenli aralıklarla santral olarak uygulanan kisspeptinin, besin alım süresini arttırdığı ve farelerde gece besin alımını azalttığı gösterilmiştir (118).

Koyunlarda yapılan başka bir çalışmada da santrale uygulanan kisspeptinin POMC'yi inhibe ettiği ve ARC' de NPY mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (119). Fakat bu çalışmaların aksini ifade eden çalışmalarda mevcuttur (120). Bu sebeple kisspeptinin POMC/CART ve/veya NPY/AgRP sistemlerini düzenlemedeki kesin rolü henüz net değildir. Arkuat nükleusta kisspeptin nöronlarının, overektomili (OVX) sıçanlarda vücut ağırlığı üzerindeki bilinen etkilerini önlediğini göstermiştir (121).

Üreme konusundaki rollerinin yanı sıra E2'nin beyinde ER α yoluyla hareket ettiği, besin alımını azaltarak ve enerji tüketimini artırarak vücut kompozisyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, ARC'deki kisspeptin nöronlarının, OVX'li sıçanlarda oreksijenik etki gösterdiği söylenebilir (116).



4. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 13.12.2017 tarih ve 235562 Sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin (FÜBAP) TF.18.11 proje no'lu kararı gereğince karşılanmıştır.

4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

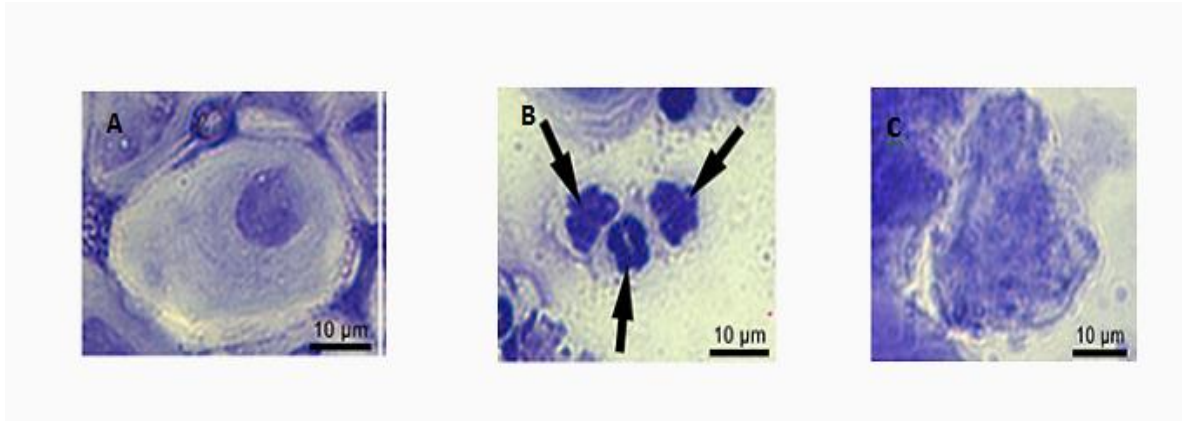
Çalışmada 21 adet ortalama ağırlığı 35-40 gram olan erişkin Balb/c cinsi dişi fare kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar FÜDAM'da gerçekleştirilmiştir.

Fareler, FÜDAM'da; sıcaklığı (22-25°C) ve bağıl nemi sabit tutulan (% 40-55), havalandırılan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü uygulanan odalarda barındırılmışlardır. Fotoperiyot değişimi sabah 07.00'de aydınlık faz olacak şekilde otomatik zaman ayarlayıcı ile yapılmıştır. Tüm gruplarda yer alan fareler standart fare kafeslerinde olarak barındırılmışlardır. Fareler, Korkutelim Yem Gıda San. Tic. AŞ. (Korkuteli/ANTAYA) pelet halindeki özel fare yemleriyle beslenmişlerdir. Hayvanların su gereksinimi ise; kafeslerde özel bölümlere yerleştirilen, uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişelerdeki çeşme suyu ile sağlanmıştır.

4.2. Östrus Siklusunun Belirlenmesi

Östrus siklusunun fazları, davranışsal değişikliklerle ya da vajinal sitolojik değerlendirmelerle belirlenir. Vajinal sitolojik değerlendirme (vajinal smear); östrus siklusunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan, hızlı ve pratik bir yol olarak kabul edilir (122).

Hücre popülasyonunun, 24 saatlik süre boyunca değişimi vajinal mukoza, uterus ve yumurtalıkların durumu ile ilişkili olduğu gibi östrus siklusu boyunca yumurta follikülleri tarafından sekrete edilen progesteron ve östradiol seviyelerinin değişiminden de kaynaklanır. Fazın doğru bir şekilde tanımlanması için günün belirli zamanlarında vajinal smear ile siklus takip edilir (123, 124). Östrus döngüsünün her bir fazı vajinal smear ile belirlenen üç tip hücrenin oranına bağlıdır. Bu hücre tipleri; lökosit hücre, epitel hücre ve kornifiye hücrelerdir (125). (Şekil 3). Histolojik değerlendirmede bu aşamalar; mevcut hücrelerin varlığı, yokluğu, orantısı, hücre yoğunluğu ve hücrelerin slayt üzerinde düzenlenmesi ile tanımlanır (120).



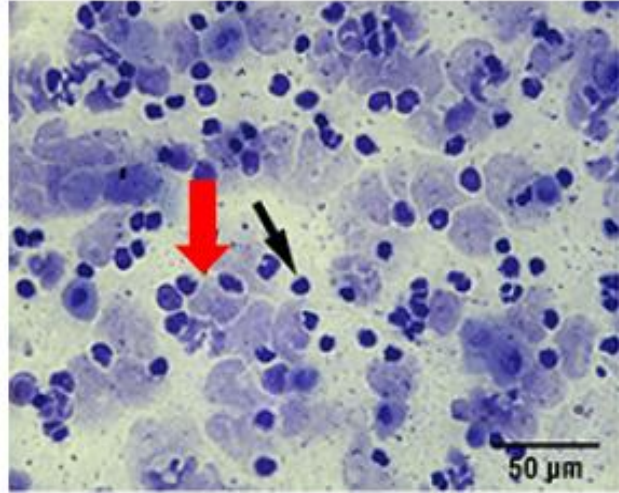
Şekil 3. Smear Örnekleri: (A) çekirdekli epitel hücreler, (B) lökosit hücreler, (C) kornifiye epitel hücreler gösterilmiştir (126).

4.2.1. Dişi Farelerde Östrus Siklusunun Fazları

Dişi farelerde üreme siklusu; proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus olmak üzere dört aşamadan oluşur. Ovulasyon süreci, proöstrus ile başlar östrus evresinin bitmesiyle sona erer (127).

4.2.1.1. Metaöstrus

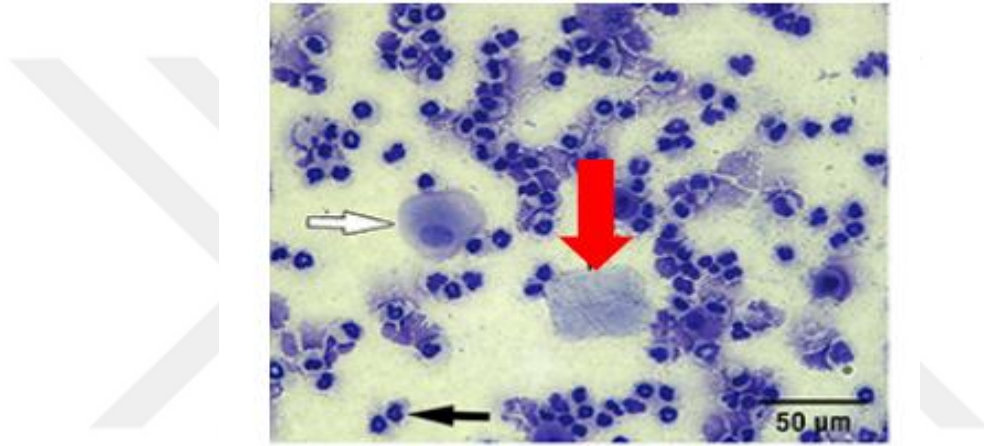
Metaöstrus, diöstrusun ilk gününün (diöstrus 1) ilk döneminde bir geçiş periyodu olarak tanımlanır ve 21 saat sürer (123, 128). Metaöstrus, birkaç hücre tipinin bulunduğu bir dönemdir. Bu dönemde lökosit hücreleri baskın olmasına rağmen çekirdekli epitel hücreler ve kornifiye hücreler de bulunur (Şekil 4). Plazmadaki östrojen seviyesi düşüktür (129).



Şekil 4. Metaöstrus fazı, lökosit hücre siyah ok ile; kornifiye epitel hücre kırmızı ok ile gösterilmiştir (126).

4.2.1.2. Diöstrus

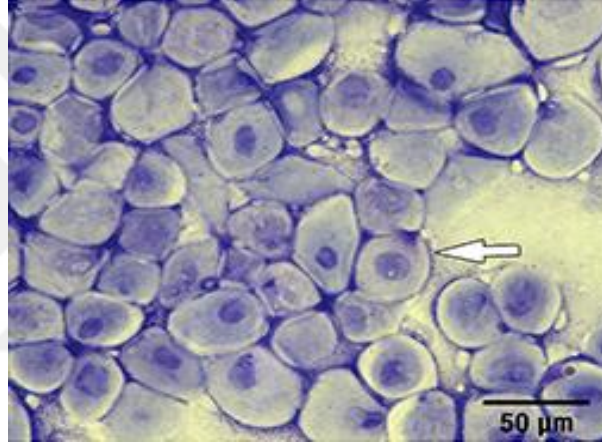
Östrus siklusunun en uzun dönemi olup, 57 saatten fazla sürer (128). Diöstrus, ağırlıklı olarak lökosit hücrelerin hakim olduğu bir dönemdir (Şekil 5). Bu dönemde östrojen seviyesi artmaya başlar. Östrus, metaöstrus ve diöstrus aşamalarında, LH ve FSH'nin plazmadaki seviyeleri düşüktür (129).



Şekil 5. Diöstrus fazı, çekirdekli epitel hücre beyaz ok ile, lökosit hücre siyah ok ile kornifiye epitel hücre kırmızı ok ile gösterilmiştir (126).

