

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

**PUBERTE VE ÜREMENİN NÖROENDOKRİN  
KONTROLÜNDE KİSSPEPTİN, RFRP-3 VE  
NESFATİN-1'İN ETKİLEŞİMİ ÜZERİNE  
DENEYSEL ARAŞTIRMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**Zafer ŞAHİN**

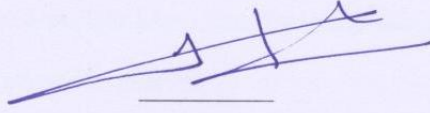
**2015**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

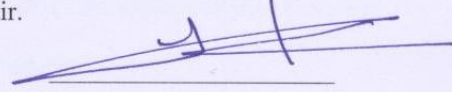


Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



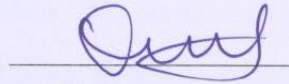
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

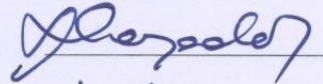
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



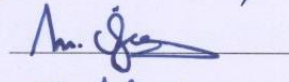
Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK



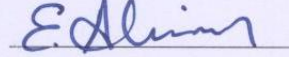
Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



Doç. Dr. Mete ÖZCAN



Doç. Dr. Ergül ALÇİN



**Rahmetli babam**  
**Muzaffer ŞAHİN'in**  
**aziz ruhuna ithaf ediyorum.**

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalar esnasında malzeme temini ve verilerin hazırlanması gibi teknik konuların yanı sıra moral ve motivasyon gibi manevi hususlarda cömertliklerine devam ettikleri için Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN ve Sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince ilgilerini benden esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ ve Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR'a teşekkür ederim.

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK ve Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU'na teşekkür ederim.

Anabilim Dalımızda görev yapmakta olan Araştırma Görevlisi arkadaşlara, Doktora ve Yüksek Lisans öğrencilerine de yardım ve ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

İmmünohistokimya ve ELISA analizlerinde laboratuvar imkanlarını kullanmamda ve beyin kanülleri ile ilgili malzeme temininde yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sedat YILDIZ, Doç. Dr. Ergül ALÇİN, Arş. Gör. Suat TEKİN ve Arş. Gör. Tuba ÖZGÖÇER'e teşekkür ederim.

Şu an Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı olarak görev yapmakta olan, Anabilim Dalımızın eski

Öğretim Üyesi, Sayın Prof. Dr. Selim KUTLU'ya ilgi ve manevi desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) görevlileri Lütfi DEMİREL ve Veysel ÇAK'a deneysel çalışmalar esnasında gösterdikleri ilgi ve yardımdan dolayı teşekkür ederim.

Beni aşan nedenlerle, birazcık, ara vermek zorunda kaldığım ve bu yüzden uzun döneme yayılan lisansüstü öğrenimim süresince, maddi-manevi verebilecekleri ne varsa, hiç düşünmeden, feda ettikleri için, kilometrelerce uzakta olmalarına rağmen her zaman yanımda olduklarını hissettirdikleri için, varlıklarından huzur bulduğum, annem Saniye ŞAHİN, kız kardeşim Gül ŞAHİN ÇAKICI, eniştem Serkan ÇAKICI ve ailemizin prensi Muhammed Melih ÇAKICI'ya teşekkür ederim.

Araştırmamıza 113S193 numaralı proje kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

1. Özet.....	1
2. Abstract.....	3
3. Giriş.....	5
3.1. Puberte.....	7
3.2. Pubertenin Nöroendokrinolojik Kontrolü.....	14
3.2.1. RFamid Nöropeptidler.....	14
3.2.1.1 RFRP-3.....	16
3.2.1.2. Kisspeptin.....	19
3.2.1.3. İnsanda KISS1/KISS1R Sisteminin Önemi.....	21
3.2.1.4. Kemirgen Canlılarda Kiss1/Kiss1r Sistemi.....	22
3.2.1.5. Kisspeptinin Eksojen Etkileri.....	23
3.2.1.6. Hipotalamusta Kisspeptin Sentezinin Gonadlarla İlişkisi.....	24
3.2.1.7. Kisspeptinin Hipofiz ve Gonadlar Üzerindeki Etkileri.....	26
3.2.1.8. Kisspeptin Nöronlarının İnsan ve Diğer Canlılardaki Özellikleri.....	27
3.2.1.9. Kisspeptinin Tanımlanan Fizyolojik Rollerini.....	30
3.2.1.9.1. Kisspeptin ve Puberte.....	30
3.2.1.9.2. Kisspeptin ve Östrus Siklusu.....	32
3.2.1.9.3. Kisspeptinin Üremenin Metabolik Düzenlenmesindeki Rolü.....	33
3.3. Puberte Yaşına Vücudun Enerji Rezervinin Etkisi.....	34
3.3.1. Obezite ve Puberte.....	36
3.3.2. Leptin ve Puberte.....	38
3.3.3. Enerji Dengesi İle İlgili Yeni Peptid: Nesfatin-1.....	40
3.3.3.1. Nesfatin-1 ve Hipotalamus İlişkisi.....	40

3.3.2. Nesfatin-1 ve Beslenme Davranışı.....	42
3.3.3. Nesfatin-1 ve Üreme.....	48
3.4. Puberte Yaşının Fizyolojik Sınırlarda Kalmasının Önemi.....	49
4. Gereç ve Yöntem.....	53
4.1. Grupların Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar.....	53
4.2. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması.....	55
4.3. Floresan İmmünohistokimya.....	55
4.4. Serum LH, FSH ve Leptin ELISA Protokolü.....	56
4.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	57
5. Bulgular.....	58
5.1. Yem Tüketimi.....	58
5.2. Su Tüketimi.....	63
5.3. Canlı Ağırlık Artışı.....	68
5.4. Puberte Yaşı.....	72
5.5. İlk Östrüs Yaşı.....	74
5.6. Puberte Canlı Ağırlığı.....	76
5.7. İlk Östrüs Canlı Ağırlığı.....	79
5.8. Gonadotropin Seviyeleri.....	80
5.9. Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları.....	85
5.10. Serum Leptin Düzeyleri.....	87
5.11. ARC Kisspeptin İmmünoreaktivitesi.....	88
6. Tartışma ve Sonuç.....	91
6.1. Beslenme Davranışı ve Canlı Ağırlık Artışı.....	91
6.1.1. Kisspeptinin Etkileri.....	91

6.1.2. RF9'un Etkileri.....	98
6.1.3. Nesfatin-1'in Etkileri.....	102
6.2. Puberte Yaşı, Puberte Canlı Ağırlığı, İlk Östrüs Yaşı ve İlk Östrüs Canlı Ağırlığı.....	108
6.2.1. Kisspeptinin Etkileri.....	108
6.2.2. RF9'un Etkileri.....	112
6.2.3. Nesfatin-1'in Etkileri.....	114
6.3. Gonadotropin Seviyesi ve ARC Kisspeptin İmmünoaktivitesi.....	117
6.3.1. Kisspeptinin Etkileri.....	117
6.3.2. RF9'un Etkileri.....	121
6.3.3. Nesfatin-1'in Etkileri.....	126
7. Kaynaklar.....	131
8. Özgeçmiş.....	155

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> İnsanlardaki Endojen RFamid Peptidleri ve Aminoasit Dizilim Özellikleri.....	16
<b>Tablo 2.</b> GnIH ve Eşdeğer Yapıların Omurgalı Canlılarda Aminoasit Dizilimleri.....	19
<b>Tablo 3.</b> Kisspeptinin Etkin Formunun İnsan ve Diğer Omurgalı Canlılarda Sekans Özelliği.....	20
<b>Tablo 4.</b> Prepubertal 26. Günden Erişkin 60. Güne Kadar (34 Günlük), 100 gram CA için, Günlük Yem Tüketim Ortalamaları (gr/100gr CA).....	62
<b>Tablo 5.</b> Prepubertal 26. Günden Erişkin 60. Güne Kadar (34 Günlük), 100 gram CA için, Günlük Su Tüketim Ortalamaları (ml/100gr CA).....	67
<b>Tablo 6.</b> Prepubertal 26. Günden Erişkin 60. Güne Kadar 34 Günlük Periyotta CA Ortalamaları (Ort±SH).....	71
<b>Tablo 7.</b> Puberte ve İlk Östrüs Yaşı.....	76
<b>Tablo 8.</b> Puberte ve İlk Östrüs Ağırlığı.....	79
<b>Tablo 9.</b> Gonadotropin Seviyeleri.....	84
<b>Tablo 10.</b> Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları.....	87

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil. 1.</b> Kızlarda Gonadotropin Sekresyon Profiline Yaşla İlişkisi.....	8
<b>Şekil. 2.</b> KISS1 geni ürünü endojen kisspeptin formları.....	20
<b>Şekil. 3.</b> Gonadal Steroidlerin AVPV Kisspeptin Nöronlarına Pozitif Geri Bildirimi.....	25
<b>Şekil. 4.</b> Gonadal Steroidlerin ARC Kisspeptin Nöronlarına Negatif Geri Bildirimi.....	26
<b>Şekil. 5.</b> Fare ve sıçan (A), Maymun (B) ve Koyun (C) gibi canlı türlerinde GnRH ve Kisspeptin nöronlarının hipotalamik yerleşimi.....	29
<b>Şekil. 6.</b> Puberte Öncesi ve Puberte Döneminde GnRH/Kisspeptin Aktivasyonunda Muhtemel Uyarıcı ve Baskılayıcı Nöromedyatörlerin Durumu ve Kisspeptin nöronlarında östrojen reseptörü alfa ( $ER\alpha$ ) Sinyalleşmesi.....	31
<b>Şekil. 7.</b> Dişilerde siklusun değişik dönemlerinde ovaryum östrojen üretimine bağlı olarak ARC ve AVPV kisspeptin nöronlarında Kiss1 ekspresyonu.....	33
<b>Şekil. 8.</b> NUCB2/Nesfatin geni tarafından üretilen proteinin nesfatin-1'e işlenmesi.....	41
<b>Şekil. 9.</b> Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Yem Tüketimi.....	59
<b>Şekil. 10.</b> Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Yem Tüketimi.....	60
<b>Şekil. 11.</b> Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Yem Tüketimi.....	61

<b>Şekil. 12.</b> Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Su Tüketimi.....	64
<b>Şekil. 13.</b> Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Su Tüketimi.....	65
<b>Şekil. 14.</b> Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Su Tüketimi.....	66
<b>Şekil. 15.</b> Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Vücut Ağırlığında Oluşan Değişimlerin %'si.....	68
<b>Şekil. 16.</b> Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Vücut Ağırlığında Oluşan Değişimlerin %'si.....	69
<b>Şekil. 17.</b> Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Vücut Ağırlığında Oluşan Değişimlerin %'si.....	70
<b>Şekil. 18.</b> Sham, Kisspeptin, p234 ve Kisspeptin+p234 Gruplarında Puberte Başlangıç Günlerinin % Oranları.....	73
<b>Şekil. 19.</b> Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında Puberte Başlangıç Günlerinin % Oranları.....	73
<b>Şekil. 20.</b> Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında Puberte Başlangıç Günlerinin % Oranları.....	74
<b>Şekil. 21.</b> Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında Pubereye Giriş Vücut Ağırlığı Ortalamaları.....	77
<b>Şekil. 22.</b> Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında Pubereye Giriş Vücut Ağırlığı Ortalamaları.....	78
<b>Şekil. 23.</b> Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında Pubereye Giriş Vücut Ağırlığı Ortalamaları.....	78

<b>Şekil 24.</b> Kisspeptin ve kisseptin reseptör antagonistinin	
LH ve FSH üzerine etkileri.....	81
<b>Şekil. 25.</b> RF9 ve kisseptin reseptör antagonistinin	
LH ve FSH üzerine etkileri.....	82
<b>Şekil. 26.</b> Nesfatin ve kisseptin reseptör antagonistinin	
LH ve FSH üzerine etkileri.....	83
<b>Şekil. 27.</b> Sham, Kisspeptin, p234 ve kisseptin+p234 Gruplarında	
Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları.....	85
<b>Şekil. 28.</b> Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında	
Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları.....	86
<b>Şekil. 29.</b> Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında	
Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları.....	86
<b>Şekil. 30.</b> Serum leptin Düzeyleri.....	88
<b>Şekil. 31.</b> Sham (A), Kisspeptin (B), p234 (C) ve Kisspeptin+p234 (D)	
gruplarında ARC kisseptin immünoreaktivitesi.....	89
<b>Şekil. 32.</b> RF9 (A), RF + p234 (B), Nesfatin-1 (C) ve Nesfatin-1+ p234 (D)	
gruplarında ARC kisseptin İmmünoreaktivitesi.....	90

## KISALTMALAR LİSTESİ

AgRP	:Agouti-related peptide
ARC	:Arkuat nukleus
as-MON	:Antisence-morpholino oligonucleotid
AVPV	:Anteroventral periventriküler nukleus
BMI/VKİ	:Vücut kütle indeksi
CA	:Canlı ağırlık
CART	:Kokain ve Amfetamin ile regüle edilen Transkript
CCK	:Kolesistokinin
CRH/CR	:Kortikotropin serbestleştirici hormon/faktör
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	:Hücre içi kalsiyum
db/db	:Genetik olarak diyabetli
DHEA	:Dehidroepiandrosteron
DHEAS	:Dehidroepiandrosteron sülfat
DMN	:Dorsomedial nukleus
ERK	:Extracellular signal-regulated kinases
Er $\alpha$	:Östrojen reseptörü alfa
FSH	:Folikül stimüle edici hormon
GABA	:Gamma-aminobütirik asit
GH	:Büyüme hormonu (Growth hormon)
GHRH	:Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GnIH	:Gonadotropin inhibe edici hormon
GnRH	:Gonadotropin salgılatıcı hormon
GnRH-GFP; <i>Kiss1r</i> -null	:Kisspeptin reseptör mutasyonlu-GnRH normal

HH	:Hipogonadotropik hipogonadizmli
HHA/HPA	:Hipotalamo-hipofizer adrenal aks
HHG/HPG	:Hipotalamo-hipofizer gonadal aks
GPR54 -/-	:Kisspeptin reseptör mutasyonu oluşturulmuş
ICV	:İntraserebroventriküler (Beyin ventrikül içi)
IGF-1	:İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IHH	:İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm
IV	:İntravenöz (damar içi)
İP	:İntraperitoneal (periton içi)
Kiss1 -/-	:Kisspeptin gen mutasyonu oluşturulmuş
KISS1R/kiss1r	:Kisspeptin reseptörü (GPR54)
Kiss1r KO / GPR54 -/-	:Kisspeptin reseptör mutasyonu oluşturulmuş
LH	:Lüteinleştirici hormon
LHA	:Lateral hipotalamik alan
MAPK	:Mitogen-activated protein kinases
MBH	:Mediobazal hipotalamus
MCR	:Melanokortin reseptörü
ME	:Median eminens
MSS	:Merkezi sinir sistemi
mTOR	:Phosphor-mammalian target of rapamycin
NHANES	:National Health and Nutrition Examination Survey
NPAF	:Nöropeptid AF
NPFF	:Nöropeptid FF
NPY	:Nöropeptid Y

NTS	:Nükleus traktus solitarius
NUCB2	:Nucleobindin 2
ob/ob	:Leptin gen mutasyonlu obez (ob/ob)
Ort±SH	:Aritmetik Ortalama±Standart Hata
PBS	:Fosfatlanmış tamponlanmış salin/tuzlu su
PC	:Prohormon Convertase
PeVN	:Periventriküler nükleus
POA	:Preoptik alan
POMC	:Pro-opiomelanokortin
PrRP	:Prolaktin salgılatıcı peptid
PVN	:Paraventriküler nükleus
RFamid	:Arjinin (R) ve amide halde fenilalanin (F) içeren
RFRP	:RFamid-İlişkili peptid
RP3V	:3. ventrikülün rostral periventriküler alanı
SC	:Subkutan (derialtı)
SON	:Supraoptik nükleus
TNF	:Tümör nekrozis faktör
TRH	:Tirotropin salgılatıcı hormon
VHT	:Ventral hipotalamik trakt
VMN	:Ventromedial nükleus
α-MSH	:Alfa-melanosit uyarıcı hormun

## 1. ÖZET

### **Puberte Ve Üremenin Nöroendokrin Kontrolünde Kisspeptin, RFRP-3 ve Nesfatin-1'in Etkileşimi Üzerine Deneysel Araştırmalar**

Araştırmamızda kisspeptin ve nesfatin-1'in dişi sıçanlarda üreme fonksiyonu ve enerji rezervi üzerine etkisinin yanı sıra RF9'un (RFRP3/GnIH antagonisti) ve p234'ün (kisspeptin reseptör (kiss1r) antagonisti) modülatör etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için 21 günlük süttten kesilmiş Spraque-Dawley dişi yavru sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlara intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon için kanüller anestezi altında takıldıktan sonra, 23. günden 60. güne kadar, kisspeptin, kisspeptin+p234, p234, RF9, RF9+p234, nesfatin-1 ve nesfatin-1+p234 günlük ICV olarak enjekte edilmiştir. Kisspeptin, RF9 ve nesfatin-1'in LH salgılanmasını artırdığı, p234'ün tek başına bazal LH düzeyine etki etmediği fakat kisspeptin, RF9 ve nesfatin ile birlikte uygulandığında ise LH düzeyinin anlamlı şekilde düştüğü görüldü. Kisspeptin, RF9 ve nesfatin uygulanan hayvanlarda pubertenin morfolojik işareti olan vajinal açıklığın erken başladığı, p234 ile geciken pubertenin kisspeptin, RF9 ve nesfatin-1 ile kombine edildiği gruplarda ise kontrol grubu ile aynı seviyeye döndüğü tespit edildi. Kisspeptin ve nesfatin gıda alımında azalma ve canlı ağırlık artışını azaltıcı etki oluştururken, RF9'un ise canlı ağırlık artışına etki etmeksizin gıda alımında azalma meydana getirdiği görüldü. Bu veriler, kiss1r antagonisti p234 ile kisspeptinin yanı sıra, ilk kez, GnIH/RFRP-3 antagonisti RF9'un ve kısmen

nesfatin-1'in gonadal aks ve enerji rezervinin düzenlenmesiyle ilgili etkilerinin değiştirilebildiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** puberte, üreme, kisspeptin, nesfatin-1, RF9, p234, enerji dengesi

## 2. ABSTRACT

### **Experimental Studies on Interaction Between Kisspeptin, RFRP-3 and, Nesfatin-1 in Neuroendocrine Regulation Of The Puberty and Reproduction**

The aim of this study was to determine the modulatory effect of p234 (an antagonist of kisspeptin receptor (kiss1r)) and RF9 (an RFamide-related peptide-3 (RFRP3/GnIH) antagonist) on kisspeptin and, nesfatin-1- induced changes in reproductive functions and energy balance in the female rats. The prepubertal Sprague-Dawley female rats were weaned on day 21. The animals were intracerebroventricularly (ICV) cannulated under general anesthesia on postnatal 23 ages. Groups of female rats injected with kisspeptin, nesfatin-1, RF9, peptide 234, or kisspeptin plus p234, nesfatin plus p234 and, RF9 plus p234, daily (from 23 to 60 postnatal days). Kisspeptin, nesfatin-1 and, RF9 elicited significant elevations of circulating LH levels. Coadministrations of kisspeptin, nesfatin-1 and, RF9 with p234 decreased LH levels significantly. P234 alone did not cause any significant change in LH secretion. Kisspeptin, RF9 and, nesfatin-1 advanced vaginal opening (VO), which was delayed by kisspeptin antagonist. In the rats given kisspeptin plus p234, nesfatin-1 plus p234 or RF9 plus peptide 234, VO was not different from control rats. Kisspeptin and nesfatin-1 decreased both food intake and body weight while RF9 decreased only food intake without affecting body weight. The effects of kisspeptin and RF9 on energy balance were also reversed by central administration of p234. In conclusion, these results shows that

it can be modulated as well as kisspeptin with kiss1r antagonist p234, for the first time, GnIH / RFRP-3 receptor antagonist RF9 and partly nesfatin-1 the effects related to the regulation of gonadal axis and energy balance.

**Key words:** puberty, reproduction, kisspeptin, nesfatin-1, RF9, p234, energy balance

### 3. GİRİŞ

Endüstrileşmiş ülkelerde 19. yüzyılın ortalarından itibaren toplumun hayat tarzında önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Özellikle 20. yüzyılda belirgin olarak görüldüğü için Yüzyılın Eğilimi (Secular Trend) olarak adlandırılan bu durum, insanlarda birçok biyolojik fonksiyonun yanı sıra, puberte gelişimini de etkilemiştir (1).

Tüm dünyada, özellikle gelişmiş ülkelerde değişen sosyo-ekonomik koşullarla birlikte puberte yaşı son 100–150 yılda, her 10 yıl için 2–3 ay erkene kayma eğilimi göstermektedir. Gelişmekte olan ülkeler arasına dahil edilen Hindistan ve Çin’de de benzer etkiler söz konusudur (2-6).

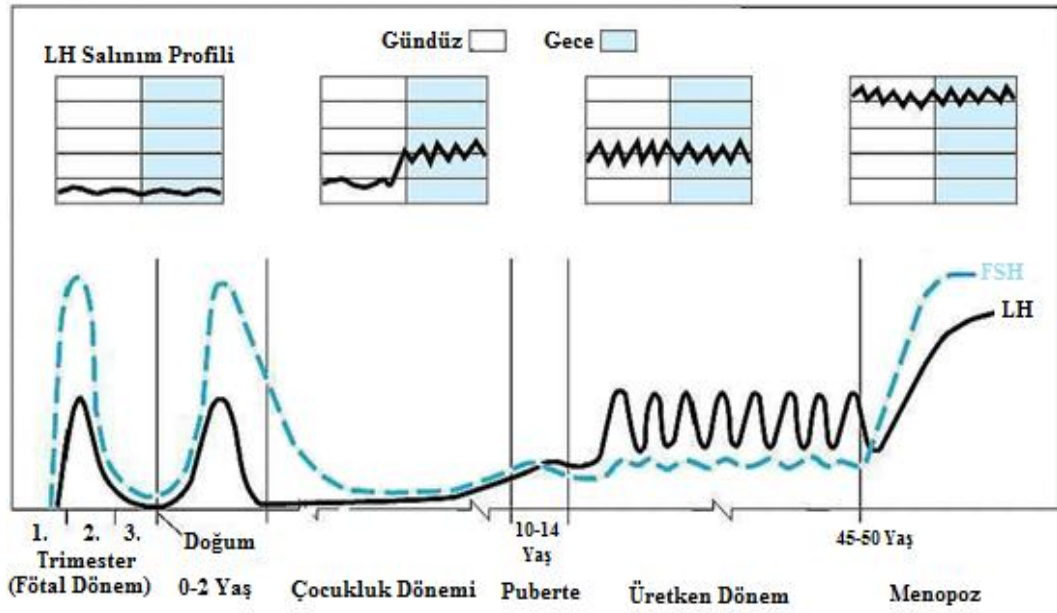
Puberte başlangıç yaşı ırklara göre bir takım farklılıklar gösterebilmektedir. Siyah ırkta beyazlara oranla puberte bulguları daha erken görüldüğü gibi yine benzer sosyo-ekonomik koşullara sahip Akdeniz ülkelerinde diğer Avrupa ülkelerine göre puberte daha erken yaşlarda ortaya çıkabilmektedir (7-9). Puberte yaşıyla ilgili olarak, genetik özelliklerin yanı sıra, özellikle beslenme ile ilgili alışkanlıkların değişmesi ve buna bağlı olarak artan enerji rezervinin etkisi olmak üzere bir takım çevresel faktörlerin dahil olmasının belirleyici etken olduğu düşünülmektedir (10). Yetersiz beslenme ile ilişkili negatif enerji rezervinin gecikmiş puberteye yol açtığı, yağ doku artışının normalden fazla olacak şekilde beslenmenin ve pozitif enerji durumunun ise erken puberteye neden olabileceği ileri sürülmüştür (11). Buna bağlı olarak, geçen yüzyıl boyunca puberte başlangıç yaşı, gelişmiş ülke popülasyonlarında sosyoekonomik durum ve beslenme tarzında meydana gelen değişikliklerin etkisiyle daha erken yıllara kayma eğilimi

gösterdiği ifade edilmektedir (10, 12-15). Bu durumla ilişkili olarak, az gelişmiş ülkelerden Avrupa'ya göç eden evlat edinilmiş çocuklarda erken puberte görülme oranının % 30'u bulabildiği ileri sürülmektedir (16). Örneğin Belçikalı yerli halkta erken puberte görülme oranı % 0,01 iken, sonradan bu ülkeye gelen çocuklarda ise oran % 0,8 düzeyinde, yani 80 kat fazladır (17). Evlatlık çocuklarda ortaya çıkan erken puberte durumu, yetersiz beslenme oranının yüksek olduğu ortamdandır, daha fazla beslenme imkanının mümkün olduğu topluma dahil olmanın sonucu olarak izah edilmiştir (18). Ayrıca bu tür durumlarda, kısıtlı ekonomik koşullar nedeniyle bireylerin temel ihtiyaçlarını karşılayabilmek için bile daha fazla enerji harcanmasını ve daha yoğun stresle baş edilmesini gerektiren şartların ortadan kalmış olmasının etkileri de göz ardı edilmemelidir.

Adolesan (gençlik) çağı, bireyin fiziksel ve psikososyal olarak çocukluktan erişkinliğe geçtiği dönemdir. Puberte terimi ise, bu süreçte meydana gelen fizyolojik değişiklikleri kapsamaktadır. Puberte sürecinde oluşan temel fiziksel değişiklikler; birincil cinsel yapıların olgunlaşması (gonadlar ve genital organlar), ikincil cinsel özelliklerin ortaya çıkması (cinsiyete özgü kıllanma, kızlarda göğüs gelişimi, erkeklerde ses kalınlaşması, vücut yağ dağılımı ve iskelet gelişimi) şeklinde özetlenebilir. Böylece, bu kritik geçiş dönemi kızlarda menstürasyonun, erkeklerde spermatogenezin başlaması ve sürdürülebilir yeteneğinin kazanılması ile yetişkinlik evresine geçişi ifade etmektedir (19-22).

### 3.1. Puberte

Pubertenin başlaması, ilerlemesi ve tamamlanması kompleks nöroendokrin mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Hipotalamo-hipofizer gonadal aksdaki (HHG=HPG) aktivite, bir nevi mevcut fonksiyonun yeniden aktifleşmesidir (Şekil 1). Çünkü hipotalamo-hipofizer portal sistem, gebeliğin fetal hayatta çalışır duruma gelmektedir. Doğumda gonad hormonları ve gonadotropinler hem kız hem de erkek bebeklerde pubertal düzeylerde ve gonadotropinlerin plazma düzeyleri yaklaşık 2-3 yaşına kadar, çeşitli dönemlerde, pikler gösterebilir (24). Çocukluk dönemi olarak kabul edilen 4-9 yaşları arasında gonadal hormonların oluşturduğu negatif geri bildirim ve daha da önemli olmak üzere hipotalamustaki merkezi inhibitör mekanizmalarla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) puls jeneratörü baskı altında tutulmaktadır (21, 25-28). Pubertenin başlayabilmesi için hipotalamusun medio-lateral bazal kesiminde yerleşen GnRH nöronlarından episodik GnRH salınımı gereklidir (29).



**Şekil. 1.** Kızlarda Gonadotropin Sekresyon Profiline Yaşla İlişkisi (Kaynak 23'den değiştirilerek ve eklemeler yapılarak alınmıştır).

Puberte başlangıcında gonad hormonlarına karşı negatif geri bildirim azalmakla birlikte, en önemli değişim GnRH nöronları üzerinde inhibitör sistemlerin etkinliğinin azalması, uyarıcı sistemlerin etkin duruma gelmesidir (30-36). Puberte süreci GnRH sekresyonunun amplitüd ve sıklığında artma ve merkezi sinir sistemindeki (MSS) değişiklikleri içerir. GnRH, hipofizer gonadotropinlerin ve sonrasında gonadal steroidlerin artışı başlatan ve düzenleyen hormondur. Bunun sonucu olarak cinsel olgunlaşma ve fertilité meydana gelir. Sekonder seksüel karakterlerin gelişimi; büyüme/gelişme atağı, fertilitéye ulaşma ve bunlara eşlik eden psikososyal değişiklikler; gonadların matürasyonu ve gonadal steroid sekresyonundaki artışın bir sonucudur. Gonadal fonksiyonun gelişimi ile karakterize olaylar, cinsiyete ait özelliklerin kazanıldığı farklılaşma sürecinin devamlı ilerlemesi ve juvenil dönemden puberte sürecindeki fertilité ve tam cinsel

olgunluğa ulaşma şeklindedir (37-41). Bu döneme ait iki önemli değişim, peripubertal ve pubertal dönemde, steroidlerin artışıyla ilerleyişini sürdürmektedir. Birincisi puberteden yaklaşık iki yıl önce devreye giren ve adrenal androjen artış ile şekillenen adrenarştır. İkincisi ise HHG aksın yeniden aktif ve sürekli hale gelmesinde rol alan gonadal olgunlaşmadır (gonadarş) (42-45).

Hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) aksın aktivasyonu ile oluşan adrenarş, her iki cinsten de yaklaşık 6-8 yaşları arasında (kızlarda 6-7, erkeklerde 7-8) meydana gelir. Adrenarş, pubik kıllanma, akne ve koku gibi değişiklikler ile karakterize pubarşa yol açar. Adrenarş, P450c17 enziminin 17 $\alpha$ -hidroksilaz ve 17,20 liyaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak dehidroepiandrosteron (DHEA) ve dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) yapımında artış meydana gelmesi sonucu oluşur. Adrenarş, insan ve primatlara özgü bir olaydır (46).

Kızlarda pubik kıllanma, genellikle göğüs gelişimini takip eden 6 ay içinde başlamaktadır. Bu dönem, adrenal bez kökenli androjenlerin etkisi ile şekillenmekte ve yaklaşık 2-3 yıllık bir periyoda yayılmaktadır. Apokrin bezlerin gelişmesi (erişkin vücut ter kokusu) ve koltukaltı bölgesinin kıllanmasının yanı sıra sivilce oluşumu da adrenal bez ve ovaryum kaynaklı androjenlerin etkisi ile aynı dönemde gerçekleşmektedir (20).

Ortalama puberte başlangıç yaşı, kızlarda 10, erkek çocuklarda ise 11 yaş civarındadır. Puberte döneminin başlangıcında kız çocuklarda meme gelişimi, erkek çocuklarda ise testis hacminde artış ön plandadır. Kızlarda meme dokusundaki gelişim sürerken sırasıyla pubik ve aksiler kıllanma ortaya çıkmakta ve menarş ile devam etmektedir. Erkeklerde testis gelişiminin yanı sıra pubik ve

aksiler kıllanma dönemini spermatogenez takip etmektedir. Puberte döneminde kızlarda östrojenler, erkeklerde ise testosteron, büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) artışına bağlı olarak boy uzaması hız kazanmaktadır (47-49). İnsanda puberte başladıktan sonra 3–4 yıl içerisinde tamamlanmaktadır (50). Dolayısıyla puberte yaşı ile ilgili değişikliklerin yansımaları olarak ortaya çıkan olumsuz sonuçlardan birisi de büyüme-gelişme döneminin erken veya geç tamamlanmasına ait sonuçlardır. Erken puberte sonrası, büyüme dönemi erken tamamlanacağı için; ebeveynlerden gelen genetik özelliklerin dışında, yaşlılarına nazaran daha kısa boy uzunluğuna sahip olma sözü konusu olabilmektedir. Örneğin, az gelişmiş/fakir ülkelerden gelen evlatlık kız çocuklarının beslenme düzeyinin iyileşmesiyle daha hızlı gelişim ve büyüme oranı yakaladıkları; ancak erken menarş nedeniyle erişkin dönemdeki boy uzunluklarının kendi ülkelerindeki yaşlılarından daha kısa kaldığı belirlenmiştir. Böylece, puberte yaşının erkene kayması ile büyüme evresinde meydana gelen kısalmanın, erişkin dönem boy uzunluğuna olumsuz etki yaptığı kanısına varılmıştır (51-53).

İnsan fizyolojisine yönelik veri elde etmede, kemirgenler ve primatlar puberteyi kontrol eden temel ve düzenleyici mekanizmaların anlaşılması için üzerinde en fazla çalışılan türlerdir. Kemirgenlerde pubertenin başlangıç belirtileri olarak genellikle erkeklerde androjenik etkiyle oluşturulan prepsiyum ayrılması, dişilerde ise östrojenik aktiviteye bağlı olarak oluşan vajinal açıklık kullanılmaktadır (29). Ancak primatlar ve kemiricilerde pubertenin başlamasını kontrol eden mekanizmalar arasında temel bir farklılık vardır. Kemiricilerde, GnRH sekresyonu puberte öncesinde güçlü steroid inhibisyon ile baskılanırken

(54), insan ve primatlarda gonadal sinyallerden bağımsız santral mekanizmalar inhibisyon oluşturmaktadır (55-57). Ayrıca primatlar dışındaki memeli türlerinde, ovulasyon öncesi östrojenin pozitif geri bildirimine bağlı olarak GnRH salgılanmasında daha büyük bir artışa ihtiyaç duyulmaktadır. Farklılıklara rağmen, GnRH nöronlarının pubertal aktivasyonunda benzer uyarıcı ve baskılayıcı mekanizmalar söz konusudur (58). Bu işleyişe trans-sinaptik ve glia-nöron bağlantılı yapılar katkıda bulunmaktadır. Böylece, eksitator amino asitler ve son yıllarda keşfedilen kisspeptin gibi eksitator sinyallerin aktive edilmesine, gamma-aminobütirik asit (GABA) ve opiyoiderjik inhibitör yolların etkisinin azalması eşlik etmektedir (59).

Puberte zamanlamasında GnRH nöronlarının yeniden yapılanmasının da katkıda bulunması söz konusu olabilir (60). GnRH nöronlarının bizzat kendilerinde ya da afferent bağlantılarında meydana gelen yapısal değişikliklerin GnRH nöronlarının pubertal olgunlaşmasını sağladığına ilişkin çalışmalar (61, 62) önceki yıllarda yapılmış olmasına rağmen üzerinde fazla durulmamıştır. Dendrit sayısı ile dendrit ve soma dikenciklerinde pubertal plastisitenin belirlenmesi, pubertenin başlamasına ilişkin perdenin aralanmasında önemli bir adım kabul edilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, puberteyi başlatan biyolojik olayların zamanlamasının büyük ölçüde genetik olarak belirlendiğini göstermiştir (63). Ancak, bazı nörotransmitter ve nöromodülatörler vücudun metabolik durumu, enerji kaynakları, somatik gelişme ve bazı türlerde mevsimsel ve sosyal çevreye ilişkin sinyaller aracılığıyla GnRH sentez ve salgılanması üzerinde ve dolayısıyla pubertenin başlaması üzerinde bir etkiye sahip olabilir.

Pubertenin başlaması için pulsatil tarzdaki GnRH salgılanmasında bir artış zorunludur (64). İnsanda GnRH nöronları ftal (40) ve neonatal dönemde (65) aktif olup, puberteye kadar nispeten sessizdirler (64). GnRH salgılanmasının puberteye kadar dk seviyede kalmasında inhibitör bir nöronal mekanizmanın rol oynadığı ve hipotalamusun olgunlaşma süreci içerisinde bu inhibitor sistemin etkisinin azalmasıyla GnRH nöronlarının aktivitelerinde artış meydana geldiği ileri sürülmektedir. Puberteye yakın, GnRH nöronlarının inhibitor sinyallerinde azalma meydana gelmesine karşılık, nöron ve glia hücrelerinden gelen uyarıcı sinyallerin etkisinde artış gözlenmektedir. Uyarıcı sinyallerin başında glutamat ve kisspeptin gelirken, inhibitor etkinin başlıca GABA ve opiyoidler tarafından oluşturulduğu ileri sürülmektedir (58).

Puberte, nöroendokrinolojik yönden GnRH'ın hayatın belirli bir döneminde yeniden yeterli düzeyde ve periyodik olarak salgılanmaya başlaması sonucu oluşmaktadır (66). Farklı formları bulunmasına rağmen, GnRH-1 geni tarafından kodlanan tip memelilerde özel öneme sahiptir. GnRH nöronları embriyolojik gelişme esnasında olfaktör plakod bölgesinden olfaktör nöronlar ile birlikte hipotalamustaki normal yerlerine gç etmektedir (67). Bu durum, aynı zamanda, koku duyusu ile üreme fonksiyonları arasındaki yakın ilişkiye de işaret etmektedir. Anosmin-1 adlı proteini kodlayan KAL1 geninin mutasyonu sonucu oluşan Kallmann sendromunda, idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) ve anosmianın birlikte görülmesi bu ilişkinin tipik bir örneğidir (67).

GnRH nöronlarının sayıca oldukça az (yaklaşık 1000-2000 hücre) ve diensefalonda dağılmış vaziyette yer almaları bu nöronların özelliklerinin araştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, deneysel çalışmalarda daha ziyade

immortalize GnRH nöronları kullanılmaktadır (68). Bu hücrelerin, pulsatil GnRH salgıladıkları gösterilmiştir. Puberte ve üremeyi düzenleyen GnRH nöronlarının beyinde daha ziyade arkuat nukleusta (ARC) yoğunlaştıkları bilinmektedir. GnRH pulsatil karakterde salgılandığı için ARC'deki bu işleyiş "puls jeneratör" olarak adlandırılır. Puls jeneratör aktivitesindeki değişiklikler gonadotropinlerin salgılanmasını düzenler. İnsanlarda fetal hayatta başlayan gonadotropin salgılanması (gebeliğin yaklaşık 10. haftası) giderek artmaya başlar ve gebeliğin ikinci yarısında en yüksek düzeyine ulaşır. Daha sonra, plasentadan salgılanan steroidlerin negatif geri bildirim sebebiyle azalmaya başlar. Doğumdan sonra steroid azalmasına bağlı olarak folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) salgılanmasında tekrar artış meydana gelmektedir. Erkek çocuklarda yaklaşık 6 ay ve kız çocuklarında ise 1-2 yaşına kadar yüksek düzeyde salgılanmaya devam etmekte ve sonrasında çocukluk dönemi boyunca düşük düzeyde kalmaktadır (69). Dokuz yaşına doğru gonadotropin salgılanması tekrar artmaya başlamaktadır. Pubertenin başlangıcında daha ziyade geceleyin ortaya çıkan LH pulsasyonları zamanla 24 saatlik periyoda yayılmaktadır (Şekil 1). Yetişkin erkeklerde, LH pulsları her iki saatte meydana gelirken, dişilerde menstrüasyon safhasına göre değişiklik göstermektedir. Foliküler fazın erken döneminde yaklaşık her 90 dakikada bir gözlenirken, LH pikine yakın birer saatlik aralıklarla meydana gelmektedir. Luteal fazda ise ovülasyon sonrası LH pulsları yaklaşık 2-4 saatte bir görülmekte ve giderek yavaşlamaktadır. Mediobazal hipotalamusun (MBH) infundibular bölgesi (insan dışındaki canlılarda ARC) tonik LH salgılanmasından sorumlu iken, preoptik alan (POA) ovülasyon öncesi LH pikinin oluşmasını sağlamaktadır. GnRH puls jeneratörü dişi sıçanlarda östrus

boyunca tonik LH sekresyonu devam ettirmektedir. Ovulasyon öncesi LH piki proöstrusun ortalarında meydana gelmektedir. Tonik sekresyonun opioid peptidler, LH pikinin ise GABA tarafından kontrol edildiği ileri sürülmektedir (70).

Buraya kadarki bölümlerde puberte ve üremenin temel düzenleyicisi olan GnRH'nin rolü, sekresyon özelliği ve gonadotropinlerle ilişkisi üzerinde durularak literatür değerlendirmeleri ortaya konulmuştur. Bu bilgilere ilave olarak, GnRH'nin aktivasyonunda veya GnRH puls jeneratörünün işleyişinde uyarıcı ve baskılayıcı sinyallerin irdelenmesi yerinde olacaktır.

## **3.2. Pubertenin Nöroendokrinolojik Kontrolü**

### **3.2.1. RFamid Nöropeptidler**

GnRH'nin 1970'li yılların başındaki keşfinden (71, 72) beri gonadotropin sentezi ve salgılanmasında temel düzenleyici olduğu kabul edilmektedir. Fakat 2000 yılından itibaren elde edilen önemli bulgular, GnRH'nin fizyolojik regülasyonuna katkıda bulunan ortak ve/veya yardımcıların varlığına işaret etmektedir. Tsutsui ve çalışma ekibi (73), 2000 yılında, kanatlılarda yeni bir hipotalamik nöropeptid keşfettiler. Üstelik bu hormon gonadotropin salınması bakımından GnRH'nin tam tersi bir etkiye sahipti. Bu nedenle, bulunan yeni hipotalamik nöropeptid gonadotropin inhibe edici hormon (GnIH) olarak isimlendirildi. Aradan geçen yaklaşık 15 yıllık süre zarfında, gonadotropin salgılanmasında inhibitör rol oynayan bu hormonun sadece kuş türlerinde mevcut

olmadığı, GnIH eşdeğeri nöropeptidlerin insan da dahil diğer omurgalı canlılarda da varlığı ortaya konulmuştur (74-77). Ancak isimlendirme hususunda memeli canlı türlerinde GnIH eşdeğeri RFamid-İlişkili peptidler (RFRPs) terminolojisi (78, 82), son birkaç yıldır RFRP-3 olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu durum, GnIH benzeri etkiyi meydana getiren nöropeptidin, kuş türleri dışındaki canlılarda, RFRP-3 olduğunun tespit edilmesi (78, 80, 82, 83) sonucunda oluşmuştur. GnRH'nin zıttı etkisi olan ve özellikle mevsimsel üreme periyoduna sahip canlılarda bu rolü (83) daha net ortaya konulan GnIH'nin keşfiyle üreme fizyolojisi üzerine yeni bulguların ardı sıra geldiği bir dönemde; bu sefer GnRH'nin en kuvvetli uyarıcısı ve dolayısıyla GnIH'nin tam tersi etkiye sahip yeni bir nöropeptid sahnedeki yerini almıştır. İlk olarak G proteini reseptör ailesinden olan, GPR54 reseptörü (84) ve sonrasında aynı yıl, üç farklı araştırma ekibi tarafından, bu reseptöre bağlanan ligandın Kiss1 geni ürünü olduğu (85-87) belirlenmiştir. Tümör baskılayıcı etkisi nedeniyle metastin (88) olarak isimlendirilen bu ligand, 2003 yılında iki farklı grup tarafından, puberte gecikmesi problemlili ve hipogonadotropik hipogonadizmlili (HH) kişilerde GPR54 mutasyonlarının mevcudiyetinin (89, 90) ortaya konulmasıyla birlikte, hem kulvar hem de isim değiştirerek özellikle üreme fizyologları tarafından kisspeptin olarak anılmaya başlamıştır. Günümüzde metastin ismi muhafaza edilmekle birlikte hem reseptör hem de ligand terminolojisi bakımından kisspeptin ön plandadır. Keşfi ve fizyolojik fonksiyonları ilginç bir seyir takip eden kisspeptinin, moleküler yapısı ortaya konulduğunda bir başka dikkat çekici durum da aminoasit dizilimi bakımından GnIH ile aynı aileyi paylaşıyor olmasıdır. Etki bakımından zıt fakat sekans özellikleri bakımından ortak noktaları olan bu iki hormonun, özellikle

insanlarda RF-amid nöropeptid ailesi olarak bilinen, aynı ailenin mensubu olmaları ilginç bir husustur.

Günümüzde ortak karboksil terminallerinde arjinin (R) ve amidasyona uğramış fenilalanin (F) motifi barındıran nöropeptidler RFamid Peptid Ailesi olarak bilinmektedir (81). İnsan dahil diğer canlılarda da mevcut olan bu peptidler nöropeptid FF (NPFF), GnIH, 26RFa, prolaktin salgılatıcı peptid (PrRP) ve kisspeptin/metastin olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadır (Tablo 1).

<b>Tablo 1. İnsanlardaki Endojen RFamid Peptidleri ve Aminoasit Dizilim Özellikleri</b>			
<b>Grup</b>	<b>Peptid</b>	<b>Aminoasit Dizilimi</b>	<b>Kaynak</b>
<b>NPFF grubu</b>	<b>NPFF</b>	SQAFLFQPQR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	(91)
	<b>NPAF</b>	AGEGLNSQFWSLAAPQR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	
<b>GnIH grubu</b>	<b>RFRP-1 (NPSF)</b>	MPHSFANLPLR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	(92, 97)
	<b>RFRP-3 (NPVF)</b>	VPNLPQR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	
<b>26RFa grubu</b>	<b>43RFa (QRFP)</b>	<EDEGSEATGFLPAAGEK-TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	(93, 96)
	<b>26RFa</b>	TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	
<b>PrRP grubu</b>	<b>PrRP31</b>	SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	(94, 95)
	<b>PrRP20</b>	TPDINPAWYASRGIRPVGR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	
<b>Kisspeptin grubu</b>	<b>Kisspeptin-54 (Metastin)</b>	GTSLSPPESSGSRQQPLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREK-DLPNYNWNSFGLR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	(85, 87)
	<b>Kisspeptin-14</b>	DLPNYNWNSFGLR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	
	<b>Kisspeptin-13</b>	LPNYNWNSFGLR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	
	<b>Kisspeptin-10</b>	YNWNSFGLR <u>F</u> -NH <sub>2</sub>	

### 3.2.1.1 RFRP-3

GnIH, 2000 yılında, 12 amino asitlik nöropeptid olarak kuş beyininden izole edilmiştir. Bıldırcın hipofizinden gonadotropin salınmasını baskılayabilme özelliğinden dolayı GnIH olarak isimlendirilmiştir (73). Farklı bir araştırma gurubu tarafından 2000 yılında, RFRP-1 ve RFRP-3 insan RFRP geninin ürünü

olarak tanımlanmıştır (97). Bu ürünlerin NPPF ve nöropeptid AF (NPAF) ile homoloji gösteren sekanslara sahip oldukları görülmüştür. Bu peptidlerin biyolojik etkileri, membran reseptörleri ile ilişkili olarak, farklı kanallar aracılığıyla meydana gelmektedir. RFRP-1 ve RFRP-3 tercihi olarak RFRP reseptörüne (RFRP aynı zamanda NPPF1R veya GPR147 olarak da isimlendirilir) bağlanmaktadır. NPPF ve NPAF ise NPPF reseptörüne (NPPFR, aynı zamanda NPPF2R olarak da adlandırılır) bağlanmakta ve aktive etmektedir (98-101). NPPF'nin opioid dağılımının modülasyonu ve nosisepsiyonu kapsayan (102-105) biyolojik etkilerinin büyük oranda karakterize edilmiş olmasına rağmen, RFRP'lerin rolleri 2006 yılına kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Kriegsfeld ve ekibi (81) daha yüksek sınıf omurgalılarda gonadotropin sekresyonunun kontrolünde inhibitör etkiye dayanarak, memelilerdeki RFRP'lerin kanatlılardaki GnIH'm karşılığı olduğunu önermiştir. Şu ana kadarki elde edilen verilere göre, RFRP'ler koyun ve kemirgenlerde gonadotropik aksın negatif düzenlemesinde önemli role sahiptir (101).

Memelilerde, RFRP nöronlarının başlıca periventriküler nükleus (PeVN), dorsomedial nükleus (DMN) ve DMN ile ventromedial nükleus (VMN) arasında yer aldığı immünohistokimyasal (80, 81, 97, 106-108) ve in situ hibridizasyon (78, 81, 92, 97, 109, 110) çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Kuşlarda ise GnIH nöronları, paraventriküler nükleusta (PVN) yoğunlaşmışlardır (73, 111-114). Bu nöronlara ait aksonal dağılımlar, memelilerde (79, 92, 107, 110) ve kuşlarda (73, 114) median eminens (ME) ve ARC gibi alanlarda mevcuttur.

GnIH aksonlarının ve reseptörlerin dağılım örnekleri hipofize direkt olarak etki edebileceğini göstermektedir. GnIH peptidlerinin in vitro uygulanmasıyla LH

ve FSH sekresyonunu memelilerde (78, 83, 115) ve bildircinlarda (73) inhibe etmektedir. Ayrıca in vivo olarak da LH sekresyonunu baskılamaktadır (80, 116). Goldfish'de balık GnIH'ı olan LPXRFa peptid-3'ün periton içi (ip=intraperitoneal) uygulanması LH düzeylerini azaltmaktadır (117). Bütün bunlar birlikte ele alındığında, GnIH gonadotropin salınması üzerine negatif düzenleyici olarak etki etmektedir ve bu durum balıktan memelilere kadar aynıdır (73). Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan bir çalışmada, Sibiryaya hamsterlerinde üreme sezonlarına göre LH salınmasında GnIH uygulamasıyla birbirine zıt etkiler oluşabildiği görülmüştür (108). Bütün bunlar, farklı fizyolojik şartlarda GnIH'ın üremedeki rolüne dair başka çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca GnIH beslenme davranışı üzerine de etkiye sahiptir. Kuşlarda (118, 119) ve kemirgenlerde (80, 82, 120) gıda alımını uyarıcı etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

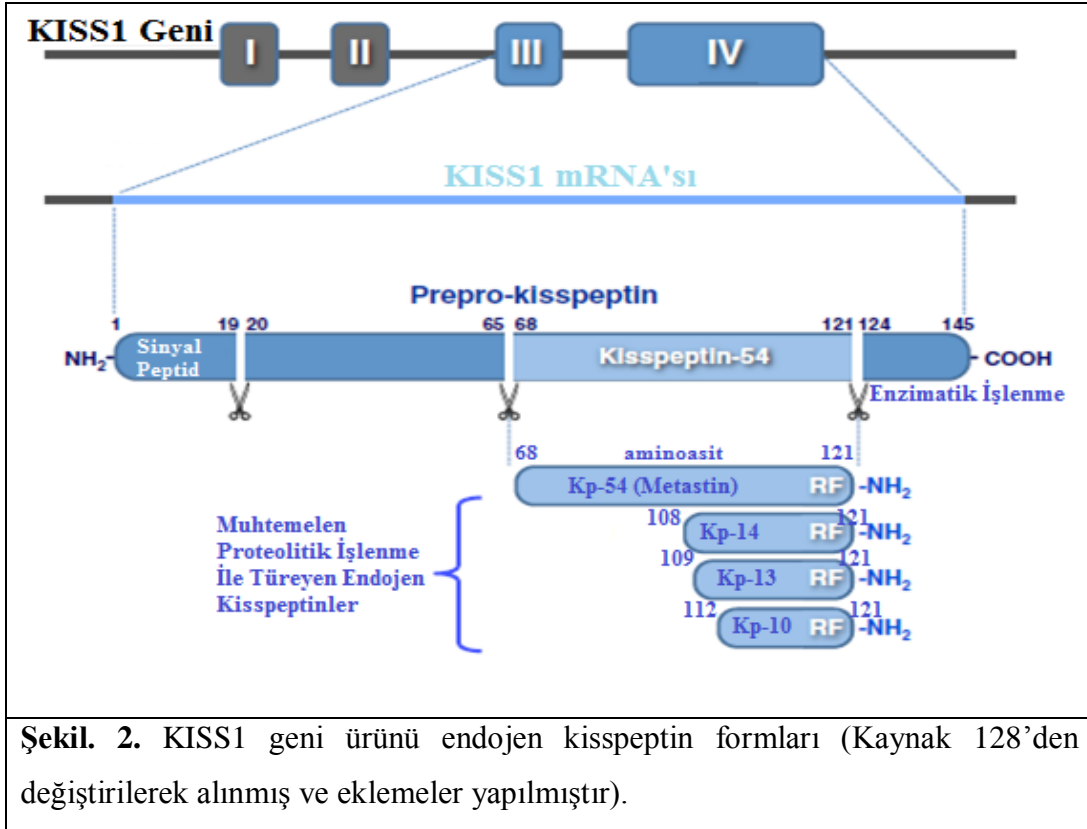
GnIH'ye benzer şekilde RFRP-3 de kemirgenlerde (80-82), koyunda (78, 83) ve sığırdaki (115) gonadotropin salınmasını inhibe edici özelliğe sahiptir. Memelilerde RFRP-3, hipotalamustaki GnRH nöronları üzerine etki ederek gonadotropin sentezi ve salınmasını baskılamaktadır (81, 121-123). Ayrıca memelilerde, RFRP-3'ün aynı zamanda hipofiz bezine direkt olarak etki ederek gonadotropin sentezi ve salınmasını inhibe etmesi de olasıdır (82, 83). Bu bağlamda, memeli RFRP-3'ü gonadotropin sentezi ve salınmasını inhibe etme özelliği bakımından kuşlardaki GnIH'nin eşdeğeri olarak rol almaktadır. Bu nedenle RFRP-3 memeli GnIH'si olarak tanımlanmıştır.

<b>Tablo 2. GnIH ve Eşdeğer Yapıların Omurgalı Canlılarda Aminoasit Dizilimleri</b>			
<b>Canlı Türü</b>	<b>Yapı</b>	<b>Sekans</b>	<b>Kaynak</b>
<b>Bıldırcın</b>	<b>GnIH</b>	SIKPSAYLPLRFa	(73)
	<b>GnIH-RP-1*</b>	SLNFEEMKDWGSKNFMKVNTPTVnkVPNSVANLPLRa	(124)
	<b>GnIH-RP-2</b>	SSIQSLLNLPQRFa	(124)
<b>Tavuk</b>	<b>GnIH*</b>	SIRPSAYLPLRFa	(125)
	<b>GnIH-RP-1*</b>	SLNFEEMKDWGSKNFKVNTPTVnkVPNSVANLPLRa	(125)
	<b>GnIH-RP-2*</b>	SSIQSLLNLPQRFa	(125)
<b>İnsan</b>	<b>RFRP-1</b>	MPHSFANLPLRFa	(92)
	<b>RFRP-3*</b>	VPNLPQRFa	
<b>Sıçan</b>	<b>RFRP-1</b>	SVTFQELKDWGAKKDIKMSAPANKVPHSAANLPLRa	(97)
	<b>RFRP-3*</b>	ANMEAGTMSHFPSLPQRFa	(126)

\*Muhtemel etkin formlar

### 3.2.1.2. Kisspeptin

KiSS1 geni tarafından kodlanan 145 amino asitli protein, enzimatik olarak kisspeptin-54 veya metastin adı verilen peptidin yanı sıra 14, 13 veya 10 amino asitli daha kısa peptidlere de bölünmektedir (85, 127) (Şekil 2). Bu peptidlerin hepsi ortak C-terminale sahip dekapeptid (kisspeptin-10 (Kp-10)) içerdiği için topluca kisspeptin/kisspeptinler olarak adlandırılmaktadır (85).



Kisspeptinin etkin formu olarak kabul edilen Kp-10'un aminoasit dizilimi tablo 3'de yer almaktadır.

**Tablo 3.** Kisspeptinin Etkin Formunun İnsan ve Diğer Omurgalı Canlılarda Sekans Özelliği

Canlı Türü	Gen	Reseptör	Sekans	
İnsan	KISS1	KISS1R (GPR54)	YNWNSFGLRFa	(87)
Sıçan	Kiss1	Kiss1r (GPR54)	YNWNSFGLRYa	(129)
Fare	Kiss1	Kiss1r (GPR54)	YNWNSFGLRYa	(129)
Kanathlı Türleri	Keşfedilmedi	Keşfedilmedi	Keşfedilmedi	(130)

Kisspeptin ile ilgili olarak insan ve diğer canlı türlerinde gen ve reseptör isimlendirmesi için tavsiye edilen terminoloji (131) esas alınmıştır.

Kisspeptin ve kiss1r ilişkisi pubertenin nöroendokrin kontrolünde başlıca öneme sahiptir. Kisspeptinin santral yolla kronik uygulanmasının dişi sıçanlarda pubertenin birkaç gün erken başlamasına yol açtığı rapor edilmiştir (132). Böylece, kisspeptin-kiss1r sinyal gücündeki artışın puberteyi başlatması kuvvetle muhtemeldir. Nitekim hayvan çalışmalarında kisspeptin nöronlarının puberte döneminde aktivitelerinde artış olduğuna ilişkin bulgular elde edilmiştir (133, 134). Kisspeptin dişilerde pubertenin daha erken görülmesinde de önemli bir role sahip olabilir. Dişi farelerin hipotalamusunda, anteroventral periventriküler nukleusta (AVPV) erkeklere göre yaklaşık 10 kat daha fazla Kiss1 nöronu yer almaktadır (135).

### **3.2.1.3. İnsanda KISS1/KISS1R Sisteminin Önemi**

KISS1R mutasyonlarının insanda pubertal olgunlaşmayı engellediği rapor edilmiştir (89, 90, 136). KISS1 ve/veya KISS1R mutasyonları HH fenotipine yol açmaktadır. İnsanlarda HH tablosu, hipotalamusta GnRH yapımında, hipofizde GnRH reseptör fonksiyonunda veya LH ve FSH yapımındaki eksikliklerden kaynaklanabilmektedir. Hipotalamus ve hipofizde bir lezyon olmadığı ve hipofizin normal fonksiyon yaptığı durumda, anosmia da mevcut ise Kallman sendromu olarak adlandırılır. Anosmia yoksa izole veya IHH olarak adlandırılmaktadır. IHH muhtemelen GnRH sentezi veya aktivitesindeki bir eksiklikten kaynaklanabilmekte ve bu duruma GnRH reseptör mutasyonları da dahil birçok farklı genetik bozukluk iştirak edebilmektedir. Ancak çoğu zaman sorumlu genler belirlenememektedir. KISS1R geninin işlevselliğini ortadan

kaldıran mutasyonlarında IHH meydana geldiği gösterilmiştir (89, 90, 136-140). Mevcut araştırma bulguları, IHH görülen erkeklerde eksojen gonadotropin veya GnRH tedavisinden sonra spermatogenezis, kadınlarda ise normal doğum ve emzirmenin gerçekleştiğini göstermiştir (139). KISS1R geninde yoğun aktivasyona yol açan mutasyona sahip bir kişide ise prekoks (erken) puberte gözlenmiş (141) olması kisspeptinin fonksiyonel olmadığına ortaya çıkan tablonun dışında aşırı aktif olduğunda meydana gelebilecek durum için önemli bir göstergedir.

#### **3.2.1.4. Kemirgen Canlılarda Kiss1/Kiss1r Sistemi**

Genetik olarak Kiss1r delesyonlu oluşturulan farelerde pubertal olgunlaşma gerilemektedir. Kiss1r'den yoksun fareler (GPR54<sup>-/-</sup>) plazmada düşük gonadotropin düzeyi ve buna bağlı olarak da azalmış gonadal hormon sekresyonu ile karakterize HH gelişmekte ve puberte sekteye uğramaktadır. Erkek farelerde testisler küçük kalmakta, dişi farelerde ise puberte göstergesi olan vajinal açıklık daha geç oluşmakta ve ovaryumlarda antral foliküller gelişmemektedir. Bu farelerde hipotalamusta GnRH düzeyi normal olup, hem GnRH hem de gonadotropin uyarımına cevap vermektedir. GPR54<sup>-/-</sup> fareler ayrıca anatomik olarak median eminense giden uzantıları olan normal GnRH nöronlarına sahiptir (90, 142). Bu yönüyle ortaya çıkan hipogonadizm, Kallman sendromunda olduğu gibi, GnRH nöronlarının anormal göçünden kaynaklanmamaktadır (143). Kiss1r aracılığıyla kisspeptin sinyalleşmesi, hipotalamustan GnRH salgılanmasında özel bir öneme sahiptir. Çünkü normal farelerde LH ve FSH düzeyinde önemli artışa

yol açan kisspeptin, aynı dozda GPR54 -/- farelere uygulandığında bu yönde bir etki oluşturamamaktadır. Bu sonuç, kisspeptinin GnRH nöronlarındaki mevcut kisspeptin reseptörleri (Kiss1r/GPR54) aracılığıyla gonadotropin salgılanmasını düzenlediğine işaret etmektedir. Nitekim erkek Kiss1 -/- farelerin şiddetli hipogonadizm göstermelerine karşılık, dişi Kiss1-/- fareler GPR54 -/- fareler ile karşılaştırıldığında, yarısında benzer fenotip görülmesine karşılık, diğer yarısında gonadal gelişim yönünden normal farelere göre daha az farklılık oluşmaktadır (144). Dişi farelerin fenotiplerindeki bu farklılığın sebebi henüz bilinmemektedir. Ancak GPR54 -/- farelerin aksine periferal Kp-10 enjekte edilen Kiss1 -/- farelerde gonadotropin salgılanmasındaki artış, kisspeptinlerin Kiss1r/GPR54 reseptörlerinin başlıca fizyolojik ligandları olduğunu göstermektedir (144, 145).

### **3.2.1.5. Kisspeptinin Eksojen Etkileri**

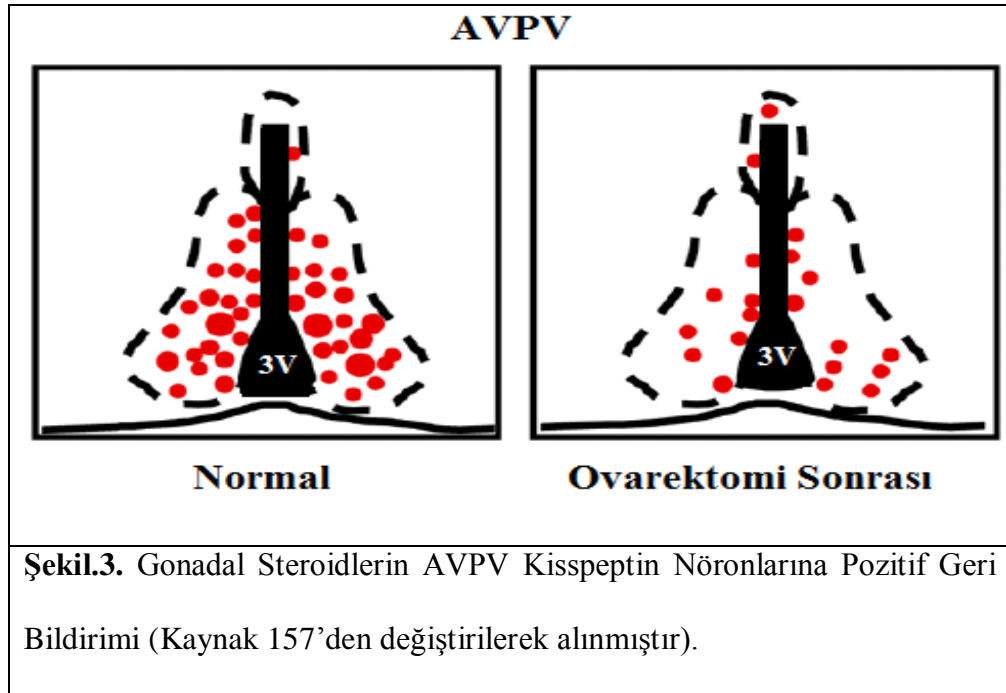
Kisspeptinin erkek ve dişi fare ve sıçanlara, erkek maymunlara tek doz intraserebroventriküler (ICV) veya periferal verilmesi LH ve FSH salgılanmasını uyarır (133, 146-150). Kisspeptinin bu etkileri bir GnRH antagonisti olan acyline tarafından bloke edilebilmektedir (146, 147, 149, 150). Bu çalışmalar, kisspeptinin gonadotropin sekresyonunu GnRH bağımlı şekilde uyardığını göstermektedir. Kisspeptinin sıçanlarda tekrarlayan intravenöz (iv) enjeksiyonu belirgin LH pulsasyonları oluşturmaktadır (151). Aksine, kisspeptinin mini ozmotik pompalar ile sürekli verilmesi, ilk 24 saatte LH sekresyonunu uyarırken, sonrasında bunu LH salgılanmasında azalma izlemektedir (152). Bu etki kisspeptinin sürekli verilmesinin GPR54 reseptörlerinde desensitizasyona yol

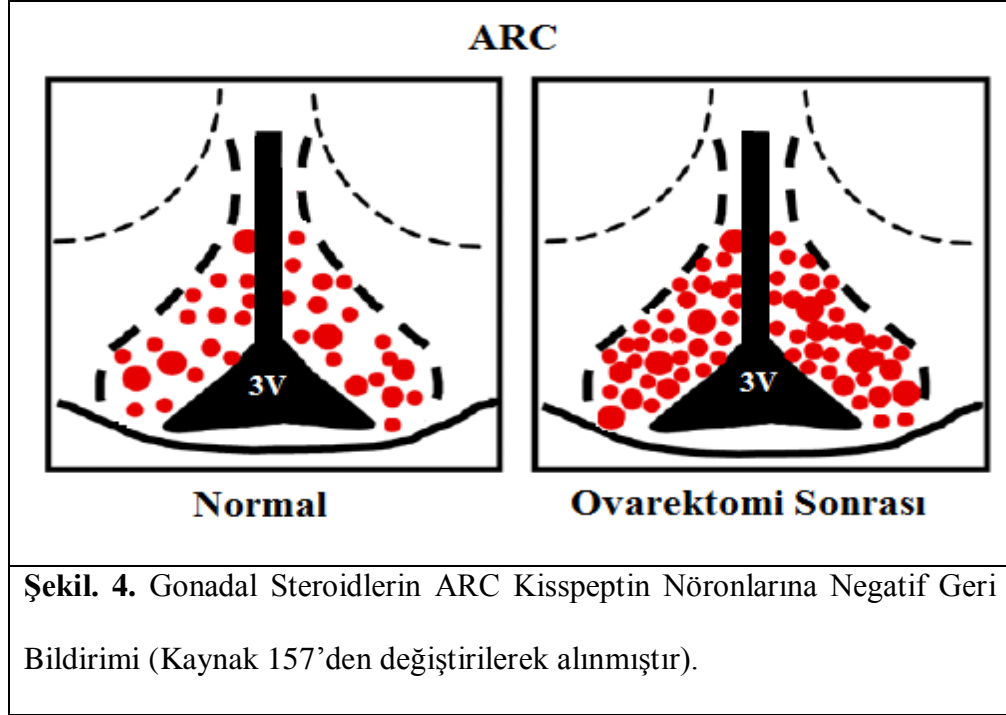
açtığını göstermektedir (154). Fare ve sıçan hipotalamusunda GPR54 mRNA, GnRH nöronları ile birlikte lokalize olduğundan kisspeptinin GnRH sekresyonunu doğrudan etkileyebileceği kabul edilmektedir (143, 149). Nitekim farelere kisspeptinin derialtı (sc) verilmesi GnRH nöronlarında c-Fos indüksiyonuna yol açmaktadır (147). Kisspeptinin ICV verilmesi GnRH nöronlarının % 86'sında c-Fos aktivasyonunu başatabilmektedir (149). Kisspeptinin GnRH salınmasını uyarıcı etkisine yönelik farklı protokollerden elde edilen veriler de mevcuttur. Kisspeptin ex vivo sıçan hipotalamus explantlarında GnRH salınmasını uyarmaktadır (148). Yetişkin erkek ve dişi farelerden elde edilen GnRH nöronlarında *in vitro* olarak etkili ve uzun süreli depolarizasyonuna yol açabilmektedir (134). Koyunlarda kisspeptinin ICV verilmesi beyin-omurilik sıvısında GnRH salınmasında artış ve buna paralel olarak plazma LH artışı ile sonuçlanmaktadır (143). Dişi sıçanlarda iv kisspeptin verilmesi GnRH salınmasında artışa yol açarken GnRH puls jeneratörün elektrofizyolojik aktivasyonunda bir değişiklik gözlenmediği de rapor edilmiştir (154).

### **3.2.1.6. Hipotalamusta Kisspeptin Sentezinin Gonadlarla İlişkisi**

Farelerde, Kiss1 mRNA'sı gonadotropin salgılanmasının nöroendokrin kontrolünde önemli role sahip olan hipotalamus alanlarında eksprese edilmektedir. Bu bölgeler, AVPV/PeVN ve ARC'dir (146). Erkek farelerde, kastrasyon ARC'de Kiss1 mRNA ekspresyonunu önemli derecede artırmaktadır. Bu etki testosteron uygulaması ile geri çevrilebilmektedir (155). Aksine, kastrasyon AVPV de Kiss1 ekspresyonunu azaltmakta ve bu etki de testosteron ile

önlenebilmektedir. Aynı şekilde ovariektomi ve östradiol replasmanı dişi farelerde de benzer etkileşimlere yol açmaktadır (156). Bu sonuçlar, farelerde, AVPV'deki kisspeptin nöronlarının GnRH sekresyonu ile ilgili pozitif geri bildirim alanı (Şekil 3), ARC nöronlarının ise negatif geri bildirim merkezi (Şekil 4) olarak rol oynadıklarını göstermektedir. Pozitif geri bildirim, dişilerde ovülasyonda gerekli olan LH piki için önemlidir. Farelerde olduğu gibi, sıçanlarda da hipotalamusta Kiss-1 ve GPR54 gen ekspresyonu gonadektomi sonrası artmakta ve bu artış dişi ve erkek sıçanlarda gonadal steroidler ile önlenebilmektedir. Ayrıca ilgili genlerin ekspresyonunda da östrus siklusu boyunca değişim görüldüğü bildirilmektedir (132).





### 3.2.1.7. Kisspeptinin Hipofiz ve Gonadlar Üzerindeki Etkileri

Kiss1 ve Kiss1r/GPR54 genleri erkek ve dişi sıçan gonadotrop hücrelerinde eksprese edilmiştir. Dişi sıçan gonadotroplarında, Kiss1 mRNA düzeyi ovarektomi sonrası azalmakta ve bu etki östradiol verilmesi ile önlenmektedir (158). Bu sonuç, östradiolün hipofizde Kiss1 ekspresyonunu doğrudan pozitif yönde etkileyebileceğine işaret etmektedir. Sıçan veya sığır hipofiz hücrelerinin *in vitro* kisspeptin ile inkübasyonu LH salgılanmasında önemli artışa yol açmaktadır (159, 160). Yine, *in vitro* olarak, kisspeptinin koyun hipofiz hücre kültüründe LH salgılanmasını artırdığı ileri sürülmektedir (161). Ancak, ovarektomize ve hipotalamus-hipofiz bağlantısı kesilmiş olan ve GnRH verilen koyunlarda kisspeptinin LH salınması üzerine bir etkisi gözlenmez. Ayrıca, hipofiziyal portal kanda kisspeptin düzeyi düşük olup, LH piki esnasında bir değişim gözlenmez

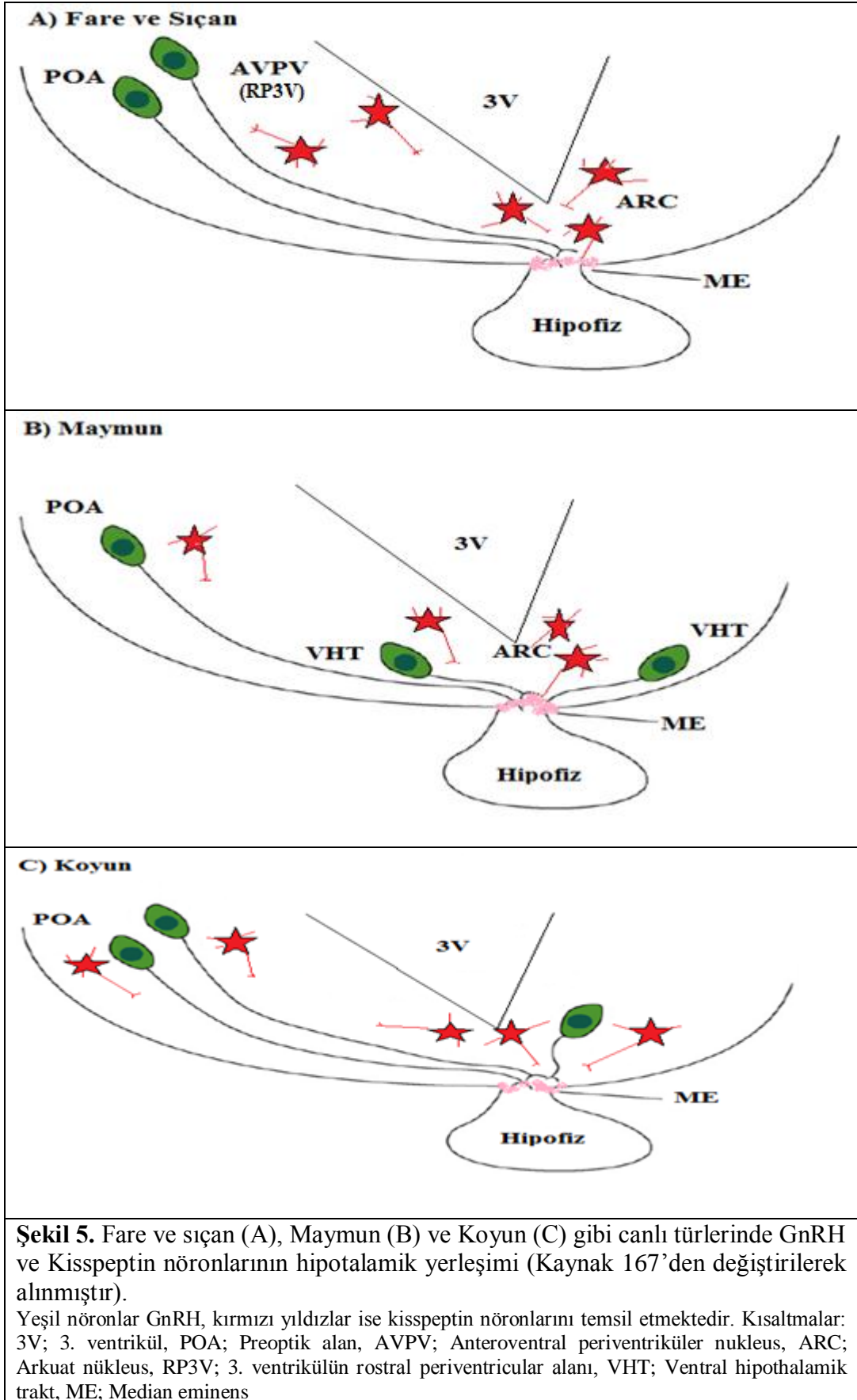
(161). Bu sebeple, *in vitro* etki oluşturduğu ileri sürülmüş olmasına karşın, hipofiz bezi üzerinde fizyolojik rolü *in vivo* olarak tanımlanamamıştır.

Yetişkin sıçan ovaryumunda Kiss1 ve GPR54 mRNA ekspresyonu tespit edilmiştir. Kiss1 gen ekspresyonunun siklus safhalarına göre farklılık göstermesine rağmen, GPR54 gen ekspresyonunda her hangi bir değişim meydana gelmediği belirtilmiştir. Dişi sıçanlarda, ovaryum Kiss1 ekspresyonu proöstrus günü öğleden sonra ve hemen ovulasyon öncesi artmaktadır (162). LH pik oluşumu, farmakolojik inhibisyonla, ortadan kaldırıldığında bu etkinin önlenmesi mümkün görünmektedir. Bu nedenle, kisspeptinin sıçanlarda ovulasyonu doğrudan kontrol edebilmesi ihtimal dahilindedir (29).

### **3.2.1.8 Kisspeptin Nöronlarının İnsan ve Diğer Canlılardaki Özellikleri**

İnsan hipotalamus kesitlerinin incelenmesinde, kisspeptin nöronlarının daha ziyade infundibular nükleusta yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca postmenopozal kadınlarda daha fazla sayıda bulunduğu görülmüştür (163). Bu sonuç, hipotalamusta KiSS1 mRNA ekspresyonunun gonadal steroidler tarafından düzenlenmesinin bütün türlerde benzer olduğunu ve başlıca farkın KiSS1 ekspresyonunun belirlendiği hipotalamus bölgesi olduğunu göstermektedir. Kemirgenlerde, ARC Kiss1 nöronlarının GnRH sekresyonunun negatif geri bildiriminde, AVPV'dekiler ise pozitif geri bildirimde rol almaktadır. Koyun, maymun ve insanda ise özellikle ARC/infundibular nükleustaki kisspeptin nöronları gonadal steroidler ile etkileşim göstermektedir (29).

Koyunda, kisspeptin nöronları POA, PeVN ve ARC'de bulunmaktadır (164). İlginç olarak, sadece koyunda preoptik alanda kisspeptin ve GnRH lokalizasyonu söz konusudur (Şekil 5). Böylece, kisspeptin bazı türlerde GnRH nöronları üzerinde otokrin bir etkiye sahip olabilir. Konuyla ilgili olarak, *in vitro* GnRH nöronlarından elde edilmiş destekleyici bulgular mevcuttur (165). Koyunlarda ovariectomi sadece ARC kisspeptin nöronlarında artışa yol açmaktadır (164). Bu etki, östradiol ile normale döndürülebilmektedir (161). Bu sonuçlar koyunda ARC'de kisspeptinin ovaryum steroidleri tarafından negatif olarak kontrol edildiğini göstermektedir. Erkek (166) ve dişi (163) maymunlarda da koyunlardakine benzer bir negatif düzenleme söz konusudur.



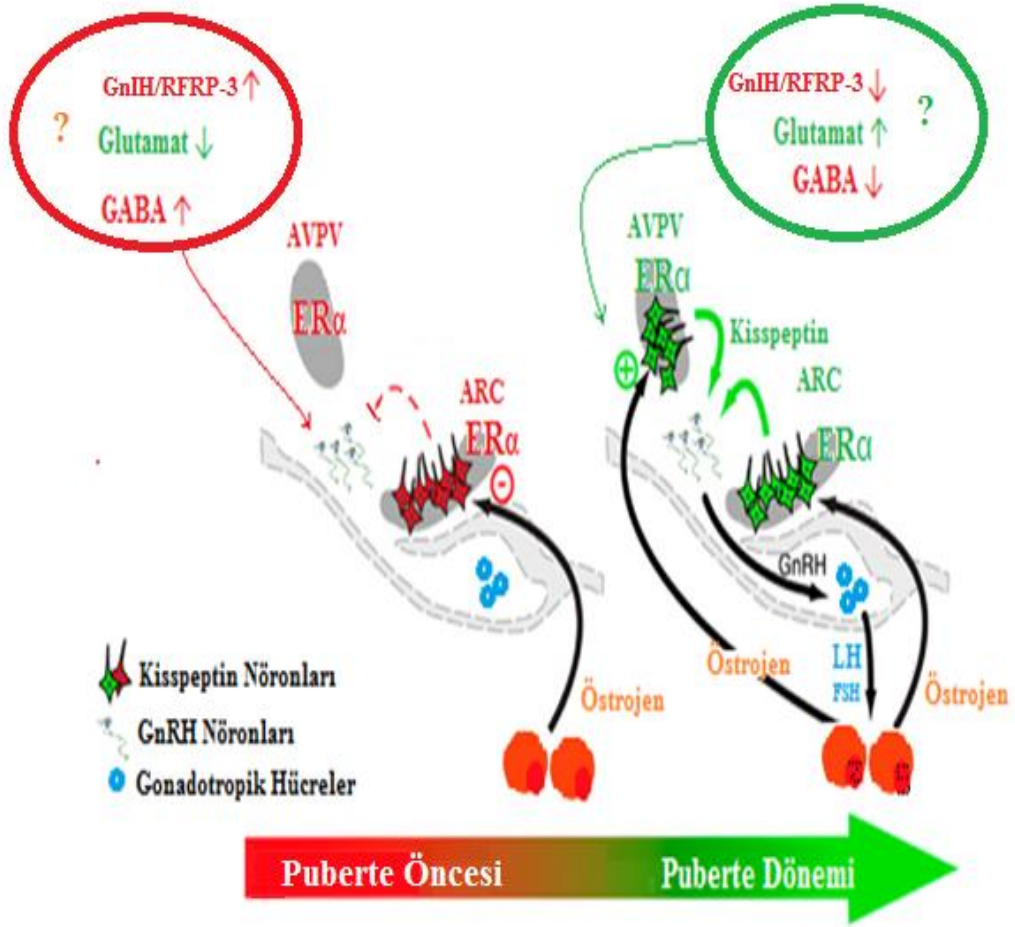
### **3.2.1.9. Kisspeptinin Tanımlanan Fizyolojik Roller**

#### **3.2.1.9.1. Kisspeptin ve Puberte**

Kisspeptin pubertenin başlamasında kritik bir öneme sahiptir. Erkek ve dişi farelerde AVPV ve PeVN'deki kisspeptin nöronları doğum sonrası farklı bir gelişme gösterirler. Bu bölgelerde, postnatal dönemin 10. gününde hiçbir kisspeptin nöronu belirlenmemesine rağmen, 25. günden pubertenin başlamasına yakın döneme kadar nöron sayısında artış gözlenmiştir (135). Kisspeptin nöronlarının benzeri gelişme safhalarına ARC'de rastlanmamaktadır. Kisspeptin nöronlarına ait akson uçları ile GnRH nöronları arasında ilk defa 25. günde yakın temas gözlenmektedir. AVPV/PeVN kisspeptin nöronları puberte başladığında erişkinlerdeki popülasyon değerlerine ulaşır ve puberte için kritik öneme sahip olan GnRH nöronlarının uyarılmasında aktif rol alabilirler.

GnRH nöronlarının kisspeptine karşı duyarlılığında da bir değişim mevcuttur (134). Genç farelerde çok az GnRH nöronu kisspeptine karşı duyarlı iken, puberteye yakın yarısına yakın ve erişkinlerde ise hemen tümünde duyarlılık gözlenir. Kisspeptinin LH salgılanmasını artırma yeteneği de puberteye yakın artmaktadır. Genç ve erişkin fareler arasında ne GPR54 kapsayan GnRH nöron sayılarında ne de GnRH nöronlarında GPR54 mRNA ekspresyonunda bir farklılık görülmez. Bu sebeple, GnRH nöronlarının kisspeptine karşı duyarlılıklarının artışında GPR54 ekspresyonundaki bir artışın rolünden bahsedilemez. Benzer şekilde, sıçan ve maymunlarda hipotalamustaki KiSS1 mRNA seviyesi puberte zamanında en yüksek düzeye çıkmaktadır (132, 150).

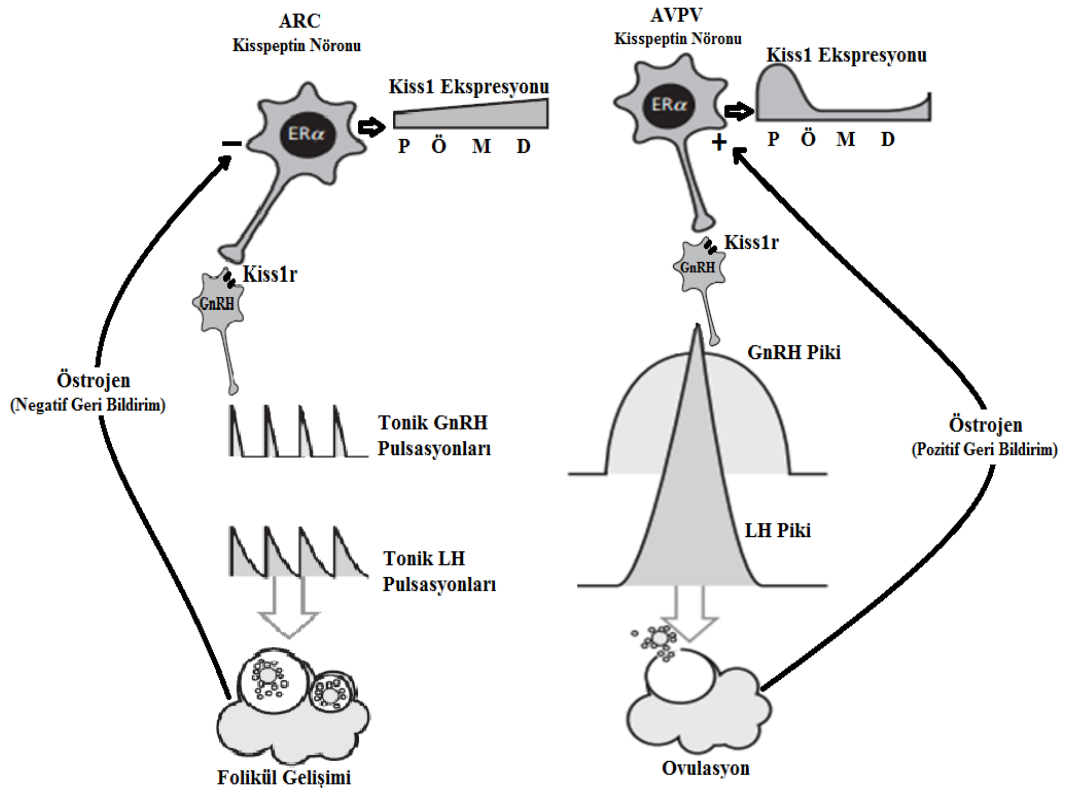
Kisspeptinin puberte öncesi genç dişi sıçanlara 5 gün süreyle günde iki defa ICV verilmesi prekoks puberteye yol açmıştır (133). Nöropeptid Y (NPY), glutamat, GABA ve glia kökenli bazı moleküllerinin de pubertenin başlamasıyla yakından ilgili oldukları bilinmektedir (59, 168).



**Şekil. 6.** Puberte Öncesi ve Puberte Döneminde GnRH/Kisspeptin Aktivasyonunda Muhtemel Uyarıcı ve Baskılayıcı Nöromedyatörlerin Durumu ve Kisspeptin nöronlarında östrojen reseptörü alfa (ERα) Sinyalleşmesi (Kaynak 169'daki şekil değiştirilmiş ve eklemeler yapılmıştır).

### 3.2.1.9.2. Kisspeptin ve Östrus Siklusu

Kisspeptinin erkek (170) ve dişi (171) sıçanlarda POA'ya doğrudan verilmesi LH sekresyonunu önemli derecede artırmaktadır. Aksine olarak, siklustaki sıçanlarda POA'ya spesifik monoklonal antikor enjeksiyonu proöstrus LH pikini yok etmekte ve östrus siklusu meydana gelmemektedir (171). Bu sonuç, POA'daki kisspeptinin preovulatör LH pikinin oluşmasında rol oynadığını ve östrus siklusunu düzenlediğine işaret etmektedir. Pre-ovulatör LH pikinin gonadal steroidler tarafından kontrolünde AVPV'nin sorumlu olduğu kabul edilmektedir (172). Dişi fare (135) ve sıçanlar (173) AVPV alanında erkeklere göre daha fazla kisspeptin nöronu kapsamaktadır. Dişi sıçanlarda proöstrus akşamı Kiss1 mRNA düzeyi AVPV'de pik yaparken, ARC'de en düşük düzeydedir. AVPV'deki Kiss1 nöronlarının çoğu LH piki esnasında c-Fos eksprese ederken, diöstrusta ise bu durum geçerli değildir (173). Aynı dönemde ARC Kiss1 nöronları için bu tür değişiklikler söz konusu değildir. AVPV ve ARC'deki Kiss1 nöronlarının büyük bölümü ER $\alpha$  mRNA'sı eksprese ettiklerinden, östradiolün bu nöronları doğrudan etkilemesi söz konusu olabilir. Normal siklus gösteren dişi sıçanlarda ER $\alpha$  blokajı kisspeptine LH cevabını azaltmakta ve ovulasyonu önlemektedir (174). Bu sonuçlar, kisspeptinin sıçanlarda preovulatör LH pikinin sağlamasında ER $\alpha$ 'nın rolünü ortaya koymaktadır. Nitekim östradiol uygulaması ile GnRH nöronlarında c-Fos ekspresyonu artışı olmakla birlikte, GPR54 -/- farelerde GnRH bağımlı LH piki oluşturulabildiği de ileri sürülmektedir (175). Bu sonuç, kisspeptin-GPR54 sinyalleşmesinin yokluğunda diğer mekanizmaların bunu telafi edebileceğine işaret etmektedir.