4.2.1.3. Proöstrus

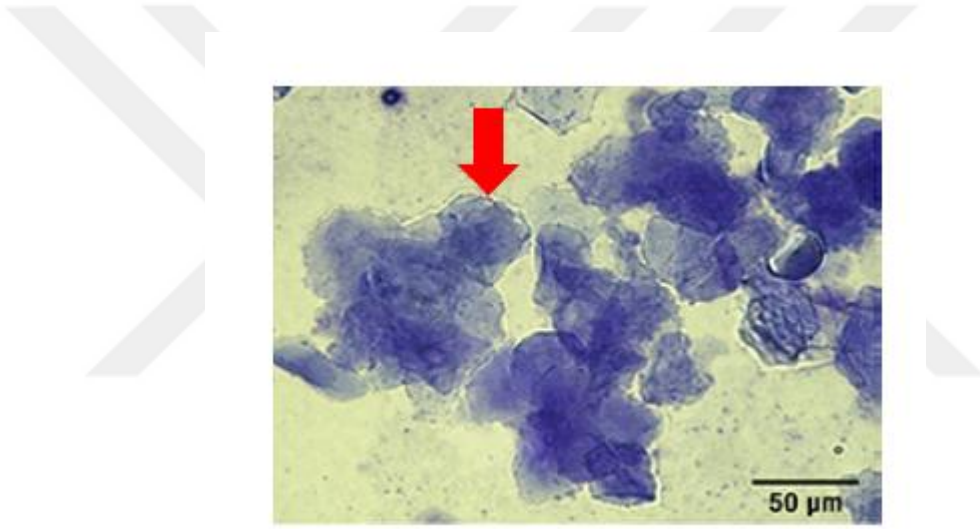
Dişi farelerde proöstrus fazı yaklaşık 12 saat sürer (128). Standart 4 günlük bir döngüde, proöstrus, genellikle mikroskop altında granüler bir görünüme sahip olan yuvarlak, çekirdekli epitelyal hücrelerin varlığıyla tanımlanır (Şekil 6). Hücreler kümeleşmiş veya ayrılmış şekilde görünebilir. Proöstrus fazı ovulasyon öncesi dönemdir. Bu dönemde, östrojen artar, LH ve FSH sekrete edilir (129).



Şekil 6. Proöstrus fazı; çekirdekli epitelyal hücreler beyaz ok ile gösterilmiştir (126).

4.2.1.4. Östrus

Östrus fazı, 9 ila 15 saat sürer (128). Dişi farelerin cinsel arzularının en yüksek olduğu dönemdir. Bu dönem, belirgin bir şekilde kornifiye epitel hücrelerle karakterizedir (Şekil 7). Kornifiye hücreler, 4 günlük siklus için bir gün; 5 günlük bir siklus için ardaşık iki gün mevcut olabilir. Çekirdekli hücreler yoktur. Sitoplazma granüllerdir ve düzensiz bir şekle sahiptir. Östrojen günün belli döneminde (sabah) artar daha sonra bazal seviyeye (öğlen) geri döner (129).



Şekil 7. Östrus fazı; kornifiye epitel hücre görüntüsü kırmızı ok ile gösterilmiştir (126).

4.3.Vajinal Smear Uygulaması

Bir pastör pipetine veya damlalığa yaklaşık 0,2 ml serum fizyolojik çekildi. Smear yapılacak hayvanın karnı yukarı bakacak şekilde sıkıca tutularak pipet ucu vajinaya yerleştirilirdi ve serum fizyolojik içeri püskürtüldü. Pipetin ucu dışarı çıkarılmadan, vajinaya püskürtülen sıvı, tekrar pipetin içine çekildi. Pipetle alınan sıvı temiz bir lamın üzerine alındı. Alınan sıvı, ışık mikroskopunda 10x büyütmeyle incelenerek epitel hücre, kornifiye hücre ve lökosit hücre varlığı ve oranına bağlı olarak siklus dönemleri tespit edildi.

4.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Dişi farelerin vajinal açıklığının belirlendiği günden itibaren başlanarak 15 gün süre ile (ortalama 3 östrus döngüsü olacak şekilde) her gün 08:00-12:00 saatleri arasında vajinal smear yöntemiyle siklusları takip edilip, siklus dönemlerinde periyodik olarak düzenlilik gösteren fareler her grupta 7 hayvan olacak şekilde aşağıda gösterilen gruplar şeklinde ayrıldı:

Grup I: Diöstrus (n=7)

Grup II: Proöstrus (n=7)

Grup III: Östrus (n=7)

Metaöstrus grubu, diöstrusun ilk gününün (diöstrus 1) ilk döneminde bir geçiş periyodu olarak tanımlandığı için çalışma grubuna dâhil edilmemiştir.

4.5. Boyama Basamakları

4.5.1. Beyin Kesitlerinin Alınması

Her üç gruptaki fareler belirlenen cinsel dönemlerde herhangi bir kimyasal ajan uygulamadan dekapite edildi. Beyin dokuları hızlı bir şekilde çıkarılıp kuru buzda donduruldu. Dondurulan beyinler kyrostat cihazında (Leica) 18 mikrometrelilik kesitler alındı. Kesitler, fare beyin atlasından (130) faydalanılarak ilgili alanları kapsayacak şekilde alındı. Alınan kesitler slidelara yapıştırıldı ve slidelar ısıtıcı tabla üzerinde 40 ± 5 °C'de 30 dk süreyle kurutuldu.

Floresan Boyama

Bu tez çalışmasında araştırılan beyin bölgeleri immünofloresan yöntemle incelenmiştir (131).

Beyin kesitleri 30 dk süreyle oda sıcaklığında (20-25°C) bekletildi. Oda sıcaklığında bekletilen beyinler -20°C'deki etanolün içerisinde 15 dk fikse edildi. 3x5 dk shaker üzerinde Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) içerisinde 80 RPM'de çalkalandı. %5 Bovine Serum Albümin (BSA) (Sigma) ve PBS-T ile hazırlanan Blocking Solüsyon her beyine 30 mikrolitre (μ l) olacak şekilde eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle 80 RPM'de çalkalandı. Daha sonra primer antikor (Proteintech) eklendi +4°C'de bir gece (yaklaşık 12-16 saat) 80 RPM'de çalkalandı.

Ertesi gün kesitler, 3x5 dk shaker üzerinde PBS'de 80 RPM'de yıkandı. Sekonder antikor (Jakson ImmunoResearch) eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında 80 RPM'de çalkalandı. Sekonder antikordan sonra kesitler 3x5 dk shaker üzerinde

PBS ile içerisinde yıkandı. Çekirdek boyası (DAPI, Diamidin-2-Fenilindol Dihidroklorid) eklenip 5 dk süreyle karanlık ortamda bekletildi. Kesitler, 80 RPM'de 5 dk PBS içerisinde çalkalandı. Kesitler lam üzerinde karanlıkta kuruduktan sonra Gel/Mount akışkan koruyucu madde ile kaplanarak lamelle üzeri kapatıldı. ZEISS floresan mikroskopta 10X büyütmede görüntüler incelenip fotoğrafları çekildi. İlgili bölgelerin yoğunluk analizi yapıldı.

4.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları istatistiksel açıdan SPSS 23.0 for Windows programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler, Ortalama±Standart hata ($Ort \pm SH$) değerleri ile belirtilmiştir. Verilerin değerlendirilmesi ve gruplar arası farklılıklar için normal dağılım göstermeyen üç grubun ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığını test amacıyla kullanılan One-Way ANOVA'nın non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde, p değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

Vajinal smear ile cinsel dönemleri belirlenen dişi fareler; diöstrus, proöstrus ve östrus fazlarında gruplara ayrılmıştır. Belirlenen gruplar arasında, hipotalamusun sırayla ARC, PVN, DMN ve VMN'deki kisspeptin yoğunluklarına ait Ort±SH değerleri tablo 1'de gösterilmiştir.

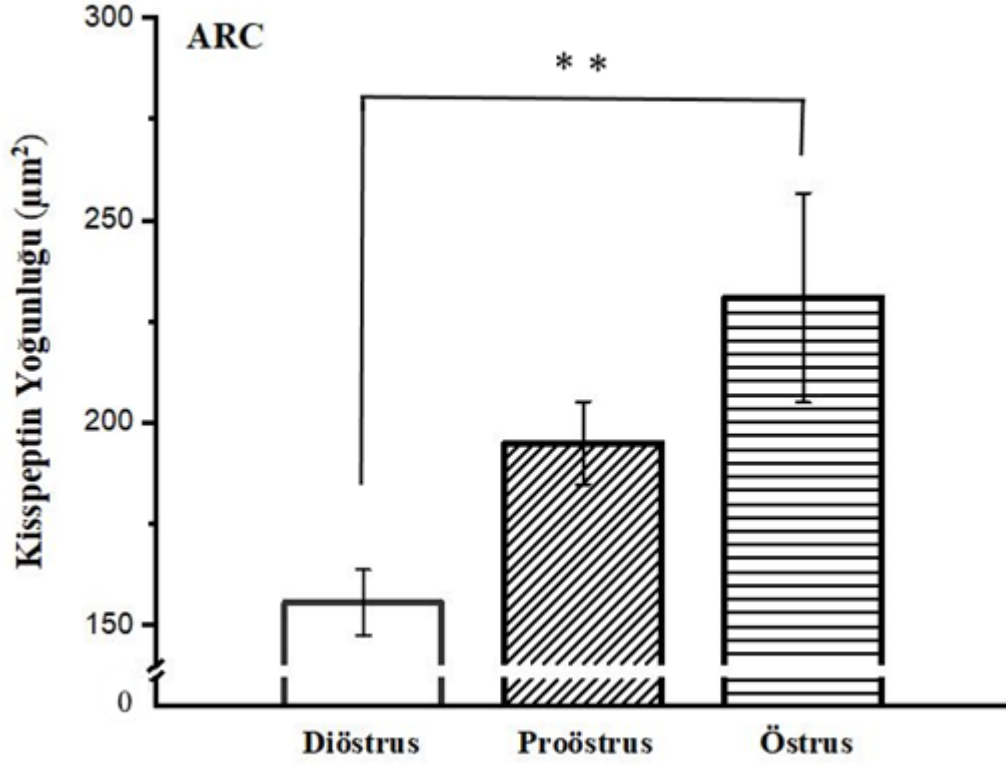
Tablo 1. Diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında hipotalamik çekirdeklerdeki kisspeptin yoğunluğunun Ort±SH değerleri. * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 diöstrus grubuyla karşılaştırıldığında.

	ARC	PVN	DMN	VMN
Gruplar	Ort±SH	Ort±SH	Ort±SH	Ort±SH
Diöstrus	155,70±8,06	279,78±38,64	162,12±8,66	167,67±8,56
Proöstrus	194,97±10,19	247,47±25,19	228,87±7,85*	217,95±10,22*
Östrus	230,83±25,82**	291,00±21,32	271,30±32,49***	222,25±26,00*

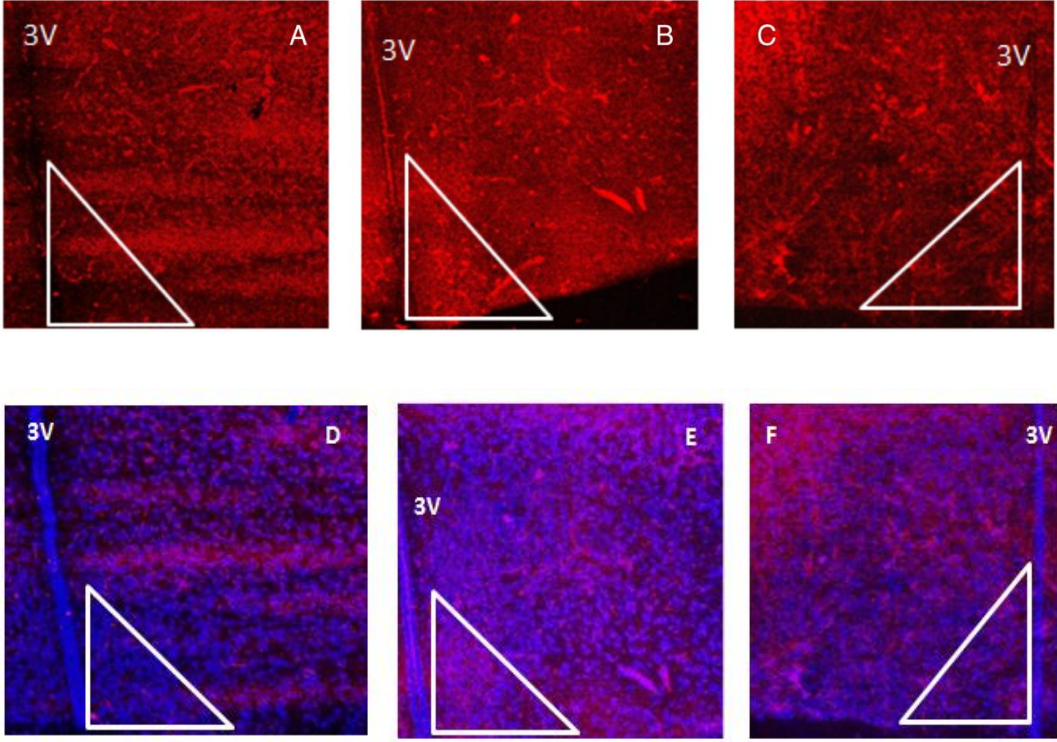
5.1. Arkuat Nükleus

Arkuat nükleus için gruplar arasındaki kisspeptin yoğunluğunun Ort±SH değerleri tablo 1'de gösterilmiştir. Östrus grubunda, kisspeptin yoğunluğunun, diöstrus grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmektedir (p<0.01). Diöstrus ile proöstrus grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte proöstrustaki kisspeptin yoğunluğunun fazla olduğu şekil

8'de görülmektedir. Benzer şekilde östrus ile proöstrus grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. Fakat östrustaki kisspeptin yoğunluğunun proöstrusa göre daha fazla olduğu şekil 8'de görülmektedir.