**Şekil. 7.** Dişilerde siklusun değişik dönemlerinde ovaryum östrojen üretimine bağlı olarak ARC ve AVPV kisspeptin nöronlarında Kiss1 ekspresyonu. (Kaynak 176'dan değiştirilerek alınmıştır).

### 3.2.1.9.3. Kisspeptinin Üremenin Metabolik Düzenlenmesindeki Rolü

Yağ dokusundan salgılanan leptin hipotalamus üzerine etki ederek iştahı azaltır ve üreme fonksiyonunu uyarır. Leptin mutasyonlu (ob/ob) farelerde ARC Kiss-1 mRNA ekspresyonu azalmaktadır (177). Ob/ob farelere leptin enjeksiyonu ise ARC Kiss1 mRNA düzeyini artırmaktadır. ARC Kiss1 mRNA ekspresyonu söz konusu olan nöronların yaklaşık % 40'ında leptin reseptörü mevcuttur. Böylece, Kiss-1 nöronları leptinin doğrudan hedefi olabilir ve leptin eksikliğinde

gözlenen üreme fonksiyonlarındaki yetersizliğin kısmen ARC kisspeptin ekspresyonundaki azalmadan kaynaklanabileceği söylenebilir. Nitekim besin kısıtlaması ile leptin seviyesi düşürülen prepubertal sıçanlarda hipotalamusta Kiss1 ekspresyonunun azaldığı ifade edilmektedir (178). Pubertal hayvanlara ICV kisspeptin verilmesi besin kısıtlamasında, leptinin santral immüno-nötralizasyonunda ve ayrıca leptin direnci gibi durumlarda gonadotropin salınmasını artırmaktadır (132). Bu sonuç ise kisspeptinin gonadotropin sekresyonu üzerindeki etkisinin leptinden bağımsız olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca kisspeptin sinyalindeki değişiklikler diyabetik kemirgenlerde üreme fonksiyonundaki azalmayla da ilgilidir. Deneysel diyabetik erkek sıçanlarda hipotalamus Kiss1 ekspresyonu azalmaktadır ve orşidektomi sonrası hipotalamus Kiss1 ekspresyonundaki beklenen artış meydana gelmemektedir. Ancak ICV leptin verilmesi ile hipotalamus Kiss1 ekspresyonu, plazma LH ve testosteron düzeylerinin normaleştiği belirtilmektedir (179).

### **3.3. Puberte Yaşına Vücudun Enerji Rezervinin Etkisi**

Enerji dengesi, üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir (180). Memelilerde puberte fizyolojik olarak vücudun enerji kaynakları tarafından ayarlanmaktadır. Cinsel olgunlaşma ile vücut ağırlığı ve bileşimi arasında yakın ilişki vardır (181, 182). Puberte başlamadan önce, kritik bir vücut ağırlığı veya yağ kütlesine ulaşılması gerekir (183). Benzer şekilde, diyet ve egzersizdeki değişiklikler de pubertal olgunlaşmayı etkiler (184, 185). Aşırı kilolu kızların zayıflara göre daha erken puberteye girme eğilimi göstermelerine ilişkin

gözlem (186), vücut yağlanmasının mensin başlamasına yol açan nöroendokrin olayları başlatabileceğine ilişkin hipoteze yol açmıştır (187). Vücut kütle indeksi (VKİ=BMI) ile ölçülen obezitenin beyaz kızlarda ve daha az önemli derecede siyahlarda erken puberte ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (188).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kızlarda puberte zamanının son 30 yılda giderek daha erken başladığını ve aynı zaman periyodunda çocuklarda artan obezitenin başlıca sebep olabileceğini göstermektedir. Yüksek VKİ'ye sahip kızlarda mens ve pubertenin diğer belirtileri daha erken başlamaktadır. Elde edilen bulgular, erken pubertenin vücut yağında artışa sebep olmasından ziyade, obezitenin erken puberteye yol açtığını göstermektedir. Kızlarda yeterli yağ dokusu oluşmadan pubertenin başlamamasının sebebi, anne ve bebeğin ihtiyaç duyacağı enerjinin yeterli olmadığı takdirde gebeliğin sürdürülmesinin güç olabileceği (188) şeklindeki biyolojik gerçekle bağdaşmaktadır.

Kuzey Avrupa Ülkelerindeki (Norveç, Danimarka, Finlandiya) kızlarda pubertenin başlangıcı olarak kabul edilen menarş yaşı 19. yüzyılda 16–17 iken, 20. yüzyılın ortalarında 13'e indiği ifade edilmektedir (189).

Endüstriyel gelişmeye paralel olarak sosyo-ekonomik durum ve beslenme tarzındaki değişikliklerin menarş yaşındaki bu azalmada önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu gözlemlere göre, puberte zamanlamasında sadece genetik faktörler değil aynı zamanda epigenetik etkinin de söz sahibi olduğu söylenebilir. Ayrıca, obez kızlarda pubertenin daha erken başladığını, buna karşılık zayıf olanların daha geç ergenlik çağına girdiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, uzun dönem ağır fiziksel aktivite sonucu yağ dokusunda önemli derecede eksiklik meydana gelen kızlarda puberte gecikebilmektedir (190). Üreme

kapasitesinin devamı için yaklaşık % 20 düzeyinde bir yağ kütlesine ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (191). Bu veriler enerji rezervinin puberte için önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır.

### **3.3.1. Obezite ve Puberte**

Obezite, dünya genelinde epidemiyolojik oranlara erişmiş olup, toplum sağlığını tehdit eden başlıca problemlerden birisidir. Yetişkin yaş grubundaki bireylerde oranın, Batı Avrupa Ülkelerinde %10–25 ve bazı ABD bölgelerinde %20–25 gibi yüksek değerlere ulaştığı belirlenmiştir. Çocuklarda ve ergenlerde ise, National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES) raporuna göre obezite % 20’lik bir orana ulaşmıştır Tüm yaş gruplarında kızlar, erkeklere göre daha yüksek risk grubundadır (192). Obezitede, genetik yapı kadar, çevresel ve sosyo-kültürel faktörlerin etkileri de önemlidir. Fakat tek başına genetik veya çevresel etkiden kaynaklanan obeziteden ziyade bu etmenlerin birlikteliğiyle ortaya çıkan tablo, seyri ve önlenmesi ya da tedavisi bakımından en zorlu kategoride yer almaktadır.

Hem genetik faktörler hem de çevresel faktörler (hayat tarzı, gıda türü ve beslenme tarzı) sebebiyle maternal obezitede (anneyle ilişkili faktörler) olduğu gibi paternal obezite (babayla ilgili) de çocuklarda kilo almaya yatkınlığı belirleyen önemli risk faktörleridir (193, 194). Çocuklukta obezitenin gelişmesi için kritik dönemler söz konusudur (195). Gebelik döneminde, yüksek doğum ağırlığı ile yağ doku artışı arasında sıkı bir ilişki mevcuttur (196). Bebeklik döneminin ilk yılında, beslenme davranışında değişiklik meydana gelebilmekte ve

bu durum daha sonraki yıllarda yağ doku miktarını belirleyici faktör olarak etki edebilmektedir. Diğer kritik dönem 5–8 yaşları arasındadır. Bu dönemde, yağ doku düzeyi çocuklukta en düşük değerinden uzaklaşarak, artış göstermeye başladığı evreye geçiş yapmaktadır. Böylece bu dönemde yağlanmada meydana gelebilecek ivme, ilerleyen dönemde aşırı yağ doku artışının önemli bir nedeni olabilir (197, 198). Erken yaşta vücutta yüksek derecede yağ birikmesine yol açan çevresel faktörler arasında, fiziksel aktivite eksikliğinin uzun döneme yayılması (aşırı televizyon izlemek, bilgisayar/internet bağımlılığı gibi) ve yüksek kalorili fast-food türü beslenme tarzı sayılabilir. Genetik faktörler arasında, beta-adrenerjik reseptör, tümör nekrozis faktör (TNF), pro-opiomelanokortin (POMC), NPY, NPY reseptörü, melanokortin reseptörü (MC4R), leptin ve leptin reseptörü ile ilgili genlerin herhangi birindeki polimorfizm veya mutasyonlar sayılabilir (199). Ayrıca ebeveynlerinde obezite olan çocuklarda kilolu olma veya obezite ile karşılaşma sıklığının daha yoğun olduğu unutulmamalıdır. Israrlı obezite gelişimi için en son kritik dönem ise çocukluk ve ergenlik periyodunu içermektedir (200).

Bazı çocuklarda psikolojik sorunlara tepki olarak aşırı iştahsızlık görülebileceği gibi, bazılarında bu tepki fazla yeme şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Anne-baba ve çocuk arasındaki ilişkiler, ev ortamındaki problemler, arkadaş ortamında kabul görmeme, derslerdeki başarısızlıklar gibi faktörlerin çocuğun ruhsal yapısını etkileyerek beslenme bozukluklarına neden olabileceği ifade edilmektedir (201, 202).

Psikanalitik kurama göre aşırı yeme davranışı, psikoseksüel gelişmenin oral dönemine bağlı kalmasından kaynaklanmaktadır. Yemek yeme, parmak emme gibi oral davranışlar, küçük çocuklarda yakınlığa ve sevgiye eşdeğerdir, çocukta

sevgi, şefkat ve güvenliğe olan gereksinim yeterince doyurulmamış ise bilinçaltında yuvalanan bu tür yoksunluklar, daha sonraki yıllarda oburluk davranışı ile telafi edilmeye çalışılmaktadır. Çocuklarının her ağlama ve huzursuzluğuna, genellikle emzik ya da biberonla çözüm arayan anneler, böylece onların oral doyum ve beklenti açlığını, farkında olmadan, koşullandırarak ileride stres altında kaldığında oral doyum aramasına neden olabilecek davranış modeline zemin hazırlamaktadır (203).

### **3.3.2. Leptin ve Puberte**

Hipotalamusta ve ön hipofizin gonadotrop hücrelerinde leptin reseptörleri keşfedilmiştir (204). Leptin, hipotalamusta ARC nöronlarında GnRH sekresyonunu artırarak HHG aksı üzerinde doğrudan uyarıcı etkiye sahiptir (205). Ön hipofizde, leptin gonadotroplarda nitrik oksit sentaz aktivasyonu ile LH ve daha az ölçüde FSH salgılanmasını doğrudan uyarır (206). Granuloza, teka ve intersitisyel hücreler dahil, ovaryum foliküllerinde (207) ve leydig hücrelerinde (208) fonksiyonel leptin reseptörleri eksprese edilmiştir.

Leptinin diğer efektörleri beslenmenin kontrolünde önemli olup, puberte üzerindeki etkileri daha az bilinir. Besin alınmasını uyarıcı NPY, GnRH salgılanması üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (54). Leptin verilmesi ARC'de NPY ekspresyonunu azaltır ve böylece NPY'nin pulsatil GnRH salgılanması üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır (209).

Leptin düzeyi pubertal gelişme sürecinde önemli değişiklikler gösterir. Erkek çocuklarda, plazma testosteron, GH ve IGF-1 artışı meydana gelmeden

önce leptin düzeyi puberte öncesi en yüksek düzeye ulaşır. Testosteron artışından yaklaşık 3 yıl sonra leptin düzeyleri bazal değerlere dönmektedir. Kızlarda leptin düzeyi puberte boyunca östrojen artışı ile aynı zamanda artış göstermektedir (210). Ayrıca bayanlarda leptin düzeyi erkeklere göre daha yüksektir (211). Cinsiyete özgü bu farklılık birkaç faktörle ilişki olabilir: Bunlardan ilki, yağ dokudan salgılanan leptinin pulsasyon amplitüdünün kadınlarda 2–3 kat daha yüksek olmasıdır (212). İkincisi, yağ kütlesi dağılım farkına bağlı olarak bayanlarda derialtı / viseral yağ oranı erkeklere göre daha fazladır. Nitekim leptin mRNA ekspresyonu derialtı yağ dokuda daha yoğundur (213). Üçüncüsü, bayanlarda total leptin düzeyi daha yüksek, fakat leptin bağlayan protein seviyesi ise erkeklere göre daha düşüktür (214). Son olarak, bayanlar yağ dokusu leptin sekresyonunu uyarıcı glikokortikoid gibi hormonlara daha duyarlıdır (215).

Leptin proteinlerinden (216) veya fonksiyonel leptin reseptörlerinden (217) yoksun kişiler puberteye erişemezler ve FSH ile LH düzeyleri düşüktür. Leptin eksikliği olan bir çocukta rekombinant leptin verilmesi sonucu pulsatil gonadotropin salgılanması sağlanabilmiştir (218, 219). İlginç bir şekilde, yüksek konsantrasyonda leptin, menstrual siklus boyunca ovaryumdaki foliküler ve teka hücrelerinde çeşitli hormon ve faktörlerin (insülin, glikokortikoidler, IGF-1) gonadotropinler tarafından uyarılmış olan steroidogenezi artırıcı etkisini antagonize edebilmektedir (220). Ayrıca leydig hücrelerinde testosteron yapımı üzerinde inhibitör bir etkiye sahiptir (208). Bu verilere göre, leptin plazmadaki düzeyine bağlı olarak HHG aks üzerinde çift yönlü etki meydana getirebildiği söylenebilir.

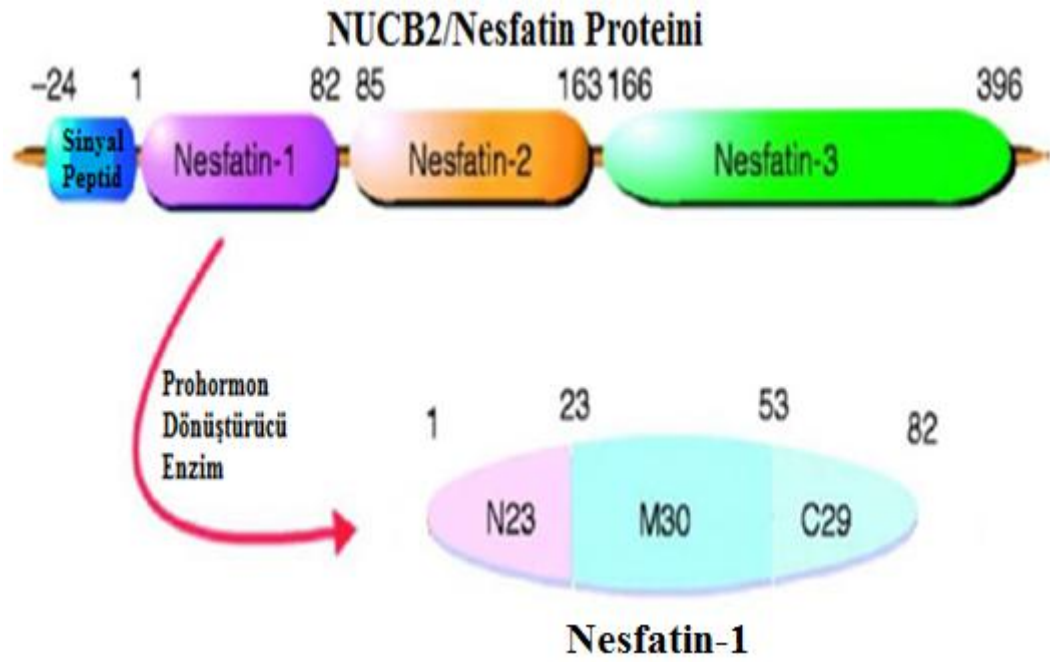
Leptin enjekte edilen dişi farelerde klasik puberte belirtilerinin daha erken başlaması sebebiyle, leptinin üreme işlevi için ihtiyaç duyulan enerji kaynaklarının ‘mevcut olduğu’ bilgisini beyine ileten bir sinyal olduğu kabul edilmektedir (221). Bundan dolayı, leptin puberte zamanının belirlenmesinde rol oynayabilir. Leptin, yetersiz beslenmeden dolayı puberte başlangıç yaşı geciken sıçanlarda pubertenin başlamasını sağlamıştır (222). Böylece, leptin puberteyi başlatan değil fakat pubertenin oluşması için gerekli metabolik sinyal olarak görev yaptığı anlaşılmaktadır. Santral prekoks puberteli kızlar normal sağlıklılara göre daha yüksek serum leptin düzeyine sahiptir (223). Pubertede leptin düzeyindeki artış ile menarş yaşının azalması arasında ilişki olduğu ifade edilmektedir. Serum leptin düzeyinde her 1 ng/ml’lik artış menarş yaşında 1 aylık azalmaya sebep olabilir. Vücut yağındaki her 1 kg artış ise menarşda 13 günlük azalmaya tekabül ettiği ileri sürülmüştür (224). Bütün bu veriler, menarş başlangıcı için kritik bir leptin eşik değeri olabileceğine işaret etmektedir.

### **3.3.3. Enerji Dengesiyle İlgili Yeni Peptid: Nesfatin-1**

#### **3.3.3.1. Nesfatin–1 ve Hipotalamus İlişkisi**

Nesfatin–1, 2006 yılında, OH-I ve arkadaşları tarafından (225) tanımlanan 82 aminoasitten oluşan bir peptiddir. Araştırmacılar, nucleobindin 2 (NUCB2) geni tarafından kodlanan ürünü, tokluk ve yağa etki eden protein anlamını çağrıştıracak şekilde (NUCB2-encoded satiety and fat influencing protein) nesfatin olarak isimlendirmiştir (225). Nesfatin/NUCB2, 396 aminoasitten oluşan

ve 24 amino asidlik sinyal peptidi dizisi içeren bir protein yapıdır (226, 227). NEFA/NUCB2 proteininin fonksiyonu, iştah üzerine etkisinin dışında, tam olarak bilinmemektedir. NUCB2 proteini Prohormon Convertase (PC) tarafından işlenen, şuan için belirlenen, 3 ürün içermektedir. Bunlar, Nesfatin-1 (1-82 aminoasit), Nesfatin-2 (85-163 aminoasit) ve Nesfatin-3 (166-396 aminoasit) olarak tanımlanmaktadır (225) (Şekil 8).



**Şekil 8.** NUCB2/Nesfatin geni tarafından üretilen proteinin nesfatin-1'e işlenmesi. (Kaynak 228'den değiştirilerek alınmıştır).

Nesfatin/NUCB2 hipotalamusun iştahın kontrolü ile ilgili PVN, supraoptik nükleusunda (SON), lateral hipotalamik alanda (LHA) ve zona incerta'daki nöronlarda ekspresse edilmektedir (225). Nesfatin-1 immünoreaktivitesi ayrıca,

vagusun dorsal nükleusu ve nükleus traktus solitarius (NTS) gibi beyin sapı alanlarında da tespit edilmiştir (225, 229).

Sıçanlarda açlık durumunda PVN'de nesfatin/NUCB2 mRNA'sının ekspresyonunun azaldığı ve beslenme ile bu azalmanın restore edildiği belirlenmiştir. Diğer hipotalamik nükleuslarda ise açlık durumunda herhangi bir anlamlı değişiklik gözlenmediği rapor edilmiştir. NUCB2'nin amino-terminal fragmentlerinden türeyen nesfatin-1'in ICV infüzyonu doz bağımlı olarak 6 saat süresince gıda alımını azaltmıştır. Ancak, nesfatin/NUCB2'den türeyen nesfatin-2, nesfatin-3 ve nesfatin-2/3 gibi diğer fragmentlerin ICV infüzyonunda bu tür bir etki gözlenmemiştir (230).

### **3.3.2. Nesfatin-1 ve Beslenme Davranışı**

Sıçan serebrospinal sıvısında nesfatin-1'in mevcudiyeti ortaya konulmuştur. Nesfatin-1'in 3. ventriküle, uzun süreli olarak, kronik infüzyonu neticesinde vücut ağırlığının ve beyaz yağ doku ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, nesfatin/NUCB2'yi kodlayan geni duyarsızlaştıran antisense-morpholino oligonucleotid'in (as-MON) ICV uygulandığında ise sıçanların vücut ağırlıklarındaki meydana gelen azalmayı telafi etmeye başladıkları belirlenmiştir. Bu veriler, nesfatin/NUCB2'nin sıçanlarda beslenme davranışının fizyolojik düzenlenmesinde rolü olduğunu ortaya koymaktadır (230).

İki farklı araştırmacı grup tarafından nesfatin-1'in kan-beyin bariyerini serbest bir şekilde geçtiği tespit edilmiştir (231, 232). Bu çalışmalar, hem endojen

nesfatin-1'in hem de ekzojen olarak uygulanan nesfatin-1'in beyine geçiş yapabileceğini ve beslenme davranışını inhibe edebileceğini göstermektedir.

Erkek farelerde (gıda kısıtlaması olmayan), nesfatin-1'in ip enjeksiyonu karanlık faz boyunca 3 saat süresince doz bağımlı olarak gıda alımını baskılamıştır (225). Ayrıca, nesfatin-1'in sc uygulanması da gıda alımını enjeksiyon sonrası 14 saat süresince inhibe etmiştir. Anoreksijenik etkinlik bakımından sc uygulama ile elde edilen etkinin ip uygulamadan daha uzun süreli olduğu tespit edilmiştir (230).

Anti-obezite etkili ilaç üretilmesi amacıyla, nesfatin-1 analoglarının geliştirilmesine yönelik çalışmalarda, nesfatin-1'in aktif segmentinin belirlenmesine de çalışılmıştır. Böylece, nesfatin-1'in üç ayrı segmente sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu segmentlerden 1-23 aminoasitlik bölüm N23, 23-53 aminoasitlik bölüm M30 ve 53-82 aminoasitlik bölüm ise C29 olarak adlandırılmıştır. Nesfatin-1'in bu üç segmentinin beslenme davranışı üzerine etkilerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, orta segmentin yani M30'un iştah üzerine nesfatin-1 ile aynı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (233).

Leptin reseptörü mutasyonu oluşturulmuş Zucker Fatty sıçanlarda nesfatin-1 ile uyarılmış anoreksi oluşturulmuştur. Anti-nesfatin-1 antikoru uygulanmış hayvanlarda ise leptin ile indüklenen anoreksi baskılanamamıştır (225). M30'un ip enjeksiyonu, genetik olarak obez (ob/ob), genetik olarak diyabetli (db/db) ve % 45 yağ içeren diyetle beslenen ve leptin direnci şartlarına sahip sıçanlarda, gıda alımını azaltmıştır (233). Bu veriler, nesfatin-1'in oluşturduğu anoreksi ile hipotalamik leptin sinyali yolu aracılığıyla oluşan etkinin aynı şekilde olmadığı yani birbirinden bağımsız olduğunu ortaya koymaktadır. Alfa-melanosit uyarıcı

hormun'un ( $\alpha$ -MSH) ICV enjeksiyonu PVN'de nesfatin/NUCB2 gen ekspresyonunu artırmıştır. Ayrıca nesfatin-1 ile oluşan anoreksinin MCR 3/4 antagonisti olan SHU9119 uygulamasıyla ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, nesfatin-1'in ICV enjeksiyonu ARC'de POMC gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Bu gözlemler, hipotalamusta nesfatin-1 sinyalizasyon yolu ile melanokortin sinyalizasyon yolunun ilişkili olabileceğini göstermektedir (230).

Nesfatin-1 tarafından beslenme davranışının baskılanmasında hipotalamusun bazı bölgeleri öne çıkmaktadır. PVN'de ve SON'de nesfatin/NUCB2 ekspresyonu açlık ve tekrar beslenme ile modüle edilmektedir (225, 234). Nesfatin-1, PVN'deki nöronların farklı alt popülasyonlarının büyük bölümünde uyarım oluşturabilmektedir (235). PVN ve SON'deki nesfatin-1 nöronları oksitosin ve vazopressin ile birlikte ekspresse edilmektedir (234). immünohistokimyasal çalışmalarda, PVN'deki parvoselüler nöroendokrin nöronlarda, tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), kortikotropin salgılatıcı hormon/faktör (CRH=CRF), somotostatin, nörotensin ve büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ile magnoseüler nöroendokrin nöronlarda, oksitosinin ve vazopressinin nesfatin/NUCB2 ile birlikte yerleşimleri ortaya konulmuştur. Magnoseüler oksitosin nöronları, beslenme ile aktive olmakta ve oksitosin antagonistinin ICV uygulanması gıda alımında artış meydana getirmektedir (236). Bu veri, beslenme davranışının düzenlenmesinde, oksitosinin olası rolüne işaret etmektedir. Bütün bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, hipotalamusta nesfatin-1 ile indüklenen anoreksinin oksitosin ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (230).

Nesfatin/NUCB2 immünoaktif nöronları, aynı zamanda, ARC'de mevcuttur. Bu nöronlar, POMC/Kokain ve amfetamin ile regüle edilen transkript (CART) nöronları ile irtibatlı yerleşim göstermelerine karşın NPY/ Agouti ilişkili peptid (AgRP) nöronları ile kolokalizasyona sahip olmadığı ileri sürülmektedir (225, 229). Bununla birlikte, ARC'de NPY nöronları nesfatin-1 ile hiperpolarize olmakta ve ATP-duyarlı potasyum iletim antagonisti olan glibenclamide, nesfatin-1'in oluşturduğu hiperpolarizasyonu önleyebilmektedir. Nesfatin-1'in başlattığı anorekside NPY nöronlarında hiperpolarizasyon oluşması önemli bir bulgudur (235). Nesfatin-1'in POMC/CART nöronlarından salınarak, NPY/AgRP nöronal aktivasyonuna etki etmesi ihtimal dahilindedir. Ayrıca, Inhoff ve arkadaşları (237), serbest olarak beslenen sıçanlarda periferal ghrelin uygulamasıyla oluşan oreksijenik etkinin desaçil ghrelin ile inhibisyonunda nesfatin-1'in rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu görüşü, eşzamanlı bir şekilde ghrelin ve desaçil ghrelin enjeksiyonları ile ARC'de nesfatin/NUCB2 immünoaktif nöronlarının aktive olmasından dolayı benimsemişlerdir. Ayrıca ARC'de ghrelin ile NPY/AgRP nöronlarında oluşan aktivasyonun periferal desaçil ghrelin uygulamasıyla baskılanabilmesinin nesfatin-1 pozitif nöronları aracılığıyla meydana geldiğini ve bunun yeni bir yol olabileceği de aynı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür.

M30'un ip enjeksiyonundan sonra beyin sapındaki NTS'de c-Fos anlamlı şekilde aktive edilmektedir. Bu duruma 3 saat süresince gıda alımının anlamlı şekilde baskılanması eşlik etmektedir. Ancak böyle bir etki ARC için geçerli değildir. Nesfatin-1'in orta segmentinin enjeksiyonu NTS'deki POMC ve CART genlerinin ekspresyonunu anlamlı şekilde artırmakta fakat bu durum ARC'de

oluşmamaktadır. Nesfatin/NUCB2 ve CART ekspresse eden nöronlar beyin sapı nükleuslarını içeren bölgelerde birlikte yerleşim göstermektedir (238). Bu bulgular, M30'un ip enjeksiyonuyla oluşan anoreksinin NTS'deki POMC ve CART nöronlarını aktive etmesinin leptinden bağımsız bir şekilde olabileceğine işaret etmektedir.

Nesfatin/NUCB2 mRNA'sının beyin ve yağ dokuyu kapsayan çeşitli vücut alanlarında da mevcudiyeti ortaya konulmuştur. Nesfatin/NUCB2, aynı zamanda, sıçanların serum ve serebrospinal sıvılarında belirlenmiştir. Ancak, dolaşımdaki nesfatin-1'in orijini anlaşılamamıştır. Çünkü PC vücudun vücudun oldukça farklı dokularında dağılım göstermektedir (230). Son zamanlarda, nesfatin/NUCB2 immünoaktivitesi sıçan gastrik mukozasında tespit edilmiştir (239). Bu durum, nesfatin/NUCB2 ilişkili peptidlerin gastrointestinal fonksiyonun fizyolojik düzenlenmesinde de rolü olduğu ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Ancak, gastrik mukozadaki nesfatin/NUCB2 tarafından nesfatin-1'in işlenmesi gösterilememiştir. Fakat nesfatin-1'in gastrik mukozada üretiliyor olması olasıdır. Çünkü gastrik mukozada PC-1/3 ve PC-2 mRNA'sı oldukça bol şekilde bulunmaktadır (240). Böylece, nesfatin/NUCB2 gen ekspresyonunun beslenme durumu tarafından düzenlenmesi ihtimali giderek artmaktadır.

Ayrıca enerji homeostazisinde periferal nesfatin-1'in düzenleyici rol üstlenmesi de ihtimal dahilindedir. Gastrik vagal afferent sinirler, açlık durumunda, midede üretilen ghrelin sinyallerinin iletimi için başlıca yoldur (241). Periferal olarak uygulanan nesfatin-1 ve onun orta segmenti olan M30'un oluşturduğu anoreksijenik sinyalin beyin sapına vagal sinirler aracılığıyla, ghrelinin taşınmasına benzer şekilde, taşınması olasıdır. Bu amaçla, sistemik

kapsaisin enjekte edilmiş farelere ip M30 enjekte edilerek; M30'un anoreksijenik etkisinin, vagal sinirler ile ilişkisi araştırılmıştır. İp olarak uygulanan M30'un, önceden kapsaisin enjekte edilmiş farelerde anoreksijenik etki oluşturmadığı gözlenmiştir (242). Bu sonuç, ip olarak uygulanan M30'un anoreksiyi başlatabilmesi için vagal sinirlerin önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, muskarinik kolinesptör antagonisti olan atropin metil nitrat ve adrenerjik gangliyon blokeri olan bretylium tosylate uygulamalarıyla birlikte ip M30 uygulandığında, M30'un oluşturduğu gıda alımının baskılanmasının engellenmediği belirlenmiştir. Nikotinik kolinerjik bloker olan heksametyum uygulaması ile ip M30 enjeksiyonuyla ise M30 tarafından oluşturulan gıda alımındaki azalmanın, heksametyum tarafından ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir. Bu veriler, M30'un oluşturduğu anorekside nikotinik kolinerjik sistemin de yer aldığını ortaya koymaktadır (230).

Nesfatin/NUCB2 immünoreaktif hücreleri hem farelerin hem de sıçanların pankreas adacıklarında beta ( $\beta$ ) hücreleri ile ilişkilidir (243). Pankreasın  $\beta$  hücrelerinin hem PC-1/3 hem de PC-2'yi ekspresse ettikleri bilinmektedir. Nesfatin/NUCB2'nin nesfatin-1'e işleme sürecinin, pankreasın  $\beta$  hücrelerinde gerçekleşiyor olması kuvvetli bir ihtimal gibi görünmektedir. Pankreasta nesfatin/NUCB2 immünoreaktivitesinin yoğunluğu ve  $\beta$  hücreleriyle ilişkisi bu olasılığı artırmaktadır (230).

PVN'de (225) ve gastrik mukozada (239) NUCB2 ekspresyonunun açlık durumunda, serbest beslenme şartlarına göre, daha düşük olduğu da tespit edilmiştir. Bu veriler nesfatin-1'in dolaşımdaki seviyesinin gıda alımı neticesinde artış gösterdiğine işaret etmektedir. Mide ve pankreas gibi nesfatin-1 üreten

organlarda nesfatin-1 seviyesinin dolaşımdaki düzeyine göre daha yüksek olabileceği ifade edilmektedir. Gangliyonik nöronların aktivasyonunu sağlayabilmek için etkili nesfatin-1 konsantrasyonunun  $10^{-10}$  M düzeyinde olduğu bildirilmektedir. Nesfatin-1'in kolesistokinin-8'e (CCK) duyarlı nöronlarda özellikle  $[Ca^{+2}]_i$  artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, CCK-8 duyarlı nöronların bir kısmını nesfatin-1 duyarlı nöronların oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna dayanarak, gangliyonik nöronlarda nesfatin-1 ve CCK-8'in iştahın baskılanmasıyla ilgili olarak aynı paya sahip oldukları da ifade edilmiştir (244). Buna karşın, CCK'nın periferik uygulanmasıyla PVN'de ve beyin sapındaki nesfatin-1 ile ilgili nöronlarda c-Fos ekspresyonunun uyarıldığı da rapor edilmiştir (245). Bu veriler ve diğer çalışmaların sonuçları birlikte ele alındığında, nesfatin-1'in merkezi veya periferik uygulanması neticesinde ortaya çıkan gıda alımındaki azalmanın, periferik CCK yanıtı ile bağlantılı olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır (244).

### 3.3.3. Nesfatin-1 ve Üreme

Yeni keşfedilen bu tokluk peptidinin obezite ile mücadele yönünden oldukça ümit verici özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca enerji dengesi ve üremenin düzenlenmesi bakımından nesfatin-1 ile ilgili olarak 2010 yılında yapılan bir çalışmada (246) pubertal olgunlaşma sürecindeki dişi sıçanlara bu peptidin ICV as-MON infüzyonunun hipotalamik NUCB2 seviyesini azalttığı, puberte başlangıç yaşını uzattığı, ovaryum ağırlığını ve LH düzeyini azalttığı belirlenmiştir. Yine aynı araştırma gurubu tarafından insan, sıçan ve fare

testislerinde ve sıçan ovaryumunda NUCB2 mRNA ekspresyonunun mevcudiyeti rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak, immünohistokimyasal çalışmalar ile de leydig hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi tespit edilmiştir (228). Bütün bunlara dayanarak nesfatin-1'in pubertenin düzenlenmesinde olmazsa olmaz faktörlerden birisi olduğu ileri sürülmüştür (246). Bu peptidin, *in vivo* çalışmalarla, GnRH ve kisspeptin ile etkileşiminin ortaya konulması gerekmektedir. Bu yönde yapılmış herhangi bir araştırma mevcut değildir. Böylece, üremenin hem beslenme yönünden hem de nöroendokrin düzenlenmesiyle ilgili olarak, yeni ilişkilerin ortaya çıkarılması, kafalardaki soru işaretlerinin azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

### **3.5.Puberte Yaşının Fizyolojik Sınırlarda Kalmasının Önemi**

Ergenlik dönemi boyunca bazı beyin bölgelerinde değişiklikler görüldüğü ve nöronal ağların yeniden yapılandığı bildirilmektedir (247, 248). Beynin değişim döneminde olmasından dolayı erişkin beynine göre daha hassas olduğu ifade edilmektedir (249-251). Ayrıca puberte döneminde akson ve sinapslarda meydana gelen yapısal gelişim atağını, puberte sonrasında sinaptik azalmanın takip ettiği ileri sürülmektedir (252).

Ergenlik döneminde değişim gösteren yapılarından biri de bazal gangliyonlardır. Bazal gangliyon miktarındaki artış ergenlikten başlayarak, otuzlu yaşlara kadar devam etmekte ve kırklı yaşlara doğru yavaşlamaktadır. Ergenlik döneminde bazal gangliyon yapılarının bağımlılık yapan maddelere daha duyarlı olması muhtemelen bu sebeptir. Bazal gangliyonlar prefrontal bölge üzerinden

motivasyon ve davranışla ilgili fonksiyonlara katkıda bulunmaktadır (253, 254). Dolayısıyla bazal gangliyona etki eden patofizyolojik şartlar, anti-sosyal davranışlar, zararlı madde kullanımı ve bağımlılık gibi durumlarla yol açabileceği ileri sürülmektedir (255-257). Cinsiyete bağlı olarak, kızlarda hipokampus, erkeklerde ise amigdala hacminin daha fazla olduğu rapor edilmiştir (258, 259). Dolayısıyla, dikkat eksikliği, hiperaktivite ve Obsesif Kompulsif Bozukluklar erkeklerde daha sık, kızlarda ise amigdala hacmindeki azalmaya bağlı olarak anksiyete ve duygu durum bozuklukları tüm ergenlik dönemi boyunca daha fazla ortaya çıkmaktadır (260, 261).

Özetle beynin diğer bütün önemli alanları (hipokampus, amigdala, nükleus accumbens, prefrontal, frontal, orbital korteks ve limbik sistem) ergenlik dönemi boyunca yeniden yapılanmaktadır. Özellikle prefrontal korteks hacmi insan ve hayvanlarda tüm ergenlik boyunca azalmaktadır (262, 263). Nitekim insan beyni erişkin hacmine puberte döneminde ulaşmaktadır.

Gonadal hormonlardaki artış ergenlik döneminde davranışsal uyuma ve dolayısıyla birtakım davranış problemlerine neden olabilmektedir. Bu dönemde HHG işleyiş kadar HHA aks da normal ergenlik gelişiminde önemlidir. Nitekim bu dönemde hipotalamo-hipofizer adrenal aksa olumsuz etki edecek faktörlerin, ileride stres duyarlılığında artış veya strese yatkınlık ile sonuçlanacağı ileri sürülmektedir (264). Yine ergenlik dönemi ile ilişkili bir takım psikolojik sorunların bu tür olumsuz etkiler nedeniyle meydana gelmiş olabileceği ifade edilmektedir (265).

Ergenlik hem bedensel hem de zihinsel olarak büyük değişimlerin yaşandığı önemli bir süreçtir. Bu derece hızlı ve yoğun değişimlere uyum sağlamak çok

kolay değildir. Normal ilerleyen bir ergenlik süreci bile hem gence hem de ailesine çeşitli güçlükler ve değişik risklerin eşlik ettiği bir mücadele dönemi getirmektedir. Bu dönemin erkene çekilmesi veya gecikmesinin getireceği olumsuz sonuçlar ise sadece bu dönemle sınırlı kalmayıp, ilerleyen yaşlarda hatta ömür boyu sorunlar ve riskler sunmaya devam edecektir.

**Bu tez çalışması ile:**

Vücutun enerji dengesi, dolayısıyla bunu düzenleyen beslenme davranışıyla ilgili moleküller ve nöroendokrin sistemin etkileşimi söz konusu olduğuna göre; hem puberte ve üreme fizyolojisi hem de enerji dengesinin regülasyonu bakımından kisspeptin, nesfatin-1, leptin ve RFRP3 (GnIH) ve/veya antagonisti (RF9) arasında direkt/dolaylı etkileşim olabileceğinden hareketle:

Kisspeptin'in bu ilişkideki rolü,

GnIH etkisinin RF9 ile modifikasyonu mümkünse bu durumun ARC kisspeptin nöronlarında etki oluşturup oluşturmadığı,

Nesfatin-1'in beslenme davranışı ve gonadotropinler üzerine etkisinin kisspeptin nöronları ile ilişkisi,

Ayrıca inhibitör ve uyarıcı nöroendokrin mekanizmaların işleyişinde farmakolojik modifikasyonun pubertal ve erişkin dönem etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Grupların Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar

Araştırmada Spraque Dawley türü dişi yavru sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma grupları, İntakt kontrol, Sham (çözücü ICV), Kisspeptin, p234, Kisspeptin + p234, RF9, RF9 + p234, Nesfatin-1, Nesfatin-1 + p234 olarak belirlenmiştir. Bunun için hayvanlar 21 günlük canlı ağırlıkları (CA)  $40\pm 2$  gr olan yavrular arasından, her grupta 7'şer hayvan olacak şekilde, rastgele dağılımla seçilmiştir. Deney süresince hayvanlar sabit sıcaklık ( $21\pm 1$  °C) ve 12 saat gece/12 saat gündüz (ışık açılışı 07:00) ortamda tutulmuştur. Yem ve su *ad libitum* olarak verilmiştir. İntakt kontrol grubunun dışında, ICV uygulamanın oluşturabileceği stres ve kullanılan maddelerin çözücülerinin olası etkisini ortadan kaldırmak için, sham grubu da yer almıştır.

Yavrular 23 günlük olduklarında, ketamin HCl/xylazine HCl (80/12 mg/kg kas içi) ile anestezi edilerek, ICV enjeksiyon için sabit kanüller sterotaksik koordinatlara göre (bregma noktasının 1.5 mm laterali ve 1mm posterioru) kafatası dişi tur aletiyle delinerek, beynin sol lateral ventrikülüne (kafatası kemiğinden itibaren 4 mm), girilmiş (266) ve dental sement yardımıyla kafatasına sabitlenmiştir. Cerrahi müdahale yapılan bütün hayvanlara operasyon sonrasında 2 gün boyunca ağrı kesici olarak ibuprofen (1 mg/sıçan) oral yolla verilmiş ve yavruların sağlık durumu günde birkaç kez kontrol edilmiştir.

Kisspeptin, p234, Kisspeptin + p234, RF9, RF9 + p234, Nesfatin-1, Nesfatin-1 + p234 enjeksiyonları ICV kanüller takıldığından itibaren (23

günlükken) başlamış ve hayvanlar 60 günlük erişkinliğe ulaşmaya kadar devam edilmiştir. ICV uygulamalar için kisspeptin 50 pmol, p234 1 nmol, RF9 10 nmol ve nesfatin 25 pmol dozda, 5 µl hacimde, % 0,9'luk NaCl içerisinde hazırlanarak her gün 10:00-12:00 saatleri arasında uygulanmıştır. Bu süre zarfında sham grubuna da aynı hacimde çözücü (% 0,9'luk NaCl) ICV olarak verilmiştir.

Yavrular 26 günlük olduklarında, günlük vücut ağırlığı, yem ve su tüketimleri ölçülmeye başlanmış ve 60 günlük olana kadar devam edilmiştir. Pubertenin başlama zamanının belirlenmesi için günlük olarak vajinal açıklık kontrolü yapılmış ve vajinal açıklık gözlenen hayvanlarda vajinal smear incelenerek ilk östrus yaşı, vücut ağırlığı ve siklus düzeni belirlenmiştir.

Hayvanlar 60 günlük olduklarından itibaren diöstrus döneminde olanlar ketamin HCl/xylazine ile genel anestezi altına alınmış ve lateral kuyruk veni aracılığıyla hormon analizi için 0,5 ml kan alınmasını takiben son ICV enjeksiyonlar gerçekleştirilmiş ve 15 dakika sonra, batin açılarak sol ventriküle enjektör yardımıyla girilerek, vakumlu tüplere kan alınmıştır. Toplanan kanlar soğutmalı santrifüjde (3000-4000 rpm/dakika) serumları ayrılıp analizler yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır. Kalpten kan alınmasının ardından, transkardiyal yoldan ilk olarak heparin + % 0,9'luk NaCl, ardından fosfatlanmış tamponlanmış salin (PBS) + % 4 paraformaldehit solüsyonu ile immünohistokimyasal boyama için beyinler sabitlendikten sonra sıçanların kafası giyotin yardımıyla kesilmiştir. Hızlı bir şekilde kafatası açılarak beyinler çıkarılıp PBS + % 4 paraformaldehit solüsyonuna konulmuştur. Ayrıca tüm hayvanlara ait uterus ve ovaryumlar disekte edilerek ağırlıkları belirlenmiştir.

Hipotalamus örneklerinde, immünohistokimyasal olarak kisspeptin immünoreaktivitesi, serum örneklerinde ise FSH, LH ve leptin düzeyleri ölçülmüştür.

#### **4.2. Beyin kesitlerinin hazırlanması**

Kalpten kan alınmasının ardından, transkardiyal yoldan ilk olarak heparin + % 0,9'luk NaCl, ardından PBS + %4 paraformaldehit solüsyonu ile immünohistokimyasal boyama için beyinler sabitlendikten sonra sıçanların kafası giyotin yardımıyla kesildi. Hızlı bir şekilde kafatası açılarak beyinleri çıkarılıp PBS + % 4 paraformaldehit içinde 4°C'de 3-4 saat bekletildi, daha sonra taze PBS + % 4 paraformaldehit ile solüsyon değiştirilip 16-20 saat 4°C'de beyin sabitlenmesi devam ettirildi. % 4 paraformaldehit solüsyonu, % 25 sükröz solüsyonu ile değiştirilip 24-48 saat beyinler sükrözle doygunluğa erişene kadar 4°C'de tutuldu. Sükröz solüsyonundan çıkarılan beyinler soğutmalı mikrotomda -20 °C'de dilimlendi. Stereotaksik atlas yardımıyla AVPV, ARC ve DMN boyunca 25 µm kalınlığında koronal (frontal) hipotalamik kesitler alındı. Bu kesitler kryoprotektan solüsyonu içerisinde -20 °C'de immünohistokimyal analizler yapılana kadar saklandı.

#### **4.3. Floresan immünohistokimya**

Kisspeptin floresan immünohistokimya deneyleri 25 µm kalınlığında hipotalamusun serbest yüzen kesitlerinde gerçekleştirildi. Kesitler oda

sıcaklığında 0.05 M PBS'de yıkandı (pH 7.3, 8x15 dakika), %3 hidrojen peroksitte 30 dakika inkübe edildi ve tekrar 0.05 M PBS'de yıkandı (6x5 dakika). Kesitler 4°C'de % 5 normal at serumu (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), % 0.1 BSA ve % 0.05 Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) içeren PBS çözeltisinde gece boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve özgün olmayan bağlanmalar elimine edildi. Kesitler PBS-Eşek serum çözeltisinde hazırlanan primer antikor, Kisspeptin (Tavşan, anti-Kisspeptin antikor, AB9754, Merck Millipore), ile 4°C'de 48 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında 0.05 M PBS'de yıkandı (4x5 dakika). İmmünoflorasını tespit etmek için kesitler oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat PBS-at serumu çözeltisinde sekonder antikor, Cy3-konjuge AffiniPure donkey antirabbit IgGs (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), ile inkübe edildi ve tekrar oda sıcaklığında 0.05 M PBS'de yıkandıktan (4x5 dakika) sonra kesitler lam (Fisherbrand Superfrost Plus; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) üzerine yerleştirildi. Kesitler lam üzerinde karanlıkta kuruduktan sonra GEL/MOUNT akışkan koruyucu madde ile kaplandıktan sonra lamelle kapatıldı ve analizler yapılana kadar 4°C'de muhafaza edildi.

#### **4.4. Serum LH, FSH ve Leptin ELISA Protokolü**

Analiz için Pappa ve arkadaşlarının (267) kullandığı metod, bazı modifikasyonlar ile esas alınmıştır. Kısaca, sıçan LH ve FSH antikorları ile kaplanan 96 wellplate'ler (Nunc, Roskilde, Denmark) ilk olarak standartlar ve serum örnekleri ile preinkübasyon süreci başlatılarak, primer antikorlarla solid faz

sürecinde antijen bağlanmasının gerçekleşmesi sağlandı. Sonrasında, plate'ler yıkama işlemine ve sekonder antikorla konjuge halde streptavidin peroxidase her bir kuyucuğa ilave edilerek, substrat olarak ise tetramethylbenzidine kullanılarak renk oluşumu meydana getirildi. İnkübasyon sonrası, plateler ELISA okuyucuda (Biotek, Synergy HT, USA) 450 nm'de ölçüme tabi tutuldu. Sıçan FSH ve LH primer antikorları (rabbit anti-rat LH and rabbit anti-rat FSH) Dr. A.F. Parlow'dan (NIDDK, NIH, USA) temin edildi. Sekonder antikorlar (goat anti-rabbit IgG) ve konjugatı streptavidin peroxidase Sigma'dan (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) satın alındı. FSH ve LH için kullanılan testin sensitivitesi, sırasıyla, 1 ng/ml ve 2 ng/ml düzeyindeydi. Ayrıca inter-assay ve intra-assay varyasyon katsayıları % 8'in altındaydı. Leptin değerleri ise ticari kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) kullanılarak belirlendi. Leptin Rat ELISA kiti için sensitivite değeri 0.04 ng/mL'ydi. Ayrıca intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları ise, sırasıyla, % 1.9–2.5 ve % 3.0–3.9 düzeylerindekiydi.

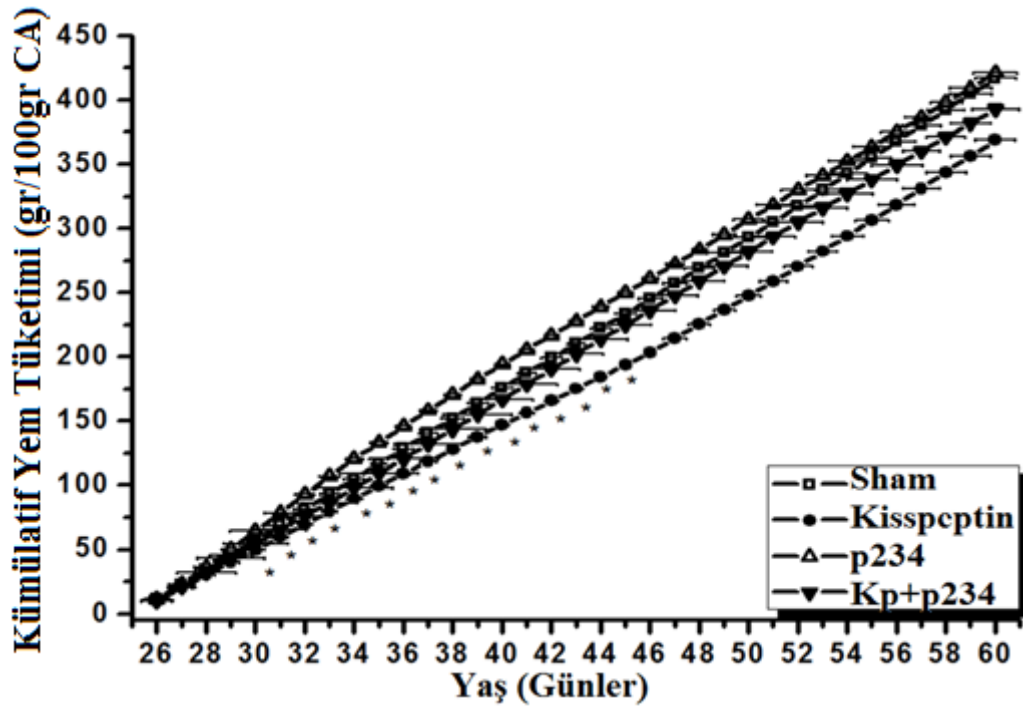
#### **4.5. İstatistiksel Değerlendirme**

Bütün değerler; ortalama ve standart hata ( $AO \pm SH$ ) olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 12.0 ve Origin 8.0 programları kullanılarak yapıldı. Verilerin değerlendirilmesi ve gruplar arası farklılıklar için one-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD ve Mann Whitney U testleri kullanılmıştır. Tüm analizlerde  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

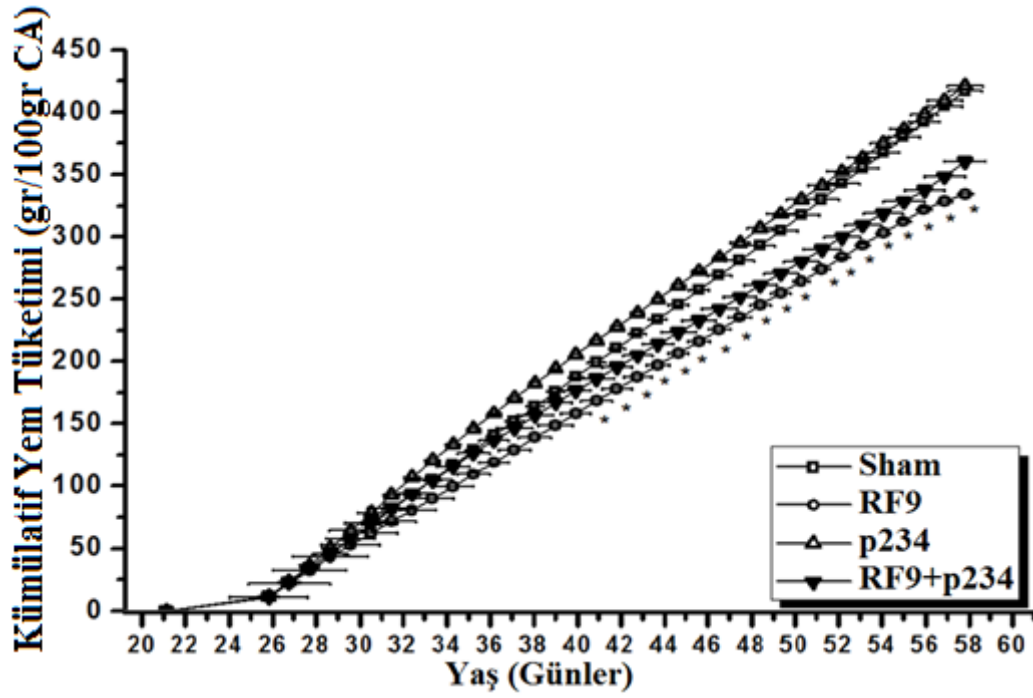
### 5.1. Yem Tüketimi

Ölçümlerin başladığı 26. günden hayvanlar 60 günlük olana kadar elde edilen 34 günlük, 100 gram CA için, tüketilen yem miktarı tablo 4’de sunulmuştur. Kisspeptin grubundaki hayvanlarda sham grubuna göre 30. günden 45. güne kadarki 16 günlük dönemde yem tüketiminde önemli azalma tespit edildi ( $p<0,05$ ). Genel tablonun 26. günden 56. güne kadar, 30 günlük süre zarfında, istatistiksel bakımdan anlamlı olmasa da ( $p>0,05$ ) daha düşük yem tüketimi şeklinde olmasının yanı sıra, erişkinlik dönemine yaklaştıkça (60. gün) anoreksijenik etkide zayıflama eğilimi olduğu görüldü. P234 grubunda yem tüketimi sham grubuna göre istatistiksel bakımdan farklı değildi. Fakat 26. günden 39. güne kadar bu gruptaki hayvanların sham grubuna göre daha fazla yem tükettikleri görüldü ( $p>0,05$ ). Geri kalan 40. günden 50. güne kadar yem tüketiminin azalma eğilimi göstererek sahm grubuyla aynı seviyede olduğu, 50. günden sonra tüketim miktarında düşüşün daha da belirginleşmeye başladığı belirlendi. Kisspeptin+p234 grubunda sham grubuyla aynı düzeyde yem tüketildiği belirlendi (Şekil 9).



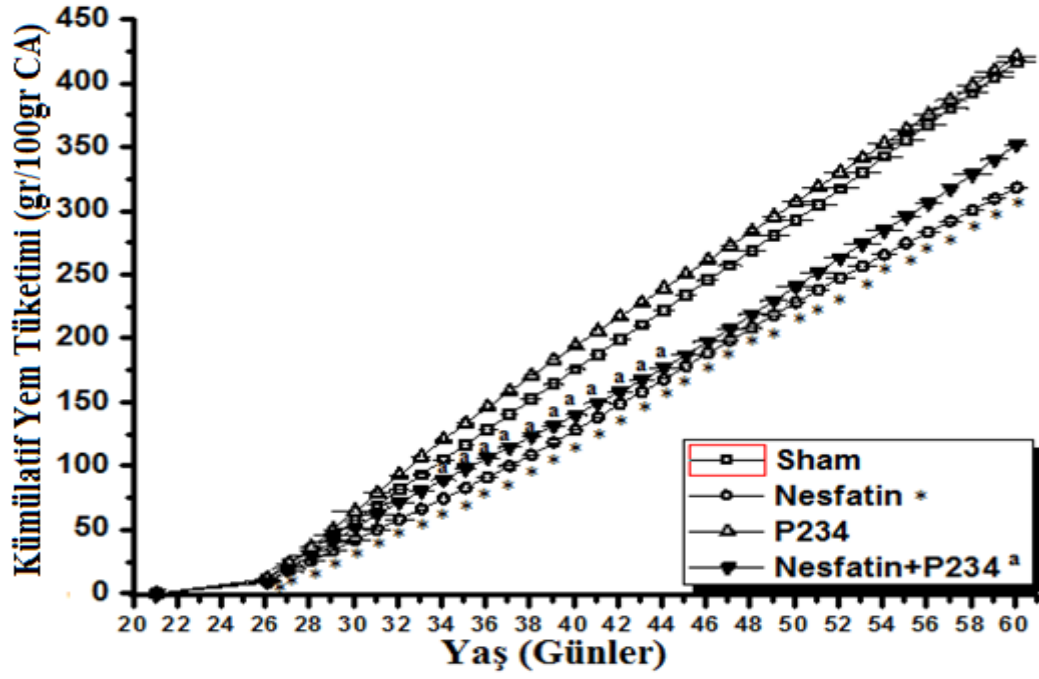
Şekil. 9. Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Yem Tüketimi. \*;  $p<0.05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

RF9 grubunda ise, 34. günden itibaren 60. güne kadar genel olarak kontrol grubuna göre daha az yem tüketilmekle birlikte, 42. günden 60. güne kadarki tüketimin kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte, 26. günden 33. güne kadar kontrol grubuyla aynı seviyede olan tüketimin 35. günden itibaren azalmaya başladığı ve yukarıda anlamlı düzeyde olan günlerin dışındaki günlerde de bu durumun 60. güne kadar geçerli olduğu belirlendi. RF9+p234 grubunda ise 44, 47 ve 54. günden 60. güne kadarki süreçte daha yoğun olmakla birlikte daha az yem tüketildiği fakat kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bakımdan farklı olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ), (Şekil 10).



Şekil. 10. Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Yem Tüketimi. \*;  $p < 0.05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

Kontrol grubuna göre 34 günlük süre zarfında nesfatin grubunda yem tüketimi istatistiksel bakımdan anlamlı şekilde düşüktü ( $p < 0,05$ ). Nesfatin+p234 grubunda 34. günden 44. güne kadar kontrole göre yem tüketim miktarları anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0,05$ ). Geri kalan günlerde de kontrol grubuna kıyasla düşük düzeyde tüketim miktarlarının söz konusu olduğu görüldü ( $p > 0,05$ ), (Şekil 11).



Şekil. 11. Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Yem Tüketimi. \*; a;  $p < 0.05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

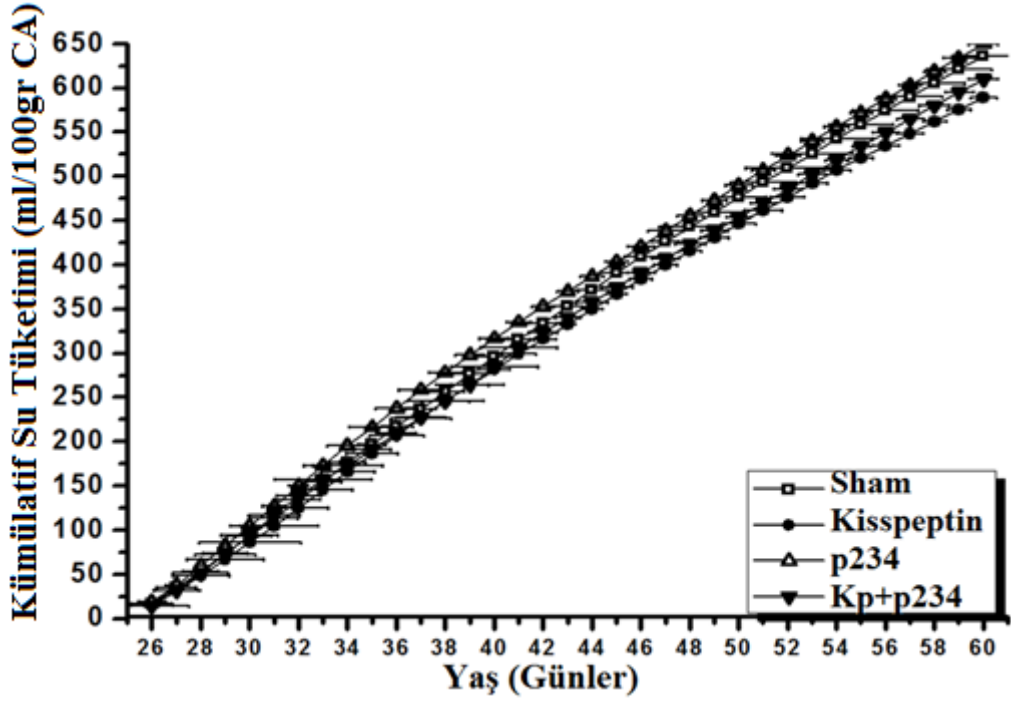
**Tablo 4.** Prepubertal 26. Günden Erişkin 60. Güne Kadar (34 Günlük), 100 gram CA için, Günlük Yem Tüketim Ortalamaları (gr/100gr CA)

Günler	Gruplar							
	Sham	Kp	p234	Kp + p234	RF9	RF9 + p234	Nesfatin	Nesfatin + p234
26. Gün	11±0,5	10±1	12±0,3	11±1	11±2	11±0,2	9±0,5*	10±1
27. Gün	11±0,5	10±0,4	12±0,3	10±1	12±2	11±0,2	8±0,6*	10±1
28. Gün	12±0,4	11±0,3	13±0,5	11±1	11±2	11±0,2	8±0,6*	11±1
29. Gün	11±1	10±0,3	13±0,4	11±1	11±2	11±1	8±0,6*	11±1
30. Gün	12±0,4	10±0,3*	14±1	12±1	13±1	10±1	8±0,6*	11±1
31. Gün	12±0,5	10±0,3*	14±1	11±1	12±1	10±1	7±0,6*	10±1
32. Gün	12±0,4	10±0,3*	14±0,4	11±1	12±1	10±1	8±0,6*	9±1
33. Gün	12±0,4	10±0,3*	14±0,4	10±1	12±1,1	10±1	8±0,3*	9±0,5
34. Gün	12±0,4	10±0,3*	13±0,4	12±2	11±1	10±1	8±0,3*	9±0,5*
35. Gün	12±0,3	10±0,3*	13±0,3	11±2	11±1	10±1	8±0,4*	9±0,5*
36. Gün	12±0,4	10±0,3*	12±0,3	11±1	11±1	10±1	8±0,4*	9±0,5*
37. Gün	12±0,4	9±0,3*	12±0,3	11±1	10±1	10±1	9±0,5*	9±0,5*
38. Gün	12±0,4	10±0,2*	12±0,3	12±1	10±1	10±1	9±0,3*	9±0,4*
39. Gün	12±0,4	9±0,3*	12±0,3	11±1	10±1	10±1	10±0,3*	8±0,5*
40. Gün	12±0,4	9±0,3*	12±0,3	12±1	10±1	10±1	10±0,3*	9±0,5*
41. Gün	12±0,4	9±0,3*	11±0,3	12±1	10±1	10±1	10±0,2*	9±1*
42. Gün	12±0,4	9±0,3*	11±0,3	12±1	9±1*	10±1	10±0,3*	9±0,5*
43. Gün	11±0,4	9±0,2*	11±0,3	12±1	9±1*	10±1	10±0,3*	9±1*
44. Gün	12±0,4	9±0,2*	11±0,3	11±1	9±1*	10±1	10±0,2*	9±1*
45. Gün	12±0,4	9±0,2*	11±0,3	11±1	9±0,5*	10±1	10±0,3*	10±1
46. Gün	12±0,5	9±0,2	11±0,3	11±1	9±0,5*	10±1	10±0,3*	10±1
47. Gün	12±0,5	11±1	11±0,3	11±1	10±0,5*	10±1	10±0,3*	10±1
48. Gün	12±1	11±0,4	11±0,3	12±1	9±0,5*	10±1	10±0,4*	11±1
49. Gün	12±1	11±0,4	12±0,5	12±1	9±0,5*	10±1	10±0,5*	11±1
50. Gün	12±1	11±1	12±1	12±1	10±0,5*	10±1	10±0,4*	11±1
51. Gün	12±0,8	11±1	12±1	11±1	9±0,5*	10±1	10±0,5*	11±1
52. Gün	12±1	12±1	11±1	11±1	10±0,4*	10±1	9±0,6*	11±1
53. Gün	12±1	12±1	11±1	11±1	10±0,4*	10±1	9±0,6*	11±1
54. Gün	13±1	12±1	11±1	11±1	10±0,4*	10±1	9±0,5*	11±1
55. Gün	13±1	12±1	11±1	11±1	10±0,3*	10±1	9±0,4*	11±1
56. Gün	13±1	12±1	12±1	11±1	9±0,3*	10±1	9±0,5*	11±1
57. Gün	12±1	12±1	12±1	11±1	10±0,3*	10±1	9±0,5*	11±0,2
58. Gün	12±1	12±1	11±1	11±1	10±0,4*	10±1	9±0,5*	11±1
59. Gün	12±1	12±1	11±1	11±1	10±0,4*	10±1	9±0,5*	12±1
60. Gün	12±1	12±1	12±1	11±1	10±0,4*	10±1	9±0,5*	12±0,5

\*p<0.05; Kontrol (sham) grubu ile karşılaştırıldığında

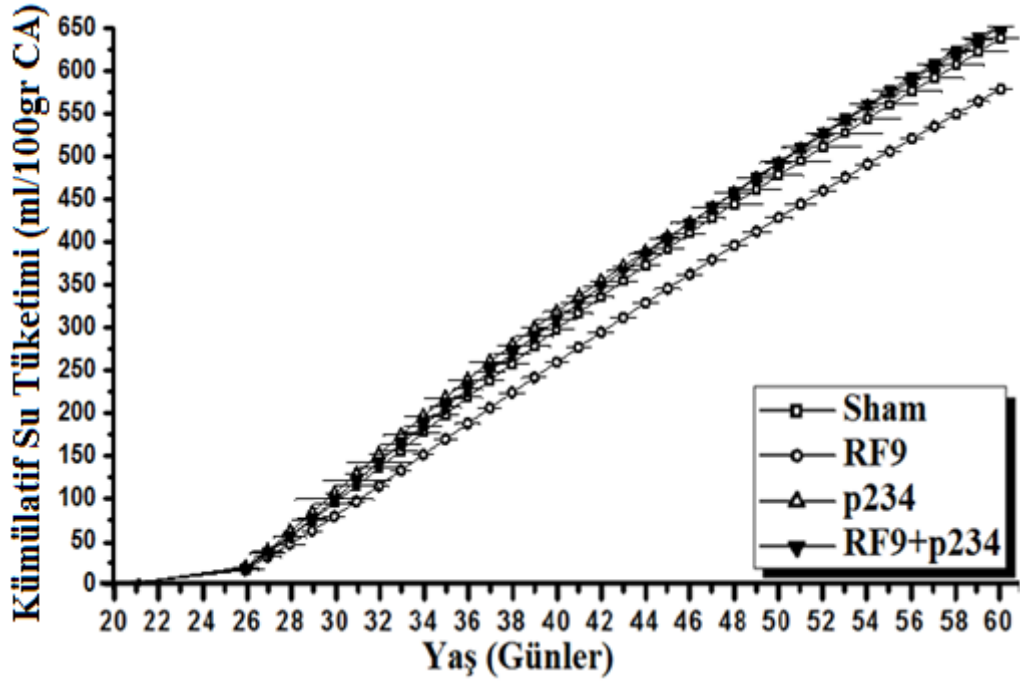
## 5.2. Su Tüketimi

100 gram CA esas alınarak yapılan değerlendirmede elde edilen 34 günlük su tüketim değerleri toplu olarak tablo 5’de sunulmuştur. Kisspeptin ve p234 gruplarında 26. günden 60. güne kadar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bakımdan geçerli değişiklikler tespit edilmedi (Şekil 12). Ancak kisspeptin grubunda su tüketiminin 26. günden 28. güne kadar kontrol grubundaki tüketime göre daha az olduğu, 31. günden 38. güne kadar aynı seviyede fakat 39. günden itibaren 60. güne kadar tüketimde azalma eğiliminin devam ettiği görüldü ( $p>0,05$ ). P234’de ise 35. güne kadar yüksek olan tüketim miktarının, 36. günden itibaren 60. güne kadar kontrol grubuyla aynı seviyede olduğu belirlendi. Kisspeptin+p234 grubunda 34. günde su tüketiminin önemli derecede azaldığı belirlendi ( $p<0,05$ ). Fakat 28-32. günler arası ve 40-41. günlerde su tüketim miktarının yükseldiği, 26-27. günler, 33. gün, 35-39. günler arasında ve 42. günden 47. güne kadar kontrol grubu tüketim düzeyinden düşük iken, 48. günden itibaren kontrol grubuyla aynı seviyede olduğu tespit edildi.



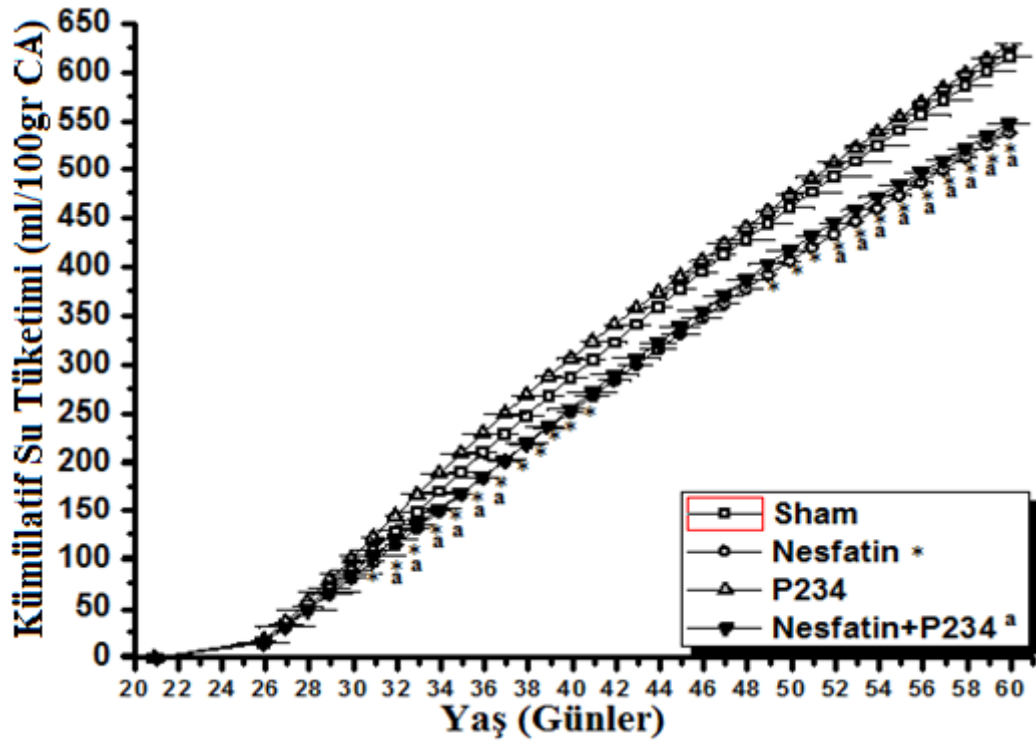
**Şekil. 12.** Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Su Tüketimi.

RF9 grubundaki tüketimle ilgili olarak ise, 28-29. günlerde ve 34. günlerde daha belirgin olmakla birlikte, istatistiksel bakımdan anlamlı olmamasına karşın, genel itibariyle 47. güne kadar düşük olan su tüketiminin bu dönemden sonra kontrolle aynı düzeyde olacak şekilde artış gösterdiği belirlendi. RF9+p234 grubunda kontrol grubu değerleriyle paralel tüketim düzeyleri söz konusuydu (Şekil 13).



Şekil. 13. Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Su Tüketimi.

Nesfatin grubunda, 31-41. ve 49-60. günler arası su tüketimi önemli ölçüde düşüktü ( $p < 0,05$ ). Bununla birlikte, 26-28. günler arasındaki değerler hariç, 60. güne kadar nesfatin grubundaki hayvanların su tüketim miktarları kontrol grubundakilere göre, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, daha azdı ( $p > 0,05$ ). Nesfatin+p234 grubunda, 32. günden 37. güne kadar ve 52-60. günler arasında su tüketimi önemli ölçüde düşüktü ( $p < 0,05$ ). Geri kalan günlerde de su tüketim miktarı düşük olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0,05$ ), (Şekil 14).



Şekil. 14. Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Kümülatif Su Tüketimi. \*; a;  $p < 0.05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

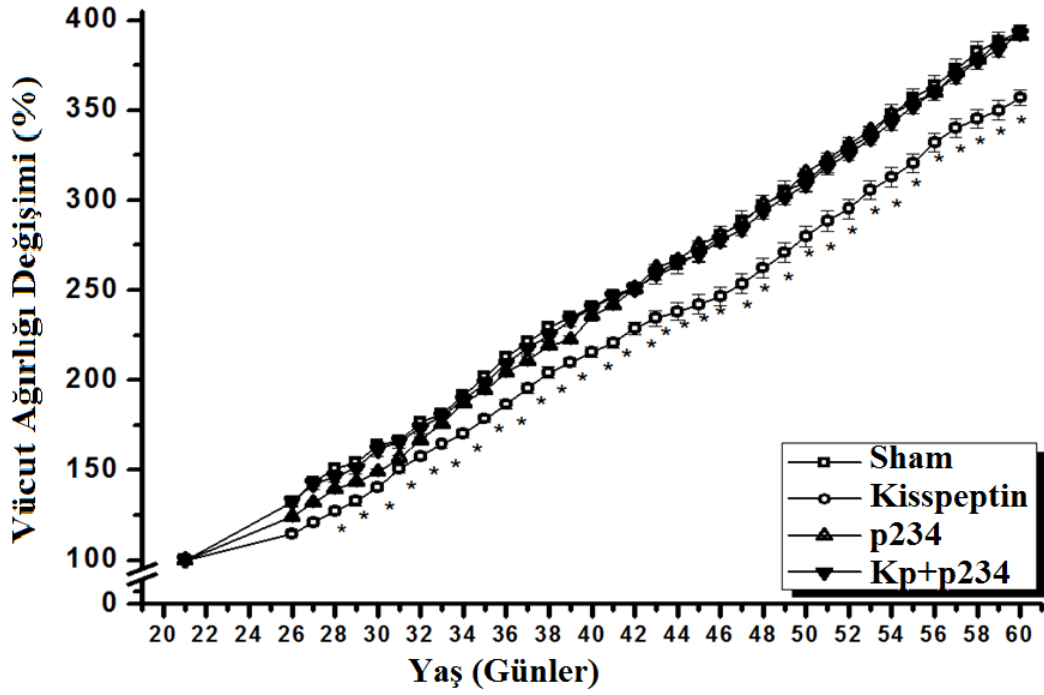
**Tablo 5.** Prepubertal 26. Günden Erişkin 60. Güne Kadar (34 Günlük), 100 gram CA için, Günlük Su Tüketim Ortalamaları (ml/100gr CA)

Günler	Gruplar							
	Sham	Kp	p234	Kp + p234	RF9	RF9 + p234	Nesfatin	Nesfatin + p234
26. Gün	17±1	16±1	19±0,6	14±2	15±0,6	17±0,3	17±1	16±1
27. Gün	18±1	16±1	19±0,4	18±1	15±0,6	19±1	17±1	17±1
28. Gün	19±1	17±1	22±0,2	20±1	15±0,6	19±0,3	17±1	17±1
29. Gün	20±1	18±2	22±0,1	21±1	15±0,4	20±1	17±1	19±1
30. Gün	20±1	19±2	23±0,4	22±1	17±0,5	22±2	17±1	19±1
31. Gün	20±1	19±2	23±0,5	22±1	17±1	22±2	17±0,5*	20±2
32. Gün	21±1	20±1	23±0,4	22±1	18±1	21±1	17±0,4*	17±1*
33. Gün	21±1	21±1	23±1	19±2	18±0,5	21±1	17±1*	16±1*
34. Gün	22±1	21±1	22±1	18±2	18±0,5	21±1	17±0,5*	16±1*
35. Gün	21±1	20±1	21±1	18±1	18±0,5	22±1	17±0,7*	16±1*
36. Gün	20±1	20±1	21±1	18±1	18±1	21±1	17±1*	17±1*
37. Gün	20±1	20±1	21±1	18±1	18±0,5	21±1	17±1*	17±1*
38. Gün	20±1	19±1	20±1	19±1,5	18±0,6	20±1	17±1*	18±1
39. Gün	20±1	19±1	20±0,6	18±1	18±0,5	20±1	17±0,6*	18±1
40. Gün	19±1	18±1	19±0,6	20±2	18±0,5	19±1	17±0,6*	18±1
41. Gün	19±1	17±1	18±0,5	21±1,6	17±0,5	20±1	17±0,7*	18±1
42. Gün	19±1	17±0,5	18±0,4	17±0,6	19±0,6	19±1	17±1	17±1
43. Gün	19±1	17±0,3	17±0,4	17±0,5	17±0,5	19±1	17±1	18±1
44. Gün	19±1	17±0,4	17±0,4	17±0,6	17±1	19±1	17±1	16±1
45. Gün	18±1	17±0,4	17±0,5	17±0,6	17±1	18±1	17±1	17±1
46. Gün	18±1	17±0,5	17±0,5	16±0,5	17±1	18±1	16±1	17±1
47. Gün	18±1	16±0,5	18±1	16±0,6	17±1	18±1	16±1	17±1
48. Gün	16±1	16±0,4	17±0,5	16±0,6	17±1	18±1	16±1	16±1
49. Gün	17±1	15±1	17±0,5	15±0,5	16±1	18±1	14±0,4*	16±1
50. Gün	17±1	15±1	17±0,6	15±0,5	16±1	17±1	14±0,5*	15±1
51. Gün	17±1	16±1	17±0,5	16±0,5	16±1	17±1	14±0,4*	15±1
52. Gün	16±2	15±1	17±0,5	16±0,6	16±1	17±1	14±0,3*	14±1*
53. Gün	16±2	15±1	16±0,5	16±0,6	15±1	16±1	14±0,3*	14±1*
54. Gün	17±2	15±1	16±0,5	16±0,5	15±0,5	16±1	14±0,4*	13±1*
55. Gün	16±1	14±1	16±0,4	16±0,4	15±0,5	16±1	14±0,5*	13±1*
56. Gün	16±1	14±1	16±0,4	16±0,5	15±0,5	16±1	14±0,5*	13±1*
57. Gün	16±1	14±1	15±0,5	15±0,6	14±0,4	16±1	14±0,5*	13±1*
58. Gün	15±1	14±1	15±0,4	15±0,6	14±0,4	16±1	13±0,5*	13±1*
59. Gün	15±1	13±1	16±0,6	15±0,6	14±0,5	15±1	13±0,5*	13±1*
60. Gün	15±1	13±1	16±0,6	15±0,6	14±0,5	15±1	13±0,4*	13±1*

\*p<0.05; Kontrol (sham) grubu ile karşılaştırıldığında

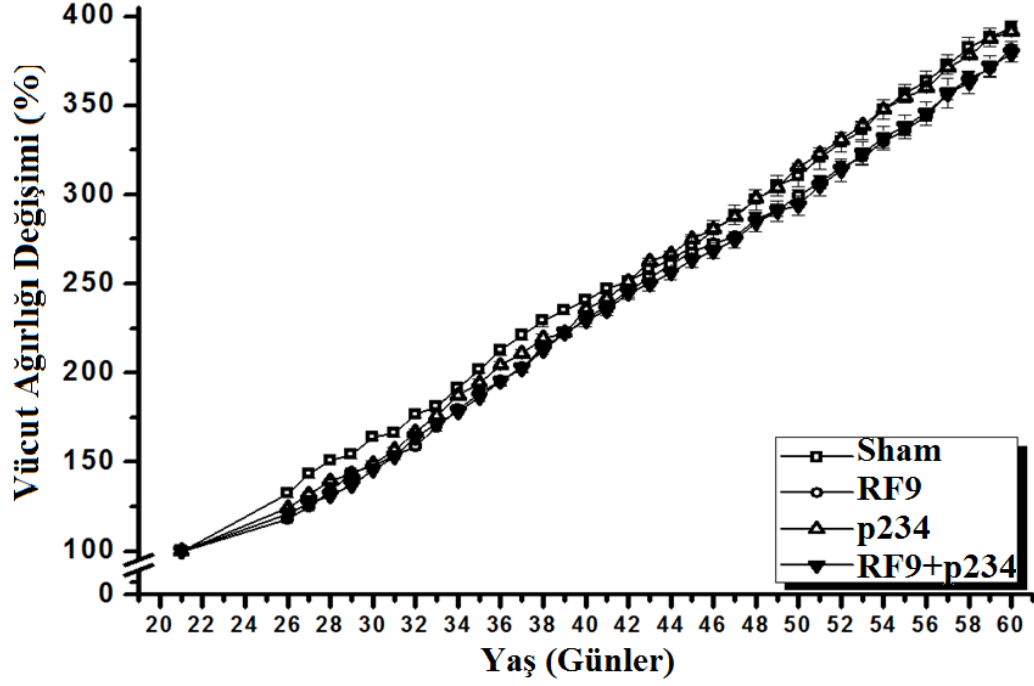
### 5.3. Canlı Ağırlık Artışı

Kisspeptin grubunda ağırlık artışının 26 günden itibaren 60. güne kadar sham grubuna kıyasla önemli düzeyde düşük olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). P234 grubunda ağırlık artışının, genel olarak, biraz daha düşük kalsa da kontrol grubu değerlerine paralel seyir izlediği tespit edildi. Kisspeptin + p234 grubunda ise 34 günlük CA artışının kontrol grubuyla aynı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 15).



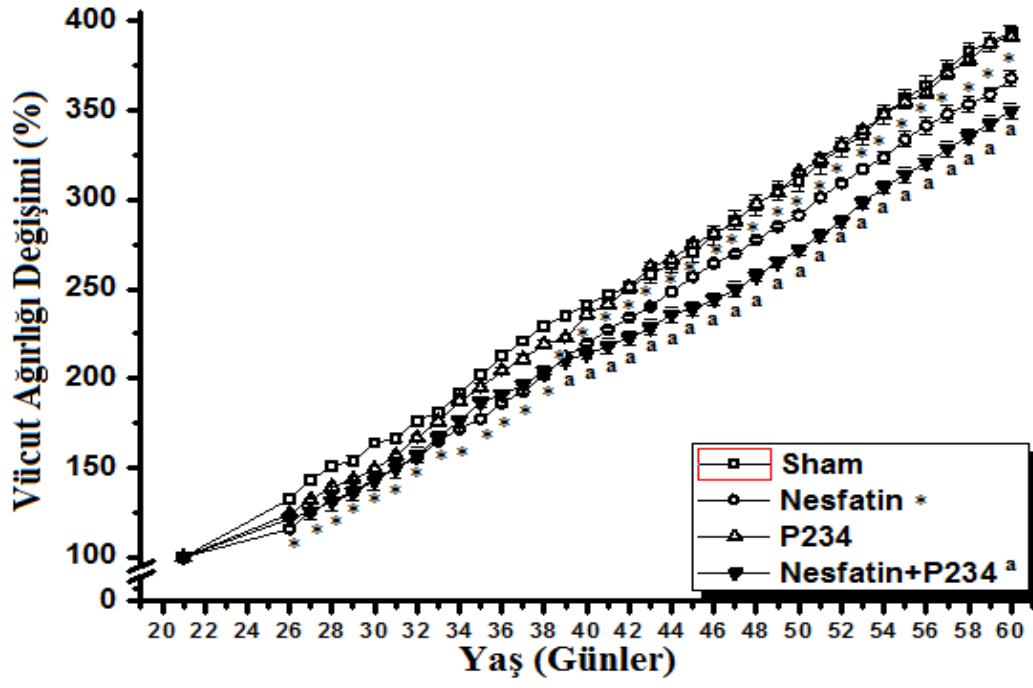
Şekil. 15. Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Vücut Ağırlığında Oluşan Değişimlerin %'si. \*;  $p<0,05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

RF9 grubunda ise, sham grubuna göre anlamlı farklılık söz konusu değildi. Fakat genel eğilim olarak, kontrol grubuna göre, CA düzeyleri daha düşüktü. Aynı durumun RF9 + p234 grubu için de geçerli olduğu belirlendi (Şekil 16).



Şekil. 16. Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Vücut Ağırlığında Oluşan Değişimlerin %'si.

Nesfatin grubunda, 26. günden 60. güne kadar 34 günlük süreçte CA düzeyinin sham grubuna kıyasla, istatistiksel bakımdan anlamlı derecede, daha düşük olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Nesfatin + p234 grubuyla ilgili olarak ise, 26. günden 38. güne kadarki CA artışının, anlamlı olmasa da, kontrole göre daha düşük olduğu ( $p > 0,05$ ), fakat 39. günden itibaren 60. güne kadarki 21 günlük dönemde CA artışında istatistiksel bakımdan önemli düzeyde azalma belirlendi ( $p < 0,05$ ), (Şekil 17).