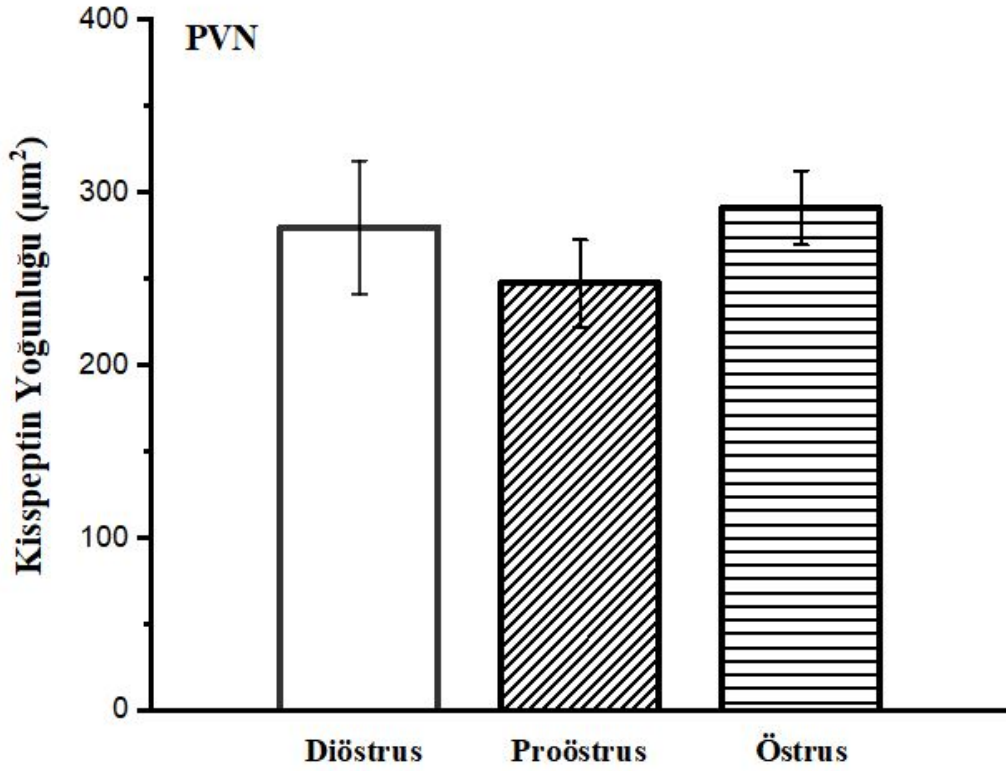
Şekil 8. Arkuat nükleusta; diöstrus, proöstrus, östrus gruplarındaki kisspeptin yoğunluğu Diöstrus grubuyla kıyaslandığında; ** p<0.01.



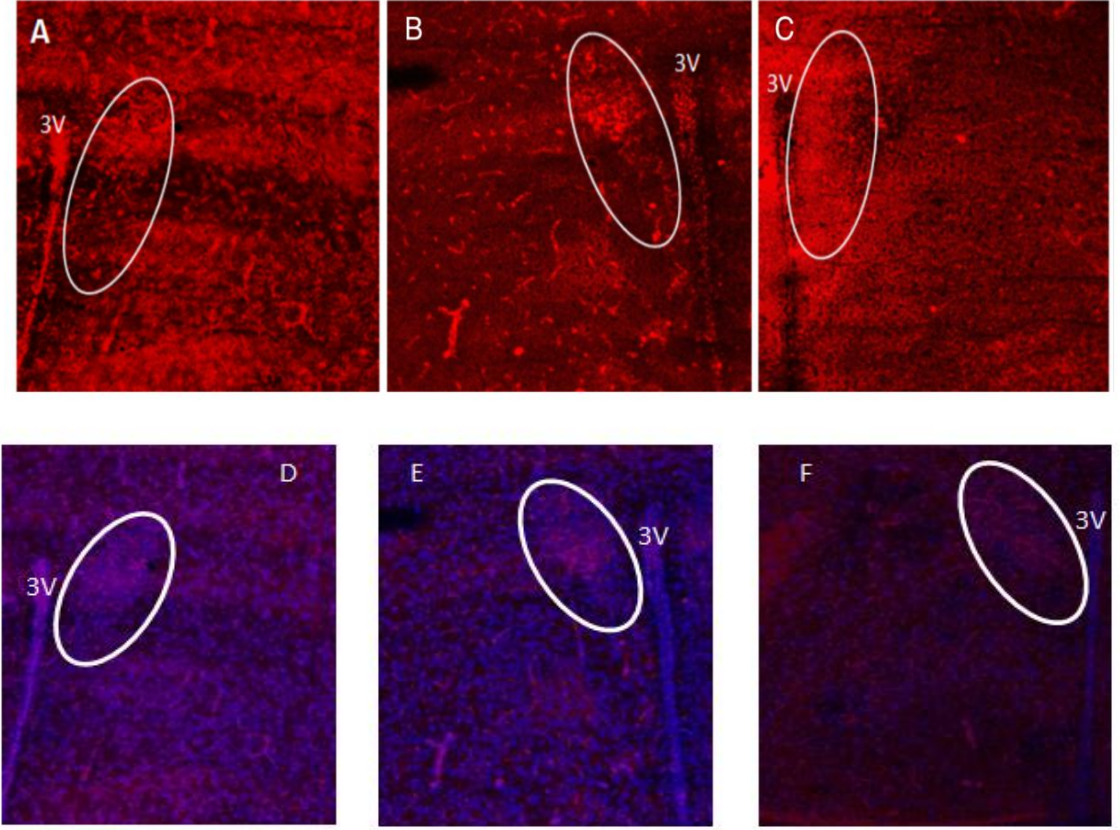
Şekil 9. Arkuat nükleustaki A Diöstrus; B proöstrus ve C östrus gruplarındaki kisspeptin yoğunluğu; D Diöstrus; E proöstrus F östrus dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri. Büyütme A-E; 10X. Kisspeptin immünoreaktivitesi (Kırmızı flöresan, Cy3), dapi: Mavi Floresan, 3V: Üçüncü Ventrikül.

5.2. Paraventriküler Nükleus

Gruplar arasındaki kisspeptin yoğunluğunun Ort \pm SH değerleri tablo 1’de gösterilmiştir. PVN’deki kisspeptin yoğunluğunda, istatistiksel olarak gruplara göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kisspeptin yoğunluğunun proöstrus grubunda en düşük olduğu görülürken, diöstrus ve östrus gruplarında, kisspeptin yoğunluğunun birbirine benzer olduğu şekil 10’da görülmektedir.



Şekil 10. Paraventriküler nükleusta diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu.

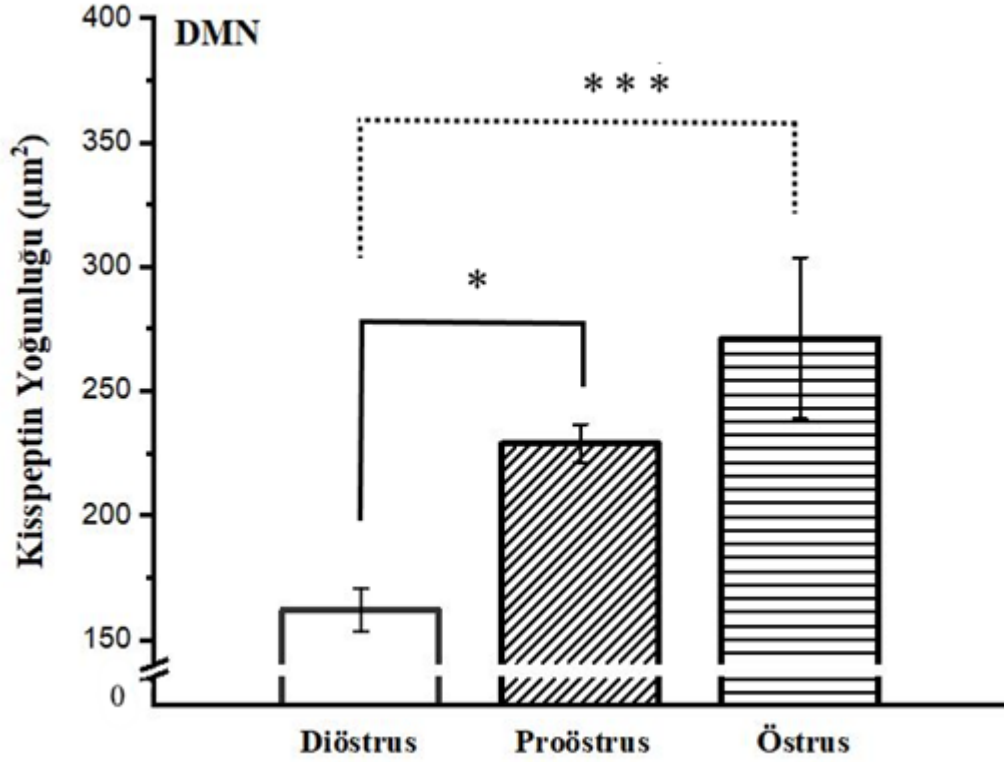


Şekil 11. Paraventriküler nükleusta A diöstrus; B proöstrus ve C östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu. D Diöstrus; E proöstrus F östrus dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri. Büyütme A-E; 10X. Kisspeptin immünoreaktivitesi (Kırmızı flöresan, Cy3), dapi: Mavi Floresan, 3V: Üçüncü Ventrikül.

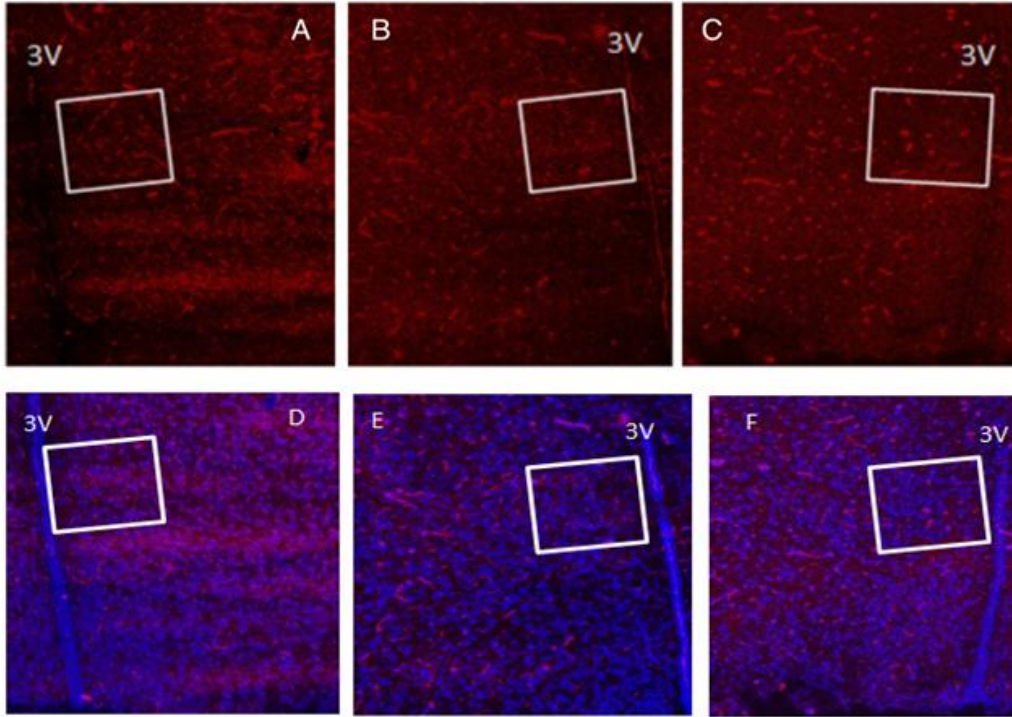
5.3. Dorsomedial Nükleus

Dorsomedial nükleus, için gruplar arasındaki kisspeptin yoğunluğunun $Ort \pm SH$ değerleri tablo 1’de gösterilmiştir. Östrus grubunun, diöstrus grubuna göre kisspeptin yoğunluğu anlamlı derece de arttığı görülürken ($p < 0.001$). Benzer

şekilde, proöstrus grubunun, diöstrus grubu göre kisspeptin yoğunluğu anlamlı derece de arttığı görülmektedir ($p<0.05$). Proöstrus ve östrus grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı Şekil 12’de görülmektedir.



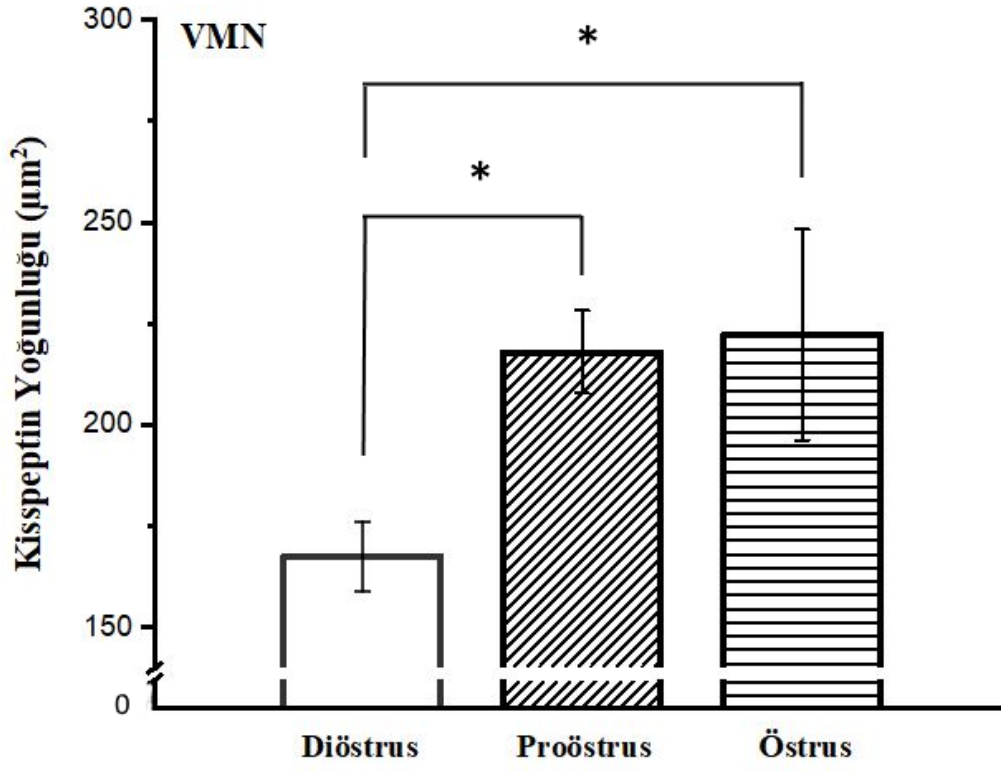
Şekil 12. Dorsomedial nükleusta diöstrus, proöstrus ve östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu. Diöstrus grubuyla kıyaslandığında; * $p<0.05$ ve *** $p<0.001$.



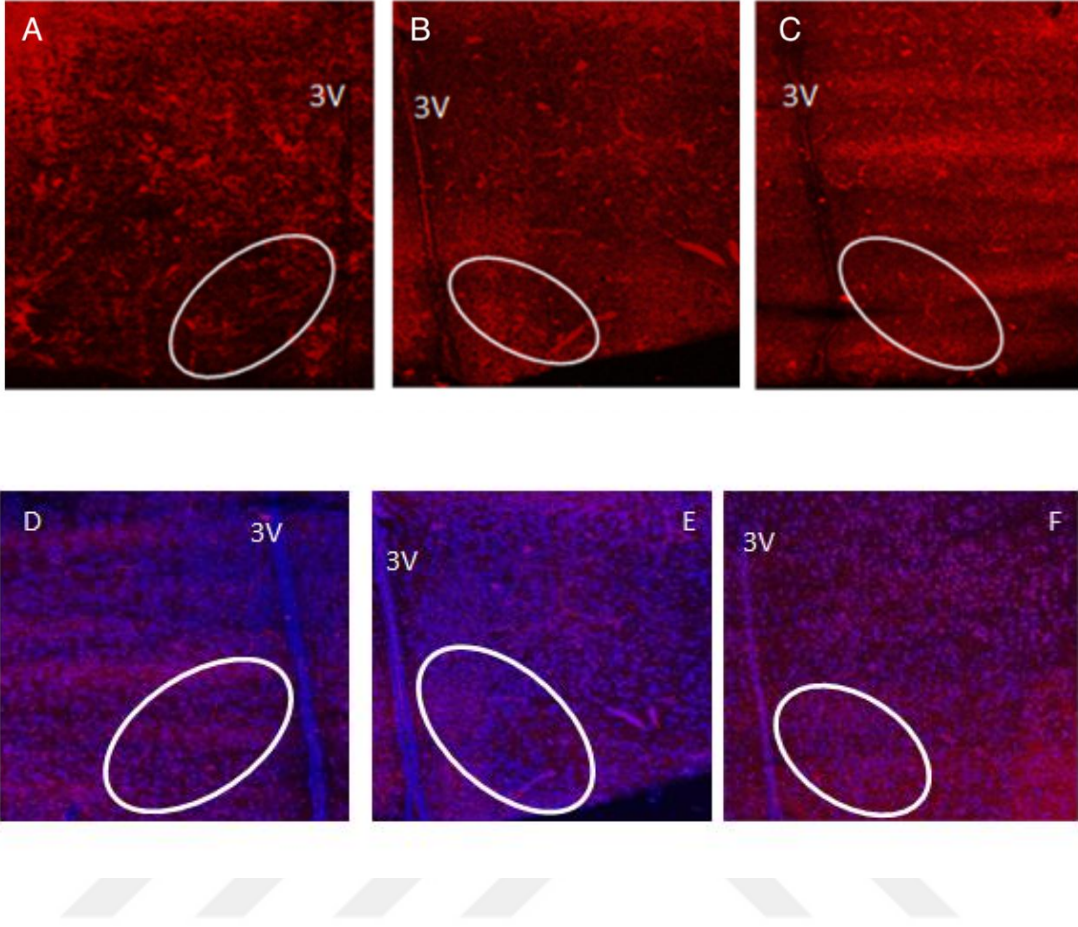
Şekil 13. Dorsomedial nükleusta, A diöstrus; B proöstrus ve C östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu. D Diöstrus; E proöstrus F östrus dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri. Büyütme A-E; 10X. Kisspeptin immünoreaktivitesi (Kırmızı flöresan, Cy3), dapi: Mavi Floresan, 3V: Üçüncü Ventrikül.

5.4. Ventromedial Nükleus

Ventromedial nükleus da gruplar arasındaki kisspeptin yoğunluğunun Ort±SH değerleri tablo 1’de gösterilmiştir. Proöstrus grubunda, kisspeptin yoğunluğu diöstrus grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Aynı şekilde, östrus grubunun kisspeptin yoğunluğu diöstrus grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Şekil 14’de görülmektedir.



Şekil 14. Ventromedial nükleusta diöstrus, proöstrus, östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu. Diöstrus grubuyla kıyaslandığında; * p<0.05.



Şekil 15. Ventromedial nükleustaki A diöstrus; B proöstrus ve C östrus gruplarında kisspeptin yoğunluğu. D Diöstrus; E proöstrus F östrus dapi ile boyanmış hücre çekirdekleri. Büyütme A-E; 10X. Kisspeptin immünoreaktivitesi (Kırmızı flöresan, Cy3), dapi: Mavi Floresan, 3V: Üçüncü Ventrikül.

6. TARTIŞMA

Kisspeptin, insan ve kemirgenlerde kromozom 1 üzerinde lokalize olan kiss1 geni tarafından kodlanan peptit bir hormondur (31). Kisspeptin, HHG aksın önemli bir düzenleyicisi olduğundan, bu sisteminin modülasyonunun çeşitli üreme koşullarında incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmada farklı östrus sikluslarındaki dişi farelerde dört önemli beyin bölgesindeki kisspeptin ekspresyonları immünfloresan yöntemle araştırılmıştır. Kisspeptinin üreme aksının düzenlenmesindeki önemi göz önüne alındığında, beyindeki kisspeptin nöronlarının yerleşimi ve projeksiyonlarının açık bir şekilde anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

6.1. Arkuat Nükleusda Kisspeptin Yoğunluğu

Arkuat nükleus bazomedial hipotalamusta yer alan besin alımı ve enerji tüketimini düzenleyen, kisspeptin ekspresyonunun en fazla görüldüğü önemli bir beyin bölgesidir (132). Araştırmalar ARC'deki kisspeptin ekspresyonunun GnRH'nın pulsatil salınımı için gerekli olduğunu göstermektedir ve kisspeptin antagonistinin ARC'ye uygulamasının LH puls frekansını düşürdüğü gözlenmiştir (133). Ayrıca, kisspeptin ARC'ye uygulandığında LH salınımının uyarıldığı gözlenmiştir (134). Yapılan çalışmalar, ARC'deki kisspeptin nöronlarının GnRH puls oluşumunu sağlayan nöronal bir pacemaker kaynağı olabileceğini göstermektedir (46, 135). Bu tez çalışmasında immünfloresan yöntemle ARC'de dişi farelerde östrus siklusunun farklı dönemlerindeki kisspeptin yoğunluğu değerlendirilmiştir. Östrus grubunda, proöstrus ve diöstrus gruplarına göre anlamlı

düzeyde daha yüksek bir yoğunluk gözlenmiştir. Dişi farelerin, proöstrus ve östrus dönemlerinde östrojenin yüksek, diöstrusta ise düşük olması bu çalışmadaki kisspeptin yoğunluğundaki değişimleri açıklamaktadır. Diöstrustan başlayarak proöstrus ve östrusa doğru giderek artan östrojenin paralel olarak ARC'de kisspeptin yoğunluğunda artışa yol açtığı söylenebilir. Ayrıca kisspeptindeki artış LH pikinin oluşumunu tetikleyerek ovulasyona yol açmış olabilir. Bununla birlikte, kisspeptin reseptör ekspresyonunda östrojen regülasyonu hakkındaki bilgiler yeterli değildir.