Şekil. 17. Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında 34 Günlük Dönemde Vücut Ağırlığında Oluşan Değişimlerin %'si. \*; a; p<0.05; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

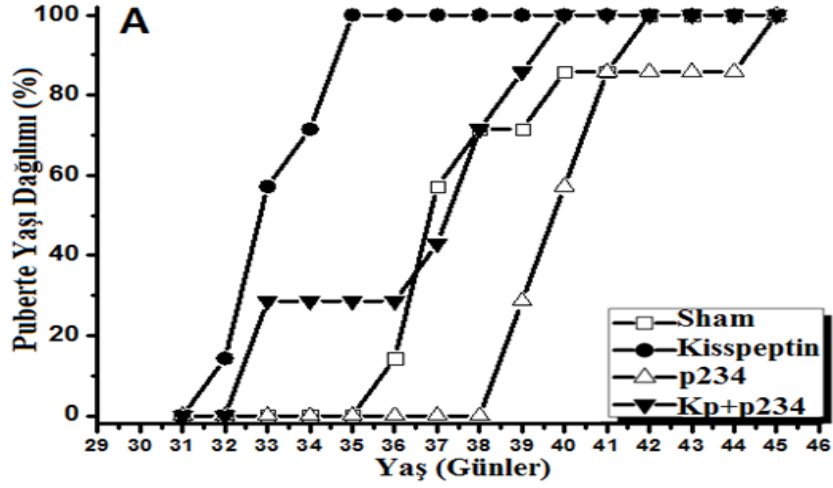
**Tablo 6.** Prepubertal 26. Günden Erişkin 60. Güne Kadar 34 Günlük Periyotta CA Ortalamaları (Ort±SH)

Günler	Gruplar							
	Sham	Kp	p234	Kp + p234	RF9	RF9 + p234	Nesfatin	Nesfatin + p234
26. Gün	51±2	43±1*	47±1	51±3	46±1	44±3	44±1*	47±4
27. Gün	55±2	46±1*	50±1	55±3	49±1	48±2	48±2*	48±5
28. Gün	58±2	48±1*	53±1	57±3	52±1	50±2	50±2*	50±5
29. Gün	59±2	50±2*	55±1	59±3	56±1	53±1	52±2*	52±5
30. Gün	63±2	53±2*	57±2	63±4	58±1	56±1	55±2*	55±5
31. Gün	64±2	57±2*	60±1	64±3	60±1	59±2	57±2*	58±6
32. Gün	68±2	59±2*	64±2	67±3	64±2	63±2	59±2*	60±5
33. Gün	70±2	62±2*	68±2	70±4	66±2	66±2	63±1*	64±4
34. Gün	74±2	64±2*	72±3	73±3	70±2	68±2	66±2*	68±3
35. Gün	78±2	67±2*	74±2	77±3	74±3	71±2	68±2*	72±3
36. Gün	83±2	70±3*	78±2	81±3	77±3	75±2	71±1*	73±3
37. Gün	86±3	74±3*	81±3	85±3	80±3	77±2	74±1*	75±3
38. Gün	89±3	77±3*	83±2	88±3	84±3	80±3	78±1*	78±3
39. Gün	91±2	79±3*	84±2	91±3	87±3	84±3	81±1*	81±3*
40. Gün	93±3	81±3*	89±3	93±3	91±3	86±3	84±1*	82±3*
41. Gün	96±3	83±3*	91±3	96±4	93±3	89±3	87±1*	84±4*
42. Gün	98±3	86±4*	95±2	97±3	96±3	92±3	90±1*	86±4*
43. Gün	100±4	88±4*	99±2	101±4	99±3	94±4	91±1*	88±4*
44. Gün	105±5	90±4*	101±2	103±4	102±3	97±4	95±2*	91±4*
45. Gün	107±5	91±4*	104±2	104±3	105±3	100±4	98±2*	92±4*
46. Gün	111±5	93±5*	106±3	108±3	106±3	102±4	101±2*	94±4*
47. Gün	115±5	96±5*	109±3	110±3	108±3	104±5	103±1*	96±4*
48. Gün	119±6	99±5*	113±2	114±4	111±3	108±6	106±1*	99±4*
49. Gün	121±6	102±5*	115±2	117±4	113±3	111±6	109±1*	102±3*
50. Gün	123±6	105±5*	119±2	120±4	116±4	112±6	110±2*	104±3*
51. Gün	127±6	109±4*	122±2	124±4	119±3	117±6	114±2*	108±3*
52. Gün	130±5	111±4*	125±2	127±4	122±3	121±7	118±1*	111±3*
53. Gün	133±5	115±4*	128±2	130±4	125±4	125±7	120±2*	115±3*
54. Gün	137±5	118±4*	132±2	133±4	128±3	129±7	124±3*	118±3*
55. Gün	140±5	121±5*	134±2	137±4	131±3	131±7	127±4*	122±4*
56. Gün	143±5	125±4*	136±2	140±4	134±3	134±7	130±5*	125±4*
57. Gün	146±5	128±4*	141±1	144±4	139±3	138±8	132±5*	128±4*
58. Gün	150±5	130±4*	143±2	147±4	142±3	140±6	135±5*	130±4*
59. Gün	152±5	132±4*	147±2	149±4	144±4	144±6	137±4*	133±4*
60. Gün	154±4	134±5*	148±2	153±4	148±4	146±5	141±4*	136±4*

\*p<0.05; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

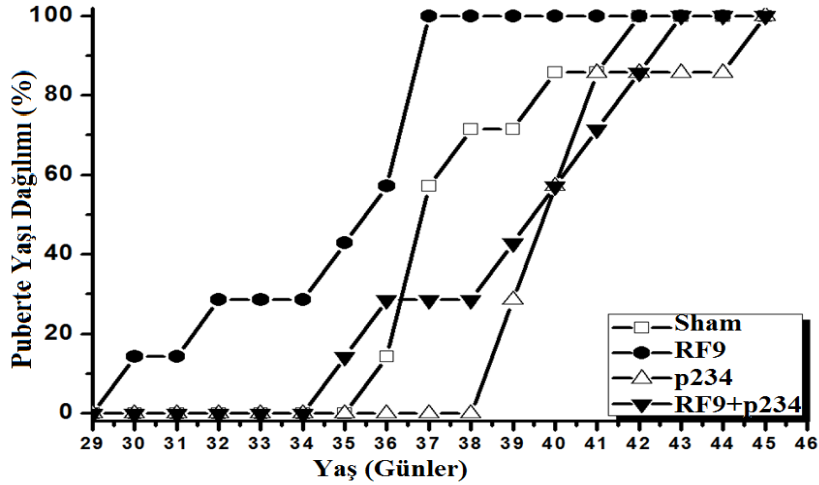
#### 5.4. Puberte Yaşı

Araştırmamızın bu kısmında, ICV enjeksiyon ve uyguladığımız cerrahi müdahalelerin olası etkilerini değerlendirebilmek maksadıyla, intakt kontrol grubu bulguları da yer almaktadır. Puberte ve ilk östrus yaşına ait veriler hem ortalama $\pm$ SH hem de medyan değerleri şeklinde tablo 7’de yer almaktadır. intakt kontrol ve sham-kontrol grubundaki hayvanların hemen hemen aynı günlerde puberteye girdiği ve istatistiksel bakımdan fark olmadığı belirlendi. İntakt gruptaki hayvanların puberteye giriş günlerinin medyanı 38 iken sham-kontrol grubu için bu değer 37 olarak tespit edildi. Ayrıca puberte yaşı bakımından en erken günlerin intakt grupta 35, sham grubunda ise 36 olduğu; maksimum günlerin ise, sırasıyla, 40 ve 42 olduğu görüldü. Kisspeptin grubunda puberte yaşının önemli ölçüde erkene kaydığı görüldü ( $p<0,001$ ). Bu grup için, puberte yaşı medyanının 33 olduğu, en erken 32. gün olmak üzere üç hayvanın 33, bir hayvanın 34 ve iki hayvanın da 35. günde puberteye girdiği belirlendi. P234 grubunda puberte yaşının sham grubuna göre önemli derecede geciktiği görüldü ( $p<0,05$ ). Bu grubun medyanı 40,5 iken, en erken 39 ve maksimum puberte yaşı ise 45 olarak belirlendi. Kisspeptin + p234 grubunda farklılık mevcut değildi ve medyan değeri 38’di (Tablo 7), (Şekil 18).



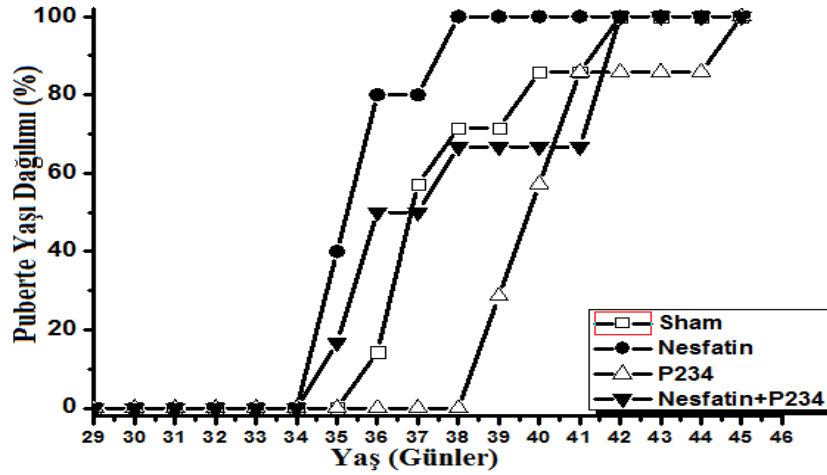
Şekil. 18. Sham, Kisspeptin, p234 ve Kisspeptin+p234 Gruplarında Puberte Başlangıç Günlerinin % Oranları

RF9 için puberte medyanının 36,5 olduğu ve sham grubuna göre puberte yaşı ortalamasının anlamlı şekilde erkene kaydığı görüldü ( $p < 0,05$ ). Bu grup için en erken puberte yaşının 30. gün olduğu maksimum değer ise 37. gün olduğu belirlendi. RF9 + P234 grubunda puberte yaşının sham grubuyla farklılık arz etmediği ve medyan değerinin 38 olduğu görüldü (Tablo 7), (Şekil 19).



Şekil. 19. Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında Puberte Başlangıç Günlerinin % Oranları

Nesfatin grubunda medyan 36'ydı ve puberte başlangıç yaşının sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde erkene kaydığı belirlendi ( $p<0,05$ ). Nesfatin+p234 grubu medyanı 37'ydi ve puberte yaşında herhangi bir farklılık söz konusu değildi (Tablo 7), (Şekil 20).



Şekil. 20. Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında Puberte Başlangıç Günlerinin % Oranları

### 5.5. İlk Östrüs Yaşı

Sham grubu medyanının 47 olduğu, en erken östrüs gününün iki hayvanda 43 ve maksimum östrüs gününün bu grup için 51 olduğu belirlendi. Kisspeptin grubunda medyan değerinin 46 olduğu, en erken 32. günde ve en geç ise 56. günde olmak üzere geniş bir dağılımın söz konusu olduğu ve sham grubuna göre anlamlı değişiklik olmadığı görüldü. Aynı durumun Kisspeptin + p234 için de geçerli olduğu tespit edildi. Bu grubun medyan değeri 48, en erken ve en geç puberte değeri 36 ve 59 şeklindeydi. P234 grubunda östrüs yaşı ortalamasının,

sham grubuna kıyasla, istatistiksel bakımdan önemli şekilde daha geç döneme kaydığı belirlendi ( $p<0,05$ ). Bu grup için östrüs medyanı 52, en erken östrüs yaşı bir hayvanda 45 iken, en geç östrüsün ise 56. günde meydana geldiği görüldü. RF9 grubu için medyan değerinin 45,5 olduğu aynı sonucun RF9 + P234 için de söz konusu olduğu ve östrüs yaşı ortalamaları bakımından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark olmadığı belirlendi. RF9 için en erken östrüs 33. gün iken RF9 + p234 için bu değer 38'di. Ayrıca östrüs yaşının maksimum değerleri RF9'da 53 iken, RF9 + P234 grubunda ise 51'di. Nesfatin ve Nesfatin+p234 gruplarında da kontrole göre farklılık olmadığı belirlendi. Nesfatin için medyan değeri 49 iken, Nesfatin+p234 için ise 47,5'di (Tablo 7).

**Tablo.7.** Puberte ve İlk Östrus Yaşı

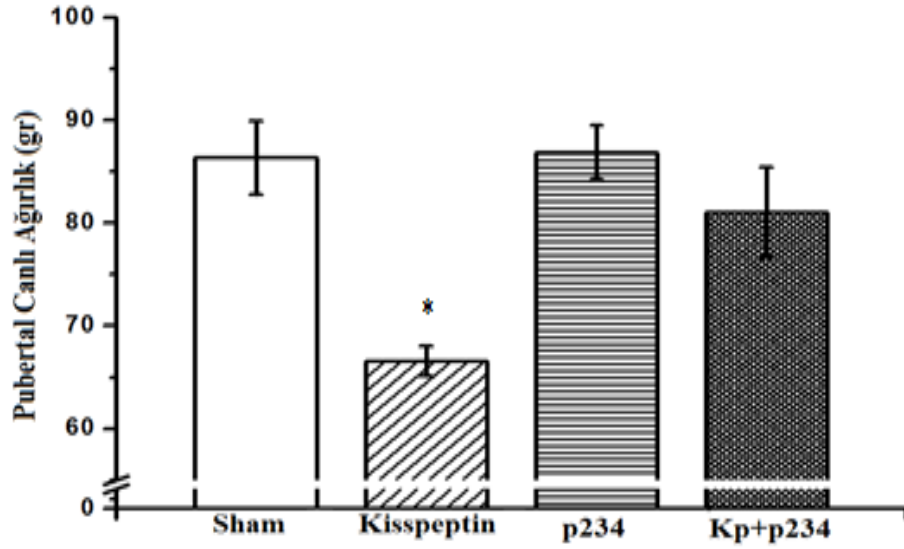
Gruplar	Puberte Yaşı		İlk Östrus Yaşı	
	Ort±SH	Medyan	Ort±SH	Medyan
<b>Kontrol</b>	37,6±0,72	38	44,14±0,86	44
<b>Sham</b>	38,1±0,8	37	46,43±1,07	47
<b>Kisspeptin</b>	33,6±0,43 <sup>a</sup>	33	45,71±3,21	46
<b>P234</b>	40,8±0,67 <sup>a</sup>	40,5	51,5±1,12 <sup>a</sup>	52
<b>Kp+P234</b>	36,9±1,06 <sup>b</sup>	38	47,86±2,54	48
<b>RF-9</b>	35,1±0,95 <sup>a</sup>	36,5	44,75±2,48	45,5
<b>RF-9+P234</b>	36,6±1,65 <sup>c</sup>	38	44,83±2,55	45,5
<b>Nesfatin</b>	36±0,55 <sup>a</sup>	36	48±1,3	49
<b>Nes+P234</b>	38,2±1,28 <sup>d</sup>	37	47±3,11	47,5

<sup>a</sup>p<0.001; Sham grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>b</sup>p<0.001; kisspeptin grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>c</sup>p<0.001; RF-9 grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>d</sup>p<0.001; Nesfatin grubu ile karşılaştırıldığında

### 5.6. Puberte Canlı Ağırlığı

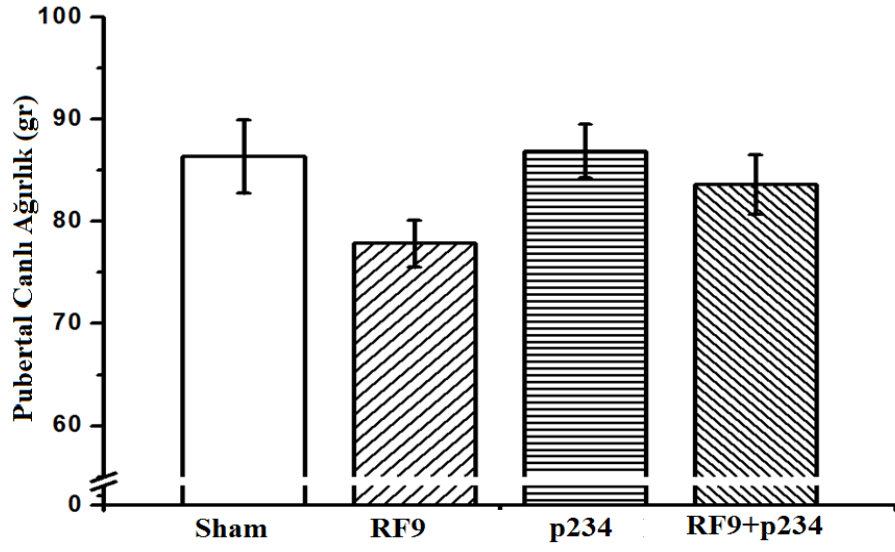
Pubertenin başladığı ortalama vücut ağırlığı sham grubu için 86,36±3,56 gramdı ve kisspeptin grubu ortalaması 66,57±1,43 gram değeriyle anlamlı şekilde azalma göstermişti (p<0,05). P234 grubunun (86,88±2,59 gr) sham ile aynı

düzyeyde ortalamaya sahip olduğu, Kisspeptin + p234 grubunda (81±4) azalma söz konusu olmasına rağmen bu durumun istatistiksel bakımdan fark arz etmediği görüldü (Şekil 21), (Tablo 8).

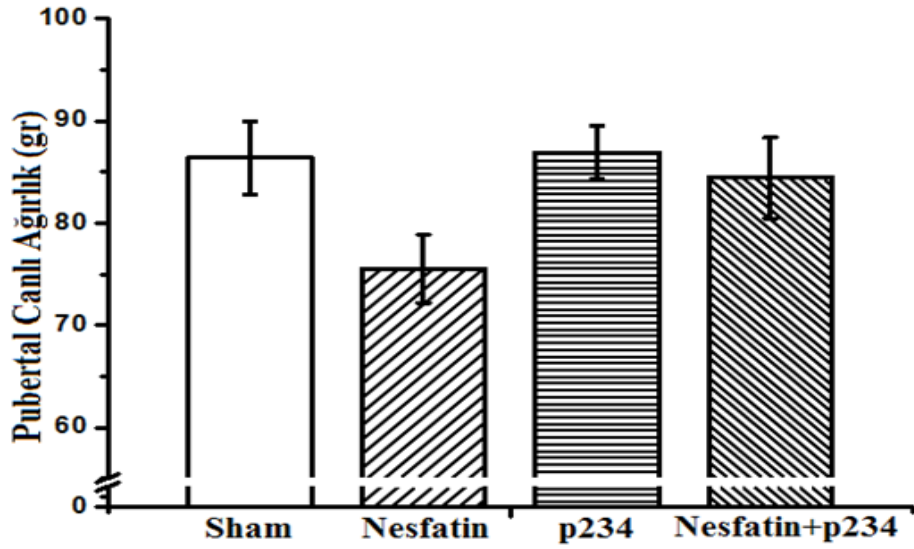


**Şekil. 21.** Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında Pubereye Giriş Vücut Ağırlığı Ortalamaları. \*; p<0.05; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

RF9 grubu puberte vücut ağırlığının (77,81±2,27) diğer gruplara göre nispeten daha fazla düşük olmasına karşı kontrolle kıyasla anlamlı farkın söz konusu olmadığı (Şekil 22) aynı durumun nesfatin (75,5±3,35) için de geçerli olduğu (Şekil 23) belirlendi. RF9 + p234 (83,6±2,94) ve nesfatin + p234 (84,42±3,96) gruplarının ağırlık ortalamalarının sham grubuna yakın düzeyde olduğu görüldü (Tablo 8).



**Şekil. 22.** Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında Pubereye Giriş Vücut Ağırlığı Ortalamaları.



**Şekil. 23.** Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında Pubereye Giriş Vücut Ağırlığı Ortalamaları.

### 5.7. İlk Östrüs Canlı Ağırlığı

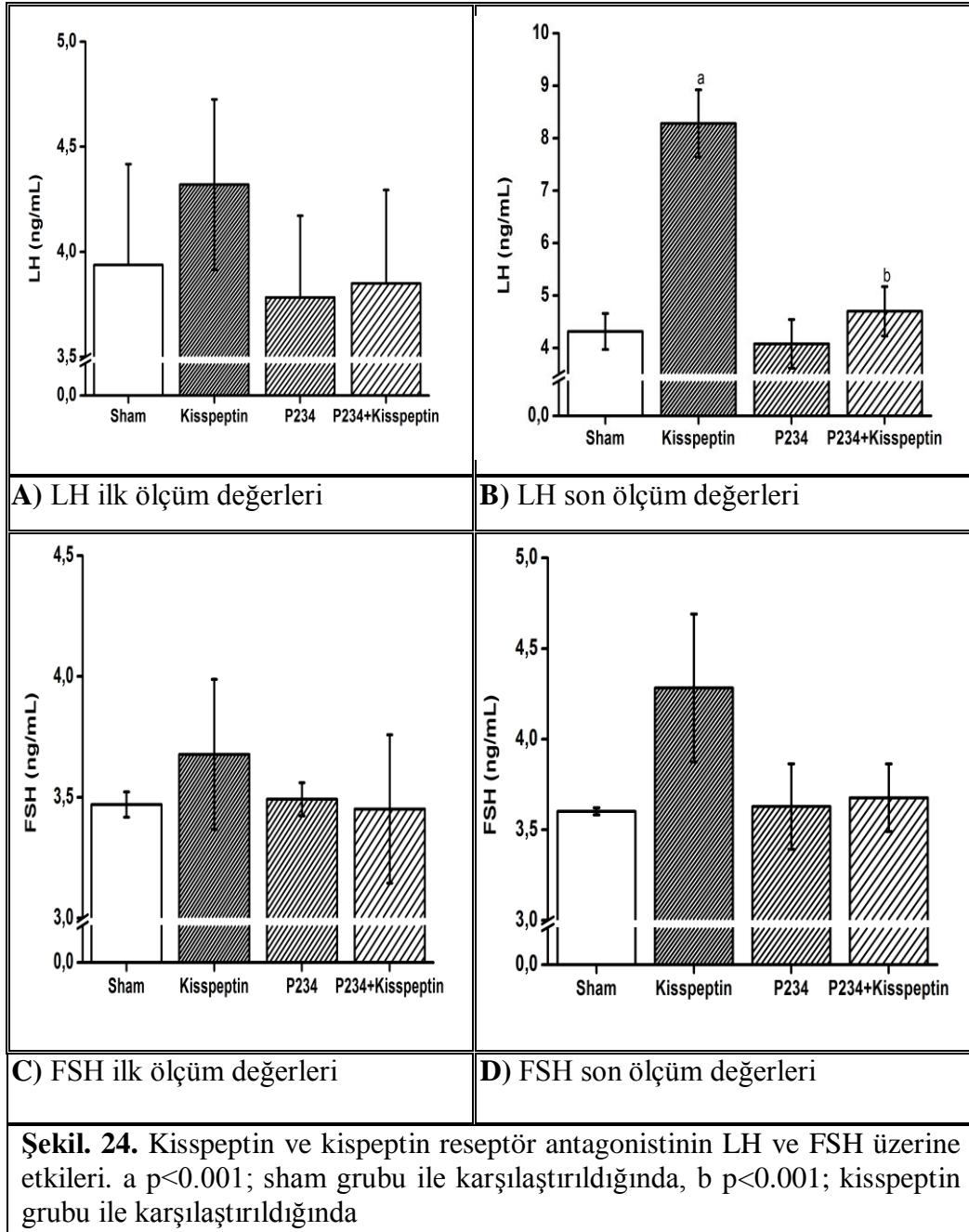
Sham grubu ağırlık ortalamasına göre (108,3±1,57) kisspeptin grubunda ortalama değerlerin (97,93±5,69) önemli şekilde düşük olduğu belirlendi (p<0,05). P234 grubunda (117,5±3,12) nispeten artış söz konusuydu fakat anlamlı değildi. Kiss+p234 (104,1±5,09), RF-9 (106,3±7,04), RF-9+p234 (106,8±3,52), Nesfatin (110,9±4,06) ve Nes+p234 (107,6±6,07) gruplarının ortalamaları sham grubuyla aynı düzeydeydi (Tablo 8).

<b>Tablo.8. Puberte ve İlk Östrüs Ağırlığı</b>			
<b>Gruplar</b>	<b>Puberte Canlı Ağırlığı</b>	<b>İlk Östrüs Canlı Ağırlığı</b>	<b>60. Gün CA</b>
	<b>Ort±SEM</b>	<b>Ort±SEM</b>	<b>Ort±SEM</b>
<b>Sham</b>	86,36±3,56	108,3±1,57	153,9±4,1
<b>Kisspeptin</b>	66,57±1,43 <sup>a</sup>	97,93±5,69	134,4±4,66
<b>P234</b>	86,88±2,59	117,5±3,12 <sup>a</sup>	148,1±2,02
<b>Kiss+P234</b>	81±4,41	104,1±5,09	152,6±3,98
<b>RF-9</b>	77,81±2,27	106,3±7,04	148,3±4,37
<b>RF-9+P234</b>	83,6±2,94	106,8±3,52	145,7±4,96
<b>Nesfatin</b>	75,5±3,35	110,9±4,06	140,6±4,33
<b>Nes+P234</b>	84,42±3,96	107,6±6,07	135,7±4,11

<sup>a</sup>p<0.001; Sham grubu ile karşılaştırıldığında,

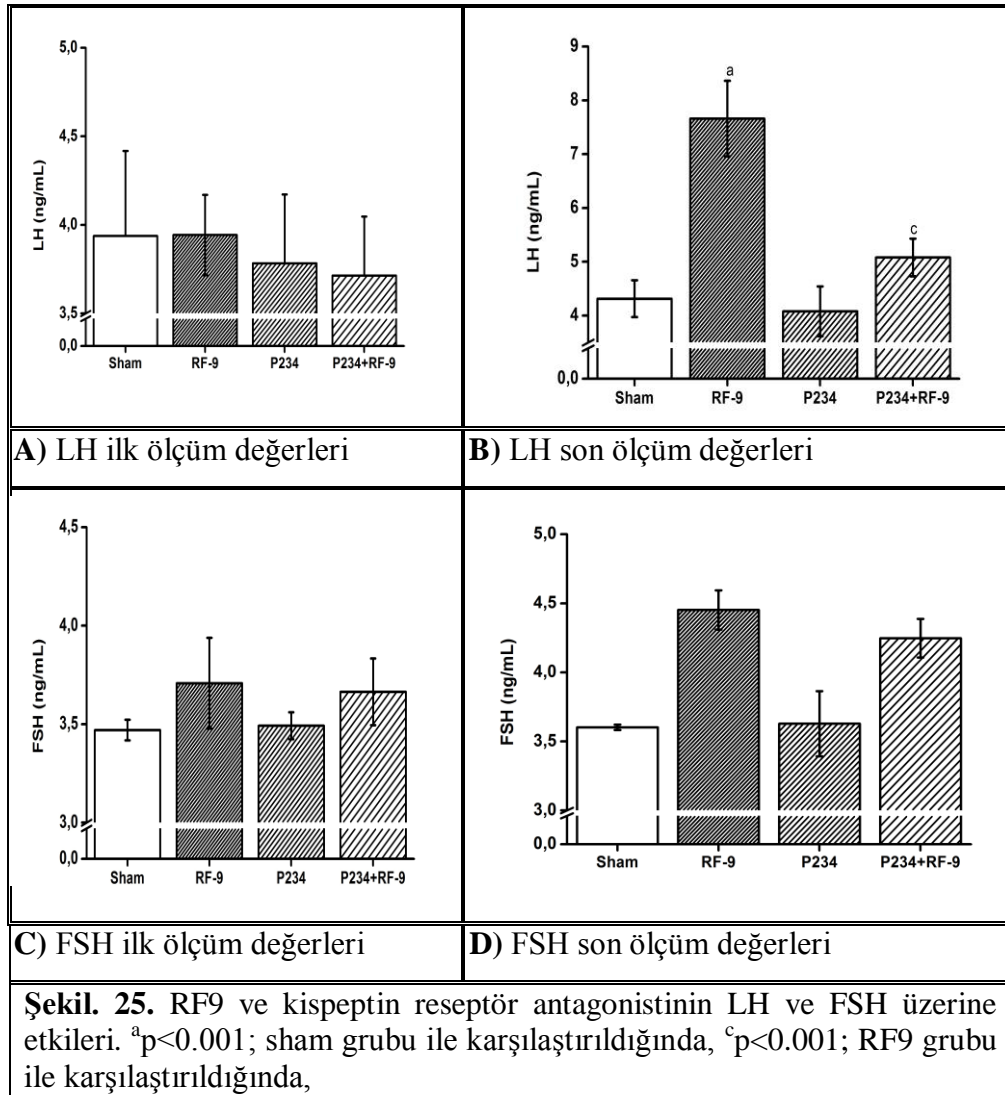
## 5.8. Gonadotropin Seviyeleri

Hem bazal hem de ICV enjeksiyon sonrasında oluşan FSH ve LH düzeyleri tablo 9'da görülmektedir. FSH için bazal seviyeler ve ICV enjeksiyon sonrasındaki düzeyler arasında istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilebilecek değişiklik tespit edilmedi. Sham grubu bazal değerleri ve ICV çözücü uygulamasının 15 dakika sonrasında, sırasıyla,  $3,47 \pm 0,05$  ng/ml ve  $3,6 \pm 0,02$  ng/ml düzeyindeydi. Kisspeptin grubunda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, ICV uygulama sonrasında  $3,68 \pm 0,31$  olan ortalamanın  $4,28 \pm 0,41$ 'e yükseldiği belirlendi ( $p > 0,05$ ). P234 ve Kisspeptin + p234 gruplarında, sırasıyla,  $3,49 \pm 0,07$  ve  $3,45 \pm 0,31$  olan bazal değerlerin ICV enjeksiyon sonrasında  $3,63 \pm 0,24$  ve  $3,68 \pm 0,19$  düzeyinde olduğu görüldü (Şekil 24 C-D). RF9 grubundaki hayvanların bazal FSH seviyeleri  $3,71 \pm 0,23$  ng/ml iken, ICV uygulama sonrasında bu değer  $4,45 \pm 0,14$  seviyesine yükseldiği, fakat bu artışın istatistiksel bakımdan önemli olmadığı belirlendi ( $p > 0,05$ ). RF9 + P234 grubunda ise aynı şekilde  $3,66 \pm 0,17$ 'den  $4,25 \pm 0,14$  düzeyine varan artış miktarı anlamlı değildi ( $p > 0,05$ ) (Şekil 25 C-D). Nesfatin grubunda bazal değer  $3,52 \pm 0,25$ 'den  $3,94 \pm 0,14$ 'e, anlamlı olmayan ( $p > 0,05$ ), artış gösterdiği, Nesfatin + p234 grubunda ise bazal seviyenin ve ICV enjeksiyon sonrası değer, sırasıyla,  $3,25 \pm 0,22$  ve  $3,47 \pm 0,21$  ng/ml olduğu belirlendi (Şekil 26 C-D).

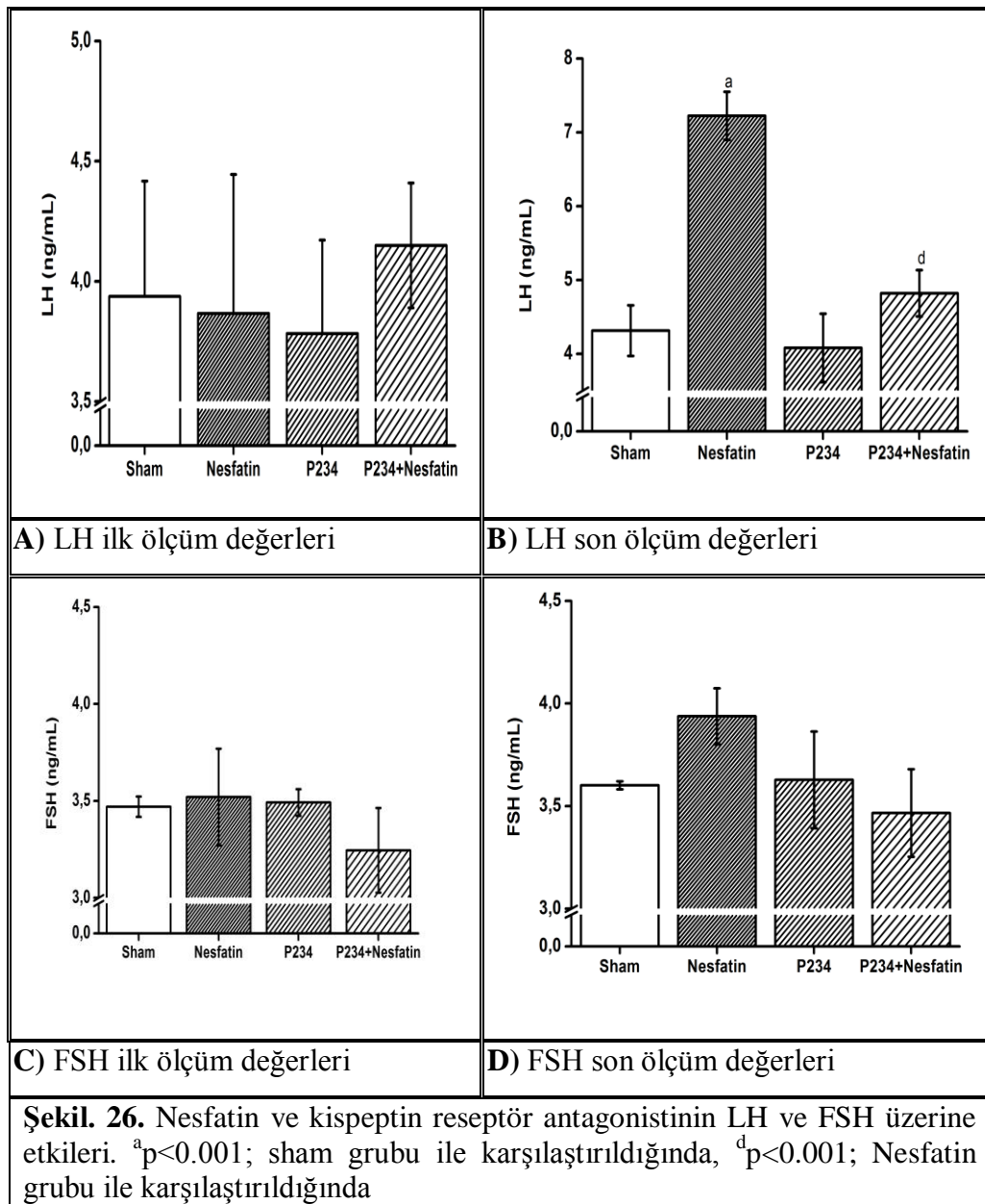


LH ile ilgili olarak ise, Sham grubu bazal düzeylerinin  $3,94 \pm 0,48$  ng/ml olduğu ve ICV çözücü uygulamasının 15 dakika sonrasında ise  $4,31 \pm 0,34$  ng/ml ortalamasıyla aynı seviyede olduğu görüldü. Kisspeptin grubu bazal değerlerinin  $4,32 \pm 0,41$ 'den  $8,28 \pm 0,64$ 'e istatistiksel bakımdan anlamlı derecede, yaklaşık iki kat, artış gösterdiği tespit edildi ( $p < 0,001$ ). P234 grubu LH düzeyleri bazal ve

ICV uygulama sonrası, sırasıyla,  $3,78 \pm 0,39$  ve  $4,08 \pm 0,46$  düzeyindeydi. Kisspeptin + p234 grubunda bazal LH düzeyi  $3,85 \pm 0,44$  ng/ml ve ICV enjeksiyon sonrası  $4,7 \pm 0,47$  ng/ml olan seviye bakımından fark yoktu. Fakat kisspeptin grubu ICV uygulama sonrası LH düzeyiyle ( $8,28 \pm 0,64$ ) kisspeptin ve reseptör antagonistinin kombinasyonu olan Kisspeptin + p234 grubunda ICV uygulama neticesindeki değer ( $4,7 \pm 0,47$ ) istatistiksel bakımdan anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0,001$ ), (Şekil 24 A-B).



RF9 grubunda bazal LH düzeyi  $3,94 \pm 0,23$ 'den  $7,66 \pm 0,7$  seviyesine anlamlı şekilde, yaklaşık iki kat, yükseldiği belirlendi ( $p < 0,001$ ). RF9 + p234 grubunda ise  $3,71 \pm 0,33$  ve  $5,08 \pm 0,35$  düzeylerinde olduğu, ICV enjeksiyon sonrası RF9 grubu ile RF9 + p234 ortalamaları kıyaslandığında ( $7,66 \pm 0,7$  ng/ml'den  $5,08 \pm 0,35$  ng/ml'ye), istatistiksel bakımdan anlamlı şekilde, azalma tespit edildi ( $p < 0,001$ ), (Şekil 25 A-B).



Yine nesfatin grubunda da bazal ve ICV uygulama sonrası önemli artış ( $3,87\pm0,58$ 'den  $7,23\pm0,33$ 'e) söz konusuydu ( $p<0,001$ ). Nesfatin+p234 grubunda bazal ve ICV uygulama sonrası LH düzeyleri, sırasıyla,  $4,15\pm0,26$  ve  $4,82\pm0,31$  düzeyindeydi. Nesfatin grubundaki ICV uygulama değeriyle ( $7,23\pm0,33$  ng/ml) kıyaslandığında, nesfatin ve kisspeptin reseptör antagonistinin birlikte ICV uygulandığı Nesfatin+p234 grubu düzeyinin ( $4,82\pm0,31$  ng/ml), istatistiksel bakımdan anlamlı şekilde, düşük olduğu tespit edildi ( $p<0,001$ ), (Şekil 26 A-B).

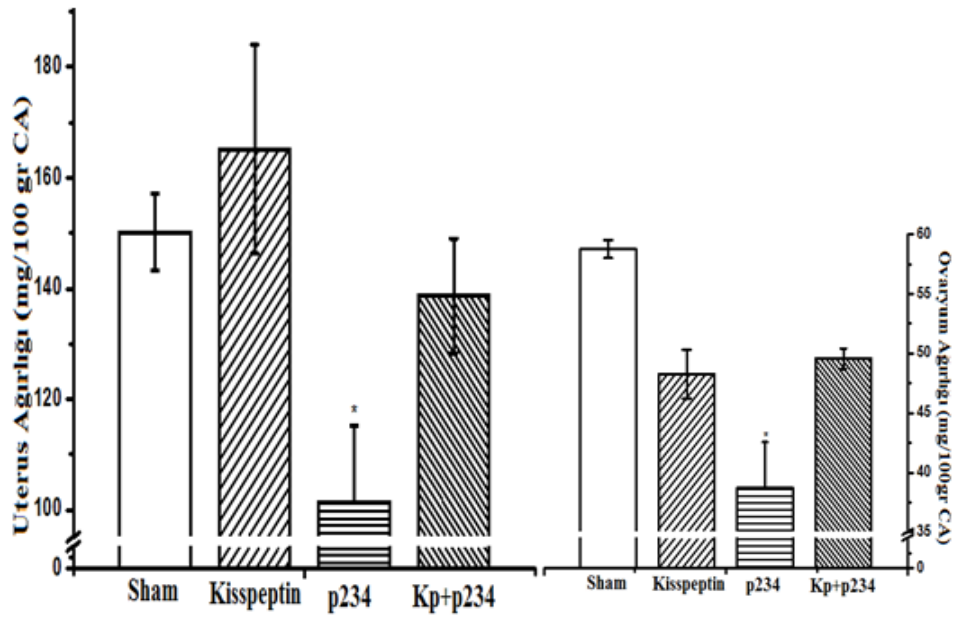
**Tablo. 9. Gonadotropin Seviyeleri**

Gruplar	LH SEVİYELERİ (ng/ml)		FSH SEVİYELERİ (ng/ml)	
	Bazal	ICV Enjeksiyondan 15 Dakika Sonra	Bazal	ICV Enjeksiyondan 15 Dakika Sonra
Sham	$3,94\pm0,5$	$4,31\pm0,3$	$3,5\pm0,1$	$3,6\pm0,02$
Kp	$4,32\pm0,4$	$8,28\pm0,6^a$	$3,7\pm0,3$	$4,28\pm0,41$
p234	$3,78\pm0,4$	$4,08\pm0,5$	$3,5\pm0,1$	$3,63\pm0,24$
Kp+p234	$3,85\pm0,4$	$4,7\pm0,5^b$	$3,4\pm0,3$	$3,68\pm0,19$
RF9	$3,94\pm0,2$	$7,66\pm0,7^a$	$3,7\pm0,2$	$4,45\pm0,14$
RF9+p234	$3,71\pm0,3$	$5,08\pm0,4^c$	$3,6\pm0,2$	$4,25\pm0,14$
Nesfatin	$3,87\pm0,6$	$7,23\pm0,3^a$	$3,5\pm0,3$	$3,94\pm0,14$
Nes+p234	$4,15\pm0,3$	$4,82\pm0,3^d$	$3,3\pm0,2$	$3,47\pm0,21$

<sup>a</sup> $p<0,001$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>b</sup> $p<0,001$ ; kisspeptin grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>c</sup> $p<0,001$ ; RF-9 grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>d</sup> $p<0,001$ ; Nesfatin grubu ile karşılaştırıldığında

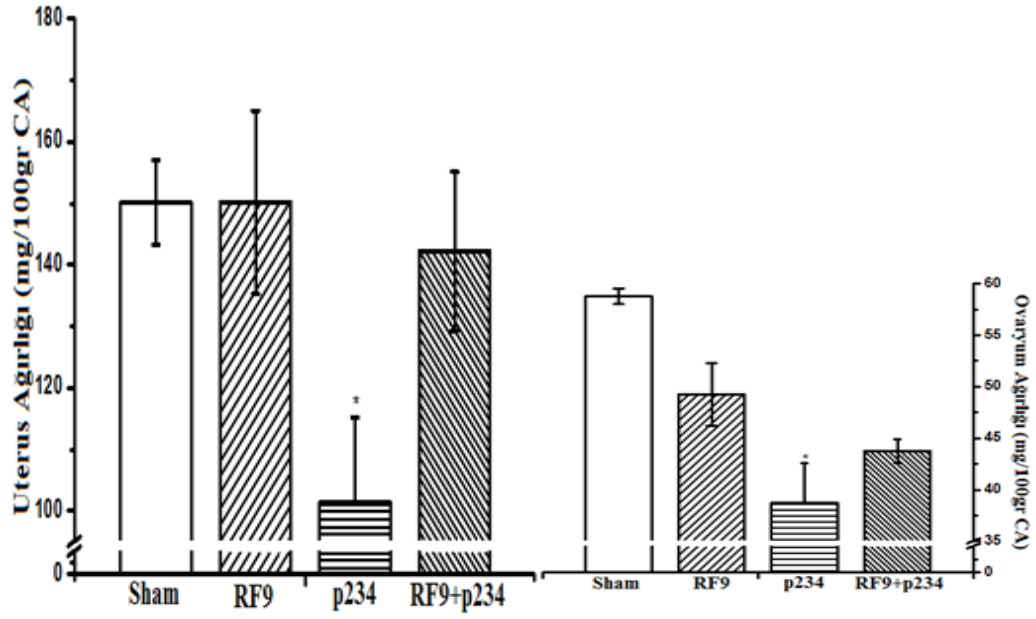
## 5.9. Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları

100 gram CA için uterus ve ovaryum ortalamaları tablo 10'da yer almaktadır. Sham grubuna göre kisspeptin grubu uterus ağırlığı yüksek olmakla birlikte, istatistiksel öneme sahip bir farklılık mevcut değildi ( $p>0,05$ ). Ancak p234 grubunda hem uterus hem de ovaryum ağırlığının sham grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ), (Şekil 27).

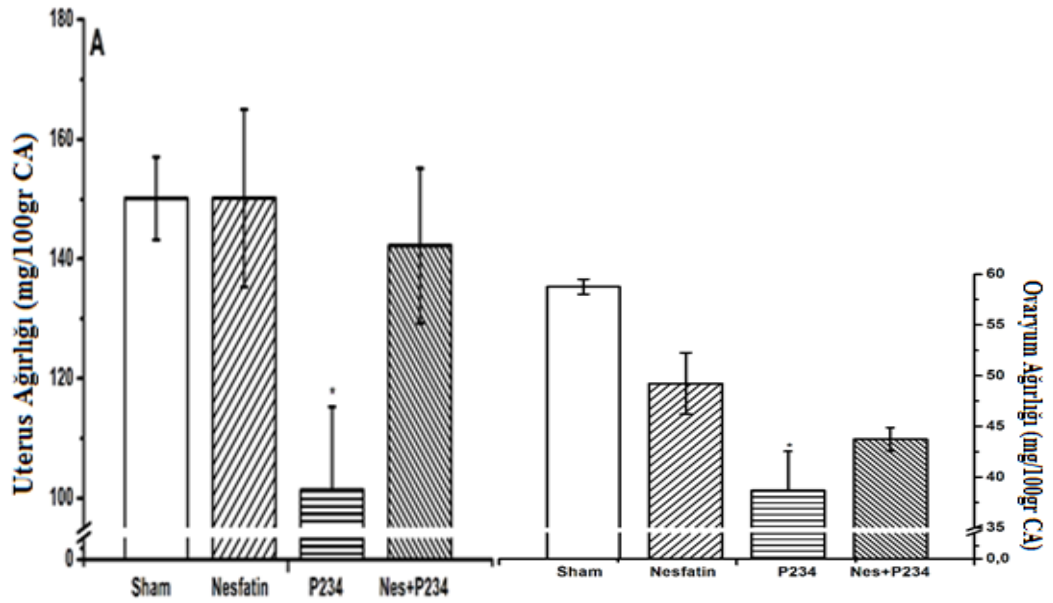


Şekil. 27. Sham, Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 Gruplarında Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları. \*:  $p<0,05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

RF9 (şekil 28) ve nesfatin (Şekil 29) gruplarında kontrole kıyasla belirgin bir fark olmamakla birlikte, nesfatin grubu uterus ağırlığının kontrol grubu ortalamasından yüksek olduğu görüldü ( $p>0,05$ ). RF9 ve nesfatin ile kisspeptin reseptör antagonisti uygulanan gruplarda uterus ağırlıklarının kontrole yakın değerde olduğu görüldü.