Adachi ve arkadaşları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle ARC Kiss1r seviyesinin östrus sırasında diöstrus ve proöstrusa göre daha düşük olduğunu ve yüksek östradiyol ile muamele edilmiş OVX sıçanlarda, herhangi bir muamele yapılmamış OVX sıçanlara göre anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmiştir (136). Bir başka çalışmada OVX'li sıçanların ARC'sinde daha düşük Kiss1r ekspresyonu gösterilmiştir Bu çalışmada, diöstrusun birinci gününe ve proöstrus'a odaklanılmıştır (137). Navarro ve arkadaşları, sıçan hipotalamusunda Kiss1r ekspresyonunun östrus siklusuna bağlı olduğunu ve diöstrusta Kiss1r en yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir (138). Bu çalışma; PVN'de proöstrusta en yüksek Kiss1r ekspresyonu gösteren Ozaki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyumlu değildir (137). Ancak Navarro ve arkadaşları çalışmalarında Kiss1r'yi tüm hipotalamusta değerlendirmişlerdir dolayısıyla bu uyumsuzluğun olası bir nedeni Kiss1r eksprese eden diğer hipotalamik bölgeler, örneğin, supraoptik çekirdek, premamiller ve supramamiller çekirdeklerdeki Kiss1r ekspresyonundaki değişiklik kaynaklı olabilir.

Arkuat nukleusta kisspeptin nakavt dişi sıçanlarda yapılan çalışmada, çalışmanın 100 günlük periyodu boyunca hayvanların daha az sayıda ve daha uzun siklus döngüsü gösterdiği ve LH puls frekansında da düşme gözlenmiştir (139). Bu veriler ARC-kisspeptin seviyesinin korunmasının normal pulsatil LH salınımı ve östrus döngüsü için gerekli olduğunu göstermektedir (139). strus döngüsü boyunca, günün farklı zamanlarındaki enjeksiyona rağmen, yüksek dozlarda kisspeptin, östrus ve diöstrus sabahlarında (düşük LH seviyeleri) ve ayrıca proestrusta gleden sonra (yüksek LH seviyeleri) belirgin LH patlamalarına yol açmaktadır. Bununla birlikte, bu tez çalışmasında paralel olarak kisspeptine karşı maksimal cevapların östrusta meydana geldiği grlmştir (140).

Östrusun başlarında, intraserebral kisspeptin enjeksiyonu, preovulatuar pikini andıran büyük bir LH pikine yol açabilir. Ayrıca endojen santral kisspeptin-54'n immüno-nötralizasyonunu proöstrustaki LH artışını tamamen önlemiştir (58).

Wistar ırkı dişi sıçanlarda, ARC de Kiss1 mRNA ekspresyonu diöstrusun 2. gününde en yüksek iken proöstrusta gleden sonra en düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda Kiss1 mRNA ekspresyonu overektomi ile düzeyi artarken östrojen tedavisi ile azaldığı ifade edilmiştir (136). Bu sonuç, Kiss1 mRNA seviyesinin, sıçan östrus döngüsü sırasında proöstrus veya östrusta distrusa göre daha düşük olduğunu gösteren önceki çalışma ile tutarlıdır (138). Yapılan bir başka çalışmada ARC'deki Kiss1 nöronlarında, LH piki sırasında ve aynı zamanda diöstrusta Fos negatif olarak gözlenmiştir (40). Sprague Dawley ırkı dişi sıçanlarda yapılan çalışmada Kiss1'in ARC'deki ekspresyonunun AVPV'deki ekspresyonunun tam tersi şekilde düzenlendiği gösterilmektedir.

ARC'de Kiss1 mRNA diöstrusun sonuna doğru zirve değere ulaşırken, proöstrus ve östrus evrelerinde en düşüktür (40). Bu çalışmalarda bizim bulgularımıza zıt sonuçlar elde edilmiştir. Bunun sebebi çalışmanın farklı türlerde ve farklı yöntemlerle yapılması olabilir. Nitekim literatüre bakıldığında kisspeptin ekspresyonu türlere göre de farklılık göstermektedir. Örneğin sıçanlarda, farelere kıyasla hücre gövdelerinde daha az peptit depolandığının gösterilmesi kisspeptin salımında her iki tür arasında farklı dinamikleri yansıtabilir (141). Fareler ve sıçanlar arasındaki diğer bir fark DMN'deki kisspeptinerjik hücre popülasyonunda gösterilmiştir. Farelerden farklı olarak, proöstrustaki sıçan grubunda hangi antikor kullanılırsa kullanılsın DMN'de, paraventriküler talamik çekirdek ve amigdala gibi beyin bölgelerinde herhangi bir kisspeptin immünoreaktif hücre tespit edilememiştir (141, 142). Bunun gerçek bir tür farkını yansıtıp yansıtmadığı, belirli bir fizyolojik düzenleme veya çalışmalar arasındaki metodolojik farklılıkların araştırılması gerekmektedir.

G-protein bağlı reseptör-54 mRNA ekspresyonunun AVPV, ARC gibi hipotalamik nükleuslarda incelendiği çalışmalarda östrus siklusundan etkilenmediği görülmüştür. Bu bilgiye dayanarak, dişi sıçanlarda östrojenin GnRH/LH sekresyonundaki pozitif feedback etkisinin kisspeptin ekspresyonuyla düzenlendiği ancak reseptörüyle düzenlenmediği söylenebilir (58, 136).

Enerji dengesi ile üreme arasında oldukça açık bir ilişki bulunmaktadır ve obezite dâhil olmak üzere enerji dengesindeki bozulmalar sıklıkla doğurganlıkta bozulmalara neden olmaktadır (143). Metabolizmada harcanan enerji miktarının alınan enerji miktarından daha fazla olduğu negatif enerji dengesinde çoğu durumda, üreme aksı baskılanır. Erkek sıçanlarda, gıda kısıtlaması, LH, FSH ve

testosteron düzeylerini, ad libitum beslenen kontrollere kıyasla azaltmıştır (144). Farelerde yapılan benzer çalışmalar, yetersiz beslenmenin bir sonucu olarak doğurganlığın azaldığını göstermektedir (145, 146). Genel olarak, bu çalışmalar yiyecek alımının azaldığı zayıf hayvanların genellikle hipogonadotropik olduğunu göstermektedir. Aç bırakılan prepubertal sıçanlarda, hipotalamusun tümünde Kiss1'de anlamlı bir azalma gözlenirken, normal beslenen sıçanlara kıyasla Kiss1r ekspresyonu artmıştır (145). Yetişkin erkek farelerde kısa süreli açlığın (48 saat), hem Kiss1 hem de Kiss1 mRNA ekspresyonu, normal beslenen kontrollere kıyasla azalmıştır (146). Kiss1r nakavt farelerde obez ve diyabetik bir fenotip geliştiği gösterilmiştir (147). Kisspeptinin enerji durumunun doğurganlık üzerindeki etkilerine aracılık etmedeki rolünün anlaşılması için eksojen kisspeptinin bu durumlarda HHG aksta iyileşmelere yol açtığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Aç bırakılan prepubertal dişi ve erkek sıçanlarda santral olarak uygulanan kisspeptin, LH seviyelerinde önemli bir artışa yol açmıştır (145). Bu bilgiler ışığında, enerji dengesinin üreme aksının üzerinde belirgin etkilere sahip olduğunu ve bunlara kısmen kisspeptin ekspresyonunun ve hipotalamustaki sinyalleşmenin aracılık ettiği söylenebilir.

Enerji dengesinin düzenlendiği önemli bir beyin bölgesi olan ARC'de bu çalışmayla gösterildiği gibi kisspeptin yoğunluğunun farklı siklus evrelerinde değişmesi besin alımının ve enerji tüketiminin bu evrelerdeki değişiminde kisspeptinin rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Arkuat nükleus; gıda alımının düzenlenmesinde önemli bir bölgedir ve paraventriküler nükleusa, dorsomedial ve lateral hipotalamik bölgelere efferentler gönderir.

Çalışmalar, obezitede gözlenen leptin direncinin, santral leptin direncine aracılık ettiğini göstermektedir. Leptin, beslenmeyi düzenleyen hipotalamik devrelerin gelişiminde kritik bir rol oynar (148). Bu açıdan bakıldığında, ARC nöronlarındaki Kiss1 mRNA'nın yaklaşık yarısının leptin reseptör mRNA eksprese ettiğinin gözlenmesi leptin, vücut ağırlığının kontrolü ve kisspeptin arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir (149). Fonksiyonel veriler, santral kisspeptin uygulamasının gıda alımını değiştiremediğini göstermiştir (145), ancak RT-PCR ile tespit edilen Kiss1 mRNA seviyeleri açlıkta azalmıştır (146). Ayrıca, leptin eksikliği olan leptin gen mutasyonlu obez (ob/ob) farelerde Kiss1 mRNA'da azalma tespit edilirken, başka bir çalışmada ise herhangi bir değişiklik bildirilmemiştir (146, 149). Bu bilgilerin ışığında, bu tez çalışmasının ana hedeflerinden biri olmadığından gıda alımı ve enerji düzenlenmesi incelenmemiştir. Ancak çalışmamızda gıda alımıyla ilgili beyin bölgelerinde meydana gelen değişimler farklı östrus döngülerinde besin alımının değişebileceği, bunu da leptin, kisspeptin ve diğer oreksijenik ve anoreksijenik hormonlar aracılığıyla olabileceği söylenebilir.

Wistar ırkı dişi sıçanlarda dolaşımdaki LH ve total testosteron seviyeleri, kisspeptin-54'ün; GPR54 ve kisspeptin immünoreaktivitesi gösteren rostral preoptik alan (RPOA), MPOA, PVN ve ARC'ye enjeksiyonundan 60 dakika sonra önemli ölçüde artmıştır. Sonuçlar kisspeptinin, HHG aksın üzerindeki etkilerine hipotalamusun bu bölgeleri yoluyla aracılık edebileceğini göstermektedir (134).

6.2. Paraventriküler Nükleusta Kisspeptin Yoğunluğu

Kisspeptin lifleri RP3V ve ARC'deki hücre gövdelerinden esas olarak GnRH nöronlarına ve farklı hipotalamik alanlara uzanır. Bunlar arasında PVN bu sistemin ana hedeflerinden biri gibi görünmektedir (150, 151). Yapılan farklı çalışmalarda, kemirgenlerde PVN'nin kisspeptin lifleri ile yoğun bir şekilde inerve edildiği gösterilmiştir (56, 142, 151). Hipotalamus içinde PVN, nöroendokrin/otonomik düzenlemede ve enerji dengesinin kontrolünde önemli roller oynayan heterojen nöronal popülasyonlara sahip bir bölge olup enerji homeostazı için kritik düzenleyici merkezdir (152, 153). PVN, HHG aksın düzenlenmesinde çok önemli bir bölge olmamakla birlikte PVN'ye kisspeptin-54'ün uygulanmasını takiben HHG aksın uyarılmasına preoptik GnRH nöronlarına uzanan internöronlar aracılık edilebilir. Bu bölgenin hipotalamusun diğer bölgelerine, özellikle de preoptik bölgelere göre periferik kisspeptine yanıt olarak çok daha az nöronal aktivasyon gösterdiği bildirilmiştir (154). PVN'de kisspeptine duyarlı nöronların tanımlanması ve bunların hipotalamusun diğer alanlarındaki GnRH nöronları ile ilişkisini araştırmak için ileri çalışmalar gereklidir. Her ne kadar GPR54 ekspresyonu PVN'de spesifik olarak bildirilmese de, kisspeptin immünoreaktif lifleri ve hücre gövdeleri ile GnRH immünoreaktif nöronların bu bölgede mevcut olduğu bilinmektedir (56, 155). Mevcut çalışmada da PVN bölgesinde östrus siklusunun farklı evrelerinde kisspeptin yoğunluğunda anlamlı farklılık görülmemiştir. Literatürle uyumlu olarak farklılığın görülmemesi HHG aks da önemli bir rolünün olmadığını desteklemektedir. Ancak PVN'nin tamamına yayılan kisspeptin pozitif liflerinin varlığı, kisspeptinin, PVN tarafından kontrol edilen üreme dışındaki birçok fizyolojik aktivitenin düzenlenmesinde rol

oynayabileceğini göstermektedir. Organizmanın enerji dengesi hem pubertenin düzenli başlangıcı hem de üremenin düzenlenmesi için çok önemlidir.

Paraventriküler nükleusun, magnoselüler nöronları içeren lateral kısmı esasen OT ve AVP kana salgılayan arka hipofize uzanır, PVN'nin medial kısmında bulunan parvosellüler nöronlar çeşitli nörotransmitterler, nöropeptitler ve nörotransmitterlerin senteziyle ilişkili enzimler (örn; tirozin hidroksilaz (TH), (156), nöral nitrik oksit sentaz (nNOS) (157, 158), CSH (159), TRH, (160), AVP (161) ve SST (162) içerir.

Yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre AVP ve nNOS içeren nöronların kisspeptin sistemi ile güçlü bir şekilde ilişkili olmadığı öne sürülürken, kisspeptin immünoreaktivitesinin yüksek olduğu medial PVN'de OT ve TRH pozitif nöronların varlığı bu sistemler arasındaki olası bir ilişkiyi düşündürmektedir (150). Diğer yandan kisspeptin, AVP ve OT nöronlarının düzenlenmesinde rol oynayabilir. Rao ve arkadaşları (163), kisspeptinin AVP ve OT mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığını gösterdi ve sonraki bir in situ hibridizasyon çalışması, diöstrustaki dişi sıçanlarda Kiss1r'nin PVN'nin medial kısmında OT nöronlarının alt popülasyonlarında birlikte eksprese edildiğini ortaya çıkardı (152). PVN'deki oksitosin nöronlarının, proöstrusta kisspeptin ekspresyonunun yüksek olduğu RP3V'deki kisspeptin nöronlarından projeksiyon aldığı (31, 152, 164, 165) ve oksitosinin, sıçanlarda lordoz davranışını arttırdığı (166) ve proöstrusta PVN Kiss1r ekspresyonunda önemli artış olduğu gösterilmiştir. Bu etkiler dişi reseptif davranışını artırabilir. Oksitosinin sıçanlarda lordoz davranışını arttırması (166) ve proöstrusta (164) PVN'deki kisspeptin liflerinin bulunması kisspeptinin oksitosin sekresyonu modülasyonu aracılığıyla

dişi sıçanlarda reseptif davranışlarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (152). Bu çalışmada her ne kadar PVN bölgesinde kisspeptin yoğunluğunda anlamlı düzeyde fark bulunmasa da, PVN'nin oksitosin üreten bölgelerinde kisspeptin salınımının ve kisspeptinin oksitosininin etkilerini amplifiye edip etmediğinin ortaya çıkarılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Dişi sıçanlarda yapılan çalışmada PVN'de östrusta daha yüksek kisspeptin ekspresyonu görülmüştür (40). Bu çalışmayla benzer şekilde bu çalışmada PVN'de her ne kadar anlamlı olmasa da östrusta daha yüksek kisspeptin yoğunluğu görülmüştür. Östrusta daha yüksek kisspeptin yoğunluğunun görülmesi bu bölgedeki oksitosin nöronlarıyla ilişkili olarak dışideki reseptif davranışlara yol açabileceği düşünülmektedir.

6.3. Dorsomedial Nükleusda Kisspeptin Yoğunluğu

Arkuat nükleus efferentlerinin ana hedef bölgelerinden biri de, enerji homeostazının ve stresin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir çekirdek olan DMN'dir. Bununla birlikte, DMN'ye kisspeptin-10'un doğrudan uygulanması, dolaşımdaki LH ve testosteronda herhangi bir değişikliğe neden olmamakla birlikte bu durum kisspeptinin, bu çekirdeğe inputunun, HHG aksın aktivitesinde rol oynamadığını gösterir (134).

Diöstrustaki dişi farelerde yapılan bir çalışmada DMN deki bazı hücreler de kisspeptin immünoreaktivitesi tespit edilmiştir (57, 142). Bu çalışmada DMN bölgesinde farklı östrus evrelerinde kisspeptin yoğunluğunda özellikle proöstrus ile diöstrus evresi ve diöstrus ile östrus evreleri arasında olmak üzere anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıkların görülmesi DMN'nin farklı

fonksiyonlarıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle östrusta diğer evrelere göre daha yüksek kisspeptin yoğunluğunun görülmesi hayvanlardaki stres ve enerji metabolizmasıyla ilişkili olabilir. Farelerden farklı olarak, dişi sıçanlarda yapılan bir çalışmada proöstrustaki dişi sıçanlarda, kullanılan antikör ne olursa olsun, DMN'de herhangi bir kisspeptin immünoreaktif reaksiyon gözlenmemiştir. Bu bölgede GPR54 mRNA seviyesinin nispeten yüksek olması ise kisspeptinin üremeden bağımsız başka rollere sahip olduğunu göstergesidir (57).

Kisspeptin-54'ün, DMN ve lateral hipotalamik alana uygulandığında, dolaşımdaki gonadotropinler veya total testosteron konsantrasyonları üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (134). GPR54 ekspresyonu, DMN'de (167) nispeten yoğun bir şekilde görülmektedir ancak bu bölgeye kisspeptin-54 uygulamasının, HHG aksın uyarmadığı görülmüştür. Daha önce erişkin erkek sıçanlarda i.c.v. kisspeptin-10 enjeksiyonunun etkisi incelenmiştir. Enjeksiyondan sonra 10. 20. ve 60. dakikalardaki LH, testosteron ve FSH yanıtları incelendiğinde 60. dakikada en yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (168). Dorsomedial nükleus veya lateral hipotalamik bölgeye enjekte edilen Kisspeptin-54'ün enjeksiyondan 60. dakikada dolaşımdaki total testosteron seviyelerini etkilememiştir, bu durumun, LH'nın normalden daha önce sekrete olması ve LH düzeyinde meydana gelen çok az bir artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir (134). Periferal kisspeptin-10 uygulamasından 60 dakika sonra, LH etkisi olmasa bile plazma testosteron düzeyinin yükselmeye devam ettiği gözlenmiştir (168).

6.4. Ventromedial Nükleusta Kisspeptin Yoğunluğu

Ventromedial hipotalamusta, arkuat nükleus sınırlarının dışında ventrolateral kısımda az miktarda kisspeptin immünoreaktif nöron gözlenmiştir (169). Yapılan bir çalışmada ventromedial hipotalamusun ventrolateral kısmında nNOS eksprese eden ve kisspeptin nöronları ile iletişim kuran bir nöron alt grubu gösterilmiştir. Nitrik oksidin (NO), kisspeptin nöronlarının etkilerinde önemli bir nörotransmitter olduğu fikrine uygun olarak, nNOS'ta bozukluk görülen dişi farelerde, lordoz davranışlarında önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar, kisspeptinin dişi farelerde hem eş tercihini hem de cinsel motivasyonu yönettiğini, cinsel davranış ve yumurtlamanın aynı nöropeptid tarafından koordine edildiğini göstermektedir (170). Bu tez çalışmasında ventromedial nükleusta, proöstrus ve östrus gruplarındaki kisspeptin yoğunluğu diöstrus grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Literatürde bahsedilen çalışmaya uyumlu olarak özellikle siklusun östrus safhasında bu bölgede yükselmesi kisspeptin nöronlarının, ventromedial hipotalamustaki nitrik oksit sentezleyen nöronları etkilediğinin bilinmesiyle birlikte, dişi fare beynindeki cinsel davranışı düzenleyen santral bir fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada dişi farelerin östrus sikluslarının farklı evrelerinde üreme, enerji dengesi ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rolleri olan beyin bölgelerindeki kisspeptin ekspresyon yoğunluğu immünfloresan yöntemle incelenmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Yapılan çalışmadan elde edilen veriler ışığında, kisspeptinin hipotalamustaki önemli nükleuslarda

ekspresyonunun görülmesi üreme aksının dışında çok sayıda fizyolojik mekanizmayı da etkileyebileceğini göstermektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Alotaibi FM, Physiology of puberty in boys and girls and pathological disorders affecting its onset. *Journal of Adolescence*, 2019; 71: 63–71.
2. Traggiai C, Stanhope R. Disorders of pubertal development. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2003; 17(1): 41-56.
3. Çolak A, Cengiz M. Lüteinleştirici hormon. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics* 2015; 1: 19-25.
4. Rose M, Das G. Definition and Measurement of follicle stimulating hormone. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 5–22.
5. Dorn LD, Biro FM. Puberty and Its Measurement: A Decade in Review. *Journal Of Research On Adolescence* 2011; 21(1): 180-95.
6. Sisk CL, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2005; 26: 163-74.
7. Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence, *Nature Neuroscience* 2004; 7(10): 1040-7.
8. Plant TM, The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol*. 2015 August; 226(2): T41–T54. doi:10.1530/JOE-15-0113.
9. Krsmanovic LZ, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009; 20(8): 402-8.
10. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors. *Endocrine Reviews*. 2004; 25(2): 235-75.
11. Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction*. 2010; 140(3): 399-410.
12. Williams SR. Menstrual Williams cycle characteristics and predictability of ovulation of bhutia women in sikim india. *J Physiol Anthropol*. 2006; 25(1); 85-90.