Şekil. 28. Sham, RF9, p234 ve RF9+p234 Gruplarında Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları. \*;  $p < 0.05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında



Şekil. 29. Sham, Nesfatin, p234 ve Nesfatin+p234 Gruplarında Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları. \*;  $p < 0.05$ ; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

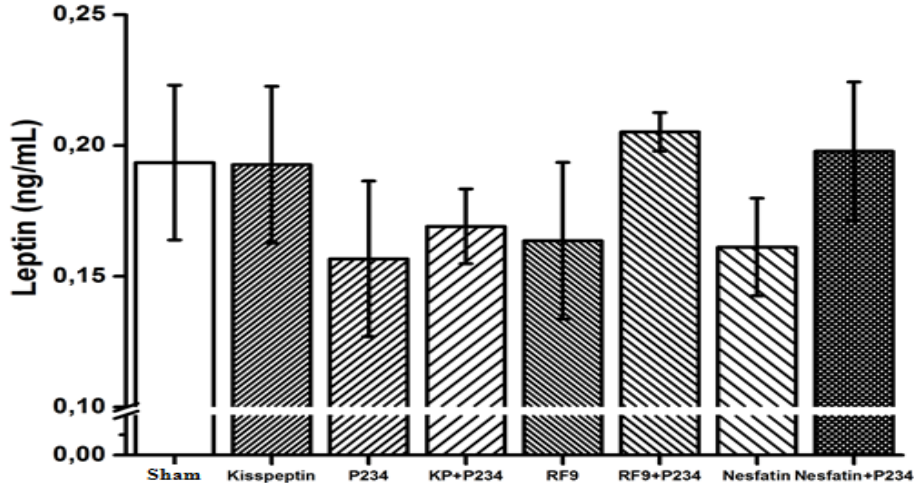
**Tablo 10.** Uterus ve Ovaryum Ağırlıkları

	<b>Uterus (mg/100gr CA)</b>	<b>Ovaryum (mg/100gr CA)</b>
<b>Sham</b>	150,1±6,9	58,8±0,8
<b>Kisspeptin</b>	165,2±18,9	48,3±2,1
<b>p234</b>	101,4±13,9*	38,7±3,9*
<b>Kiss+p234</b>	138,7±10,4	49,6±0,9
<b>RF9</b>	150,2±14,9	45,2±3,1
<b>RF9+p234</b>	142,2±12,9	43,7±1,2
<b>Nesfatin</b>	169,9±24,3	49,6±1,1
<b>Nes+p234</b>	149,4±20,4	54,1±4,5

\*p<0.05; Sham grubu ile karşılaştırıldığında

### 5.10. Serum Leptin Düzeyleri

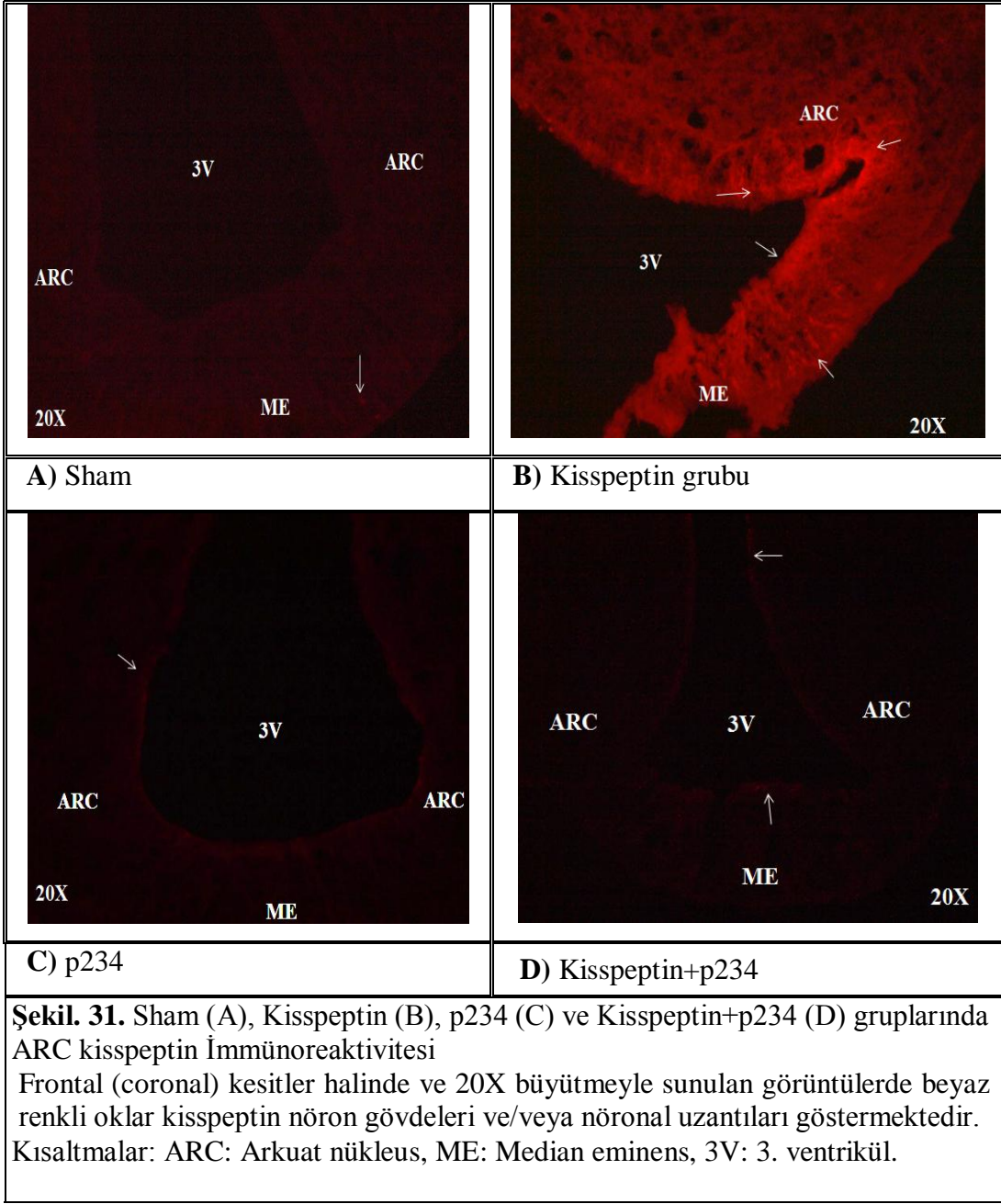
Serum leptin düzeylerine ait bulgular şekil 8’de gösterilmiştir. Grupların hiç birinde kontrol grubu değerlerine kıyasla önemli bir farklılık meydana gelmediği belirlendi. Kisspeptin grubu değerlerinin kontrol ile aynı seviyede, ancak p234, kisspeptin+p234 ve RF9 gruplarında nispeten düşük görülen ortalamaların, RF9+p234 grubunda ise yükselme eğiliminde olduğu görüldü (Şekil 30).

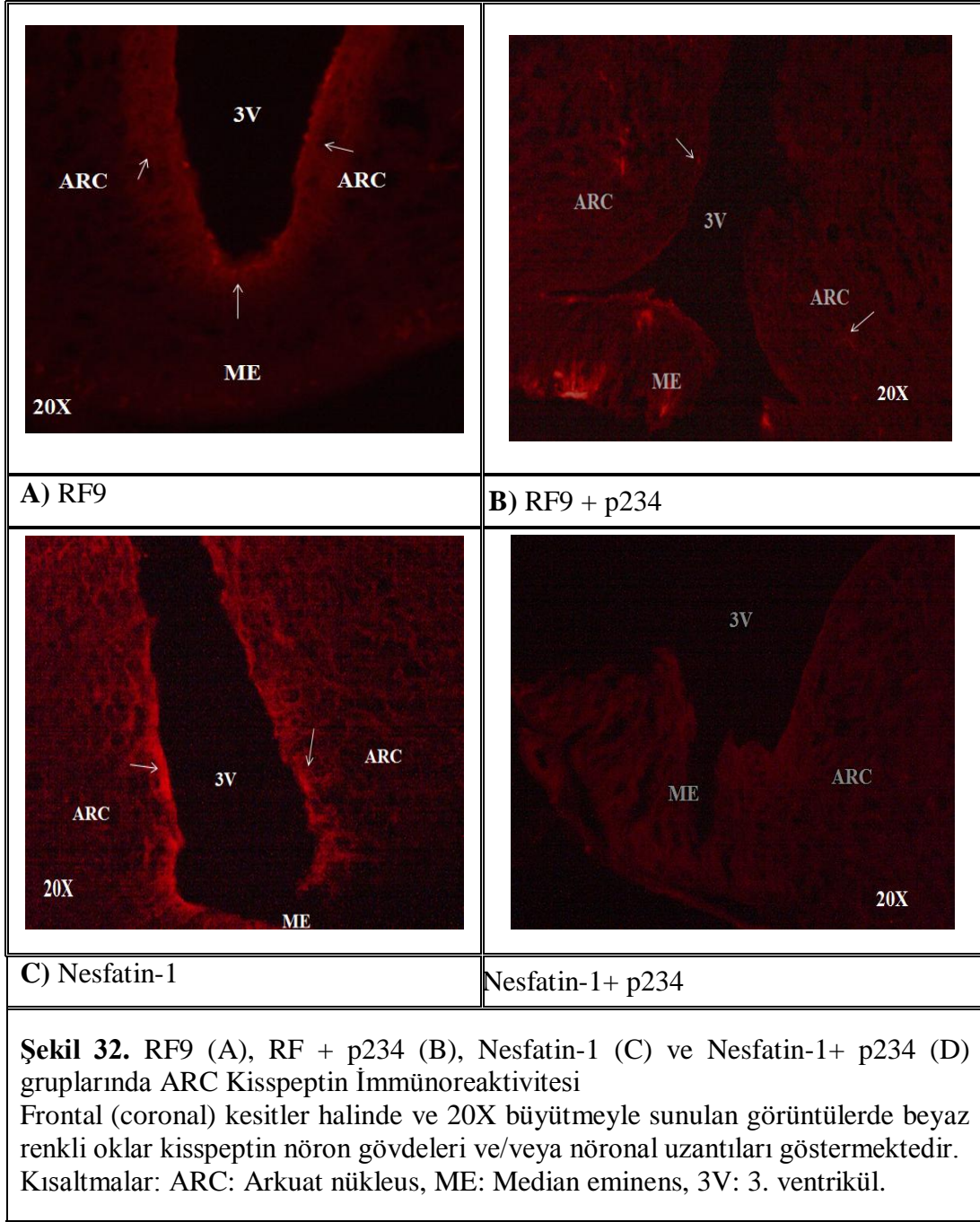


Şekil. 30. Serum Leptin Düzeyleri

### 5.11. ARC Kisspeptin İmmünoreaktivitesi

Kisspeptin grubunda kisspeptin uygulamasının ARC kisspeptin immünoreaktivitesini artırdığı (Şekil 31 B), Sham (Şekil 31A), kisspeptin reseptör antagonisti p234 grubunda (Şekil 31 C) ve kisspeptin+p234 grubunda (Şekil 31 D) bu yönde bir immünoreaktivitenin mevcut olmadığı görüldü. İlginç şekilde RF9 grubunda yoğun ARC kisspeptin immünoreaktivitesi oluştuğu (Şekil 32 A) ve kisspeptin reseptör antagonisti p234 ile immünoreaktivite yoğunluğunda baskılanma söz konusuydu (Şekil 32 B). Nesfatin grubunda ise kısmen artış gösteren immünoreaktivitenin daha ziyade 3. ventrikül etrafında kendini belli ettiği (Şekil 32 C), bununla birlikte nesfatin+p234 grubunda herhangi bir aktivasyon mevcut değildi (Şekil 32 D).





## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgular, gelişme periyodu sürecinde (puberte öncesi, puberte ve erişkinlik dönemlerinde) beslenme davranışı ve CA artışı üzerindeki değerlendirmeler, puberte yaşı ve ilk östrüs ile ilgili tespitlerin yorumlanması ve erişkin dönem gonadotropin sekresyonu ile ARC kisspeptin immünoreaktivitesinin analizini içeren, üç husus üzerine şekillendirilmiştir.

### 6.1. Beslenme Davranışı ve CA Artışı

#### 6.1.1. Kisseptinin Etkileri

İnsanlarda ve diğer canlılarda üreme ve neslin devamını sağlama doğuştan gelen ve ergenlik dönemi ile su yüzüne çıkan biyolojik bir özelliktir. Böylece yeryüzündeki her canlının, sınırlı bir ömre sahip olmasına karşın, neslini sürdürebilmesi söz konusudur. Bu nedenle üreme yeteneğinin devamı için fizyolojik işleyişinin aksamaması önem arz etmektedir. Nitekim günümüzde üremenin fizyolojik regülasyonunda enerji rezervinin rolü daha iyi anlaşılır hale gelmiştir. Bunun için kadınlarda hamilelik döneminde dengeli beslenmenin önemi ve doğum sonrasında bebeğin yeterli süt alabilmesini temin etme amacıyla enerji rezervini koruma gereksinimi örnek olarak verilebilir. Üstelik bu durum sadece insanlar için geçerli değildir. Cinsel olgunlaşma ile vücudun belli bir ağırlık ve büyüme oranı yakalaması arasındaki ilişki (181, 182) yeni bir bilgi değildir. Enerji dengesinin negatife kayması sonucu ergenlik yaşının geciktiği bilinmektedir.

Bununla birlikte aşırı yağlanma veya enerji dengesinin aşırı yükseldiği obezite gibi durumlarda ise fertilitede bozulma meydana gelmektedir (268). Aynı şekilde fazla yağlanma neticesinde çocuklarda puberte başlangıç yaşının düşmesi de bir başka patofizyolojik bir durumdur.

Kisspeptin ile ilgili çalışmaların reproduktif endokrin etkileri üzerine yoğunlaşmış olması, bu nöropeptid ile ilgili olarak ilk yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla ilgili olabilir. Nitekim Kiss1 veya GPR54 mutasyonlu farelerin aynı doğum yaşına sahip intakt farelere göre vücut ağırlığı bakımından farklı olmadığı (144), santral kisspeptin enjeksiyonu sonrasında gıda alımı, vücut ağırlığı ve NPY, AgRP, POMC ve CART gibi iştahla ilgili hipotalamik nöropeptidlerin ekspresyonunun değişmediği (178) şeklindeki raporlar, günümüzde yeniden yorumlanmakta ve aksi yöndeki çalışmaların sıklığı artış göstermektedir. Örneğin Kiss1 veya GPR54 mutasyonlu farelerin tam erişkinliğe ulaşmadan değerlendirme yapıldığı ve diğer metabolik sonuçlarla ilişkili parametrelerin yeterince irdelenmediği anlaşılmıştır (269). Ayrıca kisspeptin nöronal uzantılarının ARC'deki NPY/AgRP ve POMC/CART ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (270). Konuyla ilgili olarak elektrofizyolojik çalışmalarda kisspeptinin POMC/CART nöronlarını direkt olarak uyardığı, NPY/AgRP nöronlarını ise GABA aracılı indirek mekanizma ile inhibe ettiği tespit edilmiştir (271). Bu verileri doğrular nitelikte, ICV kisspeptin uygulamasının farelerde öğün aralıklarının uzamasına ve gece periyodunda gıda alımında azalma oluşturduğu bildirilmiştir (272). Fakat koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada ICV kisspeptin infüzyonunun POMC inhibisyonu ve NPY mRNA artışı ile sonuçlanan etki oluşturduğu ifade edilmiştir (270). Ancak kisspeptinin

infüzyon tarzında santral uygulanmasının antagonistik etkiye sebep olabileceği için, bu tür infüzyon tarzı sürekli uygulama neticesinde, elde edilen bulguların tam tersi şekilde yorumlanması gerekmektedir. Çünkü sürekli tarzda kisspeptin verilmesiyle kisspeptin reseptörü aracılı GnRH salınmasında (153) ve GnRH nöronlarında kisspeptin reseptör ekspresyonunda azalmaya yol açarak (273) bir nevi duyarsızlık (desensitizasyon) geliştiği ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda puberte öncesi dönemden erişkin döneme kadar gıda alımının değerlendirilmesi sonucunda, kisspeptin grubundaki hayvanların kontrol grubundakilere nazaran nispeten daha düşük yem tüketim profiline sahip oldukları görüldü. İstatistiksel öneme sahip azalmanın prepubertal/pubertal dönemden puberte sonrası 45. güne kadar uzandığı belirlendi. Erişkinlik döneminden itibaren ise gıda alımındaki azaltıcı etkinin tedricen zayıfladığı görüldü. Deneylerimizde bakış açısı zenginliği bakımından antagonistler de kullanılmıştır. Kisspeptin antagonistinin puberte öncesi ve puberte sürecinde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, gıda alımında artış eğilimi yönünde bir profil meydana getirdiği, bu durumun erişkinlik dönemine doğru kontrol grubu yem tüketimi ortalamalarıyla aynı düzeye geldiği ve 60. güne yaklaştıkça bu etkinin daha da belirginleştiği görüldü. Bu sonuç kisspeptinle elde edilen tüketim profilinin tam tersi olması bakımından birbirini doğrular niteliktedir. Buradan hareketle, kisspeptinin puberte döneminde anoreksijenik etkisinin erişkinlik dönemine doğru zayıfladığını söyleyebiliriz. Ayrıca Kisspeptin+p234 grubunda kontrol grubuyla aynı oranlarda yem tüketildiğini de hatırlatmak faydalı olacaktır. Beslenme davranışı ile ilgili bir parametre olarak su alımı üzerine etkisi bakımından hem kisspeptin hem de reseptör antagonistinin anlamlı etkileri tespit edilmedi. Ancak kontrol grubundaki

su tüketimi ortalamalarına göre kisspeptin grubunda pubertal dönemde aynı olan değerlerin prepubertal ve erişkin dönemlerde nispeten daha az olduğu görüldü. P234'de ise pubertal dönemin sonlarına kadar göreceli yüksek olan su tüketim miktarının, puberte dönemi sonlarından erişkinlik dönemine kadar kontrol grubuyla aynı seviyede olduğu belirlendi. İlginç olarak, Kisspeptin + p234 grubunda puberte döneminde su tüketiminin nispeten düşük olduğu görüldü. Ancak puberte öncesi ve puberte dönemlerinde göre artma ve azalma şeklinde devam eden eğilimin erişkin döneme doğru kontrol grubu değerleriyle paralellik gösterdiği belirlendi. Hem besin hem de su alımı ile ilgili verilere CA sonuçları ile eş zamanlı değerlendirmeye tabi tutmak, bulguların değerini tespit açısından yerinde bir uygulama olacaktır. Kisspeptin uygulanan hayvanların puberte öncesi dönemi de içeren pubertal periyotta ve puberte sonrası dönemden erişkinlik dönemine kadar uzanan süreçte, kontrol grubu hayvanlara göre anlamlı düzeyde, daha düşük CA ortalamalarına sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlar kisspeptinle ilgili olarak prepubertal, pubertal ve erişkin dönemin, beslenme davranışı ve vücut ağırlığı bakımından, değerlendirilmesinin yapıldığı ilk veriler olması nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir. Kisspeptin antagonistinin uygulandığı grupta ağırlık artışı oranı nispeten biraz daha düşük olmak birlikte kontrol grubu değerlerine yakın düzeylerde ve Kisspeptin + p234 grubunda ise 34 günlük takip sürecinde CA ortalamalarının kontrol grubuyla aynı doğrultuda olduğunu da göz önünde bulundurarak, kisspeptinin anoreksijenik etki potansiyeline sahip olduğunu söyleyebiliriz. Arc nükleustaki NPY/AgRP nöronlarına komşu POMC/CART nöronlarının etkinliği gıda alımı ve enerji harcanmasının kontrolünde anoreksijenik etkinin ortaya çıkmasını temin eden primer düzenleyici faktördür

(274). Konuyla ilgili olarak, POMC/CART nöronlarının kisspeptin nöronlarına projeksiyonlar gösterdiği koyunda (270) ve farelerde (275, 276) yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Ayrıca farelerde kisspeptin nöron alt tiplerinin MCR4 ekspresse ettiği de belirlenmiştir (275). Kiss1-GFP farelerde elektrofizyolojik çalışmalar sonucunda ARC nükleustaki kisspeptin nöronlarında CART uygulamasının postsinaptik depolarizasyon oluşturduğu belirlenmiştir (276). 2014 yılında yapılan bir çalışmada, kisspeptin reseptör mutasyonu oluşturulmuş (Kiss1r KO) farelerin, aynı süreçte doğan, intakt ve heterozigot kontrol grubundaki hayvanlarla vücut ağırlık artışı, 4 haftalık dönemden sonra, hem dişi hem de erkeklerde kıyaslanmıştır. Dişi farelerin yaklaşık 8-10 haftalık periyoda kadar kontrol grubundakilerle aynı vücut ağırlığına sahip olmalarına rağmen, bu dönemden sonra anlamlı şekilde, hem intakt ve heterozigot kontrol grubundaki hayvanlara göre daha fazla canlı ağırlığa sahip oldukları rapor edilmiştir (277). Hayvanlar 5 aylık olduklarında ise Kiss1r KO farelerin diğer kontrol gruplarına göre %30 gibi yüksek bir oranda CA artışına sahip oldukları ve bu süreçte kontrol olarak kullanılan intakt ve heterozigot grubunda farklılık tespit edilmediği ifade edilmiştir. Araştırmanın en ilginç sonucu ise, Kiss1r KO farelerin dişilerinde obezite gelişmesine karşın, erkeklerde CA düzeyinin intakt ve heterozigot kontrol grubundaki hayvanlara göre benzer olmasıdır. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz verileri desteklemektedir. Araştırmamızda puberte öncesi ve puberte döneminde de CA azalması meydana geldiğinin tespit edilmesi, puberte ve sonrası metabolik regülasyonun santral ve periferik düzenlenmesi ile ilgili farklı modellerle araştırmalar yapılarak yorumlanması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çünkü kisspeptin reseptörü hem pankreas (85) hem de yağ dokuda

(278) ekspresse edilmektedir. Araştırmamızda kisspeptin uygulanan grupta leptin seviyesinde kontrole göre önemli bir değişiklik meydana gelmediği görüldü. Fakat kisspeptin reseptör antagonisti uygulamasının leptin düzeyinde göreceli bir düşüşe sebep olduğu ve kisspeptin+p234 grubunda ise ortalamanın kontrol değerlerine yaklaştığı belirlendi. Oysaki kisspeptin reseptör mutasyonu oluşturulmuş transjenik dişi farelerde, 19-21 haftalık yaş periyodunda yapılan değerlendirmede, yağ kütlesi artışı ve belirgin hiperleptinemi tespit edilmiştir. Serum leptin konsantrasyonunun intakt kontrole göre % 450'den fazla artış göstermiş olması dişilerde leptin direnci meydana gelmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (277). Araştırmamızda pankreas hormonları ve yağ doku leptin ekspresyonuna yönelik değerlendirme yapmadığımızdan dolayı bu durumun ileriki çalışmalarla irdelenmesi önem arz etmektedir. Aynı model üzerinde erkek fareler için kilo farkı olmaksızın, yağ kütlesinde artış ve yağsız kütle miktarında azalma ve belirgin hiperleptinemi (%300) ortaya çıkmasının da yağ doku artışının bir sonucu olabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca bu modelde (Kiss1r KO) diyabetik fenotip gelişme ihtimalini değerlendirmek için, 18-20 haftalık dişi ve erkek farelerde, glikoz seviyeleri de değerlendirilmiştir. Kiss1r KO dişilerin intakt kontrol ve heterozigot kontrol gruplarına göre daha yüksek açlık kan glikoz düzeyi ve glikoz toleransında bozulma olduğu, fakat erkek fareler için aynı durumun geçerli olmadığı ifade edilmiştir. Kiss1r KO dişilerde meydana gelen obezitenin, beslenme davranışında artış olmasının bir sonucu olup olmadığını değerlendirmek için yem alımı takibi de gerçekleştirilmiştir. İlginç bir sonuç olarak, dişi farelerde obezite gelişmesine karşın yem alımının intakt ve heterozigot kontrol gruplarına göre önemli düzeyde azaldığı, bu durumun yüksek leptin düzeyinin bir yansıması

ve santral leptin direnci nedeniyle meydana gelmiş olabileceği rapor edilmiştir (277).

Bugüne kadar KISS1 ve KISS1R mutasyonu tespit edilen insanlarda infertilite problemlerinin (89, 90, 139, 279, 280) dışında, obezite veya beslenme davranışı ile ilgili her hangi bir bulgu rapor edilmemiştir. Doğal olarak, bu etkileşim göz ardı edilmiştir. Oysaki bu hastaların, mutasyon tespiti edilene kadar devam eden şikayetleriyle ilgili olarak, ne tür ilaç ve/veya hormon replasman tedavisi aldıkları bilinmemektedir. Genelde bu hastalar çocukluk döneminde oldukları için de puberte süreci sonrasında erişkin dönem metabolik durumları hakkında elimizde veri mevcut değildir. Giriş bölümünde ‘Kisspeptinin üremenin metabolik düzenlenmesindeki rolü’ başlığı altında literatür değerlendirmeleri eşliğinde dikkat çekmeye çalıştığımız ve araştırmamızın önemli bölümünü oluşturan hedeflerden birisi ‘üreyebilmek için kontrol merkezinin yeterli enerjiye sahip olduğuna yönelik sinyaller almasında ve sonrasında üreme organlarına komut verme sürecinde beslenme davranışı ve gonadotropinlerin etkileşimi üzerine uyarıcı ve inhibe edici nöropeptidlerin etkileşimini tespiti’ üzerinedir. Çünkü üreme ve pubertenin başlamasında başrollerden birine sahip olarak görülen bir hormonun, ait olduğu organizmanın üreyebilme ile ilgili enerji rezervine sahip olup olmadığından bihaber, etkin duruma geçmesi, aktivasyonunu azaltması veya bu etkileşimlerden uzak işleyiş göstermesi mümkün görünmemektedir. Buradan hareketle, dişi sıçanlarda prepubertal, puberte ve erişkin dönemi içeren süreçte vücut ağırlığı ve gıda alımı ile kisspeptin arasındaki ilişki ilk kez sorgulanmıştır. Doğum sonrası 26. günden itibaren 60 günlük erişkinlik dönemine kadar kisspeptinin vücut ağırlığı üzerine negatif etkisi söz konusuysen, su alımına etki

etmediği ancak gıda alımını, özellikle erişkinlik dönem öncesinde (postnatal 45. güne kadar) daha kuvvetli olmak üzere, baskıladığı görülmüştür. Erişkin dönem öncesi beslenme davranışının düşük seviyede fakat erişkinliğe doğru gıda alımındaki baskılayıcı etkinin tedrici şekilde zayıflamasının puberte döneminde kisspeptin nöronların aktivasyonunda meydana gelen artışın bir yansıması olduğunu söyleyebiliriz. Puberte ve üreme ile ilgili bu süreçte, kisspeptinin sadece reproduktif işleyişte değil aynı zamanda enerji dengesine ve metabolik regülasyona yönelik santral ve periferik fizyolojik sinyallerin etkinliğinde de rol sahibi olabilir.

### **6.1.2. RF9'un Etkileri**

GnIH/RFRP-3'ün kuşlarda (118, 119) ve kemirgenlerde (80, 82, 120) gıda alımını uyarıcı etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Kuşların dışındaki canlılardan elde edilen veriler, kimi zaman birbiriyle uyum göstermediği için insan dahil diğer memeli canlılara yönelik etki değerlendirmesi uzun süre yerinde saymıştır. Bu durumun ortaya çıkmasında GnIH/RFRP-3'ün etkisinin özellikle mevsimsel üreyen canlılarda daha belirgin ve üreme sezonu ile üreme dönemi dışında farklılık arz edebilmesi ile ilişkilidir. Mevsimsel üreme özelliği gösteren Sibirya hamsterlerinde üreme sezonlarına göre LH salınmasında GnIH uygulamasıyla birbirine zıt etkiler oluşabildiği görülmüştür (108). Bu durum, farklı fizyolojik şartlarda RFRP-3'ün üreme fonksiyonu üzerindeki rolünün değerşkenlik gösterebileceğine işaret etmektedir. Yine gıda alımı ile elde edilen verilerin sağlandığı kemirgenlerin bir bölümü (Suriye veya Sibirya hamsteri) mevsimsel

üreme özelliğine sahip kemirgenler olduğu için bu durumu hatırd tutmakta fayda vardır. Günümüze kadar GnIH'nin insanlardaki rolü yukarıda saydığımız gerekçelerden dolayı nispeten zayıf kalmıştır. Fizyolojide, yapıların fonksiyonel özellikleri önem arz ettiği için, etki değerlendirilmesinde söz konusu yapı ve yapıya ait fizyolojik ürünlerin analizinde konsantrasyon değişikliği veya ürünü ortamdandan kaldırarak oluşan tablonun değerlendirmesiyle fizyolojik roller tanımlanmaya çalışılmaktadır. GnIH/RFRP-3 ile ilgili olarak RF9 isimli antagonist tanımlanmaya kadar insan fizyolojisine yönelik muhtemel etkilerin deneysel gözlemi çok sağlıklı yürütülemediği. Ancak RFRP'lerin üyesi olduğu RFamid ailesine ait reseptörlerin farklı gruplardaki endojen nöropeptidlerle etkileşebilmesinden dolayı RF-9'un antagonistik potansiyeli ile ilgili değerlendirmeler devam etmektedir.

Kanatlı GnIH'nin insan dahil memeli canlılarda eş değeri olarak kabul edilen RFRP-3 (NPVF) ve kısmen RFRP-1 (NPSF) için tanımlanan reseptörler Nöropeptid FF grubu üyesi NPFF ve NPAF peptidlerine ait reseptörlerdir. NPFF ve NPAF aynı prekürsür proteinden işlenmesine karşın, RFRP-1 ve RFRP-3 farklı prekürsürden meydana gelmektedir (91, 97, 281, 282). Ancak her iki gruba ait peptidlerin NPFF1 (GPR147) ve NPFF2 (GPR74) reseptörlerine bağlanmaları söz konusu olmasına karşın, RFRP'lerin NPFF1 reseptörüne daha yüksek affiniteye sahip olduğu, NPFF grubu peptidlerin ise tercihen NPFF2 reseptörüne bağlandıkları ileri sürülmektedir (100). Bu karşılıklı bağlanma ilişkisinin, G proteini ile etkileşen reseptör ailesinin üyesi ve yaklaşık %50 oranında benzer olan reseptörlere sahip oldukları için (97, 98, 283, 284) meydana gelmesi muhtemeldir. Bu durum, *in vitro* şartlarda NPFF1 (GPR147) ve NPFF2 (GPR74)

için tespit edilmiştir. İlginç şekilde ailenin diğer üyeleri olan, QRFPR, PrRPR ve Kiss1r'nin (eski ismiyle GPR54) kendi endojen peptidleri için yüksek düzeyde seçici oldukları belirlenmiştir (285). Örneğin PrRP grubu peptidleri NPFF2 (GPR74) reseptörüne de NPFF grubu üyelerine yakın oranda bağlanabilmesine karşın (286), PrRP reseptörü sadece PrRF ve analoglarına cevap vermektedir (286, 287). 2006 yılında, güçlü ve seçici özellikte sentez ürünü, RF9 (1-adamantanecarbonyl-RF-NH<sub>2</sub>) NPFF reseptörlerinin antagonisti olarak, tanımlanmıştır (100). Dolayısıyla GnIH/RFRP-3'de NPFF reseptörüne bağlandığı için RF9, RFRP-3 reseptör antagonisti olarak, RFRP-3/GnIH'nin fizyolojik rolü ile ilgili veri elde etmesine yönelik önem taşımaktadır.

Araştırmamızda özellikle puberte dönemi sonrasındaki 42. günden 60. güne uzanan periyotta 10 nmol dozda uyguladığımız RF9 grubunda gıda alımında azalma meydana geldiği belirlendi. İlginç şekilde, prepubertal dönemde kontrol grubuyla aynı düzeyde seyreden tüketimin pubertal dönemle birlikte azalma eğilimini artırarak devam ettiği görüldü. Bununla birlikte su tüketiminde kayda değer herhangi bir farklılık gözlemlenmezken, CA artışı bakımından kontrol grubuna nazaran nispeten daha düşük olmakla birlikte önemli bir değişim belirlemedi. Konuyla ilgili olarak fareler üzerinde yapılan bir çalışmada RF9'un 30 nmol ICV ve derialtı 10 mg/kg dozda uygulamasının gıda alımını azaltıcı etki oluşturduğu bildirilmiştir (288). Ancak adı geçen çalışmada farelere göre hem ICV hem de derialtı enjeksiyon için oldukça yüksek dozda RF9 uygulandığı ve 17 saatlik yem kısıtlamasından sonra iştahla ilgili değerlendirme yapıldığı görülmüştür. Dolayısıyla su tüketimi veya CA kazanımı gibi faktörler değerlendirilmemiştir. Üstelik 17 saatlik gece aç bırakma protokolünden sonra

sadece 5 saatlik zaman dilimindeki iştahın belirlenmiş olması, araştırmamızla uyumlu veriler elde edilmiş olmasına rağmen, değerlendirme bakımından verilerimizi bu yönüyle çok fazla analiz etme olanağı tanımamaktadır. Ancak NPPF agonisti ile birlikte RF9’un etkilerinin sorgulanmış olması, yukarıda bahsettiğimiz reseptör etkileşimlerine ışık tutması bakımından önemlidir. Nitekim aynı çalışmada NPPF agonisti ([Tyr<sup>1</sup>]NPPF, 10 nmol dozda) uygulaması neticesinde de, RF9 da olduğu gibi, gıda alımını azaltıcı etki meydana geldiği bildirilmiştir. Dolayısıyla araştırmacılar, RF9 ile ilgili olarak elde ettikleri MAPK (mitogen-activated protein kinases)/ ERK (extracellular signal-regulated kinases) 1/2 fosforilasyonu ile ilgili *in vitro* etkileşimlere de dayanarak, NPPF reseptörleri aktivasyonu bakımından antogonistik etkiden ziyade agonistik bir durumun söz konusu olduğunu ileri sürmüştür (288). Bu sonuç ‘RF9’un gonadotropin sekresyonuna etkisi’ bölümünde dile getirdiğimiz, RF9 ve dolayısıyla GnIH/RFRP-3 ekseninde henüz tanımlanmamış farklı etkileşimlerin söz konusu olabileceği, yönündeki görüşümüzle aynı doğrultuda olması bakımından önemlidir. RF9’un yapısal olarak NPY reseptörü alt tipi Y1 antagonisti (BIBP3226) ile benzer olduğu ve BIBP3226’nın NPPF reseptör alt tiplerine bağlanabilmesinden dolayı aynı G proteini ailesine mensup kisspeptin reseptörü bakımından da bu durumun söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Fakat aynı iddianın dile getirildiği çalışmada böyle bir sonucun görülmediği de ilave edilmiştir (100). Daha spesifik çalışmalarla bu tür etkileşimlerin sağlam şekilde tespitine yönelik çalışmalara ihtiyaç olduğu ortadadır. Araştırmamızda, RF9’un gıda alımındaki, özellikle erişkin döneme doğru baskınlaşan, azaltıcı etkisine yukarıda değinilmiştir. Bununla birlikte RF9 + p234 grubunda ise kontrole göre

beslenme davranışında anlamlı herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Kisspeptin reseptör antagonistinin ilavesiyle tablonun değişikliğe uğraması yukarıdaki tespitlerimizi kuvvetlendirmektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada GnRH nöronlarının RF9 ile uyarılabildiği ve bu etkide NPFF1 reseptöründen başka reseptör grubunun da pay sahibi olabileceği ifade edilmiştir. Çünkü sadece %20-30 civarında GnRH nöronunda NPFF1 ekspresyonu mevcut iken RF9 uygulaması ile bu nöronların %70'den fazlasının uyarılabilmesini (289) başka türlü izah etmek güçtür. Ayrıca araştırmacıların kisspeptin reseptörü olmayan GnRH nöronlarında RF9 uygulandığında uyarım oluşmadığını tespit etmesi (289) RF9 ve kisspeptin reseptör antagonisti ile ilgili elde ettiğimiz verileri ve yorumları desteklemektedir.

### **6.1.3. Nesfatin-1'in Etkileri**

Birçok araştırmacı tarafından nesfatinin beslenme davranışına etkisinin yanı sıra doz-cevap ilişkisi ve farklı beyin bölgelerine enjeksiyon sonrası etki potansiyeli de değerlendirilmiştir. Lateral ve 4. ventriküle 5-20 pmol'lük nesfatin-1 enjeksiyonu sonrasında kemirgenlerde karanlık faz gıda alımının azaldığı (290-297) belirlenmiştir. Ayrıca lateral ventriküle 5 pmol'lük enjeksiyon sonrasında yem alımında 3 saate varan azalma meydana geldiği ve 25 pmol'lük dozda ise gıda alımında 6 saati aşkın süre boyunca baskılanma rapor edilmiştir (291, 296). Nesfatin-1 ile ilgili olarak henüz tanımlanmış spesifik bir reseptör mevcut olmadığından dolayı antagonist geliştirilememiştir. Bunun yerine nesfatin için geliştirilen as-MON kullanılarak, nesfatinin etkisi ortadan kaldırıldığında ortaya

çıkan tablo değerlendirilmektedir. Bu yönde yapılan bir çalışmada ICV nesfatin as-MON uygulamasının puberte dönemindeki dişi sıçanlarda yem alımını ve vücut ağırlığını değiştirmediği bildirilmiştir (246). Araştırmacılar daha ziyade puberte yaşını belirlemek için deney düzeneği oluşturdukları için sadece postnatal 28-35. günler arasında gıda alımı değerlendirmesi yaptıkları gibi, ayrıca etki kıyaslaması için nesfatin grubu çalışmada yer almamıştır.

Araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre, nesfatin puberte öncesi dönemden itibaren erişkinlik periyoduna kadar 34 günlük uygulama periyodunda, gıda alımında belirgin derecede azalma oluşturmaktadır. Nesfatinin beslenme davranışını baskılayıcı etkisinin, leptin reseptör mutasyonlu canlılarda da ortaya çıkmasından dolayı, leptinden bağımsız olduğu belirlenmiştir (225, 290). Ayrıca leptin uygulamasının hipotalamik NUCB2 mRNA ekspresyonuna etki etmediği ileri sürölmektedir (225). Çalışmamızda, nesfatin grubunda leptin seviyesinde herhangi bir anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir. Gıda alımında azalmayla birlikte nesfatin grubu CA ortalamasının 26. günden 60. güne kadar kontrol grubuna göre önemli şekilde daha düşük olduğu göröldü.

Nesfatin-1'in iştahi baskılayıcı etkisi oldukça açık olmasına rağmen, etki mekanizması iyi anlaşılamamıştır. Nitekim yukarıdaki lateral ventrikülle ilgili sonuçlara ilave olarak, 3. veya 4. ventriküle ya da sisterna magna'ya nesfatin enjekte edildiğinde 1 saat boyunca besin alımını azaltmaktadır (225, 291). Göröldüğü üzere değişik beyin ventriküllerine uygulama sonrası aynı nöropeptidin etki gücünde farklılık meydana gelebilmektedir. Hipotalamik alanlardan, PVN'ye mikroenjeksiyonu ile karanlık faz beslenmesinde 1 saatten 5 saate varan sürelerde azalma meydana gelebilmektedir (290). Ayrıca aynı etki için

lateral ventriküle daha yüksek konsantrasyonda nesfatin verilmesi gerekliliği oysaki VMN ve subfornikal organa enjekte edildiğinde ise herhangi bir etki oluşmadığı bildirilmektedir (298, 299). Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin ortaya çıkması için en düşük dozda (5 pmol) en verimli etkinin PVN'de meydana geldiği ileri sürülmektedir (299). Beynin diğer alanlarıyla ilgili nesfatin-1'in beslenme davranışında ve üreme ile ilgili fizyolojik rolü gün yüzüne çıkarılmayı beklemektedir.

3. ventriküle nesfatin enjeksiyonu PVN'deki oksitosin nöronlarında c-Fos artışı meydana getirmektedir (290). Ayrıca 4. ventriküle oksitosin reseptör antagonisti H4928 enjeksiyonu sonrasında nesfatin-1'in iştah baskılayıcı etkisinin ortadan kalktığı ileri sürülmektedir (290, 294). NTS'deki oksitosinerjik sinir sonlanmalarının PVN'den bu alana uzanmaları ve POMC nöronlarına yakın yerleşim göstermeleri (300) anoreksijenik etkide, POMC'den enzimatik yıkımlanma ile türeyen ve melanokortin 3/4 reseptörünün endojen ligandı olan (301),  $\alpha$ -MSH ve/veya reseptörü ile birlikteliğin söz konusu olabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Nitekim hem 3. ventriküle hem de diğer beyin ventriküllerine MCR 3/4 antagonisti (SHU9119) enjeksiyon sonrası nesfatinin anoreksijenik etkisinin tümüyle ortadan kalktığı ifade edilmektedir (225, 293). Ayrıca 3. ventriküle  $\alpha$ -MSH enjeksiyonu ile PVN'deki NUCB2 mRNA ekspresyonu artış göstermektedir (225). Nesfatinin ARC hücre kültürüne uygulandığında oreksijenik bir peptid olan NPY-pozitif nöronlarda hiperpolarizasyon oluşturması (235) hem anoreksijenik etki mekanizması ile ilgili hem de üreme ve puberte üzerine fonksiyonuna dair, sorgulanması gereken, önemli bir ipucudur.

Çalışmamızda nesfatin ile birlikte kisspeptin reseptör antagonisti uygulamasında ise nesfatin-1'in tek başına uygulandığı grupta meydana gelen kuvvetli anoreksijenik etkinin Nesfatin + p234 grubunda zayıfladığı belirlendi. 34. günden 44. güne kadar istatistiksel olarak kontrole göre yem tüketim miktarları anlamlı derecede düşük olmasına karşın, erişkin döneme doğru gıda alımındaki azaltıcı etkinin güç kaybettiği belirlendi. Kisspeptin reseptör antagonisti ile birlikte uygulanan grupta, nesfatinin anoreksijenik etkisinin değişikliğe uğramış olması, bu nöropeptidin kisspeptin ile direk veya dolaylı işbirliğinin söz konusu olabileceğine işaret etmektedir. Bu ihtimale dair ne yazık ki araştırmamızın bulguları dışında verilebilecek örnek bulunmamaktadır. Bu durum şimdiye kadar ya kisspeptin-nesfatin ilişkisinin sorgulanmamış olmasından ya da elle tutulur bir veri elde edilemeyişinden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle beslenme davranışı ile ilgili olarak nesfatin-1'in etkisinin kisspeptin reseptör antagonisti ile değişiyor olması, farklı metot ve uygulamalar ile sorgulanması gereken, önemli bir bulgudur. CA kazanma oranları bakımından nesfatin + p234 grubu değerlerinin kontrole göre düşük olmakla birlikte, 26. günden 38. güne kadar nesfatin grubu değerlerine göre daha yüksek olan CA artışının, 39. günden itibaren belirgin bir düşme eğilimi göstermeye başladığı görüldü.

Gıda alımı üzerine inhibitör etkisi uzun zamandır bilinen CRF<sub>2</sub> (302, 303) ile nesfatin arasında ilişkinin sorgulanması üzerine, bu peptidin 3. ventriküle enjeksiyonu ile PVN'deki CRF içeriğinin artış gösterdiği (304), ayrıca in vitro şartlarda PVN nöronlarında CRF pozitif nöron uyarımı ile nesfatin uygulaması arasında pozitif ilişki belirlenmiştir (305). Bu durum in vitro olarak (hipofiz

kültürü) gözlenmemiş olsa da, ICV nesfatin-1 enjeksiyonu sonrasında plazma ACTH ve kortizol düzeyi artış gösterdiği ileri sürülmektedir (306).

Her ne kadar gıda alımındaki nesfatine bağlı anoreksijenik etkinin lokomotor aktivitenin (225, 291, 296) veya tımarlama (temizlik, kaşınma, yalama) davranışında (291) değişiklik olmadan direkt olarak meydana geldiği düşünülse de, bu nöropeptidin HHA aks üzerindeki etkilerini göz ardı etmemize sebep değildir. Bu vesileyle, nesfatinin doz bağımlı şekilde (25-80 pmol) anksiyete davranışına sebep olduğunu (293, 307) ifade etmekte yarar vardır. Konuyla ilgili olarak, CRF<sub>2</sub> reseptör blokajı, hem ICV astressin2-B enjeksiyonuyla hem de 3. ventriküle CRF1/CRF<sub>2</sub> antagonisti  $\alpha$ -helical CRF9-41 uygulaması, nesfatinin iştah baskılayıcı etkisini zayıflatmaktadır (291, 304). Sisterna magna'ya nesfatin verildiğinde ise astressin2-B karanlık faz beslenmesini değiştirmemektedir (291). Bu durum beslenmeyle ilişkili primer etkinin POMC-MCT  $\frac{3}{4}$  ile ortaya çıktığı görüşünü (225, 293) güçlendirmekle birlikte, stres yanıtı ve özellikle gece beslenmesinde azalma ile ilgili fonksiyonları açıklamak için yeterli değildir. Gece beslenmesine etki etmesi bakımından nesfatinin, melatonin, serotonin ve kortizol gibi, sirkadiyen ritim gösteren hormonlarla etkileşimi anlaşılmalıdır. Periton içi 5-HT1B/2C agonisti (mchlorophenyl piperazine) uygulaması hipotalamik NUCB2 mRNA artışı ve gıda alımında azalma oluştururken, tam tersi durumun farelerde NUCB2 ve POMC azalması ve sonrasında gıda alımında artış oluşturması (308) nedeniyle serotoninin nesfatinle işbirliği söz konusu olabilir. Fakat serotoninin nörotransmitter olarak ruhsal durum ile ilgili önemli düzenleyicilerden birisi olması bu ilişkinin anksiyete/depresyon veya diğer psikosomatik durumların patofizyolojisi için de ortaya konulmasını gerekli kılmaktadır.

Su tüketimi ile ilgili olarak nesfatin grubunda kontrol grubuna göre, puberte öncesi, puberte ve erişkin dönemde, 34 günlük süre zarfında daha az su tüketildiği görüldü. Özellikle 31. günden 41. güne kadar ve 49-60. günler arasında istatistiksel olarak azalma düzeyinin önemli olduğu belirlendi. Nesfatin + P234 grubunda ise su tüketiminin, genel olarak kontrolden düşük olmakla birlikte, inişli çıkışlı bir seyir takip ettiği belirlendi. 31. güne kadar kontrol grubu tüketim değerlerine yakın olan ortalamanın 32. günden 37. güne kadar anlamlı şekilde azaldığı ve 38. günden 51. güne kadar kontrol grubu değerlerine yaklaşmaya başlayan, yine düşük kalmakla birlikte, ortalama tüketimin 52. günden 60. güne kadar tekrar anlamlı şekilde düşük kaldığı görüldü. İstatistiksel bakımdan anlamlı olarak daha az yem tüketilen günlerin puberte evresi (peripubertal) ve erişkinlik dönemlerini kapsamaktadır. Puberte döneminde hipotalamo-hipofizer-adrenal aksın işleyişi değişmektedir. Bu nedenle, puberte sürecindeki azalmanın adrenal bez aktivitesine ve bu periyotta strese yatkın olmanın dolaylı etkileri söz konusu olabilir. Her ne kadar gıda alımı ile su tüketiminin esasen birbiriyle ilişkili faktörler (309) olsalar da, nesfatin-1 için su tüketimini azaltıcı (antidipsojenik) etkinin anoreksijenik etkiden bağımsız bir fonksiyon olabileceği ileri sürülmektedir (293). Nesfatinin gıda alımını baskılayıcı etkisine nazaran su alımını düşürücü etkisi için daha yüksek doz gerekli olduğu (>60 pmol ICV) ifade edilmesine karşın (293), subfornikal organa düşük doz (2 pmol) nesfatin enjeksiyonu neticesinde su içme davranışında artış (dipsojenik) meydana geldiği, üstelik bu durumun gıda alımından ve anjiotensinerjik etkiden bağımsız olduğu ileri sürülmüştür (299). Daha önceki çalışmalarda farklı protokoller uygulanılarak (anjiotensin II enjeksiyonu sonrasında veya gıda-su kısıtlama gibi) değerlendirme

yapılmış olması mümkündür. Subfornikal organ su alımının düzenlenmesinde önemli bir merkez olduğu için, diğer çalışmalarla tam aksi yöndeki bu sonucun da göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünüyoruz. Ancak dehidrasyon veya sıvı kısıtlaması durumunda anoreksijenik nöropeptid artışı, açlık (anoreksi ile indüklenen) durumunda oreksijenik nöropeptidlerin artış gösterdiği (293) görüşünden hareketle, protokol farklılıklarının önemli değişkenler olabileceği ayrıca antidiüretik hormon profili ile plazma ve idrar osmolarite takibi yapılmadan tutarlı sonuç elde etmenin zor olduğu anlaşılmaktadır. Araştırmamızda su alımı ile ilgili olarak sabit bir seyirden ziyade inişli çıkışlı devam eden tüketim gözlemlendiğinden dolayı, yukarıdaki araştırmalar ekseninde sonuçlarımızı konumlandırmak kolay görünmemektedir. Herhangi bir kısıtlama olmadan su tüketiminde, hem nesfatin hem de nesfatin + p234 grubunda, nispeten bir azalama meydana geldiğini ve bu durumun otonom sinir sistemi ile ilgili değişikliklerin dolaylı veya direkt etkisi dahilinde değerlendirilmesinin daha sağlıklı olacağını düşünmekteyiz.

## **6.2. Puberte Yaşı, Puberte Canlı Ağırlığı, İlk Östrüs Yaşı ve İlk Östrüs Canlı Ağırlığı**

### **6.2.1. Kisperptinin Etkileri**

Puberte gonadal aktifliğin başladığı ve devam ettirebilme yeteneğinin kazanıldığı, aynı zamanda sinir sisteminin ve diğer yapıların da bu değişikliğe ayak uydurmasına ihtiyaç duyan kompleks ve kritik bir evredir. Bu dönemin

anahtar değişimi GnRH n6ronlarının pulsatil tarzda salınımına başlamasıyla meydana gelmektedir. Kisspeptin GnRH n6ronlarını ve dolayısıyla gonadotropin sekresyonunu g6çlü bir şekilde uyarabilen bir sinyaldir. Kisspeptin gen mutasyonu (142, 145) ya da resept6r defekti (90, 142, 144, 175, 310) oluşturulmuş transjenik farelerde puberte meydana gelmemektedir. Bu durumdaki mutant farelerde infertilite ile karakterize gonadal b6yümede yetersizlik ve d6şük gonadotropin seviyeleri ortaya çıkmaktadır. Deneysel olarak prepubertal hayvanlara kisspeptin uygulaması gonadotropik aksın işleyişinin erken başlamasına ve puberte başlangıç yaşının 6ne kaymasını sağladığı bildirilmektedir (311). Üstelik sadece puberte 6ncesi d6nemde değil, aynı şekilde erişkin hayvanlarda da ICV kisspeptin uygulamasının GnRH uyarımı ve gonadotropin sekresyonunu artırıcı 6zelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (143, 146, 148, 149, 171). Bu y6n6yle, henüz tam olarak aydınlatılmamış puberte fizyolojisinde kisspeptinin rolü daha iyi anlaşılmak 6zere değişik modellerle sorgulanmaktadır. Araştırmamızda ICV olarak 50 pmol konsantrasyonda kisspeptin uyguladığımız grupta puberte başlangıç yaşının 6nemli 6lçüde erkene kaydığı tespit edildi. Kontrol grubundaki hayvanlarda puberte yaşı ortalaması  $38,1 \pm 0,8$  iken kisspeptin uygulanan hayvanlarda bu değer  $33,6 \pm 0,43$  olarak yaklaşık 5 g6n erkene kayması 6nemli bir neticedir. Ayrıca kisspeptin resept6r antagonistinin uygulandığı grupta puberte yaşının 40 g6n6 aştığı g6r6ldü. Kisspeptin ve resept6r antagonistinin birlikte verildiği grupta ise puberte yaşının kontrol grubu değerlerine geri d6ndüğü belirlendi. İlk olarak, Pineda ve arkadaşları tarafından (312) p234'6n kontrole g6re puberte yaşını etkilediği bildirilmiş olmasına karşın, şimdiye kadar herhangi bir 6alışmada yukarıdaki gibi 6ift y6nlü (uyarıcı-antagonist-

uyarıcı+antagonist) bir sorgulama söz konusu olmamıştır. Yine önemli bir netice olarak, kisspeptin grubundaki hayvanların puberte vücut ağırlığının kontrole göre yaklaşık 20 gram daha düşük olmasıdır ( $66,57 \pm 1,43$ 'e karşı  $86,36 \pm 3,56$ ). Bu durum pubertal olgunlaşmada kisspeptinin gücünü değerlendirme imkanı sunması bakımından önemlidir. Çünkü ergenlik başlamadan önce, vücudun belli bir ağırlığa ya da enerji rezervine sahip olması (183) gereklidir. Yine puberte yaşı ile orantılı olarak p234 grubunda ve kisspeptin+p234 grubunda ağırlık ortalamalarının sırasıyla 86 gram ve 81 gram civarında olduğu belirlendi. Aynı dönemdeki yavrulardan kisspeptin uygulanan gruptakilerin kontrole göre 1/4 oranında daha az canlı ağırlığa sahip olmalarına rağmen ergenliğe girmeleri, kisspeptinin pubertal aktivasyonda ne derece güçlü bir tetikleyici olduğuna işaret etmesi bakımından önemli bir neticedir. Hipotalamik Kiss1 nöronları vücudun enerji durumuna ve diğer metabolik geri bildirimlere yüksek düzeyde duyarlı oldukları için negatif enerji rezervinin üreme aksının işleyişine olumsuz etkisiyle ilişkilendirilmektedir (313, 314). Bu sonuçlara göre 'ne kadar enerji rezervi söz konusuysa o nispette de üreme gücü meydana gelir' önermesi ilerleyen dönemlerde geçerliliğini muhafaza edememektedir. Çünkü deneysel obezite geliştirilen erişkin farelerde Kiss1/Kiss1r regülasyonunun bozulması (315) gibi ilginç bir durum da mevcuttur. Giriş bölümünde çocuklarda fazla yağlanma veya enerji fazlalığının erken puberte ile ilişkili olduğuna dair tespitleri sunarken, dikkat çekmeye çalıştığımız husus, gereksiz enerjinin üreme fonksiyonuna kattığı aşırılığın zamanla patofizyolojik hale dönüştüğüdür. Nitekim erken puberte de fizyolojik bir durum değil patolojik bir sonuçtur. Kisspeptin uygulaması ile pubertenin yaşlılarına göre daha düşük kiloda olmasına rağmen erkene

çekilebildiğini belirlemiş olmamız, kisspeptinin GnRH aktivasyonunda ne derece etkin olduğunun yanı sıra kisspeptin ile ilgili olarak ortaya çıkacak dengesizliğin sonuçlarının da o nispette olacağına işaret etmesi bakımından önemlidir. Kisspeptin reseptör antagonisti p234 uygulaması ile ortaya çıkan puberte yaşının uzaması bu duruma bir örnektir. Kisspeptin puberteyi başlatan bir sinyal ise, o halde kisspeptin aktivasyonu GnRH uyarımı ile koordineli ve bağımlı bir özellik arz etmelidir. Hem intakt hem de ovaektomili maymunlarda ME kisspeptin salınım karakteristiği irdelendiğinde, kisspeptinin de pulsatil tarzda salgılanma özelliği taşıdığı ve puberte döneminde GnRH artışına eşlik ettiği belirlenmiştir (316). Ayrıca prepubertal dönemde düşük pulsasyon ve uzun frekans aralığına sahip kisspeptin sekresyonunun puberte döneminde daha yüksek frekans ve daha kısa aralıklar şeklinde cereyan ettiği görülmüştür (317). Aynı ekip tarafından, çeşitli dönemlerden elde edilen verilere göre, pubertal pulsatil kisspeptin salınımı ve sonrasında ME'deki artan düzeylerinin dişi maymunlarda puberte sürecinde GnRH salınım karakteristiği ile paralel olduğu ifade edilmiştir (318, 319).

Araştırmamızda kisspeptin reseptör antagonisti uyguladığımız hayvanlarda puberte yaşı 40 günü aşsa da sonunda puberteye eriştikleri görüldü. p234'ü 1 nmol dozda ICV uygulayarak elde ettiğimiz bu verilerin farklı doz ve uygulama şekilleriyle irdelenmesi önemlidir. Çünkü p234 grubunda östrüs başlangıç yaşı medyanı kontrole göre uzamış olsa da (sırasıyla 52. gün ve 47. gün), östrüsün meydana gelebildiği belirlenmiştir. Kisspeptin ve kisspeptin+p234 grubundaki medyan değerleri ise 46 ve 48'di. Kisspeptin reseptör antagonisti grubunda pubertenin önemli ölçüde gecikmesi fakat ortadan kalkmamış olmasının nedeni, p234'ün bazal LH düzeyine etki etmediği içindir (320). Bu durumun, doz-cevap

ilişkisi dışında, kisspeptinden başka GnRH'yı uyaran ve/veya puberteyi başlatan, henüz keşfedilmemiş, başka faktörün/faktörlerin kisspeptinden bağımsız etkisi devam ettiği için meydana gelme ihtimalini akla getirmektedir.

### **6.2.2. RF9'un Etkileri**

Şimdiye kadar GnIH/RFRP-3'ün rolünü belirlemek için peptid uygulamasından sonra hormon sekresyonu ve/veya GnRH aktivitesinin ölçülmesiyle birlikte immünohistokimya ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanılmıştır. Ancak RFRP'nin etkisini tam olarak karakterize etmek için reseptör blokajına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaca ihtiyaç duyulan seçici reseptör antagonisti keşfedilinceye kadar ulaşılamamıştır. Simonin ve arkadaşları tarafından (100) RFRP reseptörüne (NPFF1R veya GPR147) ve aynı aileden bir peptid olan NPFF'nin reseptörüne de (NPFF2R=GPR74) bağlanabilen güçlü bir antagonist olarak RF9 sentezlenmiştir. Spesifik antagonist kullanılarak GnIH/RFRP-3'ün etkisi ortadan kaldırılarak puberte yaşı ile ilgili değerlendirme ilk kez bu çalışmada ortaya konulmuştur. Bunun dışında puberte fizyolojisinde RF9 ile ilgili veri mevcut değildir. Deneylelerimizde yavru hayvanlara ICV RF9 uygulamasıyla puberte yaşının erkene kaydığı belirlenmiştir. Nitekim kontrol grubunda ortalama  $37,6 \pm 0,72$  olan puberte başlangıç yaşının, RF9 grubunda  $35,1 \pm 0,95$  olduğu görülmüştür. Buradan hareketle, GnIH dolayısıyla memeli canlılardaki RFRP-3'ün etkinliği ortadan kaldırıldığında gonadal aks üzerineki RFRP-3 inhibisyonunun zayıflamasıyla puberte yaşı değişmektedir. 2008 yılında erkek yavru sıçanlara 24 günlük olduklarında RFRP-3 antisense oligonucleotid

ICV olarak infüze edilmiş ve uygulama sonunda puberte yaşında kontrol grubuna göre değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir. Bununla birlikte RFRP-3 antisense uygulanan gruptaki hayvanların testis hacminin daha fazla olduğu ve kontrole göre, FSH için olmasa da, daha yüksek LH düzeylerinin söz konusu olduğu ifade edilmiştir. Erişkin hayvanlara ICV RFRP-3 infüzyonu sonrasında testis hacminin ve LH düzeyinin kontrol grubuna göre düşük kaldığı fakat büyüme hormonu artışı görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca hem RFRP-3 antisense uygulamasının hem de RFRP-3'ün kisspeptin ekspresyonunda etki etmediği, böylece endojen RFRP-3'ün erkek sıçanlarda pubertenin zamanlamasında rol almadığı ileri sürülmüştür (120). Araştırmamızda kisspeptin reseptör antagonisti ile birlikte RF9 uyguladığımız grupta puberte yaşı ortalamasının  $36,6 \pm 1,65$  olduğu görüldü. Dolayısıyla RF9 için yaklaşık 35 olan puberte yaşının, p234 ilavesiyle kontrol grubu değerlerine yaklaşma eğilimi gösterdiği tespit edildi. Eğer kisspeptin reseptörü bloklandığında RF9'un etkisi değişiyorsa, RF9'un GnIH/RFRP-3 üzerinden oluşan dolaylı etkinin dışında kisspeptin ile ilgili direkt bir ilişkinin de söz konusu olabilir. RFRP-3 için tonik salınım sinyalleşmesi sayesinde GnRH nöronlarının uyarımı üzerine baskılayıcı tarzda etki oluşturduğu sanılmaktadır. Ancak beyin kesitleri üzerinde yapılan gözlemlerde GnRH nöronlarının yaklaşık % 50'lik bölümünde RFRP-3 hem inhibe edici hem de uyarıcı etki göstermektedir (122, 123). O halde RF9 kisspeptin gibi puberte yaşını nasıl erkene alabiliyor? Kontrol grubunda yaklaşık 38 olan puberte başlangıç yaşının kisspeptin grubunda 33, RF9 grubunda 35 ve RF9+p234 grubunda yaklaşık 37 olduğunu hatırlamakta fayda var. Görüldüğü üzere kisspeptin reseptör antagonisti RF9'un etkisini değiştirebilmektedir. Her ne kadar RF9 özellikle

NPFF1R (GPR147) üzerinden RFRP-3'ün GnRH nöronları üzerinde oluşturduğu baskılayıcı etkiyi ortadan kaldırarak uyarıcı etki (122, 123, 321) meydana getiriyor olsa da, GnRH nöronlarının sadece % 20-30'unda GPR147 (NPFF1R) ekspresyonunun söz konusu olduğu bildirilmektedir (321, 322). Kisspeptin antagonisti ile etkisinin değişebilmesi bu durumda daha da bir önem kazanmaktadır. Nitekim sentetik bir ürün olan RF9 için karakterize edilen durumların dışında başka yapılarla etkileşimi ve farklı etkileri mümkün olabilir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada GnRH nöronlarının %70'den fazlasının RF9 ile uyarılabildiğini ifade edilmektedir. Aynı çalışmada kisspeptin reseptör mutasyonu oluşturulmuş Kiss1r-null farelerde RF9 tarafından GnRH uyarımının oluşmadığı da rapor edilmiştir (289). Bu sonuç bizim RF9 ve kisspeptin antagonisti ile elde ettiğimiz verilerin ne anlama geldiğini açıklamamıza yardım etmesi bakımından önemlidir. Çünkü ilk kez GnRH antagonistinin puberte yaşını erkene kaydırıldığı ve bunu ortaya koyarken GnRH baskılayıcı etkisinin yanı sıra kisspeptin nöronları ile etkileşerek çalıştığı belirlenmiştir. Çünkü GnRH/RFRP-3 antagonistinin etkilerinin, ilginç şekilde, kisspeptin reseptör antagonisti ile geri çevrilebildiği tespit edilmiştir.

### **6.2.3. Nesfatin-1'in Etkileri**

2010 yılında, dişi sıçanlarda hipotalamik NUCB2/nesfatin-1 ekspresyonunun puberte öncesi ve puberte evresinde (20. günler ile 35. günler arasında) artış gösterdiğinin rapor edilmesiyle (246) birlikte, gözler bu nöropeptidin puberte ve üreme fizyolojisindeki rollerine çevrilmiştir. Bu vesileyle

son dönemde üzerinde yoğunlaştığımız kisspeptin ile ilgili çalışmalarımıza nesfatin de dahil edilmiştir. Araştırmamızda, kontrol grubu ortalamasına ( $38,1\pm 0,8$ ) göre ICV nesfatin uygulanan grupta puberte yaşının anlamlı şekilde öne kaydığı ( $36\pm 0,55$ ) görüldü. Bu nöropeptidin ilk keşfedildiği 2006 yılında, hipotalamusda PVN, LHA, SON ve ARC gibi alanda ekspresse edildiği bildirilmiştir (225). İlk olarak anoreksijenik etkisi ortaya konulduğu ve adı geçen hipotalamik nükleusların iştah ve enerji regülasyonu ile ilgili olmasından dolayı önceki çalışmalar genelde bu ekseninde devam etmiştir. Özellikle ARC başta olmak üzere DMN ve diğer hipotalamik alanların direkt veya dolaylı şekilde üreme ile ilgili düzenleyici alanlar olduğu için üreme fiziolojisi ile nesfatin-1 ilişkisi gittikçe artan şekilde irdelenmektedir. Konuyla ilgili olarak, prepubertal evreden puberteye geçiş döneminde LHA, PVN ve SON'da (in situ hibridizasyon ile) mRNA düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı, hipotalamus total protein içeriğinin de (western blot ile) üç kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak puberte öncesi (geç infantil dönem) döneminde (postnatal 20. gün), yoğun olmasa da, ARC ve DMN NUCB2 mRNA ekspresyonu tespit edilmesine rağmen, peripubertal dönemdeki (35. gün) dişilerde ekspresyon analizlerinden birbirini doğrulayan veri elde edilememiş olması (225) ilginç bir neticedir. Önemli bir hatırlatma olarak, araştırmamızla ilgili karşılaştırma veya değerlendirme yaptığımız çalışmalar ile ilgili verileri sunarken, kıyaslarımızın ve yorumlarımızın daha sağlıklı olabilmesi için, araştırmacıların kullandıkları terminoloji muhafaza edilerek sunulmaya çalışılmaktadır. Nitekim nesfatin ve puberte yaşı üzerine ilk bulguyu ortaya koyan araştırmada, 20 günlük dişiler geç-infantil dönemde, 33. postnatal gün pubertal, 35. gün için ise protokol serilerine göre peripubertal veya pubertal olarak değişen

sınıflandırma yapılmıştır (225). Puberte öncesi dönemdeki dişi sıçanlara nesfatin as-MON'unun ICV infüzyonunun hipotalamik NUCB2 ekspresyon oranını azalttığı, puberte başlangıç yaşını geciktirdiği, ovaryum ağırlığını ve LH düzeyini kontrol grubuna göre azalttığı belirlenmiştir. Bütün bunlara dayanarak nesfatin-1'in pubertenin ilerleyişinde esas faktörlerden birisi olduğu ileri sürülmüştür. Özellikle puberte süreci için bu nöropeptidin çok önemli veya olmazsa olmaz şeklinde sunulmasının nedeni özellikle gonadotropin seviyesi bakımından yetişkin dönemde aynı sonucun geçerli olmadığı şeklinde ifade edilmiştir (225).

Çalışmamızda nesfatinin puberte yaşını erkene çektiği (ortalama 36. gün) belirlenmiş olmakla birlikte, kisspeptin reseptör antagonisti p234 ile birlikte nesfatin uygulandığında puberte yaşındaki erkene kayma durumunun engellendiği (ortalama 38. gün) ilk defa tespit edilmiştir. Şimdiye kadar kisspeptin ile nesfatin işbirliğine dair herhangi bir çalışma yapılmamıştır. 2010 yılında hipotalamusta farklı alanlarda NUCB2 ile phosphor-mammalian target of rapamycin'in (mTOR) lokalizasyonunda yakınlık rapor edilmiştir (323). mTOR ile ilgili olarak Kiss1 gen ekspresyonunda muhtemel düzenleyici faktörlerden birisi olabileceği ileri sürülmektedir (324). Bu duruma göre, nesfatin-1 ile ortaya çıkan etkinin kisspeptin reseptör antagonisti ile ortadan kalkıyor olması, kisspeptin reseptörünün mevcut olduğu alanlarda nesfatinin pay sahibi olabileceğine işaret etmektedir. Ancak bulgularımızın daha farklı metotlar ile puberte, üreme, beslenme davranışı ve diğer fizyolojik/patofizyolojik durumlar için zenginleştirilmesi gerekmektedir. Şuan için puberte sürecinde nesfatin-1'in pozitif yönde katılımı olduğunu ve bu etkinin kisspeptin ile direkt veya dolaylı olarak ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

### **6.3. Gonadotropin Seviyesi ve ARC Kisspeptin İmmünoreaktivitesi**

#### **6.3.1. Kisspeptinin Etkileri**

Kisspeptinin gonadotropin sekresyonunun uyarılması ile ilgili olarak insanlar (325, 326) ve fare (143, 146), sıçan (132, 148, 152, 327, 328), maymun (153, 329) ve koyun (143, 330) gibi memeli canlılarda da önemli etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca kisspeptin veya reseptörüyle ilgili genetik inaktivasyon uygulanmış mutant farelerde hipotalamustan GnRH salınmasında anormal sekresyon profili (331) ve fizyolojik düzeye ulaşamayan düşük miktarda LH ve FSH salınımı ortaya çıkmaktadır (90, 144, 175, 310, 331). Kisspeptin çok düşük dozlarda ve sistemik enjeksiyonla bile güçlü bir LH ve FSH salgılanmasına sebep olabildiğinden, GnRH uyarımının terapötik amaçlı gerekli olduğu durumlarda GnRH uygulamasına alternatif olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (332). Bu gibi durumlarda GnRH uyarımı sonucu gonadotrop hücre havuzundan gonadotropin salgılatıcı etkinin kisspeptin tarafından başlatılmasının fizyolojik regülasyona etki bakımından daha olumlu sonuçlar doğurabileceği ve farmakolojik dozda ekzojen GnRH agonisti uygulaması sonucu ortaya çıkan desentizasyonun böylece hafifletilmesinin mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (151). Ancak gittikçe artan kanıtlar, kisspeptinin sürekli olarak infüzyon tarzı uygulamasının da GnRH nöronlarında desentizasyona yol açabildiğine işaret etmektedir (152, 153, 332). Bu nedenle araştırmamızda kisspeptin günlük 50 pmol dozda ICV olarak uygulandı. 60. günden itibaren diöstrüsdeki hayvanlardan nöropeptid enjeksiyonundan önce ve uygulamadan 15 dakika sonrasında alınan

kan örneklerinde gerçekleştirilen LH ölçümlerinde, sham grubu bazal düzeylerinin  $3,94\pm 0,48$  ng/ml olduğu ve ICV çözücü uygulamasının 15 dakika sonrasında ise  $4,31\pm 0,34$  ng/ml düzeyiyle istatistiksel bakımdan aynı seviyede olduğu görüldü. Kisspeptin enjeksiyonundan önce  $4,32\pm 0,41$  ng/ml olan LH seviyesi, uygulamadan 15 dakika sonraki örneklerde,  $8,28\pm 0,64$  ng/ml düzeyine yükselerek yaklaşık iki kat artış gösterdiği belirlendi. Kisspeptin reseptör antagonisti enjeksiyonundan önceki ve sonraki LH değerleri sırasıyla  $3,78\pm 0,39$  ve  $4,08\pm 0,46$  ng/ml düzeyindeydi. Kisspeptin+p234 grubunda ise bazal LH düzeyi  $3,85\pm 0,44$  ng/ml ve ICV enjeksiyon sonrası  $4,7\pm 0,47$  ng/ml'yd. Kisspeptin, p234 ve kisspeptin+p234 gruplarının bazal değerleri bakımından fark olmamasına karşın kisspeptin uygulaması ile yükseliş gösteren LH profilinin ( $8,28\pm 0,64$ ), Kisspeptin + p234 grubunda azalma gösterdiği ( $4,7\pm 0,47$ ), yani kisspeptin reseptör antagonistinin tarafından baskılandığı anlaşılmıştır. FSH ile ilgili olarak p234 ve kisspeptin+p234 için herhangi bir önemli değişiklik olmamakla birlikte, kisspeptin uygulaması ile  $3,68\pm 0,31$  ng/ml'den  $4,28\pm 0,41$  ng/ml'ye çıkan FSH düzeyinin yükselişe geçtiği görüldü. p234 ile ilgili olarak vurgulamak istediğimiz önemli bir tespit, kisspeptinin LH üzerine oluşturduğu artış potansiyelini azaltmasıdır. Daha açık bir ifadeyle, p234 bazal LH seviyesini değiştirmemektedir ama LH artışını tırpanlayabilmektedir. Nitekim bu tespit sadece bize ait olan bir değerlendirme değildir. Fakat p234'ün karakterize edildiği çalışmada (320) belirtilen durumun tekrar edilebilir ve geçerli olması bakımından ayrı bir önem taşımaktadır.

Gonadektomi (kastasyon veya ovarektomi) cinsiyet hormonlarının negatif geri bildirimini ortadan kaldırdığı için LH düzeyi artış göstermektedir. Kastasyon

uygulanan farelerde p234 uygulaması ile bu artış engellenebilmektedir (320). Bu sonuca değinmemizin nedeni kisspeptin antagonistine ait verileri değerlendirirken ‘kisspeptin nöronlarının regülasyonu bu durumdan ne ölçüde etkileniyor?’ sorusunu analiz etmenin önemini ortaya çıkarmak içindir. Çünkü gonadektomi uygulaması her iki cinsiyette de ARC’deki kisspeptin nöronlarının aktivitesini artırmaktadır (149, 334). Yukarıda bahsettiğimiz LH artışı işte bu nedenledir. Yani testosteron veya östrojene bağlı geri bildirim ortadan kalktığı için ARC’de kisspeptin ekspresyonu artmakta ve böylece GnRH üzerinden LH salgılanması uyarılmaktadır. Bu temel fizyolojik bir mekanizmadır. Ancak konumuzla ilgili olarak önem arz eden durum ‘kisspeptin üreten nöronlar cinsiyet hormonları için bir nevi irtibat merkezi olarak iş görüyorsa (155) kisspeptin reseptör antagonisti uygulaması ile tablo nasıl şekillenecektir?’ sorusunu gündeme alarak yukarıdaki durumu analiz edebiliriz. Hipotalamik kesitlerimizde kisspeptin grubunda ARC kisspeptin immünoaktivitesinin arttığı belirlendi. Kisspeptin reseptör antagonisti ve kisspeptin+p234 uyguladığımız gruplarda ise kisspeptin grubundaki tablonun kaybolduğu tespit edildi. Böylece kisspeptin uygulaması ile ilgili elde ettiğimiz erken puberte ve LH artışının ARC’deki kisspeptin nöronlarının uyarılmasında meydana gelen artış nedeniyle şekillendiğini söyleyebiliriz. Ancak p234’ün bazal LH seviyesini değiştiremiyor olması (320), LH salınımında kisspeptin reseptör antagonistinin etkisinin tam olarak ortaya çıkıp çıkmadığını akla getirdiği gibi bazal LH regülasyonunda kisspeptin dışında muhtemel düzenleyicilerin varlığına da işaret ediyor olabilir. Bu durum GnRH nöronlarında bazal ateşleme oranlarına p234 uygulamasının etki etmediği in vitro olarak gösterildiği gibi maymunlarda bazal GnRH sekresyonuna ve ovarektomi yapılmış koyunlarda bazal LH

seviyesine de etki etmediği *in vivo* olarak da belirlenmiştir (320). Kisspeptin gen mutasyonu oluşturulmuş farelerde infertilite önemli ölçüde sekteye uğramasına karşın gonadotropin fonksiyonunun düşük seviyede de olsa devam edebildiği ve ovaryum foliküler gelişimi ile sporadik ovülasyonların bu tür transjenik farelerde ortaya çıkabildiği ileri sürülmektedir (144). Araştırmamızda kisspeptin reseptör antagonisti grubundaki hayvanlarda seksüel siklus düzenli olmasa da östrüsün meydana geldiğini gözlemlenmiş olmamız, yukarıdaki verilerle uyusmaktadır. Ancak bu durum kisspeptinin puberteyi başlatma ve üreme fonksiyonundaki rolünü zayıflatmaktan ziyade, sürece katılması muhtemel nöropeptidlerin veya nörotransmitterlerin gün yüzüne çıkarılması için farklı modellerle araştırılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir. GnRH ile kisspeptinin iletişimi ve diğer faktörlerin katılımı ne kadar iyi anlaşılırsa üreme sağlığı veya genital problemlerle yüzleşen insanlara o nispette çözüm üretilebilecek demektir. Nitekim araştırmamızda endojen hormonun yanı sıra antagonist uygulamasını da dahil ederek endojen faktörün fizyolojik özelliklerini *in vivo* olarak daha iyi değerlendirme fırsatı elde ettiğimizi söyleyebiliriz. Çünkü sonuçlarımızın kisspeptin ile ilişkili patofizyolojik durumlarda, örneğin hormonun eksikliğinde, yetersizliğinde veya aşırı salgılandığı patolojiler için, ileride tedavi amaçlı kullanım yönünde veri sağlaması da bir başka önemli sonuçtur.

### 6.3.2. RF9'un Etkileri

Kisspeptinlerin de dahil olduğu RFamid nöropeptid ailesi (77) gonadotropik aksın kontrolünde karşılıklı etkiye sahiptir. Gonadotropin sekresyonunun uyarılmasında kisspeptinin güçlü etkisi daha iyi tanımlanmış (333) olmasına rağmen, GnIH'nın memeli canlılardaki eşdeğeri olarak kabul edilen RFRP-3'ün gonadotropin sekresyonu üzerine baskılayıcı etkisiyle ilgili, kimi zaman birbiriyle çelişen, kanıtlar kisspeptine nazaran daha zayıf niteliktedir.

Hem kanatlılarda (73) hem de memeli canlılarda (78, 83, 115) GnIH peptidlerinin in vitro şartlarda LH ve FSH sekresyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca in vivo olarak da LH sekresyonunu baskılayabildiği rapor edilmiştir (80, 116). Mevsimsel üreme özelliği gösteren Sibirya hamsterlarında üreme sezonlarına göre LH salınmasında GnIH uygulamasıyla birbirine zıt etkiler oluşabildiği görülmüştür (108). Bu durum, farklı fizyolojik şartlarda RFRP-3'ün üreme fonksiyonu üzerindeki rolünün değişkenlik gösterebileceğine işaret etmektedir.

Memelilerde RFRP-3'ün gonadotropin sentezi ve salınması üzerine inhibitör etkisinin hipotalamustaki GnRH nöronlarına etki ederek meydana geldiği ileri sürülmektedir (81, 121-123). Kuşlarda olduğu gibi, memeli RFRP karşıtı oligonükleotidlerinin kronik infüzyonu neticesinde prepubertal erkek sıçanlarda serum LH konsantrasyonları ve testis ağırlıkları artış göstermektedir (120). Buna göre memeli seksüel gelişiminde de RFRP'nin rolü olduğu ileri sürülebilir. Fakat Murakami ve arkadaşları (82) ovarektomili sıçanlarda RFRP3'ün ICV olarak LH seviyesi, puls sıklığı ve genliğine etki etmediğini rapor etmiştir. Yine bir

ovarektomili modelde, Pineda ve arkadaşları (335), RFRP3'ün ICV enjeksiyondan sonra, yalnızca 15 dakika geçmiş olmasına karşın, LH seviyesinde düşüş oluşturduğunu belirlemiştir. Diğer yandan, Anderson ve arkadaşları (336) ovarektomi yapılmış sıçanlarda RFRP3'ün ICV 2.5 ve 25 µg dozda, LH puls amplitüdüne, puls sıklığı veya ortama düzeylerine etki etmediğini tespit etmiştir. Benzer çelişkiler, 1 µg dozda iv RFRP3 enjeksiyonundan 120 dakika sonra LH seviyesinin azaldığı (82), 1, 10 µg dozlarda etki etmediği (337) şeklinde ifade edilmiştir. Ovarektomili Suriye hamster'lerinde GnIH 500 ng dozda ICV olarak veya iv 600 ng dozda LH seviyesini azalttığı rapor edilmiştir (338). Bununla birlikte, diğer çalışmalarda akut RFRP3 enjeksiyonu LH ve FSH salınmasını Hem Suriye (339) hem de Sibiry (108) hamster'inde artırdığı bildirilmiştir. Yalnızca bir çalışmada iv infüzyon ile koyunda LH puls amplitüdünün baskılandığı belirlenmiştir (78).

2006 yılında Simonin ve arkadaşları tarafından (100), RFRP ve aynı aileden bir peptid olan NPPF'nin seçici antagonisti olarak RF9 tanımlanmıştır. RF9 uygulaması dişi koyunlarda LH sekresyonunu güçlü bir şekilde uyarmaktadır ve bu etki anöstrüs sezonu süresince oldukça belirgindir. Bu sonuç, aynı araştırma ekibinin, RF9'un gonadotropin sekresyonu üzerine kemirgenlerde uyarıcı etkiye sahip olduğuna dair, çalışmasıyla (340) paraleldir. Bu durum özellikle mevsimsel üreme özelliğine sahip canlılarda, üreme sezonunun dışındaki süreçte mevcut inhibisyonun sağlanmasında temel faktör olarak muhtemelen kanatlı GnIH'ı ile ilişkili inhibitör sistemin RFRP-3 olduğuna işaret etmektedir. Ancak insan dahil mevsimsel üreme özelliği göstermeyen diğer canlılarda daha fazla delile ihtiyaç duyulduğu ortadadır. Hem erkek hem de östrüs ve diöstrüs dönemindeki dişi

sıçanlarda RF9'un ICV verilmesiyle plazma LH düzeylerinde güçlü bir artış meydana gelmektedir (75). Aynı modelde (335), RFRP3'ün inhibitör etkisinin görülmesi göz önünde bulundurulduğunda, GnIH/RFRP-3 reseptör antagonisti RF9'dan diğer memelilerde de üreme fizyolojisindeki inhibitör mekanizmaların aydınlatılmasında istifade edilebileceğini göstermektedir.

RF9 grubundaki hayvanların bazal FSH seviyesinin ( $3,71 \pm 0,23$  ng/ml) ICV RF9 uygulama sonrasında, istatistiksel bakımdan önemli olmasa da yükseldiği ( $4,45 \pm 0,14$ ) görüldü. RF9 + P234 grubunda da FSH düzeyinde enjeksiyon sonrası artış eğilimi olmakla birlikte ( $3,66 \pm 0,17$ 'den  $4,25 \pm 0,14$ 'e), RF9 grubuna nazaran nispeten daha düşük düzeydeydi. LH seviyesine etki bakımından ise, RF9 grubunda bazal seviyenin ( $3,94 \pm 0,23$ ), ICV enjeksiyon sonrası, yaklaşık iki kat yükseldiği ( $7,66 \pm 0,7$  ng/ml) belirlendi. RF9 + P234 grubunda bazal düzeyden ( $3,71 \pm 0,33$ ) ICV enjeksiyon sonrası ( $5,08 \pm 0,35$ ) yükselen LH seviyesinin, RF9 grubu ile karşılaştırıldığında ( $7,66 \pm 0,7$  ng/ml'ye karşı  $5,08 \pm 0,35$  ng/ml), önemli şekilde, kisspeptin antagonisti p234 ilave edilen grupta düşük kaldığı belirlendi. FSH için elde edilen değişiklikler, öyle görünüyor ki, farklı doz değerlendirmesi yapmadığımızdan dolayı sönük kalsa da önemli verilerdir. Kaldı ki FSH ölçümleri değerlendirilirken özellikle dişilerde siklus dönemi ve bu hormonun salınmasını sınırlandırabilen inhibin hormonuna ait etki göz ardı edildiğinde yapılan yorumlar havada kalacaktır.

RF9'un tıpkı kisspeptin gibi LH salgılanmasını güçlü şekilde uyarabildiğini gözlemlemiş bulunmaktayız. Üstelik bu artış kisspeptin reseptör antagonisti p234 uygulamasıyla azaltılabiliyordu. RF9'u 10 nmol dozda p234'ü ise 1 nmol konsantrasyonda kullandığımız için, reseptör antagonistinin bloklayıcı etkisi biraz

zayıf kalmıştır. Oysaki eşit konsantrasyonlarda daha baskın etki oluşması muhtemeldir. Çünkü p234'ün karakterize edildiği çalışmada (320) etki gücünün doz bağımlı artış gösterebildiği ifade edilmektedir. İlk olarak Pineda ve arkadaşları tarafından (340) RF9'un gonadotropin sekresyonu ile ilgili uyarıcı potansiyeli keşfedilmiştir. Araştırmacılar, RFRP-3 ile elde ettikleri verilerin nispeten daha zayıf özellik göstermesine karşın RFRP-3 antagonistinin bu derece baskın etki oluşturması üzerine, bu etkinin tanımlanan primer etkiden ziyade, henüz anlayamadıkları, sekonder etkileşimle ortaya çıkabileceğini düşünmüşlerdir. Çünkü akıllarına gelen etkileşimlerin RF9'un farmakolojik karakterizasyonu ile ilgili araştırmada söz konusu olmadığını gördüklerini ifade etmişlerdir. Adı geçen çalışmada Simonin ve ekibi (100), RF9'un yapısal olarak BIBP3226 (NPY reseptörü alt tipi Y1 antagonisti) ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. BIBP3226'nın ise RFamid türevi peptidlerle yapısal benzerliğinin olduğu ve NPPF reseptör alt tiplerine bağlanabildiği için RF9'un da bu tür değerlendirmeye tabi tutulduğu belirtilmiştir. Böylece RFP'un insan NPY reseptör alt tipi Y1 ve GPR10, GPR54 ile GPR103 gibi üç RFamid nöropeptid ailesine ait reseptörlere ve opioid ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) reseptörlerine bağlanma aktivitesinin değerlendirilmiştir. 10  $\mu$ M konsantrasyonda RF9'un opioid  $\mu$  ve  $\kappa$  reseptörüne zayıf rekabetinin dışında herhangi bir affinite belirlenmediği ifade edilmiştir (100). Muhtemelen bu sonuçlar üzerine Pineda ve ekibi (340) RF9'un kisspeptin antagonisti ile etkileşimini değerlendirmeyi, haklı olarak, uygun görmemiştir. Ancak bu durumu *in vivo* olarak bir de kendimizin gözleme istediğimizden dolayı, çalışmamıza RF9+p234 grubu ilave edildi. Yukarıda açıkladığımız şekilde RF9'a ait LH artışı p234 ile azaltılabiliyordu. Üstelik puberte yaşı ve beslenme

davranışı da buna dahildi. Bu sonuçlar ileride fertilité veya üreme sistemi ile ilgili rahatsızlıkların tedavisi için, farmakolojik bir ajanın kullanım potansiyelini geliştirebilecek, ilk kez tanımlanan önemli verilerdi. Hipotalamik analizlerimizde RF9'un ARC kisspeptin immünoaktivitesini artırdığını da gördükten sonra, kisspeptin ile ilişkili bir durumun olduğuna kanaat getirmekle birlikte; bu ilişkinin ispatı için farklı protokoller düşündüğümüz dönemde, Liu ve ekibi tarafından yapılan bir çalışma (289), kisspeptin aktivasyonu ile ilgili düşüncemizi doğrulamaktaydı. Liu ve ekibi de, bizim gibi, RF9'un çok güçlü gonadotropin sekresyonu artış gücüne sahip olmasından dolayı kisspeptin ve GnRH ile ilişkisini gözden geçirmeye karar vermişti. Yaptıkları çalışmaya göre, RF9'un GnRH nöronlarını uyarabildiği ve bu durumun RFRP-3'ün etkilerini bloklayarak oluşturduğu dolaylı baskılayıcı etkiden daha güçlü şekilde direkt olarak GnRH üzerinden meydana getirmekteydi. Üstelik bu etkinin oluşması için en önemli etken Kiss1 reseptörüydü. Çünkü RF9, kisspeptin reseptör mutasyonu oluşturulmuş GnRH-GFP;*Kiss1r*-null farelerde GnRH uyarıcı etki ortaya koyamamaktaydı. Böylece RF9 için RFRP-3 antagonisti etki özelliği ile dolaylı gonadotropin uyarıcı etki potansiyelinin yanı sıra, ilk kez, kisspeptin reseptör antagonisti ile etkisinin değiştiği ve ARC kisspeptin nöronlarını da uyardığı şeklindeki bulgularımız doğrulanmıştır.

### 6.3.3. Nesfatin-1'in Etkileri

Nesfatin grubunda, FSH bazal değerinin ICV enjeksiyon sonrasında önemli olmayan bir artış ( $3,52\pm 0,25$  ng/ml'den  $3,94\pm 0,14$  ng/ml'ye) ortaya koyduğu; nesfatin + p234 grubunda ise, bazal seviyenin ve ICV enjeksiyon sonrası değerin aynı oranda olduğu görüldü. Ancak LH sekresyonu bakımından, nesfatin grubunda ICV uygulama sonrası önemli artış ( $3,87\pm 0,58$ 'den  $7,23\pm 0,33$ 'e) mevcuttu. Nesfatin+p234 grubunda bazal ve ICV uygulama sonrası LH düzeyleri değişmemişti (sırasıyla,  $4,15\pm 0,26$  ve  $4,82\pm 0,31$ ) düzeyindeydi. Nesfatin grubundaki LH artış değerine ( $7,23\pm 0,33$  ng/ml) göre nesfatin+p234 grubu düzeyinin ( $4,82\pm 0,31$  ng/ml) düşük olması, nesfatinin LH sekresyonunu artırıcı etkisine yönelik bulgularımızın yanı sıra, kisspeptin reseptör antagonistinin bu etkiyi geriye çevirebildiğine yönelik ilk veriler olması bakımından önemli ve dikkat çekicidir. Konumuzla ilgili yapılan çalışmalarda pubertal dişi sıçanlarda ICV nesfatin verilmesinin orta düzeyde LH artışına ve önemsiz kabul edilebilecek kadar düşük düzeyde FSH salıverilmesine yol açtığı bildirilmiştir. Ancak 48 saatlik aç bırakma sonrasında santral nesfatin uygulamasının çok daha güçlü bir LH yanıtı oluşturduğu da tespit edilmiştir (246). Nesfatin-1 ile ilgili olarak bu tür bir yanıt gelişmesi, gonadotropin sekresyonunu artırabilme yeteneğine sahip faktörler için tanımlanmış bir fenomendir (178, 341). Yani gıda kısıtlamasıyla azalan endojen nesfatin düzeyinin, uyarım sonrasında normal metabolik şartlarda ılımlı LH yanıtına neden olmasına karşın, normalden daha yüksek düzeyde karşılık verebilme gonadotropin sekresyonunda ve enerji dengesinde söz sahibi olduğu anlamına gelmektedir.

Yine García-Galiano ve arkadaşlarının çalışmasında (246), puberte dönemindeki dişilerin aksine erişkinlerde ekzojen nesfatin-1 uygulaması dolaşımdaki gonadotropin seviyelerinde herhangi bir anlamlı değişiklik meydana getirmemiştir. Bu durum, NUCB2/nesfatin-1'in puberte dönemindeki dişi sıçanlarda gonadotropik aksın düzenleyicisi olarak önemli bir etkiye sahip olduğu fakat erişkin dönemdeki dişilerde ise hipotalamik nesfatin sinyalleşmesinin gonadotropinlerin ovulasyon öncesi artışı için zorunlu olmadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca, hipotalamusta NUCB2'nin bloklanmasının, erişkin dişi sıçanlarda vücut ağırlık artışı ve günlük gıda alımı üzerine belirgin bir etki oluşturmadığı rapor edilmiştir (246). Oysaki bundan önceki çalışmalarda, erişkin erkek sıçan ve farelerde, tam aksi bulgular söz konusudur (225, 230). Bu durum, nesfatinin erkek kemirgenlerde beslenmenin regülasyonunda daha baskın sinyalleşme karakterine sahip olabileceği şeklinde yorumlanmaktadır (342). Araştırmamızda dişi sıçanlarda erişkin dönemde de gıda alımında azalma ve gonadotropin sekresyonu artışı tespit etmemizden dolayı, adı geçen çalışmalardaki nesfatinin cinsiyete ve erişkinlik dönemlerine göre farklı etki oluşturduğuna dair yorumların, dişi ve erkeklerde eş zamanlı protokollerle yapılan araştırmalar sonrasında değerlendirilmesinin daha sağlıklı olacağı kanısındayız. Çünkü mevcut veriler dışında elimizde konuyla ilgili çok fazla sonuç mevcut değildir. Ayrıca keşfedildiğinden beri 9 yıl geçmiş olmasına rağmen nesfatin-1'e ait reseptör/reseptörler ne yazık ki tanımlanamamıştır. Hipotalamusun farklı alanlarında, Kiss1 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde muhtemel düzenleyicilerden biri olabileceği ileri sürülen mTOR (324) ile NUCB2'nin birlikte yerleşim gösterdiği ileri sürülmektedir (323). Araştırmamızda kisspeptin

reseptör antagonisti ile nesfatin-1'in oluşturduğu etkilerin azaltılabildiğini belirlemiş olmamızın yanı sıra, ARC kisspeptin nöronlarının immünoaktivitesinin nesfatin grubunda nesfatin+p234 grubuna göre kısmen daha yoğun olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar nesfatin ile Kiss1 reseptörü arasında direkt veya dolaylı ilişkinin varlığının yanı sıra aynı zamanda kisspeptin nöron aktivitesinin düzenlenmesinde de muhtemel birlikteliğin söz konusu olduğuna işaret etmektedir.

NUCB2 mRNA'sı insan, sıçan ve fare testislerinde olduğu kadar aynı zamanda sıçan ovaryumunda da mevcudiyeti ileri sürülmektedir (228). Ayrıca immünohistokimyasal analizler sonucunda testislerdeki leydig hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi ortaya konulmuştur (343). Son zamanlarda hipofiz bezinde NUCB2 mRNA'sının mevcut olduğu ve gonadal steroidlerle etkileştiği ileri sürülmektedir. Ayrıca ovariectomi sonrasında ön hipofizde NUCB2 ekspresyonunun azaldığı, eksojen progesteron ve östrojen enjeksiyonları ile birlikte artış gösterdiği ifade edilmektedir. Hipofiz bezi hücre kültüründe ise in vitro östrojen uygulamasının NUCB2 mRNA ekspresyonunu artırdığı ve progesteron veya progesteron+östrojen ilavesiyle de azalma meydana geldiği aynı çalışmada rapor edilmiştir (344). Bu nöropeptidin spesifik reseptörü/reseptörleri bilinmemesine karşın, etkileştiği reseptörler arasında kiss1r'nin de dahil edilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca puberte verileri, gonadotropin sekresyonu ve ARC'deki kisspeptin nöronlarında gözlemlediğimiz göreceli immünoaktiviteden yola çıkarak, cinsiyet hormonlarının geri bildiriminde ve östrojen reseptörü alfa aktivasyonunda nesfatinin rolüne dair sorgulamalar

yapılmasının GnRH ve kisspeptin iletişiminde karanlık noktaların aydınlatılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

### **Sonuç olarak:**

Kisspeptin gonadotropik aksın kontrolündeki uyarıcı rolüne ilave olarak enerji dengesiyle ilişkili fonksiyonlara da sahiptir.

GnIH antagonisti RF9 ile puberte yaşının erkene çekilebildiği ve anoreksijenik etki meydana geldiğinin belirlenmesinin yanı sıra kisspeptin gibi gonadotropin sekresyonunu ve ARC immünoreaktivitesini uyarıcı etki potansiyelinin söz konusu olduğu ve bu etkide GnIH (RFRP-3) antagonizmasının yanı sıra kisspeptin reseptörü aktivasyonu da pay sahibidir.

Nesfatin-1 beslenme davranışı ve puberte sürecinde yer almakla birlikte, erişkin dönem gonadotropin uyarıcı etki potansiyeli de mevcuttur ve bu işleyişte beslenme davranışı ve CA değişimi üzerine kisspeptin reseptör antagonisti ile kısmen değişiklik oluşmasına karşın puberte yaşı, gonadotropin sekresyonu ve ARC immünoreaktivitesinin kisspeptin antagonisti ile baskılanabilmesinden dolayı kisspeptin nöronları ile işbirliği söz konusudur.

Kisspeptin, RF9 ve kısmen nesfatine bağlı etkilerin kisspeptin reseptör antagonisti ile değişmesinin yanı sıra GnIH antagonisti RF9'un kisspeptin reseptörü agonisti olarak etki gösterdiğinin belirlenmesi puberte, üreme fizyolojisi ve beslenme davranışı fizyolojisi için, ilk kez belirlenen, önemli veriler olmasının yanı sıra, prekoks puberte, obezite ve infertilite gibi patofizyolojik durumların tedavisi için de yeni yaklaşımlar sunabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Tanner JM. The secular trend towards earlier maturation. *T Soc Geneesk* 1966; 44: 524-38.
2. Eveleth PB, Taner JM. *Worldwide variation in human growth*, 2nd ed. Cambridge University Pres, 1990.
3. Tanner JM. The trend toward earlier menarche in London, Oslo, Copenhagen, the Netherlands and Hungary. *Nature* 1973; 243: 95.
4. Veronesi FM, Guerresi P. Trend in menarcheal age and socioeconomic influence in Bologna (northern Italy). *Ann Hum Bi ol* 1994; 21: 187-96.
5. Wyshak G, Frisch RE. Evidence for a secular trend age of menarche. *N Engl J Med* 1982; 306 (17): 1033-35.
6. Zacharias L, Rand M, Wurtman R. A prospective study of sexual development in American girls: the statistics of menarche. *Obstet Gynecol Surv* 1976; 31: 325-37.
7. Herman-Giddens ME, Slora RJ, Wasserman RC, et al. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in Office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. *Pediatrics* 1997; 99: 505-12.
8. Sun SS, Schubert CM, Chumlea WC, et al. National estimates of the timing of sexual maturation and racial differences among US children. *Pediatrics* 2002; 110: 911-19.
9. Parent AS, Teilmann G, Juul A, et al. The timing of normal puberty and age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends and changes after migration. *Endocr Rev* 2003; 24 (5): 668-93.
10. Domine F, Parent AS, Rasier G, Lebrethon MC, Bourguignon YP. Assessment and mechanism of variations in pubertal timing in internationally adopted children: a developmental hypothesis. *European Journal of Endocrinology* 2006; 155: S17-S25.
11. Gluckman PD, Hanson MA. Changing times: the evolution of puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255: 26-31.
12. Lee PA, Guo SS, Kulin HE. Age of puberty: data from the United States of America. *APMIS* 2001; 109: 81-8.
13. Kaplowitz PB, Slora EJ, Wasserman RC, Pedlow SE, Herman-Giddens ME. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics* 2001; 108: 347-53.
14. Biro FM, Khoury P, Morrison JA. Influence of obesity on timing of puberty. *Int J Androl* 2006; 29: 272-7
15. Posner RB. Early menarche: A review of research on trends in timing, racial differences, etiology and psychosocial consequences. *Sex Roles* 2006; 54: 315-22.
16. Proos LA, Hofvander Y, Tuvemo T. Menarcheal age and growth pattern of Indian girls adopted in Sweden. I. Menarcheal age. *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 852- 8.

17. Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M, et al. Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Hum Reprod* 2001; 16: 1020- 6.
18. Oostdijk MW, Drop SLS. Early puberty in adopted children. *Horm Res* 2002; 57:1- 9.
19. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969; 44: 291-303.
20. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970; 45: 13-23.
21. Rosenfeld R. Puberty in female and its disorders. In: Sperling MA (ed) *Pediatric Endocrinology* 2nd edition. Saunders. Philadelphia 2002: 455-518.
22. Wheeler MD. Physical changes of puberty. *Endocr Metab North Am* 1991; 20: 1-14.
23. Jameson JL. *Harrison's Endocrinology*, 3rd Edition. Janet E. Hall: Section 2, chapter 10. The Female Reproductive System, Infertility, and Contraception. McGraw-Hill Education, LLC 2013; 178-193.
24. Öcal G. *Pediatric Endocrinoloji*. Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtuluş S (eds). Pubertal fizyoloji. I. Baskı. Ankara: Kalkan Matbaacılık 2003; 137-155.
25. Bucler JMH. Puberty. In: Bucler JMH (ed). *A Reference Manual of Growth and Development*. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford, Blackwell Scil 1997; 64-68
26. Grumbach MM. Onset of puberty. In: Berenberg SR (ed). *Puberty, Biologic and Social Components*. Leiden, The Netherlands: HE. Stenfert Kroese 1975;1-21.
27. Ojeda SR, Heger S. New thought on female precocious puberty. *J. Pediatr Endocr* 2001; 14: 245-256.
28. Veldhuis JD. Neuroendocrin mechanism mediating awakeing of human gonadotropic axis in puberty. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 304-317.
29. Keleştimur H, Ayar A, Kılıç E, Çolakoğlu N, Özcan M. *Dişi Sıçanlarda Enerji Durumu ve Pineal Bezin Puberteye Geçiş Üzerindeki Nöroendokrin Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması TÜBİTAK Projesi (107T825) Sonuç Raporu*, 2009.
30. Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P. Neuroendocrine mechanism of onset of puberty. Sequential reduction in activity of inhibitory and facilitatory N-methyl-D-aspartate receptors. *J Clin Invest* 1992; 90 (5): 1736-44.
31. Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P. Control of pulsatile secretion of gonadotrophin releasing hormone from hypothalamic explants. *Hum Reprod* 1993; 8 (2): 18-22.
32. Delemarre-van de Waal HA. Regulation of puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16: 1-12.
33. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 2002; 57: 2-14.
34. Reiter EO. Neuroendocrine control process. Pubertal onset and progression. *J Adoles Health Care* 1987; 8: 479-491.

35. South SA, Yanko V I, Evans WS. Normal reproductive neuroendocrinology in the female. *Endocr Metab North Am* 1993; 22: 1-28.
36. Zamorano PL, Mahesh VB, Sevilla LD, et al. Excitatory aminoacid receptors and puberty. *Steroids* 1998; 63: 268-270.
37. Grumbach MM, Kaplan SL. Fetal Pituitary Hormones and the Maturation of Central Nervous System Regulation of Anterior Pituitary Function. In: Gluck L (Ed). *Modern Perinatal Medicine*. Chicago, Year Book Medical 1974; 247-271.
38. Grumbach MM, Kaplan SL. The Neuroendocrinology of Human Puberty: An Ontogenic Perspective. In: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML (Eds). *Control of the Puberty*. Baltimore, Williams&Wilkins, 1990; 1-68.
39. Grumbach MM, Gluckman PD. The Human Fetal Hypothalamus and Pituitary Gland; the Secretion of Fetal Pituitary Growth Hormone, Prolactin, Gonadotropin, and Adrenocorticotropin-Related Peptides and Thyrotropin. In: Tulchinsky D, Little AB (eds). *Maternal-Fetal Endocrinology*. Philadelphia, WB Saunders, 1994; 193-261.
40. Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Orpg Horm Res* 1976; 32: 161-243.
41. Terasawa E, Keen KL, Mogi K., Claude P. Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinology* 1999; 140: 1432-41.
42. Grumbach MM, Richards GE, Conte FA, et al. Clinical Disorders of Adrenal Function and Puberty: an Assessment Of The Role of The Adrenal Cortex in Normal and Abnormal Puberty in Man and Evidence for an ACTH-Like Pituitary Adrenal Androgen Stimulating Hormone. In: James VHT, Serio M, Giusti G, et al (eds). *The Endocrine Function of the Human Adrenal Cortex, Serone Symposium*. New York, Academic Pres 1977; 583-612.
43. Ibanez L, DiMartino-Nardi J, Potau N, et al. Premature adrenarche: normal variant of forerunner of adult disease? *Endocr Rev* 2000; 21: 671-696.
44. Reiter EO, Grumbach MM. Neuroendocrine control mechanisms and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol*. 1982; 44: 595-613.
45. Terasawa E, Luchansky LL, Kasuya E, et al. An increase in glutamate release follows a decrease in GABA and the pubertal increase in LHRH release in female monkeys. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 275-282.
46. Arlt W, Martens JW, Song M, et al. Molecular evolution of adrenarche: structural and functional analysis of p450c17 from four primate species. *Endocrinology* 2002; 143 (12): 4665-72.
47. Nebesio TD, Eugster EA. Current concepts in normal and abnormal puberty. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2007; 37 (2): 50-72.
48. Lee PA. Puberty and its disorders. *Pediatric Endocrinology* (Ed. Fima Lifshitz) Fourth Ed. Marcel Dekker, Basel, Switzerland. 2003; 211-38.

49. Blondell RD, Foster MB, Dave KC. Disorders of puberty, *Am Fam Physician* 1999; 60 (1): 209-18.
50. Layman LC, Reindollar RH. The diagnosis and treatment of pubertal disorders. *Adolesc Med* 1994; 5: 37–55.
51. Proos LA, Hofvander Y, Tuvemo T. Menarcheal age and growth pattern of Indian girls adopted in Sweden. II Catch-up growth and final height. *Indian J Ped* 1991; 58: 105- 14.
52. Proos LA, Hofvander Y, Wennqvist K. A longitudinal study on antropometric and clinical development of Indian children adopted in Sweden. II. Growth, morbidity and development during two years after arrival in Sweden. *Ups J Med Sci* 1992; 97: 93- 106.
53. Proos LA, Karlberg J, Hofvander Y, et al. Pubertal linear growth of Indian girls adopted in Sweden. *Acta Paediatr* 1993; 82: 641- 4.
54. Plant TM, Shahab M. Neuroendocrine mechanisms that delay and initiate puberty in higher primates. *Physiol Behav* 2002; 77: 717–22.
55. Richter TA, Terasawa E. Neural mechanisms underlying the pubertal increase in LHRH release in the rhesus monkey. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12 (8): 353–9.
56. Plant TM. The male monkey as a model for the study of the neurobiology of puberty onset in man. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254–255: 97–102.
57. Plant TM, Witchel SF. Puberty in nonhuman primates and humans. ed: Neill JD, ed. *The Physiology of Reproduction*. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press/Elsevier 2006; 2177–230.
58. 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: 1166–74.
59. Ojeda SR, Prevot V, Heger S, et al. Glia-to neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med* 2001b; 35: 244–55.
60. Cottrell EC, Campbell RE, Han SK, Herbison AE. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin- releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147(8): 3652–61.
61. Wray S, Hoffman G. Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology* 1986; 43: 93–7.
62. Perera AD, Lagenaur CF, Plant TM. Postnatal expression of polysialic acidneural cell adhesion molecule in the hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 1993; 133: 2729–35.
63. Banerjee I, Clayton P. The Genetic Basis for the Timing of Human Puberty. *Journal of Neuroendocrinology* 2007; 19: 831–8.
64. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocrine Reviews* 2001; 22: 111–51.

65. Winter JS, Faiman C, Hobson WC, Prasad AV, Reyes FI. Pituitary gonadal relations in infancy. I. Patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years in man and simpanzee. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 545–51.
66. Ebling FJ. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 2005; 129: 675–83.
67. Wierman ME, Pawlowski JE, Allen MP, et al. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 96–102.
68. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, et al. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 1990; 5: 1–10.
69. Grumbach MM. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3122–7.
70. Kimura F, Funabashi T. Releasing Hormone Neurons Control Gonadotropin Secretion in Rats. *News Physiol Sci* 1998; 13: 225–31.
71. Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971; 43:1334–1339.
72. Burgus R, Butcher M, Amoss M, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 278–282.
73. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 661–667.
74. Tsutsui K. Review: A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 76–88.
75. Tsutsui K, Ukena K. Review: Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: Identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 2006; 27: 1121–1129.
76. Ukena K, Tsutsui K. A new member of the hypothalamic RF-amide peptide family, LPXRF-amide peptides: structure, localization, and function. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 469–486.
77. Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, et al. Review: Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31(3): 284-95.
78. Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, et al. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2008; 149: 5811–5821.
79. Gibson EM, Humber SA, Jain S, et al. Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2008; 149: 4958–4969.
80. Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 2007; 51: 171–180.

81. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2410–2415.
82. Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, et al. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 2008; 199: 105–112.
83. Sari IP, Rao A, Smith JT, Tilbrook AJ, Clarke IJ. Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 2009; 150: 5549–5556.
84. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999; 446 (1): 103-7.
85. Kotani M, Dethieux M, Vandenberghe A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631–34636.
86. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001; 276: 28969–28975.
87. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411:613–617.
88. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-7.
89. de Roux N, Genin E, Carel JC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10972–10976.
90. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614–1627.
91. Perry SJ, Yi-Kung Huang E, Cronk D, et al. A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPF and FMRFamide. *FEBS Lett* 1997; 409: 426-430.
92. Ubuka T, Morgan K, Pawson A.J, et al. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* 2009; 4: e8400.
93. Bruzzone F, Lectez B, Tollemer H, et al. Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinalcord. *J Neurochem* 2006; 99: 616-627.
94. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, et al. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; 393: 272-276.
95. Langmead CJ, Szekeres PG, Chambers JK, et al. Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 683-688.

96. Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, et al. Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15247-15252.
97. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, et al. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 703-708.
98. Bonini JA, Jones KA, Adham N, et al. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* 2000; 275: 39324–39331.
99. Zajac JM. Neuropeptide FF: new molecular insights. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22 (2): 63.
100. Simonin F, Schmitt M, Laulin JP, et al. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 466–471.
101. Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT. Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30: 371–378.
102. Roumy M, Zajac JM. Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur J Pharmacol* 1998; 345: 1–11.
103. Panula P, Aarnisalo AA, Wasowicz K. Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Prog Neurobiol* 1996; 48: 461–487.
104. Panula P, Kalso E, Nieminen M et al. Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain Res* 1999; 848: 191–196.
105. Yang HY, Tao T, Iadarola MJ. Modulatory role of neuropeptide FF system in nociception and opiate analgesia. *Neuropeptides* 2008; 42 (1): 1–18.
106. Fukusumi S, Habata Y, Yoshida H, et al. Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540 (3): 221–232.
107. Yano T, Iijima N, Kakihara K, et al. Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Research* 2003; 982: 156–167.
108. Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, et al. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 2012; 153: 373–385.
109. Legagneux K, Bernard-Franchi G, Poncet F, et al. Distribution and genesis of the RFRP-producing neurons in the rat brain: comparison with melanin-concentrating hormone and hypocretin-containing neurons. *Neuropeptides* 2009; 43: 13–19.
110. Ubuka T, Lai H, Kitani M, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *Journal of Comparative Neurology* 2009a; 517: 841–855.
111. Bentley GE, Perfito N, Ukena K., Tsutsui K., Wingfield JC. Gonadotropin inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Neuroendocrinology* 2003; 15: 794–802.

112. Osugi T, Ukena K, Bentley GE, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *Journal of Endocrinology* 2004; 182: 33–42.
113. Ubuka T, Ueno M, Ukena K, Tsutsui K. Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) hypothalamo-hypophysial system. *Journal of Endocrinology* 2003; 178: 311–318.
114. Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K. Distribution of a novel avian gonadotropin inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Research* 2003; 312: 73–79.
115. Kadokawa H, Shibata M, Tanaka Y, et al. Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines. *Domestic Animal Endocrinology* 2009; 36: 219–224.
116. Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 2006; 147: 1187–1194.
117. Zhang Y, Li S, Liu Y, et al. Structural diversity of the GnIH/GnIH receptor system in teleost: its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptides* 2010; 31: 1034–1043.
118. Tachibana T, Sato M, Takahashi H, et al. Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Research* 2005; 1050: 94–100.
119. Tachibana T, Masuda N, Tsutsui K., Ukena K, Ueda H. The orexigenic effect of GnIH is mediated by central opioid receptors in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2008; 150: 21–25.
120. Johnson MA, Fraley G. Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology* 2008; 88 (4): 305–315.
121. Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, et al. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 2008; 149: 5770–5782.
122. Ducret E, Anderson GM, Herbison AE. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 2009; 150 (6): 2799–804.
123. Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol AN, Alreja M. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *J Physiol* 2009; 587: 1401–1411.

124. Satake H, Hisada M, Kawada T, et al. Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J* 2001; 354:379–385.
125. Ikemoto T, Park MK. Chicken RFamide-related peptide (GnIH) and two distinct receptor subtypes: identification, molecular characterization, and evolutionary considerations. *J Reprod Dev* 2005; 51: 359–377.
126. Ukena K, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K. A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. *FEBS Lett* 2002; 512:255–258.
127. Harms JF, Welch DR, Miele ME. KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 11-8.
128. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 48–69.
129. 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: 5399–5404.
130. Um HN, Han JM, Hwang JI, et al. Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1200: 67-74.
131. Kirby HR, Maguire JJ, Colledge WH, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev.* 2010; 62 (4): 565-78.
132. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, 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* 2004b; 145: 4565-74.
133. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004a; 561: 379–86.
134. Han S, Gottsch ML, Lee K, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005; 25(49): 11349–56.
135. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus: sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147: 5817–25.
136. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, et al. Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1849–55.

137. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, et al. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1137–44.
138. Lanfranco F, Gromoll J, von Eckardstein S, et al. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 845–52.
139. Pallais JC, Bo-Abbas Y, Pitteloud N, Crowley WF Jr, Seminara SB. Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255: 70-7.
140. Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, et al. Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2006; 155 (Suppl 1): S3–S10.
141. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008; 358: 709–15.
142. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1357–63.
143. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1761–6.
144. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, et al. Kiss1 / mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54 / mice. *Endocrinology* 2007; 148: 4927–36.
145. D'anglemont De Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 10714–9.
146. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 4073–7.
147. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 383–8.
148. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004a; 16: 850–8.
149. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 264–72.
150. Shahab M, Mastronardi C, Seminara S.B, et al. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2129–34.

151. Tovar S, Vazquez MJ, Navarro VM, et al. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 2006; 147: 2696–704.
152. Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, et al. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E1074–E1082.
153. Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF Jr, Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 2006; 147: 2122–6.
154. Kinsey-Jones JS, Li XF, Luckman SM, O’Byrne KT. Effects of kisspeptin-10 on the electrophysiological manifestation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female rat. *Endocrinology* 2007; 149: 1004–8.
155. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005; 146: 2976–84.
156. 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: 3686–92.
157. Smith JT, Donald K, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 2006; 131: 623–630.
158. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and GnRH. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 381–93.
159. Gutierrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, et al. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 521–30.
160. Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2008; 103: 360–365.
161. Smith JT, Rao A, Pereira A, et al. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood, but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: Evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 2007; 149: 1951–9.
162. Castellano JM, Gaytan M, Roa J, et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 2006; 147: 4852–62.
163. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2744–50.

164. Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 2006; 147: 804–10.
165. Quaynor S, Hu L, Leung PK, et al. Expression of a functional G protein-coupled receptor 54-kisspeptin autoregulatory system in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 3062–70.
166. Shibata M, Friedman RL, Ramaswamy S, Plant TM. Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 432–8.
167. Colledge WH. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20 (3): 115–21.
168. Plant TM. Neurobiological bases underlying the control of the onset of puberty in the rhesus monkey: a representative higher primate. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22, 107–39.
169. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 (52): 22693–8.
170. Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, et al. Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 349–54.
171. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, 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.
172. Wiegand SJ, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology* 1982; 34: 395–404.
173. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, et al. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; 148: 1774–83.
174. Roa J, Vigo E, Castellano JM, et al. Opposite roles of estrogen receptor (ER) {alpha} and ER{beta} in the modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat: implications for the generation of the preovulatory surge. *Endocrinology* 2008; 149: 1627–37.
175. Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, et al. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone / luteinizing hormone. *J Neurosci* 2007; 27: 12088–95.
176. Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI. Kisspeptin/Metastin: A Key Molecule Controlling Two Modes of Gonadotrophin-Releasing Hormone/Luteinising Hormone Release in Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology* 2009; 21: 299–304.

177. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 298–303.
178. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, 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.
179. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, et al. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes* 2006; 55: 2602–10.
180. Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: The role of leptin and insulin. *Mol and Cell Endocrinol* 2006; 254–255: 133–9.
181. Kennedy GC, Mitra J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol* 1963; 166: 408-18.
182. Frisch RE, Revelle R, Cook S. Components of weight at menarche and the initiation of the adolescent growth spurt in girls: estimation total water, lean body weight and fat. *Hum Biol* 1973; 45: 469–83.
183. Frisch RE. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed Proc* 1980; 39: 2395–2400.
184. Frisch RE, Wyshak G, Vincent L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *N Engl J Med* 1980; 303: 17–9.
185. Warren MP. The effects of exercise on pubertal progression and reproductive functions in girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1150–7.
186. Garn SM, Haskell JA. Fat and growth during childhood. *Science* 1959; 130: 1711–2.
187. Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance and onset. *Science* 1974; 185: 949–51.
188. Kaplowitz PB. Link Between Body Fat and the Timing of Puberty. *Pediatrics* 2008; 121: S208-S217.
189. Wyshak G, Frisch RE. Evidence for a secular trend age of menarche. *N Engl J Med* 1982; 306 (17): 1033-35.
190. Warren MP. The effects of under nutrition on reproductive function in the human. *Endocr Rev* 1983; 4(4): 363–77.
191. Frisch RE. Body fat, menarche, fitness and fertility. *Hum Reprod* 1987; 6: 521–33.
192. Troiano F, Flegal K. Overweight children and adolescents: Description, epidemiology, and demographics. *Pediatrics* 1998; 101 (Suppl): 497–504.
193. Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 1997; 337: 869–73.
194. Maffei C, Talamini G, Tato L. Influence of diet, physical activity, and parents' obesity on children's adiposity: A four-year longitudinal study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 758–64.

195. Dietz WH. Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 955–9.
196. Seidman DS, Laor A, Gale R, Stevenson DK, Danon YL. A longitudinal study of birth weight and being overweight in late adolescence. *Am J Dis Child* 1991; 145: 782–5.
197. Whitaker RC, Pepe MS, Wright JA, Seidel KD, Dietz WH. Early adiposity rebound and the risk of adult obesity. *Pediatrics* 1998; 101 (3): E5.
198. Williams S, Davie G, Lam F. Predicting BMI in young adults from childhood data using two approaches to modeling adiposity rebound. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 348–54.
199. Perusse L, Chagnon YC, Dionne FT, Bouchard C. The human obesity gene map: the 1996 update. *Obesity Res* 1997; 5 (1): 49–61.
200. Dietz WH. Health consequences of obesity in youth: childhood predictors of adult obesity. *Pediatrics* 1998; 101: 518–25.
201. Babaoğlu, K. Hatun, Ş. Çocukluk Çağında Obezite, Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi (STED) 2002; 11 (1): 8-10.
202. Yiğit H, Ertekin V, Altınkaynak S. “Çocukluk Çağında Obezite”. *Sendrom* 2002; 14: 66-73.
203. Durukan, P. Fiziksel Aktivite Ve Psikososyal Faktörlerin Obezite Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Ankara 2001.
204. Jin L, Burguera BG, Couce ME, et al. Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2903–11.
205. Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, et al. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing-hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. *Endocrinology* 2000; 141: 1464–1469.
206. Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997; 138 (11): 5055-8.
207. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4144–8.
208. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4939–47.
209. El Majdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM. Neuropeptide Y: a hypothalamic break restraining the onset of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6179–84.
210. Clayton PE, Gill MS, Hall CM, et al. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 46: 727–733.
211. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 579–84.

- 212.Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, et al. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4140–7.
- 213.Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O’Rahilly S. Depot-and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 1997; 46: 342–7.
- 214.Mcconway MG, Johnson D, Kelly A, et al. Difference in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 717–23.
- 215.Halleux CM, Servais I, Reul BA, Detry R, Brichard SM. Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 902–10.
- 216.Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998; 18: 213–5.
- 217.Clement K., Vaisse C., Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398–401.
- 218.Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, et al. Effect of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341: 879–884.
- 219.Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110: 1093–103.
- 220.Barkan D, Jia H, Dantes A, et al. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology* 1999; 140: 1731–8.
- 221.Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 391–5.
- 222.Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, et al. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997; 138: 855–8.
- 223.Palmert MR, Radovick S, Boepple P. Leptin levels in children with central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2260–5.
- 224.Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3239–45.
- 225.Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443:709–712.
- 226.Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H, et al. Human protein NEFA a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1994; 375: 497–512.

227. Miura K, Titani K, Kurisawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 375–380.
228. Garcia-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 2010; 45 (5): 281-90.
229. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148: 5088–5094.
230. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J* 2009a; 56 (4): 537-43.
231. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*. 2007; 28 (11): 2223-8.
232. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28 (12): 2372-81.
233. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides* 2009b; 30 (5): 995-8.
234. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology*. 2008; 149 (3): 1295-301.
235. Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 2008; 1230: 99-106.
236. Douglas AJ, Johnstone LE, Leng G. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. *Physiol Behav* 2007; 91 (4): 352-65.
237. Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S et al. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 2008; 29 (12): 2159-68.
238. Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 2008; 156: 563-579.
239. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232–238.
240. Macro JA, Dimaline R, Dockray GJ. Identification and expression of prohormone-converting enzymes in the rat stomach. *Am J Physiol* 1996; 270(1Pt1): G87-93.
241. Date Y, Murakami N, Toshinai K, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123 (4): 1120-8.
242. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009c; 150 (2): 662-71.

243. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381 (4): 643-8.
244. Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M, et al. Nesfatin-1 evokes Ca<sup>2+</sup> signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca<sup>2+</sup> influx through N-type channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390 (3): 958-62.
245. Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, et al. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul Pept* 2009; 157 (1-3): 84-91.
246. Garcia-Galiano D, Navarro VM, Roa J, et al. The Anorexigenic Neuropeptide, Nesfatin-1, Is Indispensable for Normal Puberty Onset in the Female Rat. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30 (23): 7783-7792.
247. Benes FM. Why does psychosis develop during adolescence and early adulthood? *Curr Opin Psychiatry* 2003; 16: 317-319.
248. Blumberg HP, Martin A, Kaufman J, et al. Frontostriatal abnormalities in adolescents with bipolar disorder: Preliminary observations from functional MRI. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 1345-1347.
249. Adriani JW, Laviola G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* 2004; 15: 341-352.
250. Dahl RE. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1021: 1-22.
251. Olazabal DE, Kalinichev M, Morrell JI, et al. MPOA cytotoxic lesions and maternal behavior in the rat: effects of midpubertal lesions on maternal behavior and the role of ovarian hormones in maturation of MPOA control of maternal behavior. *Horm Behav* 2002; 41: 126-138.
252. Andersen SL, Teicher MH. Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1988-1993.
253. Chambers RA, Krystal JH, Self DW. A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001; 50 (2): 71-83.
254. Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry* 2003; 160 (6): 1041-52.
255. Breiter HC, Aharon I, Kahneman D, et al. Functional imaging of neural responses to expectancy and experience of monetary gains and losses. *Neuron* 2001; 30: 619-639.
256. Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res* 2000; 886: 113-164.
257. Potenza MN. The neurobiology of pathological gambling. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2001; 6: 217-226.

258. Aylward EH, Reis AL, Reader MJ, et al. Basal ganglia volumes in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Child Neurol* 1996; 11: 112-115.
259. Castellanos FX, Sharp W S, Gottesman RF, et al. Anatomic brain abnormalities in monozygotic twins discordant for attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 1693-1696.
260. Rapoport JL, Swedo SE, Leonard HL. Childhood obsessive compulsive disorder. *J Clin Psychiatry* 1992; 53: 11-16.
261. Drevets WC. Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 813-829.
262. Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, et al. Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. *Neuroimage* 1999; 9: 587-97.
263. Sowell ER, Delis D, Stiles J, et al. Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: a structural MRI study. *J Int Neuropsychol Soc* 2001; 7: 312-22.
264. Cicchetti D, Rogosch FA. A developmental psychopathology perspective on adolescence. *J Consult Clin Psychol* 2002; 70: 6-20.
265. Birmaher B, Heydl P. Biological studies in depressed children and adolescents. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001; 4: 149-157.
266. Zeinoaldini S, Swarts JJ, Van de Heijning BJ. Chronic leptin infusion advances, and immunoneutralization of leptin postpones puberty onset in normally fed and feed restricted female rats. *Peptides* 2006, 27 (7): 1652-8.
267. Pappa A, Seferiadis K, Marselos M, Tsolas O, Messinis IE. Development and application of competitive ELISA assays for rat LH and FSH. *Theriogenology* 1999; 51: 911-926.
268. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14: 482-487.
269. De Bond JA, Smith JT. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction* 2014; 147 (3): R53-63.
270. Backholer K, Smith JT, Rao A, et al. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 2010; 151: 2233-2243.
271. Fu LY, van den Pol AN. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *Journal of Neuroscience* 2010; 30: 10205-10219.
272. 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.
273. Li Q, Roa A, Clarke IJ, Smith JT. Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 2012; 96: 212-221.

274. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews. Genetics* 2002; 3: 589–600.
275. Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 2011; 173: 37–56.
276. True C, Verma S, Grove KL, Smith MS. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is a potent stimulator of GnRH and kisspeptin cells and may contribute to negative energy balance-induced reproductive inhibition in females. *Endocrinology* 2013; 154: 2821–2832.
277. Tolson KP, Garcia C, Yen S, et al. Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *J Clin Invest* 2014; 124 (7): 3075-9.
278. Brown RE, Imran SA, Ur E, Wilkinson M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008; 281: 64–72.
279. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012; 366 (7): 629-35.
280. Nimri R, Lebenthal Y, Lazar L, et al. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96 (3): E536-45.
281. Vilim FS, Aarnisalo AA, Nieminen ML, et al. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol Pharmacol* 1999; 55 (5): 804-11.
282. Liu Q, Guan XM, Martin WJ, et al. Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem* 2001; 276: 36961–9.
283. Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, et al. Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 25965–71.
284. Kotani M, Mollereau C, Detheux M, et al. Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 138–44.
285. Elhabazi K, Humbert JP, Bertin I, et al. Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* 2013; 75: 164-71.
286. Engström M, Brandt A, Wurster S, Savola J, Panula P. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 825–832.
287. Talmont F, Garcia LP, Mazarguil H, Zajac JM, Mollereau C. Characterization of two novel tritiated radioligands for labelling neuropeptide FF (NPFF(1) and NPFF(2)) receptors. *Neurochem Int* 2009; 55: 815–819.

288. Maletínská L, Tichá A, Nagelová V, et al. Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPY/FF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration. *Brain Res* 2013; 1498: 33-40.
289. Liu X, Herbison AE. RF9 Excitation of GnRH Neurons Is Dependent Upon Kiss1r in the Adult Male and Female Mouse. *Endocrinology* 2014; 155 (12): 4915-24.
290. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, et al. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 2009; 10 (5): 355-65.
291. Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 2009; 150:4911–4919.
292. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides* 2011; 32: 36–43.
293. Yosten GL, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R330–336.
294. Yosten GL, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: R1642–1647.
295. Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, et al. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport* 2010; 21: 1008–1011.
296. Konczol K, Pinter O, Ferenczi S, et al. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36: 1514–1521.
297. Xia ZF, Fritze DM, Li JY, et al. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G570–577.
298. Chen X, Dong J, Jiang ZY. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul Pept* 2012; 177: 21–26.
299. Moreau JM, Ciriello J. Nesfatin-1 induces Fos expression and elicits dipsogenic responses in subfornical organ. *Behav Brain Res* 2013; 250: 343–350.
300. Kirchgessner AL, Sclafani A. PVN-hindbrain pathway involved in the hypothalamic hyperphagia-obesity syndrome. *Physiol Behav* 1988; 42: 517–528.
301. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr. Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661–671.
302. Zorrilla EP, Taché Y, Koob GF. Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 421–427.
303. Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, et al. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 2303–2314.

304. Gotoh K, Masaki T, Chiba S et al. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem* 2013; 124: 90–99.
305. Price CJ, Hoyda TD, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 245–250.
306. Konczol K, Bodnar I, Zelena D, et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int* 2010; 57: 189–197.
307. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 201: 115–123.
308. Nonogaki K, Ohba Y, Sumii M, Oka Y. Serotonin systems upregulate the expression of hypothalamic NUCB2 via 5-HT<sub>2C</sub> receptors and induce anorexia via a leptin-independent pathway in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372: 186–190.
309. Zorrilla EP, Inoue K, Fekete EM, et al. Measuring meals: structure of prandial food and water intake of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R1450–1467.
310. Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA et al. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci* 2007; 27 (33): 8826–35.
311. Navarro VM, Castellano JM, García-Galiano D, Tena-Sempere M. Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8 (1): 11–20.
312. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, et al. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 2010; 151 (2): 722–30.
313. Roa J, Tena-Sempere M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21 (9): 519–28.
314. Roa J, Garcia-Galiano D, Castellano JM et al. Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 324 (1–2): 87–94.
315. 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: 4601–11.
316. Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalkmedian eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 2008; 149: 4151–57.
317. Guerriero KA, Keen KL, Millar RP, Terasawa E. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female Rhesus monkeys

- (*Macaca mulatta*): Implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology* 2012; 153:825–36.
318. Watanabe G, Terasawa E. In vivo release of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) increases with puberty in the female rhesus monkey. *Endocrinology* 1989; 125: 92–99.
319. Chongthammakun S, Claypool LE, Terasawa E. Ovariectomy increases in vivo LHRH release in pubertal, but not prepubertal, female rhesus monkeys. *J Neuroendocrinol* 1993; 5: 41–50.
320. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 2009; 29 (12): 3920–9.
321. Rizwan MZ, Poling MC, Corr M, et al. RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* 2012; 153: 3770–3779.
322. Poling MC, Kim J, Dhamija S, Kauffman AS. Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 2012; 153: 1827–1840.
323. Inhoff T, Stengel A, Peter L, et al. P. Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides* 2010; 31: 257–262.
324. Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, et al. The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 2009; 150: 5016–5026.
325. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (12): 6609–15.
326. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92 (10): 3958–66.
327. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005; 146 (4): 1689–97.
328. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 2005; 146 (1): 156–63.
329. Plant TM, Ramaswamy S, DiPietro MJ. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 2006; 147 (2): 1007–13.

330. Caraty A, Smith JT, Lomet D, et al. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 2007; 148 (11): 5258-67.
331. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 2008; 149 (8): 3926-32.
332. Ramaswamy S, Seminara SB, Pohl CR, et al. Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 148: 3364–3370, 2007.
333. Roa J, Castellano JM, Navarro VM, et al. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 2009; 30 (1): 57-66.
334. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255: 91-6.
335. Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, et al. Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299: E39–E46.
336. Anderson GM, Relf HL, Rizwan MZ, Evans JJ. Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* 2009; 150 (4): 1834-40.
337. Rizwan MZ, Porteous R, Herbison AE, Anderson GM. Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 2009; 150: 1413–1420.
338. Kriegsfeld LJ. Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. *Horm Behav* 2006; 50 (5): 655-66.
339. Ancel C, Bentsen AH, Sébert ME, et al. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* 2012; 153: 1–12.
340. Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, et al. Characterization of the potent gonadotropin-releasing activity of RF9, a selective antagonist of RF-amide-related peptides and neuropeptide FF receptors: physiological and pharmacological implications. *Endocrinology* 2010; 151: 1902–1913.
341. Castellano JM, Navarro VM, Roa J, et al. Alterations in hypothalamic KiSS-1 system in experimental diabetes: early changes and functional consequences. *Endocrinology* 2009; 150: 784–794.

342. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience* 2009; 162: 1141–1149.
343. Garcia-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, et al. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology* 2012; 153 (4): 1959-71.
344. Chung Y, Kim J, Im E, Kim H, Yang H. Progesterone and 17 $\beta$ -estradiol regulate expression of nesfatin-1/NUCB2 in mouse pituitary gland. *Peptides* 2014; 63C: 4-9.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Samsun'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi aynı şehirde tamamladıktan sonra, 1997 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. Aynı yıl, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım ve 2006 yılında Fizyoloji Bilim Uzmanı olarak öğrenimimi tamamladım. 2005-2009 yılları arasında Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (FÜDAM) görev yaptım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladım. Aynı yıl Bitlis Eren Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü'ne Öğretim Görevlisi olarak atandım. 2014 yılında Doktora Tez çalışmalarımı tamamlayabilmek için Bitlis Eren Üniversitesi'ndeki görevimden ayrıldım. Halen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda TÜBİTAK (114S179) Projesi kapsamında Bursiyer Araştırmacı olarak görev yapmaktayım.