13. Delemarre-van de Waal HA. Regulation of Puberty. Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism 2002; 16(1): 1-12.
14. Beshay VE, Carr BR. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. Clinical Reproductive Medicine and Surgery 2013; 31-42.
15. Yiğit G. Hematoloji ve Endokrin Fizyolojisi, Nobel Tıp Kitapevi, 2011.
16. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, et al. Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? Endocrinology 2006; 147(3): 1166-74.
17. Karakuş S. Fluoksetinin sıçanların menstrual siklusu üzerine etkileri, Uzmanlık tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyolog ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, 2012.
18. Hall JE. Guyton Tıbbi Fizyoloji. Yeğen BÇ, Alican İ, Solakoğlu Z (Çeviren). 12. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, 2013.
19. Köylü H. Tıbbi Fizyoloji Klinik Anlatımlı, Nobel Tıp Kitapevi, 2014.
20. Barrett KE, Barman SM. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. Gökbel H (Çeviren). 23. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, 2011.
21. Hayes FJ, Crowley WF Jr. Gonadotropin Pulsations across Development. Hormone Research 1998; 49: 163-8.
22. Rogol AD. Androgens and Puberty. Molecular and Cellular Endocrinology 2002; 198: 25-9.
23. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. Annu. Rev. Physiol. 2008; 70: 213-38.
24. Terranova PF. The Male Reproductive System. Reproductive Physiology, Chapter 37.
25. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Vander İnsan Fizyolojisi. Özgünen T (Çeviren). 13. Baskı, Güneş Tıp Kitapevi, 2014.
26. Holder MK, Blaustein JD. Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. Frontiers in Neuroendocrinology 2014; 35: 89-110.
27. Preston RR, Wilson TE. Lippincott Fizyoloji. Alkaç Üİ, Ermutlu MN, Yılmaz B (Çeviren). Nobel Tıp Kitapevi, 2014.

28. Türkoğlu İ. Menstrual döngü süresinde dinlenme metabolik hızı, vücut bileşimi ve besin alımındaki bireysel farklılıkların saptanması. Uzmanlık tezi, Hacettepe üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme Bilimleri Programı, Ankara, 2010.
29. Sarıözkan S. Lalahan Hay. Laboratuvar hayvanlarında reproduksiyon (Derleme). Araşt. Enst. Derg. 2005; 45 (1): 33 – 9.
30. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. The Journal of biological chemistry. 2001; 276(31): 28969-75.
31. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. The Journal of biological chemistry. 2001; 276(37): 34631-6.
32. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature. 2001; 411(6837): 613-7.
33. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003; 100(19): 10972-6.
34. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. The New England journal of medicine. 2003; 349(17): 1614-27.
35. Clarke H, Dhillon WS, Jayasena CN. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea). 2015; 30(2): 124-41.
36. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. Annual review of physiology. 2008; 70: 213-38.

37. Liu X, Herbison AE. Kisspeptin Regulation of Neuronal Activity throughout the Central Nervous System. *Endocrinology and metabolism* (Seoul, Korea). 2016; 31(2): 193-205.
38. Ebling FJ, Cronin AS. The neurobiology of reproductive development. *NeuroReport*. 2000; 11: R23–R33.
39. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptor. *FEBS Lett*. 1999; 446: 103-7.
40. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006; 26(25): 6687-94.
41. Stafford LJ, Xia C, Ma W, Cai Y, Liu M. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res*. 2002; 62: 5399-404.
42. Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A and Aparicio SAJ.R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54, PNAS. 2005; 102: 1761-6.
43. Qin C, Li J and Tang K. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases, *Endocrinology*. 2018; 159: 3458-72.
44. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2013; 14(4): 387-407.
45. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 2004; 80(4): 264-72.
46. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004; 145(9): 4073-7.

47. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005; 146(9): 3686-92.
48. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006; 147(12): 5817-25.
49. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, et al. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*. 2007; 148(4): 1774-83.
50. Greives TJ, Mason AO, Scotti MA, Levine J, Ketterson ED, Kriegsfeld LJ, et al. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology*. 2007; 148(3): 1158-66.
51. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007; 92(7): 2744-50.
52. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010; 151(8): 3479-89.
53. Grachev P, Li XF, Hu MH, Li SY, Millar RP, Lightman SL, et al. Neurokinin B signaling in the female rat: a novel link between stress and reproduction. *Endocrinology*. 2014; 155(7): 2589-601.
54. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005; 146(7): 2976-84.
55. Garcia-Galiano D, Pinilla L, Tena-Sempere M. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. *Journal of neuroendocrinology*. 2012; 24(1): 22-33.

56. Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, et al. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 2005; 481(3): 314-29.
57. Franceschini I, Yeo SH, Beltramo M, Desroziers E, Okamura H, Herbison AE, et al. Immunohistochemical evidence for the presence of various kisspeptin isoforms in the mammalian brain. *Journal of neuroendocrinology*. 2013; 25(9): 839-51.
58. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, et al. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*. 2005; 146(10): 4431-6.
59. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. 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*. 2005; 102(6): 2129-34.
60. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters*. 1999; 446(1): 103-7.
61. Hahn TM, Breiniger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1998; 1: 271-2.
62. Chen P, Li C, Haskell-Luevano C, Cone RD, Smith MS, Expression of agouti-related transcript (ART) and neuropeptide Y (NPY) in the hypothalamic arcuate nucleus of female rats during the estrous cycle. *Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, LA, 1998 (Abstract P3-663)*, p 52.
63. Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res*. 1997; 756: 283-6.
64. Pu S, Jain M, Horvath TL, Diano S, Kalra SP, Co-existence of neuropeptide Y (NPY) and g-aminobutyric acid (GABA) in the hypothalamus: interactive effects on feeding. *Program of the 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 1997; 23: 1344 (Abstract)*.

65. Pu S, Jain MR, Horvath TL, Diano S, Kalra PS, Kalra SP. Interactions between neuropeptide Y and g-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology*. 1999; 140: 933-40.
66. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL and Kalra PS, Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight, *Endocrine Reviews*. 1999; 20: 68-100.
67. Motta M. *Brain Endocrinology*. Raven Press, New York, 1991; pp. 1–483.
68. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*. 1983; 6(1): 269–324.
69. Okamoto S, Sato T, Tateyama M, Kageyama H, Maejima Y, Nakata M, Hirako S, Matsuo T, Kyaw S, Shiuchi T, Toda C, Sedbazar U, Saito K, Asgar NF, Zhang B, Yokota S, Kobayashi K, Fougère F, Ferré P, Nakazato M, Masuzaki H, Shioda S, Yada T, Kahn BB, Minokoshi Y. Activation of AMPK-regulated CRH neurons in the PVH is sufficient and necessary to induce dietary preference for carbohydrate over fat. *Cell Reports*. 2018; 22(3): 706-21.
70. Morales-Delgado N, Merchán P, Bardet SM, Ferrán JL, Puelles L, D'íaz C. Topography of somatostatin gene expression relative to molecular progenitor domains during ontogeny of the Mouse hypothalamus. *Front Neuroanat*. 2011; 5: 10.
71. Sutton AK, Pei H, Burnett KH, Myers MG Jr, Rhodes CJ, Olson DP. Control of food intake and energy expenditure by *Nos1* neurons of the paraventricular hypothalamus. *J Neurosci*. 2014; 34(46): 15306-18.
72. Shah BP, Vong L, Olson DP, Koda S, Krashes MJ, Ye C, Yang Z, Fuller PM, Elmquist JK, Lowell BB. MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(36): 13193-8.
73. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*. 1989; 10: 89–93.

74. Zhu JN, Guo CL, Li HZ and Wang JJ, Dorsomedial Hypothalamic Nucleus Neurons Integrate Important Peripheral Feeding-Related Signals in Rats. *Journal of Neuroscience Research*. 2007; 85: 3193-204.
75. Bernardis LL, Bellinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998; 218: 284–306.
76. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*. 1999; 20: 68–100.
77. Bellinger LL, Bernardis LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: Lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*. 2002; 76: 431-42.
78. Nakai Y, Shioda S. The effect of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 1999; 264: 117–20.
79. Orsini JC, Wisner AK, Himmi T, Boyer A. Sensitivity of lateral hypothalamic neurons to glycemia level: possible involvement of an indirect adrenergic mechanism. *Brain Res Bull*. 1991; 26: 473–478.
80. Choi YH, Fujikawa, Lee J, Reuter A and Kim K, Revisiting the ventral medial nucleus of the hypothalamus: the roles of SF-1 neurons in energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. 2013; 7: 1-9.
81. Hetherington AW. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity and other phenomena in the rat. *Am. J. Physiol*. 1941; 133: 326-7.
82. Tejwani GA and Richard, CW. Effect of electrolytic and chemical ventromedial hypothalamic lesions on food intake, body weight, analgesia and the CNS opioid peptides in rats and mice. *NIDA Res Monogr*. 1986; 75: 497-500.
83. Matsuda K, Azuma M, Maruyama K, et al. Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in vertebrates. *Obes Res Clin Pract* 2013; 7: e1–e7.
84. Choi YH, Fujikawa T, Lee J, et al. Revisiting the ventral medial nucleus of the hypothalamus: The roles of SF-1 neurons in energy homeostasis. *Front Neurosci* 2013; 7: 71.

85. Kim KW, Zhao L, Donato J Jr, et al. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 10673-8.
86. Resch JM, Boisvert JP, Hourigan AE, et al. Stimulation of the hypothalamic ventromedial nuclei by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hypophagia and thermogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 301: R1625–R1634.
87. Vandenbergh JG: Pheromones and mammalian reproduction; in Neill JD (ed): *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd ed. Elsevier, 2006; 2041-58.
88. Pineda R, Plaisier F, Millar RP, Ludwig M: Amygdala kisspeptin neurons: putative mediators of olfactory control of the gonadotropic axis. *Neuroendocrinology* 2017; 104: 223-38.
89. Insel TR. The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron*. 2010; 65: 768-79.
90. Skuse DH, Gallagher L. Dopaminergic-neuropeptide interactions in the social brain. *Trends Cogn Sci*. 2009; 13: 27–35.
91. Comminos AN, Dhillon WS, Emerging Roles of Kisspeptin in Sexual and Emotional Brain Processing. *Neuroendocrinology*. 2018; 106: 195–202.
92. Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG, Pavlova MN, Rohde AD, Clifton DK, Steiner RA, Rissman EF. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci*. 2007; 27: 8826-35.
93. Adekunbi DAL, Li XF, Colledge WH, O'Byrne K. Kisspeptin in the posterodorsal medial amygdala modulates mate preference and anxiety in male mice. *Endocr Rev*. 2017; 38: SAT 445.
94. Bakker J, Pierman S, Gonzalez-Martinez D. Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav*. 2010; 57: 390-5.

95. Watanabe Y, Ikegami K, Ishigaki R, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H, Inoue N. Enhancement of the LH surge by male olfactory signals is associated with AVPV Kiss1 cell activation in female rats. *J Neuroendocrinol.* 2017; 29: e12505.
96. Ogawa S, Nathan FM, Parhar IS: Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 3841-6.
97. Nathan FM, Ogawa S, Parhar IS. Kisspeptin1 modulates odorant-evoked fear response via two serotonin receptor subtypes (5-HT1A and 5-HT2) in zebrafish. *J Neurochem.* 2015; 133: 870-8.
98. Nathan FM, Ogawa S, Parhar IS. Neuronal connectivity between habenular glutamatekisspeptin1 co-expressing neurons and the raphe 5-HT system. *J Neurochem* 2015; 135: 814-29.
99. Rao YS, Mott NN, Pak TR: Effects of kisspeptin on parameters of the HPA axis. *Endocrine* 2011; 39: 220-8.
100. Comninou AN, Wall MB, Demetriou L, Shah AJ, Clarke SA, Narayanaswamy S, Nesbitt A, Izzi-Engbeaya C, Prague JK, Abbara A, Ratnasabapathy R, Salem V, Nijher GM, Jayasena CN, Tanner M, Bassett P, Mehta A, Rabiner EA, Honigsperger C, Silva MR, Brandtzaeg OK, Lundanes E, Wilson SR, Brown RC, Thomas SA, Bloom SR, Dhillon WS. Kisspeptin modulates sexual and emotional brain processing in humans. *J Clin Invest* 2017; 127: 709-19.
101. Kinsey-Jones JS, Li XF, Knox AM, Wilkinson ES, Zhu XL, Chaudhary AA, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT. Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 20-9.
102. Csabafi K, Jaszberenyi M, Bagosi Z, Liptak N, Telegdy G. Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic- pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res.* 2013; 241: 56-61.
103. Ogawa S, Ng KW, Ramadasan PN, Nathan FM, Parhar IS. Habenular Kiss1 neurons modulate the serotonergic system in the brain of zebrafish. *Endocrinology* 2012; 153: 2398-407.

104. Tanaka M, Csabafi K, Telegdy G. Neurotransmissions of antidepressant-like effects of kisspeptin-13. *Regul Pept.* 2013; 180: 1–4.
105. Silvers JA, Wager TD, Weber J, Ochsner KN. The neural bases of uninstructed negative emotion modulation. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2015; 10: 10–8.
106. Asaba A, Osakada T, Touhara K, Kato M, Mogi K, Kikusui T. Male mice ultrasonic vocalizations enhance female sexual approach and hypothalamic kisspeptin neuron activity. *Horm Behav.* 2017; 94: 53–60.
107. Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2010; 151: 312–21.
108. Arai AC. The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. *Peptides*, 2009; 30: 550 16–25.
109. Telegdy G, Adamik, A. The action of kisspeptin-13 on passive avoidance learning in mice. Involvement of transmitters. *Behavioural Brain Research*, 2013; 243: 667 300–5.
110. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends in Molecular Medicine*, 2001; 7: 548–54.
111. Jiang JH, He Z, Peng YL, Jin WD, Wang Z, Han RW, Chang M, Wang R. Kisspeptin-13 enhances memory and mitigates memory impairment induced by Ab1–42 in mice novel object and object location recognition tasks. *Neurobiology of Learning and Memory.* 2015; 123: 187–95.
112. Hauge-Evans AC, Richardson CC, Milne HM, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. A role for kisspeptin in islet function. *Diabetologia*, 2006; 49: 2131–5.
113. Silvestre RA, Egidio EM, Hernandez R, Marco J. Kisspeptin-13 inhibits insulin secretion without affecting glucagon or somatostatin release: study in the perfused rat pancreas. *J Endocrinol*, 2008; 196: 283–90.
114. Panidis D, Rousso D, Koliakos G et al. Plasma metastatin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2006; 85: 1778–83.

- 115.Small CJ, Stanley SA, Bloom SR. Appetite control and reproduction: leptin and beyond. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2002; 20: 389–398.(doi:10.1055/s-2002-36712).
- 116.De Bond JAP and Smith JT, Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction* 2014; 147: 53–63.
- 117.De Bond JA, Smith JT. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction* (Cambridge, England). 2014;147(3):R53-63.
- 118.Stengel A, Wang L, Goebel-Stengel M, Tache Y. Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport*. 2011; 22: 253–257. (doi: 10.1097/WNR.0b013e32834558df).
- 119.Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*. 2010; 151: 2233-43. (doi: 10.1210/en.2009-1190).
- 120.Kim GL, Dhillon SS, Belsham DD. Kisspeptin directly regulates neuropeptide Y synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogenactivated protein kinase signaling pathways in NPY-secretin hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 2010; 151: 5038-47. (doi: 10.1210/en.2010-0521).
- 121.Mittelman-Smith MA, Williams H, Krajewski-Hall SJ, Lai J, Ciofi P, McMullen NT, Rance NE. Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology*. 2012; 153: 2800-12. (doi:10.1210/en.2012-1045).
- 122.Hamid HY and Zakar Abu Bakar MD, Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *African Journal of Biotechnology* 2013; 16: 2510-4.
- 123.Goldman JM, Murr AS and Cooper RL. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research (Part B)*. 2007; 80: 84–97.
124. Cora MC, Kooistra L and Travlos G, Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*. 2015; 43: 776-93.

125. Marcondes FK, Bianchi FJ and Tanno AP, Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations, *Braz. J. Biol.*, 2002; 62: 609-14.
126. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL, Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments*, 2012; 67: 1-6.
127. Schwartz NB. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am. J. Physiol.*, 1964; 107: 1251-9.
128. Lohmiller J, Swing SP. Reproduction and Breeding. In Suckow MA, Weisbroth SH and Franklin CL. *The Laboratory Rat*. 2nd ed. 2006; pp. 147-164. Elsevier Academic Press.
129. Caligioni C, Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2009; Appendix-4I; 1-11.
130. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB reports*. 2015; 48(4): 229-33.
131. George Paxinos and Charles Watson. *The Mouse Brain*. In *Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition. Academic Press. 1998.
132. Reitmeir R, Kilic E, et al. Vascular endothelial growth factor induces contralesional corticobulbar plasticity and functional neurological recovery in the ischemic brain. *Acta Neuropathol*. 2012; 123: 273-284.
133. Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, et al. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PloS one*. 2009; 4(12): e8334.
134. Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR. Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *Journal of neuroendocrinology*. 2006; 18(5): 349-54.
135. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, et al. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone

- secretion in the goat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010; 30(8): 3124-32.
136. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, et al. 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*. 2007; 53(2): 367-78.
137. Ozaki S, Higo S, Iwata K, Saeki H, Ozawa H. Region-specific changes in brain kisspeptin receptor expression during estrogen depletion and the estrous cycle. *Histochemistry and cell biology*. 2019.
138. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, et al. 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*. 2004; 145(10): 4565-74.
139. Beale KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, et al. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology*. 2014; 155(3): 1091-8.
140. Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Casanueva FF, et al. Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology*. 2006; 147(6): 2864-78.
141. Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, et al. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *Journal of neuroendocrinology*. 2010; 22(10): 1101-12.
142. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *Journal of neuroendocrinology*. 2009; 21(8): 673-82.
143. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2007; 14(6): 482-7.

144. Compagnucci C, Compagnucci GE, Lomniczi A, Mohn C, Vacas I, Cebal E, et al. Effect of nutritional stress on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the growing male rat. *Neuroimmunomodulation*. 2002; 10(3): 153-62.
145. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 2005; 146(9): 3917-25.
146. Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology*. 2007; 148(10): 4601-11.
147. Tolson KP, Garcia C, Yen S, Simonds S, Stefanidis A, Lawrence A, et al. Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124(7): 3075-9.
148. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science (New York, NY)*. 2004; 304(5667): 108-10.
149. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of neuroendocrinology*. 2006; 18(4): 298-303.
150. Marraudino M, Miceli D, Farinetti A, Ponti G, Panzica G, Gotti S. Kisspeptin innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus: sexual dimorphism and effect of estrous cycle in female mice. *Journal of anatomy*. 2017; 230(6): 775-86.
151. Yeo SH, Herbison AE. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology*. 2011; 152(6): 2387-99.
152. Higo S, Honda S, Iijima N, Ozawa H. Mapping of Kisspeptin Receptor mRNA in the Whole Rat Brain and its Co-Localisation with Oxytocin in the Paraventricular Nucleus. *Journal of neuroendocrinology*. 2016; 28(4).
153. Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2008; 12(6): 717-27.

154. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 320(2): 383-8.
155. Naik DV. Immunoreactive LH-RH neurons in the hypothalamus identified by light and fluorescent microscopy. *Cell and tissue research*. 1975; 157(4): 423-36.
156. Ruggiero DA, Baker H, Joh TH, Reis DJ. Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region of mouse. *The Journal of comparative neurology*. 1984; 223(4): 556-82.
157. Gotti S, Chiavegatto S, Sica M, Viglietti-Panzica C, Nelson RJ, Panzica G. Alteration of NO-producing system in the basal forebrain and hypothalamus of Ts65Dn mice: an immunohistochemical and histochemical study of a murine model for Down syndrome. *Neurobiology of disease*. 2004; 16(3): 563-71.
158. Gotti S, Sica M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microscopy research and technique*. 2005; 68(1): 13-35.
159. Wang L, Goebel-Stengel M, Stengel A, Wu SV, Ohning G, Tache Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain research*. 2011; 1415: 34-46.
160. Kadar A, Sanchez E, Wittmann G, Singru PS, Fuzesi T, Marsili A, et al. Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse. *The Journal of comparative neurology*. 2010; 518(19): 3948-61.
161. Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS, 3rd. Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Progress in neurobiology*. 2008; 84(1): 1-24.
162. Tan HY, Huang L, Simmons D, Veldhuis JD, Steyn FJ, Chen C. Hypothalamic distribution of somatostatin mRNA expressing neurones relative to pubertal and adult changes in pulsatile growth hormone secretion in mice. *Journal of neuroendocrinology*. 2013; 25(10): 910-9.

- 163.Rao YS, Mott NN, Pak TR. Effects of kisspeptin on parameters of the HPA axis. *Endocrine*. 2011; 39(3): 220-8.
- 164.Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain research reviews*. 2008; 57(2): 277-87.
- 165.Scott V, Brown CH. Kisspeptin activation of supraoptic nucleus neurons in vivo. *Endocrinology*. 2011; 152(10): 3862-70.
- 166.Caldwell JD, Prange AJ, Jr., Pedersen CA. Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides*. 1986; 7(2): 175-89.
- 167.Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Hattori M, Nishimura A, Ohtaki T, et al. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochimica et biophysica acta*. 2004; 1678(2-3): 102-10.
- 168.Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillo WS, Todd JF, et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of neuroendocrinology*. 2004; 16(10): 850-8.
- 169.Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*. 2009; 30(1): 26-33.
- 170.Hellier V, Brock O, Candlish M, Desroziers E, Aoki M, Mayer C, et al. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nature communications*. 2018; 9(1): 400.

8. ÖZGEÇMİŞ

06.09.1991 yılında İngiltere'nin Sheffield şehrinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 2006 yılında TÜBİTAK Liseler arası proje yarışmasına "Elazığ İlinin Coğrafik Yapısının Nükleer Santral Kurulmasına Uygun Olup Olmadığının Araştırılması" konulu proje ile Ankara'da finale katılmayı hak kazandım. 2010 yılında Ankara Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik bölümünü kazandım. 2013-14 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi ve Ankara Numune Hastanesi (Yetişkin Stajı); Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi (Toplum Sağlığı Beslenme Stajı) ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi (Çocuk Stajı) tamamladım. 2014 yılında aynı üniversiteden mezun oldum. 2016 yılında Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. Halen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmekteyim.